

분비 가능 삼형체 TRAIL을
발현하는 종양 선택적 복제가능
아데노바이러스에 의한
항종양 효과 분석

연세대학교 대학원

의 과 학 과

정 성 미

분비 가능 삼형체 TRAIL을
발현하는 종양 선택적 복제가능
아데노바이러스에 의한
항종양 효과 분석

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2007년 12 월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

정 성 미

정성미의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2007년 12 월

감사의 글

“ 사람이 마음으로 자기의 길을 계획할지라도

그 걸음을 인도하는 자는 여호와시니라 ” 잠언 16:9

하나님의 인도하심에 따라 무사히 석사과정을 마치게 해 주심에
하나님께 무한한 감사와 영광을 드립니다 - 아멘.

“ 졸업 축하해”

본 심사를 마치고, 환하게 웃으시며 졸업 축하한다는 윤채옥 선생님의 말씀 한마디에 실험실에서 보냈던 2년이란 시간 동안의 모든 일들이 파노라마처럼 머릿속을 살며시 스치고 지나갔습니다. 학부를 마치고 과학에 대한 강한 열정과 자신감 하나 가지고 대학원 생활에 임하면서 생각보다 쉽지 않은 석사 생활에 많은 슬럼프를 겪고 눈물 흘리기도 했지만 앞서나간 선배들의 모습을 보면서 힘을 얻고 다시 오뎅이처럼 일어설 수 있었습니다. 하지만 여전히 많이 부족한 제가 논문의 앞표지를 장식할 감사의 글을 쓰려고 이 자리에 앉으니 부끄럽기만 합니다. 모든 일의 끝자락에 다다르면 그 동안 나의 노력에 대한 자부심과 성취감에 만족하기 보다는 왜 항상 부족한 것들에 대한 아쉬움이 더 크게 느껴지는지요... 하지만 아쉬움은 있을지언정 후회는 없는 석사 생활이었다는 것은 자부할 수 있을 것 같습니다. 왜냐하면, 가족과도 같은 소중한 인연을, 이 곳에서 얻었으니까요...

자식을 기르시는 어머니의 마음으로 인생의 큰 가르침을 주신 존경하고 사랑하는 우리 윤채옥 선생님, 항상 남을 먼저 배려하고 이해하려고 노력하라는 선생님의 귀한 가르치심을 마음깊이 새기고 사회에 나

가 내가 놓여져 있을 곳이 나로 인해 더욱더 밝게 빛날 수 있도록 노력하겠습니다.

바쁘신 와중에도 학생들의 작은 것까지도 관심 가져 주시고 챙겨주시는 다정하신 우리 김주향 선생님, 선생님의 백만 불짜리 웃음소리에 그 동안의 무거웠던 어깨의 짐들을 내려놓을 수 있었고, 데이터 발표 시간이면 냉철한 선생님의 평가로 인해 저희들이 더욱 발전할 수 있었습니다.

또한 발표를 준비하면서 미흡했던 부분들도 너그럽게 이해해주시며 끝까지 진심어린 조언을 통해 논문이 잘 완성되기까지 많은 도움을 주신 김건홍 교수님, 이 모든 분들께 모든 것에 있어서 헤아릴 수 없을 만큼 정말 감사드립니다. 그리고 타고난 미소로 못 여성들의 마음을 사르르 녹이시는 옆집 오빠 같은 손주혁 선생님, 연구에 대한 불타오르는 열정이 존경스러운 조병철 선생님, 친언니같이 만나면 항상 마음편한 최혜진 선생님께도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

석사 과정 동안에 저의 모든 희로애락을 함께한 소중한 우리 실험실 식구들의 많은 도움이 있었기에 지금의 제가 있을 수 있는 것 같습니다. 지금은 먼 곳에서 꿈을 이루어 나가고 계시는 암연구소의 영원한 전설이자 진정한 최고의 리더이셨던 재성선배님, 공부, 연애, 놀기 뭐하나 빠짐없이 다 잘하는 그리운 나의 사부 윤아 언니, 누구에게나 배려하려는 마음이 고마운 진선언니, 도움을 청하면 항상 가제트 만능팔을 내미시는 김인욱 선생님, 귀찮을 것 같은 질문에도 늘 웃으며 꼼꼼히 대답해 주는 성실한 지영언니, 실험실의 작은 일에도 꼼꼼히 신경 쓰는 만언니 같은 경주언니, 함께하면 즐겁고 마음 따뜻한 의리파 아름언니, 어린 나의 투정을 말없이 잘 받아준 나만의 카운셀러 민정언니, 내가 챙기지 못하는 것까지 신경 써서 잘 챙겨주는 세심한 평환오빠, 자신을

희생하며 실험실 일에는 늘 앞장서는 모든 일에 열심인, 모범적인 선배 일규오빠, 실험실의 애교 등이 지훈오빠, 엉뚱, 발랄, 쾌활한 예의바른 트로트보이 송남오빠, 얼굴 한 번 찡그린 적 없는 항상 밝고 긍정적인 곰돌이 엄마 정선언니, 후배에 대한 배려심이 깊고 몸만큼이나 마음 넓은 실험실의 하숙생 오준오빠, 모든 것을 믿고 의지 할 수 있었던 믿음의 선배 민주언니, 실험실에 갓 입학해서 설레임과 열정으로 가득 찼을 수다지성, 양파연아, 듬직혜원, 그리고 말없이 조용히 우리 뒤편에 서서 실험실을 이끄는 두 기둥 같은 존재인 영미언니와 선아, 힘들 때마다 전적으로 나의 편이 되어 주고 늘 웃음을 잃지 않도록 도와준 나의 소중한 친구들 서윤이, 은미, 연숙이, 지영이, 이 모두에게 감사의 마음을 전합니다.

그리고 마지막으로 자식을 위해 모든 것을 아끼지 않으시고 헤아리지 않으시고 베풀어주시기만 사랑하고 존경하는 우리 부모님, 혹여 자식 공부하는데 조금이라도 신경 쓰일까봐 전혀 내색하지 않으시고 홀로 모든 힘든 일을 말없이 감당하시는 아버지, 밤 늦은 시간에 돌아오는 자식 걱정해 항상 불을 밝히고 기다려주시며, 기도로써 지친 우리를 일으켜 세워주시는 든든한 버팀목이 되어주시는 우리 어머니, 그리고 장남으로서 집 안의 모든 일을 척척 해결해 나가고 늘 집안의 자랑거리인 자랑스러운 우리 오빠에게, 저에게 항상 따뜻한 울타리가 되어주어 감사하고, 사랑한다는 말씀 전해 드리고 싶습니다.

마지막으로 알게 모르게 저의 앞뒤 좌우에서 도와주신 모든 분들께도 감사의 말씀드리며 꼭 보답하리라 다짐하겠습니다.

저 자 씀

차 례

그림 및 표 차례	iv~vi
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 대상 세포주 및 세포 배양	8
2. 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출	8
3. 저산소조건 처리	10
4. TRAIL 단백질 발현 양상 규명	10
5. 아데노바이러스의 증식 및 세포 살상능 검증	11
6. MTT assay	12
7. 전자현미경(TEM)을 통해 살펴본 세포 형태	12
8. TUNEL assay를 이용한 세포고사 관찰	13
9. Propidium iodide(PI) 염색을 통한 세포고사 관찰	14
10. 아데노바이러스의 생산량 비교	14
11. 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증	14
12. 종양 조직 내의 아데노바이러스의 증식 및 세포고사 유도 검증	15

III. 결과	17
1. HRE 인핸서와 변형된 mTERT 프로모터에 의해 복제가 조절되며, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 제작 및 TRAIL의 발현 양상 규명	17
2. HRE 인핸서와 변형된 mTERT 프로모터에 의해 복제가 조절되며, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 비교 검증	19
3. 재조합 아데노바이러스에 감염된 암세포의 전자 현미경적 소견	25
4. 재조합 아데노바이러스들의 세포 사멸 기전 검증	
가. TUNEL assay를 이용한 세포 사멸 검증	27
나. PI 염색과 유세포 분석을 통한 세포 사멸 검증	30
5. 정상산소조건과 저산소조건 처리를 통한 재조합 아데노바이러스의 생산량 비교	33
6. HRE를 포함하고, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스들의 생체 내 항종양 효과 비교 검증	34
7. TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰	37
IV. 고찰	40
V. 결론	44

참고문헌45

영문요약49

그림 차례

Figure 1. Schematic representations of selectively replication-competent adenoviral vectors	17
Figure 2. Quantity of TRAIL secreted by U87MG cells infected with Ads	18
Figure 3. Cell killing effect of selectively replicating-competent adenoviruses <i>in vitro</i> in normoxia and hypoxia.....	21
Figure 4. Enhanced cancer cell killing effect of selectively replication-competent adenovirus	23
Figure 5. Electron micrographs of uninfected and infected U87MG cells with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11, or Ad-YKC11-stTRAIL	26
Figure 6. <i>In vitro</i> TUNEL assay in U87MG cells and in U251N cells	29
Figure 7. Efficient induction of apoptosis of TRAIL	

.....	32
Figure 8. Quantification of viral production after treatment with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL	34
Figure 9. Suppression of tumor growth by oncolytic adenoviruses expressing TRAIL	36
Figure 10. Immunohistochemistry of U87MG xenografts treated with PBS, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL	39

표 차례

Table 1. The mean percentage of subG1 induced by each treatment	30
Table 2. The mean percentage of apoptotic cells induced by each treatment	32

국문 요약

분비 가능 삼형체 TRAIL을 발현하는 종양 선택적 복제가능 아데노바이러스에 의한 항종양 효과 분석

복제가능 바이러스 벡터를 사용함으로써 성공적인 암 치료를 위해서는 바이러스에 감염된 세포에서부터 감염되지 않은 세포로 효과적인 바이러스 전달 능력에 달려있다. 최근에는 높은 역가의 복제가능 아데노바이러스를 사용함에도 불구하고 임상 실험에서는 제한적인 성공률을 보이고 있다. 이러한 결과의 원인 중 한 가지로는, 암세포의 빠른 성장 속도로 인해 암 조직 내부로 산소공급이 원활하지 못하면서 산소부족현상(hypoxia)을 겪게 되고, 바이러스 단백질의 발현이 감소하면서 결과적으로는 바이러스의 복제가 감소되어지기 때문이다. 이러한 제한점을 극복하기 위해 본 연구에서는, 암세포의 산소 부족 현상에서 활성이 증가하는 인핸서인 HRE를 이용하여 오히려 바이러스 복제 증가되도록 유도하였다. 또한 강력한 세포고사 유도인자인 stTRAIL을 종양세포에 선택적으로 복제 가능한 아데노바이러스에 삽입하여, 암세포 특이적이고 지속적인 TRAIL의 발현과 분비에 의해 증가된 항종양 효과를 규명하고자 하였다. 이에 본 연구에서는 먼저, TRAIL을 포함하도록 제작되어진 바이러스에서 정상산소조건과 저산소조건 모두에서 TRAIL의 발현이 효과적으로 이루어지는 것을 관찰하였다. 종

양 선택적 복제 가능 아데노바이러스의 세포 살상능을 비교 검증할 수 있는 CPE assay와 MTT assay를 통하여 저산소조건에서 바이러스의 복제가 증가될 수 있도록 제작되어진 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL가 Ad-Rb7 Δ 19에 비해 세포 살상능이 우수함을 확인할 수 있었다. 저산소조건에서 향상된 세포 살상능이 HRE에 의한 바이러스 복제 증가로 인한 것임을 바이러스 생산량 확인 실험을 통해 관찰할 수 있었다. 또한 TRAIL에 의한 세포고사를 검증하고 정도를 비교하기 위해 TENUL assay와 PI staining을 통해 암세포 살상능이 월등히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Ad-YKC11-stTRAIL을 통한 이러한 암세포 살상능의 상승작용은 인체 뇌암 세포주 U87MG를 통해 생체 내 항종양 실험에서도 확인 되었다. 결론적으로, 이들 결과들을 통해 산소 부족 환경에서도 바이러스의 복제가 감소하지 않고 오히려 증가함으로써 바이러스 증식에 따른 세포고사와 TRAIL에 의한 세포고사를 함께 유도할 수 있어, 항종양 효과를 더욱 개선시킬 수 있음을 의미한다. 이는 결과적으로 항암치료에 있어서 화학요법치료와 방사선요법치료를 통해서도 극복할 수 없었던 암 조직내 산소부족환경에서 항암치료에 대한 저항성을 극복할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

핵심되는 말: 복제가능 아데노바이러스, 산소부족환경, TRAIL, 세포고사, 암유전자치료

분비 가능 삼형체 TRAIL을 발현하는 종양 선택적 복제가능 아데노바이러스에 의한 항종양 효과 분석

<지도교수 윤 체 옥>

연세대학교 대학원 의과학과

정 성 미

I. 서론

악성 종양의 성장은 영양분과 산소공급에 의해 크게 좌우된다. 특히, 산소는 암세포에서 적절한 에너지 대사를 위해 절대적으로 필요한 물질이다. 일반적으로 암세포는 급속한 성장 속도로 인하여 종양의 중심부에 쉽게 산소부족현상(hypoxia)이 나타난다. 암세포가 성장하면서 나타나는 산소부족현상은 암 치료와 암 진행에 있어서 매우 중요한 요소이다. 고형암내에서 산소부족지역은 암세포의 생존과 전이를 위한 운동성 그리고 혈관형성을 촉진시킴으로서 암의 진행에 있어서 유리하게 작용하게 된다²². 또한 최근 연구에 의하면 암세포가

산소부족현상을 겪게 되면 항 세포고사 물질의 발현이 증가하여 세포 고사가 억제 되고, 또한 방사선치료요법과 항암화학치료요법에 대한 내성을 가지게 된다고 보고 되고 있다^{2, 10}. 암세포가 가지는 이러한 특성으로 인해 야기되는 항암치료의 한계점을 극복하기 위해 새로운 항암치료법의 개발이 시급한 현실이다.

따라서 암 치료를 위한 효과적인 치료법으로 현재 바이러스를 이용한 방법들이 많이 개발되고 있다. 대표적으로 현재 증식 가능 아데노바이러스를 이용한 임상시험들이 활발히 진행되고 있다³⁻⁷. 재조합 아데노바이러스는 세포의 분열상태 여부에 관계없이 다양한 종류의 세포에 대한 우수한 유전자 전달 효율을 보이며 높은 역가의 바이러스를 쉽게 생산할 수 있고, 쉽게 농축할 수 있을 뿐만 아니라, 생체 내에서도 유전자 전달이 용이하다¹². 또한 암을 유전자 요법으로 치료할 경우, 치료유전자를 장기적 혹은 지속적으로 발현할 필요가 없으며, 치료용 바이러스 자체에 의해 유도되는 숙주의 면역반응도 크게 문제되지 않으며 오히려 이점이 될 수 있기 때문에 아데노바이러스가 암 치료용 유전자 전달체로 각광을 받고 있다. 이러한 장점을 바탕으로, 최근에 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 재조합 아데노바이러스를 이용하는 빈도수가 지속적으로 증가하고 있다¹²⁻¹⁵.

특히, 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상하는 종양세포 특이 증식 및 세포살상 재조합 아데노바이러스에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 암세포에서만 특이적으로 증식하여 암세포를 죽일 수 있는 종양 살상 아데노바이러스는 바이러스의 증식으로 일차 감염세포 뿐만 아니라 주변의 종양세포들도 이차적으로 감염할 수 있어 치료효과를 현저히 증대 시킬 수 있으며, 주변의 정상세포에서는 종양 살상 아데노바이러스의 증식이 억제되므로 아데노바이러스

에 의한 독성이 감소되는 이점도 있다. 또한 암 특이적 유전자 조절 부위를 E1 유전자 부위에 삽입하여 암 조직에서만 더욱 선택적으로 증식하도록 제작된 재조합 아데노바이러스도 개발되고 있다. 이에 따라 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 임상 응용 가능성이 점차 증가 할 것으로 예상되고 있다^{16, 17}.

암세포에서 나타나는 산소부족환경 하에서 HIF-1 α 와 p21^{cip1}가 활성화되며, 그 발현이 증가함으로써 세포 주기가 억제됨에 따라 자신의 모든 생활사를 숙주세포에 의존적으로 살아가는 바이러스의 증식이 억제되는 현상이 나타나는데, 이것이 바이러스를 이용한 지속적인 암 치료에 대한 제한점으로 나타나고 있다⁸. 그러나, 이를 역으로 사용하여 산소부족에 의해 조절되는 유전자들의 프로모터나 인핸서를 이용하면 암세포에 대한 특이성을 보다 증가시킬 수 있을 것이다. 이러한 사실을 바탕으로 본 연구에서는, 암세포 조직 발달을 위해 필요한 신생혈관 생성에 관여하는 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 인핸서 부분인 hypoxia-responsive element(HRE)를 이용하여 암세포에서만 특이적 활성을 가진 벡터를 개발하고자 한다. Human VEGF 유전자의 인핸서 부분인 HRE는 산소부족에 의해 조절되는 몇몇 유전자들(예. Epo, VEGF, GAPDH)의 코딩부위에도 위치하며, 산소수준이 아주 낮을 때만 단백질의 생산을 시작하도록 할 수 있는 조절부위이다. 보고에 의하면, 고형암 특이적 환경인 저 산소 조건에서 높은 수준으로 발현되는 human VEGF 프로모터 5' 인접부위 중 HRE(-1.2 ~ -0.8kb) 부위를 암세포 특이적 promoter에 연결시켰을 때 *in vitro* 와 *in vivo* 모두에서 암 특이적이고 강화된 항암 활성을 나타내었다¹⁸. 이것은 고형암의 특징인 저산소증 상태에서 특이적으로 활성화될 수 있는 인핸서와 암세포 특이적 프로모터를 결합

시키는 방법을 통해 암세포 특이성을 증가시킬 수 있음을 보여준다.

유전자 치료를 통한 항암 치료를 하는 방안으로, 암세포 특이적인 프로모터에 의해 바이러스의 복제가 조절되어 암 세포만을 선택적으로 사멸시킬 수 있는 종양 선택적 살상 바이러스를 이용하는 방법과 함께, 암세포 내에 세포고사를 유도 할 수 있는 치료 유전자를 전달시킬 수 있는 방안도 있다. 세포 고사를 유도하는 여러 가지 자살 유전자 중 본 연구에서는 TNF family에 속하는 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)을 이용하고자 한다. TRAIL이 다양한 범위의 암세포에 세포고사를 유발하지만 정상적인 세포에는 세포독성을 보이지 않는다는 점에서 TRAIL이 새로운 생물학적 항암제로 적용할 수 있다는 가능성을 제공해 주고 있다. 또한 death receptor를 통한 세포고사는 p53과 무관하게 암세포에 세포고사를 유발할 수 있는 장점이 있다²⁰. TRAIL의 동형 삼중체 구조는 TRAIL의 세포고사 기능을 위해 요구되는 것으로, 3개의 TRAIL 분자에 의해 형성된 포켓 안에는 TRAIL의 cysteine과 상호 작용하는 zinc 이온에 의해 안정화 되게 된다. 그러나 zinc 이온의 제거와 cysteine의 산화로 인해 TRAIL의 동형 삼중체 구조가 해체되면서 TRAIL의 세포고사 기능이 현저히 약화되게 된다. TRAIL의 이러한 구조적 특성을 바탕으로 하여 인위적으로 trimerization domain을 첨가시킴으로 삼중체를 보다 지속적으로 안정하게 유지되어서 세포고사 기능을 유도할 수 있도록 하며, secretion signal domain을 첨가하여 안정한 구조를 가지는 TRAIL을 세포 밖으로 분비를 유도함으로 좀 더 증가된 세포고사능을 나타낼 수 있도록 secretable trimeric TRAIL(stTRAIL)이 제작되어 졌다²¹.

따라서 본 연구에서는 강력한 세포살상 유도인자인 stTRAIL을

종양 세포 선택적으로 복제 가능한 아데노바이러스에 삽입하여, 암세포 특이적이고 지속적인 TRAIL의 발현과 분비에 의해 항종양 효과를 증대시킬 수 있는지를 검증하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포 배양

본 연구에서 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주(U87MG, U343, U251N)와 폐암 세포주(A549, Sk-Lu I), 간암 세포주(Hep1), 그리고 인체 정상 세포주인 섬유아 세포주(WI38, BJ, IMR90)등을 사용하였으며, 모두 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 HEK293 세포주(ATCC)를 아데노바이러스 생산 세포주로 사용하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아 혈청 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 이 포함된 DMEM 배양액으로 항생제 100 U/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin (Gibco-BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C의 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

6개의 HRE 인핸서를 포함하며 5MMTERT프로모터에 의해 E1A 유전자의 발현이 조절되는 아데노바이러스를 제작하기 위하여 먼저 아데노바이러스 전체 유전자를 주형으로 하여 Rb7△19/E1B55 부위를 polymerase chain reaction(PCR)으로 증폭하여, 원하는 유전자 부위를 얻는다. Sense primer로 5'-GCGGAATTCACTCTTGAGTGC CAGCGAGTA-3'와 antisense primer로 5'-CGCGGATCCACATTT CAGTACCTCAATCTG-3'을 사용하였으며, 클로닝 상의 편의를 위

해 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소 부위를 삽입하였다. 생성된 PCR 산물을 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단한 후, pBluescript II SK(+)벡터에 삽입하고, 본 연구실에서 제조한 5MMTERT 프로모터를 포함하고 있는 벡터를 *ClaI*과 *EcoRI*으로 절단한 후, 삽입하였다. 마지막으로, 6개의 HRE 서열을 첨가하기 위해 *XhoI*과 *SaI*으로 절단하여 앞서 제작된 pBluescript II SK(+)/5MMTERT/Rb7 Δ 19 벡터로 전달한다.

이렇게 제작된 pBluescript II SK(+)/HRE₆5MMTERT/Rb7 Δ 19로부터 재조합한 인핸서와 프로모터를 E1 셔틀벡터인 p Δ E1sp1B에 삽입하기 위해 *XhoI*과 *BamHI*으로 절단하여 삽입한다. 상기의 방법으로 제작된 E1 셔틀 벡터를 *XmnI* 제한효소로 절단한 후 *BstBI* 제한효소 처리로 단일가닥이 된 아데노바이러스 *dB24BstBI* 과 함께 대장균 BJ5183에 동시에 형질 전환시켜, 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도한다. BJ5183에서 획득한 재조합된 플라스미드 DNA는 다시 DH5a 대장균에 형질 전환시켜 DNA를 증폭시켰다. DH5a 대장균으로부터 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하고 *HindIII* 제한효소로 처리하여 각각의 재조합된 아데노바이러스 유전체들을 선별하였다.

stTRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스를 제작하기 위하여 pGt2/stTRAIL 벡터를 *BglI*로 절단하여 stTRAIL 유전자를 분리해내고 이를 *BamHI*으로 절단한 pSP72 Δ E3 셔틀 벡터에 삽입하여 pSP72 Δ E3/stTRAIL 벡터를 제작하였다. 제작된 E3 셔틀 벡터를 *XmnI* 제한효소로 절단한 후, *SpeI* 제한효소 처리로 단일가닥이 된 YKC11과 함께 대장균 BJ5183에 동시에 형질 전환시켜, 유전자 상동 재조합을 유도한다. BJ5183에서 획득한 재조합된 플라스미드 DNA는 다시 DH5a 대장균에 형질 전환시켜 DNA를 증폭시켰다. DH5a 대장

균으로부터 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하고 *Hind*III 제한 효소로 처리하여 각각의 재조합된 아데노바이러스 유전체들을 선별하였다.

재조합된 각각의 아데노바이러스 플라스미드를 *Pac*I로 절단한 뒤, HEK293 세포주에 형질 전환하여 Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL 아데노바이러스를 생산하였다. 이들 아데노바이러스들은 HEK293 세포 주에서 증식시켜 CsCl gradient로 농축하여 순수 분리하고, limiting titration assay 또는 spectrophotometer로 바이러스의 역가(plaque forming unit; PFU)를 결정하였다.

3. 저산소조건 처리

HRE에 의해 저산소조건에서 바이러스의 복제능이 증가되는지 관찰하기 위해, 본 연구에서 진행한 실험 과정 중 모든 암 세포주와 정상 세포주에 각각의 재조합 바이러스들을 처리하고 바로 저산소조건을 처리해 주었다. 저산소조건은 저산소 가스(1% O₂, 5% CO₂, and 94% N₂)가 유입될 수 있도록 유출입관이 삽입되어 있는 밀폐된 37°C 항온 배양기를 사용하였다.

4. TRAIL 단백질 발현 양상 규명

Ad-YKC11-stTRAIL의 세포감염에 따른 TRAIL의 발현 정도를 측정하기 위하여 ELISA를 시행하였다. U87MG 세포주(8×10^5 개)를 100 mm³ dish에 분주한 다음, 0.5 multiplicity of infection(MOI)의 Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11 또는 Ad-YKC11-stTRAIL을 각각 감염시키고 24 시간 후에 배지를 수득하였다. 수득된 세포 배양액 또는 순

차적으로 희석한 TRAIL 재조합 단백질을 TRAIL을 특이적으로 인지하는 항체로 코팅된 96-well plate(Biosource International, Inc. California, USA)에 각각 넣고, 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 세척하였다. 이 후, biotin이 부착된 항체를 plate에 넣은 뒤 실온에서 1시간 동안 반응시키고, streptavidin-HRP 용액을 세척한 plate에 넣어 30 분간 발색시킨 뒤 microplate reader(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)로 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 450 nm에서 각각 측정하였으며, 표준 용량곡선에 따라 배양액 중에 발현된 TRAIL의 양을 산출하였다.

5. 아데노바이러스의 증식 및 세포 살상능 검증

암세포 및 정상 세포에 대한 아데노바이러스의 세포 살상능을 검증하기 위하여, 인체 뇌암 세포주(U87MG, U343, U251N)와 폐암 세포주(A549, Sk-Lu I), 간암 세포주(Hep1), 그리고 인체 정상 세포주인 섬유아 세포주(BJ, IMR90)등을 24-well plate에 각각 분주하고 24 시간 후 각각의 재조합 아데노바이러스를 여러 역가의 MOI로 처리하였다. 감염시킨 바이러스들 중 한 바이러스가 가장 낮은 역가에서 감염세포를 거의 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet (50% methanol) 용액으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 세포 살상능을 비교 분석하였다.

6. MTT assay

복제가능 아데노바이러스 감염에 따른 세포 살상능을 정량화하

기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2mg/ml) assay를 수행하였다. 암 세포주와 정상 세포주들을 24-well plate에 각각 70~80% confluency로 분주하고 24시간 후 각각의 재조합 아데노바이러스를 다양한 MOI로 처리하였다. 바이러스 감염 후 일정 시간이 지나고 나서, 세포의 생존율을 측정하기 위해 배지를 제거한 후, MTT 용액을 각 well 당 250 μ l을 넣고 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 4 시간동안 반응시킨 후 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 plate well에 1 ml의 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, DMSO로 용출된 상층액을 microplate reader(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다. 세포의 생존율은 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 색소 흡수률} - \text{기준 색소 흡수률}}{\text{대조군의 평균 색소 흡수률} - \text{기준 색소 흡수률}} \times 100$$

7. 전자현미경을 통해 살펴본 세포 형태

인체 뇌암 세포주인 U87MG를 60 mm³ dish에 80% confluency로 분주하고 각각의 바이러스들을 1 MOI로 감염시켰다. 36시간 후 모든 세포들을 획득하여 원심분리하고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 2회 세척하였다. 감염된 세포들을 0.1 M PBS 완충액(pH 7.4)으로 조정된 Karnovsky 고정액(2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.5% CaCl₂)으로 6시간 이상 전 고정한 후 0.1 M cacodylate-HCl(pH 7.4)에 용해시킨 1% OsO₄에 2시간 후 고정하였다. 표본을 에탄올로 탈수한 뒤 Epon에 포매하고 절편을 만들어 전자

현미경으로 관찰하였다.

8. TUNEL assay를 이용한 세포고사 관찰

각 재조합 아데노바이러스의 암세포에 대한 세포고사 유도능력과 TRAIL을 발현하는 Ad-YKC11-stTRAIL에 의한 세포고사 정도를 비교하기 위하여, U87MG 세포주(7×10^4)와 U251N 세포주(2×10^5)를 2-well chamber slide에 분주하고 각각의 바이러스들을 1 MOI로 감염시켰다. 48시간 후 배지를 제거하고, ApopTag Kit(Intergen, Purchase, NY)를 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 TUNEL assay를 수행하였다. 양성 대조군으로는 camptothecin-11(CPT)을 1 μ M로 48시간 동안 처리된 세포를 사용하였다. 발색여부를 확인하기 위해 peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 diaminobenzine(DAB; DAKO, Carpinteria, CA)과 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 증류수로 3회 세척하였다. 세포질을 관찰하기 위해 0.5% methyl green으로 다시 10분간 염색하고 세척한 후 xylene에 슬라이드를 완전히 적시고 Permount(SP15-500; Fisher scientific, Fair Lawn, NJ)로 mount하여 현미경으로 관찰하였다. 현미경 상에서 두 곳 이상의 부위를 무작위로 정하여 전체 세포들 중 염색된 세포의 비율을 산출하였다.

9. Propidium iodide(PI) 염색을 통한 세포고사 관찰

재조합 아데노바이러스와 TRAIL 발현에 의한 세포 고사 유도 정도를 비교하기 위해, U87MG 세포주(8×10^5)를 100 mm³에 분주하

고 24시간이 지난 후 아데노바이러스를 2 MOI로 감염시켰다. 양성 대조군으로 1 μ M CPT와 음성 대조군으로는 PBS를 처리하였으며 48시간 후 감염된 세포들을 회수하여 PBS로 2회 세척하였다. 70% 에탄올로 4°C에서 24시간 이상 고정시킨 후 PI/RNASE staining buffer(BD Bioscience Pharmingen)를 500 μ l 넣고 4°C에서 15분간 반응시킨 뒤 유세포 분석을 시행하였다.

10. 아데노바이러스의 생산량 비교

재조합 아데노바이러스들의 암 세포내 바이러스 생산량을 비교하기 위해 6-well plate에 1×10^5 개의 U87MG 암 세포주를 분주하고 24시간 후 각각의 아데노바이러스들을 1 MOI로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 3일 째에 세포와 배지를 각각 회수하였다. 감염된 세포는 얼림과 녹임을 3회 반복하여 바이러스를 방출시켰으며, 전체 바이러스의 역가는 HEK293 세포주에서 limiting titration assay를 수행하여 산출하였다.

11. 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증

생후 6 ~ 8주 정도 경과된 수컷 누드마우스(BALB/c-nu)를 사용하여 [Shizuoka Laboratory Center (Japan SLC Inc, Tokyo, Japan)] 실험을 진행하였다. 누드마우스의 복벽에 1×10^7 개의 U87MG 세포주를 피하 주사하였다. 폴리카보네이트 케이지에 5 ~ 6 마리씩 넣어 멸균된 수돗물과 사료(중앙실험동물, Seoul, Korea)를 공급하고 가능한 스트레스를 받지 않도록 조용한 분위기의 specific pathogene free room 에서 사육하였다. 모든 동물실험은 연세대학교

의과대학의 동물사육 및 실험관련규칙을 준수하였다. 종양의 용적이 약 100 ~ 150 mm³ 정도 성장하였을 때, 제작한 재조합 아데노바이러스(5 × 10⁷ PFU/30μl)를 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 투여한 후 2일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. 음성 대조군은 PBS를 이용하였고, 바이러스 투여와 같은 방법으로 투여하였다. 종양의 용적은 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정하고, 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

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

12. 종양 조직 내의 아데노바이러스의 증식 및 세포고사 유도 검증

생후 6~8주 정도 경과된 누드마우스(BALB/c-nu)의 복벽에 1×10⁷개의 U87MG 세포주를 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 100~150 mm³ 정도 되었을 때, 5×10⁷ PFU의 Ad-YKC11, 또는 Ad-YKC11-stTRAIL, 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 투여하였다. 마지막 바이러스를 투여한 후 3일경에 종양을 적출하여 10% formalin용액에 고정시킨 뒤 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 4μm 두께로 잘라 슬라이드로 만든 뒤, 이를 xylene, 100%, 90%, 70% ethanol 용액에 차례로 넣어 파라핀을 제거한 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하였다. 아데노바이러스와 TRAIL의 발현에 의해 종양 내 일어난 세포고사 여부도 동일한 부위의 파라핀 블록 슬라이드를 이용하여 관찰하였다. ApopTaq Kit을 이용해 제조회사가 제시한 방법에 따라 TUNEL assay를 시행하였으며, peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 DAB와 반응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 0.5% methyl green으로

10 분간 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 또한 복제 가능 아데노바이러스가 종양 조직 내에서 활발히 복제를 되어지는지 검증하기 위해 아데노바이러스의 E1A 부위와 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 형광면역염색을 시행하였다. 파라핀이 제거된 종양 조직 슬라이드를 3% H₂O₂용액에서 10분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시키고, blocking solution 으로 30분간 비특이적인 항체 반응이 일어나지 않도록 한 후, E1A의 일차 항체(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)로 hybridization시켰다. fluorescent dye가 결합된 이차 항체 Alexa Fluor[®]488(Invitrogen, USA)로 hybridization시킨 뒤 E1A의 발현 양상을 규명하였다.

III. 결과

1. 산소부족환경에서 인핸서 HRE에 의해 바이러스의 복제가 조절되며, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 제작 및 TRAIL의 발현 양상 규명

암세포의 저산소조건에서 복제능이 선택적으로 증가하는 아데노바이러스를 제작하기 위해, 아데노바이러스에 내재적으로 존재하는 E1A의 프로모터를 변형된 TERT 프로모터로 치환, 삽입하여 E1A의 발현이 조절되도록 하였고, upstream에 산소 농도가 낮아지면 발현이 증가하는 HIF-1 전사조절인자가 부착할 수 있는 HRE 인핸서를 삽입하였다(Fig. 1). 또한, 암세포의 살상능을 증가시키기 위하여 E3 부위에 세포 고사를 유도하는 분비 가능 삼형체 TRAIL을 삽입하였다(Fig. 1).

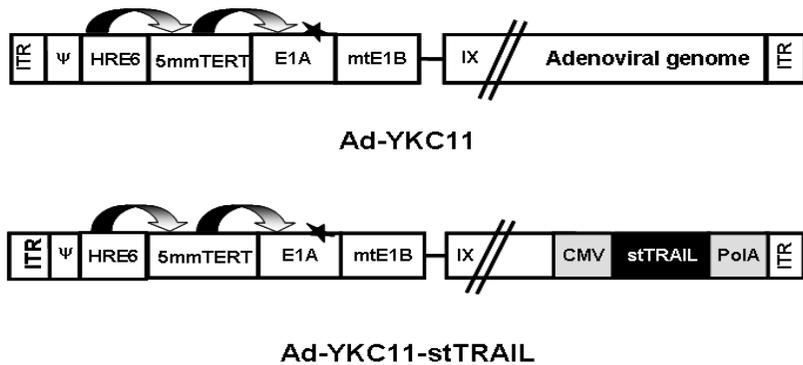


Figure 1. Schematic representations of selectively replication-competent adenoviral vectors used in this study. Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL adenovirus express mutated E1A under the

control of 6 copy of HRE and 5MMTERT promoter and lack E1B 19kDa. Ad-YKC11-stTRAIL adenovirus expresses stTRAIL gene in the E3 region of YKC11 adenovirus. (★ denotes the mutation in E1A.)

먼저 제작된 Ad-YKC11-stTRAIL에 의한 TRAIL의 발현 정도를 알아보기 위하여, U87MG 뇌암 세포주에 아데노바이러스(Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL)를 0.5 MOI로 각각 처리하고, 24시간 후에 배지를 회수하여 ELISA를 수행하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이, Ad-YKC11-stTRAIL에 감염된 세포의 경우 정상산소조건에서 3824 ± 108 pg/mL, 저산소조건에서 5712 ± 92 pg/mL로 TRAIL의 발현이 유도되었다. 이러한 큰 발현차이를 나타내는 결과들로부터, TRAIL을 포함하도록 제작된 아데노바이러스의 감염에 의해 TRAIL의 발현이 효율적으로 일어남을 확인 할 수 있었다.

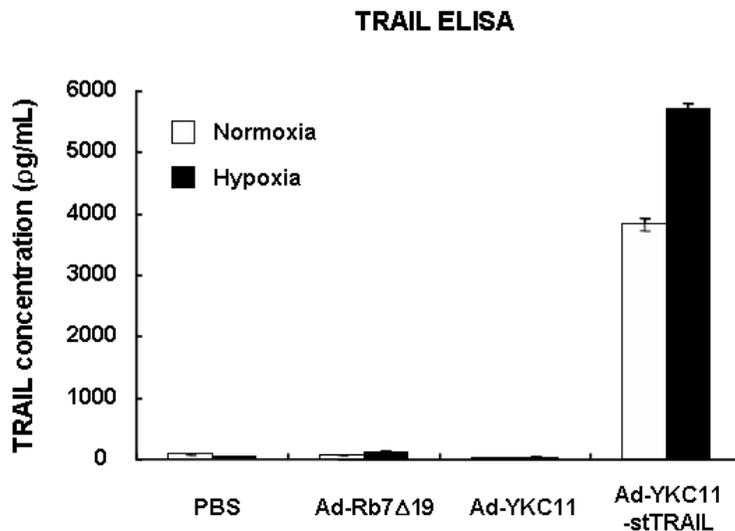


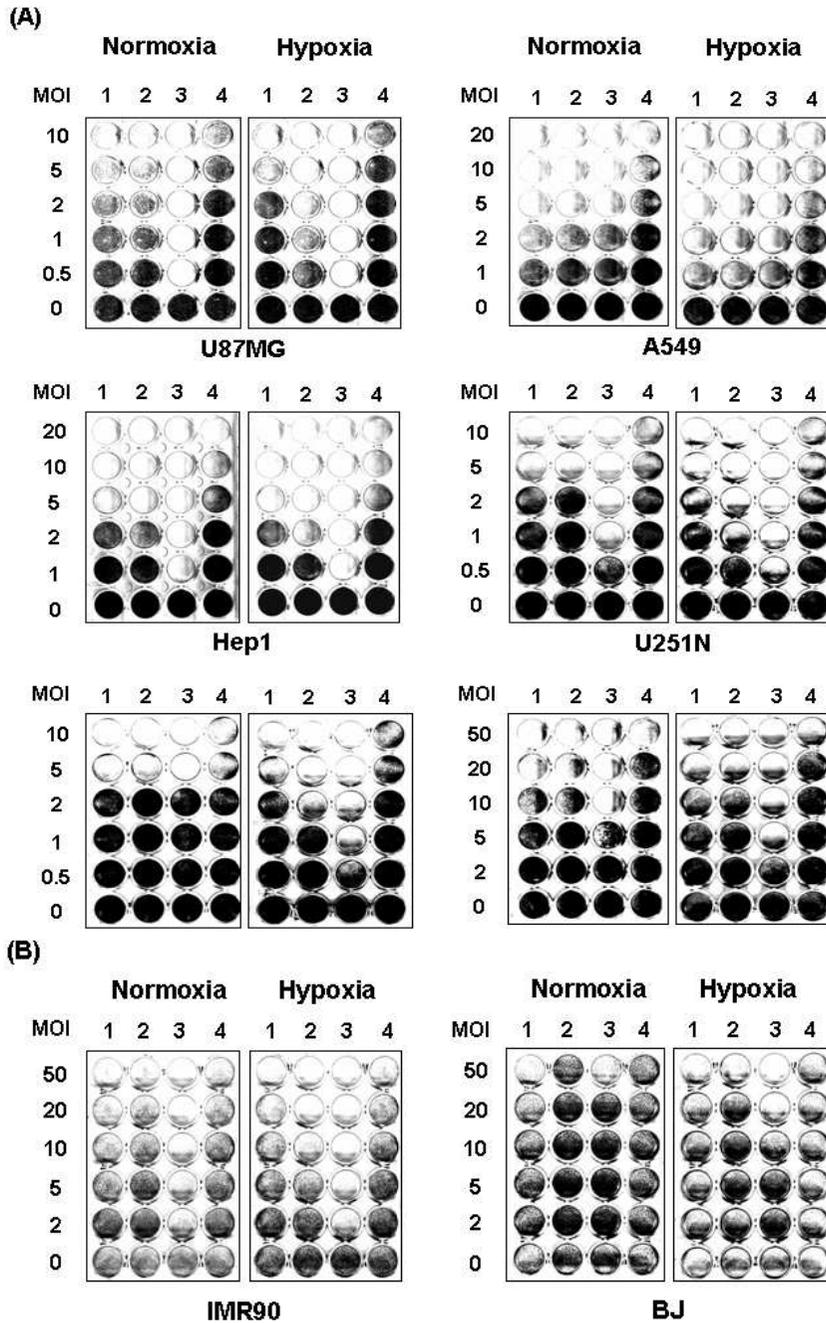
Figure 2. Quantity of TRAIL secreted by U87MG cells infected with Ads. U87MG human glioblastoma cells were treated with PBS (lane 1), Ad-Rb7 Δ 19 (lane 2), Ad-YKC11 (lane 3), or Ad-YKC11-stTRAIL (lane 4) adenovirus at an MOI of 3. The concentration of TRAIL was measured in the culture supernatant at 24 hours after infection by ELISA assay. TRAIL was highly expressed in the stTRAIL gene inserted virus compared to other virus in normoxia condition and hypoxia condition.

2. 산소부족환경에서 인핸서 HRE에 의해 바이러스의 복제가 조절되며, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스의 세포 살상 효과 비교 검증

HRE를 포함하도록 제작된 복제 가능 아데노바이러스와 E3 부위에 TRAIL을 포함하는 복제 가능 아데노바이러스의 정상산소조건과 저산소조건에서 세포 살상능을 비교 검증하기 위하여 여러 종류의 암 세포주와 정상 세포주에 각각의 바이러스를 감염시켜 세포살상 정도를 관찰하였다. 정상산소조건과 저산소조건은 24시간을 주기로 처리하였으며 사용된 인체 암세포 주들로서는 뇌암 세포주(U87MG, U343, U251N), 간암 세포주(SK-Hep1), 그리고 폐암 세포주(SK-LuI, A549)이며, 각각의 세포주에 아데노바이러스를 0.5 ~ 50 MOI로 처리하였다 (Fig. 3). 정상산소조건에서는 모든 암세포 주에서 양성대조군인 Ad-Rb7 Δ 19과 Ad-YKC11간의 세포 살상능이 큰 차이를 보이지 않았고, TRAIL을 발현하는 Ad-YKC11-stTRAIL에서는 U343과 TRAIL에 저항성을 갖는 A549를 제외하고는 TRAIL에 의한 세포 고

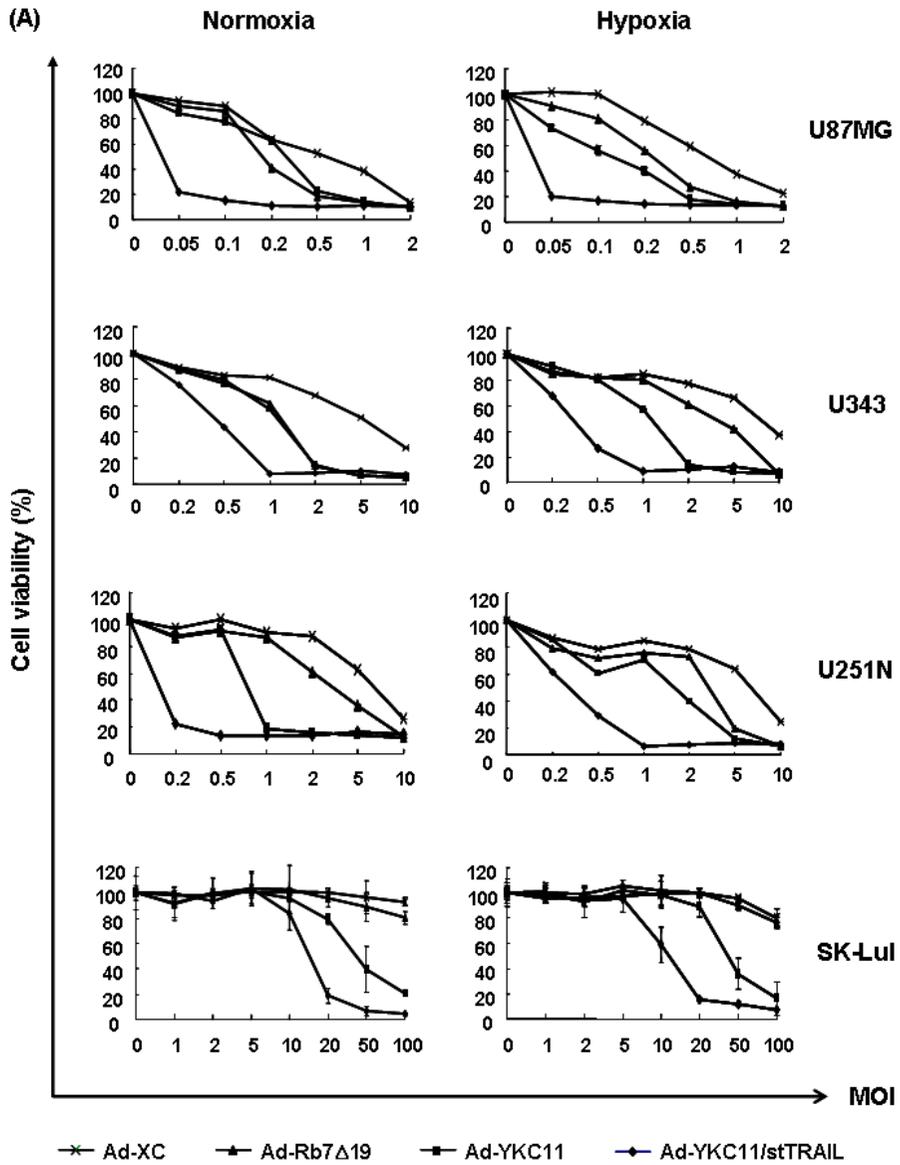
사로 인해 가장 낮은 MOI에서도 세포 살상 효과를 나타내었다. 하지만, 저산소조건을 처리한 실험군에서는 Sk-Lu1을 제외하고는 HRE를 포함하고 있는 Ad-YKC11이 Ad-Rb7 Δ 19에 비해 2 ~5 배 증가된 세포 살상능을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 Ad-YKC11-stTRAIL의 경우도 정상산소조건에서 보다 저산소조건에서 증가된 세포 살상능을 관찰할 수 있었다. 특히 Sk-Lu1과 U343에서는 2배와 4 배 정도 높은 세포 살상 효과를 나타내어 HRE와 TRAIL 발현으로 인해 증가된 종양 세포 살상능을 관찰할 수 있었다. 정상 세포주에서는 정상산소조건에서 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL에 비해 선택성이 약한 Ad-Rb7 Δ 19가 높은 세포 살상능을 보이다가 저산소 조건 하에서는 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL에서 Ad-Rb7 Δ 19에 비해 세포 살상능이 증가하는 것을 보고, HRE의 효과를 다시 검증할 수 있었다.

HRE와 TRAIL 발현에 따른 암 세포 살상능 상승효과를 보다 면밀하게 정량화하기 위해서 다양한 MOI로 아데노바이러스를 처리한 후 한 시점에서 살아있는 세포의 생존율을 측정할 수 있는 MTT 분석을 시행하였다. 각각의 바이러스 감염에 따른 세포 생존율은 실험에 사용한 세포주에서 바이러스를 처리하지 않은 경우의 세포 생존율을 100%로 환산하여 상대 비교하였다. 그 결과 본 실험에 이용된 모든 암 세포주들에서 세포 살상 효과 실험에서와 유사하게 정상산소조건에서 보다 저산소조건에서 Ad-Rb7 Δ 19에 비해 Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL를 처리한 실험군에서 세포 살상능이 크게 증가하였으며, 특히 U87MG의 경우에는 0.05 MOI에서 TRAIL에 의한 세포 살상능이 Ad-Rb7 Δ 19와 Ad-YKC11에 비해 각각 4배, 3배 증가되는 것으로 나타났다.(Fig. 4A).



1. Ad-Rb7 Δ 19 2. Ad-YKC11 3. Ad-YKC11/stTRAIL 4. Ad-XC

Figure 3. Cell killing effect of selectively replicating-competent adenoviruses *in vitro* in normoxia and hypoxia. Monolayer of cells in 24-well plate was treated with different viruses, as indicated. Selectively replication-competent adenovirus, Ad-Rb7 Δ 19 and wild type adenovirus Ad-XC served as controls, respectively. When cells infected with any kind of adenoviruses were completely lysed, cells remaining on the plates were fixed and stained with crystal violet. Representative results are shown. (A) Cancer cells; (B) Normal cells



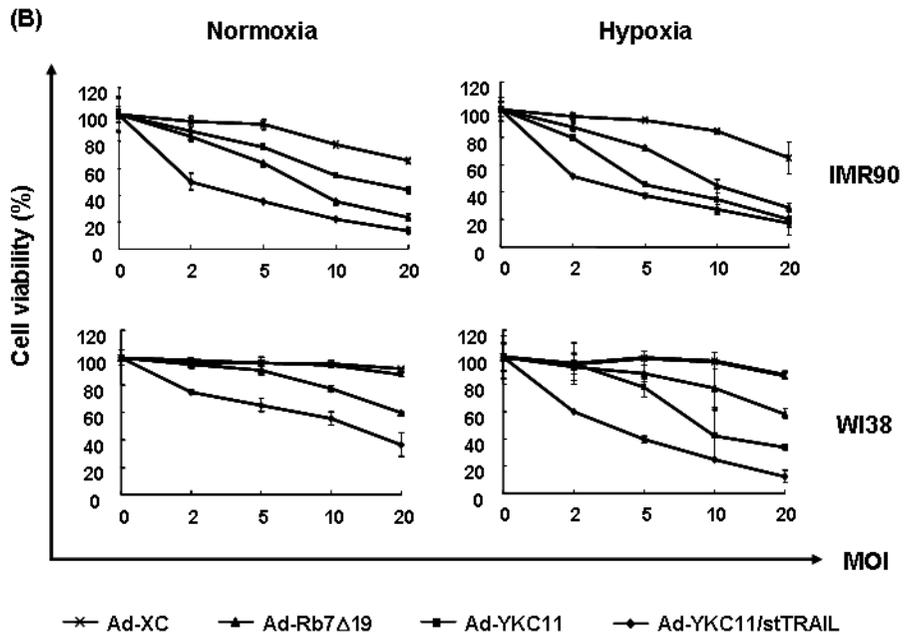


Figure 4. Enhanced cancer cell killing effect of selectively replication-competent adenovirus; Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL expressing stTRAIL. Monolayer of cancer (A) and normal (B) cells was treated with Ad-XC (×), Ad-Rb7Δ19 (▲), Ad-YKC11 (■), or Ad-YKC11-stTRAIL (◆) at the range of 0.05 ~200 MOIs in normoxia and hypoxia. MTT assay was then performed to measure total viable cells. Results are expressed as a percentage of control (untreated cells), and values represent the means SD obtained from replicate determinations.

3. 재조합 아데노바이러스에 감염된 암세포의 전자 현미경적 소견

아데노바이러스와 TRAIL에 의한 세포사를 보다 면밀하게 관찰하기 위하여, Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11, 그리고 Ad-YKC11-stTRAIL 바이러스를 1 MOI로 감염된 U87MG 세포주를 전자현미경으로 관찰하였다 (Fig. 5). 바이러스에 감염되지 않은 U87MG의 핵이나 세포막, 세포 내 다른 소기관들은 정상적인 모양을 갖추고 있었고, Ad-Rb7Δ19와 Ad-YKC11로 감염된 세포는 바이러스의 감염으로 정상 세포에 비해 핵이 비대해졌으며, 바이러스의 복제가 활발하게 이루어져 핵 내에 고루 퍼져있는 반면, 핵막과 세포막은 온전한 것을 관찰할 수 있었다. 이와는 대조적으로 세포고사를 유도하는 Ad-YKC11-stTRAIL로 감염된 세포에서도 염색체의 형태를 알아볼 수가 없고 세포막이 심하게 찢겨져 있는 모습이 관찰되어지는 것으로 보아 TRAIL에 의해 빠른 세포 분해가 일어나는 것을 관찰할 수 있었고, 핵 내에 바이러스의 존재를 통해 복제가 활발히 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

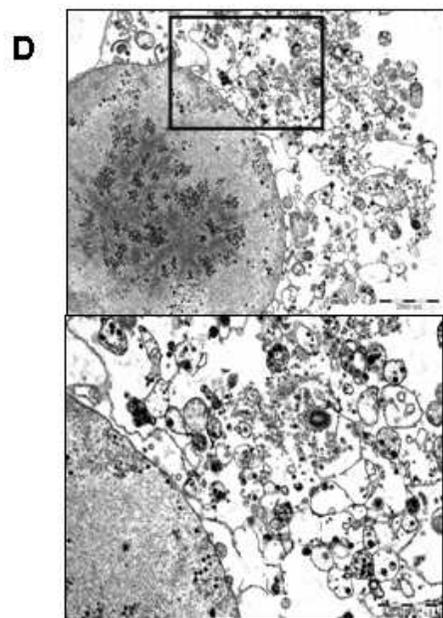
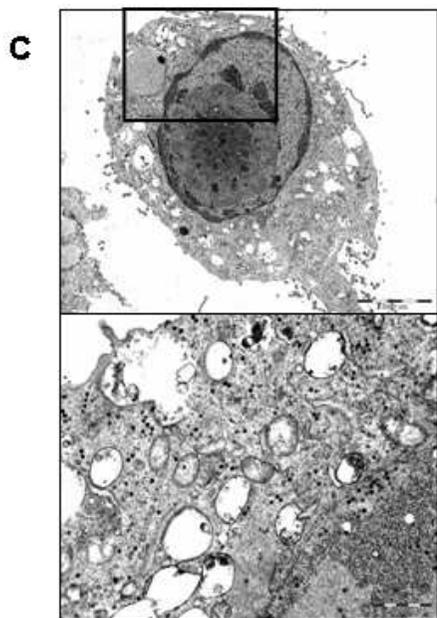
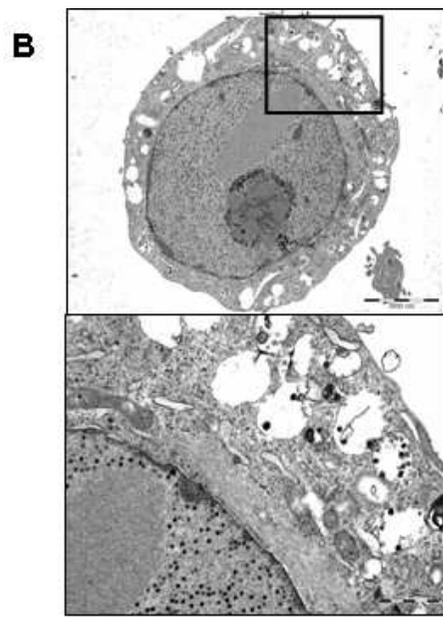
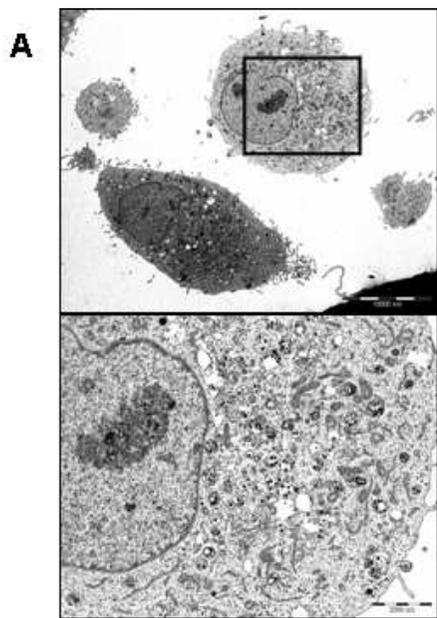


Figure 5. Electron micrographs of uninfected and infected U87MG cells with Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11, or Ad-YKC11-stTRAIL at 36 hours post-infection. Cells were infected at an MOI of 1 as described in Materials and Methods. Representative low power ($\times 5,000$) and high power ($\times 20,000$) images are shown. A. PBS, B. Ad-Rb7Δ19, C. Ad-YKC11, D. Ad-YKC11-stTRAIL

4. 재조합 아데노바이러스들의 세포 사멸 정도 비교와 검증

HRE에 의해 E1A의 유전자 발현이 조절되며, TRAIL을 발현하는 아데노바이러스가 정상산소조건과 저산소조건에서 세포고사를 유도하는 정도를 비교해 보기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다.

가. TUNEL assay를 이용한 세포 사멸 검증

저산소조건에서 HRE에 의한 바이러스 복제 증가와 TRAIL에 의한 세포 고사 유도 능력을 통해 정상산소조건에 비해 세포 고사 진행이 상승적으로 증가하는지를 검증하기 위하여, 초기 세포내고사의 특징인 DNA 절편화를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 시행하였다. U87MG와 U251N 세포주에 1 MOI로 각각의 아데노바이러스를 처리하고 48시간 후 실험을 진행하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이, 양성 대조군으로 상용한 CPT를 처리한 모든 실험군의 경우에 거의 대부분의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 세포고사가 활발히 진행되고 있음을 확인하였다. 정상산소조건과 저산소조건의 결과 비교시, U87MG에서 저산소조건을 주었을 때 CPT와 Ad-Rb7Δ19를

처리한 경우에는 각각의 세포고사율이 18.4% 감소하거나 증가가 없는 반면에 HRE를 포함하고 있는 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL을 처리한 경우에는 정상산소조건에 비해 세포고사율이 10.19%와 40.68%로 증가함을 관찰할 수 있었다. U251N에서도 마찬가지로 저산소조건을 주었을 때 CPT와 Ad-Rb7 Δ 19를 처리한 경우에 각각의 세포고사율이 23.15%, 18.66%로 감소하는 반면 Ad-YKC11-stTRAIL을 처리한 경우에는 정상산소조건에 비해 세포고사율이 3.03% 증가함을 관찰할 수 있었다. 이 결과들을 토대로, 산소 부족으로 인한 세포주기 억제로 일반적인 바이러스들의 복제능이 감소되지만 저산소조건에서 오히려 활성을 가지는 HRE 인핸서를 포함하고 있는 바이러스에서는 산소부족환경에서도 바이러스의 복제능이 감소되지 않거나 오히려 증가함으로써 세포 살상효과를 상승적으로 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

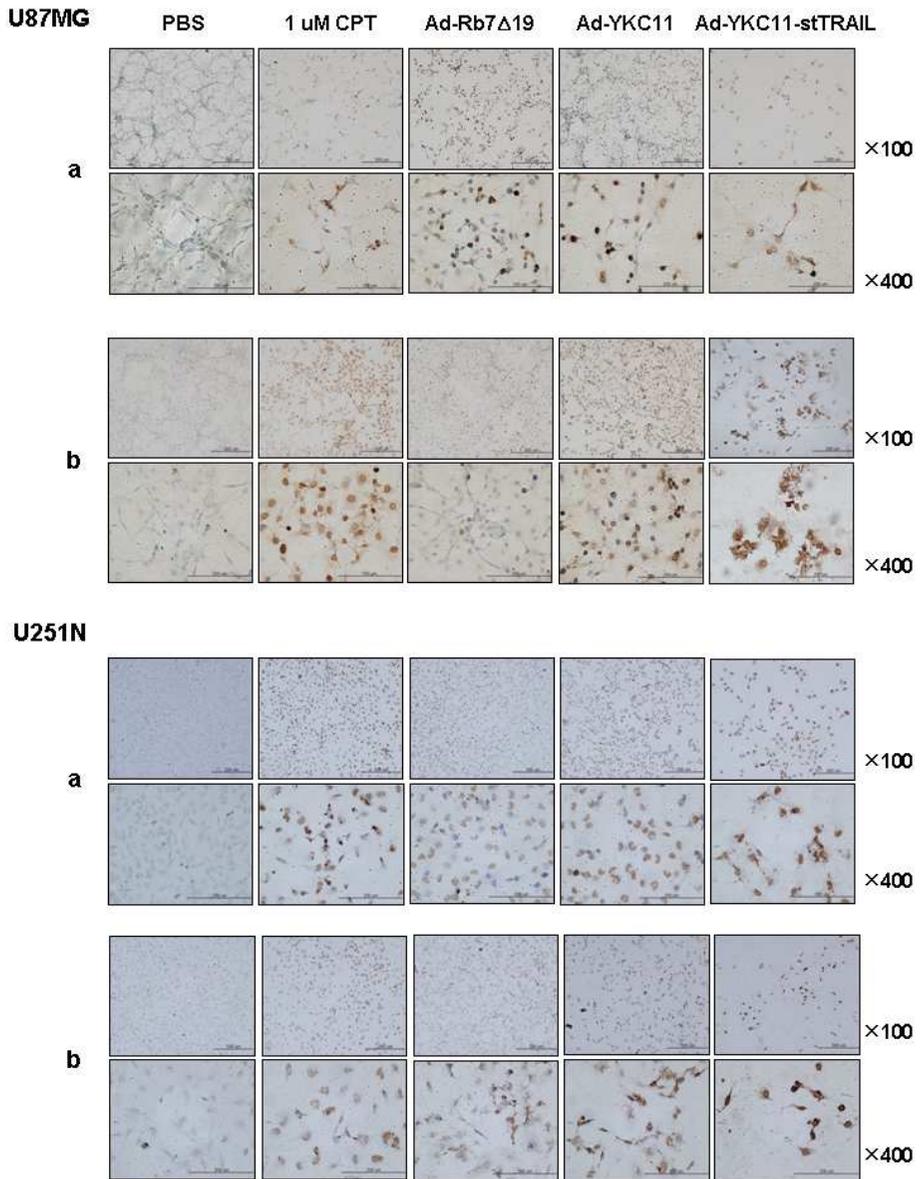


Figure 6. *In vitro* TUNEL assay in U87MG cells and in U251N cells. At 48 hours after treatment without (untreated) or with 1 μ M of CPT, Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11, or Ad-YKC11-stTRAIL at an

MOI of 1, apoptotic cells were detected by labeling with DAB using terminal deoxynucleotidyl transferase (counter-stained with methyl green). Brown staining indicates positive staining for DNA strand breakage. PBS was used as a negative control and CPT was used as a positive control to induce apoptosis. Original magnifications were $\times 100$ and $\times 400$.

Table 1. The mean percentage of apoptotic cells induced by each treatment. Cells were infected with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL. PBS was used as a negative control and CPT was used as a positive control to induce apoptosis. Each of the indicated values is expressed as the percentage of apoptotic cells.

A. U87MG

Apoptotic cell ratio (%)	PBS	1 μ M CPT	Ad-Rb7 Δ 19	Ad-YKC11	Ad-YKC11-stTRAIL
a. Normoxia	0 \pm 0	88.27 \pm 7.86	17.68 \pm 1.19	30.21 \pm 3.22	57.82 \pm 17.8
b. Hypoxia	5.17 \pm 1.09	69.87 \pm 7.06	17.76 \pm 5.47	40.40 \pm 3.04	98.5 \pm 1.5

B. U251N

Apoptotic cell ratio (%)	PBS	1 μ M CPT	Ad-Rb7 Δ 19	Ad-YKC11	Ad-YKC11-stTRAIL
a. Normoxia	0 \pm 0	92.17 \pm 5.18	47.62 \pm 11.94	64.66 \pm 9.01	87.71 \pm 6.88
b. Hypoxia	4.05 \pm 2.16	69.02 \pm 6.06	28.96 \pm 3.66	64.34 \pm 4.02	90.74 \pm 4.89

나. PI 염색과 유세포 분석을 통한 세포 사멸 검증

세포고사의 또 다른 일반적 특징은 DNA가 무작위적으로 절편화되어 나타나는 subG1 세포군의 비율이 증가하는 현상이다. 일반적인 세포배양 조건에서는 G1, S, 그리고 G2/M기에 해당되는 세포군들이 일정한 비율로 유지되지만, 세포고사가 진행 중인 세포들은 염색체들이 작은 절편으로 나뉘어져 subG1 peak가 증가된다. TRAIL에 의한 세포 고사율 증가를 관찰하기 위해 U87MG 세포주에 Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11, 그리고 Ad-YKC11-stTRAIL을 2MOI로 처리하고 48시간 후에 회수하여 PI 염색을 통해 FACS를 이용하여 subG1 세포군의 증가를 관찰하였다. 정상산소조건에서는 Ad-Rb7Δ19와 Ad-YKC11가 각각 30.26%와 19.85%로, Ad-Rb7Δ19가 Ad-YKC11보다 약 10% 더 높은 subG1 세포군의 비율을 나타내었지만, 저산소조건에서는 바이러스의 복제 감소로 인해 정상산소조건에 비해 Ad-Rb7Δ19에 의한 세포 고사는 23.05%로 감소되고 Ad-YKC11은 44.68%로 증가되어 subG1 세포군의 비율이 Ad-Rb7Δ19에 비해 Ad-YKC11에 의한 세포고사가 약 25% 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 Ad-YKC11-stTRAIL을 처리한 실험군에서는 TRAIL에 의한 강한 세포 고사로 인해 정상산소조건이나 저산소조건 모두에서 66.01%, 77.12%로, 다른 실험군에 비해 높은 subG1 세포군의 비율을 나타내었고, 특히 저산소조건에서는 11% 더 증가한 높은 subG1 세포군의 비율을 나타냄으로 인해 HRE와 TRAIL에 의해 강한 세포 고사가 유도 되면서 빠르게 암세포를 살상할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig . 7).

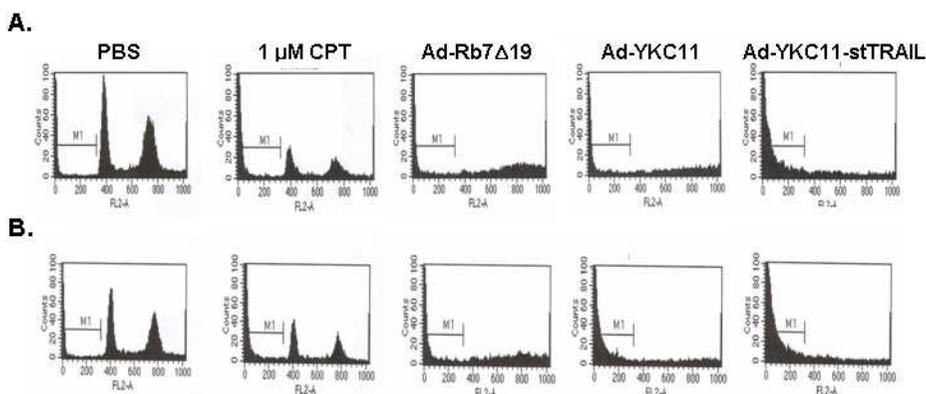


Figure 7. Efficient induction of apoptosis of TRAIL. U87MG cells were treated with CPT, Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL at an MOI of 2. At 48 hours post-infection, cells were harvested and stained with PI. The stained cells were analyzed in a fluorescence-activated cell sorter. The values in each panel represent the % of sub G1 population.

Table 2. The percentage of subG1 population induced by each treatment. SubG1 populations were determined by PI staining, followed by FACS analysis. Cells were infected with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL. PBS was used as a negative control and CPT was used as a positive control to induce apoptosis.

SubG1 (%)	PBS	1 μ M CPT	Ad-Rb7 Δ 19	Ad-YKC11	Ad-YKC11-stTRAIL
A. Normoxia	14.7	77.71	30.26	19.85	66.01
B. Hypoxia	10.63	64.90	23.5	44.68	77.12

5. 정상산소조건과 저산소조건 처리를 통한 재조합 아데노바이러스의 생산량 비교

저산소조건에서 HRE에 의한 영향으로 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL의 바이러스 생산량이 증가하는지를 정량화시켜 관찰하기 위해 바이러스 생산 실험을 진행하였다. U87MG 세포주를 Ad-Rb7Δ19, Ad-YKC11, 그리고 Ad-YKC11-stTRAIL로 감염시키고 72시간 후에 감염된 세포와 배양액을 각각 회수하여 바이러스의 역가를 산출하였다. 그 결과 저산소조건을 처리하였을 때, Ad-Rb7Δ19에서는 바이러스의 생산량이 1.16×10^9 pfu에서 8.71×10^8 pfu로 감소된 반면에 HRE를 포함하고 있는 Ad-YKC11에서는 2.29×10^8 pfu에서 9.71×10^8 pfu로, Ad-YKC11-stTRAIL에서는 2.34×10^7 pfu에서 8.98×10^7 pfu로 바이러스의 생산량이 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 전제적인 바이러스 생산량이 Ad-Rb7Δ19이 가장 높게 나타난 것은 아데노바이러스에 내재되어 있는 프로모터가 변형된 TERT 프로모터에 비해 강한 활성을 가지고 있어서 이러한 결과를 보인 것으로 여겨지나 내재된 E1A의 프로모터는 선택성이 없다는 큰 단점을 가지고 있기 때문에 장기적으로 봤을 때는 TERT 프로모터를 사용하는 것이 유리하다고 판단되어진다.

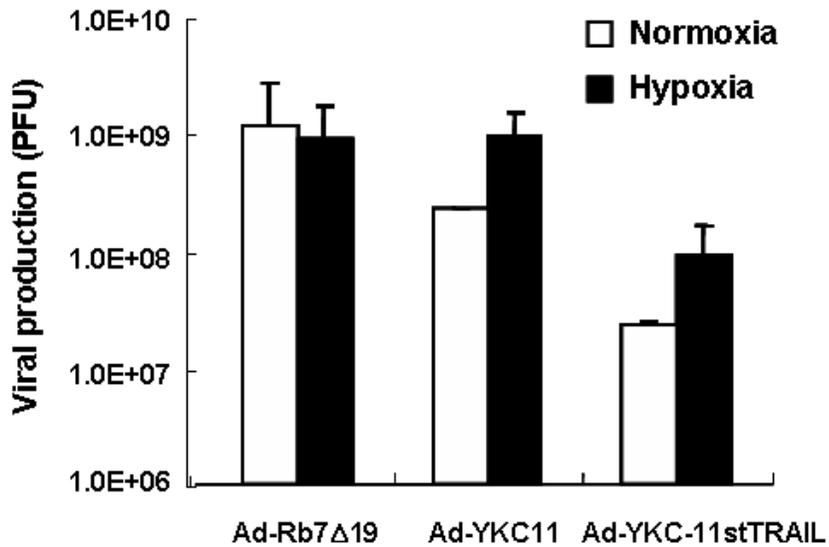


Figure 8. Quantification of viral production after treatment with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL. (A) U87MG cells were treated with Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL at an MOI of 1. The virus present in cell and supernatant was extracted at 72 hours post-infection, and viral production was measured by limiting titration assay on HEK293 cells.

6. HRE를 포함하고, TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스들의 생체 내 항종양 효과 비교 검증

본 연구에서 제작한 각각의 재조합 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과를 검증하기 위하여, 인체 뇌암 세포주인 U87MG 세포를 누드마우스의 복부 피하에 주사하고, 형성된 종양의 용적이 약 100~150 mm³ 정도 되었을 때 5 X 10⁷ PFU의 Ad-Rb7 Δ 19, Ad-YKC11,

그리고 Ad-YKC11-stTRAIL을 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀 간격으로 3번 종양 내에 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다(Fig. 9). PBS를 투여한 대조군에서는 투여 후 13 ~ 19일 사이에 평균적으로 $1195 \pm 111.46 \text{ mm}^3$ 에서 $1929 \pm 176.72 \text{ mm}^3$ 으로 종양이 급속도로 증가하는 것을 관찰하였고, Ad-YKC11를 투여한 마우스의 경우는 종양의 크기가 꾸준히 증가하는 경향을 보이다가 바이러스 투여 후 23일째가 되면서 1000 mm^3 이상으로 급격히 자라는 것을 확인하였다. 빠르고 강한 세포 고사를 유도하는 TRAIL을 포함하고 있는 Ad-YKC11-stTRAIL을 투여한 마우스의 경우는 7마리 중, 2마리에서 종양이 완전히 제거된 것을 관찰하였고, 이 후 20일이 지나도 종양의 재성장은 관찰되지 않았다. 또한 바이러스 투여 후 20일경에도 종양의 크기가 $385.36 \pm 167.29 \text{ mm}^3$ 으로 종양의 성장이 지연되는 것으로 보아 생체 외에서 뿐만 아니라 생체 내에서도 Ad-YKC11-stTRAIL에 의해 보다 향상된 항종양 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

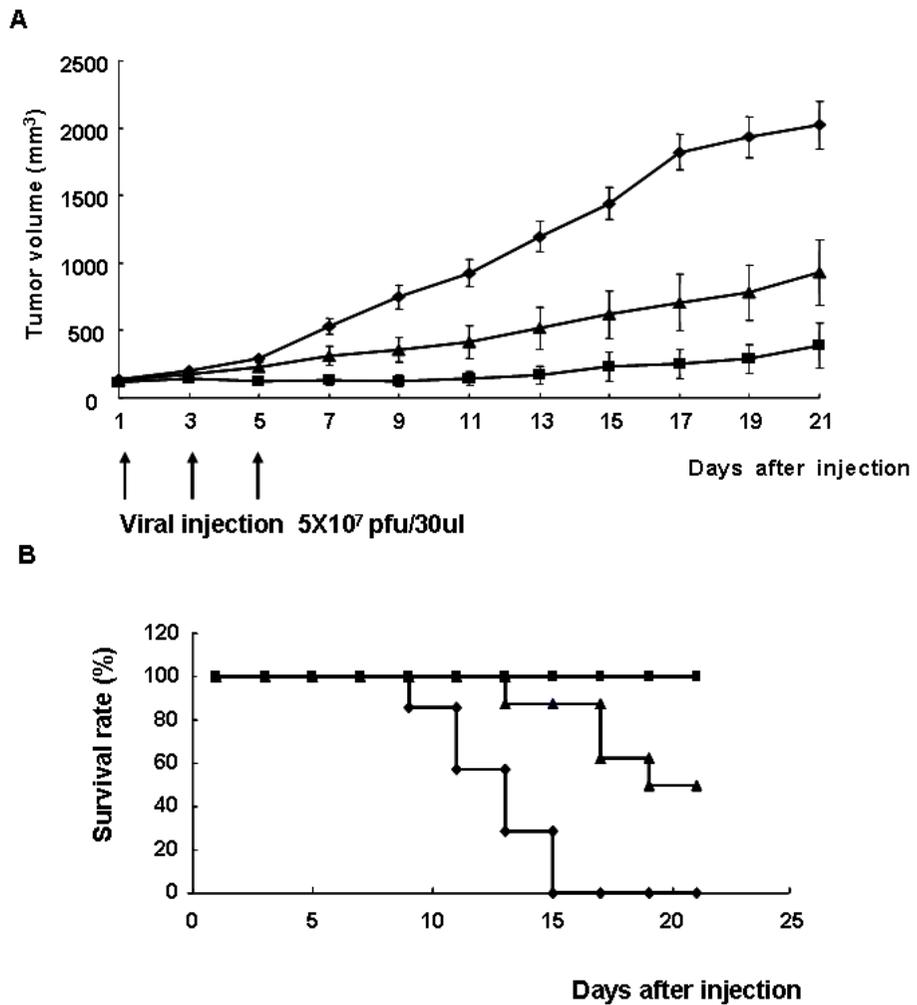


Figure 9. Suppression of tumor growth by oncolytic adenoviruses expressing TRAIL. It was planted 1×10^7 U87MG human glioblastoma cells subcutaneously in the abdomen of nude mice. After tumor formation each animal was injected intratumorally with Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL, along with PBS as a negative control every 2 days. Each virus was treated as 5×10^7 PFU/30 μ l/mouse at the time which is indicated by the arrow. The

oncolytic adenovirus expressing TRAIL, demonstrated enhanced antitumor activity compared to its cognate controls, Ad-YKC11. Tumor growth was monitored on a 2-day interval by measuring the short length (w) and long length (L) of the tumor. Tumor volume was estimated on the basis of the following formula: $\text{volume} = 0.523 \times Lw^2$.

7. TRAIL을 발현하는 재조합 아데노바이러스 투여에 따른 종양조직의 변화 관찰

앞서 실험을 통해 검증되었듯이 종양 선택적 복제 가능 아데노바이러스에 의한 TRAIL의 발현에 따른 개선된 항종양 효과가 실제로 종양 내 아데노바이러스의 복제와 TRAIL에 의한 세포고사에 의한 것인지 확인하기 위하여 먼저, H & E 염색을 통해 조직의 상태를 관찰하였으며, TUNEL assay를 통하여 세포고사를 검증하였다. 또한 조직 내에서 아데노바이러스의 복제를 관찰하기 위해 E1A 단백질의 발현을 조직 면역염색을 시행하여 검증하였다(Fig. 10).

인체 뇌 종양 세포주인 U87MG를 누드 마우스 복벽 피하에 접종한 후 형성된 종양에 복제 가능 바이러스인 Ad-YKC11 또는 Ad-YKC11-stTRAIL 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 3 회 종양 내 주사한 후 3일 뒤에 종양 조직을 적출하여 Hematoxylin과 eosin으로 염색을 시행하여 조직의 상태를 검증하였다. Figure. 10 (A)에서 볼 수 있듯이 Ad-YKC11을 투여한 종양의 경우에는 조직의 국소적 부위에서만 세포괴사가 진행된 반면, Ad-YKC11-stTRAIL를 투여한 종양에서는 조직 전체에서 세포괴사

가 활발히 진행된 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 종양 내 변화가 실제로 TRAIL의 발현에 의한 세포고사인지 확인하기 위해, 동일한 블록의 슬라이드를 사용하여 TUNEL assay를 시행하였다. 그 결과, 음성 대조군인 PBS를 처리한 종양 조직 내부에는 세포고사를 거의 확인할 수 없었던 반면, Ad-YKC11 또는 Ad-YKC11-stTRAIL을 투여한 종양 내부에서 세포가 갈색으로 염색되는 것으로 보아 세포고사가 일어남을 확인할 수 있었다. 그 중에서 Ad-YKC11-stTRAIL을 투여한 종양에서는 조직 전체가 갈색으로 염색될 만큼 높은 빈도로 세포고사가 활발히 유도됨을 관찰할 수 있었다.

또한, 종양 조직 내 아데노바이러스의 복제 양상을 검증하기 위하여, 아데노바이러스의 E1A 부위와 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 형광면역염색을 시행하였다. 복제 가능 아데노바이러스 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL을 투여한 종양의 경우에는 E1A가 검출됨을 통해 아데노바이러스가 종양내부에서 복제함을 확인할 수 있었으나, 종양내의 대부분의 조직이 이미 괴사되어 넓은 부위에서 E1A를 검출할 수 없었으며 종양 가장자리 일부 국소적 부위에서만 아데노바이러스가 검출되었다.

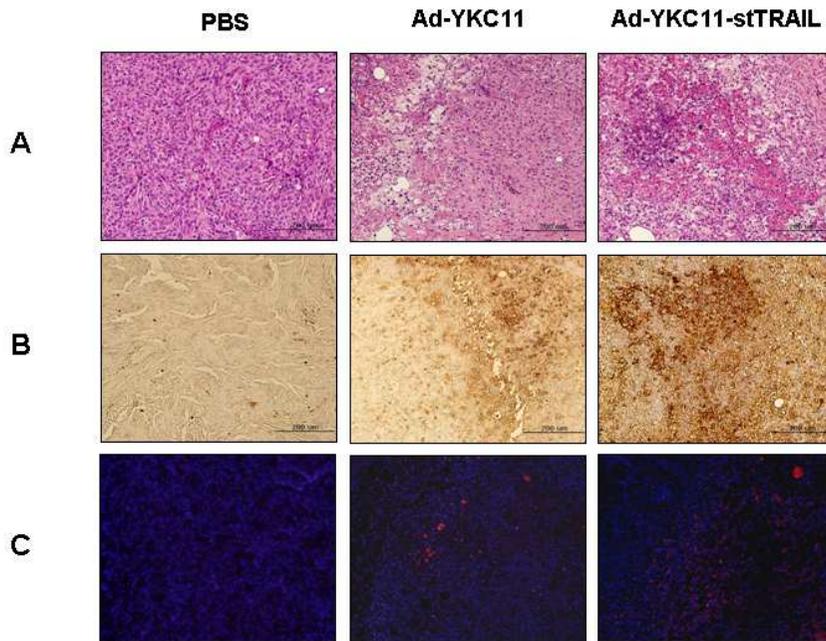


Figure 10. Immunohistochemistry of U87MG xenografts treated with PBS, Ad-stTRAIL, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL. Ads were injected on day 1, 3, 5, and tumors harvested on day 3 for histological analysis. (A) H & E stainings after PBS, Ad-YKC11 or Ad-YKC11-stTRAIL treatment. It was observed dead cells in the whole area of tumor which was treated by Ad-YKC11-stTRAIL. (B) TUNEL assay. In Ad-YKC11-stTRAIL treated tumors, apoptotic nuclei with double-strand DNA breaks were more abundant compared to those of Ad-YKC11-treated tumors. (C) Immunohistochemistry specific to adenovirus E1A protein. E1A signal is stronger in Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL-treated tumor than in PBS treated tumor which were shown limited E1A distribution.. Magnification: 200

IV. 고찰

암세포의 급속한 성장으로 인해 산소 소비가 증가함에 따라 암세포의 주변 환경은 산소부족현상(산소분압 0-20 mmHg)이라는 비정상적인 생리학적 상황에 처하게 된다. 산소부족현상은 암세포의 악성형질 변환을 유도하고, Bcl-2와 IAP와 같은 항 세포고사 유도물질의 발현을 증가시키고, 암 치료에 있어서 방사선치료요법과 항암화학요법에 대해 내성을 제공 한다^{1-2,10}. 따라서 암 치료를 위한 방법으로 현재 바이러스를 이용한 치료법들이 많이 개발되고 있고, 대표적으로 증식 가능 아데노바이러스가 새로운 암 유전자 치료법으로 대두된 이후 현재 이를 이용한 임상시험들이 활발히 진행되고 있다³⁻⁷. 그러나, 암세포의 산소부족현상으로 HIF-1 α 와 p21^{cip1}의 발현이 증가하고 활성화를 나타냄으로 세포 주기가 억제됨에 따라 자신의 모든 생활사를 숙주세포에 의존적으로 살아가는 바이러스의 증식이 억제되는 것이 지속적인 암 치료에 대한 제한점으로 나타나고 있다⁸. 이러한 한계점을 극복하기 위한 방안으로 본 연구에서는 산소부족현상에서 오히려 바이러스의 복제가 증가하도록 유도되는 바이러스를 제작하여 정상산소조건과 저산소조건을 비교를 통해 저산소조건에서 바이러스의 세포살상능의 증가를 분석하였다. 또한 암세포의 세포 살상능을 증가시키기 위한 방법으로 정상 세포와 암세포에 대한 선택성을 가지고 암세포에 강한 세포 고사를 유도하는 물질인 분비 가능 삼형체 TRAIL을 이용하였다¹¹.

산소부족에 의해 조절되는 유전자들 중에 암세포 조직 발달을 위해 필요한 신생혈관 생성에 관여하는 VEGF의 인핸서 부분인 HRE를 암세포에 대한 선택성을 증가시키기 위해 변형된 5MMTERT 프

로모터와 연결시키고 이로 인해 아데노바이러스의 복제에 필요한 E1A 유전자의 발현이 조절되며 E3 지역에 세포고사 유도 물질인 TRAIL을 포함하는 종양 선택적 복제가능 아데노바이러스를 제작하였다⁹. 이렇게 제작된 아데노바이러스를 인체 뇌암 세포주인 U87MG에 감염시켜 TRAIL의 발현을 관찰한 결과 정상산소조건과 저산소조건 모두에서 TRAIL의 발현이 강하게 유도됨을 확인할 수 있었다. 다양한 인체 암 세포주를 제작한 바이러스로 감염시킨 후 정상산소조건과 저산소조건을 처리하여 세포 살상능 증가 정도를 비교 검증한 결과, 모든 암 세포주에서 정상산소조건에서는 Ad-Rb7Δ19와 Ad-YKC11에서 비슷한 세포 살상능을 나타내었으나 저산소조건에서는 HRE를 포함하고 있는 Ad-YKC11에서 증가된 세포 살상능을 보여주었다. 또한 암세포에 처리한 모든 바이러스 중에서 저산소조건에서 Ad-YKC11-stTRAIL에서 가장 높은 세포 살상능을 보여 주었다. 특히 U87MG 세포주에서는 가장 낮은 MOI에서도 높은 세포 살상능을 나타내었다. 정상세포에도 저산소조건을 처리하였을 때 Ad-YKC11의 살상능이 증가하는 것을 보아 HRE의 효과를 다시 한번 확인해 볼 수 있었다. 또한, 저산소조건에서 아데노바이러스와 TRAIL에 의한 세포고사가 증가됨을 TUNEL assay와 DNA 절편화로 인한 SubG1 세포군의 증가를 관찰하는 실험을 통하여 확인하였다. 전자 현미경을 이용한 세포형태 관찰에서는 Ad-YKC11-stTRAIL에 감염된 세포들이 TRAIL에 의한 강한 세포고사 유도에 의해 Ad-Rb7Δ19와 Ad-YKC11에 감염된 경우보다 훨씬 빠른 속도로 세포 분해가 일어남을 확인할 수 있었다.

이렇게 저산소조건에서 바이러스로 인한 세포 살상능이 증가되는 것이 실제 HRE에 의해 바이러스의 생산량이 증가됨에 따라 나타

나는 현상인지 알아보기 위해 바이러스 생산량을 정량적으로 알아볼 수 있는 바이러스 생산량 실험을 시행한 결과, 저산소조건에서 Ad-Rb7Δ19는 바이러스의 생산량이 감소되는 반면에 HRE를 인핸서로 포함하고 있는 Ad-YKC11과 Ad-YKC11-stTRAIL에서는 저산소 조건에서 바이러스의 생산량이 증가되는 것을 관찰할 수 있었고, TRAIL에 의해서 빠른 세포 고사가 유도됨으로 인해 Ad-YKC11-stTRAIL의 바이러스의 생산량은 감소됨을 관찰할 수 있었다.

Ad-YKC11, Ad-YKC11-stTRAIL 종양 선택적 복제가능 아데노 바이러스들의 생체내 항종양 효과를 비교 검증해 본 결과, Ad-YKC11-stTRAIL이 생체 내에서 빠른 속도로 성장해 나가는 종양에 대해 바이러스에 의한 효율적이고 지속적인 유전자 전달로 인해 TRAIL에 의해 강한 세포 고사가 유도됨으로서 효과적인 암세포 살상 효과를 유발시킴으로 U87MG xenograft model에서도 우수한 종양 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다. 또한 생체 내 생존율 검증 실험에서도 Ad-YKC11-stTRAIL을 처리하였을 때 Ad-YKC11을 처리한 경우에 비해 생존율이 크게 증가한 것을 관찰할 수 있었다. Ad-YKC11-stTRAIL에 의한 개선된 종양 세포 선택적 복제능과 살상능은 H&E 조직 염색과 E1A 단백질 조직면역 염색에서도 같은 결과로 확인 되었으며, 또한 TUNEL 분석에서도 높은 빈도로 세포고사를 나타내는 결과를 통해 우수한 항종양 효과를 유도할 수 있음을 확인하였다.

결론적으로, 본 연구에서 제작한 HRE를 포함하고, stTRAIL을 발현하는 종양 선택적 증식 및 살상 가능한 아데노바이러스인 Ad-YKC11-stTRAIL은 HRE에 의해 암세포 내에 저산소조건에서도

바이러스 생산량이 억제되지 않고 오히려 증가함으로서 아데노바이러스에 의해서 유도되어지는 종양 세포 선택적 항종양 효과뿐만 아니라, TRAIL이 종양 세포에서 고 발현됨에 따라 더욱 증대된 종양 선택적 항종양 효과가 유도되는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 암세포의 산소부족현상에서도 바이러스의 복제가 억제되지 않도록 고안하여 제작한 종양 선택적 복제 가능 아데노바이러스인 Ad-YKC11에 stTRAIL을 삽입함으로써 저산소조건에서도 바이러스의 복제능이 증가하여 결과적으로 증가된 암세포 살상능을 관찰할 수 있었고, 또한 삽입한 TRAIL에 의해 활발한 세포고사가 유도됨으로 인해 더욱 증대된 항종양 효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 제작되어진 Ad-YKC11-stTRAIL 아데노바이러스를 통해 바이러스를 이용한 암 유전자 치료의 제한점을 극복함으로써 암세포에 대한 살상능의 증가로 더욱 효율적인 암 치료 효과를 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW. Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation. *Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4078-81.
2. Post DE, Van Meir EG. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene.* 2003 Apr 10;22(14):2065-72.
3. Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, Hecht JR, Benson A 3rd, Galanis E, et al. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1498-1504.
4. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, et al. p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53(10):2231-34.
5. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000;6(8):879-885.
6. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW,

Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997;57(13):2559-63.

7. Yu DC, Chen Y, Seng M, Dilley J, Henderson DR. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 1999;59(17):4200-03.

8. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J*. 2004 May 5;23(9):1949-56.

9. Kim E, Kim JH, Shin HY, Lee H, Yang JM, Kim J, Sohn JH, Kim H, Yun CO. Ad-mTERT-delta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. *Hum Gene Ther*. 2003 Oct 10;14(15):1415-28.

10. Park SY, Billiar TR, Seol DW. Hypoxia inhibition of apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Feb 15;291(1):150-3.

11. H Tsurushima, X Yuan, LE Dillehay, KW Leong.

Radioresponsive tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) gene therapy for malignant brain tumors. *Cancer Gene Therapy* 2007 14, 706-716.

12. Runnebaum IB. Basics of cancer gene therapy. *Anticancer Res* 1997; 17: 2887-90.

13. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Human Gene Ther* 1998; 9: 283-6.

14. Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239-40.

15. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. In: *The internet book of gene therapy Cancer therapeutics*. Appleton & Lange Stamford 1994; 3-16.

16. Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I, Kufe DW. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest* 2000;106:763-771.

17. Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer gene therapy* 2002;9:725-736.

18. Ido A, Uto H, Moriuchi A et al, Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia-inducible enhancer linked to a human alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Res* 2001; 61(7): 3016-21.
19. Youngleem Kim and Dai-Wu Seol. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cells*. 2003 Jun 30;15(3):283-93
20. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 337-348, 2003
21. C-Y Kim, M Jeong, H Mushiake, B-M Kim, W-B Kim, JP Ko, M-H Kim, M Kim, T-H Kim, PD Robbins, TR Billiar and D-W Seol. Cancer gene therapy using a novel secretable trimeric TRAIL. *Gene Therapy* (2006) 13, 330-8
22. Brian Keith, M. Celeste Simon. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129, May 4, 2007

Abstract

Oncolytic Adenovirus expressing Secretable Trimeric TRAIL Elicits enhanced cytopathic effects by inducing apoptosis

Sung Mi Jung

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

Directed by Professor Chae-Ok Yun

The uncontrolled proliferation of cancer cells causes the formation of hypoxic regions within solid tumors due to lack of adequate blood supply. Hypoxia exists to varying degrees in most solid tumors, and clinically, tumor hypoxia has been associated with poor therapeutic response and patient prognosis. Hypoxia-inducible factor (HIF) is a heterodimeric transcription factor that mediates responses to hypoxia by binding to a hypoxia-response element (HRE) present within target genes. Therefore, the HIF/HRE system can be utilized to specifically target therapeutic gene expression to tumors.

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a member of the TNF family, is a type II

transmembrane cytokine molecule. Soluble TRAIL has been shown to induce apoptosis in a wide variety of cancer cells *in vitro* and to suppress tumor growth specifically without damaging normal cells and tissues *in vivo*. In our previous report, we have used that adenovirus expresses and secretes highly apoptotic secretable trimeric TRAIL into the culture supernatant³. Here, as an approach to TRAIL-based cancer gene therapy, Secretable trimeric TRAIL (stTRAIL) was previously cloned into YKC11 under the modified mTERT promoter to form YKC11-stTRAIL, which had much better cytopathic effect than YKC11. YKC11-stTRAIL adenovirus potently induced apoptosis *in vitro* in cancer cell lines such as U87MG, U343, U251N in hypoxic environment. Our data reveal that a gene therapy using YKC11-stTRAIL has a promising potential to treat human cancers including gliomas. Taken together, these lines of evidence demonstrate that the newly generated adenovirus expressing stTRAIL induces efficient cell lysis in hypoxic environment, which is critical for adding therapeutic value to replicating adenovirus for cancer gene therapy.

Keywords: Oncolytic adenovirus, TRAIL, hypoxia, Cancer gene therapy