

NK 세포의 세포독성을 증가시키는
새로운 물질과 그 유도체들의
항암효과 및 작용기전

연세대학교 대학원

의과학과

김 소 영

NK 세포의 세포독성을 증가시키는
새로운 물질과 그 유도체들의
항암효과 및 작용기전

지도교수 김 종 선

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

김 소 영

김소영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

지난 2년 동안 제게 이 연구를 할 수 있도록 기회를 주시고, 항상 올바른 연구의 길로 인도 해주신 김종선 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 부족한 석사 논문이 완성되기까지 많은 조언을 아끼지 않으신 김주향 교수님과 최인홍 교수님께도 감사 드립니다. 연세대학교 화학과 태진성 교수님께도 감사 드립니다. 그리고 부족한 저를 2년 동안 지켜 봐주신 김세종 교수님, 박전한 교수님, 조상래 교수님, 이봉기 교수님, 신전수 교수님, 이재면 교수님 감사합니다.

본 연구에 큰 도움을 주신 연세대학교 화학과의 양영근 선생님 감사합니다. 연구를 진행하는데 있어서 어떤 조언도 아끼지 않은 스승과 다름 없는 형란언니, 2년 이라는 시간이 짧게 느껴질 정도로 실험실 생활을 즐겁고 활기차게 해준 셋별언니, 작은 투정도 다 받아주고 항상 같이 고민해준 민경언니와 현주언니, 도움을 청할 때면 언제나 흔쾌히 나서 도와주신 영미 선생님, 선배로서 언니로서 보이지 않게 많은 도움을 준 영주언니, 항상 기분 좋게 웃어주는 상은언니, 언제나 열심히 하는 진원오빠, 항상 기분 좋게 신경 써주시는 김일휘 선생님, 고시환 선생님 모두 감사합니다.

힘들 때 고민을 들어주고 큰 힘이 되어준 혜현이와 미리언니,

자주 만나지 못해도 항상 옆에 있는 것처럼 힘이 되어주는 소중한 친구들 주아, 지희, 해영, 지현, 보람, 지혜, 수경, 근영, 민선언니, 존재만으로도 든든한 아영언니, 정은언니, 은주언니, 봉주, 힘든 시기에 같이 고민해준 현정언니, 말하지 않아도 언제나 내 기분을 알아주고, 오랫동안 내 옆에 있어준 11년 지기 친구 슬기와 동근이 모두 너무 감사합니다.

누나로서 많이 챙겨주지는 못하지만 하나밖에 없는 동생 동수 무엇이든 잘 해내길 바라고, 딸이라는 이유 하나로 항상 부족한 것 없이 무엇이든 다 해주시는 든든한 후원자이신 부모님 정말 사랑합니다.

지난 2년 이라는 시간은 잘 해내기 보다는 최선을 다해 열심히 하려고 노력한 시간이었습니다. 힘들었던 시간조차 즐거웠던 지난 2년 동안의 경험을 밑거름 삼아 끊임없이 욕심 내고 노력해서 기대이상의 것을 창출해내는 사람이 되겠습니다.

김소영

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	9
1. NK 세포 활성화 물질(NKAM)의 유도체 합성	9
2. NK 세포의 분리	9
3. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) 분리	10
4. 세포주 배양	10
5. Flow cytometric analysis	11
6. [³ H]-thymidine release assay (JAM test)	13
7. Non-radioactive cytotoxicity assay (LDH assay)	14
8. <i>In vitro</i> kinase assay	15
9. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)	16
10. Golgistop의 영향	18
III. 결과	20
1. Gö6983에 기반을 둔 유도체들의 합성	20

2. NKAM 처리에 의한 NK 세포 표면의 NCR 발현량 변화	22
3. NKAM 처리에 의한 NK 세포 표면의 death ligands 발현량 변화	27
4. NKAM 처리에 의한 NK 세포 내의 granzyme B와 perforin의 발현량 변화	30
5. NKAM의 적정 사용농도 및 NKAM의 작용 kinetics	34
6. 암 세포주와 정상세포에 대한 NKAM의 세포독성 확인	37
7. NKAM 처리에 의한 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성 변화	40
8. NKAM의 PKC- α 활성화 억제 효과	43
9. NKAM101 처리에 의한 NCR과 granzyme B, perforin, death ligands의 mRNA 발현량 변화	45
10. 골지체의 단백질 수송에 NKAM의 관여여부 확인	48
IV. 고찰	54
V. 결론	61
참고문헌	63
영문요약	70

그림 차례

그림 1. Gö6983 (NKAM101)을 포함하여 본 연구에서 합성하여 사용한 총 27종류의 NKAM	21
그림 2. NKAM 처리에 의한 NCR의 발현량 변화	24
그림 3. NKAM 처리에 의한 death ligands의 발현량 변화 .	28
그림 4. NKAM 처리에 의한 granzyme B와 perforin의 발현량 변화	32
그림 5. NKAM의 농도와 작용시간에 따른 효과 분석 . . .	36
그림 6. NKAM의 세포독성	39
그림 7. NKAM에 의해 활성화된 NK 세포의 세포독성 변화 . .	42
그림 8. NKAM에 의한 PKC- α 의 활성 억제	44

그림 9. NKAM101 처리 후 NCR, granzyme B, perforin, death ligands의 mRNA 발현량의 변화 47

그림 10. NKAM이 골지체의 기능에 관여하여 NCR의 발현량을 조절할 가능성 확인 50

그림 11. NKAM이 골지체의 기능에 관여하여 death ligands의 발현량을 조절할 가능성 확인 52

국문요약

NK 세포의 세포독성을 증가시키는 새로운 물질과 그 유도체들의 항암효과 및 작용기전

자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)는 바이러스에 감염된 세포나 종양세포에 대한 선천적 면역 작용에 중요한 역할을 하는 세포이다. 이러한 NK 세포의 활성화를 유도함으로써 세포독성을 증가시키는 새로운 물질을 발견하여 종양의 치료를 위한 새로운 면역 조절제 후보물질 개발에 기여하고자 본 연구를 시작하였다. 최근 우리 연구팀에서는 Gö6983이 NK 세포를 활성화시켜 암세포에 대한 세포독성을 증가시킨다는 사실을 밝혀냈다. 이러한 사실을 바탕으로 Gö6983보다 더 효과적으로 NK 세포의 활성화를 유도하는 물질을 찾아내기 위해 Gö6983을 포함, 총 27종류의 NK 세포 활성화 물질(NK cell activating molecule; NKAM) 유도체들을 합성하였다. 이들 NKAM 유도체를 NK 세포에 처리하여 NCR (natural cytotoxicity receptor)과 death ligands의 발현량을 확인 함으로써 NK 세포의 활성을 효과적으로 증가시키는

NKAM125, 126, 127을 선별하였다. 그 중에서도 가장 효과적인 것으로 생각되는 NKAM127을 NK 세포에 처리한 결과 NKAM101을 처리한 경우 보다 세포독성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 NKAM이 NK 세포의 활성을 유도하는 작용기전에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과 NKAM이 NCR의 세포 표면 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라 NCR mRNA의 발현도 어느 정도 증가시키는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 합성된 단백질의 세포 내 이동에 중요한 역할을 하는 골지체의 기능에도 NKAM이 관여하여 NCR과 death ligands의 발현량을 조절한다는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 총 27종류의 NKAM 유도체 물질 중 NKAM125, 126, 127이 NK 세포 활성화 유도효과가 가장 높아 종양의 치료를 위한 새로운 면역 조절제 후보물질로서의 가능성이 높다는 것을 밝혀내었고, 또한 이들 NKAM의 작용기전에 대한 이해를 도울 수 있는 기초연구 데이터를 수립하였다.

핵심 되는 말 : NK 세포, NCR, death ligand, granzyme B, perforin, 세포독성, 종양세포

NK 세포의 세포독성을 증가시키는 새로운 물질과
그 유도체들의 항암효과 및 작용기전

<지도교수 김종선>

연세대학교 대학원 의과학과

김 소 영

I. 서론

현재까지 암환자의 치료에는 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법 등이 수행되어져 왔다. 화학요법이나 방사선요법은 암세포뿐만 아니라 정상세포까지도 죽게 만드는 심각한 부작용으로 인해 많은 문제가 되어왔고, 수술은 암세포가 전이된 경우 완치가 어렵다는 문제점이 있다. 이로 인해 최근에는 암의 완치를 위해 이들 전통적인 암 치료법 이외에도 효과적인 면역요법의 개발이 필요한 상황이며, 면역기능의 활성화를 유도 함으로서 부작용이 없는 치료를 하고자 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 최근의 연구동향에 맞추어 면역세포를 활성화시키는 새로운 물질을 발견하여 부작용 없이 암을 치료할 수 있는 면역 조절제 후보물질 개발에 일조하고자

본 연구를 시작하였다.

자연살해세포(natural killer cell; NK 세포)는 골수로부터 유래되는 림프구의 일종으로 표면에 표지(marker)로서 CD16, CD56을 발현하고 있지만 CD3는 발현하고 있지 않다¹. NK 세포는 바이러스에 감염된 세포나 종양세포 등에 대해서 강력한 면역작용을 나타내는 대표적인 자연면역(innate immunity) 세포로 알려져 있다². NK 세포는 항원의 자극 없이도 표적세포를 죽이는 능력을 갖고 있으며^{3, 4}, 현재까지 다양한 연구를 통해 이들 NK 세포가 종양세포의 사멸을 유도하는 다양한 작용기전이 알려져 있다⁵.

NK 세포는 세포독성을 나타내는 다양한 granules를 세포 밖으로 분비하여 종양세포의 용해를 유도한다. NK 세포가 생성하여 분비하는 granule에 포함되어 있는 단백질 중 하나인 perforin은 종양세포의 세포막에 모여 집합체를 이루어 세포 표면에 일반적인 단백질이 모두 빠져나올 정도의 큰 구멍을 형성해 세포의 괴사를 유도한다⁶. NK 세포가 분비하는 granule에 포함되어 있는 또 다른 단백질인 granzyme은 perforin에 의해 생성된 종양세포 표면의 구멍을 통해 세포 내로 들어가 세포괴사를 유도하는 것으로 알려져 있다^{7, 8}.

NK 세포가 종양세포의 세포사를 유도하는 데에는 NK 세포

표면의 death ligand와 그에 특이적인 종양세포 표면의 수용체 (death receptor)간의 상호작용 또한 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 종양세포의 death receptor 중의 하나인 Fas와 NK 세포의 ligand인 FasL간의 상호작용, 종양세포의 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor (DR4, DR5)와 NK 세포의 ligand인 TRAIL간의 상호작용이 잘 알려져 있다⁹⁻¹¹. 종양세포 표면의 death receptor는 NK 세포 표면의 death ligand와 결합하여 세포 내로 특정 신호를 전달하고 이로 인해서 종양세포의 세포고사가 유도되는데, 종양세포의 death receptor에 NK 세포의 death ligand가 결합하게 되면 세포 내의 caspase-8, -10이 활성화되고 이로 인해 caspase-3, -7이 활성화되어 결과적으로 종양세포의 세포고사가 유도된다^{12, 13}.

NK 세포는 표면에 다양한 수용체를 발현하고 있다. 이들 수용체는 크게 NK 세포에 활성화 신호를 주는 활성화 수용체 (activating receptor)와 억제 신호를 주는 억제 수용체 (inhibitory receptor)로 나누어지고, NK 세포의 활성화는 이 두 종류의 수용체 사이의 균형에 의해 조절이 된다¹⁴. NK 세포의 활성화를 억제시키는 억제 수용체에는 CD94/NKG2A, B, KIR2DL과 Ly49A등이 있다¹⁵. 이들 억제 수용체에는 immunoreceptor tyrosine based inhibition

motif (ITIM)가 존재하고 있어 NK 세포의 활성화 억제 신호 전달에 중요한 작용을 한다^{16, 17}. 또한 NK 세포에 활성화 신호를 전달함으로써 여러 가지 독성 분자를 생성하도록 유도하여 표적세포에 대한 세포독성(cytotoxicity)을 증가시키는 역할을 하는 활성화 수용체에는 대표적으로 natural cytotoxicity receptors (NCRs), NKG2D와 2B4 등이 있는데, 이들 수용체 중에서도 NK 세포의 세포독성과 복잡한 관계가 있는 것으로 알려진 가장 중요한 수용체가 바로 NCR이다. 최근까지 밝혀진 NCR의 종류에는 NKp46, NKp44와 NKp30으로 알려진 NCR1, 2, 3가 있다¹⁸⁻²⁰. NKp46 (NCR1)과 NKp30 (NCR3)의 경우 활성화되지 않은 휴식상태의 NK 세포와 활성화된 NK 세포 모두에서 발현되어 있는 것으로 알려져 있지만, NKp44 (NCR2)의 경우 활성화된 NK 세포에서만 발현되어 있다고 알려져 있다^{21, 22}. NKp46의 extracellular domain은 2개의 C2-type Ig-like domain으로 이루어져 있고, intracellular domain은 CD3 ζ , Fc ϵ R I γ 와 결합되어 있다. 또한 NKp44의 extracellular domain은 1개의 Ig-like V domain으로 이루어져 있고, intracellular domain은 DAP12와 결합되어 있다. NKp30의 extracellular domain은 1개의 Ig-like V domain으로 이루어져 있고, intracellular domain은 CD3 ζ 와 결합되어 있다¹⁷. NCR에 의해 인식되는 ligand는 아직

밝혀지지 않은 상태이지만, NCR에 의해 신호가 전달되면 세포 내의 Syk 분자가 활성화되어 다양한 신호 전달 분자의 활성화를 유도한다. 이로 인해 ERK가 활성화되어 NK 세포의 세포독성을 증가시키며, 항종양효과를 나타내는 각종 cytokine의 분비를 촉진시킨다²³. NCR의 표면 발현량이 높은 NK 세포의 경우 발현량이 적은 경우에 비해 세포독성이 강해진다는 사실이 밝혀져 있어 NCR의 발현량은 NK 세포의 활성화 정도를 평가하는 척도로도 이용되고 있다^{21, 22, 24}. NK 세포가 종양세포를 인식하여 세포사멸을 유도하는 데는 이와 같이 다양한 분자들 간의 상호작용이 관여되어 있다.

단백질 인산화 효소 C (protein kinase C; PKC)는 단백질의 serine이나 threonine 부위를 인산화시키는 효소이다²⁵. 현재까지의 여러 연구결과를 통해서 다양한 PKC의 활성화는 NK 세포의 기능에 긍정적인 효과를 나타낸다는 사실이 밝혀져 있다²⁶⁻²⁸. PKC의 활성 억제제로는 Gö6976, Gö6983, Rottlerin, Bisindolylmaleimide III (Bis III)등이 알려져 있다²⁹⁻³¹. 최근 우리 연구팀에서는 PKC의 저해제로 알려져 있는 bisindolylmaleimide의 일종인 Gö6983이 NCR 발현량과 death ligands의 발현량을 효과적으로 증가 시키면서 NK 세포의 활성화를 유도한다는 사실을 밝혀냈다. 이러한 연구결과를 바탕으로 Gö6983보다 효과적으로 NK 세포의 활성화를

유도하여 더 뛰어난 항암효과를 기대할 수 있는 물질을 찾아내어 새로운 면역 조절제 후보물질 개발에 기여하고자 본 연구를 시작하였다.

본 연구를 위해 Gö6983의 화학적 구조를 바탕으로 하여 새롭게 총 26종류의 유도체를 연세대학교 화학과의 태진성 교수 연구팀에 의뢰하여 합성하였다. Gö6983을 비롯한 이들 유도체들은 NK 세포 활성화 물질(NK cell activating molecule; NKAM) 후보물질로서 이후 NKAM으로 약칭한다. 이들 NKAM을 각각 NK 세포에 처리하여 NK 세포 활성화의 지표가 되는 NCR, death ligands, granzyme B, perforin 발현량의 변화를 확인하여 NK 세포의 활성을 효과적으로 유도하는 NKAM을 선별하고, 실제로 이들 NKAM에 의해 활성화된 NK 세포가 종양세포를 보다 효과적으로 죽이는지 확인하고자 하였다. 그리고 이러한 연구결과를 종합적으로 분석하여 NK 세포의 활성화 유도효과가 뛰어난 특정 NKAM을 선별하여 새로운 면역 조절제 후보물질로서 제시하고자 하였다. 또한 NKAM이 NK 세포의 NCR과 death ligands의 발현량을 조절하여 활성화를 유도하는 작용기전에 대한 연구를 진행하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. NK 세포 활성화 물질(NKAM)의 유도체 합성

Gö6893을 포함, 총 27종류의 유도체들을 공동 연구팀인 연세대학교 화학과의 태진성 교수 연구팀에 의뢰하여 합성하였다. 기존에 보고된 bisindolylmaleimide 합성 방법^{32, 33}에 의거하여 이들 Gö6893 유도체들(이하 NKAM이라 통칭함)을 합성하였다.

2. NK 세포의 분리

NK 세포는 건강한 공여자로부터 혈액을 제공받아 RosetteSep NK enrichment antibody cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, B.C. Canada)을 이용하여 전혈에서 분리하였다. 혈액 1 mL당 RosetteSep NK enrichment cocktail을 50 μ L씩 섞어준 후 20 분간 상온에서 반응시켰다. 이 혈액과 2%의 우태아혈청(fetal bovine serum : FBS (GIBCO, Grand Island, N.Y. USA))이 포함된 인산 염 완충용액(PBS, pH 7.4)을 동량으로 섞어주어 2배 희석한 후, Ficoll-plaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)층 위에 올려 1600 rpm의 속도로 20 분간 원심 분리 하였다. 원심 분리된 NK 세포층을 따로 분리하여 2% FBS가 포함된 인산 염

완충용액을 이용하여 두 번 세척하였다. 이렇게 얻은 NK 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 media를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) 분리

PBMC는 건강한 공여자로부터 혈액을 제공받아 Ficoll-plaque를 이용하여 분리하였다. 혈액과 RPMI 1640 media를 동량으로 섞어주어 2배 희석한 후, Ficoll-plaque층 위에 올려 1600 rpm의 속도로 20 분간 원심 분리 하였다. 원심 분리된 PBMC층을 따로 분리하여 RPMI 1640 media를 이용하여 두 번 세척하였다. 이렇게 얻은 PBMC는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 media를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4. 세포주 배양

자궁 경부 암 세포주인 HeLa (ATCC CCL 13)는 10%의 FBS가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. HeLa는 NKAM 자체의 암세포에 대한 세포독성을 확인하는데 표적세포로 사용하였다. 간암 세포주인 Hep3B (ATCC HB8064)와 HepG2 (ATCC

HB8065)는 10%의 FBS가 포함된 MEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. Hep3B와 HepG2, HeLa 세 종류의 암 세포주는 NK 세포의 세포독성을 확인하는 실험의 표적세포로 사용하였다.

5. Flow cytometric analysis

NK 세포 표면의 NCR (NKp30, NKp44, NKp46)과 death ligands (TRAIL, FasL)의 발현량을 flow cytometric analysis를 통해 확인하였다. NKAM을 처리하여 5% CO₂, 37℃의 환경에서 24 시간 동안 배양한 NK 세포를 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 두 번 세척하였다. anti-NKp30, anti-NKp44, anti-NKp46 (Beckman Coulter Company, Marseille, France) 혹은 anti-human FasL, anti-human TRAIL (Bioregend, San Diego, CA, USA) 등의 항체를 각각 NK 세포에 처리하여 4℃에서 빛을 차단한 상태로 1 시간 동안 반응시킨 후 다시 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 세포를 두 번 세척하였다. 세포를 적정량의 인산 염 완충용액에 부유시킨 후 FACS calibur flow cytometer (Becton Dickinson Bioscience, Lincoln Park, NJ, USA)를 이용하여 각각의 NCR과 death ligands의 발현량을 비교, 분석하였다. 실험결과는 NKAM을

처리한 그룹의 대조군(아무것도 처리하지 않은 그룹)에 대한 비율로 나타내었다.

NK 세포 내부의 granule에 포함된 granzyme B와 perforin의 발현량을 확인하기 위해 역시 flow cytometric analysis를 수행하였다. 혈액으로부터 분리한 NK 세포에 Golgistop (protein transport inhibitor (containing monensin) - Becton Dickinson Bioscience)을 4 시간 동안 처리한 후 인산 염 완충용액을 이용하여 두 번 세척하였다. 이 NK 세포에 NKAM을 처리하여 5% CO₂, 37°C의 환경에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 NK 세포를 0.1%의 BSA (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)가 포함된 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 두 번 세척한 후 2%의 para-formaldehyde (Sigma)에 세포를 부유시켜 4°C의 빛을 차단한 환경에서 15 분간 배양 함으로서 세포를 고정시켰다. 그 후 다시 0.1%의 BSA가 포함된 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 두 번 세척한 후 0.1%의 saponin (Sigma)이 포함된 차가운 인산 염 완충용액에 세포를 부유시켜 4°C의 빛이 차단된 환경에서 15 분간 배양하였다. 0.1%의 BSA가 포함된 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 세포를 두 번 세척한 후 anti-granzyme B 혹은 anti-perforin (BD Bioscience) 항체를 각각 세포에 처리하여

4℃에서 빛을 차단한 상태로 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 0.1%의 BSA가 포함된 차가운 인산 염 완충용액을 이용하여 세포를 두 번 세척한 후 세포를 적정량의 0.1%의 BSA가 포함된 인산 염 완충용액에 부유시켜 FACS calibur flow cytometer (BD Bioscience)를 이용하여 세포 내부의 granzyme B와 perforin의 발현량을 분석하였다. 실험결과는 NKAM을 처리한 그룹의 대조군에 대한 비율로 나타내었다.

6. [³H]-thymidine release assay (JAM test)

[³H]-thymidine release assay (JAM test)를 통해서 NK 세포에 의한 암 세포주의 세포사를 측정하였다. 표적 암 세포주를 96-well plate에 분주하고 24 시간 배양하였다. 여기에 [³H]-thymidine (37 MBq/ml, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA)을 2 μ Ci/mL의 농도로 배지에 섞어주어 5% CO₂, 37℃의 환경에서 24 시간 동안 배양한 후 표적세포를 인산 염 완충용액을 이용하여 두 번 세척하였다. NKAM을 처리하여 5% CO₂, 37℃의 환경에서 4 시간 동안 배양한 NK 세포와 표적세포를 3:1의 비율에 맞춰 섞어주어 2 시간 동안 함께 배양한 후 96-well harvester를 이용하여 세포와 배지를 모두 glass fiber filter (size

90 · 120 mm; Wallac, Turkr, Finland)로 옮겼다. Filter를 여러 번 세척하고 말린 후 scintillator sheet (Meltilex, Wallac)를 녹여 filter를 코팅하였다. 그 후 1450 MicroBeta TriLux (PerkinElmer Life and Analytical Sciences)를 이용하여 방사능을 측정하였고, 표적세포의 세포사 백분율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포사 백분율} = (\text{control value} - \text{experimental value}) / \text{control value} \times 100$$

7. Non-radioactive cytotoxicity assay (LDH assay)

자궁 경부 암 세포주인 HeLa와 정상세포인 PBMC에 NKAM을 처리하고 8 시간 후 세포가 죽으면서 분비하는 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 측정하여 세포의 용해를 확인하였다. 먼저 HeLa 세포를 96-well plate에 분주하고 5% CO₂, 37°C의 환경에서 24 시간 동안 배양한 후, 인산 염 완충용액으로 세척하였다. Phenol red가 포함되어 있지 않은 새로운 배지로 교체해주면서 5 μM 농도의 NKAM을 처리하여 8 시간 동안 5% CO₂, 37°C의 환경에서 배양하였다. 그 후 50 μL의 배양액을 새로운 96-well plate에 옮겨 동량의 기질 혼합액을 잘 섞어주고 빛을 차단한 채 상온에서 30 분간 반응시킨 다음 동량의 정지액을 섞어주었다.

마지막으로 490 nm의 흡광도를 측정하였다. 이 실험에 사용한 기질 혼합액과 정지액은 Non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega corporation, Medison, WI, USA)에 포함되어 있는 것을 이용하였다. 다음으로 PBMC를 phenol red가 포함되어 있지 않은 배지에 부유시켜 96-well plate에 분주하고 5 μ M 농도의 NKAM을 처리하여, 8 시간 동안 5% CO₂, 37°C의 환경에서 배양하였다. 이후의 실험방법은 HeLa 세포를 이용한 실험방법과 동일하게 수행하였다. NKAM의 암세포와 정상세포에 대한 세포독성은 다음의 계산식으로 계산하였다.

NKAM 세포독성의 백분율 = {(experimental value - effector control value - negative control value)/(positive control value - negative control value)} \times 100

8. *in vitro* kinase assay

NKAM의 PKC 활성 억제능력을 측정하기 위해 *In vitro* kinase assay를 수행하여 NKAM 처리 후 PKC- α 에 의한 Histon H1의 인산화 정도를 측정하였다. 5 μ M의 NKAM, 10X reaction buffer (HEPES buffer) (GIBCO), 1 mg/mL의 Histon H1 (Upstate, Lake Placid, NY, USA), PKC lipid activator (Upstate), CaCl₂, 1.25 ng의

PKC- α active (Upstate, Temecula, CA, USA), dH₂O, 10 μ Ci의 [γ -³²P]ATP (PerkinElmer Life and Analytical Sciences), magnesium/ATP cocktail (Upstate)을 잘 섞어 30°C에서 30 분간 반응시켰다. 이 반응물을 P81 phosphocellulose squares (Upstate)에 떨어뜨린 후 잘 말린 다음 40 mL의 0.75% phosphoric acid (Duksan pure chemicals co, Korea)에 담근 후 5 분간 잘 흔들어 세척하였다. 이런 세척 과정을 세 번 반복한 후 40 mL의 acetone (Duksan pure chemicals co)에 P81 phosphocellulose squares를 옮겨 마찬가지로 잘 흔들어 5 분간 세척하였다. 세척과정이 끝난 P81 phosphocellulose squares를 잘 말린 후 mini poly-Q™ vial (Beckman instruments. INC, Fullerton, CA, USA)에 옮겨 여기에 scintillation cocktail (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA)을 6 mL 첨가하고 잘 섞어 준 후 LS6500 Liquid scintillation counter (Beckman coulter)를 이용하여 방사능을 측정하였다. PKC- α 의 활성은 다음의 계산식으로 계산하였다.

$$\text{PKC-}\alpha \text{ 활성} = \{(\text{experimental value} - \text{negative control value}) / (\text{positive control value} - \text{negative control value})\} \times 100$$

9. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법을 통해서 NKAM에 의해 활성화된 NK 세포의 NCR, granzyme B, perforin, death ligands mRNA 양의 변화를 분석하였다. NK 세포의 전체 RNA는 RNeasy Kit (Qiagen, Santa Clara, Calif. USA)를 이용하여 분리하였다. 분리한 RNA 1 μ g과 1 μ L의 random hexamer (Amersham Pharmacia Biotech), 4 μ L의 2.5 mM dNTPs를 섞어 65°C 조건에서 5 분간 반응시켰다. 이 반응물에 4 μ L의 5X first-strand buffer, 2 μ L의 0.1 M DTT를 섞어 25°C 조건에서 10 분, 37°C 조건에서 2 분간 반응시켰다. 마지막으로 1 μ L의 murine leukemia virus-reverse transcriptase (MMLV-RT; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 섞어 37°C 조건에서 50 분, 70°C 조건에서 15 분간 반응시켰다. 이와 같은 방법으로 RNA로부터 합성한 cDNA 2 μ L를 2 μ L의 10 pM sense primer, 2 μ L의 10 pM antisense primer, 14 μ L의 pure distilled water와 섞어주어 GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.)을 이용하여 증폭시켰다. PCR 생성물은 아가로스 젤(agarose gel) 전기영동을 통해서 그 양을 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 다음과 같다.

NKp30의 sense primer : 5'-ATCAATGAATTCATGGCCTGG

ATGCTGTTGCTCATC-3', antisense primer : 5'-GCCTTTAAGC
 TTCTAGGGACATCTGGGCTCTGGAATCAC-3'. NKp44의 sense
 primer : 5'-AGGCTCTCAGGCACAATCCA -3', antisense primer :
 5'-AGTTCTGTGGCTGTGAAGGGA-3'. NKp46의 sense primer :
 5'-TATACGGAATTCATGTCTTCCACACTCCCTGCC-3', anti-
 sense primer : 5'-GACACCAAGCTTTCAAAGAGTCTGTGTGTT
 CAGCCTTCT-3'. FasL의 sense primer : 5'-GCTCTTCCACCTA
 CAGAAGGA-3', antisense primer : 5'-GAGCTCAGATACGTTGA
 CATA-3'. TRAIL의 sense primer : 5'-CACATTGTCTTCTCCAA
 ACTC-3', antisense primer : 5'-GTCCATGTCTATCAAGTGCTC
 -3'. Granzyme B의 sense primer : 5'-ATGTCACCTTGGGGGCC
 ACA-3', antisense primer : 5'-TTTCGTCCATAGGAGACAATG
 -3'. Perforin의 sense primer : 5'-CGCCTACCTCAGGCTTATCT
 C-3', antisense primer : 5'-GGATGAAGGTCACCTCCAGCT-3'.

역전사 증합효소 연쇄반응의 결과물을 전기 영동한 결과는 TINA
 2.0 프로그램을 이용하여 수치화 시킨 후 비교 분석하였다.

10. Golgistop의 영향

NK 세포 내의 단백질 이동에 중요한 역할을 하는 골지체의

기능을 억제시키기 위해 단백질 수송 억제제 (Protein transport inhibitor) (BD Biosciences, GolgiStop™)를 이용하였다. 4×10^5 cells/mL의 NK 세포 6 mL당 Golgistop 4 μ L를 섞어주어 5% CO₂, 37°C의 환경에서 4 시간 동안 배양하였다. 인산 염 완충용액을 이용하여 세포를 두 번 세척하고, NKAM을 처리한 후 24 시간 동안 5% CO₂, 37°C의 환경에서 배양하였다. 그 후 Flow cytometric analysis를 통해서 NK 세포 표면의 NCR과 death ligands의 발현량의 변화를 관찰하였다. 실험결과는 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대한 비율로 나타내었다.

III. 결과

1. G6983에 기반을 둔 유도체들의 합성

G6983과 G6983의 구조를 변화시킨 새로운 물질 26종류를 연세대학교 화학과의 태진성 교수 연구팀에 의뢰하여 공동연구로 합성하였다. NK 세포 활성화 물질로 밝혀진 G6983을 NKAM101로 명명하고 새로 합성한 26종류의 유도체 물질은 각각 합성한 순서대로 NKAM102 ~ NKAM127로 명명하였다(그림 1).

NKAMs (NK cell Activating Molecules)

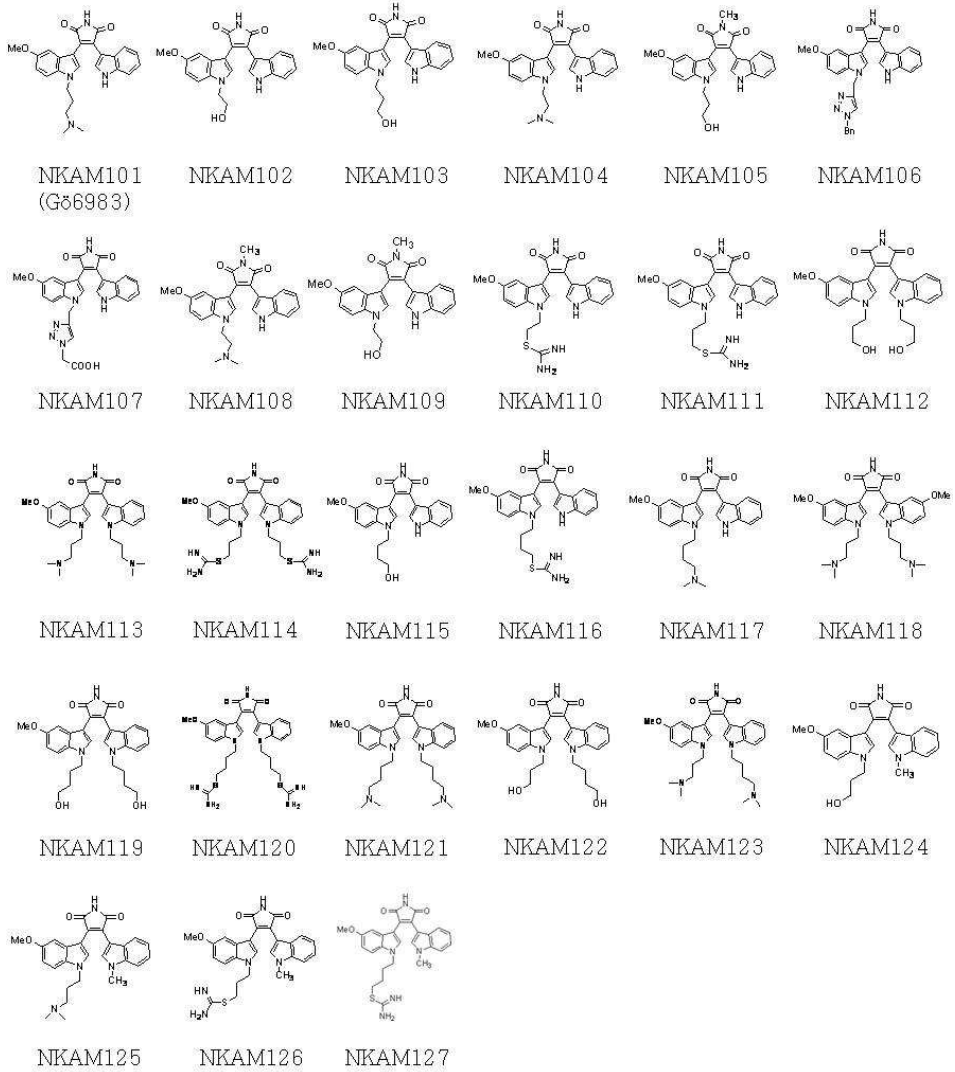


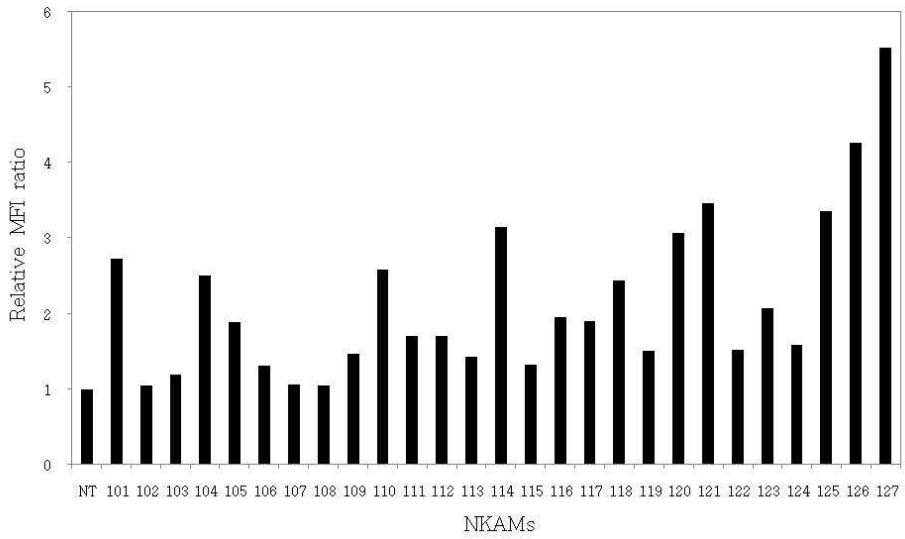
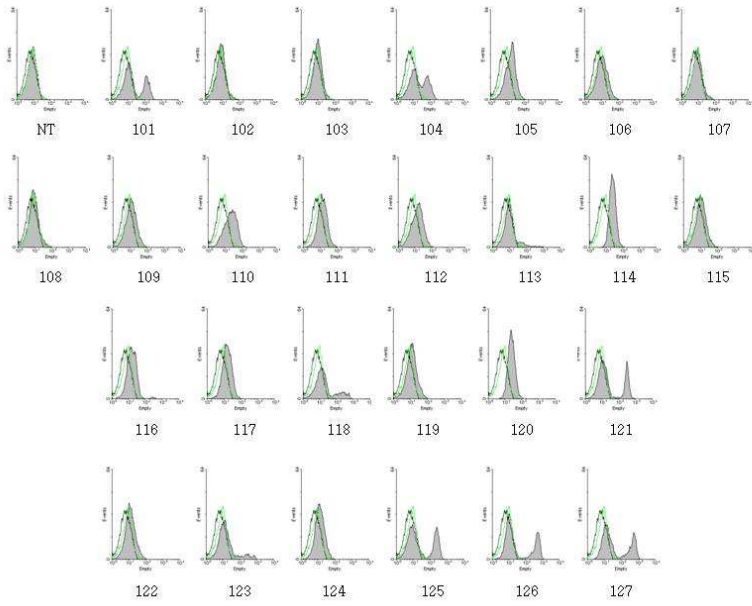
그림 1. Gö6983 (NKAM101)을 포함하여 본 연구에서 합성하여 사용한 총 27종류의 NKAM.

2. NKAM 처리에 의한 NK 세포 표면의 NCR 발현량 변화

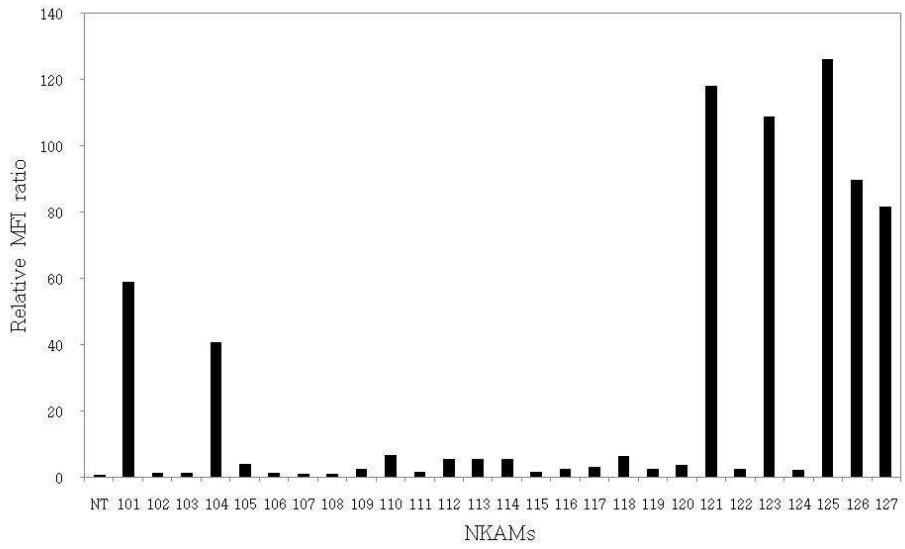
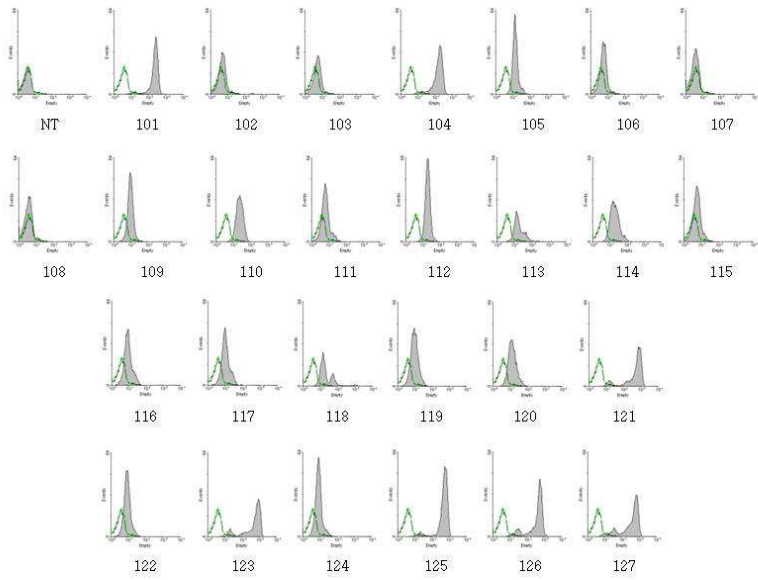
우리 연구팀에서 최근에 밝혀낸 G66983 (NKAM101)이 NCR의 표면 발현량을 증가시킨다는 사실을 바탕으로 27종류의 NKAM이 NK 세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하여 G66983보다 더 효과적인 물질을 선별하기 위한 연구를 진행하였다. NK 세포에 5 μ M 농도의 NKAM을 각각 24 시간 동안 처리한 후 NKAM101 처리에 의한 세포 표면 NCR 발현량의 변화와 다른 NKAM 처리에 의한 NCR 발현량의 변화를 확인하여 아무것도 처리하지 않은 NK 세포의 NCR 발현량과 비교해 보았다. 그 결과 NKAM101은 NKp30 (NCR3)의 발현량을 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 2.7배 증가시켰으며 다른 NKAM 중에 NKAM101보다 효과적으로 NKp30의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것은 NKAM114 (3.1배 증가), 120 (3.1배 증가), 121 (3.5배 증가), 125 (3.4배 증가), 126 (4.3배 증가), 127 (5.5배 증가)인 것으로 나타났다(그림 2a). 또한 NKAM101은 NKp44 (NCR2)의 발현량을 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 58.9배 증가시켰으며 다른 NKAM 중에 NKAM101보다 효과적으로 NKp44의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것은 NKAM121 (118배 증가), 123 (108.7배 증가), 125 (125.9배 증가), 126 (89.8배 증가), 127 (81.6배 증가)인 것으로 나타났다(그림

2b). NKAM101은 NKp46 (NCR1)의 발현량을 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 4.4배 증가시켰으며 NKAM101보다 효과적으로 NKp46의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것은 NKAM121 (8.5배 증가), 125 (9.5배 증가), 126 (11배 증가), 127 (11.3배 증가)인 것으로 나타났다(그림 2c). 이 결과를 통해 NKAM121, 125, 126, 127이 NKAM101보다 효과적으로 NCR의 전체적인 세포 표면 발현량을 증가시키는 물질임을 확인할 수 있었다.

(a)



(b)



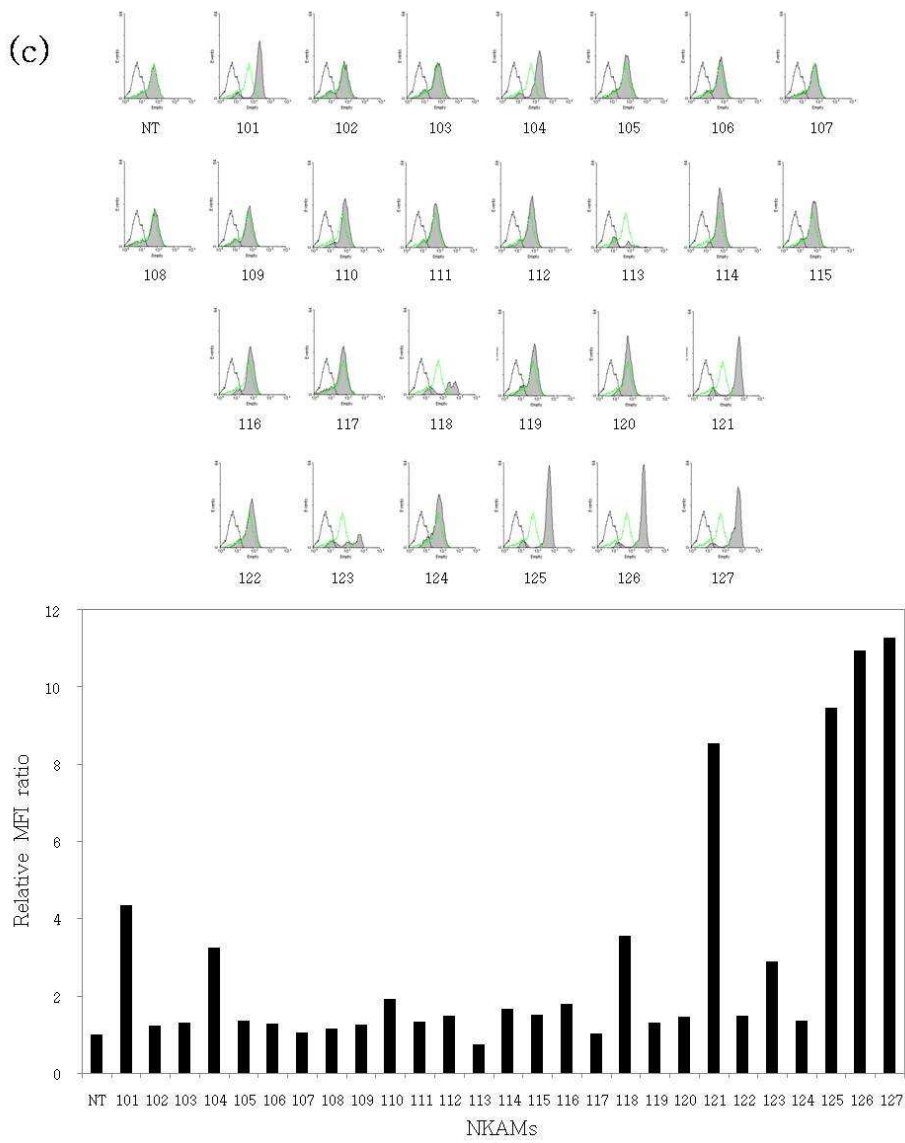
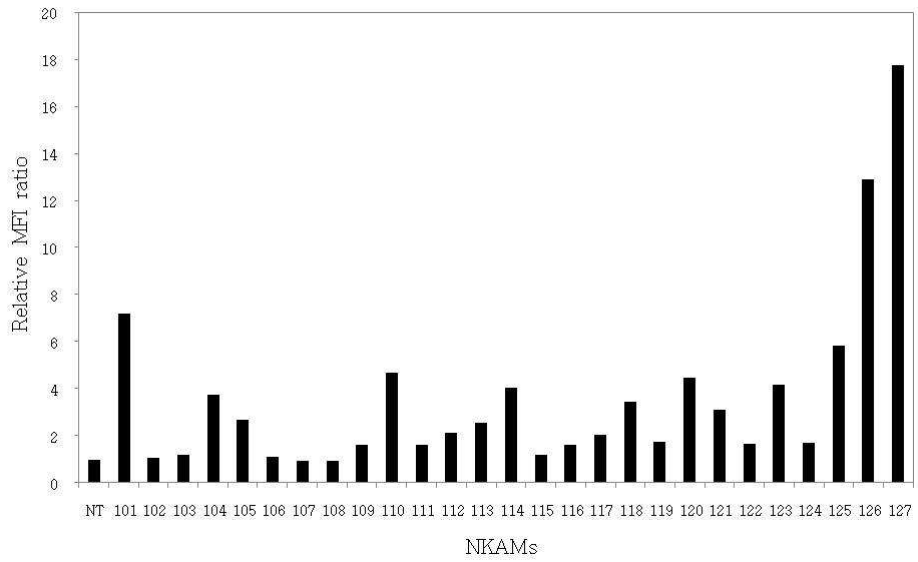
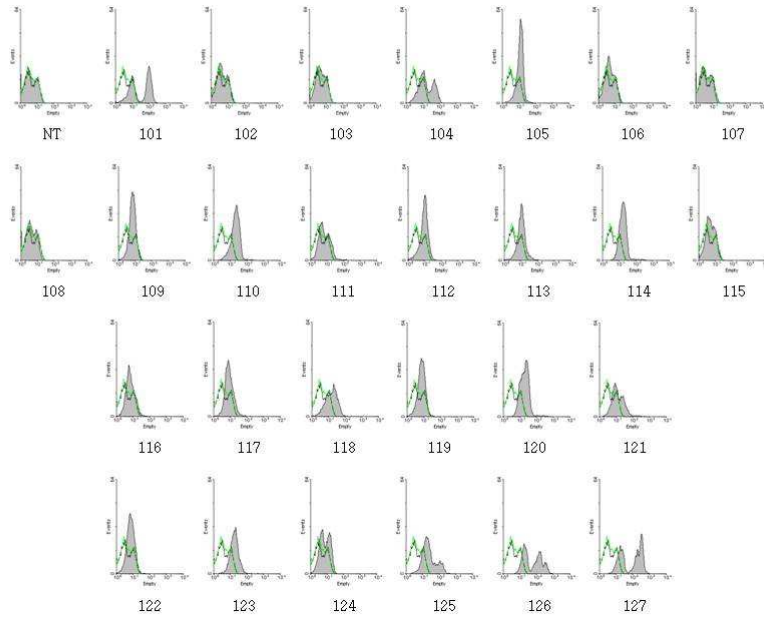


그림 2. NKAM 처리에 의한 NCR의 발현량 변화. (a) NKp30 (NCR3), (b) NKp44 (NCR2), (c) NKp46 (NCR1)의 flow cytometry 결과를 histogram (위 그림)과 relative MFI ratio (아래 막대그래프)로 나타냈다. (NT; no treat, 검은색 실선; isotype control, 회색 실선; 아무것도 처리하지 않은 대조군의 NCR 발현량, 채워진 부분; NCR 발현량)

3. NKAM 처리에 의한 NK 세포 표면의 death ligands 발현량 변화

27종류의 NKAM 중에서 NK 세포의 death ligands 표면 발현량을 증가시켜 효과적으로 세포독성을 증가시킬 것으로 기대되는 물질을 선별하기 위한 연구를 진행하였다. NK 세포에 5 μ M 농도의 NKAM을 각각 24 시간 동안 처리한 후 death ligands 발현량의 변화를 확인하고 아무것도 처리하지 않은 NK 세포의 death ligands 발현량과 비교하였다. 그 결과 NKAM 중 NKAM101은 FasL의 발현량을 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 7.2배 증가시켰는데 NKAM101보다 효과적으로 FasL의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것은 NKAM126 (12.9배 증가), 127 (17.8배 증가)인 것으로 나타났다(그림 3a). NKAM101은 또한 TRAIL의 발현량을 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 56배 증가시켰는데 NKAM101보다 효과적으로 TRAIL의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것은 NKAM125 (149.2배 증가), 126 (105.3배 증가), 127 (109.8배 증가)인 것으로 나타났다(그림 3b). 이 결과를 통해서 NKAM125, 126, 127이 NKAM101보다 효과적으로 death ligands의 표면 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었고, 이 세 종류의 NKAM이 NK 세포의 세포독성을 증가시킬 것으로 기대할 수 있었다.

(a)



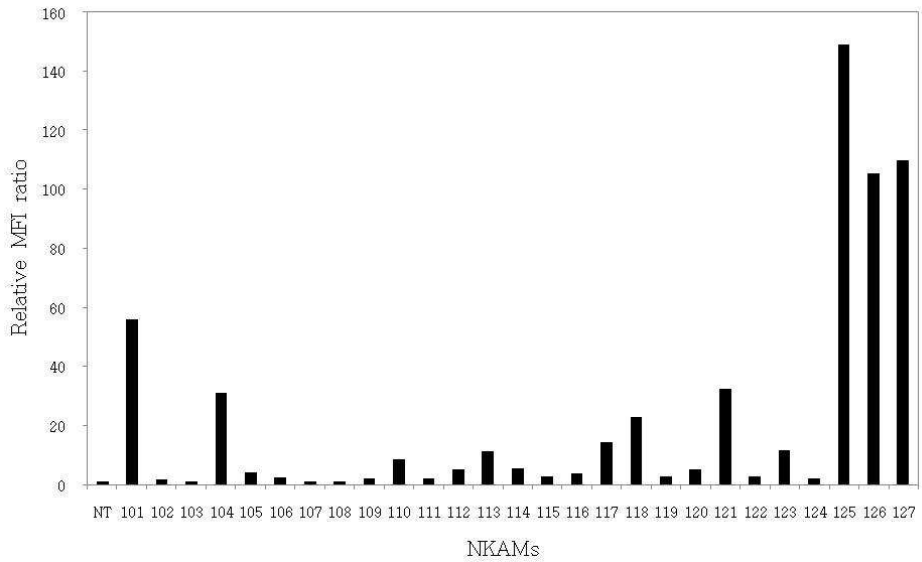
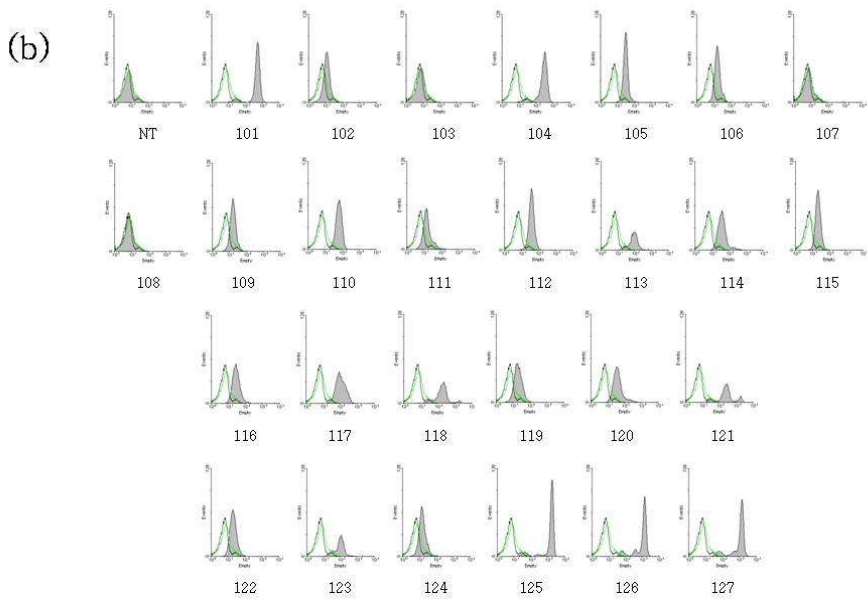


그림 3. NKAM 처리에 의한 death ligands의 발현량 변화. (a) FasL와 (b) TRAIL의 flow cytometry 결과를 histogram (위 그림)과 relative MFI ratio (아래 막대그래프)로 나타냈다.

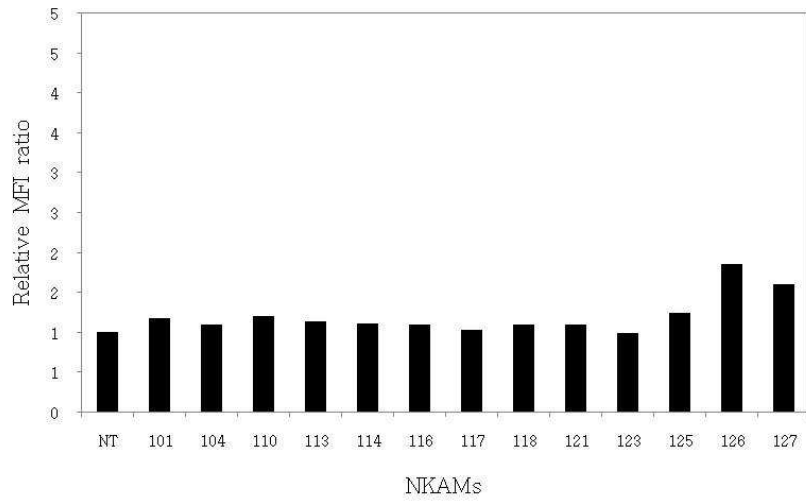
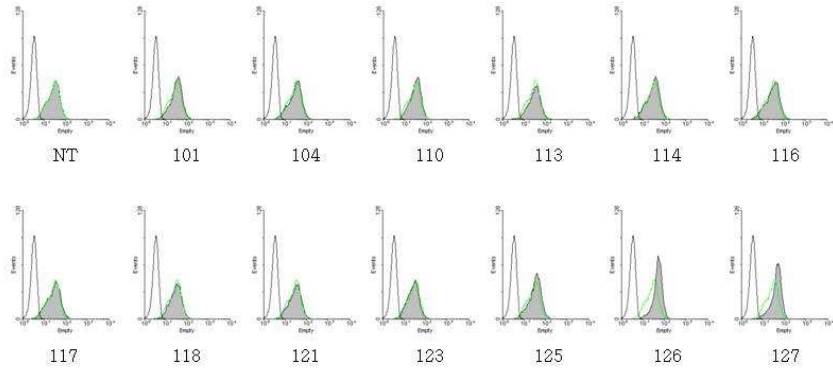
4. NKAM 처리에 의한 NK 세포 내의 granzyme B와 perforin의 발현량 변화

NKAM이 NK 세포 내 세포독성 물질인 granzyme B와 perforin의 발현량의 변화에 미치는 영향을 확인해보고, NCR과 death ligands의 발현량 변화를 확인한 결과와 함께 비교하여 효과적으로 NK 세포의 활성화를 유도하는 물질을 선별하고자 다음 연구를 수행하였다. 지금까지의 연구결과를 통해 NCR 발현량과 death ligands 발현량을 증가시키는 것으로 확인된 몇 가지 NKAM (NKAM101, 104, 110, 113, 114, 116, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 127)을 NK 세포에 처리하여 granzyme B와 perforin의 발현량 변화를 관찰하기 위해 intracellular FACS를 수행하였다. NKAM101을 처리하였을 때 granzyme B의 발현량과 비교, 관찰해 본 결과 NKAM125, 126, 127을 처리했을 때 granzyme B의 발현량이 약간 증가하는 것 같지만 전체적으로 눈에 띄는 변화를 관찰할 수는 없었다(그림 4a). perforin의 경우 granzyme B에 비해 약간의 큰 변화를 관찰할 수 있었는데 NKAM104, 110, 125, 126, 127을 처리했을 때 NKAM101을 처리했을 때와 비교하여 그 발현량이 조금 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4b). 하지만 두 세포독성 물질 모두 NCR과 death ligands의 발현량 변화와 비교해

보았을 때 큰 변화가 없는 것을 볼 수 있다. 이 결과를 통해 NKAM이 NK 세포의 granzyme B와 perforin의 발현량에는 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

지금까지의 결과를 통해 총 27종류의 NKAM 중 효과적으로 NCR과 death ligands의 발현량을 증가시키는 몇 가지 NKAM (NKAM101, 104, 110, 113, 114, 116, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 127)을 선별할 수 있었다. 그리고 그 중에서도 NKAM101보다 효과적으로 NCR과 death ligands의 발현량을 증가시켜 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성을 증가시킬 것으로 기대되는 물질로 NKAM125, 126, 127을 선별할 수 있었다.

(a)



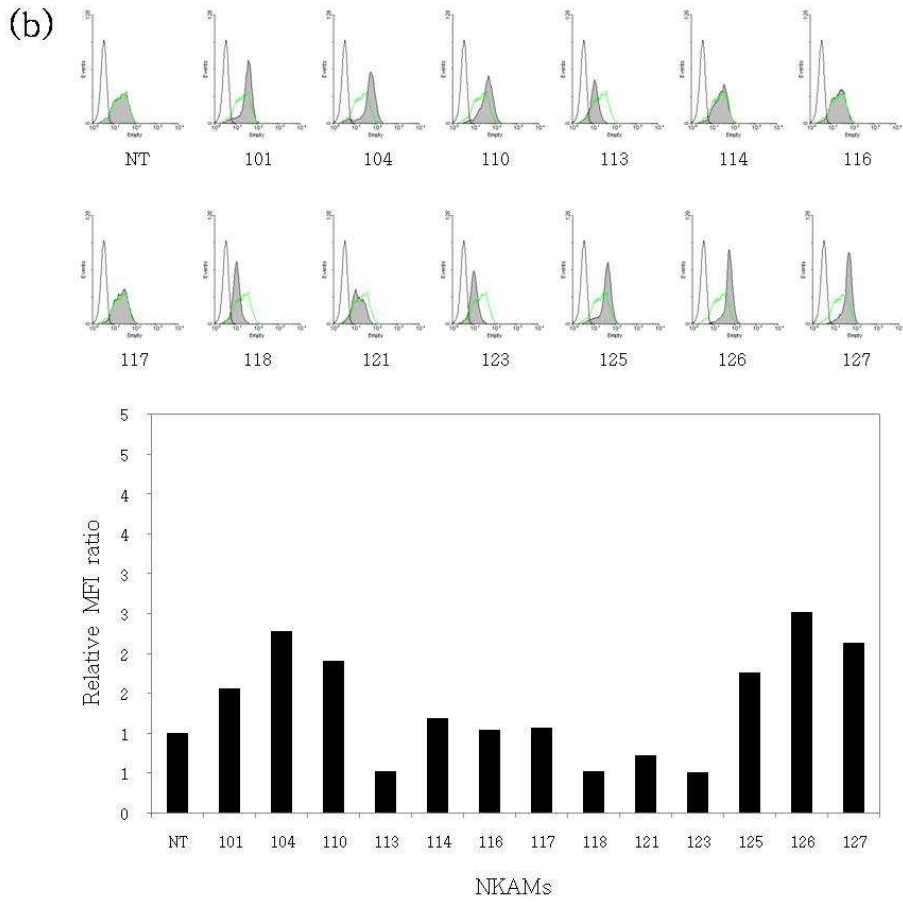


그림 4. NKAM 처리에 의한 granzyme B와 perforin의 발현량 변화. (a) granzyme B와 (b) perforin의 flow cytometry 결과를 histogram (위 그림)과 relative MFI ratio (아래 막대그래프)로 나타냈다.

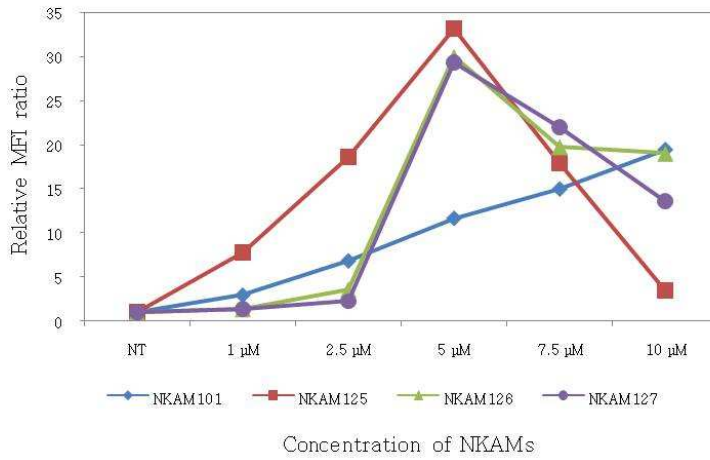
5. NKAM의 적정 사용농도 및 NKAM의 작용 kinetics

NKAM을 NK 세포에 처리하였을 때 세포의 활성을 효과적으로 유도하면서 side effect를 유발하지 않는 적정 농도를 확인하기 위해 세포에 서로 다른 농도의 NKAM을 처리한 후 NCR의 발현량을 비교해 보았다. NK 세포에 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M 농도의 NKAM101, 125, 126, 127을 각각 24 시간 동안 처리한 후 NKp30의 세포 표면 발현량을 확인해 보았다. 그 결과 NKAM101을 처리한 경우 그 농도가 높아질수록 NK 세포 표면의 NKp30 발현량이 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 NKAM125를 처리한 경우 5 μ M의 농도까지는 NKp30의 발현량이 점차 증가하다가 그 이상의 고농도에서는 NKp30의 발현량이 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었다. NKAM126, 127을 처리한 경우 저농도에서는 NKp30의 발현량에 별다른 변화가 없지만 5 μ M의 농도에서 NKp30의 발현량이 효과적으로 증가되며 그 이상의 고농도에서는 오히려 NKp30의 발현량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(그림 5a). 이 결과를 통해 NKAM101의 경우는 고농도일수록 보다 더 효과적이지만 NKAM125, 126, 127의 경우는 5 μ M이 사용하기에 가장 적절한 농도라는 것을 확인할 수 있었다.

또한 NK 세포의 활성이 증가되는 반응이 NKAM을 처리한 후

초기에 빠르게 유도되는 현상인지 후기에 천천히 유도되는 현상인지 확인해 보기 위해 NKAM 처리 후 시간 별로 NCR의 발현량을 비교해 보았다. 5 μ M의 농도로 NKAM을 NK 세포에 처리한 후 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 12 시간 후 각각의 NKp30의 발현량을 확인해보았다. 그 결과 4종류의 NKAM (NKAM101, 125, 126, 127)모두 세포에 처리한 후 1-2 시간 내에 NKp30의 발현량이 빠르게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(그림 5b). 이 결과를 통해 NKAM에 의한 NK 세포의 활성화 유도 현상이 1-2 시간 내에 일어나는 비교적 빠른 반응에 속한다는 것을 확인할 수 있었다.

(a)



(b)

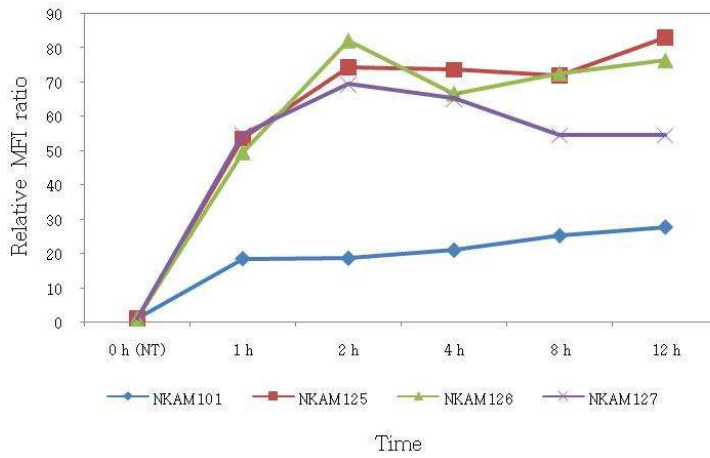


그림 5. NKAM의 농도와 작용시간에 따른 효과 분석. (a) 각각 다른 농도의 NKAM을 24 시간 동안 세포에 처리한 후 NKp30의 발현량을 flow cytometry로 확인하였다. (b) 5 μ M 농도의 NKAM을 각각 처리시간을 달리하여 NKp30의 발현량을 flow cytometry로 확인하였다.

6. 암 세포주와 정상세포에 대한 NKAM의 세포독성 확인

NKAM을 처리하여 활성화를 유도한 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성을 확인하는 연구에 앞서 NKAM 자체의 종양세포에 대한 독성을 확인하는 실험을 수행하였다. 자궁 경부 암 세포주인 HeLa 세포에 NK 세포의 활성을 유도하는 NKAM (NKAM101, 104, 110, 113, 114, 116, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 127)을 5 μ M 농도로 8 시간 동안 각각 처리한 후 세포가 죽으면서 분비하는 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 측정하여 NKAM에 의한 HeLa 세포의 용해를 확인하였다. 그 결과 5 μ M 농도의 NKAM은 HeLa 세포의 용해를 거의 유발하지 않는 것을 확인할 수 있었다(그림 6a). 이 결과를 통해 5 μ M 농도의 NKAM은 종양세포를 죽이는 독성을 갖지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 NKAM이 정상세포에 대해 독성을 나타낸다면 새로운 면역 조절제 후보물질로 이용할 수 없기 때문에 NKAM 자체의 정상세포에 대한 세포독성을 확인하는 실험을 수행하였다. 혈액에서 분리한 PBMC에 5 μ M 농도의 NKAM (NKAM101, 104, 110, 113, 114, 116, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 127)을 8 시간 동안 각각 처리한 후 세포가 죽으면서 분비하는 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 측정하여 NKAM에 의한 PBMC의 용해를 확인하였다.

그 결과 NKAM 처리에 의해 PBMC의 용해가 거의 유도되지 않는 것을 확인할 수 있었다(그림 6b). 이 결과를 통해서 5 μ M 농도의 NKAM은 일반적인 세포에 대한 독성을 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

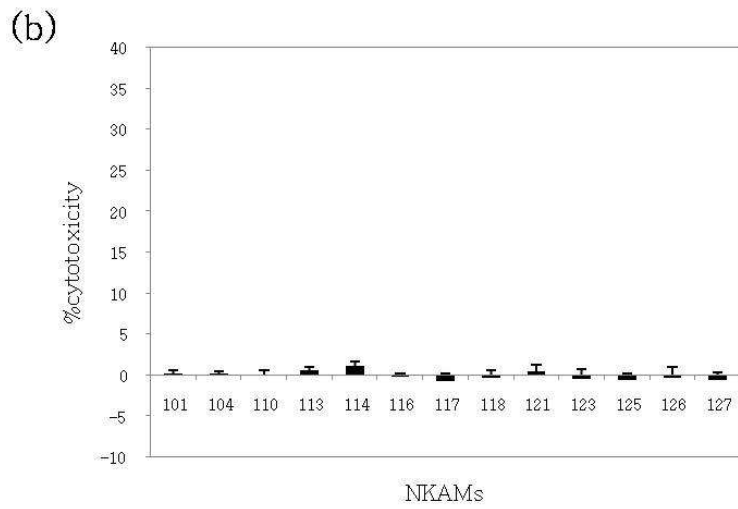
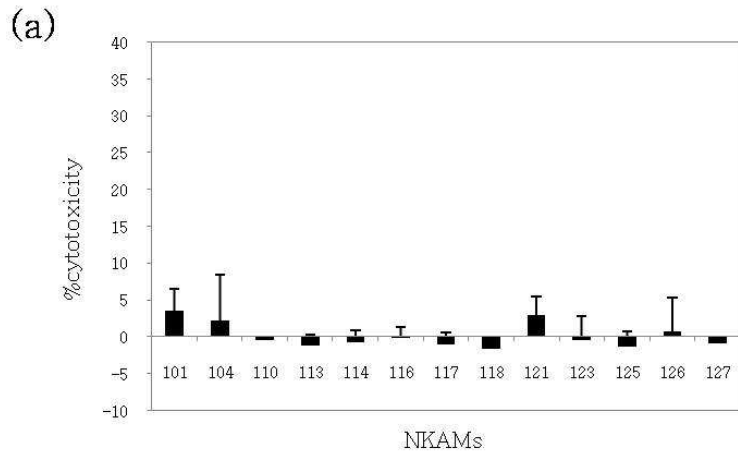


그림 6. NKAM의 세포독성. (a) HeLa 세포와 (b) PBMC에 5 μ M 농도의 NKAM을 8 시간 처리한 후 유도되는 세포의 용해를 LDH assay를 통해 확인하였다.

7. NKAM 처리에 의한 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성 변화

지금까지 세포 표면의 NCR과 death ligands, granzyme B, perforin의 발현량을 확인 함으로서 NKAM101 (Gö6983)보다 효과적으로 NK 세포를 활성화시키고 세포독성을 증가시킬 것으로 예상되는 새로운 물질로 NKAM125, 126, 127 이 세가지 NKAM을 선별할 수 있었다. 지금까지의 결과를 바탕으로 하여 실제로 이들 NKAM 처리에 의해 활성화된 NK 세포의 표적세포에 대한 세포독성이 NKAM101을 처리한 경우에 비해 증가하는지 확인해보고자 하였다. NK 세포에 NKAM101과 26종류의 NKAM 중 그 효과가 가장 뛰어날 것으로 기대되는 NKAM127을 처리한 후 표적세포와 함께 배양하여 표적세포의 세포사가 얼마나 강하게 유도되는가를 JAM test를 통해 확인해 보았다. 그 결과 아무것도 처리하지 않은 NK 세포에 비해 NKAM101을 처리한 NK 세포의 표적세포 세포사 유도능력이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 NKAM127을 처리한 NK 세포의 경우 NKAM101을 처리한 경우에 비해 표적세포 세포사 유도능력이 더 증가됨을 확인할 수 있었다(그림 7). NKAM101과 127에 의한 세포독성의 증가 현상은 HepG2, Hep3B, HeLa 세 종류의 표적세포를 사용한 모든 경우에서 동일하게 나타났다. 이 결과를 통해 NKAM127 처리에 의해 NCR과

death ligands의 발현량이 증가된 NK 세포는 실제로 종양세포의 세포사를 NKAM101 보다 강하게 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

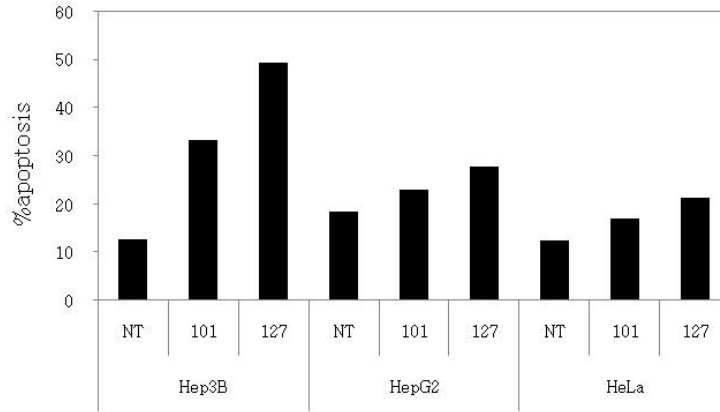


그림 7. NKAM에 의해 활성화된 NK 세포의 세포독성 변화. NKAM101과 127을 처리한 NK 세포의 표적 암세포(Hep3B, HepG2, HeLa)에 대한 세포독성을 JAM test를 통해 확인하였다. (NK 세포와 표적세포의 비율 = 3:1)

8. NKAM의 PKC- α 활성 억제 효과

앞선 우리 연구팀의 연구결과에 따르면 NKAM101 (Gö6983)의 경우 PKC 활성 억제제 임에도 불구하고 NK 세포의 활성을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 새로 합성한 26종류의 NKAM이 NKAM101의 유도체라는 사실을 바탕으로, NK 세포의 활성화를 효과적으로 유도하는 NKAM125, 126, 127 역시도 PKC의 활성을 억제시키는 물질인지 확인해 보기 위해 NKAM을 처리한 후 PKC- α 에 의한 Histone H1의 인산화 정도를 비교해보았다. 그 결과 NKAM101과 마찬가지로 NKAM125, 126, 127 모두 평균 80%정도 PKC- α 의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(그림 8). 이 결과를 통해 NKAM이 PKC의 활성을 억제시킴에도 불구하고 NK 세포의 활성화를 유도하는 작용기전에 대한 보다 심도 깊은 연구의 필요성을 느끼게 되었다.

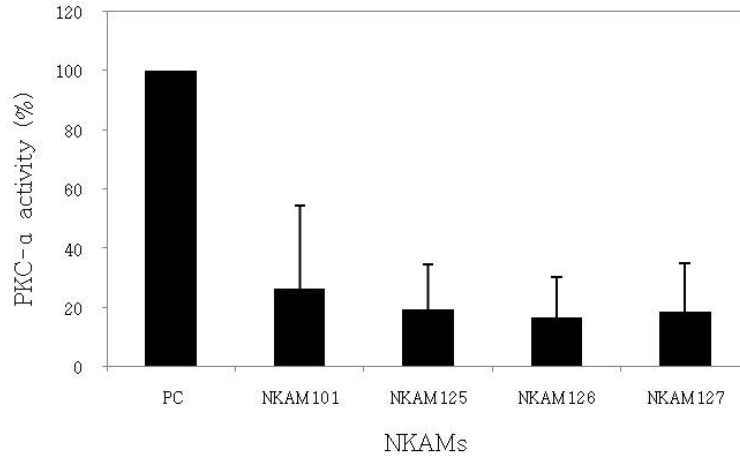


그림 8. NKAM에 의한 PKC- α 의 활성 억제. Histon H1이 인산화되는 정도를 측정하여 PKC- α 의 활성을 확인하였다. NKAM을 처리하지 않은 상태(PC)에서의 PKC- α 활성을 100%로 고정했을 때 NKAM 처리에 의해 변화된 PKC- α 의 활성값을 나타냈다. (PC; positive control)

9. NKAM101 처리에 의한 NCR과 granzyme B, perforin, death ligands의 mRNA 발현량 변화

NK 세포의 활성화와 세포독성을 Gö6983보다 효과적으로 증가시키는 NKAM을 선별하는 연구와 병행하여 NKAM의 작용기전을 밝혀내는 연구가 필요하였다. 이러한 목적으로 NKAM 처리에 의해 NCR과 death ligands의 발현량이 증가되는 작용기전에 대한 연구를 진행하였다. NKAM이 NK 세포에 작용하여 NCR과 death ligands의 발현량을 증가시키는 조절 작용을 두 단계로 나누어서 생각해 볼 수 있다. 먼저 DNA로부터 단백질이 합성되는 과정 중 mRNA의 발현량을 증가시켜 단백질의 합성량을 증가시키는 단계가 있고, 그 다음으로 단백질의 합성과정 이후 세포 내에서 세포 표면으로 발현되기까지의 과정을 조절하는 단계를 생각해 볼 수 있다. 우선 NKAM이 NK 세포에 작용하여 표면 발현 단백질의 유전자 발현량을 증가시켜 결과적으로 표면 발현량을 증가시키는지 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 mRNA의 발현량을 비교해보았다.

역전사 중합효소 연쇄반응의 결과물을 전기 영동한 결과(그림 9a)를 TINA2.0 프로그램을 이용하여 수치화(그림 9b) 한 후 분석하였다. NCR의 경우 NKAM101을 처리한 경우 2배 정도

mRNA의 발현량이 증가하였다. 하지만 granzyme B와 perforin의 경우는 별다른 변화가 없었고, death ligands의 경우 약간 증가하기는 했지만 큰 변화는 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 NKAM이 NCR의 유전자 발현을 증가시켜 단백질 합성을 어느 정도 조절하지만 death ligands의 유전자 발현에는 크게 관여하지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다. 중요한 것은 NCR의 표면 발현량의 변화에 비해 증가되는 mRNA의 발현량이 훨씬 적다는 사실이다. 이러한 결과로 보아 NKAM이 단백질의 유전자 발현 과정에 일부 관여하기는 하지만, 그보다 단백질의 합성 이후, 세포 표면으로 발현되는 과정에 더 많이 관여하여 조절할 것이라고 생각할 수 있다.

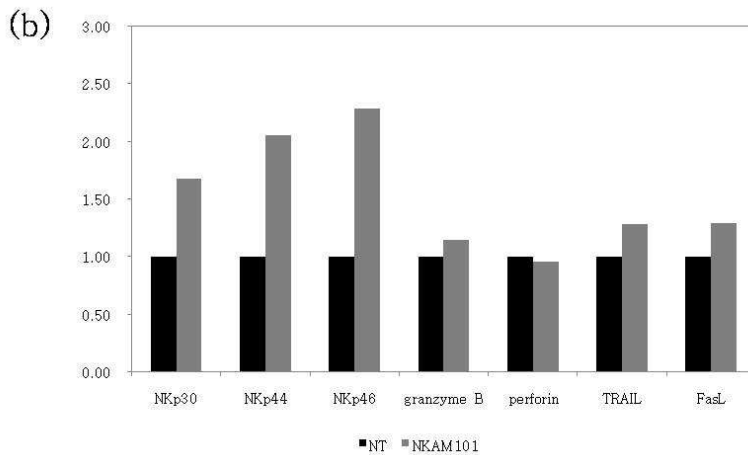
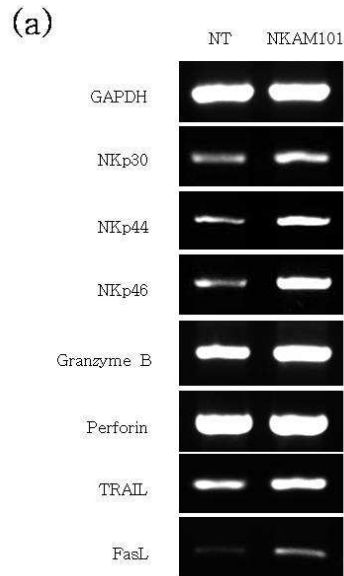


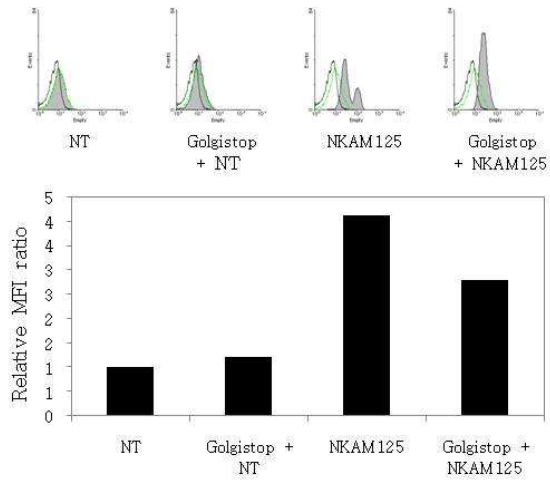
그림 9. NKAM101 처리 후 NCR, granzyme B, perforin, death ligands의 mRNA 발현량의 변화. (a) 분리한 mRNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후, RT-PCR을 통해 증폭시킨 cDNA를 전기 영동한 결과와 (b) 그 결과를 TINA2.0을 이용하여 수치화시킨 결과로 나타냈다. (NKAM을 처리하지 않은 경우의 mRNA 발현량에 대한 비율로 나타냈다.)

10. 골지체의 단백질 수송에 NKAM의 관여여부 확인

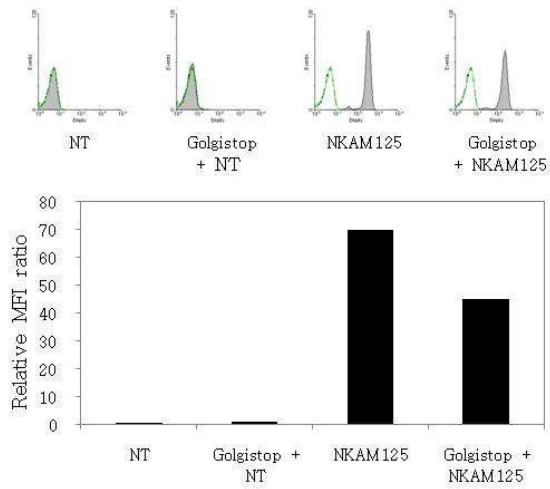
세포 표면에 발현되는 수용체와 세포 밖으로 분비되는 분비 단백질은 핵 내의 DNA로부터 합성되어 ER에서 빠져 나와 골지체를 통해 세포 표면으로 이동하는 것으로 알려져 있다³⁴. 이런 사실을 바탕으로 NKAM이 골지체의 단백질 수송능력을 활성화시켜 단백질의 세포 표면 발현량을 증가시키는지 확인해보기 위해 Golgistop을 이용한 실험을 수행하였다. NK 세포에 Golgistop을 처리하여 골지체의 기능을 억제시킨 후 NKAM을 처리하였을 때 수용체의 표면 발현량이 Golgistop을 처리하지 않고 NKAM만을 처리한 경우와 비교하여 변화가 없다면 NKAM이 골지체의 기능에 전혀 관여하지 않는다고 말할 수 있다. 반면 NK 세포에 Golgistop을 처리한 후 NKAM을 처리하였을 때 수용체의 표면 발현량이 얼마나 억제되는가를 통해 NKAM이 골지체의 기능에 얼마나 관여하는지를 확인할 수 있다. Golgistop을 이용하여 골지체의 기능을 억제시킨 후 NKAM125를 처리하였을 때 NKp30의 경우 그 발현량이 32.3% 감소되는 것을 확인할 수 있었고(그림 10a), NKp44의 경우 35.7% (그림 10b), NKp46의 경우 28.6% 감소되는 것을 확인할 수 있었다(그림 10c). Golgistop을 이용하여 골지체의 기능을 억제시킨 후 NKAM101을 처리하였을 때 death ligand인 TRAIL의 경우 그

발현량이 40% 감소되는 것을 확인할 수 있었고(그림 11a), FasL의 경우 39.6% 감소되는 것을 확인할 수 있었다(그림 11b). 이 결과를 통해 NKAM이 골지체의 단백질 수송기능에 어느 정도 관여하여 세포 표면 수용체의 발현량을 조절한다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 Golgistop 처리에도 불구하고 NCR과 death ligands의 발현량이 NKAM을 처리하지 않은 경우의 발현량으로 완전히 복구되지 않는 것을 볼 수 있었다. 따라서 NKp30의 발현량이 고농도의 Golgistop과 NKAM을 처리하였을 경우에 NKAM을 처리하지 않은 경우의 발현량으로 복귀하는지 여부를 확인해 보았다. 그 결과 저농도의 Golgistop (6 mL의 배양액에 1 μ , 2 μ 의 Golgistop 처리)을 처리한 경우와 고농도의 Golgistop (6 mL의 배양액에 6 μ , 10 μ 의 Golgistop 처리)을 처리한 후 NKAM101을 처리한 경우 모두 NKp30의 발현량이 NKAM을 처리하지 않은 경우의 발현량으로 복구되지 않는 것을 확인할 수 있었다(그림 11c). 이러한 결과로 보아 아직 밝혀내지 못한 세포 내의 또 다른 작용기전을 통해 NKAM이 NCR과 death ligands의 발현량을 조절할 것으로 생각된다.

(a)



(b)



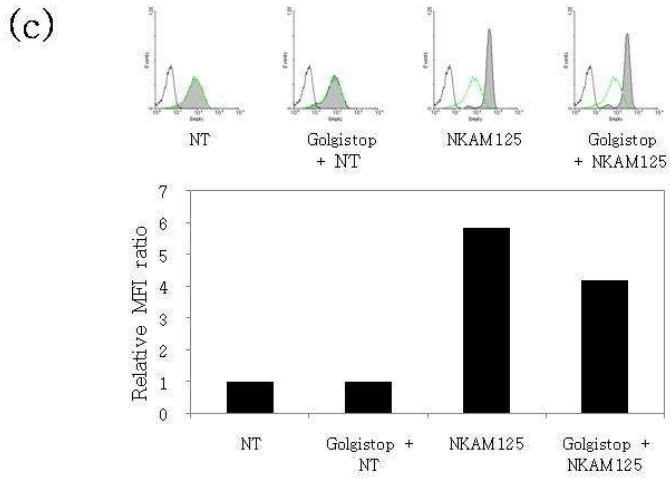
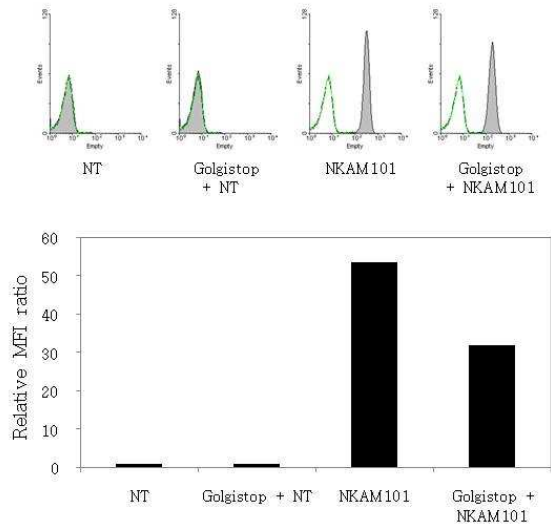
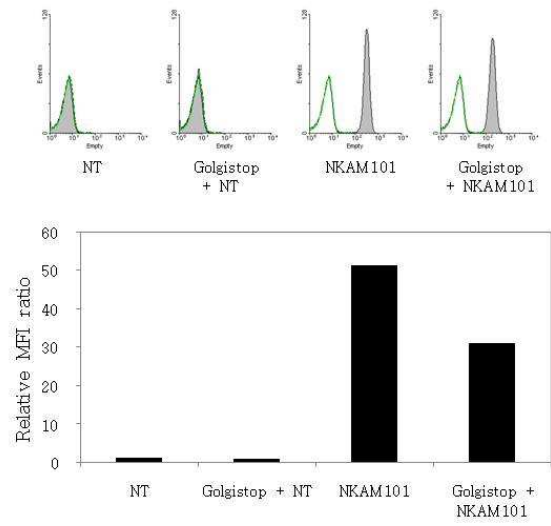


그림 10. NKAM이 골지체의 기능에 관여하여 NCR의 발현량을 조절할 가능성 확인. Golgistop을 이용하여 NK 세포의 골지체 기능을 억제시킨 후 NKAM125를 처리한 후 NCR의 발현량을 flow cytometry로 조사하였다. (a) NKp30, (b) NKp44, (c) NKp46의 flow cytometry 결과를 histogram (위 그림)과 relative MFI ratio (아래 막대 그래프)로 나타냈다.

(a)



(b)



(c)

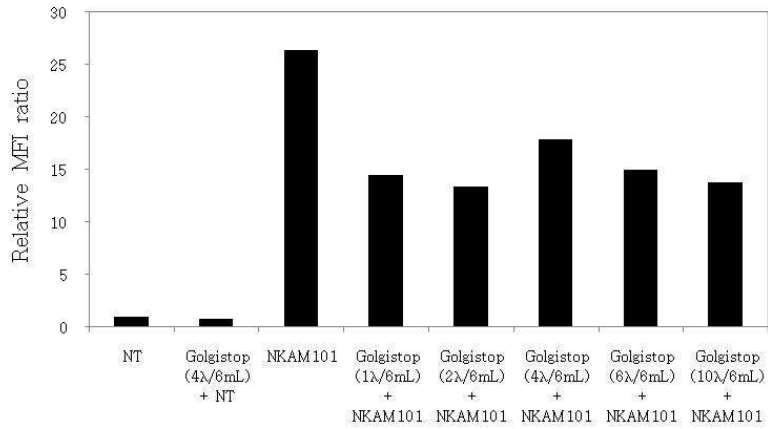


그림 11. NKAM이 골지체의 기능에 관여하여 death ligands의 발현량을 조절할 가능성 확인. Golgistop을 이용하여 NK 세포의 골지체 기능을 억제시킨 후 NKAM101을 처리하였을 때 death ligands의 발현량 변화. (a) TRAIL과 (b) FasL의 flow cytometry 결과를 histogram (위 그림)과 relative MFI ratio (아래 막대그래프)로 나타냈다. (c) Golgistop을 농도 별로 처리 했을 때 NKp30 발현량의 변화를 relative MFI ratio로 나타냈다.

IV. 고찰

NK 세포의 세포독성에 중요한 영향을 주는 수용체로 알려져 있는 NCR (NKp30, NKp44, NKp46)의 경우 그 발현량을 통해서 NK 세포의 활성화를 측정하는 척도가 되기도 한다^{22, 24}. 또한 표적세포 표면의 death receptor와 결합하여 세포사를 유도하는 NK 세포 표면의 death ligand 역시도 NK 세포의 활성을 측정하는 척도가 되기도 한다^{12, 13}. 따라서 NKAM을 NK 세포에 처리하여 세포 표면에 발현되는 NCR과 death ligands의 발현량 변화를 확인하여 효과적으로 NK 세포의 활성을 유도하는 NKAM을 선별하고자 하였다. 그 결과 NKAM101, 104, 110, 113, 114, 116, 117, 118, 121, 123, 125, 126, 127이 효과적으로 NCR과 death ligands의 표면 발현량을 증가시킨다는 사실을 확인하였다(그림 2, 3). NCR 발현량의 변화는 혈액을 제공한 공여자들 마다 개인차가 나타나는데 발현량이 증가되는 정도의 차이는 있지만 특정 NKAM이 발현량을 증가시키는 경향은 모든 공여자에서 동일하게 나타남을 확인할 수 있었다(데이터 제시 안 함).

NK 세포의 NCR과 death ligands의 발현량을 증가시키는 이들 NKAM이 세포 내에서 생성되어 세포 밖으로 분비된 후 표적세포를

용해시키는 granzyme B와 perforin의 생성 역시 증가시키는지 확인해보았다. 그 결과 granzyme B의 경우 전체적으로 눈에 띄는 변화를 관찰할 수는 없었지만 NKAM125, 126, 127을 처리했을 때 약간 증가하는 것을 확인할 수 있었고 perforin의 경우 granzyme B에 비해 약간 큰 변화를 관찰할 수 있었는데 NKAM104, 110, 125, 126, 127을 처리했을 때 그 발현량이 조금 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4). 지금까지의 결과들을 통해 새로 합성한 27종류의 NKAM 중에서 NKAM101보다 NK 세포의 활성화 유도효과가 현저하게 큰 것은 NKAM125, 126, 127임을 확인할 수 있었다.

위에서 언급한 바와 같이 NKAM101, 125, 126, 127이 NCR이나 death ligands의 발현량을 눈에 띄게 증가시키는 결과와는 달리 granzyme B와 perforin의 생성량에는 크게 영향을 미치지 않는 결과로 미루어 이들 NKAM이 작용하는 기전이 세포 표면에 발현되는 수용체에 국한된 것이라는 가설을 세울 수 있었다. 즉, 세포 내의 단백질에는 별다른 영향을 미치지 않고 세포 표면으로 발현되는 단백질에만 작용하여 그 발현량을 조절하는 것으로 생각된다. 이러한 가설을 뒷받침하기 위해 본 논문에서 결과는 보여주고 있지 않지만 세포 내에 존재하는 cytoplasmic protein 중의 하나인 caspase-3의 발현량이 NKAM에 의해 조절이 되는가를 실제로 확인해 보았다. 그

결과 NKAM101 처리에도 caspase-3의 발현량에는 별다른 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해서 NKAM의 작용이 세포 표면에 발현하는 단백질에 국한된 것이라는 가설을 좀 더 뒷받침 할 수 있을 것으로 생각된다.

다음으로 NKAM에 의해 활성화된 NK 세포가 실제로 종양세포의 세포사를 효과적으로 유도하는지 확인해 보았다. 그 결과 아무 처리하지 않은 NK 세포에 비해 NKAM101을 처리한 경우 NK 세포의 세포독성이 증가되고, NKAM101을 처리한 경우보다 NKAM127을 처리하여 NK 세포의 활성화를 유도한 경우 NK 세포의 종양세포에 대한 세포독성이 증가되는 것을 확인하였다(그림 7). NK 세포의 세포독성을 확인하는 실험에서 NKAM 자체에 의한 표적세포의 세포사가 유도될 수도 있기 때문에 이러한 요인을 배제하기 위해 HeLa 세포에 대한 NKAM의 세포독성을 확인해보았다. 그 결과 5 μ M 농도의 NKAM은 HeLa 세포에 대한 세포독성을 갖지 않는다는 것을 확인할 수 있었다(그림 6). 또한 NKAM 자체가 정상세포에 대한 세포독성을 나타내는가를 확인하기 위해 PBMC에 대한 NKAM의 세포독성을 확인해 보았다. 고농도의 NKAM이 정상세포에 미치는 영향에 대한 실험은 수행하지 않았지만, 5 μ M 농도의 NKAM은 정상세포에 대한 세포독성을 갖지 않는다는

것을 확인할 수 있었다(그림 6). 이로 인해 NK 세포의 활성화를 효과적으로 유도하는 새로운 물질인 NKAM이 적어도 5 μ M 정도의 농도에서는 세포독성이 별로 없는 면역 조절제 후보물질로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

PKC의 활성이 NK 세포의 활성화에 긍정적인 영향을 준다는 다양한 연구결과들이 밝혀져 있다^{26-28, 35}. 하지만 우리 연구팀의 선행 연구결과에서 PKC 활성 억제제로 알려져 있는 Gö6983³⁰의 경우 NK 세포에 처리했을 때 오히려 NK 세포의 활성화를 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 새롭게 합성하여 사용한 NKAM125, 126, 127 역시도 PKC- α 의 활성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 8). 그럼에도 불구하고 이들 NKAM이 NK 세포의 활성을 유도한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이와 같은 현상이 나타나는 이유는 PKC의 활성 억제에 의한 효과보다 NKAM의 다양한 작용기전에 의한 NK 세포의 활성화를 유도하는 작용이 더 강하기 때문일 것으로 생각된다. PKC의 활성이 NK 세포의 활성화에 긍정적인 효과를 나타낸다는 사실을 고려해 볼 때, 만약 NKAM의 PKC 억제기능을 개선할 수 있다면 NK 세포의 활성을 지금보다 강하게 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 NKAM의 PKC 활성 억제기능을 제거한 새로운 유도체의 합성이

필요할 것으로 생각된다.

NKAM의 작용기전을 좀 더 구체적으로 알아보기 위하여 먼저 NKAM이 NCR과 death ligands의 유전자 발현을 증가시키는지 mRNA의 발현량을 조사해보았다. 그 결과 NCR의 경우 mRNA의 발현량이 약 2배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었고, death ligands의 경우 mRNA의 발현량이 약간 증가하기는 하지만 눈에 띄는 변화를 확인할 수 없었다. 또한 세포 내의 발현량에 별다른 변화가 없었던 granzyme B와 perforin의 경우 mRNA의 발현량 역시도 별다른 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다(그림 9). 이 결과를 통해서 NKAM이 NK 세포의 NCR의 세포 표면 발현량을 증가시키는데 있어 이들 단백질의 유전자 발현에 어느 정도 관여하여 조절하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 세포 표면으로 발현되는 단백질의 변화량에 비해 mRNA의 발현량 변화가 훨씬 적은 것으로 보아 NKAM의 전사단계에서의 조절보다 합성된 단백질의 세포 내에서의 이동에 보다 많은 영향을 미치는 것으로 생각된다.

세포 표면 발현 수용체와 세포 밖으로 분비되는 분비 단백질은 핵 내의 DNA로부터 합성되어 ER에서 빠져 나와 골지체를 통해 세포 표면으로 이동하는 것으로 알려져 있다³⁶. 표면 발현 단백질은 cis-golgi reticulum에서 cis-golgi로 이동한 후 다시 medial golgi를

통과하여 trans-golgi로 이동하고, 이어 trans-golgi reticulum으로 이동한다. Transport vesicle에 싸여 골지체로부터 빠져 나온 단백질은 세포 표면으로 이동되어 발현하게 된다. 분비 단백질은 표면 발현 단백질과 동일한 과정으로 골지체를 거친 후 secretory vesicle에 싸여 골지체로부터 빠져 나와 세포 표면으로 이동된 후 분비된다^{34, 37, 38}. 이러한 사실을 바탕으로 NKAM이 골지체의 단백질 수송능력을 활성화시키는데 관여하여 세포 표면 발현 단백질의 발현량을 조절하는지 확인해보았다. 그 결과 골지체의 작용을 억제시킨 후 NKAM을 처리하였을 때 NCR의 경우 그 발현량이 약 30% 정도 감소하였고(그림 10), death ligands의 경우 그 발현량이 약 40% 정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 11). 이 결과를 통해 NKAM이 세포 내 골지체의 단백질 수송기능에 어느 정도 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 골지체의 기능을 억제하였음에도 불구하고 아무것도 처리하지 않은 NK 세포보다 NKAM을 처리한 NK 세포의 NCR과 death ligands의 발현량이 더 많이 증가되어 있는 것을 볼 수 있다. 또한 골지체의 기능을 억제시키기 위한 Golgistop의 농도를 고농도로 처리 하여도 NCR과 death ligands의 발현량이 NKAM 처리에 의해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(그림 11). 이러한 결과로 미루어 골지체의 단백질

수송기능 이외에 아직 밝혀내지 못한 또 다른 작용기전에 NKAM이 관여할 가능성도 있는 것으로 생각된다. 따라서 NKAM의 작용기전에 대한 보다 체계적이고 심도 깊은 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

1. 총 27종류의 NKAM 유도체들 중 NKAM101 (Gö6983)보다 NK 세포 활성화를 더 효과적으로 유도하는 NKAM을 선별하고자 NCR, death ligands, granzyme B, perforin의 발현량 변화를 비교 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. NCR의 발현량을 효과적으로 증가시키는 것은 NKAM121, 123, 125, 126, 127임을 확인하였다.

나. Death ligands의 발현량을 효과적으로 증가시키는 것은 NKAM 125, 126, 127임을 확인하였다.

다. Granzyme B, perforin의 발현량은 별다른 변화가 없었다.

결과적으로 NKAM125, 126, 127이 NKAM101보다 NK 세포 활성을 효과적으로 유도하고, 그 중에서도 NKAM127이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

2. NKAM127에 의해 활성화된 NK 세포는 표적 암세포를 죽이는 세포독성 또한 NKAM101을 처리한 경우 보다 증가하였다.

3. NKAM에 의한 NK 세포의 활성화는 빠른 시간 내에 유도되는

현상이며, NK 세포의 활성을 유도하는 NKAM의 적정 사용농도는 5 μ M이다.

4. NKAM125, 126, 127은 NKAM101과 마찬가지로 PKC- α 의 활성을 억제한다.

5. NKAM이 NK 세포를 활성화시키는 일부 작용기전을 확인해보는 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. NKAM은 NCR의 mRNA 발현을 다소 증가시킨다.

나. NKAM은 death ligands의 mRNA 발현에는 크게 관여하지 않는다.

다. NKAM은 골지체의 단백질 수송능력에 관여하여 NCR과 death ligands의 발현량을 증가시킨다.

6. 본 연구 결과를 통해 NKAM125, 126, 127을 NKAM101보다 효과적인 새로운 면역 조절제 후보물질로 제시할 수 있다.

참고문헌

1. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:405–29.
2. Roder JC, Pross HF. The biology of the human natural killer cell. *J Clin Immunol* 1982;2:249–63.
3. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975;16:216–29.
4. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975;5:112–7.
5. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:850–61.
6. Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995;16:194–201.

7. Raja SM, Wang B, Dantuluri M, Desai UR, Demeler B, Spiegel K, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* 2002; 277: 49523–30.
8. Shi L KR, Aebersold R, Greenberg AH. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 1992;175:553–66.
9. Kim HR, Park HJ, Park JH, Kim SJ, Kim K, Kim J. Characteristics of the killing mechanism of human natural killer cells against hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:461–70.
10. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182:1223–30.
11. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the

- cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:2909–15.
12. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635–6.
 13. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004;23:2950–66.
 14. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006;118:1–10.
 15. Kumar V, Medhi B. Emerging role of uterine natural killer cells in establishing pregnancy. *Iran J Immunol* 2008;5:71–81.
 16. Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev* 2002;189:161–78.
 17. Biassoni R, Cantoni C, Marras D, Giron–Michel J, Falco M, Moretta L, et al. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 2003;7:376–87.

18. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998; 188:953–60.
19. Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, et al. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 1999;189:787–96.
20. Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Tadokoro K, Juji T, Hanaoka K, et al. Identification of novel single nucleotide substitutions in the NKp30 gene expressed in human natural killer cells. *Tissue Antigens* 2001;58:255–8.
21. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell–mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197–223.
22. Moretta A BR, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural

- cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000;21:228–34.
23. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004;306:1517–9.
 24. Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 2004;23:255–9.
 25. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 1995;270:28495–8.
 26. Tassi I, Cella M, Presti R, Colucci A, Gilfillan S, Littman DR, et al. NK cell activating receptors require PKC θ for sustained signaling, transcriptional activation and IFN- γ secretion. *Blood* 2008.
 27. Adrian T, Ting S, RAS, Robert T, Abraham*& and Paul J. Leibson SII. Interaction between Protein Kinase C-dependent and G Protein-dependent Pathways in the Regulation of Natural Killer Cell Granule Exocytosis. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 1992;267.
 28. Alvarez-Arias DA, Campbell KS. Protein kinase C regulates

- expression and function of inhibitory killer cell Ig-like receptors in NK cells. *J Immunol* 2007;179:5281–90.
29. Martiny–Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 1993;268:9194–7.
 30. Young LH, Balin BJ, Weis MT. Go 6983: a fast acting protein kinase C inhibitor that attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Drug Rev* 2005;23:255–72.
 31. Gschwendt M, Muller HJ, Kielbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G, et al. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:93–8.
 32. Faul MM, Winneroski LL, Krumrich CA. A New, Efficient Method for the Synthesis of Bisindolylmaleimides. *J Org Chem* 1998;63:6053–8.
 33. Sanchez–Martinez C, Shih C, Zhu G, Li T, Brooks HB, Patel BK, et al. Studies on cyclin–dependent kinase inhibitors: indolo–[2,3–a]pyrrolo[3,4–c]carbazoles versus bis–indolylmaleimides. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:

3841–6.

34. James Darnell HL, David Baltimore. . Molecular cell biology. 4 ed. New York 2000.
35. Leibson PJ, Midthun DE, Windebank KP, Abraham RT. Transmembrane signaling during natural killer cell-mediated cytotoxicity. Regulation by protein kinase C activation. *J Immunol* 1990;145:1498–504.
36. Hong W, Tang BL. Protein trafficking along the exocytotic pathway. *Bioessays* 1993;15:231–8.
37. Conn PM, Ulloa–Aguirre A, Ito J, Janovick JA. G protein–coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev* 2007;59:225–50.
38. Mogelsvang S, Marsh BJ, Ladinsky MS, Howell KE. Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian Golgi complex. *Traffic* 2004;5:338–45.

Abstract

NK cell activating molecules (NKAMs) which enhance the natural cytotoxicity of human NK cells

So Young Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jongsun Kim)

Natural Killer (NK) cells are important effectors of the innate immune response against tumor cells and virus-infected cells. Natural cytotoxicity receptors (NCRs) are the major receptors involved in NK cytotoxicity. NK cells induce tumor cell death by perforin and granzyme B release. Death ligands such as TRAIL and FasL also play an essential role in NK cell mediated apoptotic cell death of tumors. Recently, we discovered that a NK cell activating molecule (NKAM101; Gö6983) increased the surface expression of NCRs and death ligands. Consequently NKAM101 enhanced the NK cell cytotoxicity against tumor cells. To find more effective NK

cell activating molecules (NKAMs), we synthesized a series of 27 NKAM derivatives and measured their NK cell activating property. We found that the NKAM125, 126 and 127 are more effective than NKAM101 among 27 derivatives. These NKAMs effectively and rapidly up-regulated the surface expression of NCRs on human primary NK cells. The surface expression of death ligands was also up-regulated by treatment of NKAMs. However, intracellular production of granzyme B and perforin was not up-regulated by treatment of NKAMs. Furthermore NKAM127 enhanced the NK cell cytotoxicity against tumors and the effect of NKAM127 was greater than that of NKAM101. Additionally, we demonstrated that NKAMs increased gene expression of NCRs. However, the gene expressions of granzyme B, perforin and death ligands were not significantly increased by NKAM treatment. Moreover the surface expression of NCRs and death ligands was down-regulated by treatment of protein transport inhibitor, Golgistop. This result

demonstrated that NKAMs might participate in the protein transport activity of golgi complex.

Key Words : NK cell, NCR, death ligand, granzyme B, perforin, cytotoxicity, cancer cell