

□ 원 저 □

Lewis 폐암 마우스 모델에서 Retroviral Vector나 Adenoviral Vector로 이입된 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자치료

원자력병원 분자종양학실*, 강원대학교 생명과학부**, 서울대학교 의과대학 내과학교실, 의학연구원 폐연구소***

권희충*, 정재민*, 김정현*, 함용호*, 서지숙*,
이기호*, 김창민*, 이한수**, 이춘택***

= Abstract =

Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Therapy Delivered by Retroviral or Adenoviral Vector in Mouse Model of Lewis Lung Carcinoma

Heechung Kwon, M.S.*, Jae-Min Jeong, M.S.*, Jung-Hyeon Kim, M.S.*,
Yong-Ho Ham, B.S.*, Ji-Sook Seo, B.S.*, Ki-Ho Lee, Ph.D.*, Chang-Min Kim, M.D.*,
Hansoo Lee, Ph.D.** and Choon-Taek Lee, M.D.***

*Laboratory of Molecular Oncology**, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea,
*Division of Life Science***, Kangwon National University, Chuncheon, Korea,
*Department of Internal Medicine****, Seoul National University College of Medicine,
Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : The antitumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) and ganciclovir (GCV) strategies for cancer gene therapy have a the following advantages : 1) a direct cytotoxicity to HSV-tk modified cancer cells by GCV 2) a cell death by the local transfer of toxic metabolites from the HSV-tk modified cells to nearby unmodified tumor cells (bystander effect), and 3) *in vivo* bystander effect such as antitumor-immunity. Retroviral and adenoviral sequences can silence transgene expression in cells and mice. In this study, we investigated the above described advantages of HSV-tk/GCV strategy in Lewis lung cell and

†본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

Address for correspondence :

Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-2634 Fax : 02-762-9662 E-mail : ctle@snu.ac.kr

mouse lung cancer model using retroviral vector and adenoviral vector. Also, we observed whether the expression of a silenced gene can be reactivated by treating cells with butyrate.

Methods : Retrovirus-HSV-tk and adenovirus-HSV-tk vectors were used for the transduction of Lewis lung carcinoma (LLC) cells. The change of HSV-tk expression by butyrate was measured by Western blot. The antitumor activities containing bystander effect were observed *in vivo* (by MTT assay) and *in vivo* tumor models of various combinations of LLC and LLC-tk.

Results : 1. Butyrate induced the enhancement of HSV-tk expression from adenovirally transduced cells but not from retrovirally transduced cells. 2. Both retrovirus-HSV-tk and adenovirus-HSV-tk vectors with GCV treatment were effective for killing of tumor cell *in vitro* and suppression of LLC tumorigenicity. Bystander effect was responsible for killing of mixture of LLC-tk and LLC *in vitro* and *in vivo*-tumorigenicity model.

Conclusion : Butyrate could augment adenovirus-mediated HSV-tk gene expression. Cancer gene therapy with HSV-tk suicide gene by retroviral and adenoviral vector seems to be an effective approach for lung cancer therapy. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 298-309)

Key words : HSV-tk, GCV, Gene therapy, Adenovirus, Retrovirus, Lung cancer.

서 론

폐암의 빈도는 많은 선진국에서 증가하고 있을 뿐 아니라 국내에서도 암으로 인한 사망의 세 번째 원인을 차지하는 중요한 질환이며 국내의 높은 흡연률을 감안해보면 앞으로 유병율은 증가될 것으로 예상된다. 암 치료에 있어 최근의 발전에도 불구하고 폐암에 대한 예후는 향상되지 않고 있다.

HSV-tk/GCV 전략은 세포에 이입된 HSV-tk 유전자가 항 바이러스제인 Ganciclovir(GCV)를 인산화시키면 이 독성 GCV metabolite가 세포의 DNA 합성을 방해하여 세포살상효과를 나타내는 현상을 이용한 것으로 생체 외 실험과 생체 내 동물모델에서 그 효과가 증명되었다¹⁻³. HSV-tk/GCV 연구에 의하면 직접적인 살상효과⁴ 외에도 유전자가 투입되지 않은 주위의 세포도 살상할 수 있는 bystander effect로 암 유전자요법의 치료효과를 극대화시킬 수 있다⁵. HSV-tk/GCV 전략을 이용한 전 임상시험은 난소암 치료에 처음으로 승인된⁶ 후 여러 가지 암들을 대상으로 임상시험이 활발히 진행중이며 뇌종양에서는 부분적인 항암 효과가 있음이 알려지고 있다⁷.

HSV-tk/GCV 전략을 이용한 암세포 살상에 대한

많은 연구 중에서 생체 내 유전자 전달에서 특히, retroviral vector는 분열하는 세포에만 유전자를 전달하기 때문에 아주 비효율적이어서 HSV-tk 유전자를 포함하는 retrovirus를 생산하는 vector producer cell을 종양 내에 주사하여 국소적으로 종양의 성장을 억제하는 연구가 이루어졌다^{8,9}. 이러한 retroviral vector의 생체 내 비효율적인 유전자 전달 효과를 극복하기 위하여 adenoviral vector를 종양에 HSV-tk 유전자를 전달하는 수단으로 이용되었다^{10,11}.

Adenoviral vector의 단점은 1) 이들이 모든 세포를 감염하며 2) 단기간 발현되어 세포가 분열하기 전에 antitumor effect가 발생해야 하고 3) 숙주에 대한 독성이 있다는 것 등이다¹². Retroviral, adeno-associated 또는 adenovirus vector를 이용하여 유전자를 세포 내에 전달할 때 비록 유전자의 전달이 효율적으로 이루어져도 발현이 억제되는 현상이 보고되었다¹³. 이런 현상의 원인은 잘 이해되지 않고 있으나 histone deacetylase의 inhibitor인 butyrate와 trichostatin A를 처리하여 포유동물세포의 세포 내에서 대사의 변화를 가져와 유전자의 억제된 발현을 재활성화 할 수 있다.

본 연구는 HSV-tk 유전자를 retroviral vector와

adenoviral vector로 각각 Lewis 폐암세포주에 이입하였으며 이것을 이용한 생체 내 그리고 생체 외 실험을 수행하여 HSV-tk/GCV에 의한 살상효과와 bystander effect를 관찰하였다. 또한, LLC에 HSV-tk 유전자 이입한 후 이 유전자의 발현이 butyrate에 의해 증대하는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 세포주

8주된 female C57BL/6마우스를 Harlan Inc.에서 구입하여 사용하였다. 폐암세포주인 Lewis lung carcinoma cell (LLC), transformed human kidney cell인 293cell 그리고 amphotropic packaging cell인 PA317을 ATCC (Rockville, MD)에서 구입하였다.

2. HSV-tk를 포함한 viral vector의 제작과 폐암세포주에서의 발현

2-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우

HSV-tk와 neo유전자가 삽입된 pMOTEN viral vector를 미국 Havard의 Dr. R. Mulligan으로부터 제공받았다. HSV-tk 유전자는 LTR (Long Terminal Repeat) promoter로부터, neo 유전자는 internal promoter인 IRES (Internal Ribosomal Entry Site)에 의해 발현된다. pMOTEN을 calcium phosphate 방법으로 amphotropic PA317 packaging cell line에 이입하여 neo 유전자가 발현되는 producer cell을 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418로 선별하였다. 이 producer clone중 HSV-tk 유전자를 높이 발현하면서 high titer의 virus를 생산하는 retroviral producer cell을 선별하여 Lewis 폐암세포주에 감염하였다. Lewis 폐암세포주를 100 mm culture dish에 plating한 후 4 ml retrovirus HSV-tk를 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene과 혼합한 후 2시간 동안 배양하였다.

24시간 후 1 mg/ml G418 배지로 교환하여 clone이 생길 때까지 4일마다 새로운 배지로 배양한 다음 LLC-tk를 선별 분리하였다. 본 실험에 사용된 LLC-tk 세포주는 mixed population을 사용하였으며 HSV-tk 유전자의 발현을 5 mM butyrate (Sigma)로 유도한 후 western blotting으로 확인하였다.

2-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

pAC-CMVpLpA plasmid (미국 Texas 주립대학의 Dr. Gerard로부터 제공받았음) Xba I site에 1.1 kb size의 HSV-tk cDNA를 삽입하여 pAC-HSV-tk를 만들었다. pAC-HSV-tk를 pJMI7과 함께 calcium phosphate 방법으로 293 cell line에 cotransfection하여 cell lysis를 나타내는 세포에서 virus를 freezing-thawing방법으로 adenovirus HSV-tk를 (Adtk) 분리하였고 293 cell에서 증식을 하였다. Recombinant adenovirus vector는 plaque purification에 의해 다시 순수 분리하였고 viral vector의 대량 생산은 CsCl 초원심분리에 의해 2번 정제 하였다. Virus titration은 plaque assay을 이용한 infectious titration과 OD_{260nm}에서 총 virus particle 수를 측정하는 방법을 병행하였다. HSV-tk 유전자의 발현을 5 mM butyrate로 유도한 후 Western blotting으로 확인하였다.

3. 폐암세포주에서 HSV-tk/GCV에 의한 살상효과와 bystander effect

3-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우

HSV-tk를 발현하는 LLC-tk 폐암세포주를 96-well plate에 2×10^3 cells/well로 배양하였다. 다음날 여러 가지 농도 (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 μM)의 GCV가 첨가된 배지로 교환하고 7일 동안 배양하였다. Bystander effect를 검색하기 위하여 LLC와 LLC-tk 세포주를 각각 0%, 10%, 30%, 50%, 70% 그리고 100%의 비율로 혼합하여 96 well plate에 2×10^3 cells/well로 seeding한 후 10 μM GCV를 처리

하였다. 생존세포는 MTT 검사로 수행하였다.

3-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

LLC를 6-well plate에서 하루 동안 배양한 후 Adtk와 adenovirus LacZ (AdLacZ)를 각각 10 MOI로 90분 동안 세포주에 감염한 후 배양하였다. 다음날 96-well plate에 2×10^3 cells/well로 분주하고 하루 더 배양한 후 여러 농도의 GCV (0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 μ M)를 처리하고 7일 동안 배양하였다. By-stander effect를 검색하기 위하여 LLC에 Adtk나 AdLacZ를 각각 10 MOI로 감염한 후 이들을 각각 0%, 25%, 50%, 75% 그리고 100%의 비율로 혼합 배양하여 96 well plate에 2×10^3 cells/well로 분주한 후 10 μ M GCV를 처리하였다. 생존세포는 MTT 검사로 측정하였다.

4. Western blotting

세포를 수거하여 RIPA buffer (0.1% Nonidet P40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5-8.0, 250 mM NaF)로 추출한 후 bicinchoninic acid를 이용하여 단백질을 정량 하였다. 추출한 30 μ g의 단백질을 SDS-PAGE로 25 mA로 2시간동안 전기 영동한 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C에서 2시간 동안 250 mA에서 이동하였다. 얻어진 membrane에 5% dry-milk로 1시간 동안 비특이 결합을 차단하였다. Membrane을 5% dry-milk에 1 : 2,000으로 희석한 polyclonal rabbit anti-HSV-tk antibody로 1시간 동안 반응시킨 후 TBS (10 mM Tris-HCL, pH8.0, 150 mM NaCl)로 세척하였고 ECL kit (Amersham Co.)를 사용하여 발색하였다.

5. MTT assay

Phosphate buffered saline (PBS)에 최종농도가 5 mg/ml 가 되도록 녹인 MTT용액을 2 μ m filter막에 여과시켜 멸균시킨 후 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태로 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. 96 well

plate의 각 well에 100 μ l의 배양액을 넣은 후 MTT 용액을 10 μ l 씩 첨가하여 MTT 최종 농도를 0.5 mg/ml로 맞추었다. 37°C에서 4시간 동안 incubation 한 후 배양액을 제거하여 590 nm에서 ELISA 판독기로 광학밀도를 측정하였다.

6. HSV-tk/GCV에 의한 생체 내 종양성장 억제효과와 bystander effect

6-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우

LLC와 HSV-tk 유전자가 이입된 폐암세포주인 LLC-tk을 실험 군에 따라 5×10^5 세포를 0.1 ml의 serum-free 배양액에 현탁하여 C57BL/6 마우스 우엽에 피하주사 후 종양의 크기가 100 ± 30 mm³ 되었을 때 50 mg/kg GCV를 14일 동안 하루에 두 번씩 투여하였다. 실험 동물군은 다음의 4개 그룹으로 분류하였다 : 1. LLC/GCV 그룹 (n=12), 2. LLC-tk 그룹 (n=12), 3. LLC-tk 50% 그룹 (n=12, LLC-tk와 LLC 폐암세포주를 50:50 비율로 혼합), 4. LLC-tk 25% 그룹 (n=12, LLC-tk와 LLC 폐암세포주를 25 : 75 비율로 혼합). 각 동물군의 1/2은 saline 처리를 하였고 나머지 1/2는 GCV를 처리하였다. 상기의 마우스들은 2-3일 간격으로 종양의 크기를 측정하였으며 종양의 용적(tumor volume)은 L (종양의 장축) \times W (종양의 단축)² \div 2의 공식으로 계산하였다.

6-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

LLC에 60 MOI로 Adtk와 AdLacZ를 90 분 동안 감염한 후 완전배지로 교환하여 하루동안 배양하였고 5 mM sodium butyrate를 배지에 첨가하여 하루 더 배양하였다. LLC-Adtk와 LLC-AdLacZ 세포주를 각각 100 : 0, 50 : 50, 75 : 25 그리고 0 : 100의 비율로 혼합하고 5×10^5 세포를 0.1 ml의 serum-free 배양액에 현탁하여 4그룹(각 그룹당 n=7)으로 나누어진 마우스의 피하에 주사하였다. 피하주사 2일 후부터 7일 동안 50 mg/kg GCV를 14일 동안 하루에 두 번씩 투여하였다.

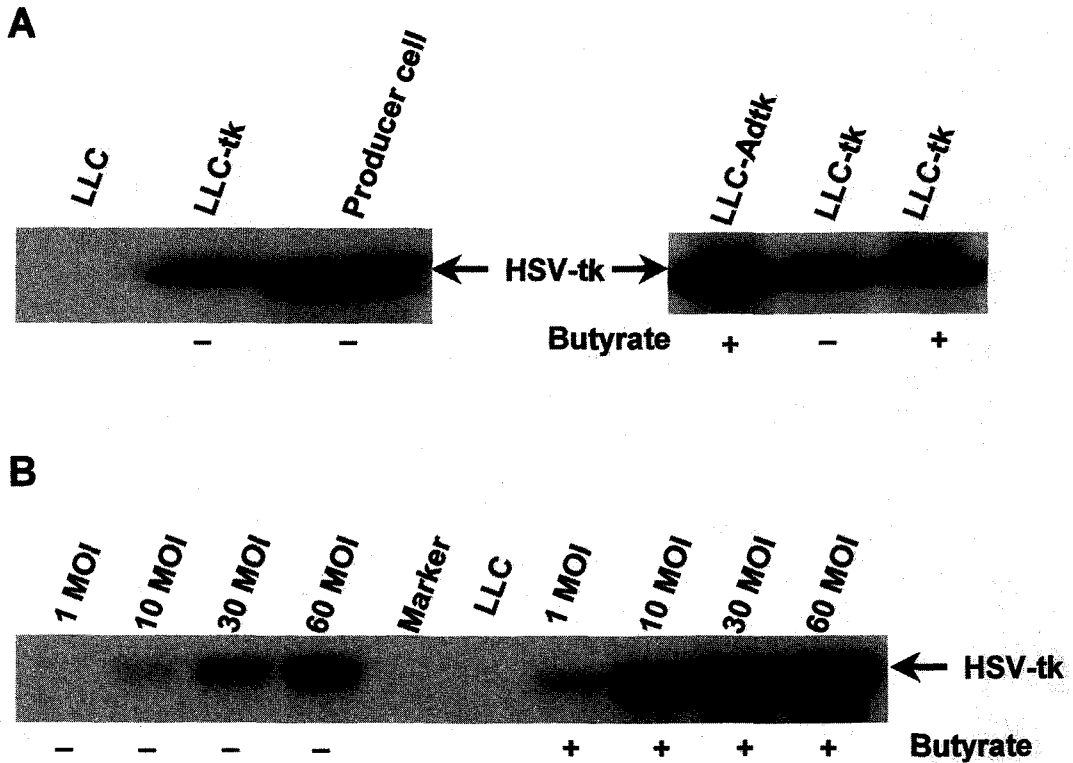


Fig. 1. Detection of HSV-tk protein expression by Western blot analysis. A. HSV-tk expression in LLC-tk cells. LLC, uninfected cells ; LLC-tk, LLC cells transduced with retrovirus HSV-tk ; producer cell, retrovirus HSV-tk producing PA 317 cells ; LLC-Adtk, infected with a 10 MOI Adtk. B. HSV-tk expression in LLC-Adtk cells. LLC cells were infected with a various MOI (0, 1, 10, 30, 60) of Adtk and treated with 5 mM butyrate. 30 μ g of total protein was separated by electrophoresis and incubated with rabbit anti-HSV1-tk antiserum followed by mouse anti-rabbit AP conjugate.

7. 통 계

이 실험에서 통계처리 방법은 2-tailed *t*-test를 사용하였다.

결 과

1. 폐암세포주에서의 HSV-tk 유전자의 발현

1-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우 LLC, LLC-tk 그리고 retrovirus HSV-tk를 생산하

는 PA 317 세포주에서 단백질을 추출하여 HSV-tk 유전자의 발현수준을 비교하였다. 분주된 sample의 단백질 양은 같고 잘 전달되었다는 것을 Coomassie blue staining에 의해 확인하였다(data not shown). 모세포주인 LLC는 HSV-tk 유전자가 이입되지 않아 발현이 검출되지 않은 반면 LLC-tk 세포주는 retrovirus HSV-tk를 생산하는 PA 317 세포주에서 나타난 47 kDa band가 검출되어 이입된 HSV-tk 유전자가 발현한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). Butyrate를 처리한 LLC-tk와 처리하지 않은 LLC-tk 세포주의 경우에는 HSV-tk 발현 양에는 변화

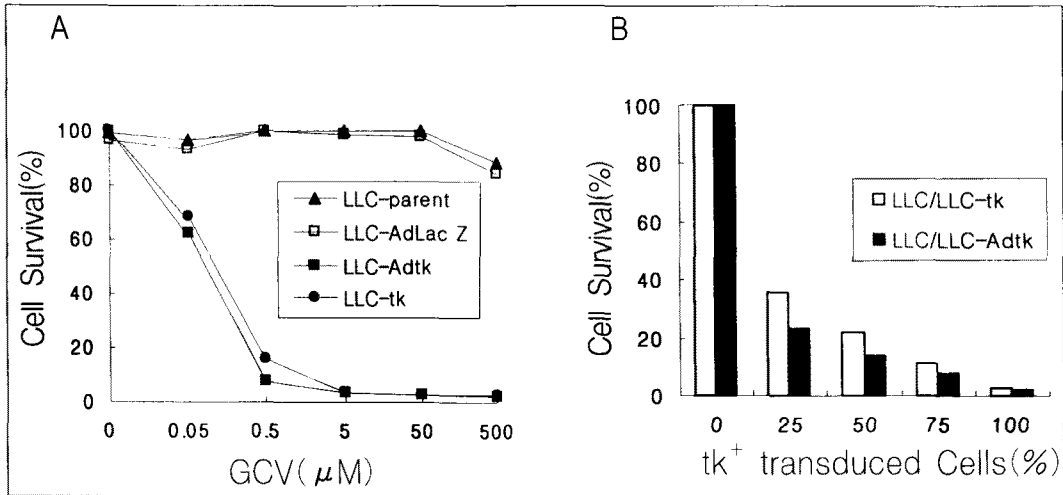


Fig. 2. *In vitro* GCV sensitivity and bystander effect of HSV-tk expressing LLC cells transduced by retroviral or adenoviral vectors. The cytotoxic activity was measured by cell proliferation assays (MTT assay). A. GCV sensitivity of HSV-tk-modified cells. GCV showed dose-dependent cytotoxic activity. B. *In vitro* bystander effect in a mixed culture of unmodified or HSV-tk-modified cells. A mixture of unmodified or HSV-tk-modified cells at various ratios were incubated with 10 μM GCV.

가 없었다(Fig. 1A).

1-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

LLC 세포주에 Adtk를 0, 1, 10, 30, 60 MOI로 감염 후 butyrate를 하루동안 처리한 것과 처리하지 않은 것의 HSV-tk 유전자발현을 비교하였고 10 MOI에서 시간별로 발현 양을 측정하였다. 대조 군에서 HSV-tk가 발현되지 않은 반면 HSV-tk의 발현은 MOI가 증가함에 따라 현격히 증가하였고 sodium butyrate를 처리한 것이 처리하지 않은 것보다 1과 10 MOI에서 8배를 30과 60 MOI에서는 약 2.5와 1.58배 정도의 발현증가를 보였다(Fig. 1B). 10 MOI의 Adtk로 이입된 LLC-Adtk의 HSV-tk 발현 양이 retrovirus로 이입된 LLC-tk보다 7.5% 정도 높았다(Fig. 1A).

2. 폐암세포주에서 HSV-tk/GCV에 의한 살상민감도 검사

2-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우

LLC와 LLC-tk에 대하여 GCV 농도별 살상민감도를 측정하였다. GCV의 농도가 증가하면서 HSV-tk 유전자로 이입된 LLC-tk의 살상민감도도 현격히 증가하여 5 μM GCV에서 95% 이상의 세포가 살상되었다. LLC-tk의 IC_{50} 은 0.3 μM 이하였고 LLC 세포주는 500 μM 이상으로 이들의 IC_{50} 은 1,000배 이상의 차이가 나타났다(Fig. 2A). Bystander effect를 이들 LLC와 LLC-tk를 혼합 배양한 culture에서 관찰하였는데 단지 25% LLC-tk된 세포주가 혼합된 mixed culture에서 65% 이상의 살상민감도를 보였으며 LLC-tk 세포비율이 증가함에 따라 살상효과는 더 증가하였다(Fig. 2B).

2-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

LLC 폐암세포주에 Adtk를 10 MOI로 감염시켜 GCV 농도별 살상민감도를 측정하였다. GCV 농도가 증가하면서 LLC-Adtk의 살상민감도도 증가하였으며 0.5 μM GCV에서도 90%의 세포가 살상되었다.

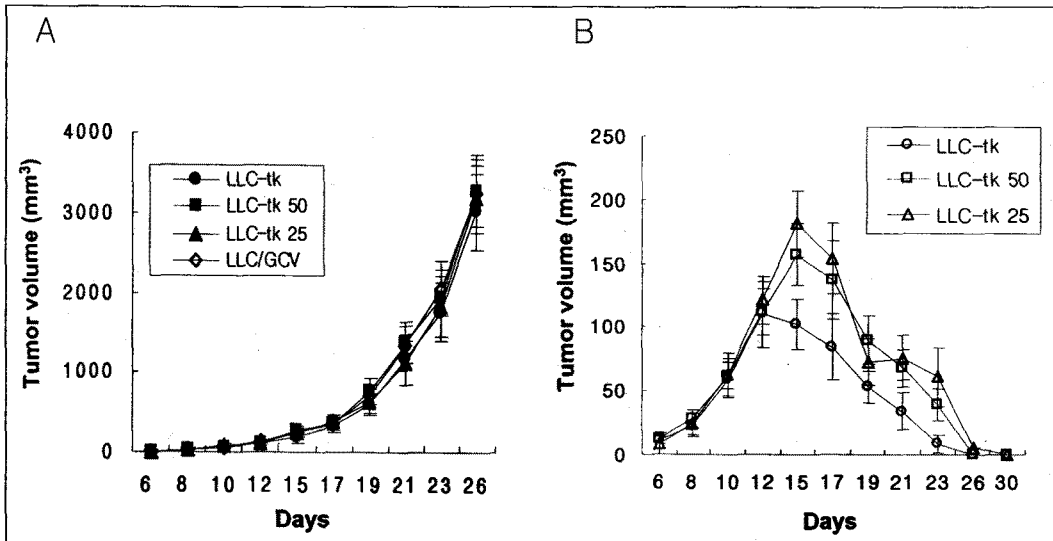


Fig. 3. *In vivo* inhibition of tumor growth and bystander effect by HSV-tk/retro/GCV treatment. Mice were divided according to the following treatment : LLC/GCV group, implanted with LLC cells and treated with GCV (A) or saline (data not shown) ; LLC-tk group, implanted with LLC-tk and treated with saline (A) or GCV (B) ; LLC-tk 50% group, implanted with a mixture of 50% LLC-tk and 50% LLC, and treated with saline (A) or GCV (B) ; LLC-tk 25% group, implanted with a mixture of 25% LLC-tk and 75% LLC and treated with saline (A) or GCV (B). A half of the mice in each group were treated with 50 mg/kg GCV twice a day for 14 days and the other half were treated with saline when tumor volume was $100 \pm 30 \text{ mm}^3$ in each mouse. Error bar = mean \pm SD.

LLC-Adtk의 IC_{50} 은 $0.2 \mu\text{M}$ 이하였고 LLC 세포주는 $500 \mu\text{M}$ 이상으로 이들의 IC_{50} 은 1,000배 이상 차이를 보였다(Fig. 2A). 또한 bystander effect를 LLC-Adtk와 LLC-LacZ를 혼합 배양하여 관찰하였는데 25% LLC-Adtk 세포주가 혼합된 배양에서 75% 이상의 살상민감도를 보였으며 LLC-Adtk 세포수가 증가함에 따라 살상효과는 더 증가하였다(Fig. 2B).

3. 체내에서 HSV-tk/GCV에 의한 종양의 소멸

3-1. Retroviral vector를 사용하였을 경우

폐암세포주인 LLC와 HSV-tk 유전자가 형질 도입된

폐암세포주 LLC-tk를 각각 마우스의 피하에 주사하였으며 이들을 혼합하여 이식한 마우스에서 bystander effect를 조사하였다. 2-3일 간격으로 종양의 크기를 측정하여 크기가 100 ± 30 (mean \pm SD) 되었을 때부터 마우스에 GCV를 주사하였다(Fig. 4A). LLC-tk를 이식한 마우스 그룹의 종양은 GCV처리 3일 후부터 성장이 둔화되기 시작하여 10일 되었을 때 완전히 소실되었지만 saline을 처리한 마우스그룹의 종양[LLC-tk 그룹, $3012 \pm 384 \text{ mm}^3$ (mean \pm SD) ($p < 0.01$)]은 LLC로 이식한 마우스의 종양 [$3248 \pm 428 \text{ mm}^3$ 과 비교하여 차이가 거의 없었으며 지속 성장하였다(Fig. 3A). Bystander effect의 발생 여부를 검색하기 위해서 LLC-tk와 LLC 폐암세

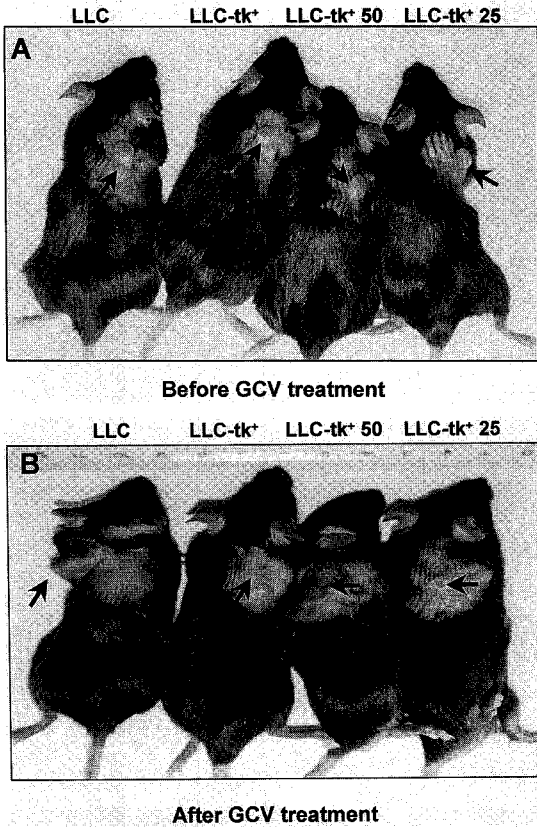


Fig. 4. Complete inhibition of tumorigenesis by GCV treatment in the mouse implanted with LLC-tk cells.

포주를 50 : 50과 25 : 75 비율로 혼합한 마우스그룹에서도 LLC-tk가 100%인 그룹처럼 14일 동안 GCV 주사 후 종양은 소멸되었다(Fig. 4B). LLC-tk 100% 그룹의 경우 GCV 주사 후 3일째 종양 [102 ± 20의 성장억제가 나타난 반면 혼합비율그룹에서는 3일까지 지속성장 [LLC-tk 50% 그룹, 157 ± 25; LLC-tk 25% 그룹, 181 ± 26을 보였으며 6 일째부터 성장억제 [LLC-tk 50% 그룹, 137 ± 31 mm³; LLC-tk 25% 그룹, 154 ± 28가 이루어졌다 (Fig. 3B). 이와 대조적으로 saline을 주사한 혼합그룹에서는 종양의 성장은 지속되었고 saline 처리를 마친 후 대조 군과 비교하여 혼합그룹의 종양의 크기 [LLC-tk 50% 그룹, 3273 ± 455 mm³ (LLC와 비

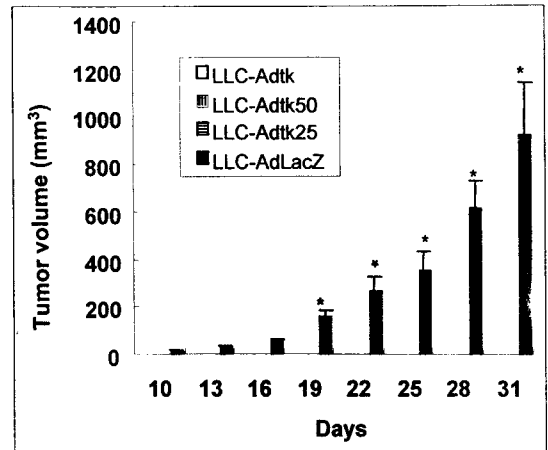


Fig. 5. *In vivo* inhibition of tumor growth and bystander effect by HSV-tk/adv/GCV treatment. Mice were divided according to the following treatment : LLC-Adtk group(n=7), implanted with LLC-Adtk and treated with GCV ; LLC-Adtk 50% group(n=7), implanted with a mixture of 50% LLC-Adtk and 50% LLC-AdLacZ, and treated with GCV ; LLC-tk 25% group (n=7), implanted with a mixture of 25% LLC-Adtk and 75% LLC-AdLacZ, and treated with GCV. Mice were subcutaneously inoculated with 5 × 10⁵ cells on day 0 and treated with 50 mg/kg GCV twice a day for 14 days. Error bar=mean ± SD, *p < 0.01 compared with the control group.

교하여 p < 0.05) ; LLC-tk 25% 그룹, 3175 ± 425 mm³ (LLC와 비교하여 p < 0.05)]에는 차이가 없었다(Fig. 3A).

3-2. Adenoviral vector를 사용하였을 경우

LLC에 AdHSV-tk와 AdLacZ를 60 MOI로 감염하여 24시간 배양한 후 5 mM butyrate를 배지에 첨가하여 24시간 더 배양하였다. LLC-Adtk와 LLC-AdLacZ 세포주를 각각 100 : 0, 50 : 50, 25 : 75 그리고 0 : 100의 비율로 혼합하여 4그룹 (각각 7마

리)의 마우스 피하에 주사한 후 다음날부터 7일 동안 GCV를 투여하여 종양의 발생을 조사하였다. LLC-Adtk 100% 그룹 뿐만 아니라 50%와 25%로 혼합 이식한 3그룹의 21마리 마우스 모두(100%)에서 종양이 30일 동안 발생하지 않았다(Fig. 5). 반면에 LLC-AdLacZ 그룹의 경우 7마리 마우스 모두(100%)에서 종양이 발생하였고 30일 후 종양의 크기는 $921 \pm 224 \text{ mm}^3$ (대조 군과 비교하여 $p < 0.01$)로 지속성장 하였다.

고 찰

세포주와 생체 내 유전자 전달 실험에서 Viral vector에 의해 전달된 유전자의 발현이 억제되는 현상이 종종 발생하는데 adenoviral vector로 이입된 유전자의 발현증가를 높이기 위해 세포전달 후 butyrate 처리하여 유전자의 발현을 5-10배 증가시킨 사례가 보고되었다¹⁴. 본 연구에서는 HSV-tk 유전자를 폐암세포주인 LLC에 retroviral vector와 adenoviral vector를 이용하여 형질 도입한 후 butyrate에 의한 HSV-tk 유전자의 발현을 관찰하였다. Butyrate에 의해 유도된 HSV-tk 유전자 발현은 Western blotting에 의해 검증되었다. Retroviral vector 경우 발현의 증가가 나타나지 않은 반면 adenoviral vector의 경우 1과 10 MOI의 경우 8배 발현증가를 보였고 10 MOI로 Adtk를 이입한 LLC에서 발현한 HSV-tk 단백질의 양은 retroviral vector로 HSV-tk 유전자가 100%로 이입된 LLC-tk보다 7.5% 더 발현되었다. 이런 결과는 adenoviral vector와 butyrate를 함께 사용하였을 경우 낮은 MOI에서 목표유전자의 발현을 증가시킬 수 있어 높은 titer가 요구되는 생체 내 실험에서 효과가 있을 것으로 사료된다.

암 유전자치료에 대한 HSV-tk/GCV 전략에는 세포에 이입된 HSV-tk 유전자가 세포의 DNA 합성을 방해하는 직접적인 살상효과⁴ 외에도 유전자가 투입되

지 않은 주위의 세포도 살상할 수 있는 bystander effect가 관찰된다. 이 Bystander effect의 기전으로 1) 살상된 세포의 apoptotic vesicle이 이웃한 암세포에 의해서 endocytosis 됨^{15,16} 2) 독성물질이 gap junction을 통한 세포내이동¹⁷ 3) 생체 내에서 immune/inflammatory response와 delayed-type hypersensitivity를 일으켜 암에 대한 면역반응의 유도¹⁸ 등이 있다. 상기의 HSV-tk/GCV 전략을 관찰하기 위해 폐암세포주인 LLC에 retroviral 또는 adenoviral vector로 HSV-tk 유전자를 이입한 후 조사하였다. MTT 검사를 통해서 모세포에 비해 retroviral vector나 adenoviral vector에 의해 HSV-tk 유전자를 이입한 세포주에서 낮은 농도의 GCV에서도 현저한 세포 살상효과가 있으며 GCV 농도가 증가하면 할수록 살상효과가 크다는 것을 알 수 있었다. LLC와 HSV-tk 이입된 LLC의 IC₅₀은 두 viral vector 모두 똑같이 1,000배 이상의 차이를 보여 GCV의 투여 용량이 증가할수록 더욱 효과적인 암세포를 죽일 수 있을 것으로 예상되나 사람에게 적용시 GCV투여에 따른 백혈구 감소와 혈소판 감소 등의 부작용이 있어 GCV 용량증가에는 제한점이 있을 것으로 사료된다^{19,20}. 두 viral vector 간의 차이는 bystander effect를 관찰한 실험에서 관찰되었는데 retroviral vector를 사용하였을 때 보다 adenovirus vector를 사용하였을 때 5-15% 더 높은 살상효과를 보였는데 이런 결과는 10 MOI의 adenovirus HSV-tk로 이입된 LLC의 HSV-tk 발현 양이 retrovirus로 이입된 LLC의 HSV-tk 발현 양보다 7.5% 정도 높아서 더 높은 bystander effect가 나온 것으로 사료된다.

생체 내 연구에서 retroviral vector로 HSV-tk 유전자가 이입된 LLC-tk그룹에서 종양의 성장은 GCV 투여 3일만에 억제되었으며 10일 후 소멸되었고 혼합그룹인 LLC-tk 50%와 LLC-tk 25% 그룹에서는 3일 늦은 6일째부터 나타나 14일 후 종양이

완전히 소멸되는 bystander effect가 발생하였다. Adenoviral vector를 이용한 생체 내 연구에서 비슷한 결과가 나타났는데 LLC-AdLacZ 그룹에서만 종양이 발생하여 성장한 것과는 대조적으로 HSV-tk가 25% 이상 섞인 다른 3그룹에서는 종양의 발생이 이루어지지 않았다. 이러한 연구결과로 HSV-tk 유전자의 이입 후 GCV의 투여에 의한 직접적인 살상효과와 더불어 bystander effect로 종양의 성장억제가 발생한 것으로 사료되며 상기의 viral vector에서 사용된 실험방법의 차이는 있었지만 관찰된 종양소멸효과의 차이는 없었다. 생체 내 bystander effect 기전의 한 근거로 종양에 대한 면역증강을 일으켜 종양을 사멸시키는 효과²⁾가 존재한다고 설명하고 있으며 또한 저자들이 시도한 간암적생모델에서 HSV-tk/GCV에 의한 CD4 그리고 CD8 lymphocyte와 같은 면역세포들이 활성화 된 것을 관찰하였기 때문에 본 모델에서 나타난 bystander effect의 기전에 관하여 추후의 관찰이 필요하리라 생각된다.

요 약

연구배경 :

암 유전자치료에서 각광받고 있는 HSV-tk/GCV 전략의 항암효과에는 다음과 같은 장점들이 거론되고 있다 : 1) GCV 처리에 의한 암세포 직접살상효과 2) HSV-tk 이입된 세포에 의해서 HSV-tk 이입되지 않은 주변세포를 살상하는 bystander effect 3) 생체 내 bystander effect로 알려진 anti-tumor immunity. Retrovirus와 adenovirus sequence를 이용할 경우 몇몇 세포주와 마우스에서 이들이 목적유전자의 발현을 억제할 수 있다는 것이 보고되고 있다. 본 연구에서는 retroviral나 adenoviral vector로 HSV-tk 유전자를 이입한 Lewis 폐암세포주와 폐암 마우스 모델을 통하여 HSV-tk/GCV 전략의 장점을 조사하였고 이 viral vector들 사이의 차이를 비교 조

사하였다. 또한 Lewis 폐암세포주에서 butyrate를 처리한 후 HSV-tk 유전자의 발현증가를 관찰하였다.

방 법 :

Lewis 폐암세포주에 retroviral vector와 adenoviral vector로 HSV-tk 유전자를 이입한 후 butyrate로 HSV-tk 유전자의 발현을 유도하고 Western blotting수행하여 분석하였다. 생체 외에서 HSV-tk/GCV에 의한 세포살상효과를 MTT 검사로 수행하였고 생체 내에서 LLC 나 HSV-tk 이입된 LLC 세포주를 이식하여 종양소멸 및 bystander effect를 조사하였다.

결 과 :

1. Butyrate로 유도된 HSV-tk 발현은 adenovirus로 이입된 LLC에서 증가한 반면 retrovirus로 이입된 LLC에서는 증가하지 않았다.
2. 생체 외 그리고 생체 내에서 viral vector로 HSV-tk를 이입한 종양세포에 GCV 투여하는 것은 종양세포의 살상에 효과적이었으며 LLC와 LLC-tk 세포주를 혼합한 실험에서 bystander effect도 종양세포의 성장을 억제하는 것으로 관찰되었다.

결 론 :

항후 생체 외 그리고 생체 내 실험에서 adenoviral vector를 이용한 유전자 전달에 butyrate를 함께 사용하면 유전자발현을 증진시킬 것으로 사료되며 자살 유전자인 HSV-tk을 종양에 이입하여 GCV을 처리하는 치료가 폐암유전자치료에 효과가 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Moolten FL : Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes. Paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 1986;45:5276-81.

2. Moolten FL, Wells JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase gene transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990;82: 297-300.
3. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992;256:1550-52.
4. Mullen CA. Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmac Ther* 1994;63:199-207.
5. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koepf DS, Moolten FL, et al. The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53:5274-83.
6. Clinical protocol : HSV-tk gene therapy, *Cancer Gene Ther* 1994;1:291-2.
7. Clinical protocol : Gene therapy for the treatment of brain tumors using intratumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther* 1993;4:39-69.
8. Short MP, Choi BC, Lee JK, Malick A, Breakefield XO, Martuza RL. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci* 1990; 27:427-33.
9. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 4348-52.
10. O'Malley BW Jr, Chen SH, Schwartz MR, Woo SL. Adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer in a nude mouse model. *Cancer Res.* 1995;55:1080-5.
11. Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. Gene therapy for brain tumors : Regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3054-57.
12. Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. *In situ* use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 1996;23: 31-45.
13. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong JY, Townes TM. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 5798-803.
14. Tang DC, Johnston SA, and Carbone DP. Butyrate-inducible and tumor-restricted gene expression by adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 1994;1:15-20.
15. Sambrano GR, Steinberg D. Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages : Role of membrane phosphatidylserine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1396-400.
16. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 1994;153: 3218-27.
17. Doble BW, Kardani E. Basic fibroblast growth factor stimulates connexin-43 expression and intercellular communication of cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 1995;143:81-7.
18. Freeman SM, Ramesh R, Marrogi AJ, Jensen A, Abboud CN. *In vivo* studies on the mechanism of the "bystander Effect". *Cancer Gene Ther* 1994; 4:326.

19. Crumpacker CS : Ganciclovir. N Engl J Med 1996;335:721-9.
20. 노재경, 공수정, 김주향, 엄효동, 유내춘, 송재진 등. Retroviral vector를 이용한 Herpes simplex virus-thymidine kinase 유전자 도입과 발현이 인체 위암세포주의 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향. 대한암학회지 1998;30:20-30.
21. Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSV-tk gene involves an immune component. Cancer Res 1994;54:6228-34.