

# 향장기성 두경부 편평세포암종의 미세잔존암 모델에서 GM-CSF 유전자를 이입시킨 제한복제성 헤르페스바이러스 벡터를 이용한 종양백신의 유전자 치료\*

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

김세현 · 최은창 · 김한수 · 장정현 · 김지훈 · 김광문

= Abstract =

## Gene Therapy Using GM-CSF Gene Transferred by a Defective Infectious Single-cycle Herpes Virus in Micro-residual Organotropic Head and Neck Squamous Cell Cancer Model

Se-Heon Kim, M.D., Eun Chang Choi, M.D., Han Su Kim, M.D.,

Jung Hyun Chang, M.D., Ji Hoon Kim, M.D., Kwang-Moon Kim, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background and Objectives :** The Herpes Simplex type 2 Defective Infectious Single Cycle virus (DISC virus) is attenuated virus originally produced as viral vaccines but are also efficient gene transfer vehicle. The main goals of this study were to examine the efficiencies of the gene transfer using DISC vectors for various head and neck squamous cell carcinoma cell lines and to evaluate the efficacy of vaccination with DISC virus carrying a immunomodulatory genes (GM-CSF) as cancer therapy in a organotopic oral cavity squamous cell cancer model.

**Materials and Methods :** We determined the gene transfer efficiency of DISC virus by x-gal stain method and proved gene and protein expression of DISC-GMCSF transfected SCCVII cells by RT-PCR and ELISA method. Also we evaluated the ex vivo vaccination effects of SCCVII/GMCSF (DISC-GMCSF transfected SCCVII vaccine) vaccine on preventing the recurrence of micro-residual tumor. After the vaccination of SCCVII/GMCSF, specific cytotoxic T-cell responses was evaluated by CTL assay.

**Results :** At an MOI of 10 DISC virus showed 64-88% of transfection rates in various head and neck squamous cancer cell lines. SCCVII cells transduced by DISC virus vector (MOI=10) carrying the GM-CSF gene, produced 4.5 nanogram quantities of GM-CSF per  $10^6$  cells. *In vivo* vaccination using tumor cells transduced *ex vivo* with DISC-GMCSF resulted in better protection rate against subsequent tumor recurrence in organotopic oral cavity cancer model. Although tumor free survival rate was not statistically significantly increased in vaccination group ( $p=0.078$ ), tumor specific cytotoxic T-cell responses were significantly increased in SCCVII/GMCSF vaccination group.

**Conclusion :** These data demonstrate that ; 1) The DISC virus vector is capable of efficient gene transfer to various head and neck squamous cancer cell lines, 2) GM-CSF secreting genetically modified tumor vaccine (SCCVII/GMCSF) efficiently protected against tumor recurrence in organotopic micro-residual oral cavity cancer model and produced tumor specific cytotoxic T-cell response. DISC virus-mediated, cytokine gene transfer may prove to be useful as a clinical therapy for head and neck cancers.

**KEY WORDS :** Gene therapy · Tumor vaccine · DISC-virus · GM-CSF.

\*본 연구는 2001년도 한국학술진흥재단 신진교수연구지원사업 연구비로 이루어졌음.

교신저자 : 김세현, 서울 강남구 도곡동 146-92 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 3497-3463 · 전송 : (02) 3463-4750 E-mail : shkimmd@yumc.yonsei.ac.kr

## 서 론

두경부 영역의 암 발생률은 전체 암 발생 중 여섯 번째를 차지한다. 이 중의 대부분을 차지하는 암종은 편평세포암종으로 후두암과 하인두암 및 구강암과 구인두암의 경우, 환자의 과반수는 발견 당시 이미 진행된 병기를 보이며, 5년 생존율은 지난 30년간 치료법의 발달에도 불구하고 30% 내외로 매우 저조한 편이며, 아직 담보 상태에 있다. 이와 같이 진행된 두경부 편평세포암종에 있어 생존율이 저조한 이유는 수술이나 방사선 치료 후 문제되는 미세잔존암과 미세전이가 주원인이다<sup>1)</sup>. 따라서 두경부암 환자의 무병생존율을 올리기 위해서는 수술, 방사선 또는 약물 치료 후 잔존할 수 있는 미세암과 전이를 좀더 효율적으로 치료할 수 있는 새로운 치료법이 필요하다. 최근 두경부 편평세포암종에서의 종양억제 유전자, 자살 유전자 또는 면역조절 유전자를 이용한 유전자 치료전략들이 실험 단계에 있으며, 기대되는 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>2-4)</sup>. 이들 유전자 치료전략 중 종양백신을 이용한 면역체계자극 전략은 종양세포에 면역조절유전자를 주입시킨 후 방사선 조사로 종양세포의 분열은 억제하면서 항원성을 유지한 종양세포 자체에서 면역조절물질을 분비하도록 하여, 항종양 면역체계를 자극시키는 방법으로, 두경부종양 뿐 아니라 여러 다른 종양에서도 많은 연구가 시도되고 있다<sup>5-8)</sup>. 면역조절물질 중 특히 granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)는 두경부 편평세포암종, 대장암, 전립선암 및 악성흑색종에서 종양의 예방 및 성장억제에 효과적이라는 실험 결과들이 보고되고 있다<sup>7)</sup>. 이러한 종양백신 유전자 치료에 가장 중요한 요소는 유전자를 전달하는 벡터(vector)로, 최근 헤르페스바이러스를 벡터로 이용한 유전자치료 연구가 활발히 진행중이며, 이것은 기존의 다른 유전자 전달 벡터 보다 많은 장점을 갖고 있다. 우선 분열하는 세포뿐만 아니라 미분열 상태에 있는 세포에도 효율적으로 감염을 일으켜 종양백신을 만들기 위해 방사선을 조사한 세포에서도 효율적으로 감염이 일어나며, 숙주세포에 감염되는 시간이 수 시간 이내로 매우 짧고, 여러 종류의 암 중에서 효율적으로 감염을 일으킨다. 또한 유전자의 크기가 크기 때문에 (15Kb) 원하는 유전자의 도입에 제한이 적다는 장점들이 있다<sup>9-11)</sup>. 헤르페스 바이러스 벡터중 하나인 DISC(defective infectious single cycle herpes simplex virus) 바이러스는 단백질을 형성하는 부분의 유전자(gH)를 삭제시킨 유전적 변형으로, 특성상 숙주 세포에 감염되어 바이러스의 증식은 효율적으로 일어나나, 그 후손들(progeny)은 감염능력이 상실되어 다른 세포에 감염될 수 없기 때문에 유전자 전달 벡터로서의 안정성이 입증된 바이러스이다<sup>12)</sup>. 연구자

들은 두경부 편평세포암 세포주에서 DISC 바이러스의 벡터로서의 효율성을 입증하였으며, 실험 동물모델에서 DISC-GMCSF 바이러스(GM-CSF 유전자를 도입시킨 DISC 바이러스)를 벡터로 하여 만든 종양백신의 항 종양 효과를 보고한 바 있다<sup>13)</sup>. 이 연구는 종양백신을 이용한 유전자 치료가 미세잔존암의 효과적인 치료법으로서 응용될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

본 연구는 좀더 두경부종양과 임상 양상이 유사한 두경부암의 항장기성 실험 동물 모델을 만들어 수술 후 미세잔존암이 남아 있는 상태와 비슷한 상황을 만든 후, 각각의 실험 동물로부터 얻어진 절제된 종양 조직을 단일 세포부유액으로 만든 상황에서 DISC-GMCSF 바이러스 벡터를 이용하여 수술과 동시 단계로 진행할 수 있는 종양백신 생성의 가능성을 알아보고, 적출된 종양 조직을 이용하여 만든 종양백신의 항장기성 미세 잔존암에 대한 유전자치료 효과를 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주 배양

DISC 바이러스의 감염 효율성을 살펴보기위해 6가지의 두경부 편평세포암종 세포주를 사용하였다. 3가지 세포주(HN886, MSKQLL2, SCC1483)는 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center에서, 2가지는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA ; SCC 15, SCC 25)에서 분리하여 특성화 하였다. SCCVII 세포주는 플로리다 대학의 Seeman에 의해 제공되었는데, 이 세포주는 C3H/HeJ쥐에 자연 발생한 표피의 편평세포암이다. 세포주의 종양발생능력을 극대화시키기 위해 세포주를 실험동물에 주사해 종양을 유발시킨 후 멸균한 조건에서 종양을 적출하여, 콜라겐아제(collagenase)로 효소분해 시킨 후 세포를 채취하여 사용하였다. 배지는 10% 소의 태아 혈청(FCS)이 포함된 MEM(minimal essential media) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경 하에, 주당 2회 계대배양하였고, 3회 계대배양(P3)에서 12회 계대배양(P12) 사이의 세포를 사용하였다.

### 2. DISC 바이러스 벡터의 생성

HSV-2 strain HG52중 glycoprotein H(gH)-deleted HSV-2 바이러스(DISC)를 분리하여, gH를 생성하는 monkey kidney cell의 일종인 Vero 세포주(CR1)에서 증식시킨 다음 m(h)GM-CSF 유전자를 PIMR3 벡터를 이용하여 HSV-2 strain HG52의 gH 유전자 부분에 삽입하였다(Bournsnel 등, 1997). 삽입된 GM-CSF 유전자는 CMV early promoters의 조절 하에 발현되도록 하였다(DISC-

GMCSF). 바이러스의 정량화는 CR1 세포주에서의 플라크 형성단위(plaque forming unit(pfu))에 근거하여 시행하였으며, 사용할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다<sup>12)14)</sup>.

### 3. X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactopyranoside) 염색(In vitro X-Gal staining)

DISC 바이러스는 표식 유전자인 LacZ 유전자가 ICP6 유전자 부분에 삽입되어 있으므로, 바이러스에 감염된 종양세포에서 X-gal 염색을 통하여 간접적으로 바이러스의 종양세포 감염 정도를 분석할 수 있다. 6개의 두경부 편평상피암 세포주를 24개의 용기(24 well plate, Costar)에 한 용기 당  $1 \times 10^5$ 개의 종양세포를 이식하였다. 20시간 후 대조군과 DISC 바이러스를 처치한군(MOI=10)으로 나누어 DISC바이러스를 감염시키고, 이후 2시간 후에 1% glutaraldehyde로 고정시켜 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactopyranoside; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) 용액에 2시간 배양, 염색하였다. 감염의 효율성을 측정하기 위하여, 양성 염색된 세포의 비율을 고배율(200배율)로 3회 측정 하였다<sup>15)</sup>.

### 4. RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법에 의한 GM-CSF 유전자의 발현 확인

DISC-GMCSF에 감염된 SCCVII 세포(SCCVII/GMCSF)에서 GM-CSF 유전자가 발현되는지를 확인하기 위하여, GM-CSF 유전자에 대한 RT-PCR을 시행하였다.  $5 \times 10^6$ 개의 SCCVII/GMCSF 세포에서 Rneasy(QIAGEN<sup>®</sup>) kit를 이용하여 RNA를 분리하였다. Oligo-dT primers와 Superscript II RT enzyme(GIBCO/BRL)을 이용하여, First-strand cDNA를 만들었다. cDNA에 남아있을지 모르는 RNA를 제거하기 위하여, RNase 처리를 하였다. RT-PCR 반응의 양성 대조군으로  $\beta$ -actin을 사용하였다.  $\beta$ -actin의 유전자 발현을 확인하기 위해 사용된 sense와 antisense primers는 다음과 같다. sense; 5' CTACAATGAGCTGCGTGTGG 3', antisense; 5' AAGGAAGGCTGGAA-GAGTGC 3'. PCR 반응은 Perkin-Elmer<sup>®</sup> Gene Amp PCR System 960035를 사용하여,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 45초 그리고  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 45초를 1cycle로 35cycles를 시행하였다. RT-PCR 반응에 의해 생성된 DNA 산물의 크기는 528bp이다. GM-CSF의 sense와 antisense primers의 염기배열 순서는 다음과 같다. sense; 5' CC-CATCACTGTCACCCGGCCTTGG 3', antisense; 5' GTCCGTTTCCGGAGTTGGGGGC 3'. PCR 반응은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 90초,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, 그리고  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 45초를 1 cycle로 35cycles를 시행하였다. 생성된 GM-CSF DNA 산물의 크기는 279bp이다. 각각의 PCR 생성물들은 1.5% agarous gel에서 전기영동 하였다.

### 5. 항장기성 두경부 편평세포암 동물 모델

8~10주 연령의 C3H/HeJ mice 20마리의 구강설과 구강저 사이에  $1 \times 10^6$ 개의 종양세포를 주사하였다. 종양세포 주입 후 4일 후부터 3일 간격으로 5마리씩 구강저를 해부하여 종양의 크기가 3mm에서 5mm사이 정도로 성장하는 시기를 확인하고, 종양을 절제한 후 조직을 파라핀 포매하여, 종양절제 후 구강근육 또는 하악골에 침투되어 남아 있는 미세 잔존암의 존재를 확인하였다. 이상의 실험을 거쳐 종양 적출 후 미세잔존암의 형성이 항상 예측 가능하며, 또한 봉합 후 실험 동물의 사망률이 가장 적은 시기를 결정하였다.

### 6. 종양조직을 이용한 DISC-GMCSF Vaccine(SCCVII/GMCSF)에서의 GM-CSF발현

C3H/HeJ mice의 구강에  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포를 피하 주사하여 종양을 형성한 후 종양 최대축의 길이가 0.5 cm 사이인 실험동물에서 종양을 채취한 후 1ml 당  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포 부유액을 만든 후 대조군은 인산원충생 리식염수로 처치하였으며, 실험군은 10,000cGy로 방사선 조사 후 DISC-GMCSF  $1 \times 10^7$  pfu(MOI=10)로 2시간 동안 감염시켰으며 이후 DISC-GMCSF바이러스는 3회간 원심분리하여 세척하였다. 각 군에 따라 24시간 후 ELISA 방법(R&D systems<sup>®</sup> Minneapolis, MN)을 이용하여 조직 내 GM-CSF 생산 농도를 측정하였다.

### 7. DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/GMCSF) 투여 후 항 종양효과

8~10주 연령 C3H/HeJ mice의 구강에 항장기성 편평세포암 종양을 만들어 주입 후 7일째 이를 적출한 후 mice를 무작위로 12마리씩 2개의 군으로 나누었다(N=12/group). 각각의 대조군과 실험군은 다음과 같다. 대조군: 방사선 조사를 한 종양세포만으로 종양적출 부위에 국소적으로 백신 치료한 군, 실험군: 방사선 조사 후 DISC-GMCSF로 감염시킨 SCCVII 세포(SCCVII/GMCSF)로 종양적출 부위에 국소적으로 백신 치료한 군. 치료군은 종양세포에 <sup>137</sup>Cs를 이용하여 10,000cGy의 방사선을 조사하고, DISC-GMCSF를 2시간 동안 감염시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $300 \times \text{g}$ 로 6분 원심분리 후 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복하여, 바이러스를 제거한 후  $1 \times 10^7$ 개의 세포를  $50 \mu\text{l}$ 의 부유액으로 만들어 백신으로 사용하였다. 생성된 종양백신을 2일 간격으로 3회 실험동물의 구강내 종양적출부 또는 꼬리정맥을 통해 투여하였다. 반면 대조군은 종양세포 자체에 대한 면역반응의 효과를 배제하기 위해 <sup>137</sup>Cs를 이용하여 10,000 cGy의 방사선을 조사한 종양세포로 종양백신을 만들어, 2일 간격으로 3회 실험동물의 구강내 종양적출부에 투여하였다. 백신 치료는 펜토바비탈(pentobarbital, 50mg/kg in-

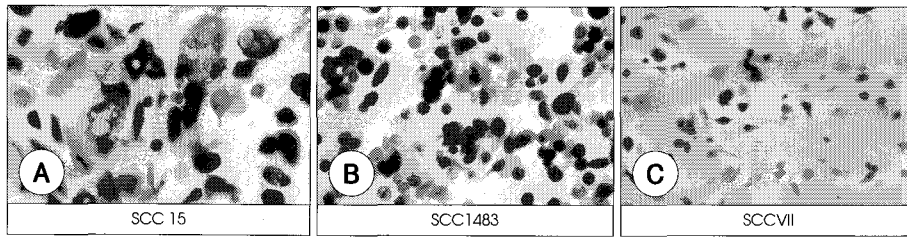


Fig. 1. X-gal stain results in head and neck squamous cell lines. At an MOI of 10 DISC virus showed 64–88% of transfection rates in various head and neck squamous cancer cell lines.

traperitoneal)을 복강 내 마취한 후 시행하며, 3회의 종양 백신 치료 후 3일간격으로 실험동물의 구강을 정밀 촉진하여, 종양의 생성 여부를 측정 하였다.

### 8. <sup>51</sup>Chromium 유리를 이용한 T-림프구의 항종양 세포독성시험

상기 기술한 종양백신 치료군과 대조군에서 마지막 백신 부터 2주 후에, 멸균 하 상태에서 비장을 적출하였다. 인산 완충생리식염수로 세척 후 세그물망을 이용하여 비장세포를 분리하였다. 적혈구 용해 완충용액으로 적혈구를 용해시킨 뒤, RPMI-1640 배지를 이용하여 3회 세척하였다.  $2 \times 10^7$ 개의 비장세포(T-림프구)를  $3 \times 10^6$ 개의 10,000cGy를 조사한 SCCVII 종양세포와 혼합하여 T-25 배양용기에 넣어 배양하였다. 24시간 후 합성 IL-2(10Units/ml)를 첨가하여 5일간 배양하였다. 동종의 신선한  $5 \times 10^6$ 개의 SCCVII 종양세포를  $100 \mu\text{Ci}$  <sup>51</sup>Cr에 1시간동안 노출시켜 배양 후, 96-well(U-bottom)을 이용하여, 배양된 비장세포와 1 : 12.5, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100으로 섞어 분주 후 10시간 배양하였다. 배양판(96-well plates)를 원심분리(200g×30sec) 후 Skatron 장치로 상층액을 채취 후  $\gamma$ -counter로 <sup>51</sup>Cr 유리를 정량화 하였다.

### 9. 통계학적 분석

모든 자료는 평균값과 standard error로 표시하였다. Group들간의 비교는 대상에 따라 two-tailed students t-test, repeated measured ANOVA test, logrank test를 이용하여 통계학적 검증을 하였다.

## 결 과

### 1. In Vitro X-gal 염색

In vitro에서 DISC바이러스 감염에 대한 유용성을 평가하기 위하여, 10 MOI의 DISC바이러스를 2시간 동안 처리하고 바이러스를 세척하였다. X-gal 용액 처리 후  $\beta$ -galactosidase에 대하여 조직화화 염색을 시행하였다. 모든 세포군에서 64.5% 내지 88.8% 정도로  $\beta$ -galactosidase를 발현하였다(Table 1, Fig. 1). 세포주 중에서는 SCC15 세

Table 1. In vitro X-Gal staining results

Cell line	Percent blue cells by X-Gal staining at 24hr (%)
SCC1483	79.5 ± 6.4
SCC15	88.8 ± 10.2
SCC25	87.2 ± 7.7
SCCQLL2	64.5 ± 8.7
HN886	87.5 ± 12.1
SCCVII	70.4 ± 9.7

Each of the six SCC cell lines were plated into 12-well plates at  $1 \times 10^5$  cells per well. Twenty-four hours later the cells were exposed to DISC-LacZ at an MOI of 10. Cells were stained with X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indol-D-galactopyranoside) and the percent of blue staining cells calculated

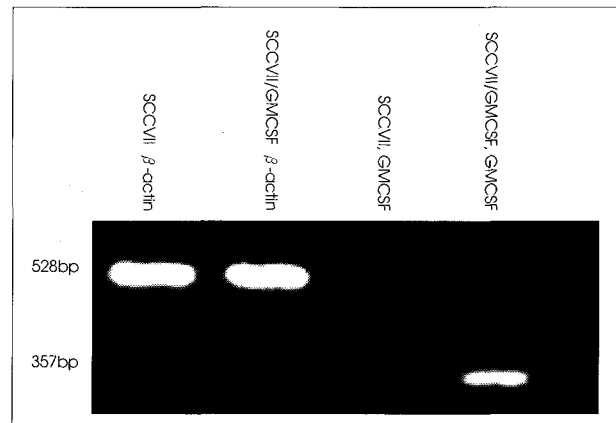


Fig. 2. RT-PCR result of GM-CSF. RT-PCR of SCCVII/GMCSF demonstrated the presence of mRNA encoding  $\beta$ -actin, or GM-CSF, while non-transfected cells contained  $\beta$ -actin mRNA, but not GM-CSF. The expected fragment size for GM-CSF mRNA is 357bp.

포주가 가장 민감하였고 SCC VII 세포주가 가장 저항성을 보였다. X-gal 염색으로 본 DISC 바이러스의 감염효능은 방사선을 조사한 군에서 방사선을 조사하지 않은 세포주에서 보다 비슷하거나, 좀 더 많은 염색세포가 관찰되었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없어 적어도 방사선 조사 후 바이러스의 감염 능력이 저하되지 않았음을 알 수 있었다 (data not shown).

### 2. DISC-GMCSF 벡터를 이용한 SCCVII 세포주로의 유전자 이입과 이로 인한 GM-CSF의 mRNA 발현

DISC-GMCSF를 SCCVII 세포주에 배양기 안에서 2시

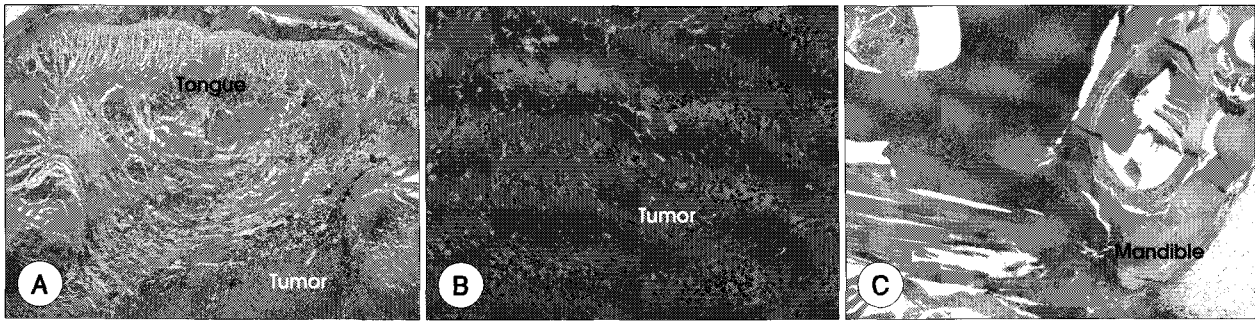


Fig. 3. Organotopic tumor model of oral cavity cancer. A : Picture shows tumor mass in oral tongue ( $\times 40$ ), B : shows muscular invasion of tumor cells ( $\times 100$ ), C : shows mandibular invasion of tumor cells.

간 동안 노출시켜 감염을 유발한 후, 24시간후에 mRNA 및 단백질의 발현을 측정하였다. DISC-GMCSF에 감염된 SCCVII종양세포(SCCVII/GMCSF)에서는 양성 대조군인  $\beta$ -actin과 함께, GM-CSF mRNA를 확인할 수 있으나, 대조군인 DISC-LacZ를 감염시킨 종양세포에서는 GM-CSF의 mRNA는 발현되지 않았다(Fig. 2).

### 3. 항장기성 두경부 편평세포암 동물 모델

8~10주 연령의 C3H/HeJ mice 30마리의 구강설과 구강저 사이에  $1 \times 10^6$ 개의 종양세포를 주사하여 종양세포 주입 후 4일 후부터 3일 간격으로 3마리씩 구강저를 해부하여 종양의 크기가 3mm에서 5mm사이 정도로 성장하는 시기를 확인하고, 종양을 절제한 후 조직을 파라핀 포매하여, 종양절제 후 구강근육 또는 하악골에 침투되어 남아 있는 미세 잔존암의 존재를 확인하였다. 종양세포 주입 후 7일째 종양은 전 실험 동물에서 발생하였으며, 종양의 크기는 3mm에서 5mm사이로 비교적 비슷한 크기로 관찰 되었다. 종양은 결절 모양으로 축적되나 조직 검사상 주변의 구강근육을 침투하여 퍼지는 양상을 보였고, 주입 후 13일째는 주변 하악골로 종양에 의한 침범이 관찰 되었다(Fig. 3).

### 4. 종양조직을 이용한 DISC-GMCSF Vaccine(SCCVII/GMCSF)에서의 GM-CSF발현

C3H/HeJ mice의 구강에  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포를 구강에 주사하여 종양을 성한 후 종양 최대축의 길이가 0.5 cm 사이인 실험동물에서 종양을 채취하여 1ml 당  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포 부유액을 만들고 1,000cGy의 방사선 조사 후 DISC-GMCSF 바이러스를 감염중복도 10으로 감염을 시켜 각각의 사이토카인의 생성량을 ELISA 분석 방법(R&D System)으로 측정한 결과,  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포당 GM-CSF는 4,282pg에서 4,693pg까지 생성되었다. DISC 바이러스에 의해 유전자의 이입이 일어나지 않은 대조군 SCCVII 세포주에서는 GM-CSF의 단백질의 발현은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4).

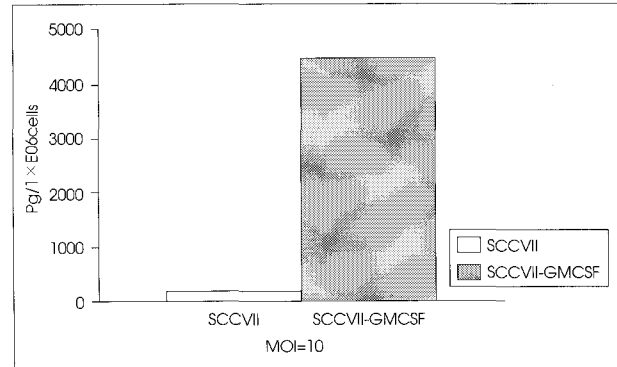


Fig. 4. GM-CSF concentration after DISC-GMCSF transfection on SCCVII cell suspension from excised tumor tissue. The group, which underwent the DISC-GMCSF transfection, had significant concentration levels, which exceeded 4500 pg per  $1 \times 10^6$ . SCCVII tumor cells.

### 5. DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/GMCSF) 투여 후 항 종양효과

C3H/HeJ mice의 구강에 항장기성 편평세포암 종양을 만들어 주입 후 7일째 이를 적출하여 미세잔존암이 있는 상황을 인위적으로 만든 후 mice를 무작위로 12마리씩 2군으로 나누었다. 1,000cGy의 방사선을 조사한 종양세포로 백신을 준 대조군과 군과 방사선 조사 후 DISC-GMCSF로 감염시킨 SCCVII 세포(SCCVII/GMCSF)로 종양적출 부위에 국소적으로 백신 치료한 군인 실험군으로 나누어 (N=12/group). 각각의 대조군과 실험군에서 국소 종양재발의 방지효과를 알아본 결과 대조군에서는 종양적출 후 9일째 91.6%에서 종양의 국소 재발 소견을 보였다. 반면 종양 적출 후 SCCVII/GMCSF로 백신 치료한 실험군에서는 종양 적출 후 9일째 58.3%에서 종양의 국소 재발 소견을 보여 대조군에 비해 현저한 종양의 국소재발 억제 효과를 보였고, 16.6%의 동물은 3주간의 추적관찰 결과 종양의 국소재발 소견을 보이지 않았다. 하지만 두 군간의 무병 생존률은 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지는 않았다 ( $p=0.078$ , Logrank test) (Fig. 5)

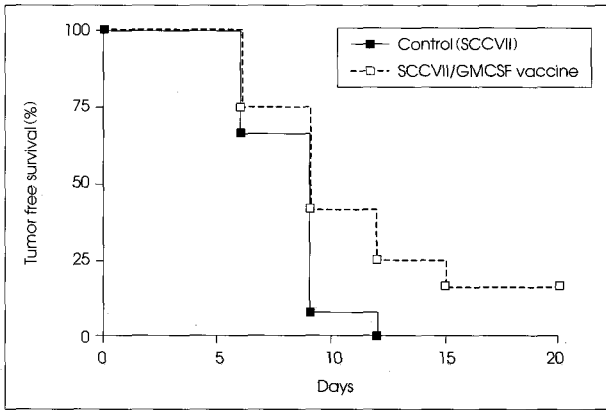


Fig. 5. Effect of vaccination with SCCVII trasduced with DISC-GMCSF viral constructs on tumor-free survival in a C3H/HeJ syngeneic tumor model. Tumor free survival of mice treated with SCCVII/GMCSF was greater than mice treated with SCCVII (control) ( $p=0.078$ , Logrank test).

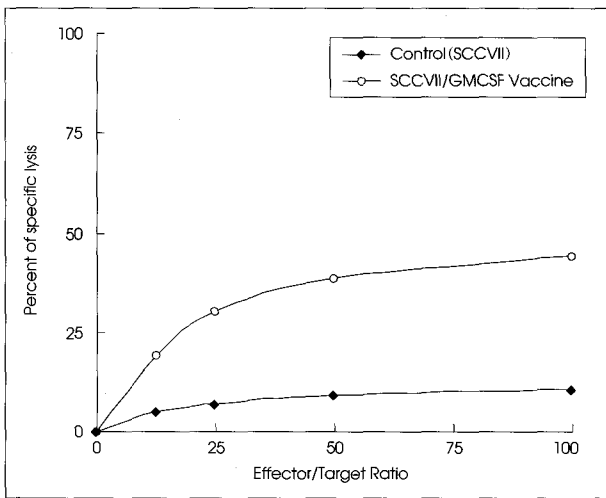


Fig. 6. Splenocyte tumoricidal activity against SCCVII target. Splenocyte from animals pre-treated with irradiated tumor exposed to DISC-GMCSF showed effective cell lysis response.

## 6. <sup>51</sup>Chromium 유리를 이용한 T-임파구의 특이적 항종양 세포독성시험

DISC-GMCSF를 이용하여 만든 종양백신(SCCVII/GM-CSF)을 치료한군의 비장세포에서 대조군(방사선을 조사한 종양세포로 백신 치료한 군)에 비해 의미 있는 특이적 종양세포 살상 능력을 관찰 할 수 있었다(Effector : Target ratio=100시 특이적 종양살상 능력은 10.5%(대조군) : 44.3%(실험군),  $p<0.05$ ) (Fig. 6).

## 고 찰

지난 30년간 수술 및 방사선 치료법의 발달에도 불구하고 두경부 편평세포암종 환자의 생존율은 답보상태에 있으며, 따라서 새로운 치료법의 개발이 요구되고 있다. 최근 종양 치료에 있어 유전자 치료가 새로운 치료법으로서의 가

능성을 보여주고 있다. 유전자 치료는 원하는 유전물질을 치료목적으로 환자의 조직 내에서 발현시키는 치료법으로 1990년 Anderson등은 adenosine deaminase의 결손으로 인해 생기는 면역결핍증 환자에게서 레트로바이러스를 벡터(vector)를 이용하여 첫 유전자 치료를 시도하였다<sup>16)</sup>. 그러나 암의 발생기전은 단순 유전자의 결핍에서 유발하는 질환보다는 매우 복잡하며, 최소한 6 내지 7회의 유전적 변형이 일어나야 하므로 단순 유전자의 결핍에 의해 초래되는 질환보다는 새로운 유전자 치료 전략이 필요하다. 두경부 편평세포암종에서는 Clayman 등이 종양억제 유전자인 p53 유전자를 이용한 유전자치료를 처음 시도하였다.<sup>2)</sup> 지금까지 보고된 유전자치료전략은 크게 5가지로 구분된다. 첫째로는 종양에 대한 면역반응을 강화시키는 전략으로, 이제 까지 보고된 유전자치료전략의 과반수 이상을 차지하고 있으며, 방법은 종양 내로 원하는 유전자를 직접 전달하는 *in vivo* 방법과, 종양을 채취하여 배양상태에서 원하는 유전자를 이입시킨 후 종양 백신을 만들어 다시 주입하는 *ex vivo* 방법이 있다. 그 외로는 종양억제 유전자를 이용하는 방법, 전구약물과 반응하여 세포독성을 유발할 수 있는 자살유전자 요법, 항암 치료약물에 내구성을 갖는 유전자를 환자의 조혈세포에 이입시키는 방법, 발암유전자를 무력화 시켜 발현을 차단하는 방법 등이 있어 보고되고 있다. 이중 대표적인 유전자 치료전략의 하나는 유전적으로 변형된 종양백신을 이용하는 것이다. 종양백신의 개념은 Prehn과 Main이 처음 보고하였는데 단순히 종양의 절제 후 동질의 종양세포를 투여하면, 종양의 형성이나 성장이 억제된다는 면역 예방(immunoprophylaxis)을 입증한 것이었다<sup>17)</sup>. 종양백신을 만들기 위해서는 종양의 항원이 필요하기 때문에 종양세포 추출물, 종양세포내 펩타이드, 열쇼크단백(heat-shock proteins) 등을 항원으로 이용하려는 연구가 진행되고 있으나, 특이적 종양 항원의 정체는 아직 규명되지 않은 상태이다. 아울러 동종의 종양항원을 사용했을 경우 주요조직 적합항원의 상이함으로 백신으로서의 유용성이 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 최상의 방법은 추정되는 종양 항원을 모두 가지고 있는 자가 종양조직으로 백신을 만드는 것이라 생각한다. 본 연구에서는 자가 종양조직으로부터 세포를 분리하고, 방사선을 조사하여 종양의 항원성은 유지한 채, 세포의 분열능력을 없앤 종양 백신을 만들고, 종양 백신의 면역체계를 자극 강화를 위해 GM-CSF 유전자를 갖는 DISC 바이러스를 종양백신에 감염시켜 종양백신 자체에서 면역조절 물질을 분비하게 한 후 항 종양 효과를 관찰할 예정이다. 이렇게 유전적으로 변형된 종양백신의 논리적 근거는 다음과 같다. 첫째, 이입된 유전자에 의하여, 사이토카인과 같은 면역조절 물질이 종양세포에서 분비되므로, 추정되는 종양 항원과 밀접한 위치에서 효과적인 농도를 유지시킬 수

있으며, 둘째, 지속적 국소적 분비로 인하여, 사이토카인의 전신적 또는 국소적 직접 투여시 문제되는 짧은 반감기 및 부작용을 피할 수 있다. 유전자치료를 이용한 종양백신의 궁극적 목적은 항 종양면역반응을 향상시키고, 종양에 대한 지속적인 면역능력을 갖게 하는데 있다<sup>18-21)</sup>. 본 실험에 이용될 예정인 GM-CSF는 여러 연구에서 항종양 효과가 입증된 면역조절물질이다. 이것은 항원전달 세포의 성장과 기능을 향진시키며, 거식세포나 돌기세포(dendritic cell) 등 항원전달 세포의 주요조직적합항원의 표현을 강화시켜 종양항원이 유리되면 항원전달 세포가 종양항원을 섭취 후 공정을 거쳐 주변 림프절로 이동 종양세포의 항원성을 자연 T 림프구에 전달하여 자극하는 과정에 작용한다. 종양백신의 생성을 위해 가장 중요한 요소는 원하는 유전자를 전달하는 벡터이다. 지금까지 유전자 치료에 이용된 벡터는 대부분이 바이러스를 이용하였다. 이중 아데노바이러스와 레트로바이러스가 유용한 벡터로 많이 이용되어 왔으나, 아데노바이러스는 대부분의 숙주가 이 바이러스에 대하여 면역성을 지니고 있으며 반복적 바이러스의 투여시 면역성으로 인하여 벡터로서의 효율성이 떨어진다는 단점이 있으며, 레트로바이러스는 분열이 일어나는 세포에만 감염이 효율적으로 일어나므로, 종양백신과 같이 방사선을 조사해 분열 능력이 상실된 세포에서는 많은 제한점이 예상된다. 최근 헤르페스 바이러스가 두경부평형세포암의 유전자 전달 벡터로서 많은 장점을 가지고 있음이 증명되었다<sup>22)</sup>. 헤르페스 바이러스는 천성적으로 신경조직에 친화성이 있어, 처음에는 신경계 질환의 유전자 치료에 사용되도록 고안되었다. 그러나 바이러스의 감염과정을 살펴보면 처음 피부나 점막 표면의 감염을 시작으로, 분열 및 증식과정을 거치므로 이것을 고려해 볼 때, 헤르페스 바이러스 벡터가 상피세포에서 유래한 평형세포암의 유용한 유전자전달 매개체라는 사실을 납득할 수 있다. 최근의 연구에 의하면, 헤르페스 바이러스는 거식세포, 섬유아세포, 간세포, 대장암 및 평형상피암세포에서도 유용한 벡터인 것이 증명되었다. 벡터로서 헤르페스 바이러스의 장점은 다음과 같다. 다른 바이러스에 비하여 지놈(genome)의 크기가 크기 때문에(150Kb), 원하는 유전자를 이입하는데 제한이 적으며, 여러 종류의 세포에 단시간에 효율적인 감염이 가능하며, 무엇보다 가장 큰 장점은 분열하지 않거나 매우 천천히 분열하는 세포에도 효과적으로 원하는 유전 물질을 발현시킬 수 있다는 점이다<sup>23)</sup>. 방사선 조사 후 분열이 정지된 세포에서의 감염 능력은 유전자 조작에 의한 종양백신 생성에 가장 중요한 요소이다. 이러한 특성은 중요한 임상적 의미가 있다. 종양의 적출로 얻어진 신선한 종양조직에서 종양세포를 분리하여 별도의 배양 과정 없이 부유액 상태로 방사선 조사 후 원하는 유전자를 지닌 바이러스에 감염시킴으로써 단시간

내에 유전적으로 조작된 종양백신을 만들 수 있다는 점이다. Tung 등은 헤르페스 바이러스 벡터의 일종인 앰플리콘 바이러스를 이용하여, 20분내에 유전물질의 전달이 일어나며, 세포 부유액 상태에서도 효과적 감염이 일어남을 보고하였다<sup>24)</sup>. 레트로바이러스나 아데노바이러스 등은 위와 같은 과정 시, 별도의 배양과정과 시간이 필요함을 비교하여 보면, 헤르페스 바이러스가 수술 과정 중, 종양 백신을 생성할 수 있는 보다 최적의 바이러스 벡터라고 생각된다. 본 실험에서 사용한 DISC 바이러스는 헤르페스 바이러스의 막을 형성하는 gH 부분의 유전자를 제거하고 여기에 원하는 유전자를 이입시킨 것으로, 숙주세포에 감염 후 완전한 복제 과정을 거치나, 그 자손들은 유전자 조작으로 인해 감염 능력이 상실된다. 따라서 헤르페스바이러스의 세포독성을 극소화시킨 안전한 바이러스 벡터이다. 본 연구에서는 좀더 임상적용에 가까운 환경을 만들기 위해 적출된 종양 조직을 이용하여 단일 세포 부유액 상태에서의 DISC 바이러스의 유전자 전달의 효율성을 알아 보았다. 그 결과 연구자 등의 선행 연구<sup>13)</sup> 결과와 마찬가지로 DISC 바이러스는 이입된 GM-CSF 유전자를 효율적으로 종양세포에 전달하였고,  $1 \times 10^6$ 개의 SCCVII 세포당 4,500pg정도의 GMCSF 단백질이 발현되는 것을 증명할 수 있어 DISC 바이러스가 임상적으로 응용될 수 있는 유전자전달 매개체(벡터)로서의 가능성을 제시함과 동시에 종양치료를 적용될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 적출된 종양 조직을 이용하여 만든 단일세포 부유액에 DISC-GMCSF바이러스를 감염시켜 만든 종양 백신(SCCVII/GMCSF)의 항 종양 효과를 보는 동물 실험에서 종양 적출 후 연구자 등은 DISC-GMCSF 벡터를 이용하여 만든 종양 백신의 항종양 효과가 단순히 분열 능력을 없애며 종양세포의 항원성을 유지하기 위해 방사선을 조사한 종양세포로만 백신 치료를 한 대조군 보다 현저히 월등함을 관찰 할 수 있었다. 대조군에서는 종양적출 후 9일째 91.6%에서 종양의 국소 재발 소견을 보인 반면 SCCVII/GMCSF로 백신 치료한 실험군에서는 종양 적출 후 9일째 58.3%에서 종양의 국소 재발 소견을 보였고, 실험군에서 16.6%의 동물은 3주간의 추적관찰 결과 종양의 국소재발 소견을 보이지 않았다. 비록 무병생존률에 있어 통계학적으로 의미있는 차이는 보이지 않았지만 매우 고무적인 결과이다. 여기서 염두해 두어야 할 사항은 SCCVII종양세포를 이용한 두경부암 동물 모델은 주변 근육 및 하악골로의 침습이 관찰되어 임상에서 보는 구강암과 매우 유사한 양상을 지닌 좋은 동물 모델로 본 연구에서 확인되었지만, 종양의 자라는 속도가 매우 빨라 백신에 의한 종양면역 기능이 활성화 되기 전에 종양이 크게 자랄 수 있어 백신의 효과가 반감 될 수 있다는 점이다. 만일 종양의 성장 속도가 좀더 느린 항장기성 모델을 사용하였다면 더 좋은

항 종양 효과를 기대할 수 있지 않을까 생각한다. 본 실험에서 관찰된 항 종양 효과가 종양백신의 특이적 반응으로 인한 것인지를 확인하기 위하여 <sup>51</sup>Chromium 유리를 이용한 T-림프구의 특이적 항종양 세포독성시험을 하여 세포독성 T-림프구의 종양세포 살상능력을 대조군과 치료군에서 비교하였다. 종양세포와 활성화된 T-림프구 사이의 비율에 따라 차이는 있으나 SCCVII/GMCSF로 백신 치료한 군에서 대조군 보다 의미있는 특이적 항 종양 효과를 보여 백신에 의해 유발되는 특이적 항종양 효과임이 본 실험을 통하여 증명되었다. 종양백신의 항암효과는 표적이 되는 종양의 부피가 적을수록 증대된다. 대체적으로 이상적인 종양 표적의 크기는 10<sup>9</sup>개 미만의 종양 세포, 크기로는 1.5cm 미만의 종양이다. 두경부 편평세포암의 주된 치료 실패 원인이 수술 또는 방사선 치료 후 미세잔존암이나, 미세전이에 의한 원발부위 또는 국소 재발이다. 연구자 등은 항장기성(organotropic) 편평세포암종의 동물 모델을 만들어 종양을 적출한 후 미세잔존암이 남아있는 실험적 모델을 개발한 뒤 각각의 적출된 종양 조직을 이용하여 종양 백신을 이용한 유전자 치료를 하여, 고무적인 결과를 얻었으며, 종양백신은 수술이나 방사선치료 후 재발의 원인이 되는 미세잔존암이나, 미세전이의 치료전략으로 유용하게 이용될 수 있으리라 생각한다.

## 결 론

1) DISC-GMCSF 백터는 종양적출 후 이로 만든 단일 세포 부유액 상에서도 종양세포에 효과적인 유전자 이입과 이로 인한 단백질의 발현을 나타내었다.

2) DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/GMCSF) 치료군이 대조군에 비하여 무병생존률 비교에선 의미 있는 차이를 보이지 않았으나 비교적 우수한 항 종양 효과를 보였다.

3) T-림프구의 종양 살상능력은 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/GMCSF) 치료군이 대조군에 비해 의미 있게 증가되었다.

**중심 단어 :** 유전자치료 · 종양백신 · DISC 바이러스 · GM-CSF.

## References

1) Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK : *Head and Neck Cancer. N Engl J Med.* 1993 ; 328 : 184-194  
 2) Clayman GL, Liu TJ, Overholt M : *Gene therapy for head and neck cancer : comparing the tumor suppressor gene p53 and a cell cycle regulator WAF1/CIP1 (p21).* Arch Otolaryngol Head

Neck Sur. 1996 ; 122 : 489-493  
 3) O'Malley BW, Cope KJ, Chen SH, Li D, Schwartz R, Woo SL : *Combination gene therapy for oral cancer in a murine model.* Cancer Res. 1996 ; 56 : 1737-1741  
 4) Myers JN, Mank-Seymour A, Zitvogel L, et al : *Interleukin-12 gene therapy prevents establishment of SCCVII squamous cell carcinomas, Inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice.* Laryngoscope. 1998 ; 108 : 261-268  
 5) Golubek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI : *Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4.* Science. 1991 ; 254 : 713-716  
 6) Saito S, Bannerji R, Gansbacher B, et al : *Immunotherapy of bladder cancer with cytokine gene-modified tumor vaccines.* Cancer Res. 1994 ; 54 : 3516-3250  
 7) Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A : *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.* Proc Natl Acad Sci USA. 1993 ; 90 : 3539-3543  
 8) Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese MR, Etinghausen SE, Hwu P, Karp SE : *Initial proposal of clinical research project : Immunization of cancer patients using autologous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin-2.* Hum Gene Ther. 1992 ; 3 : 75-90  
 9) Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB : *An efficient deletion mutation packaging system for defective herpes simplex virus vectors. Potential applications to human gene therapy and neuronal physiology.* Proc Natl Acad Sci USA. 1990 ; 87 : 8950-8954  
 10) Tung C, Federoff HJ, Brownlee M, et al : *Rapid production of interleukine-2-secreting tumor cells by herpes simplex virus-mediated gene transfer : Implications for autologous vaccine production.* Hum Gene Ther. 1996 ; 7 : 2217-2224  
 11) Karpoff HM, Angelica MD, Blair S, Brownlee MD, Federoff H, Fong Y : *Prevention of hepatic tumor metastases in rats with herpes viral vaccinations and r-interferon.* J Clin Invest. 1997 ; 99 : 799-804  
 12) Mclean CS, Erturk M, Jennings R, et al : *Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1.* JID. 1994 ; 170 : 1100-1109  
 13) Kim SH, Carew JF, Kooby DA, et al : *Combination gene therapy using multiple immunomodulatory genes transferred by a defective infectious single-cycle herpes virus in squamous cell cancer.* Cancer Gene Ther. 2000 ; 7 (9) : 1279-1285  
 14) Bournnell MEG, Entwisle C, Blakeley D, Roberts C, Duncan IA, McLean CS : *A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provide effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease.* J Infec Dis. 1997 ; 175 : 16-25  
 15) Geller AI, Breakfield XO : *A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli B-galactosidase in cultured peripheral neurons.* Science. 1988 ; 241 : 1667-1669  
 16) Anderson WF : *Human gene therapy.* Science. 1992 May 8 ;



- 17) Prehn RT, Main JM : *Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. J Natl Cancer Inst. 1957 ; 18 : 767-778*
- 18) Blankenstein T : *Increasing tumor immunogenicity by genetic modification. Eur J Cancer. 1994 ; 30 : 1182-1187*
- 19) Scott AM, Cebon J : *Clinical promise of tumor immunology. Lancet. 1997 ; 349 (supplII) : 19-22*
- 20) Gilboa E : *Immunotherapy of cancer with modified tumor vaccines. Semin Oncol. 1996 ; 23 : 101-107*
- 21) Dranoff G, Mulligan RC : *Gene transfer as cancer therapy. Adv Immunol. 1995 ; 58 : 417-454*
- 22) Carew JF, Federoff H, Halterman M, et al : *Efficient gene transfer to human squamous cell carcinoma by the herpes simplex virus type1 amplicon vector. Am J Surg. 1998 ; 176 : 404-408*
- 23) Fong Y, Federoff HJ, Brownlee M, Blumberg D, Blumgart LH, Brennan M : *Rapid and efficient gene transfer in human hepatocytes by herpes viral vectors. Hepatology. 1995 ; 22 : 723-729*
- 24) Tung C, Federoff HJ, Brownlee M, et al : *Rapid production of interleukine-2-secreting tumor cells by herpes simplex virus-mediated gene transfer : Implications for autologous vaccine production. Hum Gene Ther. 1996 ; 7 : 2217-2224*