

E1B 55 kD 유전자 소실 재조합
아데노바이러스의 항종양 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

김 진 안

E1B 55 kD 유전자 소실 재조합
아데노바이러스의 항종양 효과

지도 김 성 규 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 진 안

김진안의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 항상 자상하고 세심한 지도와 정성으로 이끌어주신 김성규 교수님, 김주항 교수님께 충심으로 감사드리며, 동시에 본 논문을 위하여 조언과 격려를 아끼지 않으신 이원영 교수님, 박전한 교수님, 김경섭 교수님께 감사를 드립니다. 아울러 본 연구를 위해 항상 협조해 주신 암센터 연구원 여러분과 끊임없이 격려해 주신 부모님께 감사를 드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	4
1. 대상 세포주 및 세포 배양	4
2. 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 제조 및 바이러스 생산	4
3. 바이러스 게놈 분리와 PCR 분석	6
4. Immunoblotting 분석	6
5. YKL-1의 증식 및 세포 살상능 검증	7
6. Luciferase reporter 발현에 의한 p53 활성화도 측정	7
7. YKL-1이 누드마우스에 형성된 인체 암종괴의 성장에 미치는 영향	8
III. 결 과	8
1. YKL-1에서의 E1B 55 kD 유전자 소실 규명	8
2. YKL-1의 암세포 특이 증식 및 살상 능력의 비교	10
3. 인체 정상 세포주에서 YKL-1의 증식 및 세포 살상능	12
4. 인체 정상 세포주 및 암세포주에서 p53 활성화도	12
5. YKL-1의 항종양 효과 검증	15
VI. 고 찰	18
V. 결 론	20
참고문헌	21
영문요약	23

그림 차례

Fig. 1. Cloning strategy of pYKL-1	5
Fig. 2. Characterization of YKL-1	9
Fig. 3. Virus replication and the cytopathic effect of YKL-1 on a variety of human cancer cells	11
Fig. 4. Reduced virus replication and the cytopathic effect of YKL-1 in normal human cells	13
Fig. 5. Endogenous p53 expression/activity in human normal and cancer cells	14
Fig. 6. P53 induction by DNA-damaging agent or YKL-1 infection	15
Fig. 7. Effect of YKL-1 on C33A xenograft	16
Fig. 8. Effect of YKL-1 on Hep3B xenograft	17

표 차례

Table 1. Summary of p53 status of human cell lines used in the study	10
--	----

E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스의 항종양 효과

유전자 치료법의 바이러스성 전달체제로 이용되고 있는 아데노바이러스는 표적세포를 감염시킨 후 자기 증식을 위하여 바이러스가 내재하고 있는 조기발현 유전자의 하나인 E1B가 p53와 결합하여 p53의 기능을 저해한다. 따라서 E1B가 소실된 돌연변이형 아데노바이러스는 p53가 정상형인 세포에서는 증식하지 못하고 p53의 기능이 저하된 세포에서만 자기 증식과 세포 살상 능력을 가지게 된다. 이는 각종 종양에서 많은 경우에 p53의 기능이 비활성화되어 있다는 사실과 연루되어 E1B 유전자 소실 아데노바이러스의 종양 특이 증식 및 살상이 가능하다는 이론적 배경을 이룬다.

이를 바탕으로 본 연구자는 E1 부위가 완전히 소실된 아데노바이러스 벡터에 E1A와 E1B 19 kD을 재도입하고 대장균에서 유전자 상동 재조합에 의해 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스 YKL-1을 제작하여 E1B 55 kDa 소실 재조합 아데노바이러스의 항종양효과를 검증하고자 본 연구를 계획하였다. YKL-1으로 감염된 자궁암 세포주 C33A에서 획득한 바이러스의 게놈을 주형 DNA로 하여 PCR로 증폭시킨 산물의 존재 여부와 크기를 분석한 결과 YKL-1의 게놈상에는 E1B 55 kD 유전자의 대부분이 소실되어 있음을 확인하였다. YKL-1에 의한 E1A 및 E1B 19 kD의 발현을 확인하기 위하여 YKL-1으로 감염된 C33A 세포주에서 세포 단백질을 추출하여 E1A 또는 E1B 19 kD 특이 항체를 이용하여 immunoblotting를 시행한 결과 E1A와 E1B 19 kD이 양성 대조군 세포주 293 수준으로 효율적으로 잘 발현됨을 알 수 있었다. YKL-1의 증식능을 규명하기 위하여 인체 정상 세포주 및 암세포주 그리고 양성 대조군 세포주 293을 MOI 10의 YKL-1 또는 야생형 바이러스 ad-XJ로 감염시킨 후 생산된 바이러스를 획득하여 상대적인 역가를 산출한 결과 정상 세포주에서 YKL-1의 증식 능력은 현저히 감소되었으나 각종 암세포주에서는 상대적으로 증식이 활성화되어 있음을 알 수 있었다. 동일한 세포주들을 대상으로 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, E1B 55 kD 유전자를 부분적으로 제거한 dl1520, 야생형 양성 대조군 ad-XJ, 증식불능 음성 대조군 ad- Δ E1/ β -gal로 각기 감염시킨 후 세포 사멸 정도를 관찰한 결과 정상 세포주에서의 YKL-1의 세포 사멸능은 ad-XJ의 1/1,000 이하로 떨어짐을 알 수 있었다. 한편 YKL-1은 p53의 돌연변이로 p53가 비활성화된 것으로 알려진 C33A 또는 Hep3B에서는 야생형 바이러스와 유사한 정도의 세포 살상능력을 보여주었다. p53 유전자 발현이 YKL-1에 대한 세포의 감수성과 관련이 있는가를 알아보기 위하여 내인성 p53 발현에 대한 immunoblotting을 실시한 결과 야생형 p53 유전자의 구조를 가지는 인체 정상 세포주 및 인체 암세포주(HepG2, HeLa, H460)에서 p53는 소량 발현되고 있었다. 한편 돌연변이 p53을 가진 자궁암 세포주 C33A에서는 p53의 대량 발현을 관찰할 수 있었다. 이들 세포주에 각각 DNA 손상인자인 camptothecin을 투여하였을 때 야생형의 p53 유전자를 가진 세포주에서는 p53의 발현이 증가하였으나, 돌연변이형 p53 유전자를 가진 세포주에서는 p53 단백질의 발현증

가가 관찰되지는 않았다. 결과적으로 YKL-1 아데노바이러스는 p53 발현이 DNA 손상 유발인자에 의해 반응을 보이지 않는 세포에 대해서는 현저한 세포살상능을 보였다. YKL-1의 종양 퇴행 유발 능력을 규명하기 위하여 암세포주 C33A 또는 Hep3B를 누드 마우스에 접종한 후 형성된 종양에 YKL-1(실험군) 또는 자외선조사를 통하여 비활성화시킨 동량의 YKL-1(대조군)을 종양에 주사한 후 종양의 크기를 관찰한 결과 실험군의 경우 종양의 성장이 크게 억제됨을 확인할 수 있었던 반면 대조군에서는 지속적인 종양 성장이 관찰되었다. 실험동물로부터 종양을 적출하여 H/E staining을 시행한 결과 YKL-1을 주입한 실험군 종양에서는 세포의 괴사가 현저히 유발되는 반면 대조군에서는 활발한 종양세포의 증식을 확인할 수 있었다. 실험동물로부터 적출한 암세포주 Hep3B에서 TUNEL 분석법을 시행한 결과 퇴행된 종양조직에서는 뚜렷한 apoptosis를 관찰할 수 있었다.

p53 유전자가 비활성화 되어있는 암세포에서 특이적으로 증식한 YKL-1은 감염세포를 살상시키고 종양세포에서 증식된 YKL-1 아데노바이러스는 일차 감염 시 감염되지 않은 주변의 종양세포를 감염시키고 선택적으로 증식 가능하게 되어 종양세포의 분열을 억제하고 퇴행시키는 효과를 유발할 수 있는 것으로 여겨지며 이러한 효과는 세포내 p53 유전자의 기능 여부와 연관지어 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 이는 기존의 증식불능 아데노바이러스에 치료용 유전자를 도입하여 바이러스가 일차감염된 세포에서만 국소적으로 치료효과를 보이던 유전자 치료효과의 한계를 극복할 수 있는 새로운 암 치료법으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 유전자 치료, 종양 특이 증식 살상 아데노바이러스, p53, E1B 55 kD

E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스의 항종양 효과

<지도 김 성 규 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 진 안

I. 서 론

현재까지 암의 원인규명과 조기진단, 치료에 대한 연구가 활발히 진행되어오고 있지만 암에 대한 치료방법은 지난 10년간 거의 답보상태에 있다.¹ 한편 분자생물학의 눈부신 발전으로 유전자 수준에서 암을 비롯한 난치성 질환의 원인이 점차로 규명되어 가고 있어 이를 질병 치료에 응용하려는 유전자 치료가 새로운 치료분야로 발전해나가고 있다.² 실제로 유전자 치료의 임상시험 프로토콜 중 70% 이상이 암을 대상질환으로 하고 있으며 치료용 유전자를 대상세포에 전달해 주는 매개체로는 유전자 발현효율의 우수성 등의 장점을 가진 아데노바이러스가 레트로바이러스를 대신하여 많이 이용되고 있다.^{3,4} 최근, 암에 대한 유전자 치료 연구의 경향은 한가지 특정 유전자를 이용한 치료법의 개발보다는 여러 치료 유전자를 동시에 이용하는 방안, 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 종양특이 증식살상 아데노바이러스의 개발, 방사선 또는 항암제 등 기존의 치료방법과 병합 치료하는 방안 등의 시도가 주로 연구되고 있다.^{5,6}

한편 종양억제 유전자로 잘 알려진 p53은 폐암, 난소암, 유방암, 직장암, 두경부암 등 인체 종양의 50% 정도에서 유전자 변이를 확인할 수 있고,^{7,8} p53가 정상형으로 밝혀진 종양에서도 mdm2의 과다발현^{9,10} 또는 human papilloma 바이러스 감염¹¹ 등으로 p53가 비활성화되어 있는 경우가 빈번한 것으로 보고되어 왔다.¹² 아데노바이러스 초기 발현 유전자 중의 하나인 E1B 55 kD 유전자의 발현이 저하된 아데노바이러스 변이체(E1B-attenuated adenovirus: dl1520 또는 ONYX-015)는 암세포와 같이 p53의 기능이 저해된 세포에서는 야생형 바이러스와 마찬가지로 증식하여 암세포의 살상을 유발할 수 있을 것이라는 이론적인 배경에 근거하여¹³ McCormick 등¹⁴은 p53 유전자가 비활성화된 종양 세포에서 선택적으로 증식하고 결과적으로 암세포를 공격적으로 살상시키는 아데노바이러스 변이체의 암 유전자 치료에 대한 실용 가능성을 보고하였다. 즉 아데노바이러스의 genome이 숙주세포의 핵으

로 들어가면 E1A 부위로부터 다기능 조절단백질이 생성되어 E1B 부위에서 55 kD, 19 kD 두 종류의 단백질을 생성케 되는데 이들이 감염주기 진행의 필수적인 역할을 하게 된다. 이때 E1B 55 kD 단백질은 p53와 결합하여 p53의 비활성화를 유도하며,^{13,15} p53의 비활성화는 결과적으로 아데노바이러스의 성장과 복제를 가능케 한다.

이러한 배경 하에 본 연구에서는 E1B 55 kD이 선택적으로 소실된 아데노바이러스 변이체, YKL-1를 자체 제작하여, YKL-1의 종양 특이 증식 및 세포 살상 능력을 판정하고, 인체 정상 세포주 및 암세포주에서 p53 활성도에 따른 YKL-1의 세포 살상효과를 비교하고 YKL-1 투여시 누드마우스에 형성된 종양의 퇴행여부를 검증하여 결과적으로 YKL-1의 임상응용 가능성을 확인하고자 본 연구를 계획하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 모두 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1이 발현되는 293 세포주는 재조합 아데노바이러스의 생산 및 E1 발현 확인시 양성 대조군 세포주로 이용하였다. FHs738Lu, FHs173We는 각각 폐조직과 배(embryo)세포에서 기원된 인체정상 세포주이고 C33A, Hep3B, HepG2, SK-Hep1, HeLa, H460은 인체 암세포주들이다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO BRL)를 배양액으로 항생제 penicillin (100 IU/ml)/ streptomycin (50 µg/ml) (GIBCO BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 제조 및 바이러스 생산

아데노바이러스 E1 부위 중 E1B 55 kD 유전자를 결실시키기 위해 E1A와 E1B 19 kD 유전자를 포함하는 primer를 제작해 pXC1 (Microbix; Ontario, Canada)을 주형 DNA로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하여 바이러스의 유전자 염기서열 343 핵산에서 2,270번째 핵산까지를 포함하는 PCR 산물을 획득하였다. PCR을 위한 primer로는 말단에 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입시킨 5'-TTATTGGATCCTTTGTCTAGGGCCGCGGG-3'를 sense primer로 BamHI와 BglIII 인식부위 및 2253 (C::T)와 2262 (G::T)의 치환으로 2개의 중결코돈을 삽입시킨 5'-TCTTGGATCCAGATCTATACAGTTAAGCCACCTATAACAAC-3'을 anti-sense primer로 사용하였다. PCR로 얻어진 1.9 kb 생성물을 BamHI으로 절단한 후 E1이 완전히 소실된 pCA14 (Microbix; Ontario, Canada)의 BglIII 부위에 삽입시켜 shuttle vector인 pCA14-E1A/E1B 19 kD을 제작하였고 이를 XmnI으로 절단하였다. E1 및 E3 유전자 소실 아데노바이러스 벡터 pTG-CMV (Dr. Verca, University of Fribourg, Switzerland)를 ClaI으로 처

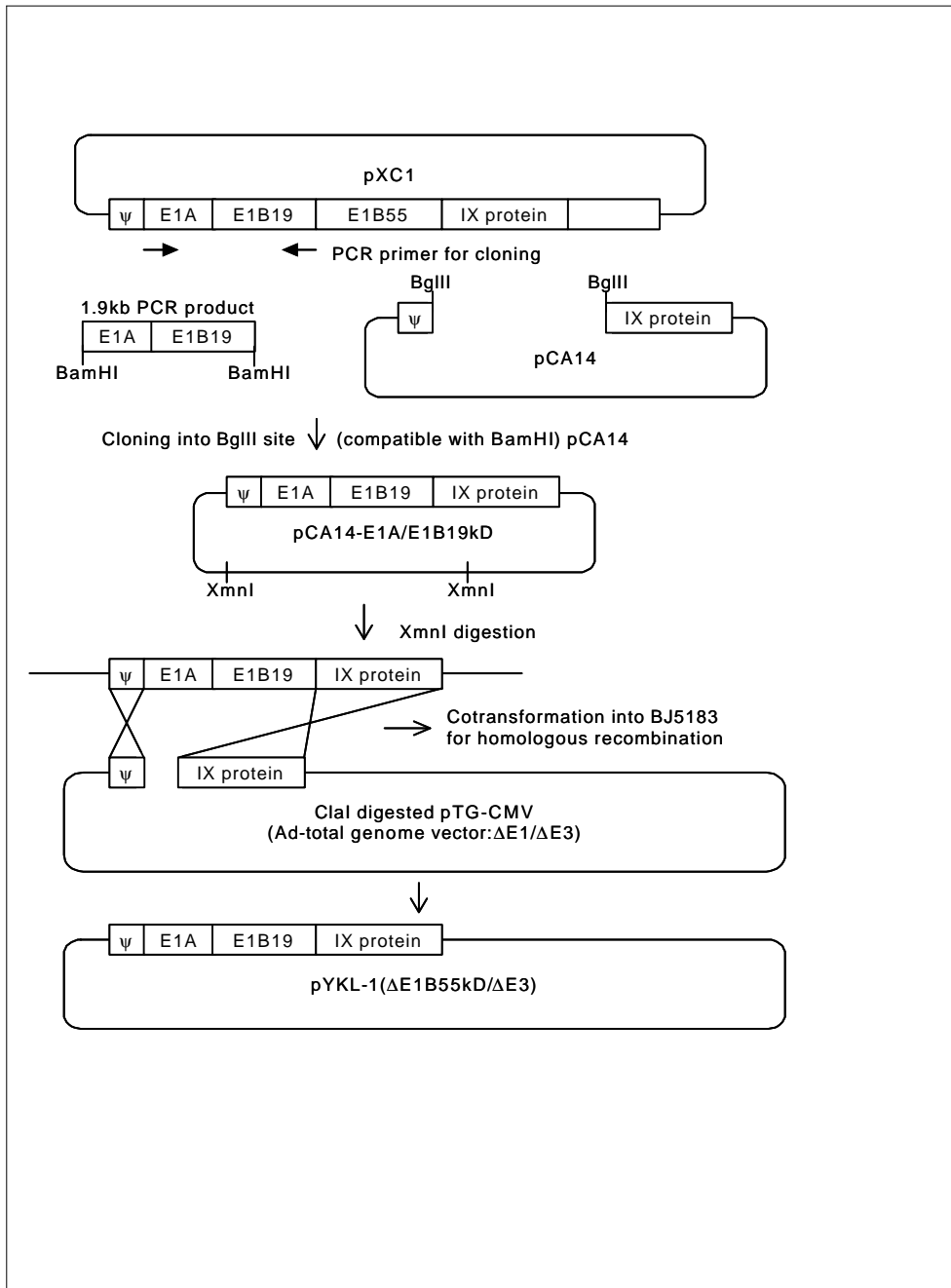


Fig. 1. Cloning strategy of pYKL-1. 1.9 kb E1A/E1B 19 kD was harvested with PCR (Polymerase Chain Reaction) method using pXC1 as a template. And BamHI digested PCR product was cloned into BglIII site of pCA14. Newly synthesized pCA14-E1A/E1B 19 kD was digested with XmnI, then cotransformed into BJ5183 with Clal digested pTG-CMV for homologous recombination.

리하고 위의 shuttle vector와 pTG-CMV를 각각 100 ng씩 혼합하여 대장균 BJ5183에 42°C에서 1분간 열처리로 형질전환시켜 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도하여 E1B 55 kD이 소실된 재조합 아데노바이러스를 제작하고자 하였다(Fig. 1). 대장균으로부터 추출한 plasmid DNA는 HindIII로 처리하여 E1B 55 kD이 소실된 pYKL-1임을 확인하였다. pYKL-1을 PacI으로 절단하여 293 세포주에 Lipofectamin (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 형질도입하여 생성된 아데노바이러스는 293 세포주에서 세포 살상 효과를 보여주었다. 세포 살상 효과가 관찰된 지 3일만에 그 상층액을 회수하였고, 다시 293 세포주에 재감염시켜 E1B 55 kD이 소실된 YKL-1 재조합 아데노바이러스를 대량 생산하였다.¹⁶ 대조군 바이러스인 증식불능 아데노바이러스 ad- Δ E1 및 β -galactosidase (LacZ)가 내재된 ad- Δ E1/ β -gal과 야생형 재조합 아데노바이러스 ad-XJ은 각각 pCA14, p Δ E1sp1A/ β -gal과 pXC1 (Microbix; Ontario, Canada)를 shuttle vector로 사용하여 동일한 방법으로 제작하였다. 단계적으로 희석한 재조합 바이러스($\times 10^{-1} \sim 10^{-9}$)들을 293 세포주에 감염시켜 바이러스의 역가를 결정하였다. 지속적인 실험수행을 위해 바이러스를 293 세포주에 재감염시켜 생산하였으며 동물 실험을 위해서는 CsCl gradient로 농축하여 순수 분리하였다.¹⁷

3. 바이러스 게놈 분리와 PCR 분석

YKL-1, dl1520 및 ad-XJ 바이러스를 multiplicity of infection (MOI) 10으로 자궁암 세포주 C33A에 감염시키고 2일 후 Qiagen genomic isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 바이러스 게놈을 회수하고 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다. 아데노바이러스의 E1B 55 kD 유전자의 존재여부를 확인하기 위해서 바이러스의 게놈의 염기서열 319에서 339 및 3516에서 3536에 해당하는 319 primer 5'-TTTGTGTTACTCATAGCGCGT-3'과 3536 primer 5'-ATTCTT-TCCCACCCTTAAGCC-3'을 이용하거나 2543에서 2563 및 3516에서 3536에 해당하는 2543 primer 5'-TGCAAAGGTGGCACTTAGGCC-3'과 3536 primer 5'-ATTCTTTCCCACCCTTAAGCC-3'을 이용하여 PCR을 수행하였다.

4. Immunoblotting 분석

C33A 세포주에 YKL-1, ad- Δ E1 또는 dl1520을 MOI 10으로 감염시키고 2일 후 감염된 세포를 회수하여 lysis buffer (50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitor: PMSF, TLCK, TPCK)로 lysis시켜 total protein 20 μ g을 10% SDS-PAGE로 전기영동하였다. 전기영동된 acrylamide gel은 semi-dry transfer 방식을 통하여 PVDF membrane (RPN 303 F, Amersham, Piscataway, NJ, USA)에 이동시킨 후 PBS-T (Phosphated buffered saline with Tween 20, pH 7.4)에 녹인 5% non-fat dry milk solution (blocking solution)으로 1시간 동안 blocking시켰다. 여기에 adenovirus 특이항체인 E1A (sc-430; Santa Cruz biotechnology, Inc.,

Santa Cruz, CA, USA), E1B 19 kD (DP17; Oncogene, Cambridge, USA), 및 α -actin 단일 항체를 일차항체로 blocking solution에서 hybridization시키고 PBS-T로 10분간 3번 orbital shaker에서 washing하였다. 다시 HRP (Horse-Radish Peroxidase)로 labeling된 이차항체(E1A는 anti-rabbit IgG, E1B 19 kD와 α -actin은 anti-mouse IgG)로 2차 hybridization을 하였으며 ECL (Enhanced Chemi-Luminescence: RPN 2108, Amersham)을 이용하여 단백질의 발현양상을 규명하였다.

5. YKL-1의 증식 및 세포 살상능 검증

재조합 아데노바이러스의 증식능을 검증하기 위하여 인체 정상 세포주 FHs738Lu, FHs173We 및 인체 암세포주 Hep3B, C33A, HeLa, H460들을 MOI 10의 YKL-1 또는 ad-XJ로 감염시키고 3~4시간 후에 바이러스 inoculum을 완전히 제거하고 새로운 배양액을 채워 3일간 더 배양하여 바이러스의 증식을 유도하였다. 배양액과 잔류 세포를 얻어 세번의 freezing/thawing으로 바이러스를 획득하여 역가를 산출하였다.¹⁷ 산출 방법은 먼저 6-well에 293 세포주를 50% 정도의 efficiency로 plating하고 앞에서 얻어진 바이러스들을 각각 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 으로 희석하여 1시간 동안 감염시킨 후 첨가된 바이러스 soup을 걸어내고 0.8% agarose overlay (in DMEM media with 10% fetal bovine serum)를 첨가시켜 상온에서 식힌 후 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양시켰다. 7~8일이 지난 후 생성된 바이러스의 plaque 개수를 counting하여 바이러스의 역가를 산출하였다. 또한 YKL-1의 상대적인 역가는 다음과 같이 산출되었다.

$$\text{YKL-1에 의한 역가/ad-XJ에 의한 역가} \times 100$$

재조합 아데노바이러스의 세포 살상능을 검증하기 위해서는 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, ad-XJ 그리고 ad- Δ E1/ β -gal 바이러스를 상기한 세포주에 각각 처리하였다. 각각 바이러스들의 세포살상능 비교는 MOI 0.1의 ad-XJ가 감염세포를 거의 사멸시킨 시점에 남아있는 세포들을 1% crystal violet (50% methanol)으로 고정하고 염색하여 분석하였다.¹⁷

6. Luciferase reporter 발현에 의한 p53 활성도 측정

실제로 세포 내에서 p53의 기능 유무를 알아보기 위해 luciferase의 활성도를 표지자로 하여 Lee 등이 기술한 방법으로 시행하였다.¹⁸ p53에 반응하는 luciferase 발현 cassette를 포함한 p53-luc 혹은 pGL-enhancer를 pcDNA-LacZ (β -galactosidase; Invitrogen)와 함께 6 well plate에 배양한 대상 세포에 Lipofectamin (GIBCO BRL)을 이용하여 transfection하였다. 형질 도입 2일 후 세포를 인산 완충 식염수로 1회 세척하였고 reporter lysis buffer (Luciferase assay kit; Promega) 200 μ l를 첨가하여 세포추출액을 얻었다. 96-well plate에 lysis된 cell

lysate supernatant 20 μ l를 첨가하고 luciferase substrate (Luciferase assay kit; Promega)를 100 μ l를 첨가하여 luciferase 활성도를 Luminometer로 측정하였다. β -galactosidase 활성도를 측정하기 위해서는 회수된 cell lysate supernatant 10 μ l를 96-well plate에 첨가하고 120 μ l Z-buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoethanol, ONPG: 0-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Sigma) 0.7 mg/ml) 첨가하여 30 분 동안 37°C incubation한 후 50 μ l stop solution (1 M Na_2CO_3)를 첨가하였다. Spectrophotometer 420 nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 plasmid 형질도입 효율을 표준화하였다.

7. YKL-1이 누드마우스에 형성된 인체 암종괴의 성장에 미치는 영향

생후 6~8주 정도 경과된 누드마우스에 1×10^7 개의 자궁암세포주 C33A 또는 간암세포주 Hep3B를 양측 복벽에 주사하였다. 종양이 60~80 mm^3 정도 성장하였을 때 1×10^7 에서 1×10^9 pfu (plaqueforming unit)의 YKL-1 바이러스 또는 자외선조사로 비활성화시킨 동량의 YKL-1 바이러스를 이들 간격으로 세 번 종양에 직접 주사한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 용적은 caliper를 이용하여 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다. (단축 mm)² × 장축 mm × 0.523.¹⁷ 또한 같은 방법으로 바이러스를 주사한 누드마우스로부터 종양을 적출하여 H/E 염색법을 시행하였고, 조직 내에서 apoptosis 출현 여부를 확인하기 위하여 조직 일부를 채취하여 포르말린에 고정한 후 2시간 이내에 통상의 방법에 따라 수세, 파라핀 포매 과정을 거쳐서 5 μ m의 연속 절편을 만든 후 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling) 검사를 시행하였다. TUNEL 검사는 ApopTagTM Kit (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용하였으며 방법을 약술하면 다음과 같다. 조직절편은 내인성 peroxidase를 억제하기 위하여 2% H_2O_2 용액에 실온에서 5분간 담가 놓은 후 5분간 2회에 걸쳐 PBS 용액으로 세척하였다. 이후 조직절편은 1X equilibration 완충액을 처리하여 10초간 실온에 놓아 두었다가 terminal deoxynucleotidyl transferase를 첨가하여 37°C 항온가습기에 1시간 동안 반응시킨 후 PBS 용액으로 5분씩 3회에 걸쳐 세척한 후 slide에 anti-digoxigenin peroxidase를 도포하여 실온의 가습기 안에서 반응시켰으며, 발색반응은 PBS 세척 후 DAB (deaminobenzidine)를 이용하였다.

III. 결 과

1. YKL-1에서의 E1B 55 kD 유전자 소실 규명

YKL-1이 E1A, E1B 19 kD는 존재하나 E1B 55 kD만이 특이적으로 소실된 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스인지를 알아보기 위하여 바이러스의 게놈에 대한 PCR 또는 감염세포에서의 E1A 및 E1B 55 kD 단백질의 발현 양상을 확인하여 검증하였다(Fig.

2). 먼저 YKL-1, dl1520 및 ad-XJ로 감염된 자궁암 세포주 C33A에서 획득한 바이러스의 게놈을 주형 DNA로 하여 PCR로 증폭시킨 산물의 존재여부와 크기를 분석하였다(Fig. 2A). E1 유전자를 모두 포괄할 수 있는 319/3536 primer를 이용한 경우(left panel) YKL-1은 2.0

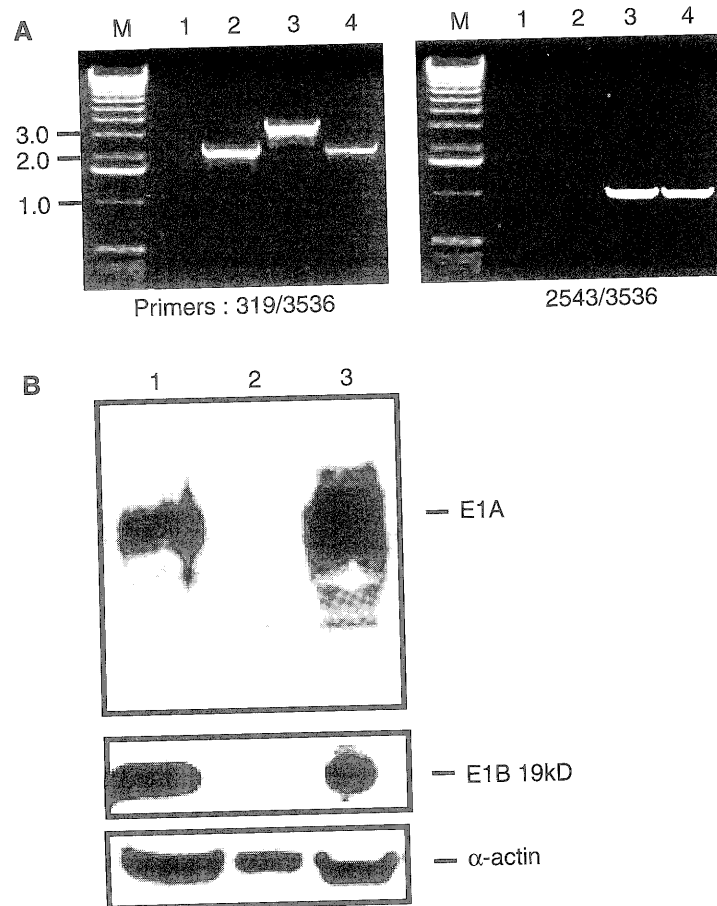


Fig. 2. Characterization of YKL-1. A. PCR analysis of YKL-1. Two days post-infection, virus genome was recovered from C33A cells and PCR was performed using primers corresponding to the upstream sequence of E1A and the downstream sequence of E1B 55 kD (left panel) or primers corresponding to E1B 55 kD (right panel). PCR products were visualized using 1% agarose electrophoresis and EtBr staining. lane 1; mock infected, lane 2; YKL-1 infected, lane 3; ad-XJ infected, lane 4; pCA-E1A/E1B 19 kD (left panel), pXC1 (right panel) as a positive control B. Expression analysis of adenovirus E1A and E1B 19 kD protein. Infected cells were harvested and lysed with cell lysis buffer. Reducing SDS-PAGE was then performed and E1A and E1B 19 kD were visualized by immunoblotting. lane 1; 293 cells as a positive control, lane 2; mock infected, lane 3; YKL-1 infected. A similar level of α -actin expression indicated that an equal amount of protein was loaded in each lane.

kb (lane 2), 야생형 바이러스 ad-XJ를 주형으로 하는 경우는 3.2 kb (lane 3)의 PCR 산물을 각기 생성하였다. 예상대로 pCA14-E1A/19 kD shuttle 벡터를 주형 DNA로 하였을 때에는 YKL-1과 마찬가지로 2.0 kb (lane 4)의 산물이 생성되었다. E1B 55 kD 유전자특이 2543/3536 primer의 경우(right panel) ad-XJ (lane 3)와 야생형 shuttle vector인 pXC1 (lane 4)은 0.8 kb의 PCR 산물을 생성하지만 YKL-1 (lane 1)과 dl1520 (lane 2)은 PCR산물을 생성하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 ad- Δ E1은 어느 경우에도 PCR 산물을 생산하지 못하였다. 이러한 결과는 YKL-1의 계놈상에는 E1B 55 kD 유전자의 대부분이 소실되어 있음을 보여준다. 다음으로 YKL-1에 의한 E1A 및 E1B 19 kD의 발현을 확인하기 위하여 YKL-1 또는 ad- Δ E1으로 감염된 C33A 세포주에서 세포 단백질을 추출하여 E1A 또는 E1B 19 kD 특이 항체를 이용하여 immunoblotting를 시행하였다(Fig. 2B). 그 결과 ad- Δ E1으로 감염된 세포주 (lane 2)와는 달리 YKL-1으로 감염된 세포주(lane 3)에서는 E1A와 E1B 19 kD이 양성 대조군 세포주 293 (lane 1) 수준으로 효율적으로 잘 발현됨을 알 수 있었다. 이로서 YKL-1은 E1이 소실된 바이러스 변이체에 E1A와 E1B 19 kD을 재도입하여 획득한 E1B 55 kD 유전자 결손 바이러스 변이체임을 확인하였다.

2. YKL-1의 암세포 특이 증식 및 살상 능력의 비교

이번 연구에서 사용된 세포의 특성을 Table 1에 요약하였다. 3개의 인체 정상 세포주는 정상기능을 가진 야생형 p53을 갖고 있는 반면 인체 암세포주는 다양한 p53의 활성도를 보이는 것으로 알려져 있다.^{19,20}

Table 1. Summary of p53 status of human cell lines used in the study

Cell line	Cell type	p53 Mutation	Comments
FHs173We	Fetus lung cells	Wild type	Normal cells
FHs738Lu	Embryonic cells	Wild type	Normal cells
Human fibroblast	Fibroblast from patient's ascites	Wild type	Normal cells
SK-Hep1	Hepatocellular carcinoma	A partial deletion or rearrangement	
HepG2	Hepatoblastoma	Wild type	Wild type p53
Hep3B	Hepatocellular carcinoma	Homozygous deletion	Homozygous deletion
C33A	Cervical carcinoma	R273C	Mutation in DNA-binding domain of p53
HeLa	Cervical carcinoma	Wild type	HPV positive
H460	Large cell lung carcinoma	Wild type	Wild type p53

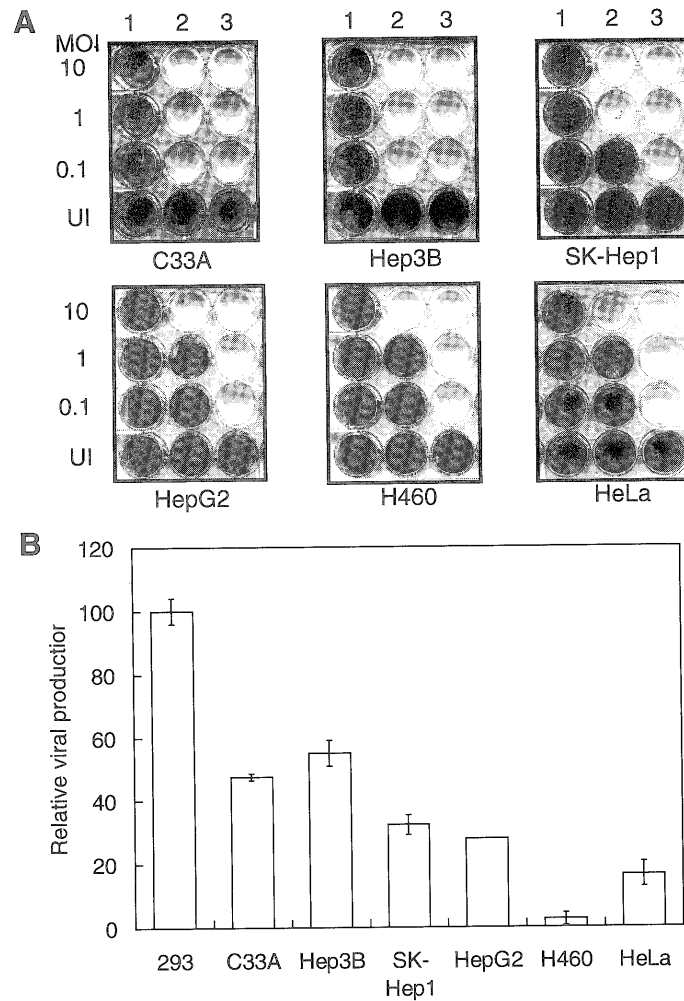


Fig. 3. Virus replication and the cytopathic effect of YKL-1 on a variety of human cancer cells. **A.** Cytotoxicity of YKL-1 in human cancer cells. C33A, Hep3B, SK-Hep1, HepG2, H460 and HeLa on 24-well plates were infected with ad-ΔE1 YKL-1, ad-XJ, or uninfected (UI) at MOIs of 10, 1, or 0.1. When the cells infected with ad-XJ at an MOI of 0.1 showed complete cytolysis, the cells were fixed and stained with crystal violet. lane 1; ad-ΔE1, lane 2; YKL-1, and lane 3; ad-XJ. **B.** The virus replicating capability of YKL-1 in human cancer cells. Cells were infected with YKL-1 or ad-XJ at an MOI of 10. Four days post-infection, the virus was recovered from culture supernatant and the virus titer was determined by a limiting dilution assay on 293 cells. The amount of YKL-1 produced was normalized against the amount of ad-XJ produced in the same cells. Values shown represent the mean values of at least 3 independent experiments.

YKL-1의 인체 암세포주에서의 증식과 살상능력을 규명하기 위하여 Table 1에 제시된 다양한 종류의 인체 암세포주를 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, 야생형 양성 대조군 ad-XJ, 증식불능 음성 대조군 ad- Δ E1/ β -gal로 각기 감염시킨 후 잔류세포를 crystal violet으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰하였으며 또한 생산된 바이러스를 획득하여 상대적인 역가를 산출하였다(Fig. 3). YKL-1은 p53의 돌연변이로 p53가 비활성화된 것으로 알려진 C33A 또는 Hep3B에서는 야생형 바이러스와 유사한 정도의 세포 살상능력을 보여주었고 p53가 정상형으로 알려진 HeLa 및 H460에서의 세포 살상 능력은 야생형에 비하여 낮았다(Fig. 3A). p53 유전자가 비활성화 되어있는 암세포에 대한 YKL-1의 특이 살상능은 dl1520의 그것과 유사한 것으로 확인되었다. 또한 예상대로 증식불능 음성 대조군 ad- Δ E1/ β -gal 또는 ad- Δ E1 (lane 1)에서는 세포 살상 능력을 전혀 관찰할 수 없었다(data not shown). YKL-1은 각종 암세포주에서는 상대적으로 증식이 활성화되어 있음을 알 수 있었으며 특히 p53가 돌연변이형으로 알려진 Hep3B 및 C33A에서의 YKL-1의 증식은 각기 293 세포주의 $55 \pm 3.4\%$ 와 $47.5 \pm 3.7\%$ 로 야생형의 증식 정도에 근접하는 수준이었고 p53가 정상형으로 알려진 HeLa 또는 H460에서는 각기 $16.5 \pm 0.3\%$ 와 $2.5 \pm 1.0\%$ 였다(Fig. 3B).

3. 인체 정상 세포주에서 YKL-1의 증식 및 세포 살상능

YKL-1의 정상 세포에서의 증식과 세포 살상 능력을 알아보기 위하여 인체 정상 세포주 FHs738Lu, FHs173We 그리고 섬유아세포를 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, 야생형 양성 대조군 ad-XJ, 증식불능 음성 대조군 ad- Δ E1/ β -gal로 각기 감염시킨 후 잔류세포를 crystal violet으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰하였으며 또한 생산된 바이러스를 획득하여 상대적인 역가를 산출하였다(Fig. 4). YKL-1에 감염된 인체 정상 세포는 10 MOI에서도 감염 후 12일까지도 세포 살상 효과를 보이지 않았다. 반면 ad-XJ를 감염시킨 경우는 0.1의 낮은 MOI에서도 감염 후 8~12일 내에 세포 살상을 보였다(Fig. 4A). YKL-1에 감염된 세포들에서 바이러스 생산은 급격히 감소하여 ad-XJ의 1% 이하 수준으로 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 연구결과는 인체 정상 세포주에서 YKL-1의 세포 살상 및 바이러스 증식이 인체 암세포주에 비해 현저히 낮음을 보여준다(Fig. 3, 4). YKL-1의 인체 정상 세포주에 대한 증식 및 세포 살상능은 dl1520의 그것과 유사한 것으로 확인되었다(data not shown). 요약하면 이러한 결과들은 실험에 사용된 인체 암세포주가 인체 정상 세포주에 비해 YKL-1에 대한 보다 높은 감수성을 가지고 있음을 나타내었다.

4. 인체 정상 세포주 및 암세포주에서 p53 활성화도

어떠한 자극도 없는 내인성 p53의 활성화도와 전사 능력은 p53 기능의 지표가 될 수 있다.¹⁹ p53 유전자 발현이 YKL-1에 대한 세포의 감수성과 관련이 있는가를 알아보기 위하여 내인성 p53 발현에 대한 immunoblotting을 실시하였다(Fig. 5A). 예상하였던 대로 야생형

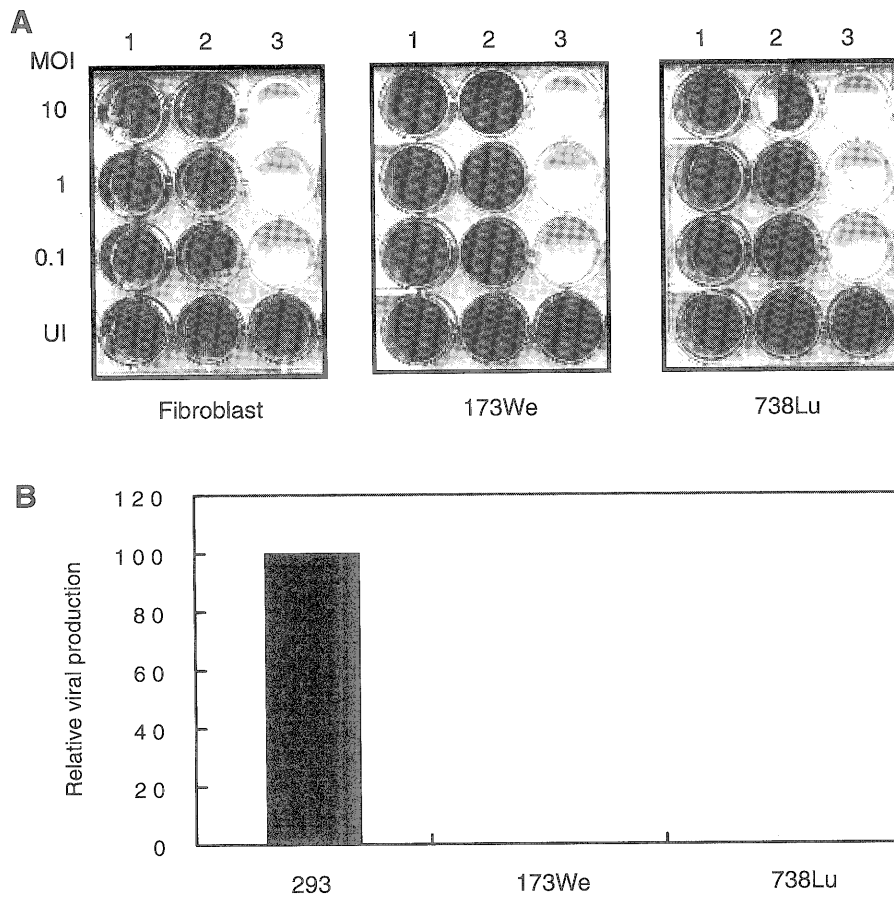


Fig. 4. Reduced virus replication and the cytopathic effect of YKL-1 in normal human cells. Cells were infected with YKL-1, ad-XJ or ad- Δ E1. Then virus production and cytopathic effects were examined, as described in Fig. 2. A. Cytopathic effect of YKL-1 in normal human cells. lane 1; ad- Δ E1, lane 2; YKL-1, lane 3; ad-XJ. B. Replication capability of YKL-1 in 173We and 738We cells. The amount of YKL-1 produced was compared to the amount of ad-XJ produced in the same cells. Values represent the means of at least 3 independent experiments.

p53을 발현하는 인체 정상 세포주(FHs738Lu, FHs173We) 및 인체 암세포주(HepG2, HeLa, H460)에서 p53는 소량 발현되었으나 DNA binding domain중 273번 위치의 Arginine이 Cysteine으로 치환되어 비활성 돌연변이 p53의 반감기를 증가시키는^{19,20} 자궁암 세포주 C33A에서는 p53의 다량 발현을 확인할 수 있었다. 다른 정상세포 및 암세포와 비교할 때 SK-Hep1에서도 p53이 높게 나타났는데 이것은 비정상적인 p53의 활성도를²¹ 보여주는 것이다. p53 유전자 동형 소실을 일으킨 Hep3B에서는²¹ p53이 검출되지 않았다. 내인성 p53

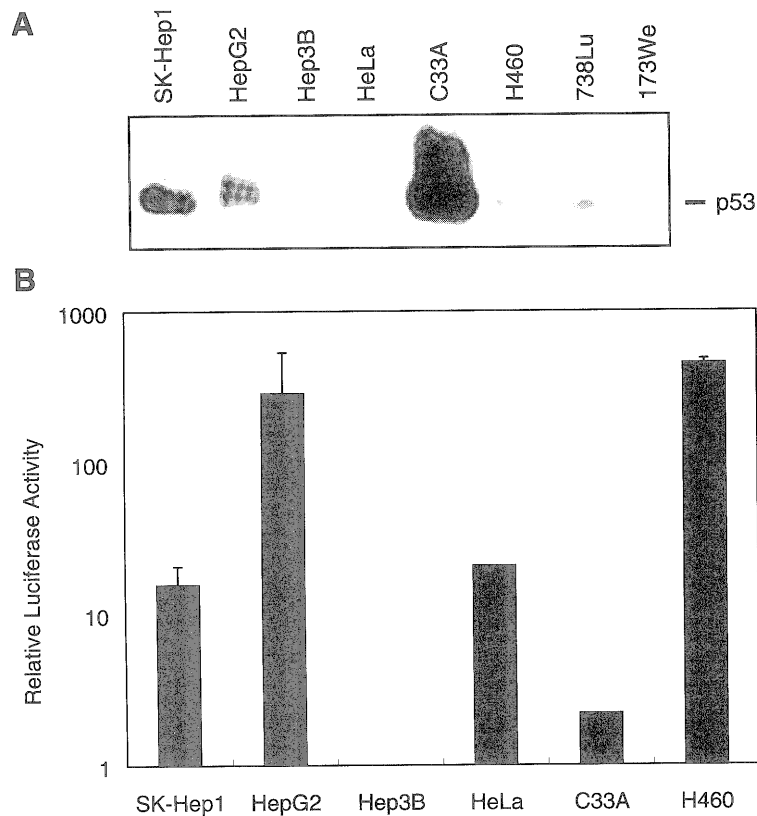


Fig. 5. Endogenous p53 expression/activity in human normal and cancer cells. A. p53 expression in normal human cells and cancer cells. Equal amounts of cell lysates were loaded into SDS-PAGE and evaluated by immunoblotting using an antibody to p53. B. Endogenous p53 transcriptional activity in human cancer cells. Cells were transiently transfected with p53-luc or pGL2-enhancer together with pcDNA- β gal, which is an indicative of transfection efficiency. Luciferase activity was determined and normalized on the basis of β -galactosidase activities. The fold increase represents the relative activity of p53-luc versus pGL2-enhancer in the transfected cells. The values are the averages of at least 3 independent experiments.

에 대한 전사능력을 측정하기 위하여 p53-반응 luciferase reporter plasmid를 이용한 일시적 transfection 분석을 시행하였으며 대조군으로는 p53 촉진자(promoter)대신 SV-40 촉진자를 이용하여 활성도를 비교하였다(Fig. 5B). Luciferase 활성도가 H460에서는 SV-40 촉진자에 비하여 453.5배, HepG2에서는 288.2배 그리고 HeLa 및 SK-Hep1에서는 각각 20.7배 및 15.6배 발현되었으나, Hep3B 및 C33A에서는 1~2배 정도만 발현되었다. HeLa는 human papilloma 바이러스에 감염된 자궁암 세포주로서 내인성 p53의 낮은 전사능력으로 인해 비

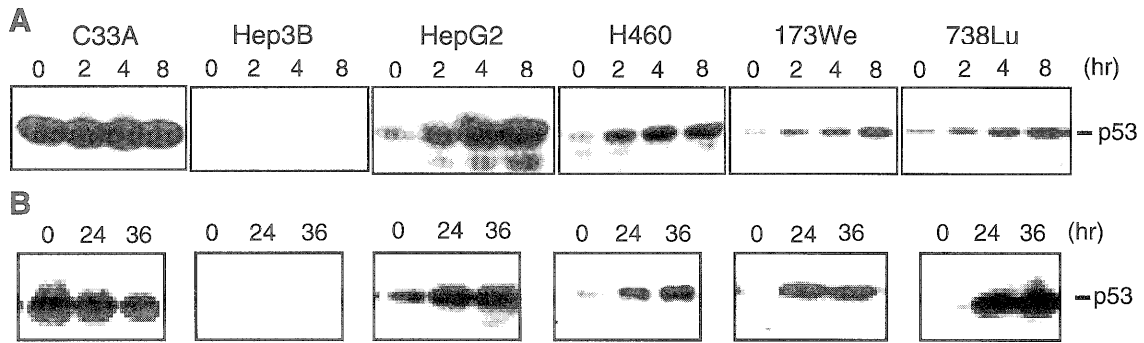


Fig. 6. P53 induction by DNA-damaging agent or YKL-1 infection. C33A, Hep3B, HepG2, H460, 173We and 738Lu were treated with camptothecin or YKL-1 for variable times as shown above. Cells were harvested and lysed with cell lysis buffer. 10% reducing SDS-PAGE was performed and p53 was visualized by immunoblotting. 20 μ g of protein were loaded in each lane, which was confirmed by immunoblotting to the identical blot with α -actin (data not shown). A. Expression of p53 by 1 mM camptothecin. lane 1; 0 hr, lane 2; 2 hr, lane 3; 4 hr and lane 4; 8 hr treatment. B. Expression of p53 by YKL-1 treatment. lane 1; 0 hr, lane 2; 24 hr and lane 3; 36 hr infection.

정상적인 p53의 기능을 가지고 있다고 알려져 있다.²²

DNA를 손상시키는 약물 처리 후 그리고 YKL-1 감염에 의한 p53의 발현 양상을 시간 변화에 따라 조사하였다(Fig. 6). 세포는 camptothecin이나 YKL-1으로 처리한 후 immunoblotting을 시행하여 p53 발현을 알아보았다. p53은 예상했던 대로 3개의 정상 세포주 및 H460, HepG2에서는 시간 경과에 따라 그 발현이 증가하였으나 자극의 종류에 무관하게 C33A 세포주에서는 p53가 다량으로 발현되었으며 Hep3B에서는 발현되지 않았다. 이상의 결과는 YKL-1에 대한 암세포주의 상대적 감수성은 DNA 손상인자에 의하여 p53 유전자의 발현증가를 보이는 세포주보다는 발현증가를 보이지 않는 세포에 대하여 더욱 뚜렷한 세포살상능이 있음을 제시하고 있다(Fig. 5, 6).

5. YKL-1의 항종양 효과 검증

YKL-1의 종양 퇴행 유발 능력을 규명하기 위하여 누드마우스에서의 종양 형성능이 확인된 암세포주 C33A (Fig. 7) 또는 Hep3B (Fig. 8)를 누드마우스에 접종한 후 형성된 종양에 YKL-1(실험군) 또는 자외선조사를 통하여 비활성화시킨 동량의 YKL-1(대조군)을 종양에 주사한 후 종양의 크기를 관찰하였다. 육안 관찰상으로도 실험군의 경우 종양주위로 형성되어지던 혈관들이 서서히 사라지면서 종양의 성장이 크게 억제됨을 확인할 수 있었던 반면 대조군에서는 지속적인 종양 성장이 관찰되었다. 실험군에서는 보다 많은 양의 YKL-1이 접종될수록 종양의 성장은 그에 비례하여 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 8A). 실험동물로부터 종양을 적출하여 H/E staining을 시행한 결과 YKL-1을 투여한 실험군 종양에서는 세포의 괴사가 현저히 유발되는 반면 대조군에서는 활발한 종양세포의 증식을 확

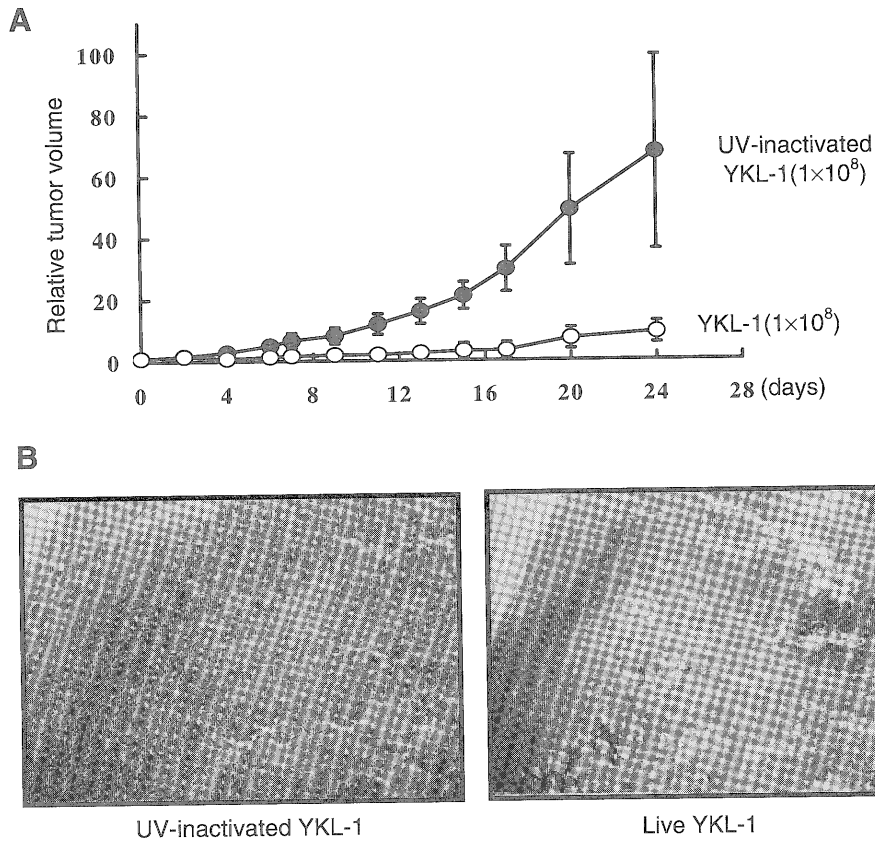


Fig. 7. Effect of YKL-1 on C33A xenograft. 1×10^7 cells were injected subcutaneously into the flanks of *nu/nu* mice. Once tumor volume reached about $80 \mu\text{l}$ in size, live or UV-inactivated YKL-1 was injected. Live or UV-inactivated YKL-1 of indicated PFU was injected 3 times intratumorally once every other day. Tumor growth was measured 3 times weekly by a caliper until the end of the study. Relative tumor growth was analyzed using the following equation: tumor volume at study termination/tumor volume at the time of the first virus injection. A. Antitumoral effect of live YKL-1. B. H/E staining. Fifteen days after the injection of live or UV-inactivated YKL-1, the animals were sacrificed and H/E staining was carried out in formalin-fixed paraffin-embedded tumor sections. Tumor specimens injected with UV-inactivated YKL-1 (left panel) demonstrated active proliferation of tumor cells and the specimen injected with live YKL-1 (right panel) showed tumor necrosis.

인할 수 있었다(Fig. 7B). 실험동물로부터 적출한 암세포주 Hep3B에서 TUNEL 분석법(Fig. 8B)을 시행한 결과 퇴행된 종양조직에서는 현저한 apoptosis를 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 항종양 효과는 용량에 비례하며, 종양 내 주사한 경우 종양세포의 apoptosis를 유발함을 알 수 있었다.

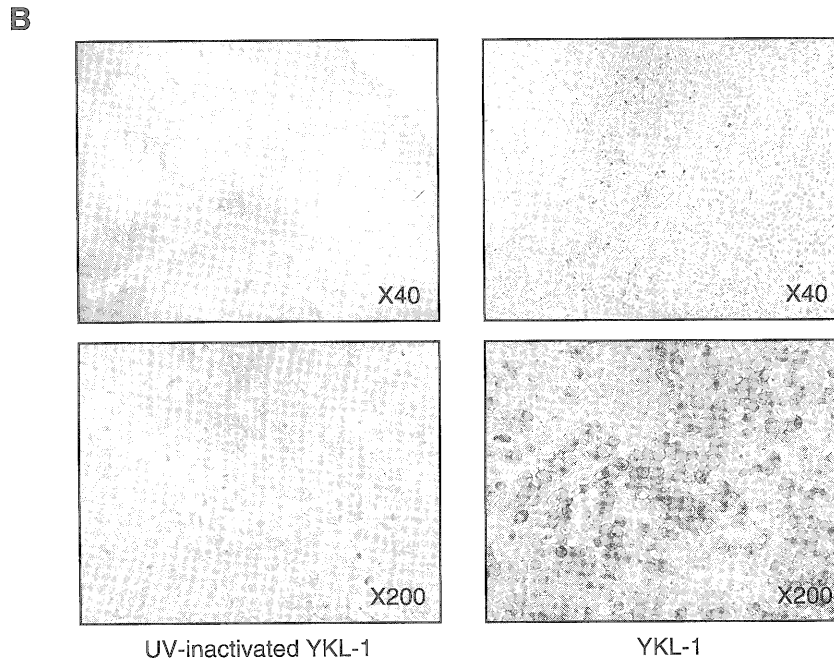
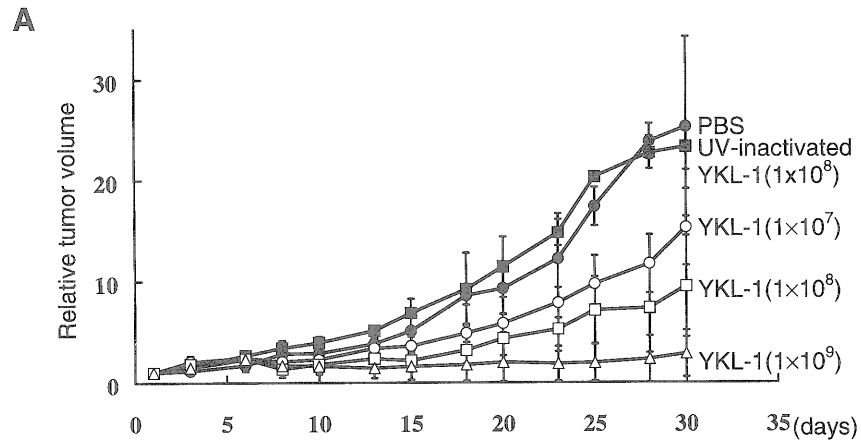


Fig. 8. Effect of YKL-1 on Hep3B xenograft. Hep3B xenograft was prepared and live or UV-inactivated YKL-1 was administered as described in Fig. 7. A. Relative tumor volumes by differently administered viral doses. B. TUNEL assay of Hep3B human tumor xenografts. Fifteen days after the injection of live (right panel) or UV-inactivated YKL-1 (left panel), animals were sacrificed and TUNEL assay was conducted in formalin-fixed paraffin-embedded tumors. The right panel demonstrates numerous apoptotic cells.

IV. 고 찰

본 연구에서 대장균을 이용하여 유전자 상동 재조합에 의해 제작한 YKL-1은 아데노바이러스 초기발현 유전자 E1 중 E1A 및 E1B 19 kD만이 계놈상에 존재하고 발현되며(Fig. 2) E1B 55 kD은 발현되지 않는 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스임을 확인할 수 있었다. 아데노바이러스 초기발현 유전자인 E1B 55 kD은 p53와 결합하여 p53의 기능을 억제하여 야생형 아데노바이러스의 활발한 증식 및 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도하는 것으로 보고된 바 있다.^{13,23} p53는 대부분의 인체 종양에서 유전자의 직접적인 돌연변이 또는 mdm2의 과다발현 등 간접적인 요인에 의해 그 기능이 비활성화되어 있고²⁴ 이는 약물 요법이나 방사선 치료 등 기존 치료에 의한 치료 효과를 저하시키는 주된 요인 중의 하나이다.^{12,24} 이와 같은 기존 암치료의 문제점을 극복하기 위하여 E1이 소실된 증식 불능 재조합 아데노바이러스를 매개체로 치료용 유전자를 도입하여 종양의 퇴행을 유발시키려는 유전자 치료의 연구가 꾸준히 진행되고 있다.^{3,17,25} 하지만 이러한 시도들은 바이러스가 일차 감염된 세포 및 주변의 극히 일부 세포에서만 치료 효과를 기대할 수가 있어 실질적인 치료효과를 기대하기에는 커다란 한계가 있다.

상기한 문제점을 극복하기 위하여 종양특이증식 및 살상능을 가진 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스를 암 유전자 치료에 이용하려는 시도가 최근 활발히 연구되고 있다. Bischoff 등¹⁴은 E1B 55 kD 유전자가 부분적으로 소실된 아데노바이러스 dl1520의 항종양 효과를 보고하였고 더욱이 이러한 아데노바이러스와 cisplatin과 같은 항암제를 동시에 처리함으로써 p53의 변이가 확인되지 않은 암세포도 효과적으로 세포 살상을 유도할 수 있음을 확인하였다.²⁶ 본 연구의 산물인 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스인 YKL-1은 암세포 특이적 증식 및 세포 살상능에 있어 dl1520과 유사한 결과를 보였다. 인체 정상세포 FHs173Lu, FHs738We에서 YKL-1의 증식 및 세포 살상능은 야생형 아데노바이러스에 비해 현저히 감소하였고 그 감소 정도는 dl1520의 그것과 유사한 수준이었다(Fig. 4). 반면에 각종 암세포주에서의 YKL-1의 증식 및 세포 살상능은 상대적으로 활성화되어 특히 p53가 돌연변이형으로 알려진 C33A 및 Hep3B에서의 바이러스 증식은 야생형 바이러스와 유사한 수준이었다(Fig. 3). 반면 p53가 정상형으로 알려진 HeLa 또는 H460의 경우에는 바이러스 증식 및 세포 살상능이 다소 떨어졌다. 이상의 사실은 YKL-1의 세포살상능은 특히 DNA손상 유발인자 투여시 p53의 발현에 변화가 관찰되지 않는 즉 p53 유전자가 비활성화 되어있는 세포에서(Fig. 6, 7) 선택적인 세포살상 효과가 있음을 보여준다. 최근 세포 내 p53상태와 바이러스 생산, 바이러스 유전자 표현, E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스의 항종양 효과 간에는 서로 상관 관계가 적다는 보고가 나오면서 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스를 암 유전자 치료에 이용하는 것에 대해 의문이 제기되고 있다.²⁷⁻³⁰

이들 연구에서의 문제점은 첫째, 대부분의 p53 특이성에 대한 연구는 p53의 상태를 결정하기 위하여 암세포주에서 염기서열 정보를 이용하였다. 그러나 다기능적인 전사 조절자로서의 p53은 염기서열과 관계없이 부분적으로 비활성화되어 있는 것으로 널리 알려져 있다.^{9,12} 본 연구의 결과들은 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스의 항종양 효과가 인체 정상 세포주 및 암세포주 모두에서 내인성 p53의 기능 상태와 관련이 있는 것을 보인다. 즉 정상 기능의 p53을 가진 3개의 인체 정상 세포주는 바이러스 증식 및 결과적인 세포 살상에 있어서 YKL-1에 대해 뚜렷한 저항성을 보이는 데 반하여(Fig. 3~6), 비정상 p53을 가진 Hep3B와 C33A 인체 암세포주는 YKL-1에 가장 예민한 감수성을 나타내었다. 현재까지 연구에서 HepG2와 H460은 인체 정상 세포주와 비교할 때 p53의 기능상 별다른 차이가 없었으나(Fig. 5, 6) YKL-1에 대해서는 정상 세포주보다 예민한 감수성을 보였다(Fig. 3, 4). 이러한 결과는 본 연구에서는 확인되지 않았으나 HepG2 및 H460 세포주에서 p53의 기능이 부분적으로 비활성화되었을 가능성을 제기한다. 둘째, 이러한 보고들은 대부분 p53의 유전자 변이 양상에 근거하여 암세포만을 연구대상으로 하고 있고 세포 감염 시 높은 MOI를 사용함과 동시에 감염 초기의 세포 살상 양상을 관찰하고 있다. 따라서 이것은 낮은 MOI로 감염된 암세포주 감염의 실질적인 상황을 충분히 반영하지 못하고 있다. Vollmer 등³¹은 최근 간암세포에서 E1B 유전자 소실 아데노바이러스의 p53 선택적 복제는 오직 낮은 바이러스 농도에서만 발생한다고 보고하였다. 그러나 p53 기능과 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스의 항종양 효과에 대한 관계는 추후로도 더 심도있게 연구되어야 할 것이다. 또한 누드마우스에 형성된 C33A 및 Hep3B 종양에 대한 E1B 유전자 소실 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 종양특이 살상효과를 *in vivo*에서도 확인할 수 있었다(Fig. 7, 8). 이는 자외선으로 비활성화된 음성 대조군 바이러스와는 달리 암세포 특이적으로 증식한 YKL-1은 일차 감염 시 감염되지 않은 주변의 종양세포를 감염시킴과 동시에 세포 살상 및 apoptosis를 유도하여 궁극적으로 종양의 퇴행을 유발시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

최근 Wildner 등^{32,33}은 E1B 유전자 소실 재조합 아데노바이러스에 Herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-TK)를 삽입한 재조합 바이러스를 이용하여 흑색종, 직장암, 자궁암을 대상으로 치료 효과를 검증한 바가 있다. 또한 Freytag 등³⁴은 E1B 유전자 소실 아데노바이러스에 HSV-TK와 또 다른 약제 감수성 유전자인 cytosine deaminase (CD)를 포함시키고 방사선 치료와의 병합 치료로 항종양 효과를 검증하였다. 그리고 Heise 등²⁶은 E1B 55 kD 유전자 소실 아데노바이러스의 치료 효과가 cisplatin이나 5-FU 같은 항암제와 함께 사용될 때에는 더욱 개선된 항종양 효과가 있음을 보고하고 있다. 본 연구에서도 YKL-1의 감염은 암세포주에서 adriamycin의 세포 살상 효과를 증강시켰으나 정상 세포주에서는 세포 살상능에 차이가 없었다(data not shown).

본 연구에 이용된 YKL-1은 dl1520과는 제작 공법 및 바이러스의 계놈상에 차이가 있다. 즉 YKL-1은 E1이 완전히 소실된 아데노바이러스 벡터에 E1A와 E1B 19 kD을 재도입하여

생산된 반면 dl1520은 전체 E1B 55 kD (1.5 kb) 중 일부 유전자를 소실시키기 위하여 제한 효소 처리 및 돌연변이 유도 방법을 취하여¹³ E1B 유전자의 잔류 정도에 차이가 있다. 즉 YKL-1의 경우 E1B 55 kD의 84%인 1260 bp (2270~3530)가 소실된 형태로 E1B 19 kD과 염기서열상 중복되는 E1B 55 kD의 최소부분만이 잔류하여 실질적으로 E1B 55 kD이 소실된 형태인 반면 dl1520의 경우 827 bp (2496~3323)만이 소실되어 있다. 이는 319/3536 primer를 이용한 Fig. 2A (left panel)의 PCR 결과 YKL-1은 2.0 kb 그리고 dl1520의 경우 2.3 kb의 PCR 산물이 생산되는 것으로 확인할 수 있었다. 더욱이 YKL-1은 아데노바이러스의 또 다른 초기발현 유전자 E3가 소실된 형태로 4.9 kb까지의 유전자 삽입능을 가져 dl1520의 2.7 kb에 비해 현저히 큰 유전자 삽입능을 가짐으로써 유전자 전달 매개체로서 상대적으로 높은 이용도를 가지고 있다.

결론적으로 p53 유전자가 비활성화 되어있는 암세포에서 특이적으로 증식한 YKL-1은 감염세포를 살상시키고 종양세포에서 증식된 YKL-1 아데노바이러스는 일차 감염 시 감염되지 않은 주변의 종양세포를 감염하고 선택적으로 증식 가능하게되어 종양세포의 분열을 억제하고 퇴행시키는 효과를 유발시킬 수 있는 것으로 여겨지며 이러한 효과는 세포 내 p53 유전자의 기능 여부와 연관지어 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구의 결과를 포함하여 앞서의 연구의 결과들은 향후 암 유전자 치료의 새로운 치료 전략으로 E1B 유전자 소실 아데노바이러스 매개체가 널리 이용될 수 있을 가능성을 제시하고 있다.

V. 결 론

본 연구의 결과 E1B 55 kD이 결손된 재조합 아데노바이러스 YKL-1은 정상세포에서 증식 및 세포 살상능이 현저히 저하되어 있는 반면 p53 유전자가 비활성화 되어있는 암세포에서는 활발한 증식으로 암세포 살상효과가 유도되는 것을 세포 수준에서 관찰할 수 있었다. 그리고 누드마우스를 모델로 한 동물실험에서도 YKL-1은 p53 유전자가 비활성화 되어있는 자궁암세포 및 간암 세포주에 의해 형성된 종양의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 p53 유전자가 비활성화 되어있는 암세포 특이적으로 증식한 YKL-1은 감염세포를 살상시키고 종양세포에서 증식된 YKL-1 아데노바이러스는 일차 감염 시 감염되지 않은 주변의 종양세포를 감염하고 선택적으로 증식 가능하게되어 종양세포의 분열을 억제하고 퇴행시키는 효과를 유발시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 이는 기존의 증식불능 아데노바이러스에 치료용 유전자를 도입하여 바이러스가 도입된 세포에서만 국소적으로 치료효과를 보이던 유전자 치료효과의 한계를 극복할 수 있는 새로운 개념으로 받아들여질 수 있으며 방사선치료, 약물치료 그리고 효과적인 치료유전자의 바이러스 내 도입과 같은 기존의 암 치료법과 병행하는 치료 등을 추구한다면 각각의 치료법을 극대화하고 서로의 단점을 보완, 극복할 수 있는 새로운 암 치료법으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Bailar JC, Gornik HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997;336:1569-74.
2. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Hum Gene Ther* 1998;9:283-6.
3. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. In: Soval RE, Scanlon KJ, editors. *The internet book of gene therapy Cancer therapeutics*. Stamford, CT: Appleton & Lange; 1994. p.3-16.
4. Kim YS, Lim HK, Kim JH, Min JS. Comparison of efficiency of infection of human cancer cell lines via retroviral vector system. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29:1-10.
5. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:21-39.
6. Mastrangelo MJ, Nathan BD. Gene therapy for human cancer: an essay for clinicians. *Semin Oncol* 1996;23:4-21.
7. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158-68.
8. Perkins AS, Steern DF. Molecular biology of cancer: oncogenes. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & practices of oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997. p.79-102.
9. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, et al. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:2231-4.
10. Marchetti A, Buttlita F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, et al. MDM2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Dign Mol Pathol* 1995;4:93-7.
11. Scheffner M, Warness BA, Huibrechtse JM, Levine AJ. The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63:1129-36.
12. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implication of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-22.
13. Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication In: Fields EN, editor. 3th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1996. p.2111-48.
14. Bischoff J, Kirn D, Williams A, Heise C, Horn S, McCormick F, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-6.
15. Shenk T, Flint SJ. Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res* 1991;57:47-85.
16. Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M. Efficient generation of recombination adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 1996;70:4805-10.
17. Hitt M, Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. *Cell biology: A laboratory handbook*. San Diego, CA: Academic press Inc; 1994. p.479-90.

18. Lee H, Choi JK, Li M, Kaye K, Kieff E, Jung JU. Role of cellular tumor necrosis factor receptor-associated factors in NF- κ B activation and lymphocyte transformation by herpesvirus saimiri STP. *J Virol* 1999;73:3913-9.
19. Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F. Functional p53 protein in human papilloma virus-positive cancer cells. *Oncogene* 1995;10:927-36.
20. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-6.
21. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1973-77.
22. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5523-7.
23. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 1992;357:82-5.
24. Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
25. Yee P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 1997;11:615-23.
26. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff D, Kirn D. ONXY-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Med* 1997;3:639-45.
27. Hall A, Dix B, Simon J, Braithwaite O. p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nature Med* 1998;4:1068-72.
28. Goodrum FD, Ornelles DA. P53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 1998;72:9479-90.
29. Goldsmith KT, Dion LD, Curiel DT, Garver RI. Trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus. *Virology* 1998;248:406-19.
30. Hay JG, Shapiro N, Sauthoff H, Heitner S, Phupakdi W, Rom W. Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: The importance of the adenoviral E1B-55kD gene. *Hum Gene Ther* 1999;10:579-90.
31. Vollmer CM, Ribes A, Butterfield LH, Dissette VB, Andrews KJ, Ellber FC, et al. p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:4359-74.
32. Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, Ford H, Ramsy WJ, Blaese RM. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1998;6:57-62.
33. Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999;59:410-3.
34. Freytag S, Rogulski K, Paielli D, Gilbert J, Kim J. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: Concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum Gene Ther* 1998;9:1323-33.

Abstract

Oncolytic potential of E1B 55 kD-deleted recombinant adenovirus

Jin Ahn Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sung Kyu Kim)

Purpose: To overcome the limitations of cancer gene therapy by using replication-incompetent adenovirus, we generated E1B 55 kD-deleted adenovirus (YKL-1) by polymerase chain reaction (PCR) and homologous recombination. We then investigated tumor-specific virus replication and cytotoxicity of YKL-1 *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods: YKL-1 was constructed by reintroducing E1A and E1B 19 kD into pTG-CMV E1/E3-deficient adenoviral vector by inducing homologous recombination in *E. coli*. The recombinant vector pYKL-1 was transfected into 293 cells to generate YKL-1. The properties of newly constructed YKL-1 was defined by PCR and immunoblotting analysis. Virus replicaton was examined by infecting human normal and cancer cells on 6-wells at multiplicity of infection (MOI) of 10 for 3 days. Virus was then recovered and titered. Cytopathic effect was analyzed by infecting human normal and cancer cells on 24-wells at MOIs of 10, 1 or 0.1 for 7 to 10 days and staining them with crystal violet solution. To measure the endogenous transcriptional activity of p53, transient transfection analysis was performed using the p53-responsive luciferase reporter plasmid. We investigated the induction rate of p53 by DNA-damaging agents or YKL-1 infection. The tumor growth inhibition was examined in human cancer cell xenografts in *nu/nu* mice by intratumoral injection of YKL-1.

Results: PCR and immunoblotting analysis confirmed that YKL-1 contained E1A and E1B 19 kD but not E1B 55 kD. In normal human cells, virus replicaton and subsequent cytopathic effect of E1B 55 kD-deleted adenovirus YKL-1 was markedly attenuated by larger than 2 to 3 log in magnitude, compared to that of wild-type ad-XJ. In contrast, YKL-1 was capable of replicating and inducing cytotoxicity in most human cancer cells with a broad spectrum of the sensitivity. C33A and Hep 3B containing p53 mutation were much more sensitive, whereas HeLa and H460 with wild-type p53 were relatively resistant to YKL-1. The YKL-1 and DNA damaging agent, camptothecin effectively induced p53 in H460 and HepG2 as well as in normal cells. Furthermore, YKL-1 effectively prohibited both Hep3B and C33A tumor growth in *nu/nu* mice in a dose-dependent manner. H/E staining and TUNEL assay indicated a largely distributed

necrotic area and apoptosis in regressed tumor.

Conclusion: The results here demonstrated preferential virus replication and cytotoxicity of E1B 55 kD-deleted adenovirus YKL-1 in cancer cells and its promising oncolytic potential as a antitumoral virus agent and a selectively replication-competent virus vector.

Key Words: E1B 55 kD, p53, oncolysis, replicaton-competent adenovirus, cancer gene therapy