Zinc finger protein을 이용한 VEGF-A promoter 활성화 조절 연구

연세대학교 대학원

의과학과

강 윤 아

Zinc finger protein을 이용한 VEGF-A promoter 활성화 조절 연구

지도 교수 김 주 항

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

강 윤 아

강윤아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005 년 12 월 일

감사의 글

작년 감사의 글을 쓰고 있는 선배 옆에서 좋게 써달라고 말했던 기억이 생생한 데 옆에서 감사의 글 좋게 써달라는 후배의 말을 듣고 있으니 기분이 묘합니다. 파이펫팅조차 할 줄 몰랐던 제가 실험실에 들어와서 이렇게 논문이란 것을 내기까지 참 많은 일들이 있었습니다. 처음으로 클로닝한 바이러스가 잘 만들어지지 않아 속상했던 일, 바이러스의 효과가 나타나는 실험 결과가 나왔을 때의 신기함 등 이루 다 말할 수 없습니다. 처음 논문을 쓰기 시작했을 때만 해도 제 자신이 뿌듯하고 대견스러웠는데 이렇게 마지막 정리를 하며 돌아보니 너무 부족한 점이 많아 보입니다. 그렇지만 석사 생활 2년 누구에게도 부끄럽지 않게 열심히 했다는 자부심을 가지고 감히 이 논문을 마무리 합니다.

아직 모르는 것이 너무 많고 부족한 제가 석사 생활을 정리할 수 있는 이런 귀한 논문을 낼 수 있었던 것은 무엇보다도 저희 실험실 사람들 덕분입니다. 항상 허허 하시며 저희들을 격려해 주시지만 때론 예리하게 잘못된 점을 지적해 주시는 김주항 선생님, 실험실의 모든 일들을 세심히 돌봐주시고 저희 실험을 하나하나 이끌어 주시는 엄청난 능력의 소유자 윤채옥 선생님 두 분께 정말 감사드립니다. 또한, 이 논문을 마치 선생님 실험실 학생의 논문처럼 꼼꼼히 살펴보시고 검토해 주신 신전수 선생님께도 감사드립니다. 항상 실험실 학생들에게 친한 선배처럼 편하게 대해 주시는 손주혁 선생님과 새로이 오셔서 아직 친해지지는 못했지만 늘 암연구소 세미나를 열어주시는 안중배 선생님, 그리고 항상 열심히 하는 모습을 몸소 보여 주셨던 김현희 선생님께도 감사의 마음을 전합니다. 석사 생활을 큰 어려움 없이 즐겁고 재밌게 실험할 수 있도록 효과 좋은 zinc finger protein을 만들어 주신 그리고 많은 실험적인 조언을 해주신 김진수 선생님과 신현철 선생님, 전혀 angiogenesis를 모르던 제게 친절하게 많은 것을 가르쳐 주신 권영근 선생님, 김억천 선생님, 그리고 민정기 선생님께도 정말 감사드립니다.

사랑하는 저희 실험실 식구들 모두 너무 너무 고맙습니다. 분자생물학적 지식이 부족한 저에게 늘 자세히 가르쳐 주시던 재성 선배님, 실험실 맏언니로 후배들에 많은 것을 전수해 주시던 영숙 언니, 멀리 중국에서 오셔서 열심히 실험하고 계시는 동물 실험의 대가 황경화 선생님, 고등학생도 모자라 중학생처럼 보이는 김진선 선생님, 늘 조용히 열심히 실험하시는 그러나 술자리에선 무서운 왕언니 민정

언니, 아무것도 모르던 저에게 실험을 가르치느라 고생했을 이제는 아기 엄마가 된 경주 언니, 같은 분야의 실험을 하며 실질적으로 제가 논문 실험을 하는데 있어 가장 많은 조언과 도움을 준 열혈 실험쟁이 지영 언니, 1 연구소 분위기 메이커이자 정말 꼼꼼한 평환 오빠, 털털한 성격이 정말 매력적인 아름 언니, 이제 영국에서 새로운 출발을 준비하는 태영 언니, 저의 하나 밖에 없는 동기이자 분위기 메이커인 너무 착한 일규 오빠, 이제 막 실험실 막내를 벗어나 아직도 여러 가지 잡일을 도맡아 하는 성실한 오준이, 아기같이 귀엽고 착한 특히 웃는 모습이 너무나 사랑스러운 민주, 그리고 명실상부 실험실 막내로 이제 막 새로운 걸음을 내딛는 성미. 여러분 모두에게 정말 감사드리고 항상 좋은 일들만 함께 하기를 바랍니다. 늘 보이지 않는 곳에서 실험실 여러 가지 일들을 도맡아 하시는 박근호 선생님과 선영이 에게도 감사하다는 말씀을 전합니다.

제가 힘들고 지칠 때마다 항상 저에게 웃음과 여유를 주었던 사랑하는 고등학교 친구들, 대학 동기들, 춤패탈 선후배 여러분께 사랑한다는 말을 전하고 싶습니다. 오빠 아닌 오빠로 실험에 지쳐 전화할 때마다 늘 웃으며 받아준 호준이, 원생이란 동질감으로 힘이 되어준 성찬이, 태식 오빠에게도 좋은 결과가 있기를 바랍니다.

무엇보다도 제가 정말 아끼고 사랑하는 우리 가족들, 진심으로 존경하는 잘생긴 우리 아빠, 때로는 친구처럼 때로는 힘들다고 다 큰딸이 어린애 마냥 어리광을 부려도 다 받아주시는 세상 때 묻지 않은 우리 엄마, 늘 티격태격하지만 언어 능력이 아주 뛰어난 자랑스러운 멋쟁이 우리 언니 그리고 옆에서 늘 큰 힘이 되어준 사랑하는 민철이에게도 저의 이 고마운 마음, 사랑하는 마음을 전하고 싶습니다.

저자 씀

〈차 례〉

그림 및 표 차례 · iii

국문요약 · 1

Ⅰ. 서 론 · 3

II.. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 8
2. 실험 동물 · 9
3. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출 · · · · · · · · · · 9
4. VEGF-A 발현 변화 검증 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 10
5. Tube formation assay · 11
6. *Ex vivo* aorta ring sprouting assay · · · · · · · · · · 12
7. VEGF-A 전사를 억제하는 zinc finger protein을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증 · · · · · 12
8. 생체 내 항종양 효과 및 생존율 검증 · · · · · · · · · · · 13
9. VEGF-A 전사를 억제하는 zinc finger protein을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직 내 신생혈관 형성 억제 효과 검증 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 13
10. 종양 내 혈관 수의 계산 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 14

III. 결 과

1. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 VEGF-A 발현 변화 검증 · · · · · 15
2. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데

노바이러스에 의한 신생 혈관 형성능 검증 · · · · · · · · · 18
3. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-ko*x*를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증 · · · · · · · · · · 23
4. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-ko*x*를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 및 생존율 검증 · 24
5. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-ko*x*를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 투여에 따른 종양 내 혈관 분포 관찰 · 27

IV. 고 찰 · 29

V. 결 론 · 34

참고문헌 · 35

영문요약 · 42

그림 차례

Figure 1. Schematic representations of the adenoviral vectors used in this study · · · · · · · · · · 15

Figure 2. The expression of VEGF-A by U343 and U87MG infected with Ad-ΔE1GFP-kox · · · 16

Figure 3. The expression of VEGF-A infected with Ad-ΔE1GFP-p65 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 18

Figure 4. Replication incompetent adenovirus encoding F435-kox or F435-p65 inhibits or promotes VEGF-induced tube formation of HUVEC · 19

Figure 5. Replication incompetent adenovirus encoding F435-kox inhibits VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo* · · · · · · · · · · · · · · · 21

Figure 6. Replication incompetent adenovirus encoding F435-p65 promotes VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo* · · · · · · · · · · · · · · · 22

Figure 7. Cytopathic effects of Ad-ΔB7-kox *in vitro* · 24

Figure 8. Anti-tumor effects and survival rate of adenoviruses expressing F435-kox · · · · · 26

Figure 9. Histological assessment of angiogenesis in the tumor tissue treated with Ad-ΔB7-kox · · · 28

국문요약

Zinc finger protein을 이용한 VEGF-A promoter 활성화 조절 연구

신생 혈관 형성은 내재하는 혈관에서 새로운 모세 혈관이 자라나는 과정으로 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 신생 혈관 형성의 가장 강력한 유도체이다. VEGF가 중재하는 신생 혈관 형성은 종양의 성장 및 침윤에 중요한 역할을 하기 때문에 항암 치료에 있어서 주된 표적이 되고 있다. 항암 치료를 위한 신생 혈관 억제와 반대로, 치료 목적의 신생 혈관 형성은 허혈 조직에 산소와 혈액을 공급하는 collateral vessel의 수를 증가시키는 혁신적인 방법이다. 따라서 VEGF의 발현을 조절할 수 있다면 신생 혈관 형성을 억제 혹은 촉진함으로써 항암 치료나 허혈성 질환 치료에 이용할 수 있다.

진핵 전사 인자 중 가장 큰 그룹을 이루는 Cys_2-His_2 zinc finger protein을 이용하여 내재적인 표적 위치를 바로 인지하여 전사를 촉진하거나 억제하는 인공 전사 인자를 만들 수 있다. 이는 표적 DNA의 변형 없이 그 발현을 조절할 수 있다는 이점이 있다. 따라서 내재하는 VEGF-A 프로모터의 활성을 조절함으로써 모든 isoform의 발현을 조절할 수 있는 전사 억제 인자인 F435-kox와 활성화 인자인 F435-p65를 유전자 전달 효율이 높은 아데노바이러스에 삽입하였다.

즉, 아데노바이러스의 E1 부위에 green fluorescent protein(GFP)을 표지 유전자로 도입하고 E3 부분에 F435-kox를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하여 VEGF 발현 억제 정도를 humanVEGF ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하여 확인하였다. VEGF 발현 감소로 인한 혈관 내피 세포의 분화 능력 감소와 sprouting 감소를 tube formation assay와 aorta ring sprouting assay를 통하여 확인할 수 있었다. 이와 더불어 아데노바이러스의 E1B 유전자가 소실되고 E1A 부위 중 Rb와의 결합능이 소실된 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 E3 부위에 F435-kox를 삽입

하여 뛰어난 생체 내 항종양 효과를 확인하였다. 혈관 내피 세포 표지 인자인 CD31 발현 정도 확인을 통하여 종양 조직 내에서의 신생 혈관 억제 효과도 검증할 수 있었다. 또한, F435-p65를 GFP를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입하여 VEGF 발현 촉진 정도를 hVEGF ELISA를 수행하여 확인하였고, 그 효과를 tube formation assay와 aorta ring sprouting assay를 통하여 다시 한 번 검증할 수 있었다.

이와 같은 결과를 통하여 Ad-ΔE1GFP-kox와 Ad-ΔE1GFP-p65 모두 내재하는 VEGF-A 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 종양 선택적 살상 아데노바이러스 자체의 종양 선택적 살상능과 더불어 E1A 발현과 F435-kox 발현으로 유도된 VEGF-A 발현 억제로 인해 상승된 항종양 효과를 보이는 Ad-ΔB7-kox는 항암 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각된다. 모든 종류의 VEGF-A isoform을 발현시키는 Ad-ΔE1GFP-p65는 생체 내의 생리학적 신생 혈관 형성과 가장 유사한 효과를 유도하여 허혈성 질환이나 심혈관계 질환 치료에 효과가 있을 것으로 사료 된다.

핵심되는 말 : VEGF, 신생 혈관 형성, zinc finger protein,
인공 전사 인자, 아데노바이러스

Zinc finger protein을 이용한 VEGF-A promoter 활성화 조절 연구

< 지도교수 김주항 >

연세대학교 대학원 의과학과

강 윤 아

Ⅰ. 서론

Senger 연구팀에 의해 vascular permeability factor(VPE)가 1983년에 최초로 발견되고[1] 1989년에는 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 기능이 규명되었다. 그 후 VPE와 VEGF가 같은 물질이라는 것이 밝혀졌고 종양 신생 혈관 형성에의 결정적인 역할 때문에 VEGF에 대한 많은 연구들이 이루어지기 시작하였다. VEGF-A는 신생 혈관 형성의 주요 유도 물질로 VEGF-A의 단일 allele이 손상되더라도 심혈관계 발달이 치명적으로 저해되기 때문에 어린 배아 상태에서 죽음에 이른다[2]. 이로부터 VEGF-A의 발현이 아주 정교하게 조절되어야 한다는 것을 알 수 있다. Human VEGF-A에는 일곱 종류의 isoform이 존재하는데 이들은 각각 121, 145, 148, 165, 183, 189, 그리고 206개의 아미노산으로 구성되어 있으며 alternative splicing에 의해 만들어 진다[3,4]. 최근 연구들에 의하면 VEGF가 세포고사 억제, 림프 신생 혈관 형성, 면역 억제 그리고 조혈모세포의 생존(hematopoietic stem cell survival) 조절에도 작용한다고 알려져 있다[5-8].

VEGF가 중재하는 신생 혈관 형성은 내재하는 혈관에서 새로운 모세 혈관이 자라나는 과정을 말하는데 종양의 성장 및 침윤에 중요

한 역할을 하고 있으며, 많은 종류의 종양 세포에서 VEGF-A가 과발현 되어 있다[9]. 종양이 자라는데 있어 신생 혈관 생성을 통한 혈류 공급의 증가는 필수적이기 때문에 종양 내 혈관 생성 억제는 암 치료의 주요 표적이 되고 있고, angiostatin, endostatin, thrombospondin-1 그리고 uPA-fragment 등이 현재 신생 혈관 생성 억제제로 이용되고 있다[10]. 이러한 신생 혈관 형성 억제제들을 종양 내에서 고발현 시켜 준다면 상당한 치료 효과를 기대 할 수 있을 것이다. 실제 전임상 연구에서 angiostatin과 같은 신생 혈관 억제 물질들을 투여하여 항종양 효과를 보고한 바 있다[11]. 그러나 신생 혈관 억제제 투여 방법은 이들 물질들의 짧은 반감기 때문에 반복 투여가 불가피하고 이로 인한 독성 위험과 고비용, 그리고 적정 사용량 등의 문제점을 안고 있다. 이에 비해 유전자 치료는 한 번의 시술로 지속되는 고발현 효과와 비용 절감 효과, 그리고 하나 이상의 치료 유전자를 체내에 도입할 수 있다는 장점이 있다[12]. 암 유전자 치료에 이용되는 유전자 전달체 중에서 아데노바이러스가 현재 가장 널리 사용되고 있는데, 아데노바이러스는 우수한 유전자 전달 효율을 보이고 높은 역가로 생산이 가능하며 쉽게 농축할 수 있는 장점이 있다. 실례로 angiostatin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 생체내로 일회 투여하여 U87MG glioma xenograft 모델에서 종양의 성장을 약 80% 억제하였다[13]. 따라서 아데노바이러스에 이들 신생 혈관 생성 억제제들을 도입하여 고발현 시켜 준다면 상당한 항암 치료 효과를 기대 할 수 있을 것이다.

항암 치료를 위한 신생 혈관 억제와 반대로, 치료 목적의 신생 혈관 형성은 허혈 조직에 산소와 혈액을 공급하는 collateral vessel의 수를 증가시키는 혁신적인 방법이다[14]. β-blockers, Ca^{2+}-antagonists, nitrates(coronary artery disease(CAD)의 치료), 그리고 prostanoids(peripheral arterial occlusive disease(PAOD)의 치료) 등 기존의 치료법들은 collateral vessel의 성장을 촉진시키지는 못한다[10]. 허혈 조직에 새로운 혈관을 형성시키는 초기 단계에는 성장 인자의 지속적인 발현이 필요하기 때문에 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료는 재조합 성장 인자 단백질의 투여 방법에 비해 여러 측면에서 우월하다[15]. 재조합 성장 인자 단백질을 투여할 경우에는 혈관의

luminal side부터 노출되고 높은 생산 원가와 시술 횟수 면에서 유전자 치료에 비해 효율적이지 못하다. 실례로 CAD 환자를 대상으로 한 VEGF와 fibroblast growth factor(FGF) 단백질을 투여한 임상 실험은 치료 효과를 보지 못하고 실패하였다[16,17]. 이에 반해 CMV 프로모터에 의해 발현되는 FGF-5를 발현하는 재조합 복제 불능 아데노바이러스를 돼지의 관상 동맥에 주사한 경우에는, 약 25-30%의 심근 세포들이 아데노바이러스에 감염되었고, 효과적인 치료 유전자의 발현으로 새로운 collateral 혈관들의 성장이 촉진되었다. 또한, 스트레스로 인해 유도되는 심장 혈류 흐름의 이상과 심근 기능의 결함도 정상으로 돌아왔다[18].

혈관은 유전자 도입을 위한 접근이 쉽고 형질 도입된 유전자의 단기적 발현만으로도 허혈성 질환에 대한 치료 효과를 보기에 충분하기 때문에[19,20] 아데노바이러스를 이용한 허혈성 질환에 대한 유전자 치료는 전망이 밝다. 즉, 허혈성 심혈관 질환의 경우 유전자 치료법을 이용하여 일부 심근 세포들에만 치료 유전자의 형질 이입이 이루어지더라도 심근 세포들이 신생 혈관 성장 인자를 지속적으로 분비할 수 있다. 또한, 성장 인자는 신생 혈관 형성 프로그램이 시작되는 초기 단계에만 필요하기 때문에 치료 효과가 충분히 나타날 것으로 생각된다[10]. 오히려 국소적으로 VEGF가 장기간 발현될 경우에는 과도한 신생 혈관 생성과 혈관종(hemangioma)의 형성을 유도할 수 있어 안전성을 위협할 수 있다[21]. 현재 심혈관 유전자 치료의 주요 대상은 관상동맥 질환(CAD), 말초동맥 폐쇄 질환(PAOD)을 위한 신생 혈관 생성 촉진[14,22], 혈관 성형술 후(postangioplasty), 그리고 도관 재협찰(stent restenosis)의 억제[23,24] 등이다.

유전자 치료가 임상에 보다 효과적으로 적용되기 위해서는, 치료 유전자의 발현을 특이적으로 조절할 수 있는 시스템의 개발이 선결되어야 한다. 자연계에서 특정 유전자의 전사 조절은 전사 인자라는 단백질을 통해 이루어지는데 이 단백질은 두개의 기능적으로 분리된 단위로 이루어져 있다. 하나는 특정부위의 DNA를 인지하여 결합하는 도메인이고 다른 하나는 대상 유전자의 전사를 조절하는 기능적 단위이다[25]. Cys_2-His_2 zinc finger protein은 진핵 전사 인자 중 가장 큰

그룹을 이루는 단백질로 인간 유전체 중 반 이상의 전사 활성화 인자들이 이 그룹에 속한다[26]. 따라서 zinc finger는 인공 전사 인자를 만드는데 있어 매우 중요한 platform을 제공한다[27]. 특정 DNA 위치에 결합하는 zinc finger를 자연계에 존재하는 전사 활성화 도메인 또는 억제 도메인과 결합시키면 내재적인 표적 위치를 바로 인지하여 전사를 촉진하거나 억제하는 인공 전사 인자를 만들 수 있고 이는 표적 DNA의 변형 없이 그 발현을 조절할 수 있다는 이점이 있다. 실제로 인공적으로 제작된 zinc finger protein을 이용하여 내재적인 chromosomal gene을 성공적으로 조절한 예들이 보고되고 있다[28-30].

본 연구는 VEGF-A 프로모터에 특이적으로 결합하는, 사람의 유전체 염기 서열에서 유래한 zinc finger에 전사 억제 인자 (kox) 또는 전사 활성화 인자(p65)를 결합한 인공 전사 인자들인 F435-kox 또는 F435-p65를 아데노바이러스에 도입하여 VEGF-A의 발현 감소 또는 증대 효과를 알아보고자 하였다.

종양 세포에서는 p53 단백질의 변이 뿐 아니라 retinoblastoma 단백질(pRb)의 돌연변이 혹은 pRb 관련 신호기전이 상당부분 손상되어 있기 때문에, pRb와의 결합능이 소실된 아데노바이러스는 정상 세포에서는 pRb의 활성으로 아데노바이러스의 복제가 억제 되지만 pRb의 기능이 억제된 종양 세포에서는 활발하게 복제되어 암세포를 선택적으로 살상할 수 있다[31,32]. 이러한 점에 착안하여, 본 연구실에서는 아데노바이러스의 E1A 유전자 부위 중 pRb와의 결합에 관여하는 CR1 부위의 Glu 아미노산을 Gly로 치환시키고 CR2 부위의 7개 아미노산(DLTCHEA)을 Gly(GGGGGGG)으로 치환시킴으로서 pRb와의 결합능이 소실된 아데노바이러스를 제작하였다. 동시에 p53 단백질의 기능을 억제하는 E1B 55 kDa과 세포 고사 억제 기능을 하는 E1B 19 kDa 유전자를 제거함으로써, p53이 불활성화된 종양세포들에서 선택적으로 복제 가능하고[33-38], 또한 세포 고사도 함께 유발할 수 있는 개선된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7을 제작하였다.

이러한 배경 하에, 궁극적으로 본 연구에서는 VEGF-A를 전사 단계에서 억제시키는 인공 전사 인자 유전자를 본 연구실에서 제작한 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 삽입하여 고발현 시켜줌으로써,

복제 가능한 바이러스에 의한 암세포 특이적 살상 효과와 더불어 신생 혈관 형성 억제에 의한 항암 효과가 함께 유도되어 총체적인 항종양 효과가 향상되는지를 알아보고자 하였다. 또한 복제 불능 아데노바이러스에 VEGF-A의 발현을 촉진하는 인공 전사 인자 유전자를 삽입하여 VEGF-A를 높게 발현 시켜줌으로써 허혈성 질환에서의 치료 효과를 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주인 U343와 U87MG, 인체 평활근 세포인 coronary artery smooth muscle cell(CASMC)과 human aortic smooth muscle cell(AoSMC)를 이용하였다. 뇌암 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 평활근 세포들은 Cambrex(Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA)에서 구입하였다. Human umbilical vascular endothelial cell(HUVEC)은 연세대학교 생화학과 권영근 선생님으로부터 받았다. 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 HEK293 세포주(ATCC)를 아데노바이러스 생산 세포주로 사용하였다. 뇌암 세포주들은 10%의 우태아 혈청(FBS; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM 배양액으로 항생제 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin(Gibco-BRL)을 첨가하여 5% CO_2의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. 평활근 세포들은 5% FBS, 2 ng/ml human fibroblast growth factor-B, 0.5 ng/ml human epidermal growth factor, 50 μg/ml gentamicin, 50 ng/ml amphotericin-B, 그리고 5 μg/ml bovine insulin이 첨가된 SmGM-2(Cambrex) 배양액으로 배양하였고 계대 배양 5-8 사이의 세포들만 실험에 사용하였다. HUVEC 세포는 20% FBS가 포함된 M199(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 항생제 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 3 ng/ml basic fibroblast growth factor(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), 그리고 5 U/ml heparin을 넣고 배양한 계대 배양 3-5 사이의 세포들로 실험을 하였다.

2. 실험동물

Rat aorta ring sprouting assay는 6 주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 SLC(Japan SLC, Inc., Japan)에서 구입하여 사용하였고, 생체 내 항종양 효과 실험은 6~8주령의 수컷 누드 생쥐(BALB/c-nu)를 SLC에서 구입하여 사용하였다. 동물 사육실의 온도는 22 ± 2°C, 습도는 55~60%로 유지시켰으며, 명암 순환이 12 시간 단위로 조절되게 하였고, 방사선 조사로 멸균한 고형사료(중앙실험동물, Seoul, Korea)와 멸균된 급수를 자유로이 섭취하게 하였다.

3. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

VEGF-A의 전사를 효과적으로 억제 혹은 증가시킬 수 있는 zinc finger protein 플라즈미드인 F435-kox와 F435-p65((주) 툴젠, Daejeon, Korea)를 아데노바이러스 E3 셔틀 벡터인 pSP72ΔE3에 삽입하여 각각 pSP72ΔE3-F435-kox와 pSP72ΔE3-F435-p65를 제작하였다. GFP와 zinc finger protein을 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하기 위하여, 상기에서 제작된 pSP72ΔE3-F435-kox와 pSP72ΔE3-F435-p65 E3 셔틀벡터를 각각 *Pvu*I과 *Sca*I 제한효소로 처리하여 선형화시키고, E3 유전자가 소실되고 E1부위에 GFP가 삽입된 pAd-ΔE1GFP 바이러스 벡터를 *Spe*I 제한효소를 처리하여 선형화시켰다. 이들을 함께 대장균 BJ5183 (obtained from S.B. Verca, University of Fribourgh, Switzerland)에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도하여 GFP 유전자와 VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터인 pAd-ΔE1GFP-kox와 pAd-ΔE1GFP-p65를 각각 제작하였다. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, 상기에서 제작된 pSP72ΔE3-F435-kox 아데노바이러스 E3 셔틀벡터를 *Pvu*I 제한효소로 처리하여 선형화시킨 뒤, *Spe*I 제

한효소를 처리하여 선형화 시킨 pAd-ΔB7 아데노바이러스 토탈 벡터(E1A의 Rb 결합 부위가 변이되고, E1B 19 kDa 유전자와 E1B 55 kDa 유전자가 함께 소실된 종양 특이적 살상 아데노바이러스)와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 pAd-ΔB7-kox 종양 선택적 살상 아데노바이러스 벡터를 제작하였다. 상동 재조합된 아데노바이러스 벡터들을 *Hind*III 제한효소로 처리하여 상동 재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라즈미드들은 *Pac*I 제한효소로 절단한 뒤 HEK293 세포주에 형질 전환시켜 아데노바이러스를 생산하였다. 대조군으로 사용된 바이러스는 E1 부위의 유전자들이 결손 되고 그 부위에 GFP 유전자를 가진 Ad-ΔE1GFP와 E1A 부위의 Rb 결합 부위가 변이되고, 동시에 E1B 19 kDa와 E1B 55 kDa유전자들이 모두 결손된 Ad-ΔB7이며, 각각의 아데노바이러스는 HEK293 세포주에서 증식시켜 CsCl gradient로 농축하여 순수 분리하였으며, limiting titration assay으로 역가(plaque forming unit; PFU)를 산출하였다.

4. VEGF-A발현변화검증

VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스에 의해 VEGF-A의 발현이 효과적으로 억제 혹은 증진되는지를 검증하기 위하여, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 시행하였다. 먼저 VEGF-A의 발현이 억제되는지 확인하기 위하여 뇌암 세포주인 U343, U87MG(1 X 10^6 cells)를 25T flask에 각각 분주한 뒤, 다음날 아데노바이러스를 여러 농도의 multiplicity of infection(MOI)로 감염시키고 4 시간 후, 5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체하였다. 바이러스 감염 후 48, 72, 96 시간에 배지를 회수하기 위하여, 배지 회수 30시간 전에 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 6시간 동안 starvation을 준 뒤 1% FBS가 포함된 DMEM으로 배지를 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 회수된 배지는 800 g로 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤, 이 중 100 μl의 상층액을 이용하여 VEGF-A ELISA 분석을 시행하였다. 배지를 회수한 후, 남아있는 세포는 150 μl의 차가운 lysis 용액으로 세포를 용해시킨 다음, 10,000 g

에서 15 분간 원심 분리하여 단백질을 분리하고, 단백질 분석 kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 세포내 단백질 양을 정량하였다. ELISA 분석에 의해 산출된 VEGF-A 양은 세포내 단백질 양에 의해 보정하였다. VEGF-A 발현 증진 여부를 확인하기 위해서는, U343 세포주(6 X 10^5 cells), CASMC, AoSMC(2.5 X 10^5 cells)를 6-well plate 에 분주한 뒤 다음 날 아데노바이러스를 여러 농도의 MOI로 감염시키고 4 시간 후, 각각 1% FBS가 포함된 DMEM과 SmGM-2 배지로 교체하였다. 배지 교체 후 24 시간, 36 시간 그리고 48 시간에 배지를 각각 회수하여 상기된 방법과 동일하게 ELISA를 수행하였다.

5. Tubeformationassay

VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein 발현에 따른 VEGF-A의 발현 감소 혹은 증가로 혈관 내피 세포의 tube formation 기능이 변화되는지를 알아보기 위하여, HUVEC 세포를 이용하여 tube formation assay를 시행하였다. 먼저, 250 μl의 growth factor-reduced matrigel(Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA)를 얼음 위에서 차갑게 만든 24-well plate에 균일하게 분주한 뒤, 37°C에서 30분간 polymerization하였다. HUVEC(3-5 계대 배양) 세포는 6시간 동안 1% FBS를 포함한 M199 배지에서 배양하여 혈청 starvation시킨 뒤, trypsin을 처리하여 세포수를 측정하였다. 혈청 starvation 전처리가 된 HUVEC(2 X 10^5 cells) 세포를, VEGF-A 발현 억제 실험군의 경우 Ad-ΔE1GFP 또는 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스를 각각 30 MOI 처리한 후 48 시간 후에 수득한 U343 세포 배양액과 50 MOI를 처리한 후 72 시간 뒤에 수득한 U87MG 세포 배양액과 섞은 뒤, matrigel이 분주된 24-well plate에 분주하고 배양하였다. VEGF-A 발현 촉진 실험군의 경우에는, 100 MOI(U343)와 500 MOI(CASMC)의 Ad-ΔE1GFP 또는 Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 각각 처리하고 36 시간 뒤에 수득한 세포 배양액과 섞은 뒤 배양하였다. 양성 대조군으로는 40 ng/ml의

VEGF-A 단백질(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)을 이용하였다. 배양 후 18 시간에서 24 시간 사이에 배양액을 제거하고 PBS로 2번 세척한 뒤 현미경으로 tube 형성을 관찰하였다.

6. *Ex vivo* aorta ring sprouting assay

VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein 발현에 따른 혈관 형성 억제 혹은 증가를 관찰하기 위하여, aorta ring sprouting assay를 시행하였다. 6 주령의 Sprague Dawley rat으로부터 aorta를 분리하고, aorta 주변의 fibro-adipose tissues를 제거한 뒤, 1 mm 두께의 ring으로 얇게 잘랐다. 차갑게 한 48-well plate에 matrigel을 120 µl씩 분주하고 37°C에서 10분간 polymerization한 뒤, aorta ring을 각각의 well에 얹고, 50 µl의 matrigel를 overlay 하였다. 30분 후 matrigel이 굳으면, tube formation assay에서 사용된 것과 같은 세포 배양액 250 µl를 각각의 well에 처리하여 배양하였다. 양성 대조군으로는 VEGF-A 단백질(40 ng/ml)을 처리하였다, 배양 후 6일, 9일, 12일 경에, 현미경(optical imaging technique)으로 aorta ring으로부터 생성되어진 혈관들을 관찰하였다[39]. 형성된 혈관들은 double-blinded manner로 양성 대조군(most positive)을 5점, 혈관이 형성되지 않은 실험군(least positive)을 0점으로 점수를 부여하여 분석하였으며, 각각의 실험군에 대해 12개의 aorta ring을 대상으로 aorta ring sprouting assay를 수행하였다.

7. VEGF-A 전사를 억제하는 zinc finger protein을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포살상능 검증

VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein의 발현 여부가 아데노바이러스의 복제에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여, 바이러스의 복제 결과로 나타나는 cytopathic effect(CPE)를 조사하였다. 뇌암 세포주(U343), 간암 세포주(Hep1), 자궁암 세포주(C33A), 폐암 세포주(A549) 등의 인체 종양 세포주들을 24-well plate에 각각 분주

하고, 24 시간 후 Ad-ΔE1LacZ, Ad-ΔB7, 또는 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 여러 농도의 MOI로 감염시켰다. 낮은 MOI의 바이러스로 감염시킨 세포들이 거의 사멸된 시점에 배지를 제거하고 plate 바닥에 남아있는 세포들을 0.5% crystal violet (in 50% methanol)으로 고정하고 염색한 후 분석하였다.

8. 생체내항종양효과및생존율검증

생후 6~8주 정도 경과된 누드 생쥐 복부 피하에 1 X 10^7개의 인체 뇌암 세포주 U87MG를 주사하였다. 종양의 용적이 약 60~70 mm^3 정도 되었을 때, 5 X 10^8 PFU의 Ad-ΔE1GFP, Ad-ΔE1GFP-kox, Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 각각 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 주사한 후 종양의 크기를 이틀 간격으로 측정하였다. 종양의 용적은 caliper로 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다[36].

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

9. VEGF-A 전사를 억제하는 zinc finger protein을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직 내 신생혈관 형성 억제 효과 검증

6~8주령의 누드 생쥐 복부 피하에 뇌암 세포주인 U343과 U87MG를 주사한 후 종양의 크기가 약 100~120 mm^3 정도 되었을 때, 5 X 10^8 PFU의 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 투여하였다. 마지막 바이러스를 투여한 후 10 일경에 종양을 적출하여 IHC Zinc fixative(Formalin-free)(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) 용액에 고정시킨 뒤 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라

핀 블록을 4 ㎛ 두께로 잘라 슬라이드로 만든 뒤, 이를 xylene, 100%, 90%, 70% ethanol 용액에 차례로 담궈 파라핀을 제거(deparafinization)한 후 hematoxylin과 eosin(H & E)으로 염색하였다. VEGF-A 전사를 억제하는 zinc finger protein의 발현에 의해 종양 조직 내 혈관 형성이 억제 되었는지 확인하기 위하여, 혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31을 선택적으로 인지할 수 있는 항체, rat anti-mouse CD31 monoclonal antibody(MEC13.3; BD Biosciences Pharmingen)를 이용하여 조직 면역 염색을 시행하였다. 파라핀이 제거된 4 ㎛ 두께의 종양 조직 슬라이드를 3% H_2O_2 용액에서 10분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시키고, CAS-BLOCK(Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 30분간 비특이적인 항체 반응이 일어나지 않도록 한 후, α-CD31 항체를 일차 항체로 hybridization시켰다. Biotin이 결합된 polyclonal anti-rat IgG antibody(BD Biosciences Pharmingen)를 이차 항체로 hybridization시킨 뒤 DAB(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)을 이용하여 CD31의 발현 양상을 규명하였다.

10. 종양내혈관수의 계산

혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31(platelet endothelial cell adhesion molecule 1) 양성으로 염색된 종양 내 혈관을 먼저 저배율로 관찰하여 무작위로 사진을 찍은 후, 배율을 높여 100배 시야에서 관찰되는 혈관의 수를 정량하였다. 세 장의 슬라이드로부터 각각 5개 시야를 선택하여 혈관 수를 계산하고 평균값을 산출하여 그 값을 대표 값으로 사용하였다.

Ⅲ. 결과

1. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 VEGF-A 발현 변화 검증

VEGF-A 프로모터에 특이적으로 결합하여 VEGF-A의 전사를 억제 혹은 촉진하는 zinc finger protein인 F435-kox와 F435-p65를 각각 발현하는 두 종류의 아데노바이러스(Ad-ΔE1GFP-kox, Ad-ΔE1GFP-p65)를 제작하였다.(Fig. 1A)

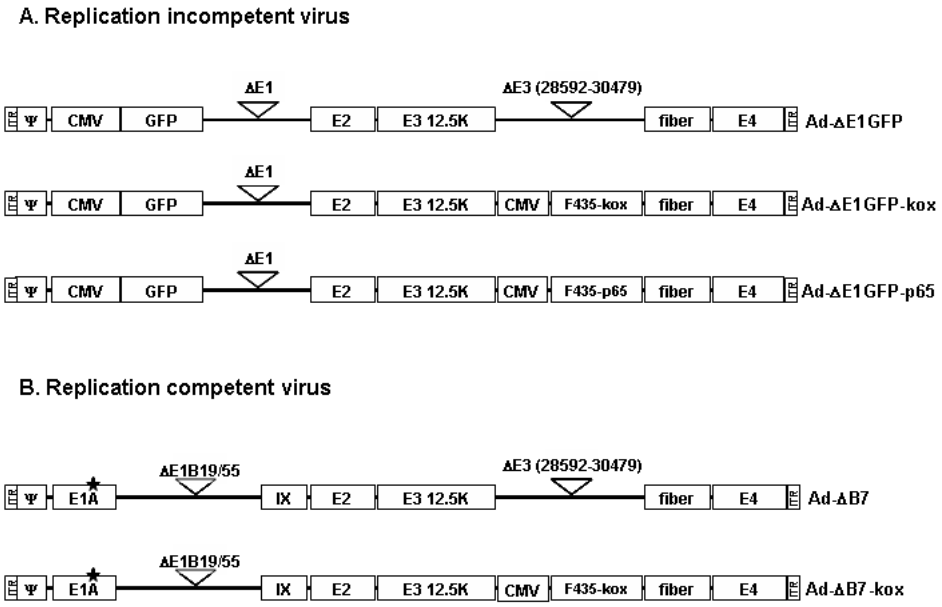

Figure 1. Schematic representations of the adenoviral vectors used in this study. All indicated adenoviral vectors were derived from full-length adenovirus genomes cloned and manipulated in *E. coli* as bacterial plasmids. (A) Ad-ΔE1GFP has the whole E1 region deleted and expresses GFP gene under the control of CMV promoter inserted into the E1 region; Ad-ΔE1GFP-kox and Ad-Δ

E1GFP-p65 have F435-kox and F435-p65 in E3 region, respectively. (B) Ad-ΔB7 contains mutated E1A, but lacks E1B 19 kDa and E1B 55 kDa; Ad-ΔB7-kox has F435-kox in E3 region.

아데노바이러스의 초기 유전자인 E1A를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스에 의하여 VEGF의 발현이 감소된다는 보고에 따라[40], F435-kox 발현에 의한 VEGF-A 발현 변화를 검증하기 위하여, 먼저 E1A가 소실되고 F435-kox와 GFP 유전자를 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP-kox를 제작하였다. Ad-ΔE1GFP-kox를 VEGF 발현양이 높은 인체 뇌암 세포주 U343과 U87MG에 감염시키고, 세포로부터 배지를 회수하여 ELISA를 통하여 VEGF-A 발현양을 정량하였다.

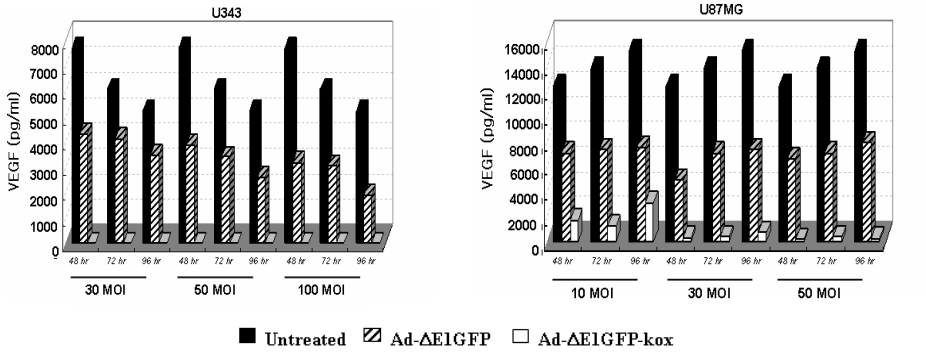

Figure 2. The expression of VEGF-A by U343 and U87MG infected with Ad-ΔE1GFP-kox. VEGF-A expression by U343 and U87MG infected with Ad-ΔE1GFP or Ad-ΔE1GFP-kox at different MOIs was measured by ELISA as a time dependent manner.

그 결과, 두 종류의 세포주 모두에서 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바

이러스의 감염에 의해 VEGF-A의 발현이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 즉, U343 세포주에서는 30 MOI 이상의 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스로 감염된 모든 경우에 VEGF-A의 발현이 완전히 억제되는 것을 확인하였으며, U87MG 세포주에서도 30 MOI 이상의 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스로 감염된 배지에서는 VEGF-A가 거의 검출되지 않았다. 특히, 30 MOI의 아데노바이러스로 96시간동안 감염된 U87MG 세포주의 경우, Ad-ΔE1GFP-kox에 의해 감염된 세포에서 발현된 VEGF-A의 양(0.2 ng/ml)이 대조군 바이러스인 Ad-ΔE1GFP에 의해 감염된 경우(7.9 ng/ml)에 비해 약 40배 정도 낮게 검출되는 것을 확인하였다. VEGF-A의 전사를 촉진하는 zinc finger protein인 F435-p65를 발현하는 Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 인체 뇌암 세포주인 U343과 인체 평활근 세포인 CASMC와 AoSMC에 감염시킨 경우에는, 처리한 바이러스의 용량에 비례하여, 그리고 처리해준 시간에 비례하여 VEGF-A의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 즉, AoSMC를 대조군 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP 500 MOI로 감염시킨 경우(340 pg/ml)에 비해 Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 감염시킨 경우(819 pg/ml) VEGF-A의 발현이 약 2.5배 증가하였다.

■ Untreated ▨ Ad-ΔE1GFP □ Ad-ΔE1GFP-p65

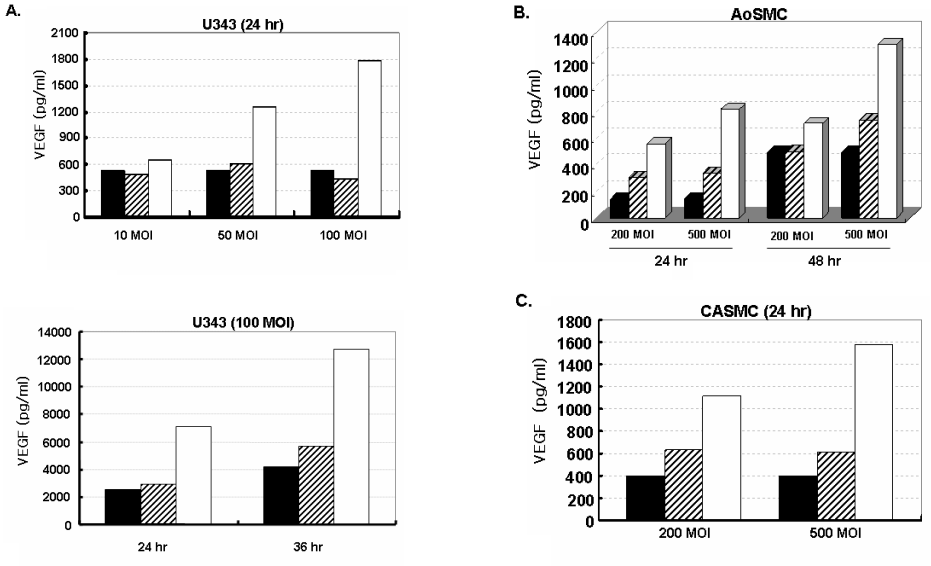

Figure 3. The expression of VEGF-A infected with Ad-Δ E1GFP-p65. The concentration of VEGF-A in the culture supernatant was measured by ELISA. (A) VEGF-A expression by U343. (B) VEGF-A expression by AoSMC at different MOIs as a time dependant manner. (C) VEGF-A expression by CASMC was measured at 24 hrs after infection.

2. VEGF-A 프로모터 특이적 zinc finger protein을 발현하는 아데노바이러스에 의한 신생혈관형성능 검증

VEGF-A 발현을 억제 혹은 증가시키는 zinc finger protein인 F435-kox와 F435-p65의 발현으로 인한 VEGF-A 발현양의 변화가 혈관 내피 세포의 분화 능력에 미치는 영향을 검증하기 위하여, HUVEC 세포를 이용하여 tube formation assay를 시행하였다. U343, U87MG 세포주를 30 MOI 또는 50 MOI의 Ad-ΔE1GFP 또는 Ad-Δ

E1GFP-kox 아데노바이러스로 각각 감염시키고 48시간(U343)과 72시간(U87MG) 뒤에 수득한 배지로 HUVEC 세포를 배양하였다. 그 결과 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액 또는 Ad-ΔE1GFP 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 크고 굵은 tube가 형성된 반면, Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 HUVEC 세포들의 혈관 형성이 잘 되지 않아 가늘고 부분적으로 끊어진 tube가 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 이와 대조적으로, Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 100 MOI(U343) 또는 500 MOI(CASMC)로 감염시키고 36 시간 후에 회수한 세포 배양액을 처리해 준 경우에는, 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액 또는 대조군 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP를 처리해준 세포 배양액을 처리한 경우에 비해 형성된 tube의 굵기가 더 크고 끊어진 tube의 빈도도 적은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 특히, 양성대조군인 40 ng/ml의 VEGF-A 정제 단백질을 처리한 경우와 비슷한 정도의 활발한 혈관 형성을 확인할 수 있었다.

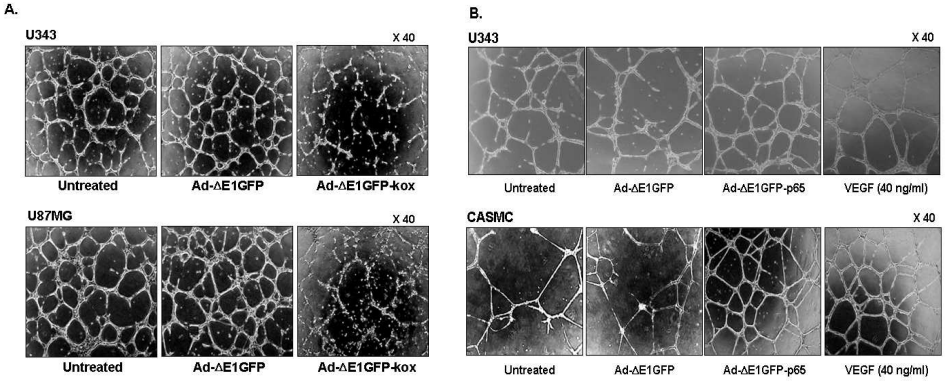

Figure 4. Replication incompetent adenovirus encoding F435-kox or F435-p65 inhibits or promotes VEGF-induced tube formation of HUVEC. (A) HUVECs were plated on matrigel-coated plates at a density of 2 X 10^5 cells/well and then incubated with the conditioned media of Ad-ΔE1GFP or Ad-ΔE1GFP-kox infected

U343 at 30 MOI for 48 hrs, in the case of U87MG, 50 MOI and 72 hrs. (B) The conditioned media of U343 infected with 100 MOI Ad-ΔE1GFP or Ad-ΔE1GFP-p65 for 36 hrs and that of CASMC infected with 500 MOI for 36 hrs were used. After 18-24 hrs, microphotographs were taken (X40). Representative endothelial tubes were shown.

이상에서 확인된 신생 혈관 형성능의 차이를 *ex vivo* 상에서 확인하기 위하여, rat의 aorta를 이용하여 vessel sprouting assay를 수행하였다. 먼저, Ad-ΔE1GFP 또는 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스를 50 MOI로 감염시키고 72 시간 뒤에 회수한 U87MG 세포 배양액을 aorta ring에 처리하고 7일 동안 배양한 결과, 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 Ad-ΔE1GFP를 감염시킨 U87MG 세포 배양액을 처리한 aorta ring과는 대조적으로, Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스를 처리한 세포 배양액으로 aorta ring을 배양한 경우에 vessel sprouting이 거의 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 이를 보다 정량적으로 비교 검증하기 위하여, 형성된 혈관들을 double-blinded manner로 양성 대조군(most positive)을 5점, 혈관이 sprouting 되지 않은 실험군(least positive)을 0점으로 점수를 부여하여 분석하였다. 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 Ad-ΔE1GFP를 감염시킨 U87MG 세포 배양액을 처리한 모든 aorta에서 각각 4.4 ± 0.9 와 3.4 ± 1.5 로 혈관형성이 활발하게 일어남을 확인할 수 있었으나, Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스를 감염시킨 세포의 배양액을 처리한 경우에는 1.0 ± 0.0 의 혈관만이 sprouting되어 대조군 바이러스인 Ad-ΔE1GFP에 비해 혈관 형성이 현저하게 억제됨을 확인하였다(Fig. 5B).

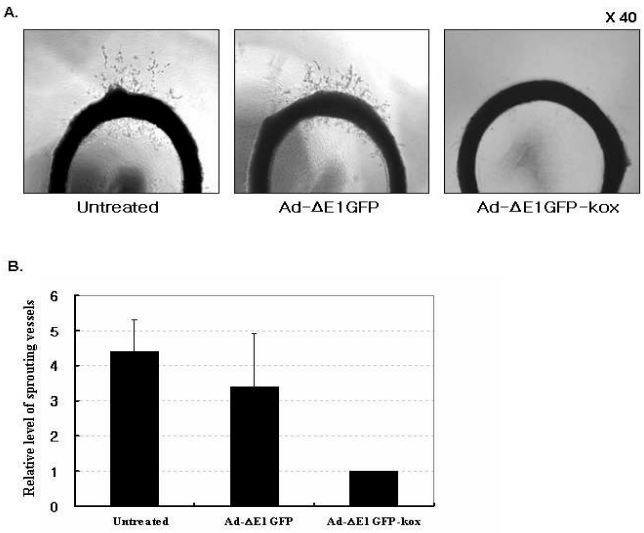

Figure 5. Replication incompetent adenovirus encoding F435-kox inhibits VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo*. (A) Aortas in matrigel were treated with the conditioned media of Ad-ΔE1GFP or Ad-ΔE1GFP-kox infected U87MG at 50 MOI for 72 hrs. (B) Ad-ΔE1GFP-kox blocked VEGF-induced vessel sprouting. The assay was scored from 0 (least positive) to 5 (most positive) and the data are presented as mean (n = 7) ± SE

또한, tube formation assay 결과와 마찬가지로 Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는, 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 Ad-ΔE1GFP를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에 비해, vessel sprouting이 매우 활발하게 일어난 것을 관찰하였다(Fig. 6 A and C). 이를 상기의 방법과 동일한 방법으로 정량화한 결과, 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 Ad-ΔE1GFP 대조군 아데노바이러스를 감염시킨 U343 세포 배양액을 처리한 모든 aorta에서 각각 1.1 ± 0.22 와 1.3 ± 0.45 로 vessel

sprouting이 매우 낮은 빈도로 일어난 반면에, Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 4.6 ± 0.65 로 vessel sprouting이 매우 왕성하게 일어난 것을 확인할 수 있었고, CASMC 세포 배양액을 처리한 경우에도 같은 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 6 B and D).

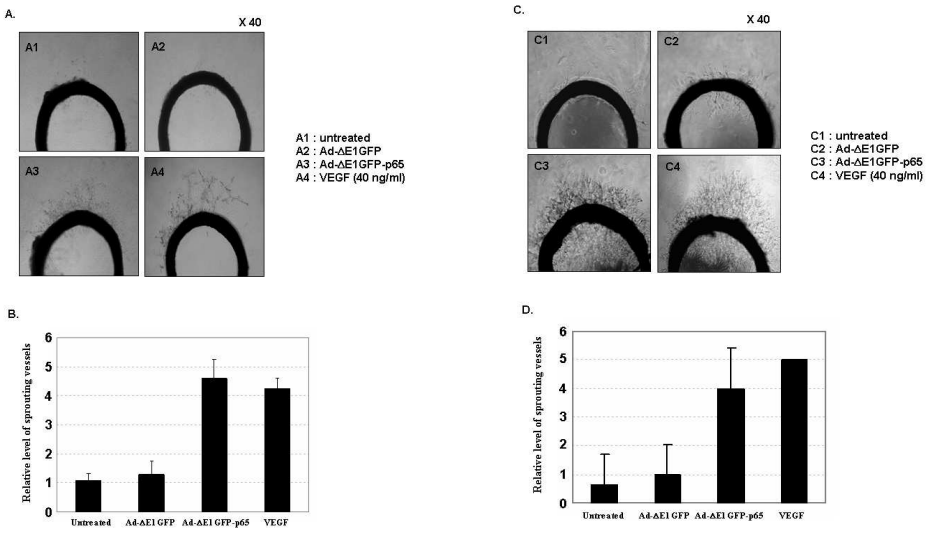

Figure 6. Replication incompetent adenovirus encoding F435-p65 promotes VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo*. (A) Aortas in matrigel were treated with the conditioned media of U343 infected with 100 MOI Ad-ΔE1GFP or Ad-ΔE1GFP-p65 for 36 hrs. (B) Ad-ΔE1GFP-p65 promoted VEGF-induced vessel sprouting. The assay was scored from 0 (least positive) to 5 (most positive) and the data are presented as mean (n = 5) ± SE. (C) The conditioned media of CASMC infected with 500 MOI for 36 hrs were treated. Representative aortic rings were photographed (X40). (D) The assay was scored from 0 (least positive) to 5 (most positive) and the data are presented as mean (n = 8) ± SE.

3. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-kox를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증

VEGF-A 발현 억제로 인한 신생 혈관 형성능의 감소는 종양의 성장을 억제 할 수 있기 때문에 F435-kox의 항암 효과를 확인해 보고자 F435-kox를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7-kox와 대조군 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7을 각각 제작하였다(Fig. 1B). F435-kox의 발현으로 아데노바이러스의 복제가 저해될 수 있는지를 확인하기 위하여, 여러 종류의 암세포주 및 정상세포주들을 Ad-ΔE1LacZ, Ad-ΔB7, 또는 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스로 감염시키고, 바이러스의 복제에 따른 세포 사멸 정도를 CPE assay로 관찰하였다(Fig. 7). 음성 대조군인 Ad-ΔE1LacZ 복제 불능 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상 효과가 나타나지 않았으나, 복제 가능 아데노바이러스들인 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-kox로 감염된 경우에는 감염된 바이러스 양이 증가함에 따라 세포 살상 효과도 증가되었다. 특히, A549와 WI38 세포주를 제외한 모든 세포주들(Hep1, C33A, U343, IMR90)에서, F435-kox를 발현하는 아데노바이러스인 Ad-ΔB7-kox의 세포 살상능이 대조군 바이러스인 Ad-ΔB7에 비해 약간 빠르거나 비슷한 것을 관찰할 수 있었다.

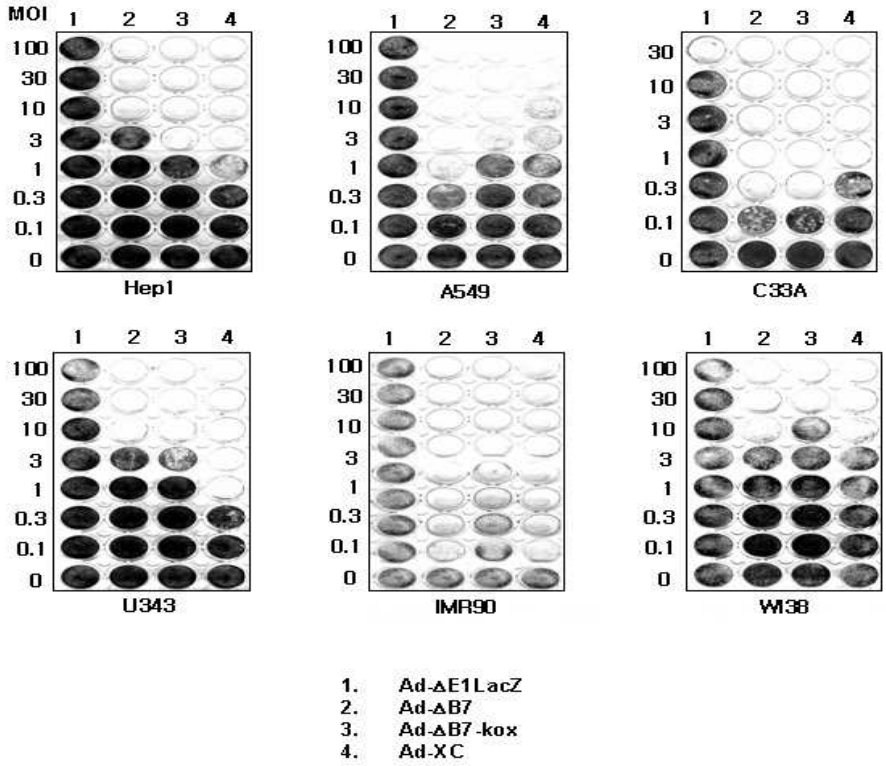

Figure 7. Cytopathic effects of Ad-ΔB7-kox *in vitro*. Cells were infected with Ad-ΔE1LacZ, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-kox, or Ad-XC at the indicated MOI. Replication incompetent adenovirus, Ad-ΔE1LacZ and wild type adenovirus Ad-XC served as controls. At 4-10 days after infection, cells remaining on the plates were fixed and stained with crystal violet.

4. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-kox를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 및 생존율 검증

VEGF-A 발현을 억제하는 F435-kox를 발현하는 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과를 검증하기 위하여, 인체 뇌암 세포주인

U87MG 세포를 누드 생쥐의 복부 피하에 주사하고, 형성된 종양의 용적이 약 60~70 mm^3 정도 되었을 때 5 X 10^8 PFU의 Ad-ΔE1GFP, Ad-ΔE1GFP-kox, Ad-ΔB7 그리고 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양 내에 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다(Fig. 8A). 음성 대조군인 PBS를 투여 받은 누드 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 22 일경에 이미 종양의 용적이 약 2789.4 ± 337.4 mm^3으로 급격히 성장하였으나, F435-kox를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP-kox나 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7 또는 Ad-ΔB7-kox를 투여한 경우에는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인하였다. 즉, Ad-ΔE1GFP-kox, Ad-ΔB7, 또는 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 투여 받은 누드 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 22 일경에 종양의 용적이 각각 1046.4 ± 163.5 mm^3 , 942.9± 383.4 mm^3 그리고 399.9 ± 158.3 mm^3로, F435-kox의 신생 혈관 형성 억제로 인한 항종양 효과와 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 뚜렷한 항종양 효과를 관찰할 수 있었다. 특히, Ad-ΔB7 투여군은 26일 경에 용적이 1000 mm^3를 넘은 반면 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 투여한 경우, 36일 경에도 그 용적이 900 mm^3를 넘지 않아 보다 향상된 항종양 효과를 확인할 수 있었다. 또한, 복제 불능 바이러스인 Ad-ΔE1GFP를 투여한 경우에도 약소하게나마 종양의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다.

누드 생쥐의 생존율을 조사한 결과 Ad-ΔE1GFP-kox 와 Ad-ΔB7 아데노바이러스를 투여한 경우 각각 28일과 36일 경에 생존율이 50% 이하로 떨어진 반면 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 투여한 경우 50여일이 경과하도록 한 마리의 누드 생쥐도 죽지 않아 F435-kox를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 뛰어난 항종양 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 8B).

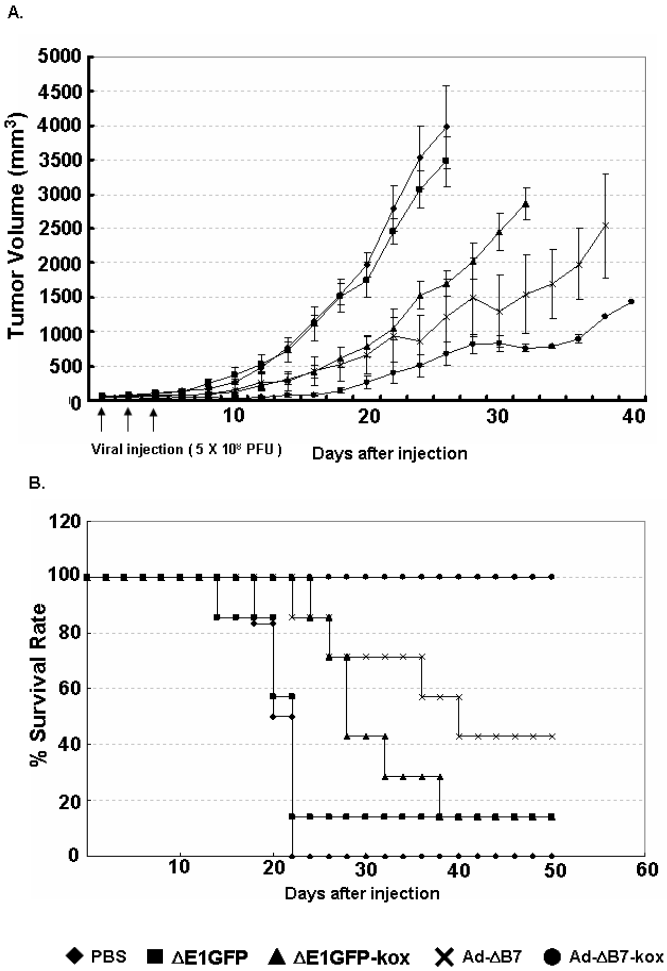

Figure 8. Anti-tumor effects and survival rate of adenoviruses expressing F435-kox. (A) Tumors were established by subcutaneous implantation of 1 X 10^7 cells and allowed to grow to 60～70 mm^3. Nude mice with established tumors were randomized into five treatment groups of seven animals each. Each group received intratumoral injection of adenovirus (5 X 10^8 PFU of adenovirus in 30 μl of PBS) on days 1, 3, and 5. Tumor growth was monitored every other day by measuring the short length (w) and the long length (L) of the tumor. Tumor volume was

estimated on the basis of the following formula ;
tumor volume (mm^3) = 0.523 X Lw^2
(B) Survival curve analysis. The percentage of surviving mice was determined by monitoring the death of mice. Tumor size over 2000 mm^3 was regarded as death.

5. VEGF-A 발현을 억제하는 F435-kox를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 투여에 따른 종양 내 혈관 분포 관찰

인체 뇌암 세포주인 U343과 U87MG를 누드 생쥐의 복부 피하에 주사 한 후 형성된 종양에 Ad-ΔB7과 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 주사하였다. 마지막 투여 후 10일 경에 종양 조직을 적출하여 혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31을 조직 면역 염색법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 종양 조직 내 혈관 형성이 왕성히 일어난 PBS 군에 비해 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7과 Ad-ΔB7-kox를 투여한 경우에는 혈관 형성이 억제된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9 A and B). 특히, U343 종양 조직의 경우 대조군 바이러스인 Ad-ΔB7 처리군의 혈관 수에(217 ± 45) 비하여 Ad-ΔB7-kox 처리군의 혈관 수가(78 ± 15) 약 3배 가까이 감소한 것을 확인 할 수 있었으며 U87MG 종양 조직에서도 혈관 형성이 약 2.5배 억제 된 것을 확인 하였다(Fig. 9C).

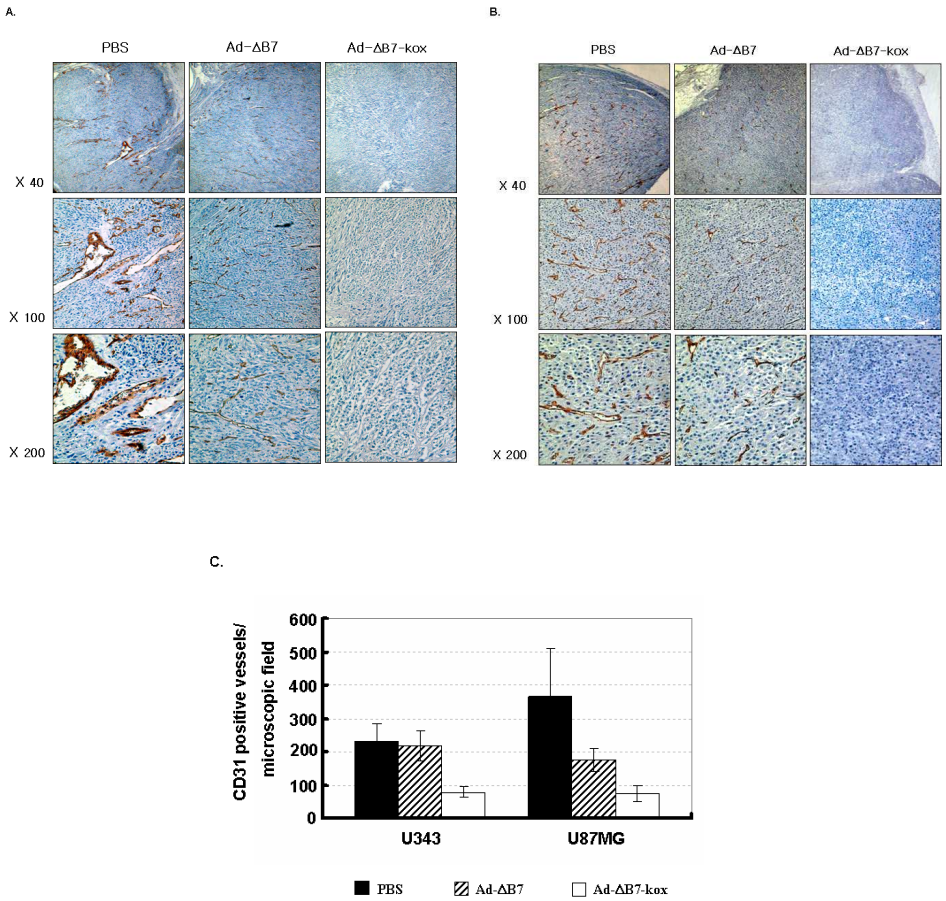

Figure 9. Histological assessment of angiogenesis in the tumor tissue treated with Ad-ΔB7-kox. Ten days following third adenovirus administration, mice were sacrificed and the tumor tissues were embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut and stained with an antibody against platelet endothelial cell adhesion molecule-1. (A) U343 tumor tissue; (B) U87MG tumor tissue; Representative CD31 stained tissues were photographed. (C) Quantification of vessel numbers in tumor tissues. The data are presented as mean (n = 3) ± SE.

Ⅳ. 고찰

VEGF family는 생리학적 혹은 병리학적 신생 혈관 형성에 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며, 특히 VEGF-A는 가장 중요한 신생 혈관 형성 인자로 알려져 있다. 따라서 이러한 VEGF-A의 발현을 조절할 수 있다면 여러 병리학적인 신생 혈관 형성의 억제 또는 촉진 방안을 개발하여 궁극적으로 항암 치료나 허혈성 심혈관계 질환의 치료에도 이용할 수 있다.

Zinc finger protein을 이용한 인공 전사 인자를 이용할 경우 antisense나 RNA-interference(RNA*i*)를 바탕으로 한 mRNA 분해 기전보다 더욱 강력하게 VEGF-A 발현을 조절 할 수 있다. 즉, antisense 나 RNA*i* 는 한 세포 당 여러 copies의 mRNA에 결합해야 하지만 zinc finger protein은 VEGF-A locus의 각 allele에만 결합하여도 VEGF-A의 발현을 충분히 조절할 수 있다. 따라서 그 효과를 유지하기 위해 필요한 농도가 VEGF-A 유전자의 발현 양과는 무관하기[41] 때문에 VEGF-A의 발현 조절에 더 효율적이다. 또한, zinc finger protein은 single deliverable effector molecule을 이용하여 내재하는 유전자의 자연적으로 존재하는 모든 isoform을 조절할 수 있다는 장점이 있다[42]. 이미 zinc finger protein 전사 인자를 이용하여 VEGF-A의 전사를 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 효과적으로 조절한 예들이 보고되어 있다[41,43]. 본 연구에서는, 기존의 zinc finger protein 전사 인자와는 다른 방법으로, (주) 툴젠에서 개발한 GeneGrip 기술로 만들어진 zinc finger protein 전사 인자를 사용하였다. Genomic DNA들은 진핵 세포 내에서 chromatin 상태로 뭉쳐 있기 때문에 *in vivo* 상에서 선별한 GeneGrip 방식의 zinc finger protein이 기존의 phage display 방법으로 *in vitro* 상에서 선별해 낸 그것보다 고등 진핵 세포의 유전자 발현을 조절하는 데에 더 효과적일 것이라 생각된다[44]. 또한, 인간 유전체의 염기 서열에서 유래한 완전한(intact) 야생형의

zinc finger를 이용하였고, 각각의 finger를 연결하는 linker 서열들 역시 자연계에 존재하는(naturally occurring linker sequences) 것을 이용하였기 때문에 본 연구에서 이용한 인간 zinc finger protein으로 만들어진 전사 인자는 숙주의 면역 반응 유도를 최소화 한다는 점에서 치료 적용(therapeutic applications)에 더 유용할 것으로 사료 된다[44].

이렇게 만들어진 VEGF-A 발현을 억제 혹은 증진하는 zinc finger protein 전사 인자인 F435-kox와 F435-p65를 아데노바이러스에 삽입하여 세포 내로 도입한 결과 확연한 조절 효과를 관찰 할 수 있었다. 먼저, VEGF-A 전사 억제 인자인 F435-kox의 효과를 관찰하기 위하여 복제 불능 아데노바이러스를 제작하여 혈관 형성이 왕성한 glioma cell인 U343과 U87MG에서 VEGF-A 발현 양을 조사해 본 결과, 바이러스 용량과 시간에 비례하여 그 억제 효과가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. VEGF-A 발현 억제로 인하여 VEGF-A에 의해 유도되는 신생 혈관 형성 역시 억제됨을 *in vitro*와 *ex vivo* 상에서 관찰하였다. 이러한 신생 혈관 형성 억제로 인한 항암 효과를 검증하고자 복제 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP에 F435-kox를 삽입한 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스와 본 연구실에서 개발한 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7에 F435-kox을 삽입한 Ad-ΔB7-kox 아데노바이러스를 제작하여 U87MG xenograft 모델에서 우수한 항종양 효과를 확인하였다. U87MG가 highly vascularizing glioblastoma에서 유래된 세포주[45] 임을 감안했을 때, Ad-ΔE1GFP-kox를 투여한 경우 복제 불능 바이러스였음에도 불구하고 종양의 성장을 대조군인 Ad-ΔE1GFP 바이러스에 비하여 현저하게 억제하였다. 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7-kox는 E1A 유전자의 발현에 따른 VEGF-A 발현 억제[40] 뿐 아니라 F435-kox 발현에 따른 VEGF-A 발현 억제도 함께 유도하여, 생체 내 항종양 효과를 더욱 현저하게 증진시켰음을 확인하였다. 종양 조직 내 혈관 분포를 관찰한 결과에서도 Ad-ΔB7-kox의 효과를 다시 한 번 검증 할 수 있었다. U343과

U87MG 종양 조직 모두에서 PBS 군에 비하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 처리한 경우 혈관의 수가 줄어들었다. U343의 경우 PBS 군에 비해 Ad-ΔB7를 처리한 경우 혈관 개수는 큰 차이가 나지 않았지만 이는 혈관의 면적은 고려하지 않은 값이기 때문에 Fig. 9A에서 볼 수 있듯이 혈관 면적의 감소를 고려하면 종양 선택적 살상 아데노바이러스만으로도 신생 혈관 형성을 억제 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, F435-kox로 인하여 더욱 확연한 신생 혈관 형성 억제 효과를 입증함으로써 F435-kox가 효과적으로 VEGF-A의 발현을 억제하였음을 알 수 있었다.

VEGF-A의 발현을 증대시키는 F435-p65 역시 효과적으로 VEGF-A 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. VEGF 발현양이 이미 높은 암세포에서도 그 발현양이 대조군에 비해 2배 이상 증가하였고(Fig. 3A), 아데노바이러스의 감염률이 낮은 AoSMC나 CASMC에서도 2배 이상 VEGF-A 발현양이 증가하였다(Fig. 3 B and C). VEGF-A에 의하여 유도되는 신생 혈관 형성능 역시 증대되었음을 대조군에 비해 더 견고하고 튼튼한 HUVEC 세포의 관 형성 결과를 통해 알 수 있었다. 대조군 아데노바이러스인 Ad-ΔE1GFP를 처리한 상기의 실험(Fig. 4A)에 비해 Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스의 혈관 내피 세포 분화능 증대 효과를 알아본 실험(Fig. 4B)에서 Ad-ΔE1GFP를 처리한 경우에 혈관 형성이 적게 일어난 이유는, 바이러스 처리 후 배양 시간이 짧기 때문에 세포 배양 동안 발현되는 pro-angiogenic factor의 양이 낮기 때문인 것으로 생각된다. Aorta ring sprouting assay 결과 역시 마찬가지로 바이러스를 처리한 후의 세포 배양 시간을 조절하여, 대조군 바이러스인 Ad-ΔE1GFP를 처리한 세포 배양액 내의 pro-angiogenic factor의 발현양을 달리하여(Fig. 5 and Fig. 6) Ad-ΔE1GFP-p65 아데노바이러스의 신생 혈관 형성능 증대 효과 및 Ad-ΔE1GFP-kox 아데노바이러스의 신생 혈관 형성능 억제 효과를 검증하였다. 또한, tube formation assay나 aorta ring

sprouting assay에서 VEGF-A 단백질 양은 U343 세포 배양액이 더 높았음에도 불구하고(Fig. 5 and Fig. 6A) CASMC 세포 배양액을 처리한 실험군이 tube 형성이나 sprouting이 더 활발하게 일어난(Fig. 4 and Fig. 6C) 이유는 smooth muscle cell 배양액인 SmGM-2 배양액에 들어있는 여러 growth factor들이나 unknown factor들이 HUVEC 세포의 분화나 혈관 sprouting에 좀 더 유리한 환경을 제공하고 있다가 VEGF에 의해 신호가 trigger되어 왕성한 tube formation과 sprouting을 유발했을 가능성 때문일 수도 있다고 생각된다.

VEGF-A 유전자는 여러 종류의 isoform을 발현하고 이 isoform들은 기능이 같거나 중복되지 않다는 결과[46]에 따르면 결국 zinc finger protein을 이용하여 내재적으로 존재하는 VEGF-A 유전자의 발현을 증대시키면 모든 isoform의 발현으로 단일 isoform cDNA를 발현시키는 것보다 생리학적으로 더 성숙한 신생 혈관 형성을 유도할 수 있다는 장점이 있다. 실례로 VEGF-A_{165} 단일 isoform 발현으로 인해 유도된 신생 혈관이 zinc finger protein을 이용하여 내재하는 VEGF-A를 발현 시켰을 때 유도되는 신생 혈관보다 더 hyperpermeable하다는 결과가 있다[43]. 또한, 새로이 형성되는 혈관들은 방향성(directional)있는 이동을 위해 길고 짧은 단위(range)의 guidance cues가 모두 필요한데, VEGF-A_{165}는 soluble한 형태와 matrix bound된 형태가 모두 존재하여 길고 짧은 단위의 신호(cue)를 모두 제공할 수 있지만 VEGF-A_{121}이나 VEGF-A_{189}는 각각 긴 단위의 신호와 짧은 단위의 신호만을 제공하여 VEGF-A_{121}이나 VEGF-A_{189}만 발현하도록 유전적으로 형질 전환된 마우스의 경우 severe vascular anomalies를 보인다[47]. 이렇듯 VEGF-A_{165}만으로도 정상적인 신생 혈관의 발달을 보이지만 모든 isoform을 발현하면 한 종류의 isoform을 발현했을 때보다 murine hind limb ischemia에서 단일 isoform 투여 용량의 1/100 이하의 낮은 용량에서도 치료 효과가 있음이 보고되고 있다[48]. 즉, F435-p65를 이용하여 내재하는 VEGF-A 발현을 증대시키는 것이 여

러 isoform의 상승효과(synergistic effect)로 인해 CMV 프로모터에 의해 한 종류의 isoform만을 고발현 시키는 것보다 신생 혈관 형성에 더 효과적이라는 것을 알 수 있다.

인공 전사 인자를 유전자 치료에 적용함에 있어 대두되고 있는 세 가지 이슈는 첫째, 표적 DNA에 대한 결합 특이성이 높아야 함과 둘째, 대상 세포에서 충분한 유전자 발현이 유도되어야 함, 그리고 셋째, 인공 전사 인자가 표적 유전자의 발현만을 특이적으로 조절하고 주변 유전자의 발현은 조절해서는 안 된다는 점이다[25]. 이러한 면들을 고려해 볼 때, F435-kox 또는 F435-p65는 생체 내에서 사람의 zinc finger protein을 선별하여 제작된 인공 전사 인자이기 때문에 상기의 조건들을 만족시킬 뿐만 아니라 궁극적으로 임상 단계에서도 숙주의 면역 반응 유발을 최소화한다는 장점이 있다. 또한, VEGF-A의 모든 종류의 isoform 발현을 억제 혹은 촉진하기 때문에 한 종류의 isoform 발현을 조절하는 것 보다 그 효과가 훨씬 증대될 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결론

인간 유전체에서 선별한 zinc finger protein을 이용하여 만든 VEGF-A 발현 억제 전사 인자인 F435-kox와 활성화 인자인 F435-p65는 내재하는 VEGF-A 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있었다. 따라서 종양 선택적 살상 아데노바이러스 자체의 종양 선택적 살상능과 더불어 E1A 발현과 F435-kox 발현으로 유도된 VEGF-A 발현 억제로 인해 상승된 항종양 효과를 보이는 Ad-ΔB7-kox는 항암 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각되며, 모든 종류의 VEGF-A isoform을 발현시키는 Ad-ΔE1GFP-p65는 생체 내의 생리학적 신생 혈관 형성과 가장 유사한 효과를 유도하여 허혈성 질환이나 심혈관계 질환 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983;219:983 - 998.

2. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 1996;380:435 - 439.

3. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999; 13:9 - 22.

4. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev 2004;56(4):549-580. Review.

5. Baldwin ME, Stacker SA, and Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis. Bioessays 2002;24:1030 - 1040.

6. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. J Exp Med 2002;196:1497 - 1506.

7. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, *et al.* VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. Blood 2003;101: 4878 - 4886.

8. Mann DR and Plant TM. Leptin and pubertal development. Semin Reprod Med 2002;20:93 - 102.

9. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, and Roberts IS. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. Histopathology 2001; 39:409 - 415.

10. Rubanyi GM. The future of human gene therapy. Mol Aspects Med 2001;22(3):113-42. Review.

11. Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J, and Black PM. Angiostatin suppresses malignant glioma growth *in vivo*. Cancer Res 1998;58:4654 - 4659.

12. Lam PY and Breakefield XO. Potential of gene therapy for brain tumors. Hum Mol Genet 2001;10:777 - 787.

13. Tanaka T, Cao Y, Folkman J, and Fine HA, Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. Cancer Res 1998;58:3362 - 3369.

14. Rubanyi GM, Editor, Angiogenesis in Health and Disease, Marcel Dekker, New York (2000), pp. 1 - 552.

15. Isner JM. Angiogenesis and collateral formation. In: K.L. March, Editor, Gene Transfer in the Cardiovascular System: Experimental Approaches and Therapeutic Implications, Kluwer Academic Publishers, Boston (1997), pp. 307 - 330.

16. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, *et al.* Double blind, placebo

controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: The VIVA Trial. J Am Coll Cardiol 1999;33:384A.

17. Laham RJ, Chronos NA, Leimbach M, *et al.* Results of Phase I open label dose escalation study of intracoronary and intravenous FGF-2 in patients with severe ischemic heart disease: 6 months follows-up. J Am Coll Cardiol 2000;35 Suppl. A:73A.

18. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, *et al.*, Intracoronary gene-transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. Nat Med 1996;2:534 - 539.

19. Nabel EG and Nabel GJ. Complex models for the study of gene function in cardiovascular biology. Annu Rev Physiol 1994;56:741 - 761.

20. Yla-Herttuala S and Martin JF. Cardiovascular gene therapy. Lancet 2000;355:213 - 222.

21. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, and. Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. Mol Cell 1998;2:549 - 558.

22. Dormandy JA, Dole WP, and Rubanyi GM, Editors. Therapeutic Angiogenesis, Springer, Berlin (1999), pp. 1 - 184.

23. Sanghong B and March KL. Gene therapy for restenosis: Getting nearer the heart of the matter. Circ Res 1998;82:295 - 305.

24. De Young MB and Dichek DA. Gene therapy for restenosis:

Are we ready?. Circ Res 1998;82:306 - 313.

25. Yaghmai R, Cutting GR. Optimized regulation of gene expression using artificial transcription factors. Mol Ther 2002; 5(6):685-94.

26. Tupler R, Perini G, and Green MR. Expressing the human genome. Nature 2001;409:832 - 833.

27. Kang JS and Kim JS. Zinc finger proteins as designer transcription factors. J Biol Chem 2000;275:8742 - 8748.

28. Liu PQ. Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A. J Biol Chem 2001;276:11323 - 11334.

29. Zhang L. Synthetic zinc finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene. J Biol Chem 2000;275:33850 - 33860.

30. Beerli RR, Dreier B, and Barbas CF. Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:1495 - 1500.

31. Dyson N and Harlow E. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. Cancer Surv 1992;12:161-195.

32. Whyte P, Ruley HE, Harlow E. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. J Virol 1988;62:257-265.

33. Ptzera BM, Stiewea T, Parssanedjad K, Rega S, and Esche H. E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. Cell death & Differentiation 2000;7(2):177-188.

34. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, *et al.* An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 1996;274:373-376.

35. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, and Kirn 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.

36. Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO, *et al.* Oncolytic potential of E1B 55 kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: correlation with p53 functional status. Int J Cancer 2000;88:454-463.

37. 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.

38. Sauthoff H, Heitner S, Rom WN, Hay JG. Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. Hum Gene Ther 2000;11:379-388.

39. Nicosia RF and Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study

of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. In vitro Cell Dev Biol 1990;26:119-128.

40. Zhou Z, Zhou RR, Guan H, Bucana CD, Klenerman ES. E1A gene therapy inhibits angiogenesis in a Ewing's sarcoma animal model. Mol Cancer Ther 2003;2(12):1313-1319.

41. Snowden AW, Zhang L, Urnov F, Dent C, Jouvenot Y, Zhong X, *et al.* Repression of vascular endothelial growth factor A in glioblastoma cells using engineered zinc finger transcription factors. Cancer Res 2003;63(24):8968-8976.

42. Liu PQ, Rebar EJ, Zhang L, Liu Q, Jamieson AC, Liang Y, *et al.* Regulation of an endogenous locus using a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor A. J Biol Chem 2001;276:11323 - 11334.

43. Rebar EJ, Huang Y, Hickey R, Nath AK, Meoli D, Nath S, *et al.* Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. Nat Med 2002;8(12):1427-1432. Epub 2002 Nov 4.

44. Bae KH, Kwon YD, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park KS, *et al.* Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. Nat Biotechnol 2003;21(3):275-280. Epub 2003 Feb 18.

45. Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, Ji XD, Wang D, Shih CC, *et al.* Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth

factor. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:8502-8507.

46. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano FJ, and Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. Mol Cell Biol 2000;20:7282 - 7291.

47. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. J Thromb Haemost 2005;3(8):1835-1842.

48. Whitlock PR, Hackett NR, Leopold PL, Rosengart TK, Crystal RG. Adenovirus-mediated transfer of a minigene expressing multiple isoforms of VEGF is more effective at inducing angiogenesis than comparable vectors expressing individual VEGF cDNAs. Mol Ther 2004;9(1):67-75.

Abstract

Regulation of VEGF-A promoter
using a zinc finger protein

Yoon-A Kang

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Joo-Hang Kim)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a most potent inducer of angiogenesis, the sprouting of new blood vessels from pre-existing vessels. VEGF is an attractive target for anti-cancer therapy because of its critical role of tumor growth and invasion. Unlike anti-cancer therapy, therapeutic angiogenesis is a progressive approach aimed at increasing the number of collateral vessels delivering oxygen and blood to ischemic tissue. Therefore, it can be used as anti-cancer therapy or ischemic disease treatment by inhibition or activation of angiogenesis, modulating VEGF expression.

Artificial transcription factors based on Cys_2-His_2 zinc finger proteins (ZFPs) recognize an endogenous target site directly and could activate or inhibit transcription. For the aim to demonstrate the utility of ZFPs as therapeutic agents, in this study, we have generated adenoviruses expressing VEGF promoter-inhibiting ZFP (F435-kox) and VEGF promoter-activating ZFP (F435-p65). Replication-incompetent adenovirus expressing F435-kox, Ad-△E1GFP-kox, significantly down-regulated angiogenesis, showing reduced level of VEGF expression and inhibition of tube formation and vessel sprouting. In addition, oncolytic adenovirus expressing F435-kox, Ad-△B7-kox, elicited enhanced anti-tumor effect in comparison to its cognate control oncolytic adenovirus, Ad-△B7, in U87MG xenograft model. Furthermore, vessel density in tumor tissue treated with Ad-△B7-kox was greatly reduced compared to that in tumor treated with Ad-△B7. In the other hand, F435-p65

expressing adenovirus, Ad-△E1GFP-p65, induced therapeutic angiogenesis. The expression of VEGF-A in CASMC and AoSMC treated with Ad-△E1GFP-p65 increased two fold compared to that treated with Ad-△E1GFP. Additionally, the increased VEGF-A expression induced enhanced tube formation and vessel sprouting.

In summary, these results demonstrated that artificial transcription factors based on zinc finger proteins could be potent regulators of gene expression with therapeutic promise in the treatment of disease.

Key Words : VEGF, angiogenesis, zinc finger protein, artificial transcription factor, adenovirus