

IL-12 와 4-1BB ligand 를 발현하는
종양 선택적 살상 복제가능 재조합
아데노바이러스와 수지상세포
병합치료의 항 종양 효과

연세대학교 대학원
의과학과
황 경 화

IL-12 와 4-1BB ligand 를 발현하는
종양 선택적 살상 복제가능 재조합
아데노바이러스와 수지상세포
병합치료의 항 종양 효과

지도교수 김 주 항

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

황 경 화

황경화의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2007년 6월 일

감사의 글

외과의사라는 우월한 직업을 잠시 그만두고 박사공부를 선택하여 한국에 나온지 어언 4 년이란 세월이 흘렀습니다. 인생에서는 적지 않는 시간이라고 생각합니다. 이 선택을 하기에는 거의 2 년이라는 시간이 걸렸었습니다. 그렇지만 암 치료에 대한 열정과 욕망은 저를 이곳까지 불렀고 지금까지 달려오게 되었습니다. 언제인가 이런 말을 들은 적이 있습니다. ‘이미 늦었다고 생각하였을 때가 제일 빠른 시기이다’ 라고…… 그리고 ‘인생은 배움의 길’ 이라고…… 이것은 누구의 인생에서나 채찍이 될 말인 것 같습니다. 4 년 전, 그런 와중에 연변병원의 김해 병원장님, 허동철 외과교수님과 동생 심용호 박사의 도움으로 어려운 결정을 내리게 된 것을 진심으로 감사드립니다. 박사과정 시작부터 논문을 완성하기까지 주변의 모든 분들의 도움이 없었다면 불가능하였을 것입니다.

2003 년, 단풍이 울긋불긋 물들었을 때 희망에 가득 찼던 제가 처음 연세대학 암연구소에 와서 보고, 듣고 하는 것이 왜 그렇게 생소하고 낯설기만 하던지, 너무 힘들어서 모든 것을 포기하고 집으로 돌아가기 싶은 생각이 날 때가 한 번 두 번이 아니었습니다. 의과대학을 졸업했기에 다른 사람만 나올 거라고 생각했지만 그것은 80 년대의 지식에 불과하였습니다. 학부 때의 기초 실험은 지금에서 보면 참으로 너무나도 기본이었습니다. 처음 제가 영어장애부터 여러 가지 생소한 분자생물학과 유전자 기초실험을 접촉하였을 때 너무 힘들어 하던 저에게 항상 힘이 되어 주셨던 김주향 교수님과 윤채옥 교수님을 너무나 고맙게 생각합니다. 바쁘신 시간을 내어 연구실에 올라오실 때마다 저에게 연구진행 상황을 상세히 물으시면서 빨리 좋은 연구실적을 내기를 기대하시던 김주향 교수님, 그리고 윤채옥

교수님은 제가 한국에 처음 왔을 때, 영어장애 때문에 저와의 discussion 에서 항상 간단한 언어로 대화하려고 하셨던 기억이 아직도 생생합니다. 그리고 기본이 안 되어 있는 저의 기초분자생물학 지식이 저의 열정에 걸림돌이 될까 염려하시어 임상적인 혹은 해부학적 문제로 저에게 물으시면서 항상 용기와 열정에 사랑의 물줄기를 뿌려 주셨습니다. 또 나이가 좀 많은 학생인 저의 자존심을 고려하시어 어린 학생들 앞에서 항상 저에게 관심을 가져주셨던 것도 저에게는 얼마나 큰 도움이 되었는지 참으로 고마운 일이었습니다. 나이가 좀 많아서 그런지 아니면 저의 적응력이 부족하여 그런지 여러 가지 원인으로 인하여 이 연구소에서 생활한지가 거의 2 년 반이 지났을 때 윤채옥 교수님이 처음 저에게 이런 말씀하셨습니다. 저와의 discussion 이 enjoy 라고…… 그렇게 기초가 안되어 있던 저를 이제껏 이끌어 주시고 지도해주셨던 분이라는 것을 새삼스럽게 다시 생각하여 보았습니다. 언제나 선생님이기도 하시면서 누님 같기도 하신 윤채옥 교수님, 깊이 머리 숙여 감사 드립니다…… 그리고 그렇게 바쁘신 와중에도 저의 논문에 깊은 관심을 가져주셨고 또 많은 보귀한 의견과 수정을 해주신 이민걸 교수님, 김경섭 교수님, 라선영 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 또 항상 재미있게 저와 discussion 을 하여 주신 안중배 선생님과 손주혁 선생님에게도 감사 드립니다.

이렇게 어렵게 ‘아기 걸음발’ 부터 시작한 박사과정에서 항상 옆에 있어 주었던 두 사람은 저의 실험실 선배이자 동생인 김재성 박사, 그리고 아직 저와 같은 박사과정이지만 실험실 선배나 다름이 없는 최경주, 이 두 분은 제가 실험실 생활에서 파이렛맨 쓰는 방법부터 가르쳐주신 고마운 동생들입니다. 명절연휴에 외국타향에 나와서 외로워 할까 근심되어 자기집에까지 초대해주던 최경주, 참으로 맘 한구석이 뜨거웠던

일이었습니다. 그리고 이미 박사과정을 졸업했지만 저에게 여러모로 도움을 줬던 이영숙씨, 저와 같이 ‘아저씨 삼총사’의 일원이자 룸메이트 동생인 림창수박사와 직설적인 성격에 맘이 더운 김인욱 박사, 만화 속의 공주 같고 애교 만점인 김진선박사, 또 ‘아저씨 삼총사’ 앞줄에 앉아 매일 실험하면서 재미있는 이야기를 주고 받던 박사과정 ‘미녀삼총사’ - ‘우리 큰 며느리’ 민정이, 열썸이 유지영, 쪽쪽빵빵 아름이, 그리고 이제 어엿한 회사원이 된 동현이, 레절 바른 김평환, 덜렁덜렁한 것 같지만 세심하고 귀여운 구태영이, 정이 많고 의리에 사는 지훈이, 연기의 달인 최일규, 이쁜이 강윤아, 이쁜 일만 골라서 하는 사랑스런 김민주, 가수 뺨을 치는 정선미, 박사과정에 금방 들어선 장송남, 우리 실험실에 금방 발을 들여놓고 열정에 쌓인 최정선, 섬세하고 예절 바르고 실험과 사랑에 열정을 쏟을 줄 아는 오준이…… 모두 가슴이 찡하게 여러모로 저에게 도움을 줬던 고마운 동생들이었습니다. 진짜 어느 세월에도 안되었던 우리 실험실이 이렇게 식구가 많아졌는지 모를 정도로 그사이 많이 컸구나 하는 생각이 듭니다. 거기에는 김주항 교수님과 윤채옥 교수님의 피땀이 들어 있었고 실험실 일동이 퍼부은 열정이 깃들어 있습니다.

한때 룸메이트도 같이 하고 술잔에 이 세상의 모든 맛을 담아 마시면서 동고동락했던 친구 송범이, 그리고 언제나 사랑과 격려로 배려해주고 이 친구가 잘 되기만 바라던 친구 장위훈, 주영호 등에게 진심으로 고맙게 생각합니다. 그리고 아버지가 간암으로 입원해 있을 때, 이 자식을 대신하여 남부럽지 않게 치료와 보살핌을 아끼지 않았던 연변병원 종양외과 허동철 과장님, 김문호 부과장님, 최현선생님과

김성림, 최해, 김철수 등 의사 여러분들과 간호사분들에게 진정으로 감사 드립니다.

어렵게 시작한 저의 박사학업이 순조롭게 마칠 수 있게 든든한 뒷심이 되어 주시고 적극 지지를 해주셨던 돌아가신 아버지와 아직 고향에 계시면서 이 아들을 어렵게 뒤 바라지를 하였고 지금까지 지켜보고 계시는 노숙하신 어머님께 깊은 감사 드립니다. 제가 학업이 끝나기를 기다려 주시지 못하고 간암으로 돌아가신 아버지, 운명하시는 시간까지 옆을 지켜주지 못한 이 아들의 불효를 용서해 주십시오. 아버지, 부디 하늘나라에서 행복하게 보내십시오. 그리고 축복해주십시오, 이 아들을……

또 그렇게도 이 사위를 사랑해주시고 아껴주셨던 장인 어르신과 장모님, 변함없는 사랑과 지지를 주신 백일수 형님 부부와 그 일가족들, 경자누님과 제부 차덕수, 맏형님 정승일, 큰 처제 김옥설, 둘째 처제 김란, 처남 김걸과 처남댁 이연화에게 감사드립니다. 그리고 사랑하는 백학림, 백미화 일가족, 차충학, 정춘려, 박서연, 김리정 등 여러 조카들에게도 항상 고맙게 생각합니다.

돌이켜 생각하면 무엇보다 저를 행복에 잠기게 한 것은 저의 일 가족입니다. 남편을 타지에 보내고 속으로만 눈물 흘렸고 남편의 고생과 락을 함께 나누며 사랑으로 든든한 뒷심이 되어 준 사랑하는 아내 김영이와 10 살 나이에 집안일을 도와서 한 가정의 남자노라 힘을 자랑하고 이 불효한 아버지를 대신하여 할아버지의 영전을 지켜주었으며 또 아버지에 대한 사랑으로 늘 학업에서 우수한 성적을 알려준 사랑하는 아들 지홍이에게 너무나 감사하고 미안하기만 합니다. 너무나도

감동스런 세월이었으며 하나 하나가 저를 여기까지 이끌어 준 힘이었습니다.

4 년이라는 세월은 어느새 이렇게 흘러가고 감개무량한 추억과 여운을 남겨주었습니다. 오늘도 논문을 마무리하는 저의 맘이 동해안의 출렁이는 저 파도처럼 설레이게 합니다. 저에게 알게 모르게 도움을 주시고 축복해주었던 주변의 모든 분들에게 이 논문을 바치면서 늘 행복하고 기분 좋은 일만 찾아 들기를 기원합니다.

저자 씀

차 례

차례 및 그림 차례	i ~ v
국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	9
1. 대상세포주 및 세포배양	9
2. 실험동물	9
3. IL-12와 4-1BBL을 발현하는 종양선택적 복제가능 재조합 아데노바이러스 제작, 생산 및 역가산출	10
4. Oncolytic assay를 통한 바이러스의 복제와 살상능 비교	11
5. 골수유래 수지상세포의 분화와 배양	11
6. B16-F10 악성흑색종 세포주에서의 IL-12 발현량 측정	12
7. B16-F10 악성흑색종 세포주에서의 4-1BBL 발현량 측정	12
8. 악성흑색종 유도 및 항 종양 효과 관찰	13
9. 악성흑색종 전이모델에서의 폐전이 억제 관찰	14
10. 마우스 생체 비장세포 추출	14
11. 악성흑색종 조직 내 IFN- γ 발현량 측정	15
12. 골수유래 수지상세포의 flow cytometry 분석	15
13. IFN- γ ELISpot assay	16
14. 조직면역염색 분석	16
15. CTL 분석	17
16. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 수지상세포 이동능 분석	18
17. 통계분석	19

III. 결과	20
1. IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 종양 선택적 살상, 복제가능 재조합 아데노바이러스의 제작 및 IL-12 와 4-1BBL 발현양상 규명	20
2. Oncolytic assay 를 통한 재조합 아데노바이러스의 복제와 살상능 비교	22
3. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 아데노바이러스의 항 종양 효과.....	23
4. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 악성흑색종 조직 내 IFN- γ 발현량 분석	24
5. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 IFN- γ ELISpot 분석	25
6. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 악성흑색종 조직 내 면역세포 분포 분석	26
7. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 CTL 분석	27
8. 골수유래 수지상세포의 분화과정과 flow cytometry 분석	28
9. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료에 의한 항 종양 효과	29
10. 악성흑색종 전이모델에서의 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료에 의한 폐 전이 억제 효과	30
11. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 종양조직 내 IFN- γ 발현량 분석	32
12. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 IFN- γ ELISpot 분석	33
13. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 면역세포 분포 분석	34
14. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 CTL 분석	35
15. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 수지상세포 이동능 분석	36

IV. 고찰.....	38
V. 결론.....	43
참고문헌.....	44
영문요약.....	50

그림 차례

Figure 1. Schematic representation of Ad-5 type genomes with IL-12 and/or 4-1BBL gene	21
Figure 2. Confirmation of IL-12 and 4-1BBL expression.....	21
Figure 3. Oncolytic assay of adenoviruses expressing IL-12 and/or 4-1BBL	22
Figure 4. Elicited anti-tumor effect of IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses	23
Figure 5. Evaluation of IFN- γ expression in tumor tissues after treatment of IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses	24
Figure 6. IFN- γ ELISpot assay using the splenocytes of the B16-F10 bearing mice treated with IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses	26
Figure 7. Histological assessment of tumor tissues treated with IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses	27
Figure 8. Cytotoxic activity after IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses treatment	28
Figure 9. Microscopy and flow cytometry analysis of Bone marrow derived dendritic cells	29
Figure 10. Elicited anti-tumor effect of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy	30
Figure 11. Anti-metastasis effect of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy on melanoma metastasis	31
Figure 12. Effect of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy on IFN- γ expression.....	33
Figure 13. INF- γ ELISpot assay in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse	34
Figure 14. Histological assessment of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs treated melanoma	35
Figure 15. Cytotoxic activity in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse	36
Figure 16. DCs migration activity in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse.....	37

국 문 요 약

IL-12 와 4-1BB ligand 를 발현하는 종양 선택적 살상 복제가능 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료의 항 종양 효과

종양 선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스를 이용한 암에 대한 유전자치료 연구가 최근에 활발히 진행되고 있으며, 암 치료에 이용되는 유전자로는 주로 면역 활성화, 혈관형성 억제, 세포 주기의 억제에 관여하는 유전자 등이 있다.

대부분의 종양세포는 그 세포막에 공동자극분자의 결핍으로 면역계통의 인지를 피하게 된다. 이러한 종양세포의 면역반응 회피를 극복하기 위하여 여러 가지 공동자극분자 또는 수지상세포 등이 이용되고 있다. CD137(ILA/4-1BB) ligand(4-1BBL)는 활성화된 수지상세포 및 B 세포 표면에 있는 공동자극분자인데 4-1BB 와 반응하여 T 세포(특히 CD8⁺) 등의 증식을 거쳐 항암면역을 나타낸다. 또한 전문화된 항원제시세포(antigen presenting cells, APCs)인 수지상세포(dendritic cells, DCs)는 종양에 대한 면역반응에서 innate immunity 와 adaptive immunity 를 이어주는 연결고리임으로 현재까지 알려진 가장 강력한 암 치료용 세포치료제로써 많이 주목 받고 있다. 그리고 interleukin-12(IL-12)는 강력한 항암면역기능을 가진 cytokine 으로 알려져 있으며, natural killer(NK) 세포와 lymphokine-activated killer(LAK) 세포, T 세포, 대식세포 등의 세포살상 기능을 높여주는 기능을 한다.

본 연구는 아데노바이러스의 E1B55kDa 과 E1B19kDa 유전자의 결손 및 E1A 부위의 retinoblastoma 단백질(pRb)과의 결합부위를 변이 시킨 Ad-ΔE1Bmt7(Ad-ΔB7) 아데노바이러스를 매개체로 IL-12, 4-1BBL 를 발현 시킬 수 있는 복제가 능한 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 가 Ad-ΔB7, Ad-ΔB7/IL12 와 Ad-ΔB7/41BBL 에 비하여, 그리고 수지상세포와의 병합치료가 각각의 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 단독 치료와 수지상세포 단독 치료에 비하여 항 종양 효과를 더욱 개선할 수 있는지 여부를 규명하기 위하여 계획되었다.

IL-12 단백질과 4-1BBL 의 발현은 ELISA 와 Western blotting assay 로 확인하였으며, 마우스의 피하 악성흑색종에서 Ad-

ΔB7/IL12/41BBL 바이러스가 Ad-ΔB7, Ad-ΔB7/41BBL, Ad-ΔB7/IL12 등 바이러스 보다 종양의 성장을 더 현저하게 억제함을 관찰하였다($p < 0.05$, Ad-ΔB7/IL12/41BBL: Ad-ΔB7/IL12; $p < 0.01$, Ad-ΔB7/IL12/41BBL: Ad-ΔB7/41BBL and Ad-ΔB7). 이러한 항암기전이 종양에 대한 특이면역반응에 의한 것인지 여부를 검증하기 위하여 마우스 비장세포의 interferon- γ (IFN- γ) ELISpot 분석, 종양 내 IFN- γ 발현 및 cytotoxic T lymphocyte(CTL) 분석을 하였다. 그 결과, Ad-ΔB7/IL12/41BBL 를 이용하여 치료한 마우스에서 다른 대조 마우스에 비하여 종양 내 IFN- γ 발현이 현저하게 증가함과 CTL 의 종양특이 세포살상능 증가, 그리고 ELISpot 분석을 통하여 비장세포 종양 특이 면역세포의 유의한 증가를 확인하였다. 종양 내 CD4⁺, CD8⁺, CD86⁺, CD11c⁺ 등 면역세포의 침윤은 IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 아데노바이러스로 치료한 종양에서 Ad-ΔB7 로 치료한 경우에 비하여 현격하게 증가한 것을 확인하였다.

나아가서 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 아데노바이러스를 수지상세포와 함께 마우스의 악성흑색종에 투여할 때 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스 단독 치료그룹에 비하여, 그리고 수지상세포 단독 치료그룹에 비하여 각각 더욱 개선된 항 종양 효과를 나타내었다. 또한 종양에 대한 특이 면역반응 여부를 검증하기 위하여 비장세포의 IFN- γ ELISpot 분석과 종양 내 IFN- γ 발현 및 CTL 분석으로 그 변화를 관찰한 결과, Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료한 마우스의 비장에서 종양 특이 살상세포의 증가와 종양 내 IFN- γ 발현의 증가, 그리고 종양세포에 대한 특이 살상능의 현저한 증가를 확인하였다. 치료 후 종양조직에는 CD4⁺, CD8⁺, CD86⁺, CD11c⁺ 등 면역세포의 침윤이 현저하게 증가함이 관찰되었다. 또한 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료할 때 lymph node 로 이동한 수지상세포의 수가 수지상세포를 단독으로 치료할 때 보다 더욱 증가됨을 확인하였다. 마우스 B16BL6 악성흑색종을 이용한 폐 자연전이 모델에서 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포의 병합치료 결과, 폐에 암전이가 현저히 억제됨을 확인하였다. 결과적으로 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료하는 것이 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스 혹은 수지상세포를 단독으로 치료한 경우에 비하여 세포 독성면역으로 항 종양 효과가 현저히 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

종합하면 IL-12 와 4-1BBL 를 종양 선택적 세포살상, 복제가능 아데노바이러스에 탑재하여 항 종양 효과의 개선을 확인하였다. 그리고 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 종양항원으로 인지시킨 수지상세포를 병합하여 치료하면 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 또는 수지상세포를 각각 단독으로 치료에 사용하는 것 보다 더 강력한 항암 효과 및 암전이 억제효과가 유도됨을 확인하였다.

이에 근거하여 결론적으로 IL-12 및 4-1BBL 를 발현하는 종양선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스를 수지상세포와 병합하여 악성흑색종을 치료하는 방법을 실제 환자의 치료에 응용하여 그 치료효과의 유용성 여부를 규명할 필요가 있음을 제안한다.

핵심되는 말: 종양선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스, IL-12, 4-1BBL, 세포치료, 유전자치료, 면역치료, 암

IL-12 와 4-1BB ligand 를 발현하는
종양 선택적 살상 복제가능 재조합
아데노바이러스와 수지상세포
병합치료의 항 종양 효과

<지도교수 김 주 향>

연세대학교 대학원 의과학과

황 경 화

I. 서 론

바이러스를 이용한 암 유전자 치료는 1990 년대에 연구가 시작되었으며, 초기에는 레트로바이러스 활용이 큰 비중을 차지했으나 점차 아데노바이러스를 이용한 연구가 최근 연구의 주된 흐름이다. 재조합 아데노바이러스는 우수한 유전자 전달효율 및 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있는 특징을 갖고 있다. 뿐만 아니라 in vivo 에서도 유전자 전달이 용이하다는 점이 보고¹ 되면서 최근 5 년 사이에 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 재조합 아데노바이러스를 이용하는 빈도수가 급격히 증가하고 있다. 증식불능 아데노바이러스를 이용한 일 세대 아데노바이러스는 감염된 세포 및 극히 일부의 주변세포들에서만 항암효과를 유발할 수 있어 그 효과가 미미한 수준이었다². McCormick 그룹은 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상하는 종양세포 특이 증식 및 세포살상 재조합 아데노바이러스에 대한 연구결과를 처음 보고하여 그 한계를 극복하기 위한 방안을 제시한바 있으며³, 그 후 종양세포 선택적 살상 아데노바이러스를 이용한 항암치료의 가능성이 다각도로 연구되고 있다.

아데노바이러스가 정상세포에 감염하면, 감염된 세포는 종양 억제 단백질인 p53 을 활성화시켜 바이러스의 증식을 억제하며 아데노바이러스의 E1B55kDa 단백질은 감염세포의 p53 단백질과 결합하여 p53 의 기능을 억제하는 역할을 하게 된다⁴. 결과적으로 정상세포에 야생형 아데노바이러스가 감염하면 아데노바이러스의 증식이 가능하게 되어 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도한다. 하지만 E1B55kDa 유전자가 소실된 재조합 아데노바이러스가 정상세포에 감염되면 이들 세포에 있는 p53 의 비활성화를 유도할 수 없어 바이러스의 증식이 억제된다. 그러나 정상세포와는 달리 p53 의 기능이 억제되어 있는 암세포들에서는 바이러스의 증식을 억제하지 못하여 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되고 결과적으로 종양세포에서만 살상을 유도하게 된다^{3, 5}. Bischoff 등은 E1B55kDa 유전자가 부분 결실된 ONYX-015(d1 1520) 아데노바이러스의 선택적 항 종양 효과를 보고하였고, cisplatin 과 같은 항암제를 동시에 처리함으로써 암세포에 대한 살상능을 증가시킬 수 있었으며, p53 이 정상인 암세포들도 효과적으로 살상할 수 있었음을 보고하였다^{3, 5}.

아데노바이러스 E1B 유전자의 또 다른 단백질인 E1B19kDa 은 강력한 세포고사 억제체로서 Bcl-2 와 염기서열 및 그 기능이 유사하다^{6, 7}. E1B19kDa 단백질은 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A 에 의해 유도되는 세포고사, 종양세포에서 p53 에 의하여 유도되는 세포고사⁸⁻¹¹, 성장 인자의 결핍, 방사선치료 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사 등을 억제한다¹². 이를 근거로 이미 본 실험실에서는 아데노바이러스의 E1B19kDa 과 E1B55kDa 를 동시에 결손시킴으로써 보다 우수한 항 종양 효과를 유도 할 수 있음을 보고하였다¹³.

아데노바이러스 E1A 는 바이러스 복제 시 가장 먼저 발현되는 단백질로서 바이러스 복제에 필수적이다. E1A 단백질은 세포주기를 조절하는 retinoblastoma 단백질(pRb)과 결합하여 E2F-pRb 복합체로부터 E2F 의 해리를 유도하여¹⁴⁻¹⁶ 세포주기 활성화에 관여하는 여러 단백질들의 전사를 촉진시킨다¹⁷. 그러나 많은 종양세포에서는 pRb 유전자의 변이로 이와 관련된 신호전달체계(p16ARF/pRb/E2F 등)가 손상되어 세포주기가 계속 진행되어지며¹⁸ 이에 따라 바이러스의 증식이 지속적으로 일어난다. 이에 반하여 pRb 의 기능이 정상적인 세포 내에서는 pRb 와의

결합력이 상실된 증식가능 아데노바이러스의 E1A 가 pRb 와 결합할 수 없어 감염된 세포는 S 세포주기로 진행되지 못하고 결과적으로 바이러스는 복제되지 못한다. 이에 근거하여 Fueyo 등은 120-127 아미노산 서열을 결손 시킨 Δ 24 아데노바이러스가 Rb 유전자가 돌연변이 된 암세포를 선택적으로 살상할 수 있음을 보고하였으며¹⁹, 본 연구실에서는 E1A 유전자 염기서열 중 pRb 단백질과의 결합에 관여하는 CR1 결합부위의 Glutamine 을 Glycine 으로, CR2 의 121-127 아미노산을 Glycine 으로 치환하고 동시에 E1B19kDa 과 E1B55kDa 유전자를 결실시킨 Ad- Δ B7 를 제작하였다. 이 바이러스는 야생형 아데노바이러스와 유사하거나 보다 빠른 종양세포살상을 유도하였으며, 정상세포에서는 Ad- Δ B7 아데노바이러스의 세포 살상능이 현저히 감소하는 종양세포 특이성을 확인하였다²⁰.

최근 종양 면역학의 급속한 발전으로 숙주와 종양과의 관계가 규명되어짐에 따라 숙주의 면역반응의 활성화를 통하여 종양을 치료하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. IL-12는 p40과 p35 소단위 공유결합의 75kDa의 cytokine으로서²¹ Th1 세포 활성화의 중요한 조절 인자로 알려져 있으며, 수지상세포, 단핵세포, 대식세포에서 많이 발현하고 있다²²⁻²⁴. IL-12는 감염초기반응에서 생성되며²³ NK 세포와 T 세포의 활성화를 유도한다²⁴. Heller등은 IL-12를 발현할 수 있는 플라즈미드를 B16-F10 악성흑색종에 직접 투여한 다음 전기충격을 주어 세포가 IL-12를 발현하게 함으로써 항 종양 효과를 향상시킴과 동시에 IL-12의 독성을 최소화 하는 방안을 보고한바 있다²⁵.

최근 연구가 많이 되고 있는 4-1BB와 4-1BBL는 일종의 면역세포의 공동자극분자다. 4-1BB는 type I 수송막 당단백질에 속하는 tumor necrosis factor(TNF)의 수용체이다. 특히 생쥐와 인간의 CD4⁺ 와 CD8⁺ 세포에서 발현되며²⁶⁻²⁹, 생쥐에서는 활성화된 NK 세포 및 수지상세포 외에 호중구에도 발현이 되고 있다³⁰. 인간에서는 4-1BB가 여포의 수지상세포³¹, 단핵세포³², 간암세포²⁷ 그리고 악성종양에서 생성된 특정 혈관 벽에도 발현이 된다고 보고되어 있다³³. 이에 상응하는 4-1BBL는 type II 수송 막 당 단백질에 위치하고 TNF superfamily에 속하는 세포외부의 탄소말단구역에 위치하고 있으며 인간과 생쥐에서는 주로 활성화된 수지상세포와 대식세포뿐만 아니라 B 세포에도 그 발현이 증가된다는 보고가 있다³⁴⁻³⁸. 4-1BB와 4-1BBL는

TNF-TNF 조절분자들의 한 family로서 T 세포의 활성화^{28, 39, 40}, 분화 및 세포고사 억제에⁴¹ 관여한다. Lee⁴² 등은 4-1BB의 활성화가 Bcl-XL와 Bfl-1 등 세포고사 저해 단백질들을 증가시킴으로써 NF- κ B를 활성화시켜 CD8⁺ T 세포를 activation-induced cell death(AICD)로부터 벗어나게 한다고 보고하였다. 또한 Lindstedt³¹와 Wen⁴⁰ 등은 수지상세포의 4-1BBL 발현과 그 기능에 의해 증가된 효과기 CD8⁺ T 세포가 인간의 CD8⁺ T 세포 면역반응을 기인한다고 보고하였다. 최근에는 4-1BBL가 수지상세포의 활성화 기능을 하는 것으로 보고되었다^{37, 43}. 4-1BBL는 효과기 CD8⁺ T 세포 및 기억 CD8⁺ T 세포 분화, 증식과 생존연장에서 중요한 기능을 한다^{40, 42, 44}. CD8⁺ T 세포뿐만 아니라 CD4⁺ T 세포에서도 4-1BBL의 신호전달경로를 선택적으로 비교한 연구가 있는데, Melero⁴⁵ 등은 마우스 항체를 사용하여 선택적으로 CD4⁺ T 세포 집락을 고갈시킨 후 항 종양 효과가 없어지는 것을 생쥐 실험에서 관찰하였다. 또한, Zhu⁴⁶ 등은 항원 투여로 생체실험을 했을 때 4-1BBL가 B 세포의 생존을 조절함으로써 체액 면역반응을 조절한다고 보고하였다.

이러한 4-1BBL는 세포독성면역과 기억면역세포에서 그 면역조절작용이 검증되었다^{47, 48}. Martinet⁴⁹ 등은 복제불능 아데노바이러스를 벡터로 사용하여 유방암 간 전이모델에서 IL-12와 항 4-1BB 항체 또는 4-1BBL를 마우스의 종양에 전달시켜 마우스의 생존율이 각각 87%와 78%에 달하는 치료효과를 보고하였으며, Xu⁵⁰ 등은 IL-12와 4-1BBL를 병합하여 치료시 항 종양 효과는 주로 CD8⁺ T 세포의 활성화를 기인한다고 보고하였다. 그리고 Pan⁵¹ 등은 IL-12와 항 4-1BB 항체가 삽입된 복제불능 아데노바이러스를 이용하여 BALB/c 대장암의 간 전이를 억제하였을 뿐만 아니라 종양에는 수지상세포와 NK 세포의 침윤을 일으킨다고 보고하였다.

Steinman과 Chon⁵² 이 1973년에 보고한 수지상세포는 'nature's adjuvant'라는 명성을 얻고 있으며 고도로 전문화된 항원제시세포로 resting / naive T 세포의 활성화에 중요한 기능을 하는 것으로 밝혀졌다⁵³⁻⁵⁷. 수지상세포가 강력한 면역기능 활성의 중심에 설수 있는 이유는 세포표면에 major histocompatibility complex molecule(MHC) I/II를 발현함으로써 APC의 기능을 수행할 뿐만 아니라 CD80, CD86과 4-1BBL, adhesion molecule(예, ICAM-1)등을 고농도로 발현하기 때문

이다. 또한, 수지상세포는 CTL의 활성화를 통하여 TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-18 등 여러 가지 cytokine을 분비하도록 할 뿐만 아니라 스스로 cytokine을 분비하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 수지상세포에 의한 CD4⁺ helper T 세포(Th1 type)의 증식 및 활성화뿐만 아니라 *in vivo* 실험을 통해 생체 내로 주입된 수지상세포도 CTL의 생성을 촉진한다고 보고되었다⁵⁷⁻⁶². 따라서 수지상세포를 이용하여 치료하고자 하는 종양의 항원/표지 인자로 교육시켜 종양 특이 면역세포의 기능을 회복시키거나 활성화시키도록 유도한다면, 종양을 치료하는 면역세포 치료제로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라 기억 면역을 되살려 숙주가 종양세포의 공격을 받을 때 보호작용을 할 수 있다.

지금까지 IL-12와 4-1BBL를 종양 선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스에 삽입하여 항 종양 효과를 규명한 연구가 없었다. 본 연구자는 앞에서 제시한 여러 가지 기전들을 종합적으로 병합하여, 즉 IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 종양 선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스와 수지상세포를 병합하여 항암치료에 적용한다면 아데노바이러스의 종양 살상 작용뿐만 아니라 유전자면역치료와 면역세포치료를 병합하여 더욱 개선된 항 종양 효과를 유도할 수 있을 것으로 사료되는바 이의 검증을 위하여 본 연구를 계획하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주로는 아데노바이러스의 E1 유전자를 함유하고 있는 인체 배아 신장세포주(HEK293)와 인체 뇌종양 세포주(U343), 폐암 세포주(A549), 마우스 피부 섬유아세포주(Mus Dunn) 그리고 마우스 악성흑색종 세포주 B16BL6와 B16-F10 등 이다. B16BL6 는 한국 서울대 세포주은행에서 구입하였고 그 외의 모든 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 대부분 세포주는 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 배양하고, B16BL6 세포주는 1 x 의 Minimum essential medium (MEM) vitamin solution(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 함유된 10% MEM(Invitrogen) 배양하였다. 모든 세포의 배지에는 2 mM L-glutamine 100 IU/ml(Invitrogen); penicillin/ streptomycin 100 μ g/ml(Invitrogen); gentamycin sulphate(Duchefa, Haarlem, Netherlands)를 15 μ g/ml 되게 첨가하여 사용하였다. 수지상세포의 분화와 배양에 사용한 10% RPMI-1640 에는 50 μ M의 β -mercaptoethanol을 첨가하였고 recombinant mouse interleukin-4(rmIL-4, Endogen, Woburn, MA, USA)를 0.01 μ g/ml, recombinant mouse granulocyte and monocyte-colony stimulating factor(rmGM-CSF, Endogen)를 0.01 μ g/ml 각각 첨가하였다.

2. 실험동물

생후 6~8 주 된 체중 20 g 내외의 건강한 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하였다. 마우스는 Shizuoka Laboratory Center (Japan SLC Inc, Tokyo, Japan)에서 구입하여 폴리카보네이트 케이지에 3~4 마리씩 넣어 멸균된 수돗물과 사료(중앙실험동물, Seoul, Korea)를 공급하고 가능한 스트레스를 받지 않도록 조용한 분위기의 specific pathogene free room 에서 사육하였다. 모든 동물실험은 연세대학교 의과대학의 동물사육 및 실험관련규칙을 준수하였다.

3. IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 종양선택적 복제가능 재조합 아데노바이러스 제작, 생산 및 역가 산출

연구에 사용된 아데노바이러스는 V type으로 E1B 부위와 E3 부위가 모두 소실되고 E1A 부위의 Rb 단백질 결합 위치가 돌연변이된 Ad-ΔB7(pd1 324ΔE1B/E1A mt#7)으로서 이는 이미 본 연구소에서 그 종양세포 특이적 살상 복제가능 기능이 확인된 바 있다²⁰.

Ad-ΔB7/IL12/41BBL를 제작하기 위하여, 먼저 mouse IL-12 유전자를 발현하는 Ad-ΔB7/IL12를 제작하였다. 이를 위하여 pcDNA3.1-IRES 벡터(cytokine 은행, 전북대학교, 전주시, 한국)를 *EcoRI* 제한효소로 처리하여 나온 약 800 base pair(bp) 크기의 IRES 유전자를 pcDNA3.1-p35 벡터(cytokine 은행)의 p35 유전자 바로 뒤의 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 삽입시켜 pcDNA3.1-p35/IRES 벡터를 제작하였다. 그리고 pcDNA3.1-p40(cytokine 은행)을 *PmeI* 과 *XhoI* 제한효소로 처리하여 나온 1007 bp 크기의 p40 유전자를 pcDNA3.1-p35/IRES 벡터의 IRES 바로 뒤의 *EcoRV* 제한효소를 이용하여 삽입시켜 pcDNA3.1-IL12 벡터를 제작하였다. pcDNA3.1-IL12 벡터를 *PmeI* 과 *XhoI* 제한효소로 다시 처리하여 나온 약 2.5 kb 크기의 IL-12(p35/IRES/p40)를 *EcoRV* 과 *SalI* 제한효소로 처리된 pCA14 또는 pCA14/E1AE1B19 벡터에 삽입시켜 pCA14/E1AE1B19-IL12 아데노바이러스 E1 셔틀벡터를 제작하였다. 제작된 pCA14/E1AE1B19/IL12 셔틀벡터를 *NdeI* 제한효소로 처리하여 선형화시키고, *BstBI* 을 처리하여 선형화된 토달 벡터인 Ad-ΔB7 과 함께 대장균 BJ5183에 동시에 형질 전환시켜 상동 재조합을 유도하여 E1 부위에 IL-12 유전자가 삽입된 종양 특이적 살상, 복제가능 아데노바이러스인 Ad-ΔB7/IL12를 제작하였다.

그리고 4-1BBL 유전자를 추출하기 위하여 C57BL/6 마우스의 골수에서 분리, 분화, 활성화 시킨 수지상세포로부터 reverse transcription - polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하여 total RNA 산물을 획득한 다음 cDNA를 합성하였다. 4-1BB ligand를 증폭할 수 있는 primer(sence: 5'-ATGGATCCACCATGGACCAGCACACTTG-3', anti-sence: 5'-AGATAAGCTTTCATTCCCATGGGTGTC-3')를 제작하고 PCR을 수행하여 획득한 산물을 *BamHI* 과 *HindIII* 제한효소로 잘라서 약 930 bp 길이의 DNA 절편을 획득한 뒤, pSP72/ΔE3/CMV-polyA 셔틀벡터⁶³에 ligation 하여 또 다른 pSP72/ΔE3/CMV(cytomegalovirus promoter)-41BBL-poly 셔틀벡터를 제작하였다. 4-1BBL 유전자의 염기서열을 확인하여 본 결과 National Center for Biotechnology Information(NCBI) L15435 염기서열의 53~982 부분과 완전히 동일하

였다. 이 셔틀벡터를 *Xmn*I 으로 자른 다음 *Spe*I 제한효소로 자른 Ad-ΔB7(pd1 324ΔE1B/E1A mt#7) 토달 벡터, 그리고 E1B 부위에 마우스 IL-12 유전자가 삽입된 Ad-ΔB7/IL12 아데노바이러스 토달벡터(pd1 324ΔE1B/E1Amt#7/CMV-IL12-polyA)와 각각 BJ5183 대장균에 형질전환시켜 상동재조합을 유도하여 E3 부위에 마우스 4-1BBL 유전자가 삽입된 Ad-ΔB7/41BBL와 Ad-ΔB7/IL12/41BBL를 제작하였다. 제작된 모든 플라스미드는 *Pac*I 으로 자른 다음 lipofectamine(Invitrogen)과 plus(Invitrogen)을 사용하여 HEK293 세포주에 형질 도입하였다. 이렇게 각각의 아데노바이러스를 증식 배양 한 후 CsCl density purification을 시행하고 투석한 후, 4% sucrose를 함유한 storage buffer의 삼투를 거친 다음 분취하여 -80℃에 냉동 저장하였다⁶³. 각 바이러스 용액의 역가는 분광기를 이용하여 바이러스 genome의 흡광도에 의한 optical density(O.D)로 산출하였다.

4. Oncolytic assay 를 통한 바이러스의 복제와 살상능 비교

IL-12 와 4-1BBL 유전자의 발현여부가 아데노바이러스의 복제와 종양세포 살상능에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여 Ad-d1 324BstB1(Ad-ΔE1), Ad-ΔB7, Ad-ΔB7/IL12, Ad-ΔB7/41BBL, Ad-ΔB7/IL12/41BBL 등 5 종류의 바이러스를 이용하여 종양세포 살상효과를 비교, 분석하였다. 실험에 사용한 세포주들은 인체 뇌암세포주-U343, 인체 폐암 세포주-A549, C57BL/6 마우스의 악성흑색종 세포주-B16-F10 이다. 암세포주들은 30~50% 의 confluence 로 24-well plate 에 분주한 뒤 바이러스를 0.1~500 multiplicity of infection(MOI) 별로 선택하여 각각 감염시켰다. 이들 바이러스 중 어느 한 바이러스가 제일 낮은 역가에서 암세포를 완전히 사멸시킨 시점, 혹은 감염 후 5~7 일 시점에서 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet(in 50% methanol)로 잔존한 세포들을 고정하고 염색한 후 분석하였다.

5. 골수유래 수지상세포의 분화와 배양

골수유래 수지상세포(bone marrow derived dendritic cells, BMDCs)의 분화와 배양은 변형된 Inaba 등의 배양방법⁵⁸으로 시행하였다. 골수세포는 6~8 주령 된 C57BL/6 마우스의 경골과 대퇴골에서 분

리하고 적혈구를 제거하기 위하여 EDTA-ammonium chloride 용액(0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)을 10 ml 넣어 4°C에서 5 분간 방치한 후 10% RPMI-1640 배지로 2 회 세척하였다. 그리고 이를 100 μm의 cell strainer에 걸러서 찌꺼기를 제거하였다. 이 여과 된 세포를 1 x 10⁶ cells/ml로 10% RPMI-1640(50 uM β-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 15 μg/ml gentamycin)에 부유시킨 다음 rmIL-4를 0.01 μg/ml, rmGM-CSF를 0.01 μg/ml 넣어주고 6 well plate에 분주하였다. 분주 후 2 일과 4 일에는 부유되어 있는 세포와 배지를 버리고 rmIL-4와 rmGM-CSF가 각각 0.01 μg/ml 함유된 신선한 10% RPMI-1640 배양액으로 갈아주었다. 분주 후 6 일에는 위와 같은 배지로 갈아주는 동시에 B16-F10 혹은 B16BL6 악성흑색종 세포에서 정제, 추출해 낸 총 단백질을 50 μg/ml 첨가하여 주고 분주 후 7 일에는 lipopolysaccharide(LPS, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1 μg/ml 첨가하여 주었다. 배양 후 8 일에는 용기에 살짝 붙어 있는 세포를 파이펫 충격으로 떨어뜨려 회수한 다음 원심 분리하여 상층액은 버리고 세포는 멸균된 식염수로 세척하여 사용하였다.

6. B16-F10 악성흑색종 세포주에서의 IL-12 발현량 측정

Ad-ΔB7/IL12 와 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 의 세포감염 후 IL-12 단백질의 발현 정도를 측정하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였다. Murine 세포주에 대해서는 human 아테노바이러스의 유전자 전달효율이 낮다고 보고 된 바 있어, 유전자 전달 효율을 증가시켜 주기 위해 lipofectamine과 plus를 이용하였다. B16-F10 마우스 악성흑색종 세포를 2 X 10⁴ cells/well, 6 well plate에 분주한 다음 날 0, 25, 50, 100 등 여러 MOI로 배지 단독, 그리고 Ad-ΔB7/41BBL, Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스를 lipofectamine과 15 분간, plus와 15 분간 상온에서 반응시킨 다음 용적을 10% RPMI-1640 배지로 1.5 ml 맞추어 각각의 well에 감염시켰다. 감염 4 시간 뒤 1.5 ml의 배지로 갈아주고 감염 후 48 시간 경에 배지를 수득하여 ELISA를 실시하였다. ELISA의 전 과정은 mouse IL-12 ELISA set(Endogen)의 설명서에 따라 시행하였다.

7. B16-F10 악성흑색종 세포주에서의 4-1BBL 발현량 측정

바이러스가 감염된 세포에서 4-1BBL의 발현을 알아보기 위해서, lipofectamine과 plus를 첨가한 상기의 바이러스들로 20, 40, 80 MOI

로 각각 감염시킨 1×10^6 개의 B16-F10 세포를 20 시간 뒤 수득하여 phosphate buffered saline(PBS, Invitrogen)로 2 회 세척한 다음 proteinase inhibitor cocktail(Sigma)을 1x 되게 첨가한 RIPA 용액 (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-Cl: PH 7.2, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, in DW)을 사용하여 세포를 용해시켰다. 여기에서 총 단백질을 추출하고 BCA™ protein assay kit(Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질의 양을 각각 측정하였다. 측정된 단백질에 β -mercaptoethanol을 10% 되게 첨가, protein loading buffer 를 1x 되게 첨가한 다음 끓는 물에 5 분간 반응 시킨 후, 즉시 얼음에 넣어 10 분간 충분히 냉각시키고 흔들어 섞어주었다. 이 준비된 단백질 표본을 10% Tris-glycine SDS-polyacrylamide gel에서 전기 영동을 한 뒤, 12 V 에서 전기영동으로 1 시간 동안 PVDF membrane에 단백질을 옮겼다. 그 다음 1% BSA가 첨가된 PBS로 단백질이 옮겨진 PVDF membrane을 실온 shaker에서 30 분간 blocking 하였다. Blocking 된 PVDF membrane을 5% 탈지분유가 함유된 PBS-T buffer에 담그고 33.3 ng/ml로 goat anti - mouse 4-1BB ligand 항체를(R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 넣어서 실온에서 45 분간 binding 시킨 다음 tween 20 이 0.1% 들어있는 PBS로 3 회 세척해주고 rabbit anti-goat IgG(H+L)-HRP(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 1:3000으로 넣어서 실온, shaker에서 45 분간 반응시켰다. PBS-T로 3 회 세척한 다음 western blotting luminol reagent solution “A” 와 “B” (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1:1로 섞어서 PVDF membrane을 적셔주고 필름에 현상하였다.

8. 악성흑색종 형성 및 항 종양 효과 관찰

B16-F10 악성흑색종 세포는 10% RPMI-1640 배지에서 단층으로 배양하여 0.25% trypsin-EDTA(Invitrogen)를 처리한 후 5×10^5 개의 생존세포를 $50 \mu\text{l}$ hanks' balanced salt solution(HBSS, Invitrogen)으로 부유하여 마우스의 우측 종양 복부 피하에 주사하였다. 종양세포 이식 후 약 5~7 일경에 종양의 크기가 약 60~80 mm³ 성장한 다음 바이러스 투여를 시작하였다. 대조군 PBS는 $50 \mu\text{l}$, Ad- Δ B7 및 Ad- Δ B7/41BBL는 1×10^{10} viral particle(VP)/ $50 \mu\text{l}$, Ad- Δ B7/IL12, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스는 5×10^9 VP/ $50 \mu\text{l}$ 로 lipofectamin과 plus에 혼합하여 2 일에 한번씩, 3 회 종양 내로 주사하였다.

아데노바이러스와 수지상세포를 병합치료하는 경우의 항 종양 효과 관찰은 종양세포 이식 후 7~9 일경에 종양의 크기가 약 100~120

mm³ 성장한 다음 바이러스 투여를 시작하였다(0 일). 대조군 PBS와 바이러스는 lipofectamin과 plus에 혼합하였으며 수지상세포는 생리식염수에 용해시켰다. 대조군은 PBS를 투여하였으며 DC, Ad-ΔB7/IL12/41BBL, Ad-ΔB7/IL12/41BBL + DC를 투여한 실험군에서는 바이러스를 5 X 10⁹ VP/50 μl로 2 일에 한번씩 3 회 종양 내로 투여(0, 2, 4 일), 수지상세포는 1 X 10⁶ cells/50 μl로 바이러스 투여를 시작한 다음 날부터 2 일에 한번씩 3 회 종양 내로 투여하였다(1, 3, 5 일).

종양의 크기는 바이러스 투여시점부터 1~2 일에 한번씩 종양의 최장경(a)과 그에 수직되는 최단경(b)을 각각 측정하여 $a \times b^2 \times 0.523(\text{mm}^3)$ 의 공식으로 산출하였다.

9. 악성흑색종 전이모델에서의 폐전이 억제 관찰

B16BL6 악성흑색종 세포주를 이용한 폐 자연전이 암 모델에서의 전이억제 관찰에서는 다음과 같이 실험을 진행하였다. 먼저 B16BL6 세포를 1.5 X 10⁵ cells/50 μl로 HBSS에 부유시킨 다음 마우스의 발바닥 피하에 주사하였다. 그리고 악성흑색종의 크기가 약 180~200 mm³ 되었을 때(18 일) Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스는 B16BL6 세포주사 후 18 일, 20 일, 22 일에 각각 5 X 10⁹ VP/50 μl씩 종양 내로 투여했고 수지상세포는 B16BL6 세포주사 후 19 일, 21 일, 23 일에 각각 1 X 10⁶ cells/100 μl씩 흉강 내 투여를 실시하였다. 26 일에(수지상세포 투여가 끝난 후 3일째) 오른쪽 무릎관절을 절단한 다음 사육, 관찰하였다. B16BL6 세포주사 후 48 일에 마우스를 경추 탈골 시키고 해부하여 폐 전이 상황을 분석하였다. 폐의 무게를 측정하고 폐의 자연전이 된 악성흑색종 nodule 은 최장경에 근거하여 great>1 cm, 1 cm≥large>0.5 cm, 0.5 cm≥medium>0.3 cm, 0.3 cm≥small로 나누어 분석하였다.

10. 마우스 생체 비장세포 추출

C57BL/6 마우스에서 무균상태로 비장을 적출한 뒤 비장을 균질화하고, 적혈구를 제거하기 위하여 EDTA-ammonium chloride 용액을 (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, Sigma) 10 ml 넣어 4℃에서 5 분간 방치하고 2000 rpm에서 10 분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거하고 10% RPMI-1640 배지로 2 회 세척하였다. 위의 세척과정이 끝난 세포는 100 μm의 cell strainer에 찌꺼기를 걸러내고 여과된 세포만 수거하여 실험에 사용하였다.

11. 종양조직 내 IFN- γ 발현량 관찰

종양내의 면역관련 IFN- γ 발현도와 항 종양 효과의 상관관계를 확인하기 위하여 종양조직 단백질을 추출하여 IFN- γ ELISA로 측정하였다. 마우스에 유발시킨 B16-F10 악성흑색종 내로 각각의 바이러스를 5×10^9 VP/50 μ l, 2 일 간격으로 3 회 투여를 끝내고 5 일 후 종양을 적출하였다. 그리고 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포의 병합치료 그룹에서 바이러스는 5×10^9 VP/50 μ l, 2 일 간격으로 3 회 종양 내 투여하였고 수지상세포는 첫 번째 바이러스 투여를 시작한 다음 날부터 2 일 간격으로 3 회 종양 내 투여를 실시하였다. 수지상세포의 투여가 끝난 5 일 후 종양을 적출하였다. 적출한 종양을 막자 사발에 균질화 한 후 1 x protease inhibitor cocktail(Sigma)이 첨가된 PBS를 사용하여 부유한 다음, 4 $^{\circ}$ C, 13200 rpm에서 10 분간 원심 분리한 뒤 상층액을 수득하여 단백질 정량을 시행하고 일정량의 단백질에서의 IFN- γ 발현량을 ELISA로 측정하였다. ELISA 전부과정은 마우스 IFN- γ ELISA kit(Endogen) 사용설명서에 따라 시행하였다.

12. 수지상세포 flow cytometry 분석

마우스의 골수유래 수지상세포를 단세포 부유물로 만든 다음, purified hamster anti-mouse CD3e monoclonal antibody, R-phycoerythrin-conjugated hamster anti-mouse CD11c(Integrin α_x chain) monoclonal antibody, purified rat anti-mouse CD14 monoclonal antibody, purified rat anti-mouse CD19 monoclonal antibody, purified rat anti-mouse CD40 monoclonal antibody, purified rat anti-mouse CD86(B7-2) monoclonal antibody, purified rat anti-mouse CD80(B7-1) monoclonal antibody, purified mouse anti-mouse H-2Kb/H-2Db monoclonal antibody, purified mouse anti-mouse I-A^b monoclonal antibody(Pharmingen, San Diego, CA, USA)등을 각각 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 45 분간 반응시킨 후 2% PBS 로 2 회 세척하고 fluorescence isothiocyanate(FITC) 혹은 phycoerythrin(PE)가 연결된 이차항체(SouthernBiotech)를 첨가하여 다시 45 분간 반응시켰다. 이후 2% PBS로 2 회 세척하고 2% paraformaldehyde(Sigma)로 고정된 후 flow cytometry 분석을 실시하였다.

13. IFN- γ ELISpot assay

아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 T 세포 매개 살상효과를 검증하기 위하여, 치료 후 마우스의 비장세포와 방사선을 조사한 종양세포와 공동배양을 실행하고 IFN- γ ELISpot assay를 실시하였다. 먼저 12000 Gy의 방사선을 조사한 B16-F10 세포를 3×10^6 cells/175T로 나누어 넣어주고 24 시간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고 24 시간 후 각각의 아데노바이러스 혹은 Ad- Δ B7/IL12/41BBL와 수지상세포로 치료한 마우스의 비장세포를 분리하여 3×10^7 cells/175T로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 recombinant mouse interleukin-2(rmIL-2, Endogen)가 100 U/ml 되게 첨가된 10% RPMI-1640 배양액과 같이 넣어서 방사선 조사된 B16-F10 세포와 5 일간 공동배양을 시행하고 다시 비장세포를 수거하였다. 24 시간 전에 anti-mouse IFN- γ (Pharminen) 항체로 4°C에서 코팅한 96 well assay plate(Pharminen)를 10% RPMI-1640로, 37°C에서 2 시간 blocking하고 수집된 비장세포를 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 , 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 개의 세포씩 96 well assay plate에 range 별로 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 12시간 후 plate 에 있는 세포를 버리고 증류수로 반응을 정지시킨 후 FBS가 10% 첨가된 PBS로 1 시간 blocking하고 washing buffer로 3 회 세척한 다음 biotinylated anti-IFN- γ (Pharminen) 항체를 넣고 2 시간 반응시키고 streptavidine-alkaline phosphatase (Pharminen) 접합체를 넣어 30 분간 반응시켰다. 기질액(Pharminen)을 넣고 반응을 지속시킨 다음 각각의 세포에서 IFN- γ 단백질을 분비하면 항원-항체 반응에 의하여 IFN- γ 가 붙은 부위가 자줏빛 색깔이 있는 점으로 보여지게 되는데, 반점이 적당할 때 증류수로 반응을 정지시키고 ELISpot reader로 그 수를 측정하였다. 모든 실험과정은 ELISpot mouse IFN- γ set(Pharminen)에서 제시한 실험법을 그대로 시행하였다.

14. 조직면역염색 분석

약 6~8 주령의 C57BL/6마우스의 우측 중앙복부 피하에 5×10^5 개의 B16-F10 세포를 주사한 후, 종양의 크기가 약 80~100 mm³ 성장하면 Ad- Δ B7, Ad- Δ B7/41BBL, Ad- Δ B7/IL12, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이

러스를 5×10^9 VP로 각각 lipofectamin과 plus 용액 6: 8(μ l) 비율로 반응시켜 2 일에 한번씩 3 회 종양 내로 주사하였으며 대조군은 PBS를 주사하였다. 그리고 DC, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 그리고 Ad- Δ B7/IL12/41BBL + DC로 각각 치료한 그룹에서, 바이러스는 5×10^9 VP/50 μ l로 2 일에 한번씩 3 회 종양 내로 주사하였고 DC는 1×10^6 cells/50 μ l, 바이러스 투여간격 사이로 2 일에 한번씩 3 회 종양 내로 주사하였으며 대조군은 PBS와 생리식염수를 주사하였다. 각각의 치료가 끝난 5 일 뒤 마우스에서 종양을 적출하여 조직은 O.C.T. compound(Sakura Finetec, Torrance, CA, USA)로 동결 박편 하고 10 μ m 두께로 절단하여 젤라틴이 코팅된 글라스 슬라이드 위에 부착한 다음 조직면역염색을 실시하였다. 먼저 조직과 슬라이드에 부착된 OCT는 20 분간 4 $^{\circ}$ C 100% acetone 용액에 넣어서 제거하고 슬라이드에 부착된 조직을 3% H₂O₂ 용액에서 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 4% 함유된 PBS로 실온에서 1 시간 blocking 처리를 한 다음 일차항체인 CD4(purified rat anti-mouse CD4 monoclonal antibody, Pharmingen), 또는 CD8(purified rat anti-mouse CD8 monoclonal antibody, Pharmingen), CD86(purified rat anti-mouse CD86 monoclonal antibody, Pharmingen), hamster anti-mouse CD11c(purified hamster anti-mouse CD11c monoclonal antibody, Pharmingen)를 1:20으로 dilution한 용액을 100 μ l씩 조직박편에 떨어뜨려 습도가 적당한 실온에서 2 시간 반응시켰다. 이 후 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 goat anti-rat(goat anti-rat IgG-HRP, Pharmingen) 이차항체를 넣어 실온에서 1 시간 반응 시키고, 3,3'-diaminobenzidine(DAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 첨가하여 발색 정도를 지켜본 후 70%, 90%, 100% alcohol에 탈수하고 100% xylene에 침전시킨 다음 커버 글라스를 덮어 관찰하였다.

15. CTL 분석

앞서의 여러 가지 아데노바이러스에 의한 항 종양 효과의 기전, 종양에 대한 세포독성 정도, 그리고 또 제작된 아데노바이러스와 수지상세포의 병합치료에서 어느 정도의 종양세포 특이 독성을 나타내는지 등을 확인하기 위하여 CTL 분석을 실행하였다. 여러 가지 그룹의 샘플 준비는 위의 IFN- γ ELISpot assay 와 같다.

마우스에서 종양세포 특이 살상 T 세포 활성도를 검증하기 위한 실험은 5 시간 ^{51}Cr 유리법을 이용하였다. 비장에서 추출한 적혈구를 제거한 세포를 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 10% RPMI-1640 배지로 희석한 후 rmIL-2(100 U/ml)와 방사선이 조사된 B16-F10 세포와 함께 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5 일간 배양하였다. 배양 후 5 일에 세포를 수집하여 원심 분리하고, 10% RPMI-1640 배지로 2 회 세척하였다. 표적세포(target cell: B16-F10 and Mus dunni cells)를 ^{51}Cr 로 표지시키기 위해서는, ^{51}Cr 을 200 uci 첨가하고 10% RPMI 1640 을 $150 \mu\text{l}$ 넣어주고 FBS 를 $50 \mu\text{l}$ 넣어준 다음 부유하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 60 분간 배양하였으며, 10% FCS 가 들어 있는 RPMI-1640 배지로 1000 rpm 에서 3 분씩 2 회 원심 분리하여 세척하였다. 앞서 준비된 5 일간 공동배양한 비장세포(effector cell)와 ^{51}Cr 으로 표지된 표적세포를 5:1, 15:1, 45:1(E: T)의 비율로 섞은 후 round-bottomed 96-well microplate 에 넣고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 5 시간 배양하였다. 배양 5 시간 후 1000 rpm 에서 5 분간 원심분리하고 상층액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 채취해 γ -counter 로 상층액에 유리된 ^{51}Cr 에 의한 γ 선의 강도를 측정하여 세포에 대한 독성을 산출하였다. 각 실험은 3 배수(triplicate)로 하였으며, 다음의 공식으로 세포독성에 의한 ^{51}Cr 의 방출량을 산출하였다.

$$^{51}\text{Cr Release (cytotoxicity) \% = (E-S) \times 100\% / (M-S)$$

E: Experimental release count

S: Spontaneous release count

M: Maximum incorporation count

16. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 수지상세포 이동능 분석

Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스가 수지상세포의 이동능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 DCs 이동능 분석을 시행하였다. 실험그룹은 수지상세포만 종양에 투여한 마우스와 수지상세포와 Ad- Δ B7/IL12/41BBL를 병합하여 종양에 투여한 마우스, 2 개의 그룹으로 나누었다. 6일까지 분화시킨 골수유래 수지상세포에 E1 부위에 green fluorescence protein 유전자가 삽입된 Ad- Δ E1/EGFP 복제불능 바이러스를 300 MOI로 감염시킨 동시에 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 종양항원과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 첨가하여 8일까지 활성화시켰다. C57BL/6 마우스의 오른쪽 복

부중양 피하에 B16-F10 흑색종양을 유발한 다음 100 mm³ 되었을 때부터 Ad-ΔB7/IL12/41BBL은 5 X 10⁹ VP로 2일 간격으로 3회 종양 내 투여를 실행하였으며, Green fluorescence protein(GFP)로 표기된 활성화된 수지상세포(GFP-DCs)는 바이러스 투여가 시작된 다음날부터 1 x 10⁶ 개의 세포를 2 일 간격으로 3 회 종양 내에 투여하였다. 마지막 GFP-DCs 투여 후 48 시간 경에 마우스를 경추탈골시켜 종양과 종양하단에 위치한 오른쪽 서혜부의 임프절을 적출하여 10 μm 두께로 paraffin section을 시행하였다. 절편된 종양과 임프절 조직은 GFP 조직면역염색을 실시하여 GFP가 발현된 세포군집의 분포와 수를 분석하였다. GFP 조직면역염색은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 절편조직을 100% xylene, 100%, 90%, 70% 알코올순서로 paraffin을 제거한 뒤 1% nonidep-p40(NP40, Sigma))으로 10 분간 세포막을 용해시켰다. 슬라이드에 부착된 조직을 0.3% H₂O₂ 용액에서 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시킨 후 BSA가 4% 함유된 PBS로 실온에서 1 시간 blocking 하였다. 일차 항체인 mouse anti GFP monoclonal antibody(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 1:500 희석한 용액을 100 μl씩 조직박편에 처리하여 상온에서 2 시간 반응시킨 후 goat anti-mouse horseradish peroxidase (goat anti-mouse IgG-HRP, Pharmingen) 이차항체를 1:200으로 희석하여 100 μl씩 조직박편에 처리하여 실온에서 1 시간 반응 시켰다. 다음 DAB을 첨가하여 발색시켰다. 이후 70%, 90%, 100% 알코올에 탈수하여 100% xylene 에 침전시킨 뒤 커버 글라스를 덮어 관찰하였다.

17. 통계학적 분석

서로 다른 검사결과들은 SPSS 통계프로그램의 *t* test 를 실행하여 통계적 유의성 여부를 분석하였다.

III. 결 과

1. IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 종양 선택적 살상, 복제가능 재조합 아데노바이러스의 제작 및 IL-12 와 4-1BBL 발현양상 규명

Ad- Δ B7 은 E1B 부위가 모두 결손되고 E1A 의 일부 유전자가 인위적인 변이에 의해 pRb 와의 결합능이 소실된 암세포 특이적 살상 아데노바이러스이다²⁰. Ad- Δ B7 아데노바이러스 벡터를 이용하여 IL-12 유전자가 E1B 부위에 삽입되고 4-1BBL 유전자가 E3 부위에 삽입된 Ad- Δ B7/IL12, Ad- Δ B7/41BBL 아데노바이러스를 각각 제작하였으며, 또한 IL-12 와 4-1BBL 유전자가 동시에 삽입된 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스를 제작하였다(Fig. 1). 제작된 아데노바이러스에 의한 4-1BBL 의 발현 정도를 알아보기 위하여 마우스 악성흑색종 B16-F10 세포주에 lipofectamine 과 plus 를 사용하여 감염시키고 20 시간 후 세포를 수득하여 4-1BBL 단백질의 발현 정도를 Western blotting assay 를 실시하여 관찰하였다. 그 결과, Ad- Δ B7/41BBL 와 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 가 감염된 세포에서 28kDa, 35kDa 과 50kDa 의 4-1BBL 단백질의 발현이 바이러스의 역가가 증가함에 따라 용량 비례적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-A). 한편 마우스의 B16-F10 악성흑색종 세포주에 각각의 아데노바이러스를 lipofectamine 을 사용하여 감염시킨 후 48 시간 경에 배지를 수거하여 ELISA 를 실시하여 IL-12 의 발현량을 관찰한 결과 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스를 감염시킨 경우에서 바이러스의 역가가 증가함에 따라 IL-12 단백질의 발현도 용량 비례적으로 증가되었음을 확인할 수 있었고 IL-12 유전자가 삽입되지 않은 바이러스나 배양액에서는 거의 검출이 되지않았다(Fig. 2-B). 이러한 결과들로부터 제작된 바이러스의 감염에 의해 IL-12 와 4-1BBL 단백질이 마우스의 악성흑색종 세포에서도 발현됨을 확인할 수 있었다.

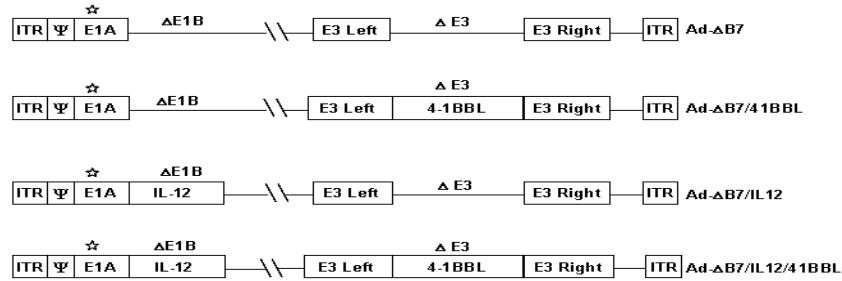


Fig. 1. Schematic representation of Ad-5 type genomes with IL-12 and/or 4-1BBL gene. Ad-ΔB7 contains mutated E1A (Rb protein binding site) and deleted E1B19kDa, E1B55kDa and E3 region; Ad-ΔB7/IL12 expressed IL-12 (75kDa) genes driven by the CMV promoter in the E1 region of Ad-ΔB7; Ad-ΔB7/41BBL expressed 4-1BBL gene driven by CMV promoter in the E3 region of Ad-ΔB7. Ad-ΔB7/IL12/41BBL is comprised of the IL-12 and 4-1BBL genes driven by the CMV promoter in the E1 and E3 region of Ad-ΔB7, respectively.

- ▲ IL-12: mouse interleukin-12.
- ▲ 4-1BBL: mouse 4-1BB ligand.

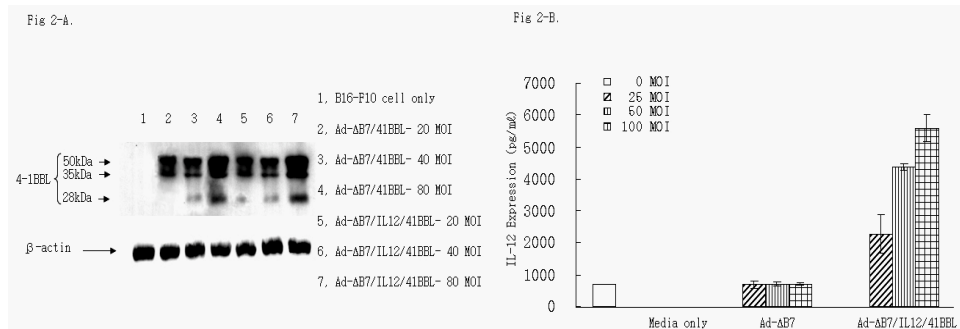


Fig. 2. Confirmation of IL-12 and 4-1BBL expression. (A). Western Blot analysis for 4-1BBL expression. B16-F10 mouse melanoma cells were infected with recombinant adenovirus, and cells were harvested 20 hr after infection, and undergone western blot assay. 4-1BBL protein was detected only in the viruses inserting 4-1BBL gene in size of 28, 35kDa, 50kDa. 4-1BBL protein expression was increased in proportion to adenoviruses titer. **(B). ELISA for IL-12 expression.** B16-F10 mouse melanoma cells were infected with recombinant adenovirus, and media were harvested 48 hr after infection and undergone ELISA. IL-12 protein (75kDa) was highly expressed in the IL-12 gene inserted viruses compared to control virus ($p < 0.01$), and IL-12 expression was proportional to MOI (0, 25, 50 and 100 MOI) of virus.

2. Oncolytic assay 를 통한 재조합 아데노바이러스의 복제와 살상능 비교

IL-12와 4-1BBL 유전자 발현이 아데노바이러스의 복제와 살상능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 oncolytic assay를 시행하였다. 여러 종류의 암 세포주를 Ad- Δ E1, Ad- Δ B7, Ad Δ B7/41BBL, Ad- Δ B7/IL12 그리고 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 등 5 종류의 아데노바이러스로 각각 0.1~200 MOI 감염시키고 잔류 세포를 crystal violet을 염색하여 세포사멸 정도를 관찰하였다. 관찰결과, 음성 대조군인 복제불능 Ad- Δ E1 아데노바이러스로 감염시킨 세포에서는 세포살상 효과가 나타나지 않았으나 복제가능 아데노바이러스인 Ad- Δ B7, Ad Δ B7/41BBL, Ad- Δ B7/IL12 또는 Ad- Δ B7/IL12/41BBL를 감염시킨 경우에는 현저한 세포살상효과가 나타났을 뿐만 아니라 투여된 바이러스 역가의 증가에 따라 종양세포 살상효과가 증대되는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 특히 인간 폐암세포주인 A549의 경우, 각각의 바이러스에 의한 세포사멸 정도가 비슷하였으며 인간 뇌암 세포주인 U343과 마우스 악성흑색종 세포주인 B16-F10에서 Ad- Δ B7/IL12, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스의 감염에 의해 세포 사멸 정도가 약간 빠르게 유도되는 것을 관찰하였다. 그리고 IL-12와 4-1BBL 단백질의 발현에 의해 아데노바이러스의 복제와 세포살상능이 감소되지 않음을 확인할 수 있었다.

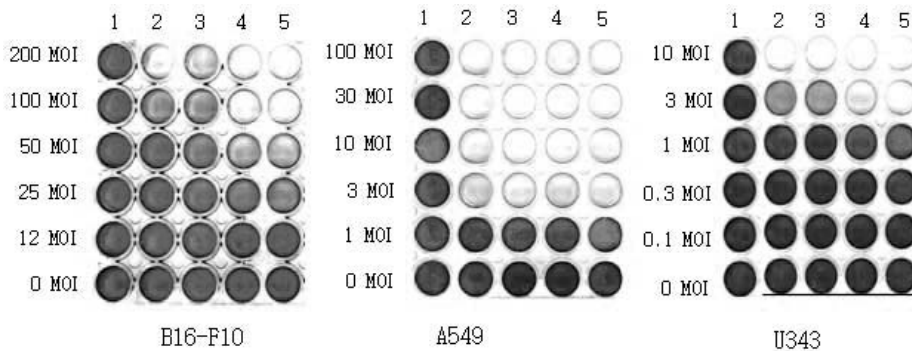


Fig. 3. Oncolytic assay of adenoviruses expressing IL-12 and/or 4-1BBL. Recombinant oncolytic adenoviruses revealed more powerful cytolytic efficacy than replication incompetent adenovirus (Ad- Δ E1) in human (A549, U343) and mouse cells (B16-F10). Replication and cytolytic activity of adenovirus were not lessened by the expression of IL-12 or 4-1BBL. The description of lane, 1, Ad- Δ E1; 2, Ad- Δ B7; 3, Ad Δ B7/41BBL; 4, Ad- Δ B7/IL12; 5, Ad- Δ B7/IL12/41BBL.

3. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 아데노바이러스의 항 종양 효과

재조합 아데노바이러스의 항 종양 효과를 관찰하기 위하여 C57BL/6 마우스에 B16-F10으로 악성흑색종을 유발한 뒤 각각의 종양 특이적 세포살상 아데노바이러스를 종양 내에 주사하고 종양의 성장을 비교 관찰하였다. 음성 대조군인 PBS를 투여한 마우스의 경우 종양이 빠른 속도로 성장하여 18 일 이후에는 생존한 마우스가 거의 없었다. 치료를 시작한 후 12 일부터는 IL-12 유전자가 삽입된 2 종류의 바이러스로 치료한 그룹(Ad-ΔB7/IL12: $263.2 \text{ mm}^3 \pm 96.4$; Ad-ΔB7/IL12/41BBL: $56.2 \text{ mm}^3 \pm 28.8$)은 2 배의 높은 역가로 치료한 IL-12 유전자가 삽입되지 않은 바이러스로 치료한 다른 그룹(Ad-ΔB7 3310.9 $\text{mm}^3 \pm 831.0$; Ad-ΔB7/41BBL 2239.8 $\text{mm}^3 \pm 749.4$) 보다 현저한 항 종양 효과를 보였다($p < 0.01$). 그리고 IL-12 유전자와 4-1BBL 유전자를 발현하는 Ad-ΔB7/IL12/41BBL($56.2 \text{ mm}^3 \pm 28.8$)로 치료한 그룹은 Ad-ΔB7/IL12($263.2 \text{ mm}^3 \pm 96.4$)로 치료한 그룹에 비하여 더욱 개선된 항 종양 효과를 보였다($p < 0.05$). 그에 비하여 Ad-ΔB7/41BBL($2239.8 \text{ mm}^3 \pm 749.4$) 치료군은 Ad-ΔB7($3310.9 \text{ mm}^3 \pm 831.0$) 치료군에 비하여 개선된 항 종양 효과를 보였지만 통계학적인 유의성은 없었다.

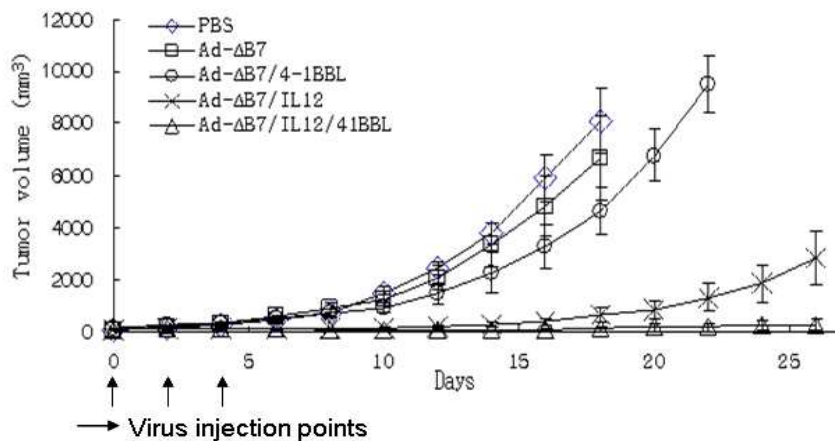


Fig. 4. Elicited anti-tumor effect of IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses. Orthotopic mouse melanoma model was established by subcutaneous injection of B16-F10 cells into right abdominal flank of the C57BL/6 mouse. The first injection of the viruses was initiated when tumor volume reached around 80~100 mm^3 . The mice were treated with PBS (◇), Ad-ΔB7 (□) (1×10^{10} VP/time), Ad-ΔB7/41BBL (○) (1×10^{10} VP/time), Ad-

Δ B7/IL12 (X) (5×10^9 VP/time) and Ad- Δ B7/IL12/41BBL (\triangle) (5×10^9 VP/time). Tumor growth was monitored on one to two day interval. Data points represent the mean \pm SD of the tumor size in each group at the indicated time points. Ad- Δ B7/IL12 and Ad- Δ B7/IL12/41BBL treated group showed significant anti-tumor effect compared to those of Ad- Δ B7 and Ad- Δ B7/41BBL even two fold high dose ($p < 0.01$, $n = 8 \sim 9$ mice per group). Also, Ad- Δ B7/IL12/41BBL showed the enhanced anti-tumor effect compared to Ad- Δ B7/IL12 ($p < 0.05$).

4. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 악성흑색종 조직 내 IFN- γ 발현량 분석

IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 항암 효과의 기전이 종양조직 내의 NK 세포와 CTL 세포에 의한 cytokine의 변화에 의한 것인지를 검증하기 위하여 종양조직내의 IFN- γ 발현량을 ELISA를 실시하여 비교, 분석하였다. 악성흑색종 조직에서 IFN- γ 발현을 관찰한 결과, 4-1BBL 만 삽입한 아데노바이러스로 치료하였을 때(Ad- Δ B7/41BBL: $57.3 \text{ pg/mg} \pm 10.5$) 벡터 대조그룹(Ad- Δ B7: $25.2 \text{ pg/mg} \pm 2.2$)에 비하여 현저한 IFN- γ 발현 증가를 확인할 수 있었으며($p < 0.01$) IL-12를 삽입한 2 종류의 아데노바이러스로 치료한 그룹에서는(Ad- Δ B7/IL12: $279.2 \text{ pg/mg} \pm 18.3$; Ad- Δ B7/IL12/41BBL: $366.3 \text{ pg/mg} \pm 7.5$) IL-12를 삽입하지 않은 아데노바이러스로 치료한 그룹(Ad- Δ B7: $25.2 \text{ pg/mg} \pm 2.2$; Ad- Δ B7/41BBL: $57.3 \text{ pg/mg} \pm 10.5$) 보다 유의한 IFN- γ 발현 증가를 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 그리고 IFN- γ 의 발현량은 IL-12와 4-1BBL 유전자를 모두 삽입한 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스를 투여한 종양조직에서($366.3 \text{ pg/mg} \pm 7.5$) Ad- Δ B7/IL12 아데노바이러스를 투여한 종양조직($279.2 \text{ pg/mg} \pm 18.3$) 보다 유의하게 높은 발현을 보였다($p < 0.01$).

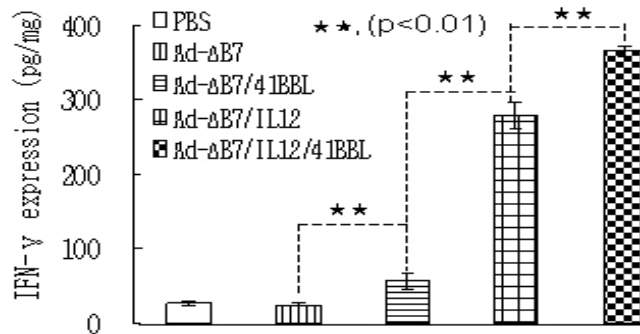


Fig. 5. Evaluation of IFN- γ expression in tumor tissues after treatment of IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses. Five days after injection of PBS (□), Ad- Δ B7 (▣), Ad- Δ B7/41BBL (▤), Ad- Δ B7/IL12 (▥), or Ad- Δ B7/IL12/41BBL (▦) into B16-F10 tumors established in C57BL/6 mice, the IFN- γ expression was measured in tumor homogenates using IFN- γ ELISA. Tumors treated with IL-12 expressing adenovirus (▥, ▦) showed significantly higher level of IFN- γ expression than tumors treated with adenovirus not containing IL-12 ($p < 0.01$). Furthermore, the expression of IFN- γ significantly increased in a group treated by adenovirus expressing both IL-12 and 4-1BBL (▦) compared to adenovirus expressing IL-12 only (▥) ($p < 0.01$). We also demonstrated significantly high expressed IFN- γ in tumor treated with 4-1BBL inserted adenovirus (▤) than Ad- Δ B7 vector control (▣). Data points represent mean \pm SD of three independent experiments.

5. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 IFN- γ ELISpot 분석

재조합 아데노바이러스를 투여한 마우스에서 종양세포 특이적 항종양 유도에 관여하는 IFN- γ cytokine을 분비하는 세포들의 빈도를 ELISpot 분석으로 측정하였다. 재조합 아데노바이러스로 치료한 마우스에서 분리한 비장세포와 방사선 조사를 한 B16-F10 세포를 5일간 공동배양을 시행하고 수집된 세포를 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 , 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 개씩 anti-mouse IFN- γ 항체로 코팅된 96 well-PVDF membrane plate에 분주하고 12 시간 반응시켰다. 이를 위해서는 ELISpot mouse IFN- γ set를 사용하였고 실험은 제조사의 추천방법대로 진행하였다. Ad- Δ B7/IL12로 치료한 마우스에서 4×10^4 개의 세포를 처리한 경우, spot의 수가 175.7 ± 20.3 로 다른 세 개의 치료그룹, 즉 PBS(14.0 ± 3.1)와 Ad- Δ B7(29.0 ± 6.2) 그리고 Ad- Δ B7/41BBL(40.3 ± 6.1)에 비해 크게 증가하였으며($p < 0.01$) 특히 Ad- Δ B7/IL12/41BBL로 치료한 경우는 Ad- Δ B7/IL12로 치료한 경우에 비해서도 더욱 크게 증가한 spot(409.3 ± 17.0) 수를 관찰하였다 ($p < 0.01$)(Fig. 6).

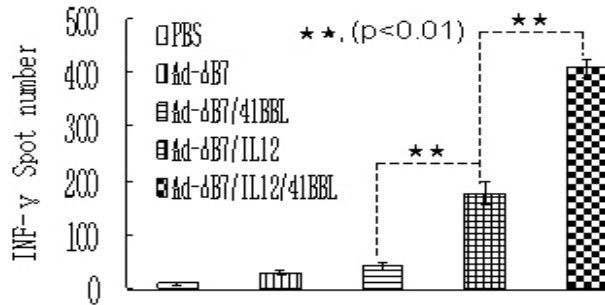


Fig. 6. IFN- γ ELISpot assay using the splenocytes of the B16-F10 bearing mice treated with IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses. Five days after injection of PBS (\square), Ad- Δ B7 (\square), Ad- Δ B7/41BBL (\square), Ad- Δ B7/IL12 (\square), or Ad- Δ B7/IL12/41BBL (\square) into B16-F10 tumors established in C57BL/6 mice, mice were sacrificed and their splenocytes were co-cultured with irradiated B16-F10 cells for five days. IFN- γ spot number were significantly increased in IL-12 expressing adenovirus treated groups compared to its cognate control groups ($p < 0.01$). Moreover, Ad- Δ B7/IL12/41BBL treated group showed significantly augmented spot numbers than Ad- Δ B7/IL12 treated group ($p < 0.01$). Data points represent mean \pm SD of three independent experiments.

6. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 악성흑색종 조직 내 면역세포 분포 분석

재조합 아데노바이러스 치료 5 일 후 각각 종양의 괴사범위를 분석하기 위하여 H&E 염색을 실시한 결과, Ad- Δ B7/41BBL로 치료하였을 때 백터 대조 아데노바이러스인 Ad- Δ B7로 치료한 그룹에 비하여 더욱 넓은 종양의 괴사가 확인 되었고 Ad- Δ B7/IL12와 Ad- Δ B7/IL12/41BBL로 치료한 그룹에서 종양이 가장 크게 감소하였을 뿐만 아니라 종양조직의 괴사범위도 제일 넓었다. 또한 종양조직 내 침윤된 림프구 세포군집을 조사하기 위하여 CD4⁺, CD8⁺ T 림프구를 특이적으로 인지할 수 있는 항체와 수지상세포 군집을 인지하는 CD86⁺, CD11c⁺ 항체를 사용하여 조직면역염색법을 실시한 결과 Ad- Δ B7/41BBL로 치료한 종양조직에서 Ad- Δ B7로 치료한 종양조직 보다 더욱 많은 CD4⁺와 CD8⁺ T 세포군집과 CD86⁺, CD11c⁺ 세포군집을 확인하였고 IL-12 유전자가 삽입된 Ad- Δ B7/IL12, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스의 경우, 더 크게 증가된 CD4⁺, CD8⁺ T 세포 군집과 CD86⁺, CD11c⁺ 세포 군집을 확인하였다. 그리고

이러한 세포군집의 침윤이 Ad-ΔB7/IL12/41BBL로 치료한 종양에서 Ad-ΔB7/IL12로 치료한 종양조직 보다 더욱 많이 나타나는 것을 확인하였다.

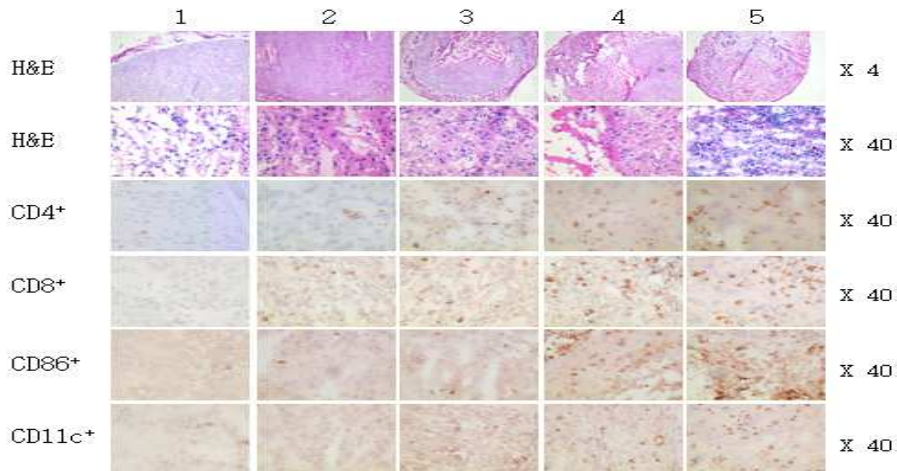


Fig. 7. Histological assessment of tumor tissues treated with IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses. Five days after third adenovirus administration, mice were sacrificed and the tumor tissues were embedded in frozen sections. Frozen sections were stained with an antibody against various immune cell markers. Brown staining indicates positive staining. PBS (1), Ad-ΔB7 (2), Ad-ΔB7/41BBL (3), Ad-ΔB7/IL12 (4), Ad-ΔB7/IL12/41BBL (5). Necrotic area of Ad-ΔB7/IL12 (4) and Ad-ΔB7/IL12/41BBL (5) treated groups were large compared to other groups. CD4⁺, CD8⁺, CD86⁺ and CD11c⁺ cells were highly infiltrated in tumors treated by Ad-ΔB7/IL12 or Ad-ΔB7/IL12/41BBL compared with other adenovirus treated groups.

7. IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스 치료 시 CTL 분석

IL-12와 4-1BBL를 발현하는 재조합 아데노바이러스의 항 종양 효과가 종양 특이적 세포독성 CD8⁺ T 세포의 관련성 여부를 검증하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 실험과정은 ELISpot assay 실험과정과 유사하게 진행하였으며 표적세포는 B16-F10을 사용하였고 대조 표적 세포로는 Mus dunni 종양세포를 사용하였다. 실험 결과 IL-12가 삽입된 아데노바이러스에서 세포살상기능의 현격한 증가를 확인하였으며(T:E=1:45, Ad-ΔB7/IL12 = 22.20% ± 1.48 and Ad-ΔB7/IL12/41BBL = 25.88% ± 0.94, p<0.01, versus Ad-ΔB7/41BBL), 그 중 IL-12와 4-

1BBL를 발현하는 Ad- Δ B7/IL12/41BBL에서 더욱 현저한 세포살상능의 증가를 보였다($p < 0.01$ versus Ad- Δ B7/IL12 group). 반면에 Mus dunni 세포에서는 이러한 살상효과가 5~7% 미만에 그치는데 불과 하였다 (data not shown)(Fig. 8).

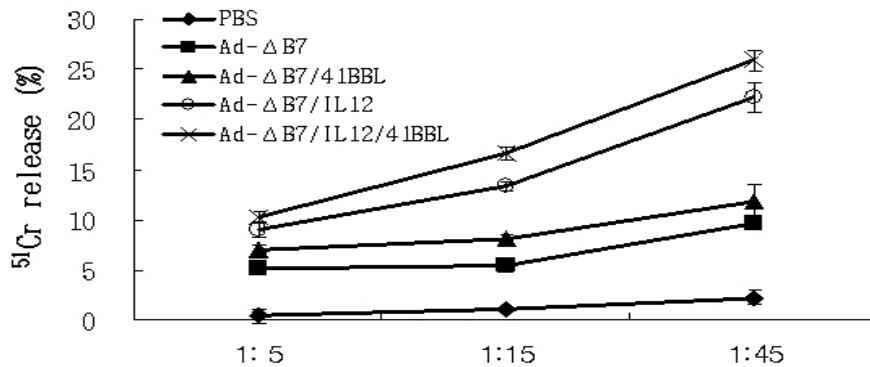


Fig. 8. Cytotoxic activity after IL-12 and/or 4-1BBL expressing oncolytic adenoviruses treatment. Spleen cells derived from mice treated with PBS (◆), Ad- Δ B7 (■), Ad- Δ B7/41BBL (▲), Ad- Δ B7/IL12 (○), or Ad- Δ B7/IL12/41BBL (X), and were re-stimulated with irradiation-inactivated B16-F10 cells for five days *in vitro*. B16-F10 and Mus dunni cells were used as targets. Target cell (B16-F10): effector cell (co-cultured splenocyte) (T:E) ratios ranged from 1:5, 1:15, 1:45. Cytotoxic activity of Ad- Δ B7/IL12 and Ad- Δ B7/IL12/41BBL treatment groups were significantly increased than other groups ($p < 0.01$). Cytotoxic activity in Δ B7/IL12/41BBL treated group were significantly increased than in Ad- Δ B7/IL12 group ($p < 0.01$). Data points represent mean \pm SD of three independent experiments.

8. 골수유래 수지상세포의 분화과정과 flow cytometry 분석

마우스 골수에서 추출한 수지상세포의 분화와 활성화 정도를 알아보기 위하여 활성화된 수지상세포에서 과발현되는 표식자를 인지하는 항체를 사용하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. 분석결과, CD11c⁺, CD40⁺, CD86⁺, MHC II 세포군은 93.13%, 62.95%, 60.82%, 89.65%로 각각 관찰 되었다. 한편 마우스에서 분리한 수지상세포의 경우, 다른 면역세포에 의해 오염될 수 있기 때문에 T 세포 표식자인 CD3e⁺와 B 세포 표식자인 CD19⁺, 단핵세포 표식자인 CD14⁺을 이용하여 세포군집의 양을 확인하였다. CD3e⁺ 세포군집은 0.68%, CD19⁺ 세포군집의 경우 3.29%, CD14⁺ 단핵세포군집의 경우 9.42%로 확인되었다. 따라서 앞서 언급한 방법으로 추출한 골수유래 마우스 수지상세포는

CD11c⁺ 표식자가 과발현 되어 있고 전형적인 수지상세포의 특징을 보이고 있을 뿐만 아니라 T, B 세포와 단핵세포의 오염도가 낮고 순도가 높은 수지상세포임을 확인하였다. 또한 현미경상으로도 돌기가 방사형으로 돌출되고 약간 부유된 상태의 전형적인 수지상세포의 성숙된 형태임을 관찰 할 수 있었다(Fig. 9).

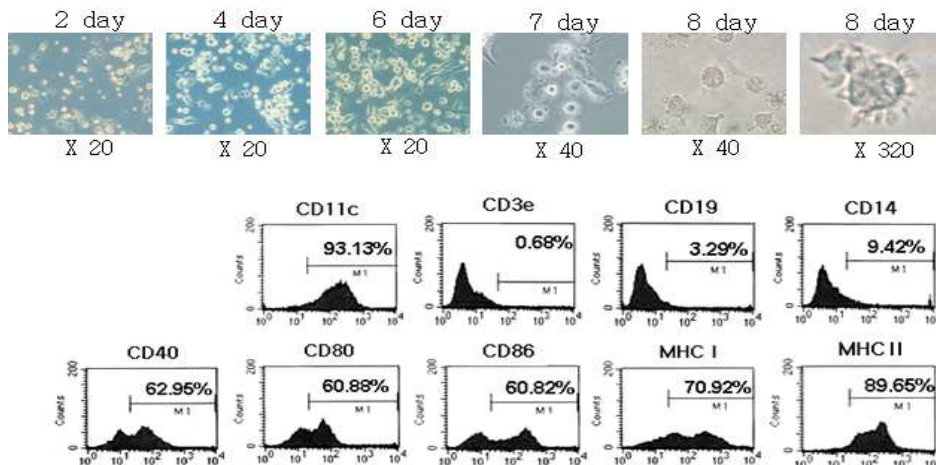


Fig. 9. Microscopy and flow cytometry analysis of Bone marrow derived dendritic cells. Population of CD11c (93.13%), CD3e (0.68%), CD19 (3.29%), CD14 (9.42%), CD40 (62.95%), CD80 (60.88%), MHC I (70.99%), and MHC II (89.65%) in total cultured cells. Similar results were also obtained in three independent experiments.

9. Ad-ΔB7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료에 의한 항 종양 효과

본 연구에서 제작된 아데노바이러스 중 종양 살상능이 가장 우수한 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 종양 항원으로 인지시킨 수지상세포를 병합 투여하여 항 종양 효과의 증가여부를 생쥐의 복부피하 B16-F10 악성흑색종 모델에서 종양 내로의 직접적인 투여방식으로 비교하였다. 바이러스 투여를 시작한 후 12 일에 종양의 크기를 분석한 결과 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료한 그룹($20.8 \text{ mm}^3 \pm 12.3$)이 바이러스 단독 치료한 그룹($281.5 \text{ mm}^3 \pm 92.4$)에 비하여 유의한 항 종양 효과를 보였고($p < 0.05$) 그리고 수지상세포로 단독 치료한 그룹($2347.9 \text{ mm}^3 \pm 1107.1$)에 비하여는 더욱 유의한 항 종양 효과를 보였고($p < 0.01$). 또한, 종양이 완전 소실된

마우스도 3 마리가 있었으며(3/7) 이들 마우스는 추후의 관찰기간 동안(120 일)에도 종양이 다시 형성되지 않았다. 수지상세포로 단독 치료한 그룹은 PBS 치료그룹($6148.1 \text{ mm}^3 \pm 646.5$)에 비하여 항 종양 효과가 우수하였다($p < 0.01$). 모든 그룹의 마우스 개체 수는 6~7 마리였다.

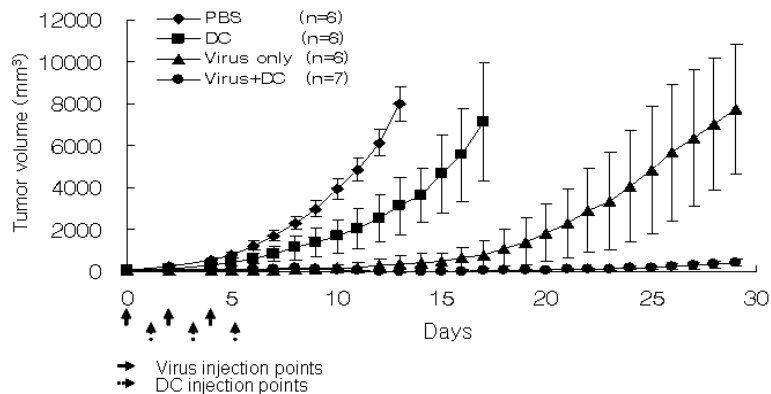


Fig. 10. Elicited anti-tumor effect of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy. Tumors were grown subcutaneously in the abdomen of C57BL/6 mice and were subsequently injected with PBS (\diamond), DCs (\blacksquare), Ad- Δ B7/IL12/41BBL (\triangle), or Ad- Δ B7/IL12/41BBL with DCs (\bullet). Virus was injected intra-tumorally 3 times (2.5×10^9 VP/time) with 2 days interval. DCs were also injected intra-tumorally 3 times between the virus injections with 2 day interval. Tumor growth was monitored on 1 to 2 day interval after each treatment. Ad- Δ B7/IL12/41BBL with DCs combined treatment group showed remarkably enhanced anti-tumor effect compared to Ad- Δ B7/IL12/41BBL alone treated group ($p < 0.05$) and DCs alone treated group ($p < 0.01$). DCs alone treated group also showed anti-tumor effect ($p < 0.01$, compared to PBS treated group). (Number was 6~7 mice per group).

10. 악성흑색종 전이모델에서의 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료에 의한 폐 전이 억제 효과

Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 종양 선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스와 종양 항원으로 인지시킨 수지상세포의 병합치료가 악성흑색종 폐 전이에 미치는 효과를 분석하기 위하여 B16BL6 마우스 악성흑색종 폐 자연전이 모델에서 바이러스와 수지상세포의 병합치료를 시행한 후 전이된 악성흑색종 nodule과 폐 무게를 측정하여 비교하였다. 수지상세포 및 바이러스의 단독 치료 그룹에서 PBS 그룹에 비하여 폐

의 전이 nodule이 감소하였다. 수지상세포와 바이러스의 병합치료 시에는 great nodule의 감소를 관찰하였다. 그러나 medium과 small 크기의 종양은 바이러스 치료그룹에서 오히려 더 많이 나타났다(Fig. 11-C). 폐의 무게를 측정한 결과 PBS로 치료한 그룹(505.0 mg \pm 59.3)에 비하여 수지상세포 단독 치료그룹(340 mg \pm 83.8)($p < 0.05$), 바이러스 단독 치료 그룹(295 mg \pm 65.8)($p < 0.01$)은 유의하게 폐의 무게가 적었다. 바이러스와 수지상세포의 병합치료 그룹(226.7 mg \pm 15.2)은 바이러스 단독 치료 그룹과 비교하여 폐의 무게가 유의하게 적었으나($p < 0.05$) 수지상세포를 단독 처리한 그룹에 비하여는 유의한 차이를 보이지 않았다($p = 0.0572$, 340 mg \pm 83.8). 그러나 폐 무게가 감소하는 경향성은 확인할 수 있었다(Fig. 11-B, D). 각 그룹의 마우스 개체 수는 6~7 마리였다.

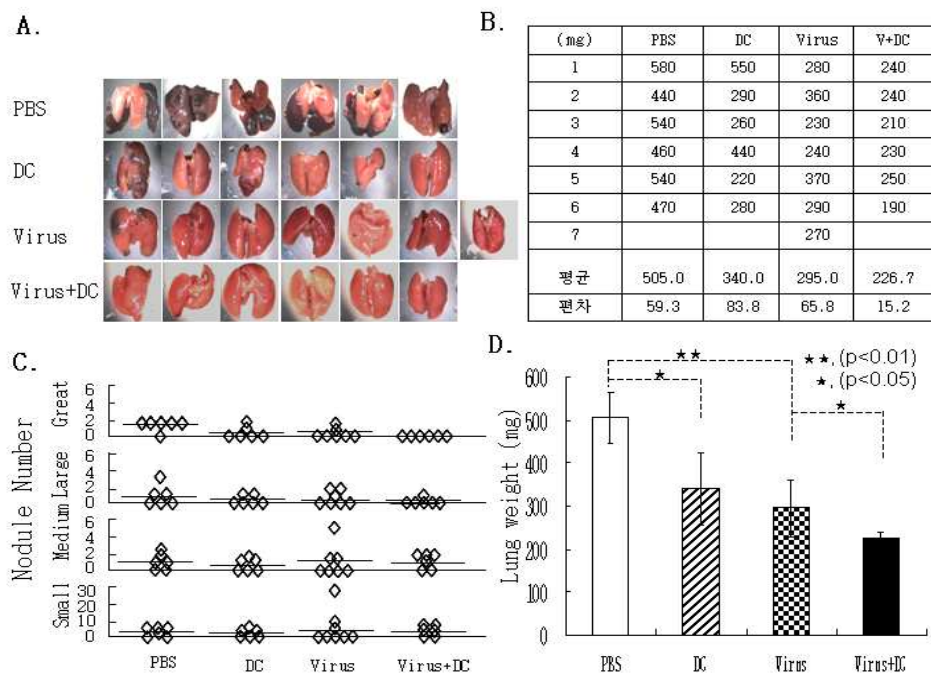


Fig. 11. Anti-metastasis effect of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy on melanoma metastasis. Melanoma (B16BL6) was established in right foot pad of C57BL/6 mice. Treatment was initiated when tumor sizes reached around 180~200 mm³ (day 18). On days 18, 20, 22, virus were injected intra-tumorally (5×10^9 VP/time, total 3 time), and on days 19, 21, 23, DCs were injected into intra-pleural cavity (1×10^6 cells/time, total 3

time). On day 26, the right knees of mice were cut. On day 48, mice were sacrificed and metastatic melanoma nodules and lung weights were measured. Nodule sizes were designated as $\text{great} > 1 \text{ cm}$, $1 \text{ cm} \geq \text{large} > 0.5 \text{ cm}$, $0.5 \text{ cm} \geq \text{medium} > 0.3 \text{ cm}$, $0.3 \text{ cm} \geq \text{small}$. Lung weight of combination therapy with virus and DCs group was significantly lighter than virus alone treated group ($p < 0.05$). In virus alone treated group and DCs alone treated group, the lung weights were significantly low compared to PBS treated group ($p < 0.01$, virus treated group versus PBS treated group; and $p < 0.05$, DC treated group versus PBS treated group). (Number was 6~7 mice per group).

11. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 종양조직 내 IFN- γ 발현량 분석

Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포의 병합치료에서 각각의 치료를 개별적으로 시행하는 경우에 비하여 항암효과의 개선이 종양조직 내의 면역 세포에 의한 IFN- γ 의 변화와 어떠한 상관관계가 있는지를 검증하기 위하여 종양조직 내의 IFN- γ 발현량을 ELISA로 비교하였다. IFN- γ 발현은 Ad- Δ B7/IL12/41BBL와 수지상세포를 병합하여 치료한 종양조직($508.4 \text{ pg/mg} \pm 29.5$)에서 수지상세포로 단독 치료한 종양조직($316.9 \text{ pg/mg} \pm 14.8$) 및 바이러스로 단독 치료한 종양조직($366.3 \text{ pg/mg} \pm 7.5$)에서 보다 현저하게 증가되었다 ($p < 0.01$, versus virus alone and DC alone treated tumors). 그리고 수지상세포를 단독으로 치료한 종양조직도 PBS로 치료한 종양조직($28.1 \text{ pg/mg} \pm 2.9$)보다 현저하게 더 많은 양의 IFN- γ 를 발현하였다 ($p < 0.01$). 바이러스 단독 치료그룹과 수지상세포 단독 치료그룹을 비교한 결과, 수지상세포 단독 치료그룹에서 종양 내 IFN- γ 발현이 유의하게 높았다($p < 0.01$). 이 실험은 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, 종양에 바이러스 투여하여 그룹당 3 마리를 이용하여 3 회의 반복실험을 거쳐 모두 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

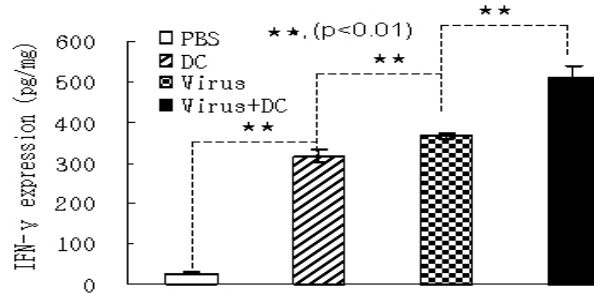


Fig. 12. Effect of Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy on IFN-γ expression. Melanoma (B16-F10) model was established in right abdomen of C57BL/6 mice subcutaneously and treated with PBS (□), DCs (▨), Ad-ΔB7/IL12/41BBL (▣), and combination of Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DCs (■). Treatment were initiated when tumor volume reached around 60~80 mm³. Five days after treatment, mice were sacrificed and tumors were harvested. In the tumor of combined treated with Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DCs (■), the expression level of IFN-γ showed marked increase compare to virus alone (p<0.01) or DCs alone (p<0.01) treated group, respectively. Treatment with DC alone group also showed significantly higher level of IFN-γ than that of PBS group (p<0.01), but lesser than that of Ad-ΔB7/IL12/41BBL alone treated group (p<0.01). Data represents three independent experiments.

12. Ad-ΔB7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 IFN-γ ELISpot 분석

Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합 투여 시 종양 특이적 면역세포의 증식을 확인하기 위하여 비장세포를 분리, 수거하여 IFN-γ ELISpot 분석을 실시하였다. 그 결과, 바이러스와 수지상세포를 함께 치료한 마우스의 경우 spot 수가 1025.0 ± 19.2로 다른 방법으로 치료한 마우스에 비하여(PBS: 50.0 ± 5.0, DCs: 323.0 ± 16.5, Ad-ΔB7/IL12/41BBL: 527.3 ± 11.8) IFN-γ 의 spot 수가 훨씬 더 많이 증가됨(p<0.01)을 관찰하였다. 이 실험은 C57BL/6 마우스를 이용하였으며 그룹당 3 마리를 이용하여 3 회의 반복실험을 거쳐 모두 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

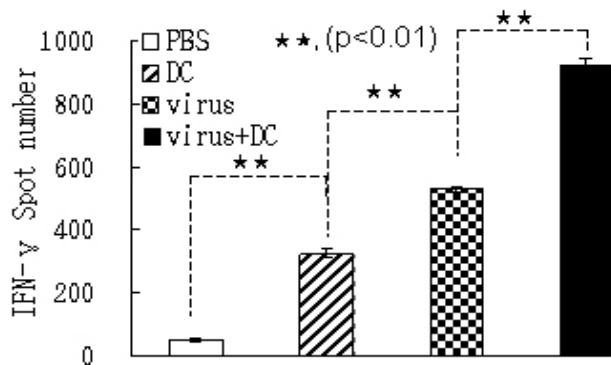


Fig. 13. IFN- γ ELISpot assay in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse. Melanoma (B16-F10) model was established in right abdomen of C57BL/6 mice subcutaneously and treated with PBS (\square), DCs (\square with diagonal lines), Ad- Δ B7/IL12/41BBL (\blacksquare), and combination of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs (\blacksquare). Treatment were initiated when tumor volume reached around 60~80 mm³. Five days after treatment, mice were sacrificed and tumors were harvested, and splenocytes were co-cultured with irradiated B16-F10 cells for five days. IFN- γ spot number were significantly increased in Ad- Δ B7/IL12/41BBL with DCs combination group than that of virus alone treated group ($p < 0.01$) and than that of DCs alone treated group ($p < 0.01$). DCs alone treated group were significantly higher number of IFN- γ spot than that of PBS treated group ($p < 0.01$), but lesser number than that of Ad- Δ B7/IL12/41BBL alone treated group ($p < 0.01$) Data represents three independent experiments.

13. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 면역세포 분포 분석

마우스에 형성된 악성흑색종에 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 후 종양 내 괴사범위를 비교하기 위하여 H&E 염색을 실시한 결과 Ad- Δ B7/IL12/41BBL와 수지상세포를 함께 치료한 그룹에서 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 단독 치료그룹 또는 수지상세포 단독 치료그룹에 비하여 현저한 종양크기의 감소를 보였으며, 종양조직 괴사범위도 제일 컸다. Ad- Δ B7/IL12/41BBL로 치료한 종양에서 증가된 CD4⁺, CD8⁺ T 군집을 관찰할 수 있었으며 또한 증가된 CD86⁺ 항원제시 세포 군집과 CD11c⁺ 수지상세포 군집을 확인할 수 있었다. 종양항원으로 인지시킨 수지상세포만 투여한 경우에도 종양 내에 증가된 앞서의 면역세포들을 확인할 수 있었다. 그리고 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료한 종양조직에서는 각각의 단독

치료그룹에 비해 현격하게 증가된 CD4⁺, CD8⁺ T 세포 군집과 CD86⁺, CD11c⁺ 세포 군집을 관찰 할 수 있었다.

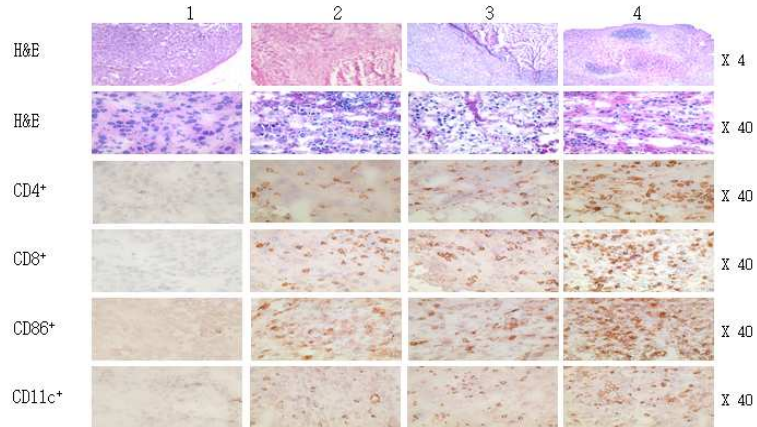


Fig. 14. Histological assessment of Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DCs treated melanoma. Five days following third adenovirus and DCs administration, mice were sacrificed and the tumor tissues were embedded in frozen sections. Frozen sections were stained with antibodies against various immune cell markers. Brown staining indicates positive staining. PBS (1), DC (2), Ad-ΔB7/IL12/41BBL (3) and combination treatment with Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DC (4). Necrotic areas of the melanoma treated with Ad-ΔB7/IL12/41BBL and DC were large compared to that of other groups. CD4⁺, CD8⁺, CD86⁺ and CD11c⁺ cells were heavily infiltrated in tumors treated by Ad-ΔB7/IL12/41BBL with DCs compared to that of Ad-ΔB7/IL12/41BBL alone or DC alone treated group. Data represents three independent experiments.

14. Ad-ΔB7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 CTL 분석

Ad-ΔB7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포의 병합치료 시 CTL 분석을 수행하였는데 실험과정은 ELISpot 분석실험과정과 유사하게 진행하였으며 표적세포는 B16-F10을, 그리고 대조 표적세포로는 *Mus dunni* 세포를 사용하였다. 실험 결과(Fig. 15) 바이러스 단독 치료그룹, 수지상세포 단독 치료그룹, Ad-ΔB7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 수지상세포 병합 치료그룹에서 모두 T:E 비례가 증가함에 따라 악성흑색종 세포 살상효과도 증가하는 것을 관찰하였다. Ad-ΔB7/IL12/41BBL 치료그룹과 수지상세포 치료그룹은 거의 비슷한 세포 살상효과(T:E=1:45에서 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 단독 치료그룹은 25.88%

± 0.94, 수지상세포 단독 치료그룹은 22.53% ± 1.40)를 보였으나 병합 치료그룹(34.95% ± 0.91)은 보다 향상된 종양세포 특이 살상능을 보여주었다($p < 0.01$, versus Ad- Δ B7/IL12/41BBL or DCs alone treated group). 반면에 *Mus dunni* 세포에서는 이러한 살상효과가 6% 미만에 그치는데 불과하였다(data not shown).

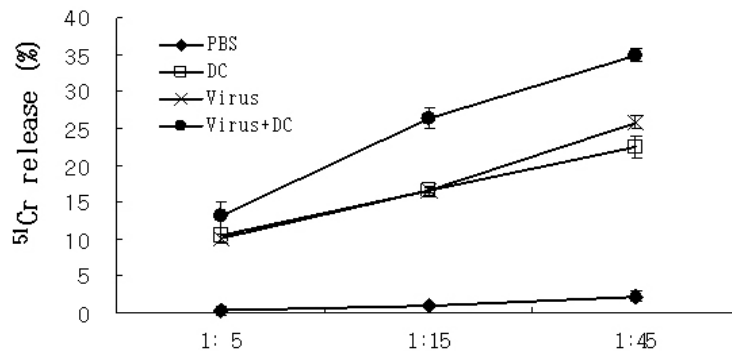


Fig. 15. Cytotoxic activity in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse. Spleen cells derived from the mice treated with PBS (◆), DCs (□), Ad- Δ B7/IL12/41BBL (X), and Ad- Δ B7/IL12/41BBL with DCs (●) were re-stimulated with irradiation-inactivated B16-F10 cells for five days *in vitro*. Target cell (B16-F10): Effector cell (co-cultured splenocyte) (T:E) ratios ranged from 1:5, 1:15, 1:45. Cytotoxic activity were significantly increased in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combination therapy group than in virus alone treated group ($p < 0.01$) and than in DCs alone treated group ($p < 0.01$). Data points represent mean \pm SD of three independent experiments.

15. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포 병합치료 시 수지상세포 이동능 분석

Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스가 수지상세포의 이동능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 먼저 300 MOI의 Ad- Δ E1/EGFP로 수지상세포를 감염시키고 48시간 후 95% 이상의 수지상세포가 GFP를 발현하는 것을 현미경상으로 확인하였다. GFP로 표기된 수지상세포 (GFP-DCs)를 수득하여 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스와 함께 악성흑색종에 투여한 마우스의 임프절에서(94.7 ± 11.9) GFP-DCs를 단독으로 투여한 마우스의 임프절에서(67.3 ± 11.7) 보다 GFP-DCs의 수가 증

가됨을 관찰하였다($p < 0.05$). 반면에 종양 내 GFP-DCs 수는 GFP-DCs와 Ad- Δ B7/IL12/41BBL를 병합하여 투여하였을 때 GFP-DCs를 단독으로 투여한 것 보다 더 적다는 것을 현미경상으로 관찰할 수 있었다(Fig. 16). 결과적으로 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스와 GFP-DCs를 병합하여 치료할 때 GFP-DCs의 임프절 내로의 이동능이 더욱 활성화된다는 것을 알 수 있었다. 이 실험은 각각 서로 다른 3 마리의 마우스의 악성 흑색종 조직과 임프절에서 확인되었다.

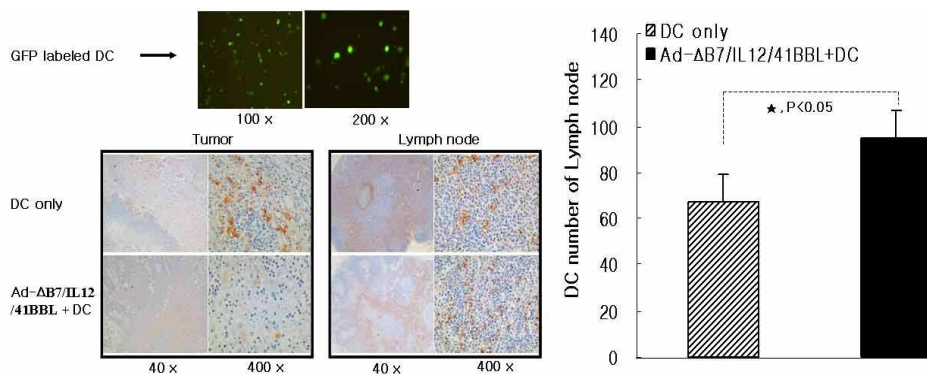


Fig. 16. DCs migration activity in Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combine treated mouse. Melanoma (B16-F10) model was established in right abdomen of C57BL/6 mice subcutaneously. Ad- Δ B7/IL12/41BBL and GFP - DCs were injected three times at intervals of two days, intratumorally. Two days after final injection, the tumor tissues and the draining lymph nodes (lymph nodes of the groin region in the right rank of mice) were embedded in paraffin sections. Tissue sections were stained with GFP antibody. Experiment Groups were divided into two groups that of the GFP - DCs alone treatment and Ad- Δ B7/IL12/41BBL with GFP - DCs combination treatment. GFP - DCs number were augmented in the LNs of Ad- Δ B7/IL12/41BBL with GFP - DCs combination treatment (94.7 ± 11.9) compared to that of the GFP - DCs alone treatment (67.3 ± 11.7) ($p < 0.05$). Data represents three independent experiments.

IV. 고 찰

암 유전자치료 연구에서 면역유전자를 치료유전자로 사용하는 비중은 지속적으로 증가하는 추세이다.

본 연구에서는 세포고사 기능을 억제하는 유전자인 E1B19kDa 과 p53 단백질의 기능을 억제하는 유전자인 E1B55kDa 이 결손되고, 바이러스의 복제에 필수적인 E1A 유전자의 pRb 결합부위가 변형되어 Rb 유전자가 변이된 암세포 내에서만 선택적으로 증식하는 Ad-ΔB7 종양 선택적 살상 및 복제가능 아데노바이러스²⁰ 를 유전자 전달체로 이용하여 IL-12 유전자를 E1B 가 제거된 부위에 삽입하고 4-1BBL 유전자를 E3 부위에 삽입하여 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 를 제작하였다. 이는 재조합 아데노바이러스로 종양세포를 선택적으로 살상할 뿐만 아니라 다른 한편으로는 종양 내에 면역 단백질의 발현으로 더 한층 개선된 항 종양 효과를 유도하고자 하는 전략이었다. 면역체계에 미치는 영향으로 IL-12 는 NK 세포와 CTL 의 활성화를 유도하고 APC 의 항원제시능력을 증가시키는 작용을 하며, 4-1BBL 는 CTL 과 CD4⁺ T 세포, 그리고 수지상세포의 활성화를 유도할 수 있기 때문이다.

Ad-ΔB7/IL12/41BBL 는 oncolytic assay 에서 확인된 바와 같이 A549, U343 세포주에서의 복제, 살상능이 매우 효과적일 뿐만 아니라 B16-F10 마우스 악성흑색종 세포주에서도 바이러스의 복제가 저해되지 않고 세포살상능도 감소하지 않음을 확인할 수 있었다. Guinn⁶⁴ 등은 적은 양의 4-1BBL 를 발현하는 A20 lymphoma 세포를 마우스에 주사하였을 때 150 일 가량의 생존율을 보였지만, 고 발현 시 종양의 형성이 보이지 않음을 관찰하여 본 연구에서 바이러스의 투여용량 의존적으로 cytopathic effect 가 증가하고 동물모델에서 종양의 크기가 감소한 경우와 유사하였다. 이는 4-1BBL 와 같은 공동자극분자의 발현량이 충분하지 못하면 항암효과를 나타내지 못할 것으로 생각되며 어느 정도의 발현량이 항 종양 효과를 최적으로 유도할 수 있는지에 대하여 추후의 연구로 확인이 필요하다고 생각한다.

최근 복제불능 아데노바이러스에 IL-12 와 4-1BBL 유전자를 삽입하여 유방암 모델, 장암 모델, 장암 간 전이모델 등에서 우수한 항 종양 효과를 유도한 결과들도 보고된바 있으나^{44, 50, 51} 이들 실험에 사용한 유전자 전달체는 복제불능 제 1 세대 아데노바이러스로서 본 연구에서 이용한 종양 선택적 살상 복제가능 아데노바이러스에 비하여 그 치료효능이 낮은 단점을 가지고 있다.

종양형성에 대한 면역감시에서 T 세포를 매개로 한 adaptive immunity 는 효과적으로 종양을 살상하고 나아가서 장기적인 종양의 완치에서 필수적인 역할을 한다⁶⁵. 본 연구에서 항 종양 효과의 기전을 규명하기 위하여 NK 세포와 CTL 에서 분비하는 cytokine 인 INF- γ 의 종양 내의 발현을 ELISA 로 분석한 결과 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스로 치료한 종양에서 INF- γ 발현이 유의하게 증가하였고 ELISpot 분석을 통하여서도 종양세포 특이적으로 INF- γ 를 분비하는 면역세포가 더욱 증가함을 확인하였다. Ad- Δ B7/IL12/41BBL 아데노바이러스로 치료한 종양에서 대조그룹 아데노바이러스로 치료한 종양에 비하여 종양 내 괴사가 더 광범위하게 진행되었으며 또한 종양 내에 CD4⁺, CD8⁺ T 세포, 그리고 항원제시세포의 표지인자인 CD86⁺과 수지상세포 표지인자인 CD11c⁺를 발현하는 세포의 침윤이 더 많이 관찰되었다. 이는 4-1BBL 와 4-1BB 가 결합함으로써 CD8⁺ T 세포의 활성을 증가시켜 면역반응을 향상시킨다는 보고⁴³ 와 또 Shuford 와 Melero 등이 보고한 4-1BB 와 4-1BBL(혹은 항 4-1BB 마우스항체)의 반응이 T 세포를 매개로한 면역반응의 증가를 유도한다는 결과^{45, 66}, 그리고 Melero⁶⁷의 마우스의 피하종양 모델에서 항 4-1BB 항체를 사용하면 CD4⁺, CD8⁺ T 세포를 활성화시켜 종양이 치료된다고 한 보고와 유사하다. 또한 이는 IL-12 의 NK 세포와 T 세포의 활성화를 유도하는²⁴ 작용이 동시에 면역활성을 유도한다는 또 하나의 증거이기도 하다. 본 연구에서 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 로 실험동물의 악성흑색종에 투여하였을 때 종양 내의 수지상세포의 침윤이 증가한 것은 4-1BBL 가 수지상세포의 activator 로도 작용하고³⁷ IL-12 가 NK 세포와 T 세포를 활성화시켜 INF- γ 를 분비하게 되어 수지상세포를 활성화 시키는 작용이 서로 합치되어 나타난

결과로 생각되는데 이는 Pan⁵¹ 등이 복제불능 아데노바이러스를 벡터로, IL-12 와 항 4-1BBL 를 사용하여 진행한 실험결과와 유사하였다.

앞서 언급한 것처럼 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 바이러스의 종양 특이 살상능의 검증을 위하여 ELISpot 분석과 CTL 분석한 결과에서는 종양 특이 세포독성 면역세포의 증가에 의한 종양 살상능의 증가임을 확인할 수 있었다. 이 결과는 IL-12 와 4-1BBL 병합치료는 innate immune 의 NK 세포에 의한 항 종양 효과도 있지만 그에 의해 더 증가된 CTL 반응을 나타내어 adaptive immune 반응을 거쳐 장기적인 항 종양 효과를 나타낸다고 Chen^{68, 69} 등이 보고한 결과와 유사하였으며 그 효과는 IL-12 혹은 4-1BBL 유전자를 단독으로 삽입한 종양 선택적 살상 아데노바이러스로 치료한 것 보다 더 강력하였다.

종양세포가 면역계의 감시를 회피하는 하나의 기전은 전문화된 항원 제시세포가 결핍되어 있거나 또는 이런 면역세포의 종양 항원에 의한 활성화가 충분하지 못한 결과이다. 생체 내로 주입된 수지상세포는 CTL 의 생성을 촉진 시킨다⁵⁷⁻⁶². 수지상세포, 대식세포와 같은 항원제시세포 들은 생체 내에서 주로 자극에 의해 IL-12 를 생산함으로써 NK 세포나 T 세포를 활성화시켜 IFN-γ 를 생성하고 그에 따라 항 종양 활성을 나타낸다^{70 71}. 본 연구에서 골수유래 수지상세포를 *ex vivo* 에서 배양하여 종양항원을 인지시키고, 이 수지상세포를 Ad-ΔB7/IL12/41BBL 아데노바이러스와 함께 B16-F10 악성흑색종 내에 병합치료한 결과, 각각의 단독 치료 보다 그 항 종양 효과가 더 개선된 것은 면역활성화 유전자와 수지상세포 간에는 상호보완적으로 면역체계의 활성화를 유도하고 있음을 의미한다.

Ex vivo 에서 분화, 증식된 수지상세포의 주요 제한점의 하나는 투여부위로부터 주위의 lymph node 로의 이동능이 안정하지 못하다는 것이다^{72, 73}. 종양항원을 인지한 수지상세포로 종양을 치료할 때 먼저 투여한 IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 종양세포 특이살상, 복제가능 재조합 아데노바이러스에 의해 종양세포가 살상되면서 방출된

종양항원과 4-1BBL 공동자극분자의 발현에 의해 수지상세포는 더욱 활성화될 것이다. 고 본 실험에서는 추정하였다. 결과, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 바이러스와 수지상세포를 병합하여 치료할 때 수지상세포 단독치료 보다 수지상세포의 임프절로의 이동능이 상향조절됨을 확인하였다. 항암면역을 일으키는 T 세포는 종양항원에 대하여 낮은 친화력을 자주 발생함⁷⁴으로 강력한 공동자극이 필요하다. Liu⁷⁵ 등은 4-1BBL 를 사용하였고 그 외에 secondary lymphoid organ chemokine (SLC)과 tumor necrosis factor-related activation induced cytokine (TRANCE) 등을 수지상세포에 painting 하여 종양에 투여하였을 때 draining lymph node 로의 이동능력이 개선된다는 것을 검증하였으며 그에 의해 개선된 면역반응으로 항 종양 효과를 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이에 근거하여 본 연구자는 골수유래 수지상세포 치료에 4-1BBL 와 IL-12 유전자를 병합하여 치료하면 항암면역 중심위치의 수지상세포의 이동능의 증가와 활성화에 더욱 도움을 주었다고 사료할 수 있었다.

본 실험결과에 의하면 수지상세포와 아데노바이러스를 병합하여 치료하였을 때 악성흑색종 내에 CD4⁺, CD8⁺ 등 T 세포의 침윤 증가, CD86⁺, CD11c⁺ 등 항원제시세포의 침윤 증가, 그리고 종양 내에 IFN- γ 의 발현 증가 등을 함께 수반하여 결과적으로 항 종양 효과의 개선을 나타내었다. 본 연구에서는 장기적인 종양 억제, 살상효과를 나타낼 수 있는 adaptive immunity 를 분석한 결과, 종양 특이 면역세포의 침윤 증가가 종양 특이 독성반응을 유도함으로써 항 종양 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구와 같이 수지상세포와 IL-12, 그리고 4-1BBL 를 병합하여 치료한 연구사례는 보고된 바가 없어 본 연구의 결과를 직접 비교, 고찰하기는 어려웠다.

또한 본 연구에서 암 전이모델로 B16BL6 악성흑색종 폐 자연전이 모델⁷⁶을 선택하여 새로운 방식의 병합치료를 시행한 결과, Ad- Δ B7/IL12/41BBL 혹은 수지상세포를 각각 단독으로 치료하였을 때 보다 현저한 항 암전이 억제효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 종양항원으로 활성화되고 성숙된 수지상세포에 의한 항 암 백신효과와 암전이 억제⁷⁷, 4-1BBL 를 수지상세포에 고 발현시킴으로써 나타나는

항암작용⁷⁵ 그리고 IL-12 와 4-1BBL 가 함께 발현됨에 따라 암전이 억제 효과가 유도된 결과⁴⁹ 들과 유사하였다. 결과적으로 이는 앞서의 면역반응들이 통합되어 유도된 CTL 면역반응에 의해 암전이 억제 효과가 유발된 것으로 사료된다.

본 실험의 결과를 전체적으로 종합하면, IL-12 와 4-1BBL 를 발현하는 종양 선택적 복제, 살상가능 아데노바이러스는 바이러스에 의한 종양세포 살상뿐만 아니라 IL-12 와 4-1BBL 의 발현에 따른 종양 특이 면역반응의 유도, 그리고 수지상세포 병합치료에 의한 종양 특이 면역반응을 더욱 활성화함으로써 실험동물모델에서 국소종양의 퇴행과 암세포의 전이 억제가 더욱 효율적으로 유도된 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 종양선택적 살상, 복제가능 아데노바이러스인 Ad- Δ B7 에 IL-12 와 4-1BBL 를 동시에 발현할 수 있는 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 를 제작하고 이를 Ad- Δ B7, 또는 IL-12 와 4-1BBL 각각 하나씩 삽입된 바이러스와 비교한 결과 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 의 항 종양 효과가 더욱 우수함을 확인하였다. 그리고 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 재조합 아데노바이러스와 수지상세포를 C57BL/6 마우스의 B16-F10 악성흑색종에 병합투여 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Ad- Δ B7/IL12/41BBL 와 수지상세포의 병합치료는 종양선택적 살상 아데노바이러스에 의한 종양세포의 살상과 함께 종양특이 면역세포의 활성화를 유도하여 우수한 항 종양 효과와 암전이 억제효과를 보였으며, 이는 Ad- Δ B7/IL12/41BBL 종양선택적 살상 아데노바이러스와 수지상세포를 각각 단독으로 치료한 경우에 비하여 현저히 개선된 치료반응을 나타내었다.

따라서 향후, 위와 같은 치료전략을 실제 암환자의 치료에 응용하여 그 치료효과의 효용성 여부를 규명할 필요가 있음을 제안한다.

참 고 문 헌

1. Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, Fernandez N, Cordier L, Abina MA, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J Mol Med.* 1996;74(4):183-189.
2. Bailar JC, 3rd, Gornik HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med.* 1997;336(22):1569-1574.
3. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 1996;274(5286):373-376.
4. Shenk T, Flint J. Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res.* 1991;57:47-85.
5. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med.* 1997;3(6):639-645.
6. Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, Venkatesh LK, Schaeper U, Elangovan B, et al. Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 1994;79(2):341-351.
7. 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(10):6553-6566.
8. Boulakia CA, Chen G, Ng FW, Teodoro JG, Branton PE, Nicholson DW, et al. Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene.* 1996;12(3):529-535.
9. Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 1993;7(4):546-554.
10. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(16):7742-7746.
11. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 1996;10(4):461-477.
12. Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene.* 1997;14(4):405-414.
13. Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(9):725-736.
14. Dyson N, Harlow E. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv.* 1992;12:161-195.
15. Flint J, Shenk T. Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet.* 1997;31:177-212.
16. Whyte P, Williamson NM, Harlow E. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell.* 1989;56(1):67-75.

17. Sladek TL. E2F transcription factor action, regulation and possible role in human cancer. *Cell Prolif.* 1997;30(3-4):97-105.
18. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Kyritsis AP. The functional role of tumor suppressor genes in gliomas: clues for future therapeutic strategies. *Neurology.* 1998;51(5):1250-1255.
19. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000;19(1):2-12.
20. Kim JS, Choi KJ, Kim PH, Kim JH, Sohn JH, CO. Y. Enhanced Oncolytic Effect and Anti-Tumor Effect of Replication Competent Adenovirus with Double Mutation in E1A & E1B Regions. *J Bacteriol Virol. Korean.* 2005;35(2):113-124.
21. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989;170(3):827-845.
22. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:495-521.
23. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995;154(10):5071-5079.
24. Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, et al. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res.* 1992;4(4):355-368.
25. Heller L, Merkler K, Westover J, Cruz Y, Coppola D, Benson K, et al. Evaluation of toxicity following electrically mediated interleukin-12 gene delivery in a B16 mouse melanoma model. *Clin Cancer Res.* 2006;12(10):3177-3183.
26. Kwon BS, Kestler DP, Eshhar Z, Oh KO, Wakulchik M. Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cell Immunol.* 1989;121(2):414-422.
27. Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, von Kempis J, Lotz M. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood.* 1995;85(4):1043-1052.
28. Vinay DS, Kwon BS. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol.* 1998;10(6):481-489.
29. Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, et al. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol.* 1993;150(3):771-781.
30. Heinisch IV, Daigle I, Knopfli B, Simon HU. CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur J Immunol.* 2000;30(12):3441-3446.
31. Lindstedt M, Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA. Expression of CD137 (4-1BB) on human follicular dendritic cells. *Scand J Immunol.* 2003;57(4):305-310.

32. Kienzle G, von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol.* 2000;12(1):73-82.
33. Broll K, Richter G, Pauly S, Hofstaedter F, Schwarz H. CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(4):543-549.
34. Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, et al. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol.* 1994;24(9):2219-2227.
35. Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol.* 1993;23(10):2631-2641.
36. Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-murine primed splenic B cells. *Eur J Immunol.* 1994;24(2):367-374.
37. Futagawa T, Akiba H, Kodama T, Takeda K, Hosoda Y, Yagita H, et al. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol.* 2002;14(3):275-286.
38. DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH. Costimulation of CD28-T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol.* 1997;158(2):551-559.
39. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol.* 2001;167(3):1313-1324.
40. Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol.* 2002;168(10):4897-4906.
41. Laderach D, Movassagh M, Johnson A, Mittler RS, Galy A. 4-1BB costimulation enhances human CD8(+) T cell priming by augmenting the proliferation and survival of effector CD8(+) T cells. *Int Immunol.* 2002;14(10):1155-1167.
42. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 2002;169(9):4882-4888.
43. Kim YJ, Li G, Broxmeyer HE. 4-1BB ligand stimulation enhances myeloid dendritic cell maturation from human umbilical cord blood CD34+ progenitor cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(6):895-903.
44. Martinet O, Divino CM, Zang Y, Gan Y, Mandeli J, Thung S, et al. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. *Gene Ther.* 2002;9(12):786-792.
45. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med.* 1997;3(6):682-685.

46. Zhu G, Flies DB, Tamada K, Sun Y, Rodriguez M, Fu YX, et al. Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/I-Ealpha-transgenic mice. *J Immunol.* 2001;167(5):2671-2676.
47. Yurkovetsky ZR, Shurin GV, Barry DA, Schuh AC, Shurin MR, Robbins PD. Comparative analysis of antitumor activity of CD40L, RANKL, and 4-1BBL in vivo following intratumoral administration of viral vectors or transduced dendritic cells. *J Gene Med.* 2006;8(2):129-137.
48. Qiu H, Zhang H, Feng ZH, Geng H, Zhang GM. [Therapeutic effects of simultaneous expression of 4-1BBL and sPD-1 on experimental murine hepatoma]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2006;14(7):505-509.
49. Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, et al. Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(11):931-936.
50. Xu DP, Sauter BV, Huang TG, Meseck M, Woo SL, Chen SH. The systemic administration of Ig-4-1BB ligand in combination with IL-12 gene transfer eradicates hepatic colon carcinoma. *Gene Ther.* 2005;12(20):1526-1533.
51. Pan PY, Gu P, Li Q, Xu D, Weber K, Chen SH. Regulation of dendritic cell function by NK cells: mechanisms underlying the synergism in the combination therapy of IL-12 and 4-1BB activation. *J Immunol.* 2004;172(8):4779-4789.
52. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med.* 1979;149(1):1-16.
53. Steinman L. Prospects for immunotherapy directed to the T cell receptor in human autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;636:147-153.
54. Shurin MR. Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;43(3):158-164.
55. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-252.
56. Palucka K, Banchereau J. Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med.* 1999;5(8):868-870.
57. Inaba K, Young JW, Steinman RM. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med.* 1987;166(1):182-194.
58. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med.* 1990;172(2):631-640.
59. Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, et al. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol.* 1994;24(3):605-610.
60. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD, Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med.* 1996;183(1):283-287.
61. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 1997;90(9):3245-3287.

62. Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A. Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int J Cancer*. 2001;91(6):749-756.
63. Yun CO, Kim E, Koo T, Kim H, Lee YS, Kim JH. ADP-overexpressing adenovirus elicits enhanced cytopathic effect by induction of apoptosis. *Cancer Gene Ther*. 2005;12(1):61-71.
64. Guinn BA, Bertram EM, DeBenedette MA, Berinstein NL, Watts TH. 4-1BBL enhances anti-tumor responses in the presence or absence of CD28 but CD28 is required for protective immunity against parental tumors. *Cell Immunol*. 2001;210(1):56-65.
65. Pham-Nguyen KB, Yang W, Saxena R, Thung SN, Woo SL, Chen SH. Role of NK and T cells in IL-12-induced anti-tumor response against hepatic colon carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;81(5):813-819.
66. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med*. 1997;186(1):47-55.
67. Melero I, Bach N, Hellstrom KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L. Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur J Immunol*. 1998;28(3):1116-1121.
68. Chen SH, Pham-Nguyen KB, Martinet O, Huang Y, Yang W, Thung SN, et al. Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Mol Ther*. 2000;2(1):39-46.
69. Xu D, Gu P, Pan PY, Li Q, Sato AI, Chen SH. NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Int J Cancer*. 2004;109(4):499-506.
70. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol*. 1994;153(4):1697-1706.
71. Brunda MJ. Role of IL12 as an anti-tumour agent: current status and future directions. *Res Immunol*. 1995;146(7-8):622-628.
72. Lappin MB, Weiss JM, Delattre V, Mai B, Dittmar H, Maier C, et al. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology*. 1999;98(2):181-188.
73. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res*. 1999;59(1):56-58.
74. Overwijk WW. Breaking tolerance in cancer immunotherapy: time to ACT. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(2):187-194.
75. Liu S, Foster BA, Chen T, Zheng G, Chen A. Modifying dendritic cells via protein transfer for antitumor therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2007;13(1):283-291.
76. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(20):1482-1493.

77. Lim DS, Kim JH, Lee DS, Yoon CH, Bae YS. DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of tumor metastasis or recurrence, although it is not efficient for the eradication of established solid tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2007.

Abstracts

Antitumor Effect of Oncolytic Adenovirus Expressing IL-12 and 4-1BBL in Combination with Dendritic Cell Therapy

Jing-Hua Huang

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

(Directed by professor Joo-Hang Kim)

Oncolytic adenoviral vectors are currently being developed as biological anti-tumor therapeutic agents. A clear benefit of oncolytic adenovirus is amplification of the therapeutic gene expression, as the replicating vector could infect and deliver the therapeutic gene to adjacent cells as well as the first infected cells.

Interleukin-12(IL-12) is a cytokine known to enhance the cytolytic activity of natural killer cells (NK cells), lymphokine-activated killer cells (LAK cells), T cells, and macrophages. However, most of tumor cells lack the expression of co-stimulatory molecules on their surface, resulting in escape of recognition by immune system. CD137 ligand (4-1BBL) is a co-stimulatory molecule expressed on the surface of activated T cells. Interaction of 4-1BBL with its own receptor, CD137 (4-1BB) has shown amplification of T-cell (especially CD8⁺)-mediated anti-tumor immunity. It is already known that DCs are the most potent antigen presenting cells and thus considered as a favorable type of therapeutic cell in cancer immunotherapy.

In this study, to increase the potential anti-tumor activity of oncolytic adenovirus, we constructed E1B deleted, and retinoblastoma (Rb) protein binding site of E1A region mutated oncolytic adenoviral vector expressing murine IL-12 and murine 4-1BBL, Ad-ΔB7/IL12/41BBL. The anti-tumor efficacy of Ad-ΔB7/IL12/41BBL was evaluated in B16-F10 melanoma bearing immune-competent mice. Significant inhibition of tumor growth was shown in Ad-ΔB7/IL12/41BBL treated group compared to PBS, Ad-ΔB7, Ad-ΔB7/41BBL,

or Ad- Δ B7/IL12 treated groups. We demonstrated that the anti-tumor effect is associated with the tumor-specific immune response; we first quantified the expression level of interferon- γ (IFN- γ) in tumor tissues and examined the cytolytic activity of splenocytes using cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay and IFN- γ ELISpot assay. Furthermore, the infiltrations of CD4, CD8, CD86, CD11c immune cells in tumors were confirmed with immunohistochemistry.

Moreover, we also demonstrated the enhanced anti-tumor efficacy of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and dendritic cells (DCs) combinatorial therapy showing a higher incidence of tumor regression compared to an IL-12 and 4-1BBL expressing oncolytic adenovirus alone treated ($p < 0.05$) or DCs alone treated ($p < 0.01$), respectively. Furthermore, we verified strong anti-metastatic potency of Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combination therapy in spontaneous lung metastatic B16BL6 melanoma model. In order to prove that the anti-tumor effects is associated with the tumor-specific immune response, we quantified the expression level of IFN- γ in tumor tissues and examined the cytolytic activity of splenocytes using CTL assay and IFN- γ ELISpot assay. Furthermore, confirmed the infiltrations of CD4, CD8, CD86, CD11c immune cells in tumor through immunohistochemistry. In addition, the number of migrated Green fluorescent protein labeled DCs(GFP-DCs) were augmented in the lymph nodes of Ad- Δ B7/IL12/41BBL with GFP - DCs combination treatment compared to that of the GFP - DCs alone treatment ($p < 0.05$). We validated that Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combinatorial therapy induced significantly higher T cell-mediated anti-tumor activity than Ad- Δ B7/IL12/41BBL alone and DCs alone treatment.

Taken together, these improved the anti-tumor effects obtained by Ad- Δ B7/IL12/41BBL oncolytic adenovirus. Subsequent we also demonstrated that Ad- Δ B7/IL12/41BBL and DCs combination treatment showed remarkably enhanced anti-tumor effects as well as the anti-metastatic effects compared to Ad- Δ B7/IL12/41BBL alone treatment and DCs alone treatment.

To conclude, we were considered as new strategy for clinical anti-cancer therapy using oncolytic adenovirus, expressing IL-12 and 4-1BBL, and the DCs combination therapy.

Key Words: oncolytic adenovirus, IL-12, 4-1BBL, dendritic cell, cancer, cell therapy, gene therapy, immunotherapy.