

□ 원 저 □

폐암에서의 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자 치료와 Cytokine 유전자 치료의 복합요법[†]

대진의료재단 분당제생병원*, 서울대학교 의과대학 내과학 교실, 서울대학교 의학연구원 폐연구소,
서울대학교병원 임상의학연구소 유전자치료연구실

김계수*, 박경호, 설자영, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

Combination Gene Therapy of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase and Cytokines in Lung Cancer

Gyesu Kim, M.D.*, Kyung-Ho Park, M.S., Ja Young Seol, M.S.,
Chul-Gyu Yoo, M.D., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., and Young-Soo Shim, M.D.

Daejin Medical Center, Bundang Jesaeng Hospital,
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,
Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University,
Gene Therapy Laboratory of CRI of Seoul National University Hospital*

Background : One of the important mechanisms responsible for a tumor escaping the immune response is an absence of the tumor associated antigen (TAA) on the cancer cell surface. To overcome this, combination gene therapy using a herpes simplex thymidine kinase (HSTK) gene, prototype of drug sensitizing gene, was conducted to enhance TAA release by cell destruction, as well as the cytokine genes for immune cell attraction.

Methods : We investigated whether or not transduction with the adenovirus-HSTK (Ad-HSTK) enhanced the sensitivity of Lewis lung carcinoma (LLC) to ganciclovir (GCV) and induced a bystander effect. A Tumor vaccine trial was performed using LLC with ad-HSTK ± ad-GM-CSF ± ad-IL-2 to determine if they exhibit

[†]이 연구는 1999년도 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원으로 이루어진 것임.

Address for correspondence :

Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine
28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-2634 Fax : 02-762-9662 E-mail : ctlee@snu.ac.kr

some antitumor effect on established lung cancer xenografts.

Results : LLC with ad-HSTK revealed a much higher sensitivity to ganciclovir (GCV). LLC transduced with ad-HSTK and/or ad-IL-2, ad-GM-CSF showed a lower *in vivo* tumorigenicity. In the treatment experiment, vaccination with LLC transduced with ad-HSTK, ad-IL-2, or ad-GM-CSF alone modestly suppressed the growth of an established tumor. Combined transduction with HSTK and GM-CSF induced stronger growth suppression of a established lung cancer, while HSTK and IL-2 combination transduction did not have any antitumor effect on individual transduction. Vaccination with LLC-HSTK-GM-CSF increased the infiltration of dendritic cells in the spleen.

Conclusion : It was concluded that a tumor vaccine transduced with HSTK and GM-CSF induces strong antitumor immunity by activating the dendritic cells. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 135-146)

Key words : Gene therapy, Herpes simplex virus thymidine kinase, IL-2, GM-CSF, Adenovirus, Dendritic cell.

서 론

암의 유전자 치료는 작용 기전에 따라 인체의 면역 기전을 이용하는 면역 유전자 치료법과 직접 종양 세포를 죽이는 비면역학적 유전자 치료법으로 구분할 수 있다. 면역학적 유전자 치료로는 암세포 주변으로 면역 세포를 유도하여 암세포 자체의 면역성을 높이는 치료법, 즉 사이토카인(cytokine) 유전자를 이입하는 방법이 대표적이며, 비면역학적 유전자 치료에는 특정 약제에 대한 감수성 유전자를 이입하는 유전자 요법이 대표적이다¹. 암의 유전적 성질의 다양성 때문에 단일 유전자 요법으로는 만족할 만한 성적을 얻지 못하고 있고 이에 대한 대안으로 두 종류 이상의 유전자 치료를 복합하여 치료 효과를 높이려 하는 시도가 이루어지고 있다. 이 일환으로 면역학적 유전자 치료와 비면역학 치료를 복합하는 시도가 많이 이루어지고 있다.

전신으로 전이하는 암의 특성과 모든 암세포에 유전자를 이입할 수 없다는 한계 때문에 인체의 면역 기능을 이용하는 유전자 치료법이 이론적으로는 암의 치료에 적합하다고 할 수 있다. 그러나 암 환자의 면역 기능에는 여러 가지 장애가 있다는 사실이 밝혀지고 있다. 이중 최근에 많은 관심이 집중되는 것은 암 환자

에서 수상세포(dendritic cell)의 항원 표현 기능이 저하되어 있다는 사실이다²⁻⁴. 즉 암 환자에서는 수상 세포의 역할인 세포 외부의 항원을 흡수한 후 세포 내부에서 processing 단계를 거쳐 세포막에 표현하는 기능이 저하되어 있어 정상 세포와는 여러 가지 차이가 있는 암세포에 대한 항암 면역 반응이 일어나지 못한다는 것이다. 그 외에 암세포 자체의 문제도 항암 면역 반응 유도에 장애가 된다. 즉 암세포에 특이한 항원(tumor associated antigen, TAA)이 암세포 표면에 표현되지 않거나 세포 밖으로 노출이 되지 않아서 암세포에 대한 인체의 항암 면역 반응이 효과적으로 일어나지 못하는 원인이 된다.

이를 극복하기 위해 비면역학적 및 면역학적 유전자 치료를 복합하여 암을 치료할 수 있는지 알아보자 본 연구를 시행하였다. 대표적인 약제 감수성 유전자인 herpes simplex virus thymidine kinase(이하 HSTK) 유전자를 이용하여 암세포의 일부를 파괴해서 종양특이항원의 노출을 최대화하고 면역학적 치료로서는 사이토카인(IL-2, GM-CSF) 유전자를 동시에 이입하여 사이토카인이 분비되고 이 사이토카인에 의해서 많은 면역세포가 암 주위로 몰려 들어 결국 암의 종양특이항원을 인지하고 살상할 수 있는 항암면역 반응을 유도하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

1) 세포주 및 동물

실험에 사용된 세포주는 Lewis lung carcinoma (LLC)로 C57BL/6 생쥐에서 자연적으로 발생한 폐암 세포주로 미국의 ATCC(Manassas, VA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 동물은 C57BL/6 mouse로 일본의 SLC사에서 구입하였다.

2) 유전자 재조합 아데노바이러스

실험에 사용된 adenovirus-HSTK, adenovirus-mGM-CSF, adenovirus-mIL-2는 모두 본 연구실에서 제작되었다. 그중 adenovirus-HSTK의 제작 과정은 다음과 같다. 국립암센터 김창민 박사가 제공한 pMFG-HSTK plasmid를 BamHI로 절단하여 HSTK cDNA를 분리한 후 Qiex kit(Qiagen)를 이용하여 순수 분리하였다. 아데노바이러스의 packaging plasmid인 pAC CMV pLpA의 pUC19 poly-linker를 BamHI로 절단한 후 Qiex를 이용해서 순수 분리하였다. HSTK cDNA와 BamHI로 자른 pAC CMV pLpA를 T4 ligase를 이용하여 16°C에서 12시간 ligation한 후 E-coli DH5α에 형질전환(transformation)을 시행하였다. Ampicillin을 포함한 LB 배지에서 플라스미드가 이입된 E-coli의 클론을 선택한 후 large scale preparation을 통해 pAC-CMV-HSTK plasmid를 대량 분리하였다. 이 플라스미드는 자동염기서열분석기를 이용하여 HSTK 유전자가 정확히 삽입되어 있는지를 확인하였다. 이 pAC CMV pLpA와 adenovirus type 5의 지놈(genome) 전부를 갖고 있는 pJM17을 adenovirus type 5의 E1 gene이 안정적으로 전달감염(transfection)되어 있는 293 세포(human renal embryonal cell)에 동시에 인산칼슘침전 방법으로 이입하였다. 이후 293 세포를 2% FBS의 RPMI에서 배양하면서 세포병변효과(cytopathic effect)가 생긴 것을 확인한 후 세포를 용해시켜 동종 재조합(homologous recombina-

tion)을 통해 만들어진 ad-HSTK를 추출하였다. 이 바이러스는 293 세포(20cm plate, 30개)에서 대량 생산한 후 CsCl 초원심분리를 통해 순수 분리하고 plaque assay를 이용하여 농도를 측정하였다^{5,6}.

2. 연구 방법

1) 폐암 세포주(LLC)에 대한 아데노바이러스의 감염 LLC를 virus의 감염 능력 및 전사 능력을 증강시킨다고 알려진 sodium butyrate(5mM)로 처리하면서 100 moi(multiplicity of infection)의 아데노바이러스를 1시간 감염시킨 후 butyrate가 포함된 배지에서 24시간 배양하였다.

2) Adenovirus-HSTK에 의한 LLC의 ganciclovir (GCV)에 대한 감수성 증가 관찰

LLC에 100 moi의 adenovirus-HSTK를 형질도입(transduction)하고 나서 96 well plate(1×10⁴/well)로 옮긴 지 24시간 후 배지를 여러 농도(0, 0.05, 0.5, 5, 50, 500μM)의 GCV를 포함하는 배지로 바꾸고 이후 1일, 3일 5일째에 pink assay를 이용하여 세포 수를 측정하였다.

3) Mixed population culture를 통한 adenovirus-HSTK의 bystander effect 관찰

LLC에 100 moi의 adenovirus-HSTK를 감염시킨 후 아데노바이러스를 처리하지 않은 야생형(wild type) LLC와 여러 비율로 섞은 다음 6 well plate에 1.0×10⁵/well(3배수)씩 올려 놓고 나서 24시간 후에 50μM의 GCV를 투여하고 그로부터 4일 후 세포 수를 측정하였다. 100% untransduced LLC의 세포 수를 100%로 하여 % survival을 측정하였다.

4) Adenovirus-HSTK, Ad-IL-2, 및 Ad-GM-CSF 형질도입이 LLC의 체내 종양 형성능에 미치는 효과 관찰

LLC에 Ad-HSTK, Ad-IL-2, Ad-GM-CSF 및 Ad-HSTK + Ad-IL-2, Ad-HSTK + Ad-mGM-CSF를

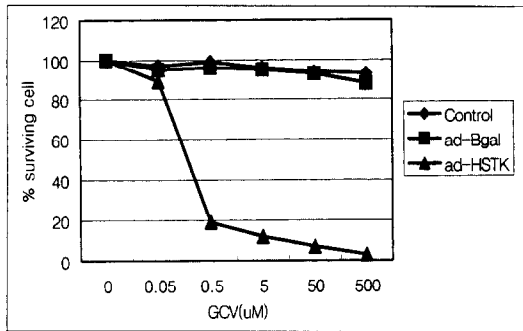


Fig. 1. Increased sensitivity of the herpes simplex thymidine kinase(HSTK) gene transduced Lewis lung cancer(LLC) cells to ganciclovir. At a concentration of $0.5\mu\text{M}$ of ganciclovir, the proportion of surviving HSTK transduced cells falls below 20%.

각각 100moi로 감염시킨 후 각 군 당 5마리의 C57BL/6 생쥐의 피하 조직에 1.0×10^6 개씩 주사하고 Ad-HSTK가 감염된 군에는 3-7일까지 GCV (100mg/kg)를 복강 안에 주입하였다. 이후 종양세포 주사 부위에 종양이 형성되는지를 육안으로 관찰하고 그 크기를 $1/2 \times (\text{width})^2 \times (\text{length})$ 의 공식에 따라 측정하였다.

5) 치료 효과 관찰

2×10^5 개의 야생형 LLC를 C57BL/6 생쥐의 우측 배부 피하조직에 주사한 후 7일째 장축이 약 4-5mm 정도 되는 종양이 형성된 것을 확인한 다음 좌측 배부에 야생형 LLC 및 Ad-HSTK, Ad-IL-2, Ad-GM-CSF, Ad-HSTK+Ad-IL-2, Ad-HSTK+Ad-GM-CSF로 감염시킨 LLC를 각각 1.0×10^6 개씩 tumor vaccine으로 피하 주사하였다. 그런 다음 3일째부터 5일간 GCV를 복강 내로 주입하고 나서 우측에 원래 형성되어 있던 종양의 직경의 변화를 관찰하였다.

6) 기전 확인

LLC를 Ad-HSTK, Ad-HSTK+Ad-IL-2, 및 Ad

-HSTK+Ad-GM-CSF로 형질도입한 후 1.0×10^6 개씩을 피하 조직에 주사하고 나서 3일째부터 5일째까지 GCV로 처리한 다음 7일째 쥐에서 비장을 적출하였다. Mouse의 수상세포의 표지자인 CD11c 항체로 단백질면역염색을 시행하여 비장내 CD11c 양성 림프구, 즉 수상세포의 침윤 정도를 비교하였다.

7) 통계 처리

종양의 성장 속도는 여러 군 간의 결과를 two factor factorial ANOVA test로 검증하였다.

결 과

1. Adenovirus-HSTK에 의한 LLC의 ganciclovir (GCV)에 대한 감수성 증강

LLC에 대한 Adenovirus-HSTK에 의한 HSTK의 형질도입은 본 연구진의 이전 연구에서 확인하였다⁷ (Ref. 7 Fig. 1 참조).

GCV의 농도가 $0.05\mu\text{M}$ 일 때는 대조군과 차이가 없었으나 $0.5\mu\text{M}$ 에서부터 GCV에 대한 감수성이 급격히 증가하였다(Fig. 1).

2. Mixed population culture를 통한 adenovirus-HSTK의 bystander 효과의 관찰

형질도입이 된 암세포가 5%만 섞인 well에서 40%의 암세포가 죽고 형질도입 암세포가 50% 섞인 well에서는 85%의 암세포가 죽는 등 현저한 bystander 효과가 관찰되었다(Fig. 2).

3. Adenovirus-HSTK, Ad-IL-2, 및 Ad-GM-CSF의 형질도입이 LLC의 체내 종양 형성능에 미치는 효과

야생형의 LLC는 C57BL/6의 피하 조직에서 모두 종양을 형성하였으며 Ad-GM-CSF만을 단독으로 이

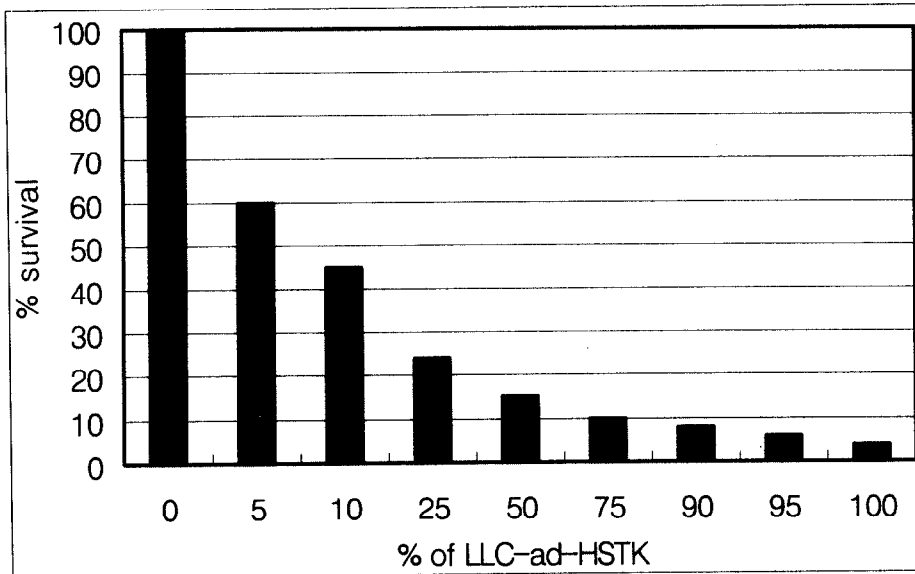


Fig. 2. The bystander effect. When HSTK transduced LLC was not present, all tumor cells survived in spite of ganciclovir administration. When HSTK transduced LLCs comprised 5% of the total cells, 40% of tumor cells died as a result of ganciclovir treatment. When half the cells were HSTK transduced, 85% of cells died.

입한 LLC를 주사한 C57BL/6의 피하 조직에서도 야생형 LLC보다는 작지만 종양이 형성되었다($p < 0.05$ by Anova test). 그러나 Ad-IL-2, Ad-HSTK, Ad-HSTK+Ad-IL-2 및 Ad-HSTK+Ad-GM-CSF가 이입된 LLC는 종양을 형성하지 않았다(Fig. 3).

4. 치료효과

야생형의 LLC가 종양백신(tumor vaccine)으로 사용된 군(대조군)에 비해서 Ad-HSTK 단독, Ad-IL-2 단독 및 Ad-HSTK+Ad-IL-2 복합으로 이입한 LLC를 종양백신으로 사용한 군에서 LLC 종양의 성장이 부분적으로 억제되었다($p < 0.01$) (Fig. 4). 그러나 이 세 군간에는 유의한 차이가 없었다. 즉 Ad-HSTK 및 Ad-IL-2의 복합 투여가 단독 투여보다 더 강력한 항암 면역 반응을 유도하지는 않았다. 그러나 Ad-GM-CSF를 이입한 LLC를 주사한 군에

서는 대조군 및 Ad-HSTK 군에 비해 종양의 성장이 유의하게 억제되었다($p < 0.01$: 대조군, $p < 0.05$: Ad-HSTK와 비교시). Ad-HSTK 및 Ad-GM-CSF를 동시에 이입한 LLC를 주사한 군에서는 각 바이러스를 단독으로 주사한 생쥐, 특히 Ad-GM-CSF 군에 비해서도 LLC 종양의 성장이 현저하게 억제되었다($p < 0.001$) (Fig. 5).

5. 기전 확인

위의 결과에서 HSTK, GM-CSF의 복합 치료군에서 항암 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 이 효과의 기전을 확인하기 위해 GM-CSF 효과의 특성인 수상세포(즉 antigen presenting cell)의 침윤을 비장에서 측정하였다. HSTK 단독 및 HSTK, IL-2 복합 치료 군에서는 CD11c 양성인 수상세포가 거의 관찰되지 않았으나 HSTK, GM-CSF 복합 치료군의 비장에서는 CD11c 양성 수상세포가 많이 관찰되었

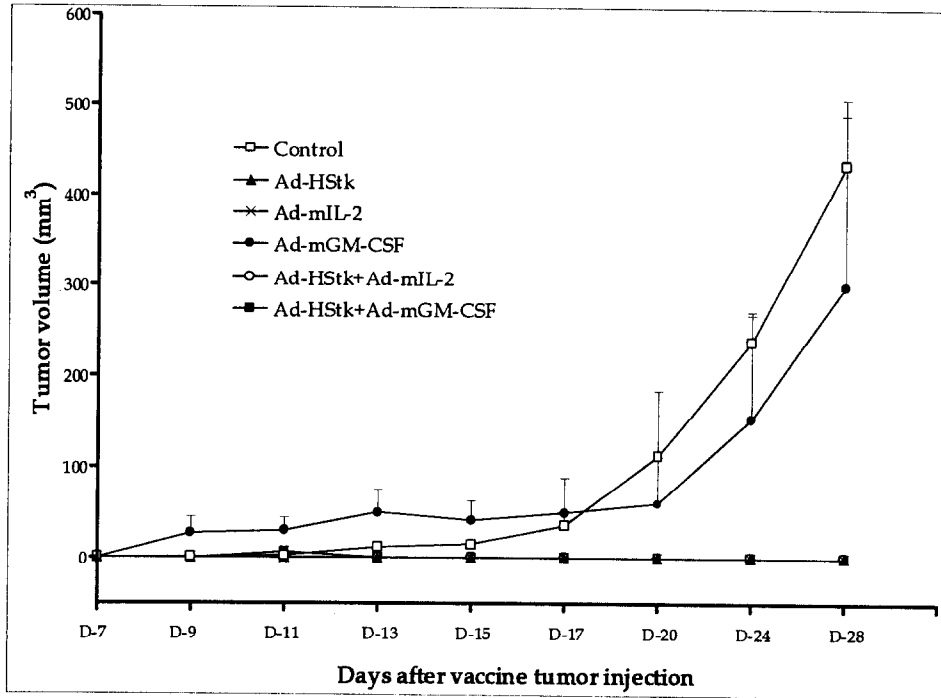


Fig. 3. Changes in the tumorigenicity of LLC by transduction with HSTK, GM-CSF and IL-2. All tumor cells transduced with HSTK, IL-2, HSTK+GM-CSF, and HSTK+IL-2 failed to form a tumor mass when they were injected into the subcutaneous tissue of C57BL/6 mice and treated with GCV. However, wild type LLCs and LLCs transduced with GM-CSF alone could form a tumor mass.

다(Fig. 6).

고 찰

암세포는 여러 면(DNA, RNA, protein)에서 정상 세포와 차이가 있다. 인체의 면역 체계에서 보면 암세포는 비정상 세포로서 non-self로 인식되어 면역 기능에 의해 제거되어야 한다. 그러나 암이 발생하였다는 사실은 암세포가 인체의 면역감시 체계를 회피하여 증식하였다는 것을 의미한다. 이러한 면역회피의 기전으로서 암세포의 차이점이 여러 경로를 이용하여 감추어지는 것과 암 환자의 면역 기능이 부분적으로 저하되는 현상 등이 알려져 있다. 암세포의 정상 세포와의 차이점을 부각시키고 인체의 면역 기능을 강화하는 치

료법이 면역 치료법이고 유전자 치료를 이용한 면역 치료법이 면역유전자치료법이다. 암세포의 면역 체계 회피 기전 중 종양 특이 항원이 MHC class molecule, beta-2 microglobulin, TAP 및 B7 등의 결핍 때문에 세포 표면으로 발현되지 않는 것이 중요한 기전으로 알려져 있다. 본 연구에서는 약제 감수성 유전자인 Herpes simplex thymidine kinase 유전자를 이용하여 암세포를 파괴하므로써 암 세포내의 종양 특이 항원을 세포 외부로 다량 노출시키는 방법을 이용하였다.

Herpes simplex thymidine kinase(HSTK) 유전자는 Moolten이 암 치료 가능성을 제시한 최초의 약제 감수성 유전자이다⁸. Thymidine kinase는 DNA 합성 과정에서 티미딘(thymidine)을 인산화하는 효

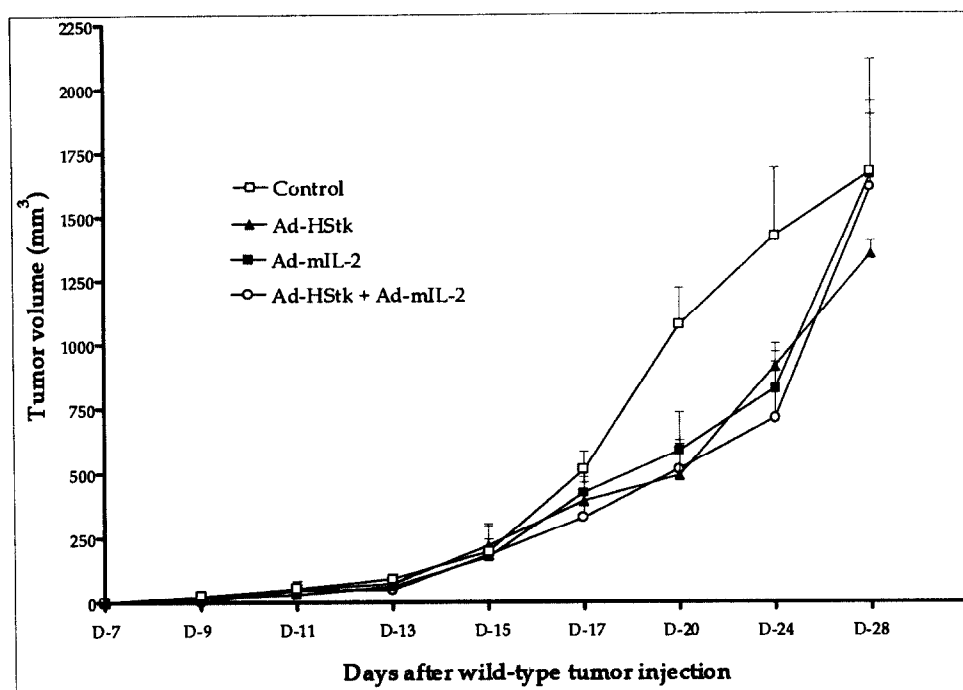


Fig. 4. Inhibitory effect of HSTK and IL-2 transduction on established wild type LLC (treatment). 1.0×10^5 of wild type-LLC were injected into the subcutaneous tissue. At day 7, 2.0×10^5 of the untransduced LLC(control), LLC-HSTK, LLC-IL-2, and LLC-HSTK-IL-2 were injected into the contralateral side and GCV was subsequently injected into the peritoneum from day 10 to day 14. The sizes of tumors from the initial wild-type LLC were measured. Vaccination of LLC-HSTK, LLC-IL-2 and LLC-HSTK-IL-2 induced moderate growth suppression of established wild type tumors. However, no significant differences were found between the three groups. This indicates there is no evidence of immune potentiation by a combination of HSTK and IL-2.

소이다. HSTK는 티미딘 외에도 ganciclovir(GCV)를 포함하여 여러 구아노신(guanosine)의 유사물질을 인산화할 수 있다. 삼인산(triphosphated) GCV는 DNA 합성 과정에서 GTP 대신 들어가 DNA 합성을 억제하고 결국 세포를 죽인다. 특히 HSTK 유전자 치료의 장점은 bystander 효과가 있다는 것이다. HSTK-GCV에 의해서 종양 세포가 파괴될 때 발생하는 독성 물질이 HSTK-GCV가 들어가지 않은 주변 종양 세포를 죽이는 효과를 보이는 것이다. 모든 암세포에 유전자를 전달하는 것이 어려운 현실에서 bystander 효과는 매우 중요한 역할을 한다^{8,9}.

권 등은 이미 retrovirus-HSTK 및 본 연구에 이용된 adenovirus-HSTK를 이용하여 Lewis lung carcinoma에 HSTK 유전자를 이입한 후 C57BL/6의 피하 조직에 주사하고 GCV를 투여함으로써 종양 형성이 억제되는 것을 증명하였다⁷. 본 연구에서 HSTK 유전자가 이입되지 않은 LLC는 성장에 GCV의 영향을 받지 않으나 HSTK 유전자가 이입된 LLC는 GCV에 의하여 강력하게 성장이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 특히 mixed population culture를 통해 HSTK gene이 이입된 암세포가 죽으면서 주위에 있는 HSTK 유전자가 이입되지 않은 LLC도 파

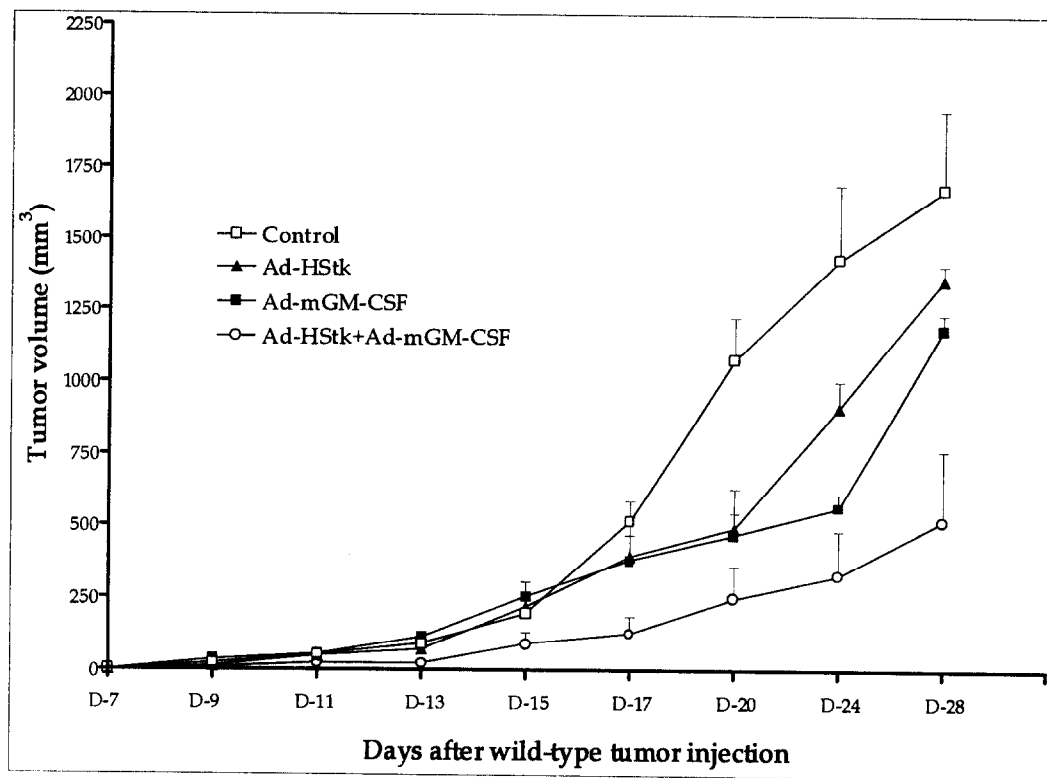


Fig. 5. Inhibitory effect of HSTK and GM-CSF transduction on established wild type LLC (treatment). 1.0×10^5 of wild type-LLCs were injected into the subcutaneous tissue. At day 7, 2.0×10^5 of untransduced LLC, LLC-HSTK, LLC-GM-CSF and LLC-HSTK-GM-CSF were injected into the contralateral side and GCV was injected into the peritoneum from day 10 to day 14. The sizes of the tumors from initial wild-type LLC were measured. LLC-HSTK and LLC-GM-CSF induced moderate growth suppression of established wild type tumors. However, LLC-HSTK-GM-CSF induced stronger growth suppression of established tumors compared with LLC-HSTK and LLC-GM-CSF. This means that a combination of HSTK and GM-CSF can potentiate antitumor immunity against a wild type tumor.

괴되는 것을 볼 수 있었다. 이 bystander 효과의 기전으로는 1) 죽은 세포의 apoptotic vesicle이 이웃한 암세포에 의해서 세포내 이입(endocytosis) 되는 것¹⁰, 2) 독성 물질이 간극결합(gap junction)을 통해서 세포 간에 이동하는 것¹¹, 3) 생체 내에서 면역/염증반응과 지연형 과민반응을 일으켜서 암에 대한 면역 반응을 유도하는 것¹² 등이 있다. 이 bystander 효과는 HSTK 유전자 치료의 가장 중요한 특징으로 알려져 있으며 본 연구에 이용된 adenovirus-HSTK

에서도 생기는 것을 확인할 수 있었다.

Bystander effect에 관한 국내연구로 박 등¹³은 retinoic acid를 이용하여 HSTK의 bystander effect를 증가시킬수 있다는 보고가 있다.

면역학적 유전자 치료의 대표는 사이토카인 유전자 치료법이다. 사이토카인을 암 치료에 이용한 것은 1988년 Rosenberg 등이 IL-2를 전신적으로 사용한 것이 처음이다. 그러나 전신 투여에 따른 부작용이 많아서 널리 사용되지 않았다. 유전자 치료법이 발달하

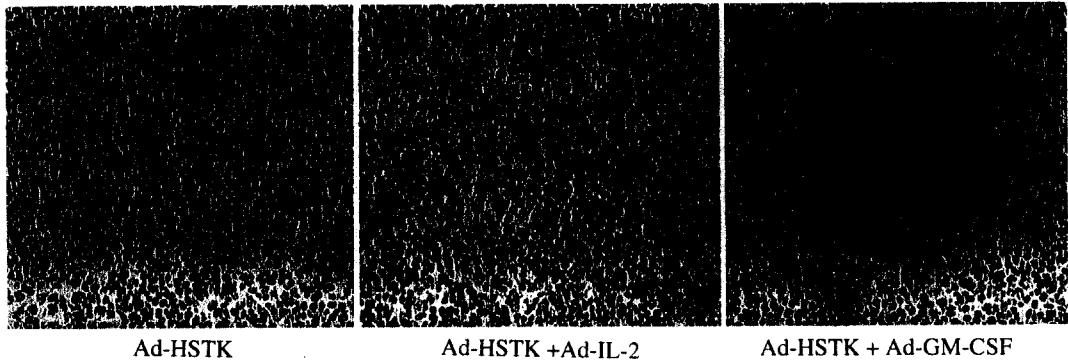


Fig. 6. Infiltration of dendritic Cells(CD11c+ : dark colored cells) in the spleen. The DCs were densely infiltrated in the spleen of mice injected with the LLCs transduced with ad-HSTK and Ad-GM-CSF. However, But little DCs were found in the spleen in mice injected with LLC transduced with Ad-HSTK or Ad-HSTK + Ad-IL-2, little DCs. This finding suggested the mobilization of dendritic cells for an effective immune response.

면서 암세포에 사이토카인 유전자를 이입하여 국소적으로 높은 농도의 사이토카인이 분비되도록 하여 효과를 증대시키고 부작용은 최소화하는 치료법이 개발되었다¹.

본 연구에서는 IL-2, GM-CSF 의 두 사이토카인 유전자를 이용하였다. 이 두 유전자가 가장 많이 연구되어 있고 단독으로도 강력한 항암 면역 반응을 유도한다고 보고되어 있기 때문이다¹⁴⁻¹⁷.

IL-2는 가장 먼저 연구된 사이토카인으로 활성화된 CD4⁺ T세포에서 분비되어 면역 반응을 일으킨다. 쥐의 대장암 세포인 CT26에 IL-2 cDNA를 이입시킨 암세포를 투여한 후 종양 형성 능력이 없어지고 CD4⁺ T세포의 도움 없이 항종양 면역 능력이 형성되는 것이 보고되었다¹⁴.

GM-CSF는 가장 강력하고 오래 지속하는 항종양 면역반응을 유도한다고 알려져 있다. 레트로바이러스 매개체 (retroviral vector)를 이용한 여러 사이토카인의 비교 실험에서 GM-CSF는 가장 강력한 항암면역반응을 유도하였다¹⁵. 특히 GM-CSF는 수지세포가 professional antigen presenting cell로 분화하는 것을 촉진하는 독특한 성질을 가지고 있다. Lee 등¹⁶은 쥐의 폐암 모델에서 adenovirus-GM-CSF를 이용하여 Lewis lung carcinoma cell에 GM-CSF 유전자

를 이입했을 때 폐암세포특이 세포독성T림프구가 유도되고 이미 형성된 폐암을 치료하는 효과가 있음을 보여주었고 종양 주위로 수지세포가 침윤하는 것을 증명하였다.

Lewis lung carcinoma(LLC)는 C57BL/6에서 자연적으로 발생한 폐암 세포주로 인공적으로 발암 물질에 의해 유도한 암 세포주와 달리 면역성이 약하고 전이 능력이 강하여 실제 환자에서 발생하는 암과 비슷하며 면역 치료로 좋은 효과를 얻기 어려운 세포주로 알려져 있어 본 실험의 대상 암 세포주로 선택하였다.

우선 LLC에 IL-2(LLC-IL-2) 혹은 GM-CSF 유전자(LLC-GM-CSF) 만을 이입한 후 쥐에 주사하여 종양을 형성하는가를 본 실험의 결과로서 IL-2를 이입한 LLC는 종양을 형성하지 못하였지만 GM-CSF를 이입한 쥐에서 종양이 형성되었다. 그러나 Ad-HSTK 단독, Ad-HSTK + Ad-IL-2, Ad-HSTK + Ad-GM-CSF 복합 이입 후 쥐에 주사한 다음 GCV를 처리한 경우 초기에 작은 종양이 형성되다가 소실되어 종양백신으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

본 연구의 최대 핵심은 HSTK과 사이토카인 유전자 복합 치료법의 종양 치료 효과에 관한 부분이다.

즉 이미 형성된 야생형 LLC의 종양이 유전자로 처리된 LLC, 즉 종양백신의 투여로 치료가 될 수 있는가 하는 점이다. 이번 연구에서 2×10^5 개의 LLC를 주사한 후 1주일을 기다려 5mm 정도의 비교적 큰 종양이 형성된 것을 확인한 다음 종양백신의 주사를 시작하였고 이는 1.0×10^5 개의 LLC를 주사하고 3일 후에 치료를 시작했던 이전 실험¹⁶보다 좀 더 어려운, 보다 실제에 가까운 상황에서 치료를 시행한 것이다. LLC-HSTK, LLC-IL-2의 종양백신을 투여한 군에서 대조군보다 종양의 성장이 억제되는 것이 관찰되었으나 기대했던 LLC-HSTK-IL-2의 군에서 LLC-HSTK 또는 LLC-IL-2 치료군에 비해 치료 효과의 차이가 없어 복합 치료의 효과를 관찰할 수 없었다 (Fig. 4). 그러나 GM-CSF의 경우에는 LLC-GM-CSF로 치료한 군에서 대조군에 비해 현저한($p < 0.01$) 성장 억제 효과를 보였고 LLC-HSTK 치료군에 비해서도 유의한 성장 억제를 보였다($p < 0.05$). 특히 LLC-HSTK-GM-CSF를 주사한 군에서 단독 치료 군들에 비해서 더 강력한 성장 억제 효과가 일어나는 것을 관찰하여 기대했던 대로 항암 효과가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

약제감수성 유전자와 사이토카인 유전자의 복합 치료에 관해서는 소수의 보고가 있다. 1995년 Chen 등은 대장암 세포주를 대상으로 아데노바이러스를 이용하여 HSTK와 IL-2를 동시에 투여하여 세포독성 T 림프구가 형성되고 항암 효과가 일어나는 것을 증명하였다¹⁷. 또 이 연구진은 위의 모델에 GM-CSF를 추가하여 지속적인 항암 면역 반응이 일어남을 증명하였다.

본 연구에서는 HSTK과 IL-2의 복합 치료에서는 단독 치료에 비해 항암 효과가 더 커지지 않고 HSTK와 GM-CSF의 복합이 항암 효과를 증강시킨다는 결과를 얻었다. 특히 Ad-GM-CSF로 치료한 생쥐의 비장에서 항원표현(antigen presentation) 기능이 있는 CD11c 양성 수지세포가 현저하게 증가하는 것이 관찰되어 이미 알려져 있는 GM-CSF에 의한 수지세포로의 분화 촉진¹⁸⁻²¹이 일어나고 있어 중

요 기전이 되리라는 간접적인 증거를 얻었다.

그러나 HSTK와 GM-CSF의 복합으로 항암 효과의 증가를 관찰하기는 하였으나 종양의 완전 소실을 얻지는 못한 만큼 향후 다른 사이토카인 등과의 3제 복합 유전자요법 등의 연구가 필요하리라 본다.

결론적으로 Herpes simplex virus thymidine kinase를 이입하는 비면역적 유전자 치료와 GM-CSF 등의 사이토카인을 이입하는 면역적 유전자 치료를 복합함으로써 암을 치료할 수 있는 가능성을 제시하였다.

요 약

배 경 :

암세포는 정상 세포와 다르므로 면역 기전에 의해 제거되어야 함에도 불구하고 암이 발생하는 것은 암세포가 면역 감시 체계를 회피하기 때문이다. 약제감수성 증강 유전자인 herpes simplex thymidine kinase (HSTK) 유전자를 이용하여 암세포를 파괴하여 종양 특이항원이 더 잘 유리되도록 하고 사이토카인 유전자를 이용하여 면역세포를 유도하여 이 장애향을 극복할 수 있는지 보고자 이 실험을 하였다.

방 법 :

Lewis 폐암 세포주(LLC)에 adenovirus를 이용하여 HSTK를 형질도입하고 이에 의해 ganciclovir에 대한 LLC의 감수성을 증강시키는지를 관찰하고 mixed population assay를 이용하여 bystander 효과를 관찰하였다. Ad-HSTK, Ad-IL-2, Ad-GM-CSF의 형질도입이 LLC의 종양 형성 능력에 영향을 미치는지 관찰하였다. 또한 그러한 형질 도입이 기존의 종양에 대한 항암 효과를 가져오는지 관찰하였다. 항암 효과의 기전을 확인하기 위해 쥐의 비장을 관찰하였다.

결 과 :

Ad-HSTK의 형질도입은 ganciclovir에 대한 LLC의 감수성을 현저하게 증강시켰다. Ad-HSTK, Ad-IL-2, Ad-GM-CSF를 형질도입한 LLC를 쥐에 주

사하고 ganciclovir로 처리하였을 때 종양 형성 능력이 감소하였다. Ad-HSTK, Ad-IL-2, Ad-GM-CSF를 형질도입한 LLC를 종양백신으로 사용하였을 때 종양 성장이 어느 정도 저해되는 것을 관찰하였다. 특히 HSTK와 GM-CSF를 복합 형질도입했을 때 더 강력한 항암효과가 일어나는 것을 관찰하였다. 그러나 HSTK와 IL-2를 복합 형질도입했을 때는 각각을 단독으로 형질도입했을 때보다 항암효과가 상승되지 않았다. HSTK와 GM-CSF의 복합 형질도입한 LLC를 종양백신으로 사용하였을 때 비장의 수상세포 침윤이 현저히 증가하였다.

결 론 :

HSTK와 GM-CSF의 복합 형질도입으로 만든 종양백신은 수상세포를 활성화시키므로써 항암면역기능을 유의하게 증강시킬 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Lee C-T, Kubba S, Coffee K, Carbone DP. Chapter 17. Gene therapy. In : H. I. Pass, J. B. Mitchell, D. H. Johnson, A. T. Turrissi, and J. D. Minna, editors. Lung Cancer, 2nd ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins;2000. p. 318-33.
2. Gabrilovich D, Ciernik IF, Carbone DP. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. Cell Immunol 1996;170:101-10.
3. Gabrilovich D, Nadaf S, Corak N, Berzofsky JA, Carbone DP. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. Cell Immunol 1996;170:111-9.
4. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nature Med 1996;2:1096-103.
5. Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In : Gene transfer and expression protocols. NJ : Clifton;1991. p.109-28.
6. Becker TC, Noel RJ, Coats WS. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. In : Protein expression in animal cells. San Diego, CA:Academic press; 1994. p.161-88.
7. 권희충, 정재민, 김정현, 함용호, 서지숙, 이기호, et al. Lewis 폐암 마우스 모델에서 Retroviral Vector나 Adenoviral Vector로 이입된 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자치료. 결핵 및 호흡기질환 2000;49:298-309.
8. Moolten FL. Tumor sensitivity conferred by inserted herpes simplex thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 1986;46:5276-81.
9. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A, Freeman SM. Potentiation of the bystander effect by immunization combined with suicide gene therapy. Adv Exp Med Biol 1998;451:125-31.
10. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast bitrorectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. J Immunol 1994;153:3218-27.
11. Doble BW, Kardani E. Basic fibroblast growth factor stimulates connexin-43 expression and intercellular communication of cardiac fibroblasts. Mol Cell Biochem 1995;143:81-7.
12. 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* 1993;53:5274-83.
13. 박재용, 김창호, Alvelda SM, 정태훈. Herpes simplex virus thymidine kinase gene을 이용한 유전자치료에서 retinoic acid가 bystander effect에 미치는 영향. *결핵 및 호흡기질환* 1997;44: 162-74.
 14. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
 15. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3539-43.
 16. Lee C-T, Wu S, Ciernik IF, Chen HL, Nadaf-Rahrov S, Gabrilovich D, Carbone DP. Genetic immunization of established tumors with adeno-virus-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Human Gene Ther* 1997;8: 187-94.
 17. Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K-I, Finegold MJ, Rich SS, Woo SLC. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* . 1995; 92:2577-81.
 18. Albert ML, Sauer B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-9.
 19. Colaco CA : Why are dendritic cells central to immunotherapy? *Mol Med Today* 1999 Jan, 14-7.
 20. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, Cameron PU, Gezelter S, Kopeloff I, et al. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 1993;178:1067-76.
 21. Reid CDL. The biology and clinical applications of dendritic cells. *Transf Med* 1998;8:77-86.
-