

□ 원 저 □

면역체계가 Retroviral Vector로 이입한 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자치료에 미치는 영향†

경북대학교 의과대학 내과학교실¹⁾, 경북대학교병원 암연구소²⁾,
계명대학교 의과대학 내과학교실³⁾, 대구효성카톨릭대학교 의과대학 미생물학교실⁴⁾

박재용^{1, 2)}, 주소영²⁾, 장희진²⁾, 손지웅¹⁾, 김관영¹⁾,
김정석¹⁾, 김창호^{1, 2)}, 박재호³⁾, 이종기⁴⁾, 정태훈^{1, 2)}

= Abstract =

Effect of Immune System on Retrovirus-Mediated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Therapy

Jae Yong Park, M.D.,^{1, 2)} Soyoung Joo, M.S.,²⁾ Hee Jin Chang, B.S.,²⁾
Ji Woong Son, M.D.,¹⁾ Kwan Young Kim, M.D.,¹⁾ Keong Seok Kim, M.D.,¹⁾
Chang Ho Kim, M.D.,^{1, 2)} Jae Ho Park, M.D.,³⁾ Jong Ki Lee, Ph.D.,⁴⁾ Tae Hoon Jung, M.D.,^{1, 2)}

¹⁾Department of Internal Medicine, School of Medicine, Cancer Research Institute,
Kyungpook National University, Taegu, Korea

³⁾Department of Internal Medicine, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

⁴⁾Department of Microbiologg, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hgosung, Taegu, Korea

Background : The impact of the immune response on cancer gene therapy using viral vectors to deliver a "suicide gene" is currently unclear. A vigorous immune response targeted at viral proteins or transgene may enhance the efficacy of tumor destruction and even augment responses to tumor antigens. These responses may involve the release of cytokines and stimulation of tumor specific cytotoxic T-lymphocytes that enhance therapeutic efficacy. On the other hand, a vigorous rapid cellular immune response may destroy cells expressing the therapeutic gene and attenuate the response to therapy. Furthermore, development of neutralizing antibody responses may prevent readministration of virus, a potentially significant limitation. Evaluating the significance of these limitations in animal models and developing solutions are therefore of obvious importance.

Methods : After retroviral transduction of mouse mesothelioma cell line(AB12) with Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSVtk) gene in vitro, subcutaneous flank tumors were established. To study the effect of in-

† 본 연구는 1997년도 학술진흥재단 연구비 지원으로 이루어진 것임.

tact immune system on efficacy of tumor eradication, the ability of the HSVtk/ganciclovir system to inhibit tumor growth was compared among normal Balb/c mice, immunodeficient Balb/c-nude and SCID mice, and Balb/c mice immunosuppressed with cyclosporin.

Results : Ganciclovir treatment resulted in greater inhibition of tumor growth in Balb/c mice compared with immunodeficient Balb/c-nude mice and SCID mice (in immunodeficient mice, there were no growth inhibition by ganciclovir treatment). Ganciclovir treatment resulted in greater inhibition of tumor growth in non-cyclosporin (CSA) treated Balb/c mice compared with CSA treated Balb/c mice. On day 8, mean ganciclovir-treated tumor volume were 65% of control tumor volume in Balb/c mice versus 77% control tumor volume in CSA-treated Balb/c mice. This effect was still evident during therapy (day 11 and 13). On day 13, non-CSA treated tumor volume was 35% of control tumor volume versus 60% of control tumor volume in CSA treated Balb/c mice. Duration of expression of HSVtk was not affected by the immunosuppression with CSA.

Conclusion : These results indicate that the immune responses against retrovirally transduced cells enhance the efficacy of the HSVtk/ganciclovir system. These findings have important implications for clinical trials using currently available retrovirus vectors as well as for future vector design. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 229-240)

Key words : Immunity, Retrovirus, HSV-thymidine kinase, Gene therapy.

서 론

Herpes Simplex Virus thymidine kinase(HSVtk)를 encoding하는 유전자를 암세포에 이입(transfection)하여 ganciclovir(GCV)에 선택적으로 감수성을 갖도록 한 후 GCV를 투여하여 암세포의 apoptosis를 초래하는 자살유전자(suicide gene) 치료는 동물실험에서 그 효과가 증명되었다¹⁻³⁾. 이러한 HSVtk/GCV를 이용한 유전자치료는 HSVtk가 이입된 암세포 뿐 만 아니라 HSVtk유전자가 이입되지 않은 주위의 암세포도 GCV 투여 후에 사망하는 bystander effect에 의해 암세포의 10-20%에 HSVtk를 이입할 경우 거의 모든 암세포의 apoptosis가 일어난다⁴⁻⁵⁾. 그러나 이러한 bystander effect에도 불구하고 동물실험에서 종양을 완전히 제거하지 못한 예가 많을 뿐 아니라, GCV 투여 중단 후 종양이 재발된 예들이 많아^{1, 6-7)}, HSVtk/GCV를 이용한 유전자치료의 효과를 증가시키기 위해서는 새로운 벡타의 개발과 함께 bystander effect를 극대화시킬 수 있는

방법에 대한 연구가 필요하다.

Bystander effect의 기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 apoptosis에 의해 파괴된 세포의 독성 잔유물의 endocytosis와 gap junction을 통한 세포간의 metabolic cooperation등이 관여한다고 알려져있다⁸⁻¹⁰⁾. Freeman등⁴⁾은 세포매개성 면역반응으로 생성된 cytokine 가운데 IL-1 α 와 IL-6가 bystander effect에 관여할 것으로 보고하였으나 아직 면역반응이 bystander effect에 미치는 영향에 대한 체계적인 연구가 없다. HSVtk/GCV를 이용한 유전자치료에서 면역반응은 1) adenovirus 혹은 retrovirus와 같이 벡타로 사용된 virus의 단백질, 2) 치료목적으로 이입된 HSVtk 유전자의 생성물, 3) 암세포에 대해서 일어날 수 있다¹¹⁻¹²⁾. 그리고 이러한 면역반응은 cytokines의 생성 혹은 cytotoxic tumor-specific T-cell의 생성을 초래하여 bystander effect에 의한 살상효과를 증가시키거나^{4, 13)}, anti-tumor immunity를 유도하여 tumor vaccine의 효과를 나타낼 수 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 한편 이와는 대조적으로 면역반응은 HSVtk

유전자를 발현하는 세포들을 파괴하여 이입된 HSVtk 유전자의 발현기간을 제한함으로써 유전자치료의 효과를 감소시킬 수도 있다¹⁷⁾.

저자들은 retroviral vector로 이입한 HSVtk 유전자치료를 면역체계가 bystander effect와 유전자치료의 효과에 미치는 영향을 보다 정확히 규명하고자 본 연구를 시행하였다. 본 연구의 결과는 HSVtk 유전자와 IL-2 혹은 GM-CSF 등의 cytokine 유전자의 병합유전자치료(combined gene therapy) 혹은 HSVtk 유전자치료와 cyclosporin 혹은 rapamycin과 같은 면역조절제의 병합치료의 이론적 토대가 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구의 결과는 바이러스 벡터의 면역성을 변화시켜 유전자 치료효과를 증가시킬 수 있는 새로운 벡터의 개발에도 도움이 될 것으로 생각된다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Balb/c mice의 악성종피종 세포주인 AB12 세포주를 사용하였으며, Albelda SM(University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, USA)로부터 제공받았다. AB12 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS), penicilline G(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

2. Retroviral vector의 생산과 유전자이입

본 연구에 사용하는 retroviral vector는 neomycin resistance 유전자(neoR)와 promoter로 5LTR(long terminal repeat)를 갖고 있는 LNL6 vector에 HSVtk 유전자와 promoter로 Simian Virus 40을 삽입하여 만들었으며, Albelda SM(University of Pennsylvania Medical Center, USA)로부터 제공받았다. 제공받은 retroviral vector를 calcium-

phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection 시킨 후 neomycin analogue인 G418 800 µg/ml을 함유하는 배지에서 14일간 배양하여 유전자가 이입된 clone을 선택하였다. 선택한 PA317 producer cell line을 다시 직경 20cm culture dish에서 배양하고 그 배양액을 필터로 걸러 retroviral vector를 함유하는 viral stock을 얻었다.

AB12 세포주를 6-well tissue culture plate에 well당 10⁵개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 lipofectamine(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 이용하여 세포주 내로 retroviral HSVtk 유전자를 이입하였다. 먼저 polystyrene tube에서 1ml 배지와 8 µl lipofectamine을 넣어 혼합한 뒤 다시 여기에 1ml viral stock을 첨가하여 20℃에서 30분간 방치하였다. 그런 다음 24시간 동안 배양한 6-well culture plate의 배지를 버리고 well당 0.5ml의 viral/lipofectamine 혼합액과 10% FBS가 첨가된 2.5ml 배지를 첨가하여 배지의 양이 3.0ml 되게 한 후 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하였다. 그리고 G418 800 µg/ml이 함유된 배지에서 2주간 배양하여 HSVtk 유전자가 이입된 세포(AB12-STK)를 선택하였다.

3. Ganciclovir에 대한 감수성검사

HSVtk 유전자가 이입되지 않은 AB12 세포와 HSVtk 유전자가 이입된 AB12-STK세포를 96-well tissue culture plate에 well당 4000개(100 µl media/well)의 세포를 각각 분주하였다. 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하여 세포들이 monolayer를 형성하였을 때 GCV가 첨가되지 않은 배지와 0.02 µM에서부터 2000 µM까지의 GCV를 첨가한 배지로 교환하였다. 5일간 배양한 후 각 well의 생존 세포 수는 생존세포의 dehydrogenase 활성도를 측정하는 비색분석법인 MTT 검사법으로 측정하였다. 각각의 well마다 20 µl MTT 용액을 첨가하고

37℃에서 3시간 동안 추가 배양한 뒤에 490nm에서 흡광도를 측정하였다. GCV가 첨가된 well의 흡광도를 GCV가 첨가되지 않은 배지로 배양한 well의 흡광도와 백분율로 생존율을 구하였다.

4. 동물모델의 확립

출생 후 8-10주의 암컷 Balb/c 생쥐(체중 20gm)을 사용하여 동물모델을 확립하였다. 암컷 Balb/c 생쥐의 양측 측 복부에 100 μ l DMEM 배지에 부유시킨 5×10^6 AB12 세포를 피하주사 하였다. 종양은 피하주사 3일 후 지름이 4-5mm로 육안으로 측정할 수 있는 크기가 되었으며 이 후 3일 간격으로 종양의 지름(L : length)과 폭(W : width)을 측정하여 종양의 크기를 구하였으며 종양의 크기는 $L \times W^2/2$ 로 계산하였다.

5. 면역체계가 HSVtk/GCV 유전자치료에 미치는 영향

HSVtk 유전자가 이입된 AB12-STK 세포와 이입되지 않은 AB12 세포를 1 : 20으로 혼합하여 면역체계가 다른 생쥐 즉 Balb/c mice, Balb/c-nude mice와 SCID mice의 양측 옆구리에 피하 주사하였다(각각 12마리의 생쥐). 피하주사 후 3일에 각 군에서 6마리는 2주간 GCV 50 mg/kg/day를 복강 내로 주사하였으며 6마리는 동량의 saline을 투여하여 대조군으로 하였다.

6. 면역억제제가 HSVtk/GCV 유전자치료에 미치는 영향

Balb/c mice 40마리를 두 그룹으로 나누어 1군은 암세포를 주사하기 하루 전에 cyclosporin 20mg/kg을 복강내 주사하였고 2군은 동량의 saline을 투여하였다. HSVtk 유전자가 이입된 AB12-STK 세포와 이입되지 않은 AB12 세포를 1 : 40으로 혼합하여

생쥐의 양측 측 복부에 피하주사 하였다.

Cyclosporin 투여 군은 Yang등¹⁹⁾과 같이 20mg/kg/day의 cyclosporin을 격일로 2주간 복강 내로 주사하였다. 암세포를 피하주사하고 3일 후부터 각 군에서 6마리는 GCV 50mg/kg/day를 그리고 6마리는 동량의 saline을 복강 내로 주사하면서 3일 간격으로 종양의 크기를 조사하였다. Cyclosporin 투여에 따른 HSVtk 유전자의 발현 차이를 규명하기 위하여 각 군별로 4마리의 생쥐를 암세포 주사 후 1주일과 2주일에 희생시키고 종양을 절단하여 -70℃에 보관하였다.

8. Cyclosporin 투여에 따른 HSVtk 유전자의 발현 차이

Cyclosporin 투여에 따른 HSVtk 유전자의 발현차이는 암세포 주사 후 1 주일과 2 주일에 절단한 암조직에서 RT-PCR로 조사하였다.

RNA는 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration법으로 추출하였다¹⁸⁾. 동결된 조직을 denaturing solution(4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate(pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercapthanol)과 혼합한 후 glass homogenizer를 사용하여 4℃에서 마쇄시켰다. 2M sodium acetate와 water saturated phenol-chloroform을 마쇄조직에 첨가한 후 4℃에서 14,000rpm으로 15분간 원심분리해서 얻은 상층액을 모으고 동량의 isopropanol을 첨가한 다음 -20℃에서 1시간 동안 방치한 후 4℃에서 14,000rpm으로 15분간 원심분리해서 RNA를 침전시켰다. RNA pellet을 75% 에탄올로 세척한 다음 상온에서 방치하여 말린 후 DEPC로 처리한 증류수 20 μ l에 녹여서 -70℃에 보관하였다. 분리된 RNA에 대한 cDNA의 합성은 Perkin-Elmer사의 cDNA합성 kit를 사용하였다. 즉 조직에서 얻은 500ng RNA, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 10x buffer 1 μ l, 2.5mM dNTP 4 μ l, 25U M-MuLV reverse transcriptase, 2.5 μ M random

Table 1. Primer sequences of HSVtk and β -actin

Primer	Sequence
HSVtk	5' primer 5'-ATGGCTTCGTACCCCTGCCA-3'
	3' primer 5'-GGTATCGCGCGCGCCGGGTA-3'
β -actin	5' primer 5'-AACATGGCATTGTTACCAACT-3'
	3' primer 5'-ATAGCACAGCTTCCCTTTGAT-3'

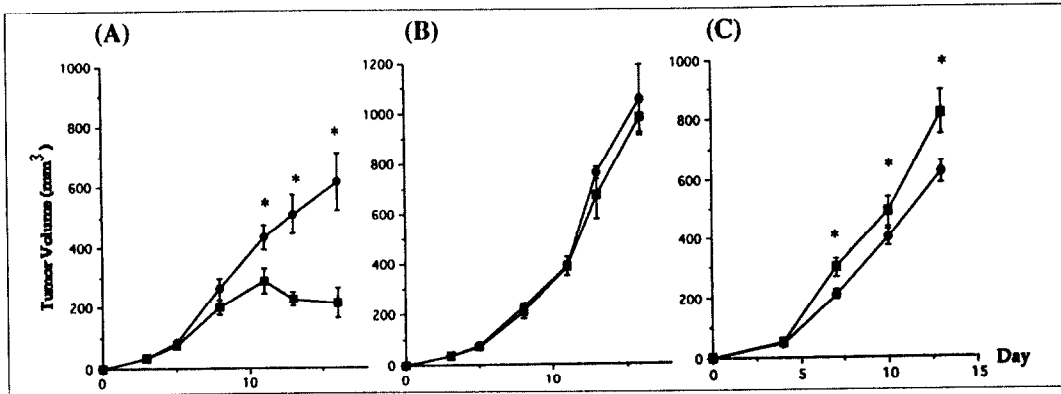


Fig. 1. Effect of immune system on the retrovirally transfected HSVtk gene therapy. A mixture of HSVtk+to HSVtk-AB12 cells at a ratio of 1 : 20 were subcutaneously injected in immunocompetent Balb/c mice(A), and immunodeficient Balb/c-nude mice(B) and SCID mice(C) on day 0. Half of animals(n=6) in each group received intraperitoneal ganciclovir(50mg/kg/day) from day 3 to day 16(controls received saline, n=6). Tumor growth was faster in immunodeficient mice compared with Balb/c mice. Ganciclovir treatment resulted in greater inhibition of tumor growth in Balb/c mice compared with immunodeficient mice(there was no growth inhibition in immunodeficient mice by ganciclovir treatment.). Error bars=SEM, ● =ganciclovir treated mice, ■ =saline injected mice, * =p<0.05.

hexadeoxynucleotide primer와 증류수의 양이 10 μ l 가 되도록 하였다. 42℃에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하고 99℃에서 5분간 반응시켜 합성을 중지시키고 5℃에서 5분간 냉각시켰다. PCR은 25mM MgCl₂ 2 μ l, 10x buffer 4 μ l, Taq polymerase 2.5U, sense 및 antisense primer 각각 0.5 μ l (0.25pM)와 증류수의 양이 40 μ l 이 되도록 한 다음 동일한 tube에 첨가하여 시행하였다. 중합효소반응은 94℃에서 60초간 변성, 56℃에서 60초간 annealing, 72℃에서 80초간 extension, 마지막 extension은 72℃에서 8분간 연장처리 하였으며, HSVtk 는 35회 그리고 β -actin은 25회 시행하였다. 중합효

소반응에서 얻은 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 30분간 염색하였다. PCR에 사용한 primer의 서열은 Table 1과 같다.

9. 통계분석

대조군에 대한 치료군의 비교는 Student's t-test를, 그리고 면역억제제 투여 유무에 따른 치료율의 비교는 Fisher's test를 이용하였으며 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적인 의의가 있는 것으로 판정하였다.

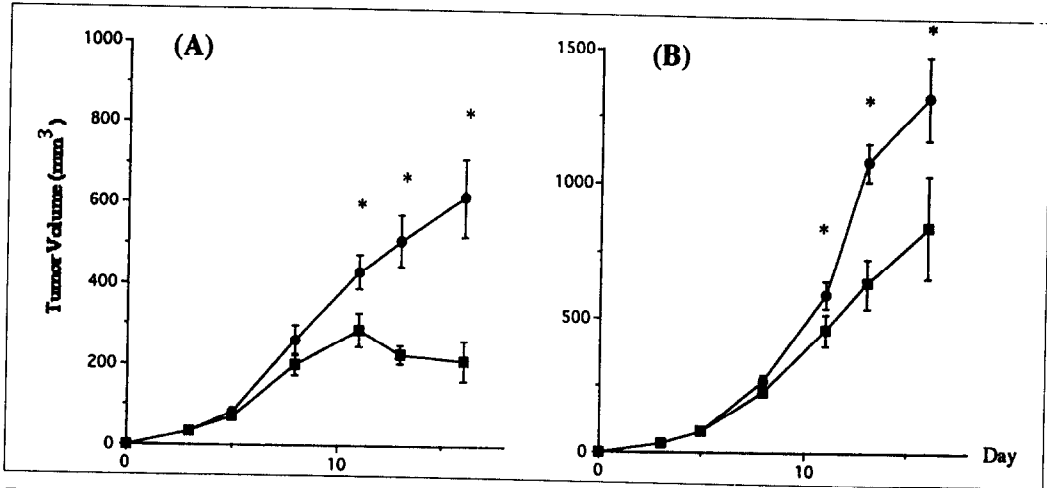


Fig. 2. Effect of immunosuppression on the retrovirally transduced HSVtk gene therapy. A mixture of HSVtk+ to HSVtk-AB12 cells at a ratio of 1 : 20 were subcutaneously injected in immunocompetent Balb/c mice(A), and immunosuppressed Balb/c mice(B). Half of animals(n=6) in each group received intraperitoneal ganciclovir(50mg/kg/day) from day 3 to day 16(controls received saline, n=6). Tumor growth was faster in CSA treated mice compared with non-CSA treated mice.

Ganciclovir treatment resulted in greater inhibition of tumor growth in non-CSA treated mice compared with CSA treated mice.

Error bars=SEM, ● =ganciclovir treated mice, ■ =saline injected mice, * =p<0.05.

결 과

1. GCV 감수성검사

HSVtk 유전자가 이입된 AB12세포의 50%가 0.1 μ M GCV에서 사망하였으나 유전자가 이입되지 않은 세포는 200 μ M에서 50% 사망하여 HSVtk 유전자가 이입된 세포들은 HSVtk 유전자가 이입되지 않은 세포에 비해 GCV에 대한 감수성이 유의하게 증가되었다(data not shown).

2. 면역체계에 따른 HSVtk 유전자치료 효과

Immunocompetent Balb/c mice에서는 GCV를 투여한 군에서 saline을 투여한 대조군에 비해 종양의 성장이 유의하게 감소하여 GCV 투여 후 13일째에는 종양의 크기가 대조군에 비해 65.5% 감소되었다

($210 \pm 50.0 \text{ mm}^3$ versus $615 \pm 96.0 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$). 그러나 Balb/c-nude mice와 SCID mice에서는 종양의 성장이 Balb/c mice에 비해 빠를 뿐 아니라 GCV를 투여한 경우에도 종양의 성장이 억제되지 않았다(Fig. 1과 Fig. 4). Balb/c-nude mice에서는 HSVtk+ 세포와 HSVtk-세포를 1 : 5의 비율로 한 실험에서 종양의 성장이 억제되었다(data not shown).

3. 면역억제제가 HSVtk/GCV 유전자치료에 미치는 영향

Balb/c mice에 면역억제제인 cyclosporin을 투여한 군에서도 GCV를 투여한 경우 saline을 투여한 대조군에 비해 종양의 성장이 유의하게 억제되었다($842 \pm 192.2 \text{ mm}^3$ versus $1323 \pm 156.0 \text{ mm}^3$ on day 16, $p < 0.05$). 그러나 cyclosporin을 투여한 군은

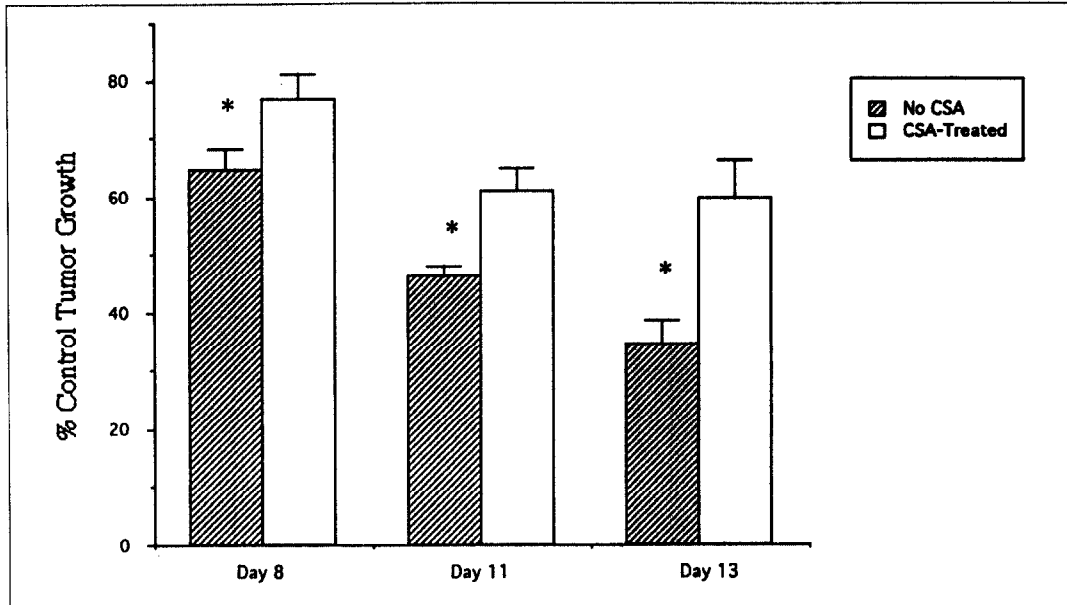


Fig. 3. Comparison of retrovirally transfected HSVtk gene therapy in immunocompetent versus immunosuppressed Balb/c mice. Ganciclovir therapy was more effective in immunocompetent mice. Early during therapy (Day 8), mean ganciclovir-treated tumor volume were 65% of control tumor volume in immunocompetent mice versus 77% control tumor volume in CSA treated mice ($p < 0.05$). This effect was still evident during therapy (Day 11 & 13). On day 13, non-CSA treated tumor volume was 35% of control tumor volume versus 60% of control tumor volume in CSA treated mice ($p < 0.05$). Error bars = SD.

cyclosporin을 투여하지 않은 군에 비해 종양의 성장이 유의하게 빨라 (saline-treated group, $1323 \pm 156.0 \text{ mm}^3$ versus $615 \pm 96.0 \text{ mm}^3$ on day 16, $p < 0.05$) 치료효과가 상쇄되었으며 (Fig. 2), 이와 같은 종양의 성장속도를 고려하지 않은 경우에도 cyclosporin을 투여하지 않은 군은 GCV 투여 후 13일째 종양의 크기가 saline을 투여한 대조군에 비해 65.5% 감소한 반면 cyclosporin을 투여한 군에서는 GCV 투여에 따른 종양의 크기 감소가 saline을 투여한 대조군의 40.3%에 불과하여 치료효과가 유의하게 낮았다 (Fig. 3과 Fig 4).

4. Cyclosporin 투여에 따른 HSVtk 유전자의 발현 차이

HSVtk mRNA 발현은 cyclosporin을 투여하지 않

은 군과 cyclosporin을 투여한 군에서 모두 발현되었으며 발현수준도 유사하였다 (Fig. 5).

고 찰

암의 유전자치료는 암세포에 대한 면역반응을 증강시켜 암을 치료하고자 하는 유전적 면역강화법 (genetic immunopotential), 암유전자의 과발현이나 종양 억제유전자의 결손을 교정하는 돌연변이보상법 (mutation compensation), 그리고 HSVtk 혹은 cytosine deaminase (CD)와 같은 약제 감수성유전자를 이용한 분자화학요법 (molecular chemotherapy) 등이 시도되어지고 있다¹⁹⁻²¹⁾.

ADA (adenosine deaminase) 결핍으로 인한 면역결핍증과 같은 유전질환에 대한 유전자치료는 세포

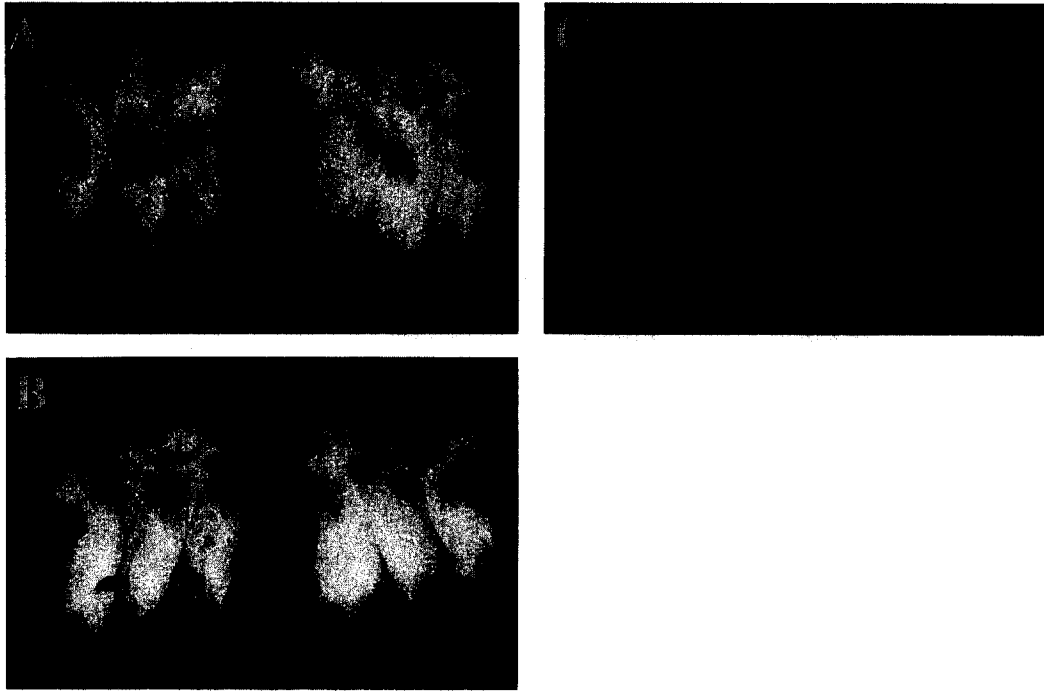


Fig. 4. The effects of immunity on retrovirally transfected HSVtk gene therapy. On day 16, greater inhibition of tumor growth in Balb/c mice(A) compared with CSA treated Balb/c mice(B) and Balb/c-nude mice(C)(there was no growth inhibition in Balb/c-nude mice). Left : saline-injected mice, right : ganciclovir injected mice.

의 일부에만 유전자를 이입하더라도 치료효과를 얻을 수 있는데²²⁾ 비핵 암에 대한 유전자치료는 모든 암세포를 제거하여야만 치료효과를 기대할 수 있다. HSVtk/GCV를 이용한 유전자치료는 암세포의 10~20%에 HSVtk 유전자를 이입할 경우 bystander effect에 의해 거의 모든 암세포의 apoptosis가 일어나며^{4-5, 23-24)}, 따라서 모든 암세포에 유전자를 이입할 수 없는 기술적인 한계를 극복할 수 있다. 뿐만 아니라 HSVtk 유전자치료는 암세포의 유전적 이상에 관한 정확한 규명이 없이도 시도할 수 있으며, 유전적 이상이 다른 여러 가지 종양에 비선택적으로 시도할 수 있는 장점이 있다¹⁻³⁾.

최근 HSVtk 유전자치료에서 중요한 항암기전의 하나인 bystander effect의 면역학적인 기전에 많은 관심이 모아지고 있다. 즉 in-vitro에서는 apoptosis

에 의해 파괴된 세포의 독성 잔유물의 endocytosis 혹은 gap junction을 통한 세포간의 metabolic co-operation등이 관여한다고 알려져 있으나⁸⁻¹⁰⁾, in-vivo에서의 bystander effect는 적어도 3가지 이상의 기전에 의한다고 한다. 즉 첫째, in-vitro에서의 주요기전인 GCV에 대한 chemosensitization, 둘째, apoptotic cell에서 유리된 TNF, IL-1, IL-6 등에 의한 hemorrhagic tumor necrosis(HTN)²⁵⁻²⁷⁾, 셋째, HTN으로 인한 면역세포의 종양내 침윤과 ICAM-1, B7-1, MHC molecule의 upregulation에 의해 종양의 주위환경이 면역적으로 활성화됨에 따른 anti-tumor immunity^{25, 28, 29)}등이 관여한다. 그리고 이와 같은 HSVtk 유전자치료의 면역학적인 요소는 종양 세포에서 분비되는 면역억제물질로 인한 면역요법의 한계를 극복할 수 있는 면역요법과의 병합치료³⁰⁾의

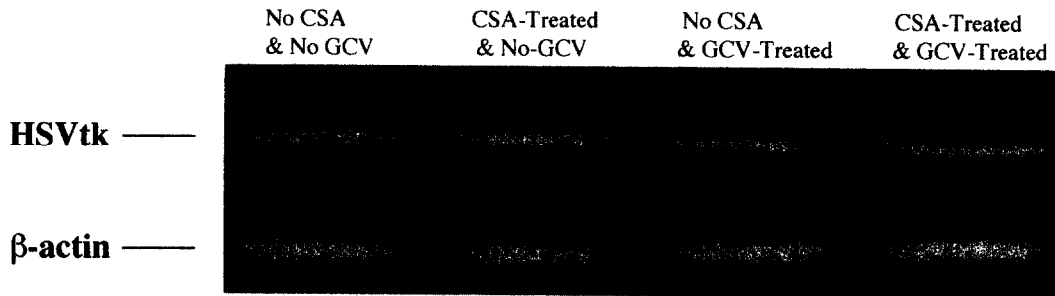


Fig. 5. RT-PCR analysis of HSVtk in tumors. Fourteen days after injection of AB12 cells(a mixture of HSVtk + to HSVtk-AB12 cells at a ratio of 1 : 20), tumors were harvested and mRNA isolated in non-immunosuppressed Balb/c mice and Balb/c mice immunosuppressed with cyclosporin. RT-PCR was performed with primers designed to amplify both HSVtk and β -actin.

이론적 배경이 되며, 또한 IFN- α , IL-2, GM-CSF, IL-4와 같은 cytokine 유전자와 HSVtk 유전자 병합치료의 이론적 배경이 되고 있다^{29, 31-33}).

한편 Yang 등^{17, 34})은 adenovirus를 벡타로 사용한 동물실험에서 cytotoxic T-cell(CTL)에 의해 유전자가 이입된 세포가 파괴되어 유전자의 발현기간이 감소되는데 비해, cyclosporin을 투여하여 CTL을 억제한 후에는 유전자의 발현기간이 증가되고 이에 따라 치료효과도 증가되었다고 보고하였다.

그리고 Engelhardt 등³⁵)과 Yang 등³⁶)은 adenovirus E2a gene의 mutation을 일으킬 경우 유전자가 이입된 세포에 대한 면역반응이 감소하고 이에 따라 이입한 유전자의 발현기간이 증가하였다고 한다. 뿐만 아니라 Yang 등³⁷)은 일시적으로 CD4 helper T-cell을 억제할 경우 neutralizing antibody의 형성을 억제하여 유전자의 재투여의 효과가 향상되었다고 보고한 바 있다. 이들의 결과들은 면역억제시 유전자 발현기간의 증가와 재투여의 효과가 증가한다는 것이다.

이상의 상반된 결과 즉 면역증강시 치료 효과가 증가된다는 연구들과 이와는 대조적으로 면역억제시 치료 효과가 증가된다는 결과들은 유전자치료에 있어서 면역학적인 역할에 관한 보다 많은 연구의 필요성을 제기한다고 하겠다. HSVtk 유전자 치료에 있어서 면

역반응은 벡타로 사용한 바이러스의 유전자 생성물과 치료목적으로 이입된 HSVtk 유전자의 생성물에 대해 일어날 수 있으며^{13, 14}), 따라서 사용한 바이러스 벡타에 따른 차이를 규명할 필요가 있다. 본 연구는 면역체계가 retrovirus 벡타로 이입한 HSVtk 유전자 치료에 미치는 영향을 조사하고 특히 이와 같은 면역체계가 이입한 유전자의 발현기간에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 본 연구에서는 retrovirus 벡타를 사용한 유전자치료에 있어서는 면역반응이 bystander effect와 유전자치료 효과를 증가시키며 이입한 유전자의 발현기간에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 retrovirus 벡타로 이입한 유전자는 숙주의 염색체에 integration되기 때문에 retrovirus에 의해 이입된 유전자는 면역반응에 의해 발현기간이 제한되지 않는 반면 면역반응은 HSVtk 유전자치료의 bystander effect는 증가시키는 것을 시사한다. 이러한 결과는 retrovirus 벡타를 사용한 유전자치료시에는 면역증강이 치료효과를 증가시킬 것으로 생각되었다.

요 약

연구배경 :

HSVtk/GCV를 이용한 유전자치료에서 면역반응은 1) adenovirus 혹은 retrovirus와 같이 벡타로 사용

된 virus의 단백질, 2) 치료목적으로 이입된 HSVtk 유전자의 생성물, 3) 암세포에 대해서 일어날 수 있다. 그리고 이러한 면역반응은 cytokines의 생성 혹은 cytotoxic tumor-specific T-cell의 생성을 초래하여 bystander effect에 의한 살상효과를 증가시키거나, anti-tumor immunity를 유도하여 tumor vaccine의 효과를 나타낼 수 있다. 한편 이와는 대조적으로 면역반응은 HSVtk 유전자를 발현하는 세포들을 파괴하여 이입된 HSVtk 유전자의 발현기간을 제한함으로써 유전자치료의 효과를 감소시킬 수도 있다. 본 연구는 retrovirus 벡터로 이입한 HSVtk 유전자치료에서 면역체계가 bystander effect에 의한 살상효과에 미치는 영향을 규명하고 면역체계가 이입한 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

방 법 :

Immunocompetent mice인 Balb/c mouse와 immunodeficient mouse인 Balb/c-nude 및 SCID mouse에서 retrovirus 벡터를 사용하여 HSVtk 유전자를 이입하고 치료효과를 조사하였다. 그리고 Balb/c mouse에 면역억제제인 cyclosporin을 투여하여 면역억제제가 bystander effect 및 유전자치료 효과와 유전자의 발현기간에 미치는 영향을 조사하였다.

결 과 :

Balb/c mouse에 HSVtk 유전자를 이입하고 GCV를 투여한 군은 GCV를 투여하지 않은 대조군에 비해 종양의 성장이 유의하게 억제되었으나 Balb/c-nude mouse와 SCID mouse의 경우 GCV를 투여한 군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다.

면역억제제인 cyclosporin을 투여한 군에서 유전자치료 효과가 cyclosporin을 투여하지 않은 정상 mouse에 비해 치료효과가 유의하게 작았다.

Cyclosporin 투여에 따른 유전자의 발현기간에는 유의한 차이가 없었다.

결 론 :

Retrovirus 벡터를 사용한 HSVtk 유전자치료에는

면역증강이 치료효과를 증가시킬 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Moolten FL, Wells JM : Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 82 : 297, 1990
2. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM : In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256 : 1550
3. Hwang HC, Smyth WR, Elshami AA, Kucharczuk JC, Amin KM, Williams JP, Litzky LA, Kaiser LR, Albelda SM : Gene therapy using adenovirus carrying the herpes simplex-thymidine kinase gene to treat in vivo models of human malignant mesothelioma and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 : 7, 1995
4. Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ : The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogenic cells. *Cancer Letter* 92 : 167, 1995
5. Ram Z, Culver KW, Wallbridge S, Blaese RM, Oldfield EH : In situ retroviral mediated gene transfer for the treatment for brain tumors in rats. *Cancer Res* 53 : 83, 1993
6. Ezzedine ZD, Martuza RL, Platika D, Short MP, Malick A, Choi B, Breakefield XO : Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer for herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* 3 : 608, 1991
7. Osaki T, Tanio Y, Tachibana I, Hosoe S, Kumagai T, Kawase I, Oikawa S, Kishimoto T : Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by type-specific

- expression of herpes simplex thymidine kinase gene. *Cancer Res* 53 : 5258, 1994
8. Li Bi W, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ : In vivo evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 4 : 725, 1993
9. Colombo BM, Benedetti S, Ottoolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, Finocchiaro G : The bystander effect : Association of U-87 cell death with ganciclovir mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. *Hum Gene Ther* 6 : 763, 1995
10. Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM : Gap junctions play a role in the bystander effect of the Herpes Simplex thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther* 3 : 85, 1996
11. Tapscott SJ, Miller AD, Olson JM, Berger MS, Groudine M, Spence AM : Gene therapy of the 9L gliosarcoma tumors by transduction with selective genes does not require drug selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 8185, 1994
12. Abina MA, Lee MG, Descamps V, Cordier L, Lopez M, Perricaudet M, Haddada H : LacZ gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and protects mice against the development of further tumors. *Gene Ther* 3 : 212, 1996
13. Caruso M, Paris Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D : Regression of established macroscopic liver metastasis after in situ transduction of a suicide gene. *Med Science* 90 : 7024, 1993
14. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC : Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocytes-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3539, 1993
15. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH : Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Med Sci* 91 : 4348, 1994
16. Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR : Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res* 54 : 6228, 1994
17. Yang Y, Ertl HCJ, Wilson JM : MHC class-I restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1 : 433, 1994
18. Chocmzynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytica Biochem* 162 : 156-159, 1987
19. 박재용 : 암의 유전자치료. 영남대학교 약품개발연구소 제4회 학술 심포지움 발표논문집 1, 1997
20. Fine HA, Kufe DW : Chapter 84, *Cancer Gene Therapy*, In Holland JF, Frei III E, Bast RC, Kufe D, Morton DL, Weichselbaum RR (Ed.) *Cancer Medicine*, 4th Ed., p1265, Baltimore, Williams & Wilkins, 1997
21. 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
22. Hirschborn R : Adenosine deaminase deficiency.

- Immunodeficient Rev 2 : 175, 1990
23. Freeman SM, Abboud CN, Whatenby KA, Abraham GN : The bystander effect : tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 53 : 5274, 1993
24. Freeman SM, Whatenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ : In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 23 : 31, 1996
25. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A, Abboud CN, Freeman SM : In vivo analysis of the "bystander effect" : a cytokine cascade. *Exp Hematol* 24 : 829, 1996
26. Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ, Kinsella AR : Prodrug-activated gene therapy : involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther* 3 : 83, 1996
27. Robertson PO, Ross HJ, Figlin RA : Tumor necrosis factor induces hemorrhagic necrosis of a sarcoma. *Ann Intern Med* 111 : 682, 1989
28. Ramesh R, Munshi A, Abboud CN, Marrogi AJ, Freeman SM : Expression of costimulatory molecules : B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. *Cancer Gene Ther* 3 : 373, 1996
29. Freeman SM, Ramesh R, Marrogi AJ : Immune system in suicide gene therapy. *Lancet* 349 : 2, 1997
30. Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T : Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir mediated killing of tumor cell induces tumor specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther* 4 : 91, 1997
31. Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SL : Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma : sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 56 : 3758, 1996
32. 이춘택, 박경호, 권희충, 김창민 : 약제감수성 유전자와 cytokine 유전자의 병합투여를 통한 항암면역반응의 극대화. 제24회 대한암학회 학술대회 초록집 58, 1998
33. Benedetti S, Dimeco F, Pollo B, Cirenei N, Colombo BM, Bruzone MG, Cattaneo E, Vescovi A, Didonato S, Colombo MP, Finocchiaro G : Limited efficacy of the HSV-TK/GCV system for gene therapy of malignant glioma and perspectives for the combined transduction of the interleukin-4 gene. *Human Gene Ther* 8 : 1345, 1997
34. Yang Y, Joosse KU, Su Q, Ertl HCJ, Wilson JM : Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther* 3 : 137, 1996
35. Engelhardt JF, Litzky L, Wilson JM : Prolonged transgene expression in Cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a. *Human Gene Ther* 5 : 1217, 1994
36. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM : Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nature Genet* 7 : 362, 1994
37. Yang Y, Greenough K, Wilson JM : Transient immune blockade prevents formation of neutralizing antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther* 3 : 412, 1996