

## 단순 헤르페스 제 1형 티미딘 키나제 유전자 이입 간암세포주에서 방사표지 IVDU와 IVFRU의 섭취 평가

원자력의학원 사이클로트론응용연구실<sup>1</sup>, 핵의학과<sup>2</sup>, 분자종양학연구실<sup>3</sup>, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과<sup>4</sup>, 이태섭<sup>1,4</sup>, 최태현<sup>1,4</sup>, 안순혁<sup>1</sup>, 우광선<sup>1</sup>, 정위섭<sup>1</sup>, 권희충<sup>3</sup>, 오옥두<sup>4</sup>, 최창운<sup>1,2</sup>, 임상무<sup>1,2</sup>.

### In Vitro Uptakes of Radiolabeled IVDU and IVFRU in Herpes Simplex Virus Type-1 Thymidine Kinase (HSV1-tk) Gene Transduced Morris Hepatoma Cell Line

Tae Sup Lee,<sup>1,4</sup> M.S., Tae Hyun Choi<sup>1,4</sup> M.S., Soon Hyuk Ahn<sup>1</sup>, M.S., Kwang Sun Woo<sup>1</sup>, B.A., Wee Sup Jeong<sup>1</sup>, B.A., Hee Chung Kwon<sup>3</sup>, Ph.D., Ok Doo Awh<sup>4</sup> Ph.D, Chang Woon Choi<sup>1,2</sup> M.D., Sang Moo Lim<sup>1,2</sup> M.D.

Laboratory of Cyclotron Application<sup>1</sup>, Department of Nuclear Medicine<sup>2</sup>, Laboratory of Molecular Oncology<sup>3</sup>, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences(KIRAMS), Seoul, Korea; Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University<sup>4</sup>, Wonju, Korea

#### Abstract

**Purpose:** The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene(HSV1-tk) is an attractive candidate as a reporter gene in noninvasive reporter gene monitoring system. The HSV1-tk gene was chosen as a reporter gene, because it has been extensively studied, and there are appropriate reporter probes, substrates of HSV1-tk gene product, to apply for HSV1-tk gene imaging. We used radiolabeled 5-iodovinyl-2'-deoxyuridine (IVDU) and 5-iodovinyl-2'-fluoro-2'-deoxyuridine (IVFRU) as reporter probes for HSV1-tk gene monitoring system. **Materials and Methods:** We prepared HSV1-tk gene transduced Morris hepatoma cell line using retroviral vector, MOLTEN containing HSV1-tk gene. And we confirmed the HSV1-tk gene expression by Northern blotting and Western blotting. We compared in vitro uptakes of radioiodinated IVDU and IVFRU to monitor HSV1-tk gene expression in Morris hepatoma cell line (MCA) and HSV1-tk gene transduced MCA (MCA-tk) cells until 480 minutes. We also performed correlation analysis between percentage of HSV1-tk gene transduced MCA cell % (MCA-tk%) and uptakes of radiolabeled IVDU or IVFRU. **Results:** MCA-tk cell expressed HSV1-tk mRNA and HSV1-TK protein. Two compounds showed minimal uptake in MCA, but increased uptake was observed in MCA-tk. IVDU showed 4-fold higher accumulation than IVFRU at 480 min in MCA-tk ( $p < 0.01$ ). Both IVDU and IVFRU uptake were linearly correlated ( $R^2 > 0.96$ ) with increasing MCA-tk%. **Conclusion:** The radiolabeled IVDU and IVFRU showed higher specific accumulation in retrovirally HSV1-tk gene transfected Morris hepatoma cell line. Both IVDU and IVFRU could be used as good substrates for evaluation of HSV1-tk gene expression.

**Key Words:** Radiolabeled IVDU and IVFRU, Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase(HSV1-tk), Gene imaging, Gene therapy

Received December. 1, 2003; accepted February. 6, 2004

Corresponding author : Sang Moo Lim, MD, PhD, Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences(KIRAMS), 215-4 Gongneung-Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-706, Korea

Tel : 82-2-970-1213 Fax : 82-2-970-1341

E-mail : smlim328@kcch.re.kr

※ 이 연구는 과학기술부 원자력 연구개발 중·장기 계획사업의 RI 이용 진료기술개발과제의 연구비 보조로 이루어졌음.

서 론

유전자 치료는 암치료 방법 중에서 치료 유전자를 선택적으로 종양에 전달하여 종양세포를 파괴하는 방법으로서 가장 발전이 기대되는 암 치료 방법 중에 하나이다. 분자생물학의 발전으로 암의 발생원인에 관련된 많은 세포내 기작이 밝혀져 암에 대한 이해의 폭이 넓어졌다. 암세포와 정상세포를 구분하는 기준이 되는 여러 형태의 악성형질들은 대부분 세포의 유전적 변이에 기인한다는 것이 밝혀졌고 유전자 변이에 의해 암 발생이 유도되는 유전자들 즉 암 유전자(oncogene)와 종양억제 유전자 (tumor suppressor gene)들이 발견되어 연구되어 왔다<sup>1,2)</sup>. 따라서 암세포에서 발견되는 유전자 이상을 대상으로 하여 이를 교정, 조절하는 치료법을 개발하고자 하는 노력이 시도되었다. 암의 유전자치료의 임상적용 방법은 다음의 5가지로 나눌수 있다. 유전자 표지 (genetic marking), 암백진(cancer vaccination), 암 유전자 발현의 억제(oncogene antagonism), 종양억제 유전자의 회복(tumor suppressor gene transfer) 그리고 자살 유전자 전달(suicide gene transfer) 등이 있다<sup>3)</sup>.

자살 유전자 전달은 여러 가지 방법을 이용하여 자살 유전자(suicide gene)를 종양세포에 전달한다. 전달된 유전자는 독성을 나타내지 않는 전구약물 (prodrug)을 매우 독성이 높은 물질로 변환하는 효소를 암호화하는 서열을 가진다. 이로써 자살 유전자가 전달된 종양세포 특이적인 세포독성을 나타내어 암을 치료하는 방법이다(Fig. 1). Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV1-tk)는 ganciclovir (GCV)를 triphosphorylated GCV (GCV-TP)로, cytosine deaminase (CD)는 5-fluorocytosine (5-FC)을 5-fluorouracil (5-FU)로, 그리고 xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (XGPRT)는 6-thioxanthine (6-TX)을 triphosphorylated 6-Tx (6-TX TP)로 변형 시킴으로서 종양세포를 살상할 수 있다. 이중에서 HSV1-tk와 GCV를 이용한 유전자 치료방법은 동물 실험과 임상 연구결과에서도 종양에 대한 유전자의 전달 후에 종양 특이적인 치료효과를 나타내고 있으며, 이외에도 다양한 유전자를 이용한 종양의 치료방법이 연구 개발되고 있으며 임상 시험이 진행되고 있다<sup>4)</sup>.

유전자 치료를 위하여 대상 조직 또는 특이적인 장기에 유전자 전달할 때 임상에 적용할 수 있는 비침습적 방법으로 치료 유전자 발현 유무를 평가하

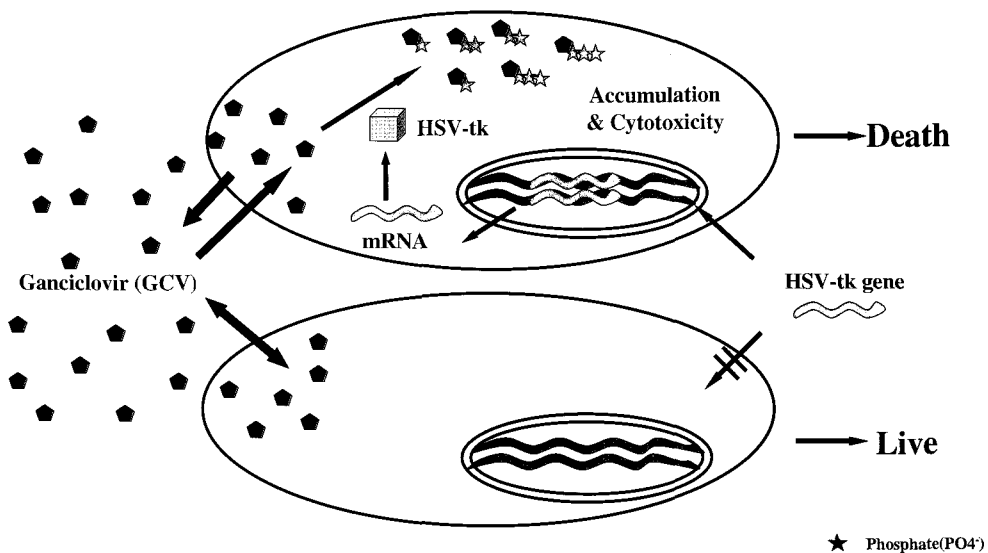


Fig. 1. Gene therapy system using ganciclovir and herpes simple virus thymidine kinase(HSV-tk).

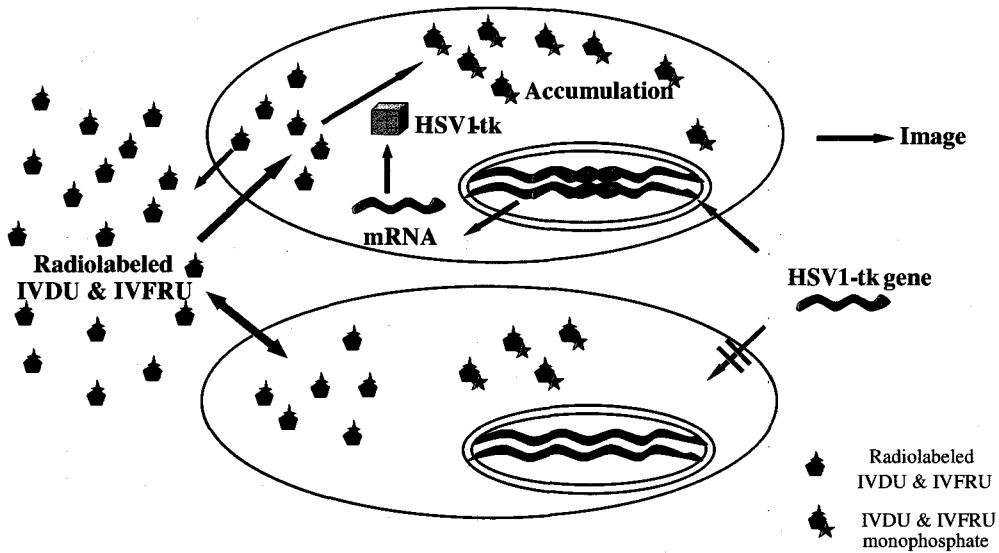


Fig. 2. Principle of nuclear gene imaging of HSV1-tk using IVDU and IVFRU.

는 것은 매우 중요하다. 전달된 치료 유전자를 비침습적 방법으로 평가할 수 있다면, 시간경과에 따른 치료 유전자의 발현 정도, 발현 위치, 그리고 발현 기간 등을 실제 임상에서 손쉽게 모니터링하여 새로운 유전자 치료법의 임상적 유용성을 평가하는 중요한 수단이 될 수 있을 것으로 생각된다.

HSV1-tk 유전자에 적합한 보고 기질(reporter substrate)은 바이러스 감염 치료제를 응용하여 개발되었다. 9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine (acyclovir, ACV), 9-[[1,3-dihydroxy-2-propoxy)-methyl] guanine (DHPG, ganciclovir), 5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine(BVDU) 그리고 1-(2-deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-methyl uracil (FMAU) 등이 단순 헤르페스 바이러스 감염 치료에 효과적인 약물들로 알려져 있으며 동시에 유전자 치료에 사용할 수 있는 전구약물로서 연구되어왔다<sup>5-8)</sup>. 이 중에서 BVDU가 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포의 성장을 억제하는데 FMAU와 GCV보다 약 100배 높은 억제 효과를 나타내었으며, ACV 보다 1,000배 높은 성장 억제 효과를 나타내었다<sup>9)</sup>. BVDU와 유사한 구조를 가진 유도체인 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine(IVDU)가 GCV에 비하여 HSV1-tk 유전자가 발현된 종양세포의 성장을 100배 이상 낮은 농도에서 억제할 수 있

음이 보고되었다<sup>10)</sup>. 그러나 BVDU와 IVDU는 생체 내의 thymidine phosphorylase 효소에 의하여 쉽게 파괴됨으로서 유전자 치료시의 전구약물로서는 사용하기에 어려움이 있었으며, 이러한 단점을 극복하기 위하여 당 구조의 2' 위치를 불소로 치환한 물질로서 ribose 구조를 가진 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxy-2'-fluoro-1-β-D-ribofuranosyluracil (IVFRU)와 arbinose 구조를 가지는 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxy-2'-fluoro-1-β-D-arabinofuranosyluracil (IVFAU)를 합성하여 HSV1-tk 유전자가 이입된 종양세포에서의 성장억제를 측정할 결과 기존의 IVDU에 훨씬 못 미치는 종양세포 성장억제 효과를 나타내었다<sup>11)</sup>. 그럼에도 불구하고 생체내에서 안정성을 나타냄으로서 전구약물로서의 가능성을 가지는 물질로서 인지되었다. 또한 IVDU와 IVFRU는 현재까지 유전자 영상에 가장 많은 연구가 이루어진 uracil nucleoside 유도체인 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil(FIAU) 보다 높은 소수성으로 인해서 혈액 장벽을 쉽게 통과할 수 있는 측면을 장점을 가진 것으로 보고되었다<sup>12)</sup>.

IVDU와 IVFRU는 uracil nucleoside 유도체로서<sup>11)</sup>, 세포내로 이동하여 HSV1-tk 효소에 의하여 인산화되어 세포내에 축적됨으로서 HSV1-tk 유전자

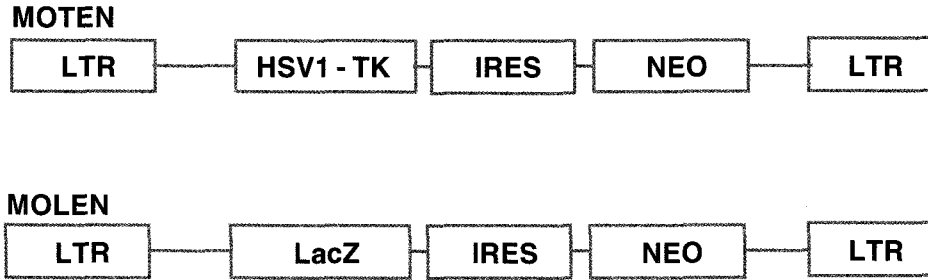


Fig. 3. Structure of recombinant retroviral vectors MOTEN and MOLEN.

LTR: retroviral long terminal repeat, IRES: internal ribosome entry site, Neo: neomycin phosphotransferase, HSV1-tk: herpes simplex virus type-1 thymidine kinase, LacZ: beta-galactosidase.

가 발현되는 세포내에 선택적으로 국소화되어 집적된다(Fig. 2). IVDU의 경우에는 nucleoside phosphorylase에 의하여 쉽게 파괴되어 생체내에서 대사되지만, IVFRU의 경우에는 2' 위치가 불소로 치환되어 N-glycosidic 결합이 안정화되어 이러한 효소들에 의하여 쉽게 파괴되지 않아서 결과적으로 혈장에서 생물학적 반감기가 상당히 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>.

본 연구에서는 유전자 발현 영상을 위하여 retroviral vector를 이용하여 HSV1-tk 유전자를 이입한 간암 세포주를 확립하고, 기 보고된 방사포지 IVDU와 IVFRU의 제조방법<sup>14)</sup>을 개선하여 무담체로 표지한 IVDU와 IVFRU를 이용하여 세포내 섭취를 비교 평가하고, 추가적으로 HSV1-tk 유전자 발현 세포주의 증가 백분율에 따른 각 기질의 섭취율과의 상관관계를 분석함으로써 IVDU와 IVFRU를 이용한 유전자 발현 영상화가 가능한지에 대한 여부를 확인하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. Retroviral vector를 이용한 HSV1-tk 유전자 발현 간암 세포주의 제조

본 실험에서 사용된 MFG plasmid는 HSV1-tk와 neo(neomycin phosphotransferase) 유전자가 subclone된 MOTEN과 HSV1-tk cDNA와 LacZ (E.coli

$\beta$ -galactosidase) cDNA가 subclone된 MOTEL로 미국 harvard 대학의 Dr. R. Mulligan 박사로부터 제공받았다. 이 pMFG vector들은 Mo-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)의 proviral sequence를 포함하고 있으며, MOTEN의 경우 HSV1-tk 유전자는 LTR (Long Terminal Repeat) promoter로부터, neo 유전자는 internal promoter인 IRES (Internal Ribosomal Entry Site)에 의해 발현되는 dicistronic retrovirus vector이며, plasmid size는 8.8 Kb (kilo base)이다. MOTEL의 경우는 MOTEN의 neo 유전자가 LacZ 유전자로 대체된 구조로서 size는 10.8 Kb이다(Fig. 3). HSV1-tk cDNA와 E.coli  $\beta$ -galactosidase cDNA를 지닌 plasmid MOTEL에서 HSV1-tk와 internal promoter인 IRES를 제거하기 위해 제한효소 Nco I와 Xho I으로 절단하였다. 이 plasmid의 양쪽 끝을 blunt end로 만들기 위해 klenow 효소로 중합한 후 self ligation해서 MOL을 만들었다. MOTEN에서 IRES와 neo gene을 지닌 1.4 Kb의 BamH I 절편을 얻어 MOL의  $\beta$ -galactosidase의 stop codon내에 위치한 BamH I 위치에 subcloning하여 MOLEN이라는 retrovirus plasmid vector를 얻었다. MOLEN retroviral producer cell line 제작을 위해 PA317 amphotropic packaging cell line(ATCC CRL 9078, American type culture collection, USA)를 100 mm culture dish 당  $1 \times 10^6$  cell로 분주하여 37°C에서 배양하여 사용하였다. PA317 세포주에 Transfinity<sup>TM</sup> Calcium Phosphate Transfection

System (BRL, Life Technology Inc.) kit을 사용하여 retrovirus plasmid vector를 이입하였다. MOLEN vector와 MOTEN vector를 생산하는 클론들의 선별은 G418 (800ug/ml)로 선별하고 이들 클론에서 생산한 바이러스를 이용하여 다음의 실험에 사용하였다.

Buffalo 랫드의 hepatoma cell line인 MCA-RH 7777 (MCA)을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO, USA)에 10% fetal calf serum을 가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 첫째날에 1×10<sup>6</sup>의 MCA cell을 100 mm culture dish에 plating하였다. 둘째날 4 ml retroviral vector를 8 µg/ml polybrene과 혼합한 후 2 시간동안 감염하였다. 셋째날 1 mg/ml G418이 든 배지로 교환하여 클론이 생길때까지 4 일마다 새로운 배지로 배양한 다음 ring cloning 방법에 의해 clone을 분리하여 HSV1-tk clone들을 얻었다. 얻어진 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포주인 MCA-RH7777-thymidine kinase (MCA-tk) 세포주의 발현을 확인하기 위하여 Northern blot과 Western blot을 시행하였다. total RNA 5 µg을 formamide와 formaldehyde로 변성시킨 후 1% agarose gel에서 전기영동한 후 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane에 transfer하였다. HSV1-tk cDNA를 [<sup>32</sup>P]dCTP를 사용하여 random primer technique으로 방사성 동위원소가 표지된 probe를 만들었다. 이 probe를 1.5×10<sup>7</sup> cpm의 농도로 50% formamide가 포함된 hybridization buffer에서 transfer된 nylon membrane을 가이거미터로 계수하면서 세척한 후, -70 °C에서 X-ray 필름에 감광하였다. 세포를 수거하여 RPIA buffer를 처리하여 세포추출물을 얻은 후 BCA법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 추출한 30 µg의 단백질을 SDS gel에 loading하여 26 mA로 2 시간동안 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 밤새 이동시켰다. 얻어진 membrane에 HSV1-tk 단백질에 대한 가토의 다클론 항체를 각각 결합시킨 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit (Amersham Co.)을 사용하여 필름을 감광하여 현상하였다.

## 2. 방사표지 IVDU와 IVFRU의 제조 및 분리정제

반응관에 5-[2-(Trimethylsilyl) vinyl]-2'-deoxyuridine (TMS-VDU) 또는 5-[2-(Trimethylsilyl) vinyl]-2'-fluoro-2'-deoxyuridine (TMS-VFRU)를 에탄올 5 mg/ml로 녹인 용액 50 µl를 넣고, 1 N HCl 수용액을 100 µl 넣은 후에 Na<sup>125</sup>I (Amersham co, USA)을 10 ~ 100 µl의 용량으로 하여 10 mCi (370 MBq)를 넣고, 산화제로서 30% 과산화수소수 용액을 50 µl 넣은 후에 실온에서 15 분간 반응하면서 3 분간격으로 vortexing하여 반응을 유도하였다. 반응의 종결은 0.1 ml의 포화 NaHSO<sub>3</sub> 용액과 1 ml의 포화 NaHCO<sub>3</sub> 용액을 사용하여 중화하였다. 방사성 요오드가 표지된 5-iodovinyl-2'-deoxyuridine (IVDU)와 5-iodovinyl-2'-fluoro-2'-deoxyuridine (IVFRU)의 분리정제 및 표지수율의 평가는 고분해능 액체 크로마토그래피(HPLC)법을 사용하였다. 컬럼은 µ-Bondapak C-18(Waters Co, USA)을 사용하였고, 전개용액은 acetonitrile (용매 A)과 증류수(용매 B)를 사용하였다. 전개액을 1분에서 5분은 A = 10%, B = 90%의 등속도로 전개하고, 5분에서 10분은 A = 40%, B = 60%의 구배로 전개하며, 10분에서 25분은 A = 40%, B = 60%을 등속도로 전개하며, 25분에서 30분은 A = 10%, B = 90%의 구배로 전개하여 분리정제 하였다. 물질의 분석에는 254 nm에서 흡광도를 측정하고 방사선 측정 장치인 GABI RI detector (Raytest, Germany)를 이용하여 방사능을 계측하였다. HPLC를 이용하여 분리된 분획을 각각 1 ml 씩 fraction collector(Model 2110, Bio-Rad Co, USA)로 분취하고 방사능이 나타나는 분획을 모아서 argon 기류하에서 건조하고 생리식염수로 재건하여 다음 실험에 사용하였다.

## 3. 시험관내 섭취율 실험

Morris hepatoma 세포주인 MCA와 HSV1-tk 유전자가 retrovirus에 의해서 유입된 세포주인 MCA-tk를 6 well plate (Corning, USA)에 우물당 1×10<sup>6</sup> cell (n=3)이 되도록 seeding하고 18 시간 배양하였다. 각각의 세포에 5 µCi (185 KBq)의

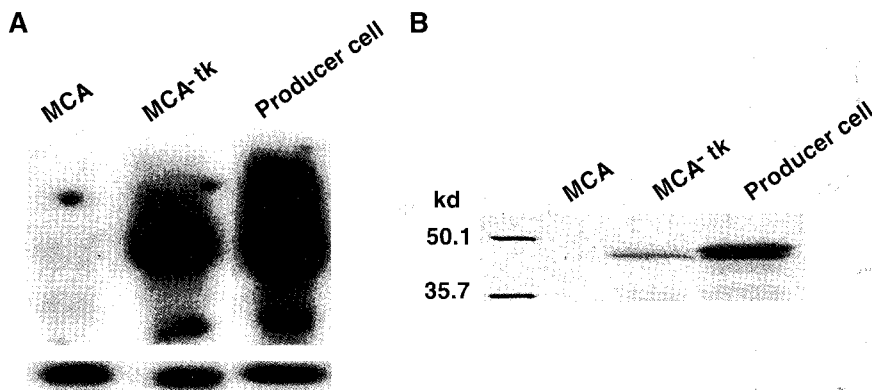


Fig. 4. Analysis of HSV1-tk gene expression of MCA-tk cells. Northern blot(A) and Western blot(B).

<sup>125</sup>IVDU 또는 5  $\mu$ Ci(185 KBq)의 <sup>125</sup>IVFRU 를 넣은 DMEM 3 ml을 각각의 세포에 넣고 15 분, 30 분, 60 분, 120 분, 240 분 그리고 480 분에서 각각의 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 떼어내고 cold PBS 1 ml을 이용하여  $\times 1,000$  rpm에서 원심분리하였으며 추가로 2 회 세척하여 세포내 섭취된 방사능을 우물형태의 NaI crystal을 가진 감마 카운터 (Wallac Wizard co, USA)를 이용하여 측정하여 평가하였다. 섭취율은 투입된 방사능의 백분율(% ID: injected radioactivity dose)로 나타내었다.

#### 4. HSV1-tk 발현 세포주 백분율과 섭취율 상관도 실험

HSV1-tk 유전자가 발현되는 세포의 백분율의 증가와 방사포지 IVDU 또는 IVFRU의 섭취율이 어떠한 상관관계를 나타내는지를 평가하기 위하여 MCA와 MCA-tk 세포를 섞을 때 MCA-tk 세포의 분율이 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%가 되도록  $1 \times 10^5$ 의 세포를 접종하고, 24 시간 배양후 2  $\mu$ Ci (74 KBq)의 <sup>125</sup>IVDU 또는 4  $\mu$ Ci(148 KBq)의 <sup>125</sup>IVFRU 를 각각 첨가하고 4 시간 후에 MCA-tk%에 따른 방사포지 IVDU와 IVFRU의 섭취율을 평가하였다.

#### 5. 통계

실험은 대부분 군당 개체수를 3개로 하여 실험하여 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 통계처

리 방법은 paired student's *t*-test를 사용하여 유의성을 평가하였다.

## 결 과

### 1. Retroviral vector를 이용한 HSV1-tk 유전자 발현 간암 세포주의 제조

MCA-RH7777, MCA-RH7777tk+ 그리고 retrovirus HSV1-tk를 생산하는 PA 317 세포주에서 단백질과 RNA를 추출하여 HSV1-tk 유전자의 발현수준을 비교하였다(Fig. 4). Northern blot의 경우 MCA-RH7777은 HSV1-tk 유전자가 이입되지 않아 발현이 검출되지 않은 반면 MCA-RH7777tk+ 세포주는 3 Kb에서 HSV1-tk 유전자가 발현하는 것이 확인되었고 retrovirus HSV1-tk를 생산하는 PA 317 세포주에서는 3Kb와 6Kb에 걸쳐 비교적 넓은 범위의 band가 검출되어 이입된 HSV1-tk 유전자가 발현한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 모세포주인 MCA-RH7777은 HSV1-tk 유전자가 이입되지 않아 단백질 발현이 검출되지 않은 반면 MCA-RH7777tk+ 세포주는 retrovirus HSV1-tk를 생산하는 PA 317 세포주에서 나타난 47 KDa의 band가 검출되어 이입된 HSV1-tk 유전자가 발현한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

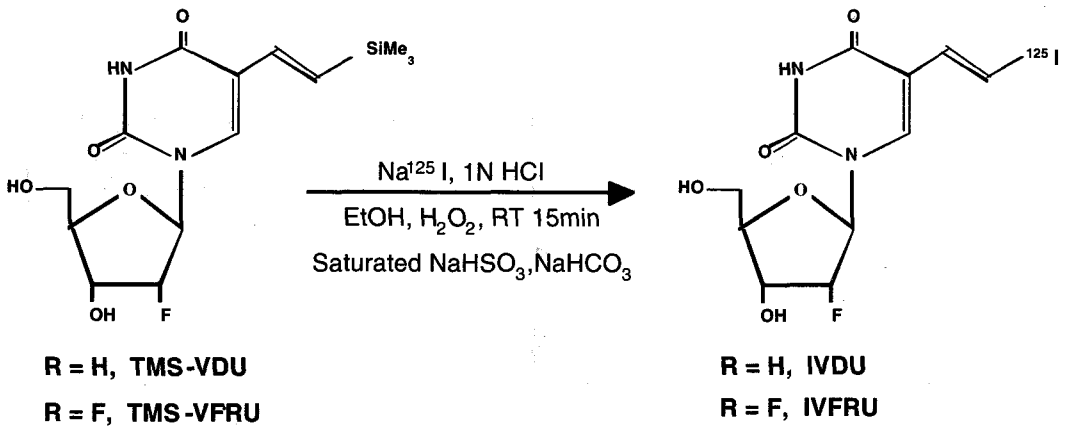


Fig. 5. Synthesis scheme of radioiodinated IVDU and IVFRU.

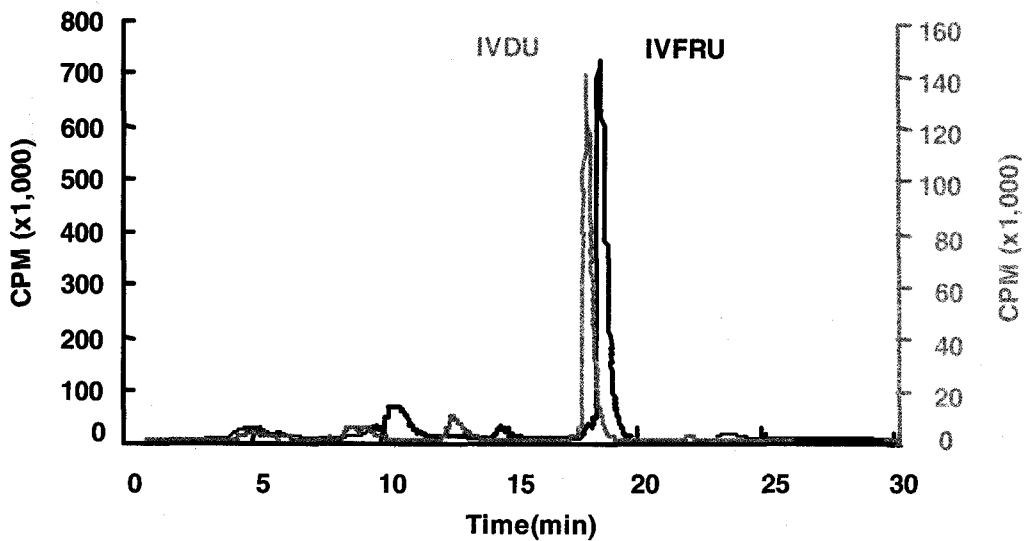


Fig. 6. HPLC analysis of purified radioiodinated IVDU and IVFRU. The radiolabeling yield with  $^{125}\text{I}$  was 84%. The radiochemical purity was more than 98%. The retention time of IVDU and IVFRU was 17.3 min and 18.2 min. IVDU was earlier eluted than IVFRU, because IVFRU was more hydrophobic than IVDU by 2'-fluorine substitution.

## 2. 방사표지 IVDU와 IVFRU의 제조 및 분리정제

담체가 첨가되지 않는 방법을 사용하여 방사성 요오드를 산화제로서 과산화수소수를 이용하여  $\text{Na}^{125}\text{I}$ 를 표지하여 84%의 표지수율을 나타내었다. 반응혼합액을 HPLC를 이용하여 분리정제 하였으

며, Fig. 6에 분리 정제된 방사성 요오드가 표지된 IVDU와 IVFRU의 HPLC 분석 결과를 나타내었다. 분리 정제된 방사성 요오드가 표지된 IVDU와 IVFRU의 방사 화학적 순도는 98%이상으로 확인 되었다. 방사성 요오드가 표지된 IVDU는 17.3 분에서 용출되었으며, IVFRU의 경우에는 18.2 분에 용출되었다. 방사성 요오드 표지 IVDU가 IVFRU

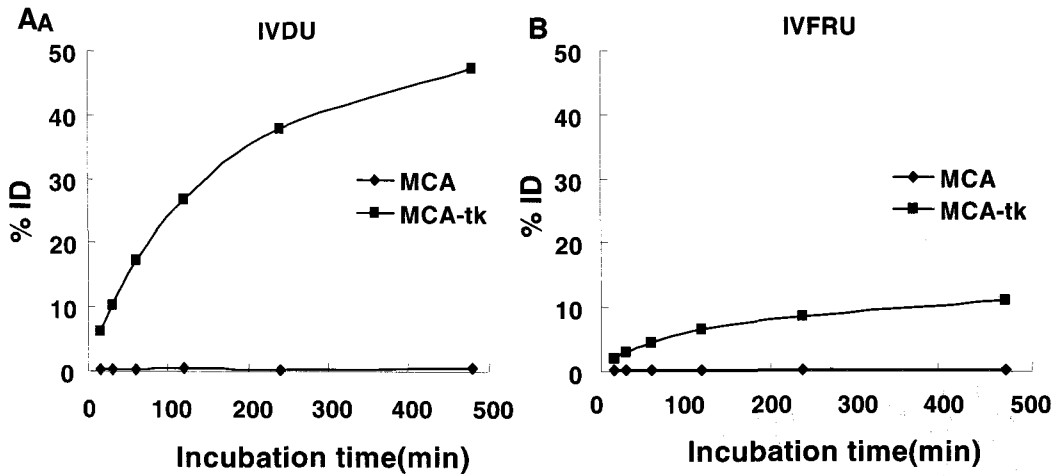


Fig 7. In vitro cellular uptake of IVDU(A) and IVFRU(B) in MCA and MCA-tk cells. Uptake of IVDU and IVFRU was minimal in MCA, but higher accumulation of IVDU and IVFRU was shown in MCA-tk. IVDU showed higher accumulation than IVFRU(P<0.01).

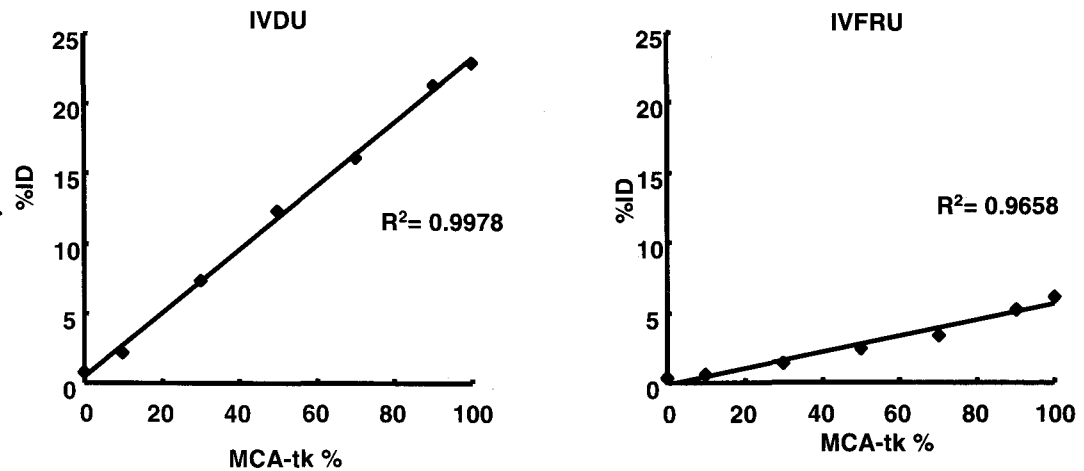


Fig. 8. Correlation between MCA-tk % and cellular uptake of radiolabeled IVDU(A) and IVFRU(B).

보다 0.9 분 정도 빠르게 용출되었으며 이는 IVFRU가 2' 위치에 불소로 치환되어서 소수성이 증가됨으로서 나타나는 결과로 해석된다.

### 3. 시험관내 섭취를 실험

HSV1-tk 유전자가 이입되지 않은 MCA 세포주에서는 방사성 요오드 표지 IVDU와 IVFRU의 섭취가 미미한 것으로 확인되었으며, HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포주에서는 증가된 섭취

율을 나타내어서 HSV1-tk 유전자 이입에 따라 형성된 HSV1-tk 단백질에 의하여 인산화되어 세포 내에 집적되는 것으로 확인되었다(Fig. 7). MCA-tk 세포주에서 방사표지 IVDU의 경우 15분, 30분, 60분, 120분, 240분, 480분에서 각각 6.2 %ID, 10.4 %ID, 17.3 %ID, 26.8 %ID, 37.8 %ID, 47.4 %ID를 나타내었으며(Fig. 7A), 방사표지 IVFRU의 경우에는 각각 2.1 %ID, 3.0 %ID, 4.4 %ID, 6.5 %ID, 8.5 %ID, 11.1 %ID를 나타내었다(Fig. 7B). 방사표



지 IVDU는 MCA세포에 비하여 MCA-tk 세포주에 시간대별로 각각 30 배, 32배, 45 배, 47 배, 100 배, 116 배의 섭취율의 증가가 나타났으며, IVFRU의 경우에는 각각 10 배, 16 배, 12 배, 38 배, 51 배, 37 배의 섭취율의 증가가 나타났다. HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포주에서 IVUD가 IVFRU 보다 시간대별로 각각 3.0 배, 3.4 배, 3.9 배, 4.1 배, 4.4 배, 4.2 배의 증가된 섭취율이 나타났다( $p < 0.01$ ).

#### 4. HSV1-tk 발현 세포주 백분율과 섭취율 상관도 실험

HSV1-tk 유전자 발현을 영상화 할때 유전자 영상과 유전자 발현율간의 상관관계를 평가하기 위하여 HSV1-tk 유전자 이입 세포주인 MCA-tk 세포주의 백분율의 증가와 방사성 요오드 표지 IVDU 또는 IVFRU의 섭취율의 상관관계를 분석하였다. 방사성 요오드 표지 IVDU의 섭취율은 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포수의 증가에 따라서 직선적인 상관관계( $R^2 = 0.998$ )를 나타내었으며(Fig. 8A), IVFRU의 섭취율 또한 MCA-tk 세포수의 백분율이 증가함에 따라 직선적인 상관관계( $R^2 = 0.966$ )를 나타내었다(Fig. 8B). 이로서 IVDU와 IVFRU의 섭취율과 HSV1-tk 유전자의 발현정도가 서로 상관관계가 있음을 확인할 수 있었다.

### 고 찰

본 연구는 ganciclovir와 함께 유전자 치료제로 사용되는 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제(Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase: HSV1-tk)을 이용하여 유전자 발현 영상 기법에 적용하여 HSV1-tk를 보고 유전자(reporter gene)로 사용하고 uracil nucleoside 유도체인 IVDU와 IVFRU를 보고 기질(reporter substrate)로 사용하여 HSV1-tk 유전자의 발현을 영상화 할 수 있는지에 대한 가능성을 시험관내에서 평가하고자 하였다.

유전자의 전달과 발현을 임상에서 모니터링하기 위해서는 보고 유전자와 보고 기질의 적절한 조합에 의해서 가능하다. 유전자 모니터링 시스템

에서 필요한 이상적인 특성들은 다음과 같다. (1) 정상적인 치료대상의 조직에 유전자가 없거나 발현되지 않아야 하며, 보고유전자 산물이 면역학적 반응을 유발하지 않아야 한다. (2) 보고 기질은 정상적으로는 치료대상 조직내에서 대사되지 않거나 천천히 대사되는 물질이어야 하며, 보고 유전자가 발현되는 조직내에서 선택적으로 국소화되고 보고유전자가 발현되지 않는 조직에서는 보고 기질이 집적되지 않아야 한다. (3) 보고 기질은 생체막을 이동하여 세포내로 이동이 가능하여야 하고, 보고 유전자에 의해 형성된 단백질에 의해서 빠르게 대사되어 기질을 영상화하는 동안에 보고 유전자 발현 조직내에 효과적으로 국소화되어야 하며, 또한 집적된 물질의 양이 현재 임상에서 사용되고 있는 영상기법을 이용하여 측정할 수 있는 수준이어야만 한다. (4) 생체내에서 보고 기질의 영상신호가 보고유전자의 mRNA의 발현 정도 또는 단백질의 발현정도와 상관관계가 있어야 한다<sup>12)</sup>. 이러한 측면들을 고려해 볼 때 HSV1-tk 유전자는 1.2 Kb의 비교적 작은 크기의 유전자로서 벡터에 삽입시 크기에 대한 영향이 비교적 적으며 정상적이 포유류의 세포내에 존재하지 않는 바이러스의 유전자로서 내재적인 단백질과 상호관계를 하지 않는 특징을 가지고 있다. 또한 면역 반응을 유발하는 경우도 비교적 낮으며, 목적 유전자와 같이 전달될 경우 목적 유전자와 보고 유전자의 발현율이 직선적인 상관관계를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>.

본 연구에서 제조된 MCA-tk 세포주는 안정적으로 HSV1-tk 유전자를 발현하는 것을 확인할 수 있었으며, lac Z 유전자가 이입된 세포주와의 세포성장 속도가 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아서 HSV1-tk 유전자 이입에 의한 세포의 성장의 차이가 없음을 확인하고 본 실험에 사용하였다.

IVDU와 IVFRU에 다양한 종류의 방사성 요오드를 표지하게 되는데 방사성 요오드의 표지방법에는 크게 담체(carrier)가 첨가되는 반응과 담체가 첨가되지 않는 반응으로 나눌수 있다. 담체가 첨가되는 반응은 단위 무게당 방사능인 비방사능이

낮아서 생체영상을 얻을경우에 영상으로 판독할 수 있을 만큼의 국소적인 섭취가 나타나지 않을 수 있는 단점이 있다. 기존의 연구<sup>14)</sup>에서는 ICI를 담체로 사용하여 표지하는 방법으로 방사성 요오드가 표지된 보고 기질을 사용하였으나, 본 연구에서는 과산화수소를 이용하여 담체가 첨가되지 않은 상태에서 반응을 유도하여 IVDU와 IVFRU에 동위원소를 표지하였다.

많은 연구결과에서 다양한 형태의 uracil nucleoside 유도체인 FIAU, FIRU 그리고 FMAU등과 acycloguanosine 유도체인 FGCV, FHPG, 그리고 FHBG등이 HSV1-tk 유전자 핵영상에 높은 특이도와 민감도를 보이는 것으로 보고하였다. 그러나, 최근의 연구결과에서는 uracil nucleoside 유도체인 FIAU와 FMAU등이 HSV1-tk 유전자가 안정적으로 유전자가 이입되어 발현하는 세포에서의 시험관 섭취율 시험과 생체영상에서 acycloguanosine 유도체인 FHBG와 FHPG 보다 훨씬 더 높은 특이적인 방사능의 집적이 확인되는 것으로 보고 되었다.<sup>16-20)</sup> 이러한 연구결과를 바탕으로 IVDU와 IVFRU를 이용한 HSV1-tk 유전자 발현의 평가 방법은 유용한 것으로 생각되며 본 연구에서 나타난 결과에서도 IVDU는 480 분에서 47.4 %ID를 나타내었으며(Fig. 7A), 방사표지 IVFRU의 경우에는 11.1 %ID를 나타내어 언급된 실험결과와 일치함을 확인하였다.

HSV1-sr39tk와 같이 돌연변이 형태의 보고유전자를 사용하는 경우에는 FHBG/ HSV1-sr39tk 조합이 FIAU/ HSV1-tk 조합 유전자 영상 시스템보다 훨씬 더 민감한 것으로 보고되었으<sup>21)</sup>, 이는 돌연변이 형태의 유전자가 guanosine 계열의 기질에 대한 친화도가 높은 것에 기인한 결과로 해석된다. 본 연구에서와 같이 wild 형태의 HSV1-tk 유전자를 사용하는 경우에는 uracil nucleoside 계열의 기질이 높은 친화도를 나타내어 IVDU와 IVFRU를 이용하는 방법은 유용한 것으로 생각된다.

HSV1-tk 이입세포주인 MCA-tk 세포주에서 IVDU와 IVFRU의 섭취율에는 크게 4 배까지의 차이가 나타났는데 이는 HSV1-tk 효소에 대한 친화도의 차이에 기인하여 세포내에서 방사표지 기

질의 집적정도가 차이가 나는 것으로 생각되며, 추가적으로 섭취율의 차이가 세포막에 존재하는 transporter에 의한 것인지를 평가하기 위하여 세포에서의 섭취 이동경로에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다. 또한 유전자 발현의 영상화에 있어서 보고 유전자의 발현량과 보고 기질의 섭취량과의 상관관계는 매우 중요하며 본 연구에서 제조한 IVDU와 IVFRU는 모두 직선적인 상관관계( $R^2 > 0.96$ )를 나타냄으로서 유전자 발현의 정량적인 평가에 사용하는 데에 유용할 것으로 기대된다.

## 요 약

**목적:** 단순 헤르페스 제 1형 티미딘 키나제(herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene: HSV1-tk)는 GCV와 함께 유전자치료의 한 방법으로서 가장 활발하게 연구되어왔으며, HSV1-tk 효소에 대한 다양한 기질들이 연구되어서 이를 보고 기질로 한 비침습적인 HSV1-tk 유전자 영상시스템에서 가장 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 보고기질로서 방사성 요오드가 표지된 5-iodovinyl-2-deoxyuridine (IVDU) and 5-Iodovinyl-2-fluoro-2-deoxyuridine (IVFRU)를 보고 기질로 하여 HSV1-tk 유전자 영상시스템에서의 유용성을 확인하고자 하였다. **대상 및 방법:** HSV1-tk 유전자 영상을 위하여 HSV1-tk 유전자를 레트로 바이러스 벡터를 이용하여 Morris hepatoma 세포주(MCA-tk)에 이입한 세포주를 제조하였으며, HSV1-tk 유전자의 발현을 확인하기 위하여 Northern blotting과 Western Blotting을 시행하였다. 대조세포주인 MCA와 제조된 MCA-tk 세포주에 방사표지 IVDU와 IVFRU를 이용하여 480분까지 세포내 섭취율을 평가하였으며, 또한 MCA-tk 세포주의 백분율을 증가시키면서 이에 따른 IVDU와 IVFRU의 섭취율을 평가함으로써 섭취율과 세포수와의 상관관계를 평가하였다. **결과:** MCA-tk 세포주에서 HSV1-tk의 mRNA의 발현과 HSV1-TK 단백질의 발현을 확인하였다. 방사성 요오드 표지 IVDU와 IVFRU 모두는 MCA 세포주에서는 아주

낮은 섭취율을 나타내었으며, MCA-tk 세포주에서는 모두 증가된 섭취를 보였다. IVDU가 480분에서 IVFRU보다 4배 높은 섭취를 나타내었다 ( $p < 0.01$ ). 방사표지 IVDU와 IVFRU 모두에서 MCA-tk의 핵분율의 증가에 따라서 직선적인 상관관계( $R^2 > 0.96$ )를 나타내었다. 결론: 방사성 요오드 표지 IVDU와 IVFRU는 HSV1-tk 유전자가 이입된 간암세포주에서 모두 특이적인 높은 섭취율을 나타내고 직선적인 상관관계가 나타나서 두 기질 모두 HSV1-tk 유전자 영상시스템에서 보고 기질로서 유용하게 사용될 수 있을것으로 기대된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.
- 2) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994 ;54:4855-4878.
- 3) Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 1996;23(1):31-45.
- 4) Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 1994;10:174-178 12. Culver KW, Blaese RM. Gene therapy for cancer. *Trends Genet* 1994;10:174-178.
- 5) Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 5716-5720.
- 6) Smee DF, Martin JC, Verheyden JP, Matthews TR. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:676-682.
- 7) De Clercq E, Descamps J, Balzarini J, Fukui T, Allaudeen HS. Antiviral activity of the 3'-amino derivative of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Biochem J* 1983;211(2):439-45.
- 8) Watanabe KA, Reichman U, Hirota K, Lopez C, Fox JJ. Nucleosides. 110. Synthesis and antiherpes virus activity of some 2'-fluoro-2'-deoxyarabinofuranosylpyrimidine nucleosides. *J Med Chem* 1979; 22:21-24.
- 9) Balzarini J, Bohman C, De Clercq E. Differential mechanism of cytostatic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 or type 2. *J Biol Chem* 1993;268:6332-6337.
- 10) Balzarini J, De Clercq E, Verbruggen A, Ayusawa D, Seno T. Highly selective cytostatic activity of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine derivatives for murine mammary carcinoma (FM3A) cells transformed with the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene. *Mol Pharmacol* 1985;28:581-587.
- 11) Balzarini L, Morin KW, Kanus EE, Wiebe LI, De Clercq E. Novel (E)-5-(2-iodovinyl)-2-deoxyuridine derivatives as potential cytostatic agents against herpes simplex virus thymidine kinase gene transfected tumors. *Gene Ther* 1995;2:317-322.
- 12) Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, Blasberg RG. Imaging the expression of transfected genes *in vivo*. *Cancer Res* 1995;55:6126-6132.
- 13) Abrams DN, Lee YW, Mercer JR, KnausEE, Wiebe LI. Tumor uptake of radiolabeled pyrimidine bases and pyrimidine nucleosides in animal models. IX. Radiolabeled 1-(2-fluoro-2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)uracil and 1-(2-chloro-2-deoxy-β-D-ribofuranosyl) uracil. *Br J Radiol* 1986;59:263-268.
- 14) Choi TH, Ahn SH, Choi CW, Lim SM, Awh OD. Synthesis of substrates for gene monitoring of HSV1-tk system. *Korean J Nucl Med* 2002;36:102-109.
- 15) Zinn KR, Chaudhuri TR, Buchsbaum DJ, Mountz JM, Rogers BE. Simultaneous evaluation of dual gene transfer to adherent cells by gamma-ray imaging. *Nucl Med Biol* 2001;28:135-144.

- 16) de Vries EF, van Waarde A, Harmsen MC, Mulder NH, Vaalburg W, Hospers GA. [<sup>11</sup>C]FMAU and [<sup>18</sup>F]FHPG as PET tracers for herpes simplex virus thymidine kinase enzyme activity and human cytomegalovirus infections. *Nucl Med Biol* 2000;27:113-119.
  - 17) Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, Finn R, Bornmann W, Thaler H, Conti PS, Blasberg RG.. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of *HSV1-tk* gene expression. *J Nucl Med* 2002;43:1072-1083.
  - 18) Wang HE, Deng WP, Chang PF, Chang CW, Liu RS, Lin WJ, Ting G. Evaluation and comparison of <sup>18</sup>F-FHBG and <sup>131</sup>I-FIAU as gene probes in gene therapy [abstract]. *J Nucl Med* 2002;43(Suppl):274.
  - 19) Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, Hall FL, Conti PS. Comparative evaluation of FMAU and acycloguanine derivatives, FHPG and FHBG in MDA-MB-468 breast cancer cells for gene therapy imaging [abstract]. *J Nucl Med* 2002;43(Suppl):275.
  - 20) Brust P, Haubner R, Friedrich A, Scheunemann M, Anton M, Koufaki ON, Hauses M, Noll S, Noll B, Haberkorn U, Schackert G, Schackert HK, Avril N, Johannsen B. Comparison of [<sup>18</sup>F]FHPG and [<sup>124/125</sup>I]FIAU for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. *Eur J Nucl Med* 2001;28:721-729.
  - 21) Min JJ, Iyer M, Gambhir SS. Comparison of [<sup>18</sup>F]FHBG and [<sup>14</sup>C]FIAU for imaging of *HSV1-tk* reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. *Eur J Nucl Med* 2003;30:1547-1560.
-