

KAERI/CM-1044/2007

양성자가속기 이용자프로그램 개발 및 운영

Development and management of  
proton accelerator user program

양성자조사에 의한 암의 저산소부위의 세포사멸유도연구

Induction of cancer cell death by proton beam in tumor  
hypoxic region

*KAERI*

경북대학교

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원 양성자기반공학기술개발사업단장 귀하

본 보고서를 “양성자가속기 이용자프로그램 개발 및 운영” 과제의 소과제 “양성자조사에 의한 암의 저산소부위의 세포사멸유도연구” 의 보고서로 제출합니다.

2008. 4. 30

연구수행기관명 : 경북대학교 자연과학대학

연구책임자 : 이 유 미

연구원 : 허 태 린

” : 이 큰 별

” : 장 근 혁

” : 김 하 나

” : 이 선 희

” : 정 명 환



KAERI

보고서 초록

과제관리번호	B-6-1(이용자) C-1-2(지역)	해당단계 연구기간	2단계 3차년도 ('07.4~'08.3)	단계 구분	
연구사업명	세부사업명	양성자가속기반공학기술개발사업			
연구과제명	세부과제명	양성자가속기 이용자프로그램 개발 및 운영			
	소과제명	양성자조사에 의한 암의 저산소부위의 세포사멸유도연구 Induction of cancer cell death by proton beam in tumor hypoxic region			
연구책임자	이 유 미	해당단계 참여연구원 수	총 : 7 명 내부 : 5 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부: 30,000 천원 기업: 천원 계: 30,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 자연과학대학 생명과학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>양성자 빔은 독특한 에너지 전달 특성으로 정상 세포를 제외한 종양 세포에 대한 처리가 가능하며, 여러 암 치료에 응용되고 있다. 그러나 신생 혈관 발생에 있어서 양성자 빔의 연구는 아직까진 미흡하다. 여기서 혈관 신생 과정의 억제에 양성자 빔의 효과를 살펴보기 위해 zebrafish 모델을 이용하였는데, flk-1-GFP transgenic embryo를 이용하여 발생 과정이 저해되고 혈관 발생에 이상을 보임을 확인했다. 그리고 DNA damage가 일어난 세포들이 정상 embryo와 비교하여 유의적으로 늘어났음을 확인했다. 그리고 HUVEC을 이용한 실험을 통해, 세포 사멸이 증가했음을 알 수 있었는데 항산화제인 N-acetyl cystein (NAC)의 전처리를 통해 그 증상이 사라짐을 확인했다. 이로써 저농도의 양성자 빔에 의해 신생 혈관이 현저히 억제됨을 확인하였으며 이는 reactive oxygen species (ROS) 매개 세포사멸에 의한 것으로 추정되었다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	양성자 빔, SOBP, 혈관 형성, 내피 세포, 세포사멸, 제브라피쉬			
	영 어	proton beam, SOBP, blood vessel formation, endothelial cells, cell death, zebrafish			

## I. 제목: 양성자조사에 의한 암의 저산소부위의 세포사멸유도연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

암세포 내부에 존재하는 저산소 부위에 대한 양성자 빔의 방사선 조사는 세포적인 단계에서 진행되어 왔던 것이 사실이다. 이는 동물 모델 시스템을 이용한 실험의 경우, 실험 대상에 대한 크기, 운동성 등의 여러 환경적인 제어가 불가능하다는 것이 그 이유였는데, 상대적으로 규모면에서 작고 제어하기 쉬운 범위에 속하는 zebrafish 모델 시스템을 이용해 저산소 상태에서 나타나는 혈관신생의 억제 효과능력과 세포사멸효과를 판단함으로써 양성자 빔 조사를 위한 동물 모델 시스템으로 적절한지 여부를 확인하여 이를 이용한 향후 동물 실험에 대한 기술 확보 및 검증은 목적으로 하였다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1, 2차년도에 확립한 최적의 암세포 사멸조건을 바탕으로, zebrafish에서 양성자 빔을 조사하여 저산소부위에서 생성되는 혈관신생을 양성자 빔에 의해 억제하는지를 확인하여 in vivo system으로 extrapolation이 가능한지 확인하고, 또한 세포사멸에 대한 효과를 확인하여 간접적으로 암세포의 저산소부위에서의 세포사멸 효과를 알아보고자 하였다.

### IV. 연구개발결과

- ① Flk-GFP transgenic zebrafish 에 beam을 proton beam (35 MeV)을 1, 2, 5 Gy를 조사하였을 때, dose가 증가할수록 zebrafish의 혈관형성이 억제 되어 몸의 길이가 짧아짐으로써 배아 발달이 저해되는 것을 관찰하였다.
- ② Proton beam (35 MeV)을 1, 2, 5 Gy를 조사하였을 때 dose 가 증가할수록 zebrafish embryo의 꼬리와 머리부분에 cell death가 증가하는 것을 관찰하였다.
- ③ 사람의 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)과 mouse fibroblast 세포를 양성자 빔 1, 2, 5 Gy를 처리하여 관찰한 결과, 세포사멸을 관찰할 수 있었으며, 이는 cell cycle subG-1 phase 의 증가로 다시 한 번 확인하였고, N-acetyl cystein (NAC) 처리 시, ①에서 관찰된 혈관 신생 저해 효과가 회복되었다. 또 이러한 세포사멸을 일으키는 것은 양성자 빔에 의한 ROS 증가가 원인일 수 있음을 확인하였다.

### V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과는 양성자 조사에 의한 저산소 부위의 세포 사멸에 대한 연구를 진행하는데 기초자료 및 결과로 활용할 수 있다. 발생 과정 중에서 존재하는 저산소 부위에서 세포 사멸이 일어나는지, 세포 유형에 따른 세포 사멸이 일어나는지, 신생혈관 억제제와 관계하여 세포 사멸의 정도가 차이가 있는지 등과 같은 연구가 가능할 것이고, 이상의 실험이 zebrafish 모델 시스템으로 충분히 연구 가능함을 밝힘으로써 발생, 독성, 암치료 혈관 관련 질환의 실험적 모델 등으로 다방면으로 활용할 계획이다.

## S U M M A R Y

I. Title: Induction of cancer cell death by proton beam in tumor hypoxic region

### II. Aim and Background of the study

Proton beam has been applied to treat various tumor patients in clinical studies. However, it is still undefined whether proton radiation can inhibit the blood vessel formation and induce the cell death in vascular endothelial cells in growing organs. The aim of this study are first, to develop an optimal animal model for the observation of blood vessel development with low dose of proton beam and second, to investigate the effect of low dose proton beam on the inhibition of blood vessel formation induced by hypoxic conditions.

### III. Scope and methodology of the study

In this study, *flk1-GFP* transgenic zebrafish embryos were used to directly visualize and determine the inhibition of blood vessels by low dose (1, 2, 5 Gy) of proton beam with spread out Bragg peak (SOBP). And we observed cell death by acridine orange staining at 96 hours post fertilization (hpf) stage of embryos after proton irradiation. We also compared the effects of proton beam with those of gamma-ray. An antioxidant, N-acetyl cystein (NAC) was used to investigate whether reactive oxygen species (ROS) were involved in the cell deaths induced by proton irradiation.

### IV. Results

Irradiated *flk-1-GFP* transgenic embryos with proton beam irradiation (35 MeV, spread out Bragg peak, SOBP) demonstrated a marked inhibition of embryonic growth and an altered fluorescent blood vessel development in the trunk region. When the cells with DNA damage in the irradiated zebrafish were stained with acridine orange, green fluorescent cell death spots were increased in trunk regions compared to non-irradiated control embryos. Proton beam also significantly increased the cell death rate in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), but pretreatment of N-acetyl cystein (NAC), an antioxidant, recovered the proton-induced cell death rate ( $p < 0.01$ ). Moreover, pretreatment of NAC abrogated the effect of proton beam on the inhibition of trunk vessel development and malformation of trunk truncation.

## V. Application of the study

From this study, we found that proton radiation therapy can inhibit the blood vessel growth which is probably induced in hypoxic region *in vivo* in zebrafish embryos. The inhibition of blood vessel formation by proton beam might be caused by vascular cell death through the increased ROS generation. Therefore, proton therapy can be applied to treat tumor angiogenesis as well as abnormal vessel formation developing in hypoxic region.



## C O N T E N T S

1. Necessity of the study .....	8 P
2. Background of the study .....	8 P
3. Scope and Results .....	10 P
4. Accomplishment and contribution to related fields .....	16 P
5. Applications .....	16 P
6. References .....	17 P



## 목 차

1. 연구개발의 중요성 .....	8 쪽
2. 국내외 연구동향 .....	8 쪽
3. 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	10 쪽
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	16 쪽
5. 연구개발결과의 활용계획 .....	16 쪽
6. 참고문헌 .....	17 쪽





# 1. 연구개발의 필요성

## 가. 연구과제의 중요성 및 독창성

### (1) 연구의 중요성

#### - 기술적 측면:

본 연구는 양성자 빔에 의한 암세포사멸 유도에 있어서 암세포 내부에 존재하는 저산소 부위에 대하여 동물 모델 시스템 상에 양성자 빔의 효과를 관찰하는데 그 중요성이 있다. 동물 모델 시스템의 특성상 양성자 빔 조사의 어려움으로 그 실험이 쉽지 않았던 상황에서 zebrafish 모델을 이용하여 양성자 빔 조사를 진행함으로써 연구 진행의 유효성을 알아본 실험으로 향후 연구에 활용가능 여부를 알 수 있다. Flk1-GFP transgenic line을 이용하여 양성자 빔을 조사한 후, 혈관 신생 과정에 있는 zebrafish에서 어떠한 영향이 있는지 확인하고, acridine orange 시약을 이용하여 apoptosis가 일어나는지 여부를 확인하는 연구이다.

#### - 경제·산업적 측면:

기존의 암의 방사선 치료는 저산소 부위에 그 효과가 저하되어 암세포의 내성을 유발하게 됨으로써 암세포가 더욱 성장하게 될 뿐 아니라 암의 재발에 대한 위험성을 막을 수 없는 한계를 나타내었지만, 양성자에 의한 치료가 저산소 부위의 암세포까지도 세포사멸을 유도할 수 있다면 이는 방사선 요법에 의한 암치료에 큰 변화를 가져올 수 있을 것이다. 또 동물 모델 시스템에서 양성자 빔 조사의 효과를 확인함으로써 양성자 빔이 치료 방법으로 얼마나 유효할 수 있는지 확인이 가능할 것이다. 이로써 얻을 수 있는 경제적, 산업적인 중용성은 현재의 암환자의 증가추세와 암수술 후 암의 재발률을 볼 때 국가적, 민간의 의료산업분야에서 부가가치가 높은 분야로서 양산될 수 있을 것으로 생각된다.

#### - 사회·문화적 측면:

양성자 조사에 의한 암의 저산소 부위에서의 세포사멸내성을 극복하는 것은 암의 치료율을 높이고 재발의 가능성을 낮출 수 있기 때문에 증가추세에 있는 암 환자들에게 희망과 삶의 행복을 가져다 줄 수 있는 연구가 될 것이다. 이는 사회적으로나 문화적인 면에서 계산할 수 없는 효과를 낼 것으로 생각된다.

### (2) 연구의 독창성

저산소에 의한 방사선 조사의 세포사멸 저해의 극복여부에 대한 관점에서 연구를 시도하는 것이며, 특히 동물 모델에서 양성자 조사의 강도와 시점에 대한 효과를 직접 관찰하여 저산소 부위에 대한 동물 모델 실험이 가능한지 여부를 판단하는 것이 본 연구의 특성이다. 동물 모델 시스템으로 zebrafish를 이용하는 데, Flk1-GFP transgenic line을 이용하여 blood vessel을 형성하는 부위에 GFP를 발현하는 embryo를 획득한 후, 이를 양성자 빔을 조사하여 혈관 신생의 영향을 살펴보고 세포사멸의 정도를 관찰하는 연구이다.

이 과정에서 zebrafish가 양성자 빔 조사 연구에 효과적인 동물 모델이 될 수 있는지 알아보고 저산소 부위에 대한 양성자 빔 조사 효과를 연구하는데에 연구의 독창성이 있으며 이의 효용성을 확인하는 방법적 독창성을 적용한 연구이다.

# 2. 국내외 연구 동향

## 가. 유사 연구사례에 대한 조사 현황

## (1) 암의 저산소 상태와 방사선 조사 내성연구:

(가) 오랜 기간 동안 방사선 요법으로 암치료를 연구해 온 암전문가들은 방사선 요법에 방해가 되는 요소가 바로 암세포 내 저산소 상태일 것이라고 추정하게 되었는데, 이유는 세포 내 산소농도가 25-30mmHg 이하의 경우 radiosensitivity가 급격히 저하되는 것이 관찰되었고 산소가 존재하면 많은 양으로 생성되는 free radical (또는 ROS)이 DNA damage를 초래하여 DNA repair 기회가 감소됨에 따라 apoptosis가 증가되는 것이 관찰되었기 때문이다. 또한 화학 요법제에 의한 항암제 투여 역시 그 약물의 효과를 최대화하기 위해서는 세포 내 산소가 필수적이지만 저산소 부위에서는 약물에 의한 세포사멸은 이루어지지 않고 그 반대의 현상이 일어나게 된다.

(나) 암치료제 (방사선 조사 등)에 대한 저산소 부위의 내성은 몇 가지 기전에 의해 일어날 것으로 추정된다.

① 직접적 원인: DNA damage의 고착화 실패.

② Proteomic change와 관련된 간접적 원인:

- ㉠ 증식의 kinetics 감소
- ㉡ G1/S phase arrest: G0 phase cell 수 증가
- ㉢ Glutathione 및 관련 thiol의 감소
- ㉣ DNA repair enzyme과 내성관련 단백질의 증가

③ 유전체와 clonal selection과 관련된 간접적 원인:

- ㉠ Apoptosis와 분화의 감소
- ㉡ Clonal heterogeneity
- ㉢ 내성 clone의 증식
- ㉣ Aggressive phenotype을 가진 cell 수 증가

④ 2차적인 원인: 강력해진 glycolysis 경로와 세포 외부의 acidosis로 생각된다.

(다) 이를 극복하기 위해 암치료 전문가들은 그동안 많은 연구와 노력을 기울여 왔는데, 예를 들면, 저산소 부위에만 결합하는 화합물 (misonidazol, pimonidazol 등 imidazol 연관)을 개발하여 free radical을 증가시켜 방사선의 치료효과를 높이고자 하였고, 또한 직접적으로 산소 농도를 높이는 방법도 강구하기도 하였다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고 여전히 암 내부에는 저산소가 존재하게 되고 이러한 암치료 요법의 한계가 줄어들지 않고 있다.

## (2) 양성자 빔을 이용한 암치료 연구:

그동안의 암에 대한 양성자 치료는 그동안 포괄적인 상대적 생물학적 효능을 사용하여 왔는데 보통 처음의 빔 에너지 또는 특정 부위와 관계없이 적용되는 것이었다. 양성자 빔에 의한 RBE가 목적 부위의 가장자리에서 높은 것을 관찰하였고, in vivo 동물 실험 모델에서 감마선 조사보다 DNA damage와 micronucleus 형성 및 apoptosis가 증가됨을 보았고, 세포 생존은 감소하였으나, gamma선 조사보다 조사 후 정상세포로 회복이 늦게 됨을 알 수 있었다. 하지만 여전히 정상세포와 암세포에서 모두 저에너지 (7-33keV)의 양성자 조사에 의해서 세포가 사멸했으며 이는 감마선보다 효과가 좋은 것으로 나타났다. 특히 재미있는 사실은 감마선에 의해 내성을 나타내는 세포조차 양성자 조사에서는 효과가 좋은 것으로 관찰되었다. 또 양성자가 부위에 따른 에너지 발생이 다르게 나타나기 때문에 치료 시 치료 부위까지의 거리와 치료 부위의 깊이 등을 고려하는 연구도 진행하고 있으나 아직 정확한 데이터는 부족하다.

(가) 국내의 경우: 국내에서는 연구 진행 사례가 없다.

(나) 조사한 연구 개발 사례에 대한 자체분석 및 평가 결과

이러한 양성자 빔을 이용한 암치료 연구를 조직적으로 동물 모델에서 진행한 연구는 안구암 등에서 진행한 몇몇의 보고를 제외하고는 매우 드물며, 특히 암조직의 내부에 존재하는 저산소 부위에 대한 고려와 이를 직접 실험적으로 증명하려고 하는 연구는 부족하다. 그러므로 본 연구의 필요성이 절실하다.

### 3. 연구개발 수행 내용 및 결과

#### 가. 연구수행 방법

(1) 세포배양: Human umbilical vascular endothelial cell과 Nih3T3 cell을 각각 20% FBS, antibiotics(streptomycin/penicillin)를 포함한 Media 199와 10% FBS, antibiotics가 포함된 Dulbecos' minimal essential media (DMEM)에 배양하였다. 배양기 조건은 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 조건으로 37°C에서 배양하였다.

(2) 세포사멸 관찰: HUVEC 세포와 Nih3T3 세포에 양성자 빔을 조사하여 48시간 이후 MTT assay를 실시하였다.

(3) ROS 측정 : 양성자 빔이 조사된 세포들을 배양 dish에서 떼어낸 다음, 2uM의 Dichlorofluorescein (DCF) diacetate를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 배양되었다. 이후, FACS Calibur 를 이용하여 ROS 정도를 관찰했다.

(4) 혈관내피세포에 발현되는 VEGF receptor인 Flk-1에 GFP를 발현하도록 한 transgenic zebrafish를 유지하여, wild type인 AB와 mating시켜 Flk-1 transgenic zebrafish embryo를 획득했다.

(5) 일반적인 zebrafish stage 관찰을 위해, ZEISS Stemi 2000 모델을 이용하여 관찰을 했으며, stage 관찰과 GFP 발현, 부위별 defect 관찰은 LEICA MZFLIII를 이용했다. 또한, ZEISS axioskop과 ZEISS Imager.Z1 모델을 이용하여 사진 관찰을 했다.

(6) in vivo 세포사멸 실험 : 96hpf stage embryo에서 세포사멸 정도를 확인하기 위해, stage 2 ~ 3h 전에 sample을 모으고, PBS-tw (tween 0.1%)를 10 ~ 30초간 처리하여 coating한 후, room temperature에서 1시간 동안 acridine orange를 처리한다. (암반응을 시켜야 하므로, 호일 로 감싸준다) 이후, linger 1% 용액으로 20분간 4 ~ 5회 washing한 후, tricaine 용액을 이용하여 마취 후, 3% methyl cellulose에 mounting하여 관찰했다.

(7) 양성자 빔 조사: 양성자기반공학기술개발 사업단이 확립한 양성자가속 장치 (Cyclotron,

Scanditronix, Sweden, 서울 원자력 병원 내 위치)를 이용하여 각 조사선량별로 세포에 조사하여 암세포사멸능력을 조사하였다. 이와 비교실험을 위하여 경북대병원 방사선과에 있는 감마선을 같은 방법으로 조사하였다.

## 나. 연구수행 내용 및 결과

### (1) 연구내용

- (가) 저에너지 양성자 빔에 의한 zebrafish 에서 혈관신생과정 억제 여부 및 그에 따른 세포사멸 연구.
- (나) 저에너지 양성자 빔에 의한 HUVEC 과 Nih3T3 cell 의 세포사멸 및 ROS 생성정도 연구.
- (다) 저에너지 양성자 빔 조사와 감마선 조사 간에 zebrafish에서 혈관신생과정 억제 결과에 대한 비교 연구.

### (2) 연구결과

#### (가) Flk-GFP transgenic zebrafish에 양성자 빔을 조사하여 혈관신생억제효과 관찰

Flk1-GFP transgenic zebrafish와 wild type 인 AB zebrafish 간에 mating을 하여, 양성자 빔 조사 실험을 진행하기 위해 필요한 sample embryo 를 획득했다. 그리고 zebrafish embryo 의 stage가 24 시간 무렵을 지날 때, 양성자 빔 (35 Mev)을 1, 2, 5 Gy 의 dose로 embryo 들에 조사하였다. 양성자 빔의 dose가 증가할수록 zebrafish embryo 의 혈관형성이 억제 되어 혈관의 퍼져나감이 온전치 못하고 그로 인해 전체적인 몸의 길이가 짧아짐으로써 배아 발달이 저해되는 것을 관찰하였다 (Fig. 1, 2).

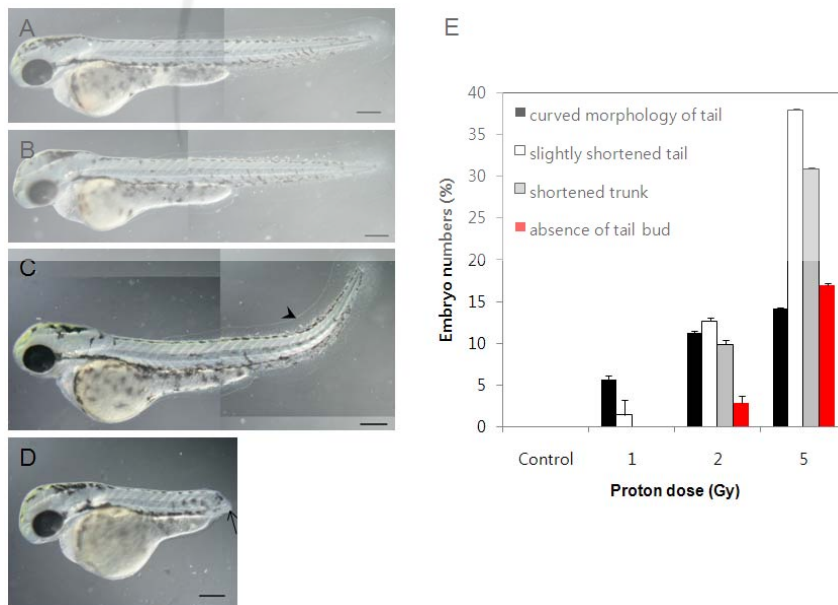


Fig. 1. Gross morphology and abnormalities observed in zebrafish embryo after irradiated with proton beam. A) Embryos at 24 hpf stage were irradiated with proton 0 (A), 1 (B), 2 (C) and 5 Gy (D). After 24 h (48 hpf), gross morphology was observed under the stereomicroscope and pictured. Scale bar is 200  $\mu\text{m}$ . Treatment of proton resulted in curved tail (arrow in C), shortened tail or the absence of tail bud (D) in whole embryos. E) The ratio of embryos with defects in each dose is shown.

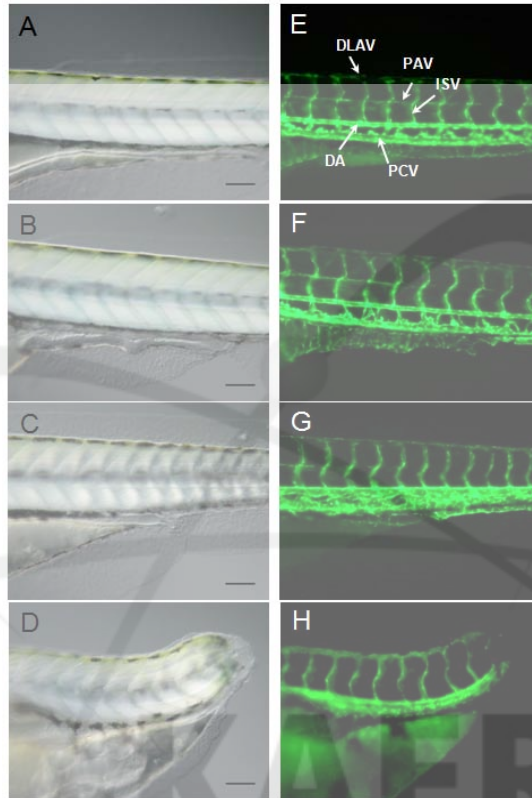


Fig. 2. Effect of proton beam on the development of blood vessels in trunk and tail regions. *Flk-1-GFP* transgenic zebrafish was irradiated with proton beam 0 (A, E), 1 (B, F), 2 (C, G) and 5 Gy (D, H) at 24 hpf. Pictures with light (A-D) and dark fields (E-H) of embryos show respective GFP fluorescence of micro-vessels in proton-irradiated *flk-1-GFP* transgenic zebrafish embryos at 96 hpf under the fluorescent stereomicroscope. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ . DLAV, dorsal longitudinal anastomotic vessel, PAV, parachordal vessel, ISV, intersegmental vessel, DA, dorsal aorta, PCV, posterior cardinal vein.

#### (나) Flk-GFP transgenic zebrafish와 혈관내피세포에서 세포사멸유도효과를 관찰

역시 24 시간 무렵의 zebrafish embryo 에 양성자 빔 (35 MeV)을 1, 2, 5 Gy 조사하였을 때, 96 hpf stage 에서 dose 가 증가할수록 zebrafish embryo 의 꼬리와 머리 부분에 cell death가 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3). 이는 acridine orange를 사용한 DNA damage 여부 실험에서, green fluorescence를 관찰함으로써 확인할 수 있었다.

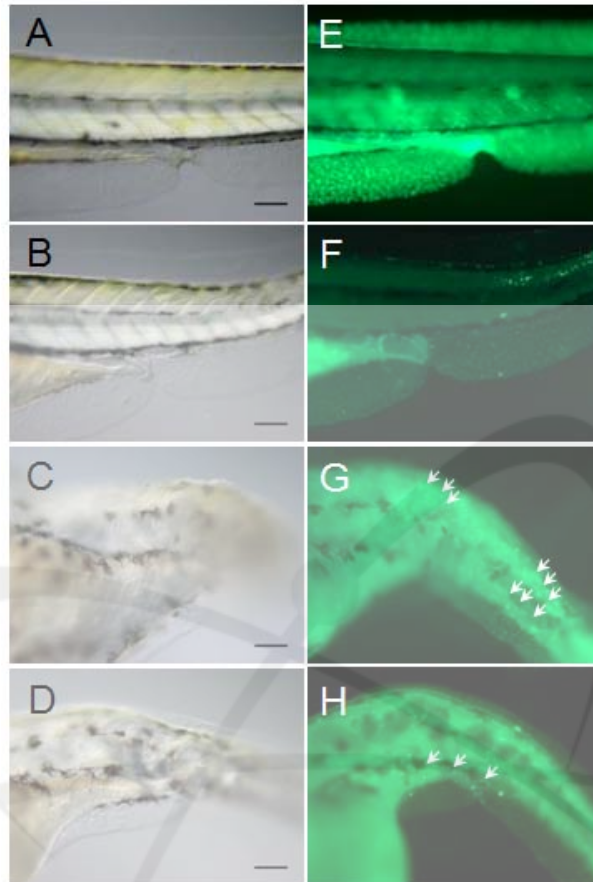


Fig. 3. Effect of proton beam on cell death in trunk and tail bud regions of zebrafish embryos. Irradiation of proton was same as described in Fig.1 and 2. Damaged cells were fluorescently spotted (arrows in G, H) under the fluorescent microscope after stained with acridine orange at 96 hpf. Pictures with light (A-D) and dark fields (E-F) of embryos show respective GFP fluorescence of DNA damaged green fluorescent spots. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

#### (다) 혈관내피세포와 정상 fibroblast에서 양성자빔에 의한 세포사멸 관찰

사람의 혈관내피세포인 HUVEC 세포와 마우스 fibroblast (Nih3T3)를 대상으로, 양성자 빔 1, 2, 5 Gy 처리 후 MTT assay를 통해 관찰한 결과, 역시 세포수준에서도 양성자 빔이 dose 에 따라 세포사멸이 진행됨을 관찰할 수 있었으며, 이는 FACS Calibur를 이용한 측정을 통한 분석에서도, cell cycle subG-1 phase 의 증가로 다시 한 번 확인할 수 있었다. 또 이러한 세포사멸을 일으키는 것은, Dichlorofluorescein (DCF) diacetate 를 통한 양성자 빔에 대한 ROS 증가를 확인하는 것으로써, ROS에 의해 세포사멸이 매개되는 것으로 사료된다 (Fig. 4).

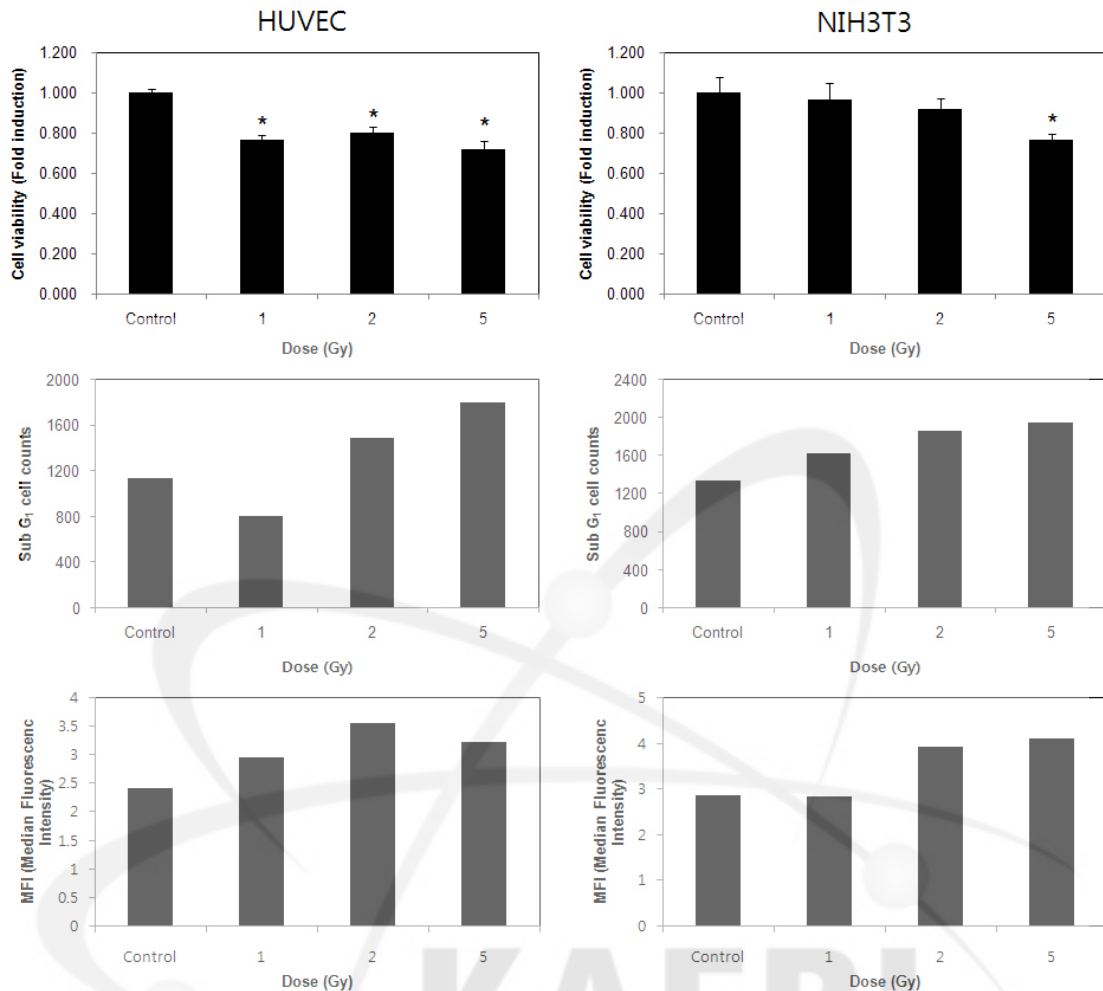


Fig. 4. In vitro effects of proton beam on the cell death of vascular cells. HUVECs and NIH3T3 cells were irradiated with proton beam (1, 2, 5 Gy) and at 48 h after irradiation, cell viability was checked with MTT assay, subG<sub>1</sub> phase cell population was determined with FACS analysis and ROS generation was also examined. MFI is median fluorescent intensity. Significance was examined  $p < 0.01$  (\*).

(라) Flk-GFP transgenic zebrafish에 감마선을 조사하여 혈관신생억제효과 관찰

Flk1-GFP transgenic zebrafish와 wild type 인 AB zebrafish 간에 mating을 하여, 감마선 조사 실험을 진행하기 위해 필요한 sample embryo 를 획득했다. zebrafish embryo stage가 24 시간 무렵을 지날 때, 감마선을 양성자 빔에서 조사한 조사량과 동일한 정도로, 1, 2, 5 Gy 의 dose로 embryo 에 조사하였다. 양성자 빔의 경우, 조사 dose가 증가할수록 zebrafish embryo 의 혈관형성이 억제되었던 것에 반하여, 감마선의 경우, dose가 증가함에 따른 혈관형성 억제 효과를 뚜렷하게 관찰할 수가 없었다 (Fig. 5, 6).

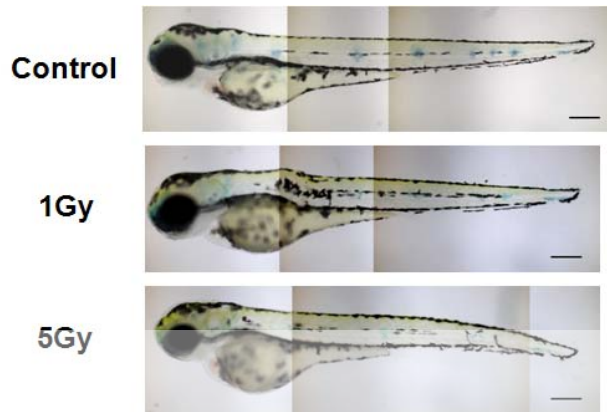


Fig. 5. Gross morphology of zebrafish embryo at 72 hpf after irradiated gamma ray. 24 hpf stage embryos were irradiated with gamma ray at 1, 2, 5 Gy. After 48 h, gross morphology was observed under the stereomicroscope. Scale bar is 200  $\mu\text{m}$ .

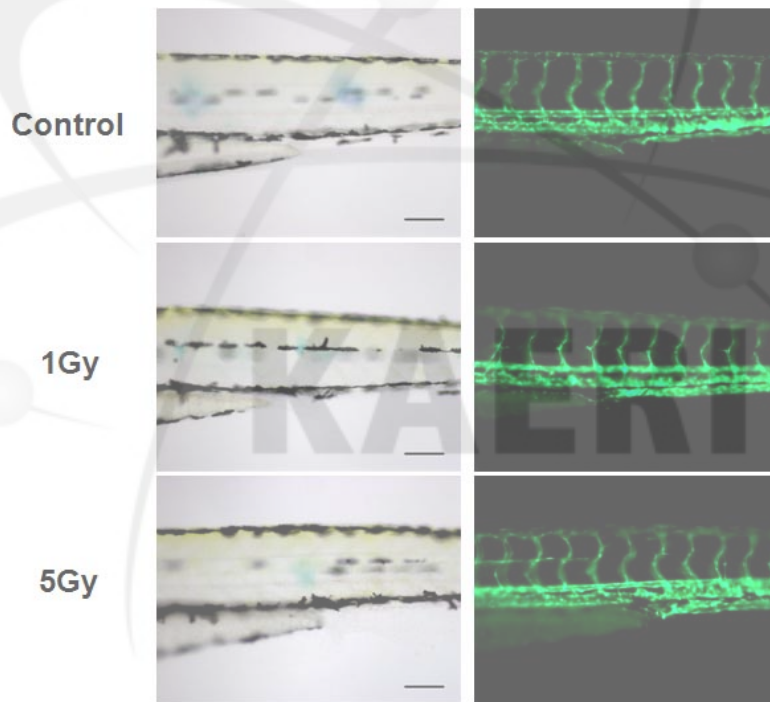


Fig. 6. Blood vessel development in trunk and tail region. Flk-1-GFP transgenic zebrafish was irradiated with gamma ray at 1, 2, 5 Gy at 24 hpf stage, and the green fluorescent blood vessels were observed at 72 hpf under the fluorescent stereomicroscope. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

#### (마) Antioxidant인 NAC의 처리에 의한 anti-angiogenesis 효과의 상쇄

Flk1-GFP transgenic zebrafish와 wild type 인 AB zebrafish 간에 mating을 하여, sample embryo를 획득했다. zebrafish embryo stage가 24 시간 무렵을 지날 때, antioxidant인 NAC을 처리하여 양성자 빔을 1, 2, 5 Gy 의 dose로 embryo 에 조사하였다. NAC을 처리하지 않은 것과 처리한 것의 결과를 비교하면, NAC을 처리하였을 때, 양성자 빔 조사를 통해 관찰되었던 anti-angiogenesis의 효과가 사라짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 7B-7G). HUVEC을 이용한 세포 실험의 경우에서도, 2 Gy의 양성자 빔 조사시, NAC의



처리 유무에 따라 생존의 정도에 차이가 있음을 알 수가 있다 (Fig. 7A).

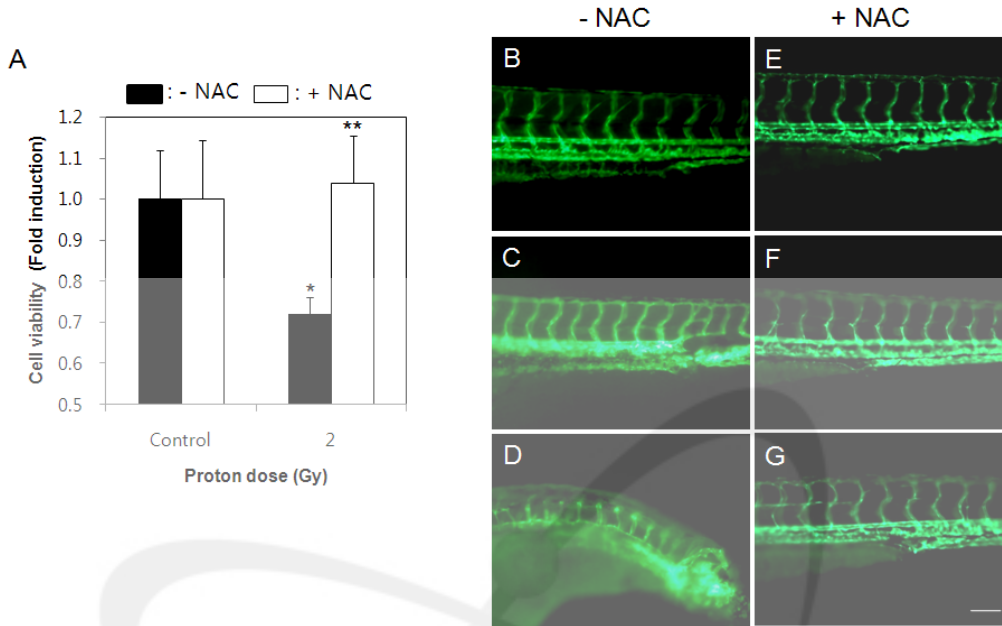


Fig. 7. Antioxidant treatment rescued the cell death of vascular endothelial cells or abnormal vessel development in trunk and tail bud regions induced by proton beam. A) Pretreatment of NAC rescued the cell viability induced by 2 Gy of proton beam. Significance was examined  $p < 0.01$  (\*) compared to control and to 2 Gy proton only (\*\*). B, E) No treatment of proton beam (control). C) 2 or D) 5 Gy of proton beam induced altered morphology of blood vessel development including no tail bud. E-G, however, NAC pretreatment abrogated the effect of F) 2 or G) 5 Gy of proton on the abnormal vessel development. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 2단계 (3차년도 2007~): 동물 모델에서 양성자 빔의 농도별 조사 수준을 비교 결정하였다. 1, 2차년도에 확립한 최적의 암세포 사멸 조건을 바탕으로 실제로 *in vivo*에서 이러한 저산소 조건에서 생성되는 조직 내부의 혈관 신생에 대한 제어 효과와 세포사멸에 대하여 *in vivo* 동물 실험을 통해 확인함으로써, 앞으로의 연구 진행에 동물 모델 시스템의 활용 가능성을 열었으며 동물 모델 시스템을 이용하여 양성자 빔 조사의 효과에 대한 유효성을 제시하였다.

#### 5. 연구개발결과의 활용계획

##### 가. 기술적 측면:

- (1) Zebrafish 모델의 양성자 빔 조사 연구의 유효성을 바탕으로 저산소 부위에서 세포사멸 현상을 확인
- (2) 저산소 부위에서 양성자 빔의 효과가 세포 특이적인지 여부 확인
- (3) 다른 형태의 동물 모델 시스템 이용 가능성 개발

## 나. 경제 산업적 측면:

- (1) 암환자에 대한 방사선 치료 분야 발달
- (2) 암전이로 인한 암의 재발 억제로 암환자의 의료비 절감
- (3) 국가 및 민간의료 산업 분야에 양성자 암치료 분야 등, 부가가치가 높은 분야로서의 양산

## 다. 사회 경제적 측면:

양성자 조사에 의한 암의 저산소 부위에서의 세포사멸 내성을 극복하는 것은 암의 치료율을 높이고 재발의 가능성을 낮출 수 있기 때문에 증가 추세에 있는 암 환자들에게 희망과 삶의 행복을 가져다 줄 수 있다. 이는 사회적으로나 문화적인 면에서 계산할 수 없는 효과를 낳을 것으로 생각된다.

## 6. 참고문헌

1. Belli M., Bettega D., Calzolari P., Cera F., Cherubini R., Dalla Vecchia M., Durante M., Favaretto S., Gialanella G., Grossi G., Marchesini R., Moschini G., Piazzola A., Poli G., Pugliese M., Saporà O., Scampoli P., Simone G., Sorrentino E., Tabocchini M. A., Tallone L., and Tiveron P., Inactivation of human normal and tumour cells irradiated with low energy protons. *Int J Radiat Biol.* 76, 831-839 (2000).
2. Bettega D., Calzolari P., Chauvel P., Courdi A., Herault J., Iborra N., Marchesini R., Massariello P., Poli G. L., and Tallone L., Radiobiological studies on the 65 MeV therapeutic proton beam at Nice using human tumour cells. *Int J Radiat Biol.* 76, 1297-303 (2000).
3. Brunner T. B., Gupta A. K., Shi Y., Hahn S. M., Muschel R. J., McKenna W. G., and Bernhard E. J., Farnesyltransferase inhibitors as radiation sensitizers. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 569-76 (2003).
4. Brunner T. B., Hahn S. M., McKenna W. G., and Bernhard E. J., Radiation sensitization by inhibition of activated Ras. *Strahlenther Onkol.* 180, 731-40 (2004).
5. Cerimele F., Battle T., Lynch R., Frank D. A., Murad E., Cohen C., Macaron N., Sixbey J., Smith K., Watnick R. S., Eliopoulos A., Shehata B., and Arbiser J. L., Reactive oxygen signaling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr Virus (EBV)-positive versus EBV-negative Burkitt's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 175-9 (2005).
6. Chadderton N., Cowen R. L., Sheppard F. C., Robinson S., Greco O., Scott S. D., Stratford I. J., Patterson A. V., and Williams K. J., Dual responsive promoters to target therapeutic gene expression to radiation-resistant hypoxic tumor cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol Phys.* 62, 213-22 (2005).
7. Chan J., Bayliss P. E., Wood J. M., and Roberts T. M., Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach. *Cancer Cell.* 1, 257-267 (2002).
8. Concin N., Stimpfl M., Zeillinger C., Wolff U., Hefler L., Sedlak J., Leodolter S., and Zeillinger R., Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 22, 51-7 (2003).

9. Di Pietro C., Piro S., Tabbi G., Ragusa M., Di Pietro V., Zimmiti V., Cuda F., Anello M., Consoli U., Salinaro E. T., Caruso M., Vancheri C., Crimi N., Sabini M.G., Cirrone G. A., Raffaele L., Privitera G., Pulvirenti A., Giugno R., Ferro A., Cuttone G., Lo Nigro S., Purrello R., Purrello F., and Purrello M., Cellular and molecular effects of protons: apoptosis induction and potential implications for cancer therapy. *Apoptosis* 11, 57-66 (2006).
10. el Gamoussi R., Stratford I. J., and Guichard, M., Relationship between intracellular concentration and radiosensitizing effect of pimonidazole and etanidazole on two human melanoma cell lines. *Int J Radiat Biol.* 63, 27-36 (1993).
11. Engel R.H., and Evens A.M., Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci.* 11, 300-12 (2006).
12. Folkman J., Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol.* 42-62 (1985).
13. Giuliano M., Lauricella M., Vassallo E., Carabillo M., Vento R., and Tesoriere G., Induction of apoptosis in human retinoblastoma cells by topoisomerase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(8), 1300-11 (1998).
14. Haffter P., Granato M., Brand M., and Mullins M. C., The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development.* 123, 1-36 (1996).
15. Harris A.L., Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2, 38-47 (2002).
16. Hashimoto T., Tokuyue K., Fukumitsu N., Igaki H., Hata M., Kagei K., Sugahara S., Ohara K., Matsuzaki Y., and Akine Y., Repeated proton beam therapy for hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65, 196-202 (2006).
17. Isenberg J. S., Jia Y., Field L., Ridnour L. A., Sparatore A., Del Soldato P., Sowers A. L., Yeh G. C., Moody T. W., Wink D. A., Ramchandran R., and Roberts D. D., Modulation of angiogenesis by dithiolethione-modified NSAIDs and valproic acid. *Br J Pharmacol.* 151(1), 63-72 (2007).
18. Jabs T., Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol.* 57, 231-245 (1999).
19. Kari G., Rodeck U., and Dicker A.P., Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clin Pharmacol Ther.* 82, 70-80 (2007).
20. Kennedy A. R., Guan J., Ware J. H. Countermeasures against space radiation induced oxidative stress in mice. *Radiat Environ Biophys.* 46, 201-3 (2007).
21. Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., and Shilling T. F., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental. Dyn.* 203, 253-310 (1995).
22. Langheinrich U., Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays.* 25(9), 904-12 (2003).
23. Lee K. B., Lee J. S., Park J. S., Huh T. L., and Lee Y. M., Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Exp Mol Med,* 40, 118-129 (2008).
24. Levin W. P., Kooy H., Loeffler J. S., and DeLaney T. F., Proton beam therapy. *Br.J.Cancer* 93, 849-854 (2005).

25. Li L., and Dowling J. E., A dominant form of inherited retinal degeneration caused by a non-photoreceptor cell-specific mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21), 11645-50 (1997).
26. Limoli C. L., Giedzinski E., Baure J., Rola R., and Fike J. R., Redox changes induced in hippocampal precursor cells by heavy ion irradiation. *Radiat Environ Biophys.* 46(2), 167-72 (2007).
27. Mishra K. P., Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 23, 61-6 (2004).
28. Sanchez-Prieto R., Rojas J. M., Taya Y., and Gutkind J. S., A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 60, 2464-72 (2000).
29. Seiler C., and Nicolson T., Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol.* 41(3), 424-34 (1999).
30. Semenza G. L., Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1 $\alpha$ . *Cancer Cell.* 5, 405-406 (2004).
31. Taraboletti G., and Giavazzi R., Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer.* 40(6), 881-9 (2004).
32. Wan X. S., Zhou Z., Ware J. H., Kennedy A. R., Standardization of a fluorometric assay for measuring oxidative stress in irradiated cells. *Radiat Res.* 163(2), 232-40 (2005).
33. Westerfield M., *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio).* (3rd ed.), University of Oregon Press, Eugene (1995).
34. Williams K. J., Telfer B. A., Xenaki D., Sheridan M. R., Desbaillets I., Peters H. J., Honess D., Harris A. L., Dachs G. U., van der Kogel A., and Stratford I. J., Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother Oncol.* 75, 89-98 (2005).
35. Yabu T., Tomimoto H., Taguchi Y., Yamaoka S., Igarashi Y., Okazaki T., Thalidomide-induced antiangiogenic action is mediated by ceramide through depletion of VEGF receptors, and is antagonized by sphingosine-1-phosphate. *Blood.* 106(1), 125-34 (2005).