

# Suicidal gene therapy with rabbit cytochrome P450 4B1/2-aminoanthracene or 4-ipomeanol system in human colon cancer cell

Su Jin Jang<sup>1,2</sup>, Joo Hyun Kang<sup>1,\*</sup>, Byung Seok Moon<sup>3</sup>, Yong Jin Lee<sup>1</sup>, Kwang Il Kim<sup>1</sup>, Tae Sup Lee<sup>1</sup>, Jae Gol Choe<sup>2</sup>, and Sang Moo Lim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging Research Center, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), Seoul, Korea;

<sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine, Korea University Anam Hospital, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea;

<sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

## ABSTRACT

Suicidal gene therapy is based on the transduction of tumor cells with "suicide" genes encoding for prodrug-activating enzymes that render target cells susceptible to prodrug treatment. Suicidal gene therapy results in the death of tumor with the expression of gene encoding enzyme that converts non-toxic prodrug into cytotoxic product. Cytochrome P450 4B1 (CYP4B1) activates 4-ipomeanol (4-IPO) or 2-aminoanthracene (2-AA) to cytotoxic furane epoxide and unsaturated dialdehyde intermediate. In this study, therapeutic effects of suicidal gene therapy with rabbit CYP4B1/2-AA or 4-IPO system were evaluated in HT-29 (human colon cancer cell). pcDNA-CYP4B1 vector was transfected into HT-29 by lipofection and stable transfectant was selected by treatment of hygromycin (500 µg/mL) for 3 weeks. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed for confirmation of CYP4B1 expression in CYP4B1 gene transduced cell. The cytotoxic effects of CYP4B1 transduced cell were determined using dye-exclusion assay after treatment of 2-AA or 4-IPO for 96 hrs. Dye-exclusion assay showed that IC<sub>50</sub> of HT-29 and CYP4B1 transduced HT-29 was 0.01 mM and 0.003 mM after 4-IPO or 2-AA treatment at 96 hrs exposure, respectively. In conclusion, CYP4B1 based prodrug gene therapy probably have the potential for treatment of colorectal adenocarcinoma. *J Radiopharm Mol Probes 1(2):118-122, 2015*

**Key Words:** Suicidal gene therapy, Rabbit cytochrome P450 4B1, Prodrug, Human colon cancer cell

## Introduction

종양 치료에 있어서 기존의 외과수술에 의한 치료나 방사선 치료에 비해 효과적이며 부작용이 적은 치료 방법에 대한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 자살유전자 발현을 이용한 종양의 치료법은 새로운 치료기법으로서 연구가 활발히 진행되고 있다. Suicidal gene therapy 즉 자살유전자 발현을 이용한 종양 치료는 종양세포에 치료용 유전자를 발현하고, 발현된 효소단백질에 의해 독성이 없는 전구체(prodrug)를 독성물질로 전환하여 종양세포를 선택적으로 치료하는 방법이다(1,2).

대표적인 자살 유전자로는 Herpes Simplex Virus에서 유래된 Thymidine kinase (tk)와 박테리아 또는 이스트로부터 유래된 Cytosine Deaminase (CD)가 있다. Thymidine kinase (tk)는 독성 없는 ganciclovir (GCV)를 독성이 있는 triphosphorylated GCV (GCV-TP)로 전환시켜 DNA합성을 저해해 tk를 발현하는 종양세포를 죽이게 된다(3-5).

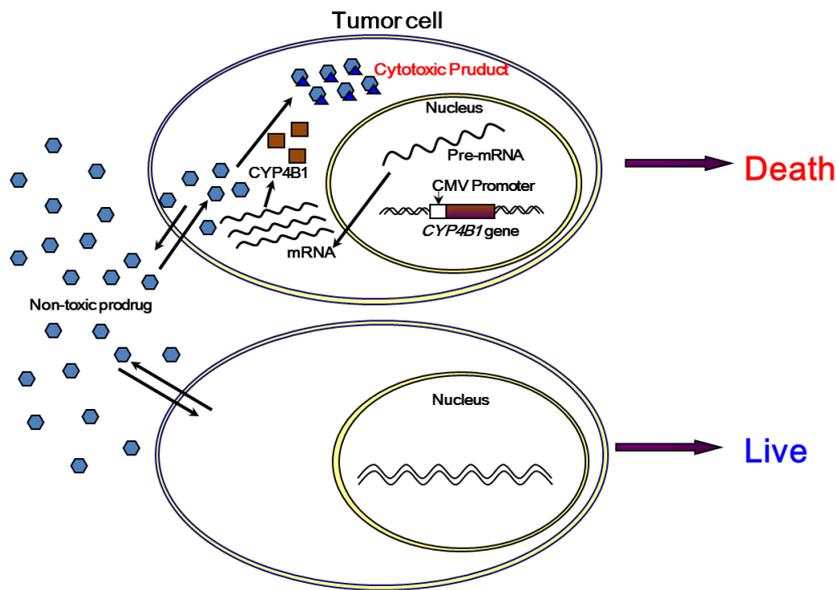
본 연구에서는 토끼 cytochrome P450 4B1 (CYP4B1)을 자살유전자로 사용하였다. CYP4B의 알려진 전구체인 2-aminoanthracene (2-AA) 또는 4-ipomeanol (4-IPO)를 사용하였다(Figure 1). CYP4B1은 이들 전구체를 반응성 있는 furane epoxide와 unsaturated dialdehyde intermediates,

Received: November 11, 2015 / Revised: December 18, 2015 / Accepted: December 19, 2015

**Corresponding Author:** Joo Hyun Kang

Molecular Imaging Research Center, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), 75 Nowon-ro, Nowon-gu, Seoul 01812, Korea  
Tel: +82-2-970-1339, Fax: +82-2-970-1341, E-mail: kang2325@kirams.re.kr

Copyright © 2015, The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes



**Figure 1.** Schematic diagram of CYP4B1 expression mediated prodrug-activating system. Tumor cells expressing CYP4B1 could convert non-toxic prodrug to cytotoxic drug and result in death. Expression of rabbit CYP4B1 in human colon cancer cell line rendered these cells highly sensitive to the prodrugs 4-IPO or 2-AA.

aromatic amines으로 전환하여 DNA 또는 단백질의 alkylation을 유발함으로써 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 사람의 CYP4B1 isozyme은 간과 폐에서 발현하지만 그 활성이 토끼의 CYP4B1에 비해 1% 미만인 것으로 알려져 있다(6-10). CYP4B1/2-AA와 CYP4B1/4-IPO 시스템을 이용하여 자살유전자의 종양치료효과를 쥐 신경교종세포인 C6에서 확인한 결과가 보고되었다(11).

종양치료에 있어 HSV-tk/GCV나 CYP4B1/2-AA 또는 CYP4B1/4-IPO 시스템을 이용하면 이들 자살유전자를 발현하는 종양세포만을 살상하는 치료효과뿐만 아니라 자살유전자가 이입되지 않은 주변 종양세포까지 죽게하는 bystander effect가 있다고 보고되고 있다(12,13). Bystander effect는 인접한 세포사이에 형성된 gap junction을 통해 자살유전자가 발현되는 종양세포로부터 만들어진 세포독성 대사가 전달됨으로써 나타나는 것으로 알려져 있으며 낮은 유전자 이입효율을 보완하여 자살유전자의 치료효과를 증진시키는 것으로 알려져 있다.

자살유전자치료 시스템의 종양 세포 살상효과를 향상시키기 위해서는 자살유전자를 종양세포에 높은 효율로 발현시키기 위한 벡터개발이 중요하다. 자살유전자 전달용 벡터는 크게 비바이러스성 벡터와 바이러스성 벡터로 나뉘어진다. 비바이러스성 벡터는 제조방법이 비교적 쉽고 면역반응을 유발하지 않으며 유전자의 크기 제한이 없다는 장점이 있으나 이입 효율이 낮고 유전자 발현이 일시적이라는 단점이 있다. 바이러스성 벡터는 높은 유전자 전달 효율을 가지나 안전성에 대한 문제가 있다는 단점이 있다.

CYP4B1유전자 발현을 위한 비바이러스성 벡터로 양이온 지질성 리포솜을 이용하여 쥐의 뇌종양 세포주를 치료한 연구와 간암세포주를 치료한 연구 등이 발표되었다(12,14).

현재 HSV-tk를 자살유전자로 적용한 연구는 임상시험 단계까지 갔으나, CYP4B1 유전자는 상대적으로 연구가 덜 진행되었으며 바이러스성 유래가 아닌 비바이러스성 벡터를 사용한다는 점에서 앞으로 연구가 주목받고 있다. 따라서 본 연구에서는 토끼 폐유래 CYP4B1 유전자를 인간 대장암세포(HT-29)에 이입시켜 안정적인 발현 세포주를 만들고, 전구체인 2-AA와 4-IPO에 대한 세포독성을 알아보았다.

## Materials and Methods

### 1. 세포주 구축

American Type Cell Collection (ATCC)로부터 분양받은 인간 대장암세포(HT-29)를 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) 이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (WelGENE, Korea)을 이용하여 175 mm<sup>2</sup> culture flask에서 배양하였다.

종양세포를 6-well tissue culture plate에 well당 3×10<sup>5</sup>개 (100 μL media/well)의 HT-29세포를 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 조건의 37°C 배양기에서 24시간 배양하고 lipofectamine 2000 (Invitrogen) 10 μL를 serum free Opti-mem media (Invitrogen) 250 μL으로 희석한 후 pcDNA-CYP4B1(11) 4 μL를 혼합

후 상온에서 5분간 반응하고 serum free media 1 mL와 섞어 각 well에 첨가하여 4~6시간 5% CO<sub>2</sub> 조건의 37°C 배양기에서 배양한다. 배양이 끝나면 10% fetal bovine serum이 포함된 media로 갈아준 후 18시간 배양한 후, hygromycin 500 µg/mL이 첨가된 media로 3주간 처리하여 발현 세포주 2종류(CYP4B1#1, CYP4B1#3)를 선별하였다.

## 2. CYP4B1 발현 확인

무작위로 4개의 세포주를 선별하여 total RNA 분리하였고, One Step RT-PCR Kit (Qiagen, USA)을 사용하여 CYP4B1 특이 primer인 sense (5'-CTT CCA TTA CGA CGT GCT GA-3')와 antisense (5'-TCA TGC ACA TGG TCA GGT AG-3')을 사용하여 PCR을 시행하였다. Human β-actin에 특이적인 primer인 sense (5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAG GGC-3')와 antisense (5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3')을 internal control로 사용하였다.

## 3. 세포독성 시험

CYP4B1 발현세포와 대조군 HT-29를 6-well tissue culture plate에 1x10<sup>4</sup> cells/well 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 조건의 37°C 배양기에서 24시간 배양 후 2-aminoanthracene (0~0.01 mM) 또는 4-ipomeanol (0~1 mM)을 media에 희석하여 농도별로 처리하여 96시간 배양 후 살아있는 세포 개수를 측정하였다. Trypan-blue solution (Sigma, St Louis, MO, USA) 20 µL와 동량의 세포를 섞어 C-Chip (Digital Bio., Korea)에서 현미경으로 살아있는 세포수를 측정하였다.

# Results

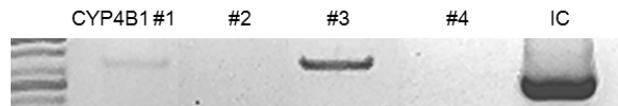
## 1. 인간 대장암세포에 토끼 CYP4B1 유전자 이입 후 안정적 발현 세포주 선별

pcDNA-CYP4B1을 lipofectamine 2000을 이용해 이입시킨 후 hygromycin 500 µg/mL을 3주간 처리하여 CYP4B1의 안정적 발현 세포를 선별하였다. 4종의 세포(CYP4B1 #1, #2, #3, #4)가 무작위로 선별되었으며 각각의 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하였다. 양성대조군으로 β-actin 프라이머를 이용하여 540bp의 밴드를 관

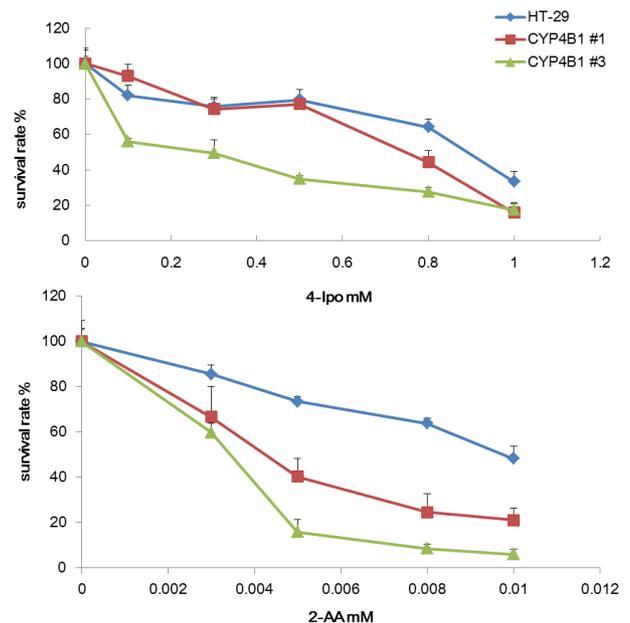
찰하였으며, CYP4B1 프라이머를 이용하여 CYP4B1 유전자가 발현된 4종의 세포 중 2종의 세포(CYP4B1#1, CYP4B1#3)에서 650bp 밴드가 나타났고 음성대조군인 물 또는 유전자가 이입되지 않은 각 세포에서는 CYP4B1이 발현되지 않음을 확인하였다(Figure 2).

## 2. HT-29에서 CYP4B1 발현에 의한 세포독성평가

CYP4B1이 안정적으로 발현하는 세포 CYP4B1 #1 또는 CYP4B1 #3에 독성없는 전구체 (2-AA: 0~0.01 mM 또는 4-IPO: 0~1 mM)를 다양한 농도로 처리하고 96시간 후의 세포생존율을 trypan blue dye-exclusion 방법으로 분석하였다. 대조군(HT-29)에 비해 CYP4B1 유전자 발현세포의 2-AA 또는 4-IPO에 대한 50% 세포성장저해 농도가 훨씬



**Figure 2.** Identification of CYP4B1 expression in CYP4B1 gene transduced HT-29. Confirmation of CYP4B1 expression in HT-29 cells (CYP4B1 #1, #2, #3, #4) by RT-PCR analysis. RT-PCR products of CYP4B1 were 650 bp. The β-actin product was 540 bp amplified PCR product as an internal control.



**Figure 3.** 4-IPO or 2-AA induced cytotoxicity in CYP4B1 gene transduced HT-29. Dose-dependent cytotoxicity of 2-AA or 4-IPO in CYP4B1 gene transduced HT-29 was determined by trypan-blue dye exclusion assay in HT-29 cells. Cell survival rate was measured at 96 h after 4-IPO treatment (upper panel) or 2-AA treatment (lower panel).

낮은 것으로 확인되었으며, 2-AA를 96시간 처리했을 때 0.003 mM인 경우 대조군의 생존율은 86%이지만 CYP4B1이 발현하는 세포에서는 67% (CYP4B1 #1) 또는 60%(CYP4B1 #3)였다. 또한 4-IPO 경우 0.1 mM에서 대조군의 생존율은 82%였고, CYP4B1이 발현하는 세포에서는 56%(CYP4B1 #3)인 것을 확인했다. 반면 CYP4B1 #1의 경우 4-IPO농도 0.8 mM부터 대조군의 생존율(64%)에 비해 생존율(44%)이 떨어짐을 확인했다(Figure 3).

## Discussion

본 연구는 자살유전자인 CYP4B1을 이용한 종양치료 효과를 알아보기 위해 인간 대장암세포인 HT-29를 사용하였고 자살유전자를 발현시키기 위한 유전자 전달방법으로 plasmid transfection법을 이용하였다. 본 연구에서 사용한 plasmid transfection법은 유전자 발현이 불안정하다는 단점이 있다. 이를 보완하고자 자살유전자를 종양 세포에 높은 효율로 발현 또는 감염시키기 위한 방법으로 바이러스성 벡터(아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스등)를 이용할 수 있다. 또한 CYP4B1 유전자 발현에 의한 2-AA 또는 4-IPO에 대한 약제 감수성을 알아보기 위해 사용한 trypan blue dye exclusion assay는 약물의 세포독성 혹은 세포 생존율 검사에 쓰이는 방법으로 죽은 세포를 제외한 살아있는 세포에 의해 측정되는 것으로 살아 있는 세포는 세포막을 통하여 trypan blue 색소가 들어올 수 없기 때문에 사멸세포의 수를 측정함과 동시에 사멸세포의 세포막에 푸른색으로 염색이 됨으로 해서 세포막의 손상 정도를 알 수 있는 방법이다. 세포독성 결과에 따르면 CYP4B1 유전자를 플라스미드 이입을 통해 발현시켰을 때 4-IPO보다 2-AA에 대한 감수성이 높은 것을 알 수 있었다. 이는 bystander effect가 4-IPO보다 2-AA에 대해 높아 본 연구에서도 자살유전자 치료효과를 증진시킨 것임을 예측해볼 수 있고, 기존에 CYP4B1 유전자가 발현된 신경교종 세포주중의 하나인 9L을 2-AA로 처리했을 경우 약물의 IC<sub>50</sub> 값이 1 μM로 보고된 것에 비교할 만한 수준 (3 μM)을 나타내었다(12). 그리고 자살유전자를 이용한 종양의 치료효과 판정을 위한 영상을 얻기 위하여 형광 (fluorescence)이나 생물발광 (bioluminescence)같은 광학영상을 사용하거나, 감마카메라, Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) 또는 Positron Emission Tomography (PET)같은 핵의학영상 등이 이용되고 있는데 본 연구팀의 이전 연구에서 CYP4B1

발현으로 [<sup>18</sup>F] 또는 [<sup>3</sup>H]으로 표지된 4-IPO의 섭취율 증가 결과를 얻었으므로 CYP4B1 유전자 치료에 의한 치료 효과를 다양한 영상으로 모니터링할 수 있는 가능성을 보고한 바 있다(15).

요약하면 본 연구를 통하여 인간 대장암세포에 CYP4B1 유전자의 안정적 발현을 이루었으며, 이를 RT-PCR을 통해 확인하였다. CYP4B1/2-AA 또는 CYP4B1/4-IPO를 이용한 종양의 안정적 치료효과 유도가 가능하였으며, [<sup>18</sup>F] 또는 [<sup>3</sup>H]으로 표지된 4-IPO의 섭취율 증가 결과를 이전 연구에서 얻었으므로, 이를 종합하여 CYP4B1 유전자 치료에 의한 치료효과를 모니터링할 수 있을 것으로 기대한다.

## Acknowledgments

This work was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by the Korea government (MEST) (NRF-2012M2A2A7013480).

## References

1. Springer CJ, Niculescu-Duvaz I. Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J Clin Invest* 2000;105:1161-1167.
2. Sasaki M, Plate KH. Gene therapy of malignant glioma: recent advances in experimental and clinical studies. *Ann Oncol* 1998;9:1155-1166.
3. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986;46:5276-5281.
4. Li Z, Shanmugam N, Katayose D, Huber B, Srivastava S, Cowan K, Seth P. Enzyme/prodrug gene therapy approach for breast cancer using a recombinant adenovirus expressing Escherichia coli cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 1997;4:113-117.
5. Jang SJ, Kang JH, Kim KI, Lee TS, Lee YJ, Lee KC, Woo KS, Chung WS, Kwon HC, Ryu CJ, Choi TH, Choi CW, Lim SM, Cheon GJ. Application of bioluminescence imaging to therapeutic intervention of herpes simplex virus type I - Thymidine kinase/ganciclovir in glioma. *Cancer Lett* 2010;297:84-90.
6. Smith PB, Tiano HF, Nesnow S, Boyd MR, Philpot RM, Langenbach R. 4-Ipomeanol and 2-aminoanthracene cytotoxicity in C3H/10 T<sup>1/2</sup> cells expressing rabbit cytochrome P450 4B1. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1567-1575.
7. Baer BR, Rettie AE. CYP4B1: an enigmatic P450 at the interface between xenobiotic and endobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 2006;38:451-476.
8. Rainov NG, Dobberstein KU, Sena-Esteves M, Herrlinger U, Kramm CM, Philpot RM, Hilton J, Chiocca EA, Breakefield XO. New prodrug activation gene therapy for cancer using cyto-

- chrome P450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-ipomeanol. *Hum Gene Ther* 1998;9:1261-1273.
9. Czerwinski M, McLemore TL, Philpot RM, Nhamburo PT, Korzekwa K, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Metabolic activation of 4-ipomeanol by complementary DNA-expressed human cytochromes P-450: Evidence for species-specific metabolism. *Cancer Res* 1991;51:4636-4638.
  10. Mohr L, Rainov NG, Mohr UG, Wands JR. Rabbit cytochrome P450 4B1: A novel prodrug activating gene for pharmacogene therapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000;7: 1008-1014.
  11. Jang SJ, Kang JH, Lee TS, Kim SJ, Kim KI, Lee YJ, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM. Prodrug-activating gene therapy with rabbit cytochrome P450 4B1/4-ipomeanol or 2-aminoanthracene system in glioma cells. *Nucl Med Mol Imaging* 2010;44:193-198.
  12. Frank S, Steffens S, Fischer U, Tlolk A, Rainov NG, Kramm CM. Differential cytotoxicity and bystander effect of the rabbit cytochrome P450 4B1 enzyme gene by two different prodrugs: implications for pharmacogene therapy. *Cancer Gene Ther* 2002; 9:178-188.
  13. Kievit E, Nyati MK, Ng E, Stegman LD, Parsels J, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts. *Cancer Res* 2000;60:6649-6655.
  14. Mohr L, Rainov NG, Mohr UG, Wands JR. Rabbit cytochrome P450 4B1: A novel prodrug activating gene for pharmacogene therapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000;7: 1008-1014.
  15. Moon BS, Jang SJ, Kim SJ, Lee TS, Chi DY, Lee BC, Kang JH, Kim SE. Synthesis and evaluation of a <sup>18</sup>F-labeled 4-ipomeanol as an imaging agent for CYP4B1 gene prodrug activation therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 2013;28:588-597.