

조직 특이 발현 Sodium Iodide Symporter 유전자 이입에 의한 방사성옥소 간암세포 치료와 광학영상을 이용한 치료효과 평가

경북대학교 의과대학 핵의학교실¹, 경북대학교 치과대학 구강생화학교실²
장병국¹ · 이유라¹ · 이용진¹ · 안순주¹ · 류민정¹ · 윤선미¹ · 이상우¹ · 유정수¹ · 조제열²
이재태¹ · 안병철¹

Radioiodine Therapy of Liver Cancer Cell Following Tissue Specific Sodium Iodide Symporter Gene Transfer and Assessment of Therapeutic Efficacy with Optical Imaging

Byoung-Kuk Jang, M.D., Ph.D., You La Lee, M.S., Yong Jin Lee, Ph.D., Sohn Joo Ahn, M.S.,
Min-Jung Ryu, M.S., Sun-Mi Yoon, M.S., Sang-Woo Lee, M.D., Jeongsoo Yoo, Ph.D.,
Je Yeol Cho, Ph.D., Jaetae Lee, M.D., Ph.D., and Byeong-Cheol Ahn, M.D., Ph.D.

¹Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, ²Department of Biochemistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: Cancer specific killing can be achieved by therapeutic gene activated by cancer specific promotor. Expression of sodium iodide symporter (NIS) gene causes transportation and concentration of iodide into the cell, therefore radioiodine treatment after NIS gene transfer to cancer cell could be a form of radionuclide gene therapy. luciferase (Luc) gene transfected cancer cell can be monitored by *in vivo* optical imaging after D-luciferin injection. Aims of the study are to make vector with both therapeutic NIS gene driven by AFP promoter and reporter Luc gene driven by CMV promoter, to perform hepatocellular carcinoma specific radioiodine gene therapy by the vector, and assessment of the therapy effect by optical imaging using luciferase expression. **Materials and Methods:** A Vector with AFP promoter driven NIS gene and CMV promoter driven Luc gene (AFP-NIS-CMV-Luc) was constructed. Liver cancer cell (HepG2, Huh-7) and non liver cancer cell (HCT-15) were transfected with the vector using liposome. Expression of the NIS gene at mRNA level was elucidated by RT-PCR. Radioiodide uptake, perchlorate blockade, and washout tests were performed and bioluminescence also measured by luminometer in these cells. *In vitro* clonogenic assay with I-131 was performed. *In vivo* nuclear imaging was obtained with gamma camera after I-131 intraperitoneal injection. **Results:** A Vector with AFP-NIS-CMV-Luc was constructed and successfully transfected into HepG2, Huh-7 and HCT-15 cells. HepG2 and Huh-7 cells with AFP-NIS-CMV-Luc gene showed higher iodide uptake than non transfected cells and the higher iodide uptake was totally blocked by addition of perchlorate. HCT-15 cell did not showed any change of iodide uptake by the gene transfection. Transfected cells had higher light output than control cells. *In vitro* clonogenic assay, transfected HepG2 and Huh-7 cells showed lower colony count than non transfected HepG2 and Huh-7 cells, but transfected HCT-15 cell did not showed any difference than non transfected HCT-15 cell. Number of Huh-7 cells with AFP-NIS-CMV-Luc gene transfection was positively correlated with radioiodine accumulation and luciferase activity. *In vivo* nuclear imaging with I-131 was successful in AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected Huh-7 cell xenograft on nude mouse. **Conclusion:** A Vector with AFP promoter driven NIS and CMV promoter driven Luc gene was constructed. Transfection of the vector showed liver cancer cell specific enhancement of I-131 cytotoxicity by AFP promoter, and the effect of the radioiodine therapy can be successfully assessed by non-invasive luminescence measurement. (Nucl Med Mol Imaging 2008;42(5):383-393)

Key Words: tissue specific promoter, AFP, radioiodine, luciferase, gene therapy, molecular imaging

• Received: 2007. 12. 28. • Accepted: 2008. 6. 5.
• Address for reprints: Byeong-Cheol Ahn, M.D., Ph.D., 50, Sam-
duck 2ga, Chung-go, Daegu, 700-721, Korea
Tel: 82-53-420-5583, Fax: 82-53-422-0864
E-mail: abc2000@knu.ac.kr
※ 본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RT104-03-02) 지원으로
수행되었음

서 론

나트륨 옥소 공동 수송체(Sodium iodide symporter: NIS)
는 세포막 단백질로 13개의 transmembrane domain을 가지

고 있으며, 2개의 나트륨 이온과 한 개의 옥소 이온을 갑상선 세포내로 이동시키는 역할을 한다.¹⁻⁴⁾ NIS를 발현하는 분화 갑상선암의 옥소 축적능을 이용하면 재발 여부 및 재발 부위의 진단이나 수술로 제거가 불가능한 병소의 치료에 핵의학 적 기법을 이용할 수 있어,⁵⁾ NIS의 발현이 갑상선암이 예후가 좋은 암 가운데 하나가 되게 하는데 중요한 역할을 하고 있다.⁶⁾

인간과 백서의 NIS 유전자가 1996년에 클로닝 된 이후, 많은 연구자들이 갑상선암의 고용량 방사성옥소 치료법을 모방한 NIS 유전자 이입을 이용한 악성종양의 유전자 치료법 연구결과들을 발표하고 있다.^{2-4,7)} 악성종양내로 NIS 유전자를 이입하면, 악성종양 세포막에 NIS 단백질 발현되고, 이 세포는 옥소 축적능을 가지게 된다. 베타선을 방출하는 I-131을 투여하게 되면, NIS 유전자가 발현되는 암세포는 I-131을 세포내로 축적하여 사멸되며, 모든 암세포가 NIS 유전자를 발현하지 않더라도 I-131의 비정거리로 인한 cross firing 효과로 인해 옥소를 축적하지 않은 주위세포들도 사멸될 수 있다.⁸⁾

조직 특이 프로모터는 특정한 세포에서만 유전자가 발현되게 하는 프로모터로 유전자의 발현을 특이 조직 혹은 세포에 한정시키는 데 이용할 수 있다. NIS 유전자를 조직 특이 프로모터와 함께 이입하면, 비록 다양한 세포에 유전자가 이입되더라도 옥소 섭취능은 프로모터의 특이성에 따라 한정된 세포에서만 발현되게 된다.⁹⁾ 조직 특이 프로모터로는 전립선세포에서만 발현되는 prostate specific antigen 프로모터,¹⁰⁾ 간암세포에만 발현되는 alpha fetoprotein (AFP) 프로모터, 갑상선 세포 조직에서만 발현되는 thyroglobulin 프로모터, 수질 갑상선암에서만 발현되는 calcitonin 프로모터,¹¹⁾ 심근세포에서만 발현되는 alpha-myosin heavy chain 프로모터 등이 있다.¹²⁾

분자영상은 세포의 근원적 현상, 생체 기전을 영상화하는데 시간적 정보와 공간적 정보를 함께 평가하는 연구기법으로 질병의 조기 진단, 신약의 개발 및 유전자 치료의 발전에 큰 도움을 줄 것으로 예상되고 있다.¹³⁾ 리포터 유전자 발현을 이용한 분자영상은 체내 영상을 통하여 반복적으로 정량적인 세포의 분포를 알려 줄 수 있어 세포의 추적, 유전자 치료영상, 내인적 유전자 발현영상 등에 이용할 수 있다. 발광을 이용하는 광학분자영상은 예민도가 높으며, 실시간으로 판단할 수 있으며, 비용이 적게 든다는 장점이 있어 소동물에 이용한 분자영상에 널리 이용된다.^{14,15)} 이러한 광학영상용 리포터 유전자를 치료유전자와 함께 이입할 하면, 치료유전자에 의한 세포사멸 효과를 리포터 유전자 발현을 이용하여 정량적으로 평가 할 수 있다고 알려져 있다.¹⁴⁾

본 연구는 간암세포에 간암 특이 프로모터인 AFP 프로모터의 조절을 받는 NIS유전자와 CMV 프로모터의 조절을 받

는 Luciferase (Luc) 유전자를 이입하여, 간암세포의 NIS 유전자 치료법 적용시 AFP 프로모터를 이용한 특이성을 알아 보았으며, 또한 이러한 치료효과를 광학영상용 리포터 유전자인 Luc 유전자 동시이입을 통하여 비침습적 평가법의 가능성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 유전자 이입용 벡터 제작

1) AFP 프로모터에 조절 받는 NIS 유전자 벡터 제작

일본 Hokkaido 대학 Dr. Nakabayashi로 부터 얻은 AFP enhancer 부분¹⁶⁾과 GSTP 프로모터를 가진 pGL3-AFP-GSTP 벡터를 template로 하여 *Kpn* I과 *EcoR* I 제한효소 부위를 붙인 primer를 이용하여 PCR 기법으로 생산하였다. 미국 Ohio 대학의 Jhiang으로부터 받은 NIS 유전자를 가진 pcDNA3 벡터를 template로 하여 양쪽 모두 *EcoR* V 제한효소 부위를 붙인 primer를 이용하여 PCR 기법으로 생산하였다. pcDNA3 벡터의 multiple cloning site에 *Kpn* I과 *EcoR* I 제한 효소로 전처리를 시행한 다음 앞에서 얻어진 AFP 프로모터 부분을 연결하였으며, *EcoR* V 제한효소로 처리한 후 앞에서 제작해 높은 NIS 유전자를 삽입하였다.

2) CMV 프로모터에 조절 받는 Luc 유전자 벡터 제작

Luc 유전자가 있는 pGL3-Luciferase 벡터(Promega Co, USA)를 template로 하여, *Hind* III와 *Xba* I 제한효소 부위를 붙인 primer를 이용하여 PCR 기법으로 생산하였다. pcDNA3 벡터의 multiple cloning site에 *Hind* III와 *Xba* I 제한 효소로 전처리를 시행한 다음 앞에서 얻어진 Luc 유전자를 삽입하였다.

3) AFP 프로모터 조절 NIS 유전자와 CMV 프로모터 조절 Luc 유전자 벡터 제작

AFP 프로모터 조절 NIS 유전자가 포함된 pcDNA 벡터를 template로 하여, *Kpn* I와 *Not* I 제한효소 부위를 붙인 primer를 이용하여 PCR 기법으로 AFP 프로모터 조절 NIS 유전자를 제작하였다. CMV 프로모터 조절 Luc 유전자가 포함된 pcDNA 벡터를 template로 하여, *Xho* I 제한효소 부위를 붙인 primer를 이용하여 PCR 기법으로 CMV 프로모터 조절 Luc 유전자를 제작하였다. AFP 프로모터 조절 NIS 유전자와 CMV 프로모터 조절 Luc 유전자가 동시 발현되는 벡터 제작(AFP-NIS-CMV-Luc)은 아래와 같이 시행하였다. 먼저 pShuttle 벡터의 multiple cloning site에 *Kpn* I와 *Not* I 제한 효소로 전처리를 시행한 다음, 앞서 얻어진 AFP 프로

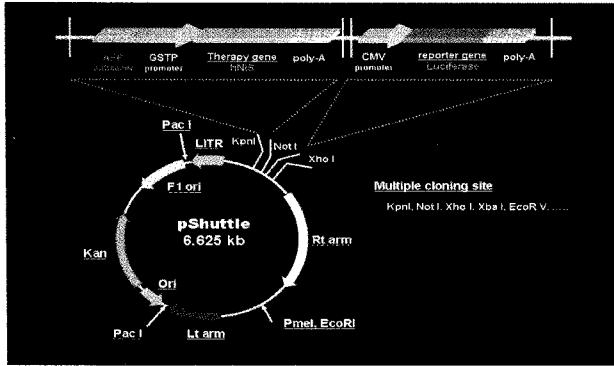


Figure 1. Construction of pShuttle vector with both NIS gene driven by AFP promoter and Luc gene driven by CMV promoter.

모터 조절 NIS 유전자 부분을 연결하였으며, *Xho I* 제한효소로 처리한 후, 앞서 제작해 높은 CMV 프로모터 조절 Luc 유전자를 삽입하였다(Fig. 1).

2. 세포주

AFP가 발현되는 사람 간암세포주인 HepG2와 Huh-7와 AFP가 발현되지 않는 사람 대장암 세포주 HCT-15를 실험에 이용하였다. HepG2와 Huh-7 세포는 10% FBS (GibcoBRL Co, USA), 1% antibiotic-antimycotic 100X solution (GibcoBRL Co, USA)가 첨가된 D-MEM 배양액에서 배양하였으며, HCT-15 세포는 10% FBS (GibcoBRL Co, USA)가 첨가된 RPMI-1640 배양액에서 배양하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 각 세포주의 배양액내 AFP 농도는 표 1과 같았다(Table 1).

3. AFP-NIS-CMV-Luc 벡터 유전자 이입

먼저 AFP-NIS-CMV-Luc 벡터를 각각의 세포에 이입하고자 각 세포를 2×10^5 세포를 24 well plate에 유전자 이입용 배양액을 이용하여 분주하였다. 24시간 후 AFP-NIS-CMV-Luc 벡터를 0.4 μ g DNA와 Plus reagent (Invitrogen Co, USA)를 혼합한 후 상온에서 15분간 방치하였다. 그 후 1 μ Liposome (Lipofectamine plus, Invitrogen Co, USA)을 혈청이 없는 배양액에 앞에서 만들어 놓은 AFP-NIS-CMV-Luc 벡터와 Plus reagent와 혼합 후 실온에서 15분간 반응을 한 후, 각 well에 50 μ l 씩 첨가 하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 7시간 배양하고 새 배양액을 750 μ l 씩 첨가하였다. DNA의 유전자 이입 후 24시간에 배지를 교환 하였다. 이입된 유전자의 발현 여부 및 기능평가는 AFP-NIS-CMV-Luc 벡터를 이입 후 48시간이 경과한 후 실험을 시행하였다.

Table 1. Concentrations of AFP in Supernatant of Culture Medium

Cell lines	AFP concentration (ng/ml/1 X 10 ⁵ cell day)
HepG2	1271.4
Huh-7	331.4
HCT-15	0.15

4. 방사성옥소 섭취율 측정

시간별 방사성옥소 섭취율을 알아보기 위하여 HepG2, Huh-7과 HCT-15 세포를 24 well 배양용기 한 well 당 2×10^5 세포를 접종 후 liposome으로 유전자 이입을 하였다. 48시간 배양한 후 0.1 μ Ci/0.5 ml의 방사성옥소(I-125)와 10 mM NaI가 첨가된 HBSS (Hanks balanced salt solution, Invitrogen, USA)를 각 well에 0.5 ml씩 넣었다. 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 15, 30, 60 분간 배양하였다. 각 시간마다 차가운 2 ml HBSS 로 두 번 수세하고 2% SDS로 세포 용해 후 감마선 계측기(Cobra II, Packard, USA)로 세포 안에 섭취된 방사능을 측정하였다. 각 섭취된 세포의 단백질 양을 측정하고자 BCA 단백질 정량 키트(Pierce Co, USA)를 사용하였다. NIS 유전자의 기능을 측정하기 위한 방사성옥소 섭취율 측정 시 50 μ M의 KClO₄를 첨가하여 ClO₄⁻에 의해 옥소의 섭취가 저해되는지를 평가하였다. 방사성옥소의 섭취율은 pmol/mg protein으로 환산하여 평가하였다. 방사성옥소 섭취정도로 유전자가 이입된 세포 수를 예측할 수 있는지를 알아보기 위하여, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 세포를 0.125×10^6 , 0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 개를 배양하여 위와 동일한 방법으로 방사성옥소 섭취율을 측정하였다.

5. 방사성옥소의 유출량 측정

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2와 Huh-7 세포에서 섭취된 방사성옥소의 유출량을 측정하였다. 방사성옥소의 섭취율 측정과 같이 0.2 μ Ci/ml의 I-125와 10 mM의 NaI가 들어있는 HBSS를 넣고 37 °C에서 30분간 배양한 후 차가운 HBSS로 두 번 씻어낸다. 다시 HBSS를 넣고 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 27분에 HBSS를 회수하여 각 시간의 회수된 HBSS에서의 유출된 방사성옥소의 방사능을 감마선 계측기로 측정하였다. 측정된 방사성옥소는 백분율로 환산하여 평가하였다.

6. Luc 발현능 측정

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2, Huh-7과 HCT-15 세포에서 luciferase의 발현능을 측정하고자, 유전자 이입 후 48시간에 차가운 PBS로 2회 수세 후 1 X lysis buffer로 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 4°C, 12000 rpm

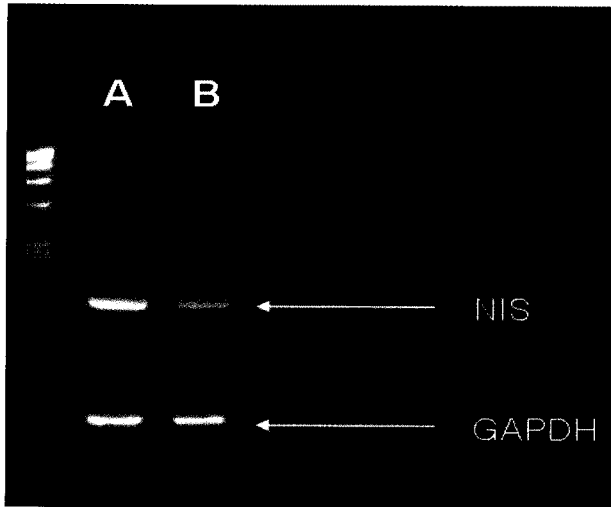


Figure 2. mRNA expression of NIS gene in NIS gene transfected HepG2 cell line. Lane A, CMV-NIS gene transfection, Lane B, AFP-NIS-CMV-Luc gene transfection.

으로 원심분리 후 상층액을 -20°C 에 보관하며 사용하였다. $20\ \mu\text{l}$ 용해된 세포액에 $100\ \mu\text{l}$ Luciferin액(Promega Co, USA)을 혼합 후 luminometer로 측정하였다. Luc 발현 정도로 유전자가 이입된 세포 수를 예측할 수 있는지를 알아보기 위하여 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 세포를 0.125×10^6 , 0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 개를 배양하여 위와 동일한 방법으로 발광을 측정하였다.

7. I-131 세포독성능 측정(Clonogenic assay)

HepG2, Huh-7과 HCT-15 세포를 T75 flask에 5×10^6 개씩 분주하고 liposome으로 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자를 각 세포에 이입시킨 48시간 후 HBSS로 세척하였다. HBSS로 0.25, 0.5 mCi I-131을 희석하고 각각의 Flask에 희석액을 넣어 7시간 동안 배양하였다. HBSS로 2회 세척한 후에 Trypsine-EDTA를 처리해서 세포를 회수하고 6 well 배양기에 well 당 1×10^3 개의 세포를 넣고 37°C 에서 7일 동안 배양하였다. 1X PBS로 3회 세척하고 crystal violet solution (0.5 g crystal violet 250 ml, 40% formaldehyde 25 ml, ethanol 50 ml, water 175 ml) 500 μl 씩 분주하여 염색한 후, 세포수가 30개 이상인 집락을 측정하였다. 평균과 표준 편차를 구하고 세포의 생존율을 백분율로 환산하였다

8. 동물 모델

Nude 마우스(Balb/c nu/nu, 수컷, 5주령)를 사용하였고, 모든 동물은 경북대학교병원 의학연구소 동물 실험실에서 정

상적으로 사용하였다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh-7 세포를 2×10^7 개로 제조 후 nude 좌측 대퇴부 피하주사를 하였다.

9. 체내영상 획득

생체 내에서 이식된 세포의 NIS유전자의 발현을 측정하고자 세포이식 2시간 후 0.5 mCi의 I-131을 복강으로 주사하였다. 주사 2시간 후 바늘구멍 조준기가 장착된 감마카메라(Infinia II, GE, USA)를 이용하여 영상을 획득하였다.

10. 통계처리

통계적 처리는 SPSS 12.0K for windows 프로그램을 사용하였다. 두 군간의 비교는 student t test 를 이용하였으며, p 값이 0.05이하인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 간암 세포주에서의 NIS 유전자 발현 및 방사성옥소 섭취율 측정

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2 세포는 NIS 유전자가 발현됨을 RT-PCR로 확인할 수 있었다.(Fig. 2)

HepG2와 Huh-7 세포의 방사성옥소 섭취율은 15분에 각각 23과 39 pmol/mg protein이었고, 30분에는 79와 61 pmol/mg protein이었으며, 60분에는 129과 91 pmol/mg protein이었다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자를 이입시킨 HepG2와 Huh-7 세포의 방사성옥소 섭취율은 15분에 각각 41과 737 pmol/mg protein으로 섭취 되었고, 30분에는 98와 807 pmol/mg protein으로 섭취되었고, 60분에는 161과 678 pmol/mg protein으로 섭취되어 NIS 유전자 발현에 의해 방사성옥소의 섭취증가가 있었다.

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2와 Huh-7 세포에 ClO_4^- 를 처리 시 방사성옥소 섭취율이 15분에 각각 22과 50 pmol/mg protein이었고, 30분에는 75와 58 pmol/mg protein이었고, 60분에는 123과 83 pmol/mg protein으로, NIS 유전자 발현에 의해 증가된 옥소 섭취율이 ClO_4^- 에 의해 완전히 저해 되었다. 그러나 AFP가 발현되지 않는 대장암 세포주인 HCT-15세포의 15분, 30분 60분 방사성옥소 섭취율은 70, 169, 165 pmol/mg protein으로 이었으며, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자를 이입 시 방사성옥소의 섭취율은 15분, 30분 60분에 74, 150, 143 pmol/mg protein으로 유전자 이입 전과 차이가 없었다(Fig. 3, 4, 5).

Iodide uptake (pmol/mg protein)

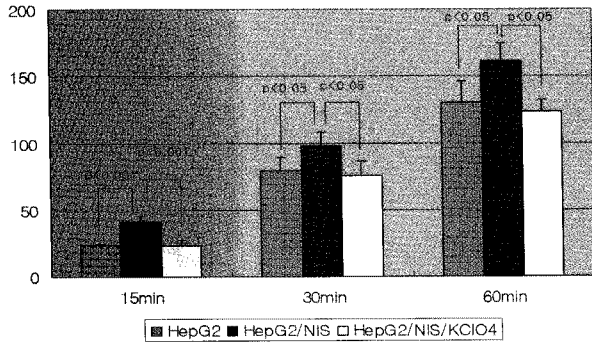


Figure 3. Change of iodide uptake by AFP-NIS-CMV-Luc gene transfection and perchlorate inhibition in HepG2 cell. HepG2/NIS means AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected HepG2 cell. HepG2/NIS/KClO₄ means KClO₄ pretreated HepG2/NIS.

Iodide uptake (pmol/mg protein)

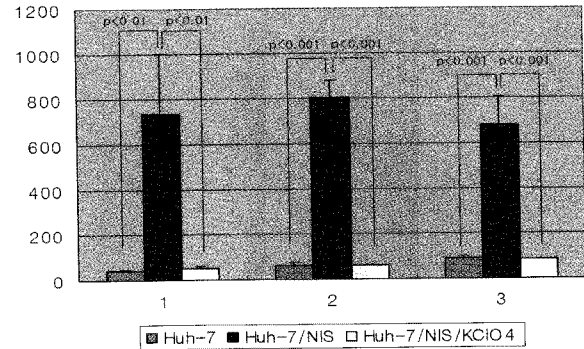


Figure 4. Change of iodide uptake by AFP-NIS-CMV-Luc gene transfection and perchlorate inhibition in Huh-7 cell. Huh-7/NIS means AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected Huh-7 cell. Huh-7/NIS/KClO₄ means KClO₄ pretreated Huh-7/NIS.

Iodide uptake (pmol/mg protein)

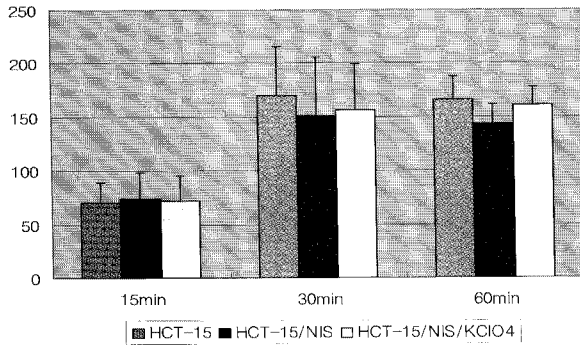


Figure 5. Change of iodide uptake by AFP-NIS-CMV-Luc gene transfection and perchlorate inhibition in HCT-15 cell. HCT-15/NIS means AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected HCT-15 cell. HCT-15/NIS/KClO₄ means KClO₄ pretreated HCT-15/NIS.

2. 방사성옥소 유출량 측정

30분간 방사성옥소를 섭취시킨 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2와 Huh-7 세포에서의 방사성옥소 유출의 반감기는 약 4분과 6분으로 각각 나타났다(Fig. 6).

3. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 간암 세포 주에서의 Luciferase 발현 측정

HepG2, Huh-7 세포의 Luciferase의 발현은 74와 32 RLU (relative light uptake)/2×10⁵ cells 로 나타났으며, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2, Huh-7세포에서는

Retention of radioactivity (%)

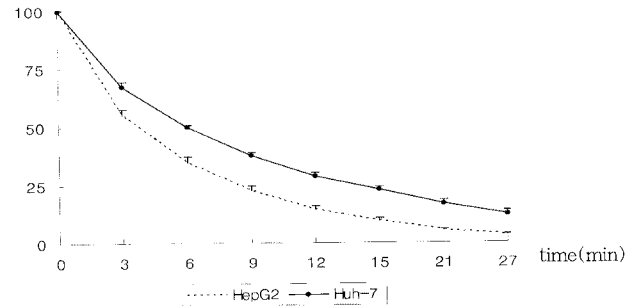


Figure 6. Retention of radioactivity in AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected HepG2 and Huh-7 cells.

Luciferase의 발현 정도는 241와 441 RLU/2 X 10⁵ cells로 나타났다(Fig. 7).

4. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입에 의한 I-131에 의한 독성 증가

HepG2 세포에 I-131 0.25 mCi로 처리한 경우, I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 73%와 81% 인데 비하여, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입 HepG2 세포는 I-131 0.25 mCi로 처리한 경우 I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 51%로 감소가 있었다(Fig. 8).

Huh-7 세포에 I-131을 0.25 mCi와 0.5 mCi를 처리한 경우, I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 98%와

Relative light uptake

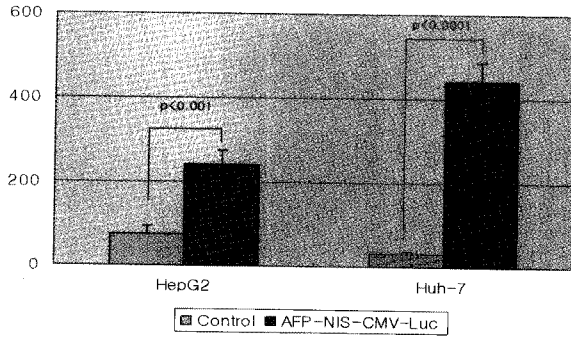


Figure 7. Luciferase activity in control and AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected HepG2 and Huh-7 cells. AFP-NIS-CMV-Luc means AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected cell lines.

Percentage survival

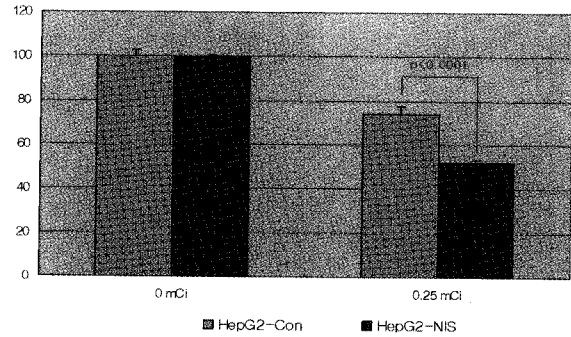


Figure 8. Clonogenic assay. In an *in vitro* clonogenic assay, HepG2 cell and HepG2 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene were exposed to 0 and 0.25mCi of I-131. HepG2 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene showed lower survival rate than control HepG2 cell.

Percentage survival

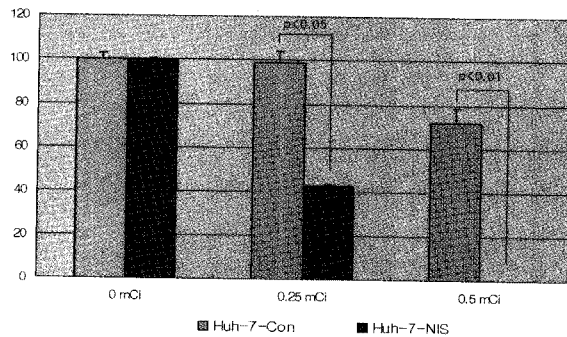


Figure 9. Clonogenic assay. In an *in vitro* clonogenic assay, Huh-7 cell and Huh-7 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene were exposed to 0, 0.25 and 0.5 mCi of I-131. Huh-7 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene showed lower survival rate than control Huh-7 cell.

Percentage survival

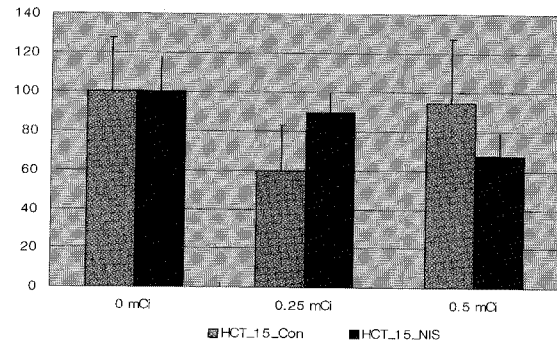


Figure 10. Clonogenic assay. In an *in vitro* clonogenic assay, HCT-15 cell and HCT-15 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene were exposed to 0, 0.25 and 0.5 mCi of I-131. There was no significant difference of survival rate between two cells.

71% 인데 비하여, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입 Huh-7 세포는 I-131을 0.25 mCi를 처리한 경우 I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 42%로 감소하였으며, I-131을 0.5 mCi를 처리한 경우 콜로니 형성이 관찰되지 않았다 (Fig. 9).

HCT-15 세포에 I-131을 0.25 mCi와 0.5 mCi를 처리한 경우, I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 59%와 94% 인데 비하여, AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입 HCT-15 세포는 I-131을 0.25 mCi와 0.5 mCi를 처리한 경우 I-131을 처리하지 않은 경우에 비하여 콜로니 형성이 89%와 67%였다(Fig. 10).

5. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh-7 세포의 숫자에 따른 방사성옥소 섭취 및 Luc 발현 측정

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh 7 세포 수에 따라 방사성옥소 섭취율이 증가하였으며, luciferin 투여 시 luciferase 활성도 증가에 따른 발광량이 증가하였다(Fig. 11, 12).

6. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 종양의 소동물영상

AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh-7 세포를 누드마우스의 좌측 대퇴부 피하에 주사한 2시간 후 I-131 500

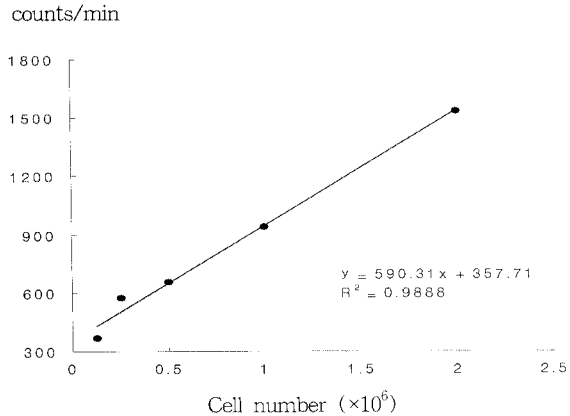


Figure 11. Increase of Iodide uptake by increase of AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected cell number.

uCi를 투여한 후 바늘구멍 조준기를 장착한 감마카메라 영상에서 이식 종양부위에 방사능 축적이 관찰되었다(Fig. 13).

고 찰

간 세포암은 세계적으로 4번째로 흔한 암이며, 우리나라에서도 위암, 폐암에 이어 세 번째로 흔한 암으로(11.3%)^{17,18)} 완치를 위한 근치적 절제술은 간내 다발성 암종, 간 외 전이, 기저 간기능 저하, 간문맥 내 종양 침습 등으로 인하여 불가능한 경우가 많다.^{19,20)} 이러한 수술적 치료의 제한점으로 인해 현재 간동맥 화학색전술(Transcatheter arterial chemo-embolization), 경피적 에탄올 주입술(Percutaneous ethanol injection therapy), 고주파 열치료(Radiofrequency ablation), 항암제치료 등 다양한 비수술적 치료법들이 시도되고 있으나, 이 치료법들 역시, 기저 간기능, 종양의 크기 및 위치, 간문맥 침범, 간 외 전이에 의한 영향이 적지 않으며, 효과 또한 제한적인 경우가 많아, 새로운 치료 방법의 개발이 절실하다.

최근 분자생물학 기법의 발전에 따라 간 세포암의 특성과 분자생물학적 기술을 기반으로 하는 유전자 치료법, 방사성 핵종 표지 항체 치료술, 펩타이드 수용체 방사성핵종 치료술 등 새로운 치료법이 연구되어 지고 있다. 유전자 치료는 악성 종양 치료법 가운데 매우 좋은 장점을 가진 치료법 중 하나이다.²¹⁾ 악성종양에 치료 효과를 가지는 물질을 만들어 낼 수 있는 유전자를 가진 벡터를 혈관을 통해 전신으로 투여할 경우, 원발 부위는 물론 눈에 보이지 않는 미세 전이부위나 혈관 내에 있는 종양세포에도 치료효과를 발휘할 수 있다.²¹⁾ 이 용되는 치료 유전자로 p53, Fas, p202, E1A, BAX, Bik, PEA3과 같이 세포고사를 일으키는 유전자와 전구약제를 독

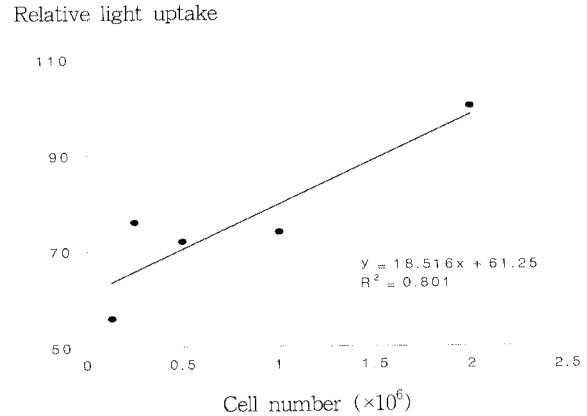


Figure 12. Increase of luciferase activity by increase number of AFP-NIS-CMV-Luc gene transfected cell.

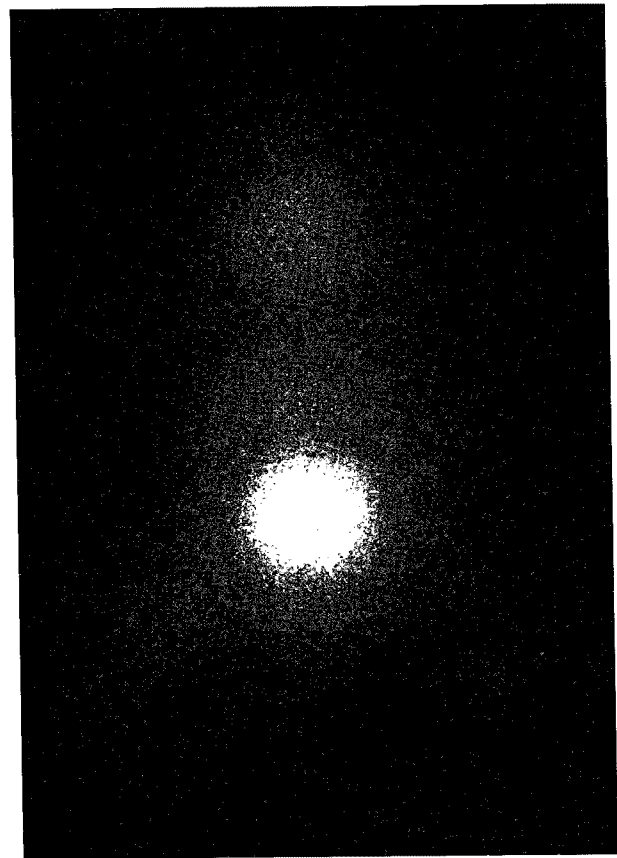


Figure 13. I-131 Whole body scintigraphic images of tumor bearing nude mouse. The mouse was subcutaneously transplanted with Huh-7 cell with AFP-NIS-CMV-Luc gene. Radiocaine accumulation (red arrow) was measured 2 hour after intraperitoneal injection of 0.5 mCi of I-131.

성대사물질로 대사시키 세포를 사멸시키는 thymidine kinase 및 cytosine deaminase와 같은 자살유전자,²²⁾ 세포독성을 가지는 물질을 세포내에 축적시키는 NIS 유전자 등이 있다.^{24,7)} NIS 유전자는 양성 혹은 악성 갑상선 세포가 가지는 옥소를 축적 할 수 있는 특성을 이용하는 원리로, 갑상선암 전이가 진행된 경우에도 제거가 가능한 정상 및 악성 갑상선조직의 외과적 절제 후에 제거가 불가능한 병소를 방사성옥소로 효과적으로 치료할 수 있다는 점에서 착안하게 되었다. 1996년 Carrasco 등²⁾이 흰쥐의 갑상선 세포주인 FRTL-5 세포에서 만들어진 흰쥐 NIS 유전자를 클로닝하고, Jhiang 등³⁾이 인간 NIS 유전자를 클로닝 하게 된 후 NIS 유전자의 연구가 활발해 졌으며, 이러한 NIS 유전자의 클로닝은 갑상선 세포에서 옥소 운반의 기전을 이해하는데 중요한 역할을 하였을 뿐만 아니라 *in vivo* 영상법 개발과 또한 유전자 치료도 가능케 하였다.^{5,23)}

유전자 치료의 연구 영역 중 극복하여야 할 영역 하나가 낮은 유전자 이입효율로 치료가 필요한 모든 세포에 치료 유전자가 이입되지 않는다는 점이다. 이러한 낮은 유전자 이입효율을 극복하는 하나의 방법으로 유전자 치료가 유전자가 이입되지 않은 주위세포에 사멸효과를 나타낼 수 있는 유전자이다. NIS 유전자는 주위세포에 사멸효과를 보이는 대표적인 예 가운데 하나로, NIS 유전자 이입 후 투여되는 I-131은 NIS 유전자가 이입되지 않은 세포도 주위세포의 유전자 이입에 의한 I-131 축적과 이로 인한 베타선 방출로 세포사가 발생할 수 있다.³⁴⁾

유전자 치료 시 이입 할 치료 유전자의 프로모터 부분을 악성종양 혹은 특이세포에서만 발현하는 프로모터를 도입하면, 종양세포에만 특이하게 치료유전자가 발현하게 할 수 있어, 방사선치료나 항암제치료가 가지지 못한 종양이 아닌 정상조직의 손상을 줄일 수 있다는 장점을 가진으로 인하여 유전자 치료법에서 왕성이 연구되고 있는 영역이다.²¹⁾ 갑상선조직에서 특이 발현되는 Thyroglobulin 프로모터, 간세포 특이성이 있는 알부민 프로모터, 전립선암 특이성이 있는 PSA 프로모터, 간암 세포 특이성이 있는 AFP 프로모터 등이 있다.⁹⁻¹²⁾

AFP 프로모터는 간암세포에서 AFP의 발현을 일으키는 주요원인으로 작용하며, 이로 인하여 AFP 프로모터는 간암 세포의 특이하게 유전자를 작동시키기에 이상적인 프로모터이다. 본 연구에는 일본 Hokkaido 대학의 Dr. Nakabayashi로부터 AFP enhancer A 및 B domain을 포함하는 AFP 프로모터를 PCR 법으로 제작하여 실험에 사용하였다.

본 연구에서는 치료용 유전자로 NIS유전자를 이용하였으며, 간암세포에서만 유전자 발현이 일어나게 하기 위해 AFP 프로모터를 이용하였다. 이렇게 제작된 벡터를 이입한 결과, 비간암세포인 인체대장암 HCT-15 세포에서는 옥소 축적능

에 차이가 없었으나, 간암세포의 경우 옥소축적능이 작게는 1.5배에서 18배까지 높게 되는 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험에서는 HepG2가 Huh7 세포보다 AFP의 발현정도가 더 높으나, AFP 프로모터 조절 NIS 유전자의 이입에 의한 옥소축적능은 예상과 달리 Huh7 세포에서 더 높게 나타났다. 이는 이 두 세포 사이의 유전자 이입효율의 차이에 의해 발생할 수 있다고 생각된다. 즉 AFP enhancer의 발현이 높은 세포라도 NIS 유전자의 이입효율이 낮다면 HepG2 세포에서 NIS 단백질의 전체 생산량은 낮아져 이로 인하여 AFP 합성이 많은 HepG2 세포가 더 낮은 옥소섭취능을 가질 수 있다.

NIS 유전자가 이입된 세포에서의 옥소 유출 반감기는 비교적 짧은 세포에서 빠른 시간내에 배출되는 것으로 보고되고 있다. Dywer 등²⁵⁾은 아데노바이러스를 이용하여 NIS를 이입한 경우 옥소의 유출 반감기가 5.6분으로 발표하였으며, Haberkorn 등²⁶⁾은 세포내 옥소의 59%가 10분 내에 세포외로 배출된다고 보고하였다. 또한 Willhauck 등²⁷⁾은 투여된 옥소의 70~80%가 20분 내에 세포외로 배설되나, 본 연구와 동일하게 베타선을 방출하는 치료용 방사성핵종인 I-131에 7시간 노출시킨 경우 세포사멸 효과가 78%에 이른다고 보고하였다. 본 연구에서는 옥소 유출반감기가 4~6 분 정도로 나타났으며, 이는 세포주의 종류나 유전자 발현 정도에 따라 차이를 일으킬 수 있다고 생각된다. 본 연구에서도 대조군 세포에 비하여 NIS 유전자가 이입된 세포에서 세포사멸효과가 높게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 특히 옥소 섭취능 증가가 높았던 NIS 유전자 이입 Huh-7세포의 경우 0.5 mCi의 I-131 처리 시 모든 세포가 사멸하는 결과를 나타내었다.

하지만 NIS 유전자 이입에 의하여 세포내로 섭취된 옥소는 *in vitro* 실험에서 배출률이 높아, *in vivo* 적용 시 갑상선 세포에 비하여 방사성옥소 투여 시 세포 사멸효과가 낮을 수 있으므로, NIS 유전자가 이입된 세포에서 옥소의 배출을 감소시키는 방법의 추가는 NIS 유전자 치료법의 성능을 획기적으로 상승시킬 수 있을 것으로 생각되고 있다.²⁸⁾ 갑상선에서 일어나는 옥소의 유기화가 옥소의 갑상선 정체를 일으키므로, NIS 유전자 이입 종양 내에서도 옥소의 유기화가 종양내 옥소 저류를 일으키는지에 대한 연구가 필요하다고 생각되고 있다.^{5,23)}

본 연구의 실험의 결과는 AFP 프로모터에 의한 발현되는 NIS 유전자를 이입한 경우 간암세포에서 옥소 축적능이 다른 세포에 비해 상대적으로 높고, I-131 투여시 간암세포의 사멸 효과 있으므로 간암의 유전자 치료에 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 치료 유전자로 NIS 유전자를 이용하면, 영상화를 위한 복잡한 방사성 의약품의 합성이나 표지 과정 없이 I-123, Tc-99m, I-124로 감마카메라 및 PET 영상을 얻을 수

있어 NIS 유전자의 발현을 비침습적으로 쉽게 평가할 수 있고, 연이어 I-131, Re-188을 투여함으로써 치료로 쉽게 진행해 나갈 수 있다는 장점이 있다.

분자영상은 분자생물학적 연구기법과 영상과학 기술이 접목된 새로운 영상기법으로 비침습적으로 살아있는 생물에서 분자 및 세포 수준의 현상을 영상화 하는 분야로, 이러한 연구는 생리적 혹은 병리적인 현상을 더 쉽게 이해하게 해주며, 질환의 진단과 치료기법 발전에 기여할 새로운 연구영역으로 각광을 받고 있다.^{15,29)}

분자영상기법 가운데 예민도가 가장 높다고 알려진 광학분자영상법에 Luc 유전자가 널리 이용되는데 이는 다양한 유기체에 존재하는데 박테리아, 반딧불이, 산호, 해파리 등에 존재하며, 이 유전자에 의해 생산된 luciferase는 luciferase 종류에 따른 기질과 반응하여 빛을 내게 된다.^{15,30,31)} 발광영상은 형광과 달리 배경신호가 거의 없어 매우 민감한 결과를 나타내게 된다. 본 연구의 *in vitro* 실험에서 Luc 유전자가 이입된 세포수의 증가에 따라 발광량이 증가하는 것으로 나타나, *in vivo* 광학영상으로 얻은 발광량으로 생체내 유전자이입세포수를 예상할 수 있어 비침습적인 영상으로 종양크기의 감소 혹은 증가를 예측할 수 있다고 판단된다.

본 연구에서 Luc 유전자의 발현정도로 세포수를 예측할 수 있음을 실험으로 확인하였으며, 이는 방사성옥소를 이용한 치료시 세포 사멸 후 남은 종양세포 숫자를 Luc 유전자 발현으로 판단할 수 있음을 예측할 수 있다.

본 연구에서 이입한 유전자는 NIS 유전자 발현을 이용한 핵의학 영상 및 I-131을 이용한 치료가 가능하고, Luc 유전자 발현을 이용한 발광을 이용한 광학영상으로 치료정도를 비침습적으로 평가가 가능한 유전자임을 알 수 있었다. 즉 NIS 유전자는 AFP 프로모터에 의해 발현되게 되므로 간암세포에서만 특이 발현되게 되어, 이입한 유전자가 전달된 모든 세포를 파악할 수 없으나, 항상 발현되는 CMV 프로모터에 의해 조절되는 Luc 유전자가 동시에 이입되므로 유전자가 이입된 모든 세포를 파악할 수 있었다. 이는 본 연구에서 제작된 유전자가 종양세포 내 이입 후 I-131 치료 시, 세포사멸효과를 Luc 유전자를 이용한 광학영상으로 평가할 수 있다는 점을 예상할 수 있다.

본 연구에서는 유전자가 이입된 세포를 유전자를 이입한 후 안정세포주(stable cell line)을 얻어 소동물에 이입한 후 체내 영상을 얻는 경우 이식된 세포주가 종양을 형성한 후 영상을 획득하나, 본 연구에서는 일과성 유전자이입(transient transfection)을 시행한 세포를 누드마우스 이식하였으므로, 유전자 발현이 시간경과에 따라 감소함을 고려하여, 이식한 후 2시간에 바로 영상을 얻었다.

NIS 유전자 이입 후 I-131 투여를 이용한 치료를 임상에 적용할 때 정상 갑상선 조직에 의한 치료의 실패 혹은 치료 부작용이 발생할 가능성이 높다. 이는 정상 갑상선 조직에서 투여된 I-131을 축적하게 됨으로 발생되므로 NIS 유전자 이입 후 I-131 치료 이전에 수술 등을 통한 정상 갑상선 조직의 제거가 필수적이다.⁶⁾ 이 외에도 전신에 퍼져있는 치료하고자 하는 다발성 종양내로 안전하면서도 효율적으로 NIS 유전자를 전달하는 방법 개발이 유전자치료법의 필수적인 선결 과제이다.⁵⁾

조직 및 세포 특이 프로모터의 발전으로 다양한 악성종양 특이적인 유전자 발현이 가능해 지고, 치료용 유전자의 발현을 강화시킬 수 있는 방법들도 속속 개발되고 있어 유전자 치료법의 현실화가 점점 다가오고 있다. 특히 치료용 동위원소를 축적하는 유전자를 이용한 유전자 치료법은 유전자가 이입되지 않은 주위의 악성종양세포도 사멸시킬 수 있는 장점으로 인하여 향후 더 많은 발전이 기대되는 분야이다.

본 연구는 간암세포 특이성이 있는 AFP 프로모터에 의해 발현되는 NIS 유전자와 CMV 프로모터에 의해 발현되는 Luc 유전자와 함께 클로닝하여 간암세포에 이입한 후 I-131을 투여하여 간암세포를 치료를 시행하였으며, NIS 유전자 이입 후 투여된 I-131의 세포 사멸효과를 Luc 유전자 발현에 의한 광학영상으로 확인할 수 있었다. 향후 소동물 종양 모델에서도 시험관내와 동일한 효과를 나타내는 지에 대한 연구가 필요하다.

요 약

목적: 조직 특이 프로모터를 이용하면 특정 암조직내에서만 원하는 치료유전자를 발현시킬 수 있다. 나트륨 옥소 공동수송체(sodium iodide symporter: NIS) 유전자는 옥소를 섭취하는 특성을 가져 방사성옥소를 이용한 치료용 유전자로 사용될 수 있다. 광학 영상용 유전자인 luciferase (Luc) 유전자를 세포에 이입하면 비침습적으로 유전자가 이입된 세포의 상태를 평가할 수 있다. 본 연구는 간암 특이성을 나타내는 AFP 프로모터에 의해 발현이 조절되는 NIS 유전자와 CMV 프로모터에 의해 발현되는 Luc 유전자를 간암세포에 이입하여 NIS 유전자 이입에 의한 방사성옥소 유전자치료의 효과를 알아보고, 종양 사멸 정도를 광학 리포터 유전자 발현으로 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** AFP enhancer와 GSTP 프로모터를 연결하여 AFP 프로모터를 제작하였으며 이를 NIS유전자와 연결하였다. 또한 CMV 프로모터에 조절 받는 Luc 유전자를 동시에 삽입하여 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 발현 벡터를 생산하였다. 실험 대상 세포주로는 간암세포주인 HepG2와 Huh-7

세포와 사람 대장암세포주인 HCT-15 세포를 이용하였다. AFP-NIS-CMV-Luc 발현벡터를 Liposome을 이용해 실험대상 세포주 내로 이입하였으며, 방사성옥소 섭취율과 방사성옥소의 유출량을 측정하였다. 또한 Luciferase 발현 정도를 luminometer로 측정하였으며, clonogenic assay를 통하여 I-131에 대한 세포주에 따른 사멸효과 차이를 알아보았다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입 세포주를 누드마우스에 대퇴부 피하에 주입하여 I-131 추적여부를 감마카메라 영상을 획득하였다. **결과:** AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 발현 벡터를 제작하였다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2와 Huh-7 세포의 방사성옥소 섭취율은 유전자 이입이 되지 않은 대조군 HepG2와 Huh-7 세포에 비하여 높았으며, $KClO_4$ 를 처리시 옥소 섭취가 저해되었다. 대장암 세포주인 HCT-15세포에 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자를 이입 시 방사성옥소의 섭취율은 증가되지 않았다. 30분간 방사성옥소를 섭취시킨 AFP-NIS-Luc 유전자가 이입된 HepG2와 Huh-7 세포에서의 방사성옥소의 유출반감기는 약 4분과 6분으로 각각 나타났다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 HepG2, Huh-7세포의 Luc 유전자의 발현은 $241, 441 \text{ RLU}/2 \times 10^5$ cells 로 나타났으며, 대조군 HepG2와 Huh-7세포에서의 Luc 유전자의 발현은 $74, 32 \text{ RLU}/2 \times 10^5$ cells로 나타났다. HCT-15 세포는 AFP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입에 따라 I-131에 의한 세포 사멸능이 증가되지 않았으나, HepG2 및 Huh-7 세포는 FP-NIS-CMV-Luc 유전자 이입에 따라 I-131에 의한 세포 사멸능이 증가되었으며, Huh-7 세포의 경우 0.5 mCi의 I-131을 투여한 경우 모든 세포가 사멸하였다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh-7 세포수가 많을수록 방사성옥소 섭취율이 증가하며 luciferase 활성도도 높게 나타났다. AFP-NIS-CMV-Luc 유전자가 이입된 Huh-7 세포를 이식한 누드마우스에 I-131 감마카메라 영상에서 중앙이식부위에 방사능 축적을 관찰 할 수 있었다. **결론:** AFP 프로모터의 의하여 NIS 유전자가 발현되며, CMV 프로모터에 의한 Luc 유전자가 발현되는 벡터를 제작하였으며, 이 벡터를 이입한 경우 간암세포에 서만 I-131의 세포 독성이 증가하는 효과를 나타내었다. 또한 Luc 유전자를 이용하여 비침습적인 광학 영상으로 세포사멸 효과를 확인할 수 있었다. 간암특이 프로모터에 조절되는 치료 유전자와 광학리포터 유전자를 한 벡터에 동시에 이입하면 간암 특이 유전자 치료와 그 치료효과를 비침습적으로 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

AFP enhancer를 제공한 일본 Hokkaido 대학 Dr. Nakabayashi에 감사드립니다.

References

- Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochem Biophys Acta* 1993;1154:65-82.
- Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
- Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:339-45.
- Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997;138: 3555-8.
- Spitzweg C, Morris JC. Approaches to gene therapy with sodium/iodide symporter. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001; 109:56-9.
- Mazzaferri EL. An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 1999;9:421-7.
- Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3327-35.
- Dingli D, Russell SJ, Morris JC 3rd. *In vivo* imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter. *J Cell Biochem* 2003;90:1079-86.
- Hart IR. Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy. *Semin Oncol* 1996;23:154-8.
- Adams JY, Johnson M, Sato M, Berger F, Gambhir SS, Carey M, Iruela-Arispe ML, Wu L. Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging. *Nat Med* 2002;8:891-7.
- Cengic N, Baker CH, Schutz M, Goke B, Morris JC, Spitzweg C. A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4457-64.
- Hadjantonakis AK, Dickinson ME, Fraser SE, Papaioannou VE. Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* 2003;4:613-25.
- Kang JH, Lee DS, Paeng JC, Lee JS, Kim YH, Lee YJ, Hwang DW, Jeong JM, Lim SM, Chung JK, Lee MC. Development of a sodium/iodide symporter-transgenic mouse for imaging of cardiomyocyte-specific reporter gene expression. *J Nucl Med* 2005;46:479-83.
- Serganova I, Blasberg R. Reporter gene imaging: potential impact on therapy. *Nucl Med Biol* 2005;32:763-80.
- Cassidy PJ, Radda GK. Molecular imaging perspectives. *J R Soc Interface* 2005;2:133-44.
- Nakabayashi H, Koyama Y, Suzuki H, Li HM, Sakai M, Miura Y, Wong NC, Nishi S. Functional mapping of tissue-specific elements of the human alpha-fetoprotein gene enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:773-85.
- 통계청. 2002년 사망원인 통계 결과. 통계청 홈페이지 (www.nso.go.kr)
- 대한민국 보건복지부, 국립암센터. 한국중앙암등록사업 23차 2002년도 보고서. 2003.
- Lai EC, Fan ST, Lo CM, Chu KM, Liu CL, Wong J. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma. An audit of 343 patients. *Ann Surg* 1995;221:291-8.
- Colleoni M, Audisio RA, De Braud F, Fazio N, Martinelli G,

- Goldhirsch A. Practical consideration in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Drugs* 1998;55:367-82.
21. Lo HW, Day CP, Hung MC. Cancer-specific gene therapy. *Adv Genet* 2005;54:235-55.
 22. Dilber MS, Gahrton G. Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Intern Med* 2001;249:359-67.
 23. JY Cho. Molecular imaging using sodium iodide symporter. *Korean J Nucl Med* 2004;38:152-160.
 24. Scholz IV, Cengic N, Baker CH, Harrington KJ, Maletz K, Bergert ER, Vile R, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Ther* 2005;12:272-80.
 25. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits *in vivo* radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. *Hum Gene Ther* 2006;17:661-8.
 26. Haberkorn U, Kinscherf R, Kissel M, Kübler W, Mahmut M, Sieger S, Eisenhut M, Peschke P, Altmann A. Enhanced iodide transport after transfer of the human sodium iodide symporter gene is associated with lack of retention and low absorbed dose. *Gene Ther* 2003;10:774-80.
 27. Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Klutz K, Cengic N, Wolf I, Mohr L, Geissler M, Senekowitsch-Schmidtke R, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Alpha-fetoprotein promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther* 2008;15:214-23.
 28. Elisei R, Vivaldi A, Ciampi R, Faviana P, Basolo F, Santini F, Traino C, Pacini F, Pinchera A. Treatment with drugs able to reduce iodine efflux significantly increases the intracellular retention time in thyroid cancer cells stably transfected with sodium iodide symporter complementary deoxyribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2389-95.
 29. Chung JK. General Perspectives for Molecular Nuclear Imaging. *Korean J Nucl Med* 2004;38:111-114.
 30. Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* 2001;19:316-7.
 31. Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 2001;4:297-306.