개 유선종양세포에 대한 자연살해세포 독성

정다운^{1,†} · 변정수^{1,†} · 구나연¹ · 정문희² · 김은희² · 김형석² · 조인수¹ · 송재영¹ · 현방훈¹ · 이지현^{1,*}

¹농림축산검역본부 바이러스질병과, ²전남대학교 의과대학 법의학고실

Cytotoxicity of natural killer cells on canine mammary carcinoma cells

Da-Un Jeong^{1,†}, Jeong Su Byeon^{1,†}, Na-Yeon Gu¹, Moonhee Jung², Eun Hee Kim²,
Hyung-Seok Kim², In-Soo Cho¹, Jae-Young Song¹, Bang-Hun Hyun¹, Jienny Lee^{1,*}

¹Viral Disease Research Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

²Department of Forensic Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju 61469, Korea

*Corresponding author

Jienny Lee
Viral Disease Research Division, Animal
and Plant Quarantine Agency, 177 Hyeoksin
8-ro, Gimcheon 39660, Korea

Tel: +82-54-912-0809
Fax: +82-54-912-0812
E-mail: roska@korea.kr

[†]These authors contributed equally to this
work.

ORCID:
Da-Un Jeong
<https://orcid.org/0000-0002-2781-5491>
Jeong Su Byeon
<https://orcid.org/0000-0003-4977-398X>
Na-Yeon Gu
<https://orcid.org/0000-0001-6009-0093>
Moonhee Jung
<https://orcid.org/0000-0001-5382-8459>
Eun Hee Kim
<https://orcid.org/0000-0002-3331-5477>
Hyung-Seok Kim
<https://orcid.org/0000-0002-8297-9747>
In-Soo Cho
<https://orcid.org/0000-0002-2692-3191>
Jae-Young Song
<https://orcid.org/0000-0001-6070-3785>
Bang-Hun Hyun
<https://orcid.org/0000-0002-3429-3425>
Jienny Lee
<https://orcid.org/0000-0001-5192-8800>

Conflict of Interest
The authors declare no conflicts of interest.

Received: June 28, 2019
Revised: November 28, 2019
Accepted: December 2, 2019

Abstract: Natural killer (NK) cells play have a crucial role in the early phase of immune responses against various pathogens. We compared characteristics of canine NK cells against two canine mammary carcinoma cell lines, REM134 and CF41.Mg. REM134 showed higher expression of progesterone receptor, proliferative cell nuclear antigen, Ki67, multiple drug resistance, Bmi-1, c-myc, E-cadherin, and human epidermal growth factor receptor type-2 than that of CF41.Mg. For specific expansion and activation of NK cells, we isolated CD5 negative cells from canine peripheral blood mononuclear cells and co-cultured K562 cells in the presence of interleukin (IL)-2, IL-15, and IL-21 for 21 days. As a result, we found that expression markers of activated NK cells such as NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD244, perforin, granzyme B, and tumor necrosis factor alpha were highly upregulated. In addition, we found there was upregulated production of interferon gamma of activated NK cells against target cells such as REM134 and CF41.Mg. Specifically, we observed that cytotoxicity of NK cells against target cells was more sensitively reacted to CF41.Mg than REM134. Based on the results of this study, we recommend the development of an experimental application of CF41.Mg, which has not been reported in canine mammary carcinoma research.

Keywords: canine; mammary carcinoma; natural killer cells; interferon gamma; cytotoxicity

서론

여성에서 흔하게 진단되는 유방암은 발암 과정에서 수많은 유전자의 변형이 있어 치료가 쉽지 않고 전이 가능성이 높은 질병으로 방사선 치료 또는 화학적 치료를 병행한 외과적 수술이 적용되어 왔다[1]. 대표적 반려동물인 개의 경우에서도 빈번하게 발병되는 종양 중 하나인 유선종양은 나이 든 암컷 개에서 흔하게 나타나며 그 중 절반은 악성으로 진단되고 있다[2]. 개의 유선종양은 사람과 유사한 발병 부위를 나타낼 뿐만 아니라 역학적, 형태학적 측면에서도 여성의 유방암과 유사성을 지니고 있어 유방암 연구분야의 실험모델로서도 활용되고 있다[3,4].

개에서 암을 치료하는 방법으로는 주로 외과적 수술을 사용해왔다. 1946년에 백혈병 진단을 받은 개를 대상으로 화학적 치료가 시도되었고[5], 이후 점차적으로 각종 암에 화학적 치료가 적용되기 시작하였으나[6], 환축을 대상으로 장기간 치료를 지속하는 경우는 드물고 이러한 화학적 치료의 효능을 뒷받침할 만한 수의학적 자료 부족의 한계가 있었다[7]. 이후 체내 면역체계

가 암의 성장을 조절하고 완화할 수 있다는 연구 결과들이 보고되면서 최근 대표적인 면역세포인 자연살해세포(natural killer cells, NK세포)나 T세포 등을 표적으로 하는 면역 요법에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있으며, 수의학분야에서도 동물의 다양한 질병을 대상으로 면역 요법에 대한 기초 및 임상 관련 적용 연구들이 진행되고 있다[4].

각종 면역세포 중 NK세포는 생체 내 암 발생을 억제하는 최전선의 핵심 면역세포로써 항원특이적인 수용체를 가진 T세포, B세포와 달리 다양한 선천면역 수용체를 세포 표면에 발현하고 이들을 통해 정상세포와 암세포를 구분하며, 퍼포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme B)을 분비하여 즉각적으로 암세포를 사멸하는 특징을 가진다. 이러한 NK세포는 암의 발생, 전이, 재발에 중요한 역할을 하는 암줄기세포(cancer stem cells)를 효과적으로 제거할 수 있어 항암 면역요법에서 많은 장점을 갖고 있다. 다양한 암 환자에서 NK세포의 기능 결함이 보고되고 있으며, 이 기능 결함의 정도가 향후 임상에서의 예후와 밀접한 상관관계가 있다는 것이 보고되었다. 현재 NK세포를 이용하여 사람의 암을 치료하려는 다양한 시도들이 있으며[8], 개에서도 연구가 진행 중이다[9].

NK세포의 대표적 마커인 NKp46 (NCR1)에 기초하여 볼 때, 개 NK세포는 전체 말초혈액 단핵세포에서 약 5% 정도로 존재하여 사람 NK세포 비율(10~15%)에 비해 그 비율이 현저히 적다[7]. 사람에서 CD5 항원은 정상 T세포에 존재하며 NK세포에서는 발현하지 않는다고 보고되었으며[10], Huang 등은 CD5 음성 세포가 개 NK세포의 특성과 밀접하게 관련되어 있음을 보고하였다[11]. Canter 등도 골육종을 가진 개에게 방사선 치료 후 CD5dim, NKp46+ 세포를 개에게 투여하여 NK세포의 활성화 증가 및 종양 성장 지연을 보고한 바 있다[9].

사람에서 유방암을 진단하는 대표적 바이오마커로는 estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor type-2 (HER-2) 등이 있으며, 유방암의 약 70% 정도는 암세포 성장 촉진에 이러한 호르몬들이 영향을 미친다고 알려져 있다[1]. 개의 유선종양에서는 이러한 호르몬 수용체뿐만 아니라 proliferative cell nuclear antigen (PCNA), tumor suppressor protein p53 (p53), E-cadherin, endothelial growth factor 및 암줄기세포 특이마커 등이 알려져 있으며, 이러한 마커들은 종양의 악성도에 따라 다른 발현을 나타내므로 항암 면역요법에 대한 반응은 유선종양과 관련된 특이마커에 따라 다르게 결정될 수 있다[12]. 이러한 바이오마커는 특정 치료에 대한 잠재적인 반응을 결정하는 데에 유용한 정보를 제공하고 성공적인 치료 전략을 위해 중요하게 사용된다[13].

본 연구는 서로 다른 바이오마커를 발현하는 개 유선종양 유래 2가지 세포를 대상으로 개 말초혈액으로부터 분리한 CD5 음성 세포를 체외에서 상당량 증폭 및 NK세포로 활성화한 다음, 개 유선종양세포(표적세포)와 공배양하여 표적세포에 대한 NK세포의 독성 및 그 차이를 분석하였으며, 향후 개 유선종양 면역세포 치료 연구에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

개 유선종양세포 배양

개 유선종양세포인 REM134 (ECACC, UK)와 CF41.Mg (ATCC, USA)를 사용하였다. REM134 세포와 CF41.Mg 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 1× glutamax (Gibco)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다.

개 NK세포 분리 및 증식

건강한 암컷 개(female beagle)의 말초혈액(Genia Inc., Korea) 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)로부터 NK세포들만 선택적으로 배양하고자 PBMCs에서 CD5 음성 세포만을 분리하였다. 말초혈액을 PBS와 1:1로 희석하였으며, Ficoll-Paque (GE Healthcare, Sweden)을 사용하여 희석된 말초혈액으로부터 PBMCs를 분리하여 2회 세척하였다. PBMCs를 대상으로 CD5 (MCA1037PE, Bio-Rad, USA) 항체를 30분간 염색한 다음, anti-PE microbeads (Miltenyi Biotec, USA)로 2차 염색하여 MACS 시스템(Miltenyi Biotec)으로 CD5 항체가 부착되지 않은 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 유세포 분석(FACS Cabilur, USA)을 통해 CD5 음성 세포임을 확인하였다. 또한, NK세포만을 선택적으로 증식하기 위해 사람 혈액암 세포주인 K562를 영양세포(feeder cells)로 사용하였다. K562에 방사선 감마선(100 Gy)을 조사하여 세포 분열을 저해한 다음 6 well plate에서 K562 (5 × 10⁵개/well)와 CD5 음성 세포 (1 × 10⁶개/well)를 10% FBS (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 500 U/mL human IL-2 (R&D, USA), 10 ng/mL human IL-15 (R&D) 및 5 ng/mL canine IL-21 (R&D)가 첨가된 RPMI, GlutaMAX™ (Gibco) 배양액에서 7일 간격으로 계대하여 총 21일간 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 배양하였다.

정량적 중합효소연쇄반응(quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qPCR)을 이용한 유전자 분석

세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 Nano-drop 1000 (Thermo, USA)을 사용하여 RNA 상태와 농도를 측정한 다음, GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, USA)를 사용하여 cDNA 합성하였다. qPCR은 96 well plate에 LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 pre-denaturation (95°C, 10분), annealing (60°C, 10초), elongation (72°C, 10초)을 45 cycle 반복한 후 2^{-ΔCt} 계산법을 이용하여 melting curve를 분석하였으며, β-actin을 reference gene으로 사용하여 qPCR 결과를 분석하였다. 사용된 primer의 정보와 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')	Accession number
β-actin	F-GCT ACG TCG CCC TGG ACT TC	NM_001003349
	R-GCC CGT CGG GTA GTT CGT AG	
PR	F-TAT TGC CGC ACA GTT ACC CA	NM_001003074
	R-TGG GCA CAC AGA AAC ACC TT	
PCNA	F-TCC TGC GCA AAA GAT GGA GT	XM_534355.4
	R-GAG AGA GCG GAG TGG CTT TT	
Ki67	F-GGT CGT CTG AAA CCG GAG TT	XM_005637893.1
	R-GAG CTG GAG ATC CCT TAC GC	
CD133	F-AGC CCT GTT GAA CGT GAA CA	KJ654317
	R-GTT GTA GCC ACT GGA GGG AC	
MDR	F-GAG GAC TTG AAT GAG AAT GTT CCT	[14]
	R-CGG GTA AAG ATC CCT ATA ATC CTT	
Bmi-1	F-CAC TGT GAA TAA TGA CTT CTT GCA T	NM_001287063
	R-AAG TTT ACT TTC CTT TGA TCG GTT T	
c-myc	F-AAT AGG AAC TAT GAC CTC GAC	[14]
	R-AGC AGC TCG AAT TTC TTC CAG	
E-cadherin	F-CTG ACC CTA CTG CTC CTC CT	NM_001287125
	R-ATG TCC GCC AGC TTC TTG AA	
N-cadherin	F-TGT TTG TCC TCA CGG TTG CT	NM_0012871756
	R-AGT TGC CGT TGA CTG AGG AG	
HER-2	F-ATC AAC TGC ACC CAC TCC TG	NM_001003217
	R-GCG GCA ATG ATG GAT GTC AC	
p53	F-TTC CTC CCC GAT GGC TCT TA	CFU62133
	R-AGA TGC CAA ACC AGA CCT CG	
NKp30	F-TTG GCT CTG TCA CGT GGT AC	DQ003484
	R-CAG TGT CCC ATT CCC TGT CC	
NKp44	F-ATC GAG TGG CAG GGC AGA CA	XM_0846203
	R-TTC CTC CTT CAG ACC AAT CAT GGT	
NKp46	F-CCA GCA GAG CCC AAA ACA AC	NM_001284448
	R-CGG GAT GAA CGG AGA GAG TG	
NKG2D	F-ACG AAG GCA AAA GAG AAA GCC	XM_849013
	R-TGA TGA TTA TGG CAC CGC AT	
CD244	F-GGA GGA GGC TGG GGT TTT AC	XM_022415323
	R-GCG CCA TCT ACT CTC ACT CC	
Perforin	F-GAC AGA GCC CGT TGG AAG AA	FJ973622
	R-TTG GTG ATC CCC GAG TTG TG	
Granzyme B	F-GGA ACA GGA GAA GAC CCA GC	XM_547752
	R-TTG GCC TTC CTC TCA AGC AG	
TNF-α	F-GAG CCG ACG TGC CAA TG	Z70046
	R-CAA CCC ATC TGA CGG CAC TA	

F, forward; R, reverse; PR, progesterone receptor; PCNA, proliferative cell nuclear antigen; MDR, multiple drug resistance; HER-2, human epidermal growth factor receptor type-2; TNF-α, tumor necrosis factor alpha.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통한 IFN-γ 분석

표적세포인 REM134와 CF41.Mg에 대한 개 NK세포의 활성을 분석하고자 IFN-γ ELISA kit (DY781B, R&D systems, USA)를 이용하여 활성화된 NK세포의 주요한 특징

인 IFN-γ의 생성을 분석하였다. REM134, CF41.Mg와 NK 세포를 1:10 (2×10^5 : 2×10^6) 비율로 RPMI, GlutaMAX™ (Gibco)에 10% FBS (Gibco), 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 첨가된 세포 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 24시간 공배양한 다음, 상층액

Fig. 1. Morphology of REM134 (A) and CF41.Mg (B) cells. REM134 cells show an epithelial-like phenotype and CF41.Mg cells show a mesenchymal-like phenotype at the following magnifications (left) $\times 40$ and, (right) $\times 100$ magnifications; scale bar = $100\ \mu\text{m}$.

Fig. 2. Expression of canine mammary carcinoma markers. Expression levels of PR, PCNA, Ki67, CD133, MDR, Bmi-1, c-myc, E-cadherin, N-cadherin, HER-2, and p53 from REM134 and CF41.Mg cells were analyzed determined by qPCR analysis. β -actin was used as a housekeeping gene. Values are means $\pm$ SD of three individual experiments.

PR, progesterone receptor; PCNA, proliferative cell nuclear antigen; MDR, multiple drug resistance; HER-2, human epidermal growth factor receptor type-2.

** $p < 0.001$.

을 수집하여 IFN- γ 의 농도를 측정하였다.

표적세포에 대한 NK세포 독성 분석

표적세포인 REM134와 CF41.Mg에 대한 개 NK세포의 독성을 분석하고자 lactase dehydrogenase (LDH) 방출을 이용한 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega)를 이용하여 NK세포의 표적세포에 대한 세포 독성을 분석하였

다. NK세포와 표적세포를 25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.13:1, 1.56:1 비율로 U bottom 96 well plate에 세포를 분주하여 NK세포와 표적세포를 37°C , 5% CO_2 조건의 세포 배양기에서 4 시간 공배양한 다음 흡광도 490 nm에서 LDH를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험 결과는 평균과 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내

Fig. 3. Isolation and expansion of canine NK cells. (A, B) Canine CD5 negative cells were separated from PBMCs as confirmed by FACS analysis. (C) Canine CD5 negative cells and K562 cells were co-cultured with human IL-2 (500 U/mL), human IL-15 (10 ng/mL), and canine IL-21 (5 ng/mL) for 21 days. Gamma ray (100 Gy) irradiated K562 cells were used as feeder cells for specific expansion of NK cells. Values are means $\pm$ SD of three individual experiments. PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; NK, natural killer; IL, interleukin.

었으며, 각 실험군의 평균값 비교는 one-way ANOVA (analysis of variance)와 Student's *t*-test (JMP® 6.0; SAS Institute, USA)에 의해 검정하였다.

결 과

개 유선종양세포 모양 및 특이마커 발현

개 유선종양세포인 REM134와 CF41.Mg 1×10^6 개를 각

각 T75 플라스크에 부착하였다. 최초 부착 이후 REM134는 상피세포 형태로 자라는 것을 확인하였고 CF41.Mg는 중간엽세포와 유사한 형태로 자라는 것을 확인하였으며, 2가지 세포 모두 3일 후 약 80% confluency에 도달하였다(Fig. 1).

REM134와 CF41.Mg에서 유전종양 특이 바이오마커들의 발현을 확인하고자 PR, CD133, MDR (multiple drug resistance), Bmi-1, c-myc, E-cadherin, N-cadherin, HER-2, p53, PCNA 및 Ki67의 발현을 분석하였다. 그 결과, CF41.Mg은 REM134에 비해 유의적으로 Bmi-1, MDR, c-myc, HER-2, PCNA 및 Ki67의 발현이 낮았고 CD133, N-cadherin의 발현에는 큰 차이가 없었으며, p53과 E-cadherin의 발현은 오히려 유의적으로 높음을 확인하였다(Fig. 2).

NK세포 체외 증식 및 활성화

개 PBMCs로부터 MACS system으로 CD5 음성 세포를 분리하여 유세포 분석을 통해 그 결과를 확인하였다(Fig. 3A and B). 다음으로 개 CD5 음성 세포와 감마선(100 Gy)이 조사된 K562 세포에 IL-2, IL-15 및 IL-21을 첨가하여 21일간 배양하여 NK세포 체외 증식 및 활성화된 NK세포의 수용체 발현을 분석하였다. 그 결과, 최초의 CD5 음성 세포에 비해 21일간 배양을 거친 CD5 음성 세포는 약 100배 이상 세포 수가 증식하였으며(Fig. 3C), 활성화된 NK세포의 특이마커인 NKp30 (17.6 ± 1.4), NKp44 (24.7 ± 2.0), NKp46 (522.9 ± 22.8), NKG2D (63.6 ± 2.2), CD244 (1.3 ± 0.0), perforin (118.6 ± 10.6), granzyme B (229.2 ± 14.6) 및 TNF- α (6.0 ± 0.6)의 발현이 현저하게 증가하였음을 확인하였다(Fig. 4).

활성화된 NK세포의 IFN- γ 생성

IFN- γ 생성 증가는 활성화된 NK세포가 표적세포를 인지

Fig. 4. Expression of activated NK cell markers. Expression levels of NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD244, perforin, granzyme B, and TNF- α were analyzed determined by qPCR analysis. β -actin was used as a housekeeping gene. Values are means $\pm$ SD of three individual experiments.

TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

** $p < 0.001$.

Fig. 5. Production of IFN- γ of activated NK cells against target cells. Activated NK cells and REM134 (or CF41.Mg) cells were co-cultured for 24 hr. Cell culture supernatants were harvested for enzyme-linked immunosorbent assay quantification of IFN- γ release by ELISA. Values are means $\pm$ SD of three individual experiments.

IFN- γ , interferon gamma; NK, natural killer.

** $p < 0.001$.

Fig. 6. Cytotoxic activity of NK cells against target cells. Cytotoxic activity levels of NK cells against target cells at various E:T ratios (25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.13:1 and 1.56:1) were measured to access the function of NK cells. Values are means $\pm$ SD of three individual experiments.

NK, natural killer.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

하여 나타나는 주요한 특징 중 하나이다. CD5 음성 세포를 21일간 NK세포로 활성화하여 특이마커의 현저한 발현을 확인하였으므로 활성화된 NK세포와 표적세포를 24시간 공배양하여 IFN- γ 생성이 증가하는지를 분석하였다. 그 결과, 활성화된 NK세포와 표적세포인 REM134 (181.1 ± 10.0 pg/mL), CF41.Mg (172.6 ± 1.2 pg/mL)와 함께 공배양한 상층액에서 NK세포 단독 배양군(78.9 ± 0.7 pg/mL) 보다 2배 이상 높은 IFN- γ 생성을 확인하였다(Fig. 5).

NK세포의 표적세포에 대한 세포 독성

NK세포의 표적세포(target cells, T) REM134, CF41.Mg에 대한 세포 독성을 분석하고자 활성화된 NK세포를 작동세포(effector cells, E)로 활용하여 E:T 비율이 25:1-1.56:1이 되도록 혼합하여 세포 독성을 분석하였다. 그 결과 NK세포는 표적세포인 REM134, CF41.Mg에서 세포 독성을 나타내었는데, E:T 비율이 25:1인 경우, REM134는 32.9%, CF41.Mg는 68.2%의 세포 독성이 확인되었다. 즉, NK세포의 2가지 표적세포에 대한 세포 독성을 비교한 결과, REM134에 비해 CF41.Mg에서 현저하게 높은 세포독성이 관찰되었다(Fig. 6).

고 찰

개 유선종양은 대략 8세 이후의 암컷 노령견에서 주로 발병하며 대부분 전이성을 갖고 있는 악성이다. 유선종양의 유형으로 선암(adenocarcinoma), 유두암(papillary carcinoma), 고형암(solid carcinoma), 암육종(carcinosarcoma) 및 복합암(complex carcinoma) 등이 있다. 동일한 개체에서 1개 이상의 종양 유형이 발견되기도 하며 각각의 종양은 다른 종양 등급을 나타내기도 한다[12]. 이처럼 개 유선종양은 치료가 쉽지 않고 재발 가능성이 높은 암이므로, 종양 유형에 따라 치료 표적으로 사용될 수 있는 예후 인자들을 제대로 확인하는 것은 매우 중요한 일이다.

개 유선종양에서 스테로이드 호르몬 수용체의 발현과 그 발현 정도는 질병의 진단 및 치료를 위한 유용한 예측 인자로서 사용될 수 있는데, PR과 같은 스테로이드 호르몬 수용체의 발현이 부족한 경우 치료적 측면에서 볼 때 좋지 않은 예후로 이어질 수 있다. 정상 유선조직 및 양성 종양조직에서는 스테로이드 호르몬 수용체가 발현하지만 악성 종양조직 및 전이가 진행된 종양조직에서는 PR 수용체가 음성인 경향을 나타낸다[15]. PR은 성장 호르몬 생산에도 관여하지만 종양세포의 증식을 유도하는 역할도 한다[16]. 이러한 PR의 발현은 세포 증식 관련 인자인 PCNA, Ki67의 발현과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보고되었다. Fanelli 등은 사람 유방암 17개 조직에서 PR의 발현과 세포 증식 관련성을 조사하였는데, PR을 발현하는 44%가 세포 증식과 관련되어 있고 33%는 관련이 없었으며 22%는 PR을 발현하는 조직에서 오히려 낮은 세포 증식을 나타냈다고 보고하였다[17]. 본 연구에서는 대표적인 개 유선종양세포인 REM134와 CF41.Mg를 이용하여 종양 형성, 증식, 전이 등 관련 특성을 비교하였다. 그 결과, REM134에 비해 CF41.Mg는 PR 수용체의 발현이 현저히 낮았으며, PCNA 및 Ki67의 발현도 같은 경향을 나타내었다.

CD133, MDR, Bmi-1 및 c-myc은 종양을 유발할 수 있는 자가 재생능을 가진 악성 종양의 대표적인 마커로 알려져 있다[18]. 특히, CD133은 줄기세포 속성과 마찬가지로 자가 재생능, 분화능 및 높은 증식능을 가진 세포에서 발현되고 있으며, 사람 유방암 치료 요법에서 CD133을 발현하는 세포들을 표적으로 하는 전략들이 제안되고 있다[19]. 악성

종양은 노화에 의한 세포 사멸 회로를 회피하여 비정상적으로 성장하게 되는데, p16^{INK4a}, p53, RB 또는 P21^{WAF1}과 같은 세포주기 조절 유전자의 기능이 비활성화되거나 돌연변이를 일으키는 특징이 있다. 세포주기 조절 유전자의 기능적 비활성화는 Bmi-1 및 c-myc과 같은 종양 형성 마커를 과발현시키고 암의 진행을 가속화시키게 된다[18]. Jacobs 등은 myc의 비정상적인 신호에 의해 나타나는 세포주기 조절 유전자인 INK4a/AR의 발현을 Bmi-1가 하향 조절하여 Bmi-1과 c-myc의 협력 작용으로 종양 발생을 유도한다고 보고한 바 있다[20]. 본 연구에서는 REM134와 CF41.Mg를 이용하여 악성 종양 관련 특이마커들의 발현을 비교한 결과, REM134는 CF41.Mg에 비해 MDR, Bmi-1 및 c-myc의 높은 발현을 확인하였다.

E-cadherin 및 N-cadherin은 칼슘 의존성 세포 접착인자로써 세포간 부착을 유도하고 세포의 이동 및 종양의 전이에 관여한다. E-cadherin의 발현 감소는 세포간 유착의 감소로 이어져 세포의 이동을 유도하고 E-cadherin의 발현이 없는 전이성 종양 세포에서 N-cadherin은 발현되어 종양 세포의 이동 및 유착을 유도하는 것으로 알려져 있다[21]. Norval 등은[22] 동물실험 결과를 통해 REM134는 전이성이 없다고 보고하였고, Leonel 등은[23] CF41.Mg에서 E-cadherin의 낮은 발현과 N-cadherin의 높은 발현을 확인하여 전이성이 있다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 REM134와 CF41.Mg를 이용하여 E-cadherin 및 N-cadherin의 발현을 비교한 결과, REM134에 비해 CF41.Mg에서 E-cadherin 발현이 낮음을 확인하였으나, N-cadherin의 발현에서는 큰 차이가 없음을 확인하였다.

HER-2는 유선종양에서 종양의 성장, 생존 및 분화를 조절하는 매우 중요한 인자로 개 유선종양의 약 30%가 HER-2를 발현한다[12]. HER-2를 발현하는 종양 조직이 반드시 악성 종양이라고 할 수는 없지만 HER-2의 과발현은 종종 나쁜 예후를 나타낸다고 보고되어 있으며[12], 사람에서는 이미 여러 가지 HER-2 타겟 치료제(trastuzumab, pertuzumab 및 lapatinib 등)가 개발되어 유방암 치료제로 사용되고 있다[24]. 이러한 HER-2의 과발현은 종양억제인자인 p53의 돌연변이와 관련될 수 있다[25]. p53은 비정상적인 세포에서 세포사멸 기능을 갖는 핵 전사인자로서 사람 암의 50% 이상이 p53 유전자의 기능이 돌연변이를 갖거나 기능이 상실된 것으로 알려져 있다[26]. Román-Rosales 등은 p53의 돌연변이가 일어나지 않은 유방암 세포에서 HER-2의 낮은 발현을 보고한 바 있다[25]. NK세포는 NKG2D와 같은 리간드를 발현하여 변형된 세포들을 인식하고 제거하지만 종종 NK세포가 제거하지 못하는 암세포들이 존재하는데, Textor 등은 p53을 발현하는 세포에서 NK세포의 높은 활성화를 확인하였으며, 즉 p53의 기능이 보존되어 있을 때 NK세포 기반 면역 요법이 효과적으로 작용한다고 보고하였다[27]. 본 연구에서 CF41.Mg는 REM134에 비해 HER-2의 발현이 낮고 p53을 높게 발현하였다. 또한, NK세포의 표적세포에 대한 세포 독성 비교에서도 NK세포에 대하여 CF41.Mg는 REM134

에 비해 높은 세포 독성을 나타내어 NK세포에 민감하게 반응함을 확인하였다. 현재 REM134를 이용한 개 유선종양 연구가 다수이나, NK세포에 대한 항암 면역 요법 기초 연구에 있어서 CF41.Mg 또한 개 유선종양 연구에 유용할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산검역본부 연구사업(과제번호: B-1543083-2018-20-0102)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Korean Breast Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2018. Korean Breast Cancer Society, Seoul, 2018.
2. Baioni E, Scanziani E, Vincenti MC, Leschiera M, Bozzetta E, Pezzolato M, Desiato R, Bertolini S, Maurella C, Ru G. Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. BMC Vet Res 2017;13:203.
3. Moulton JE, Rosenblatt LS, Goldman M. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. Vet Pathol 1986;23:741-749.
4. Park JS, Withers SS, Modiano JF, Kent MS, Chen M, Luna JJ, Culp WT, Sparger EE, Rebhun RB, Monjazez AM, Murphy WJ, Canter RJ. Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human. J Immunother Cancer 2016;4:97.
5. Innes JR, Parry HB, Berger J. Leukaemia in dogs; including a record of a case treated by urethane. Br Vet J 1946;102:383-393.
6. Brick JO, Roenigk WJ, Wilson GP. Chemotherapy of malignant lymphoma in dogs and cats. J Am Vet Med Assoc 1968;153:47-52.
7. Addissie S, Klingemann H. Cellular immunotherapy of canine cancer. Vet Sci 2018;5:100.
8. Suen WC, Lee WY, Leung KT, Pan XH, Li G. Natural killer cell-based cancer immunotherapy: a review on 10 years completed clinical trials. Cancer Invest 2018;36:431-457.
9. Canter RJ, Grossenbacher SK, Foltz JA, Sturgill IR, Park JS, Luna JJ, Kent MS, Culp WT, Chen M, Modiano JF, Monjazez AM, Lee DA, Murphy WJ. Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial. J Immunother Cancer 2017;5:98.
10. Levitz SM, Dupont MP, Smail EH. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1994;62:194-202.
11. Huang YC, Hung SW, Jan TR, Liao KW, Cheng CH, Wang YS, Chu RM. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. J Leukoc Biol 2008;84:1501-1510.
12. Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. Acta Vet Scand 2018;60:66.
13. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. Transl Cancer Res 2015;4:256-269.
14. Michishita M, Akiyoshi R, Yoshimura H, Katsumoto T, Ichikawa H, Ohkusu-Tsukada K, Nakagawa T, Sasaki N, Takahashi K. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. Res Vet Sci 2011;91:254-260.
15. Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. In Vivo 2011;25:455-465.
16. Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E, Rijnberk A. Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. Endocrinology 1994;134:287-292.
17. Fanelli MA, Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Lucero De Angelis R, Ciocca DR. Estrogen receptors, progesterone receptors, and cell proliferation in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1996;37:217-228.
18. Pang LY, Argyle DJ. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. Biochim Biophys Acta 2009;1792:380-391.
19. Tume L, Paco K, Ubidia-Incio R, Moya J. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. Gac Mex Oncol 2016;15:22-30.
20. Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. Genes Dev 1999;13:2678-2690.
21. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. J Cell Biol 1999;147:631-644.
22. Norval M, Maingay J, Else RW. Studies of three canine mammary cell lines--II. In vivo properties. Eur J Cancer Clin Oncol 1984;20:1501-1508.
23. Leonel C, Borin TF, de Carvalho Ferreira L, Moschetta MG, Bajgelman MC, Vitoria-Petit AM, de Campos Zuccari DA. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition and metastasis by combined TGFbeta knockdown and metformin treatment in a canine mammary cancer xenograft model. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2017;22:27-41.
24. Jackisch C, Lammers P, Jacobs I. Evolving landscape of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer treatment and the future of biosimilars. Breast 2017;32:199-216.
25. Román-Rosales AA, García-Villa E, Herrera LA, Gariglio P, Díaz-Chávez J. Mutant p53 gain of function induces HER2 over-expression in cancer cells. BMC Cancer 2018;18:709.
26. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. Cancers (Basel) 2011;3:994-1013.
27. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. Cancer Res 2011;71:5998-6009.