

## Retroviral Vector를 이용한 Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase 유전자의 도입과 발현이 인체 위암세포주의 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>외과학교실, <sup>3</sup>연세암센터, <sup>4</sup>연세 암연구소

노재경<sup>1,3,4</sup> · 공수정<sup>1,3,4</sup> · 김주형<sup>1,3,4</sup> · 임효동<sup>4</sup>  
유내춘<sup>1,3,4</sup> · 송재진<sup>4</sup> · 조재용<sup>1,3,4</sup> · 라선영<sup>1,3,4</sup>  
정현철<sup>1,3,4</sup> · 민진식<sup>2,3,4</sup> · 김병수<sup>3,4</sup>

### Gene Transfer Effects of Thymidine Kinase Gene of Herpes Simplex Type I on Ganciclovir Cytotoxicity in Gastric Cancer Cell Line

Jae Kyung Roh, M.D.<sup>1,3,4</sup>, Soo Jung Gong, M.D.<sup>1,3,4</sup>, Joo Hang Kim, M.D.<sup>1,3,4</sup>  
Hyo Dong Uhm, M.D.<sup>4</sup>, Nae Chun Yoo, M.D.<sup>1,3,4</sup>, Jae Jin Song, Ph.D.<sup>4</sup>  
Jae Yong Cho, M.D.<sup>1,3,4</sup>, Sun Young Rha, M.D.<sup>1,3,4</sup>, Hyun Cheol Chung, M.D.<sup>1,3,4</sup>  
Jin Sik Min, M.D.<sup>2,3,4</sup> and Byung Soo Kim, M.D.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, <sup>2</sup>Department of General Surgery,  
Yonsei University College of Medicine <sup>3</sup>Yonsei Cancer Center,  
<sup>4</sup>Institute for Cancer Research

**Purpose:** Gastric cancer is the most common malignancy in Korea. Although treatment such as surgery, chemotherapy, and immunotherapy has greatly improved, the mortality rate of gastric cancer is still high. A new therapeutic trial is necessary to improve the cure rate of gastric cancer. Therefore we investigated the pre-clinical significance of HSV-tk gene therapy using retroviral vector for gastric cancer cell lines.

**Materials and Methods:** LNC/HSV-tk retroviral vector and PA317/LNC/HSV-tk producer cell line were constructed. HSV-tk gene transduction and expression were detected by PCR. An in vitro ganciclovir(GCV) sensitivity test was performed by MTT assay. To evaluate in vivo GCV sensitivity, GCV was intraperitoneally injected after tumor formation in the nude mice. Bystander effect was observed in vitro MTT assay using YCC-S-2 cell line and in vivo using N87 and YCC-S-2 cell lines.

**Results:** The in vitro GCV sensitivity test showed that the growth inhibition was 30~32% with 0.5 uM GCV and 52~77% with 500 uM GCV in the HSV-tk transduced cell line in comparison with 0~5% with 0.5 and 500 uM GCV in the parent cell line. The in vivo GCV administration showed that the tumors induced by HSV-tk transduced N87 cell line and YCC-S-2 cell line decreased completely, while the tumors with the parent cell

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

본 연구는 1995년도 한국과학재단 특정연구(95-0403-16-01-2) 연구비의 지원에 의한 결과임.

접수일 : 1997년 10월 11일, 게재승인일 : 1997년 12월 26일

lines continued to grow in nude mice. We observed no tumor cells in tissue specimen of the tumor induced by the N87/HSV-tk cell line after GCV administration. In vitro and in vivo bystander effects were observed in HSV-tk/GCV system due to the resultant cell death exceeding the proportion of HSV-tk transduced cells in the mixtures of HSV-tk transduced and parent cells.

**Conclusion:** HSV-tk transduced gastric cancer cell lines showed sensitivity to GCV and a bystander effect was observed. These results suggested that HSV-tk/GCV system should be evaluated in the clinical settings.

**Key Words:** Gastric cancer, Gene therapy, Retroviral vector, HSV-tk gene, Ganciclovir

## 서 론

유전자 치료는 DNA 재결합 방법(recombinant DNA technology)을 이용하여 새로운 기능을 가진 유전자를 형질도입하거나 결함을 가진 유전자를 대체하여 질환을 치료하는 방법이다(1,2). 암환자를 대상으로한 유전자 치료의 방법으로는, 면역 감시체계에 결함이 있는 암환자에서 자가세포면역 항진을 목적으로 IL-2, TNF 등의 사이토카인을 이용하거나, 비활성화된 종양 억제 유전자의 활성화를 목적으로한 정상형 종양억제 유전자의 형질도입 및 antisense를 이용한 암유전자의 억제 그리고 약제 감수성 증가 유전자의 사용 등이 있다(3,4). 이중 약제 감수성 증가를 목적으로 하는 방법은 herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) 유전자를 형질도입한 후 유전적으로 조작된 세포에 독성을 나타내는 전약제(prodrug)인 ganciclovir(GCV)(5,6) 또는 acyclovir 등의 nucleoside 유도체를 투여하는 방법으로 nucleoside 유도체가 인산화되어 DNA에 삽입됨으로써 DNA 합성이 중지되어 세포사망이 일어나게 된다. HSV-tk 유전자를 이용한 유전자 치료는 형질도입된 유전자가 표현될 때까지 비교적 짧은 시간을 요하고, 암세포 모두에 유전자 조작을 하지 않아도 주변의 암세포를 효과적으로 제거할 수 있는 방관자 효과(bystander effect), 그리고 유전자 형질도입 후 전약제에 노출되어 죽은 암세포에 의한 강한

면역 반응 유발 등의 장점(7,8)을 가지고 있어 1991년 난소암 치료(9)에 처음 승인된 이후 현재 뇌종양과 악성흉막 증피종 등에서 임상 시도가 이루어지고 있다(10,11).

한편, 우리나라에서 가장 많은 발생률을 보이는 위암은 수술 및 항암제 치료 등 기존의 치료법의 발전에도 불구하고 높은 사망율을 보이고 있다. 이에 저자들은 인체 위암세포주를 대상으로 HSV-tk 유전자를 이용한 위암에서의 유전자 치료의 이용가능성 여부를 규명하고자 본 연구를 계획하였다.

## 연구대상 및 방법

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

Viral vector는 Miller등(12)이 개발한 LNCX vector를 이용하였는데 이는 human cytomegalovirus의 promoter와 neomycin phosphotransferase gene을 가지며 herpes virus의 생성을 억제하고 retrovirus의 titer를 높게 얻을 수 있도록 제조된 것이다. LNC/HSV-tk는 HSV-tk 유전자를 coding하고 있는 p $\Delta$ ACMVTk로부터 Hind III/Hpa I을 이용하여 1.2 kb 크기의 HSV-tk를 절단하고, 같은 제한효소를 이용하여 절단한 retroviral vector LNCX에 T4 DNA ligase를 이용하여 subcloning 하여 제조하였다(13).

2) 대상 세포주

대상위암세포주는 미국 국립암연구소에서 수립한 N87 세포주(14)와 연세암연구소에서 수립한 YCC-S-2 세포주를 이용하였으며, 이들 세포주는 가열 비활성화된 10% 우태아 혈청이 첨가된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 5% CO<sub>2</sub>의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 배양되었다. 세포주에서 RNA와 DNA는 Davis등(13)의 방법에 따라 추출하였다.

3) Packaging cell line을 이용한 PA317/LNC/HSV-tk의 제조

Miller등(15)이 개발한 amphotropic packaging cell line인 PA317 세포 5×10<sup>5</sup> 개를 직경 60 mm 배양 접시에서 10% 우태아 혈청이 함유된 5 ml의 DMEM 배양액으로 18~24시간 배양한 뒤 calcium phosphate법으로 LNC/HSV-tk의 형질도입에 사용하였다(13). Calcium phosphate법으로 LNC/HSV-tk가 형질도입된 PA317세포주는 배양기에서 48시간동안 배양된 뒤 G418(GIBCO, Gaithersberg, MD, USA)이 함유된 배양액을 이용하여 선택배양되었다.

높은 titer의 HSV-tk 유전자를 포함한 재조합 retrovirus를 산출하는 master packaging cell line을 선별하기 위해 G418을 이용하여 선택배양한 세포 배양액으로 target cell line NIH-3T3를 감염시켰다. 감염 하루전에 NIH-3T3 세포를 6-well plate의 well당 2×10<sup>4</sup> 개씩 plating하여 배양하였으며, viral supernatant를 DMEM 배양액으로 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>배로 희석하고 viral supernatant가 희석된 배양액 1 ml씩에 최종 농도 8 µg/ml의 polybrene을 첨가하여 NIH-3T3 세포에 투여하였다. 이후 30분 간격으로 천천히 dish를 흔들어 virus를 포함한 배지가 세포 전체로 균일하게 퍼지게 하면서 세포 배양기 안에서 세포를 감염시켰다. 세포를 3시간 동안 감염시킨후 2 ml의 DMEM 배양액을 첨가하여 세포를 배양하였다. 감염 48시간 후부터 G418을 함유하는 DMEM 배양액 2 ml씩을 각 well에 투여하여 배양하며 48시간마다 배지를 갈아준 12

~15일후 G418에 저항성이 있는 세포군이 관찰 되면 배양액을 제거하고 methylalcohol/methylene blue 염색용액으로 세포군을 염색한후 retrovirus 역가를 Kriegler(16)가 제안한 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{역가} = (\text{최고 희석 배수에서의 집락의 수}) \times (\text{희석 배수})$$

높은 역가의 retrovirus를 산출하는 producer cell line PA317/LNC/HSV-tk를 확인한후 그 배양액을 모아 다음의 실험에 사용하였다.

4) 위암세포에 HSV-tk 유전자의 형질도입 및 HSV-tk 유전자의 발현 조사

위암세포주를 6-well plate의 well당 2×10<sup>4</sup>개씩 분주하여 24시간 동안 배양한후 높은 역가의 retrovirus를 생산하는 PA317/LNC/HSV-tk 세포주로부터 얻어진 배양액을 투여하여 위암세포를 3항의 방법과 마찬가지로 감염시킨후 G418을 이용하여 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주를 선별 배양하였다.

재조합 retrovirus LNC/HSV-tk에 의해 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포로부터의 HSV-tk RNA 발현을 조사하기 위하여 total RNA isolation kit(Promega, WI, USA)를 이용하여 total RNA를 분리한 뒤 HSV-tk 유전자 특이 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였으며, 중합효소연쇄반응의 결과는 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

5) 위암세포주의 ganciclovir에 대한 생체의(In Vitro) 감수성 검사

위암 세포주를 대상으로한 생체의(In Vitro) ganciclovir(GCV)에 대한 감수성은 3-(4, 5-dimethyl-2-tetrazoly1)-2, 5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) 검사를 이용하였다(17). 이는 살아있는 세포에서는 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 용해성의 tetrazolium염이 불용성의 form-

azan 침전물로 전환이 되는 점을 이용하여 분광 흡도계(spectrophotometer)로 광학밀도를 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 방법이다. 방법을 약술하면, 세포성장 곡선상 지수성장기에 해당하는 위암세포주  $1 \times 10^3$  개씩을 180  $\mu$ l의 배양액에 부유하여 96 well plate의 well에 각각 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 하루동안 배양하였다. GCV(Syntex, Ins, Paly Alto, CA)를 다양한 농도로 20  $\mu$ l 생리식염수에 녹여 각각의 well에 투여하여 4일간 배양한후 MTT를 1 mg/ml 농도로 phosphate-buffered-saline(PBS; GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)에 녹여 50  $\mu$ l씩 각 well에 첨가하여 4 시간동안 추가 배양하고, 대조군의 well에는 GCV 대신 동량의 생리 식염수를 투여하였다. 그리고 나서 30  $\mu$ l 정도의 배양액이 남도록 상층액을 제거한 후 150  $\mu$ l씩 DMSO(Dimethyl sulfoxide, Sigma, U.S.A.)를 각 well에 넣고 multi-well ELISA automatic spectrometer reader(Behring ELISA Processor II, Germany)를 이용하여 570 nm 파장에서 광학밀도(색소 흡수율)를 측정한 후 대조군의 광학밀도와 비교하여 다음과 같은 공식으로 광학밀도를 평균하여 세포성장억제율을 구하였다(18).

$$\% \text{ 성장 억제율} = \left( \frac{1 - \text{실험군(GCV 처리군)의 색소 흡수율(광학밀도)}}{\text{대조군의 색소 흡수율(광학밀도)}} \right) \times 100$$

### 6) 생체내(In Vivo)에서의 GCV에 대한 감수성 검사

HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주(N87/HSV-tk, YCC-S-2/HSV-tk)와 유전자 조작을 시행하지 않은 위암모세포주(N87, YCC-S-2) 각각  $5 \times 10^5$  개씩을 0.5 ml의 PBS에 현탁하여 각각 3마리의 nude 마우스의 양측 복벽에 피하주사하였다. 피하주사 2일후부터 GCV를 50 mg/kg씩 14일간 복강내 주사하였으며 GCV 투여 2일후부터 3~4일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. 종양의 용적(tumor volume)은 Rockwell등(19)의 제안에 따

라 (종양의 단축)<sup>2</sup> × (종양의 장축) ÷ 2 의 공식으로 계산하였다.

### 7) 방관자효과 검사

위암세포주에 HSV-tk 유전자의 형질도입후 GCV 투여시의 방관자효과에 대한 검사를 위하여 YCC-S-2 전체 위암세포중 HSV-tk 유전자가 형질도입된 YCC-S-2/HSV-tk 위암세포주가 차지하는 비율을 각각 0%, 10%, 30%, 50%, 70% 그리고 100%의 비율로 혼합하여 96 well plate의 well당 총세포의 수를  $1 \times 10^3$  개로 하여 각각의 well에 분주하여 MTT 검사를 시행하였다.

또한 방관자 효과에 대한 생체내 검사를 위하여는 YCC-S-2 위암모세포주와 HSV-tk 유전자가 형질도입된 YCC-S-2 위암세포주를 50 : 50 및 80 : 20의 비율로 혼합한 뒤 총 세포수  $5 \times 10^5$  개를 각각 3마리의 nude 마우스의 복벽에 피하주사하였으며, N87 위암모세포와 N87/HSV-tk 위암세포주도 50:50 및 70:30의 비율로 혼합한 후 역시 총 세포수  $5 \times 10^5$  개를 각각 3마리의 nude 마우스의 복벽에 피하주사하였다. 피하주사 2일후부터 GCV를 50 mg/Kg씩 14일간 복강내 주사하였고 GCV 투여 2일후부터 3~4일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다.

### 8) 총 계

모든 자료는 공분산 분석(analysis of covariance)을 사용하여 검증하고 평균 ± 표준오차로 나타내었다.

## 결 과

### 1) HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포로부터 HSV-tk 유전자의 발현

재조합 retrovirus LNC/HSV-tk를 이용하여 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주 및 해당 위암모세포주에서 각각 RNA를 추출하여 HSV-tk 유전자 특이 primer를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 결과, 위암모세포주에서는 해당 DNA 분

질을 확인할 수 없었으나, HSV-tk 유전자가 형질 도입된 위암세포주에서는 HSV-tk 유전자 특이 DNA 분절의 증폭을 확인할 수 있어 유전자 형질 도입이 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2) HSV-tk 유전자의 형질도입이 위암세포주의 생체외(In Vitro) GCV 감수성에 미치는 영향

HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주(N87/HSV-tk, YCC-S-2/HSV-tk)와 그렇지 않은 위암세포주(N87, YCC-S-2)에서 GCV에 대한 감수성을 비교하였을 때 두 종류의 위암세포주 모두에서 HSV-tk 유전자가 형질도입된 경우, GCV 농도에 비례하여 감수성의 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 GCV에 대한 감수성은 위암 세포주에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. N87 위암세포주에서 HSV-TK 유전자가 형질도입된 경우 그렇지 않은 경우보다 0.5  $\mu$ M의 GCV 농도에서는 32%, 500  $\mu$ M GCV 농도에서는 77%의 성장억제가 관찰되었으며 YCC-S-2 위암세포주의 경우는 0.5  $\mu$ M 농도에서 30%, 그리고 500  $\mu$ M 농도에서는 52%의 세포성장억제 효과가 각각 관찰되었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

3) HSV-tk 유전자의 형질도입이 생체내(In Vivo) 에서 GCV 감수성에 미치는 영향

N87 위암모세포주와 N87/HSV-tk 위암세포주를 각각  $5 \times 10^5$  개씩 3마리의 nude 마우스의 양측 복

Fig. 1. RT-PCR Analysis of HSV-tk Expression

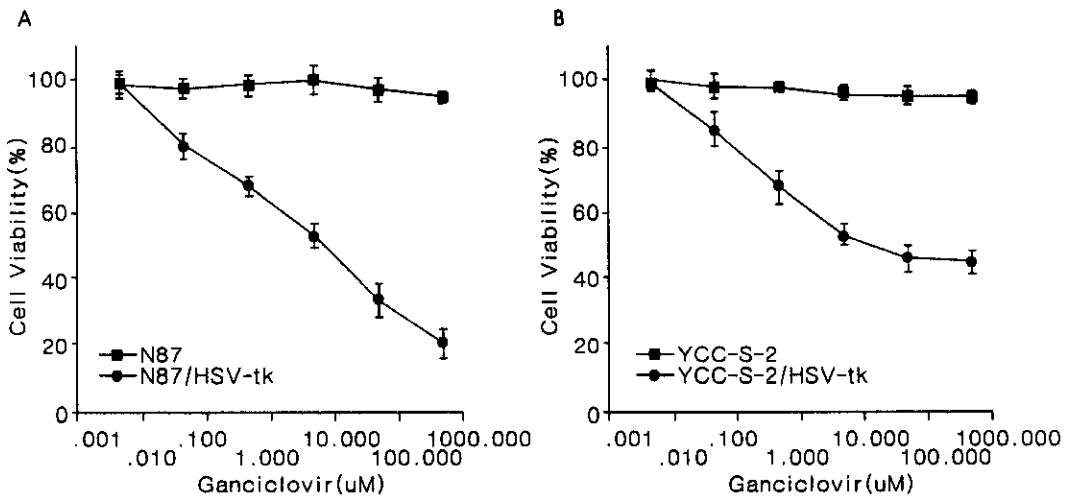


Fig. 2. Effects of Ganciclovir on Growth of N87 and N87/HSV-tk Cells(A) and YCC-S-2 and YCC-S-2/HSV-tk Cells(B).

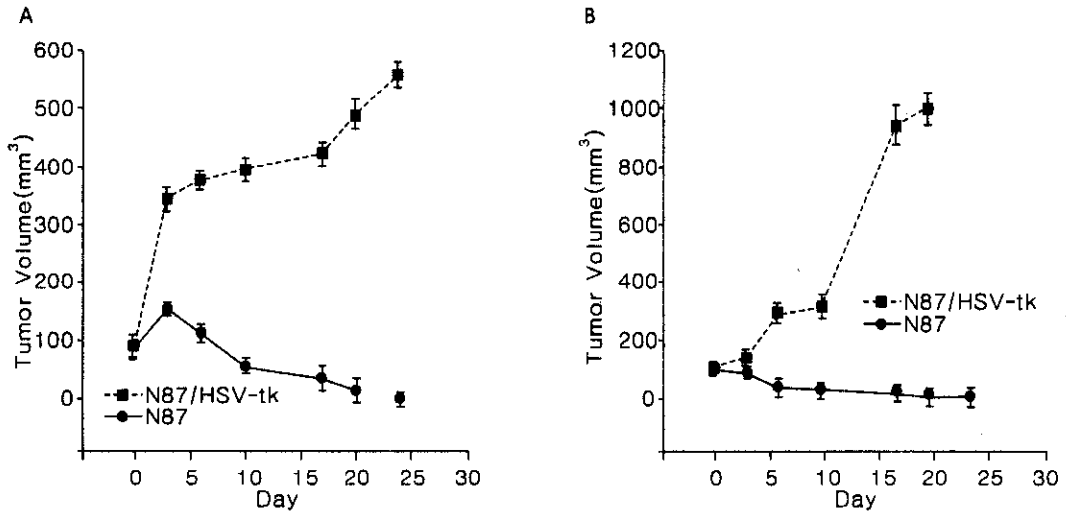


Fig. 3. Effects of Ganciclovir on Tumor Growth in Nude Mice Injected with HSV-tk Transduced and Wild-type N87 Cells(A) and YCC-S-2 Cells(B).

벽에 피하주사한 2일후부터 GCV를 50 mg/kg씩 14일간 복강내 주사하면서 종양의 크기를 측정하였다. 처음에는 양측 복벽의 종양이 함께 자라다가 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포주에 의해 유발된 종괴는 점차 크기가 감소하였으며 주사 21일째에는 완전히 소실되었는데 비하여 N87 위암세포주에 의한 종괴는 지속적인 성장을 보였다. YCC-S-2 위암세포주에서도 유사한 결과를 나타내어 HSV-tk 유전자가 형질도입된 경우 GCV 투여부터 종양의 크기가 점차 줄어들다가 2주경부터는 종양이 완전히 소실되었으며 반대편의 모세포주에 의한 종괴는 지속적인 성장을 보였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3, 4). 그리고 N87/HSV-tk 위암세포주에 의해 종양이 형성되었다가 GCV 투여후 종양이 소실된 부위의 H & E 조직검사 소견은 Fig. 5에서 보는 것처럼 피하조직 부위에서 암세포가 모두 사멸된 것을 확인할 수 있었다.

#### 4) 발관자 효과

YCC-S-2 위암세포주에서 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주와 형질도입되지 않은 위암모세포주를 함께 혼합하여 HSV-tk 유전자가 형질

도입된 세포가 전체위암세포의 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 그리고 100% 비율로 혼합되어 있을때 각 혼합비율에서 GCV 농도의 증가에 따른 세포 성장 억제여부를 관찰하였다. HSV-tk 유전자가 형질도입된 YCC-S-2/HSV-tk 세포가 100%인 경우 50%의 혼합비율인 경우와 비교시 의미있게 GCV 농도가 증가함에 따라 세포 성장이 억제됨을 알 수 있었고 YCC-S-2/HSV-tk 세포가 70% 혼합되어 있는 경우는 0%, 10%, 50%의 혼합비율과 비교시 의미있게 세포 성장이 억제됨을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 그외의 비율의 비교시는 세포성장의 억제 정도에 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 6).

한편 3마리의 nude 마우스에 N87 위암세포주와 N87/HSV-tk 위암세포주가 50 : 50, 80 : 20의 비율로 혼합된 세포를 피하주사하여 종양을 형성시킨후 GCV를 투여하였을 때 N87/HSV-tk 위암세포주가 50 : 50의 비율로 섞인 경우가 80 : 20의 경우에 비하여 종양이 느리게 성장하여 성장속도의 차이에 통계학적인 유의성이 있었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7). 그러나 어느 경우에서도 종양의 완전한 소실을 유도하지는 못하였다. YCC-S-2 위암세포주에서도 YCC-S-2 위암모세포주와 YCC-S-2/HSV-

**Fig. 4.** Effects of Ganciclovir on Tumor Growth of LNC/HSV-tk Transduced N87 Cells(A) and YCC-S-2 Cells(B). LNC/HSV-tk transduced N87 and YCC-S-2 clones were implanted into the left(L) flanks and parent N87 and YCC-S-2 cells into the right(R). The tumor formed by HSV-tk transduced gastric cancer cell lines gradually decreased in size and finally disappeared, while the parent cell lines kept growing.

**Fig. 5.** Ganciclovir Effects on N87(A) and N87/HSV-tk Cells(B)(x200). The tissue specimen from the tumor formed by N87 cells showed the aggregation of the tumor cells(A), but the disappearance of the tumor cells in subcutaneous region(arrow) was seen(B) in the specimen from the N87/HSV-tk cells.

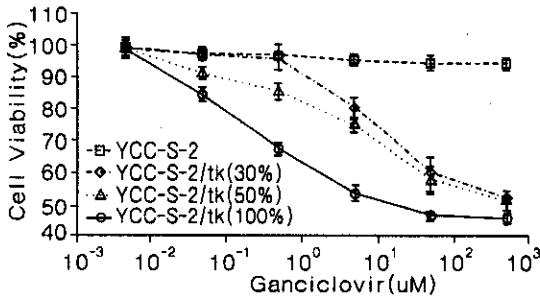


Fig. 6. In Vitro Effect of Ganciclovir Growth of the Mixtures of HSV-tk Transduced YCC-S-2 and Wild-type Cells.

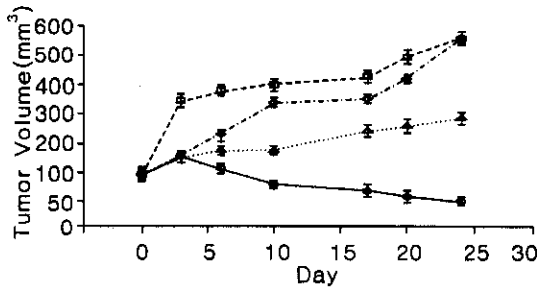


Fig. 7. Effects of Ganciclovir on Tumor Growth in Nude Mice Injected with Mixtures of HSV-tk Transduced and Wild-type N87 Cells. Mixtures  $5 \times 10^6$  cells consisting 0%, 20%, 50% and 100% gene modified cells were injected into each flank of nude mice. GCV(50 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 2 weeks since 2 days after tumor cell implantation.

tk 위암세포주를 50 : 50, 70 : 30의 비율로 혼합하여 피하주사하는 같은 실험을 시행하였는데, 여기서는 두 군 사이에서 종양의 성장속도 차이에 통계학적인 유의성을 발견하지 못하였다(Fig. 8).

## 고 찰

위암은 우리나라에서 그 유병률이 가장 높고, 최근 수술이나 항암제 치료 및 면역치료 등에 많은 발전이 있었지만 아직도 복막전이나 간전이로 인해 사망률이 높은 질환이다. 이에 본 연구에서는 HSV-tk 유전자를 이용한 위암 유전자의 치료

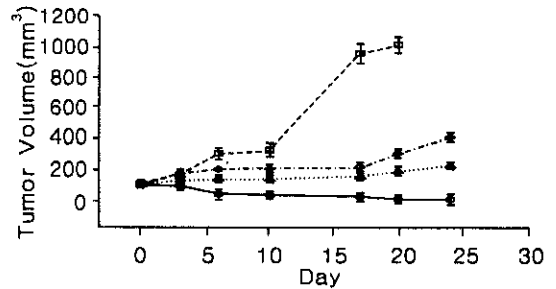


Fig. 8. Effects of Ganciclovir on Tumor Growth in Nude Mice Injected with Mixtures of HSV-tk Transduced and Wild-type YCC-S-2 Cells. Mixtures  $5 \times 10^6$  cells consisting 0%, 30%, 50% and 100% gene modified cells were injected into each flank of nude mice. GCV(50 mg/kg, i.p.) was administered twice daily for 2 weeks since 2 days after tumor cell implantation.

시 효용성 여부를 검증하기 위하여 위암세포주(N87, YCC-S-2)에 HSV-tk 유전자를 형질도입한 후 GCV에 대한 감수성의 변화 여부를 관찰하였다. MTT 검사를 통한 생체의 실험을 보면, N87 위암세포주에서 HSV-tk 유전자를 형질도입한 경우 위암세포에 비해 GCV 투여로 현저한 세포성장억제효과를 나타내었으며, GCV 농도가 0.005  $\mu\text{M}$ 에서 500  $\mu\text{M}$ 로 증가할 때 용량 의존적으로 성장 억제를 보였다. 또한 YCC-S-2 위암세포주에서도 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포주에서 GCV 농도에 비례하여 성장 억제를 보여주었다. Yoshida 등(20)도 본 연구와 유사한 연구 결과를 보고한 바 있는데 이같은 연구결과들을 종합한다면 HSV-tk 유전자를 이용한 유전자 치료시 GCV의 투여 용량이 증가할수록 더욱 효과적으로 암세포를 죽일 수 있을 것으로 예상되나, 실제 사람에게 적용시에는 GCV 투여에 따른 백혈구 감소증 또는 혈소판 감소증 및 무정자증과 혈청 크레아티닌치의 상승 등의 부작용이 따라올 수 있어(5) GCV의 용량 증가에는 제한점이 있을 것으로 생각된다.

동물 실험으로 nude 마우스에서 HSV-tk 유전자가 형질도입된 N87 위암세포주에 의해 유발된 종양은 GCV 투여에도 불구하고 처음에는 종양크기



가 약간 증가하였으나 점차 종양 크기가 감소하고 21일째 종양이 완전히 소실됨이 보였으며, YCC-S-2 위암세포주에서도 2주경에 종양의 완전 소실이 보였다. Caruso등(21)은 육안적 간전이기가 있는 rat의 종양부위에 HSV-tk 유전자를 생산하는 PA317 세포주를 직접 주사한후 GCV를 투여하여 종양이 소실된 부위를 조직검사하여 염증세포에 의한 섬유화 반응으로 둘러싸인 종양의 괴사를 관찰하였는데 본 연구에서도 HSV-tk 유전자가 형질도입된 N87/HSV-tk 위암세포주로 종양을 형성시킨후 GCV 투여후 소실된 종양부위에 대해 H & E 염색을 하여 관찰한 결과 피하조직내 종양 세포의 괴사를 관찰할 수 있었다. 이러한 연구의 결과로 생체내 실험에서도 HSV-tk 유전자의 형질도입후 GCV의 투여로 종양의 퇴행을 유발할 수 있음을 알 수 있었다.

레트로바이러스 운반체(22~24)는 유전자 치료에 널리 사용되는 방법으로 host genome에 안정적으로 유전자를 삽입할 수 있고 삽입된 유전자가 오랫동안 발현 가능한 장점이 있어 Caruso등(21)이 전이된 간암에서 HSV-tk 유전자를 표현하는 레트로바이러스 입자를 종양에 직접 주입하고 GCV를 투여한 후 종양이 소실됨을 보고하는 등 HSV-tk 유전자의 형질도입시 암세포가 GCV에 감수성을 갖게 되는 생체내 및 생체외 실험결과들이 보고되고 있다(25,26). 그러나 레트로바이러스 운반체에 의한 유전자 치료시 그 특성상 활발히 분열하는 세포에만 쉽게 형질도입이 가능하여 주위의 분열하지 않는 정상세포 사이에 있는 암세포에는 형질도입의 한계가 있다는 생각으로 Culver등(27)은 쥐의 뇌종양에 직접 HSV-tk 유전자를 포함하는 레트로바이러스의 producer cell line을 주입하여 종양내에서 지속적으로 레트로바이러스 입자를 분비하게 하고 GCV를 투여하여 종양이 소실됨을 보고하였다.

한편 본 연구에서도 retrovirus를 이용하여 위암세포에 HSV-tk 유전자의 형질도입후 HSV-tk 특이 primer 쌍을 이용하여 중합효소연쇄반응으로 HSV-tk 유전자의 형질도입 여부를 확인하였으나

retrovirus를 이용한 유전자의 형질도입은 그 효율성이 낮아 종양억제 유전자나 사이토카인 등을 이용한 암유전자 치료시 레트로바이러스를 이용하는 경우 형질도입의 효율을 향상시킬 수 있는 방안이 중요한 과제로 제기되고 있다. 이에 대한 방안으로 화학적 매개체 또는 packaging cell line을 달리하여 레트로바이러스의 효율성을 높이려는 방법이나 아데노바이러스를 이용한 형질도입 방법, 바이러스를 이용하지 않은 방법 등이 개발되고 있고 임상시험 단계에 있으며(28~30) Ido등(31)은 간암에서  $\alpha$ -FP의 promoter를 가지는 retroviral vector를 이용할 때 간암세포주에 대한 유전자의 형질도입이 더욱 효과적임을 보고하였다. 그런데 HSV-tk 유전자를 이용한 유전자 치료시에는 유전자가 전체 암세포에 형질도입되지 않았더라도 GCV 투여로 형질도입되지 않은 암세포까지 함께 죽이는 방관자 효과가 있다(32). 이는 gap junction을 통해 인산화된 GCV 유도체가 주변세포로 전달되거나 HSV-tk로 파괴된 세포 즉 apoptotic vesicle의 조각이 주위 암세포에 의해 잡아먹혀 결국 암세포의 파괴를 유발하는 것으로 생각된다(32,33). Freeman등(33)은 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포가 10%만 있어도 다른 주위의 암세포를 모두 죽일 수 있다고 하였다. 본 연구의 in vitro 실험에서는 HSV-tk 유전자가 형질도입된 YCC-S-2 위암세포주를 전체 YCC-S-2 위암모세포주에 대해 0%, 10%, 30%, 50%, 70% 그리고 100%의 비율로 혼합하였을때, 각각의 혼합비율에서 GCV의 투여 농도가 증가할수록 그리고 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포의 혼합비율이 증가할수록 산술적인 비율 이상으로 세포의 증식이 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 한편 동물 실험에서 방관자 효과를 통한 유전자 치료의 가능성을 확인하고자 nude 마우스에 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주(N87/HSV-tk, YCC-S-2/HSV-tk)와 위암모세포주(N87, YCC-S-2)를 혼합하여 종양을 형성시킨후 GCV 투여의 효과를 관찰하였다. 본 연구에서는 N87/HSV-tk 위암세포주의 비율이 각각 50%와 20%가 되게하여

종양을 유발한 경우 GCV 투여로 종양이 완전히 소실되지는 않았으며, 다만 N87/HSV-tk 위암세포주의 혼합 비율이 높을수록 종양의 성장 속도가 유의하게 둔화됨을 알 수 있었고, YCC-S-2의 경우에는 50%와 30%의 비율로 혼합하였을 때 의미 있는 차이를 발견할 수 없어 세포주에 따라 감수성 정도에 차이가 있다고 추측되었다. 따라서 HSV-tk 유전자를 이용한 유전자 치료가 효과적으로 임상에 이용되기 위해서는 레트로바이러스를 이용한 유전자 치료에서 유전자 형질도입의 효율 개선이 필요할 것으로 생각된다. 또한 murine sarcoma를 대상으로 HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포의 비율이 10%만 되어도 전체 종양세포를 죽일 수 있다는 Culver등(27)의 보고와 차이가 있어, 이것이 면역 체계를 활성화할 때 방관자 효과가 증가됨이 보고된바 사용한 nude mouse가 면역 결핍 상태의 동물이기 효과적인 방관자 효과가 일어나지 않는 것인지 또는 실험 대상 세포주의 차이에 원인하는 결과인지, 혹은 그밖의 종양 주변환경의 차이에 따른 것인지 추후의 관찰이 필요하리라 생각된다.

## 결 론

레트로바이러스를 이용하여 HSV-tk 유전자를 위암세포주에 형질도입하면 위암세포주의 GCV에 대한 감수성이 현저히 증가하여 세포 성장의 억제 또는 사멸을 유도할 수 있었는데 nude 마우스를 대상으로 실험한 결과 GCV 투여로 HSV-tk 유전자가 형질도입된 위암세포주에 의해 형성된 종괴의 퇴행은 가능하였으나, HSV-tk 유전자가 형질도입된 세포주와 형질도입되지 않은 위암모 세포주를 혼합하여 투여한 경우에는 종양의 완전 퇴행을 유발하지는 못하였다. 따라서 이를 실제 위암 치료의 임상에 이용하려면 유전자 형질도입의 효율 개선이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. DeVita VT, Hellmann S, Rosenberg SA, eds. Cancer:

Principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1996.

2. Ledley FD. Somatic gene therapy for human disease: Background and prospects. *J Pedia* 1987; 110(1): 1-8.

3. Culver KW, Vickers TM, Lamsam JL, Walling HW, Seregina T. Gene therapy for solid tumors. *Br Med Bull* 1995; 51(1): 192-203.

4. Whartenby KA, Abboud CN, Marrogi AJ, Ramesh R, Freeman SM. Biology of disease. The biology of cancer gene therapy. *Lab invest* 1995; 72(2): 131-145.

5. Crumacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996; 335: 721-729.

6. Oliver S, Bublely G, Crumacker CS. Inhibition of HSV-transformed murine cells by nucleoside analogs, 2'-NDG and 2'-nor-cGMP: Mechanisms of inhibition and reversal by exogenous nucleosides. *Virology* 1985; 145: 84-93.

7. Moolten FL. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1(4): 279-287.

8. Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Sem Oncol* 1996; 23(1): 31-45.

9. Freeman SM, McCune C, Angel C, Abraham GN, Abboud CN. Treatment of ovarian cancer using HSV-tk gene-modified vaccine-regulatory issues. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 342-349.

10. Clinical protocol: Gene therapy for the treatment of brain tumors using intratumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther* 1993; 4:39-69.

11. Clinical protocol: HSV-tk gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 291-292.

12. Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotech* 1989; 7(9): 980-990.

13. Davis L, Kudhl M, Battey J, eds. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994.

14. Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss Jr DP, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, Bang YJ, Kim JP, Gazdar AF. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 2773-2780.

15. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2895-1902.

16. Kriegler M. Gene transfer and expression. A labora-

- tory manual. New York: Stockton Press, 1990.
17. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye(MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; 56: 279-285.
  18. Osaki T, Tanio Y, Tachibana I, Hosoe S, Kumagai T, Kawase I, Oikawa S, Kishimoto T. Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Res* 1994; 54: 5258-5261.
  19. Rockwell SC, Kallmann RF, Fajardo LF. Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative. *J Natl Cancer Inst.* 1972; 49: 735-747.
  20. Yoshida K, Kawami H, Yamaguchi Y, Kuniyasu H, Nishiyama M, Hirai T, Yanagihara K, Tahara E, Toge T. Retrovirally transmitted gene therapy for gastric carcinoma using herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer* 1995; 75: 1467-1471.
  21. Caruso M, Panis Y, Gagandep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(15): 7024-7028.
  22. Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1994; 1(1): 51-64.
  23. Vile RG, Russell SJ. Retroviruses as vectors. *Br Med Bull* 1995; 51(1): 12-30.
  24. Salmons B, Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 129-141.
  25. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prostatic cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; 46: 5276-5281.
  26. Moolten FL, Wells JM. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 297-300.
  27. 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.
  28. Chuck AS1, Palsson BO. Consistent and high rates of gene transfer can be obtained using flow-through transduction over a wide range of retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 743-750.
  29. Kremer EJ, Perricaudet M. Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Br Med Bull* 1995; 51(1): 31-44.
  30. Schofield JP, Caskey CT. Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull* 1995; 51(1): 56-71.
  31. Ido A, Nakata K, Kato Y, Nakao K, Murata K, Fujita M, Ishii N, Tamaoki T, Shiku H, Nagataki S. Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human  $\alpha$ -fetoprotein gene producer. *Cancer Res* 1995; 55: 3105-3109.
  32. 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: 725-732.
  33. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packmann 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.