

MN/CA9 촉진자를 가진 Replication-competent 아데노바이러스를 이용한 신세포암에 대한 종양 특이적 유전자요법

Tumor-specific Gene Therapy for Renal Cell Carcinoma Using MN/CA9-directed Replication-competent Adenovirus

Se Joong Kim, Miwon Ahn, Ho Yeong Lim¹, Hyun Cheol Chung², Thomas A. Gardner³, Chinghai Kao³, Sang-Jin Lee³, Min Kyu Choi, Young Soo Kim

From the Departments of Urology and ¹Medical Oncology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea, ²Cancer Metastasis Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, and ³Department of Urology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA

Purpose: A new therapeutic approach is needed in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) because of a dismal prognosis. MN/CA9 is a transmembrane glycoprotein that was first identified in the human cervical carcinoma cell line, HeLa. Since MN/CA9 protein is highly expressed in RCC tissues, but not in normal kidney, we constructed a tumor-specific replication-competent adenoviral vector utilizing MN/CA9 promoter (Ad-MN/CA9-E1a) and demonstrated its selective cytotoxicity toward MN/CA9-expressing RCC cells *in vitro*.

Materials and Methods: MN/CA9-positive (HeLa, SK-RC-52) and MN/CA9-negative (SK-RC-29) cells were used. RT-PCR assay for MN/CA9 mRNA was performed in each cells. Ad5 E1a protein production in each cells after infection with Ad-MN/CA9-E1a was determined by western blot analysis. *In vitro* cytotoxicity assay was performed for assessing the selective cytotoxicity of Ad-MN/CA9-E1a to MN/CA9-expressing cells.

Results: RT-PCR assay showed that a distinct 255-bp fragment corresponding to the sequence within MN/CA9 cDNA was detected in HeLa and SK-RC-52 cells, but SK-RC-29 cells did not have MN/CA9 transcripts. Western blot analysis demonstrated that HeLa and SK-RC-52 cells showed much stronger Ad5 E1a protein expressions compared with SK-RC-29. *In vitro* cytotoxicity assay revealed that the growth of MN/CA9-positive cells was significantly inhibited with 0.1-1MOI of Ad-MN/CA9-E1a, but the growth of MN/CA9-negative cells (SK-RC-29) could only be inhibited by as many as 100MOI.

Conclusions: These results suggest that a novel replication-competent adenoviral vector mediated by MN/CA9 promoter, Ad-MN/CA9-E1a, can selectively replicate in MN/CA9-expressing cancer cells with cytotoxic effects and may be utilized for the treatment of RCC. (Korean J Urol 2004;45:456-462)

Key Words: Renal cell carcinoma, Gene therapy, Adenovirus, Virus replication

대한비뇨기과학회지
제 45 권 제 5 호 2004

아주대학교 의과대학 비뇨기과학교실,
¹종양내과학교실, ²연세대학교
의과대학 암전이연구센터,
³인디애나대학교 의과대학
비뇨기과학교실

김세중 · 안미원 · 임호영¹ · 정현철²
Thomas A. Gardner³ · Chinghai
Kao³ · 이상진³ · 최민규 · 김영수

접수일자 : 2004년 1월 14일
채택일자 : 2004년 3월 10일

교신저자: 김세중
아주대학교병원 비뇨기과
경기도 수원시 영통구 원천동 산
5번지
☎ 442-721
TEL: 031-219-5272
FAX: 031-219-5276
E-mail: sejoong@madang.
ajou.ac.kr

본 연구는 2001년 아주대학교대학원의학
과 연구비에 의하여 수행되었음.

서 론

신세포암은 성인 암의 2-3%, 악성 신종양의 약 85%를 차지한다. 최근에는 초음파촬영술 등의 발달로 저병기의 신세포암이 우연히 발견되는 경우가 많으며 이 경우에는 수술 후 예후가 좋지만, 전이성 신세포암의 경우에는 아직도 예후가 불량하다.¹ 따라서 전이성 신세포암에서는 기존의 치료방법만으로는 불충분하며 유전자요법과 같은 새로운 치료방법의 도입이 절실히 요구된다.

아데노바이러스를 이용하여 유전자치료를 시행하는 경우 대부분에서는 바이러스를 감염시킨 후 세포 내에서 복제되지 못하도록 만든 replication-defective 아데노바이러스를 이용한다. 이 경우 모든 암세포를 감염시키지는 못하므로 유전자 전달의 효율이 낮고, 유전자 발현 기간이 짧다는 문제점이 있다. 반면에 replication-competent 아데노바이러스는 감염시킨 암세포 내에서 바이러스의 복제가 일어나므로 복제된 바이러스가 암세포를 파괴하고 나온 후 주위의 암세포들을 다시 감염시켜 파괴하므로 적은 양의 바이러스만 주입하여도 유전자 전달의 효율이 높다는 장점이 있다.^{2,3} 또한 종양 혹은 조직 특이적인 촉진자 (promoter)를 사용하면 원하는 암세포 내에서만 아데노바이러스가 선택적으로 작용하게 되는데,^{2,3} 본 연구에서는 촉진자로 MN/CA9를 이용하여 replication-competent 아데노바이러스를 만들었다.

MN/CA9는 carbonic anhydrase (CA) family의 일종이며, 54/58kDa의 분자량을 가진 막내의 (transmembrane) 당단백으로, 인체 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에서 최초로 발견되었다.^{4,6} 그후 MN/CA9는 자궁경부암, 신세포암, 식도암, 결장직장암, 폐암, 유방암 등 여러 암조직에서 발현되지만 정상조직에서는 오직 위장관 상피세포에서만 발현됨이 보고되었다.⁷⁻¹²

신세포암의 경우에 MN/CA9는 MN 혹은 G250의 이름으로도 연구가 진행되어 왔는데 최근에 모두 동일한 물질임이 밝혀졌다.¹³⁻¹⁵ 또한 MN/CA9는 약 90%의 신세포암에서 발현되지만 정상 신조직에서는 발현되지 않으며,^{8,15} MN/CA9의 발현양상은 신세포암 환자의 생존율과 관련이 있음이 보고되었다.¹⁶⁻¹⁸ 따라서 MN/CA9는 신세포암의 진단 및 치료를 위한 표지자 혹은 표적자로 이용 가능성이 제시되었고,^{8,15-18} 본 연구에서는 아데노바이러스의 촉진자로 이용하였다.

저자들은 MN/CA9 촉진자를 이용하여 MN/CA9가 발현되는 암세포 내에서만 조직 특이적으로 복제되도록 만든 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 만들었고, 이 아데노바이러스가 MN/CA9를 발현하는 신세포암에서 선택적으로 세포살상효과를 나타내는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

MN/CA9 양성 세포주인 인체 자궁경부암 세포주 HeLa^{4,5}는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하였다. 인체 신세포암 세포주로 MN/CA9 양성 세포주인 SK-RC-52와 MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29^{15,19}는 Neil H. Bander 교수 (New York Hospital-Cornell Medical Center, New York, USA)에게서 공급받아 사용하였다. 전환 (transformation)된 인체 태아 망막아 (retinoblast) 세포주인 911과 PER.C6은 각각 Introgen (Leiden, Netherlands)과 DirectGene (Annapolis, USA)에서 구입하였다. 배양액으로는 HeLa 세포는 minimum essential medium (MEM) (Gibco BRL, Grand Island, USA)을, SK-RC-52와 SK-RC-29 세포는 RPMI 1640 (Gibco BRL)을 사용하였고, 911과 PER.C6 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL)을 사용하였다. 각 배양액에 10% fetal bovine serum (FBS)과 100units/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin (Gibco BRL)을 첨가하였고, 각 세포들은 37°C, 5% CO₂하에서 통상의 방법으로 세포배양하였다.

2. Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스의 생산

MN/CA9 촉진자에 의해 아데노바이러스의 E1a가 작동되도록 만든 replication-competent 아데노바이러스 (Ad-MN/CA9-E1a)를 만든 방법은 다음과 같다. pMN/CA9PGL3-P에 있는 550-bp의 MN/CA9 촉진자를 EcoRI 제한효소를 이용하여 잘라낸 후 pΔBPΔE1II의 EcoRI 제한효소 부위에 삽입하여 pMN/CA9E1a를 만들었다. 이 pMN/CA9E1a shuttle 벡터와 pJM17을 DOTAP liposomal transfection reagent (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA)를 이용하여 911 세포에 cotransfection시켜서 homologous recombination 과정을 통하여 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 만들었다. 합성된 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스는 각각의 plaque로부터 cloning하여 PER.C6 세포에서 증폭시킨 후 CsCl gradient ultracentrifugation 방법에 의하여 순화시키고 투석 완충액으로 투석을 시행하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

3. MN/CA9 mRNA에 대한 cDNA 합성 및 증합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)

각 세포들에서 Trizol 용액 (Gibco BRL)을 이용하여 세포들을 분쇄시켜서 RNA를 추출한 후 에탄올로 침전시키고, diethylpyrocabonate (DEPC) (Sigma, St. Louis, USA) 처리한 증류수로 용해시켰다. RNA 2μg과 random hexamer primer

0.2µg을 섞어서 총 20µl로 만들고, 70°C에 5분간 유지시킨 후 얼음에 냉각시켰다. 이 RNA와 시발체 (primer)의 혼합물에 1mM deoxynucleotide triphosphate, 20U/µl ribonuclease inhibitor, 50mM Tris-HCl, 50mM potassium chloride, 4mM magnesium chloride, 10mM DTT를 첨가하고 25°C에 5분간 유지하였다가 얼음에 냉각시킨 후, Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase (MBI Fermentas, Hanover, USA) 20U/µl를 첨가하였다. 역전사 반응을 위하여 37°C에서 1시간 동안 유지시킨 후 -20°C 냉동고에 보관하였다.

중합효소연쇄반응은 Bartosova 등¹²이 이용한 방법을 약간 수정하여 시행하였다. 시발체로는 5'-CCG AGC GAC GCA GCC TTT GA-3' 염기서열의 sense와 5'-TAG TCG ACT AGG CTC CAG TCT CGG CTA CTT-3' 염기서열의 antisense를 사용하여 MN/CA9 cDNA 내의 255-bp 부위를 증폭시켰고, 내부 대조를 위해 β-actin cDNA를 함께 증폭시켰다. 반응 조건은 변성 (denaturation)은 95°C에서 20초, 결합 (annealing)은 65°C에서 30초, 연장 (extension)은 72°C에서 40초씩 총 35 cycle을 시행한 후 72°C에서 5분간 유지시켰다. 중합효소연쇄반응의 결과는 1% agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다.

4. 아데노바이러스 E1a 단백 발현에 대한 western blot

각 세포들에서 Ad5 E1a 단백 발현을 확인하기 위하여 2x10⁶ 세포씩 100mm dish에 플레이트하고 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 1MOI (multiplicity of infection)의 농도로 14시간 동안 감염시켰다. 아데노바이러스 감염 2일 후에 세포들을 회수하여 200µl의 cell lysis buffer (0.1M Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% SDS, 5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µM leupeptin)로 용해시키고, 14,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 단백 농도는 dye binding assay (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 측정하였다. 20 µg의 단백을 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 분리 후 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Scheleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 옮겼다. Ad5 E1a 단백에 특이적인 일차 항체 (MS-587-P1, NeoMarkers, Fremont, USA)로 반응시키고, 다시 goat anti-mouse horseradish peroxidase로 표지된 이차 항체로 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence (Amersham, Arlington Heights, USA) 방법으로 발색하였다.

5. Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스의 in vitro 세포살상효과 판정

각 세포들을 24-well 플레이트에 각 well당 5x10³ 세포씩 플레이트하고, 24시간 후에 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 0.01-100MOI의 다양한 농도로 감염시켰다. 아데노바이러스 감염 (Day 0) 후 3일과 5일째에 배양액의 절반을 제거하고 새로운 배양액으로 갈아주었다. 각 well당 상대적 세포수는 0, 1, 3, 5, 7일째에 한 플레이트씩 crystal violet 염색을 시행하여 분석하였고, 자료는 Ad-MN/CA9-E1a를 감염시키지 않은 대조군의 세포수에 대한 Ad-MN/CA9-E1a 감염군 세포수의 백분율로 표시하였다.

결 과

1. MN/CA9 발현에 대한 역전사 중합효소연쇄반응 (RT-PCR) 분석

자궁경부암 세포주인 HeLa와 신세포암 세포주인 SK-RC-52 및 SK-RC-29에서 RNA를 추출해서 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 MN/CA9의 발현을 조사하였다. 그 결과 MN/CA9 양성 세포주인 HeLa와 SK-RC-52 세포에서는 MN/CA9 cDNA가 발현되었으나 MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29 세포에서는 MN/CA9 cDNA가 발현되지 않았다 (Fig. 1).

2. 아데노바이러스 E1a 단백 발현에 대한 western blot 분석

각 세포에 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 감염시킨 후 단백을 추출해서 western blot 분석을 이용하여 아데노바이러스 E1a 단백질의 발현 정도를 조사하였다. 모든 세포들에서 Ad-MN/CA9-E1a를 감염시키기 전에는 아데노바이러스 E1a 단백질이 발현되지 않았다. Ad-MN/CA9-E1a 감염 후에는 MN/CA9 양성 세포주인 HeLa와 SK-RC-52 세포에서는 35-

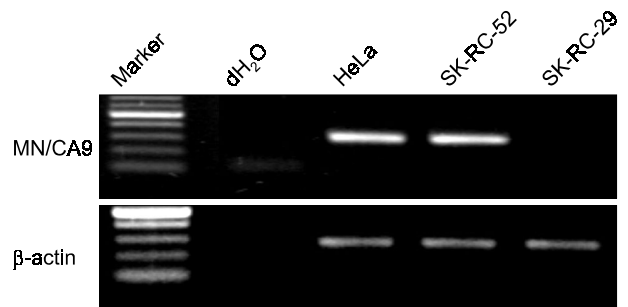


Fig. 1. RT-PCR assay identifies the 255-bp fragment in MN/CA9 cDNA in HeLa and SK-RC-52 cell lines, but not in the SK-RC-29 cell line. β-actin is included to confirm RNA preparation.

46kDa 크기의 E1a 단백질이 강하게 발현되었으나, MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29 세포에서는 E1a 단백질의 발현이 매우 미약하였다 (Fig. 2).

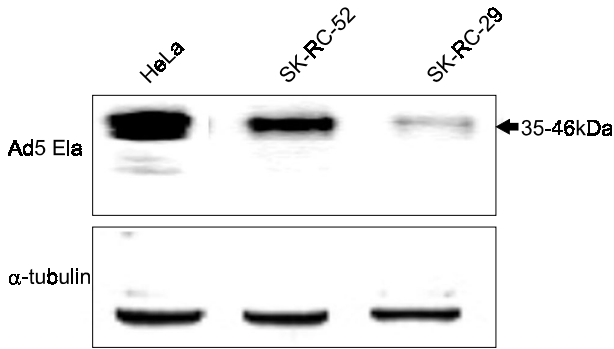


Fig. 2. Expression of Ad5 E1a protein by Ad-MN/CA9-E1a. A large amount of E1a proteins ranging in size from approximately 35 to 46kDa are detected in HeLa and SK-RC-52 cells. However, SK-RC-29 cells have a much lower level of E1a proteins. α -tubulin is included as an internal control.

3. Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스의 *in vitro* 세포살상효과

각 세포들에서 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스의 *in vitro* 세포살상효과를 판정하기 위하여 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 0.01-100MOI로 감염시킨 후 세포살상효과를 확인하여 보았다. 그 결과 MN/CA9 양성 세포주인 HeLa 세포와 SK-RC-52 세포에서는 각각 0.1MOI와 1MOI의 낮은 농도에서 세포살상효과를 보인 반면, MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29 세포에서는 매우 높은 농도인 100MOI에서만 세포살상효과가 나타났다 (Fig. 3).

고찰

Replication-defective 재조합 아데노바이러스는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 유전자 전달을 위한 벡터로 널리 이용되어 왔는데, 암유전자치료에 이용하는 경우 모든 암세포를 감염시킬 수는 없으므로 일차 감염세포와 극히 일부분의 주변세

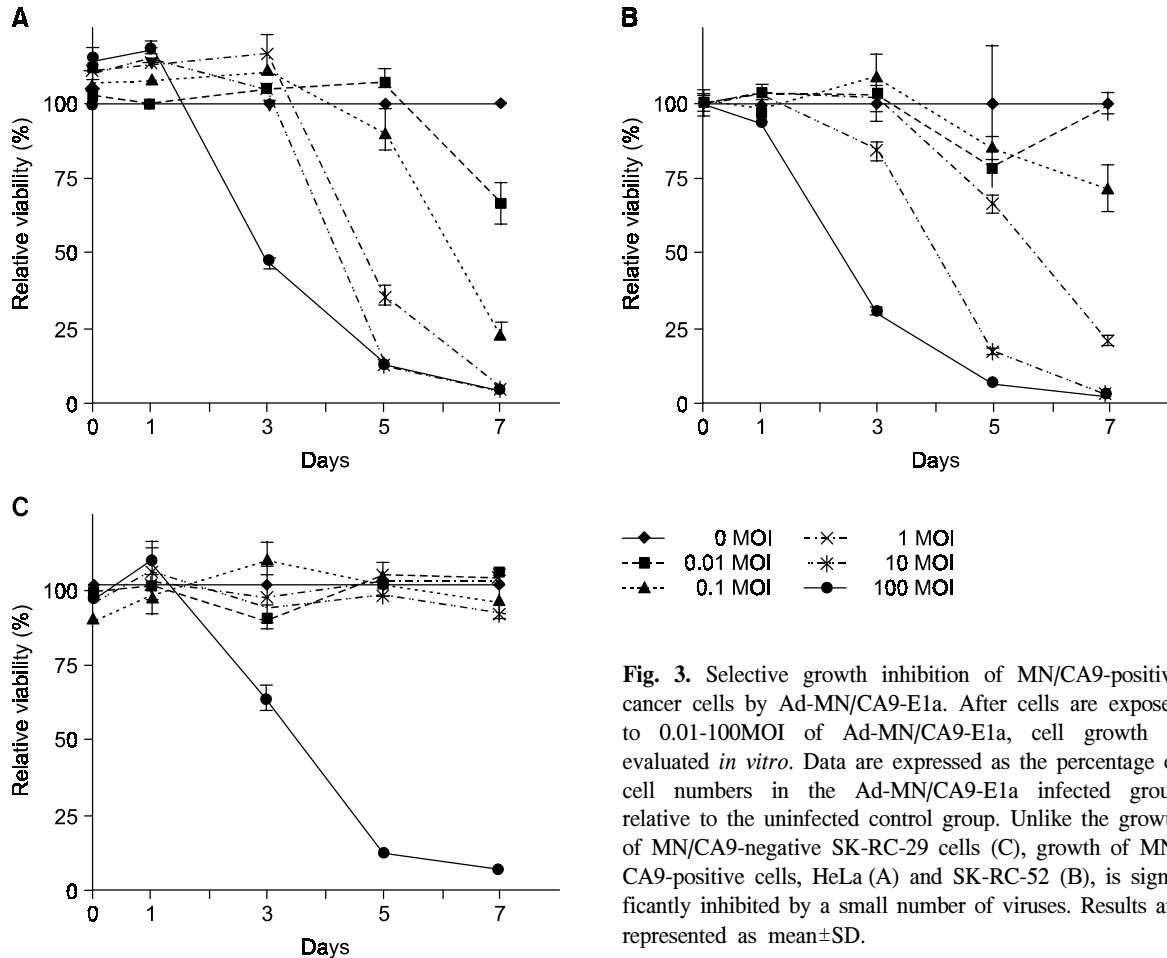


Fig. 3. Selective growth inhibition of MN/CA9-positive cancer cells by Ad-MN/CA9-E1a. After cells are exposed to 0.01-100MOI of Ad-MN/CA9-E1a, cell growth is evaluated *in vitro*. Data are expressed as the percentage of cell numbers in the Ad-MN/CA9-E1a infected group relative to the uninfected control group. Unlike the growth of MN/CA9-negative SK-RC-29 cells (C), growth of MN/CA9-positive cells, HeLa (A) and SK-RC-52 (B), is significantly inhibited by a small number of viruses. Results are represented as mean \pm SD.

포들에만 항암효과를 나타내는 문제점이 있다.^{2,3}

반면에 종양 혹은 조직 특이적인 촉진자를 가진 replication-competent 아데노바이러스를 이용한다면 주위의 정상 세포에는 손상을 주지 않으면서 원하는 암세포 내에서만 바이러스가 복제하면서 증폭되므로 전체 암세포를 감염시켜 죽일 수 있다.^{2,3} 이러한 replication-competent 아데노바이러스에 관한 연구로 prostate-specific antigen (PSA) 촉진자에 의해 아데노바이러스 E1a의 발현을 유도하도록 만든 아데노바이러스인 CN706은 PSA를 발현하는 전립선암 세포 내에서만 선택적으로 복제하여 세포살상효과를 보였다.²⁰ 또한 alpha-fetoprotein (AFP) 촉진자에 의해 아데노바이러스 E1a의 발현을 유도하도록 만든 AvE1a04i 아데노바이러스는 AFP를 발현하는 간세포암 세포 내에서만 선택적으로 복제하여 세포살상효과를 보였다.²¹ 본 연구에서는 MN/CA9 촉진자에 의해 아데노바이러스 E1a의 발현을 유도하도록 만든 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스가 MN/CA9를 발현하는 신세포암 세포 내에서만 선택적으로 복제를 일으켜서 세포살상효과를 나타내는지 알아보려고 하였으며, MN/CA9가 최초로 발견된 인체 자궁경부암 세포주 HeLa를 양성 대조군으로 이용하였다.

MN/CA9는 약 90%의 신세포암에서 발현되지만 정상 신 조직에서는 발현되지 않는다.^{8,15} 또한 Murakami 등¹⁷이 49례의 신세포암 조직, 22례의 정상 신조직과 5례의 호산성과립 세포종 (oncocytoma)을 대상으로 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 분석을 시행한 결과 MN/CA9는 투명신세포암에서 다른 조직학적 형태보다 높게 발현되었고, 저병기에서 고병기에 비해 높게 발현되었으며, MN/CA9가 높게 발현되는 경우가 낮게 발현되는 경우에 비해 예후가 좋았다. Bui 등¹⁸은 321례의 투명신세포암 조직에서 MN/CA9에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 85%의 염색정도를 절단치로 해서 그 이상 염색되면 고발현, 그 이하인 경우를 저발현으로 하였다. 그 결과 79%의 환자에서 고발현을 나타냈고, 전이성 신세포암 환자에서의 평균 생존율은 MN/CA9가 고발현된 경우에는 24.8개월, 저발현된 경우에는 5.5개월로 MN/CA9 발현은 생존율의 독립적인 예후인자였다. 국소 신세포암 환자에서도 진행의 위험성이 높은 경우 (T stage \geq 3 및 grade \geq 2)에 MN/CA9가 고발현되면 평균 생존율이 30.3개월인 반면 MN/CA9가 저발현된 경우에는 평균 생존율이 10개월밖에 되지 않아서 MN/CA9 발현은 예후와 연관이 있었다. 따라서 MN/CA9는 신세포암에서 매우 중요한 표지자라고 하였다.

발암과정에서 MN/CA9의 역할은 아직 확실치 않지만 MN/CA9가 암의 진행에 관여하리라는 일부 증거들이 있다. MN/CA9 cDNA를 NIH 3T3 생쥐 섬유아세포에 transfection

시키면 악성 표현형 (malignant phenotype)을 유도할 수 있다.⁶ 또한 MN/CA9 발현은 HeLa 세포와 섬유아세포의 hybrid에서의 종양형성 표현형 (tumorigenic phenotype)과 연관이 있어서, MN/CA9 단백질은 종양을 형성하지 않는 hybrid 세포 (clone CGL1)에서는 없지만 종양을 형성하는 hybrid 세포 (clone CGL3 및 CGL4)에서는 발견된다. 따라서 MN/CA9는 세포의 증식 및 변형의 조절에 관여하는 것으로 생각한다.^{6,22-24} 이러한 근거들로 볼 때 MN/CA9는 신세포암의 진단 및 치료를 위한 표지자 혹은 표적자로 이용 가능하겠으며, 본 연구에서는 MN/CA9를 촉진자로 이용하여 replication-competent 아데노바이러스인 Ad-MN/CA9-E1a를 만들어서 실험에 이용하였다.

현재까지 sheared Ad5 DNA로 인체 태아 신장 세포를 전환시켜서 만든 293 세포가 재조합 아데노바이러스를 만드는 데 필요한 helper 세포주로 가장 많이 이용되고 있는데,²⁵ 본 연구에서는 293 세포 대신에 Ad5 E1 부위를 전환시킨 인체 태아 망막아 세포주인 911 세포²⁶와 PER.C6 세포²⁷를 이용하였다. 그 이유는 replication-competent 아데노바이러스를 만들 때 다른 replication-competent 아데노바이러스가 함께 발생되지 않아야 하는데, Fallaux 등^{26,27}의 보고에 의하면 911 세포나 PER.C6 세포를 이용하여 만든 replication-defective 아데노바이러스 벡터 batch에서는 replication-competent 아데노바이러스가 발생되지 않았다고 보고하였기 때문이다.

MN/CA9 양성 세포주인 인체 자궁경부암 세포주 HeLa를 양성 대조군으로 하고, 신세포암 세포주로는 MN/CA9 양성 세포주인 SK-RC-52와 MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29를 이용하여 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스가 조직 특이적인 복제 및 세포살상효과를 보이는지 확인하여 보았다. 각 세포들에서 MN/CA9 발현 양상을 확인하기 위하여 시행한 역전사 중합효소연쇄반응 결과 HeLa 및 SK-RC-52 세포에서는 MN/CA9 cDNA가 발현되었으나 SK-RC-29 세포에서는 MN/CA9 cDNA가 발현되지 않았다. Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스 감염 후 MN/CA9를 발현하는 세포 내에서만 선택적으로 MN/CA9 촉진자에 의해 E1a 단백질의 발현이 유도되는지 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. 그 결과 HeLa 세포와 SK-RC-52 세포에서는 E1a 단백질이 강하게 발현되었으나 SK-RC-29 세포에서는 E1a 단백질의 발현이 매우 미약하여 MN/CA9를 발현하는 세포에서만 아데노바이러스가 선택적으로 복제하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 역전사 중합효소연쇄반응의 결과와 일치하였다. Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스가 MN/CA9를 발현하는 세포에만 선택적으로 세포살상효과를 보이는지 알아보기 위하여 *in vitro* 세포살상효과 판정 실험을 시행하였다. 그 결과 MN/CA9 양성 세포주인 HeLa와 SK-RC-52 세포에서는 각각

0.1MOI와 1MOI의 매우 낮은 농도의 바이러스에서도 세포 살상효과를 보였지만 MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29에서는 100MOI의 매우 높은 농도의 바이러스에서만 세포살상효과를 보였다. Shirakawa 등²⁸에 의하면 SK-RC-29 세포에 Ad-RSV-βgal 아데노바이러스를 6시간 동안 감염시킨 후에 X-gal 염색을 시행한 결과 아데노바이러스를 2.5MOI로 감염시킨 경우에는 34%의 세포가 감염되었고, 5MOI에서는 45%, 10MOI에서는 72%, 20MOI에서는 91%의 세포가 감염된 것으로 보고하여, SK-RC-29 세포는 아데노바이러스에 대한 감염력이 높은 세포임을 알 수 있다. 또한 Brandli 등²⁹에 의하면 Ad-CMV-GFP 아데노바이러스를 SK-RC-52 세포와 SK-RC-29 세포에 감염시킨 후 flow cytometry를 시행하여 감염된 정도를 평가하여 본 결과 SK-RC-29 세포가 SK-RC-52 세포보다 감염이 더 잘 되는 것을 확인하였다. 그러므로 *in vitro* 세포살상효과 판정 실험의 결과는 세포 간에 아데노바이러스에 대한 감염력의 차이 때문은 아니며 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스가 MN/CA9를 발현하는 암세포에서만 선택적으로 세포살상효과를 보인 것임을 알 수 있다. 따라서 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스는 MN/CA9를 발현하는 신세포암의 암유전자치료를 위한 새로운 벡터로 이용 가능하리라고 생각한다. 그러나 본 연구에서는 *in vitro* 실험만 시행을 하였고, MN/CA9가 정상 위장관 상피세포에서도 발현되기 때문에 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 전신적으로 투여하는 경우 위장관 상피세포에 손상을 줄 가능성은 있으므로 실제 신세포암 환자의 치료에 이용하기 위해서는 추후에 *in vivo*에서의 안전성과 투여 경로 등에 관한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

신세포암에 대한 새로운 유전자요법의 개발을 위하여 MN/CA9 촉진자에 의해 MN/CA9를 발현하는 암세포에서만 선택적으로 복제되도록 한 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스를 만들었다. 이 아데노바이러스를 이용하여 MN/CA9 양성 세포주인 인체 자궁경부암 세포주 HeLa를 양성 대조군으로 하고, 인체 신세포암 세포주인 MN/CA9 양성 세포주인 SK-RC-52와 MN/CA9 음성 세포주인 SK-RC-29에서 세포살상효과를 확인하여 본 결과, Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스는 MN/CA9를 발현하는 암세포에서만 선택적으로 복제하여 세포살상효과를 보였다. 따라서 Ad-MN/CA9-E1a 아데노바이러스는 신세포암에 대한 새로운 유전자요법으로 이용될 수 있으리라 생각한다.

REFERENCES

1. Russo P. Renal cell carcinoma: presentation, staging, and surgical treatment. *Semin Oncol* 2000;27:160-76
2. Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999;6:113-38
3. Kim D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* 2000;19:6660-9
4. Der CJ, Stanbridge EJ. A tumor-specific membrane phosphoprotein marker in human cell hybrids. *Cell* 1981;26:429-38
5. Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 1996;33:480-7
6. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* 1994;9:2877-88
7. Liao SY, Brewer C, Zavada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A, et al. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J Pathol* 1994;145:598-609
8. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997;57:2827-31
9. Turner JR, Odze RD, Crum CP, Resnick MB. MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: a clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum Pathol* 1997;28:740-4
10. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastorekova S, Pastorek J, et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998;153:279-85
11. Vermylen P, Roufosse C, Burny A, Verhest A, Bosschaerts T, Pastorekova S, et al. Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 1999;14:806-11
12. Bartosova M, Parkkila S, Pohlodek K, Karttunen TJ, Galbavy S, Mucha V, et al. Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2. *J Pathol* 2002;197:314-21
13. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, Stifelman MD, Katz AE, Chen MW, et al. Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2362-5
14. Grabmaier K, Vissers JL, De Weijert MC, Oosterwijk-Wakka

- JC, Van Bokhoven A, Brakenhoff RH, et al. Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer* 2000;85:865-70
15. Uemura H, Nakagawa Y, Yoshida K, Saga S, Yoshikawa K, Hirao Y, et al. MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999;81:741-6
 16. Mulders P, Bleumer I, Oosterwijk E. Tumor antigens and markers in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* 2003;30:455-65
 17. Murakami Y, Kanda K, Tsuji M, Kanayama H, Kagawa S. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int* 1999;83:743-7
 18. Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:802-11
 19. Ebert T, Bander NH, Finstad CL, Ramsawak RD, Old LJ. Establishment and characterization of human renal cancer and normal kidney cell lines. *Cancer Res* 1990;50:5531-6
 20. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW, Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997;57:2559-63
 21. Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, et al. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1999;10:1721-33
 22. Stanbridge EJ, Der CJ, Doersen CJ, Nishimi RY, Peehl DM, Weissman BE, et al. Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 1982;215:252-9
 23. Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M, Babusikova O, Zavada J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* 1992;187:620-6
 24. Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, Ciampor F, Pastorek J, Zelnik V. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int J Cancer* 1993;54:268-74
 25. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-72
 26. Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, et al. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996;7:215-22
 27. Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, et al. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1998;9:1909-17
 28. Shirakawa T, Gardner TA, Ko SC, Bander N, Woo S, Gotoh A, et al. Cytotoxicity of adenoviral-mediated cytosine deaminase plus 5-fluorocytosine gene therapy is superior to thymidine kinase plus acyclovir in a human renal cell carcinoma model. *J Urol* 1999;162:949-54
 29. Brandli D, Shalhav M, Shalhav T, Kim HS, Kao C, Gardner TA. MN-based transcriptional regulation of adenoviral early proteins provides renal cell carcinoma-specific oncolysis. *J Urol Suppl* 2002;167:132, abstract 529