

shTGF β 2 와 shDaxx 를 발현하는
아데노바이러스의 항 종양 효과

연세대학교 대학원
의과학과
김 은 경

shTGF β 2 와 shDaxx 를 발현하는
아데노바이러스의 항 종양 효과

지도교수 김 주 항

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함


2014년 6월


연세대학교 대학원


의과학과

김 은 경

김은경의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 주 항 인 

심사위원 송 재 진 인 

심사위원 박 전 한 인 

연세대학교 대학원

2014년 6월

감사의 글

졸업을 앞두고 감사의 글을 쓰려니 처음 암 연구소에 들어왔던 때가 기억이 납니다. 많이 낯설었지만 많은 분들의 도움으로 제가 무사히 졸업까지 할 수 있었습니다. 너무 감사한 분들이 많은데, 먼저 많이 부족한 저를 학생으로 받아주시고, 좀더 넓은 학문의 길로 들어설 수 있게 기회를 주신 김주향 교수님께 정말 감사 드립니다. 실험에 대해 잘 모르던 저에게 실험에 대한 방향을 잡아주시고, 저의 부족한 부분에 대해 충고와 칭찬으로 실험에 흥미를 가질 수 있게 도와주신 송재진 교수님께 정말 감사 드립니다. 제 논문을 심사하시면서 제 연구 방향에 대한 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 박전한 교수님께도 감사드립니다. 암 연구소에서 생활을 시작할 때 많은 걱정과 염려가 앞섰지만 좋은 사람들을 만나서 많이 배우고, 재미있게 실험할 수 있었습니다. 물어보는 모든 것마다 친절하고 자세하게 많은 것을 설명해 주고 마음이 따뜻한 소영언니, 실험실에 와서 저에게 실험을 가르쳐주고, 적응할 수 있게 도와준 세은 언니, 귀엽고 늘

웃는 얼굴이었던 지나 언니, 활발한 수진언니, 같이 동기로 들어와서 새 생활에서 많이 의지되고 힘이 되었던 승하, 막내로써 함께 일하고, 마음이 따뜻하며 사랑스러운 수연이, 실험에 대한 이야기를 나누고 조언도 많이 해주신 동욱 선생님, 조용하고 성실하신 철수 선생님 까지 모두에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 저의 의견을 가장 먼저 존중해주고, 한없는 사랑과 물심양면으로 딸을 응원해준 부모님께 정말 감사하고 사랑합니다. 그리고 동생한테도 고맙고 사랑합니다. 암 연구소에서 보낸 시간 속에서 많은 것들을 배울 수 있었고, 좋은 추억을 쌓으며, 한층 성숙하게 될 수 있었습니다. 이 곳에서의 경험을 토대로 더 큰 세상에서 많은 것을 배우고 이루는 사람이 되도록 노력하겠습니다.

김은경 씀

차례

국문 요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	10
1. 세포 배양	10
2. 바이러스 제작 및 생산	10
3. 효소결합면역흡착검사 (ELISA)	12
4. Western blot	13
5. Virus replication (post-infection).....	14
6. MTT assay	15
7. 군락 형성 분석 (Clonogenic assay)	15
8. In vivo mouse model 로 항 종양 효과 확인	16
9. 조직 염색	17
10. 통계 처리	18

III. 결과.....	19
1. 정상 췌장 세포와 여러 췌장암 세포에서의 TGF- β 1, TGF- β 2 단백질 측정	19
2. HPAC 와 BxPC3 세포에서shTGF- β 1, shTGF- β 2 아데노바이러스 감염에 의한 암세포 생존 측정	24
3. 췌장암 세포에서 단·장기간의 세포 생존에 있어 세포 안의 변화	27
4. shDaxx 의 아데노바이러스의 복제, 생성에 미치는 효과 확인	30
5. TGF- β 2 와 Daxx 의 두 가지 모두 발현을 감소시키는 아데노바이러스 제작 및 효과 확인	31
6. 생체 내 에서 항 종양 효과 확인	38
IV. 고찰	43
V. 결론	51
참고문헌	53
영문요약	60

그림 차례

그림 1. 정상 췌장세포, HPAC, MiaPaCa-2, BxPC3 췌장암 세포의 TGF β 1와 TGF β 2양 측정	20
그림 2. shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염시킨후 단 · 장기간 암세포 생존능 확인	21
그림 3. shTGF β 2 아데노바이러스 감염 시 ERK 와 Akt 의 신호 전달 변화.....	26
그림 4. shDaxx 가 아데노바이러스의 구조단백질 발현과 생성에 미치는 효과 확인	29
그림 5. shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스 효과 확인..	34
그림 6. 아데노바이러스의 생체 내 효과 확인.....	41

국문 요약

shTGF β 2 와 shDaxx 를 발현하는 아데노바이러스의 항 종양 효과

TGF β (transforming growth factor β)는 정상세포와 초기 종양세포에서는 종양을 억제하는 역할을 하지만, 종양이 점차 자라면서 종양의 성장을 촉진하는 방향으로 그 기능이 바뀌고, Daxx (death-associated protein 6)는 아데노바이러스 감염시 아데노바이러스 복제에 부정적인 역할을 한다. 췌장암 세포에 TGF β 2의 발현량을 감소시켜 암세포의 성장 및 증식을 억제하는 동시에 Daxx의 발현량을 감소시켜 아데노바이러스의 복제 증가를 통해 항종양 효과를 더욱 개선시키고자 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 정상 췌장 세포에 비해 췌장암 세포에서 TGF β 2의 발현양이 늘어났기 때문에 췌장암 세포에서 TGF β 2 shRNA (shTGF β 2) 아데노바이러스를 이용하여 TGF β 2 단백질의 양을 감소시키는 것이 필요했고, 실제 shTGF β 2 아데노바이러스를 췌장암 세포에 감염시켰더니 TGF β 2가 효과적으로 감소된 것을 관찰할 수 있었다. shTGF β 2 아데노바이러스가 암세포의 생존 및 증식을 억제시키는지 확인해 보기 위해서 MTT assay, 군락형성분석(clonogenic assay) 실험을 진행하였다. MTT assay 결과 TGF β 2의 양을 감소시켰더니 HPAC 세포에서 shTGF β 2 아데노바이러스가 대조군 바이러스에 비해서 유의성있게 암세포의 생존이 감소되었지만 BxPC3

세포에서는 shTGF β 2 아데노바이러스가 암세포의 생존과 증식을 감소시키지는 못했다. 그러나 군락형성분석(clonogenic assay)실험에서는 두 가지 췌장암 세포주 모두에서 shTGF β 2 아데노바이러스를 감염시켰을 때 군락형성이 감소되는 것을 확인하였다. 단기간의 암세포 생존을 확인해 보는 MTT assay 결과와 장기간의 암세포 생존을 확인해 볼 수 있는 군락형성분석의 결과가 달랐기 때문에 그 이유를 알아보기 위해서 시간대 별로 세포를 얻어 시간에 따른 세포내 신호 전달의 변화를 보고자 western blot 을 시행하였다. 시행한 결과 2 일이라는 단기적 시간에는 p-ERK, p-Akt 밴드가 나타났다. 그렇지만 시간이 지나면서 p-ERK, p-Akt 밴드가 사라지게 되면서 장기간의 암세포 생존을 줄이는 효과를 보였다. 한편 Daxx shRNA (shDaxx) 아데노바이러스를 이용하여 BxPC3 세포에 Daxx 의 발현량을 감소시켰더니 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질인 E1A 의 발현이 증가되었고, 생산도 증가된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 HPAC 세포에서는 세포내 Daxx 단백질의 양이 적어 그러한 효과를 확인할 수 없었다. shTGF β 2 와 shDaxx 를 함께 넣은 바이러스를 두 가지 췌장암 세포주에 감염시켰더니 TGF β 2 와 Daxx 모두의 발현량이 감소하였다. 세포증식 억제 및 군락형성에 신호전달에는 생체 내에서는 어떠한 효과를 보이는지 확인해 보고자 동물실험을 진행하였을 때 shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 3 가지 아데노바이러스 모두 마우스의 종양의 크기를 줄이는 효과를

보였다. 그러나 HPAC 세포를 이용한 생체 내 실험에서 3 가지 바이러스 간의 차이는 보기 힘들었다.

그렇지만 생체 외 실험을 진행해 본 결과 BxPC3 세포에서는 shDaxx 아데노바이러스가 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질인 E1A 의 증가와 생산을 증가 시킬 수 있었기 때문에 shTGF β 2 로 인한 항 종양효과와 아데노바이러스의 복제 및 생산을 증가시켜 더욱 더 항 종양 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다. 앞으로 이것을 동물실험으로 입증하는 것이 필요하겠다.

핵심 되는 말 : TGF β 2, Daxx, oncolytic adenovirus, ERK, Akt, Antitumor

shTGF β 2 와 shDaxx 를 발현하는

아데노바이러스의 항 종양 효과

< 지도교수 김 주 향 >

연세대학교 대학원 의과학과

김 은 경

I. 서론

암의 치료에는 외과적 수술로 상당한 종양을 제거할 수 있지만, 수술만으로 완벽하게 암을 치료할 수 없기 때문에 보통 방사선요법 또는 화학요법과 병행하여 치료해 왔다. 하지만 이러한 요법에는 암세포뿐만 아니라 정상 세포에게도 영향을 주는 부작용들이 있기 때문에 현재 암 치료에 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 요즘은 유전자 치료 와 면역 치료가 주목 받고 있다. 유전자 치료란 질병의 치료나 치료

모델을 개발하기 위해 유전자 또는 유전자가 삽입된 세포를 사람의 체내로 투입하는 방법을 말한다. 유전자 치료에서 중요한 것은 유전자를 정확하게, 효율적으로 전달하는 것이다. 이에 따라 유전자의 전달 방법에 대한 많은 연구가 진행되었다. 유전자를 세포 내로 전달하기 위한 벡터는 크게 비바이러스성 벡터와 바이러스 벡터의 두 부분으로 나눈다. 바이러스 벡터는 비바이러스성 벡터에 비해 유전자 전달 효율이 높고, 바이러스 증식 기전으로 인해 유전자가 계속 발현된다는 장점을 가진다. 그 중 아데노바이러스 벡터는 포유동물세포를 감염시킬 수 있는 벡터로써 이용되는데, 이는 높은 농도로 만들기 쉽고, 세포 핵 내에서 염색체와 결합하지 않으므로 돌연변이의 가능성도 적어 생체에 적용하기 쉽다는 장점들이 있다. 특히, 아데노바이러스는 암세포만 특이적으로 증식이 가능하다는 연구가 있다^{1,2}. 아데노바이러스 벡터의 암세포 특이성은 암세포 선택적 복제에 관여하는 유전자로 알려진 E1A 와 E1B 때문이다. E1A 는 세포주기를 조절하는 pRb 와 결합하여 세포 주기를 S 주기로 가게 하여, DNA 복제와 관련된 단백질들을 아데노바이러스가 복제에 이용하게 함으로써 세포 내에서 아데노바이러스가 증식할수 있게 한다 . E1B 단백질은 E1B55kDa 와 E1B19kDa 두 종류의 단백질을 통칭하는 말인데, 이 중 E1B55kD 는 대표적인 암 억제 유전자인 p53 과 결합하여 그 기능을 불활성화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{4,5}. 그러나 p53 은 사람의 종양에서 50% 정도 유전자 변이가 일어난 것으로 확인되었다⁶. 이 때문에 E1B55kDa 가 결손된 아데노바이러스를 유전자 전달체로 이용할 경우, 정상세포에서는 p53 단백질이 정상적으로 활성화 되어서 바이러스 증식이 되지 않지만, p53 의 변이가 된 암세포에서는 p53 이 제대로 역할을 하지 못하므로 아데노바이러스가 증식할 수 있어서 p53 결손된 암세포만

특이적으로 사멸하게 되는 것이다. 아데노바이러스 벡터를 통해 특정 유전자의 발현을 감소시키기 위해서 small interference RNA (siRNA)를 이용하게 된다. siRNA는 특정 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는데, 이는 이중 가닥의 Pre-mRNA가 Dicer라 불리는 효소에 의해 이중가닥의 RNA가 절단되면서 만들어진다⁷. 이렇게 생성된 miRNA는 helicase에 의해서 두 가닥으로 분리되며, 그 중에서 antisense 가닥이 RNA induced silencing complex (RISC)의 도움으로 목표 mRNA에 결합함으로써 단백질의 발현을 억제하는 데 도움을 준다⁸.

TGF β (transforming growth factor β)는 정상 세포의 성장, 분화⁹, 면역 활성화 등 세포내의 여러 가지 생물학적 영향을 조절하는 사이토카인이다^{10,11}. TGF β 는 정상세포, 초기 종양 세포에서와 후기 종양 세포에서의 역할이 다르다. 정상세포, 초기 종양 세포에서 TGF β 는 세포의 분화를 억제하고 세포 자살을 억제하는 역할을 한다. 그러나 후기 종양세포에서 TGF β 는 종양세포 성장, 분화 유도, 암세포의 증식, Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)를 돕는 역할로 그 기능이 바뀌게 된다^{12,13,14}. TGF β 가 이러한 역할을 하는 것은 암세포 내에서 여러 기전들이 변화되어 일어나는 일이다. 초기종양세포에서 TGF β 는 NF- κ B^{15,16}, PI3K/Akt 신호의 활성을 조절하게 되어 종양의 증식과 생존을 억제하지만, 종양이 점차 자라면서 TGF β 는 신호전달의 조절 장애를 유도하게 되어 종양세포의 생존을 촉진시키게 된다. 실제 유방암, 전립선암과 간암 등의 후기 암에서 증가된 TGF β 가 NF- κ B 활성을 유도시켜 암세포 생존과 관련한 유전자들의 발현을 유도하게 된다^{17,18,19}.

여러 후기 암 환자들에서 TGF β 의 발현이 높게 나타나고, 특히 TGF β 의 여러 아형중 TGF β 2는 후기 위암과 췌장암에서 발현량이 높게

나타난다²⁰. 이처럼 후기 암에서 높은 TGF β 발현량은 환자의 좋지 않은 예후와 관련이 있다. 실제 임상 실험 결과를 보면 유방암, 피부암, 췌장암 환자에서 암이 많이 진행된 환자일수록 TGF β 분비량이 증가되고, 이러한 점이 환자의 좋지 않은 생존률과도 관련이 있다는 보고가 있다^{21,22,23}. 실제 환자에서 TGF β 발현량이 높아 환자의 생존률이 좋지 않기 때문에 후기 암환자에서 TGF β 발현량을 억제시키면 암세포의 성장 및 증식을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다. 여러 가지 방법으로 TGF- β 신호전달을 억제하는데, TGF β 수용체를 렌티바이러스를 이용하여 저해시켜 TGF β 신호전달을 억제하였을 때 유방암과 결장 암세포에서 암세포의 성장과 전이가 억제되었다²⁴. 또한 TGF β 항체를 이용하여 암세포의 성장을 억제시키기도 하는데²⁵, 유방암, 뇌종양 등 여러 가지 암에서 항체로 TGF β 의 신호 전달을 억제시켰을 때 암세포의 성장이 감소되었다^{26,25}. 현재 임상 실험에서도 TGF β 를 억제하는 여러 가지 약물들이 사용되고 있다. TGF β 2를 타겟하는 antisense 올리고뉴클레오타이드인 Trabedersen(AP12009)는 TGF β 2의 발현량이 많은 Pancreatic ductal adenocarcinoma(PDAC)에서 생체 외 실험을 진행해 보았을 때 췌장암 세포의 전이, 성장, 혈관 생성 등을 억제한다는 것이 밝혀졌고, 생체 내 실험에서도 그 효과가 증명되었다^{27,28}. 실제 후기 PDAC 환자들에게도 정맥주사로 Trabedersen(AP12009)을 주입하여 보니 환자의 전반적인 생존률이 평균 13.4 달 증가하였고, 임상실험을 진행한 환자들 중 전이가 많이 진행되었던 한 환자는 완전한 반응을 보이는 결과를 보였다²⁹. 이렇듯 TGF β 를 억제하는 것은 암세포의 생존, 증식을 억제시킬 수 있으며, 또한 이것은 실제 암환자에게도 환자의 생존률을 증가시킬 수 있다는 것이 보고되었다. 최근, 실험실에서 shTGF β 2 아데노바이러스를

이용하여 TGF β 2 mRNA 발현을 감소시켜 보았다. shTGF β 2 아데노바이러스는 TGF β 2 mRNA 발현뿐만 아니라 TGF β 1 의 mRNA 발현까지 현저하게 감소시켰다. 이로써 하나의 TGF β 2 mRNA 의 억제가 다른 TGF β 아형에도 영향을 미치는 것을 확인하였다³⁰. 이와 같은 결과들을 종합해 보았을 때, TGF β 2 의 발현을 억제하였을 때 항 종양 효과가 나타날 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 TGF β 2 를 저해하는 shRNA 를 발현하는 아데노바이러스를 제작하여, 항 종양 효과를 확인하고자하였다.

Death domain associated (Daxx) 단백질은 세포질과 핵 안의 Promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear body (NBs) 에 존재하고, 세포에서 여러 가지 물질들과 결합함으로써 역할을 한다고 알려져 있는 단백질이다^{32, 33}. 먼저 Daxx 는 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다. Daxx 의 C-terminal 부분은 Fas 와 결합하고, 나머지 부분이 Jun N-terminal kinase (JNK) pathway 와 결합하여 세포 고사를 유도한다³⁴. 또한 Daxx 는 바이러스의 복제에 관여하는 것으로 알려져 있다. Daxx 는 아데노바이러스의 복제에 부정적인 조절자인 것으로 알려져 있다³⁵. shRNA 로 Daxx 의 발현량을 감소시킨 세포주에 야생형 아데노바이러스 5 형을 감염시켰을 때, Daxx 의 발현이 감소한 세포 주에서는 바이러스 복제에 필요한 E1A, E2A, E4orf6 단백질들의 mRNA 발현과 단백질 발현 모두가 증가하였다는 것을 확인할 수 있다³⁶. 또 다른 실험에서는, Daxx 의 발현을 감소시킨 사람의 간세포주에 야생형 아데노바이러스를 감염시켰더니 아데노바이러스의 DNA 가 합성되는 양이 증가하여 바이러스 양도 증가한 것이 확인되었다. Daxx 의 발현을 감소시킨 세포에 다시 Daxx 가 발현할 수 있도록 했더니, 아무것도 처리하지 않은 간세포주에

아데노바이러스를 감염시킨 대조군과 동일한 양의 바이러스 양이 측정되었다³⁷. Daxx 의 아데노바이러스의 부정적인 조절자로서의 역할에 대한 메커니즘은 정확히 알려져 있지 않지만 아데노바이러스의 repressive chromatin remodeling complexes 와 함께 작용하는 것 같다는 내용의 보고가 있었다³⁸. X-linked α -thalassaemia retardation syndrome protein (ATRX) 라는 chromatin remodeling protein 이다. Daxx 와 ATRX 가 바이러스 게놈과 복합체를 이루어 바이러스의 복제에 부정적인 조절자로서 작용한다는 것이다³⁷. 이로써 Daxx 는 아데노바이러스의 복제를 억제하는 방식으로 조절한다는 것을 알 수 있다. 따라서 shRNA 로 Daxx 의 발현을 줄인다면 아데노바이러스의 증식이 증대되어 우리가 원하는 유전자의 발현이 증가하고, 기존의 효과보다 더 증진된 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 본 연구에서는, small hairpin RNA (shRNA) 를 사용해 암세포 내에서의 TGF β 2 의 발현을 억제하는 동시에 Daxx 의 발현 또한 억제하고자 하였다. 이를 통하여 Daxx 의 억제로 바이러스의 복제를 향상시켜 shTGF β 2 의 전달효율을 높이고, TGF β 2 억제 효과가 보다 더욱 개선된 항 종양 효과를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

293A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), MiaPaCa-2, HPAC (ATCC, Manassas, VA, USA) 세포주는 DMEM (HyClone, Logan, Ut) 배지, BxPC3 (ATCC, Manassas, VA, USA) 는 RPMI (HyClone, Logan, Ut) 배지, normal pancreatic cell (ABM, Richmond, BC, CANADA) 는 Prigrow II (ABM, Richmond, BC, CANADA) 배지를 사용 하였다. 각 배지는 10 % 우태아 혈청 (HyClone) 과 10 unit/ml 의 Penicillin-Streptomycin 용액 (HyClone), 25 mM 의 HEPES 를 첨가하여 사용하였으며, 5 % CO₂ 를 유지하는 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 바이러스 제작 및 생산

가. TGF β 1, TGF β 2, Daxx 의 발현을 감소시키는 증식 불능 아데노바이러스 제작

TGF β 1, TGF β 2 와 Daxx 의 mRNA 수준을 특이적으로 감소시키는 shRNA 를 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위해 Genolution 사 (Genolution, Seoul, Korea) 에 의뢰하여 사람의 TGF β 1, TGF β 2 와 Daxx 의 mRNA 발현을 감소시키는 shRNA 들을 선정하였다. 선정된 shRNA 들은 *Bam*HI 과 *Hind*III (NewEngland Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소로 처리한 pSP72 Δ E3

셔틀벡터에 각각 삽입되었으며, d1324-IX 아데노바이러스 유전자와 상동 재조합을 하여 증식 불능한 d1324-shTGF β 1, d1324-shTGF β 2, d1324-shDaxx 아데노바이러스를 제작하였다.

나. 종양 선택적 살상 아데노바이러스 제작

증식 불능 아데노바이러스에서 TGF β 2, Daxx 에 대한 shRNA 의 효과를 확인한 후 shRNA 를 발현하면서 종양 선택적으로 세포를 살상하는 아데노바이러스를 제작하였다. 종양선택적 살상 아데노바이러스를 만들기 앞서 아데노바이러스의 E1A 부분에 여러 유전자를 넣을 수 있는 셔틀벡터를 제작하고자 E1A 와 E1B55kDa 유전자를 포함하며 다양한 효소인식부위를 포함하는 pBSK II-3484 합성 유전자를 제작하였다. 합성된 유전자를 상동 재조합이 용이한 형태로 바꾸기 위해서 pBSK II-3484 를 PCR 하여 *Fsp* I (NewEngland Biolabs) 처리한 뒤 두 가닥 말단 효소로 양 가닥을 두 가닥 말단으로 만들고 다시 *Bam*HI 으로 처리하였다. pCA14 는 *Ssp*I (NewEngland Biolabs)을 이용하여 자른 후 두 가닥 말단 효소를 이용하여 두 가닥 말단으로 만든 후, *Bg*I/II (NewEngland Biolabs, Ipswich) 를 처리하여 동일전달제한효소(Isoschizomer) 인 *Bam*HI 과 *Bg*I/II 로 부착말단으로 제작하고 다른 쪽을 두 가닥 말단으로 제작하여 합성된 유전자를 삽입함으로 셔틀벡터를 제작하였다. 제작된 모든 바이러스들은 293A 세포에서 증식, 배양한 후 세습밀도 구배에 따른 바이러스 정제 및 농축을 한 후에 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 통해 2 시간 투석을 총 2 회 실시한 후에 저장완충액(10 mM Tris-HCl, 4 % sucrose, 2 mM MgCl₂) 에서 2 시간 동안 투석시킨 후에 -80°C 냉동고에 저장하였다. 각 바이러스의 농도는 end-point dilution assay 를 이용하여 각 well 에서 생성되는

Cytopathic effect (CPE)를 측정한 후 계산하였다. 293A 세포를 96 well 플레이트 각 well 에 1×10^4 으로 각각 분주하여 배양한 후에 다음날 10^{-7} 부터 10^{-14} 까지 희석시킨 바이러스를 각 농도 별로 10 개의 well 씩 감염을 시키고 7-10 일간 세포를 용해시키며 형성되는 plaque 개수를 센 후에 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

KÄRBER 의 통계학적인 방법으로 Titer 는

$$T = 10^{1 + 1(S - 0.5)} \times 20 \text{ TCID}_{50} / \text{mL} \quad (S \text{ 는 CPE 가 형성된 well 개수}/10)$$

$\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 를 PFU/mL 로 바꿔준다.

$$T = 10^{1 + 1(S - 0.5) - 0.7} \times 20 \text{ PFU}/\text{mL}$$

3. 효소결합면역흡착검사 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

TGF β 1, TGF β 2 는 분비형 단백질로써 shRNA 를 발현하는 바이러스의 감염에 따른 TGF β 1, TGF β 2 의 발현 감소 정도를 측정하기 위하여 ELISA 를 시행하였다. HPAC, BxPC3 를 6 well 에 2×10^5 개의 세포수로 분주하여 배양한 다음날 바이러스를 MOI 별로 감염시켰다. TGF β 1, TGF β 2 는 우태아 혈청에도 존재하기 때문에 세포에서 분비되는 고유한 TGF β 1, TGF β 2 의 차이를 확인하기 위하여 다음날 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 바꿔 24 시간 더 배양하였다. 바이러스를 감염한지 2 일 후 배지를 수거하여 ELISA assay 를 시행하였다. 수거한 배지를 일차 항체가 부착되어 있는 각 well 에 넣고 상온에서 두 시간 동안 항체에 부착시켰다. 이후 TGF β 1, TGF β 2 항체와 결합하지 않은 단백질을 씻어, 기질혼합액을 첨가하여 빛을 차단한 상태에서 30 분간 발색시킨 후에 정지액을 넣어

반응을 정지시킨 후 microplate reader (Molecular devices corporation, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도 값을 구하였다. 흡광도는 540 nm 에서 측정하였으며 표준용량곡선에 따라 분비된 TGF β 1, TGF β 2 의 양을 산출하였다. ELISA assay 의 모든 과정은 Quantikine hTGF β 1, Quantikine hTGF β 2 (R&D, Minneapolis, MN, USA)의 설명서에 따라 시행하였다.

4. Western blot

각 세포 별로 바이러스에 의한 단백질 발현 변화를 확인하기 위해 western blot 을 시행하였다. 각 세포는 6 well 에 2×10^5 개의 세포수로 분주하여 배양한 후 다음날 sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 mM Tris-HCl(pH6.8))로 용해시킨 다음, BCA protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) 를 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질들을 각 well 에 30 μ g 씩 넣어 SDS-polyacrylamide gel (4 % stacking gel 과 12 % resolving gel) 을 이용하여 전기영동 한 후 transfer buffer (2.5 mM Tris, 200 mM Glycine, 30 % Methanol)를 이용하여 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) 으로 120 V 로 2 시간 동안 옮긴 후, blocking buffer (5 % non-fat milk in TBST) 에 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 그 후 5 % non-fat milk 용액 또는 5 % BSA (5 % BSA in TBST) 에 일차 항체를 1:200-1:2000 까지 희석하여 각각 4 $^{\circ}$ C 에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날 TBST 로 15 분간 3 번 세척하고 각 일차항체에 맞는 이차항체를 5 % non fat milk 또는 5 % BSA 1:2000 으로 희석한 후 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 후 TBST 로 10 분간 3 번 세척하였다. 항체가 붙어있는 membrane 을 detection kit (ELPIS biotech,

Taejon, Korea) 을 이용하여 반응시킨 후, chemiluminescence (Syngene, Frederick, MD, USA) 을 이용하여 각 바이러스가 감염되었을 때 달라진 단백질의 발현양을 확인하였다. 이 과정 중에 사용한 항체는 β -actin, Daxx (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA), p-ERK, p^{S473}-AKT (Cell signaling Biotechnology, Carlsbad, CA, USA)

5. Virus replication (post-infection³¹)

HPAC, BxPC3 각 세포를 6 well 에 2×10^5 개의 세포수로 분주하여 배양한 후 증식 불능한 d1324-sh scrambled, d1324-shDaxx 아데노바이러스와 증식 가능한 d1324-CMVpromoter-shscrambled, d1324-CMVpromoter-shTGF β 2, d1324-CMVpromoter-shDaxx, d1324-CMVpromoter-shTGF β 2-shDaxx 를 감염시켰다. 293A 세포를 96well 플레이트의 각 well 에 1×10^4 으로 각각 분주하여 배양한 후에 다음날 10^{-2} 부터 10^{-8} 까지 희석시킨 2 일 후에 세포를 떼어내어 얻어낸 바이러스 soup 과 세포를 Freezing & thawing 을 진행한 후 각 농도 별로 10 개의 well 씩 감염을 시키고 7-10 일간 세포를 용해시키며 형성되는 세포독성효과(CPE)의 개수를 센 후에 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

KÄRBER 의 통계학적인 방법으로 Titer 는,

$$T = 10^{1 + 1 (S - 0.5)} \times 20 \text{ TCID}_{50} / \text{mL}$$
 (S 는 CPE 가 형성된 well 개수/10) $\text{TCID}_{50} / \text{mL}$ 를 PFU/mL 로 바꿔준다.

$$T = 10^{1 + 1 (S - 0.5) - 0.7} \times 20 \text{ PFU/mL}$$

그리고 나서 post-infection 으로 나온 titer 를 처음에 감염시킨 바이러스 titer 로 나누어준다.

6. MTT assay

shTGF β 1, shTGF β 2 바이러스를 감염시켰을 때 세포의 생존을 측정하기 위해서 MTT assay 를 진행하였다. 48 well 에 2×10^4 으로 세포를 분배하고, 그 다음날 d1324-sh scrambled, d1324-shTGF β 1, d1324-shTGF β 2 바이러스를 감염시켰다. 그리고 2 일 후에 CellTiter 96 [®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Biotech, Madison, WI, USA) 를 이용하여 세포증식 분석 실험을 진행하였다. 먼저 염색 용액을 각 well 에 15 μ l 씩 넣어주고 4 시간 동안 기다렸다. 그 후 반응을 멈추게 하는 용액을 각 well 에 100 μ l 씩 넣고 1 시간 후 570 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 세포생존 정도를 분석하였다.

7. 군락형성분석(Clonogenic assay)

shTGF β 1, shTGF β 2, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 암세포의 생존 및 증식에 어떠한 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위하여 군락형성분석을 시행하였다. 60 mm dish 에 HPAC, BxPC3 세포주를 4×10^5 개를 분주한 다음날 5 % 우태아 혈청을 함유한 DMEM 배지에 바이러스를 감염시켰다. 감염시킨 후 2 일 후에 다시 1×10^5 으로 다시 세포를 분배하고 2 일 간격으로 배지를 교체해 주었다. 10 일이 지나 군락이 형성되면 배양하던

배지를 제거한 후 4 % paraformaldehyde 를 상온에서 15 분간 처리하여 고정시키고, 0.05 % crystal violet 을 이용하여 1 시간 동안 염색 후 물로 세척하여 보라색으로 염색된 군락을 관찰하였다.

8. 동물실험으로 생체 내 항 종양 효과 확인

동물실험은 생후 6-8 주 된 체중 20 g 내외의 BALB/c nude 수컷 마우스를 사용하였다. 이들 마우스는 오리엔트 바이오사 (오리엔트 바이오, Seongnam, Korea)에서 구입하여 SPF (Scientific Pathogen Free) 사육실에서 Polycarbonate cage 에 5 마리씩 넣어 멸균된 수돗물과 pellet 사료 (중앙 실험동물, Korea) 를 공급하고 청정공기를 제공하여 미생물에 감염되지 않게 사육하였다. $1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$ HPAC 생존 세포를 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 로 부유하여 마우스 피하에 주사하였다. 종양 세포 이식 7 일 후에 종양이 커지면 PBS, 복제 가능한 바이러스인 d1324-CMVpromoter-sh scrambled (NC), d1324-CMVpromoter-shTGF β 2 (shTGF β 2), d1324-CMV promoter-shDaxx (shDaxx), d1324-CMVpromoter-shTGF β 2-shDaxx (shTGF- β 2-shDaxx) 바이러스를 각각 1×10^{10} VP (virus particle)/ml 의 농도로 50 μl 씩 2 일 간격으로 총 3 번 종양내로 투여하였다. 종양의 크기는 종양의 최장경(a) 와 최장경에 수직한 최단경(b)을 각각 측정하여 $a \times b^2 \times 0.523$ 의 공식으로 산출하였다.

9. 조직 염색

가. 면역 조직 화학 염색

마우스에 형성된 암 조직을 얻기 위해 마우스를 이산화탄소 가스로 질식사시킨 후 암 조직을 적출하였다. 적출한 조직은 10 % formaldehyde 에 상온에서 고정시킨 뒤 70 % 에탄올에서 탈수를 시켜 파라핀에 넣어 굳혀서 블록을 만들어 4 μm 의 두께로 잘라 유리 슬라이드 위에 올려 xylene 과 100 %, 90 %, 75 % 에탄올로 수화시킨 뒤 면역조직 염색을 시행하였다. 이후 동결절편과 파라핀 절편 모두 0.4 % H_2O_2 용액에서 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 일차항체인 rabbit- anti-adenovirus type 5 항체 (Abcam, Cambridge, CB40FL, UK), mouse anti-TGF β 2 항체 (Abcam, Cambridge, CB40FL, UK), mouse anti- Daxx 항체 (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA) 를 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤동안 반응시켰다. 이후, horseradish peroxidase (HRP) 가 결합된 이차 항체인 anti-mouse (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA) 또는 anti- rabbit (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA)을 넣어 상온에서 30 분간 반응시키고 3,3' -Diaminobenzidine (DAB) 을 첨가하여 발색 정도를 지켜본 후 Harris hematoxyline (BBC Biochemical corporation, Stanwood, WA, USA) 로 1-3 분간 핵을 염색한 후에 70 %, 90 %, 100 % 에탄올과 xylene 용액에 침전시키고 커버 글라스를 덮어 관찰하였다.

10. 통계처리

Graphed PRISM 6.0 을 이용하여 그래프 작성 및 t-test 를 사용하여 실험 결과의 유의성있는 차이를 표시하였다.

Ⅲ. 결과

1. 정상 췌장 세포와 여러 췌장암 세포주에서의 TGF β 1, TGF β 2 단백질 발현양

정상 췌장 세포와 여러 췌장암 세포에서의 hTGF β 1, hTGF β 2 단백질 발현량을 확인하기 위해서 ELISA 를 시행하였다 (그림 1). TGF β 1는 정상세포에서 상당한 양의 단백질 발현량이 있었고, BxPC3 췌장암 세포에서는 TGF β 1 의 단백질 발현량이 가장 높게 발현되는 것을 알 수 있었다. 반면 TGF β 2 의 단백질 발현량은 정상 췌장 세포에 비해 HPAC 와 BxPC3 췌장 암세포에서 높은것을 알 수 있었다. 여러 췌장암 세포주 중에서 TGF β 1, TGF β 2 의 발현량이 높은 HPAC 와 BxPC3 세포를 이용하여 앞으로의 실험을 진행하였다.

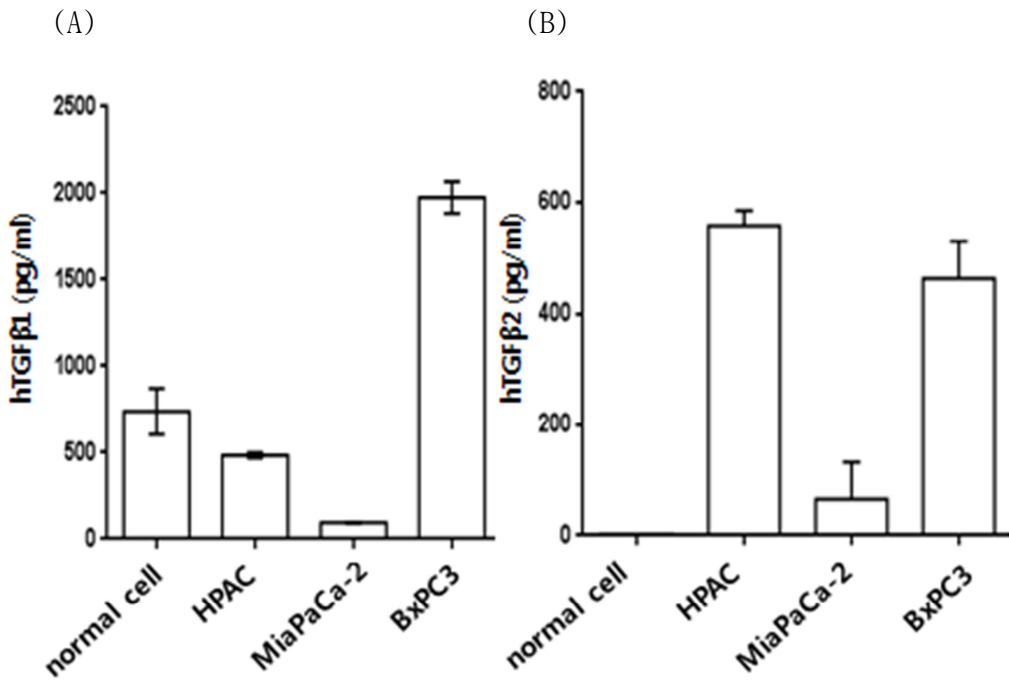
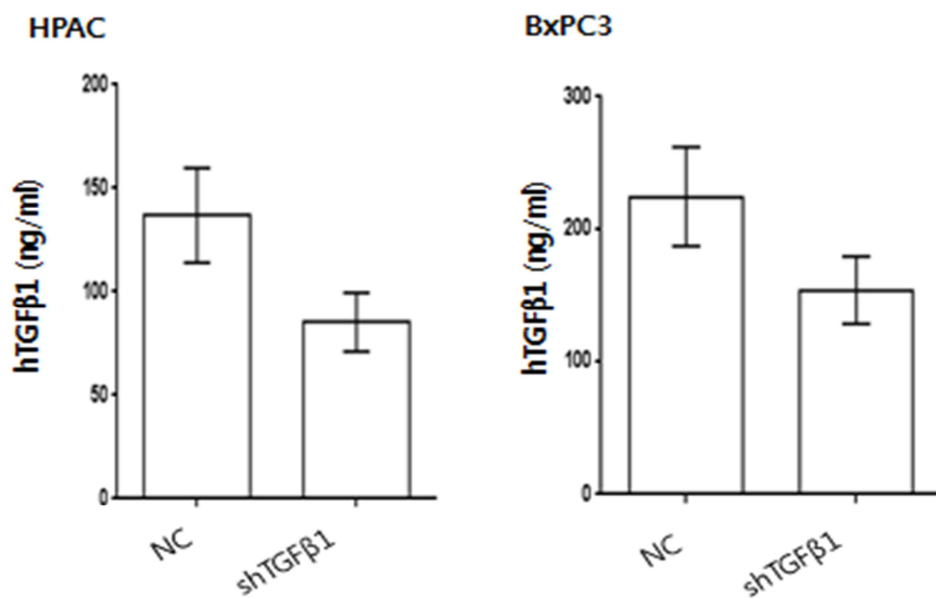


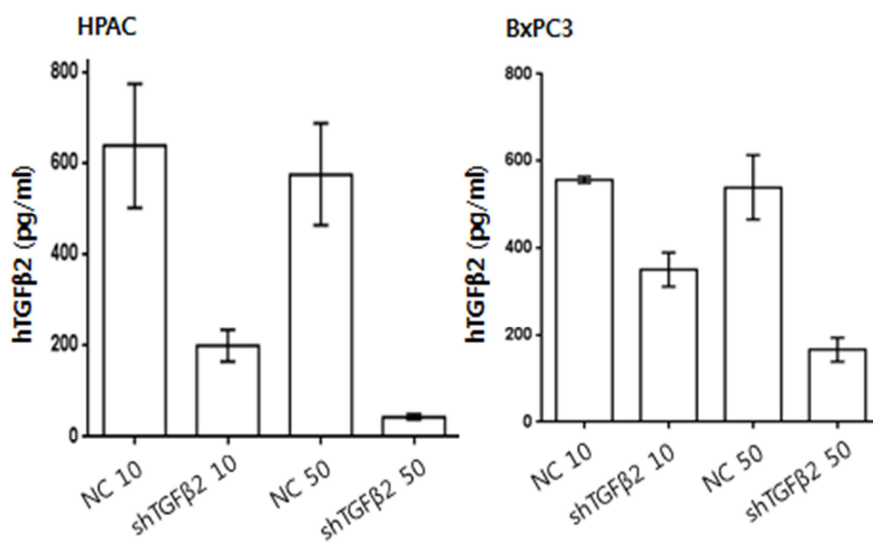
그림 1. 정상 췌장세포, HPAC, MiaPaCa-2, BxPC3 췌장암 세포주에서
TGF β 1(A)와 TGF β 2(B)양 측정

여러 가지 세포를 6 well 플레이트에 2×10^5 로 분배하고, 하루 뒤에 혈청이 없는 배지로 교체하였고 그 다음날 배지를 얻어 ELISA 를 수행하였다.

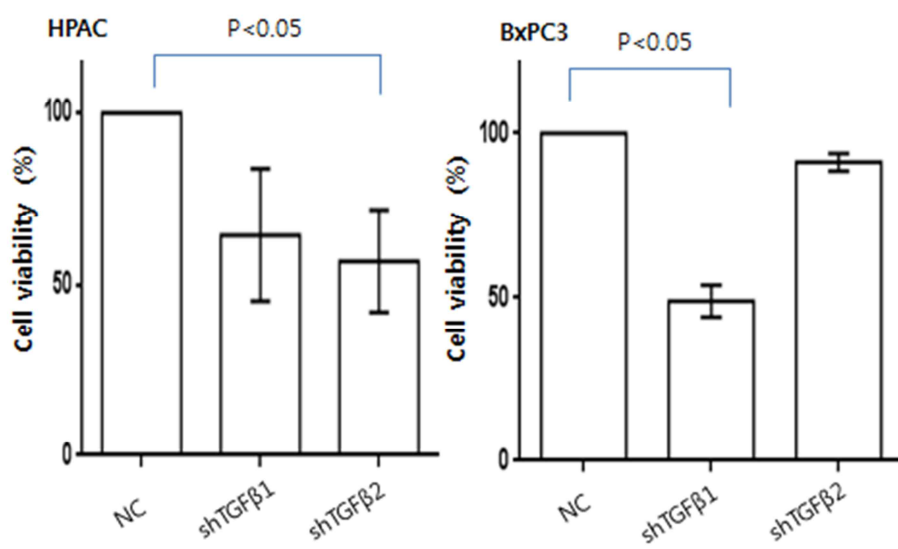
(A)



(B)



(C)



(D)

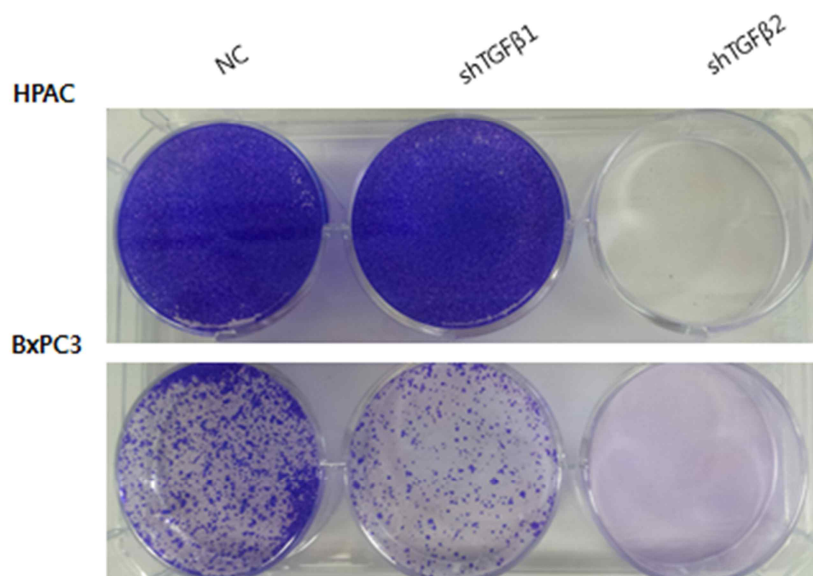


그림 2. shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염에 의한 단·장기간
췌장암세포주 생존능 변화

(A) shTGF β 1 아데노바이러스 감염에 의한 TGF β 1 감소.

HPAC 와 BxPC3 세포를 6 well 플레이트에 2×10^5 으로 분배하고
다음날 NC(negative control), shTGF β 1 아데노바이러스를 50
MOI 로 감염시켰다. 그리고 다음날 혈청이 없는 배지로 교체하고
다음날 배지를 얻어 TGF β 1 ELISA 를 시행하였다.

(B) shTGF β 2 아데노바이러스 감염에 의한 TGF β 2 감소.

HPAC 와 BxPC3 세포를 6 well 플레이트에 2×10^5 으로 분배하고
다음날 NC, shTGF β 2 아데노바이러스를 10 MOI, 50 MOI 로
감염시켰다. 그리고 다음날 혈청이 없는 배지로 바꾸고 다음날
배지를 수확하여 TGF β 2 ELISA 를 시행하였다

(C) shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염에 의한 췌장암 세포주
단기간 생존능 변화

HPAC 와 BxPC3 세포를 48 well 플레이트에 1×10^4 으로 분배하고 ,
그 다음날 NC, shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로
감염시키고, 48 시간 후 MTT assay 를 진행하여 세포 생존을
확인하였다.

(D) shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염에 의한 췌장암 세포주
장기간 생존능 변화

HPAC 와 BxPC3 세포에 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를
이용하여 군락형성분석(Clonogenic assay)를 시행하였다. 군락
형성 분석(Clonogenic assay)를 위해서 HPAC 와 BxPC3
세포를 2×10^5 으로 세포를 6 well 플레이트에 분배하고, 다음날 NC,

shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 감염시켰다. 그리고 2 일 후에 세포를 떼어내고, 6 well 플레이트에 1×10^5 으로 다시 세포를 깔고 2 일에 한 번씩 배지를 교체해주었다. 세포가 균락을 형성할 때까지 지켜보았다. 10 일 정도 지나 균락이 형성되면 4% paraformaldehyde 로 세포를 고정시키고, 0.05 % crystal violet 으로 염색하였다.

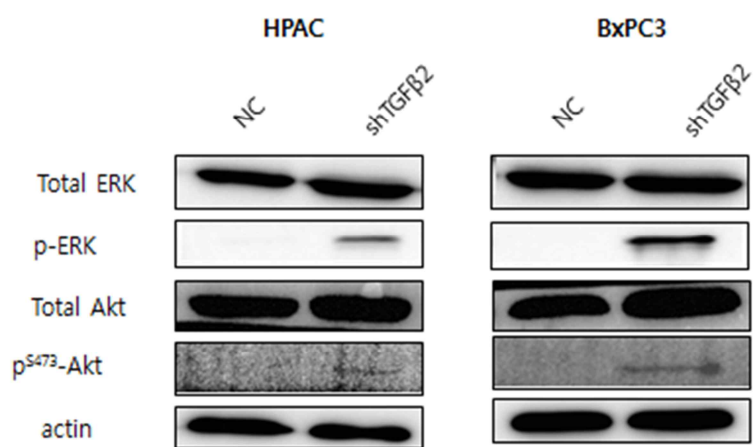
NC: d1324- sh scrambled, shTGF β 1 : d1324- shhTGF β 1 ,
shTGF β 2 : d1324- shhTGF β 2

2. HPAC 와 BxPC3 세포에서 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염에 의한 세포 생존능 변화

shTGF β 2 유전자를 발현하는 바이러스를 제작하였다. HPAC 와 BxPC3 세포에 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 감염시켜 세포에 TGF β 1, TGF β 2 의 단백질을 감소시키는지 확인하기 위해서 ELISA 를 시행하였다(그림 2A,B). shTGF β 1 아데노바이러스 50 MOI 감염시 대조군 바이러스에 비해서 TGF β 1 양이 감소한 것을 알 수 있었다(그림 2A). shTGF β 2 아데노바이러스의 경우 10 MOI, 50 MOI 를 3일 배양 세포주에 감염시켰을 때 바이러스 MOI 가 증가할수록 TGF β 2 단백질이 효과적으로 감소한 것을 알 수 있었다(그림 2B). TGF β 가 암세포의 성장과 증식에 영향을 주는 것으로 알려져 있기 때문에 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스가 암세포의 생존 및 증식을 감소시키는지 확인해 보기 위해서 MTT assay 와 균락형성분석(clonogenic assay)을 시행하였다. MTT assay 는 단기간의 살아있는 세포를 확인하는 방법인데, HPAC 와 BxPC3

세포에 NC, shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 MTT assay 를 진행하였다(그림 2C). HPAC 세포에서는 대조군 바이러스에 비해 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스 감염시켰을 때 살아있는 세포가 감소하였지만 shTGF β 2 아데노바이러스가 shTGF β 1 아데노바이러스 보다 더 살아있는 암세포가 감소하였다는 알 수 있었다(그림 2C). 그러나 BxPC3 세포는 shTGF β 2 아데노바이러스보다 shTGF β 1 아데노바이러스 감염시켰을 때 유의성있게 세포의 단기간 생존을 감소시키는 것을 확인하였다(그림 2C). 장기간에는 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스가 세포 생존에 어떠한 영향을 주는지 확인해 보기 위해서 군락형성분석(clonogenic assay) 을 시행하였다(그림 2D). 군락형성분석은 HPAC 와 BxPC3 췌장암세포에 NC, shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 감염시키고 2 일 간격으로 배지를 갈아주고 군락이 형성되는 것을 10 일간 관찰하였다. 군락이 형성된 이후에 crystal violet 염색을 통해 세포를 염색하여 군락 형성 정도를 관찰하였다. HPAC 에서는 세포 생존에 있어서 shTGF β 1 아데노바이러스는 대조군 바이러스와 차이가 크지 않았고, shTGF β 2 아데노바이러스는 현저하게 군락형성을 감소시켰다(그림 2D). BxPC3 세포에서는 shTGF β 1 아데노바이러스도 대조군 바이러스에 비해서 군락형성을 감소시켰지만 shTGF β 2 아데노바이러스가 더욱 군락형성을 감소시켰다(그림 2D). 두 세포주에서 shTGF β 1 아데노바이러스보다 shTGF β 2 아데노바이러스가 세포 생존을 현저하게 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

(A)



(B)

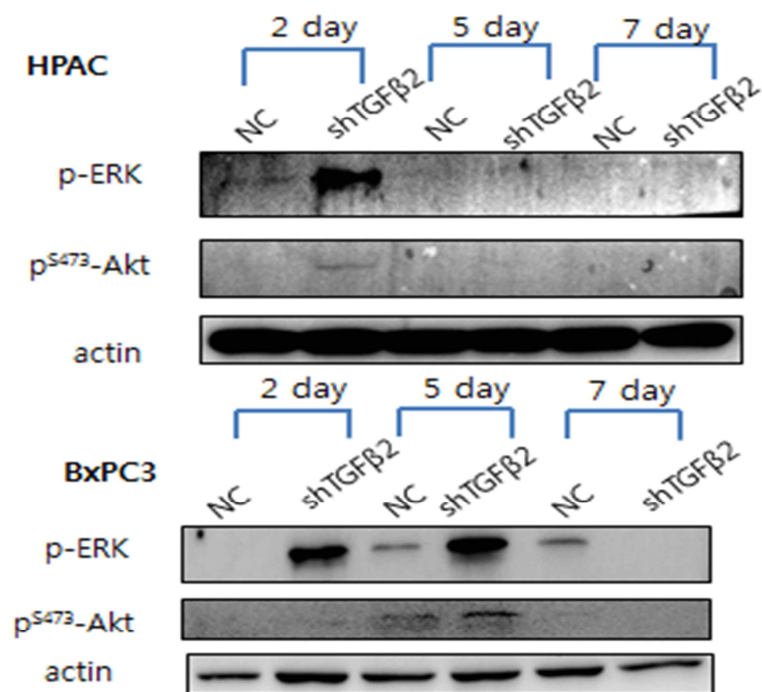


그림 3. shTGF β 2 아데노바이러스 감염 시 ERK 와 Akt 의 신호 전달 변화

(A) shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 HPAC 와 BxPC3 에 감염시킨후 인산화된 ERK (p-ERK) 와 Akt (p-Akt) 밴드가 나타났다.

(B) shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 HPAC 와 BxPC3 에 감염시킨후 다른 시간에 세포를 얻어 western blot 을 통해서 인산화된 ERK (p-ERK) 와 Akt (p-Akt) 를 확인하였을 때, 시간이 지날수록 밴드가 사라졌다.

HPAC 와 BxPC3 세포를 6 well 에 세포를 분배하고, 그 다음날 NC, shTGF β 2 아데노바이러스를 50 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 세포를 얻어 2 일 째 western blot 을 할 수 있는 샘플을 준비하였다. 그리고 5 일 째, 7 일 째 샘플은 바이러스 감염 후 2 일 후에 세포를 떼어 세포를 다시 깔았다. 5 일, 7 일 western blot 할 수 있는 샘플을 준비하였다.

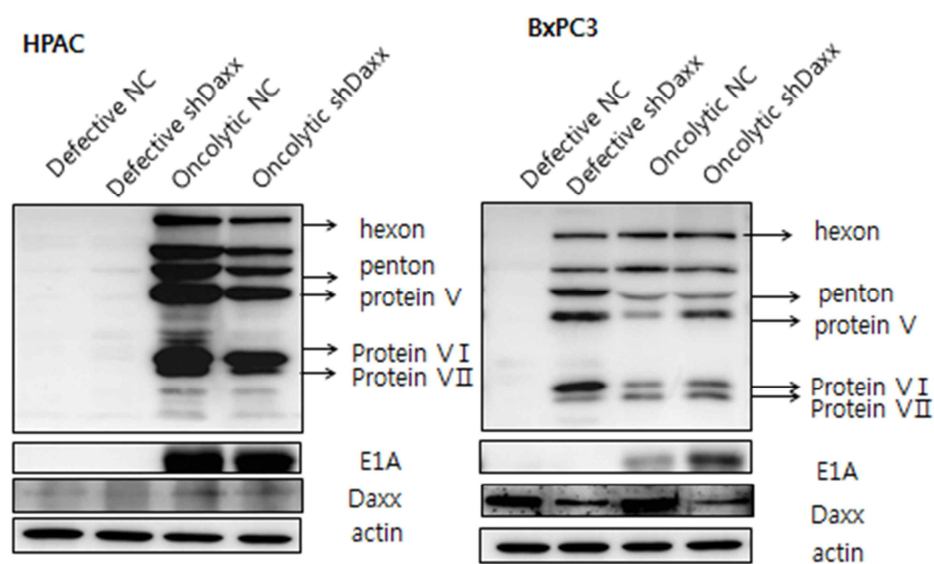
NC: d1324- sh scrambled, shTGF β 2 : d1324- shTGF β 2

3. 췌장암 세포주에서 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스에 감염에 의한 단·장기간의 세포 생존능 변화와 관련된 단백질의 변화

HPAC, BxPC3 두가지 세포주간의 TGF β 2 에 대한 반응에 차이가 나는 이유와, BxPC3 세포에서 shTGF β 2 아데노 바이러스의 단기, 장기간의 생존에 차이가 나는 이유를 세포안의 신호 전달의 변화 때문이라고 생각하고 그것을 확인해 보기위해 다음 실험을 진행하였다. HPAC 와 BxPC3 세포를 2×10^5 를 6 well 플레이트에 분배하고, 다음날 NC, shTGF β 2

아데노바이러스를 50 MOI 로 감염시키고 2 일 후에 세포를 얻어 western blot 을 시행한 결과 두 세포주 모두에서 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 나타났다(그림 3A). 48 시간 단기간의 MTT assay 결과와 장기간의 암세포 생존을 확인한 균락 형성분석(clonogenic assay)에서 shTGF β 2 아데노바이러스에 대한 반응이 두 가지 실험 결과가 다르기 때문에 더 장기간의 세포안의 신호전달에 변화를 보기위해 5 일과 7 일 샘플을 얻어 p-ERK, p-Akt 를 확인해 보았다(그림 3B). HPAC 세포에서는 2 일 쯤 나타나던 p-ERK, p-Akt 밴드가 5 일 쯤부터는 사라지는 것을 볼 수 있었다(그림 3B). 그러나 BxPC3 세포에서는 5 일 쯤까지 p-ERK, p-Akt 밴드가 나타나다가 7 일 쯤부터 p-ERK, p-Akt 밴드가 사라지게 되었다(그림 3B). 위 결과를 종합해보면 BxPC3 세포에서만 세포 생존을 감소시킨 shTGF β 1 바이러스에 비해서 shTGF β 2 바이러스는 두 가지 체장암세포주 모두에서 장기간의 암세포 생존을 억제하는 효과가 있었다. 그리고 HPAC 세포는 짧은 시간에 shTGF β 2 바이러스 세포생존을 억제하는 효과가 나타나지만 BxPC3 세포는 shTGF β 2 바이러스 세포생존을 억제시키는 효과가 HPAC 세포 보다 조금 늦게 나타났다.

(A)



(B)

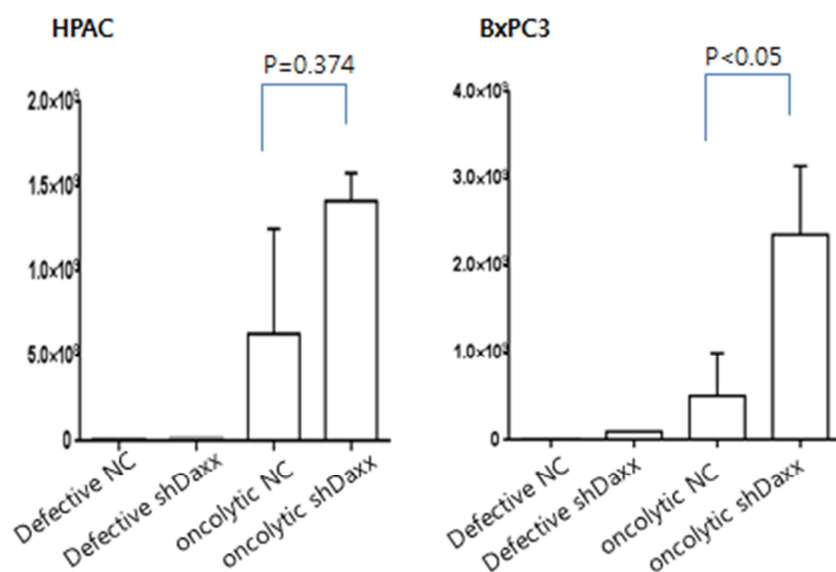


그림 4. shDaxx 가 아데노바이러스의 복제에 필요한 단백질 발현과 생성에 미치는 효과 확인

(A) HPAC 와 BxPC3 세포에 복제불능 NC, shDaxx 와 복제가능 NC, shDhaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 세포 샘플을 얻어 western blot 을 진행하였다.

(B) HPAC 와 BxPC3 세포에 복제불능 shDaxx 와 복제가능 shDhaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI 로 감염시키고 2 일 후에 세포를 얻어 293 A 세포에 10^{-3} - 10^{-7} 까지 희석시킨 바이러스를 다시 감염시킨 후 8 일이 지나 세포를 용해시켜 생긴 세포독성효과 (CPE)형성 개수를 세었다.

Defective NC(복제 불능 NC): d1324- sh scrambled,

Defective hshDaxx(복제 불능 shDaxx) : d1324- shDaxx

Oncolytic NC(복제 가능 NC): d1324-CMVp-sh scrambled

Oncolytic shDaxx(복제 가능 shDaxx): d1324-CMVp-shDaxx

4. shDaxx 의 아데노바이러스의 복제, 생성에 미치는 효과

Daxx 가 아데노바이러스 복제에 부정적인 역할을 하는 것³¹ 으로 알려져 있기 때문에 Daxx 의 shRNA 를 삽입한 shDaxx 아데노바이러스를 제작하여 바이러스의 복제를 증가시키고 바이러스 양을 증대시키는지 확인하고자 하였다. shDaxx 아데노바이러스가 바이러스의 단백질 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해서 HPAC 와 BxPC3 세포 2×10^5 세포를 6 well 에 분배하고, 다음날 복제불능 NC, shDaxx 아데노바이러스 와 복제가능 NC, shDaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI 감염시켜 2 일 후 세포를

수확하여서 western blot 과 293A 세포에 postinfection 을 진행하였다(그림 4). HPAC 세포와 BxPC3 세포에 복제 가능 NC 와 shDaxx 바이러스 감염시켰을 때 먼저 HPAC 세포는 복제 가능 NC 바이러스와 shDaxx 바이러스 감염시켰을 때는 late gene 의 발현 감소나, E1A 의 발현에 크게 변화가 없었다 (그림 4A). BxPC3 에서는 E1A 단백질의 발현이 증가하였지만, late gene 의 단백질의 양에는 변화가 없는 것을 알 수 있었다(그림 4A). shDaxx 아데노바이러스가 바이러스의 생성도 증가시키는지를 확인해 보고자 post infection 을 시행하였다. HPAC 세포와 BxPC3 세포에 복제불능 NC, shDaxx 아데노바이러스 와 복제 가능 NC, shDaxx 아데노바이러스를 50 MOI 감염시켜 48 시간만에 세포를 수확하여 얻은 후 freezing & thawing 실시하여 293A 세포에 10^{-3} - 10^{-7} 까지 희석시킨 바이러스를 다시 감염시켰다. 그리고 8 일 후에 바이러스 감염에 의한 세포독성효과(CPE)를 확인하였다. 세포독성효과(CPE)를 일으킨 well 의 개수를 세어 확인한 결과 BxPC3 세포주에서 복제 가능 NC, shDaxx 바이러스를 감염시켰을 때 NC 바이러스에 비해서 shDaxx 바이러스가 세포를 깨고 나온 바이러스의 수가 늘어난 것을 확인 하였다. 그러나 HPAC 에서는 복제 가능 shDaxx 바이러스에서 아데노바이러스의 수가 증가되었지만 통계적으로 유의성이 없었다(그림 4B).

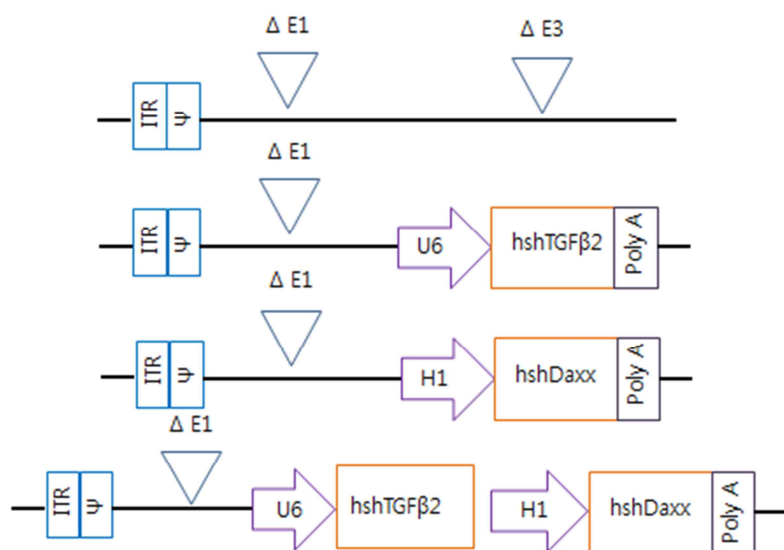
5. TGF β 2 와 Daxx 의 두 가지 모두 발현을 감소시키는 아데노바이러스 제작 및 효과 확인

shTGF β 2 와 shDaxx 를 발현하는 바이러스를 제작하였다. 그 후 셔틀 벡터와 아데노바이러스를 이용하여 두 shRNA 를 동시에 발현하는

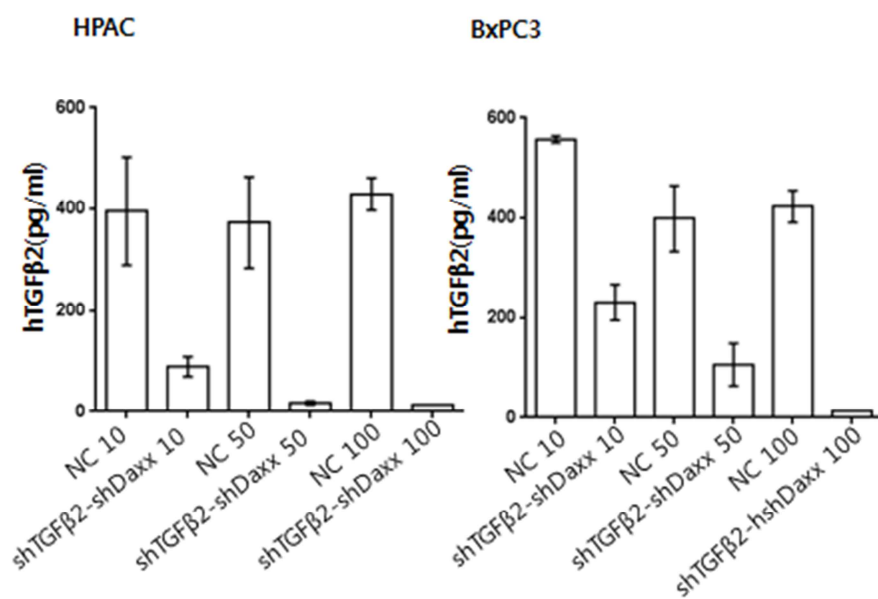
바이러스를 제작하였다(그림 5A). 복제 불능 shTGF β 2-shDaxx 바이러스가 shTGF β 2 단백질의 양을 감소시키는지 ELISA 로 확인하였다. HPAC 와 BxPC3 세포를 6 well 에 2×10^5 으로 세포를 분배하고, 다음날 복제 불능 NC, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 10 MOI, 50 MOI, 100 MOI 로 각각 감염시켰다. 그리고 그 다음날 혈청이 없는 배지로 교체하고, 하루 뒤에 TGF β 2 ELISA 를 실행하였다. 두 가지 췌장암 세포에서 모두 MOI 가 증가할수록 TGF β 2 단백질의 양이 감소한 것을 알 수 있었다(그림 5B). 그 다음으로 복제 불능 shTGF β 2-shDaxx 바이러스가 HPAC 와 BxPC3 세포에 효과적으로 Daxx 단백질의 양을 감소시키는지 확인하고자 복제 불능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI, 100 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 세포 샘플을 얻어 western blot 을 시행하여 Daxx 의 발현 변화를 확인하였다(그림 5C). 두 가지 세포주 모두 바이러스의 MOI 가 증가할수록 Daxx 단백질의 양이 감소되었다. 그 다음으로는 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 shTGF β 2 아데노바이러스가 췌장암 세포의 장기간의 생존과 증식을 억제시켰던 것처럼 생존을 억제시킬 수 있는지 확인해 보기 위해서 군락형성분석(clonogenic assay) 을 시행하였다. shTGF β 2 아데노바이러스가 장기간의 암세포의 생존을 효과적으로 감소시키는 것처럼 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스도 두 가지 췌장암 세포에서 군락형성을 감소시켰다(그림 5D). 두 가지 유전자를 넣은 바이러스인 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 바이러스의 유전자의 발현에는 어떠한 영향을 끼치는지 확인하기 위해서 복제 가능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 HPAC 와 BxPC3 세포에 50 MOI 로 감염시켰다. 그리고 2 일 후에 샘플을 얻어 western blot 을 시행하여 late gene, E1A, Daxx 등의 발현정도를 확인하였다(그림 5E). 먼저,

HPAC 세포에서 복제가능 shDaxx 과 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스는 NC 아데노바이러스와 비교하였을 때 late gene, E1A 의 발현량에 영향을 주지 못하였다. 그러나 BxPC 세포의 경우에는 앞에서 설명했던것처럼 복제가능 NC 와 shDaxx 아데노바이러스가 late gene 발현에는 영향을 주지 못하였지만, shDaxx 아데노바이러스가 NC 아데노바이러스에 비해서 E1A 의 발현을 증가시켰다. 이러한 경향성은 복제가능 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 감염시켰을 때에도 유사했다(그림 5E). shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 바이러스의 생성도 증가시키는 지를 확인해 보고자 post infection 을 시행하였다. HPAC 세포와 BxPC3 세포에 복제 불능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스 와 복제 가능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 50 MOI 감염시켜 48 시간만에 세포를 수확하여 얻은 후 freezing & thawing 실시하여 293A 세포에 10^{-3} - 10^{-7} 까지 희석시킨 바이러스를 다시 감염시켰다. 그리고 8 일 후에 바이러스 감염에 의한 세포독성효과(CPE)를 확인하였다. 세포독성효과(CPE)를 일으킨 well 의 개수를 세어 확인한 결과 BxPC3 세포주에서 복제 가능 NC, shTGF β 2-shDaxx 바이러스를 감염시켰을 때 NC 바이러스에 비해서 shTGF β 2-shDaxx 바이러스가 세포를 깨고 나온 바이러스의 수가 유의성있게 늘어난 것을 확인하였다. 그러나 HPAC 에서는 복제 가능 NC, shTGF β 2-shDaxx 바이러스가 아데노바이러스가 증가되었으나 유의성있지는 못하였다(그림 5F).

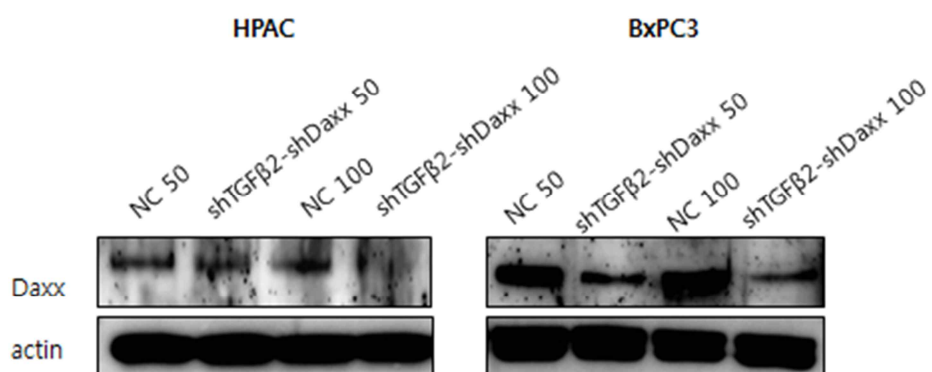
(A)



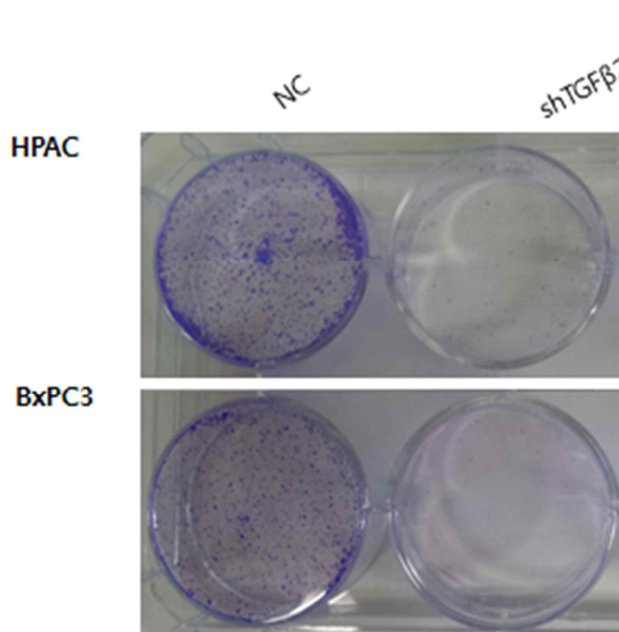
(B)



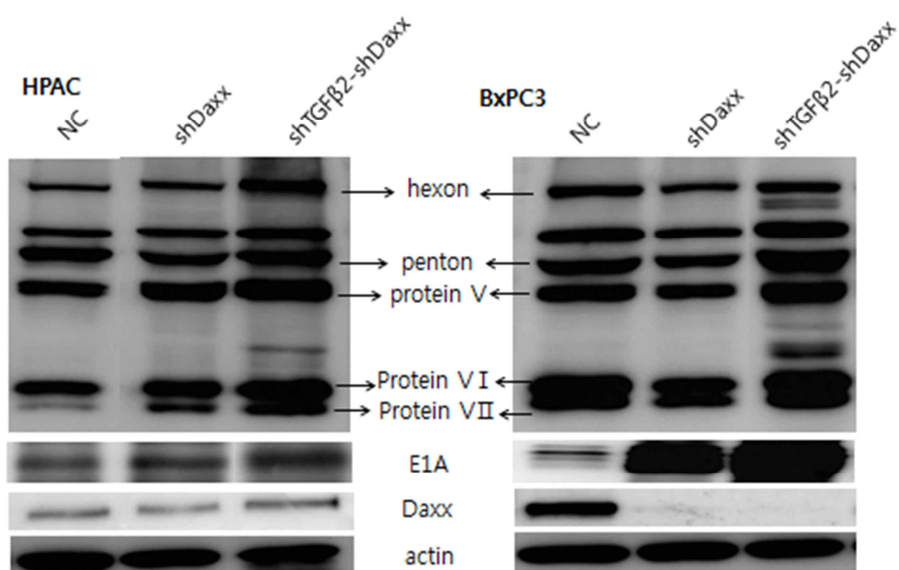
(C)



(D)



(E)



(F)

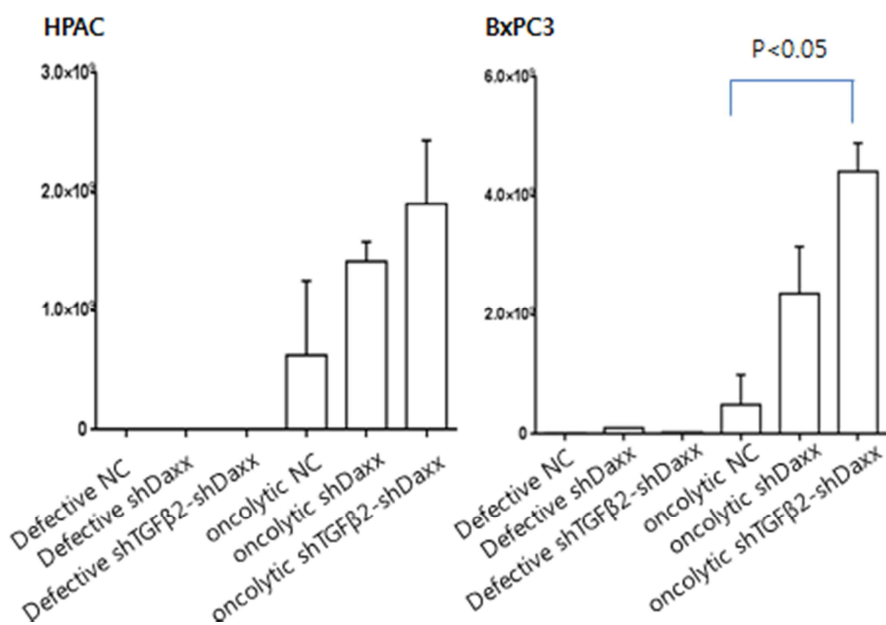


그림 5. shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스 효과

(A) 복제 불능 아데노바이러스 5의 구조를 도식화한 그림

NC: d1324-sh scrambled, shTGF β 2: d1324-shTGF β 2 ,

shTGF β 2-shDaxx: d1324- shTGF β 2-shDaxx (위에서 아래로)

(ITR: inverted terminal repeat, Ψ : packaging signal, U6 : U6 promoter

H1 : H1 promoter)

(B) shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 효과적으로 TGF β 2 단백질의 양을 감소시키는지 확인하였다. HPAC 와 BxPC3 세포주를 6 well 플레이트에 분배하고, 다음날 NC, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 10 MOI, 50 MOI, 100 MOI 로 감염시켰다. 그리고 다음날 혈청이 없는 배지로 바꾸고 다음날 배지를 얻어 TGF β 2 ELISA 를 시행하였다.

(C) HPAC 와 BxPC3 세포에 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI, 100 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 세포 샘플을 얻어 western blot 을 진행하였다.

NC: d1324-shscrambled, shDaxx: d1324-shDaxx,

shTGF β 2-shDaxx: d1324- shTGF β 2-shDaxx

(D) HPAC 와 BxPC3 세포에 shTGF β 2, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 이용하여 군락형성분석(Clonogenic assay)을 시행하였다. 군락형성 분석(Clonogenic assay)를 위해서 HPAC 와 BxPC3 세포를 2×10^5 으로 세포를 6 well 플레이트에 분배하였고, 다음날 복제 가능 NC, shTGF β 2, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 50 MOI로 감염시켰다. 그리고 2일 후에 세포를 떼어내고, 6 well

플레이트에 1×10^5 으로 다시 세포를 분배하고 2일에 한 번씩 배지를 교체해 주었다. 세포가 군락을 형성할 때까지 지켜보았다. 10 일 정도 지나 군락이 형성되면 4 % paraformaldehyde 세포를 고정시키고, 0.05 % crystal violet으로 염색하였다. 보라색의 점들은 생존한 세포를 의미하였다.

복제 가능 NC: d1324- CMVp -sh scrambled,

복제 가능 shTGF β 2 : d1324- CMVp- shTGF β 2 ,

복제 가능 shTGF β 2 -shDaxx : d1324- CMVp- shTGF β 2-shDaxx

(E) HPAC 와 BxPC3 세포에 복제가능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI 로 감염시키고, 2 일 후에 세포 샘플을 얻어 western blot 을 진행하였다.

(F) HPAC 와 BxPC3 세포에 복제불능 NC, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 와 복제가능 NC, shDhaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 각각 50 MOI 로 감염시키고 2 일 후에 세포를 얻어 293 A 세포에 10^{-3} - 10^{-7} 까지 희석시킨 바이러스를 다시 감염시킨 후 8일이 지나 세포를 용해시켜 생긴세포독성효과 (CPE)형성 개수를 세었다.

6. 생체 내에서 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스의 항 종양 효과 확인

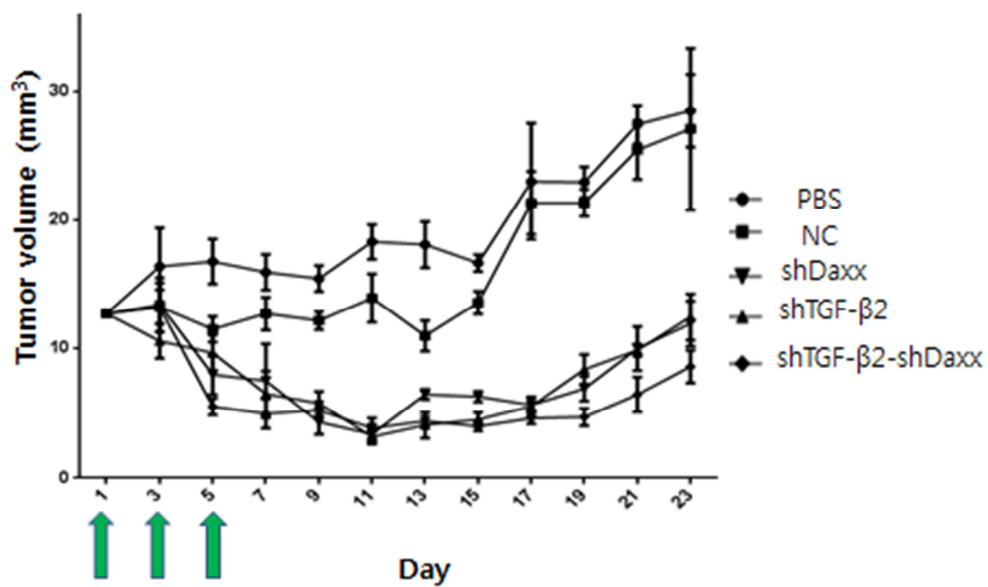
BALB/c nude 수컷 마우스에 HPAC 세포를 1×10^7 / 100 μ l 로 이식하였다. 암세포 이식 후 7 일째 되는 날 각 종양의 크기를 재서 각 군당 종양이 비슷한 크기가 되도록 분류한 뒤 NC, shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 각 바이러스를 각각 실험군 마우스에 2 일 간격으로 10^{10} VP/ml (virus particle) 의 농도로 50 μ l 로 3 번 종양내로 주사하였다. 바이러스를

감염시킨 날부터 종양의 크기를 측정하기 시작하여 2 일 간격으로 종양 크기를 측정하였다. 그 결과 PBS 를 처리한 그룹의 종양은 바이러스를 처리한 그룹보다 훨씬 종양의 크기가 컸고, 종양의 성장 속도도 가장 빠른 것을 알 수 있었다. NC 바이러스를 처리한 그룹은 PBS 그룹보다는 종양의 크기가 작았지만, shTGF β 2, shDaxx 와 shTGF β 2-shDaxx 바이러스를 처리한 그룹보다는 종양이 컸다. HPAC 는 세포가 성장하는데 어느 정도의 시간이 필요하고, 어느 정도 종양의 크기가 커지게 되면 급속도로 체장암이 커지게 되어 공격적이게 된다. 처음에는 세포의 수가 적어서 종양의 크기가 크지 않지만 17 일부터 급격히 종양의 크기가 커졌다. HPAC 세포의 수가 어느 정도 자라서 그렇게 종양의 크기가 커지게 된것이다. shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 바이러스를 주사한 3 개의 그룹은 종양의 크기를 효과적으로 줄였다. shDaxx 바이러스는 13 일 이후부터 종양의 크기가 약간씩 커졌다. 그러나 shTGF β 2 와 shTGF β 2-shDaxx 두 가지 바이러스를 주사한 그룹에서는 계속 종양의 크기를 줄였지만 종양 크기를 줄임에 있어서는 두 가지 바이러스간의 차이를 보이지 못하였다(그림 6A). 종양내에서 TGF β 2 와 Daxx 가 감소하고 있는지 조직면역화학염색법을 이용하여 확인해 보았다(그림 6B). PBS 를 주사한 그룹에서는 아데노바이러스는 발현되지 않으며, TGF β 2 와 Daxx 가 핵주위로 염색된 것을 볼 수 있다. NC 를 주사한 그룹에서 아데노바이러스는 발현되며, TGF- β 2 와 Daxx 가 염색된 것을 알 수 있다. shTGF β 2 아데노바이러스를 주사한 그룹에서 아데노바이러스는 발현되는 것을 알 수 있고, TGF β 2 는 염색을 확인할 수 없었으며 Daxx 는 염색된 것을 볼 수 있다. shDaxx 를 주사한 그룹에서는 Daxx 의 발현의 감소를 확인할 수 있었고, 아데노바이러스를 확인하였을 때 NC 나 shTGF β 2

아데노바이러스를 주사한 그룹보다 약간 더 진하게 염색된 것을 알 수 있다. shTGF β 2-shDaxx 를 주사한 그룹에서는 아데노바이러스의 발현이 증가하였고, TGF β 2, shDaxx 의 발현이 약간 감소된 것을 알 수 있다.

이를 통하여 생체 외에서나 생체 내에서 TGF β 2 의 발현을 감소시켰을 때 암세포의 성장 및 증식을 억제시켜 종양의 크기를 줄이는 효과를 보이며 Daxx 의 경우 발현이 높은 세포에서 Daxx 의 발현을 감소시켰을 때 아데노바이러스의 유전자 발현 증가와 생산을 증대 시킬 수 있고 생체 내 종양의 크기를 줄일 수 있다는 결론을 얻었다.

(A)



(B)

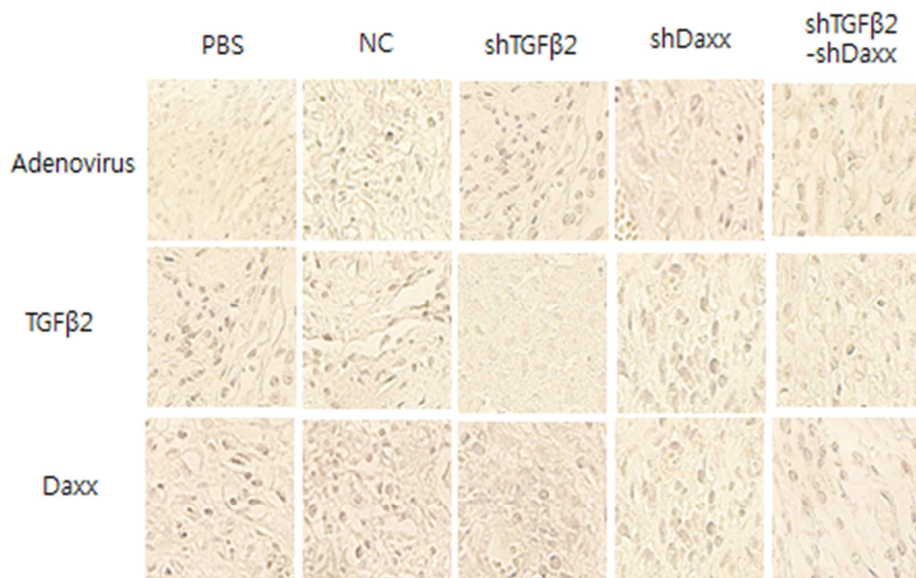


그림 6. shTGF β 2 , shDaxx, shTGF β 2- shDaxx 아데노바이러스의
생체 내 효과 확인

(A) 종양 크기 측정

BALB/c nude 수컷 마우스를 각 그룹당 6 마리씩 분배하고, $1 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$ 으로 HPAC 세포를 이식하였다. 그리고 7 일 후에 종양이 생겼을 때 복제 가능 shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스를 1×10^{10} VP/ml 의 농도로 $50 \mu\text{l}$ 씩 3 번 종양 내로 주사하였다. 그리고 2 일 간격으로 종양 크기를 측정하였다.

(B) 조직면역화학염색

사람 췌장암 세포인 HPAC 세포를 $1 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$ 피하에 주사했다. 그리고 7 일 후 각각의 PBS, NC, shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 3 번의 아데노바이러스를 1×10^{10} VP/ml 의 농도로 $50 \mu\text{l}$ 로 종양내로 주사한 후 첫번째 주사하고 9 일 후에 조직을 떼어내어 10 % formaldehyde 로 하룻밤동안 고정시켰다. 파라핀조직은 항체를 사용하여 염색하였다. 여기서 사용된 항체는 adenovirus 5, human TGF β 2, human Daxx 를 이용하였다.

(Magnification: $\times 400$)

IV. 고찰

TGF β (transforming growth factor β)는 정상세포와 초기 종양세포에서는 종양을 억제하는 역할을 하지만, 종양이 점차 자라면서 종양의 성장을 촉진하는 방향으로 그 기능이 바뀌게 된다. 그러므로 TGF β 의 발현을 억제하는 shTGF β 2 아데노바이러스를 제작하여 암세포의 생존과 증식을 억제하고자 하였다. 그리고 아데노바이러스의 복제에 부정적인 역할을 한다고 알려져³¹ 있는 Daxx의 발현을 억제하기 위한 shDaxx 바이러스를 제작하였다. 먼저 정상 췌장세포와 여러 가지 췌장암세포에서 TGF β 1, TGF β 2의 단백질의 양이 어느정도 되는지 ELISA로 확인하였다. TGF β 1은 MiaPaCa-2 세포에서 발현량이 가장 적었고, HPAC 세포에서는 정상췌장세포에서와 비슷한 TGF β 1의 양이 확인되었다. 그렇지만 BxPC3 세포는 정상세포에 비해서 TGF β 1 단백질 발현량이 눈에 띄게 많은 것을 확인하였다. 다음으로 TGF β 2의 양을 확인하였는데 정상 췌장 세포와 MiaPaCa-2 세포에서 TGF β 2의 발현량이 거의 없는 반면에 HPAC와 BxPC3 세포에서는 많은 TGF β 2 양이 발현되었다. 이는 정상췌장세포에 비해서 암이 진행될수록 TGF β 의 발현량이 증가한다는 보고들과 같은 맥락의 결과라 할수 있다²³. 두 가지 췌장암세포주 HPAC, BxPC3에서 TGF β 1, TGF β 2 발현량이 높은 것으로 확인됨에 따라, TGF β 1, TGF β 2 발현을 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스를 이용하여 억제시키고자 하였다. HPAC, BxPC3 췌장암 세포에 shTGF β 1 바이러스를 50 MOI로 감염시킨 후 TGF β 1의 양이 감소하였고, shTGF β 2 바이러스를 50 MOI로 감염시킨 후 TGF β 2는 바이러스의 MOI가 증가할수록 TGF β 2가 감소되어 50 MOI일 때는 TGF β 2 양이 효과적으로 감소되었다.

TGF β 가 여러 암세포의 생존, 증식을 촉진한다는 보고³⁹ 가 있었기 때문에 shTGF β 1, shTGF β 2 아데노바이러스로 TGF β 1, TGF β 2 를 감소시켰을 때 암세포의 생존에는 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. HPAC 와 BxPC3 세포에 shTGF β 1, shTGF β 2 바이러스를 감염시켜 MTT assay, 군락형성분석(clonogenic assay) 로 cell viability 를 측정하였다. HPAC 세포에서는 대조군 바이러스에 비해 shTGF β 2 바이러스 감염시 48 시간, 단기간 세포의 생존을 확인하는 MTT assay 와 장기간 세포의 생존을 확인할 수 있는 군락형성분석(clonogenic assay)를 시행하였을 때 모두 살아있는 암세포가 감소되었다. 그러나 shTGF- β 1 바이러스를 HPAC 세포에 감염시켜 TGF β 1 의 양을 감소시켰을 때 MTT assay 와 군락형성분석(clonogenic assay) 두 실험 모두 췌장암 세포의 생존과 증식을 감소시키는데는 영향을 끼치지 못하였다. BxPC3 세포에서 MTT assay, 군락형성분석(clonogenic assay)을 진행한 결과 shTGF β 1 바이러스를 감염시켰을 때 대조군 바이러스 비해 단기간, 장기간 췌장암 세포 생존 및 증식을 감소시키는데 효과가 있었다. BxPC3 세포에 shTGF β 2 바이러스를 감염시켰을 때 MTT assay 결과를 보면 대조군 바이러스에 비해 단기간 암세포 생존을 감소시킬수는 없었지만, 장기간 암세포 생존을 관찰할 수 있는 군락형성분석(clonogenic assay) 결과에서는 shTGF β 1 바이러스가 암세포의 생존을 감소시킨 것보다 더욱 효과적으로 암세포의 생존을 감소시켰다. 선행된 연구에 따르면 TGF β 1 은 같은 췌장암 세포라 하더라도 TGF β 1 단백질에 반응하는 반응성은 cell type 에 따라 다를 수 있다⁴⁰. HPAC 와 BxPC3 는 같은 췌장암 세포주라 할지라도 cell type 이 달라서 shTGF β 1 아데노바이러스를 감염시켜 TGF β 1 단백질 양을 감소시켰다 할지라도 세포의 종류가 달라 다른 효과를 보인 것으로 생각할

수 있겠다. shTGF β 1 아데노바이러스가 BxPC3 에서는 암세포의 생존을 억제 시킬수 있었지만 HPAC 에서는 암세포의 생존을 감소시킬수 없었던 것이다. BxPC3 세포에서 shTGF β 2 아데노바이러스에 대해 MTT assay 와 군락형성분석(clonogenic assay) 결과가 다르게 나왔다. 이것은 BxPC3 세포에서 shTGF β 2 바이러스의 반응에 시간적 차이가 존재한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 2 일 후에 시행한 ELISA 결과를 확인하여 보았을 때(그림 2B), 결과를 보면 두 가지 세포에 shTGF β 2 아데노바이러스 50 MOI 를 감염시켰을 때 HPAC 에서 92 % 의 TGF β 2 양이 감소하는 반면 BxPC3 에서는 50 MOI 를 감염시켰을 때 60 % 정도밖에 감소하지 않은 것을 알 수 있다. 2 일 후에 50 MOI 를 감염시킨 HPAC 세포의 MTT assay 결과를 보면 상당한 양의 TGF β 2 가 감소하여 단기간의 췌장암 세포의 생존을 감소시킬 수 있는 반면에, shTGF β 2 아데노바이러스 50 MOI 를 감염시킨 BxPC3 에서는 2 일 후에 세포안의 아직 남아있는 TGF β 2 의 양이 존재하게 되어 단기간의 MTT assay 결과에서 암세포의 생존을 유의성있게 감소시키지 못하다가 시간이 지나면서 TGF β 2 의 양이 세포 안에서 점차 감소하게 되어 군락형성분석(clonogenic assay) 결과에서 췌장 암세포의 생존을 억제시키는 효과를 보인 것이라고 말할 수 있다.

TGF β 는 ERK 와 PI3K/Akt 신호 전달 활성을 통해서 암세포의 증식 또는 생존을 증가시키는 것으로 알려져 있고 ⁴¹ PI3K/Akt 신호전달이 억제되었을 때 TGF- β 에 의한 암세포 생존이 억제 되었다는 보고가 있다 ⁴². shTGF β 2 바이러스의 암세포의 생존이 억제되는 것이 ERK 와 PI3K/Akt 신호 전달을 통해서 이루어진 것이라고 예측하고 이것을 증명하기 위해 HPAC 와 BxPC3 에 shTGF β 2 바이러스를 감염시키고 2 일 후에 western blot 을 시행하여 p-ERK, p-Akt 를 확인하여 보았다. TGF β 2 의 단백질양을 감소시키면

p-ERK 와 p-Akt 밴드가 사라질거라는 예상과는 달리 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 나타났다. p-ERK 와 p-Akt 밴드는 외부 스트레스에 대한 세포 스스로의 보호 반응으로 신호전달이 나타나게 된다는 보고가 있다^{43,44}. 세포 안에서는 외부 스트레스를 순간적으로 처리하게 되면 외부 스트레스에 대한 세포의 보호의 관점으로 생존에 관여하는 신호가 나오게 되나, 이 신호는 점차 사라지게 되어 사라진 신호가 세포 사멸을 유도하게 된다는 것이다. 이러한 내용을 바탕으로 보아 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 나타난 것은 shTGF β 2 아데노바이러스로 인하여 TGF β 2 양이 줄게되어 세포자체가 스스로의 생존신호인 p-ERK 와 p-Akt 신호를 활성화 시킨것으로 볼 수 있으며, 그러나 이것은 시간이 지나면서 신호가 감소하게 되어 췌장 암세포의 생존을 저해시키게 된다. 그 생존 신호가 사라지는 반응이 조금 빠른 HPAC 에서는 48 시간만의 MTT assay 결과에서도 세포의 증식이 억제되는 효과를 보였고, 5 일 까지 세포 스스로 생존 신호를 활성화시킨 BxPC3 세포는 48 시간의 MTT assay 에서는 세포 생존의 효과가 없었던 것을 알 수 있다. 이렇게 두가지 세포에서 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 사라지는데 시간적 차이가 나는 이유를 먼저 HPAC 세포에서는 2 일 만에 TGF β 2 아데노바이러스에 의해서 TGF β 2 의 양이 92 % 나 감소하게 되어(그림 2 B), 적어진 TGF β 2 의 양 때문에 p-ERK 밴드가 잠시 나타나게 되는 것이고, 그 이후로는 시간이 갈수록 TGF β 2 의 양이 매우 적어졌기 때문에 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 시간이 갈수록 빠르게 사라졌던 것이다. 그러나 BxPC3 같은 경우에 2 일에 측정해본 ELISA 결과를 위에서 보았듯이(그림 2B), TGF β 2 의 양이 60 % 정도밖에 감소되지 않아서 2 일, 5 일까지 세포 안의 TGF β 2 의 양이 남아있게 되어 p-ERK 와 p-Akt 밴드가 나오게 되고, 5 일 이후로 시간이 갈수록 세포

안의 TGF β 2 의 양이 매우 감소하게 되어 그때야 비로소 p-ERK 와 p-Akt 밴드 가 감소된 것이라고 말할 수 있겠다.

shDaxx 가 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질의 발현을 증가시키고, 바이러스 생산도 증가시킨다는 보고가 있어서³¹ 이것을 증명하고자 NC 바이러스와 shDaxx 바이러스를 HPAC 와 BxPC3 두 가지 세포에 50 MOI 로 감염시킨 후 2 일 후에 세포를 얻어 western blot 으로 아데노바이러스 복제의 필수적인 단백질의 발현을 확인하였다. 확인한 결과 BxPC3 세포에서는 복제불능 shDaxx 바이러스도 late gene 발현을 증가시켰고, 복제가능 shDaxx 바이러스에서 E1A 유전자의 발현이 증가된 것을 알수 있었다. 그러나 HPAC 에서는 late gene 이나 복제에 필요한 단백질인 E1A 의 발현에 하나도 영향을 주지 못하는 것을 확인하였다. shDaxx 아데노바이러스가 아데노바이러스의 생산에도 영향을 주는지 확인하기 위해서 복제불능 NC, shDaxx 바이러스와 복제가능 NC, shDaxx 바이러스를 두 가지 세포에 감염한 것을 2 일 후에 세포를 얻어 293A 세포에 다시 post-infection 하여 8 일 후에 세포를 깨고 나온 바이러스의 양을 확인하였다. BxPC3 세포에서는 복제가능 NC 바이러스 보다 복제가능 shDaxx 바이러스가 훨씬 아데노바이러스의 증식을 증가시켰다. 그러나 HPAC 에서는 바이러스의 유전자의 발현을 확인한 것에서도 바이러스의 양을 보는 실험에서도 복제가능 NC 바이러스와 shDaxx 바이러스의 차이가 없었다(그림 4A,B). HPAC 의 경우는 BxPC3 세포에 비해서 세포 안에 존재하는 Daxx 의 양이 적기 때문에 shDaxx 아데노바이러스를 이용하여 세포안의 Daxx 의 발현량을 감소시킨다 하더라도 대조군인 NC 아데노바이러스를 감염시켰을 때와

아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질의 발현과 생산에는 영향을 주지 못한 것으로 보인다.

지금까지 shTGF β 2 와 shDaxx 각각의 효과에 대해서 확인하였다. 다음으로는 shTGF β 2 와 shDaxx 를 함께 넣은 바이러스를 제작하여 효과를 확인하였다. 먼저 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 TGF β 2 양을 감소시키는지 ELISA 로 확인하였다. 두 가지 HPAC, BxPC3 세포 모두에서 바이러스의 MOI 가 증가할수록 TGF β 2 양을 감소시켰다. 그리고 Daxx 의 발현량도 감소시키는 지 확인하였을 때 두 가지 세포 모두에서 MOI 가 증가할수록 효과적으로 Daxx 의 발현이 감소되었다. shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스도 shTGF β 2 바이러스가 장기간의 췌장암 세포의 성장 및 증식을 억제하였던 것처럼 두 가지 췌장암 세포에서 군락 형성이 감소된 것을 알 수 있었다. 그리고 유전자 발현을 확인하였을 때도 shDaxx 아데노바이러스의 효과와 유사한 결과를 보였다. 각각의 바이러스가 생체 내에서도 항 종양 효과를 나타내는지 확인해 보기 위해서 동물 실험을 진행하였다. TGF β 가 면역물질이기 때문에 면역이 있는 마우스로 실험을 진행하는 것이 맞지만 생체 외 실험에서도 암세포의 생존과 증식에 영향을 주는 것에 대하여 실험하였기 때문에 생체 내 실험에서도 암세포의 생존과 증식을 확인하고자 BALB/c nude 수컷 마우스에 HPAC 세포에 이식하여 동물실험을 진행하였다. 췌장암세포인 HPAC 세포는 세포의 수가 어느 정도 궤도에 올라야 가속이 붙어 빠르게 증식 하게 된다. 종양이 너무 커지게 되면 바이러스의 증식 속도보다 세포가 성장하는 속도가 빨라 바이러스의 효과를 제대로 보기 힘들기 때문에 종양의 크기가 작은 상태에서 동물실험을 시작하였다. PBS, 복제 가능 NC, 복제 가능 shTGF β 2, 복제 가능 shDaxx, 복제 가능 shTGF β 2-

shDaxx , 즉 PBS 와 4 가지 바이러스를 2 일 간격으로 모두 3 번 종양 내로 직접 주사하였고, 2 일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. PBS 그룹에서는 종양의 크기가 가장 커지고, NC 바이러스를 주사한 그룹은 종양의 크기에 변화가 없다가 15 일 이후부터는 HPAC 세포의 성장 속도가 급격히 증가되는 것을 확인하였다(그림 6A). 15 일 이후부터 HPAC 세포의 수가 어느 정도 궤도에 올라서 이때부터 종양 크기가 급격히 증가하게 되는 것을 알 수 있다. 나머지 shTGF β 2 바이러스의 경우 종양의 크기가 작을 때 시작을 해서 첫번째 바이러스를 주사했을 때부터 종양의 크기가 줄어든 것을 확인할 수 있었다. shTGF β 2 바이러스는 생체 내에서도 효과적으로 암세포의 증식을 억제하고 있었다. 나머지 shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 바이러스는 5 일째부터 종양의 크기가 줄기 시작했다. 그러나 시간이 갈수록 11 일째까지 세가지 바이러스간의 차이는 나타나지 않았다. shDaxx 아데노바이러스도 종양의 크기를 감소시킬 수 있는데, 이것은 Daxx 가 항-세포고사를 유도^{45,46} 한다고 알려져 있기 때문에 Daxx 의 단백질양을 감소시켰을 때 세포 고사가 일어난 것이라고 생각한다. shTGF β 2 와 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스는 계속 작은 종양 크기를 유지시키고 있다. shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스에서 좀더 증대된 항종양효과를 보일 것이라고 예상하였다. 그렇지만 shTGF β 2 아데노바이러스와 비교하였을 때 종양의 크기를 줄이는데 큰 차이를 보이지 않았다. 보고된 바에 따르면 Daxx 가 세포의 사멸을 유도할 때 caspase 에 의존하지 않은 신호전달로 세포사멸을 유도한다는 보고가 있다^{47,48}. 그렇기 때문에 shDaxx 아데노바이러스의 세포사멸의 신호전달과 shTGF β 2 에 의해 항종양효과를 나타내는 신호 전달이 유사하여 두 가지 유전자를 억제시킨 효과가 나타나지 않고 하나의

유전자를 억제한 효과만 나타나게 된 것이라고 생각한다. 그래서 shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스로 효과 확인을 해보았을 때 생체 외 실험에서와 생체 내 실험에서 각각 shTGF β 2, shDaxx 아데노바이러스의 효과 정도만 얻을 수 있었다. Daxx 의 발현량이 적은 HPAC 세포에서는 Daxx 의 발현을 줄여 아데노바이러스의 복제와 생산을 증가시키는 효과를 보기는 힘들었다. 그렇지만 생체 외 실험을 진행해 본 결과 BxPC3 세포에서는 shDaxx 아데노바이러스가 아데노바이러스의 복제와 생산을 증가 시킬 수 있었기 때문에 shTGF β 2 로 인한 항 종양 효과와 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질의 생산을 증가시켜 더욱 더 항 종양효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다. 앞으로 이것을 동물 실험으로 입증하는 것이 필요하겠다.

V. 결론

TGF β (transforming growth factor β)는 정상세포와 초기 종양세포에서는 종양을 억제하는 역할을 하지만, 종양이 점차 자라면서 종양의 성장을 촉진하는 방향으로 그 기능이 바뀌고, Daxx (death-associated protein 6)는 아데노바이러스 감염시 아데노바이러스 복제에 부정적인 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 TGF β 2, Daxx 의 발현을 억제할 수 있는 shTGF β 2 - shDaxx 을 발현하는 아데노바이러스를 이용하여 암세포의 생존 및 증식을 억제하고, 아데노바이러스의 증식을 증가시키는 효과를 얻고자 실험을 진행하였다. 생체 외 실험에서 실험을 진행한 결과 췌장암 세포주인 HPAC 와 BxPC3 에서는 TGF β 1 단백질을 감소시키는 것보다 TGF β 2 단백질을 감소시키는 것이 장기간 췌장 암세포의 생존 및 증식을 억제시키는데 효과적이라는 사실을 증명하였다. 그리고 단기간에는 두 가지 세포주에서 TGF β 2 에 대한 반응성의 차이가 있었지만 장기간에는 두 가지 세포주 모두에서 TGF β 2 를 감소시킨 shTGF β 2 아데노바이러스를 사용하는 것이 췌장암 세포의 생존 및 증식을 억제시킨다는 것을 확인하였다.

BxPC3 세포에 복제가능 shDaxx 아데노바이러스를 감염시켰을 때 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질인 E1A 의 발현이 증가되었고 또한, 바이러스의 생산도 많아진 것을 확인할 수 있었다. 생체 내 실험을 진행해 보았을 때도 shTGF β 2, shDaxx, shTGF β 2-shDaxx 아데노바이러스가 마우스의 종양 크기를 줄이는 효과를 보였으나 세가지 바이러스간의 차이를 보이지는 않았다. Daxx 의 발현량이 적은 HPAC 세포에서는 Daxx 의 발현을 줄여 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질의 발현의 증가와 바이러스 생산을 증가시키는 효과를 보기는 힘들었다. 그렇지만 생체 외

실험을 진행해 본 결과 BxPC3 세포에서는 shDaxx 아데노바이러스가 아데노바이러스의 복제에 필수적인 단백질의 발현인 E1A 의 증가와 와 생산을 증가 시킬 수 있었기 때문에 shTGF β 2 로 인한 항 종양효과와 아데노바이러스의 복제 및 생산을 증가시켜 더욱 더 항 종양 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

참고 문헌

1. Post DE, Khuri FR, Simons JW, Van Meir EG. Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens. *Hum Gene Ther* 2003;14:933-46.
2. Oosterhoff D, van Beusechem VW. Conditionally replicating adenoviruses as anticancer agents and ways to improve their efficacy. *J Exp Ther Oncol* 2004;4:37-57.
3. Dyson N, Harlow E. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* 1992;12:161-95.
4. Yew PR, Liu X, Berk AJ. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 1994;8:190-202.
5. Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 1994;68:6553-66.
6. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158-68.
7. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.
8. Tijsterman M, Ketting RF, Okihara KL, Sijen T, Plasterk RH. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 2002;295:694-7.
9. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007;178:437-51.
10. Lebrun JJ. Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol* 2009;668:69-78.
11. Padua D, Massague J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 2009;19:89-102.
12. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:1011-22.

13. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807-21.
14. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:435-57.
15. Cao Y, Karin M. NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8:215-23.
16. Neil JR, Schiemann WP. Altered TAB1:I kappaB kinase interaction promotes transforming growth factor beta-mediated nuclear factor-kappaB activation during breast cancer progression. *Cancer Res* 2008;68:1462-70.
17. Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, Watabe T, Maruyama O, Imamura T, et al. Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JyMC(A) cells. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1734-46.
18. Park JI, Lee MG, Cho K, Park BJ, Chae KS, Byun DS, et al. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:4314-32.
19. Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:15-34.
20. Ma GF, Miao Q, Zeng XQ, Luo TC, Ma LL, Liu YM, et al. Transforming growth factor-beta1 and -beta2 in gastric precancer and cancer and roles in tumor-cell interactions with peripheral blood mononuclear cells in vitro. *PLoS One* 2013;8:e54249.
21. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:6949-52.
22. Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:4413-8.
23. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth

- factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 1998;77:1492-4.
24. Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998;8:1243-52.
 25. Park JA, Wang E, Kurt RA, Schluter SF, Hersch EM, Akporiaye ET. Expression of an antisense transforming growth factor-beta1 transgene reduces tumorigenicity of EMT6 mammary tumor cells. *Cancer Gene Ther* 1997;4:42-50.
 26. Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, et al. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2909-14.
 27. Schlingensiepen KH, Jaschinski F, Lang SA, Moser C, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2011;102:1193-200.
 28. Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Scott B. Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57:3200-7.
 29. <Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas.pdf>.
 30. Oh S, Kim E, Kang D, Kim M, Kim JH, Song JJ. Transforming growth factor-beta gene silencing using adenovirus expressing TGF-beta1 or TGF-beta2 shRNA. *Cancer Gene Ther* 2013;20:94-100.
 31. Schreiner S, Burck C, Glass M, Groitl P, Wimmer P, Kinkley S, et al. Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes. *Nucleic Acids Res* 2013;41:3532-50.

ABSTRACT

Anti-tumor effect of adenovirus expressing shTGF β 2-shDaxx

Eunkyung Kim

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Joo-Hang Kim)

TGF β (transforming growth factor β) acts as a tumor suppressor in normal cells and early-phase tumor cells, but switches its function to a tumor promoter in advanced tumor stages. Daxx (death-associated protein 6) plays an inhibitory role in the replication of adenovirus in the adenovirus infection. This experimental study was conducted with the purpose of improving the antitumor effects of a oncolytic adenovirus containing short hairpin RNA (shRNA), which reduces TGF β 2 and Daxx expression in pancreatic cancer cells. Thereby inhibiting TGF β 2 induced cancer cell growth and proliferation, and concomitantly reducing Daxx expression to promote the oncolytic adenovirus replication. The experimental results are described in the following sections below. TGF β 2 expression is increased in pancreatic cancer cells compared to normal

pancreatic cells. Thus, to reduce the amount of TGF β 2 protein expression, TGF β 2 shRNA (shTGF β 2) adenovirus infected in pancreatic cancer cells. The shTGF β 2 adenovirus effectively reduced TGF β 2 in pancreatic cancer cells. In order to examine whether shTGF β 2 adenovirus inhibits cancer cell survival and proliferation, MTT assays and clonogenic assays were performed. The MTT assay results showed that shTGF β 2 adenovirus infection in HPAC cells induced a decrease in TGF β 2 expression, which was accompanied with a significant reduction of HPAC cell survival when in HPAC cells infected with the control virus. While shTGF β 2 adenovirus did not show any inhibitory effect on the survival and proliferation of BxPC3 cancer cells when assayed by MTT assay. But they showed inhibitory effect in the clonogenic assay. Thus, the clonogenic assay results indicated that clonogenic assay survival decreased in both types of pancreatic cancer cells when infected with the shTGF β 2 adenovirus. Given the difference in the results between the MTT assay and clonogenic assay, which can measure short-term and long-term cancer cell survival, respectively, western blot analysis was performed to determine the time-dependent changes in intracellular signaling by harvesting the cells in a time series. In a short-term timeframe of 2 d, phosphorylated extracellular-signal regulated kinase (p-ERK) and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) were detected. However, both p-ERK and p-Akt gradually disappeared over time, resulting in a decreased in long-term cancer cell survival. On the other hand, the Daxx shRNA (shDaxx) adenovirus-mediated decrease Daxx expression in BxPC3 cells resulted in an increase in adenovirus early region A1 (E1A) expression, which is essential for

adenovirus replication, which amount increased accordingly. However, such effects could not be observed in HPAC cells, due to the small amount of intracellular Daxx protein. When the two types of pancreatic cancer cells were infected with the shTGF β 2-shDaxx combined virus, both TGF β 2 and Daxx expression decreased. The animal trial, which was conducted to investigate the *in vivo* effects of all three adenoviruses (shTGF β 2, shDaxx, and shTGF β 2-shDaxx), indicated that all three adenoviruses reduced tumor size in mice. However, no distinguishable difference could be observed among the three adenoviruses in the *in vivo* experiment using HPAC cells. Nonetheless, the *in vitro* experiments revealed that shDaxx adenovirus could increase the production of adenovirus by increasing E1A expression, which is essential for adenovirus replication. Thus, improved antitumor effects may be expected by combining the shTGF β 2 and shDaxx-mediated antitumor effects and the promotion of adenovirus replication and production. Further research is warranted to prove the *in vivo* antitumor effects of shTGF β 2-shDaxx combinations in BxPC3 cell.

Key Words : TGF β 2, Daxx, oncolytic adenovirus, ERK, Akt,
Antitumor