

종양 선택적 살상 아데노바이러스와
항암제의 병용투여에 의한 두경부암
세포 살상능의 변화

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 평 환

종양 선택적 살상 아데노바이러스와
항암제의 병용투여에 의한 두경부암
세포 살상능의 변화

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 평 환

종양 선택적 살상 아데노바이러스와
항암제의 병용투여에 의한 두경부암
세포 살상능의 변화

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 평 환

김평환의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005 년 6 월 일

감사의 글

어떠한 말로, 어떻게 시작을 해야 할지 모르겠습니다. 대학교 졸업하고 바이오에 대한 조그만 관심으로 시작된 저의 대학원 생활, 어느덧 벌써 졸업을 앞두고 되었습니다. 시간이 언제 이렇게 지나 갔나 지금 이순간 제가 걸어온 길을 한번 돌아보게 됩니다. 실험이 뭔지, 파이펫 한번 제대로 잡아보지 않았던 제가 부족하긴 하지만 어느덧 한편의 논문이라는 것을 완성하기까지 실수와 실패, 좌절, 그에 따른 제 나름대로의 노력과 제가 흘린 땀, 그리고 그러한 역경 속에서도 저를 위한 주위 분들의 관심과 우리 암연구소 교수님들과 실험실 식구들의 아낌없는 보살핌과 호통이 없었다면 불가능하지 않았나 싶습니다. 처음 멋진 그림을 그리기 위해 붓을 든 초년생 화가 지망생의 심정으로 막연한 동경심과 떨림으로 처음 실험을 시작할 때와 졸업을 앞둔 지금 제가 얼마나 멋진 그림을 그렸는지 다시 한번 생각하게 됩니다.

이 논문에는 저의 석사생활 동안의 기쁨과 슬픔, 그리고 저의 모든 것이 묻어 있기에 아직은 부족한 것이 많지만 많은 애착과 아쉬움이 남는, 하지만 뿌듯한 논문입니다.

저의 이러한 논문이 나오기까지는 많은 분들이 함께 해주셨는데 먼저, 저희 실험실의 정신적 지주이자 아버지 같으신 김주향 교수님, 환자진료를 비롯해 항상 바쁘신 일정속에서도 매일 실험실에 오셔서 학생들을 다독겨려 주시는 인자하고 근엄하신 분입니다. 오실 때 마다 실험 때문에 바쁘다는 핑계로 교수님께 인사한번 제대로 건네지 못한 마음이 늘 죄송하고 한편

으로는 항상 감사한 마음 가지고 있다는 말을 전해드리고 싶습니다. 그리고 행여나 잘못된 길을 갈까 항상 노심초사 저희 학생들만을 걱정해 주시는, 무서울 때는 눈물이 왕창 쏙 빠지도록, 하지만 다정하실 때는 한없이 부드러운신 윤채옥 교수님, 항상 바쁘신 일로 몸이 열개라도 모자라신 상황에서도 당신이 책임지는 학생 한명 한명에 대한 관심과 배려를 늘 잊지 않으시는 세심하고 포근하신 분이십니다. 처음 제가 실험실에 왔을 때 저에게 해주셨던 ‘초심’을 잃지 말라는 그 말씀, 늘 머릿속에서 잊은 적이 없고 항상 그 마음 지키려고 노력했는데 얼마나 초심을 지켰는지 모르겠습니다. 교수님의 그 말씀을 앞으로 제가 하게 될 모든 일에 있어서 밑거름으로 삼고 항상 노력하는 교수님의 부끄러운 제자가 되지 않도록 노력하겠습니다. 이 두 분이 있었기에 부족하지만 올바른 방향으로 저의 논문이 나오지 않았나 싶습니다. 두 분께 머리 숙여 진심으로 감사의 말씀 올립니다.

또한 바쁘신 와중에도 보다 나은 논문의 완성을 위해 꼼꼼한 관심과 조언을 아껴주시지 않은 서창옥 교수님과 최은창 교수님께도 진심으로 사과와 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 기쁜 일, 슬픈 일 모두를 함께한 우리 실험실 식구들. 항상 편한 형처럼 다가와 저희를 보살펴주시는 손주혁 선생님과 안지는 얼마되지 않지만 저희에 대한 관심을 아끼지 않으신 안중배 선생님, 어려운 일이 있을 때마다 실험이든 다른 일이든 저희 대신 걱정해주시는 김현희 선생님, 저희가 실험만 열중할 수 있도록 실험실의 사무적인 일들을 도맡아 해주신 박근호 선생님과 선영이에게 감사와 고마움을 전합니다.

실험실 생활 처음 시작하면서 제가 정말 많이 의지한 모든 걱정과 고민을 함께 해준 친형 같은 재성이형, 지금은 다른

곳에서 열심히 생활하고 있는 은희누나, 곧 산고의 고통을 느끼며 둘째를 갖게 될 영숙누나, 멀리 타향에 와서 식구들과 떨어져 지내시는 외로워 보이지만 강하고 친근하고 근엄하신 황선생님, 저의 대학 선배이자 새로이 학위를 시작한 아기엄마 민정이누나, 새로이 사회생활에 첫발을 디딘 대봉이형과 동현이형, 실험실에서 편하게 얘기할 수 있는 동갑내기 친구들인 지영이와 경주, 조금은 덜렁대지만 시원시원한 성격의 아름이와 곧 다른 곳에서 새롭게 새출발을 위한 준비를 하고있는 태영이, 실험실의 모든 잡다한 일을 술선수범하여 행동하는 믿음직한 일규, 항상 실험에 대한 열정이 식지 않는 윤아, 대학원 생활을 시작한 지 얼마 안되는 막내동생 같은 착한 오준이와 민주에게 감사와 고마움을 표하고 싶습니다. 지금은 졸업하고 다른 곳에서 열심히 생활하고 있는 은아와 태영이에게도 고마움을 표합니다.

마지막으로 오늘날의 저와 이 자리에 설 수 있도록 해주신, 제가 가진 모든 것을 버려도 아깝지 않은 저의 부모님과 형, 어느 부모님이 안그러시겠냐마는 이 나이 때까지 저를 위해 뒷바라지며 항상 노심초사 아들 잘 되라고 걱정을 놓지 않으시는 저의 부모님과 멀리 이국땅에서 보다 나은 자신을 만들기 위해 외롭게 식구들과 떨어져 연구에 전념하고 있는, 동생 잘되라고 모든 것을 포기할 수 있는 저희 형에게 작지만 저의 석사생활이 담긴 이 논문을 받치며 제대로 해보지 못한 말 **‘사랑합니다’**.

저자 씀.

<차례>

그림 및 표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 대상 세포주 및 세포배양	8
2. 재조합 아데노바이러스 Ad-mTERT- Δ 19의 제작 및 생산	8
3. MTT assay를 이용한 항암제에 의한 암세포 살상능 비교 검증	8
4. MTT assay를 이용한 재조합 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 암세포 살상능 비교 검증	9
5. TUNEL assay를 통한 세포고사 관찰	10
6. Annexin-V/PI 이중 염색을 통한 세포고사 관찰	10
7. 생체 내 항종양 효과 실험	11
III. 결과	12
1. 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19의 생산	12
2. 단독 및 두 가지 항암제의 배합 병용 투여에 의한 암세포 살상능 비교 검증	12
3. 종양 선택적 살상 아데노바이러스 Ad-mTERT- Δ 19와 항암제의 병용 투여에 의한 암세포 살상능 상승효과 비교 검증	18
4. TUNEL assay를 통한 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 세포고사 관찰	20

5. Annexin-V/PI 이중 염색을 통한 종양 선택적 살상 아데노바이 러스와 항암제의 병용 투여에 의한 세포사멸 기전 검증	22
6. 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 생체 내 항종양 효과 비교 검증	25
IV. 고찰	28
V. 결론	32
참고문헌	33
영문요약	37

그림 차례

Figure 1. Structure of replication competent adenoviral vector Ad-mTERT- Δ 19 and restricted replication of the Ad-mTERT- Δ 19 in cancer cells	13
Figure 2. Confirmation of IC ₂₀ of single chemotherapeutic agents and efficient cancer cell killing effect of combination of chmotherapeutic agents <i>in vitro</i>	15
Figure 3. Efficient cancer cell killing effect of combination therapy	19
Figure 4. <i>In vitro</i> TUNEL assay	21
Figure 5. Efficient apoptosis of combination therapy	23
Figure 6. Anti-tumor effect of combination therapy against FaDu xenograft in male athymic nude mice	26

국문 요약

종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 두경부암 세포 살상능의 변화

암은 전 세계적으로 질병 사망의 수위를 차지하는 질병으로 수술, 방사선 치료, 항암화학 요법 등의 복합적인 치료를 하더라도 약 50% 이상의 환자들은 결국 사망하게 되는 난치의 질환이다. 초기의 암은 외과적 수술이 효과적이지만, 전이가 있는 대부분의 암은 수술 이외에 방사선과 항암제 치료를 병행하게 된다. 하지만 그러한 치료는 정상세포에 미치는 부작용이 크고 암세포의 다중약제에 대한 내성으로 치료율이 극히 낮다. 이에 대한 대안으로 유전자 치료 또는 면역 치료 같은 새로운 개념의 치료방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에 진행된 여러 임상시험 결과, 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 안전성이 입증되고 부분적으로 항종양 효과도 보고되었지만, 치료 효과를 높이기 위해서는 고농도의 아데노바이러스를 반복적으로 투여하여야 하는데 이는 결과적으로 생체 내 독성을 초래할 수 있다. 그래서 이를 극복하기 위한 방안으로 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 여러 종류의 항암제를 병용 투여하여 항종양 효과를 증대시키려는 시도들이 많이 이루어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 두경부암을 대상으로 E1B 19kDa이 소실되어 암세포 살상능이 증대되고, 동시에 바이러스의 증식이 암세포 선택적으로 활성화되는 TERT(telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 의해서 조절되는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19와 2 종류의 항암제들이 배합된 cisplatin + 5-fluorouracil과 carboplatin + paclitaxel 항암제를 함께 병용 투여하였을 때의 세포 살상능, 세포고사 빈도 및 생체 내 항종양 효과를 비교

검증해 보았다. 그 결과, 각각의 항암제를 단독으로 사용하였을 경우보다 2 종류의 항암제를 배합하여 사용하였을 경우에 암세포 살상능이 증가하는 것을 확인하였으며, 또한 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스와 2 종류의 항암제가 배합된 것을 단독 처리한 경우보다 이들을 함께 병합 처리한 경우에 보다 높은 세포 살상이 유도될 수 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용처리에 의해서 유도되어지는 세포고사를 보다 가시적·정량적으로 관찰하기 위해 시행한 Annexin-V/PI 이중 염색법을 이용한 유세포 분석과 TUNEL assay를 통해서도 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스와 배합된 항암제를 각각 단독으로 사용하였을 경우보다는 이들을 병용하여 처리하였을 때 세포고사 및 세포사멸이 월등히 증가함을 알 수 있었다. 나아가, 인체 두경부암 xenograft 모델을 이용하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 배합된 항암제를 병용투여 하였을 때, 이들을 단독으로 투여한 경우에 비해 생체 내 항종양 효과가 크게 개선되는 것을 확인하였다.

결과적으로, 본 연구에서 확인된 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 따른 향상된 항종양 효과는 암치료에 필요한 아데노바이러스 및 항암제의 투여량을 감소시켜 아데노바이러스에 의한 생체 내 독성을 크게 줄일 수 있을 뿐 아니라 항암제에 의한 부작용도 현저히 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이는 나아가 암 유전자 치료의 안전성과 유용성을 증가시켜 암유전자 치료를 한걸음 진일보된 방안으로 확립하는데 일조 할 수 있을 것으로 사료된다.

.....
 핵심되는 말 : 유전자 치료, 복제 가능 아데노바이러스, 항암제, 병용 투여, cisplatin, 5-fluorouracil, carboplatin, paclitaxel

중양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 두경부암 세포 살상능의 변화

<지도교수 윤 체 옥>

연세대학교 대학원 의과학과

김 평 환

I. 서론

암은 전 세계적으로 질병 사망의 수위를 차지하는 질병으로 수술, 방사선 치료, 항암화학 요법 등의 복합적인 치료를 하더라도 약 50% 이상의 환자들은 결국 사망하게 되는 난치의 질환이다. 초기의 암은 외과적 수술이 효과적이지만, 전이가 있는 대부분의 암은 수술 이외에 방사선과 항암제 치료를 병행하게 된다. 하지만 그러한 치료는 정상세포에 미치는 부작용이 크고 암세포의 다중약제에 대한 내성으로 치료율이 극히 낮다. 이에 대한 대안으로 유전자 치료 또는 면역 치료 같은 새로운 개념의 치료방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻⁴. 유전자 치료는 재조합 DNA 기술을 이용하여 인체에 유전 물질을 도입하여 질병을 치료하거나 예방하는 방법으로써, 대부분의 현대 의학이 단순히 질병의 증상만을 치료하는 것임에 반해 유전자 치료는 질병의 원인이 되는 유전적 결함을 보정하거나 세포에 새로운 기능을 부여할 수 있는 근본적인 치료방법으로 현재 유전자 치료제 개

발에 대한 요구가 증가 하고 있다.

아데노바이러스는 생체 외(*in vitro*) 뿐 아니라 생체 내(*in vivo*)에서도 유전자 전달효율이 우수하고 높은 역가로 생산이 가능할 뿐 아니라 쉽게 농축할 수 있는 여러 장점들이 보고 되면서⁴, 최근 5년 사이에 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 아데노바이러스를 이용하는 빈도가 꾸준히 증가하고 있다^{2, 6-7}. 또한, 암을 대상으로 유전자 치료를 시행하는 경우에는 장기적이고 지속적인 치료 유전자의 발현을 필요로 하지 않고 아데노바이러스에 의해 유도 되는 숙주의 면역반응이 크게 문제시 되지 않거나 오히려 잇점이 될 수 있기 때문에 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용하는 유전자치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 초기의 암 유전자 치료에 이용된 대부분의 아데노바이러스는 복제 불가능한 아데노바이러스로, 이들을 유전자 전달체로 이용하는 경우에는 일차적으로 감염된 세포 또는 극히 일부의 주변 세포들에만 항암효과를 유발할 수 있어, 암 치료 효율이 낮은 단점이 부각되었다⁸⁻⁹. 이러한 한계점을 극복하는 한 방안으로, 암세포에서만 선택적으로 증식하고 살상할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며¹⁰⁻¹¹, McCormick 그룹은 종양 억제 유전자인 p53을 불활성화 시키는 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 55kDa이 부분적으로 소실된 ONYX-015를 개발하여 p53이 불활성화 된 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상할 수 있음을 보고 하였다¹². 그러나 이러한 E1B 55kDa 유전자가 변형된 아데노바이러스들의 종양 세포 선택적 살상능은 야생형 아데노바이러스 보다 현격히 낮아 임상에 효과적으로 이용하기 위해서는 이들의 세포 살상능이 개선되어야 한다.

최근에 진행된 몇몇 초기 임상시험 결과, 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 안전성이 입증되고 부분적으로 항종양 효과도 보고

되었지만, 치료 효과를 높이기 위해서는 고농도의 아데노바이러스를 반복적으로 투여하여야 하는데 이는 결과적으로 생체 내 독성을 초래할 수 있다. 이를 극복하기 위한 방안으로 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 여러 종류의 항암제를 병용 투여하여 항종양 효과를 증대시키려는 시도들이 많이 이루어지고 있다. 간암 선택적으로 복제하는 아데노바이러스인 CV890과 doxorubicin을 함께 투여함으로써 생체 외 뿐 만 아니라 생체 내 항종양 효과를 현저히 향상시킬 수 있었으며¹³, 전립선암 선택적 살상 아데노바이러스인 CV787과 paclitaxel을 함께 병용 투여함으로써 항종양 효과를 크게 증대시킬 수 있었다¹⁴. 또한, ONYX-015 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 cisplatin 또는 5-fluorouracil(5-FU)을 병용 투여한 결과 각각을 단독 투여한 경우에 비하여 이들을 병용 투여하였을 때 암세포 살상능이 현격히 향상되고 암조직 내의 바이러스의 확산이 증가되었다. 재발한 두경부암 환자들을 대상으로 최근에 진행된 ONYX-015 아데노바이러스와 cisplatin과 5-FU를 함께 병용 투여하는 제 2상 임상시험에서 총 37명의 환자 중 19명(전체 시험환자 중 51%, 평가 가능한 환자 중 63%)에서 항암효과가 나타났다¹⁵. 항암제 치료만 한 경우에는 일반적으로 30-40%의 치료반응이 나타나고 ONYX-015만 투여한 경우에는 14%의 항암효과가 나타난 것에 비교해볼 때, 바이러스를 함께 병용 투여한 경우에 상승적인 항암효과를 얻을 수 있었으며, 항암치료 후 예후도 훨씬 좋았다.

현재 두경부암에 대한 항암치료에 널리 사용되고 있고 많은 연구가 되어져 있는 항암제들로는 cisplatin과 그것의 아날로그인 carboplatin, 그리고 단독으로 쓰일 때 보다는 다른 항암제와 병합되어 사용될 때 상승적 치료효과를 보이는 5-FU와 paclitaxel이 대표적이다. 알킬화제로 분류되는 cisplatin은 DNA에서 수소이온을 알킬기(R-CH)로 대체시켜 세포가 사용할 수 없는 분자로 만들어 신진대사에 장애

를 일으킴으로써 세포의 증식을 막고 세포살상 유도하며, 그것의 아날로그형인 carboplatin 역시 이 기전과 유사하게 암세포 살상을 유도한다¹⁶⁻¹⁷. 5-FU는 항대사제(antimetabolite)로써 세포 주기(cell cycle)의 S시기에 작용하여 nucleotide의 생성이나 그 기반이 되는 purine 또는 pyrimidine 형성을 방해하고, 그 결과 DNA 합성을 저지하여 세포살상을 유도하게 된다¹⁸. 한편, paclitaxel은 튜블린 단위체의 중합작용을 유도하여 마이크로튜블을 안정화시킴으로써 유사분열 과정에서 세포 주기를 정지시켜 종양세포의 세포살상을 유도한다¹⁹. 현재 두경부암의 표준 항암 치료법으로 cisplatin과 5-FU를 함께 투여하는 방법이 많이 이용되어지고²⁰, 종양 선택적 살상 아데노바이러스와의 병용 치료법으로도 이들 두 종류의 항암제를 임상시험에 주로 사용하였으며, 아데노바이러스와의 상승적 항암효과도 보고된 바 있다. 하지만, cisplatin, carboplatin과 5-FU는 DNA 합성을 저해하여 암세포 살상을 유도하게 되는데, 아데노바이러스의 유전체는 이중가닥의 DNA로 구성되어 있어 이들 항암제에 의해 아데노바이러스의 복제과정이 저해받을 수 있으며 이에 따라 종양세포를 살상할 수 있는 바이러스 분자의 양이 감소하기 때문에 항종양 효과도 감소할 수 있다고 보고된 바 있다²¹. 이와는 대조적으로, paclitaxel은 DNA 합성을 저해하지 않고 세포 주기를 정지시켜 세포 살상을 유도하기 때문에 아데노바이러스의 증식을 저해하지 않는다²². 그 결과, paclitaxel 항암제와 병용 투여된 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 증식이 암세포 내에서 활발히 일어나게 되어 항종양 효과가 효과적으로 유도될 수 있다.

분자 생물학의 발전으로 바이러스 유전자들의 기능을 보다 폭넓게 이해할 수 있게 됨으로서, 종양세포를 더욱 효과적으로 표적화할 수 있는 변형된 아데노바이러스들이 개발되었다. 아데노바이러스의 E1B 19kDa 유전자는 강력한 세포고사 억제제인 bcl-2와 구조적으로 기능적으로 유사하며, 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A에 의해

유도되는 세포고사를 억제한다고 알려져 있다²³. 실제로 김재성 등은 E1B 19kDa 유전자가 소실된 아데노바이러스는 세포고사를 활발하게 유도하여 결과적으로 암세포 살상능을 크게 향상시킬 수 있음을 보고하였다²⁴. 이후, 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 19kDa가 소실되어 암세포 살상능이 증대되고, 동시에 바이러스의 증식이 암세포 선택적으로 활성화되는 TERT(telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 의해서 조절되는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19의 우수한 생체 내·외 항종양 효과가 보고되었다²⁵. TERT 프로모터는 암 진행 전단계인 양성종양 조직과 암세포주 및 암 조직에서 활성이 선택적으로 증가한다고 알려져 있는 대표적 암세포 선택적 활성 프로모터로서, 아데노바이러스의 증식이 TERT 프로모터에 의해서 조절되는 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스는 암세포 선택적으로 증식하고 그 결과, 암세포 선택적 세포살상을 유도할 수 있다.

이러한 배경 하에 본 연구에서는, 두경부암의 표준 치료법으로 사용되고 있는 항암제인 cisplatin과 5-FU의 배합과 cisplatin의 독성과 부작용을 줄인 carboplatin과 DNA 합성을 저해하지 않는 paclitaxel의 배합을 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19와 함께 병용 투여함으로서 암세포 살상효과를 향상시켜 암치료 효율을 개선시킬 수 있는지를 알아보았다. 이는 향후 향상된 암세포 살상능으로 암치료에 필요한 아데노바이러스 및 항암제의 투여량을 감소시켜 아데노바이러스에 의한 생체 내 독성을 크게 줄일 수 있을 뿐 아니라 항암제에 의한 부작용도 현저히 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 두경부암 세포주(QLL1, CAL27, FaDu, SCC9)와 293 세포주 등이며, 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. FaDu 세포주를 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand island, NY)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO BRL, Grand island, NY)를 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin(GIBCO BRL, Grand island, NY)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다. FaDu 세포주는 같은 조건하에서 MEM(GIBCO)으로 배양하였다.

2. 재조합 아데노바이러스 Ad-mTERT-Δ19의 생산

아데노바이러스 플라스미드인 pAdmTERT-Δ19를 제한효소 PacI으로 처리하여 선형화 시킨 뒤, 293 세포주에 lipofectamine(GIBCOBRL)을 이용하여 형질전환하여 Ad-mTERT-Δ19 복제 가능 아데노바이러스를 생산하였다. 생성되어진 아데노바이러스는 293 세포주에서 증식시켜 limiting dilution 또는 plaque assay로 바이러스의 역가를 결정하였다. 동물실험을 위해서는 CsCl gradient로 농축하여 바이러스를 순수 분리하였다.

3. MTT assay를 이용한 항암제에 의한 암세포 살상능 비교 검증

네 가지 종류의 두경부암 세포주들(QLL1, CAL27, FaDu, SCC9)을 대상으로 각각의 항암제들, 즉 cisplatin, 5-FU, carboplatin, paclitaxel의 암세포 살상 효과를 비교 검증하기 위해서, 세포들을 24-well plate에 분주하고 24시간 뒤에 항암제의 농도를 높여가며 처리하고 72시간 후에 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) 용액 200 μ l씩을 plate well에 첨가하여 4시간동안 37℃ 항온기에서 반응시켰다. MTT에 의해 살아있는 세포에서 포마젠 결정이 형성되면 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37℃에서 10분간 방치한 후 microplate reader(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다. 세포의 생존율은 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 색소 흡수율} - \text{기준 색소 흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소 흡수율} - \text{기준 색소 흡수율}} \times 100$$

4. MTT assay를 이용한 제조합 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 암세포 살상능 비교 검증

암세포 특이적 살상 아데노바이러스와 배합된 항암제들(cisplatin + 5-FU 또는 carboplatin + paclitaxel)을 각각 또는 병용 처리한 뒤, 시간에 따른 암세포 살상능을 비교하기 위하여, 두경부암 세포주인 QLL1, CAL27, FaDu, SCC9를 24-well plate에 분주하고 24시간 후 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스를 각각 0.3, 0.5, 3, 0.3 MOI로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 각각의 세포들에 cisplatin(1 μ M) + 5-FU(1 μ M) 또는 carboplatin(10 μ M) + paclitaxel(1 nM)을 처리한 후 1, 3, 5일째(QLL1, FaDu) 또는 2, 4, 6일째(CAL27, SCC9)에 MTT assay를 시행하였다.

5. TUNEL assay를 통한 세포고사 관찰

종양세포 특이적 살상 아데노바이러스와 배합된 항암제들 (cisplatin + 5-FU 또는 carboplatin + paclitaxel)의 암세포에 대한 각각의 세포고사 유도능력과 병용투여에 따른 세포고사 유도능력 변화를 비교하기 위하여, 두경부암 세포주들인 QLL1(4×10^5 cell), CAL27(3×10^5 cell), FaDu(1×10^5 cell), SCC9(4×10^5 cell)를 chamber slide에 분주하고 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스로 각각 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 각각의 세포들을 cisplatin($1 \mu\text{M}$) + 5-FU($1 \mu\text{M}$) 또는 carboplatin($10 \mu\text{M}$) + paclitaxel(1 nM)로 처리하였다. 항암제 처리 24시간 후 배지를 제거한 뒤 ApopTag Kit(Intergen, Purchase, NY)을 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 TUNEL assay를 수행하였다. 양성 대조군으로는 camptotecin-11(CPT)을 처리하였다. 발색여부를 확인하기 위해 peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 diaminobenzidine(DAB; DAKO, Carpinteria, CA)과 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 증류수로 3회 세척하였다. 세포질을 관찰하기 위해 0.5% methyl green으로 다시 10분간 염색하고 세척한 후 xylene에 슬라이드를 완전히 적시고 Permount(SP15-500; Fisher scientific, Fair Lawn, NJ)로 mounting하여 현미경으로 관찰하였다.

6. Annexin V-FITC/Propidium Iodide(PI) 이중 염색을 통한 세포고사 관찰

종양세포 특이적 살상 아데노바이러스와 배합된 항암제들 (cisplatin + 5-FU 또는 carboplatin + paclitaxel)의 병용투여에 따른 세포고사 유도능력의 변화를 알아보기 위하여, 두경부암 세포주들인 QLL1, CAL27, FaDu, SCC9를 각각 1×10^6 cell로 25T culture flask

에 분주하고 24시간 후 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스를 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간째 각각의 세포들에 cisplatin(1 μ M) + 5-FU(1 μ M) 또는 carboplatin(10 μ M) + paclitaxel(1 nM)을 처리한 후 48시간 또는 72시간 후에 감염된 세포들을 회수하여 1 $\times$ binding buffer로 세척한 후 ApoAlert Annexin V-FITC apoptosis kit(Clontech, Palo Alto, CA)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

7. 생체 내 항종양 효과 검증

생후 6~8주 정도 경과된 누드마우스의 복벽 피하에 1×10^7 개의 인체 두경부암 세포주인 FaDu를 주사한 뒤, 종양의 크기가 약 50~80 mm³ 정도 성장하였을 때, 1×10^7 plaque forming unit (PFU)/20 μ l의 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스와 음성 대조군인 PBS를 종양 내에 직접 이틀 간격으로 3회 주사하였다. 첫 번째 바이러스 투여 후 24시간 뒤부터 cisplatin(4 mg/kg) + 5-FU(10 mg/kg) 또는 carboplatin(20 mg/kg) + paclitaxel(4 mg/kg)을 이틀 간격으로 3회 복강 내에 투여하고 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 크기는 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정하고, 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$\text{Tumor size(mm}^3\text{)} = (\text{단축 mm})^2 \times \text{장축 mm} \times 0.523$$

III. 결 과

1. 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19의 생산

종양세포 특이적 활성 프로모터인 hTERT의 활성과 암세포 특이성을 향상시키기 위한 방안으로 야생형 hTERT에 1개의 c-myc 결합부위와 5개의 Sp1 부위를 첨가하여 변환된 m-hTERT 프로모터를 제작하였다(Fig. 1A). 세포 살상능이 월등히 증대된 복제 가능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1B19에 암세포 특이적 복제능을 부여하기 위하여, m-hTERT 프로모터를 아데노바이러스 E1A의 내재 프로모터와 치환하여 제작한 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스의 복제가 암세포 특이적으로 일어나는지를 알아보기 위해, 대조군 바이러스인 Ad- Δ E1B19와 함께 각각 감염시킨 후 아데노바이러스에 의해 발현되는 E1 단백질의 발현 양상을 검증하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이, Ad- Δ E1B19에 의해 감염된 경우는 암세포들과 정상세포들 모두에서 바이러스의 복제가 활발히 일어나 E1 단백질이 높게 발현된 반면, Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스에 의해 감염된 경우는 telomerase 활성이 높은 암세포주들에서만 발현이 되고 telomerase 활성이 미미한 모든 정상세포주들(WI38, BJ, IMR90)에서는 전혀 발현되지 않았다.

2. 단독 및 두 가지 항암제의 배합 병용 투여에 의한 암세포 살상능 비교 검증

종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 두경부 암세포 살상능의 상승효과를 검증하기 위한 예비 실험으로

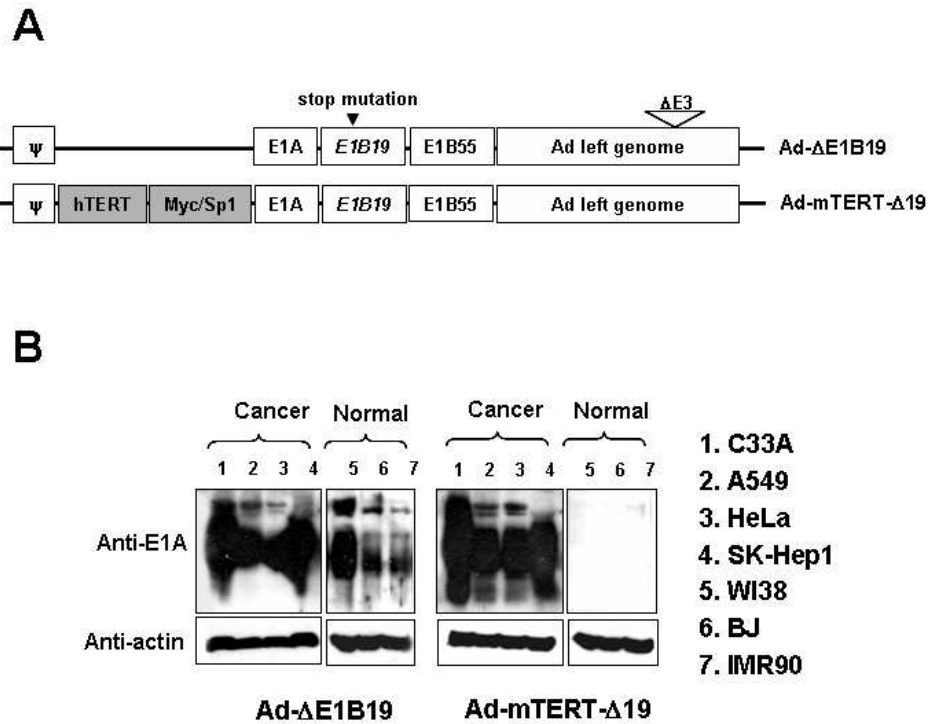


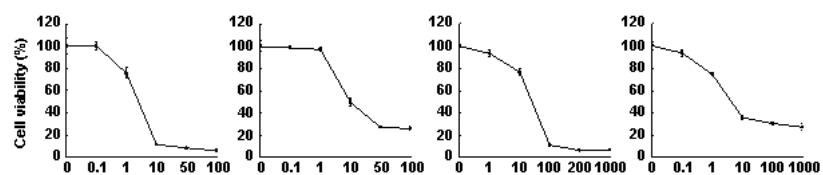
Figure 1. (A) Schematic illustration of replication-competent adenoviral vectors used in this study. Ad- Δ E1B19 expresses E1A under the control of endogenous promoter and carries E1B 19kDa mutated in translational initiation codon. ; Ad-mTERT- Δ 19 has the same backbone as Ad- Δ E1B19 except for the expression of E1A controlled by m-hTERT promoter. (B) Restricted replication of the Ad-mTERT-19 in cancer cells. Forty-eight hours after infection, total protein from C33A (lane 1), A549 (lane 2), HeLa (lane 3), SK-Hep1 (lane 4), WI38 (lane 5), BJ (lane 6) and IMR90 (lane 7) cells infected with Ad- Δ E1B19 or Ad-mTERT- Δ 19 at an MOI of 1 in cancer cells (lanes 1, 2, 3 and 4), and at an MOI of 10 in normal cells (lanes 5, 6 and 7), was analyzed with anti-E1A or anti-actin antibody as described in Materials and Methods.

4 종류의 항암제(cisplatin, 5-FU, carboplatin, paclitaxel)의 단독 투여에 따른 세포 살상능을 알아보았다. 이를 위하여, 먼저 인체 두경부암 세포주들인 QLL1, CAL27, FaDu, SCC9을 대상으로 cisplatin(0.1, 1, 10, 50, 100 μ M), 5-FU(0.1, 1, 10, 50, 100 μ M), carboplatin(1, 10, 100, 200, 1000 μ M), paclitaxel(0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)을 여러 농도로 처리하여 세포의 사멸 정도를 MTT assay를 시행하여 비교 분석하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 모든 종류의 두경부암 세포주에서 투여된 항암제의 농도가 증가함에 따라 세포 살상 효과가 증가되는 것이 관찰되었으며, 이를 바탕으로 약 20% 정도의 세포 살상을 유도하는 각각의 항암제 적정 투여 농도인 cisplatin(1 μ M), 5-FU(1 μ M), carboplatin(10 μ M), paclitaxel(1 nM)를 결정하였다.

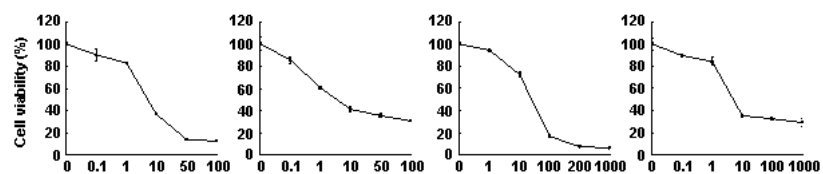
현재 두경부암 치료에 빈번하게 이용되는 항암제 병용 투여법인 cisplatin과 5-FU의 배합과 바이러스의 증식에 악영향을 미치지 않는 항암제인 carboplatin과 paclitaxel의 병용 투여에 따른 암세포 살상능 증진 여부와 이들 두 가지의 병용 투여법의 암세포 살상능을 비교 검증하기 위하여, 4 가지 종류의 두경부암 세포주들을 대상으로 cisplatin(1 μ M) + 5-FU(1 μ M) 또는 carboplatin(10 μ M) + paclitaxel(1 nM)을 각각 투여한 뒤 세포살상 정도를 MTT assay를 시행하여 산출하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이, 본 연구에서 실험한 모든 두경부암 세포주들에서 한 가지 항암제를 투여한 경우에 비해 두 가지 항암제를 병용 투여한 경우에 세포살상 정도가 상승적으로 증가함을 확인하였다. 즉, PBS 만을 처리한 음성 대조군의 cell viability를 100% 기준으로 하였을 때, QLL1 세포주에 cisplatin과 5-FU를 단독으로 투여한 경우에는 각각 17%와 4%의 세포살상을 유도한 반면, 이들을 함께 투여하였을 경우에는 29%의 세포살상을 유도하여 세포살상 정도가 상승적으로 증가하였다. 이와 유사하게, carboplatin과 paclitaxel을 단독으로 투여한 경우에는 각각 19%와 25%의 세포살상을 유도한 반면,

A.

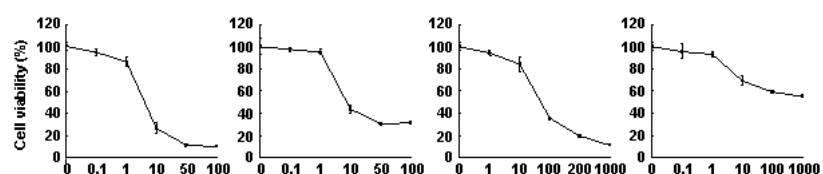
QLL1



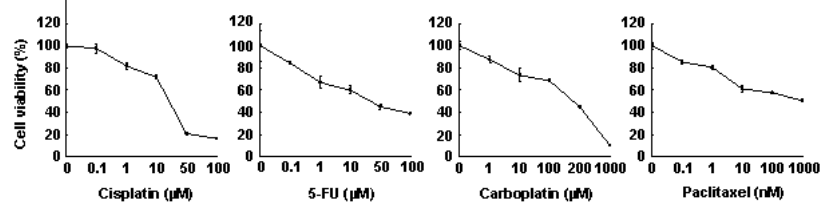
CAL27



FaDu



SCC9



B.

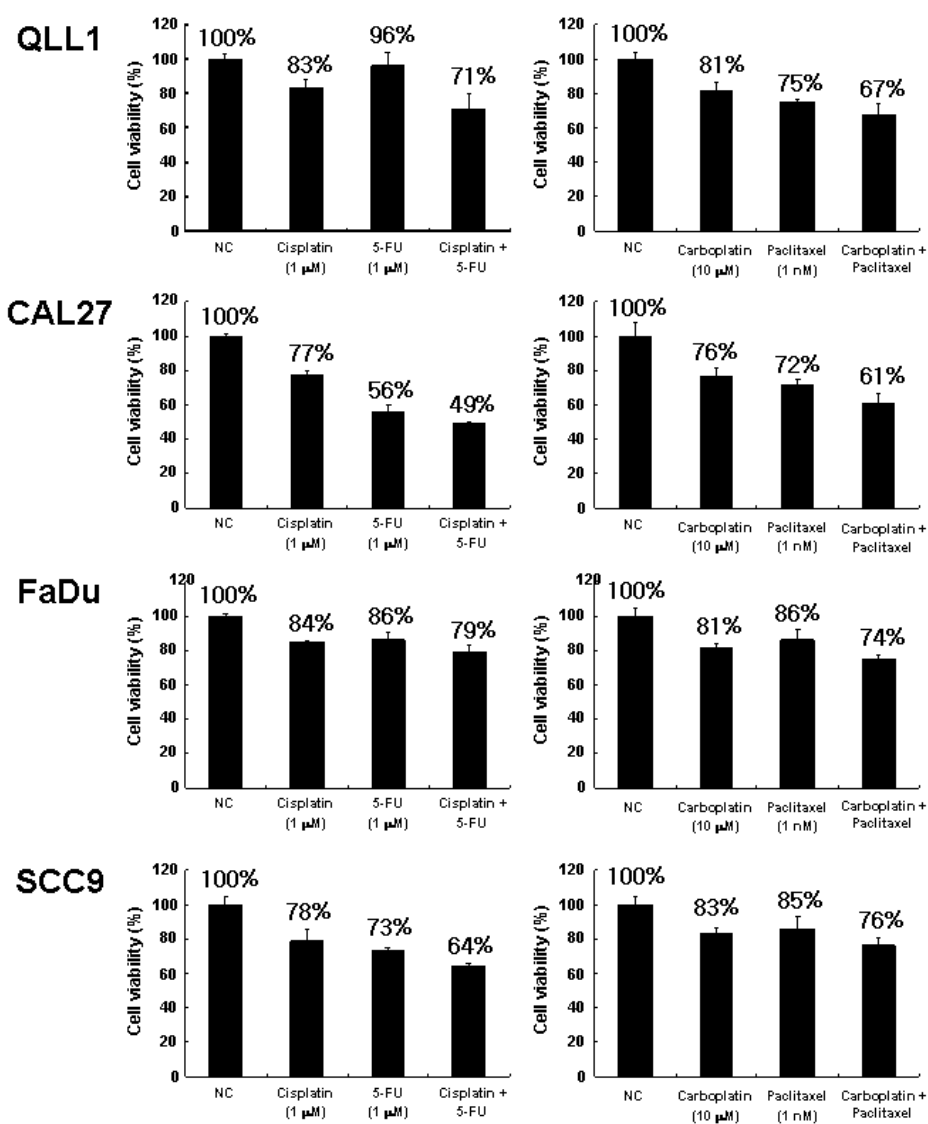


Figure 2. Dose-response curve of head and neck cancer cell lines to chemotherapeutic agents (A) and cell killing effect of combination therapy of cisplatin + 5-FU or carboplatin + paclitaxel (B). A, Cells were exposed to cisplatin, 5-FU, carboplatin, and paclitaxel for 3 days at the range of 0.1~100 μ M for cisplatin and 5-FU, 1~1000 μ M for carboplatin and 0.1~1000 nM for paclitaxel, and cytotoxicity of each chemotherapeutic agent was determined by MTT assay. B, Cells were treated with PBS, cisplatin (1 μ M), 5-FU (1 μ M), carboplatin (10 μ M), paclitaxel (1 nM), or combination of cisplatin (1 μ M) + 5-FU (1 μ M) and carboplatin (10 μ M) + paclitaxel (1 nM). Cell survival was evaluated by an MTT assay. Results are expressed as a percentage of control (untreated cells), and values represent the means SD obtained from triplicate determinations.

이들을 함께 병합하여 투여하였을 경우에는 33%의 증가된 세포 살상을 유도하였다. 이러한 항암제 병용투여에 따른 증대된 세포 살상능 현상은 CAL27, FaDu, SCC9에서 모두 유사하게 나타났으며, 이러한 결과들을 바탕으로, 한 가지 항암제를 투여한 경우에 비해 두 가지 항암제를 병용 투여한 경우에 세포살상 정도가 상승적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

3. 종양 선택적 살상 아데노바이러스 Ad-mTERT- Δ 19와 항암제의 병용 투여에 의한 암세포 살상능 상승효과 비교 검증

종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19와 2가지 종류의 항암제 병용 투여에 의한 종양 세포 살상능 상승효과를 검증하기 위하여, QLL1, CAL27, FaDu, SCC9 두경부암 세포주들을 대상으로 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스를 각각 0.3, 0.5, 3, 0.3 MOI로 감염시키고, 24시간이 경과한 뒤에 cisplatin(1 μ M)과 5-FU(1 μ M) 또는 carboplatin(10 μ M)과 paclitaxel(1 nM)을 처리하여 세포의 사멸 정도를 비교 분석하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 실험에 이용된 모든 세포주들에서 항암제 또는 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스만을 처리한 경우, 그리고 항암제와 아데노바이러스를 병용투여 한 모든 경우에서, 시간이 지남에 따라 세포 살상 효과가 증가되는 것이 관찰되었으며, 특히 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스 또는 항암제를 단독으로 투여한 경우보다 이들을 병용 투여한 경우에 높은 종양 살상능이 유도되었다. 특히, QLL1과 CAL27 세포주의 경우에는, carboplatin과 paclitaxel 항암제를 혼합하여 투여한 경우가 cisplatin과 5-FU 항암제를 혼합하여 투여한 경우에 비해 아데노바이러스와 병용 투여되었을 때 더 높은 종양 살상효과를 나타내는 것으로 확인할 수 있었다. 하지만 이와는 대조적으로, FaDu와 SCC9 세포주의 경우에는,

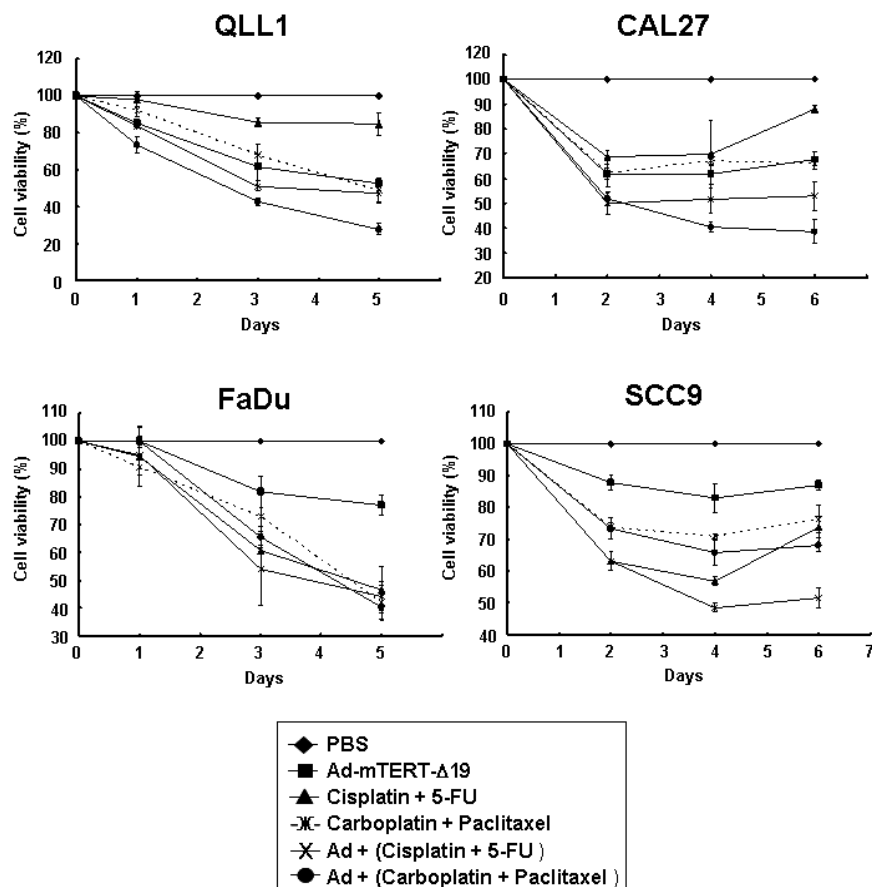


Figure 3. *In vitro* growth inhibition by combination therapy of Ad-mTERT- Δ 19 and cisplatin + 5-FU or carboplatin + paclitaxel. Monolayer of head and neck cancer cells was treated with PBS (◆), Ad-mTERT- Δ 19 (■), cisplatin + 5-FU (▲), Ad-mTERT- Δ 19 plus cisplatin + 5-FU (X), carboplatin + paclitaxel (⋈), Ad-mTERT- Δ 19 plus carboplatin + paclitaxel (●). For the combination therapy of adenovirus with chemotherapeutic agents, cells were infected with Ad-mTERT- Δ 19 at an MOI of 0.3 (QLL1), 0.5 (CAL27), 3 (FaDu), 0.3 (SCC9). At 24 hr post infection, cells were then exposed to cisplatin (1 μ M) + 5-FU (1 μ M) or carboplatin (10 μ M) + paclitaxel (1 nM) for 72 hr. MTT assay was performed to totally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.

cisplatin과 5-FU 항암제를 혼합하여 투여한 경우에 carboplatin과 paclitaxel 항암제를 혼합하여 투여한 경우와 유사하거나 약간 나은 세포살상을 유도하였다.

4. TUNEL assay를 통한 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 세포고사 관찰

종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19 또는 항암제를 단독투여 한 경우의 세포고사 유도 능력과 이들을 함께 병용투여 하였을 때 세포고사 진행이 상승적으로 증가하는지를 확인하기 위해서 세포고사의 중요한 생화학적 특징 중의 하나인 DNA 절편화를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 시행하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 양성 대조군으로 사용한 CPT-11을 처리한 모든 4 종류의 인체 두경부암 세포주의 경우에 거의 대부분의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 세포고사가 활발히 진행되고 있음을 확인하였다. 또한, Ad-mTERT- Δ 19 바이러스 또는 항암제를 단독으로 처리하였을 때 보다는 이들을 병용 투여 하였을 경우에 세포고사가 진행되고 있는 진한 갈색으로 염색된 세포들의 비율이 증가하였다. 특히, QLL1 세포주의 경우, Ad-mTERT- Δ 19 바이러스를 단독 처리하였을 때 약 10%미만의 세포들이 진한 갈색으로 염색된 반면 아데노바이러스와 carboplatin + paclitaxel의 항암제를 함께 투여한 경우는 약 80% 이상의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 바이러스와 항암제를 병용투여 할 때 현저히 높은 빈도로 세포고사가 진행되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 병용 투여법의 상승적 세포고사 유도는 다른 두경부암 세포들인 CAL27, FaDu, 그리고 SCC9에서도 관찰되었다.

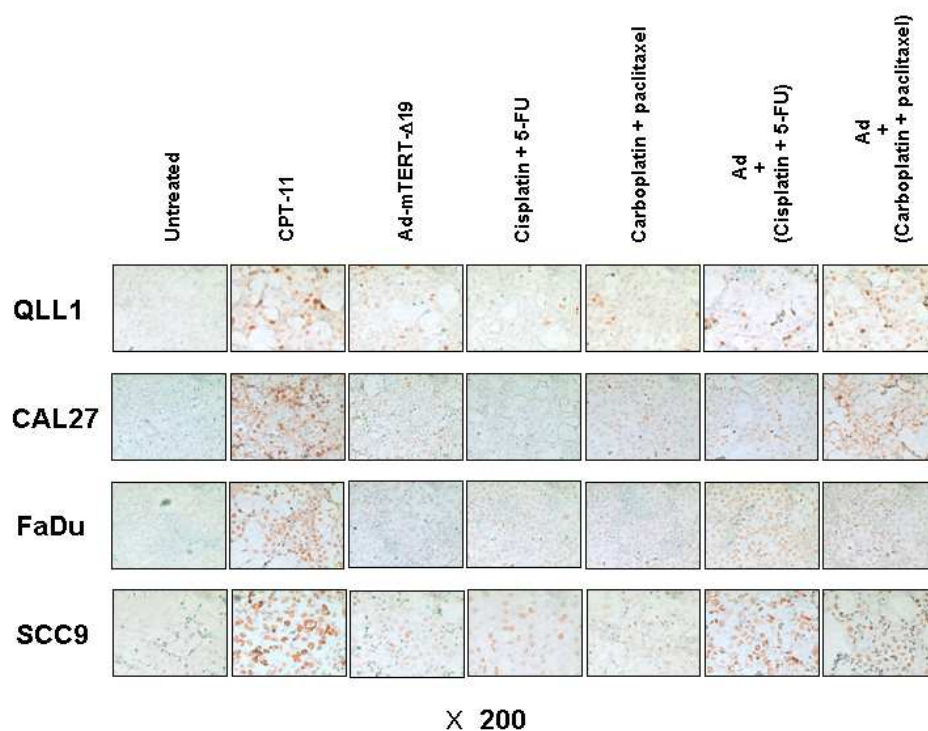
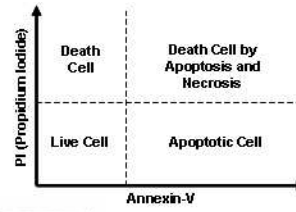


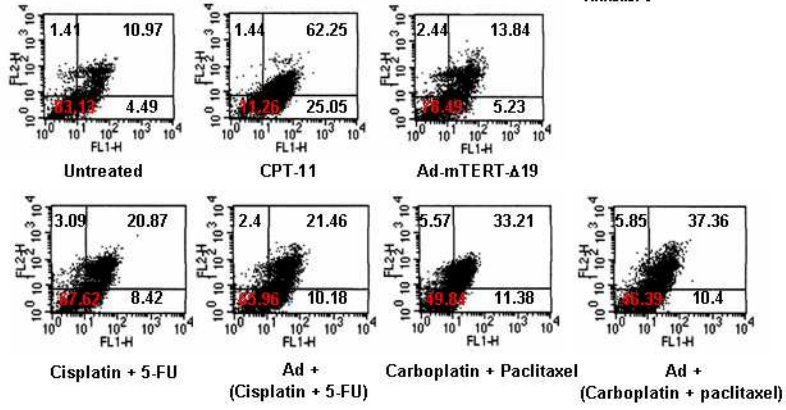
Figure 4. Efficient induction of apoptosis in combination therapy. At 48 hr after treatment without or with 1 M of camptothecin (CPT), Ad-mTERT- Δ 19, cisplatin + 5-FU, Ad-mTERT- Δ 19 plus cisplatin + 5-FU, carboplatin + paclitaxel, Ad-mTERT- Δ 19 plus carboplatin + paclitaxel, apoptotic cells were detected by TUNEL assay. Ad-mTERT- Δ 19 oncolytic Ad combined with chemotherapeutic agents showed significantly increased induction of apoptosis compared to the treatment with each single modality.

5. Annexin-V/PI 이중 염색을 통한 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 세포사멸 기전 검증

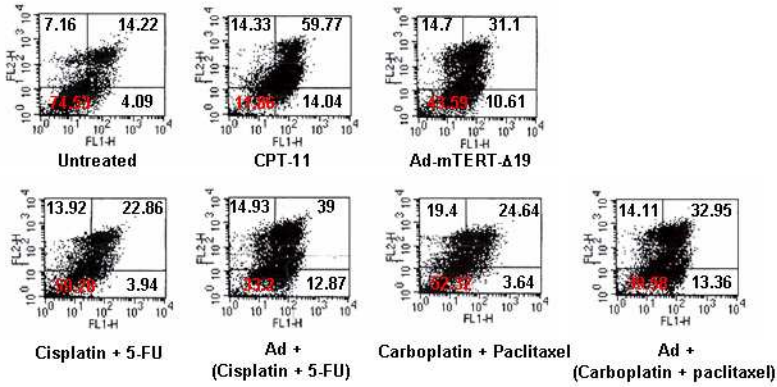
종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19 또는 항암제를 단독투여 한 경우의 세포고사 유도 능력과 이들을 함께 병용투여 하였을 때 세포고사 진행이 상승적으로 증가하는지를 알아보기 위해서, 초기 세포고사를 확인할 수 있는 Annexin-V와 propidium iodide(PI)로 이중염색(double staining)하여 유세포 분석을 시행하였다 (Fig. 5). 일반적으로 세포고사 과정이 진행되는 동안 세포막 안쪽에 주로 존재하는 phosphatidylserine(PS)은 세포막 밖으로 유출되게 되는데, Annexin-V는 세포고사 초기에 세포막 밖으로 유출되어 나온 PS를 검출할 수 있는 반면에 PI는 세포사 후기에 나타나는 현상인 세포막의 파괴로 PI가 세포내로 들어가 핵내에 있는 chromatin과 결합할 수 있어 세포괴사(necrosis)의 특징을 확인할 수 있다. 따라서 Annexin-V에 음성반응(-), PI에 음성 반응(-)을 보이는 세포 (Annexin-V⁻/PI⁻)는 건강한 세포를 의미하며, Annexin-V⁺/PI⁻는 세포고사가 일어난 세포, 그리고 PI⁺ 세포는 세포괴사가 일어난 세포를 의미한다. 네 종류의 두경부암 세포주(QLL1, CAL27, FaDu, SCC9)에 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스를 각각 1, 1, 3, 2 MOI로 처리하고 24시간 뒤 cisplatin(1 μ M) + 5-FU(1 μ M) 또는 carboplatin(10 μ M) + paclitaxel(1 nM)로 처리한 후 48-72시간 뒤에 FACS를 시행하였다. 그 결과, SCC9 세포주에 Ad-mTERT- Δ 19, cisplatin + 5-FU, 또는 carboplatin + paclitaxel을 단독 투여한 경우에는 각각 11.27%, 9.94%, 9.51%의 세포들이 초기 세포고사의 특성을 나타낸 반면, Ad-mTERT- Δ 19와 cisplatin + 5-FU, 또는 carboplatin + paclitaxel을 병용 투여한 경우에는 각각 16.03%와 18.6%의 세포들이 초기 세포고사의 특성을 나타내었다. 또한, 세포고사가 진행되고 있는 세포들



QLL1



CAL27



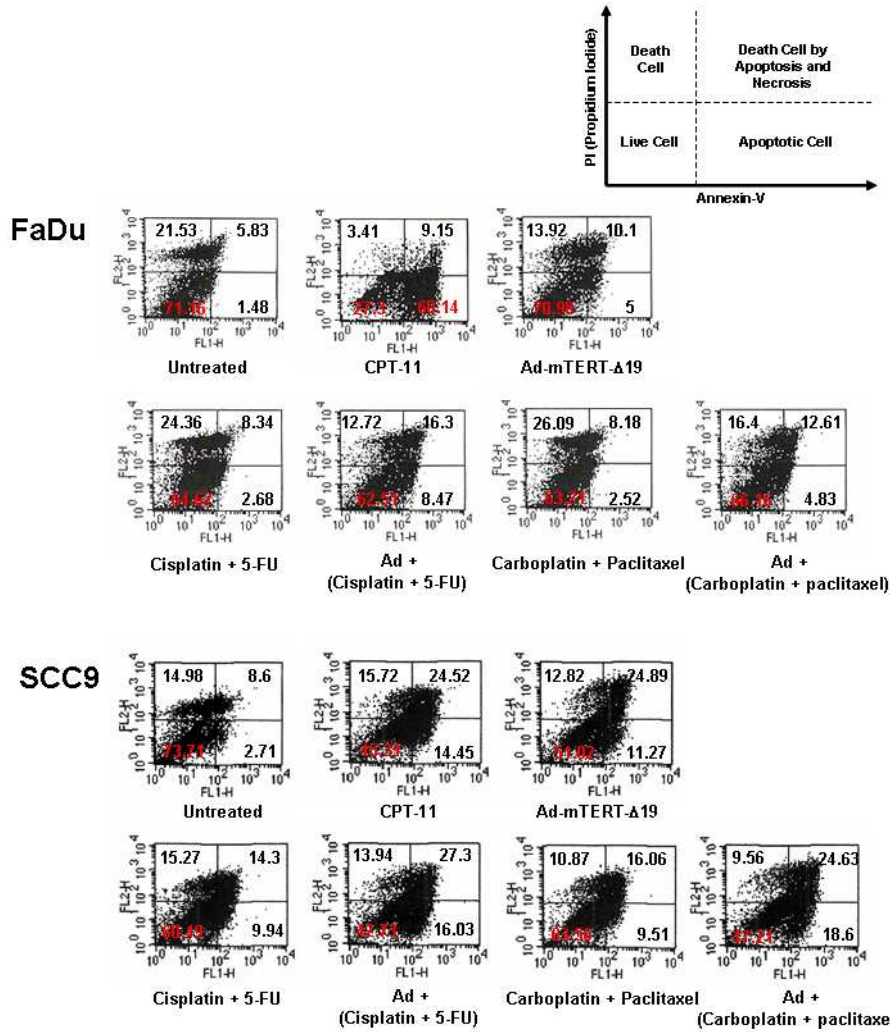


Figure 5. Analysis of early apoptotic cell population by Annexin-V/PI double staining. At 48 or 72 hr after treatment without or with 1 M of camptothecin (CPT), Ad-mTERT- Δ 19, cisplatin + 5-FU, Ad-mTERT- Δ 19 plus cisplatin + 5-FU, carboplatin + paclitaxel, Ad-mTERT- Δ 19 plus carboplatin + paclitaxel, cells were stained with Annexin-V-FITC and PI. The stained cells were analyzed by flow cytometry. Combination of oncolytic Ad and chemotherapeutic agents showed significantly increased apoptosis compared to the treatment with each single modality.

(Annexin-V⁺/PI⁻ + Annexin-V⁺/PI⁺)의 경우에도, Ad-mTERT-Δ19, cisplatin + 5-FU, 또는 carboplatin + paclitaxel을 단독 투여한 경우에는 각각 36.16%, 24.24%, 25.57%인 반면, 이들을 함께 병용투여 한 경우에는 각각 43.33%와 43.23%로 상승적으로 세포고사가 증대함을 확인할 수 있었다. 이러한 병용 투여에 따른 증대된 세포고사 유도능은 QLL1과 CAL27 세포주에서도 확인할 수 있었으며, FaDu 세포주의 경우에는, Ad-mTERT-Δ19와 carboplatin + paclitaxel을 병용 투여한 경우에 비해 Ad-mTERT-Δ19와 cisplatin + 5-FU를 병용 투여한 경우에 세포고사 빈도가 증가하였음을 확인 할 수 있었다.

6. 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 의한 생체 내 항종양 효과 비교 검증

종양 선택적 살상 아데노바이러스와 배합된 항암제를 병용투여 하였을 때, 이들을 단독으로 투여한 경우에 비해 생체 내 항종양 효과가 개선되는지를 알아보기 위해서, 인체 두경부암 세포주인 FaDu를 누드 마우스 복벽 피하에 접종하여 형성된 종양에 1×10^7 PFU의 Ad-mTERT-Δ19 바이러스를 이틀 간격으로 3회 종양 내에 직접 투여하였으며, cisplatin(4 mg/kg) + 5-FU(10 mg/kg)의 항암제 배합 또는 carboplatin(20 mg/kg) + paclitaxel(4 mg/kg)의 항암제 배합을 첫 번째 바이러스 투여 후 다음날부터 이틀 간격으로 복강 내에 3회 주사하였다. 음성 대조군인 PBS를 종양 내 3번 투여하고 생체 식염수를 3번 복강 내 투여한 누드 생쥐의 경우에는 종양의 크기가 바이러스 투여 후 24일경에 $2474.7 \pm 1351.8 \text{ mm}^3$ 정도로 빠르게 성장하였으나, cisplatin + 5-FU, 또는 carboplatin + paclitaxel을 단독 혹은 이들을 Ad-mTERT-Δ19 바이러스와 함께 병용 투여한 경우에는 음성 대조군에 비해 종양의 성장이 현저히 억제되었다(Fig. 6). 즉, cisplatin + 5-FU 또는 carboplatin + paclitaxel의 배합된 항암제를 단독으로 투

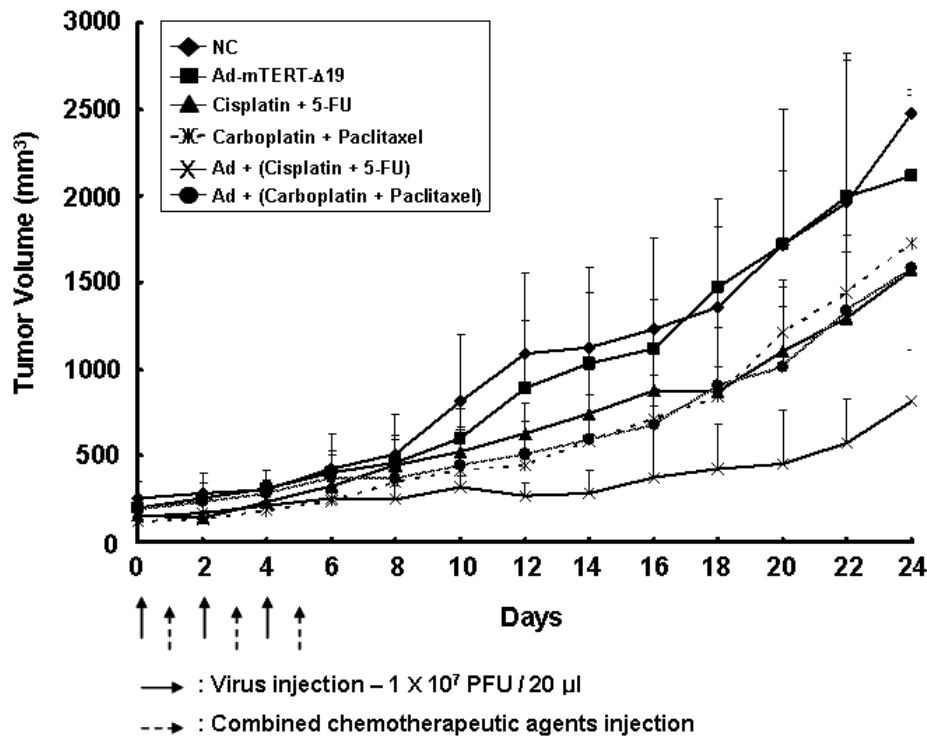


Figure 6. *In vivo* anti-tumor effect of the combination treatment of oncolytic adenovirus and chemotherapeutic agents. Human head & neck squamous cell carcinoma (FaDu) xenograft established in nude mice were grouped (n=4) and treated with PBS (◆), Ad-mTERT-Δ19 (■), cisplatin + 5-FU (▲), Ad-mTERT-Δ19 plus cisplatin + 5-FU (X), carboplatin + paclitaxel (⌘), Ad-mTERT-Δ19 plus carboplatin + paclitaxel (●). Tumor growth was monitored on a 2- to 3-day interval after each treatment. Data points represent the mean ± SE of the tumor size in each group at the indicated time points. Ad-mTERT-Δ19 Ad combined with cisplatin + 5-FU induced significantly more potent *in vivo* anti-tumor effect compared to the treatment with Ad or cisplatin + 5-FU alone.

여 받은 누드 생쥐의 경우에, 항암제 투여 후 24일경에 종양의 크기가 각각 $1569.9 \pm 523.9 \text{ mm}^3$ 와 $1728.7 \pm 361.1 \text{ mm}^3$ 로 항종양 효과를 관찰할 수 있었다($P < 0.05$). 또한, Ad-mTERT- $\Delta 19$ 바이러스와 cisplatin + 5-FU 또는 carboplatin + paclitaxel을 병용투여한 경우에는, 바이러스 투여 후 24일경에 종양의 크기는 $816.8 \pm 294.9 \text{ mm}^3$ 와 $1585.9 \pm 997.5 \text{ mm}^3$ 로 아테노바이러스와 항암제를 단독투여 한 경우에 비해 종양의 성장이 더욱 억제 되어 상승적인 항종양 효과를 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

외과적 수술 후에 MTD(maximal tolerated dose)의 다양한 항암약제 화학요법 사용에도 불구하고 종양의 재발은 여전히 공통된 현상이다. 더욱이 항암화학요법은 치료적 효과나 안정성을 개선하기 위한 두 가지 주요한 문제점을 가지고 있다²⁶. 이중 하나는 대부분의 항암화학 약제들은 독성을 비롯한 심각한 부작용을 가지고 있다는 것이고 나머지 주된 문제점은 약제에 내성을 갖는다는 것이다. 이러한 항암 약제들에 대한 종양 내성의 연구는 거의 항상 세포내 그리고 분자적 기전에 초점이 맞추어져 있었다. 그러나 어떤 결과들은 생리학적 기전들이 항암 약제에 대해 종양세포들이 내성을 갖는데 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다²⁷. 결국은 이러한 문제점을 해결하기 위해서 약제의 흡수를 증가시키거나 약제에 대한 내성을 감소시키고 또는 치료효과를 증가시키는 방법들을 모색하게 되었다. 그중 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 이용한 암치료는 항암화학요법과 함께 병합치료 될 때 치료 효율이 크게 증대될 수 있음이 여러 전임상 모델 및 임상시험 등을 통해 검증되고 있다. 병합 항암치료에 기초한 이론은 각기 다른 기전을 가진 항암 치료를 통해 종양세포를 공격하는 것이며, 이는 곧 종양 세포로 하여금 치료에 대한 저항성이 생기는 시간을 지연 및 억제 할 수 있다¹. 그러나 기존의 임상시험에 사용된 대부분의 종양 특이적 살상 아데노바이러스들은 세포고사 억제 기능을 가진 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 19kDa 단백질을 발현하여 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하게 되어, 그 결과 아데노바이러스와 항암제에 의해서 유도되어지는 세포 살상능을 감소시킬 수 있다.

따라서 본 연구에서는 두경부암을 대상으로 E1B 19kDa이 소실되어 암세포 살상능이 증대되고, 동시에 바이러스의 증식이 암세포

선택적으로 활성화되는 TERT 프로모터에 의해서 조절되는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19와 2 종류의 항암제들이 배합된 cisplatin + 5-FU와 carboplatin + paclitaxel 항암제를 함께 병용 투여하였을 때의 세포 살상능, 세포고사 빈도 및 생체 내 항종양 효과를 비교 검증해 보았다. 먼저 항암제 배합 전, 약 20%의 세포 살상능을 나타내는 농도에서 항암제 단독으로 사용하였을 경우보다 항암제를 배합하여 사용하였을 경우에 암세포 살상능이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 암세포 살상능을 정량화할 수 있는 MTT assay를 통해서 Ad-mTERT- Δ 19 바이러스와 2 종류의 항암제가 배합된 것을 단독 처리한 경우보다 이들을 함께 병합 처리한 경우에 보다 높은 세포 살상이 유도될 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, QLL1과 CAL27 세포주 경우에는, carboplatin + paclitaxel 항암제를 아데노바이러스와 병합하여 투여한 경우가 cisplatin + 5-FU 항암제와 아데노바이러스를 병합하여 투여한 경우에 비해 더 높은 종양 살상효과를 나타낸 반면에, FaDu와 SCC9 세포주 경우에는, cisplatin + 5-FU 항암제를 아데노바이러스와 병합하여 투여한 경우에 carboplatin + paclitaxel 항암제를 아데노바이러스와 병합하여 투여한 경우와 유사하거나 약간 나은 세포살상을 유도하였다. 이러한 결과들을 바탕으로, QLL1과 CAL27 세포주에서는 DNA 합성을 저해하지 않고 세포 주기를 정지시켜 세포 살상을 유도해 아데노바이러스의 증식을 저해하지 않는 paclitaxel이 포함된 항암제가 배합된 경우, 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 함께 투여될 때 보다 향상된 암세포 살상을 유도할 수 있음을 알 수 있다. 하지만, FaDu와 SCC9 세포주에서는 오히려 cisplatin + 5-FU 항암제와 아데노바이러스를 함께 병용투여 한 경우에 보다 나은 세포 살상이 유도되었기 때문에, 이러한 현상은 세포주의 특이성에 따라 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있다. 즉, 각각의 세포주들의 항암제에 대한 민감성이 다르고, 이에 따라 항암제와의 병합투여에 따른 암세포 살상정도가 달라질 수 있을 것으로 생각된다. 종양 선택적 살상

아데노바이러스와 항암제의 병용치리에 의해서 유도되어지는 세포고사를 보다 가시적·정량적으로 관찰하기 위해 시행한 Annexin-V/PI 이중 염색법을 이용한 유세포 분석과 TUNEL assay를 통해서도 Ad-mTERT- Δ 19 아데노바이러스와 배합된 항암제를 각각 단독으로 사용하였을 경우보다는 이들을 병용하여 처리하였을 때 세포고사 및 세포사멸이 월등히 증가함을 알 수 있었다.

여러 전임상 및 임상시험 결과들과 마찬가지로, 본 연구 결과 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암화학요법을 함께 병용 투여하는 경우에 보다 증대된 항종양 효과를 유도할 수 있음을 확인하였다. 병합 치료의 증가된 항종양 효과의 기전은 아직 확실히 규명되지는 않았지만, 이를 뒷받침 해주는 몇몇 가설들이 존재한다. 첫째, 아데노바이러스의 감염으로 세포내 p53의 발현이 증가하고, 그 결과 항암제에 대한 세포 민감성을 증대시켜 암세포 살상 효과를 증가시킬 수 있다는 것이다. 이러한 가설을 지지해 주는 것으로, 전립선암 선택적 살상 아데노바이러스인 CV787과 docetaxel의 병합치료시 p53의 발현이 증가됨이 보고 되었다⁸. 둘째, 대부분의 항암 약제들은 면역반응을 억제하기 때문에 아데노바이러스의 생체 내 면역반응을 억제하여 바이러스를 생체 내에 전신투여 하였을 때 고농도의 바이러스가 종양에도달할 수 있게 해준다는 것이다. 셋째, 아데노바이러스의 E1A 유전자의 발현은 항암제에 대한 종양세포의 감수성을 증가시킨다는 것이다²⁹.

본 연구에서 확인된 종양 선택적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 투여에 따른 향상된 항종양 효과는 암치료에 필요한 아데노바이러스 및 항암제의 투여량을 감소시켜 아데노바이러스에 의한 생체 내 독성을 크게 줄일 수 있을 뿐 아니라 항암제에 의한 부작용도 현저히 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이는 나아가 암 유전

자 치료의 안전성과 유용성을 증가시켜 암유전자 치료를 한걸음 진일보된 방안으로 확립하는데 일조 할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는, 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 19kDa가 소실되어 암세포 살상능이 증대되고 항암제에 의한 세포살상을 효과적으로 촉진하며, 동시에 바이러스의 증식이 암세포 선택적으로 활성화되는 TERT(telomerase reverse transcriptase) 프로모터에 의해 조절되는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19와 2가지 배합된 항암제, 즉 두경부암에 있어서 표준 항암화학치료에 이용되고 있는 cisplatin과 5-FU의 배합과 carboplatin과 paclitaxel의 배합으로 구성된 항암제를 단독 및 병용 투여하였을 때의 세포 살상능을 생체 내·외에서 비교 검증하였다. 그 결과, 아데노바이러스 및 배합된 항암제를 단독으로 처리하였을 때 보다는 이들을 병용 처리하였을 경우에 보다 효과적이고 상승된 항암효과를 유도 할 수 있음을 확인하였다. 이러한 암세포에 대한 살상능의 개선으로 암치료에 필요한 항암제 및 바이러스의 투여량을 감소시켜 바이러스에 의한 생체 내 독성과 면역반응을 크게 줄이고 동시에 정상세포에 대한 항암제의 독성을 줄여 효율적인 암치료 효과를 유도할 수 있을 것으로 기대한다.

VI. 참고문헌

1. Roland L. Chu, Dawn E. Post, Fadlo R. Khuri, and Erwin G. Van Meir. Use of replicating oncolytic adenovirus in combination therapy for cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5299-5312 Review
2. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Human Gene Therapy* 1998; 9:283-286
3. Grill J, Georger B, Lamfers M, Dirven C, Van Beusechem V, Gerritsen W, Vassal G Conditionally replicative adenoviruses: a second wind for cancer gene therapy. *Bull Cancer* 2003; 90:1039-1048
4. Runnebaum IB. Basics of cancer gene therapy. *Anticancer Research* 1997; 17:2887-2890
5. Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389:239-240
6. Dobbelsstein M. Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 273:291-334
7. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. In: *The internet book of gene therapy Cancer therapeutics*, Soval RE and Scanlon KJ. Eds. Appleton & Lange Stamford, CT 1994; 3-16
8. Bailar JC and Gornik HL. Cancer undefeated. *N. Engl. J. Med* 1997; 336:1569-1574
9. Bishop JM. Cancer: What should be done?. *Science* 1997; 278:995-998

10. Cohen EE, Rudin CM. ONYX-015. Onyx Pharmaceuticals. Curr Opin Investig Drugs 2001; 2:1770-1775
11. McCormick F. Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015. Cancer Biol Therapy 2003; 2:S157-160
12. Bischoff J, Kirn D, Williams A, Heise C, Horn S, Muna A, Ng L Nye Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 1996; 274:373-376
13. Yuanhao Li, De-Chao Yu, Yu Chen, Pinky Amin, Hong Zhang, Natalie Nguyen, and Daniel R. Henderson. A Hepatocellular Carcinoma-specific Adenovirus Variant, CV890, Eliminates Distant Human Liver Tumors in Combination with Doxorubicin. Cancer Res 2001; 61:6428-6436
14. De-Chao Yu, Yu Chen, Jeanette Dilley, Yuanhao Li, Millicent Embry, Hong Zhang, Natalie Nguyen, Pinky Amin, Joe Oh, and Daniel R. Henderson. Antitumor Synergy of CV787, a Prostate Cancer-specific Adenovirus, and Paclitaxel and Docetaxel. Cancer Res 2001; 61:517-525
15. Fadlo R. Khuri, *et al.* A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nature Medicine 2000; 6:879-885
16. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer Metastasis Rev 1992; 11:121-139
17. Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that

cis-diamminedichloroplatinum(II) and
 cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ
 only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res*
 1986; 46:1972-1979

18. Judit Kralovánszky, Csilla Katona, András Jeney, et al.
 5-Ethyl-2'-deoxyuridine, a modulator of both antitumour
 action and pharmacokinetics of 5-fluorouracil. *Journal of*
Cancer Research and Clinical Oncology 1999; 125:675-684

19. Orr GA, Verdier P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of
 Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003 Oct
 20; 22:7280-7295

20. D Kirn. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a
 replication-selective adenovirus for the treatment of cancer:
 what have we learned?. *Gene Therapy* 2001; 8:89-98 Review

21. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al. Phase II trial of
 intratumoral administration of ONYX-015, a
 replication-selective adenovirus, in patients with refractory
 head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19:289-298

22. Li, Yingming, Okegawa, Takatsugu, Lombardi, Donald P,
 Frenkel, Eugene P, Hsieh, Jer-Tsong, Enhanced transgene
 expression in androgen independent prostate cancer gene
 therapy by taxane chemotherapeutic agents. *The Journal of*
Urology 2002; 167:339-346

23. Lakshmi Rao, Digant Modha, Eileen White. The E1B 19K
 protein associates with lamins in vivo and its proper
 localization is required for inhibition of apoptosis. *Oncogene*
 1997; 15:1587-1597

24. Jaesung Kim, Jae Yong Cho, Joo-Hang Kim, Kyeong Cheon Jung, Chae-Ok Yun. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. 2002; 9:725-736

25. Eunhee Kim, Joo-Hang Kim, Ha-Youn Shin, Hansaem Lee, Jai Myung Yang, Jungho Kim, Joo-Hyuk Sohn, Hoguen Kim, Chae-Ok Yun. Ad-mTERT- Δ 19, a Conditional Replication-Competent Adenovirus Driven by the Human Telomerase Promoter, Selectively Replicates in and Elicits Cytopathic Effect in a Cancer Cell-Specific Manner. *Human Gene Therapy* 2003; 14:1415-1428

26. Hui Wang, Mao Li, John J. Rinehart, and Ruiwen Zhang. Pretreatment with Dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: *in vivo* activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:1633-1644

27. Teicher, B. A., Herman, T. S., Holden, S. A., Wang, Y. Y., Pfeffer, M. R., Crawford, J. W., and Frei, E., III. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only *in vivo*. *Science* 1990; 247:1457-1461

28. Yu DC, Chen Y, Dilley J, et al. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Research* 2001; 61:517-525

29. Wang XL, Qian XL, Zhao QZ, Xu ZG, Tang PZ. Effects of E1A gene on the growth and chemosensitivity of transplantation tumor of nude mice. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2003; 38:409-412

Abstract

Anti-tumor effects of combinatorial chemotherapy with tumor specific replicating adenovirus in Head & Neck squamous cell carcinoma

Pyung-Hwan Kim

*Department of Medical Science
The Graduated School, Yonsei University*

(Directed by professor Chae-Ok Yun)

The head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) affects an estimated 500,000 patients annually worldwide. At present, the combination therapy of chemotherapeutic agents, cisplatin and 5-fluorouracil(5-FU), has been used as a standard therapy for advanced HNSCC. Gene attenuated replication competent adenoviruses are being developed as novel anti-tumor therapeutics. Clinical trials with the ONYX-015 (*E1B 55kDa*-deleted) adenovirus in combination with chemotherapeutic agents (cisplatin, 5-FU) have demonstrated a synergistic antitumor effect. However, most of replicating adenoviruses used in combination therapy to date have their *E1B 19kDa* gene intact. Because the E1B19 protein is an anti-apoptotic agent, adenoviruses retaining their *E1B 19kDa* gene may interfere with the mode of action of some chemotherapeutic agents, resulting in attenuating the overall potency of these combination treatment. In our previous report, *E1B 19kDa*-deleted adenovirus, Ad-mTERT- Δ 19, which

encode the E1A gene driven by the uniquely modified m-hTERT promoter, elicited enhanced viral replication and cytopathic effects in a cancer cell-specific manner. For the aim of improving the therapeutic efficacy for HNSCC cancer, we investigated the value of different combinations of various chemotherapeutic agents combined with Ad-mTERT- Δ 19. We assessed the cytotoxic activity of each combination in four different HNSCC cancer cell lines, utilizing MTT assay. Our results show that the combination therapy with Ad-mTERT- Δ 19 and chemotherapeutic agents led to improved cytotoxic effect compared with a virus or chemotherapeutic agents alone treatment. The induction of apoptosis was also synergistically increased in cancer cells treated with Ad-mTERT- Δ 19 and chemotherapeutic agents, demonstrated by FACS analysis and TUNEL assay. Furthermore, combination therapy with Ad-mTERT- Δ 19 and chemotherapeutic agents exhibited superior anti-tumor effect in FaDu head and neck tumor *in vivo* compared with either agent alone. Overall, this study presents strong evidence for a synergistic effect when treatment of Ad-mTERT- Δ 19 is combined with chemotherapeutic agents.

.....
Key Words : gene therapy, combination therapy, cisplatin, 5-fluorouracil, carboplatin, paclitaxel