

ORIGINAL ARTICLE

## 파지 디스플레이를 이용한 췌장암 특이적 결합 펩타이드 개발

이동원<sup>1,2</sup>, 박재명<sup>1,3</sup>, 양승목<sup>1</sup>, 곽문화<sup>1</sup>, 노윤진<sup>1</sup>, 이인석<sup>3</sup>, 최명규<sup>1,3</sup>

가톨릭 광의학 연구소<sup>1</sup>, 가톨릭대학교 의과대학 의생명건강과학교실<sup>2</sup>, 가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 내과<sup>3</sup>

### Development of a Pancreatic Cancer Specific Binding Peptide Using Phage Display

Dong Won Lee<sup>1,2</sup>, Jae Myung Park<sup>1,3</sup>, Seung Mok Yang<sup>1</sup>, Moon Hwa Kwak<sup>1</sup>, Yoon Jin Roh<sup>1</sup>, In Seok Lee<sup>3</sup> and Myung-Gyu Choi<sup>1,3</sup>

Catholic Photomedicine Research Institute<sup>1</sup>, Department of Medical Lifescience, College of Medicine, The Catholic University of Korea<sup>2</sup>, Department of Internal Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea<sup>3</sup>, Seoul, Korea

**Background/Aims:** Pancreatic cancer has a very poor prognosis, and early diagnosis is a way to increase the survival rate of patients. The purpose of this study was to develop pancreatic cancer-specific peptides for imaging studies.

**Methods:** Three pancreatic cancer cell lines, MIA PaCa-2, UACC-462, and BxPC-3, and a control cell line, CCD841, were used. Biopannings were performed on MIA PaCa-2 using a phage display library. After this, the peptides were synthesized and labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). Immunocytochemistry (ICC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and fluorescence-activated cell sorter (FACS) were performed to examine the specific binding. To examine its therapeutic applications, a photosensitizer, chlorin e6 (Ce6), was conjugated on the peptide and photodynamic therapy was performed. Cell survival was investigated using a [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay.

**Results:** After three biopannings, the phages were amplified from  $1.4 \times 10^4$  to  $3.2 \times 10^5$  plaque-forming units. The most strongly binding phage was selected from the ELISA and ICC results. FITC-labeled peptide, M5, in the three pancreatic cancer cell lines showed significantly higher immunofluorescence in the ICC experiments than that of CCD841. The higher binding ability to MIA PaCa-2 cells was confirmed from FACS analysis, which showed a right shift compared to CCD841. M5 bound to Ce6 showed a significantly lower cell survival rate than that of Ce6 alone in photodynamic therapy, which was observed consistently as a change in the tumor size and fluorescence intensity in MIA PaCa-2 cell-implanted animal models.

**Conclusions:** This study showed that the noble peptide, M5, binds specifically to the pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. The M5 peptide has potential use in future optical diagnostic and therapeutic purposes. (Korean J Gastroenterol 2019;74:30-41)

**Key Words:** Bacteriophages; Pancreatic neoplasms; Peptides; Photochemotherapy

## 서론

췌장암은 전 세계적으로 약 5% 정도 진단되는 9번째로 흔한 종양이다.<sup>1</sup> 췌장은 후복막 및 다른 장기들에 둘러 싸여져 있어, 췌장암은 복통과 황달이 가장 흔한 증상이나 증상이 발

현된 경우에는 진행암인 경우가 대부분이다. 진행암 환자 중 수술이 가능한 환자는 10-15% 이내이고,<sup>2</sup> 수술 후에도 미세 전이가 있어 재발률이 높고 5년 생존율이 낮다.<sup>3</sup> 수술이 불가능한 환자에서 시행하는 항암제 혹은 방사선 치료에 대한 치료 반응이 제한적이어서<sup>3</sup> 췌장암 환자의 생존율을 높이는 방

Received November 19, 2018. Revised April 18, 2019. Accepted May 6, 2019.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2019. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 박재명, 06591, 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 내과

Correspondence to: Jae Myung Park, Department of Internal Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 06591, Korea. Tel: +82-2-2258-6022, Fax: +82-2-2258-2089, E-mail: parkjerry@catholic.ac.kr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1534-7467>

Financial support: This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea, funded by the Ministry of Education, Science and Technology (NRF-2017R1D1A1B03035104) and Research Fund of Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea.

Conflict of interest: None.

법은 조기 발견과 근치적 절제술이라 할 수 있다.<sup>4,6</sup>

현재 췌장암은 영상학적 검사법인 초음파, 컴퓨터단층촬영, 자기공명영상, 초음파 내시경 등을 사용하여 종괴를 발견함으로써 진단하고 있다.<sup>7,8</sup> 질병 특이적 바이오마커는 진단에 유용하게 사용될 뿐만 아니라, 치료 반응을 관찰할 수 있는 객관적인 측정 방법이다. 췌장암의 진단으로 혈청 CA19-9나 CEA 등의 수치 상승을 사용해볼 수 있으나, 이들의 진단 특이도 및 민감도는 80% 미만으로 낮다.<sup>2,3,9</sup> 이외 췌장암 바이오마커로 제시되고 있는 물질들로는 osteopontin, macrophage inhibitory cytokine-1, plectin-1 등이 있으나 추가 연구가 필요하다.<sup>10-12</sup>

파지 디스플레이는 1985년 G. Smith에 의하여 처음 도입된 개념이며, 1990년 영국 Medical Research Council에 의하여 처음으로 항체의 제조에 응용되었고, 이를 개발한 과학자들이 신약 개발 기반을 조성한 공로로 2018년 노벨 화학상을 수여하였다.<sup>13-15</sup> 파지 디스플레이 방법은 박테리오파지의 표면에 펩타이드, 단백질 혹은 항체 조각을 발현하는 특징을 이용하여 원하는 다양한 변이체에 특이하게 결합하는 펩타이드나 단백질을 발굴할 수 있는 기술이다.<sup>16</sup> 파지 디스플레이 라이브러리는 외부 DNA 삽입체를 운반하는 파지 클론들의 이질성 혼합물로 구성되어 있다. 표적 단백질을 코딩한 다음 준비된 파지를 반응시키면 bio-panning을 통하여 표적 단백질과의 특이적 결합과 친화도를 보이는 파지를 선택하여 추출할 수 있다. 추출된 파지 클론들을 이용하여 박테리아 숙주세포를 감염시키면 숙주세포의 세포 분열 주기가 반복되는 동안 파지들은 증폭된다. 이때 파지의 표면에 동일한 펩타이드 서열이 나열되게 되고 특정 서열을 가진 펩타이드를 얻을 수 있다. 현재 면역학, 세포 생물학, 약물 전달 기술 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다. 현재 임상에 사용되는 약물 중 파지 디스플레이 방법에 의하여 제조된 대표적인 예로는 tumor necrosis factor- $\alpha$ 에 대한 항체(adalimumab, 상품명 휴미라)로서 2002년 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)의 승인을 받아 현재까지 관절염 및 크론병 치료제로 사용되고 있다.

파지 디스플레이를 이용한 소화기암 진단법은 주로 대장암을 중심으로 연구되어 왔다.<sup>17</sup> 대장암은 조기 발견이 암 사망률 감소와 직결되며, 현재의 진료는 대장 내시경으로 전암 병변을 제거하도록 추진되어 왔다.<sup>18</sup> 하지만 병변을 놓치는 경우에는 대장 내시경을 시행받은 시간이 많이 경과되지 않아도 대장암이 발생하며, 이를 중간암(interval cancer)이라고 부르고 있다. 중간암이 발생하는 예들 중 하나로, 대장 내시경에서 관찰이 잘 되지 않는 톱니모양 선종(serrated adenoma)이 대두되고 있다. 이를 극복하고자 최근에는 분자영상을 이용한 대장 내시경 기법으로 톱니모양 선종(serrated adenoma)을

잘 발견하고자 연구가 진행되고 있다.<sup>19</sup>

유전체 연구를 통해서도 바이오마커 개발이 활발히 진행되고 있다. 하지만 유전체 연구의 경우 진단 민감도는 높지만 영상학적 접목은 어렵다. 따라서 이번 연구에서는 세포 표면의 표현형에 즉각적인 반응을 나타내며, 형광 물질과의 연결도 용이하고, 저렴하게 제작할 수 있는 파지 디스플레이를 이용한 아미노산 서열을 개발하고자 하였다. 이번 연구의 구체적인 목적은 영상학적 진단에 사용 가능한 췌장암 특이적 펩타이드를 파지 디스플레이 방법을 이용하여 얻고자 하였다. 이차적 연구로 췌장암 특이적 펩타이드의 치료적 사용 가능성을 모색하고자 개발된 펩타이드를 광감각제(photosensitizer)에 결합한 후 광역학 치료를 수행함으로써 췌장암 특이적 세포 독성이 가능한지 실험실적으로 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 시약

파지 디스플레이는 라이브러리 키트(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)를 이용하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), minimum essential medium (MEM), phosphate-buffered saline (PBS), 1% penicillin-streptomycin (Corning, Manassas, VA, USA), Glycine, Tris, polyethylene glycol 및 sodium chloride 및 bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich, Yongin, Korea), chlorin e6 (Ce6) (Frontier scientific, Newark, DE, USA), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher scientific, Seoul, Korea), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Biosesang, Seongnam, Korea)를 사용하였다. 인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)를 사용하였고, 대조 세포주로 정상 상피세포인 CCD841 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)을 사용하였다. Fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) 및 기타 명시하지 않은 시약은 모두 Sigma Aldrich (Yongin, Korea)에서 구입하였다.

### 2. 세포 배양

MIA PaCa-2와 UACC-462 세포는 DMEM 배지에서, BxPC-3 세포는 RPMI 1640 배지에서, CCD841 세포는 MEM 배지에서 각 10% (v/v) fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% 이산화탄소 환경에서 배양하였다.

### 3. 파지 디스플레이와 bio-panning

파지 디스플레이 라이브러리 키트 Ph.D<sup>7</sup>을 사용하여 진행하였고, MIA PaCa-2 세포를 1,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 수집하고 상등액을 제거한 다음 3% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 다음  $1 \times 10^{13}$  plaque forming units (pfu) 파지를 3% BSA에 첨가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Phosphate-buffered saline+0.05% Tween-20, pH 7.4 (T-PBS)로 5회 세척한 후 200 mM Glycine-hydrogen chloride (pH 2.2)를 첨가하고 25°C에서 5분 동안 배양함으로써 세포 표면으로부터 용출되었다. 파지가 용출된 용액에 1M Tris-hydrogen chloride 완충액(pH 9.0) 300 µL를 첨가하여 즉시 중화시켰다. 이렇게 얻은 파지 상층액의 파지 농도를 결정하고 위 과정을 3회 반복하여 MIA PaCa-2 세포에 결합하는 파지를 최종 선택하였다.

### 4. 파지 역가 측정

파지 역가를 측정하기 위하여 파지 용액을 lysogeny broth를 이용하여 연속 희석하고 각 희석 용액을 ER2738과 10분간 배양하여 파지 입자에 의한 박테리오파지의 형질 감염을 시도하였다. 3 mL의 Agar를 액체로 만들어 파지 희석액과 섞고 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (50 mg/mL) 및 X-gal (40 mg/mL)을 함유한 lysogeny broth 우무평판에 분주하였다. 우무평판을 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 마지막으로, 파지 용액의 농도를 우무평판에 균집한 청색 플라크의 수를 계수하여 계산하였다.

### 5. 파지 클론의 증폭

37°C에서 흡광도 0.5로 배양된 *Escherichia coli* ER2738 1 mL에 선택된 청색 플라크를 넣어 4.5시간 동안 ER2738 배양시킨 후 원심 분리하여 상층액만 취하여 파지 원액을 만들었다. 파지 농축액을 얻기 위하여 파지 원액을 37°C에서 흡광도 0.5로 배양된 *Escherichia coli* ER2738 20 mL에 넣어 4.5시간 동안 배양시키고,  $4 \times 13,000$  rpm으로 원심 분리하여 얻은 상등액에 20% polyethylene glycol/2.5 M sodium chloride를 5 mL 첨가하여 4°C에서 2시간 반응시키고  $4 \times 13,000$  rpm으로 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 상등액을 버리고 침전물만 PBS 1 mL에 용해시켰다.

### 6. 효소면역법(enzyme-linked immunosorbent assay)

파지 클론을 확인하기 위하여 효소면역법을 시행하였다. MIA PaCa-2 세포와 CCD841 세포를  $1 \times 10^4$  cell/well로 96-well plate에 100 µL씩 분주하고 안정화시켰다. PBS로 3회 세척하고 아세톤과 메탄올을 1:1 비율로 섞은 용액을 이용하여 4°C에서 30분 동안 고정시켰다. 이어서 T-PBS (0.05% v/v

triton X-100)로 3회 세척하고 3% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 선택한 파지 클론 및 음성 대조군인 M13KE 파지를 MIA PaCa-2 세포에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 추가 배양하였다. 그다음 T-PBS로 3회 세척하고 anti-M13 HRP (Abcam, Cambridge, UK)를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. T-PBS로 3회 세척하고 tetramethylbenzidine을 100 µL/well로 첨가하고 차광하여 37°C에서 30분 처리 후 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 100 µL/well로 첨가하여 중단시켰다. 마지막으로 Micro plate-reader model 550 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 7. 면역화학염색

8-well chamber에 MIA PaCa-2 세포와 CCD841 세포를  $1 \times 10^4$  cell/well만큼 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. PBS로 세척하고 아세톤과 메탄올을 1:1 비율로 섞은 용액을 이용하여 4°C에서 30분 동안 고정시켰다. 이어서 T-PBS로 3회 세척하고 3% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 선택한 파지 클론과 세포를 함께 실온에서 1시간 동안 배양하고 T-PBS로 3회 세척한 다음 항원-항체 반응을 이용하여 세포 표면에 결합하고 양성 반응을 보이는 파지 클론을 동정하였다. 실온에서 1시간 동안 1차 항체 anti-M13 HRP (Abcam)로 배양하고 T-PBS로 3회 세척하여 2차 항체 Alexa 488 (Abcam)과 1시간 동안 차광하여 배양시켰다. PBS로 3회 세척하고 DAPI를 이용하여 1분간 반응하고 형광 현미경을 사용하여 세포 및 파지 결합을 확인한 후 CCD841를 음성 대조세포로 사용하였다. 조직의 염색은 H&E를 이용하였으며, 세포 사멸을 확인하기 위하여 cleaved caspase-3 (Abcam) 항체로 면역화학염색을 시행하였다. 면역화학염색 후 발색은 peroxidase substrate solution (0.05% DAB and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 사용하였다.

### 8. DNA 염기서열 분석과 펩타이드 합성

농축된 파지 원액에서 ssDNA를 추출하였다. 서열 분석에 사용된 프라이머는 지침서에서 제시한 -96gIII 5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' 및 -28gIII 5'-GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C-3'를 이용하였고 발견한 서열은 펩타이드 데이터베이스인 BLAST 및 Clustal W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)를 사용하여 분석하였다. 새롭게 발견한 펩타이드의 합성은 Pepton (Daejeon, Korea) 및 Anaspec (Fremont, CA, USA)에 의뢰하였다. 새로운 펩타이드의 N-말단에 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 접합하였다. 펩타이드의 순도는 95% 이상이었으며 high performance liquid chromatography로 측정하였다.

### 9. 면역형광염색(immunofluorescence assay)

8-well chamber에 인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 세포와 정상 세포주인 CCD841 세포를  $1 \times 10^4$  cell/well만큼 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. PBS로 세척하고 아세톤과 메탄올을 1:1 비율로 섞은 용액을 이용하여 4℃에서 30분 동안 고정시켰다. 이어서 T-PBS으로 3회 세척하고 3% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 합성된 새로운 펩타이드를 10  $\mu$ M의 농도로 실온에서 1시간 동안 배양하고 T-PBS로 3회 세척한 다음 DAPI를 이용하여 1분간 반응하고 형광 현미경을 사용하여 세포와 펩타이드의 특이적 결합을 재확인하였다.

### 10. Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

인간 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3와 인간 결장 정상 세포주인 CCD841을 사용하였다. 세포를 T75 플라스크에서 수확하였다. 세포를 계수하여  $1 \times 10^5$  cell만큼 FACS 튜브에 분주하였다. 원심 분리를 통하여 상등액을 제거하고 3% BSA로 차단시켰다. 이후 PBS로 3회 세척하고 FITC로 표지된 M5 펩타이드를 10  $\mu$ M 농도로 세포에 첨가하고 1시간 동안 차광하여 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 1% BSA를 첨가하여 CANTO II (BD Science, San Jose, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 11. 광감각제 세포 흡수

MIA PaCa-2 세포를  $1 \times 10^4$  cell/well로 24-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 0-12  $\mu$ g/mL 범위의 Ce6를 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 세척하고 아세톤과 메탄올을 1:1 비율로 섞은 용액을 첨가하여 4℃에서 30분간 고정하고 DAPI로 염색하였다. PBS로 3회 세척하고 세포를 형광 현미경 Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 세포 내 흡수의 정도를 확인하였다.

### 12. 세포 생존력 측정(cell viability assay)과 레이저 조사

Ce6가 결합된 MIA PaCa-2, CCD841 세포의 생존력은 MTT 분석에 의하여 평가하였다. 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. PBS

로 3회 세척하고, Ce6 또는 M5-Ce6 (Ce6, M5-Ce6 농도 0-12  $\mu$ g/mL)를 함유하는 DMEM과 MEM으로 대체하였고 1시간 동안 항온 배양하였다. 광독성을 관찰하기 위하여 세포를 PBS로 3회 세척하였고, 레이저(670 nm, 400 mW, 3 J)로 조사한 다음 0.5 mg/mL MTT를 첨가하여 4시간 동안 반응하였다. 배지를 제거한 후 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하고 흡광도를 PowerWave HT-Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

### 13. MIA PaCa-2 이식 동물모델에서 M5 결합 Ce6의 효과

5주령의 BALB/c-nu 누드마우스 10마리를 사용하였다. DMEM 배지에서 배양한  $1.5 \times 10^7$ 의 MIA PaCa-2 세포를 70  $\mu$ L의 PBS에 50  $\mu$ L의 Matrigel Matrix (BD bioscience, Bedford, IN, USA) 혼합액에 섞어 누드마우스 대퇴부 피하에 주입을 하였다. 세포 주입 약 일주일 후 종양 부피가 약 140 mm<sup>3</sup>에 이르면, 누드마우스 5마리는 Ce6 (4  $\mu$ M)를, 5마리는 M5-Ce6 (4  $\mu$ M)를 1 mL 주사기로 종양에 천천히 직접 주입을 하였다. 1시간 후 종양의 형광 발현을 optical in vivo imaging system-IVIS (Lumina XRMS, PerkinElmer Inc, Waltham, MA, USA)로 측정하였다(excitation: 420 nm; emission: 710 nm). 각 군에서 형광값이 가장 높은 개체와 가장 낮은 개체를 제외하고 3마리를 광역학 치료를 시행하였다. 레이저는 종양에 100 J/cm<sup>2</sup>, 0.25 W의 조건으로 670 nm 파장으로 5분 30초 동안 조사하였다. 광역학 치료 이틀 후 종양의 크기를 처음과 비교하였다. 종양의 크기는 디지털 자를 사용하였다. 종양의 부피는 (장경 $\times$ 단경<sup>2</sup>)/2의 공식을 사용하였다. 동물의 체중은 종양 적출 직전까지 매일 측정하였다. 모든 동물실험은 가톨릭대학교 동물 윤리위원회의 프로토콜에 따라서 진행되었다.

### 14. 통계적 분석

각 실험은 적어도 세 번 수행되었다. 데이터는 중간값과 범위로 표시하였다. 두 그룹 간의 차이는 Kruskal-Wallis-test를 사용하여 분석하였다. 0.05 이하의 p값은 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

**Table 1.** Progressive Enrichment of Phages with the Selection Rounds

Phage titer	Input	Output	Recovery <sup>a</sup>
1st round	$1.0 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^4$	$1.4 \times 10^{-7}$
2nd round	$1.1 \times 10^{11}$	$5.7 \times 10^4$	$5.2 \times 10^{-7}$
3rd round	$2.2 \times 10^{11}$	$3.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-6}$

<sup>a</sup>Recovery rate: input/output.

## 결 과

### 1. MIA PaCa-2 췌장암 세포에 결합하는 파지 클론의 농축

M13 파지를 기본으로 하는 Ph.D<sup>7</sup> 파지 디스플레이 라이브러리를 MIA PaCa-2 표면에 결합하는 아미노산 서열을 선별하고자 bio-panning을 진행하였다. MIA PaCa-2 세포에 특이적으로 결합된 파지 클론을 확인하고자 input과 output 농도를 계산하였다(Table 1). 3차 bio-panning 결과 회수된 파지의 농도와 회복 효율이 모두 증가하는 것을 확인하였다. 첫 번째 bio-panning 시 회수된 파지는  $1.4 \times 10^4$  pfu에서 시작하여 세 번의 bio-panning 후  $3.2 \times 10^5$  pfu만큼 회수되었고 약 22배 증가하였다. 이러한 결과는 MIA PaCa-2 췌장암 세포에 특이적으로 결합하는 파지 클론의 성공적인 선택 및 효과적인 농축을 증명한다.

### 2. 효소면역법을 이용한 양성 파지 클론의 확인

MIA PaCa-2 췌장암 세포에서의 3번의 bio-panning 후 48개의 파지 클론을 무작위로 선별하고 증폭시켰다. 얻어진 48개의 파지 클론의 특이적 결합을 확인하고자 정상 상피세포인 CCD841과 췌장암 세포인 MIA PaCa-2에서 효소면역법을 시행하였다. 그중 높은 결합력을 보인 9개의 파지 클론 중에서 2, 3, 4, 5번 파지 클론이 췌장암 세포 MIA PaCa-2에서 정상 상피세포 CCD841보다 약 1.5배 이상 높은 결합을

보이는 것을 확인하였다(Fig. 1).

### 3. 췌장암 세포에 결합된 아미노산 서열의 염기서열 분석

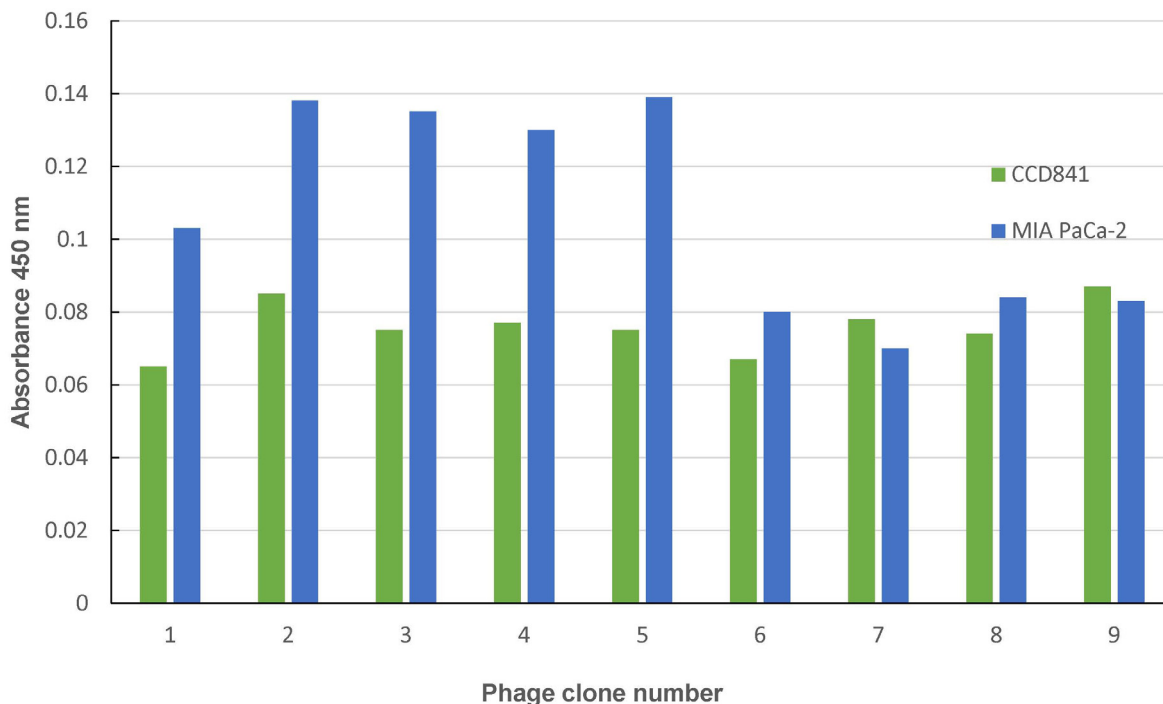
효소면역법에서 췌장암 세포에 높은 결합력을 보인 2, 3, 4, 5번 파지의 아미노산 서열을 확인하고자 하였다. 양성 파지 클론 원액에서 ssDNA를 추출하였다. 이후 7개의 아미노산을 포함하는 독특한 DNA 서열을 확인하였다. 확인된 펩타이드는 BLAST 및 Clustal W ([www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo](http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo))를 사용하여 분석하였다. 그러나 파지 펩타이드 EGGDSRH, RLRAIFS, VSRVAPC, WLEVYLG 모두 알려진 단백질과의 상동성이 확인되지 않았기에 각각 M2, M3, M4, M5라 명명하였다(Table 2).

### 4. 췌장암 세포에 대한 펩타이드의 특이적 결합

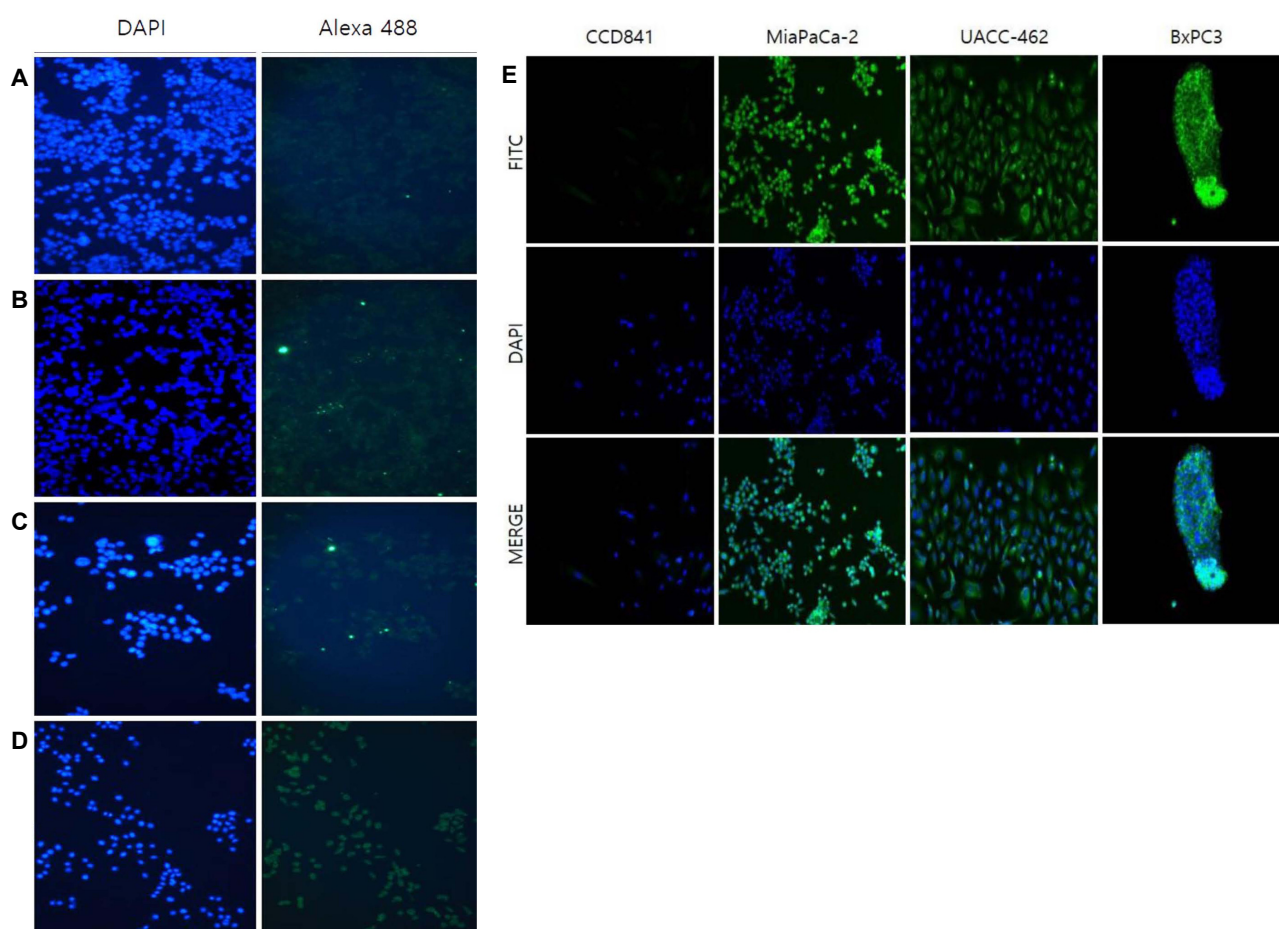
췌장암 세포주인 MIA PaCa-2 세포에 대한 M2, M3, M4, M5 파지의 결합 특이성을 확인하고자 M13 항체를 이용하여

**Table 2.** Identification of the Amino Acid Sequence

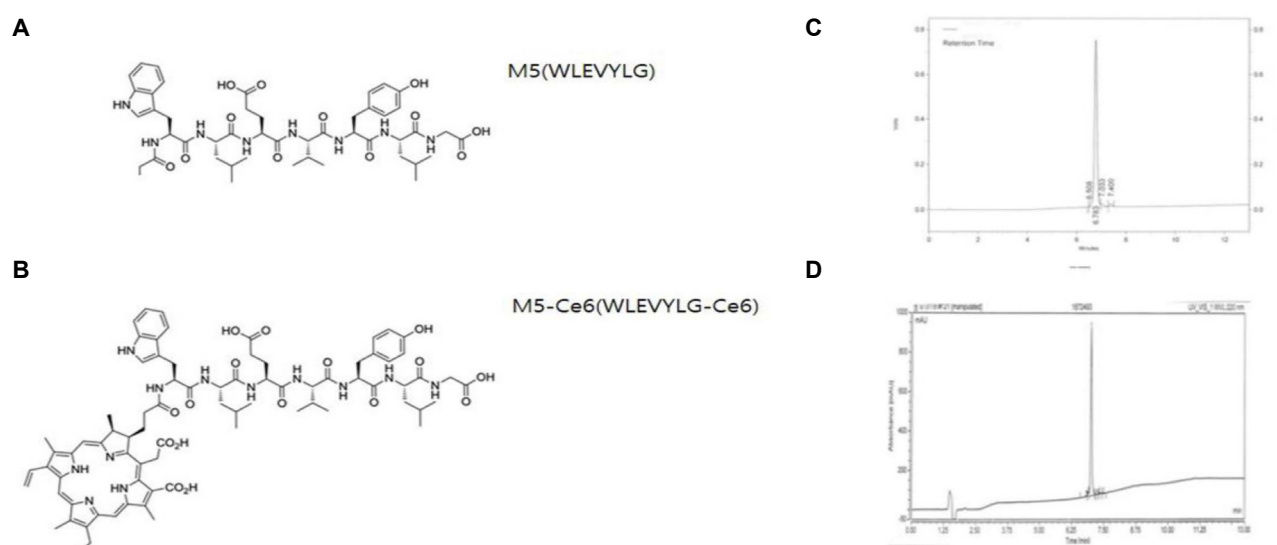
Phage no.	Sequence	Name
Phage clone 2	EGGDSRH	M2
Phage clone 3	RLRAIFS	M3
Phage clone 4	VSRVAPC	M4
Phage clone 5	WLEVYLG	M5



**Fig. 1.** ELISA assays were performed to select a phage that adhered specifically to MIA PaCa-2 cells among nine randomly selected phage candidate groups. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining was performed using Alexa 488 to confirm the binding affinity of the phage clone to pancreatic cancer (A) phage 2; (B) phage 3; (C) phage 4; (D) phage 5. The binding site of the phage expresses as green fluorescence; and (E) CCD841, MIA PaCa-2, UACC-462, and BxPC-3 cells, which were subjected to immunofluorescence staining to confirm the cell binding ability of the M5 peptide. The M5 peptide was labeled with FITC, and the cells were stained with DAPI (Magnification  $\times 200$ ). FITC, fluorescein isothiocyanate; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

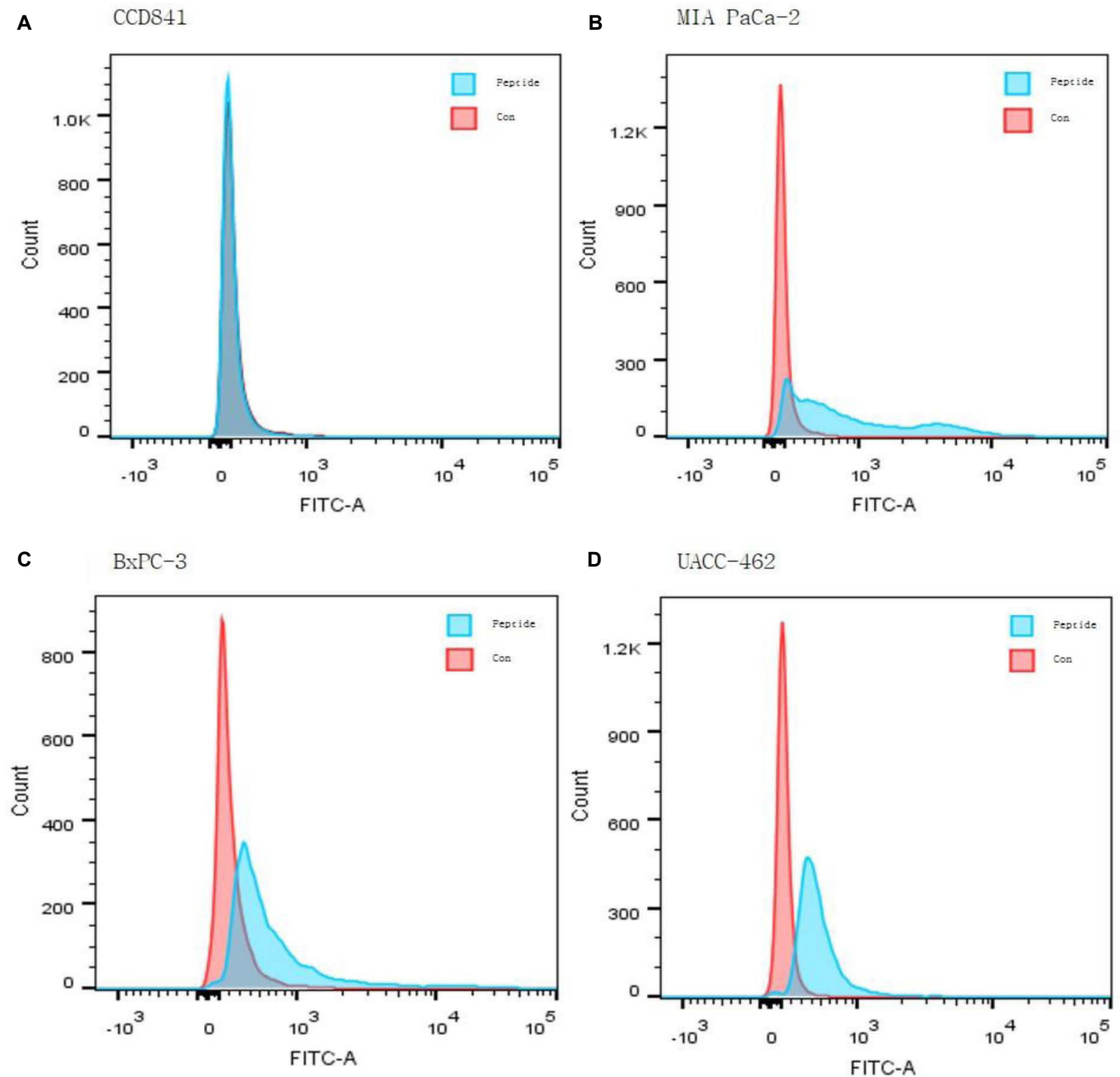


**Fig. 3.** Structure of the peptide and peptide HPLC profile. (A) Structure of the M5 peptide, (B) structure of the peptide M5 coupled with the photosensitizer Ce6, (C) HPLC analysis of peptide M5, (D) HPLC analysis of peptide M5 and the Ce6 conjugate peptide. Ce6, chlorin e6; HPLC, high-performance liquid chromatography.



세포 화학염색을 시행한 결과 모든 파지에서 녹색 형광이 발현되었으나 그중 M5 파지의 형광이 가장 진하게 발현되었다(Fig. 2A-D). M5 파지의 DNA 서열을 근거로 펩타이드 합성을 진행하였고, N-말단에 FITC를 결합하여 표지하였다. 이후 광감각제 Ce6와 M5를 결합하여 합성을 진행하였다(Fig. 3A, B). 합성된 펩타이드의 순도는 high performance liquid chromatography 분석으로 확인하였다(Fig. 3C, D). M5 펩타이드의 결합 능력 및 특이성을 평가하기 위하여 대조세포인 CCD841 세포와 비교 실험을 진행하였다. 췌장암 세포인

MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 세포의 형광 현미경 이미지는 FITC 표지된 M5 펩타이드가 세포 표면에서 관찰되었다. 그러나 대조세포 CCD841에서는 형광이 관찰되지 않았다. 이러한 결과에 따라 새롭게 발견한 M5 펩타이드의 췌장암 특이도를 증명하였다(Fig. 2E). 앞선 실험들에서 높은 결합력을 보인 M5 펩타이드에 대하여 FITC 표지된 펩타이드를 한 번 더 확인하고자 FACS를 실시하였다. 대조세포인 CCD841과 췌장암 세포인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 세포에 M5 펩타이드를 각 10  $\mu$ M로 분주하여 세포와

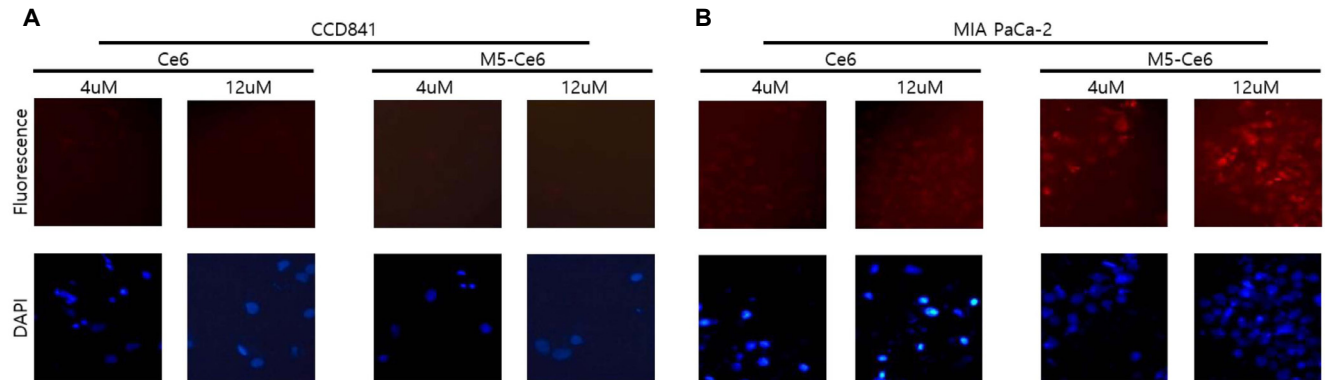


**Fig. 4.** (A-D) Fluorescence activated cell sorter of the CCD841 and MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 cells bound with the control and M5 peptide: blue line-control, and red line-M5 peptide. FITC, fluorescein isothiocyanate.

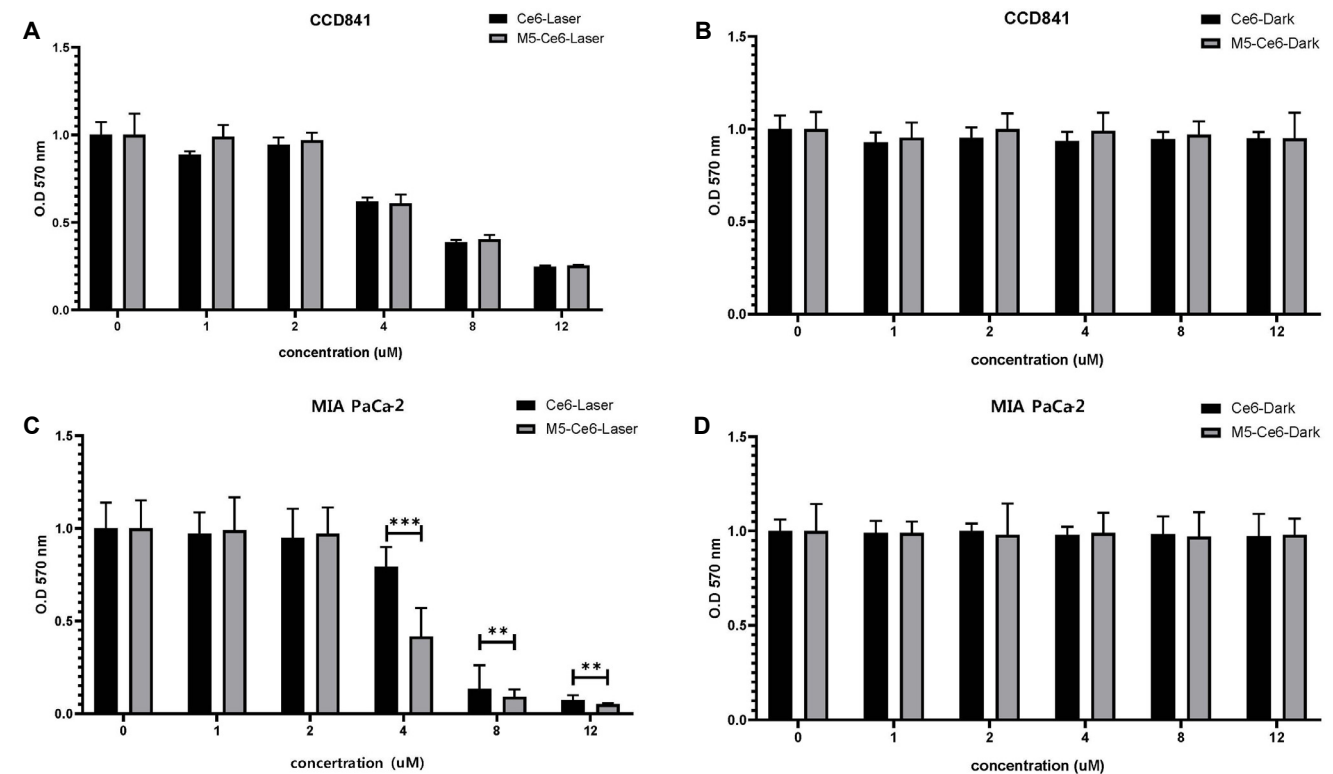
의 결합한 세포를 계수하였다. 대조세포인 CCD841과 비교하였을 때 실험군인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3 세포에서 펩타이드 처리군이 오른쪽으로 이동한 것을 확인하였다(Fig. 4). 이에 M5 펩타이드가 사용된 모든 췌장암 세포주에 특이적 결합을 보임을 확인할 수 있었다. 이후의 실험에서는 MIA-PaCa-2 세포를 이용하여 진행하였다.

## 5. 광감각제 세포 흡수 확인

췌장암 세포주 MIA PaCa-2와 대조세포 CCD841에 Ce6 단독 처리군과 M5 펩타이드가 결합된 Ce6 처리군의 광감각제 Ce6의 세포 흡수를 확인하였다. 4  $\mu\text{g/mL}$ 와 12  $\mu\text{g/mL}$ 에서 확인하였을 때 대조세포인 CCD841에서는 Ce6 단독 처리군과 M5와 Ce6 결합 펩타이드 처리군 사이의 차이가 크게 확인되지 않았다(Fig. 5A). 췌장암 세포주 MIA PaCa-2에서

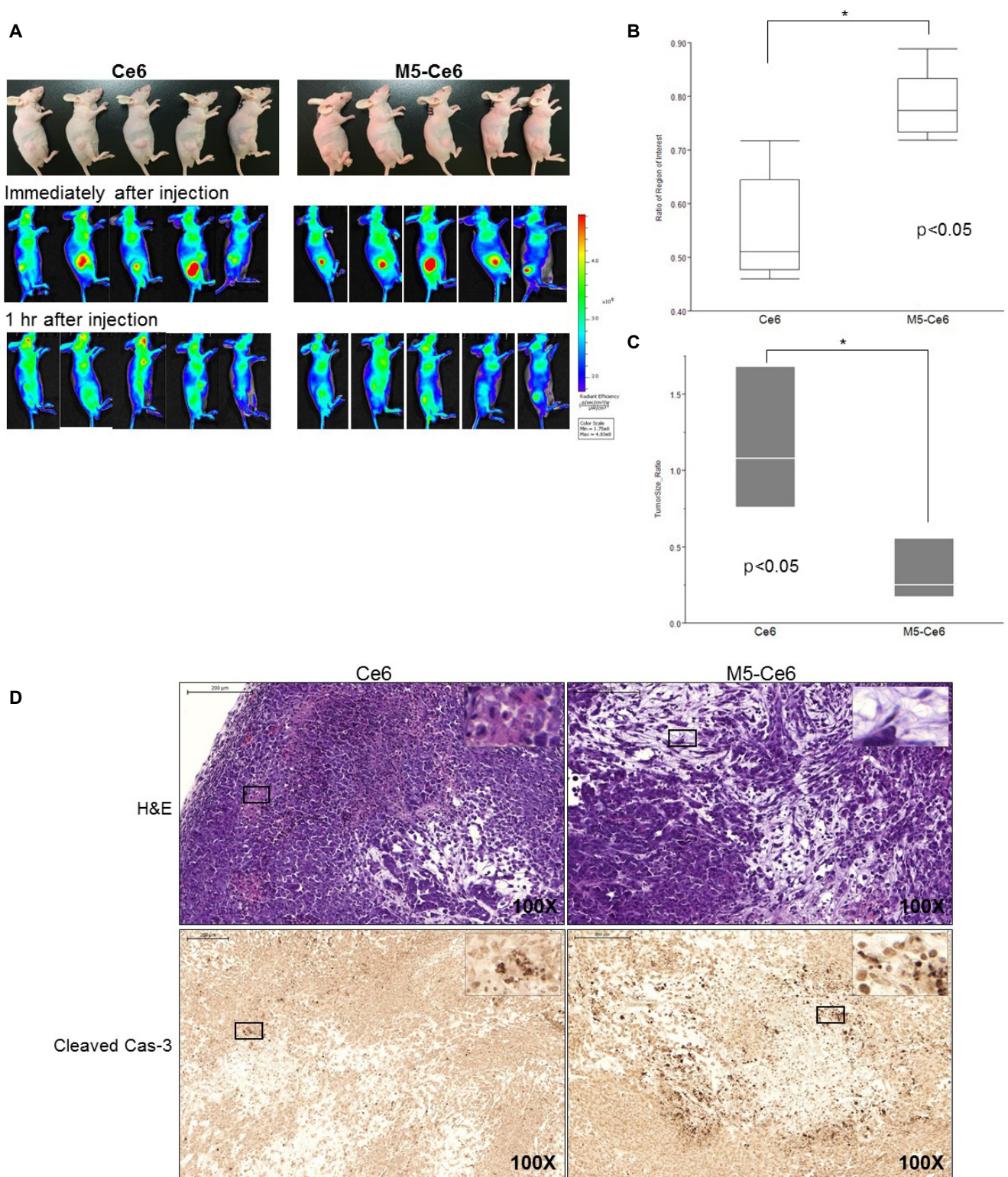


**Fig. 5.** Cellular uptake of the photosensitizer, Ce6, in the Ce6-treated group, in which the Ce6-treated group and M5-peptide were combined, was confirmed in the control cell CCD841 and the pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. 4  $\mu\text{g/mL}$  and 12  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. (A) CCD841 cell Ce6 alone and M5-Ce6 treatment group, (B) MIA PaCa-2 cell Ce6 alone and M5-Ce6 treatment group. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; Ce6, chlorin e6.



**Fig. 6.** MTT cytotoxicity assay confirmed the laser irradiation effect of the M5 peptide and M5-Ce6. (A) Laser irradiation in CCD841 cells, (B) laser non-irradiation in CCD841 cells. (C) Laser irradiation in MIA PaCa-2 cells, (D) laser non-irradiation in MIA PaCa-2 cells. Ce6, chlorin e6; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide.





**Fig. 7.** *In vivo* study using nude mice implanted with MIA PaCa-2 cells. (A) Comparison of the fluorescence intensity between chlorin e6 (Ce6) group (left) and M5-conjugated chlorin e6 (M5-Ce6) group (right) by the optical in vivo imaging system-IVIS. Ce6 and M5-Ce6 were injected into the tumors with a volume of 150 µL (4 µM). *In vivo* fluorescence just after the injection of the photosensitizers (middle) and after one hour (bottom). (B) Fluorescence intensity ratio of the tumors between the two groups (each n=5). (C) Change in tumor size before and 48 hours after photodynamic therapy of the two groups (each n=3). (D) Microscopic findings. M5-Ce6 group showed more necrosis (right top, H&E, ×100) than the Ce6-pretreated group (left top, H&E, ×100). Cleaved caspase-3 positive cells were also observed abundantly in the M5-Ce6 group (right bottom, Cleaved Cas-3, ×100) than the Ce6 group (left bottom, Cleaved Cas-3, ×100).

Ce6 단독 처리군에 비하여 M5와 Ce6 결합 펩타이드 처리군에서 농도에 따라 형광이 높게 관찰되었다(Fig. 5B). 이를 바탕으로 펩타이드 M5가 세포에 결합함을 확인할 수 있었다.

## 6. 세포 독성 확인

MTT 세포 독성 분석을 이용하여 췌장암 세포주 MIA PaCa-2와 대조세포 CCD841에 Ce6 처리군과 M5 펩타이드가 결합된 Ce6 처리군의 광역학 치료 효과를  $3 \text{ J/cm}^2$  (11분 25초) 레이저 조사 24시간 후 MTT 실험으로 비교하였다(Fig. 6). 대조세포인 CCD841는 Ce6 단독 처리군과 M5 펩타이드가 결합된 Ce6 처리군의 광역학 치료 효과는 큰 차이가 없었다(Fig. 6A, B). 하지만 M5 펩타이드가 결합된 Ce6 처리군에서 MIA PaCa-2 세포에 Ce6 단독 처리군보다 췌장암세포의 생존율이 낮은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6C, D). 구체적으로는  $4 \mu\text{g/mL}$  농도에서 M5 펩타이드가 결합된 Ce6 처리군이 Ce6 단독 처리군에 비하여 42% 세포 생존 감소율을 보였고 더 높은 농도에서는 큰 차이가 없었다.

## 7. MIA PaCa-2 이식 동물모델에서 M5 결합 Ce6의 효과

MIA PaCa-2 세포를 이식한 누드마우스에서 Ce6와 M5를 결합한 Ce6를 종양 내 주입한 후 형광값을 측정하였다. M5-Ce6를 주입한 종양에서 Ce6를 주입한 종양에 비하여 주입 1시간 후 형광값이 유의하게 더 높게 측정되었다( $2.83\text{E}+08$  [ $2.60\text{E}+08$ - $3.20\text{E}+08$ ] vs.  $2.41\text{E}+08$  [ $2.23\text{E}+08$ - $2.82\text{E}+08$ ],  $p=0.047$ ) (Fig. 7A). 이를 기저치와 비교하여 비율로 나타내어 두 군 간의 차이를 조사하였다. Fig. 7B에 제시된 바와 같이 Ce6 치료군에서는 형광값의 변화가 0.51 (0.46-0.72)인데 반하여, M5-Ce6 치료군에서는 0.77 (0.72-0.89)로 유의하게 높았다 ( $p=0.009$ ). 각 군의 5개체 중 형광값 최고치와 최저치를 제외하고 3개체에 광역학 치료를 시행하였다. Fig. 7C에 제시된 바와 같이 치료 48시간 후 췌장 종양을 적출하여 크기를 비교하였다. Ce6 투여 후 광역학 치료를 한 군에서 종양 크기의 변화는  $1.26 \text{ cm}^3$  (0.45-4.74)인데 반하여, M5-Ce6 투여군에서는  $0.02 \text{ cm}^3$  (0.01-0.17)로 유의하게 종양 크기가 줄어들었다( $p=0.049$ ). Ce6와 M5-Ce6 치료군에서 적출한 종양의 조직학적 소견을 비교하였다(Fig. 7D). Ce6 치료군에 비하여 M5-Ce6 치료군에서 괴사된 부위가 관찰되었으며, 세포 사멸 정도를 비교하기 위한 면역화학염색에서도 M5-Ce6 치료군의 종양에서 cleaved caspase-3 면역염색 양성세포가 많이 발견되었다. 실험군과 대조군 사이에 종양 적출 전까지 측정된 동물의 체중은 차이가 없었다.

## 고 찰

이번 연구에서는 파지 디스플레이 기반의 췌장암의 진단과 치료에 잠재력이 있는 펩타이드를 개발하고자 하였다. 이번 연구에서 개발한 M5 펩타이드는 면역세포염색과 FACS로 분석하였을 때 췌장암 세포에 특이적인 결합력을 보였다. 췌장암 특이적 결합력을 이용한 치료 효과를 탐색하기 위하여 M5 펩타이드를 Ce6 광감각제에 결합시켰고, M5-Ce6 광감각제는 광역학 치료로 광감각제 단독 사용보다 췌장암 세포 생존을 유의하게 저해하였다.

췌장암의 진단은 영상학적 진단과 혈청학적 방법이 주로 이용되고 있는데 CA19-9, CA-125, CEA, CA242<sup>20,21</sup> 등의 표지자를 검출하는 방법이나 대부분의 소화기계의 암에서 상승하는 등 특이도가 낮다. 따라서 대부분 영상학적 진단을 통하여 진단하고 있다. 영상학적 진단은 췌장의 종괴를 발견하여야 한다.<sup>8</sup> 종괴의 혈관 형성이 증가함을 이용하여 CT나 초음파에서는 조영제를 사용하고 있으나 이는 매우 비특이적 방법이다.<sup>22-24</sup> 그러므로 미래의 의학에서는 췌장암 특이적 바이오마커를 이용한 진단법이 필요하다.

바이오마커는 체내 세포나 혈관, 단백질 DNA 등을 이용하여 변화를 확인할 수 있는 생물학적 지표를 말한다. 과거에는 혈압과 체온, 혈당 수치 같은 생리학적 지표를 바이오마커로 주목하였으나 최근에는 DNA와 RNA, 단백질, 바이러스 등이 바이오마커로 주목받고 있다. 하지만 췌장암에서는 다른 종양에 비하여 바이오마커의 개발에 어려움이 있다. 실제 환자의 종양 조직을 이용하여 시험관적 연구와 이형 연구가 필수적 요건인데 연구 목적의 환자 조직 샘플을 획득하기가 상당히 어렵기 때문에 임상 연구를 위해서는 조직 또는 세포의 banking 구축이 필요하다.<sup>25</sup>

파지 디스플레이는 현재 면역학, 세포 생물학, 약물 전달 기술 등의 다양한 분야에서 활용되고 있다.<sup>13,15,26</sup> 이 기법으로 췌장암 발현과 관련된 연구 중에는 plectin-1 단백질을 표적으로 하는 KTLLPTP 펩타이드가 있다.<sup>10</sup> KTLLPTP 펩타이드는 환자 조직 microarray 분석에서 양성 종양에서는 발현하지 않았고 췌장암 조직에서만 발현하였다. 시험관 내 광학영상 및 마우스 현미분광 측정법, 컴퓨터단층촬영과 자기공명영상에서 췌장암 특이도를 확인하였다.<sup>27</sup>

이번 연구에서도 파지 디스플레이 기법을 이용하여 Mia PaCa-2 췌장암 세포 특이적 펩타이드를 개발할 수 있었고, 이를 이용하여 췌장암 진단에 사용할 수 있는지에 대한 보다 많은 검증 과정이 필요하다. 특히 펩타이드는 아미노산의 중합체로 저분자 화합물에 비하여 상대적으로 낮은 독성을 지니고 있고, 펩타이드의 합성 과정이 저분자 화합물보다 간편하다는 장점을 가지고 있다. 아직 밝혀지지 않은 부분이 많기에

실제 사용하려면 추가로 동물실험 및 임상학적 연구가 필요하다.<sup>28,29</sup>

모든 세포는 세포 표면에 다양한 분자들이 존재한다. 최근 분자영상의 연구는 위장관 종양의 모양과 생화학적 변화를 실시간으로 확인하고자 진행되고 있다.<sup>24</sup> 분자영상을 위해서는 종양 특이적 바이오마커와 바이오마커를 시각화할 방법 및 영상학적 기기가 필요하다. 바이오마커는 종양의 생화학적 및 분자적 변화를 나타내므로, 대부분의 마커는 병태학적 변화에 근거하여 개발되고 있다. 따라서, 분자영상의 이상적 장점은 병변의 위치를 지정할 수 있을 뿐만 아니라 분자적 변화 및 활성도도 동시에 측정할 수 있을 것이라 생각된다. 이는 병변의 진단뿐만 아니라 종양의 변화를 이용한 치료적 목적으로도 미래에는 사용될 수 있을 것이다.

전이 및 진행성 췌장암의 치료는 화학 요법에 국한되어 있다. 1차적 항암제로는 gemcitabine, FOLFIRINOX, nab-paclitaxel과 gemcitabine 병용 투여 요법이 사용되고 있다.<sup>30</sup> Nab-paclitaxel 치료 요법이 실패한 경우 2차적 항암제로 nano-liposomal irinotecan을 사용하고 있으나 생존율 증가 효과는 1차적 항암제에 비하여 약 1.8개월 정도 증가하는 등 미미한 수준이다.<sup>31</sup> 방사선 치료 또한 국소 병변에만 효과가 있고<sup>32</sup> 절제술이 가능한 경우가 극히 낮기에 진단의 높은 반응성 및 개선된 효능에 대한 혁신적인 연구가 절실히 필요하다.<sup>33</sup> 광역학 치료는 광감각제 주사 후 레이저를 조사하여야 한다. 췌장은 체내 심부에 위치하므로 레이저 조사가 쉽지 않다. 이전 임상시험에서는 췌장 종괴에 경피로 광섬유를 삽입하기도 하였고,<sup>34,35</sup> 초음파 내시경 유도로 광섬유 삽입 후 레이저 조사하기도 하였다.<sup>36</sup> 따라서, 광감각제가 췌장에 고루 분포하더라도 종괴 전체에 적절한 레이저 조사가 어려운 단점이 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로 현재 자가형광 에너지를 이용한 광역학 치료법에 관한 연구들이 기대되고 있다.<sup>37,38</sup> 이번 연구에서는 췌장암 특이적 펩타이드를 광감각제와 결합하여 광역학 치료에 사용이 가능할지 예비적 실험 결과를 보여 주었다. 이번 연구 결과에서 얻은 마커의 특이도로 영상학적 검사가 가능한 정도인지를 알기 위해서는 정위 췌장암 모델 등을 이용한 추가적 실험과 더불어 실제 췌장암 환자 조직 또는 혈액을 대상으로 한 임상 연구도 필요하다.

이번 연구를 통하여 개발된 펩타이드 M5는 췌장암 세포주 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3에 특이적으로 결합함을 확인하였다. M5 펩타이드를 광감각제와 결합하여 확인한 결과 췌장암 특이적 광역학 진단 및 치료 가능성을 확인할 수 있었다. M5 펩타이드는 췌장암 특이적 영상학적 진단 및 치료 목적으로 사용할 수 있는 새로운 탐지 도구가 될 수 있다고 생각된다.

## 요 약

**목적:** 췌장암은 예후가 매우 불량한 암으로, 조기 진단이 환자의 생존율을 높일 수 있는 방법이나 진단에 특이적 증상은 없다. 이번 연구는 영상학적 진단에 사용할 수 있는 췌장암 특이적 펩타이드를 개발하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 7-mer 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 3회의 bio-panning을 췌장암 세포주인 MIA PaCa-2, UACC-462, BxPC-3에서 실시하였다. 증폭된 파지로 췌장암 세포주들과 대조세포인 CCD841 세포주에서 면역효소법과 면역화학염색을 시행하여, 췌장암 세포에 특이적으로 결합하는 파지를 선택하였다. 합성된 펩타이드에 FITC로 표지한 후 면역형광염색 및 FACS로 췌장암 특이도를 조사하였다. 치료적 사용 가능성 탐색을 위하여 개발된 펩타이드에 광감각제인 Ce6를 결합하였고, 이 결합체를 MIA PaCa-2와 CCD841 세포주에 전처리 및 레이저(3 J/cm<sup>2</sup>) 조사 24시간 후에 MTT로 세포 생존율을 분석하였다. 실험실적 결과를 췌장암 세포주 이식 모델에서 다시 확인하였다.

**결과:** 췌장암 세포주에서 3번의 bio-panning을 시행하여, 첫 회의 파지 회수율 1.4×10<sup>4</sup> pfu에서 세 번째에는 3.2×10<sup>5</sup> pfu로 증가되었다. 증폭된 파지 클론으로 면역효소법 및 면역화학염색을 시행하여 췌장암 세포주 MIA PaCa-2에 특이적 결합을 보이는 파지(M5)를 선택하였다. M5의 아미노산 서열(WLEVYLG)로부터 펩타이드를 합성하였다. FITC가 표지된 펩타이드 M5는 CCD841에 비하여 MIA PaCa-2에서 높은 형광을 보여주었고, FACS 분석에서도 우측 이동을 확인하였다. Ce6와 결합된 M5는 Ce6 단독에 비하여 광역학 치료에서 유의하게 낮은 세포 생존율을 보였다. MIA PaCa-2 세포주를 이식한 동물실험에서도 M5와 결합한 Ce6가 Ce6 단독군에 비하여 유의하게 높은 종양 특이적 형광발현 및 광역학 치료 반응을 보여주었다.

**결론:** 이번 연구로 펩타이드 M5가 췌장암 세포주 MIA PaCa-2에 특이적으로 결합함을 확인하였으며, 이를 이용하여 영상학적 진단 및 치료 목적으로 사용 가능할 것으로 생각되었다.

**색인 단어:** 박테리오파지; 췌장암; 펩타이드; 광역학 치료

## REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018;68:7-30.
2. Ryu JK. The early detection of pancreatic cancer: whom and how? *Korean J Pancreas Biliary Tract* 2015;20:198-203.
3. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet* 2016;388:73-85.
4. Fong ZV, Tan WP, Lavu H, et al. Preoperative imaging for resect-

- able periampullary cancer: clinicopathologic implications of reported radiographic findings. *J Gastrointest Surg* 2013;17:1098-1106.
5. Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:88-95.
  6. Kozuka S, Sassa R, Taki T, et al. Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer* 1979;43:1418-1428.
  7. Lee JH, Cassani LS, Bhosale P, Ross WA. The endoscopist's role in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;10:1027-1039.
  8. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and detection of pancreatic cancer. *Cancer J* 2017;23:333-342.
  9. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2007;33:266-270.
  10. Bausch D, Thomas S, Mino-Kenudson M, et al. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:302-309.
  11. Faca VM, Song KS, Wang H, et al. A mouse to human search for plasma proteome changes associated with pancreatic tumor development. *PLoS Med* 2008;5:e123.
  12. Koopmann J, Fedarko NS, Jain A, et al. Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:487-491.
  13. Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:610-616.
  14. Wilson DR, Finlay BB. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* 1998;44:313-329.
  15. Rodi DJ, Makowski L. Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:87-93.
  16. Frei JC, Lai JR. Protein and antibody engineering by phage display. *Methods Enzymol* 2016;580:45-87.
  17. Joshi BP, Wang TD. Targeted optical imaging agents in cancer: focus on clinical applications. *Contrast Media Mol Imaging* 2018;2018:2015237.
  18. Kaminski MF, Regula J, Kraszewska E, et al. Quality indicators for colonoscopy and the risk of interval cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1795-1803.
  19. Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 2008;14:454-458.
  20. Gu YL, Lan C, Pei H, Yang SN, Liu YF, Xiao LL. Applicative value of serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in diagnosis and prognosis for patients with pancreatic cancer treated by concurrent chemoradiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:6569-6573.
  21. Honda K, Katzke VA, Hüsing A, et al. CA19-9 and apolipoprotein-A2 isoforms as detection markers for pancreatic cancer: a prospective evaluation. *Int J Cancer* 2019;144:1877-1887.
  22. DeWitt J, Devereaux B, Chriswell M, et al. Comparison of endoscopic ultrasonography and multidetector computed tomography for detecting and staging pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 2004;141:753-763.
  23. Joshi BP, Dai Z, Gao Z, et al. Detection of sessile serrated adenomas in the proximal colon using wide-field fluorescence endoscopy. *Gastroenterology* 2017;152:1002-1013.e9.
  24. Bang JY, Magee SH, Ramesh J, Trevino JM, Varadarajulu S. Randomized trial comparing fanning with standard technique for endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of solid pancreatic mass lesions. *Endoscopy* 2013;45:445-450.
  25. Bang S. Surveillance and early diagnosis of pancreatic cancer. *Korean J Pancreas Biliary Tract* 2015;20:1-4.
  26. Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009;27:1006-1020.
  27. Moris M, Dawson DW, Jiang J, et al. Plectin-1 as a biomarker of malignant progression in intraductal papillary mucinous neoplasms: a multicenter study. *Pancreas* 2016;45:1353-1358.
  28. Wang J, Zheng M, Xie Z. Carrier-free core-shell nanodrugs for synergistic two-photon photodynamic therapy of cervical cancer. *J Colloid Interface Sci* 2019;535:84-91.
  29. Zullo SW, Zeitouni NC, Segal RJ. Long-term efficacy of combination vismodegib and photodynamic therapy for multiple basal cell carcinomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;24:164-165.
  30. Lee KH. Chemotherapy and targeted therapy with management of related complications in pancreatic cancer. *Korean J Pancreas Biliary Tract* 2015;20:5-13.
  31. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25:1960-1966.
  32. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1200-1210.
  33. Yabar CS, Winter JM. Pancreatic cancer: a review. *Gastroenterol Clin North Am* 2016;45:429-445.
  34. Huggett MT, Jermyn M, Gillams A, et al. Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014;110:1698-1704.
  35. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 2002;50:549-557.
  36. Choi JH, Oh D, Lee JH, et al. Initial human experience of endoscopic ultrasound-guided photodynamic therapy with a novel photosensitizer and a flexible laser-light catheter. *Endoscopy* 2015;47:1035-1038.
  37. Yang Y, Hou W, Liu S, Sun K, Li M, Wu C. Biodegradable polymer nanoparticles for photodynamic therapy by bioluminescence resonance energy transfer. *Biomacromolecules* 2018;19:201-208.
  38. Kim YR, Kim S, Choi JW, et al. Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. *Theranostics* 2015;5:805-817.