

□ 원 저 □

Butyrate가 Adenoviral Vector로 이입한 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자치료에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 내과학교실¹⁾, 경북대학교 암연구소²⁾, 계명대학교 의과대학 내과학교실³⁾

박재용^{1, 2)}, 김정란²⁾, 장희진²⁾, 김창호^{1, 2)}, 박재호³⁾, 정태훈^{1, 2)}

= Abstract =

Effect of Butyrate on Adenovirus-Mediated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Therapy

Jae Yong Park, M.D.,^{1, 2)} Jeong Ran Kim, M.S.,²⁾ Hee Jin Chang, B.S.,²⁾
Chang Ho Kim, M.D.,^{1, 2)} Jae Ho Park,³⁾ M.D., Tae Hoon Jung, M.D.^{1, 2)}

Department of Internal Medicine¹⁾, Cancer Research Institute²⁾, Kungpook National University Hospital, Taegu, Korea

Department of Internal Medicine, Keimyung University, School of Medicine³⁾, Taegu, Korea

Background : Recombinant adenovirus hold promise as vectors to carry therapeutic genes for several reasons : 1) they can infect both dividing and non-dividing cells ; 2) they have the ability to directly transduce tissues in vivo ; 3) they can easily be produced in high titer ; and 4) they have an established record of safety as vaccination material. However, one of the major limitation in the use of adenoviruses is that transgene expression is quite short because adenoviruses insert their DNA genome episomally rather than by chromosomal integration, and an immune response against the virus destroys cells expressing the therapeutic gene. Since sodium butyrate has been reported to induce adenovirus-mediated gene expression, we hypothesized that treatment of tumor cells, transduced with herpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk) gene using adenoviral vector, with butyrate could augment the effect of gene therapy.

Methods : We transduced HSVtk gene, driven by the cytomegalovirus promoter, into REN cell line(human mesothelioma cell line). Before proceeding with the comparison of HSVtk/ganciclovir mediated bystander killing, we evaluated the effect of butyrate on the growth of tumor cells in order to rule out a potential antitumor effect of butyrate alone, and also on expression of HSVtk gene by Western blot analysis. Then we determined the effects of butyrate on bystander-mediated cell killing in vitro.

Results : There was no inhibition of growth of cells exposed to butyrate for 24 hours at a concentration of 1.5mM/L. Toxic effects were seen when the concentration of butyrate was greater than 2.0mM/L. Gene expression was more stable and bystander effect was augmented by butyrate treatment of a concentration of 1.5mM/L.

Conclusion : These results provide evidence that butyrate can augment the efficiency of cell killing with HSVtk/GCV system by inducing transgene expression and may thus by a promising new approach to improve responses in gene therapy using adenoviral vectors. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 46 :587-595)

Key words : Butyrate, Adenovirus, Gene therapy

서 론

암의 유전자치료는 암세포나 면역세포에 인위적으로 유전자를 이입하여 암을 치료하고자 하는 치료법을 말하며, 암세포에 대한 면역반응을 증강시켜 암을 치료하고자하는 면역강화법(genetic immuno-potentiation), 돌연변이로 인한 암유전자의 과발현이나 종양 억제유전자의 결손을 교정하는 돌연변이보상법(mutation compensation), 그리고 약제 감수성유전자를 이용한 분자화학요법(molecular chemotherapy) 등이 시도되어지고 있다¹⁻³⁾.

유전자치료에서 가장 중요한 과제 중의 하나는 유전자 이입기술의 개발이며, 이상적인 유전자 이입방법은 안전성(safety), 효율성 및 정확성(accuracy), 조직특이성(tissue specificity), 및 안정성(stability)이 있어야 한다. 즉 치료목적으로 재조합된 유전자를 원하는 인체 세포내로 선택적이며 효율적으로 이입할 수 있어야하며, 이입된 유전자의 발현이 적당한 기간동안 지속적으로 발현되어야하고, 또한 이입된 유전자로 인한 부작용이 없어야 한다⁴⁾. 대상세포내로 유전자를 이입하는 방법으로는 물리적인 방법과 바이러스를 벡터로 이용하는 방법이 있으며, 바이러스를 벡터로 사용하는 방법은 retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus 등이 널리 사용되고 있다⁵⁾. Retrovirus는 면역성이 적고, retrovirus에 의해 이입된 유전자는 장기간 발현되지만 체외에서 고농도로 증식시키기 어렵고 분열하는 세포에만 유전자를 이입할 수 있는 단점이 있다. 이에 비해 adenovirus는 고농도로 증식이 가능하고 in vivo에서 유전자를 세포내로 직접 이입할 수 있는 장점이 있으나 세포의 핵내에서 episome으로 존재하여

말세포에 형질이 전달되지 않을 뿐 아니라 숙주의 강한 면역반응으로 인해 이입된 유전자의 발현이 일시적인 단점이 있다⁵⁻⁷⁾.

최근 adenovirus 벡터에 의해 이입된 유전자의 발현기간을 증가시킬 수 있는 방법에 관한 연구들, 즉 숙주의 면역반응을 줄일 수 있는 2세대 벡터의 개발⁸⁾ 또는 면역억제제를 투여하여 숙주의 면역반응을 감소시키는 방법에^{10,11)} 관한 연구들이 진행되고 있다.

포화 지방산인 sodium butyrate는 정상 혹은 암세포에서 세포의 G1-S기 진행을 억제하고^{12,13)}, 암세포의 분화를 유도할^{14,15)} 뿐 아니라 retrovirus의 long terminal repeats와 simian virus의 large T 항원의 전사조절요소의 활성화^{16,17)}에도 관여하는 것으로 알려져있다. 최근 Tang등¹⁸⁾과 Chen등¹⁹⁾은 butyrate가 adenovirus 혹은 adeno-associated virus를 매개체로 이입한 유전자의 발현을 증가시킨다고 보고하였다.

저자들은 유전자치료시 butyrate를 병용투여 할 경우 이입한 유전자의 발현이 증가되고, 따라서 유전자치료의 효과를 증가시킬 수 있을 것이라는 가정하에 butyrate가 herpes simplex virus thymidine kinase유전자를 이용한 유전자치료에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험의 결과는 유전자치료의 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

1) 종양세포

REN 세포주는 악성중피종 환자에서 분리된 세포주로

Albelda SM(University of Pennsylvania, Philadelphia, USA)로 부터 제공 받았으며, 10% FBS, penicillin G(100 U/mL) streptomycin(100ug/mL)이 첨가된 RPMI 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

2) Adenoviral Vector 및 유전자 이입

본 실험에 사용된 adenoviral vector인 Ad.CMVtk와 Ad.CMVlacZ는 Albelda SM으로부터 제공 받았다²⁰⁾. 제공받은 vector들은 293세포에서 증식시킨 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였으며 vector의 역가는 293 plaque assay와 spectrophotometric density로 측정하였다.

유전자는 실험에 사용한 REN 세포들이 T25 cell culture flask의 60-70% 정도 채울 정도로 자란 상태에서 Ad.CMVtk 혹은 Ad.CMVlacZ를 감염시켜 세포내로 이입시켰다. REN 세포주는 Ad.CMVlacZ를 감염시킨 후 X-gal 역색상 100% lacZ 유전자의 이입이 확인된 MOI(multiplicity of infection)인 세포당 5 pfu(particle forming unit)로 감염시켰다.

3) GCV 감수성검사

HSVtk 유전자가 이입되지 않은 REN 세포와 HSVtk 유전자가 이입된 세포(RENSTK)를 96-well tissue culture plate에 well당 4000개(100uL media/well)씩 분주하였다. 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하여 세포들이 monolayer를 형성하였을 때 GCV가 첨가되지 않은 배지와 0.02uM에서부터 200uM까지의 GCV를 첨가한 배지로 교환하였다. 5일간 배양한 후 각 well의 생존세포수를 측정하였으며, 생존세포수는 비색분석법인 MTT 검사법²¹⁾(Cell Titer 96 Aqueous Nonradioactive MTT Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA)으로 간접적으로 측정하였다. 즉 5일간 배양 후 각각의 well마다 20uL MTT용액

을 첨가하고 37°C에서 3시간동안 추가 배양한 뒤에 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, GCV가 첨가된 well의 흡광도를 GCV가 첨가되지 않은 배지로 배양한 well의 흡광도와 백분율로 생존율을 구하였다.

4) 세포 증식속도(growth rate) 측정

세포의 증식속도에 영향이 없는 butyrate농도를 구하기 위해 butyrate가 세포증식속도에 미치는 영향을 조사하였다. REN세포와 RENSTK세포를 96-well culture plate에 well당 4000개씩 분주하여 24시간 배양한 후 butyrate처리군과 대조군으로 나누었다. Butyrate처리군은 1.5mM/L, 2mM/L과 3.0mM/L의 butyrate가 첨가된 배지로 교환하여 24시간 배양한 후 butyrate가 첨가되지 않은 배지로 3일간 배양하였으며, 대조군은 butyrate가 첨가되지 않은 배지로 4일간 배양하였다. 세포수는 MTT검사법으로 측정하였으며, butyrate 첨가에 따른 세포성장의 정도는 butyrate를 첨가하지 않은 배지로 배양한 well의 흡광도와 백분율로 구하였다.

5) Western blot analysis

REN 세포들이 T25 cell culture flask의 60-70% 정도 채울 정도로 자란 상태에서 세포당 5pfu (particle forming unit)의 Ad.CMVtk를 감염시켜 유전자를 이입하고 24시간 배양한 후 3군으로 나누었다. 제1군은 butyrate가 첨가되지 않은 배지로 배양하였고, 제2군은 유전자이입 후 2일째 날(24시간에서 48시간까지)에 1.5mM/L butyrate를 첨가하여 배양하였으며, 제3군은 유전자이입 후 3일째날에 1.5mM/L butyrate를 첨가한 배지로 배양하였다. Western blot analysis는 유전자이입 후 2일, 3일, 그리고 7일에 각각 시행하였다.

먼저 10⁶개 세포들을 원심분리하여 상층액은 버리고 0.5ml SDS sample buffer(62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromo-

phenol dye)를 넣고 혼합한 후 5분간 100℃에서 가열하여 용해하였다. 용해된 추출물은 SDS-PAGE 전기영동을 실시한 후, 겔은 transfer buffer(25mM Tris, 0.1% SDS, 192mM glycine, 20% methanol)로 5분간 수세하고 흡착지에 전기이동시켰다. 흡착지는 차단용액(4% bovine serum albumin, 0.02% sodium azide in PBS)로 2시간동안 처리하여 비특이적인 단백질의 binding을 blocking한 후, HSVtk에 대한 rabbit polyclonal antibody 혼합액(1:800)으로 4℃에서 12시간동안 반응시켰다. TBST(50mM Tris-HCl pH 7.4, 0.9% NaCl, 1% Tween 20)으로 3회 수세 후 2차항체 혼합액(anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated secondary antibody, Promega)(1:7500)으로 1시간 동안 반응시켰다. 그런다음 TBST로 3회, AP buffer(10mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)로 1회 수세하고 substrate solution(0.4mM nitroblue tetrazolium, 0.38mM 5-bromo-4-chloro-3 indolyl phosphate in AP buffer) (Sigma Chemical Co.)에 담근 다음 30분간 실온에 방치하여 발색시켰다.

6) In Vitro, bystander effect 측정

REN 세포들을 세포당 5 pfu의 Ad.CMVtk를 감염시켜 유전자를 이입하고 24시간 배양한 후 butyrate 처리군은 1.5mM/L butyrate가 첨가된 배지로 24시간 배양하고 대조군은 butyrate가 첨가되지 않은 배지로 24시간 배양한 후 "mixing study"를 시행하였으며, 그 방법은 박동²²⁾에 의해 설명된 바 있으나 간단히 설명하면 다음과 같다. HSVtk 유전자가 이입되지 않은 HSVtk 음성세포와 HSVtk 유전자가 이입된 HSVtk 양성세포를 각각 4×10⁴/ml로 만든 후 HSVtk 음성세포에 대한 HSVtk 양성세포의 비율을 0%, 10%, 20%, 30%, 50%, 100%로 되게 섞은 다음 96-well culture plate에 100μl씩 분주하였다. 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 16시간 배양하여

세포들이 monolayer를 형성하였을 때 20μM GCV가 첨가된 배지로 교환하여 5일간 배양하였다. HSVtk 음성세포가 100%인 well의 세포가 조직배양판에 100% 차게되면 MTT 검사법으로 각 well의 생존세포수를 간접적으로 측정하였다. HSVtk 양성세포가 10%에서 100%까지 섞인 well의 흡광도를 100% HSVtk 음성세포로만 된 well의 흡광도에 대한 백분율로 생존율을 구하였다.

결 과

1) GCV 감수성검사

REN 세포주의 GCV에 대한 감수성검사 성적은 Fig. 1과 같다. HSVtk 유전자가 이입된 세포의 50%가

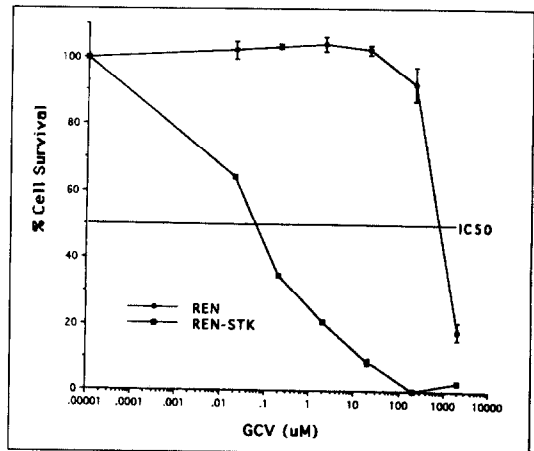


Fig. 1. Adenovirus-mediated transfer of HSVtk renders the human malignant mesothelioma cell line sensitive to ganciclovir treatment in vitro. Comparison of ganciclovir dose-response between untransduced cells(REN) and HSVtk transduced cells(REN-STK) is shown. Points on the ordinate represent the percentage of cells present at each dose of ganciclovir compared to untreated cells(no ganciclovir). A total of 50% of HSVtk-transduced cells were killed at 0.7μM GCV(IC₅₀) as compared to untransduced cells, which showed only 5% cell death at 200μM GCV.

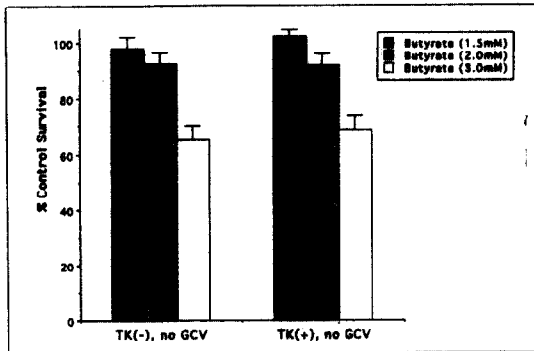


Fig. 2. Effect of butyrate on in vitro growth rates. Growth of cells exposed to butyrate was compared to growth of control cells, not exposed to butyrate. There was no inhibition of growth of cells exposed to butyrate at a concentration of 1.5mM/L. Toxic effects were seen when the concentration of butyrate was greater than 2.0mM/L.

0.7uM GCV에서 사망하였으나 유전자가 이입되지 않은 세포는 약 600uM에서 50% 사망하여 HSVtk 유전자가 이입된 세포들은 HSVtk 유전자가 이입되지 않은 세포에 비해 GCV에 대한 감수성이 유의하게 증가되었다.

2) Butyrate가 세포 증식속도에 미치는 영향

Butyrate의 세포성장 억제효과가 bystander effect에 미치는 영향을 배제하기 위하여 butyrate가 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. REN세포와 RENSTK세포는 1.5mM/L의 butyrate가 첨가된 배지에서는 대조군과 성장속도의 차이가 없었으나, 2.0mM/L과 3.0mM/L butyrate가 첨가된 배지에서는 대조군에 비해 성장속도가 8-9%와 31-35% 감소하였다.

3) Butyrate가 이입된 유전자의 발현에 미치는 영향

세포의 성장속도에 영향이 없는 1.5mM/L butyrate

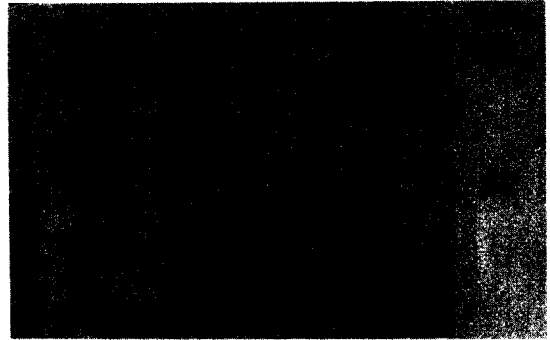


Fig. 3. Western blot analysis of HSVtk protein expression : Adenovirus-mediated gene expression was more stable by butyrate treatment. REN cells were infected at multiplicity of infection of 5 pfu per cell by Ad.CMVtk on day 0. Medium containing 1.5mM/L butyrate was added and withdrawn of day 2 or day 3 for 24 hours. HSVtk protein expression was analyzed with a rabbit polyclonal antibody at day 2, 3, and 7 after infection with Ad.CMVtk. Lane 1-3, without butyrate treatment ; Lane 4-6, treated with butyrate between day 1 and 2 ; Lane 7-9, treated with butyrate between day 2 and 3.

처리에 따른 유전자의 발현여부는 Fig. 3과 같다. butyrate가 첨가되지 않은 배지로 배양한 대조군에서는 유전자이입 후 7일에 유전자의 발현이 없었으나 butyrate를 처리한 군에서는 유전자이입 후 7일에도 이입된 유전자의 발현이 있었으며, 특히 유전자 이입하고 48시간 후에 butyrate를 처리한 군에서 유전자의 발현이 저명하였다.

4) In vitro, bystander effect

Butyrate가 bystander effect에 미치는 영향을 조사하기 위해 1.5mM/L butyrate를 처리한 군에서의 bystander effect와 butyrate를 처리하지 않은 대조군의 bystander effect를 비교하였다. Butyrate를

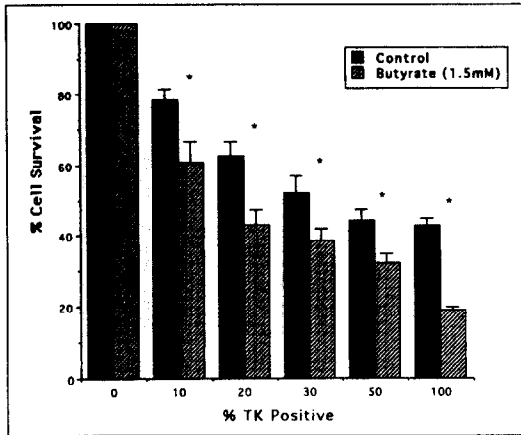


Fig. 4. In vitro mixing experiments in presence and absence of 1.5mM/L butyrate : Bystander effect was augmented by butyrate treatment. X-axis, varying mixture of HSVtk⁺ and HSVtk⁻ cells ; Y-axis, percentage of cells surviving expressed as a percentage of HSVtk⁻ control cells after exposure to 20 μ M GCV for 5 days.

처리한 군에서 대조군에 비해 bystander effect에 의한 살상효과가 유의하게 증가되었다(Fig. 4).

고 찰

Adenovirus는 DNA 바이러스로 상피세포에 강한 친화력이 있고 증식하지 않는 세포에도 유전자의 이입이 가능하며, in vivo에서 다른 매개체에 비해 유전자 이입 효율이 높은 장점이 있으나 adenovirus에 의해 이입된 유전자는 숙주세포의 염색체에 integration 되지 않기 때문에 유전자의 발현이 일시적인 문제점이 있다^{2,5,6}.

Riggs등²³이 butyrate가 histone의 hyperacetylation을 초래한다는 보고를 한 후, butyrate의 세포 성장과 유전자발현에 미치는 영향에 관한 많은 연구가 진행되었다. Butyrate는 세포의 G1-S 진행을 억제하는 세포주기 조절작용과 암세포의 분화를 유도하는

작용이 있으며, 유전자의 발현을 조절한다¹²⁻¹⁵. 즉 여러 가지 암세포주에서 butyrate를 처리할 경우 c-fos와 c-jun 유전자의 발현은 증가되고 p53와 Rb 유전자 발현은 감소된다²⁴. Butyrate가 세포의 성장과 유전자의 발현에 관여하는 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 histone deacetylase을 억제하여 histone이 hyperacetylation됨에 따른 chromatin structure의 변화에 의한다고 한다^{25,26}.

최근 이와같은 butyrate의 세포성장상에 미치는 작용 외에도 butyrate가 retrovirus의 LTRs와 simian virus large T 항원의 전사조절요소를 활성화하여 바이러스 유전자의 전사를 증가시킨다는 보고들과^{16,17} 바이러스를 매개체로 이입한 유전자의 발현을 증가시킨다는 보고들은^{18,19,27,18} 유전자치료에 butyrate가 사용될 수 있음을 시사한다.

Tang등¹⁸과 Dion등²⁸은 adenovirus의 유전자 가운데 Ela 부위를 CMV promoter와 luciferase 유전자로 치환한 바이러스 벡터를 이용한 실험에서 butyrate를 처리한 경우 이입한 유전자의 발현이 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 butyrate 농도와 처리시간에 따라 유의한 차이가 있었다고 하였다. 그리고 이들은 histone deacetylase inhibitor인 trichostatin A(TSA)를 처리 하였을 때에도 butyrate를 처리한 경우와 같이 유전자의 발현이 증가되는 현상으로 보아 이와같은 유전자 발현의 증가는 histone의 hyperacetylation에 의한다고 하였다. 저자들의 연구에서도 세포의 성장에 영향이 없었던 1.5mM/L의 butyrate를 24시간 처리한 경우 유전자의 발현기간의 유의한 차이가 있었으며, 특히 유전자를 이입하고 48시간 후에 butyrate를 처리한 경우 발현기간의 증가가 보다 뚜렷하였다.

HSVtk 유전자를 이용한 유전자치료에서 bystander effect는 HSVtk를 발현하는 암세포 주위의 세포도 GCV 투여 후 사망하는 현상을 말하며, 이러한 bystander effect에 의해 암세포의 10-20%에만 HSVtk 유전자를 이입해도 거의 모든 암세포의 apoptosis가 초래된다²⁹. Bystander effect는

HSVtk 유전자치료에서 주요 항암기전의 하나로 그 기전은 세포간의 gap junction를 통한 metabolic co-operation과 세포성면역 등에 의해 일어난다고 알려져 있다²²⁾. 저자들은 butyrate를 처리한 경우 bystander effect의 유의한 증가가 있었으며 이와같은 bystander effect의 증가는 butyrate에 의해 HSVtk 유전자의 발현기간의 증가에 인한 것으로 생각되었다.

요 약

연구배경 :

유전자치료를 이용하는 adenovirus를 기초로 하는 벡타는 상피세포에 강한 친화력이 있고 증식하지 않는 세포에도 유전자의 이입이 가능하며, in vivo에서 다른 벡타에 비해 유전자이입 효율이 높은 장점이 있다. 그러나 adenovirus에 의해 전달된 유전자는 세포의 chromosome에 삽입되지 않기 때문에 세포가 분열하면 딸세포에 형질이 전달되지 않을 뿐 아니라 adenovirus가 숙주의 면역반응을 초래하여 이입된 유전자가 제거됨에 따라 전달된 유전자의 발현기간이 짧은 단점이 있다. 포화지방산인 butyrate는 histone의 acetylation을 증가시켜 전달된 유전자의 발현을 증가시킨다고 한다. 저자들은 유전자치료를 butyrate를 병용투여 할 경우 이입한 유전자의 발현이 증가되고, 따라서 유전자치료의 효과를 증가시킬 수 있을 것이라는 가정하에 butyrate가 herpes simplex virus thymidine kinase 유전자를 이용한 유전자치료를 미치는 영향을 조사하였다.

방 법 :

악성 중피종세포인 REN세포에 Ad.CMVtk를 이입한 후 세포들을 3군으로 분류하였다. 1군은 butyrate를 처리하지 않고 7일간 배양하였으며, 2군은 이입 후 1일째에 그리고 3군은 이입 후 2일째 1.5mM/L butyrate를 함유하는 배지에서 24시간 동안 배양한 후 butyrate가 함유되지 않은 배지로 교환하여 배양하였다. 유전자 이입 후 2일, 3일, 그리고 7일에

Western blotting을 시행하여 유전자의 발현정도를 조사하였으며, butyrate 처리 유무에 따른 bystander effect에 의한 살상효과의 차이를 조사하였다.

결 과 :

Butyrate를 처리하지 않은 대조군은 유전자이입 후 7일째에 유전자의 발현이 없었으나 butyrate를 처리한 군은 7일째에도 유전자의 발현이 있었다. 그리고 butyrate를 처리한 경우 bystander effect에 의한 살상효과가 유의하게 증가되었다.

결 론 :

이상의 결과로 butyrate는 유전자의 발현을 증가시키는 데 의해 bystander effect를 증가시킬 수 있으며, 향후 adenovirus를 이용한 유전자치료의 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Rosenberg SA : New approaches to cancer treatment : Gene therapy of cancer, In : Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA(Ed.) Cancer : Principles and practice of oncology, 4th Ed., p2598, Philadelphia, J. B. Lippincott, 1993
2. 박재용 : 암의 유전자치료. 영남대학교 약품개발연구소 제4회 학술 심포지움 발표논문집 4 : 1, 1996
3. Whartenby KA, Abraham GN, Calabresi PA, Abboud CN, Calabresi P, Marrogi A, Freeman SM : Gene modified cells for the treatment of cancer. Pharmac Ther 66 : 175, 1995
4. Culver KW, Blaese RM : Gene therapy for cancer. Trends Genetics 10 : 174, 1994
5. Moen RC : Methods of gene transfer for gene therapy, Brenner MK, Moen RC(Ed.) Gene therapy in cancer, 1st Ed., pl, New York, Marcel Dekker, 1996

6. Kozarsky KF, Wilson JM : Gene therapy : adenovirus vectors. *Cur Opin Genet Devel* 3 : 499, 1993
7. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM : Cellular immunity to viral antigens limits El-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 4407, 1994
8. Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson JM : Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decrease inflammatory response in mouse liver. *Proc natl Acad Sci USA* 91 : 6196-6200, 1994
9. Cotten M : Adenovirus-augmented, receptor-mediated gene delivery and some solutions to the common toxicity problems. In doerfler W, Boehm P(Ed.) *The molecular repertoire of Adenoviruses III : Biology and Pathogenesis*, p283, Berlin, Springer, 1995
10. Yang Y, Joose Ku, Su Q, Ertl HCJ, Wilson JM : Immune response to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther* 3 : 137, 1996
11. Elshami AA, Sterman DH, Coonrod L, Kucharczuk JC, Park JY, Ritz N, Molnar-Kimber K, Amin K, Litzky LA, Kaiser LR, Albelda SM : Host immune responses in adenovirus-mediated gene therapy for cancer are detrimental. *Cancer Gene Ther*(in Press)
12. Wintersberger E, Mudrak L, Wintersberger U : Butyrate inhibits fibroblasts at a control point in the G1 phase. *J Cell Biochem* 21 : 239, 1983
13. Charollais RH, Buquet O, Mester J : Butyrate blocks the accumulation of CDC2 and mRNA in late G1 phase but inhibits both early and late G1 progression in chemically transformed mouse fibroblasts BP-A31. *J Cell Physiol* 145 : 46, 1990
14. Otaka M, Singhal A, Hakomori S : Antibody-mediated targeting of differentiation inducers to tumor cells : inhibition of colonic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 158 : 202, 1989
15. Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviet C, Remesy C, Murat JC : Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Can* 52 : 286, 1992
16. Tang DC, Taylor MW : Transcriptional activation of the adenine phosphoribosyltransferase promoter by an upstream butyrate-induced Moloney murine sarcoma virus enhancer-promoter element. *J Virol* 64 : 2907, 1990
17. Goldberg YP, Leaner VD, Parker MI : Elevation of large-T antigen production by sodium butyrate treatment of SV40-transformed WI-38 fibroblasts. *J Cell Biochem* 49 : 74, 1992
18. Tang DC, Johnston SA, Carbone DP : Butyrate-inducible and tumor-restricted gene expression by adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* 1 : 15, 1994
19. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong JY, Townes TM : Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 5798, 1997
20. Elshami AA, Cook JW, Amin KM, Choi H, Park JY, Coonrod L, Sun J, Molnar-Kimber K, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM : The effect of promoter strength in adenoviral vectors containing herpes simplex virus thymidine kinase on cancer gene therapy in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 4 : 213, 1997
21. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Caerwinski MJ, Fine LF : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer*

- Res 48 : 589, 1988
22. 박재용, 김창호, 정태훈, Albelda SM : Herpes simplex virus thymidine kinase gene을 이용한 유전자치료에서 retinoic acid가 bystander effect에 미치는 영향. 결핵 및 호흡기질환 44 : 162, 1997
 23. Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM : n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature 268 : 462, 1977
 24. Cuiisset L, Tichonicky L, Jaffray P, Delpech M : The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. J Biol Chem 272 : 24148, 1997
 25. Kruh J : Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. Mol Cell Biochem 42 : 65, 1982
 26. Turner BM : Decoding the nucleosome. Cell 75 : 5, 1993
 27. Pages JC, Loux N, Farge D, Briand P, Weber A : Activation of Moloney murine leukemia virus LTR enhances the titer of recombinant retrovirus in Ψ CRIP packaging cells. Gene Ther 2 : 547, 1995
 28. Dion LD, Goldsmith KT, Tang DC, Engler JA, Yoshida M, Garver RL : Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase. Virol 231 : 201, 1997
 29. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN : The bystander effect : Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Res 53 : 5247, 1993