

# 마우스 흑색종모델에서 Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir 종양자살유전자요법과 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 종양백신요법의 복합치료효과

충북대학교 의과대학 내과학교실

김 승 택

Effect of combination gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase suicidal gene and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in murine melanoma model

Seung Taik Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University

## 서 론

항암 유전자 요법에 있어서 cytokine 유전자, 암유전자, 종양 억제 유전자 등의 이용은 종양화 기전 및 면역 반응의 다양성을 고려할 때 개개의 종양과 실험 동물 종간의 차이에 따라 치료효과가 다를 수 있다. 반면에 자살유전자요법(suicidal gene therapy)은 유전자가 전이된 세포를 일정한 조건하에서 비특이적으로 죽일 수 있으므로 종양의 종류, 실험동물의 종에 상관없이 좋은 치료효과를 기대할 수 있다.

현재 자살 유전자로서 많이 이용되는 유전자는 herpes simplex virus의 thymidine kinase(HSVtk) 유전자이다. 이 경우 ganciclovir(GCV)에 의한 세포의 살상 효과는 HSVtk가 이입된 세포에 국한되지 않고 HSVtk 유전자 이입이 없는 인근 암세포까지 미친다. Bystander 효과라 알려진 이러한 현상은 현재의 유전자 이입방법으로는 모든 종양 세포에 HSVtk 유전자를 이입시킬 수 없다는 한계점을 보완해 줄 수 있다는 점에서 자살유전자를 이용한 유전자요법의 실용 가능성을 한층 제고시켜 준다. 실제로 동물모델을 이용한 실험에서 암세포의

10% 정도에만 HSVtk 유전자가 이입되어도 종양전체를 완전히 소멸시킬 수 있다고 보고되어 있다<sup>1)</sup>.

Bystander 효과의 기전은 확실히 밝혀져 있지는 않지만 여러 가지 설이 제기되고 있다. 즉, HSVtk 양성인 암세포가 GCV 투여에 의하여 죽으면서 생성된 apoptotic vesicle을 인접하고 있는 HSVtk 음성 암세포가 섭취하여 HSVtk 유전자를 갖게되어 GCV에 죽게 된다는 설<sup>2)</sup>과 HSVtk 양성 암세포와 HSVtk 음성 암세포사이의 gap junction을 통하여 HSVtk 양성세포에서 대사된 GCV가 HSVtk 음성 암세포로 전달되어 일어난다는 설이 있다<sup>3)</sup>. 이러한 기전 외에 최근에는 살상된 암세포에 대하여 발생한 면역기능의 향진 때문에 인근 암세포의 죽음이 초래되어 bystander 효과가 생긴다는 설이 대두되고 있다<sup>4)</sup>.

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)는 다양한 생물학적 작용을 지니고 있다. 이는 골수내 전구세포들을 과립구나 대식세포로 분화시킬 뿐 아니라 과립구 및 대식세포의 식작용을 증가시키고 항체의존성 세포독성을 향진시킨다. 특히 dendritic cell/Langerhans cell 계통 세포의 성숙을 촉진시켜 T 세포의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>5, 7)</sup>.

본 연구는 이와 같은 GM-CSF의 면역학적 작용이 HSVtk 유전자 치료시의 bystander 효과를 향진시킴으로써 항암효과의 상승작용을 유발하는 지를 알아보고자 시행되었다.

## 방 법

### 1. Recombinant retroviral vector의 제작

#### 1) LtkSP plasmid의 제작

R. Thomson으로부터 얻은 pEPPUC에서 promoter와 polyadenylation signal이 포함되지 않은 HSVtk 유전자를 절단하고, 이를 5'-primer에 *Bam*HI, 3'-primer에 *Eco*RI 위치가 포함되도록 고안된 primer와 함께 PCR을 시행하여 증폭된 HSVtk 유전자를 얻었다. 다음 이를 PJ Stambrook에게서 제공받은 pBabePuro plasmid에 ligation 시킨 후 표준적인 DNA cloning 방법에 의하여 LtkSP plasmid를 제작하였다.

#### 2) LGMSN plasmid의 제작

WRA Osborne(University of Washington)으로부터 제공받은 LXS(N; long terminal repeats of Murine Moloney Leukemia virus, X; multi-cloning site, S; SV40 virus early promoter, N; bacterial neomycin phosphotransferase gene) plasmid에 김선영 교수(서울대 유전공학연구소)로부터 획득한 GM-CSF 유전자 절편을 ligation 시킨 후 표준적인 DNA cloning 방법에 의하여 LGMSN plasmid를 제작하였다.

### 3) Recombinant retroviral vector의 생성

위에서 제작한 plasmid를 packaging cell line인 PE501 cell과 PA317 cell에 차례로 transfection 과 infection 시켜 recombinant retrovirus의 생성을 시도하였다 (PA317/ LtkSP, PA317/LGMSN). Retrovirus가 제대로 생성되는지의 검정은 PA317/LtkSP의 경우에는 selection한 세포주를 ganciclovir(GCV, 20  $\mu$ M) 하에서 배양하여 확인하였으며, PA317/LGMSN의 경우에는 PA317 cell clone 배양상층액에서의 GM-CSF 활성도를 ELISA 방법으로 측정함으로써 확인하였다. 동시에 PA317 clone의 DNA를 Southern blot 방법으로 확인하여 바른 크기의 proviral DNA가 이입되어 있는지의 여부를 검정하였다.

### 4) Virus titer 측정

PA317 세포주에서 생성된 virus를 NIH 3T3 세포에 감염시킨 후 G418하에서 선택 배양하여 생성된 세포집락수를 측정함으로써 virus titer를 정하였다.

## 2. Recombinant retrovirus를 이입한 종양세포주의 확립

B16F1 melanoma 세포주는 neuroectodermal origin의 종양으로 ATCC에서 구입하였다. PA317/LtkSP를 DMEM with 10% FBS에 배양하여 recombinant retrovirus가 포함된 상층액을 얻고 이를 같은 배양액에 배양한 B16F1 세포주에 polybrene(4ug/ml)하에서 24시간 첨가시켰다. 이어 puromycin(2ug/ml)이 포함된 배양액에서 배양하여 retrovirus가 감염된 세포만을 분리하였다. 이러한 방법으로 얻은 세포주를 GCV(20uM) 하에서 5-7일간 배양해 cytotoxicity를 검사함으로써 HSVtk 활성도를 증명하였다(B16/LtkSP).

PA317/LGMSN을 DMEM with 10% FBS에 배양하여 recombinant retrovirus가 포함된 상층액을 얻어서 이를 B16-F1 세포주에 polybrene과 함께 감염시키고, 이어 G418(1mg/ml)이 포함된 배지에서 배양하여 retrovirus가 감염된 세포를 분리하였다. 세포주의 상층액을 채취하여 GM-CSF의 농도를 ELISA로 증명하였다 (B16/LGMSN).

PA317/LtkSP를 DMEM with 10% FBS에 배양하여 recombinant retrovirus가 포함된 상층액을 얻어서 이를 배양 중인 B16/LGMSN 세포주에 polybrene과 함께 넣은 다음 puromycin이 포함된 배지에서 배양하여 LtkSP retrovirus가 감염된 세포의 분리를 시도하였다. 세포주를 GCV(20uM)가 포함된 배양액에서 5-7일간 배양해 cytotoxicity를 검사함으로써 HSVtk 활성도를 증명하였다(B16/LGMtk).

## 3. in vitro bystander 효과의 비교

B16F1 세포를 위에서 제작한 B16/LtkSP, B16/LGMtk 세포주와 각각 2 : 1의 비율로 섞은 후, GCV하에서 배양하여 세포살상효과를 관찰하였다. 상기 비율로 혼합된 세포( $5 \times 10^3$ )를 10 cm plate에 GCV(40  $\mu$ M)하에서 배양하여 배양 10일째 GCV가 들어있지 않은 배양액에서 배양한 control과 생존 세포수를 비교하였다. 또한 같은 방법으로 B16/LGMSN 및 B16/LtkSP 세포주와

2 : 0.5 : 0.5의 비율로 섞어서 세포수를 측정하였다.

#### 4. 동물실험모델을 이용한 검증

C57/BL6 mouse 10 마리씩을 한 군으로 하여 제 1군은 B16F1과 B16/LtkSP를 2 : 1로, 제 2군은 B16F1과 B16/LGMtk를 2 : 1로, 그리고 제 3군은 B16F1과 B16/LGMSN, 그리고 B16/LtkSP를 2 : 0.5 : 0.5로 혼합된 세포를 총  $5 \times 10^5$  세포씩 피하 접종하였다. 각 군내에서 5마리는 세포 접종후 7일째부터 GCV 75 mg/kg를 하루 2회씩 복강내 주사하였으며 나머지 5마리는 대조용으로 사용하였다.

### 결 과

#### 1. in vitro bystander effect

##### 1) 각 세포주의 증식능

B16, B16/LGMSN, B16/LtkSP 및 B16/LGMtk 각 세포주의 세포( $5 \times 10^3$ )를 10 cm plate에서 배양하였을 때 각 세포주의 증식능 간에 차이가 없었으며 증식 곡선은 (Figure 1)에 보는 바와 같다.

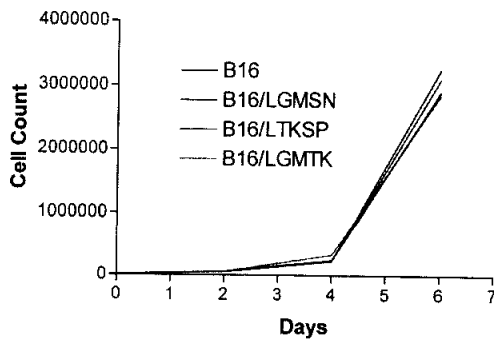


Figure 1. Growth curves for each cell line.

##### 2) HSVtk 이입 세포에서의 tk 활성도

B16/LtkSP 및 B16/LGMtk 세포( $5 \times 10^3$ )를 10 cm plate에 GCV 40  $\mu$ M 농도 하에서 10% 배양하여 제 10일째 세포수를 측정한 결과, B16/LtkSP 경우의 세포 수는  $1.2 \times 10^7$ 으로 GCV가 첨가되지 않은 대조군의  $1 \times 10^5$ 에 비해서 99.2%의 억제효과가 있었다. B16/LGMtk의 경우에는 각각  $7.6 \times 10^6$ ,  $1.8 \times 10^6$ 으로 76.3%의 억제 효과가 있었다(Figure 2).

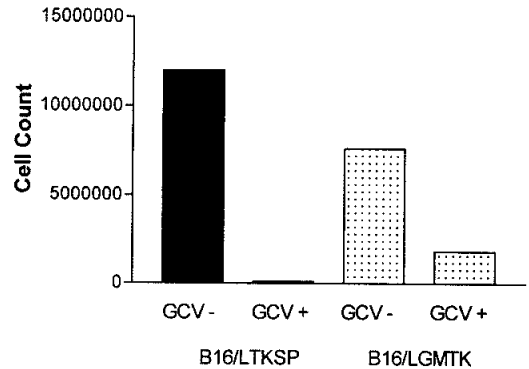


Figure 2. HSVtk activities measured by GCV cytotoxicities.

#### 2. GM-CSF의 활성도

GM-CSF 유전자가 이입된 B16/LGMSN 및 B16/LGMtk 세포( $1 \times 10^5$ )를 24시간 배양후 배양액에서의 GM-CSF 농도를 ELISA로 측정한 결과 각각 2,847 pg/ml, 3,220 pg/ml이었다.

#### 3. 동물모델을 이용한 bystander 효과의 검증

##### 1) 각 세포주의 종양 형성능

C57/BL6 mouse 5 마리씩을 한 군으로 하여 B16, B16/LGMSN, B16/LtkSP 및 B16/LGMtk 세포( $5 \times 10^5$ )를 각각 우측 배복부에 피하 주사하고 2일 간격으로 종양의 부피를 측정하였다. 종양의 부피는  $1/2 \times (\text{thickness} \times \text{width} \times \text{length})$ 로 하였다<sup>8)</sup>. 제 12일째의 종양 용적은 B16의 경우  $721 \pm 211(\text{SEM})\text{mm}^3$ , B16/LGMSN의 경우에는  $712 \pm 143 \text{ mm}^3$ , B16/LtkSP의 경우

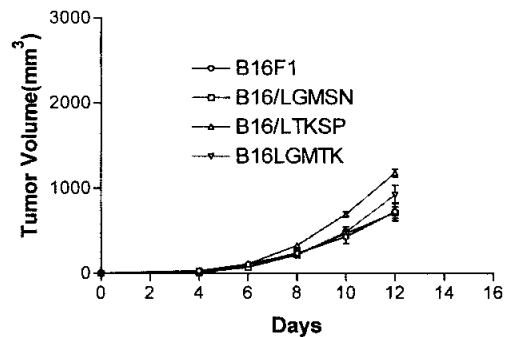
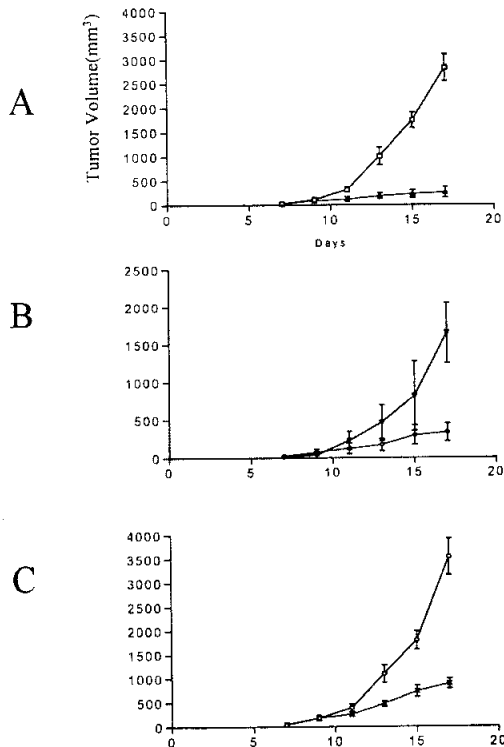


Figure 3. Tumor formation by each cell lines.

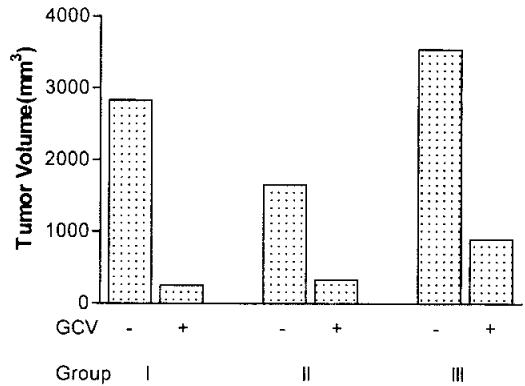
에는  $1174 \pm 103 \text{ mm}^3$ , B16/LGMtk의 경우에는  $922 \pm 237 \text{ mm}^3$ 로 각 세포주 간에 종양 형성능의 차이는 없었다 (Figure 3).

## 2) GM-CSF 발현에 따른 bystander 효과의 차이

GCV에 의한 종양 증식 억제 효과는 제 1군(B16 + B16/LtkSP)에서 가장 컸으며 제 2군(B16 + B16/LGMtk) 및 3군(B16 + B16/LGMSN + B16/LtkSP)에서는 그 효과가 비슷하였다(Figure 4). 제 1 군의 경우 치료군 및 대조군의 종양용적은 각각  $2,832 \pm 274 \text{ mm}^3$ ,  $255 \pm 108 \text{ mm}^3$ , 제 2 군의 경우에는 각각  $1653 \pm 403 \text{ mm}^3$ ,  $334 \pm 117 \text{ mm}^3$ , 제 3군의 경우에는 각각  $3544 \pm 379 \text{ mm}^3$ ,  $893 \pm 105 \text{ mm}^3$ 로 제 17일 쯤의 최종 종양 용적을 기준으로 한 Treated/Control(T/C) 비율은 제 1군에서 0.09, 제 2 군에서 0.29, 그리고 제 3군에서는 0.25이었다(Figure 5).



**Figure 4.** The effect of GCV on tumor formation. A. Group I (B16F1 + B16/LtkSP). B. Group II (B16F1 + B16/LGMtk). C. Group III (B16F1 + B16/LGMSN + B16/LtkSP). The lower curves are GCV treated group in each graph.



**Figure 5.** The effect of GCV for each treatment group. The T/C ratio was 0.09 for Group I(B16F1 + B16/LtkSP), 0.29 for Group II(B16F1+B16/LGMtk), and 0.25 for Group III(B16F1 + B16/LGMSN + B16/LtkSP).

## 고 찰

항암 유전자 치료에 대한 연구는 비교적 짧은 역사를 가지고 있지만 최근 양적으로 엄청난 증가 추세를 보이고 있다. 전통적인 치료방법으로는 더 이상의 치료 효과 개선을 기대하기 힘든 상황에서 유전자 치료에 대한 기대는 실로 크다고 할 수 있다. 그러나 유전자 치료가 실제로 임상에 응용되기 위해서는 여러 가지 문제가 해결되어야 한다. 유전자 치료의 안전성 문제, 유전자의 효과적 전달 수단(vehicle), 전달 방법 등 실제적인 문제 이외에도, 이론적으로는 종양 형성 기전의 복잡성 및 세포 간의 이질성(heterogeneity)등으로 인하여 어느 한가지의 유전자 조작만으로는 치료가 불가능하다는 점, 대부분이 체세포인 모든 암세포에 유전자 도입이 불가능하다는 점등이 앞으로 해결되어야 할 매우 어려운 난관이라 할 수 있다.

HSVtk 유전자는 도입된 세포에서 조건적인 세포사를 유도한다. 또한 그 효과가 근위 세포에까지 파급되는 bystander 효과를 가지므로 모든 암세포에 도입될 필요가 없다는 점이 장점이다. 최근에는 bystander 효과를 극대화하기 위하여 여러 가지 cytokine 유전자를 병합한 복합 유전자 치료에 대한 연구가 진행되는 추세이다. Bystander 효과의 기전은 아직 확립되어 있지는 않지만 최근 면역학적 기전이 관여할 것이라는 가설이 대두되고 있기 때문이다.

본 연구에서 사용된 GM-CSF 도 이러한 cytokine의

일종으로 단독 치료시에도 항종양 효과가 있는 것으로 알려져 있다. GM-CSF의 항종양효과는 주로 면역학적 기전에 기인하는 것으로 특히 antigen presenting cell의 동원능력이 중요한 것으로 알려져 있다. 만일 bystander 효과에 특이적인 면역학적 기전이 관련한다면 이러한 antigen presenting cell의 동원이 필수적인 것이다. 그러나 본 연구에서는 GM-CSF에 의하여 HSVtk 유전자요법의 bystander 효과의 향진을 관찰 할 수 없었다. 오히려 GM-CSF 유전자 복합 치료군에서 T/C 비율이 더 높게 나타났는데 이는 각 세포주의 HSVtk 발현 수준의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 즉 in vitro에서 측정된 GCV에 의한 세포증식 억제 효과는 B16/LtkSP에서 99.2%, B16/LGMtk 76.3%로 이 비율은 in vivo 실험에서와 비슷한 수준이었다. 또한 HSVtk 이입세포의 수가 50% 수준인 제 3군(B16 + B16/LGMSN + B16/LtkSP)의 T/C 비율이 1군에 비해서 높게 나타나고 HSVtk 활성도가 낮은 2군과는 비슷하게 나타난 점으로 볼 때 GM-CSF에 의한 bystander 효과의 개선은 없었다고 결론지을 수 있다. 실제로 bystander 효과에 특이적인 면역 기전이 관여하지 않을 가능성도 있지만, 본 연구에 사용된 GM-CSF 유전자의 발현수준(B16/LGMSN: 2,847 pg/ml/24h/10<sup>6</sup> cell, B16/LGMtk: 3,220 pg/ml/24h/10<sup>6</sup> cell)이 bystander 효과를 향진시키기에는 비교적 낮은 수준이었을 가능성도 배제할 수는 없다. 실제로 GM-CSF 단독 치료시 그 효과는 GM-CSF의 발현 수준에 의존한다는 보고가 있다<sup>9)</sup>. 그러나 본 연구에서는 GM-CSF의 직접적인 효과가 아니라 면역학적 감작 효과를 기대한 것이므로 GM-CSF의 발현 수준이 치료 수준으로 높을 필요는 없다. 만일 GM-CSF의 발현 수준이 높아서 단독으로도 종양 성장 억제 효과가 있었다면 그 효과가 GM-CSF 및 HSVtk 유전자의 단순한 가산효과(additive effect)인지, bystander 효과의 개선으로 인한 상승효과(synergistic effect)인지 구별하기가 곤란할 수도 있다. 본 연구에서는 B16/LGMSN 및 B16/LGMtk의 종양 형성능이 B16F1이나 B16/LtkSP와 다르지 않았다.

결론적으로 GM-CSF와 HSVtk 유전자 복합 치료시

저수준(low-level)의 GM-CSF 발현은 bystander 효과에 영향을 미치지 않았다. Bystander 효과에 GM-CSF의 작용이 관여하는지의 여부는 다양한 GM-CSF 농도에서의 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) 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. 53:5274, 1993*
- 2) Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ: *In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. Hum Gene Ther 4:725, 1993*
- 3) 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 91:4348, 1994*
- 4) Nabel GJ, Yang ZY, Nabel EG, et al: *Direct gene transfer for treatment of human cancer. Annals of New York Academy of Science 772:227, 1995*
- 5) AR Miller, WH McBride, K Hunt, JS Economou: *Cytokine-mediated gene therapy for cancer. Ann Surg Oncol 1(5):436-450, 1994*
- 6) Witmer-Pack MD, Oliver W, Valinsky J, Schuler G, Stein RM: *Granulocyte macrophage colony stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. J Exp Med 166:1484-1498, 1987*
- 7) Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM: *Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. J Exp Med 169:1169-1178, 1989*
- 8) Tomayko MM, Reynolds CP: *Determination of subcutaneous tumor size in athymic(nude) mice. Cancer Chemother Pharmacol 24:148-154, 1989*
- 9) Armstrong CA, Botella R, Galloway TH, Murray N, Kramp JM, Song IS, Ansel JC: *Antitumor effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor production by melanoma cells. Cancer Res 56: 2191-2198, 1996*