

## 인체 간암세포주에 레트로바이러스를 이용한 Herpes Simplex Virus의 Thymidine Kinase 유전자의 형질도입이 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학, <sup>1</sup>암센터, <sup>2</sup>암연구소, <sup>3</sup>내과학교실

김주항<sup>1,2,3</sup> · 송재진<sup>2</sup> · 장윤수<sup>3</sup> · 김은희<sup>2</sup> · 김재성<sup>2</sup> · 이희란<sup>2</sup>  
안중배<sup>1,2,3</sup> · 유내훈<sup>1,2,3</sup> · 정현철<sup>1,2,3</sup> · 노재경<sup>1,2,3</sup> · 김병수<sup>1,2</sup>

### Effects of Herpes Simplex Virus - Thymidine Kinase Gene Transduction into the Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Using the Retrovirus on Ganciclovir Cytotoxicity

Joo-Hang Kim, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Jae-Jin Song, Ph.D.<sup>2</sup>, Yoon Soo Chang, M.D.<sup>3</sup>  
Eun-Hee Kim, M.S.<sup>2</sup>, Jae-Sung Kim, M.S.<sup>2</sup>, Heuiran Lee, Ph.D.<sup>2</sup>  
Joongbae Ahn, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Nae Chun Yoo, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Hyun Cheol Chung, M.D.<sup>1,2,3</sup>  
Jae Kyung Roh, M.D.<sup>1,2,3</sup> and Byung Soo Kim, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Yonsei Cancer Center, <sup>2</sup>Institute for Cancer Research, and  
<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Yonsei University  
College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancy with high mortality in Korea. A new therapeutic modality such as gene therapy is necessary to improve the prognosis of hepatoma patients. Therefore we investigated the preclinical significance of Herpes simplex virus - thymidine kinase/ganciclovir (HSV-tk/GCV) gene therapy model using the retroviral vector for HCC cell lines.

**Materials and Methods:** LNC/HSV-tk retroviral vector and PA317/LNC/HSV-tk producer cell line were constructed. HSV-tk transduced HCC cells using the LNC/HSV-tk retrovirus were selected by the G418 containing media. In vitro GCV sensitivity test of the HCC cells was performed by MTT assay. To evaluate in vivo GCV sensitivity, GCV was intraperitoneally injected after subcutaneous administration of HCC cells into each flank of the nude mouse.

**Results:** HSV-tk gene transduction and expression in HCC cells were confirmed by RT-PCR. HSV-tk transduced HCC cell lines (SK-Hep1/HSV-tk and Hep-3B/HSV-tk) showed the marked GCV sensitivity comparing with the parental cell lines (SK-Hep1 and Hep-3B) by MTT assay ( $p < 0.001$ ). The MTT test revealed that SK-Hep1/HSV-tk cells

---

책임저자 : 김주항, 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세암센터, 120-752

본 연구는 보건복지부 1996년도 보건의료기술 연구개발비(HMP-96-M-2-0010)의 지원에 의한 결과임.

접수일 : 1998년 5월 11일, 게재승인일 : 1998년 8월 19일

were more sensitive to GCV compare with that of Hep-3B/HSV-tk cells, and the parent cell line showed minimal growth suppression by the GCV treatment. In 12 nude mice received tumor cell mixtures of Hep-3B and Hep-3B/HSV-tk cells which contained more than 50% of HSV-tk transduced cells, the tumor was not developed in 11 mice by the intraperitoneal administration of GCV. The tumors developed in 1 of 6 mice and 5 of 6 mice when mixtures contained 30% and 10% of HSV-tk transduced cells, respectively. Five mice out of 6 mice received inoculum containing the mixtures of 70% and 50% of HSV-tk transduced cells into each flank survived more than 6 month after HSV-tk/GCV treatment.

**Conclusion:** HSV-tk gene transduced HCC cells showed the enhanced sensitivity to GCV. In nude mice HSV-tk/GCV strategy for HCC seemed to be more effective when tumor cell inoculum contained more than 30% of HSV-tk transduced HCC cells.

**Key Words:** Gene therapy, Hepatoma, HSV-tk, Ganciclovir, Retroviral factor

## 서 론

간암은 우리나라에 흔한 악성종양의 하나로 대부분 만성 간염후, 진행된 간경변을 동반한 5 cm 이상의 큰 간암으로 발견되는 경우가 많으며, 대부분의 환자는 진단후 6개월 이내에 사망하고 치료를 받지 않는 경우의 중앙생존 기간은 약 1~4 개월 정도로 대단히 예후가 불량한 암이다(1). 이와같이 불량한 간암의 예후를 개선하기 위해서는 기존의 수술, 간동맥내 항암제 주입법 및 방사선 치료 외에도 유전자 치료와 같은 새로운 치료법의 개발이 절실한 상태이다.

유전자 치료는 유전적 결함을 교정하기 위하여 또는 특정 세포에 새로운 유전적 기능을 부여하기 위하여 세포내에 유전자를 삽입하여 질병을 치료하는 방법으로 정의할 수 있다. 암에 대한 유전자 치료시의 전략으로는 p53와 같은 tumor suppressor gene(2,3), Herpes simplex virus의 thymidine kinase(HSV-tk) 유전자와 같은 drug-sensitivity gene (4~7), immunotherapy를 위한 interleukin 또는 tumor necrosis factor gene(8), 항암제 투여에 의한 골수 조혈간세포(hematopoietic stem cell)의 손상을 억제하여 고용량 또는 효과적인 화학요법치료를

를 위한 MDR(multidrug resistance) 유전자의 이용, 그리고 antisense RNA를 합성하기 위한 antisense DNA등(9)의 이용 등이 있다.

HSV-tk 유전자는 bacterial cytosine deaminase gene(10)과 같이 대표적인 drug susceptibility(suicide) 유전자로, HSV-tk 유전자의 산물은 guanosine analogue인 ganciclovir(GCV)를 인산화시켜 DNA 합성을 중단 시킬 수 있는 intermediate로 전환시켜 cell death를 유도한다(11,12). Culver등(13)은 rat의 glioma 모델을 이용하여 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포가 전체 종양세포의 10%만 되어도 GCV의 투여로 종양의 완전퇴행이 가능함을 보고하여 bystander 효과를 HSV-tk 유전자를 이용한 유전자 치료의 장점으로 제시한바 있다.

본 연구는, 이러한 배경하에, HSV-tk 유전자를 subcloning한 재조합 레트로바이러스(LNC/HSV-tk)를 제조하여 HSV-tk 유전자를 간암세포주에 형질도입할 때 in vitro 및 in vivo에서 항바이러스제인 GCV에 대한 간암세포주의 감수성의 변화여부를 규명하고자 계획되었다.

## 연구대상 및 방법

### 1) 간암세포주의 배양 및 RNA의 추출

대상 간암세포주 SK-Hep1와 Hep-3B는 ATCC

(MD, U.S.A.)에서 구입하였으며, 이들은 가열 비활성화된 10% 우태아혈청(GIBCO, U.S.A.)을 함유하는 RPMI 1640(GIBCO, U.S.A.)을 기본 배양액으로 이용하여 5% CO<sub>2</sub>의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. 인체 간암세포주에서 RNA는 1~5×10<sup>7</sup>개의 세포를 각각 GIT buffer (4M guanidine isothiocyanate, Fluka Biochemica, Switzerland; 3M Sodium acetate, pH 6, Mallinckrodt, U.S.A; 0.8% β-mercaptoethanol, Sigma, U.S.A.)에 녹인후 5.7M cesium chloride의 존재하에 초원심 분리하여 phenol 및 chlorform 추출을 시행한 후 ethanol 침전을 형성하여 Davis등(14)의 방법에 따라 분리하였다.

## 2) HSV-tk 유전자의 cDNA를 포함한 retroviral vector LNC/HSV-tk의 제조

Viral vector는 Miller등(15)이 개발한 LNCX를 이용하였는데 이는 human cytomegalovirus의 promoter와 neomycin phosphotransferase gene을 가지며 helper virus의 생성을 억제하고 retrovirus의 titer를 높게 얻을 수 있도록 개발된 것이다. HSV-tk 유전자가 삽입된 LNC/HSV-tk는 HSV-tk 유전자를 coding 하고 있는 pΔACMVTK로부터 Hind III/Hpa I을 이용하여 1.2 kb 크기의 HSV-tk를 절단하고, 같은 제한효소를 이용하여 절단한 retroviral vector LNCX에 T4 DNA ligase(GIBCO, Gaithersberg, MD, USA)를 이용하여 subcloning하여 제조하였다(14).

## 3) PA317/LNC/HSV-tk producer cell line의 제조

Miller등(16)이 개발한 amphotrophic packaging cell line인 PA317 세포 5×10<sup>5</sup>개를 직경 60 mm 배양접시에 10% fetal calf serum이 함유된 5 ml의 DMEM 배양액으로 18~24시간 배양한 뒤 calcium phosphate법(14)으로 pLNC/HSV-tk의 형질도입에 사용하였다. Calcium phosphate법으로 LNC/HSV-tk가 형질도입된 PA317세포주는 배양기에서 48시간동안 배양한 뒤 G418(GIBCO, Gaithersberg, MD, USA)이 함유된 배양액을 이용하여 ret-

roviral vector LNC/HSV-tk가 형질도입된 PA317/LNC/HSV-tk producer cell line을 selection하였다. 약 12~15일동안 G418 selection을 시행하여 형성된 colony를 cloning하여 배양한후 viral titer의 증가를 목적으로(17) 상등액을 채취하여 ecotropic packaging cell line인 ϕ<sub>2</sub> 세포주(18)를 감염시킨후 다시 ϕ<sub>2</sub> 세포주의 배양액을 채취하여 PA317/LNC/HSV-tk 세포주에 재감염시키는 과정을 수차례 반복하였다.

## 4) Recombinant retrovirus의 역가 측정

PA317 세포주로부터 높은 titer의 HSV-tk 유전자를 포함한 재조합 retrovirus를 산출하는 producer cell line을 선별하기 위해 PA317 세포주와 ϕ<sub>2</sub> 세포주간의 교대감염을 통하여 얻어진 PA317/LNC/HSV-tk 세포의 배양액으로 target cell line NIH-3T3를 감염시켰다. 감염 하루전에 NIH-3T3 세포를 six-well plate의 well 당 2×10<sup>4</sup>개씩 plating하여 배양한후, viral supernatant를 DMEM 배양액으로 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>배 등으로 희석하고 최종 농도 8 μg/ml의 polybrene를 첨가한 후 viral supernatant가 희석된 배양액 1ml씩을 세포 배양액이 제거된 NIH-3T3 세포에 투여하였다. 30분 간격으로 천천히 dish를 흔들어 virus가 포함된 배지가 세포 전체로 균일하게 퍼지게 하면서 세포 배양기 안에서 세포를 3시간동안 감염시킨 후 2 ml의 DMEM 배양액을 첨가하여 세포를 배양하였다. 감염 48시간후에 배양액을 제거한 후 G418을 함유하는 DMEM 배양액 2 ml씩을 각 well에 투여하여 배양하며 48시간마다 배지를 갈아주었다. 약 12~15일후 G418에 저항성이 있는 세포군이 관찰되면 배양액을 제거하고 methylalcohol/methylene blue 염색용액으로 세포군을 염색한 뒤 retroviral titer를 Kriegler(19)가 제안한 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{titer} = (\text{number of colonies in highest dilution}) \times (\text{dilution})$$

가장 높은 titer의 retrovirus를 산출하는 PA317/LNC/HSV-tk clone 이 결정되면 그 세포군의 배양액을 모아 다음 실험에 이용하였다.

### 5) 인체 간암세포주에서 HSV-tk 유전자발현의 조사

실험대상 인체 간암세포주에 형질도입된 HSV-tk 유전자의 발현을 확인하기 위하여 LNC/HSV-tk virus로 감염시킨 뒤 선택배양한 간암세포주로부터 RNA를 분리하여 중합효소 연쇄반응을 이용하여 HSV-tk 유전자의 발현을 조사하였다. HSV-tk 유전자에 대한 특이 primer로는 5'-TAG AAG CGA CCA TGG CTT CGT-3'와 5'-TAT TGG CAA GCA GCC CGT AAA-3'를 이용하였다(20).

### 6) HSV-tk 유전자가 도입된 간암 세포주의 GCV에 대한 감수성 측정

간암세포주에서 HSV-tk 유전자의 발현이 GCV에 대한 감수성에 미치는 영향을 조사하기 위해 HSV-tk 유전자가 형질도입되지 않은 대조군 간암 세포들과 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암 세포들을 96 well plate에 plating 한 후 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 이용하여 간암세포주의 GCV에 대한 감수성의 차이를 조사하였는데(21), 약술하면 다음과 같다. HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포주와 형질도입되지 않은 각각의 간암세포주로 성장곡선을 그려, 지수성장을 보이는 세포수를 결정한 후 이에 해당하는 세포수를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 단일 부유 암세포로 만든 후, 10% FCS가 함유된 RPMI 1640 배지로 3회 세척하고, 180 µl의 배양액에 지수성장기에 해당하는 세포수를 부유하여 96 well plate(Costar, U.S.A.)에 분주하였다. 분주한 각각의 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후, 여러 농도의 GCV를 20 µl의 생리식염수에 용해시켜 96 well plate에 투여하였다. 이후 microplate를 4일 추가 배양한 후 MTT 50 µl(2 mg/dl)를 각 well에 첨가하고 이를 4시간 더 추가 배양하였다. 배양이 끝난 microplate

는 450 g에서 10분간 원심분리한 후, 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서, 30 µl 정도의 배양액이 남도록 digital multichannel pipette(Flow Titerck, Finland)을 사용하여 상층액을 제거하였다. 여기에 다시 150 µl의 dimethyl sulfoxide(Sigma, U.S.A.)를 각 well에 첨가하고 진탕기(plate shaker)에서 formazan결정이 용해될 때까지 36°C에서 10분간 진탕한 후 multi-well ELISA automatic spectrometer recorder(Behring ELISA Processor II, Germany)를 이용하여 540 nm의 파장에서 판독한 실험군의 색소흡수율(absorbance, optical density)을 대조군의 색소흡수율과 비교하여 아래의 공식으로 생존율을 구하였다.

$$\% \text{생존율} = \frac{\text{실험군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}} \times 100$$

### 7) 누드 생쥐에서 GCV의 투여가 간암세포주의 성장에 미치는 영향

실험동물에서 GCV 투여에 의한 간암의 치료효과를 조사하기 위하여 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암 세포주 및 유전자 조작을 시행하지 않은 모세포주를 단독으로 또는 혼합하여 총 1×10<sup>7</sup>개씩을 0.1 ml의 PBS용액에 현탁하여 누드생쥐의 양측복벽에 각각 피하 주사하였다. 간암 세포주의 피하접종 2일후부터는 누드생쥐에 50 mg/kg의 GCV를 복강내로 매일 주사하였다. 간암세포주의 접종은, bystander effect의 견증을 위해서, HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포주와 형질도입하지 않은 간암 모세포주를 서로 다른 비율로 혼합하여 접종하였는데 (A)군은 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암세포의 비율이 각각 100%와 0%가 되게 하여 누드생쥐의 양측복벽에 각각 주사하였으며, (B)군은 각각 70%와 50%가 되게, 그리고 (C)군은 각각 30%와 10%가 되도록 혼합비율을 조정하여 접종하였다. 각 실험군은 6마리씩의 누드생쥐를

이용하였다.

### 8) HSV-tk/GCV 유전자 치료후 실험동물의 생존기간

누드생쥐의 생존율은 누드생쥐에 간암세포를 접종한 후 GCV를 투여하면서 Kaplan-Meier법에 의하여 비교분석하였으며 생존기간의 산정은 간암세포주를 접종한 날을 기점으로 하였다.

### 9) 통계적 검증

생체외에서 GCV에 대한 간암세포주의 감수성 차이여부는 SAS System을 이용하여, 생존율의 비교는 Log rank test를 이용하여 검증하였으며 p값이 0.05 미만인 경우를 유의수준으로 하였다.

## 결 과

### 1) 사람간암세포에서 exogenous HSV-tk 유전자 발현의 조사

간암세포주에서 RNA를 추출한후 HSV-tk 유전자 특이 primer를 이용하여 중합효소연쇄 반응을 시행한 결과 간암모세포주(SK-Hep1 및 Hep-3B)에서는 HSV-tk 유전자의 발현이 없었으나, LNC/HSV-tk virus에 감염된 간암세포주에서는 744 bp의 HSV-tk 유전자 특이 mRNA의 발현을 확인할 수 있어 유전자 형질도입이 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

### 2) HSV-tk 유전자의 형질도입이 간암세포주의 생체외(in vitro) GCV 감수성에 미치는 영향

간암모세포주와 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암세포주(SK-Hep1/HSV-tk, Hep-3B/HSV-tk)의 GCV에 대한 감수성은 HSV-tk 유전자가 형질도입된 경우 각각의 간암 모세포주에 비하여, 용량 의존적으로 GCV에 대한 감수성의 유의한 증가를 관찰할 수 있었으며(각각  $p < 0.001$ ), 감수성의 증가는 SK-Hep1/HSV-tk 세포주에서 더욱 뚜렷하였다. 그러나 HSV-tk 유전자를 형질도입하지 않은 간암모세포주의 경우는 GCV를 500  $\mu\text{g/ml}$  이상의 높

Fig. 1. Expression of Herpes simplex virus - thymidine kinase gene. PCR revealed Herpes simplex virus - thymidine kinase specific 744 bp sized mRNA bands in SK-Hep1/HSV-tk and Hep-3B/HSV-tk cells.

은 용량으로 투여하였을 때 약간의 세포성장 억제를 관찰할 수 있었으나, 이보다 적은 용량에서는 세포성장 억제의 효과가 미미하였다(Fig. 2).

### 3) 실험동물에서 GCV의 투여가 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암세포주의 성장에 미치는 영향

누드마우스의 양측복벽에 각각 총  $10^7$ 개의 간암세포주를 주사한 후 GCV를 투여할 때 HSV-tk 유전자가 형질도입되지 않은 간암모세포주(Hep-3B)에 의한 종괴는 지속적인 성장을 보인 반면 HSV-tk 유전자가 형질도입된 Hep-3B/HSV-tk에 의한 경우는 종괴가 형성되지 않았다. Bystander effect의 검증을 위하여 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포와 도입되지 않은 간암세포주를 혼합하여 누드마우스에 여러비율로 혼합하여 접종한후 GCV를 투여하였을 때 형질도입된 세포의 비율이

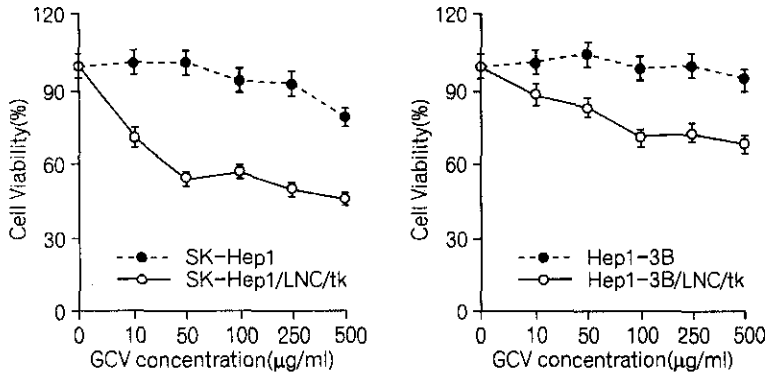
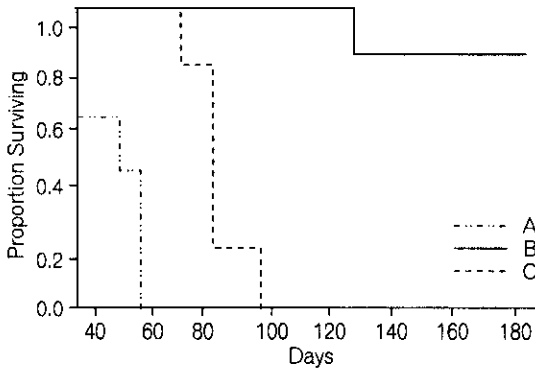


Fig. 2. Effects of Ganciclovir on hepatoma cell growth. In both panel A and B, Herpes simplex virus - thymidine kinase transduced hepatoma cells showed enhanced sensitivity to ganciclovir ( $p < 0.001$  in both panel).

Fig. 3. Effects of Ganciclovir on tumor growth in nude mice injected with mixtures of Herpes simplex virus - thymidine kinase transduced and wild-type Hep-3B cells. Each mixture ( $1 \times 10^7$  cells) consisting of 30% and 10% gene modified cells was injected into the right and left flank, respectively. Intraperitoneal Ganciclovir (50 mg/kg) was administered twice daily for 2 weeks since 2 days after tumor cell implantation. Tumor developed in 1 of 6 mice and 5 of 6 mice when mixtures contained 30% and 10% of HSV-tk transduced cells respectively.

50% 이상을 차지하는 경우에는 실험대상 누드생쥐 12마리 중 11마리에서 종괴가 형성되지 않았다. 그러나 형질도입 세포의 비율이 30%인 경우

는 대상 누드생쥐 6마리 중 1마리에서, 10%인 경우는 6마리 중 5마리에서 종괴의 성장을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).



**Fig. 4.** Survival curves of nude mice. Each group of nude mice were treated with Ganciclovir after implantation of mixtures ( $1 \times 10^7$  cells) consisting of Herpes simplex virus - thymidine kinase transduced and wild type Hep-3B cells. Tumor cell mixtures consisting of 100% and 0% (Group A), 70% and 50% (Group B) and 30% and 10% gene modified cells (Group C) were injected into the right left flank of the mouse, respectively. Ganciclovir (50 mg/kg) was administered twice daily for 2 weeks since 2 days after tumor cell implantation. Survival duration was measured from the day of tumor cell implantation ( $p < 0.001$ ).

**4) 누드생쥐에 간암세포 접종후 GCV 투여가 누드생쥐의 생존에 미치는 영향**

누드생쥐에서 간암세포 접종후 HSV-tk/GCV 유전자 치료후의 각군별 생존곡선은 Fig. 4와 같다. 누드생쥐의 양측 복벽에 주사한 간암세포중 HSV-tk 유전자 함유 세포의 비율이 각각 50%와 70%를 차지하는 (B)군의 경우 6개월의 관찰기간 동안 종괴의 성장을 보였던 1마리만 사망하고 나머지 5마리는 모두 생존하여 중앙생존기간은 180+일이었으며, HSV-tk 유전자 함유 세포비율이 각각 100%와 0%이었던 (A)군은 중앙생존기간 55일, 그리고 HSV-tk 유전자 함유세포 비율이 각각 30%와 10%이었던 (C)군의 중앙생존 기간은 82일로 유의한 차이를 보였다( $p < 0.001$ ).

**고    찰**

HSV-tk 유전자와 GCV를 이용한 HSV-tk/GCV

유전자 치료시의 세포사멸 기전은 apoptosis에 의하며, 세포사멸의 효과는 bystander effect에 의해 증가하는 것으로 알려져 있다(22). Bystander effect는 일부의 종양세포에만 HSV-tk 유전자가 형질도입되어도 HSV-tk/GCV 유전자 치료시 HSV-tk 유전자가 형질도입되지 않은 주변의 종양세포까지 죽게 만드는 효과를 말한다(13). HSV-tk를 이용한 유전자 치료시의 bystander effect에 대한 기전으로는 HSV-tk가 형질도입된 세포에서 도입되지 않은 세포로 세포사이의 gap junction을 통한 phosphorylated GCV의 이전, HSV-tk 형질도입된 세포의 사멸시 apoptotic vesicle이 주위세포에 전달되거나, 또는 HSV-tk 형질도입 세포의 사멸시 면역반응에 의한 주변 세포의 살상 등의 기전이 제시되고 있다(23~25). 본연구에 이용한 누드생쥐는 T세포 매개면역 반응에 장애가 있는 동물임에도 불구하고 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암세포의 비율이 30%에 해당하는 경우 6마리 중 5마리에서 GCV의 투여로 종양이 형성되지 않았고 HSV-tk 유전자 형질도입 세포의 비율이 10%이었던 경우는 실험대상 누드생쥐 6마리 중 1마리에서는 종양이 발생되지 않았고, 또한 이들 실험동물에서 종양발생의 억제가 주로 국소적으로 이루어진 사실들을 종합한다면 bystander effect는 주변 세포에 gap junction을 통한 phosphorylated GCV의 이전 또는 apoptotic vesicle의 전달등이 더욱 주된 기전일 것으로 생각된다. Ram등(7)도 15명의 악성종양 환자에게 HSV-tk 유전자를 포함하는 retrovirus를 생산하는 vector producing cell(VPC)을 종양내에 주사하고 GCV를 투여하여 5예의 종양이 축소됨을 보고하면서 종양의 퇴행은 VPC를 주사한 부위에서만 국소적으로 관찰되었음을 보고하면서 bystander effect는 gap junction을 통한 phosphorylated GCV의 전달이 주된 기전으로 작용할 것을 제시한 바 있다.

Ram등(7)은 HSV-tk/GCV에 의한 유전자 치료시 항종양효과의 주된기전인 bystander effect는 gap junction의 발현과 관계가 많기 때문에, 치료전에 종양조직에서의 gap junction의 양을 정량분석하

여 치료대상을 선별하든지 또는 gap junction의 발현을 증가시킬 수 있는 약제를 병용투여한다면 좀더 효과적인 항종양 효과가 유도될 수 있을 것으로 제시하고 있다. 본연구에서 retrovirus를 이용하여 HSV-tk 유전자를 형질도입한 간암세포주만을 선별배양하여 GCV에 대한 감수성을 MTT 검사를 비교하였을때에도 GCV에 대한 감수성의 정도는 세포주에 따라 차이가 많았으며, 동일한 연구를 위암세포주를 대상으로 시행하였을때에도 세포주에 따라 GCV에 대한 감수성에 차이가 있었다(26). 이러한 결과들은 역시 세포주에 따른 gap junction 발현 정도의 차이에 의해 유발되었을 것으로 생각된다.

Colombo등(22)은 누드생쥐를 대상으로 U-87 glioma cells를 이용한 HSV-tk/GCV 유전자 치료의 실험을 진행하여 면역장애가 있는 동물에서는 종양이 줄어들다가 다시 자라는 것으로 보고하였는데 본연구에서는 HSV-tk/GCV 유전자 치료법으로 종양이 소실된 누드마우스 5마리는 180일까지도 종양이 재발하지 않고 생존하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과의 차이는 실험대상 세포주의 성장의 차이 또는 Colombo등(22)의 경우 본연구와는 달리 HSV-tk 양성세포를 PA317 producer cell로 사용하였는데 이와같이 서로 다른 실험 design 등에 그 원인이 있을 것으로 생각된다.

Culver등(13)은 실험동물의 뇌에 glioma 세포주를 접종한 후 HSV-tk/GCV 유전자 치료후 5주 동안의 관찰동안 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포의 비율이 10%일때 15마리 중 6마리에서, 50%와 100%일때 각각 15마리 중 1마리와 2마리에서 종양이 발생함을 보고하였는데 본연구에서는 HSV-tk 유전자 형질도입 간암세포의 비율이 50%를 넘는 경우에는 HSV-tk/GCV 유전자 치료로 간암종괴가 실험동물 1마리를 제외한 11마리에서 종괴가 완전히 소실되었고, 30%일때는 6마리 중 1마리에서 그리고 10%의 형질도입 세포가 혼합되었을때는 6마리 중 5마리에서 간암종괴가 성장함을 관찰할 수 있었다. 따라서 HSV-tk/GCV 유전자 치료시에는 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포의 비

율이 중요한 변수일 것으로 생각되며 형질도입 세포의 비율이 높을수록 효과적이겠으나 적어도 그 비율이 30% 이상일 때 더욱 효과적인 것으로 생각된다. 또한 본연구에서 실험군별의 누드생쥐의 생존율은 HSV-tk 유전자 형질도입 세포의 비율이 각각 50%와 70%로하여 양측복벽에 접종후 GCV를 투여한 (B)군이 6마리 중 5마리가 종양의 성장없이 180일 이상 생존하여 제일 높았으며, HSV-tk 유전자 형질도입 세포의 비율이 각각 100%와 0%이었던 (A)군은 0%이었던 접종부위의 종양진행으로, 30%와 10%의 비율을 접종하였던 (C)군은 10% 접종부위 종양의 성장으로 생존율이 높지 않았었다( $p < 0.001$ ).

HSV-tk/GCV 유전자 치료로 종괴의 소실을 보인 누드생쥐에 간암세포주의 재접종 효과를 관찰하기 위하여 6개월간의 결과 관찰 후 종양의 재발없이 생존한 5마리의 누드생쥐에 간암모세포주 Hep-3B를  $1 \times 10^7$ 개씩을 0.1 ml의 PBS 용액에 현탁하여 재접종한후 종괴의 성장을 관찰하였으나 1개월간의 관찰기간동안 종양의 발생은 관찰되지 않았다. 이러한 사실은 HSV-tk/GCV 유전자 치료로 종양세포가 죽을 때 숙주의 면역반응을 유도하여(27) 같은 종양세포의 재접종시 종양발생의 억제효과를 나타내는 것으로 생각되나 이에 대해서는 추사가 필요하리라고 본다.

## 결 론

인체간암세포에 레트로바이러스를 이용하여 HSV-tk 유전자를 형질도입하여 GCV에 대한 감수성의 변화여부를 관찰한 결과 in vitro 및 in vivo에서 GCV에 대한 감수성의 증가를 관찰할 수 있었다. 누드생쥐에서 bystander effect의 검증을 위해 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포와 형질도입하지 않은 간암모세포주를 혼합하여 접종한 후 GCV를 투여하였을 때 HSV-tk 유전자가 형질도입된 간암세포의 비율이 30%를 넘을 때 비교적 만족스러운 항종양효과를 관찰할 수 있었다. HSV-tk/GCV 유전자 치료로 종양의 퇴행을 보



인 누드생쥐에 간암세포의 재접종은 종양발생의 억제를 보였는데 이의 기전은 추후의 실험에서 규명되어야 할 것이다. 이상의 결과는 HSV-tk/GCV 유전자 치료법의 임상시도의 당위성을 제시하고 있다고 생각되나, HSV-tk/GCV 유전자 치료가 더욱 효과적으로 시행되기 위해서는 gap junction의 발현 정도와 HSV-tk/GCV 유전자 치료사의 효과와의 상호관계 규명에 대한 연구가 또한 필요하다.

### 참 고 문 헌

1. Lotze MT, Flickinger JC, Carr BI. Hepatobiliary neoplasms. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Principles and practise of oncology. 4th edit, Philadelphia; JB Lippincott. 1993; 883-914.
2. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
3. 김주향, 문유선, 신동환, 송재진, 공수정, 라선영, 김수경, 정숙정, 정현철, 노재경, 민진식, 김병수: 안체위암 세포주에 retroviral vector를 이용한 p53 종양억제 유전자의 형질도입에 관한 연구. *대한암학회지* 1997; 29: 754-764.
4. Oldfield, EH, Culver KW, Ram Z, Blease RM. A clinical protocol: Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous gancyclovir. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 39-69.
5. Moolten FL, Well JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 297-300.
6. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blease RM, Oldfield EH. In situ retroviral mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1993; 53: 83-88.
7. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, DeVroom HL, Otto E, Ling Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blease RM, Oldfield EH. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nature Med* 1997; 3: 1354-1361.
8. Zwiebel JA, Su N, Macpherson A, Davis T, Ojeifo J. The gene therapy of cancer: Transgenic immunotherapy. *Semin Hematol* 1993; 30: 119-128.
9. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA. Specific inhibition of k-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991; 51: 1744-1748.
10. Mullen CA, Kilstrup M, Blease RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative seleting system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 33-37.
11. Borrelli ER, Heyman MH, Evans RM. Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7572-7576.
12. Ezzedine ZT, Martuza RL, Platica D, Short MP, Marlick A, Choi B, Breakfield XO. Seletive killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* 1991; 3: 608-614.
13. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-1552.
14. Davis L, Kuehl M, Battey J. Basic methods in molecular biology. 2nd ed, Norwalk: Appleton & Lange, 1994.
15. Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Bio Techniques* 1989; 7: 980-982.
16. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2895-2902.
17. Kozak SL, Kabat D. Ping-pong amplification of a retroviral vector achieves high-level gene expression: Human growth hormone production. *J Virol* 1990; 64: 3500-3508.
18. Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983; 33: 153-159.
19. Kriegler M. Gene transfer and expression. A laboratory manual. New York: Stockton press, 1990.
20. McKnight SL. The nucleotide sequence and transcript of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucl Acids Res* 1980; 8: 5949-5964.
21. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell B. Expression of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: An assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936-942.
22. Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, Finocchiaro G. The "Bystander

- effect": Association of U-87 cell death with ganciclovir mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 763-772.
23. Bi WL, parysek LM, Stambrook PJ. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV-tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 725-731.
  24. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53: 5274-5283.
  25. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of antitumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4348-4352.
  26. 노재경, 공수정, 김주향, 엄효동, 유내춘, 송재진, 조재용, 라선영, 정현철, 민진식, 김병수. Retroviral vector를 이용한 Herpes simplex virus-Thymidine kinase 유전자의 도입과 발현이 인체 위암세포주의 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향. *대한암학회지* 1998; 30: 20-30.
  27. Moolten FL. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 279-287.