

Relaxin과 decorin이 세포외
기질분해와 세포고사 유도에
미치는 영향 분석

연세대학교 대학원

의과학과

윤 아 름

Relaxin과 decorin이 세포외
기질분해와 세포고사 유도에
미치는 영향 분석

연세대학교 대학원

의과학과

윤 아 름

Relaxin과 decorin이 세포외
기질분해와 세포고사 유도에
미치는 영향 분석

지도 윤 채 옥 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

윤 아 름

윤아름의 박사학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

논문을 마무리 하며 연구실에 첫발을 내딛었던 그 날 이후, 짧지 않았던 대학원 생활을 통해 성장한 저의 모습을 돌아보니 감회가 새롭습니다. 부족하지만 이 논문의 완성은 지금까지 연구의 마무리와 새로운 시작을 준비하는 출발점을 의미한다는 점에서 매우 감사하고 감격스럽습니다. 하지만 그보다 더 감사한 것은 어리고 부족하기만 하던 제가 바로 이 자리에서 훈련 받는 동안 이 논문의 완성 그 이상의 소중한 것을 얻을 수 있었다는 점이 아닐까 싶습니다. 무엇보다 저를 긴 시간동안 인내와 애정으로 지도하시며 이 모든 것이 가능하도록 이끌어 주신 윤채옥 선생님께 감사드립니다. 자주 뵙기는 어렵지만 언제나 지켜봐 주시고 아껴주신 김주향 교수님, 바쁘신 와중에도 논문에 대한 깊은 관심으로 세심하게 지도해 주신 김호근 교수님, 문성환 교수님, 김철훈 교수님, 별 때마다 따뜻한 관심을 주시는 생화학 교실 허만욱 교수님께 감사드리며 좋은 경험을 할 수 있도록 기회를 주시고 부족한 제게 과분한 신뢰를 주신 일본 AIST의 Renu선생님과 Sunil선생님께도 감사드립니다.

하루의 대부분의 시간을 함께하며 같이 웃고 고민하면서 함께 성장해 가는 사랑하는 실험실 식구들 민정 언니, 평환 오빠, 일규, 오준, 지훈 오빠, 정선, 송남, 정우, 지성, 혜원, 태진과 일본에 계신 김인욱 선생님, 두 분의 연구교수님 김만복, 강은아 선생님, 이제 막 실험실에 첫발을 내딛은 리연, 성경, 언주 모두에게 고마움을 표합니다. 실험실의 역사 재성 선배님, 은희 언니, 영숙 언니, 석사 동지들 태영, 은아 언니, 동현 오빠, 각자의 자리에서 더 멋진 모습으로 열심히 나아가고 있는 지영 언니, 윤아, 경주 언니, 황경화 선생님, 내겐 보석 같은 동생들 태영,

민주, 성미 감사합니다. 그리고 손주혁 선생님과 최혜진 선생님
께도 감사를 드립니다.

인생을 더욱 풍요롭게 만들어 준 소중한 예원, 효원, 경
미, 연희, 수봉, 상미, 지나, 경주, 희정언니, 몽미, 신원, 승수오
빠, 정석오빠, 진현, 지민, 동욱, 미정, 미선, 노준, 지명, 대환, 호
성 오빠, 21기 승수, 야구치 언니, 일본 친구들, 그리고 충식 오
빠 고맙습니다.

빼딱한 저를 위해서도 머리에 손 얹고 기도해 주시는 김
홍성 목사님과 15년간 사랑으로 목양해 주신 정몽현 목사님께도
감사를 드립니다.

태어난 순간부터 지금까지 단 일초도 쉬지 않고 제게 무
한한 애정을 쏟아 부으시는 우리 할머니 사랑하고 감사합니다.
언제나 딸의 결정을 존중해 주시고 변치 않는 신뢰를 주시는 부
모님의 사랑과 기도가 제 긍정적인 삶의 원동력입니다. 가장 운
아름다운 인생을 만들어 가도록 곁에서 지지해 주셔서 감사합니
다. 가장 가깝고 편한 곳에서 언니의 모든 도움 요청에 기꺼이
응하는 누구보다 믿고 의지할 수 있는 온유한 내 동생 승혜에게
온 마음으로 감사를 전합니다.

이 모든 과정을 주관하시고 가장 좋은 길로 선하게 인도
하시는 하나님께 영광과 감사를 드립니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	11
1. 대상 세포주 및 세포 배양	11
2. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 생산 및 역가 산출	11
3. 실험동물	12
4. RT-PCR	12
5. Cytopathic effect(CPE) 분석	13
6. MTT assay	13
7. Western blot 분석	14
8. 유세포 분석	15
9. NO production assay	15
10. 조직면역염색법	16
III. 결과	18
1. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 생산 	18
2. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한	

MMP발현 양상의 변화	18
3. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 중양 조직 내 collagen type III, elastin 그리고 collagen -type I의 발현 양상 확인	20
4. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 TGF- β 의 발현 양상 변화	22
5. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EGFR signaling의 변화	24
6. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EMT(epithelial-mesenchymal transition) molecule의 발현양상 변화	26
7. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양세포 살상효과 비교 검증	28
8. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양세포 살상효과 비교 검증	30
9. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 p53 단백질 발현 양상 비교	33
10. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 NO 생산량 비교	33
11. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 iNOS의 발현 양상 비교	35
12. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 mitochondrial apoptotic 단백질 발현 양상 비교	37

13. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 PARP 단백질 발현 양상 비교	37
14. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 세포주기 양상 비교	39
15. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 내 apoptotic signal의 발현 양상 비교, 검증	42
16. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 내 apoptotic signal의 발현 양상 비교, 검증	42
IV. 고찰	45
V. 결론	60
참고문헌	62
영문요약	70
게제리스트	72

infected with dB or dB/DCN . . . 44

표 차례

Table. 1 The mean percentage of early apoptosis, G0-G1, S and G2-M.....	39
Table. 2 Molecular characterization of relaxin and decorin on the degradation of extracellular matrix.....	57
Table. 3 Molecular characterization of relaxin and decorin on the induction of apoptosis.....	58

국문요약

Relaxin과 decorin이 세포외 기질분해와 세포고사 유도에 미치는 영향 분석

기존에 McCormick 그룹에 의해 종양세포 특이 증식 및 세포 살상 재조합 아데노바이러스에 대한 연구가 처음 보고 된 이후 그 유용성과 안전성이 임상시험에서 확인되었지만, 종양내로 투여된 바이러스가 일부 주변으로만 제한적, 국소적으로 확산되고 종양조직 전체에 퍼지지 못하여 결과적으로 바이러스에 감염되지 않은 종양 세포는 다시 빠르게 성장하여 만족할 만한 치료효과를 얻지 못하였다. 이러한 항종양 치료용 아데노바이러스의 국소적 종양 침투력과 낮은 항종양 효과의 한계를 개선하기 위해 종양 특이적 살상 아데노바이러스에 matrix degradative protein인 relaxin과 decorin 유전자를 각각 도입시킨 아데노바이러스가 제작되어 종양 조직 내 바이러스 확산능의 향상과 암세포 살상 증대 효과를 비교 검증 하는 시도가 이루어졌으며, 이를 통해 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 개선된 종양 조직 내 확산능과 우수한 생체 내,외 항종양 효과를 확인되었다. 그러나 relaxin과 decorin과 같은 matrix degradative protein이 어떠한 메커니즘에 의해 종양 조직내 바이러스 확산능을 증가시키고 세포사를 유도하며 세포고사에 의한 암세포 살상 효과를 증가시키는 지에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 이러한 배경 하에, 본 연구에서는 relaxin과 decorin이 암세포의 세포기질 분해와 세포고사에 작용하는 기전을 정확히 밝히고자 relaxin과 decorin을 발현하는 바이러스를 이용하여 relaxin- 또는 decorin-mediated extracellular matrix(ECM) degradative pathway와 relaxin- 또는 decorin-mediated apoptosis

pathway를 규명하였다. 본 연구에서는 decorin과 relaxin을 발현하는 아데노바이러스의 종양 조직 내 확산효율의 증대가 relaxin과 decorin에 의한 metalloproteinase(MMP)1, MMP10 등의 세포외 기질 분해에 관여하는 enzyme의 증가, collagen type I, elastin 그리고 collagen type III와 같은 세포외 기질의 주요 성분의 분해에 의해 촉진됨을 확인하였다. 또한 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스는 tumor growth factor(TGF)- β , epidermal growth factor receptor(EGFR) 그리고 epithelial mesenchymal transition(EMT)의 발현조절을 통해 extracellular matrix(ECM)의 assembly와 생산 그리고 분해 등 여러 단계에서 종양 조직 내 결합조직의 재조합에 중요한 역할을 함으로써 세포외 기질분해와 바이러스 확산능을 증대시키는 중요한 원인으로 작용함을 확인 하였다. 한편, 아데노바이러스에 의해 발현되는 relaxin 또는 decorin이 세포고사의 여러 단계에 관여하여 세포사를 유도하며 특히, relaxin은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 촉매되는 nitric oxide(NO)의 생성을 통해 p53-independent pathway로 apoptosis signal을 mitochondria에 전달하고 이렇게 전달된 신호는 세포고사의 마지막 단계까지 관여함이 확인되었다. 반면, decorin은 p53 dependant apoptosis를 통해 mitochondrial apoptosis protein인 Bax, Bcl2, Cytochrome C에 신호를 전달하여 mitochondria-mediated apoptosis를 유도함을 확인 하였으며, 이렇게 전달된 apoptotic signal은 세포고사의 마지막 단계에 존재하는 단백질인 Poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)까지 전달됨으로써, decorin을 통한 강력한 세포고사가 유도됨을 밝혔다. 또한 decorin은 세포주기를 조절하는 p21의 발현을 촉진시킴으로써 G2/M arrest를 유도할 뿐 아니라 EGFR의 활성을 저해하고 Mitogen-activated

protein kinases(MAPK)의 활성을 억제하여 암세포의 증식을 방해함으로써 세포사를 유도함을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서는 중앙 조직 내로의 바이러스의 확산증진과 강력한 세포고사 유도제로 작용하는 relaxin과 decorin의 새로운 기능을 분자적인 수준에서 규명하여 실제로 아데노바이러스를 전달체로 이용한 유전자 치료에 적용하였고 이는 추후, 여러 종류의 비-바이러스성 유전자 전달체를 이용한 유전자 치료뿐만 아니라 아데노바이러스와 항암제의 병용투여 시 치료효과의 증대 목적으로 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심 되는 말 : relaxin, decorin, 세포외 기질분해, 세포고사,
암 유전자 치료

Relaxin과 decorin이 세포외 기질 분해와 세포고사 유도에 미치는 영향 분석

<지도교수 윤채옥>

연세대학교 대학원 의과학과

윤 아 름

I. 서론

재조합 아데노바이러스가 우수한 유전자 전달 효율을 보이며 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있을 뿐 아니라 *in vivo*에서도 유전자의 전달이 용이하다는 점이 여러 연구자에 의하여 보고되면서 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 재조합 아데노바이러스를 이용하는 빈도수는 급격히 증가하고 있다¹⁻⁴. 하지만, 암 치료용 재조합 아데노바이러스는 대부분이 증식 불가능한 일 세대 바이러스로 이들을 유전자 전달체로 이용하는 경우는 일차 감염세포 또는 극히 일부의 주변세포들에만 제한적으로 항암 효과를 유발할 수 있어, 임상적인 실용성 면에서 많은 제약이 있다^{5,6}. 이러한 한계를 극복할 수 있는 방안으로 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상하는 종양세포 특이 증식 및 세포살상 재조합 아데노바이러스에 대한 연구가 McCormick 그룹에 의해 처음 보고 된 이후⁷, 그 유용성과 안전성이 임상시험에서 확인 되었다. 그러나 종양 내로 투여된 바이러스가 일부 주변으로만 제한적으로 확산되고 종양 조직 전체에 퍼지지 못하여 결과적으로 바이러스에 감염되지 않은 종양 세포가 다시 빠르게 성장하여 만족할 만한 치료효과를 임상에서 얻기 힘들고, 효과적

인 적용을 위해서는 상당히 높은 역가의 바이러스를 투여해야 하거나 항암제나 방사선 치료요법을 병행해야 하는 제한점들이 제시되고 있다^{8,9}. 따라서 바이러스성 유전자 전달체의 제한된 조직 내 확산 문제와 이로 인한 낮은 유전자 전달 효율을 극복하기 위한 방안의 일환으로 N. Kuriyama 연구진들은 collagen과 그 외의 다른 세포외기질들을 분해할 수 있는 collagenase/dispase 또는 trypsin과 같은 단백질 분해 효소(protease)를 아데노바이러스를 투여하기 전에 처리하여 아데노바이러스의 유전자 전달 효율을 크게 향상시켰고¹⁰, L. Maillard 연구진들은 동맥의 주요 구성 성분인 elastin을 분해할 수 있는 elastase를 토끼의 동맥에 처리하여 아데노바이러스에 의한 유전자 전달 효율을 약 2배 정도 향상시킬 수 있었다¹¹. 이 외에도 세포외 기질을 분해시킬 수 있는 hyaluronidase를 이용하여 아데노부속바이러스에 의한 렛트근육으로의 유전자 전달 효율을 약 2~3배 정도 향상시킬 수 있음이 보고되었으며¹² 같은 맥락으로, relaxin 또는 decorin 유전자를 각각 도입시킨 중앙 특이적 살상 아데노바이러스가 제작되어 이들 바이러스에 의한 중앙조직 내 바이러스 확산능과 암세포 살상 증대효과에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다³².

Relaxin은 구조적으로 insulin/relaxin family의 부류에 속하는 6 kDa의 peptide 호르몬으로서 여러 종류의 생체 조직에서 생물학적 활성을 나타내는 것으로 알려져 "master hormone"으로 분류되고 있다¹³. Relaxin은 heterotrimer를 이루는 G-protein coupled receptor인 leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor7(LGR7), LGR8과 결합함으로써, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)-dependent pathway를 통해 세포내로 relaxin의 신호를 전달한다¹⁴. Relaxin에 의해 활성화된 cAMP는 nitric oxide synthase(NOS)의 발현을 증가시켜 L-arginine-nitric oxide pathway를 자극하고 결과적

으로 nitric oxide(NO)의 생산을 유발하는 것으로 알려져 있으며 이렇게 생성된 NO는 생물학적인 측면에서 세포의 생존, 증식, 혈관 형성 반응, 염증반응 등과 관련된 다양한 기능을 가지고 있다¹⁵. 한편, relaxin은 metalloproteinase(MMP)와 Tissue inhibitor of MMP(TIMP)의 조절에 관여하여 collagen을 분해하고 connective tissue와 basal membrane을 파괴하여 세포의 기질의 분해를 유도한다. 실제로 인체의 여러 기관에서 relaxin에 의한 MMP1, MMP2, MMP3, 그리고 MMP9 등과 같은 여러 종류의 MMP family의 발현 촉진과 TIMP1, TIMP2 등의 발현의 감소가 관찰 되었으며, 이들 조직들에서 relaxin은 collagen의 과 발현을 막는 억제제로 작용한다고 보고되었다¹⁶⁻¹⁸. 이러한 relaxin의 세포외 기질 분해와 세포고사 유도에 관련된 다양한 작용은 relaxin을 발현하는 아데노바이러스의 확산능 증가 및 증대된 항종양 효과에 있어서도 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

Extracellular matrix(ECM)을 구성하는 성분의 한 종류인 decorin은 small leucin rich proteoglycan(SLRP) 부류에 속하는 단백질로서 leucin rich repeat로 구성되어 있으며¹⁹, core 부위는 arch 형태로 되어 있어 세포 외 기질에 존재하는 여러 종류의 growth factor 또는 decorin receptor와의 결합이 용이한 구조로 형성 되어있다^{20,21}. Decorin은 ECM의 독특한 구성요소로서 선택적으로 collagen의 섬유와 결합하여, triple helical 구조의 collagen 단일분자가 assembly 되는 것을 지연시키고 그 결과 섬유의 직경을 감소시킨다²². Decorin은 tumor growth factor(TGF)- β 의 활성을 억제시킴으로써 collagen의 섬유화를 억제할 뿐 아니라 세포외기질의 구성(matrix assembly)에 관여하고, 종양 세포 성장을 억제하여 종양의 형성과 성장에 natural

antagonist로 작용한다고 알려져 있다^{23,24}. 또한 decorin은 growth factor나 metal ion과 같은 세포외 기질의 구성 성분과 반응하여 MMP1과 MMP2 등의 발현을 촉진시켜 세포외기질을 분해시키며²⁵⁻²⁹ fibronectin이나 thrombospondin과 같은 ECM 성분과의 상호작용을 조절한다^{21,28}. 한편 decorin은 epidermal growth factor receptor(EGFR)의 novel biological ligand로 작용하여 여러 종류의 암 세포들에 존재하는 EGFR과 결합함으로써 EGFR의 역할을 불활성화시켜 세포의 증식을 방해하는 한편 caspase-3의 활성을 증가시킴으로써 세포고사를 유도한다고 알려져 있다²⁹. 또한 decorin에 의한 endogenous cyclin dependent p21^{WAF1}의 발현 촉진은³⁰ 세포주기 G1 arrest 유도에 따른 세포살상을 강하게 유도한다고 보고되었다³¹. 이러한 decorin의 세포외 기질 분해와 세포사에 관련된 다양한 작용은 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 확산능 증가 및 증대된 항종양 효과에 있어서도 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

선행 되어진 이러한 연구를 배경으로, 종양 치료용 아데노바이러스의 국소적 종양 침투력을 개선하기 위해 matrix degradative protein으로 작용하는 relaxin과 decorin 유전자가 도입된 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 이용한 연구가 진행 중에 있으며 이를 통해 relaxin과 decorin 유전자를 도입시킨 종양 특이적 살상 아데노바이러스에 의한 종양 조직 내 바이러스 확산능과 이에 따른 암세포 살상 증대효과에 의한 우수한 생체 내,외 항종양 효과가 보고되었다³². 그러나 아직까지 이러한 relaxin과 decorin의 matrix degradative protein으로서의 기능과 세포고사 유도제로서의 기능이 아데노바이러스 시스템에서 어떠한 기전으로 작용하는지에 대한 구체적 연구는 거의 이루어

어 지지 않았다. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 ECM을 분해하고 종양 조직내로 침투, 확산까지 종양세포에서의 relaxin과 decorin의 작용기전과 세포 살상과 세포 주기에 미치는 relaxin과 decorin의 작용 기전에 대한 정확한 연구와 이해는 relaxin과 decorin을 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료에 적용하는데 있어서 필수적인 요소라고 볼 수 있다. 이러한 배경 하에 본 연구에서는 종양 조직 내로의 확산과 강력한 세포고사 유도제로 작용하는 relaxin과 decorin의 새로운 기능을 분자적인 수준에서 규명 하고자 하였으며 이러한 노력의 결과로 relaxin과 decorin은 MMP1, MMP10 등의 세포외 기질 분해에 관여하는 enzyme의 증가, collagen type I, elastin 그리고 collagen type III와 같은 세포외 기질의 주요 성분의 분해, TGF- β , fibronectin등의 변화, EMT의 발현조절등을 통해 ECM의 assembly와 생산 그리고 분해 등 여러 단계에서 종양 조직 내 결합조직의 재조합에 중요한 역할을 함으로써 세포외 기질분해와 바이러스 확산능을 증대시키는 중요한 원인으로 작용함을 확인하였다. 한편, relaxin은 iNOS에 의해 촉매 되는 NO를 통해 p53 independent pathway로 apoptosis signal을 mitochondria를 거쳐 세포고사의 마지막 단계까지 전달하며, decorin은 p53-dependant apoptosis, G2M arrest의 유도, 암세포의 증식억제등을 통해 세포사를 유도함을 확인하였다 (Figure 1, 2).

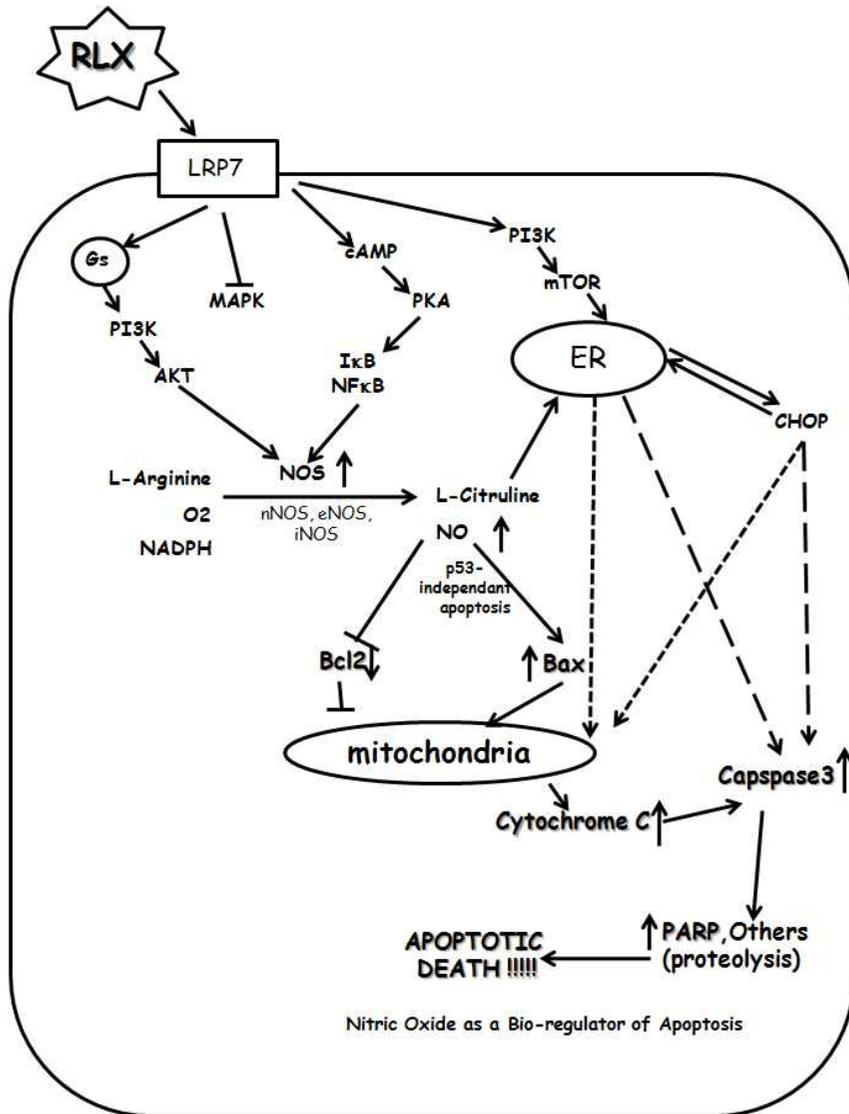


Figure. 1. Relaxin induces nitric oxide(NO)-mediated apoptosis pathway not p53 dependent apoptosis pathway. NO is synthesized from arginine and O₂ by inducible NO synthase(iNOS). Relaxin activates caspase signaling by NO- induced mitochondrial apoptosis.

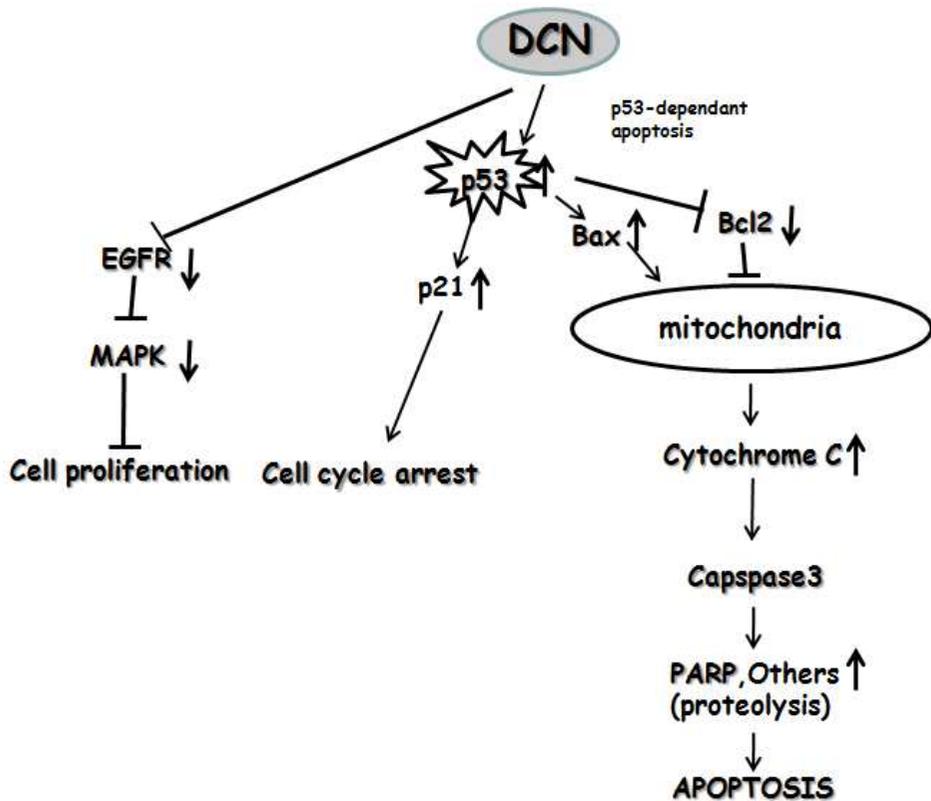


Figure. 2. Decorin induces cell death through p53 dependent pathway, inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest. Decorin activates mitochondrial apoptosis and G2M arrest by increased p53 expression. Also decorin inhibits cell proliferation by blocking epithelial growth factor receptor(EGFR) and Mitogen-activated protein (MAP) kinases(MAPK) pathway.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 뇌암 세포주(U343, U87MG), 자궁 경부암 세포주(C33A), 간암 세포주(Hep3B) 그리고 폐암 세포주(A549)와 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어있는 HEK293 세포주이며, 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. Hep3B를 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아 혈청(GIBCO, Grand Island, NY)을 포함하는 DMEM 배양액으로 penicillin/streptomycin(GIBCO)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. Hep3B는 같은 조건하에 MEM(GIBCO)으로 배양하였다.

2. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스들의 생산 및 역가 산출

복제 불능 아데노바이러스로는 아데노바이러스의 E1과 E3 유전자가 소실된 dE1이 대조군으로 사용되었으며 dE1 backbone의 E3 부위에 relaxin 또는 decorin 유전자를 발현하는 dE1/RLX, dE1/DCN이 실험군으로 사용되었다. 한편, 종양 선택적 살상 아데노바이러스로는 아데노바이러스의 유전자중 E1A와 E1B 19kDa부위는 존재하지만 E1B 55kDa부위가 결손 되어 종양 내에서만 선택적으로 복제가 가능한 dB가 대조군으로, dB backbone의 E3 부위에 relaxin 또는 decorin

유전자를 발현하는 dB/RLX, dB/DCN이 실험군으로 사용되었다. 각각의 재조합 아데노바이러스들은 293 세포주에서 증식시켜 CsCl₂ gradient로 농축, 분리하는 정제과정을 거친 후 OD를 측정하여 수득한 바이러스의 전체 역가(VP)를 산출하였으며 limiting dilution을 통해 실제 세포 감염이 가능한 plaque-forming units(PFU)를 결정하였다. 실험에 사용된 재조합 아데노바이러스인 dE1, dE1/RLX, dE1/DCN, dB, dB/RLX 그리고 dB/DCN의 VP/PFU(수득한 바이러스의 총 입자 수/ 실제 감염 가능한 바이러스의 입자 수)의 비율은 각각 57, 87, 70, 22, 58 그리고 43 으로 확인되었다.

3. 실험동물

동물 실험은 6~8주령의 수컷 누드 생쥐(BALB/c-nu)를 오리엔트(Orient. Inc.Korea)에서 구입하여 시행하였다. 동물 사육실의 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 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.

4. RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction)

Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 세포외 기질 분해에 미치는 영향을 확인하기 위해 인체 폐암 세포주인 A549와 인체 뇌암 세포주인 U343을 6 cm dish에 분주하고 24 시간 후 복제 불능 아데노바이러스인 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN을 100, 200 그리고 500 multiplicity of infection(MOI)로 각각 처리하였다. 복제 불

능 아데노바이러스를 처리한지, 48 시간 후에 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 RNA를 분리한 뒤, 1 μ g의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고, MMP1, MMP2, MMP7, MMP10, TGF- β , SIP1(Smad-interacting protein1), twist snail, fibronectin, iNOS 그리고 N-cadherin 등을 검출할 수 있는 primer set를 이용하여 RT-PCR을 수행 하였다.

5. Cytopathic effect(CPE) 분석

Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 암세포 살상능을 검증하기 위하여, 여러 종류의 인체 종양 세포주(U343, Hep3B, A549)를 각각 24-well plate에 60-70%로 분주하고 24 시간 후 음성 대조군인 dE1, dB와 실험군인 dB/RLX을 여러 가지 역가로 각각 처리하였다. 각각의 독립된 실험에 처리된 여러 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 분석 하였다.

6. MTT assay

Decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 증식에 따른 암세포 살상능을 정량화하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 수행하였다. 인체 뇌암 세포주(U343, U87MG), 자궁 경부암 세포주(C33A), 간암 세포주(Hep3B) 그리고 폐암 세포주(A549)를 각

각 96-well plate에 분주하고 24 시간 후, dB와 dB/DCN을 음성 대조군인 dE1와 함께 10 MOI로 각각 처리하였다. 바이러스 감염 48 시간 후 200 μ l의 MTT 용액(2 mg/ml)을 plate well에 첨가하여 4 시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 plate well에 200 μ l의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10 분간 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다.

7. Western blot 분석

Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 세포고사에 미치는 영향을 확인하기 위해 인체 폐암 세포주인 A549와 인체 뇌암 세포주인 U343를 6 cm dish에 분주하고 24 시간 후 복제 불능 아데노바이러스인 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 아데노바이러스들을 20 그리고 50 MOI로 각각 감염시키고 2일 뒤에 lysis buffer(50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitors: PMSF, TLCK, TPCK)로 세포들을 용해시켜 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane에 electrotransfer한 뒤 epidermal growth factor receptor(EGFR)(Cell signaling technology, Beverly, MA) phospho-EGFR(Cell signaling technology), p53(Cell signaling technology), phospho-p53(Cell signaling technology), Bax(Santa Cruz biotechnology, Danvers, MA), Bcl2(Cell signaling technology), CytochromeC(Santa Cruz biotechnology), Poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)(Cell signaling

technology), Mitogen-activated protein (MAP) kinases(MAPK)(Cell signaling technology) 그리고 Phosphoinositide 3-kinases(PI3K)Cell signaling technology) 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 일차 항체로 hybridization시키고 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 이차 항체로 다시 hybridization시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence)을 이용해 membrane 상의 이들 단백질과 항체와의 결합여부를 조사하고 각 단백질의 발현양상을 확인하였다.

8. 유세포 분석

Relaxin과 decorin의 발현에 의해 유도되는 세포고사 및 세포주기 변화를 확인하기 위하여, 인체 뇌암 세포주인 U343을 10 cm dish에 각각 1×10^6 개로 분주하고 12 시간 후 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하고 다시 12 시간 후, dB/RLX, dB/DCN 그리고 음성 대조군인 dB를 200 MOI의 농도로 5% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지에 희석하여 각각 감염시켰다. 감염 후 48 시간에 감염된 세포들을 회수하여 70% 에탄올로 4°C에서 6 시간 이상 고정시킨 후 propidium iodide(PI, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 ribonuclease(RNase)가 혼합된 용액을 500 $\mu\text{l}/\text{well}$ 를 넣고 4°C에서 15 분간 반응시킨 뒤 곧바로 유세포 분석(FACS analysis)을 시행하였다.

9. NO production assay

Relaxin을 발현하는 아데노바이러스가 nitric oxide(NO)의 생산에 미치는 영향을 확인 하고자 인체 폐암 세포주인 A549와 인체

뇌암 세포주인 U343를 6 cm dish에 분주하고 24 시간 후 복제 불능 아데노바이러스인 dE1/RLX과 음성대조군인 dE1 아데노바이러스를 50 MOI로 각각 처리하고 6 시간 동안 배양하였다. 이후 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하고 24 시간 동안 배양한 뒤 배지를 회수하여 nitrite/nitrate assay kit(R&D technology, Minneapolis, MN)을 이용하여 배지로 방출된 NO의 양을 확인 하였다.

10. 조직면역염색법

Relaxin, decorin을 발현하는 복제 가능 아데노바이러스의 처리가 세포외 기질분해와 세포고사에 영향을 미치는 단백질들의 발현에 미치는 실질적 변화를 종양 조직 내에서 관찰하고자, 생후 6~8 주된 누드 생쥐의 복벽에 피하로 1×10^7 개의 인체 폐암 세포주(A549)와 인체 뇌암 세포주(U343)를 각각 $100 \mu\text{l}$ 의 Hanks' balanced salt solution(HBSS)(Gibco BRL)에 부유하여 피하 주사하고 누드 생쥐의 복벽에 형성된 종양이 약 100 mm^3 정도로 성장하였을 때, 음성대조군인 PBS와 5×10^8 PFU의 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB, dB/RLX, dB/DCN를 각각 이틀간격으로 3 회 종양 내로 주사하고 마지막 주사일로부터 3 일 뒤에 종양 조직을 적출하여 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 $3 \mu\text{m}$ 두께의 슬라이드로 절단한 뒤, 이를 xylene, 100%, 95%, 80%, 70% ethanol 용액에 차례로 담귀 파라핀을 제거(deparafinization)한 후 슬라이드에 부착된 조직을 3% H_2O_2 용액에서 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 일차 항체인 anti-collagen type III(Sigma, Saint Louis, MO, C7805), elastin(Sigma, E4013), collagen type I(Santa Cruz

biotechnology), fibronectin(Santa Cruz biotechnology) 그리고 p53(Cell signaling technology) 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 실온에서 4 시간 동안 일차 항체로 처리하고 horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 이차 항체로 다시 반응시켰다. 이후 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)를 첨가하여 발색 정도를 지켜본 후 100%, 95%, 80%, 70%, 100% ethanol과 xylene 용액에 침전시키고 커버 글라스를 덮어 관찰하였다.

III. 결과

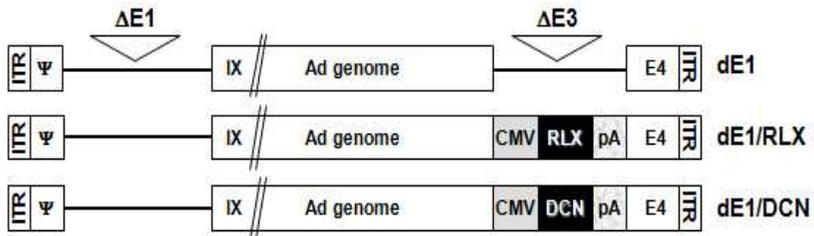
1. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 생산

Relaxin과 decorin 유전자의 발현에 따른 세포의 기질 분해와 그에 따른 바이러스의 조직내 침투력의 변화, 세포사의 양상 등을 확인하고자, 복제 불능 아데노바이러스인 dE1와 dE1의 E3 부위에 relaxin과 decorin을 발현하는 dE1/RLX과 dE1/DCN, 그리고 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB와 dB의 E3 부위에 relaxin과 decorin을 발현하는 dB/RLX, 그리고 dB/DCN를 실험에 이용하였다(Figure. 3).

2. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 MMP 발현 양상의 변화

MMP는 세포의 기질을 분해하는데 있어 매우 중요한 요소로 작용하므로 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 MMP의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 여러 가지 MMP family에 대한 RT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 relaxin과 decorin 유전자가 각각 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입된 복제불능 아데노바이러스인 dE1/RLX과 dE1/DCN을 100, 200 그리고 500 MOI의 역가로 폐암 세포주인 A549와 뇌암 세포주인 U343에 감염시키고, 48 시간 후에 RNA를 분리, 추출하여 이 중 1 μ g의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA를 template로 MMP1, MMP2, MMP7, MMP10을 검출할 수 있는 primer set을 이용하여 RT-PCR을 수행하고 MMP의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 종양의 전이에 관여

A. Replication-incompetent adenovirus



B. Replication-competent adenovirus

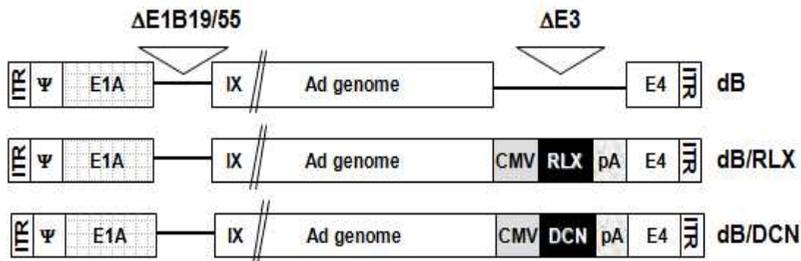


Figure. 3. Structure of six genetically engineered mutant adenoviruses. A schematic representation of the adenoviral vectors used in this study. DE1/RLX, dE1/DCN dB/RLX and dB/DCN, along with dE1 and dB. DE1 has the deleted E1 region. DB contains E1A, but E1B19 kDa and E1B55 kDa is deleted. DE1/RNX, dE1/DCN dB/RLX and dB/DCN comprised of the RLX and DCN gene driven by the CMV promoter inserted into the E3 region. $\Delta E1$ and $\Delta E3$ denote the deletion of E1 and E3 gene, respectively.

하는 MMP2의 발현정도는 relaxin과 decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스인 dE1/RLX과 dE1/DCN에 의해 변화가 없을 뿐 아니라, 오히려 dE1/DCN를 처리한 A549 세포주의 경우, MMP2의 발현 정도가 감소함을 관찰할 수 있었다. 한편 dE1/RLX과 dE1/DCN를 처리한 경우 모든 세포주에서 대조군 바이러스인 dE1을 처리한 경우와 비교하여 MMP1과 MMP10의 발현은 증가, MMP7의 발현은 감소함이 확인 되었다(Figure. 4).

3. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 조직 내 collagen type III, elastin 그리고 collagen type I의 발현 양상 확인

앞선 실험에서 MMP1, MMP10의 증가가 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 ECM을 분해하고 종양 조직 내로의 침투와 확산능을 증가시킬 가능성을 확인하였으므로, relaxin과 decorin의 발현이 MMP1에 의해 분해되는 collagen type III, MMP10에 의해 분해되는 elastin 그리고 MMP8에 의해 분해된다고 알려진 collagen type I과 같은 세포외 기질의 주성분의 발현에 미치는 실질적인 변화를 종양조직에서 확인하고자 하였다. 이를 위하여 인체 뇌암 세포주인 U343과 인체 폐암 세포주인 A549을 nude 생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB, dB/RLX, 또는 dB/DCN를 음성 대조군인 PBS와 함께 3회 종양 내 주사하고 마지막 주사일로부터 3일째에 종양 조직을 적출하여 collagen type III, elastin 그리고 collagen type I과 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 immunohistochemistry(IHC)를 시행하였다. Figure. 3에서 볼 수 있듯이, MMP1에 의해 분해되는 collagen type III의 발현이 dB/RLX 또는 dB/DCN 바이러스를 투여한 종양에서 현저히 감소하였으며

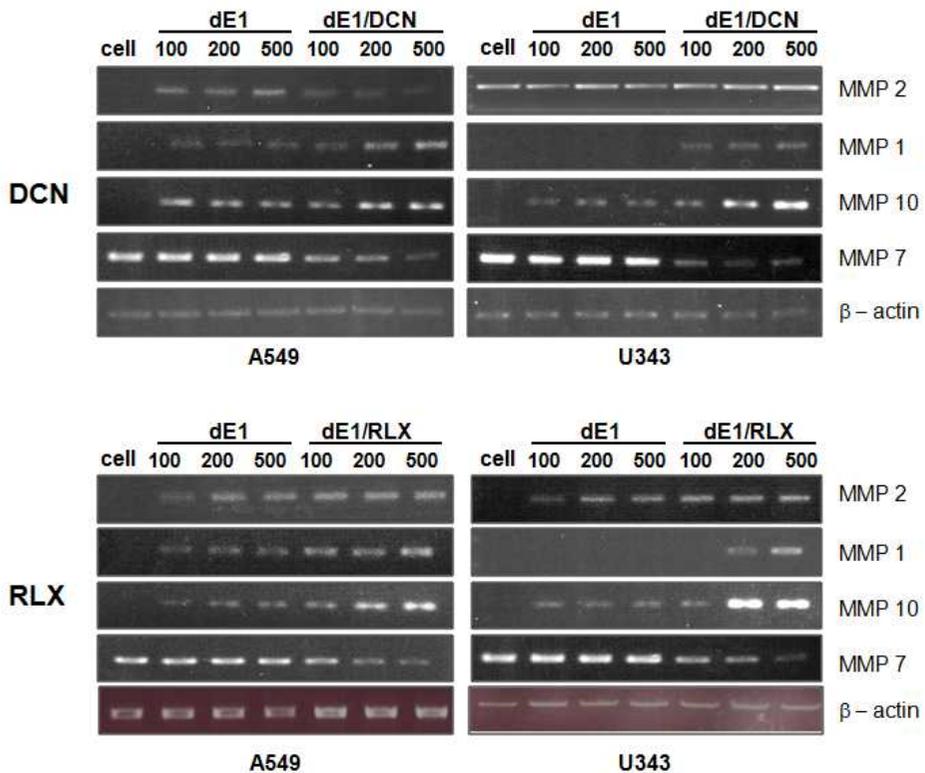


Figure. 4. The expression of MMPs in cells infected with Ads expressing decorin or relaxin. Cancer cells were incubated with dE1, dE1/RLX, dE1/DCN for 48 hr. For RT-PCR to determine expression of MMPs, total RNA was isolated from cells at 48 hr post-infection. Equal amounts of RNA (1 μ g) were used in the RT reaction, using oligo(dT)₂₃ as the primer, to generate the first-strand cDNA. The cDNA from each sample was then subjected to PCR amplification.

MMP10에 의해 분해되는 elastin의 종양 내 발현 또한 dB/RLX 또는 dB/DCN에 의해 감소됨을 확인하였다. 한편 decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB/DCN를 투여한 U343 종양에서 MMP8에 의해 분해되는 collagen type III의 발현이 현저히 감소됨을 관찰하였다(Figure. 5).

4. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 TGF- β 의 발현양상 변화

TGF- β 는 decorin의 강력한 antagonist로 작용할 뿐 아니라^{24,25} 세포외 기질의 생성과 분해를 조절하는 매우 중요한 요소로 작용하므로 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 TGF- β 의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 TGF- β 에 대한 RT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 relaxin과 decorin 유전자가 각각 아데노바이러스의 E3 부위에 삽입된 복제불능 아데노바이러스인 dE1/RLX과 dE1/DCN을 대조군인 dE1과 함께 100, 200 그리고 500 MOI의 역가로 폐암 세포주인 A549와 뇌암 세포주인 U343에 감염시키고, 48 시간 후에 RNA를 분리, 추출하여 이 중 1 μ g의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA를 template로 TGF- β 를 검출할 수 있는 primer set을 이용하여 RT-PCR을 수행하고 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, dE1/DCN를 처리한 A549 세포주에서 음성 대조군인 dE1을 처리한 세포주에 비해서 TGF- β 의 발현 정도가 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다. 이러한 TGF- β 발현 감소 현상은 U343에서도 동일하게 관찰되었다. 반면 dE1/RLX을 처리한 경우, 모든 세포주에서 대조군 바이러스인 dE1을 처리한 경우와 비교하여

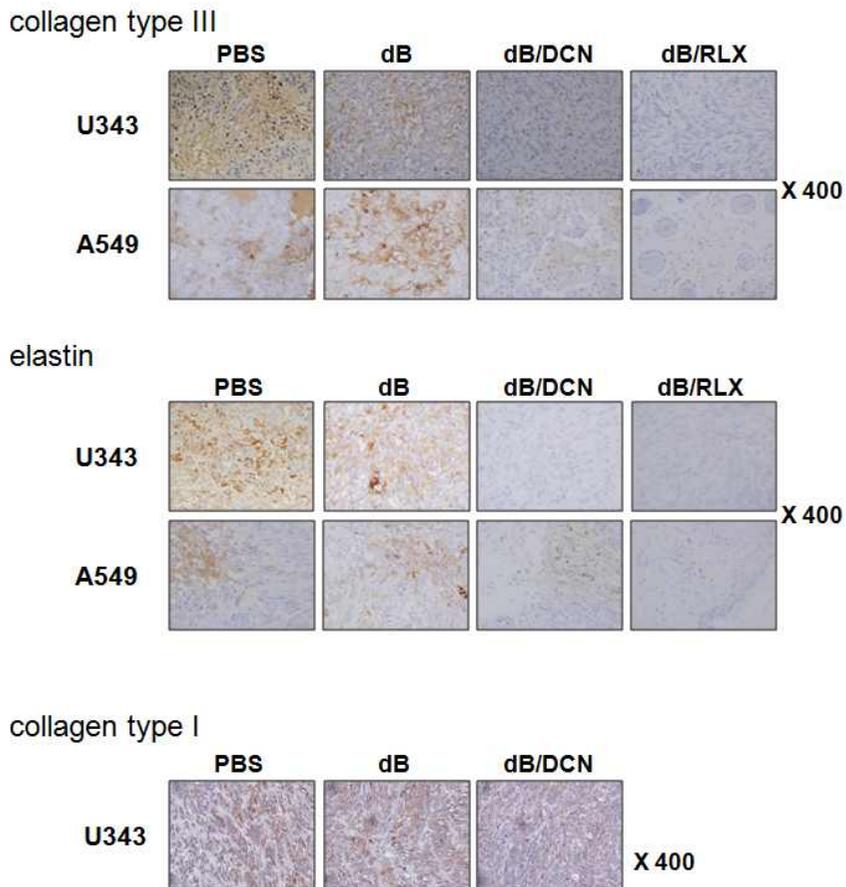


Figure. 5. Immunohistochemical staining of collagen type III, elastin, or collagen type I in tumor tissue. Representative photomicrographs of U343 and A549 tumor tissues demonstrating histological changes in response to administration of PBS, dB, dB/RLX or dB/DCN. Significantly decreased signal is observed in the wider region of dB/RLX or dB/DCN-treated tumor, suggesting relaxin or decorin decrease expression of ECM component inside of tumor mass. Original magnification: x400

TGF- β 의 발현양상은 전혀 변화가 없음을 확인하였다(Figure. 6).

또한 Decorin에 의한 TGF- β 의 감소현상이 실제적으로 종양 조직 내에서도 일어나는지 확인하기 위해 TGF- β 에 대한 immunohistochemistry(IHC)를 수행 하였다. Figure. 6(B)에서 볼 수 있듯이, decorin을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스 dB/DCN를 투여한 종양에서 TGF- β 의 발현이 dB 또는 PBS를 투여한 종양에 비해 현저히 감소되었음을 확인하였다.

5. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EGFR signaling의 변화

세포외 기질의 장벽과 결합 조직을 분해하는데 있어, TGF- β 와 EGF(epidermal growth factor)의 상승작용은 이미 여러 그룹에 의해 보고된 바 있다. 앞서 수행된 실험 결과에 의하면, decorin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스와 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의해서 TGF- β 의 발현이 현저히 감소되었으므로 이에 따른 EGFR의 발현 양상의 변화를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 인체 뇌암 세포주인 U343를 6 cm dish에 분주하고 12 시간, 24 시간 후 복제 불능 아데노바이러스인 dE1 그리고 decorin을 발현하는 dE1/DCN 아데노바이러스를 20 그리고 50 MOI로 각각 감염시키고 2일 뒤에 이로부터 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 시행하였다. EGFR 또는 phospho-EGFR 단백질을 특이적으로 인지하는 항체를 일차 항체로 hybridization시키고 HRP가 결합된 이차 항체로 다시 반응시켜 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EGFR과 phospho-EGFR의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, Figure. 7(A)에서 볼 수 있듯이,

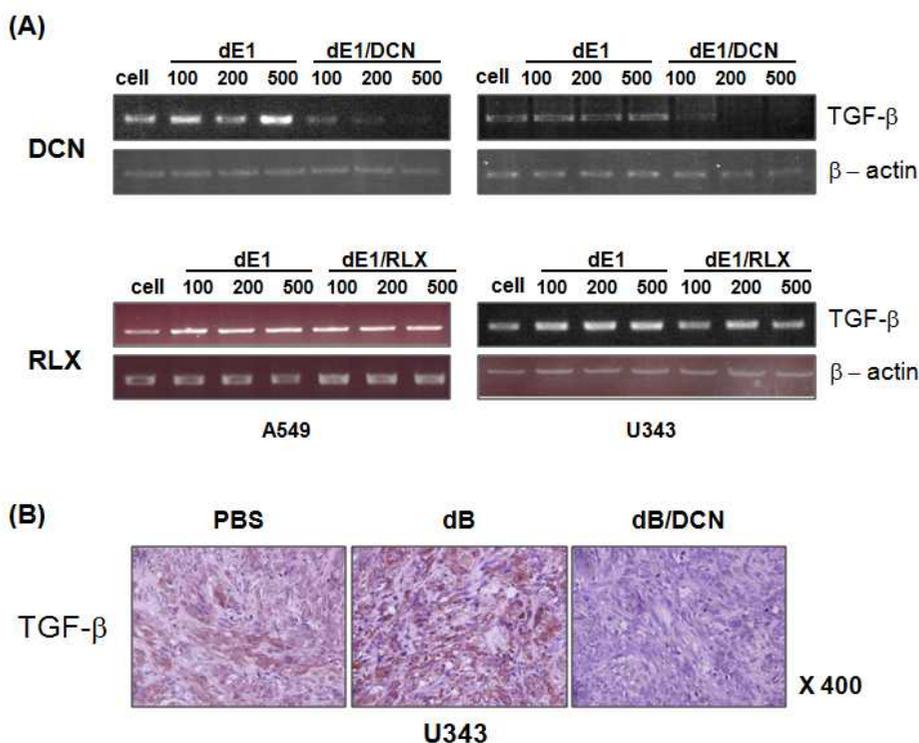


Figure. 6. Effect of decorin and relaxin on TGF- β expression *in vitro* and *in vivo*. (A) Changes of expression level of TGF- β in response to administration of PBS, dE1, dE1/RLX or dE1/DCN. (B) Immunohistochemical staining of TGF- β in tumor tissue. Representative photomicrographs of U343 tumor tissues demonstrating histological changes in response to administration of PBS, dB, or dB/DCN. Significantly decreased expression of TGF- β is observed in the wider region dB/DCN-treated tumor, suggesting decorin decrease expression of TGF- β component inside of tumor mass. Original magnification: x400

total EGFR의 경우 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 발현의 변화가 없었지만 phospho-EGFR의 경우 decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스인 dE1/DCN을 처리한 세포주에서 음성 대조군인 dE1를 처리한 세포주에 비해 그 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

한편 EGFR이 autophosphorylation되어 down signal에 신호를 전달할 경우, MAPK pathway가 활성화 되어 종양 세포의 증식이 일어나기 때문에³³, dE1/DCN에 의해 감소된 phospho-EGFR의 발현이 MAPK(Erk1/2)의 발현에 미치는 영향을 확인하고자 Erk1/2에 대한 Western blot assay를 수행하였다. 그 결과, Figure. 7(B)에서 볼 수 있듯이, decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스인 dE1/DCN을 처리한 세포주에서 음성 대조군인 dE1를 처리한 세포주에 비해 Erk1/2의 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

6. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EMT(epithelial-mesenchymal transition) molecule의 변화

Decorin은 세포외 기질의 장벽을 구성하는 성분의 하나인 fibronectin과의 상호작용을 통해 활성이 저해된다고 알려져 있으므로²⁸, decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스 dB/DCN에 의해 발생하는 fibronectin의 발현의 변화를 종양 조직 내에서 확인하고자 U343 종양조직을 이용하여 fibronectin에 대한 IHC를 수행 하였다. 그 결과 Figure. 8(A)에서 확인할 수 있듯이, 음성 대조군인 PBS 또는 dB를 처리한 종양 조직에 비해 decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB/DCN을 처리한 종양조직에서의

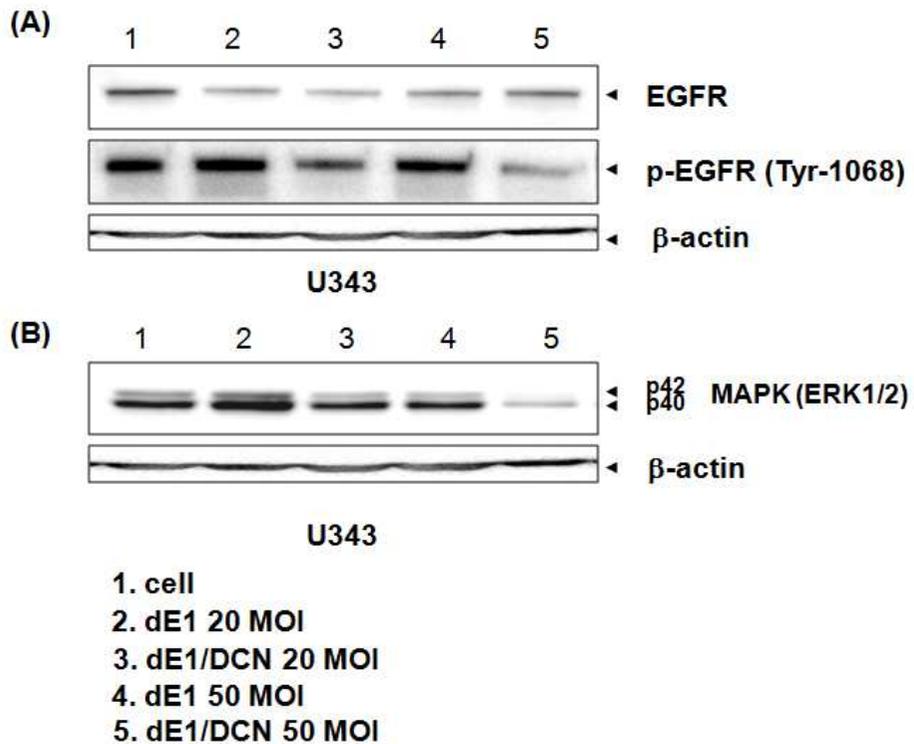


Figure. 7. Attenuation of EGFR signaling by decorin-expressing adenovirus (A)Significantly decreased signal of phospho-EGFR was observed in the cells treated dE1/DCN, suggesting decorin decrease expression of phospho-EGFR, not total EGFR. (B)Significantly decreased signal of Erk1/2 was observed in the cells treated dE1/DCN.

fibronectin의 발현이 현저히 감소됨을 관찰 하였다. 한편, relaxin과 decorin의 발현이 세포의 침윤과 이동에 관여하는 여러 종류의 Epithelial-mesenchymal transition(EMT) molecules의 발현 변화에 미치는 영향을 확인하고자 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, decorin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 dE1/DCN에 의해 SIP1, fibronectin, N-cadherin의 발현이 dE1을 처리한 음성 대조군에 비해 감소함을 확인하였다. 한편 relaxin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 dE1/RLX에 의해 N-cadherin과 twist의 발현이 dE1을 처리한 음성 대조군에 비해 감소하였으나 SIP1, fibronectin등의 발현에는 변화가 없음을 관찰 하였다(Figure. 8(B)).

7. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양세포 살상효과 비교 검증

Relaxin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 암세포 살상능을 검증하기 위하여, 여러 종류의 인체 종양 세포주(U343, C33A, A549)를 각각 24-well plate에 60-70%로 분주하고 24시간 후 음성 대조군인 dE1, dB 그리고 dB/RLX을 0.1-10 MOI로 각각 처리하였다. 각각의 독립된 실험에 처리된 여러 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 dB/RLX의 세포살상 효과를 관찰, 분석 하였다. 그 결과 Figure. 9에서 볼 수 있듯이, A549의 경우, 음성 대조군인 dE1으로 감염된 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식에 의한 세포 살상효과가 관찰되지 않았으나, dB/RLX으로 감염된 경우에는 relaxin이 발현되지 않는 대조군 바이러스인 dB에 비해 약 20 배

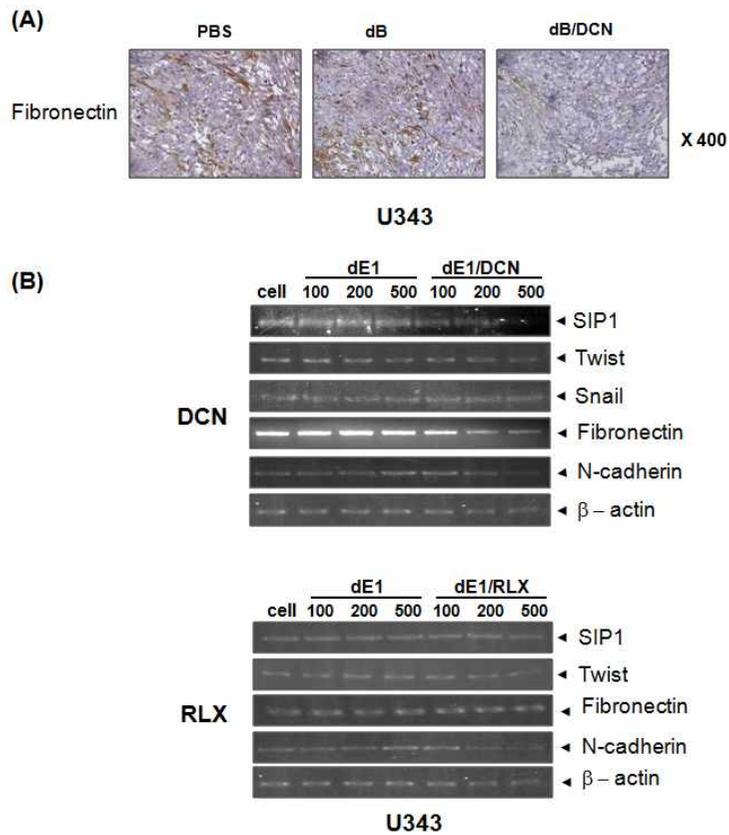


Figure. 8. Effect of decorin and relaxin on the expression of EMT molecules. (A) Changes of expression level of fibronectin in response to administration of PBS, dB, or dB/DCN. in tumor tissue. Significantly decreased expression of fibronectin was observed in the wider region of dB/DCN-treated tumor. Original magnification: x400 (B) Changes of expression level of EMT molecules in response to administration of PBS, dE1, dE1/RLX or dE1/DCN. Decreased expression of SIP1, fibronectin and N-cadherin was observed by decorin. And decreased expression of Twist and N-cadherin was observed by relaxin.

정도 높은 암세포 살상효과가 관찰되었다. 이러한 현상은 실험에 이용한 모든 세포주에서 관찰되었으며 평균적으로 대조군에 비해 약 5-10 배 정도 높은 암세포 살상효과를 유도하였다.

8. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양세포 살상효과 비교 검증

Decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 암세포 살상능을 검증하고 정량화하기 위해서, 여러 종류의 인체 종양 세포주(U343, Hep3B, A549, U87MG, C33A)를 각각 24-well plate에 60-70%로 분주하고 24 시간 후 음성 대조군인 dE1와 함께 dB 그리고 dB/RLX을 20 MOI로 각각 처리하였다. 바이러스 처리 후, 48 시간 경에 MTT 분석을 시행하여 세포의 생존율을 측정하였다 (Figure. 10). 각 바이러스의 생존율은 dE1의 세포 생존율을 100%로 환산하여 상대 비교하였다. 복제 불능 아데노바이러스인 dE1을 처리한 모든 세포주에서는 바이러스 복제에 따른 세포 살상이 유도되지 않아 100%수준의 세포 생존율을 보인 반면, 종양 선택적 살상 아데노바이러스들을 투여한 암 세포주들의 경우에는 세포 사멸이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, dB/DCN 대조군인 dB보다 빠른 암 세포 살상을 유도하였다.

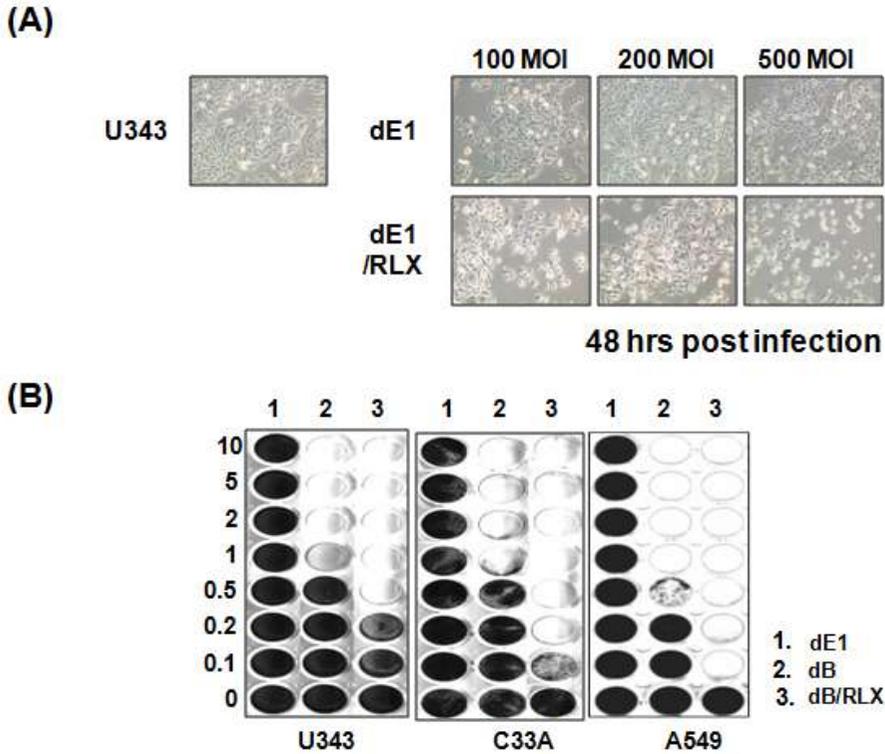


Figure. 9. (A) Morphologic change of U343 cells in response to administration of dE1 or dE1/RLX. in tumor tissue. Much more increased cytopathic effect(CPE) was observed in the wider region of dE1/RLX-treated group compare with dE1-treated group. Original magnification: x200 (B) Cytopathic effect(CPE) assay with dB, isogenic control virus without relaxin, and dB/RLX. Cells were infected with dE1, dB and dB/RLX at the indicated MOI. At 4-8 days post-infection, surviving cells were stained using crystal violet. Replication-incompetent adenovirus dE1 served as a negative control. Each cell line was tested at least three times, and data shown were from representative experiments.

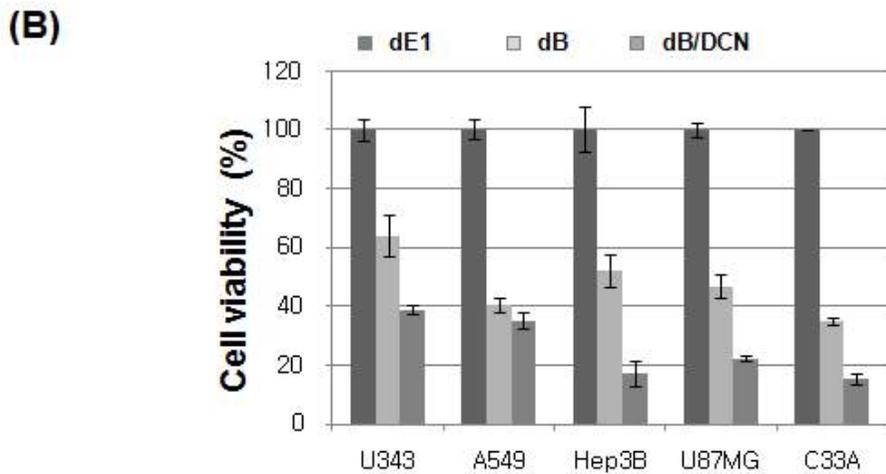
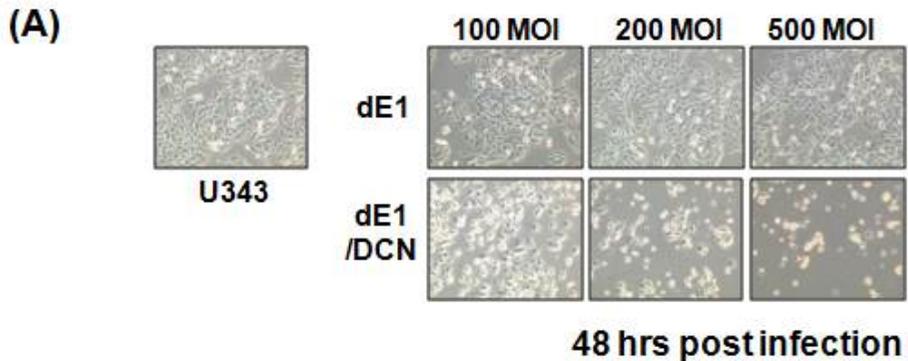


Figure. 10 (A) Morphologic change of U343 cells in response to administration of dE1 or dE1/DCN, in tumor tissue. Much more increased cytopathic effect(CPE) was observed in the wider region of dE1/DCN-treated group compare with dE1-treated group. Original magnification: x200 (B) Cancer cell killing of dB/DCN. Monolayers of cancer cells were infected with dE1, dB and dB/DCN at an MOI of 20. dE1- infected cells were served as a negative control. Viable cells were analyzed by MTT assay, and results are the mean of triplicated experiments.

9. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 p53 단백질 발현 양상 비교

Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 p53의 발현 양상을 비교 검증하기 위해, U343 그리고 A549 세포주를 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 복제 불능 아데노바이러스로 각각 20, 50 MOI로 감염시킨 뒤 48 시간 경에 세포를 회수하여 p53을 검출할 수 있는 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다 (Figure. 11). Figure. 11 (A) 에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 dE1 바이러스로 감염된 U343 세포의 경우에는 p53이 매우 약하게 검출된 반면, decorin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/DCN로 감염된 U343 세포에서는 p53이 매우 강하게 검출됨을 관찰 할 수 있었다. 한편 relaxin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/RLX으로 감염된 A549 세포에서는 대조군인 dE1과 비교하여 p53의 발현의 변화가 없었으며 p53이 활성화된 형태인 phospho-p53의 발현 양상에도 변화가 없음을 관찰하였다(Figure 11. (B)). 이러한 결과를 통해 relaxin을 발현 하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 세포고사는 p53-independent pathway에 의해, decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 세포고사는 p53-dependant pathway에 의해 발생할 가능성을 확인할 수 있었다.

10. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 NO 생산량 비교

선행된 실험에서 relaxin이 p53 independent pathway로 세포고사를 유도할 가능성 확인하였으므로 relaxin에 의해 유도되는 apoptosis가 어떤 기전에 의해 발생하는지 알아보하고자 NO의 생산량을 확인하는 실험을 수행하였다.

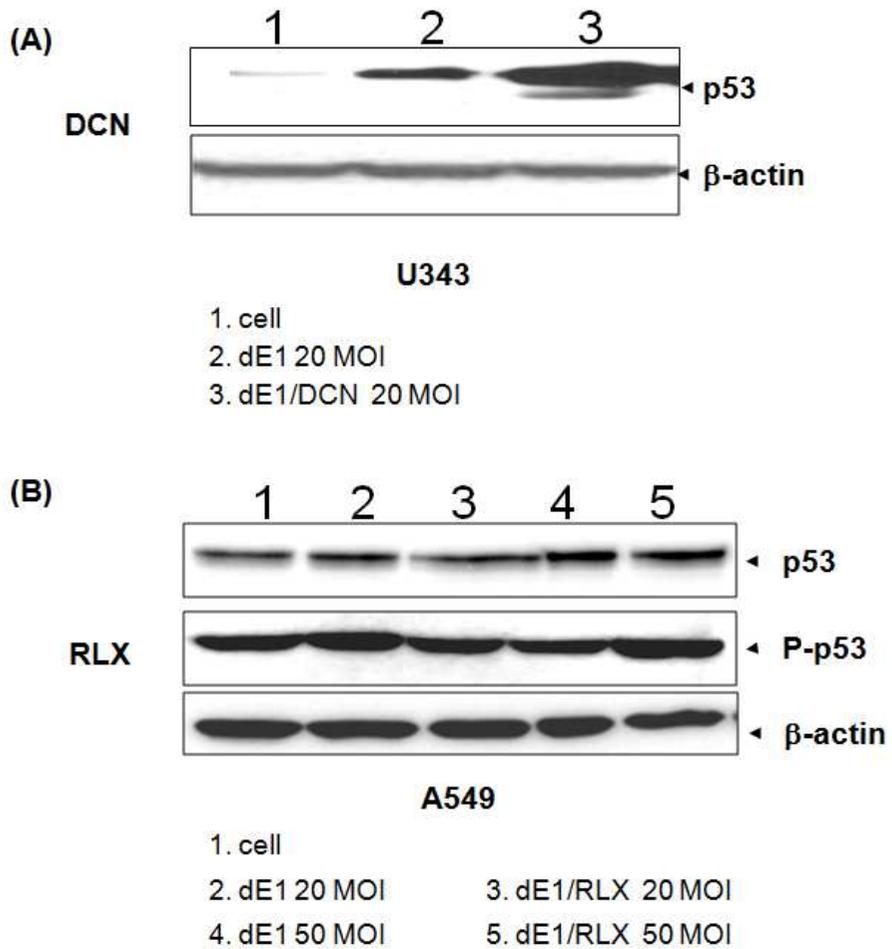


Figure. 11. The expression of p53 in cells infected with dE1, dE1/RLX or dE1/DCN. Cell on 6cm plates were infected with dE1, dE1/RLX, dE1/DCN adenovirus at an MOI of 20 or 50. At 24 hrs after infection, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an antibody recognizing p53, phospho-p53 or β -actin.

NO는 특정 환경에 노출되어 peroxynitrite로 변화되면 S-nitrosothiols 을 형성하거나 L-arginine의 고갈 상태를 유도함으로써 항종양 활성을 띠거나³⁵, Cytochrome oxidase의 불활성 유도를 통해 미토콘드리아의 호흡을 억제시켜 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다³⁶. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 NO의 생산 양상을 비교 검증하기 위해, U343 그리고 A549 세포를 6 cm dish에 분주하고 24 시간 후 복제 불능 아데노바이러스인 dE1/RLX과 음성대조군인 dE1 아데노바이러스를 50 MOI로 각각 처리하고 6 시간 동안 배양하였다. 이후 우태아 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하고 24 시간 동안 배양한 뒤 배지를 회수하여 nitrite/nitrate assay kit을 이용하여 배지로 방출된 NO의 양을 확인 하였다(Figure. 12). Figure. 12에서 볼 수 있듯이, A549 또는 U343 cell에서 relaxin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 dE1/RLX에 의한 NO의 생산량이 대조군인 dE1에 비해 2-3 배 증가함을 관찰하였다.

11. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 iNOS의 발현 양상 비교

앞서 수행된 실험에서 relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 NO의 생산이 크게 증대됨을 확인했기 때문에 relaxin의 발현이 NO를 형성하는 synthase의 일종인 inducible nitric oxide synthase(i-NOS)의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 iNOS에 대한 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, A549 세포주에서 relaxin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 dE1/RLX에 의해 iNOS의 발현정도가 대조군인 dE1을 처리한 경우와 비교하여 크게 증가함을 확인하였다(Figure. 13).

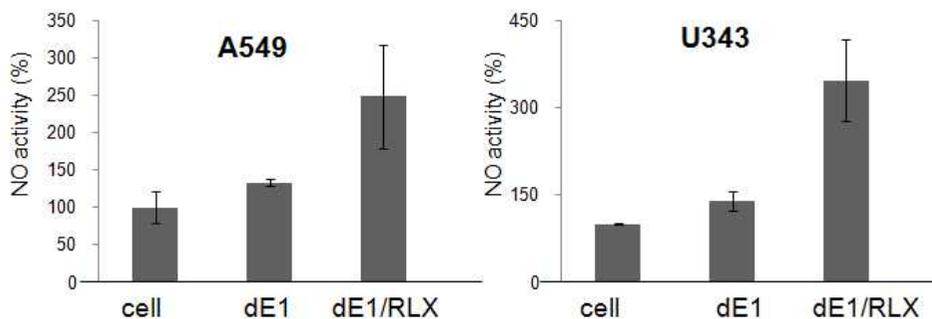


Figure. 12. The production of NO in cells infected with dE1 and dE1/RLX. Cells on 6cm plates were infected with dE1 and dE1/RLX at an MOI of 50. At 30 hr after infection, media were subject to NO assay.

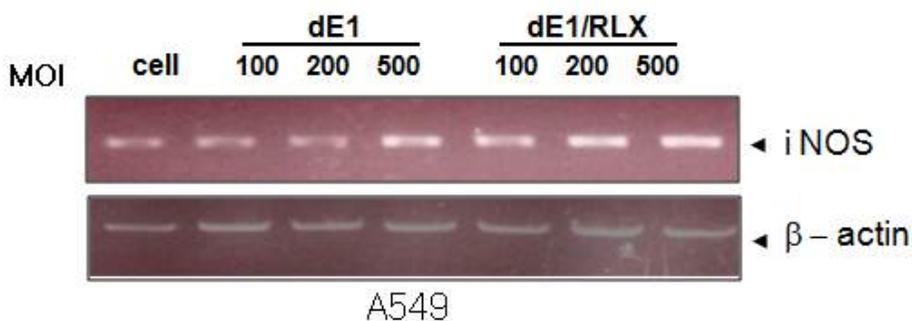


Figure. 13. Effect of relaxin on iNOS expression in A549. Increased expression level of iNOS in response to administration of dE1, or dE1/RLX was shown.

12. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 mitochondria apoptosis 관련 단백질 발현 양상 비교

Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 mitochondrial apoptotic protein의 발현 양상을 비교 검증하기 위해, U343 그리고 A549 세포주를 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 복제 불능 아데노바이러스로 각각 20, 50 MOI로 감염시킨 뒤 24 시간 후에 세포를 회수하여 Bax, Bcl2 그리고 Cytochrome C를 검출할 수 있는 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다(Figure. 14). Figure. 14(A)에서 볼 수 있듯이, decorin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/DCN로 감염된 U343 세포에서 Bax와 Cytochrome C의 증가가 관찰되었고 anti-apoptotic protein인 Bcl2의 경우, dE1/DCN에 의해 그 발현이 현저히 감소됨을 관찰 할 수 있었다. 한편 relaxin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/RLX으로 감염된 A549 세포에서도 역시 Bax와 Cytochrome C의 증가와 Bcl2의 감소가 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 일련의 결과를 통해 relaxin 또는 decorin을 발현 하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 세포고사가 모두 mitochondrial apoptosis에 의해 매개 될 가능성을 확인할 수 있었다.

13. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 PARP 단백질 발현 양상 비교

세포고사의 마지막 단계에서 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 PARP의 발현 양상을 비교 검증하기 위하여 U343 그리고 A549 세포주를 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 복제 불능 아데노바이러스로 각각 20, 50 MOI로 감염시킨 뒤 24 시간 경에 세포를 회수하여 PARP를 검출할 수 있는 항체를 이용하여

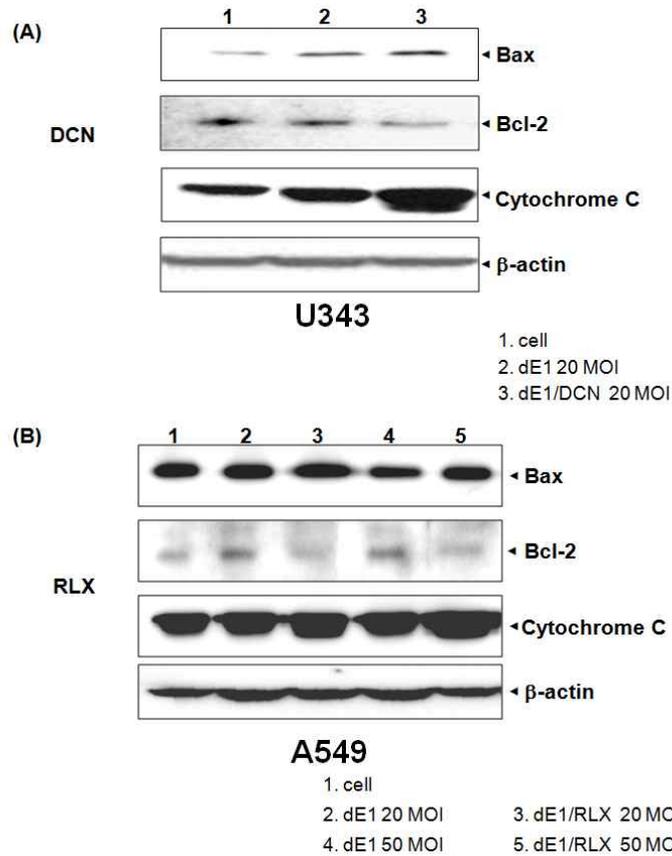


Figure. 14. (A) The change of expression of Bax, Bcl2 and Cytochrome C by decorin. Cells on 6 cm plates were infected with dE1 or dE1/DCN adenovirus at an MOI of 20 or 50. (B) The change of expression of Bax, Bcl2 and Cytochrome C by relaxin. Cells on 6 cm plates were infected with dE1 or dE1/RLX adenovirus at an MOI of 20 or 50. Increased expression level of Bax and Cytochrome C in response to administration of dE1, dE1/DCN or dE1/RLX was shown. Decreased expression level of Bax and Cytochrome C in response to administration of dE1, dE1/DCN or dE1/RLX was shown.

Western blotting을 시행하였다(Figure. 15). 그 결과, relaxin 또는 decorin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/RLX 또는 dE1/DCN로 감염된 U343세포에서 대조군 바이러스인 dE1로 감염된 세포주에 비해 활성화 된 PARP의 발현이 현저히 증가됨을 관찰하였다. 이러한 일련의 결과를 통해 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 세포고사가 caspase-3에 의해 매개됨을 간접적으로 확인할 수 있었다.

14. Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 세포주기 양상 비교

Relaxin과 decorin의 발현에 의해 유도되는 세포고사 및 세포주기 변화를 확인, 검증하기 위하여, U343 세포주에 200 MOI의 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 복제 불능 아데노바이러스로 감염시키고 PI를 처리하여 유세포 분석(FACS analysis)을 시행하였다(Figure. 16). 그 결과, Figure 16와 Table 1에서 볼 수 있듯이, relaxin과 decorin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 처리한 세포주에서 세포사를 나타내는 subG1 population과 함께 G2-M의 population이 현저히 증가됨을 확인하였다.

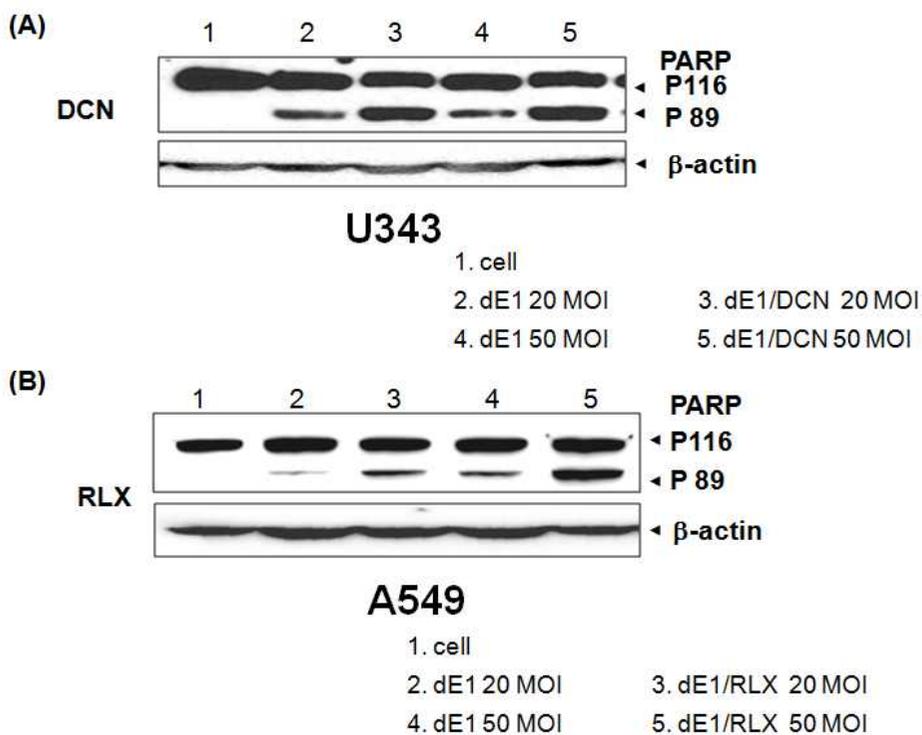


Figure. 15. (A) The change of expression of PARP by decorin. Cells on 6 cm plates were infected with dE1 or dE1/DCN adenovirus at an MOI of 20 or 50. (B) The change of expression of PARP by relaxin. Cells on 6 cm plates were infected with dE1 or dE1/RLX adenovirus at an MOI of 20 or 50. Increased expression level of PARP in response to administration of E1/DCN or dE1/RLX was shown.

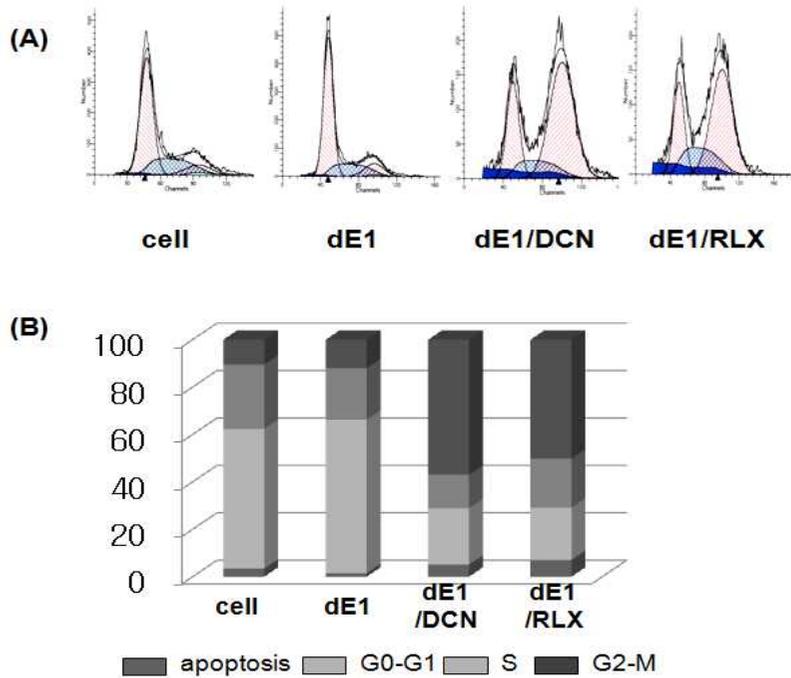


Figure. 16. Effect of relaxin and decorin on cell cycle (A) Histogram of cell cycle in each cells infected with dE1, dE1/RLX or dE1/DCN. (B) A bar graph representations of populations of each phase in cell cycle : At after 48hrs, PI staining was performed. using the cells were treated PBS, 1 μ M of CPT and viruses at an MOI 0.5-50 of adenoviruses.

	SubG1	G0-G1	S	G2-M
cell	3.47	58.88	27.14	10.50
dE1	1.53	64.76	21.65	12.05
dE1 /DCN	5.11	23.81	14.14	56.95
dE1 /RLX	7.11	22.04	20.62	50.23

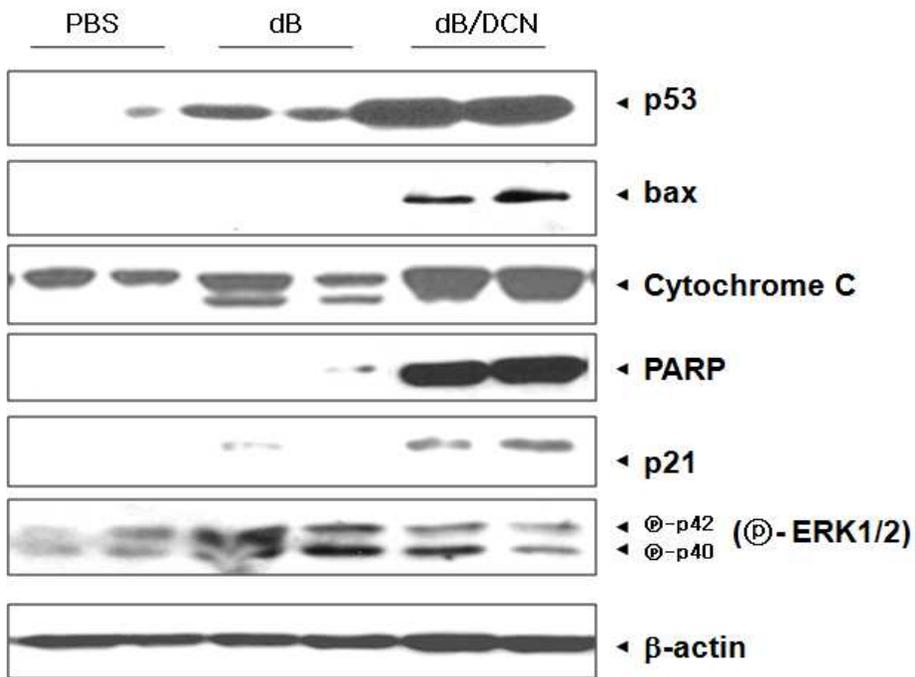
Table. 1 The mean percentage of early apoptosis, G0-G1, S and G2-M. Cells were infected with dE1, dE1/RLX or dE1/DCN.

15. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 내 apoptotic signal의 발현 양상 비교, 검증

Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 내 apoptotic signal의 발현 양상을 검증하고자 5×10^8 PFU의 dB, dB/DCN을 U343 종양 조직 내에 이틀 간격으로 3 회 투여하고 3 일 후에 종양을 회수하여 apoptosis와 관련된 여러가지 protein의 항체(p53, Bax, Bcl2, Cytochrome C, p21 그리고 MAPK)를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. Figure. 17에서 볼 수 있듯이, decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB/DCN이 투여된 종양 조직에서 p53, Bax, Cytochrome C, PARP 그리고 p21의 증가가 관찰되었다. 한편 MAPK의 발현은 dB/DCN이 투여된 종양 조직에서 decorin에 의해 감소함이 관찰되었다.

16. Decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 종양 내 apoptotic signal의 발현 양상 비교, 검증

Decorin을 발현하는 아데노바이러스가 실제적으로 종양 내 p53 단백질의 발현에 미치는 변화를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 인체 뇌암 세포주인 U343을 nude 생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB, dB/RLX, 또는 dB/DCN를 음성 대조군인 PBS와 함께 이틀간격으로 3 회 종양 내 주사하고 3 일 후에 종양 조직을 적출하여 p53과 선택적으로 결합하는 항체를 이용하여 IHC를 시행하였다. Figure. 18에서 볼 수 있듯이, 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB/DCN에 의해 p53의 발현이 증가됨을 확인하였고 이는 *in vitro*, *in vivo* 상에서의 Western blot의 결과와 일치하는 결과이다.



U343 (*in vivo*)

Figure. 17. The expression of apoptotic protein in tumors infected with dB or dB/DCN. Tumors were injected with 5×10^8 PFU of dB or dB/DCN adenovirus 3 time every other day. At 3 days after injection, tumor lysates were subject to immunoblot analysis with antibodies recognizing p53, Bax, Cytochrome C, p21, PARP, phospho-Erk or β -actin.

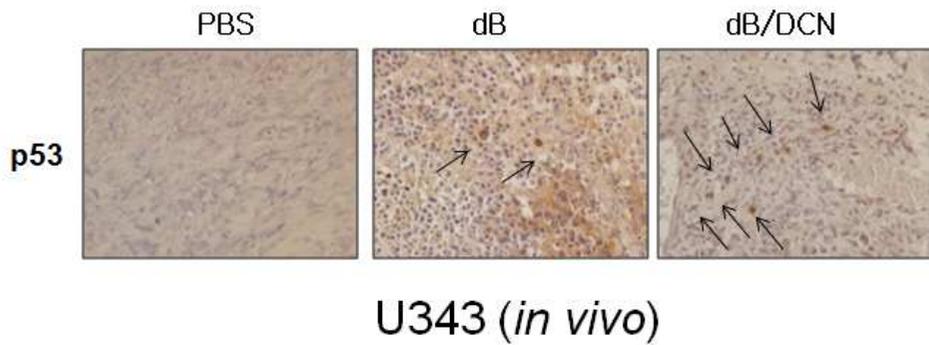


Figure. 18. The expression of apoptotic protein in tumors infected with dB or dB/DCN. Tumors were injected with 5×10^8 PFU of dB or dB/DCN adenovirus 3 time every other day. At 3 days after injection, tumor lysates were subject to immunohistochemistry analysis with an antibody recognizing p53.

IV. 고찰

종양 특이적 살상 아데노바이러스가 새로운 암 유전자 치료법으로 대두된 이후 이를 이용한 임상 시험들이 활발히 진행되고 있다. 종양 특이적 살상 아데노바이러스는 감염된 일차 암세포뿐만 아니라 주위의 다른 암세포로 확산됨으로써 기존의 복제 불능 아데노바이러스에 비해 높은 유전자 전달 효율과 뛰어난 항종양 효과를 유도할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다. 그러나 대부분의 종양 조직은 암세포들이 단순히 군집되어 있는 것이 아니라, 혈관과 정상 조직들이 단단하게 뒤엉켜 있으며 암세포 외부 주위에 존재하는 세포외 기질이 형성되어 있어 바이러스뿐만 아니라 항암 치료제가 종양에 원활히 침투되지 못하여 항 종양효과를 제대로 발휘하지 못하고 이러한 원인으로 초기 임상시험 결과는 아직 만족할 만한 항종양 효과를 얻지 못하였다. 이에 아데노바이러스의 국소적 종양 침투력을 개선하기 위해 matrix degradative protein으로 작용하는 relaxin과 decorin 유전자를 도입시켜 종양 특이적 살상 아데노바이러스가 제작되었으며 이를 종양치료 목적으로 이용한 유전자 치료에 이용하여 relaxin과 decorin의 종양 조직 내 바이러스 확산능과 이에 따른 암세포 살상 증대효과에 의한 우수한 생체 내,외 항종양 효과를 관찰하여 보고된 바 있다.

Relaxin과 decorin을 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료에 적용하기 위해서는 ECM 장벽과 결합조직을 분해, 종양 조직내로의 침투와 확산 그리고 세포 주기와 세포 살상에 작용하는 relaxin과 decorin의 기전에 대한 정확한 연구와 이해가 필수적인 요소라고 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 종양 조직 내로의 확산과 강력한

세포고사 유도제로 작용하는 relaxin과 decorin의 새로운 기능을 분자적인 수준에서 규명 하였다.

Relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 조직 침투성을 검증하기 위해 실시된 초기 연구는 생체 종양과 유사한 3차 구조를 가진 종양구 조직을 배양하여 E1 부위에서 LacZ를 발현하고 E3 부위에서 relaxin과 decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스인 dE1/RLX, dE1/DCN에 의한 조직 내 바이러스의 확산 정도에 따른 유전자 전달 효율을 관찰하는 형태로 이루어졌으며, 그 결과 dE1/RLX, dE1/DCN의 LacZ의 전달 효율이 dE1에 비해 이 현저히 증가 하여 종양구의 표면뿐만 아니라 종양구의 안쪽까지 LacZ가 발현함을 확인하였다. 또한 생체 내 암 조직에서도 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 바이러스의 투여 부위(injection site)로부터 더 멀리 그리고 더 넓게 퍼져나간 것을 통해서도 relaxin과 decorin의 우수한 조직 침투성이 확인되었다. 이러한 relaxin과 decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스의 조직 내 바이러스 확산 증진 효과가 종양 특이적 살상 아데노바이러스에도 적용되어 증대된 항종양 효과가 수반되었다³².

Relaxin에 의한 조직내 collagen의 분비감소는 MMP 또는 procollagenase 발현의 촉진에 의한 것으로 밝혀졌다¹⁶⁻¹⁸. 또한 decorin은 matrix assembly에 관여하며 growth factor나 metal ion과 같은 세포외기질의 구성 성분과 반응하여 MMP1과 MMP2등의 발현을 촉진시켜 세포외 기질을 분해시킨다²⁵⁻²⁷. MMP는 구조적인 측면에서 zinc-dependent endopeptidases의 일종으로, 세포외 기질의 분해에

있어 매우 필수적인 성분이다⁴². 이러한 일련의 사실을 바탕으로 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 MMP의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위한 RT-PCR을 수행한 결과, 먼저 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 MMP2의 발현에는 거의 영향을 미치지 못하거나 오히려 약하게 감소시킴을 확인 하였고 또한 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스는 MMP1, MMP10의 증가에 직접적으로 영향을 미치는 반면, MMP7 발현은 감소시킴을 관찰 하였다(Figure. 3) 여러 종류의 tumor에서 과 발현되어 있는 MMP2는 침윤이 시작된 종양세포의 표면에 $\alpha v \beta_3$ integrin을 통해 결합하여 암세포의 이동과 침윤을 촉진시켜 전이를 유발 한다^{38,39}. 그러므로 이러한 결과는 relaxin과 decorin의 발현이 종양의 전이에 관여하지 않을 뿐 아니라 MMP1, MMP10등의 발현을 증가시켜 종양의 세포외 기질의 주요 성분의 분해를 촉진함으로써 바이러스의 확산능을 촉진시킴을 의미한다. 이러한 결과는 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 전이에 대한 위험 없이 세포외 기질 분해라는 장점을 극대화 시켜 종양치료에 유용하게 적용될 수 있음을 의미한다.

MMP1(collagenase I)은 collagen type III의 분해를 촉진시키고 MMP10(stromelysin)은 elastin 또는 fibronectin의 분해를 유발한다⁴². Relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 MMP1, MMP10의 발현의 증가는 결국 relaxin과 decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 적용되어 실제적으로 종양 조직에서 collagen type I, elastin 그리고 collagen type III과 같은 ECM을 분해하고 종양조직내로의 아데노바이러스의 침투와 확산능을 증가 시키는 것이 확인 되었다(Figure. 5). 이러한 결과는 relaxin과 decorin을 발현

한 아데노바이러스를 이용한 초기 실험에서 Masson's trichrome 염색을 시행하여 세포외기질의 주성분이며 특히 결합조직의 주성분인 collagen의 분포를 관찰했을 때 대조군(dB)을 투여한 경우에는 푸른색으로 염색된 collagen이 종양 세포들 사이에서 많이 관찰된 반면에, relaxin 과 decorin을 발현하는 바이러스(dB/RLX, dB/DCN)를 투여한 경우에는 종양 내부에서는 거의 푸른색을 관찰할 수 없었던 결과와 일치한다³².

본 연구에서 수행한 TGF- β 에 대한 RT-PCR을 통하여 relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 TGF- β 의 발현 양상에는 변화가 없지만 decorin을 발현하는 아데노바이러스의 경우 TGF- β 의 발현을 현격히 억제시키고 이는 결국 종양 조직 내의 TGF- β 의 활성을 저해함을 확인하였다(Figure. 6). Decorin은 TGF- β 의 natural antagonist로서 TGF- β 활성을 억제시킴으로써 collagen의 섬유화를 막고 matrix assembly에 관여하며, 종양 세포 성장을 억제하여 종양의 형성과 성장에 관여한다⁴⁰. 또한 TGF- β 는 세포외 기질의 생성과 분해를 조절하는 단백질로서 Ras나 PI3K등의 pathway에 의해 활성화 되면 종양세포의 이동성이나 EMT, intra- 또는 extra-vasation에 관여하여 종양의 성장에 영향을 미친다⁴¹⁻⁴². 그러므로 decorin의 발현에 의한 TGF- β 발현의 감소는 세포외 기질의 섬유화를 조절하고 종양세포의 성장을 저해함을 의미한다.

Decorin은 EGFR의 novel biological ligand로 작용하여 여러 종류의 암세포들에 존재하는 EGFR과 결합함으로써 EGFR의 역할을 불활성화 시켜 세포의 증식을 방해한다고 알려져 있다²⁹. 또한, 세포외 기

질의 장벽과 결합 조직을 분해하는데 있어, TGF- β 와 EGF의 상승작용은 이미 여러 그룹에 의해 보고된 바 있다⁴³⁻⁴⁴. 본 연구에서는 decorin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스와 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의해서 TGF- β 의 발현이 현저히 감소되었으며, 이는 EGFR의 활성화된 형태인 phospho-EGFR의 발현 감소에도 영향을 미침을 확인하였고 더 나아가 종양 세포의 증식에 관여하는 MAPK pathway의 key molecule인 Erk의 발현 또한 현저히 감소함을 확인하였다(Figure. 7). 이러한 일련의 결과는 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 TGF- β 와 EGFR의 효과적인 antagonist로 작용할 뿐 아니라 세포의 증식도 효과적으로 억제함을 의미한다.

EMT 현상은 종양생성의 초기 단계에 종양세포의 변형에 관여하는 EMT molecule은 MMP의 발현이 증가에 의해 그 활성이 유도 된다⁴⁵. 앞에서 확인 된 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 MMP의 발현 증가가 EMT molecule의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위한 RT-PCR을 수행한 결과(Figure. 8), relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 EMT molecule의 변화는 twist의 감소를 제외하고는 관찰되지 않았으며 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해서는 오히려 fibronectin, N-cadheirin, twist, SIP1 등의 발현이 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 relaxin과 decorin에 의한 MMP1, MMP10등의 발현 증가가 종양의 전이에 관여하는 EMT molecule의 발현에는 영향을 주지 않으며 특히 SIP1은 TGF- β 에 의해 그 발현이 직접적으로 조절되는 molecule로서 decorin에 의한 TGF- β 활성 감소가 SIP1의 발현에 영향을 미쳤을 것으로 예상된다. 한편 *in vitro*에서의 decorin을 발현하는 복제불능 아데노바이러스에

의한 fibronectin의 감소는 실제적으로 종양조직에서 decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 fibronectin의 발현의 감소도 함께 유도함을 관찰 하였으며, 이는 decorin이 fibronectin의 N-terminal에 결합하여 그 활성을 억제한다는 기존의 보고와도 일치하는 결과이다²¹⁻²⁸.

한편 relaxin과 decorin에 의한 세포고사 유도의 기전은 아직 명백히 밝혀져 있지는 않다. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의해서 종양 세포의 세포고사가 진행됨이 최초로 밝혀졌으나³⁴ 그 외의 relaxin에 의한 세포고사와 관련된 보고는 전무한 실정이며, 또한 최근에 decorin이 caspase-3의 활성을 증가시킴으로서 세포고사를 유도한다는 보고가 있는 후²⁹, decorin에 의한 세포고사와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직 세포고사와 관련된 정확한 기전이 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 세포고사를 검증할 수 있는 세 가지 분석 방법들, 즉 PI 염색 또는 annexin V-FITC/PI 이중 염색 후 유세포 분석, 그리고 TUNEL 분석을 시행하고 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 relaxin과 야생형 decorin에 의해 세포고사를 증가시킴을 확인하고 이에 관한 정확한 기전을 밝히기 위한 실험을 진행하였다³².

본 연구에서 수행한 p53에 대한 Western blot을 통해 decorin의 경우 p53-dependant pathway를 통해 세포고사가 이루어지는 반면, relaxin은 p53-independent pathway로 세포고사의 신호를 전달함을 확인하였다(Figure. 11). NO는 생물학적으로 NO는 세포의 생존, 증식, 혈관 형성 반응, 염증반응 등 생물학적인 측면에서 여러 가

지 작용을 하는 물질로서 특정 환경에 노출되어 peroxynitrite로 변화되면 S-nitrosothiols 을 형성하거나 L-arginine의 고갈 상태를 유도함으로써 항종양 활성을 띠거나³⁵, Cytochrome oxidase의 불활성 유도를 통해 미토콘드리아의 호흡을 억제시켜 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다³⁶. 한편, 보고에 의하면 relaxin은 NO를 생성하여 L-arginine-nitric oxide pathway를 활성화 시킨다¹⁴. Relaxin이 p53-independent pathway로 세포고사를 유도함을 확인하였으므로 relaxin에 의해 유도되는 apoptosis가 NO의 생산에 의해 발생하는지 확인하고자 relaxin의 발현에 의한 NO의 생산 양상을 비교 검증한 결과, A549 또는 U343 cell에서 relaxin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 dE1/RLX에 의한 NO의 생산량이 대조군인 dE1에 비해 현저히 증가함을 관찰 하였다. 이러한 결과는 relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 NO의 증가가 세포고사를 유도할 가능성을 의미한다.

NO는 L-Arginine, NADPH, 그리고 O₂는 nitric oxide synthase (NOS) family에 의한 촉매 작용을 통해 NO 와 Citrulline으로 변환된다⁴⁶⁻⁴⁸. Relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 NO의 생산이 크게 증대됨을 확인하고 NO를 형성하는 synthase의 일종인 iNOS의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 relaxin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 dE1/RLX에 의한 iNOS의 발현정도가 대조군인 dE1을 처리한 경우와 비교하여 크게 증가됨을 확인하였다(Figure. 13). NOS의 종류에는 neuronal NOS(nNOS/NOS1), endothelial NOS(eNOS/NOS3), 그리고 inducible NOS(iNOS/NOS2)가 존재하며⁴⁹ 이중 iNOS는 chondrocyte, epithelial cell, hepatocyte, glial cells 그리고 여러 종류의 면역세포에서 발현되

고⁵⁴ eNOS와 nNOS가 상피세포나 신경세포에 발현되어 Ca^{2+} /calmodulin에 의해 조절되는 것과는 달리 Ca^{2+} /calmodulin에 민감하지 않고 endotoxin이나 inflammatory cytokine에 의해 조절된다⁵⁵⁻⁵⁷. 또한 iNOS는 NO에 의해 유도되는 세포고사에 직접적으로 관련되어 있는 것으로 알려져 있다⁵⁰. 본 연구에서 수행되어진 연구결과와 이와 관련된 일련의 연구는 relaxin이 iNOS에 의해 촉매 되는 NO의 생성을 활성화시켜 이에 의한 세포고사가 유도될 가능성을 제시한다.

한편, relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 mitochondrial apoptotic protein의 발현 양상을 비교 검증하기 위해 dE1, dE1/RLX 그리고 dE1/DCN 복제 불능 아데노바이러스에 의한 Bax, Bcl2 그리고 C의 발현양상을 확인하였다(Figure. 14). Relaxin과 decorin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/RLX 그리고 dE1/DCN로 감염된 세포에서 Bax와 C의 증가가 관찰되었고 anti-apoptotic protein인 Bcl2의 경우, dE1/RLX 그리고 dE1/DNC에 의해 현저히 감소됨을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의해 유도되는 세포고사가 mitochondria mediated apoptosis일 가능성을 제시하였다. 또한 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 세포고사의 마지막 단계에 존재하는 PARP 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하고자 PARP에 대한 Western blot을 수행한 결과 relaxin 또는 decorin을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1/RLX 또는 dE1/DCN로 감염된 U343 세포에서 대조군 바이러스인 dE1로 감염된 세포주에 비해 활성화 된 PARP의 발현이 증가됨을 관찰 하였다. 이러한 일련의 결과를 통해 relaxin 또는 decorin을 발현 하는 아데노바이러스에 의해 유도

되는 세포고사가 caspase3에 의해 매개됨을 간접적으로 확인할 수 있었다.

Relaxin과 decorin이 세포사에 미치는 영향을 좀 더 면밀히 관찰하기 위하여, 종양 특이적 살상 아데노바이러스에 의한 세포주기의 변화와 세포고사 정도를 PI staining으로 확인한 결과(Figure. 16), relaxin과 decorin을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 처리한 세포주에서 세포사를 나타내는 subG1 population의 증가와 함께 G2-M arrest가 발생함을 확인 하였다. 실제로 decorin에 의한 endogenous cyclin dependent p21^{WAF1}의 발현 촉진^{29,30} 세포주기 arrest 유도에 따른 세포살상을 강하게 유도한다는 보고가 있으며, 본 연구에서도 decorin에 의한 cell cycle의 저해제 역할을 하는 p21^{WAF1}의 발현 촉진함을 확인한 바 있다. 이와 같은 사실은 relaxin과 decorin 세포고사 뿐 아니라 세포주기에도 영향을 미쳐 암세포의 강력한 살상효과를 일으킨다는 사실을 증명한다.

실제로 종양 내에서도 decorin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 apoptotic signal의 발현 양상이 *in vitro*에서의 발현 양상과 일치 하는지 검증하고자 U343 종양조직을 이용하여 apoptosis와 관련된 여러 가지 protein(p53, Bax, C, PARP, p21 그리고 phospho-ERK1/2)의 발현 양상을 비교한 결과(Figure. 17), decorin을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 dB/DCN이 투여된 종양 조직에서 p53, Bax, C, PARP 그리고 p21의 증가와 phospho-Erk1/2의 감소가 관찰되었다. 한편 종양 조직 내 p53 단백질의 변화를 확인한 IHC 결과도 이와 일치함을 검증하였다(Figure. 18).

이는 decorin의 세포고사 유도제로서의 기능이 in vitro뿐 아니라 in vivo에서도 유지되고 있음을 의미한다.

이러한 연구 결과들을 종합해 보면 relaxin과 decorin이 MMP1, MMP10등의 세포외기질 분해에 관여하는 enzyme의 증가와 collagen type I, elastin 그리고 collgena type III와 같은 세포외 기질의 주요 성분의 분해, TGF- β , EGFR 그리고 EMT와 같은 물질의 발현을 ECM의 assembly와 생산 그리고 분해 등 여러 단계에서 조절함으로써 세포외 기질분해와 바이러스 확산능을 증대시키는 중요한 원인으로 작용할 뿐 아니라 relaxin 또는 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 세포고사의 여러 단계에 관여하며 세포사를 유도함을 알 수 있다.

Relaxin을 발현하는 아데노바이러스의 경우, i-NOS에 의해 촉매 되는 NO의 생산을 활성화시켜 이에 의한 p53-independent apoptosis를 통해 세포고사를 유도하며 NO를 통해 전달된 apoptosis signal은 mitochondrial apoptosis protein인 Bax, Bcl2, C에 신호를 전달하여 세포고사의 마지막 단계에 관여하는 PARP의 활성을 증가시킴으로써 세포고사를 유도함을 확인하였다(Table. 2, 3). 한편, decorin을 발현하는 아데노바이러스의 경우 p53-dependant apoptosis를 통해 mitochondrial apoptosis protein인 Bax, Bcl2, CytochromC에 신호를 전달하여 mitichondria-mediated apoptosis를 유도한다. 이렇게 전달된 apoptotic signal은 세포고사의 마지막 단계에 존재하는 단백질인 PARP까지 전달되어 decorin을 통한 강력한 세포고사가 유도된다. 또한 decorin은 세포주기를 조절하는 p21의 발현을 촉진시킴으로써 G2/M arrest를 유도할 뿐 아니라 EGFR의 활성을 저해하고 MAPK의

활성을 억제하여 암세포의 증식을 방해함으로써 세포사를 유도함을 확인할 수 있었다(Table 2, 3).

Relaxin에 의한 종양세포의 세포 살상효과와 세포고사에 대한 연구가 보고 된지 얼마 되지 않았으며 이에 대한 후속 연구가 진행되고 있으나 아직 밝혀지지 않은 부분이 많이 존재하고, 현재 진행되어 지는 연구와 보고를 통해 연구를 통해 몇 가지 가설을 제시 할 수 있다. 먼저 IGF-1은 relaxin과 같은 종류의 peptide hormone family에 속하는 단백질로서 그 기능과 특성이 relaxin과 매우 유사하다. IGF-1은 PI3K pathway를 통해 apoptosis를 유도하는 한편 MAPK 의 활성을 저해하고⁵¹, ER stress에 관여하는 CCAAT/enhancer binding protein homologous protein(CHOP)의 활성을 자극함으로써 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다⁵². NO에 의한 세포고사는 ER stress에 의한 mitochondria의 oxidative injury에 의해 주로 일어나기 때문에 relaxin에 의해 발생한 ER stress에 의해 mitochondrial apoptosis가 유도될 가능성이 매우 높다. 이러한 예상은 본 연구에서 확인한 relaxin을 발현하는 아데노바이러스에 의한 NO 생산량의 증가와 mitochondrial apoptosis signal의 증가에 의해 뒷받침된다. 또한, relaxin이 종양세포의 세포고사뿐 아니라 cell cycle arrest, autophagic death 등 세포사의 여러 단계에 관여하여 세포 살상 효과가 나타날 가능성도 배제할 수 없다. 본 실험에서 진행한 세포주기에 관한 연구 결과는 relaxin이 G2/M arrest를 유도함을 증명했으며, 최근의 보고된 바에 의하면 IGF-1은 phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) pathway를 통해 세포의 autophagy를 유도하는 mTOR등의 활성을 증가시킨다⁵³. 이러한 결과들은 relaxin이 세포사의 여러 단계에 관여한

다는 추론을 뒷받침하고 있다.

치료 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 이용한 암유전자 치료가 성공적으로 이루어지기 위해서는 치료유전자에 대한 이해가 필수적이다. 본 연구에서 수행한 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스가 ECM 장벽과 결합조직을 분해하고 종양조직내로의 침투와 확산하기까지 종양세포에서의 작용기전과 세포 살상과 세포 주기에 미치는 작용 기전에 대한 분자적인 수준에서 규명은 치료 유전자에 대한 정확한 이해를 돕게 되어 이를 실제 치료에 적용함으로써 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스를 암유전자 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

ECM degradation		Relaxin	decorin
MMP	1	증가	증가
	2	변화 없음	감소 또는 변화 없음
	7	감소	감소
	10	증가	증가
	TGF- β	변화 없음	감소
EMT	SIP1	변화 없음	감소
	TWIST	감소	변화 없음
	Snail	-	변화 없음
	N-cadherin	변화 없음	감소
	fibronectin	변화 없음	감소
ECM 성분	Collagen typeI	-	감소
	Collagen typeIII	-	감소
	Elastin	-	감소

Table. 2 Molecular characterization of relaxin and decorin on the degradation of extracellular matrix. Relaxin and decorin induce degradation of extracellular matrix by up-regulation of expression of MMP1, MMP10 not by expression of MMP2. The expressions of collagen typeI, elastin and collagen typeIII in tumor tissue are significantly decreased by relaxin and decorin.

Apoptosis 유도		Relaxin	decorin
p53		변화 없음	증가
Mitochondria apoptosis 관련 protein	Bax	증가	증가
	Bcl-2	감소	감소
Caspase의 substrate	PARP	증가	증가
NO pathway	NO production	증가	-
	i NOS	증가	-
Mitochondria apoptosis 관련 protein	Bax	증가	증가
	Bcl-2	감소	감소
	Cytochrome C	증가	증가
Cell cycle arrest 유도		Relaxin	decorin
p21		-	증가
G2/M arrest		○	○
Cancer cell proliferation의 감소		Relaxin	decorin
EGFR		-	감소
MAPK		-	감소

Table. 3 Molecular characterization of relaxin and decorin on the induction of apoptosis. Decorin induces cell death through p53-dependent apoptosis pathway, inhibition of cell proliferation and induction of cell cycle arrest. Decorin activates mitochondrial apoptosis and G2M arrest by increased p53 expression. Also decorin inhibits cell proliferation by blocking epithelial growth factor receptor(EGFR) and mitogen-activated protein (MAP) kinases(MAPK) pathway. Also, Relaxin induces nitric oxide(NO)-mediated apoptosis pathway not p53 dependent apoptosis pathway.

NO is synthesized from arginine and O₂ by inducible NO synthase (iNOS). Relaxin activates caspase signaling by NO-induced mitochondrial apoptosis.

V. 결론

본 연구에서는 decorin과 relaxin을 발현하는 아데노바이러스의 종양 조직 내 확산효율의 증대가 relaxin과 decorin에 의한 MMP1, MMP10등의 세포외 기질 분해에 관여하는 enzyme의 증가, collagen type I, elastin 그리고 collagen type III와 같은 세포외 기질의 주요 성분의 분해에 의해 촉진됨을 확인하였다. 또한 TGF- β , EGFR 그리고 EMT의 발현조절을 통해 ECM의 assembly와 생산 그리고 분해 등 여러 단계에서 종양 조직 내 결합조직의 재조합에 중요한 역할을 함으로써 세포외 기질분해와 바이러스 확산능을 증대시키는 중요한 원인으로 작용함을 확인 하였다. 한편, 아데노바이러스에 의해 발현되는 relaxin 또는 decorin이 세포고사의 여러 단계에 관여하며 세포사를 유도하여 특히, relaxin은 iNOS에 의해 촉매 되는 NO를 통해 p53 independent pathway로 apoptosis signal을 mitochondria에 전달하고 이렇게 전달된 신호는 세포고사의 마지막 단계까지 관여함을 확인하였다. 또한 decorin은 p53-dependant apoptosis를 통해 mitochondrial apoptosis protein인 Bax, Bcl2, C에 신호를 전달하여 mitochondria-mediated apoptosis를 유도함을 확인 하였으며, 이렇게 전달된 apoptotic signal은 세포고사의 마지막 단계에 존재하는 단백질인 PARP까지 전달되어 decorin을 통한 강력한 세포고사가 유도됨을 밝혔다. 또한 decorin은 세포주기를 조절하는 p21의 발현을 촉진시킴으로써 G2M arrest를 유도할 뿐 아니라 EGFR의 활성을 저해하고 MAPK의 활성을 억제하여 암세포의 증식을 방해함으로써 세포사를 유도함을 확인할 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서는 종양 조직 내로의 확산과 강력한 세포고사 유도제로 작용하는 relaxin과 decorin

의 새로운 기능을 분자적인 수준에서 규명 하고 relaxin과 decorin를 이용한 암 치료에 대한 이해를 높여 실제로 이를 적용함으로써 relaxin과 decorin을 발현하는 아데노바이러스를 암유전자 치료에 유용하게 이용될 수 있는 기반을 마련하였다.

참고문헌

1. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992;68:143-155.
2. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996;70:7498-7509.
3. Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8522-8526.
4. Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, Fernandez N, Cordier L, Abina MA, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J Mol Med* 1996;74:183-189.
5. Post DE, Khuri FR, Simons JW, Van Meir EG. Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens. *Human Gene Ther* 2003;14:933-946.
6. Parks RJ. Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet* 2000;58:1-11.
7. Zhang WW. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999;6:113-138.
8. Oosterhoff D, van Beusechem VW. Conditionally replicating

- adenoviruses as anticancer agents and ways to improve their efficacy. *Exp Ther Oncol* 2004;4:37-57.
9. 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;6:879-885.
 10. Kuriyama, N., et al., Pretreatment with protease is a useful experimental strategy for enhancing adenovirus-mediated cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2000. 11: p. 2219-30.
 11. Maillard, L., et al., Pre-treatment with elastase improves the efficiency of percutaneous adenovirus-mediated gene transfer to the arterial media. *Gene Ther*, 1998. 5: p. 1023-30.
 12. Favre, D., et al., Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. *Gene Ther*, 2000. 7: p. 1417-20.
 13. Sherwood, O.D., et al., Dynamic changes of multiple forms of serum immunoreactive relaxin during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 1984. 114: p. 806-13.
 14. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, et al , INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem* 2002;277:31283-6
 15. Baccari MC, Bani D. Relaxin and nitric oxide signalling. *Curr*

Protein Pept Sci. 2008 Dec;9:638-45.

16. Qin, X., et al., An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod*, 1997. 56: p. 812-20.
17. Palejwala, S., et al., Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology*, 2001. 142: p. 3405-13.
18. Qin, X., et al., An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod*, 1997. 56: p. 800-11.
19. Krusius, T. and E. Ruoslahti, Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83: p. 7683-7.
20. Day, A., et al., Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone. *Biochem J*, 1987. 248: p. 801-5.
21. Fisher, L.W., J.D. Termine, and M.F. Young, Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows. *J Biol Chem*, 1989. 264: p. 4571-6.
22. Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*. 1984 Nov 1;223:587-97.

23. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, et al.. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med.* 1996 Apr;2:418-23.
24. Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;3:141-74.
25. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E .*Nature.* Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. 1990 Jul 19;346:281-4.
26. Vogel KG, Paulsson M, Heinegård . Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 1984 Nov 1;223:587-97.
27. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* 1997 Feb 10;136:729-43.
28. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol.* 1997 Feb 10;136:729-43.
29. Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, et al.. J Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3

- activation. *Biol Chem.* 2006 Sep 8;281:26408-18.
30. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV, Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 1996 Aug 2;271:18961-5.
 31. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jul 18;92:7016-20.
 32. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Oct 18;98:1482-93.
 33. Ma W, Tan Y, Cai S, Chen H, Du J, Cai S. et al. The action of decorin in anti-fibrosis and anti-cancer. 2007 Feb;24:222-5. Review.
 34. Beaulieu JF. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem.* 1997;31:1-78.
 35. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2:907-16. Review.
 36. McDonald LJ, Moss J. Nitric oxide-independent, thiol-associated ADP-ribosylation inactivates aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1993 Aug
 37. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and

- disease: an overview. *Front Biosci.* 2006 May 1;11:1696-701.
38. Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol.* 2001 Jun;53:187-202.
 39. Martignetti JA, Aqeel AA, Sewairi WA, Boumah CE, Kambouris M, Mayouf SA, et al. Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. *J. Nat Genet.* 2001 Jul;28:261-5.
 40. Yan W, Wang P, Zhao CX, Tang J, Xiao X, Wang DW. Decorin gene delivery inhibits cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats by modulation of transforming growth factor-beta/Smad and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Hum Gene Ther.* 2009 Oct;20:1190-200.
 41. Li H, Xu D, Toh BH, Liu JP. TGF-beta and cancer: is Smad3 a repressor of hTERT gene? *Cell Res.* 2006 Feb;16:169-73.
 42. Molteni A, Ward WF, Ts'ao CH, Taylor J, Small W Jr, Brizio-Molteni L, et al.. Review. Cytostatic properties of some angiotensin I converting enzyme inhibitors and of angiotensin II type I receptor antagonists. *Curr Pharm Des.* 2003;9:751-61.
 43. Piccinno R, Puopolo M, Rigault De La Longrais IA, Fracchioli S, Massobrio M, Katsaros D. Growth factors in epithelial ovarian cancer. *Minerva Ginecol.* 2002 Feb;54:33-52. Review

44. Uttamsingh S, Bao X, Nguyen KT, Bhanot M, Gong J, Chan JL, et al.. Synergistic effect between EGF and TGF- β 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27:2626-34.
45. Kang Y, Massagué J..Cell. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. 2004 Aug 6;118:277-9.
46. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333:664-6.
47. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Jun 30;153:1251-6.
48. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87:682-5.
49. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. *Biochem J*. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition 2001 Aug 1;357:593-615.
50. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr*. 2007 Jun;137:1616S-1620S.
51. Dupraz S, Grassi D, Bernis ME, Sosa L, Bisbal M, Gastaldi L, et al.. PI3K p110 alpha and p110 beta have differential effects on Akt activation and protection against oxidative

- stress-induced apoptosis in myoblasts. *J Neurosci.* 2009 Oct 21;29:13292-301.
52. Endo H, Murata K, Mukai M, Ishikawa O, Inoue M. Activation of insulin-like growth factor signaling induces apoptotic cell death under prolonged hypoxia by enhancing endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67:8095-103.
53. Matheny RW Jr, Adamo ML. Effects of PI3K catalytic subunit and Akt isoform deficiency on mTOR and p70S6K activation in myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 11;390:252-7. Epub 2009 Sep 30.

Abstract

Molecular characterization of relaxin and decorin on the degradation of extracellular matrix and induction of apoptosis

A-Rum Yoon

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

(Directed by Professor Chae-Ok Yun)

The pressing challenge for contemporary gene therapy is to deliver an effective level of therapeutic genes to cancer cells throughout at tumor in vivo. The extracellular matrix provides one barrier to adenoviral dispersion in a tumor. To overcome this barrier, we inserted the genes for relaxin and decorin, a protein that degrades the extracellular matrix, into adenoviruses. By using these relaxin and decorin expressing adenoviruses, we have confirmed that relaxin or decorin expression increased the dispersion of the virus from cell to cell within the tumor and the induction of tumor cell apoptosis. However, the mechanism that which relaxin and decorin induces degradation of extracellular matrix and apoptosis is not clearly understood. In this study, we characterize the mechanism of relaxin and decorin on the degradation of extracellular matrix and induction of apoptosis.

Relaxin and decorin induce degradation of extracellular

matrix by up-regulation of expression of MMP1, MMP10 not by expression of MMP2. Decorin plays a role on decreasing expression of TGF-beta and EGFR which trigger extracellular matrix - degradation and - remodeling function. The expressions of collagen typeI, elastin and collagen typeIII in tumor tissue are significantly decreased by relaxin and decorin. Also, Decorin induces cell death through p53-dependent apoptosis pathway, inhibition of cell proliferation and induction of cell cycle arrest. Decorin activates mitochondrial apoptosis and G2M arrest by increased p53 expression. Also decorin inhibits cell proliferation by blocking epithelial growth factor receptor(EGFR) and mitogen-activated protein (MAP) kinases(MAPK) pathway. Also, Relaxin induces nitric oxide(NO)- mediated apoptosis pathway not p53 dependent apoptosis pathway. NO is synthesized from arginine and O₂ by inducible NO synthase(iNOS). Relaxin activates caspase signaling by NO- induced mitochondrial apoptosis.

In summary, our results clearly demonstrated the molecular mechanism of relaxin and decorin on degradation of extracellular matrix and induction of apoptosis and exhibited the potential strategy based on relaxin and decorin expressing oncolytic adenovirus and open new chance for combining the cancer gene therapy.

Key Words : relaxin, decorin, extracellular matrix and induction of apoptosis

게재 List

1. Yoon AR, Kim JH, Lee YS, Kim H, Yoo JY, Yun CO. Markedly enhanced cytolysis by E1B-19kD-deleted oncolytic adenovirus in combination with cisplatin. Hum Gene Ther. 2006 Apr;17(4):379-90.
2. Yun CO, Yoon AR, Yoo JY, Kim H, Kim M, Kim JH. Coxsackie and adenovirus receptor binding ablation reduces adenovirus liver tropism and toxicity. Hum Gene Ther. 2005 Feb;16(2):248-61.
3. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. J Natl Cancer Inst. 2006 Oct 18;98:1482-93.
4. Choi IK, Lee YS, Yoo JY, Yoon AR, Kim JH, Yun CO. Effect of decorin on overcoming the extracellular matrix barrier for oncolytic virotherapy. Gene Ther. 2009 Nov 12.