

MAGE-3 암특이항원을 지령하는 DNA백신 개발을 위한 MAGE-3 발현성 Plasmid의 구축

¹계명대학교 의과대학 의과학 연구소, ²고신대학교 의과대학 의과학 연구소

박종욱¹ · 이미현² · 윤수정¹ · 백원기¹
서성일¹ · 서민호¹ · 이강대² · 유태현²

Construction of MAGE-3 Expressing Plasmid for Development of DNA Vaccine Encoding MAGE-3 Cancer Antigen

Jong-Wook Park, M.D.¹, Mi-Hyun Lee, M.D.², Soo-Jung Yoon, M.D.¹
Won-Ki Baek, M.D.¹, Seong-Il Suh, M.D.¹, Min-Ho Suh, M.D.¹
Kang-Dae Lee, M.D.² and Tae-Hyun Yu, M.D.²

¹Institute for Medical Science, Keimyung University School of Medicine;

²Institute for Medical Science, College of Medicine, Kosin University, Taegu, Korea

Purpose: The spectrum of melanoma antigen gene (MAGE)-expressing tumor is very wide and the gene of MAGE express antigens that are targets for specific recognition by cytotoxic T lymphocytes derived from tumor-bearing patients. All of these characteristics represent MAGE as tumor vaccine can be useful for cancer prevention or treatment. Here, we detected MAGE-3 gene expression in cancer cell lines and evaluated recombinant MAGE-3 protein producibility of MAGE plasmid to develop MAGE DNA vaccine.

Materials and Methods: MAGE-3 gene expression of cancer cell lines was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Two kinds of MAGE-3 expressing plasmids were constructed and their MAGE-3 protein producibility was evaluated by immunohistochemistry and immunoblotting using monoclonal anti-MAGE-3 antibody.

Results: Among 13 cell lines, SNU484, AMC-HN-3, AMC-HN-4, AMC-HN-7, HeLa, NCI H1703 and HT29 expressed MAGE-3 mRNA. In order to make MAGE plasmid, cDNA that showed 100% DNA homology with MAGE-3 gene was cloned into pcDNA 3 plasmid and pSecTag plasmid. Intracytoplasmic and secretory recombinant MAGE-3 was produced by MAGE-3 containing pcDNA 3 plasmid and pSecTag plasmid, respectively.

Conclusion: In this study, we showed high expression frequency of MAGE-3 in cancer cell line, and established two kinds of plasmid that produce recombinant MAGE-3 in cell

책임저자 : 박종욱, 대구시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 면역학교실, 700-712

Tel: 053-250-7796, Fax: 053-255-1398, E-mail: J303nih@dsmc.or.kr

본 연구는 1998년도 계명대학교 의과대학 특수과제연구비로 이루어진 것임.

접수일 : 1999년 7월 4일, 게재승인일 : 1999년 11월 18일

lines. We expect these plasmids will be used in cancer treatment or MAGE-3 function study in future.

Key Word: Melanoma antigen gene, Plasmid, Vaccine

서 론

암 및 감염병 치료를 위한 유전자요법으로는 암세포 또는 미생물 특이항원의 유전자 도입법, 사이토카인 유전자를 이용한 면역활성법, 자살 또는 antisense 유전자를 암세포에 도입하는 법 등의 여러 가지 방법들(1~3)이 있다. 이중에서 암의 예방을 기대할 수 있는 방법은 암세포 특이항원 유전자 도입법이다.

암세포 특이항원 유전자 도입법이란 암항원을 지령하는 유전자를 진핵세포 표현용 플라스미드(plasmid)에 클로닝한 뒤 다양한 경로를 이용하여 체내로 전달시키는 방법을 말한다. 체내로 전달하는 방법은 단순히 플라스미드를 주사하는 방법과 liposome과 플라스미드를 혼합하여 복합체를 만들어 전달하는 방법 및 gene gun을 이용하여 플라스미드가 부착된 gold particle을 표피에 전달시키는 등의 방법이 있다(4,5). 이렇게 전달된 플라스미드는 체내에서 대다수 파괴되나 일부는 세포내로 흡수되며, 세포내에서 플라스미드에 클로닝되어 있는 항원이 발현되게 된다. 이렇게 발현된 외래 단백질은 항원으로 작용하여 면역반응을 유발하게 된다. 따라서 외래 항원유전자를 플라스미드에 삽입시킨 후 이를 상기한 방법으로 체내에 전달 시키면 체내에서 이 항원이 산생된 후 항원에 대한 특이항체나 세포독성 T 립프구 등을 유도됨으로서 이 항원을 표현하는 암이나 미생물을 사멸 및 예방할 수 있다(6,7).

항암 DNA 백신에 사용될 가장 이상적인 암특이항원은 암에서만 표현이 되는 암특이성과 체액성 및 세포성 면역반응을 유도할 수 있는 강한 면역원성이 있어야 하며, 가능한 많은 암에서 발현

이 되는 것이다. 본 연구에서는 암세포특이항원으로 흑색종 등 여러 암에서 높은 빈도로 발현되는 melanoma antigen gene (MAGE)을 DNA 백신으로 개발하고자 한다. MAGE는 폐암(9), 유방암(10,11), 간암(12), 백혈병(13), 신경아세포종(14), 난소암(15), 위암(15,16), 식도암(17), 대장암(18) 등 각종 암조직에서 발현이 되고 있다. 정상조직에서는 고환조직에서만 표현이 되기 때문에 이 항원을 크게 암관련고환항원으로 분류하고 있다(19). MAGE는 이런 다양한 암조직에서 표현될 뿐만 아니라, 세포독성 T 세포를 유도할 수 있는 암항원으로 보고되고 있어 암을 예방할 수 있는 암항원으로서의 가치가 크다고 생각한다(20,21).

본 실험에서는 MAGE DNA 백신을 개발하기 위한 기초실험으로서 우선 암조직에서 MAGE-3의 표현성을 조사하였으며, MAGE-3 유전자를 클로닝하여 이 유전자가 세포주내에서 발현되는가를 알아보았다.

재료 및 방법

1) 암세포주 및 암조직

3종의 위암 세포주(SNU484, SNU638, SNU668; 한국세포주 은행), 3종의 두경부암 세포주(AMC-HN-3, AMC-HN-4, AMC-HN-7), 2종의 자궁경부암 세포주(HeLa, Caski), 2종의 폐암 세포주(NCI H1703, NCI H522), 대장암세포주(HT29), 전이성 전립선암 세포주(LN.CAP.CLONE) 및 마우스 renal adenocarcinoma cell line (Renca; National Cancer Institute, MD)을 사용하였다. Hela는 10% fetal bovine serum (FBS, JRH Biosciences, Lenexa, KS)이 첨가된 F10 배지를 사용하였으며, 3종의 두경부암 세포주는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하

였으며, 나머지 세포주는 모두 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였다. 이들 중 SNU484는 MAGE-3 유전자 클로닝에 사용하였으며, Renca는 MAGE-3 표현용 세포로 사용하였다.

2) MAGE 단백질 동질성 조사

12종의 MAGE 유전자를 Genebank에서 찾은 뒤 이들의 coding sequence (CDS)로부터 생성될 수 있는 아미노산 서열을 DNAsis program (Hitachi Co, Japan)을 이용하여 규명하였다. 각 MAGE 단백질의 아미노산 서열의 동질성을 Prosis program (Hitachi Co, Japan)을 이용하여 분석하고 비교하였다.

3) Total RNA 분리

배양세포를 PBS로 3회 세척한 뒤 상층액을 제거하고, 여기에 1.5 ml RNAzolB용액을 넣어 cell scraper로 혼합하여 세포를 녹였다. 세포 및 조직이 용해된 RNAzolB용액에 1/10 부피의 chloroform을 첨가하여 진탕 혼합한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 단백질 층과 RNA를 분리하였으며, 분리된 상층의 RNA용액을 조심스럽게 수거하여 1.5 ml 시험관에 옮겼다. RNA용액에 동량의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -20°C에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. RNA-isopropanol 혼합액을 12,000 rpm으로 원심하여 RNA pellet을 만든 뒤 상층을 제거하였으며, 여기에 ice-cold 70% ethanol을 1 ml 첨가하여 RNA pellet을 세척한 뒤 원심하여 상층의 ethanol용액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 DEPC-DW에 녹인 후 DNase로 3시간 처리하였다. Total RNA를 다시 상기한 바와 같이 RNAzolB 및 ethanol 침전법을 사용하여 농축시킨 후 DEPC-DW에 녹여 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도와 순도를 측정하였다.

4) 역전사 중합효소 연쇄반응

Total RNA 용액을 70°C 수조에 10분간 두어 RNA를 변성시킨 뒤 열음에 보존하였다. 먼저 5X

RT buffer 2 μ l, 10 mM dATP 0.25 μ l, 10 mM dGTP 0.25 μ l, 10 mM dTTP 0.25 μ l, 10 mM dCTP 0.25 μ l, MMLV reverse transcriptase (200 U/ μ l) 0.25 μ l, RNase inhibitor (28 U/ μ l) 0.25 μ l, 50 μ M oligo dT primer 0.5 μ l, DEPC-DW 4 μ l를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들었다. RT-mixture에 열음에 보존한 total RNA용액(1 μ g/ μ l)을 2 μ l 첨가한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 실온에 10분간 두었다. 이 시험판을 PCR 기계에 넣어 42°C에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였으며, 역전사반응물을 DW로 1:1 회석한 뒤 PCR에 이용하였다. PCR은 상기한 PCR-mixture 25 μ l에 역전사 반응물을 5 μ l 넣고 혼합한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR 기계에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C 30초, 57°C 45초, 72°C 45초를 1 cycle로 하여 18~35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다. PCR에 사용한 primer는 Table 1에 정리하였다.

5) MAGE-3 cDNA합성 및 플라스미드 분리

배양한 SNU484 암세포주로부터 total RNA를 수거한 뒤 상기한 RT-PCR방법으로 MAGE-3 cDNA를 합성하였다. 합성에 사용한 primer는 MAGE-3S 및 MAGE-3AS (Table 1 참조)이며, 생성된 cDNA는 994 bp (제한효소부위 및 Kozak sequence 등을 제외한 cDNA 크기는 945 bp)로서 MAGE-3 유전자의 CDS 크기와 동일함을 확인하였다. RT-PCR법

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Primers	Sequence
GAPDH-S	CGTCTTCACCACCATGGAGA
GAPDH-AS	CGGCCATCACGCCACAGTTT
MAGE-3S	TATATGCGGCCGCGACCAGA-GTCATCATGCCT
MAGE-3AS	GCTGCTCTAGATCGTGCTCA-GACTCACTCTT

으로 합성한 MAGE-3 cDNA용액에 1/10 부피의 3M sodium acetate와 2배의 100% ethanol을 첨가하여 혼합한 뒤 -20°C에 16시간 보관하여 cDNA를 침강시키고, 15,000 rpm으로 15분간 원심하여 DNA pellet을 만든 뒤 70% ethanol용액으로 pellet을 세척하고 멸균증류수에 녹인 후 유전자 클로닝에 이용하였다. pcDNA3 및 pSecTag 플라스미드(Invitrogen Co., Sandiego, CA)를 가지고 있는 대장균(Top 10)을 ampicillin이 함유된 LB broth에 대량 배양한 후 세포를 수거하여 Qiagen사(Valencia, CA)의 endofree maxi kit를 이용하여 pcDNA3와 pSecTag 플라스미드를 분리하였다.

6) MAGE-3 gene 클로닝

RT-PCR법으로 생산한 MAGE-3 cDNA를 TA 클로닝 벡터(Invitrogen Co., Sandiego, CA)에 직접 클로닝하거나 또는 아래와 같이 제한효소를 이용하여 진핵세포 발현용 벡터에 클로닝 하였다. 간기하면, MAGE-3 cDNA와 pSecTag 플라스미드 및 pcDNA3 플라스미드 용액 14 μ l에 Not I (40 u/ μ l)과 Xba I (10 u/ μ l)를 각각 2 μ l, 10X 절단용 buffer를 2 μ l 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 절단하였다. 이들을 1% agarose gel에 전기영동하여 절단된 cDNA 및 플라스미드를 잘라낸 뒤 Wizard gel prep kit (Promega Co., Medison, WI)를 이용하여 gel 내에 함유된 DNA를 추출하고 이들의 농도를 spectrophotometer로 측정하였다. 0.5 ml 시험관에 MAGE-3 cDNA 0.03 μ g과 pcDNA3 플라스미드 0.1 μ g을 혼합한 뒤 T4 DNA ligase 2 μ l과 10X ligase buffer를 2 μ l 첨가하고 멸균증류수로 최종 20 μ l 되게 전체 부피를 맞추었다. 이 시험관을 16°C 수조에 16시간 두어 cDNA와 플라스미드를 ligation시키고 Top 10 competent cell에 상기한 ligation 반응물을 1 μ l 첨가하여 열음에 20분간 둔 후 42°C에서 45초간 열충격을 가하였으며, 열음에 2분간 둔 후 SOC 배지를 1 ml 첨가하여 37°C 전탕배양기에서 1시간 배양하였다. 배양한 세포를 ampicillin이 함유된 LB agar배지에 도말한 후 37°C 배양기에서 24시간 배양하여

MAGE-3 플라스미드를 가진 세균집락을 순수분리하였다. 이 세균을 상기한 방법으로 배양하고 플라스미드를 분리한 뒤 이 플라스미드내에 MAGE-3 cDNA가 들어있는가를 상기한 제한효소 절단 및 PCR로 확인하였다.

MAGE-3 플라스미드에 함유된 cDNA가 MAGE-3 유전자임을 최종 확인하기 위하여 MAGE-3 플라스미드의 염기서열을 deoxynucleotide chain termination 방법으로 조사하였다. DNAsis program을 이용하여 조사된 염기서열과 GenBank에 등록된 human MAGE-3 유전자(GenBank No. U03735)의 염기서열을 비교하여 이 유전자가 MAGE-3 유전자임을 확인하였다.

7) MAGE-3 플라스미드의 세포내 전달 및 발현

MAGE-3 플라스미드에서 MAGE-3 단백질이 생산되는지를 확인하기 위하여 이 플라스미드를 renal adenocarcinoma cell (Renca)에 전달시킨 후 단백질 생성여부를 면역조직화학법을 통하여 확인하였다. 세포내 플라스미드의 전달은 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지에 Renca 세포를 배양한 후 Lipofectin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)과 플라스미드 복합체를 전달하였으며, G-418 (600 ug/ml)이 첨가된 배지에서 한달간 배양한 세포를 마우스 anti-MAGE-3 단크론 항체로 염색하여 관찰하였다. Anti-MAGE-3 단크론 항체(22)는 Dr. G.C. Spagnoli (Surgical Research Lab., Switzerland)로부터 제공받았다.

결 과

1) 암세포의 MAGE-3 유전자 발현성

13종의 인간암세포주를 배양한 뒤 이들로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로 MAGE-3의 발현성을 측정하였다. MAGE-3를 표현하는 세포주는 SNU484, AMC-HN-3, AMC-HN-4, AMC-HN-7, HeLa, NCI H1703 및 HT29으로서 총 13주 중 7주(53.8%)에서 양성으로 나타났다(Fig. 1).

Fig. 1. Detection of MAGE-3 expressing human cancer cell lines. Total RNAs of 13 human cancer cell lines were isolated and MAGE-3 message of each cell lines was measured by RT-PCR.

2) MAGE-3 단백질의 동질성

각 MAGE의 CDS를 아미노산 서열로 전환시킨 후 이들간의 동질성을 비교하였다. MAGE-3와 다른 MAGEs 단백질간의 동질성을 비교한 결과 MAGE-6와는 95.9%의 동질성을 나타내었으며, MAGE-10과는 49.8%로 동질성이 가장 낮게 나타났다. 그 외 MAGE-12, -2, -5, -1과의 동질성이 각각 84.7%, 84.4%, 71.8% 및 66.6%로 다소 높은 동질성을 나타내었다.

3) MAGE-3 gene 클로닝

MAGE-3를 표현하는 SNU484를 배양한 후 RT-PCR법으로 MAGE-3 유전자를 합성하였다(Fig. 2-A). 합성된 cDNA는 994 bp였으며, 이를 T 벡터에 클로닝한 후 염기서열을 규명하여 DNA 동질성을 MAGE-3 유전자와 비교한 결과 MAGE-3 유전자와 100% 동일함을 확인하였다. 이 cDNA는 initiation 코돈(codon)에서 termination 코돈까지 MAGE-3의 전체 coding sequence를 포함하였다.

4) MAGE-3 gene의 subcloning과 발현

MAGE-3 cDNA를 RT-PCR법으로 합성한 뒤 이 cDNA와 pcDNA3 플라스미드 및 pSecTag 플라스미드를 제한효소로 자른 후 다시 ligation시켜 MAGE-3 플라스미드를 합성하였다. MAGE-3 플라스미드를 대장균에 전달시켜 transformant를 순수 분리한 후 이 균주로부터 플라스미드를 추출

Fig. 2. Cloning of MAGE-3 gene into pcDNA3 plasmid. MAGE-3 cDNA was produced from RNA of SNU484 by RT-PCR (A), and it was cloned into pcDNA3 plasmid (B). B-1, MAGE-3-pcDNA3 plasmid; B-2, MAGE-3-pcDNA plasmid digested with restriction enzymes; B-3, PCR results using MAGE-3-pcDNA3 plasmid as template.

하고 플라스미드내에 cDNA insert가 들어있는지를 제한효소처리법 및 PCR법으로 확인하였으며 (Fig. 2-B), DNA 염기서열 규명을 통해 MAGE-3 유전자와 동일함을 재확인하였다.

MAGE-3 플라스미드의 세포내 발현성을 알아보기 위하여 마우스 Renca 세포를 배양하고 이 세포에 transfection을 실시하였다. MAGE-3 유전자가 클로닝된 pcDNA3 플라스미드를 내독소가 오염되지 않게 하여 대량 생산한 후 이를 lipofectin과 혼합하여 Renca 세포에 전달시키고 이 세

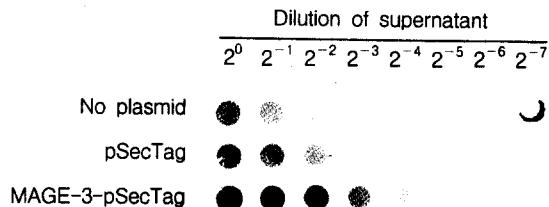


Fig. 4. Identification of secretary recombinant MAGE-3 protein in culture supernatant of Renca. Renca transfected with pSecTag plasmid and Renca transfected with MAGE-3-pSecTag plasmid. Secretory recombinant MAGE-3 proteins were detected by anti-human MAGE-3 monoclonal antibody.

또 분비형 MAGE-3 단백질이 생성되는 가를 알아보기 위하여 MAGE-3 유전자가 클로닝된 pSecTag 플라스미드를 생산한 후 이를 lipofectin과 혼합하여 Renca 세포에 전달시키고 이 세포를 48시간 배양한 후 배양상층액을 수거하여 면역블로팅법을 실시한 결과(Fig. 4), 이 플라스미드를 전달받은 Renca 세포에서 재조합형 단백질이 산생되어 세포 밖으로 분비되고 있음을 확인하였다.

Fig. 3. Identification of recombinant MAGE-3 in Renca. Renca cells transfected with pcDNA 3 plasmid (A) and MAGE-3-pcDNA3 plasmid (B) were selected in medium containing G-418. Recombinant MAGE-3 protein produced in Renca transformant was detected by staining with anti-MAGE-3 monoclonal antibody.

포를 G-418이 함유된 선택배지에 배양하여 MAGE-3 transfectant를 추출하였다. 이 세포를 순수 분리 배양한 후 anti-MAGE-3 antibody를 이용하여 세포를 염색한 결과(Fig. 3), Renca 세포나 대조용 플라스미드인 pcDNA3 플라스미드를 전달받은 경우 일부 세포의 핵속에서 약하게 양성반응을 보였으나, MAGE-3 플라스미드를 전달받은 Renca 세포는 세포질이 강하게 염색이 되어 이 플라스미드에 의해 MAGE-3 단백질이 세포질내에 생산되고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

DNA 백신이 가지는 최대의 장점은 외래 단백질을 생체 세포내에서 생산시키는 것이다. 세포내에서 생산된 외래단백질의 처리 및 전달과정은 바이러스 등이 세포에 감염된 후 세포내에서 생산되는 바이러스 항원이 면역반응을 유발하는 것과 같은 경로를 거치게 된다. 즉 세포내에서 생성된 외래 단백질은 작은 펩타이드로 분해된 후 세포가 생산하는 MHC에 결합하여 세포면에 표출하게 된다. 이때 펩타이드에 결합하는 MHC는 class I MHC이며 이 MHC-펩타이드 복합체는 CD8을 가진 세포독성 T 세포의 활성화를 유발시키는 역할을 한다. 활성화된 CTL은 이 외래 단백질을 표현하는 세포를 인식한 후 perforin 또는 Fas/Fas ligand 매개성 apoptosis 등을 이용하여 인식된 세포를 파괴한다(23). 따라서 DNA 백신 형태의 항원으로 면역할 시 이 항원은 CTL이라는 강력한

세포독성 면역세포를 유발할 수가 있으므로, 이 방법은 암세포를 제거하는데 이용될 가능성이 크다고 본다.

본 연구자들은 암을 예방 또는 치료하기 위한 DNA 백신으로 개발하기 위하여 CEA등(24) 각종 암항원을 조사하였으며, 그 중에서 MAGE 항원이 백신개발 대상으로 적합하다고 생각하였으며 그 이유는 다음과 같다. 먼저 MAGE는 CTL을 유발할 수 있는 항원으로 알려져 있다. MAGE의 일부 항원결정기는 MHC와 더불어 전달되며 이런 전달은 CTL을 유발시킬 수 있음이 보고되고 있다(20~22). 그러나 이러한 연구들은 주로 펩타이드를 이용한 실험이며 본 연구의 시도와 같이 항원을 세포내에서 직접 생산시키는 DNA 백신을 이용한 보고는 아직 없다. 상기한 바와 같이 DNA 백신의 장점을 고려할 때 DNA 백신이 암을 제거할 수 있는 강력한 CTL 반응을 유발할 가능성이 있다고 생각한다. 둘째는 항원의 발현특이성으로서 MAGE는 고환을 제외한 정상조직에서는 표현되지 않기 때문에 상당한 암특이성이 있다고 생각된다(9~19). 고환조직에서 MAGE가 하는 기능은 남자 배선세포가 정자로 되는 과정에 있어서 정자 전구세포의 감수분열에 관계하는 것으로 알려지고 있다(19). 그러나 이러한 세포들은 비록 MAGE는 표현하나 MHC를 표현하지 않는 특성을 가지고 있어 MAGE DNA 백신으로 MAGE에 의한 CTL이 유도되어도 이들이 정자 전구 세포들을 공격할 수 없을 것으로 추정된다. MAGE가 표현되는 암은 한국인 5대 호발암을 비롯한 십여 종의 암에서 표현이 된다. 따라서 이 백신은 여러 종의 암을 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 장점이 있다고 생각된다.

MAGE는 MAGE-1에서 -12, MAGE B, MAGE X 등 최소 18종이 있으며 이 각 아형(isotype)의 발현성은 암종에 따라 매우 다양하다. 그러나 아직 한국인의 암종에서 표현되는 MAGE 아형의 발현빈도에 대한 연구는 거의 없어 어느 형의 유전자를 DNA 백신개발에 이용하여야 할지는 알 수 없다. 그러나 이강대등(25)의 보고에 따르면 MAGE-1

에 비해 MAGE-3의 발현빈도가 높다는 보고가 있어 본 연구에서는 MAGE-3 유전자를 그 대상으로 선택하였다. MAGE-3 유전자의 암세포에서의 발현성을 알아보기 위하여 암세포주 13예를 대상으로 RT-PCR을 실시한 결과 7예에서 양성으로 나타났다. MAGEs는 여러 종이 있기 때문에 그 종간에 동질성이 적으면 백신으로서의 가치가 적어진다고 생각한다. 따라서 우선 각 MAGE의 CDS를 아미노산 서열로 전환시킨 후 MAGE-3와 다른 MAGEs 단백질간의 동질성을 비교한 결과 MAGE-10과는 49.8%로 동질성이 가장 낮았으며, MAGE-6와는 95.9%의 동질성을 나타내었다. 그 외 MAGE-12, -2, -5, -1과의 동질성이 각각 84.7%, 84.4%, 71.8% 및 66.6%로 다소 높은 동질성을 보이고 있다. 이상의 결과는 MAGE-3가 암조직에서 발현빈도가 높으며 또 다른 MAGE들과의 단백질 동질성도 높아서 MAGE-3에 의해 유도된 면역성이 교차반응에 의해 다른 MAGE에도 반응할 가능성이 있음을 나타낸다. 또 MAGE-3가 CTL에 제공되는 데 필요한 HLA형, 즉 HLA A2, HLA B44 등이 한국인에서 발현 빈도가 높기 때문에 면역원으로서 적합하다고 생각된다(26).

MAGE-3 플라스미드를 제작하기 위하여 RT-PCR을 실시하여 MAGE-3 cDNA를 합성하고 이를 T 벡터에 클로닝한 뒤 염기서열을 조사한 결과 클로닝된 유전자가 MAGE-3임이 확인되었으며, 이 cDNA를 pcDNA 3 플라스미드 및 pSecTag 플라스미드에 재클로닝하였다. 본 연구에 사용된 두 플라스미드는 모두 진핵세포 발현용이나 pcDNA 3 플라스미드는 단순히 MAGE-3를 발현시키는 반면 pSecTag 플라스미드는 단백질의 amino terminal 쪽에 분비신호(secretory signal)가 들어 있어 합성된 단백질이 세포 외로 분비되게 고안된 플라스미드이다. 대다수 DNA 백신을 연구한 보고들에서는 pcDNA 3 플라스미드처럼 단순히 *cytomegalovirus*의 promoter를 이용하여 왔다. DNA 백신용으로서 두 종의 플라스미드 중 어느 것이 더 적합한가를 직접 비교한 보고는 없으나, 분비형 단백질을 생산할 시 세포독성 T 림프구의 활성화

와 더불어 분비된 항원단백질이 항원제공세포에 탐식됨으로서 협조 T 세포를 유도할 수 있어 면역반응 유도성이 더욱 효율적일 가능성이 있다. 본 연구에서는 분비형 또는 비분비형 항원단백질을 세포 내에서 생성시키기 위하여 상기한 2종의 플라스미드에 MAGE-3 유전자를 클로닝한 뒤 이 플라스미드에서 재조합 MAGE-3가 생성되는가를 면역조직화학법 및 면역브로팅법을 이용하여 확인한 결과 pcDNA 3 플라스미드에 클로닝한 경우 세포질에 인간 MAGE-3 단백질이 생성되며 pSecTag 플라스미드에 클로닝한 경우 세포 배양상총액 MAGE-3 단백질이 존재하고 있음을 확인하였다. 위의 실험결과에서 플라스미드에 삽입된 유전자가 MAGE-3 유전자이며 이 플라스미드에서 재조합형 단백질이 생성됨을 관찰하였다.

이상의 결과를 종합하면 본 연구에서 구축한 플라스미드는 암 예방을 위한 백신개발 분야 또는 이미 암을 가지고 있는 환자의 면역유발에 위한 치료 등의 연구에 활용할 수 있을 것으로 생각하며, 더 나아가 이 플라스미드를 정상 배양세포에 전달함으로서 MAGE 유전자의 기능을 연구하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 MAGE-3의 암세포주에서의 표현성을 조사한 뒤 MAGE-3를 표현하는 암세포로부터 이 유전자를 추출하여 전핵세포 표현용 플라스미드를 구축하였다. MAGE-3는 13종의 암세포주 중 7주에서 표현되었으며, MAGE-3 유전자를 함유하는 pcDNA 3 플라스미드와 pSecTag 플라스미드는 세포질 또는 분비형 재조합 MAGE-3 단백질을 산생하였다.

참 고 문 헌

- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749.
- Colombo MP, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today* 1994;15:48-51.
- Spooner RA, Deonarain MP, Epenetos AA. DNA vaccination for cancer treatment. *Gene Ther* 1995;2:173-180.
- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993;260:926-932.
- Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 1993;4:733-740.
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh Lew D, Yankaukas MA, Baird SM, Rhodes GH. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9519-9523.
- Tascon RE, Colston MJ, Ragni S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med* 1996;2:888-892.
- Manickan E, Rouse RJD, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 1995;155:259-265.
- Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. Expression of MAGE genes by non-small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 1994;56:826-829.
- Russo V, Traversari C, Verrecchia A, Mottolese M, Natali PG, Bordignon C. Expression of MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor-specific immunotherapy. *Int J Cancer* 1995;64:216-221.
- Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol* 1997;8:369-372.
- Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;24:1437-1440.
- Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Miyajima J, Sagawa K, Itoh K. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 1995;41:90-103.
- Corrias MV, Scaruffi P, Occhino M, De Bernardi B,

- Tonini GP, Pistoia V. Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer* 1996;69:403-407.
15. Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1997;17:3559-3563.
16. Inoue H, Li J, Honda M, Nakashima H, Shibuta K, Arinaga S, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. MAGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1995;64:76-77.
17. Inoue H, Mori M, Li J, Mimori K, Honda M, Nakashima H, Mafune K, Tanaka Y, Akiyoshi T. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer* 1995;63:523-526.
18. Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, Haraguchi M, Tsuji K, Ueo H, Barnard GF, Akiyoshi T. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1996;224:183-188.
19. Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5211-5216.
20. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. The immunogenic properties of melanoma-associated anti-gens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Exp Clin Immunogenet* 1998;15:19-32.
21. Mazzocchi A, Storkus WJ, Traversari C, Tarsini P, Maeurer MJ, Rivoltini L, Vegetti C, Belli F, Anichini A, Parmiani G, Castelli C. Multiple melanoma-associated epitopes recognized by HLA-A3-restricted CTLs and shared by melanomas but not melanocytes. *J Immunol* 1996;157:3030-3038.
22. Hofbauer GF, Schaefer C, Noppen C, Boni R, Kamarashev J, Nestle FO, Spagnoli GC, Dummer R. MAGE-3 immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Am J Pathol* 1997;151:1549-1553.
23. Kumar V, Sercarz E. Genetic vaccination: The advantages of going naked. *Nat Med* 1996;2:857-859.
24. Lee KB, Lee ES, Moon HY, Kim YC. The comparative study between peripheral venous blood and draining venous blood CEA levels in coloractal cancer. *J Korean Cancer Assoc* 1998;30:306-312.
25. Lee KD, Lee KS, Lee HB, Lee YW, Lee HK, Yu TH, Kim KH. Expression of the MAGE-1, -3 genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otol* 1997;8:287-292.
26. Kim SJ, Nisperos B, Mickelson E, Choi IH, Dahlberg S, Kim JD, Giblett ER, Hansen JA. The HLA system in the Korean population. *Hum Immunol* 1986;17:259-272.