

Interleukin-12, granulocyte-
macrophage colony-stimulating factor
및 Herpes simplex virus-thymidine
kinase 를 발현하는 종양세포 살상
아데노바이러스와 전약제인
Ganciclovir 의 병합치료에 의한 항 종양
효과

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 지 성

Interleukin-12, granulocyte-
macrophage colony-stimulating factor
및 Herpes simplex virus-thymidine
kinase 를 발현하는 종양세포 살상
아데노바이러스와 전약제인
Ganciclovir 의 병합치료에 의한 항 종양
효과

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 지 성

Interleukin-12, granulocyte-macrophage
colony-stimulating factor 및 Herpes
simplex virus-thymidine kinase 를 발현하는
종양세포 살상 아데노바이러스와 전약제인
Ganciclovir 의 병합치료에 의한 항 종양
효과

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2010년 6월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 지 성

김지성의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2010년 6월

감사의 글

설레기도 하고, 긴장된 발걸음으로 대학원 면접 왔을 때가 엇그제 같은데 벌써 이렇게 졸업을 앞두고 있다니 실감이 잘 나지 않습니다. 대학을 졸업하면서 면역학을 공부하고 싶은 열정과 자신감 하나만으로 대학원을 지원하였고, 처음 공부를 시작하였을 때, 졸업할 때쯤이면 많은 것을 이룰 수 있을 것만 같았었는데, 이렇게 막상 졸업을 앞두고, 아직 부족한 점도 너무 많고, 배울 것도 너무나 많은 것 같아 이렇게 감사의 글을 쓰면서도 주춤하게 됩니다. 하지만, 2년 반이란 시간 동안 학문을 공부한다는 게 무엇인지, 과학이 무엇인지, 실험이 무엇인지, 아무런 기반도 안 잡혀있던 제가 윤채옥 교수님께 지도 받을 수 있었던 건 정말 큰 행운이었다고 생각합니다. 바쁜 일정에도 불구하고, 항상 저희들의 발전을 먼저 생각하시며, 언제나 열정적으로 저희를 가르쳐주시는 교수님의 마음은 언제나 저를 분발하게 북돋아주는 힘의 원천이었습니다. 진정한 과학자로서의 소양과 자세, 실험을 계획하는 것부터 결과를 해석하기까지 논리적으로 접근하는 방법을 알려주시고, 틀에 박히지 않은 다양한 방면에서의 학문적인 가르침 덕분에 어느 누구보다 값진 대학원 생활을 할 수 있었다고 생각합니다. 항상 남을 먼저 배려하고, 정이 많으신 우리 윤채옥 교수님, 회식 때, MT 땐 노는 것도 잘하는 사람이 공부도 잘한다며 화끈하게 저희와 함께 밤도 새주시는 우리 교수님, 때론 친구같이 때론 엄마 같은 교수님과 함께한 시간, 아낌없는 사랑, 가르침 잊지 않겠습니다. 마음 깊숙이 감사드립니다.

또한 많은 진료로 바쁘신 일정에도 따뜻한 마음으로 논문이 완성되기까지 자상하게 자문해주신 김주향교수님께도 감사 드립니다. 잠깐 지나가다 마주쳐도 항상 먼저 잘 지내냐고 안부 물으셨던 교수님의 따뜻한 마음 잊지 않겠습니다.

대학원 번역학 강의 수업을 들을 때, 더욱더 번역학의 매력에 빠져들게 했던 최인홍교수님! 교수님께 번역학 수업을 들으며 차분하고 빠짐없는 알찬 강의에 많은 것을 배울 수 있었고, 그런 교수님께 저의 논문 자문심사를 받을 수 있어서 더 감사했습니다. 논문이 완성되기까지 항상 따뜻한 관심으로 부족한 저를 지도해주셔서 감사합니다. 그리고, 진취적인 강은아 교수님! 실험하는 것부터 논문 쓰는 것까지 직접 당신의 경험을 비추어, 효율적으로 능률적으로 일을 하도록 좋은 조언도 따끔한 충고도 많이 해주셔서 교수님을 통해 깨달은 바가 많았습니다. 감사합니다.

지금 이 시간 감사의 글을 쓰면서 시간을 되돌아 보니, 저의 대학원 생활은 너무나 즐겁고, 값지고, 소중한 시간이었습니다. 물론, 때론 힘들 때도, 지칠 때도 있었지만 그때마다 옆에서 응원해준 선배님, 동기, 후배, 친구들이 없었다면, 이렇게 마지막까지 완주 할 수 없었을 것 같습니다. 먼저 실험실에 처음 들어와서 아무것도 모르던 저에게 많은 것을 가르쳐준 열정적인 경주언니! 언니와 함께 실험하면서 힘들 때도 있었지만, 언니와 떨어져서 처음으로 일본에서 혼자 실험할 때 깨달았습니다. 언니에게 배운 게 얼마나 많은지……시간가는 줄 모르고 열정적으로 함께 실험하던 그때가 그립습니다. 감사합니다. 실험실 만능 맥가이버 김인옥선생님! 석사 초기에 실험이 잘 안돼서 자책하는 모습의 절 보시곤, 아무렇지 않게 다가와 특유의 유머로 절 웃게

만드셨던 선생님! 표현은 서투르지만 선생님 덕분에 실험이 잘 안될 때에도 다시 금방 맘 잡을 수 있었습니다. 감사합니다. 그리고 실험실의 왕 언니이면서도, 저의 친언니 같은 민정언니! 그 동안 표현은 잘 못했지만, 첫 면접 때도, 2년 반이 지난 지금도, 언니는 한결같이 저에게 용기 북돋아주는 나의 언니! 입니다. 언니의 하트가 “뽕뽕” 들어간 따뜻한 응원의 쪽지는 앞으로도 큰 힘이 될 귀중한 선물입니다. 감사합니다. 자상하고 매너 있는 평환 오빠, 특유의 유머로 항상 즐겁게 해주시고 독특한 만화캐릭터 같은 오빠의 모습으로 실험하는 오빠의 모습 덕분에 웃음이 끊이질 않았습니다.

지금은 예쁜 아이의 엄마가 된 멋진 지영 언니! 밤늦게 까지 항상 한결같이 열심히 언니와 함께 실험을 마치고, 집으로 돌아가는 길에 나누었던 이야기들이 그때도 너무나 큰 힘이 되었었지만, 언니와 떨어져 있는 지금 더 생각이 납니다. Trifle “A” family~yo! 따뜻한 지훈 오빠, 나만의 counselor 가 되어주기도 하고, 가끔은 오랜 친구 같기도 한 언어 표현의 연금술사! 멋진 색감의 소유자! 일본에 계실 때 실험실로 걸려온 전화 목소리가 너무 좋아서 누구 일지 너무 궁금했었는데 그 기대를 저버리지 않고, 어떤 노래도 멋지게 부르시고, 유머러스하고, 후배를 잘 챙겨주는 오빠덕분에 정말 큰 힘이 되었습니다. 긍정의 힘! 아름 언니! 일본 가기 전에는 아름 언니와 함께 한 실험실에서 생활 할 기회가 없어서 아쉬웠었는데, 일본에서 함께 보낸 4일 동안 언니의 매력 속으로 속 빠졌었습니다. 밝고 항상 긍정적으로 생각하는 언니 덕분에 함께 할 때 항상 즐거웠고, 일을 능률적으로 처리하는 언니를 통해 배울 점도 많았습니다. “우리의 인연은 참 특별한 것 같습니다.” 실험도 일등!

가정에서도 일등! 저와 친한 쿨~한 정선 언니, 언젠가 초코파이 상자 위에 편지를 써주라며 조른 저에게 한편의 시와 같은 편지를 똑딱 멋지게 써준 언니, 웨스턴과 스테이닝에 있어서는 어느 누구보다 잘하는 언니를 통해 저도 많이 배웠습니다. 언니와 함께하는 시간은 항상 유쾌한 시간이었습니다. 우리 실험실 유머남, 곰돌이 최기자 정우 오빠! 실험에 있어서는 스피드 있게 일도 잘하여 본받고 싶고, 놀 때 항상 즐겁고 유쾌하게 분위기를 만들어주어, 오빠의 특유의 미소에 저 또한 웃음이 끊이질 않았습니니다. 정말 우리 실험실에서 없어서는 안될 분위기 메이커인 것 같습니다. 실험실의 면역학 팀장! 일규 오빠! 항상 남을 먼저 배려하고 아끼는 헌신적인 모습과 면역학에 있어서는 항상 누구보다 자신 있는 모습이 정말 멋졌습니다. 후배이지만 먼저 인정해주며, 배려해주는 오빠를 통해 깨달은 점이 많았습니다. 정말 감사합니다. 그리고 나와 생일이 같은 송남 오빠! 박정현의 R&B부터 송대관의 구수한 트로트까지 모든 장르를 섭렵하신 것처럼, 학문에 있어서는 무엇이든 척척 빠르게 잘 해내고, 항상 논리적으로 생각하려 노력하시는 오빠! 가끔 오빠만의 개성 있는 개그로 박장대소 하게 만드는 오빠 덕분에 즐겁게 함께 면역학을 공부할 수 있어서 좋았습니다. 엉뚱한 것 같기도 하고, 생각이 참 많은 태진 오빠! 툭툭 쏘는 경상도 말투로 가끔은 무안을 주기도 하지만, 암연구소의 특유한 매력의 소유자! 유쾌한 오빠 덕분에 즐겁게 실험 할 수 있었습니다. 그리고 듬직하고 마음 넓은 성실한 오준 오빠! 후배들이 힘들어 보이면 상큼한 과일주스로 충전도 시켜주시고, 실험실 일에 있어선 똑 부러지게 일 처리도 잘 하시는 척척 박사! 묵묵히 옆에 있어주는 것 만으로

도 든든하고 믿음직스럽습니다. 큰 힘이 되어 주어 감사합니다. 상
큼 깜찍 발랄한 민주언니! 첫 면접 때 점심시간이 되었으니 밥 먹
고 하자며, 언니 밥 반 그릇을 뚝 떼어 주신 밝은 미소의 민주언니!
그때 그 밥 덕분에 힘이 나서 면접도 잘 마칠 수 있었습니다. 신실
한 성미! 항상 밝고 건강미 넘치는 모습으로 응원해주며, 무슨 일
이든 척척 언니처럼 잘 해내던 모습에 함께 있으면 기운이 넘쳤습
니다. 나의 동기 따뜻한 마음의 연아! 실험 중 첨단 관에서 암연구
소까지 갑자기 찾아온 연아는 항상 따뜻한 마음으로 지친 마음을
달래주곤 했습니다. 그리고 나의 듬직한 동기 우리~혜원이! 혜원이
는 “우리~혜원이”가 참 어울립니다. 새 병원 아지트에서 서로 응
원해주며, 의지했던 정말 없어서는 안될 나의 “소울메이트” 였습니
다. 함께 였던 그 시간들이 그림습니다. 그리고 이제 실험실에서
열정적으로 꿈을 펼쳐나갈 부지런한 리연언니! 시대의 아이콘 깜찍
발랄 성격이! 볼수록 매력적인 “볼매” 언주! 에게 감사의 마음을
전합니다. 그리고 의대 학부일정도 바쁠 텐데 연구의 열정으로 저
를 더욱더 분발하게 만들었던 “청순 민경”, “귀여운 지혜”, “월리
재호”, 말없이 조용히 우리 실험실 일을 이끌어 준 “내 친구 선아”,
“애교만점 고은이”, 그리고 지금의 “믿음직스러운 선정언니” 에게
도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 공부하고 싶은 만큼 맘껏 하라
며 학비도 대준다고 했던 내 친구 리나! 내가 누구에게든 자신 있
게 자랑스럽게 소개해 주고픈 소중한 참 바르고 마음 예쁜 사랑
하는 친구, 날 언제나 믿어주는 리나 덕분에 멀리 있어도 항상 듬
직했습니다. 힘들 때 짧은 전화 통화 한번으로도 큰 힘이 된 나의
소중한 친구들~나의 보금자리를 함께 알아봐줬던 너무 고마운 늘

씬하고 마음도 예쁜 이지! 얼굴도 마음도 선한 단짝 친구 심선! 첼로도 일렉 기타도 못하는 게 없는 멋진 노갱이! 벌써 두 아이의 엄마가 된 행복한 가정을 멋지게 꾸린 유진이! 에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 마지막으로 이 세상에서 가장 존경하는 두분 어머니, 아버지, 이제야 철이 든 건지……제가 그 동안 해드린 게 너무 없는 것 같아 두분 생각만으로도 목이 메입니다. 자주 못 내려가서 전화만으로 안부 여쭙는 게 전부인 자식 전화에, 항상 평소보다 한 톤 높은 밝은 음색으로 “우리 공주”라며 전화 받으시는 우리 부모님, 공부하는데 신경쓰일까봐 힘든 내색 전혀 안 하시고, 항상 묵묵히 그 자리에서 버팀목이 되어주시는 두 분의 쉬지 않는 기도로 정말 이렇게 성장 할 수 있었습니다. 정말 존경하고 사랑합니다. 그리고 항상 어느 자리에서든 책임감 있고 성실함으로 묵묵히 나아가는 멋진 우리 오빠! 막상 오랜만에 만났을 때에는 무뚝뚝함으로 정을 표현하지만 든든한 오빠가 있어주어 너무 고맙고, 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 명성 오빠 최고!! 항상 “우리 강아지”라며 아무것도 해드린게 없는 손녀딸을 위해 기도해주시고 챙겨주시는 할머니께도 그리고 하늘에서 편히 계실 할아버지께도 감사 드린다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 항상 중보기도로써 저의 든든한 기도 후원자가 되어주신 빛과소금교회 목사님과 집사님께 감사 드립니다. 마지막으로 이렇게 부족한 저를 인도 하시여 석사과정을 잘 마치게 해 주신 나의 선한 목자, 하나님께 감사와 영광을 드립니다. “나의 가는 길을 오직 그가 아시나니 그가 나를 단련하신 후에는 내가 정금같이 나가리라” 욥기23장 10절 말씀. 아멘.

저자 씀

<차 례>

국문요약	1
I. 서론	5
II. 재료 및 방법	9
1. 대상 세포주 및 세포 배양	9
2. 실험동물	9
3. IL-12 와 GM-CSF, HSV-TK 를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 제작, 생산 및 역가 산출	10
4. IL-12, GM-CSF, HSV-TK 단백질 발현 양상 규명.....	11
5. HSV-TK 단백질 발현 측정을 위한 immunoblotting	12
6. Cytopathic effect(CPE)분석	12
7. HSV-TK 를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증식능에 대한 GCV 의 영향 검증	12
8. MTT assay 에 따른 세포 생존율 검사	13
9. 생체내 항종양 효과와 생존율 검증	14
10. 마우스 생체내의 비장 세포의 조제	14

11. CTL 활성 측정	15
12. IFN- γ ELISpot assay	16
13. 종양조직 내 사이토카인 발현량 측정.....	16
14. 유세포 분석에 의한 마우스 비장 세포의 특성 변화 관찰	17
15. IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 를 발현하는 복제가능 아데노바이러스 투여와 GCV 의 병합치료에 따른 종양조직의 변화 관찰	17
III. 결과	19
1. IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 IL-12, GM-CSF, HSV-TK 의 발현 양상 규명.....	19
2. IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 유전자 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석	22
3. HSV-TK 를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증식능에 대한 GCV 의 영향 검증	23
4. MTT assay 에 따른 세포 생존율 검사.....	25
3. 아데노바이러스의 항종양 효과와 생존율 검증.....	28
4. 암세포 특이적 면역반응 활성 검증.....	30
5. 마우스 비장세포의 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T 세포 군집변화	30

6. IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ 의 종양내 발현량 측정	31
7. IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 를 발현하는 복제가능 아데노바이러스 투여와 GCV 의 병합치료에 따른 종양조직의 변화 관찰.....	33
IV. 고찰.....	37
V. 결론	41
참고문헌	42
영문요약	47

그림 차례

Figure 1. Schematic representations of the adenoviral vectors used in this study	20
Figure 2. Measure of IL-12, GM-CSF and HSV-TK expression secreted by A549 cells infected with Ads	20
Figure 3. CPE formation of adenoviruses expressing IL-12, GM-CSF or plus HSV-TK	22
Figure 4. Viral production assay	24
Figure 5. MTT assay.....	26
Figure 6. Antitumor effect of in vivo	29
Figure 7. Induction of cancer cell specific immune response.....	30
Figure 8. Analysis of immune cell population.....	30
Figure 9. Increased local IL-12, GM-CSF, or IFN- γ expression following treatment with Ad- Δ B7/IL12/GMCSF-TK plus GCV	32

Figure 10. Histological change in tumors and TUNEL
assay for detecting apoptotic cells in tumor
section..... 35

국문요약

Interleukin-12, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 및 Herpes simplex virus-thymidine kinase 를 발현하는 종양세포 살상 아데노바이러스와 전약제인 Ganciclovir 의 병합치료에 의한 항 종양 효과

암은 종양 내 면역 억제 환경(immunosuppressive tumor microenvironment)을 조성함으로써, 다양한 숙주 면역반응을 회피하고, 파괴하며, 결과적으로 종양의 생존을 촉진 하는 특징을 가진다. 따라서 최근에는 종양 내 면역 억제환경을 개선하여 암세포에 대한 면역반응을 증진 시키고자 interleukin (IL)-12, IL-18, IL-23, interferon-gamma(IFN- γ), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF), tumor necrosis factor(TNF) 와 같은 사이토카인 유전자, B7 분자와 같은 동 자극 유발 인자, 직접적으로 APC 의 역할을 하는 수지상세포(DC), 종양항원으로 활성화시킨 T Cell 등을 이용하여 향상된 항암 면역치료 효과를 얻고자 하는 다양한 연구가 진행 되고 있다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고, 여전히 종양 면역치료는 종양의 낮은 면역원성으로 인하여 치료 효과가 제한 되고 있는 실정이다. 따라서, 종양의 면역억제 환경을 개선함과 더불어, 종양의 면역원성을 높여 치료효과를 높이기 위해 최근에는 종양 특이적

아데노바이러스를 이용한 면역치료와 함께 방사선 치료, 항암 화학요법 등을 병행하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 종양 특이적 살상 능력 특이성이 보다 개선된 RdB 아데노바이러스를 이용하여 일차적으로 감염된 세포뿐만 아니라 바이러스의 증식에 따른 종양특이적 세포살상과 E1 부위에 IL-12, E3 부위에 GM-CSF 를 도입하여, 숙주의 종양특이적 면역체계를 활성화 시켜 항종양 효과를 증대시키고, 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 아데노바이러스 E3 부위에 동시에 도입하여, ganciclovir(GCV)의 병용 투여로 인한 세포 살상 효과와 바이러스에 감염되지 않은 암세포까지 bystander effect 를 통한 세포살상으로 극대화된 항종양 효과를 유도하고자 하였다. C57BL/6 마우스의 LLC 종양 모델에서 항종양 효과를 검증한 결과, RdB/IL12/GMCSF 에 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스를 투여한 경우 증대된 항종양 효과를 관찰할 수 있었으며, RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스와 GCV 를 병용 투여한 경우 더욱 증대된 항종양 효과가 유도됨을 확인하였고, 병합치료 군의 5 마리 중 3 마리는 종양이 완전히 사라짐을 관찰하였다. 또한, 생체 내 생존을 검증 실험에서도 역시 RdB/IL12/GMCSF-TK+ GCV 병합치료 군에서 가장 높은 생존율을 관찰할 수 있었다. 그렇다면, 이러한 극대화된 항종양 효과 유도가 생체 내의 어떠한 변화에 의한 것인지 검증하고자, 종양 조직 절편의 H&E 염색과 과 면역 화학 염색법을 시행한 결과, RdB/IL12/GMCSF-TK+ GCV 병합치료 군에서 종양조직의 괴사가 조직 전반적으로 넓게 관찰되었을 뿐만 아니라,

종양 조직 내로의 림프구의 침윤이 확연히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 침윤된 림프구의 세포 군들을 면역 조직 화학 염색법(immunohistochemistry, IHC)을 통하여 관찰한 결과, 확연히 증가된 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포를 확인할 수 있었으며, TUNEL assay 를 통한 세포고사를 확인해본 결과, 대조 군에 비하여 병합치료 군에서 종양 주위뿐 아니라 종양 내 전반적으로 세포고사가 일어났음을 확인할 수 있었다. 또한 종양 내 사이토카인 발현을 조사해 본 결과, 숙주의 면역 활성화와 항 종양 효과에 중요한 사이토카인으로 알려진 IL-12, GM-CSF, IFN- γ 발현이 다른 대조군에 비해 현저하게 증가함과 동시에 종양의 성장을 촉진시킬 수 있는 사이토카인으로 알려진 TGF- β 의 경우 PBS 에 비해 치료군에서 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

이렇게 종양 내 면역체계를 활성화 시킬 수 있는 사이토카인의 발현을 통해 면역억제가 개선 된 종양 내에서 암세포 특이적인 CD4⁺, CD8⁺ T 세포는 Type-1 면역 반응을 유도하고 효율적으로 종양 살상을 유도하며, 바이러스의 종양특이적 살상과 GCV 로 인한 극대화된 살상효과로 종양 면역원성이 증가함에 따라 결과적으로, 종양특이적 면역활성이 단독치료에 비하여 더 극대화 되었음을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서 이용된 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 전약제의 GCV 의 병합 치료는 종양 선택적 아데노바이러스인 RdB 에 의해 유도되어지는 종양 세포 특이적 살상 효과뿐만 아니라, 종양 내 면역 억제를 개선시키고 항종양 효과를 유도하는 IL-12, GM-CSF 의 종양 세포 특이적 고 발현과 종양 내 TK 의

발현으로 인한 GCV 의 활성화로 종양의 면역원성이 증대되고, 효율적인 면역활성을 유도함으로써 한 층 더 증대 된 종양 세포 특이적 항종양 효과를 유도할 수 있으며, 기존의 단독 면역치료 요법, 방사선 요법, 항암화학 요법에서의 제한된 치료를 극대화시킬 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 증대된 항암 면역반응으로 국소적인 암의 치료는 물론 전이 암의 치료 및 암의 재발 억제에도 유용하게 이용 될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심 되는 말: 종양 내 면역억제환경, IL-12, GM-CSF, HSV-TK, GCV 병합 치료

Interleukin-12, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 및 Herpes simplex virus-thymidine kinase 를 발현하는
종양세포 살상 아데노바이러스와 전약제인 Ganciclovir 의
병합치료에 의한 항 종양 효과

<지도교수 윤 채 옥>

연세대학교 대학원 의과학과

김 지 성

I. 서론

암 치료제의 급속한 발전에도 불구하고, 암은 여전히 전 세계적으로 사망률이 높은 질환 중의 하나이다. 기존의 임상적으로 사용되고 있는 주요 암 치료 방법은 외과적 수술, 방사선 치료, 항암제 치료 방법으로 또는 이를 병행하는 치료로서 최대한 암세포를 환자에게서 제거해 내는 방법이다. 하지만, 이러한 치료는 비교적 초기 암으로 전이가 되지 않은 상황에서 암세포를 완전히 제거했을 때 치료효과를 보이며, 빠르게 분열하는 다른 정상적인 세포들도 죽여 여러 부작용을 일으킬 수 있다는 단점이 있다. 따라서 최근에는 면역치료 방법으로 우리 몸의 종양 특이적 면역활성을 유도하여 암을 치료하고자 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁻⁴

그러나, 암은 종양 내 면역 억제 환경 (immunosuppressive tumor microenvironment)을 유도함으로써, 다양한 숙주 면역반응을 교묘히 회피하고, 파괴하며, 결과적으로 종양의 생존을 지속적으로 촉진할 뿐만 아니라, 면역 체계가 활성화 되었다더라도 활성화된 항 종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력을 가진다는 점에서 면역치료 역시 그 한계가 제기되고 있는 실정이다⁵⁻⁶. 따라서 종양 내 면역 억제환경을 개선하여 암세포에 대한 면역반응을 증진 시키고자 interleukin (IL)-12, IL-18, IL-23, interferon-gamma (IFN- γ), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor (TNF) 와 같은 사이토카인 유전자, B7 분자와 같은 동 자극 유발 인자, 직접적으로 antigen presenting cell(APC)의 역할을 하는 수지상세포(DC), 종양항원으로 활성화시킨 T Cell, Natural killer 세포(NK cell)등을 이용하여 증진된 항암 면역치료 효과를 얻고자 하는 다양한 연구가 진행되고 있다⁷⁻⁹. 특히, IL-12 는 주로 단핵세포(monocytes), 대식세포(macrophages), 그리고 DC 등과 같은 antigen presenting cell(APC)로부터 분비되며 암 세포를 효과적으로 제거할 수 있는 cytotoxic T lymphocyte(CTL)와 natural killer(NK) 세포에 직접 작용하여 이들을 활성화 시키고 IFN- γ 의 분비를 유도할 뿐만 아니라 암 세포에 대한 살상 능력 또한 증강시키는 것으로 알려져 있으며¹⁰, 또한 naive CD4⁺ 림프구에 작용하여 T helper 1 세포(Th1)로의 분화를 촉진시켜 결국 항암 면역 반응에 중추적인 역할을 하는 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 유도하고 증강 시킴으로써 항암 면역 반응을 활성화시키는데 중요한 역할을 한다¹¹⁻¹⁴. 한편, GM-CSF 는 DC 을 자극하여 antigen presenting cell(APC)로의 분화를 촉진시켜 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포들의 면역반응을 강화시켜 주는 역할을 하며, 또한 primary monocyte 에서 MHC class II를 구성하는

분자들의 발현 조절에도 관여한다¹⁵. 더불어, 종양 내에 GM-CSF 의 발현을 통한 효과로 종양 주변으로 많은 APC 들이 모이게 유도함으로써, 종양 항원을 효과적으로 processing 하여 강한 항암 면역반응을 유도함이 보고되었다¹⁶⁻¹⁷. 이를 바탕으로, 본 연구실에서도 E1B 55kDa 유전자가 소실된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 YKL-1(Ad-ΔE1B55)를 이용하여 IL-12 의 항종양 효과를 보고한 바 있으며¹⁸, E1B 유전자의 소실과 E1A 의 Rb 결합부위가 변이되어 이보다 종양 선택적 살상능이 증진된 RdB 아데노 바이러스를 이용하여 GM-CSF 의 항종양 효과 또한 보고한바 있다¹⁹. 하지만, 종양 내 면역 억제 환경이 개선 될지라도, 종양의 낮은 면역원성으로 인하여 여전히 면역 치료법으로 암을 완전히 치료하기에는 많은 한계점들을 드러내고 있다. 따라서 종양 내의 면역활성과 함께 면역원성을 증대 시키기 위한 한가지 방법으로서 Herpes simplex virus(HSV)의 thymidine kinase(HSV-TK)나 E.coli 의 cytosine deaminase(CD)와 같은 약제 감수성 유전자등을 병합함으로써 극대화된 암세포 살상뿐만 아니라 암세포의 면역원성으로 하여 종양특이적 면역활성을 증대 시키고자 연구가 진행 되고 있다²⁰⁻²⁵.

HSV-TK 는 DNA 합성시 salvage pathway 에 이용되는 효소로 독성이 없는 전약제인 ganciclovir(GCV)를 인산화 시켜 활성화된 ganciclovir triphosphate 형태로 전환된다. 이렇게 인산화된 GCV 는 nucleotide analogs 로서 작용되어 DNA 합성시 DNA 사슬에 삽입되어 DNA 사슬의 형성을 중단시켜 결과적으로, DNA 합성을 억제하게 된다. 즉, 정상세포에는 독성을 일으키지 않는 전약제인 GCV 를 전신적으로 투여하였을 때, HSV-TK 를 발현하는 종양 특이적 바이러스에 감염된 암세포에서만 GCV 의 인산화가 유도되어 암세포를 사멸시킬 수 있게 된다. 또한 HSV-TK 가 이입되지 않은 암세포에서도 인산화된 GCV 가 세포 사이의 gap junction 을 통해 들어가 세포 사를 일으키는 bystander

effect 를 통하여, 극대화된 세포살상을 유도할 수 있으며²⁶, 이것은 현재 암 치료를 위한 유전자 요법의 가장 큰 제한인 모든 암세포에 치료유전자를 이입할 수 없다는 결점을 부분적으로 보완 할 수 있다는 점에서 중요한 의미를 갖는다.

이러한 연구들을 바탕으로, 본 연구에서는 종양 특이성과 살상능이 보다 개선 된 RdB 아데노바이러스 E1 부위에 IL-12, E3 부위에 GM-CSF 를 도입하여, 바이러스의 증식에 따른 종양 특이적 세포 살상과 종양 내 사이토카인의 지속적 발현을 통한 면역 억제를 개선 시켜, 종양 특이적 면역 체계의 활성화와 항 종양 효과 증대를 유도하고자 한다. 더불어 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 아데노바이러스 E3 부위에 동시에 도입함으로써, ganciclovir(GCV)의 병용 투여를 통한 “bystander effect”로 극대화된 세포 살상 유도하여 암 세포에 면역원성을 부여하고, APC 의 antigen presenting 능력을 강화시킴으로써, 결과적으로 증대된 항 종양 효과가 일어날 수 있는지 검증 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주(U343), 인체 간암 세포주(Huh7), 마우스 간암 세포주(BNL), 인체 폐암 세포주(A549, H358, H460) 마우스 폐암 세포주(LLC, CMT64), 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주유전체내에 내재되어 있는 293 세포주이며, 이들 세포주들은 모두 ATCC(America Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, H460(10%우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 배지)를 제외한 모든 세포주는 5% 또는 10%의 우태아 혈청(Terracell)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo) 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin(invirogen)을 첨가하여 5% CO₂의 조건에서 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 실험동물

생체 내 항종양 실험은 6~8 주령 된 체중 20~25g 내외의 C57BL/6 수컷 생쥐를 SLC(Japan SLC, Inc., Japan)에서 구입하여 시행하였다. 동물 사육실의 온도는 22 ± 2℃, 습도는 55~60% 로 유지시켰으며, 명암 순환이 12 시간 단위로 조절되게 하였고, 방사선 조사로 멸균한 고형사료(중앙 실험동물, Seoul, Korea)와 멸균된 급수를 자유로이 섭취하게 하였다.

3. 재조합 아데노바이러스의 제작 및 생산

IL12와 GMCSF를 동시에 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위하여 pCA14/IL12 벡터에 삽입되어 있는 murine IL12를 *Sna*BI과 *Sa*II 제한효소를 처리하여 2.4Kb의 DNA절편을 얻은 뒤 pXC1/IL12 셔틀벡터를 제작하였다. 또한, pGL3 basic 클로닝 벡터에 삽입되어있는 murine GMCSF를 *Hind*III 제한효소로 처리하여 약 800 bp의 DNA 절편을 획득한 뒤, pSP72dE3/GMCSF 셔틀벡터에 삽입한 후, pvdml324BstB토탈벡터(S.B. Verca, University of Fribourg, Switzerland)와 함께 대장균 BJ5183에 형질 전환시켜 상동재조합을 유도하여 dl324/GMCSF 토탈벡터를 제작하였다. 이렇게 제작된 dl324/GMCSF 토탈벡터를 pXC1/IL12 셔틀 벡터를 함께 대장균 BJ5183에 형질 전환시켜 RdB/IL12/GMCSF 바이러스를 제작하였다. 또한, RdB/IL12/GMCSF-TK 아데노바이러스를 제작하기 위하여 GM-CSF-IRES(사이토카인 은행, 전북대학교) 를 주형으로 sense primer(5'-acggatccaccatgtggctgcagaatttacttttc-3')와 antisense primer(5'-caagatctttatcatcgtgttttcaaaggaaaa-3')를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction) 을 수행하였으며 생성된 PCR산물을 *Bam*HI, *Bg*III 로 절단한 단편을 *Bam*HI 으로 절단하여 얻은 pSP72dE3/CMV에 삽입하여 GMCSF, IRES유전자가 삽입된 E3 셔틀 벡터인 pSP72dE3/CMV/GMCSF-IRES를 제작하였다. 여기에 HSV-TK 유전자를 삽입하기 위해 pSP72dE3/CMV-TK polA를 *Bam*HI으로 절단하여 얻은 TK 유전자를 *Bg*III 로 미리 절단한 pEGFP-N1 벡터에 삽입하고 이를 다시 *Hind*III로 절단하여 *Hind*III로 절단한 pSP72dE3/CMV/GMCSF-IRES 에 삽입하여 GMCSF와 HSV-TK가 동시에 발현되는 셔틀벡터인 pSP72dE3/CMV/GMCSF-IRES-TK를 제

작하였다. 이를 *PvuI*으로 절단한 후 *BstBI* 제한효소로 단일가닥이 된 아데노바이러스 vmd1324Bst 와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동재조합(homologous recombination)을 유도하였다. BJ5183에서 획득한 DNA는 다시 DH5a 대장균에 형질 전환시켜 증폭시키고 이를 *HindIII* 제한효소로 처리하여 재조합 된 아데노바이러스 유전체들을 선별하였다. dl324dE3/GMCSF-TK 아데노바이러스 DNA를 *BstBI*으로 절단하고 pXC1RdB/IL12을 *NdeI*으로 절단하여 단일 가닥으로 만든 뒤 대장균 BJ5183에 동시 형질 전환시켜 유전자 상동재조합을 유도하였다. 이를 다시 DH5a 대장균에 형질 전환시켜 DNA를 증폭시키고, 복제 불능 아데노바이러스와 같은 방법으로 확인하여 재조합 된 최종 DNA를 얻었다. 재조합이 확인된 이들 DNA는 293 세포 주에 형질 전환시켜 RdB/IL12/GMCSF-TK 재조합바이러스를 생산, 증식하였으며, limiting titration assay방법으로 바이러스의 역가를 결정하고, CsCl gradient를 이용하여 농축 및 분리하였다.

4. IL-12 와 GM-CSF 단백질 발현 양상 규명

A549 인체 폐암 세포주(3×10^5 개)를 6-well 플레이트에 분주한 다음날 재조합 아데노바이러스 RdB/IL12/GMCSF(1,5 MOI), RdB/IL12/GMCSF-TK(1,5 MOI)를 각각의 역가로 감염시키고 48시간 후 culture media를 회수하여 IL-12와 GM-CSF의 발현을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 확인하였다.

ELISA 의 전 과정은 mouse IL12 ELISA kit(e-bioscience), mouse GMCSF ELISA kit(MBL, Nagoya, Japan)의 설명서에 따라 상기에 서술된 동일한 방법으로 시행하였다.

5. HSV-TK 단백질 발현 측정을 위한 immunoblotting

A549에 재조합 아데노바이러스 RdB/IL12/GMCSF(5,10 MOI), RdB/IL12/GMCSF-TK(1,5,10 MOI)를 각각의 역가로 감염시키고 48시간 후 감염된 세포를 회수하여 감염시킨 바이러스 역가의 증가에 따른 TK의 발현 증가여부를 western blotting 방법으로 관찰하였다.

6. Cytopathic effect(CPE) 분석

IL12 와 GMCSF 및 HSV-TK 의 발현 여부가 아데노바이러스의 복제에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여, 바이러스의 복제 결과로 나타나는 CPE 를 비교하였다. 다양한 인체 종양 세포주를 24-well plate 에 분주하고 24 시간 후 dE1, RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK, Ad-WT 0.1~100 MOI 역가의 아데노바이러스들을 각각 처리하였다. 실험에 사용된 바이러스들 중 어느 한 바이러스가 가장 낮은 역가에서 세포를 거의 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet(in 50% methanol)으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 분석하였다.

7. HSV-TK를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증식능에 대한 GCV의 영향 검증

HSV-TK를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 종양 세포 내 증식능에 대한 GCV의 영향을 검증하기 위하여, 24 well plate에 A549 세포 2×10^4 개를 분주하고 24 시간 배양 후 RdB/IL12/GMCSF(3 MOI), RdB/IL12/GMCSF -TK(3,10 MOI)을 각각 감염시키고 24 시간 후 GCV

를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였다. 대조군은 아데노바이러스만 감염시켰으며 GCV는 처리하지 않았다. GCV 처리 후 날짜에 따른 바이러스 생산량의 변화를 조사하기 위하여 각각의 아데노바이러스를 감염시키고 1, 2, 3일째 되는 날 감염된 세포와 배지를 각각 회수하였다. 회수된 감염된 세포는 3번의 얼림과 녹임을 반복하여 바이러스를 수득하였다. 날짜 별로 수득한 바이러스를 각각 293 세포주에서 limiting titration assay 방법으로 바이러스 역가를 산출하였다.

8. MTT assay에 따른 세포 생존율 검사

IL12, GMCSF 및 HSV-TK를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 감염에 따른 세포 살상능을 정량화하기 위해서 암세포주를 48 well plate에 30~50% confluency로 분주하고 24시간 배양 후 RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스들을 감염시킨다. 바이러스 감염 24시간 후에 ganciclovir(GCV; F.Hoffman-LaRoche Ltd, Basel, Switzerland)를 0~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고, GCV 처리 2~3일 후에 MTT를 2 mg/ml의 농도로 phosphate buffer saline (PBS)에 녹여 150 μl 씩 well에 첨가하고 4 시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 상층액을 제거한다. 각각의 well에 DMSO(dimethyl sulfoxide) 500 μl 를 첨가하고 37°C에서 15분간 formazan을 녹인 후, 각 well의 solution을 96 well plate에 200 μl 씩 옮기고 multi-well ELISA automatic spectrometer reader(Behring ELISA ProcessorII, Germany)를 이용하여 540 nm 파장에서 광학밀도를 측정한 후 대조군의 광학밀도와 비교하여 세포 생존율을 산출하였다.

9. 생체내 항종양 효과와 생존율 검증

생후 7~8주 정도의 C57BL/6 마우스에 2×10^6 개의 LLC 세포를 $50 \mu\text{l}$ Hanks' Balanced salt solution(HBSS)로 부유하여 마우스의 복부 피하에 주사하였다. 종양세포 이식 후 약 7일경, 종양의 크기가 약 100 mm^3 정도 성장하였을 때 RdB/IL12/GMCSF와 RdB/IL12/GMCSF-TK를 1×10^8 plaque-forming unit (PFU)/ $50 \mu\text{l}$ 용량으로 2일에 한번씩 3회 종양 내로 투여하였다. 마지막 바이러스 투여 3일 후 RdB/IL12/GMCSF-TK 그룹은 GCV를 100 mg/kg 용량으로 이틀 간격 7회 복강주사 하였다. 음성 대조 군으로 PBS를 종양 내 주사하고, 종양의 용적은 종양의 단축과 장축을 각각 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

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

10. 마우스 생체내의 비장 세포의 조제

C57BL/6 생쥐의 복벽에 형성된 종양에 "생체내 항종양 효과 및 생존율 검증" 실험과 동일한 방법으로 아데노바이러스를 각각 투여한 뒤, 마지막 바이러스 주사 후 3~5 일경에 마우스를 경추 탈골시키고 복부를 절개하여 비장을 무균적으로 적출한 뒤, 멸균된 슬라이드의 거친 부분을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 비장세포를 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 부유시킨 후 2000 rpm 으로 10 분간 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하고, 적혈구 용혈액(ACK lysing buffer; 0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0.1 mM $\text{Na}_2 \text{EDTA}$, pH 7.2)을 넣어

4°C에서 5 분간 방치하여 적혈구를 제거하였다. 이 후 2000 rpm 으로 10 분간 원심분리 한 뒤 세포 침전물을 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2 회 세척하고 trypan blue(Gibco BRL)로 세포를 희석하여 세포수를 측정하였다.

11. CTL 활성 측정

아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 T 세포 활성도를 검증하기 위한 CTL 활성 실험은 4 시간 ^{51}Cr 유리법을 이용하였다. 상기의 "마우스 생체내의 비장 세포의 조제" 방법에서 제조된 비장 세포를 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 배지로 희석한 후 IL-2(100 U/ml)와 방사선이 조사된 LLC 세포주와 함께 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~5 일 동안 배양 하였다. 배양 후 3~5 일경에 원심 분리하여 세포를 침전 시키고, 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2 회 세척하였다. 표적 세포(T; LLC)를 ^{51}Cr 로 표지(labeling)시키기 위해서는, Na₂CrO₄(150 µCi)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 60 분간 배양한 뒤, 1000 rpm 에서 10 분간 원심 분리한 후 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2 회 세척하였다. 상기에서 준비한 비장세포(E)와 ^{51}Cr 으로 표지된 표적세포를 100:1, 30:1, 10:1 (E:T)의 비율로 섞은 뒤 v-bottomed 96-well microplate(Corning, New York, USA)에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4 시간 동안 배양하였다. 4 시간 후 1,000rpm 에서 10 분간 원심 분리하고 상층액을 100 µl씩 취해 γ-counter 로 상층액에 유리된 ^{51}Cr 에 의한 γ 선의 강도를 측정하여 세포 독성을 산출하였다. 각 실험은 3 배수(triplicate)로 하였으며, 다음의 공식에 의해 세포 독성을 산출하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = (E-S)/(M-S) \times 100$$

E : Experimental release count

S : Spontaneous release count

M : Maximum incorporation count

12. IFN- γ ELISpot assay

아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 면역 세포 활성도를 검증하기 위하여, enzyme-linked immune spot(ELISpot) assay 를 수행하였다. 각각의 아데노바이러스를 투여한 마우스의 비장세포를 상기의 방법으로 분리하였다. Assay plate 는 anti-IFN- γ 항체로 24 시간 코팅하고, 다음 날 1×10^5 , 5×10^5 개의 비장세포를 plate 에 분주하고 24 시간 반응시켰다. 이후 biotinylated anti-IFN- γ 항체를 넣고 2 시간 동안 반응시키고 streptavidin-alkaline phosphatase 접합체를 넣고 1 시간 동안 반응시켰다. 기질로 3-amino-9-ethylcarbazol(AEC) 용액을 넣고 반응을 지속시킨 다음, 각각의 IFN- γ 를 분비하는 세포들(붉은빛 색깔)의 개수를 입체 현미경을 사용하여 측정하였다.

13. IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ 의 종양조직 내 발현량 측정

마우스의 피하에 형성된 종양내로 각각의 바이러스를 투여하고 2 일 뒤 종양을 적출하였다. 적출한 종양을 액체 질소에 담근 후 막자사발로 분쇄하고 proteinase inhibitor cocktail(Sigma)이 첨가된 PBS 에 부유하였다. 종양 조직을 보다 미세하게 분쇄하기 위하여 homogenizer (ART-MICCRA D-8, ART moderne Labortechnik,

munchen, Germany)로 균질화한 후, 3000 rpm 에서 10 분 원심분리한 뒤 상층액만 수득하여 IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ 단백질의 발현정도를 ELISA 로 분석하였다. IFN- γ 의 ELISA 전 과정은 IFN- γ kit(ENDOGEN, Woburn, MA, USA)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 수행하였으며, IL-12 와 GM-CSF 의 ELISA 는 상기의 "RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 아데노바이러스의 단백질 발현 양상 규명"과 같은 방법으로 수행하였다.

14. 유세포 분석에 의한 마우스 비장 세포의 특성 변화 관찰

마우스의 비장 세포를 적출하여 단세포 부유물로 만든 다음, FITC-conjugated hamster anti-mouse CD3e 단클론 항체(DiNonA, Seoul, Korea), PE-conjugated rat anti-mouse CD4/L3T4 단클론 항체(DiNonA), 또는 PE-conjugated rat anti-mouse CD8/Lyt-2 단클론 항체(DiNonA)를 각각 처리하여, 4°C에서 45 분간 반응 시킨 후 PBS 로 3 번 세척하고 유세포 분석을 수행하였다.

15. IL-12 와 GM-CSF 및 HSV-TK 를 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스 와 전약제 GCV 투여에 따른 종양 조직의 변화 관찰

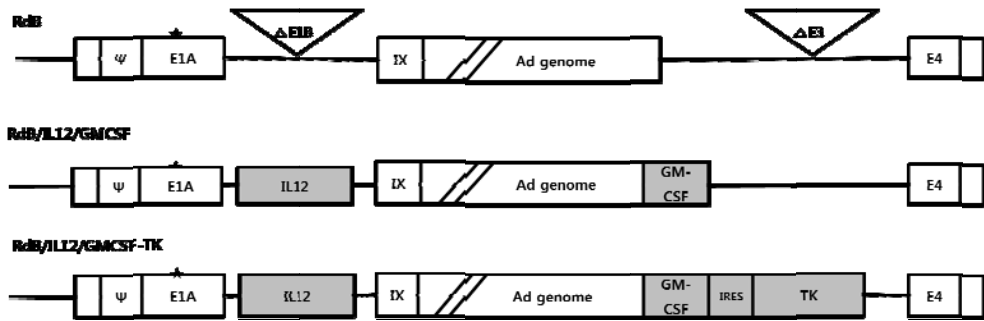
C57BL/6 마우스의 복벽에 형성된 마우스 종양에 바이러스와 GCV 를 교대로 3 번씩 “생체내 항종양 효과와 생존율 검증”과 동일한 방법으로 각각 투여한 뒤, 마지막 바이러스 주사 후 2 일에 종양을 적출하였다. 그리고 O.C.T. compound 로 동결 박편한 뒤 9-10 μ m 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 조직 면역 염색을 시행하였다. 슬라이드에 부착된 조직을 0.3% H₂O₂ 용액에서

10 분간 반응시켜 내 인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 일차 항체인 rat anti-mouse CD4 단클론 항체(PharMingen) 또는 rat anti-mouse CD8 단클론 항체(PharMingen)를 넣어 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이 후 HRP 가 결합된 이차 항체인 goat anti-rat IgG-HRP 항체를 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응 시키고, DAB 를 첨가하여 발색 정도를 지켜본 후 100%, 90%, 70% ethanol 과 xylene 용액에 침전시키고 커버 글라스를 덮어 관찰하였다. 또한 종양조직의 세포고사를 관찰하기 위하여 ApopTag Kit(Intergen, Purchase, NY)을 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay 를 시행하였다. 발색여부를 확인하기 위해 peroxidase 와 결합된 avidin 을 사용하여 3,3'diaminobenzine(DAB; Dako, Carpinteria, CA)과 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 0.5% methyl green 으로 10 분간 염색하고 현미경으로 관찰하였다.

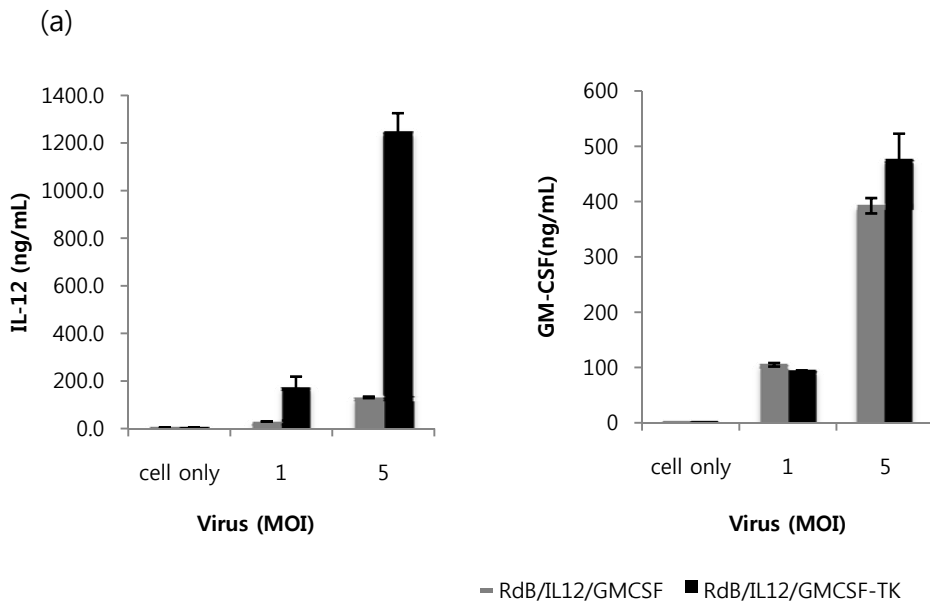
III. 결과

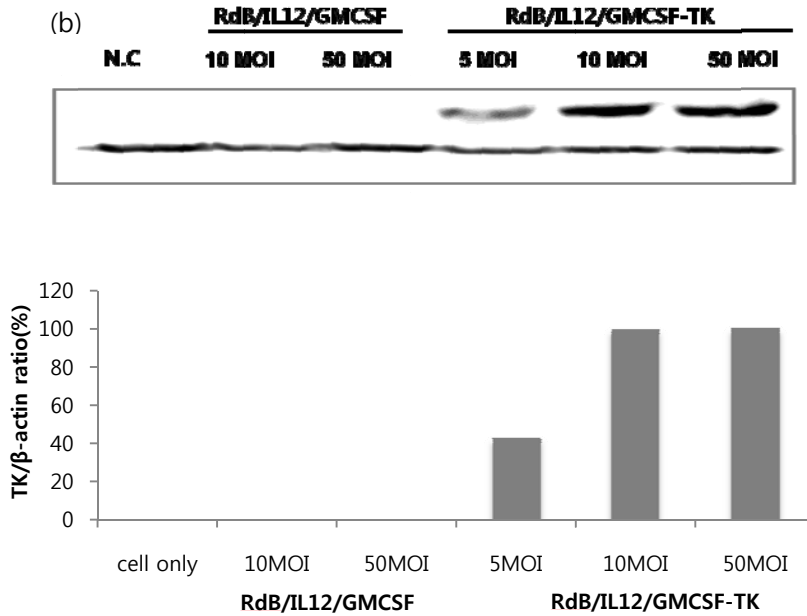
1. IL-12 와 GM-CSF 및 HSV-TK 를 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 의 발현 양상 규명

IL-12 와 GM-CSF 및 HSV-TK 유전자의 동시 발현에 따른 항종양 효과의 개선여부를 비교 분석하고자, 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 유전자가 소실되고, E1A 유전자가 변이된 암세포 특이적 살상 아데노바이러스에 IL-12 와 GM-CSF 유전자가 아데노바이러스의 E1, E3 부위에 각각 삽입된 아데노바이러스인 RdB/IL12/GMCSF 와 IL-12 와 GM-CSF 및 HSV-TK 유전자가 IRES 로 연결되어 E1, E3 부위에 각각 삽입된 아데노바이러스인 RdB/IL12/GMCSF-TK 을 각각 제작하였다(Figure 1). 제작된 아데노바이러스들에 의한 IL-12 또는 GM-CSF 및 HSV-TK 의 발현 정도를 알아보기 위하여, A549 인체 폐암 세포주에 아데노바이러스(RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK)를 1,5 MOI 씩 각각 감염시키고, 48 시간 후에 배지 및 세포를 회수하여 ELISA(IL12, GM-CSF) 및 Western blot 을 수행하였다. Figure 2 에서 보는 바와 같이, 감염시킨 바이러스의 역가가 증가함에 따라 IL-12, GM-CSF 및 HSV-TK 의 발현량이 용량 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 한편, 같은 바이러스 역가에서 비교해보았을 때, IL-12 발현량이 RdB/IL12/GMCSF 에 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스를 처리하였을 때, 6 배 이상 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 증가된 IL-12 의 발현은 증대된 숙주 면역체계활성을 유도할 것으로 기대된다.



(Figure 1.) Schematic representations of oncolytic adenoviruses expressing IL-12, GM-CSF or plus HSV-TK. RdB contains mutated E1A, but is E1B deleted. RdB/IL12/GMCSF or RdB/IL12/GMCSF-TK comprised of the IL-12 and GMCSF or IL12 and GMCSF-IRES-TK genes in each E1 and E3 region of RdB, respectively.(★: mutation)

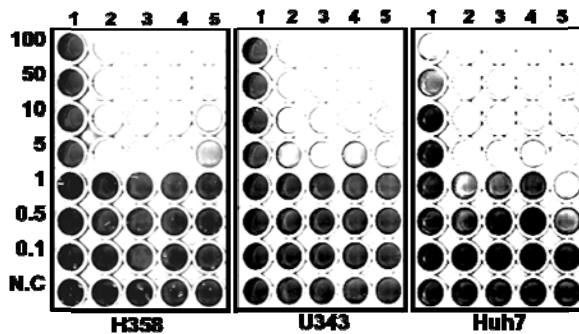




(Figure 2.) Measure of IL-12, GM-CSF and HSV-TK expression secreted by A549 cells infected with Ads. (a) A549 cells were infected with RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK adenovirus at range of 1, 5 MOIs. The concentration of IL-12 and GM-CSF were measured in the culture supernatant at 48hrs after infection by ELISA assay. IL12 and GMCSF level were increased linearly in a dose dependent manner. (b) A549 cells were infected with RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK adenovirus at range of 5, 10, 50 MOIs. The concentration of HSV-TK was measured in the cell lysate at 48 hrs after infection by western blotting. HSV-TK level was increased in a dose dependent manner.

2. IL-12, GM-CSF 또는 HSV-TK 유전자 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석

IL-12, GM-CSF 또는 HSV-TK 유전자 발현이 아데노바이러스의 복제에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 아데노바이러스의 복제에 따른 세포 사멸 정도를 CPE assay 로 관찰하였다. 여러 종류의 암세포주들(H358, Huh7, U343)을 dE1, RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 또는 Ad-WT 아데노바이러스로 각각 0.1-100 MOI 로 감염시키고 잔류 세포를 crystal violet 으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰하였다. Figure 3 에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 dE1 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상효과가 나타나지 않았으나, 복제가능 아데노바이러스인 RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 또는 Ad-WT 아데노바이러스로 감염된 경우는 처리된 바이러스의 양이 증가함에 따라 세포 살상효과가 증가되었다. 또한, 본 연구에서 사용된 모든 세포주들에서 RdB/IL12/GMCSF-TK 아데노바이러스의 세포 사멸 능이 대조군 바이러스인 RdB, RdB/IL12/GMCSF 에 의한 세포 사멸능과 비슷한 경향성으로 나타났다.

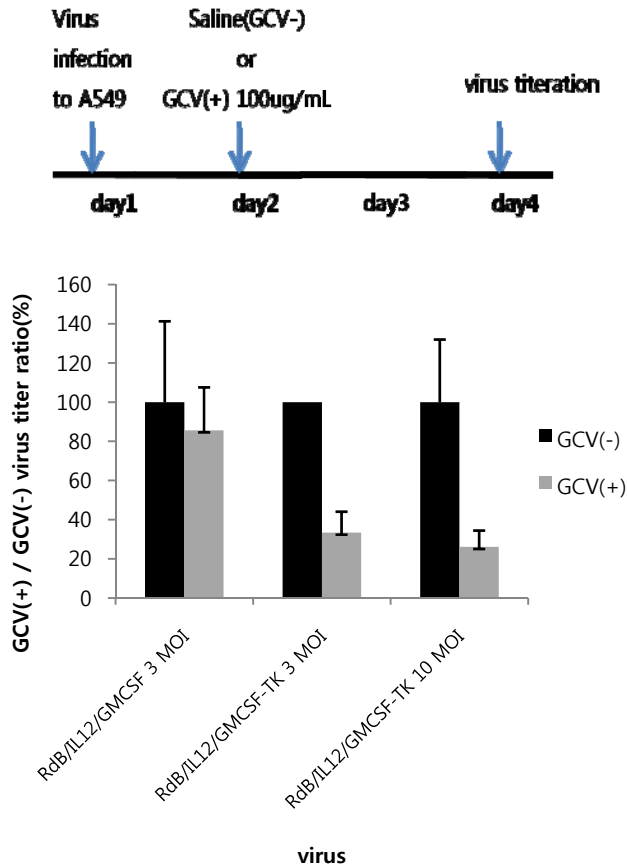


1. dE1 2.RdB 3.RdB/IL12/GMCSF 4.RdB/IL12/GMCSF-TK 5.Ad-WT

(Figure 3.) CPE assay of Ads expressing IL-12, GMCSF or plus HSV-TK. Cell monolayer in 24-well plate were infected with dE1, RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK, Ad-WT at range of 0.1-100 MOIs. At 4-10 days p.i, the infected cells were stained with crystal violet.

3. HSV-TK를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증식능에 대한 GCV의 영향 검증

HSV-TK를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증양 세포 내 증식능에 대한 GCV의 영향을 검증하기 위하여, 24 well plate에 A549 세포 2×10^4 개를 분주하고 24 시간 배양 후 RdB/IL12/GMCSF (3MOI), RdB/IL12/GMCSF-TK (3,10MOI)을 각각 감염시키고 24 시간 후 GCV를 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하였다. 대조군은 아데노바이러스만 감염시켰으며 GCV는 처리하지 않았다. GCV 처리로 인한 바이러스 생산량의 변화를 조사하기 위하여 각각의 아데노바이러스를 감염시키고 3 일째 되는 날 감염된 세포와 배지를 각각 회수하여 GCV를 처리하지 않은 대조군들과 비교해 본 결과, HSV-TK를 발현하는 RdB/IL12/GMCSF-TK의 증식능이 50%이상 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 TK 유전자의 발현에 의한 인산화로 활성화된 GCV는 nucleotide analogs로서 작용하여, DNA 바이러스인 아데노바이러스에 증식능에 영향을 미침을 알 수 있었다.



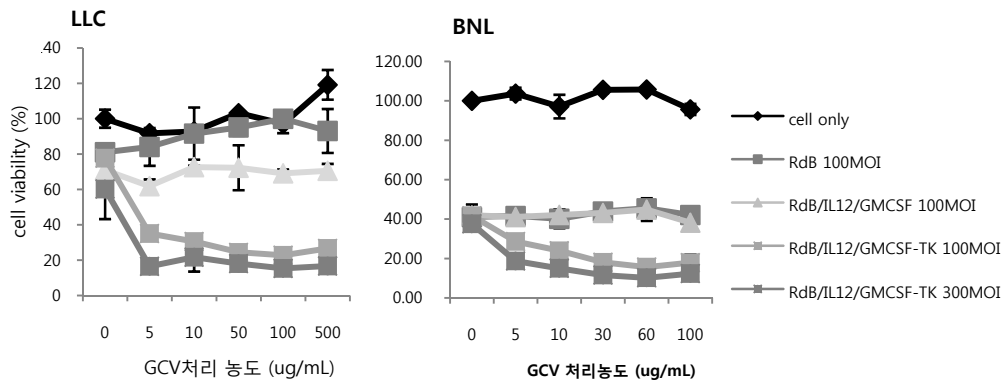
(Figure 4.) Viral production assay. Monolayers of A549 cells were infected with adenoviruses at 3, 10 (RdB/IL12/GMCSF-TK only) MOI. The next day of virus infection, cells were treated with or without of GCV(100ug/mL). Each virus present in cell and supernatant was then extracted at the 3days after virus infection. Viral titers were determined by limiting titration assay.

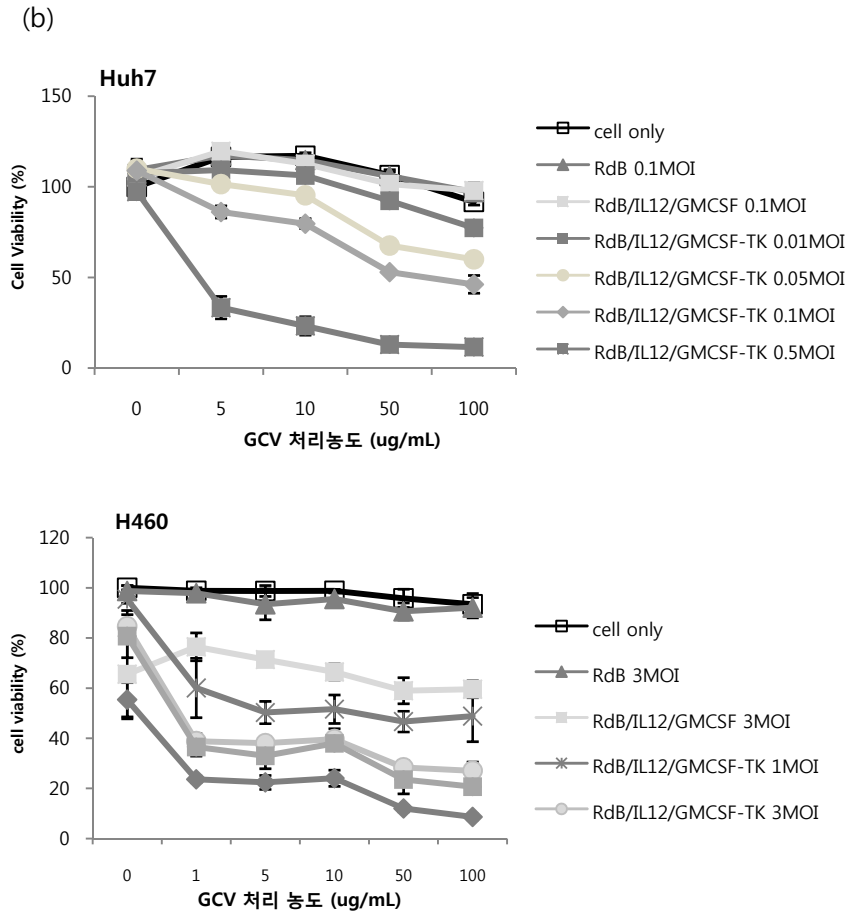
4. MTT assay에 따른 세포 생존율 검사

증식 가능 아데노바이러스와 전약제인 GCV의 병용 처리에 의한 암세포 살상능을 정량화 하기 위하여 인체 간암 세포주(Huh7), 인체 폐암세포주 (H460), 마우스 폐암 세포주(LLC), 마우스 간암 세포주(BNL)에 RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK로 각각 감염시킨 후, GCV를 0~500ug/mL의 농도로 처리 한 뒤 4~7일 후에 살아남은 세포의 생존율을 측정하였다. 또한, 전약제인 GCV에 의한 암세포주의 독성을 알아보기 위하여 암세포주에 바이러스를 감염시키지 않고 GCV만을 0~500ug/mL 농도로 처리하였으며, 각 바이러스 감염에 따른 세포 생존율은 각각의 세포주에 바이러스 또는 GCV를 처리하지 않은 경우의 세포 생존율을 100%로 환산하여 상대 비교하였다. 아데노바이러스를 처리하지 않고 GCV만 처리한 세포주에서는 세포의 생존율이 거의 90~100%정도로 GCV만으로서의 세포 독성이 거의 나타나지 않음을 검증하였으며, 마우스 세포주인 LLC와 BNL의 경우 각 바이러스를 100MOI, 그리고 HSV-TK를 발현하는 RdB/IL12/GMCSF-TK의 경우엔 100MOI 에서 300MOI 까지 높여 감염한 후, 다양한 GCV농도에서 비교해본 결과, Figure 5a에서 나타난 바와 같이 GCV농도가 0ug/mL에서는 같은 바이러스 역가로 처리한 경우 세포생존율이 비슷하게 나타나거나, RdB바이러스에 비해 RdB/IL12/GMCSF와RdB/IL12/GMCSF-TK를 처리한 실험군에서 조금 더 낮은 세포생존율을 보였다. 하지만, GCV처리농도가 증가함에 따라 HSV-TK를 발현하는 RdB/IL12/GMCSF-TK바이러스를 처리한 실험군에서 세포생존율이 현저하게 감소함을 관찰하였다. 또한, 인체 세포주인 Huh7과 H460을 이용하여 Figure 5b에서 보는 바와 같이 다양한 낮은 역가의 바이러스를 감염시킨 후, 세포생존율을 비교해본 결과, 마우스 세포주와 마찬가지로 GCV농도가 0ug/mL에서는, 각 역가에 따른 바

이러스 만의 세포 살상능을 확인할 수 있었으며, GCV의 농도가 증가함에 따라 HSV-TK를 발현하는 RdB/IL12/GMCSF-TK바이러스를 처리한 실험군에서 세포 생존율이 확연히 감소됨을 확인하였다. 특히, GCV농도가 증가함에 따라 다른 대조군보다 더 낮은 역가의 바이러스를 처리한 실험군에서도 세포의 생존율이 다른 대조군의 3배(H460), 10배(Huh7) 높은 역가의 바이러스와 비교해 보았을 때도 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

(a)



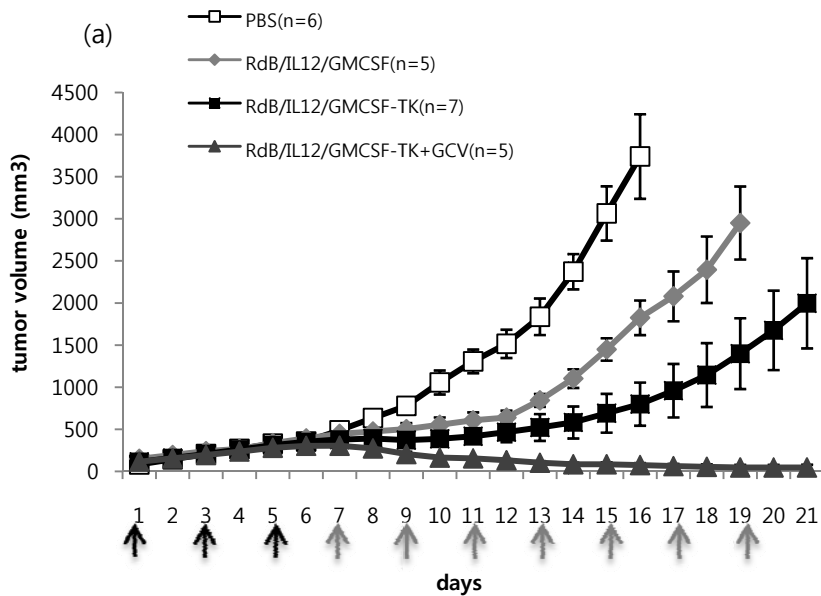


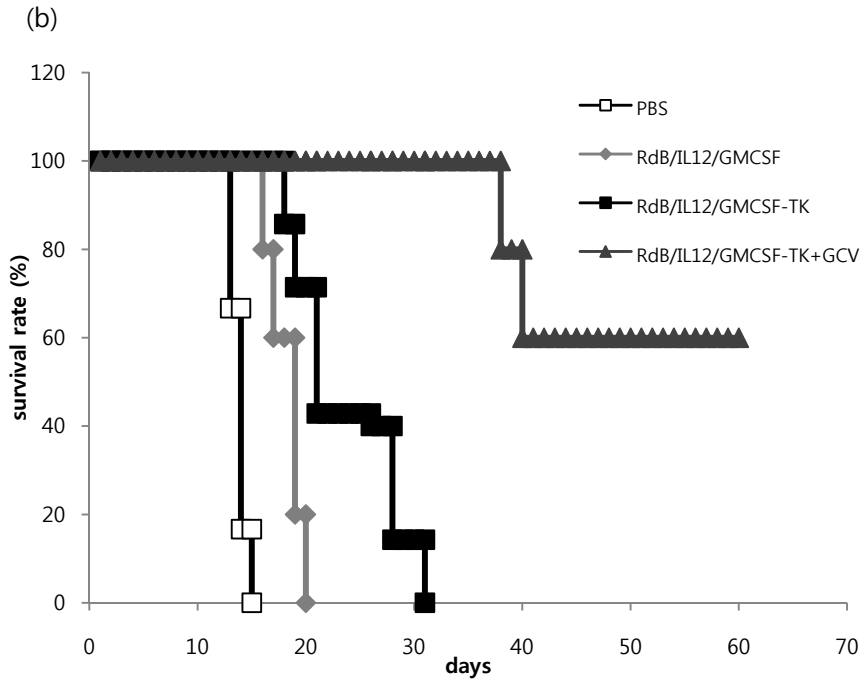
(Figure 5.) In vitro cytotoxicity of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK combined with GCV treatment. Monolayers of cancer cells were infected with various range of RdB, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK viruses. The next day of infection, cancer cells were treated with various concentrations of GCV and cultured for 4~7days. The viability of the cells were estimated by MTT assay. Mean values and standard errors of two or more experiments, each performed in duplicate, are shown.

5. 생체내 항종양 효과와 생존율 검증

IL-12 와 GM-CSF 를 발현하는 종양 특이적 살상 바이러스인 RdB/IL12/GMCSF 와 IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 를 동시에 발현하는 종양 선택적 살상 바이러스 그리고 GCV 를 이용하여 병합 치료하였을 때, 생체 내 항종양 효과를 비교 검증 하기 위하여, LLC 마우스 폐암 세포주를 C57BL/6 마우스의 피하에 주사한 후 형성된 종양에 각각의 바이러스를 1×10^8 PFU/30 μ l 로 2 틀간격 3 회 종양 내로 주사하고 GCV 100mg/kg 이틀간격 7 일동안 복강 내 주사한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 음성대조군인 PBS 를 투여한 마우스의 경우에는 종양이 급속한 속도로 성장하여 16 일 이후 생존한 마우스는 없었으며, IL-12 와 GM-CSF 를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB/IL12/GMCSF 을 투여한 마우스 대조군의 경우에는 처음 12 일간은 종양의 성장이 억제된 경향을 보였으나 그 이후에는 종양이 점차적으로 성장하여 바이러스 투여 후 19 일경에는 종양의 크기가 2945 ± 433.68 mm³ 로 크게 증가하였다. 그리고 RdB/IL12/GMCSF-TK 를 투여한 실험군에서는 바이러스 투여 후 21 일째에 종양의 크기가 각각 1996.7 ± 535.82 로서 RdB/IL12/GMCSF 에 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK 가 처리된 실험군에서의 종양의 성장이 현저히 억제됨을 관찰하였다. 또한 RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스와 GCV 를 병용 투여한 실험군에서는 21 일째 46.2743 ± 32.4 mm³ 으로 바이러스 단독을 처리한 다른 대조군에 비하여 더욱 향상된 항종양 효과를 확인할 수 있었다(Figure 6a). 또한, 마우스의 생존율을 조사한 결과, Figure 6B 에서 볼 수 있듯이 PBS 또는 RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 을 투여한 마우스들이 각각 15 일, 20 일, 31 일 이후에 모두 죽은 반면, RdB/IL12/GMCSF-TK+GCV 를 투여한 마우스들은 각각 5 마리중 2 마리만 38 일, 40 일에

각각 죽었으며, 나머지 3 마리는 완전히 종양이 사라지는 것을 관찰할 수 있었으며, 60 일 후에도 재성장이 되지 않는 것을 관찰하였다. 즉, 대조군인 PBS 또는 RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 에 비해 생존율이 월등히 증가됨을 관찰할 수 있었다(Figure 6b). 이와 같이 마우스 항종양 효과에서와 마찬가지로 RdB/IL12/GMCSF-TK 아데노바이러스와 GCV 를 병용 투여한 경우, 마우스 생존율에서도 뚜렷한 개선 효과를 확인 할 수 있었다.





(Figure 6.) Anti-tumor effect (a) and survival rate (b) of RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK or RdB/IL12/GMCSF-TK+GCV. C57BL/6 mice bearing tumors established by subcutaneous injection of LLC cells were treated 3 times with intratumoral injection of 1×10^8 PFU/30 μ l of RdB/IL12/GMCSF or RdB/IL12/GMCSF-TK adenoviruses on days 1, 3, and 5, and 7 times of I.P injection with GCV to combination group. Tumor growth was then monitored on a 2 day interval until the end of the study.

4. 암세포 특이적 면역반응 활성화 검증

진행중 Figure7.

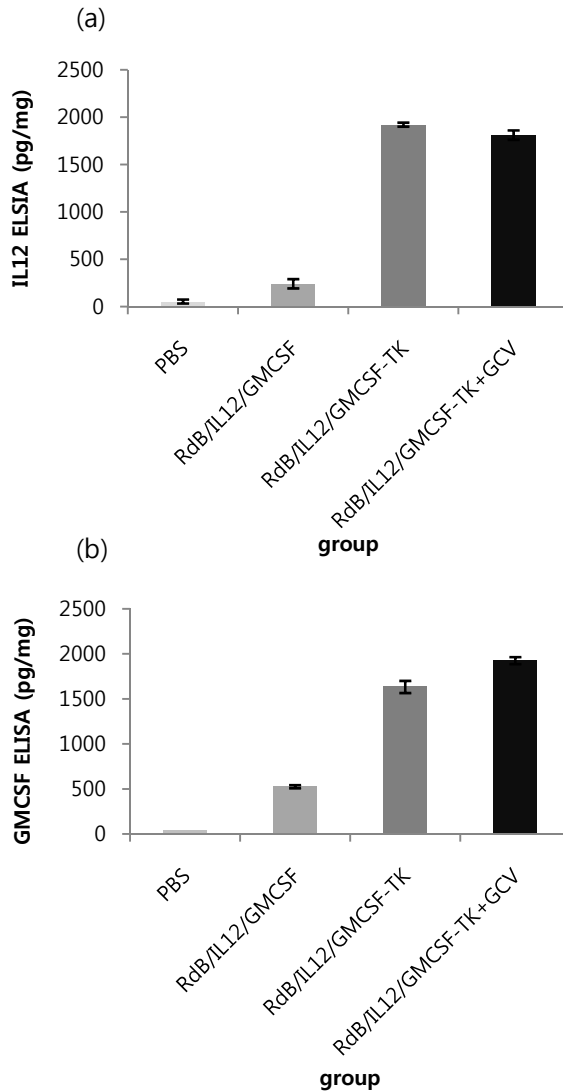
5. 마우스 비장세포의 CD4⁺/CD8⁺ T 세포 군집변화

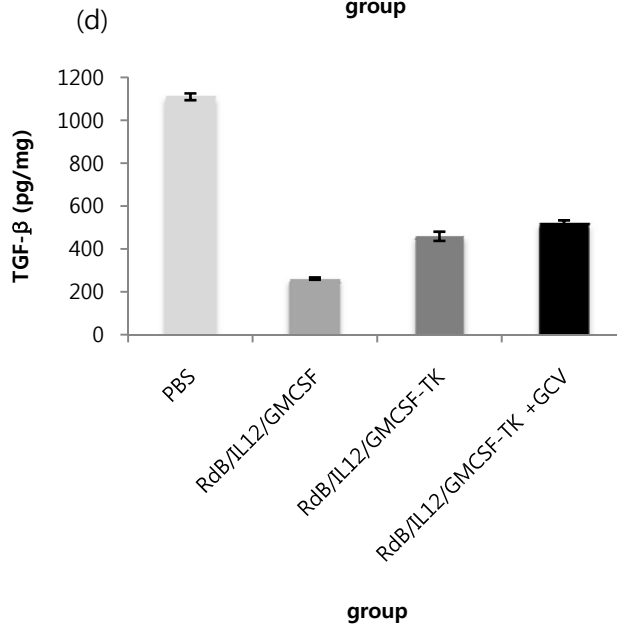
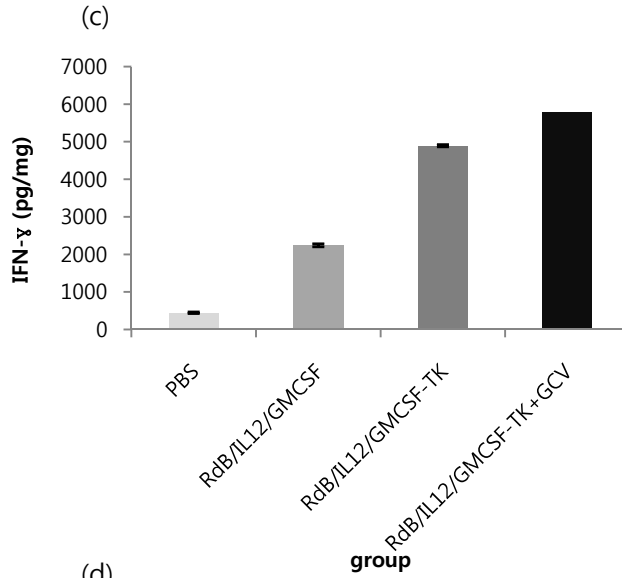
진행중 Figure8.

6. IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ 의 종양내 발현량 측정

바이러스가 투여된 종양 조직 내에서의 IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ 의 발현량을 알아보기로 하자, 바이러스가 투여된 마우스로부터 종양조직을 적출하여 미세하게 분쇄한 뒤 IL-12, GM-CSF, 또는 IFN- γ ELISA 분석을 각각 시행하였다. IL-12의 ELISA 분석에서는 PBS, RdB/IL12/GMCSF를 처리한 실험군에서는 각각 52.5pg/mg, 240pg/mg만이 검출된 반면, RdB/IL12/GMCSF-TK 또는 GCV를 함께 처리한 실험군에서는 1920pg/mg, 1810pg/mg으로서 다른 대조군에 비해 8배 이상 IL-12가 검출되는 것을 확인하였다 (Figure 9a). 또한, 종양 조직내 GM-CSF 발현량의 경우, PBS, RdB/IL12/GMCSF를 처리한 실험군에서는 43.75pg/mg, 525pg/mg의 GM-CSF만이 검출된 반면, RdB/IL12/GMCSF-TK 또는 GCV를 함께 처리한 실험군에서는 1632.5pg/mg, 1925pg/mg의 GM-CSF이 검출됨을 확인할 수 있었다(Figure 9b). 이로서 암 조직 내에서 선택적으로 증식할 수 있는 아데노바이러스에 의해 IL-12와 GM-CSF이 종양 조직 내에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 RdB/IL12/GMCSF에 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK에서 더 높은 사이토카인 발현이 검출된 것은 실제 *in vitro* 상에서 확인한 IL12 발현의 증가가 *in vivo* 내에서도 확실히 증가됨을 다시 확인할 수 있었으며, 종양 내의 증가된 IL-12의 발현은 면역세포의 활성을 증대시켜 결과적으로, GM-CSF 발현에도 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 또한, IFN- γ 의 종양 조직 내 발현량의 경우에서도 RdB/IL12/GMCSF-TK와 GCV를 병용 처리한 종양조직에서 5790pg/mg으로 매우 높게 검출되어, PBS(445pg/mg) RdB/IL12/GMCSF(2242.5pg/mg)을 투여한 경우뿐만 아니라 RdB/IL12/GMCSF-TK(4895pg/mg)를 투여한 경우에 비해서도 발현

정도가 확연히 높은 것을 확인할 수 있었다(Figure9c). 또한 종양의 성장을 촉진시키는 TGF- β 사이토카인 level 을 확인해 본 결과, PBS(1109pg/mg)에 비해 RdB/IL12/GMCSF(261pg/mg), RdB/IL12/GMCSF-9458pg/mg) 아데노바이러스 또는 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 를 병용 처리(517pg/mg)한 종양조직 내에서 확연히 감소됨을 확인할 수 있었다.



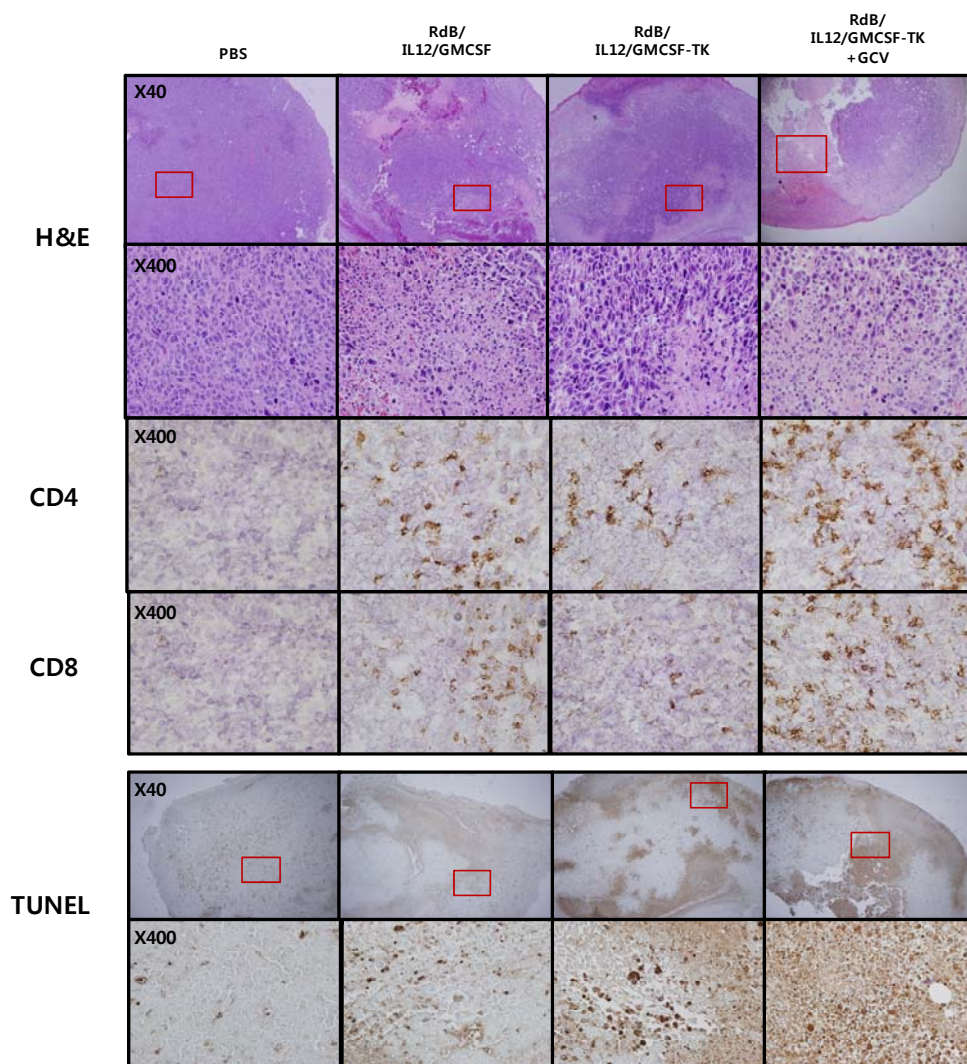


(Figure 9.) Increased local IL-12, GM-CSF, or IFN- γ expression following treatment with RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK or plus GCV. After injection of PBS, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK or plus GCV into established LLC tumors in C57BL/6 mice, IL-12(a), GM-CSF(b), IFN- γ (c) or TGF- β (d)

expression was measured in tumor homogenates using ELISA kit. The IL-12, GM-CSF, or IFN- γ secretion was substantially increased in tumors treated with RdB/IL12/GMCSF-TK or plus GCV. And TGF- β secretion was decreased in tumors treated with RdB/IL12/GMCSF-TK plus GCV

7. IL-12 와 GM-CSF 을 발현하는 복제가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰

IL-12 와 GM-CSF 발현에 따른 종양조직 내의 변화를 알아보하고자 각각의 바이러스 또는 PBS 를 투여한 종양조직을 H & E 염색한 결과, PBS 를 제외한 RdB/IL12/GMCSF 또는 RdB/IL12/GMCSF-TK 를 투여한 실험군과 GCV 를 병합 투여한 치료 실험 군에서는 종양 주위로의 림프구의 침윤을 확인할 수 있었으며, 또한, RdB/IL12/GMCSF 또는 RdB/IL12/GMCSF-TK 에 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 를 병합 투여한 종양 조직의 경우에는 종양 주위뿐만 아니라 종양 조직 내부에도 많은 림프구가 침윤된 것을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, 대부분의 암세포들이 고사되어 있음을 관찰하였다(Figure 10). 종양 조직내 침윤된 림프구의 세포군을 보다 면밀히 조사하기 위하여 CD4⁺와 CD8⁺ T 림프구를 특이적으로 인지할 수 있는 항체를 사용하여 IHC 를 시행한 결과, RdB/IL12/GMCSF 또는 RdB/IL12/GMCSF-TK 비해 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 를 병합 투여한 종양 조직에서 현저하게 증가된 CD4⁺과 CD8⁺ T 림프구를 종양조직 내부와 주위에서뿐만 아니라 종양 조직 내부에서도 전반적으로 관찰할 수 있었다(Figure 10).



(Figure 10.) Histological analysis of tumor sections from mice treated with adenoviruses. Ads was injected on day 1, 3, 5, and GCV was treated on day 2, 4, 6. Tumors were harvested on day 8 for histological analysis. Paraffin sections of tumor tissue were then stained by hematoxylin and eosin. Original magnification: $\times 40$ and $\times 400$. Infiltration of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in tumors harvested from mice treated with PBS, RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK,

RdB/IL12/GMCSF-TK+GCV Frozen sections of tumor tissue were stained with anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody. Paraffin section of tumor tissues were stained by TUNEL assay to detect apoptotic cells in tumor tissue (Methyl green counterstained). Large numbers of apoptotic cells with nuclear condensation are observed in the tumor treated with RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK, RdB/IL12/GMCSF-TK+GCV. Note the close similarity of necrotic region shown by H & E staining to the apoptotic region Original magnification: $\times 40$ and $\times 400$.

IV. 고찰

암은 종양 내 면역 억제 환경 (immunosuppressive tumor microenvironment)을 조성함으로써, 다양한 숙주 면역반응을 교묘히 회피하고, 파괴하며, 결과적으로 종양의 생존을 지속적으로 촉진 하는 능력을 가지며, 설사 면역 체계가 활성화 되었다라도 활성화된 항 종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력을 가진다는 점에서 면역치료의 한계가 제기되고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 종양 내 면역 억제환경을 개선하고 암세포에 대한 면역반응을 증진 시키고자 interleukin (IL)-12, IL-18, IL-23, interferon-gamma (IFN- γ), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor (TNF) 와 같은 사이토카인 유전자, B7 분자와 같은 동 자극 유발 인자, 직접적으로 APC 의 역할을 하는 DC, 종양항원으로 활성화시킨 T Cell 등을 이용하여 향상된 항암 면역치료 효과를 얻고자 하는 다양한 연구가 진행 되고 있다. 하지만 이러한 노력에도 불구하고, 여전히 종양 면역치료는 종양의 낮은 면역원성으로 인하여 치료 효과가 제한 되고 있다. 따라서, 최근에는 종양의 면역억제 환경을 개선함과 더불어, 종양의 면역원성을 높여 치료효과를 높이기 위해 종양 특이적 아데노바이러스를 이용한 면역치료와 함께 방사선 치료, 항암 화학 요법 등이 함께 병행하는 연구가 진행되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 종양 특이성과 살상능이 보다 개선 된 RdB 아데노바이러스 E1 부위에 IL-12, E3 부위에 GM-CSF 를 도입하여, 바이러스의 증식에 따른 종양 특이적 세포 살상유도뿐만아니라, 종양 내 사이토카인 의 지속적 발현을 통한 종양의 면역 억제를 개선하고자 하였으며, 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 아데노바이러스 E3 부위에 동시에 도입하여, ganciclovir(GCV)의 병용 투여를 통한

“bystander effect”로 극대화된 세포 살상으로 암 세포에 면역원성을 부여하고, 숙주의 효과적인 종양특이적 면역체계를 활성화를 유도하여 향상된 항종양 효과가 유도될 수 있는지 알아보고자 하였다.

먼저, IL-12, GM-CSF 와 HSV-TK 유전자의 발현 양상 분석과 이들 유전자의 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석을 통해 검증된 RdB/IL12/GMCSF, RdB/IL12/GMCSF-TK 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 를 함께 병합 치료한 실험군과 생체 내 항종양 효과를 비교 검증해보았다. 그 결과, RdB/IL12/GMCSF 와 RdB/IL12/GMCSF-TK 를 처리한 실험군에 비해 GCV 를 병용 투여한 경우, 종양의 성장이 현저하게 억제되고 그 억제효과가 지속되는 것을 관찰할 수 있었으며, 향상된 항종양 효과가 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한, 생체 내 생존을 검증 실험에서도 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 를 병용 치료한 경우, 다른 바이러스 단독 치료군에 비해 생존율이 크게 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 이들 5 마리 중 3 마리 마우스에서 모두 종양이 완전히 제거되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들은 IL-12 와 GM-CSF 에 의한 면역억제가 개선된 환경 내에서 종양특이적 바이러스의 세포살상과 TK 와 GCV 극대화된 종양 살상이 더해져 좀 더 강력하고 효과적인 면역반응이 일어남으로써 항종양 효과가 증대된 것을 의미한다. 현재까지의 보고에 의하면, 이와 같은 항종양 효과는 Type-1 면역 반응에 의해 주로 유도되는 것으로 알려져 있으며²⁷, 이러한 면역반응을 증진 시키기 위한 사이토카인 유전자 치료와 세포면역치료등을 함께 이용한 연구들에서²⁸⁻³⁰, 단독치료에 비해 병합치료를 하였을 때, 훨씬 더 증대된 항종양 효과가 일어남이 보고 된바 있다. 본 연구실에서도 최근 IL-12 와 41BBL 를 발현하는 종양 특이적 아데노바이러스와 수지상세포의 병합 치료를 통하여 바이러스 단독치료에 비하여 항종양 효과가 뛰어나게

유도됨을 검증하였다³¹. 본 연구에서도 RdB/IL12/GMCSF-TK 와 GCV 을 병합 투여한 마우스의 종양 내에서 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 빈도를 조사한 결과, 바이러스 단독 치료 대조군에 비하여 GCV 와의 병합 치료군에서 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포가 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 종양 내 항종양 사이토카인인 IL-12, GM-CSF, IFN- γ ELISA 를 시행한 결과에서도 RdB/IL12/GMCSF 와 RdB/IL12/GMCSF-TK 를 처리한 실험군에 비해 GCV 를 병용 투여한 경우 IL12, GMCSF, IFN- γ 의 발현량이 크게 증가되어있음을 관찰하였다. 또한 종양의 성장을 촉진시킬 수 있는 사이토카인으로 알려진 TGF- β 의 경우 PBS 에 비해 치료군에서 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

이는 종양 내로의 IL-12 와 GM-CSF 의 동시 발현으로 인한 종양 내 면역억제를 개선되고, TK 와 GCV 의 작용에 의한 극대화된 세포살상으로 종양의 면역원성이 증가됨에 따라 APC 의 활성을 보다 쉽게 유도하며, Type-1 면역 반응을 유도하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 비율이 증가와 이들로부터 분비된 IFN- γ 가 증진된 면역활성과 항종양 효과를 더 강하게 유도하였을 것으로 예상된다.

본 연구에서는 RdB/IL12/GMCSF-TK 바이러스와 GCV 를 병용 투여함으로써, 종양 선택적 아데노바이러스인 RdB 에 의해 유도되어지는 종양 세포 특이적 세포살상 뿐만 아니라, TK 와 GCV 에 의한 한층 더 극대화된 종양세포 살상을 유도함으로써, 종양의 면역원성을 높이고, IL-12 와 GM-CSF 의 종양 세포 특이적 고 발현에 따른 종양 내 면역억제를 개선함으로써 종양 특이적 면역반응을 동시에 유도하여 증대된 종양특이적 항종양 효과를 유도할 수 있었다. 이는 기존의 방사선 요법과 항암화학 요법에서 나타나는 심각한 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 예상되며, 또한 항암 면역반응으로 국소적인 암의 치료는 물론

암의 재발을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 전이 암의 치료에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

암은 종양 내 면역 억제 환경 (immunosuppressive tumor microenvironment)을 조성함으로써, 다양한 숙주 면역반응을 교묘히 회피하고, 파괴하며, 결과적으로 종양의 생존을 지속적으로 촉진 하는 능력을 가지며, 설사 면역 체계가 활성화 되었다고 활성화된 항 종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력을 가진다. 따라서, 본 연구에서는 종양 특이적 살상 능과 특이성이 보다 개선 된 RdB 아데노바이러스를 이용하여 일차적으로 감염된 세포뿐만 아니라 바이러스의 증식에 따른 종양특이적 세포살상과 E1 부위에 IL-12, E3 부위에 GM-CSF 를 도입하여, 종양 조직 내 면역억제를 개선하여 숙주의 종양특이적 면역체계를 활성화 시키고, 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 아데노바이러스 E3 부위에 동시에 도입하여, ganciclovir(GCV)의 병용 투여로 인한 세포 살상 효과와 바이러스에 감염되지 않은 암세포까지 bystander effect 를 통한 세포살상 종양 면역원성이 증가를 함께 유발함에 따라 총체적으로 극대화된 종양특이적 면역반응을 유도함으로써, 증대된 항종양 효과의 유도로 암 면역유전자치료에 있어서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 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**(3): 397-403.
2. Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Zeh HJ, 3rd, McKinney TG, Schreiber RD *et al.* Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* 1995; **154**(12): 6466-74.
3. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M *et al.* Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 1991; **254**(5032): 713-6.
4. Maciag PC, Seavey MM, Pan ZK, Ferrone S, Paterson Y. Cancer immunotherapy targeting the high molecular weight melanoma-associated antigen protein results in a broad antitumor response and reduction of pericytes in the tumor vasculature. *Cancer Res* 2008; **68**(19): 8066-75.
5. Hui K, Grosveld F, Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984; **311**(5988): 750-2.
6. Wallich R, Bulbuc N, Hammerling GJ, Katzav S, Segal S, Feldman M. Abrogation of metastatic properties of tumour cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 1985; **315**(6017): 301-5.

7. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Hum Gene Ther* 1998; **9**(3): 283-6.
8. Grill J, Geoerger B, Lamfers M, Dirven C, Van Beusechem V, Gerritsen W *et al.* [Conditionally replicative adenoviruses: a second wind for cancer gene therapy]. *Bull Cancer* 2003; **90**(12): 1039-48.
9. Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 1997; **389**(6648): 239-42.
10. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K *et al.* Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; **156**(11): 4274-9.
11. Fernandez NC, Levraud JP, Haddada H, Perricaudet M, Kourilsky P. High frequency of specific CD8+ T cells in the tumor and blood is associated with efficient local IL-12 gene therapy of cancer. *J Immunol* 1999; **162**(1): 609-17.
12. Ahn WS, Bae SM, Kim TY, Kim TG, Lee JM, Namkoong SE *et al.* A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum Gene Ther* 2003; **14**(15): 1389-99.
13. Tahara H, Lotze MT. Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1995; **2**(2): 96-106.

14. Moreno M, Mol BM, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ *et al.* Toll-like receptor agonists and invariant natural killer T-cells enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Cancer Lett* 2008; **272**(1): 70-6.
15. Hornell TM, Beresford GW, Bushey A, Boss JM, Mellins ED. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003; **171**(5): 2374-83.
16. Gri G, Gallo E, Di Carlo E, Musiani P, Colombo MP. OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response. *J Immunol* 2003; **170**(1): 99-106.
17. Min L, Mohammad Isa SA, Shuai W, Piang CB, Nih FW, Kotaka M *et al.* Cutting edge: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is the major CD8(+) T cell-derived licensing factor for dendritic cell activation. *J Immunol* 2010; **184**(9): 4625-9.
18. Lee YS, Kim JH, Choi KJ, Choi IK, Kim H, Cho S *et al.* Enhanced antitumor effect of oncolytic adenovirus expressing interleukin-12 and B7-1 in an immunocompetent murine model. *Clin Cancer Res* 2006; **12**(19): 5859-68.
19. Choi KJ, Kim JH, Lee YS, Kim J, Suh BS, Kim H *et al.* Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect. *Gene Ther* 2006; **13**(13): 1010-20.
20. Nasu Y, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Kaku H, Abarzua F *et al.* Suicide gene

- therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther* 2007; **15**(4): 834-40.
21. Huang Q, Liu XZ, Kang CS, Wang GX, Zhong Y, Pu PY. The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells. *Cancer Gene Ther* 2010; **17**(3): 192-202.
 22. Degreve B, De Clercq E, Balzarini J. Bystander effect of purine nucleoside analogues in HSV-1 tk suicide gene therapy is superior to that of pyrimidine nucleoside analogues. *Gene Ther* 1999; **6**(2): 162-70.
 23. Azatian A, Yu H, Dai W, Schneiders FI, Botelho NK, Lord RV. Effectiveness of HSV-tk suicide gene therapy driven by the Grp78 stress-inducible promoter in esophagogastric junction and gastric adenocarcinomas. *J Gastrointest Surg* 2009; **13**(6): 1044-51.
 24. Nasu Y, Bangma CH, Hull GW, Yang G, Wang J, Shimura S *et al.* Combination gene therapy with adenoviral vector-mediated HSV-tk+GCV and IL-12 in an orthotopic mouse model for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2001; **4**(1): 44-55.
 25. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li YY, Wu Y *et al.* Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J Leukoc Biol* 2008; **84**(4): 1001-10.
 26. Pang B, Neijssen J, Qiao X, Janssen L, Janssen H, Lippuner C *et al.* Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during

- apoptosis. *J Immunol* 2009; **183**(2): 1083-90.
27. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M *et al.* The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; **46 Suppl**: S52-61.
 28. Jiang XB, Lu XL, Hu P, Liu RE. Improved therapeutic efficacy using vaccination with glioma lysate-pulsed dendritic cells combined with IP-10 in murine glioma. *Vaccine* 2009; **27**(44): 6210-6.
 29. Sapra P, Allen TM. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res* 2002; **62**(24): 7190-4.
 30. Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B, Jalil J, de la Rocha P, McCannel TA *et al.* Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; **15**(19): 6267-76.
 31. Huang JH, Zhang SN, Choi KJ, Choi IK, Kim JH, Lee MG *et al.* Therapeutic and tumor-specific immunity induced by combination of dendritic cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 and 4-1BBL. *Mol Ther* 2010; **18**(2): 264-74.

Abstract

Combined gene therapy using adenovirus expressing Interleukin-12, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and thymidine kinase with prodrug Ganciclovir

Ji-Seong Kim, Kyoung-ju Choi and Chae-Ok Yun

Brain Korea 21 Project for Medical Science, Institute for Cancer Research,
Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South
Korea

Tumors exhibit immune escape properties by generating immunosuppressive tumor microenvironment and subverting host immune responses that finally promote their survival. Accordingly, Immunotherapy has been investigated with various strategies involving multiple elements such as combination with several cytokines, co-stimulatory molecules and DC vaccination to improve immune system in tumor microenvironment. Despite of these efforts, still cancer immunotherapy is limited by various huddles. Especially, lack of tumor susceptibility is one of the focused problems. To further investigate the efficient and synergistic cancer immunotherapy by improving tumor susceptibility and tumor cell killing, combined cytokine and “suicide gene” therapy can be novel approach that leads to stimulate tumor specific immune system. In this study, we generated IL-12, GM-CSF and HSV-TK-expressing oncolytic Ads for additive and synergistic anti-tumor immune responses and therapeutic effects through activating type-I immune response and inducing DC activation via enhancing tumor susceptibility. Combinational administration of RdB-IL12/GMCSF-TK Ads with ganciclovir showed significant

antitumor effect compared with control virus *in vitro* and *in vivo* and also significant survival rate was observed. Moreover, IL-12, GM-CSF and IFN- γ cytokine levels in co-treated tumor were significantly greater than those treated with virus only. Furthermore, massive infiltration of CD4+, CD8+ T cells into tumor tissues observed in co-treated group.

Our results indicate that combined IL-12, GMCSF and suicide gene therapy is a promising cancer immunotherapy by synergistic antitumor immune response.

Key Words: immunosuppressive tumor microenvironment, immunotherapy, combined suicide gene therapy, IL-12, GM-CSF, HSV-TK