

## HSV-TK 유전자를 암호화하는 EBV 유래 플라스미드를 이용한 유전자 치료

오상택 · 민경아\* · 김종국\* · 이숙경†

가톨릭대학교 의과대학연구원 면역생물학연구소, \*서울대학교 약학대학  
(2003년 9월 22일 접수 · 2003년 10월 9일 승인)

### EBV-Based Plasmid Encoding HSV-TK for Cytocidal Gene Therapy

Sang Taek Oh, Kyoung Ah Min\*, Chong-Kook Kim\* and Suk Kyeong Lee†

Research Institute of Immunobiology, Catholic Research Institutes of Medical Science, Catholic University, Seoul 137-701, Korea

\*Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received September 22, 2003 · Accepted October 9, 2003)

**ABSTRACT**—Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) has been widely used for suicidal gene therapy in combination with nucleoside analogs such as ganciclovir (GCV). The use of HSV-TK is limited due to the side effect of GCV at high concentrations. Previous studies showed that stable transfectants of mutant HSV-TK with enhanced affinity to GCV were killed at lower GCV concentrations. In this study, we tested whether mutant HSV-TK can provide enhanced suicidal effect when transiently transfected with Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid. EBV-based plasmid which contains OriP and EBNA-1 sequence is well known for a stable episomal maintenance in human cells. Optimal transfection condition was assessed for SNU-638 gastric cancer cell line using polyethylenimine (PEI). Maximum transfection efficiency was achieved when DNA:PEI was 1:3 (w/v). Cytotoxicities of mutant and wild type HSV-TK were compared before and after partially selecting transfected cells. The cells were sensitive to 100 µg/ml hygromycin. Following GCV treatment, more cells were killed after hygromycin selection than before selection. The mutant HSV-TK showed enhanced cytotoxicity compared with the wild type HSV-TK. Our results suggest that the EBV-based plasmid encoding mutant HSV-TK may be useful to treat the diseases caused by uncontrolled cell proliferation such as cancer and rheumatoid arthritis.

**Key words**—Herpes simplex Virus-Thymidine kinase, EBV-Based plasmid, Gene therapy, Polyethylenimine

유전자 치료(gene therapy)는 유전적 이상으로 생긴 질병을 치료하기 위하여 치료 유전자를 표적 세포에 전달하여 이상 유전자를 대체하거나 치료용 단백질을 생산함으로써 질병을 치료하고자 처음 개발되었으나 요즘은 감염성 질환 및 항암 치료 등에도 응용되고 있다.<sup>1,2)</sup> 항암 유전자 치료를 위해 종양 억제에 기여하는 다양한 유전자가 사용될 수 있는데 이들 가운데 종양 세포를 사멸시키기 위해 자살유전자(suicide gene)를 이용한 방법이 좋은 결과를 얻고 있다. 자살유전자를 이용한 유전자 치료의 기본 개념은 정상 세포에는 존재하지 않는 자살 효소 유전자를 암세포에 전달하여 독성을 나타내지 않는 전구 약물(pro-drug)을 독성 약물로 전환시킴으로써 자살유전자를 발현하는 암세포의 사멸을 유도하는 것이다. 현재까지 알려진 자살유전자로는 Herpes simplex virus thymidine kinase(HSV-TK) 유전자,<sup>3)</sup> diphtheria toxin A-chain 유전자,<sup>4)</sup> cytosine deaminase 유전자,<sup>5)</sup> xanthine-guanine phosphoribosyl-transferase 유전자<sup>6)</sup> 등이

있는데 HSV-TK가 가장 널리 사용되고 있다. HSV-TK 유전자가 표적 세포에 전달되면 thymidine kinase라는 효소 단백질을 생산하게 된다. 이 단백질은 이 후 세포에 처리하는 ganciclovir(GCV) 등 뉴클레오시드 유사체(nucleoside analog)인 비 독성의 전구 약물을 인산화 시켜 독성의 약물로 전환시킨다. 인산화 된 독성 약물은 표적 세포의 유전자가 복제되는 과정에서 유전자의 복제를 차단하여 세포의 성장을 저해한다. HSV-TK와 함께 사용되는 GCV 등 전구 약물도 고 농도로 사용하면 부작용이 관찰되어 가급적 소량을 사용하는 것이 필요하다. 이를 극복하고자 Black 박사 등은<sup>7,8)</sup> HSV-TK의 뉴클레오시드 결합 위치에 무작위 돌연변이(random mutation)를 유발시킨 다양한 mutant HSV-TK를 제작하고 스크리닝을 통하여 GCV와의 친화력이 높아져 저 농도의 GCV에 의해서도 세포 독성을 나타내는 유용한 mutant HSV-TK를 찾아 보고한 바 있다. 그러나 이러한 결과들은 mutant HSV-TK를 permanent하게 발현하는 세포주를 사용하여 얻어진 것들로 임상 적용의 경우 100%의 세포에 치료 유전자를 전달할 수 없는 현실과는 거리가 있다.

유전자 치료는 세포로 많은 양의 유전자가 전달되고 전달

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)590-2396, E-mail : sukklee@cmc.cuk.ac.kr

된 유전자가 세포 내에서 높은 효율로 지속적으로 발현되어야 좋은 효과를 기대할 수 있다. 지금까지는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)나 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector) 등 바이러스성 벡터를 이용하여 치료 유전자를 간암, 폐암, 또는 위암 등에 전달하는 연구가 많이 수행되었다.<sup>9)</sup> 바이러스성 벡터는 유전자의 전달 효율이 높은 장점이 있지만, 숙주 세포의 DNA에 삽입되어 돌연변이를 유발할 가능성과 제작 과정이 매우 어렵고 면역 반응을 일으켜 정상 세포에 독성을 나타낼 수 있다는 단점이 한계로 지적된다.<sup>10)</sup> 한편, 비바이러스성 벡터들은 안전성이 뛰어난 반면 유전자 전달 효율과 발현 지속성이 나쁜 단점을 지닌다. 이는 비바이러스성 벡터로 전달된 플라스미드가 세포의 증식에 따라 희석되고 핵으로부터 쉽게 소실되기 때문이다. Epstein-Barr virus(EBV)는 숙주 세포 내에서 episomal DNA의 형태로 존재하면서 장기간 복제를 함으로써 잠재 감염상태를 유지한다. 이것은 EBV 핵 항원 중의 하나인 EBV nuclear antigen-1(EBNA-1)이 복제 기점인 OriP와 숙주 염색체에 동시에 결합하여 숙주 세포 DNA가 복제될 때 EBV 게놈도 복제되고 세포 분열 시에 딸세포로 나뉘어 들어갈 수 있게 해주기 때문이다.<sup>11)</sup> 이 OriP와 EBNA-1을 포함하는 EBV 유래 플라스미드는 EBV 게놈과 마찬가지로 전달된 세포의 핵 내에서 장기간 유지되는 특징을 보여<sup>12)</sup> 치료용 유전자의

클로닝에 적합하다.

본 실험에서는 비바이러스성 벡터를 사용하면서도 장기간 유전자 발현이 가능하도록 EBNA-1 및 OriP 서열을 포함하는 EBV 유래 플라스미드에 HSV-TK 보다 GCV와의 결합력이 더욱 증진된 mutant HSV-TK<sup>7,8)</sup>를 클로닝 하여 암세포에 전달함으로써, mutant HSV-TK의 발현 기간을 연장시키고 적은 농도의 GCV를 사용하여 독성을 줄이면서도 더욱 향상된 항암 효과를 얻을 수 있는지 조사하였다.

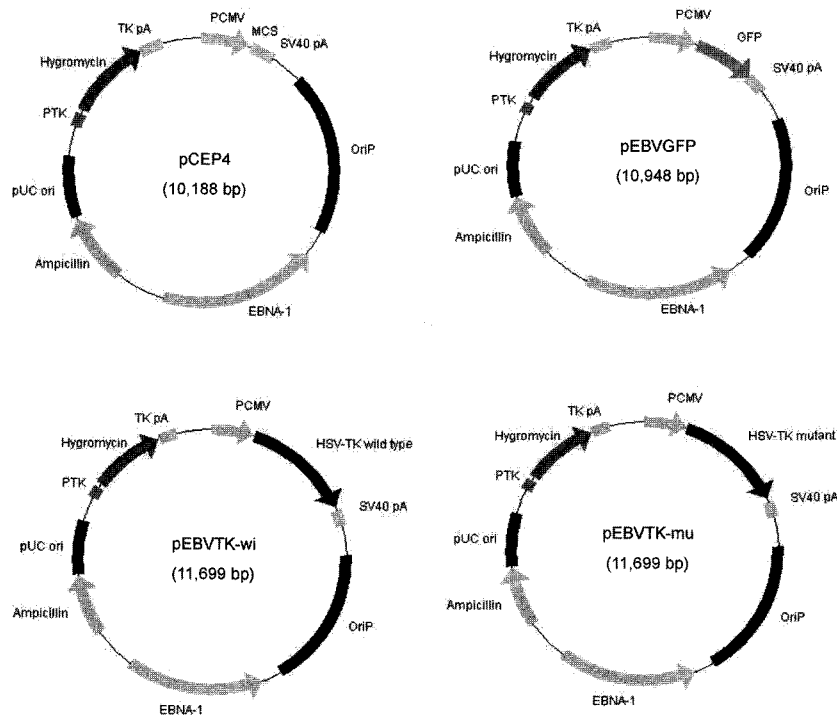
### 실험 방법

#### 시약 및 기기

Polyethylenimine(PEI)(branched polymer, MW 25,000)와 hygromycin은 Sigma(St. Louis, MO)사로부터 구입하였고, 그 외의 일반 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 기기로는 confocal microscope(Bio-Rad MRC-1024, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA), microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA)를 사용하였다.

#### 세포주 배양

SNU-638 위암 세포주는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 10% 우 태아 혈청(Fetal Bovine Serum,



**Figure 1**—Schematic representation of pCEP4, pEBVGFP, pEBVTK-wi, and pEBVTK-mu. All EBV-based plasmids carry EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1) gene and the origin of EBV replication (OriP). The genes for hygromycin and ampicillin resistance and a prokaryotic plasmid origin of replication are also present in all the plasmids. GFP or HSV-TK genes are driven by cytomegalovirus promoter (PCMV).

Gibco BRL, Rockville, MD)이 포함된 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL사)를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

#### 플라스미드 DNA 제작

SNU-638 세포주에 트랜스펙션(transfection)을 실시하기 위해 4 종류의 EBV 유래 플라스미드가 사용되었다(Figure 1). 본 연구에서는 연구 대상 유전자인 HSV-TK의 발현 효율이나 transfectant 선별 과정을 쉽게 모니터하기 위하여 green fluorescent protein(GFP)을 발현하도록 기존에 제작한 pEBVGFP<sup>12)</sup>를 대상 플라스미드와 1:1(w/w)로 섞어 트랜스펙션 하여 실험하였다. pCEP4는 비교를 위한 control 플라스미드로 사용되었다. pEBVGFP는 이미 발표된 바와 같이 pCEP4(Invitrogen, San Diego, CA)를 *NheI*과 *BamHI* 제한 효소로 자른 후 pEGFP-C1(Clontech, Palo Alto, CA)로부터 동일한 제한 효소로 잘라낸 GFP 유전자를 삽입하여 얻은 것을 사용하였다.<sup>12)</sup>

pEBVTK-wi과 pEBVTK-mu 플라스미드를 제작하기 위해 pCEP4를 *PvuII* 제한 효소를 이용하여 평활 말단(blunt end)으로 절단한 후 박테리아 알카라인 포스파테이즈(Bacterial Alkaline Phosphatase, Gibco BRL사)를 첨가 후 65°C에서 1시간 동안 반응하여 5' 말단의 인산기를 제거하였다. HSV-TK 유전자는 wild type과 mutant 모두 pET-23d(+) 벡터에 삽입된 것<sup>7)</sup>을 *XbaI*과 *BamHI* 제한 효소를 이용하여 절단 후 0.7% 아가로스 겔에 전기 영동하였다. 1,511 bp의 단편을 확인 후 gel extraction kit(Viogene, Sunnyvale, CA)를 이용하여 DNA를 추출하고 DNA polymerase I large (Klenow) fragment(Gibco BRL사)를 이용하여 양쪽 말단을 평활화하였다. *PvuII*로 절단한 pCEP4에, 준비된 HSV-TK 유전자를 T4-ligase(Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 접합 후 Top-10 박테리아에 형질 전환하여 형성된 콜로니에서 pEBVTK-wi과 pEBVTK-mu를 얻었다. 얻어진 클론 중에서 wild type과 mutant HSV-TK 유전자가 pCEP4에 제대로 삽입되었는지를 확인하기 위하여 각각의 콜로니를 항생제가 포함된(ampicillin 50 µg/ml) LB 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 진탕 배양한 후 1.5 ml 튜브에 덜어 원심 분리하여 박테리아를 수확하였다. 알카라인 용해법을 이용해 플라스미드를 분리한 후 *MluI* 제한 효소를 이용하여 절단하였다. 절단된 플라스미드는 0.7% 아가로스 겔에 전기 영동하여 각 단편의 크기를 확인하였고, 염기서열을 분석하여 확인하였다.

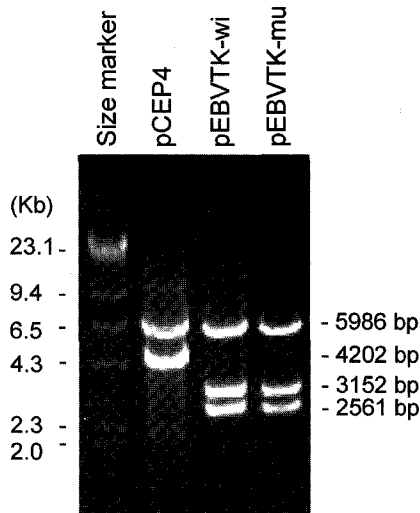
#### SNU-638 세포로의 유전자 전달 및 Transfectant 선별

SNU-638 세포주에 polyethylenimine(PEI)를 사용하여

EBV 유래 플라스미드를 전달하기 위한 최적 조건을 확립하기 위해 5×10<sup>4</sup> cells/well을 12-well plate(Nalgen Nunc International, Rochester, NY)에 접종하고 세포가 plate를 약 60–70% 정도 채울 때 트랜스펙션을 실시하였다. PEI를 우태아 혈청이 포함되지 않은 RPMI-1640 배지 100 µl에서 DNA:PEI의 비율이 각각 1:3, 1:6, 1:9(w/v)가 되도록 DNA와 혼합하였다. 상온에서 15분간 방치하여 PEI/DNA 복합체가 형성되도록 하고, 복합체가 형성되는 동안 SNU-638 세포가 접종된 plate를 RPMI-1640 배지를 이용해 3회 수세(washing)하였다. PEI/DNA 복합체 100 µl를 세포 위에 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 밤새 배양 후 배지를 10%의 우태아 혈청이 포함된 RPMI-1640 배지로 교환하였다. 2일 후 형광 현미경으로 각각의 well을 관찰하여 유전자 전달 효율을 비교 분석하였다. 하이그로마이신(hygromycin, Sigma)에 의한 transfectant 선별 효과를 관찰하기 위해 T-25 세포 배양용 플라스크(Nunc사)에 5×10<sup>5</sup> cells/플라스크를 접종하고 DNA:PEI를 1:3(w/v)의 비율로 혼합하여 앞서 실시한 동일한 방법으로 트랜스펙션을 실시하였다. 트랜스펙션 2일 후 다양한 농도의 하이그로마이신을 DNA가 전달된 세포에 처리하고, 선별 과정을 실시하기 전과 선별 12일 후 형광 현미경을 이용해 관찰하고 GFP 형광을 나타내는 세포와 그렇지 않은 세포를 세어서 GFP 발현 세포의 퍼센트를 계산하였다.

#### TK 발현 세포에 대한 GCV 감수성 시험

Wild type HSV-TK와 mutant HSV-TK의 GCV에 대한 감수성을 비교하기 위해 하이그로마이신 선별 과정 전후의 세포들을 대상으로 GCV에 의한 세포 독성 시험을 실시하였다. T-25 세포 배양용 플라스크(Nunc사) 6개에 SNU-638 세포를 접종 후 pCEP4, pEBVTK-wi, 또는 pEBVTK-mu 플라스미드를 pEBVGFP와 1:1(w/w)로 섞어 각각 2개의 플라스크씩 트랜스펙션 하였다. 트랜스펙션 2일 후 서로 다른 종류의 DNA가 전달된 SNU-638 세포를 접종한 2개의 플라스크 중 1개씩을 골라 세포를 수확하여 96-well plate(Nunc사)에 2×10<sup>3</sup> cells/well이 되도록 접종하였다. 나머지 1개씩의 플라스크는 하이그로마이신을 처리하여 12일간 선별한 후 각각 세포를 수확하여 96-well plate에 2×10<sup>3</sup> cells/well 이 되도록 접종하였다. 96-well plate에 접종하고 24시간 배양된 SNU-638 세포는 10<sup>-1</sup>~10<sup>2</sup> µg/ml 농도의 GCV를 처리하고 48시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 RPMI-1640 배지를 100 µl씩 각 well에 분주한 다음 20 µl의 CellTiter 96 AQueous One Solution(Promega, Madison, WI)을 각 well에 분주하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배



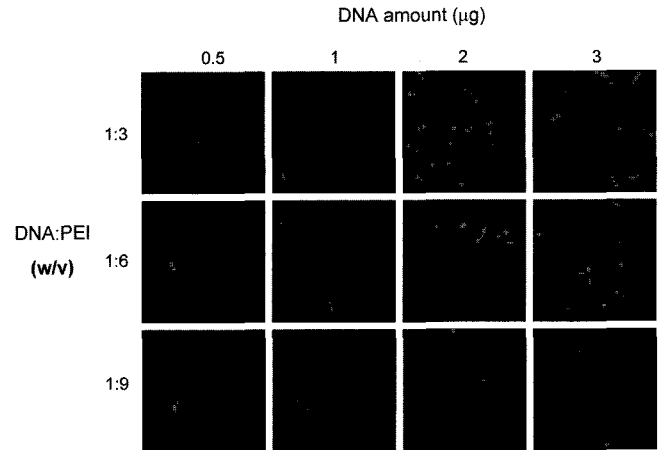
**Figure 2**—Gel electrophoresis of pEBVTK-wi and pEBVTK-mu after *MluI* digestion. pCEP4, pEBVTK-wi, and pEBVTK-mu were digested with *MluI* restriction enzyme. Digested DNA was loaded on a 0.7% agarose gel for electrophoresis.

양기에서 4시간 동안 배양한 후, 490 nm 파장에서 흡광도를 microplate reader로 측정하여 wild type과 mutant HSV-TK에 의한 선별 과정 전후의 세포 독성을 비교 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 플라스미드 DNA제작

본 연구에서 pCEP4를 기반으로 새로이 제작된 pEBVTK-wi와 pEBVTK-mu는 *MluI* 제한 효소를 이용하여 삽입된 유전자를 확인하였다(Figure 2). HSV-TK를 클로닝 하는데 사용된 pCEP4 벡터만을 *MluI*으로 절단하면 5,986 bp와 4,202 bp의 2단편이 얻어진다. *XbaI*과 *BamHI*으로 잘라낸 HSV-TK 유전자 내에는 *MluI* 제한 효소 인식 서열이 한곳 존재하는데, 이 서열은 *XbaI*의 인식 서열과는 70 bp, *BamHI* 인식 서열과는 1,445 bp 떨어져 있다. 따라서 HSV-TK 유전자가 pCEP4에 삽입되는 방향에 따라 *MluI* 제한 효소로 절단 시 서로 다른 크기의 단편이 얻어지게 된다. 만약 HSV-TK 유전자가 벡터의 프로모터로부터 정 방향으로 삽입되면 5,986 bp, 3,152 bp, 2,561 bp의 모두 3개의 단편을 확인할 수 있다. 그러나 만약 반대 방향으로 삽입되면 정 방향일 때와 달리 5,986 bp, 3,932 bp, 1,781 bp의 3가지 단편을 얻게 된다. Figure 2는 wild type과 mutant HSV-TK가 모두 벡터에 정 방향으로 제대로 삽입되었음을 보여준다. 각각의 클론은 DNA 염기 서열 분석을 통해 정확히 클로닝된 것을 재확인하였다(data not shown).



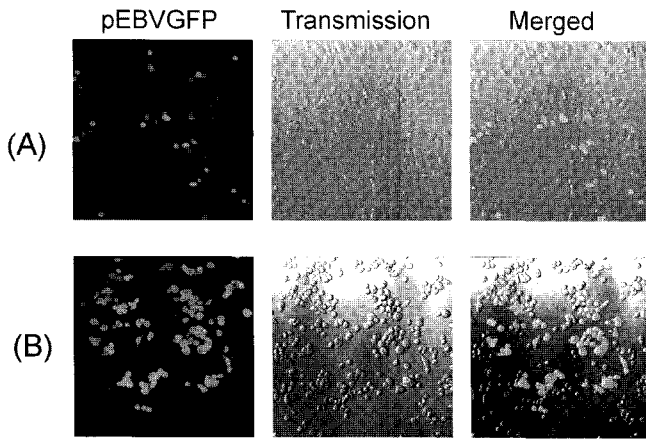
**Figure 3**—Optimal transfection conditions for SNU-638 cells by EBV-based plasmid/PEI. SNU-638 cells were transfected with 1:1 (w/w) mixture of pEBVGFP and pCEP4 using PEI. GFP expression was examined by confocal microscopy two days after transfection. (200x objective)

### PEI를 이용한 유전자 전달 효율

SNU-638 세포주를 12-well plate에 접종 후 PEI를 이용해 pCEP4와 1:1(w/w)로 섞은 pEBVGFP를 트랜스펙션하고 최적 조건을 확립하였다. DNA의 양을 0.5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 3  $\mu$ g으로 증가시키며 DNA:PEI를 1:3, 1:6, 1:9(w/v)로 변경시켜 실험을 실시하였다. 그 결과 2  $\mu$ g DNA를 PEI와 1:3의 비율로 혼합하여 트랜스펙션을 실시한 경우 가장 높은 발현 효율을 보이며 약 13%의 세포가 GFP를 발현함을 confocal microscope을 이용해 확인할 수 있었다(Figure 3). DNA를 3  $\mu$ g 사용한 경우는 2  $\mu$ g일 때와 비교해 큰 변화를 보이지 않았다. DNA:PEI를 1:3의 비율로 사용한 경우 유전자 전달 효율이 높을 뿐만 아니라 1:6이나 1:9일 때와 비교해 세포에 대해 낮은 독성을 나타내었다. 특히 1:9의 조건에서는 50% 이상의 세포가 사멸하여 적당하지 않은 트랜스펙션 조건으로 생각되었다. 최적의 트랜스펙션을 위해 이후의 실험에서는 pEBVGFP와 pCEP4, pEBVTK-wi, 혹은 pEBVTK-mu를 각각 1:1(w/w) 비율로 섞은 2  $\mu$ g의 DNA를 PEI와 1:3 (w/v)으로 복합체를 형성시키고 SNU-638 세포주에 전달하였다.

### 하이그로마이신에 의한 Transfectant 선별 효과

트랜스펙션 된 세포들을 하이그로마이신 처리하기 전과 후 형광 현미경을 이용해 관찰하였다. 하이그로마이신 농도를 달리하여 실험을 실시한 결과 50–100  $\mu$ g/ml을 사용한 경우 세포 선별이 잘 되는 것을 확인하였고(data not shown), 본 실험에서는 100  $\mu$ g/ml을 사용하였다. SNU-638 세포주에 pCEP4를 pEBVGFP와 1:1(w/w)로 섞어서 트랜스펙션하면



**Figure 4**—Selection of the transfected SNU-638 cells by hygromycin treatment. SNU-638 cells were transfected using PEI with 1:1 (w/w) mixture of pEBVGFP and pCEP4. From 2 days after transfection, the cells were cultured in a medium containing hygromycin to select the transfectants. DNA:PEI was 1:3 (w/v) and 2 µg DNA mixture was used for transfection. GFP expression was examined by a confocal microscope either 2 days after transfection (A) or 12 days after selection (B). (200x objective)

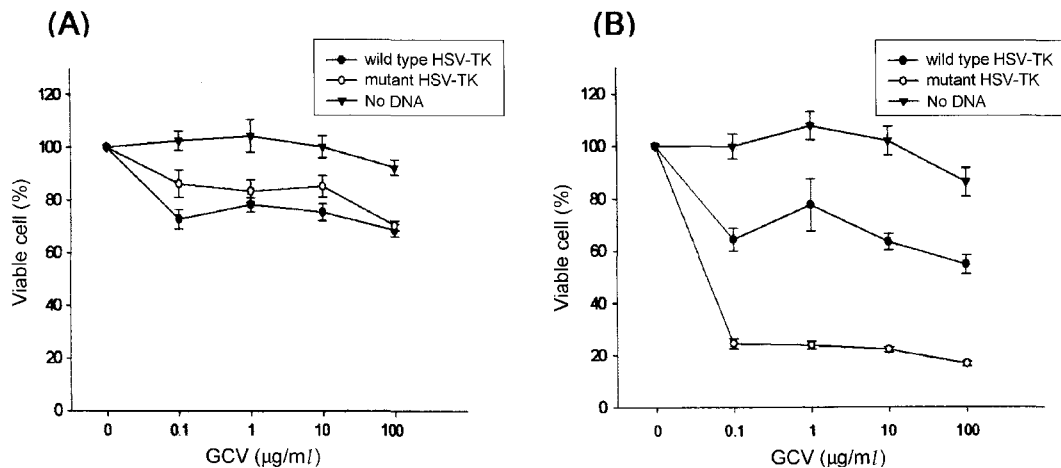
하이그로마이신 처리 이전에 GFP를 발현하는 세포가 전체의 약 13% 차지하던 것이 12일간 하이그로마이신 처리 후 약 43%로 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4). pEBVTK-wi와 pEBVTK-mu를 pEBVGFP와 1:1로 섞어 각각 SNU-638에 트랜스펙션한 경우에서도 유사한 결과를 얻었다(data not shown). 일반적인 플라스미드가 트랜스펙션하고 1-2주 정도 지나면 세포로부터 거의 완전히 소실되는 것과는 달리 EBV 유래 플라스미드를 가지고 있는 세포 비율이 하이그로마이신 선별 12일 후(트랜스펙션 14일째에 해당) 오히려 증가된 것은 EBV 유래 플라스미드가 세포 내에서 자가 복제

가 가능하고 핵 내에서 우수한 체류성을 나타내기 때문인 것으로 사료된다.

**Wild type HSV-TK와 Mutant HSV-TK 전달 후 GCV에 의한 세포 독성 비교**

SNU-638 세포주에 pEBVTK-wi이나 pEBVTK-mu를 트랜스펙션하고 2일 지난 세포나 그 후 12일간 더 하이그로마이신으로 선별한 세포를 각각 수확하여 96-well plate에 접종하고, 다양한 농도의 GCV를 처리하며 세포 독성을 측정하였다. DNA를 트랜스펙션 하지 않은 세포들에서는 다양한 농도의 GCV 처리에 의한 세포 독성이 거의 나타나지 않았다. pEBVTK-wi 또는 pEBVTK-mu를 전달한 세포는 하이그로마이신으로 선별하지 않고 GCV를 처리하면, DNA를 트랜스펙션하지 않은 세포에 비하여 약간의 세포 독성을 나타내었다. 그러나 wild type HSV-TK나 mutant HSV-TK를 발현하는 세포가 전체 세포 중 차지하는 비율이 낮아서인지 두 세포 그룹 간에 GCV에 의한 세포 독성에는 유의성 있는 차이가 보이지 않았다(Figure 5A). 반면, pEBVTK-wi와 pEBVTK-mu를 트랜스펙션 후 12일간 하이그로마이신으로 선별하고 GCV를 처리한 경우 확인한 세포 사멸 효과가 관찰되었다(Figure 5B). 특히, 상기 결과에서 wild type의 HSV-TK에 비해 mutant HSV-TK가 트랜스펙션 된 세포에서 GCV에 의한 세포 독성이 매우 높게 나왔다. Control 플라스미드인 pCEP4를 전달한 세포들은 하이그로마이신으로 선별하기 전후 모두 아무 DNA도 트랜스펙션 하지 않은 세포들과 비교할 때 GCV 처리에 의한 세포 독성에 큰 차이가 없었다(data not shown).

본 연구에서는 wild type이나 mutant HSV-TK를 PEI를



**Figure 5**—Sensitivity to GCV of SNU-638 transfectants expressing wild type or mutant HSV-TK. SNU-638 cells were plated in 96-well plates and treated with increasing concentrations of GCV for 48 hrs. Relative cell viability was then estimated for triplicate samples using a CellTiter96 AQUEOUS one solution kit (Promega, Madison, WI). Assay was performed before (A) and after selection (B).

이용해 위암 세포에 전달하고, GCV를 처리하여 세포 사멸을 유도할 수 있음과 EBV 유래 플라스미드의 이용으로 기존의 비바이러스성 수송체에서 한계점으로 지적되고 있는 짧은 유전자 발현 지속성의 문제를 해소할 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, mutant HSV-TK를 이용하면 낮은 농도의 GCV에 의해서도 큰 세포 사멸 효과를 얻어 wild type HSV-TK를 사용할 경우 고농도의 GCV를 처리해야 세포 사멸이 유도되기 때문에 관찰되었던 부작용의 문제점을 극복할 수 있을 것으로 기대된다. HSV-TK와 같은 자살유전자를 이용한 유전자 치료의 특징은 자살 유전자가 전달된 세포의 사멸뿐만 아니라 자살 유전자가 전달되지 않은 이웃 세포에도 세포 사멸이 유도되는 바이스탠더(bystander) 효과이다. 이러한 바이스탠더 효과에 의해 자살유전자가 전달된 소수의 종양 세포에 의해서도 효과적인 항종양 효과를 나타낼 수 있다.<sup>13)</sup> 본 연구에서 하이그로마이신으로 선별 후 약 43%의 세포가 mutant HSV-TK를 발현하나 GCV 처리에 의한 세포 사멸은 80% 정도로 관찰된 것도 이러한 바이스탠더 효과에 의한 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과는 EBV 유래 플라스미드와 mutant HSV-TK를 사용한 유전자 치료는 전달 유전자의 장기간 발현이 가능하고 적은 양의 GCV 이용으로도 높은 세포 독성을 나타낼 수 있어 항종양 유전자 치료 요법이나 활막 세포의 이상 증식을 보이는 류마티스성 관절염 치료 등에 효과적으로 활용될 가능성이 있음을 시사한다.

### 감사의 말씀

클로닝에 사용된 wild type과 mutant HSV-TK 유전자들은 미국 Washington State University의 M.E. Black 박사로부터 얻어서 사용하였음. 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원 (과제번호: 03-PJ1-PG1-21400-0001)과 한국과학재단 우수연구센터연구 지원 (과제번호: R11-2002-098-04006-0)으로 수행되었음.

### 문 헌

- 1) J. Smith, Y. Zhang and R. Niven, Toward development of a non-viral gene therapeutic, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **26**, 135-150 (1997).
- 2) M. Nishikawa and L. Huang, Nonviral vectors in the new

- millennium: Delivery barriers in gene transfer, *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861-870 (2001).
- 3) F.L. Moolten, Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy, *Cancer Res.*, **46**, 5276-5281 (1986).
- 4) G.S. Harrison, C.J. Long, T.J. Curiel, F. Maxwell and I.H. Maxwell, Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene, *Hum. Gene Ther.*, **3**, 461-469 (1992).
- 5) Y. Dong, P. Wen, Y. Manome, M. Parr, A. Hirshowitz, L. Chen, E.A. Hirschowitz, R. Crystal, R. Weichselbaum, D.W. Kufe and H.A. Fine, *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).
- 6) P.J. Mroz and F.L. Moolten, Retrovirally transduced Escherichia coli gpt genes combine selectability with chemosensitivity capable of mediating tumor eradication, *Hum. Gene Ther.*, **4**, 589-595 (1993).
- 7) M.E. Black, T.G. Newcomb, H.M. Wilson, L.A. and Loeb LA, Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 3525-3529 (1996).
- 8) M.S. Kokoris, P. Sabo, E.T. Adman and M.E. Black, Enhancement of tumor ablation by a selected HSV-1 thymidine kinase mutant, *Gene Ther.*, **6**, 1415-1426 (1999).
- 9) D.A. Heideman, V.W. van Beusechem, G.J. Offerhaus, T.J. Wickham, P.W. Roelvink, M.E. Craanen, H.M. Pinedo, C.J. Meijer and W.R. Gerritsen, Selective gene transfer into primary human gastric tumors using epithelial cell adhesion molecule-targeted adenoviral vectors with ablated native tropism, *Hum. Gene Ther.*, **13**, 1677-1685 (2002).
- 10) N. Chirmule, K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian and J. Wilson, Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans, *Gene Ther.*, **6**, 1574-1583 (1999).
- 11) J.L. Yates, N. Warren and B. Sugden, Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells, *Nature* **313**, 812-815 (1985).
- 12) K.A. Min, S.T. Oh, K.H. Yoon, C.K. Kim and S.K. Lee, Prolonged gene expression in primary porcine pancreatic cells using an Epstein-Barr virus-based episomal vector, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **305**, 108-115 (2003).
- 13) F.J. Burrows, M. Gore, W.R. Smiley, M.Y. Kanemitsu, D.J. Jolly, S.B. Read, T. Nicholas and C.A. Kruse, Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells, *Cancer Gene Ther.*, **9**, 87-95 (2002).