

VSV-G epitope이 삽입된 증식가능
아데노바이러스를 이용한 유전자
전달 및 세포 살상 효율 분석

연세대학교 대학원

의과학과

조 은 아

VSV-G epitope이 삽입된 증식가능
아데노바이러스를 이용한 유전자
전달 및 세포 살상 효율 분석

지도교수 김 주 항

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2003 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

조 은 아

조은아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2003 년 6 월 일

감사의 글

바쁘신 와중에도 지금까지 지도해주신 김주항 교수님께 깊이 감사드립니다. 그리고 실험 전반에 걸쳐 지도 편달을 아끼지 않으시고 본 논문의 내용을 세심하게 다듬어 주신 윤채옥 교수님께 감사드리며 본 논문 심사를 위하여 자문과 조언을 해주신 김건홍 교수님께 감사드립니다.

또한 실험실에서 같이 생활한 재성 선배, 은희 언니, 대봉 선배, 영숙 언니와 동현 오빠, 경주, 태영, 아름, 평환, 지영, 그리고 막내 태영이 모두에게 고마움을 표합니다.

함께 지내며 힘이 되어주는 동생들과 무엇보다도 물심양면으로 뒷바라지 해주시고 기도해주신 부모님께 진심으로 감사드리며, 지금까지 저의 길을 인도해주신 하나님께 모든 영광을 돌립니다.

저자 씀

차 례

그림 차례	iii
국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 대상 세포주 및 세포배양	8
2. VSV-G epitope이 fiber 말단에 삽입된 아데노바이러스 fiber 셔틀 벡터의 제작	8
3. 암세포 특이적 살상 아데노바이러스 YKL-VSVG와 표지 유전자로 LacZ를 지니는 dl-LacZ-VSVG 바이러스의 제작	11
4. <i>In vitro</i> 유전자 전달 효율 비교 검증	13
5. <i>In vivo</i> 유전자 전달 효율 비교 검증	13
6. Cytopathic effect 분석	14
7. MTT assay	14
8. VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스의 바이러스 생산량 비교	14
9. YKL-VSVG의 생체내 항종양 효과 검증	15
III. 결 과	16
1. VSV-G epitope이 fiber 말단에 삽입된 아데노바이러스의 생산	16

2. <i>In vitro</i> dl-LacZ-VSVG의 증가된 유전자 전달 효율	16
3. <i>In vivo</i> 유전자 전달 효율 비교 검증	18
4. YKL-VSVG의 종양 세포 살상 능력의 비교	22
5. VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스와 대조군 바이러스의 바이러스 생산량 비교	24
6. YKL-VSVG의 생체내 항종양 효과 검증	27
IV. 고 찰	32
V. 결 론	36
참고문헌	36
영문요약	40

그림 차례

Fig. 1. A) Schematic representation of the C-terminus of adenovirus (Ad) fiber to which the VSV-G epitope is attached through a glycine linker B) Schematic diagram showing the strategy of expanding tropism of Ad by a VSV-G epitope incorporated Ad	7
Fig. 2. Construction of VSV-G epitope incorporated fiber shuttle vector	10
Fig. 3. Structure of the adenoviral vectors	12
Fig. 4. The fiber genotype was confirmed by PCR amplification using a primer set specific for VSV-G epitope	17
Fig. 5. Enhanced transduction efficiency of dl-LacZ-VSVG	19-20
Fig. 6. Quantification of β -galactosidase activity	21
Fig. 7. Comparison of <i>in vivo</i> gene transfer efficiencies with X-gal assays	23
Fig. 8. CPE assay	25
Fig. 9. MTT assay	26
Fig. 10. Comparative growth curves of VSV-G	

epitope incorporated Ads (dl-LacZ-VSVG
and YKL-VSVG) and their unmodified
counterparts (dl-LacZ and YKL-1) 28-29

Fig. 11. U87MG tumor xenografts in nude mice were
treated with intratumoral injection of YKL-1,
YKL-VSVG 31

국문요약

VSV-G epitope이 삽입된 증식 가능 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달 및 세포 살상 효율 분석

아데노바이러스는 생체내 유전자 전달 효율이 우수하여 암치료용 벡터로 많이 이용되고 있으나 임상 시험결과 인체의 종양조직에는 아데노바이러스의 세포수용체인 Coxsackie and Adenovirus Receptor(CAR)의 발현이 낮아 암세포로의 유전자 전달 효율이 낮다는 문제점이 제기되고 있다. 따라서 본 연구에서는 암세포로의 아데노바이러스의 감염 효율을 증대시키기 위한 방안으로, 인체 세포주의 세포막에 다량으로 발현되어 있는 phosphatidyl serine(PS)과 결합할 수 있는 VSV-G 막단백질의 epitope을 이용하여 암세포로의 감염 효율 증가를 유도하였다. 즉, 다양한 숙주세포로의 감염을 매개하는 VSV-G epitope을 아데노바이러스의 fiber 말단 부위에 삽입하여 CAR와의 결합능 이외에 PS를 통해서도 세포를 감염시킬 수 있는 아데노바이러스를 제작하였다. LacZ를 표지 유전자로 발현하고 fiber 말단에 VSV-G epitope이 삽입된 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ-VSVG의 경우, 야생형 fiber를 가진 대조군 아데노바이러스인 dl-LacZ 바이러스에 비해 유전자 형질 도입율이 현저히 증가하였으며, 특히 CAR의 발현이 매우 낮은 세포주들에서의 유전자 전달 효율이 약 20배 정도 증가함을 관찰하였다. 또한, 복제 가능 아데노바이러스의 세포 살상능을 비교 검증할 수 있는 CPE assay와 MTT assay를 통하여, 대조군 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1에 비해 VSV-G epitope이 삽입된 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-VSVG에 의한 세포 살상능이 월등히 우수함을 확인할 수 있었다. 이러한 YKL-VSVG 아데노바이

러스의 증가된 암세포 살상능은 생체내 항종양 실험에서도 확인되었다. 이러한 결과들은 본 연구에서 제작된 VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스들이 CAR 수용체 뿐만 아니라 PS를 통해서도 세포를 감염함으로써 유전자 전달 효율과 세포 살상능이 증가될 수 있음을 의미한다. 이는 결과적으로 CAR에 의존적으로 세포를 감염하는 기존의 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료 효과의 한계를 극복할 수 있어 암 유전자치료에 보다 더 안전하고 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말 : 아데노바이러스, 유전자 치료, CAR, VSV-G epitope,
아데노바이러스 fiber

VSV-G epitope이 삽입된 증식 가능 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달 및 세포 살상 효율 분석

<지도교수 김주항>

연세대학교 대학원 의과학과

조 은 아

I. 서 론

유전자 치료에 사용하는 대표적인 유전자 전달 수단으로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 부속 바이러스(AAV), 그리고 리포솜 등을 이용한 방법들이 있다. 이들 중 아데노바이러스는 효율적으로 세포 속으로 감염하여 외래 유전자를 다량으로 발현시킬 수 있어 암 또는 여러 종류의 질병을 치료하는 목적으로 이용되고 있다¹⁻². 재조합 아데노바이러스는 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있으며 생체 내 유전자 전달이 용이하다는 점이 보고 되면서, 유전자 치료에 재조합 아데노바이러스를 이용하는 빈도수가 증가하고 있다. 특히 분열하지 않는 세포들로도 유전자를 전달할 수 있어 세포주기가 다양하게 존재하는 암을 대상으로 하기에 적합하고, 더욱이 암 치료에는 치료용 유전자의 발현이 2-3주 정도로도 충분하며 바이러스에 의해 유도되는 세포성 면역반응이 크게 문제시되지 않거나 오히려 이점이 될 수도 있기 때문에 재조합 아데노바이러스를 암유전자 치

료용 유전자 전달체로 개발하려는 노력이 활발히 이루어지고 있다³.

아데노바이러스의 세포내 이입은 아데노바이러스의 세포 수용체인 CAR를 통해 표적세포에 부착된 후 아데노바이러스의 penton base와 세포의 integrin과의 결합으로 세포내로 유입되는 2단계 과정으로 이루어진다⁴⁻⁵. 즉, 아데노바이러스의 fiber 말단 부위인 knob과 표적세포에 발현되어 있는 CAR와의 결합으로 인해 바이러스가 세포에 부착되면, 그 다음 단계로 아데노바이러스의 penton base에 있는 Arg-Gly-Asp(RGD) motif와 세포표면의 $\alpha\beta 3$ 또는 $\alpha\beta 5$ integrin과의 상호작용으로 인한 세포내 도입이 일어난다⁶⁻⁸. 일반적으로 대부분의 세포에서는 CAR의 발현이 높지만, 성숙한 근세포, 일차 기관지 상피조직, 평활근, 내피조직, 대식세포, T세포, 그 외 일부 종양세포(방광암, 신경아교종, 편평상피 세포암, 악성 흑색종) 등에서는 CAR의 발현이 미미하거나 결손되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 이루어진 아데노바이러스를 이용한 암유전자 치료 임상시험에서, 여러 종양세포로의 낮은 유전자 전달 효율의 중요한 원인은 CAR 발현의 결손인 것으로 밝혀지고 있으며, 대상세포에서의 CAR 발현 정도와 아데노바이러스에 의한 형질 도입률이 서로 비례한다는 것이 보고되었다⁹⁻¹¹. 또한, CAR 수용체를 통한 아데노바이러스의 감염은 CAR의 발현이 상대적으로 많은 정상세포에 아데노바이러스를 집중시켜 CAR의 발현이 낮은 대상세포(종양세포)로의 감염율을 저하시키는 결과를 초래하기도 한다. 이러한 대상세포로의 낮은 형질 도입율을 극복하기 위하여 임상시험에서 고역가의 아데노바이러스를 이용하여야 하는데, 이는 결과적으로 아데노바이러스 전달체 자체에 의한 부작용과 숙주의 면역반응을 증가시켜 안전하고 효과적인 임상치료를 위협하는 요인으로 작용한다.

이와 같이 CAR 수용체에 의존한 아데노바이러스의 유전자 전달은 유전자치료의 효과를 제한하는 문제점으로 작용할 수 있어, 이러한 제한점을

극복하기 위하여 CAR 수용체를 통하지 않고 세포를 감염시킬 수 있는 방안들이 연구되고 있다. 실제로 아데노바이러스 type 2의 fiber를 아데노바이러스 type 17의 fiber로 대체하여 기도 표피세포에 대한 유전자 전달 효율을 증가시킬 수 있었으며, 아데노바이러스 type 5의 knob domain을 아데노바이러스 subgroup B의 knob domain으로 치환시킨 혼합형 아데노바이러스는 아데노바이러스 type 5에 의해 잘 감염이 되지 않는 조혈 세포들을 효과적으로 감염시킬 수 있었다¹²⁻¹⁴. 또한, fiber C-말단에 RGD motif를 부착시킨 바이러스는 CAR의 발현은 낮지만 α_v integrin의 발현이 풍부한 내피세포와 평활 근육세포로의 유전자 전달 효율을 현격히 증가시킬 수 있었다. 폴리라이신기를 아데노바이러스 fiber C-말단부위에 결합시켜 헤파린에 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 아데노바이러스는 대부분의 포유 동물 세포에 다량 발현하는 헤파린이 포함된 세포 수용체를 인식하고 결합하여 아데노바이러스의 fiber에 대한 수용체가 부족한 세포에도 유전자를 효율적으로 전달할 수 있었으며, 그 결과 야생형 아데노바이러스에 비해 약 10-300배 더 높은 유전자 전달 효율을 보였다¹⁵⁻¹⁸. 이외에도 Gastrin-releasing peptide(GRP), NGR motif, EGF 그리고 FLAG epitope 등의 리간드를 아데노바이러스 fiber knob의 C-말단이나 HI-loop, DG loop 등에 결합시키는 방법들도 연구되고 있다¹⁹⁻²⁴. 이러한 일련의 연구들을 통하여 CAR 수용체와의 결합이 아데노바이러스의 효과적인 세포 내 진입을 위해 선행되어야 하는 필수적인 과정이 아님을 알 수 있었으며, 또한 아데노바이러스의 fiber 부분을 변형하여 대상세포의 세포막에 다량 발현되어 있는 여러 종류의 세포 수용체를 재표적화 한다면 그 결과 아데노바이러스의 특정 대상세포에 대한 친화력이 변경되어 이들 세포에서의 아데노바이러스 벡터에 의한 유전자 전달 효율을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

VSV(Vesicular stomatitis virus)-G는 VSV의 외투막 단백질로서 다양한 숙주세포로의 감염을 가능하게 할 뿐 아니라 초원심 분리에 의한 바이러스 농축 과정 동안 안정하게 유지될 수 있어 고역가의 바이러스 생산이 가능한 이점도 제공한다²⁵. 따라서 현재 VSV-G 외투막 단백질은 감염률 증가를 위한 여러 종류의 레트로바이러스의 pseudotyping에 가장 많이 이용되고 있다. 하지만 아데노바이러스는 비외투막 바이러스로서 외투막이 존재하지 않기 때문에, 외투막 pseudotyping에 의한 세포 감염률 증가 시도는 이루어질 수 없다. 최근에 VSV-G 외투막 단백질 중 아미노산 염기 서열 118번째부터 136번 사이에 있는 19개의 아미노산 (GTWLNPGFPPQSCGYATVT)가 특히 VSV의 세포 감염에 직접적으로 관여하는 epitope으로서 인체 세포주의 세포막에 다량으로 발현되어 있는 PS와 결합한다는 사실이 보고되었다²⁶. 따라서 본 연구에서는 아데노바이러스의 유전자 전달 효율을 증대시키기 위한 한 방안으로, PS와 결합할 수 있는 VSV-G epitope을 표적화기로 이용하였다. 즉, VSV-G epitope을 아데노바이러스의 fiber 말단 부위에 삽입하여 CAR와의 결합능 이외에 PS를 통해서도 아데노바이러스가 세포를 감염시킬 수 있도록 하여 아데노바이러스의 유전자 전달 효율을 개선하고자 하였다(Fig. 1). 이는 기존의 아데노바이러스에 의해 잘 감염이 되지 않는 여러 종류의 암세포들에 대한 감염율을 증대시킬 수 있을 것이며 결과적으로, 적은 양의 바이러스로도 충분한 형질 도입을 시킬 수 있어 고역가의 아데노바이러스 투여에 의해 야기될 수 있는 독성과 숙주의 면역반응을 최소화하여 아데노바이러스를 이용한 유전자치료의 안전성과 실용화를 앞당길 수 있을 것으로 사료된다.

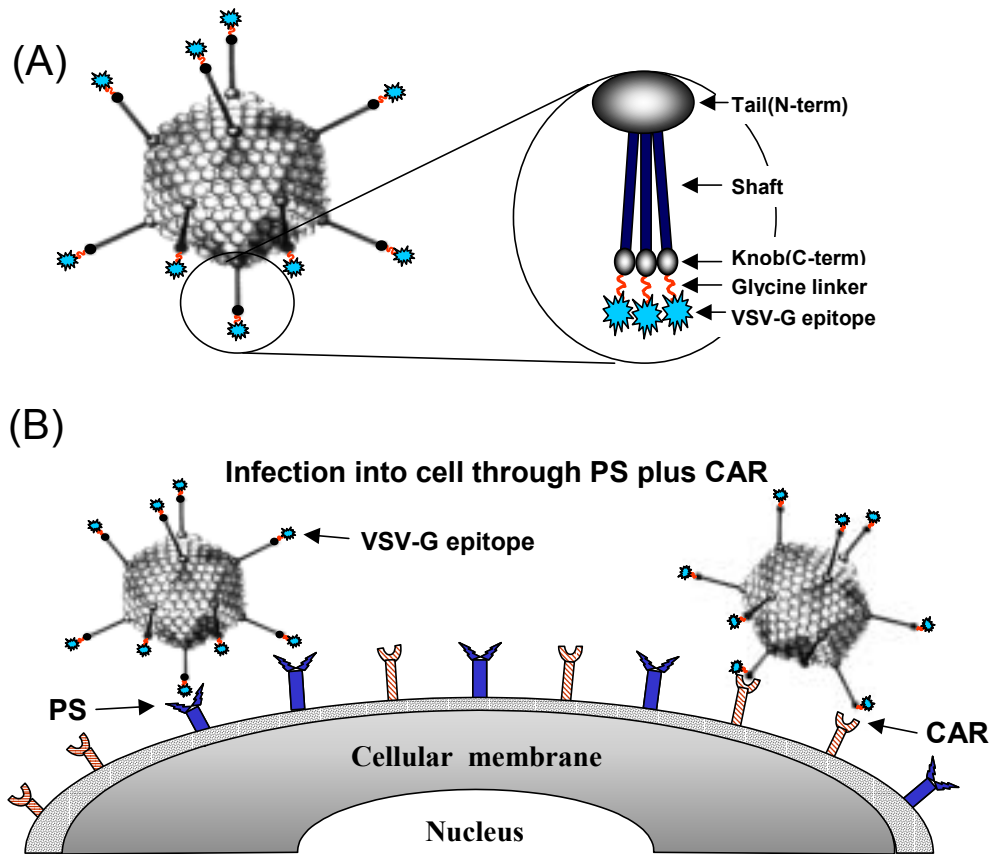


Fig. 1. A) Schematic representation of the C-terminus of adenovirus(Ad) fiber to which the VSV-G epitope is attached through a glycine linker. B) Schematic diagram showing the strategy of expanding tropism of Ad by a VSV-G epitope incorporated Ad. Addition of VSV-G epitope to fiber knob of Ad would allow for additional binding of the knob domain to PS, resulting in retargeting of Ad vector with intact CAR-entry capability and an additional PS-entry capability.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 뇌암 세포주(U251N, U87MG, U343, U118MG, Daoy, C6), 자궁경부암 세포주(HeLa, C33A), 폐암 세포주(A549), 간암 세포주(Hep3B), 유방암 세포주(MCF7), 햄스터의 난소세포(CHO-K1, Pro5, Lec2)와 293이며 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCOBRL, Life Technologies, Rockville, MD)과 항생제 penicillin/streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(GIBCOBRL, Life Technologies, Rockville, MD)으로 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. VSV-G epitope이 fiber 말단에 삽입된 아데노바이러스 fiber 셔틀 벡터의 제작

아데노바이러스 fiber 셔틀벡터의 제작에 필요한 fiber의 3' 말단 부위만을 cloning하기 위하여 아데노바이러스 subtype 5를 주형 DNA로 하고 5'-GGCCTTTACTTGTTTACAGC-3'(sense primer)과 5'-GGGGAGCTCGGATCCTTCTTGGGCAATGTATG-3'(antisense primer)의 염기서열을 가지는 primer set를 사용하여 PCR을 수행하였으며, antisense primer에는 fiber의 종결 코돈(TTA)을 glycine(TCC, 고딕체 부분)으로 치환하도록 하여 fiber말단에 있는 종결 코돈을 제거하고 차후에 연속적으로 실시되는 cloning에 필요한 제한효소들인 *Bam*HI과 *Sac*I의 인식부위(밑줄 친 부분)를 삽입시켰다. PCR 수행 후 생성된 약 805 bp의 DNA 절편을 *Hind*III와 *Sac*I으로 절단하고 이것을 클로닝 벡터인 pSP72(Promega,

Madison, WI, USA)에 삽입시켜 pSP72[805]를 제작하였다. VSV가 숙주 세포안으로 들어가는데 관여하는 VSV-G 막단백질의 118번째부터 136번째까지의 epitope으로 알려진 19개의 아미노산은 GTWLNPGFPPQSCGYA TVT이며 이의 염기서열은 GGA/ACT/TGG/CTG/AAT/CCA/GGC/TTC /CCT/CCT/CAA/AGT/TGT/GGA/TAT/GCA/ACT/GTG/ACG이다. 이 epitope을 아데노바이러스 fiber의 3' 쪽 말단에 삽입하기 위하여 적당한 공간적 배치를 할 수 있도록 glycine 아미노산이 8개가 연속적으로 발현되는 연결 고리로 부착하였다. 이러한 형태의 DNA 단편을 pSP72[805]에 삽입시키기 위한 전 단계로서 연결고리를 포함한 VSV-G epitope의 서로 상보적인 5'쪽과 3'쪽 oligonucleotide를 제작하였다. 이때 5'쪽에는 *Bam*HI 제한효소 인식부위(고딕체 부분)를 삽입시키고 3'쪽에는 *Sac*I 인식부위(이탤릭체 부분)를 삽입시켜 다음과 같은 oligomer 를 합성하였다. 5'-**GA/TCC**/GGC/GGG/GGC/GGT/GGA/GGA/GGG/GGT/GGA/ACT/TGG /CTG/AAT/CCA/GGC/TTC/CCT/CCT/CAA/AGT/TGT/GGA/TAT/GCA /ACT/GTG/ACG/**TGA/GCT**-3'. 이 oligomer와 상보적인 염기서열을 가지는 oligomer를 DNA 합성기로 합성하고 37°C에서 5분간 방치하여 서로 합체되도록 한 뒤, *Bam*HI과 *Sac*I으로 절단하여 pSP72[805]에 삽입시켜 pSP72[805+VSVG]을 제작하였다. VSV-G epitope이 삽입된 pSP72[805+VSVG]를 *Hind*III와 *Eco*RI으로 절단하여 VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스의 fiber 부위를 얻은 뒤 이를 아데노바이러스 셔틀벡터인 pSK5543와 cloning하여 pSK[5543+VSVG]를 제작하였다(Fig. 2).

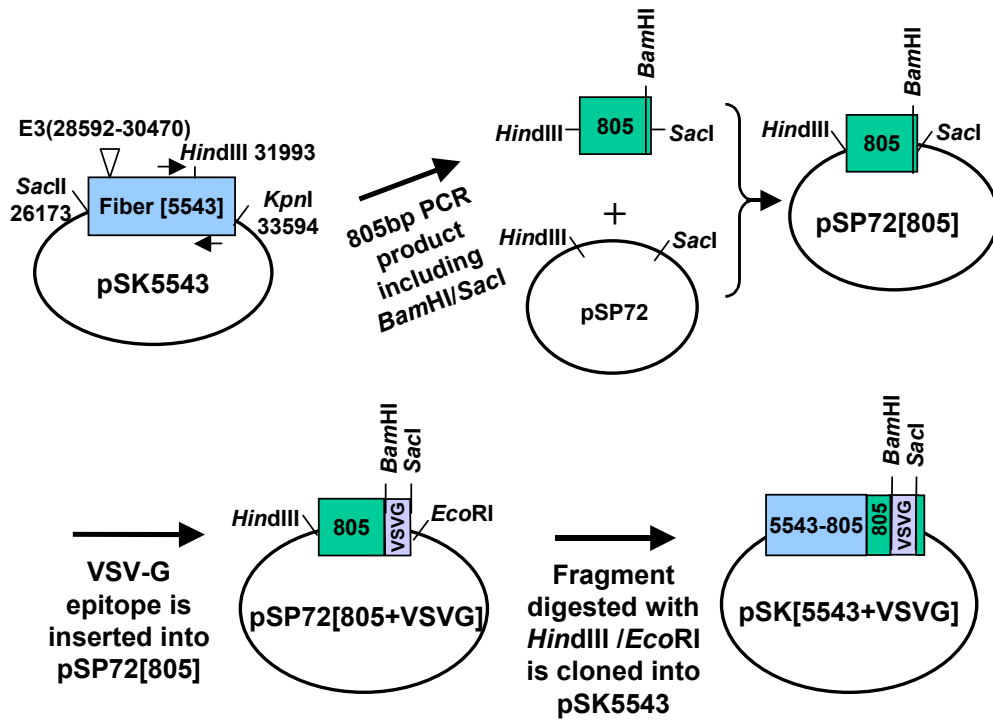


Fig. 2. Construction of VSV-G epitope incorporated Ad fiber shuttle vector. See Materials and Methods for details.

3. 암세포 특이적 살상 아데노바이러스 YKL-VSVG와 표지 유전자로 LacZ를 지니는 dl-LacZ-VSVG 바이러스의 제작

VSV-G epitope이 fiber 부위에 삽입된 복제가능 아데노바이러스를 제작하기 위해서, 아데노바이러스 type 5의 E1B 55KDa²⁷ 유전자가 소실된 종양 특이적 살상 아데노바이러스 벡터인 YKL-1을 바이러스 플라스미드로 이용하였다. YKL-1 벡터를 *SpeI* 제한효소를 처리하여 선형화하고 셔틀 벡터인 pSK[5543+VSVG]도 *XmnI* 제한효소를 처리하여 선형화한 뒤 이들을 함께 대장균 BJ5183에서 형질 전환시켜 상동재조합(homologous recombination)을 유도하여 YKL-VSVG 바이러스 벡터를 제작하였다. 형질 전환된 대장균을 배양한 뒤 이로부터 DNA를 수득하고 이를 대장균 DH5a에 다시 형질 전환시켜 DNA를 증폭한 후 PCR을 수행하여 VSV-G epitope의 삽입을 확인하였다. 상동재조합된 플라스미드 DNA는 *PacI*으로 절단한 뒤 아데노바이러스의 E1 유전자를 포함하는 293 세포주에 형질 전환하여 YKL-VSVG 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 생산하였다. VSV-G epitope이 fiber 부위에 삽입되고 LacZ를 표지 유전자로 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하기 위해서, 먼저 E1과 E3 유전자가 소실된 복제 불능 아데노바이러스인 dl324의 소실된 E1 부위에 표지 유전자 LacZ가 삽입된 바이러스 벡터인 dl-LacZ를 *SpeI* 제한효소를 처리하여 선형화하고 이를 fiber 부위에 VSV-G epitope이 삽입된 fiber 셔틀 벡터인 pSK[5543+VSVG]와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동재조합을 유도하여 dl-LacZ-VSVG 바이러스 벡터를 제작하였다. 제작된 dl-LacZ-VSVG는 상기한 방법과 동일한 방법으로 293 세포주에 형질 도입하여 아데노바이러스를 생산하였다. 재조합 아데노바이러스의 생성과 농축, 그리고 역가 결정은 293 세포주에서 실시하였다(Fig. 3).

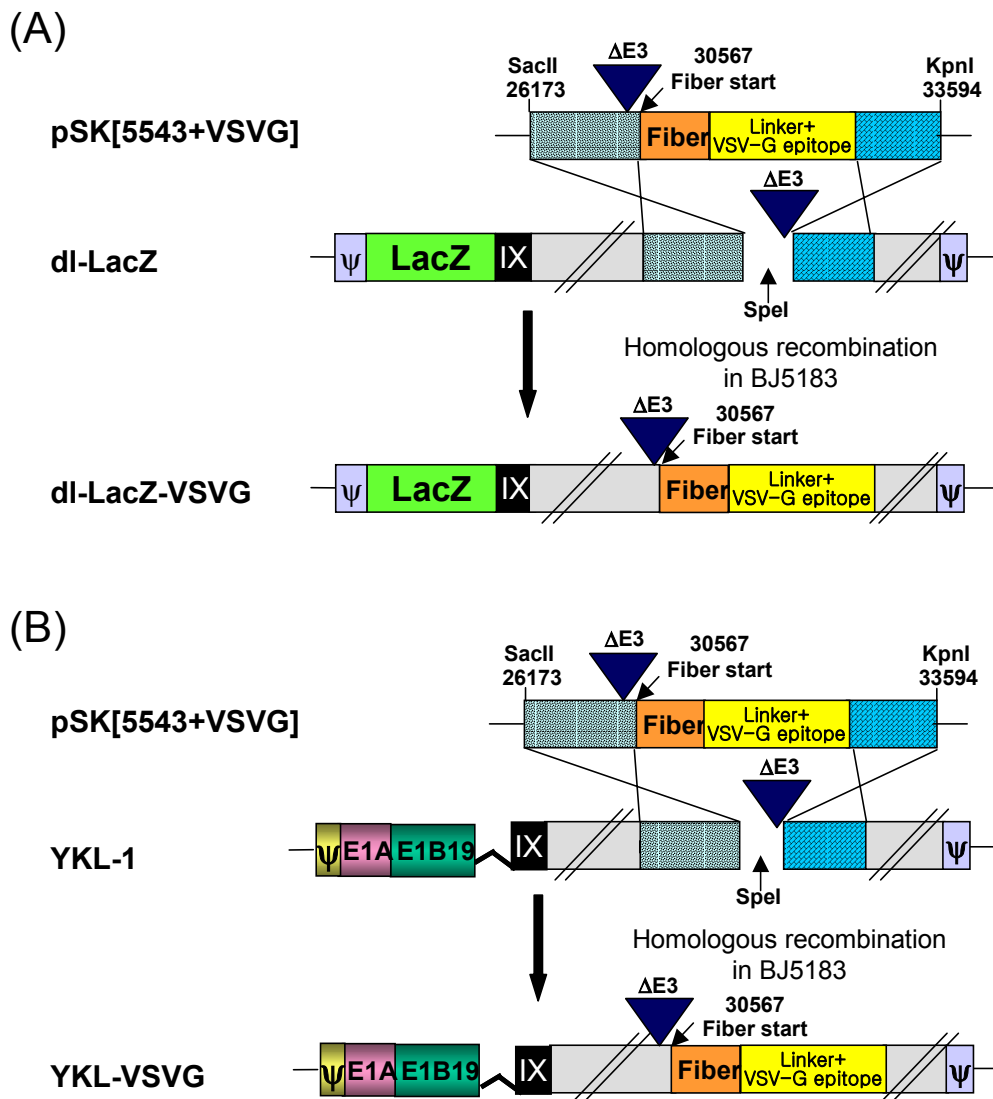


Fig. 3. Structure of the adenoviral vectors. All indicated Ad vectors are derived from full-length Ad genomes cloned and manipulated in *E. coli* as bacterial plasmids. VSV-G epitope incorporated Ades dl-LacZ and YKL-VSVG were generated by homologous recombination between pSK[5543+VSVG] shuttle vector and dl-LacZ or YKL-1 total plasmids, respectively, in *E. coli* BJ5183.

4. *In vitro* 유전자 전달 효율 비교 검증(β -galactosidase assay)

세포를 12-well plate에 분주하고 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-VSVG 바이러스로 감염시킨 뒤 이틀 후에 X-gal 염색을 시행하였다. 세포를 고정액(1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in dH₂O)에서 5분간 고정하고 PBS로 2회 씻은 후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactopyranoside(X-Gal; Life Technologies, Rockville, MD)이 포함된 염색 용액으로 37°C에서 12시간 동안 반응시켜 β -galactosidase의 활성을 관찰하였다. 또한 β -galactosidase 발현도를 정량화하기 위해 세포를 회수하여 세포 용해용 완충용액(50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 1% Nonidet P-40(NP-40), 150 mM NaCl, and 0.1 mM zinc acetate, protease inhibitors)으로 용해시키고 o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside(ONPG; Sigma, Deisenhofen, Germany)를 기질로 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. *In vivo* 유전자 전달 효율 비교 검증

약 6-8주된 수컷 누드 생쥐의 복벽에 종양세포 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 개를 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 150-200 mm³ 정도 성장하였을 때 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-VSVG를 5×10^8 plaque-forming unit(PFU)/50 μ l의 역가로 종양 내에 직접 주사하였다. 바이러스 투여 후 3일 뒤에 종양을 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에 넣은 뒤 4°C에서 4 ~ 8시간동안 고정시킨 후 30% sucrose 용액에서 12시간 정도 탈수시켰다. 탈수된 조직은 O.C.T. compound(Sakura Finetec, Torrance, CA)로 동결박편한 뒤 8 μ m의 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 X-gal 염색을 실시하였다.

6. Cytopathic effect 분석

종양 특이적 살상 아데노바이러스의 바이러스 복제에 따른 세포 살상능을 검증하기 위하여, 여러 종류의 암세포들을 24-well plate에 분주하고 24시간 후 YKL-1과 YKL-VSVG 바이러스를 여러 농도의 multiplicity of infection(MOI)로 처리하였다. 가장 낮은 MOI의 아데노바이러스로 감염된 세포에서 세포살상이 확인되면 (1% crystal violet, 50% methanol)으로 고정하고 염색하여 세포살상 효과를 비교 분석하였다.

7. MTT assay

바이러스 감염 후 시간에 따른 세포 살상능을 검증하기 위하여, 여러 종류의 암세포들을 24-well plate에 분주하고 24시간 후에 YKL-1 또는 YKL-VSVG 바이러스로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 일정시간 간격으로 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) 용액 200 μ l씩을 plate에 첨가하여 4 시간 동안 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 반응시킨 후 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C 에서 10분간 방치한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다.

8. VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스와 대조군 아데노바이러스의 바이러스 생산량 비교

293 세포주에 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-VSVG 바이러스를 각각 10 MOI로 감염시킨 후 24, 48, 72 시간에 바이러스를 수득하였다. 수득된 각각의 바이러스 생산량은 limiting titration assay²⁸⁻²⁹를 통해 측정하였다. 또한, YKL-1과 YKL-VSVG의 바이러스 생산량을 비교 검증하기 위해서 U251N 세포주에 이들 바이러스를 10 MOI로 각각 감염시킨 후 24, 48, 72

시간에 바이러스를 수득하여 아데노바이러스의 총생산량을 측정하였다.

9. YKL-VSVG의 생체내 항종양 효과 검증

약 6-8주된 수컷 누드 생쥐의 복벽에 종양세포 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 개를 피하 주사한 후 종양의 크기가 약 $60-80 \text{ mm}^3$ 정도 성장하였을 때 5×10^8 PFU/50 μl 의 종양 특이적 살상 아데노바이러스 YKL-1 또는 YKL-VSVG를 이틀 간격으로 다섯 번 종양 내에 직접 주사하였다. 종양의 용적은 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였으며, 통계학적으로 분석하여 종양세포 살상효과를 검증하였다. 종양의 용적 = (단축 mm)² x 장축 mm x 0.523.

III. 결 과

1. VSV-G epitope이 fiber 말단에 삽입된 아데노바이러스의 생산

재조합 아데노바이러스의 형질 도입율을 높이기 위한 방안으로 먼저, VSV-G epitope이 아데노바이러스의 fiber 말단에 삽입된 아데노바이러스 fiber 셔틀벡터를 제작하였다. VSV-G epitope을 아데노바이러스의 fiber 말단에 발현시키기 위하여 fiber 종결코돈을 glycine으로 바꾸고 적합한 공간적 배치를 할 수 있도록 8개의 glycine linker를 삽입하여 fiber 셔틀벡터 pSK[5543+VSVG]를 제작하였다(Fig. 2). 제작된 pSK[5543+VSVG] fiber 셔틀벡터는 LacZ를 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ 또는 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1과 각각 상동 재조합하여 dl-LacZ-VSVG와 YKL-VSVG를 제작하였다(Fig. 3). 이들 아데노바이러스의 fiber 말단에 VSV-G epitope이 제대로 삽입되었는지 확인하기 위해 VSV-G epitope을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, VSV-G epitope과 8 glycine linker가 포함된 약 103bp 정도의 DNA 절편이 대조군 바이러스인 dl-LacZ와 YKL-1에서는 생성되지 않는 반면 dl-LacZ-VSVG과 YKL-VSVG에서는 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로, 본 연구에서 제작된 dl-LacZ-VSVG과 YKL-VSVG 아데노바이러스의 fiber 말단에 VSV-G epitope이 삽입되었음을 알 수 있었다.

2. *In vitro* dl-LacZ-VSVG의 증가된 유전자 전달 효율

아데노바이러스의 fiber에 VSV-G epitope을 삽입하여 유도되어지는 대상 세포로의 감염 효율의 증가 여부를 규명하기 위하여, 표지 유전자로서 LacZ가 발현되는 dl-LacZ-VSVG 바이러스를 이용하여 여러 암세포로의

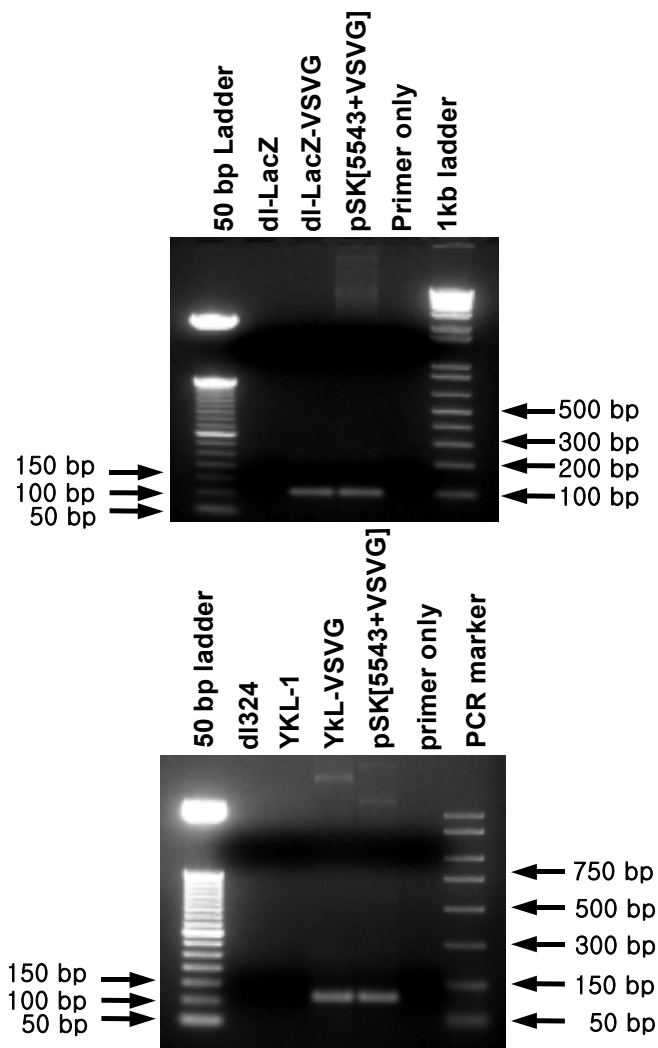
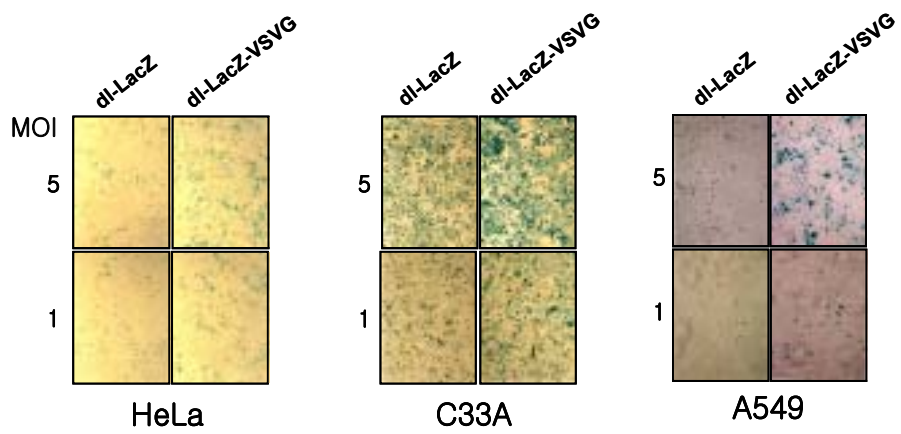
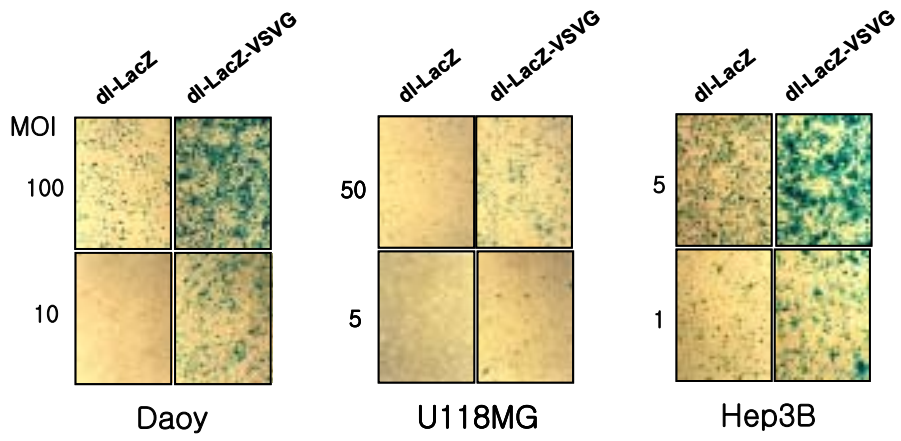
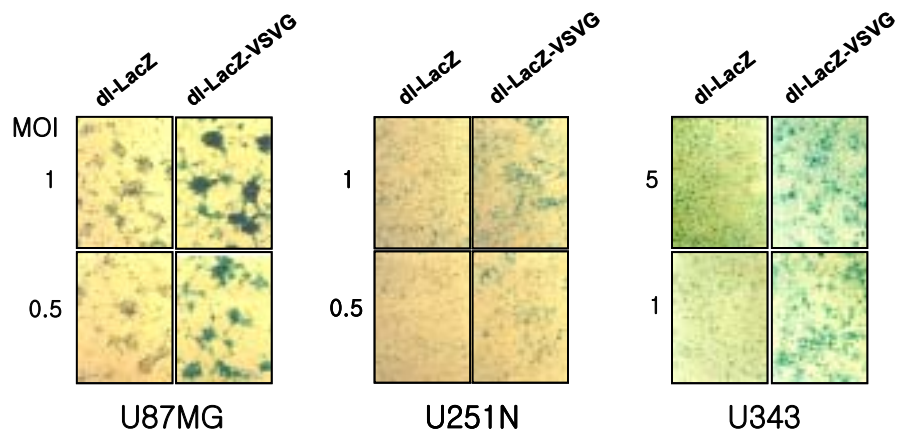


Fig. 4. The fiber genotype was confirmed by PCR amplification using a primer set specific for VSV-G epitope. PCR product of 103 bp was found in the PCR sample of VSV-G epitope incorporated viruses, dl-LacZ-VSVG and YKL-VSVG. As a positive control, pSK[5543+VSVG] was used.

유전자 전달 효율을 평가하였다. U343, U251N, U87MG, Daoy, A549, C33A, HeLa, Hep3B, CHO-K1, Pro5, Lec2 및 MCF7을 대상으로 대조군 아데노바이러스인 dl-LacZ 및 VSV-G epitope이 부착된 아데노바이러스인 dl-LacZ-VSVG를 각각 여러 다른 MOI로 감염시킨 후 이틀 뒤에 X-gal 염색을 실시하였다. 상기한 모든 세포주들에서 dl-LacZ-VSVG는 증가된 감염 효율로 인한 LacZ 유전자 발현 효율이 향상되었음을 알 수 있었다 (Fig. 5). 특히, 아데노바이러스의 native receptor인 CAR의 발현이 낮아 정상적인 아데노바이러스들에 의해 잘 감염이 되지 않는 CHO-K1, Pro5, 그리고 Lec2 세포주들에서도 CAR와의 결합에 의존하지 않고 세포막에 널리 발현되어 있는 PS를 통한 감염으로 유전자 전달 효율이 현저히 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 VSV-G epitope의 삽입에 의한 유전자 전달 효율의 증가를 정량화하기 위하여 각각의 바이러스로 감염된 U87MG, U251N, Daoy, HeLa, C33A, A549, CHO-K1, Pro5, Lec2 세포주에서 β -galactosidase 활성도를 측정하였다(Fig. 6). 상기한 모든 세포주들에서 dl-LacZ-VSVG 바이러스에 의한 감염효율의 증가로 인하여 LacZ 유전자 발현효율이 약 3~20 배정도 크게 향상되었다. 특히 CAR의 발현이 낮은 CHO-K1, Pro5, Lec2 등의 세포주들에서는 dl-LacZ로 감염된 경우 매우 낮은 β -galactosidase 활성이 관찰된 반면 dl-LacZ-VSVG로 감염된 세포는 20 배 이상 향상된 β -galactosidase 활성이 관찰되었다.

3. *In vivo* 유전자 전달 효율 비교 검증

dl-LacZ-VSVG의 생체내 유전자 전달 효율을 알아보기 위해 약 6-8주 된 수컷 누드 생쥐의 복벽에 U343 종양세포주를 피하 주사한 후 종양의



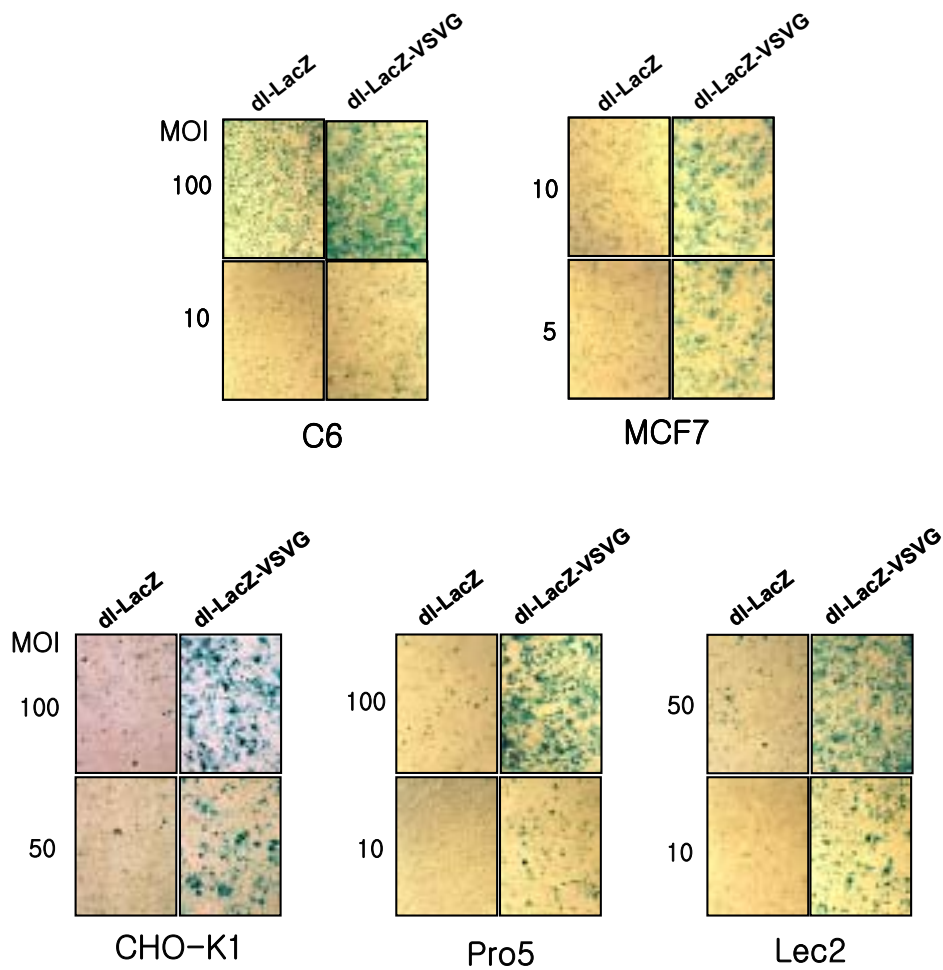


Fig. 5. Enhanced transduction efficiency of dl-LacZ-VSVG. Cells were transduced with dl-LacZ or dl-LacZ-VSVG Ad with different MOIs, as indicated besides the rows. At 48 h post infection (p.i.), the infected cells were analyzed for β -galactosidase expression by staining the monolayers with X-Gal.

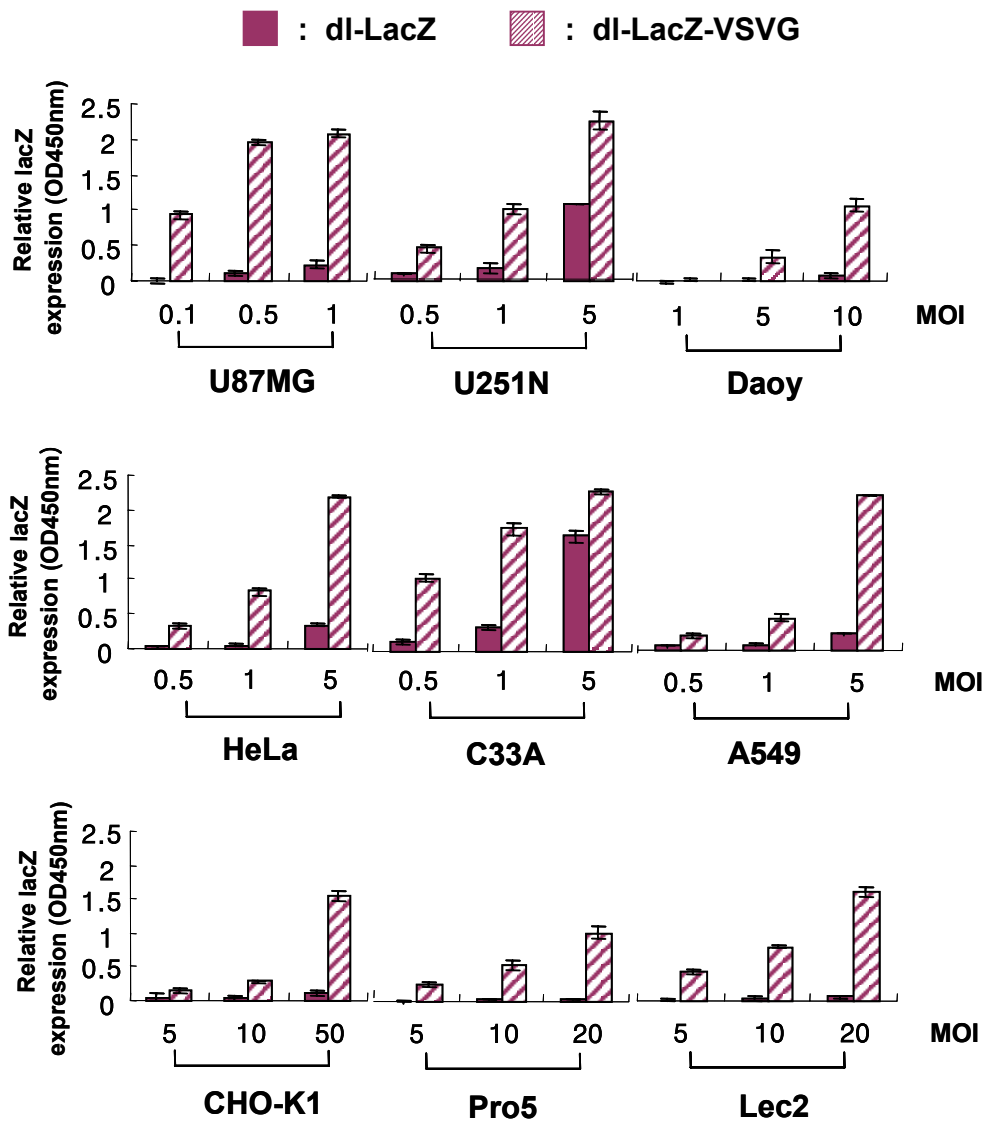


Fig. 6. Quantification of β -galactosidase activity. Cells were transduced with indicated MOIs of dl-LacZ (closed bar) or dl-LacZ-VSVG (hatched bar) Ad. At 48 h p.i., cell extracts were prepared and relative LacZ expression was determined by β -gal assay. All data are presented as the mean \pm SD of quadruplicate experiments and the results are representative of three independent experiments.

크기가 약 150-200 μm^3 정도 되었을 때 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-VSVG를 5×10^8 PFU/50 μl 의 역가로 종양 내에 직접 주사하였다. 바이러스 투여 후 3일 뒤에 종양을 적출하여 O.C.T. compound(Sakura Finetec, Torrance, CA)로 동결박편한 뒤 8 μm 의 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 슬라이드 글라스 위에 부착하여 X-gal 염색을 실시하였다. 그 결과 dl-LacZ가 투여된 조직의 경우 LacZ 발현도가 미약한 반면 dl-LacZ-VSVG가 투여된 조직의 LacZ 발현도는 dl-LacZ보다 현저히 높게 나왔다(Fig. 7). 이를 통해 생체내에서도 dl-LacZ-VSVG의 유전자 전달 효율이 크게 증가하였음을 알 수 있었다.

4. YKL-VSVG의 종양 세포 살상 능력의 비교

VSV-G epitope이 삽입된 종양 특이적 증식 가능 아데노바이러스의 암 세포에 대한 세포 살상능을 검증하기 위하여, 인체 종양세포주인 Hep3B, U251N, U343 들을 YKL-1 또는 YKL-VSVG 바이러스로 음성대조군인 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ와 함께 각각 0.1~10 MOI로 감염시키고 잔류 세포를 crystal violet으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰하였다. Fig. 8 에서 보듯이 dl-LacZ 아데노바이러스로 감염된 암세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상효과가 나타나지 않았으나, 복제가능 아데노바이러스인 YKL-1 또는 YKL-VSVG로 감염된 경우는 투여된 바이러스의 양이 증가함에 따라 세포 살상효과가 증가되었으며, VSV-G epitope이 fiber부분에 삽입된 YKL-VSVG의 경우는 본 실험에 사용된 U251N, Hep3B, U343 세포주들에서 YKL-1 보다 높은 살상능을 보였다. 바이러스 감염 후 시간에 따른 세포살상능을 검증하기 위하여, 여러 종류의 인체 암세포들을 dl-LacZ, YKL-1 또는 VSV-G epitope이 삽입된

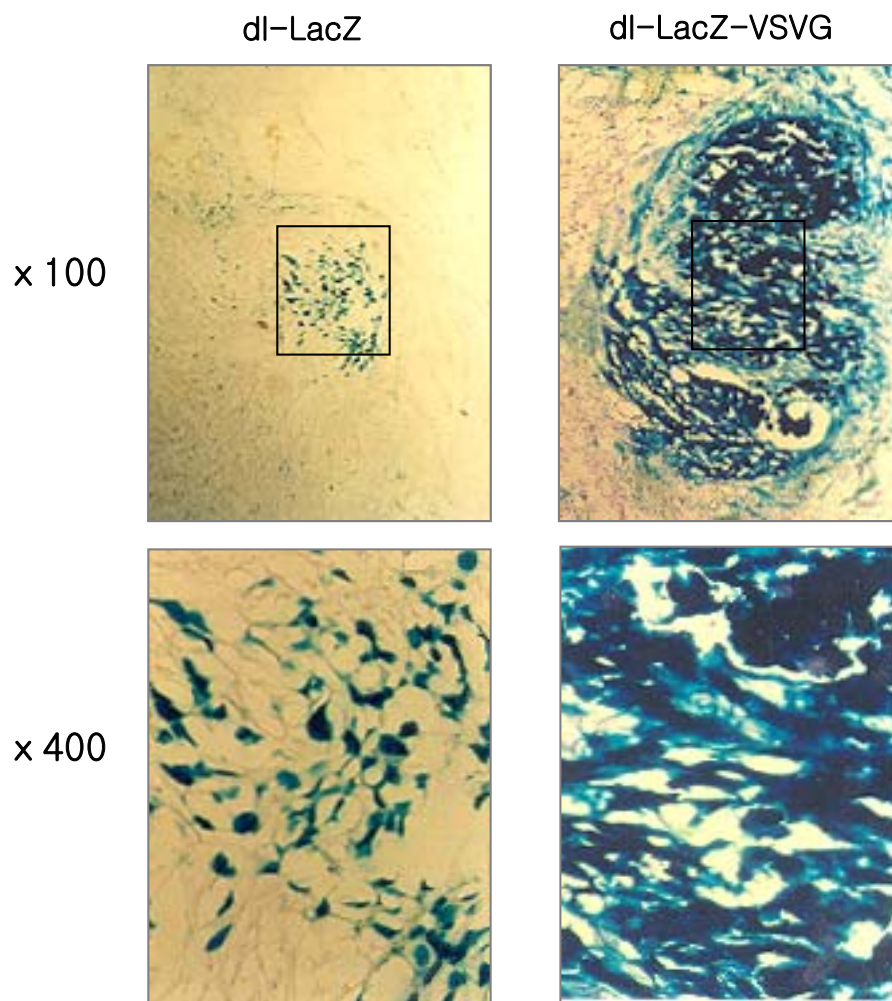


Fig. 7. Comparison of *in vivo* gene transfer efficiencies with X-gal assays. dl-LacZ and dl-LacZ-VSVG were injected into U343 tumor. At 72 hours after the gene transfer, tissue samples were fixed and the expression of β -galactosidase was detected using X-gal staining. Blue-staining cells represent positively transduced cells. Hematoxylin was used as a counter-stain.

YKL-VSVG로 감염시킨 후 일정시간 간격으로 세포 생존율을 측정할 수 있는 MTT 분석을 시행하였다. 인체 뇌암 세포주인 U251N과 U343 세포주는 5 MOI로 감염시켰으며, 인체 유방암 세포주인 MCF-7와 인체 뇌암 세포주인 U118MG는 각각 100 MOI로 감염시킨 뒤 MTT 분석을 시행하였다. 그 결과 Fig. 9 에서 보는 바와 같이 본 실험에 사용된 모든 세포주들에서 YKL-VSVG이 YKL-1에 비해 약 2-3 배정도 세포 살상능이 증가하였다. 이러한 결과들은 아데노바이러스 fiber 말단에 삽입된 VSV-G epitope에 의하여 세포 감염율이 증가되어 YKL-VSVG 바이러스의 세포 살상능이 향상되었음을 의미한다.

5. VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스와 대조군 바이러스의 바이러스 생산량 비교

VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스의 향상된 세포 감염율에 따른 아데노바이러스 생산량 변화를 검증하기 위하여, 293 세포주에 dl-LacZ 또는 dl-LacZ-VSVG 바이러스를 각각 10 MOI로 감염시킨 후 24, 48, 72 시간에 증식된 바이러스를 수득하였다. 배지로 방출된 바이러스와 세포내에 잔존한 아데노바이러스의 총생산량을 측정하기 위하여, 바이러스로 감염된 세포와 배지를 모두 수득한 뒤, limiting titration assay에 의해 바이러스의 총생산량을 정량하였다. 복제 불능 아데노바이러스인 dl-LacZ로 감염된 293 세포주에서의 바이러스 총생산량은 감염 후 48시간과 72시간에 각각 1.42×10^8 와 3.99×10^8 (PFU/ml)였으며, dl-LacZ-VSVG의 경우는 3.58×10^8 과 5.67×10^8 (PFU/ml)로, dl-LacZ-VSVG의 바이러스 총생산량이 야생형 fiber를 가진 dl-LacZ에 비하여 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 10A). 또한 U251N 세포주에 YKL-1과 YKL-VSVG를 10 MOI로 감

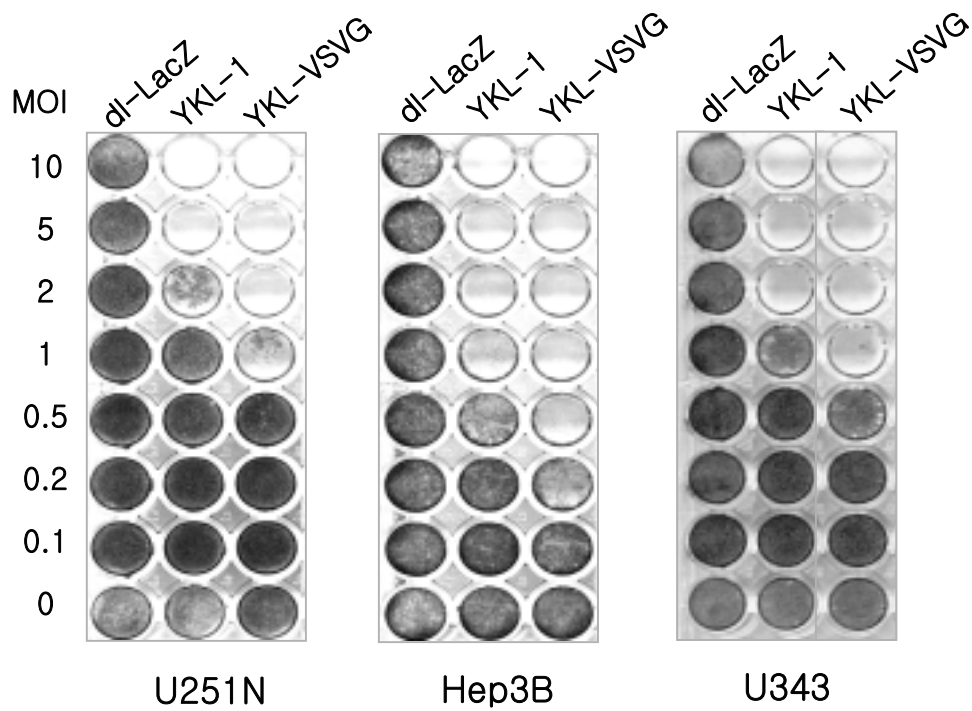


Fig. 8. Cancer cells were infected with dl-LacZ, YKL-1, or YKL-VSVG at different MOIs, as indicated. Replication-incompetent Ad dl-LacZ was served as a negative control. YKL-VSVG Ad cytolysed cancer cells better than its unmodified counterpart YKL-1.

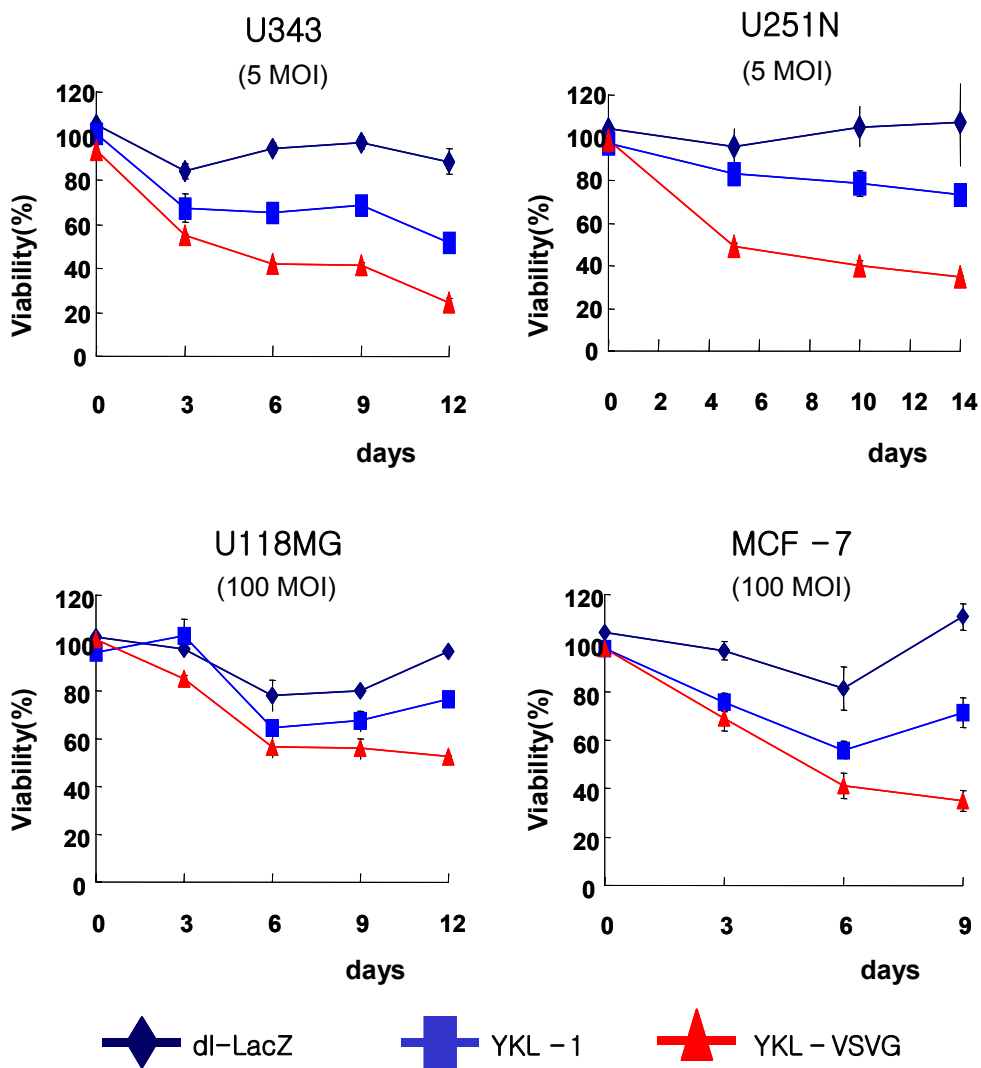


Fig. 9. Cancer cells were infected with indicated MOIs of dl-LacZ, YKL-1, or YKL-VSVG. At several days p.i., cell viability was evaluated by MTT assay. YKL-VSVG showed higher lytic potency than its unmodified counterpart YKL-1.

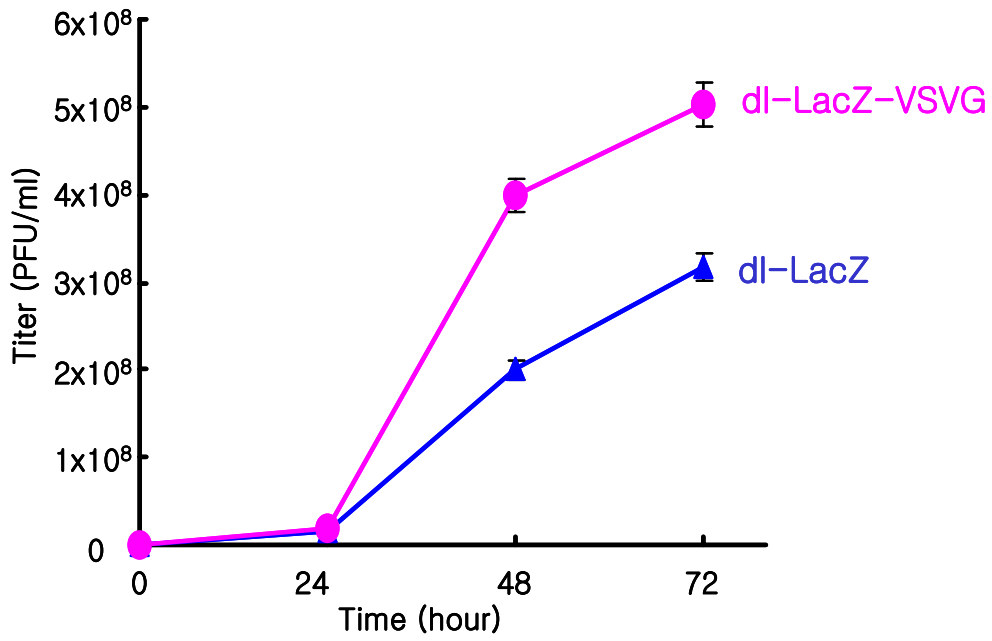
염시킨 후 24, 48, 72 시간에 증식된 바이러스를 수득하여 아데노바이러스의 총생산량을 비교 검증하였다. YKL-1의 경우 바이러스 감염 후 48시간과 72시간에 각각 2×10^6 과 2.52×10^6 (PFU/ml)의 바이러스가 생산되었고, YKL-VSVG의 경우는 2.52×10^6 과 3.99×10^6 (PFU/ml)의 바이러스가 생산되어, YKL-VSVG의 바이러스 총생산량이 대조군 복제 가능 아데노바이러스인 YKL-1에 비하여 증가하였다(Fig. 10B). 이러한 결과들에 의하여, VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스로 감염된 세포에서의 바이러스 생산량이 야생형 fiber를 가진 대조군 바이러스에 비하여 현저히 증가하였음을 알 수 있었으며, 이는 VSV-G epitope의 삽입에 따른 아데노바이러스의 감염을 증가와 이에 따른 바이러스 생산량 증가를 의미한다.

6. YKL-VSVG의 생체내 항종양 효과 검증

VSV-G epitope이 fiber 말단에 삽입된 YKL-VSVG와 대조군 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1의 생체내 항종양 효과를 비교 검증하기 위해서, 6-7 주령의 누드 생쥐의 복부 피하에 인체 뇌암 세포주인 U87MG를 접종하여 형성된 종양에 YKL-VSVG 또는 YKL-1을 각각 5×10^8 PFU/50 μ l로 이틀 간격으로 다섯 번 종양내 투여한 다음 종양의 크기를 관찰하였다(Fig. 11). 음성대조군인 PBS를 종양내 투여한 경우에는 종양의 크기가 시간이 지남에 따라 계속 성장하여 바이러스 투여 후 17일에는 U87MG 종양모델에서 약 933 ± 936 mm³로 크게 성장하였으나, YKL-VSVG 또는 YKL-1을 투여한 경우에는 종양의 성장이 현저히 억제되었다. 즉, YKL-VSVG를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 17일에 뇌암 모델에서 종양의 크기가 124 ± 208 mm³였으며, YKL-1은 146 ± 172 mm³으로, 이들 아데노바이러스의 뚜렷한 항종양 효과를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$). 또한, 야생형 fiber를 지닌 대조군 아데노바이러스인

(A)

Viral Titer (PFU/ml)		
Time (Hour)	dl-LacZ	dl-LacZ-VSVG
24	1.59×10^7	2.00×10^7
48	2.00×10^8	3.99×10^8
72	3.17×10^8	5.02×10^8



(B)

Viral Titer (PFU/ml)		
Time (Hour)	YKL-1	YKL-VSVG
24	1.26×10^6	1.59×10^6
48	2.00×10^6	2.52×10^6
72	2.52×10^6	3.99×10^6

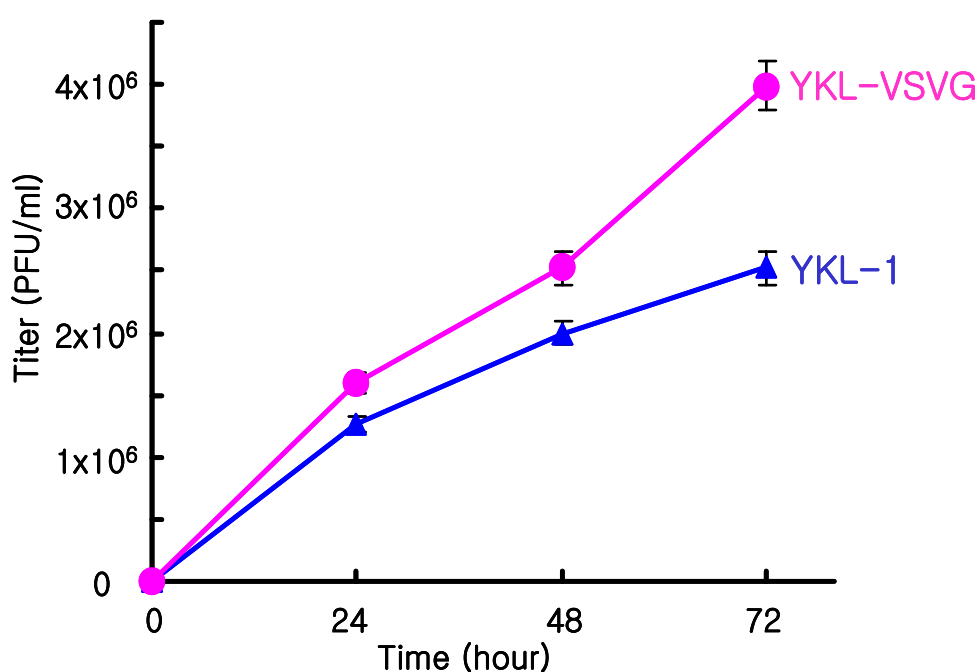


Fig. 10. Comparative growth curves of VSV-G epitope incorporated Ads (dl-LacZ-VSVG and YKL-VSVG) and their unmodified counterparts (dl-LacZ and YKL-1). 293(A) or U251N(B) cells were infected with the same input viral particles (MOI of 10) for 4 h at 37 °C, and then the total viruses were harvested at indicated times. Infectious titer of each sample was determined by limiting titration assay in 293 cell. Data shown are representative results of three independent experiments.

YKL-1를 투여한 경우(바이러스 투여 후 31일, $800 \pm 935 \text{ mm}^3$)보다, VSV-G epitope이 삽입된 YKL-VSVG를 투여한 경우(바이러스 투여 후 31일, $139 \pm 226 \text{ mm}^3$)에 보다 향상된 항종양 효과를 확인할 수 있었다.

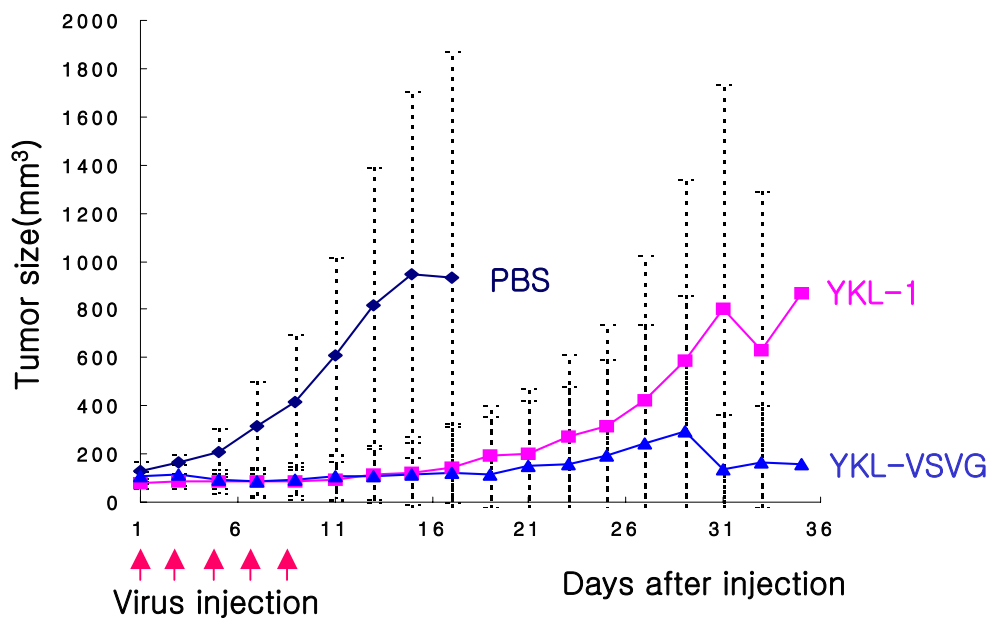


Fig. 11. U87MG tumor xenografts in nude mice were treated with intratumoral injection of 5×10^8 PFU/50 μ l of YKL-1, YKL-VSVG, or with PBS alone. Tumor growth was monitored on a 2- to 3-day interval. Data points represent the mean \pm SE of the tumor size in each group at the indicated time points (n=7). Treatment with YKL-VSVG showed more significant suppression in tumor growth.

IV. 고찰

재조합 아데노바이러스를 이용한 암유전자 치료가 장차 실질적인 치료 수단으로 부상하기 위해서는 효율적인 치료유전자 전달이 이루어져야 한다. 재조합 아데노바이러스는 다른 여러 유전자 전달체에 비해 생체내 유전자 전달이 우수한 장점이 있지만, 이들을 임상에 적용하기 위해서는 대상세포로의 형질 도입율을 개선시켜 유전자를 더욱 효과적으로 전달할 수 있는 바이러스 벡터의 개발이 필요하다. 재조합 아데노바이러스를 유전자 치료에 이용할 경우, 대상세포의 CAR 발현정도와 이들 세포로의 아데노바이러스의 형질 도입율간에 높은 상관관계가 있음이 밝혀졌다⁹⁻¹¹. 즉, CAR 발현정도가 높을수록 아데노바이러스의 감염율이 증가하고 이에 따른 형질 도입율이 증가하였다. 그러나 여러 종류의 종양세포에서는 CAR 발현이 낮거나 결손되어 있어 이들 세포로의 유전자 전달 효율은 낮을 수밖에 없다. 따라서 CAR의 발현이 미미하거나 결손되어 있는 이들 암세포로의 낮은 유전자 도입율을 극복할 수 있는 방안으로 아데노바이러스의 세포수용체인 CAR를 통하지 않고 세포를 감염시킬 수 있는 방안들이 모색되고 있는데, 이를 위해 본 연구에서는 VSV-G epitope을 retargeting motif로 이용하였다. 아데노바이러스의 fiber 말단에 세포표면의 PS를 인지할 수 있는 VSV-G의 19개 아미노산(epitope)을 삽입시켜 바이러스가 CAR를 통해서 뿐만 아니라 PS를 통해서도 세포내로 감염할 수 있게 할 수 있는 LacZ를 표지유전자로 발현하는 증식불능 바이러스인 dl-LacZ-VSVG와 암세포 특이적 증식 바이러스인 YKL-VSVG를 제작하였다.

VSV-G epitope이 삽입된 dl-LacZ-VSVG를 이용하여 유전자 형질 도입율을 검증한 결과, U87MG, U251N, U343, Daoy 등과 같은 PS 발현이 높다고 알려진 인간 뇌암 세포주들³⁰과 HeLa, C33A, A549 등의 다양한 인

체 암세포들에서 야생형 fiber를 가진 대조군 아데노바이러스인 dl-LacZ 바이러스에 비해 dl-LacZ-VSVG의 유전자 형질 도입율이 현저히 증가(약 3배 이상 증가)되었다. 특히 CAR 발현이 매우 낮은 CHO-K1, Pro5, Lec2 세포주들의 경우, dl-LacZ-VSVG에 의한 유전자 전달 효율이 CAR 발현이 비교적 높은 다른 세포주들에 비하여 현격히 증가하여(약 20배 증가), 바이러스 감염에 필요한 CAR에 대한 의존성이 크게 감소하였음을 알 수 있었다. 즉 이러한 결과는, 아데노바이러스 fiber 말단에 삽입된 VSV-G epitope과 세포막에 다량 발현되어있는 PS와의 결합에 의해 바이러스의 세포내 감염이 이루어질 수 있어, 아데노바이러스의 정상적인 감염경로인 CAR에 대한 의존성을 극복할 수 있음을 의미한다.

복제 불능 바이러스에서의 VSV-G epitope의 삽입에 의한 유전자 전달 효율의 향상은 복제 가능 바이러스인 YKL-VSVG의 세포 살상능 증가로 이어졌다. 증식 가능 아데노바이러스의 세포 살상능을 비교 검증할 수 있는 CPE assay와 MTT assay를 통하여, 야생형 fiber를 지닌 대조군 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 YKL-1에 비해 YKL-VSVG에 의한 세포 살상능이 월등히 우수함을 알 수 있었다. 또한, 생체내에서의 항종양 효과를 비교 검증한 실험에서도 YKL-VSVG의 항종양 효과가 YKL-1의 경우보다 더 우수함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 VSV-G epitope을 아데노바이러스 fiber 말단에 삽입시켜 CAR 뿐만 아니라 PS를 통하여서도 세포내 감염이 가능하여 아데노바이러스의 감염율이 증가되었고, 그 결과 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 암세포 살상능이 증가되어 이에 따른 생체내 항종양효과가 증대되었음을 의미한다. 한편 생체내 종양세포의 CAR 발현도는 종양이 성장함에 따라 점차적으로 낮아지는 것으로 사료되는데, 이러한 낮은 CAR 발현율에 따른 아데노바이러스의 감염율 감소로 나타날 수 있는 복제 가능 아데노바이러스의 항종양 효과 감소가 YKL-1

을 종양내 투여한 경우에 비해 YKL-VSVG를 투여한 경우에 그 감소 정도가 낮게 나타났다. 즉 YKL-1을 투여 받은 경우는, 바이러스에 의해 나타난 항종양효과로 크기가 감소되었던 종양이 바이러스 투여 후 약 30일 이후에 다시 증가하기 시작하였으나, VSV-G epitope이 삽입된 YKL-VSVG를 투여 받은 종양의 경우에는 항종양 효과가 훨씬 지속적으로 유지되었다. 이러한 결과는, YKL-VSVG 아데노바이러스의 경우는 낮은 CAR 발현의 제약을 극복할 수 있어 아데노바이러스의 감염율이 저하되지 않아 지속적인 항종양 효과가 나타난 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는, 아데노바이러스의 fiber 말단에 VSV-G epitope을 삽입한 재조합 아데노바이러스 dl-LacZ-VSVG와 YKL-VSVG를 개발하여, CAR를 통한 세포내 감염뿐 아니라 여러 종류의 세포막에 다량 발현되어 있는 PS를 통한 세포내 감염에 따른 다양한 종류의 세포들로의 유전자 전달 효율 증가와 복제 가능 아데노바이러스의 현저한 세포 살상능 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 본 연구에서 개발된 VSV-G epitope이 삽입된 재조합 아데노바이러스들이 CAR 수용체에 의존적인 세포내 감염에 따른 제한점을 극복할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에서 개발된 VSV-G epitope이 삽입된 아데노바이러스의 유전자 전달 효율과 세포 살상능 증가는 결과적으로, 유전자 치료에 필요한 바이러스 투여량을 줄일 수 있고 이에 따라 바이러스에 의해 야기될 수 있는 독성과 면역반응을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 이는 궁극적으로 CAR 발현에 의존적인 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료효과의 한계를 극복할 수 있어, 암 유전자치료에 보다 더 안전하고 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Mittereder N. et al. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996;70:7498-7509
2. Descamps V. et al. Strategy for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J Mol Med* 1996;74:183-189
3. Runnebaum IB. Basics of cancer gene therapy. *Anticancer Res* 1997;17:2887-2890
4. Bergelson JM. Receptors mediating adenovirus attachment and internalization. *Biochem Pharm* 1999;57:975-979
5. Guadalupe Bilbao. et al. Improving adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Tumor Targeting* 1998;3:59-79
6. Krasnykh VN, Douglas JT, van Beusechem VW. Genetic targeting of adenoviral vectors. *Mol Ther* 2000;1:391-405
7. Nemerow GR. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 2000;274:1-4
8. Nemerow GR. Role of av integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Micro and Mol Bio Rev* 1999;63:725-734
9. Nalbantoglu J, Pari G, Karpati G, Holland PC. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther* 1999;10:1009-1019
10. Pickles RJ, McCarty D, Matsui H, Hart PJ, Randell SH, Boucher RC. Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated

- airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J Virol* 1998;72:6014-6023
11. Hidaka C, Milano E, Leopold PL, Bergelson JM, Hackett NR, Finberg RW, Wickham TJ, Kovesdi I, Roelvink P, Crystal RG. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* 1999;103:579-587
 12. Zabner J, Chillon M, Grunst T, Moninger TO, Davidson BL, Gregory R, Armentano D. A chimeric type 2 adenovirus vector with a type 17 fiber enhances gene transfer to human airway epithelia. *J Virol* 1999;73:8689-8695
 13. Stecher H, Shayakhmetov DM, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2001;4:36-44
 14. Wickham TJ et al. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 1997;71: 8221-8229
 15. Reynolds PN et al. Insertion of an RGD motif into into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther* 1999;6:1336-1339
 16. Koizumi N. Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568:13-20
 17. Wickham TJ et al. Adenovirus targeted to heparan-containing

- receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. Nat Biotech 1996;14:1570-1573
18. Bouri K, Feero WG, Myerburg MM, Wickham TJ, Kovesdi I, Hoffman EP, Clemens PR. Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. Hum Gene Ther 1999;10:1633-1640
 19. Dmitriev I et al. Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cell. J Virol 2000;74:6875-6884
 20. Michael SI, Hong JS, Curiel DT, Engler JA. Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. Gene Ther 1995;2:660-668
 21. Kirby I et al. Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. J Virol 1999;73:9508-9514
 22. Krasnykh VN et al. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. J Virol 1996;70:6839-6846
 23. Krasnykh VN et al. Genetic targeting of adenoviral vectors. Mol Ther 2000;1:391-405
 24. Miller C.R., Buchsbaum D.J., Reynolds P.N., Douglas J.T., Gillespie G.Y., Mayo M.S., Raben D., and Curiel D.T. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor

- receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res* 1998;58:5738-5748
25. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11400-11406
 26. Hall M.P, Burson K.K, Huestis W.H. Interactions of a vesicular stomatitis virus G protein fragment with phosphatidylserine: NMR and fluorescence studies. *Biochim Biophys Acta* 1998;1415:101-113.
 27. Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO, Choi J, Yun CO, Kim BS, Kim JH. Oncolytic potential of E1B 55 kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: correlation with p53 functional status. *Int J Cancer* 2000;88:454-463
 28. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996;70:7498-7509
 29. Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nature Med* 1997;3:808-811
 30. Lee H., Song J.J., KIM E., Yun C.O., Choi J., Lee B., Kim J., Chang J.W., and Kim J.H. Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor. *Gene Ther* 2001;8:268-273.

Abstract

Effects of VSV-G epitope incorporated replicating adenovirus on the efficiency of gene transfer and cytopathic ability

Eun-A Cho

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

(Directed by Professor Joo-Hang Kim)

Recombinant adenovirus has become the choice of vector system for cancer gene therapy. However, the utility of adenoviral vectors has been limited due to the low efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to cancer cells, which express low level of CAR on their surface. By developing strategies to achieve adenovirus infection via alternate receptor pathway, enhanced and more specific gene delivery can be achieved. To increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to cancer cells, we generated novel recombinant adenoviruses, dl-LacZ-VSVG and YKL-VSVG, which contain a fiber knob with intact CAR-entry capability and an additional PS-entry capability by incorporating the VSV-G epitope onto the C-terminus of the fiber knob. VSV-G is an envelop protein of VSV that facilitates the specificity for the binding of the virus to a PS-moiety on the cellular plasma membrane. In this study, we show that dl-LacZ-VSVG substantially increased the gene transfer efficiency in a variety of cancer cells

including CAR-deficient cells. The largest improvement of gene transfer was observed for the cells that were difficult to transduce with untargeted Ads. In addition, we demonstrate that the oncolytic potential of YKL-VSVG was greatly improved by enhanced infectivity. Furthermore, treatment with YKL-VSVG significantly suppressed tumor growth in xenograft tumor model when compared with control adenovirus that lacks VSV-G epitope. Taken together, these studies demonstrate that the strategy to extend adenovirus tropism may greatly improve utilities of adenovirus for gene therapy application.

Keyword : Adenovirus, Gene therapy, CAR, VSV-G epitope, Adenovirus fiber