

□ 원 저 □

암세포에서 Retroviral Vector를 이용한 종양괴사인자 유전자 이입후 획득된 종양괴사인자 내성의 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

이혁표*, 오연목, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구

= Abstract =

The Mechanisms of Resistance to TNF in TNF-Sensitive Cancer Cells Transfected with TNF- α Gene Using Retroviral Vector

Hyuk Pyo Lee, M.D.*, Yeon Mok Oh, 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 majorities of current protocols is aiming the in vitro gene transfer to cancer cells and re-introducing genetically modified cancer cells to host. In previous study, it was shown that TNF-sensitive cancer cells transfected with TNF- α cDNA would become highly resistant to TNF. Understanding the mechanisms of TNF-resistance in TNF- α gene 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 the role of new protective protein synthesis in the acquired resistance to TNF of TNF- α gene transfected cancer cells.

Method : We transfected TNF- α c-DNA to WEHI164, a murine fibrosarcoma cell line, using retroviral vector (pLT12SN(TNF)) and confirm the expression of TNF with PCR, ELISA, MTT assay. Then we determined the TNF resistance of TNF gene transfected cells(WEHI164-TNF) and the changes of TNF sensitivities after treatments with actinomycin D(transcription inhibitor) and cycloheximide(translation inhibitor).

Results : WEHI164 which was sensitive to TNF became resistant to TNF after being transfected with TNF- α gene and the resistance to TNF was partially reversed after treatment with actinomycin D, but not with cycloheximide.

“이 논문은 1994년도 서울대학교병원 신진연구비(05-94-003)지원에 의해 이루어 진것임”

*현재는 인제대학교 의과대학 내과학교실 근무

Conclusion : The acquired resistance to TNF after TNF- α gene transfection may be associated with synthesis of some protective proteins.

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

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 염증 반응과 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 중요한 것으로 알려져 있으며 반면 생체내에서는 간접적인 작용, 예를 들면 TNF가 염증세포를 활성화 시킴으로써 동원된 염증세포의 작용으로 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 작용이 중요할 것으로 알려져 있다.

최근 분자생물학의 발전에 힘입어, 사람의 TNF 유전자를 E. coli등에서 cloning하여서 유전자의 염기서열이 밝혀졌고 이를 통해서 재합성 TNF생산이 가능하게 되었다^{5,6)}. 뿐만 아니라, TNF의 아미노산 서열과 3차 구조도 밝혀졌고^{7,8)}, TNF가 작용하는 세포막의 TNF 수용체도 밝혀지게 되었다⁹⁾. 이와 함께, retrovirus를 이용한 유전자 이입법이 개발되어서 사람을 포함하는 포유동물세포에 원하는 유전자를 이입시켜 발현시키는 것이 가능하게 되었다¹⁰⁻¹²⁾. 이런 분자생물학적인 발전을 토대로 하여 TNF 유전자를 생체 외에서 직접 암세포에 이입하여서, TNF 유전자가 이입된 세포에서 TNF를 발현시켜 TNF를 생성하게

함으로써 항암효과를 기대하는 노력이 최근 진행되었다¹³⁾. 그런데, TNF는 전신적으로 쓸 경우 부작용이 심할 뿐만 아니라¹⁴⁾ 반감기가 약 30분 내외로 아주 짧다. 따라서, TNF의 전신독성과 짧은 반감기를 해결하기 위해서 암세포로 하여금 TNF를 지속적으로 분비하게 하는 암세포에 대한 TNF 유전자 이입(cancer cell targeted TNF gene therapy)에 대한 연구가 최근 진행되고 있다. 이는 암세포의 주위에서만 TNF가 작용하게 함으로써 인체에는 전신독성을 극소화하고 암세포의 살상 효과를 높이는 것을 목적으로 한 것이다.

암세포에 TNF 유전자가 이입되었을 경우 예상되는 항암작용의 이론적 기전은 다음과 같은 네 가지 기전을 생각할 수 있다. 첫째, TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비되는 TNF의 직접적인 세포독성에 의해 주위 암세포가 사멸되는 타살 기전이 있겠고, 둘째, TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비되는 TNF의 직접적인 세포독성에 의하여 TNF 유전자가 이입된 세포 자신이 사멸되는 자살 기전이 있겠으며, 셋째, TNF 유전자가 이입된 암세포를 생체 내로 주입하였을 경우 생체 내에서 TNF가 분비되어서 림프구나 대식세포 등 면역 관련 세포들을 활성화시킴으로써 항암작용을 일으키는 기전을 생각할 수 있으며, 넷째, TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비하는 TNF가 생체내의 interferon- γ 등의 cytokine과 상승 작용으로 항암 작용을 일으키는 기전이 있겠다. 위의 네 가지의 TNF 유전자 이입과 발현에 의한 항암 작용의 예상 기전 중, 첫째 기전은 TNF에 직접적인 감수성이 있는 암세포주에만 한정되게 항암 효과를 기대할 수 있는 것으로 이미 그 효과가 밝혀져 있고, 셋째 기전도 이미 입증되었고¹⁵⁾, 넷째 기전도 생체 외 연구에서 이미 확인되고 있다. 그러나, 둘째 기전은 아직 생

쥐 섬유육종 세포주의 하나인 L929에 대한 보고¹⁶⁾만 있을 뿐 명확히 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라, 만일 TNF 유전자를 이입받은 세포가 TNF에 대한 감수성에 변화가 생겨서, TNF 유전자를 이입받기 전에는 TNF에 대해 감수성을 보이다가도 TNF 유전자를 이입받고 나서는 TNF의 세포독성에 죽지 않고 생존한 세포가 TNF에 대해서 내성을 획득하게 된다면¹⁷⁾, TNF 유전자의 이입으로 암세포에서 TNF가 발현되어 국소적으로 분비되어도 주위 암세포는 죽일 수 있지만 TNF 유전자가 이입된 암세포 자신은 자신이 분비한 TNF에 죽지 않고 생존하여 암성장을 지속시키는 문제가 생긴다.

이에 연구자는 TNF 유전자가 이입된 암세포가 자신이 분비한 TNF에 의해서 사멸 또는 세포독성을 나타낼 수 있는가를 검증하는데 목적을 두었다. 그리고, 만일 TNF 유전자를 이입받은 암세포는 자신이 분비한 TNF에 의해서 사멸되지 않고 생존한다면, TNF 유전자의 이입 과정에서 TNF에 대한 내성을 획득하

는데 관여하는 기전을 알아보고자 유전자 전사 과정을 억제한다고 알려진 물질인 actinomycin D와 translation을 억제하는 물질인 cycloheximide를 처리하여 TNF 유전자가 이입된 세포에서 획득된 TNF에 대한 내성에 actinomycin D 및 cycloheximide가 어떤 영향을 주는지 추가로 살펴 보았다.

대상 및 방법

1. 세포주와 배양법

WEHI164 세포주(ATCC #1751)와 TNF 유전자를 함유한 retroviral vector를 포함하는 pLT12SN plasmid, 그리고 packaging 세포주인 PA317은 미국 국립보건원(NIH)에서 얻었다. 그리고, WEHI 164 세포주는 RPMI-1640배지에 10% 우태혈청과 항생제(gentamicin 50g/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였다.

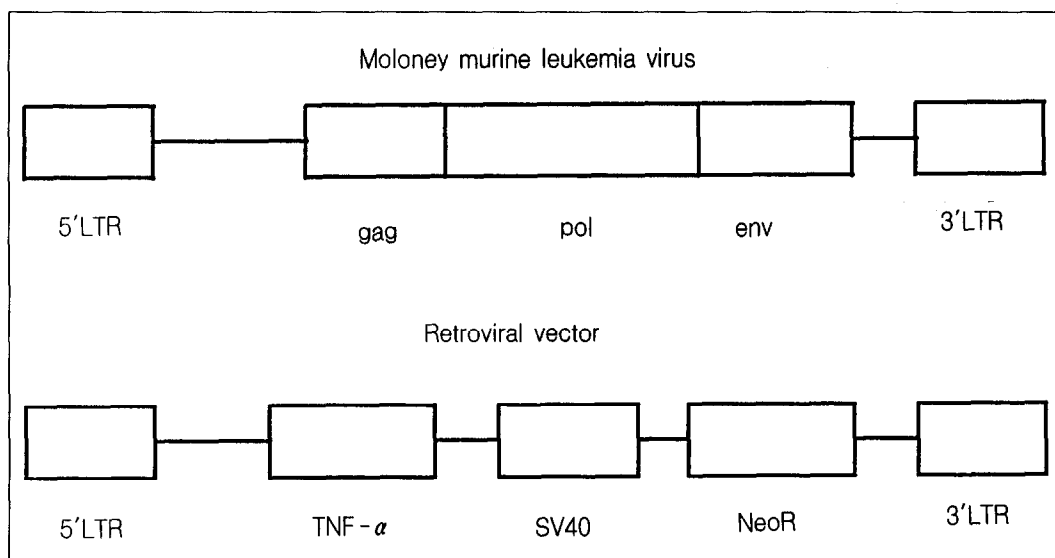


Fig. 1. Genomic structure of original virus and retroviral vector

2. Retroviral vector의 생산

본 실험에서 사용된 retroviral vector는 Moloney murine leukemia virus를 변형시킨 것으로 그 구조는 그림 1과 같다. 즉, Moloney murine leukemia virus의 gag, pol, env gene 대신에 사람 TNF- α 유전자와 선택 표식 유전자(selectable marker gene)인 Neo^R 유전자를 삽입한 것으로서, retrovirus의 5' LTR(long terminal repeat)가 TNF- α 유전자를 promote하고 SV40 promotor는 Neo^R 유전자를 promote하도록 설계되어 있다. 이 retroviral vector를 calcium-phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection시킨 후 neomycin analogue인 G418(0.8g/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

WEHI164 세포주가 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 하루밤동안 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 이입 확인

실험 대상 세포의 genomic DNA에 TNF 유전자가 이입되었는지는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)으로 확인하였다.

TNF 유전자 이입을 확인하고자 하는 세포주인 WEHI164-TNF, 그리고 모세포주(parent cell

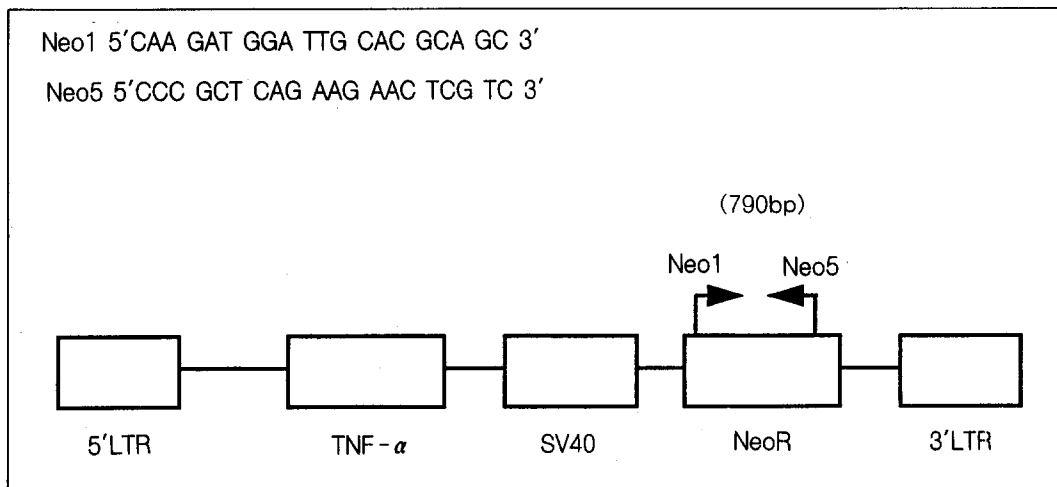


Fig. 2. Primer sequences for NeoR gene PCR amplification

line)인 WEHI164에서 genomic DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 100 μ g/ml의 proteinase K와 0.5% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함하는 digestion buffer 1ml를 10cm dish에 짝 차게 자란 세포에 넣고 이리저리 흔든 다음 microcentrifuge 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 6,800 g로 10분간 원심한후 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 DNA 가닥이 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 primer(fig. 2)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 대조군으로 TNF 유전자를 이입시키지 않은 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 ELISA kit(R & D사, Quantikine™ human TNF- α Immunoassay)를 이용하여 이입된 TNF 유전자로부터 TNF가 발현되어 생산되는지 측정하였다.

TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 WEHI164-TNF를 10⁶개씩 직경 5cm dish에

배지의 양이 3ml되도록 심어서 24시간 동안 생산한 TNF의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 모세포인 WEHI164도 동일한 방법으로 상층 배양액을 얻어 TNF를 생산하는지 비교하였다.

6. 이입된 TNF 유전자로부터 발현된 TNF의 생물학적 활성도 측정

유전자 이입을 시행한 암세포에서 이입된 TNF 유전자의 발현으로 생물학적인 활성을 가진 TNF가 분비되는지 WEHI164세포를 이용한 bioassay로 확인하였다. TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 WEHI164-TNF를 10⁶개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3ml가 되도록 심어서 24시간 배양하여 얻은 배양 상층액을 사용하여, 10⁶개의 세포가 24시간 동안 생산한 TNF의 양을 WEHI164 모세포주(parent cell line)를 이용한 bioassay로 측정하였다. WEHI164 모세포주를 96well plate에 well당 10⁴개의 세포를 심고 12시간 배양 후, 배지를 상기 상층 배양액 또는 1/2 희석액으로 교환하여 well에 첨가하여 36시간 추가로 더 배양하였다. 그런 다음 세포의 사망률을 MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) assay로 측정하였다. 즉 MTT 용액(2mg/ml)을 well당 50 μ l씩 넣고 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 200g 10분 원심하여 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 μ l/well 넣고 15분간 흔들어서 섞고 하루밤 배양하여 microplate판독기(Molecular Device사, Thermo-max)로 490nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포사망률(cytotoxicity)은 다음과 같이 구하였다.

cytotoxicity(%) =

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

대조군으로, 모세포주인 WEHI164에 대하여 동일한 방법으로 생물학적 활성을 지닌 TNF를 생산하는지도 확인하였다.

7. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 TNF에 대한 감수성 측정

WEHI164 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주 (WEHI164-TNF)를 각각 well당 10^4 세포씩 96 well 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.

8. Actinomycin D의 TNF 감수성에 미치는 효과 평가

위 7.의 TNF에 대한 감수성 측정과 동일한 방법으로 시행하였다. 다만, TNF 반응 시간인 36시간중 마지막 12시간은 actinomycin D를 $1\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가하여 세포사망률의 변화를 평가하였다.

9. Cycloheximide가 TNF 감수성에 미치는 효과의 평가

위 7.의 TNF에 대한 감수성 측정과 동일한 방법으로 시행하였다. 다만, TNF 반응 시간인 36시간중 마지막 12시간은 cycloheximide를 $5\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가하여 세포사망률의 변화를 평가하였다.

10. 결과 분석

모든 자료의 그래프는 평균 \pm 표준오차(standard error of mean)로 나타내었고, 각 군간의 비교는 스튜던트 t-검정을 적용하였다.

결 과

1. DNA 수준에서 유전자 이입의 확인

WEHI164 세포주에 TNF 유전자가 제대로 이입되었

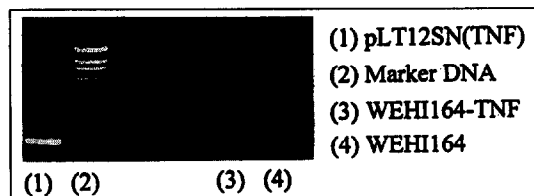


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of NEO^R gene PCR amplification

는지를 확인하기 위하여 PCR을 시행하였고, TNF 유전자를 이입시키지 않은 모세포와 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)를 PCR 시행한 것과 함께 전기영동하여 비교하였다(Fig. 3). 그 결과 TNF 유전자가 이입된 WEHI164TNF 세포주 및 양성 대조군인 pLT12SN은 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보이는 반면 모세포주인 WEHI164에서는 790 base pair의 DNA band가 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

2. 단백질 수준에서 이입된 유전자 발현의 확인

1) ELISA를 이용한 TNF 발현의 확인

WEHI164-TNF 세포주를 배양한 배양 상층액에서 ELISA로 TNF양을 측정한 결과(표준곡선 Fig. 4 참조), WEHI164-TNF 세포는 $12.2 \pm 0.36\text{ng}/24\text{hr}/10^6\text{cells}$ 의 TNF를 생산하였다. 반면, 모세포주인 WEHI164는 TNF를 검출 가능한 수준으로는 생산하지 않았다.

2) 생산된 TNF의 생물학적 활성도 측정

농도를 아는 TNF가 WEHI164 모세포를 죽이는 세포사망률을 표준곡선(Fig. 5)으로 삼고, TNF 유전자 이입이 DNA수준에서 확인되었고 ELISA를 이용하여 TNF를 생산함이 확인된 WEHI164-TNF를 배양하여 얻은 배양 상층액이 WEHI164 모세포를 죽

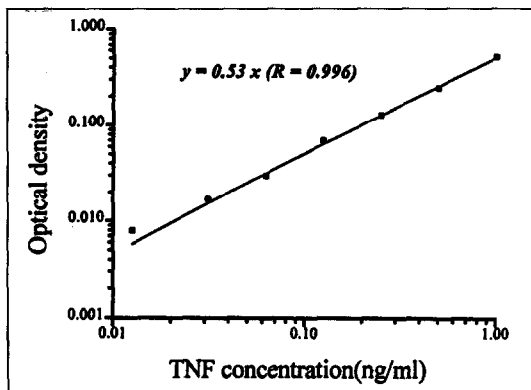


Fig. 4. Standard curve in TNF ELISA optical density according to TNF concentration

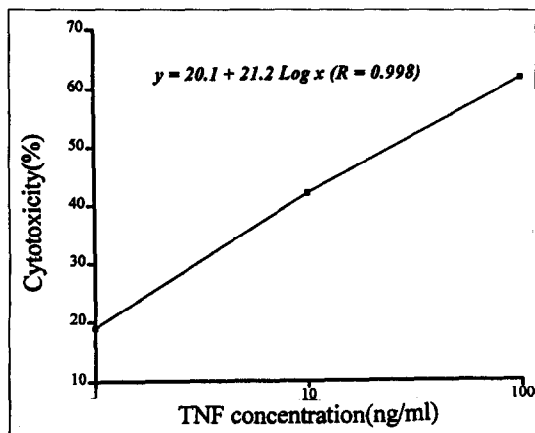


Fig. 5. Standard curve in percent cytotoxicity according to TNF concentration

이는 세포사망률을 표준곡선과 비교하여 생산된 TNF의 생물학적 활성도를 측정하였다. TNF 유전자가 이입된 세포주에서 발현된 생물학적 활성을 지닌 TNF의 양은 WEHI164-TNF의 경우는 $10.9 \pm 1.47 \text{ ng} / 24 \text{ hr} / 10^6 \text{ cells}$ 이었다. 반면에 대조군으로 TNF 유전자 이입을 하지 않은 WEHI164 모세포주를 배양하여 얻은 배양 상층액의 경우는 WEHI164 세포주의 사망을 일으키지 않았다. 이로서 TNF 유전자를 이입 받은 TNF 감수성인 WEHI164 세포주에서 생물학적으로 활성을 지닌 TNF를 분비함에도 불구하고 사멸되지 않고 생존한 세포들이 있음을 알 수 있었다.

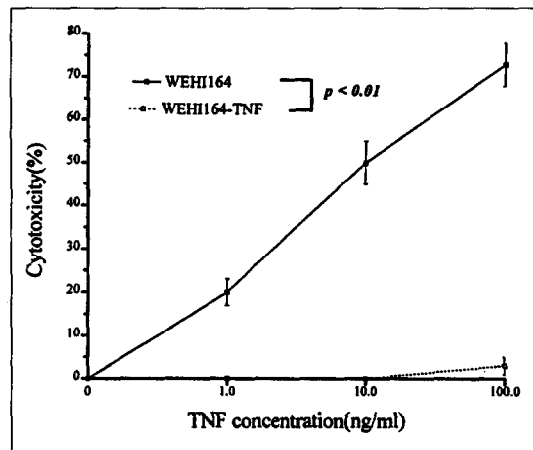


Fig. 6. Comparison of sensitivity of WEHI164 to exogenous TNF before and after TNF- α gene transfection

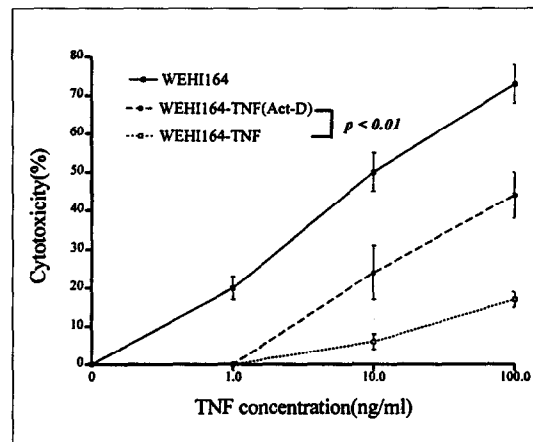


Fig. 7. Effect of Actinomycin D on TNF sensitivity of WEHI164-TNF

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. 6). 그 결과, WEHI 164의 경우는 TNF 농도 100 ng/ml 에서 모세포는 $73 \pm 5\%$ 의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 $3 \pm 2\%$

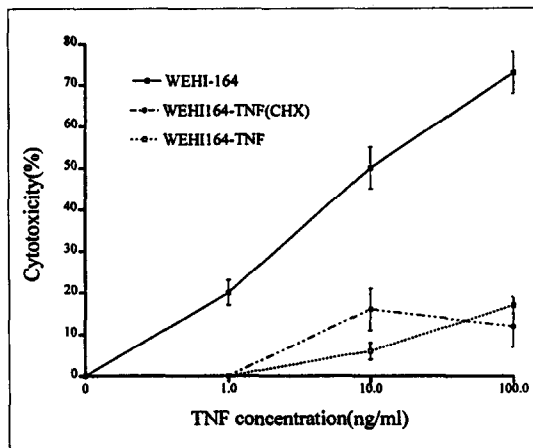


Fig. 8. Effect of cycloheximide on TNF sensitivity of WEHI164-TNF

의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.01$). 따라서, TNF 유전자가 이입된 세포주인 WEHI164-TNF는 자신의 모세포주인 WEHI164보다 TNF에 의한 세포독성에 뚜렷한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

4. TNF 유전자 이입후 획득된 TNF에 대한 내성의 기전

TNF 유전자 이입으로 TNF에 내성을 보이게 된 WEHI164-TNF 세포주에 actinomycin D를 최종농도 $1 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 12시간 처리한 결과는 그림 7과 같다. TNF에 내성을 획득한 WEHI164-TNF에 actinomycin D를 처리한 경우 TNF 농도 10ng/ml과 100ng/ml에서 각각 $24 \pm 7\%$, $44 \pm 6\%$ 의 세포독성을 보여서 actinomycin D를 처리하지 않았을 때의 세포독성 $6 \pm 2\%$, $17 \pm 2\%$ 보다 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.01$). 따라서, 전사 과정을 억제하는 actinomycin D를 처리하면 TNF 유전자 이입된 후 TNF에 내성을 획득한 WEHI164-TNF 세포주의 TNF에 대한 감수성이 부분적으로 회복됨을 관찰할 수 있었다.

한편 cycloheximide를 최종 농도 $5 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록

로 처리한 결과는 그림 8에 표시된 바와 같이 TNF 감수성에 변화를 초래하지 않았다.

고 찰

1980년대 초에 retrovirus를 이용한 유전자 이입이 시도된 이래¹⁰⁻¹²⁾, 최근에는 환자 치료에까지 retrovirus를 이용한 유전자 이입 방법이 시도되고 있다. 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 생체내에서 직접 적용하여 감염시킬 경우 그 효율이 낮기 때문에, 생체외에서 retroviral vector를 이용하여 세포에 유전자의 이입을 시도한 후 선택을 시행한 다음 숙주(host)에 주입하는 방법을 쓴다. 그런데, 이 과정에서 이입된 유전자가 TNF등의 세포독성이 있는 cytokine일 경우 내성이 문제가 된다¹⁶⁾.

Tumor Necrosis Factor는 1975년 생쥐를 BCG로 전처치한 다음 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 발견한 이래, 여러 암세포에 생체내(in vivo)에서는 출혈성 괴사를 일으키고, 생체외(in vitro)에서는 cytolysis를 보임이 밝혀져 있다^{2,3)}. 그러나, 이런 TNF의 암세포에 대한 세포독성을 인체에 응용하기에는 문제점이 있다. 즉, TNF가 효과적인 항암효과를 나타낼 수 있는 용량은 $400 \sim 500 \mu\text{g/kg/day}$ 이지만 TNF의 전신 독성 때문에 $5 \mu\text{g/kg/day}$ 이상으로 인체내에 투여할 수 없다. 이런 TNF의 전신 독성을 피하면서 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여, TNF 유전자를 암세포주에 이입시키고 발현시켜서 암세포주위에서만 TNF의 농도를 높게 유지하는 방법이 시도되었다¹³⁾. 이런 시도 중, 생체외(in vitro)실험의 경우 기대한 바와는 달리, TNF에 감수성이 있어서

TNF에 의해 죽던 모세포가 TNF 유전자가 암세포주에 이입되고 나서는 TNF의 세포독성에 내성을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있다^{16,18)}. 따라서, 본연구에서는 생쥐 섬유육종세포주(WEHI164)에 TNF- α 유전자를 retrovirus vector를 이용하여 이입하고 이입 전후의 TNF에 대한 감수성의 정도를 비교해 보았다. 그리고, 유전자의 전사(transcription) 과정을 차단하는 것으로 알려진 actinomycin D를 처리하여, TNF에 내성을 보이게된 TNF 유전자 이입 WEHI 164-TNF 세포주가 TNF에 대한 내성에 변화가 생기는지 실험해보았다. 그 결과, TNF 유전자 이입으로 TNF의 세포독성에 대한 내성을 획득함을 알 수 있었다. 그리고, actinomycin D를 처리하면 TNF 유전자 이입으로 인한 TNF에 대한 내성을 잃고 다시 TNF에 대한 감수성을 보이게 됨을 확인하였다. 따라서, 미지의 유전자의 전사과정이 TNF 유전자의 이입으로 인한 TNF에 대한 내성을 획득하는 기전에 관여할 것으로 추측할 수 있다. 이와 같은 연구자의 연구 결과를 뒷받침하는 연구 보고들을 살펴 보면, TNF 유전자를 L929세포에 이입해서 얻은 L929-TNF 세포주는 TNF에 대해 매우 감수성이 있던 성질이 바뀌어서 내성을 나타내었다고 보고한 연구가 있었다¹⁶⁾. 또한, 사람 폐암 세포주에 TNF- α 유전자를 이입하고 생체내(nude mouse)에 주입한 결과 종양의 성장이 억제되었지만 9개월이 지나서도 현미경적으로는 종양 세포들이 남아 있다고 보고한 연구¹⁸⁾를 이번 연구 결과인 'TNF 유전자 이입후 TNF에 대한 내성 획득'으로 설명할 수 있겠다. 이와 유사하기는 하지만 앞의 연구와 그 기전에 있어서 선후가 바뀌었다고 볼 수 있는 다른 연구에서는 TNF에 감수성이 있는 세포주인 ZR-75-1(사람 유방암 세포주)를 TNF를 계속 처리하면서 제대배양하면 TNF에 내성을 보이는 clone이 출현하는데 이 clone을 선택적으로 배양할 경우, TNF에 내성을 보이게 된 clone에서 TNF를 생산하지 않던 세포주가 TNF를 생산하는 세포주로 바뀜을 보고하였다¹⁹⁾. 또, 비슷한 연구로 TNF에 감수성이 높은 세포주인 L929로부터 선택 배양되어

TNF에 내성을 보이는 clone인 L929r에서 TNF가 생산됨을 보고하였다²⁰⁾. 이상의 연구 보고들을 토대로 하지 않더라도 TNF 유전자를 이입하고 발현시켜 TNF를 분비하게 하면 분비된 TNF에 대해서 살아남는 세포는 자신이 분비한 TNF 뿐만 아니라 외부에서 투여한 TNF에 내성을 보일 것이라는 것은 어느 정도 예측 가능하였던 결과로써 이번 실험에서 확인할 수 있었다.

이번 연구에서 TNF 유전자의 이입후 TNF에 대한 내성을 획득하게 되는 기전을 단정적으로 결론 내리기는 충분하지 않지만 미지의 유전자의 전사가 TNF에 대한 내성 획득 기전에 관여할 것으로 보이고 향후 TNF에 대한 내성 획득 기전에 대해서는 더 연구가 필요하겠다.

TNF 유전자 이입을 생체내(in vivo)에 실험한 경우는, TNF 유전자를 tumor infiltration lymphocyte(TIL)에 이입후 환자 치료에 시도하고 있는 것²¹⁾이 그 예라 할 수 있다. 또한 비록 생체의 실험에서 TNF에 대해 감수성이 없고 내성을 나타내는 세포주라도 TNF 유전자를 발현할 경우 생체내에서 훨씬 암 발생이 억제됨이 보고되고 있다²²⁾. 이 연구 결과는 생체내에서 암세포로부터 발현된 TNF가 암세포에 대해 직접적인 세포독성 작용이 아닌 간접적인 방법인 면역세포의 동원을 통한 방법으로 암세포의 생체내 성장을 억제한다고 생각할 수 있고, 본 논문의 연구 결과가 암세포에 TNF 유전자를 이입하여 발현된 TNF가 직접 암세포에 세포독성을 일으켜 항암 효과를 기하려는 시도는 TNF 유전자의 이입으로 암세포가 TNF에 대한 내성을 획득하게 됨으로써 처음 기대하였던 항암 효과에는 한계가 있음을 밝힌 이상, TNF 유전자 이입에 의한 생체내에서 간접적인 항암 효과에 보다 더 연구가 필요하리라 생각된다. 뿐만 아니라, TNF 유전자를 이입받은 TIL의 경우 생체내에서 TNF 유전자 발현이 기대한 정도에 못 미치는 문제가 있어서 암세포주 자체에 대한 TNF 유전자 이입과 그의 생체내 실험에 보다 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

종양괴사인자(tumor necrosis factor ; TNF)는 다양한 생물학적 기능을 가지고 있는바, 그 중 생체외에서 증명된 뚜렷한 항암효과로 말미암아 최근 항암유전자요법의 중요한 대상으로 관심을 모으고 있다. 그러나 유전자 이입의 기술적 문제로 생체외에서 암세포에 유전자 이입을 시행한 후 이를 다시 환자의 생체내로 이식하는 방법이 연구의 주종을 이루고 있다. 그러나 저자들의 과거의 연구를 포함한 여러 연구에서 TNF가 이입된 암세포는 TNF에 대해 내성을 보이는 것으로 증명되었다. 이 획득내성의 기전을 밝히는 것이 종양생물학의 이해를 넓히고 보다 효과적인 항암유전자요법을 개발하기위한 매우 중요한 과제로 생각된다. 저자들은 TNF 유전자 이입에 따른 암세포의 TNF에 대한 획득 내성에 새로운 방어단백질의 합성이 관여하는지를 규명하고자 본 실험을 수행하였다.

방 법 :

TNF에 감수성을 보이는 생쥐 섬유육종 세포주인 WEHI164에 TNF- α 유전자를 retroviral vector를 이용하여 이입하고 TNF의 발현을 시도하여 PCR, ELISA, MTT assay로 확인하였고, TNF 유전자가 이입된 세포(WEHI164-TNF)는 TNF에 내성을 보이는지 역시 MTT assay로 검증하였다. WEHI164-TNF세포를 transcription 억제제인 actinomycin D와 translation 억제제인 cycloheximide로 처리한 후 역시 MTT assay로 TNF에 대한 감수성에 변화를 보이는지 확인하였다.

결 과 :

1) TNF- α 유전자 이입 및 발현 확인

PCR을 시행한 결과 TNF 유전자가 이입된 WEHI164-TNF 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

WEHI 164-TNF의 배양상층액에서 TNF양을 ELISA와 MTT assay로 측정한 결과, 생물학적 활성을 지닌 TNF를 $10.9 \pm 1.47 \text{ ng/24hr/} 10^6 \text{ cells}$ 생산함을 알 수 있었다.

2) TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 농도 100ng/ml에서 모세포는 $73 \pm 5\%$ 의 세포독성을 보인 반면 WEHI164-TNF 세포는 $3 \pm 2\%$ 의 세포독성을 보여 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) TNF에 대한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

3) TNF 유전자 이입 후 획득된 TNF에 대한 내성의 기전

WEHI164-TNF 세포를 actinomycin D로 처리한 경우 TNF 농도 10ng/ml과 100ng/ml에서 각각 $24 \pm 7\%$, $44 \pm 6\%$ 의 세포독성을 보여 control의 $6 \pm 2\%$, $17 \pm 2\%$ 보다 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) TNF에 대한 감수성이 부분적으로 회복됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 cycloheximide로 처리한 경우에는 TNF에 대한 감수성에 변화를 관찰할 수 없었다.

결 론 :

TNF에 감수성을 보이는 암세포주인 WEHI164에 TNF 유전자를 이입하여 TNF를 발현하게하였을 때 그 세포 자신은 TNF에 대해 내성을 획득하게되며 이에는 미지의 방어단백질의 합성이 일부 관여할 것으로 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, Aggarwell BB, Hass PE : Re-

- combinant 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 pleotropic biological effects. *Drugs of the Future* **1269** : 891, 1987
5. Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Von Der Heyden J, Tizard R, Kawashima 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
6. 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
7. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spenser SA, Henjel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goedde DV, Harkins RN : Human tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **260** : 2345, 1985
8. Jones EY, Stuart DI, Walker NPC : Structure of tumor necrosis factor. *Nature* **338** : 225, 1989
9. Tartaglia LA, Goeddel DV : Two TNF receptors. *Immunol Today* **13** : 151, 1992
10. Varmus HE : Form and function of retroviral provirus. *Science* **216** : 812, 1982
11. 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
12. Miller AD, Rosman GJ : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* **7** : 980, 1989
13. Anderson WF : Human gene therapy. *Science* **256** : 808, 1992
14. 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
15. Teng MN, Park BH, Koepen HKW : Long-term inhibition of tumor growth by tumor necrosis factor in the absence of cachexia or T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 3535, 1991
16. 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
17. 오연목, 박계영, 정만표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철 : Retroviral vector를 이용한 TNF- α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자(TNF) 감수성에 미치는 효과. *결핵 및 호흡기 질환* **41(2)** : 87, 1994
18. 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
19. Spriggs D, Imamura K, Rodrigues C : Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 6563, 1987
20. Rubin BY, Anderson SL, Sullivan SA, Williamson BD, Carswell EA, Old LJ : Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. *J Exp Med* **164** : 1350, 1986
21. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K : Gene

transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes mediated by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 323 : 570, 1990

22. Vanhaesebroeck B, Mareel M, Roy FV, Grooten

J, Walter Fiers : Expression of tumor necrosis factor gene in tumor cells correlated with reduced tumorigenicity and reduced invasiveness in vivo. *Cancer Res* 51 : 2229, 1991