

레트로바이러스를 이용한 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 유전자 발현이 대장암 세포의 전이 및 종양형성에 미치는 영향

오일웅 · 정자영 · 장석기 · 이수해 · 김연수* · 손여원#

식품의약품안전청, 생명공학의약품과, *배제대학교

(Received April 20, 2004; Revised June 16, 2004)

Anti-tumorigenic and Invasive Activity of Colon Cancer Cells Transfected with the Retroviral Vector Encoding Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2

Il Ung Oh, Jayoung Jeong, Seok Kee Chang, Su Hae Lee, Yeon Soo Kim* and Yeowon Sohn#

Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

*Baejae University

Abstract — Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) play a key role in tumor invasion and metastasis. As an inhibitor of MMP-2, TIMP-2 is known to block both the invasive and metastatic behavior of cancer cells, and decrease tumor growth activity. We performed this study to investigate the effects of TIMP-2 over-expression induced by retroviral mediated gene transfer *in vitro* and *in vivo*. The human colon cancer cell line SW480 was transfected with the retroviral vector encoding TIMP-2. The effects of TIMP-2 over-expression were analyzed by invasion assay and gelatinase activity test in colon cancer cells and tumorigenicity in nude mice. In evaluation of the transfection efficiency of the retroviral vector encoding TIMP-2 in colon cancer cells, we confirmed up-regulation of TIMP-2 expression dependent on the time of cell culture. In addition, inhibition of MMP-2 expression in SW480/TIMP-2 was shown by gelatin zymography. In the *in vitro* invasion assay SW480/TIMP-2 inhibited the invasiveness on matrigel coated with collagen. To determine whether TIMP-2 can modulate *in vivo* tumorigenicity and metastasis, SW480/TIMP-2 cells were injected subcutaneously in nude mice. The tumor mass formation of SW480/TIMP-2 cells in nude mice was markedly decreased compared to non-transfected cancer cells. These results showed that colon cancer cells transfected with the retroviral vector encoding TIMP-2 inhibits the invasiveness *in vitro* and tumorigenicity *in vivo*.

Keywords □ MMP-2, TIMP-2, retroviral vector, tumorigenicity, colon cancer cell, nude mice

최근 암 진단 및 치료방법의 눈부신 발전에도 불구하고 암으로 인한 사망의 주요원인은 암세포 전이에 의한 것이다.¹⁾ 암세포 전이는 암세포가 발생부위로부터 혈관이나 림프관을 통해 일정부위에 정착하고 성장하여 생기는 현상으로 암 환자의 전이는 발병부위와 상관없이 전체적인 암세포의 분포양상을 보임에 따라 암으로 인한 사망의 주요원인이 되고 있다. 암세포의 성장과 전이는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 분해가 필수적인 과정으로 matrix metalloproteinases(MMPs), serine proteinase 및 cathepsin 등의 효소가 관여하며, MMPs가 세포외 기질 분해에 주도적 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁾ MMPs는 암세포의 성장

과 이동을 위해 주위조직과 혈관내로의 침윤과정과 혈관신생에서 혈관 내피세포의 성장과 이동에 필요한 공간을 확보하는데 관여하고 있다. 또한 MMPs는 세포외 기질에 대해 광범위한 단백 분해능을 가지는 Zn²⁺ dependent endopeptidase family로서 현재까지 20여종 이상이 발견되었으며,³⁾ 그 중 암의 전이와 침윤에 가장 중요한 역할을 하며 불량한 예후와 관련성이 있는 type IV collagenase에 속하는 gelatinase A(MMP-2)와 gelatinase B(MMP-9)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이외에도 MMPs는 정상인에서 상처치유, 임신과 분만, 골 재생 및 유방퇴축과 같은 생리적 작용과 관절염, 치주염, 골다공증 및 심장병 등의 비종양성 질환의 병인에도 관여하는 것으로 보고되었다. 이러한 MMPs는 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)와 1:1 복합체를 형성하게 되면 생리적 활성이 억제된다. 따라서 암의 성장과 전이에 관여하는 MMPs 활성을 억제하는 것은 암 치료에 있어 효과적

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-380-1740 (팩스) 02-380-1739
(E-mail) ywsohn@kfda.go.kr

인 수단이 될 수 있을 것이다. 아데노바이러스 벡터와 레트로바이러스 벡터를 이용한 TIMP-2 유전자 전달을 통하여 암세포 및 정상세포의 invasion과 migration 억제효과뿐 아니라 *in vivo* 상에서 antitumor 효과를 보이는 것으로 보고되었다.^{4,7)}

지금까지 알려진 TIMPs는 4종류로 TIMP-2와 TIMP-1이 MMP-2와 MMP-9를 각각 선택적으로 억제하는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ MMP-2의 활성을 선택적으로 저해하는 것으로 알려진 TIMP-2는 세포내에서 용해 가능한 형태로 분비되며, TIMP-2 재조합 단백질을 투여하면 암세포 전이를 저해하고 *ras*-transformed rat embryo fibroblasts 세포에 TIMP-2를 과발현 시킴으로써 암세포의 폐 전이를 억제하는 것으로 보고되었다.⁹⁾ MMPs와 TIMPs 사이의 균형은 세포의 기질의 정상 상태를 유지하고 기관발달의 조절과 세포의 성장과 분화에서 결합조직내 단백질의 항상성 유지에 중요한 요소이지만, 암세포 성장과 전이가 일어나는 동안 균형이 깨어져 MMPs 비율이 증가하는 것으로 보고되었다.¹⁰⁾

암의 유전자치료는 유전자 조작을 통하여 선택적으로 종양세포만을 제거할 수 있는 장점을 가지고 있어 전통적인 화학요법의 단점을 보강하고 불치의 암을 극복할 수 있는 대안으로 제시되고 있다. 현재 암을 치료하기 위한 유전자치료의 대표적 예는 세포독성 유전자를 이용하는 것으로 임상적용을 위한 다양한 시도가 이루어지고 있으나,¹¹⁾ 이러한 방법은 특이적으로 종양세포만을 표적으로 하여 세포독성 유전자를 전달하는가 하는 문제점을 가지고 있다. 반면, protease inhibitor 관련 유전자를 이용한 치료방법은 형질 도입된 세포가 단백질 분해 억제물질을 분비함으로써 세포의 기질의 분해를 어렵게 하여 종양세포의 침윤과 전이를 억제하는 효과를 가지게 될 것이다.

이에 본 연구에서는 GaLV pseudo-type retroviral system을 이용하여 TIMP-2 유전자를 대장암 세포주에 이입시켜 TIMP-2 과발현이 암세포의 침윤과 전이에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 하였다.

실험방법

실험재료

대장암 세포주인 SW480(ATCC CCL228) 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용한 RPMI 1640, DMEM, FBS, trypsin-EDTA는 GIBCO-BRL(Gaithersburg, MD)에서 구입하여 사용하였다. Amphotropic packaging cell line으로 이용한 PG13 세포는 gibbon ape leukemia virus(GaLV)를 근간으로 NIH3T3 TK 세포에서 얻어진 것으로 DMEM 배지에서 계대배양 하였다.

벡터 및 생산 세포주

Encephalomyocarditis virus의 internal ribosomal entry

site(IRES)를 포함하는 HSV-TK 유전자를 레트로바이러스 벡터 LNC(L : LTR, N : *neo*, C : HCMV MIEP) 부위의 *HpaI* 절단 부위에 삽입하고, pcDNA3로부터 *EcoRV*와 *HindIII*로 절단한 700 bp 크기의 *TIMP-2* cDNA를 분리하여 LNC/IRES/TK를 *BglII*로 절단한 부위에 삽입시켰다. *LacZ* 발현하는 LNβZ는 *TIMP-2* 대신 *LacZ* 유전자를 삽입하여 제조하였다.¹²⁾

LNC/TIMP-2/IRES/TK 재조합 DNA를 amphotropic packaging 세포주인 GP+*env*-Am12 세포에 도입시켜¹³⁾ 24시간 배양 후 상층액을 분리하고 0.45 μm membrane filter(Nalgene, Rochester, NY)에 여과하여 얻어진 amphotropic 재조합 레트로바이러스 입자를 MuLV-*gag-pol*/GaLV-*env* pseudo-type packaging 세포주인 PG13 세포에 도입시켰다. 유전자를 도입하고 48시간 배양 후 800 μg/ml G418(GIBCO, Gaithersburg, MD)이 포함된 배지로 G418-resistant 콜로니를 선별 배양하여 높은 역가를 생성하는 콜로니를 선별하였다. *LacZ* 유전자가 들어간 LNβZ도 위와 같은 방법으로 도입시켰다.

내인성 MMP-2 발현

Serum-free RPMI 배지에서 SW480 세포를 2, 3, 4, 6 및 8일 배양 후 배양액을 회수하여 15,000×g에서 10분간 원심분리하고 Auto-Concentrator(Heto., Allerod, Denmark)로 1시간 농축하였으며, 10 μl 2×sample buffer를 넣어 0.1% gelatin이 포함된 zymogram gel(Novex, Carlsbad, CA)에서 125 V, 2시간 전기영동을 실시하였다. 겔을 2.5% Triton X-100에 평형화시켜 Brij-35와 0.001% NaN₃가 포함된 100 mM Tris-HCl 용액에 37°C, 20시간 배양하였으며, 0.25% Coomassie brilliant blue G-250 용액으로 염색하고 탈색하여 백색 밴드의 정도를 관찰하였다.

TIMP-2 유전자 도입 및 발현

5×10⁵/well 개의 대장암 세포주를 6 well에서 24시간 배양하였으며, 레트로바이러스 벡터 생산 세포주의 배양 상층액을 단계 희석하여 8 μg/ml polybrene(Sigma, St. Louis, MO) 존재하에 배양액을 1×10⁻⁴ 농도로 희석하고 1 ml씩 접종하여 4시간 감염시켰다. 배양액 3 ml을 첨가하고 48시간 배양하여 1.2 mg/ml G418이 포함된 배양액에서 14일간 G418-resistant 콜로니를 선별하였다. 또한, *LacZ* 유전자가 도입된 생산 세포주도 위와 같은 방법으로 선별하였다.

대장암 세포주 SW480/TIMP-2 세포를 2×10⁶ cells/100 mm plate로 24시간 배양한 후 serum-free RPMI 배지로 교환하고 3, 6, 8 및 11일간 배양한 뒤 배양액을 취하여 원심분리하고 상층액을 취하여 1시간 농축하였다. 상층액에 0.5 M dithiothreitol 처리된 5 μl SDS-PAGE sample buffer를 넣고 100°C에서 10분간 끓여 12% polyacrylamide gel에서 100 V 조건하에 2시간 전기영동을 실시하였다. Nitrocellulose막을 TIMP-2에 대한 1차 항체

(R&D Systems, Minneapolis, MN)로 4°C에서 12시간 반응 후 2차 항체인 anti-mouse IgG-horse radish peroxidase로 1시간 반응시켰으며, chemiluminescence system(Amersham, Piscataway, NJ)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

SW480/LacZ 세포를 48시간 배양하고 PBS로 세척한 후 1 ml의 0.5% glutaraldehyde를 넣어 15분간 고정시켰으며, 1% sodium deoxycholate, NP-40, 1 M MgCl₂, 100 mM potassium ferricyanide 및 100 mM potassium ferrocyanide가 포함된 2 ml의 0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyronoside(Sigma, St. Louis, MO) 용액을 넣고 37°C에서 4시간 반응시켜 β-galactosidase의 발현을 확인하였다.

대장암 세포의 침윤시험

Polycarbonate 필터에 matrigel이 처리된 Matrigel™ Invasion Chamber(Becton Dickinson, Bedford, MA)를 이용하여 대장암 세포의 침윤 및 이동성을 시험하였다. Chamber의 안쪽에 SW480과 SW480/TIMP-2 세포를 각각 1.5×10⁵ cells/0.3 ml의 농도로 넣고, 바깥쪽에는 10% FBS를 포함한 배지를 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3일간 배양하였다. Chamber의 안쪽에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고 1% formaldehyde 용액으로 10분간 고

정하였으며, polycarbonate filter의 아래쪽으로 침윤한 세포를 Hematoxylin & Eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

대장암 세포의 종양형성 및 성장시험

누드마우스(*nu/nu*) 7주령 18마리를 국립독성연구원 동물실험실에서 1주간 순화시켜 폴리카보네이트 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다. SW480 및 SW480/TIMP-2 세포를 3×10⁶ cells/0.1 ml로 피하주사 하였으며, 실험군은 6마리씩 배정하여 전체 3군(대조군, SW480 세포 처치군, SW480/TIMP-2 세포 처치군)으로 설정하였다. 종양세포 처치 후 1일 1회 3주간 일반증상을 관찰하였으며, 종양성장은 시험 종료 후 vernier caliper(Mitutoyo, Kawasaki, Japan)을 이용하여 측정하고 종양 무게를 측정하였다. 발생한 종양조직과 주위 근육층을 절제하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 광학현미경 하에서 관찰하였다.

실험결과

레트로바이러스 벡터 제조

TIMP-2를 발현하는 약 9 kb mutant Mo-MuLV의 proviral

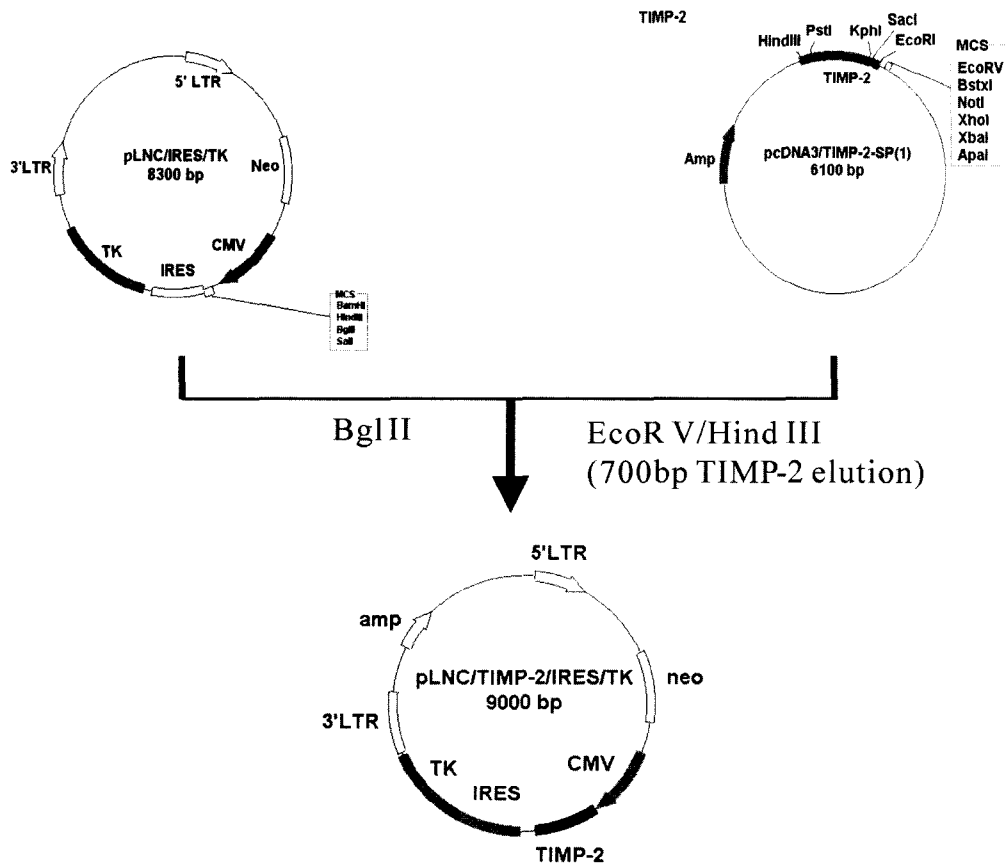


Fig. 1 – Map of the retroviral vector LNC/TIMP-2/IRES/TK expressing human TIMP-2.

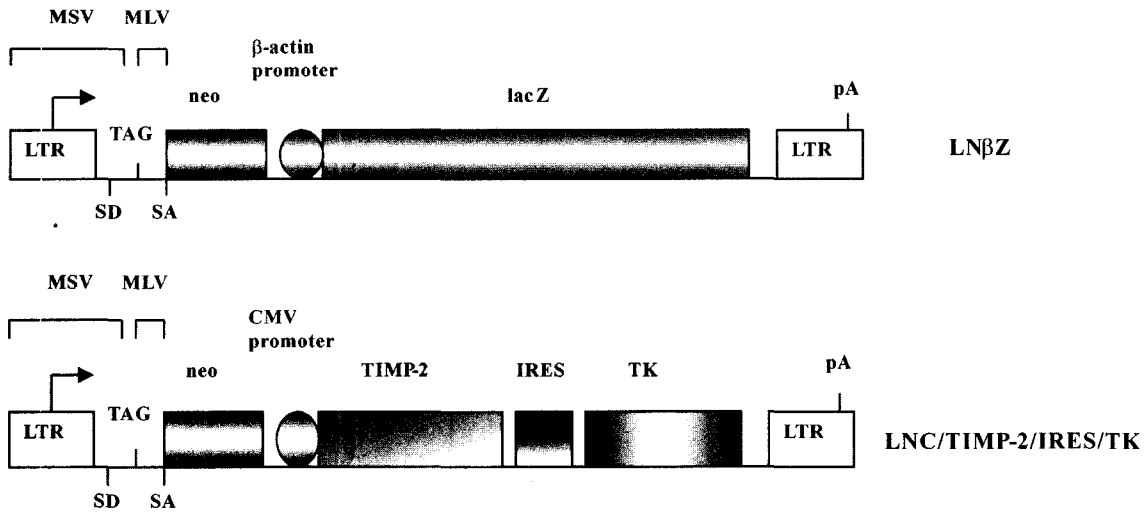


Fig. 2 – Map of recombinant retroviral vectors. The LNβZ vector contains the neomycin resistance gene and *lacZ* gene. The LNC/TIMP-2/IRES/TK retroviral vector containing the neomycin gene, human TIMP-2 cDNA, and thymidine kinase gene of herpes simplex virus type. Abbreviations: SD, splice donor; SA, splice acceptor; pA, poly-adenylation signal.

sequence를 포함하는 plasmid와 HSV-TK 및 TIMP-2를 internal promoter로 하는 IRES를 중간에 위치시킨 LNC/TIMP-2/IRES/TK 벡터를 제조하였고, marker rescue assay를 위한 벡터는 TIMP-2, IRES 및 TK 유전자 대신에 β-galactosidase의 *LacZ*와 β-promoter로 대치시킨 LNβZ 벡터를 제조하였다(Figs. 1, 2).

TIMP-2 및 *LacZ* 발현 확인

LNC/TIMP-2/IRES/TK 벡터를 도입시킨 G418 resistant PG13 세포의 클론 중 7×10^5 CFU/ml의 높은 역가를 보이는 클론을 선별하여 대장암 세포의 유전자 이입에 사용하였다. 선별된 PG13 세포 클론을 이용하여 대장암 세포주 SW480에 유전자를 이입시켜 TIMP-2 유전자 발현이 높은 SW480/TIMP-2 세포를 선별하였으며, 동일한 방법으로 *LacZ* 유전자를 높게 발현하는 SW480/*LacZ* 세포를 선별하였다. 유전자 이입 후 종양세포의 분화 및 성장에는 특이할 만한 영향은 미치지 않았으나, SW480/TIMP-2 세포에서 TIMP-2 발현이 점차적으로 증가하는 것을 확인하였으며(Fig. 3), X-gal 염색을 통하여 *LacZ* 유전자 및 대장암 세포로의 유전자 이입 효율을 확인하였다(Fig. 4). 한

편, 암세포의 침윤과 전이에 결정적 역할을 하는 것으로 알려진 MMP-2의 단백질해 활성을 확인하기 위하여 zymography 및

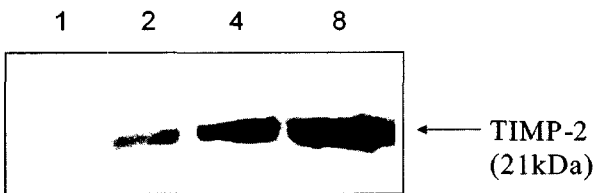
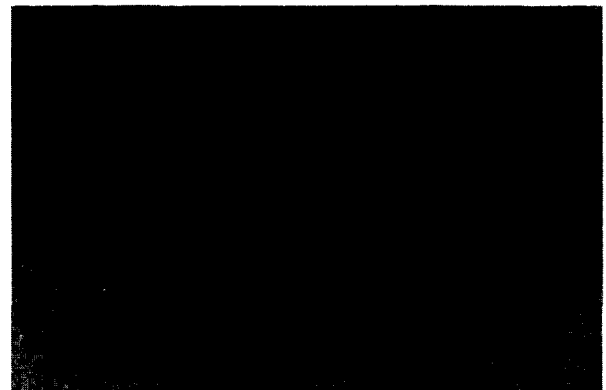


Fig. 3 – Western blot of TIMP-2 expression in SW480/TIMP-2 supernatant. Lanes 1, 2, 4, 8 : days after incubation.



SW480



SW480/LNβZ

Fig. 4 – *LacZ* expression in LNβZ transfected SW480.

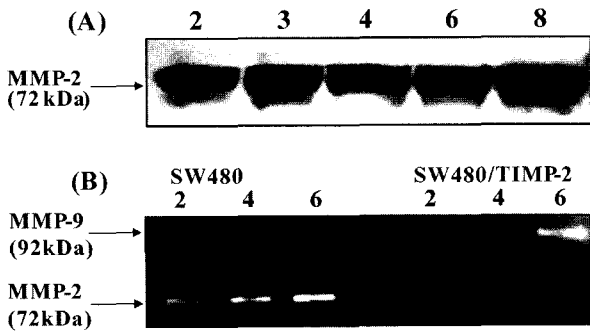


Fig. 5 - (A) Expression of endogenous MMP-2 in SW480 cell. (B) Comparison of MMP-2 secretion in SW480 and SW480-TIMP-2 cell. Zymographic detection of gelatinases secreted into the cell culture supernatant and western blot detection are shown. Band of lysis representing gelatinolytic activity appear white against a dark background. Lanes 2, 3, 4, 6, 8 : days after incubation.

Western blotting을 수행한 결과 TIMP-2 유전자를 이입한 SW480 세포에서 MMP-2의 활성이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

대장암 세포의 침윤에 미치는 영향

레트로바이러스 벡터에 의해 도입된 TIMP-2 유전자 발현이 대장암 세포의 침윤성에 미치는 영향을 Matrigel™ invasion chamber를 이용하여 조사한 결과 SW480에 비해 SW480/TIMP-2 세포주에서 약 70% 정도의 강한 침윤 억제효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 6).

대장암 세포의 종양형성 및 성장억제

BALB/c 누드마우스(*nu/nu*)에 각각의 대장암 세포주 3×10^6 cells/0.1 ml를 피하주사 후 3주간 TIMP-2 유전자가 도입된 세포의 종양형성 유무 및 성장에 미치는 영향을 관찰한 결과 SW480 및 SW480/TIMP-2 세포주에서 각각 100% 및 50%의 종양 발생 빈도가 관찰되었다. SW480 세포 처치군의 종양크기(0.4 g, $\phi \leq 1.0$ cm)에 비해 SW480/TIMP-2 세포 처치군의 종양크기(0.2 g, $\phi \geq 0.6$ cm)는 다소 작은 경향을 보였으나, 통계적 유의성은 나타나지 않았다(Table I). 육안적으로 SW480 세포를 단독 처치한 동물에서 발생한 종양조직은 주위조직과 명확한 경계를 이루며 여러 개의 불규칙한 크기와 형태의 작은 소엽으로 구성되어 잘 분

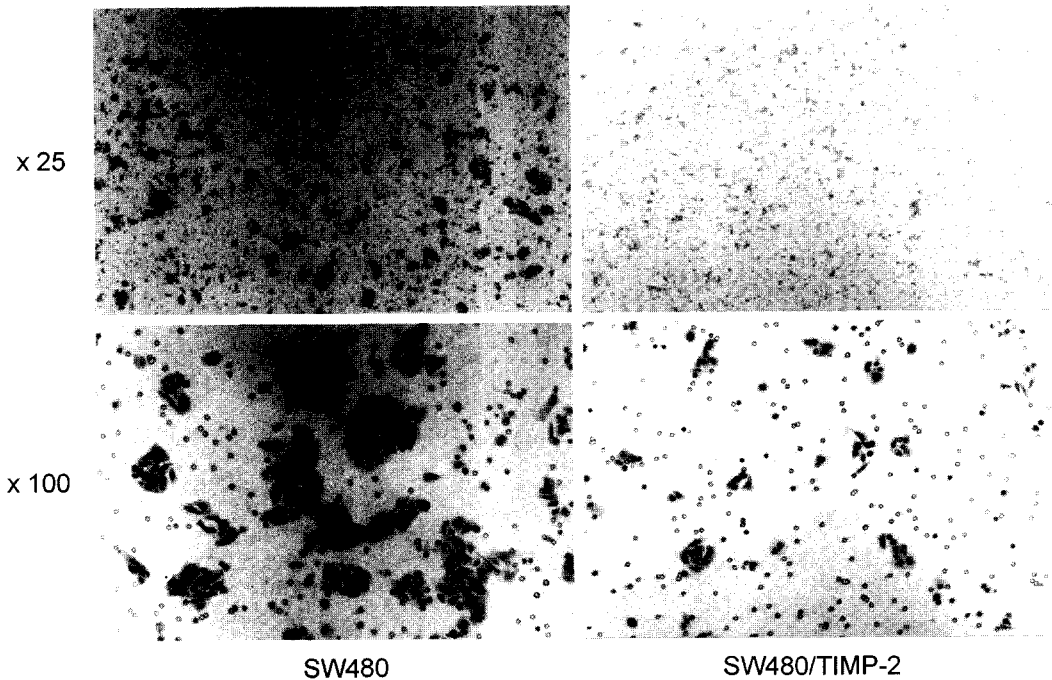


Fig. 6 - *In vitro* invasion assay determining the invasiveness in synthetic basement membrane. After incubation the non-invading cells were removed from the upper surface of the membrane by "scrubbing". The cells on the lower surface of the membrane were stained with H/E stain. x, magnification.

Table I - Tumorigenicity of SW480&SW480/TIMP-2 cells in nude mice

Cell lines	Injected cell numbers (100 μ l)	Mass formation	Weight (g)	Diameter (mm)	Nodular type
SW480	3×10^6 cells	6/6	0.4	$10 \leq$	Multi-nodular
SW480/TIMP-2	3×10^6 cells	3/6	0.2	≤ 6	Multi-nodular

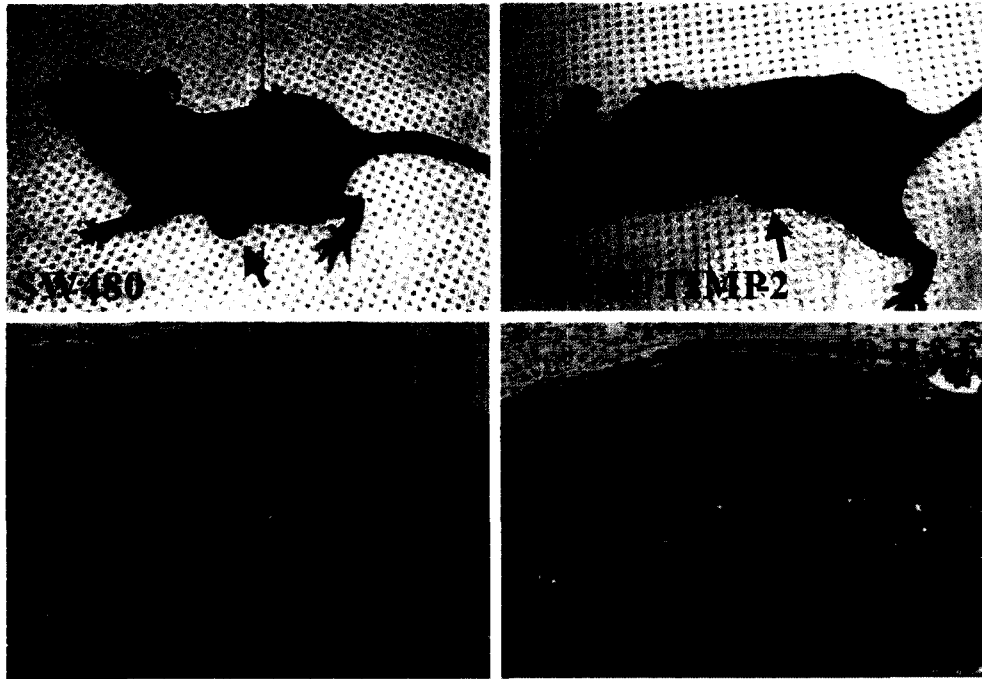


Fig. 7 - Tumorigenicity formation of SW480&SW480/TIMP-2 cells in nude mice. Note well-demarcation of tumor mass and necrosis and angiogenesis in inset, but there is no difference between SW480 and SW480/TIMP-2 in terms of cellularity, differentiation and mitosis.

리되었다. 이와 같은 소견은 SW480/TIMP-2 세포의 처치에 의해 생성된 종양조직 소견에서도 동일하였다. 종양조직의 조직학적 소견에서 SW480 세포 및 TIMP-2 유전자를 이입시킨 SW480/TIMP-2 세포를 처치한 종양조직 병변에서의 차이는 확인되지 않았으나, 공통적인 소견으로 주위조직과의 한계가 분명하였으며 암세포의 침윤 소견은 관찰되지 않았다. 또한, 암 세포의 분열과 종양조직의 중심부위 괴사 및 혈관신생 소견이 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

지금까지 암에 대한 유전자치료는 원인유전자를 정상적인 유전자로 대체하거나, 생성된 암 세포의 성장을 억제하거나 죽게 하는 유전자를 세포내로 도입시키는 방법이 주로 사용되어져 왔다. 최근 암의 생성, 분화, 성장 및 전이에 대한 많은 부분이 규명됨에 따라 다양한 유전자치료법을 개발하고자 관련 유전자를 조절하여 암의 성장 및 분화를 억제하고 치료하기 위한 수많은 연구가 진행되고 있다. 한편, 최근 다양한 유전자치료법의 개발에도 불구하고 아직까지 만족할 만한 성과를 얻지 못하는 실정으로 효과적인 유전자 도입과 발현을 위한 벡터시스템의 개선이 무엇보다 중요하다.

본 연구에서는 MMP-2의 활성을 저해하는 것으로 알려진 TIMP-2 유전자를 레트로바이러스 벡터를 이용하여 대장암 세포인 SW480에 안정적으로 전달시켰으며, 이입된 TIMP-2에 의한 암세포의 침윤과 종양형성에 미치는 영향을 *in vitro* 및 *in vivo*

에서 평가하였다. 본 연구에 사용된 레트로바이러스 벡터는 유전자 전달을 위한 효과적인 방법의 하나로 높은 역가의 바이러스 생산 세포주를 효과적으로 만들어 낼 수 있다. 일반적인 마우스 유래의 레트로바이러스 벡터는 이들이 내재적으로 가지는 레트로바이러스로의 복제(RCR; replication-competent retrovirus) 가능성으로 레트로바이러스 벡터에서 유래한 유전자치료 의약품의 안전성과 품질관리에 있어 중요한 요인으로 작용하고 있다.¹⁴⁾ 또한, 미국 FDA에서는 임상시험 벡터제조에 대한 권고안과 레트로바이러스 벡터로부터 유래한 유전자치료제의 RCR 시험에 대한 지침을 발표하였다.¹⁵⁾ 따라서 본 연구는 RCR 위험성을 감소시키며 특정 세포에 대해 높은 도입 효율을 갖는다고 보고된 GaLV envelope를 이용한 pseudo-type의 레트로바이러스 벡터를 사용하였으며,^{16,17)} 이는 도입 유전자를 보다 효율적이고 안전하게 전달시키며 유전자를 안정적으로 발현하는 세포주를 만들어 내는데 효과적인 것이다.

최근 연구에 의하면 대장암이 간으로 전이된 경우 MMP-2 활성이 급격히 증가하는 것으로 보고되었으며, 면역조직화학적 검사에서 MT1-MMP는 주로 암세포에 위치하나 MMP-2와 MMP-9는 종양조직의 섬유아세포나 백혈구 등에 분포하는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾ 본 연구에서 이용된 대장암 세포인 SW480에서 내인성 MMP-2의 발현을 zymography와 western blot을 이용하여 확인하였으며(Fig. 5), β -galactosidase의 발현 정도를 X-gal 염색법으로 확인한 결과 레트로바이러스 벡터는 유전자 이입 효율에 대한 유용성을 가짐을 확인하였다(Fig. 4). 대장암 세포주

인 SW480에 이입된 TIMP-2의 발현을 western blot으로 확인한 결과 TIMP-2 발현이 점차적으로 증가됨을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 변화는 정상상태에서 MMPs와 TIMPs의 균형이 기관의 발달 및 세포성장과 분화에 있어 항상성 유지에 주요한 기능을 가지고 있으나, 암 세포의 전이가 일어나는 동안 이러한 균형이 깨어져 MMPs의 비율이 증가하게 되면 종양의 발달과 성장에 주요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한, TIMP-2가 세포의 성장과 분화에도 관여하므로 TIMP-2 유전자를 도입시키지 않은 대장암 세포에서 어느 정도 발현된다는 것이 보고되었다.¹⁹⁾ 따라서 암세포의 내인성 MMP-2 활성이 TIMP-2 발현과 어떤 상관관계를 가지는가 알아보기 위해 대장암 세포주의 침윤과 이동성에 미치는 영향을 평가함으로 MMP-2의 활성이 TIMP-2의 발현 증가에 의해 저해됨을 확인하였으며(Fig. 6), 이는 암세포의 MMP-2 활성은 TIMP-2의 발현이 증가하여 상호 1:1 복합체를 형성하므로 저해효과가 나타난 것으로 사료된다. 한편, TIMP-2 유전자를 이입시킨 SW480/TIMP-2 세포의 종양형성 및 성장에 미치는 영향을 평가하고자 SW480과 SW480/TIMP-2 세포를 누드마우스의 피하에 주사한 결과 SW480/TIMP-2 대장암 세포가 SW480 세포의 종양형성과 성장에 비해 현저히 억제되는 것을 확인하였다(Table I). 이러한 결과는 TIMP-2 유전자의 도입에 의해 암세포의 정착과 성장을 억제한 것으로 조직병리검사와 유전자 도입 후 암세포의 분화에서 특이할 만한 변화를 보이지 않았는데 TIMP-2 유전자가 암세포의 특성 변화에는 영향을 주지 않기 때문인 것으로 사료된다(Fig. 7). 본 연구에서 TIMP-2 유전자를 이입한 대장암세포를 이용하여 레트로바이러스 벡터의 생체내·외 유전자 전달 효율을 평가함으로 바이러스 벡터의 유용성 평가와 앞으로 이러한 MMP-2의 활성억제와 TIMP-2의 발현 증가에 의해 유발될 수 있는 안전성 연구가 병행되어 TIMP-2의 임상 적용 가능성을 고려해야 할 것이다.

결과적으로 GaLV pseudo-type retroviral vector를 이용한 TIMP-2 유전자의 대장암 세포로의 이입은 유전자 전달시스템의 효율성을 증가시켰으며, 암세포의 성장과 전이를 억제하여 암의 치료를 위한 가능성을 제시하였다.

결 론

암의 생성, 분화, 성장 및 전이에 관련되는 유전자를 조절을 통하여 암의 유전자치료에 유용성을 가지기 위해서는 효과적인 유전자 도입과 발현을 위한 벡터시스템의 개선 및 인체 안전성에 대한 고려가 무엇보다 먼저 선행되어야 할 것이다.

참고문헌

1) Sporn, M. B. : The war on cancer. *Lancet* **347**, 1377 (1996).

- 2) Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. and Shafdie, S. : Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67 (1980).
- 3) Matrisian, L. M. : The matrix degrading metalloproteinases. *Bioassays* **14**, 455 (1992).
- 4) Li, H., Grenet, C., Opolon, P., Menashi, S., Soria, C. and Yeh, P. *et al.* : AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum. Gene Ther.* **12**, 515 (2001).
- 5) Rigg, A. S. and Lemoine, N. R. : Adenoviral delivery of TIMP1 and TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* **8**, 869 (2001).
- 6) Imren, S., Kohn, D. B., Shimada, H., Blavier, L. and DeClerk, Y. A. : Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 retroviral-mediated gene transfer *in vivo* inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res.* **56**, 2891 (1996).
- 7) Ahn, S. M., Jeong, S. J., Kim, Y. S., Sohn, Y. W. and Moon, A. : Retroviral delivery of TIMP-2 inhibits H-ras-induced migration and invasion in MCF10A human breast epithelial cells. *Cancer Letters* **207**, 49 (2004).
- 8) Pohar, N., Godenschwege, T. A. and Buchner, E. : Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from Drosophila to human. *Genomics* **57**, 293 (1999).
- 9) Declerck, Y. A., Perez, H. S., Boone, T. C., Langley, K. E. and Taylor, S. M. : Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* **52**, 701 (1992).
- 10) Ponton, A. B., Coulombe and Skup, D. : Decreased expression of tissue inhibitor of the metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res.* **51**, 2138 (1991).
- 11) Yen, N., Ioannides, C. G., Xu, K., Swisher, S. G., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Walsh, G. L. and Roth, J. A. : Cellular and humoral immune responses to adenovirus and p53 protein antigens in patients following intratumoral injection of an adenovirus vector expressing wild-type. *Cancer Gene Ther.* **7**, 530 (2000).
- 12) Kim, Y. S. and Risser, R. : TAR-independent transactivation of the murine cytomegalovirus major immediate early promoter by the Tat protein. *J. Virol.* **67**, 239 (1993).
- 13) Kim, T., Leibfried-Rutledge, M. L. and First, N. L. : Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with gibbon ape leukemia virus envelopes. *Mol. Reprod. Develop.* **35**, 105 (1993).
- 14) Donahue, R. E., Kessler, S. W., Bondie, D., Mcdonagh, K., Dunbar, C., Goodman, D., Agricola, B., Byrne, E., Raffeld, M.,

- Moen, R., Bacher, J., Zsebo, K. M. and Nienhuis, A. W. : Helper virus induction T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* **176**, 1125 (1992).
- 15) Wilson, C. A. and Miller, A. E. : Evaluation of recommendations for replication-competent retrovirus testing associated with use of retroviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **8**, 869 (1997).
- 16) Bauer, T. R., Jr., Miller, A. D. and Hickstein, D. D. : Improved transfer of the leukocyte integrin CD18 subunit into hematopoietic cell lines by using retroviral vectors having a gibbon ape leukemia virus envelope. *Blood* **86**, 2379 (1995).
- 17) Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M. and Morgan, R. A. : High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and non-human primate peripheral blood lymphocytes. *PNAS* **92**, 7739 (1995).
- 18) Aii, S., Ishigami, S., Mori, A., Onodera, G. and Imamura, M. : Implication of VEGF and MMPs in hepatic metastasis of human colon cancer. *Nippon. Geka. Gakkai. Zasshi.* **99**, 436 (1998).
- 19) Masuda, H. and Aoki, H. : Host expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in normal colon tissue affects metastatic potential of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* **42**, 393 (1999).