

## Sodium Iodide Symporter (NIS)를 이용한 분자영상

경북대학교 치과대학 구강생화학교실

조 제 열

## Molecular Imaging Using Sodium Iodide Symporter (NIS)

Je-Yoel Cho, Ph.D

Department of Oral Biochemistry, Kyungpook National University School of Dentistry, Daegu, Korea

Radioiodide uptake in thyroid follicular epithelial cells, mediated by a plasma membrane transporter, sodium iodide symporter (NIS), provides a first step mechanism for thyroid cancer detection by radioiodide injection and effective radioiodide treatment for patients with invasive, recurrent, and/or metastatic thyroid cancers after total thyroidectomy. NIS gene transfer to tumor cells may significantly and specifically enhance internal radioactive accumulation of tumors following radioiodide administration, and result in better tumor control. NIS gene transfers have been successfully performed in a variety of tumor animal models by either plasmid-mediated transfection or virus (adenovirus or retrovirus)-mediated gene delivery. These animal models include nude mice xenografted with human melanoma, glioma, breast cancer or prostate cancer, rats with subcutaneous thyroid tumor implantation, as well as the rat intracranial glioma model. In these animal models, non-invasive imaging of *in vivo* tumors by gamma camera scintigraphy after radioiodide or technetium injection has been performed successfully, suggesting that the NIS can serve as an imaging reporter gene for gene therapy trials. In addition, the tumor killing effects of I-131, ReO4-188 and At-211 after NIS gene transfer have been demonstrated in *in vitro* clonogenic assays and *in vivo* radioiodide therapy studies, suggesting that NIS gene can also serve as a therapeutic agent when combined with radioiodide injection. Better NIS-mediated imaging and tumor treatment by radioiodide requires a more efficient and specific system of gene delivery with better retention of radioiodide in tumor. Results thus far are, however, promising, and suggest that NIS gene transfer followed by radioiodide treatment will allow non-invasive *in vivo* imaging to assess the outcome of gene therapy and provide a therapeutic strategy for a variety of human diseases. (Korean J Nucl Med 38(2):152-160, 2004)

**Key Words:** NIS, Molecular imaging, Gene therapy, Thyroid

## 서 론

유전자 치료분야는 지난 10여 년간 큰 발전을 거듭해 왔다. 수 백 건의 임상 실험에 천여 명 이상의 환자에게 시도 되어왔다. 대 사성 질병, 감염성 질병 그리고 종양 등의 질병 치료를 위해, 여러 가지 경로를 통해 바이러스 벡터(vector)(아데노바이러스, 레트로 바이러스 등) 또는 리포솜 같은 비바이러스(non-viral) 벡터를 이용하여 치료유전자를 생체내로 전달하는 시도들이 있어 왔다.

치료에 효과적인 유전자 치료를 위해서는 치료 유전자를 원하는 조직이나 장기에 원하는 시기 동안, 효과적으로 발현시켜야만 달성할 수 있다. 그러나 지금까지 종종 여러 유전자치료 시도가 실패를 거듭해 왔다. 그리고 그 원인을 분석함에 있어서 무엇 때문에 왜 어디가 잘못 되었는지를 이해하기는 매우 어려웠다. 이러한 실패를 이해하는 주요한 장애물은 먼저 전달한 외부 유전자의 발현을 비침습적(non-invasive)으로 어디에(location) 얼마나(level) 그리고 얼마동안(duration) 발현하고 있는지 반복적으로 모니터링 할 수 있는 시스템의 부재에 기인한다. 그리하여, 유전자 치료를 시도하는 과학자와 의사들은, 이러한 여러 유전자 이식 벡터를 이용하여, 치료유전자의 발현을 리포트(report) 할 수 있는 안전하고 믿을 만한 비침습적인 분자영상법을 개발하려는 시도를 해 오고 있다.<sup>1)</sup>

현재까지, 핵의학적 방법, 자기공명분석법(magnetic resonance spectrometry), 광학적 영상법 및 생물발광(bioluminescence) 영상법들이 개발되고 시도되어 왔다.<sup>2-4)</sup> 이들 각각의 영상법은 각

• Received: 2004. 4. 6. • Accepted: 2004. 4. 10.

• Address for reprints: Je-Yoel Cho, Ph.D., Department of oral Biochemistry School of Dentistry Kyungpook National University dongin 2-ga 101, Daegu 700-422, Korea

Tel: 053) 420-4998, Fax: 053)421-1417

E-mail: jeycho@knu.ac.kr

\*이 논문은 2002년 발표된 본인의 review 논문 (Curr Gene Ther 2002;2:393-402.)의 일부를 근간으로 하여 최근 발표된 NIS를 이용한 영상에 관한 논문들을 추가적으로 고찰하여 작성한 것임을 밝혀 둔다.

각의 장단점이 있다. 그렇지만 핵의학적인 영상법이 현재까지는, 실제 임상에서 많이 이용되고 있는 해부학적 영상법의 기술과 아울러, 좋은 민감도(sensitivity)와 투과도를 제공하는 임상 실현성이 근접한 기술이라 생각된다. 이리하여 지금까지 바이러스 벡터를 이용하여 감마카메라, single photon emission computed tomography(SPECT) 그리고 positron emission tomography (PET) 같은 핵의학 기술을 이용한 여러 영상법이 시도 되어 왔다. 대표적인 예로는, Hsv-tk 와 도파민(dopaminergic) 수용체 유전자를 이용한 외부유전자 발현 양상을 비침습적으로 그리고 반복적으로 영상화하려는 시도를 들 수 있다.<sup>5)</sup> 하지만 이 방법은 복잡한 기질(substrates)을 제작해야 하는 번거로움이 요구되고 또한 PET 같은 고가의 장비가 요구되는 단점이 있다.

한편 갑상선에서 요오드를 흡수하는 운반체 유전자인 sodium iodide symporter(NIS)가 클로닝(cloning)된 후, 이 단백질의 방사성요오드나 Technetium pertechnetate 같은 방사성 동위원소를 흡수하는 특이적인 성질을 이용하여 분자영상학이 가능하리라는 가설이 제기되었다.<sup>6,7)</sup> Sodium iodide symporter(NIS)를 이용한 분자영상법은 복잡한 방사성 동위원소의 표지 없이, 간단한 방사성요오드나 Technetium pertechnetate(Tc-99m)을 투여한 후 감마카메라를 이용하여 *in vivo*로 관찰 할 수 있는 큰 장점이 있다. NIS가 분자 영상에 이용될 수 있다는 가능성이 제기된 이후, 지금까지 NIS를 이용한 여러 분자 영상법들이 시도 되어 왔으며, 전도유망한 결과들이 보고 되고 있다. NIS는 이렇게 외부 유전자의 발현을 나타내주는 영상을 제공해 줄 뿐만 아니라, 실제로 NIS를 발현하는 세포에 I-131 같은 치료용 방사성 동위원소를 줌으로써 암세포를 죽일 수 있는 치료의 근거를 제공해 주므로 분자영상과 유전자 치료를 유도하는 일석이조(一石二鳥)의 효과를 제공하는 유익한 유전자라 할 수 있다. 이 종설에서는 지금까지 진행되어온 NIS를 이용한 분자영상 결과들을 살펴보고, 더 개선해야 할 부분들을 제시하도록 하겠다.

### NIS의 분자생물학적 정체

먼저 우리는 sodium iodide symporter(NIS)에 관해서 살펴보기로 한다. 갑상선은 갑상호르몬인 thyroxin(T4)과 triiodothyronin(T3)을 합성하여 분비하는 독특한 내분비선이다. 이러한 갑상선 호르몬의 합성은 thyroperoxidase(TPO) 효소가 요오드(I)를 thyroglobulin(TG) 분자의 티로신(tyrosine) 잔기에 붙여 줌으로써 시작되어진다. 이렇게 하여 요오드화된 티로신 잔기가 TG분자로부터 잘라져 나와서 갑상호르몬이 혈액으로 분비되게 되는 것이다. 이 과정에서 갑상선 낭포세포의 기층막

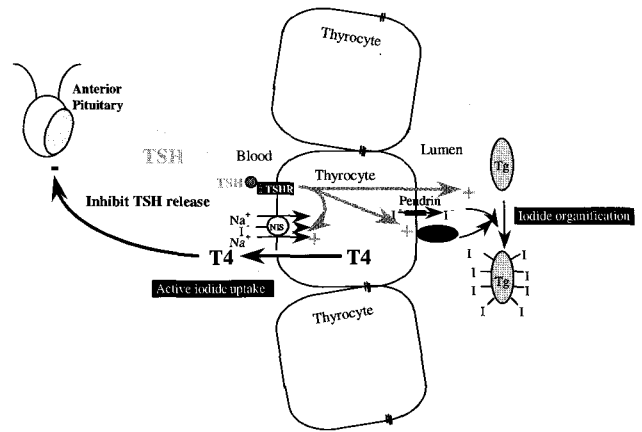


Fig. 1. 갑상선 세포에서 요오드의 흡수와 organification 과정, 그리고 그 조절을 보여주는 모식도. 요오드(I)는 갑상선 상피세포의 기층막에 존재하는 NIS에 의해 2개의 Sodium(2Na<sup>+</sup>)과 함께 흡수된다. 이 과정은 ATP가 요구되는 능동수송 기전이다.

(basolateral membrane)을 가로지르는 요오드의 이동은 가장 초기에 일어나며 이들 세포에서 갑상선 호르몬을 합성 분비함에 있어서 속도를 결정짓는 느린 과정이다(Fig. 1). 이러한 요오드 이동은 농도에 역행하여 일어나며, 따라서 혈액 요오드 농도의 40 배 이상으로 까지 갑상선 세포에 농축시킬 수 있게 된다. 그리고 이 과정은 ATP 에너지를 요구하는 능동수송이라고 알려져 왔었다. 이리하여 이러한 요오드를 흡수하는 운반체가 있으리라고 생각되어져 왔었다. 그러나 그 운반체의 분자생물학적 정체는 밝혀지지 않았었다.

한편 이러한 갑상선에서의 방사성요오드를 농축할 수 있는 능력은 임상적으로도, 침투성, 재발성 그리고 전이성 갑상선암을 가진 환자에서 효과적인 방사성요오드 치료를 위해서 많이 이용되어져 왔었다. 그것은 대부분의 분화성 갑상선암은 어느 정도의 요오드 농축 능력이 있기 때문이다.<sup>8,9)</sup> 이러한 갑상선 세포의 요오드를 농축할 수 있는 독특한 능력 덕분에 갑상선암은 심지어 전이가 진행된 환자에서도 외과적 수술 후에 방사성요오드로 효과적으로 치료할 수 있는 큰 이점이 있다.

그리하여, 갑상선에서 요오드를 흡수하는 운반체의 중요성을 인식하면서, 이 운반체의 분자생물학적 클로닝을 하려는 시도가 있어 왔었다. 그러던 중, Carrasco 실험실에서 1996년 Fischer rat thyroid cell line인 FRTL-5 세포에서 만들어진 cDNA library의 기능적 탐색을 개구리(Xenopus laevis) 알에서 수행하여 처음으로 rat NIS(rNIS) cDNA를 클로닝하게 되었다.<sup>10)</sup> 그 직후 본 저자가 수학하던 Jhiang 실험실에서 human NIS(hNIS) cDNA를 클로닝 하게 되었다.<sup>11)</sup> NIS는 13개의 막을 가로지르는 도메인을 가진 세포막에 침투되어 있는 막 단백질이다. Rat NIS는 618개의 아미노산으로 구성되어 있으며 추측되는 분자량은 약 65.2 kDa

이다.<sup>12)</sup> rNIS의 비당질화된 형태는 SDS-PAGE에서 전기영동 시 약 60 kDa의 분자량을 보인다. 인간 NIS는 1929개의 뉴클레오타이드가 643개의 아미노산을 코딩(coding) 하는 단백질이며, rNIS와는 84%가 동일한 아미노산 서열로 구성되어 있다. 인간 NIS의 코딩부위는 14개의 인트론(intron)으로 분리되며, hNIS는 19p chromosome에 위치하는 것으로 발표되어졌다.<sup>13)</sup> 또한 rNIS 단백질의 FRTL-5 세포에서의 반감기는 약 4일로 보고 되었다.<sup>14)</sup>

NIS 단백질은 세포막에서 크게 당질화(glycosylation)된 형태로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그리하여 당질을 제거한 hNIS는 약 60 kDa의 분자량을 보이지만, 갑상선 세포에서 완전히 당질화된 형태의 hNIS는 약 90 kDa의 분자량을 나타낸다.<sup>15)</sup> 특이한 사실은 이러한 당질화 정도가 조직마다 특이적으로 다르다는 사실이다. 우리는 설치류의 유선(mammary gland)에서는 일반적으로 약하게 당질화된 약 65 kDa와 70 kDa의 두개의 형태가 존재함을 보고하였다.<sup>16)</sup> 또한 우리는 최근에 인간의 정상 침샘에서 hNIS는 더욱 많이 당질화되어 약 110 kDa의 분자량을 보이는 것을 관찰하였다.(Cho 등, 논문 준비중) 한 보고에 의하면 이러한 N-linked 당질화의 부분적 또는 전체적 부재에도 불구하고 NIS의 활성과 안전성은 여전히 보존된다고 한다.<sup>12)</sup> 그렇지만, 이러한 각기 다른 조직에서 왜 다른 당질화 정도가 나타나는지 그리고 그것이 이들 각 조직에서 NIS의 기능과 조절에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 더욱 연구가 진행되어야 하리라고 본다.

NIS에 관한 전기 생리학적 연구에서, NIS는 한 개의  $\Gamma$  이온을 두개의  $\text{Na}^+$  이온과 같이 이동시키는 것으로 밝혔으며, NIS는 또한  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  그리고  $\text{IO}_4^-$  등 다른 다양한 음이온들을 이동시킬 수 있음이 밝혀졌다. 한편 Perchlorate( $\text{ClO}_4^-$ )는 NIS에 결합은 하지만 NIS에 의해 이동되지는 않아서 NIS 억제제로 알려져 있다.<sup>17-18)</sup> 또한 핵의학 물질로는 I-123, I-124, I-125, I-131외에 Pertechnetate( $\text{TcO}_4^-$ -99m), Perrhenates( $\text{ReO}_4^-$ -188와  $\text{ReO}_4^-$ -186),  $\text{Br}^-$ -76, 그리고 Astatine-211( $\text{At}$ -211) 등도 NIS에 의해 이동될 수 있는 음이온들로 알려져 있다.<sup>19-23)</sup>

NIS는 방사성요오드의 흡수를 매개하는 효과적인 운반체 유전자 이므로 NIS를 바이러스나 혹은 비바이러스 벡터를 이용하여 갑상선의 암세포에 발현시켜 줄 수 있다면 이 역시 방사성요오드 투여로 방사성요오드의 세포내 축적을 일으켜 이들 암조직도 진단 및 치료할 수 있을 것이라고 생각되어져 왔다. 이러한 가설을 시험하기 위해 우리와 여러 다른 연구자들은 먼저 이들 NIS 유전자를 여러 다양한 암 세포주에 비바이러스 혹은 바이러스 매개로 발현시키는 실험을 수행하였다.<sup>24-32)</sup>

## NIS를 이용한 분자영상 고찰

유전자 치료법의 개발과 발맞추어서, 살아있는 동물 혹은 인간에서 외부에서 넣어준 유전자들의 발현 위치, 기간 그리고 발현 정도를 분석할 수 있는 비침습적이고 반복적인 영상법의 개발 요구도 함께 크게 증대되고 있다. 이와 같은 비침습적인 방사성 영상법(radionuclide imaging paradigm)을 개발함에 있어서 중요한 고려사항이 있다. 그것은 어떠한 이식유전자(transgene)를 사용하며, 어떠한 방사성약제(radiopharmaceutical)를 사용할 것인가를 선택하는 작업이다. 많은 "reporter gene"을 이용한 실험방법이 제시되었는데, 이들은 주로 환자에서 유전자이식과 유전자 치료 시에 그 효과와 그 안전성을 평가하는 방법들이다.<sup>33)</sup> 지금까지  $\gamma$ -scintigraphy나 single photon emission computed tomography(SPECT), or positron emission tomography(PET)에 의한 핵의학영상법(nuclear imaging)에 이용된 reporter gene으로는 herpes simplex virus-thymidine kinase(Hsv-tk)와 도파민 수용체 유전자가 많이 이용되어 왔었다. Hsv-tk를 표지 유전자로 사용할 때는 표지물질로는 방사성 동위원소를 붙인 FIAU/GCV/PCV가 사용 되어진다.<sup>34)</sup>

NIS도 만약 특정 세포에 강제적으로 발현시켜 준다면 좋은 영상 리포터 유전자가 될 수 있다. 그 뿐 아니라, 크게 아래의 두가지 이유로 인하여 NIS는 비침습적인 분자 영상법의 좋은 리포터 유전자가 될 수 있다. 첫째로, 대부분의 치료용 이식유전자는 적절한 방사능표지 탐식자(radiolabeled probe)를 사용하지 않고는 영상화 될 수 없다. 그렇지만 NIS 유전자는 단지 자유 방사성 요오드만으로도 영상 리포터 유전자로 사용될 수 있다. 이것은 다른 영상 리포터 유전자에 비해 큰 이점이 있다. 왜냐하면 각 치료유전자에 대한 새로운 방사능표지 탐식자를 개발하고 검증하는 것은 때로 매우 시간 소모적이며 비효율적이기 때문이다. 그에 반해 NIS에 의해 매개되는 유전자 이식에서는 자유 I-131 같은 방사성 동위원소 자체가 표지 물질인 동시에 암을 죽이는 인자로 작용하는 것이다. 둘째로, HSV-tk 같은 다른 영상용 또는 치료용 이식 유전자와는 달리, NIS는 인간을 비롯한 포유류에 내재하는 유전자 이므로, 외부에서 발현시킨 NIS 단백질에 대한 면역반응이 없거나 최소한으로 적다는 큰 장점이 있다.

우리 그룹과 다른 연구그룹에서는 NIS 유전자 이식 후 여러 암 모델에서 비침습적인 암 영상을 연구하였다(Table 1). NIS를 넣어준 종양에서 시도한 첫 번 영상 시도는 NIS로 트랜스펙션(transfection)된 NIS 활성이 없는 형질변환된 FRTL-Tc 세포를 가진 쥐에서 자가 방사법(autoradiography)으로 이루어졌다.<sup>24)</sup> 이 실험에서는 I-125를 복강 내에 주사한 후 Tc-NIS 종양에서 방

Table 1. Non-invasive *in Vivo* Tumor Imaging Trials After NIS Gene Delivery

Source <sup>66</sup>	Tumor cells	NIS delivery	Animal model	Radionuclide, dosage	Tumor size	Imaging
(Shimura <i>et al.</i> , 1997)	FRTC-Tc rat thyroid tumor	Plasmid-transfected stable cell line	Rat s. c. implantation	<sup>125</sup> I, 10mCi	10-30mm	Autoradiograph Su
(Mandell <i>et al.</i> , 1999)	A375 human melanoma	Retrovirus-mediated transduction	Nude mice s. c. xenografts	<sup>123</sup> I, 8mCi	~10mm	g-camera
(Cho <i>et al.</i> , 2000)	U1240 human glioma	Adenovirus-mediated intratumoral injection	Nude mice s. c. xenografts	<sup>99m</sup> Tc, 0.3mCi	~10mm	g-camera (*failed)
(Boland <i>et al.</i> , 2000)	SiHa human cervix tumor	Adenovirus-mediated intratumoral injection	Nude mice s. c. xenografts	<sup>123</sup> I, 50mCi	~8 mm	g-camera
(Cho <i>et al.</i> , 2002)	F98 rat glioma	Retrovirus-mediated transduction	Rat intracranial brain tumor	<sup>99m</sup> Tc, 2mCi <sup>123</sup> I, 250mCi	4.5 mm	g-camera
(Spitzweg <i>et al.</i> , 2000)	LNCaP human prostate tumor	Plasmid-transfected stable cell line	Nude mice s. c. xenografts	<sup>123</sup> I, 500mCi	~10mm	g-camera
(Haberkm <i>et al.</i> , 2001)	Rat Morris hepatoma	Retrovirus mediated transduction	Rat s.c. implantation	<sup>131</sup> I, 400mCi	15mm	Scintillation camera
(Nakamoto <i>et al.</i> , 2000)	MCF-7 human breast tumor	Plasmid-transfected stable cell line	Nude mice s. c. xenografts	<sup>131</sup> I, 11.1MBq	?	g-camera
(Marsee <i>et al.</i> , 2004)	Pulmonary tumors of MLL prostate tumor cells	Retrovirus mediated transduction	Rat pulmonary metastatic tumors by tail vein injection of MLL	<sup>99m</sup> Tc, 1mCi <sup>125</sup> I, 1mCi	3mm	SPECT
(Petrich <i>et al.</i> , 2002)	Papillary thyroid carcinoma K1	Plasmid-transfected stable cell line	Nude mice s. c. xenografts	<sup>131</sup> I, 2.0MBq <sup>99m</sup> Tc, 10 MBq <sup>211</sup> At, 0.4 MBq	10-12 mm	g-camera
(Shen <i>et al.</i> , 2004)	RG2 rat glioma	Retrovirus-mediated transduction	Rat intracranial brain tumor	<sup>99m</sup> Tc, 2mCi <sup>188</sup> ReO <sub>4</sub> , 2.5 mCi	3-6mm	g-camera
(Barton <i>et al.</i> , 2003)	C33A human cervical adenocarcinoma	Replication-competent adenovirus	Nude mice s. c. xenografts	<sup>99m</sup> Tc, 150mCi	~500 mm <sup>3</sup>	g-camera
(Groot-Wassink <i>et al.</i> , 2004)	*no tumor, systemic delivery, liver image	Adenovirus-mediated intraveanl injection	C57/B6 mice	<sup>124</sup> I, 1.85 MBq	?	PET
(Shin <i>et al.</i> , 2004)	CT-26 mouse colon carcinoma	Plasmid-transfected stable cell line	Nude mice s. c. xenografts	<sup>124</sup> I, 300 mCi	?	g-camera

\*s. c. 는 피하(subcutaneous)를 의미한다.

사성요오드의 축적이 자가 방사법에 의해 보여 졌다. 이 종양에서는 방사성요오드 투여 1.5 시간 후에 I-125 축적이 최대로 나타났으며, 그 후 급속히 감소하였다. 이 실험에서는 비침습적인 방법이 아닌 동물을 죽인 후 자가 방사법으로 영상을 하였다. 이후 대부분의 방사성요오드를 이용한 NIS 유전자 이식의 영상법은 감마카메라 혹은 SPECT를 이용하였다. NIS를 발현시킨 A375 인간 흑색종을 면역결핍 쥐(nude mice)의 피하에 이식시킨 후, 이 종양이 크기 약 10 mm 일 때, I-123을 복강 내에 주사 후 전신 측면(planar) 영상으로 종양을 검출하는 실험을 하여 성공한 예가 있다.<sup>25)</sup>

우리 그룹에서는 면역결핍 쥐의 피하에 신경교종(glioma) 모델을 만들고, 이 종양에 NIS 유전자를 포함하는 아데노바이러스(rAd-CMV-hNIS)를 주사하여 NIS를 발현 시킨 후, 그 종양이

약 10 mm 되었을 때, Tc-99m 300  $\mu$ Ci를 미정맥에 주사하고 5분 또는 20분 후 감마카메라로 영상을 시도하였으나 영상을 얻는데 실패하였다.<sup>35)</sup> NIS 단백질의 발현과 NIS 활성은 확인되었지만, 아데노바이러스에 의한 직접 종양 내 *in vivo* 유전자 이식 방법으로는, 면역조직학적 염색 결과에서 보여 준대로 한정된 부위에서만 NIS가 발현되어서, 감마카메라로 영상을 획득하기에는 충분하지 않은 것으로 생각되어진다. 이 결과는 보다 감도 높은 SPECT 이나 PET을 이용하고, 보다 높은 rAd-CMV-hNIS 감염이 분자영상을 획득하기 위해서 요구되어 집을 시사하고 있다. 한편 또 다른 연구자들은 NIS를 포함하는 아데노바이러스 직접 주사 후( $2 \times 10^9$  p.f.u.), 50  $\mu$ Ci의 I-123을 복강 내에 주사하고 감마카메라로, 약 8 mm의 SiHa 종양을 *in vivo* 영상화 하는데 성공하였다.<sup>27)</sup> 이 실험에서는 많은 양의 아데노바이러스를 적은 중

양에 주사함으로 보다 높은 감염도(infectivity)와 보다 높은 NIS 발현을 유도할 수 있었기 때문에 이 종양이 감마 영상화 될 수 있었던 것으로 사료된다.

LNCaP 전립선암 세포 주에 NIS가 영구적으로 발현하도록 트랜스펙션 시킨 후, 이 암세포주로 면역결핍 생쥐의 피하에 종양을 만들고, 500  $\mu$ Ci의 I-123을 복강 내로 주사하여 감마카메라로 영상을 얻었으며, 15-20 시간 후, 주사된 방사성요오드의 체내 축적 양 중에서 약 27%가 종양 내에서 검출됨을 확인하였다.<sup>30)</sup> 한편 유방암 세포주인 MCF-7 세포 주에 역시 NIS를 영구 발현 시킨 후, 면역결핍 생쥐에 이종이식을 만든 경우, I-131 투여 2시간 후 깨끗한 감마 영상을 얻은 결과도 보고 되었다.<sup>29)</sup> 또 간암 모델에서도 NIS를 이용한 영상을 수행하여 성공한 예가 보고되어 있다.<sup>31)</sup> 즉, MH3924 rat Morris 간암 세포 주에 레트로바이러스를 이용하여 hNIS로 형질도입 시킨 후에 만든 쥐 피하 종양 모델에서, 15 mm 크기의 종양이 I-131을 이용한 감마영상에서 가시화 되었다. I-131의 축적은 투여 한 시간 후에 최대치를 나타냈으며, 그 후 점차 감소하는 양상을 나타내었다.

한편 우리 그룹에서는, 먼저 hNIS를 레트로바이러스 벡터에 클론한 후에, 이 레트로바이러스를 F-98 rat 신경교종 세포 주에 감염시켜서, NIS를 영구 발현하는 F-98 세포(F-98/hNIS)를 선별하였다. 그 후 이 신경교종 세포를 대뇌에 정위법(stereotaxis)으로 심어서 Tc-99m 과 I-123 방사능동위원소로 영상화하는 실험을 수행하였다.<sup>36)</sup> 이 동물실험에서 우리는, 2 mCi의 Tc-99m을 쥐의 미정맥에 주사하고 20분 후, 두정부에서 감마카메라를 이용하여 두정 혹은 우측 관찰을 하였을 때, F-98 모세포로 발생한 종양에서는 내재성 NIS의 활성을 보이는 조직인 갑상선과 침샘만 영상화 되었다. 그러나 F-98/hNIS 종양에서는 명료한 대뇌 종양의 영상을 획득할 수 있었다(Fig. 2). Tc-99m 감마 영상으로 검출할 수 있는 최소한의 F-98/hNIS 종양 크기를 조사하기 위해서, 이 동물모델에서, 종양 세포를 이식하고 7, 9, 11, 12, 14일 후에 각각 감마카메라로 영상을 시도하였다. 그 결과 11일 후에 처음으로 영상이 획득 되었으며, 이 동물을 희생시킨 후 대뇌에서 종양의 크기를 측정하였더니, 그 크기가 4.5×3.8 mm 이었다. 이 모델에서 감마카메라로 영상화 할 수 있는 범위 내에서, 방사성요오드가 이 뇌종양에 얼마나 오랫동안 잔류하는지 조사하기 위하여 250  $\mu$ Ci의 I-123을 주사하고 5분 후부터 37시간 후 까지 영상을 시도하였다. 그 결과 갑상선에서는 24 시간 후 까지, 방사성요오드의 축적 및 잔류가 증가하고 37시간 후에는 조금 감소하는 양상을 보였지만, F-98/hNIS 뇌종양에서는 방사성요오드 투여 후 4시간 까지 요오드 축적이 증가하여 정점을 이루고, 그 후 24 시간 까지 감소하는 추세를 보였다. 이것은 아마도 갑상선

에서와는 달리 이들 뇌종양에서는 요오드의 organification 이 일어나지 않기 때문인 것으로 사료된다. 한편 시간-활성 곡선에서, 이 F-98/hNIS 뇌종양에서의 I-123의 유효 반감기(effective half-life)는 5.7시간으로 계산되었다. 반면에 갑상선에서는 7.9시간 이상으로 계산 추측되었다. 이 실험에서 우리는 I-123 투여 후 일반적인 감마카메라로 영상을 시도하였다. 만약 I-124를 이용하여, PET나 혹은 최근 개발된 micro-PET을 이용하여 영상을 시도한다면, 감도와 화상도가 높은 영상을 획득할 수 있을 것으로 기대된다.

최근 한 연구에서는, NIS를 발현하는 전립선암 세포(MLL/NIS)를 면역결핍 쥐의 미정맥에 주사하여 이 전립선암이 폐에 전이된 동물모델을 만든 후 Tc-99m SPECT을 이용하여 영상을 얻는 실험을 수행하였다.<sup>37)</sup> 그리하여 폐에 전이되어 나타나는 3 mm 크기의 종양을 SPECT을 이용하여 영상화하는데 성공하였다. 이 실험은 NIS를 발현하는 세포주가 생체 내에서 전이해 가서 어느 조직에 정착했을 때, 핵의학적 방법으로 그 위치를 찾아 낼 수 있다는 가능성을 보여주었다는데 그 의미가 있다. 또 한편 I-123, Tc-99m 그리고 강력한  $\alpha$ -emitter인 Astatine-211 (At-211)을 이용한 감마 영상을 비교한 실험이 이루어졌다.<sup>19)</sup> NIS 활성이 없는 papillary 갑상선암 세포 등에 플라스미드 벡터를 이용하여 NIS를 영구 발현시킨 후 면역결핍 쥐에 피하 종양 모델을 만들었다. 그 후 감마 영상법으로 NIS를 발현시키지 않은 대조군 종양과 비교하여 방사성 동위원소들의 축적을 분자영상

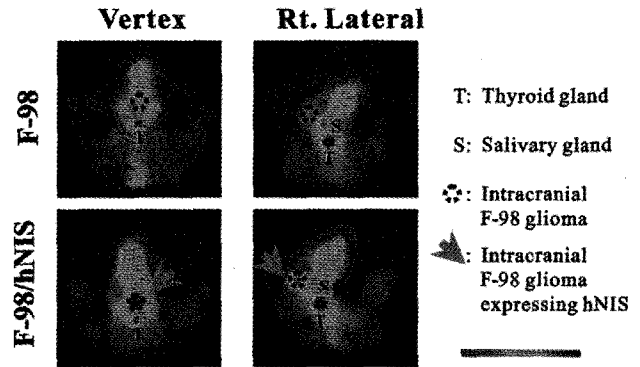


Fig. 2. 쥐에서 만든 대뇌 F-98 신경교종에 시행한 Tc-99m scintigraphy.<sup>36)</sup> F98 신경교종을 일으키도록 만든 쥐를 마취시키고 2 mCi의 Tc-99m을 0.2 ml의 생리식염수에 넣어 미정맥으로 주사하였다. 주사 20분후, 쥐를 pinhole collimator와 low energy ultra high-resolution (LEUHR) parallel hole collimator로 장착된 이중 두(dual head) 감마 카메라로 영상을 획득하였다. 두정(vertex) 과 우측(right lateral) 관찰로 한 영상 당 500K counts를 수집하였다. 영상 획득 시간은 약 2-3분 정도이었다. hNIS를 발현하는 F-98 신경교종(F-98/hNIS)이 내재성 방사성 Tc-99m 흡수를 보이는 갑상선과 침샘에 아울러 영상화되는 것을 보여주고 있다. 색깔 막대는 검은색에서 빨간색으로 갈수록 방사능동위원소의 축적이 많음을 보여준다.

으로 비교해 보았다. 그 결과 I-123은 70배, Tc-99m은 25배 그리고 At-211은 10배 높게 나타났다. 이것은 이들 각기 다른 방사성 동위원소를 이용한 감마 영상시 해상도가 I-123 > Tc-99m > At-211임을 시사한다. 또 최근 Jhiang 박사팀의 연구에서는 강력한  $\beta$ -emitter인  $ReO_4^-$ -188을 이용한 감마 분자영상이 시도되었다.<sup>21)</sup> 이 실험에서는 RG2/hNIS로 유도된 대뇌 신경교종을 나타내는 쥐에서 2.5mCi의  $ReO_4^-$ -188를 투여하고 30분에서 12시간 후 까지 감마카메라로 영상을 획득할 수 있었다.

최근에는 복제능이 있는 바이러스 벡터를 이용한 NIS 이식방법이 시도되었으며 I-124와 PET을 이용한 영상법도 시도되었다. Barton 등은 최근에 지금까지 주로 복제능이 결핍된 아데노바이러스를 사용한 것과는 달리 복제 능을 가진 아데노바이러스 벡터에 NIS를 클로닝 한 후 이 아데노바이러스를 인간의 전립선암인 C33A 종양 이종이식을 가진 면역결핍 쥐의 종양에 직접 투여한 후 Tc-99m으로 감마영상을 시도하여 좋은 결과를 얻었다.<sup>38)</sup> 이들은 또한 이 복제능을 가진(NIS를 발현시키는) 아데노바이러스를 개의 전립선에 직접 투여하여 감염시킨 후, 복제능이 없는(NIS를 발현시키는) 아데노바이러스를 투여한 반대쪽 전립선과 비교하는 실험을 수행하였는데, 그 결과 아데노바이러스 투여 후 1일째는 두 바이러스의 차이가 없었으나, 2일째부터 5일째까지는 복제 능을 가진 아데노바이러스가 더 잘 퍼져나가서, 보다는 Tc-99m 흡수가 감마 영상에서 보였다. Groot-Wassink 등은 NIS를 발현시켜주는 아데노바이러스를 투여한 후 I-124와 PET을 이용한 비침습적 영상을 시도하였다.<sup>39,40)</sup> 이들은 NIS 발현 아데노바이러스를 약  $10^9$  pfu 정도를 미정맥을 통해 생쥐에 전신주사하고 72시간 후 1.85 MBq의 I-124를 역시 미정맥을 통해 주사하였다. 약 1시간 후 까지 소 동물용 PET을 이용하여 영상을 시도한 결과 아데노바이러스가 가장 많이 흡착되어 감염되는 간에서 뚜렷한 영상을 얻을 수 있었다. 이 실험은 NIS 발현 아데노바이러스를 전신주사하고, I-124와 PET을 이용하여 영상을 얻은 첫 시도으로써 의미를 가진다. 한편 생쥐의 대장암 세포 이종이식 종양에 대해 수행한 감마영상 실험에서는, NIS를 이용한 분자 영상을 Hsv-tk를 이용한 분자영상 성상과 비교한 결과 NIS 유전자는 Hsv-tk 유전자와 동일한 정도로 외부 이식유전자의 발현을 나타내 줄 수 있는 것으로 보였다.<sup>41)</sup>

지금까지 NIS를 이용한 감마 영상 시도가, 몇몇 아데노바이러스를 이용한 실험을 제외하고는, 레트로바이러스나 플라스미드를 이용하여 종양세포에 영구적으로 NIS를 발현하도록 하고 그 세포주를 선택한 후 동물에 종양을 야기 시키고, 그 후 이들 종양을 영상화 하는 개념 증명(proof of concept) 형태의 실험이 많이 진행되어 왔다. 그러나 이러한 방법들은 실제로 임상에서 종양의 분

자영상에는 사용하기 힘든 방법이다. 다만 이러한 NIS의 *ex vivo* 형질도입 시도는, 혈액 암이나 대사성 질병에서, 세포를 추출한 후 레트로바이러스 등을 이용하여 *ex vivo*에서 형질도입 시키고 이들 세포를 다시 체내에 주입해주는 유전자 치료법에서, 이 NIS 나 혹은 NIS를 이용하여 간접적으로 다른 치료유전자의 발현을 영상화 하는 경우에는 유리한 방법이라 할 수 있다.

여러 연구자들은 이렇게 NIS를 종양에 여러 벡터를 이용하여 이식한 후, 살아있는 동물의 이종이식모델에서, 주로 I-131 또한 최근에는  $ReO_4^-$ -188 등을 이용하여 종양을 죽이거나 종양 크기를 감소시키는 치료적 연구들을 진행 시켜서 상당한 효과들이 있는 것으로 보고하고 있다. 그 구체적인 연구방법론은 이 종설의 범위를 초과하므로 다른 논문들을 참고하기 바란다.<sup>6,21,30,36,42,43)</sup>

## 갑상선의 조직에서의 NIS

NIS는 주로 갑상선 조직에서 발현된다. 그렇지만 위, 침샘(salivary gland)의 관세포, 유선, 뇌의 choroid plexus 같은 다양한 다른 조직들은 각기 다른 정도의 NIS를 발현하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 유조직(breast)에서 NIS의 발현과 기능이 수유 관련 호르몬, 예를 들면 oxytocin<sup>6,44)</sup>과 prolactin<sup>6)</sup>에 의해 조절된다는 사실이 밝혀졌다. 최근에는 유방암 환자에서 암조직이 NIS를 발현하며, 이들 유방암이 10 mCi의 Tc-99m을 정맥 투여한 10 분후 감마카메라로 영상화됨을 보여주었다.<sup>45)</sup> 특이하게도 이들 유방암조직의 NIS 활성도는 갑상선에서와는 달리 Perchlorate에 의해 억제 되지 않았다. 하지만 과산화효소 억제제인 propylthiouracil (PTU)에 의해서 organified된 방사성요오드가 감소함을 보아서 유방암 조직에서도 요오드가 과산화효소에 의해 organification 됨을 보여주었다. 실제로 오래전, 수유중인 유선에서 요오드가 alveolar 세포에 발현되는 lactoperoxidase에 의해 카세인과 우유단백질에 organification 된다는 사실이 보고 되었었다.<sup>46,47)</sup> 이것은 갓 태어난 새끼에게 요오드를 제공하는 한 방법인 것이다. 한편 우리는 정상 침샘(salivary gland)에서 NIS 단백질의 발현이 정상 갑상선 세포보다 높게 나타나는 경우를 Western blot으로 확인한 바 있다(Cho 등, 논문 준비 중). 따라서 이들 침샘이나 유방조직에서 NIS의 발현을 조절하는 기전을 밝혀냄으로써 이들 선(gland) 유래의 암 조직에서 NIS의 발현을 극대화 시켜서 NIS의 분자영상을 가능케 하고, 아울러 치료의 효과도 이를 수 있다면 이들 종양 환자의 진단과 치료에 크게 도움이 되리라 예상된다.

## NIS를 이용한 분자영상의 개선점과 전망

이상에서 우리는 NIS를 이용한 여러 분자영상 시도들에 대해서 각각의 특성을 살펴보았다. 이제 이러한 NIS 분자영상 시도의 개선점과 전망에 관해 살펴보고자 한다. 첫째, NIS를 외부 이식 유전자의 발현을 관찰하는 분자영상 리포터 유전자로 사용함에 있어서 단점 중의 하나는 갑상선, 위, 침샘 등 정상적으로 NIS 활성을 보이는 내재성 NIS 발현 조직이 방사성요오드 영상에서 높은 신호를 나타낸다는 것이다. 특히 높은 정도의 잔류(retention)를 보이는 갑상선은, NIS와 I-131을 이용한 암 치료시에, 크게 영향을 받아 손상을 입게 되는 문제점도 있다. 우리는 이 문제를 극복하는 한 방법으로 갑상선 호르몬을 사료에 첨가하여, 뇌하수체에서 TSH 분비를 감소시켜 갑상선에서 NIS의 활성을 낮추는 시도를 하였는데, 그 결과 Tc-99m 감마 영상에서 갑상선이 보이지 않았으며, 이 갑상선 조직에 대한 Western blot 단백질 분석에서 NIS 단백질 발현이 검출 되지 않았다.<sup>36)</sup> 그러나 한편 분자영상 시도에서 이러한 갑상선 같은 내재성 NIS 발현 조직이 영상화 되는 것은 한편 장점이 될 수도 있다. 즉 이들 내재성 NIS 활성 영상은 외재성 NIS 발현의 정도를 가늠할 때 하나의 내부 대조군의 역할을 제공해 주기 때문이다.

둘째, NIS를 이용한 분자영상 특히 유전자 치료를 적용할 때, 감도와 해상도 높은 영상 그리고 효과적인 치료를 달성하기 위해서는, 높은 수준의 효과적인 NIS 유전자 이식이 요구되어진다. 생물학적 조직에서 I-131은  $\beta$ -emission의 경우 평균 약 0.8 mm의 짧은 거리를 조사한다. 그리고 그 방사성 조사량은 거리가 증가함에 따라 급속히 감소한다.<sup>48)</sup> 따라서 높은 NIS 유전자 이식이 필요하고 또 많은 양의 방사성 동위원소가 좋은 영상과 효과적인 치료를 위해 요구되는 것이다.

셋째, 좋은 분자영상과 효과적인 유전자 치료를 달성하기 위해서는 NIS에 의해 흡수된 방사성 동위원소가 세포내에 상당기간 동안 머무를 필요가 있게 된다. 정상 갑상선에서는 흡수된 자유 요오드가 TPO 효소에 의해 TG에 organification 되므로, 갑상선 내에 요오드의 잔류가 있게 된다. 그러나 신경교종 같은 암세포에서는 NIS를 외부에서 유전자 이식에 의해 발현시켜 주어도 TPO나 TG가 없기 때문에 방사성요오드의 세포내 잔류가 매우 제한적이고 Pendrin이라는 운반체에 의해 쉽게 세포 밖으로 흘러 나가게 된다.<sup>49-53)</sup> 따라서, NIS 유전자 이식에 의한 분자영상을 달성할 때, TPO와 TG 유전자들을 같은 벡터 안에서 IRES등을 이용해서 혹은 각각 다른 벡터를 이용해서 같이 이식해 주어야 한다.<sup>52)</sup> 실제로 이 가설은 *in vitro*에서 NIS와 TPO를 같이 발현시켜 주어서 요오드의 잔류가 증가함을 보여주었다.<sup>32)</sup> 이 가설은

바이러스 벡터를 이용한 *in vivo* 실험에서도 증명될 필요성이 있다. 또한 보다 높은 잔류효과를 내기 위해서는 TPO의 기질인 TG를 같이 발현시켜주는 것이 더 큰 기대를 내리라 본다. 그러나 TG는 약 8500 염기쌍의 DNA와 660 kDa의 단백질로 코딩되는 큰 분자이므로 이것을 바이러스 벡터에 클로닝 하는 것은 기술적으로 어려움이 따른다. 그래서 우리는 현재, 이 TG중 TPO에 의해 주로 요오드화 되는 티로신이 많이 존재하는 부위를 부분적으로 아데노바이러스에 클로닝 하는 작업을 진행 중에 있다. 그러나 한편, 암의 종류에 따라서는 어느 정도 요오드의 organification이 일어나는지 알기 힘들지만, 적어도 이러한 TPO와 TG의 외부적 발현 없이 NIS의 외부적 발현과 I-131의 투여만으로도 암 조직이 거의 사라지는 효과가 보고 된 사실<sup>30)</sup>에 우리는 주목할 가치가 있다.

넷째, 여러 다른 유전자 이식과 유전자 치료에서와 마찬가지로 정확한 NIS의 표적화(targeting)가 특정 표적 장기의 영상화와 치료를 위해 요구된다. 이를 위해서는 어떤 조직 특이성 유전자의 프로모터 인자(promoter)를 이용하여 바이러스가 가지는 유전자를 원하는 특정 조직에만 발현시키도록 바이러스 벡터를 만드는 것이 하나의 방법이다. 또 한편으로는 특정조직이나 종양에서만 나타나는 세포막 표지인자를 발견한다면 그것을 표적하도록 아데노바이러스의 파이버(fiber)의 트로피즘(tropism)을 변형시키는 것이 다른 한 방법이다. 후자는 아데노바이러스가 세포에 감염되는 시점부터, 원래 아데노바이러스가 결합하는 CAR 수용체에 결합하지 않고, 세포막에 특이한 수용체에 표적화 하도록 하므로 종양이나 질병조직으로의 표적화가 더 효율적이라 할 수 있다. 또 이 두 가지 표적화를 결합하므로 보다 정밀한 표적화를 달성 할 수 있으리라 기대된다.

## 결 론

NIS 유전자의 클로닝은 갑상선 세포에서 요오드 운반의 기전을 이해하는데 중요할 뿐만 아니라 *in vivo* 영상법 개발과 또한 유전자 치료도 가능케 하였다. 이상에서 살펴본 유망한 결과들을 보건데, NIS 유전자 이식과 연이은 방사성요오드의 투여는 이식 유전자의 *in vivo* 비침습 영상을 달성하는 좋은 전략이 될 수 있다. 또한 여러 근원의 다양한 암조직을 치료하는데도 이용될 수 있다. 자유 방사성요오드가 NIS 이식 후 영상 표식자로 직접 이용될 수 있으므로 정량적인 영상으로 측정된 NIS 활성도는 곧바로 살아있는 생체에서 이식유전자의 위치, 발현시작, 발현기간, 그리고 발현정도를 결정하는 비침습적 영상법이 될 수 있는 것이다. 임상적 사용에 있어서는 NIS 유전자의 조직 특이적인 이식이

국소적 잔류 암을 영상화 한다든지 치료바리를 가능케 할 것이다. 치료목적에서는 방사성요오드를 매개로하는 NIS와 다른 약제를 매개로 하는 암사멸 유전자를 함께 발현시키므로 방사능과 약제에 의한 이중 사멸 효과도 올릴 수 있을 것으로 기대된다. 한편 유선 조직, 위, 그리고 침샘 같이 내재성 NIS의 발현과 활성이 있는 조직에서 유래하는 종양은 이들 조직에서 NIS의 발현과 활성을 조절하는 인자들을 찾아낸다면, 복잡한 외부적 NIS 유전자 이식 없이, 방사성 요오드를 이용하여 바로 이들 조직의 분자영상과 치료가 가능하다는 커다란 이점이 있다. 하지만 그 외 암조직의 미세 전이나 재발성 그리고 원근 전이성 암을 영상화 하고 치료하기 위해서는 NIS 유전자를 전신에, 조직 특이적으로 그리고 효과적으로 이식시키는 기술이 개발 되어야 가능하리라 본다.

## References

1. Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, Yoyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M. Quantitation of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. *Nat Med* 2000;6:933-37.
2. Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, et al. Imaging the expression of transfected genes *in vivo*. *Cancer Res* 1995;55:6126-32.
3. Gambhir SS, Herschman HR, Cherry SR, Barrio JR, Satyamurthy N, Toyokuni T, et al. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia* 2000;2:118-38
4. Bell JD, Taylor-Robinson SD. Assessing gene expression *in vivo*: magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Gene Ther* 2000; 7:1259-64.
5. Tjuvajev JG, Joshi A, Callegari J, Lindsley L, Joshi R, Balatoni J, et al. A general approach to the non-invasive imaging of transgenes using cis-linked herpes simplex virus thymidine kinase. *Neoplasia* 1999;1:315-20.
6. Cho JY. A transporter gene (sodium iodide symporter) for dual purposes in gene therapy: imaging and therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:393-402.
7. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-20.
8. Schlumberger M, Tubiana M, De Vathaire F, Hill C, Gardet P, Travagli JP, et al. Long-term results of treatment of 283 patients with lung and bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:960-67.
9. Mazzaferri EL. Radioiodine and other treatments and outcomes. Werner and Ingbar's The thyroid: A fundamental and clinical text. Braverman LE, Utiger RD, Philadelphia JB.: Lippincott Co;1996. p.922-45.
10. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
11. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:339-45.
12. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, et al. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 5568-73.
13. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997;138:3555-8.
14. Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity. *J Biol Chem* 1997;272:18245-9.
15. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, et al. An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* 1998;139:4416-9.
16. Cho JY, Leveille R, Kao R, Rousset B, Parlow AF, Burak WE Jr, et al. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression in mammary glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2936-43.
17. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 1997;272:27230-8.
18. Yoshida A, Sasaki N, Mori A, Taniguchi S, Mitani Y, Ueta Y, et al. Different electrophysiological character of I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, and SCN<sup>-</sup> in the transport by Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:731-4.
19. Petrich T, Helmeke HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Pötter E. Establishment of radioactive and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodine symporter. *Eur J Nucl Med* 2002;29:842-54.
20. Zuckier LS, Dohan O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E. Kinetics of perchlorate uptake and comparative biodistribution of perchlorate, pertechnetate, and iodide by NaI symporter-expressing tissues *in vivo*. *J Nucl Med* 2004;45:500-7.
21. Shen DHY, Marsee DK, Schaap J, Yang W, Cho JY, Hinkle G, et al. Effects of dose, intervention time, and radionuclide on sodium iodide symporter(NIS)-targeted radionuclide therapy. *Gene Ther* 2004;11:161-9.
22. Niu G, Gaut AW, Ponto LL, Hichwa RD, Madsen MT, Graham MM, Domann FE. Multimodality noninvasive imaging of gene transfer using the human sodium iodide symporter. *J Nucl Med* 2004;45:445-9.
23. Dadachova E, Bouzazah B, Zuckier LS, Pestell RG. Rhenium-188 as an alternative to Iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter(NIS). *Nucl Med Biol* 2002;29:13-8.
24. Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. Iodide uptake and experimental 131I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Endocrinology* 1997;138:4493-6.
25. Mandell RB, Mandell LZ, Link CJ Jr. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* 1999;59:661-8.
26. Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER, Castro MR, McIver B, Heufelder AE, et al. Prostate-specific antigen(PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 1999;59:2136-41.
27. Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart JM, Yeh P, Filetti S, et al. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res* 2000;60: 3484-92.
28. Carlin S, Cunningham SH, Boyd M, McCluskey AG, Mairs RJ. Experimental targeted radioiodide therapy following transfection of the sodium iodide symporter gene: effect on clonogenicity in both two- and three-dimensional models. *Cancer Gene Ther* 2000;7: 1529-36.
29. Nakamoto Y, Saga T, Misaki T, Kobayashi H, Sato N, Ishimori T, et al. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med* 2000;41:1898-904.
30. Spitzweg C, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY,



- Morris JC. Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res* 2000;60:6526-30.
31. Haberkorn U, Henze M, Altmann A, Jiang S, Morr I, Mahmut M, et al. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. *J Nucl Med* 2001;42:317-25.
  32. Huang M, Batra RK, Kogai T, Lin YQ, Hershman JM, Lichtenstein A, et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2001;8:612-8.
  33. Blasberg RG, Tjuvajev JG. Herpes simplex virus thymidine kinase as a marker/reporter gene for PET imaging of gene therapy. *Q J Nucl Med* 1999;43:163-69.
  34. MacLaren DC, Toyokuni T, Cherry SR, Barrio JR, Phelps ME, Hershman JM, et al. PET imaging of transgene expression. *Biol Psychiatry* 2000;48:337-48.
  35. Cho JY, Xing S, Liu X, Buckwalter TL, Hwa L, Sferra T, et al. Expression and activity of human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:740-9.
  36. Cho JY, Shen DHY, Yang W, Williams B, Buckwalter TLF, La Perle KMD, et al. Non-invasive imaging and radioiodine therapy of sodium iodide symporter gene transfer in intracerebral animal model of gliomas. *Gene Ther* 2002;9:1139-45.
  37. Marsee DK, Shen DHY, MacDonald LR, Vadysirisack DD, Lin X, Hinkle G, et al. Imaging of metastatic pulmonary tumors following NIS gene transfer using single photon emission computed tomography. *Cancer Gene Ther* 2004;11:121-7.
  38. Barton KN, Tyson D, Stricker H, Lew YS, Heisey G, Koul S, et al. GENIS: gene expression of sodium iodide symporter for noninvasive imaging of gene therapy vectors and quantification of gene expression *in vivo*. *Mol Ther* 2003;8:508-18.
  39. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Glaser M, Lemoine NR, Vassaux G. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression *in vivo* by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. *Hum Gene Ther* 2002;13:1723-35.
  40. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Wang Y, Lemoine NR, Reader AJ, Vassaux G. Quantitative imaging of Na/I symporter transgene expression using positron emission tomography in the living animal. *Mol Ther* 2004;9:436-42.
  41. Shin JH, Chung JK, Kang JH, Lee YJ, Kwang IK, Kim CW, et al. Feasibility of sodium/iodide symporter gene as a new imaging reporter gene: comparison with *HSV1-tk*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:425-32.
  42. Dingli D, Peng KW, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, et al. Image-guided radiotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood* 2004;103:1641-6.
  43. Gaut AW, Niu G, Krager KJ, Graham MM, Trask DK, Domann FE. Genetically targeted radiotherapy of head and neck squamous cell carcinoma using the sodium-iodide symporter(NIS). *Head Neck*. 2004;26:265-71.
  44. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao Q H, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 2000;6:871-8.
  45. Upadhyay G, Singh R, Agarwal G, Mishra SK, Pal L, Pradhan PK, et al. Functional expression of sodium iodide symporter(NIS) in human breast cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:157-65.
  46. Strum JM. Site of iodination in rat mammary gland. *Anat Ec* 1978;192:235-44.
  47. Shah NM, Eskin BA, Krouse TB, Sparks CE. Iodoprotein formation by rat mammary glands during pregnancy and early postpartum period. *P Soc Exp Biol Med* 1986;181:443-9.
  48. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999;141:443-57.
  49. Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, et al. Expression of pendrin and the Pendred syndrome(PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2028-33.
  50. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Beck-Peccoz P. The role of pendrin in iodide regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:18-22.
  51. Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, et al. Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol* 2001;144:297-302.
  52. Levenson VV, Transue ED, Roninson IB. Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers. *Hum Gene Ther* 1998;9:1233-36.
  53. Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, et al. Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3356-61.