

폐암의 유전자 치료법을 위한 암특이적인 PRC1 프로모터

조영화 · 윤혜진¹ · 권희총² · 김희종 · 조성하 · 강봉수 · 김연주 · 설원기^{1*} · 박기량^{**}

충북 청원군 내수읍 덕암리 산4, 주성유전자치료기술센터, ¹부산시 부산진구 개금동 633-146, 인제대학교 뇌과학기술연구소, ²서울시 도봉구 공릉동 한국원자력의학원

Received July 17, 2008 / Accepted October 21, 2008

A Cancer-specific Promoter for Gene Therapy of Lung Cancer, Protein Regulator of Cytokinesis 1 (PRC1). Young-Hwa Cho, Hye Jin Yun¹, Heechung Kwon², Heejong Kim, Sung-Ha Cho, Bong-Su Kang, Yeun-Ju Kim, Wongi Seol^{1*} and Keerang Park^{**}. *Juseong Gene Therapy R&D Center, Juseong College, Chungbuk 363-794, Republic of Korea, ¹Institute for Brain Science and Technology, Inje University, Gaegumdong, Busanjin-gu, Busan 614-735, Korea, Republic of Korea, ²Division of Radiation Cancer, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul 139-706, Korea* - We have recently reported the PRC1 promoter as a promoter candidate to control expression of transcriptionally targeted genes for breast cancer gene therapy. We tested whether the PRC1 promoter could be also applied for the lung cancer gene therapy. In the transient transfection assay with naked plasmids containing the luciferase fused to the PRC1 promoter, the promoter showed little activity in the normal lung cell line, MRC5. However, in the lung cancer A549 cells, PRC1 showed approximately 30-fold activation which was similar to the survivin promoter, the gene whose promoter has been already reported as a candidate for the gene therapy of lung cancer. In viral systems, the PRC1 promoter showed approximately 75% and 66% of transcriptional activity compared to the CMV promoter in the adeno-associated virus (AAV) and the adenovirus (AV) systems, respectively. However, the PRC1 promoter in either AAV or AV showed approximately 20% activity compared to the CMV promoter in the normal lung cells. In addition, human lung tumor xenograft mice showed that the PRC1 promoter activity was as strong as the CMV activity *in vivo*. Taken together, these results suggested that PRC1 might be a potential promoter candidate for transcriptionally targeted lung cancer gene therapy.

Key words : Gene therapy, protein regulator of cytokinesis 1, lung cancer, promoter

서 론

유전자 치료는 원래 특정 유전자의 돌연변이로 인한 질병을 치료하기 위하여, 인위적으로 야생종 유전자를 환자의 세포에서 발현하여 정상 단백질을 발현하도록 하여 병을 치료하는 방법으로 개발되었다. 현대 생물학과 의학의 발전으로 이제 유전자 치료법은 유전자의 돌연변이로 인한 질병뿐 아니라 암과 같은 질병에서도 특정 유전자의 발현 촉진이나 억제로 암세포를 제거하거나 암의 원인을 제거하여 암을 치료하는 개념으로 발전하고 있다[11]. 이러한 유전자 치료에는 적절한 표적세포의 선택, 표적 세포만을 특이적으로 죽일 수 있는 치료유전자[16], 표적세포에만 치료 유전자를 전달할 수 있는 유전자 전달 방법[3,5], 표적세포에서만 특이적으로 이 유전자를 과발현할 수 있는 발현 프로모터의 개발[6] 등이 필

수적이다. 치료유전자로는 암세포만을 선택적으로 죽일 수 있는 bcl-2, bcl-xs 등 세포자멸사에 관련된 유전자[2,10], 바이러스의 thymidine kinase 같은 독성 유전자[15] 등이 여러 종류의 전달 방법을 통해 다양한 조직의 암세포에서 그 효과가 연구되어 왔다. 이러한 치료유전자를 과발현하기 위해서는 일반적으로 CMV 프로모터가 사용되었다. 하지만 CMV 프로모터는 그 대상유전자를 과발현한다는 장점이 있지만, 암세포와 정상세포를 구별하지 못하기 때문에 대상 유전자가 정상세포에 전달되었을 경우에도 대상유전자를 강하게 발현시켜 오히려 부작용을 야기하는 문제점이 있다. 이 때문에 표적 암세포에서만 대상유전자를 특이적으로 과발현하고, 표적유전자가 정상 세포에 전달되었을 경우에 그 유전자 발현이 억제되어 이 치료법의 부작용을 최소화시킬 수 있는, 대상 암세포 특이적인 프로모터의 개발은 암 유전자치료법의 중요한 부분으로 연구되어 왔다. 현재로는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT, [13]), survivin (BIRC5, [1,18]) 등이 여러 암세포에서 효율적임이 보고되었고, 특정 암세포에만 작용하는 프로모터들도 다수 보고되었다[4,7,17,19].

폐암은 암 치료의 획기적인 발전에도 불구하고 조기진단법이 아직 개발되지 않아서, 그 생존률이 15% 밖에 되지 않

*Corresponding author

Tel : +82-51-892-4184, Fax : +82-51-892-0059
E-mail : wseol@inje.ac.kr

**Corresponding author

Tel : +82-43-210-8462, Fax : +82-43-210-8465
E-mail : krpark@jsc.ac.kr

는다. 이러한 폐암의 치료를 위해서 다양한 방법이 연구되고 있는데 유전자 치료법도 그 하나이다. 폐암의 유전자 치료용 프로모터로는 survivin [1], secretory leukoprotease inhibitor (SLPI; [12]), insulinoma-associated 1 (INSM1; [14]) 등의 프로모터들이 연구, 보고되었다. 우리는 protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1) 과 ribonuclease reductase 2 (RRM2) 프로모터가 유방암세포에서 암특이적인 발현을 보임을 이전 연구에서 보고하였다[19]. 본 연구에서는 플라스미드 자체나 아데노바이러스, 아데노부속바이러스의 바이러스를 사용한 형질전환을 이용하여, PRC1 프로모터가 폐암세포에서도 암 특이적인 발현을 나타냄을 보고한다.

재료 및 방법

플라스미드 제작

pmGL3-PRC1는 PRC1 프로모터(Genebank accession number AC068831의 85000-83254)의 일부분을 pGL3-Basic (Promega, Madison, WI)에 삽입하여, 아데노부속바이러스 벡터 pAAV-PRC1-GFP는 pAAV-CMV-GFP의 CMV를 동일한 PRC1 프로모터 부분으로 대체, 삽입하여 제작하였다[19]. 같은 방법으로 survivin (BIRC5) 프로모터(Genebank accession number U75285의 844-2813)로 pmGL3-BIRC5, pAAV-BIRC5-GFP를 제작하였다[19]. 아데노바이러스 벡터를 제작하기 위해서는, pAAV-PRC1-GFP에서 PRC1 프로모터-GFP-SV40 polyadenylation 부분을 포함한 DNA 조각을 아데노바이러스 벡터인 pShuttle 벡터(Quantum Biotechnologies, Carlsbad, CA)에 삽입하여 Ad-PRC1-GFP를 완성하였다. Ad-CMV-GFP는 이미 보고된 벡터를 사용하였다[9]. 생체이미징을 하기 위한 벡터, pAAV-PRC1-luciferase는 pAAV-PRC1-GFP plasmid 벡터의 GFP cDNA를 luciferase cDNA로 대체하여 제작하였다.

세포주 배양, 형질전환, 루시퍼라제 assay

인간 유래 정상 폐세포주인 MRC-5 (ATCC, CCL-171)와 폐암세포주인 A549 (ATCC, CCL-185)는 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml) 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

MRC5, A549의 세포주를 5×10⁴ cells/ well의 조건으로 각각 24 well plate에서 배양하였다. 하루 뒤에 명기한 플라스미드 350 ng을 각 well에 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 형질전환하였다. 이 때, 각 시료의 형질전환 효율을 보정하기 위하여 pRL-TK (Promega, Madison, WI) 50 ng을 동시에 사용하였다. 형질전환한 세포는 2일간 배양한 후 발현된 Luciferase 활성을 dual luciferase assay kit (Promega)로 측정하였다.

AAV, AV 제작 및 그 프로모터 활성 측정

각 재조합 아데노부속 바이러스(recombinant Adeno-associated virus, rAAV) 벡터를 생산하기 위해서 GFP cDNA 혹은 luciferase cDNA를 함유하고 있는 pAAV plasmid DNA, AAV serotype 2 (AAV2)rep-cap plasmid DNA, adenoviral helper plasmid DNA의 세 가지 plasmid DNA를 1:1:1 분자 수 비율로 HEK293 세포를 이용하여 calcium-phosphate precipitation 방법으로 triple co-transfection 하여 rAAV를 생산하여 정량하였다[19]. 준비된 rAAV-PRC1의 활성을 측정하기 위하여, 12-well plate에 well당 1×10⁴ 개의 세포를 배양한 폐암세포주인 A549와 정상 폐세포주인 MRC-5에 각 rAAV 벡터를 200,000 multiplicity of infection (MOI)로 72시간 동안 처리하였다. rAAV에 감염된 세포에서의 GFP발현은 형광현미경 (CKX41, OLYMPUS, Tokyo, Japan)과 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, CA)를 이용하여 분석하였다[19].

Ad-CMV-GFP, Ad-PRC1-GFP는 이미 보고된 방법을 따라 생산, 분리하여[9] 6 well 당 4×10⁵, 1×10⁶ 개의 세포를 각각 배양한 A549와 MRC-5에 MOI 100으로 감염시켜 2일 배양 후 그 GFP 활성을 flow cytometry (BD FACSCalibur™ system, BD)로 측정하였다.

Xenograft mouse 모델에서의 *in vivo* 프로모터 활성 측정

Xenograft mouse 모델에서의 PRC1, CMV 프로모터의 생체내 활성은 LivingImage™ 프로그램을 포함한 IVIS 시스템 (Xenogen Corp., CA)을 이용하여 측정하였다[8]. A549 폐암 세포주를 이식하고 7일이 경과한 누드마우스에 각 rAAV 벡터(3×10¹¹ virus particles/mouse)를 미정맥 투여하였고, 투여 후 일정기간 동안 xenograft 누드마우스에 발현되는 *in vivo* luciferase 활성을 다음과 같이 측정하였다. 마우스를 2% iso-fluorane/air 혼합물로 마취시키고, D-luciferin potassium salt (150 mg/kg, MIPS, USA)를 복강 투여한 후 마우스 각 부위에서 발생하는 총 photon counts를 획득하여 정량적으로 분석하였다.

결과 및 고찰

플라스미드의 형질전환에서의 PRC1 프로모터 활성

폐암세포주 특이적인 PRC1의 활성을 측정하기 위하여 pmGL-PRC1을 MRC5 정상폐세포주와 A549 폐암세포주에 각각 형질전환하였다. 이 때, 대조군으로 공벡터인 pmGL3와 이미 폐암특이적인 프로모터로 보고된 survivin (BIRC5) 프로모터[1]가 포함된 pmGL-BIRC5를 같이 사용하였다. Fig. 1에서 보인 바와 같이 PRC1, BIRC5는 정상세포주에서는 공벡터와 비슷하게 활성이 거의 없으나, 폐암세포주에서는 높은 활성을 보여, 두 프로모터 모두가 공벡터에 비해 약 30배의 증가된 활성을 보인다. 이 결과는 PRC1이 BIRC5와 비슷

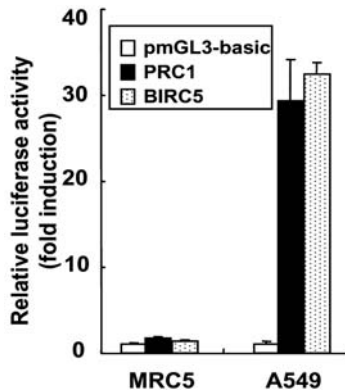


Fig. 1. The transcriptional activity of the PRC1 promoter by transient transfection of the plasmids. Each sample of pmGL3-basic, -PRC1 or -BIRC5 plasmids (350 ng/well, 24 well plate) were transiently transfected to normal (MRC5) and tumor (A549) cell lines originated from lung tissue. The luciferase activity of each sample was assayed by the dual luciferase assay kit (Promega) after two days of incubation. pRL-TK plasmid (Promega, 50 ng/well) was co-transfected to normalize the transfection efficiency difference among samples. The experiment was carried out as triplicates and repeated. One representative result was shown with average values and their standard deviations.

한 활성을 보여 폐암 특이적인 프로모터로서의 이용 가능성을 시사한다.

Virus 벡터에서의 PRC1 프로모터 활성

AAV serotype 2 벡터에 CMV, PRC1 및 BIRC5 프로모터를 각각 포함한 rAAV-GFP 벡터를 제작하였고, MRC5와 A549에 대해 세 종류의 rAAV 벡터를 감염하여 프로모터 활성을 상대적으로 비교하였다. 각 세포주에 대한 AAV의 감염율이 수용체단백질의 발현 정도에 따라 다르므로 CMV 프로모터에 의한 활성을 기준으로 하여 다른 프로모터의 활성을 상대적으로 각 세포주에 따라 분석하였다. 각 세포주에서 rAAV-CMV-GFP 벡터에 의하여 나타내는 GFP 활성을 100으로 간주하고 다른 rAAV-CMV-GFP와 rAAV-PRC1-GFP 감염에 따라 나타나는 활성을 비교 분석한 그래프를 Fig. 2A에 보였다. 그림에서와 같이 PRC1은 정상 세포주에서는 CMV에 비해 그 활성이 20% 정도로 비교적 낮은 반면에, 폐암 세포주인 A549에서는 CMV 활성의 약 75% 정도의 활성을 나타내었다. PRC1 프로모터는, 폐암 특이적인 고발현을 하는 것으로 보고된 BIRC5 프로모터[1]에 비해 정상세포나 암세포 모두에서 약간 낮은 활성을 보이나, 정상세포주에서의 두 프로모터의 활성을 비교, 고려하면 치료 벡터에 응용될 경우에는 PRC1이 낮은 부작용으로 그 안전성이 좀 더 좋을 것으로 사료된다.

아데노부속바이러스와 더불어 유전자치료를 많이 사용되

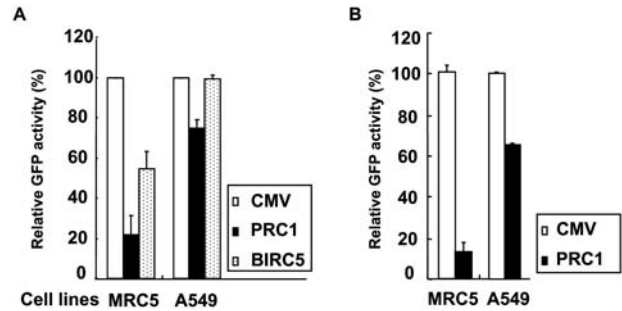


Fig. 2. *In vitro* transcriptional activity of the PRC1 promoter by viral transductions. A. The PRC1 activity of rAAV-PRC1-GFP. Three different types of rAAV-GFP containing PRC1, CMV and BIRC5 promoters (rAAV-PRC1-GFP, rAAV-CMV-GFP and rAAV-BIRC5-GFP) were prepared as described [19] and used to infect MRC5 or A549 cells at 2×10^5 MOI. The cells were incubated for 72 hrs. B. The PRC1 activity of Ad-PRC1-GFP. Two kinds of adenovirus, Ad-PRC1-GFP and -CMV-GFP, were prepared and used to transduce MRC5 or A549 cells at 100 MOI. Cells were incubated for 48 hrs. In all experiments, each GFP activity was measured by flow cytometry analysis of each sample's fluorescence. The activity of the CMV promoter was set up as 100% in each case and other promoter activities were calculated against the CMV promoter activity. The same experiments were repeated twice, and the average value and the standard deviation of each case were calculated and plotted on the graph.

는 벡터인 아데노바이러스(AV) 벡터에서의 PRC1 프로모터 활성도 비슷한 방법으로 실험하여 CMV 프로모터 활성과 비교한 결과를 Fig. 2B에 보였다. AAV의 경우와 같이 PRC1 프로모터가 정상세포주에서는 CMV에 비해 상당히 낮은 약 15%의 활성을, 폐암 세포주에서는 비교적 높은 66%의 활성을 보임을 알 수 있다(Fig. 2B).

이상의 바이러스 실험 결과는 PRC1 프로모터가 이미 보고된 바와 같이 유방암에서뿐만 아니라 폐암에서도 유전자 치료용 바이러스 벡터의 프로모터로 사용이 가능함을 암시하고 있다.

Xenograft mouse 모델에서의 promoter 활성

우리는 생체 내 PRC1 프로모터의 활성을 luciferase 생체 이미징 기법을 이용하여 CMV 활성과 비교, 조사하였다. A549 세포를 이식하여 종양을 발생시킨 면역결핍생쥐에 AAV-PRC1-luciferase와 AAV-CMV-luciferase 바이러스를 각각 감염시켜 luciferase의 생체내 활성을 비교하였다. 각각 두 마리의 생쥐를 이용하여 실험한 결과 두 마리 모두 바이러스 벡터 주입 후 2일 쯤부터 약한 발현을 보였으며(data not shown) Fig. 3과 같이 10일 쯤에는 PRC1 프로모터가 CMV 프로모터보다 약간 우월한 활성을 보이는 강하고 안정된 발현을 보였다. 활성 부위를 분석한 결과, 등 쪽의 이미지

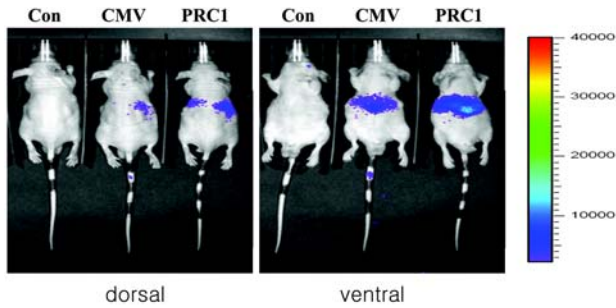


Fig. 3. The transcriptional activity of the PRC1 promoter *in vivo*. A549 cells were subcutaneously implanted into the nude mice and tumors were allowed to develop for 7 days. These nude mice were administered with either rAAV-CMV-luciferase or -PRC1-luciferase vectors (3×10^{11} virus particles /mouse) by a tail-vein injection. After 10 days, the dorsal and ventral luciferase activities *in vivo* were visualized by live-imaging analysis (IVIS system, Xenogen Corp., CA, USA). Two mice were used for each case and the negative control (Con) was the nude mice without any treatment.

에서는 CMV의 경우 한 쪽 종양의 부위에서만 약한 발현을 보이는데 비해, PRC1의 경우는 그 발현이 양쪽에 이식한 종양 전체 부위에서 비교적 강한 발현을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 배 쪽의 이미지에서는 두 프로모터 모두 간으로 추정되는 넓은 부위에서 활성을 나타내는 결과를 보였다. 마우스에 발현된 luciferase 활성은 23일 쯤까지 지속되는 것을 확인하였다(data not shown).

우리는 이상의 연구에서 PRC1 프로모터가 세 가지의 다른 유전자 전달 방법(플라스미드 DNA 자체와 두 종류의 바이러스)과 두 대상 유전자(GFP, 루시퍼라제 reporter)에 대해서 폐암세포주에서만 높은 활성을 보이고, 정상세포주에서는 그 활성이 미미함을 보였다. 이러한 PRC1 프로모터는, 암에 유전자 치료법을 적용할 경우에, 암세포와 정상세포의 구별 없이 고발현하는 CMV 프로모터와는 달리, 주변 정상 세포에서의 발현을 감소시켜서 치료에 동반되는 부작용을 최소화시킬 수 있다. 그러므로, PRC1은 이미 발표된 유방암뿐 아니라[19] 폐암의 유전자 치료용 벡터 제작에 필요한 프로모터로도 개발될 수 있는 높은 가능성을 보였으며, 저자의 기존 연구[19]와 미 발표된 자료에 의해서도 PRC1은 이미 암 치료용 유전자로 많이 연구된 TERT [6,13]보다 암 특이적인 높은 전사 활성을 보였다. 또한, A549 폐암세포주를 이식한 xenograft 누드마우스를 이용하여 생체 내 PRC1 프로모터의 활성과 각 조직에서의 발현양상을 모니터링한 결과, AAV 감염 10일 쯤에 CMV와 유사한 활성을 양 쪽 종양의 모든 부위에서 보여 유전자치료 벡터용 프로모터로서의 이용 가능성을 시사하였다. 그러나 배 쪽의 이미지를 분석하여 보면, 실질적으로 *in vitro* 세포주를 이용한 연구에서는 강한 암 특이적인 발현을 보였던 PRC1 프로모터가 *in vivo* 결과에서는 간

으로 추정되는 다른 조직에서도 발현이 감지되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 우선 본 실험에서 AAV 벡터의 투여 경로를 꼬리정맥을 통해 투여한 것에 기인할 것으로 추정된다. 미정맥투여된 바이러스 벡터는 우선적으로 간조직을 거쳐 체순환을 하는 것으로 예상되는데 투여한 바이러스 벡터의 상당 양이 일단 간에서 포획되고 그 결과 Fig. 3과 같이 어느 정도 발현을 하는 것으로 추측된다. 한편, 간을 벗어나 체순환으로 들어간 벡터는 Fig. 3의 결과와 같이 주로 종양조직 부위에서만 발현 양상이 국한되는 것을 확인할 수 있었다. 현재 본 연구에 포함되었던 PRC1 프로모터를 다양한 크기로 조작하여 동일한 조건에서 간에서는 전혀 발현되지 않고 종양조직에서만 발현되는 mutant 프로모터를 개발하고 있으며, 이러한 연구를 통해 부작용이 최소화된 안전하고 효율적인 암 치료용 전달체 개발에 이용 가능한 암 특이적 프로모터를 개발하고자 하는 연구를 진행하고 있다.

요 약

우리는 최근에 PRC1 프로모터가 유방암 유전자치료를 위하여 전사 표적이 된 유전자의 발현을 조절할 수 있는 후보 프로모터임을 보고하였다. 우리는 본 실험에서 PRC1이 폐암 유전자 치료에서도 적용이 가능한지 조사하였다. 특정 프로모터가 루시퍼라제 유전자와 연결된 플라스미드를 이용한 형질전환 assay에서 PRC1 프로모터는 정상폐세포주에서는 활성을 보이지 않으나 폐암세포주에선 약 30 배의 활성을 보였다. 이는 이미 암 특이적인 발현으로 알려진 BIRC5 (survivin) 프로모터와 유사한 결과였다. 또한, 바이러스 벡터를 이용한 실험에서 PRC1은 CMV 프로모터에 비해 아데노부속바이러스에서 약 75%, 아데노바이러스에서 약 66%의 활성을 보였다. 이와 대조적으로, PRC1 프로모터를 함유한 이들 두 종류의 바이러스는 정상 폐세포에서는 20% 정도의 낮은 활성을 보였다. 흥미롭게도, 인간 폐종양세포를 이식한 생쥐모델을 사용한 결과에서는 PRC1 프로모터가 CMV 프로모터와 비슷한 생체 활성을 보였다. 종합하면, 이상의 결과는 PRC1이 폐암 유전자치료를 위한 전사표적 유전자의 발현을 위한 프로모터로 사용 가능성을 암시한다.

감사의 글

이 논문은 교육과학기술부 과학재단의 유전자치료 기술사업(M10534040001-05N3404-00110와 M10534040002-08N3404-00210), 인제대학교 IBST 2007(설원기)에 의해 지원받았음.

References

1. Chen, J. S., J. C. Liu, L. Shen, K. M. Rau, H. P. Kuo, Y.

- M. Li, D. Shi, Y. C. Lee, K. J. Chang and M. C. Hung. 2004. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **11**, 740-747.
2. Ealovega, M. W., P. K. McGinnis, V. N. Sumantran, M. F. Clarke and M. S. Wicha. 1996. bcl-xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice. *Cancer Res.* **56**, 1965-1969.
 3. El-Aneed, A. 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control Release* **94**, 1-14.
 4. Fukazawa, T., Y. Maeda, M. L. Durbin, T. Nakai, J. Matsuoka, H. Tanaka, Y. Naomoto and N. Tanaka. 2007. Pulmonary adenocarcinoma-targeted gene therapy by a cancer- and tissue-specific promoter system. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 244-252.
 5. Gardlik, R., R. Palfy, J. Hodossy, J. Lukacs, J. Turna and P. Celec. 2005. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.* **11**, RA110-121.
 6. Gu, J. and B. Fang. 2003. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2**, S64-70.
 7. Guo, X., T. R. Evans, S. Somanath, A. L. Armesilla, J. L. Darling, A. Schatzlein, J. Cassidy and W. Wang. 2007. *In vitro* evaluation of cancer-specific NF-kappaB-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **97**, 745-754.
 8. Laxman, B., D. E. Hall, M. S. Bhojani, D. A. Hamstra, T. L. Chenevert, B. D. Ross and A. Rehemtulla. 2002. Noninvasive real-time imaging of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16551-16555.
 9. Lee, H. J., Y. J. Lee, H. C. Kwon, S. Bae, S. H. Kim, J. J. Min, C. K. Cho and Y. S. Lee. 2006. Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats. *Am. J. Pathol.* **169**, 1601-1611.
 10. Lin, J., C. Page, X. Jin, A. O. Sethi, R. Patel and G. Nunez. 2001. Suppression activity of pro-apoptotic gene products in cancer cells, a potential application for cancer gene therapy. *Anticancer Res.* **21**, 831-839.
 11. Lo, H. W., C. P. Day, and M. C. Hung. 2005. Cancer-specific gene therapy. *Adv. Genet.* **54**, 235-255.
 12. Maemondo, M., Y. Saijo, K. Narumi, T. Kikuchi, K. Usui, R. Tazawa, K. Matsumoto, T. Nakamura, K. Sasaki, M. Takahashi, Y. Niitsu and T. Nukiwa. 2004. Gene therapy with secretory leukoprotease inhibitor promoter-controlled replication-competent adenovirus for non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **64**, 4611-4620.
 13. Majumdar, A. S., D. E. Hughes, S. P. Lichtsteiner, Z. Wang, J. S. Lebkowski and A. P. Vasserot. 2001. The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters. *Gene Ther.* **8**, 568-578.
 14. Pedersen, N., M. W. Pedersen, M. S. Lan, M. B. Breslin and H. S. Poulsen. 2006. The insulinoma-associated 1: a novel promoter for targeted cancer gene therapy for small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* **13**, 375-384.
 15. Su, H., J. C. Chang, S. M. Xu and Y. W. Kan. 1996. Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum. Gene Ther.* **7**, 463-470.
 16. Walther, W. and U. Stein. 1999. Therapeutic genes for cancer gene therapy. *Mol. Biotechnol.* **13**, 21-28.
 17. Wang, J., H. Zhang, R. X. Liang, B. Pang, Q. G. Shi, P. T. Huang, C. F. Huang and J. G. Zhou. 2007. Identification and characterization of the novel human prostate cancer-specific PC-1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 8-13.
 18. Yang, L., Z. Cao, F. Li, D. E. Post, E. G. Van Meir, H. Zhong and W. C. Wood. 2004. Tumor-specific gene expression using the survivin promoter is further increased by hypoxia. *Gene Ther.* **11**, 1215-1223.
 19. Yun, H. J., Y. H. Cho, Y. Moon, Y. W. Park, H. K. Yoon, Y. J. Kim, S. H. Cho, Y. I. Lee, B. S. Kang, W. J. Kim, K. Park and W. Seol. 2008. Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2. *Exp. Mol. Med.* **40**, 345-353.