

E1B 55 kD 유전자 결손 아데노바이러스의 종양 특이 증식 및 살상능 검증

연세대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²연세암센터, ³암연구소

김재성³ · 이보영³ · 김진안¹ · 안중배^{1,2} · 박준오^{1,2} · 유내춘^{1,2,3}
김주항^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3} · 민진식^{2,3} · 김병수^{1,2,3} · 이희란¹

Tumor-specific Virus Replication and Cytotoxicity of E1B 55 kD-deleted Adenovirus

Jaesung Kim, M.S.³, Boyoung Lee, M.S.³, Jinahn Kim, M.D.¹
Joong Bae Ahn, M.D.^{1,2}, Joon Oh Park, M.D.^{1,2}, Nae Chun Yoo, M.D.^{1,2,3}
Joo-Hang Kim, M.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}, Jin Sik Min, M.D.^{2,3}
Byung Soo Kim, M.D.^{1,2,3} and Heuiran Lee, Ph.D.¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Yonsei Cancer Center,
³Institute for Cancer Research, Yonsei University
College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To overcome the limitations of cancer gene therapy using replication-incompetent adenovirus, we generated E1B 55 kD-deleted adenovirus (YKL-1) by polymerase chain reaction (PCR) and homologous recombination. We then investigated tumor-specific virus replication and cytotoxicity of YKL-1 *in vitro* and *in vivo*.

Materials and Methods: YKL-1 was constructed by reintroducing E1A and E1B 19 kD into pTG-CMV E1/E3-deficient adenoviral vector and inducing homologous recombination in *E. coli*. The recombinant vector pYKL-1 was transfected into 293 cells to generate YKL-1. The properties of newly constructed YKL-1 was defined by PCR and immunoblotting analysis. Virus replication was examined by infecting human normal and cancer cells on 6-wells at multiplicity of infection (MOI) of 10 for 3 days. Virus was then recovered and titered. Cytopathic effect was analyzed by infecting human normal and cancer cells on 24-wells at MOIs of 10, 1 or 0.1 for 7 to 10 days and staining them with crystal violet solution. Inhibition of tumor growth was examined in human cancer cell xenografts in *nu/nu* mice by intratumoral injection of YKL-1.

Results: PCR and immunoblotting analysis confirmed that YKL-1 contained E1A and E1B 19 kD but not E1B 55 kD. In human normal cells, virus replication and subsequent

책임저자 : 이희란, 서울시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 연세암센터 암연구소, 120-752

Tel: 361-7622, Fax: 363-5592, E-mail: heuiran@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 연세대학교 의과대학 신진교수 연구비(1999) 보조로 수행되었음.

접수일 : 1999년 8월 25일, 게재승인일 : 1999년 12월 10일

cytopathic effect of E1B 55 kD-deleted adenovirus YKL-1 was markedly attenuated by larger than 2 to 3 log in magnitude, compared to that of wild-type ad-XJ. In contrast, YKL-1 was capable of replicating and inducing cytotoxicity in most human cancer cells. C33A and Hep3B containing p53 mutation were much more sensitive, whereas HeLa and H460 with wild type p53 were relatively resistant to YKL-1. Finally, the tumor growth was dramatically retarded by intratumoral injection of YKL-1 in C33A cervical cancer xenograft and the histology showed significant necrosis by intratumoral injection of YKL-1.

Conclusion: The results here demonstrated the ability of preferential virus replication and cytotoxicity of E1B 55 kD-deleted adenovirus YKL-1 in human cancer cells. Therefore, these indicated a promising potential of YKL-1 as an antitumoral virus agent and a selective replication-competent virus vector.

Key Words: Adenovirus, Gene therapy, E1 gene, p53 gene

서 론

현재까지 암의 원인규명과 조기진단, 치료에 대한 연구가 활발히 진행되어오고 있지만 암에 대한 치료방법은 지난 10년간 거의 답보상태에 있다(1). 한편 분자생물학의 눈부신 발달로 유전자 수준에서 암을 비롯한 난치성 질환의 원인이 점차로 규명되어 가고 있어 이를 질병 치료 특히 암 치료에 응용하려는 유전자 치료가 새로운 치료분야로 발전해나가고 있다(2). 실제로 유전자 치료의 임상시험 프로토콜 중 70% 이상이 암을 대상 질환으로 하고 있으며 치료용 유전자를 대상세포에 전달해주는 매개체로는 우수한 유전자 발현효율 등의 장점을 가진 아데노바이러스가 레트로바이러스를 대신하여 많이 이용되고 있다(3,4). 그리고 암에 대한 유전자 치료 연구의 경향으로는 한 가지 특정유전자를 이용한 치료법의 개발보다는 여러 치료 유전자를 동시에 이용하는 방안, 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 종양 특이 증식 살상 바이러스의 개발, 방사선 또는 항암제 등 기존의 치료방법과 병합 치료하는 방안 등의 시도가 주로 연구되고 있다(2,5,6).

한편 종양억제 유전자로 잘 알려진 p53는 폐암,

난소암, 유방암, 직장암, 두경부암 등 인체 종양의 50% 정도에서 유전자 변이를 확인할 수 있고(7,8) p53가 정상형으로 밝혀진 종양에서도 mdm2의 과다발현(9,10) 또는 human papilloma 바이러스 감염(11) 등으로 p53가 비활성화되어 있는 경우가 빈번한 것으로 보고되어 왔다(12). 이러한 사실을 바탕으로 1996년 McCormick등(13)은 p53 유전자가 비활성화된 종양 세포에서 선택적으로 증식하고 결과적으로 암세포를 공격적으로 살상시키는 아데노바이러스 변이체의 암 유전자 치료에 대한 실용 가능성을 보고하였다. 이는 아데노바이러스 초기 발현 유전자 중의 하나인 E1B 55 kD 유전자의 발현이 저하된 아데노바이러스 변이체(d11520 또는 ONYX-015)가 암세포와 같이 p53의 기능이 저해된 세포에서는 야생형 바이러스나 마찬가지로 증식하여 암세포의 살상을 유발할 수 있을 것이라는 이론적인 배경에 근거한다(14). 즉 아데노바이러스가 감염되면 감염세포는 p53를 활성화시켜 바이러스의 증식을 억제하는데 이때 E1B 55 kD이 p53와 결합하여 p53의 비활성화가 유도된다(14,15).

이러한 배경 하에 저자들은 E1B 55 kD이 선택적으로 소실된 아데노바이러스 변이체, YKL-1을 자체 제작하여, YKL-1의 종양 특이 증식 및 세포

살상 능력을 규명하고 누드생쥐에 형성된 종양의 퇴행 여부를 검증하여 결과적으로 YKL-1의 임상 응용 가능성을 확인하고자 본 연구를 계획하였다.

대상 및 방법

1) 대상 세포주 및 세포 배양

실험에 사용된 세포주들은 모두 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1이 발현되는 293 세포주는 재조합 아데노바이러스의 생산 및 E1 발현 확인시 양성 대조군 세포주로 이용하였다. FHs738Lu, FHs173We는 인체 정상 세포주이고 C33A, Hep3B, HeLa, H460은 인체 암세포주들이다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO BRL, NY)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO BRL, NY)를 배양액으로 항생제penicillin/streptomycin (GIBCO BRL, NY)을 첨가하여 5% CO₂의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2) 재조합 아데노바이러스 YKL-1의 제조 및 바이러스 생산

아데노바이러스 E1 부위 중 E1B 55 kD 유전자를 결실시키기 위해 E1A와 E1B 19kD을 포함시킬 수 있는 primer를 제작해 pXC1 (Microbix; Ontario, Canada)을 주형 DNA로 하여 PCR을 수행하여 바이러스의 유전자 염기서열상 343에서 2270을 포함하는 PCR 산물을 획득하였다(Fig. 1A). 이를 위해 말단에 BamHI 제한효소 인식부위를 삽입시킨 5'-TTATTGGATCCTTTGTCTAGGGCCGCGGG-3'를 5' primer로 BamHI와 BglIII 인식부위 및 2253 (C::T)와 2262 (G::T)의 치환으로 2개의 종결코돈을 삽입시킨 5'-TCTTGGATCCAGATCTATACAG-TTAAGCCACCTATAACAAC-3'을 3' primer로 사용하였다. PCR로 얻어진 1.9 kb 생성물을 BamHI로 절단한 후 E1이 완전히 소실된 pCA14 (Microbix; Ontario, Canada)의 Bgl II 부위에 삽입시켜 shuttle vector인 pCA14-E1A/E1B 19 kD을 제작하였고 이를 XmnI으로 자른 후 ClaI으로 처리한 E1

및 E3 유전자 소실 아데노바이러스 벡터 pTG-CMV (Dr. Verca, University of Fribourg, Switzerland)와 함께 대장균 BJ5183에 삽입시켜 유전자 상동 재조합을 유도하였다(Fig. 1A). 대장균으로부터 DNA를 획득하여 HindIII로 처리하여 E1B 55 kD이 소실된 pYKL-1임을 확인하고 획득하였다. pYKL-1을 PacI으로 절단하여 293 세포주에 첨가하여 E1B 55 kD이 소실된 YKL-1 재조합 아데노바이러스를 생산하였다(16). 대조군 바이러스인 증식불능 아데노바이러스 ad- Δ E1 및 β -galactosidase (LacZ)가 내재된 ad- Δ E1/ β -gal과 야생형 재조합 아데노바이러스 ad-XJ은 각각 pCA14, p Δ E1sp1A/ β -gal과 pXC1 (Microbix; Ontario, Canada)을 shuttle vector로 사용하여 동일한 방법으로 제작하였다. Limiting dilution 또는 plaque assay로 각각의 재조합 바이러스를 순수 분리하였고 293 세포주에서 바이러스의 역가를 결정하였다. 실험수행을 위해 바이러스들은 293 세포주에 재감염시켜 생산하였으며 동물 실험을 위해서는 CsCl gradient로 농축하여 순수 분리하였다(17).

3) 바이러스 게놈 분리와 PCR 분석

YKL-1, dl1520 및 ad-XJ 바이러스를 MOI 10으로 자궁암 세포주 C33A에 감염시키고 2일 후 Qiagen genomic isolation kit (Santa Clarita, USA)으로 바이러스 게놈을 회수하여 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다. 바이러스 게놈의 염기서열 319에서 339 및 3516에서 3536에 해당하는 319 primer 5'-TTTGTGTTACTCATAGCGCGT-3'과 3536 primer 5'-ATTCTTTCCCACCCTTAAGCC-3'을 이용하거나 2543에서 2563 및 3516에서 3536에 해당하는 2543 primer 5'-TGCAAAGGTGGCACTTAGGCC-3'과 3536 primer 5'-ATTCTTTCCCACCCTTAAGCC-3'을 이용하여 PCR을 수행하였다(Fig. 1).

4) Immunoblotting 분석

C33A 세포주에 YKL-1, ad- Δ E1 또는 dl1520을 MOI 10으로 감염시키고 2일 후 감염된 세포를 회수하여 lysis buffer (50 mM HEPES, 0.15 M NaCl,

Fig. 1. Characteristics of YKL-1. YKL-1 was generated by reintroducing E1A and E1B 19 kD into E1/E3-deficient adenoviral vector pTG-CMV. 2.0 kb (319/3536) or no (2543/3536) PCR product from YKL-1 genome was amplified, which implied that as E1B 55 kD-deleted recombinant adenovirus, YKL-1 retained E1A and E1B 19 kD but not E1B 55 kD. A. Schematic representation of the E1 region of YKL-1. All numbers indicated base position of the wild type adenovirus type 5 sequence. B. PCR analysis of YKL-1. lane 1; mock-infected, lane 2; YKL-1 infected, lane 3; dl1520 infected, lane 4; ad-XJ infected, lane 5; pCA14-E1A/E1B 19 kD in left panel or pXC1 in right panel as a positive control.

0.5% NP-40, protease inhibitor: PMSF, TLCK, TPCK) 로 lysis시켜 SDS-PAGE로 전기영동하였다. PVDF membrane에 단백질을 이동시킨 후 아데노바이러스 특이 항체인 E1A (sc-430; Santa Cruz, USA), E1B 19 kD (DP17; Oncogene, USA), 및 α -actin 단일항체(sc-1615; Santa Cruz, USA)를 일차 항체로 ECL (Enhanced Chemi-Luminescence: RPN2108, Amersham, USA)을 이용하여 단백질의 발현 양상을 규명하였다.

5) YKL-1의 증식 및 세포 살상능 검증

재조합 아데노바이러스의 증식능을 검증하기 위하여 인체 정상 세포주 FHs738Lu, FHs173We 및 인체 암세포주 Hep3B, C33A, HeLa, H460들을 MOI 10의 YKL-1 또는 ad-XJ로 감염시키고 3~4 시간 후에 바이러스 inoculum을 완전히 제거하고 새로운 배양액을 채워 3일간 더 배양하여 바이러스의 증식을 유도하였다. 배양액과 잔류 세포를 얻어 세번의 freezing/thawing으로 바이러스를 획득하여 역가를 산출하였다. YKL-1의 상대적인 역

가는 다음과 같이 산출되었다. YKL-1에 의한 역가/ad-XJ에 의한 역가 $\times 100$.

재조합 아데노바이러스의 세포 살상능을 검증하기 위해서는 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, ad-XJ 그리고 ad- $\Delta E1/\beta$ -gal 바이러스를 상기한 세포주에 각각 처리하였다. MOI 0.1의 ad-XJ가 감염세포를 거의 사멸시킨 시점에 남아있는 세포들을 1% crystal violet (50% methanol)으로 고정하고 염색하여 분석하였다.

6) YKL-10이 누드생쥐에 형성된 인체 암종과의 성장에 미치는 영향

생후 6~8주 정도 경과된 누드 생쥐에 1×10^7 개의 자궁암세포주 C33A를 주사하였다. 종양이 60~80 mm³ 정도 성장하였을 때 1×10^8 plaque-forming unit (PFU)의 YKL-1 바이러스 또는 자외선조사로 비활성화시킨 동량의 YKL-1 바이러스를 이들 간격으로 세 번 종양에 직접 주사한 후 종양의 성장을 고찰하였다. 종양의 용적은 caliper를 이용하여 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다(단축 mm)² \times 장축 mm \times 0.523. 또한 같은 방법으로 바이러스를 주사한 누드마우스로부터 종양을 적취하여 H/E 염색법을 시행하였다.

결 과

1) E1B 55 kD 소실 YKL-1의 특성 규명

YKL-1이 E1A, E1B 19 kD은 존재하나 E1B 55 kD만이 특이적으로 소실된 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스인지를 알아보기 위하여 바이러스의 계놈에 대한 PCR 또는 감염세포에서의 E1A 및 E1B의 발현 양상을 검증하여 규명하였다(Fig. 1, 2). 먼저 YKL-1, dl1520 및 ad-XJ로 감염된 자궁암 세포주 C33A에서 획득한 바이러스의 계놈을 주형 DNA하여 PCR로 증폭시킨 산물의 존재여부와 크기를 분석하였다(Fig. 1B). E1 유전자를 모두 포괄할 수 있는 319/3536 primer를 이용할 경우(left panel), YKL-1은 2.0 kb

(lane 2), E1B 55 kDa 유전자 발현 저하 dl1520은 2.3 kb (lane 3) 그리고 야생형 바이러스 ad-XJ는 3.2 kb (lane 4)의 PCR 산물을 각기 생산하였다. 예상대로 pCA14-E1A/19 kD shuttle 벡터를 주형 DNA로 하였을 때에도 YKL-1과 마찬가지로 2.0 kb (lane 5)의 산물이 생성되었다. E1B 55 kD 유전자 특이 2543/3536 primer의 경우(right panel) ad-XJ (lane 4)와 야생형 shuttle vector인 pXC1 (lane 5)은 0.8 kb의 PCR 산물을 생산하지만 YKL-1 (lane 2)과 dl1520 (lane 3)은 PCR산물을 생성하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 ad- $\Delta E1$ 은 어느 경우에도 PCR 산물을 생산하지 못하였다(data not shown). 이러한 결과는 YKL-1의 계놈상에는 E1B 55 kD 유전자의 대부분 소실되어 있음을 보여준다. 다음으로 YKL-1에 의한 E1A 및 E1B 19 kD의 발현을 확인하기 위하여 YKL-1 또는 ad- $\Delta E1$ 으로 감염된 C33A 세포주에서 모든 단백질을 회수하여 E1A 또는 E1B 19 kD 특이 항체를 이용하여 immunoblotting을 시행하였다(Fig. 2). 그 결과 ad- $\Delta E1$ 으로 감염된 세포주(lane 2)와는 달리 YKL-1으로 감염된 세포주(lane 1)에서는 E1A와 E1B 19 kD이 양성 대조군 세포주 293 (lane 3) 수준으로 효율적으로 잘 발현됨을 알 수 있었으며 ad-XJ 또는 dl1520을 같은 조건에서 처리하여 immunoblotting을 시행하는 경우에도 E1A 및 E1B 19 kD이 YKL-1 수준으로 효율적으로 잘 발현됨을 또한 관찰하였다(data not shown). 이로서 YKL-1은 E1이 소실된 바이러스 변이체에 E1A와 E1B 19 kD을 재도입하여 획득한 E1B 55 kD 유전자 결손 바이러스 변이체임을 확인하였다.

2) YKL-1의 암세포 특이 증식 및 살상 능력의 규명

YKL-1의 증식능을 규명하기 위하여 인체 정상 세포주 및 암세포주 그리고 양성 대조군 세포주 293을 MOI 10의 YKL-1 또는 야생형 바이러스 ad-XJ로 감염시킨 후 생산된 바이러스를 획득하여 상대적인 역가를 산출하였다. 그 결과 정상 세포주에서 YKL-1의 증식 능력은 293 세포주의 1%

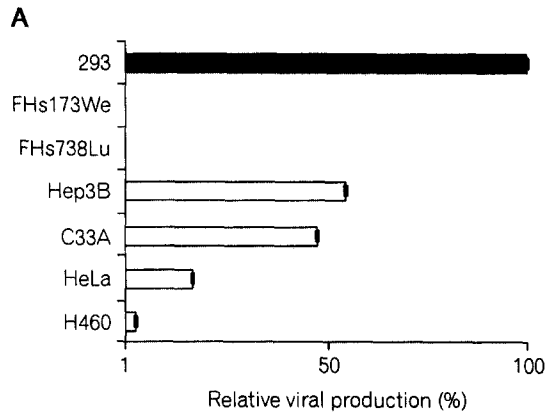


Fig. 3. Oncolytic capability of YKL-1. YKL-1 was capable of replicating and inducing cytopathic effect in human cancer cells but not in human normal cells. FHs173We and FHs738Lu are human normal cells while Hep3B, C33A, HeLa and H460 are all human cancer cells. A. Virus replication of YKL-1 on a variety of human cells. The values represented three independent experiments, at least. B. Cytopathic effect of YKL-1 on human normal or cancer cells. lane 1; replication-incompetent ad- Δ E1/ β -gal. infected, lane 2; YKL-1 infected, lane 3; wild type ad-XJ infected.

Fig. 2. Expression of adenovirus E1A and E1B 19 kD protein in C33A cells infected with YKL-1. E1A and E1B 19 kD were readily detected in C33A cells infected with YKL-1 by immunoblotting analysis. The similar intensity of α -actin in each lane on the same blot demonstrated that equal amount of proteins per lane was loaded. lane 1; C33A infected with YKL-1, lane 2; C33A infected with ad- Δ E1, lane 3; 293 cells as a positive control.

이하 수준으로 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 반면에 각종 암세포주에서는 상대적으로 증식이 활성화되어있음을 알 수 있었으며 특히 p53가 돌연변이형으로 알려진 Hep3B 및 C33A에서의 YKL-1의 증식은 각기 293 세포주의 55±3.4%와 47.5±3.7%로 야생형의 증식 정도에 근접하는 수준이었고 p53가 정상형으로 알려진 HeLa 또는 H460에서는 각기 16.5±0.3%와 2.5±1.0%였다. 동일한 세포주들을 대상으로 MOI 10, 1, 0.1의 YKL-1, ad-XJ, ad- Δ E1/ β -gal로 각기 감염시킨 후 잔류세포를 crystal violet으로 염색하여 세포 사멸 정도를 관찰한 결과(Fig. 3B), 정상 세포주에서의 YKL-1 (lane 2)의 세포 사멸능은 ad-XJ (lane 3)의 1/1000 또는 그 이하로 떨어짐을 알 수 있었다. 한편 YKL-1은 p53의 돌연변이로 p53

가 비활성화된 것으로 알려진 C33A 또는 Hep3B에서는 야생형 바이러스와 유사한 정도의 세포 살상능력을 보여주었고 p53가 정상형으로 알려진 HeLa 및 H460에서의 세포 살상 능력은 야생형에

비하여 낮았다. YKL-1의 암세포 특이 살상능은 dl1520의 그것과 유사한 것으로 확인되었다(data not shown). 또한 예상대로 증식 불능 음성 대조군 ad- Δ E1/ β -gal (lane 1) 또는 ad- Δ E1 (data not shown)에서는 세포 살상 능력을 전혀 관찰할 수 없었다.

3) YKL-1의 항종양 효과 검증

YKL-1의 종양 퇴행 유발 능력을 규명하기 위하여 p53 유전자가 비활성화되어있는 자궁암세포주 C33A를 누드생쥐에 접종한 후 형성된 종양에 1×10^8 PFU의 YKL-1 (실험군) 또는 자외선조사를 통하여 비활성화시킨 동량의 YKL-1 (대조군)을 종양에 주사한 후 종양의 크기를 관찰하였다(Fig.

4). 육안 관찰상으로도 실험군의 경우 종양주위로 형성되어지던 혈관들이 서서히 사라지면서 종양의 성장이 크게 억제됨을 확인할 수 있었던 반면 대조군에서는 지속적인 종양 성장이 관찰되었다(Fig. 4A). 실험동물로부터 종양을 적출하여 H/E staining을 시행한 결과 실험군 YKL-1을 주입한 종양에서는 세포의 괴사가 현저히 유발된 반면 대조군에서는 활발한 종양세포의 증식을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 또한 아데노바이러스 외피단백질 특이 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행한 결과 YKL-1을 주사한 경우 암 종괴내에서 바이러스의 증식이 유발됨을 확인할 수 있었다 (data not shown).

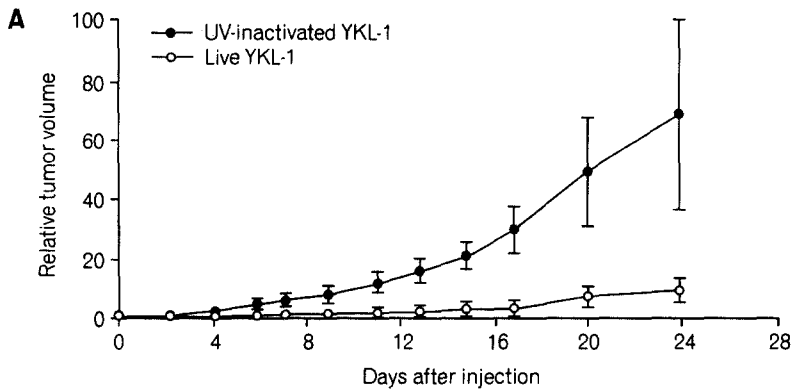


Fig. 4. Effects of YKL-1 on C33A tumor growth. The dramatic inhibition of tumor growth and severe necrosis was observed in C33A xenograft by intratumoral injection of live YKL-1 (n=4). A. The growth inhibition of C33A xenograft by YKL-1 intratumoral injection. As a control group, the equal amount of UV-inactivated YKL-1 was administered. B. The histology of C33A xenograft 20 days postinjection by H/E staining.

고 찰

본 연구 결과는 대장균에서 유전자 상동 재조합에 의해 생산한 YKL-1이 아데노바이러스 초기 발현 유전자 E1 중 E1A 및 E1B 19 kD만이 게놈 상에 존재하고 발현되어(Fig. 1, 2) 결과적으로 E1B 55 kD은 발현되지 않는 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스임을 보여주었다. 아데노바이러스 초기발현 유전자인 E1B 55 kD은 p53와 결합하여 p53의 기능을 억제하여 야생형 아데노바이러스의 활발한 증식 및 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도하는 것으로 보고된 바 있다(14,18). p53는 대부분의 인체 종양에서 유전자의 직접적인 돌연변이 또는 mdm2의 과다발현 등 간접적인 요인에 의해 그 기능이 저하되어 있고(19) 이는 약물 요법이나 방사선 치료 등 기존 치료에 의한 치료 효과를 저하시키는 주된 요인 중의 하나이다(12,19). 이와 같은 기존 암치료의 문제점을 극복하기 위하여 E1이 소실된 증식 불능 재조합 아데노바이러스를 매개체로 치료용 유전자를 도입하여 종양의 퇴행을 유발시키려는 시도가 활발하다(3,17,20). 하지만 이러한 시도들은 바이러스가 일차 감염된 세포 및 주변의 극히 일부 세포에서만 치료 효과를 기대할 수가 있어 실질적인 치료효과를 기대하기에는 커다란 한계가 있다.

상기한 문제점을 극복하기 위하여 E1B 55 kDa 유전자 소실 아데노바이러스의 종양 특이 증식 및 살상능의 안전성 및 효능을 검증하고 암 유전자 치료의 새로운 개념으로 도입시키려는 시도가 대두되기 시작하였다. Bischoff등(13)은 E1B 55 kDa 발현 저하 아데노바이러스 dl1520의 항종양 효과를 보고하였고 더욱이 이러한 아데노바이러스와 cisplatin과 같은 항암제를 동시에 처리함으로써 p53의 변이가 확인되지 않은 암세포도 효과적으로 살상할 수 있음을 확인하였다(21). 또한 이러한 종양 특이 증식 살상 아데노바이러스를 두경부암에 대한 phase-I/II 임상 시험에 적용하여

획기적인 치료 효과를 보고한 바 있다(22). 본 연구의 산물인 E1B 55 kD 유전자 소실 재조합 아데노바이러스인 YKL-1은 암세포 특이적 증식 및 세포 살상능에 있어 dl1520과 상당한 유사성을 보였다(Fig. 3). YKL-1의 인체 정상세포 FHs173Lu, FHs738We에 대한 증식 및 살상능은 야생형에 비해 현저히 감소하였고 그 감소 정도는 dl1520의 그것과 유사한 수준이었다. 반면에 각종 암세포주에서의 YKL-1의 증식 및 세포살상능은 상대적으로 활성화되어 특히 p53가 돌연변이형으로 알려진 C33A 및 Hep3B에서의 바이러스 증식은 야생형 바이러스와 유사한 수준이었다. 이상의 사실은 YKL-1의 암세포 특이성을 보여주며 특히 p53 유전자와 YKL-1의 증식 및 세포 살상능 간의 상관관계를 시사한다. 또한 누드마우스에 형성된 C33A 종양에 대한 항종양 효과를 볼 때 YKL-1의 종양 특이 살상효과를 *in vivo*에서도 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 자외선으로 비활성화된 음성 대조군 바이러스와는 달리 암세포 특이적으로 증식한 YKL-1은 일차 감염 시 감염되지 않은 주변의 종양세포를 감염시키고 동시에 세포 살상을 유도하여 궁극적으로 종양의 퇴행을 유발시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

이상과 같은 특징을 가진 YKL-1은 dl1520과는 제작 공법 및 바이러스의 게놈상에 차이가 있다. 즉 YKL-1은 E1이 완전히 소실된 아데노바이러스 벡터에 E1A와 E1B 19 kD을 재도입하여 생산(Fig. 1A)된 반면 dl1520은 전체 E1B 55 kDa (1.5 kb) 중 일부 유전자를 소실시키기 위하여 제한 효소 처리 및 돌연변이 유도 방법을 취하여(13) E1B 유전자의 잔류 정도에 차이가 있다. 즉 YKL-1의 경우 E1B 55 kD의 84%인 1260 bp (2270~3530)가 소실된 형태로 E1B 19 kD과 염기서열상 중복되는 E1B 55 kDa의 최소부분(Fig. 1A)만이 잔류하여 실질적으로 E1B 55 kDa이 소실된 형태인 반면 dl1520의 경우 827 bp (2496~3323)만이 소실되어 있다. 이는 319/3536 primer를 이용한 Fig. 1B (left panel)의 PCR 결과 YKL-1은 2.0 kb 그리고 dl1520의 경우 2.3 kb의 PCR 산물이 생산되는 것으로도

또한 입증되었다. 더욱이 YKL-1은 아데노바이러스의 또 다른 초기발현 유전자 E3가 소실된 형태로 4.9 kb까지의 유전자 삽입능을 가져 dl1520의 2.7 kb에 비해 현저히 큰 유전자 삽입능을 가짐으로써 유전자 전달체로서 상대적으로 우수한 성질을 가지고 있다.

최근 Blaese등(23,24)은 E1B 유전자 소실 아데노바이러스에 Herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-TK)를 삽입한 재조합 아데노바이러스의 유용성을 보고하였고 Freytag등(25)은 여기에 HSV-TK와 또 다른 약제 감수성 유전자인 cytosine deaminase (CD)를 포함시키고 방사선 치료와의 병합 치료로 항종양 효과를 검증하였다. 본 연구의 결과를 포함하여 앞서의 연구의 결과들은 향후 암유전자 치료의 새로운 치료 전략으로 E1B 유전자 소실 아데노바이러스 매개체가 널리 이용될 수 있을 것을 예견하여 준다.

한편 E1B 유전자 소실 아데노바이러스의 항종양 효과와 세포내 p53 기능 여부에 대한 상관관계에 대한 의문을 제기하는 보고들도 있다(26~28). 하지만 이러한 보고들은 대부분 p53의 유전자 변이 양상에 근거하여 암세포만을 연구대상으로 하고 있고 세포 감염 시 높은 MOI를 사용함과 동시에 감염 초기의 세포 살상 양상을 관찰하는 등이 실험 방법상의 문제점으로 제기되고 있다. 이러한 점은 p53가 정상형으로 알려진 human papilloma virus 감염 자궁암 세포주 HeLa에서 YKL-1에 대한 증식 또는 세포 살상능이 정상세포주에 비해 활성화되어 있다는(Fig. 3) 본 연구의 결과에서도 유추된다. 따라서 E1B 유전자 소실 아데노바이러스의 p53 기능 의존성 여부를 규명하기 위해서는 먼저 세포내 p53의 비활성화 여부 등을 보다 정확히 규명하여야 할 것이다.

결 론

본 연구의 결과 E1B 55 kD이 결손된 재조합 아데노바이러스 YKL-1은 암세포 특이적으로 활발하게 증식하여 암세포의 살상을 유도하며 누드

마우스에 형성된 종양의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 증식 불능 아데노바이러스를 이용한 암 유전자 치료효과의 한계를 극복할 수 있는 방안을 제시한다.

참 고 문 헌

1. Bailar JC, Gornik HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997;336:1569-1574.
2. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Human Gene Ther* 1998;9: 283-286.
3. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. In: *The internet book of gene therapy Cancer therapeutics*, Soval RE and Scanlon KJ. Eds. Appleton & Lange Stamford, CT 1994:3-16.
4. Kim YS, Lim HK, Kim JH, Min JS. Comparison of efficiency of infection of human cancer cell lines via retroviral vector system. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29:1-10.
5. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:21-39.
6. Mastrangelo MJ, Nathan BD. Gene therapy for human cancer: an essay for clinicians. *Semin Oncol* 1996; 23:4-21.
7. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158-3168.
8. Perkins AS, Steern DF. Molecular biology of cancer: oncogenes In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds *Cancer: Principles & practices of oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997:79-102.
9. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53: 2231-2234.
10. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Bevilacqua G. MDM2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Dign Mol Pathol* 1995;4:93-97.
11. Scheffner M, Warness BA, Huibrechtse JM, Levine AJ. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation

- of p53. *Cell* 1990;63:1129-1136.
12. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implication of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-1022.
 13. Bischoff J, Kim D, Williams A, Heise C, Horn S, Muna A, Ng L, Nye Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376.
 14. Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: Fields EN, eds. 3th ed. Philadelphia. NY: Lippincott-Raven, 1996:2111-2148.
 15. Shenk T, Flint SJ. Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res* 1991;57:47-85.
 16. Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A, Mehtali M. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* 1999;70:4805-4810.
 17. Hitt M, Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Construction and propagation of human adenovirus vectors. *Cell biology: A laboratory handbook*. Academic press Inc, 1994:479-490.
 18. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 1992;357:82-85.
 19. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
 20. Yee P, Ferricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J* 1997;11:615-623.
 21. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff D, Kim D. ONXY-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytotoxicity and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Med* 1997;3:639-645.
 22. McCormick F. Recombinant oncolytic adenovirus. The American Society of Gene Therapy (1st annual meeting).
 23. Wildner O, Blaese RM, Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999;59:410-413.
 24. Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, Ford H, Ramsy WJ, Blaese. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Therapy* 1998;6:57-62.
 25. Freytag S, Rogulski K, Paielli D, Gilbert J, Kim J. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: Concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Human Gene Ther* 1998;9:1323-1333.
 26. Hall A, Dix B, Simon J, Braithwaite O. p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nature Med* 1998;4:1068-1072.
 27. Goodrum FD, Ornelles DA. P53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 1998;72:9479-9490.
 28. Hay JG, Shapiro N, Sauthoff H, Heitner S, Phupakdi W, Rom W. Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: The importance of the adenoviral E1B-55 kD gene. *Human Gene Ther* 1999;10:579-590.