

Increased Antitumor Immunity of Mouse GM-CSF in Mouse Colon Tumor (CT-26) Model

Mi Kyung Kim¹, Yu Kyoung Lee², Yeon Sook Lee² and Tae Ho Hwang^{3,†}

¹Department of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Sillajen Inc., Busan 609-735, Korea

³Division of Pharmacology, Pusan National University of Korean Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Oncolytic vaccinia virus is an engineered vaccinia virus that selectively destroys cancer cells and induces tumor immune response. Oncolytic vaccinia expressing mouse GM-CSF showed cytotoxic activity against various kinds of cancer cells when oncolytic vaccinia virus expressing human GM-CSF and mouse GM-CSF is intravenously administered in the mouse CT26 colon tumor model. Cancer cells treated with isolated immunoglobulin G from the serum with complement showed these cytotoxic activity and complement observed dose-dependent cytotoxic effect. These results suggest that oncolytic vaccinia virus expressing mouse GM-CSF can increase oncolytic vaccinia virus by inducing anticancer antibody in a mouse tumor model. Further studies are needed on antitumor immunity of GM-CSF.

Key Words: Antitumor immunity, Complement, GM-CSF, IgG, Oncolytic vaccinia virus

서 론

항암 백시니아바이러스는 종양세포에서 증식하여 종양 세포를 사멸시키도록 유전적 변형이 가해진 바이러스로 암세포 내에서 바이러스의 선택적 증식뿐만 아니라 이들 바이러스에 의한 항암 면역작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Todo, 2008). 이러한 항암 백시니아바이러스는 thymidine kinase (TK) 유전자 결손 (deletion)을 통해 정상 세포와 조직 내에서 독성을 약하게 하였고, hGM-CSF (human Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)의 발현으로 항종양 면역반응을 자극하도록 설계하였다 (Mastrangelo et al., 1999).

종양에 대한 숙주의 면역반응을 증가시키기 위한 종양 면역학에 관한 연구가 활발하게 진행 중에 있는 가운데 IL-2, IL-4, IL-6, G-CSF, GM-CSF와 같은 면역 증진 유전

자들을 벡터에 삽입하여 종양에 대한 면역치료 연구와 임상시험 또한 진행 중에 있다 (Bubenik, 1996; Dranoff, 2002; Hofbauer et al., 2008; Qian et al., 2010; Lee and Margolin, 2011). 그 중 GM-CSF는 호중구를 만들어내는 전구세포에 주로 작용하여 호중구의 분화와 성장을 촉진시키는 기능을 하는 조혈성장인자이며, 주로 임상에서는 항암 화학요법 후에 발생하는 골수저하에 의한 호중구 감소증에 주로 사용되며, 그 외의 질병에서 면역 기능을 증가시키기 위해 많이 사용되고 있다 (Fossati et al., 1998).

GM-CSF는 종양특이적 세포독성 T 림프구 생성에 관여하는 것으로 알려져 있어 항암 백시니아바이러스를 비롯한 여러 항암 바이러스 또한 hGM-CSF를 발현하도록 설계되어 연구되고 있다 (Hermiston and Kuhn, 2002; Hermiston and Kim, 2005).

그러나 hGM-CSF를 발현하는 항암 바이러스의 경우 hGM-CSF 발현을 측정할 수 있는 동물 모델의 부족과 면역반응 증가와 관련된 hGM-CSF의 직접적인 효능에 관한 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 GM-CSF를 발현하는 항암 백시니아바이러스의 종양 면역에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 생쥐 대장암 모델에서 활성이 없는 인간형 GM-CSF 유전자 (hGM-CSF)와 활성을 가지는 생쥐형 GM-CSF 유

*Received: August 5, 2013 / Revised: December 27, 2013

Accepted: December 27, 2013

†Corresponding author: Tae Ho Hwang, Division of Pharmacology, Pusan National University of Korean Medicine, Yangsan 626-870, Korea.

Tel: +82-51-510-7551, Fax: +82-51-510-7558

e-mail: thhwang@pnu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

전자 (mouse GM-CSF, mGM-CSF)를 삽입한 항암 백시니아바이러스를 이용하여 GM-CSF의 활성이 중앙 면역반응에서 생쥐 대장암 모델에서의 어떠한 효과를 나타내는 지 연구하였다.

재료 및 방법

항암 백시니아바이러스

항암 백시니아바이러스는 Wyeth 백시니아 strain을 백분으로, hGM-CSF 유전자 혹은 mGM-CSF 유전자가 각각 TK 유전자 영역에 삽입하였으며, lacZ 유전자 또한 TK 유전자 영역에 삽입되었다 (Fig. 1A). (Mastrangelo et al., 1999). 백시니아 바이러스의 또 야생형 대조군으로서 NYCBH (New York City Board of Health)가 사용되었다.

10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (PS)가 함유된 100 ml RPMI 1640 세포 배양액에 HeLa S3 세포를 2×10^6 cell/ml을 롤러 플라스크에서 배양하였다. 클로로퀸 400 μ l을 첨가하여 3시간 동안 배양한 후, 1 plaque forming unit/cell의 항암 백시니아바이러스를 감염시킨 뒤 2시간 동안 배양한 후 RPMI 1640 세포배양액 100 ml을 넣고 72시간 동안 배양하였다. 항암 백시니아 바이러스가 감염된 HeLa S3 세포를 6,000 rpm, 15분 동안 원심 분리하여 상층액은 제거하고 남은 pellet 층에 10 mM Tris (pH 9.0) 7 ml에 현탁시켰다. 초음파 분쇄기로 pellet 층을 분쇄시킨 뒤 12,000 rpm에서 1시간 20분 동안 고속도 원심 분리기 (JA-20.1)를 이용하여 원심 분리하였다. 상층액은 제거한 뒤 남은 항암 백시니아바이러스가 포함된 pellet 층은 10 mM Tris (pH 9.0) 0.5 ml에 모아서 글리세롤을 첨가하여 -80°C에 저장한다. 사람 난소암 세포주 A2780에서 plaque assay로 바이러스의 역가를 측정하였다.

대상 세포주 및 세포배양

사람 자궁경부암 세포인 HeLa S3는 5% FBS를 함유하는 RPMI 1640 세포배양액으로 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하여 항암 백시니아바이러스를 증식시키는데 사용하였다. 사람 자궁경부암 세포인 HeLa와 사람 난소암 세포인 A2780, 사람 골육종 세포 (U2-OS, ATCC로부터 구입)는 10% FBS를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 세포배양액을 이용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 사람 대장암 세포 HCT-8과 HCT-116 (한국세포주은행으로부터 구입)는 10% FBS를 함유하는 RPMI

1640 세포배양액으로 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 생쥐 대장암 세포 CT-26 (한국세포주은행으로부터 구입)는 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 세포배양액으로 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다.

세포독성 측정

항암 백시니아바이러스를 투여 받은 생쥐 대장암 모델에서 분리된 혈청의 세포독성을 관찰하기 위해 사람 자궁경부암 세포인 HeLa와 사람 난소암 세포인 A2780, 사람 대장암 세포 HCT-8과 HCT-116와 생쥐 대장암 세포 CT-26을 각각을 96 well plate에 2×10^4 cell/100 μ l로 분주하여 24시간 동안 배양한다. PBS (Phosphate Buffer Solution)를 투여 받은 대조군과 항암 백시니아바이러스 (mGM-CSF vaccinia virus, NYCBH, hGM-CSF vaccinia virus)를 투여 받은 생쥐 대장암 모델의 혈청을 각각의 암세포에 처리한 후 4시간 동안 배양한 후 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 Microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 관찰하였다. 세포의 생존율은 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{생존율 (\%)} = \frac{\text{실험군의 평균색소 흡수율} - \text{기준색소 흡수율}}{\text{대조군의 평균색소 흡수율} - \text{기준색소 흡수율}} \times 100$$

IgG 분리

생쥐 대장암 모델에서 PBS와 항암 백시니아바이러스 (mGM-CSF vaccinia virus)를 투여 받은 혈청으로부터 Melon Gel IgG Purification Kit (Pierce, USA)를 사용하여 면역글로블린 IgG를 분리하였다. 500 μ l의 겔 슬러리를 튜브에 넣고 1분 동안 6,000 \times g에서 원심 분리한 후 300 μ l의 분리용액을 넣고 10초 동안 6,000 \times g에서 원심 분리한다. 그 위에 500 μ l의 희석된 혈청을 넣어주고 5분 동안 실온에서 방치한 후 1분 동안 원심 분리 후 IgG (Immunoglobulin G)를 분리하였다. 분리한 IgG를 사람 난소암 세포주 A2780에 처리한 후 complement를 처리하고 4시간 동안 배양한 후 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 Microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 관찰하였다.

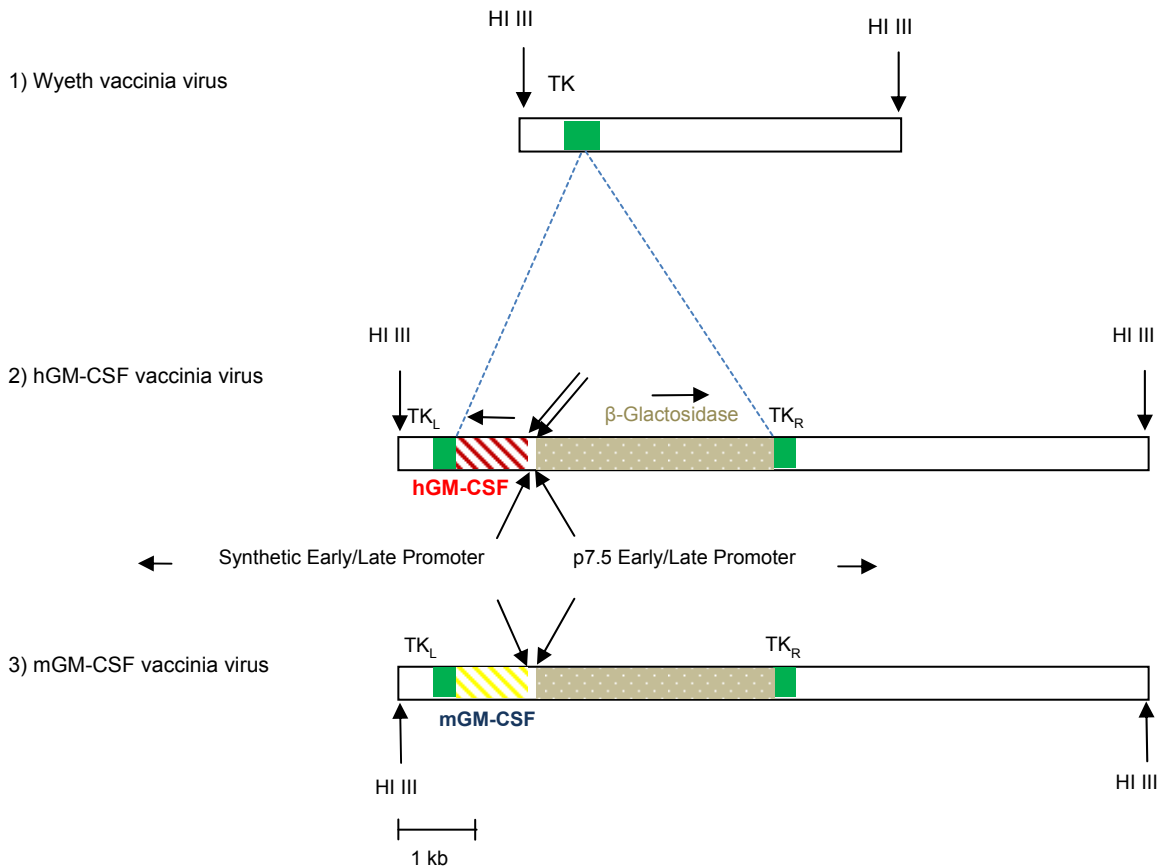


Fig. 1. Genetic construct for oncolytic vaccinia virus expressing human GM-CSF and mouse GM-CSF (reproduced from Mastrangelo et al., 1999). Human GM-CSF vaccinia virus and mouse GM-CSF vaccinia virus expresses hGM-CSF and mGM-CSF from the disrupted TK gene region under control of the synthetic early-late promoter.

생쥐 대장암 모델

19마리의 생후 7주된 BALB/c 생쥐를 PNUH 동물실험실에서 일주일의 적응 기간을 둔 후 실험에 이용하였다. 생쥐 대장암 모델에 만들기 위해 생쥐 대장암 세포 CT-26을 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배양액에서 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하여 4 × 10⁵의 CT-26 세포를 BALB/c 생쥐의 옆구리 피하층에 0.1 ml씩 주입한다. 종양의 크기가 약 50~80 mm³ 정도 성장하였을 때, 생쥐를 4마리씩 4그룹 (PBS / mGM-CSF vaccinia virus / NYCBH / hGM-CSF vaccinia virus)으로 나누어 각각 1 × 10⁷ plaque forming unit (PFU)/100 μl의 정맥 투여와 종양 내 투여를 일주일 간격으로 2회 투여하였다. 두 번째 투여 후 일주일 후 세포독성을 관찰하기 위해 각각의 생쥐 대장암 모델로부터 안구채혈을 통해 혈청을 획득하였다.

결 과

mGM-CSF를 발현하는 항암 백신니아바이러스 세포독성 효과

GM-CSF가 항암 면역에 관여하는지를 알아보기 위해 생쥐에서 활성이 있는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신니아바이러스와 활성이 없는 hGM-CSF를 발현되는 항암 백신니아바이러스를 사용하였다 (Fig. 1). 그 외에 대조군으로서 PBS와 야생형 항암 백신니아바이러스 (NYCBH)도 함께 1 × 10⁷ pfu/100 μl의 일주일 간격으로 2회 정맥 (n=2) 또는 종양 내 투여 (n=2)한 뒤 일주일 후 생쥐 대장암 모델의 혈청으로부터 세포독성이 나타나는지를 암세포에서 상대적 생존율을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 활성을 관찰하기 위해 사람 난소암 세포인 A2780, 사람 대장암 세포 HCT-8과 HCT-116에 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신니아바이러스를 정맥 내 투여 받

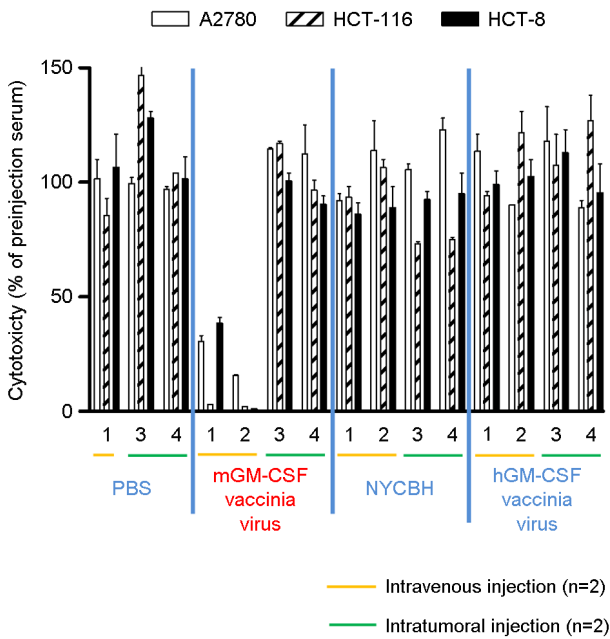


Fig. 2. Anti-tumor activity of serum collected from CT-26 tumor model (n=4) treated with oncolytic vaccinia virus. Serum was treated in A2780, HCT-8 and HCT-116 cell lines and cell viability was measured using CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japan) after 4-hour incubation at 37°C. Means were analysed using a 2-way ANOVA ($P < 0.0001$).

은 생쥐 대장암 모델의 혈청을 처리한 실험군에서만 세포독성이 나타난 것을 관찰할 수 있었고 ($P < 0.0001$), PBS를 투여한 대조군과 활성이 없는 hGM-CSF 항암 백신시아바이러스를 비롯한 야생형 항암 백신시아바이러스는 세포독성이 나타나지 않은 것이 관찰되었다. 그러므로 항암 백신시아바이러스의 경우 생쥐 대장암 모델에서 활성이 있는 mGM-CSF가 세포독성을 일으키는데 관여한다는 사실을 알 수 있었다.

생쥐 대장암 모델에서 세포독성 효과를 보이는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신시아바이러스의 투여 경로 비교

이전 실험에서 활성이 있는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신시아바이러스를 투여 받은 생쥐 대장암 모델의 혈청에서만 세포독성을 일으키는 것을 관찰하였으므로 본 실험에서는 정맥 내 투여와 종양 내에 투여의 투여 경로에 대한 세포독성 효과를 관찰하였다. 그 결과 동일한 활성이 있는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신시아바이러스를 투여하였음에도 불구하고 종양 내 투여하였을 때는 세포독성이 관찰되지 않았으며, 정맥 내 투여에서만

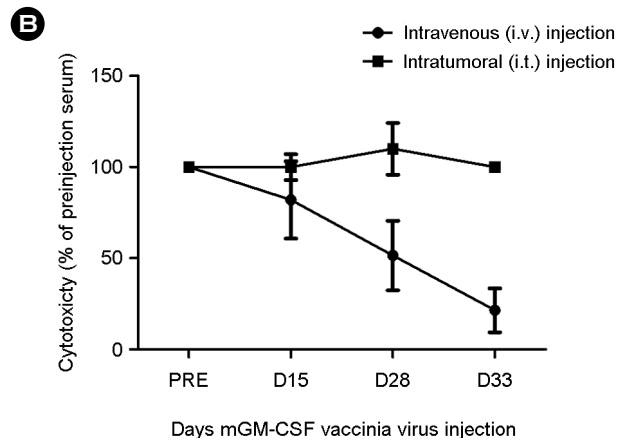
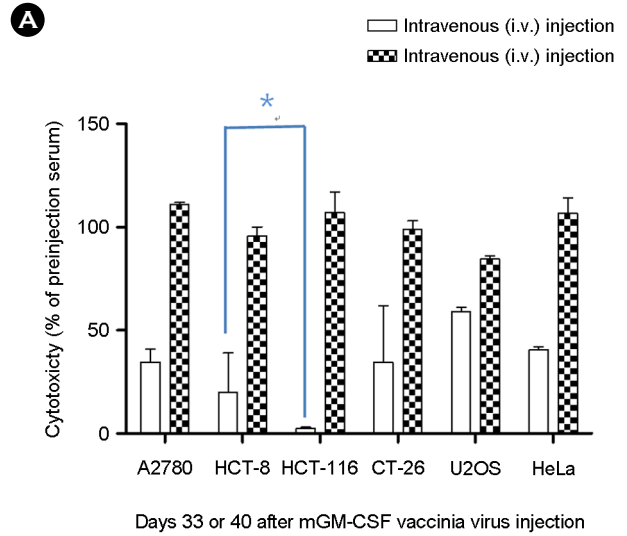


Fig. 3(A). Comparison between intravenous and intratumoral injection for anti-tumor activity of serum collected from CT-26 tumor model treated with mGM-CSF vaccinia virus in several cancer cell lines. CT-26 mouse tumor were injected intravenously or intratumorally with 10^7 pfu of mGM-CSF vaccinia virus. The serum was treated in A2780, HCT-8, HCT-116, CT-26, U2OS and HeLa. Means were analysed using a 2-way ANOVA ($*P = 0.0378$). **(B).** Time dependent antitumoral effect of serum obtained after mGM-CSF vaccinia virus injection into mouse colon tumor (CT-26) model. Serum was serially obtained at pre-treatment, Day 15, 28 and 33. The serum was treated in CT-26 cell line. Means were analysed using a 2-way ANOVA ($P < 0.001$).

세포독성이 관찰되었다 (Fig. 3A, 3B). 정맥 내 투여의 경우 항원이 직접적으로 비장으로 전달되게 되어 비장에서 항체가 생산되기 시작되어 림프조직으로 이어져 림프조직에 있는 면역세포에서 대부분의 항체가 생성되기 시작한다. 그러나 종양 내 투여의 경우 종양으로 인한 신생 혈관들이 많이 생성되어 있지만, 혈관의 흡수율이 정맥

고찰

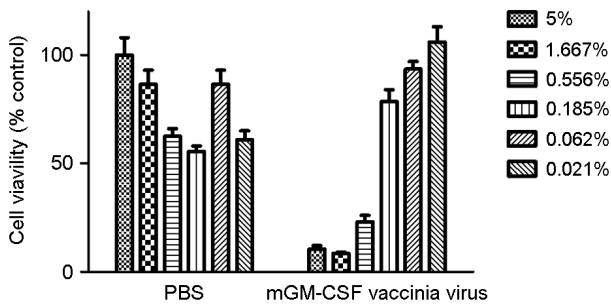


Fig. 4. Dose dependent of effect of isolated IgG from PBS or mGM-CSF vaccinia virus injected CT-26 mouse tumor model. CT-26 mouse tumors were injected 10^7 pfu of mGM-CSF vaccinia virus and PBS. IgG was extracted from mGM-CSF vaccinia virus and PBS injected CT-26 mouse's serum. Then IgG was treated A2780 cell line. Means were analysed using a 2-way ANOVA ($P < 0.0001$).

내 투여보다 낮을 뿐만 아니라 림프조직으로의 흡수율보다 낮아 항체 생성이 적은 것으로 여겨진다. 그러므로 생쥐 대장암 모델에 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신이나 바이러스를 투여하더라도 투여 경로에 따라 항체를 생성하는 정맥 내 투여에서만 세포독성이 관찰되었다.

항체용량 의존적 세포독성 효과

세포독성을 나타내는 활성이 있는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신이나 바이러스를 투여 받은 생쥐 대장암 모델의 혈청으로부터 세포독성과 관련된다고 여겨지는 IgG를 분리하여 혈청에서와 마찬가지로 IgG를 암세포에 처리하였을 때 세포독성이 나타나는지를 관찰하였다. 항체는 항원과 결합하여 항원의 작용을 방해하거나 또는 항원을 제거하는 기능을 가지고 있으며, 그 중에는 항체의존 세포매개세포독성 (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)과 보체의존세포독성 (CDC, complement-dependent cytotoxicity)의 기능이 있으며 (Mastrangelo et al., 1999), 이 중 본 실험결과는 생쥐에서 활성이 있는 mGM-CSF를 발현하는 항암 백신이나 바이러스를 투여 받은 생쥐 대장암 모델의 혈청으로부터 분리된 IgG와 보체를 포함하고 있는 정상 생쥐의 혈청을 함께 처리하여 세포독성이 일어나는지 관찰하였다. 그 결과 PBS를 투여한 대조군의 혈청으로부터 분리한 IgG는 세포독성을 보이지 않았으나, mGM-CSF 유전자를 발현하는 항암 백신이나 바이러스를 투여 받은 생쥐 대장암 모델의 혈청에서 분리한 IgG는 용량의존적 세포독성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

항암 바이러스 치료 (Oncolytic Virotherapy)는 암 치료를 위한 새로운 방법으로 종양세포 내 유전적 비정상 부위를 표적으로 한다. 바이러스의 복제, 이후의 세포용해 및 조직을 통한 바이러스 확산은 종양세포와 종양조직 내에서 각각 선택적으로 일어난다. 약 10년 전 종양세포에서 바이러스가 선택적으로 복제되도록 설계한 최초 시도 후, 선택적 항암 바이러스 치료 영역은 급속도로 확대되었다. 항암 바이러스는 암용해 혹은 괴사와 같은 새로운 메커니즘을 통해 종양세포를 죽이며 (Russell, 1994; Kim et al., 2001; Parato et al., 2005) 활성화된 유전대사경로 (activated genetic pathways) 혹은 종양억제인자기능 소실을 표적으로 하여 종양세포를 선택할 수 있다 (Martuza et al., 1997; Heise et al., 1997; Stojdl et al., 2000). 이 바이러스의 선택적 종양 내 복제로 감염된 종양세포의 용해가 이루어지고, 인접 종양세포로 확산된다 (Todo et al., 2001). 또한 이러한 바이러스들은 종양-특이적 세포독성 T림프구 유도 및 치료목적으로 삽입된 유전자 (transgene) 발현을 포함한 다른 기전들을 통해 종양세포를 사멸할 수 있다 (Chase et al., 1998; Hermiston and Kim, 2005; Todo et al., 2001; Hermiston and Kuhn, 2002). 항암 바이러스는 주변 종양세포를 공격하고, GM-CSF와 같은 사이토카인 발현으로 종양에 대한 면역반응을 강화시킨다. 이러한 바이러스 치료는 현재 승인된 치료법에 효과를 나타내지 않는 암을 효과적으로 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있으며, 또한 이러한 바이러스들은 종양혈관차단을 통해 종양괴사를 유도할 수 있다 (Breitbach et al., 2007).

GM-CSF는 조혈 집락 자극인자 중 하나로 골수전구세포의 분화와 증식을 조절하고, 성숙된 단핵구와 과립구의 기능을 항진시키며, 종양특이적 세포독성 T 세포를 유발하는 역할을 보여준다 (Fossati et al., 1998). 이 때문에 human GM-CSF 유전자가 아데노바이러스 (Zhu et al., 2005), 헤르페스바이러스 (Todo, 2008), 백신이나 바이러스 (Kim et al., 2006)를 비롯한 여러 항암 바이러스에 human GM-CSF가 삽입되어 면역을 증강시키도록 고안되었다. 종양 선택적 아데노바이러스를 면역 결핍 생쥐에서 종양 내 투여하였을 때 mGM-CSF의 발현이 증가된 것이 보고된 바 있으며 (Qian et al., 2006), 또한 mGM-CSF를 발현하는 약독화 된 항암 헤르페스바이러스 (Herpes Simplex Virus)를 종양 내 투여하였을 때 투여된 종양뿐만 아니라

라 투여하지 않은 다른 종양도 억제된 것을 보고하였다. hGM-CSF를 발현하는 항암 백시니아바이러스도 난치성 간암환자에게 종양 내 투여하는 임상시험에서 종양의 크기가 감소되는 것이 관찰되었다. 이러한 항암 백시니아바이러스 역시 항암 헤르페스바이러스와 마찬가지로 투여된 종양뿐만 아니라 투여되지 않은 종양에서도 반응이 관찰되었다 (Kim and Thorne, 2009; Yoo et al., 2012). 결론적으로, hGM-CSF를 발현하는 항암 바이러스는 종양세포를 파괴하면서 hGM-CSF의 발현으로 항종양 면역반응을 자극하는 결과를 보였다.

그러나 이러한 새로운 암 치료법의 한계점은, 항암 바이러스로부터 발현되는 hGM-CSF의 현 효과를 판단하기 위한 검증된 동물종양 모델이 없다는 점이다. Human GM-CSF는 mouse와 rat에서는 활성을 가지지 않는 것으로 알려져 있다 (Stojdl et al., 2000; Kim et al., 2013). GM-CSF를 이용한 많은 항암요법에서 시행 중에 있으나 GM-CSF를 이용한 요법은 단순한 면역증강의 효과를 기대할 뿐 GM-CSF의 직접적인 효과를 증명한 데이터가 없는 실정이다.

본 실험에 앞서 자궁경부암 VX2 토끼종양 모델에 hGM-CSF를 발현하는 백시니아바이러스를 투여하고 2주 후 VX2 종양토끼로부터 혈청을 얻어 여러 종류의 사람 암세포에 처리하였을 때 암세포가 사멸되는 것을 관찰하였다. 여러 가지 실험을 통하여 암세포를 사멸시키는 주된 요인은 항암바이러스를 투여한 후 생성된 항체라는 것을 알게 되었으며, 이러한 항체 생성에는 여러 가지 메커니즘을 작용을 하겠지만, 그 중 백시니아바이러스에 삽입된 hGM-CSF가 항체를 생성하는데 주된 역할을 할 수 있다고 생각되어 생쥐종양 모델을 이용하여 사이토카인 GM-CSF의 항체 생성 역할을 알아보려고 하였다.

생쥐종양 모델에서는 hGM-CSF가 작용하지 않는 것은 이미 알려져 있으므로 hGM-CSF 대에 mGM-CSF를 발현하는 백시니아바이러스를 이용하여 항암바이러스 투여 후 생성된 항체가 GM-CSF 관련이 있는지를 알아보았다. Fig. 2는 야생형의 백시니아바이러스 NYCBH, mGM-CSF 또는 hGM-CSF를 발현하는 백시니아바이러스를 대장암 생쥐종양 모델에 투여 후 얻은 생쥐 혈청을 사람의 난소암 세포주 A2780과 사람의 대장암 세포주 HCT-8과 HCT-116에 처리하였을 때 mGM-CSF를 발현하는 항암 백시니아바이러스를 투여한 혈청에서만 암세포가 사멸되는 것을 관찰하였으며, 야생형의 NYCBH나 hGM-CSF를 발현하는 백시니아바이러스를 투여한 혈청과 mGM-CSF

를 발현하는 항암 백시니아바이러스도 종양 내 투여한 혈청에서는 암세포가 사멸되지 않는 것을 관찰하였다. 이 결과를 바탕으로 생쥐 종양모델에서만 활성을 가진 mGM-CSF의 사이토카인 활성으로 인해 생성된 항체가 암세포를 사멸시킨다는 결과를 얻었으며, 이전 논문 (Kim et al., 2013)의 실험과 마찬가지로 이 혈청 속의 IgG 항체가 암세포를 사멸시킨다는 것을 증명하기 위하여 생쥐혈청으로부터 IgG를 분리하여 다시 암세포에 처리하였을 때 역시 암세포가 사멸되는 것을 관찰하였다. 따라서 이들 GM-CSF가 체액성 면역에 중요한 작용을 하는 것을 보여주는 결과로서 그와 관련된 분자 생물학적 기전의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG, Falls TJ, McGuire A, Parato KA, Stojdl DF, Daneshmand M, Speth K, Kim D, McCart JA, Atkins H, Bell JC. Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther*. 2007. 15: 1686-1693.
- Bubenik J. Cytokine gene-modified vaccines in the therapy of cancer. *Pharmacol Ther*. 1996. 69: 1-14.
- Burger JA, Baird SM, Powell HC, Sharma S, Eling DJ, Kipps TJ. Local and systemic effects after adenoviral transfer of the murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into mice. *Br J Haematol*. 2000. 108: 641-652.
- Chase M, Chung RY, Chiocca EA. An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat Biotechnol*. 1998. 16: 444-448.
- Dranoff G. GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev*. 2002. 188: 147-154.
- Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D, Ricevuti G, Edwards SW, Moulding DA, Rossi ML. *In vitro* effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int J Mol Med*. 1998. 1: 943-951.
- Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kim DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic

- agents. *Nat Med.* 1997. 3: 639-645.
- Hermiston TW, Kim DH. Genetically based therapeutics for cancer: similarities and contrasts with traditional drug discovery and development. *Mol Ther.* 2005. 11: 496-507.
- Hermiston TW, Kuhn I. Armed therapeutic viruses: strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes. *Cancer Gene Ther.* 2002. 9: 1022-1035.
- Hofbauer GF, Baur T, Bonnet MC, Tartour E, Burg G, Berinstein NL, Dummer R. Clinical phase I intratumoral administration of two recombinant ALVAC canarypox viruses expressing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2: the transgene determines the composition of the inflammatory infiltrate. *Melanoma Res.* 2008. 18: 104-111.
- Kim JH, Oh JY, Park BH, Lee DE, Kim JS, Park HE, Roh MS, Je JE, Yoon JH, Thorne SH, Kim D, Hwang TH. Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF. *Mol Ther.* 2006. 14: 361-370.
- Kim MK, Caroline JB, Anne M, Heo J, Lee YK, Cho M, Lee J W, Kim SG, Kang DH, John CB, Park BH, Kim DH, Hwang TH. Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Induces Antibody-Mediated Complement-Dependent Cancer Cell Lysis in Humans. *Sci Transl Med.* 2013. 5: 185-163.
- Kim D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med.* 2001. 7: 781-787.
- Kim DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009. 9: 64-71.
- Lee JH, Roh MS, Lee YK, Kim MK, Han JY, Park BH, Trown P, Kim DH, Hwang TH. Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model. *Cancer Gene Ther.* 2010. 17: 73-79.
- Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers.* 2011. 3: 3856-3893.
- Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science.* 1991. 10: 854-856.
- Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr., Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, Kovatich AJ, Lattime EC. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.* 1999. 6: 409-422.
- Parato KA, Senger D, Forsyth PA, Bell JC. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer.* 2005. 5: 965-976.
- Qian C, Liu XY, Prieto J. Therapy of cancer by cytokines mediated by gene therapy approach. *Cell Res.* 2006. 16: 182-188.
- Russell SJ. Replicating vectors for gene therapy of cancer: risks, limitations and prospects. *Eur J Cancer.* 1994. 30: 1165-1171.
- Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N, Bell JC. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000. 6: 821-825.
- Todo T. "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh Migr.* 2008. 2: 208-213.
- Todo T, Martuza RL, Dallman MJ, Rabkin SD. In situ expression of soluble B7-1 in the context of oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001. 1: 153-161.
- Yoo JY, Haseley A, Bratasz A, Chiocca EA, Zhang J, Powell K, Kaur B. Antitumor efficacy of 34.5ENVE: a transcriptionally retargeted and "Vstat120"-expressing oncolytic virus. *Mol Ther.* 2012. 20: 287-297.
- Zhu M, Bristol JA, Xie Y, Mina M, Ji H, Forry-Schaudies S, Ennist DL. Linked tumor-selective virus replication and transgene expression from E3-containing oncolytic adenoviruses. *J Virol.* 2005. 79: 5455-5465.