

E1A/E1B 이중변이형 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 개선된 암세포 살상 효과 및 항종양 효과

암연구소, 암센터, 연세대학교 의과대학, 연세대학교

김재성 · 최경주 · 김평환 · 김주항 · 손주혁 · 윤채옥*

=Abstract=

Enhanced Oncolytic Effect and Anti-Tumor Effect of Replication Competent Adenovirus with Double Mutation in E1A & E1B Regions

Jaesung Kim, Kyung-Ju Choi, Pyung-Hwan Kim, Joo-Hang Kim, Joo-Hyuk Sohn and Chae-Ok Yun*

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Institute for Cancer Research, Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, 120-752, Korea

Gene-modified replication-competent adenoviruses (Ads) are emerging as a promising new modality for the treatment of cancer. We have previously shown that E1B 19kDa and E1B 55kDa gene deleted Ad (Ad- Δ E1B19/55) exhibits improved tumor-specific replication and cell lysis, leading to potent anti-tumor effect. As an additional effort to increase cancer cell-selectivity of replicating adenovirus, we have first generated eleven E1A-mutant Ads (Ad-mt#1 ~ #11) with deletion or substitution in retinoblastoma (Rb) binding sites of E1A. Of these viruses, Ad-mt#7 demonstrated significantly improved cytopathic effect (CPE) and viral replication in a cancer cell-specific manner. To further increase the cancer cell-specific killing effect of Ad-mt#7, both E1B 19kDa and E1B 55kDa genes were deleted, resulting in an Ad- Δ E1Bmt7. As assessed using CPE assay, MTT assay, and immunoblot analysis for Ad fiber expression, Ad- Δ E1Bmt7 exerted markedly enhanced cancer cell-specific killing effect as well as viral replication in comparison to either Ad-mt#7 or Ad- Δ E1B19/55. Furthermore, the growth of established human cervical carcinoma in nude mice was significantly suppressed by intratumoral injection of Ad- Δ E1Bmt7. In summary, we have developed an oncolytic adenovirus with significantly improved therapeutic profiles for cancer treatment.

Key Words: Cancer gene therapy, Conditionally-replicating adenovirus, Apoptosis

서 론

암 유전자 치료에 이용되던 초기 아데노바이러스 벡터는 치료 유전자가 삽입된 형태의 증식 불가능 아데노바이러스로 일회성의 감염으로 인한 제한적인 치료 효과가 문제점으로 대두되었다 (15,4). 이러한 낮은 항종양 효과를 극복하기 위하여, 정상 세포에서는 바이러스의 증식이 제한되어 세포 살상이 일어나지 않지만 종양세포에서는 활발히 증식되어 암세포만을 선택적으로 살상할 수 있는 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 개발하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다

(1,7,11). 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1B는 E1B 19kDa과 E1B 55kDa 유전자로 이루어져있으며 (10), 이들 중, E1B 55kDa은 종양 억제 단백질인 p53과 결합하여 바이러스 감염으로 유도되는 세포주기 중지신호 및 세포고사 신호기전을 억제한다 (24). 이를 바탕으로 하여 개발된 E1B 55kDa 유전자가 소실된 ONYX-015 (dl1520) 아데노바이러스와 본 연구실에서 개발한 Ad- Δ E1B55 (YKL-1) 아데노바이러스는 p53 단백질이 관여하는 세포내 신호전달체계가 손상된 종양 세포에서만 선택적으로 복제하여 암세포 특이적 살상을 유도한다 (1,11,14). E1B 19kDa 유전자는 강력한 세포고사

접수: 2005년 4월 11일, 게재결정: 2005년 6월 20일

*교신저자: 윤채옥. 120-752, 암연구소, 암센터, 연세대학교 의과대학, 연세대학교

Phone: +82-2-2228-8040, Fax: +82-2-362-0158, e-mail: chaek@yumc.yonsei.ac.kr

(apoptosis) 억제제로 알려진 Bcl-2와 염기서열 및 기능이 유사하며, 아데노바이러스에 의해 감염된 세포내에서 일어나는 세포고사를 억제한다 (2). 따라서 E1B 19kDa 유전자가 소실된 복제 가능 아데노바이러스는 바이러스의 복제에 따른 세포사멸뿐만 아니라 세포고사도 함께 유도할 수 있어 세포 살상능이 증가되며, 이러한 E1B 19kDa 유전자가 소실된 복제 가능 아데노바이러스의 증대된 세포 살상능은 생체의 뿐만 아니라 생체내 항종양 효과 실험에서도 입증되고 있다 (12,20). 또한, E1B 55kDa 유전자와 더불어 E1B 19kDa 유전자가 함께 소실된 복제 가능 아데노바이러스 (Ad-ΔE1B19/55)는, E1B 55kDa 유전자만 소실된 복제 가능 아데노바이러스 (Ad-ΔE1B55)에 비하여 암세포 선택적 세포 살상능이 더욱 높음이 밝혀졌다 (12).

아데노바이러스 E1A는 감염 직후 가장 먼저 발현되는 단백질로써 바이러스 복제에 필수적이고, 세포주기를 조절하는 retinoblastoma 단백질 (pRb)과 결합하여 E2F-pRb 복합체로부터 E2F의 해리를 유도한다 (5,23). pRb로부터 해리된 E2F는 아데노바이러스의 E2 promoter의 활성화를 촉진시킬 뿐 아니라 세포주기의 진행을 주관하는 cyclin E, cyclin A, cdc2, cdk2, cdc6, orcl, Mem 2-6, 또는 DNA polymerase α 등과 같은 유전자들의 전사도 촉진시킨다 (18,21). 또한 E2F에 의해 발현된 세포주기 활성화 단백질들은 세포 내로 감염된 아데노바이러스 유전자들의 복제 및 전사에도 관여하여 바이러스의 증식을 촉진시킨다 (13). pRb가 결합하는 E1A의 두 부위는 CR1 (conserved region 1)의 30 - 60 아미노산 서열과 CR2 (conserved region 2)의 120-127 아미노산 서열로서, 이들 중 어느 한 부위라도 결손되면 E1A-pRb 복합체의 형성이 제대로 이루어지지 않는다 (17). 이에 근거하여 Fueyo 등은 120-127 아미노산 서열을 결손시킨 Δ24 아데노바이러스를 개발하여 Rb 유전자가 돌연변이된 암세포만을 선택적으로 살상할 수 있음을 보고하였다 (7). 대부분의 정상적인 세포들은 pRb를 포함한 세포주기 G1에서 S주기로의 진행 여부를 결정하는 G1-S phase checkpoint 관련 신호 단백질들의 기능이 정상적으로 조절되어 Go-G1에서 세포주기가 정지되어 있으나, 많은 종류의 암세포들은 Rb 유전자의 변이뿐만 아니라 pRb pathway, 즉 p16/pBb/E2F 신호전달 경로 등이 비정상적으로 조절되기 때문에, 세포주기가 활발히 진행되고 세포 분열이 왕성해진다 (8). 따라서 Δ24 아데노바이러스와 같이 pRb와의 결합능이 상실된 증식 가능 아데노바이러스가 Rb 유전자가 비활성화된 암세포를 감염하게 되면, E1A-pRb의 결합이 이루어지지 않아도 세포는 S 세포 주기로 진행하게 되고, 결과적으로 아데노바이러스 복제가 왕성하게 일어나게 된다. 이에 반하여 pRb의 기능이 정상적인 세포에서는 돌연변이된 E1A가 pRb와 결합할 수 없어 S 세포 주기로 진행되지 못하고, 결과적으로 바

이러스의 복제능이 현저히 감소하게 된다 (7). 즉, pRb와의 결합능이 소실된 E1A 유전자가 내재된 아데노바이러스는 대부분의 정상 세포에서는 복제되지 않지만 pRb의 기능이 상실되어 세포주기가 왕성하게 진행되는 종양세포 내에서만 선택적으로 복제가 가능하게 되어 종양세포 특이적 살상을 유도할 수 있다.

복제 가능 아데노바이러스가 암 유전자 치료에 효과적으로 이용되기 위해서는 먼저 종양 특이적으로 세포를 살상할 수 있어야 하며, 또한 세포 살상을 효율적으로 유도할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 pRb의 기능이 소실된 암세포에서만 선택적 복제 및 살상을 유도할 수 있는 여러 종류의 E1A 변이체 아데노바이러스들을 제작하고, 이들 중 가장 세포 살상능이 우수하고 동시에 암세포 특이성이 우수한 pRb 결합능 소실 아데노바이러스 변이체, Ad-mt#7를 선별하였다. 또한, p53의 기능이 손상된 종양세포 내에서만 선택적 복제가 일어날 수 있도록 Ad-mt#7로부터 E1B 55kDa 유전자를 결손시키고, 동시에 감염된 세포의 세포사멸을 더욱 효과적으로 유도하기 위해 E1B 19kDa도 함께 결손시켜 개선된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1Bmt7를 제작하였다. 이와 더불어, p53 결합능 뿐만 아니라 pRb 결합능이 함께 소실된 아데노바이러스인 Ad-ΔE1Bmt7의 종양 선택적 살상능이 pRb 결합능 또는 p53 결합능이 각각 단독으로 소실된 아데노바이러스에 비해 개선될 수 있는지도 함께 검증하였다.

재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 간암세포주 (SK-Hep1, Hep3B), 뇌암세포주 (U343), 폐암세포주 (A549), 자궁암세포주 (C33A), 섬유아 세포주 (Chang, BJ, 173WE, MRC5)이며, 모두 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. 그리고 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 HEK293 세포주 (ATCC)를 아데노바이러스 생산 세포주로 사용하였다. Hep3B를 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아 혈청 (Gibco-BRL, Grand Island, NY)이 포함된 DMEM 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin (Gibco-BRL)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. Hep3B 세포주는 같은 조건하에 MEM (Gibco-BRL) 배양액으로 배양하였다.

2. 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출

아데노바이러스의 E1A 유전자 염기서열 중 pRb 단백질과의 결합에 관여하는 두 결합부위 (88~180 bp in CR1, 361~381 bp in CR2)를 부분적으로 결손 또는 치환시키기 위하여, 먼저

Table 1. Nucleotide sequences of E1A mutation-inducible primer set

Primer name		Primer sequences
CR1 (E::G)	sense	5'-CCACCTACCCTTCACGGACTGTATG ATTTAGAC-3'
	antisense	5'-GTCTAAATCATAACAGTCCGTGAAGG GTAGGTGG-3'
CR2 (Δ 7a.a)	sense	5'-CTTGTAACGGAGGTGATCGGCTTTC CACCCAGTGACG-3'
	antisense	5'-TCACTGGGTGGAAAGCCGATCACCT CCGGTACAAG-3'
CR1 (Δ 30a.a)	sense	5'-ATCGAAGAGGTAAGTGGCTGCGGTTT CGCAGATTTTTC-3'
	antisense	5'-AAATCTGCGAAACCGCAGCCAGTAC CTCTTCGAT-3'
CR2 (7Gly)	sense	5'-GTACCGGAGGTGATCGGTGGTGGCG GAGGCGGGGGTGGCTTTCCACCCAG-3'
	antisense	5'-CTGGGTGGAAAGCCACCCCGCCTC CGCCACCACCGATCACCTCCGGTAC-3'
CR2 (C::G)	sense	5'-GTGATCGATCTTACCGCCACGAGG CTGGC-3'
	antisense	5'-GCCAGCCTCGTGGCCGGTAAGATCG ATCAC-3'

야생형 아데노바이러스 E1 서플렉터인 pXC1을 *Bam*HI과 *Xba*I 제한효소로 E1 부위 (9875~1339 bp)를 절단하고, 절단된 E1A DNA를 pSP72 클로닝 벡터의 *Bam*HI/*Xba*I 부위에 subcloning하여 pSP72/XC-BX를 제작하였다. 제작된 pSP72/XC-BX를 주형으로 하여 Site-directed mutagenesis를 시행하여 pRb 결합부위를 결손 또는 치환된 11종류의 E1A 변이 플라스미드를 제작하였다. 즉, Ad-mt#1은 E1A 단백질의 CR1 45번째 아미노산인 Glu를 Gly으로 치환시켰으며, Ad-mt#2와 Ad-mt#6은 CR2 121-127번째 부위의 7개의 아미노산을 각각 결손시키거나 Gly로 치환시켰다. 또한 Ad-mt#3은 CR1 부위 (30~60 번째 아미노산)를 결실시켰으며, Ad-mt#9는 CR2 부위의 124 번째 아미노산인 Cys를 Gly으로 치환하였다. 나머지 E1A 변이체들은 각각의 돌연변이체들을 조합하여 제작하였다. 돌연 변이 유도에 사용된 primer set들은 Table 1에 제시하였으며, pRb 결합 부위가 결손 또는 치환된 총 11종류의 pSP72/XC-BX-mt 벡터들에 대한 염기서열 분석을 시행하여 각각의 돌연 변이된 부위들의 염기서열들을 확인하였다. 돌연 변이된 아데노바이러스 E1 부위를 아데노바이러스 E1 서플렉터에 재도입하기 위하여, pSP72/XC-BX 돌연 변이체들을 각각 *Bam*HI/*Xba*I으로 처리하여 E1 부위를 잘라내고, 이를 다시 pXC1의 *Bam*HI/*Xba*I site에 도입하여 11종류의 아데노바이러스 E1 서플렉터들 (pXCmt#1~#11)을 각각 제작하였다. 제작된 pXC 돌연 변이체들을 각각 *Xmn*I으로 처리하여 선형화하고, 이를 *Bst*BI 제한효소로 처리한

아데노바이러스 토달 플라스미드인 vmdl324Bst (Dr. S.B. Verca, University of Fribourg, Switzerland; 22)와 함께 상동재조합이 가능한 BJ5183 대장균에 동시 형질전환시켜 pRb 결합 부위가 소실 또는 치환된 아데노바이러스 플라스미드들 (pAd-mt#1~#11)을 제작하였다. 이들 11종류의 아데노바이러스 플라스미드들을 *Pac*I 제한효소를 처리하여 선형화시키고, HEK293 세포주에 형질전환하여 총 11종류의 아데노바이러스를 제작하였다 (Fig. 1). 또한, pRb 결합 부위와 p53 결합 부위가 동시에 소실된 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, E1A 변이형 아데노바이러스 서플렉터들 중 pAd-mt#7를 *Sca*I/*Xba*I 제한효소로 처리하여 약 2.2 kb 크기의 E1 부위를 잘라내고, 이를 E1B 부위가 완전히 결손된 p Δ E1B 벡터의 *Sca*I/*Xba*I 부위에 도입하여 p Δ E1Bmt7 서플렉터를 제작하였다. p Δ E1Bmt7 서플렉터는 상기한 방법으로 vmdl324Bst와 함께 상동재조합된 뒤, HEK293 세포주에 형질전환시켜 Ad- Δ E1Bmt7 아데노바이러스를 생산하였다 (Fig. 4A). 대조군으로 사용된 바이러스들은 E1 부위가 완전히 결손되어 바이러스의 복제가 불가능한 Ad- Δ E1 아데노바이러스와 E1B 55kDa 유전자가 결손된 Ad- Δ E1B55 (YKL-1), E1B 19kDa와 E1B 55kDa 유전자들이 모두 결손된 Ad- Δ E1B19/55, 그리고 E1 부위가 야생형인 Ad-wt이며 (12, 14), 각각의 아데노바이러스는 HEK293 세포주에서 증식시켜 limiting titration assay 또는 plaque assay로 역가 (plaque forming unit; PFU)를 산출하였다.

3. 아데노바이러스의 증식 및 세포 살상능 검증

인체 종양세포와 정상세포에 대한 재조합 아데노바이러스들의 살상능력을 비교하기 위하여 간암세포주 (Hep3B), 뇌암세포주 (U343), 자궁암세포주 (C33A), 폐암세포주 (A549) 등의 인체 종양세포주들과 BJ, 173WE, MRC5와 같은 정상 세포주들을 24-well plate에 각각 분주하고 24 시간 후 각각의 아데노바이러스를 여러 MOI (multiplicity of infection)로 감염시켰다. 가장 낮은 MOI의 바이러스로 감염시킨 세포들이 거의 사멸된 시점에 배지를 제거하고 plate 바닥에 남아있는 세포들을 0.5% crystal violet (50% methanol)으로 고정하고 염색한 후 아데노바이러스의 세포 살상능을 비교, 분석하였다.

4. MTT assay

아데노바이러스의 복제 및 증식에 따른 세포 살상능을 정량화하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) assay를 수행하였다. 종양세포주와 정상 세포주들을 24-well plate에 각각 30~80% confluence로 분주하고 24 시간 후 Ad- Δ E1, Ad-mt#7, Ad- Δ E1B19/55, Ad- Δ E1Bmt7, Ad- Δ E1B55, 또는 Ad-wt 아데노바이러스를 Hep3B는 2 MOI, C33A는 5 MOI, A549와 U343은 10 MOI, 그리고 정상 세포주

인 BJ, 173WE, MRC5는 50, 20, 20 MOI로 각각 감염시켰다. 바이러스 감염 후 일정 시간 간격으로 250 μ l의 MTT 용액을 plate well에 첨가하여 4 시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 plate well에 1 ml의 DMSO (dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, DMSO로 용출된 상층액을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 구하였다.

5. Immunoblotting 분석

여러 종류의 종양세포주들과 정상 세포주들에 Ad- Δ E1, Ad-mt#7, Ad- Δ E1B19/55, Ad- Δ E1Bmt7, Ad- Δ E1B55, 또는 Ad-wt 아데노바이러스를 각각 10 또는 100 MOI로 감염시키고 24 시간, 혹은 48시간 후 감염된 세포를 회수하였다. Lysis buffer (50 mM HEPES containing 0.15 M NaCl, 0.5% Nonidet P-40 and protease inhibitor: 0.1 mM PMSF)로 세포들을 용해시키고 SDS-PAGE (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane에 전기이동시킨 후 아데노바이러스 E1A 단백질 (sc-430; Stratagene, La Jolla, CA), p53 (pAb 1801; NeoMarkers, Fremont, CA), β -actin (Sigma, St. Louis, MO), 혹은 아데노바이러스 파이버(fiber) 단백질을 특이적으로 인지하는 항체 (2A6; Neomarkers, Fremont, CA)를 일차 항체로 결합시켰다. HRP (horseradish peroxidase)가 결합된 goat anti-rabbit IgG (sc-2004; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), 또는 goat anti-mouse IgG (sc-2005; Santa Cruz Biotech)를 이차항체로 혼성화시킨 뒤, ECL (enhanced chemi-luminescence) (sc-2048; Santa Cruz Biotech) 방법으로 X-선 필름에 감광시켜 membrane 상의 단백질과 항체와의 결합여부를 조사하고 각 단백질의 발현양상을 확인하였다.

6. 생체내 항종양 효과 검증

생후 7-8주 정도 경과된 누드 생쥐에 1×10^7 개의 인체 자궁암세포주 C33A를 복부 피하에 주사하였다. 종양의 용적이 약 70-80 mm^3 정도 되었을 때, 5×10^7 PFU의 Ad- Δ E1B19/55, Ad- Δ E1Bmt7, Ad-mt#7 아데노바이러스 또는 음성 대조군으로서 PBS를 각각 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 주사한 후 종양의 크기를 2, 3일 간격으로 측정하였다. 종양의 용적은 caliper로 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$\text{종양의 용적 (mm}^3\text{)} = (\text{단축 mm})^2 \times \text{장축 mm} \times 0.523$$

결 과

1. E1A 변이형 아데노바이러스들의 종양세포 및 정상세포

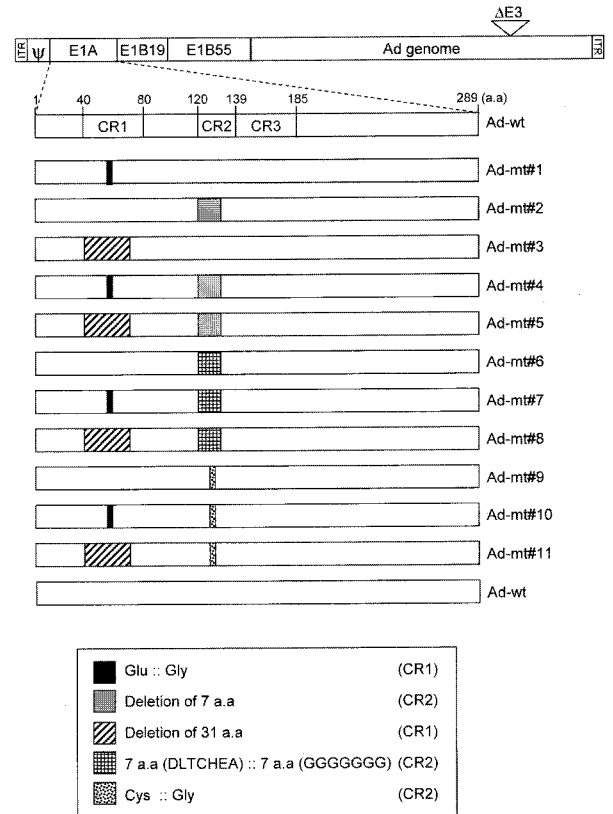


Figure 1. Representative structures of E1A-mutated recombinant adenoviruses. A schematic outline of deletions or substitutions introduced into the adenovirus genome is shown. ITR, inverted terminal repeat. Ψ , packaging signal. Δ E3, deletion of E3 region (28592-30470 bp). Black box, substitution of Glu with Gly at 45th amino acid in CR1. Gray box, deletion of 7 amino acids at 121th-127th in CR2. Hatched box, deletion of 31 amino acids at 30th-60th in CR1. Checked box, substitution of 7 amino acids (DLTCHEA) with 7 Gly (GGGGGG) in CR2. Spotted box, substitution of Cys with Gly at 124th amino acid in CR2. Ad-wt has an intact E1A region.

살상능 비교 검증

본 연구에서는 pRb의 기능이 소실된 암세포에서만 선택적으로 증식하고 세포 살상을 유도할 수 있는 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 제작하기 위하여, E1A 유전자 염기서열 중 pRb 단백질과의 결합부위가 부분적으로 결손되거나 glycine으로 치환된 형태의 11 종류의 아데노바이러스 E1 서플렉터를 각각 제작하고, 아데노바이러스 토달 벡터인 vmdl324Bst 과 상동 제조함하여 pRb 결합 부위가 소실 또는 치환된 아데노바이러스 (Ad-mt#1~#11)들을 제작 및 생산하였다 (Fig. 1). 먼저, 제작된 11 종류의 E1A 돌연변이형 아데노바이러스들의 종양세포 살상능을 비교 검증하기 위해 각각의 아데노바이러스를 MOI 별로 여러 종류의 인체 종양세포주들 (Hep3B, C33A, A549, U343)에 감염시키고 아데노바이러스의 증식능에 따른 세포

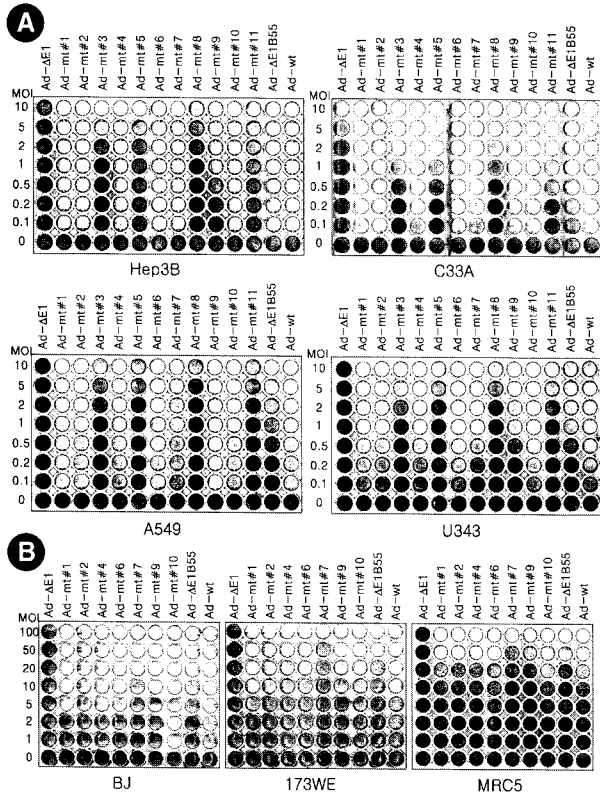


Figure 2. Cytopathic effects of E1A-mutant adenoviruses. Monolayers of cells were infected with E1A-mutant adenoviruses at an MOI of 0.1 to 10 in cancer cell lines (A) or 1 to 100 in normal cell lines (B) and cell killing was allowed to proceed for 8-12 days, followed by crystal violet staining to detect live cells. Replication-incompetent adenovirus, Ad-ΔE1, and wild-type adenovirus, Ad-wt, served as a negative and a positive control, respectively.

살상 효과를 관찰하였다 (Fig. 2A). 복제 불능 바이러스인 Ad-ΔE1과 야생형인 Ad-wt를 각각 음성 대조군과 양성 대조군으로 사용하였으며, 또한 p53 의존적으로 세포를 살상할 수 있는 종양 특이적 살상 아데노바이러스 Ad-ΔE1B55 (YKL-1) 아데노바이러스를 비교 실험 대조군으로 사용하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이, Ad-ΔE1 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 바이러스의 복제가 일어나지 않아 세포 살상 효과가 전혀 관찰되지 않았으나 복제 가능 아데노바이러스들로 감염된 종양세포들에서는 각각 다른 정도의 세포 살상 효과를 관찰할 수 있었다. 특히, E1A 변이형 아데노바이러스들 중 E1A 유전자의 CR1 부위의 31개 아미노산 (30~60 번째 아미노산)을 코딩하는 염기서열 (88~180 bp in CR1)이 소실된 Ad-mt#3, #5, #8, #11 변이형 아데노바이러스들은 모든 종양세포주들에서 현저히 낮은 세포 살상능을 유도한 반면, E1A 유전자의 CR1 또는 CR2 부위 중 하나 또는 두 개의 아미노산이 glycine으로 치환된 아데노바이러스들인 Ad-mt#1, #9, #10들과 일곱 개의 아미노산이 결손 또는 glycine으로 치환된 Ad-mt#2, #4, #6, #7

변이형 아데노바이러스들은 야생형과 비슷하거나 약간 낮은 종양세포 살상능을 유도하였다.

종양세포 살상능이 비교적 높은 Ad-mt#1, #2, #4, #6, #7, #9, #10 변이형 아데노바이러스들의 정상세포에서의 복제능과 세포 살상능을 조사하기 위하여, 이들 아데노바이러스들을 각각 BJ, 173WE, MRC5와 같은 정상 세포주들에 감염시킨 후 세포 살상능을 관찰하였다 (Fig. 2B). BJ 정상 세포주에서는 Ad-mt#10을 제외한 모든 E1A 변이형 아데노바이러스들의 세포 살상능이 Ad-wt에 비해 낮았으며, 173WE 세포주에서는 Ad-mt#7과 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스만이 Ad-wt에 비해 낮은 세포 살상능을 유도하였다. 그리고 MRC5 세포주에서는, Ad-mt#7과 Ad-mt#9의 세포 살상능이 Ad-wt에 비해 낮았다. 이러한 결과들을 종합해 보면, Ad-mt#7 변이형 아데노바이러스는 모든 종류의 종양세포주들에서는 높은 살상능을 유도하는 반면 정상 세포주들에서는 세포 살상능이 감소하여 종양세포 선택적 살상을 유도할 수 있음을 확인하였다. 특히, Ad-mt#7 변이형 아데노바이러스는 종양세포 특이적 살상을 유도할 수 있다고 알려진 대조군 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스보다도 정상 세포에서의 살상능이 감소하여 암세포 선택적 살상능이 우수함을 알 수 있었다.

2. Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스의 종양세포 선택적 복제 및 살상능 검증

본 연구실에서 진행된 일련의 연구들에 의하여, E1B 19kDa 단백질을 발현하지 않는 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19는 세포 살상능이 야생형보다도 훨씬 우수하지만 정상 세포에서도 복제되어 종양세포 선택적 살상을 유도할 수 없는 반면, E1B 55kDa 유전자가 소실된 Ad-ΔE1B55와 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스는 종양세포 선택적 살상을 유도할 수 있음이 밝혀졌다 (12). 이에 따라, E1B 변이형 아데노바이러스들 (Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19, Ad-ΔE1B55)의 p53-의존적 복제능과 이에 따른 종양세포 특이적 살상능을 보다 체계적으로 비교 검증하기 위하여, p53이 돌연변이된 C33A 인체 자궁암세포주와 173WE 정상 세포주에 각각의 E1B 변이형 아데노바이러스를 감염시키고 24시간 후에 아데노바이러스의 E1A 단백질의 발현양을 관찰하였다 (Fig. 3A). 종양세포주 (C33A)의 경우에는 Ad-ΔE1을 제외한 모든 E1B 변이형 바이러스에 의하여 E1A 단백질들이 다량으로 발현되는 반면, 정상 세포 (173WE)에서는 Ad-ΔE1B19로 감염된 경우에만 E1A 단백질이 발현되고 다른 두 종류의 E1B 변이형 아데노바이러스들로 감염되었을 때는 E1A가 전혀 발현되지 않았다. 이러한 결과는 E1B 55kDa이 소실된 아데노바이러스에 의해 정상 세포가 감염되면 정상 세포에 존재하는 p53이 활성화되어 바이러스 복제가 억제됨을 의미한다.

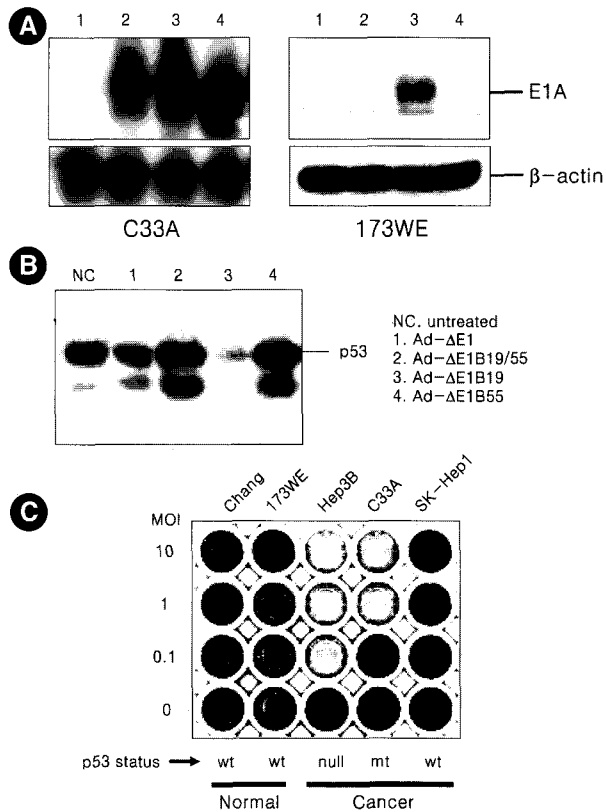


Figure 3. Characterization of Ad-ΔE1B19/55. (A) Cancer cell-specific E1A expression of E1B 55kDa-deleted replication-competent Ads. Cervical cancer (C33A) or normal (173WE) cells were infected with E1B mutant adenoviruses (Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19 or Ad-ΔE1B55) at an MOI of 10. After 24 hours, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an E1A polyclonal antibody. Beta-actin was used as a quantitative control. (B) Western blot analysis of p53 protein in U343 cells infected with E1B mutant adenoviruses (Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19 or Ad-ΔE1B55) at an MOI of 10. At 48 hours post-infection, cell lysates were subject to immunoblot analysis with an antibody recognizing p53 protein. (C) p53-dependent cytopathic effects of Ad-ΔE1B19/55 adenovirus. Normal (Chang, 173WE) and cancer (Hep3B, C33A, SK-Hep1) cells were plated on 24-well plate, and then infected with Ad-ΔE1B19/55 at an MOI of 0.1 to 10. When any kind of cell lines infected with Ad-ΔE1B19/55 at an MOI of 0.1 was completely lysed, the surviving cells on the plates were fixed and stained with crystal violet. Data shown are from representative experiments.

또한, p53 유전자가 정상형인 종양세포주에서의 p53 단백질 발현양상을 알아보기 위해, U343 뇌암세포주를 Ad-ΔE1, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B19 및 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스들로 각각 감염시키고 E1B 55kDa 단백질의 발현 유무에 따른 세포 내 p53 단백질의 발현양상을 비교하였다. 일반적으로, 아데노바이러스의 감염으로 인해 E1A 단백질이 발현되면 세포주기가 비정상적으로 활성화되고, 이에 따른 방어기전으로 p53 단백질이 과다하게 발현된다 (19). 그러나 아데노바이러스에 의해 E1B 55kDa 단백질이 발현되면, 활성화된 p53 단

백질과 결합해 p53을 비활성화 시킨다 (24). Fig. 3B에서 볼 수 있듯이, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55 바이러스는 감염된 세포 내에서 E1B 55kDa 단백질을 발현하지 못하기 때문에 E1A 발현에 따른 p53 단백질의 과다발현이 유도됨을 확인하였다. 그러나 E1B 55kDa 단백질을 발현하는 Ad-ΔE1B19로 감염된 세포에서는 E1B55 kDa이 p53 단백질과 결합하여 p53의 분해를 유도하기 때문에 p53의 발현이 매우 낮음을 확인하였다.

본 연구실에서 진행된 이전 연구들을 통하여, E1B 55kDa과 더불어 E1B 19kDa이 함께 소실된 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스의 세포 살상능이 E1B 55kDa만 소실된 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스보다 우수함을 확인한 바 있다 (12). 따라서 우수한 종양세포 살상능을 가진 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스의 p53-의존적 종양세포 선택적 살상능을 보다 면밀히 분석하기 위하여, p53이 정상적인 정상 세포주 (Chang, 173WE), p53이 정상적인 종양세포주 (SK-Hep1), 그리고 p53 유전자가 결손 혹은 돌연변이된 종양세포주 (Hep3B, C33A)를 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스로 감염시키고 세포살상 효과를 비교하였다. Fig. 3C에서 볼 수 있듯이, Ad-ΔE1B19/55 바이러스는 Hep3B와 C33A에서 높은 세포살상을 유도한 반면 Chang, 173WE 및 SK-Hep1 세포주에서는 세포살상을 전혀 유도하지 않았다. 이러한 결과들을 통하여, Ad-ΔE1B19/55 바이러스는 E1B 55kDa 유전자의 결손으로 인하여 p53 단백질 의존적인 복제 및 종양세포 특이적 세포살상을 유도할 수 있을 뿐 아니라 E1B 19kDa 유전자의 결손에 따라 감염된 세포 내에서의 효율적인 세포고사 유도 및 인접 세포로의 빠른 확산으로 더욱 우수한 세포 살상능을 유도할 수 있음을 확인하였다.

3. Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 제작 및 종양세포 선택적 살상능 검증

본 연구에서 확인된 Ad-mt#7 변이형 아데노바이러스의 종양세포 선택적 살상능을 더욱 개선시킬 목적으로, Ad-mt#7 변이형 아데노바이러스의 E1B 55kDa 유전자와 E1B 19kDa 유전자들을 결손시켜 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스를 제작하였다 (Fig. 4A). 먼저, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 종양세포 및 정상 세포에서의 살상능을 검증하기 위해서, 음성대조군으로서 Ad-ΔE1과 실험대조군으로서 Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, Ad-mt#7, 그리고 Ad-wt 아데노바이러스들과 함께 여러 역가로 세포들을 감염시킨 후 세포 살상 정도를 비교 관찰하였다 (Fig. 4B). 본 연구에 사용된 모든 종양세포주들 (Hep3B, C33A, A549, U343)에서 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스는 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스에 비해 약 5-50배 정도 높은 세포 살상을 유도하였으며, 야생형 아데노바이러스인 Ad-wt와는 거의 유사하거나 약 5배 정도 빠른 세포 살상을 유도하

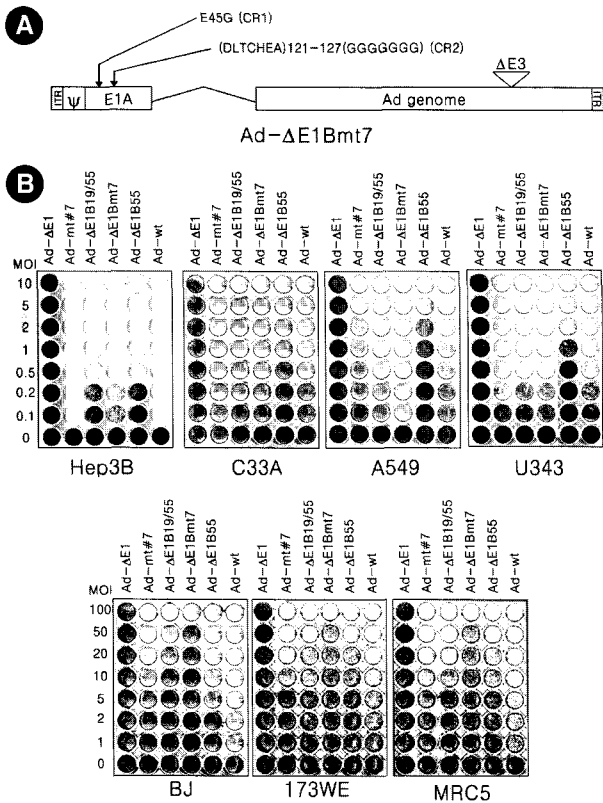


Figure 4. Genomic structure and cancer cell-specific cytopathic effect of Ad-ΔE1Bmt7. (A) A schematic representation of Ad-ΔE1Bmt7. (B) Cancer (Hep3B, C33A, A549, U343) or normal (BJ, 173WE, MRC5) cell lines were infected with Ad-ΔE1, Ad-mt#7, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1Bmt7, Ad-ΔE1B55, or Ad-wt at indicated MOIs. After 8-12 days of incubation at 37°C, the live cells were then stained with 0.5% crystal violet. Each cell line was tested at least three times, and data shown are from representative experiments.

었다. 이에 반하여, 정상 세포주들 (BJ, 173WE, MRC5)에서는 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 세포 살상능이 Ad-wt 아데노바이러스에 비해 약 10-100 배 정도 낮았으며, 암세포 선택적 살상능이 있는 대조군인 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스보다도 약 5-20배 정도 낮았다. 이러한 결과들을 바탕으로, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 세포 살상능이 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스에 비해 종양세포들에서는 증가된 반면 정상 세포들에서는 감소하여, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 우수한 종양세포 선택적 살상능을 확인할 수 있었다.

또한, E1A 유전자 변이 및 E1B 19kDa와 E1B55 kDa 유전자들의 유무에 따른 아데노바이러스의 세포 살상 효과를 바이러스 감염 시간에 따라 정량화하기 위해, 여러 종류의 종양세포주들 (Hep3B, C33A, A549, U343)과 정상 세포주들 (BJ, 173WE, MRC5)을 Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, Ad-mt#7, Ad-wt와 같은 복제 가능 아데노바이러스와 음성 대조군 아데노바이러스인 Ad-ΔE1로 각각 감염시킨 후 일정시간 간격으로

MTT 분석을 시행하여 세포의 생존율을 구하였다 (Fig. 5). 각 바이러스 감염에 따른 세포 생존율은 각각의 세포주에 바이러스를 처리하지 않은 경우의 세포 생존율을 100%로 환산하여 상대 비교하였다. 복제 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1을 처리한 모든 세포주에서는 바이러스 복제에 따른 세포 살상이 유도되지 않아 바이러스를 처리하지 않은 세포주와 유사한 수준의 세포 생존율을 보인 반면, 복제 가능 아데노바이러스들을 투여한 종양세포주들의 경우에는 시간이 경과함에 따라 세포 사멸이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스는 야생형 아데노바이러스인 Ad-wt과 유사하거나 보다 빠른 종양세포 살상을 유도하였다. 이에 반하여, 정상 세포주들에서는 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 세포 살상능이 현저히 감소하여 종양세포 특이적 세포 살상능을 확인할 수 있었다. 즉, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스를 MRC5와 173WE 세포주는 20 MOI로, 그리고 BJ 세포주는 50 MOI로 각각 감염시킨 경우, 바이러스 감염 후 약 12-20 일 경에도 거의 대부분의 세포들이 생존하여 바이러스를 처리하지 않은 세포주의 생존율과 비슷한 정도의 높은 세포 생존율을 관찰하였다. 이와는 대조적으로, Ad-wt 아데노바이러스를 정상 세포주에 감염시킨 경우에는 바이러스 감염 후 시간이 경과함에 따라 세포 생존율이 급격하게 감소하여 MRC5, 173WE, BJ 세포주의 경우에는 바이러스 감염 후 12-20일 경에 각각 약 35%, 40%, 40%의 세포들만이 생존하였음을 관찰하였다. 실험대조군으로 사용한 종양 특이적 살상 아데노바이러스들인 Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-mt#7를 감염시킨 경우에는 MRC5, 173WE, BJ 세포주들에서 약 60-90%의 세포 생존율이 관찰되어 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스에 비하여 정상 세포주들에 대한 세포살상능이 높음을 알 수 있었다. 이러한 결과들로, 본 연구에서 제작한 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 종양세포 선택적 살상능이 Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-mt#7에 비하여 보다 우수함을 재확인할 수 있었다.

4. Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 종양세포 선택적 복제능 검증

Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 종양 선택적 복제 여부를 알아보기 위하여, 인체 종양세포주들과 정상 세포주들을 Ad-ΔE1, Ad-mt#7, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1Bmt7, Ad-ΔE1B55, 또는 Ad-wt 아데노바이러스로 각각 감염시키고, 아데노바이러스의 복제에 따른 파이버 단백질의 발현 양상을 조사해 보았다 (Fig. 6). Hep3B, C33A, A549, U343과 같은 종양세포주들에서는 Ad-ΔE1 바이러스를 제외한 모든 아데노바이러스들의 복제가 활발히 일어나 파이버 단백질이 다량으로 발현된 반면, BJ, 173WE, MRC5와 같은 정상 세포주들에서는 다양한 파이버

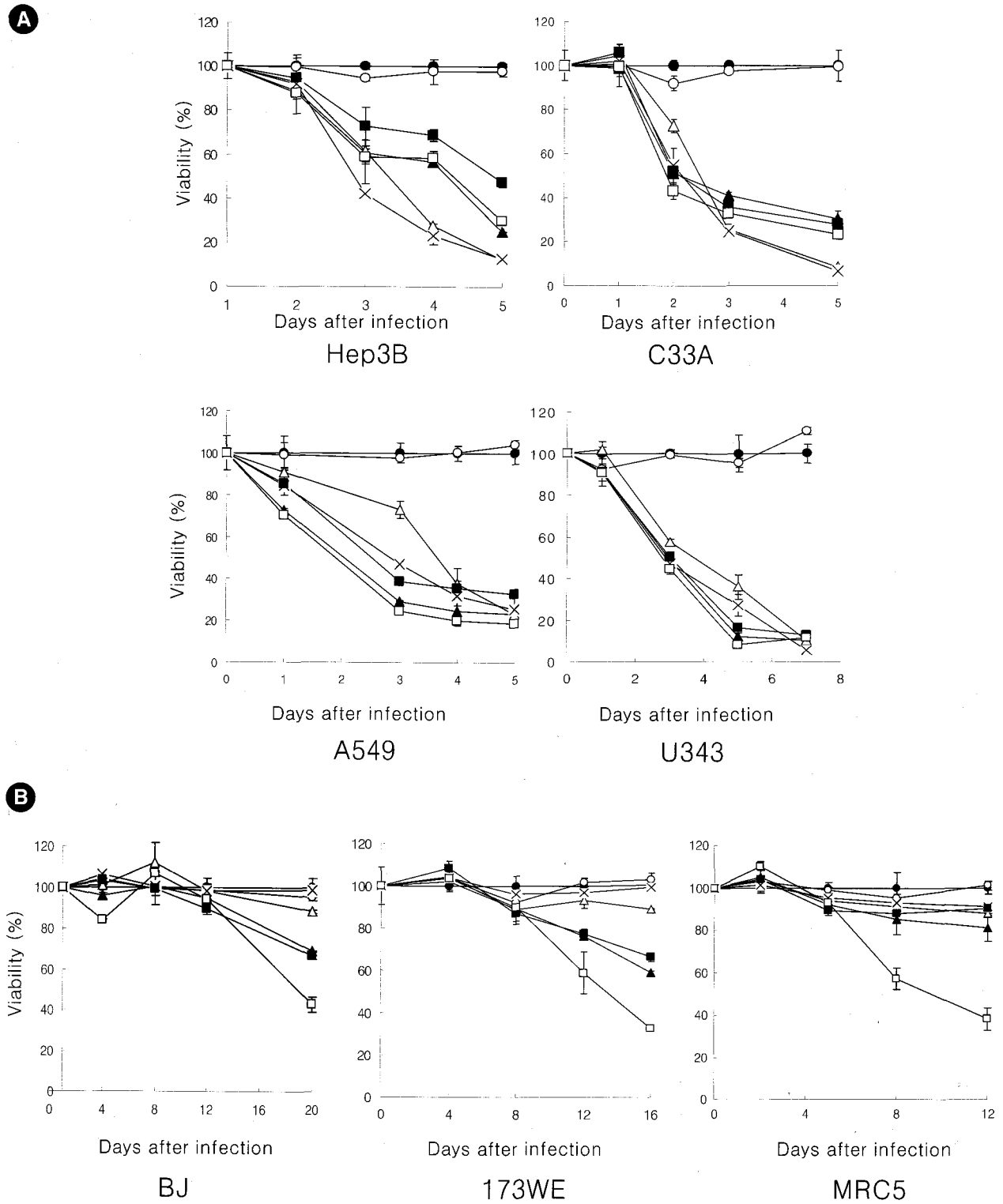


Figure 5. Cancer cell-specific killing of Ad-ΔE1Bmt7. Monolayers of cancer (A) and normal cells (B) were infected with Ad-ΔE1 (○), Ad-mt#7 (▲), Ad-ΔE1B19/55 (△), Ad-ΔE1Bmt7 (×), Ad-ΔE1B55 (■), or Ad-wt (□) at an MOI of 2 (Hep3B), 5 (C33A), 10 (A549, U343), 20 (173WE, MRC5), or 50 (BJ). Untreated cells were served as a negative control (●). Viable cells were analyzed by MTT assay, and expressed as a percentage of uninfected cells at the same time point. Mean values and standard errors of three or more experiments, each performed in duplicate, are shown.

버 발현 양상이 관찰되었다. 종양세포 특이성이 없는 Ad-wt 아데노바이러스의 경우에는 감염된 모든 종양세포주 및 정상 세포주들에서 파이버 단백질이 높게 발현되어 세포의 종류와 무관하게 바이러스의 복제가 왕성하게 일어남을 확인하였다. 이에 반하여 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스로 감염된 모든 정상 세포주들에서는 파이버 단백질이 전혀 발현되지 않아 종양세포 특이적 복제능을 확인할 수 있었다. 하지만 Ad-mt#7, Ad-ΔE1B19/55 혹은 Ad-ΔE1B55로 감염시킨 경우에는, 야생형 아데노바이러스에 비해서는 제한적이지만 아데노바이러스의 복제가 약하게 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 통하여, Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 종양세포 특이적 복제능이 본 연구에서 대조군으로 비교한 여러 종양 특이적 살상 아데노바이러스들 (Ad-mt#7, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B55)보다 훨씬 선택적임을 알 수 있었다. 또한, 본 연구 결과는 앞서 진행된 종양세포 특이적 살상능 검증 실험들 (CPE assay와 MTT assay)에서 확인된 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스

의 우수한 종양세포 특이적 살상능이 아데노바이러스의 종양 세포 특이적 복제능에 기인한다는 사실을 뒷받침해준다.

5. Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과 검증

Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스의 생체내 항종양 효과를 확인 하기 위하여, C33A 세포주를 누드마우스의 복부 피하에 주사 하고 형성된 종양에 5×10^7 PFU의 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1Bmt7를 이들 간격으로 3번, 종양 내에 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다 (Fig. 7). 본 실험에서는 암세포 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19/55와 Ad-ΔE1Bmt7의 항종양 효과를 비교하기 위해서, Ad-ΔE1B19/55의 항종양 효과를 검증한 이전 연구 (12)에 비해 50배 낮은 역가의 바이러스를 사용 하였다. 음성 대조군인 PBS를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 40 일 이후에 종양의 용적이 약 2000 mm^3 이상으로 급격히 성장하였으나, 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1Bmt7을 주사한 경우에는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인하였다 ($p < 0.01$). 즉, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1Bmt7 아데노바이러스를 투여 받은 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 41 일에 종양의 용적이 각각 $1042.7 \pm 264.5 \text{ mm}^3$ 와 $446.9 \pm 122.3 \text{ mm}^3$ 로 이들 아데노바이러스의 뚜렷한 항종양 효과를 관찰할 수 있었으며 ($p < 0.05$), 특히 Ad-ΔE1B19/55를 투여한 경우보다 Ad-ΔE1Bmt7를 투여한 경우에

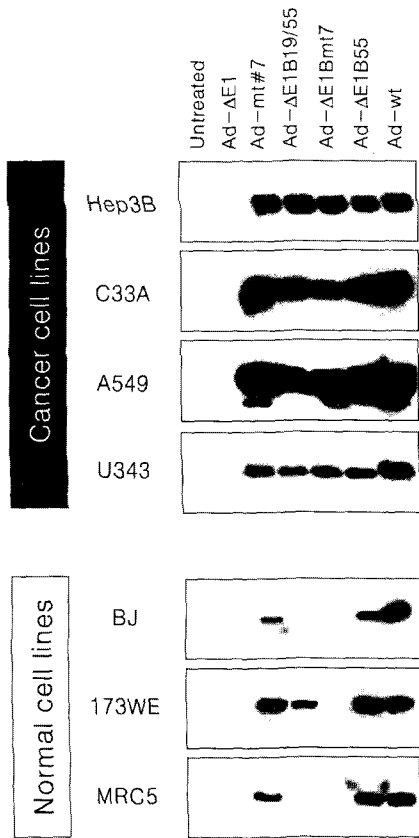


Figure 6. Western blot analysis showing that Ad-ΔE1Bmt7 expresses fiber proteins in cancer cells, but not in normal cells. Cancer cells (Hep3B, C33A, A549 and U343) were infected with 10 MOI of Ad-ΔE1, Ad-mt#7, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1Bmt7, Ad-ΔE1B55 or Ad-wt. Normal cells (BJ, 173WE and MRC5) were infected with 100 MOI of each virus. At 48 hours post-infection, total cell lysates were analyzed for fiber protein using a fiber specific monoclonal antibody.

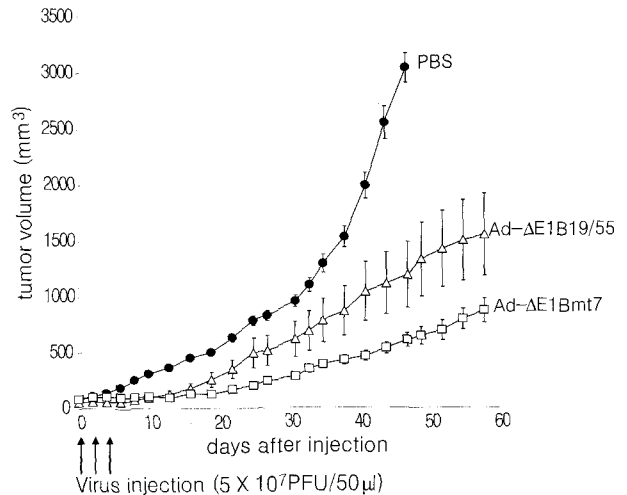


Figure 7. Antitumoral efficacy of Ad-ΔE1Bmt7 oncolytic adenovirus against C33A xenografts established in male athymic nude mice. C33A human cervical cancer cells (1×10^7) were injected into abdominal subcutaneous of nude mice, and allowed to grow to an average size of $70\text{--}80 \text{ mm}^3$ volumes. Mice were then injected intratumorally with PBS, Ad-ΔE1B19/55, Ad-mt#7, or Ad-ΔE1Bmt7 (5×10^7 PFU in $50 \mu\text{l}$ of PBS) on days 1, 3 and 5 (vertical arrows). Values represent the mean (SEM for 6-8 animals per group).

보다 향상된 항종양 효과를 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 또한 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스를 투여한 총 9 마리의 마우스들 중 2 마리는 바이러스 투여 후 25 일과 30 일경에 종양이 완전히 소멸되는 것을 관찰할 수 있었다.

고 찰

종양 특이적 살상 아데노바이러스가 새로운 암 유전자 치료법으로 대두된 이후, 현재 이를 이용한 전임상 및 임상시험들이 활발히 진행되고 있다 (6,9). 암세포 내에서만 선택적으로 복제하여 주변의 암세포로 확산하여 세포 살상 효과도 미노 현상과 같이 계속 퍼져나갈 수 있는 잇점이 있는 종양 특이적 살상 아데노바이러스는 기존의 일 세대 아데노바이러스인 복제 불능 아데노바이러스보다 유전자 전달효율 및 항암 효과가 현저히 우수하다. 그러나 최근에 이루어진 여러 임상시험에서 종양 특이적 살상 아데노바이러스가 인체에 안전하며 항종양 효과를 유도한다는 것이 밝혀졌지만, 낮은 암세포 살상능으로 고농도의 아데노바이러스를 인체에 반복적으로 투여해야 하고 기존의 다른 항암요법들과 함께 병용치료를 하여야 하는 제한점들이 대두되고 있다 (3,16). 이를 극복하기 위한 한 방안으로, 본 연구에서는 아데노바이러스의 E1A 및 E1B 구성 유전자들을 선택적으로 결손 또는 변형시킨 여러 변이형 아데노바이러스들을 제작하여 종양세포 특이적 증식 및 살상 효과를 체계적으로 비교, 분석하였다.

종양 선택적 살상 아데노바이러스를 제작하기 위한 암세포에서의 선택적 복제능을 부여하는 방법으로, E1B 55kDa 유전자의 결손 및 변형 외에도 E1A 유전자의 pRb 결합부위를 결손 및 변형시킴으로서 Rb 유전자가 변이된 암세포 내에서만 선택적으로 증식하고 이에 따른 암세포 특이적 세포 살상능을 유도할 수 있다 (7). 본 연구에서는 종양세포에 대한 특이성 및 세포 살상능이 개선된 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 개발하기 위해, 일차적으로 E1A 유전자 염기서열 중 Rb 단백질과의 결합부위가 결손되거나 Gly (G) 아미노산으로 치환된 형태의 각기 다른 11 종류의 E1A 변이형 아데노바이러스들을 제작하고, 이들 아데노바이러스들의 종양세포 살상능을 비교 검증하였다. CPE assay를 시행한 결과, E1 유전자의 CR1 부위에 있는 31개 아미노산을 코딩하는 유전자들이 결손된 4 종류의 변이형 아데노바이러스들 (Ad-mt#3, #5, #8, #11)의 세포 살상능이 현저히 감소하였는데, 이는 결손된 pRb 단백질 결합부위와 더불어 아데노바이러스 복제에 필수적인 부위마저 결손되어 아데노바이러스의 복제가 효율적으로 일어나지 못하기 때문인 것으로 추정된다. 그 외 다른 7종류의 E1A 변이형 아데노바이러스들은 여러 종류의 암세포들에서 높은 세포 살상능을 유도하였다. 종양세포 살상능이 비교적

높은 7 종류의 E1A 변이형 아데노바이러스들, 즉 Ad-mt#1, #2, #4, #6, #7, #9, #10들의 정상세포 특이적 복제 억제능과 세포 살상능을 비교 검증하기 위하여, 여러 종류의 정상 세포주들에 각 바이러스들을 감염시킨 결과, E1 유전자의 CR1 부위의 Glu 아미노산이 Gly로 치환되고 CR2 부위의 7개 아미노산 (DLTCHEA)이 Gly (GGGGGGG)으로 치환된 Ad-mt#7 아데노바이러스의 세포 살상능이 다른 6종류의 E1A 변이형 아데노바이러스들에 비해 감소하는 것을 확인하였다.

Ad-mt#7 아데노바이러스의 종양세포 특이적 살상능을 보다 개선시키기 위한 방안으로, E1B 19kDa와 E1B 55kDa 유전자 부위를 함께 결손시켜 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스를 제작하였다. p53 단백질의 기능을 억제하는 E1B 55kDa과 세포고사 억제 기능을 하는 E1B 19kDa 유전자가 선택적으로 결손된 아데노바이러스 (Ad- Δ E1B19/55)는 p53이 불활성화된 종양 세포들에서 선택적 복제가 가능하고 이에 따른 암세포 특이적 세포 살상을 유도할 수 있으며, 또한 세포고사를 함께 유발할 수 있기 때문에 개선된 종양세포 선택적 살상 효과를 유도할 수 있다 (12). 따라서, 본 연구에서는 Ad- Δ E1B19/55 아데노바이러스의 우수한 암세포 특이적 살상능을 Ad-mt#7 아데노바이러스에 도입하여, p53뿐만 아니라 pRb에도 의존적인 암세포 선택적 복제능으로 종양 선택적 살상능이 개선될 수 있는지를 조사하였다.

여러 종류의 종양세포주들과 정상 세포주들에서의 세포 살상 효과를 관찰한 결과, Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스의 세포 살상능이 종양세포주들에서는 다른 대조군 종양 특이적 살상 아데노바이러스들 (Ad-mt#7, Ad- Δ E1B, Ad- Δ E1B55)에 비해서 증가된 반면, 정상 세포주들에서는 감소되어 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스의 우수한 암세포 선택적 살상능을 확인할 수 있었다. 이러한 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스의 개선된 암세포 특이적 살상능은 MTT assay에서도 같은 결과로 확인되었으며, 또한 C33A xenograft model에서도 우수한 항종양 효과를 유도할 수 있음을 확인하였다. 특히, Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스는 현재 미국에서 제 3상 임상시험이 진행된 ONYX-015 (Ad- Δ E1B55)보다 종양 세포를 더욱 효과적으로 살상하지만 정상 세포에서는 복제 및 살상 효과가 현저히 감소하여 암세포 살상능 및 특이성이 크게 개선되었음을 확인하였다. 따라서 ONYX-015보다 개선된 암세포 특이성과 높은 살상능을 나타내는 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스를 암 유전자 치료 임상에 적용한다면 치료에 필요한 바이러스 투여량을 감소시킬 수 있으며, 이에 따라 바이러스에 의한 독성과 인체 내 면역반응을 최소화할 수 있는 잇점도 제공할 수 있을 것으로 추정된다. 결론적으로, 종양 선택적 증식 및 살상이 가능한 Ad- Δ E1Bm7 아데노바이러스는 종양세포 선택적 복제에 따른 체내에서의 '안전성' 개선뿐 아니라

증대된 바이러스의 종양세포 살상능에 따른 ‘암치료 효율’의 향상으로 인하여 더욱 개선된 항종양 효과를 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구에 공헌해 주신 연세대학교 암센터 암연구소 연구진들 모두에게 감사 드립니다. 본 연구는 산업자원부 (990-14-05-00008131, Dr. C-O. Yun)와 한국과학재단 (R04-2004-000-10011-0, Dr. C-O. Yun; R15-2004-024-02001-0, Dr. C-O. Yun and Dr. J-H. Kim)의 지원에 의하여 연구되었으며, 김재성, 최경주, 김평환은 ‘연세대학교, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences’로부터 지원 받은 대학원생입니다.

참 고 문 헌

- 1) **Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F:** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274:** 373-376, 1996.
- 2) **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* **68:** 6553-6566, 1994.
- 3) **Chu RL, Post DE, Khuri FR, Van Meir EG:** Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* **10:** 5299-5312, 2004.
- 4) **Dobbelstein M:** Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* **273:** 291-334, 2004.
- 5) **Dyson N, Harlow E:** Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* **12:** 161-195, 1992.
- 6) **Everts B, van der Poel HG:** Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther* **12:** 141-161, 2005.
- 7) **Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Milianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP:** A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* **19:** 2-12, 2000.
- 8) **Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Kyritsis AP:** The functional role of tumor suppressor genes in gliomas: clues for future therapeutic strategies. *Neurology* **51:** 1250-1255, 1998.
- 9) **Glasgow JN, Bauerschmitz GJ, Curiel DT, Hemminki A:** Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. *Curr Gene Ther* **4:** 1-14, 2004.
- 10) **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R:** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36:** 59-74, 1977.
- 11) **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* **3:** 639-645, 1997.
- 12) **Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO:** Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* **9:** 725-736, 2002.
- 13) **Kumin D, Hofmann C, Uckert W, Both GW, Loser P:** Identification of an ovine atadenovirus gene whose product activates the viral E2 promoter: possible involvement of E2F-1. *Virology* **318:** 79-89, 2004.
- 14) **Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO, Choi J, Yun CO, Kim BS, Kim JH:** Oncolytic potential of E1B 55 kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: correlation with p53 functional status. *Int J Cancer* **88:** 454-463, 2000.
- 15) **Parks RJ:** Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet* **58:** 1-11, 2000.
- 16) **Post DE, Khuri FR, Simons JW, Van Meir EG:** Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens. *Hum Gene Ther* **14:** 933-946, 2003.
- 17) **Pützera BM, Stiewea T, Parsanedjad K, Rega S and Esche H:** E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell death & Differentiation* **7(2):** 177-188, 2000.
- 18) **Qin XQ, Livingston DM, Ewen M, Sellers WR, Arany Z, Kaelin WG Jr:** The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol Cell Biol* **15:** 742-755, 1995.
- 19) **Querido E, Teodoro JG, Branton PE:** Accumulation of p53 induced by the adenovirus E1A protein requires regions involved in the stimulation of DNA synthesis. *J Virol* **71:** 3526-3533, 1997.
- 20) **Sauthoff H, Heitner S, Rom WN, Hay JG:** Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Hum Gene Ther* **11:** 379-388, 2000.
- 21) **Sladek TL:** E2F transcription factor action, regulation and

- possible role in human cancer. *Cell Prolif* **30**: 97-105, 1997.
- 22) **Thimmappaya B, Weinberger C, Schneider RJ, Shenk T**: Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* **31**: 543-551, 1982.
- 23) **Whyte P, Ruley HE, Harlow E**: Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J Virol* **62**: 257-265, 1988.
- 24) **Yew PR, Liu X, Berk AJ**: Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* **8**: 190-202, 1994.