

□ 원 저 □

Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene을 이용한 유전자 치료에서 retinoic acid가 bystander effect에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 내과학교실, 미국 펜실베이니아대학교 의과대학 호흡기내과*

박재용, 김창호, 정태훈, Steven M Albelda*

= Abstract =

Effect of retinoic acid on the bystander effect in gene therapy using the Herpes Simplex Virus thymidine kinase

Jae Yong Park, M.D., Chang Ho Kim, M.D., Tae Hoon Jung, M.D., Steven M Albelda, M.D.*

*Department of Internal Medicine, Kyungpook National University Hospital, Taegu,
Pulmonary and Critical Care Division, Hospital of the University of Pennsylvania, Philadelphia, USA**

Background : Metabolic cooperation via gap junctional intercellular communication (GJIC) is an important mechanism of the bystander effect in gene therapy using the Herpes Simplex Virus thymidine kinase/ganciclovir (HSVtk) “prodrug” system. Since retinoids have been reported to increase GJIC by induction of connexin 43 expression, we hypothesized that treatment of tumor cells with retinoic acid could augment the bystander effect of the HSVtk/GCV system and result in improved tumor cell killing by enhancing GJIC.

Methods : We transferred HSVtk gene to SKHep-J cell line that does not express connexin43, and also transferred the gene to human and murine mesothelioma cell lines that express connexin43. We verified that retinoic acid enhanced GJIC utilizing a functional double-dye transfer study and evaluated the effects of retinoic acid on the growth rate of tumor cells. We then tested the effects of retinoic acid on bystander-mediated cell killing.

Results : Addition of all-trans retinoic acid (RA) increased GJIC in cell lines expressing connexin 43 and was associated with more efficient in vitro bystander killing in cells transduced with HSVtk via adenoviral and retroviral vectors. In contrast, there was no increase in the efficiency of the bystander effect after exposure to RA in a cell line which had no detectable connexin 43.

Conclusion : These results provide evidence that retinoids can augment the efficiency of cell killing with the HSVtk/GCV system by enhancing bystander effect and may thus be a promising new approach to improve responses in gene therapy utilizing the HSVtk system to treat tumors.

Key words : HSV thymidine kinase, retinoids, gap junctions, bystander effect, gene therapy

서 론

유전자치료란 유전자를 인체세포에 이입(transfection)하여 유전적 결함을 교정하거나 세포가 새로운 기능을 갖도록 하는 치료법을 말한다^{1, 2)}. 암의 유전자치료는 암에 대한 인체의 면역체계를 강화하는 유전적 면역강화법(genetic immunopotential), 암의 발생에 관여하는 암유전자(oncogen)의 발현을 억제하거나 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 발현을 증대시키는 돌연변이보상법(mutation compensation), 골수의 간세포(stem cell)에 다제내성 유전자를 이입하여 항암화학요법에 대한 내성을 갖도록 하는 정상조직보호법(normal tissue protection), herpes thymidine kinase나 cytosine deaminase와 같은 효소를 encoding하는 자살유전자(suicide gene)를 암세포에 선택적으로 이입하여 화학물질에 대한 감수성을 증가시키는 분자화학요법(molecular chemotherapy)으로 구분된다¹⁻⁴⁾.

Herpes Simplex Virus의 thymidine kinase(HSVtk)를 encoding 하는 유전자를 암세포에 선택적으로 이입하여 ganciclovir(GCV)에 대한 감수성을 증가시키는 암유전자치료는 Moolten등⁵⁾과 Hwang등⁶⁾에 의해 보고된 바 있다. Nucleoside analog인 GCV는 HSVtk에 의해 monophosphated form으로 전환된 후, 계속해서 세포내에 정상적으로 존재하는 내인성 thymidine kinase에 의해 세포의 DNA replication을 억제하여 세포의 apoptosis를 초래하는 GCV triphosphate로 전환된다⁷⁾. 따라서 HSVtk를 encoding 하는 유전자를 세포에 이입할 경우 HSVtk를 발현하는 세포에서 선택적으로 GCV triphosphate가 생성되어 세포의 apoptosis가 일어난다⁷⁾. 한편 Culver등⁸⁾과 Freeman등⁹⁾은 HSVtk를 발현하는 암세포 뿐 만아니라 HSVtk를 발현하지 않는 주위의 암세포도 GCV 투여 후에 사망하는 현상을 발견하고 bystander effect라 명명하였으며, 이러한 bysta-

nder effect에 의해 암세포의 10%정도가 HSVtk를 발현할 경우에도 거의 모든 암세포의 apoptosis가 일어날 수 있다¹⁰⁾.

그러나 이러한 bystander effect에도 불구하고 동물실험에서 종양을 완전히 제거하지 못한 예가 많을 뿐 아니라¹¹⁾ GCV 투여 중단 후 종양이 재발한 예들이 많아^{5,12,13)} 치료효과를 증가시키기 위해서는 이러한 bystander effect의 극대화가 필요하다.

Bystander effect의 발생기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았지만, Li Bi 등¹⁴⁾은 gap junction을 통한 세포간의 metabolic cooperation, 즉 HSVtk를 발현하는 암세포에서 생성된 GCV 대사산물이 gap junction을 통해 주위의 세포로 전달되어 일어난다고 하였다. Gap junction은 분자량이 1 KDa 이하의 대사물질이 통과할 수 있는 세포간의 통로로 6개의 connexin으로 구성되어 있다¹⁵⁾. 지금까지 10종 이상의 connexin이 밝혀졌고 각각의 세포는 특징적인 connexin을 갖는다¹⁶⁾. Connexin43는 심근 및 평활근세포 gap junction에서 특징적으로 발현되고 중피세포와 악성중피종 gap junction의 주요 구성성분이다^{16,17)}. 한편 retinoids는 connexin43 유전자의 발현을 증가시켜 gap junction을 통한 세포간의 communication을 증가시킨다고 한다¹⁸⁻²⁰⁾.

저자들은 connexin43를 발현하는 2종류의 악성중피종 세포주와 connexin43를 발현하지 않는 세포주에서 retinoids가 HSVtk 유전자를 이용한 유전자치료에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험의 결과는 유전자치료의 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

재 료 및 방 법

1) 종양세포

SKHep-J 세포주는 D. Spray(Albert Einstein Colle-

ge of Medicine, Bronx, NY)로부터 제공받았으며, 이 세포주는 전이성이 강한 간세포암 세포주인 SKHep 1의 subclone으로 connexin 43의 발현이 없는 것이 특징이다²¹⁾. AB12 세포주는 Balb/C mice의 악성종괴종 세포주로 Bruce W.S. Robinson (University of Western Australia, Perth, Australia)으로부터 제공받았다. SKHeP-J 세포주와 AB12 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 ug/ml)이 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. REN 세포주는 악성종괴종 환자에서 분리된 세포주로 10% FBS, penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 ug/ml)이 첨가된 RPMI 배지로 배양하였다. Connexin 43에 대한 monoclonal antibody (Zymed Labs.)를 이용한 western blot 검사상 REN과 AB12 세포주에서는 connexin 43가 관찰되었으나 SKHeP-J 세포주에서는 connexin 43의 발현이 없었다(data not shown).

2) Adenoviral Vector의 생산 및 유전자 이입

본 실험에 사용된 adenoviral vector는 adenovirus type 5를 변형시킨 것으로 adenovirus의 유전자 가운데 E1a, E1b와 E3 region의 일부 대신 Rous Sarcoma virus 3' promoter region과 Herpes Simplex Virus type I thymidine kinase gene을 삽입하여 재조합하였다(Ad.RSVtk). 그리고 유전자의 이입을 확인하기 위한 표식 vector는 beta-galactosidase를 encoding하는 E. coli lacZ 표식 유전자를 HSVtk 유전자 대신 삽입하여 만들었다(Ad.RSVlacZ). 이렇게 만들어진 vector들은 293세포에서 증식시킨 후 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였으며 vector의 역가는 293 plaque assay와 spectrophotometric density로 측정하였다.

재조합된 유전자는 실험에 사용한 세가지 세포들이 T25 cell culture flask의 60-70% 정도 채울 정도로 자란 상태에서 Ad.RSVtk 혹은 Ad.RSVlacZ를

감염시켜 세포내로 이입시켰다. REN 세포주는 Ad.RSVlacZ를 감염시킨 후 X-gal 염색상 100% lacZ 유전자의 이입이 확인된²²⁾ MOI(multiplicity of infection)인 세포당 5 pfu(particle forming unit)로 감염시켰다. AB12 세포주는 REN 세포주에 비해 감염율이 현저히 낮았으며 세포당 10 pfu의 MOI로 감염시켰다.

3) Retroviral vector의 생산 및 유전자 주입

실험에 사용한 retroviral vector는 neomycin resistance 유전자(neo^R)와 promoter로 5LTR(long terminal repeat)를 갖고 있는 LNL6 vector에 HSVtk 유전자와 promoter로 Simian virus 40를 삽입하여 만들었다⁹⁾. 그리고 retroviral vector를 calcium-phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection시킨 후 neomycin analogue인 G418 800 ug/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 stock를 얻었다.

본 실험에 사용한 3가지 세포주 즉 SKHeP-J, REN 그리고 AB12 세포주를 각각 6-well tissue culture plate에 well당 10⁵개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 lipofectamine(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 세포주내로 retroviral HSVtk 유전자를 이입하였다. 먼저 polystyrene tube에서 1 ml 배지와 8 ul lipofectamine을 넣어 혼합한 뒤 다시 여기에 1 ml viral stock를 첨가하여 20°C에서 30분간 방치하였다. 그다음 24시간 동안 배양한 6 well-culture plate의 배지를 버리고 well 당 0.5 ml의 viral/lipofectamine 혼합액과 10% FBS가 첨가된 2.5 ml 배지를 첨가하여 배지의 양이 3.0 ml 되게하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 24시간 배양하였다. 그리고 나서 G418 800ug/ml이 함유된 배지에서 2주간 배양하여

HSVtk 유전자가 이입된 세포를 선택하였다.

4) Retinoid 처리

본 실험에서는 all-trans-retinoic acid(RA)(Sigma Chemical Co.)를 그리고 RA의 용매는 dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. RA를 DMSO로 용해하여 10^{-2} M 로 만든 후 -70°C 질소탱크에 보관하였으며, 실험시 배지로 원하는 농도로 만들어 사용하였다. 그리고 RA의 파괴를 방지하기 위해 500nm 이하의 빛이 들어오지 않도록하여 세포를 배양하였으며 RA를 처리한 배지는 매일 교환하였다.

5. FACS를 이용한 gap junction을 통한 세포간 communication 조사

Gap junction을 통한 세포간의 communication은 Tomasetto 등²³⁾과 같이 fluorescence-activated cell sorting(FACS)를 이용하여 functional double dye transfer study로 조사하였다. Gap junction을 통한 세포간 communication에 대한 RA의 영향을 조사하기 위해 T25 culture flask에 AB12 세포 2.5×10^5 개를 넣고 RA 처리군은 10^{-12} M 부터 10^{-6} M 까지 10 배로 희석한 RA를 첨가한 배지로 그리고 대조군은 RA를 함유하지 않은 배지로 각각 5일간 배양하여 세포들이 T25 culture flask에 90 - 95% 정도 찬 상태에서 세포간의 communication을 측정하였다.

한 개의 T25 culture flask의 세포들은 세포질막에 영구적으로 결합하여 gap junction을 통해 이동하지 않는 lipophilic red dye인 PKH26(Sigma Chemical Co.)로 표지하였다. 먼저 monolayer를 형성하고 있는 세포들을 트립신 1 ml로 부유시키고 원침하여 세포들을 모았다. FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 3 ml를 가하여 세포를 다시 부유시키고 세포수를 측정하였으며, 3×10^6 개가 되는 용적을 취하여 polypropylene tube로 옮겼다. 다시 4°C , 1000 rpm으로 10분간 원침한 후 상층액은 버리고 2 uM PKH26 300 ul(100ul당 1×10^6 개의 세

포)로 세포들을 부유하여 상온에서 3분간 방치하였다. 동량의 FBS를 가하여 염색을 중단시키고, 원침하여 표지된 세포들을 모은 후, 10% FBS가 첨가된 10 ml DMEM 배지로 3회 수세하였다. 한편 다른 한 개의 T25 culture flask의 세포들은 분자량이 작아 gap junction을 통해 쉽게 이동하는 green dye인 calcein으로 표지하였다. T25 culture flask의 배지를 버리고 PBS로 세포들을 수세한 후 1.0 uM calcein 1.5 ml를 가하여 상온에서 30분간 방치하였다. DMEM 배지로 3회 연속하여 수세한 후 트립신 1 ml로 부유시키고 원침하여 세포들을 모았다. DMEM 배지 3 ml를 가하여 세포를 다시 부유시키고 3×10^6 개의 세포를 취하였다.

세포간의 communication을 측정하기 위해 PKH26와 calcein으로 표지된 세포들을 10% FBS가 첨가된 배지로 각각 10^6 /ml 농도로 만든 후 동량씩 섞어 6-well culture plate에 well 당 2×10^6 개의 세포를 넣은 후 37°C , 5% 이산화탄소 배양기에 3시간 동안 배양한 뒤 세포의 communication을 측정하였다(time=3h). 그리고 PKH26와 calcein으로 표지된 세포를 섞지않고 따로 6-well culture plate에 well당 2×10^6 개의 세포를 넣은 후 각각 3시간 동안 배양한 뒤 FACS 직전에 세포를 섞어 time=0 때의 세포간의 communication을 측정하였다. 세포간의 communication은 EPICS Elite flow cytometer (Coulter Inc., Hialeah, FL, USA)로 측정하였다.

6) 세포증식속도(growth rate) 측정

RA의 세포증식속도에 미치는 영향을 조사하기 위해 10^{-12} M 부터 10^{-6} M 까지의 RA를 첨가한 배지와 RA를 첨가하지 않은 배지로 세포를 각각 배양한 후 세포증식속도를 비교하였다. 세포증식속도의 측정은 Coulter counter(Coulter Inc.)를 이용하여 생존세포 수를 직접 측정하는 방법과 MTT 검사법²⁴⁾을 이용한 간접적인 방법을 병용하였다. REN과 SKHep-J 세포주는 24-well culture plate에

well당 1×10^4 개의 세포를, 그리고 AB12 세포주는 well 당 5×10^3 개의 세포를 분주한 후, 10^{-12} M 부터 10^{-6} M 까지의 RA를 첨가한 배지와 RA를 첨가하지 않은 배지로 5일간 배양하였으며 배지는 매일 교환하였다. 세포수는 Coulter counter로 4개 well의 세포 수를 측정하여 평균을 구하였다. MTT 검사법은 생존세포의 dehydrogenase 활성도를 측정하는 비색분석법(Cell Titer 96 Aqueous Nonradioactive MTT Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI)으로 Alley등²⁴⁾에 의해 설명된 바 있다. REN과 SKHep-J 세포주는 96-well culture plate에 well 당 4000개의 세포를, 그리고 AB12 세포주는 well 당 2000개의 세포를 분주하였다. 5일간 배양한 후 각각의 well마다 20ul의 MTT 용액을 첨가하고 37°C에서 3시간 동안 추가 배양한 뒤에 490nm에서 흡광도를 측정하였으며 RA 첨가에 따른 세포성장의 정도는 RA를 첨가하지 않은 배지로 배양한 well의 흡광도와 백분율로 구하였다.

7) In vitro, bystander effect 측정

RA의 bystander effect에 미치는 영향을 조사하기 위해 10^{-12} M 부터 10^{-6} M 까지의 RA를 첨가한 배지와 RA가 첨가되지 않은 배지로 각각 5일간 배양한 후 "mixing study"를 시행하였으며, 그 방법은 Smythe등²⁵⁾에 의해 설명된 바 있으나 간단히 설명하면 다음과 같다. HSVtk 유전자가 이입되지 않은 HSVtk 음성세포와 HSVtk 유전자가 이입된 HSVtk 양성세포를 각각 4×10^4 /ml(AB12 세포주는 2×10^4 /ml)로 만든 후 HSVtk 음성세포에 대한 HSVtk 양성세포의 비율을 0%, 10%, 20%, 30%, 50%, 100%로 되게 섞은 다음 96-well culture plate에 100ul씩 분주하였다. 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 16시간 배양하여 세포들이 monolayer를 형성하였을 때 대조군은 20 uM GCV가 첨가된 배지로, 그리고 RA 처리군은 10^{-12} M에서 10^{-6} M의 RA와 20 uM GCV가 첨가된 배지로 교환하였으며

배지는 매일 교환하였다. 5일간 배양하여 HSVtk 음성세포가 100%인 well의 세포가 조직배양판에 100% 차게되면 MTT 검사법으로 각 well의 생존 세포수를 간접적으로 측정하였다. HSVtk 양성세포가 10%에서 100%까지 섞인 well의 흡광도를 100% HSVtk 음성세포로만 된 well의 흡광도에 대한 백분율로 생존률을 구하였다.

결 과

1) gap junction을 통한 세포간 communication

AB12 세포주에서의 FACS 분석 결과는 Fig. 1과 같다. FACS 분석 직전에 PKH26과 calcein에 표지된 세포들을 섞은 경우, 즉 time=0일때의 FACS 결과는 Fig. 1A와 같이 PKH26로 표지된 세포들은 quadrant 4에, 그리고 calcein 으로 표지된 세포들은 quadrant 1에 위치하였다. 이에 비해 PKH26과 calcein으로 표지된 세포들을 섞어 세포간 communication이 가능한 상태에서 3시간 동안 배양한 후의 FACS 결과는 Fig. 1B와 같이 Fig. 1A와 달리 quadrant 2에 새로운 세포들이 관찰되었는데 이 세포들은 calcein이 gap junction을 통해 PKH26로 표지된 세포로 이동하여 PKH26과 calcein을 동시에 함유하는 세포들을 나타낸다. 한편 10^{-6} M의 RA 처리한 경우(Fig. 1C) RA를 처리하지 않은 대조군(Fig. 1B)에 비해 quadrant 2에서 유의하게 많은 세포들이 관찰되었으며 이러한 결과는 10^{-6} M RA에 의해 gap junction을 통한 calcein의 이동이 증가됨을 나타낸다. 세포간 communication은 quadrant 2와 4의 세포 수에 대한 quadrant 2의 세포 수의 비율로 표시하였다(Fig. 1D). 세포간 communication은 10^{-8} M과 10^{-6} M RA로 처리한 경우 대조군에 비해 현저히 증가되었으며 10^{-10} M RA에서는 대조군과 차이가 없었다.

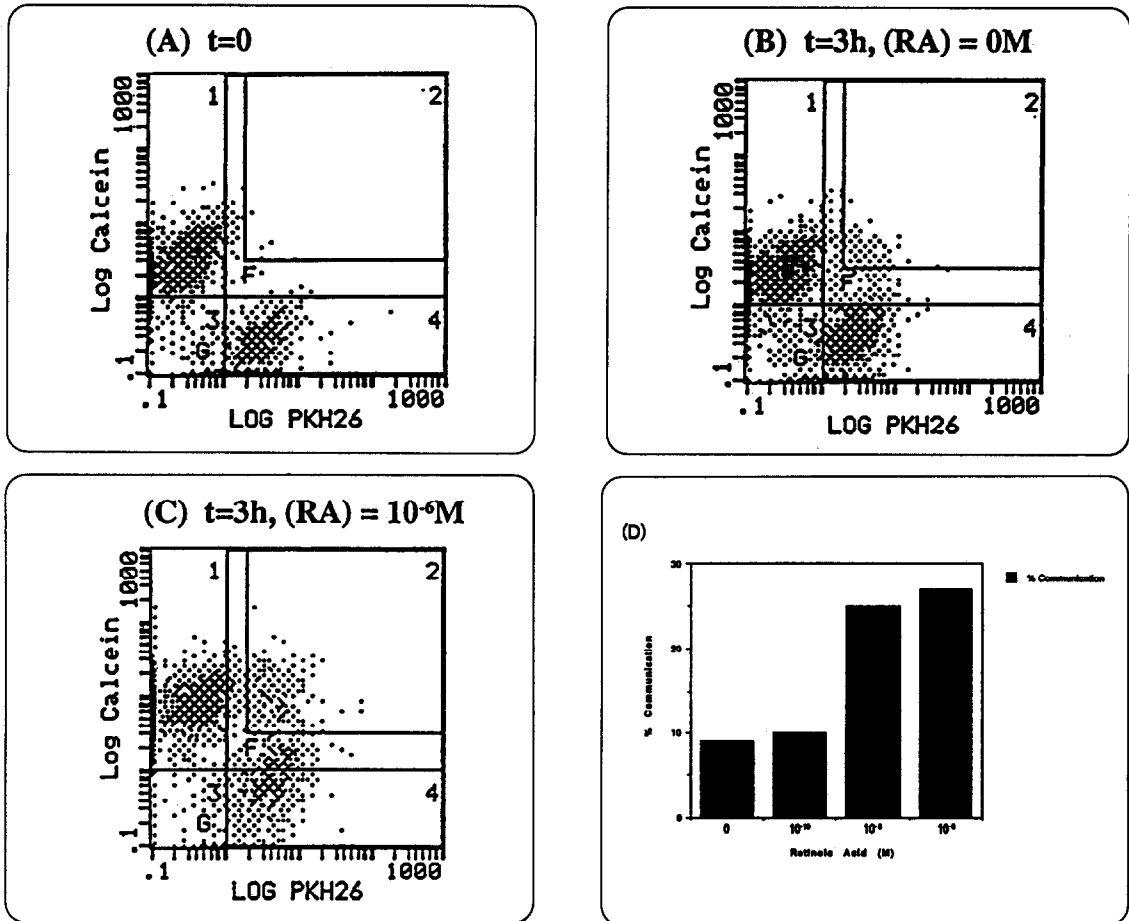


Fig. 1. Double-dye FACS analysis of gap junctional intercellular communication(GJIC) for the AB12 cell line. (A) Log calcein fluorescence (green) (Y axis); log PKH26 fluorescence (red) (X axis); each dot represents a counted cell (10,000 cells total for each analysis). The cursors were set using PKH26 and calcein-labeled cells without co-culture. Results show that PKH26-stained cells are located in quadrant 4, and calcein-labeled cells are located in quadrant 1. The box in quadrant 2 was set so that less than 1% of PKH26-labeled cells appeared in this area in the absence of co-culture. (B) Double-dye FACS analysis of GJIC in the absence of RA,. When cells were co-incubated for 3h at high density, PKH26-labeled cells appeared in the box in quadrant 2, indicating gap junctional transfer of calcein green dye. (C) Double-dye FACS analysis of GJIC after exposure to 10⁻⁶ M RA for 5 days. Compared to fig. 1B, more PKH26-labeled cells appear in the box in quadrant 2. (D) The level of GJIC (% communication) is summarized in this histogram as $100 \times \frac{(\text{the number of cells in the box in quadrant 2})}{(\text{total number of cells in quadrant 2} + \text{quadrant 4})}$. As seen in this figure, the % communication of AB12 cells in the presence of 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M RA was about three fold higher than AB12 cells in the absence of RA. 10⁻¹⁰ M RA also had no effect on GJIC.

2) 세포증식속도

RA의 세포성장 억제효과가 bystander effect에 미치는 영향을 배제하기 위해 RA를 처리한 배지와 RA를 첨가하지 않은 배지 및 DMSO를 함유하는 배지로 각각 5일간 배양한 후 세포증식속도를 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같이 RA 처리 유무에 따른 세포성장속도의 차이는 없었다.

경우 모두에서 관찰되었다(Fig 2B & 2C). AB12 세포주에 retroviral vector를 이용하여 HSVtk 유전자가 이입된 HSVtk 양성세포와 유전자가 이입되지 않은 HSVtk 음성세포를 3:7로 섞었을 때의 RA 농도에 따른 bystander effect의 차이는 Fig. 3과 같다. 10^{-6} M과 10^{-8} M RA 처리군의 bystander effect는 RA를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의하게

Table 1. Effect of all-trans retinoic acid on the growth of SKHep-J and AB12 cells

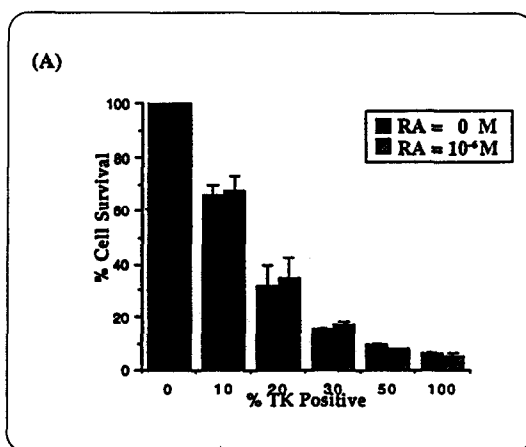
| | SKHep-J | AB12 |
|-------------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 2.14 (± 0.48) | 2.15 (± 0.22) |
| DMSO(0.01%) | 2.16 (± 0.34) | 2.08 (± 0.19) |
| All-trans retinoic acid | | |
| 10 \cdot 10 M | 2.15 (± 0.29) | 2.13 (± 0.21) |
| 10 \cdot 8 M | 2.15 (± 0.08) | 2.01 (± 0.25) |
| 10 \cdot 6 M | 2.08 (± 0.21) | 2.04 (± 0.11) |

On day 0, SKHep-J cells and AB12 cells were plated at 1×10^4 cells per well and 5×10^3 cells per well, respectively. After 5 days of culture, mean cell number ($\times 10^5$) (\pm standard deviation) of four replicate wells were determined.

3) In vitro, bystander effect

RA의 bystander effect에 미치는 영향을 조사하기 위해 본 실험에 사용한 3가지 세포주에서 RA를 처리한 군에서의 bystander effect와 RA 처리하지 대조군의 bystander effect를 비교하였다. SKHep-J 세포주에 retroviral vector(RVSV40tk)를 이용하여 HSVtk 유전자를 이입한 후 실시한 "mixing study"의 결과는 Fig. 2A와 같이 RA 처리유무에 따른 bystander effect의 차이는 없었다. 이에 비해 REN 세포주와 AB12 세포주에서는 RA로 처리한 군에서 대조군에 비해 bystander effect에 의한 살상효과가 유의하게 증가되었으며 이러한 살상효과의 증가는 adenoviral vector(Ad.RSVtk)와 retroviral vector(RVSV40tk)를 이용하여 HSVtk 유전자를 이입한

증가되었으나 10^{-10} M RA 처리군은 대조군과의 차이가 없었다.



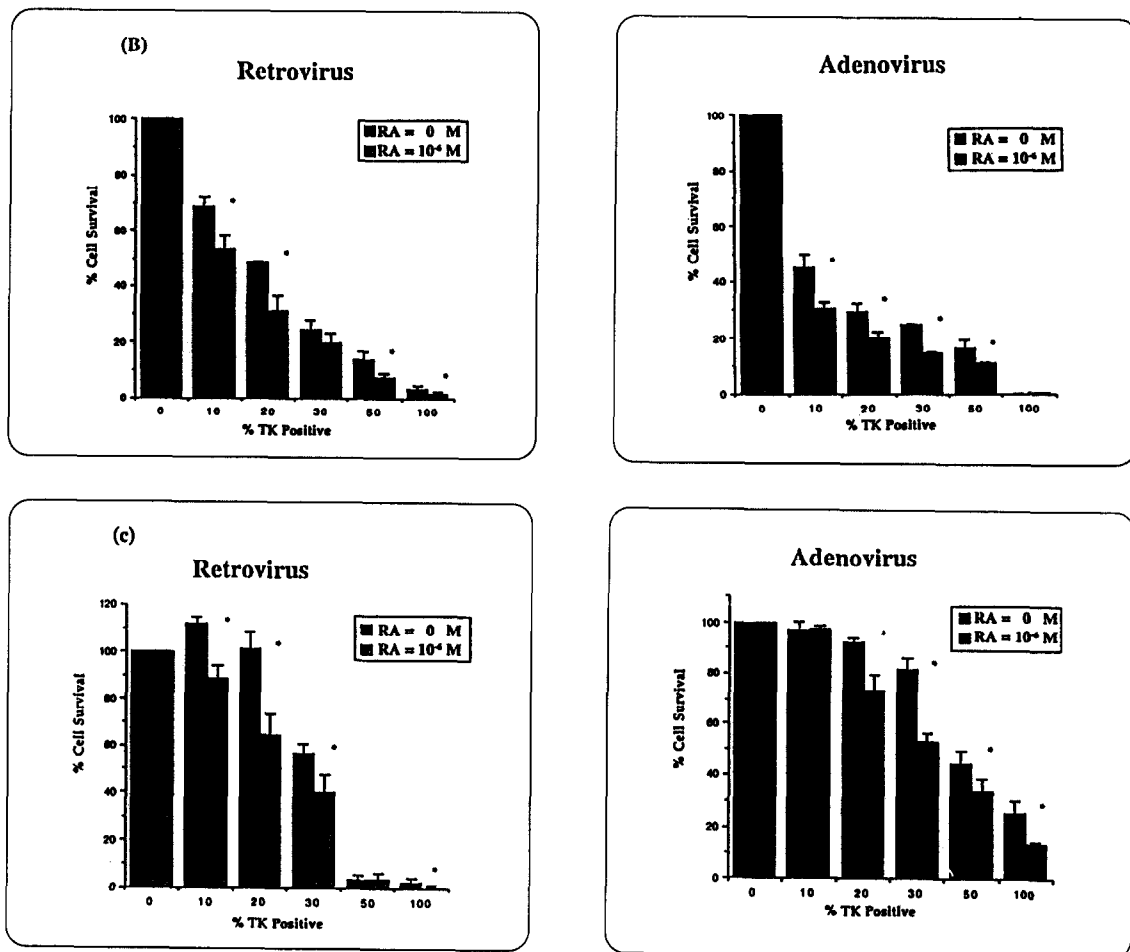


Fig. 2. In vitro mixing experiments in the presence (10^{-6} M) and absence (0 M) of RA. X-axis, varying mixture of HSVtk+ and HSVtk- cells; Y-axis, percent of cells surviving expressed as a percentage of HSVtk-control cells after exposure to 20 μ M GCV for 5 days. Viable cells were determined using a colorimetric assay for viable cell dehydrogenase activity. (A) For the SKHep-J cell line, no significant difference in cell killing were observed in the presence or absence of RA. Data represent means ($n=4$ wells for each mixture of cells) \pm SEM (bars). (B) For the REN cell line, exposure to 10^{-6} M RA resulted in a greater degree of cell killing at varying mixtures of HSVtk+ and HSVtk- cells when compared to the non-RA treated cells (* $p < 0.05$). Similar results were seen when cells were transduced with HSVtk with either adenovirus or retrovirus vectors. (C) For the AB12 cell line, exposure to 10^{-6} M RA also resulted in more efficient cell killing at varying mixture of HSVtk+ and HSVtk- cells when compared to the non-RA treated cells (* $p < 0.05$). Similar results were seen when cells were transduced with HSVtk with either adenovirus or retrovirus vectors.

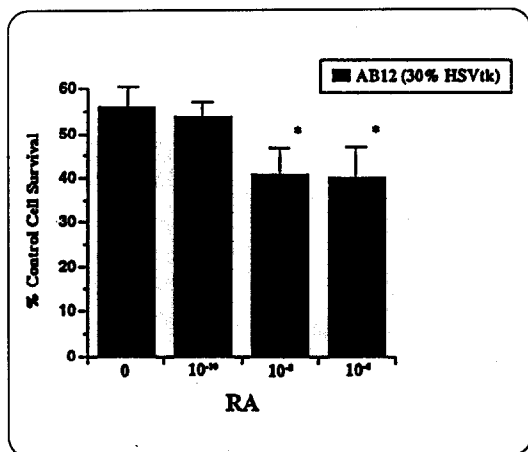


Fig. 3. Bystander effect at varying doses of RA. Shown is the degree of cell survival when 30% of AB12 cells express HSVtk and are exposed to 20 μ M GCV (expressed as a percent of control cells which have not been exposed to GCV). Fewer cells survive when treated with RA at 10^{-6} and 10^{-8} M compared to non-RA treated cells (0 M). At 10^{-10} M RA, no additional bystander killing was observed compared to non-RA treated cells. (* $p < 0.05$ compared to cell survival at 0 M RA). Compare this figure to figure 1D which also shows no increase in GJIC at concentrations of RA less than 10^{-8} M.

고찰

Bystander effect의 발생기전은 아직 확실히 밝혀 지지지는 않았지만 gap junction을 통한 세포간의 metabolic cooperation^{14,22,26}, apoptosis에 의해 파괴된 세포의 독성잔유물의 endocytosis^{9,27}, 세포성 면역²⁸ 등이 관여한다고 보고된 바 있다. 그러나 최근 Elshami 등²²은 gap junction의 구성성분인 connexin의 발현정도에 따라 세포간의 communication과 bystander effect의 차이가 있었다고 하였고, Mesnil 등²⁶은 alpha-glycyrrhethic acid로 세포간의 comm-

unication을 억제함에 따라 bystander effect는 감소 되었다고 하였다. 이들은 적어도 in vitro에서는 세포간의 gap junction을 통한 metabolic cooperation이 bystander effect의 주요기전이라고 하였다. 저자들의 성적도 이들의 가설을 뒷받침 할 뿐 아니라 retinoic acid로 gap junction을 통한 세포간의 communication을 증가시킴에 따라 bystander effect의 살상효과가 증가되었다.

Retinoids는 retinol 과 이와 관련된 유도체를 총칭하며 암예방효과 및 항암효과에 대한 많은 연구가 있었다^{29,30}. Retinoids의 항암효과는 세포분화의 유도, 세포증식의 억제 및 세포의 계획적자살(programmed cell death) 즉 apoptosis의 유도 등에 의한³⁰. 그리고 Roger 등³¹과 여러 연구자들¹⁸⁻²⁰은 retinoids가 connexin43 유전자의 발현을 증가시켜 gap junction을 통한 세포간의 communication을 증가시킨다고 하였다. 본 연구에서 저자들은 FACS를 이용하여 double-dye transfer study로 세포간의 communication을 측정하였는데 10^{-8} M- 10^{-6} M RA를 처리한 경우 세포간의 communication이 RA를 처리하지 않은 대조군에 비해 현저히 증가되어 이들의 성적과 일치하였다. RA의 정상혈청 농도는 10-20 nmol/L이며 45 mg/m²를 공급할 경우 평균 최대 혈청농도는 1 μ M에 도달한다³⁰. 따라서 본 실험에서의 RA농도는 in vivo에서도 가능한 농도로 생각된다.

Bystander effect에 의한 살상효과를 비교하는데는 처음 세포들을 분주할 때의 세포간 접촉정도와 배양기간 동안의 세포간 접촉정도의 변화에 따른 살상효과의 차이를 고려해야만 한다. 본 연구에서는 처음 세포들을 분주할 때 세포간의 접촉이 가능한 밀도로 분주하였고 세포들의 성장속도의 차이에 따른 bystander effect의 차이를 배제하기 위해 RA 처리에 따른 세포성장속도의 차이를 조사하였다. Retinoids는 세포주기의 G1기에서 암세포의

성장을 억제하는 것이 많은 세포주에서 증명된 바 있다²⁹⁾. 그러나 Lotan 등³²⁾은 retinoids에 대한 반응 양상은 매우 다양하여 실험한 세포주의 60% 이상에서 세포성장 억제효과가 있었으나 이러한 억제 효과는 세포형에 따라 다양할 뿐 아니라 같은 조직형내에서도 세포주에 따라 그리고 심지어는 subclone에 따라 차이가 있다고 하였다. 그리고 Schroder 등³²⁾은 retinoids는 세포의 성장을 억제할 수도 있고 조장할 수도 있으며, retinoids의 세포성장에 미치는 영향은 세포형, retinoids의 화학적구조 그리고 retinoids의 농도에 따라 다르다고 하였다. 이러한 보고들을 종합해 볼 때 retinoids의 세포성장에 미치는 다양한 효과에 대해서는 아직 논란이 있는 듯하다. 그리고 retinoids의 gap junction을 통한 세포간의 communication과 세포성장속도에 미치는 영향에 대해서도 여러세포주에서 규명되어야 할 것 같다. Mehta 등³⁴⁾은 세포간의 교통이 증가함에 따라 세포성장이 억제된다고 보고한 반면 Zhang 등¹⁸⁾은 retinoids에 의해 connexin43 발현과 gap junction을 통한 세포간의 communication은 증가되었으나 retinoids의 처리유무에 따른 세포 증식율의 차이는 없었다고 하였다. 그리고 Elshami 등²²⁾은 connexin의 발현 감소로 세포간의 communication이 감소된 세포주에 connexin을 coding하는 유전자를 주입한 후 세포간의 교통과 세포의 성장속도를 조사하였는데 connexin을 encoding하는 유전자의 이입시 connexin발현의 증가로 gap junction을 통한 세포간의 communication은 증가하였으나 세포성장속도는 변화가 없었다고 하였다. 본 연구에서는 10^{-12} M에서 10^{-6} M 까지 RA 처리시 세포 성장속도는 대조군과 차이는 없었으며, 10^{-6} M에서 10^{-8} M RA를 처리 한 경우 세포간의 communication은 유의하게 증가되었는데 이러한 결과는 Zhanga 등¹⁸⁾과 Elshami 등²²⁾의 성적과 일치하였다.

본 연구에서 저자들은 connexin43의 발현이 없는

SKHep-J 세포주에서는 RA 처리시 bystander effect에 의한 살상효과의 차이가 없는 반면 connexin43를 발현하는 악성종피종 세포주에서는 10^{-6} M에서 10^{-8} M RA가 세포간의 communication을 증가시켜 HSVtk/GCV 유전자 치료에서 bystander effect를 증가시킬 수 있었다. 이러한 결과는 HSVtk/GCV 유전자치료의 효과를 증대시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 임상적적용을 위해서는 더 많은 세포주를 대상으로 한 실험 및 in vivo 실험 등이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : HSVtk 유전자를 암세포에 이입하여 GCV에 대해 선택적으로 감수성을 증가시키는 HSVtk/GCV 유전자치료에서 bystander effect는 모든 암세포에 유전자를 이입하지 않고도 치료효과를 얻을 수 있도록 한다. 그러나 현존하는 viral vector는 유전자이입 효율이 낮아 임상적으로 치료효과를 기대하는 데는 한계가 있다. 따라서 유전자의 이입효율이 높은 새로운 vector의 개발과 함께 bystander effect의 극대화를 통해 치료효과를 증가시킬 수 있는 방법 등이 요구된다. 최근 gap junction을 통한 세포간의 metabolic cooperation이 bystander effect의 주요기전임이 밝혀졌고 retinoids는 gap junction을 통한 세포간의 communication을 증가시킨다고 보고되었다. 저자들은 HSVtk/GCV 유전자치료에서 bystander effect에 미치는 retinoids의 효과를 조사하였다.

방 법 : Adenovus와 retrovirus vector를 이용하여 connexin43를 발현하는 악성종피종세포와 connexin43를 발현하지 않는 SKHep-J 세포주에 HSVtk 유전자를 이입한 후 HSVtk 유전자가 이입된 세포와 HSVtk 유전자가 이입되지 않은 세포들을 여러가

지 비율로 혼합한 mixing study를 시행하였으며 $10^{-10}M - 10^{-6} M$ RA 처리 유무에 따른 bystander effect에 의한 살상효과를 비교하였다. 그리고 gap junction을 통한 세포간의 communication에 대한 retinoids의 영향을 조사하기 위해 retinoids 처리에 따른 세포간 communication을 FACS를 이용하여 double-dye transfer study로 측정하였다.

결 과 : Connexin43를 발현하지 않는 SKHep-J 세포주에서는 RA 처리유무에 따른 bystander effect에 의한 살상효과의 차이가 없었다. 그러나 connexin43를 발현하는 악성종괴종 세포주에서는 $10^{-8}M - 10^{-6} M$ RA처리시 세포간의 communication과 bystander effect가 RA를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의하게 증가되었다.

결 론 : RA는 gap junction을 통한 세포간의 communication을 증가시켜 HSVtk/GCV 유전자치료에서 bystander effect에 의한 살상효과를 증가시켰다. 이러한 결과는 HSVtk/GCV 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, eds. Cancer : Principles and practice of Oncology, 4th edit, Philadelphia : J.B.Lippincott. 1993 : 2598-2613
- 2) 한성구 : 폐암의 유전자 치료. 대한내과학회지 51(S) : 112, 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) Curiel DT, Pilewski JM, Albelda SM : Gene therapy approaches for inherited and acquired lung disease. Am J Respir Cell Mol Biol 14 : 1, 1996
- 5) Moolten FL, Wells JM: Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. J Natl Cancer Inst 82 : 297, 1990
- 6) 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
- 7) Mullen CA : Metabolic suicide genes in gene therapy. Pharmac Ther 63 : 199, 1994
- 8) 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, 1992
- 9) 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 : 5274, 1993
- 10) Moolten FL : Drug sensitivity(suicide) genes for selective cancer therapy. Cancer Gene Therapy 1 : 279, 1994
- 11) Elshami AA, Kucharczuk JC, Zhang HB, Smyth WR, Hwang H, Kaiser LR, Albelda SM : Treatment of malignant pleural mesothelioma in an immunocompetent rat model utilizing adenovirus mediated gene therapy. Hum Gene Ther 7 : 141, 1996

- 12) 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 of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* **3** : 608, 1991
- 13) 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
- 14) 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
- 15) Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC : Gap junctions : New tools. new answers, new questions. *Neuron* **6** : 305, 1991
- 16) Dermietzel R, Spray DC : Gap junctions in the brain : where, what type, how many and why? *TINS* **16** : 186, 1993
- 17) Pelin K, Hirvonen A, Linnainmaa K : Expression of cell adhesion molecules and connexins in gap junctional intercellular communication deficient human mesothelioma tumour cell lines and communication competent primary mesothelial cells. *Carcinogenesis* **15** : 2673, 1994
- 18) Zhang L, Acevedo P, Guo H, Bertram JS : Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes. *Mol Carcinog* **12** : 50, 1995
- 19) Guo H, Acevedo P, Parsa FD, Bertram JS : Gap-junctional protein connexin43 is expressed in dermis and epidermis of human skin : Differential modulation by retinoids. *J Invest Dermatol* **99** : 460, 1992
- 20) Mehta PP, Loewenstein WR : Differential regulation of communication by retinoic acid in homologous and heterologous junctions between normal and transformed cells. *J Cell Biol* **113** : 371, 1991
- 21) Moreno AP, Laing JG, Beyer EC, Spray DC : Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma(SK-Hep 1) cells. *Am J Physiol* **268** : 356, 1995
- 22) Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KA, Kaiser LR, Albelda SM : Gap junctions play a role in the bystander effect of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther* **3** : 85, 1996
- 23) Tomasetto C, Neveu MJ, Daley J, Horan PK, Sager R : Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J Cell Biol* **122** : 157, 1993
- 24) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine LF : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* **48** : 589, 1988
- 25) Smythe WR, Hwang HC, Amin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM : Use of recombinant adenovirus to transfer the herpes simplex virus thymidine kinase(HSV

- tk) gene to thoracic neoplasm : An effective in vitro drug sensitization system. *Cancer Res* **54** : 2055, 1994
- 26) Mesnil M, Yamasaki H : Role of connexin(gap junction) genes in the bystander killing of cancer cells by HSV-tk gene therapy. *Proc Am Cancer Ass Cancer Res* **37** : 341, 1996
- 27) Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi 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
- 28) Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ : The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Letters* **92** : 167, 1995
- 29) Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL : Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents(Part 1). *Cancer Treat Reports* **4** : 391, 1987
- 30) Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA : Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol* **10** : 839, 1992
- 31) Rogers M, Berestecky JM, Hossain MZ, Guo H, Kadle R, Nicholson BJ, Bertram JS : Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin43 mRNA and protein. *Mol Carcinogenesis* **3** : 335, 1990
- 32) Lotan R, Nicolson GL : Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed, and tumor cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* **59** : 1717, 1977
- 33) Schroder EW, Black PH : Retinoids : Tumor prevents or tumor enhancers? *J Natl Cancer Inst* **65** : 671, 1980
- 34) Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR : The action of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J Cell Biol* **108** : 1053, 1989