BOP (N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine) 유발 Syrian Golden Hamster 췌장암 모델에서 Farnesyltransferase inhibitor의 암 예방 효과

연세대학교 대학원
의과학 사업단
정 혜 원

BOP (N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine) 유발 Syrian Golden Hamster 췌장암 모델에서 Farnesyltransferase inhibitor의 암 예방 효과

지도 송 시 영 부교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학 사업단

정 혜 원

정혜원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

연세대학교 대학원

2001 년 6 월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 깊은 애정과 열정으로 이끌어 주신 송시영 교수님께 진심으로 존경과 감사를 바치며, 본 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 이우정 교수님, 최강열 교수님께 진심어린 깊은 감사를 드립니다. 아울러 기나긴 실험 기간 동안 동물 관리 및 약제 투여등에 커다란 도움을 주신 실험 동물부의 성재경 교수님, 김형관 선생님 그리고 김병곤 선생님께 깊은 감사를 드리며 실험동물부의 조직병리 팀에도 감사를 드립니다. 그리고 실험하는데 있어 항상 도움을 준 박승우 교수님, BK사업단 석사과정의 이지은 선생님, 그리고 박경화 선생님, 김선아 선생님, 신율 선생님께도 감사드리며 평소 저의 힘이 되어 주는 소화기 내과 선배 동료 여러분들 께 감사드립니다.

이 자리에 오기까지 사랑과 격려로 키워주신 부모님과 사랑하는 친구들에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문 요약

BOP (N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine) 유발 Syrian Golden Hamster 췌장암 모델에서 farnesyltransferase inhibitor의 암 예방 효과

치사율이 높은 암으로 알려져 있는 췌장암의 90% 이상에서 K-ras 암유전자의 돌연변이가 동반되어 있는 데, K-ras 암유전자의 돌연변이는 발암 과정의 초기 단계에서 부터 관찰되고 암화 과정이 진행되면서 조직학적인 변화와 비례적으로 증가하여, 췌장암 발생에 핵심적인 역할을 할 것으로 생각되고 있다.

Ras 단백은 세포 밖의 신호에 의해 세포질 내의 GDP와 결합된 비활성화 형태에서 GTP와 결합된 활성화 형태로 바뀌어 Raf/MEK/MAP kinase의 일련의 신호전달체계를 활성화시켜 세포의 분화 및 증식에 관여 하게 된다. Ras 단백의 활성화 과정에는 farnesylation 이라는 과정을 통한 세포막과의 연계가 필수적인데, 이 과정에 farnesyl transferase 라는 효소가 관여한다. Farnesyl transferase 의 작용을 억제하면 Ras 단백이 세포막에 부착되지 못하여 활성화 형태를 이루지 못하게 되고, 따라서 Ras 이하 일련의 신호전달이 이루어 지지 않아 세포 증식 효과를 억제할 수 있을 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 지금까지의 연구들은 이미 형성된 암의 치료 효과 및 그 기전에 대한 연구였고, 암이 발생하기 이전의 화학 예방 (chemoprevention) 의 차원에서의 효과를 관찰한 연구는 폐암·대장암·구강암 등에서 몇 예 시도되었을 뿐, 아직까지 췌장암에서 시도된 연구는 없었다.

본 연구에서는 사람의 췌장암과 유사한 조직학적 표현형을 보이는 N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (이하 BOP로 약함) 유도 Syrian golden hamster 췌장암 모델에 farnesyl transferase inhibitor (이하 FTI 로 약함) 를 암 발생단계 초기부터 투여하여, 투여하지 않은 군과의 단계별 조직학적 비교를 통하여 암 예방 효과 여부를 알아보고자 하였다.

양군 모두 BOP를 15㎎/kg 용량으로 매주 1회씩 피하 주사하여 12주간

투여하였으며, 실험군은 FTI 를 췌장 내 변화가 관찰되기 시작하는 실험 시작 9주부터 희생일 까지 매일 경구투여 하였고 대조군은 투여하지 않았다. 각각 16주 및 20주에 희생시킨 후 FTI 의 암 예방 효과 여부를 관찰하였다.

16주째 대조군 모두에서 소엽 주위 (perilobular) 와 소엽 (lobular) 내의 섬유화·신생 관 복합체 (tubular complex) 형성 및 소도세포 (islet) 의 과증식이 관찰 되었고, 주 췌관 내에서는 50% 에서 유두상 증식 (papillary hyperplasia) 을, 나머지 50% 에서 이형성 증식 (dysplastic hyperplasia) 을 보였다. 신생 관 복합체는 대부분 단층배열을 하고 있었고 일부에서 유두상 증식을 보였으나 이형성 증식은 관찰되지 않았다. 이들 관 복합체는 기존의 췌관과는 구별되게 선방세포의 소실과 병행해서 선방세포가 위치해야 할 소엽의 말초에서 관찰되었는데 이는 선방세포로부터 췌관 세포로의 이행분화 (transdifferentiation) 에 기인한 결과로 생각되었다. 20주째에는 87.5% 에서 육안상 5-10㎜ 크기의 단단하고 고정되어 있는 결절이 관찰되었고 췌장은 심하게 위축되어 있었다. 결절은 ductal adenocarcinoma 형태를 보이고 있었는데, 이는 췌관 세포들로 치환된 것으로 고려되는 말초 선방세포 위치에 존재하고 있었다. 악성화된 결절부위는 주 췌관과는 구분되어 있었는데, 오히려 주 췌관 내에서는 16주째 와 유사하게 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되었으나 악성화된 증거는 없었다.

16주째 실험군에서도 모두에서 소엽 주위와 소엽 내 섬유화·신생 관 복합체의 형성 및 소도세포의 과증식을 관찰할 수 있었으나 그 정도가 대조 군과 비교해 볼 때 경미하였고, 관 복합체는 거의 모두 단층 배열을 하고 있었다. 반면 주 췌관은 대조군과 유사한 정도의 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되었다. 20주째의 변화는 BOP군과는 확연한 차이를 보여 말초 소엽에서의 선암 발생은 전 예에서 없었다. 신생 관 복합체는 일부에서만 특정 소엽에 국한되어 형성되었을 뿐, 췌장의 대부분은 정상적인 선방세포 구조를 유지하고 있었다. 반면 주 췌관은 대조군과 유사하게 유두상 증식 및 이형성 변화가 관찰되었다.

이상의 결과로 FTI 는 BOP 유발 hamster 췌장암 모델에서 Ras 단백의 활성화 억제를 통하여 암 발생을 초기 단계부터 효과적으로 억제하여

암 예방효과가 있음을 보여주는 것으로, 향후 이의 임상적 활용이 크게 기대된다 (대조군 암 발생률 87.5%, 실험군 0%). 또한 흥미로운 점은, 선방세포로부터 이행되었을 것으로 생각되는 신생 관 복합체의 생성 및 악성으로의 변화가 대조군에 비하여 실험군에서 현저히 억제되었으나, 주췌관의 이형성 증식에는 두 군간의 차이가 없었다는 점이다. 이는 ras 암 유전자의 돌연변이가 90% 이상에서 관찰되는 인체 췌장암의 발생 기원세포가 췌관세포 자체라기 보다는 선방세포로부터 이행 분화된 새롭게 형성된 관 복합체에 존재하는 세포일 가능성과 함께, 선방세포에서 췌관 세포로의 이행 및 암화 과정에 Ras 단백이 중요한 역할을 할 것임을 의미하며, BOP에 의한 주 췌관 세포의 증식은 Ras 단백이 아닌 새로운 관련인자가 존재할 것임을 시사한다.

아울러 이들 조직에서의 다양한 암 관련 유전자 변이 규명을 통해 K-ras 암 유전자 외에 췌장암 발생의 초기 관련 인자를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말 : BOP, FTI, 햄스터, 췌장암, 화학 예방

BOP (N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine) 유발 Syrian Golden Hamster 췌장암 모델에서 Farnesyltransferase inhibitor의 암 예방 효과

<지도교수 송 시 영 >

연세대학교 대학원 의과학 사업단

정 혜 원

Ⅰ. 서 론

보다 효과적인 치료법을 개발하기 위한 수 많은 노력이 기울여지고 있음에도 불구하고 아직까지도 조기 진단을 통한 근치적 절제술 이외에 암으로부터 벗어날 수 있는 확실한 방법은 없다. 더구나 췌장암은 조기에 발견하여 근치적 절제술을 시행하더라도 2년 생존율이 10% 이하에 불과한 예후가 극히 불량한 암으로 대부분의 경우 진단과 동시에 사망을 생각케 하는 암의 하나이다[(1)-(4)]. 이와 같은 결과는 이미 암이 발생한 이후에 이를 치료하고자 하는 노력보다는 암이 생기기 전에 특히 암 발생 위험이 높은 전암 병소에서 암으로의 이행을 억제하는 측면에서의 노력이 필요함을 시사한다. 이를 위해 암 발생 초기 단계의 기전을 규명하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 여기서 얻은 지식을 토대로 암 발생을 억제하거나 또는 지연시키는 일명 '암 화학 예방 (chemoprevention)' 이라는 새로운 개념의 접근법에도 관심이 높아지고 있다[(5)-(9)].

1976년 Sporn 에 의해 처음으로 '암의 화학 예방' 이라는 용어가 사용되기 시작했는데, 이는 initiation, promotion, progression 의 순차적인 암 유발 과정 중 암화의 중심이 되는 어느 한 부분을 억제하여 전암

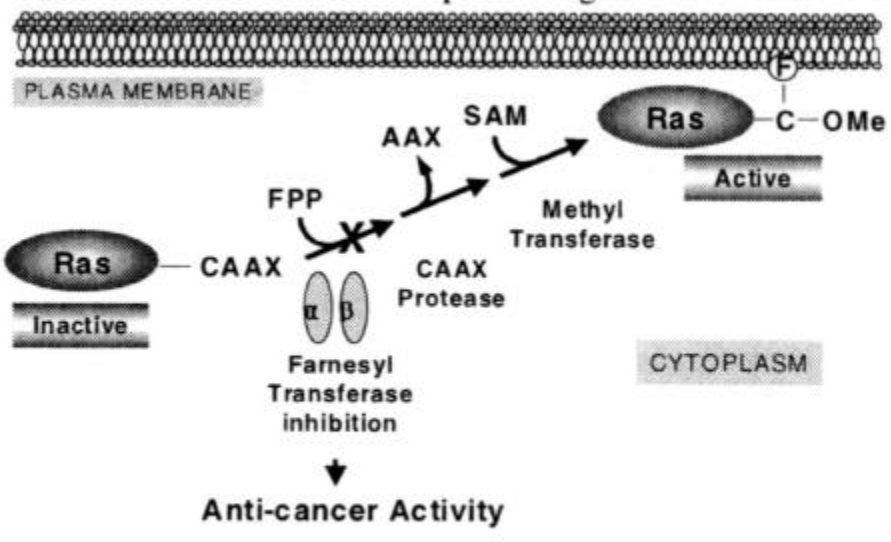
병변에서 암으로의 전환을 억제 혹은 지연 시키는 것을 말한다. 이 억제 물질에는 다양한 signal transduction modulators, growth factor receptor inhibitors, oncogene inhibitor, steroid hormone 등이 포함되며,이 외 발암 물질의 활성이나 세포 내 흡수 조절 및 세포 내 신호전달체계 등의 조절 그리고 세포 사멸 유도 및 신혈관 생성 억제 등의 기전으로 암 발생을 예방할 수 있다[5]-[9] .

실제 retinoid 나 cox-2 inhibitor 를 포함한 NSAID, 그리고calcium, selenium, folic acid 같은 영양소 등이 항암 치료와 별개로 암 예방을 위한 실험실적, 임상적 연구가 시도되어 왔다[5]-[9]. 이와 같은 암의 예방 차원에서의 연구가 이루어 지려면 암 전구 병변으로 부터 전이성 암 병변까지 순차적인 단계별 발암 모델이 있어야 하는 데, 대표적인 몇 예가 azoxymethane (AOM) 에 의한 rat 의 대장암 모델, N-methy-N-benzylnitrosamine (MBN) 에 의한 hamster 의 buccal pouch carcinoma, N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (이하 BOP로 약함) 에 의한 hamster 의 췌장암 모델 등이 있다[5],[7],[8]. 이와 같은 모델에는 각 단계별로 넘어가는 데 핵심이 되는 표지자가 있는데 이 표지자를 목표로 이를 억제 시킴으로서 암의 예방을 기대해 볼 수 있다[10].

췌장암은 인체 암 중에서 암유전자 또는 억제 암유전자의 역할이 가장 두드러지는 암의 하나로 90% 이상에서 K-ras 암유전자의 돌연변이가 동반되며, 이는 발암과정 초기부터 관찰된다 [11]-[13]. Ras 단백은 세포 밖의 신호에 의해 세포질 내의 GDP와 결합된 비활성화 형태에서 GTP와 결합된 활성화 형태로 바뀌어 Raf/MEK/MAP kinase 의 일련의 신호전달체계를 활성화시켜 세포의 분화 및 증식에 관여 하게 된다. Ras 유전자의 돌연변이는 주로 제 1 exon 의 12번째 codon 두번째 염기가 guanine 에서 adenine 으로 바뀐 것인데, 이렇게 되면 자체로 지닌 GTPase 의 작용에 저항을 가지게 되어 지속적으로 GTP와 결합된 활성화된 형태를 유지하게 되고, 이에 따라 지속적인 세포 내 전달체계의 활성으로 조절 기능을 벋어나 암이 발생하게 된다[14]. 이 Ras 단백의 활성화 과정에는 farnesylation 이라는 과정을 통한 세포막과 연계가 필수적인데, 이 과정에 farnesyl transferase 라는 효소가 관여한다. 만약 farnesyl transferase 의 작용을 억제하면 Ras 단백이 세포막과의 연계를 갖지

못하여 활성화 형태를 이루지 못하게 되고, 따라서 Ras 이하 일련의 신호전달이 이루어 지지 않아 세포 증식의 효과를 억제할 수 있을 것으로 고려되어 1990년대 초반부터 활발한 연구가 진행되어 왔다[15]-[24] (Figure 1.).

Figure 1. Mechanism of Ras processing and the role of FPT



FPP ; Farnesyl pyrophosphate
CAAX ; A: Aliphatic amino acid , X: Serine or Methionine
SAM ; S-Adenosyl methionine

지금까지의 farnesyltransferase inhibitors (이하 FTI로 약함) 의 연구에 있어서는 이미 형성된 암에 있어서 항암 효과를 세포 수준의 실험 및 동물 모델에서 관찰했던 것으로, 비교적 효과적인 항암 효과를 보이고 있었으나 아직까지 그 항암 기전에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다[15]-[24]. 췌장암의 발암과정을 실펴 보면 K-ras 유전자의 돌연변이는 암화 초기 단계, 즉 암 전구 병변부터 최근 들어 FTI의 항암 효과가 비단 Ras 단백만이 관여 하는 것이 아니라 farnesylation 과정을 필요로 하는 다른 여러 단백질 즉, lamin, RhoB, rhodopsin 등이 관여할 것이라는 가설들이 제시되고 있다[22]-[24]. FTI 는 향후 주목받는 항암 치료제로 각광을 받고 있고, 현재 구강 제제까지 제조되어 임상적인 시도에 도립하고 있다.

하지만 K-ras 암 유전자의 돌연변이가 암화 과정 초기 단계에서부터 형성되어 조직학적인 변화와 비례적으로 증가하기 때문에, Ras 단백 억제제인 FTI는 오히려 기존의 암 조직에서 보다 암 전구 병변에서 의 투여가 더 의미있는 효과를 기대 해 볼 수 있을 것이고 이는 전암 병소에서 암으로의 이행을 억제하려는 '암 예방' 측면의 노력이 될 것이다[27]. 그러나 아직까지 암 예방 차원에서의 효과를 관찰한 연구는 폐암·대장암·구강암 등에서 몇 예 시도되었을 뿐, 아직까지 췌장암에서 시도된 연구는 없었다.

따라서 본 연구에서는 형태학적·분자생물학적으로 인간의 췌장암 발생과정과 유사함을 보이는 BOP 유도 Syrian Golden Hamster 모델 [25]-[27] 을 이용하여 과증식이 관찰되기 시작하는 시기 (즉 K-ras 돌연변이가 나타나기 시작하는 시기) 부터 FTI 를 투여하여 FTI 를 투여하지 않은 대조군과 비교, 암 발생 억제 효과가 있는지를 알아보며 FTI 의 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 실험 동물

Charles River Laboratory 로 부터 몸무게 90-100g의 암컷 Syrian Golden Hamster 40마리를 구입하여 사용하였다. 사육 조건으로는 기온 24℃, 상대 습도 60% 에 12시간 마다 빛과 어둠을 바꾸어 주고, 식사(10-12g/100g)와 물 (15-20㎖/100g)은 자유롭게 공급해 주며, 한 사육 상자 당 4마리씩 배치하였다. 실험목적에 따라 세 개의 군으로 구분하여 실험을 진행하였다.

⑴ 실험군

16마리를 희생 시기에 따라 2개의 소그룹으로 세분한 뒤, 모두에서 일주일에 한번 12주 동안 BOP를 피하주입하고 실험 시작 9주 때부터 희생 시까지 FTI를 매일 경구 투여하여 16주, 20주에 각각 희생 시켰다. 매 시기마다 몸무게를 측정 하였다.

⑵대조군

16마리를 희생 시기에 따라 2개의 소그룹으로 세분한 뒤, 모두에서 BOP만을 피하 주사한 후 실험군과 동일한 시점인 16주, 20주에서 희생 시켰다. 매 시기마다 몸무게를 측정 하였다.

⑶정상 대조군

아무런 처치를 하지 않은 8마리를 희생시기에 따라 두 군으로 나누어 각각 16주, 20주에 희생 시켰다.

나. 사용 약제

⑴ BOP (N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine)(NACALAI Tech. Co., Tokyo. Japan)

DNA의 알킬화 (alkyl) 물질로, 주로 guanine 의 N^7과 O^6 위치에 메칠화 (methyl) 를 유발시키는 것으로 알려져 있는데, 이를 이용하여 K-ras 유전자의 12번째 codon 에 위치하는 guanine 을 돌연변이에 민감하게 하는 발암물질로 사용하였다. 증류수에 용해 시켜 사용하였다.

⑵ FTI (Farnesyltrans ferase inhibitor)

LG사에서 새로이 개발한 CAAX peptidomimetics 일종인 LBI-42708로, 이를 0.25M의 CH_3SO_3H (methanesulphonic acid) 용액에 녹여 사용하였다. (Figure 2)

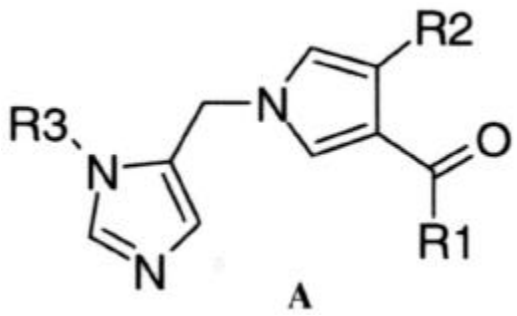
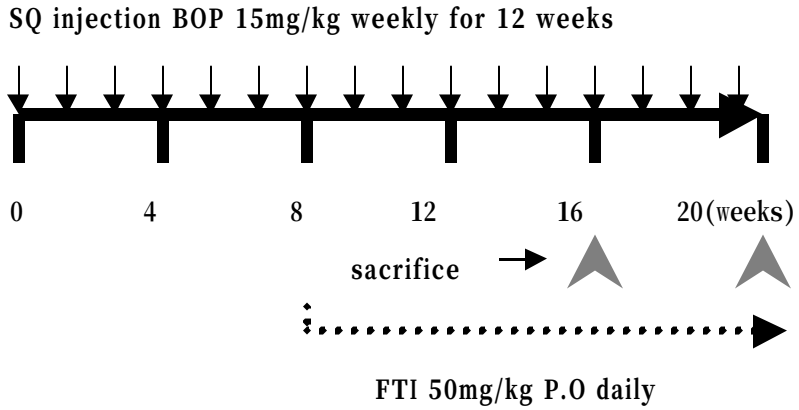


Figure 2. FTI 구조식[17]

2. 방법

BOP는 1회 투여 농도를 15mg/kg, 투여량을 0.5cc로 하여 피하주사 하였으며, 매주 1회씩 총 12주간 주사하였다. BOP를 실험군과 대조군 32마리에 각각 투여하였다. FTI는 1일 투여량 50mg/kg로, 총 투여량이 1cc가 되도록 하여 1일 1회씩 존대를 이용하여 실험군에 실험 시작 9주 째 부터 경구 투여하였다. 정상 대조군은 동일 조건 하에 아무런 처치를 하지않고 사육하였다(figure 3). 모든 hamster를 실험 시작 16 주 및 20 주 되는 시점에 희생시켰다. 희생은 Ether 마취 하에 cardiac exsanguination을 시행하여 실시하였으며, 이후 복부를 절개하여 췌장 조직을 분리한 후 4% para-formaldehyde 에 24시간 동안 고정 처리한 후 파라핀 조직 절편을 만들었다. 양군간의 조직 병리학적 특성을 비교하기 위해서 파라핀에 고정시킨 조직을 각각 5 ㎜ 로 깎아 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다.

Figure 3. 실험 방법 (G. Scarpelli . Cancer Research. 1992)



III. 결 과

1. 육안적 변화

가. 정상 대조군 (16주 및 20주)

정상 대조군에서는 16주 및 20주 모두에서 육안적으로 췌장에 아무런 변화도 관찰되지 않았다.

나. 대조군 (16주 및 20주)

16주째 희생시킨 8마리 모두에서 췌장의 전반적인 섬유화 및 위축이 관찰되었으며 그 중 6마리에서 췌장 내에 2-3 ㎜의 자그마한 결절들이 관찰되었다. 결절들은 단단하나 주변조직에 고정되어 있지 않았다. 20주째에도 역시 8마리 모두에서 췌장의 전반적인 섬유화 및 위축이 관찰되었으며 그 중 7마리에서 5-10 ㎜ 가량의 단단한 종괴가 관찰되었으며 주변 조직에 유착되어 있었다.

다. 실험군 (16주 및 20주)

16주째 희생시킨 8마리 중 1마리에서는 2-3 ㎜의 결절이 관찰되었으나 단단하지 않았고 주변 조직에 고정되어 있지 않았다. 20주째 희생한 8마리 중 2 마리에서는 2-3 ㎜의 작은 결절이 발생하였으나 단단하거나 주변 조직에 고정되어 있지 않았다. 다른 6마리는 결절은 관찰되지 않았다. 16주, 20주째 모두에서 전반적인 섬유화나 위축은 관찰되지 않으나 부분적으로 위축 과 함께 표면이 불규칙한 양상을 보였다.

2. 조직 병리학적 변화

가. 정상 대조군 (16주 및 20주)

두 시기 사이에는 차이를 보이지 않았다. 즉, 췌장은 몇 개의 소엽으로 나뉘어 있으며, 소엽의 90% 이상은 정상적인 선방세포가 차지하고 있었고 부분적으로 선방세포와 경계면이 없는 소도세포가 분포하였다. 소엽 사이에

췌관, 혈관 및 지방세포가 관찰된다. 췌관 상피는 규칙적인 단층 배열을 보였다. (figure 4).

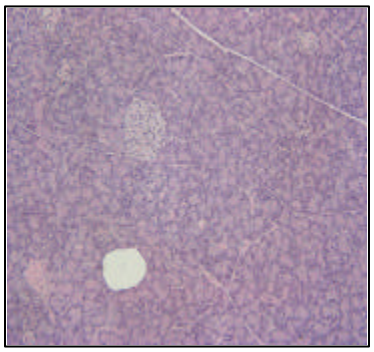


Figure 4. Hamster의 정상췌장조직
(Hematoxylin & Eosin ´ 100)

나. 대조군

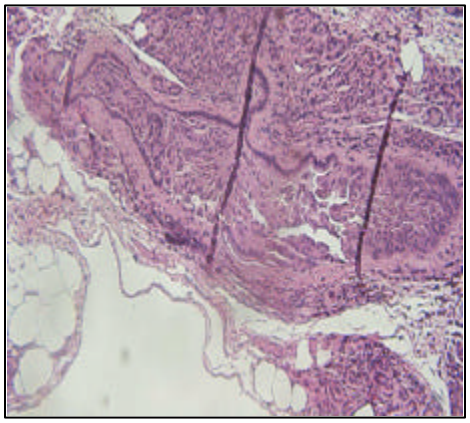
⑴ 16 주째 희생시킨 군 (Figure 5)

8마리 모두에서 소도세포의 과 증식, 소엽 주위와 소엽 내의 섬유화 및 염증 세포들의 침윤이 관찰되고, 또 8마리 모두에서 선방세포가 위치한 소엽에서 몇 개의 엽에 국소적으로 신생 관 복합체 (tubular complex) 형성이 관찰되었다. 상피는 대개 규칙적인 단층배열을 하고 있으나 일부에서 유두상 증식 및 일부 이형성 증식을 보이고 있다. 육안적으로 관찰되는 결절은 이 신생 관 복합체상피의 유두상 증식 및 일부 이형성 증식 으로 구성되어 있었다. 주 췌관 내는 50 % 에서 유두상 증식이, 나머지 50 % 에서 이형성 증식 (dysplastic change)이 관찰되나 악성변화는 관찰되지 않았다. 일부에서는 비전형적으로 확장된 췌관 형태의 구조 내에 소도세포와 유사한 세포들이 차 있는 것이 관찰되었다.

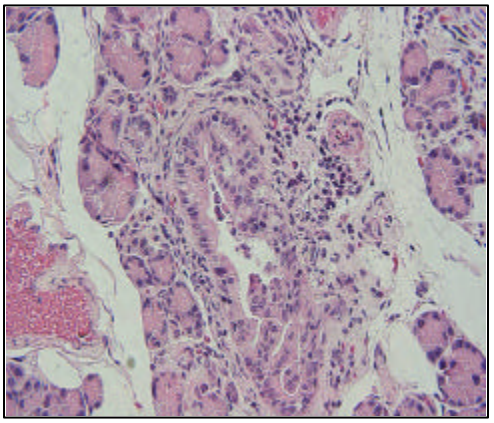
⑵ 20 주째 희생시킨 군 (Figure 6)

16주째와 마찬가지로 8마리 모두에서 소도세포의 과 증식, 소엽 주위와 소엽 내의 섬유화 및 염증 세포들의 침윤이 관찰되었다. 육안상 정상인 부위는 16주에서 관찰되던 신생 관 복합체 (tubular complex)형성이 역시 관찰되며 이 변화는 미만성으로 소엽의 대부분을 차지하고 있었다. 8마리 중 7마리에서 육안상 관찰 되었던 5-10 ㎜ 가량의 크기의 단단하고 고정되어 있는 결절은 조직병리학적 검사상 이형성 증식 및 ductal adenocarcinoma 소견을 보였다. 주 췌관 내에서는 16주째와 비슷한 정도의 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되며 악성변화는 관찰되지 않았으며 ductal adenocarcinoma 와는 떨어져 있었다.

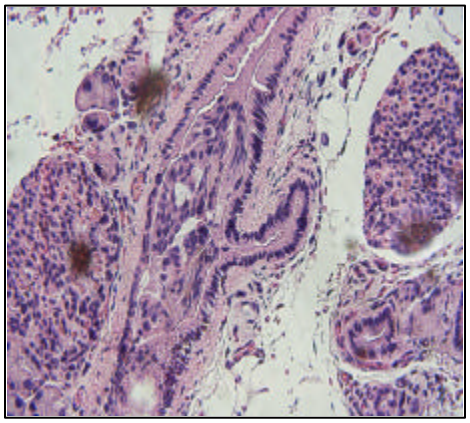
Figure 5. BOP 만을 투여한 군의 조직 병리 (16 주)



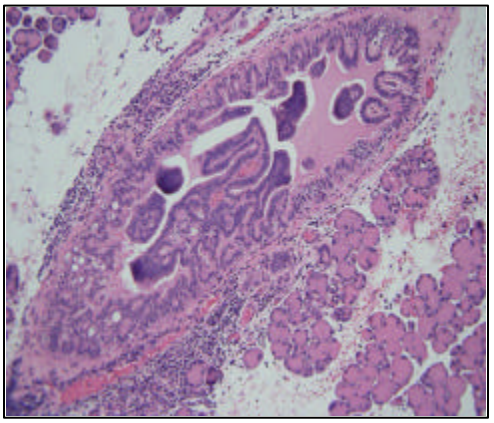
A. H & E stain ´ 200



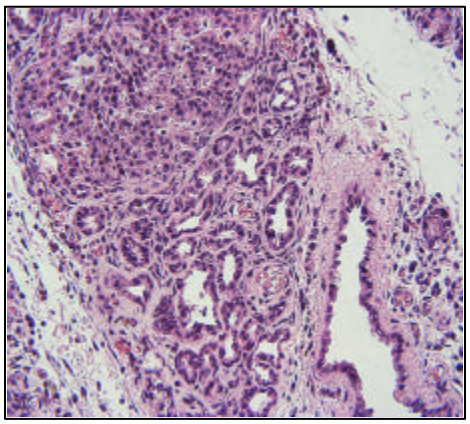
B. H & E stain ´ 400



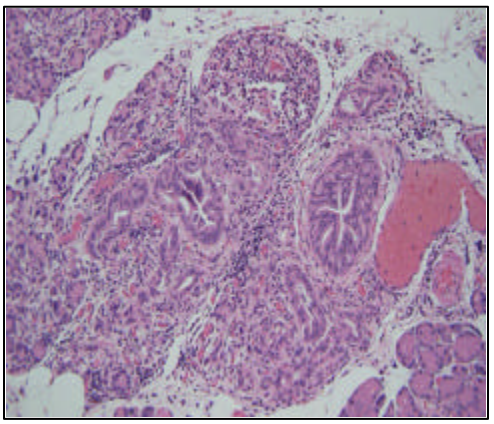
C. H & E stain ´ 200



D. H & E stain ´ 200



E. H & E stain ´ 200



F. H & E stain ´ 200

< Figure 5. 설명 >

A. 췌관 내에 유두상 증식 및 이형성 변화를 보이며 내부에 과다 증식한 세포 종괴가 관찰된다. 주변에 과 증식 상태의 소도세포 (islet)가 관찰된다.

B. 췌관 내에 유두상 증식이 관찰 되나 악성 변화는 관찰되지 않으며 내부에 세포 종괴가 관찰된다.

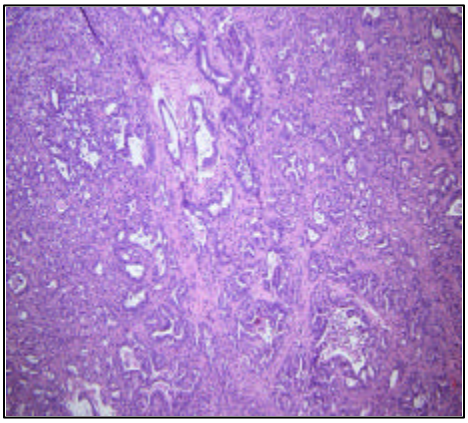
C. 췌관내로의 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되며 일부는 악성화 모습이 의심된다. 일부에서는 편평 상피의 stratified 모습을 하고 있고 일부에서는 goblet cell을 포함한 columnar 모습을 하고 있다.

D. 한 소엽에 국한되어 선방세포 (acini) 위치에 관 모양을 띈 단층배열의 다량의 신생 관복합체가 관찰된다. 세포는 규칙적으로 단층 배열되어 있다.

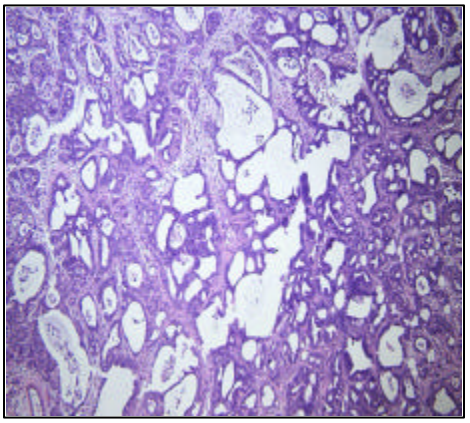
E. 소도 내에 신생 관 구조가 관찰되며 일부에서는 세포의 과 증식이 관찰되고 있다.

F. 한 소엽을 거의 차지하는 신생 관복합체가 관찰되며 일부 관은 유두상 증식 및 이형성 변화를 보이고 있다.

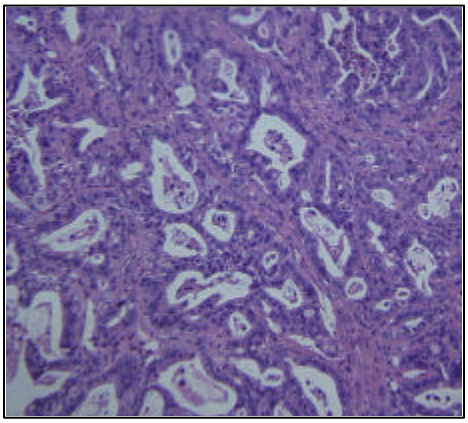
Figure 6. BOP 만을 투여한 군의 조직 병리 (20 주)



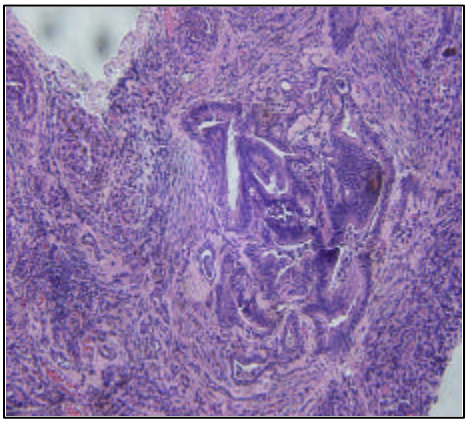
A. H & E stain ´ 200



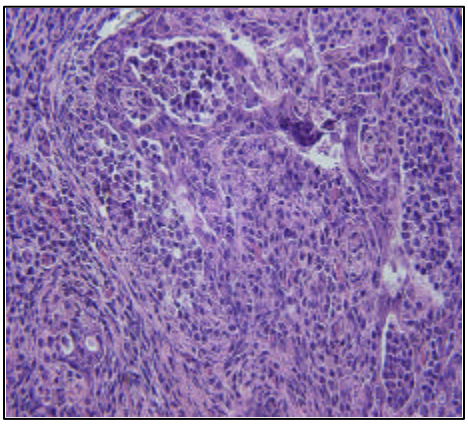
B. H & E stain ´ 200



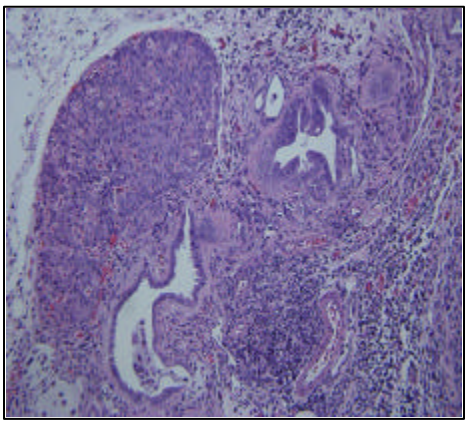
C. H & E stain ´ 400



D. H & E stain ´ 200



E. H & E stain ´ 400



F. H & E stain ´ 100

< Figure 6. 설명 >

A.-C. 분화도가 좋은 ductal adenocarcinoma 가 관찰되고 있다. 주변에 광범위한 섬유화가 관찰된다. 정상 선방세포 (acini) 는 관찰되지 않는다. 일부 관 내에 세포 종괴가 차 있음이 관찰된다.

D. 광범위한 섬유화 및 염증세포로 둘러 쌓인 악성 변화를 보이는 관 구조가 관찰된다.

E. 단층배열을 하고 있는 관 구조 형태에 세포 종괴들이 가득 차 있고 주변에 섬유화로 둘러 쌓여 있다. 세포 종괴들은 소도세포 (islet cell) 과 유사한 모습을 띄고 있다.

F. 증식된 췌관 옆으로 림프절 종대가 관찰된다.

다. 실험군

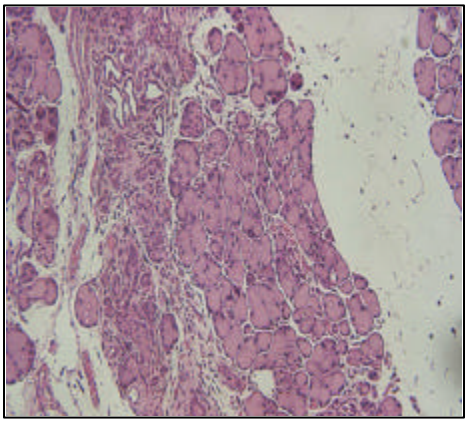
⑴ 16주째 희생시킨 군 (Figure 7)

대조군과 마찬가지로 8마리 모두에서 소도세포의 과증식, 소엽주위와 소엽내 섬유화 및 새로운 관 복합체 형성이 관찰되었으나, 그 정도는 BOP만 투여한 군과 비교해 볼 때 매우 경미하였으며 관 복합체를 구성하는 세관구조의 상피세포들도 모두 단일 층상구조를 띄고 있었다. 반면에 주췌관의 변화는 BOP군과 유사하게 8마리중 4마리에서 유두상 증식이 관찰되었으나 이형성 변화는 관찰되지 않았다.

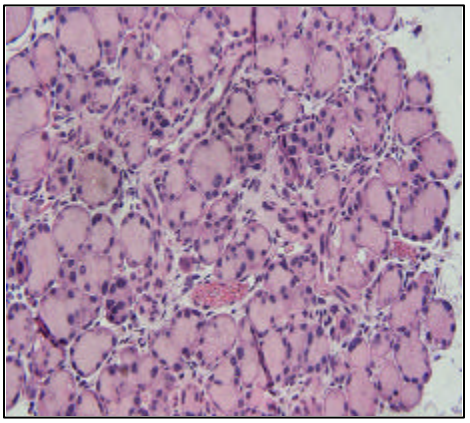
⑵ 20주째 희생시킨 군 (Figure 8)

20주째의 변화는 BOP군과는 확연한 차이를 보여 암이 발생한 경우는 없었다. 비교적 특정 소엽에 국한되어 관 복합체가 형성되기는 했으나 BOP군과 비교하여 그 정도는 매우 경미하였으며 대부분은 정상 선방세포를 유지하고 있었다. 주 췌관은 8마리 모두에서 BOP군과 유사하게 유두상 증식 및 이형성의 변화가 관찰되었으나 악성화 변화는 없었다.

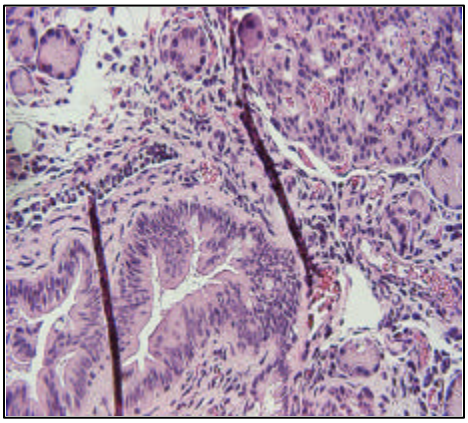
Figure 7. BOP와 FTI를 함께 투여한 군의 조직 병리 (16주)



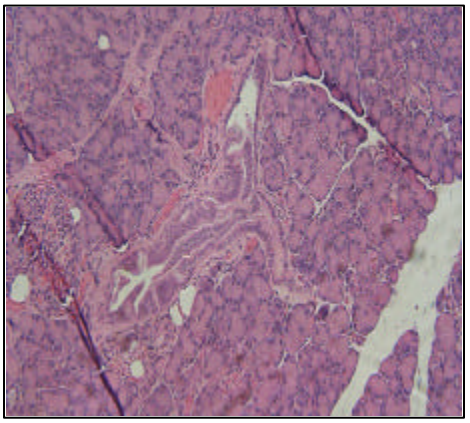
A. H & E stain ´ 200



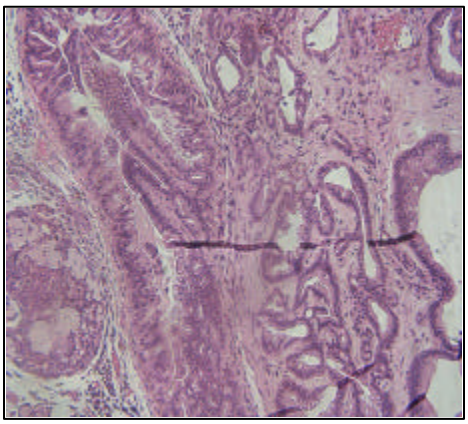
B. H & E stain ´ 400



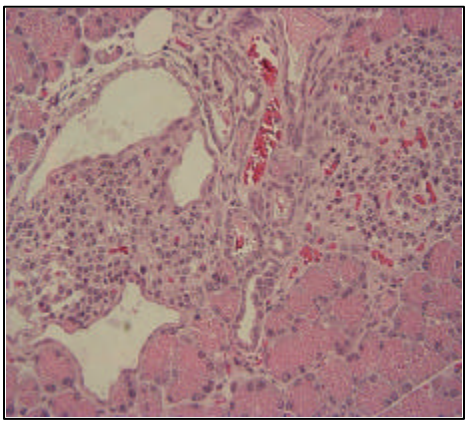
C. H & E stain ´ 200



D. H & E stain ´ 200



E. H & E stain ´ 100



F. H & E stain ´ 200

< Figure 7. 설명 >

A. 전반적으로 비교적 정상에 가까운 선방세포 (acini) 모습을 하고 있으나 일부에서 한 소엽에 국한된 신생 관 복합체가 관찰되고 있으며 이 신생 관 복합체는 단층 평편 배열을 하고 있다.

B. 정상 선방세포 사이에 염증세포의 분포와 섬유화가 관찰된다.

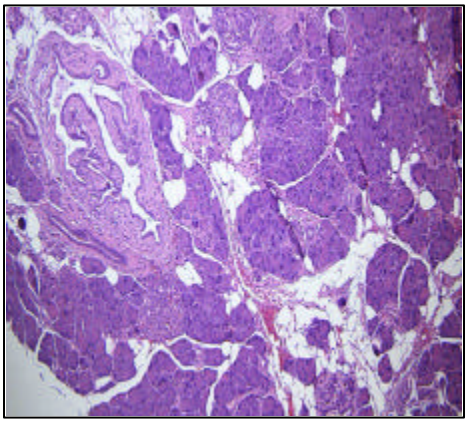
C. 신생 관 복합체의 하나로 추정되는 관 주조의 배열이 유두상 과증식을 보인다.

D. 주변 선방세포는 정상을 띄고 있으나 주 췌관은 유두상 증식 및 이형성 변화를 보이고 있다.

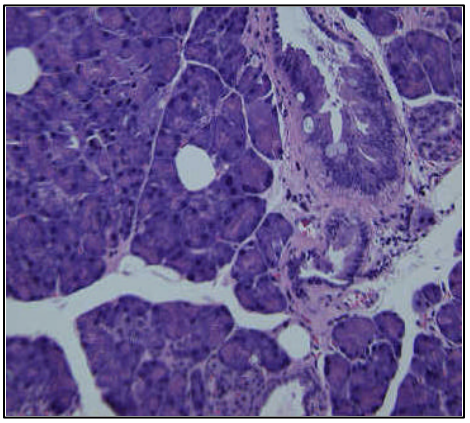
E. 주 췌관 내에 carcinoma in situ 소견이 관찰된다. 일부에서는 평편 세포 배열을 하고 있으나 일부에서는 columnar 배열을 하고 있으며 goblet cell이 관찰된다.

F. 소포세포 (islet) 의 과 증식이 관찰되며 내부에 비정상적인 확장형의 관 구조가 관찰된다.

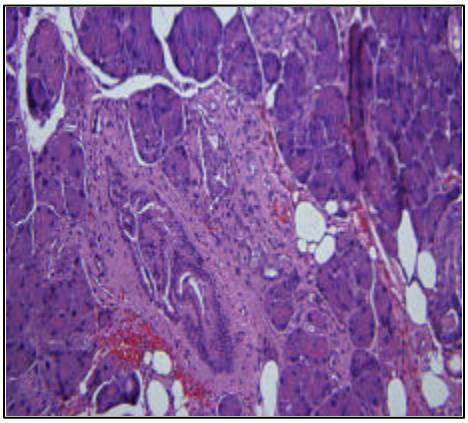
Figure 8. BOP와 FTI를 함께 투여한 군의 조직 병리 (20주)



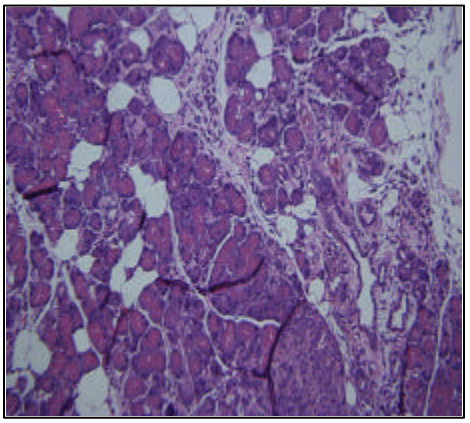
A. H & E stain ´ 200



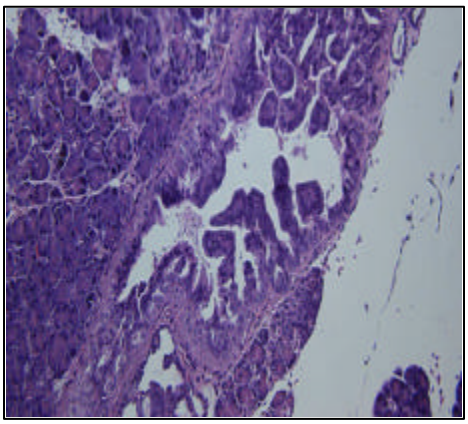
B. H & E stain ´ 200



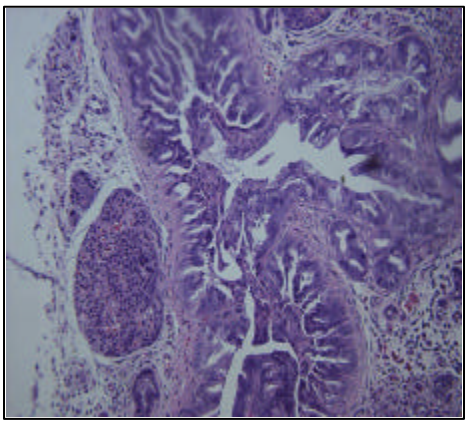
C. H & E stain ´ 200 .



D. H & E stain ´ 200



E. H & E stain ´ 200



F. H & E stain ´ 200

< Figure 8. 설명>

A.-B. 선방세포 (acini)는 비교적 정상을 유지하고 있으나 주 췌관내에는 유두상 증식이 관찰된다.

C. 주 췌관 내 이형성 변화 (dysplasitc change) 를 보이고 있고 대부분의 선방세포 (acini)는 비교적 정상을 유지하고 있으나 일부에서 신생 관 복합체가 선방세포 사이에서 관찰된다.

D. 비교적 정상인 선방세포를 유지하고 있으며 일부에서 신생 관 복합체가 선방세포 사이에서 관찰된다.

E.-F. 주 췌관 내에 carcinoma in situ 가 관찰되나 주변의 선방세포는 정상 소견을 보이고 있다.

3. 대조군과 실험군의 조직 병리학적 비교 분석

대조군과 실험군의 공통적인 변화로는 소엽주위 (perilobular)와 소엽 (lobular) 내의 섬유화·신생 관 복합체(tubular complex) 형성 및 소도세포 (islet)의 과증식 등이 관찰되었다. 또한 주 췌관 내 변화도 두 군 모두 유두상 증식(papillary hyperplasia) 및 이형성 증식(dysplastic hyperplasia), 일부에서는 carcinoma in situ 등, 시기에 따른 두 군간의 차이가 거의 없었다. 소도에서의 변화도 소도세포의 과 증식, 소도 내부와 주변의 신생 관 복합체 형성 및 일부 낭성 변성 등도 두 군 모두에서 큰 차이 없이 관찰되었다. 그러나 선방세포 사이의 신생 관 복합체 형성 및 악성 변화는 실험군이 대조군에 비해 현저하게 억제되는 양상을 보였다. 즉, 20주 째 대조군에서는 대부분의 소엽 내에 신생 관 복합체 형성을 볼 수 있으며, 87.5% 에서 ductal adenocarcinoma 가 관찰되고 있는 반면, 실험군에서는 비교적 선방세포가 정상 모습을 유지하며 악성 변화를 보이는 것은 없었다.

다음은 각 군의 단계별 조직학적 변화의 차이를 표로 표시 한 것이다.

표.1 각 군사이의 췌장내의 조직학적 변화

N=8	Tubular change (In acini)		Papillary hyperplasia (In main duct)		Dysplastic change (In main duct)		Cancerous change (In peripheral)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0
16주 대조군	8/8	100	5/8	62.5	4/8	50	0/8	0
16주 실험군	5/8	62.5	4/8	50	6/8	75	0/8	0
20주 대조군	8/8	100	1/8	12.5	4/8	50	7/8	87.5
20주 실험군	6/8	75	4/8	50	5/8	62.5	0/8	0

Ⅳ. 고 찰

FTI 는 Ras 단백 활성화에 필수적인 farnesylation 과정에 관여하는 farnesyl transferase 의 억제제로, Ras 단백의 비 활성화를 유도 Ras 와 관련된 세포 증식의 억제를 통해 암 억제 효과를 얻음을 배경으로 개발된 물질이다. FTI 는 정상 세포에는 거의 독성을 보이지 않고 암 세포에만 특이적으로 작용한다는 장점이 있는데[14], 이 때문에 처음 개발되었을 때 ras 암 유전자의 돌연변이와 관련 된 암에 있어 획기적인 새로운 치료제로서 기대되어 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔다[14]-[24]. 최근 들어 인체 내에서의 효과를 검증하기 시작하였는데, 아직 임상적 유용성을 논하기는 어려우나 그 효과가 기대 된다. FTI 의 항암 기전에 대해 아직까지 논란이 많은데, 최근 들어 FTI 의 표적 단백이 단순히 Ras 단백만이 아니라는 가설들이 제시되고 있다[22]-[24].

현재까지 FTI 는 *In vitro* 및 동물 실험을 통하여 인간 췌장암 세포주를 포함한 다양한 암세포에서 효과적인 암 억제 효과를 보여왔다[14]-[24]. 항암 반응은 다양한 형태를 보였는데, 세포 고사가 유도되기도 하고 세포주기 중 G1/S 이행을 억제하기도 하며, 어떤 경우는 G2/M 이행을 억제하기도 하였다[18]. 그러나 아직까지 가장 핵심적인 target molecule이 무엇인지에 대해서는 논란이 있다.

췌장암은 인체 암 중에서 특정 암유전자 또는 억제 암유전자의 돌연변이가 가장 높은 빈도로 관찰되는 암이다. 특히 K-ras 암 유전자의 돌연변이는 90-100% 에서 동반되고[26], 암 발생 단계의 초기부터 관여하여 단계적 암화과정이 진행됨에 따라 돌연변이의 빈도도 비례하여 증가한다고 알려져 있어 췌장암의 암화 과정 및 암의 진행 과정 모두에 K-ras 암 유전자가 핵심적인 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 이와 같은 특성을 고려할 때, FTI 사용을 단지 이미 형성된 췌장암의 성장을 억제하는 치료제에만 국한시킬 것이 아니라 암의 발생 초기 단계 즉, 암 전구 병변에의 화학 예방제로서의 사용을 시도해 볼 수 있겠다. 임상적으로 고려해 보면 췌장암의 전구 병변으로 알려진 만성 췌장염 환자에서의 암 예방적 목적으로 사용하는 것이다. 만약 암화 초기 단계부터 FTI를 투여하였을 때 암이 효과적으로 억제되지 않았을 경우 췌장암 발생 과정 초기 단계에 Ras 단백 이외의 다른 기전의

존재를 예측할 수 있을 것이며, 반대로 억제 된다면 이를 통해 Ras processing 내에서 FTI 의 target molecule 을 밝힐 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 이를 배경으로 FTI 를 암 예방 차원에서 암화 초기 단계부터 투여하기 시작하여 FTI 를 투여하지 않은 군과 비교, FTI 가 암 발생 억제 효과를 갖고 있는지, 더 나아가 억제 효과 기전이 어떠한 지 살펴보고자 하였다.

그러나 이 실험에는 몇 가지 제한 점이 있다. H-Ras 와 N-Ras 에 비해 K-Ras 가 FTI 에 대해 저항성을 보이는 점과[14], 암화 과정이 다단계 과정을 통하여 이루어 지기 때문에 K-Ras 의 억제 만으로 암 예방 불가능 할 수도 있다는 점과, 또 K-Ras 단백의 활성을 효과적으로 억제 시킬 수 있는 FTI 의 용량이 확립되지 않은 상태여서 투여를 해도 효과적인 억제가 되지 않을 수 있다는 점이다.

현재까지 발표된 BOP 유도 Hamster 췌장암 모델에서는 9주 이후부터 유두상 과 증식이 보이기 시작하여 16주 이후부터 이형성 변화 및 일부 암화를 보이고 있고 20주에는 70% 이상이 암으로의 변화를 볼 수 있다[12],[13],[25]. 따라서 희생 시기를 각각 16주와 20주로 잡았고, FTI 투여 일을 유두상 증식을 보이는 실험 시작 9주로 잡아 희생 일 까지 투여하였다. 암 예방 목적으로서 사용이 실용성이 있으려면 구강 투여가 가능해야 하기 때문에, FTI 투여를 구강으로 하였고, 이에 따라 약동학적으로 구강 투여가 췌장에 효과적으로 영향을 미칠 수 있을 지 입증하는 실험을 본 실험 이전에 본 실험에 사용할 LBI-42708 을 이용하여 실시하였다. 일정한 혈중 농도 유지를 위하여 매일 투여하였다.

실험군 및 대조군 모두에서 주목할 만한 조직 병리학적 소견은, 신생 관 복합체가 기존의 췌관과는 구별되게 선방세포의 소실과 병행해서 선방세포가 위치해야 할 소엽의 말초에서 관찰되고 있다는 것이다. 그러나 두군 사이에 정도의 차이가 있어 대조군에선 대부분의 췌장 조직이 신생 관 복합체로 대체되고 이의 유두상 증식을 보이고 있었으나 실험군에서는 비교적 정상 선방 구조를 유지하고 있었다. 이와 같은 신생 관 복합체 형성은 TGFα1 을 처리하였을 때나 췌관을 결찰하여 췌장염을 유발시킨 경우에서 관찰되는 신생 관 복합체와 유사한 형태를 갖는데 이는 선방 세포로부터 췌관 세포로 이행분화될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 그리고 20주 째 대조군

에서만 ductal adenocarcinoma 가 관찰되었는데, 아직 단정 지을 수는 없으나 이 암이 주 췌관과는 떨어져 있으며 암 발생 모양 및 위치가 말초 신생 관 복합체의 것과 유사하고, 주 췌관의 변화가 carcinoma in situ (이하 CIS로 약함) 정도의 변화만을 보이고 있어 이 암이 주 췌관 유래가 아닌, 선방 세포로부터 췌관 세포로 이행분화된 후 암으로 발전하는 것으로 가정해 볼 수 있다. 또 FTI 를 투여한 군에서는 투여하지 않은 군과 달리 암이 생성되지 않은 것과 관련하여 이 과정이 K-ras 와 관련이 있고, 반면 주 췌관의 변화는 두 군간에 차이가 없어 주 췌관 내의 변화는 K-ras 와 다른 별개의 기전이 존재할 수 있음을 가정해 볼 수 있다.

최근 들어 인체 췌장암의 90% 이상을 차지하는 ductal adenocarcinoma 가 췌관 세포 자체에서 유래된 것이 아니라 다능성을 지닌 stem cell 이 존재하여 이에서 유래했을 가능성에 대해 제시되고 있는데, 아직 까지 stem cell 의 존재 위치에 대해서는 논란이 되고 있다. 오히려 최근 들어 소도세포나 선방세포가 여러 cytokine 등에 의해 자신의 분화기능을 잃거나 (dedifferentiation), 변화되어 (transdifferentiation) 췌관 세포로 이행되었을 가능성에 대해 제시하고 있다[29)-(33)]. 이 연구들을 바탕으로 할 때 본 실험에서의 조직학적 변화는 암화 과정에 있어 돌연변이 된 K-Ras 의 활성화와 관련되어 선방 세포가 어떤 원인에 의해 그 분화 능력을 잃거나 변환되어 췌관 세포로 변환되어 최종적으로 ductal adenocarcinoma 로 발전된 것이며, 이 과정은 FTI 에 의해 억제될 수 있으며 주 췌관 내에서의 변화와는 별개의 것으로 가정해 볼 수 있다.

결론적으로 FTI가 hamster의 췌장암 발생에 있어 화학 예방으로서의 효과가 있다고 결론 짓기에는 몇 가지 가정이 필요한데, 먼저 BOP 유도 hamster 췌장암의 발암 기전이 인간의 것과 완전히 유사하다는 기본 가정과 함께, FTI 로 억제되지 않았던 주 췌관 내에서의 이형성 변화 및 CIS 정도의 변화가 암으로 발전하지 않는다는 가정이 필요하다. 만약 주 췌관이 암으로 발전하게 된다면 췌장암 발생에 K-ras 외에 또 다른 기전이 존재함을 보여주는 것이 된다.

따라서 본 실험은 좀더 긴 관찰기간을 통한 주 췌관 내의 암화 여부

를 확인할 필요가 있으며 이와 관련된 인자를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다. 즉, K-ras 암 유전자 외에 췌장암 발생의 초기 관련 인자가 있는지 유무와 조직학적으로 관여 부위의 차이에 대한 추가 연구가 있어야 하겠으며, 췌장암 유발이 다단계 과정을 겪는 것을 고려, 암화의 진행에 따른 다양한 다른 암 관련 유전자 변이를 추가적으로 규명을 할 필요가 있겠다.

V. 결 론

본 연구에서는 90-100g 의 무게를 가진 female Syrian Golden Hamster 에 N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) 15㎎/kg 을, 일주일에 한번 씩 시작부터 12주까지 피하 투여한 군을 대조군으로 하고, 동시에 farnesyltransferase inhibitor (FTI) 50㎎/kg 를 유두상 과증식 변화를 보이기 시작하는 9주 때부터 각각의 희생 시기 까지 화학 예방 (chemoprevention) 의 개념으로 매일 구강 투여한 군을 실험군으로 하여 16주, 20주 때 각각 희생 시켜 각 군의 조직학적 변화를 비교 분석하였다.

FTI는 LBI-42708 으로 CAAX peptidomimetics 제재이다.

1. 16주 대조군에서 조직학적 변화를 Hematoxylin & Eosin 염색 하에 관찰한 결과로는 8마리 모두에서 소엽 주위 (perilobular) 와 소엽 내 (intralobular) 의 섬유화·신생 관 복합체 (tubular complex) 형성 및 소도세포 (islet) 의 과 증식이 관찰 되었다. 주 췌관 내에서는 50% 에서 유두상 증식 (papillary hyperplasia) 을, 나머지 50% 에서 이형성 증식 (dysplastic hyperplasia) 을 보였다.

2. 신생 관 복합체는 대부분 단층 배열을 하고 있었고, 일부에서 유두상 증식을 보였으나 이형성 증식은 관찰되지 않았다. 이들 관 복합체는 기존의 췌관과는 구별되게 선방세포의 소실과 병행해서 선방세포가 위치해야 할 소엽의 말초에서 관찰되었는데 이는 선방세포로부터 췌관 세포로의 transdifferentiation에 기인한 결과로 생각되었다.

3. 20주째에는 87.5% 에서 육안상 5-10㎜ 크기의 단단하고 고정되어 있는 결절이 관찰되었고 남은 췌장은 위축되어 있었다. 이 결절의 조직 병리는 ductal adenocarcinoma 형태를 보이고 있었는데, 관 세포들로 치환된 것으로 고려되는 선방세포 위치에 존재하고 있었다. 이 부위는 주 췌관과는 구분되어 있었다. 오히려 주 췌관 내에서는 16주째 와 유사하게 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되었으나 악성화된 증거는 없었다.

4. 16주째 실험군에서도 유사하게 소엽 주위와 소엽 내 섬유화·신생 관 복합체의 형성 및 소도세포의 과증식을 관찰할 수 있었으나 그 정도가 대조 군과 비교해 볼 때 경미하였고, 관 복합체는 거의 모두 단층 배열을 하고 있었다. 반면 주췌관은 대조군과 유사한 정도의 유두상 증식 및 이형성 증식이 관찰되었다.

5. 20주째의 변화는 대조군과는 뚜렷한 차이를 보여 말초 소엽 위치의 암 발생은 전 예에서 없었고, 신생 관 복합체 형성은 일부 특정 소엽에만 국한되어 있을 뿐, 췌장의 대부분은 정상적인 선방세포 구조를 유지하고 있었다. 반면 주 췌관은 대조군과 유사하게 유두상 증식 및 이형성 변화가 관찰되었다.

6. 이와 같은 결과는 ras 암 유전자의 돌연변이가 90% 이상에서 관찰되는 인체 췌장암의 발생 기원세포가 췌관 세포 자체 라기 보다는 선방세포로부터 이행 분화된 새롭게 형성된 관 복합체에 존재하는 세포일 가능성과 함께, 선방세포에서 췌관 세포로의 이행 및 암화 과정에 Ras 단백이 중요한 역할을 할 것임을 의미한다. 또한 BOP에 의한 주 췌관 세포의 증식은 Ras 단백이 아닌 새로운 관련인자가 존재할 것임을 시사한다.

7. 결론적으로 주 췌관 내에서의 변화가 최종적으로 암으로 발전하지 않을 것이라는 가정 하에, FTI가 hamster의 췌장암 유발 과정에서 암 발생을 지연 혹은 억제 시키는 화학 예방으로서의 효과가 있다고 할 수 있고, 따라서 FTI를 임상적으로 췌장암 전구 병변, 예를 들면 만성 췌장염 환자 등에서 암 예방 효과로 투여해 볼 수 있다고 할 수 있다.

VI. 참고 문헌

1. Brennan MF. Pancreatic cancer. Journal of Gastroenterology & Hepatology. 2000;15 Suppl:G13-6.
2. Ginsberg GG. New developments in pancreatic cancer. Seminars in Gastrointestinal Disease. 2000 Jul. 11(3):162-7,
3. Dobelbower RR Jr. The radiotherapy of pancreatic cancer. Seminars in Oncology. 1979;6(3):378-89.
4. Cooperman AM. Kini S. Snady H. Bruckner H. Chamberlain RS. Current surgical therapy for carcinoma of the pancreas. Journal of Clinical Gastroenterology. 2000;31(2):107-13.
5. Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. Advances in Cancer Research. 2000;78:199-334.
6. Konishi Y. Tsutsumi M. Longnecker DS. Mechanistic analysis and chemoprevention of pancreatic carcinogenesis. Pancreas. 1998;17(4):334-40.
7. Gimenez-Conti IB. Slaga TJ. The hamster cheek pouch model of carcinogenesis and chemoprevention. Advances in Experimental Medicine & Biology. 1992;320:63-7.
8. Jagveer S, Nalini K, Gary K, and Bandaru SR. Mudulation of azoxymethane-induced mutational activation of ras protooncogenes by chemopreventive agents in colon carcinogenesis. carcinogenesis. 1994;15(7):1317-1323.
9. Levin B. An overview of preventive strategies for pancreatic cancer. Annals of Oncology. 1999;10(Suppl 4):193-6.
10. Ozawa F. Friess H. Tempia-Caliera A. Kleeff J. Buchler MW. Growth factors and their receptors in pancreatic cancer. Teratogenesis, Carcinogenesis, & Mutagenesis. 2000; 21(1):27-44.

11. Yoichi K, Masahiro T, Toshifumi T. Mechanistic Analysis of Pancreatic Ductal Carcinogenesis in Hamsters. Pancreas. 1998;16(3): 300-306.
12. Wendy LC, Kathy AM, Dante GS. K-ras Mutaion is an Early Event in Pancreatic Duct Carcinogenesis in the Syrian Golden Hamster. Cancer Res. 1992;52:4507-4513.
13. Masahiro T, Satoshi K, Osamu N, Kohsuke H, Eisaku K, Shunji O, Kazuo O, Kanya H, Toshifumi T, Yoichi K. K-ras Gene Mutation in Early Ductal Lesions Induced in a Rapid Production Model for Pancreatic Carcinomas in Syrian Hamsters. Jpn. J. Cancer Res. 1993;84:1101-1105.
14. V.waldmann, H.M.Rabes. What's New in Ras Genes? Physiological Role of Ras Genes in Signal Trasduction and Significance of Ras Gene Activation in Tumorigenesis. Path. Res. Pract. 1996;192:883-891.
15. Adrienne DC, Channing JD. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras? Biochimica et Biophysica Acta . 1997;1333:F51-F71.
16. Nancy EK, Scott DM, S Jane dS, Elizabeth AG, David LP, Samuel LG, Robert LS, Edward MS, ALLen O, Jackson BG. Selective inhibition of ras-Dependent Transformation by a Farnesyltransferase Inhibitors. Science. 1993;260:1934-1937.
17. Peter FL, Daitoku.S, George CP. Farnesyltransferase inhibitors induce Apoptosis of Ras-Transformed Cells Denied Substratum Attachment. Cancer Research. 1997;57:708-713.
18. Edwina CL, yimin Q, Michelle AB, Renae DF, Andreas V, Jiazhi S, Adrienn DC, Channing JD, Andrew DH, Saïd MS. Ras CAAX Peptidomimetic FTI-277 Selectively Blocks Oncogenic Ras signaling by Inducing Cytoplasmic Accumulation of Inactive Ras-Raf Complexes. J of Biological chemistry. 1995:270(45);26802-26806

19. Song SY, Ingrid MM, Robert JC, Jennifer AP, Steven DL. K-ras independent effects of the Farnesyltransferase inhibitor L-744, 832 on Cyclin B1/Cdc2 Kinase Activity, G2/M cell cycle Progression & Apoptosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma cells. Neoplasia.2000;2(3):1-12
20. Kainuma O, Asano T, Hasegawa M, Isono K. Growth inhibition of human pancreatic cancer by farnesyl transferase inhibitor. Gan To Kagaku Ryoho. 1996 ;23(12):1657-9
21. Weisz B, Giehl K, Gana-Weisz M, Egozi Y, Ben-Baruch G, Marciano D, Gierschik P, Kloog Y. A new functional Ras antagonist inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice. Oncogene. 1999;22(18):2579-88.
22. Peter FL and George CP. Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. Oncogene. 1998;17:1439-1445.
23. Wei D, Peter FL, and George CP. Elevation of α2(I) collagen, a suppressor of Ras transformation, is required for stable phenotypic reversion by farnesyltransferase inhibitors. Cancer Research. 1999;59:2059-2063.
24. Nobutaka S, Keith DV, and Fuyuhiko T. Farnesyl-transferase inhibitors induce dramatic morphological changes of KNRK cells that are blocked by microtubule interfering agents. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95:10499-10504.
25. Wendy L. Cerny, Kathy A. Mangold, and Dante G.Scarpelli. K-ras mutation is and early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian Golden Hamster. Cancer Research. 1992;20(11):4507-4513.
26. Mariyama, M. Kishi, K. Obata, H. and Nishimura S. Frequency and types of point mutation at the 12th codon of the c-Ki-*ras* gene found in pancreatic cancers from Japanese patients. JPN. J. Cancer Res. 1989;80:622-626.
27. Precancerous conditions of pancreatic carcinoma. Journal of

Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. 2000;7(6):568-74

28. Pour PM, Kazakoff K. Stimulation of islet cell proliferation enhances pancreatic ductal carcinogenesis in the hamster model. Am J Pathol. 1996;149(3):1017-25.
29. Pour PM, Stepan K. Modification of pancreatic carcinogenesis in the hamster model. VIII. Inhibitory effect of exogenous insulin. J Natl Cancer Inst. 1984;72(5):1205-8.
30. Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ, Adrian TE, Pour PM. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. Gastroenterology. 2001;120(5):1263-70.
31. Permert J, Herrington M, Kazakoff K, Pour PM, Adrian TE. Early changes in islet hormone secretion in the hamster pancreatic cancer model. Teratog Carcinog Mutagen. 2001;21(1):59-67.
32. Wang F, Larsson J, Adrian TE, Gasslander T, Permert J. In vitro influences between pancreatic adenocarcinoma cells and pancreatic islets. J Surg Res. 1998;79(1):13-9.
33. Song SY, Gannon M, Washington MK, Scoggins CR, Meszoely IM, Goldenring JR, Marino CR, Sandgren EP, Coffey RJ Jr, Wright CV, Leach SD. Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. Gastroenterology. 1999;117(6):1416-26.

Abstract

The Chemoprevention Effect of Farnesyl-transferase Inhibitor on Pancreatic Cancer induced by BOP (N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine) in Female Syrian Golden Hamsters

Hye Won Chung

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Si Young Song)

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma is a highly lethal malignancy and resistant to traditional cytotoxic therapy. K-ras oncogene mutation has been shown to be frequent event in this. Ras protein serves as connector between signals generated at plasma membrane and nuclear effectors. Early stage disruption of Ras signaling pathway can have significant potency as a chemopreventive strategy. The activation of Ras protein depends upon its posttranslational farnesylation. High rates of active K-ras oncogene mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma have generated considerable interest in the therapeutic application of novel farnesyltransferase inhibitors (FTIs).

In *in vitro* experiments and transgenic mouse models, FTIs has been proved to suppress of growth of pancreatic cancer cells and induce apoptosis. But, the mechanism has been unknown yet. Mutation of K-ras oncogene is early event in the

carcinogenesis of pancreatic cancer, so the use of FTIs at early stage for chemopreventive effect on pre-cancerous condition (eg. chronic pancreatitis) is considerable interest. But, a comprehensive analysis of the chemopreventive effect of FTIs on pancreatic cancer cells has not been performed. So we conducted the experiment to determine chemopreventive effect of FTIs at pre-cancerous stage of pancreatic cancer, which induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) in hamsters

Method: We used 32 female Syrian Golden Hamsters, which were divided into two groups. In one group, we administrated BOP (15mg/kg) subcutaneously once a week for 12 weeks and FTIs (50mg/kg) orally daily from 9 weeks to terminal day. In the other group, only BOP was administrated. We sacrified them at 16 weeks and 20 weeks after BOP injection.

Redult: At 16 weeks, in all control cases perilobular and lobular fibrosis, neo-tubular complex formation, and islet cell hyperplasia were observed, and in main duct, papillary hyperplasia occurred in half of cases and dysplastic hyperplsia in other half of cases. Most of neo-tubular complex had single layer, and in some cases papillary hyperplasia was seen, but not dysplastic hyperplasia. Unlike usual pancreatic duct, these tubular complex was associated with loss of acinar cells and located at periphery of lobule.

At 20 weeks, in 87.5% of cases, grossly 5-10 mm sized, hard, and fixed nodules were observed, remnant pancreas was atrophied. These nodules had the morphology of ductal adenocarcinoma, and located at periphery of lobule where acinar cells previously had been. These malignant nodules were separated from main pancreatic duct, and in main pancreatic duct, papillary hyperplasia and dysplasic hyperplasia were observed, but no evidence of malignant transformation was seen.

At 16 weeks, in experimental cases, like control cases, perilobular and lobular fibrosis, neo-tubular complex formation, and islet cell hyperplasia were observed, but the degree was less severe. Most of neo-tubular complex had single layer. However, in main pancreatic duct, there was no difference of papillary hyperplasia and dysplastic hyperplasia between experimental cases and control cases.

Changes at 20 weeks were quite different from control group that no adenocarcinoma was found at peripheral lobule. Neo-tubular complex were formed at focal lobules in some cases, and most of pancreas maintained their acinar structures. Although, at main pancreatic duct, papillary hyperplasia and dysplastic hyperplasia were still persisted like control cases.

Discussion: Interestingly, neo-tubular complex formation and malignant transformation from acinar cell were significantly inhibited in experimental cases, but changes at main pancreatic duct were not different between two groups. Possible explanation is that stem cells of human pancreas cancer, which were associated with ras oncogene mutation in 90% of cases, might be existed at neo-tubular complex originated from acinar cells, and hyperplasia of main pancreatic duct might be associated with factors other than ras oncogene.

Above results suggested FTI possessed chemopreventive effect for BOP-induced pancreas cancer in hamster by inhibiting activation of Ras protein in condition that pancreatic main duct would not change into malignancy. Further studies regarding its clinical application are expected.

Key word : FTIs, BOP, Hamster, pancreatic cancer, chemoprevention.