IL-16 유전자 형질 도입에 의한 마우스 신경모세포종의 항 종양 효과

연세대학교 대학원

의과학사업단

조 현 상

IL-16 유전자 형질 도입에 의한 마우스 신경모세포종의 항 종양 효과

지도 교수 김 길 영, 김 동 수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

조 현 상

조현상의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 6 월 일

감사의 글

의학의 깊고 넓은 길을 바른 방향으로 갈 수 있도록 항상 크나 큰 가르침을 베풀어주시고 본 논문을 완성하기까지 항상 고마우신 말씀과 학문적인 지도 편달을 베풀어주신 김길영 교수님, 김동수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 연구 계획 및 진행에서 많은 조언을 아끼지 않으신 이봉기 교수님, 정현철 교수님, 박영년 교수님께 감사를 드립니다.

아울러 끊임없이 기도해주신 부모님, 장모님, 그리고 삶의 주인 되신 하나님께 감사드립니다. 또한 늘 변함없이 사랑으로 대해주는 아내 혜진, 볼수록 사랑스러운 아들 민재와 이 기쁨을 같이하고 싶습니다.

끝으로 지금 이 순간에도 암과 힘겨운 투병중인 환아들, 그리고 그 가족 분들께도 항상 희망과 용기를 잃지 않기를 기원합니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

표 차 례

국문 요약

IL-16 유전자 형질 도입에 의한 마우스 신경모세포종의 항 종양 효과

IL-16은 CD4+ T 세포, 단핵구, 호산구에 대해 화학 주성 인자로 작용하고, CD4+ T 세포 표면에 IL-2 수용체의 발현을 증가시키며 항원 전달 세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 신경모세포종 세포내로 IL-16 유전자 도입이 신경모세포종이 성장이 생체내에서 억제되는지 그리고 향후 신경모세포종의 면역 유전자 치료에의 이용 가능성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

1) 사람의 IL-16 유전자를 재조합시킨 retrovirus를 A/J 마우스의 신경모세포종 세포주인 neuro-2a 세포에 감염시킨 후 약 $1x10^5$개의 IL-16 유전자가 발현된 신경모세포종 세포(neuro-2a/IL-16)를 시험관 내에서 24시간 배양하고 상층액에 있는 IL-16의 농도를 측정하였다. 2) IL-16의 발현이 종양 형성능에 미치는 영향을 알아보기 위해 neuro-2a/IL-16 세포를 마우스 피하에 주사한 후 neuro-2a/IL-16 세포에 의한 종양 발생 및 마우스의 생존 여부를 일주일 단위로 측정하였다. 이때 대조군으로 IL-16 유전자가 도입되지 않은 neuro-2a 세포(neuro-2a/LNCX)를 이용하였다. 3) 종양 백신 효과를 알아보기 위해 neuro-2a/IL-16 세포를 A/J 마우스에 먼저 피하 주사하고, 2주 후 unmodified neuro-2a 세포를 동일 마우스의 피하에 투여하여 종양의 성장을 효과적으로 억제하는지 조사하였다. 대조군으로 neuro-2a/LNCX 세포를 이용하였다. 4) 치료 효과를 관찰하기 위해 wild type neuro-2a 세포를 마우스 피하에 주사하여 5-10mm 크기의 종양을 형성시킨 후 반대측 피하에 neuro-2a/IL-16 세포를 투여하고 wild type neuro-2a 세포에 의해 형성된 종양의 크기 및 생존 여부를 관찰하였다. 5) IL-16의 항 종양 효과와 T 세

포와의 관련성을 알아보기 위해 nude 마우스에서 상기 2), 3)실험을 진행하였다. 6) 면역 세포의 침윤 정도를 알아보기 위해 neuro-2a/IL-16 세포를 피하 주사한 부위에서 조직을 절개하여 면역 조직 화학 검사를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 각각의 clone에서 IL-16의 분비 능력은 4.2 ng/10^5 cells/24hr에서 부터 6.0 ng/10^5 cells/24hr까지 다양하였다. 2) neuro-2a/IL-16 세포를 투여한 마우스에서는 종양이 형성되지 않아 8마리 모두 6주 이상 생존하였다. 그러나, unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 마우스는 1 주 후 부터 종양이 형성되기 시작하여 6 주 후까지 생존한 마우스는 없었다. 3) neuro-2a/IL-16 세포를 투여 받고 2주 후 unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 마우스에서는 종양이 형성되지 않았다. 이에 반해 neuro-2a/LNCX 세포를 투여한 후 unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 마우스에서는 종괴가 형성되었으며 6주 이후에 생존한 마우스는 없었다. 4) neuro-2a/IL-16 세포를 마우스 피하에 투여한 결과 이미 형성된 종양을 갖고 있는 마우스의 생존율은 대조군과 차이가 없었다. 5) nude마우스에서 종양 형성능은 A/J 마우스와 차이가 없었으며 종양의 예방 효과는 없었다. 6) 면역 조직화학 염색 검사에서 림프구, 호산구, 호중구, 조직구의 침윤을 관찰할 수 있었다.

결론적으로 IL-16 유전자로 도입시킨 neuro-2a/IL-16 종양 세포는 국소적 IL-16 분비에 의해 마우스에서 종양 형성이 되지 않는 반면에 종양 백신의 효과를 나타내었다. 이 세포에 의한 종양 형성 실패는 A/J 마우스 및 T 세포가 결여된 nude 마우스 모두에서 관찰되나 종양 백신의 효과는 단지 A/J 마우스에서만 관찰되었다. 이러한 사실에서 neuro-2a/IL-16 세포의 종양 백신의 효과는 T 세포에 기인되지만 종양 형성의 실패는 T 세포 외에 다른 면역 기전이 관여하였을 것으로 사료된다.

핵심 되는 말 : interleukin-16, 신경모세포종, 유전자 치료

IL-16 유전자 형질 도입에 의한 마우스 신경모세포종의 항 종양 효과

< 지도교수 김 길 영, 김 동 수 >
연세대학교 대학원 의과학사업단

조 현 상

Ⅰ. 서 론

1세 이상의 제 4기 신경모세포종은 치료에 대한 반응이 매우 불량하여 기존의 고식적인 치료법으로는 장기 생존율이 10%이하에 불과하다[1]. 최근 신경모세포종에 대한 새로운 치료법으로는 고 용량의 항 암 화학 요법 후 자가 조혈모세포이식을 시행하여 암 환자의 생존율 향상을 가져오고 있으나 50-60%이상의 환자에서는 종양의 재발 등으로 인하여 사망하게 된다[2]. 따라서 신경모세포종의 생존율을 향상시키기 위하여 새로운 치료 방법의 개발 또는 자가 조혈모세포 이식 후 미세 잔존 암을 제거하여 종양의 재발을 줄이는 치료법의 개발이 필수적이다. 현재 잔존 암 세포를 제거하기 위해 임상에서 시도되고 있는 방법으로는 자가 조혈모세포 이식 후에 1) biological response modifier인 13-cis-retinoic acid(RA)를 투여하여 신경모세포종 세포의 분화를 유도하는 방법[3], 2) ^{131}I-metaiodobenzylguanidine(MIBG) 동위원소 투여 후 방사선을 조사하여 신경모세포종을 치료하는 방법[4-5], 3) 전신적으로 저용량 또는 고용량의 interleukin(IL)-2를 피하 또는 정맥 내로 투여하여 전신적으로 면역 반응을 유발시키는 면역 치료[6], 4) 신경모세포종 세포 표면에 위치하는 세포 수용체인 GD_2 수용체에 대한 antidisialoganglioside

GD_2 antibody-IL-2 fusion protein을 투여하여 신경모세포종 세포만을 선택적으로 파괴시키는 방법[6], 5) 자가 종양 세포에 IL-2 유전자 전달에 의한 국소적 IL-2 분비를 유도하는 면역 유전자 치료[7-9] 등이 시도되고 있다.

최근 유전자 치료의 도입으로 싸이토카인 유전자를 암세포에 동비시켜 동물 모델에 투여할 경우 그 종양 세포는 종양 형성 능력을 상실하거나 또는 종양 백신의 효과를 나타내었다. 그 대표적 싸이토카인 IL-2[10-12]는 T 세포 성장인자로서 IL-2를 자가 종양 세포에 도입시킨 후 이 세포들을 재 투여하면 투여된 동물이나 사람에서 CD4+ T 세포 및 NK 세포의 활성이 증가되어 항종양 효과를 나타낸다[13,14]. 그밖에 IL-4[15], IL-12[16], tumor necrosis factor(TNF)-α[17], interferon(IFN)-γ[18], granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)[19] 등의 많은 싸이토카인 유전자들이 동물 또는 임상 치료에 시도되고있다.

IL-16은 1982년[20] 처음으로 발견되어 lymphocyte chemoattractant factor로 명명되다가 1995년부터 IL-16으로 명명되었다. 이 싸이토카인은 주로 CD8+ T 세포[21]에서 분비되나 CD4+ T 세포[22], 호산구[22], 비만 세포 및 천식 환자의 기관지 상피 세포[23] 등에서도 분비되며 그 구조는 1개의 chain이 14-17kDa으로 구성된 homotetramer의 구조를 갖고[24], 이의 수용체는 T세포 표면에 있는 CD4 수용체로 알려져 있다[25,26].

지금까지 알려진 IL-16의 작용은 CD4+ T 세포[27], 단핵구 세포[28] 및 호산구[29]의 강력한 화학 주성 인자로 작용할 뿐만 아니라, CD4+ T 세포 표면의 IL-2 수용체 발현을 증가를 유도하고[30] IL-16의 이러한 작용은 외부에서 IL-2를 투여하면 더 증폭되는 것으로 알려졌다[24]. 다른 한편으로 IL-16은 CD4+ T 세포를 세포주기의 G_0 주기에서 G_1 주기로 변화시켜 T 세포 성장에 관여하고[30], CD4+ T 세포에서 여러 싸이토카인의 분비를 촉진하며 CD4+ 단핵구 세포 표면에 INFγ-independent HLA-DR의 발현을 유도한다고 알

려져 있다[27,31]. 그 외에도 IL-16은 CD+ T 세포를 자극하여 GM-CSF의 분비를 유발하고, 수상 세포(dendritic cell) 및 대식 세포(macrophage) 같은 항원 전달 세포(antigen presenting cell)의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다[32,33].

이상과 같은 연구 결과는 IL-16이 T 세포 및 수상 세포같은 면역 세포의 조절에 어느 정도 관여하고 있다는 것을 암시하며 이는 IL-16이 항 종양 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 본 연구에서는 *in vivo*에서 IL-16이 항 종양 효과를 나타내는지 알아보기 위해 사람의 IL-16를 coding 하는 유전자를 retrovirus에 재조합 시켜 마우스 신경모세포종 세포에 형질 도입시켜 IL-16 발현을 유도하는 한편 생체 내에서 이 세포의 종양 형성능과 그리고 항 종양 효과를 조사하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 배양

ATCC(Rockville, MD, USA)로부터 구입한 마우스 신경모세포종 세포주인 neuro-2a 세포를 가열 비활성화시킨 10% 우태아혈청(GIBCO, Grand Island, NY, USA), 2.8 g/L HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2.2 g/L $NaHCO_3$(Sigma) 및 100 μg/mL penicillin(GIBCO), 100 U/mL streptomycin(GIBCO)이 포함된 Minimum essential media(MEM, GIBCO)이 포함된 배지를 기본 배양액으로 하여 5% CO_2의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 재조합 retroviral 벡터의 PA317 세포 감염

재조합 IL-16 유전자를 포함하고 있는 pLNC/IL-16 벡터(Fig. 1) 는 한국생명 과학 연구소로부터 얻었다. Amphotrophic packing 세포(PA317 세포) 약 $5x10^5$ 세포를 직경 60 mm 배양 접시에 10% 우태아 혈청이 함유된 Dulbecco`s Modified Eagle Medium(DMEM, Sigma) 배양액으로 배양한 뒤, 배양 접시 바닥 면적의 70-80% 정도 세포가 자라면 calcium-phosphate 방법으로 재조합 retrovirus를 형질 도입시킨 후 800 μg/mL 농도의 G418(Geneticin®, GIBCO)이 포함된 DMEM 배지로 배양하여 pLNC/IL-16에 의해 형질 도입된 세포들만을 선택하였다. 12 - 15일 배양 후 G418에 저항성을 가지고 있는 집락을 cloning 하여 증폭시킨 다음과 같이 바이러스 역가를 측정하였다.

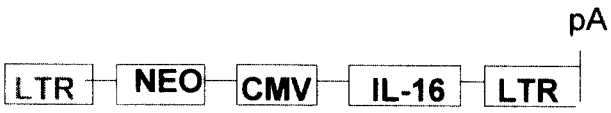

Fig.1. Structure of the recombinant retroviral vector (LNC/IL-16). LTR: long terminal repeats; NEO:neomycin resistance gene; CMV:cytomegalovirus promoter; IL-16:interleukin-16 gene

3. 재조합 retrovirus의 역가 측정

높은 역가의 IL-16 유전자를 포함한 재조합 retrovirus를 산출하는 master packing cell line의 선별은 G418을 이용하여 cloning한 세포 상층액으로 target cell line인 NIH-3T3 세포를 감염시켰다. 감염 하루 전에 NIH-3T3 세포를 six-well plate의 well 당 $2x10^4$ 세포씩 plating 하여 배양하였고, 바이러스 상층액을 DMEM 배양액으로 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} 배로 계단 희석하고, 희석된 바이러스 액 1 mL을 세포 배양액이 제거된 NIH-3T3 세포에 감염시키기 위해 접종하였다. 30분 간격으로 천천히 dish를 흔들어 바이러스가 포함된 배지가 세포 전체로 균일하게 퍼지게 하였다. 3시간 동안 바이러스를 세포에 감염시킨 후 4 mL의 DMEM 배양액을 첨가하여 세포를 배양하였다. 감염 48시간 후에 배양액을 제거한 후 800 μg/mL 농도의 G418을 함유하는 DMEM 배양액 2 mL씩을 각 well에 투여하고 계속 배양하면서 48시간 마다 배지를 갈아주었다. 약 12-15일 후 G418에 저항성이 있는 세포군이 관찰되면 배양액을 제거하고 methylalcohol/methylene blue 염색용액으로 세포군을 염색한 후 retrovirus 역가를 Kriegler[34]가 제안한 다음의 공식에 의해 계산하였다.

titer = (number of colonies in highest dilution) x (dilution)

가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 clone(PA317/LNC/IL-16)이 결정되면 그 세포군의 배양액을 모아 다음 실험에 이용하였다.

4. 재조합 retrovirus의 신경모세포종 세포주에 형질 전환

약 $1x10^5$ neuro-2a 세포를 6 well 배양 접시에 접종한 후 가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 PA317/LNC/IL-16 clone의 상층액 1 mL을 배양 접시에 골고루 섞으면서 세포에 감염시켰다. 이때 세포 감염의 효율성을 높이기 위해 8 μg/mL의 polybrene을 첨가하였다. 4시간 후 G418이 포함되지 않은 MEM 배지 4 mL을 첨가한 다음 48 시간 후부터 500 μg/mL 농도의 G418을 포함하는 MEM 배지로 선별 배양을 10 - 14 일간 계속하였다. G418에 저항성을 가지고 있는 집락 중에서 5개의 집락(neuro-2a/IL-16)을 선택하여 각각의 집락 세포를 대량 배양하였다.

5. IL-16 농도 측정

Wild type neuro-2a 세포와 G418에 내성을 나타내는 5 집락 세포를 각각 $1x10^6$ 개씩 6 well 배양 접시에 접종한 다음, 각각의 배양 접시에 1 mL의 MEM 배지를 첨가하고 배양 24시간 후 상층액을 취하였다. 채집된 상층액을 0.45 μm 크기의 syringe filter로 여과시킨 후 여과된 상층액 내의 IL-16의 농도를 mouse IL-16 ELISA kit (Endogen, Co., Woburn, MA, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 측정하였다.

6. Wild-type neuro-2a세포의 종양 형성능

마우스 신경모세포종 세포의 종양 형성능을 알아보기 위해 약 $2x10^4$, $2x10^5$, $2x10^6$, $2x10^7$의 neuro-2a세포를 0.1 mL의 생리식염수에 현탁한 후 1 mL 주사기를 이용하여 각각 3마리의 A/J 마우스 피하에 주사한 후 종양 형성 및 마우스 생존 유무를 주일 단위로 측정하였다.

7. 마우스 신경모세포종 세포에서 IL-16 유전자 발현이 종양 형성능에 미치는 영향

Neuro-2a 세포 내 IL-16 유전자 발현이 neuro-2a세포의 종양 형성능을 억제할 수 있는 지의 여부를 조사하기 위해 본 연구에서는 A/J 마우스를 이용한 neuro-2a/IL-16 세포의 종양 형성 능력을 측정하였다. 약 $2x10^6$의 neuro-2a/IL-16 세포를 0.1 mL의 생리 식염수에 현탁한 후, 1 mL 주사기를 이용하여 A/J 마우스에 피하 주사하였다. 각각의 실험에는 8마리의 A/J 마우스를 사용하였고, 대조군으로 IL-16 유전자가 도입되지 않은 신경모세포종 세포(neuro-2a/LNCX) 약 $2x10^6$ 세포를 주사하였다. 신경모세포종 세포가 주입된 A/J 마우스로부터 종양 발생 및 생존 유무에 대한 조사는 주일 단위로 시행하였다.

8. Neuro-2a/IL-16 세포의 투여가 parental 종양 세포의 종양 형성능에 미치는 영향

약 2 x 10^6의 neuro-2a/IL-16 세포를 0.1 mL의 생리식염수에 현탁한 후,

1 mL 주사기를 이용하여 8마리의 A/J 마우스에 먼저 피하 주사하고, 2주 후 약 $2x10^6$의 unmodified neuro-2a 세포를 피하에 투여하여 먼저 투여된 neuro-2a/IL-16 세포가 2번째 투여한 unmodified neuro-2a 세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 종양 백신으로서의 효과를 나타낼 수 있는지를 조사하였다. 대조군은 약 $2x10^6$의 neuro-2a/LNCX 세포를 먼저 A/J 마우스의 피하에 주사한 후, 2주 후 약 $2x10^6$의 unmodified neuro-2a 세포를 피하에 투여하였다. 신경모세포종 세포가 주입된 A/J 마우스로부터 종양 발생 및 생존 유무에 대한 조사는 주일 단위로 시행하였다.

9. Neuro-2a/IL-16 세포의 투여가 이미 형성되어 있는 종양의 성장에 미치는 영향

약 $2x10^6$의 neuro-2a 세포를 6마리의 A/J 마우스에 먼저 피하 주사하고, 약 2주 후 5-10 mm 크기의 종양이 형성된 후, 약 $2x10^6$의 neuro-2a/IL-16 세포를 피하에 투여하여 neuro-2a 종양 세포가 억제되는지를 조사하였다. 대조군은 형성된 종양에 neuro-2a/LNCX 세포를 주사하였다. 신경모세포종 세포가 주입된 A/J 마우스로부터 종양 발생 및 생존 유무에 대한 조사는 주일 단위로 시행하였다.

10. 종양 조직내에서 아포토시스 관찰

실험 9)에서 대조군과 neuro-2a/IL-16 치료군의 아포토시스(apoptosis) 정도를 비교하기 위해 Apoptag kit (Oncor, Gaitherburg, MD, USA)를 이용하여 아포토시스를 확인하였다. Nick end labeling 방법은 silane을 coating 처리한 유리 슬라이드에 파라핀 포매된 조직을 3 μm 두께의 절편으로 붙인

후 58℃에서 2시간 동안 부착하였다. 슬라이드를 크실렌과 에탄올을 이용하여 탈파라핀과 함수를 시킨 후 증류수에 두었다. 그 후 20 μg/mL 농도의 protein kinase(Sigma)로 37℃에서 10분간 반응시키고 Apoptag kit으로 염색하였다. 즉 평형 완충액으로 10분간 처리한 후 labeling safe 완충액에 terminal deoxynucleotidyl transferase 효소를 섞어 37℃에서 90분간 반응시켰으며, 정지/세척 용액으로 10분간 효소 반응을 중단시켰다. 다시 anti-digoxidinin-alkaline phosphatase를 30분 동안 반응시키고 nitro-blue terazolium chloride/5-bromo-4-chloro indolyl phosphate로 현미경하에서 발색시켰다. 배경 염색은 nuclear fast red로 염색하였다.

11. Nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포의 항 종양 효과

Neuro-2a 세포에 IL-16 유전자 형질 도입에 의한 항 종양 효과와 T 세포와의 관련성을 알아보기 위해 nude 마우스를 대상으로 실험을 하였다. 먼저 nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포의 종양 형성능을 알아보기 위해 약 $2x10^6$의 neuro-2a/IL-16 세포를 0.1 mL의 생리식염수에 현탁한 후, 1mL 주사기를 이용하여 nude 마우스에 피하 주사하였다. 각각의 실험에는 5마리의 nude 마우스를 이용하였고, 대조군으로 IL-16 유전자가 도입되지 않은 신경모세포종 세포(neuro-2a/LNCX) 약 $2x10^6$ 세포를 피하에 주사하였다. 신경모세포종 세포가 주입된 nude 마우스로부터 종양 발생 및 생존 유무에 대한 조사는 주일 단위로 시행하였다. Nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포의 종양 예방 효과를 알아보기 위해 약 $2x10^6$의 neuro-2a/IL-16 세포를 0.1 mL의 생리식염수에 현탁 후, 1 mL 주사기를 이용하여 5마리의 nude 마우스에 먼저 피하 주사하고, 2주 후 약 $2x10^6$의 unmodified neuro-2a 세포를 피하에 투여하여 먼저 투여된 neuro-2a/IL-16 세포가 후에 투여한 unmodified

neuro-2a 세포의 성장을 효과적으로 억제하는지 조사하였다. 대조군은 약 $2x10^6$의 neuro-2a/LNCX 세포를 먼저 nude 마우스의 피하에 주사한 후, 2주 후 약 $2x10^6$의 unmodified neuro-2a 세포를 피하에 투여하였다. 신경모세포종 세포가 투여된 nude 마우스로부터 종양 발생 및 생존 유무에 대한 조사는 주일 단위로 시행하였다

12. Neuro-2a/IL-16 세포의 Fas 발현

Neuro-2a/IL-16 세포의 항 종양 효과와 Fas 발현과의 관련성을 알아보기 위해 약 $1x10^6$의 neuro-2a/IL-16 세포에 FITC conjugated anti-mouse Fas 단일 클론 항체(Becton Dickinson Co., San Jose, CA, USA)를 5 uL 넣고 잘 섞어 15분간 반응시키고 FACScan 유세포 분석기(Becton Dickinson Co.)를 이용하여 Fas 양성 세포의 빈도를 측정하였다. 대조군으로 wild type neuro-2a세포를 이용하였다.

13. 면역 조직 화학 염색

Neuro-2a/IL-16 세포를 투여하고 5일째 이 세포를 주사한 피하 부위의 조직을 채취하여 파라핀으로 포매하였다. 4 μm 두께의 조직 절편을 만들어 xylene과 alcohol로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 20분간 0.3% 과산화 수소로 처리하여 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시켰다. 다시 PBS 완충액에 10분간 세척한 후 차단 혈청에 30분간 작용시켜 비 특이성 단백의 염색을 차단하였다. 조직 절편을 PBS로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 1:100으로 희석한 goat anti-mouse polyclonal CD4 및 rabbit anti-mouse polyclonal CD8(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 항체들에 각각

반응시켰다. PBS로 세척한 후에 이차항체로 PBS에 1:100으로 희석한 biotinylated anti-goat IgG(DAKO, Carpinteria, CA, USA)와 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 10분간 2회 세척하고, 실온에서 30분 동안 horseradish-peroxidase-linked streptoavidin(DAKO, LSAB kit)과 반응시켰다. 이를 PBS로 10분간 2회 세척하고 diaminobenzidine(Sigma)으로 5-10분간 발색시켜 흐르는 물에 수세하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색한 후 비 수용성 봉입제로 봉입하였다.

Ⅲ. 결 과

1. *In vitro* experiment

가. 재조합 retrovirus의 역가 측정

2 x 10^4 NIH-3T3 세포를 6 well plate에 접종한 후 well 당 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} 배로 희석된 바이러스 1 mL씩 감염시킨 후 감염된 세포만을 배양한 결과 상층액 1 mL당 바이러스 역가는 $1x10^5$부터 $1x10^7$사이로 존재하였다(Table 1). 본 실험에서는 가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 clone 4를 neuro-2a 세포 감염에 이용하였다.

Table 1. Number of colonies transfected with diluted LNC/IL-16 retroviruses and selected with G-418

Clone number	Colony numbers in diluted retroviruses				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
clone 1	15	8	1		
clone 2	86	12	2		
clone 3	36	13	4	1	
clone 4	145	70	12	3	1
clone 5	26	12	5	2	
clone 6	96	21	7	2	

나. 재조합 retrovirus의 신경모세포종 세포주에 형질 전환

약 1 x 10^5의 neuro-2a 세포를 6 well 배양 접시에 접종한 후 바이러스 상층액으로 세포 감염을 실시한 후 G418을 포함하는 MEM 배지 하에 선별 배양을 10 - 14 일간 계속한 뒤 G418에 저항성을 가지고 있는 집락 중에서 4개의 집락(neuro-2a/IL-16)을 선택하여 대량 배양하였다. Wild type neuro-2a 세포에 G418 포함된 배지로 배양한 결과 9-12일 이후에 살아있는 세포는 없었다. 그러나 PA317/LNC/IL-16 바이러스 상층액으로 감염시킨 후 G418 포함된 배지로 배양한 결과 6-9일 이후부터 세포수가 증가하기 시작하였다(Fig. 2). G418 투여 후에 계산한 형질 전환 효율은 12±2.1%였다.

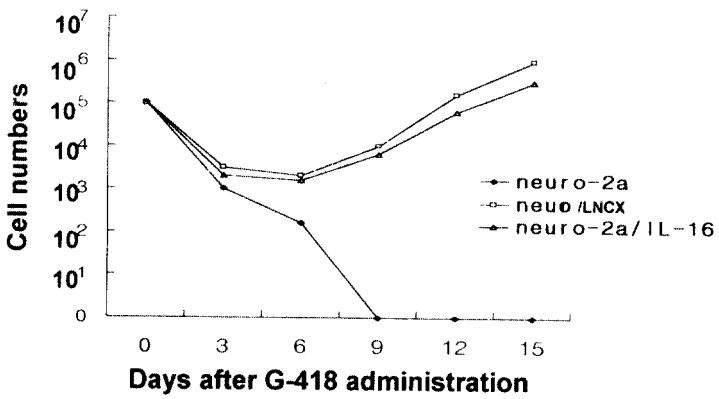

Fig.2. Transduction of neuro-2a cells with retrovirus

다. IL-16 assay

IL-16 유전자가 발현된 신경모세포종 세포주를 배양하여 4개의 집락을 선택하였다. 선택한 집락에서 약 1x10^5 neuro-2a/IL-16 세포를 선택하여 6

well 배양 접시에서 24시간 배양 후 측정한 IL-16의 농도는 Table 2와 같았다. 각각의 clone에서 IL-16의 분비 능력은 6.0 ng/mL 에서 부터 4.2 ng/mL 까지 다양하게 분비되었으며 이중에서 가장 많이 분비된 4번 clone을 *in vivo* 실험에 이용하였다.

Table 2. IL-16 secretion from vector-transduced neuro-2a cells

Cells transduced by vector	IL-16(ng/ml)
neuro-2a cells	0.1
neuro-2a/LNCX cells	0.1
neuro-2a/IL-16 cells clone 1	4.2
clone 2	5.1
clone 3	5.7
clone 4	6.0

2. *In vivo* experiment

가. Wild-type neuro-2a 세포의 종양 형성능

약 $2x10^4$의 neuro-2a 세포를 주입한 마우스에서는 종양이 형성된 마우스는 없었다. $2x10^5$의 neuro-2a 세포를 투여한 마우스에서는 3마리 중에서 2마리에서 3주 후부터 종양이 형성되었으며 $2x10^6$ 이상의 neuro-2a 세포를 주

사한 마우스에서는 1-2주 후부터 모두 종양이 발생되어 6주 후에 생존한 마우스는 없었다(Fig. 3).

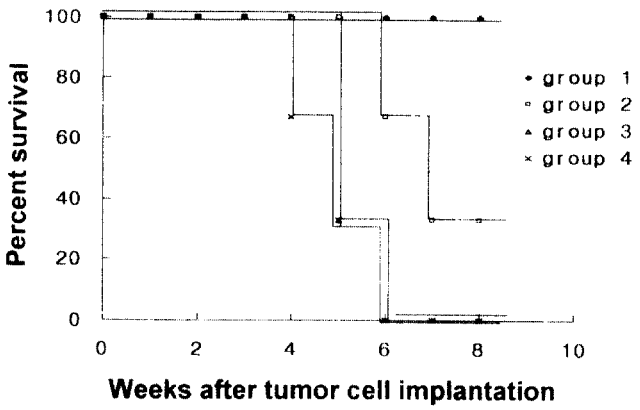

Fig. 3. Tumorigenicity of neuro-2a cells inoculated in A/J mice. Injected cell number is as follows; group 1: $2x10^4$ cells, group 2 : $2x10^5$ cells, group 3: $2x10^6$ cells, group 4: $2x10^7$ cells(N=3/each group).

나. 신경모세포종 세포에서 IL-16의 분비가 종양 형성능에 미치는 영향

Neuro-2a/IL-16 세포를 투여한 마우스에서는 종양이 형성되지 않아 8마리 모두 6주 이상 생존하였다. 그러나 neuro-2a/LNCX 세포를 투여 받은 마우스는 1주 후부터 종양이 형성되기 시작하여 4주 후에는 평균 2.3 cm^2의 종괴가 형성되었으며 6주 후까지 생존한 마우스는 없었다(Fig. 4). 따라서 IL-16 유전자로 형질 도입된 neuro-2a세포는 종양 형성 능력을 상실하였음을 알 수 있었다.

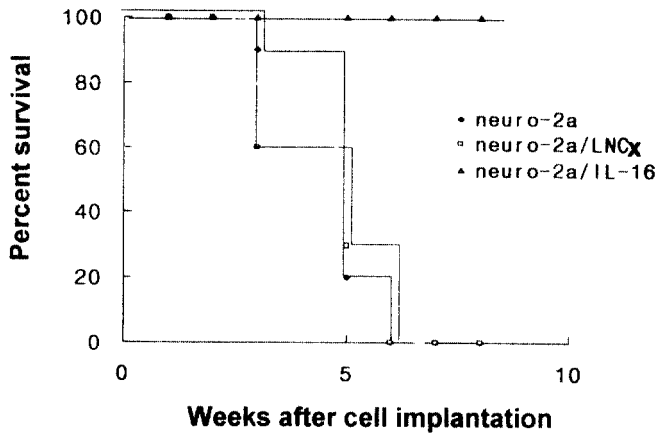

Fig.4 Tumorigenicity of neuro-2a/IL-16 cells inoculated in A/J mice. IL-16 expression reduces significantly the tumorigenicity of neuro-2a cells(N=8/ each group).

다. Neuro-2a/IL-16 세포의 투여가 parental 종양 세포의 종양 형성능에 미치는 영향

Neuro-2a/IL-16 세포를 투여 받고 2주 후 unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 마우스에서는 1마리에서 종양이 형성되었고 나머지는 종양이 형성되지 않았다. 그러나 neuro-2a/LNCX 세포를 투여한 후 unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 마우스에서는 종괴가 형성되었으며 4주 후에는 평균 2.2 cm^2의 종괴가 형성되었고 6주 이후에 생존한 마우스는 없었다(Fig. 5). 따라서 neuro-2a/IL-16 세포는 마우스 내에서 종양 형성 능력을 상실함과 동시에 종양 항원에 대한 기억 능력을 갖고있거나 아니면 T 세포 이외의 다른 면역 세포 또는 염증 세포가 관여함을 시사한다.

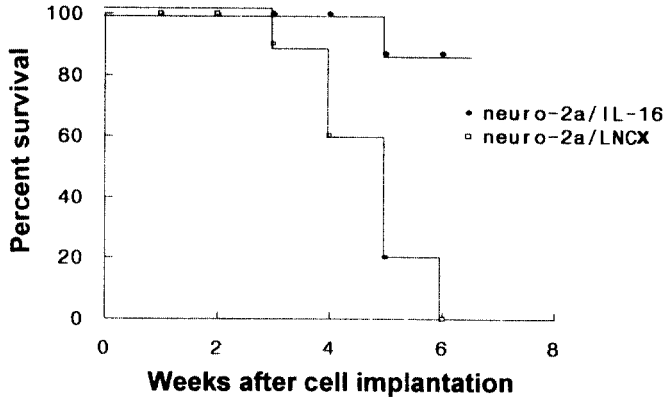

Fig.5. Prophylactic effect of neuro-2a/IL-16 cells in A/J mice. Neuro-2a/IL-16 cells induce prophylactic anti-tumor response(N=8/each group).

라. Neuro-2a/IL-16 세포의 투여가 이미 형성되어 있는 종양의 성장에 미치는 영향

5-10 mm 크기의 종양이 형성된 후 neuro-2a/IL-16 세포를 피하 투여한 경우에 대조군과 비교하여 종양의 성장을 일시적으로 감소하였으나 생존율에는 대조군과 큰 차이는 없었다(Fig. 6).

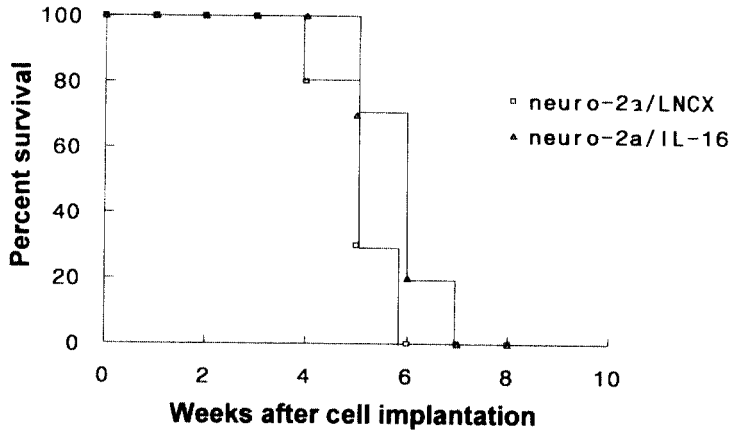

Fig.6. Therapeutic effect of neuro-2a/IL-16 cells in A/J mice. Percent survival is no statistical difference between neuro-2a/IL-16 group(N=8) and control group(N=8).

마. 종양 조직 내에서 아포토시스 관찰

4) 실험에서 대조군과 neuro-2a/IL-16 치료군에서 아포토시스 정도를 관찰한 결과 대조군에 비해 neuro-2a/IL-16 투여한 마우스 군에서 아포토시스의 빈도가 증가한 경향을 보였다(Fig. 7).

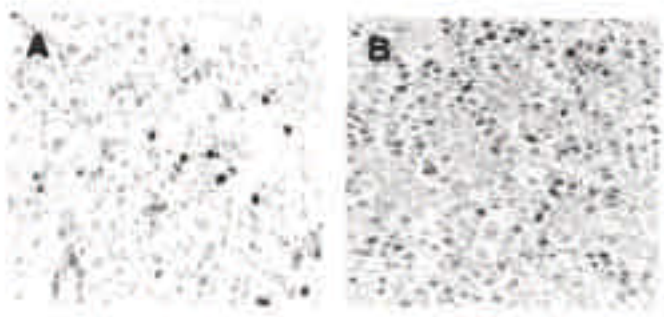

Fig. 7. Apoptosis induced by neuro-2a/IL-16 in murine neuroblastoma. Neuro-2a/IL-16 treatment group(B) shows more prominent apoptosis than control group(A). (tunel assay, x400)

바. Nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포의 항 종양 효과

T 세포가 결핍된 nude 마우스를 대상으로 neuro-2a/IL-16 세포를 투여한 결과 모든 마우스에서 종양이 형성되지 않았지만 대조군(neuro-2a/LNCX)에서는 1주 후부터 종양이 형성되기 시작하여 6주 이후 생존한 마우스는 없었다(Fig. 8). 그러나 neuro-2a/ IL-16 세포를 투여한 2주 후 unmodified neuro-2a 세포를 투여 받은 nude 마우스에서는 1-2주 후부터 모두 종양이 형성되어 6주 이후 생존한 마우스는 없었다(Fig. 9). IL-16 유전자가 형질 도입된 neuro-2a세포는 A/J 마우스나 nude 마우스 모두에서 종양 형성 능력

을 상실하였고 A/J 마우스에서는 종양 예방 효과가 있으나 nude 마우스에서 종양 예방 효과가 없는 것으로 볼 때 이는 A/J 마우스에서는 T 세포에 의해 항 종양 효과를 나타냈을 것으로 추측된다. 그러나 nude 마우스 모두에서 종양 형성 능력을 상실하였으므로 이는 T세포 이외의 또 다른 면역 세포 또는 염증 세포가 관여할 것으로 생각된다.

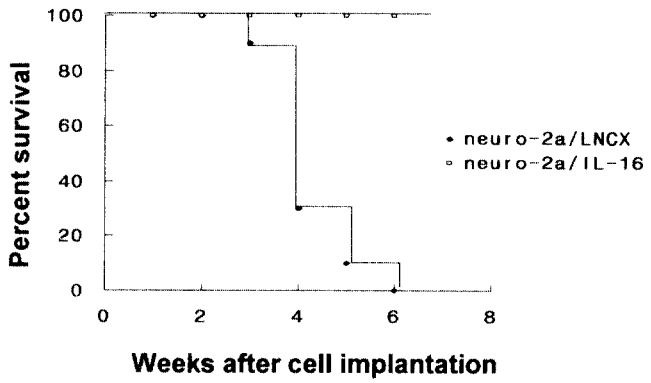

Fig.8. Tumorigenicity of neuro-2a/IL-16 cells inoculated in nude mice. IL-16 expression also reduces significantly the tumorigenicity of neuro-2a cells in nude mice(N=5).

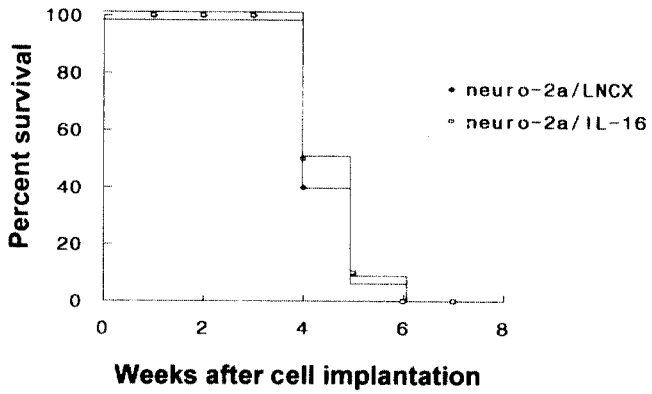

Fig.9. Prophylactic effect of neuro-2a/IL-16 cells inoculated in nude mice. Neuro-2a/IL-16 cells do not induce prophylactic anti-tumor response in nude mice(N=5/each group).

사. Neuro-2a/IL-16 세포의 Fas 발현

FACScan을 이용한 유세포 분석 결과 neuro-2a 세포 및 neuro-2a/IL-16 세포 모두에서 Fas 발현은 없었다(Fig. 10). 이는 A/J 마우스나 nude 마우스 모두에서 종양 형성 능력을 상실하였던 이유가 Fas 발현에 의한 아포토시스는 아닌 것으로 생각된다.

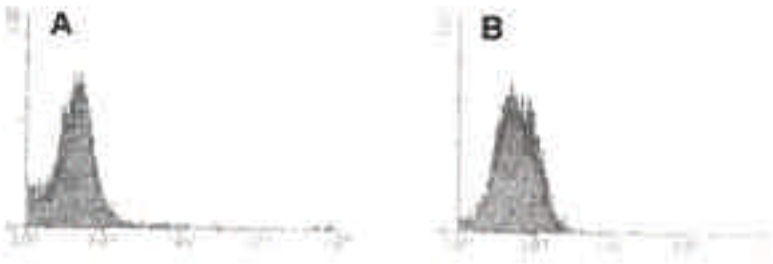

Fig. 10. Expression of Fas molecules on neuro-2a and neuro-2a/IL-16 cells. Both neuro-2a(A) and neuro-2a/IL-16 cells(B) do not express the Fas molecules.

자. 면역 조직 화학 염색

H&E 염색에서 종양 세포 주위에 림프구의 침윤이 관찰되었으며 드물게 호중구, 호산구, 조직구의 침윤을 관찰할 수 있었다. 면역 조직 화학 염색에서 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 침윤이 관찰되었다. 이는 T 세포가 항 종양 효과에 중요한 역할을 할 것으로 추측되며 이외에 호중구, 호산구, 조직구 등의 세포도 일부 관여할 것으로 생각된다(Fig. 11).

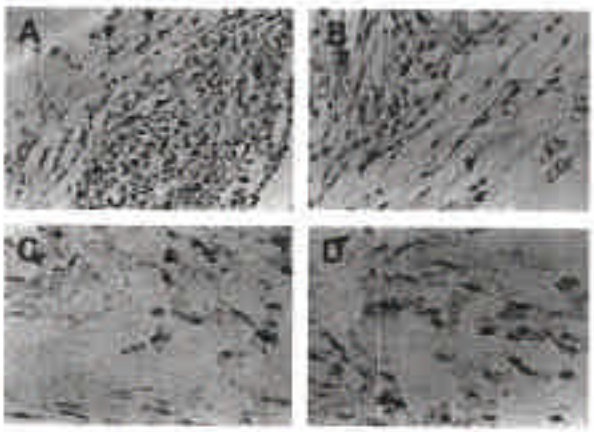

Fig. 11. Histochemical examination of neuro-2a/IL-16 tumors that injected in A/J mice. There are many lymphocyte infiltration(A), some eosinophil, neutrophil and histiocyte(B). (H&E, x200). The sections were reacted with anti-CD4 or anti-CD8 Ab (D). (x400)

Ⅳ. 고 찰

최근 IL-2[9,35], IL-4[15], IL-12[16], IL-18[36], TNF-α[17], INF-γ[18,37], GM-CSF[19] 등과 같은 싸이토카인 유전자를 암세포에 전달한 후 마우스나 사람에 다시 투여함으로써 국소적인 면역 반응을 유발시켜 항 종양 효과를 얻고자하는 면역 유전자 치료가 시도되고 있다. 본 연구에서는 새로운 싸이토카인 유전자로서 IL-16이 마우스 신경모세포종 모델에서 항 종양 효과를 나타내는지 알아보기 위한 실험을 하였다.

본 연구에서 IL-16 유전자로 형질 전환된 $1x10^5$ neuro-2a 세포에서 IL-16의 양을 측정한 결과 6.0 ng/mL/24hr 에서부터 4.2 ng/mL/24hr까지 다양하게 분비됨을 확인할 수 있었다. 싸이토카인 유전자로부터 싸이토카인의 분비 능력은 promoter의 종류 및 세포 종류에 따라 다양하게 분비되는데 Gansbacher 등[10]은 마우스의 섬유육종(fibrosarcoma) 세포주인 CMS-5 세포에 Molney murine leukemia virus의 *cis* acting promoter가 존재하는 long terminal repeats(LTR)를 promoter로 이용한 경우가 cytomegalovirus(CMV)의 internal promoter를 이용한 경우보다 IL-2의 분비가 높았다고 하였으며 Katsanis 등[9]은 마우스의 신경모세포종 세포주인 neuro-2a 세포에 LTR을 promoter로 이용한 결과 약 $1x10^6$ 세포에서 2.2 - 55.3 U/mL 범위로 다양하게 분비된다고 하였다. 본 연구에서는 CMV promoter를 이용하여 항 종양 반응을 일으킬 수 있을 정도의 충분한 양의 IL-16를 얻을 수 있었다. IL-16에 의해 형질 전환된 neuro-2a 세포를 마우스 피하에 투여하여 종양 형성능을 관찰한 결과 종양 세포의 종양 형성 능력이 소실되었음을 확인하였다. 싸이토카인을 생성하도록 형질 전환된 암세포는 종양 형성능이 소실되고 wild type 종양 세포에 대한 전신적인 면역을 얻게되는데 이의 기전으로 종양 세포에서 분비되는 싸이토카인 및 주변의 다른 면역 세포에 의한 이차적인 싸

이토카인의 분비에 의해 싸이토카인을 생성하도록 형질 전환된 암세포가 죽게되고 이때 생기는 종양 세포 파편이 class 2 조직 적합 항원 양성 세포에 전달하여 연속적으로 CD 4+ 및 CD 8+ 세포의 활성화를 일으켜 종양 세포를 파괴하며 더불어서 기억력을 갖는 T 세포에 의해 종양 백신 효과 및 치료 효과를 보이는 것으로 알려져 있다[38].

지금까지 *in vitro* 결과에서 알려진 IL-16의 기능은 (1) GM-CSF의 분비를 유발하여 항원 전달 세포의 활성화를 유발하고[30], (2) IL-2와 함께 CD4+ T 세포 증식에 관여하며[24] (3) 수상세포 및 대식세포같은 항원 전달세포의 기능을 항진시키는 것[32]으로 알려져 있다. 따라서 이런 결과를 종합해 볼 때 IL-16 역시 다른 싸이토카인 유전자 치료에서처럼 탐식된 종양 세포 peptide를 CD4+ T 세포에 전달함으로서 항 종양 반응을 유발하는 것으로 추론해볼 수 있으나 향후 더 많은 실험들이 필요할 것으로 생각된다.

IL-16에 의해 형질 전환된 neuro-2a 세포를 마우스의 피하에 투여한 다음, 2주일 후 wild type neuro-2a 세포를 투여하여 종양 형성 유무를 관찰함으로서 종양 세포에 대한 백신 효과를 관찰한 결과 IL-16에 의해 형질 전환된 neuro-2a 세포 투여군에는 종양이 형성되지 않아 IL-2 유전자를 이용한 면역 유전자 치료와 마찬가지로 종양 백신으로서의 향후 이용 가능성이 있음을 시사하였다. 그리고 nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포를 먼저 투여한 2주 후 wild type neuro-2a 세포를 투여한 종양 백신 모델에서는 종양이 형성된 것으로 볼 때 항 종양 효과를 일으키는 면역 세포는 자연 살상 세포보다는 주로 T 세포가 관여 할 것으로 추측된다. 이는 neuro-2a/IL-16 세포를 피하에 주입한 후 주입 부위의 조직을 절개하여 시행한 조직 검사에서 림프구의 침윤이 관찰된 것으로 미루어 볼 때 T 세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 nude 마우스에서 neuro-2a/IL-16 세포의 종양 형성능은 A/J 마우스에서와 마찬가지로 소실되었으므로 이는 T 세포 이외

의 또 다른 면역 세포나 염증 세포가 관여할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 IL-16이 neuro-2a 세포에 Fas 항원을 발현시켜 면역 세포에 의해 apoptosis가 일어나는지 알아보기 위해 Fas 발현을 측정하였으나 neuro-2a 세포나 neuro-2a/IL-16세포 모두에서 Fas 발현을 관찰할 수 없었다. 한편 neuro-2a/IL-16 세포를 피하에 주입한 부위에서 시행한 조직 검사에서 림프구 이외에 조직구, 호중구, 호산구의 침윤이 관찰된 것으로 미루어 볼 때 이들 세포가 nude 마우스에서 항 종양 효과를 유발할 것이라고 추론해 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 자연 살상 세포에 의한 항 종양 효과의 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 즉 IL-16 분비에 의해 INF-γ 같은 이차적인 싸이토카인을 분하여 neuro-2a 세포에 제 1형 조직 적합 항원이 많이 표현되어 자연 살상 세포에 의해 항 종양 효과를 나타낼 수 있다[39-41]. 그러나 싸이토카인 유전자 치료의 정확한 기전[12]은 아직 밝혀지지 않았듯이 IL-16 유전자 치료의 작용 기전에 대해서도 향후 더 많은 연구를 통해 규명되어져야 할 것으로 생각된다.

한편 IL-16 유전자 형질 전환에 의한 이미 형성된 종양에 대한 치료 효과는 뚜렷하지 않았다. 이는 대부분의 싸이토카인 유전자 치료 결과와 일치하는 것으로 종양 세포 수가 많을 때 즉 종양이 많이 진행한 경우 유전자 치료의 효과가 적은 것을 알 수 있다[16].

1세 이상의 제4기 신경모세포종은 치료에 대한 반응이 매우 불량하여 고 용량 항 암 화학 요법 후 자가 조혈 모세포 이식을 시행하여도 50%이상의 환자에서 종양의 재발 등으로 인하여 사망하게 된다. 최근 자가 조혈모세포이식 후 미세 잔존 암세포를 제거하기 위한 시도로 전신적으로 IL-2[11]를 투여함으로서 자연 살상 세포의 활성화에 의한 면역 치료, 13-cis-RA 또는 MIBG을 이용한 방사선 치료 등이 시도되고 있으나 그 효과는 아직 확실하지 않다. 본 연구에서는 종양 세포 내 IL-16 유전자 전달이 항 종양 효과가

있다는 사실을 실험적으로 증명하였으며, 최근 활발히 연구되고 있는 IL-2 유전자를 이용한 유전자 치료[7,9]와 더불어 IL-16 유전자 치료를 임상에 적용함으로서 진행된 종양 및 미세 잔존 암의 치료에 이용할 수 있으리라 생각된다. 이의 적용 가능성으로 1) 적절한 자가 종양 세포 배양 방법을 확립하거나 또는 자가 섬유 아세포(fibroblast)의 배양을 통한 IL-16 유전자를 전달함으로서 잔존 암의 치료 및 종양 백신으로서 이용할 수 있을 것으로 생각되며 2) 자가 조혈 모세포 이식 후 문제되고 있는 재발 방지를 위하여 조혈모세포에 IL-16 유전자를 전달함으로서 신경모세포종 환아의 생존율 향상에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

1. A/J 마우스 신경모세포종 세포 내로의 IL-16 유전자 전달에 의한 국소적 IL-16 분비는 A/J 마우스에서 종양 형성능을 소실시켰으며 종양 백신 효과를 관찰할 수 있었다.

2. 그 작용 기전은 A/J 마우스에서 종양 백신 효과가 있었으며 nude 마우스에서는 종양 백신 효과가 없고 면역 조직 검사에서 림프구 침윤이 관찰된 것으로 볼 때 T 세포에 의한 항 종양 효과가 나타난 것으로 추측되나 nude 마우스에서 항 종양 효과가 나타나지 않는 것으로 볼 때 T 세포 이외의 호중구, 호산구 등의 염증 세포가 관여할 것으로 생각된다. 그밖에 neuro-2a 세포에서 분비되는 IL-16에 의한 INF-γ와 같은 이차적인 싸이토카인 분비에 의한 자연 살상 세포의 활성화에 관한 연구 등이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Favrot MC, Michon J, Floret D, Cochat C, Negrier S, Mathiot C, et al. Interleukin-2 immunotherapy in children with neuroblastoma after high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. Pediatr Hematol Oncol 1990;7:275-84.
2. Ladenstein R, Lasset C, Hartmann O, Frappaz D, Garaventa A, Klingebiel T, et al. Impact of megatherapy on survival after relapse from stage 4 neuroblastoma in patients over 1 year of age at diagnosis: a report from the European Group for Bone Marrow Transplantation. J Clin Oncol 1993;11:2330-41.
3. Villablanca JG, Khan AA, Avramis VI, Seeger RC, Matthay KK, Ramsay NKC, et al. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. J Clin Oncol 1995;13:894-901.
4. Goldberg SS, DeSantes K, Huberty JP, Price D, Hasegawa BH, Reynolds CP, et al. Engraftment after myeloablative doses of ^{131}I-metaiodobenzylguanidine followed by autologous bone marrow transplantation for treatment of refractory neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 1998;30:339-46.
5. Matthay KK, DeSantes K, Hasegawa B, Huberty J, Hattner RS, Ablin A, et al. Phase I dose escalation of ^{131}I-metaiodobenzylguanidine with autologous bone marrow support in refractory neuroblastoma. J Clin Oncol 1998;16:229-36.
6. Lode HN, Xiang R, Dreier T, Varki NM, Gillies SD, Reisfeld A.

Natural killer cell mediated eradication of neuroblastoma metastasis to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy. Blood 1998;91:1706-15.

7. Brenner MK, Furman WL, Santana VM, Bowman L, Meyer W, Crist WM, et al. Phase I study of cytokine-gene modified autologous neuroblastoma cells for treatment of relapsed/refractory neuroblastoma. Hum Gene Ther 1992:3:665-76.
8. Katsanis E, Orchard PJ, Bausero MA, Gorden KB, McIvor RS, Blazar BR. Interleukin-2 gene transfer into murine neuroblastoma decreases tumorigenicity and enhances systemic immunity causing regression of preestablished retroperitoneal tumors. J Immunother 1994;15:81-90.
9. Cho HS, Song JY, Park CY, Lyu CJ, Kim BS, Kim KY. Retroviral-mediated IL-2 gene transfer into murine neuroblastoma. Yonsei Med J 2000;41:76-81.
10. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. J Exp Med 1990;172:1217-24.
11. Pession A, Prete A, Locatelli F, Pierinelli S, Pession AL, Maccario R, et al. Immunotherapy with low-dose recombinant interleukin 2 after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in neuroblastoma. Br J Cancer 1998;78:528-33.
12. Lotze MT. The future role of interleukin-2 in cancer therapy. Cancer J Sci Am 2000;6(suppl 1):S58-60.
13. Erard F, Corthesy P, Nabholz M, Lowenthal JW, Zaech P, Plaetinck G, et al. Interleukin 2 is both necessary and sufficient for the growth and differentiation of lectin-stimulated cytolytic T lymphocyte

precursors. J Immunol 1985;134:1644-52.

14. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989;47:187-376.
15. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. Cell 1989;57:503-12.
16. Dunussi-Joannopoulous K, Runyon K, Erickson J, Schaub RG, Hawley RG, Leonard JP. Vaccine with IL-12-transduced acute myeloid leukemia cells elicit very potent therapeutic and long-lasting protective immunity. Blood 1999;94:4263-73.
17. Hwu P, Yannelli J, Kriegler M, Anderson WF, Perez C, Chiang Y, et al. Functional and molecular characterization of tumor infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-α cDNA for the gene therapy of cancer in humans. J Immunol 1993;150:4104-15.
18. Watanabe Y, Kuribayashi K, Miyatake S, Nishihara K, Nakayama E, Taniyama T, et al. Exogenous expression of mouse interferon-gamma cDNA in mouse neuroblastoma C1300 cells results in reduced tumorigenicity by augmented anti-tumor immunity. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:9456-60.
19. Dunissi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, Ferrara JLM, Bierer BE, Croop JM. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. Blood 1998;91:222-30.
20. Center DM, Cruikshank WW. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of

chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. J Immunol 1982;128:2563-8.

21. Liberge S, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Histamine induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation: evidence for constitutive protein synthesis and storage. J Immunol 1995;55:2902-10.
22. Lim K, Wan HC, Dvorak AM, Wong DTW, Cruikshank WW, Kornfeld H, et al. Secretion of the lymphocyte and eosinophil chemotactic factors and IL-16 from bGM-CSF stimulated eosinophils. J Immunol 1996;156:2566-70.
23. Bellini A, Yoshimura H, Vitori E, Marini M, Mattoli S. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. J All Clin Immunol 1993;92:412-24.
24. Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore AC, Kornfeld H. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:5109-13.
25. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. Immunol Today 1996;17:476-81.
26. Center DM, Kornfeld H, Ryan TC, Cruikshank WW. Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. Immunol Today 2000;21:273-80.
27. Bruserud O, von Volkman HL, Ulvestad E. The cellular immune system of patients with acute leukemia and severe chemotherapy-induced leukopenia: characterization of T lymphocyte

subsets responsive to IL-16 and IL-17. Acta Haematol. 2000;104:80-91.

28. Cruikshank WW, Berman JS, Theodore AC, Bernardo J, Center DM. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. J Immunol 1987;138:3817-23.
29. Rand TH, Cruikshank WW, Center DM, Weller PF. CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. J Exp Med 1991;173:1521-8.
30. Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M, Cruikshank WW. Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. J Immunol 1998;160:2115-20.
31. Mathy NL, Scheuer W, Lanzendorfer M, Honold K, Ambrosius D, Norley S, Kurth R. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. Imunology 2000;100:63-9.
32. Hermann E, Darcissac E, Idziorek T, Capron A, Bahr GM. Recombinant interleukin-16 selectively modulates surface receptor expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells. Immunology 1999;97:241-8.
33. Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ryan T, Schwabegger A, Cruikshank WW, et al. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. J Immunol 2000;163:3232-8.
34. Kriegler M, Perez CF, Hardy C, Botchan M. Transformation mediated by the SV40 T antigens: separation of the overlapping SV40 early

genes with a retroviral vector. Cell 1984;38:483-91.

35. Zatloukal K, Schneeberger A, Berger M, Schmidt W, Koszik F, Kutil R, et al. Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine. Assessment of critical cellular and molecular parameters. J Immunol 1995;154:3406-19.
36. Yoshimura K, Hazama S, Iizuka N, Yoshino S, Yamamoto K, Muraguchi M, et al. Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the Ig kappa leader sequence. Cancer Gene Ther 2001;8:9-16.
37. Shiau AL, Lin CY, Tzai TS, Wu CL. Postoperative immuno-gene therapy of murine bladder tumor by in vivo administration of retroviruses expressing mouse interferon-γ. Cancer Gene Ther 2001;8:73-81.
38. Colombo MP, Guido F. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? Immunol Today 1994;15:48-51.
39. Long EO, Wagtmann N. Natural killer cell receptors. Curr Opin Immunol 1997;9:344-50.
40. Leong CC, Chapman TL, Bjorkman PJ, Formankova D, Mocarski ES, Phillips JH, et al. Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. J Exp Med 1998;187:1681-7.
41. Lanier LL. Natural killer cell receptors. Annu Rev Immunol 1998;16:359-93.

Abstract

An anti-tumor immune response by IL-16 gene transfer into murine neuroblastoma cells

Hyun-Sang Cho

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kir-Young Kim, Dong-Soo Kim)

Interleukin(IL)-16 is a potent chemoattractant factor for CD4+ T cells, monocytes, and eosinophils and up-regulates IL-2R on CD4+ T lymphocytes and regulates the function of antigen presenting cell. Retroviral-mediated gene transfer of the human IL-16 gene into the neuro-2a cells, murine neuroblastoma cells, was used to investigate whether locally secreted IL-16 might generate anti-tumor immune responses. It was estimated whether the local secretion of IL-16 from the genetically modified tumor cells would affect their tumorigenicity *in vivo*, and then, IL-16-transfected neuroblastoma cells would have prophylactic effect and therapeutic effect in A/J mice. The mechanism of IL-16 was investigated by nude mice trial of an anti-tumor immune response and

by the evaluation of the infiltration of immune cells at neuro-2a/IL-16 cell injection sites.

The IL-16 gene-transduced neuro-2a cell clones were secreted 4.2-6.0 ng of IL-16 per mL per 10^5 cells during 24hr. None of the mice (N=8) which injected with 2 x 10^6 IL-16 gene-transfected neuro-2a cells developed tumors within 6 weeks while all of the mice (N=8) which injected with wild-type neuro-2a cells developed tumors. Immunization of mice (N=8) with 2 x 10^6 IL-16 gene-transfected neuro-2a cells protected these animals against a subsequent challenge with 2 x 10^6 wild-type tumor cells. The growth of large neuroblastomas was slightly delayed after IL-16-secreting neuro-2a cell injection into mice compared with the control group.

Nude mice were also shown an anti-tumorigenicity effect, but there was not shown the prophylactic effect against murine neuroblastoma. Immunohistochemical stain of the subcutaneous tissue injected with neuro-2a/IL-16 cells revealed frequently the infiltration of lymphocytes, neutrophils, eosinophils and histiocytes.

These results suggest that the local secretion of IL-16 by transduced tumor cells abrogated their tumorigenicity and induced protective immunity. It may depend on T cells, but some other immune cells might also induce an anti-tumor immune response in murine neuroblastoma model.

Key Words: interleukin-16, neuroblastoma, gene therapy