

□ 원 저 □

Retroviral vector를 이용한 종양괴사인자(TNF- α) 유전자 이입 암세포에서 종양괴사인자 수용체의 발현

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

이혁표*, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구

= Abstract =

The TNF Receptor Expressions in Cancer Cells Transfected with TNF- α cDNA Using Retroviral Vector

Hyuk Pyo Lee, M.D.,* Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Young-Soo Shim, M.D., Sung Koo Han, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine and Lung Institute,
Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : Tumor necrosis factor(TNF) has been considered as an important candidate for cancer gene therapy based on its potent anti-tumor activity. However, since the efficiency of current techniques of gene transfer is not satisfactory, the majority of current protocols is aiming the in vitro gene transfer to cancer cells and re-introducing genetically modified cancer cells to host. In the previous study, it was shown that TNF-sensitive cancer cells transfected with TNF- α cDNA would become highly resistant to TNF, and the probability was shown that the acquired resistance to TNF might be associated with synthesis of some protective protein. Understanding the mechanisms of TNF-resistance in TNF- α cDNA transfected cancer cells would be an important step for improving the efficacy of cancer gene therapy as well as for better understandings of tumor biology. This study was designed to evaluate whether the levels of TNF receptor mRNA expression and soluble TNF receptor release from cancer cells are changed after TNF- α cDNA transfection.

Method : We transfected TNF- α c-DNA to WEHI164(murine fibrosarcoma cell line), NCI-H2058(human mesothelioma cell line), A549(human non-small cell lung cancer cell line), ME180(human cervix cancer cell line) cells using retroviral vector(pLT12SN(TNF)) and confirm the expression of TNF with PCR, ELISA, MTT assay. Then we determined the TNF resistance of TNF- α cDNA transfected cells(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF) and evaluated the TNF receptor mRNA expression with Northern

*현재는 인제대학교 의과대학 내과학교실 근무

blot analysis and soluble TNF receptor release with ELISA.

Results : The TNF receptor mRNA expressions of parental cells and genetically modified cells were not significantly different. The soluble TNF receptor levels of media from genetically modified cells were lower than those from parental cells.

Conclusion : The acquired resistance to TNF after TNF- α cDNA transfection may not be associated with the change in the TNF receptor and the soluble TNF receptor expression.

Key words : Tumor necrosis factor(TNF), Gene transfection, Resistance, Mechanism, Protective protein, TNF receptor, Soluble TNF receptor

서 론

생쥐를 BCG(bacillus Calmette-Guerin)로 전처치한 후 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 종양의 괴사를 유도하는 물질이 발견되어 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)라 명명된 이래¹⁾, TNF가 여러 암세포에 대해서 생체 내에서 세포독성(hemorrhagic necrosis in vivo, cytolysis in vitro)을 보임이 알려져 있다^{2,3)}. 또한, TNF는 암세포에 대한 세포독성(antitumor effect)외에도 염증반응과 면역조절에 관여하고 cachectic effect를 나타낼 뿐만 아니라 항바이러스 효과까지 있음이 알려져 있다⁴⁾. TNF가 생체 내에서 암세포에 대해 세포독성을 일으키는 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않지만 생체 외에서의 cytolysis는 TNF의 직접적인 작용이 중요할 것으로 알려져 있으며 반면 생체 내에서는 간접적인 작용, 예를 들면 TNF가 염증세포를 활성화시킴으로써 동원된 염증세포의 작용으로 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 작용이 중요할 것으로 생각되고 있다. TNF에 강력한 항암 효과가 있음에도 불구하고 전신적으로 쓸 경우 부작용이 심할 뿐만 아니라⁵⁾ 반감기가 약 30분 내외로 아주 짧아 임상적 이용은 거의 불가능하였다.

최근 분자생물학의 발전에 힘입어, 사람의 TNF 유전자의 염기서열이 밝혀졌고 이를 통해서 재합성 TNF생산이 가능하게 되었을 뿐만 아니라^{6,7)}, retrovirus를 이용한 유전자 이입법이 개발되어서 사

람을 포함하는 포유동물세포에 원하는 유전자를 이입시켜 발현시키는 것이 가능하게 되었는데 바^{8~10)}, 이런 분자생물학적인 발전을 토대로 하여 TNF 유전자를 생체 외에서 직접 암세포에 이입하여서 TNF 유전자가 이입된 세포에서 TNF를 발현시켜 TNF를 생성하게 함으로써 항암 효과를 기대하는 노력이 최근 진행되었다¹¹⁾.

그런데 과거의 저자들의 연구를 포함한 여러 연구에서 TNF 유전자를 이입받은 세포는 TNF의 세포독성에 대한 감수성에 변화를 일으켜 TNF에 감수성이 있던 세포도 TNF에 내성을 보인다는 것이 증명되었으며¹²⁾, 그 과정에 미지의 유전자의 전사과정을 수반한 어떤 방어적 단백질이 관여할 것이라는 시사가 있었으나¹³⁾ 그것이 무엇인지 구체적인 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 이러한 내성의 기전을 밝히는 것은 일반적인 종양생물학의 이해를 넓히기위해서 뿐만 아니라 효과적인 cytokine을 이용한 항암 유전자요법을 위해서도 매우 중요한 과제라 생각되는 바이다.

한편 여러가지 암세포주가 TNF에 대해 감수성을 보이거나 내성을 띄게 되는 기전에 대해서도 아직 명확히 밝혀진 바는 없고, 세포가 가진 TNF 수용체(TNF receptor)의 숫자의 차이가 고려의 대상이 될 수 있겠으나 몇몇 연구에서 상반된 결과를 보고한 바 있다^{14~17)}. TNF 수용체는 2가지(55kDa의 TNF 수용체 I 과 75kDa의 TNF 수용체 II)가 있는 것으로 알려져 있는데 둘 다 TNF- α 와 TNF- β 에 affinity를 가지고 있으나 세포독성에는 TNF 수용체 I이 주

로 관여하는 것으로 생각되고 있다^{18~20}).

만성신부전 환자의 소변에서 TNF 결합 단백질(TNF binding protein : TBP)이 발견된 이후^{21, 22}), 이것은 정상 건강인의 혈청에서도 낮은 수준으로 존재하며²³) 악성종양, 류마치스성 관절염, 패혈증, 실험적으로 유발된 염증상태 등 여러 병적 상태에서는 수치가 증가되어 있는 것이 발견되었고^{24~27}), 이 물질은 TNF- α 와 TNF- β 의 생물학적 활성을 중화할 수 있다고 밝혀졌다²⁸). TNF 결합 단백질은 두가지 TNF 수용체(I과 II)의 extracellular domain의 일부와 구조가 같아 이 수용체가 떨어져 나온 것으로 생각되며 각각 수용성 TNF 수용체 I, II(soluble TNF receptor I, II) 또는 TNF 결합 단백질 I, II(TNF binding protein I, II)로 불리고 있다. 이 수용성 TNF 수용체의 생리적 역할은 잘 알려져있지 않으나 세포의 TNF 수용체와 TNF를 두고 결합에 경쟁관계에 있게되어 세포를 보호한다는 주장^{29, 30})과 낮은 수준의 TNF에서는 TNF와 결합하여 안정시킴으로써 TNF 저장 창고(reservoir) 역할을 한다는 설이 제기되고 있다³¹).

이상의 연구 결과들을 바탕으로 연구자들은 TNF 유전자 이입 전후에 TNF 수용체 mRNA 발현의 차이와 수용성 TNF 수용체의 세포 외 유리의 차이를 살펴봄으로써 획득내성의 기전을 밝혀보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주와 배양법

이 실험에는 4가지의 인체 및 생쥐 기원의 암세포주, 즉 생쥐 섬유육종 세포주(murine fibrosarcoma cell line)인 WEHI164 세포주(ATCC CRL # 1751), 인체 중피종 세포주(human mesothelioma cell line)인 NCI-H2058 세포주(ATCC 미등록 세포주), 인체 비소세포폐암 세포주(human non-small cell lung cancer cell line)인 A549 세포주(ATCC CCL # 185), 인체 경부암 세포주(human cervix cancer cell line)인 ME180 세포주(ATCC

HTB #33) 등 4 가지의 세포주를 사용하였다.

각 세포주와 TNF 유전자를 함유한 retroviral vector를 포함하는 pLT12SN plasmid, 그리고 packaging 세포주인 PA317은 미국 국립보건원(NIH)에서 얻었다. 각 세포주는 RPMI-1640배지에 10% 우태혈청과 항생제(sodium penicillin G 10,000U/ml, streptomycin 10mg/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였다.

2. Retroviral vector의 생산

본 실험에서 사용된 retroviral vector는 Moloney murine leukemia virus를 변형시킨 것으로 Moloney murine leukemia virus의 gag, pol, env gene 대신에 사람 TNF- α 유전자와 선택표식 유전자(selectable marker gene)인 Neo^R 유전자를 삽입하여, retrovirus의 5'LTR(long terminal repeat)이 TNF- α 유전자를 promote하고 SV40 promotor는 Neo^R 유전자를 promote하도록 설계되어 있다^{12, 13}). 이 retroviral vector를 calcium-phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection시킨 후 neomycin analogue인 G418 (0.8mg/ml)을 포함하는 배지에 배양하여 유전자가 이입된 clone을 선택하였다. 그런 다음 PA317세포를 직경 10cm dish에 배양하여 dish를 60% 채울 정도로 자라게 되면 배지를 교환하였다. 다시 24시간 배양 후 PA317세포를 배양한 배양액을 0.22 μ m 필터로 걸러서 인체 세포에 대한 감염성을 지닌 재합성 retroviral vector를 얻었으며 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 얼려 보관하였다.

3. 세포주에 TNF 유전자 이입과 선택

각 세포주는 배양하여 직경 10cm dish를 70% 정도 채우게 자라면 -70°C에 보관한 감염력있는 재합성 retrovirus vector를 함유하는 배양액으로 교환하여 polybrene(최종농도 8 μ g/ml)을 첨가하고 하루밤동

안 배양하였다. 다음날 retrovirus 함유 배지를 버리고 RPMI-1640으로 바꾸어 24시간 추가 배양하였다. 그리고나서 G418(최종농도 1mg/ml)이 포함된 배지에서 배양하여, Neo^R 유전자를 선택표식 유전자(selectable marker gene)로 하여 TNF 유전자가 이입된 세포의 선택을 시행하였다.

4. TNF 유전자 이입의 확인

실험 대상 세포주의 genomic DNA에 TNF 유전자가 이입되었는 지는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)으로 확인하였다.

TNF 유전자 이입을 확인하고자 하는 각 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF), 그리고 각각의 모세포주(parental cell line)에서 genomic DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 100µg/ml의 proteinase K와 0.5% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함하는 digestion buffer 1ml를 10cm dish에 꼭 차게 자란 세포에 넣고 이리저리 흔든 다음 microfuge tube에 옮긴 후, 12~16시간 동안 50°C에서 반응시켰다. 그후 sample의 1/2부피의 phenol과 sample의 1/2부피의 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 넣고 서서히 섞어 주었다. 그런 다음 6, 800g로 10분간 원심한 후 상층액을 얻었고, phenol과 chloroform/isoamyl alcohol 처리 과정을 한 번 더 반복하였다. 이렇게 얻은 상층액에 7.5M ammonium acetate를 1/2부피 추가하고, 냉장 보관한 100% ethanol을 sample의 2배 부피로 추가하여 DNA가닥이 침전됨을 확인하였고, 1,700g에서 2분간 원심하여 genomic DNA를 얻었다.

이와 같이 추출한 genomic DNA를 PCR의 template로 삼았다. 그리고 TNF 유전자 함유 retroviral vector의 선택표식으로 사용한 Neo^R 유전자의 일부 염기 서열(Neo 1, Neo 5)을 primer¹²

¹³⁾로 써서 PCR(95°C 1분, 64°C 1분, 72°C 1분씩

30회 반복)을 시행하였다. 시행후 1% agarose gel로 전기영동시킨 다음 ethidium bromide로 염색하여 DNA band를 관찰하였다. 이때 음성 대조군(negative control)으로 증류수와 TNF 유전자를 이입시키지 않은 각 모세포주들을 이용하였고, 양성 대조군(positive control)으로는 본 실험에 이용한 retroviral vector를 포함하는 plasmid인 pLT12SN의 DNA를 이용하였다.

5. ELISA를 이용한 이입된 TNF 유전자 발현 확인

TNF 유전자가 이입된 세포주로부터 TNF가 발현되어 생산되는지 TNF ELISA kit(R&D사, QuantikineTM human TNF-α Immunoassay)를 이용하여 측정하였다.

TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 각 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF)를 10⁶개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3ml되도록 심어서 24시간 동안 생산한 TNF의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 각 모세포주도 동일한 방법으로 상층 배양액을 얻어 TNF를 생산하는지 비교하였다.

6. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 TNF에 대한 감수성 측정

각 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주를 각각 well당 10⁴세포씩 96well plate에 심은 후 12시간 배양한 다음 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF-α)를 최종농도가 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml이 되도록 well에 첨가하였다. 36시간 추가 배양 후 세포 사망률을 MTT assay로 측정하였다. 즉 MTT용액(2mg/ml)을 well당 50µl씩 넣고 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 200g 10분 원심하여 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150µl/well 넣고 15분간 흔들어서 섞고 하루밤 배양하여 microplate판독기(Molecular Device사, Ther

mo-max)로 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포사망률(cytotoxicity)은 다음과 같이 구하였다.

cytotoxicity(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{optical density with TNF}}{\text{optical density without TNF}}\right) \times 100$$

7. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 TNF 수용체(receptor I) mRNA 발현 평가

1) 실험 조건

각 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주를 직경 10cm dish에 2개씩 배양하여 거의 채울 정도로 자라면, 그 중 하나는 보통의 배양액으로 배양액을 갈아주고, 또 하나는 최종 농도 10ng/ml의 TNF (Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 포함하는 배양액으로 갈아주어 똑같이 12시간 추가로 배양한 후 총RNA를 추출하여 Northern blot analysis를 시행하였다.

2) Northern blot analysis

총RNA의 추출에는 Chomczynski와 Sacchi의 single step acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 추출법³²⁾을 modify한 GIBCO BRL사의 TRIZOL® reagent를 이용하였다.

모두의 배지를 제거하고 phosphated buffered saline(PBS)로 2번 씻어낸 후 TRIZOL® reagent 1.5ml를 넣어 cell lysate를 만들어 여러번 pipette를 통과시키고 1.5ml microcentrifuge tube로 옮겨 상온에서 5분 방치하고 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 세게 흔든다. 상온에서 2~3분 배양하고 12,000g 4도에서 15분 원침하여 상층부를 새 tube에 옮기고 0.7ml의 isopropyl alcohol을 넣고 섞어 RNA를 precipitate시키면서 상온에서 10분간 방치한 후 12,000g 4도로 10분간 원침하여 상층부를 버리고 75% ethanol 1ml로 RNA 침전물을 세척한다. RNA 침전물을 적당히 물기를 말린 후

DEPC-treated water로 녹이고 정량하여 다음 실험에 사용할 때까지 냉동 보관한다.

동량의 RNA(5 μ g)를 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동하여 분리하고 RNA를 capillary method를 이용하여 nylon membrane으로 transfer시키고 UV를 사용하여 고정시켰다.

Oncor사의 Hybrisol™[®] (containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagent)을 사용하여 42도 1시간 prehybridization을 하고 Promega사의 Prime-a-Gene labelling system(random hexamer법)을 이용하여 ³²P labelling한 TNF receptor I cDNA를 넣어 42도 16시간 hybridization시키고 washing solution(solution I: 1x SSC/0.1% SDS 15분, solution II: 0.1x SSC/0.1% SDS 15분)으로 씻어내고 intensifying screen이 들어있는 X-ray film cassette에 membrane을 넣어 -70도에서 3일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다. 정확히 동량의 RNA로 보정하기 위해 house keeping gene인 β -actin cDNA로 같은 membrane을 다시 hybridization 및 autoradiography, densitometry하여 그 relative density를 가지고 TNF 유전자 이입 유무 및 TNF 처리 유무에 따른 mRNA 발현의 차이를 비교하였다.

8. 수용성 TNF 수용체의 발현 평가(ELISA)

Human soluble TNF receptor I ELISA kit(R & D사, Quantikine™ human sTNF Immunoassay)를 이용하여 세포배양상층액의 수용성 TNF 수용체의 양을 측정하였다.

WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180 세포주 등 4가지 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF 세포주)를 10⁶개씩 각각 2개의 5cm dish에 배지의 양이 3ml가 되도록 심어서 12시간 배

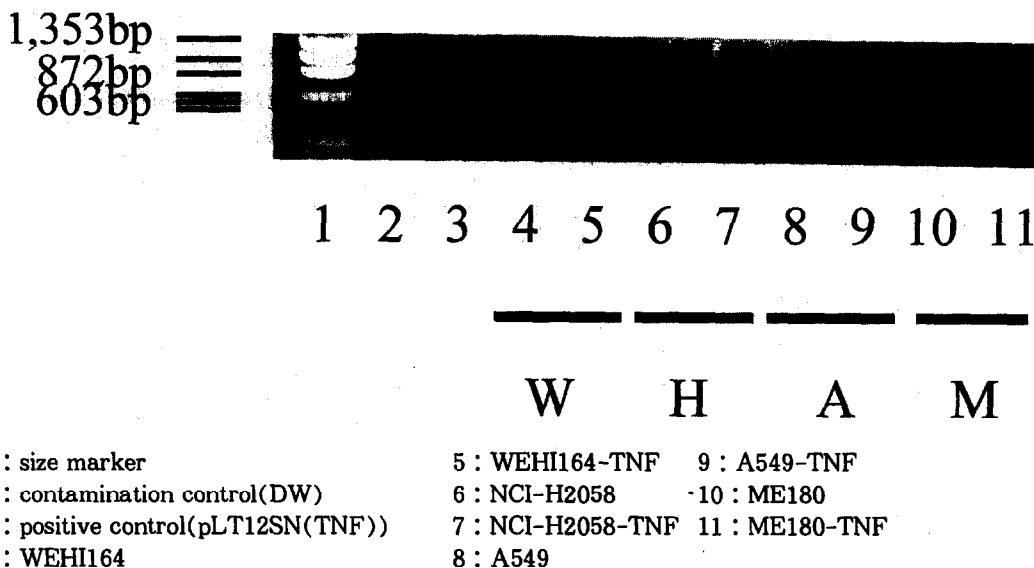


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of NEO^R gene PCR amplification.

Table 1. Total TNF produced by 10⁶cells during 24hr culture

Cell	TNF produced (ng/24hr/10 ⁶ cells)
WEHI164	ND
WEHI164-TNF	1.91 ± 0.12
NCI-H2058	ND
NCI-H2058-TNF	3.63 ± 0.20
A549	ND
A549-TNF	3.90 ± 0.05
ME180	ND
ME180-TNF	3.91 ± 0.13

*ND : not detectable

양하고 그 중 하나에는 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 최종농도가 10ng/ml가 되도록 넣고, 또 하나는 그대로 12시간을 더 배양한 후 배양상층액을 얻어 TNF 유전자 이입 유무 및 TNF 처리 유무에 따른 수용성 TNF 수용체의 발현 차이를 비교하였다.

9. 결과 분석

모든 자료의 그래프는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 각 군간의 비교는 스튜던트 t-검정을 적용하였다.

결 과

1. DNA 수준에서 유전자 이입의 확인

각 모세포주에 TNF 유전자가 제대로 이입되었는지를 확인하기 위하여 그 genomic DNA를 가지고 PCR을 시행하였고, TNF 유전자를 이입시키지 않은 모세포주의 genomic DNA를 가지고 PCR 시행한 것과 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)를 PCR 시행한 것과 함께 전기영동하여 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 TNF 유전자가 이입된 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF) 및 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보이는 반면 모세포주인 WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180

세포주에서는 790 base pair의 DNA band가 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

2. ELISA를 이용한 이입된 TNF 유전자의 단백질 수준의 발현 확인

TNF 유전자가 이입된 세포주를 배양한 배양 상층액에서 ELISA로 TNF양을 측정한 결과(Table. 1), WEHI164-TNF 세포는 $1.91 \pm 0.12\text{ng}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, NCI-H2058-TNF 세포는 $3.63 \pm 0.20\text{ng}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, A549-TNF 세포는 $3.90 \pm 0.05\text{ng}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, ME180-TNF 세포는 $3.91 \pm 0.13\text{ng}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 의 TNF를 생산하였다. 반면, 모세포주인 WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180 세포

는 TNF를 검출 가능한 수준으로는 생산하지 않았다.

3. TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 유전자 이입 전후의 TNF에 대한 세포주의 감수성(세포사망률)을 TNF의 농도 변화에 따라 비교하였다(Fig. 2, Fig. 3).

WEHI164의 경우 TNF 농도 100ng/ml에서 모세포는 $82.9 \pm 0.7\%$ 의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 $20.3 \pm 4.4\%$ 의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었고($p < 0.01$), NCI-H2058($12.0 \pm 3.3\%$ 대 $0.7 \pm 1.2\%$, $p < 0.01$)와 ME180($55.8 \pm 1.5\%$ 대 $2.2 \pm 5.1\%$, $p < 0.01$)도 차이가 있었으나, A549($27.9 \pm 1.8\%$ 대 22.9 ± 3.0

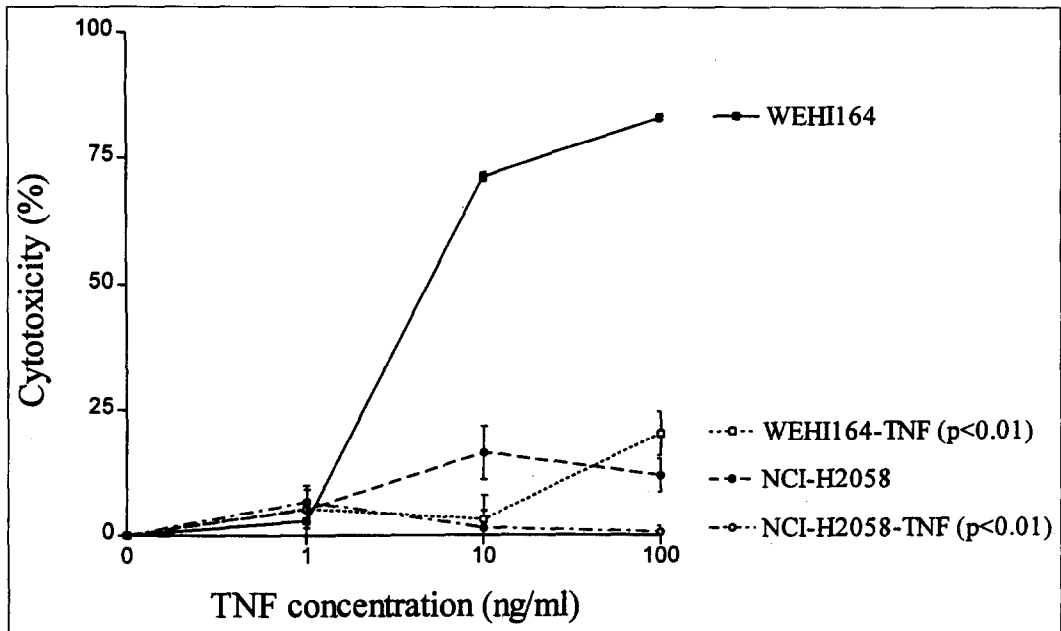


Fig. 2. Comparison of sensitivity of WEHI164 and NCI-H2058 to exogenous TNF before and after TNF- α gene transfection.

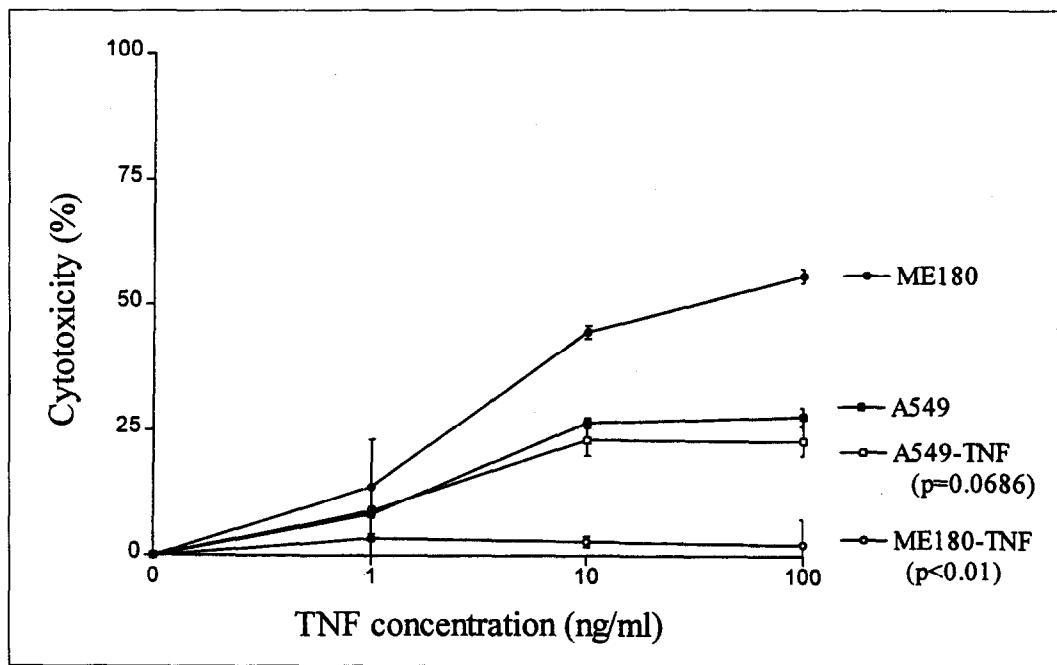


Fig. 3. Comparison of sensitivity of A549 and ME180 to exogenous TNF before and after TNF- α gene transfection.

%, $p=0.0686$)는 유의한 차이가 없었다. NCI-H2058과 A549 세포주가 TNF에 비교적 내성을 보인다는 점을 고려하면 적어도 TNF에 감수성을 보이는 세포주에서는 TNF 유전자가 이입된 후 자신의 모 세포주에 비해 TNF에 의한 세포독성에 뚜렷한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

4. TNF 유전자 이입 전후의 TNF 수용체(receptor I) mRNA 발현 양상(spontaneous & with exogenous TNF)

4가지 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주에서 exogenous TNF 처리 유무로 나누어 TNF receptor I의 mRNA 발현 정도를 β -actin mRNA 발현에 대한 상대적 density를 가지고 비교하였다(Fig. 4).

WEHI164 세포는 모든 군에서 사람 TNF 수용체

의 mRNA는 발현되지 않았고, 나머지 세포주에서는 TNF 유전자 이입 전후에 TNF 수용체의 mRNA 발현에 차이가 없었으며 exogenous TNF 처리 여부에 따라서는 차이가 없었다.

5. TNF 유전자 이입 전후의 수용성 TNF 수용체의 발현 양상

4가지 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주에서 exogenous TNF 처리 유무로 나누어 그 배양 상층액에서 수용성 TNF 수용체의 발현 정도를 ELISA로 측정하였다(Table. 2).

WEHI164 세포는 모든 군에서 수용성 TNF 수용체가 검출이 되지 않았으며, 나머지 세포주에서는 모든 검체에서 수용성 TNF 수용체가 검출이 되었다.

Exogenous TNF를 주지 않았던 검체중에서는 모 세포주에서가 TNF 유전자가 이입된 세포주에서보다

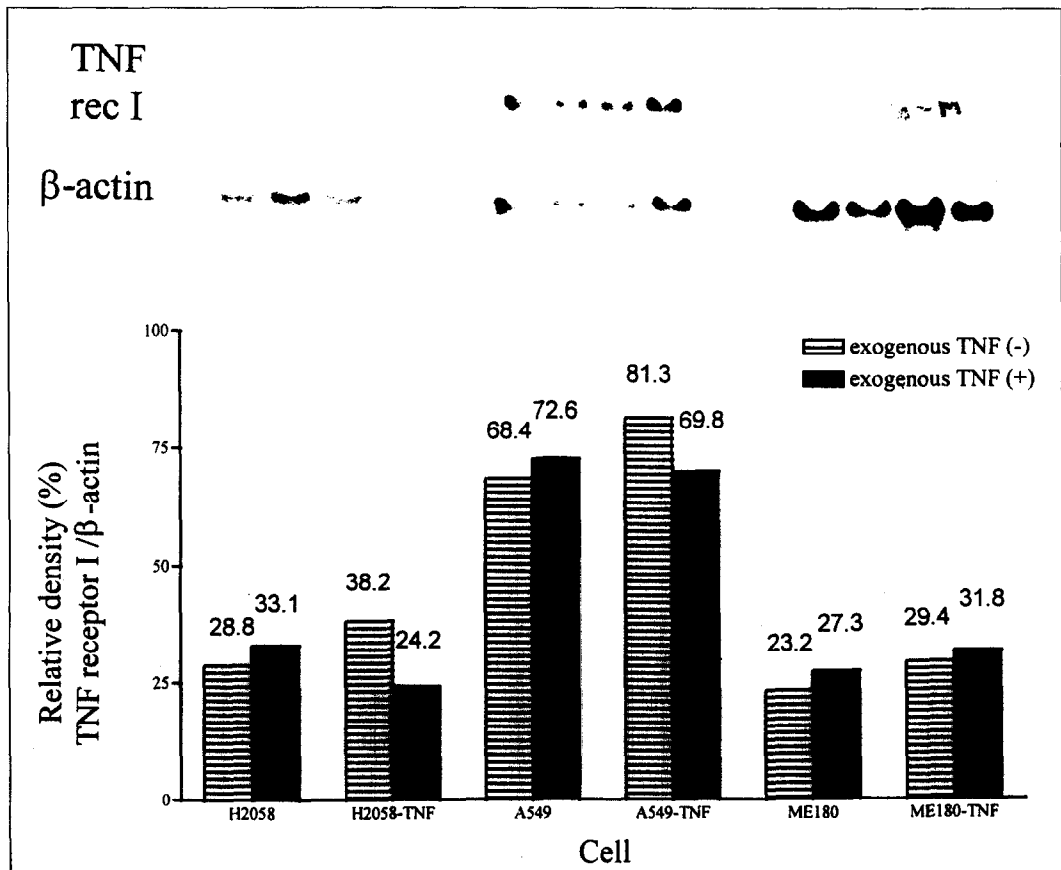


Fig. 4. Comparison of TNF receptor I m-RNA expression before and after TNF- α gene transfection(without/with exogenous TNF treatment).

더 많은 양이 검출되었다([NCI-H2058]: $460.8 \pm 40.5\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $251.1 \pm 21.0\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p < 0.01$; [A549]: $1694.1 \pm 397.5\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $720.9 \pm 105.3\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p < 0.05$; [ME180]: $555.9 \pm 28.5\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $222.9 \pm 24.6\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p < 0.01$).

Exogenous TNF를 주었던 검체에서는 NCI-H2058 세포는 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주 사이에 차이가 없었으며($235.5 \pm 29.1\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $238.8 \pm 62.7\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p = 0.9381$) A549 세포($1741.2 \pm 315.6\text{pg}/24\text{hr}/10^6$

cells 대 $685.5 \pm 34.8\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p < 0.01$)와 ME180 세포($342.6 \pm 33.6\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $187.8 \pm 63.9\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p < 0.05$)에서는 모세포주에서가 TNF 유전자가 이입된 세포주에서보다 더 많은 양이 검출이 되었다.

각 모세포주 및 TNF 유전자가 이입된 세포주에서 exogenous TNF를 처리하지 않았던 그룹과 처리한 그룹을 비교하면 모세포주에서는 A549 세포는 exogenous TNF 처리 유무에 따라 차이가 없었고($1694.1 \pm 397.5\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 대 $1741.2 \pm 315.6\text{pg}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$, $p = 0.8891$) NCI-H2058 세포(460.8

Table 2. Total soluble TNF receptor I released by 10⁶cells during 24hr culture(pg/24hr/10⁶cells)

Cell	Exogenous TNF(-)	Exogenous TNF(+)
WEHI164	ND	ND
WEHI164-TNF	ND	ND
NCI-H2058	460.8 ± 40.5	235.5 ± 29.1
NCI-H2058-TNF	251.1 ± 21.0	238.8 ± 62.7
A549	1,694.1 ± 397.5	1,741.2 ± 315.6
A549-TNF	720.9 ± 105.3	685.5 ± 34.8
ME180	555.9 ± 28.5	342.6 ± 33.6
ME180-TNF	222.9 ± 24.6	187.8 ± 63.9

*ND : not detectable

± 40.5pg/24hr/10⁶cells 대 235.5 ± 29.1pg/24hr/10⁶cells, $p < 0.01$)와 ME180 세포(555.9 ± 28.5pg/24hr/10⁶cells 대 342.6 ± 33.6pg/24hr/10⁶cells, $p < 0.01$)에서는 exogenous TNF를 처리하지 않았던 검체에서가 처리한 검체에서보다 더 많은 양이 검출되었으며; TNF 유전자가 이입된 세포주에서는 모든 세포에서 exogenous TNF 처리 유무에 따른 차이가 없었다([NCI-H2058] : 251.1 ± 21.0pg/24hr/10⁶cells 대 238.8 ± 62.7pg/24hr/10⁶cells, $p = 0.7635$; [A549] : 720.9 ± 105.3pg/24hr/10⁶cells 대 685.5 ± 34.8pg/24hr/10⁶cells, $p = 0.6098$; [ME180] : 222.9 ± 24.6pg/24hr/10⁶cells 대 187.8 ± 63.9pg/24hr/10⁶cells, $p = 0.4248$).

고 찰

1980년대 초에 retrovirus를 이용한 유전자 이입이 시도된 이래, 최근에는 환자 치료에까지 retrovirus를 이용한 유전자 이입 방법이 시도되고 있다^{9,10}. Retrovirus를 이용한 유전자 이입법은 이입된 유전자가 숙주 세포의 genomic DNA에 삽입되어 지속적으로 이입된 유전자를 발현시키는 장점과, 물리적인 방법이나 화학적인 방법으로 유전자를 이입하는 것보다 유전자 이입률이 높은 장점이 있어서 최근 임상적으로

응용되는 유전자 이입은 대부분 retrovirus를 이용한 유전자 이입법을 쓰고 있다. 그러나, retrovirus를 이용한 유전자 이입은 생체 내에서 직접 적용하여 감염시킬 경우 그 효율이 낮기 때문에, 생체 외에서 retroviral vector를 이용하여 세포에 유전자의 이입을 시도한 후 선택과정을 거쳐 숙주(host)에 주입하는 방법을 쓴다. 그런데, 이 과정에서 이입된 유전자가 TNF 등의 세포독성이 있는 cytokine일 경우 내성이 문제가 된다³³.

Tumor Necrosis Factor는 1975년 생쥐를 BCG로 전처치한 다음 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 발견한 이래, 여러 암세포에 생체 내(in vivo)에서는 출혈성 괴사를 일으키고, 생체 외(in vitro)에서는 cytolysis를 보임이 밝혀져 있다^{2,3}. 그러나, 이런 TNF의 암세포에 대한 세포독성을 인체에 응용하기에는 문제점이 있다. 즉, TNF가 효과적인 항암 효과를 나타낼 수 있는 용량은 400~500µg/kg/day이지만 TNF의 전신 독성 때문에 5µg/kg/day 이상으로 인체내에 투여할 수 없다³. 이런 TNF의 전신 독성을 피하면서 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여, TNF 유전자를 암세포주에 이입시키고 발현시켜서 암세포 주위에서만 TNF의 농도를 높게 유지하는 방법이 시도되었다³⁴. 이런 시도 중, 생체 외(in vitro) 실험의 경우 기대한 바와는 달리, TNF에 감

수성이 있어서 TNF에 의해 죽던 모세포가 TNF 유전자가 암세포주에 이입되고 나서는 TNF의 세포독성에 내성을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있다³⁵⁾. 본 연구자들의 이번 연구에서도 여러가지 세포주들에서 TNF 유전자의 이입에 따라 TNF에 대한 내성도 획득됨이 증명되었다. TNF에 감수성인 WEHI164 세포주와 ME180 세포주는 현저하게 TNF에 내성을 보이는 감수성의 변화가 관찰되었고 비교적 TNF에 자연적인 내성을 보이는 NCI-H2058 세포주와 A549 세포주는 통계적 의미가 경제선상인 작은 감수성의 변화만을 보였으나 적어도 더 내성을 보이는 쪽으로의 변화 경향은 관찰할 수 있었다.

TNF 유전자 이입 전후의 TNF 수용체의 mRNA 발현의 정도를 측정한 본 연구에서 TNF 유전자 이입에 관계없이 TNF 수용체의 mRNA 발현은 비슷하였으며 거기에 추가적으로 TNF를 주더라도 변화는 관찰되지않아 TNF에 대한 감수성의 차이(획득내성 뿐 아니라 자연적인 내성도)는 TNF 수용체 발현의 차이에 의한 것은 아니라는 간접증거가 될 수 있겠다. 본 실험에서 WEHI164 세포주는 결과를 얻을 수 없었는데 이는 WEHI164 세포주는 생쥐 기원의 세포로 TNF는 생쥐와 사람의 것이 상당 부분 homology를 보이거나 TNF 수용체는 그렇지 않기 때문에 생긴 결과로 생각할 수 있겠다.

TNF 유전자 이입 전후 및 exogenous TNF 처리 유무에 따른 세포에서 외부로의 수용성 TNF 수용체의 유리 정도를 측정한 본 실험에서 자연적 내성 및 획득 내성에 따른 차이는 없었고, 다만 세포 종류에 따른 차이는 있고, 각 세포군내에서는 TNF 유전자 이입으로 세포 자체에서 생산되었거나 외부에서 주었거나 TNF가 존재하면 수용성 TNF 수용체는 더 적게 검출되는 경향은 관찰되어, 수용성 TNF 수용체는 TNF에 대한 내성의 원인 기전으로 작용하지는 않는 것으로 보이며 적어도 TNF가 고농도로 존재할 때는 TNF 활성도에 반비례하는 이차적 현상으로 해석된다. 이 실험에서도 TNF 수용체의 Northern analysis에서와 같은 이유로 WEHI164 세포주에서는 수용

성 TNF 수용체의 검출이 되지 않았다.

Baglioni 등은 인체 림프구계통의 세포주에서 TNF에 대한 감수성이 있는 것과 없는 것은 TNF의 binding site 수에 차이가 있다고 하여 세포의 TNF 수용체 수로 TNF에 대한 감수성 유무를 설명하였으나¹⁴⁾, 그 이후 대부분의 연구에서는 TNF 수용체 수의 차이로는 각 세포의 TNF 감수성-내성을 설명할 수 없었으며 TNF 수용체의 세포 내로의 이동(internalization)과 분할(cleavage)에도 무관하여¹⁶⁾ TNF 수용체에 결합 이후의 세포내 신호전달체계에 차이가 있을 것이라는 주장도 있었다¹⁷⁾.

이상의 연구에서 TNF 유전자 이입 후 TNF에 대한 내성의 획득 기전은 과거의 연구에서 미지의 방어 단백질의 de novo 합성에 의한 가능성을 시사하는 결과를 얻었으며 이번 연구에서는 TNF 수용체 발현 차이에 의한 것은 아니라는 결과를 얻었으므로 향후 항산화작용의 효소를 비롯한 방어 단백질에 대한 연구 및 TNF와 TNF 수용체의 결합 이후의 신호전달체계에 대한 연구가 진행되어야할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

종양괴사인자(tumor necrosis factor ; TNF)는 다양한 생물학적 기능을 가지고 있는 바, 그 중 생체 외에서 증명된 뚜렷한 항암 효과로 말미암아 최근 항암 유전자요법의 중요한 대상으로 관심을 모으고 있다. 현재 유전자 이입의 기술적 문제로 생체 외에서 암세포에 유전자 이입을 시행한 후 이를 다시 환자의 생체 내로 이식하는 방법이 연구의 주종을 이루고 있다. 그러나 저자들의 과거의 연구를 포함한 여러 연구에서 TNF가 이입된 암세포는 TNF에 대해 내성을 보이는 것으로 증명되었고 이에 는 새로이 방어 단백질을 합성하는 것이 관여할 것이라는 시사가 있었다. 이 획득내성의 기전을 밝히는 것이 종양생물학의 이해를 넓히고 보다 효과적인 항암 유전자요법을 개발하기위한 매우 중요한 과제로 생각된다.

저자들을 TNF 유전자 이입에 따른 암세포의 TNF에 대한 획득내성에, TNF 수용체 mRNA 발현의 차이와 수용성 TNF 수용체의 세포 외 유리의 차이가 관련되는 지를 규명하고자 본 실험을 수행하였다.

방 법 :

TNF에 다양한 감수성을 보이는 인체 및 생쥐 기원의 4가지 암세포주(WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180)에 TNF- α 유전자를 retroviral vector를 이용하여 이입하고 TNF의 발현을 시도하여 PCR, ELISA, MTT assay로 확인하였고, TNF 유전자가 이입된 세포(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF)는 TNF에 내성을 보이는 지 역시 MTT assay로 검증하였다. TNF 유전자 이입 전후의 TNF 수용체 mRNA 발현의 차이를 Northern blot analysis를 통하여 비교하였고, 배양액에 유리된 수용성 TNF 수용체의 농도를 ELISA를 통해 비교하였다.

결 과 :

1) TNF- α 유전자 이입 및 발현 확인

PCR을 시행한 결과 TNF 유전자가 이입된 각 세포주는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보인 반면 모세포주는 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 DNA 수준에서 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 그리고 TNF 유전자가 이입된 세포의 배양상층액에서 TNF양을 ELISA로 측정된 결과 TNF를 세포에 따라 1.91ng/24hr/10⁶ cells에서 3.91ng/24hr/10⁶ cells 생산함을 알 수 있었다.

2) TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 농도 100ng/ml에서 WEHI164-TNF와 ME180-TNF 세포는 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) TNF에 대한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

3) TNF 유전자 이입 전후의 TNF 수용체 mRNA와 수용성 TNF 수용체 발현 양상

WEHI164 세포주를 제외한 세포주들에서만 발현되었고 TNF 유전자 이입 전후에 TNF 수용체 mRNA

발현에는 차이가 없었으며, 수용성 TNF 수용체는 TNF 유전자 이입 후의 세포에서가 모세포주보다 적게 검출되었다.

결 론 :

세포주에 TNF 유전자를 이입하여 TNF를 발현하게 하였을 때 그 세포 자신은 TNF에 대해 내성을 획득하게 되는데, 이 획득내성은 TNF 유전자 이입후 TNF 수용체 mRNA나 수용성 TNF 수용체 발현의 변화에 의한 것은 아니라고 판단된다.

참 고 문 헌

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA 72 : 3666, 1975
2. Matthews N : Tumor necrosis factor from the rabbit. Br J Cancer 38 : 310, 1978
3. Sargarm B, Aggarwal BB, Hass PE : Recombinant human tumor necrosis factor- α : effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230 : 943, 1985
4. Aggarwal BB : Tumor necrosis factors - TNF- α and TNF- β : their structure and pleiotropic biological effects. Drugs of the Future 1269 : 891, 1987
5. Champan PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL : Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. J Clin Oncol 5 : 1942, 1987
6. Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Von Der Heyden J, Tizard R, Kwashima E, Shaw A : Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem 152 : 515, 1985
7. Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB : Cloning and expression in Escherichia coli

- of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* 313 : 803, 1985
8. Varmus HE : Form and function of retroviral provirus. *Science* 216 : 812, 1982
9. Cone RD, Mulligan RC : High-efficiency gene transfer into mammalian cells : generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 6349, 1984
10. Miller AD, Rosman GJ : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7 : 980, 1989
11. Anderson WF : Human gene therapy. *Science* 256 : 808, 1992
12. 오연목, 박계영, 정만표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철 : Retroviral vector를 이용한 TNF- α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자(TNF) 감수성에 미치는 효과. *결핵 및 호흡기질환* 41(2) : 87, 1994
13. 이혁표, 오연목, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구 : 암세포에서 retroviral vector를 이용한 종양괴사인자 유전자 이입후 획득된 종양괴사인자 내성의 기전. *결핵 및 호흡기질환* 44(3) : 547, 1997
14. Baglioni C : Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptor on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J Biol Chem* 260 : 13395, 1985
15. Kull FC : Cellular receptor for 125 I-labeled tumor necrosis factor : specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 5756, 1985
16. Tsujimoto M : Tumor necrosis factor : specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 7626, 1985
17. Takahashi N : Mechanism of induction of tolerance to tumor necrosis factor : no involvement of modulators of TNF bioavailability or receptor binding. *Cytokine* 6 : 235, 1994
18. Aggarwal B, Essalu T, Hass P : Characterization of receptors for human TNF and their regulation by gamma IFN. *Nature* 318 : 665, 1985
19. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC : Molecular cloning and expression of a receptor for TNF. *Cell* 61 : 361, 1990
20. Tartaglia LA, Goeddel DV : Two TNF receptors. *Immunol Today* 13 : 151, 1992
21. Peetre C, Thysell H, Grubb A, Olsson I : Tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids. *Eur J Haematol* 41 : 414, 1988
22. Olsson I, Lantz M, Nilsson E, Peetre C, Thysell H, Grubb A, Adolf G : Isolation and characterization of a TNF binding protein. *Eur J Haematol* 42 : 270, 1989
23. Aderka D, Engelmann H, Shermer-Avni Y : Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine Cytokine Res* 3 : 157, 1992
24. Aderka D, Engelmann H, Hormik V, Skornick Y, Levo Y, Wallach D, Kushtai G : Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 51 : 5602, 1991
25. Heilig B, Wermann M, Gallati H, Brockhaus M : Elevated TNF receptor plasma concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Invest* 70 : 22, 1992
26. Girardin E, Lombard PR, Grau GE : Imbalance between tumor necrosis factor- α soluble TNF receptor concentrations in severe meningococemia. *Immunology* 76 : 20, 1992
27. Spinass G, Keller U, Brockhaus M : Release of sol-

- uble receptors for tumor necrosis factor in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. *J Clin Invest* 90 : 533, 1992
28. Gatanaga T, Hwang C, Kohr W, Cappucini F : Purification and characterization of an inhibitor (soluble TNF receptor) for TNF and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 8761, 1990
 29. Porteu F, Nathan C : Shedding of tumor necrosis factor by activated human neutrophils. *J Exp Med* 172 : 599 1990
 30. Van Zee KJ, Kohno E, Fisher E, Rock CS : Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 4845, 1992
 31. Aderka D : Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptor. *J Exp Med* 175 : 323, 1992
 32. Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 162 : 156, 1987
 33. Vanhaesebroeck B, Decoster E, Ostade XV : Expression of an exogenous tumor necrosis factor (TNF) gene in TNF-sensitive cell lines confers resistance to TNF-mediated cell lysis. *J Immunol* 148 : 2785, 1992
 34. Anderson WF : Human gene therapy. *Science* 256 : 808, 1992
 35. Han SK, Brody SL, Crystal RG : Suppression of in vivo tumorigenicity of human lung cancer cells by retrovirus-mediated transfer of human tumor necrosis factor- α cDNA. *Am Rev Respir Dis* 147 : A457, 1993
-