

## 암세포 용해성 AdLPCDIRESE1A 벡터의 간암 세포독성효과

정 인 재<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학

(Received February 10, 2011; Revised February 14, 2011; Accepted February 16, 2011)

### Cytotoxic Effects of an Oncolytic Adenoviral Vector AdLPCDIRESE1A in Hepatocellular Carcinoma Cells

Injae Chung<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — The replication competent adenoviral vector (AV), AdLPCDIRESE1A was generated and reported previously to have cytotoxic effects in some cell lines. In AdLPCDIRESE1A, the expression of cytosine deaminase (CD) and E1A genes are under the control of tumor-specific L-plastin promoter. CD enzyme can deaminate the nontoxic prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) to the toxic 5-fluorouracil (5-FU). E1A gene is essential for viral replication. Primary liver cancer, most of which is hepatocellular carcinoma (HCC), is the third common leading cancer in Korea. Thus, we have conducted *in vitro* preclinical study to evaluate effectiveness of AdLPCDIRESE1A on HCC. The efficacy of cytotoxicity was measured by generation of cytopathic effect (CPE) and cell counting. We infected HepG2 cells with various MOI of vector alone or concurrent with 5-FC. Exposure of cells to AdLPCDIRESE1A generated a significant cytotoxic effect as compared to the control. Almost 83% of the cell had manifested the characteristic cytotoxic effect on day 9 after infection of cells with 10 MOI of vector. We also observed the additive cytotoxic effects when AdLPCDIRESE1A vector had been coadministrated with 5-FC. The results suggest that the use of AdLPCDIRESE1A/5FC may be value in treatment of liver cancer. Further animal studies are needed for clinical trial.

**Keywords** □ adenoviral vector, hepatocellular carcinoma, cancer gene therapy

유전자치료제의 벡터로 다용되는 아데노바이러스 벡터 (adenoviral vector, AV)의 장점은 세포분열을 하거나 혹은 분열하지 않은 세포에의 높은 감염률, 역가가 높은 벡터의 생산 및 비교적 안정하다는 점 등이다. 그러나, 암유전자치료로 사용할 경우 가장 큰 장애는 AV의 비선택적인 정상세포로의 주입이다. 따라서, 유전자요법을 이용해 암의 새로운 치료제를 개발하기 위해서는, 우선 기존의 AV를 치료계수가 높아질 수 있도록 개발하는 것이 급선무이다.

종양 특이적으로 발현하는 것으로 알려진 L-plastin(LP) 유전자의 promoter를 AV의 전사 단위에 이용함으로써 치료 유전자가 종양 세포에서만 발현하게 하는 AdLP- vector 시스템을 개발하여 보고하였다.<sup>1-3)</sup> LP 단백질은 대부분의 악성 종양세포에서는 본질

적으로 발현이 되고 있으나, 조혈세포들을 제외한 정상세포에서는 발현이 되지 않고, 더욱이 종양세포에서의 발현은 LP의 promoter를 포함하는 5' 조절 영역에 의한 것으로 보고되고 있다.<sup>4,5)</sup>

AdLP-시스템의 벡터로 처음 개발된 AdLPCD vector는 LP promoter에 대장균의 cytosine deaminase(CD) 유전자가 연결된 자기복제 불가능(replication-incompetent, RIC), 즉 침투한 세포 내에서 바이러스 벡터의 증식이 불가능한 AV이다. AdLPCD의 연구 결과에 의하면, CD는 종양세포에서만 독성이 없는 5-FC(5-fluorocytosine)를 독성이 있는 5-FU(5-fluorouracil)로 변환시켜 난소암과 간암 세포의 종양 특이적 항암제로 작용하였다.<sup>3,6,7)</sup>

AdLPCD와 같은 자기복제가 불가능한 벡터의 효능은 bystander 효과로 벡터에 감염되지 않은 세포도 사멸될 수 있지만 주로 침투한 세포에 한정된다. 반면 자기복제가 가능하여 벡터의 증식이 일차로 침투한 세포에서 일어날 수 있다면, 2차 또는 3차 주변 세포로의 감염이 가능해져서 독성 효과는 확대될 수 있다. AV의 세포 감염율이 배양 중인 세포 단층(monolayer) 상태에서도

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8381 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) ijchung@duksung.ac.kr

세포 종류에 따라 다양하다는 것과 중앙 덩어리의 내부까지의 AV 감염을 고려한다면, 자가복제가 가능한(replication-competent, RC) 벡터의 개발은 매우 유효하다.

AdLPE1A는 AV 복제에 필수 불가결한 유전자인 E1A의 발현이 LP promotor에 의해 조절을 받아 종양세포 특이적으로 자가 증식이 일어날 수 있도록 고안된 RC 벡터이다. AdLPE1A는 유방암 세포, 난소암 세포 및 간암 세포에서 세포 독성 효능이 있는 것으로 보고되었다.<sup>8,9)</sup>

본 연구에서 시험한 AdLPCDIRESE1A는 자가 복제에 필요한 E1A의 전사가 L-plastin promotor에 의해 발현이 조절되며 또한 CD 유전자와 연결되어 있는 RC 아데노바이러스 벡터이다. AdLPCDIRESE1A는 자가복제가 가능한데 이것은 RIC 벡터인 AdLPCD와 비교할 때 세포에 유전자를 전달하는 비율이 높아 유방암, 직장암 및 난소암에 우수한 항암 치료효과가 있음이 보고되었다.<sup>10,11)</sup>

원발성 간암은 전 세계적으로 5번째로 빈발하는 고형암이며 세 번째로 치사율이 높은 종양이다. 매 년 60만 여명의 환자가 간암으로 사망하고 있다. 대부분이 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)인 원발성 간암은 우리나라에서는 세 번째로 흔한 암이다. 대부분의 HCC 환자는 말기에 진단되는 경우가 많아 처치 가능성이 매우 제한적이다. HCC의 의학적 치료는 수 년 간 종양학 분야의 난제로 남아있다. 치유 가능성이 있는 처치의 대상이 될 수 없는 약 40%의 HCC 환자의 생존율에 영향을 줄 수 있는 유전자요법(gene therapy)과 같은 새로운 암치료제의 개발은 매우 절실하다고 하겠다. 따라서, 본 연구에서는 암유전자 치료제로 개발된 AdLPCDIRESE1A의 HCC 간암에 대한 세포 독성 효능을 조사하였다.

## 실험방법

### 세포 배양

HEK 273 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 0.05% MEME-amino acid 첨가된 Iscove's MEM 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. HepG2 간암 세포는 10% fetal bovine serum(FBS) 함유한 MEM 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 재조합 아데노바이러스

AdLPCDIRESE1A는 CD 및 E1A 유전자의 발현이 2.4 kb의 LP 5' 조절 영역에 의해 조절되는 재조합된 아데노바이러스 벡터이다. 따라서, E1A에 의한 세포자가용해와 CD 효소에 의한 불활성 5-FU의 활성 5-FU로의 변환이 암세포에서만 일어나도록 고안되었다.<sup>2,10)</sup> AdLPCDIRESE1A는 Sidney Kimmel Cancer Center(San Diego, CA, USA)의 Dr. Deisseroth로 부터 분양을



**Fig. 1** – Demonstration of vector used in the study. In AdLPCDIRESE1A vector, the 2.4 kb of L-plastin promoter was inserted 5' to the CD and E1A genes. E1A is transcriptionally coupled to the CD gene by IRES in vector. ITR, adenoviral inverted terminal repeat; LP-P, L-plastin promoter; CD, cytosine deaminase; IRES, intraribosomal entry site.

받았다. AdLPCDIRESE1A의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

HEK 293 세포에 AV를 감염시킨 후, 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)가 80% 이상 일어나는 36~48시간 사이에 세포 및 배양액을 회수하고, 세 차례의 냉동/해동을 하여 AV를 유리시켰다. AV는 BD adeno-XTM virus Purification Kit(BD Biosciences사)를 사용하여 생산하였다. 생산된 AV의 titer는 표준방법인 plaque 형성 회석 분석 방법에 따라 HEK 293 세포를 이용하여 측정하였다.<sup>12)</sup>

### 세포독성 효과 실험

HepG2 세포는 AV를 감염시키기 24시간 전, 6-well plate에 세포가 1×10<sup>5</sup>/well 되도록 심었다. 배양액을 적절한 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)(즉, 바이러스를 접종시킨 세포 수에 대한 접종 바이러스 양의 비율)의 AdLPCDIRESE1A 벡터와 2% FBS를 함유한 IMEM으로 교환하였다. 37°C에서 90분간 노출한 후, 벡터를 함유한 배지를 제거하고, 100 μM 5-FU가 포함되었거나 혹은 포함되지 않은 완전 배지에서 계속 배양하였다. 세포독성효과를 측정하기 전까지 매일 배양액의 반을 새로운 배양액 또는 5-FU를 함유한 배양액으로 교체하였다.

감염 시킨 후, 3일, 6일 및 9일째에 형태학적 세포병변효과를 관찰하기 위해 200×의 배율로 현미경 사진을 촬영하였다. 또한 세포독성효과를 정량적으로 분석하기 위해 trypan blue로 염색한 후, 살아 있는 세포의 수를 측정하였다.

### 통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군 간의 차이는 Student's *t*-test를 사용하여 *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 매우 유의성이 있다고 판정하였다.

## 실험결과 및 고찰

간암세포주에 대한 AdLPCDIRESE1A 벡터의 세포독성효과 조건적으로 복제가 가능하여 바이러스 증식을 일으키는 AV는 암세포 분열을 억제하는 전략으로 이용될 수 있다.<sup>13,14)</sup> 아데노바이러스 내 초기 유전자 산물의 하나인 E1A는 감염된 세포의 S기 진입과 아데노바이러스의 복제에 관여한다. 따라서, E1A 유

전자의 발현을 종양 또는 조직 특이적인 promoter에 의해 조절되게 하여 표적한 세포 만의 사멸을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 LP promoter를 함유한 자가복제가능 아데노바이러스 AdLPCDIRESE1A의 *in vitro* 세포독성 실험을 수행하였다. 사용된 HCC 세포주인 HepG2는 LP promoter에 의한 외래성 유전자를 발현을 지지하는 것으로 조사되었다. HepG2 세포의 AV 감염 가능 여부는 LP promoter에 LacZ 지시유전자를 연결한 AV인 AdLPLacZ 벡터로 측정되었다. β-galactosidase 활성에 의한 X-gal 염색 분석을 통해, AdLPLacZ는 HepG2를 감염시킬 수 있고 LacZ 유전자를 발현시킨다는 것을 관찰하였다. RT-PCR 분석으로 내인성 L-plastin mRNA를 측정할 수 있었는데, 이는 HepG2 세포가 L-plastin 유전자를 발현하고 있음을 나타낸다고 하겠다.<sup>15)</sup>

AdLPCDIRESE1A의 복제 자체가 직접적인 세포독성 효과를 야기하는가를 시험하기 위해, 암세포가 바이러스 벡터 감염에 의해 나타나는 형태학적 특징을 현미경으로 관찰 비교하였다. 이런 형태학적 변화를 세포병변효과(cytopathic effect: CPE)라고 하는데, 아데노바이러스 감염에 의해 세포가 둥그랗게 되고(cell rounding up) 파괴되어 용해(total cell lysis)된다. 따라서, 자가복제가 가능한 AdLPCDIRESE1A가 HepG2 세포 모양을 둥글게 변형시켜 플라스크로부터 떨어져 나오게 하거나 세포를 용해(cytolysis)시키는 능력을 분석하였다.

세포병변효과를 현미경 관찰에 의해 비교하였는데, 벡터 처리를 시작 한 후 3일, 6일 및 9일에 사진을 촬영하였다. Fig. 2에 보는 바와 같이, HepG2 세포가 100 MOI의 자가복제 가능한 AdLPCDIRESE1A 벡터에 의해 노출된 세포군(B)은 대조군(A)과 비교하여 현저한 세포독성을 나타냈다. 대조군과 비교하여 거의 90%의 세포가 아데노바이러스 감염에 의해 나는 세포병변효과와 전형적인 특징이, 즉, 둥글게 되며, 세포 단층의 플라스크로부터의 분리 및 세포 용해, 100 MOI의 AdLPCDIRESE1A 처리 9일 후에 관찰되었다.

현미경으로 관찰된 세포독성효과는 10 MOI의 벡터를 처리한 후, 9일 만에 거의 최대로 나타났다. 벡터 처리 후, 9일을 기준으로 비교해 보면, 100 또는 250 MOI로 용량을 증가해도 10 MOI에서 관찰된 독성효과 이상의 증가는 관찰되지 않았다.

AdLPCDIRESE1A 벡터의 종양 특이적 작용과 관련하여, 대장암 모델 동물실험에서의 보고<sup>11)</sup>에 따르면, AdLPCDIRESE1A를 종양 결절(nodule)과 정상 간에 투여했을 때, 종양 결절에서만 E1A 단백질이 검출되었고, 정상 간의 조직에서는 검출되지 않았다. LP promoter 대신 종양 특이성이 없는 CMV promoter를 함유한 AdCMVDIRESE1A를 투여하면, E1A 단백질이 종양 결절 뿐 아니라 정상 간 조직에서도 검출되었다. 이는 AdLPCDIRESE1A 벡터가 종양 특이적으로 암용해작용이 있음을 나타낸다고 하겠다.

AdLPCDIRESE1A 벡터에 포함된 CD 유전자의 발현 효과에 대한 유효성을 알아보았다. LP promoter는 암세포에서만 작동하는 종양 표적성 promoter이다. 따라서, 독성이 없는 5-FC를 항암활성이 있는 5-FU로 변환시키는 CD 유전자는 종양세포에서만 발현된다. 종양세포 특이적인 벡터의 증식에 의한 세포용해 효과에 추가하여 5-FU에 의한 세포 독성효과가 기대되는 것이다. 5-FU 생성에 따른 세포독성의 상승효과 여부를 알아보기 위해, HepG2 세포를 벡터에 90분 동안 노출 시킨 후, 100 μM의 5-FC를 함유한 배지에서 3일, 6일 및 9일 동안 배양하였다. 형태학적 검사를 위해 현미경 관찰하였다. AdLPCDIRESE1A 벡

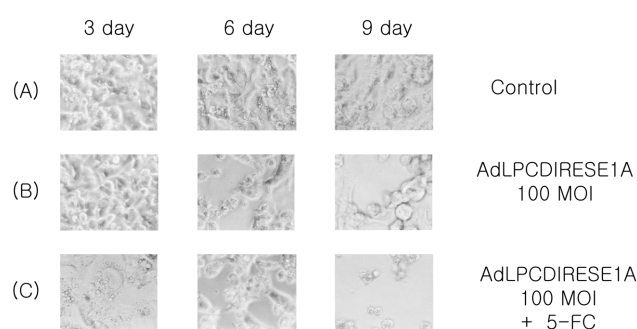


Fig. 2 – Cytotoxic effect of AdLPCDIRESE1A vector. After exposure of HepG2 cells to AdLPCDIRESE1A viral vector for 90 min at MOI of 100 (B and C), 5-FC was introduced at the concentration of 100 μM (C). Cytotoxic effects were compared under the microscope with 200× magnification and photos were taken at day 3, 6 and 9 after initiation of vector treatment.

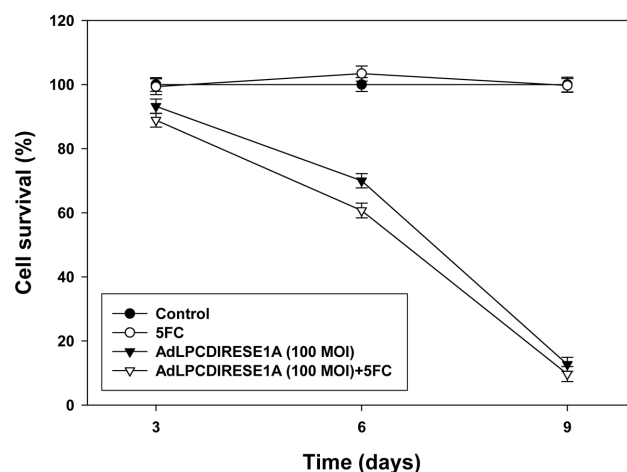


Fig. 3 – Cytotoxic effect of 100 MOI AdLPCDIRESE1A/5-FC in HepG2 at 3, 6 and 9 days. HepG2 cells were seeded in triplicate at a density of 100,000 cells/well in a six-well plate. They were infected at 100 MOI with AdLPCDIRESE1A. Another set of the above experiment were set up in triplicate and following infection with the same vector were incubated at 100 μM 5-FC. The percentage of surviving cells was counted by trypan blue exclusion.

**Table I** – Cytotoxic effect of 10, 100 and 250 MOI AdLPCDIRES-E1A/5-FC system in HepG2 cells measured by cell counting

Virus vector	Treatment	3 days	6 days	9 days
AdLPCDIRES-E1A (10 MOI)	Control	100.00±2.5	100.00±2.3	100.00±2.3
	5FC	99.90±2.5	99.51±2.4	99.86±1.9
	AdLPCDIRES-E1A	95.08±2.1	80.13±2.3 <sup>a</sup>	13.30±2.2 <sup>a</sup>
	AdLPCDIRES-E1A+5FC	89.25±2.2	67.09±2.3 <sup>a,b</sup>	5.21±2.3 <sup>a,b</sup>
AdLPCDIRES-E1A (100 MOI)	Control	100.00±2.1	100.00±2.1	100.00±2.3
	5FC	99.34±2.5	103.43±2.4	99.73±2.3
	AdLPCDIRES-E1A	93.22±2.2	70.00±2.2 <sup>a</sup>	12.72±2.8 <sup>a</sup>
	AdLPCDIRES-E1A+5FC	88.88±2.2 <sup>a</sup>	60.69±2.3 <sup>a,b</sup>	9.66±2.4 <sup>a,b</sup>
AdLPCDIRES-E1A (250 MOI)	Control	100.00±1.5	100.00±2.3	100.00±1.9
	5FC	99.94±2.4	99.89±1.8	100.00±2.2
	AdLPCDIRES-E1A	92.48±2.5	57.63±2.4 <sup>a</sup>	5.58±2.2 <sup>a</sup>
	AdLPCDIRES-E1A+5FC	88.12±2.4 <sup>a</sup>	48.32±2.1 <sup>a,b</sup>	3.55±2.1 <sup>a,b</sup>

The values are expressed as mean±S.D. (n=6).

a:  $P < 0.05$  compared with control

b:  $P < 0.05$  compared with AdLPCDIRES-E1A treatment

터와 5-FC의 병용 투여로 추가적인 세포수의 감소를 관찰하였다(Fig. 2).

정량적 분석을 위해, 3일, 6일 및 9일 째 trypan blue로 처리한 후 살아 있는 세포의 수를 직접 측정하여 세포 생존율(%)을 얻었다(Fig. 3과 Table I).

100 MOI의 AdLPCDIRES-E1A 및 AdLPCDIRES-E1A/5-FC 처리 시, 6일에 5-FC 단독 처치군에서는 세포생존율에는 변화가 없는 것에 비해, AdLPCDIRES-E1A 및 AdLPCDIRES-E1A/5-FC 처치군에서는 현저한 차이를 나타내어, 대조군의 60~70% 세포 생존율을 보였다. 9일에는 AdLPCDIRES-E1A 처리에 의해 13%의 세포만이 생존했고, AdLPCDIRES-E1A/5-FC는 약 5%의 세포가 남아있었다.

AdLPCDIRES-E1A 및 AdLPCDIRES-E1A/5-FC 처리시 10, 100 및 250 MOI로 벡터의 농도가 증가할수록 용량 의존적인 세포 독성 효과가 처치 후 6일에서 관찰되었다. 시간 의존적 세포 독성효과가 나타나 9일에서 최대의 세포독성효과가 나타났다. 5-FC의 병용으로 유의성있는 추가 독성효과도 측정되었다. 그러나, 처치 후 9일의 세포생존율에는 10 혹은 100 MOI 처치의 결과와 차이가 거의 나타나지 않았다.

실험결과, 종양세포에서만 활성이 있는 LP promoter가 전사 단위에 포함되어 있어, 치료 유전자의 발현이 종양 세포 특이적으로 일어나도록 개발된 재조합 AV 중, 자가복제가 가능한 AdLPCDIRES-E1A는 간암 세포에 대한 유의성 있는 세포 독성 효능을 나타내었다. AdLPCDIRES-E1A를 5-FC와 병용 사용 시 상승적 세포 독성 효능이 있음도 확인하였다.

## 결 론

AdLPCDIRES-E1A 단독 또는 5-FC와의 병용 투여는 HepG2

간암 세포를 바이러스의 세포 용해 작용과 5-FU로의 전환을 통해 직접 사멸시킨다. 향후, HCC 치료를 위해 임상 적용이 가능함을 시사한다.

## 감사의 말

본 연구는 덕성여자대학교 2009년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- 1) Chung, I. : Cancer gene therapy: history and major developments. *J. Toxicol. Pub. Health* **19**, 247 (2003).
- 2) Chung, I., Schwartz, P. E., Crystal, R. G., Pizzorno, G., Leavitt, J. L. and Deisseroth, A. B. : Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Ther.* **6**, 99 (1999).
- 3) Chung, I. and Deisseroth, A. B. : Recombinant adenoviral vector containing tumor-specific L-plastin promoter fused to cytosine deaminase gene as a transcription unit : generation and functional test. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 633 (2004).
- 4) Lin, C.-S., Park, T., Chen, Z. P. and Leavitt, J. L. : Human plastin genes. *J. Biol. Chem.* **268**, 2781 (1993).
- 5) Lin, C.-S., Chen, Z. P., Park, T., Ghosh, K. and Leavitt, J. : Characterization of the human L-plastin gene promoter in normal and neoplastic cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 2793 (1993).
- 6) Peng, X. Y., Won, J. H., Rutherford, T., Fujii, T., Zelterman, D., Pizzorno, G., Sapi, E., Leavitt, J., Kacinski, B., Crystal, R., Schwartz, P. and Deisseroth, A. : The use of the L-plastin promoter for adenoviral-mediated, tumor-specific gene

- expression in ovarian and bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* **61**, 4405 (2001).
- 7) Chung, I. : Chemosensitization of human ovarian carcinoma cells by a recombinant adenoviral vector containing L-plastin promoter fused to cytosine deaminase transcription unit. *J. Applied Pharmacol.* **13**, 143 (2005).
- 8) Zhang, L., Akbulut, H., Tang, Y., Peng, X., Pizzorno, G., Sapi, E., Manegold, S. and Deisseroth, A. : Adenoviral vectors with E1A regulated by tumor-specific promoters are selectively cytolytic for breast cancer and melanoma. *Mol. Ther.* **6**, 386 (2002).
- 9) Chung, I. : Cytolytic Effects of an adenoviral vector containing L-plastin promoter regulated E1A in hepatocellular carcinoma cells. *J. Applied Pharmacol.* **14**, 148 (2006).
- 10) Akbulut, H., Zhang, L., Tang, Y. and Deisseroth, A. : Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther.* **10**, 388 (2003).
- 11) Akbulut, H., Tang, Y., Maynard, J., Zhang, L., Pizzorno, G. and Deisseroth, A. : Vector targeting makes 5-fluorouracil chemotherapy less toxic and more effective in animal models of epithelial neoplasms. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7738 (2004).
- 12) Graham, F. L. and Prevec, L. : Manipulation of adenovirus vectors, *Methods in molecular biology*, Vol. 7, pp. 109-128. E. J. Murray, The Human Press Inc., Clifton, NJ (1991).
- 13) Alemany, R., Balagu, C. and Curiel, D. T. : Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nature Biotechnol.* **18**, 723 (2000).
- 14) Heise, C. and Kirn, D. H. : Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J. Clin. Invest.* **105**, 847 (2000).
- 15) Jung, K., Kim, S., Lee, K., Kim, C. and Chung, I. : Cytotoxic effect of a replication-incompetent adenoviral vector with cytosine deaminase gene driven by L-plastin promoter in hepatocellular carcinoma cells. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 770 (2007).