헤르페스 바이러스를 이용한 두경부암의 유전자 치료

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
김 세 헌

Herpes Viral Gene Therapy for the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Se-Heon Kim, MD
Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

두경부암은 전체 악성 신생암의 6.6%를 차지한다. 세계적인 발생 빈도로 볼 때 여섯 번째로 많은 종양이다. 주 치료법은 수술과 방사선 치료이다. 그러나 최근 수술 술식과 재건술의 발달 및 새로운 항암제의 발견, 방사선 치료 기법의 발달에도 불구하고, 진행된 두경부암의 경우 원발병소 및 국소 재발률이 50~60%에 이르며, 환자의 생존율은 30년 전과 비교하여, 의미 있는 증가를 보이지 못하였다.[1)2)] 따라서 현존하는 수술, 방사선 및 항암제 치료법 외에 질병치료 및 생존율을 증가시키는, 새로운 치료법의 개발이 시급하게 요구되고 있으며, 아울러 기존 수술적 치료법의 단점인 기능 장애도 줄일 수 있는 방법도 함께 모색되어야 한다.

근래 DNA의 3차원적 구조가 밝혀지고 DNA의 복제와 절단 및 결합에 관계되는 효소와 세포의 성장 조절에 관여된 중요한 단백질의 존재가 밝혀지며 인간의 질병을 보는 시각에 많은 변화가 일었고, 결손 된 유전자의 기능을 회복시켜줌으로써 질병을 치료할 수 있다는 생각이 대두되었다. 유전자 치료는 원하는 유전물질을 치료목적으로 환자의 조직 내에서 발현시키는 치료법으로 1990년 Anderson 등은 adenosine deaminase의 결손으로 인해 생기는 면역결핍증 환자에게서 레트로바이러스를 벡터(vector)로 하여 첫 유전자 치료를 시도하였다.[3)] 그러나 암의 발생기전은 단순 유전자의 결핍에서 유발하는 질환 보다는 매우 복잡하며, 최소한 6 내지 7회의 유전적 변형이 일어나야 하므로 단순 유전자의 결핍에 의해 초래되는 질환 보다는 새로운 유전자 치료 전략이 필요하다. 두경부 편평세포암종에서는 종양억제 유전자, 자살 유전자 또는 면역조절 유전자를 이용한 유전자 치료 전략들이 임상 실험 단계에 있으며, 기대되는 연구 결과들이 보고되고 있다.[4-6)] Clayman 등이 종양억제 유전자인 p53 유전자를 아데노바이러스에 이입시킨 후 종양내 투여로 치료효과를 보고한 이래, 최근 두경부편평세포암종의 새로운 치료법으로 바이러스를 유전자 전달 매개체로 한 유전자 치료가 새롭게 각광을 받으며 연구되고있으며, 좋은 결과를 보여주고 있다.[4)] DNA Advisory Committee에 승인된 인간을 대상으로 하는 유전자 치료 연구 중 62%의 연구가 악성 종양의 치료에 관한 연구이다

유전자 치료에 있어서 가장 중요한 요소 중 하나는 원하는 유전자를 목표 세포로 운반하는 물질을 벡터(vector) 이다. 바이러스는 가장 많이 사용되는 유전자 전달 벡터로 아데노바이러스(adenovirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노관련바이러스(Adeno-associated virus) 및 헤르페스바이러스(herpes simplex virus) 등이 있다. 벡터는 단순히 원하는 유전자만을 전달하면 되는 것이 아니라 expression casette라 불리는 유전자와 이 유전자의 발현 조절 요소 및 promotor를 같이 운반해야 한다. 이상적인 바이러스 유전자 전달 벡터는 다음의 조건을 갖추고 있어야 한다. 표적세포에 감염 후 바이러스의 증식이 원하는 만큼 일어나야 하며, 매개체가 운반할 수 있는 유전자의 크기에 제한이 없어야 하고, 표적 세포의 세포주기와 상관 없이 감염이 일어나야 하며, 가급적 여러 장기의 암에 효율적으로 감염을 일으킬 수 있어야 한다. 또한 숙주의 혈청에서 안정적이어야 하며, 독성이 없어야 하고, 염증 및 면역반응을 최소한으로 유발시켜야 한다.[7)]

최근 헤르페스 바이러스가 두경부편평세포암의 유전자 전달 벡터로서 많은 장점을 가지고 있음이 증명되었다.[8)] 헤르페스 바이러스는 천성적으로 신경조직에 친화성이 있어,

처음에는 신경계 질환의 유전자 치료에 사용되도록 고안되었다.[11] 그러나 최근의 연구에 의하면, 헤르페스 바이러스는 거식세포, 섬유아세포, 간세포, 대장암 및 편평상피암세포에서도 유용한 벡터인 것이 증명되었다.[9][10]

벡터로서 헤르페스 바이러스의 장점은 다음과 같다. 다른 바이러스에 비하여 게놈(genome)의 크기가 크고(150 Kb), 꼭 필요하지 않은 유전자 부분이 약 30 kb 정도 되므로 원하는 유전자를 이입하는데 제한이 적으며(30 kb 크기의 유전자까지 이입이 가능함), 여러 종류의 세포에 단시간에 효율적인 감염이 가능하며, 무엇보다 가장 큰 장점은 분열하지 않거나 매우 천천히 분열하는 세포에도 효과적으로 원하는 유전 물질을 발현시킬 수 있다는 점이다.[11] 또한 감염된 숙주 세포를 살상할 수 있는 능력을 지니고 있으며, 문제가 되는 신경 독성에 관여되는 유전자는 제거해도 바이러스의 증식 능력에 결정적인 영향이 없는 유전자들이어서, 신경독성은 줄이고 종양 살상 능력은 증가시킨 바이러스의 개발이 가능하다. 헤르페스 바이러스는 숙주에 감염된 후 핵의 염색체에 삽입이 되지 않으므로 유전자 발현을 영구히 기대할 수는 없으나, 이로 인한 돌연변이 등의 부작용은 일으킬 가능성이 없다.

헤르페스 바이러스를 이용한 유전자 치료는 크게 종양백신과 종양살상 바이러스를 이용한 방법으로 대별 된다. 방사선 조사 후 분열이 정지된 세포에서의 감염능력은 유전자 조작에 의한 종양백신 생성에 가장 중요한 요소이다. 종양백신의 벡터로 사용되는 헤르페스 바이러스로는 엠플리콘(amplicon)바이러스와 헤르페스 바이러스의 막을 형성하는 gH 부분의 유전자를 제거하고 여기에 원하는 유전자를 이입시킨 Defective Infectious Single Cycle virus(DISC)바이러스가 있으며, 종양살상 바이러스로는 헤르페스 바이러스의 신경독성은 없애고 종양에 특이적인 살상 능력을 가진 NV1020나 G207 같은 바이러스가 있다.

헤르페스 바이러스백터를 이용한 종양 백신

대표적인 유전자 치료전략의 하나는 유전적으로 변형된 종양 백신을 이용하는 것이다. 종양 백신의 개념은 Prehn과 Main이 처음 보고하였는데 단순히 종양의 절제 후 동질의 종양세포를 투여하면, 종양의 형성이나 성장이 억제된다는 면역예방(immunoprophylaxis)을 입증한 것이었다.[12] 종양 백신을 만들기 위해서는 종양의 항원이 필요하기 때문에 종양세포 추출물, 종양세포내 펩타이드, 열쇼크단백(heat-shock proteins) 등을 항원으로 이용하려는 연구가 진행되고 있으나, 특이적 종양 항원의 정체는 아직 규명되지 않은 상태이다. 아울러 동종의 종양 항원을 사용했을 경우 주요조직적합항원의 상이함으로 백신으로서의 유용성이 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 최상의 방법은 추정되는 종양 항원을 모두 가지고 있는 자가 종양조직으로 백신을 만드는 것이라 생각한다. Kim 등은 Defective Infectious Single Cycle Herpes Simplex Virus(DISC 바이러스)를 이용한 종양 백신에 대한 연구를 보고하였다.[13] DISC 바이러스는 헤르페스 바이러스의 막을 형성하는 gH 부분의 유전자를 제거하고 여기에 원하는 유전자를 이입시킨 것으로, 숙주세포에 감염 후 완전한 복제 과정을 거치나, 그 자손들은 유전자 조작으로 인해 감염 능력이 상실된다. 따라서 헤르페스 바이러스의 세포독성을 극소화시킨 안전한 바이러스 벡터이다.[14]

Kim 등은 자가 종양조직으로부터 세포를 분리하고, 방사선을 조사하여 종양의 항원성은 유지한 채, 세포의 분열능력을 없앤 후 DISC 바이러스를 벡터로 이용하여 종양 백신을 만들었다.[13] 이후 종양 백신의 면역계 자극을 강화하기 위해 IL-2 및 GM-CSF 유전자를 갖는 DISC 바이러스를 종양 백신에 감염시켜 종양 백신 자체에서 면역조절물질을 분비하게 한 후 항암 효과를 관찰하였다. 이렇게 유전적으로 변형된 종양 백신의 논리적 근거는 다음과 같다. 첫째, 이입된 유전자에 의하여, 사이토카인과 같은 면역조절 물질이 종양세포에서 분비되므로, 추정되는 종양 항원과 밀접한 위치에서 효과적인 농도를 유지시킬 수 있으며, 둘째, 지속적 국소적 분비로 인하여, 사이토카인의 전신적 또는 국소적 직접 투여시 문제되는 짧은 반감기 및 부작용을 피할 수 있고, 셋째, 면역조절물질을 면역반응이 일어나는 곳에 공급함으로써, CD4 T 임파구의 주작용을 대신할 수 있다.[15] 유전자치료를 이용한 종양 백신의 궁극적 목적은 항종양면역반응을 향상시키고, 종양에 대한 지속적인 면역능력을 갖게 하는데 있다. 대표적 사이토카인인 IL-2, GM-CSF는 여러 연구에서 항종양 효과가 입증된 면역조절물질이다. IL-2는 CD4 임파구에서 분비되는 주된 사이토카인으로, 주 기능은 CD4, CD8 임파구를 자극하고 활성화시키며, 세포독성 T-임파구의 반응을 효과적으로 유도하는 것이다. GM-CSF는 항원전달 세포의 성장과 기능을 항진시키며, 거식세포나 돌기세포(dendritic cell) 등 항원전달 세포의 주요조직적합항원의 표현을 강화시킨다. 두 가지 사이토카인 모두 항종양 면역의 도입단계 즉, 종양 항원이 유리되면 항원전달 세포가 종양 항원을 섭취 후 공정

을 거쳐 주변 림프절로 이동 종양세포의 항원성을 자연 T 임파구에 전달하여 자극하는 과정에 서로 다른 경로로 작용 한다. Kim 등의 연구 보고에 의하면, SCC VII 세포주로, IL-2와 GM-CSF 유전자를 이입한 DISC 바이러스를 감염시킨 결과, 감염된 종양세포에서 이입된 IL-2 및 GM-CSF 유전자의 전령 RNA(m-RNA)가 표현됨을 관찰할 수 있었으며, 방사선을 조사하여 분열능력을 없앤 종양세포에서도 IL-2와 GM-CSF의 단백 생성이 효과적으로 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 DISC 바이러스가 임상적으로 적용될 수 있는 종양 백신의 생성시 유용한 벡터임을 증명하였다.[13)]

앞서 언급한 바와 같이 유전자 치료에 있어, 헤르페스 바이러스 벡터의 주된 장점은 미분열 세포와 느린 속도로 분열하는 세포에도 빠르고 효과적으로 유전물질을 전달한다는 점이다. 이러한 특성은 중요한 임상적 의미가 있다. 종양의 적출로 얻어진 신선한 종양조직에서 종양세포를 분리하여 별도의 배양 과정 없이 부유액 상태로 방사선 조사 후 원하는 유전자를 지닌 DISC 바이러스에 감염시킴으로써 단시간 내에 유전적으로 조작된 종양 백신을 만들 수 있다는 점이다. Tung 등은 헤르페스 바이러스 벡터의 일종인 앰플리콘 바이러스를 이용하여, 20분 내에 유전물질의 전달이 일어나며, 세포 부유액 상태에서도 효과적 감염이 일어남을 보고하였다.[11)] 레트로바이러스나 아데노바이러스 등은 위와 같은 과정시, 별도의 배양과정과 시간이 필요함을 비교하여 보면, DISC 바이러스가 수술 과정 중, 종양 백신을 생성할 수 있는 보다 최적의 바이러스 벡터라고 생각된다.

Kim 등은 DISC 바이러스를 이용해 IL-2 또는 GM-CSF를 분비하도록 한 종양 백신(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF)의 투여는, 동종의 신선한 종양세포 주입시 종양의 생성 및 성장이 억제되었다. 반면, 대조군에서는 신선한 종양세포 주입후 7일 이내에 모든 실험동물에서 종양이 발생하였으며, 급속도로 성장하였다고 보고하였다(Fig. 1).[13)] 이러한 항종양 효과가 종양 백신의 특이적 반응으로 인한 것인지를 확인하기 위하여 시행한 51 Chromium 유리를 이용한 T-림프구의 특이적 항종양 세포독성시험에서 세포독성 T-림프구의 종양세포 살상능력이 의미 있게 증가된 양상을 보였다. 종양 백신의 항암효과는 표적이 되는 종양의 부피가 작을수록 증대된다. 대체적으로 이상적인 종양 표적의 크기는 109개 미만의 종양 세포, 크기로는 1.5 cm 미만의 종양이다. 두경부 편평세포암의 주된 치료 실패 원인이 수술 또는 방사선 치료 후 미세 잔존암이나, 미세 전이에 의한 원발부위 또는 국소 재발임을 고려할 때, 종양 백신은 주 치료법보다는 수술이나 방사선치료 후 재발의 원인이 되는 미세 잔존암이나, 미세 전이의 치료전략으로 유용하게 이용될 수 있으리라 생각한다. 앞으로 인간의 종양조직에 적용이 가능하리라 생각되며, 종양조직을 이용하여 단일세포 부유액을 만들면, 별도의 배양 과정 없이 수 시간 내에 효율적으로 원하는 유전자의 종양세포로 이입이 가능하므로, 종양 백신을 보다 쉽게 생성할 수 있으며, 수술 시야에서 안전하게 투여할 수 있다는 기능성을 제시하였다.

또한 Kim 등[13)]은 기존의 형성된 종양 조직에 DISC-GMCSF를 종양 내로 직접 투여한 결과 의미 있는 종양 성장

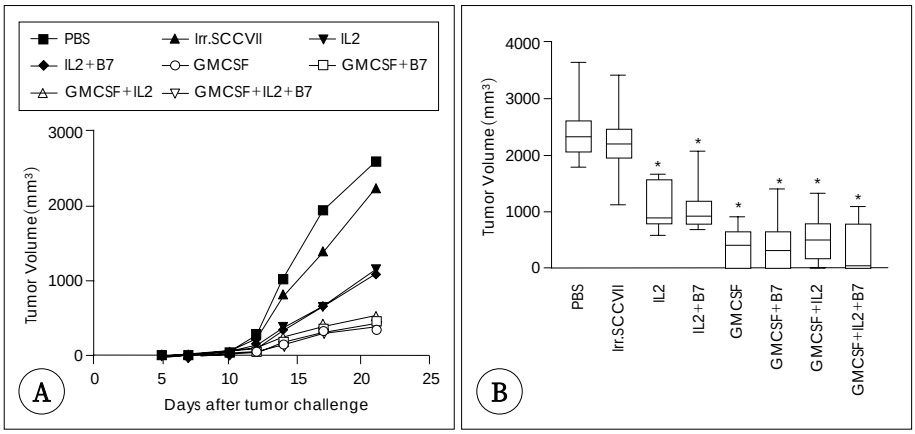

Fig. 1. Effect of vaccination with SCCVII cells transduced with various DISC viral constructs on tumor growth in a syngeneic tumor model. A : All treated groups were significantly different from groups treated with PBS or irradiated SCC. Among the multiple immunomodulatory transgene vaccination groups, combinations that included GM-CSF showed the greatest antitumoral protection. B : Box plots demonstrating the effect of vaccination with SCCVII cells modified with various DISC constructs. Data indicate tumor size at day 21 after tumor inoculation in C3H/HeJ mice. p (*p, .01 for each treated group versus PBS or irradiated SCC controls. PBS : PBS controls, Irr. SCCVII : irradiated SCCVII cells, IL2 : DISC-IL2-transduced SCCVII cells, IL21B7 : DISC-IL2- and DISC-B7-transduced SCCVII cells, GMCSF : DISC-GMCSF-transduced SCCVII cells, GMCSF1B7 : DISC-GMCSF- and DISC-B7-transduced SCCVII cells, GMCSF1IL2 : DISC-GMCSF- and DISC-IL2-transduced SCCVII cells, GMCSF1IL21B7 : DISC-GMCSF-, DISC-IL2- and DISCB7-transduced SCCVII cells).

억제 효과를 관찰할 수 있었다고 보고하였다($p<0.001$)(Fig. 2). 그러나 장기간 추적 관찰 시에는 종양의 성장 속도가 너무 빨라 DISC-GMCSF 바이러스에 의한 항종양 효과를 희석 시켰다. 따라서 이러한 치료 전략은 큰 종괴의 종양보다는 미세전이나 잔존 암과 같이 종양의 크기가 적은 경우에 효과적이라 생각한다. GM-CSF는 항원 전달 기능을 강화시켜 T-임파구를 통한 세포 독성을 증가시킨다. 따라서 CD4, CD8 임파구는 항종양 면역과정에 있어 매우 중요한 역할을 담당한다. DISC-GMCSF를 직접 주입한 종양조직에서 세포를 분리하여 종양 조직에 침투된 임파구를 flow cytometry를 통하여 분석한 결과, CD8 및 CD4 양성 T-임파구가 대조군에 비해 의미 있게 증가했음을 관찰할 수 있었으며, 아울러 전반적인 T 임파구와 B 임파구의 표면 항원인 CD45 양성세포도 증가된 양상을 보였다. 이것은 DISC-GMCSF 바이러스가 종양세포에 감염 후 유전자 이입을 통한 GM-CSF의 생산을 유발하여 항종양 면역 세포의 증가를 가져온 것을 의미한다.

종양살상 헤르페스 바이러스를 이용한 유전자 치료

최근 두경부 편평세포암의 새로운 치료법으로 유전자 치료에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들 치료전략 중 하나가 종양붕괴 바이러스를 이용한 유전자 치료법이다. G207 바이러스는 헤르페스 1형 바이러스에서(34.5 부위의 유전자를 제거하고, ICP6 유전자 부위에 표식 유전자인 Lac-Z 유전자를 삽입시킨 변형이다(Fig. 3). 헤르페스 바이러스에서(34.5 유전자의 역할은 바이러스 감염 후, 여기에 대항하여 감염된 세포에서 더 이상의 단백 합성을 중지시키는 반응을 억제하는 작용으로, 신경독성을 유발시키는 주요인자이다. 만일 이 유전자가 G207 바이러스와 같이 제거되면, 바이러스의 분열 능력이 많이 저하되는 반면, 헤르페스 바이러스의 단점인 신경독성을 거의 완전히 없앨 수 있다. ICP6 유전자는 DNA 합성에 필요한 ribonucleotide reductase(RR)를 만들어 내는 곳으로 G207 바이러스는 이 부위에 표식 유전자인 Lac-Z 유전자가 삽입되어 있어 종양세포와 같이 빨리 분화하여 RR를 강하게 발현하는 세포에서 선택적으로 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 된다. 이상의 유전자 조작으로 인하여 G207 바이러스는 신경독성이 제거되었고, 세포 분열이 활발히 일어나는 세포, 즉 RR 발현이 높은 세포에서만 분열이 효과적으로 일어나므로 종양세포에 선택적인 감염을 일으킬 수 있다. 또한 쉽게 바이러스의 존재를 인지할 수 있는 Lac-Z 유전자가 들어있어 바이러스의 분열 상태를 쉽게 인지 할 수 있고 열에 매우 약하고 기존의 항바이러스 약물에 민감하여, 혹시 우려될 수도 있는 뇌염과 같은 부작용 발생시 쉽게 바이러스를 치유할 수 있다는 장점이 있으며, 두 군데의 유전자 변형으로 인하여 야생형의 헤르페스 바이러스로 변화할 가능성이 거의 없다는 장점도 있다.[16)17)] Carew 등은 두경부 편평상피암종 세포주에서 G207 바이러스의 종양세포 살상 능력을 관찰하였으며, 일부 세포주(SCC15)에서는 MOI (multiplicity of infection) 2에서 감염 1일 후 감염률이 70%,

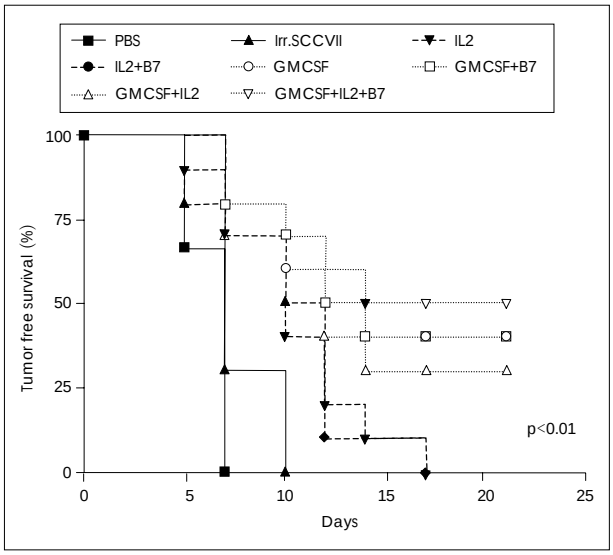

Fig. 2. Effect of vaccination with SCCVII cells transduced with various DISC viral constructs on tumor-free survival in a C3H/HeJ syngeneic tumor model. The groups tested are described in the legend to Fig. 2. The tumor-free survival of mice from the GM-CSF group was significantly better than that seen for the mice from the IL-2 group (log rank test, p, .001 : GMCSF versus PBS or Irr. SCCVII, GMCSF1B7 versus PBS or Irr. SCCVII, GMCSF1IL2 versus PBS or Irr. SCCVII, or GMCSF1IL21B7 versus PBS or Irr. SCCVII).

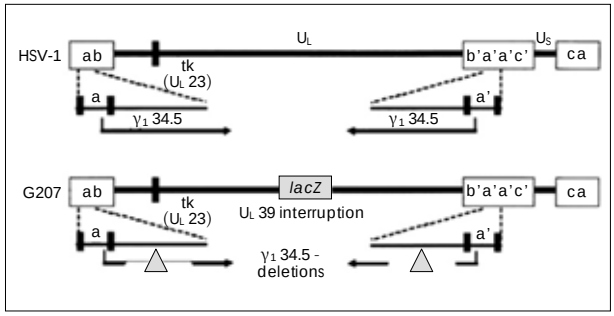

Fig. 3. G207 This slide provides a simplified diagram of G207 compared to its parent wild-type herpes simplex virus type 1. One important modification of G207 is the insertion of an E. coli lac Z marker gene at the ICP6 locus. The presence of this lac Z marker gene confers the ability to quantify viral infection by measuring functional Beta-galactosidase activity or by using X-Gal staining. The position of the insertion of this marker holds important implications as well. In wild type HSV, the ICP6 gene encodes for the large subunit of the enzyme ribonucleotide reductase.

감염 3일 후 생존 세포의 비율이 2% 미만으로 훌륭한 종양 세포 살상 능력을 보이나, 일부 세포주(SCC25)에서는 MOI (multiplicity of infection) 2에서 감염 1일 후 감염률이 5%, 감염 3일 후 생존 세포의 비율이 10% 이상으로 종양 세포의 살상 능력이 세포주의 바이러스에 대한 민감도에 따라 차이를 보임을 알 수 있다.[12] Kooby 등은 대장암 세포주들에서 G207 바이러스의 종양살상 능력을 비교해 본 결과 역시 일부 세포주들은 매우 민감하나 다른 일부 세포주들에서는 종양살상 능력이 많이 떨어짐을 관찰 할 수 있었고, 바이러스에 대한 민감도는 종양세포의 세포 주기 중 S-phase 부분에 비례한다고 하였다.[18]

Wong 등은 유전자 변형에 의하여 바이러스의 증식 능력은 유지 한 채 신경 독성을 없앤 또 G207과 유사한 종양살상 헤르페스 바이러스인 NV1020를 이용하여 두경부 편평상피세포암종에서의 종양 치료 능력을 보고하였다(Fig. 4).[19] 두경부 편평세포암종 세포주에 따라 NV1020의 종양살상 능력은 다소 차이가 있었지만, MOI=1(종양세포 1개당 바이러스 1개 비율의 감염도) 에서는 NV1020 감염 후 5일째 모든 종양세포가 완전히 살상되는 결과를 보고하였다. 또한 종양 세포에 감염을 일으킨 NV1020 바이러스는 종양세포 내에서 증식을 거듭하며, 종양세포를 붕괴시키고 또 주변의 종양세포를 감염시킴으로써 감염 2일째 처음 바이러스의 양 보다 약 200배가 증가되는 결과를 보고하여, 소량의 바이러스 감염으로도 바이러스의 증식으로 인한 주변 종양세포로의 감염 확산으로 종양을 효과적으로 살상 할 수 있다는 가능성을 보여주었다.

또한 Wong 등은 종양살상 바이러스의 항종양 효과를 배가 시키기 위해 NV1020와 비슷한 구조를 가지는 NV1023에 GM-CSF(NV1034)와 IL-12(NV1042) 유전자를 이입시킨 후 항종양 효과를 비교하였다(Fig. 4).[20] NV1023에 GM-CSF 유전자를 이입시킨 NV1034와 IL-12 유전자를 이입 시킨 NV1042는 감염 능력에 있어 NV1023와 차이가 없었으며, GM-CSF 및 IL-12 단백질의 발현을 확인 할 수 있었다. NV1023로 치료한 경우에 비하여, 의미 있게 항종양 효과가 증가하였으며, 종양 백신의 효과를 확인하기 위하여, 실험 동물의 종양을 NV1020, NV1034 와 NV1042로 치료 후 종양을 수술적으로 제거하고, 다시 종양세포를 주입 하였을 때, NV1023로 치료한 군에서는 14% 정도에서 종양생성을 억제한 반면, NV1042로 치료한 군에서는 57%에서 종양생성 억제력이 관찰되어 종양 백신의 효과도 있음을 확인 하였다. 이 효과는 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 없앤 상황에서는 관찰되지 않아 이러한 종양 억제 효과가 T 세로와 연관된 종양 백신으로 인한 면역 반응에 기인한 것을 확인하였다.

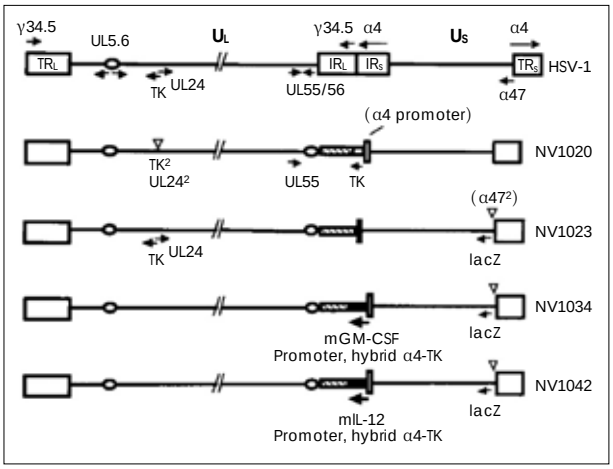

Fig. 4. Viral structures. The wild-type HSV-1 genomic structure, shown schematically, consists of long (L) and short (S) unique sequences (UL and US), each bound by inverted repeat regions (RL and RS). The locations of the following genes are shown: thymidine kinase (TK), UL24, UL5/6, g134.5 (the major HSV-1 neurovirulence gene), and the immediate-early genes a4 and a47. The NV1020 genome contains a 700-bp deletion (open triangle) in the endogenous TK/UL24 locus and a 15-kb deletion from the 39 end of gene UL55 to the promoterregulatory region of a4 located in IRS. The L/S junction of NV1020 contains a duplication of UL5/6 sequences (open circle), 5.2 kb of HSV-2 DNA (hatched box), and an exogenous copy of the TK gene under the control of the a4 promoter. NV1023 is a derivative of NV1020. NV1023 is repaired for the deletion at the TK/UL24 locus, deleted for the a4-driven TK gene, and carries the E. coli lacZ gene under the control of the a47 promoter at the a47 locus. NV1034 and NV1042 are similar in structure to NV1023 and carry the murine GM-CSF and IL-12 genes, respectively, under the control of a hybrid a4-TK promoter.

종양살상 헤르페스 바이러스와 방사선 치료의 병합 치료 효과

종양붕괴성 헤르페스 바이러스를 이용한 유전자 치료와 방사선 치료를 병합하는 이론적 근거는 다음과 같다. 첫째 G207 바이러스는 악성 수막종, 신경교종, 유방암 및 대장암 세포에서 효과적인 종양살상 능력을 보이는 이상적인 종양붕괴 바이러스이다. 둘째, 방사선 조사시 손상된 DNA에 의해 세포의 분열을 억제하고 고사를 유도하는 유전 물질인 Gadd34 단백이 발현된다는 보고가 있다.[21] 셋째, G207 바이러스에서 삭제된 유전자인 r34.5 유전자의 카르복실 종말부위에 의해 만들어지는 아미노산 중 64개의 아미노산이 Gadd34 유전자에 의해 만들어지는 아미노산과 유사하므로, 만일 Gadd34 유전자의 발현이 삭제된 r34.5 유전자의 기능을 대치할 수 있다고 가정하면, 신경독성은 희석

된 상태에서 국소적으로 (종양세포 내에서) 바이러스의 복제가 활발히 일어날 수 있다.[22] 넷째, dNTP 합성의 중요 효소인 RR는 방사선 조사 후 손상된 DNA의 유도로 활성이 증가된다는 보고가 있다.[23] 다섯째, G207 바이러스는 RR 발현을 담당하는 유전자 부위에 변성을 일으켜, 세포 분열이 왕성하여 RR의 발현이 높은 종양세포에서 선택적으로 복제 활동이 증가되는 특성이 있으며, 만일 방사선 조사 후 RR의 발현이 더욱 증가된다면, 종양세포 내에서 바이러스의 복제가 더욱 왕성히 일어날 수 있으리라 가정할 수 있다. 여섯째, G207 바이러스는 헤르페스 바이러스로서, 다른 바이러스 벡터와는 달리 방사선 조사 후 분열이 정지된 종양세포에서도 효과적인 감염을 일으킬 수 있다. Kim 등은 이상의 결과로 미루어 종양붕괴 바이러스인 G207 바이러스와 방사선 치료의 병용시, 바이러스의 신경독성을 없앤 상태에서 정상 조직은 배제한 채 종양세포에 선택적 바이러스 감염이 일어나고, 한편 방사선 조사로 인한 Gadd34 및 RR의 증가로 인하여 바이러스의 종양살상 능력이 배가되어 상승작용을 일으킬 수 있다고 보고 하였으며, 연구 결과 저용량의 방사선과 항암 바이러스의 병용요법은 두경부 편평세포암의 치료에 있어 부가 또는 상승

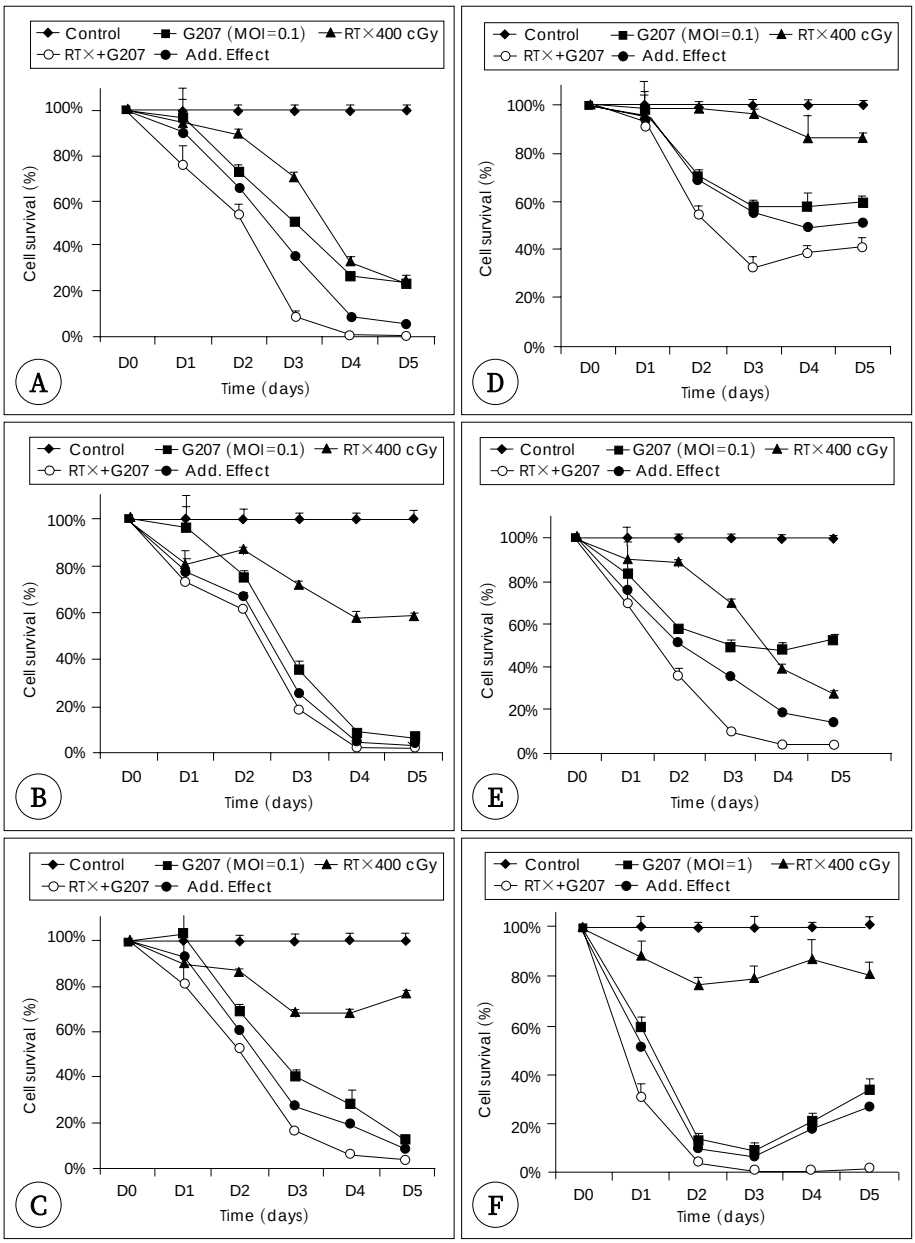

Fig. 5. In vitro cytotoxicity assays for the combination effect of G207 and radiation therapy on head and neck squamous carcinoma cell lines. The results of combining treatment are shown for SCC1483 (A), SCC15 (B), SCC25 (C), MSK QLL2 (D), HN886 (E), and SCCVII (F). The dotted line reflects the hypothetical additive effect of an exclusive radiation therapy and an exclusive G207 virus therapy (All tests were performed in quadruplicate. The product of the surviving fraction of cells after treatment with radiation and G207 represents the additive effect. MOI : multiplicity of infection, RT : radiotherapy).

효과를 가지며, 저용량의 방사선은 바이러스의 증식에 영향을 미치지 않는다는 것을 입증하였다. [24)]

이제까지 방사선 치료와 G207 바이러스 병합치료에 관한 연구는 방사선 조사량이 실제 임상적으로 적용할 수 없는 많은 양을 조사하여, 임상적 적용이 어려웠다. 그러나 Kim 등의 연구는 방사선 조사량을 임상적 치료 환경과 비슷한 조건으로 적용하여, 두경부암에서 두 가지 치료법의 병합 치료 효과를 보았다.[24)] 방사선 치료시 세포의 apoptosis에 의해 바이러스가 증식할 수 있는 세포의 수가 줄어들 것을 감안하면, 방사선 조사 후 바이러스의 증식이 줄어들지 않았다는 결과는 방사선 조사가 바이러스의 증식에 최소한 영향을 주지 않거나, 바이러스의 증식을 촉진 시킨다고 생각 할 수 있다. 또한 실험에 사용된 두경부 편평세포암종 6개의 세포주 모두에서 G207 바이러스를 이용한 유전자치료와 방사선치료의 병합 요법이 예상되는 첨가효과보다 더욱 효과적으로 종양세포를 살상 시켰으며, 이는 두 치료법이 종양세포를 살상하는 기전이 다르게 작용하거나 한 치료법이 다른 치료법의 효과를 증폭시켜준다고 생각할 수 있다(Fig. 5).

이상의 결과로 미루어 방사선 치료와 G207 바이러스를 이용한 유전자 치료는 두경부암 모델에서 상호 보완적인 효과가 있으며, 이는 방사선 치료에 저항성 있는 세포를 효과적으로 살상하므로서, 방사선 치료의 효과를 높일 수 있는 치료법으로 임상적으로 적용할 수 있는 가능성을 보여주었다.[24)]

결 론

헤르페스 바이러스는 환자의 종양 조직을 가지고 종양 백신을 생성하는데 기존의 바이러스 벡터에 비하여 많은 장점을 가지고 있는 바이러스 벡터이다. 헤르페스 바이러스는 두경부 편평세포암에도 우수한 감염 능력 및 증식 능력을 보이며, 신경 독성을 없애고, 종양세포에만 선택적으로 감염을 일으키는 유전자 변이된 종양살상 헤르페스 바이러스는 MOI=1에서 95% 이상의 종양 살상 능력을 가진다. 종양살상 헤르페스 바이러스에 면역조절유전자를 이입하면, 직접적인 종양 살상 능력과 더불어 종양 백신의 효과도 2차적으로 얻을 수 있어 의미 있게 증가된 항 종양 효과를 기대할 수 있다. 방사선 치료와 종양살상 헤르페스 바이러스인 G207 바이러스를 이용한 유전자 치료는 두경부암 모델에서 상호 보완적인 치료 효과가 있으며, 이는 방사선 치료에 저항성 있는 세포를 효과적으로 살상함으로써, 방사선 치료의 효과를 높일 수 있는 치료법으로 가능성을 보여주었다.

REFERENCES

1) Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. *Head and Neck Cancer. N Engl J Med 1993;328:184-94.*
2) Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. *National cancer data base report on cancer of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Sur 1998;124:951-62.*
3) Anderson W, Blaese RM, Culver K. *The ADA human gene therapy clinical protocol. Hum Gene Ther 1990;1:331-62.*
4) Clayman GL, el-Naggar AK, Roth JA. *In vivo molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck suqamous carcinoma. Cancer Res 1995;55;1-6.*
5) O'Malley BW, Cope KJ, Chen SH, Li D, Schwartz R, Woo SL. *Combination gene therapy for oral cancer in a murine model. Cancer Res 1996;56:1737-41.*
6) Myers JN, Mank-Seymour A, Zitvogel L, Storkus W, Clark M, Johnson CS, *et al. Interleukin-12 gene therapy prevents establishment of SCCVII squamous cell carcinomas, Inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice. Laryngoscope 1998;108:261-8.*
7) Simons JW, Mikhak B. *Ex vivo gene therapy using cytokine-transduced tumor vaccines: Molecular and clinical pharmacology. Sem Oncol;1998. p.661-76.*
8) Carew JF, Federoff H, Halterman M, Kraus DH, Savage H, Sacks PG, *et al. Efficient gene transfer to humn squamous cell carcinoma by the herpes simplex virus type1 amplicon vector. Am J Surg 1998;176:404-8.*
9) Fong Y, Federoff HJ, Brownlee M, Blumberg D, Blumgart LH, Brennan M. *Rapid and efficient gene transfer in human hepatocytes by herpes viral vectors. Hepatology 1995;22:723-9.*
10) Kooby DA, Carew JF, Halterman MW, Mack JE, Bertino JR, Blumgart LH, *et al. Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herped simplex virus type-1 (G207). FASEB 1999;13:1325-34.*
11) Tung C, Federoff HJ, Brownlee M, Karpoff H, Weigel T, Brennan M, *et al. Rapid production of interleukine-2-secreting tumor cells by herpes simplex virus-mediated gene transfer: Implications for autologous vaccine production. Hum Gene Ther 1996;7:2217-24.*
12) Prehn RT, Main JM. *Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. J Natl Cancer Inst 1957;18:767-78.*
13) Kim SH, Carew JF, Kooby DA, Shields J, Entwisle C, Patel S, *et al. Combination gene therapy using multiple immunomodulatory genes transferred by a defective infectious single-cycle herpes virus in squamous cell cancer. Cancer Gene Ther 2000;7:1279-85.*
14) Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB. *An efficient deletion mutation packaging system for defective herpes simplex virus vectors: Potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:8950-4.*
15) Scott AM, Cebon J. *Clinical promise of tumor immunology. Lancet 1997;349(supplII):19-22.*
16) Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. *Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 34.5, a gene nonessential for growth in culture. Science 1990;250:1262-6.*
17) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL. *Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. Nature Medicine 1995;1:938-43.*
18) Carew JF, Kooby DA, Halterman MW, Federoff HJ, Fong Y. *Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic herpes simplex virus type 1 (G207). Hum Gene Ther 1999;10:1599-606.*
19) Wong RJ, Kim SH, Joe JK, Shah JP, Johnson PA, Fong Y. *Effective treatment of head and neck squamous cell carcinoma by an oncolytic herpes simplex virus. J Am Coll Surg 2001;193:12-21.*
20) Wong RJ, Patel SG, Kim SH, DeMatteo RP, Malhotra S, Bennett JJ, *et al. Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in*

murine squamous cell carcinoma. Hum Gene Ther 2001;12:253-65.

21) Jackman J, Alamo I, Jr Fornace AJ. *Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five gadd genes. Cancer Res 1994;54:5656-62.*

22) He B, Chou J, Liebermann DA, Hoffman B, Roizman B. *The carboxyl terminus of the murine MyD116 gene substitutes for the corresponding domain of the γ134.5 gene of herpes simplex virus to preclude the premature shutoff of total protein synthesis in infected human cells. J Viorol 1996;70:84-90.*

23) Kuo ML, Kinsella TJ. *Expression of ribonucleotide reductase after ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. Cancer Res 1998;58:2245-52.*

24) Kim SH, Wong RJ, Kooby DA, Carew JF, Adusumilli PS, Patel SG, *et al. Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Cancer 2005;41:313-22.*