



폐암세포주에서 아데노바이러스 매개 p16 유전자 전달로 인한 유전자 발현의 변화

박미선 · 김옥희 · 박현신 · 지승완 · 엄미옥 · 엽태경 · 강호일
식품의약품안전청 국립독성연구원 유전독성과

Differential Gene Expression after Adenovirus-Mediated p16 Gene Transfer in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells

Misun Park, Okhee Kim, Hyunshin Park, Seungwan Jee, Miok Eom, Taikyung Ryeom and Hoil Kang
National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Received March 3, 2004; Accepted April 10, 2004

ABSTRACT. For the safety evaluation of adenovirus-mediated gene transfer, we investigated differential gene expressions after transfecting adenoviral vector containing p16 tumor suppressor gene (Ad5CMV-p16) into human non-small cell lung cancer cells. In the previous study, we showed adenovirus-mediated p16^{INK4a} gene transfer resulted in significant inhibition of cancer cell growth. We investigated gene expression changes after transfecting Ad5CMV-p16, Ad5CMV (null type, a mock vector) into A549 cells by using cDNA chip and oligonucleotide microarray chip (1200 genes) which carries genes related with signal transduction pathways, cell cycle regulations, oncogenes and tumor suppressor genes. We found that p16^{INK4a} gene transfer down regulated 5 genes (cdc2, cyclin D3, cyclin B, cyclin E, cdk2) among 26 genes involved in cell cycle regulations. Compared with serum-free medium treated cells, Ad5CMV-p16 changed 27 gene expressions, two fold or more on oligonucleotide chip. In addition, Ad5CMV-p16 did not seem to increase the tumorigenicity-related gene expression in A549 cells. Further studies will be needed to investigate the effect of Ad5CMV-p16 on normal human cells and tissues for safety evaluation.

Keywords: Gene therapy, Safety evaluation, Adenoviral vector, p16, DNA microarray.

서 론

유전자치료는 cystic fibrosis 등 유전질환 뿐만 아니라, 암, 당뇨병, AIDS 등 난치병에 대한 새로운 치료수단으로서, 여러 다양한 질병에 대하여 최근 폭넓게 적용되고 있다(Costantini *et al.*, 2000; Seroogy *et al.*, 2000; Vile *et al.*, 2000; Raymon *et al.*, 1997). 1990년 9월 미국

NIH에서 유전질환인 ADA(adenosine deaminase) 결핍증 환자에게 처음으로 임상시험이 시도된 이래(Blaese *et al.*, 1995; Blaese, 1990), 세계적으로 약 918건의 유전자치료 임상시험이 실시되고 있다(Gene Therapy Clinical Trials, 2004). 또한, 국내에서도 유전자치료 연구가 활발히 진행되고 있어 2001년도에는 허혈성족부질환에 대한 유전자치료가 국내 임상시험에 들어갔으며, 향후 수년 내에 유전자치료제에 대한 임상시험 수요는 크게 증가할 전망이다.

그러나 유전자치료제가 시판되기까지는 해결해야 할 문제점이 많이 남아 있다. 1999년 9월 미국 펜실베이니아대학에서 선천성 유전질환인 OTC(ornithine transcarbamylase) 결핍증 환자가 아데노바이러스를 이용한 유전자치료 도중 사망하는 일이 발생하였고(U.S. NIH Report, 2002),

Correspondence to: Hoil Kang, Division of Genetic toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
E-mail: kanghi@kfda.go.kr

The abbreviation used are: Ad5CMV-p16, adenoviral vector with p16 tumor suppressor gene; Ad5CMV, adenoviral vector as a mock; RCA, replication competent adenovirus.

2002년 10월 프랑스 파리 넥커어린이병원에서는 중증복합면역결핍증인 X-SCID(severe combined immunodeficiency) 환자에게 레트로바이러스를 이용한 유전자치료로 중 백혈병과 유사한 부작용이 발생하는 등(European Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting, 2002; US FDA CBER meeting #33, 2002), 유전자치료제의 안전성문제가 국제적으로 크게 대두되고 있다. 그러나, 유전자치료제의 안전성에 관해서는 보고된 바가 적고(Verdier *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996), 실제적으로 안전성평가를 위한 구체적인 시험 방법들도 아직 확립되어 있지 않다.

세계적으로 유전자치료 임상시험의 66%가 암에 대한 유전자치료이며, 아데노바이러스는 레트로바이러스 처럼 숙주세포의 염색체에 삽입되지는 않지만 다른 바이러스 벡터에 비하여 비교적 큰 크기의 유전자도 삽입할 수 있고 높은 titer를 얻을 수 있어서, 암 유전자치료에 있어서 자주 사용되는 벡터이다(Wu *et al.*, 2001). 암 억제유전자인 p53을 아데노바이러스 벡터에 넣은 유전자치료제는 세계적으로 전이성 악성 간암, 폐암 등에 대하여 이미 그 유효성이 인정되어 임상시험 중에 있으며(Habib *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1998), 비소세포폐암(non-small cell lung cancer)의 경우 phase I/II 임상시험 중에 있다. 현재 p53유전자 외에도 p27, p21, p16 등 암 억제유전자를 이용한 암 유전자치료 연구도 활발히 진행 중에 있다(Park *et al.*, 2001; Kawabe *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 1999).

이들 아데노바이러스 벡터를 사용한 유전자치료에 있어서 주로 예상되는 안전성 문제는 유전자치료제 투여 후 숙주세포 내에서의 증식성 아데노바이러스(RCA; replication competent adenovirus)의 출현, 면역반응, 표적장기 외에서의 목적유전자의 발현 및 치료유전자 외에 다른 특정 유전자 또는 oncogene의 과발현 등이 보고되어 있다(EMEA Guidance, 2001; Pilaro *et al.*, 1999; FDA CBER Guidance for industry, 1998).

한편, 본 실험에서 치료유전자로 사용한 p16 유전자는 CDK4와 CDK6(cyclin-dependent kinase 4 and 6)에 선택적으로 결합하는 CDK 억제제로서, 결과적으로 세포주기에 관여하는 Rb 단백질의 인산화를 억제하고 세포주기 진행을 억제함으로써, 암의 비정상적인 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Vogt *et al.*, 1998). 폐암, 방광암, 전립선암, 후두암 등의 경우, 암 억제유전자인 p16이 결손되어 있거나 변이되어 있음이 증명되어 있고(Fisher, 2001; Hall *et al.*, 1996; Ranade *et al.*, 1995, Kamb *et al.*, 1994), 최근 wild-type p16 유전자를 아데노바이러스 벡터에 넣어 암세포에 적용시켰을 때 암세포의 증식

이 억제되었다는 보고가 있다(Lee *et al.*, 1998, 2000; Kim *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1999; Caroline *et al.*, 1998).

본 연구에서는 유전자치료제의 안전성 확보를 위한 연구의 일환으로, 암 억제유전자인 p16이 삽입된 아데노바이러스 벡터를 사람 폐암암세포주인 A549 세포에 도입시킨 후, 치료용 유전자 이외의 암 유전자 등 특정유전자의 발현양상을 microarray를 이용하여 비교·분석하였으며, 나아가 암 억제유전자의 도입으로 인해 발현되는 특정 유전자들을 추적함으로써 유전자치료제의 안전성 평가에 관한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 DNA chip

RPMI 1640 Medium, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS(Fetal Bovine Serum), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, D-PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. RNA 분리용 QiaGen mini kit(QiaGen Inc., Valencia, CA, USA)으로 하였으며, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside(X-gal) 등 그 밖의 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 그 외 모든 시약은 특급을 사용하였다. Mycoplasma의 감염여부는 ELISA법을 사용하는 Mycoplasma Detection kit(Roche Diagnostic GmbH, USA)으로 검사하였다. cDNA chip은 Human Cell Cycle GEArray™(SuperArray Inc., USA)를 사용하였으며, oligonucleotide chip(HO2, 1200 genes)은 Mergen Ltd. (San Leandro, CA, USA)의 것을 사용하였다.

세포 배양

사람 태아의 초기 신장세포인 293 세포주는 Microbix Biosystems Inc.(Toronto, Canada)에서 구입하여, 10% FBS 및 1% antibiotics(penicillin-streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지로 배양(37°C, 5% CO₂) 하였으며 본 실험에는 low passage cell 만을 사용하였다. 사람 폐암세포주인 A549 세포는 한국세포주 은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, RPMI 1640 배지에 2.0 g/l sodium bicarbonate, 4.75 g/l HEPES, 10% FBS, 1% antibiotics를 각각 첨가하여 배양(37°C, 5% CO₂) 하였다.

아데노바이러스 벡터의 대량 생산 및 정제

서울대 vector core 실험실에서 아데노바이러스 type

5의 genome을 가진 2개의 plasmid(PJM17, pACCMV · pLpA)를 293 세포에 calcium phosphate 방법으로 co-transfection시킨 후 정제한 벡터를 입수하였다. 치료유전자인 p16이 삽입된 Ad5CMV-p16과 mock 벡터로서 null type인 Ad5CMV, 그리고 리포터 유전자로 *LacZ*가 삽입된 Ad5CMV-*LacZ*를 대량 생산하고 정제하였다.

아데노바이러스 벡터의 propagation 및 titer 결정

아데노바이러스 벡터(Ad5CMV-p16, Ad5CMV, Ad5CMV-*LacZ*)를 각각 293 세포에 1시간 동안 transfection 시킨 다음, 완전배지로 갈아주고 3~4일 배양(37°C, 5% CO₂) 하였다. 세포가 50% 정도 부유 되었을 때 flask 바닥에서 세포를 분리하여 freezing & thawing method로 세포막을 깨 다음 2000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. Centriplus YM-100에 상등액을 넣고 3000 g로 원심 분리하여 벡터를 농축하고 TCID₅₀법으로 각 아데노바이러스 벡터의 titer를 결정하였다.

※ Karber's formular

$$TCID_{50} = (\text{dilution rate in the first row}) \times (\text{dilution rate})^{2^{0.5}}$$

$$\Sigma = \text{total sum of (number of wells showing cytopathic effect)/(number of samples) at each degree of dilution}$$

In vitro X-gal staining

본 실험에 사용한 재조합 아데노바이러스 벡터가 사람의 비소세포폐암세포주인 A549 세포에 감염력이 있는지를 알아보기 위하여, 리포터 유전자인 *LacZ*가 삽입된 아데노바이러스 벡터(Ad5CMV-*LacZ*)를 A549 세포에 농도 별로 transfection시킨 다음 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양한 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 0.5% glutaraldehyde를 넣고 15분 동안 37°C에서 세포를 고정시켰다. X-gal 용액을 37°C에서 2시간 동안 처리한 뒤, 현미경으로 β-galactosidase의 발현을 확인하였다.

숙주세포에서의 증식성 아데노바이러스 및 p16 유전자 발현 확인

아데노바이러스 벡터를 사용한 유전자치료를 있어서 안전성에 문제가 될 수 있는 증식성아데노바이러스의 존재 여부를 검사하기 위하여, 아데노바이러스의 증식과 관련된 E1 단백질의 존재여부를 Western blot으로 확인하였다. 또한 치료유전자인 p16이 들어있는 아데노바이러스 벡터의 p16 유전자 발현 여부를 Western blot으로 확인하였다. A549 세포에 Ad5CMV-p16(100 moi)을 trans-

fection 시킨 다음 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양한 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5% Na deoxycholate, 2% Nonidet P-40, 0.2% sodium dodecyl sulfate, 1 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 μg/ml Aprotinin)를 처리하여 Western blot을 위한 cell lysate를 얻었다. 12% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Purified mouse anti-adenovirus type 5 E1A monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, USA), purified anti-human p16^{INK4a} monoclonal antibody(Pharmingen, San Diego, USA) 및 anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody를 사용하여 ECL blot(Amersham Pharmacia, USA)을 하였다.

cDNA microarray

아데노바이러스 벡터를 이용하여 p16 유전자를 비소세포폐암세포에 전달하였을 때, 세포주기와 관련된 유전자들의 발현변화를 살펴보기 위해, cDNA microarray를 수행하였다. Ad5CMV 및 Ad5CMV-p16(100 moi)을 각각 A549 세포에 처리하고, total RNA를 추출하여 cDNA를 만든 다음 Human Cell Cycle GEMArray™(SuperArray Inc., USA) nylon membrane에 hybridization하였다. Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin(AP-streptavidin) 용액을 넣어 반응시킨 후 nylon membrane을 X-ray film에 노출시켜 spot을 확인하고, Bio-Rad사의 Quantity One(version 4.2) 프로그램으로 분석하였다.

Oligonucleotide microarray

아데노바이러스 벡터를 이용한 p16 유전자의 전달이 사람 비소세포폐암세포주인 A549 세포의 유전자발현 양상에 어떤 변화를 가져오는지 조사하기 위하여, A549 세포에 serum-free medium 또는 Ad5CMV-p16(100 moi)을 각각 1시간 동안 처리한 다음 48시간 동안 배양하고 microarray 분석을 위해 total RNA를 추출하였다. Total RNA로 cDNA를 제조하고, *in vitro* transcription을 통해 biotin으로 labeling한 cRNA probe를 준비하였다. 그 다음 oligonucleotide chip에 probe를 hybridization시키고 scanning한 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

최근 연구보고에 의하면 유전자치료 연구에 있어서 치

료용 유전자를 바이러스 벡터에 넣어 숙주세포에 도입시켰을 때 치료용 유전자의 발현이 생체내의 다른 유전자의 발현을 유도하거나 억제할 수 있으며 경우에 따라서는 종양과 관련된 유전자 등의 발현에 영향을 미칠 가능성이 있다고 알려져 있다(Kataoka et al., 2000; Melcher et al., 1999). 아데노바이러스 벡터는 암의 유전자치료에 가장 널리 시도되는 유전자 전달체이나, 증식성 아데노바이러스의 출현, 면역반응, 치료유전자 외에 특정 유전자의 이상 과발현 등을 안전성 측면에서 고려해야 한다(EMEA Guidance, 2001; Pilaro et al., 1999; FDA CBER Guidance for industry, 1998).

본 연구에서는 아데노바이러스를 이용한 유전자치료제의 안전성 연구의 일환으로, 암 억제유전자인 p16이 도입된 아데노바이러스 벡터를 사람 비소세포폐암세포주인 A549 세포에 처리한 다음 microarray를 이용하여 유전자 발현 양상의 변화를 조사하였다.

아데노바이러스 벡터의 비소세포폐암세포로의 전달효율 조사

리포터 유전자로서 *LacZ* 유전자가 삽입되어 있는 아데노바이러스 벡터(Ad5CMV-*LacZ*)를 10~50 moi로 비소세포폐암세포주인 A549 세포에 도입시켰을 때, 농도의존적으로 *LacZ* 유전자 발현에 의한 β-galactosidase의 양이 증가되었다(Fig. 1). 따라서 본 실험에 사용한 재조합 아데노바이러스 벡터는 사람 비소세포폐암세포에 성공적으로 유전자를 전달할 수 있음을 확인하였으며, 치료유전

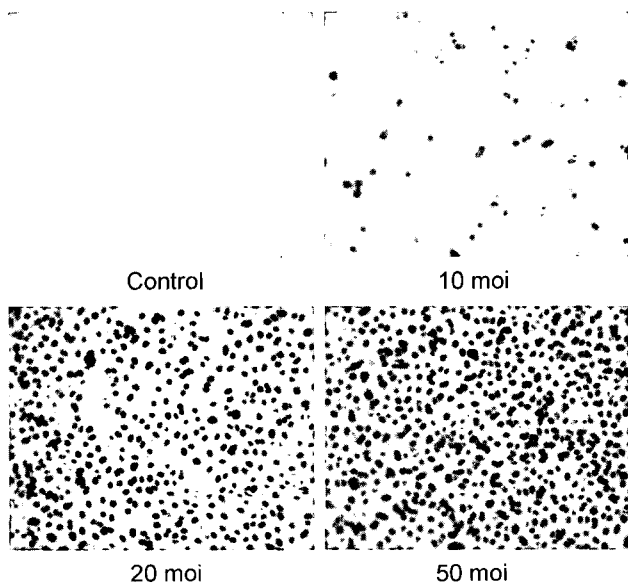


Fig. 1. β-galactosidase activity was detected by X-gal staining after transfection of Ad5CMV-*LacZ* (10~50 moi) into A549 cells.

자인 p16 유전자가 삽입된 아데노바이러스 벡터를 A549 세포에 100 moi 처리한 다음 48시간 뒤에 p16 단백질이

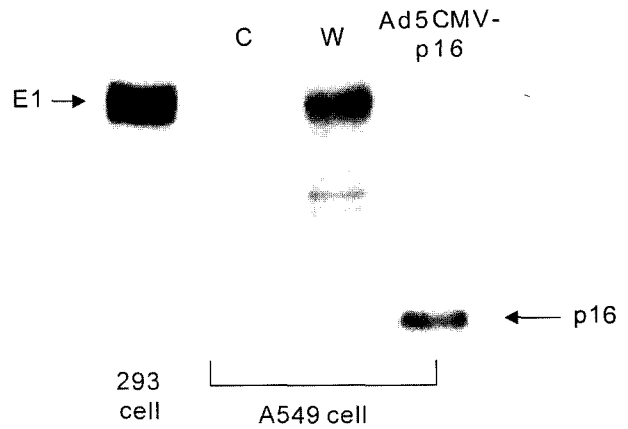


Fig. 2. Detection of RCA (E1 protein) and p16 expression by Western blot : 10% SDS-PAGE, C; control, W; wild-type adenovirus transfected A549 cells, Ad5CMV-p16; recombinant adenoviral vector containing p16 gene (100 moi) transfected A549 cells.

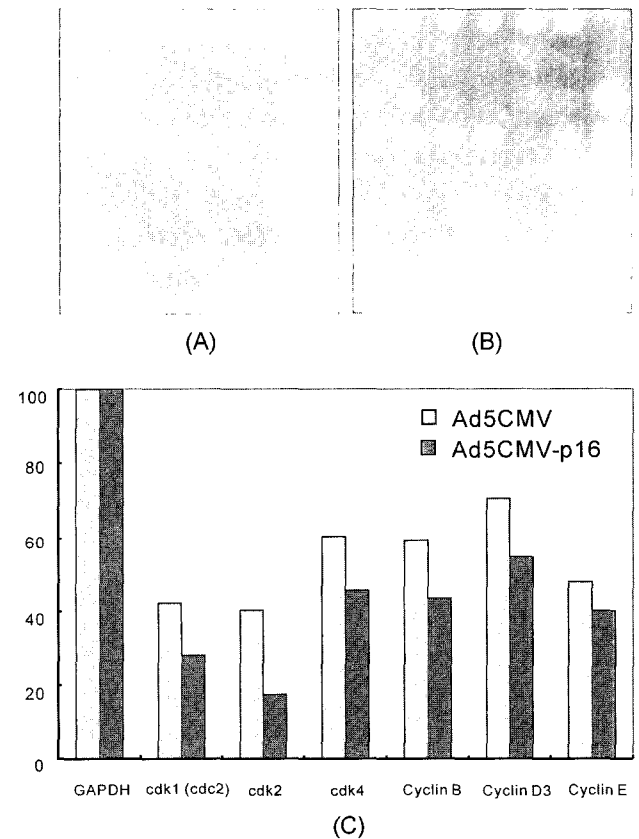


Fig. 3. cDNA microarray analysis of gene expression in A549 cells treated with Ad5CMV only (A); A549 cells treated with Ad5CMV-p16 (B); differential gene expression profile (C). GAPDH was used as a control.

발현됨을 Western blot으로 확인하였다(Fig. 2).

증식성 아데노바이러스의 확인

아데노바이러스 벡터를 유전자치료제에 사용할 때, 안전성에 문제가 될 수 있는 증식성 아데노바이러스의 존재 여부를 확인하였다. 아데노바이러스의 복제와 관련이 있는 E1 단백질 발현 유무를 조사한 결과, 본 실험에 사용한 아데노바이러스 벡터에서는 E1 단백질이 검출되지 않았다(Fig. 2). 또한 E1a, E1b primer를 이용한 RT-PCR 결과에서도 증식성 아데노바이러스가 검출되지 않았으므로(data not shown), 본 실험결과에서 증식성 아데노바이러스에 의한 영향은 배제할 수 있다고 생각된다. 또한 본 실험에 사용한 아데노바이러스 벡터에서는 세포배양과정 중 흔히 오염되기 쉬운 mycoplasma(*M. arginini*, *M. hyorhinis*, *A. laidlawii*, *M. orale*)도 검출되지 않았다.

p16 유전자전달에 따른 세포주기 관련 유전자 발현변화

암 억제유전자인 p16을 아데노바이러스 벡터에 삽입하여 A549 세포에 도입시켰을 때 세포주기와 관련된 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위해, 비소세포폐암세포주

인 A549 세포에 치료유전자가 들어 있지 않은 Ad5CMV (null type, 100 moi)와 치료유전자가 삽입된 Ad5CMV-p16(100 moi)을 각각 처리한 다음 RNA를 추출하여 DNA microarray를 실시하였다.

Ad5CMV-p16은 Ad5CMV와 비교해 볼 때 세포주기와 관련된 26개의 유전자 중 세포증식과 관련된 *cdc2*, *cyclin D3*, *cyclin B*, *cyclin E*, *cdk2* 등 5개의 유전자의 발현이 비록 2배 이상 현저한 차이는 나타내지 않았으나 재현성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3). 최근 비소세포폐암인 경우, p16^{INK4a} 유전자가 불활성화 되어 있으며 *cyclin E* 및 *cyclin D* 단백질이 과발현되어 있어, 이러한 유전자들의 발현 변화로 폐암의 조기 예측이 가능함을 시사한 보고가 있으며(Nikliński *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001), 비소세포암세포에서 p16^{INK4a} 암 억제유전자는 *cdk4/cdk6*를 억제하여 Rb dephosphorylation에 관여할 뿐만 아니라, 간접적으로 *cdk2*를 억제하여 폐암세포 증식을 억제한다고 보고 되고 있다(Grison *et al.*, 2000). 본 실험 결과는 이러한 보고들과 그 결과가 일치하고 있으며, 아데노바이러스 벡터를 매개로 한 p16 유전자의 전달이 세포 증식 관련 유전자를 억제함으로써 비소세포폐암의 증식을

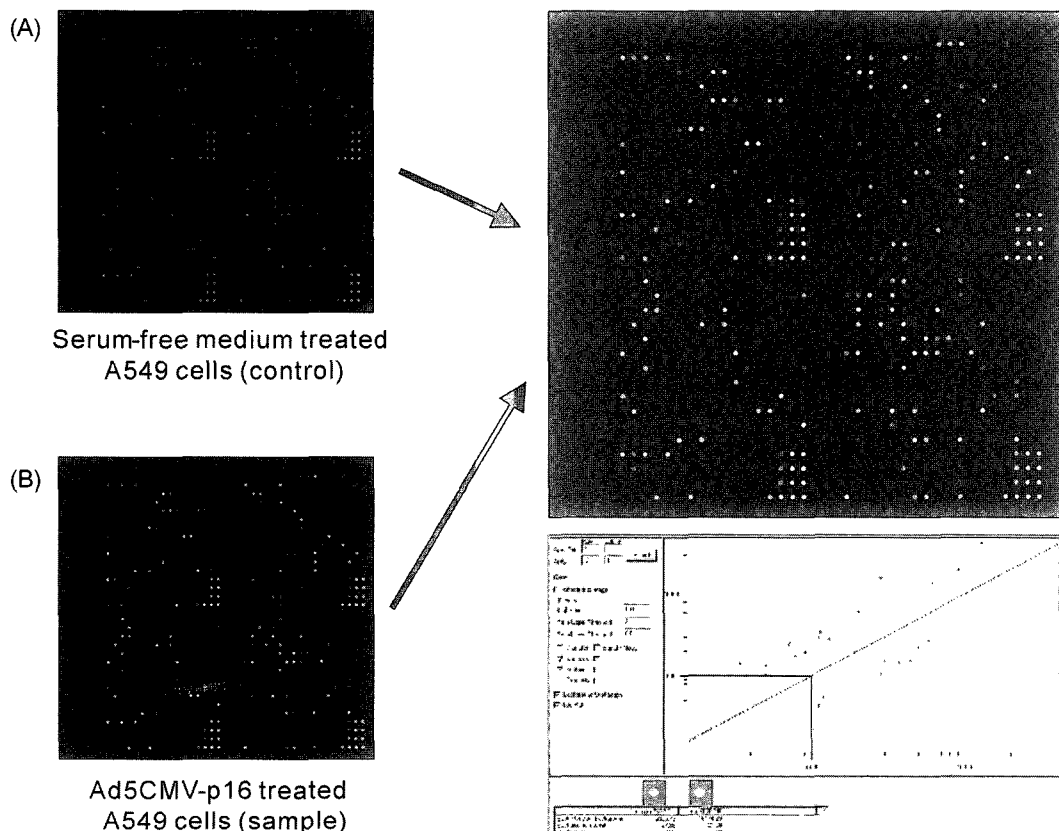


Fig. 4. Oligonucleotide microarray image after transfection of Ad5CMV-p16 into A549 cells. (A) hybridization image from serum-free medium treated A549 cells as a control (B) hybridization image from Ad5CMV-p16 treated A549 cells.

억제함을 확인하였다.

Ad5CMV-p16 처리에 의한 유전자 발현 변화

치료유전자인 p16이 삽입된 아데노바이러스 벡터에 대한 안전성 시험의 일환으로 microarray를 이용한 유전자 발현변화를 살펴보았다. 본 실험에 사용한 oligonucleotide chip(Mergen, USA)에는 암 유전자(103개), 암 억제유전자(31개), 세포주기조절 관련 유전자(31개), apoptosis 관련 유전자(90개), 세포내 신호전달과 관련된 protein kinase(19개), tumor necrosis factor(18개), cytokine 및 growth factor 관련 유전자(152개) 등 총 1152개의 유전자가 실려 있으며, 각 유전자에 대한 발현변화를 조사한 결과 대조군으로 serum-free medium을 처리한 A549 세포에 비하여 Ad5CMV-p16(100 moi)을 처리한 경우에 발현이 2배 이상 증가한 유전자는 17개, 감소한 유전자는 10개로 나타났다(Fig. 4, Table 1).

Ad5CMV-p16 처리에 의해 발현이 증가되거나 감소한 유전자들 중 대부분은 세포증식 또는 사멸과 관련된 유전자 및 세포내 homeostasis를 유지하기 위한 유전자들의 발현 변화인 것으로 생각되어진다. Glutathione S-trans-

ferase는 reactive oxygen류와 diol-epoxide 등 carcinogen과 결합하여 DNA 손상을 막아주며(Mannervik *et al.*, 1988), GSTP1은 폐에 가장 많이 분포하는 isoform으로서 흡입된 carcinogen의 detoxification에 중요한 역할을 하리라 추정되고 있다(Anttila *et al.*, 1993). 또한 최근 GSTP1의 polymorphic allele은 p16 유전자의 methylation을 일으켜 폐암발생을 증가시킬 위험이 큰 것으로 보고되었다(Gilliland *et al.*, 2002). 따라서 본 실험에서 Ad5CMV-p16의 처리로 인한 p16 유전자발현의 증가는 GSTP1의 발현증가를 동반하여 폐암발생을 억제하리라 사료된다. 또한 Ad5CMV-p16은 plakoglobin의 발현을 증가시켰는데, 이는 plakoglobin이 사람의 폐암에서는 그 발현이 감소되거나 나타나지 않으며, plakoglobin의 발현이 증가되면 transformed cell의 성장이 억제된다는 보고(Winn *et al.*, 2002)와 일치한다.

최근 serum이나 조직에서의 clusterin 소실은 식도편평세포암의 tumorigenesis와 관련이 있다는 보고가 있다(Zhang *et al.*, 2003). 본 실험결과에서는 Ad5CMV-p16에 의해 clusterin의 발현이 2.82배 증가한 것으로 나타났다(Table 1), 이것은 비소세포폐암에서도 clusterin의

Table 1. List of genes that respond to Ad5CMV-p16 in A549 cells

Rank	Fold induction	Unigene ID	Gene description
(A) Genes induced (>two-fold) by Ad5CMV-p16			
1	5.24	Hs.790	microsomal glutathione S-transferase
2	3.83	Hs.2340	junction plakoglobin
3	3.31	Hs.1640	collagen, type VII, alpha 1
4	3.15	Hs.80464	hepatitis B virus x-interacting protein (9.6 KD)
5	3.03	Hs.172182	poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1
6	2.82	Hs.75106	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40)
7	2.79	Hs.179735	ras homolog gene family, member C
8	2.58	Hs.289101	glucose regulated protein, 58 KD
9	2.50	Hs.239757	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6
10	2.46	Hs.157145	tetracycline transporter-like protein
11	2.45	Hs.159627	death associated protein 3
12	2.23	Hs.149846	integrin, beta 5
13	2.20	Hs.275163	non-metastatic cells 2, protein (NM23B)
14	2.13	Hs.300711	annexin A5
15	2.10	Hs.76288	calpain 2, (m/II) large subunit
16	2.04	Hs.82159	proteasome subunit, alpha type 1
17	2.00	Hs.226795	glutathione S-transferase pi
(B) Genes repressed (>two-fold) by Ad5CMV-p16			
1	3.12	Hs.74276	chloride intracellular channel 1
2	2.94	Hs.84974	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A
3	2.94	Hs.661	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7
4	2.85	Hs.194660	juvenile (batten, Spielmeyer-Vogt disease)
5	2.77	Hs.7912	neuronal cell adhesion molecule
6	2.70	Hs.37025	aquaporin 2 (collecting duct)
7	2.56	Hs.278614	protease, serine, 15
8	2.38	Hs.82890	defender against cell death 1, ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3
9	2.32	Hs.7381	voltage-dependent anion channel 3
10	2.17	Hs.105478	phosphoribosylformylglycinamide synthase

발현증가가 tumorigenesis를 억제할 가능성이 있음을 시사하고 있다. 그 외에도 collagen, integrin beta5 등 cell adhesion에 관련된 유전자와 calpain 같은 signal transduction 관련 유전자 등의 발현이 Ad5CMV-p16에 의해 증가된 것으로 나타났다.

한편, Ad5CMV-p16에 의해 ras 관련 유전자 및 hepatitis B virus X-interacting protein 등의 발현 증가가 나타났는데, 이러한 유전자들의 발현증가가 세포내에서의 다양한 interaction을 통해 어떤 영향을 나타낼 가능성을 배제할 수는 없다. 그러나, ras 유전자가 아닌 ras 관련 유전자의 발현 증가만으로 정상세포를 암세포화 할 수 있는 가능성도 적어 보인다. 따라서, 향후 동물을 이용한 전임상 안전성 평가연구에서 종양 관련 유전자들의 발현변화가 있는지에 대한 여부 및 암세포가 아닌 정상세포에 Ad5CMV-p16을 처리할 경우 종양 관련 유전자들의 발현변화가 있는지에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 아데노바이러스 벡터를 이용한 유전자치료제의 안전성 연구에 있어서 치료용 유전자 외에 다른 유전자의 발현 변화를 microarray를 이용하여 조사하였으며, 본 연구 결과는 유전자치료제 투여로 인한 부작용 발생 가능성을 예측하고 향후 유전자치료제의 안전성 평가하는데 있어서 기초 자료로 활용될 수 있으리라 생각된다.

감사의 말씀

본 연구 수행을 위하여 아데노바이러스 벡터를 제공해 주신 서울대학교 이춘택 교수님께 감사드립니다. 본 연구는 2001년도 식품의약품안전청의 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

- Allan, D., Koven, A., Wild, A., Kamel-Reid, S. and Dube, I.D. (1996): Endogenous murine leukemia virus DNA sequences in murine cell lines: implications for gene therapy safety testing by PCR. *Leukem Lymphom.*, **23**, 375-381.
- Anttila, S., Hirvonen, A., Vainio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Hayes, J.D. and Ketterer, B. (1993): Immunohistochemical localization of glutathione S-transferases in human lung cancer. *Cancer Res.*, **53**, 5643-5648.
- Blaese, R.M. (1990): Treatment of severe combined immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency with autologous lymphocytes transduced with a human ADA gene. *Hum. Gene Ther.*, **1**, 327-362.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., et al. (1995): T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. *Science*, **270**, 475-480.
- Caroline, C., Min, K., Dka, O., Robert, W., Dai, K., Zhuangwu, L., Yung, H.C., Bali, M., Shiv, S., Prem, S. and Kenneth, C. (1998): Effects of adenovirus-mediated p16INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells. *Oncogene*, **16**, 265-272.
- Costantini, L.C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O. and Isaacson, O. (2000): Gene Therapy in the CNS. *Gene Therapy*, **7**, 93-109.
- European Society of Gene Therapy 10th Annual Meeting (2002): Adverse event the clinical trial of gene therapy for the X-linked severe combined immune deficiency disease (XSCID).
- Fisher, D.E. ed. (2001): Tumor Suppressor Genes in Human Cancer, Totowa, New Jersey, Humana press, pp.183-195.
- Gene Therapy Clinical Trials (2004): J. Gene Med. website (www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/).
- Gilliland, F.D., Harms, H.J., Crowell, R.E., Li, Y.F., Willink, R. and Belinsky, S.A. (2002): Glutathione S-transferase P1 and NADPH Quinone Oxidoreductase Polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of p16INK4a and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in sputum. *Cancer Res.*, **62**, 2248-2252.
- Grimison, B., Langan, T.A. and Sclafani, R.A. (2000): p16^{Ink4a} tumor suppressor function in lung cancer cells involves cyclin-dependent kinase 2 inhibition by Cip/Kip protein redistribution. *Cell Growth & Differentiation*, **11**, 507-515.
- Habib, N.A., Hodgson, H.J.F., Lemoine, N. and Pignatelli, M. (1999): A Phase I/II Study of Hepatic Artery Infusion with wtp53-CMV-AD in Metastatic Malignant Liver Tumours. *Human Gene Therapy*, **10**, 2019-2034.
- Hall, M. and Peters, G. (1996): Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and Cdk inhibitors in human cancers. *Adv. Cancer Res.*, **68**, 67-108.
- Harada, H., Nakagawa, K., Iwata, S. and Saito, M., Kumon, Y., Sakaki, S., Sato, K. and Hamada, K. (1999): Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res.*, **59**, 3783-3789.
- Jin, M., Inoue, S., Umemura, T., Moriya, J., Arakawa, M., Nagashima, K. and Kato, H. (2001): Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer*, **34**, 207-218.
- Kamb, A. et al. (1994): A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. *Science*, **264**, 436-440.
- Kataoka, M., Wiehle, S., Spitz, F., Schumacher, G., Roth, J.A. and Cristiano, R.J. (2000): Down-regulation of bcl-2 is associated with p16INK4-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene*, **19**, 1589-1595.
- Kawabe, S., Roth, J.A., Wilson, D.R. and Meyn, R.E. (2000): Adenovirus-mediated p16INK4a gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells in a p53-dependent manner. *Oncogene*, **19**, 47, 5359-5366.
- Kim, M., Katayose, Y., Rojanala, L., Shah, S., Sgagias, M., Jang, L., Jung, Y.J., Lee, S.H., Hwang, S.G. and Cowan, K.H. (2000): Induction of apoptosis in p16INK4A mutant

- cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16INK4A protein. *Cell Death and Differentiation*, **7**, 706-711.
- Kobayashi, S., Shirasawa, H., Sashiyama, H., Kawahira, H. and Kaneko, O.T. (1999): p16INK4a expression adenovirus vector to suppress cancer cell proliferation. *Clin Cancer Res.*, **5**, **12**, 4182-4185.
- Lee, J.H., Lee, C.T., Yoo, C.G., Hong, Y.K., Kim, C.M., Han, S.K., Shim, Y.S., Carbone, D.P. and Kim, Y.W. (1998): The inhibitory effect of adenovirus-mediated p16INK4a gene transfer on the proliferation of lung cancer cell line. *Anticancer Res.*, **18**, **5A**, 3257-3261.
- Lee, S.H., Kim, M.S., Kwon, H.C., Park, I.C., Park, M.J., Lee, C.T., Kim, Y.W., Kim, C.M. and Hong, S.I. (2000): Growth inhibitory effect on glioma cells of adenovirus-mediated p16INK4a gene transfer *in vitro* and *in vivo*. *Int J. Mol. Med.*, **6**, 559-563.
- Mannervik, B. and Danielson, U.H. (1988): Glutathione transferases - structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **23**, 283-337.
- Melcher, A., Murphy, S. and Vile, R. (1999): Heat shock protein expression in target cells infected with low levels of replication-competent virus contributes to the immunogenicity of adenoviral vectors. *Human Gene Therapy*, **10**, 1431-1442.
- Nikliński, J., Niklińska, W., Laudanski, J., Chyczewska, E. and Chyczewski, L. (2001): Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **34**, S53-S58.
- Park, K.H., Seol, J.Y., Kim, T.U., Yoo, C.G., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S. and Lee, C.T. (2001): An Adenovirus Expressing Mutant p27 Showed More Potent Antitumor Effects Than Adenovirus-p27 Wild Type. *Cancer Res.*, **61**, 6163-6169.
- Pilaro, A.M. and Serabian, M.A. (1999): Safety Evaluation of Gene Therapies : Past, Present and Future. ASGT 2nd meeting.
- Ranade, K. *et al.* (1995) : Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nature Genet.*, **10**, 114-116.
- Raymon, H.K., Thode, S. and Gage, F.H. (1997): Application of ex Vivo Gene Therapy in the Treatment of Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*, **144**, 82-91.
- Roth, J.A., Swisher, S.G., Merritt, J.A., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., El-Naggar, A.K., Fossella, F.V., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Nesbitt, J.C., Pisters, K., Putnam, J.B., Schrupp, D.S., Shin, D.M., Walsh, G.L. (1998): Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Semin Oncol*, **25**(3 Suppl8), 33-37.
- Seroogy, C.M. and Fathman, C.G. (2000): The application of gene therapy in autoimmune diseases. *Gene Therapy*, **7**, 9-13.
- Smith, K.T., Shepherd, A.J., Boyd, J.E. and Lees, G.M. (1996): Gene delivery systems for use in gene therapy: an overview of quality assurance and safety issues. *Gene Therapy*, **3**, 190-200.
- the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2001): Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products.
- U.S. NIH report (2002): Assessment of adenoviral vector safety and toxicity : report of the national institutes of health recombinant DNA advisory committee. *Human Gene Therapy*, **13**, 3-13.
- US FDA Center for Biologics Evaluation and Research, biological Response Modifiers Advisory Committee Meeting #33 (2002).
- US FDA Center for Biologics Evaluation and Research, Guidance for industry (1998): Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy.
- Verdier, F. and Descotes, J. (1999): Preclinical safety evaluation of human gene therapy products. *Toxicological Sciences*, **47**, 9-15.
- Vile, R.G., Russell, S.J., and Lemoine, N.R. (2000): Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Therapy*, **7**, 2-8.
- Vogt, P., Reed, S. In: Vogt, P., Reed, S. eds. (1998): *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 139-148.
- Winn, R.A., Bremnes, R.M., Bemis, L., Franklin, W.A., Miller, Y.E., Cool, C. and Heasley, L.E. (2002): Gamma-catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene*, **21**, 7497-7506.
- Wu, Q., Moyana, T. and Xiang, J. (2001): Cancer gene therapy by adenovirus-mediated gene transfer. *Curr. Gene Ther.*, **1**, 101-122.
- Zhang, L.Y., Ying, W.T., Mao, Y.S., He, H.Z., Liu, Y.L., Wang, H.X., Liu, F., Wang, K., Zhang, D.C., Wang, Y., Wu, M., Qian, X.H. and Zhao, X.H. (2003): Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 650-654.