

두경부 편평상피세포암종에서의 MAGE-1,-3 Gene의 발현

고신대의대 이비인후과학교실, 미생물학교실*
이강대·이길수·이봉희·이윤우·이한국·유태현·김광혁*

=Abstract=

Expression of the MAGE-1,-3 Genes in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck

Kang Dae Lee M.D., Kil Soo Lee M.D., Bong Hee Lee M.D., Yun-Woo Lee M.D.,
Han Kook Lee M.D., Tae Hyun Yu M.D., Kwang Huck Kim Ph.D*

Department of Otolaryngology & Microbiology, College of Medicine,
Kosin University, Pusan, Korea*

The MAGE genes encode tumor antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. These antigens may constitute useful targets for anti-cancer immunotherapy, since no expression of MAGE genes has been observed in normal tissues except testis.

We investigated the expression of the MAGE-1, and -3 genes in 25 squamous cell carcinomas, 10 benign tumors, and 15 normal tissues of head and neck, using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The MAGE-1, and -3 genes were expressed at the mRNA level in 32%(8/25), 48%(12/25) respectively. Sixteen out of 25 cases(64%) expressed at least one of these genes. Neither benign tumors nor normal tissues was positive for these genes. These results suggest that immunotherapy with MAGE gene products may be useful for patients with squamous cell carcinoma of head and neck.

KEY WORDS : MAGE genes · RT-PCR · Immunotherapy

서론

암연구의 큰 목표중의 하나는 정상세포와 암세포와의 차이점을 찾아서 암세포만 선택적

으로 제거하는 방법을 개발하여 환자의 부담을 최소화하면서 성공적으로 암을 치료하는데 있다. 현재까지 암치료는 수술, 방사선 치

* 본 논문은 1996년도 고신대학교 기초임상연구기금의 지원으로 이루어짐.

료, 항암화학요법 등이 그 주류를 이루어 왔으나, 많은 치료자들의 노력에도 불구하고 치료 성적의 개선은 기대에 부응하지 못하는 실정이다. 따라서 기존의 치료법 이외에 새로운 암치료법의 개발이 요구된다.

이에대한 새로운 암치료 연구분야 중의 하나인 암 면역 연구는 암치료에 많은 기대를 모아 왔지만 아직은 만족스런 결과를 얻지 못하고 있다. 보다 성공적인 암면역치료를 위해서는 암세포에서만 선택적으로 발현되는 암항원이 존재해야 하고, 인체의 면역계는 암특이항원을 인식하여 정상세포에는 장애를 주지 않고 암세포만 제거할 수 있어야만 한다. 그러므로 암특이항원을 발견해내는 것은 많은 암연구자의 최대의 목표 중의 하나였다.

Boon 등¹⁸⁾은 흑색종 환자로부터의 흑색종 세포주와 자가림프구의 혼합배양에 의해 세포독성 림프구(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)을 유도해 내었다. 그리고 이들 CTL에 의해 인식되어지는 암특이항원을 code하는 유전자를 찾아내는데 성공하였으며 이 유전자의 이름을 Melanoma Antigen Gene, 줄여서 MAGE gene이라고 명명하였다. MAGE gene은 흑색종뿐만 아니라, 두경부암²⁰⁾¹⁰⁾, 위암^{5,6)18)}, 식도암⁷⁾¹³⁾, 대장암¹¹⁾, 폐암¹⁹⁾, 유방암¹²⁾, 난소암²⁰⁾, 간암²¹⁾ 등 여러 종류의 암세포에서는 발현이 되지만 정상조직에서는 고환이외는 발현이 없는 것으로 알려져 있다. 뿐만아니라 MAGE gene을 발현하는 고환조직에는 HLA class I 분자가 없기 때문에¹⁴⁾ MAGE gene의 정상조직에서의 발현범위는 매우 국한되어 있어 MAGE gene을 이용한 종양 특이적 면역치료(tumor specific immunotherapy)의 가능성을 시사하고 있다.

본 연구에서는 항원단백(antigen peptide)을 이용한 암면역치료의 가능성이 높은 것으로 알려져 있는 MAGE-1,-3 gene의 발현을 두경부 편평상피세포암종에서 mRNA level에서 관찰하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

두경부의 편평상피세포암종 25례로부터 수술 또는 조직검사를 통해 신선한 조직을 얻었고, 이들을 즉시 혹은 -50도의 냉동고에 냉동 보관후 수일 내에 RNA 분리를 시행하였다. 대조군으로 양성종양 10례(다형성 선종 8례, 유두종 2례), 정상 상부소화기관의 점막 15례를 사용하였다.

2. RNA 분리 및 역전사(reverse transcription)에 의한 cDNA의 합성

두경부의 편평상피세포암종 25례 그리고 대조군으로 양성종양 10례, 정상 점막 15례로부터 Trisol[®]을 이용한 Guanidinium isothiocyanate and phenol extraction(GIBCO BRL, Gaithersburg M.D.) 방법으로 total RNA를 분리하였다. Total RNA 5 µg에 50ng의 random hexamers(GIBCO BRL), 0.5mM의 각각의 deoxynucleotide triphosphate(dNTP), 1× synthesis buffer(50mM KCl, 20mM Tris-HCl[pH 8.4], 2.5mM MgCl₂, 0.1M dithiothreitol), 그리고 200units의 superscript reverse transcriptase (GIBCO BRL)을 포함하는 총 20 µl의 reaction mixture를 42°C에서 50분간, 95°C에서 5분간 그리고 2 units의 E. coli RNase H(GIBCO BRL)와 함께 37°C에서 20분간 처리하는 reverse transcription에 의해 single-stranded cDNA를 합성하였다. 대조군에서도 같은 방법으로 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다.

3. Polymerase chain reaction (PCR)

합성된 cDNA를 template로 하여 MAGE-1,-3 gene 그리고 β-actin에 특이적으로 반응하는 primer를 사용하여 PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 표 1과 같고 예상되는 PCR product의 크기는 MAGE-1 gene의 경우는 421 bp이며, MAGE-3gene은 725 bp 였고 그리고 β-actin은 316 bp 였다.

각각의 PCR 반응은 2 µL의 cDNA, 5 µL의

Table 1. Primer of MAGE-1,3, and β -actin gene

| Genes | Primer | Direction | 5-3 sequence | Expected size |
|----------------|---------|-----------|-------------------------|---------------|
| MAGE-1 | CHO-14 | sense | CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG | 421 bp |
| | CHO-12 | antisense | GCTGGAACCCCTCACTGGGTTCG | |
| MAGE-3 | AB-1197 | sense | TGGAGGACCAGAGGCCCCC | 725 bp |
| | BLE-5 | antisense | GGACGATTATCAGGAGGCCCTGC | |
| β -actin | actin-a | sense | CTACAATGAGCTGCGTGTGG | 316 bp |
| | actin-b | antisense | CGGTGAGGATCTTCATGAGG | |

bp: base pair

10×PCR buffer (100mM Tris-HCL of pH 8.8, 15mM MgCL₂, 500mM KCl), 5 μ L의 0.5mM dNTP, 1 μ L의 각 primer의 25 pmol solution 그리고 증류수로써 48 μ L의 용량이 되게하였다. 98°C에서 초기 10분간 denature시킨 후에 1:10으로 희석시킨 1.0units(2 μ L)의 Taq polymerase(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CA)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 먼저 RNA를 성공적으로 추출하였다는 것을 확인하기 위해 각각의 cDNA sample에 β -actin에 특이성을 가진 primer를 이용한 PCR 분석(assay)를 시행하였다. PCR의 조건은 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 가열냉각(annealing)시킨 다음 72°C에서 1분간을 20 cycle동안 증폭시키고, 마지막 증폭과정은 72°C에서 10분간 시행하였다. β -action의 PCR product 10 μ l를 2% agarose gel에서 전기영동(electrophoresis)하여 ethidium bromide의 염색으로 관찰하여, β -action이 성공적을 분리된 것을 확인하고 MAGE-1,-3 gene에 대한 PCR을 시행하였다. MAGE-1,-3 gene의 PCR 조건은 MAGE-1 gene은 94°C에서 1분; 72°C에서 3분; MAGE-3 gene은 94°C에서 1분; 71°C에서 2분, 72°C에서 2분을 각각 30 cycle로 증폭하였고, 마지막 증폭은 72°C에서 10분간 시행하였다. 각각의 PCR product 10 μ l를 2% agarose gel에서 전기영동하여 관찰하였다. 통계처리는 SAS(windows version 6.11)으로 하였다.

결 과

1. 편평상피암종에 있어서 MAGE-1,-3 gene의 발현

편평상피세포암종 25례 및 대조군에서의 β -actin은 gel electrophoresis 소견상 전례에서 316 bp에서 발현이 있어 각각의 검체에서 mRNA

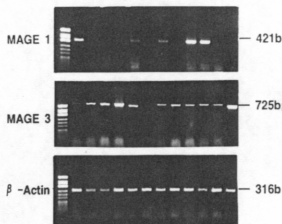


Fig.1 MAGE-1 (425bp) and MAGE-3(725bp) PCR products were expressed in head and neck squamous cell carcinoma. β -actin(316bp) was expressed in all samples.

가 성공적으로 분리되었음을 알 수 있었다. MAGE-1 gene은 편평상피세포암종 25례 중 8례 (32%)에서 gel electrophoresis 소견상 421 bp에서 양성 소견을 보였다. MAGE-3 gene은 25례중 12례 (48%)가 725 bp에서 양

성으로 발현되었다(Fig. 1). 편평상피세포암 종 25례 중 16례 즉 64%에서 MAGE-1,-3 gene 중 적어도 1개 이상의 발현이 있었다.

2. 양성종양 및 정상조직에서의 발현

8례의 다형성 선종, 2례의 후두유두종을 포함한 10례의 양성종양과 정상조직 15례에서는 MAGE-1,-3의 발현은 관찰되지 않아 암조직에서 MAGE-1,-3 gene이 유의하게 발현이 되었다($P < 0.001$).

고 찰

Boon 등은 흑색종환자로부터의 melanoma cell line과 autologous lymphocyte의 혼합배양에 의해 세포독성 림프구(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)를 유도해 내었다. 그리고 이 CTL에 의해 인식되어지는 암특이항원을 code하는 유전자(gene)를 찾아내는데 성공하였으며 이 유전자의 이름을 Melanoma Antigen Gene, 줄여서 MAGE gene이라고 명명하였다¹⁸⁾.

MAGE gene은 적어도 12개 이상의 유전자군(gene family)로 구성되어져 있으며¹⁾ 흑색종뿐만 아니라, 두경부암²¹⁰⁾, 위암^{5,6,8)}, 식도암^{7,13)}, 대장암¹¹⁾, 폐암¹⁹⁾, 유방암¹²⁾, 난소암²⁰⁾, 간암²¹⁾ 등 여러 종류의 암세포에서는 발현되지만 정상조직에서는 고환이외는 발현이 없을 뿐만 아니라, MAGE gene을 발현하는 고환조직에는 HLA class I 분자가 없기 때문에¹⁴⁾ MAGE gene의 정상조직에서의 발현범위는 매우 국한되어 있다. 따라서 정상조직에서의 MAGE gene 산물의 발현은 CTL의 입장에서 보면 매우 국한되어 있어 MAGE gene을 이용한 종양특이적 면역치료의 가능성을 암시하고 있다.

저자들이 MAGE-1,-3 gene의 발현을 두경부 편평상피세포암종에서 mRNA level에서 관찰한 결과 MAGE-1 gene의 경우는 편평상피암 25례 중 8례(32%)에서 양성 소견을 보였고, MAGE-3 gene은 25례중 12례에서 양성

으로 발현되었다. 그러나 8례의 다형성 선종, 2례의 후두유두종을 포함한 10례의 양성종양과 정상조직 15례에서는 MAGE-1,-3 gene의 발현은 관찰되지 않았다. 또 편평상피세포암종 25례 중 16례 즉 64%에서 MAGE-1,-3 gene 중 적어도 1개 이상의 발현이 있었다. 이러한 결과로 미루어 MAGE-1,-3 gene은 암세포에서만 발현하는 것으로 판단되었다. Eura 등²⁾은 MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 gene이 88례의 두경부 편평상피암종에서 각각 33%, 41%, 43%의 발현율을 보고하여 저자들의 결과와 유사하였다. Lee 등¹⁰⁾은 두경부 비편평상피암종에서도 MAGE-1,-2,-3,-4, 그리고 -6 gene이 각각 25%, 41.7%, 33.3%, 8.3%, 33.3%로 발현됨을 보고하였다.

이러한 MAGE gene의 유전자 산물, 즉 항원은 CTL에 의해 인식되어지는 항원이기 때문에 이 CTL이 MAGE 항원을 인식하기 위해서는 적절한 HLA class I 분자가 필요하다. 12개의 MAGE 유전자군(gene family)중 현재까지 가장 많이 알려진 것은 MAGE-1과-3 gene이다. 예를 들면 MAGE-1 gene에 의해 encode 되는 항원 펩타이드는 종양세포의 HLA-A1¹⁵⁾, HLA Cw1601¹⁷⁾ 그리고 MAGE-3 gene은 HLA A1³⁾, HLA A2¹⁶⁾, HLA B44¹⁾에 의해 제시되어지고 CTL에 의해 인식이 된다. 특히 MAGE-3 gene은 한국인을 대상으로 한 암면역치료에 중요한 의미가 있다. 왜냐하면 HLA A2는 한국인의 59%⁹⁾, HLA B44는 20%⁹⁾에서 발현되기 때문이다. 따라서 저자들의 결과를 토대로 보면 MAGE-3 gene이 48%에서 발현되므로 한국인의 경우 MAGE-3 gene을 이용한 암면역치료는 각각 28.3%와 9.6%로 최소 28.3%에서 최대 37.9%가 해당된다고 할 수 있다.

요 약

저자들은 암세포에서만 발현되는 것으로 알려져 있는 MAGE gene을 두경부 편평상피세포암종, 양성종양, 정상조직에서의 발현을

mRNA level에서 관찰하여 MAGE -1,-3 gene이 암세포에서만 선택적으로 발현되는 결과를 얻었다. 이러한 결과로 두경부편평상피 세포암종에서 MAGE gene은 암면역치료의 잠재적 목표로 생각되었다.

References

- 1) De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al : *Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. Immunogenetics* 40(5), 360-369, 1994
- 2) Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, et al : *Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. Int J Cancer* 64(5), 304-308, 1995
- 3) Gaugler B, van den Eynde B, van der Bruggen P, et al : *Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. J Exp Med* 179(3), 921-930, 1994
- 4) Herman J, van der Bruggen P, Luescher IF, et al : *A peptide encoded by the human MAGE 3 gene and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE 3. Immunogenetics* 43(6), 377-383, 1996
- 5) Inoue H, Li J, Honda M, et al : *MAGE-1 mRNA expression in gastric carcinoma. Int J Cancer* 64(1), 76-77, 1995
- 6) Inoue H, Mori M, Honda M, et al : *The expression of tumor-rejection antigen "MAGE" genes in human gastric carcinoma. Gastroenterology* 109(5), 1522-1525, 1995
- 7) Inoue H, Mori M, Li J, et al : *Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. Int J Cancer* 63(4), 523-526, 1995
- 8) Katano M, Nakamura M, Morisaki T, et al : *Melanoma antigen-coding gene-1 expression in invasive gastric carcinoma: correlation with stage of disease. J Surg Oncol* 64(3), 195-201, 1997
- 9) Kim SJ, Nisperos B, Mickelson E, et al : *The HLA System in the Korean Population. Human Immunology* 17(3), 259-272, 1986
- 10) Lee KD, Eura M, Ogi K, et al : *Expression of the MAGE-1, -2, -3, -4, and -6 genes in non-squamous cell carcinoma lesions of the head and neck. Acta Otolaryngol (Stockh)* 116(4), 633-639, 1996
- 11) Mori M, Inoue H, Mimori K, et al : *Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. Ann Surg* 224(2), 183-188, 1996
- 12) Russo V, Traversari C, Verrecchia A, et al : *Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. Int J Cancer* 64(3), 216-221, 1995
- 13) Toh Y, Yamana H, Shichijo S, et al : *Expression of MAGE-1 gene by esophageal carcinomas. Jpn J Cancer Res* 86(8), 714- 717, 1995
- 14) Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, et al : *Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. Cancer Res* 55(16), 3478-3482, 1995
- 15) Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, et al : *A nonapeptide*

- encoded by human gene *MAGE-1* is recognized on *HLA-A1* by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen *MZ2-E*. *J Exp Med* 176(5), 1453-1457, 1992
- 16) van der Bruggen P, Bastin J, Gajeaski T, et al : A peptide encoded by human gene *MAGE-3* and presented by *HLA-A2* induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing *MAGE-3*. *Eur J Immunol* 24(12), 3038-3043, 1994
- 17) van der Bruggen P, Szikora JP, Boel P, et al : Autologous cytolytic T lymphocytes recognize a *MAGE-1* nonapeptide on melanomas expressing *HLA-Cw*1601*. *Eur J Immunol* 24(9), 2134-2140, 1994
- 18) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254(5038): 1643-7, Dec 13, 1991
- 19) Weynants P, Lethe B, Brasseur F, et al : Expression of *mage* genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 56(6), 826-829, 1994
- 20) Yamada A, Kataoka A, Schichijo S, et al : Expression of *MAGE-1*, *MAGE-2*, *MAGE-3/-6* and *MAGE-4a/-4b* genes in ovarian tumors. *Int J Cancer* 64(6), 388-393, 1995
- 21) Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, et al : High frequency of the *MAGE-1* gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24(6), 1437-1440, 1996