

Herpes Simplex Virus thymidine Kinase/Ganciclovir 유전자 치료에서 새로운 간격결합분자 Connexin 37에 의한 방관자 효과의 증가

전북대학교 의과대학 소아과학교실

김선영 · 이호근 · 이정창 · 황동진 · 황평한 · 이대열 · 조수철

Novel Gap Junction Molecules, Connexin 37, Enhances the Bystander Effect in HSVtk/GCV Gene Therapy

Sun Young Kim, M.S., Ho Keun Yi, Ph.D., Jung Chang Lee, M.S., Dong Jin Hwang, M.D.
Pyoung Han Hwang, M.D., Dae Yeol Lee, M.D. and Soo Chul Cho, M.D.

Department of Pediatrics, Chonbuk National University, Medical School, Jeonju, Korea

Purpose : Gap junction intercellular communication(GJIC) is an important mechanism of the bystander effect in herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir(HSVtk/GCV) gene therapy. Therefore, we attempted to enhance the bystander effect *in vitro* by exogenous overexpressing connexin 37(Cx37) in cells to increase GJIC.

Methods : NIH3T3 cells were transfected with the Cx37 and HSVtk gene or the HSVtk gene alone by the calcium phosphate method, and we detected their expression from these cells by RT-PCR. GCV-mediated cytotoxicity and the bystander effect of each transfectant was then assessed and compared.

Results : Cells transfected with HSVtk became sensitive to low concentration of GCV. We found significantly increased cytotoxicity in HSVtk/GCV gene therapy after introduction of the HSVtk and Cx37 genes together compared with the cytotoxicity seen after introduction of the HSVtk gene *in vitro*. Co-expression of the HSVtk and Cx37 genes potentiates HSVtk/GCV gene therapy through the bystander effect.

Conclusion : These results indicated that the increase of GJIC using Cx37 have potentiated the bystander effect of HSVtk/GCV therapy, and may be a new approach to improve response in suicidal cancer gene therapy. (J Korean Pediatr Soc 2003;46:541-547)

Key Words : Connexin 37, HSVtk/GCV, Gene therapy

서 론

암 치료에 있어서 herpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk) 유전자와 항바이러스제인 ganciclovir(GCV) 약물을 이용하는 gene-directed enzyme prodrug therapy(GDEPT)는 잘 알려진 효소/전약체(enzyme/prodrug) 복합 치료법이다. GCV는 guanosine 유사체로 세포독성은 없지만 HSVtk 유전자에 의해서 인산화가 되며, 이어서 인산화 효소에 의해서 3

인산화가 되면 DNA의 합성을 저해하여 세포사를 유발시킨다. 대표적인 자살 유전자 치료(suicide gene therapy)¹⁾의 하나인 HSVtk/GCV를 이용한 유전자 치료는 1986년 Moolten²⁾이 여러 암세포, 특히 세포 분열이 빠른 암세포의 공략에 효과가 보고되었으며, 최근에도 많은 연구와 임상적 시도가 이루어지고 있다.

암 유전자 치료에 있어서 가장 어려운 문제점의 하나는 제한된 세포에만 전달되는 유전자의 낮은 효율로서 암조직의 전체를 제거시키는데 한계가 있다. 그러나 HSVtk/GCV를 이용한 자살 유전자 치료는 HSVtk가 도입된 암세포뿐만 아니라 HSVtk가 도입되지 않은 주위의 암세포도 GCV 투여 후 사망하는 “방관자 효과 (bystander effect)”에 의해 치료 효과가 나타나므로^{3, 4)}, 방관자 효과를 증강시킬 수만 있다면 HSVtk/GCV 유전자 치료의 효과를 극대화시킬 수 있으므로 이러한 문제점을 극복하는

이 논문의 연구는 전북대학교 연구기반 연구비에 의하여 지원되었음.

접수 : 2003년 2월 8일, 승인 : 2003년 4월 2일

책임저자 : 조수철, 전북대학교병원 소아과

Tel : 063)250-1470 Fax : 063)250-1464

E-mail : chosc@moak.chonbuk.ac.kr

방안이 될 수 있어 이에 대한 연구가 필요하다.

방관자 효과의 기전으로는 세포의 세포내이입(endocytosis) 작용으로 독성 물질의 유입이나 죽은 세포를 제거 시 나타나는 면역 작용에 의한 세포사 등이 있지만 분자수준의 기전에 관해서는 아직 확실히 알려져 있지 않다^{5,6}. 세포간에 독성 물질의 이동에는 세포내이입 이외에도 직접적으로 간격결합분자들(gap junction molecules)에 의해 매개되는 것으로 밝혀지고 있다⁷.

간격결합(gap junction)이란 세포간 이온 물질이 교환되는 통로로 Ca, cAMP, inositol 등 주로 1 kDa 이하의 이온이나 대사 산물 분자가 통과하여 세포간에 이동되며, 6개의 connexin(Cx)으로 구성되어 있다^{8,9}. 현재까지 간격결합분자들은 20여개 정도가 분리되었으며, 이온 채널의 생리적 기능 이외에 이들의 유전적 변이가 여러 질환 등에 미치는 연구가 최근에 주목받고 있다¹⁰. HSVtk에 유도되는 GCV의 세포독성 물질이 Cx 분자들을 통하여 HSVtk 유전자가 전달되지 않는 세포에도 전달되어 암 세포의 세포사가 유도되는 것으로 추측되어 자살 유전자 치료의 방관자 효과를 높이기 위한 연구로 간극결합분자인 Cx43과 Cx26의 가능성이 보고되었다^{11,12}. 최근 보고에 의하면 Cx37도 Cx43과 Cx26처럼 HSVtk/GCV 유전자 치료에 방관자 효과를 증가시킬 수 있는 유전자일 것으로 추정되고 있다¹³. 특히 Cx37은 암 면역치료에 중요한 tumor associated antigen(TAA)의 가능성이 있는 분자로 예측되고 있다¹⁴. 아직은 Cx37이 TAA로서 정확한 기전에 관해서는 밝혀져 있지 않지만 면역세포가 암 세포를 인식하는 과정에 있어서 Cx37 분자가 매개된다는 것은 중요한 의미를 갖고 있다. 이러한 결과는 Cx37이 자살유전자를 이용한 암의 유전자 치료에 있어서 방관자 효과를 높이는 효과 이외에도 암을 공격하는 면역세포의 주 표적이 된다면 암 유전자치료에 효과적으로 이용될 수 있는 분자로 생각된다. 본 연구에서는 Cx37을 암의 유전자 치료의 효과를 높이기 위한 유전자로서의 가능성을 타진하기 위하여 HSVtk/GCV 유전자 치료에 Cx37를 직접 세포에 발현을 시켜 방관자 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 방법의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 연구에서는 NIH3T3 섬유아세포주를 이용하여 실험하였다. 세포배양액은 DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비 활성화시킨 우태아 혈청(FBS; Hyclone, Logan, Utah, USA)을 10%, penicillin(100 unit/mL), streptomycin(100 µg/mL)과 glutamine(300 µg/mL)을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 융합되기 직전인 3-4일 간격으로 계대 배양하였으며, 실험에는 총 30계대 이하인 세포만을 사용하였다.

2. 유전자와 유전자의 세포내 도입과 발현

HSVtk 유전자와 사람 Cx37 유전자(미국 시카고대학의 소아 혈액종양분야의 Seul 박사로부터 분양)의 발현을 위하여 동물 세포내 발현 벡터인 pcDNA3(Invitrogen, Gronigen, Netherlands)에 각각 제조합시켰다. 실험 세포주에는 HSVtk, Cx37 각각 혹은 두 유전자를 동시에 도입시켰으며, 대조세포에는 pcDNA3 벡터만을 calcium phosphate(Promega, Madison, WI, USA) 법을 이용하여 도입시켰다. 세포 5×10⁵개를 100 mm 배양용기에 배양 후 유전자 도입 4시간 전에 새로운 무혈청 배양액으로 교체하고 유전자 10 µg과 2M CaCl₂ 36 µL를 혼합한 후 멸균 증류수로 300 µL로 고정하였다. 동량의 2×hepes buffered saline(HBS)에 Ca과 유전자 혼합액을 한 방울씩 떨어뜨려 Ca-유전자 혼합액을 제조하였다. 실온에 30분 정도 방치 후 세포주 위에 한 방울씩 떨어뜨려 유전자를 도입시켰다.

유전자 도입 3일 후 세포로부터 HSVtk, Cx37 유전자의 발현은 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 융합직전의 세포에 1 mL TRIzol(Gibco BRL, MD, USA)을 첨가하여 세포를 용해시키고, 200 µL의 클로르포름을 첨가하여 강하게 교반 후 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층의 RNA를 포함한 층을 취하였다. 0.5 mL의 아이소프로판올을 첨가하여 RNA만을 침전 분리하였다. cDNA 합성을 위한 역전사는 분리 RNA 2 µg을 취하여 역전사중합효소(MMLV, Gibco BRL, MD, USA) 200 U를 효소의 반응액과 첨가하여 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 HSVtk와 CX37의 유전자를 PCR로 증폭하였다. HSVtk 시발체는 5'-aac cac cac cac gca act-3'와 5'-gcc agc ata gcc agg tca-3'를 이용하여 513 bp를 증폭하였고, 사람 Cx37의 시발체로는 5'-tgt tgg tgg ttg gac tca-3'와 5'-gac gcc agc ctc tcc tct-3'를 이용하여 268 bp를 증폭하여 유전자의 도입을 확인하였다. cDNA 합성체와 각각의 시발체들을 첨가하고 중합효소(Taq Polymerase, Promega, Madison, WI, USA) 0.5 U를 첨가하여 94°C, 58°C, 72°C를 30회 반복하여 증폭시켰다. 증폭된 유전자는 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

3. MTT assay에 의한 세포사멸 측정

세포사멸의 정도를 Van de Loosdrecht 등¹⁵에 의한 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St Louis, USA) 방법으로 측정하였다. 24 well plate에 각각의 유전자가 도입된 세포를 분주하여 하룻밤 배양하여 MTT 측정 전에 세포배양액으로 2회 세척 후 각 well에 1 mL의 MTT 용액을 첨가하고 37°C에 4 시간 배양시켰다. 상층액을 제거시키고 형성된 formazan 침전물을 용해시키기 위해 1 mL의 DMSO를 가하여 5분간 microplate shaker상에서 용해시킨 다음 파장 630 nm의 reference filter와 파장 570 nm test filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다. MTT 용액은 phenol red가 들어있지 않은 DMEM 세포배양액을 사용하여 5 mg/mL의

농도로 만들어 사용하되 4°C에서 하룻밤 용해시킨 후 여과 멸균하여 분주한 것을 -20°C에 보관하며 사용하였다.

4. DNA 단편화

세포를 2회 차가운 PBS로 세척한 후 세포에 500 μL의 lysis buffer(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 얼음에서 30분간 용해시킨 후, 세포 찌꺼기를 13,000 rpm에서 원심 제거하였다. 상층의 용해질을 2회 phenol/chloroform으로 추출 후 에탄올로 DNA를 침전시켰고 2 μg의 RNase A가 함유된 TE용액에 녹인 후 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 DNA 단편화를 확인하였다.

5. ⁵¹Cr release assay

Cx37 유전자와 GCV 유도체의 이동에 의한 세포독성의 검증을 ⁵¹Cr 방출법으로 측정하였다. 표적세포로는 pcDNA3 벡터가 도입된 NIH3T3 세포(5×10³개)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 Na₂⁵¹CrO₄(100 μci)를 첨가하여 2시간 동안 표지화하였다. 2회 배양용액으로 세척 후 24 well plate에 배양시키고 작동세포로는 동시에 같은 수의 HSVtk 혹은 HSVtk/Cx37 유전자가 도입된 세포를 배양시켰다. 배양 다음날 GCV를 첨가시키고 24시간 배양한 후 상층액을 100 μL를 취하여 감마방사능 측정기(Wallac, Gathersburg, MD, USA)로 유리방사능을 측정하였다. 각 실험군에서의 유리량(experimental release, ER)을 측정하고, 자연유리량(spontaneous release, SR)을 작동세포 부유액 대신 동량의 배양액을 가하여 측정하였고 최대유리량(maximum release, MR)을 1% Triton X-100용액을 가하여 측정하였다. 세포독성의 값은 cytotoxicity(%)=[100×(ER-SR)/(MR-SR)]에 의해 계산하였다.

6. 통계처리

통계 방법 처리는 Student's t-test를 사용하여 검정하였으며 P값은 0.05 미만일 때 통계학적인 유의성을 인정하였다.

결 과

1. HSVtk와 Cx37 유전자가 형질도입된 세포주로부터 이들 유전자들의 발현

Cx37의 방관자 효과에 대한 영향을 알아보기 위해서 HSVtk와 Cx37 유전자를 발현벡터인 pcDNA3에 제조합시키고 NIH3T3 세포주에 도입시켰다. 형질도입된 세포주로부터 각각의 RNA를 추출하여 이들 유전자들의 특이 시발체를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행한 결과 마우스 유래 섬유아세포주인 NIH3T3 세포는 본 실험에 사용된 바이러스 유래 HSVtk와 사람의 Cx37과의 동일한 유전자 배열은 갖고 있지 않았다(Fig. 1). 유전자는 pcDNA3, HSVtk, Cx37, HSVtk/Cx37로 구분하여 각각 세포에 도입시키고 형질 도입된 세포주에서는 각각의 유전자의 특이 DNA 분절의 증폭을 확인할 수 있어 이들 유전자의 형

질도입이 성공적으로 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. GCV의 감수성에 의한 세포사멸 측정

HSVtk 세포주에 먼저 GCV에 의해 유도되는 세포사멸을 검토하였다. HSVtk 발현 세포(1×10⁴)를 24 well plate에 하룻밤 배양시키고 GCV를 1 μM에서 100 μM까지 첨가하여 24시간과 48시간 후의 GCV에 대한 감수성을 MTT로 측정하였다. 대조 세포에 비하여 HSVtk 발현 세포는 GCV에 대한 감수성이 나타나 비교적 고농도인 GCV 100 μM에서 24시간에 20% 정도와 48시간에는 30% 정도의 세포가 사멸되었다(Fig. 2). 그러나 NIH3T3와 pcDNA3 벡터만 도입된 세포는 GCV 100 μM 처리 농도에서는 실제적으로 많은 세포가 사멸되지 않았으며 오히려 20% 이상의 세포가 증식하였다(결과 미공개).

3. Cx37 유전자 형질도입에 의한 방관자효과 측정

HSVtk 발현 세포는 100 μM 농도에서 1일째에 20%, 2일째

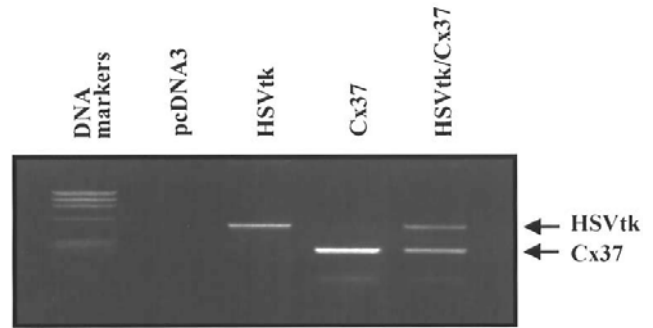


Fig. 1. HSVtk and connexin 37(Cx37) mRNA expression of transformed NIH3T3 cells used in this study. RT-PCR of total RNA from transient clones was performed to amplify specific sequences of HSVtk and Cx37 mRNA, detected as 513- and 268-bp bands, respectively, followed by electrophoresis and staining with ethidium bromide.

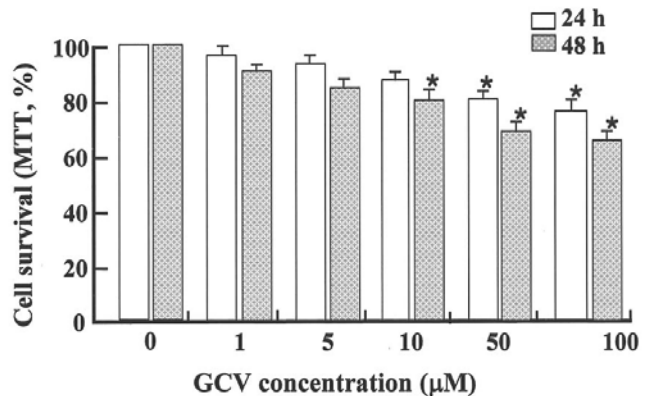


Fig. 2. Ganciclovir(GCV) sensitivity of HSVtk transduced NIH3T3 cells after GCV treatment. Cell survival was measured by colorimetric MTT assay at 24, 48 hours after GCV treatment. Results were calculated as differences between untreated and GCV-treated cultures as a percentage of the untreated culture(*P<0.05).

에 최고 30% 정도의 세포에서만 사멸되었다. 이러한 세포사멸 정도를 기준으로 Cx37이 매개되는 방관자 효과에 의한 세포사멸을 검토하기 위하여 HSVtk만 발현되는 세포와 HSVtk/Cx37 동시 발현 세포에 GCV의 농도를 달리하여 이들간의 세포사멸 정도를 비교하였다. HSVtk만 발현되는 세포는 Fig. 2의 결과처럼 24시간 후에 100 μ M에서 20% 정도만이 사멸되었다. 반면 동일한 농도에서 HSVtk/Cx37 동시 발현 세포는 75% 정도 세포가 사멸되어 2배 이상의 사멸 효과가 나타났다(Fig. 3). 이러한 사멸 효과는 저 농도의 GCV 처리에서도 동일하게 나타났다.

GCV에 의한 세포사멸은 HSVtk 발현 세포에서는 20-30% 전후의 세포사멸 현상이 나타났으며, Cx37 발현 세포도 약간의 세포사멸이 보여졌다. 그러나 HSVtk/Cx37 동시 발현 세포는 대부분의 세포가 모두 사멸되어 생존세포를 거의 확인 할 수 없었다(Fig. 4A). 이들 세포의 사멸은 세포자멸사(apoptosis)의 전형적인 DNA의 단편화가 나타났으며, 특히 HSVtk/Cx37 동시 발현 세포에서 더 많이 유도되었다(Fig. 4B).

그밖에 Cx37에 의해 유도되는 방관자 효과를 측정하기 위하여 Cx37이 전혀 매개되지 않는 NIH3T3:HSVtk와 Cx37이 부분적으로 매개되는 NIH3T3:HSVtk/Cx37과 Cx37:HSVtk 및 Cx37이 모두 매개되는 Cx37:HSVtk/Cx37의 유전자가 발현된 세포를 서로 혼합 배양하였다. 즉 Cx37 및 NIH3T3 표적세포를 기준으로 HSVtk와 Cx37/HSVtk가 도입된 작동세포 군으로 구분하여 각각 20:80, 40:60, 60:40, 80:20으로 서로 다른 비율로 혼합 배양하여 GCV에 대한 세포 사멸을 비교하였다. Cx37이 매개되지 않는 NIH3T3:HSVtk 세포에서는 약 20% 정도 특히 HSVtk의 비율을 80%로 하였을 경우 10% 이하의 세포만이 사멸되었다. 이와는 다르게 Cx37이 동시 발현되는 Cx37:HSVtk/Cx37 세포에서는 비율에 무관하게 80%에 가까운 세포가 사멸되어 Cx37의 방관자 효과를 확인 할 수 있었다. 이러한 방관자 효과는 Cx37이 부분적으로 매개되는 NIH3T3:HSVtk/Cx37과 Cx37:HSVtk 세포에서도 사멸 현상이 높게 나타났다. 그러나 NIH3T3:HSVtk/Cx37 세포에서는 Fig. 3의 결과처럼 HSVtk/Cx37 발현세포에서 나타나는 정도의 세포사멸이 초래되어 실제로 NIH3T3 표적세포에 대한 방관자 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 반면 Cx37:HSVtk 세포는 HSVtk 세포의 방관자 효과가 표적세포인 Cx37로 나타나 전혀 매개되지 않는 NIH3T3 세포에 비교하여 2배 이상의 세포사멸이 나타났다(Fig. 5).

위 실험의 결과처럼 Cx37이 세포사멸을 직접적으로 매개하고 있음을 규명하기 위하여 Cx37 발현 세포를 크로미움으로 표지화한 후 사멸되는 세포로부터 유리되는 크로미움의 양을 측정하였다. Cx37이 매개되지 않는 HSVtk 발현 세포만의 배양시 유리되는 크로미움은 총 표지화 된 양의 20% 이하만이 유리되는 것에 비하여, HSVtk/Cx37 동시 발현 세포와 혼합 배양 시에는 90%에 이르는 크로미움이 유리되었다(Fig. 6). 이상의 결과로부터 사람의 Cx37 간격결합분자는 HSVtk/GCV을 이용한 GDEPT 치료에 효과적인 방관자 효과를 나타내는 중요한 분자임을 확인

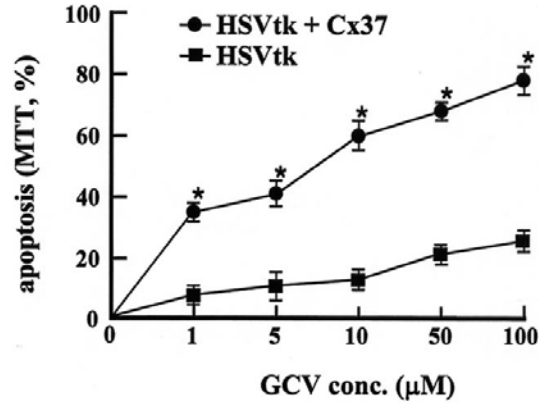


Fig. 3. Bystander killing effect of Cx37 in HSVtk transduced NIH3T3 cells after GCV treatment. GCV-mediated cytotoxicity was determined by MTT assay. Cx37 and HSVtk co-expressing cells resulted in more efficient cell killing at varying concentration of GCV when compared to HSVtk only-expressing cells (* $P < 0.05$).

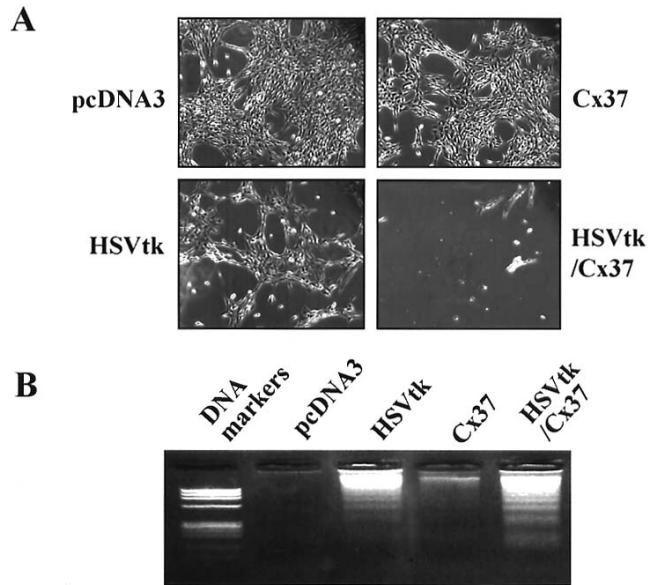


Fig. 4. Representative morphology of GCV-mediated cytotoxicity in HSVtk/Cx37 expressing NIH3T3 cells. Cx37 and HSVtk co-expressing NIH3T3 cells showed enhanced sensitivity(A) and increased DNA fragmentation(B) to GCV. DNA extracted from transduced cell was analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining.

하였다.

고 찰

일반적으로 암의 유전자 치료는 암세포에 대한 면역반응을 증강시켜 암을 치료하고자 하는 면역강화법(genetic immunopotential), 돌연변이로 인한 암유전자의 과발현이나 종양억제

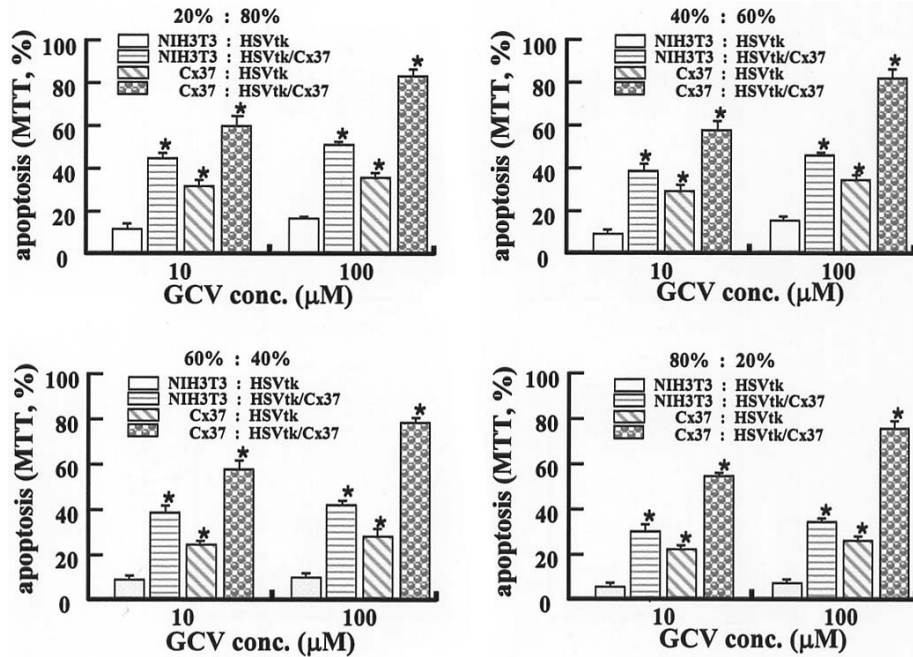


Fig. 5. Bystander effect in vitro comparing HSVtk or HSVtk/Cx37 expressing NIH3T3 cells as effector cells amid parental NIH3T3 cells as target cells. Effector cells were mixed and cocultured at varying ratios (from 20% to 80%) with target cells in 10, 100 μM GCV. GCV-mediated cytotoxicity was determined by MTT assay. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments (**P* < 0.05).

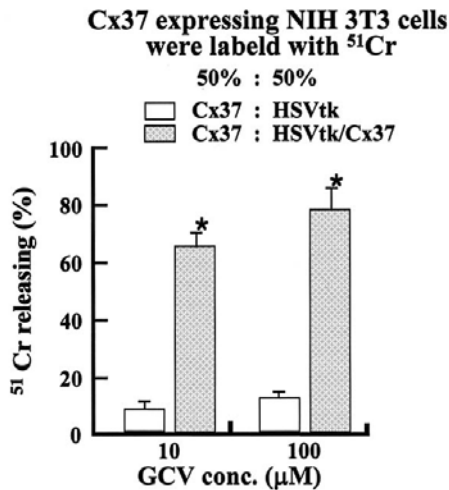


Fig. 6. Bystander killing effect of Cx37 in HSVtk transduced NIH3T3 cells after GCV treatment was determined by ⁵¹Cr releasing assay. ⁵¹Cr-labeled Cx37 expressing NIH3T3 cells as target cells were mixed and cocultured with the same number of HSVtk or HSVtk/Cx37 expressing NIH3T3 cells as effector cells. After 1 day of incubation, ⁵¹Cr release was measured by γ-counter. Results were calculated according to the following equation: [100 × (experimental release - spontaneous release) / (maximal release - spontaneous release)]. Spontaneous release was determined from target cells only, and maximal release was from target cells treated with 1% Triton X. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments (**P* < 0.05).

전자의 결손을 교정하는 돌연변이보상법(mutation compensation), 그리고 HSVtk 혹은 cytosine deaminase와 같은 약제 감수성 유전자를 이용한 분자화학요법(molecular chemotherapy) 등이 시도되고 있다¹⁶⁾. 이중 약제 감수성 증가를 목적으로 하는 방법 중 HSVtk 유전자를 이용한 유전자 치료의 장점으로는 형질도입된 유전자가 표현될 때까지 짧은 시간을 요하고, 암세포의 유전적 이상에 관한 정확한 규명없이 시도할 수 있으며, 유전적 이상이 다른 여러 가지 종양에 비 선택적으로 시도할 수 있으며, 암세포 모두에 유전자 조작을 하지 않아도 주변의 암세포를 효과적으로 제거할 수 있는 방관자효과, 그리고 유전자 형질도입 후 전약제에 노출되어 죽은 암세포에 의한 강한 면역반응 유발 등이 있다^{2, 17)}. 이러한 장점 때문에 1991년 난소암 치료¹⁸⁾에 처음 승인된 이후 현재 뇌종양, 흑색종, 전립선암, 대장암 등 비교적 광범위한 임상 적용이 시도되고 있는 방법이다^{19, 20)}.

암 유전자 치료는 일반적으로 암세포에만 유전자를 전달시켜 암세포만을 제거시키고자 하였다. 이를 위해 유전자의 발현 효율이 높은 벡터와 함께 암세포나 특정조직에 한정하여 유전자를 발현시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 암세포에 유전자를 전달시키면 실제로는 극히 일부분의 암세포에만 유전자가 전달되어 발현된다. 이러한 미약한 유전자의 전달과 발현이 유전자 치료의 효과를 낮게 하는 원인으로 작용하지만, 유전자가 전달되지 않는 주위의 암세포도 죽어 가는 "방관자 효과"가 나타나 유전자 치료의 효과를 높일 수 있는 방안으로 기대된다.

방관자 효과의 발생 기전은 아직 확실히 밝혀지지는 않았지만 간격결합을 통한 세포간의 metabolic cooperation⁷⁾, 세포사이에 의해 파괴된 세포의 독성잔유물의 세포내이입⁴⁾, 세포성 면역²¹⁾ 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 Elshami 등²²⁾은 간격결합의 구성 성분인 Cx의 발현 정도에 따라 세포간의 통신 (communication)과 방관자 효과의 차이가 있다고 하였고, Mensil 등¹¹⁾은 alpha-glycyrrhetic acid로 세포간의 통신을 억제함에 따라 방관자 효과가 감소되었다고 하였다. 이들은 적어도 *in vitro*에서는 Cx에 의해 세포간의 간격결합을 통한 metabolic cooperation이 방관자 효과의 주요 기전이라고 하였다. 또한 Park 등¹⁶⁾의 보고에 의하면 간격결합의 구성 성분인 Cx43를 발현하는 암세포주에서 retinoic acid에 의해 간격결합을 통한 세포간의 통신과 방관자 효과에 의한 살상효과가 증가되었다. 이러한 결과들은 간격결합을 통한 세포간의 통신이 방관자 효과의 주요기전임을 시사하였다. 따라서 간격결합분자를 직접 세포에 도입시키면 방관자 효과를 증가되어 HSVtk/GCV를 이용한 유전자 치료의 효과를 극대화시킬 수 있다.

간격결합분자로는 Cx26, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 등이 보고되고 있으며, 이중 Cx26과 Cx43은 이미 방관자 효과가 증명되었다^{11, 12)}. 본 연구에서는 현재까지 비교적 연구가 적게 진행된 Cx37의 방관자 효과를 확인하고자 하였다. 실험에 사용된 Cx37은 사람으로부터 유래된 유전자이며, 실험 세포주인 마우스 유래의 섬유아세포인 NIH3T3에서는 동일한 배열을 갖는 유전자의 발현은 없었다. 이는 사람 Cx37에 의한 HSVtk/GCV 유전자 치료의 방관자 효과를 증명하는데 이상적으로 생각되어 실험 세포주로 선택하였다.

다음으로 HSVtk/GCV 유전자 치료의 가능성을 검토한 결과 NIH3T3 세포에 도입된 HSVtk 유전자는 GCV에 의한 세포사멸을 유도하였다(Fig. 2). 실험에서는 GCV를 1 μ M에서 100 μ M까지 처리한 결과 배양시간과 처리 농도에 따라 다르게 세포사멸이 나타났다. GCV의 100 μ M을 처리한 경우 48시간 후에 40% 정도의 세포사멸이 나타났으나 실제적으로 고농도의 GCV 처리에 불구하고 높은 세포사멸을 기대할 수가 없었다. 이러한 낮은 세포사멸은 유전자 도입의 한계로 생각된다. HSVtk 유전자의 낮은 발현율에 따른 세포사멸 현상이 간격결합분자인 Cx37을 동시에 발현시킨 세포에서는 높게 나타났다. 100 μ M GCV 처리 24시간째에 80% 이상의 세포가 사멸되어 30% 전후의 HSVtk만에 비교하여 3배 이상의 높은 사멸효과가 나타났다(Fig. 3). 이는 Cx37이 방관자 효과의 특성을 가지고 있음을 의미한다. 지금까지 알려지고 있는 Cx26, Cx32, Cx40, Cx43을 비롯하여 Cx37에서도 방관자효과가 존재하고 있으며, 각각의 Cx간의 방관자 효과의 차이는 있겠지만 Cx37의 방관자 효과는 우수한 것으로 나타났다¹³⁾. Cx37의 방관자 효과의 증거로서 Cx37을 발현시킨 표적세포에 작동세포가 Cx37을 발현시킨 경우(Cx37: HSVtk/Cx37) 비율에 상관없이 80% 정도의 세포가 사멸되었으며, 작동세포에 Cx37이 없는 경우(Cx37: HSVtk)에도 Cx37이

매개되지 않는 세포에 비교하여 2배 이상의 세포가 사멸되었다 (Fig. 6). 특히 작동세포에 Cx37이 없는 경우의 세포사멸의 증가는 표적세포가 사멸된 결과이며, 이는 표적세포의 Cx37이 매개되어 인산화된 GCV의 산물이 이동된 것으로 추측된다. 반면 표적세포에 Cx37이 발현되지 않지만 작동세포에 Cx37 발현 경우(NIH3T3: HSVtk/Cx37)는 세포사멸이 높게 나타났지만 실제로는 표적세포의 사멸보다는 작동세포의 높은 세포 사멸의 결과로 나타났다(Fig. 6). Cx37에 의해 매개되는 방관자 효과를 정확히 증명하는 수단으로 표적세포인 Cx37 발현 세포를 크로미움으로 표지화하여 실험한 결과에서도 Cx37이 발현되는 작동세포에서 강력하게 크로미움이 유리됨으로써 그 효과를 증명할 수 있었다. 이는 자살 유전자 치료에 있어서 낮은 유전자의 발현율로부터 세포사멸을 높이는 방법으로 Cx37의 가능성을 보여주는 결과로 생각된다.

본 실험에서는 일반 세포에서 Cx37의 방관자 효과를 검토하였으나 이러한 결과는 암세포에서도 동일하게 그 효과가 있을 것으로 생각된다. 일반적으로 암세포는 악성으로 변환되는 과정에 있어서 간격결합분자의 발현율의 저하와 발현 위치의 변화가 나타난다고 한다²³⁾. 암의 진행에 있어서 간격결합분자의 정확한 기전은 알 수 없지만, 암세포에 간격결합분자의 발현을 유도하면 정상세포의 특성을 나타내는 것으로 보면 암세포의 진행에 있어서 간격결합분자의 저하는 중요한 역할을 할 것으로 생각된다²⁴⁾. 암의 HSVtk/GCV 유전자 치료와 Cx37의 혼합치료는 방관자 효과외에도 암의 진행과정의 억제에 영향을 줄 것이며, 다른 Cx와 비교하여 특히 Cx37은 암 인식 특이항원(TAA)으로서 특이성을 갖고 있으므로¹⁴⁾ 면역반응을 유발하는 장점이 있어 암의 자살유전자치료의 효과를 극대화할 수 있다.

요 약

목적 : HSVtk 유전자를 암세포에 도입하여 GCV에 대해 선택적으로 감수성을 증가시키는 HSVtk/GCV 유전자 치료에서 방관자 효과는 모든 암세포에 유전자를 도입하지 않고도 치료효과를 얻을 수 있으므로 방관자 효과를 증강시킬 수만 있다면 HSVtk/GCV 유전자 치료의 효과를 극대화시킬 수 있다. HSVtk의 방관자 효과에 관한 기전으로는 간격결합분자들이 주요 역할을 하리라고 알려져 있다. 간격결합분자들은 세포간의 통신을 담당하는 connexin family이며, 주로 Cx43에 관해서는 많이 알려져 왔다. Cx37을 암의 유전자 치료에 이용 가능한 유전자로서의 가능성을 타진하기 위하여 HSVtk/GCV 유전자 치료에 Cx37 유전자를 직접 세포에 발현을 시켜 방관자 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 방법의 가능성을 검토하였다.

방법 : 효과의 검증을 위한 세포주로는 NIH3T3를 사용하였다. HSVtk가 형질도입된 NIH3T3 세포에 GCV의 농도별로 세포사를 관찰하였다. 또한 Cx37의 발현 여부에 따른 세포사멸의 효과를 검토하기 위하여 Cx37 발현 세포주와 비발현 세포주를

서로 다른 비율로 혼합 배양후 나타나는 세포사를 관찰하였다. 최종적으로 Cx37이 세포사멸을 직접적으로 매개하고 있음을 규명하기 위하여 Cx37 발현 표적세포를 크로미움으로 표지화한 후 Cx37 발현 세포주와 비발현 작동세포와 혼합 배양 시 사멸되는 세포로부터 유리되는 크로미움의 양을 측정하였다.

결 과 : HSVtk 발현 세포는 GCV 농도에 비례하여 세포가 사멸되었으며 HSVtk/Cx37 동시 발현 세포는 HSVtk만 발현된 세포에 비해 2배 이상의 사멸 효과가 나타났다. 아울러 Cx37에 의해 유도되는 방관자 효과는 표적세포와 작동세포 모두에 Cx37이 발현되는 경우는 세포의 혼합배양 비율에 상관없이 80%에 이르는 세포가 사멸되었다. 특히 작동세포에 Cx37이 없더라도 표적세포에 Cx37이 발현하면 세포사멸은 Cx37이 매개되지 않는 경우에 비교하여 2배 이상의 증가를 보였다. 이러한 결과는 크로미움 유리 실험에서도 동일한 결과가 유도되어 Cx37은 세포사멸을 직접적으로 매개하고 있음이 나타났다.

결 론 : 이상의 결과로부터 HSVtk/GCV 유전자 치료에서 방관자효과를 나타내는 분자의 하나로 Cx37의 기능을 확인하였으며, Cx37은 방관자 효과를 증가시켜 유전자치료의 낮은 유전자 전이율을 극복하고 암의 자살 유전자 치료의 효과를 극대화할 수 있는 분자로 예측된다.

참 고 문 헌

- 1) Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 1996;23:31-45.
- 2) Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986;46:5276-81.
- 3) Barba D, Hardin J, Ray J, Gage FH. Thymidine kinase-mediated killing of rat brain tumors. *J Neurosurg* 1993;79:729-35.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Samejima Y, Meruelo D. 'Bystander killing' induces apoptosis and is inhibited by forskolin. *Gene Ther* 1995;2:50-8.
- 7) Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:725-31.
- 8) Charles AC, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J Cell Biol* 1992;118:195-201.

- 9) Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2708-12.
- 10) Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* 2002;19:121-36.
- 11) Mensil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1831-5.
- 12) Carrio M, Mazo A, Lopez-Iglesias C, Estivill X, Fillat C. Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 2001;94:81-8.
- 13) Andrade-Rozental AF, Rozental R, Hopperstad MG, Wu JK, Vrionis FD, Spray DC. Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res Rev* 2000;32:308-15.
- 14) Buchler T. Construction of a quantitative PCR system to determine expression of tumor associated antigen. *Bratisl Lek Listy* 1998;99:617-20.
- 15) Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. *J Immunol Methods* 1991;141:15-22.
- 16) Park JY, Elshami AA, Amin K, Rizk N, Kaiser LR, Albelda SM. Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther* 1997;4:909-17.
- 17) Moolten FL. Drug sensitivity("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1994;1:279-87.
- 18) Freeman SM, McCune C, Robinson W, Abboud CN, Abraham GN, Angel C, et al. The treatment of ovarian cancer with a gene modified cancer vaccine: a phase I study. *Hum Gene Ther* 1995;6:927-39.
- 19) Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR. The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer* 1997;33:1005-16.
- 20) Smythe WR. Prodrug/drug sensitivity gene therapy: current status. *Curr Oncol Rep* 2000;2:17-22.
- 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* 1995;92:167-74.
- 22) Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, et al. Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther* 1996;3:85-92.
- 23) Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli ML, Mironov N, Mensil M, Krutovskikh V. Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 1999;23:273-9.
- 24) Omori Y, Duflo-Dancer A, Mensil M, Yamasaki H. Role of connexin(gap junction) genes in cell growth control: approach with site-directed mutagenesis and dominant-negative effects. *Toxicol Lett* 1998;96:105-10.