



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위 논문

자살유전자를 이입한 사람
신경줄기세포를 이용한 악성
신경교종의 유전자치료

아주대학교 대학원

의학과

안영민

자살유전자를 이입한 사람
신경줄기세포를 이용한 악성
신경교종의 유전자치료

지도교수 : 조 경 기

이 논문을 의학 박사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

안 영 민

안영민의 의학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 조 기 홍 인

심사위원 조 경 기 인

심사위원 김 세 중 인

심사위원 진 병 관 인

심사위원 정 상 섭 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 22일

자살유전자를 이입한 사람 신경줄기세포를 이용한 악성 신경교종의 유전자치료

악성 신경교종은 성장 속도가 빠르고, 주위 정상 뇌 조직 내로 침윤 (invasion)하므로 완전 수술적 절제가 불가능하고, 재발성 성향이 높기 때문에 수술 후 방사선치료나 화학요법 등 기타 치료를 하더라도 일 년 미만의 생존율을 갖는 매우 악성 종양이다. 최근 수술기법의 개발과 고해상도의 진단기기 및 최첨단 수술기계의 도입 등으로 적극적인 종양제거 수술이 가능해졌으며, 면역치료 및 유전자치료 등의 보존 요법이 시도되고 있으나 아직까지는 악성 신경교종 환자의 예후에 큰 영향을 미치지 못하고 있다.

최근에 신경줄기세포가 종양을 추적할 수 있다고 (tropism) 보고된 이후 이tropism의 특성을 이용하여 신경줄기세포를 항암치료제의 vector로 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 김 등이 개발한 사람 신경줄기세포인 HB1.F3가 정상조직내로 침투된 악성 신경교종을 추적하는 사실을 확인하기 위해 성인 쥐의 대뇌반구에 악성 신경교종을 이식하고 난 뒤 반대쪽 대뇌반구에 HB1.F3 신경세포를 이식해서 F3의 이동 경로를 관찰하였다.

자살유전자로 알려진 대장균 사이토신탈아미노효소 (cytosine deaminase; CD)는 항진균제인 5-fluorocytosine (5-FC)을 5-fluorouracil (5-FU)로 변환시켜 FUTP, FdUMP, FdUTP 등의 대사산물을 통해 DNA, RNA 대사에 작용함으로써 종양세포 독성을 나타낸다. 따라서 본 연구는 상기 CD 유전자를 HB1.F3신경줄기세포에 이입한 후 사람 악성 신경교아세포종 (U373MG,

U251MG, U87MG)세포를 쥐의 대뇌반구에 이식한 5일 후 동측의 대뇌반구의 같은 부위에 이식하여 7일 동안 5-FC (10mg/ml)와 대조군으로 PBS를 복강 주사하여 종양세포의 성장을 관찰하였다.

대조군으로 PBS를 주입한 동물모델과 5-FC를 주입한 모델을 비교하여 5-FC를 주입한 쥐에서 뇌종양의 성장이 급격히 저하됨을 확인하였다. 이는 자살유전자가 이입된 세포뿐만 아니라 주위에 있는 세포까지 죽이는 bystander 효과로 종양세포 독성을 보였다.

상기 연구 결과를 토대로 임상에 적용함으로써 수술적 제거 후 남아 있는 신경교종이나 수술로 제거하기 힘든 부위에 위치한 종양의 치료 가능성이 있음을 보여주었다.

핵심어: cytosine deaminase, 5-Fluorocytosine, Neural stem cell,
5-Fluorouracil

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림차례	v
I. 서론	1
A. 연구의 필요성	1
B. 연구 목적	3
II. 재료 및 방법	4
A. 세포 배양	4
B. MTT 분석	4
C. 동물 종양 모델	5
D. 5-FC 약물 치료 모델	6
E. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색	6
F. LacZ 염색	7
III. 결과	8
A. CD 유전자에 대한 활동성 측정	8
B. HB1.F3가 종양부위로 이동하는 특성 확인	12
C. 종양동물모델에서의 HB1.F3/CD 이식 후 5-FC를 주입하여 tumor mass 관찰	14
IV. 고찰	17

V. 결론	21
참고문헌	22
ABSTRACT	29

LIST OF FIGURES

Fig. 1. The human stem cell HB1.F3/CD cell line construction	9
Fig. 2. Cytotoxic effect of HB1.F3 and HB1.F3/CD <i>in vitro</i>	11
Fig. 3. Co-culture HB1.F3/CD and human glioblastoma cell lines	13
Fig. 4. Migration and tropism of neural stem cell (HB1.F3/lacZ)for glioma U373MG	15
Fig. 5. Comparison of tumor mass size in rat models with 5-FC treatment	16

I. 서론

A. 연구의 필요성

사람의 악성 신경교종은 종양이 자라면서 발생 부위로부터 주변 정상 뇌조직으로 침윤하고 때로는 반대 측 대뇌반구로 멀리 이동하여 종양을 적출하더라도 다시 재발함으로써 치료하는데 어려움을 가지고 있다. 최근 고해상도의 진단기기와 수술 중 뇌파검사, 유발전위 검사 및 항법장치 (navigation system) 등 최첨단 수술기계의 도입 등으로 적극적인 종양제거 수술이 가능해졌으며, 면역치료 및 유전자치료 등의 보존 요법이 시도되고 있으나 아직까지는 악성 신경교종환자의 예후에 큰 영향을 미치지 못하고 있으며 수술 후 평균 생존 기간이 일년을 넘지 못한다.

신경교종 치료에서의 가장 큰 장애는 신경교종의 주변 조직으로의 침윤 (invasion)으로 인하여 종양의 완전 적출이 불가능하며, 주변 정상 조직 내로 침윤된 종양세포를 감별하여 치료 할 수 있는 방법이 현재 의학으로서는 없다는 점이다. 아울러 뇌종양이 생겼을 경우 항암제 약물을 혈관을 통하여 투여하였을 때 뇌에는 혈관-뇌 장벽 (blood-brain barrier; BBB)이 있어서 뇌 속으로 혈류나 삼투압에 의한 물질 이동이 제한된다는 점이다. 그러나 Aboody 등에 의해 신경줄기세포 (neural stem cell)가 종양이 있는 곳으로 추적 이동한다 (tropism)는 사실을 배경으로 본 연구에서는 신경줄기세포의 종양을 향해 추적하는 tropism을 이용하여 종양세포만을 선택적으로 죽일 수 있는 자살유전자를 종양 내로 운송하는 vector로 이용하여 악성 신경교종의 치료에 응용하고자 하였다 (Aboody 등, 2001 Bourbeau 등, 2004; Brown 등, 2003; Chung-Faye 등,

2001).

최근 활발히 시도되고 있는 유전자치료 중 선택적으로 종양세포만을 효율적으로 죽일 수 있는 연구가 각광을 받고 있다 (Okada 등, 2004). 본 연구는 소위 자살 유전자로 불리는 prodrug-converting enzyme 유전자를 종양세포 내에 주입한 후 이를 활성화시킴으로써 종양세포를 죽이는 “suicide strategy”를 악성 신경교종 치료에 적용하였다 (Kurozumi 등, 2004; Park 등, 2002).

저자들이 사용한 자살유전자로는 대장균 사이토신탈아미노효소(cytosine deaminase; CD)를 이용하였다. 이 CD유전자는 항진균제인 5-fluorocytosine (5-FC)을 5-fluorouracil(5-FU)변환시켜 FUTP, FdUMP, FdUTP 등의 대사산물을 통해 DNA, RNA 대사에 작용함으로써 종양세포 독성을 나타낸다 (Adachi 등, 2000; Barresi 등, 2003; Fischer 등, 2005; Hadaczek 등, 2005; Koyama 등, 2000).

B. 연구의 목적

본 연구는 상기 CD 유전자를 F3신경줄기세포에 이입 (transfection)시킨 후 사람 악성 신경교아세포종(U373MG, U251MG, U87MG)세포를 쥐의 대뇌반구에 이식 후 신경교종을 이식한 곳과 동일 부위에 CD 유전자가 함유된 사람신경줄기세포 (HB1.F3)를 이식하여 인체에 독성이 없는 5-FC (10mg/ml)를 쥐의 복강 내에 주사하여 종양세포의 성장 억제 현상을 관찰하였다.

이에 본 실험에서는 신경줄기세포가 종양세포를 추적하여 이동하는 것을 증명하고, 이를 토대로 자살유전자 CD가 이입된 HB1.F3를 종양부위에 이식하여 5-FC를 주입하였을 때 동일한 부위에 있는 종양세포뿐만이 아니라 주위에 있는 종양세포까지 죽여 효과적으로 치료할 수 있는지를 확인해 보고자 하였다 (Ramnaraine, 2003).

II. 재료 및 방법

A. 세포 배양

사람 신경교아세포종 (glioblastoma) 세포인 U373MG, U251MG, U87MG은 Dlubecco's modified Eagle medium (DMEM, HyClone)과 10% fetal bovine serum(FBS, HyClone), penicillin streptomycin (GIBCO) 100 unit/ml에서 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일에 한번 씩 계대배양 하였다.

HB1.F3는 임신 15주된 태아의 대뇌조직에서 얻은 세포를 myc oncogene이 저장된 retroviral vector를 이용하여 불멸화시킨 신경줄기세포이다. HB1.F3도 신경교아세포종과 같은 조건에서 배양하였고, 배양된 세포는 3일에 한번 씩 배양액을 교체하였으며 7~9일에 한번 씩 계대배양 하였다.

B. MTT 분석

MTT 분석법은 살아있는 세포를 관찰하는 실험방법이다.

U373MG, U251MG, U87MG 세포를 3×10^3 개수를 96 well 플레이트에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 DMEM 배지로 1일 동안 배양하였다. 그리고 새 배지를 교체해준 후 5-fluorouracil (5-FU, Sigma chemical, Germany)을 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 and $15 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 3일을 배양하였다. 5-FU를 처리하고 3일째 되는 날 새 배지로 교체해준 후 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol -2-yl] -2,5- diphenyltetrazoliumbromide, sigma, 5mg/ml)용액을 $10 \mu\text{l/well}$ 씩 투여하고 4시간 동안 37°C

에서 반응시켰다. 보라색 결정을 육안으로 확인한 후 solubilization buffer (10% SDS buffer: DMF solution, 1:1)를 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 분주하고 37°C 인큐베이터에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 well을 효소면역검사법 (ELISA) 플레이트 리더를 이용하여 570nm에서 630nm로 흡광도를 측정하였다.

C. 동물 종양 모델

배양되어진 사람 신경교아세포종세포를 헤모사이토메터를 이용하여 1×10^6 세포를 계산하여 마리당 $3\mu\text{l}$ 씩 동물에게 삽입할 준비를 하였다. Sprague-Dawley rat(Sam: Tac(SD) BR, Korea)으로 230~250g 암컷을 마취제(10% choral Hydrate, 400mg/kg)로 마취하고 stereotaxic frame에 쥐의 머리를 고정하였다. 쥐의 고정된 머리의 피부를 절단하고 Bregma가 잘 보이도록 하였다. Bregma를 기준으로 Ap(antero-posterior) +0.4, ML(lateral from the midline) -3.1 되는 위치를 표시한 다음 드릴로 두개골을 제거하였다. 그리고 Hemilton syringe에 세포를 넣은 상태에서 Dv(depth from dura) -4.0 좌표를 잡을 후에 $0.2\mu\text{l}/\text{min}$ 의 rate로 세포를 이식하였다.

D. 5-FC 약물 치료 모델

1그룹: 종양세포만 이식한 모델

2그룹: 종양세포를 이식한 후 5일째 되는 날 HB1.F3/CD 이식 하루 뒤
PBS를 매일 7일 동안 복강 주사한 모델

3그룹: 종양세포를 이식한 후 5일째 되는 날 HB1.F3/CD 이식 하루 뒤
5-FC를 매일 7일 동안 복강 주사한 모델

동물 종양 모델을 만든 후 5일째 되는 날에 종양세포의 세포 개수와 동일한 개수로 종양세포를 이식한 동일한 부위에 HB1.F3/CD를 1×10^6 세포를 마리당 3 μl 씩 준비하여 2그룹, 3그룹에게 이식하였다. 3그룹에게만 신경줄기세포 이식한 다음 날부터 5-FC (F7129, saline에 10mg/ml로 녹임, Sigma chemical, Germany)을 매일 7일 동안 500mg/kg로 복강 주사하였다. 7일 동안 5-FC를 주사한 3그룹과 5-FC를 주사하지 않은 1그룹, 2그룹을 같은 날에 모두 perfusion을 하였다. 뇌 속의 피를 모두 뺀 후 4% 파라포름 알데하이드에 하루정도 고정된 뒤 30% sucrose에 넣어서 down 시켰다. 동결절편을 만들어서 30 μm 로 coronal 방향으로 잘라서 gelatin 코팅이 된 슬라이드에 붙여서 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다.

E. Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

Hematoxylin은 핵에 염색이 되고 eosin은 세포질에 염색이 되는 방법이다.

슬라이드에 올린 조직을 상온에서 말린 다음 흐르는 물에 5분정도 두었다. Harris' Hematoxylin (Sigma)에서 1분정도 염색을 한 뒤 다시 흐르는 물에 5

분정도 세정하고, Acid Ethanol(70% 에탄올, HCl 0.5%)에 3번 담그는 작업을 하였다. 흐르는 물에 10분 세정한 다음 Ammoniated H₂O(3차 증류수, 5% NH₄OH)에 30초 반응시키고, 흐르는 물에 2분 세정한 후 Eosin(sigma)에서 20초간 반응 시켰다. 깨끗한 물에 세정한 다음 에탄올 70%, 95%, 100%에 차례대로 탈수과정을 거친 후에 비수용성 봉입제로 봉입하였다.

F. LacZ 염색

이 염색법은 β -galactosidase를 이용하여 LacZ를 염색하는 방법이다. -20℃에 저장한 슬라이드에 올린 조직을 상온에서 말린 다음 Dako pen으로 조직의 둘레를 그렸다. PBS(phosphate buffered saline)로 5분씩 3차례 세정의 과정을 하고 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside) 용액 (2mmol/L MgCl₂, 35mmol/L potassium ferrocyanide, 35mmol/L potassium ferricyanide in PBS)을 37℃에서 16시간 반응시켰다. PBS로 5분씩 3차례 헹굼을 거친 후에 Eosin에 20초간 염색한 후 물에 세정을 하였다. 마지막으로 탈수와 투명과정을 거친 후 비수용성 봉입제로 봉입하였다.

Ⅲ. 결 과

A. CD 유전자에 대한 활동성 측정

HB1.F3 cell line에 retrovirus를 이용하여 대장균 cytosine deaminase (CD) gene을 삽입하여 자살유전자가 삽입된 새로운 줄기세포 cell line을 만들었다 (Fig. 1).

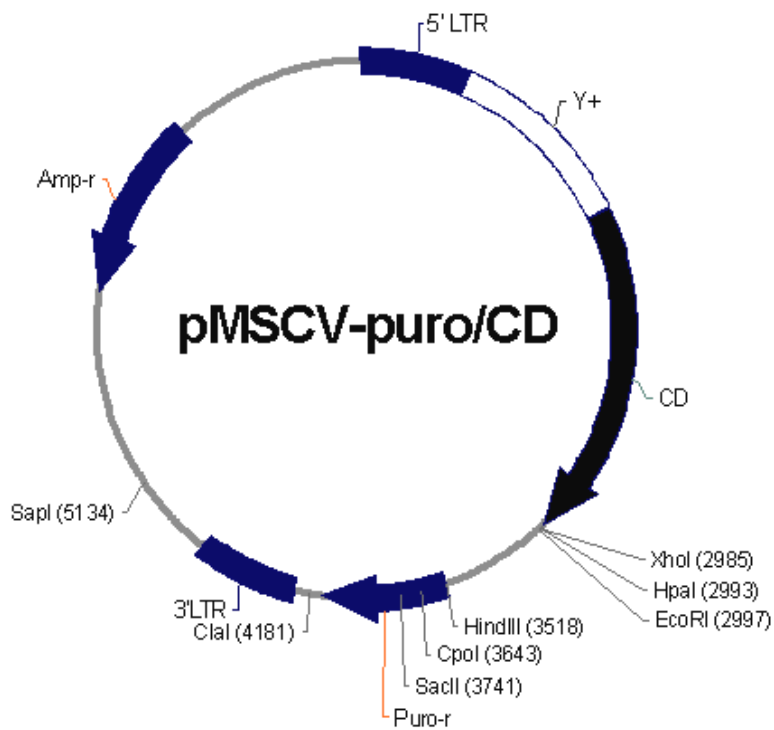


Fig. 1. The human stem cell F3/CD cell line construction.

in vitro 실험으로 줄기세포 HB1.F3와 HB1.F3/CD cell line을 가지고 각각 5-FC와 5-FU를 처리하였을 때 세포고사를 MTT분석법으로 분석하였다 (Fig. 2). 자살유전자가 이입되지 않은 HB1.F3 cell line에서 5-FU를 처리한 것은 세포고사가 일어났고 대조군과 5-FC를 처리한 것은 세포고사가 일어나지 않았다. 자살유전자가 이입된 HB1.F3/CD cell line에서는 대조군에서만 세포고사가 일어나지 않았으며 5-FC와 5-FU를 처리한 것에는 세포의 고사가 일어나는 것을 볼 수 있었다.

Fig.2 사진에서 볼 수 있듯이 HB1.F3/CD cell line에서 5-FC를 처리한 것은 세포고사로 인해 살아있는 cell이 없음을 확인할 수 있었다. 이것은 자살유전자가 삽입되지 않은 F3 cell line은 5-FC에 예민하게 반응하지 못하여 세포고사가 일어나지 않았으며, 반면에 자살유전가가 이입된 F3/CD cell line에서는 CD gene에 의해 5-FC에 예민하게 반응하여 세포고사가 일어났음을 확인할 수 있었다.

결과적으로 CD gene에 의해서 5-FC는 5-FU로 바뀌어서 세포고사를 유도하여 줄기세포 자신도 모두 세포고사가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

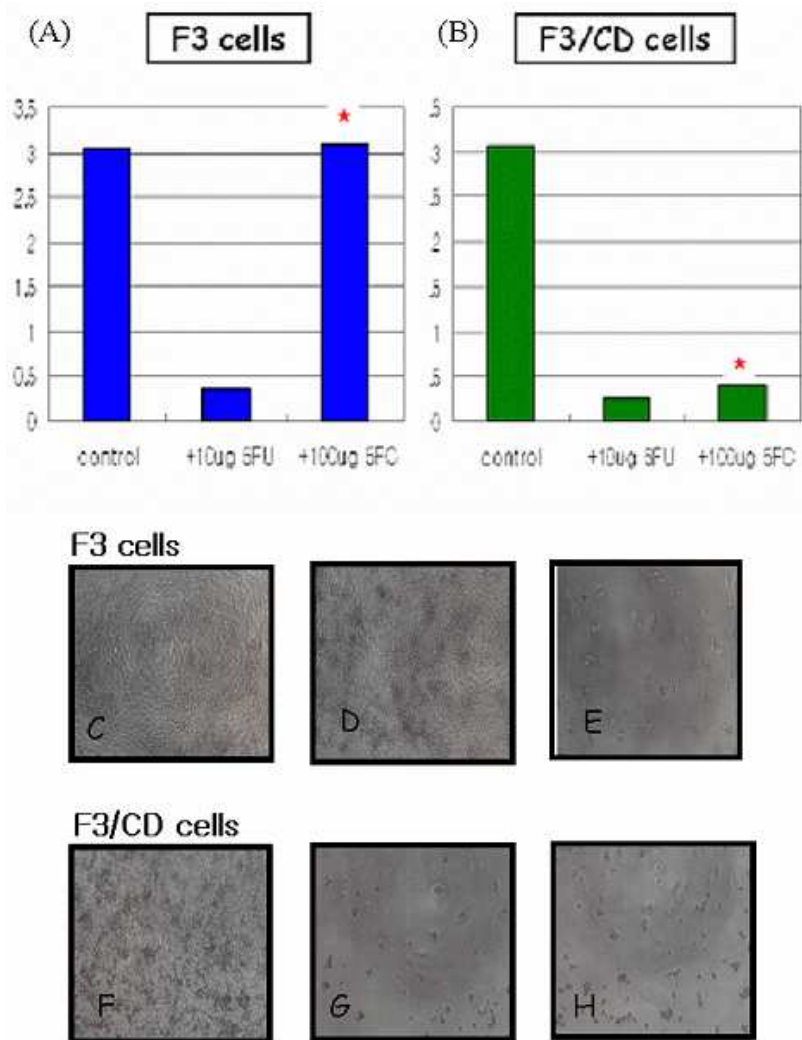


Fig. 2. Cytotoxic effect of F3 and F3/CD in vitro.

The human stem cell HB1 F3 and HB1 F3/CD was assessed cell death by converted toxic from 5-FC. Transduced cells decreased after 5-FC treatment (B, G), but not decreased after 5-FU treatment (A, D). Both transduced F3/CD cells (E) and nontransduced F3/CD cells (F) died after 5-FU treatment.

B. HB1.F3가 종양부위로 이동하는 특성 확인

in vivo 실험으로 사람에게서 유래된 신경교종세포를 이식하여 종양모델을 만든 후에 반대쪽 뇌에 신경줄기세포인 HB1.F3/LacZ를 이식하여 이동하는 것을 LacZ 염색실험방법으로 이동되는 신경줄기세포의 이동을 관찰하였다.

먼저 동물모델에 종양세포(U373MG)를 이식한 후 같은 부위에 이식된 것을 확인한 후 종양의 크기가 일정하게 자라는 것을 확인하였다. 그 결과 동물모델에 종양세포를 이식한 후 5일이 지난 것을 종양동물모델로 사용하였다.

종양동물모델에 신경줄기세포 HB1.F3/LacZ를 종양을 이식한 반대쪽에 이식하여 종양세포를 추적하는 것을 실험한 결과, HB1.F3/LacZ가 corpus callosum을 따라서 이동하여 종양부위에 LacZ 발현이 되는 것은 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 하지만, 종양이 없는 동물모델에서 HB1.F3/lacZ를 이식하여 보았을 때는 그대로 이식한 자리에 머물러 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

결과적으로 종양동물모델에서도 신경줄기세포인 HB1.F3/lacZ는 종양세포를 인식하여 이동할 수 있는 능력이 있음을 확인할 수 있었다.

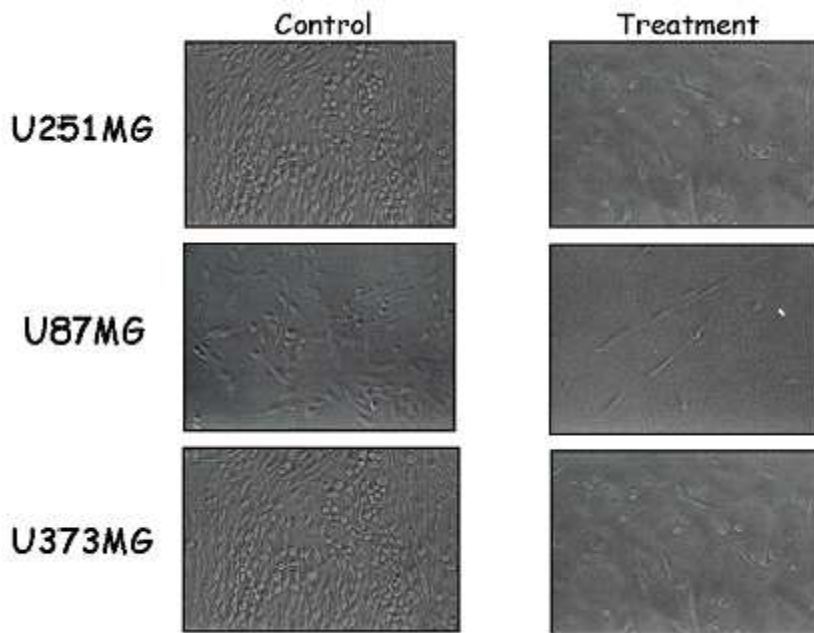


Fig. 3. Co-culture HB1.F3/CD and human glioblastoma cell lines. 5-FU has strong cytotoxic effect against malignant human glioblastoma cells(U251, U87 and U373).

C. 종양동물모델에서의 HB1.F3/CD 이식 후 5-FC를 주입하여 tumor mass 관찰

종양모델에 HB1.F3/CD를 동일한 부위에 이식하고 다음날 5-FC를 7일동안 복강주사 하였을 때 tumor mass가 줄었는지 관찰하였다.

그룹별로 실험을 한 뒤 13일째 세 그룹의 동물모델을 죽인 뒤 조직을 H&E 염색방법으로 tumor mass를 비교해 보았다 (Fig. 4) a는 1그룹이고 b는 PBS를 주입한 종양모델 1그룹이고, c, d, e는 3그룹이다. 결과는 그림에서도 비교가 되듯이 1그룹과 2그룹의 tumor mass 크기는 한쪽 뇌를 종양이 차지하고 있지만 3그룹은 종양이 1그룹을 tumor mass를 100%로 보았을 때 3그룹은 tumor mass가 33%밖에 자라지 않았다 (Fig. 5).

결과적으로 종양부위에 신경줄기세포가 CD gene에 의해 5-FC가 5-FU로 변환하여 종양세포를 세포고사 유도를 했다고 관찰되어진다.

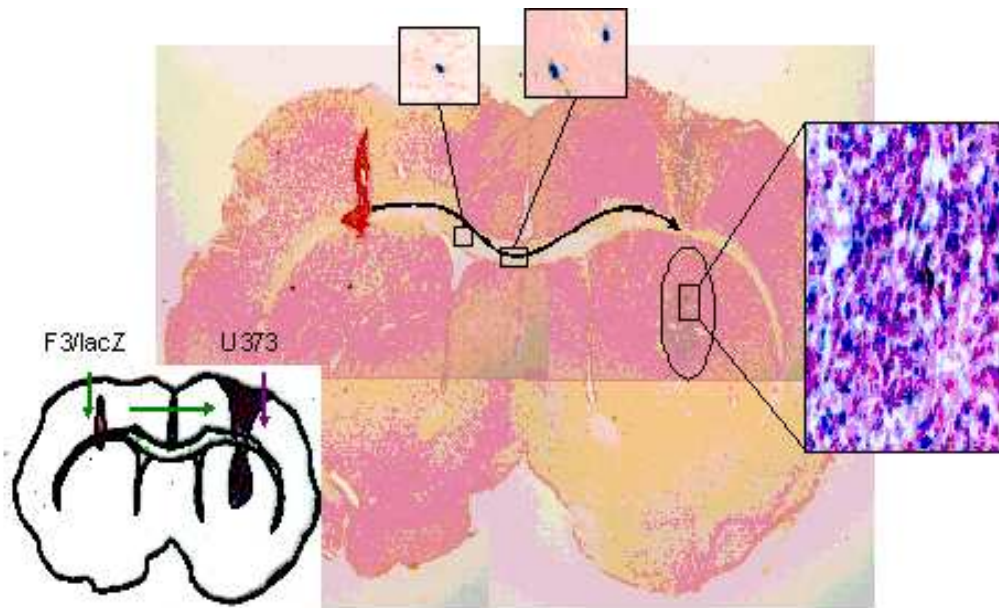


Fig 4. Migration and tropism of neural stem cell(F3/LacZ) for glioma U373MG. Three days after U373 transplantation, F3/LacZ implanted into contralateral hemisphere to the tumor implantation site and sacrificed on day 4. Tumor tissue sections were stained for 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-gal) and eosin. HB1.F3, the neural stem cells could trace through the corpus callosum to the tumor cell in the contralateral brain.

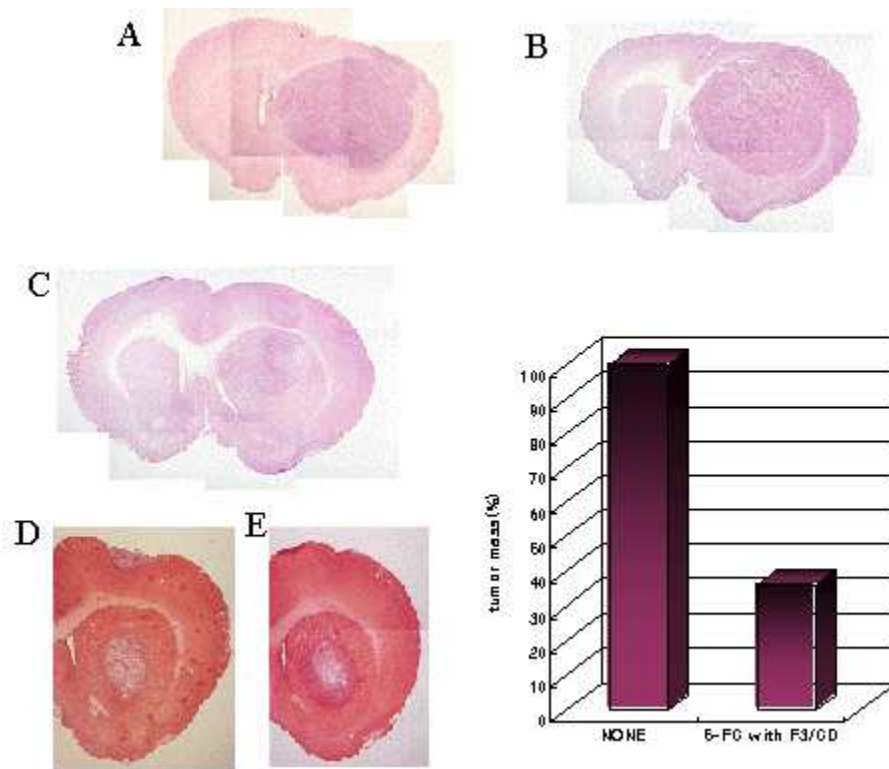


Fig. 5. Comparison to tumor mass size in rat models with 5-FC treatment. After U373 (1×10^6 cells/ml) transplantation, F3/CD or F3 (1×10^6 cells/ml), the human neural stem cell were transplanted at the same hemisphere on day 6 and injected 5-FC (500mg/kg) daily for 7 days. These brains were taken 14 days after tumor transplantation. A, B: control (n=6) C, D, E: 5-FC treatment (n=9). The tumor mass with F3/CD transplantation was reduced 30% in the size comparing to F3 transplantation.

IV. 고 찰

본 연구는 자살유전자가 이입된 사람줄기세포를 종양동물모델에 이식하고 약물을 주입해줌으로서 종양의 크기를 비교 관찰하는 것이다.

실험에 사용된 자살유전자가 이입되는 사람줄기세포(F3)는 임신 15주된 태아의 대뇌조직에서 얻은 세포를 myc oncogene이 저장된 retroviral vector를 이용하여 불멸화시킨 신경줄기세포로서 스스로 분화할 수 있는 자가분화가 가능하다 (Kim, 2004). 최근 연구로는 사람 뇌에 이식된 신경줄기세포는 이식 후에도 스스로를 분화할 수 있다는 보고와 함께 종양을 인식하여 추적할 수 있다고 한다 (Stafflin 등, 2004).

신경줄기세포가 종양을 추적하여 이동한다고 밝혀졌다. 종양세포가 증식할 때 분비되는 epidermal growth factor (EGF)에 신경줄기세포가 반응하여 이동한다는 연구결과도 발표되었고, 줄기세포에는 CXCR4라는 chemokine 수용체가 존재하는데 종양세포에서 분비되는 stromal-derived factor 1a (SDF-1a)에 접촉함으로써 신경줄기세포가 뇌종양세포를 추적할 수 있다는 연구도 발표되었다 (Zhou 등, 2002). 최근에 발표된 연구결과로는 vascular endothelial growth factor (VEGF)에 의하여 강하게 신경줄기세포가 종양세포로 추적하여 이동한다는 연구결과가 발표되었다 (Schmidt 등, 2005). 이러한 연구발표로 종양세포를 추적하여 치료할 수 있게 되었다.

또한 줄기세포는 뇌-혈관 장벽에 영향을 받지 않고 이동할 수 있다고 보고되었다. 즉 동물실험 마우스에서 꼬리정맥에 이식하여도 세포들을 통과하여 척추를 타고 올라가서 뇌 속의 종양 내까지 도달한다는 연구결과가 발표되었다 (Aboody 등, 2000). 또 중추신경계 (central nerver system, CNS)에 있는 줄기

세포에 의하여 손상된 뇌가 자가 치료된다는 보고도 있다. 즉 줄기세포는 중추 신경계의 질병에 치료하기 위한 하나의 수단으로 사용하기에는 탁월한 능력이 있다는 것이다.

암유전자치료 중 자살 유전자 (suicide gene)를 이용하여 치료하는 방법이 있는데 그 종류로는 단순포진바이러스 타이미딘카이네이스 (thymidine kinase; TK)와 대장균 사이토신탈아미노효소가 있다. 타이미딘카이네이스는 전구약물로 항바이러스약제인 acyclovior (ACV) 혹은 ganciclovir (GCV)를 이용하여 세포의 DNA합성을 억제시키고, 사이토신탈아미노효소 (CD)는 전구약물로 항진균제인 5-Fluorocytosine (5-FC)을 5-Fluorouracil (5-FU)로 강한 독성을 나타내는 물질로 변환시킨다 (Hadaczek 등, 2005)(Koyama 등, 2000). 타이미딘카이네이스 (thymidine kinase, TK)과 대장균 사이토신탈아미노효소 (cytosine deaminase, CD)는 스스로는 세포에 자극을 주지 않으며 사람 몸속에는 관여하는 gene가 없다는 것이 큰 장점이다. 두 가지 모두 독성을 나타내지 않는 약물이 독성을 나타내는 물질로 변화하여 세포를 죽이자는 점은 같고, 그 자신뿐만 아니라 주위에 있는 세포까지 독성을 나타내어 암세포를 죽인다는 bystander 효과가 있지만 TK gene은 그 기능이 뚜렷하게 밝혀진 것이 없다.

5-FU는 1957년에 처음 발견되었으며, 유방암, 위암, 직장암에도 치료제로 사용하고, 방사선에 예민한 반응을 하여 현재 임상에서도 사용하고 있다.(Evoy 등, 1997) 5-FU는 상기 기술한 다양한 암 등에 대하여 탁월한 항암 효과를 갖고 있으나 독성이 강해 뇌 암에 사용할 경우 BBB를 통과 하기위해서는 소화기 암에 사용하는 수십 배의 용량을 전신에 투여 할 경우 인체 특히 골수에 심각한 합병증을 유발하기 때문에 뇌종양에는 흔히 사용 할 수가 없는 약제이다. 그러나 5-FU의 전구약물인 5-FC는 세포에 독성이 없기 때문에 전신적으로 투

여해도 개체에 미치는 독성을 최소화 시킬 수 있다. CD gene에 의해 5-FC에서 변환되어진 5-FU는 다시 세포내 효소들에 의해 5-fluorouridine 5'-triphosphate (5-FUTP)와 5-fluoro-2'-deoxy uridine 5'-monophosphate (5-FdUMP)로 바뀌어서 결국 세포의 RNA 및 DNA 합성을 억제시켜 세포를 죽이게 된다.

연구의 가설로 신경줄기세포 (HB1.F3)에 자살유전자(CD)를 이입하고 종양모델에 이식하고 전구약물인 5-FC를 주입하면 종양세포가 뇌에서 자라지 못하고 세포고사를 유도할 것이라고 생각한다. 자살유전자가 이입된 신경줄기세포 (HB1.F3/CD)가 종양부위에 머물러 있으면서 주입된 5-FC가 5-FU로 변화하여 종양세포를 죽인다는 것이다.

하지만 본 실험에서 사용하는 자살유전자가 이입된 신경줄기세포는 약물에 의해 함께 죽음으로서 뇌에 남아있지 않다. 그리고 종양을 이식한 모델에 신경줄기세포를 이식하고 어느 정도의 시간의 흐름에 따라 다르게 종양부위로 이동을 보이지만, 정확한 연구가 발표되지는 않았다.

종양세포는 2가지 type이 있다. p53을 야생형과 돌연변이형으로 첫 번째 야생형인 종양세포는 apoptosis로 유도되기 위해서는 DNA에 손상이 되면 p53이 활동하게 되고 그것이 BAX, Fas, 또는 tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R)등과 같은 death receptor들과 결합을 한다. 또 하나 돌연변이형 종양세포도 apoptosis로 유도되기 위해서 Bcl-2는 저해하고 c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK)과 같은 death receptor와 결합을 한다. 2가지 모두 apoptosis에서는 연관성 있게 활동을 하며 CD gene에 의한 5-FC 실험에 대해서도 영향력 있게 나타내어진다 (Kurozumi 등, 2004). 그러므로 그래프에서 보듯이 대조군의 tumor mass를 100%로 보았을 때 5-FC를 주입한 모델에서는 33%만 자란

것을 확인할 수 있다.

결과적으로 tumor mass가 대조군에 비해 커지지 않는 것은 CD gene이 삽입된 신경줄기세포를 이식한 종양 모델에 5-FU를 주입하면 apoptosis가 일어난다고 볼 수 있다. 즉 약물만으로 종양세포를 줄일 수 있다는 결과를 얻은 것이고 이것이 수술적인 방법으로 제거하기 힘든 종양을 치료할 수 있는 가능성이 보여 진다고 할 수 있다.

하지만 종양세포를 세포고사를 초래하여 tumor mass를 완전하게 동물모델에서 제거할 수는 없어서 다른 자살유전자와 함께 치료하는 방법이나 세포고사를 유도하는 물질을 함께 처리함으로써 종양을 완전 치료하는 방법을 찾아야 될 것 같다.

V. 결 론

본 연구에서는 자살유전자가 삽입된 신경줄기세포를 종양모델에 삽입하여 항진균제인 5-FC를 주입하여 종양의 크기를 대조군과 비교, 관찰하는 것이다. *in vitro*에서 CD gene이 삽입된 신경줄기세포가 5-FC에 예민하게 반응하여 세포를 죽이는 것을 확인하였다. *in vivo* 실험으로 신경줄기세포가 종양을 인식하여 이동할 수 있다는 것을 확인하였고, 종양모델을 만들고 CD gene이 삽입된 신경줄기세포를 이식하여 5-FC를 주입한 것과 PBS를 주입한 것을 관찰한 결과 tumor mass의 차이를 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 대조군과 PBS를 주입한 그룹은 한쪽 뇌를 차지할 만큼 tumor mass가 자라는 것을 확인할 수 있었고, 5-FC를 주입한 그룹은 대조군에 비해 33%밖에 자라지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 약물만으로도 종양의 크기를 줄일 수 있다는 것이고 나아가 이것이 임상에 적용한다면 수술하기 힘든 종양을 제거할 수 있는 충분한 가능성이 있다고 보인다. 하지만, 남아있는 종양세포를 완전히 제거하기 위해서는 세포고사를 직접적으로 유도하는 물질을 함께 처리하는 방법이 고안되어야 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H, Ohmoto T. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther.* 1;11(1):77-89, 2000
2. Aleksandrova MA, Poltavtseva RA, Revishchin AV, Korochkin LI, Sukhikh GT. Development of human brain neural/progenitor cells after transplantation into the brain of adult rats. *Morfologiya.* 123(3):17-20, 2003
3. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;97(23):12846-51, 2000
4. Barresi V, Belluardo N, Sipione S, Mudo G, Cattaneo E, Condorelli DF. Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther.* May;10(5):396-402, 2003

5. Bourbeau D, Lavoie G, Nalbantoglu J, Massie B. Suicide gene therapy with an adenovirus expressing the fusion gene CD::UPRT in human glioblastomas: different sensitivities correlate with p53 status. *J Gene Med.* Dec;6(12):1320-32, 2004
6. Brown AB, Yang W, Schmidt NO, Carroll R, Leishear KK, Rainov NG, Black PM, Breakefield XO, Aboody KS. Intravascular delivery of neural stem cell lines to target intracranial and extracranial tumors of neural and non-neural origin. *Hum Gene Ther.* Dec 10;14(18):1777-85, 2003
7. Cho HS, Lee HR, Kim MK. Bystander-mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene. *J Korean Med Sci.* Feb;19(1):107-12, 2004
8. Chung-Faye GA, Chen MJ, Green NK, Burton A, Anderson D, Mautner V, Searle PF, Kerr DJ. *In vivo* gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther.* 8(20):1547-54, 2001
9. De Rosa MF, Sillence D, Ackerley C, Lingwood C. Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem.* 27;279(9):7867-76 2004 Feb Epub 8, 2003

10. Evoy D, Hirschowitz EA, Naama HA, Li XK, Crystal RG, Daly JM, Lieberman MD. *In vivo* adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *J Surg Res.* 69(1):226-31, 1997
11. Fischer U, Steffens S, Frank S, Rainov NG, Schulze-Osthoff K, Kramm CM. Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells. *Oncogene.* 10;24(7):1231-43, 2005
12. Gabel M, Kim JH, Kolozsvary A, Khil M, Freytag S. Selective in vivo radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells transduced with the E. coli cytosine deaminase (CD) gene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;41(4):883-7, 1998
13. Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol.* 187(1):22-36, 2001
14. Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K. Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg.* 102(2):328-35, 2005
15. Kim SU. Human neural stem cells genetically modified for brain repair

- in neurological disorders. *Neuropathology*. 24(3):159-71, 2004
16. Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of escherichia coli cytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther*. 7(7):1015-22, 2000
 17. Kurozumi K, Tamiya T, Ono Y, Otsuka S, Kambara H, Adachi Y, Ichikawa T, HamadaH, Ohmoto T. Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus. *J Neurooncol*. 66(1-2):117-27, 2004
 18. Lu XG, Zhan LB, Feng BA, Qu MY, Yu LH, Xie JH. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol*. 15;10(14):2140-4, 2004
 19. Lv SQ, Yang H, He JQ, Wang B, Yoshimura I, Liu YS. Effects of CD/5-FC suicide gene therapy system on human malignant glioma cells *in vitro*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 35(5):430-4, 2003
 20. Miller CR, Williams CR, Buchsbaum DJ, Gillespie GY. Intratumoral

- 5-fluorouracil produced by cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy is effective for experimental human glioblastomas. *Cancer Res.* 1;62(3):773-80, 2002
21. Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Katoh H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyl-transferase suicide system. *J Gene Med.* 5(1):30-7, 2003
22. Okada T, Caplen NJ, Ramsey WJ, Onodera M, Shimazaki K, Nomoto T, Ajalli R, Wildner O, Morris J, Kume A, Hamada H, Blaese RM, Ozawa K. In situ generation of pseudotyped retroviral progeny by adenovirus-mediated transduction of tumor cells enhances the killing effect of HSV-tk suicide gene therapy in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 6(3):288-99, 2004
23. Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Auguste KI, LachyankarMB, Redmond DE, Snyder EY. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther.* 9(10):613-24, 2002
24. Ramnaraine M, Pan W, Clohisy DR. Osteoclasts direct bystander killing of cancer cells *in vitro*. *Bone.* 38(1):4-12, 2006 Jan Epub 2005

25. Ramnaraine M, Pan W, Goblirsch M, Lynch C, Lewis V, Orchard P, Mantyh P, Clohisy DR. Direct and bystander killing of sarcomas by novel cytosine deaminase fusion gene. *Cancer Res.* 15;63(20):6847-54, 2003
26. Schmidt NO, Przylecki W, Yang W, Ziu M, Teng Y, Kim SU, Black PM, Aboody KS, Carroll RS. Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia.* 7(6):623-9, 2005
27. Staflin K, Honeth G, Kalliomaki S, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* 1;64(15):5347-54, 2004
28. Tiraby M, Cazaux C, Baron M, Drocourt D, Reynes JP, Tiraby G. Concomitant expression of *E. coli* cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase improves the cytotoxicity of 5-fluorocytosine. *FEMS Microbiol Lett.* 1;167(1):41-9, 1998
29. Yao L, Li Y, Wu Y, Liu A, Yan H. Product release is rate-limiting in the activation of the prodrug 5-fluorocytosine by yeast cytosine deaminase. *Biochemistry.* 19;44(15):5940-7, 2005

30. Zhang Z, Jiang Q, Jiang F, Ding G, Zhang R, Wang L, Zhang L, Robin AM, Katakowski M, Chopp M. *In vivo* magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. *Neuroimage*. 23(1):281-7, 2004
31. Zhang Z, Shirakawa T, Hinata N, Matsumoto A, Fujisawa M, Okada H, Kamidono S, Matsuo M, Gotoh A. Combination with CD/5-FC gene therapy enhances killing of human bladder-cancer cells by radiation. *J Gene Med*. 5(10):860-7, 2003
32. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *Biol Chem*. 20;277(51):49481-7,2002 Dec Epub 2002

-ABSTRACT-

Suicide Gene therapy for Malignant Gliomas using Neural Stem Cells

Young Min Ahn

Department of Medical Sciences
The graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Kyung Gi Cho)

Introduction: Despite advanced neurosurgical techniques and various multi-modal therapeutic approach have been developed for malignant gliomas, these can not save the patients from the tumors due to infiltrating behavior of these glioma cells.

Here, author investigated the possibility of treatment for the malignant gliomas with neural stem cell (HB1.F3) transduced with suicidal gene using the tropism of stem cells.

Materials and Methods: *E.coli* cytosine deaminase(CD) of suicide gene is enzyme that catalyzes the conversion of noncytotoxic 5-FC to the cytotoxic and radiosensitizing drug 5-FU. Cytotoxic 5-FU and its toxic metabolites can readily diffuse unto surrounding tumor cells giving CD.

HB1.F3 were transduced with retroviral vectors expressing the *E.coli* CD. Rats were implanted with U373MG, U251MG human glioblastoma(hGM) line

and F3/CD were injected directly into the tumor mass 6 days later. The rats with tumors were injected IP 5-FC or saline daily for 7 days since 6 days after implantation of tumors.

Results: HB1.F3 which were injected into the contralateral hemisphere to the tumor implantation site migrated through the corpus callosum to the tumor cells 3days after hGM transplantation.

The growth inhibition of treated cells 5-FU in comparison to untreated controls was remarkable in vitro. The tumor mass in the rats with transplantation of F3/CD were reduced markedly in size comparing to that with F3 after injection of 5-FC.

Conclusions: 1. The human neural stem cells can trace to the glioma cells in the rat brain. Systemic treatment with 5-FC reduced the size of tumor with direct transplantation of F3/CD .
2. Our data indicate that suicide gene therapy using neural stem cells would be promising as a new therapeutic approach for malignant glioma.

key words : cytosine deaminase, 5-fluorocytosine, neural stem cell, 5-fluorouracil