소아과 : 제 45 권 제 3 호 2002년

□원 저□

마우스 신경모세포종 모델을 이용한 HSV-TK 유전자 치료에서 Bystander 효과 및 증폭에 관한 연구

한림대학교 의과대학 소아과학교실, 아주대학교 의과대학 소아과학교실*

조현상 · 김문규* · 박종영†

A Study of the Bystander Effect and Its Enhancement in HSV-TK Gene Therapy Using a Murine Neuroblastoma Model

Hyun Sang Cho, M.D., Moon Kyu Kim, M.D.* and Chong Young Park†

Department of Pediatrics, College of Medicine, Hallym University, Seoul,
Department of Pediatrics, College of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea*

Purpose : Selective introduction of genes conferring chemosensitivity into proliferating tumor cells may be used to treat cancer. We first investigated the bystander effect of retrovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase(HSV-TK) gene to murine neuroblstoma cell line(neuro-2a) *in vitro* and *in vivo*. Second, we examined the mechanism and its enhancement of the bystander effect in murine neuroblastoma.

Methods : To investigate the bystander effect, we studied tumor growth and survival time after HSV-TK/ganciclovir(GCV) treatment in a syngenic A/J mouse neuroblastoma model by mixing various ratios of HSV-TK-expressing neuro-2a cells with wild type neuro-2a cells followed by GCV treatment. To investigate the mechanism of the bystander effect in murine neuroblastoma, immunohistochemistry using connexin 43, CD4 and CD8-specific monoclonal antibodies was analyzed. We studied whether IL-2-secreting neuro-2a cells(neuro-2a/IL-2) would potentiate the bystander effect.

Results : A strong bystander effect was observed *in vitro* and *in vivo*. The bystander effect in murine neuroblastoma was dependent on the immune response rather than connexin-mediated gap junction. Neuro-2a/IL-2 treatment enhanced the bystander effect in the HSV-TK/GCV system in murine neuroblastoma model.

Conclusion : We conclude that the bystander effect in murine neuroblastoma depends on immune response and is enhanced by neuro-2a/IL-2. **(J Korean Pediatr Soc 2002;45:354-361)**

Key Words : HSV-TK, Bystander effect, Neuroblastoma

서 론

Herpes simplex virus(HSV)-thymidine kinase (TK) 유전자 치료는 TK의 존재하에 항바이러스 제제인 ganciclovir(GCV)가 세포 살상능을 나타내는 것을 이용하는 것으로 TK 유전자를 벡터로 이용하여 암세

본 논문은 2000년도 MSD 학술상 지원에 의함.

†현주소 : 박종영 소아과의원

접수 : 2001년 9월 5일, 승인 : 2001년 11월 6일

책임저자 : 조현상, 한림의대 강동성심병원 소아과
Tel : 02)2224-2256 Fax : 02)482-8334
E-mail : hscho@hallym.or.kr

포 내로 전달함으로서 선택적으로 종양 세포를 제거하는 치료법이다[1]. HSV-TK/GCV 치료의 큰 장점은 bystander 효과에 있다. Freeman 등[2]과 Colombo 등[3]은 종양 세포의 10% 정도만 HSV-TK 유전자가 형질 도입되어도 나머지 90%의 wild type 종양 세포에서 괴사가 일어난다는 bystander 효과를 보고하여 반드시 모든 암세포에 HSV-TK 유전자가 형질 도입되지 않아도 된다고 하였다. Bystander 효과의 기전은 첫째, GCV의 독성 대사 산물이 세포사이의 gap junction을 통해 전달됨으로서 인접한 세포의 괴사를 일으키고[4-6], 둘째, 죽은 종양 세포를 항원 제공 세포(antigen presenting cell)가 탐식하여 전신적인 항 종양 면역 반응을 일으키기 때문으로 알려져 있다[7-10]. 또한 HSV-TK/GCV 치료에 의한 항 종양 면역 반응의 유발은 interleukin(IL)-2와 같은 싸이토카인에 의해 HSV-TK/GCV 치료의 bystander 효과를 증폭시킬 수 있다고 보고되고 있다[11].

본 연구에서는 마우스 신경모세포종 모델에서 HSV-TK/GCV 유전자 치료의 독특한 특징인 bystander 효과를 증명하고, 이의 기전이 다른 종양 모델에서 관찰되는 기전과 동일한지 알아보고 또한 IL-2와 병합 치료함으로써 bystander 효과의 증폭이 가능한지 조사하여 이의 결과를 신경모세포종의 수술 후 잔존암 치료에 적용하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포주 및 배양

ATCC(Rockville, MD, USA)로부터 구입한 마우스 신경모세포종 세포주인 neuro-2a 세포를 가열 비활성화시킨 10% 우태아혈청(GIBCO, Grand Island, NY, USA), 2.8 g/L HEPES(Sigma, St. Louis, MO, USA), 2.2 g/L $NaHCO_3$(Sigma) 및 100 μg/mL penicillin(GIBCO), 100 U/mL streptomycin(GIBCO)이 포함된 Minimum essential media(MEM, GIBCO)이 포함된 배지를 기본 배양액으로 하여 5% CO_2의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 재조합 retroviral 벡터의 PA317 세포 감염

재조합 TK 및 IL-2 유전자를 포함하고 있는 pLNC/TK 및 pLNC/IL-2 벡터(Fig. 1)는 한국 생명과학 연구소로부터 얻었다. Amphotrophic packing 세포(PA317 세포) 약 5×10^5 세포를 직경 60 mm 배양 접시에 10% 우태아 혈청이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Sigma) 배양액으로 배양한 뒤, 배양 접시 바닥 면적의 70-80% 정도 세포가 자라면 calcium-phosphate 방법으로 재조합 retrovirus를 형질 도입시킨 후 800 μg/mL 농도의 G418(Geneticin®, GIBCO)이 포함된 DMEM 배지로 배양하여 LNC/TK 및 LNC/IL-2에 의해 형질 도입된 세포들만을 선택하였다. 12-15일 배양 후 G418에 저항성을 가지고 있는 집락을 cloning 하여 증폭시킨 후 다음과 같이 바이러스 역가를 측정하였다.

3. 재조합 retrovirus의 역가 측정

높은 역가의 TK 및 IL-2 유전자를 포함한 재조합 retrovirus를 산출하는 master packing cell line의 선별은 G418을 이용하여 cloning한 세포 상층액으로 target 세포주인 NIH-3T3 세포를 감염시켰다. 감염하루 전에 NIH-3T3 세포를 six-well plate의 well 당 2×10^4 세포씩 plating 하여 배양하였고, 바이러스 상층액을 DMEM 배양액으로 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}배로 계단 희석하고, 희석된 바이러스액 1 mL을 세포 배양액이 제거된 NIH-3T3 세포에 감염시키기 위해 접종하였다. 30분 간격으로 천천히 dish를 흔들어 바이러스가 포함된 배지가 세포 전체로 균일하게 퍼지게 하였다. 3시간 동안 바이러스를 세포에 감염시킨 후 4 mL의 DMEM 배양액을 첨가하여 세포를 배양하였다. 감염 48시간 후에 배양액을 제거한 후 800 μg/mL 농도의 G418을 함유하는 DMEM 배양액 2 mL씩을 각 well에 투여하고 계속 배양하면서 48시간마다 배지를 갈아주었다. 약 12-15일 후 G418에 저항성이 있는 세포군이 관찰되면 배양액을 제거하고 methylalcohol/methylene blue 염색

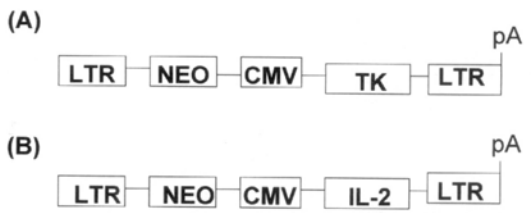

Fig. 1. Structure of the recombinant retroviral vector LNC/TK(A) or LNC/IL-2(B). LTR : long terminal repeats, NEO : neomycin resistance gene, CMV : cytomegalovirus promoter, TK : thymidine kinase gene, IL-2 : interleukin-2.

용액으로 세포군을 염색한 후 retrovirus 역가를 Kriegler[12]가 제안한 다음의 공식에 의해 계산하였다.

titer=number of colonies in highest dilution)×dilution

가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 clone (PA317/LNC/TK or PA317/LNC/IL-2)이 결정되면 그 세포군의 배양액을 모아 다음 실험에 이용하였다.

4. 재조합 retrovirus의 신경모세포종 세포주에 형질 전환

약 1×10^5 neuro-2a 세포를 6 well 배양 접시에 접종한 후 가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 PA317/LNC/TK or PA317/LNC/IL-2 clone의 상층액 1 mL을 배양 접시에 골고루 섞으면서 세포에 감염시켰다. 이때 세포 감염의 효율성을 높이기 위해 8 μg/mL의 polybrene을 첨가하였다. 4시간 후 G418이 포함되지 않은 MEM 배지 4 mL을 첨가한 다음 48시간 후부터 500 μg/mL 농도의 G418을 포함하는 MEM 배지로 선별 배양을 10-14 일간 계속하였다. G418에 저항성을 가지고 있는 집락(neuro-2a/TK or neuro-2a/IL-2)을 선택하여 각각의 집락 세포를 대량 배양하였다.

5. IL-2 농도 측정

각각 1개씩의 neuro-2a/IL-2 세포를 선택한 후 장기 배양하여 4개 집락 세포를 선택하였으며 이를 각각 1×10^6개씩 6 well 배양 접시에 접종한 다음, 각각의 배양 접시에 1 mL의 MEM 배지를 첨가하고 배양 24시간 후 상층액을 취하였다. 채집된 상층액을 0.45 μm 크기의 syringe filter로 여과시킨 후 여과된 상층액 내의 IL-2의 농도를 IL-2 ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 측정하였다.

6. *In vitro* bystander 효과

*In vitro*에서 bystander 효과를 측정하기 위해 neuro-2a/TK 세포와 unmodified neuro-2a세포를 100% : 0%, 50% : 50%, 10% : 90%, 5% : 95%, 0% : 100%의 비율로 혼합한 후 이들을 6 well 배양 접시에 1×10^6개씩 접종한 뒤, 24시간 후 10 μg/mL 농도의 GCV(Cymevene®, Syntex UK)를 포함하는 배지에서 배양한 후, 1, 2, 3, 4일 후 살아있는 세포수를 측정하였다.

7. *In vivo* bystansder 효과

*In vivo*에서 bystander 효과를 측정하기 위해 neuro-2a/TK 세포와 unmodified neuro-2a세포를 100% : 0%, 50% : 50%, 10% : 90%, 0.5% : 95%, 0% : 100%의 비율로 혼합한 후 마우스 피하에 주사하여 5-8 mm 크기의 종양이 형성된 후 GCV 50 mg/kg를 복강내로 1주간 투여한 후 종양 형성 유무를 관찰하였다. 각각의 실험에는 8마리의 A/J 마우스를 이용하였다.

8. HSV-TK 유전자 치료의 면역 반응

HSV-TK 유전자 치료와 면역 세포와의 관련성을 조사하기 위해 2×10^6 neuro-2a/TK 세포(100% HSV-TK 군) 및 wild type neuro-2a 세포(대조군)를 마우스 피하에 주사한 후 1주 후부터 50 mg/kg 농도의 GCV를 복강내로 1주일간 투여하였고 GCV 투여 종료 1주 후 wild type neuro-2a세포를 반대측 피하에 주입하여 종양 형성 유무를 관찰하였다. 각각의 실험에는 6마리의 A/J 마우스를 이용하였다.

9. 면역 조직 화학 반응

위 7번 실험에서 neuro-2a/TK 세포를 투여하고 GCV를 투여한 후 neuro-2a/TK 세포를 주사한 피하 부위의 조직을 채취하여 파라핀으로 포매 하였다. 4 μm 두께의 조직 절편을 만들어 xylene과 alcohol로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 20분간 0.3% 과산화 수소로 처리하여 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시켰다. 다시 PBS 완충액에 10분간 세척한 후 차단 혈청에 30분간 작용시켜 비 특이성 단백의 염색을 차단하였다. 조직 절편을 PBS로 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 1 : 100으로 희석한 goat anti-mouse polyclonal CD4 및 rabbit anti-mouse polyclonal CD8(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 항체들에 각각 반응시켰다. PBS로 세척한 후에 이차 항체로 PBS에 1 : 100으로 희석한 biotinylated anti-goat IgG(DAKO, Carpinteria, CA, USA)와 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 10분간 2회 세척하고, 실온에서 30분 동안 horseradish-peroxidase-linked streptoavidin(DAKO, LSAB kit)과 반응시켰다. 이를 PBS로 10분간 2회 세척하고 diaminobenzidine (Sigma)으로 5-10분간 발색시켜 흐르는 물에 수세하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색한 후 비수용

성 봉입제로 봉입 하였다. 또한 마우스 신경모세포종에서 connexin 43의 발현 정도를 알아보기 위해 2×10^6 neuro-2a/TK 세포를 마우스 피하에 주사하고 종양이 형성된 후, 조직을 채취하여 파라핀으로 포매시키고 mouse anti-connexin 43 monoclonal antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA)를 이용하여 면역 조직화학 검사를 시행하였다.

10. Bystander 효과 증폭

25% HSV-TK 군 및 10% HSV-TK 군 세포 2×10^6개를 마우스 좌측 피하에 주사한 후 5 mm 크기의 종양이 형성되면 우측 피하에 2×10^6개의 neuro-2a/IL-2 세포를 주입하고 3일 후부터 50 mg/kg 농도의 GCV를 복강내로 1주일간 투여하여 종양 크기의 변화 및 생존 유무를 neuro-2a/IL-2 세포를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 관찰하였다. 각각의 실험에는 8마리의 마우스를 이용하였다.

결 과

1. 신경모세포종 세포주의 LNC/TK retrovirus에 의한 형질 전환

2×10^4 NIH-3T3 세포를 6 well plate에 접종한 후 well 당 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}배로 희석된 바이러스 1 mL씩 감염시킨 후 감염된 세포만을 배양한 결과 상층액 1 mL당 바이러스 역가는 1×10^5부터 1×10^7 사이로 존재하였다(Table 1). 본 실험에서는 가장 높은 역가의 retrovirus를 산출하는 clone 4를 neuro-2a 세포 감염에 이용하였다.

2. IL-2 농도 측정

Neuro-2a/IL-2 유전자가 발현된 신경모세포종 세포주를 배양하여 4개의 집락을 선택하였다. 선택한 집락에서 약 1×10^6 neuro-2a/IL-2 세포를 선택하여 6 well 배양 접시에서 24시간 배양 후 측정한 IL-2의 농도는 Table 2와 같았다. 각각의 clone에서 IL-2의 분비 능력은 78.0±8.7 IU/day에서 부터 92.1±7.5 IU/day까지 다양하게 분비되었다(Table 2).

3. *In vitro* bystander 효과

HSV-TK 유전자가 형질 도입된 신경모세포종 세포주에 10 μg/mL 농도의 GCV를 포함하는 배지에서 배양한 결과 100% HSV-TK 군에서는 1, 2, 3일 및 4일 후 살아있는 세포의 생존율은 90, 35, 5, 0%였으며, 50% HSV-TK 군에서는 92, 40, 10, 0%였고 10% HSV-TK 군에서는 95, 50, 20, 15%였으며, 5% HSV-TK 군에서는 95, 60, 55, 555였다. 그러나, HSV-TK 유전자가 도입되지 않은 신경모세포종 세포주에서는 120, 150, 180, 220%의 생존율을 보였다(Fig. 2).

Table 1. Number of Colonies Transfected with Diluted Retroviruses and Selected with G-418

Clone number	Colony numbers in diluted retroviruses				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Clone 1	15	8	1		
Clone 2	86	12	2		
Clone 3	36	13	2	1	
Clone 4	145	70	12	3	1
Clone 5	26	12	5	2	
Clone 6	96	21	7	2	

Table 2. IL-2 Secretion from Vector-Transduced Neuro-2a Cells

Cells transduced by vector		IL-2(IU)
Neuro-2 cells		0.1
Neuro-2a/LNCX cells		0.1
Neuro-2a/IL-2 cells	clone 1	78.0±8.7
	clone 2	83.1±5.5
	clone 3	88.5±8.1
	clone 4	92.1±7.5

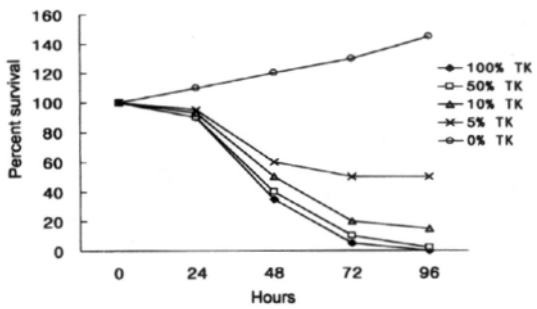

Fig. 2. *In vitro* bystander assay. Wild type neuro-2a cells and neuro-2a/TK cells were mixed at varing ratios, plated in 6 well culture plates(10^6/cells), and incubated at 37℃ overnight. Cells were exposed to GCV(10 μg/mL). On day 1, day 2, day 3 and day 4, cells were stained with trypan blue and surviving cells were enumerated.

4. *In vivo* bystander 효과

100% HSV-TK 군에서는 GCV 투여 4일째 종양이 완전이 없어졌으며, 50% HSV-TK 군에서는 6일째부터 육안적으로 종양이 관찰되지 않았으며 6주 이상 관찰한 후에도 종양의 재발되는 경우는 없었다. 반면에 10% HSV-TK 군에서는 7일간 GCV 투여한 후에 종양의 크기는 투여 전과 비교하여 더 이상 커지지는 않았다. 그러나 GCV 투여를 중지하고 약 5-7일 후부터 종양의 성장은 다시 시작되었다. HSV-TK 유전자가 도입되지 않은 신경모세포종 세포를 투여받은 군에서는 GCV 투여하는 동안에도 계속 종양이 성장하였으며 6주 이후에 생존한 마우스는 없었다(Fig. 3).

5. HSV-TK 유전자 치료의 면역 반응

100% HSV-TK 군에서는 GCV 투여 4일째 종양이 모두 없어졌으며, 제 14일에 wild type neuro-2a 세포를 반대측 피하에 주입한 후 6주 이상 관찰한 결과 종양이 형성된 마우스는 없었다. 그러나 대조군에서는 모든 마우스에서 종양이 형성되어 6주 이상 생존한 마우스는 없었다(Fig. 4).

6. 면역 조직 화학 염색

H&E 염색에서 종양 세포 주위에 림프구의 침윤을 관찰할 수 있었다. 면역 조직 화학 염색에서 CD4+ T 세포(Fig. 5A) 및 CD8+ T 세포(Fig. 5B) 침윤이 관찰되었다. 이는 T 세포가 항 종양 효과에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 마우스 신경모세포종 세포에서 connexin-43의 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 5C).

7. Bystander 효과 증폭

25% HSV-TK군에서 GCV만 단독으로 투여한 군에서는 제 7일째 종양이 완전히 소멸되었으나 neuro-2a/IL-2 세포를 주입하고 3일째부터 GCV를 투여한 군에서는 제 4일째 종양이 완전히 소멸되었다(Fig. 6A). 10% HSV-TK군에서 GCV만 단독으로 투여한 군과 비교하여 neuro-2a/IL-2 세포를 주입하고 3일째부터 GCV를 투여한 군에서는 종양의 성장 속도가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6B).

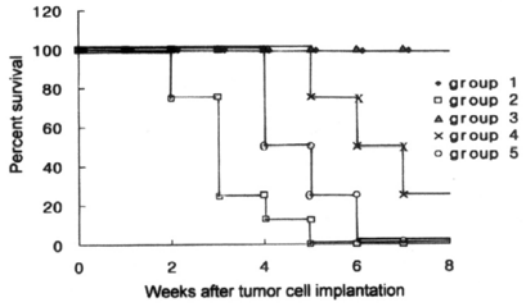

Fig. 3. *In vivo* bystander effect. 2×10^6 cells were injected s.c. into the flank as follows : 100% HSV-TK-transduced(group 1) and 100% untransduced cells(group 2) and mixtures of transduced and untransduced cells at ratios of 1 : 1(group 3), 1 : 10 (group 4) and 1 : 20(group 5). When the tumors reached the diameter of 5-8 mm, the mice received intraperitoneally 50 mg/kg GCV twice a day for 7 days.

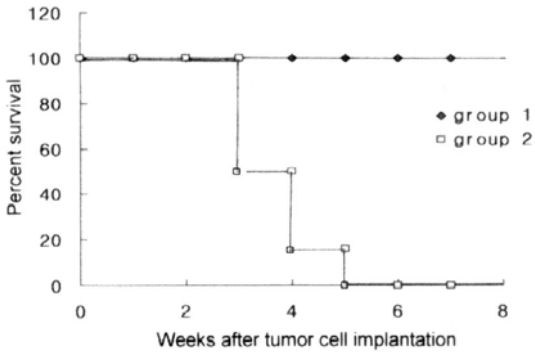

Fig. 4. Induction of immune response in HSV-TK gene-transduced neuro-2a cells. 2×10^6 HSV-TK cells(group 1) and 2×10^6 neuro-2a cells(group 2) injected s.c. into the flank of the mice, respectively (N=6/group). One week after tumor cell challenge, the mice received intraperitoneally 50 mg/kg GCV twice a day for 7 days and then the animals were challenged by s.c. implantation of approximately 2×10^6 unmodified neuro-2a cells contralaterally to the original injection sites 14 days after the last GCV treatment.

고 찰

HSV-TK는 negative 선택 표지자로서, HSV-TK에 형질 도입된 세포가 GCV에 노출되면, GCV는 HSV-TK에 의한 인산화의 기질로 작용하여 결과적으로 이 약물은 triphosphate 형태로 바뀌게되며 결국 DNA 중합효소를 억제하고 DNA에 결합하여 세포가 증식하지 못하도록 한다[1]. 지금까지 HSV-TK 유전

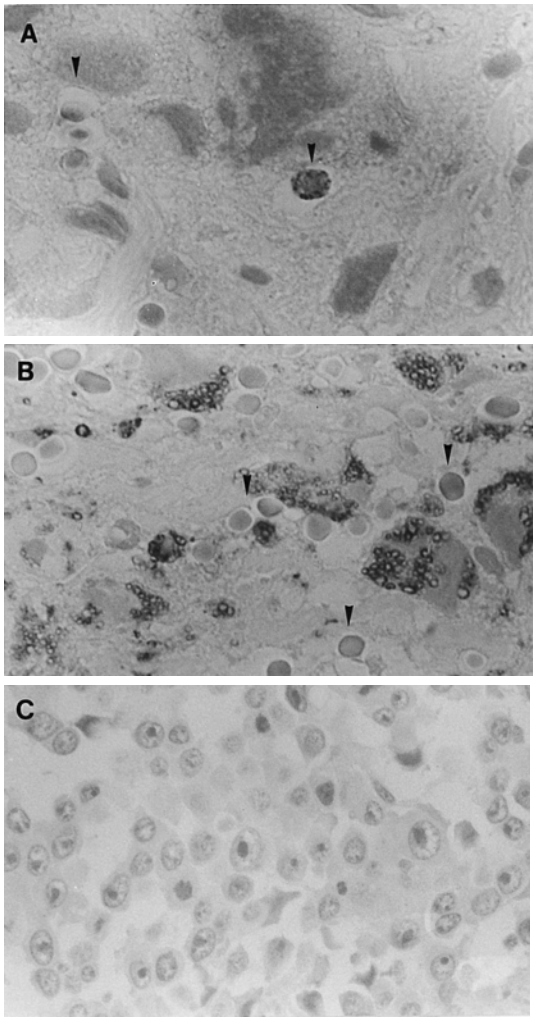

Fig. 5. Expression of CD 4, CD 8 and connexin-43 antigen. Paraffin-embedded sections were reacted with goat polyclonal antibodies to CD4(A), rabbit polyclonal antibodies to CD8(B) and not reacted with mouse anti-connexin 43 antibody(C). A-C: Magnification was at ×1,000.

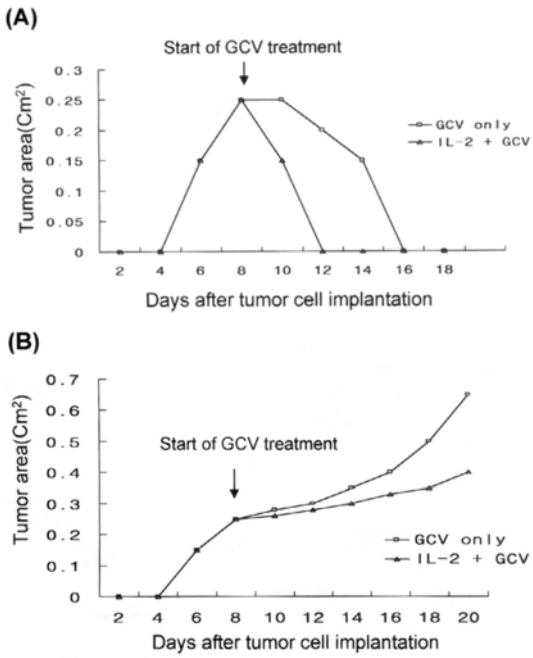

Fig. 6. Enhancement of bystander effect in murine neuroblastoma model. In 25% HSV-TK group, neuro-2a/IL-2 enhanced the effect of GCV treatment (A) In 10% HSV-TK group, the tumor growth was more delayed by neuro-2a/IL-2 and GCV treatment than GCV treatment only(B).

자 도입 및 발현을 통해서 치료 효과가 입증된 암으로는 간암[8], 뇌종양[13], 전립선암[14], 난소암[15] 등이 있다. 그러나, HSV-TK/GCV 유전자 치료는 *in vitro* 상에서의 우수한 성장 억제 효과에도 불구하고 *in vivo*상에서의 성장 억제 효과는 기대치에 훨씬 못 미치는 수준이다[16]. 이는 retrovirus를 종괴내에 국소적으로 주사할 때에 retrovirus 액이 종양 세포와 부분적으로만 접하게되어 국소 감염에 의한 감염 효율이 저하되고 또한 일부 retrovirus는 혈중 내에 있는 보체에 의해 바이러스가 불활성화 되어 retrovirus를 이용한 유전자 치료가 제한되기 때문으로 알려져 있다[17, 18]. 그러나, 이러한 단점은 HSV-TK/GCV 유전자 치료의 독특한 특징인 bystander 효과로 어느 정도 극복되어질 수 이을 것으로 기대된다. Bystander 효과는 뇌종양[4], 골육종[11] 등에서 보고되었으며 본 연구에서는 A/J 마우스의 신경모세포종 모델에서도 bystansder 효과가 관찰되는 것을 입증하였다.

Bystander 효과의 기전은 GCV의 독성 대사 산물인 GCV-triphosphate가 세포사이의 gap junction을 통해 전달됨으로서 인접한 세포의 괴사를 일으키고[4-6], HSV-TK/GCV system에 의해 세포고사(apoptosis)가 일어난 후 apoptotoc vesicle이 이웃 세포에 전달되어 세포 고사를 유발시키며[3], 죽은 종양 세포를 항원 제공 세포(antigen presenting cell; APC)가 탐식하여 전신적인 항 종양 면역 반응을 일으키기 때문으로 알려져 있다[7-10]. 최근 연구에 의하면 세포사이의 gap junction에 있는 connexin의 발현이 GCV-triphophosphate의 전달에 중요한 것으로 보고되고 있다[4-6]. 그러나, 본 연구에서 마우스 신경모세포종 세

포 표면에서 connexin 43 발현을 관찰할 수 없었으나 bystander 효과는 비교적 명확하게 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 적어도 마우스 신경모세포종 모델에서의 bystander 효과는 connexin 매개성 gap junction에 의하지 않는다는 것을 시사한다. Dahle 등[19]은 신장암 모델에서 connexin 발현이 없어도 bystander 효과가 관찰되었으며 이는 단백질의 인산화가 bystander 효과에서 중요한 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서는 HSV-TK/GCV 치료 후 조직 검사에서 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 침윤을 관찰할 수 있었다. 이는 마우스 신경모세포종 모델에서 bystander 효과는 면역학적 기전이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

그러나 *in vitro* 실험에서도 bystander 효과가 관찰된 것으로 볼 때 면역학적 기전 이외에 단백질의 인산화에 의한 bystander 효과 등과 같은 다른 기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 한편 *in vivo* 실험 결과로 유추해볼 때 HSV-TK/GCV system에 의한 항 종양 면역 반응의 유발은 IL-2와 같은 싸이토카인에 의해 항 종양 면역 반응을 증폭시킬 수 있을 것이다. Su 등[20]은 간암 모델에서 IL-2가 HSV-TK/GCV 치료 효과를 증폭시킨다고 보고하였고 Walling 등[11]도 골육종 모델에서 IL-2가 HSV-TK/GCV 치료 효과를 증폭시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 25% HSV-TK 군에서 neuro-2a/IL-2의 병합 치료는 현저하게 종양 세포의 성장을 억제하였다. 따라서 *in vivo*상에서의 HSV-TK 유전자 치료의 단점을 bystander 효과 및 이의 증폭을 통해서 극복할 수 있을 것으로 생각된다.

신경모세포종은 주로 소아에서 발생하는 악성 종양으로 1세 이상에서 발병한 제 4기 신경모세포종은 기존의 약물 치료, 방사선 치료로 5년 생존율이 10% 이하밖에 되지 않으며[21] 고용량 항암 약물 치료 후 조혈 모세포 이식을 시행하여도 생존율은 20-40%[22]에 불과하여 새로운 치료법의 개발이 요구되고 있다. 따라서 HSV-TK/GCV 치료에서 bystander 효과 및 이의 증폭을 통해 수술 후 남아있는 잔존암의 치료에 적용한다면 신경모세포종의 생존율 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

목 적 : 본 연구에서는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 HSV-TK 유전자 치료의 bystander 효과 및 기전을 관찰하고, 싸이토카인 유전자의 병합 치료가 bystander 효과를 증폭시킬 수 있는지 조사하여 그 결과를 향후 신경모세포종 치료에 적용하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 : A/J 마우스 신경모세포종 모델에서, neuro-2a/TK 세포와 unmodified neuro-2a세포를 여러 비율로 혼합하여 접종한 후 GCV를 투여하여 종양의 크기 변화 및 생존 유무를 관찰하였다. 마우스 신경모세포종에서 bystander 효과의 기전을 알아보기 위해 neuro-2a/TK 세포를 주입한 마우스의 조직을 절개하여 connexin 43, CD4+ 및 CD8+ 세포 침윤을 관찰하였다. 10% 및 25% HSV-TK 투여 군에서 neuro-2a/IL-2 세포의 투여가 bystander 효과를 증폭시키는지 조사하였다.

결 과 :

1) *in vitro* 및 *in vivo*에서 bystander 효과는 뚜렷하게 관찰되었다.

2) 마우스 신경모세포종의 면역 조직 화학 염색 검사에서 connexin 43 발현은 관찰되지 않았으나 많은 수의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 침윤이 관찰되었다.

3) 10% 및 25% HSV-TK 투여군의 마우스에서 neuro-2a/IL-2 세포의 투여는 대조군과 비교하여 종양의 성장을 더 억제 시켰다.

결 론 : *In vitro* 및 *in vivo*에서 HSV-TK/GCV 유전자 치료의 bystander 효과는 뚜렷하였으며, 그 기전으로 면역 세포가 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 그리고 bystander 효과는 IL-2 투여에 의해 증폭됨을 확인하였다. 이는 향후 신경모세포종의 수술 후 잔존암 치료에 HSV-TK/GCV 유전자 치료가 이용 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1) Oliver S, Bubley G, Crumpacker C. Inhibition of HSV-transformed murine cells by nucleoside analogs, 2′-NDG and 2′-nor-cGMP : mechanism of inhibition and reversal by exogenous nucleosides. Virology 1985;145:84-93.

2) Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, et al. The bystander effect : Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Res 1993;53:5274-83.
3) Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, et al. The bystander effect: association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. Hum Gene Ther 1995;6: 763-72.
4) Estin D, Li M, Spray D, Wu JK. Connexins are expressed in primary brain tumors and enhance the bystander effect in gene therapy. Neurosurgery 1999;44:361-8;dicussion 368-9.
5) Duflot-Dancer A, Piccoli C, Rolland A, Yamasaki H, Mesnil M. Long-term connexin-mediated bystander effect in highly tumorigenic human cells in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. Gene Ther 1998;5: 1372-8.
6) McMasters RA, Saylors RL, Jones KE, Hendrix ME, Moyer MP, Drake RR. Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin 43 gap junction formation. Hum Gene Ther 1998;9:2253-61.
7) Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. Cancer Res 1994;54:6228-34.
8) Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastasis after in situ transduction of a suicide gene. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7024-8.
9) Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:4348-52.
10) Ramesh R, Munshi A, Abboud CN, Marrogi AJ, Freeman SM. Expression of costimulatory molecules : B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. Cancer Gene Ther 1996;3: 373-84.
11) Walling HW, Swarthout JT, Culver KW. Bystander-mediated regression of osteosarcoma via retroviral transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and human interleukin-2 genes. Cancer Gene Ther 2000;7:187-96.
12) Kriegler M. Gene transfer and expression - A laboratory mannual. 1st ed, Macmillan Publishers LTD, Basingstoke, 1990:96-102.
13) Chen S-H, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. Gene therapy for brain tumors : regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3054-7.
14) Shalev M, Thompson TC, Kadmon D, Ayala G, Kernen K, Miles BJ. Gene therapy for prostate cancer. Urology 2001;57:8-16.
15) Freeman SM, McCune C, Angel C, Abraham GN, Abboud CN. Treatment of ovarian cancer using HSV-TK gene modified vaccine-regulatory issues. Hum Gene Ther 1992;3:342-9.
16) Cho HS, Park YN, Lyu CJ, Yang CH, Ryoo KY, Kim BS, et al. Effects of retroviral mediated HSV-TK gene transfer to murine neuroblastoma cell line in vitro and in vivo. Acta Oncologica 1999;36:1093-7.
17) Vile R, Russell SJ. Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. Gene Ther 1994; 1:88-98.
18) Welsh RM Jr, Cooper NR, Jensen FC, Oldstone MB. Human serum lyses RNA tumour viruses. Nature 1975;257:612-4.
19) Dahle J, Mikalsen SO, Rivedal E, Steen HB. Gap junctional intercellular communication is not a major mediator in the bystander effect in photodynamic treatment of MDCK II cells. Radiat Res 2000;154:331-41.
20) Su H, Lu R, Ding R, Kan YW. Adeno-associated viral-mediated gene transfer to hepatoma : thymidine kinase/interleukin-2 is more effective in tumor killing in non-ganciclovir(GCV)-treated than in GCV-treated animals. Mol Ther 2000;1: 509-15.
21) Finklestein JZ, Klemperer MR, Evans A. Multiagent chemotherapy for children with metastatic neuroblastoma : a report from Children's Cancer Study Group. Med Pediatr Oncol 1979;6:179-88.
22) Stram DO, Matthay KK, O'Leary M, Reynolds CP, Haase GM, Atkinson JB, et al. Consolidation chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation versus continued chemotherapy for metastatic neuroblastoma : a report of two concurrent Children's Cancer Group Studies. J Clin Oncol 1996;14:2417-26.