Tuberculosis and Respiratory Disease 결핵 및 호흡기질환, Vol. 41, No. 2, April, 1994

□ 원 저 □

Retroviral Vector를 이용한 TNF-α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자(TNF) 감수성에 미치는 효과

서울대학교 의과대학 내과학교실

오연목 · 박계영 · 정만표 · 유철규
김영환 · 한성구 · 심영수 · 한용철

= Abstract =

Effect of Retrovirus Mediated TNF-α Gene Transfer to Tumor Necrosis Factor(TNF) Sensitive Tumor Cell Lines on Sensitivity to TNF

Yeon Mok Oh, M.D., Kyeo Yeong Park, M.D., Man Pyo Jung, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Goo Han, M.D., Young Soo Sim, M.D. and Yong Chol Han, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Since tumor necrosis factor was discovered in 1975, TNF has been well known about its cytotoxic effect on tumor cells in vivo and in vitro. According to the recent improvement of molecular biological techinques, it is possible that exogenous TNF gene is transferred to tumor cells and is expressed in theirs. By virtue of TNF gene transfer, we have expected that TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells would kill tumor cells in vivo without systemic side effect. The expected mechanisms in which antitumor effects of TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells are working would be as followings. In the first mechanism, TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells would kill tumor cells around (like homicide). In the second mechanism, TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells would kill themselves (like suicide). In the third mechanism, TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells would recruit immune effector cells and kill tumor cells indirectly. In the last mechanism, TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cells would augment cytokine such as interferon-γ to kill tumor cells. Among these four mechanisms of antitumor effect, only the second mechanism has not been established yet. Therefore, to elucidate the second mechanism, We performed this study.

Method : We transferred TNF-α gene to NCI-H2058, a human mesothelioma cell line and WEHI164, a murine fibrosarcoma cell line by using retroviral vector(pLT12SNTNF). And, We determined by using MTT assay whether TNF expressed in TNF-gene-transferred tumor cell lines would kill themselves like suicide or not. Then, if TNF-gene-transferred tumor cell lines would not suicide themselves, I would know more about the TNF sensitivity of TNF-gene-transferred tumor cell lines to exogenous TNF also by MTT assay.

이 연구는 1993년도 서울대학교병원 지정연구비(02-93-028) 지원에 의한 결과임.

Result : NCI-H2058 and WEHI164 which were sensitive to TNF, became far less sensitive to endogenous and exogenous TNF after being transferred TNF-α gene to.

Conclusion : TNF-gene-transfer to NCI-H2058 and WEHI164 gave them resistance to TNF.

Key Words : Tumor necrosis factor(TNF), Gene transfer, Resistance

서 론

생쥐를 BCG (bacillus Calmette-Guerin)로 전처치한 후 내독소(endotoxin)를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 종양의 괴사를 유도하는 물질이 발견되어 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)라 명명된[1] 이래, TNF가 여러 암세포에 대해서 생체 내외에서 세포독성(hemorrhagic necrosis in vivo, cytolysis in vitro)을 보임이 알려져 있다[2,3]. 또한, TNF는 암세포에 대한 세포독성 (antitumor effect) 외에도 염증반응과 면역조절에 관여하고 cachectic effect를 나타낼 뿐만 아니라 항바이러스 효과까지 있음이 알려져 있다[4]. TNF가 생체 내외에서 암세포에 대해 세포독성을 일으키는 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않지만, 생체 외에서의 cytolysis는 TNF의 직접적인 작용이 중요할 것으로 알려져 있으며 반면 생체 내에서는 간접적인 작용, 예를 들면 TNF가 염증세포를 활성화시킴으로써 동원된 염증세포의 작용으로 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 작용이 중요할 것으로 알려져 있다.

최근 분자생물학의 발전에 힘입어, 사람의 TNF 유전자를 E. coli등에서 cloning 하여서 유전자의 염기서열이 밝혀졌고 이를 통해서 재합성 TNF 생산이 가능하게 되었다[5,6]. 뿐만 아니라, TNF의 아미노산 서열과 3차 구조도 밝혀졌고[7,8] TNF가 작용하는 세포막의 TNF 수용체도 밝혀지게 되었다[9]. 이와 함께, retrovirus를 이용한 유전자 이입법이 개발되어서 사람을 포함하는 포유동물 세포에 원하는 유전자를 이입시켜 발현시키는 것이 가능하게 되었다[10~12]. 이런 분자생물학적인 발전을 토대로 하여 TNF 유전자를 생체 외에서 직접 암세포에 이입하여서, TNF 유전자 이입된 세포에서 TNF를 발현시켜 TNF를 생성하게 함으로써 항암효과를 기대하는 노력이 최근 진행되었다[13]. 그런데, TNF는 전신적으로 쓸 경우 부작용이 심할 뿐만 아니라[14] 반감기가 약 30분 내외로 아주 짧다. 따라서, TNF의 전신독성과 짧은 반감기를 해결하기 위해서 암세포로 하여금 TNF를 지속적으로 분비하게 하는 암세포에 대한 TNF 유전자 이입(cancer cell targeted TNF gene therapy)에 대한 연구가 최근 진행되고 있다. 이는 암세포의 주위에서만 TNF가 작용하게 함으로써 인체에는 전신독성을 극소화하고 암세포의 살상 효과를 높이는 것을 목적으로 한 것이다.

암세포에 TNF 유전자가 이입되었을 경우 예상되는 항암작용의 이론적 기전은 다음과 같은 네 가지 기전을 생각할 수 있다. 첫째, TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비되는 TNF의 직접적인 세포 독성에 의해 주위 암세포가 사멸되는 타살 기전이 있겠고, 둘째 TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비되는 TNF의 직접적인 세포독성에 의하여 TNF 유전자가 이입된 세포 자신이 사멸되는 자살 기전이 있겠으며, 셋째로 예상되는 기전으로는 TNF 유전자가 이입된 암세포를 생체 내로 주입하였을 경우 생체 내에서 TNF가 분비되어서 림프구나 대식세포 등 면역 관련 세포들을 활성화시킴으로써 항암 작용을 일으키는 기전을 생각해 볼 수 있다. 네번째 기전으로는 유전자가 이입된 암세포에서 분비하는 TNF가 생체 내의 interferon-γ 등의 cytokine과 상승작용으로 항암작용을 일으킬 수 있겠다. 위의 네 가지의 TNF 유전자 이입과 발현에 의한 항암 작용의 예상 기전 중, 첫째 기전은 TNF에 직접적인 감수성이 있는 암세포주에만 한정되게 항암 효과를 기대할 수 있는 것으로 이미 그 효과가 밝혀져 있고, 셋째 기전도 이미 입증되었고[15] 넷째 기전도 생체 외 연구에서 이미 확인되고 있다. 그러나, 둘째 기전은 아직 생쥐 섬유육종 세포주의 하나인 L929에 대한 보고만[16] 있을 뿐 명확히 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라, 만일 TNF 유전자를 이입받은 세포가 TNF에 대한 감수성에 변화가 생겨서, TNF 유전자를 이입받기 전에는 TNF에 대해 감

수성을 보이다가도 TNF 유전자를 이입받고 나서 TNF의 세포독성에 죽지 않고 생존한 세포가 TNF에 대해서 내성을 획득하게 된다면, TNF 유전자의 이입으로 암세포에서 TNF가 발현되어 국소적으로 분비되어도 주위 암세포는 죽일 수 있지만 TNF 유전자가 이입된 암세포 자신은 자신이 분비한 TNF에 죽지 않고 생존하여 암성장을 지속시키는 문제가 생긴다. 이에 연구자는 TNF 유전자가 이입된 암세포가 자신이 분비한 TNF에 의해서 사멸 또는 세포독성을 나타낼 수 있는가를 검증하는데 목적을 두었다. 그리하여 다음과 같은 구체적 목적을 가지고 연구를 하였다. 첫째, TNF에 감수성을 보이는 암세포주인 NCI-H2058과 WEHI164에 TNF 유전자를 이입한 후, 이들 세포주에서 생물학적으로 활성을 지닌 TNF가 분비되는지 확인하고, 이렇게 분비된 TNF에 의해서 암세포 자신이 사멸되지 않고 생존할 수 있는지 확인하고자 하였다. 둘째, TNF에 감수성을 보이는 암세포주인 NCI-H2058과 WEHI164에 TNF 유전자를 이입한 후, 외부에서 투여한 TNF에 대한 감수성에 변화가 있는지 TNF 유전자의 이입 전후를 비교, 확인하고자 하였다.

이를 위해서, 연구자는 TNF에 감수성을 보이는 사람의 중피종 세포주인 NCI-H2058와 생쥐의 섬유육종 세포주인 WEHI164에 retrovirus를 이용한 TNF-α 유전자 이입을 시행하고, 이들 세포주의 TNF에 대한 감수성을 TNF 유전자의 이입 전과 후로 나누어 비교하였다. 이 연구에서 TNF 유전자를 이입하는 대상 암세포주로 NCI-H2058와 WEHI164를 택하였는데, 그 이유는 NCI-H2058의 경우는 사람의 중피종 세포주로서 중피종은 말기까지도 원격전이가 드물면서 늑막강이라는 한정된 공간에서만 성장하므로 유전자요법의 좋은 대상 질환이 될 것으로 생각되기 때문이고 WEHI164의 경우는 TNF에 대한 감수성이 매우 큰 세포주이기 때문이었다.

대상 및 방법

1. 세포주와 배양법

NCI-H2058 세포주와 WEHI164 세포주 (ATCC #1751) 그리고 TNF 유전자를 함유한 retroviral vector를 생산하는 packaging 세포주인 PA317[17]는 미국 국립보건연구원에서 얻었다. 그리고, 이들 세포주들은 RPMI-1640 배지에 10% 우태혈청과 항생제 (gentamicin 50μg/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

2. Retroviral Vector의 생산

본 실험에 사용된 retroviral vector는 Moloney murine leukemia virus를 변형시킨 것으로 그 구조는 Fig. 1과 같다. 즉, Moloney murine leukemia virus의 gag, pol, env gene 대신에 사람 TNF-α 유전자와 선택 표식 유전자(selectable marker gene)인 Neo^R 유전자를 삽입한 것으로서, retrovirus의 5'LTR(long terminal repeat)가 TNF-α 유전자를 promote하고 SV40 promotor는 Neo^R 유전자를 promote하도록 설계되어 있다. 이 retroviral vector를 calcium-phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection시킨 후 neomycin analogue인 G418(0.8μg/ml)을 포함하는 배지에서 배양하여 유전자가 이입된 clone을 선택하였다. 그런 다음 PA317를 직경 10cm dish에 배양하여 dish를 60% 정도 채울 정도로 자라게 되면 배지를 교환하였다. 다시 24시간 배양 후, PA317을 배양한 배양액을 22μm 필터로 걸러서 인체 세포에 대한 감염성을 지닌 재합성 retroviral vector를 얻었으며 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 얼려 보관하였다.

3. 세포주에 TNF 유전자 이입과 선택

NCI-H2058과 WEHI164 세포주가 직경 10cm dish를 70% 정도 채우게 자라면 -70°C에 보관한 감염력

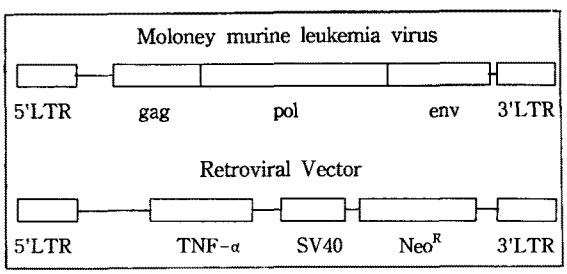

Fig. 1. Genomic structure of original virus and retroviral vector.

있는 재합성 retrovirus vector를 함유하는 배양액으로 교환하여 배양하였다. 여기에 polybrene(최종농도 8μg/ml)을 첨가하고 하루밤 동안 배양하였다. 다음날 retrovirus 함유 배지를 버리고 RPMI- 1640으로 바꾸어 24시간 추가 배양하였다. 그리고 나서 G418(최종농도 1mg/ml)이 포함된 배지에서 배양하여, Neo^R 유전자를 선택표식 유전자(selectable marker gene)로 하여 TNF 유전자가 이입된 세포의 선택을 시행하였다.

4. TNF 유전자 이입 확인

실험 대상 세포의 genomic DNA에 TNF 유전자가 이입되었는지는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR이라 약함)으로 확인하였다.

TNF 유전자 이입을 확인하고자 하는 세포주인 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF, 그리고 각각의 모세포주(parent cell line)인 NCI-H2058과 WEHI 164에서 genomic DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 100μg/ml의 proteinase K와 0.5% SDS (sodium dodecyl sulfate)를 포함하는 digestion buffer 1ml를 10cm dish에 꽉 차게 자란 세포에 넣고 이리저리 흔든 다음 microcentrifuge tube에 옮긴 후, 12~16 시간 동안 50°C에서 반응시켰다. 그 후, sample의 1/2 부피의 phenol과 sample의 1/2 부피의 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)을 넣고 서서히 섞어 주었다. 그런 다음 6800g로 10분간 원침한 후, 상층액을 얻었고 phenol과 chloroform/isoamyl alcohol 처리과정을 한 번 더 반복하였다. 이렇게 얻은 상층액에 7.5M ammonium acetate를 1/2 부피 추가하고, 냉장 보관한 100% ethanol을 sample 부피의 2배 부피로 추가하여 DNA가닥이 침전됨을 확인하였고, 1700g에서 2분간 원침하여 genomic DNA를 얻었다.

이와 같이 추출한 genomic DNA를 PCR의 template로 삼았다. 그리고, TNF 유전자 함유 retroviral vector의 선택표식으로 이용한 Neo^R 유전자의 일부 염기서열(Neo 1, Neo 5)을 primer(Fig. 2)로 써서 PCR(95°C 1분, 64°C 1분, 72°C 1분씩 30회 반복)을 시행하였다. 시행 후, 1% agarose gel로 전기영동 시킨 다음 ethidium bromide로 염색하여 DNA band를 관찰하였다. 이때 대조군으로 TNF 유전자를 이입시키지 않은 모세포주들을 이용하였고, 양성 대조군(positive control)으로는 본 실험에 사용한 retrovirus vector를 포함하는 plasmid인 pLT12SN의 DNA를 이용하였다.

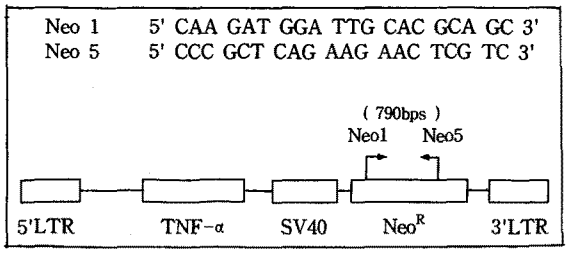

Fig. 2. Primer sequences for Neo^R gene PCR amplification.

5. ELISA를 이용한 이입된 TNF 유전자 발현 확인

TNF ELISA kit (R&D사, 제품명 Quantikin™ human TNF-α Immunoassay)를 이용하여 이입된 TNF 유전자로부터 TNF가 발현되어 생산되는지 측정하였다.

TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF를 각각 10^6개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3ml 되도록 심어서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 얻은 상층 배양액을 사용하여, 10^6개의 세포가 24시간 동안 생산한 TNF의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 각각의 모세포인 NCI-H2058와 WEHI 164도 동일한 방법으로 상층 배양액을 얻어 TNF를 생산하는지 비교하였다.

6. 이입된 TNF 유전자로부터 발현된 TNF의 생물학적 활성도 측정

유전자 이입을 시행한 암세포에서 이입된 TNF 유전자의 발현으로 생물학적인 활성을 가진 TNF가 분비되는지 WEHI164 세포를 이용한 bioassay로 확인하였다. TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF를 각각 10^6개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3ml 되도록 심어서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 얻은 상층 배양액을 사용하여, 10^6개의 세포가 24시간 동안

생산한 TNF의 양을 WEHI164 모세포주(parent cell line)를 이용한 bioassay[18]로 측정하였다. WEHI164 모세포주를 96welll plate에 well 당 10^4개의 세포를 심고 12시간 배양 후, 배지를 상기 상층 배양액 또는 1/2 희석액으로 교환하여 well에 첨가하여 36시간 추가로 더 배양하였다. 그런 후, 세포의 사망율을 MTT (dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) assay로 측정하였다[19,20]. MTT 용액(2mg/ml)을 well 당 50μl씩 넣고 4시간 동안 배양기에서 배양 후 원침(200g, 10분)하였다. 그런 다음 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150μl/well 넣고 15분간 흔들어 섞어주었다. 하루밤 배양 후, micropalte 판독기(Molecular Devices 사, 모델명 Thermo-max)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포사망율(cytotoxicity)은 다음과 같이 구하였다.

cytotoxicity(%) = 100 − (optical density with TNF /optical density without TNF) ×100

대조군으로, 각각의 모세포주인 NCI-H2058과 WEHI164에 대해서 동일한 방법으로 생물학적 활성을 지닌 TNF를 생산하는지도 확인하였다.

7. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 TNF에 대한 감수성 측정

H2058과 WEHI164 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주(H2058-TNF와 WEHI164-TNF)를 각각 well당 10^4세포씩 96well plate에 심은 후 12시간 배양한 다음 TNF(recombinant human TNF-α, Genzyme 사)를 최종농도가 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml 되도록 well에 첨가하였다. 36시간 추가 배양 후 세포 사망율을 MTT assay로 측정하였다.

8. 결과 분석

모든 자료의 그래프는 평균 ± 표준오차(standard error of mean)로 나타내었고, 각 군간의 비교는 스튜던트 t-검정을 적용하였다.

결 과

1. DNA 수준에서 유전자 이입의 확인

NCI-H2058과 WEHI164 세포주에 TNF 유전자가 제대로 이입되었는지를 확인하기 위하여 PCR을 시행하였고, TNF 유전자를 이입시키지 않은 모세포와 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)를 PCR 시킨 것을 함께 전기영동하여 비교하였다(Fig. 3). 그 결과 TNF 유전자가 이입된 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF 세포주 및 양성 대조군인 pLT12SN는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보이는 반면 모세포주인 NCI-H2058과 WEHI164에서는 790base pair의 DNA band가 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

2. 이입된 유전자 발현에 의한 단백생성의 확인

1) ELISA를 이용한 TNF 발현의 확인

ELISA로 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF를 배양한 상층 배양액의 TNF양을 측정한 결과(표준곡선 Fig. 4 참고), NCI-H2058-TNF는 23.6±0.84ng/24h/10^6 cells의 TNF를 생산하였고 WEHI164-TNF는 12.2±0.36ng/24h/10^6cells의 TNF를 생산하였다. 반면, 각각의 모세포주인 NCI-H2058과 WEHI164는 TNF를 전혀 생산하지 않았다.

2. 생산된 TNF의 생물학적 활성도 측정

농도를 아는 TNF가 WEHI164 모세포를 죽이는 세포사망율을 표준곡선(Fig. 5)으로 삼고, TNF유전자 이입이 DNA 수준에서 확인되었고 ELISA를 이용하여 TNF를 생산함이 확인된 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF를 배양하여 얻은 배양액이

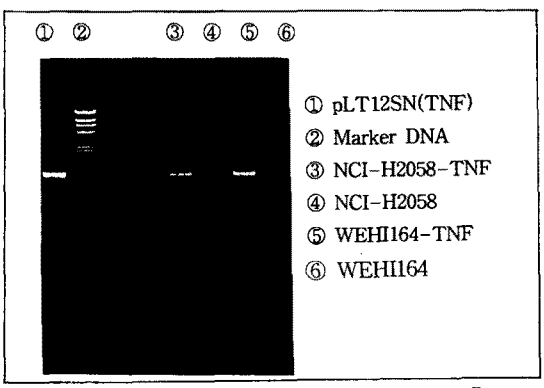

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of Neo^R gene PCR amplification.

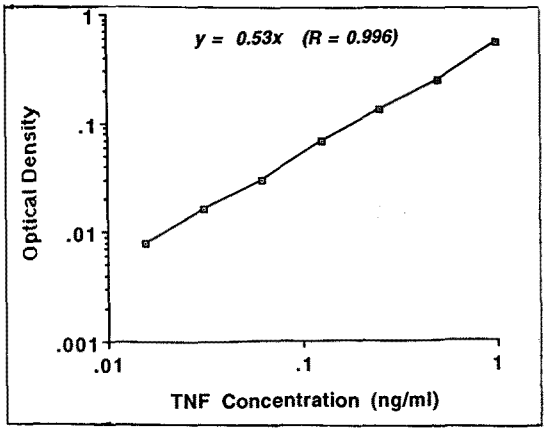

Fig. 4. Standard curve in TNF ELISA. Optical density according to TNF concentration.

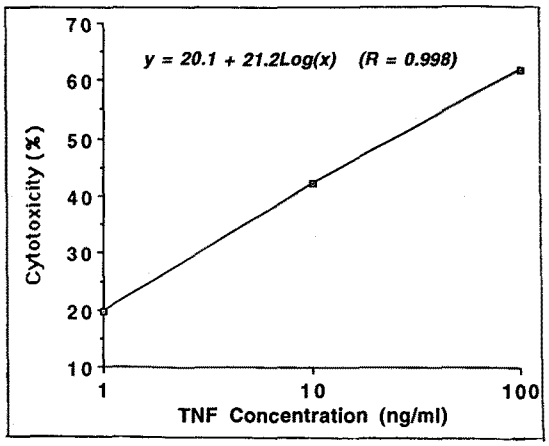

Fig. 5. Standard curve in TNF bioassay. Percent cytotoxicity according to TNF concentration.

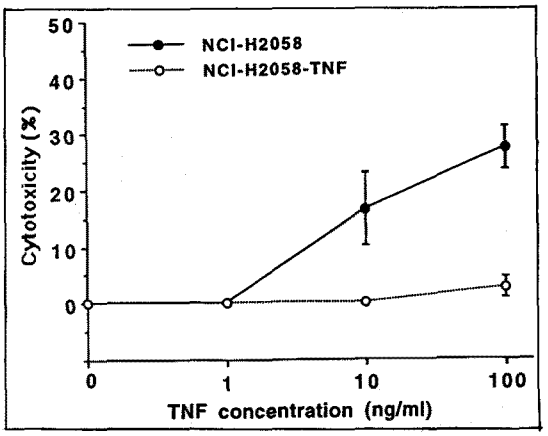

Fig. 6. Comparison of sensitivity of NCI-H2058 cell lines to exogenous soluble TNF-a before and after TNF gene transfer ($p<0.01$).

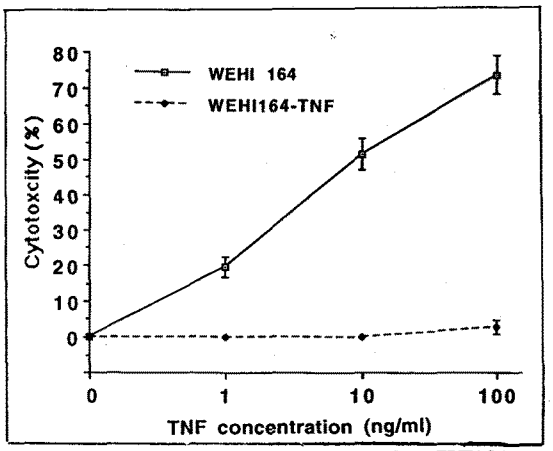

Fig. 7. Comparison of sensitivity of WEHI164 to exogenous soluble TNF before and after TNF-α gene transfer($p<0.01$).

WEHI164 모세포를 죽이는 세포사망율을 표준곡선과 비교하여 생산된 TNF의 생물학적 활성도를 측정하였다. TNF 유전자 이입된 세포주에서 발현된 생물학적 활성을 지닌 TNF의 양은 NCI-H2058-TNF 경우 32.3±15.2ng/24h-10^6cells이었고, WEHI164-TNF의 경우는 10.9±1.47ng/24h-10^6cells이었다. 반면에 대조군으로 TNF 유전자 이입을 하지 않은 각각의 모세포주를 배양하여 얻은 배양액의 경우는 WEHI164 세포주 사망을 일으키지 않았다.

위의 결과에서, TNF 유전자를 이입받은 TNF 감수성인 NCI-H2058과 WEHI164 두 세포주 모두에서 생물학적으로 활성을 지닌 TNF를 분비함에도 불구하고 사멸되지 않고 생존한 세포들이 있음을 알 수 있었다.

3. TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 유전자 이입 전후의 TNF에 대한 세포주의 감수성(세포사망율)을 TNF의 농도 변화에 따라 비교하였다(Fig. 6과 Fig. 7). 그 결과, NCI-H2058의 경우 TNF 농도 100ng/ml에서 모세포는 25±3%의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 3±2%의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p<0.01$). 그리고, WEHI-164의 경우도 TNF 농

도 100ng/ml에서 모세포는 73±5%의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 3±2%의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p<0.01$). 따라서, TNF 유전자 이입된 세포주인 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF는 각각 자신의 모세포주인 NCI-H2058와 WEHI164보다 TNF에 의한 세포독성에 뚜렷한 내성 획득함을 알 수 있었다.

고 찰

1980년대 초에 retrovirus를 이용한 유전자 이입이 시도된 이래, 최근에는 환자 치료에까지 retrovirus를 이용한 유전자 이입 방법이 시도되고 있다. retrovirus를 이용한 유전자 이입법은 이입된 유전자가 숙주 세포의 genomic DNA에 삽입되어 지속적으로 이입된 유전자를 발현시키는 장점과, 물리적인 방법이나 화학적인 방법으로 유전자를 이입하는 것보다 유전자 이입율이 높은 장점이 있어서 최근 임상적으로 응용되는 유전자 이입은 대부분 retrovirus를 이용한 유전자 이입법을 쓰고 있다. 그러나, retrovirus를 이용한 유전자 이입은 생체 내에서 직접 적용하여 감염시킬 경우 그 효율이 낮기 때문에, 생체 외에서 retroviral vector를 이용하여 세포에 유전자의 이입을 시도한 후 선택을 시행한 다음 숙주(host)에 주입하는 방법을 쓴다. 그런데, 이 과정에서 이입된 유전자가 TNF등의 세포독성이 있는 cytokine일 경우 내성이 문제가 된다.

Tumor Necrosis Factor는 1975년 생쥐를 BCG로 전처치한 다음 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 발견한 이래, 여러 암 세포에 생체 내(in vivo)에서는 출혈성 괴사를 일으키고, 생체 외(in vitro)에서는 cytolysis를 보임이 밝혀져 있다. 그러나, 이런 TNF의 암 세포에 대한 세포독성을 인체에 응용하기에는 문제점이 있다. 즉, TNF가 효과적인 항암효과를 나타낼 수 있는 용량은 400~500μg/kg/day이지만 5μg/kg/day 이상으로는 TNF의 전신독성 때문에 인체에 투여할 수 없다. 이런 TNF의 전신독성을 피하면서 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여, TNF 유전자를 암세포주에 이입시키고 발현시켜서 암세포 주위에서만 TNF의 농도가 높게 유지하는 방법이 시도되었다. 이런 시도 중, 생체 외(in vitro) 실험의 경우 기대한 바와는 달리, TNF에 감수성이 있어서 TNF에 의해 죽던 모세포가 TNF 유전자가 암세포주에 이입되고 나서는 TNF의 세포독성에 내성을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 사람 중피종 세포주(NCI-H2058)와 생쥐 섬유육종 세포주(WEHI164)에 TNF-α 유전자를 retrovirus를 이용하여 이입하고 이입 전후의 TNF에 대한 감수성의 정도를 비교해 보게 되었다. 그 결과 TNF 유전자 이입으로 TNF의 세포독성에 대한 내성 획득함을 알 수 있었다. 이와 같은 연구자의 연구 결과를 뒷받침하는 연구 보고들을 살펴보면, TNF 유전자를 L929(생쥐의 섬유육종 세포주)에 이입하고 TNF를 발현시키면 TNF 유전자가 이입된 L929-TNF 세포주는 TNF에 대해 매우 감수성이 있던 성질이 바뀌어서 내성을 나타내었다고 보고한 연구가 있었다[16]. 또한, 사람 폐암 세포주에 TNF-α 유전자를 이입하고 생체 내(nude mouse)에 주입한 결과 종양의 성장이 억제되었지만 9개월이 지나서도 현미경적으로는 종양 세포들이 남아 있다고 보고한 연구[21]를 이번 연구 결과인 'TNF 유전자 이입 후 TNF에 대한 내성 획득'으로 설명할 수 있겠다. 이와 유사하기는 하지만 앞의 연구와 그 기전에 있어서 선후가 바뀌었다고 볼 수 있는 다른 연구에서는 TNF에 감수성이 있는 세포주인 ZR-75-1(사람 유방암 세포주)를 TNF를 계속 처리면서 계대배양하면 TNF에 내성을 보이는 clone이 출현하는데 이 clone을 선택적으로 배양할 경우, TNF에 내성을 보이게 된 clone에서 TNF를 생산하지 않던 세포주가 TNF를 생산하는 세포주로 바뀜을 보고하였다[22]. 또, 비슷한 연구로 TNF에 감수성이 높은 세포주인 L929로부터 선택 배양되어 TNF에 내성을 보이는 clone인 L929r에서 TNF가 생산됨을 보고하였다[23]. 이상의 연구 보고들을 토대로 하지 않더라도 TNF 유전자를 이입하고 발현시켜 TNF를 분비하게 하면 분비된 TNF에 대해서 살아남는 세포는 자신이 분비한 TNF뿐만 아니라 외부에서 투여한 TNF에 내성을 보일 것이라는 것은 어느 정도 예측 가능하였던 결과로써 이번 실험에서 확인할 수 있었다.

TNF 유전자 이입을 생체 내(in vivo)에서 실험한

경우는, TNF 유전자를 tumor-infiltrating-lymphocyte(TIL)에 이입 후 환자 치료에 시도하고 있는 것이 그 예[24]라 할 수 있다. 또한, 비록 생체 외 실험에서 TNF에 대해 감수성이 없고 내성을 나타내는 세포주라도 TNF 유전자를 발현할 경우, 생체 내에서 훨씬 암 발생이 억제됨이 보고되고 있다.[25] 이 연구 결과는 생체 내에서 암세포주로부터 발현된 TNF가 암세포에 대해 직접적인 세포독성 작용이 아닌 간접적인 방법인 면역세포의 동원을 통한 방법으로 암세포의 생체 내 성장을 억제한다고 생각할 수 있고, 본 논문의 연구 결과가 '암세포에 TNF 유전자를 이입하여 발현된 TNF가 직접 암세포에 세포독성을 일으켜 항암효과를 기하려는 시도는 TNF 유전자의 이입으로 암세포가 TNF에 대한 내성을 획득하게 됨으로써 처음 기대하였던 항암효과에는 한계 있음'을 밝힌 이상, TNF 유전자 이입에 의한 생체 내에서 간접적인 항암효과에 보다 더 연구가 필요하리라 생각된다. 뿐만 아니라, TNF 유전자를 이입받은 TIL의 경우 생체 내에서 TNF 유전자 발현이 기대한 정도에 못 미치는 문제가 있어서 암세포주 자체에 대한 TNF 유전자 이입과 그의 생체 내 실험에 보다 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : 종양괴사인자(tumor necrosis factor ; TNF)는 여러 암세포에 대해서 세포독성을 보임이 알려져 있다. 그리고, 최근 분자생물학적 발전에 힘입어 TNF 유전자를 암세포에 이입하고 발현시키는 연구가 그 동안 진행되었다. 이들 연구의 목적은, TNF를 전신적으로 쓸 경우 전신 부작용이 심하여 인체에 쓸 수 없는 현 단계에서 암세포 자체에서 TNF를 만들어 내어서 암세포 주위에서만 작용하게 함으로써 인체에 미치는 전신독성을 최소한으로 줄이고 암세포를 사멸시키는 것이었다.

암세포에 TNF 유전자를 이입함으로써 예상되는 항암효과가 성공을 거두기 위해서는 첫째, TNF 유전자가 이입된 암세포에서 분비된 TNF가 주위 암세포를 성공적으로 사멸시켜야 하고 둘째는 분비된 TNF가, TNF 유전자가 이입된 암세포 자신을 사멸시켜야 한다. 본 연구는 이 중 두번째 기전, 즉 TNF 유전자가 이입된 암세포가 자신이 분비한 TNF에 의해서 사멸되거나 또는 세포 독성이 나타날 수 있는가를 검증하는데 목적을 두었다.

방법 : TNF에 감수성을 보이는 인체의 중피종 세포주인 NCI-H2058과 생쥐 섬유육종 세포주인 WEHI164에 TNF-α 유전자를 retroviral vector를 이용하여 이입하고 TNF를 발현을 시도하였다. DNA 수준과 단백질 수준에서 TNF-α 유전자가 제대로 이입되어 발현되는지 PCR과 ELISA 및 bioassay (MTT assay)로 확인하였다. 그리고, TNF 유전자가 이입된 세포주가 자신이 분비하는 TNF에 사멸되는지 아니면 생존하는지 MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium) assay로 알아보았다. 그리고, 만일 TNF 유전자가 이입된 암세포가 자신이 분비한 TNF에 사멸되지 않고 생존할 경우, TNF 유전자가 이입된 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF 암세포주가 외부에서 준 TNF에도 내성을 보이는지도 추가로 MTT assay 방법으로 확인해 보았다.

결과 :

1) TNF-α 유전자 이입 및 발현 확인

PCR을 시행한 결과, TNF 유전자가 이입된 NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF 세포주는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보인 반면 각각의 모세포주에서는 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 DNA 수준에서 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 그리고, NCI-H2058-TNF와 WEHI164-TNF의 상층 배양액의 TNF양을 ELISA와 bioassay(MTT assay)로 측정한 결과, 생물학적 활성을 지닌 TNF를 각각 23.6±0.84ng/24h/10^6cells, 12.2±0.36ng/24h/10^6cells 생산함을 알 수 있었다.

2) TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 유전자 이입 전후의 TNF에 대한 세포주의 감수성(세포사망율)을 TNF의 농도 변화에 따라 비교한 결과, NCI-H2058의 경우 TNF 농도 100ng/ml에서 모세포는 25±3%의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 3±2%의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p<0.01$). 그리고, WEHI-164의 경우도 TNF 농도 100ng/ml에서 모세

포는 73±5%의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 3±2%의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p<0.01$).

결론 : TNF에 감수성을 보이는 암세포주인 NCI-H2058과 WEHI164에 TNF 유전자 이입을 시행하고 TNF가 발현되게 하였을 때, TNF 유전자를 이입받은 두 암세포주 모두에서 자신이 생산해 내는 TNF에 내성을 보여 생존하였다. 뿐만 아니라 생존한 이들 세포는 외부에서 준 TNF에 대해서도 내성을 보였다. 따라서, 암세포에 대한 TNF 유전자 이입을 통한 유전자 요법이 성공을 거두려면 유전자 이입된 세포에서 분비하는 TNF의 면역 세포 동원 방법 등의 간접적인 항암기전이 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci USA **72**:3666, 1975
2) Matthews N : Tumor-necrosis factor from the rabbit. Br J Cancer **38**:310, 1978
3) Surgarman BJ, Aggarwell BB, Hass PE : Recombinant human tumor necrosis factor-α: effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science **230**:943, 1985
4) Aggarwal BB : Tumor necrosis factors-TNF-α and TNF-β : their structure and pleiotropic biological effects. Drugs of the Future **1269**: 891, 1987
5) Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Von Der Heyden J, Tizard R, Kawashima E, Shaw A: Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem **152**:515, 1985
6) Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB: Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor. Nature **313**:803, 1985
7) Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spenser SA, Henjel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goedde DV, Harkins RN : Human tumor necrosis factor. J Biol Chem **260**:2345, 1985
8) Jones EY, Stuart DI, Walker NPC : Structure of tumor necrosis factor. Nature **338**:225, 1989
9) Tartaglia LA, Goeddel DV : Two TNF receptors. Immunol Today **13**:151, 1992
10) Varmus HE : Form and function of retroviral provirus. Science **216**:812, 1982
11) Cone RD, Mulligan RC : High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. Proc Natl Acad Sci USA **81**:6349, 1984
12) Miller AD, Rosman GJ : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Bio Techniques, **7**:980, 1989
13) Anderson WF : Human gene therapy. Science **256**:808, 1992
14) Champan PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL: Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. J Clin Oncol **5**:1942, 1987
15) Teng MN, Park BH, Koeppen HKW: Long-term inhibition of tumor growth by tumor necrosis factor in the abscence of cachexia or T-cell immunity. Proc Natl Acad Sci USA **88**:3535, 1991
16) Vanhaesebroeck B, Decoster E, Ostade XV : Expression of an exogenous tumor necrosis factor(TNF) gene in TNF-sensitive cell lines confers resistance to TNF-mediated cell lysis. J Immunol **148**:2785, 1992
17) Kriegler M : Retroviral packaging cell lines. In Gene Transfer and Expression. Stockton Press, New York **1990**:51, 1990
18) Espevik T, Meyer JN. : A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cy-

totoxic factor / tumor necrosis factor from human monocytes. J Immumol Methods **95**: 99, 1986

19) Toda H, Shiho C, Kuroshima KI, Koyama M, Tsukamoto K: An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods **93**:157, 1986

20) Carmichael J, DeGraff WG, Garzdar AF : Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res **47**:936, 1987

21) Han SK, Brody SL, Crystal RG : Suppression of in vivo tumorigenicity of human lung cancer cells by retrovirus-mediated transfer of human tumor necrosis factor-α cDNA. Am Rev Respir Dis **147**:A457, 1993

22) Spriggs D, Imamura K, Rodriguez C : Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. Proc Natl Acad Sci USA **84**:6563, 1987

23) Rubin BY, Anderson SL, Sulivan SA, Williamson BD, Carswell EA, Old LJ: Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. J Exp Med **164**:1350, 1986

24) Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K : Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes mediated by retroviral gene transduction. New Engl J Med **323**:570, 1990

25) Vanhaesebroeck B, Mareel M, Roy FV, Grooten J, Walter Fiers : Expression of tumor necrosis factor gene in tumor cells correlates with reduced tumorigenicity and reduced invasiveness in vivo. Cancer Res **51**:2229, 1991