

IL-2 및 GM-CSF 유전자를 이입시킨 제한복제성 헤르페스바이러스를 이용한 편평세포암의 유전자치료

연세대학교 대학원

의 학 과

김 세 헌

IL-2 및 GM-CSF 유전자를 이입시킨 제한복제성 헤르페스바이러스를 이용한 편평세포암의 유전자치료

지도 홍 원 표 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

1999년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 세 현

김세헌의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

1999년 12월 일

감사의 글

부족함이 많은 저에게 두경부외과학을 가르쳐 주시고 앞으로의 학문적 발전에 든든한 밑거름이 될 본 연구를 완성할 수 있도록 아낌없는 지도를 베풀어주신 홍원표 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

또한 바쁘신 가운데도 많은 관심을 가지고 지도해주신 김주향 교수님, 임인경 교수님, 이진성 교수님, 최은창 교수님, 윤주현 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

제가 항상 본받고 싶고 저에게 본 연구를 할 수 있는 기회를 만들어 주신 김희남 교수님, 김광문 교수님, 이원상 교수님과 Jatin P. Shah 교수님께 삼가 감사드립니다.

이 논문을 완성하기까지 물심양면으로 헤아릴 수 없는 도움을 주신 부모님과 타지에서 고생하며 내조해준 아내 그리고 아들 효석에게 고마운 마음을 전합니다.

저 자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	3
1. 실험 동물	3
2. 세포주 배양	4
3. DISC 바이러스 매개체의 생성	4
4. 시험관 실험	4
가. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)	
방법에 의한 IL-2 및 GM-CSF 유전자의 발현 확인	4
나. DISC-LacZ, DISC-IL2 및 DISC-GMCSF 매개체를 이용한	
SCCVII 세포주로의 유전자 이입 및 이로 인한 IL-2와	
GM-CSF의 생성 측정	5
5. 동물실험	5
가. DISC-IL2와 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2,	
SCCVII/GMCSF) 투여후 동종의 신선 종양세포(SCCVII)	
투여시 항암 효과	5
나. ⁵¹ Chromium 유리를 이용한 T 림프구의 특이적 항종양	
세포독성시험	6
다. DISC-GMCSF를 종양조직내 직접 투여시 항암효과	6
라. 종양조직내 GM-CSF의 생산	7
마. 종양조직내 CD4, CD8, CD11C 및 CD45R	
양성 세포의 침윤	7
6. 통계학적 분석	8

III. 결 과	8
1. DISC-LacZ, DISC-IL2 및 DISC-GMCSF 매개체를 이용한 SCCVII 세포주로의 유전자 이입 및 이로 인한 IL-2와 GM-CSF의 mRNA 발현과 단백질의 생성 측정	8
2. DISC-IL2와 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF) 투여후 동종의 신선 종양세포(SCCVII) 투여시 함암 효과	10
3. ⁵¹ Chromium 유리를 이용한 T-림프구의 특이적 항종양 세포독성시험	11
4. DISC-GMCSF를 종양조직내 직접 투여시 항암 효과	13
5. 종양조직내 GM-CSF의 생산	14
6. 종양조직내 CD8, CD4, CD11C 및 CD45R 양성 세포의 침윤	14
IV. 고 찰	14
V. 결 론	21
참고문헌	21
영문요약	25

표 목 차

Table 1. Comparisons of tumor free survival and tumor suppression effect between vaccination groups	12
--	----

그 림 목 차

Fig. 1. RT-PCR result of IL-2 and GM-CSF	8
Fig. 2. X-gal stain of DISC-LacZ transfected SCCVII	9
Fig. 3. IL-2 and GM-CSF production in SCCVII/IL2 and SCCVII/GMCSF	9
Fig. 4. Effect of vaccination with SCCVII transduced with various DISC viral constructs on tumor-free survival in a C3H/HeJ syngeneic tumor model	10
Fig. 5. Tumor suppression effect of DISC virus vaccination in C3H/HeJ syngeneic tumor model	11
Fig. 6. Splenocyte tumoricidal activity against SCCVII target	12
Fig. 7. Effect of DISC-GMCSF injection on established syngeneic tumor model	13
Fig. 8. <i>In Vivo</i> GM-SCF concentration after intra-tumoral DISC-GMCSF injection	14
Fig. 9. FACS analysis for tumor infiltrating CD8+, CD4+, CD11C+, and CD45R+ lymphocytes from mice intratumorally inoculated with PBS, heat inactivated DISC-GMCSF or DISC-GMCSF	15
Fig. 10. Tumor infiltrating CD8+ lymphocyte subsets and CD4+ lymphocyte subsets determined by FACS analysis	16

IL-2 및 GM-CSF 유전자를 이입시킨 제한복제성 헤르페스바이러스를 이용한 편평세포암의 유전자치료

최근 두경부 편평세포암종의 치료에 있어서 바이러스를 매개체로 필요한 유전자를 이입시키는 유전자 치료법이 성공적인 결과를 보임에 따라서 유전자치료가 암치료에 있어서 또하나의 새로운 치료법으로서 가능성을 제시하고 있다. 유전자를 전달하는 바이러스는 여러 종류가 이용되고 있으나, 이들 중 헤르페스바이러스는 다른 바이러스에 비해 여러 가지 장점을 가지고 있다. 우선 분열하는 세포뿐만 아니라 미분열상태에있는 세포에도 효과적으로 감염을 일으키며, 숙주세포에 감염되는 시간이 1시간 이내로 매우 짧고, 감염률도 타 바이러스에 비하여 매우 높다. 또한 유전자의 크기가 크기 때문에(150 Kb) 원하는 유전자의 이입에 제한이 적다. 본 연구에서는 헤르페스바이러스의 단백질 막을 형성하는 부분의 유전자(gH)를 삭제시킨, 유전적으로 변형된 defective infectious single cycle herpes simplex virus (DISC 바이러스)를 사용하였다. 이 바이러스는 기존의 유전자 매개체로서의 헤르페스 바이러스의 장점을 그대로 지니었으며, 유전적 변형으로 인하여 숙주세포내에서 1회 분열에 그치므로 헤르페스바이러스의 단점인 신경독성 및 세포독성을 배제한 안전성이 입증된 바이러스이다. 본 연구는 첫째, 방사선(10,000 cGy)을 조사하여 분열능력을 없앤 반면, 종양세포의 항원성은 그대로 지닌 종양세포(SCCVII)에 Interleukin-2 (IL-2), 또는 granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)와 같은 면역조절 유전자를, DISC 바이러스를 매개로 하여 이입시킨 후, 면역조절 유전자 및 면역조절 단백질이 발현되는지 여부를 증명하고, 둘째, 이렇게 만든 종양백신을 종양세포에 특이적이며, 면역능력을 지닌 순종 쥐에 주사후 신선한 동종의 종양세포 투여시의 항암효과를 알아봄과 동시에 가장 효과적인 면역조절 유전자 조합을 선정하며, 셋째, 종양조직을 인위적으로 만들어 여기에 상기의 가장 효과적인 면역조절 유전자가 이입된 DISC 바이러스를 종양내 직접 주사 후 종양내 면역조절 단백질의 발현 및 종양증식을 살펴보았으며, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 첫째, DISC 바이러스 벡터는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 SCCVII 세포에 효과적으로 유전자를 이입시켰으며, 이로 인한 단백질의 발현을 나타내었다. 둘째, 동물실험에서 종양유발억제 및 성장억제 효과에 있어서 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/ GMCSF)이 DISC-IL2를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2)보다 의미있게 우수한 결과를 보였으며, 두 종양 백신의 병합은 SCCVII/GMCSF 단독 백신 효과와 차이가 없었다. 셋째, 종양내 DISC-GMCSF의 투여는 의미있는 종양 성장 억제효과를 보였으며, 종양내 면역반응세포의 증가를 보였다.

이상의 결과로 미루어, DISC 바이러스를 이용한 유전자 치료는, 발현되지 않은 종양세포의 항원성을 유전자변형을 통해 극대화시켜 면역체계에 노출시킴으로서, 미세전이나 미세잔존암이 주된 치료 실패 원인인 두경부 편평세포암종의 새로운 치료방법으로 응용될 수 있으리라 생각한다.

IL-2 및 GM-CSF 유전자를 이입시킨 제한복제성 헤르페스바이러스를 이용한 편평세포암의 유전자치료

<지도 홍 원 표 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 세 헌

I. 서 론

두경부 영역의 암 발생률은 전체 암발생의 6.6%를 차지한다. 이 중의 대부분을 차지하는 두경부 편평세포암종의 경우, 환자의 과반수는 발견 당시 이미 진행된 병기를 보이며, 이들의 5년 생존율도 30% 내외로 매우 저조한 편이다(Vokes 등, 1993; Hoffman 등, 1998). 따라서 현존하는 수술, 방사선 및 항암제 치료법 외에 질병치료 및 생존율을 증가시키는 새로운 치료법의 개발이 시급하게 요구되고 있으며, 아울러 기존 수술적 치료법의 단점인 기능 장애도 줄일 수 있는 방법도 함께 모색되어야 한다. 유전자 치료는 원하는 유전물질을 치료목적으로 환자의 조직 내에서 발현시키는 치료법으로, 두경부 편평세포암종에서의 종양억제 유전자, 자살 유전자 또는 면역조절 유전자를 이용한 유전자 치료전략들이 실험 단계에 있으며, 기대되는 연구 결과들이 보고되고 있다(Clayman 등, 1996; O'Malley 등, 1996; Myers 등, 1998).

이들 유전자 치료전략 중 면역체계자극 전략은, 종양세포에 면역조절 유전자를 주입시킨 후 방사선 조사로 종양세포의 분열은 억제하면서 종양세포 자체에서 면역조절물질을 분비하도록하여, 항종양 면역체계를 자극시키는 방법으로, 두경부 종양뿐 아니라 여러 다른 종양에서도 많은 연구가 시도되어 왔다(Golumbek 등, 1991; Cavallo 등, 1993; Saito 등, 1994; Colombo 및 Rodolfo, 1995; O'Malley 등, 1996; Rodolfo 등, 1996; Myers 등, 1998). 면역조절물질 중 특히 interleukine-2 (IL-2), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 등은 전립선암 및 악성흑색종에서 좋은 실험 결과가 보고되고 있다(Dranoff 등, 1993; Porgador 등, 1993; Rosenberg 등, 1993; Vieweg 등, 1993).

원하는 면역조절 물질을 추정되는 종양항원부위에서 발현되게 함으로써 항종양 면역성을 증폭시키는데 가장 중요한 요소는 유전자 전달 매개체로, 레트로바이러스, 아데노바이

러스 또는 여러 가지 물리적 방법이 시도되어져 왔다. 최근 헤르페스바이러스를 유전자 전달 매개체로 하는 연구가 활발히 진행중이며, 이것은 기존의 다른 유전자 전달 매개체 보다 많은 장점을 지니고 있다. 우선 분열하는 세포뿐만 아니라 미분열상태에있는 세포에도 효율적으로 감염을 일으키며, 숙주세포에 감염되는 시간이 수시간 이내로 매우 짧고, 감염률도 타 방법에 비하여 매우 높다. 또한 유전자의 크기가 크기 때문에(15 Kb) 원하는 유전자의 이입에 제한이 적다는 장점들이 있다(Geller 및 Federoff, 1991; Tung 등, 1996; Karpoff 등, 1997).

본 연구는 헤르페스바이러스의 단백질막을 형성하는 부분의 유전자(gH)를 삭제시킨, 유전적으로 변형된 defective infectious single cycle herpes simplex virus (DISC 바이러스)를 유전자 전달 매개체로 사용하였다. 이 바이러스는 원래 헤르페스 감염에 대한 백신으로 만들어진 것으로 그 특성상 숙주 세포에 감염되어 증식되나, 그 후손들(progeny)은 감염능력이 상실되어 다른 세포에 감염될 수 없다는 특징이 있다(Mclean 등, 1994). 이 바이러스를 실험에 이용하게된 또 다른 이유는, 현재 phase II 임상실험이 진행단계로 비교적 안전성이 입증되었고(Bournsnel 등 1997; Dilloo 등 1997), 기존의 많이 쓰이는 헤르페스바이러스 매개체인 앰플리콘(amplicon) 바이러스보다 기술적인 면에서 생산이 용이하기 때문이다.

본 연구의 목적은 첫째, 방사선(10,000 cGy)을 조사하여 분열능력을 없앤 반면, 종양세포의 항원성은 그대로 지닌 종양세포(SCCVII)에 IL-2, 또는 GM-CSF와 같은 면역조절 유전자를, DISC 바이러스를 매개체로 하여 이입시킨 후 종양세포(SCCVII)에서의 면역조절 유전자 및 면역조절 단백질의 발현을 증명하고, 둘째, 이렇게 만든 종양백신을 종양세포에 특이적이며, 면역능력을 지닌 순종 쥐에 주사후, 투여된 신선한 동종 종양세포에 대한 항암 효과를 알아봄과 동시에 가장 효과적인 면역조절 유전자 조합을 선정하며, 셋째, 종양조직을 인위적으로 만들어, 상기의 가장 효과적인 면역조절 유전자가 이입된 DISC 바이러스를 종양내 직접 주사 후 종양내 면역조절 단백질의 발현 및 종양증식의 억제성을 조사함으로써 궁극적으로는 두경부 편평상피암종에 있어서 면역조절 유전자를 이입시킨 DISC 바이러스를 이용한 유전자 치료의 가능성을 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

6 내지 8주된 암컷 C3H/HeJ종의 쥐(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)를, 병원균이 없는 적당한 조건에서 사육하여, 8~10주 정도의 연령에서 실험에 사용하였다. 종양 모델은 SCCVII 세포주를 이용하여 측배면에 만들었는데, 이 모델은 두경부편평세포암과 매우 흡사한 생물학적 특성과 면역성을 지닌 종양 모델이다(O'Malley 등, 1997). 실험동물 계획은 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center의 Institutional Animal Care Committee에 의하여

승인되었다.

2. 세포주 배양

SCCVII 세포주는 플로리다 대학의 Seeman이 제공하였는데, 이 세포주는 C3H/HeJ쥐에 자연 발생한 표피의 편평세포암이다. 세포주의 종양발생능력을 극대화시키기 위해 세포주를 실험동물에 주사해 종양을 유발시킨 후 멸균하 조건에서 종양을 적출 하여, 콜라겐아제(collagenase)로 효소분해 시킨 후 세포를 채취하여 사용하였다. 배지는 10% 소의 태아 혈청(FCS)이 포함된 MEM (minimal essential media) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 환경 하에, 주당 2회 계대배양 하였고, 3회 계대배양(P3)에서 12회 계대배양(P12) 사이의 세포를 사용하였다.

3. DISC 바이러스 매개체의 생성

HSV-2 strain HG52중 glycoprotein H(gH)-deleted HSV-2 바이러스(DISC)를 분리하여, gH를 생성하는 monkey kidney cell의 일종인 Vero 세포주(CR1)에서 증식시킨 다음 IL-2 및 mGM-CSF 유전자를 PIMR3 매개체를 이용하여 HSV-2 strain HG52의 gH 유전자 부분에 삽입하였다(Bournsnell 등, 1997). 삽입된 IL-2 또는 GM-CSF 유전자는 CMV early promoters의 조절 하에 발현되도록 하였다(DISC-IL2, DISC-GMCSF). 바이러스의 정량화는 CR1 세포주에서의 플라크형성단위(plaque forming unit (pfu))에 근거하여 시행하였으며, 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

4. 시험관 실험

가. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법에 의한 IL-2 및 GM-CSF 유전자의 발현 확인

DISC-GMCSF 및 DISC-IL2에 감염된 SCCVII 세포(SCCVII/GMCSF, SCCVII/IL2)에서 GM-CSF 및 IL-2 유전자가 발현되는지를 확인하기 위하여, GM-CSF와 IL-2 유전자에 대한 RT-PCR을 시행하였다. 5×10^6 개의 SCCVII/GMCSF 및 SCCVII/IL2 세포에서 Rneasy (QIAGEN®) kit를 이용하여 RNA를 분리하였다. Oligo-dT primers와 Superscript II RT enzyme (GIBCO/BRL)을 이용하여, First-strand cDNA를 만들었다. cDNA에 남아 있을지 모르는 RNA를 제거하기 위하여, RNase 처리를 하였다. RT-PCR 반응의 양성 대조군으로 β -actin을 사용하였다. β -actin의 유전자 발현을 확인하기 위해 사용된 sense와 antisense primers는 다음과 같다. sense; 5' CTACAATGAGCTGCGTGTGG 3', antisense; 5' AAGGA-AGGCTGGAAGAGTGC 3'. PCR 반응은 Perkin-Elmer® Gene Amp PCR System 960035를 사용하여, 94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 그리고 72°C에서 45초를 1 cycle로 35 cycles를 시행하였다. RT-PCR 반응에 의해 생성된 cDNA 산물의 크기는 528 bp이다. IL-2 유전자의 sense

와 antisense primers 염기배열 순서는 다음과 같다. sense; 5' AACTGGAGCATTACTGCTG 3', antisense; 5' GTGTTGAGATGATGCTTTGAC 3' 동일한 c-DNA를 이용하여 β -actin과 같은 조건에서 PCR 반응을 시행하였고, 생성된 cDNA산물의 크기는 357 bp이다. GM-CSF의 sense와 antisense primers의 염기배열 순서는 다음과 같다. sense; 5' CCCATCACTGTC-ACCCGGCCTTGG 3', antisense; 5' GTCCGTTTCCGGAGTTGGGGGGC 3'. PCR 반응은 72°C에서 90초, 94°C에서 45초, 그리고 60°C에서 45초를 1 cycle로 35 cycles를 시행하였다. 생성된 GM-CSF DNA산물의 크기는 279 bp이다. 각각의 PCR 생성물들은 1.5% agarous gel에서 전기영동하였다.

나. DISC-LacZ, DISC-IL2 및 DISC-GMCSF 매개체를 이용한 SCCVII 세포주로의 유전자 이입 및 이로 인한 IL-2와 GM-CSF의 생성 측정

SCCVII murine squamous cell carcinoma cells를 바닥이 편평한 6개의 용기 (Costar Corporation, Cambridge, Mass. USA)에 한 용기당 1×10^6 개의 세포 밀도로 평판하였다. 12시간 후 평판된 세포를 방사선(^{137}Cs) 조사양에 따라 다음과 같이 3군으로 나누었다: 제 1군; 방사선을 조사하지 않은 군, 제 2군; 5,000 cGy 조사군, 제 3군은 10,000 cGy를 조사한 군으로 나누었다. 방사성 조사후 각 용기에서 배지를 제거하고, 인산완충생리식염수(PBS)로 세척하였으며, 이후 DISC-LacZ, DISC-IL2, 및 DISC-GMCSF 매개체들을 감염중복도(MOI) 0, 1, 5, 10, 20으로 1 ml의 배지용액에 준비하여 각 용기에 넣었다. 표식 유전자인 LacZ 유전자를 이입시킨 DISC-lacZ로 2시간 동안 감염시킨 세포들은 세척후, 24시간 후에 1% glutaraldehyde로 고정시킨하여 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) 용액에 2시간 배양, 염색하였다. 감염의 효율성을 측정하기 위하여, 양성 염색된 세포의 비율을 고배율(200배율)로 3회 측정하였다. DISC-IL2 또는 DISC-GMCSF로 감염시킨 세포들은 2시간 후 각각의 용기에서 배지를 제거 후, PBS로 3회 세척하고, 2 ml의 배지용액을 넣었다. 24시간 배양후 배지용액을 채취하여 원심분리(300 g $\times$ 6 min) 후 GM-CSF 및 IL-2 생성량을 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)(R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량화하였다. 모든 실험은 각각의 조건에 따라 2회 중복 시행하였다.

5. 동물 실험

가. DISC-IL2와 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF) 투여 후 동종의 신선 종양세포(SCCVII) 투여시 항암효과

8~10주 연령의 C3H/HeJ mice를 무작위로 20마리씩 5개 군으로 나누었다(N=20/group). 각각의 실험군은 제 1군(제1 대조군): 인산완충생리식염수(PBS)로 백신 치료한 군, 제 2군(제2 대조군): 방사선 조사된 SCCVII 세포로 백신 치료한 군(SCCVII), 제 3군: 방사선 조사후 DISC-IL2로 감염시킨 SCCVII 세포로 백신 치료한 군(SCCVII/IL2), 제 4군: 방사선 조사

후 DISC-GMCSF로 감염시킨 SCCVII 세포로 백신 치료한 군(SCCVII/ GMCSF), 제 5군: 방사선 조사후 DISC-IL2로 감염시킨 SCCVII 세포와 방사선 조사후 DISC-GMCSF로 감염시킨 SCCVII 세포를 병합하여 백신 치료한 군(SCCVII/GMCSF+IL2)으로 구분하였다.

치료군은 종양세포에 방사선(10,000 cGy)을 조사하여 분열능력을 없앤 후 DISC-IL2 또는 DISC-GMCSF 바이러스를 이용하여 IL-2 또는 GM-CSF유전자를 종양세포(SCCVII)에 이입시킨 다음(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF), 1×10^6 개의 세포를 50 μ l의 부유액으로 종양백신을 만들어, 2일 간격으로 3회 실험동물의 측배면 피하에 백신 주사 하였다. 반면 대조군은 2군으로 나누어 한 군은 백신 대신 생리식염수를 투여하고, 다른 한 군은 방사선만을 조사한 종양세포 부유액(1×10^6 개의 세포를 50 μ l)을 투여하였다. 세포의 방사선조사는 ^{137}Cs 를 이용하여 10,000 cGy 조사하였으며, 이후 DISC-IL2 또는 DISC-GMCSF에 감염중복도(multiplicity of infection) 10으로 2시간 노출시켜, 4°C, $300 \times g$ 로 6분 원심분리후 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복하여, 바이러스를 제거한 후 백신으로 사용하였다. 백신은 페노바비탈(pentobarbital, 50 mg/kg)을 복강내 마취한 후를 사용하였으며, 마지막 백신 처치후 1주일 되는 때 동일 배양한 1×10^5 개의 신선한 SCCVII세포를 종양 유발을 위해 피하로 투여하였다. 1주일에 3회 간격으로 실험동물의 종양 생성 및 생성된 종양의 크기를 자로 측정하였으며, 종양의 부피는 타원구의 최대 장축 반지름 길이를 측정하여 'a'라하고 여기에 직각이 되는 축의 반지름을 'b'라고 하였을 때 $\frac{4}{3}\pi ab^2$ 으로 계산하여 측정하였다. 상기 치료군 중 기존의 형성된 종양에서 종양내로 DISC바이러스를 직접 투여시, 항암효과를 알아보기 위하여 가장 항종양 효과가 뛰어난 군을 설정하였다.

나. $^{51}\text{Chromium}$ 유리를 이용한 T-림프구의 항종양세포독성시험

상기 기술한 종양백신군에서 마지막 백신부터 2주 후에, 멸균하 상태에서 비장을 적출하였다. PBS로 세척후 세그먼트를 이용하여 비장세포를 분리하였다. 적혈구 용해 완충액으로 적혈구를 용해시킨 뒤, RPMI-1640 배지를 이용하여 3회 세척하였다. 2×10^7 개의 비장세포(T-림프구)를 3×10^6 개의 10,000 cGy를 조사한 SCCVII 종양세포와 혼합하여 T-25 배양용기에 넣어 배양하였다. 24시간 후 합성 IL-2 (10Units/ml)를 첨가하여 5일간 배양하였다. 동종의 신선한 5×10^6 개의 종양세포를 100 μCi ^{51}Cr 에 1시간 동안 노출시켜 배양후, 배양판(96-well)을 이용하여, 배양된 비장세포와 1 : 12.5, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100으로 섞어 분주후 10시간 배양하였다. 배양판(96-well plates)을 원심분리(200 g $\times$ 30 sec) 후 Skatron 장치로 상층액을 채취후 γ -counter로 $^{51}\text{Chromium}$ 유리를 정량하였다.

다. DISC-GMCSF를 종양내 직접 투여시 항암 효과

8~10주 연령의 25~30 g 사이의 C3H/HeJ 쥐를 사용하였다. 실험 동물의 양측 측배면에 1×10^6 개(vol.=50 μ l)의 SCCVII 세포를 피하주사하였다. 5일 후 대부분의 실험동물에서 종

양의 최대 축이 0.5 cm 정도 성장하였을 때 종양의 최대축 길이가 0.4~0.6 cm 사이의 동물을 선별하여, 무작위로 12마리씩 3군으로 나누었다. 제 1군(제1 대조군): 인산완충생리식염수 치료군, 제 2군(제2 대조군): 열처리한(70°C×5 min) DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군, 제 3군: DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군(vol.=50 μ l)으로 구분하였다. 각 군에 따라 생리식염수, 열처리한 DISC-GMCSF, 또는 DISC-GMCSF를 2일 간격으로 3회 종양내 주사하였다. 1주일에 3회 간격으로 실험동물의 종양 생성 및 생성된 종양의 크기를 앞에서 언급했던 방법과 같이 자로 측정하였다.

라. 종양조직내의 GM-CSF 생산

C3H/HeJ 쥐의 측배부에 1×10^6 개의 SCCVII 세포를 피하 주사하여 형성된 종양 최대축의 길이가 0.5~1 cm 사이인 동물을 무작위로 다음과 같이 3군으로 나누었다 (n=6/group). 제 1군(제1 대조군): 인산완충생리식염수 치료군, 제 2군(제2 대조군): 열처리한(70°C×5 min) DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군, 제 3군: DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군. 각 군에 따라 생리식염수, 열처리한 DISC-GMCSF, 또는 DISC-GMCSF를 종양내 주사한 후 24시간, 48시간 및 72시간에 각 군에서 종양을 채취하여 1 ml의 용해완충액을 가한 뒤, 호모게나이저(PowerGen 125, Fisher scientific®)를 사용하여 조직을 균질화 하였다. 이것을 300 g로 6분간 원심 분리한 후, 상층액을 채취하여 영하 80°C에 보관 후 ELISA 방법(cat.#MGM00, R&D systems® Minneapolis, MN)을 이용하여 조직내 GM-CSF 생산 농도를 측정하였다.

마. 종양조직내 CD4, CD8, CD11C 및 CD45R 양성 세포의 침윤

C3H/HeJ 쥐의 측배부에 1×10^6 개의 SCCVII 세포를 피하 주사하여 형성된 종양 최대축의 길이가 0.5~1 cm 사이인 동물을 무작위로 다음과 같이 3군으로 나누었다(n=3/group). 제 1군(제1 대조군): 인산완충생리식염수 치료군, 제 2군(제 2대조군): 열처리한(70°C×5 min) DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군, 제 3군: DISC-GMCSF 1×10^7 pfu로 치료한 군. 각 군에 따라 생리식염수, 열처리한 DISC-GMCSF, 또는 DISC-GMCSF를 2일 간격으로 3회 종양내 주사하였다. 마지막 치료 후 7일째 종양을 적출하여, 종양조직내 침윤된 림프구의 세포표면 항원을 다음과 같이 분석하였다. 적출된 종양조직을 잘게 조각 내어 콜라게나제(collagenase, 0.1%)로 37°C에서 45분간 처리 후 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한 다음 1×10^6 개의 세포를 채취하여 폴리에틸렌 관(polystyrene tube)에 담고 다시 PBS와 섞어 원심 분리(300 g×6분)하여 3회 세척하였다. 세포를 FICT 또는 PE가 붙어있는 anti-murine CD-4 [Pharmigen, San Diego, CA. USA] (1 : 100), anti-murine CD-8 [Pharmigen, San Diego, CA. USA] (1 : 100), anti-murine CD-11C [Pharmigen, San Diego, CA. USA] (1 : 100), 및 anti-murine CD-45R [Pharmigen, San Diego, CA. USA] (1 : 100) 단일 항체와 섞은 후 4°C에서 30

분간 배양하였다. PBS와 섞어 원심분리(300 g×6분)하여 3회 세척후 염색완충용액(sodium azaid buffer) 400 μ l에 섞어 FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA. USA)을 이용하여, 죽은 세포와 세포 부서러기를 제외한 10^5 개의 단일 세포군을 취하여 종양조직내 CD-4, CD8, CD11C 및 CD45R 양성 세포의 비율을 분석하였다.

6. 통계학적 분석

모든 자료는 평균값과 standard error로 표시하였다. Group들간의 비교는 대상에 따라 two-tailed students t-test, reapted measured ANOVA test, logrank test를 이용하여 통계학적 검증을 하였다.

III. 결 과

1. DISC-LacZ, DISC-IL2 및 DISC-GMCSF 매개체를 이용한 SCCVII 세포주로의 유전자 이입 및 이로 인한 IL-2와 GM-CSF의 mRNA 발현과 단백질의 생성 측정

DISC-IL2 및 DISC-GMCSF를 SCCVII 세포주에 배양기 안에서 2시간 동안 노출시켜 감염을 유발한 후, 24시간후에 mRNA 및 단백질의 발현을 측정하였다.

SCCVII/IL2와 SCCVII/GMCSF에서는 양성 대조군인 β -actin과 함께, IL-2 또는 GM-CSF mRNA를 확인할 수 있으나, 대조군에서는 IL-2 또는 GM-CSF의 mRNA는 발현되지 않았다(Fig. 1). 얼마나 많은 숙주세포에서 DISC 바이러스의 감염과 함께 유전자 전달이 이루어졌는가를 알아보기 위해 표식자 유전자인 LacZ 유전자를 이입한 DISC-LacZ를 SCCVII 세포에 2시간 노출시킨 후 24시간 배양하여 X-gal 염색을 시행한 결과, 감염중복도 10 (MOI=

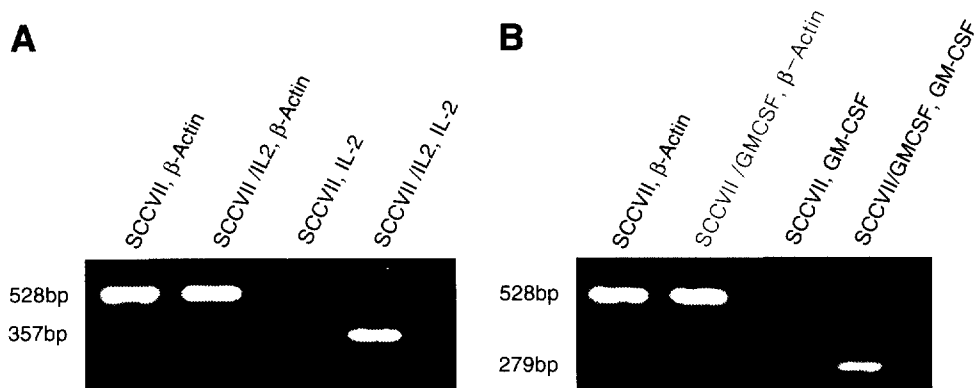
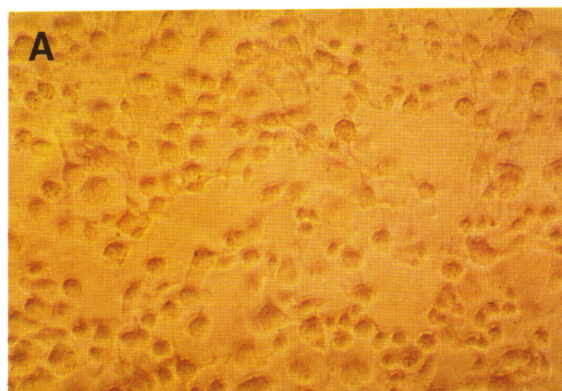
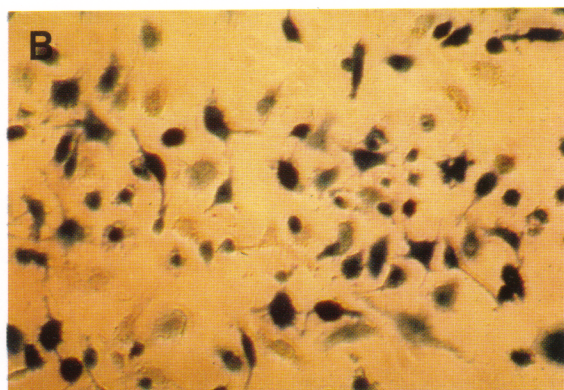


Fig. 1. RT-PCR result of IL-2 (A) and GM-CSF (B). RT-PCR of SCCVII/IL2 or SCCVII/GMCSF demonstrated the presence of mRNA encoding β -actin, IL-2, or β -actin, GM-CSF, while non-transfected cells contained β -actin mRNA, but not IL-2 or GM-CSF. The expected fragment size for IL-2 is 357 base pairs (bp), while the expected GM-CSF fragment size is 279 bp.



SCCVII, MOI=0, X-gal Stain



SCCVII, MOI=10, X-gal Stain

Fig. 2. X-gal stain of DISC-LacZ transfected SCCVII. Efficient DISC virus transduction in SCCVII cells *in vitro* using a recombinant vector containing the β -galactosidase gene (DISC-LacZ). Gene expression is depicted by a dense blue staining 24 hr after transduction when exposed to X-gal stain. (A), control cells (MOI=0) with no positive staining. (B), transduced cells showing 90% positive staining.

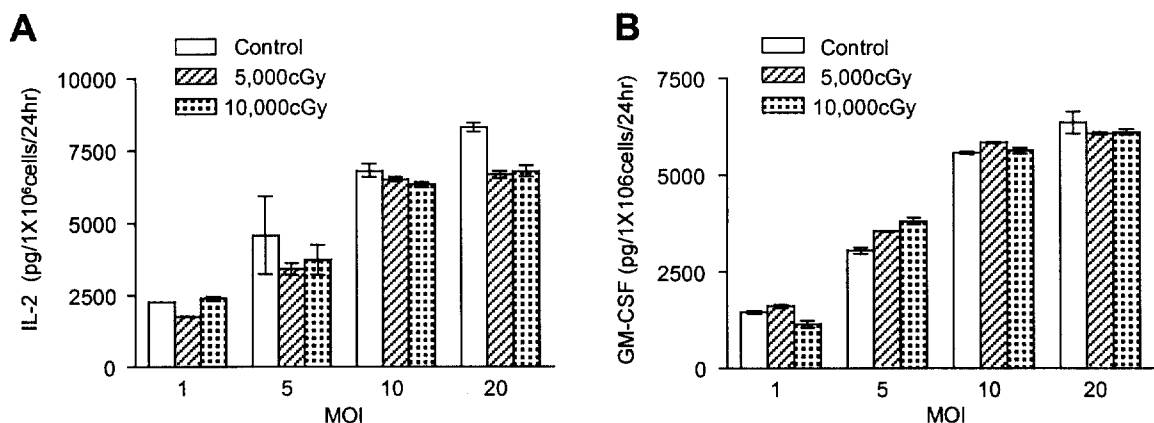


Fig. 3. IL-2 and GM-CSF production in SCCVII/IL2 and SCCVII/GMCSF. IL-2 (A) and GM-CSF (B) production by SCCVII modified by DISC-IL2 and DISC-GMCSF respectively. Detection was by ELISA 24 hours after transduction. No GMCSF or IL-2 was produced by SCCVII cells prior to DISC-GMCSF, or DISC-IL2 infection. Of particular interest was the observation that cells irradiated at different doses (5,000 cGy, 10,000 cGy) secreted levels of GM-CSF or IL-2 that were comparable to nonirradiated cells. All data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean.

10)에서 $90 \pm 7.9\%$ 의 세포가 양성 반응을 보였다(Fig. 2). 방사선을 5,000 cGy 및 10,000 cGy 조사한 세포에서도 각각 $85 \pm 6.8\%$, $83 \pm 10.2\%$ 의 세포가 양성 반응을 보여, 방사선조사 여부 및 그 조사량에 관계없이 효율적인 세포감염 및 유전자 전달이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. DISC-GMCSF 또는 DISC-IL2 바이러스를 감염중복도 1, 5, 10, 20으로 감염을 시켜 각각의 사이토카인의 생성량을 ELISA 분석 방법(R&D System)으로 측정한 결과, IL-2는

2,000 pg에서 8,500 pg까지, GM-CSF는 1,800 pg에서 6,500 pg까지 생성되었다. DISC 바이러스에 의해 유전자의 이입이 일어나지 않은 대조군 SCCVII 세포주에서는 IL-2나 GM-CSF의 mRNA와 단백질의 발현이 관찰되지 않았다. 특기할만한 사실은 DISC-mGMCSF 또는 DISC-IL2 바이러스를 감염중복도를 1, 5, 10, 20로 변화시키면서 5,000 cGy와 10,000 cGy로 방사선을 조사한 SCCVII 세포주에 감염시킨 결과, 방사선을 조사하지 않은 세포와 비교해 거의 비슷한 정도의 GM-CSF 또는 IL-2가 생성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2. DISC-IL2와 DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF) 투여 후 동종의 신선 종양세포(SCCVII) 투여시 항암 효과

DISC-IL2와 DISC-GMCSF 바이러스를 이용한 종양 백신을 투여한 군에서 의미있는 항종양 효과 및 무병생존율을 관찰할 수 있었다($P < 0.01$)(Fig. 4). 또한 이들 치료군에서 의미있는 종양 성장 억제 효과도 관찰할 수 있었다($P < 0.01$)(Fig. 5). 대조군인 방사선만을 조사한 (10,000 cGy) 종양세포를 투여한 군은 생리식염수만을 투여후 종양유발을 한 군과 무병생존율이나 종양의 성장 억제 효과에 있어 차이가 없었다. SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF, SCCVII/IL2+SCCVII/GMCSF의 세 가지 종양백신 치료군 중 SCCVII/GMCSF와 SCCVII/IL2+SCCVII/GMCSF으로 백신 치료한 치료군이 SCCVII/IL2으로 백신 치료한 군보다 의미있는 발병억제와 무병생존율 및 성장 억제 효과를 보였다($P < 0.05$). 그러나 SCCVII/GMCSF와 SCCVII/IL2+SCCVII/GMCSF로 백신 치료한 치료군 사이는 발병 억제와 무병생

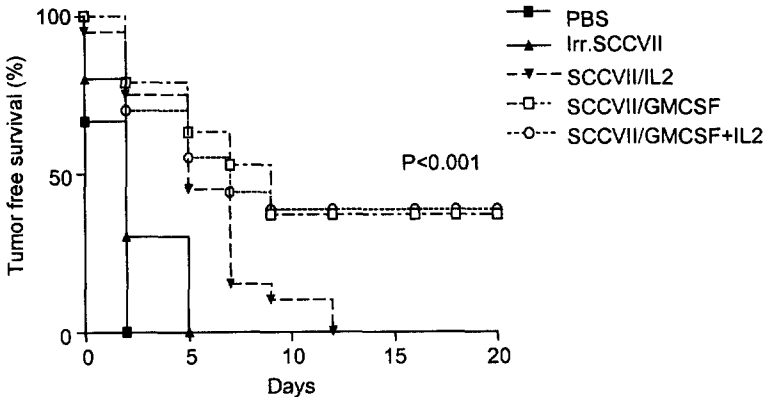


Fig. 4. Effect of vaccination with SCCVII trasduced with various DISC viral constructs on tumor-free survival in a C3H/HeJ syngeneic tumor model. Tumor free survival of mice treated with SCCVII/GMCSF or SCCVII/GMCSF+IL2 was significantly greater than mice treated with SCCVII/IL2 ($p < 0.05$, Logrank test) ($p < 0.001$: GMCSF vs PBS or Irr.SCCVII, $p < 0.001$: GMCSF+IL2 vs PBS or Irr.SCCVII, Logrank test, Day 0=date of first tumor development in PBS treated group).

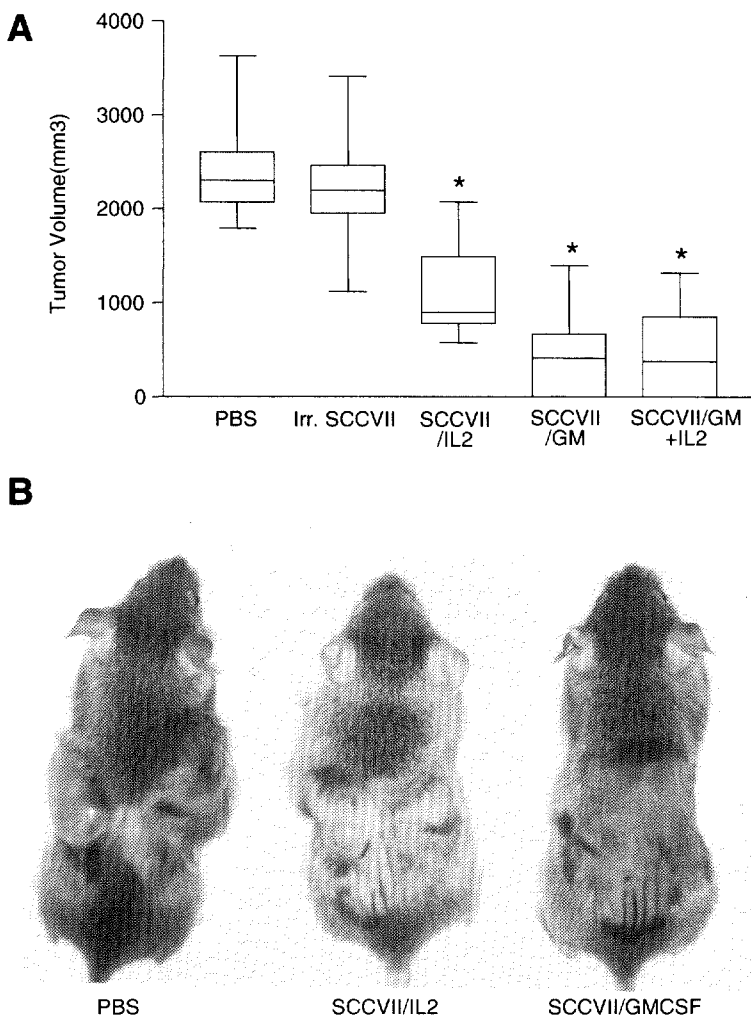


Fig. 5. Tumor suppression effect of DISC virus vaccination in C3H/HeJ syngeneic tumor model. Box plots demonstrating the effect of vaccination with SCCVII modified with various DISC virus constructs. Data are tumor size at day 21 after tumor inoculation in C3H/HeJ mice (A and B). $P < 0.01$ each treated group versus PBS or irradiated SCC controls. Among the multiple immunomodulatory transgene vaccination groups, combinations that included GMCSF showed the greatest anti-tumor protection ($P < 0.05$: GMCSF groups vs IL2 group). All data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean.

존을 및 성장 억제 효과에 있어 차이가 없었다(Table 1). 따라서 세 종류의 종양백신 중에서 SCCVII/GMCSF가 가장 효율적인 종양 백신이었다.

3. $^{51}\text{Chromium}$ 유리를 이용한 T-림프구의 특이적 항종양세포독성시험

대조군 및 SCCVII/IL2 치료군에 비해 DISC-GMCSF를 이용하여 만든 종양백신(SCCVII/

Table 1. Comparisons of tumor free survival and tumor suppression effect between vaccination groups

	PBS	Irr.SCCVII	SCCVII/IL2	SCCVII/GMCSF	SCCVII/GMCSF +IL2
PBS	NA	NS	##	##	##
Irr.SCCVII		NA	##	##	##
SCCVII/IL2			NA	##	##
SCCVII/GMCSF				NA	NS
SCCVII/GMCSF +IL2					NA

1. PBS: Phosphate buffered saline

2. Irr. SCCVII: Irradiated SCC VII cells (10,000 cGy)

3. SCCVII/IL2: Irradiated and DISC-IL2 transfected SCC VII cells

4. SCCVII/GMCSF: Irradiated and DISC-GMCSF transfected SCC VII cells

(Tumor free survival comparison: Logrank test. #: $P < 0.05$. Tumor growth suppression comparison: From D14 to D21, Repeated measured ANOVA and Tukey multiple comparison test, *: $P < 0.05$. NA: not applicable, NS: not significant)

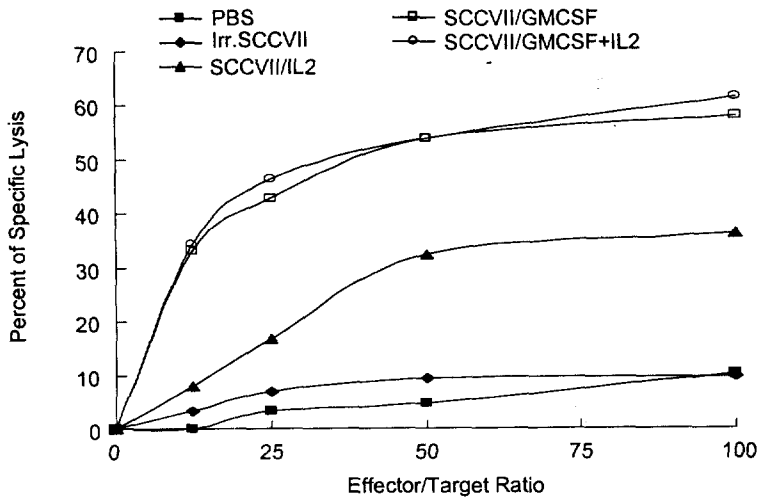


Fig. 6. Splenocyte tumoricidal activity against SCCVII target. Splenocyte from animals pre-treated with irradiated tumor exposed to DISC-GMCSF showed effective cell lysis response.

GMCSF)으로 치료한 군의 비장세포에서 의미있는 특이적 종양세포 살상 능력을 관찰할 수 있었다($p < 0.01$). 그러나 SCCVII/GMCSF와 SCCVII/IL2 + SCCVII/GMCSF 치료군 간에는 비장세포의 특이적 종양세포 살상 능력에 차이가 없었다(Fig. 6).

4. DISC-GMCSF를 종양내(*in vivo*) 직접 투여시 항암 효과

종양 백신 실험시 가장 항종양 효과가 뛰어난 DISC-GMCSF를 대상으로, 기존의 형성된 종양에서 종양내로 DISC-GMCSF를 직접 투여시, 항암 효과를 알아보았다. DISC-GMCSF를 종양내 투여한 군에서 대조군인 생리식염수를 투여한 군이나, 열처리하여 비활성화시킨 DISC-GMCSF를 투여한 군보다 의미있는 종양 성장 억제 효과가 있었다($P < 0.001$)(Fig. 7).

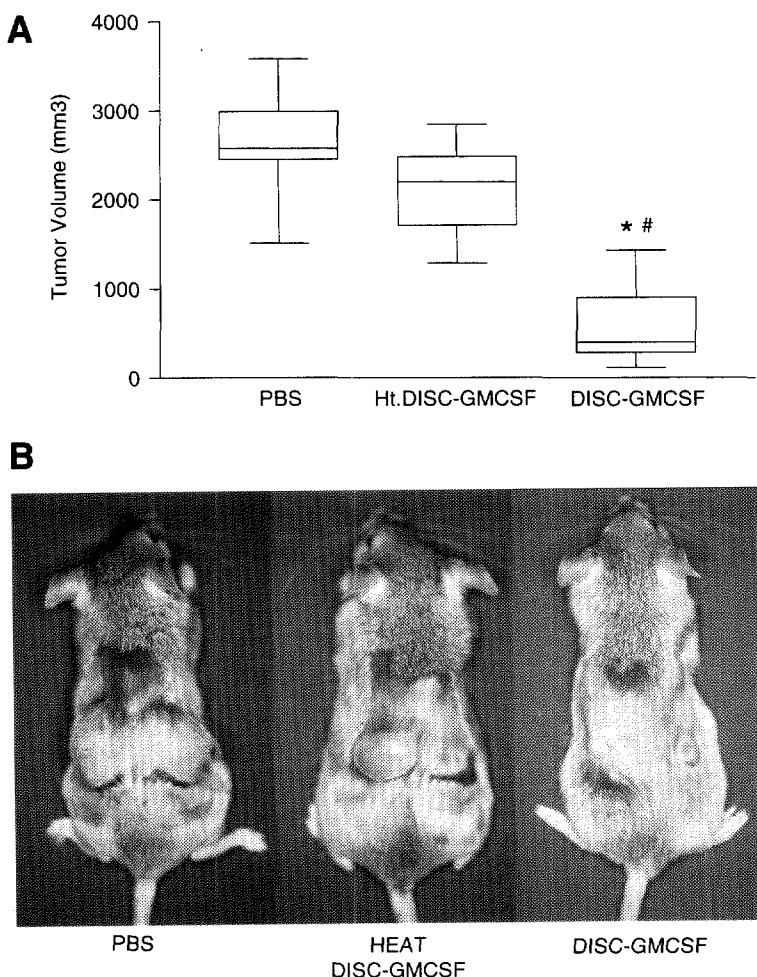


Fig. 7. Effect of DISC-GMCSF injection on established syngeneic tumor model. 14 days after last DISC-GMCSF injection (*: $P < 0.001$) (A and B). The greatest inhibition of tumor growth was seen in the DISC-GMCSF treated group ($P < 0.001$). In contrast to this, heat inactivated DISC-GMCSF showed no significant tumor suppression effect. All data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean.

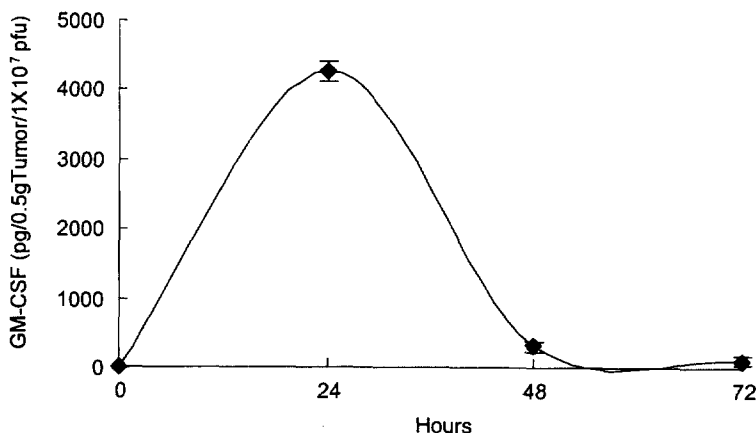


Fig. 8. *In Vivo* GM-CSF concentration after intra-tumoral DISC-GMCSF injection. The group which underwent the 5×10^6 pfu DISC-GMCSF intra-tumoral injection had significant concentration levels, which exceeded 4,500 pg per 0.5 gram of tumor tissue, but the production is decreased markedly as following the times.

5. 종양조직내 GM-CSF의 생산

생리식염수 또는 열처리한 DISC-GMCSF를 종양내 직접 투여한 실험 동물에서는 50 pg 미만의 미미한 양의 GM-CSF만이 생산된 반면, DISC-GMCSF (1×10^7 pfu)를 종양내 투여한 실험군에서는 투여후 24시간에 종양조직 0.5g당 4,500 pg의 GM-CSF가 생성되었다. 하지만 시간이 지남에 따라 종양조직에서의 GM-CSF 생산은 감소되어, 72시간 뒤에는 DISC-GMCSF 바이러스 투여전 수준으로 떨어졌다(Fig. 8).

6. 종양조직내 CD4, CD8, CD11C 및 CD45R 양성 세포의 침윤

종양조직내 CD8 양성 세포의 비율은 DISC-GMCSF투여군에서 $5.56 \pm 1.66\%$ 로 생리식염수 또는 열처리한 DISC-GMCSF를 투여한 군(각각 $1.33 \pm 0.87\%$, $2.33 \pm 1.09\%$)에 비하여 의미있게 증가되었다($P < 0.05$)(Fig. 9). 또한 CD4 양성 림프구의 비율도 DISC-GMCSF투여군에서 $20.57 \pm 1.97\%$ 로 생리식염수를 투여한 대조군($9.96 \pm 5.87\%$)에 비해 의미있는 증가를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 9, 10). CD11C와 CD45R 양성 세포의 비율도 DISC-GMCSF투여군에서 생리식염수 또는 열처리한 DISC-GMCSF를 투여한 군에 비해 증가하였으나 통계학적 의미는 없었다(Fig. 9).

IV. 고 찰

진행된 두경부편평세포암의 예후는 기존의 수술 및 방사선 치료 요법의 발달에도 불구

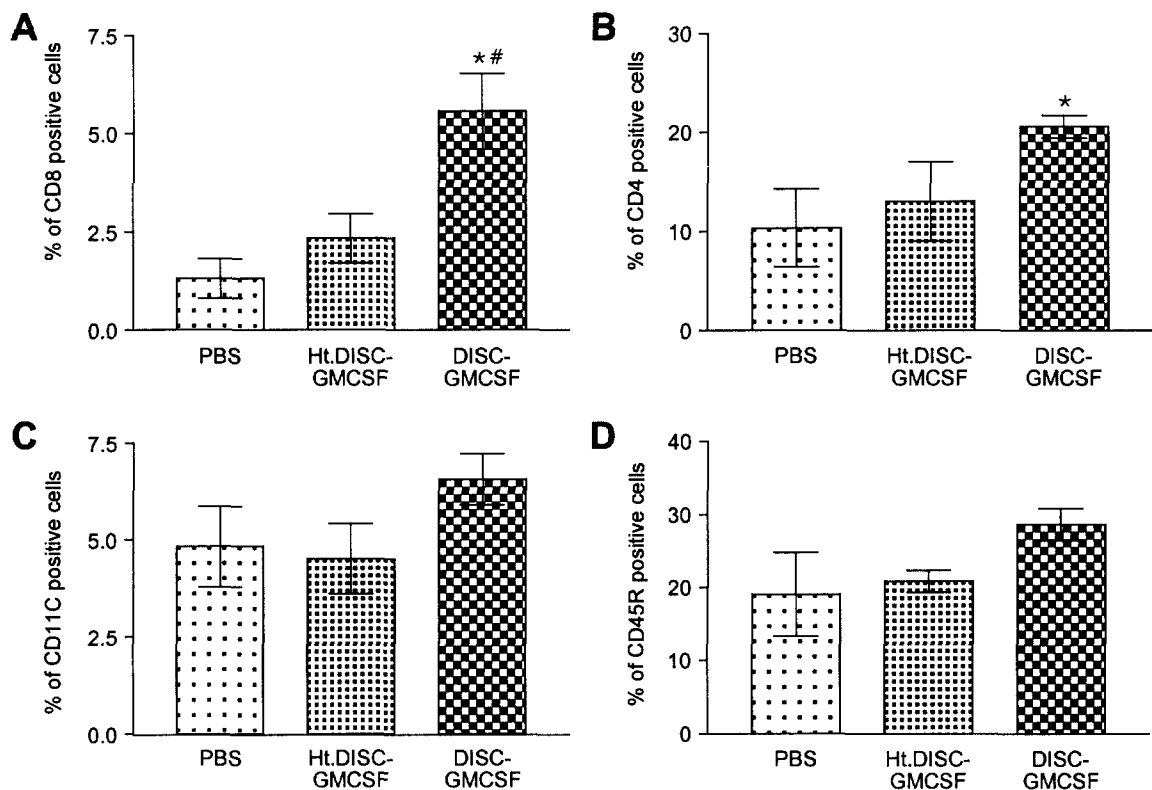


Fig. 9. FACS analysis for tumor infiltrating CD8+ (A), CD4+ (B), CD11C+ (C), and CD45R+ (D) lymphocytes from mice intratumorally inoculated with PBS, heat inactivated DISC-GMCSF or DISC-GMCSF. Treatment of DISC-GMCSF resulted in a significant elevation in the percent of CD8 positive cells in the tumors in comparison to PBS or heat inactivated DISC-GMCSF treated group ($P < 0.05$). There was also a significant elevation of the percent of CD4 positive cells in comparison to PBS treated group ($P < 0.05$). All data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (*: $P < 0.05$ Control vs DISC-GMCSF, #: $P < 0.05$ Heat DISC-GMCSF vs DISC-GMCSF).

하고, 5년 생존율이 30% 미만으로 크게 개선되지 않은 상태이다. 아울러 기존의 치료법들은 치료 후 음성, 저작 및 연하장애 등을 동반하는 경우가 많으므로 삶의 질적 측면에서 볼때, 새로운 효과적인 치료법의 개발이 요구된다(Vokes 등, 1993).

Clayman 등이 종양억제 유전자인 p53 유전자를 아데노바이러스에 이입시킨 후 종양내 주사시 종양의 치료효과를 보고한 이래, 최근 두경부편평세포암의 새로운 치료법으로 바이러스를 유전자 전달 매개체로한 유전자 치료가 새롭게 각광을 받으며 연구되고 있으며, 좋은 결과를 보여주고 있다(Clayman 등, 1996). 지금까지 보고된 유전자 치료전략은 크게 5가지로 구분된다. 첫째로는 종양에 대한 면역반응을 강화시키는 전략으로, 이제까지 보고된 유전자 치료전략의 과반수 이상을 차지하고 있으며, 방법은 종양내로 원하는 유전자를 직접 전달하는 *in vivo*방법과, 종양을 채취하여 배양상태에서 원하는 유전자를 이입시킨 후

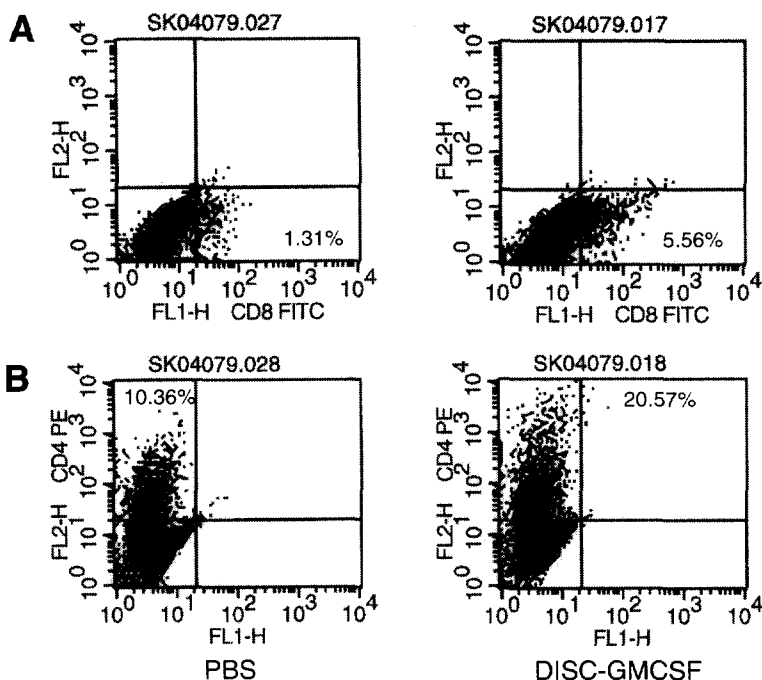


Fig. 10. Tumor infiltrating CD8+ lymphocyte subsets (A) and CD4+ lymphocyte subsets (B) determined by FACS analysis. This diagram is representative of data from animals, with mean percentages.

다시 주입하는 *ex vivo* 방법이 있다. 그 외로는 종양억제 유전자를 이용하는 방법, 전구약물과 반응하여 세포독성을 유발할 수 있는 자살유전자 요법, 항암치료약물에 내구성을 갖는 유전자를 환자의 조혈세포에 이입시키는 방법, 발암유전자를 무력화시켜 발현을 차단하는 방법 등이 있다(Ross 등 1996).

Coley에 의해 단독이 종양의 퇴화를 가져온다는 보고 후, 이제까지 많은 항종양 면역치료법이 시도되었으나 만족할 만한 결과를 보이지 못하였다. 그러나 그 원인은 종양항원이 존재하지 않아서라기보다는 효과적인 항종양 반응을 유발하지 못해서라고 생각하며(van Pel 및 Boon, 1982; Blankenstein, 1994; Scott 및 Cebon, 1997), 따라서 항종양효과를 더욱 높이기 위해, 유전자 치료전략 중 종양에 대한 면역반응을 강화시키는 연구가 활발히 행하여지고 있다.

대표적인 유전자 치료전략의 하나는 유전적으로 변형된 종양백신을 이용하는 것으로서 Prehn과 Main이 처음 보고하였는데 그 개념은 단순히 종양의 절제후 동질의 종양세포를 투여하면, 종양의 형성이나 성장이 억제된다는 면역예방(immunoprophylaxis)을 입증한 것이었다(Prehn 및 Main, 1957). 종양 백신을 만들기 위해서는 종양의 항원이 필요하기 때문에 종양세포 추출물, 종양세포내 펩타이드, 열쇼크단백(heat-shock proteins) 등을 항원으로 이

용하려는 연구가 진행되고 있으나, 특이적 종양 항원의 정제는 아직 규명되지 않은 상태이다(Berd 1996). 아울러 동종의 종양항원을 썼을 경우 주요조직적합항원의 상이함으로 백신으로서의 유용성이 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 최상의 방법은 추정되는 종양 항원을 모두 가지고 있는 자가 종양조직으로 백신을 만드는 것이라 생각한다. 본 연구에서는 자가 종양조직으로부터 세포를 분리하고, 방사선을 조사하여 종양의 항원성은 유지한 채, 세포의 분열능력을 없앤 종양백신을 만들었다. 이렇게 만든 종양백신의 면역계 자극을 더욱 강화하기 위해 IL-2 및 GM-CSF 유전자를 갖는 DISC 바이러스를 종양백신에 감염시켜 종양백신 자체에서 면역조절 물질을 분비하게 한 후 항암 효과를 관찰하였다.

유전적으로 변형된 종양백신의 논리적 근거는 다음과 같다. 첫째, 이입된 유전자에 의하여, 사이토카인과 같은 면역조절 물질이 종양세포에서 분비되므로, 추정되는 종양 항원과 밀접한 위치에서 효과적인 농도를 유지시킬 수 있으며, 둘째, 지속적 국소적 분비로 인하여, 사이토카인의 전신적 또는 국소적 직접 투여시 문제되는 짧은 반감기 및 부작용을 피할 수 있고, 셋째, 면역조절물질을 면역반응이 일어나는 곳에 공급함으로써, CD4 T림프구의 주작용을 대신할 수 있다(van Pel 및 Boon, 1982; Rosenberg 등, 1992; Pardoll, 1993; Gilboa, 1994; Rosenthal 등, 1994; Tepper 및 Mule, 1994; Gilboa 등, 1996; Rosenthal 등, 1997; Schmidt 등, 1997). 유전자치료를 이용한 종양백신의 궁극적 목적은 항 종양면역반응을 향상시키고, 종양에 대한 지속적인 면역능력을 갖게 하는데 있다. 본 실험에 이용된 사이토카인인 IL-2과 GM-CSF는 여러 연구에서 항종양 효과가 입증된 면역조절물질이다 (Gansbacher 등, 1990; Dranoff 등, 1993; Porgador 등, 1993; Rosenberg 등, 1992). IL-2는 CD4 림프구에서 분비되는 주된 사이토카인으로, 주 기능은 CD4, CD8 림프구를 자극하고 활성화시키며, 세포독성 T-림프구의 반응을 효과적으로 유도하는 것이다(Fenton 등, 1996). GM-CSF는 항원전달 세포의 성장과 기능을 항진시키며, 거식세포나 돌기세포(dendritic cell) 등 항원전달 세포의 주요조직적합항원의 표현을 강화시킨다(Fearon 등, 1990; Bannerji 등, 1994; Fragerberg, 1996).

두 가지 사이토카인 모두 항종양 면역의 도입단계 즉, 종양항원이 유리되면 항원전달 세포가 종양항원을 섭취 후 공정을 거쳐 주변 림프절로 이동 종양세포의 항원성을 자연 T 림프구에 전달하여 자극하는 과정에 서로 다른 경로로 작용하므로 본 연구에서는 각 사이토카인의 치료효과를 비교하고 또한 병합하여 사용할 때 상승효과가 있는지를 관찰하였다.

실험결과 DISC 바이러스는 이들 사이토카인 유전자를 효율적으로 종양세포에 전달하였으며, 이로 인한 항종양효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 DISC 바이러스가 임상적으로 응용될 수 있는 유전자전달매개체로서의 가능성을 제시함과 동시에 종양치료에 적용될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 최근까지 연구된 유전자 치료에 있어 원하는 유전자를 전달하는 매개체로는 대부분이 바이러스를 이용하였다. 이중 아데노바이러스와 레트로바

이러스가 유용한 매개체로 많이 이용되어 왔으나, 아데노바이러스는 대부분의 숙주가 이 바이러스에 대하여 면역성을 지니고 있으며 반복적 바이러스의 투여시 면역성으로 인하여 매개체로서의 효율성이 떨어진다는 단점이 있으며(Rainov 등, 1999), 레트로바이러스는 분열이 일어나는 세포에만 감염이 일어나므로, 종양백신과 같이 방사선을 조사해 분열능력이 상실된 세포에서는 부적합한 매개체라고 생각된다(Matsubara 등, 1996; Simons 및 Mikhak, 1998). 최근 주목을 받고 있는 헤르페스바이러스는 두정부편평세포암의 유전자 전달 매개체로서 많은 장점을 가지고 있음이 증명되었다(Carew 등, 1998). 헤르페스바이러스는 천성적으로 신경조직에 친화성이 있어, 처음에는 신경계 질환의 유전자 치료에 사용되도록 고안되었다(Geller 및 Breakfield, 1988; Chou 등, 1990). 그러나 바이러스의 감염과정을 살펴보면 처음 피부나 점막표면의 감염을 시작으로, 분열 및 증식과정을 거치므로 이것을 고려해 볼 때, 헤르페스바이러스 매개체가 상피세포에서 유래한 편평세포암의 유용한 유전자전달 매개체라는 사실을 납득할 수 있다. 최근의 연구에 의하면, 헤르페스바이러스는 거식세포, 섬유아세포, 간세포, 대장암 및 편평상피암세포에서도 유용한 매개체인 것이 증명되었다(Geller 및 Federoff, 1991; Fong 등, 1995; Carew 등, 1998; Kooby 등, 1999). 매개체로서 헤르페스바이러스의 장점은 다음과 같다. 다른 바이러스에 비하여 지놈(genome)의 크기가 크기 때문에(150 Kb), 원하는 유전자를 이입하는데 제한이 적으며, 여러 종류의 세포에 단시간에 효율적인 감염이 가능하며, 무엇보다 가장 큰 장점은 분열하지 않거나 매우 천천히 분열하는 세포에도 효과적으로 원하는 유전 물질을 발현시킬 수 있다는 점이다(Geller 등, 1990; Tung 등, 1996). 방사선 조사후 분열이 정지된 세포에서의 감염능력은 유전자 조작에 의한 종양백신 생성에 가장 중요한 요소이다. 본 실험에서 사용한 DISC 바이러스는 헤르페스바이러스의 막을 형성하는 gH 부분의 유전자를 제거하고 여기에 원하는 유전자를 이입시킨 것으로, 기존에 헤르페스바이러스 매개체로 많이 사용되던 앰플리콘(amplicon) 바이러스보다 기술적으로 생성하기 쉽다는 장점이 있다(Forrester 등, 1992). 숙주 세포에 감염후 완전한 복제 과정을 거치나, 그 자손들은 유전자 조작으로 인해 감염 능력이 상실된다. SCCVII 세포주에 IL-2와 GM-CSF 유전자를 이입한 DISC 바이러스를 감염시킨 결과, 감염된 종양세포에서 이입된 IL-2 및 GM-CSF 유전자의 전령 RNA (m-RNA)가 표현됨을 관찰할 수 있었으며, 방사선을 조사하여 분열능력을 없앤 종양세포에서도 IL-2와 GM-CSF의 단백질 생성이 효과적으로 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 DISC 바이러스가 임상적으로 적용될 수 있는 종양백신의 생성시 유용한 매개체임을 증명하였다.

앞서 언급한 바와 같이 유전자 치료에 있어, 헤르페스바이러스 매개체의 주된 장점은 미분열 세포와 느린 속도로 분열하는 세포에도 빠르고 효과적으로 유전물질을 전달한다는 점이다. 이러한 특성은 중요한 임상적 의미가 있다. 종양의 적출로 얻어진 신선한 종양조직에서 종양세포를 분리하여 별도의 배양 과정 없이 부유액 상태로 방사선 조사후 원하는 유전자를 지닌 DISC 바이러스에 감염시킴으로써 단시간 내에 유전적으로 조작된 종양백

신을 만들 수 있다는 점이다. Tung 등은 헤르페스바이러스 매개체의 일종인 앰플리콘 바이러스를 이용하여, 20분내에 유전물질의 전달이 일어나며, 세포 부유액 상태에서도 효과적인 감염이 일어남을 보고하였다(Tung 등, 1996). 레트로바이러스나 아데노바이러스 등은 위와 같은 과정시, 별도의 배양과정과 시간이 필요함을 비교하여 보면, DISC 바이러스가 수술 과정 중 종양백신을 생성할 수 있는 보다 최적의 바이러스 매개체라고 생각된다.

본 실험에서 DISC 바이러스를 이용해 IL-2 또는 GM-CSF를 분비하도록 한 종양 백신(SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF)을 투여하였더니, 동종의 신선한 종양세포 주입시에 종양의 생성 및 성장이 억제되었다. 반면, 대조군에서는 신선한 종양세포 주입후 7일 이내에 모든 실험동물에서 종양이 발생하였으며, 급속도로 성장하였다.

SCCVII/IL2, SCCVII/GMCSF 또는 SCCVII/IL2과 SCCVII/GMCSF를 병합한 종양백신 치료군 중, SCCVII/GMCSF 및 SCCVII/IL2과 SCCVII/GMCSF를 병합한 종양백신 치료군이 SCCVII/IL2 백신 치료군보다 의미있는 항종양 발생 및 성장 억제 효과를 보였다. 또한 종양세포에 특이적인 세포독성 T-림프구의 종양세포 살상능력도 SCCVII/GMCSF를 포함한 종양백신 치료군이 SCCVII/IL2 치료군보다 의미있게 증가된 양상을 보였다. 그러나 종양백신 치료군에서 비장의 비대 소견이 관찰된 것은 사이토카인 자극에 의한 림프구의 활성화 때문으로 여겨지며, 일시적 현상으로 생각된다(Pozniak 등, 1995).

GM-CSF를 이용한 종양백신은 두경부종양 모델에서는 아직 보고된 바 없으나, 뇌종양, 악성흑색종, 전립선암, 대장암 등에서 우수한 항종양 효과가 보고되었다(Abe 등, 1995; Dranoff 및 Mulligan, 1995; Arca 등, 1996; Gunji 등, 1996; Yu 등, 1997). 특히 악성흑색종에서는 가장 강력한 항 종양 면역조절물질로 보고된 바 있다(Dranoff 등, 1995; Armstrong 등, 1996; Yu 등, 1997). SCCVII/IL2와 SCCVII/GMCSF를 병합한 종양백신 치료군은 SCCVII/GMCSF 단독 치료군에 비하여 종양형성억제능력 및 T-림프구의 종양살상능력에서 의미있는 상승효과를 보이지 못하였다. 이는 본 실험 모델에서는 IL-2에 의한 직접적인 세포독성 T-림프구의 자극보다는 GM-CSF에 의한 항원전달 세포의 분화 및 기능 강화가 보다 효과적으로 항 종양 면역효과를 가져오는 것으로 추정할 수 있으며, 일단 면역체계가 자극되어 반응이 효과적으로 일어나면, 별도의 IL-2 투여는 큰 도움을 주지 못하는 것으로 생각한다. 그러나 이것은 백신투여의 시간 간격 및 백신에 의해 분비되는 면역조절 물질의 농도에 변화될 가능성이 있으므로, 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

종양백신 치료군에서 종양조직의 병리학적 소견은 군데군데 종양조직의 괴사와 더불어, 대조군에 비하여 종양조직내로의 림프구 침윤이 두드러졌으며, 호중구 및 대식세포의 침윤도 관찰되었다. 이러한 소견은 SCCVII/GMCSF를 포함한 종양백신 치료군에서 SCCVII/IL2 종양백신 치료군보다 훨씬 더 뚜렷하였다. 하지만 종양백신 치료후 종양이 형성되지 않았거나, 종양이 형성되었어도 조직에 따라 종양조직내로의 림프구 침윤이 일정하지 않아 정량적인 CD4, CD8, CD11C 및 CD45R 양성 세포의 비교가 힘들었으며, 따라서 종양조

직내로의 이들 세포들 침윤의 정량적 비교는 비슷한 부피의 종양조직을 만든 후 여기에 가장 효과적인 사이토카인이라고 판단된 GM-CSF 유전자를 지닌 DISC-GMCSF 바이러스를 직접 주입한 후 종양조직을 단일세포화 시켜, 여기에 형광물질이 부착된 CD4, CD8, CD11C 및 CD45R 세포의 항체를 부착시켜, flow cytometry를 이용하여 대조군과 정량적 비교를 하였다.

이러한 종양백신이 기능을 발휘하기 위하여는 표적이 되는 종양의 부피가 적을수록 유리하다. 대체적으로 이상적인 종양 표적의 크기는 10^9 개 미만의 종양세포로서, 크기로는 1.5 cm 미만의 종양이기 때문에 종양백신은 주 치료법보다는 수술이나 방사선치료후 재발의 원인이 되는 미세잔존암이나, 미세전이의 치료전략으로 임상에 이용될 수 있으리라 사료된다(Berd, 1996).

DISC-GMCSF의 종양내 직접 투여한 실험에서 효과적인 GM-CSF의 생산을 확인할 수 있었다. 그러나 DISC 바이러스의 후손들이 다른 숙주세포의 감염 능력이 없으므로, 투여후 48시간이 지나며, 생체내 농도가 투여전 수준으로 내려가는 것으로 관찰되었다. 이것은 *in vitro* 실험에서도 같은 양상을 보였으며, 따라서 종양백신 및 종양조직내 DISC-GMCSF 투여시, 투여 간격을 2일로 하였다. 투여 횟수는 원하는 유전자의 발현기간에 따라 결정되나, 어느 정도 기간이 적당한지는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다. 본 실험에서 치료 횟수를 3회 시행한 것은 예비 실험상 가장 효율적으로 좋은 치료성적을 보였기 때문이다. 유전자의 발현 기간이 짧다는 단점이 있으나, DISC 바이러스는 다른 헤르페스바이러스 매개체보다도 세포 독성이 적고 안전하며, GM-CSF 생성의 짧은 반감기는 본 실험에서와 같이 1~2일 정도 간격의 반복 투여로 보상할 수 있으리라 생각한다(Bournsnel 등, 1997).

기존의 형성된 종양 조직에 DISC-GMCSF를 종양내로 직접 투여한 결과 의미있는 종양 성장 억제 효과를 관찰할 수 있었다($P < 0.001$). 그러나 장기간 추적 관찰 시에는 종양의 성장 속도가 너무 빨라 DISC-GMCSF 바이러스에 의한 항 종양 효과가 감소되었다. 따라서 이러한 측면을 고려할 때에 큰 종괴의 종양보다는 미세전이나 잔존 암과 같이 종양의 크기가 적은 경우에 효과적이라 생각한다. GM-CSF는 항원 전달 기능을 강화시켜 T-림프구를 통한 세포 독성을 증가시킨다. 따라서 CD4, CD8 림프구는 항 종양 면역과정에 있어 매우 중요한 역할을 담당한다. DISC-GMCSF를 직접 주입한 종양조직에서 세포를 분리하여, 종양 조직에 침투된 림프구를 flow cytometry를 통하여 분석한 결과, CD8 및 CD4 양성 T-림프구가 대조군에 비해 의미있게 증가했음을 관찰할 수 있었으며, 아울러 항원전달세포인 거식세포나 돌기세포의 표면항원인 CD11C 양성세포, 전반적인 T 림프구와 B 림프구의 표면 항원인 CD45R 양성세포도 증가된 양상을 보였다. 이것은 DISC-GMCSF 바이러스가 종양세포에 감염후 유전자 이입을 통한 GM-CSF의 생산을 유발하여 항 종양 면역 세포의 증가를 가져온 것으로 생각한다.

V. 결 론

1. DISC-HSV 매개체는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 SCCVII 세포에 효과적으로 유전자를 이입시켰고 이로 인한 단백질의 발현을 나타내었다.
2. 종양유발억제 효과와 성장억제 효과 그리고 T-림프구의 종양 살상능력면에 있어서, DISC-GMCSF를 이용한 종양백신(SCCVII/GMCSF) 치료군이 DISC-IL2를 이용한 종양백신(SCCVII/IL2) 치료군보다 의미있게 우수하였고, SCCVII/GMCSF와 SCCVII/IL2 종양 백신의 병합은 SCCVII/GMCSF 단독 백신 효과와 차이가 없었다.
3. 종양내 DISC-GMCSF의 투여는 의미있는 종양 성장 억제효과를 보였으며, 종양 조직 내 세포독성 T-림프구의 증가를 보였다.

이상의 결과로 미루어, 본 연구는 발현되지 않은 종양세포의 항원성을 유전자변형을 통해 극대화시켜 면역체계에 노출시킴으로써, 두경부 편평세포암종의 미세전이나 미세잔존암에 대한 새로운 치료방법으로 응용될 수 있으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Abe J, Wakimoto H, Yoshida Y, Aoyagi M, Hirakawa K, Hamada H: Antitumor effect induced by granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor gene-modified tumor vaccination: comparison of adenovirus- and retrovirus-mediated genetic transduction. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 587-592, 1995
- Arca Mj, Krauss JC, Aruga A, Cameron MJ, Shu S, Chang AE: Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Gene Therapy* 3: 39-47, 1996
- Armstrong CA, Botella R, Galloway TH, Murray N, Kramp JM, Song IS, Ansel JC: Antitumor effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by melanoma cells. *Cancer Res* 56: 2191-2198, 1996
- Bannerji R, Arroyo CD, Cordon-Cardo C, Gilboa E: The role of IL-2 secreted from genetically modified tumor cells in the establishment of antitumor immunity. *J Immunol* 152: 2324-2332, 1994
- Berd D: Cancer vaccine: Reborn or just recycled? *Semin Oncol* 25: 650-610, 1996
- Blankenstein T: Increasing tumor immunogenicity by genetic modification. *Eur J Cancer* 30: 1182-1187, 1994
- Boursnell MEG, Entwisle C, Blakeley D, Roberts C, Duncan IA, McLean CS: A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provide effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infec Dis* 175: 16-25, 1997

- Carew JF, Federoff H, Halterman M, Kraus DH, Savage H, Sacks PG, Schantz SP, Shah JP, Fong Y: Efficient gene transfer to human squamous cell carcinoma by the herpes simplex virus type 1 amplicon vector. *Am J Surg* 176: 404-408, 1998
- Cavallo F, Pierro FD, Giovarelli M, Gulino A, Vacca A, Stoppacciaro A: Protective and curative potential of vaccination with Interleukin-2-gene-transfected cells from a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 53: 5067-5070, 1993
- Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B: Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to r134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250: 1262-1266, 1990
- Clayman GL, Liu TJ, Overholt M: Gene therapy for head and neck cancer: comparing the tumor suppressor gene p53 and a cell cycle regulator WAF1/CIP1(p21). *Arch Otolaryngol Head Neck Sur* 122: 489-493, 1996
- Colombo M, Rodolfo M: Tumor cells engineered to produce cytokines or cofactors as cellular vaccines: do animal studies really support clinical trials? *Cancer Immunol Immunother* 41: 265-270, 1995
- Dilloo D, Rill D, Entwistle C, Bournsnel M, Zhong W, Holden W, Holladay M, Brenner M: A novel herpes vector for the high-efficiency transduction of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 89: 119-127, 1997
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3539-3543, 1993
- Dranoff G, Mulligan RC: Gene transfer as cancer therapy. *Adv Immunol* 58: 417-454, 1995
- Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Frost P: Interleukin-2 production by tumor cells bypass T helper function in the generation of an anti-tumor responses. *Cell* 60: 397-403, 1990
- Fenton R, Steis RG, Madara K, Zea AH, Ochoa AC, Janik JE: A phase 1 study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma. *J Immunother* 19: 364-470, 1996
- Fong Y, Federoff HJ, Brownlee M, Blumberg D, Blumgart LH, Brennan M: Rapid and efficient gene transfer in human hepatocytes by herpes viral vectors. *Hepatology* 22: 723-729, 1995
- Forrester A, Farrel H, Wilkinson G, Kaye J, Davis-Poynster N, Milson T: Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequence 3s deleted. *J Virol* 66: 341-348, 1992
- Fragerberg J: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an adjuvant in tumor immunotherapy. *Med Oncol* 13: 155-160, 1996
- Geller AI, Breakfield XO: A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli β -galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science* 241: 1667-1669, 1988
- Geller AI, Federoff HJ: The use of HSV-1 vectors to introduce heterologous genes into neurons: implications for gene therapy. In O.Cohen-Haguenauer and M.Botron, eds. Human Gene Transfer. London. John Libbey Eurotext Ltd. 1991, 63-73
- Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB: An efficient deletion mutation packaging system for defective herpes simplex virus vectors: Potential applications to human gene therapy and

- neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8950-8954, 1990
- Gilboa E: Immunotherapy of cancer with modified tumor vaccines. *Semin Oncol* 23: 101-107, 1996
- Gilboa E, Lyerly HK: Specific active immunotherapy of cancer using genetically modified tumor vaccines. Philadelphia, PA, Lippincott, 1994, 10-31
- Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI: Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 254: 713-716, 1991
- Gunji Y, Tagawa M, Matsubara H, Takenaga K, Shimada H, Kondo F, Sakiyama S: Antitumor effect induced by the expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in murine colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 101: 257-261, 1996
- Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR: National cancer data base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Sur* 124: 951-962, 1998
- Karpoff HM, Angelica MD, Blair S, Brownlee MD, Federoff H, Fong Y: Prevention of hepatic tumor metastases in rats with herpes viral vaccinations and r-interferon. *J Clin Invest* 99: 799-804, 1997
- Kooby DA, Carew JF, Halterman MW, Mack JE, Bertino JR, Blumgart LH, Fong Y: Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). *FASEB* 13: 1325-1334, 1999
- Matsubara H, Tagawa M, Gunji Y, Takenaga K, Suyaga M, Urashima T: Study of irradiation effect on cytokine secretion from retrovirally-transduced tumor cells: A model for tumor vaccination. *Anticancer Res* 16: 645-650, 1996
- McLean CS, Erturk M, Jennings R, et al: Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1. *JID* 170: 1100-1109, 1994
- Myers JN, Mank-Seymour A, Zitvogel L, Storkus W, Clark M, Johnson CS, Lotze MT: Interleukin-12 gene therapy prevents establishment of SCCVII squamous cell carcinomas, Inhibits tumor growth, and elicits long-term antitumor immunity in syngeneic C3H mice. *Laryngoscope* 108: 261-268, 1998
- O'Malley BW, Cope KJ, Chen SH, Li D, Schwartz R, Woo SL: Combination gene therapy for oral cancer in a murine model. *Cancer Res* 56: 1737-1741, 1996
- O'Malley BW, Cope KA, Johnson CS, Schwartz MR: A new immunocompetent murine model for oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 20-24, 1997
- Pardoll DM: New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors. *Curr Opin Immunol* 5: 719-725, 1993
- Porgador A, Tzehoval E, Vadai E, Feldman M, Eisenbach L: Immunotherapy via gene therapy: comparison of the effect of tumor cells transduced with the interleukin-2, interleukin-6, or Interferon- γ genes. *J Immunol* 14: 191-201, 1993
- Pozniak MA, Christy PS, Albertini MR, Duffek SM, Schiller JH: Interleukin-2-induced splenic enlargement. *Cancer* 75: 2737-2741, 1995
- Prehn RT, Main JM: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18: 767-778, 1957
- Rainov NG, Ikeda K, Qureshi NH, Grover S, Herrlinger U, Pechan P, Chiocca EA, Breakefield

- XO, Barnett FH: Intraarterial delivery of adenovirus vectors and liposome-DNA complexes to experimental brain neoplasms. *Hum Gene Ther* 10: 311-318, 1999
- Rodolfo M, Zilocchi C, Melani C, Capetti B, Arioli I, Parmiani G: Immunotherapy of experimental metastases by vaccination with interleukin gene-transduced adenocarcinoma cells sharing tumor-associated antigens. *J Immunol* 157: 5536-5542, 1996
- Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese MR, Ettinghausen SE, Hwu P, Karp SE: Initial proposal of clinical research project: Immunization of cancer patients using autologous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin-2. *Hum Gene Ther* 3: 75-90, 1992
- Rosenthal FM, Cronin K, Bannerji R, Golde DW, Gansbacher B: Augmentation of antitumor immunity by tumor cells transduced with a retroviral vector carrying the interleukin-2 and interferon- γ cDNAs. *Blood* 83: 1289-1298, 1994
- Rosenthal FM, Zier KS, Gansbacher B: Human tumor vaccines and genetic engineering of tumors with cytokine and histocompatibility genes to enhance immunity. *Curr Opin Oncol* 6: 611-615, 1997
- Ross G, Erickson R, Knorr D: Gene therapy in the United States: A five-year status report. *Hum Gene Ther* 7: 1781-1790, 1996
- Saito S, Bannerji R, Gansbacher B, Rosenthal FM, Romanenco P, Heston WD, et al: Immunotherapy of bladder cancer with cytokine gene-modified tumor vaccines. *Cancer Res* 54: 3516-3520, 1994
- Schmidt W, Maass G, Buschle M, Schweighoffer T, Berger M, Herbst E, et al: Generation of effective cancer vaccines genetically engineered to secrete cytokines using adenovirus-enhanced transfection. *Gene* 190: 211-216, 1997
- Scott AM, Cebon J: Clinical promise of tumor immunology. *Lancet* 349(supplII): 19-22, 1997
- Simons JW, Mikhak B: Ex vivo gene therapy using cytokine-transduced tumor vaccines. *Semin Oncol* 25: 661-676, 1998
- Tepper RI, Mule J: Experimental and clinical studies of cytokine gene modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 5: 153-164, 1994
- Tung C, Federoff HJ, Brownlee M, Karpoff H, Weigel T, Brennan M, Fong Y: Rapid production of interleukin-2-secreting tumor cells by herpes simplex virus-mediated gene transfer: Implications for autologous vaccine production. *Hum Gene Ther* 7: 2217-2224, 1996
- van Pel A, Boon T: Protection against nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4718-4722, 1982
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK: Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 328: 184-194, 1993
- Yu JS, Burwick JA, Dranoff G, Breakefield XO: Gene therapy for metastatic brain tumors by vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced tumor cells. *Hum Gene Ther* 8: 1065-1072, 1997

Abstract

Combination gene therapy using IL-2 and GM-CSF genes transferred by a defective infectious single cycle herpes virus (DISC virus) in murine squamous cell cancer

Se-Heon Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Won Pyo Hong)

The herpes simplex type 2 defective infectious single cycle virus (DISC virus) are attenuated viruses originally produced as viral vaccines but are also efficient gene transfer vehicle. The main goals of this study were to examine determinants of the gene transfer using DISC vectors for squamous cell cancer and to evaluate the efficacy of vaccination with DISC virus carrying a combination of immunomodulatory genes (IL-2, GM-CSF) as cancer therapy in a model of squamous cell cancer in the C3H/HeJ mice. SCCVII cells transduced by DISC virus vector (MOI=10) carrying the IL-2, or GM-CSF gene, produced nanogram quantities of IL-2 or GM-CSF per 10^6 cells. Of particular interest was the observation that cells irradiated at different doses (5,000 cGy, 10,000 cGy) secreted levels of IL-2 or GM-CSF that were comparable to nonirradiated cells. *In vivo* vaccination using tumor cells transduced *ex vivo* with DISC-IL2 or DISC-GMCSF resulted in protection against subsequent tumor challenge ($P < 0.01$). Among the multiple immunomodulatory transgenes vaccination groups, DISC-GMCSF transfected irradiated tumor cell showed the greatest suppression of tumor development and growth ($p < 0.001$). Marked growth arrest of established tumor was also noted by direct injection of DISC-GMCSF ($P < 0.001$). These data demonstrate that; 1) The DISC virus vector is capable of efficient gene transfer to SCCVII cells, 2) GM-CSF secreting genetically modified tumor vaccine (SCCVII/GMCSF) efficiently protects against tumor cell challenge and suppresses the tumor growth in our tumor model, 3) Intratumoral injection of DISC-GMCSF significantly suppresses the tumor growth in established tumor model and induces intratumoral increase in immune effector cells. DISC virus mediated cytokine gene transfer may prove useful as clinical therapy for head and neck cancers.

Key Words: squamous cell cancer, gene therapy, tumor vaccine, DISC-virus, GM-CSF