

## 구강암 유전자 치료를 위한 재조합 HSCC-1 아데노바이러스의 개발

김창현 · 김진우\* · 김명진\*\* · 표성운

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, 가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실\*

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실\*\*

### Abstract

#### CONSTRUCTION OF RECOMBINANT HSCC-1 ADENOVIRUS VECTOR FOR ORAL CANCER GENE THERAPY

Chang-Hyen Kim, Jin-Woo Kim\*, Myung-Jin Kim\*\*, Sung-Woon Pyo

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

*\*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University*

In spite of the ongoing advances, standard therapies for oral cancer still has some limitations in efficacy and in ability to prolong survival rate of advanced disease and result in significant functional defect and severe cosmetic deformity. Currently gene therapy using tumor suppressor gene is considered as a potent candidate for new therapeutic approaches that can improve efficacy and reduce complications. The purpose of this research is to identify the role of adenoviral vector to transfer HSCC-1 tumor suppressor gene in oral cancer cells and to find out whether there is a possibility for it to serve in the field of gene therapy.

The human SCC-25 cell line was used for transfection. To determine the efficiency of the adenovirus as a gene delivery vector cell line was transduced with LacZ gene and analysed with X-gal staining. Northern blot was performed to confirm the transfection with HSCC-1 gene and cell viability was assessed by cell cytotoxicity assay.

We had successfully construct the recombinant HSCC-1 adenovirus(Ad5CMV-HSCC-1). DNA extracted from Ad5CMV-HSCC-1 revealed HSCC-1 gene is incorporated. The transduction efficiencies were over than 50% of SCC-25 cells with a MOI of 2 and over 95% with a MOI of 50. Northern blot analysis showed that a single 0.6kb mRNA transcript was expressed in Ad5CMV-HSCC-1 transduced SCC-25 cells. There was no or very low transcription HSCC-1 mRNA in wild and Ad5CMV-LacZ transduced SCC-25 cells. Cells transduced with Ad5CMV-HSCC-1 showed significant growth inhibition. By day 6, Ad5CMV-HSCC-1 treated cell count was decreased to 30% of mock-infected cells, while that of Ad5CMV-LacZ treated cells was 90% of mock-infected cells ( $p < 0.05$ ).

Finally, these result suggest that the Ad5CMV-HSCC-1 has potential as a gene therapy tool for oral cancer.

**Key words** : Oral cancer, Gene therapy, Recombinant adenovirus vector, HSCC-1 tumor suppressor gene

## I. 서 론

수술, 방사선 치료와 항암 화학요법 등 기본적인 치료 방법의 적용과 이의 변형에도 구강편평 세포암의 생존율은 증진되지 않고 있으며 발음과 저작 기능의 상실과 삶의 질에 영향을 끼치는 반응을 남긴다. 총체적인 치료 후에도 약 1/3의 환자에게서 국지적 재발이 발생한다<sup>1)</sup>. 재발되거나 전이된 환자들은 치료 불가능으로 판정되어 증상의 완화를 위한 화학요법치료를 받게 되나 치료 효과는 미미하다<sup>2)</sup>. 이들 중 약 2/3는 원격 전이의 증상 없이 사망하므로 국지적 치료와 처치가 매우 중요하다.

유전자 치료는 DNA 재조합 방법을 이용하여 새로운 유전자를 환자의 세포에 도입시켜 유전자 결함을 교정하거나 세포에 새로운 기능을 추가하여 인체 세포의 유전적 변형을 유도함으로써 암, 감염성 질병, 그리고 자가면역질환 등과 같은 유전자 이상에 의한 질병을 치료하거나 예방하는 방법으로 정의할 수 있다<sup>3)</sup>. 유전자 치료는 정상 조직을 보호하는 한편 암세포를 목표로 하므로, 이런 면에서 매우 효율적인 구강암의 국지적 치료가 될 수 있다. 구강암의 치료에 유전자 치료가 가능한 범위는 재발성 종양, 수술후 절제변연의 부가적 치료와 국한적인 원격전이부위가 될 수 있다<sup>4)</sup>.

세포사멸을 활성화하여 종양의 성장을 억제하는 유전자의 발견은 더 효율적인 치료방법을 개발하고자 하는 암연구의 새로운 방향을 제시하였다. 종양은 각기 다른 염색체에 위치한 여러 유전자의 다단계의 변화에 의해 발생하지만 하나의 정상적인 유전자에 의해 바뀔 수 있다는 것이며, 이는 하나의 종양 억제 유전자가 여러 개의 종양의 진행과 관련된 변화의 효과를 뒤엎을 수 있다는 것을 뜻한다<sup>5)</sup>. 종양 억제 유전자로 알려진 p53을 레트로바이러스 벡터를 이용하여 종양 세포에 감염시킨 결과 종양 세포의 성장이 억제된다는 결과가 보고된 이후<sup>6)</sup>, 보다 높은 효율의 유전자 전달과 치료 유전자를 많이 발현시킬수 있는 아데노바이러스를 유전자 전달체로 사용한 임상실험이 두경부암, 간암, 폐암에서 상당히 긍정적 결과들이 보고되고 있다<sup>7-9)</sup>.

인간 자궁경부암 억제 유전자-1(Human Cervical Cancer Suppressor-1, HCCS-1) 유전자는 김진우 등에 의하여 발견된 유전자로 79개의 아미노산을 인코딩하며 9kD 크기의 단백질을 생산한다. 주로 백혈구, 폐, 비장, 간, 심장과 자궁경부에서 발현되나, 자궁경부암 조직과 여러 암세포주에서 발현량이 매우 적거나 발현되지 않으며, HeLa 세포주에 도입되었을 때 세포 사멸과정을 통해 약 50%의 성장 억제 효과를 보인다고 보고되었다<sup>10)</sup>.

이번 연구에서는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 인체 구강암 세포주를 대상으로 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려진 HSCC-1 유전자를 주입하고 유전자 전달율과 세포 성장에 대한 영향등을 평가하고자 시행하였으며, 이러한 연구

를 통하여 구강암에 대한 재조합 HSCC-1 아데노바이러스(Ad5CMV-HSCC-1)를 이용한 유전자 치료의 가능성을 살펴보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### Cell line

본 실험에서는 70세 남자의 설 편평세포암에서 비롯된 인간 구강 편평세포암주-25(SCC-25)<sup>11)</sup>를 대상으로 하였으며, American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine과 1% penicillin/streptomycin (Gibco Co, Rockville, MD, USA)가 첨가된 RPMI 1640 배양액에서 시행하였다. 이 세포주는 37°C, CO<sub>2</sub> 항온조에서 배양하였다.

### HCCS-1 cDNA

HSCC-1 cDNA는 가톨릭대학교 의료원의 김진우 교수로부터 제공받았다. 먼저 full length의 HSCC-1를 GST 유전자 융합 벡터인 pGEX4T-3 (Amersham, Buckinghamshire, UK)에 클로닝하였다. HCCS-1가 full length로 클로닝됨을 확인하기 위하여 prokaryotic expression system을 이용하여 단백 표현 연구를 실시하였다. *E. coli* strain BL 21으로부터 pGEX4T-3와 HCCS-1가 융합된 형태의 펩타이드를 표현하는 약 35kD크기의 펩타이드를 분리하였다. pGEX4T-3 GST의 크기가 26kD으로 알려져 있으므로 HCCS-1 유전자의 단백질의 크기는 약 9kD임이 예상되었다. HCCS-1 핵산의 염기서열과 표현하는 단백질은 Table 1과 같다.

### Construction of recombinant adenoviral vector

재조합 아데노바이러스의 제조와 분리는 통법에 따라 시행되었다<sup>9,12)</sup>. 약술하면, Transpose-Ad<sup>TM</sup> system (QBiogene, USA)와 primer을 이용하여 CMV promoter를 갖고 있는 Adenovirus transfer vector인 pCR259 plasmid에 클로닝하였다. 클로닝을 위해 사용한 primer의 서열은 각기 Sense(E) 5'-nnn gaa ttc acc atg gcg cga tct cgg ct -3' 와 Antisense(N) 5'-nn ngc ggc cgc tta aaa gta gaa gta tgt -3' 이고, 각각에 EcoRI과 NotI 제한 효소절단 부위를 삽입하였다. HSCC-1 유전자의 발현을 높이기 위해 acc sequence(Kozac sequency)를 사용하였고, 말단의 태그는 유전자의 크기가 555bp로 작아서 태그할 경우 유전자의 기능에 영향을 미칠 우려가 있어 시행하지는 않았다.

**Table 1.** Full Sequence of HCCS-1 Nucleotide and Encoding Protein.

1	ggccattacc	aatcgcaaaa	cccgaatccc	tgaggaggcg	gttcatctgt	gttcatctgt
61	ggccagcggt	gcttcgggac	ccgcgctggg	cgacggggcc	tgccctgct	tggccctgct
121	atatcggggg	gcctcggtg	gagtgagcgg	tcttctctcc	ggctcttccc	ggctcttccc
181	ttgttgctgc	gagagcgaga	gggcccgg	agcggggcgg	ggatggagga	ggatggagga
241	cgtaactct	aactggaacg	cggaccagga	caatggcgcg	atctcggctc	atctcggctc
301	actgcaacct	ctgtctccca	ggttcaggaa	taaagaagct	tgagcctaaa	tgagcctaaa
361	tctggctgga	tgacttttct	agaagttaca	gtgaaatgct	cttctgtct	cttctgtct
421	gaagcaatac	tggtgaccag	aaaggacact	aaaccggcct	aatttttctg	aatttttctg
481	actcttacga	aaacgattgc	caacacatac	aaataaacia	ctttgatgat	ctttgatgat
541	gtaacttgaa	aaaaa				

Translation = "MARSRLTATSVSQVQENGFVKKLEPKSGWMTFLEVTGKICEMLF CPEAILLTRKDTLYCET GLIFLTLTKTIANITYFYF"

pCR259에 클론된 HCCS-1 유전자는 294 competent cells (QBiogene, CA, USA)에 transformation 하고 백색 colony를 골라서 miniprep을 시행하여 positive clone을 다시 분리하고 chemically competent cell에 transformation 하고 12개의 백색 colony를 선별하여 분리된 배양접시에 replication 한 후 100% 백색 colonies만 선별하였다. 다시 minipreps후에 PCR로 확인한 후 maxiprep과 PacI 제한 효소로 절단하고 linear naked DNA를 293 세포주에 transfection시켰다. Viral plaque는 14일간 증식시키고 cesium chloride gradient(CsCl<sub>2</sub>)로 순수 분리하고 2×10<sup>9</sup>/ml의 농도로 정량하고 virus stock을 -80℃에서 사용할 때까지 보관하였다. 재조합 HSCC-1 아데노바이러스(Ad5CMV-HCCS-1)의 구조는 E1 region이 대치된 변형된 아데노바이러스안에 Cytomegalovirus (CMV) promoter, HCCS-1 유전자와 SV40 polyadenylation signal을 삽입한 것이다. 표지유전자로 사용할 LacZ 유전자는 3.2kb로 CMV promoter와 BGH(bovine growth hormone) poly-A signal이 삽입된 플라스미드(Ad5CMV-LacZ)이다. SCC-25 구강암 세포주로의 감염은 viral stock을 FBS가 없는 PPMI 1640으로 희석하여 정해진 MOI(multiplicity of infection)로 배양액내의 세포 단일층에 부어 37℃에 15분간격으로 흔들어가며 60분간 배양시켰다. 그 후 감염된 세포는 기존의 PPMI 1640으로 배양하였다.

#### Ad5CMV-LacZ transduction and X-gal staining

이입된 LacZ 유전자의 SCC-25 세포주에서 발현 확인을 위해서 먼저 35mm<sup>2</sup>의 배양접시에 2×10<sup>5</sup> SCC-25 세포를 접종하고 각각 0, 1, 2, 10, 50과 200의 MOI로 Ad5-CMV-LacZ를 감염시키고 24시간 배양시켰다. 그 후 세포주가 있는 well을 0.5% glutaraldehyde용액으로 실온에서 5분간 고정하고 PBS(phosphate-buffered saline)으로 2

차례 세정하고 β-galactosidase activity를 측정하기 위해 X-gal용액(1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM NaCl, 44 mM Tri, pH 7.4, 3mM potassium ferricyanide, 3mM potassium ferrocyanide, 2% X-gal in n,n'-dimethylformamide)으로 밤새 부란하였다. 각 배양접시에서 500개의 세포를 3회 계산하여 양성으로 염색된 세포의 백분율을 판단하였다.

#### Northern blot analysis of the HCCS-1 gene

이입된 HSCC-1 유전자의 발현유무를 확인하기 위하여 Northern blotting을 시행하였다. 20μg의 총 denatured RNA를 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동하였고 이를 nylon membranes(Boehringer-Mannheim, Germany)에 transfer하였다. Blot은 <sup>32</sup>P-labeled random-primed CG373 partial cDNA probe로 42℃에서 밤새 hybridize시켰다. Northern blot은 일관성있게 2차례 시행하였으며 결과는 일치하였다.

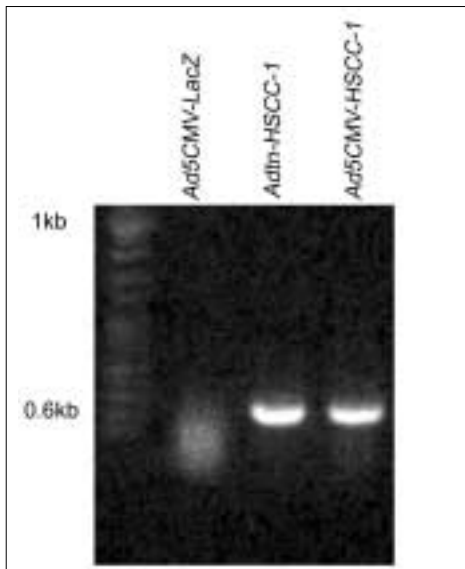
#### Cytotoxicity of Ad5CMV-HCCS-1

구강암 세포주를 96-well flat-bottomed plate에 1×10<sup>4</sup>의 농도로 접종한 후에 바닥에 부착되도록 밤새 배양하였다. 이후 Ad5CMV-HCCS-1를 50 MOI 로 transduction 하였다. 2일, 4일, 6일째에 cell counting kit-8(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 생존하는 세포의 백분율을 구하였다. Cytotoxicity assay는 기존에 기술된 것과 같이<sup>13)</sup> 생존한 세포의 dehydrogenase activity를 측정하는 것으로, 10 μl CCK-8 용액을 각각의 well에 첨가하고 2시간 배양후 450nm에서 microplate reader(Bio-rad Laboratories, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### III. 결 과

#### Construction of recombinant adenovirus

Hirt DNA 추출법에 의한 Ad5CMV-HCCS-1 vector로부터 추출된 DNA에 0.6kb크기의 HCCS-1 유전자가 관찰되었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Recombinant HCCS-1 adenovirus preparation and confirmation by PCR. DNA was extracted from Ad5CMV-HCCS-1 by Hirt DNA extraction method and compared with plasmid Adtn-HCCS-1, revealed 0.6kb HCCS-1 gene by PCR.

#### Ad5CMV-LacZ transduction and X-gal staining

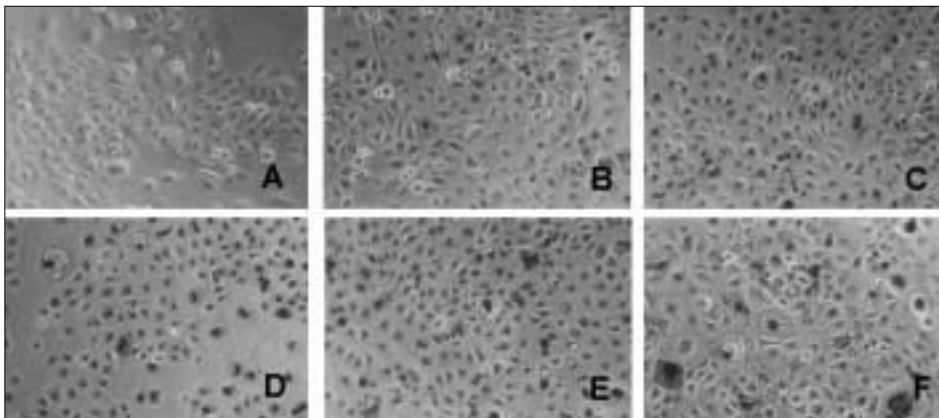
SCC-25세포주에 대한 Ad5CMV-LacZ의 이입효율은 MOI가 2일 때 50%이었고, MOI가 50일 때 95% 이었다 (Fig. 2). 바이러스와 연관된 세포 독성은 MOI가 200일 때 관찰되었다. 이 결과로 Ad5CMV에 의한 유전자 이입효율이 높음을 알 수 있다.

#### Northern blot analysis of the HCCS-1 gene

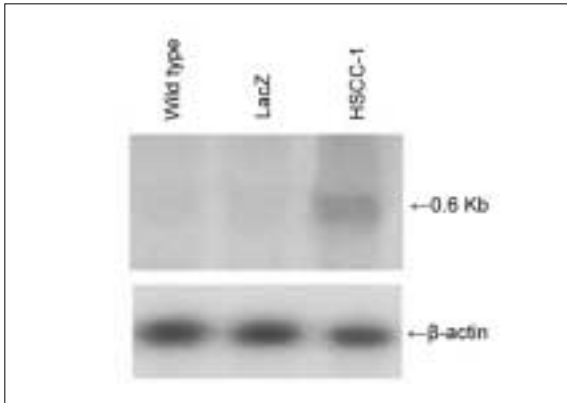
HSCC-1 유전자 이입후 단백질의 세포내 발현을 Northern blot analysis로 확인한 결과, 0.6kb 크기의 mRNA transcript가 Ad5CMV-HCCS-1로 유전자 이입된 SCC-25 세포주에서 관찰되었다. 그러나 HSCC-1 mRNA는 야생형이나 Ad5CMV-LacZ로 유전자 이입된 SCC-25 세포주에서는 발현양이 아주 적거나 발현되지 않았다(Fig. 3).

#### Cytotoxicity of Ad5CMV-HCCS-1

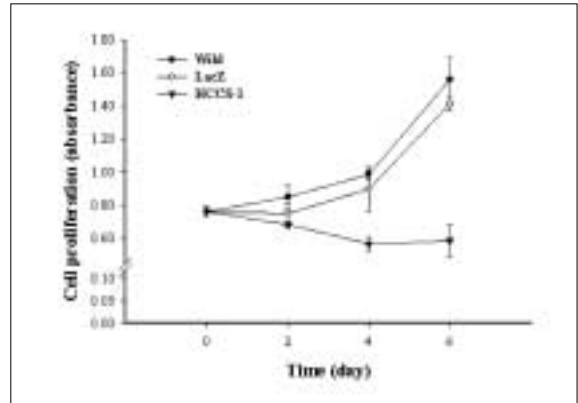
HSCC-1 유전자에 의한 구강암 세포주 성장억제 효과를 비교한 결과, Ad5CMV-HCCS-1에 감염된 SCC-25 세포주는 대조군인 Ad5CMV-LacZ에 감염된 세포주보다 상당히 억제된 성장양태를 보였다. 감염 6일째에 Ad5CMV-HCCS-1를 이입한 세포주는 mock-infected 세포의 30%가 남아있는 반면, Ad5CMV-LacZ를 이입한 세포주는 mock-infected 세포의 90%가 계수되었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 4).



**Fig. 2.** Ad5CMV-LacZ transduction of SCC-25 cell line and X-gal staining. The transduction efficiencies were over than 50% with 2 of MOI and over 90% with MOI of 50. Virus related cytotoxicity was observed at an MOI of 200 or more(A: 0 MOI, B: 1 MOI 50%, C: 2MOI 70%, D: 10 MOI 90%, E: 50 MOI 95% and F: 200 MOI, respectively).



**Fig. 3.** HCCS-1 mRNA expression in three groups of SCC-25 cells. There was no or very low expression of HCCS-1 mRNA in mock and Ad5CMV-LacZ transduced SCC-25 cells, but 0.6kb mRNA was shown in Ad5CMV-HCCS-1 transduced SCC-25 cells.



**Fig. 4.** Viability of SCC-25 cells after transduction with AdCMV-HCCS-1, AdCMV-LacZ, and wild-type SCC-25 cells. Growth inhibition of SCC-25 cells transduced with Ad5CMV-HCCS-1 was measured about 70% of wild-type cells at day 6( $p < 0.05$ ).

#### Ⅳ. 총괄 및 고찰

유전자 치료가 실질적인 치료법으로 이용되기 위해서는 치료용 유전자를 원하는 부위에 안전하고 효과적으로 전달하는 유전자 전달체의 개발이 선행되어야 한다. 이러한 요건들을 충족시키는 이상적인 유전자 전달체의 필수조건으로는 첫째, 생체내에서 치료유전자가 충분한 기간동안 발현될 수 있도록 유전자 전달체가 안정적이어야 하며 둘째, 유전자 전달체가 생체내에서 면역반응이나 독성을 일으키지 않아야 하며 셋째, 대상세포에 선별적으로 유전자 전달이 가능하게 하여 치료효과가 원하는 조직 또는 세포에서만 국소적으로 일어나고 그 외 정상조직이나 다른 장기로의 불필요한 유전자 전달을 방지 할 수 있어야 하며 넷째, 유전자 전달체가 인체내에서 암을 유발하지 말아야 하며 다섯째, 효과적인 유전자 전달을 위하여 복제하는 세포뿐만 아니라 복제하지 않는 세포들로도 유전자 전달을 할 수 있어야 한다<sup>14)</sup>.

아데노바이러스는 효율적으로 세포속으로 감염되어 외래 유전자를 다량으로 발현시킬 수 있어, 암 또는 허혈성 심혈관 질환등 여러 종류의 질병의 치료 유전자를 생체내로 전달하는 유전자 전달체로 많이 사용하고 있다<sup>15)</sup>. 이는 아데노바이러스의 MLP(major late promoter)로부터 치료용 유전자의 전사가 매우 활발히 일어나고 결과적으로 치료 유전자가 높은 효율로 발현되며, 또한 바이러스 감염 후기에는 숙주세포에서의 단백질 합성을 억제하여 외래 단백질의 발현을 효율적으로 유도할 수 있기 때문이다. 아데노바이러스의 게놈은 크기가 큰 이중나선의 DNA로 구성되어 있어 크기가 큰 외래유전자를 쉽게 삽입할 수 있다. 아데노바이러스에 외래 유전자를 삽입하는 위치는 E1과 E3 유전자 부위

가 주로 이용되고 있으며, 증강자(promoter), 외래 유전자, 그리고 polyadenylation signal 로 구성된 발현 구성체(expression cassette)로 삽입한다<sup>16)</sup>.

아데노바이러스는 다양한 종류의 숙주세포에 감염이 가능하고, 상피세포를 쉽게 감염할 수 있으며, 신경계에 독성을 나타내지 않고 인체에 심각한 질병을 유발하지 않는다. 그리고  $1 \times 10^{13}$  particle/ml의 고농도의 역가로 쉽게 생산될 수 있다. 따라서 아데노바이러스는 폐, 근육, 심장, 간, 혈관, 그리고 중추 신경계등을 포함하는 여러 기관에 높은 효율로 외래 유전자를 전달할 수 있다. 또한 재조합 아데노바이러스는 박테리아에서 안정적으로 유지될 수 있고 293 세포주를 이용하여 대량으로 증폭될 수 있어 외래 단백질의 대량 발현이 가능하고 생산비용이 저렴하다<sup>17)</sup>. 그리고 아데노바이러스는 DNA바이러스이기 때문에 레트로바이러스에서 관찰되는 RNA signal에 의한 간섭이 없는 장점이 있다. 아데노바이러스는 수용체를 매개로 하여 세포내로 들어가며<sup>18)</sup> 숙주세포의 유전체 속으로 삽입되어 들어가는 레트로바이러스와는 달리 episome의 형태로 존재하기 때문에 숙주세포의 염색체로 들어가면서 생길 수 있는 삽입 돌연변이의 위험성이 없는 장점도 있다.

아데노바이러스는 암을 대상 질환으로 하는 체세포 유전자 치료에 적합한 여러 특성들을 지닌다. 또한 레트로 바이러스와 달리 분열하지 않는 세포들로도 유전자를 전달할 수 있어 세포주기가 다양하게 존재하는 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 매우 적합하다<sup>19)</sup>. 아데노바이러스의 외래 유전자 발현기간은 일과성으로 이러한 특성은 감염된 암세포들을 제거하는 목적으로 이용되는 암 유전자 치료에 장점으로 작용한다. 아데노바이러스는 면역반응을 유도하므로 반복 투여가 어려운 점이 있지만<sup>20)</sup>, 암을 대상으로 하는 유전자치

료의 경우 암세포에 대한 면역반응은 오히려 장점으로 작용할 수 있다

암 유전자 치료를 목적으로 아데노바이러스를 이용하여 다음과 같은 여러 가지 방안들이 시도되었다. 즉 면역증진 유전자의 도입으로 인한 종양 백신으로서의 응용, 종양 억제 유전자의 도입, 종양 유전자 antisense 도입, 또는 자살/독성 유전자의 도입 등의 방법에 의하여 종양 세포를 살상하고 암세포 특이적인 면역 반응을 증가시켜 항종양 효과를 얻을 수 있다는 결과들이 여러 동물 모델을 통하여 보고되고 있다<sup>3,5,7,8)</sup>.

종양 억제 유전자로 알려진 p53을 레트로바이러스 벡터를 이용하여 종양 세포에 감염시킨 결과 종양 세포의 성장이 억제된다는 결과가 보고된 이후<sup>6)</sup>, 보다 높은 효율의 유전자 전달과 치료 유전자를 많이 발현시킬 수 있는 아데노바이러스를 이용한 기초 연구<sup>21-23)</sup>와 임상실험이 두경부암, 간암, 폐암에서 상당히 긍정적 결과들이 보고되고 있다<sup>7,8,24)</sup>.

진술한 바와 같이 기존의 구강암 치료법은 진전된 증례에서 치료 효과와 생존을 연장에서 제한적이었다. 특히 기존 방법이 실패한 경우 다른 대처 방법이 없었다<sup>1,2,25)</sup>. 그러므로 새로운 치료 전략으로 유전자 치료가 조명 받고 있다<sup>4,26)</sup>. 유전자 치료는 정상 조직을 보호하는 한편 암세포를 목표로 하므로, 이런 면에서 치료 효율이 높은 구강암의 국지적 치료 전략이 될 수 있다. 구강암의 치료에 유전자 치료가 가능한 범위는 재발성 종양, 수술후 절제변연의 부가적 치료와 국한적인 원격전이부위가 될 수 있다. 원격 전이된 예에서 전신적 투여가 이론적으로는 가능하지만, 적당하다고 보이지 않는다. 유전자 전달의 성과를 높이기 위해 병소부위의 직접 투여가 요구되므로, 시야의 확보와 접근성으로 볼 때, 원발성이나 재발성 구강암은 유전자 치료의 적당한 목표가 될 수 있다. 여러 가지 새로운 치료 전략중 종양 억제 유전자를 전달하여 세포사멸을 유도하거나<sup>24)</sup> "suicide gene therapy"가 시도되고 있다<sup>27,28)</sup>. 최근 두경부암에서 시도되고 있는 유전자 치료법 연구로 유전적 변형을 가진 암세포에만 특이적으로 증식하여 암세포를 죽일 수 있는 종양 특이적 증식 아데노바이러스에 의한 우수한 치료효과가 보고되고 있다<sup>29)</sup>.

이번 실험에서 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려진 HSCC-1 유전자를 주입하는 전달체로 아데노바이러스 벡터를 사용한 이유는 예비 실험과정에서 lipofectamin 이나 electroporation을 시도하였으나 만족할 만한 유전자 전달율을 얻지 못하였기 때문이다. 이 이유는 HSCC-1 유전자가 종양억제유전자이므로 유전자가 발현됨과 동시에 세포사멸을 유도하기 때문이라 유추할 수 있지만, 이를 뒷받침할 추가 실험이 필요할 것이다. 그리고 Ad5CMV-HSCC-1의 유전자 이입효율을 높이기 위해 cationic liposome과 conjugation 하는 등의 방법을 강구해야 할 것으로 사료된다<sup>30)</sup>.

이번 실험에서는 시험관내에서지만 Ad5CMV-HSCC-1에 감염된 세포에서 대조군과 비교했을 때 유의할 만한 성장 억제가 관찰되었다. 이는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에서의 50%의 성장 억제를 보고한 기존의 결과와 일치한다. 그러나 관찰된 성장 억제가 HSCC-1가 발현되어 세포사멸을 유도한 것에 의한 지의 여부를 살펴보는 과정이 필요하다. 그러기 위해 먼저 구강암 세포주에서 HSCC-1 유전자의 발현으로 단백질의 표현에 대한 차원의 연구가 필요하며, 단백질이 증가되는 경우, 이 유전자와 세포내에서 세포사멸을 유도하는 다른 신호전달물질과의 어떤 상호 작용 기전에 의하여 세포사멸이 진행되는 지에 대한 연구가 필요하다. 또한 이번 연구에서는 SCC-25 세포주에서만 유전자 이입효율이 측정되었지만, 속성이 다른 더 많은 구강암 세포주에서 Ad5CMV-HSCC-1에 감염으로 HSCC-1 단백질의 표현이 증가되는지에 대한 연구와 cell cytotoxicity를 측정하는 시도가 필요하다.

그리고 생체로의 유전자 이식에 아직도 많은 난제가 있는 것이 사실이다<sup>3,4)</sup>. 그러므로 nude mouse에 구강암을 유발한 후 개발한 Ad5CMV-HSCC-1를 직접 투여하는 in vivo 실험으로 투여방법, 적정량과 안전성에 대한 추가 연구가 필요하다.

총괄하면, 이번 실험의 결과에서 알 수 있듯이, 구강암에서 재조합 아데노바이러스를 통한 종양 억제유전자의 하나인 HSCC-1 유전자를 전달하는 치료법은 개발할 가치가 있을 것으로 판단된다.

## V. 결 론

구강암의 치료와 재발 방지에 있어서 기존의 치료 전략과 다른 형태의 보조적 접근이 필요할 것으로 사료되며 유전자 치료가 한 부분이 될 것이다. 이번 실험은 재조합 아데노바이러스 벡터를 이용하여 구강암 세포주내에 HSCC-1 유전자의 세포내 전달과 발현에 관한 실험적 유전자 치료법에 관한 연구이다. HSCC-1 유전자는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 높은 효율로 구강암 세포주내에 성공적으로 전달되었으며 이의 mRNA가 표현되었고 이에 따른 구강암세포의 성장 저해가 관찰되었다. 그러므로 재조합 HSCC-1 아데노바이러스 유전자치료를의 작용 기전과 효과, 안전성과 사용편의성에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, et al : Salvage management for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 22 : 34, 2000.
2. Schrijvers D, Johnson J, Jimenez U, et al : Phase III trial of modulation of cisplatin/fluorouracil chemotherapy by interferon alfa-2b in patients with recurrent or metastatic

- head and neck cancer. Head and Neck Interferon Cooperative Study group. *J Clin Oncol* 16 : 1054, 1998.
3. Cusack JC, Jr, Tanabe KK : Cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 7 : 421, 1998.
  4. Xi S, Grandis JR : Gene therapy for the treatment of oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res* 82 : 11, 2003.
  5. Anderson MJ, Stanbridge EJ : Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosome transfer. *FASEB J* 7 : 826, 1993.
  6. Cai DW, Mukhopadhyay T, Liu Y, et al : Stable expression of the wild-type p53 gene in human lung cancer after retrovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 4 : 617, 1993.
  7. Wang J, Bucana CD, Roth JA, et al : Apoptosis induced in human osteosarcoma cells is one of the mechanisms for the cytotoxic effect of Ad5CMV-p53. *Cancer Gene Ther* 2 : 9, 1995.
  8. Liu TJ, Zhang WW, Taylor DL, et al : Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Res* 54 : 3662, 1994.
  9. Zhang WW, Fang X, Mazur W, et al : High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1 : 5, 1994.
  10. Kim TE, Kim YW, Kim JW et al : Candidate tumor suppressor, HCCS-1, is downregulated in human cancers and induces apoptosis in cervical cancer. *Int J Cancer* 97 : 780, 2002.
  11. Rheinwald JG, Beckett MA : Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 41 : 1657, 1981.
  12. He TC, Zhou S, DaCosta LT, et al : Simplified system for generating recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci* 95 : 2509, 1998.
  13. Takenouchi, T, Munetaka E : Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyryl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci* 56 : 479, 1995.
  14. Wolff JA, Trubetskoy VS : The Cambrian period of nonviral gene delivery (news). *Nat Biotechnol* 16 : 421, 1998.
  15. Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC : Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 16 : 35, 1998.
  16. McGroy WJ, Bautista DS, Graham FL : A simple technique for the rescue of early region 1 mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163 : 614, 1988.
  17. Graham FL, Smiley J : Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36 : 59, 1977.
  18. Daqing L, Ling D, Paul F, et al : Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5 : 4175, 1999.
  19. Zhang WW : Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 6 : 113, 1999.
  20. Chirmule N, Propert K, Magosin S, et al : Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Cancer Gene Ther* 6 : 1574, 1999.
  21. Hamada K, Sakae M, Alemany R, et al : Adenovirus transfer of HPV 16 E6/E7 antisense RNA to human cervical cancer cells. *Gyne Oncol* 63 : 219, 1996.
  22. Cho SD, Hwang SJ, Park HR, et al. Development of gene therapy strategy using plasmid and adenovirus in cervical cancer treatment. *J Kor Obstet Gynecol* 42: 2019, 1999.
  23. Kim MS, Kwon HC, Hong SI, et al : Adenovirus-mediated gene transfer of wild-type p53 results in restoration of tumor suppressor gene function in glioma cell line. *J Kor Cancer Assoc* 20: 1026, 1998.
  24. Clayman GL, Frank DK, Brusio PA, et al : Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 5 : 1715, 1999.
  25. Sun LM, Leung SW, Su CY : The relapse patterns and outcome of postoperative recurrent tongue cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 55 : 827, 1997.
  26. Shillitoe EJ : Gene therapy for head and neck cancer. *Oral Oncol* 34 : 157, 1998.
  27. Shillitoe EJ, Laypeyre JN, Adler-Storthz K : Gene therapy-it's potential in the management of oral cancer. *Oral Oncol* 3 : 957, 1996.
  28. Kim TE, Ro DY, Kim YW, et al. Adenovirus-mediated thymidine kinase gene transfer with exposure of ganciclovir to uterine cervical cancer cell. *Kor J Gynecol Oncol Colposcopy* 14: 195, 2003.
  29. Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al : Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 60 : 6359, 2000.
  30. Fukuhara H, Hayashi Y, Yamamoto N, et al. Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol* 39 : 601, 2003.

#### 저자 연락처

우편번호 420-717

경기도 부천시 원미구 소사동 2

가톨릭대학교 성가병원 구강악안면외과

표성운

원고 접수일 2004년 9월 15일

게재 확정일 2004년 12월 5일

#### Reprint Requests

Sung-Woon Pyo

Dept. of OMFS, Holy Family Hospital, The Catholic Univ. of Korea

2 Sosa-dong, Wonmi-ku, Puchon, Kyunggi-do, 420-717, Korea

Tel : +82-32-340-2130 Fax : +82-32-340-2255

E-mail : spyo@catholic.ac.kr

Paper received 15 September 2004

Paper accepted 5 December 2004