

## Retroviral Vector를 이용한 인체 간암세포주로의 Interleukin-2 유전자 형질도입의 효과

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>외과학교실, <sup>3</sup>해부병리학교실,  
<sup>4</sup>연세암센터, <sup>5</sup>연세 암연구소

공수정<sup>1,4,5</sup> · 유내춘<sup>1,4,5</sup> · 김주항<sup>1,4,5</sup> · 신동환<sup>3</sup> · 엄효동<sup>5</sup>  
정숙정<sup>5</sup> · 조재용<sup>1,4,5</sup> · 라선영<sup>1,4,5</sup> · 김연수<sup>5</sup>  
정현철<sup>1,4,5</sup> · 노재경<sup>1,4,5</sup> · 민진식<sup>2,4,5</sup> · 김병수<sup>4,5</sup>

### Effects of Interleukin-2 Transduction into the Human Hepatoma Cell Lines Using Retroviral Vector

Soo Jung Gong, M.D.<sup>1,4,5</sup>, Nae Chun Yoo, M.D.<sup>1,4,5</sup>, Joo Hang Kim, M.D.<sup>1,4,5</sup>  
Dong Hwan Shin, M.D.<sup>3</sup>, Hyo Dong Uhm, M.D.<sup>5</sup>, Sook Jung Jeong, Ph.D.<sup>5</sup>  
Jae Yong Cho, M.D.<sup>1,4,5</sup>, Sun Young Rha, M.D.<sup>1,4,5</sup>, Yeon Soo Kim, Ph.D.<sup>5</sup>  
Hyun Cheol Chung, M.D.<sup>1,4,5</sup>, Jae Kyung Roh, M.D.<sup>1,4,5</sup>  
Jin Sik Min, M.D.<sup>2,4,5</sup> and Byung Soo Kim, M.D.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, <sup>2</sup>Department of General Surgery,  
<sup>3</sup>Department of Pathology, Yonsei University, College of Medicine  
<sup>4</sup>Yonsei Cancer Center, <sup>5</sup>Yonsei Institute for Cancer Research

**Purpose:** We compared the differences between parent hepatoma cell lines and interleukin-2(IL-2) transduced hepatoma cell lines using N<sub>2</sub>A/IL-2 and LNC/IL-2 retrovirus with regards to in vitro sensitivity to peripheral blood monocytes and in vivo tumorigenic activity.

**Materials and Methods:** Retroviral vector and producer cell line were constructed and IL-2 gene was transduced into the human hepatoma cell lines(SK-Hep1, Hep-G2, Hep-3B). IL-2 secretion after IL-2 transduction was measured by ELISA. MTT assay for in vitro sensitivity to peripheral blood monocytes was performed and the tumorigenic activity was observed in BALB/c mice and nude mice.

**Results:** IL-2 secretion was 186 pg/10<sup>6</sup> cells/24 hrs in SK-Hep1 cell line and was 147 pg/10<sup>6</sup> cells/24 hrs in Hep-3B cell line with N<sub>2</sub>A/IL-2 retroviral vector and was 55,000 pg/10<sup>6</sup> cells/24 hrs with LNC/IL-2 retroviral vector. In vitro sensitivity to peripheral blood monocytes was increased by 163.8~254% in IL-2 transduced hepatoma cell lines(Hep-3B/N<sub>2</sub>A/IL-2, Hep-G2/N<sub>2</sub>A/IL-2) compared to those of the parent cell lines. The tumorigenicity was observed in 1 of 3 BALB/c mice and all 3 nude mice. Simultaneous injection of 1 × 10<sup>7</sup> cells of the parent cell line(Hep-3B) into the right flank and IL-2 transduced

cell line(Hep-3B/LNC/IL-2) into the left flank of the three BALB/c mice and of  $5 \times 10^5$  cells for the three nude mice resulted in a complete regression of the IL-2 modified tumor cell line(Hep-3B/LNC/IL-2) in 3 weeks and the parent cell line(Hep-3B) in 5 weeks. But, after the injection of  $1.5 \times 10^7$  cells for other five nude mice, the tumor of the IL-2 transduced hepatoma cell line(Hep-3B/LNC/IL-2) was gradually disappeared, and the tumor of the parent hepatoma cell line(Hep-3B) was initially decreased and then gradually regrew 20 days later.

**Conclusion:** IL-2 transduced hepatoma cell lines secreting IL-2 became more sensitive to peripheral blood monocytes and resulted in the increased antigenicity to the tumors formed by IL-2 transduced hepatoma cell line and parent cell line, and finally resulted in the regression of the tumors in experimental animals.

**Key Words:** Interleukin-2, Hepatoma cell line, Tumor regression

## 서 론

미국에서 1990년에 처음으로 인간을 대상으로 한 유전자 치료가 시도된 이래 미국의 FDA(food and drug administration) 또는 RAC(recombinant DNA advisory committee)에서 승인한 암유전자 치료에 관한 clinical protocol은 1996년 1월 현재, 117개에 이르고 있으며 이러한 숫자는 지속적으로 증가될 전망이다(1~3). 암유전자 치료에 관한 117개의 clinical protocol 중 gene transfer의 방법으로 retroviral vector를 이용하는 경우는 81개로 오늘날 retroviral vector는 암의 유전자 치료시에 gene transfer 방법으로 가장 많이 이용되고 있는 system이며, 유전자 치료시의 대상유전자로는 IL-2, GM-CSF 등 면역 반응을 증대할 수 있는 cytokine 유전자를 이용하는 경우가 51개로 유전자 치료의 주된 방향을 이루고 있다(3).

이미 형성된 암은 면역감시체계를 벗어나 있다 하여도 자가세포면역을 항진시킴으로 암세포를 제거할 수 있다는 이론(4)하에 interleukin-2(IL-2) 등의 cytokine을 이용한 치료들이 시도되고 있다. 사람에서의 IL-2 투여는 진행성 악성흑색종 또는 신세포암 환자의 15~30% 정도에서 치료효과를 보이고 있지만(5~8) 이때에 사용된 고용량의

IL-2는 capillary leak syndrome, severe hypotension, 신부전, 간손상 그리고 pulmonary insufficiency 등과 같은 부작용이 문제점으로 수반되고 있다(9~12). 이런 이유로 저용량의 IL-2 및 continuous infusion에 의한 투여가 시도되기도 하였는데, 이는 부작용이 감소되기는 하나 치료효과가 떨어지는 문제점이 있다(13~18). 이러한 문제점을 극복하기 위한 수단으로 IL-2 유전자를 암세포에 형질도입하여 암세포에 대한 면역반응을 증대하는 방안이 제시되고 있다.

이에 본 연구에서는, IL-2 유전자가 형질도입된 종양세포를 종양백신으로 환자에게 다시 투여할 때의 치료효과 규명을 위한 전임상연구로, retroviral vector를 이용하여 간암세포주에 IL-2 유전자를 형질도입한 후 in vitro에서 종양세포의 말초혈액 단핵구에 대한 감수성의 변화 및 실험동물에서 종양의 퇴행여부 등을 관찰하여 보고하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1) 대상세포주 및 배양

ATCC(American Type Culture Collection)로부터 SK-Hep1, Hep-G2 및 Hep-3B 간암세포주를 구입하여, 이들을 가열 비활성화(56°C, 30분)시킨 10% 우태아혈청(GIBCO, NY, U.S.A.)이 함유된 RPMI

1640 배지(GIBCO, NY, U.S.A.)를 배양액으로 하여 streptomycin(100 µg/mL; GIBCO, NY, U.S.A.)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>의 존재하에 37°C 항온배양기에서 배양하였다(19).

## 2) 레트로바이러스 운반체 및 producer cell line의 제조

IL-2 유전자와 Neo<sup>R</sup> 유전자를 포함하고 있는 N2A/IL-2 및 LNC/IL-2(20) 레트로바이러스 운반체는 Molony murine leukemia virus의 gag, pol, env 유전자 대신 인간재조합 IL-2 유전자와 선택표지 유전자(selectable marker gene)로써 neomycin에 대한 내성을 갖게하는 neomycin phosphotransferase 유전자를 삽입하여 재조합한 것이다(21). Neomycin phosphotransferase 유전자는 유핵세포(eukaryotic cell)에 독성을 나타내는 neomycin 유사물질인 G418(GIBCO, NY, U.S.A.)을 비활성화시키는 작용을 하며, 본유전자의 형질도입은 세포의 표현형과 기능에 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다(22). 이러한 특성으로 retroviral vector를 이용하여 IL-2 유전자의 형질도입이 이루어진 세포주는 G418이 함유된 배양액으로 선별배양이 가능하게 된다. 포장세포주(packaging cell line)로의 IL-2 유전자의 형질도입은 PA317 amphotropic packaging cell line 5 × 10<sup>5</sup>개를 직경 60 mm 배양접시에서 10% 우태아 혈청이 함유된 5 mL의 DMEM배양액으로 18~24시간 배양한 뒤 calcium phosphate법을 이용하였다(23~24). Calcium phosphate법으로 IL-2 유전자가 형질도입된 PA317세포주를 배양기에서 48시간동안 배양한 뒤 G418이 함유된 배양액을 이용하여 N2A/IL-2 및 LNC/IL-2 retrovirus를 생성하는 producer cell line을 선택배양하였다.

## 3) 인체간암세포주로의 IL-2 유전자의 형질도입

실험대상 인체간암세포주는 25 mL 세포배양 플라스크에서 60~70%의 confluency로 자란 상태에서 PA317/N2A/IL-2 또는 PA317/LNC/IL-2 세포주의 배양시에 채취한 retrovirus 함유배양액을 대상

세포 배양플라스크에 넣어 감염을 시킨 48시간 후부터 G418으로 2주간 선택배양하였다.

## 4) IL-2유전자가 형질도입된 간암세포주의 IL-2 생산량 측정

IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주와 형질도입되지 않은 간암세포주를 24 well 세포배양용기에 10% 우태아혈청이 포함된 배지 1 mL당 1 × 10<sup>5</sup>개의 세포를 분주한 후 24시간동안 배양하였다. 세포배양 24시간후 생산되는 IL-2의 정량은 Cytoscreen<sup>TM</sup> Human IL-2(hIL-2) ELISA Kit(Bioscience International, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

## 5) 말초혈액 단핵구에 대한 간암세포주의 감수성 검사

간암세포주의 말초혈액 단핵구에 대한 감수성 변화는 유전자 조작을 시행하지 않은 간암세포주(Hep-G2, Hep-3B)와 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주를 사용하여 4시간 및 18시간 <sup>51</sup>Cr방출법으로 %세포독성(% cytotoxicity)을 측정하였다(25). 방법을 약술하면 주효세포(effector cell)인 말초혈액단핵세포 및 표적세포를 trypan blue색소배제법으로 검사하여 살아있는 세포가 95%이상임을 확인한 후 10<sup>4</sup>개의 표적세포에 0.01 mCi/mL의 Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (New England Nuclear, MA, U.S.A.) 10 mL(100 µCi)를 첨가하여 37°C 수조에서 1시간 30분동안 표지화(labeling)시킨 후 3회 세척하였다. 주효세포는 실험시마다 정상성인의 정맥혈을 채취하여 RPMI 1640(Hazelton Biologics Inc., PA, U.S.A) 세포배양용배지로 1:1로 희석시킨 후, 1:1비율의 ficoll-hypaque에 의한 비중변화도 원침법(density gradient centrifugation, 500 g, 30분)으로 단핵구를 분리하여 세포배양용 배지로 3회 세척하였다. 그 후 주효세포:표적세포(effector cell[E]:target cell[T]) 비를 각각 12.5:1, 25:1이 되도록 주효세포와 10<sup>4</sup>개의 표적세포를 배양액에 넣어 최종부피를 100 µL로 맞추고 96 well round bottomed microtiter plate(Corning, NY, U.S.A)에 함께 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 4시간과 18시간 배양한 후 400 g에서 원심분리하여 상

층액 0.05 mL을 채취하여 gamma counter(Packard Instrument Inc., IL, U.S.A)로 방사능량을 측정하였다. 이때 자연방출(spontaneous release)을 측정하기 위해서는 주효세포가 첨가되지 않은 배양액만을 사용하였고 최대방출(maximal release)을 유발하기 위해서 0.25% Tritom X-100(Sigma Chemical Co., MO, U.S.A)을 사용하였으며 자연방출이 15% 이상인 경우는 결과에서 제외하였다. 세포 독성능의 백분율(% cytotoxicity)은 다음의 공식으로 계산하였으며 모든 실험은 각 검체당 3회 중복시행하여 그 평균값을 취하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release-spontaneous release}}{\text{maximal release-spontaneous release}} \times 100$$

### 6) 실험동물에서 간암세포주에 의한 종양형성

IL-2 유전자의 형질도입시 간암세포주의 종양형성능의 변화를 관찰하기 위하여 먼저 유전자 조작을 하지 않은 간암모세포주(Hep-3B)  $1.5 \times 10^7$  개씩을 각각 3마리의 BALB/c 마우스와 nude 마우스의 복벽에 피하주사하여 종양형성여부를 관찰하였다. 그후 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자를 형질도입한 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)를 각각  $1 \times 10^7$  개씩 생리식염수에 현탁하여 같은날 3마리의 BALB/c 마우스의 좌우의 복벽에 피하주사하여 그 변화를 관찰하였다. 그리고 역시 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자를 형질도입한 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)를 각각  $5 \times 10^5$  개씩 3마리의 nude 마우스의 복벽에 피하주사하여 그 변화를 관찰하였으며, 또한 5마리의 또다른 nude 마우스에는 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자를 형질도입한 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)의 수를 각각  $1 \times 10^7$  개씩 증가시켜 역시 좌우 복벽에 피하주사하여 그 변화를 관찰하였다.

### 7) 통계적 처리

간암 세포의 말초혈액 단핵구에 대한 감수성의 변화는 공분산 분석(Analysis of Covariance)을 사

용하여 검증하였으며, 모든 자료는 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었다.

## 결 과

### 1) IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주의 IL-2 생산량 측정

$N_2A/IL-2$  레트로바이러스 운반체를 이용하여 IL-2 유전자의 형질도입후 G-418으로 선택배양된 SK-Hep1 세포주에서의 IL-2 생산량은 최고  $186 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ hrs}$  이었고, Hep3B의 경우 최고 생산량은  $147 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ hrs}$  이었다. IL-2정량의 최저 농도는  $8.7 \text{ pg}/\text{mL}$  이었다. 한편 LNC/IL-2 레트로바이러스 운반체를 이용하였을 때는 Hep-3B 세포주에서의 IL-2 최고 생산량은  $55,000 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ hrs}$  이었다.

그리고 IL-2 유전자가 형질도입되지 않은 간암모세포주(SK-Hep1, Hep-3B)에서의 IL-2 생산량은 각각 0.2 및  $0.3 \text{ pg}/10^6 \text{ cells}/24 \text{ hrs}$  이었다.

### 2) 간암세포의 말초혈액 단핵구에 대한 감수성 검사

정상성인의 말초혈액 단핵세포를 주효세포로, 그리고 간암세포주를 표적세포로 한 주효세포에 대한 표적세포의 감수성의 변화는 Fig. 1-2에서 보는 바와 같이 Hep-3B와 Hep-3B/ $N_2A/IL-2$ 의 경우 E:T ratio가 12.5:1과 25:1에서 18시간 배양시 특히 세포살상능력의 차이가 있어, IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주에서 형질도입되지 않은 간암모세포주에 비해 단핵구에 의한 세포독성도가 12.5:1일 경우 195%, 25:1인 경우에는 163.8%의 증가가 있었다( $p < 0.05$ ). 같은 실험을 Hep-G2와 Hep-G2/ $N_2A/IL-2$ 에서 시행한 결과 역시 같은 경향을 보여, 18시간 배양한 경우 E:T ratio가 12.5:1에서 254%, 25:1인 경우 201%의 세포독성도 증가를 보여 간암세포 종류에 관계없이 정상인의 말초혈액 단핵세포의 독성능은 IL-2 유전자를 형질도입받은 간암세포주에서 유전자 조작을 하지 않은 간암모세포주에 대한 경우보다 현저히 증가됨을 알 수

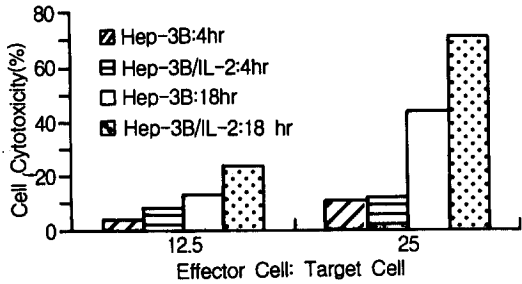


Fig. 1. Cytotoxicity of peripheral blood monocytes to parent Hep-3B and interleukin-2 transduced Hep-3B/IL-2 hepatoma cell lines.

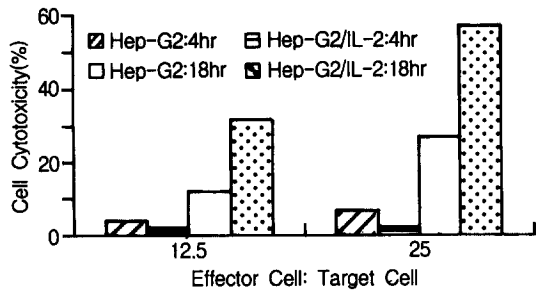


Fig. 2. Cytotoxicity of peripheral blood monocytes to parent Hep-G2 and interleukin-2 transduced Hep-G2/IL-2 hepatoma cell lines.

있었다( $p < 0.05$ ).

### 3) 실험 동물에서 종양의 변화

유전자 조작을 하지 않은 간암모세포주(Hep-3B)  $1.5 \times 10^7$ 개씩을 각각 3마리의 BALB/c 마우스와 nude 마우스의 좌우 복벽에 피하주사하여 종양형성 여부를 살펴본 결과, 1마리의 BALB/c 마우스에서 종양이 형성되었고 nude 마우스에서는 3마리 모두에서 처음에는 종양의 크기가 줄어들다가 약 2주후부터는 종양이 성장하기 시작하였다(Fig. 3).

한편 같은 날 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)  $1 \times 10^7$ 개씩을 각각 3마리의 BALB/c 마우스의 좌우 복벽에 주사하였는데, 주사 2주후부터 IL-2 유

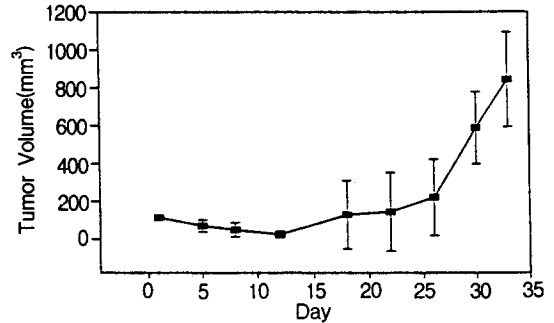


Fig. 3. Tumorigenicity of Hep-3B in nude mice.

전자의 형질도입이 이루어진 간암세포주가 접종된 오른쪽에서는, 종양의 크기가 줄어들기 시작하여 주사 3주후에는 거의 식별이 불가능해 흔적만을 찾을 수 있었으며, 주사 4주후부터는 간암모세포주를 주사하여 형성된 왼쪽의 종양도 점차 작아지기 시작하면서 5주 이후에는 종양의 완전한 퇴행을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그리고 종양이 존재하던 부분의 조직을 떼어내어 H-E 염색으로 조직학적 검사를 실시한 결과 종양세포의 괴사와 그 주위에 많은 단핵구의 침윤을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 같은 방법으로  $5 \times 10^5$ 개씩의 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)를 3마리의 nude 마우스의 좌우 복벽에 동시에 피하주사한 결과 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주에 의해 형성된 종양의 경우는 3주 이내에, 그리고 간암모세포주에 의해 형성된 종양은 5주 이내에 모두 소실되는 것을 관찰할 수 있었다( $p < 0.05$ )(Fig. 6). 또한 5마리의 nude 마우스에  $1 \times 10^7$ 개씩의 간암모세포주(Hep-3B)와 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주(Hep-3B/LNC/IL-2)를 피하주사하였을때는, IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주의 경우는 피하주사 다음날부터 점차 종양이 퇴행되는 반면 간암모세포주에서는 피하주사 약 20일까지는 종양이 퇴행되다가 그 이후에는 다시 종양이 자라나기 시작하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 7).

**Fig. 4.** Changes of tumor size after the injection of parent cell line(L) and the interleukin-2 transduced hepatoma cell line(R) into the BALB/c mouse.

A, A-1; 2 weeks after the injection of tumor cells

B, B-1; 3 weeks after the injection of tumor cells

C, C-1; 4 weeks after the injection of tumor cells

D, D-1; 5 weeks after the injection of tumor cells

**Fig. 5.** Pathology from tumor regression region.

Right side; monocytes infiltration

Left side; necrosis of tumor cells

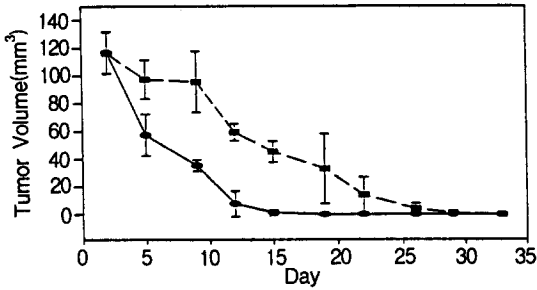


Fig. 6. Change of tumor volume after the simultaneous separate injection of parent(Hep-3B) and interleukin-2 transduced hepatoma cell lines(Hep-3B/IL-2) into the nude mice

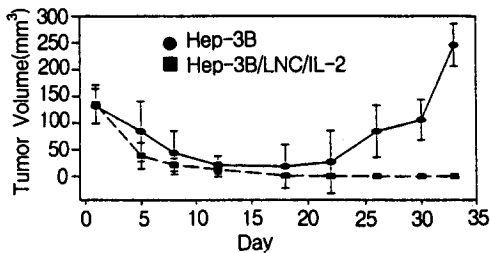


Fig. 7. Effect of LNC/IL-2 on Growth of Hep-3B Cells in Nude Mice

## 고 찰

전신적으로 IL-2를 투여하여 진행성 악성흑색종 그리고 신세포암 환자 등에서 치료 효과를 거두고는 있지만 고용량의 IL-2는 심장, 폐, 간 그리고 신장 등에 다양한 부작용을 유발할 수 있으며(5~12) 문헌 보고상 2% 정도의 환자는 이로 인하여 사망에 이를 수도 있다(26). 반면 저용량 또는 continous infusion에 의한 IL-2의 투여는 부작용이 감소되기는 하나 치료효과도 떨어지는 문제점이 있다(13~18). 따라서 세포에서 직접 IL-2를 생산하게 하는 IL-2 유전자의 형질도입은 IL-2에 의한 전신부작용을 줄이고 암세포에 대한 면역반응을 증대할 수 있는 새로운 방안으로 제시

되고 있다. 즉 IL-2 유전자가 형질도입된 종양세포에서의 IL-2 분비량은 문헌보고에 의하면 15 ng/10<sup>6</sup> cells/24 hrs 정도로 보고된 경우도 있다(27). 본 연구팀의 실험결과에 의하면 N<sub>2</sub>A/IL-2 레트로바이러스 운반체를 이용한 경우 186 pg/10<sup>6</sup> cells/24 hrs이었고 LNC/IL-2 레트로바이러스 운반체를 사용하는 경우 55,000 pg/10<sup>6</sup> cells/24 hrs로 종양세포에서 IL-2의 생산은 LNC/IL-2 레트로바이러스 운반체를 사용하는 경우 더 효과적임을 알 수 있었다. Boshart등(28)은 사람 cytomegalovirus(CMV)의 immediate early promoter는 세포의 종류 또는 동물의 종(species)에 제한 받지 않으면서 다른 종류의 enhancer에 비해 훨씬 강력한 작용을 나타냄을 보고하였는데 본 연구에 사용된 LNC/IL-2 레트로바이러스에서는 IL-2 유전자에 대한 promoter로 사람 CMV의 immediate early promoter를 사용하고 있어(29) IL-2 생산이 N<sub>2</sub>A/IL-2의 경우에 비해 훨씬 높았던 것으로 생각된다. Rosenberg는 70 kg 환자가 매 24시간마다 700 µg의 IL-2를 정맥주사하여도 toleration할 수 있다고 보고한 바 있어(27) 일반 성인 환자에서 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>개의 gene modified tumor cell에 의해 생성되는 IL-2의 양은 전신부작용을 유발하기에는 대단히 미미하므로 국소적인 효과가 주된 효과일 것으로 생각된다.

IL-2 유전자를 종양세포에 형질도입하면 실험동물에서 종양형성능이 억제됨이 보고되고 있는데 이는 종양세포로부터 분비된 IL-2가 생체내에서 종양세포와 임파구사이의 상호작용에 영향을 주기 때문으로 설명된다(21, 30~31). 이러한 결과들을 살펴보기 위해 먼저 BALB/c 마우스와 nude 마우스에서의 간암세포주(Hep-3B)의 종양형성능을 관찰하였다. BALB/c 마우스에서는 간암세포주에 의한 종양형성능이 3마리중 1마리에서 관찰되었는데 이는 면역체계가 정상적인 실험동물에 인체 간암세포주를 주입할 때 xenogenic rejection에 의해서도 종양의 퇴행이 가능함을 나타낸다고 생각된다. 그러나 본 연구에서 거부반응만이 종양 퇴행의 원인이라면 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주나 그렇지 않은 간암세포주에 의해

형성된 종양이 동시에 퇴행되어야 하나, IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주의 퇴행이 먼저 유발됨은 이 간암세포주에서 항원성이 증가되었던 것으로 생각되며 반대편의 종양이 소실된 것은 주효세포의 활성화와 거부반응이 부분적으로 함께 작용하였을 것으로 생각된다. 또한 nude 마우스를 대상으로 실험한 경우에는 3마리 모두에서 종양형성능이 관찰되었고, IL-2 유전자를 형질도입한 간암세포주와 유전자 조작을 하지 않은 간암모세포주를 좌우의 복벽에 주사한 경우에도 종양의 소실을 관찰할 수 있었는데, 이는 T-세포에 의한 세포매개성 면역장애를 보이는 nude 마우스에서도 IL-2에 의한 종양세포의 항원성 증가 그리고 주효세포의 활성화에 의해 종양의 퇴행이 유발되는 것으로 생각된다. 그러나 간암세포수를  $1 \times 10^7$ 개로 증가시켜 투여한 경우에는 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주를 피하주사한 부위에서는 지속적으로 종양의 크기가 감소하여 소실되는 반면, 간암모세포주를 피하주사한 부위에선 종양이 점차 소실되어가다가 약 20일후부터 다시 종양이 자라기 시작하였다. 이는 nude 마우스가 주효세포의 활성화에 의해 종양억제능을 가지기는 하나 T-세포에 의한 세포매개성 면역장애가 있으므로 종양의 부하(load)가 큰 경우에는 종양의 퇴행유발에 한계가 있음을 나타낸다고 생각된다.

연구결과에 의하면 종양세포에서 주변의 micro-environment에 국소적으로 IL-2를 분비하면 IL-2에 반응하는 혈중임파구군 활성화 및 이들 세포군의 지속적 유지를 유발할 수 있는데 이들 세포군은 특정한 CTL(cytotoxic T lymphocyte)전구세포를 포함하는 것이 밝혀지고 있다(26). IL-2 유전자를 형질도입한 암세포를 실험동물에 주사할 때 종양의 퇴행을 유발할 수 있는 주효세포로 Gansbacher 등(32)은 NK(natural killer) cell 또는 undefined T-cell을, Russell등(33)은 CTL을, Bubenik등(34)은 LAK(lymphokine-activated killer) cell을, 그리고 Cavallo 등(35)은 호중구를 들고 있다. 본 연구팀은 실험동물에서 종양의 퇴행을 보인 부위를 H & E 염색하여 광학현미경 관찰을 시행하여 종양세포의

괴사와 그 주변부에 단핵구의 현저한 침윤을 관찰하였으나 이들 세포의 동정은 시행치 않았었다. 또한 IL-2 유전자 형질도입전후의 간암세포주를 표적세포로 하여 정상성인의 말초 혈액 단핵구에 대한 감수성의 변화를 본 경우도 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주를 대상으로 한 경우 세포독성능이 현저히 증가함을 관찰할 수 있었으나, 아직 주효세포의 정확한 동정에는 이르지 못하였다. 따라서 종양세포에서 IL-2를 분비하여 종양이 퇴행될 때의 주효세포 동정을 위해서는 추후의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결과적으로 간암세포주에 의해 분비되는 IL-2는 종양세포의 항원성의 증가 및 주효세포의 활성화를 유도하여 실험동물에서 종양의 퇴행을 유발하는데, 종양세포의 부하가 증가되면 이러한 효과는 감소되는 것으로 생각된다.

## 결 론

이상의 결과로 IL-2 유전자가 형질도입된 간암세포주에서 IL-2의 분비가 가능하며, 이들 세포는 유전자 조작을 시행하지 않은 간암모세포주에 비하여 사람의 말초 단핵구에 대한 감수성이 증가하고 실험동물에서 항원성의 증가를 유발하는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Clinical protocol. The ADA human gene therapy clinical protocol. Hum Gene Ther 1990; 1: 327-262.
2. Clinical Protocols in Cancer Gene Ther 1994; 1: 289-295.
3. Clinical Protocols in Cancer Gene Ther 1996; 3: 58-68.
4. Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Important Advances in Oncology. 1986. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1986: 55-911.
5. Rosenberg SA, Lotze MT, Huol LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high



- dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316: 889-897.
6. West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Marshall GD, Orr DW, Thurman GB, Oldham RK. Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 1987; 316: 898-905.
  7. Rosenberg SA, Lotze MT, Muuyl LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matcra YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, Seipp CA, Simpson C, Reichert CM. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313: 1485-1492.
  8. Margolin KA, Rayner AA, Hawkins MJ, Atkins MB, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss GR, Doroshow JH, Jaffe HS, Roper M, Parkinson DR, Wieruik PH, Creekmore SP, Boldt DH. Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: Analysis of toxicity and management guidelines. *J Clin Oncol* 1989; 7: 486-498.
  9. Lotze MT, Yvedt LM, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, Custer MC, Rosenberg SA. In vivo administration of purified human interleukin-2 II: Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral cells in vivo with recombinant IL2. *J Immunol* 1985; 135: 2865-2875.
  10. Atkins MB, Gould JA, Allegretta M, Li JJ, Dempsey RA, Rudders RA, Parkinson DR, Reichlin S, Mier JW. Phase I evaluation of recombinant interleukin-2 in patients with advanced malignant disease. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1380-1391.
  11. Belldegrun A, Webb DE, Austin HA, Steinberg SM, White DE, Lineham WM, Rosenberg SA. Effects of interleukin-2 on renal function in patients receiving immunotherapy for advanced cancer. *Ann of Int Med* 1987; 106: 817-822.
  12. Ettinghausen SE, Moore JG, White DE, Platanius L, Young NS, Rosenberg SA. Hematologic effects of immunotherapy with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in cancer patients. *Blood* 1987; 69: 1654-1660.
  13. Blaise D, Olive D, Stoppa P, Viens P, Poureau C, Lopez M, Attal M, Jasmin C, Monges G, Mawas C, Mannoni P, Palmer P, Franks C, Philip T, Maraninchi D. Hematologic and immunologic effects of the systemic administration of recombinant interleukin-1 after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 76: 1092-1097.
  14. Higuchi CM, Thompson JA, Petersen FB, Buckner CD, Fefer A. Toxicity and immunomodulatory effects of interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 1991; 77: 2561-2568.
  15. Sosman JA, Kohler PC, Hank J, Moore KH, Bechhofer R, Storer B, Sondel PM. Repetitive weekly cycles of recombinant human interleukin-2: Response of renal carcinoma with acceptable toxicity. *J Natl Can Inst* 1988; 80: 60-63.
  16. Thompson JA, Lee DJ, Lindgren CG, Benz LA, Collins C, Levitt D, Fefer A. Influence of dose and duration of infusion of interleukin-2 on toxicity and immunomodulation. *J Clin Oncol* 1988; 6: 669-678.
  17. Hirsh M, Lipton A, Harvey H, Givant E, Hopper X, Jones G, Zeffren J, Levitt D. Phase I study of interleukin-1 and interferon alfa-2a as outpatient therapy for patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1657-1663.
  18. Soiffer RJ, Murray C, Cochran K, Camaron C, Wang E, Schow PW, Ritz J. Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombination interleukin-2 after autologous and T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1992; 79: 517-526.
  19. Hay R, Macy M, Chen TR, McClintock P, Reid Y. eds. American type culture collection: Catalogue of cell lines and hybridomas. 6th ed. Rockville: ATCC, 1988.
  20. Su N, Ojeifo JO, MacPherson A, Zwiebel JA. Breast cancer gene therapy: transgenic immunotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 31: 349-356.
  21. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990; 172: 1217-1224.
  22. Lotze MT, Zeh HJ, Elder EM, Cai Q, Pippin BA, Rosenstein MM, Whiteside TL, Heberman R. Use of T-cell growth factors(interleukin 2, 4, 7, 10 and 12) in the evaluation of T-cell reactivity to melanoma. *J Immunother* 1992; 12: 212-217.
  23. 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.
  24. Davis L, Khuel M, Battey J, eds. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994.
  25. Freshney RI, eds. Measurement of viability and cytotoxicity in culture of animal cells. 3rd ed. New York:

Wiley-Liss, 1994.

26. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JG, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE. Experience with the use of high dose IL-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 1989; 210: 474-484.
27. Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese MR, Etinghausen SE, Hwu P, Karp SE, Kasid A, Mule JJ, Parkinson DR, Salo JC, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Weber JS, Yannelli JR, Yang JC, Linehan WM. Immunization of cancer patients using autologous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin-2. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 75-90.
28. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985; 41: 521-530.
29. Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotech* 1989; 7(9): 980-990.
30. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990; 60: 397-403.
31. Tepper RL, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989; 57: 503-512.
32. Gansbacher B, Zier K, Cronin K, Hantzopanlos PA, Bouchard B, Houghton A, Gilboa E, Golde D. Retroviral gene transfer induced constitutive expression of interleukin-2 or interferon-gamma in irradiated human melanoma cells. *Blood* 1992; 80: 2817-2825.
33. Russell SJ, Eccles SA, Flemming CL, Johnson CA, Collins MK. Decreased tumorigenicity of a transplantable rat sarcoma following transfer and expression of a IL-2 cDNA. *Int J Cancer* 1991; 47: 244-251.
34. Bubenik J, Lotzova, Indrova M, Simova J, Jandlova T, Bubenikova D. Use of IL-2 gene transfer in local immunotherapy of cancer. *Cancer Lett* 1992; 62: 257-262.
35. Cavallo F, Giovarelli M, Gulino A, Vacca A, Stoppacciaro A, Modesti A, Forni G. Role of neutrophils and CD4+ T-lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J Immunol* 1992; 149: 3627-3635.