

IL-12 및 IL-18을 발현하는 종양
선택적 살상 아데노바이러스의
종양 성장 억제 효과

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 일 규

IL-12 및 IL-18을 발현하는 종양
선택적 살상 아데노바이러스의
종양 성장 억제 효과

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

최 일 규

최일규의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

3,4 학년의 대학 생활을 거치면서 갖게 된 자신감과 그리고 제 선택의 확신과 함께 시작 된 연세의대 암 연구소에서의 석사 과정 생활이 얼마 전 일 인거 같은데, 벌써 졸업인가 봅니다. 이제 뭐 좀 해 볼만 한 거 같은데....., 졸업을 앞두고 뿌듯함 보다 많은 아쉬움이 드는 제 자신에게 약간은 실망스럽기도 합니다. 많이 부족한 제가 이와 같이 논문을 쓰기 까지 예는 많은 분들의 도움이 있었기에 가능하였습니다. 먼저 대학을 졸업 후 아무것도 모르는 저에게 소중한 일을 할 수 있도록 기회를 주신 김주향, 윤채옥 교수님께 감사드립니다. 웃는 모습보다는 험글 같이 화내는 모습이 먼저 생각나는 저의 지도교수님이신 윤채옥 교수님, “내 학생이라는 생각이 들어야 혼을 내신다.”는 교수님의 말씀이 생각납니다. 교수님의 이런 모습이 있었기에 아직 많이 부족하지만 지금의 제가 있을 수 있었으며 지금의 논문이 있을 수 있었습니다. 감사드립니다. 교수님의 제자를 아끼시는 마음과 가르침 잊지 않겠습니다. 항상 높은 곳에서 인자하신 모습으로 바라보며 실험실을 이끌어 주시는 김주향 교수님, 환자의 진료와 연구를 동시에 수행하시는 바쁜 와중에도 실험실에 직접 올라와 격려를 아끼시지 않으시는 교수님의 모습에 가끔씩 실험에 지친 저에게 많은 힘이 되었습니다. 또한, 논문이 나오기까지 저를 믿어주시고 가르쳐 주신 은혜 잊지 않겠습니다. 다시 한 번 김주향, 윤채옥 교수님께 감사드리며, 교수님들께 부끄럽지 않고 자랑스러운 제자가 되도록 노력하겠습니다.

또한, 많은 수술 일정과 환자 진료에도 불구하고 틈틈이 시간을 내어 제 실험에 아낌없는 조언과 관심을 쏟아 주신 김동석 교수님

께 감사드립니다. 저와 같이 cancer immunotherapy에 관심이 많으신 안중배 교수님, 항상 막내 삼촌같이 따뜻하게 해주시는 손주혁 교수님에게도 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 항상 암 연구소의 일이 라면 만사 뒤로하고 먼저 챙겨주시는 박근호 선생님에게도 깊은 감사의 말씀을 전합니다.

석사 과정 동안 가족보다 더 오랜 시간을 함께 보내왔던 소중한 저의 실험실의 형, 누나, 친구, 동생들이 있었기에 쉽지 않은 석사 생활을 잘 마무리 할 수 있었습니다. 먼저 어느 덧 실험실의 첫째 형이 아닌 제 인생의 첫째 형이 되어 버린 재성이 형, 아무 개념도 없던 저를 사람 만드느라 고생 많았던 저의 영원한 선생님 영숙이 누나, 이제 얼마 남지 않은 박사 과정을 마치고 중국으로 돌아가 멋진 종양 외과 교수님이 되실 경화 형님, 만화를 많이 보는 만큼 순수한 마음을 갖고 가끔씩 제 건강을 걱정해주는 진선이 누나, 예쁜 얼굴만큼 마음도 예뻐 포근함이 느껴지는 민정이 누나, 이제 같은 박사 동기이자 제가 많이 의지하고 정말 좋아하는 평환이 형, 친 누나처럼 많이 챙겨주고 예뻐해 주는 정말 어떻게 갚아야 할지 모를 정도로 너무 고마운 지영이 누나, 누나의 모든 실험을 다 뒤로하고 면역학적인 실험을 가르쳐 줘 졸업을 가능케 해준 고마운 경주 누나, 항상 친함을 짓웃음으로 표현하지만 나에게 힘이 되어주는 친한 아름이 누나, “내 친구 일규”라며 먼저 챙겨주고 걱정해주는 마음 착하고 소중한 내 친구 태영이, 같이 입학한 후로 많이 못 해줘서 미안하지만 어느 덧 정이 많이 든 내 동기 윤아, 형 구실도 제대로 못하지만 항상 믿고 잘 따라주고 너무나 많이 받아 갚아야 할 게 너무 많은 믿음직한 동생 오준이, 항상 철없는 오빠를 말없이 예쁘게 잘 챙겨주고 실험실에서 오빠를 가장 많이 즐겁게 해주는 너무나 예쁘고 귀엽고 밥 잘 먹는 소중한

한 동생 민주, 적지 않은 일에도 항상 웃는 얼굴로 오빠 부탁을 잘 들어주는 너무나 발랄하고 귀여운 또 다른 예쁜 동생 선영이, 아직 대학생의 풋풋함이 채 가지지 않아 너무 맑아 보이는 실험실의 귀여운 막내 성미에게 깊은 감사와 고마움을 전합니다. 또한, 지금은 서강대 연구교수로 계시지만 누구보다 더 관심을 가져주시고 저에게 자신감을 심어준 현희 누나, 실험실 생활을 같이 못해 많이 아쉬운 은희 누나, 모든 일에 다재다능하고 저를 많이 챙겨주었던 고마운 대봉이 형, 저에게 실험 뿐 아니라 컴퓨터 또한 잘 가르쳐 주었던 고마운 동현이 형, 그리고 지금은 각자 다른 곳에서 열심히 공부하고 있는 태영이 누나와 은아 누나, 같이 시작한 석사 과정을 중도에 포기해야만 했지만 많이 챙겨 주고 힘이 되어 주었던 그리운 친구 정희에게도 감사하는 마음을 전합니다.

그리고 항상 힘들 때 마다 힘이 많이 되어 주었던 정말 소중한 친구들인 원영이, 창희, 규민이, 정우, 동준이, 평환이, 훈이, 그리고 준호 형에게 고마움을 전합니다.

마지막으로 제가 여기 까지 편안하게 올 수 있도록 모든 걸 포기하고 희생해주신 가장 존경하고 자랑스러워하는 저희 아버지와 어머니에게 가슴 깊이 감사한 마음을 전합니다. 어떻게 은혜를 다 갚아야 할지 모르겠습니다. 미흡하나마 이 논문으로 약간의 기쁨을 누리셨으면 합니다. 또한, 못난 오빠라도 항상 잘 챙겨주고 부모님에게 오빠 몫 까지 알아서 잘 하는 착한 동생 우리 윤정이 에게도 고마움을 전합니다.

짧지 않은 석사 과정동안 저는 저의 소중한 사람들 그리고 저의 소중한 것들을 많이 잃기도 하고 얻기도 한 거 같습니다. 그로 인해 자연스럽게 제 주위 사람들에 대한 소중함을 깨달을 수 있었고,

제가 현재 하고 있는 일에 대한 소중함과 확신 또한 얻을 수 있었습니다. 이런 확신으로 이제 다시 박사 과정을 준비하려 합니다. 많은 분들의 도움으로 쓰여진 석사 논문에 대한 고마움을 이젠 박사 논문으로 보답하고자 합니다. 이와 같이 제가 석사 논문을 쓸 수 있었고, 또한 박사 과정을 준비 할 수 있도록 도움을 주신 소중한 모든 분들께 다시 한 번 머리 숙여 깊이 진심으로 감사의 말씀을 전하며, 그 보답을 박사 논문으로 하겠다는 다짐과 함께 이만 줄일까 합니다.

저자 씀

<차 례>

그림 및 표 차례	iii
국문요약	v
I . 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 대상 세포주 및 세포 배양	7
2. 실험동물	7
3. IL-12와 IL-18을 발현하는 재조합 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출	8
4. IL-12와 IL-18 단백질 발현 양상 규명	9
5. Cytopathic effect(CPE) 분석	10
6. 생체내 항종양 효과와 생존율 검증	10
7. 마우스 생체내의 비장 세포의 조제	11
8. CTL 활성 측정	11
9. IFN- γ ELISpot assay	12
10. IL-18, IL-12, 또는 IFN- γ 의 종양조직 내 발현량 측정 ...	13
11. 유세포 분석에 의한 마우스 비장 세포의 특성 변화 관찰 ...	14
12. IL-12와 IL-18을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직의 변화 관찰	14

III. 결과	15
1. IL-12와 IL-18을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 IL-12와 IL-18의 발현 양상 규명	15
2. IL-12와 IL-18 유전자 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석	18
3. IL-12와 IL-18을 발현하는 아데노바이러스의 항종양 효과 검증	20
4. 암세포 특이적 면역반응 활성화 검증	23
5. 마우스 비장세포의 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T 세포 군집변화	26
6. IL-12, IL-18, 또는 IFN- γ 의 종양내 발현량 측정	28
7. IL-12와 IL-18을 발현하는 복제가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰	30
IV. 고찰	33
V. 결론	37
참고문헌	38
영문요약	43

그림 차례

Figure 1. Schematic representations of the adenoviral vectors used in this study	16
Figure 2. Quantity of IL-12 and IL-18 secreted by B16-F10 melanoma cells infected with adenoviruses	17
Figure 3. CPE formation of adenoviruses expressing IL-12, IL-18, or IL-12 and IL-18	19
Figure 4. Anti-tumor effect and survival rate of Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18	22
Figure 5. ^{51}Cr release assay	24
Figure 6. ELISpot analysis of IFN- γ -secreting T lymphocytes	25
Figure 7. Representative dot-plot FACS analysis of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells stained with isotype-matched control Abs	27
Figure 8. Increased local IL-12, IL-18, or IFN- γ expression following treatment with Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18	29
Figure 9. Histological analysis of tumor sections of mice treated with adenoviruses	31
Figure 10. Infiltration of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cell in tumor harvested from mice treated with PBS, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18	32

표 차례

Table 1. The average number of tumor-specific CD8 ⁺ T cells detected in IFN- γ ELISpot assays	25
---	----

IL-12 및 IL-18을 발현하는 종양 선택적 살상
아데노바이러스의 종양 성장 억제 효과

암에 대한 면역 치료법은 부작용이 심각한 기존의 방사선 요법, 항암화학 요법과는 달리 우리 몸의 면역 체계를 활성화시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하는데 그 목적이 있다. 하지만, 암 세포들은 여러 가지 전략을 사용하여 면역 체계를 교묘히 피해가며, 설사 면역 체계가 활성화 되었다고 활성화된 항종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력 또한 갖고 있기 때문에 항암 면역 치료에 많은 한계를 드러내고 있다. 따라서 이와 같이 면역원성이 지극히 낮은 암 세포에 면역원성을 부여함으로써 면역 감시 체계에 암 세포를 노출시켜 항종양 면역 반응을 유도하는 것이 관건이라 할 수 있겠다.

따라서 본 연구에서는, 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ B7에 항암 면역반응을 유도할 수 있는 IL-12와 IL-18 유전자를 도입하여 Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 그리고 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 각각 제작하였다. C57BL/6 마우스의 B16-F10 흑색종 모델에서 항종양 효과를 검증한 결과, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스에서는 종양의 성장이 억제되고 그 억제효과가 지속 되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, IL-12만 발현하는 Ad- Δ B7-IL12에 비해 IL-12와 IL-18을 동시에 발현하는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 경우에 더욱 현저한 항종양 효과가 유도되었다. 생체내 생존율 검증 실험

에서 역시 Ad- Δ B7/IL12-IL18 군이 가장 높은 생존율을 나타냈다. 또한, Ad- Δ B7/IL12-IL18 군의 마우스의 비장에서 CD4⁺, CD8⁺ T 세포의 군집을 조사 한 결과, 다른 대조군에 비하여 유의하게 증가 된 것을 확인 할 수 있었으며, IFN- γ ELISpot과 cytotoxic T lymphocyte(CTL) assay를 시행한 결과, Ad- Δ B7/IL12-IL18에 의해 암세포 특이적인 CD4⁺, CD8⁺ T 세포가 증가되어 Type-1 면역 반응이 유도됨으로서 항종양 효과가 증대되었음을 알 수 있었다. 아울러, PBS와 Ad- Δ B7 대조군에 비하여 Ad- Δ B7/IL12-IL18 군에서 종양조직의 괴사가 현저하게 관찰되었을 뿐만 아니라 종양조직내로의 림프구의 침윤이 확연히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 침윤된 림프구의 세포군들을 면역 조직 화학 염색법(immunohistochemistry, IHC)을 통하여 알아본 결과, Ad- Δ B7/IL12-IL18 군에서 현저히 증가된 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포군들을 관찰할 수 있었다. 또한, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 종양 조직 내에서 IL-12, IL-18 그리고 IFN- γ 의 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 암세포 특이적으로 복제되어 암세포 살상을 유도하는 Ad- Δ B7/IL12-IL18이 종양 내에서 활발히 증식함으로써 바이러스 내에 삽입되어있는 IL-12와 IL-18이 종양내부에서 발현되어 결과적으로는 암세포 특이적인 CD4⁺, CD8⁺ T 세포가 종양 조직 내로 침윤하고, 이들로부터 IFN- γ 의 발현이 유도됨으로서 항종양 효과를 유도하는 것으로 생각되어진다.

결과적으로, 본 연구에서 제작된 Ad- Δ B7/IL12-IL18은 종양 선택적 아데노바이러스인 Ad- Δ B7에 의해 유도되어지는 종양 세포 특이적 항종양 효과뿐만 아니라, IL-12와 IL-18의 종양 세포 특이적 고발현에 따른 항종양 면역반응을 동시에 유도함으로서 한 층 더 증대된 종양 세포 특이적 항종양 효과를 유도할 수 있었다. 이는 기존의

방사선 요법 , 항암화학 요법에서 나타나는 심각한 부작용을 최소화 할 수 있을 것으로 예상되며, 아울러 항암 면역반응으로 국소적인 암 의 치료는 물론 암의 재발 억제 및 전이 암의 치료에도 유용하게 이 용 될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 면역 치료법, Ad- Δ B7, IL-12, IL-18

IL-12 및 IL-18을 발현하는 종양 선택적 살상
아데노바이러스의 종양 성장 억제 효과

<지도교수 윤 체 옥>

연세대학교 대학원 의과학과

최 일 규

I. 서론

암은 인체를 이루는 정상세포가 여러 발암인자들에 의한 유전자 변이에 의해 정상적인 세포주기의 통제에서 벗어나 비정상적으로 무한 증식하여, 그 결과 주위에 있는 조직으로 침윤하고 혈관과 림프관등을 통하여 다른 장기로 전이하는 질환이다. 대부분의 암은 뚜렷한 자각증상 없이 이미 다른 장기로 전이가 진행된 상태에서 발견되기 때문에, 현재 표준 치료법으로 시행되어지고 있는 외과적인 수술요법, 방사선 요법, 그리고 항암화학 요법들만으로는 많은 한계를 드러내고 있다. 따라서 현재의 치료법과는 달리 좀 더 효과적인 새로운 치료법이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이에 따라 현재 각종 암 질환에 유전자 치료법과 면역 치료법과 같은 새로운 치료법들을 적용하고자 하는 치료기술 개발 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻³.

암에 대한 면역 치료법은 우리 몸의 면역 체계를 활성화시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하는데 그 목적이 있다. 20세기 초, Paul은 우리 몸의 면역 체계가 종양을 인식하여 제거할 수 있다고 주장하여 항종양 면역 치료의 가능성을 처음으로 시사하였으며⁴, 20세기 중반에 들어서는, Gross가 동물모델을 이용하여 Paul의 가설을 처음으로 입증하였다⁵. 그 후 Burnet 과 Thomas에 의해 면역 감시체계 (immune surveillance) 이론의 기반이 비로소 다져지게 되었다⁶⁻⁸. 그리고 뒤이은 급속한 유전 공학과 분자 세포 면역학의 발달로 인해 항종양 면역반응을 유도하는 면역 세포들과 그 작용기전들이 밝혀지게 되면서 항종양 면역 치료 분야에 새로운 전기를 맞이하게 되었으며, 현재까지 많은 관심과 연구들이 진행되고 있다. 하지만, 이러한 급속한 발전과 많은 노력에도 불구하고 아직 면역 치료법으로 암을 완전히 치료하기에는 많은 한계점들을 드러내고 있다. 즉, 암 세포들은 여러 가지 전략을 사용하여 면역 체계를 교묘히 피해가며, 설사 면역 체계가 활성화 되었다더라도 활성화된 항종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력 또한 갖고 있기 때문에 결과적으로 암 세포는 계속 증식하게 되는 것이다. 따라서 이러한 한계점을 극복하려는 한 방안으로, 면역 증진 cytokine 유전자를 직접 암 세포에 도입시켜 암 세포로부터 cytokine을 생성하고 분비하여 항종양 면역반응을 유도시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하려는 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 현재까지 항종양 효과가 보고 된 면역 증진 cytokine 유전자 들로는 IL-2⁹⁻¹⁰, IL-4¹¹⁻¹², IL-7¹³, IL-12¹⁴, granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)¹⁵, granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)¹⁶, interferon(IFN)- γ ¹⁷등이 있다. 이들 중 특히 IL-12는 주로 monocytes, 대식세포(macrophages), 그리

고 수지상 세포(dendritic cell)등과 같은 antigen presenting cell(APC)로부터 분비되며 암 세포를 효과적으로 제거할 수 있는 cytotoxic T lymphocyte(CTL)와 natural killer(NK) 세포에 직접 작용하여 이들을 활성화 시키고 IFN- γ 의 분비를 유도할 뿐만 아니라 암 세포에 대한 살상 능력 또한 증강시키는 것으로 알려져 있다. 또한 naive CD4⁺ 림프구에 작용하여 T helper 1 세포(Th1)로의 분화를 촉진시켜 결국 항암 면역 반응에 중추적인 역할을 하는 세포 매개 면역 반응(cell-mediated immune response)을 유도하고 증강시킴으로서 항암 면역 반응을 활성화하는데 중요한 역할하고 또한, 암 전이를 억제하는 데도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이를 바탕으로, 본 연구실에서도 E1B 55kDa 유전자가 소실된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 YKL-1(Ad- Δ E1B55)을 이용하여 IL-12의 항종양 효과를 보고한 바 있다.

또한, IL-12와 유사한 기능을 가진 IL-18은 interferon(IFN)- γ inducing factor(IGIF)로 알려져 있으며, 주로 활성화된 대식세포로부터 분비된다. IL-18은 IL-12와 유사하게 cytotoxic T lymphocyte(CTL)와 natural killer(NK) 세포에 작용함으로써 이들을 활성화 시키고 IFN- γ 의 분비를 유도할 뿐만 아니라¹⁸ 암 세포에 대한 살상 능력 또한 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁹. 동시에 대식세포를 좀 더 활성화 시켜 IL-18의 분비를 활발히 유도하여 이상의 모든 기전들을 더욱 강하게 유도한다. 특히 IL-12와 IL-18에 의해서 유도되는 IFN- γ 는 APC의 major histocompatibility complex(MHC) 분자의 발현을 증가시키는 동시에 antigen presenting 능력을 강화시킴으로서 암 세포에 면역원성을 부여함으로써 cytotoxic T 림프구(CTL)와 helper T 림프

구의 활성을 유도하고, 아울러 natural killer(NK) 세포의 암 세포 살상 능력도 증가시킨다. 그리고 현재까지의 보고들에 의하면, 기능적인 면에서 유사성을 갖고 있는 IL-12와 IL-18이 함께 작용될 때 항종양 효과가 상승적으로 나타내는 것으로 알려져 있다²⁰. 즉, IL-12와 IL-18 각각의 항종양 효과뿐만 아니라, IL-12의 발현에 따른 IL-18 receptor의 과 발현 유도 및 Th1 세포로의 분화촉진, 그리고 IL-18에 의해 분화된 Th1 세포로부터의 IL-2, IFN- γ , GM-CSF 분비 유도 등에 의해 상승적인 항종양 효과가 유도 된다²¹.

한편, 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료법이 실질적으로 임상에 효과적으로 적용되기 위해서는, 주변의 정상 세포에는 어떤 부작용 없이 암 세포만을 선택적으로 살상할 수 있는 특이성과 동시에 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 살상능이 높은 아데노바이러스의 개발이 필수적이다. 하지만, 복제에 필수적인 E1A 유전자가 소실된 1세대 복제 불능 아데노바이러스는 일회성의 감염만이 이루어지기 때문에 감염된 세포와 그 주변 조직에서 제한된 항암 효과를 유도하고, 이에 따라 암 치료효율이 낮은 것이 단점으로 부각되었다. 따라서 이를 극복하기 위한 한 방안으로서, 본 연구실에서는 E1B55 kDa 유전자가 완전히 결손 되어, p53 종양 억제 단백질이 불활성화 된 암 세포에서만 선택적으로 증식할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 YKL-1(Ad- Δ E1B55)을 개발하여 암 세포 특이적 증식 및 살상 효과를 보고 한 바 있다²². 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포만을 살상할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노바이러스는 일차 감염 세포에서만 치료효과를 보일 뿐 아니라 증식된 바이러스가 주변의 종양세포들을 이차적으로 그리고 삼차적으로 연쇄적으로 감염하고 암세

포들을 살상함으로써 그 치료효과가 도미노 현상과 같이 계속 퍼져 나갈 수 있어 암 치료효과를 현격히 증대시킬 수 있고, 또한 주변의 정상 세포에서는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 증식이 억제되므로 정상세포에 대한 부작용이 감소되는 잇 점도 있다. 하지만, YKL-1 아데노바이러스는 야생형 아데노바이러스에 비해 상대적으로 바이러스의 증식이 제한되게 일어남으로서 야생형 아데노바이러스에 비해 세포 살상능이 현저히 감소되어 결과적으로 낮은 항종양 효과를 유도하였다²³. 이러한 YKL-1 아데노바이러스의 낮은 세포 살상능을 증대시키기 위해, 본 연구실에서는 YKL-1 아데노바이러스의 E1B 19kDa 유전자 부위를 결손 시켜 세포 살상능을 증대시키고, 동시에 E1A 유전자의 CR1 부위의 45번째 아미노산인 Glu(E)을 Gly(G)로 치환시키고 CR2부위의 7개 아미노산(DLTCHEA)을 Gly으로 치환시킴으로서 종양 세포 특이적 살상능을 보다 개선시킨 Ad-ΔB7 아데노바이러스를 개발하여 우수한 생체외 및 생체내 항종양 효과를 보고한 바 있다. 즉, Ad-ΔB7 아데노바이러스는 세포고사 억제 기능을 하는 E1B 19kDa 유전자 부위를 결손시킴으로서 세포고사를 유도하여 암 세포 살상능을 증대시킬 뿐만 아니라, E1A 유전자의 Rb 결합부위를 함께 결손 및 Gly으로 치환시켜 Rb 유전자가 변이된 암 세포에서만 의존적으로 복제가 일어남에 따라 개선된 종양 세포 선택적 살상 효과를 유도할 수 있다.

이러한 연구들을 바탕으로, 본 연구에서는 종양 세포에 대한 살상능과 특이성이 보다 개선되어진 Ad-ΔB7 아데노바이러스에 항종양 면역 반응을 유도할 수 있는 IL-12와 IL-18 사이토카인 유전자를 각각 또는 함께 삽입한 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 제작하여

항종양 효과를 체계적으로 비교, 분석하고자 한다. 결과적으로 본 연구자는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의해서 유도되어지는 종양 세포 특이적 항종양 효과뿐만 아니라, IL-12와 IL-18의 종양 세포 특이적 고 발현에 따른 항종양 면역반응을 동시에 유도함으로서 한층 더 증대된 종양 세포 특이적 항종양 효과가 유도될 수 있는지를 알아보하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주(U343), 자궁 경부암 세포주(C33A), 폐암 세포주(A549)와 마우스 흑색종(B16-F10) 같은 암세포주들과 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체내에 내재되어 있는 293 세포주이며, B16-F10을 제외한 모든 세포주들은 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. B16-F10 마우스 흑색종 세포주는 서울대학교 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. 또한, B16-F10을 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY)이 함유된 DMEM 배지(Gibco BRL)를 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin(Gibco BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. B16-F10 세포주는 10%의 우태아 혈청과 penicillin/streptomycin을 포함하는 RPMI 1640(Gibco BRL)을 사용하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 실험동물

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

3. IL-12와 IL-18을 발현하는 재조합 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

IL-12와 IL-18 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위하여, 먼저 mouse IL-12 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 제작하였다. pcDNA3.1-IRES 벡터를 *EcoRI* 제한효소로 처리하여 나온 약 800 bp 크기의 IRES 유전자를 pcDNA3.1-p35 벡터(사이토카인 은행, 전북대학교)의 p35 유전자 바로 뒤의 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 삽입시켜 pcDNA3.1-p35/IRES 벡터를 제작하였다. 그리고 pcDNA3.1-p40(사이토카인 은행, 전북대학교)를 *PmeI*과 *XhoI* 제한효소로 처리하여 나온 약 1007 bp 크기의 p40 유전자를 pcDNA3.1-p35/IRES 벡터의 IRES 바로 뒤의 *EcoRV* 제한효소를 이용하여 삽입시켜 pcDNA3.1-IL12 벡터를 제작하였다. 제작된 pcDNA3.1-IL12 벡터를 *SnaBI*과 *SalI* 제한효소로 처리하여 나온 약 2.5 kb 크기의 IL-12(p35/IRES/p40)을 pXC1/ Δ B7 벡터에 삽입시켜 pXC1/ Δ B7-IL12 아데노바이러스 E1 셔틀벡터를 제작하였다. 제작된 pXC1/ Δ B7-IL12 셔틀벡터를 *NdeI* 제한효소로 처리하여 선형화시키고, *BstBI*을 처리하여 선형화된 토달 벡터인 vmdl324BstB(S. B. Verca, University of Fribourg, Switzerland)와 함께 대장균 BJ5183에 동시 형질 전환시켜 상동 재조합을 유도하여 E1 부위에 IL-12 유전자가 삽입된 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ B7-IL12를 제작하였다.

또한, IL-18 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, pcDNA3.1-IL18 벡터(사이토카인 은행, 전북대학교)를 *HindIII* 제한효소로 처리하여 얻어진 578 bp 크기의 IL-18 유전자를 pCA14 벡터에 삽입시켜 pCA14-IL18을 제작하였다. 제작된 pCA14-IL18을 *BgIII* 제한효소를 처리하여 IL-18 유전자를 CMV 프로모터에 의하여

발현시킬 수 있는 CMV-IL18-polA expression cassette를 잘라내고, 이를 아데노바이러스 E3 서플렉터인 pSP72ΔE3에 삽입하여 pSP72ΔE3-IL18 아데노바이러스 E3 서플렉터를 제작하였다. 제작된 pSP72ΔE3-IL18 서플렉터를 *XmnI* 제한효소로 처리하여 선형화시킨 다음, *SpeI*을 처리하여 선형화된 아데노바이러스 토탈 벡터인 Ad-ΔB7과 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 상동 재조합을 유도하여 E3 부위에 IL-18 유전자가 삽입된 아데노바이러스(Ad-ΔB7-IL18)를 제작하였다.

IL-12와 IL-18 유전자를 동시에 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, 상기에서 제작된 pSP72ΔE3-IL18 E3 서플렉터와 Ad-ΔB7/IL12 토탈 벡터를 함께 대장균 BJ5183에 형질 전환시켜 Ad-ΔB7/IL12-IL18 아데노바이러스 벡터를 제작하였다. 제작된 모든 바이러스 벡터들은 293 세포주에 형질 전환하여 생산하였으며, limiting titration assay방법으로 바이러스의 역가를 결정하고, CsCl gradient를 이용하여 농축 및 분리하였다.

4. IL-12와 IL-18 단백질 발현 양상 규명

Ad-ΔB7-IL12 또는 Ad-ΔB7/IL12-IL18 아데노바이러스 감염에 따른 IL-12의 발현 정도를 측정하기 위하여 ELISA를 시행하였다. B16-F10 마우스 흑색종 세포주(5×10^4 개)를 6-well 플레이트에 분주한 다음날 10~200 MOI의 Ad-ΔB7-IL12 또는 Ad-ΔB7/IL12-IL18을 각각 감염시킨 후 96 시간 경에 배지를 수득하였다. 수득된 세포 배양액 또는 순차적으로 회석한 IL-12 재조합 단백질을 IL-12를 특이적으로 인지하는 항체로 코팅된 96-well plate에 각각 넣고, 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 세척하였다. 이 후, biotin이 부착된 항체를

plate에 넣은 뒤 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, streptavidin-HRP 용액을 세척한 plate에 넣어 30 분간 발색시킨 뒤 microplate readers(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)로 흡광도 값을 구하였다. 흡광도는 450 nm와 540 nm에서 각각 측정하였으며, 표준 용량곡선에 따라 배양액 중에 발현된 IL-12의 양을 산출하였다.

또한, Ad- Δ B7-IL18 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스 감염에 따른 IL-18의 발현 정도를 알아보기 위하여 ELISA를 시행하였다. ELISA의 전 과정은 mouse IL-18 ELISA kit(MBL, Nagoya, Japan)의 설명서에 따라 상기에 서술된 동일한 방법으로 시행하였다.

5. Cytopathic effect(CPE) 분석

IL-12와 IL-18의 발현 여부가 아데노바이러스의 복제에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여, 바이러스의 복제 결과로 나타나는 CPE를 비교하였다. 인체 종양 세포주(U343, C33A, A549)를 24-well plate에 분주하고 24 시간 후 Ad- Δ E1, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, Ad- Δ B7/IL12-IL18 등의 아데노바이러스들을 0.1~20 MOI로 각각 처리하였다. 실험에 사용된 바이러스들 중 어느 한 바이러스가 가장 낮은 역가에서 세포를 거의 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet(in 50% methanol)으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 분석하였다.

6. 생체내 항종양 효과와 생존율 검증

Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 그리고 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과를 비교 검증하기 위해서, 약 6~8 주령의 C57BL/6 생쥐의 복벽에 피하로 B16-F10 세포(5×10^5 개)를

100 μ l의 Hanks' balanced salt solution(HBSS)(Gibco BRL)에 부유하여 피하 주사하였다. 종양이 약 50~80 mm³ 정도 성장하였을 때 1×10^8 PFU의 아데노바이러스들을 음성 대조군인 PBS와 함께 각각 이틀 간격으로 3회 종양에 직접 주사한 후 종양의 성장과 생존율을 관찰하였다. 종양의 용적은 버지니아 켈리퍼스를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

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

7. 마우스 생체내의 비장 세포의 조제

C57BL/6 생쥐의 복벽에 형성된 마우스 흑색종에 "생체내 항종양 효과 및 생존율 검증" 실험과 동일한 방법으로 아데노바이러스를 각각 투여한 뒤, 마지막 바이러스 주사 후 3~5일 경에 마우스를 경추 탈골시키고 복부를 절개하여 비장을 무균적으로 적출한 뒤, 멸균된 슬라이드의 거친 부분을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 비장세포를 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 부유시킨 후 2000 rpm으로 10 분간 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하고, 적혈구 용혈액(ACK lysing buffer; 0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2)을 넣어 4°C에서 5 분간 방치하여 적혈구를 제거하였다. 이 후 2000 rpm으로 10 분간 원심분리 한 뒤 세포 침전물을 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2회 세척하고 trypan blue(Gibco BRL)로 세포를 희석하여 세포수를 측정하였다.

8. CTL 활성 측정

아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 T 세포 활성도를 검증하기 위한 CTL 활성 실험은 4 시간 ⁵¹Cr 유리법을 이

용하였다. 상기의 "마우스 생체내의 비장 세포의 조제" 방법에서 제조된 비장 세포를 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 배지로 희석한 후 IL-2(100 U/ml)와 방사선이 조사된 B16-F10 세포주와 함께 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3~5일 동안 배양 하였다. 배양 후 3~5일 경에 원심 분리하여 세포를 침전 시키고, 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 표적 세포(T; B16-F10)를 ⁵¹Cr로 표지 (labeling)시키기 위해서는, Na₂CrO₄(150 µCi)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 60 분간 배양한 뒤, 1000 rpm에서 10 분간 원심 분리한 후 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 1640 배지로 2회 세척하였다. 상기에서 준비한 비장세포(E)와 ⁵¹Cr으로 표지된 표적세포를 100:1, 30:1, 10:1 (E:T)의 비율로 섞은 뒤 v-bottomed 96-well microplate(Corning, New York, USA)에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4 시간 동안 배양하였다. 4 시간 후 1,000rpm에서 10 분간 원심 분리하고 상층액을 100 µl 씩 취해 γ-counter로 상층액에 유리된 ⁵¹Cr에 의한 γ 선의 강도를 측정하여 세포 독성을 산출하였다. 각 실험은 3배수(triplicate)로 하였으며, 다음의 공식에 의해 세포 독성을 산출하였다.

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

E : Experimental release count

S : Spontaneous release count

M : Maximum incorporation count

9. IFN-γ ELISpot assay

아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 면역 세포 활성도를 검증하기 위하여, enzyme-linked immune spot(ELISpot)

assay를 수행하였다. 각각의 아데노바이러스를 투여한 마우스의 비장 세포를 상기의 방법으로 분리하였다. Assay plate는 anti-IFN- γ 항체로 24시간 코팅하고, 다음 날 1×10^5 , 5×10^5 개의 비장세포를 plate에 분주하고 24시간 반응시켰다. 이후 biotinylated anti-IFN- γ 항체를 넣고 2시간 동안 반응시키고 streptavidin-alkaline phosphatase 접합체를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 기질로 3-amino-9-ethylcarbazol(AEC) 용액을 넣고 반응을 지속시킨 다음, 각각의 IFN- γ 를 분비하는 세포들(붉은빛 색깔)의 개수를 입체 현미경을 사용하여 측정하였다.

10. IL-18, IL-12, 또는 IFN- γ 의 종양조직 내 발현량 측정

마우스의 피하에 형성된 종양내로 각각의 바이러스를 투여하고 3일 뒤 종양을 적출하였다. 적출한 종양을 액체 질소에 담근 후 막자사발로 분쇄하고 proteinase inhibitor cocktail(Sigma)이 첨가된 PBS에 부유하였다. 종양 조직을 보다 미세하게 분쇄하기 위하여 homogenizer (ART-MICCRA D-8, ART moderne Labortechnik, munchen, Germany)로 균질화한 후, 3000 rpm에서 10분 원심분리한 뒤 상층액만 수득하여 IL-12, IL-18, 또는 IFN- γ 단백질의 발현정도를 ELISA로 분석하였다. IFN- γ 의 ELISA 전 과정은 IFN- γ kit(ENDOGEN, Woburn, MA, USA)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 수행하였으며, IL-12와 IL-18의 ELISA는 상기의 "Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18 그리고 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스의 단백질 발현양상 규명"과 같은 방법으로 수행하였다.

11. 유세포 분석에 의한 마우스 비장 세포의 특성 변화 관찰

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

12. IL-12와 IL-18을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직의 변화 관찰

C57BL/6 마우스의 복벽에 형성된 마우스 흑색종에 "생체내 항종양 효과 및 생존을 검증" 실험과 동일한 방법으로 아데노바이러스를 각각 투여한 뒤, 마지막 바이러스 주사 후 3 일경에 종양을 적출하였다. 그리고 O.C.T. compound로 동결 박편한 뒤 10 µm 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 조직 면역염색을 시행하였다. 슬라이드에 부착된 조직을 0.3% H₂O₂ 용액에서 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 일차 항체인 rat anti-mouse CD4 단클론 항체(PharMingen) 또는 rat anti-mouse CD8 단클론 항체(PharMingen)를 넣어 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이 후 HRP가 결합된 이차 항체인 goat anti-rat IgG-HRP 항체를 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응 시키고, DAB를 첨가하여 발색 정도를 지켜본 후 100%, 90%, 70% ethanol과 xylene 용액에 침전시키고 커버 글라스를 덮어 관찰하였다.

결과

1. IL-12와 IL-18을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 IL-12와 IL-18의 발현 양상 규명

IL-12와 IL-18 유전자의 각각 또는 동시 발현에 따른 항종양 효과의 개선여부를 비교 분석하고자, IL-12 유전자가 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입된 아데노바이러스인 Ad- Δ B7-IL12와 IL-18 유전자가 E3 부위에 삽입된 아데노바이러스인 Ad- Δ B7-IL18, 그리고 E1 부위에 IL-12, E3 부위에 IL-18 유전자가 함께 삽입된 아데노바이러스인 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 각각 제작하였다(Figure 1). Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 그리고 Ad- Δ B7/IL12-IL18은 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 유전자가 소실되고, E1A 유전자가 변이된 암세포 특이적 살상 아데노바이러스들이다. 제작된 아데노바이러스들에 의한 IL-12 또는 IL-18의 발현 정도를 알아보기 위하여, B16-F10 마우스 흑색종 세포에 아데노바이러스(Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, Ad- Δ B7/IL12-IL18)를 각각 감염시키고, 96 시간 후에 배지를 회수하여 ELISA를 수행하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이, 감염시킨 바이러스의 역가가 증가함에 따라 IL-12 또는 IL-18의 발현량이 용량 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

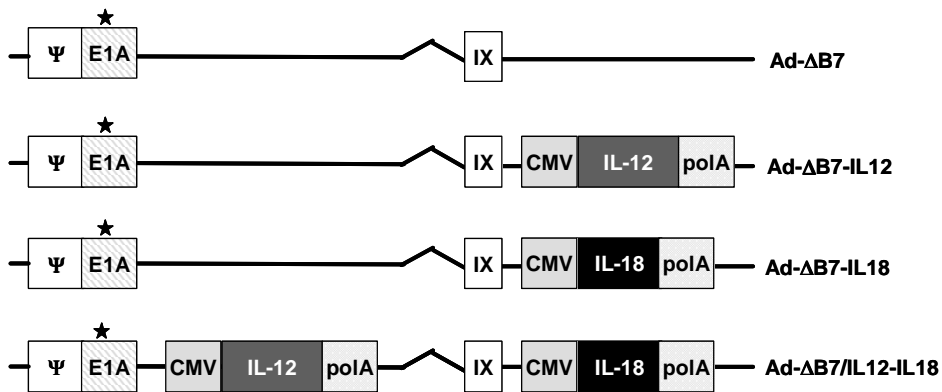
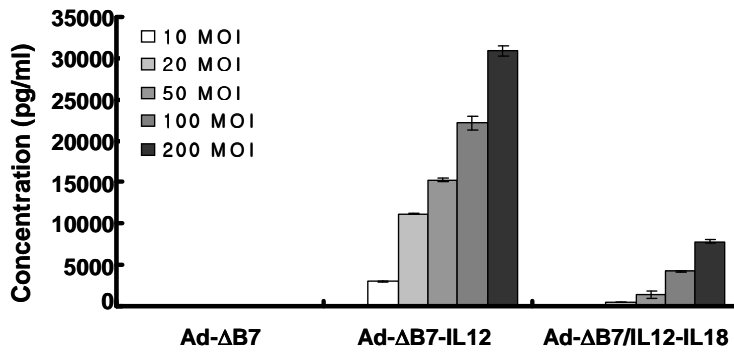


Figure 1. Schematic representations of oncolytic adenoviruses expressing IL-12, IL-18, or IL-12 plus IL-18. Ad-ΔB7 contains mutated E1A, but is E1B deleted. Ad-ΔB7-IL12 or Ad-ΔB7-IL18 comprised of the IL-12 or IL-18 gene inserted into the E3 region of Ad-ΔB7. Ad-ΔB7/IL12-IL18 comprised of the IL-12 and IL-18 genes in E1 and E3 region of Ad-ΔB7, respectively.(★ : mutation)

(A) IL-12 ELISA



(B) IL-18 ELISA

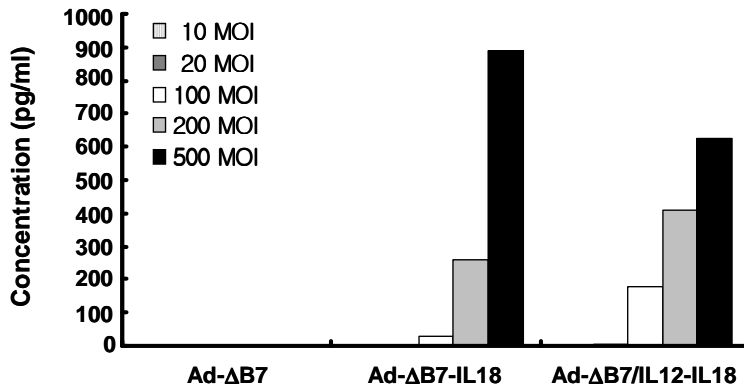


Figure 2. Quantity of IL-12 and IL-18 secreted by B16-F10 cells infected with Ads. (A) Murine B16-F10 melanoma cells were infected with Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, or Ad-ΔB7/IL12-IL18 adenovirus at range of 10~200 MOIs. The concentration of IL-12 was measured in the culture supernatant at 96 hrs after infection by ELISA assay. IL-12 level was increased linearly in a dose dependent manner. (B) Murine B16-F10 melanoma cells were infected with Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL18, or Ad-ΔB7/IL12-IL18 adenovirus at range of 10~500 MOIs. The concentration of IL-18 was measured in the culture supernatant at 96 hrs after infection by ELISA assay. IL-18 level was increased linearly in a dose dependent manner.

2. IL-12와 IL-18 유전자 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석

IL-12와 IL-18 유전자 발현이 아데노바이러스의 복제에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 아데노바이러스의 복제에 따른 세포 사멸 정도를 CPE assay로 관찰하였다. 여러 종류의 암세포주들(U343, C33A, A549)을 Ad- Δ E1, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스로 각각 0.1-20 MOI로 감염시키고 잔류 세포를 crystal violet으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰하였다. Figure 3에서 볼 수 있듯이 음성 대조군인 Ad- Δ E1 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상효과가 나타나지 않았으나, 복제가능 아데노바이러스인 Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18로 감염된 경우는 처리된 바이러스의 양이 증가함에 따라 세포 살상효과가 증가되었다. 또한, 본 연구에서 사용된 모든 세포주들에서, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스의 세포 사멸능이 대조군 바이러스인 Ad- Δ B7에 의한 세포 사멸능에 비해 약 2-5배 정도 감소함을 확인할 수 있었다.

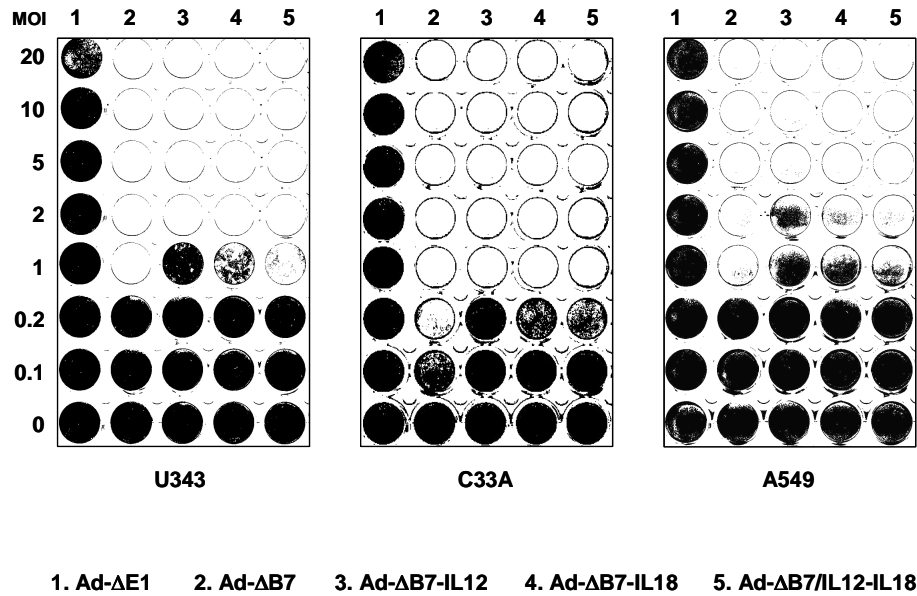


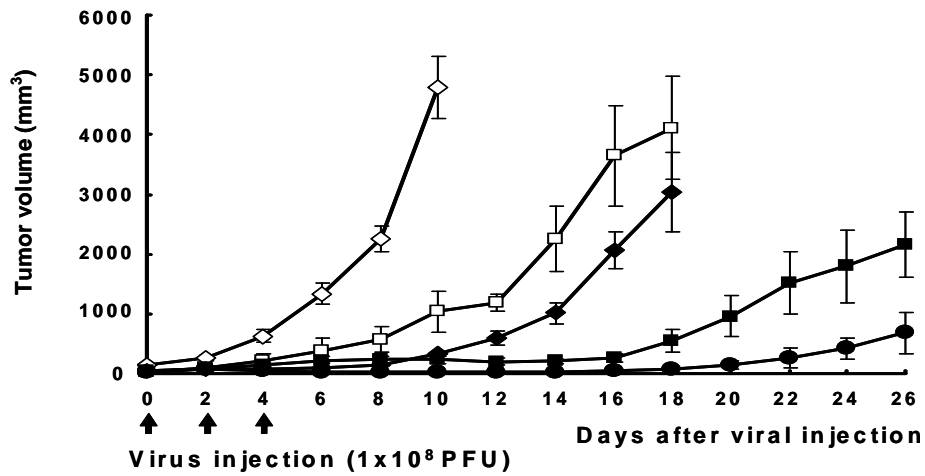
Figure 3. CPE assay of Ads expressing IL-12, IL-18, or IL-12 plus IL-18. Cell monolayer in 24-well plate were infected with Ad- Δ E1, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18 at range of 0.1-20 MOIs. At 4-10 days p.i, the infected cells were stained with crystal violet.

3. IL-12와 IL-18을 발현하는 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과 검증

IL-12 또는 IL-18을 각각 발현하는 종양 선택적 살상 바이러스인 Ad-ΔB7-IL12와 Ad-ΔB7-IL18, 또는 IL-12와 IL-18을 동시에 발현하는 종양 특이적 살상 바이러스인 Ad-ΔB7/IL12-IL18의 생체내 항종양 효과를 비교 검증하기 위하여, B16-F10 마우스 흑색종 세포주를 C57BL/6 마우스의 피하에 주사한 후 형성된 종양에 각각의 바이러스를 1×10^8 PFU/20 μ l로 종양 내로 주사한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 음성대조군인 PBS를 투여한 마우스의 경우에는 종양이 급속한 속도로 성장하여 16 일 이후 생존한 마우스는 없었으며, 대조군 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔB7을 투여한 마우스의 경우에는 처음 8 일간은 종양의 성장이 억제된 경향을 보였으나 그 이후에는 종양이 급격히 성장하여 바이러스 투여 후 20 일경에는 종양의 크기가 4698.5 ± 146.4 mm³로 크게 증가하였다. 그리고 Ad-ΔB7-IL12는 Ad-ΔB7-IL18을 투여한 군에서는 바이러스 투여 후 20 일에 종양의 크기가 각각 960.1 ± 349.3 mm³과 3946.7 ± 817.8 mm³로서 Ad-ΔB7-IL18에 비해 Ad-ΔB7-IL12가 처리된 군에서 종양의 성장이 현저히 억제됨을 관찰하였다(Figure 4A). 또한, IL-12와 IL-18이 동시에 삽입된 Ad-ΔB7/IL12-IL18을 처리한 군에서는 바이러스 투여 후 20 일에 종양의 크기가 145 ± 64.7 mm³로서, IL-12 또는 IL-18을 각각 발현하는 아데노바이러스를 투여한 경우에 비해 종양의 성장이 더욱 억제되어 증대된 항종양 효과를 확인할 수 있었다. 또한, 마우스의 생존율을 조사한 결과, Figure 4B에서 볼 수 있듯이 PBS 또는 Ad-ΔB7을 투여한 마우스들이 각각 16 일과 20 일 이후에 모두 죽은 반면,

Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18을 투여한 마우스들은 각각 34 일과 39 일 이후에 모두 죽어, 대조군인 PBS 또는 Ad- Δ B7에 비해 생존율이 약 2배 정도 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 처리한 6마리의 마우스 중 2마리는 첫 번째 바이러스 투여 후 각각 12일, 14일째 되는 날 종양이 완전히 사라진 후 60일 후에도 재성장이 되지 않는 것을 관찰할 수 있었으며, 나머지 4마리 마우스들은 43일 후에 모두 죽은 것을 알 수 있었다. 이와 같이 마우스 항종양 효과에서와 마찬가지로 IL-12와 IL-18이 함께 발현되는 Ad- Δ B7/IL12-IL18 아데노바이러스를 투여한 경우의 마우스 생존율에서도 뚜렷한 개선 효과를 확인 할 수 있었다.

A. Anti-tumor effect



B. Survival rate

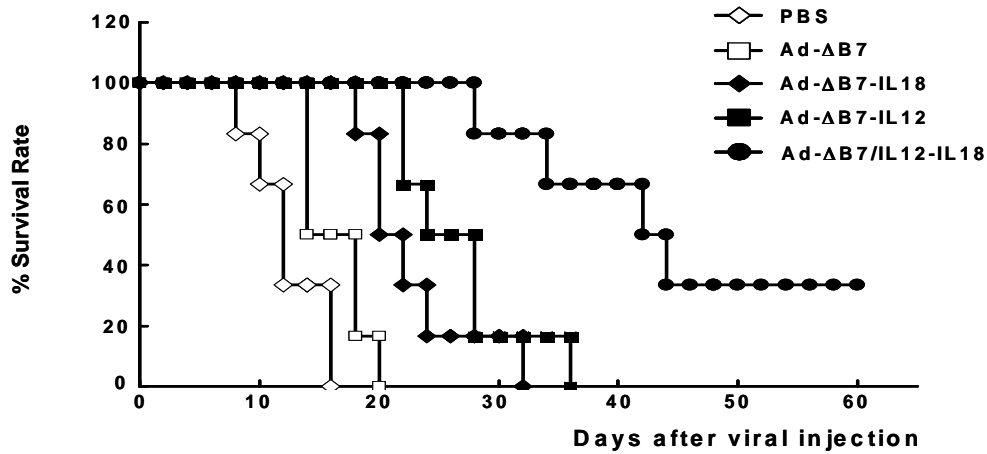


Figure 4. Anti-tumor effect (A) and survival rate (B) of Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, or Ad-ΔB7/IL12-IL18. C57BL/6 mice bearing tumors established by subcutaneous injection of B16-F10 cells were treated 3 times with intratumoral injection of 1×10^8 PFU/ $20 \mu\text{l}$ of adenoviruses. Tumor growth was then monitored on a 2 day interval until the end of the study. The oncolytic adenovirus expressing IL-12 and IL-18, Ad-ΔB7/IL12-IL18, demonstrated enhanced antitumor activity compared to its cognate controls, Ad-ΔB7-IL12 and Ad-ΔB7-IL18.

4. 암세포 특이적 면역반응 활성 검증

IL-12 및 IL-18 발현에 의해 유도되는 마우스 흑색종 B16-F10 특이적 면역 반응을 관찰하기 위해, 바이러스가 투여된 마우스로부터 비장세포를 분리하여 ^{51}Cr 유리법을 이용하여 CTL assay를 수행하였다 (Figure 5). 그 결과, Ad- Δ B7-IL18을 투여한 경우(E:T ratio = 100:1)의 암세포 특이적 살상능이 8.4%로서 대조군인 PBS(0.1%) 또는 Ad- Δ B7(3.4%)에 비해 증가되었음을 확인하였지만, Ad- Δ B7-IL12(38.5%)에 비해서는 현저히 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 또한, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 경우에는 암세포 특이적 살상능이 46.8%로서 암세포 특이적 CTL 활성이 가장 많이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

또한, 활성화된 면역 세포에 의해 주로 분비되는 사이토카인인 IFN- γ 를 분비하는 종양세포 특이적 면역 세포들의 빈도를 알아보고자 IFN- γ ELISpot assay를 시행하였다(Figure 6). 각각의 아데노바이러스를 투여한 마우스의 비장세포를 분리하여 1×10^5 , 5×10^5 개씩 anti-IFN- γ 항체로 코팅된 96 well plate에 분주한 뒤 IFN- γ 를 분비하는 세포들의 개수를 산출하였다. Figure 6에서 볼 수 있듯이, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 경우에 PBS 또는 Ad- Δ B7을 투여한 마우스 보다 붉은색 spot의 개수가 크게 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, PBS 또는 Ad- Δ B7을 투여한 마우스의 경우에는 1×10^5 , 5×10^5 개의 비장세포를 넣어준 모든 well에서 붉은색 spot을 전혀 관찰할 수 없었지만, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18을 투여한 마우스의 경우에는 5×10^5 개의 비장세포를 분주한 well에서 붉은색 spot을 관찰할 수 있었다. 특히, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 경우에는 5×10^5 개의 비장세포를 분주한 well에서는 붉은색 spot의 개수를 눈으로 식별할 수 없을 정도로 그 빈도가 현저하게 증가된 것을 관찰하였다.

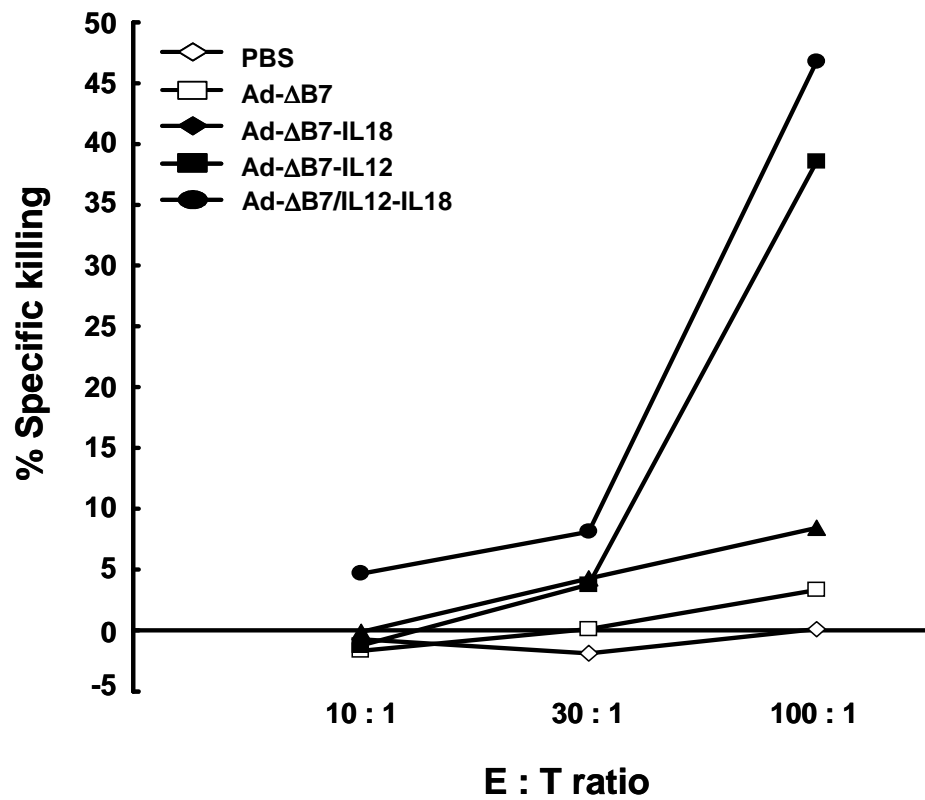


Figure 5. ^{51}Cr release assay was carried out to measure the tumor cell-specific killing activity. B16-F10 cells were labeled with ^{51}Cr , and incubated with activated T cells isolated from mice treated with PBS, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, or Ad-ΔB7/IL12-IL18 at various target/effector (T:E) ratios. Ad-ΔB7/IL12-IL18 induced the highest CTL activity.

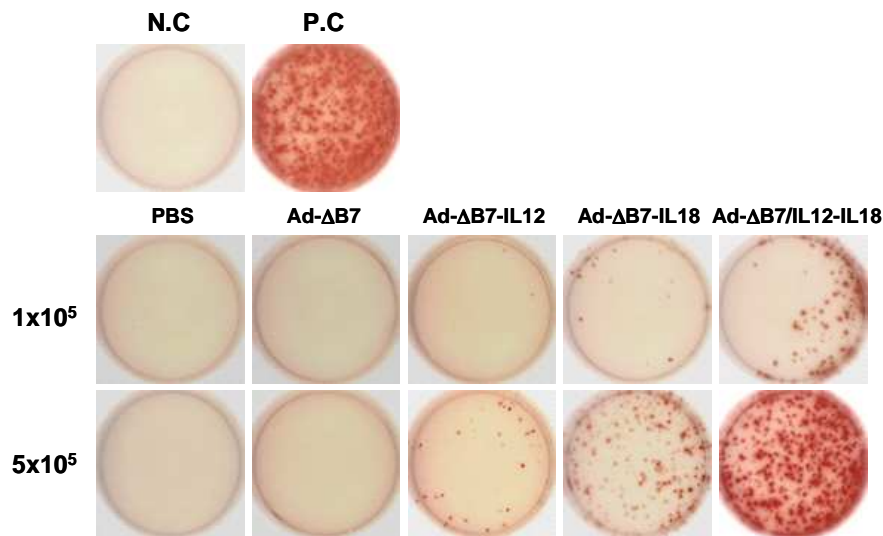


Figure 6. IFN- γ ELISpot assay. Secretion of IFN- γ was measured by harvesting spleen cells from C57BL/6 mice bearing B16-F10 tumor on 3 days after final viral injection. ELISpot plate was precoated with anti-mIFN- γ antibody and spot forming cells (SFC) were visualized using avidin-HRP enzyme and AEC substrate. Ad- Δ B7/IL12-IL18 induced the highest frequency of IFN- γ -secreting immune cells.

Table 1. The average number of spots detected in IFN- γ ELISpot assays. Splenocytes from each group were assayed in triplication.

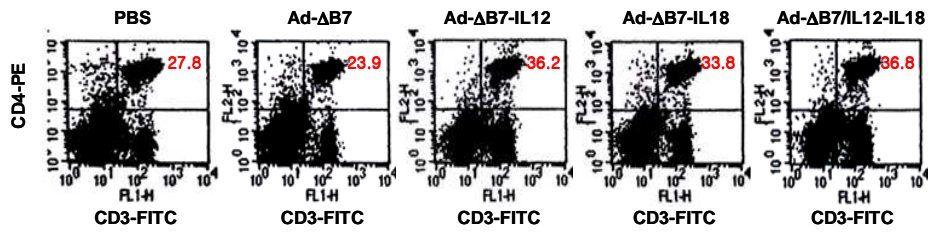
	PBS	Ad-ΔB7	Ad-ΔB7-IL12	Ad-ΔB7-IL18	Ad-ΔB7/IL12-IL18
1 x 10⁵	0	0	2	9	122
5 x 10⁵	0	0	34	183	N

N : Over the range of detection by saturation.

5. 마우스 비장세포의 CD4⁺/CD8⁺ T 세포 군집변화

B16-F10 세포를 C57BL/6 마우스에 접종 후 종양의 크기가 약 60~80 mm³ 정도 되었을 때, PBS, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, 또는 Ad-ΔB7/IL12-IL18을 이틀 간격으로 3회 종양 내에 직접 주사하고 마지막 바이러스 투여 후 3~5 경에 마우스의 비장을 적출하여 비장세포의 Th(CD4⁺)와 CTL(CD8⁺) 군집 변화를 관찰하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, 또는 Ad-ΔB7/IL12-IL18을 투여한 경우에 비장세포내 CD4⁺ 세포군의 비율이 각각 36.2%, 33.8%, 36.8%로 대조군인 PBS(27.8%) 또는 Ad-ΔB7(23.9%)에 비해 크게 증가 하였으며, CD8⁺ 세포군의 비율 역시 Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, 또는 Ad-ΔB7/IL12-IL18을 투여한 경우에 각각 32.2%, 26.9%, 26.1%로 PBS(16.3%) 또는 Ad-ΔB7(17.3%)에 비하여 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 항종양 면역 반응에 중요한 세포 매개 면역 반응을 일으킬 수 있는 T 림프구의 수가 증가되었음을 의미한다.

A. CD4



B. CD8

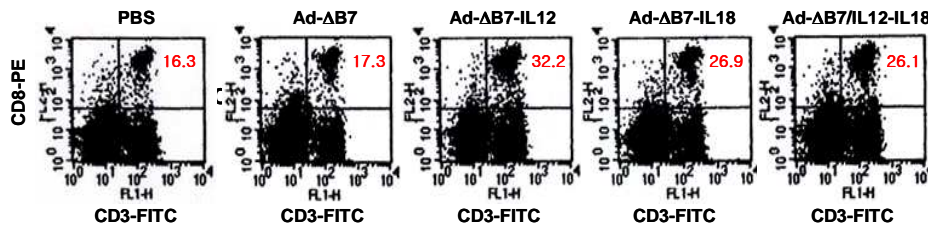
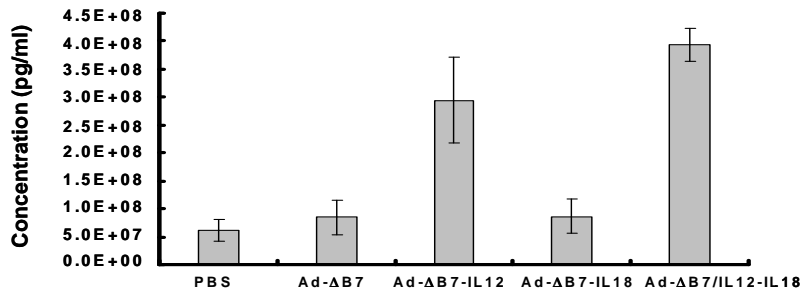


Figure 7. Representative dot-plot FACS analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells stained with isotype-matched control Abs. Dual color flow cytometric analysis was performed using spleen cells from mice treated with PBS, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, or Ad-ΔB7/IL12-IL18. Percentages of the CD4⁺ and CD8⁺ T cell population are shown in histograms.

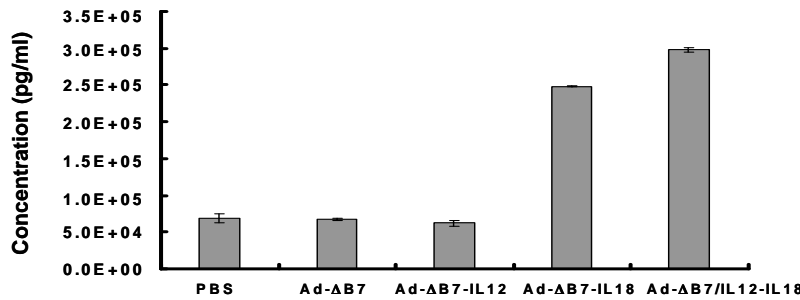
6. IL-12, IL-18, 또는 IFN- γ 의 종양내 발현량 측정

바이러스가 투여된 종양 조직 내에서의 IL-12, IL-18, 또는 IFN- γ 의 발현량을 알아보고자, 바이러스가 투여된 마우스로부터 종양 조직을 적출하여 미세하게 분쇄한 뒤 IL-12, IL-18, 또는 IFN- γ ELISA 분석을 각각 시행하였다. IL-12의 ELISA 분석에서는 PBS, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL18을 종양 내로 투여한 실험동물에서 종양조직 1 g당 각각 6.0×10^7 pg/ml, 8.5×10^7 pg/ml, 8.6×10^7 pg/ml의 IL-12만이 검출된 반면, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 종양 내 투여한 실험군에서는 종양조직 1 g당 각각 2.9×10^8 pg/ml, 3.9×10^8 pg/ml의 IL-12가 검출되는 것을 확인하였다(Figure 8A). 또한, 종양 조직내 IL-18 발현량의 경우에는, PBS, Ad- Δ B7, 또는 Ad- Δ B7-IL12를 종양 내로 투여한 실험동물에서 종양조직 1 g당 각각 6.8×10^4 pg/ml, 6.7×10^4 pg/ml, 6.2×10^4 pg/ml의 IL-18만이 검출된 반면, Ad- Δ B7-IL18 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 종양 내 투여한 실험군에서는 종양조직 1 g당 각각 2.0×10^5 pg/ml, 3.0×10^5 pg/ml의 IL-18이 검출됨을 확인할 수 있었다(Figure 8B). 이로써 암 조직 내에서 선택적으로 증식할 수 있는 아데노바이러스에 의해 IL-12와 IL-18이 종양 조직내에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, IFN- γ 의 종양 조직내 발현량의 경우에서도 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 종양조직에서 4.0×10^9 pg/ml으로 매우 높게 검출되어, PBS(4.4×10^8 pg/ml) 또는 Ad- Δ B7(4.8×10^8 pg/ml)을 투여한 경우뿐만 아니라 Ad- Δ B7-IL12(2.6×10^9 pg/ml) 또는 Ad- Δ B7-IL18(7.0×10^8 pg/ml)를 투여한 경우에 비해서도 발현 정도가 확연히 높은 것을 확인할 수 있었다(Figure 8C).

A. IL-12 ELISA



B. IL-18 ELISA



C. IFN-γ ELISA

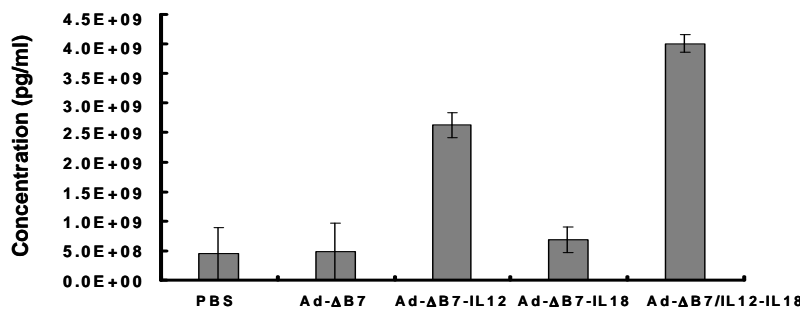


Figure 8. Increased local IL-12, IL-18, or IFN- γ expression following treatment with Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18. After injection of PBS, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18 into established B16-F10 tumors in C57BL/6 mice, IL-18, IL-12, or IFN- γ expression was measured in tumor homogenates using ELISA kit. The IL-12, IL-18, or IFN- γ secretion was substantially increased in tumors treated with Ad- Δ B7/IL12-IL18.

7. IL-12와 IL-18을 발현하는 복제가능 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰

IL-12와 IL-18 발현에 따른 종양조직 내의 변화를 알아보고자 종양내로 침윤한 림프구를 조사하였다. 각각의 바이러스 또는 PBS를 투여한 종양조직을 H & E 염색한 결과, PBS를 투여한 경우에는 종양조직내로 림프구가 거의 침윤되지 않은 반면, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18을 투여한 실험군에서는 종양 주위에 림프구가 침윤된 것을 확인하였다. 또한, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18에 비해 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 종양 조직의 경우에는 종양 주위뿐만 아니라 종양 조직 내부에도 현저하게 많은 림프구가 침윤된 것을 확인할 수 있었으며, 대부분의 암세포들이 고사되어 있음을 관찰하였다 (Figure 9). 종양 조직내 침윤된 림프구의 세포군을 보다 면밀히 조사하기 위하여 CD4⁺와 CD8⁺ T 림프구를 특이적으로 인지할 수 있는 항체를 사용하여 IHC를 시행한 결과, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18비해 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 실험군에서 현저하게 증가된 CD4⁺과 CD8⁺ T 림프구를 종양조직 내부와 주위에서 관찰할 수 있었으며, 다른 실험군에 비하여 T 림프구의 수가 확연히 증가하였음을 확인하였다(Figure 10).

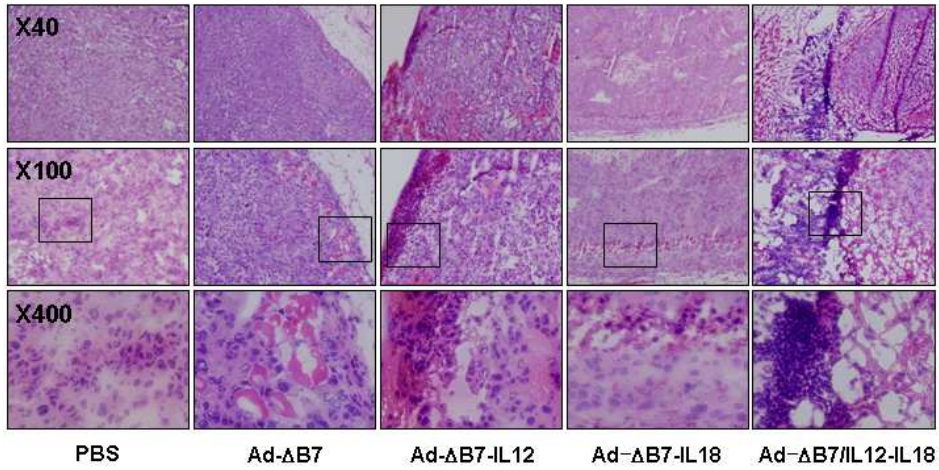
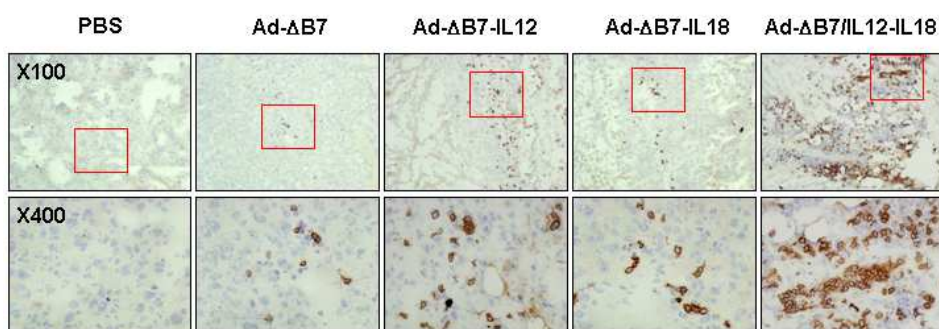


Figure 9. Histological analysis of tumor sections from mice treated with adenoviruses. Ads was injected on day 1, 3, 5, and tumors were harvested on day 8 for histological analysis. Frozen sections of tumor tissue were then stained by hematoxylin and eosin. Original magnification: $\times 40$, $\times 100$, and $\times 400$.

A. CD4



B. CD8

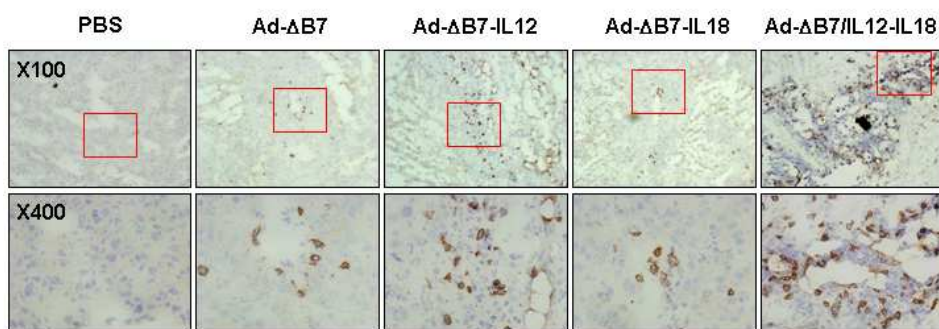


Figure 10. Infiltration of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells in tumors harvested from mice treated with PBS, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7-IL12, Ad-ΔB7-IL18, or Ad-ΔB7/IL12-IL18. Cryosections of tumor tissue were stained with anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody. Original magnification: ×100 and ×400.

IV. 고찰

암에 대한 면역 치료법은 부작용이 심각한 기존의 방사선 요법 및 항암화학 요법과는 달리 우리 몸의 면역 체계를 활성화시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하는데 그 목적이 있다. 비록 암 세포는 정상 세포로부터 유래되었지만, 정상 세포에서는 낮은 빈도로 발현되어 있거나 거의 발현되어 있지 않은 암 세포 특이적인 항원들을 발현하고 있기 때문에 면역 감시체계(immune surveillance)에 의해 인지되어 종양 특이적인 항종양 효과에 의한 제거가 가능하다. 하지만, 이러한 이론과는 달리 실제 임상에 있어서는 암에 대한 면역 치료법은 현재까지 많은 한계점을 드러내고 있는 실정이다. 즉, 암 세포들은 여러 가지 전략을 사용하여 면역 체계를 교묘히 피해가며, 설사 면역 체계가 활성화되었다도 활성화된 항종양 면역 반응으로부터 도피할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 결과적으로 암 세포는 계속 증식하게 되는 것이다. 따라서 이러한 한계점을 극복하려는 한 방안으로, 면역 증진 cytokine 유전자, major histocompatibility complex(MHC) 유전자, 보조 신호 분자 유전자, 그리고 T-cell receptor 유전자등을 직접 암 세포에 도입시켜 직접 항종양 면역반응을 유도시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하려는 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 따라서 이러한 배경 하에, 본 연구에서는 E1B 유전자가 결손 되고, E1A 유전자가 변이된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad- Δ B7을 유전자 전달체로 이용하여 IL-12와 IL-18 각각의 항종양 효과를 비교 분석하고자 하였으며, 궁극적으로는 IL-12와 IL-18 유전자를 함께 Ad- Δ B7에 탑재한 후 이들을 직접 암세포에 투여하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 암세포 특이적 복제능에 따른 암세포 살상

유도뿐만 아니라 아데노바이러스의 암세포 특이적 복제를 통한 IL-12와 IL-18의 암세포 특이적 고 발현에 따른 항종양 면역반응을 동시에 유도시킴으로서 총체적인 항종양 효과의 개선 여부를 알아보려고 하였다.

먼저, IL-12와 IL-18 유전자의 발현 양상 분석과 이들 유전자의 발현에 따른 아데노바이러스 복제능 영향 분석을 통해 검증된 Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, Ad- Δ B7/IL12-IL18 종양 선택적 살상 아데노바이러스들의 생체내 항종양 효과를 비교 검증해보았다. 그 결과, Ad- Δ B7-IL18을 투여한 군에서는 바이러스 투여 후 초기에는 종양의 성장이 억제되었지만 일정 기간 후에는 다시 종양이 성장하여 Ad- Δ B7 군과 비슷한 크기로 종양이 성장하였다. 반면, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 경우에는 종양의 성장이 현저하게 억제되고 그 억제효과가 지속되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, IL-12만 발현하는 Ad- Δ B7-IL12에 비해 IL-12와 IL-18을 동시에 발현하는 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 경우에 향상된 항종양 효과가 유도됨을 확인할 수 있었다. 또한, 생체내 생존율 검증 실험에서도 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 33.3%의 마우스에서 종양이 완전히 제거되고, Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18을 투여한 경우에 비해서도 생존율이 크게 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 IL-12와 IL-18이 그 각각보다는 동시에 작용하여 유도되는 상승효과에 의해 좀 더 강력하고 효과적인 면역반응이 일어남으로서 항종양 효과가 증대된 것을 의미한다. 현재까지의 보고에 의하면, 이와 같은 항종양 효과는 Type-1 면역 반응에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으며²⁴, 또한 IL-12와 IL-18이 동시에 작용하였을 때 상승효과에 의해 Type-1

사이토카인인 IFN- γ 와 GM-CSF의 분비가 증대되는 반면, Type-2 사이토카인인 IL-10의 분비는 저해됨으로서 Type-1 면역 반응을 유도한다고 보고 된 바 있다²⁵. 본 연구에서도 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 비장에서 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 빈도를 조사한 결과, PBS 또는 Ad- Δ B7 대조군에 비하여 현저히 증가된 것을 확인할 수 있었으며, IFN- γ ELISpot을 시행한 결과에서도 Ad- Δ B7/IL12-IL18이 Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18 대조군들에 비해 IFN- γ 의 분비를 크게 증진시키는 것을 알 수 있었다. 이는 IL-12와 IL-18의 동시 발현에 의하여 Type-1 면역 반응을 유도하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 비율이 증가되었으며, 이들로부터 IFN- γ 가 분비 되어 면역 반응이 월등히 증가된 것을 의미한다. 또한, 종양 특이적 T 세포 매개 살상 효과를 알아볼 수 있는 CTL 활성 실험을 시행한 결과, Ad- Δ B7/IL12-IL18이 Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL18 대조군들에 비해 암세포 특이적 살상능이 확연히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 IL-12와 IL-18에 의해 결과적으로 암세포 특이적인 CTL 세포가 증가되어 Type-1 면역 반응이 유도됨으로서 항종양 효과가 증대되었음을 의미한다. 한편, PBS 또는 Ad- Δ B7을 투여한 대조군에 비하여 Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 군에서 종양조직의 괴사가 현저하게 관찰되었을 뿐만 아니라 종양조직내로의 림프구의 침윤이 확연히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 침윤된 림프구의 세포군들을 IHC를 통하여 확인해 본 결과, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 군에서 증가된 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포군들을 관찰할 수 있었다. 또한, Ad- Δ B7/IL12-IL18을 투여한 마우스의 종양 조직 내에서 Ad- Δ B7-IL12 또는 Ad- Δ B7-IL18을 단독으로 처리한 실험군에 비해 IL-12, IL-18, 그리고 IFN- γ 의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 암세포 특이적으

로 복제되어 암세포 살상을 유도하는 Ad- Δ B7/IL12-IL18 종양 선택적 살상 아데노바이러스가 종양 내에서 활발히 증식함으로써 바이러스 내에 삽입되어 있는 IL-12와 IL-18이 종양내부에서 높게 발현되고, 결과적으로 암세포 특이적인 CD4⁺, CD8⁺ T 세포의 활성화에 따른 IFN- γ 의 발현을 유도하고 이들 면역 세포들의 조직내 침윤을 증대시킴으로서 항종양 효과를 보다 강하게 유도하기 때문인 것으로 유추된다.

암에 대한 면역 치료법은 우리 몸의 면역 체계를 활성화시킴으로서 암 세포만을 특이적으로 제거하는데 그 목적이 있다. 따라서 본 연구에서 제작된 Ad- Δ B7/IL12-IL18은 종양 선택적 아데노바이러스인 Ad- Δ B7에 의해 유도되어지는 종양 세포 특이적 항종양 효과뿐만 아니라, IL-12와 IL-18의 종양 세포 특이적 고 발현에 따른 항종양 면역반응을 동시에 유도함으로써 증대된 종양 세포 특이적 항종양 효과를 유도할 수 있었다. 이는 기존의 방사선 요법과 항암화학 요법에서 나타나는 심각한 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 예상되며, 또한 항암 면역반응으로 국소적인 암의 치료는 물론 암의 재발을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 전이 암의 치료에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

암에 대한 면역 치료법은 항암 면역 반응을 활성화시킴으로서 다양한 전략으로 면역 감시 체계(immune surveillance)를 교묘히 피해 무한 증식하는 종양 세포만을 특이적으로 제거하는 것이 관건이라 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 항암 면역반응을 상승적으로 유도할 수 있는 IL-12와 IL-18 유전자를 Ad- Δ B7 종양 특이적 살상 아데노바이러스에 도입함으로써 종양 특이적 T 세포 매개 세포살상에 의한 항종양 효과를 효과적으로 유도할 수 있었다. 즉, 본 연구에서 제작된 Ad- Δ B7/IL12-IL18은 종양 선택적 아데노바이러스인 Ad- Δ B7의 암세포 특이적 복제에 따른 종양 세포 특이적 항종양 효과뿐만 아니라, IL-12와 IL-18의 종양 세포 특이적 고 발현에 따른 항종양 면역반응을 동시에 유도함으로써 향상된 항종양 효과를 유도할 수 있기 때문에 암 유전자-면역 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Human Gene Ther* 1998;9:283-286.
2. Grill J, Georger B, Lamfers M, Dirven C, Van Beusechem V, Gerritsen W, et al. Conditionally replicative adenoviruses: a second wind for cancer gene therapy. *Bull Cancer* 2003;90:1039-1048.
3. Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997;389:239-240.
4. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 5 1909.
5. Gross L. Intradermal immunisation of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943;3:326.
6. Burnet FM. Cancer-a biological approach. *BMJ* 1957;I:841.
7. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1.
8. Thomas L. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper; 1959.

9. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
10. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990;172:1217-1224.
11. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989;57:503-512.
12. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M, et al. Treatment of established renal cancer by tumor cell engineered to secrete interleukin-4. *Science* 1991;254:713-716.
13. Schmidt-Wolf IG, Huhn D, Neubauer A, Wittig B. Interleukin-7 gene transfer in patients with metastatic colon carcinoma, renal cell carcinoma, melanoma, or with lymphoma. *Hum Gene Ther* 1994;5:1161-1168.
14. Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Mckinney TG, Schreiber RD, et al. Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* 1995;154:6466-6474.

15. Colombo MP, Ferrari G, Stoppacciano A, Parenza M, Rodolfo M, Mayilio F, et al. Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo. *J Exp Med* 1991;173:889-897.
16. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3539-3543.
17. Restifo NP, Spiess PJ, Karp SE, Mule JJ, Rosenberg SA. A nonimmunogenic sarcoma transduced with the cDNA for interferon gamma elicits CD8⁺ T cells against the wild-type tumor: correlation with antigen presentation capability. *J Exp Med* 1992;175:1423-1431.
18. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996;156:4274-4279.
19. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 1995;63:3966-3972.

20. Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K, et al. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 1997;159:2125-2131.
21. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 1996;26:1647-1651.
22. Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO, et al. Oncolytic potential of E1B 55kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: correlation with p53 functional status. *Int J Cancer* 2000;88:454-463.
23. 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.
24. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, et al. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:S52-61.

25. Qiao Li, Abbey L. Carr, Elizabeth J. Donald, Joseph J. Skitzki, Ryugi Okuyama, Lloyd M, et al. Synergistic Effect of IL-12 and IL-18 in Skewing Tumor-Reactive T-Cell Responses Towards a Type 1 Pattern. *Cancer Res* 2005;65:1063-1070.

26. Blattman JN, Greenberg PD. Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. *Science* 2004;305:200-205.

27. Karl-Johan Malmberg. Effective immunotherapy against cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:879-892.

Abstract

Anti-tumor effect of tumor specific replicating adenovirus expressing IL-12 and IL-18

Il-Kyu Choi

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Chae-Ok Yun)

Cancer immunotherapy denotes a strategy for activating a host's immune response for the treatment of malignancy. Although cancer cells are less immunogenic, immune system is capable of recognizing and eliminating cancer cells. Oncolytic adenoviral vectors are currently being developed as biologic anti-tumor agents, and coupling the lytic function of an oncolytic adenovirus with its ability as a transgene delivery system represents a powerful extension of this methodology. IL-12 is reported to exhibit potent anti-tumor effect by promoting NK cell and cytotoxic T cell activities. IL-18 is also have shown that augments cytotoxicity of NK cells and proliferation of T cells. It stimulates Th1 cells to produce IL-2 and IFN- γ . This effect augmented in a synergistic manner IL-12. To increase the potential anti-tumor

effect of the oncolytic adenovirus, we have generated an E1B deleted and E1A mutated oncolytic adenoviruses, Ad- Δ B7-IL12, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7/IL12-IL18 that expresses IL-12, IL-18, or IL-12 plus IL-18, respectively. The therapeutic efficacy of these oncolytic adenoviruses was then evaluated in immunocompetent C57BL/6 mice bearing murine melanoma B16-F10 tumor. The results showed significant inhibition of tumor growth following Ad- Δ B7/IL12-IL18 treatment compared to Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7-IL12 treated tumors. Moreover, the oncolytic adenovirus expressing both IL-12 and IL-18 demonstrated enhanced anti-tumor effect and higher incidences of complete tumor regression compared to Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7-IL12. To establish that the observed anti-tumor effect is associated with the generation of a tumor-specific immune response, we examined the cytolytic activity by IFN- γ ELISpot assay and CTL assay. We observed that Ad- Δ B7/IL12-IL18 induced significantly higher T cell-mediated anti-tumor effect than its cognate controls, Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL12, and Ad- Δ B7-IL18. Furthermore, immunohistochemical studies demonstrated robust CD4⁺ and CD8⁺ T-cell infiltration in these mice compared to the Ad- Δ B7, Ad- Δ B7-IL18, or Ad- Δ B7-IL12-treated subjects. These data indicate that oncolytic adenovirus-mediated IL-12 and IL-18 gene transfer provides a potential therapeutic strategy for the management of neoplasia.

Key Words : cancer immunotherapy, Ad- Δ B7, IL-12, IL-18