

Increased Cytopathic Effect of Replicating Adenovirus Expressing Adenovirus Death Protein

Eunhee Kim, Joo-Hang Kim, M.D., Taeyoung Koo, Joo-Hyuk Sohn, M.D. and Chae-Ok Yun, Ph.D.

Institute for Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Replication-competent adenoviruses (Ads) are promising new modalities for the treatment of cancer. Selective replication of a viral agent in tumor may lead to improved efficacy over non-replicating Ads due to viral multiplication, lysis of the infected cancer cell and spread to surrounding cells. In our previous studies it was shown that the E1B 55 kD-deleted Ad (YKL-1) exhibits tumor specific replication and cell lysis, but with reduced cytolytic effects compared to the wild type adenovirus (Int J Cancer 2000;88:454-463). Thus, improving the potency of oncolytic Ads remains an important goal for cancer gene therapy. To increase the oncolytic ability of YKL-1, an adenovirus death protein (ADP) gene was reintroduced under the control of a CMV or MLP promoter at the E3 region of the YKL-1, generating an YKL-cADP and YKL-mADP, respectively.

Materials and Methods: The *in vitro* cytolytic effect of ADP expressing Ads was evaluated by MTT assay, and the induction of apoptosis by ADP expressing Ads was

examined by TUNEL analysis. Finally, the antitumor effect of ADP expressing Ads was demonstrated in C33A xenograft tumor model.

Results: The YKL-cADP exerted a markedly enhanced cytolytic effect against H460 and SK-Hep1 cancer cell lines. The TUNEL assay indicated that the ADP-mediated cytotoxicity was largely driven by apoptosis. Finally, the YKL-cADP showed a superior antitumor effect than the YKL-1 or YKL-mADP in C33A xenografts.

Conclusion: These lines of evidence demonstrate that the YKL-cADP induces efficient cell lysis, which is critical for the addition of therapeutic value to replicating Ads in cancer gene therapy. (Cancer Research and Treatment 2003;35:425-432)

Key Words: Cancer gene therapy, Replication competent adenovirus, Adenovirus death protein, Apoptosis

서 론

암세포 특이적으로 복제할 수 있는 아데노바이러스는 바이러스 복제에 따른 암세포의 살상과 복제된 아데노바이러스의 이차적 감염에 따른 주변 암세포로의 살상효과가 배가될 수 있어 기존의 복제 불능 아데노바이러스보다 현저히 증가된 항종양 효과를 유발할 수 있다(1). McCormick 그룹에 의해 개발된 ONYX-015 (Ad mutant dl1520)는 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 55 kD 유전자가 부분적으로

로 소실되어 p53 유전자가 돌연변이되어 있거나 결실되어 있는 암세포에서만 선택적으로 증식할 수 있어 바이러스 복제에 따른 세포 살상이 암세포 내에서만 일어나는 장점이 있다(2). 아데노바이러스가 정상 세포를 감염하면, 감염된 세포는 종양 억제 단백질인 p53을 활성화시켜 바이러스의 증식을 억제하는데 이 때 E1B 55 kD 단백질이 p53 단백질에 결합하여 p53의 기능을 억제하는 역할을 하며, 이에 따라 야생형 아데노바이러스는 활발하게 증식을 하여 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도한다. 하지만 E1B 55 kD 유전자가 소실된 재조합 아데노바이러스가 정상 세포를 감염하면 이들 세포에 있는 p53의 비활성화를 유도할 수 없어 바이러스의 증식이 억제되지만, p53의 기능이 억제되어 있는 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되어 암세포 특이적 살상을 유도하게 된다. 이를 바탕으로 본 연구실에서 제작한 E1B 55 kD 유전자가 소실된 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1은 기존의 1세대 아데노바이러스인 복제 불능 아데노바이러스보다 형질 도입면에서 월등히 우수하였으며, 여러 종류의 인체 암세포 주들을 선택적으로 살상할 수 있었다(3).

Correspondence: Chae-Ok Yun, Institute for Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea. (Tel) 02-361-7648, (Fax) 02-362-0158, (E-mail) chaeok@yumc.yonsei.ac.kr

Received April 14, 2003, Accepted August 27, 2003

This work was supported by grants from Ministry of Commerce Industry and Energy, Republic of Korea (MCIE-00008131, Dr. C-O. Yun) and Yonsei University (YU-2001, Dr. C-O. Yun). Eunhee Kim and Tae Young Koo are graduate students sponsored by Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University.

그러나, E1B 55 kD 단백질은 p53을 불활성화시키는 기능 외에도 아데노바이러스 mRNA의 세포질로의 이동 및 아데노바이러스의 구성 단백질의 핵으로의 이동 등에 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(4). 따라서 E1B 55 kD는 아데노바이러스의 효과적인 복제에 필요한 유전자로서 이것이 소실된 재조합 아데노바이러스는 암세포 내에서의 바이러스 증식이 제한되게 일어날 수 밖에 없어 이로 인한 항종양 효과가 감소될 수 있다. 실제로, E1B 55 kD 유전자가 소실된 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1 및 ONYX-015의 세포 살상능이 E1B 55 kD 유전자가 존재하는 야생형 아데노바이러스에 비하여 약 100배 이상 낮음이 보고되었다(5). 이러한 낮은 암세포 살상능을 보완하기 위하여, 현재 미국에서 재발한 두경부암 환자를 대상으로 제 3상 임상시험으로 진행되고 있는 ONYX-015는 cisplatin 또는 5-FU와 같은 항암제와 병용하여 사용되고 있으며(6), herpes simplex thymidine kinase와 같은 치료 유전자를 암세포 특이적 복제 가능 바이러스에 삽입하여 세포 살상능을 증가시키는 시도도 이루어지고 있다(7).

아데노바이러스 E3 유전자는 바이러스의 복제에 필수적이지 않아 현재까지 개발된 대부분의 아데노바이러스 벡터에는 E3 유전자가 소실되었으며, 소실된 E3 부위에 외래 유전자를 삽입하여 백신 개발이나 유전자 치료용으로 사용하였다(8). 아데노바이러스 E3 부위는 7개의 유전자로 구성되어 있으며, 이들 중 E3 gp19 kD는 MHC class I이 ER에서 세포 표면으로 전달되는 것을 저해함으로써 CTL에 의한 세포 사멸을 저해시키는 기능을 하며(9,10), 14.7 kD는 TNF에 의해 유발되는 염증 반응을 저해함으로써 TNF에 의한 세포 사멸을 저해한다(11). E3 RID (receptor internalization and degradation) 복합체는 RID α (10.4 kD)와 RID β (14.5 kD)로 구성되어 있으며, 세포막에 위치하여 TNF에 의한 세포 사멸을 저해하고 EGF receptor의 발현을 저하시키는 것으로 알려져 있다(12,13). 그리고 E3 ADP (adenovirus death protein, 11.6 kD)는 핵막에 존재하는 단백질로서 감염된 세포로부터 아데노바이러스가 방출되는 것을 촉진하는 기능을 한다(14~16). 즉, E3 ADP를 제외한 대부분의 E3 유전자들(gp19K, 14.7 kD, RID α , RID β)은 아데노바이러스에 대한 숙주 세포의 면역 반응을 저하시키는 역할을 한다(17~19). 따라서 본 연구에서는 암세포 특이적 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1의 세포 살상능을 증가시키는 방안으로, 세포 내에서 복제된 아데노바이러스의 방출을 촉진하는 E3 ADP 유전자를 YKL-1에 재삽입시켜 바이러스에 감염된 세포의 효과적인 세포 사멸을 유도하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 간암 세포주(SK-Hep1), 뇌암 세포주(U343), 폐암 세포주(A549, H460), 자궁경부암 세포주(C33A) 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 293 세포주이며, 모두 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand island, NY)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO BRL)에 항생제 penicillin/streptomycin (GIBCO BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2) ADP 유전자가 과발현되는 복제 가능 아데노바이러스들의 제작

E3 부위에 ADP 유전자가 삽입된 복제 가능 아데노바이러스를 제작하기 위해 먼저, 아데노바이러스 E3 서플렉터를 제작하였다. 아데노바이러스의 26,591~28,588 bp와 상동 부위를 가지는 E3 서플렉터의 왼쪽 부위는 다음의 primer들로 PCR을 수행하여 증폭하였다. Sense primer는 5'-GCCCTCGA GCCATCCTGTAA ACGCCACCG-3'으로써, 클로닝의 편의를 위해 XhoI 제한효소 부위를 삽입하였고(밑줄친 부분), antisense primer는 5'-GCCAGCTGACCTGAATTA GAATA GAACG-3'으로써, PvuII 제한효소 부위를 삽입하였다(밑줄친 부분). 아데노바이러스의 30,504~31,057 bp와 상동 부위를 가지는 E3 서플렉터의 오른쪽 부위는 다음의 primer들로 PCR을 수행하여 증폭하였다. Sense primer는 5'-GCCGAATT CC TGCTAGAAAGACGCAGGGC-3'으로써, 클로닝의 편의를 위해 EcoRI 제한효소 부위를 삽입하였고(밑줄친 부분), antisense primer는 5'-GCCGATATCGTCTT GCGCGTTCAT CTGC-3'으로써, EcoRV 제한효소 부위를 삽입하였다(밑줄친 부분). 아데노바이러스의 게놈을 주형으로 PCR을 수행한 뒤 생성된 1997 bp 크기의 서플렉터의 왼쪽 부위와 553 bp 크기의 오른쪽 부위 산물을 XhoI과 PvuII 그리고 EcoRI과 EcoRV 제한효소로 각각 처리한 뒤, 같은 제한효소로 처리된 pSP72 (Promega, Madison, WI) 클로닝 벡터에 차례로 삽입하여 아데노바이러스 E3 서플렉터인 pSP72 Δ E3를 제작하였다. 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입할 ADP 유전자는 아데노바이러스의 게놈을 주형으로 다음의 primer로 PCR을 수행하여 수득하였다. Sense primer는 5'-GCCAAGCTTATGACCAACAC-AACCAACGC-3'으로써, HindIII 제한효소 부위를 primer 말단에 삽입하였고(밑줄친 부분), antisense primer는 5'-CGCCTCGAGTCATACTGTAAGAGAAAAGAA-3'으로써, XhoI 제한

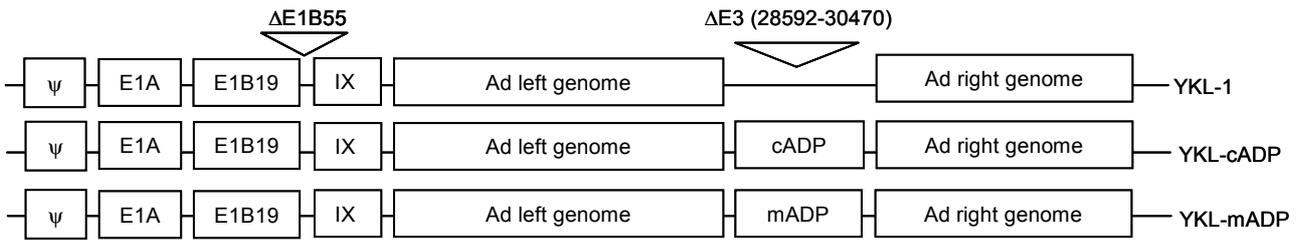


Fig. 1. Schematic illustration of replication competent adenoviral vectors used in this study. Numbers refer to nucleotide positions of the adenoviral genome. YKL-1 contains the normal E1A and E1B 19 kD, but is E1B 55 kD deleted; YKL-cADP and YKL-mADP comprise of the ADP gene driven by the constitutive control of the CMV promoter and endogenous MLP promoter inserted into the E3 region, respectively.

효소 부위를 primer 말단에 삽입하였다(밑줄친 부분). PCR을 수행한 뒤 생성된 281 bp의 ADP 유전자를 HindIII와 XhoI 제한효소로 처리한 다음 동일한 제한효소로 처리된 pcDNA3.1/hygro, lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 삽입하여 pcDNA-ADP를 제작하였다. ADP를 CMV 프로모터에 의하여 발현시킬 수 있는 CMV promoter-ADP-polA expression cassette를 MfeI과 NaeI 제한효소를 이용하여 pcDNA-ADP로부터 잘라낸 뒤 이를 E3 서플렉터인 pSP72ΔE3에 삽입하여 아데노바이러스 E3 서플렉터인 pSP72ΔE3-cADP를 제작하였다. 또한 ADP 유전자의 발현이 아데노바이러스의 내재 프로모터인 MLP (major late promoter)에 의해 조절되는 아데노바이러스를 제작하기 위해 ADP PCR 산물을 HindIII와 XhoI로 자른 다음 이를 pSP72ΔE3에 삽입하여 pSP72ΔE3-mADP E3 서플렉터를 제작하였다. 제작된 pSP72ΔE3-cADP와 pSP72ΔE3-mADP를 각각 XmnI 제한효소를 처리하여 단일가닥으로 만든 다음 SpeI 제한효소를 처리하여 단일가닥이 된 E1B 55 kD 유전자가 소실된 아데노바이러스 플라즈미드인 pYKL-1과 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합을 유도하였다. 상동 재조합된 플라즈미드 DNA를 PacI 제한효소로 처리한 뒤 293 세포주에 형질 전환하여 YKL-cADP와 YKL-mADP 암세포 특이적 복제 가능 아데노바이러스들을 생산하였다(Fig. 1).

3) Immunoblotting 분석

인체 폐암 세포주인 A549를 6-well plate에 분주한 뒤 YKL-cADP 또는 YKL-mADP를 MOI 10으로 각각 감염시켰다. 바이러스 감염 후 12, 24, 48, 72 그리고 96시간 후에 감염된 세포를 회수하여 lysis buffer (50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor: PMSF, TLCK, TPCK)로 세포들을 용해시키고 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF membrane에 electro transfer한 뒤 아데노바이러스 ADP 단백질을 특이적

으로 인지하는 항체(미국 St. Louis University School of Medicine의 Dr. Wold), 또는 β-actin (Sigma, St. Louis, MO)을 일차 항체로 hybridization시키고 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 이차 항체(sc-2004; Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA)를 다시 hybridization시킨 후 ECL (sc-2048; Santa Cruz Biotech)을 이용하여 단백질의 발현 양상을 규명하였다.

4) MTT assay

인체 폐암 세포주인 H460과 인체 간암 세포주인 SK- Hep1을 24-well plate에 각각 70~90% confluency로 분주한 후 다음날 dl-CMV-Z, YKL-1, YKL-cADP, YKL-mADP, Ad-XC 또는 Ad-XJ 아데노바이러스를 MOI 10으로 각각 감염시켰다. 일정 시간 간격으로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) 용액 200μl씩을 plate well에 첨가하여 4시간 동안 37°C 항온기에서 반응시킨 후 1 ml의 DMSO (dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다.

5) TUNEL assay

인체 뇌암 세포주인 U343을 2×10⁵개로 chamber slide에 분주하고 각각의 바이러스를 MOI 5로 감염시키고, 24시간 후에 배지를 제거한 뒤 ApoTag Kit (Intergen, Purchase, NY)을 이용해 제조 회사가 제시한 방법에 따라 TUNEL assay를 시행하였다. 발색 여부를 확인하기 위해 peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, CA)와 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 증류수로 3회 씻어내고 0.5% methyl green으로 10분간 염색하였다. 다시 증류수로 3회 씻어낸 후 cover glass로 고정시켜 현미경으로 관찰하여 현미경 상에서 네 곳 이상의 부위를 무작위로 정하여 전체 세포들 중 염색된 세포의 비율을 계산하였다.

6) 복제 가능 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증

생후 6~8주된 누드 생쥐의 복벽에 피하로 1×10^7 개의 인체 자궁암 세포주 C33A를 주사한 뒤, 종양이 $50 \sim 80 \text{ mm}^3$ 정도 성장하였을 때 5×10^8 plaque forming unit (pfu)의 YKL-1, YKL-cADP, YKL-mADP 바이러스와 음성 대조군인 PBS를 각각 6, 6, 7, 6마리의 누드 생쥐의 종양에 이를 간격으로 3번 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 용적은 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다. 종양의 용적=(단축 mm)²×장축 mm×0.523. 종양의 용적 비교는 Mann-Whitney test를 이용하였다.

결 과

1) CMV 또는 MLP 프로모터에 의해 조절되는 ADP 발현 양상 비교

감염된 세포로부터 아데노바이러스의 방출을 효과적으로 유도하는 ADP 유전자의 발현을 최대화하기 위해, 강력한 constitutive 프로모터로 알려진 CMV 프로모터와 아데노바이러스 내재 프로모터인 MLP 프로모터에 의한 ADP 발현 양상을 western blotting을 통해 비교 검증하였다. A549 세포주를 CMV 프로모터에 의해 ADP의 발현이 유도되는 YKL-cADP와 MLP 프로모터에 의해 ADP의 발현이 유도되는 YKL-mADP를 MOI 10으로 각각 감염시키고 12, 24, 48, 72 그리고 96시간 뒤에 세포를 회수하여 ADP의 발현 양상을 시간별로 검증하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이, YKL-cADP로 감염된 경우는 감염 후 12시간부터 ADP의 발현을 확인할 수 있었고, 감염 후 24시간과 48시간에 가장 높은 발현이 일어났으며, 감염 후 72시간에는 발현이 감소되었다. 이에 반하여, YKL-mADP로 감염된 경우는 감염 후 48시간부터 ADP가 발현되기 시작하여 시간이 지날수록 발현 정도가 증가되어 감염 후 96시간에 가장 높은 발현이 관찰되었다. 이러한 결과에 따라, CMV

프로모터에 의해 조절되는 ADP는 바이러스 감염 후 초기에 높게 발현되는 반면, MLP 프로모터에 의해 조절되는 ADP의 발현은 바이러스 감염 후 초기에는 미약하게 이루어지나 감염 후 시간이 지남에 따라 발현이 증가됨을 알 수 있다.

2) ADP를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 증가된 암세포 살상 효과

아데노바이러스의 세포 살상 효과를 증가시키기 위해 E3 부위에 ADP 유전자를 삽입한 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-cADP와 YKL-mADP의 세포 살상 효과를 비교 검증하기 위해, H460과 SK-Hep1 인체 암세포주들을 dl-CMV-Z, YKL-1, YKL-mADP, YKL-cADP, Ad-XC 또는 Ad-XJ 아데노바이러스로 각각 감염시킨 후 일정 시간 간격으로 세포 생존율을 측정할 수 있는 MTT 분석을 시행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 아데노바이러스 감염 후 시간이 경과함에 따라 CMV 프로모터에 의해 ADP의 발현이 유도되는 YKL-cADP 아데노바이러스는 ADP를 발현하지 않는 대조군 아데노바이러스인 YKL-1에 비해 월등히 빠르게 세포들을 살상한 반면 MLP promoter에 의해서 ADP를 발현하는 YKL-mADP는 YKL-1과 거의 유사한 속도로 세포들을 살상하였다. 또한, ADP를 발현하는 야생형 아데노바이러스인 Ad-XJ는 ADP를 발현하지 않는 대조군 아데노바이러스인 Ad-XC에 비해서 빠르게 세포들을 살상하였다. 이상의 결과들을 통해 ADP 유전자를 삽입함으로써 암세포 특이적 복제 가능 아데노바이러스의 암세포 살상 효과를 현격히 증가시킬 수 있음을 확인하였으며, ADP의 발현을 조절하는 프로모터로서는 CMV 프로모터가 내재 프로모터인 MLP 프로모터에 비해 월등히 우수함을 알 수 있었다.

3) ADP를 발현하는 아데노바이러스로 감염된 U343 세포주에서의 세포고사 유도

ADP 유전자가 세포 살상에 어떠한 영향을 미치는지 알

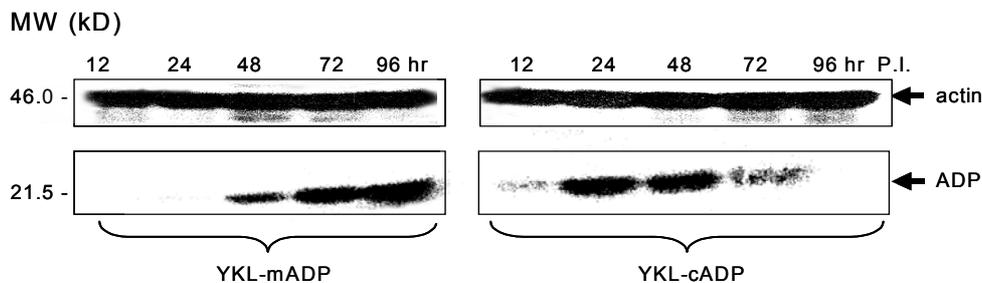


Fig. 2. The expression pattern of ADP controlled by MLP or CMV promoter. A549 cells on 6-well plates were infected with YKL-mADP or YKL-cADP adenovirus at an MOI of 10. After 12, 24, 48, 72, 96 hr after infection, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an antibody recognizing ADP or actin.

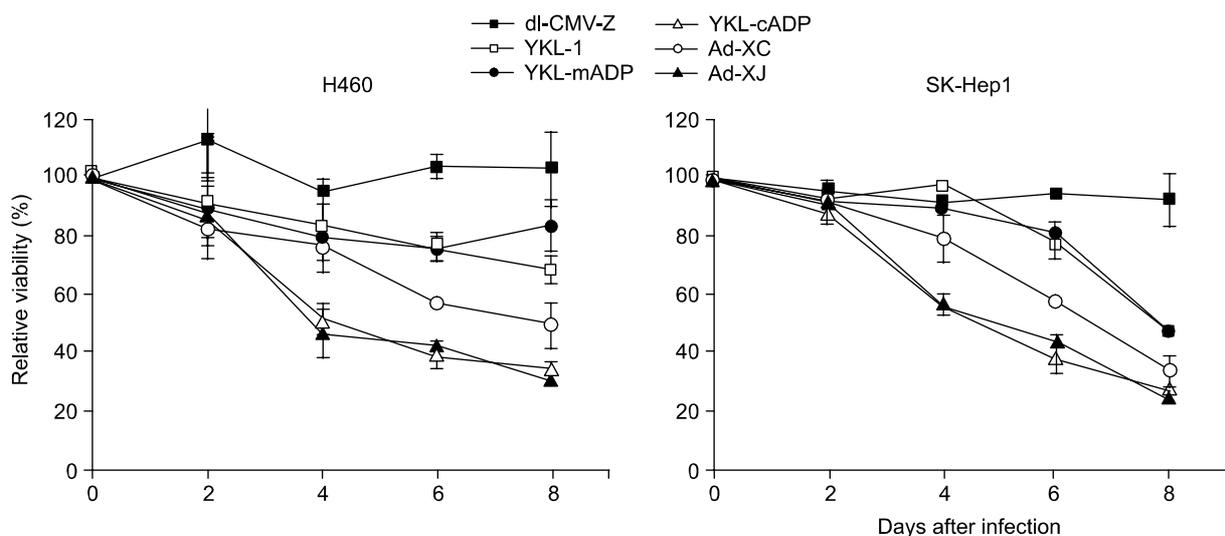
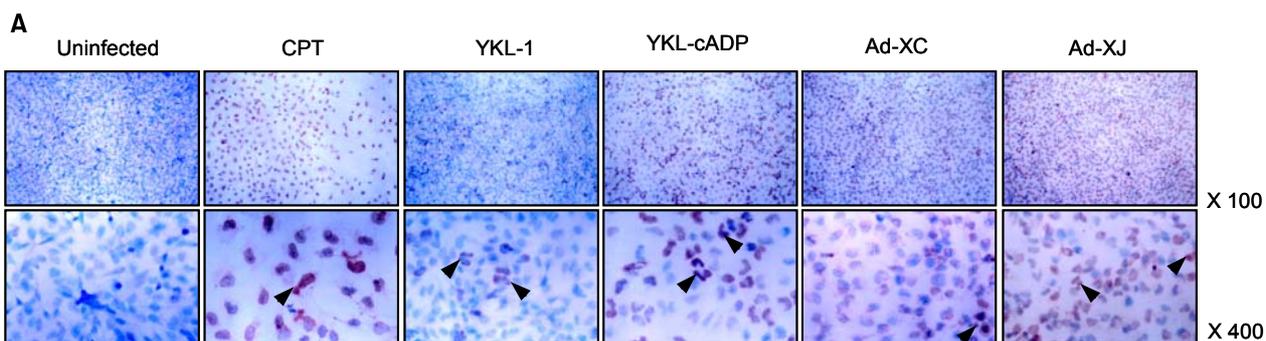


Fig. 3. MTT assay. Monolayer of H460 and SK-Hep1 cells was infected with dl-CMV-Z, YKL-1, YKL-cADP, YKL-mADP, Ad-XC or Ad-XJ at an MOI of 10. MTT assay was performed to tally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.



B

	Uninfected	CPT	YKL-1	YKL-cADP	Ad-XC	Ad-XJ
Apoptotic cell (%)	1.64±0.67	78.12±26.92	13.45±7.46	45.21±7.46	12.79±4.5	36.03±7.98

Fig. 4. TUNEL assay. (A) At 24 hr after treatment without or with 1µM of CPT, or infection with YKL-1, YKL-cADP, Ad-XC, or Ad-XJ at an MOI of 5, apoptotic cells were detected by labeling with DAB (3,3'-diaminobenzidine) using terminal deoxynucleotidyl transferase (counterstained with methyl green). Brown staining indicates positive staining for DNA strand breakage. Arrow heads indicate positive staining. Representative fields of three independent experiments are shown. Original magnification: ×100 and ×400. (B) The mean percentage of apoptotic cells induced by each treatment. The number of brown stained cells per 100 cells was counted. Each of the indicated values reflects the mean of three independent experiments, and is expressed as the percentage of apoptotic cells.

아보기 위해 세포고사의 중요한 생화학적 특징 중의 하나인 DNA 절편화를 TUNEL 분석으로 검증하였다. 상기의 MTT assay와 같은 세포 살상 실험들을 통하여 ADP의 발현에 따른 세포 살상능 증가가 YKL-mADP에서는 관찰되지 않고, YKL-cADP의 경우에만 관찰되었기 때문에 YKL-

cADP만을 이용하여 세포고사 정도를 관찰하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, YKL-1로 감염된 경우는 약 13%의 세포들이 갈색으로 흐리게 염색된 반면, ADP를 발현하는 YKL-cADP에 의해 감염된 경우는 약 45%의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 훨씬 높은 빈도로 세포고사가 유도됨을 확

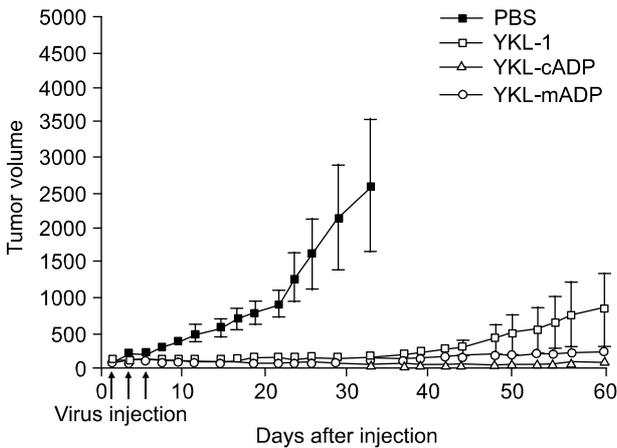


Fig. 5. Suppression of tumor growth by oncolytic adenovirus expressing ADP *in vivo*. Subcutaneous tumors derived from human cervical cancer C33A cells were treated with various adenoviruses as shown. Tumor volume was monitored over time (days) after treatment with adenovirus. The arrow indicated when treatment was given (5×10^8 PFU/mouse/treatment).

인할 수 있었다. ADP를 발현하는 Ad-XJ의 경우(약 36%)도 ADP를 발현하지 않는 Ad-XC(약 12%)에 비해 월등히 세포 고사 빈도가 높았다. 즉, ADP를 발현하지 않는 아데노바이러스인 YKL-1과 Ad-XC에 비해 ADP를 발현하는 아데노바이러스인 YKL-cADP와 Ad-XJ에 의해 감염된 경우 세포고사가 높은 빈도로 진행됨을 확인할 수 있었다.

4) ADP를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증

ADP를 발현하는 아데노바이러스인 YKL-cADP와 YKL-mADP 종양 특이적 복제 가능 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과를 비교 검증하기 위해, C33A 인체 자궁암 세포주를 nude 생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 5×10^8 pfu의 YKL-1, YKL-cADP 또는 YKL-mADP 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양 내 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 음성 대조군인 PBS를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 32일에 종양의 크기가 $2,591 \pm 1,120 \text{ mm}^3$ 로 종양이 급격히 성장하였으나, 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1, YKL-cADP 그리고 YKL-mADP를 투여받은 생쥐의 경우는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 즉, YKL-1 아데노바이러스를 투여받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 32일에 종양의 크기가 $132 \pm 105 \text{ mm}^3$ 이고, YKL-cADP의 경우는 $33 \pm 53 \text{ mm}^3$ 그리고 YKL-mADP의 경우는 $105 \pm 133 \text{ mm}^3$ 정도로 뚜렷한 항종양 효과를 보였다($p < 0.05$). 또한, 바이러스 투여 후 60일에는 PBS를 투여한 6마리의 쥐들이 모두 죽어 더

이상 종양의 성장을 측정할 수 없었고, YKL-1, YKL-cADP 또는 YKL-mADP를 투여한 경우는 종양의 크기가 각각 $812 \pm 1,267 \text{ mm}^3$, $61 \pm 89 \text{ mm}^3$, $199 \pm 184 \text{ mm}^3$ 로 ADP를 발현하는 종양 특이적 복제 가능 아데노바이러스들인 YKL-cADP와 YKL-mADP가 대조군인 YKL-1에 비하여 향상된 항종양 효과를 나타내었다. 특히, CMV 프로모터에 의해 ADP가 발현되는 YKL-cADP의 항종양 효과는 YKL-1이나 MLP 프로모터에 의해 ADP가 발현되는 YKL-mADP에 비해 우수하였으나(43일째 평균 종양 용적; $33 \text{ vs } 269 \text{ vs } 148 \text{ mm}^3$) YKL-1에 대해서만 43~47일째 통계학적으로 유의한 용적의 차이를 보였고($p < 0.05$), YKL-mADP에서는 통계학적인 차이는 없었다. 또한 YKL-cADP를 투여한 경우, 바이러스 투여 후 15일경에 6마리의 생쥐들 중 2마리에서 그리고 40일경에 1마리에서 종양이 완전히 사라짐을 관찰할 수 있었고 2달이 지나도 종양의 재성장은 관찰되지 않았다.

고찰

암세포 특이적 복제 가능 재조합 아데노바이러스는 감염된 일차 세포뿐만 아니라 주위의 다른 암세포로 확산됨으로써 기존의 증식 불능 아데노바이러스에 비해 높은 유전자 전달 효율과 뛰어난 항종양 효과를 가진다. 하지만 바이러스의 효과적 복제에 관여하는 유전자인 E1B 55 kD가 소실된 아데노바이러스인 YKL-1 또는 ONYX-015는 야생형 아데노바이러스에 비해 암세포 살상능이 현저히 떨어지는 단점이 있어, 실제로 임상에 사용하기 위해서는 고농도의 아데노바이러스를 인체에 반복적으로 투여하여야 하고, 기존의 여러 항암제들과 함께 병용하여 치료하여야 하는 제한점이 대두되었다. 이러한 단점을 보완하고자 본 연구에서는, 보다 증가된 세포 살상능을 유도하기 위해 아데노바이러스의 E3 구성 유전자인 ADP를 암세포 특이적 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1의 E3 부위에 재삽입함으로써 암세포 살상능을 증가시킬 수 있는지를 살펴보았다.

아데노바이러스의 E3 부위는 바이러스의 증식에 무관하므로 현재까지 개발된 대부분의 아데노바이러스 벡터들은 E3 부위가 소실되어 있거나 치료 유전자를 삽입하는 부위로 이용되어왔다. 아데노바이러스의 E3 구성 단백질 중 하나인 ADP는 아데노바이러스의 세포 감염 후 핵막과 골지체에 위치하는 당단백질(glycoprotein)로 바이러스의 복제 후 감염된 세포를 해리시키고, 증식된 바이러스를 세포 밖으로 방출하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(14~16). ADP는 감염 후기에 바이러스 입자가 세포 핵 내에 축적되기 시작할 때(>감염 후 20 hr) 높은 효율로 합성되는데, ADP가 소실된 돌연변이 바이러스는 야생형 아데노바이러스

스에 비해 감염된 세포로부터 천천히 방출되어 인접 세포로 확산되어 나가는 데 시간이 더 오래 걸리며 이로 인해 plaque의 크기도 작게 형성된다는 것이 보고되었다(20). 또한 ADP 돌연변이형을 지닌 아데노바이러스로 감염된 세포는 야생형 아데노바이러스로 감염된 세포에 비해 더 오래 생존하는 것으로 보고되어, ADP에 의해 세포 살상능이 증가될 수 있음을 시사하고 있다(14,15).

복제 가능 아데노바이러스를 이용한 효과적인 항종양 효과를 유도하기 위해서는 빠른 속도로 성장하는 종양 세포에 비하여 보다 빠른 바이러스의 증식과 인접 세포로의 확산을 통해 효과적인 살상 효과를 유발시켜야 한다. 바이러스 감염 후기에 세포 살상과 증식된 아데노바이러스의 방출을 촉진하기 위해서는, 이에 관여하는 ADP를 최대한 높은 효율로 발현시킬 수 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 ADP의 발현을 조절하는 프로모터로서 아주 강한 프로모터로 알려진 CMV와 아데노바이러스 내재 프로모터인 MLP를 서로 비교 검증하였다. CMV 프로모터에 의해 ADP의 발현이 유도되는 경우에는 바이러스 감염 후 초기에 높이 발현되는 반면, MLP 프로모터의 경우에는 감염 후 초기에는 발현이 미약하게 유도되나 감염 후 시간이 지남에 따라 발현이 증가되었다(Fig. 2). ADP를 발현하는 아데노바이러스의 세포 살상능 증가를 알아보기 위해 시행한 MTT assay에서도, CMV 프로모터에 의해 ADP를 발현하는 YKL-cADP 아데노바이러스가 대조군 아데노바이러스인 YKL-1에 비해 월등히 높은 암세포 살상을 보인 반면, YKL-mADP의 경우는 YKL-1과 거의 유사한 정도의 암세포 살상을 나타내어 바이러스 내재 프로모터인 MLP보다 CMV 프로모터가 ADP를 발현시키는 데 월등히 우수함을 알 수 있었다.

아데노바이러스 감염 후 일어나는 세포고사는 일종의 방어 기작으로 감염된 세포의 자살을 유도하여 인접한 비감염세포를 보호하는 기전으로 알려져 있다. 아데노바이러스는 이에 대한 대응으로 숙주 세포의 자살(apoptosis)을 저해하는 기전을 가지는데 감염 초기에 E1A 유전자에 의해 유도되는 세포고사를 E1B 19 kD와 E1B 55 kD 유전자가 각기 다른 기전으로 저해한다(21~24). 반면에 감염 후기에는 증식된 바이러스가 감염된 세포를 뚫고 나와 다른 이웃 세포를 재 감염시키고자 세포사를 촉진하게 된다. 이때 작용하는 ADP 유전자는 감염 세포로부터 바이러스의 방출을 촉진한다고 보고되어졌지만, 아직 ADP 유전자가 어떠한 기전으로 세포사를 유도하여 바이러스의 방출을 촉진시키는 지에 관해서는 밝혀진 바 없다. 이에 본 연구에서는 ADP가 세포사의 대표적 기전 중 하나인 세포고사를 유도하는 지를 알아보기 위해 세포고사를 검증할 수 있는 TUNEL 분석을 시행하였다. 핵 내의 DNA 절편을 확인할 수 있는

TUNEL 분석에서 ADP를 발현하는 두 종류의 복제 가능 아데노바이러스들인 YKL-cADP와 Ad-XJ에 의해 감염된 세포들이 ADP를 발현하지 않는 대조군 아데노바이러스들인 YKL-1과 Ad-XC의 경우보다 훨씬 높은 빈도로 세포고사를 유발할 수 있음을 확인하였다. 특히 CMV 프로모터에 의해 ADP의 발현이 유도되는 YKL-cADP에 의해 감염된 경우에, 야생형 아데노바이러스인 Ad-XJ 보다 더욱 뚜렷한 세포고사가 진행된 세포들이 많이 관찰되어 바이러스 내재 프로모터에 비해 훨씬 높은 효율로 ADP가 발현된다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료가 성공적으로 이루어지기 위해서는 높은 치료 효과와 함께 안전성을 높이기 위한 방안이 개발되어야 한다. 본 연구에서 개발된 YKL-cADP 아데노바이러스는 E1B 55 kD 유전자 소실에 의한 암세포 특이적 바이러스 증식과 이에 따른 효율적인 암세포 특이적 살상능 및 ADP 유전자와 같은 세포고사 촉진 유전자의 고효율의 발현을 통한 증가된 암세포 살상 효과를 통해, 암 치료에 필요한 투여량을 감소시킬 수 있어 바이러스에 의한 생체 내 독성과 면역 반응을 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 또한 암세포 특이적 아데노바이러스를 여러 항암제와 함께 병용하여 사용한다면, 아데노바이러스의 암세포 내 증식에 의한 세포 살상뿐 아니라 바이러스의 E1 단백질의 발현이나 투여한 항암제에 의해서 유도되는 세포고사를 더욱 촉진함으로써 보다 효과적인 항암 효과를 유도할 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

본 연구에서는, 암세포 특이적 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1의 암세포 살상능을 증가시키는 방안으로, 바이러스 감염 후 세포 내에서 복제된 바이러스의 방출을 촉진하는 ADP 유전자를 YKL-1의 E3 부위에 재도입하여 바이러스에 감염된 세포의 효과적인 세포 사멸을 유도하고자 하였다. CMV 프로모터가 내재 프로모터인 MLP보다 ADP를 발현시키는데 월등히 우수하였으며, 효과적인 세포 살상을 유도할 수 있었다. 또한, ADP의 발현에 따른 세포 살상능 증가는 ADP 유전자의 세포고사 유도에 의한 것임을 확인하였다.

REFERENCES

1. Kim D. Replication selective oncolytic adenoviruses: virotherapy aimed at genetic targets in cancer. *Oncogene* 2000;19: 6660-6669.
2. Bischoff JR, Dim DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna

- M, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in P53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;18:274(5286):373-376.
3. Kim J, Lee B, Ahn J, Park JO, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Min JS, Kim BS, Lee H. Tumor-specific virus replication and cytotoxicity of E1B 55 kD-deleted adenovirus. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32:200-209.
 4. Babiss LE, Ginsberg HS, Darnell JE. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* 1985;5:2552-2558.
 5. Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9:725-736.
 6. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, VonHoff DD, Kim DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3:639-645.
 7. Wilder O, Morris JC, Vahanian NN, Ford HJ, Ramsey WJ, Blaese RM. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1999;6:57-62.
 8. Grunhaus A, Horwitz MS. Adenoviruses as cloning vectors. *Semi Virol* 1992;3:237-252.
 9. Burgert HG, Kvist S. An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 1985;41:987-997.
 10. Pääbo S, Bhat BM, Wold WSM, Peterson PA. A short sequence in the COOH-terminus makes an adenovirus membrane glycoprotein a resident of the endoplasmic reticulum. *Cell* 1987;50:311-317.
 11. Gooding LR, Elmore LW, Tollefson AE, Brady HA, Wold WSM. A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* 1988;53:341-346.
 12. Gooding LR, Ranheim TS, Tollefson AE, Aquino L, Duerksen-Hughes P, Horton TM, Wold WSM. The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J Virol* 1991b;65:4114-4123.
 13. Krajcsi P, Dimitrov T, Hermiston TW, Tollefson AE, Ranheim TS, Vande Pol SB, Stephenson AH, Wold WSM. The adenovirus E3.14.7K protein and the E3.10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid. *J Virol* 1996;70:4904-4913.
 14. Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WSM. The E3.11.6 kDa Adenovirus Death Protein (ADP) is required for efficient cell death: Characterization of cells infected with *adp* mutants. *Virology* 1996a;220:152-162.
 15. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WSM. The adenovirus death protein (E3 11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 1996b;70:2296-2306.
 16. Wold WSM, Cladaras C, Magie SC, Yacoub N. Mapping a new gene that encodes an 11,600-molecular-weight protein in the E3 transcription unit of adenovirus 2. *J Virol* 1984;52:307-313.
 17. Wold WSM, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE. Immune responses to adenoviruses: Viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol* 1999;11:380-386.
 18. Horwitz M. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* 2001;279:1-8.
 19. Mahr JA, Gooding LR. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev* 1999;168:121-130.
 20. Tollefson AE, Scaria A, Saha SK, Wold WSM. The 11,600-Mw protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J Virol* 1992;66:3633-3642.
 21. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:7742-7746.
 22. White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WSM, Kusher DI, Gooding LR. The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor α . *Mol Cell Biol* 1992;12:2570-2580.
 23. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 1992;357:82-85.
 24. Lowe SW, Jacks T, Housman DE, Ruley HE. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53 deficient cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:2026-2030.