

Accelerated Induction of Dysplastic Lesion by TPA in HPV18 URR E6/E7 Gene Expressing Transgenic Mice

Yongil Kwon, M.D.¹, Taechul Park, M.D.¹, Jongsup Park, M.D.¹, Soojong Um, Ph.D.³, Jauheung Yu, Ph.D.², Junmo Lee, M.D.¹ and Seungeun Namkoong, M.D.¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul; ²Catholic Research Institute of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul; ³Department of Food and Nutrition, The Sejong University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: The research of HPV has been severely hampered by the inability to propagate HPVs in culture, particularly those of the mucosotropic types which produce few virions in vivo. In order to study the regulation of HPV-18 expression in vivo, we constructed transgenic mice and caused cervical neoplasia.

Materials and Methods: We investigated whether tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) increase the transcriptional activity of the URR in the C33A cervical carcinoma cells or not. And we asked whether chronic exposure of female HPV-18 URR E6/E7 transgenic mice to TPA could render the reproductive tract squamous epithelium permissive for HPV neoplasia.

Results: It was confirmed by RT-PCR that transgene was specifically expressed in epithelial tissues. TPA

upregulated the transcriptional activity of the URR in the C33A cervical carcinoma cells. There were diffuse changes on the squamous epithelium in the cervix of the transgenic mice at fifth month following TPA treatment.

Conclusion: We established the transgenic mice model which have the ability to reproduce the development of cervical dysplasias. Moreover this animal model will allow preclinical testing of compounds designed to interfere with the actions of the HPV oncogenes or other critical aspects of the cancer phenotype. (*J Korean Cancer Assoc 2001;33:56 – 63*)

Key Words: Human papillomavirus (HPV), HPV-18 URR-E6/E7, RT-PCR, Transgenic mouse

서론

역학·유전학적 연구를 통하여 자궁경부암 발생에 human papillomavirus (HPV)의 감염이 주요 원인으로 밝혀지고 있으며(1), 악성종양 발생 고위험군으로 구분되어 있는 HPV-16과 HPV-18은 80% 이상의 자궁경부암에서 발견되고 있고, 이들 HPV DNA의 일부가 *in vitro* transfection 실험에서 세포를 악성화 변형시킬 수 있기 때문에 암의 발생과 직접적인 관련이 있다고 하며(1~3), 특히 HPV-18의 경우는 자궁경부암에서 HPV-16보다 악성도가 강하며 가장 예후가 불량한 것으로 알려져 있다(4).

HPV의 발암인자로 알려진 E6와 E7의 발현은 HPV의

upstream regulatory region (URR)에 의해 조절되며, 조직 특이성도 URR에 의하여 결정되는 것으로 알려져 있다. 대부분의 HPV-18과 관련된 자궁경부암의 경우에는 바이러스 유전자가 세포의 염색체에 삽입되면서 E2 유전자가 파손되어 증가된 E6와 E7 protein은 각각 p53와 Rb와 결합하여 이들을 비활성화시킨다(5~7).

HPV 연구에서 세포 배양으로 HPV의 증식이 불가능하며, 생체 내에서도 바이러스를 거의 증식시킬 수 없다는 문제가 있다. 최근 일부에서 변형된 부대 씨스템(modified raft system)을 이용하여 HPV-11, HPV-31 등의 체외 증식이 가능하지만(8), 아직도 실험동물 모델이 적합하지 않아서 암화 과정에서 HPV의 역할에 대한 연구가 어려운 실정이다. 지금까지 알려진 실험동물 모델로는 retrovirus를 이용하여 HPV-16 E6/E7을 생쥐의 질과 자궁에 접종하는 방법, E7 유전자를 표현하는 생쥐의 각화세포를 피부에 이식하는 방법, 강력한 이질적 promotor의 조절하에 HPV-16 E6/E7 유전자를 표현하는 형질전환생쥐를 생산하는 방법 등이 있다(9~11). 이러한 동물 모델들은 E6/E7 단백질의 악성화 능력을 보여 주었으나 이질적인 promotor의 사

책임저자 : 권용일, 경기도 의정부시 금오동 65-1번지
☎ 480-130, 가톨릭대학교 의과대학 부속 의정부성모 병원 산부인과
Tel: 031-820-3097
E-mail: kyiojby@cmc.cuk.ac.kr
접수일 : 2000년 12월 29일, 게재승인일 : 2001년 3월 11일

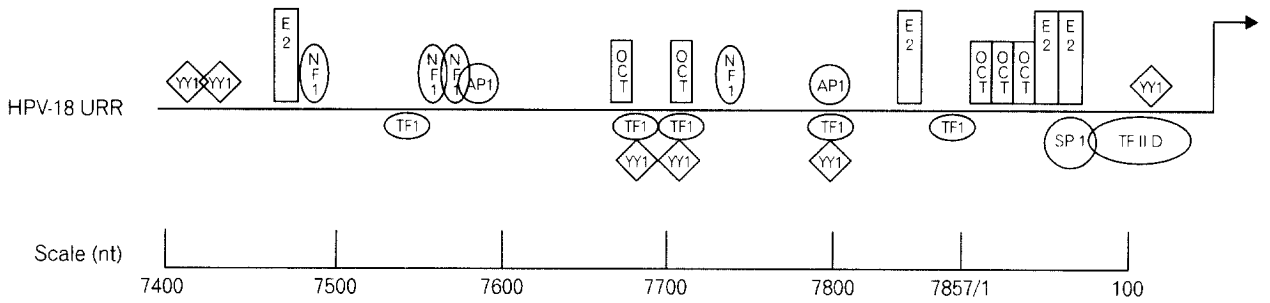


Fig. 1. The URR of HPV-18 showing the binding sites of cellular and viral trans-regulatory proteins

Table 1. Oligomer sequences of HPV-18 primers

Primers	Sequence
HPV-18 URRT	5'-TATGTGTGTGTATATATAT-3'
HPV-18 URRB	5'-AGTATTGTGGTGTGTTTCT-3'
HPV-18 E6T	5'-ACCATGGCGCGCTTTGAGGAT-3'
HPV-18 E7B	5'-TTATTACTGCTGGGATGCACAC-3'

용으로 인하여 HPV 자체가 가지고 있는 발암 유전자 발현 및 조직 특이성 등을 실제상황에 유사한 상태로 관찰할 수는 없었다.

이에 본 연구에서는 HPV의 자궁경부 세포에 대한 감염 경로와 인체 내에서의 암화 진행과정을 연구하기 위하여 HPV-18 URR E6/E7이 발현되는 형질전환생쥐를 만들었다. 또한 URR의 활성을 증가시킨다고 알려진 TPA의 효과를 자궁경부암 세포주를 이용하여 확인하고, 암화 과정을 단축시키기 위하여 형질전환 생쥐에 TPA를 처치하여 생쥐의 자궁경부에서 이형증 및 악성종양의 발생을 조직병리학적 측면에서 관찰하였다.

재료 및 방법

1) Plasmid의 제조

원형(prototype) HPV-18 plasmid로부터 HPV-18 URR을 증폭하였고(Fig. 1), 제한효소로 잘라 약제의 처리농도에 따른 기능적 활성도를 평가하기 위해 CAT 유전자가 있는 pBLCAT8+ vector에 cloning하였다. PCR 반응 조건은 Southworth(1996)의 방법을 변형하여 시행하였는데, 반응 용액에는 20~40 ng template DNA, 200 μM dNTPs, 1 μM 각각의 primer (Table 1), 1 U deepvent DNA polymerase (New England Biolabs; Beverly, MA), 반응 buffer (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100)을 넣고 전체 반응용액을 100 μl가 되게

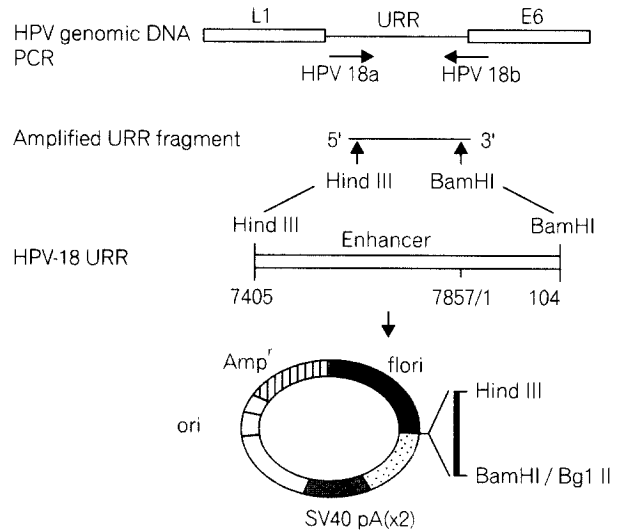


Fig. 2. The URR of HPV-18 was amplified by HPV-18 specific primers by PCR. Each amplified URR fragment was cloned into a pBLCAT 8⁺ vector.

하였다. DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus)를 이용하여, 98°C에서 5분간 반응시킨 후 98°C서 1분간 DNA를 변성시키고, 56°C에서 1분간 DNA를 정렬시키고, 72°C에서 1분 동안 DNA를 연장시키는 과정을 35회 반복하였으며, 최종 반응은 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭된 DNA부분들은 제한효소 Hind III와 Bam HI으로 절단하여 pBLCAT8+ vector의 동일한 위치에 연결하여 cloning하였다(Fig. 2).

2) TPA 농도에 따른 HPV-18 URR의 기능적 활성도 평가

HPV를 함유하지 않은 C33A의 자궁경부암 세포주를 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)에 10% FBS (Gibco-BRL, MD)를 첨가한 후 37°C에서 배양하였다. 이 세포주를 10⁵~10⁶ cells/well 농도로 transfection 5시간 전에 6-well plate에 배양한 다음, 2 μg의 pBLCAT-URR 운반 plasmid와 1 μg의 SV40 derived β-gal 내부 조절 plasmid DNA로 침전

체를 만들어 하룻밤 동안 transfection시킨 후에 세포들을 세척하고 표준 배양액으로 영양을 공급한 후 TPA를 5, 10, 50, 100, 1,000 ng/ μ l 농도로 처리하고 24시간 반응시켰다. 세포들은 차가운 $1 \times$ PBS에 2회 세척하고, 100 μ l의 0.25 M Tris-HCl (pH 7.6) 용액에서 3회 해동 과정을 반복하였다. 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액만 떼내고 Bio-Rad protein assay dye reagent와 BSA standard를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다(Rose et al, 1991). 30~70 μ l의 상층액을 떼내어 CAT 항체를 이용한 CAT ELISA (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 방법으로 URR의 TPA 농도에 따른 활성을 간접 평가하였고, β -galactosidase 기본 활성값으로 transfection 정도를 보정하였다. 모든 결과는 적어도 3번의 독립적인 실험을 실시하여 평균값으로 결정하였다.

3) 주입용 DNA의 준비

HPV-18 URR 부분을 Sal I/Hind III로 절단하여 선상 DNA의 형태로 만든 후 0.7% agarose gel에서 전기 영동을 실시한 후 DNA 절편을 electroelution 방법에 의해 회수하고 분리된 선상 DNA 절편을 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)/0.2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 농도에서 투석하여 최종 농도가 4 ng/ml이 되게 하였다.

4) 실험동물 및 수정란의 준비

KIST 유전공학연구소 생물 검정실로부터 분양 받은 4~7 주령의 교잡종(F1: C57BL/6 \times CBA) 생쥐를 이용하였다. 대리모의 경우 자연적인 상태에서 발정기의 암컷 생쥐를 육안으로 선별하여 정관 수술을 실시한 수컷 생쥐와 3:1의 비율로 합사시킨 후, 다음날 아침에 질전(vaginal plug)이 있는 암컷 생쥐만을 이용하였다. 다배란 유도를 위하여 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG; Seraruman, Japan)와 human Chorionic Gonadotropin (hCG; Sigma, St. Louis)를 48시간 간격으로 각각 5 IU씩 수컷 생쥐의 복강내에 주사한 다음, 동일개통의 암컷 생쥐와 1:1로 합사시켰다. 다음날 아침, 질 전의 유무를 확인하여 질전이 있는 개체만을 골라서 경추과열법(cervical dislocation method)으로 도살한 다음 난관을 절취하였다. 절취된 난관의 팽대부를 주사 바늘로 터뜨려 난구 세포 덩어리(cumulus cell mass)를 회수하였다. 회수한 난구 세포 덩어리를 300 unit/ml의 hyaluronidase (Sigma) 용액에 3분 처리하여 난구세포(cumulus cells)를 제거하고, 이들 수정란을 신선한 배양액으로 3회 이상 세척하고 원심분리기에서 15,000 rpm으로 3분간 원심 처리하여 두 개의 전핵이 확실하게 보이는 것만을 미세주입 실험에 이용하였다.

5) 재조합 유전자의 미세주입 및 수정란의 이식

외래유전자는 Normarski DIC (differential interference contrast) 렌즈가 부착된 현미경 하에서 미세조작기(Micromanipulator; Leitz, Germany)를 이용하여 수정란의 웅성전핵에 주입하였다. 미세 주입용 pipet에 DNA 용액을 흡입한 다음 고정용 pipet으로 1세포기 수정란의 웅성 전핵이 미세 주입용 pipet 끝에 가깝도록 고정된 후, 미세주입용 pipet을 웅성전핵의 핵막 속으로 밀어 넣는 방법으로 모두 415개의 수정란에 DNA를 주입하였고 생존한 319개의 수정란을 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 2세포기까지 배양하였다. 질전이 확인된 암컷 생쥐에 마취제(Somnopenyl; Pitman-Moore, Monticello, AR)를 생쥐 체중 10 g당 0.6 mg을 복강내에 주사하여 전신마취를 실시한 후, 배측 정중선을 약 1 cm 정도 절개한 다음 각각의 난관에 2세포기의 수정란을 10개씩 이식하였다.

6) 형질전환 생쥐의 판별: PCR을 이용한 분석

생후 4주에 해당하는 생쥐의 꼬리를 1 cm의 길이로 잘라 700 μ l의 용해용액[50 mM Tris (pH 8), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)]이 들어 있는 1.5 ml microfuge tube에 넣고 수술용 가위를 이용하여 잘게 썰어 10 mg/ml 농도의 proteinase K 용액을 각각의 tube에 35 μ l씩 첨가하여 55°C의 shaking water bath에서 15시간 흔들어 주면서 꼬리조직을 용해시켰다. 각각의 tube에 20 μ l의 RNase를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 1 volume의 phenol을 첨가하여 20분간 shaking incubator에서 잘 섞어주었고 10분간 microfuge로 원심 분리하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮겨 각각 1/2 volume의 phenol과 chloroform을 첨가하여 10분간 잘 흔들어 주었다. 그 후 1 volume의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하여 5분간 잘 섞은 후 원심분리하여 상층액을 얻어 50 μ l의 3 M NaOAc (pH 6)과 1 ml의 100% ethanol을 첨가하여 잘 섞어준 다음 원심분리하여 ethanol 상층액을 버리고 70% ethanol을 첨가하여 DNA를 씻어준 후 건조시켰다. 이렇게 얻은 genomic DNA를 1 μ g씩 각각의 tube에 넣고 증류수를 첨가하여 10 μ l로 농도로 10분간 끓인 후 얼음에 식혀 DNA를 변성시키고 protease의 활성을 없앴다. 각각의 tube에 반응 혼합물(HPV-18 URRT primer; 5'-TATGTGTGTGTAT-ATATAT-3', HPV-18 E7B primer; 5'-TTAT TACTGCT-GGGATGCACAC-3' 이용)을 90 μ l씩 첨가하고 여기에 50 μ l의 light mineral oil (Sigma)를 첨가한 후 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus)에 넣어 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel로 전기영동을 실시하고, ethidium

bromide로 염색하여 자외선 하에서 DNA band의 유무를 확인하였다.

7) 형질전환 생쥐에서 각 장기별 E6/E7 유전자의 발현 분석

형질전환 생쥐를 경추과열법으로 도살한 다음 피부, 뇌, 심장, 폐, 췌장, 간, 신장, 자궁 등의 조직을 절취하였다. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. RT-PCR Kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 HPV-18 E6T primer (5'-ACCATGGCGCTTTGAGGAT-3') 및 HPV-18 E7B primer (5'-TTATTACTGCTGGGATGCACAC-3')로 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel로 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 하에서 DNA band의 유무를 확인하였다.

8) 형질전환 생쥐에서 TPA에 의한 자궁경부의 형태학적 변화의 관찰

TPA에 의한 암화과정을 관찰하기 위하여 아세톤에 TPA를 녹여 최종농도 0.26 µg/ml 상태로 만들었다. 10마리의 형질전환 암컷 생쥐를 두 군으로 나누어 5마리의 복강에 1 ml TPA를 3일 간격으로 투여하였고 5마리는 TPA 투여 없이 관찰하였다. 대조군으로 5마리의 정상 생쥐에 동일한 농도의 TPA를 투여하였다. 사육 조건은 일조 시간을 14시간으로 하였으며, 사료와 물을 무제한으로 급여하였다. 사육기간 3개월과 5개월 후의 형질전환 생쥐를 경추과열법으로 도살한 다음 자궁을 적출하여 자궁경부의 형

태학적 변화를 관찰하기 위하여 H-E 염색법을 시행하였다.

결 과

1) HPV-18 URR의 전사활성도 측정

HPV-음성 자궁경부암 세포주인 C33A에 HPV-18 URR이 붙은 CAT reporter plasmid를 transfection한 후 TPA를 처리하여 URR의 활성도를 CAT ELISA로 분석한 결과 TPA 농도가 100 ng/µl일 때 1.5배 증가하였고, 200 ng/µl일 때 2배 증가하였으나, TPA 농도를 더욱 높였을 경우의 URR 활성도는 점점 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2) HPV-18 URR E6/E7 유전자를 미세주입한 형질전환 생쥐의 생산

E6/E7 발현 벡터를 Sal I/Hind III로 절단하여 선상 DNA의 형태로 만든 후 HPV-18 URR E6/E7을 포함하는 약 1.1 kb 크기의 외래유전자를 분리하고(Fig. 4), 외래 유전자를 F2 (C57BL/6×CBA)로부터 얻은 319개의 수정란 전핵에 주사하여 40마리의 생쥐를 얻었다. 또 E6/E7 primer를 이용한 PCR 방법에 의하여 4마리의 형질전환 생쥐를 확인

Table 2. Microinjection of E6/E7 gene into mouse embryos and production of transgenic mice

No. of embryos injected	No. of embryos survived and transferred	No. of offspring born and analyzed	No. of transgenics
415	319	40	4

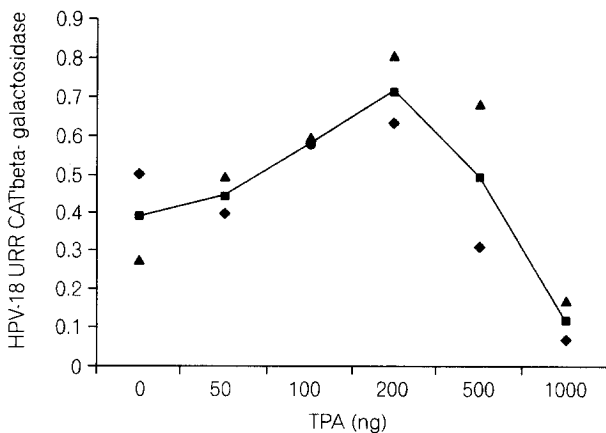


Fig. 3. Transient transfection assay in C33A cervical carcinoma cells. Relative amount of CAT was shown by the ratio of the amount of treated sample/the amount of untreated sample.

Fig. 4. Identification of HPV-18 URR E6/E7 transgene by PCR. Exact sized bands (1,100 bp, arrow) indicate right size of PCR product (lane; 5, 6 and 12).

하였다(Table 2).

1마리는 mosaic 양상을 나타냈고 1마리는 생후 10일경에 죽었다. 남은 2마리를 같은 계통의 비형질 전환 생쥐와 교배시켰다. 이 중 19번 계통에서는 형질 전환 생쥐가 나오지 않았고, 17번 계통의 생쥐에서 2회의 교배를 통하여 17마리의 생쥐를 얻었으며 이 중 2마리가 형질 전환 생쥐로 판명되었다. 이 두 마리의 형질 전환 생쥐를 계속하여 비형질 전환 생쥐와 교배시켜 두 가지 계통의 형질 전환 생쥐군을 유지하였다(Table 3).

Table 3. Transmission of transgenic mice

Line	No. of litter	No. of total progeny	No. of transgenic progeny	Transmission rate (%)
17	2	17	2	12
19	2	11	0	0

Fig. 5. RT-PCR analysis of HPV-18 E6/E7 mRNA. Total RNAs were purified from mouse skin (lane 1), brain (lane 2), heart (lane 3), lung (lane 4), pancreas (lane 5), liver (lane 6), kidney (lane 7), cervix (lane 8). The exact sized band (1,100 bp) indicated the expression of E6/E7 gene by RT-PCR.

Fig. 6. Panel A demonstrates transformation zone with squamous metaplasia in control mice (H & E stain, $\times 100$). In magnification view (Panel B), the metaplastic cells are normally differentiated and well oriented (H & E stain, $\times 200$). Panel C demonstrates superficial dyskeratotic cells with neutrophilic infiltrates in transgenic mice treated with TPA (H & E stain, $\times 40$). In magnification view (Panel D), the atypical cells are in lower portion with increased N/C ratio and hyperchromatic nuclei consistent with dysplastic change (H & E stain, $\times 200$). Panel E demonstrates enlarged hyperchromatic nuclei with numerous nucleoli and increased mitosis (arrow) in transgenic mice treated with TPA (H & E stain, $\times 200$).

3) 형질전환 생쥐에서 조직특이적인 외래유전자의 발현

E6/E7의 발현을 특정조직으로 한정시키기 위하여 HPV promotor인 URR을 사용하였다. 각 부위별(피부, 간, 뇌, 자궁, 척추, 근육 및 신장) 조직으로부터 RNA를 분리하고 E6 primer를 이용한 RT-PCR로 E6/E7 발현을 확인한 결과 URR에 의하여 E6/E7 유전자의 표현이 피부 및 자궁에서 국한되어 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

4) TPA를 처리한 형질전환 생쥐에서 자궁경부의 조직 병리학적 변화

형질전환 생쥐에서 암 발생을 가속화하기 위해 TPA를 처리하여 자궁경부에서의 종양의 발생여부를 병리조직학적인 관점에서 관찰하였다. 3개월 후 관찰한 결과 형질전환 생쥐 및 대조군 모두에서 병리조직학적 변화를 관찰할 수 없었다. 5개월 후 관찰한 결과 TPA를 투여하지 않은 형질전환 생쥐와 대조군에서는 병리조직학적 변화를 관찰할 수 없었으나, TPA를 투여한 형질전환생쥐에서는 자궁경부 상피의 상층부는 cornification, squamous metaplasia가 보였으나, 자궁경부 상피의 하층부중 기저막 주위는 세포비대, nuclear atypia, mitosis의 증가 및 pleomorphism 등 자궁경부 상피 이형종의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

한국 여성암의 22%를 차지하며 여성 사망의 여섯번째 빈도를 차지하는 질한인 자궁경부암의 효과적인 임상적 관리를 위해서는 HPV에 의한 발암 기전에 대한 정확한 이해가 필수적인데, 이를 위해서는 HPV 감염 자궁경부 세포에서 암으로의 진행 과정에서 HPV DNA의 상태와 viral 유전자들의 발현상 변화와의 연관 관계를 이해하고, 이들 유전자 발현의 조절 기전을 이해하는 것이 중요하다. HPV의 유전학적 구조 중에서 URR은 바이러스 증폭 또는 복제(replication)가 일어나는 기시부(replication origin) 근처에 있는 약 850 base pair (bp) 크기의 유전자로서 단백질을 만들지는 않으며, HPV 유전자중에서 L1의 끝과 E6의 시작 부위 사이에 존재한다(8). URR의 활성화는 NF1, AP-1, SP1, Oct-1, TEF-1 & -2, cEBP, GR 등과 같은 전사 활성인자와 YY1과 같은 전사 억제인자가 URR 내 결합부위에서 반응하면서 조절되어, 이들 세포내 인자 중 가장 많이 알려진 AP-1은 *c-Jun/c-Jun* homodimer 또는 *c-Jun/c-fos* heterodimer로서 HPV-16/18 enhancer의 TGAG/CTCA 부위에 작용하는 필수적인 전사 인자이다(12,13). HPV-18 URR에는 활성화된 AP-1단백에 대해 2개의 인식부위가

있는데 AP-1단백은 외부로 부터의 phorbol ester에 의해 활성화되어 URR부위의 AP-1 결합부위에 붙고 이 영향으로 전사가 촉진된다고 알려져 있다(14). 이러한 URR을 통한 조절에 관한 연구는 phorbol ester에 의한 외부조절이 가능함으로 인하여 활발해졌다(15,16). AP-1은 TPA에 의해 활성화된 후 URR내 결합부위에 붙어 전사활성을 촉진하며, HPV-16을 포함하는 자궁경부암세포주에 TPA를 처리한 경우 URR의 활성이 2배 이상 증가하는 것으로 알려져 있다(17). 본 연구에서도 HPV가 감염되지 않은 자궁경부암 세포주인 C33A에 HPV-18 URR이 붙은 CAT reporter plasmid를 transfection한 후 TPA를 처리한 결과 URR의 활성이 2배 이상 증가함을 알 수 있었는데 이는 아마도 TPA가 URR내의 AP-1에 대한 작용으로 추측된다(16).

형질전환동물을 만드는데 있어 가장 많이 사용되는 keratin14/k6 promotor의 경우 각화세포 친화성을 가지며 암을 유발하는데 3개월 정도의 시간을 소요하는 것으로 알려져 있다. 그외에 crystalline (각막, 피부 친화성), URR (자궁경부 친화성), metallothionein (위점막 친화성), bovine thyroglobulin (갑상선세포 친화성), beta-actin (신경상피세포 친화성) 등의 promotor가 보고되고 있다. 본 실험에서 저자는 HPV 자체의 promotor인 URR의 조절 하에 HPV-18의 E6/E7 발암유전자를 발현하는 형질전환 모델동물을 생산하였다. Keratin14/k6 promotor를 사용하는 경우 E6/E7 유전자의 암화과정에 대한 역할을 알아볼 수 있다는 점은 있으나 HPV 자신의 promotor가 아니라는 점에 있어 실제의 인체내의 상황과 일치시킬 수 없다는 실험상의 제약이 있다. URR의 사용시 형질전환 생쥐에서 암화과정에 1~2년 이상이 소요되는 것으로 알려져 있으나(18) HPV 자체의 성질을 모두 나타낼 수 있다는 점과 현재 개발중에 있는 URR의 활성을 억제시킬 수 있는 약제의 효과를 알아볼 수 있다는 면에서 다른 promotor보다 HPV 실험에 있어 바람직하다 할 수 있다.

HPV에 대한 연구는 HPV 자체를 배양시킬 수 없으며 생체 내에서 점막 친화적인 성질을 나타내므로 제한된 연구를 할 수 밖에 없다. 특히 HPV DNA의 복제는 대부분이 상피세포의 분화에 의존하고 있는 것으로 알려져 있다. 최근들어 변형 상피 부대 씨스템(modified epithelial raft system)에 의해 일부 HPV-11, HPV-31 등을 배양시켰으나 아직도 적절한 동물모델이 없는 관계로 암화과정에 있어 HPV의 역할을 연구하는데 어려움이 있는 실정이다(8,19). HPV의 자궁경부 세포에 대한 감염 경로와 인체 내에서의 암화 진행과정을 조직학적으로 확인하기 위하여 HPV-18 URR E6/E7이 발현되는 형질전환 생쥐를 만들었다. *In vitro* 상 TPA에 의해 URR의 활성이 증가된다는 실험을 토대로

형질전환 동물에서 1~2 년 이상 소요되는 URR 자체에 의한 암화 과정 기간을 단축시키기 위하여 생쥐의 복강내에 TPA를 주사하여 5개월 후 형질전환생쥐에서 자궁경부의 종양성병변을 조직학적으로 확인하였다. TPA를 투여한 형질전환생쥐에서 자궁경부 상피의 상층부는 cornification, squamous metaplasia가 보였으나, 자궁경부 상피의 하층부중 기저막 주위는 세포비대, nuclear atypia, mitosis의 증가 및 pleomorphism 등 자궁경부 상피 이형증의 변화를 관찰할 수 있었다.

결론

본 연구에서는 HPV-18 URR의 조직 특이성 및 E6/E7 바이러스 암유전자의 암화 능력을 알아보기 위하여 HPV-18 URR E6/E7 유전자를 이용하여 4마리의 형질전환 생쥐를 만들었으며 이중 한 마리로부터 지속적인 형질 전환 생쥐 계통을 얻었다. 또한 자궁경부에서 암화 과정을 실제 상황과 유사하게 관찰하기 위하여 TPA를 형질전환 생쥐의 복강내에 정기적으로(periodically) 투여하여 약 5개월 후 중등도의 이형증을 관찰할 수 있었다. 이러한 URR-E6/E7 유전자를 표현하는 형질전환동물은 자궁경부암 발생에 대한 동물모델로 HPV URR에서 주요 유전자를 조절하는 전사 인자들의 기능을 억제 또는 강화하는 물질들의 *in vivo* 분석이 가능하고, 이러한 연구 분석을 통하여 자궁경부암의 암화 및 진행에 대한 올바른 이해와 병태, 생리학적인 변화를 분자생물학적 측면에서 분석할 수 있다. 또한 자궁경부암 세포와 HPV 유전자들의 발현을 조절하는 TPA를 이용하여 빠르게 암화과정을 유발함으로써 임상실험을 위한 실험동물 모델을 빠르게 확보할 수 있고, 자궁경부암 발생과 연관된 물질의 분자생물학적 작용 기전을 밝힘으로써 보다 효과적인 화학적 예방과 새로운 암 치료 방법을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:4677-4681.
- Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jensen AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:671-677.
- Cullen AT, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J Virol* 1991; 65:606-612.
- Tammasino M, Crawford L. Human papillomaviruses E6 and E7 proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* 1995; 17:509-517.
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV 18) E2 gene product is a repressor of the HPV 18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4317-4324.
- Bauknecht T, Angel P, Royer HD, zur Hausen H. Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcription repressor YY1. *EMBO J* 1992;11:4607-1617.
- Park JS, Namkoong SE. Clinical application of HPV DNA test. *Korean J Obstet Gynecol* 1996;39:457-469.
- Meyers C, Laimins LA. *In vitro* systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:199-215.
- Sasagawa T, Inoue M, Inoue H, Yutsudo M, Tanizawa O, Hakura A. Induction of uterine cervical neoplasias in mice by human papillomavirus type 16 E6/E7 genes. *Cancer Res* 1992; 52:4420-4426.
- McLean CS, Sterling JS, Mowat J, Nash AA, Stanley MA. J Delayed-type hypersensitivity response to the human papillomavirus type 16 E7 protein in a mouse model. *Gen Virol* 1993;74:239-245.
- Lambert PF, Pan H, Pitot HC, Liem A, Jackson M, Griep AE. Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5583-5587.
- Chan WK, Chong T, Bernhard HU, Klock G. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 1990;18:763-769.
- Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, Pettersson U, Turek LP. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP1-responsive modules. *New Biol* 1990;2:450-463.
- Chong T, Chan WK, Bernard HU. Transcriptional activation of the human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancer. *Nucleic Acids Res* 1990;18:465-470.
- Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus 18. *J Virol* 1998;62:4321-4330.
- Mack DH, Laimins LA. A keratinocyte specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9102-9106.
- Angel C, Auewarakul P, Garcia-Carranca A, Ovseiovich R, Gaissert H, Gissmann L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in

- transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J Virol* 1993;67:6742-6752.
18. Quarmby VE, Korach KS. The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 1984; 114:694-702.
19. Dollard SC, Wilson JL, Demeter LM, Bonnez W, Reichman RC, Broker TR, Chow LT. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Genes Dev* 1992; 6:1131-1142.
-