

인터루킨-4를 발현하는 재조합 백신시아 바이러스에 의한 암성장의 억제

¹서울대학교 유전공학연구소 바이러스 연구실, ²中國 長春農牧大學 生物工學 研究室

윤기정¹ · 金寧一² · 김선영¹

=Abstract=

Effective Antitumor Activity of a Recombinant Vaccinia Virus Expressing Murine Interleukin 4

Keejung Yoon¹, Ning-Yi Jin² and Sunyoung Kim¹

¹Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; ²Research Institute, Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130026, China

Vaccinia virus is the prototype orthopoxvirus that has been used as a vaccine strain for small pox. This virus has been used to express a variety of cellular and viral genes in mammalian cells at high levels. Interleukin-4 (IL-4) has been found to stimulate the proliferation of T cells and enhance the cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes. To test the immunotherapeutic potential of IL-4 delivered *in vivo* by poxvirus, a recombinant vaccinia virus expressing the murine IL-4 gene (RVVmIL-4) was constructed. A high level of IL-4 production was confirmed by infecting HeLa cells and measuring IL-4 in cell culture supernatant by ELISA. As a tumor model, two cell lines were used: the murine T leukemic line P388 and the murine breast cancer line TS/A. CDF1 mice were intraperitoneally inoculated with 1×10^5 cells of P388. Mice were injected at the same site with 5×10^5 PFU of recombinant vaccinia virus; first, 3 days after the injection of tumor cells and thereafter once every week for 3 weeks. Intraperitoneal injections of RVVmIL-4 significantly prolonged the survival time of mice inoculated with tumor cells. All mice injected with RVVmIL-4 remained alive for 30 days after the postinoculation of tumor cells, while 100% and 70% of the animals injected with saline or wild type vaccinia virus died, respectively. In another tumor model using TS/A, tumor was established by subcutaneously inoculating 2×10^5 tumor cells to BALB/c mice. After tumor formation was confirmed on day 4 in all mice, 5×10^6 PFU of RVVmIL-4 was inoculated subcutaneously three times, once every week for 3 weeks. The TS/A tumor was eradicated in two of the nine mice. Seven of the nine mice treated with RVVmIL-4 developed a tumor, but tumor growth was significantly delayed compared to those treated with saline or wild type vaccinia virus. These results indicate that recombinant vaccinia viruses may be used as a convenient tool for delivering immunomodulator genes to a variety of tumors.

Key Words: Recombinant vaccinia virus, Interleukin-4, Gene therapy

서 론

백시니아 바이러스는 *Poxviridae* 科내 *Orthopoxvirus* 屬에 속하며, 200 kb에 달하는 선형 이중선 DNA 게놈에 198개의 open reading frame을 갖고 있다 (Gloebelet *et al.*, 1990). 이 바이러스는 DNA 게놈의 복제, 전사 등을 포함한 생활사의 모든 단계가 숙주 세포의 세포질에서 일어나는 것을 특징으로 한다. 백시니아 바이러스는 초기에 천연두의 병원체인 variola 바이러스에 대한 생바이러스 백신으로 사용되어 오다가, 외부 유전자와 재조합할 수 있는 기술이 개발된 이후 다양한 종류의 이중 유전자를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스가 제조되고 있다 (Mackett *et al.*, 1982).

백터로서의 백시니아 바이러스가 갖는 장점은 다음과 같다. 첫째, 감염할 수 있는 숙주 세포의 범위가 넓어 다양한 종류의 세포에 유전자를 전달할 수 있으며, 둘째, 레트로바이러스 백터나 아데노바이러스 백터보다 큰 외부 유전자 (약 20 kb까지)를 삽입할 수 있으며 (Smith *et al.*, 1983), 셋째, 동물 세포를 숙주로 하는 바이러스이므로 발현시키고자 하는 유전자가 진핵생물에서 기원한 경우 단백질의 합성에 필요한 전사 후 조절 (예: 당화, 인산화 등) 여부를 걱정할 필요가 없다는 것이다. 넷째로, 백시니아 바이러스에 의해 만들어지는 단백질의 양은 전체 단백질의 5~10%에 육박할 만큼 발현되는 수준이 높고, 다섯째, 바이러스 백터를 유전자 치료나 백신 목적으로 이용하고자 할 때 안전성이 문제가 되는데 백시니아 바이러스는 이미 인간에게 사용되어 왔기 때문에 안정성이 어느 정도 입증되어 있다는 것이다.

본 연구에서는 사이토카인을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스를 제조하여 항암 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 조사하였다. 항암 치료에는 여러 방법이 사용되어 왔는데 특히 재조합 사이토카인을 이용하는 치료기술이 집중적으로 연구되어 왔다. 그러나 생체 내에 주입한 사이토카인의 반감기가 짧아 많은 양의 단백질이 필요할 뿐 아니라, 여러 가지 부작용을 보이기 때문에 실제 임상에서의 사용은 제한적이었다. 그러나 사이토카인을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스 백터를 특정 장소에 주입할 경우 그 부분에서

는 높은 양의 사이토카인이 유지되는 반면 다른 장소에서는 매우 낮은 양이 존재하게 될 것이다. 또한 간단한 설비로도 바이러스 농도를 10^9 plaque forming unit (PFU)/ml 이상으로 생산할 수 있고, 실온에서 수 개월간 방치하여도 감염성을 잃지 않을 만큼 안정성이 뛰어나 제조와 사용에 많은 장점이 있다.

본 연구에서는 생쥐의 IL-4를 모델 사이토카인으로 사용하였다. 이 사이토카인은 활성화된 T_H2 세포에서 분비되는데 휴지기의 T 세포를 자극하여 독성 T 세포 (cytotoxic T cell)로 분화하는데 작용하고, 이미 분화된 독성 T 세포에는 perforin 활성을 상승시킨다는 보고도 있다 (Liu *et al.*, 1990). 최근에는 IL-4를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스를 이용하여 생쥐 모델에서 멜라노마와 같은 피부암 성장을 저해했다는 보고가 있다 (Elkins *et al.*, 1994). 위 사실들을 근거로 하여 IL-4를 발현하는 백시니아 바이러스를 제조하여 항암 효과 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. Homologous recombination을 위한 백터 p1-10 mL-4의 제조

백시니아 바이러스의 초기 (early) 프로모터가 들어 있는 pSFJ1-10 플라스미드 (Jin *et al.*, 1994)를 *Sma*I 제한효소로 자르고 calf intestine phosphatase 효소로 DNA 절편 양끝을 탈인산화시켰다. 레트로바이러스 백터 MFG에 삽입되어 있는 mL-4 유전자를 *Sma*I 제한 효소로 잘라 낸 후 전기 영동하여 젤상에서 회수하고 pSFJ1-10에 삽입시켜 p1-10 mL-4 플라스미드를 제조하였다 (Fig. 1).

2. DNA 트랜스펙션

293T 세포주 (DuBridge *et al.*, 1987)를 35 mm 배양 접시에서 조밀도가 80% 정도 되도록 키운 후 배지를 제거하고 야생형 백시니아 바이러스를 multiplicity of infection (MOI)이 0.05가 되도록 감염시켰다. 감염 시작 30분 후 플라스미드 DNA 20 μ g, 리포펙틴 (Gibco BRL) 20 μ g가 녹여져 있는 OPTI-MEM 배지 (Gibco BRL)를 세포에 가하고 8시간이 지난 후 새로운 배지 3 ml를 넣어 2일 동안 배양하였다.

3. 플라크 수 측정

바이러스를 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 의 배율로 phosphate-buffered saline (PBS)에 희석시킨 후, 6 well plate 상에 배양된 80% 조밀도의 COS-7 세포주 (ATCC# CRL1651)에 well 당 200 μ l씩 바이러스를 가하여 CO₂ 세포 배양기에서 감염시켰다. 1시간이 지난 후 methyl cellulose가 1% (w/v)로 녹여진 DMEM 배지 3 ml을 넣어 주고 플라크 생성이 확인해질 때까지 배양하였다. 플라크 구분이 용이해지면 배지를 제거하고 10% formaldehyde (v/v)가 들어 있는 PBS로 3번 세척한 후 0.1% crystal violet 용액으로 5분간 처리하여 플라크 수를 세었다.

4. Hemagglutination (HA) 분석

트렌스펙션한 뒤 이들이 지나 세포와 배지를 회수하여 dry ice와 37°C 항온 수조에서 각각 5분씩 3번 번갈아 가며 세포를 용해하여 바이러스를 회수하였다. 그 후 플라크 수를 측정하여 바이러스의 농도를 측정하고, 100 mm 배양접시 1개당 1,000개의 플라크가 생기도록 RK13 세포주 (ATCC# CCL37)에 백시니아 바이러스를 희석하여 감염시켰다. 3일 정도가 지나 플라크 형성이 관찰되면 배지를 제거하고 PBS로 한번 세포를 세척한 후 1:50의 배율로 희석된 닭의 적혈구 (이하 RBC) 2 ml을 가하였다. 10분이 지난 후 PBS로 세척하고 RBC가 붙지 않은 플라크를 선별하였다.

5. ELISA에 의한 mL-4의 역가 측정

HeLa 세포주 (ATCC.# CCL2)를 6-well plate에 80% 정도 자라게 배양한 후, 각 well에서 배지를 모두 제거하고 MOI가 0.01, 0.1, 1, 5가 되도록 RVV_{mIL-4}를 가하여 1시간 동안 CO₂ 세포 배양기에서 감염시켰다. 각각의 well에 새 배지를 가한 후 24, 48, 72시간의 간격으로 배지를 회수하여 생쥐 IL-4를 검출할 수 있는 ELISA 키트 (Endogen)를 이용하여 시료 내의 mL-4 역가를 측정하였다.

6. 백시니아 바이러스 정제

HeLa 세포주가 80%의 조밀도로 배양된 150 mm 배양접시 3개에 백시니아 바이러스를 감염시킨 후 3일간 방치하여 증식시키고, 세포와 배지를 모두 회수하여 초음파 분쇄법 (15초, 10회)

으로 세포를 잘게 부수었다. 이를 30 ml의 36% 설탕용액 (10 mM Tris.Cl, pH 9.0)위에 가하여 SW-28 rotor를 이용, 14,000 rpm에서 1시간 30분 동안 초원심분리를 이용하여 덩어리를 만들었다. 다시 이 덩어리를 10 mM Tris.Cl (pH 9.0) 용액에 녹여 초음파 분쇄 (15초, 3회)한 후 24~40%로 농도 구배된 설탕용액에 가하여 12,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 바이러스만으로 이루어진 밴드를 얻었다. 이 밴드를 주사기로 회수하여 원심분리하고 다시 작은 덩어리로 만든 다음 10 mM Tris.Cl (pH 9.0) 용액 1 ml에 녹인 후 200 μ l씩 분주하여 -70°C 냉장고에 보관하였다.

7. 생쥐에서의 항암 실험

생쥐의 breast cancer line인 TS/A 세포주는 항원성이 약해 생쥐에 주입했을 때 쉽게 암을 형성한다 (Nanni *et al.*, 1983). TS/A 세포주를 150 mm 배양 접시에서 증식시켜 트립신으로 떼어 내고 PBS로 3번 세척한 후 마지막 농도가 10^6 cells/ml이 되게 하였다. 생후 4주된 BALB/c 생쥐의 배부위에 준비한 세포를 200 μ l (총 2×10^5 cells)씩 피하주사하였다. 생쥐의 leukemia line인 P388 세포주는 1×10^5 세포를 CDF1 생쥐의 복강에 주입하였다. 생쥐에 TS/A를 주입하고 4일이 지나, 주사한 자리에 암이 생겼음을 확인하고 야생형 백시니아 바이러스와 RVV_{mIL-4}를 각각 1×10^5 , 5×10^5 PFU 씩 암세포 부위에 피하 주사하였다. P388을 주입한 쥐에는 3일 후 5×10^5 PFU 씩을 복강에 주입하였다. 두 가지 암모델 모두 첫 바이러스 주입일을 기준으로 1주일이 경과할 때마다 동일 양의 바이러스를 다시 주입하였다. 암의 크기는 (암의 최단 지름)² X (최장 지름)으로 계산하였다.

결 과

1. Homologous recombination을 위한 벡터 p1-10 mL-4의 제조

재조합 백시니아 바이러스를 만들기 위한 서플벡터 p1-10 mL-4 플라스미드의 구조는 Fig. 1에 보이는 바와 같다. 이 벡터의 근간이 되는 pSFJ1-10 플라스미드의 특징은 다음과 같다. 첫째, 높은 수준의 단백질 발현을 위해 A-type inclusion body 프로모터와 백시니아 바이러스의 early region 7.5 kDa 프로모터를 연결했다는 것이

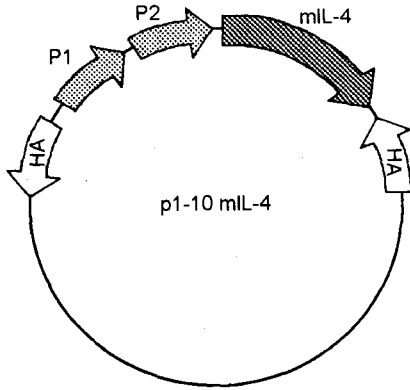


Fig. 1. Plasmid shuttle vector p1-10 mIL-4 containing vaccinia virus promoter and murine interleukin-4 coding sequence. P1, ATI promoter; P2, vaccinia virus early promoter.

다 (Jin *et al.*, 1994). 이러한 구조의 프로모터가 삽입된 재조합 백시니아 바이러스를 이용했을 때 약 7배 정도의 높은 단백질 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 둘째로, 백시니아 바이러스와의 homologous recombination을 위해 바이러스의 생활사에 중요하지 않은 유전자를 선택하여 벡터의 양쪽 가장자리에 삽입하게 되는데, pSFJ1-10 플라스미드에는 기존에 많이 사용되던 tk 유전자가 아닌 hemagglutination (HA) 유전자가 사용되었다. 따라서 이중 유전자를 가지는 재조합 백시니아 바이러스는 HA⁻ 표현형을 가지게 된다. 이후 HA⁻ 표현형을 갖는 백시니아 바이러스에 의해 형성된 플라크에는 닭의 적혈구가 붙지 않는다는 성질을 이용하여 재조합 백시니아 바이러스를 분리하였다.

2. 재조합 백시니아 바이러스의 제조

재조합 백시니아 바이러스를 만들기 위해 293T 세포주에 야생형 백시니아 바이러스를 감염시키고 30분 후에 p1-10 mIL-4 플라스미드를 트랜스펙션하였다. 그로부터 2일이 경과한 후 초음파를 이용하여 세포를 분쇄시켜 바이러스를 얻었다. 이 바이러스를 토끼의 콩팥 세포주인 RK13에 감염시킨 후 HA 분석을 수행하여 HA⁻ 표현형을 갖는 백시니아 바이러스를 분리하였다. HA⁻ 백시니아 바이러스는 3/20,000의 확률로 얻어졌다. HA⁻ 클론을 분리하는 과정에서 야생형 바이러스가 혼합되었을 가능성이 있기 때문에 클론들을 다시 RK13 세포주에 감염시켜

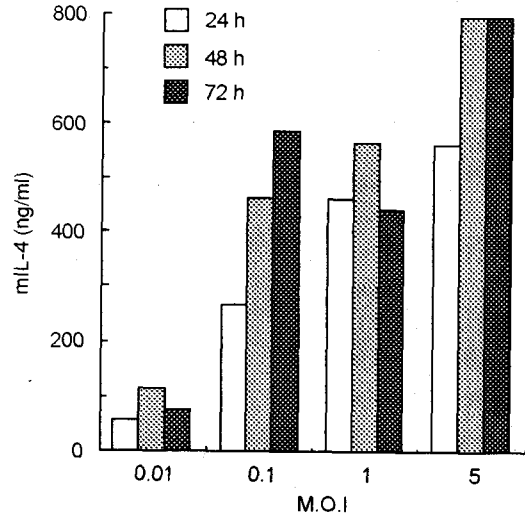


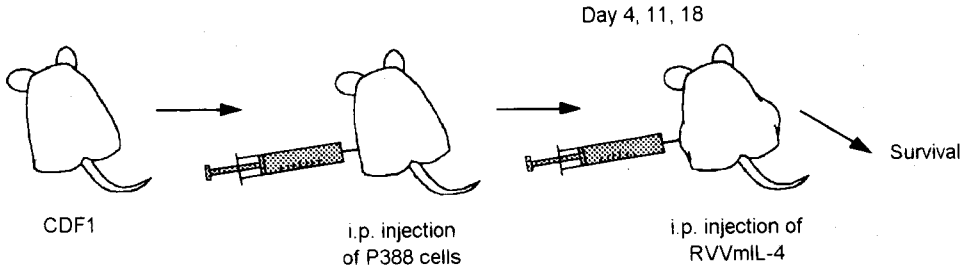
Fig. 2. Expression of murine IL-4 by recombinant vaccinia virus RVVmIL-4. HeLa cells were infected at MOI 0.01, 0.1, 1 and 3 with RVVmIL-4. Supernatants were harvested 24 h later and assessed for content of IL-4 by ELISA.

HA 분석을 통해 분리하는 과정을 3회 더 반복하여 순수한 HA⁻ 바이러스를 얻었다.

3. 백시니아 바이러스에 의한 IL-4 발현 역학

이와같이 선별 분리한 HA⁻ 바이러스를 HeLa 세포주에 감염시켜 2일 후에 배지 상층액을 회수하고 ELISA를 수행시킨 결과, 위에서 얻어진 3클론 모두 mIL-4를 발현하고 있음을 확인하였다. 이중 한 개의 재조합 백시니아 바이러스를 RVVmIL-4라 명명하였다. RVVmIL-4에 의한 IL-4 생산 양상을 두 가지 방법으로 조사하였다. 첫째, MOI를 달리하였을 때 발현되는 IL-4의 양을 조사하였다. 감염 후 24시간 후에 세포 상층액을 회수하여 조사한 결과 MOI가 0.01일 때 ml당 55 ng, 0.1일 때 267 ng, 1일 때 464 ng의 IL-4를 생산하고 있었다. 즉 동일 시간대를 기준으로 했을 때 MOI와 생산되는 IL-4의 양에는 선형적인 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 48시간 후에 시료를 회수하여 측정하였을 때에도 동일하게 나타났으나, 72시간 후에 측정하였을 때에는 MOI 0.1 이상에서는 큰 차이가 없었다. 둘째, 감염 후 배양시간에 따른 IL-4의 생산량 변화를 조사하였다. 이 결과 MOI를 0.1로 감염시켰을 때 배양시간과 생산되는 IL-4의 양이 선형적인 상관관계에 있음을 알 수 있다. 하지만

P388



TS/A

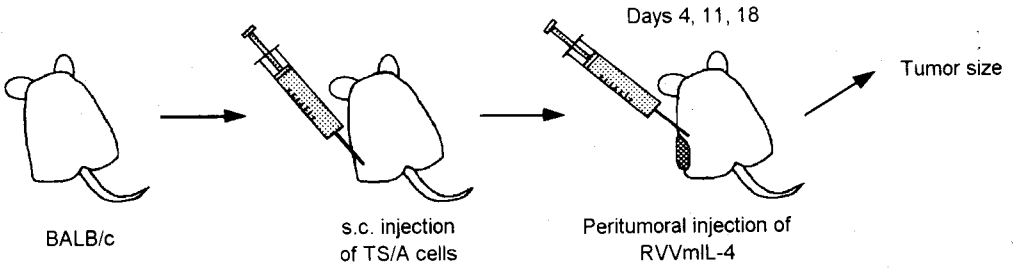


Fig. 3. Overall procedure for vaccinia virus-mediated IL-4 gene therapy of cancers.

MOI 0.01, 1, 5로 감염시켰을 때에는 배양시간에 비례해서 IL-4 생산이 증가되지 않음을 알 수 있었다.

4. RVVmIL-4에 의한 암 억제효과 조사

RVVmIL-4의 항암 효과를 알아보기 위하여 사용한 실험 방법은 Fig. 3에 보여지는 바와 같다. 암모델로서는 생쥐의 leukemia line인 P388 세포주와 breast cancer line인 TS/A 세포주를 이용하여 동물에서 암을 만들어 냈다. P388 세포주는 복강에 주입하였을 때 복강 내에서 증식하면서 백혈구를 파괴하고 장기를 손상시켜 쥐를 죽게 만들고, TS/A 세포주는 복부 피하에 주입하였을 때 외부에서 볼 수 있는 고형암을 형성한다. P388에 의해 형성된 암에 대한 효과는 수명 연장의 정도를 척도로 삼아 분석하였고, TS/A 세포주로 인해 형성된 암에 대한 RVVmIL-4의 효과는 암의 성장속도를 척도로 삼았다. 백시니아 바이러스에 의한 유전자 발현은 주입한 국부에서 3~4일을 정점으로 7일 정도가 지나면 낮아진다는 보고에 따라 (Elkins *et al.*, 1994) 4일째 암에 RVVmIL-4 바이러스를 주사하고 매 주마다 RVVmIL-4를 다시 주입하였다. 사용된 바이러스는 불필요한 세포 단백질이 끼어 들어가는 것을 방지하기 위해 설탕 농도구배를 이용한 초원심분리법으로 바이러스를 정제하여 순수도를 높였다.

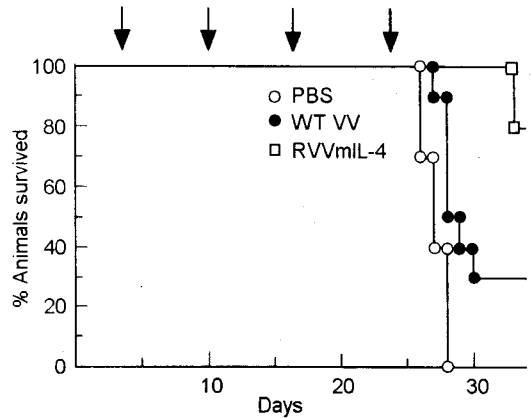


Fig. 4. Effect of treatment with recombinant vaccinia virus RVVmIL-4 on i.p. injection of P388 tumor cells. CDF1 mice were inoculated with 10^5 of P388 tumor cells. Four days later, mice were inoculated with PBS (\circ), 5×10^6 wild type vaccinia virus (WT VV: \bullet) or 5×10^6 recombinant virus RVVmIL-4 (\square) i.p.. At weekly intervals thereafter, all inoculations were repeated as indicated in arrow.

P388을 이용한 모델에서는 RVVmIL-4가 현저하게 쥐의 수명을 연장하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이 모델에서는 1×10^5 개의 P388 세포주를 복강에 주입하고 4일째 되는 날부터 RVVmIL-4를 5×10^6 PFU씩 1주 간격으로 3번 주입하였다. 이때 대조군으로서 PBS와 야생형

고 찰

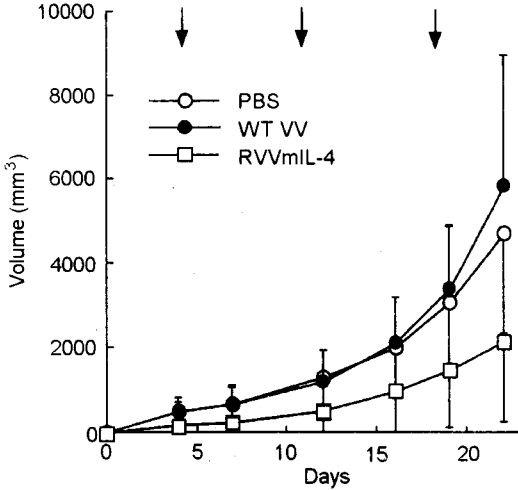


Fig. 5. Effect of injection of RVVmIL-4 on TS/A tumor. 2×10^5 TS/A tumor cells were inoculated subcutaneously in the shaved area of the left flank of BALB/c mice. All mice had palpable tumors by day 4. On days 4, PBS (○), 5×10^6 PFU of wild type vaccinia virus (■) or RVVmIL-4 were peritumorally injected. At weekly intervals thereafter, injections were repeated as indicated in arrow. Tumor volume was calculated as (shorter diameter)² X (longer diameter); in mm³.

백시니아 바이러스를 같은 조건으로 주사하였다. 항암 효과는 생존해 있는 생쥐의 수를 일정 시간 간격을 두고 세어 측정하였다. Fig. 4에 보이는 바와 같이 암세포 주입한 날을 기준으로 30일이 지났을 때 RVVmIL-4를 주입받은 실험군의 쥐 10마리는 모두 생존해 있는데 반해 야생형 백시니아 바이러스 처리군, mock 처리군의 생존율은 각각 30%, 0%임을 발견하였다.

TS/A는 2×10^5 세포를 생쥐의 복부 피하에 주사하였을 때 4일 후 손으로 만져질 정도의 (약 50~100 mm³) 암이 형성된다. 암세포 주입 후 4일째 되는 날 암형성 여부를 손과 육안으로 확인하고 암부위에 RVVmIL-4를 5×10^5 PFU의 양으로 주입하고 1주 간격으로 동량의 바이러스를 3번 주사하였다. RVVmIL-4 처리군의 9마리중 2마리의 쥐에서는 암이 전혀 성장하지 않았으며, 암이 자라는 나머지 쥐에서도 전체적인 암성장속도가 다른 대조군에 비해 현저하게 저해되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 암세포 주입 후 23일이 되는 날을 기준으로 했을 때 RVVmIL-4를 주입한 그룹의 평균 암크기는 다른 대조군의 평균 30~50% 정도에 불과함을 알 수 있다.

본 연구를 통해 mIL-4 유전자를 발현하는 백시니아 바이러스가 암세포의 성장을 효과적으로 저해할 수 있음을 알 수 있다. P388과 TS/A 모델 모두에서 RVVmIL-4는 음성 대조군들과 비교하여 현저한 항암 효과가 있었다. 특히 야생형 백시니아 바이러스는 뚜렷한 항암 효과가 없었던 것으로 미루어 보아 RVVmIL-4 증식 자체에 의한 암세포 파괴, 혹은 RVVmIL-4 감염에 의한 숙주 면역체계 발동에 의한 암성장 억제와 같은 간접적인 요인들에 의해 항암 효과를 보였던 것은 아닌 것으로 사료된다.

RVVmIL-4에 의한 항암 효과는 TS/A 모델에서 보다 P388 모델에서 더 효과적이었다. 이는 다음 두 사실에서 기인한 것이라 추측되고 있다. 첫째, P388 모델에서는 RVVmIL-4를 복강에, TS/A 모델에서는 암조직 주위의 피하조직에 주입하였는데, 피하조직보다 복강에서 백시니아 바이러스가 더 활발히 성장하여 많은 양의 IL-4를 생산했을 가능성이 있다. 암치료 효과는 발현되는 IL-4의 양과 상관관계가 있을 것이므로 복강에서 성장하고 있는 암세포에 더 효과적으로 작용했을 것이다. 둘째로, 복강이 피부조직보다는 면역세포의 이동이나 활성화에 더 유리했을 가능성이 있다. IL-4에 의한 항암 효과는 T 세포에 의존적이라는 사실이 최근에 보고되었는데 (Elkins *et al.*, 1994), 동일 양의 IL-4가 생산되었다 하더라도 이에 의해 활성화될 수 있는 T 세포와 같은 면역세포가 쉽게 접근할 수 없는 조직에서 만들어지고 있다면 항암 효과를 기대하기 힘들 것이다.

백시니아 바이러스는 쉽게 높은 농도로 생산할 수 있고, 높은 안정성을 보이기 때문에 유전자 전달 벡터로서의 잠재력을 가지고 있다. 특히 국부에서 일시적 발현으로도 치료효과를 볼 수 있는 질병에서는 매우 좋은 약물 전달체로 사용될 수 있다. 가장 대표적인 예는 각종 면역 유전자를 통하여 암을 치료하고자 하는 경우일 것이다. IL-4 이외에도 IL-2, IL-12, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 그리고 interferon-gamma (IFN- γ) 등을 발현하는 재조합 백시니아 바이러스를 이용하여 암치료에 적용하려는 시도들이 활발히 진행되고 있다 (Meko *et al.*, 1996; Peplinski *et al.*, 1996). 또한 여러 가지

사이토카인을 발현하는 백시니아 바이러스를 조합하여 면역세포의 활성을 극대화하기 위한 시도도 진행중에 있다.

그러나 이 백시니아 바이러스 벡터 시스템에도 몇 가지 문제점이 존재한다. 백시니아 바이러스를 주입했을 때 이 바이러스에 대한 세포성, 체액성 면역 반응이 유도되어 이차 주입시 치료 효과를 보이기 전에 면역반응에 의해 쉽게 제거될 수 있다. 실제로 천연두에 대한 백신으로 백시니아 바이러스를 이용하기 때문에, 동물실험에서와 달리 백시니아 바이러스에 의해 면역된 인간에서는 큰 치료 효과를 보이지 않을 수 있다. 또한 백시니아 바이러스는 복제할 수 있는 생바이러스이므로 면역체계가 약화된 환자들에게 적용할 경우 위험할 수 있다. 백시니아 바이러스가 실용되기 위하여는 이러한 단점들이 보완되어야만 할 것이다. 이와 관련하여 자외선과 화학품으로 비활성화시켜 복제 능력을 약화시킨 백시니아 바이러스나 조류 poxvirus를 이용한 사례가 보고된 바 있다.

결 론

생쥐의 P388 암모델과 TS/A 암모델을 이용하여 인터루킨-4를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스 RVVmIL-4를 제조하여 항암 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RVVmIL-4를 제조하여 숙주세포에 감염시켰을 때 IL-4를 생산할 수 있음을 확인하였다.
2. 백시니아 바이러스에 의한 IL-4 생산은 MOI 및 배양시간과 상관관계를 가졌다.
2. P388 모델에서는 암세포 주입 후 28일 되는 날 RVVmIL-4를 주입받은 쥐는 100% 생존해 있는데 반해서 야생형 백시니아 바이러스 처리군, PBS 처리군의 생존율은 각각 30%, 0%임을 알 수 있었다.
3. TS/A 모델에서 RVVmIL-4를 주입받은 일부 쥐에서는 암이 사라졌고 나머지 쥐에서도 암성장이 크게 저해되었음을 발견하였다. 암세포 주입 후 23일이 되는 날을 기준으로 했을 때 RVVmIL-4를 주입한 군의 평균 암크기는 다른 대조군의 30~50% 정도에 불과함을 알 수 있었다.
4. 이 결과는 IL-4를 발현하는 재조합 백시니아 바이러스가 항암 유전자 치료 벡터로 사용될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 선도기술개발사업과 (주) 녹십자의 지원으로 수행되었음

참 고 문 헌

1. Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouziou C, Rozenbaum W, Montagnier L: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871, 1983.
2. Brochier B, Thomas I, Bauduin B: Use of a vaccinia-rabies recombinant virus for the oral vaccination of foxes against rabies. *Vaccine* 8: 101-104, 1990.
3. DuBridge BR, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP: Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387, 1987.
4. Earl RL, Moss B, Morrison RP, Wehrly K, Nishio J, Chesebro B: T-lymphocyte priming and protection against friend leukemia by vaccinia-retrovirus env gene recombinant. *Science* 234: 728-731, 1986.
5. Elkins KL, Ennist DL, Winegar RK, Weir JP: *In vivo* delivery of interleukin-4 by a recombinant vaccinia virus prevents tumor development in mice. *Hum Gene Therapy* 5: 809-820, 1994.
6. Gloebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E: The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179: 247-66, 517-63, 1990.
7. Hu S, Abrams K, Barber GN, Moran P, Zarlning JM, Langlois AJ, Kuller L, Morton WR, Benveniste RE: Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* 255: 456-459, 1992.
8. Hu S, Kosowski SG, Dalrymple JD: Expression of AIDS virus envelope gene in recombinant vaccinia viruses. *Nature* 320: 537-540, 1986.
9. Jin N-Y, Funahashi S, Shida HH: Construction of vaccinia virus A-type inclusion body protein, tandemly repeated mutant 7.5 kDa protein, and

- hemagglutinin gene promoters support high levels of expression. *Arch Virol* 138: 315-330, 1994.
10. Jones L, Ristow S, Yilma T, Moss B: Accidental human vaccination with vaccinia virus expressing nucleoprotein gene. *Nature* 319: 543, 1986.
 11. Koup RA, Sullivan JL, Levine PH, Brewster F, Mahr A, Mazzara G, McKenzie S, Panicali D: Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody-positive sera. *J Virol* 63: 584-90, 1989.
 12. Liu CC, Joag SV, Kwon BS, Young JD: Induction of perforin and serine esterase in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J Immunol* 144: 1196-201, 1990.
 13. Littau R, Takeda A, Ennis FA: Vaccinia virus-specific cytotoxic T cell clones. *Vaccines* 9: 359-361, 1991.
 14. Luo L, Li Y, Cannon PM, Kim S, Kang CY: Chimeric gag-V3 virus-like particles of human immunodeficiency virus induce virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10527-10531, 1992.
 15. Mackett M, Smith GL, Moss B: Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7415-7419, 1982.
 16. Mackett M, Smith GL, Moss B: General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49: 857-64, 1984.
 17. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and brain. *Cell* 47: 333-348, 1986.
 18. Meko JB, Tsung K, Norton JA: Cytokine production and antitumor effect of a nonreplicating, noncytopathic recombinant vaccinia virus expressing interleukin-12. *Surgery* 120: 274-282, 1996.
 19. Moss B, Flexner C: Vaccinia virus expression vectors. *Ann Rev Immunol* 5: 305-324, 1987.
 20. Moss B, Smith GL, Gerin JL, Purcell RH: Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* 311: 67-69, 1984.
 21. Nanni P, DeGiovanni C, Lollini PI, Nicoletti G, Prodi G: TS/A: A new metastasizing cell line originated from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1: 373, 1983.
 22. Peplinski GR, Tsung K, Meko JB, Norton JA: Prevention of murine breast cancer by vaccination with tumor cells modified by cytokine-producing recombinant vaccinia viruses. *Ann Surg Oncol* 3: 15-23, 1996.
 23. Popovic M, Samgadharan MG, Read E, Gallo RC: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500, 1984.
 24. Rodriguez JF, Esteban M: Plaque size phenotype as a selectable marker to generate vaccinia virus recombinants. *J Virol* 63: 997-1001, 1989.
 25. Shen L, Chen ZW, Miller MD, Stallard V, Mazzara GP, Panicali DL, Letvin NL: Recombinant virus vaccine-induced SIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Science* 252: 440-443, 1991.
 26. Smith GL, Moss B: Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25: 21-8, 1983.
 27. Takahashi H, Merli S, Putney SD, Houghten R, Moss B, Germain RN, Berzofsky JA: A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp160. *Science* 246: 118-121, 1989.