Immune Network No. 1, Vol. 1, 2001

Herpes simplex virus-thymidine kinase 유전자가 전이된 종양 세포에서 Gancyclovir와 방사선 조사에 의한 항 종양 효과

가톨릭 대학교 강남성모병원 외과학교실[1], 의과대학 미생물학교실[2]

이재우[1], 오승택[1], 안창혁[1], 임근우[1], 조현일[2], 김금용[2], 김태규[2]

Antitunor Effect of Carcinoma cells Ttransduced with Herpes simplex virus-thymidine kinase by Gancyclovir and Radiation

Jae Woo Lee[1], Seong Taek Oh[1], Chan Hyuk Ahn[1], Kun Woo Lim[1], Hyun-Il Cho[2], Gum Ryong Kim[2], Tai-Gyu Kim[2]

Department of Surgery[1], Kang-Nam St. Marry's Hospital, Department of Microbiology[2], College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

= Abstract =

Background: Many types of cancer become resistant to current chemotherapeutic and radiotherapeutic intervention. To overcome this situation application of gene therapy by the introduction of suicide genes followed by their prodrugs may be promising. A viral enzyme, Herpes simplex thymidine kinase (HSV-tk), which converts ganciclovir from an inactive prodrug to a cytotoxic agent by phosphorylation, are being actively investigated for use in gene therapy for cancer. The purpose of this study was to determine whether combining prodrug-activating gene therapy and irradiation might result in enhanced antitumor effects. **Methods:** The HSV-tk gene was cloned into the retroviral vector, pLXSN and established the clones producing retroviruses carrying the HSV-tk gene. The carcinoma cell line, HCT116 and Huh-7 were transduced with high-titer recombinant retroviruses. These cell lines were treated with ganciclovir before or after irradiation for the defining combinational effect of suicide gene therapy and radiotherapy. **Results:** The titers of cloned PA317 amphotropic retroviruses ranged from 4 to 6 X 10^6 CFU/ml. After selectional periods, the expression of HSV-tk was confirmed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The growth of cells expressing HSV-tk was inhibited as increase of GCV dose after 48 hr and the growth inhibitory effect of GCV was much higher after 72 hr. When the cells transduced with HSV-tk gene were exposed to radiation, the growth inhibitory effect of GCV was significantly increased, as compared with non-transduced parental cells. **Conclusions:** The results suggest that the addition of HSV-tk gene therapy to standard radiation therapy may improve the effectiveness of treatment for solid tumors.

Key Words: HSV-tk, ganciclovir, suicide gene therapy, radiotherapy.

책임저자: Tai-Gyu Kim, Department of Microbiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-Dong, Seocho-Ku, Seoul, 137-701, Korea
Phone : 02-590-1216, Fax : 02-594-7355,
E-mail : kimtg@cmc.cuk.ac.kr

서 론

종양 치료에 있어서 다양한 종양이 기존의 화학 요법

과 방사선 치료에 대한 저항성을 나타내고 있으며, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 종양 세포를 선택적으로 제거하기 위한 자살 유전자 (suicide gene)을 이용한 유전자 치료 (gene therapy)가 새로운 시도로 주목을 받고 있다. 유전자 치료는 환자의 유전적 결함을 교정하거나 환자에게 치료 효과를 목적으로 세포에 유전물질을 주입하는 것으로 기존의 임상 치료 효과를 극대화하거나 치료가 불가능한 질병에 대한 대안으로 시도되고 있으며 선천적인 유전병이나 후천적인 질환에 모두 상당한 치료 효과가 기대되고 있다. 종양에 대한 유전자 치료 전략으로는 p53 등의 tumor suppressor gene (1), 자살 유전자 등의 drug-sensitive gene (2), 골수이식 시 조혈모세포의 손상을 방지하면서 고용량의 화학요법을 위한 Multidrug resistance (MDR) gene의 이용 (3)과 특정 유전자에 대한 antisence RNA를 합성하기 위한 antisence DNA의 이용 등이 있다 (4). 자살 유전자를 이용한 유전자 치료의 기본 개념은 정상 세포에 존재하지 않은 효소를 이용하여 독성을 나타내지 않은 전구 약물 (pro-drugs)을 독성의 약물로 전환시킴으로서 자살 유전자를 발현하는 세포의 세포사멸을 유도하는 것이다 (5). 현재까지 보고된 자살 유전자는 diphtheria toxin A-chain (DT-A) 유전자 (6), herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) 유전자 (5), cytosine deaminase (CD) 유전자 (7), xanthine-guanine phosphoribosyl- transferas (XPGRT) 유전자 (8) 등이 있다. 자살 유전자를 이용한 유전자 치료의 또 다른 특징은 자살 유전자가 전이된 종양 세포의 세포사멸 효과에 의해 자살 유전자가 전이되지 않은 종양 세포의 세포사멸이 유도되는 'bystander 효과'이다. 이러한 bystander 효과는 ganciclovir (GCV)를 이용한 HSV-tk 유전자에서 처음 보고 되었으며 (5), CD 유전자에 의한 bystander 효과가 실험 동물을 이용한 *in vivo* 실험과 *in vitro* 실험에서 보고 되어있다 (9-11). 이러한 bystander 효과는 소수의 자살유전자가 전이된 종양 세포에 의해 효과적인 항 종양 효과를 나타낼 수 있는 점에서 중요하다.

세포 내에서 HSV-tk는 GCV와 같은 nucleoside analog를 인산화하여 DNA에 삽입되어 DNA 중합 효소에 대한 저해제로 작용함으로써 세포사멸을 유도한다. HSV-tk 유전자를 이용한 연구는 골수 이식 환자에서의 종양의 재발 방지, 각종 감염증의 재발 및 예방을 위해 공여자의 T 세포에 HSV-tk 유전자를 전이하거나 (12-14), glioblastoma 등의 종양 세포주에 HSV-tk 유전자를 전이하여 GCV에 의한 선택적인 세포사멸과 bystander 효과에 의한 종양 세포사멸을 보고하고 있다 (15,16). 또한 최근에는 rat gliosarcima 종양 세포주에 HSV-tk 유전자를 전이하여 방사선을 조사함으로서 종양 치료 효과가 증진되는 결과를 보고하고 있다 (17).

본 연구에서는 종양의 임상 치료 효과를 극대화하기 위한 기초 연구로서 자살 유전자로 보고된 HSV-tk 유전자를 클로닝하여 효율적으로 종양 세포에 유전자를 전이하기 위한 고역가의 retrovirus를 생산하고, HSV-tk 유전자를 안정적으로 발현하는 종양 세포주를 확립하여 기존의 방사선 치료와 HSV-tk의 전구약물 효과를 병합한 효율적인 종양 치료법 개발의 기초연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

1. HSV-tk 유전자의 클로닝 및 재조합 retroviral vector의 확립

HSV-tk 유전자는 HSV-1 strain CL/01 에 대해 5' primer로 GCCGCATCTGGTGGCGTGAAACT, 3' primer로 CCGTGTTTCAGTTAGCCTC를 사용하여 PCR 방법을 이용하여 증폭하였다. 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고, gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 HSV-tk 유전자를 분리하였다. 분리된 유전자를 pBluescript SK(+) vector에 클로닝하여 염기서열을 확인하고 *Bam* HI 제한효소를 이용하여 자른 후 neomycin (Neo^R) 유전자와 HSV-tk 유전자를 발현하는 retroviral vector를 확립하기 위하여 동일한 제한효소로 처리한 pLXRN retroviral vector (Clontech, Palo Alto, USA)에 삽입하여 pLTKRN을 제조하였다 (Fig. 1). 재조합 retroviral vector의 세포주 전이시의 발현을 확인하기 위하여 일차적으로 DNA-$CaPO_4$ transfection 방법 (Gibco BRL, Rockville, USA)을 이용하여 NIH-3T3 세포주에 전이한 후 5 μg/mL의 Gancyclovir (GCV: Roche, Mannheim, Germany)를 처리하였고, 72시간 후 trypan blue (Sigma, St. Louis, USA)로 염색하여 살아있는 세포를 계측함으로서 HSV-tk 유전자의 활성을 확인하였다.

2. 세포주 및 배양

사람 대장 종양 세포주, HCT116 (ATCC CCL-247)는

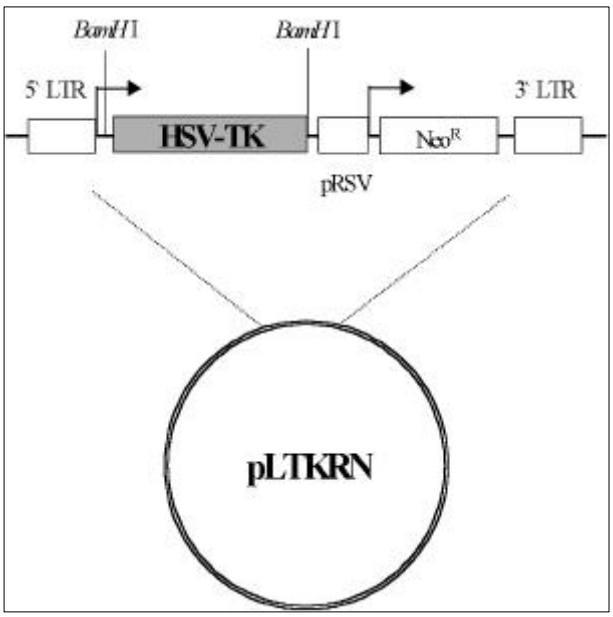

Fig. 1. Map of the recombinant retrovirus vector, pLTKRN. The direction of transcription is indicated by an arrow. Restriction endonuclease sites containing the *Bam* HI cloning site are shown and cloned with HSV-tk gene.

2 mM L-glutamine과 10% 우태아 혈청 (Fetal bovine serum; FBS: Gibco BRL, Rockville, USA)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL, Rockville, USA)을 배양액으로 하여 5% CO_2/37°C 항온 배양조에서 배양하였고, mouse fibroblast 세포주 NIH-3T3, 사람 간 종양 세포주 Huh-7, ecotropic retrovirus 생산 세포주, GP&E86 및 amphotropic retrovirus 생산 세포주, PA317는 2 mM L-glutamine과 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM (Gibco BRL, Rockville, USA) 배지에서 배양하였다.

3. HSV-tk 유전자 발현 retrovirus 생산 및 virus 역가 확인

재조합 pLTKRN retroviral vector를 일차적으로 DNA-$CaPO_4$ transfection 방법을 이용하여 60 mm 배양조에 5 x 10^5으로 접종하여 16~18시간 배양한 ecotropic retrovirus 생산 세포주 GP&E86 세포에 전이하고, 10%의 우태아 혈청을 포함한 DMEM 배지에서 1 mg/mL 농도의 neomycin (G418) 제제 (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 첨가하여 배양한 후, G418에 저항성을 가진 세포를 선택 배양하였다. 배양 상층액을 수집하여 60 mm 배양조에 3× 10^5으로 접종하여 16~18시간 배양한 amphotropic retrovirus 생산 세포주인 PA317에 8 μg/mL 농도의 polybrene (Sigma, St. Louis, USA)을 첨가하여 감염시킨 후 동일한 방법으로 선택 배양하였다. 고역가의 재조합 retrovirus를 생산하기 위하여 G418 제제에 저항성을 갖는 세포를 96-well 배양조에 1 cell/well 농도로 배양하여 단일 세포주를 확립하였다. 각 단일 세포주의 retrovirus 상층액을 수거하여 0.45 μm의 필터로 여과한 후 -70℃에 보관하였다. Virus의 역가를 측정하기 위하여 60 mm 배양조에 2 x 10^5의 NIH-3T3 세포주를 접종한 후 10배씩 희석된 각 단일 세포주의 retrovirus 상층액을 8 μg/mL 농도의 polybrene과 함께 4시간 배양한 다음 10%의 우태아 혈청을 포함한 DMEM 배지로 교환하여 48시간 배양하였다. 전이된 NIH-3T3 세포주를 20:1 split한 후 1 mg/mL 농도의 neomycin (G418) 제제가 포함된 배지에서 배양하여 neomycin에 저항성을 나타내는 colony 수를 측정하여 확인하였으며, 5 μg/mL의 GCV를 처리한 후 72시간 배양하여 HSV-tk 유전자의 활성을 확인하였다.

4. HSV-tk 유전자 발현 종양 세포주 확립

고역가의 재조합 retrovirus를 이용하여 종양 세포주에 HSV-tk 유전자를 전이하기 위하여 60 mm 배양조에 4 x 10^5의 종양 세포주를 접종하여 16 ~ 18시간 배양한 다음 8 μg/ml농도의 polybrene 존재 하에서 MOI값이 10이 되도록 재조합 retrovirus를 첨가하여 4시간 배양한 후 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지로 교환하여 배양하였다. 48시간 후 감염된 세포주를 1 mg/mL 농도의 neomycin (G418) 제제가 포함된 DMEM 배지에서 10일간 선택 배양하여 HSV-tk 유전자를 안정적으로 발현하는 종양 세포주를 확립하였다. HSV-tk 유전자의 발현을 확인하기 위하여 재조합 retrovirus가 전이된 종양 세포주로부터 RNA를 추출하여 1st Strand cDNA Sysnthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany)에 따라 만든 반응용액 (10X reaction buffer 2 μL, 25mM $MgCl_2$ 4 μL, Deoxynucleotide Mix 2 μL, RNase inhibitor 1 μL, Oligo-$p(dT)_{15}$ primer 2 μL, AMV Reverse Tramscriptase 0.8 μL, D.W 1.2 μL, mRNA 7 μL)를 25℃ 10분, 42 ℃ 60분, 99 ℃ 5분, 4 ℃ 5분 동안 반응하여 cDNA를 합성한 후 HSV-tk 유전자에 특이적인 primer set을 사용하여 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction)을 실시하여 1.5% agarose 전기영동으로 확인하였다.

5. 방사선 조사 및 세포 생존률 조사

기존의 방사선 치료 효과와 비교하기 위하여 ^{137}Cs을 이용하여 종양 세포주 및 HSV-tk 유전자가 전이된 종양 세포주에 다양한 양의 방사선을 조사하였다. 재조합 종양 세포주 및 방사선 조사된 종양 세포주의 GCV에 의한 세포독성을 확인하기 위하여 HSV-tk 유전자가 전이되지 않은 종양 세포와 HSV-tk 유전자가 전이된 종양 세포를 96-well 배양조에 1×10^4/well 농도로 접종한 후 다양한 농도의 GCV를 처리하여 배양한 다음 cell proliferation kit (XTT: Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 종양 세포의 증식을 화학적 방법으로 확인하였다. 모든 생존률 조사 실험은 3회 이상 실시하여 평균값을 이용하였다.

결 과

1. HSV-tk 유전자의 클로닝 및 고역가 retrovirus의 생산

pLXRN retroviral 벡터에 2.8 kb의 HSV-tk 유전자를 클로닝하기 위하여 HSV-tk 유전자의 말단부분은 *Bam*HI 제한효소를 이용하여 벡터의 *Bam*HI 클로닝 부위에 삽입하였다 (Fig. 1). 각 과정은 적절한 제한효소를 처리하여 절단한 후 전기영동과정을 통하여 확인하였고, 그림 2는 최종적으로 완성된 재조합 plasmid를 제한효소를 처리하여 확인한 결과이다. *Bam*HI 효소로 처리된 HSV-tk 재조합 retroviral vector에서 벡터와 2.8 kb의 HSV-tk 유전자 band를 확인하였다.

클로닝된 재조합 retroviral vector를 NIH-3T3 세포주에 DNA-$CaPO_4$ transfection 방법으로 전이하여 재조합 유전자의 발현을 확인한 후 검증된 retroviral vector를 PA317 retrovirus 생산 세포주에 전이하여 고역가의 재조합 retrovirus를 생산하는 단세포 클론을 선택 배양하였다. NIH-3T3 세포주를 이용한 Neo^R-저항성 coloney형성 바이러스 역가는 4 내지 6×10^6 CFU/mL 이었으며 (Table 1), 5 μg/mL GCV 농도에서의 72 시간 배양으로 HSV-tk 발현 세포의 세포사를 확인하였다.

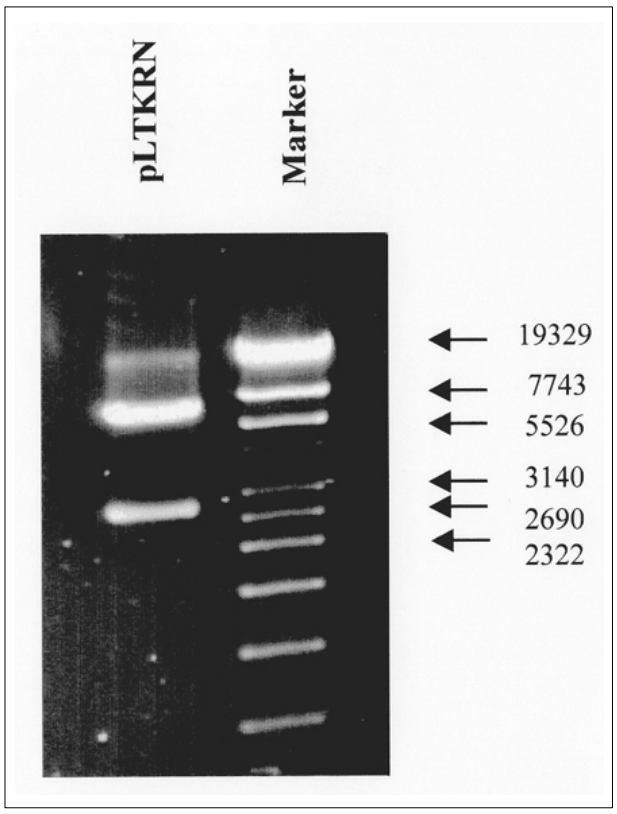

Fig. 2. Electrophoresis of pLTKRN was digested with *Bam*HI. Large DNA band of lane is 6.7 kb of pLXRN vector and small DNA band of lane in 2.8 kb of HSV-tk gene.

Table 1. Titrations of PA317 clones producing amphotropic recombinant retroviruses

Clone	No. of G418R colony*	Titer per mililiter†
1	115	5.75 X 10^6
2	103	5.15 X 10^6
3	128	6.40 X 10^6
4	109	5.45 X 10^6

*: 1:20 split in 100 mm plate 2 days after transduction.
† : Viral titer was determined as the average number of drug-resistance colony cells multiplied by a factor to account for magnification, plate size, and dilution of the infectious stock. In determining the G418-resistance titer, the number of colonies was divided by 4 to account for two cell doublings.

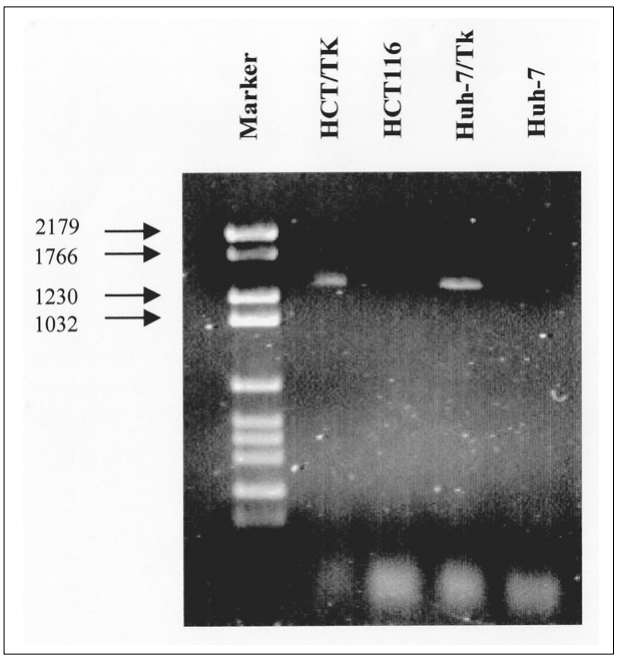

Fig. 3. Expression of HSV-tk gene in HCT/TK and Huh-7/TK. RT-PCR revealed HSV-tk specific 1.4 kb sized mRNA bands.

2. 종양 세포주에서 HSV-tk 유전자 발현 조사

확립된 고역가의 재조합 retrovirus를 이용하여 종양 세포주인 HCT116과 Huh-7 세포주에 전이하여 선택 배양한 후 HSV-tk 유전자의 발현을 확인하기 위하여 각 종양 세포로부터 RNA를 추출한 다음 HSV-tk 유전자 특이 primer를 이용하여 역전사 PCR을 수행하였다. HSV-tk 유전자가 전이되지 않은 종양 세포에서는 HSV-tk 유전자의 발현이 관찰되지 않았으나, 재조합 retrovirus로 전이한 후 선택 배양한 종양 세포에서 약 1.4 kb의 HSV-tk 유전자 특이 mRNA의 발현을 확인하였다 (Fig. 3).

3. HSV-tk 유전자 전이에 따른 종양 세포주의 GCV 감수성 조사

정상 사람 대장 종양 세포주 (HCT116)와 HSV-tk 유전자가 전이된 종양 세포주 (HCT/TK)의 GCV에 대한 감수성은 배양 36 시간까지는 특이한 차이를 나타내지 않았으나 HSV-tk 유전자가 전이된 종양 세포주에서 배

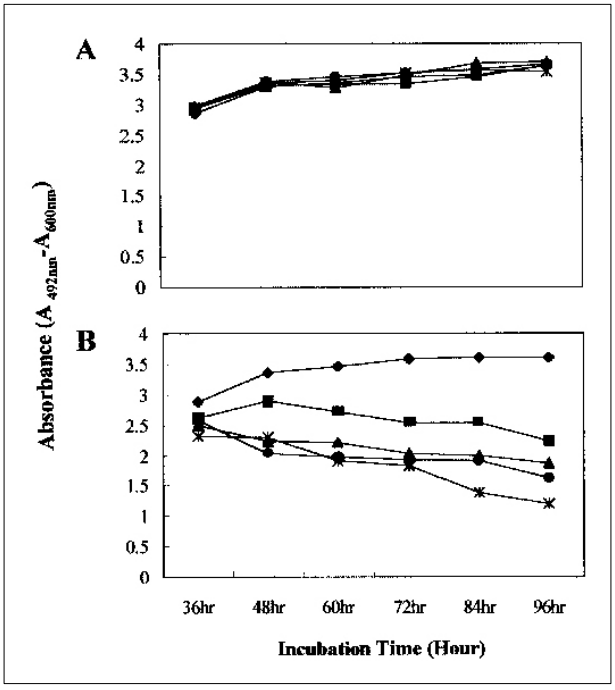

Fig. 4. Effects of Gancyclovir on the growth of human coloectal carcinoma, HCT116 (A) and HSV-tk-transduced HCT116 (HCT/TK; B). The cells were seeded at 1 X 10^4 cells/well and treated with 0 μg (◆), 5 μg (■), 10 μg (▲), 20 μg (●), and 40 μg (✳) of GCV.

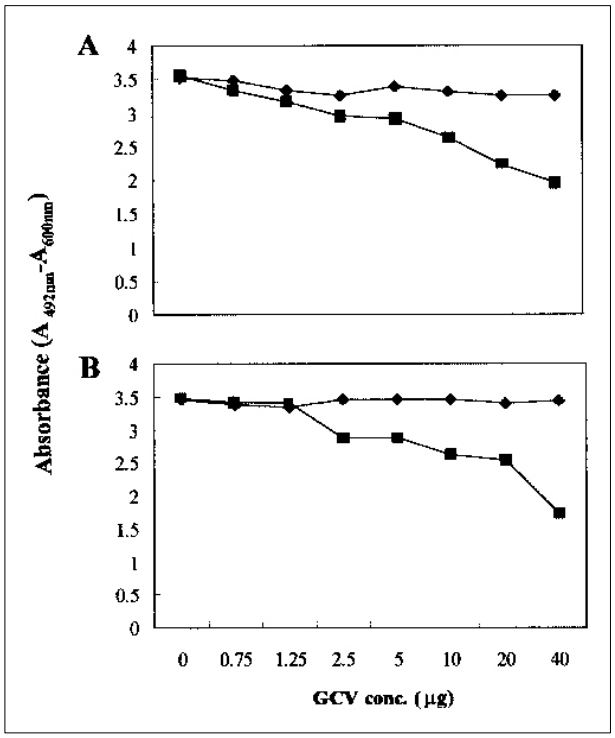

Fig. 5. Effects of Gancyclovir on the growth of human coloectal carcinoma, HCY116 (A) and human hepatocellula carcinoma, Huh-7 (B). Mock-infected (◆) and HSV-tk-transduced cells (■) were seeded at 1 X 10^4 cells/well and treated with indicated GCV for 72hr.

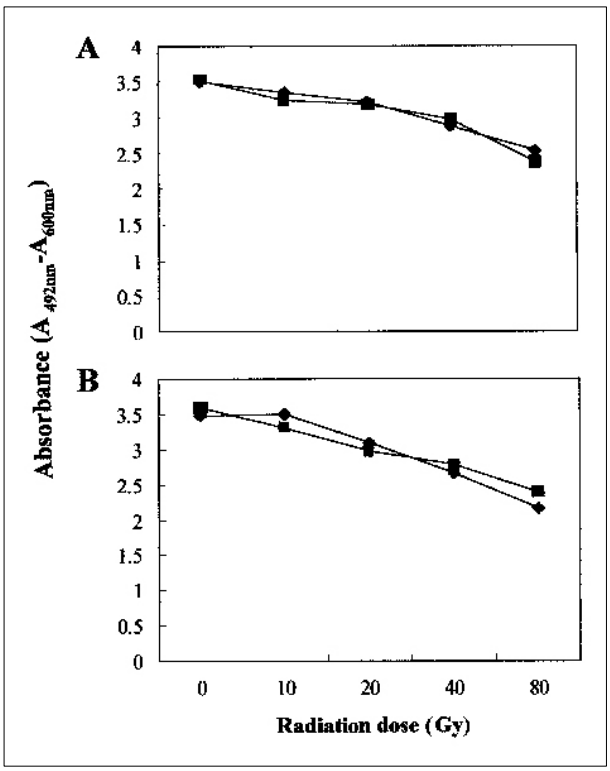

Fig. 6. Effects of irradiation on the growth of human coloectal carcinoma, HCT116 (A) and human hepatocellula carcinoma, Huh-7 (B). Mock-infected (◆) and HSV-tk-transduced cells (■) were irradiated with ^{137}Cs source as indicated dose and seeded at 1 X 10^4 cells/well.

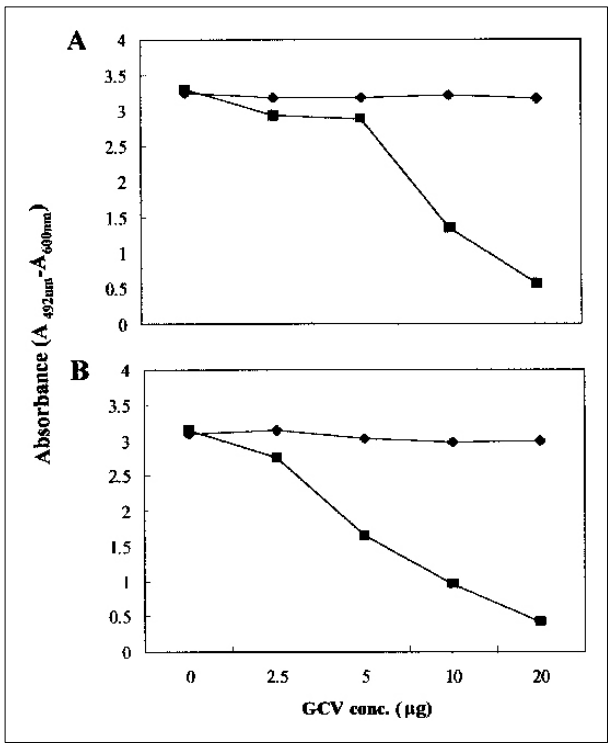

Fig. 7. Effects of Gancyclovir on radiation response of human coloectal carcinoma, HCT116 (A) and human hepatocellula carcinoma, Huh-7 (B). Mock-infected (◆) and HSV-tk-transduced cells (■) were irradiated (20 Gy) and seeded at 1 X 10^4 cells/well and treated with indicated GCV.

양 48 시간부터 GCV 용량이 증가함에 따라 세포사멸이 증가하였으며, 배양 72 시간이 경과하면 HSV-tk에 의한 세포사멸이 급속히 증가되는 것으로 관찰되었다. HSV-tk 유전자가 전이되지 않은 세포주에서 GCV를 40 μg 이상 처리하였을 때 GCV의 독성에 의한 세포사멸이 관찰되었으나 이보다 적은 용량에서는 세포사멸이 관찰되지 않았다 (Fig. 4). GCV 농도에 따른 세포사멸을 자세히 관찰하기 위하여 HCT116과 Huh-7 종양 세포주에 대하여 HSV-tk 유전자 전이에따른 GCV에 대한 감수성을 저용량 (0.75 μg)의 GCV에서 고용량 (40 μg)의 GCV를 처리한 다음 72 시간 배양한 후 세포사멸을 관찰하였다. 두 종양 세포주 모두 HSV-tk 유전자가 전이되지 않은 세포주에서는 GCV에 의한 세포사멸이 관찰되지 않았고 HSV-tk 유전자가 전이된 세포주에서는 1.25 μg까지의 GCV 농도에서는 감수성이 관찰되지 않았으나, 점차 GCV의 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5).

4. 방사선 조사에 따른 종양세포주의 GCV 감수성 조사

각 종양 세포주의 방사선 조사에 따른 세포사멸을 방사선 조사 후 72 시간 배양한 다음 확인한 결과 종양 세포주에 따라 방사선에 의한 세포사멸이 차이가 있음을 관찰하였으나, 약 20 Gy까지는 종양 세포주가 저항성을 가지는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6). 기존의 방사선요법와 HSV-tk에 의한 전구 약물 효과를 확인하기 위하여 저항성이 있는 20 Gy의 방사선을 조사한 후 다양한 농도의 GCV를 처리하여 GCV에 대한 감수성을 비교 확인하였다. HSV-tk 유전자가 전이되지 않은 종양 세포주에서는 GCV에 의한 항종양 효과가 나타나지 않았고, HCT116 세포주의 경우 5 μg의 GCV 농도까지는 방사선 조사에의한 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 20 μg의 GCV 농도에서 HSV-tk 유전자에 의한 GCV 효과와 함께 방사선에 의한 세포사멸 효과가 관찰되었고, Huh-7 세포주의 경우 5 μg의 GCV 농도에서부터 방사선에 의

한 항 종양 효과가 나타나는 경향이 관찰되었다 (Fig. 7).

고 찰

Retroviral vector는 유전자 치료에 널리 사용되는 방법으로 숙주세포의 genomic DNA에 안정적으로 삽입되어 장기간 발현되는 장점이 있다. Retrovirus의 역가는 vector, 클로닝한 유전자, retrovirus 생산 세포주 및 virus 생산 방법에 따라 차이가 있다. 본 연구에서는 long terminal repeat 염기배열에 의해 삽입된 유전자가 발현되고 rous sarcoma virus의 promoter와 neomycin phosphotransferase에 의해 전이된 세포주를 선택 배양할 수 있도록 개발된 pLXRN retroviral vector를 이용하였다. 또한 polyclonal retrovirus 생산 세포주의 생태에서는 클로닝한 유전자를 안정적으로 생산하는 세포주가 불안정하므로 본 연구에서는 고역가의 retrovitus를 생산하는 생산 세포주를 limited dilution 방법으로 클로닝하여 ~ 10^6 CFU/mL 이상의 역가를 갖는 retrovirus를 생산하였다 (Table Ⅰ). Culver 등 (18)은 mouse brain 종양에 직접 HSV-tk 유전자를 발현하는 retrovirus의 생산 세포주를 직접 주입하여 종양내에서 지속적으로 retrovirus를 생산하게 하고 GCV를 투여함으로서 종양세포가 감소하는 결과를 보고하고 있으므로 본 연구에서 확립한 고역가의 retrovirus는 HSV-tk/GCV 연구에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 종양의 종류에 따라 자살 유전자에 의한 세포사멸이 차이가 있을 것으로 사료되어 사람 대장 종양 세포주인 HCT116 세포주와 사람 간 종양 세포주인 Huh-7 세포주를 대상으로 HSV-tk/GCV에 의한 세포사멸을 확인하고, 방사선 조사에 따른 HSV-tk 유전자가 전이된 종양 세포와 전이되지 않은 종양 세포의 세포사멸 차이를 확인하고자 하였다. 고역가의 재조합 retrovirus를 전이한 후 선택 배양액에서 약 10일간 배양하여 HSV-tk 유전자를 안정하게 발현하는 종양 세포주를 확립하였고, 역전사 PCR 방법으로 HSV-tk 유전자의 발현을 확인하였다 (Fig. 3). HSV-tk 유전자와 GCV를 이용한 유전자 치료시의 세포사멸 기전은 apoptosis 경로를 통하는 것으로 알려져 있으며, 세포사멸의 기전은 자살 유전자가 전이된 종양 세포의 세포사멸 효과에 의해 자살 유전자가 전이되지 않은 종양 세포의 세포사멸이 유도되는 'bystander 효과'에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다 (5). 이러한 bystander 효과는 세포간 gap junction을 통한 metabolic cooperation (19), HSV-tk/GCV에 의한 세포 apoptosis에 의한 독성 잔해물의 endocytosis (20), 또한 숙주의 세포성 면역반응이 관여하는 것으로 보고되어 있다 (21). 본 연구에서 사람 대장 종양 세포주의 경우 GCV를 처리한 후 약 72 시간이 경과하여 HSV-tk/GCV 효과가 나타나는 결과를 확인하였다. 이러한 결과는 GCV가 HSV-tk에 의해 인산화되어 활성화된 GCV 항종양 효과를 나타내기 위해서는 일정한 시간이 요구됨을 의미한다. 또한 40 μg 이상의 GCV 농도에서는 GCV에 의한 세포독성이 나타나는 것을 확인하였고, 종양세포의 종류에 따라 HSV-tk/GCV 효과가 차이가 있음을 확인하였다 (Fig. 5).

최근의 연구결과로서 rat gliosarcima 종양 세포주에 HSV-tk 유전자를 전이하여 방사선을 조사함으로서 항종양 효과가 증진되는 보고가 있으므로 (17) 본 연구에서 종양세포주에 따른 HSV-tk/GCV와 방사선 조사에 의한 세포사멸을 조사하였다. 방사선 조사량에 따라 종양세포의 증식이 억제되어 80 Gy이상에서 완전한 세포사멸이 관찰되었다. 또한 방사선 조사와 GCV를 함께 처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 증진된 항종양 효과를 나타내었으나 좀더 정확한 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : p53 mutations in human cancers. Science 253;49-53, 1991
2. Mullen CA : Metabolic suicide genes in gene therapy. Pharmacol Ther 63;199-207, 1994
3. Licht T, Gottesman MM, Pastan I : Transfer of the MDR1 (multidrug resistance) gene: protection of hematopoietic cells from cytotoxic chemotherapy, and selection of transduced cells *in vivo*. Cytokines Mol Ther 1;11-20, 1995
4. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA : Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. Cancer Res 51;1744-1748, 1991
5. Moolten FL : Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 46;5276-5281, 1986

6. Harrison GS, Long CJ, Curiel TJ, Maxwell F, Maxwell IH : Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin Achain gene. Hum Gene Ther 3;461-469, 1992
7. Dong Y, Wen P, Manome Y, Parr M, Hirshowitz A, Chen L, Hirschowitz EA, Crystal R, Weichselbaum R, Kufe DW, Fine HA : *In vivo* replication-deficient adenovirus vector-mediated transduction of the cytosine deaminase gene sensitizes glioma cells to 5-fluorocytosine. Hum Gene Ther 7;713-720, 1996
8. Mroz PJ, Moolten FL : Retrovirally transduced *Escherichia coli* gpt genes combine selectability with chemosensitivity capable of mediating tumor eradication. Hum Gene Ther 4;589-595, 1993
9. Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, Nakatani T, Tominaga K, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T : Bacterial cytosine deaminase suicide gene transduction renders hepatocellular carcinoma sensitive to the prodrug 5-fluorocytosine. Int Hepatol Comm 4;72-79, 1995
10. Hirschowitz EA, Ohwada A, Pascal WR, Russi TJ, Crystal RG : *In vivo* adenovirus-mediated gene transfer of the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. Hum Gene Ther 6;1055-1063, 1995
11. Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA : *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. Cancer Res 53;4619-4626, 1993
12. Bordignon C, Bonini C, Verzeletti S, Nobili N, Maggioni D, Traversari C, Giavazzi R, Servida P, Zappone E, Benazzi E : Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for *in vivo* modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation. Hum Gene Ther 6;813-819, 1995
13. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C : HSV-tk gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. Science 276;1719-1724, 1997
14. Bonini C, Bordignon C : Potential and limitations of HSV-tk-transduced donor peripheral blood lymphocytes after allo-BMT. Hematol Cell Ther 39;273-274, 1997
15. Ezzeddine ZD, Martuza RL, Platika D, Short MP, Malick A, Choi B, Breakefield XO : Selective killing of glioma cells in culture and *in vivo* by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. New Biol 3;608-614, 1991
16. Takamiya Y, Short MP, Ezzeddine ZD, Moolten FL, Breakefield XO, Martuza R : Gene therapy of malignant brain tumors: a rat glioma line bearing the herpes simplex virus type 1-thymidine kinase gene and wild type retrovirus kills other tumor cells. J Neurosci Res 33;493-503, 1992
17. Kim JH, Kim SH, Kolozsvary A, Brown SL, Kim OB, Freytag SO : Selective enhancement of radiation response of herpes simplex virus thymidine kinase transduced 9L gliosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* by antiviral agents. Int J Radiat Oncol Biol Phys 33;861-868, 1995
18. 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 256;1550-1552, 1992
19. Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ : *in vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. Hum Gene Ther. 4;725-731, 1993
20. 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;5274-5283, 1993
21. Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ : The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-tk xenogeneic cells. Cancer Lett. 92;167-174, 1995

미 주

본 연구는 보건복지부 '98 보건의료기술 연구개발 과제 (HMP- 98-M-1-0003)에 의해 이루어진 것임.

Antitunor Effect with HSV-Tk and Radiation