KISEP Experimental Research J Korean Neurosurg Soc 29 : 471-476, 2000

사람의 신경교종 세포주에서 아데노바이러스 벡터를 이용한 p16/INK4a 유전자 전달에 의한 종양성장 억제*

원자력병원 신경외과,[1] 세포생물학연구실,[2] 분자종양학연구실,[3] 서울대학교 의과대학 내과학교실[4]
김미숙[2] · 권희충[3] · 강희석[2] · 박인철[2] · 이창훈[1,2] · 김창민[3] · 이춘택[4] · 홍석일[2] · 이승훈[1,2]

= Abstract =

Growth Suppression by Adenovirus-mediated Gene Transfer of p16/INK4a in Glioma Cell Lines

Mi-Suk Kim, M.S.,[2] Hee-Chung Kwon, M.S.,[3] Hee-Seog Kang, M.S.,[2] In-Chul Park, Ph.D.,[2] Chang-Hun Rhee, M.D.,[1,2] Chang-Min Kim, M.D.,[3] Choon-Taek Lee, M.D.,[4] Seok-Il Hong, M.D.,[2] Seung-Hoon Lee, M.D.[1,2]

Department of Neurosurgery,[1] Laboratory of Cell Biology,[2] Laboratory of Molecular Oncology,[3] Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea
Department of Internal Medicine,[4] Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : p16/INK4a, a kind of tumor suppressor genes, encodes a specific inhibitor of the cyclin D - dependent kinases CDK4 and CDK6. This prevents the association of CDK4 with cyclin D1, and subsequently inhibits phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein(pRb), thus preventing exit from the G1 phase. According to previous reports, over 50% of glioma tissue and 80% of glioma cell lines have been demonstrated inactivation of p16/INK4a gene. The purpose of this study was to determine whether recombinant adenovirus - p16 virus is a suitable candidate for gene replacement therapy in cases of glioma.

Methods : Three human glioma cell lines(U251MG, U87MG and U373MG) that express mutant p16 protein were used. Replication - deficient adenovirus was utilized as an expression vector to transfer exogenous p16 cDNA into the cells ; control cells were infected with the Ad - β - gal expressing β - galactosidase. To monitor gene transfer and the expression of exogenous genes, we used Western Blotting analysis. Flow cytometry studies of cellular DNA content were performed to determine the cell cycle phenotype of the glioma cells before and after treatment.

Results : We showed here that restoration of p16/INK4a expression in p16 negative U87MG, U251MG and partially deleted U373MG by Ad - CMV - p16 induced growth suppression in vitro. Flow cytometric study revealed that Ad - CMV - p16 infected U87MG cells were arrested during the G0 - G1 phase of the cell cycle. Expression of p16 transferred by Ad - CMV - p16 in glioma cells was highly efficient and maintained for more than seven days.

Conclusions : Our results suggest that Ad - CMV - p16 gene therapy strategy is potentially useful and warrants further clinical investigation for the treatment of gliomas.

KEY WORDS : p16/INK4a · Tumor suppressor · Adenovirus · Gene therapy · Glioma.

서 론

p16/INK4a 유전자는 종양억제유전자로 9번 염색체 단완 부위에 위치하며, p53 다음으로 빈번하게 비활성화 되는 유전자로 알려져 있다[13]. cyclin D - dependent kinase인 CDK4, CDK6의 특이적인 inhibitor인 p16 단백질을 만들고, 이는 CDK4가 cyclinD1과의 결합을 방해하여, RB protein이 인산화 되는 것을 방지하여 세포주기를 G1에서 진

*본 연구는 과학기술부의 ' 원자력연구개발 중장기계획 의 지원으로 수행하였습니다.

행되는 것을 방지한다[12)18)]. p16/INK4a의 비활성화 기전은 변이, 소실, 또는 promotor의 methylation에 의한 것으로 설명되고 있다[5)7)16)].

악성신경교종에서는 50%이상에서 p16/INK4a의 소실이 관찰되고 있고, 80%의 세포주에서 변형이 관찰되고 있다[9)11)15)17)]. 따라서 이 유전자가 악성신경교종의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있고, 이 유전자의 replacement를 통하여 종양을 억제할 수 있으리라는 가설을 세울 수 있다. 실제적으로 plasmid를 이용하여 p16/INK4a를 신경교종세포에 주입시 성장을 억제하였다는 보고가 있고[2)], 특히 tumor invasion을 억제할 수 있다는 보고도 있다[4)].

성공적인 유전자치료를 위해서는 목표로 하는 종양세포에 유전자를 효과적으로 전달하고 효율적으로 발현시키는 것이 가장 중요하다. 여러 가지 방법이 있으나 현재까지 아데노바이러스를 이용한 방법이 가장 효율적인 것으로 알려져 있다. 아데노바이러스는 감기를 일으키는 것으로 안전성에 대한 연구가 진행되어 왔고, 레트로바이러스와는 달리 뇌신경세포와 같이 분열을 하지 않는 세포에도 감염이 효율적으로 되는 등의 안전성 및 효율성이 입증되어 있다[1)3)10)19)].

본 연구에서는 상기와 같은 결과를 토대로 아데노바이러스를 이용하여 p16유전자를 신경교종세포에 주입하여 종양억제를 관찰하고자 하였고, 세포주기 억제를 flow-cytometry로 확인하고자 하였으며, 이를 통하여 p16/INK4a를 이용한 유전자치료의 가능성을 검증하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 세포주 및 배양방법

Human glioblastoma cell U251MG, U87MG 및 U373MG를 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratiries, Inc., Logan, UT), 10units/ml penicillin G, 100mg/ml streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다.

2. 재조합 아데노바이러스 준비와 감염 조건(Infection conditions)

아데노바이러스 p16/INK4a의 구조(construction)는 E1이 대치된 아데노바이러스 5 벡터 안에 wild-type p16/INK4a cDNA와 LacZ 유전자를 삽입하여 사용하였으며, 벡터 생산과 plaque assay는 293 세포를 사용하여 Graham과 Prevec의 방법을 이용하였다.

신경교종 세포주의 감염은 viral stock을 FBS를 첨가하지 않은 DMEM으로 희석하여 30과 40 moi(Multiplicity of Infection)로 하였으며, 희석된 viral 용액을 세포 단일층에 0.5ml/60mm로 부어 37℃에서 5분 간격으로 흔들어 가면서 1시간 동안 배양시켰다. 그 후 감염된 세포는 FBS를 포함한 DMEM 배지로 배양하였다.

3. 세포 성장 비율 측정

세포는 실험하기 24시간 전 6 well plate에 1×10^5 세포수로 심어 사용하였으며, 실험을 위해 triplicate로 준비하였다. 세포는 Ad-CMV-p16과 control로써 Ad-CMV-β-gal을 사용하여 감염시켰으며, 24시간 간격으로 trypan blue exclusion test로 세포 수를 측정하여 성장 곡선을 구하였다.

4. Western blot analysis

세포를 바이러스에 감염시킨 후 원하는 시간대에 세포를 PBS로 씻어준 다음 전체 세포의 lysate를 얻는다. lysate에 radioimmunoprecipitation assay-buffer를 넣어 주고 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 원심 분리하여 단백질을 얻었다. 이때 사용되어지는 assay buffer의 조성은 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 20mM EDTA, 50mM Tris(pH 7.4)이다.

단백질의 농도는 BCA assay에 의해 결정되었고 50μg의 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 사용하였다.

5. X-gal staining

세포의 감염 정도를 확인하기 위하여 X-gal staining을 하였다. 세포를 Ad-CMV-β-gal 바이러스에 감염시켜 48시간이 지난 다음 PBS로 한 번 씻은 후, 5% glutaral-dehyde 용액에 30분 동안 실온에서 고정시켰다. PBS로 2번 씻은 후 X-gal 용액을 넣고 배양기에서 3 4시간 염색시켰다. 이때 사용되는 X-gal 용액은 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% NP-40, 2mM MgCl 2, 5mM ferricyanide, 5mM ferrocyanide의 조성이며 X-gal은 1mg/ml로 사용하였다. 만들어진 용액은 0.45μM 여과기로 여과시켜 사용하였다.

6. Flow cytometry

Cycle Test TM Plus DNA reagent kit(Becton Dickinson, San Jose,Cal.)를 이용하여 DNA histogram을 측정하였다. U87MG와 U373MG를 50 moi의 Ad-CMV-p16으로 감염시킨 다음 48시간 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척 후 원심 분리하여 세포를 얻은 다음, 완충 용액과 염색 용액을 이용하여 염색하고 50μm nylon mesh로 걸러서 Becton Dickinson immunohistochemistry system을 이용한 검사를 실시하였다(FACSort, Becton Dickinson, San Jose, Cal.).

결 과

1. 신경교종 세포주들에서 아데노바이러스의 감염

유전자 전달 벡터로서 아데노바이러스의 장점 중 하나는 넓은 범위의 숙주 세포에서 높은 감염성을 지닌다는 사실이다. 신경교종 세포주(U-87MG, U-373MG, U251MG)의 아데노바이러스 최적 감염 조건은 Escherichia coli β-gal 유전자를 발현하는 아데노바이러스를 가지고 세포를 감염시

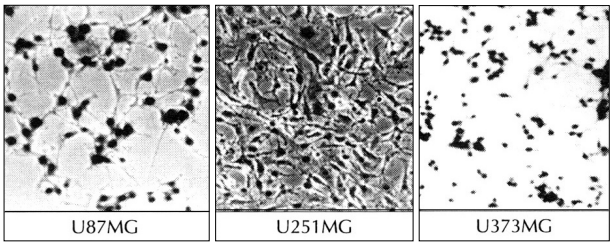

Fig. 1. X-gal staining of glioma cell lines transduced with 50 moi of Ad-CMV-β-gal. At 50 moi, greater than 95% of these cells in monolayer culture were positive for β-galactosidase activity as seen by a nuclear blue staining.

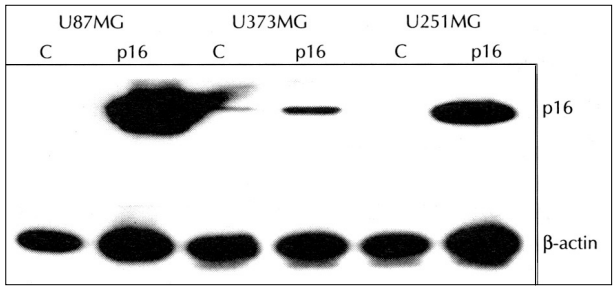

Fig. 2. Western blot analysis of the exogenous p16 expression in glioma cell lines. The exogenous p16 expression in U251MG definitely appeared two days after the Ad-CMV-p16 infection peaked by day 3 and maintained until 7 days after infection.

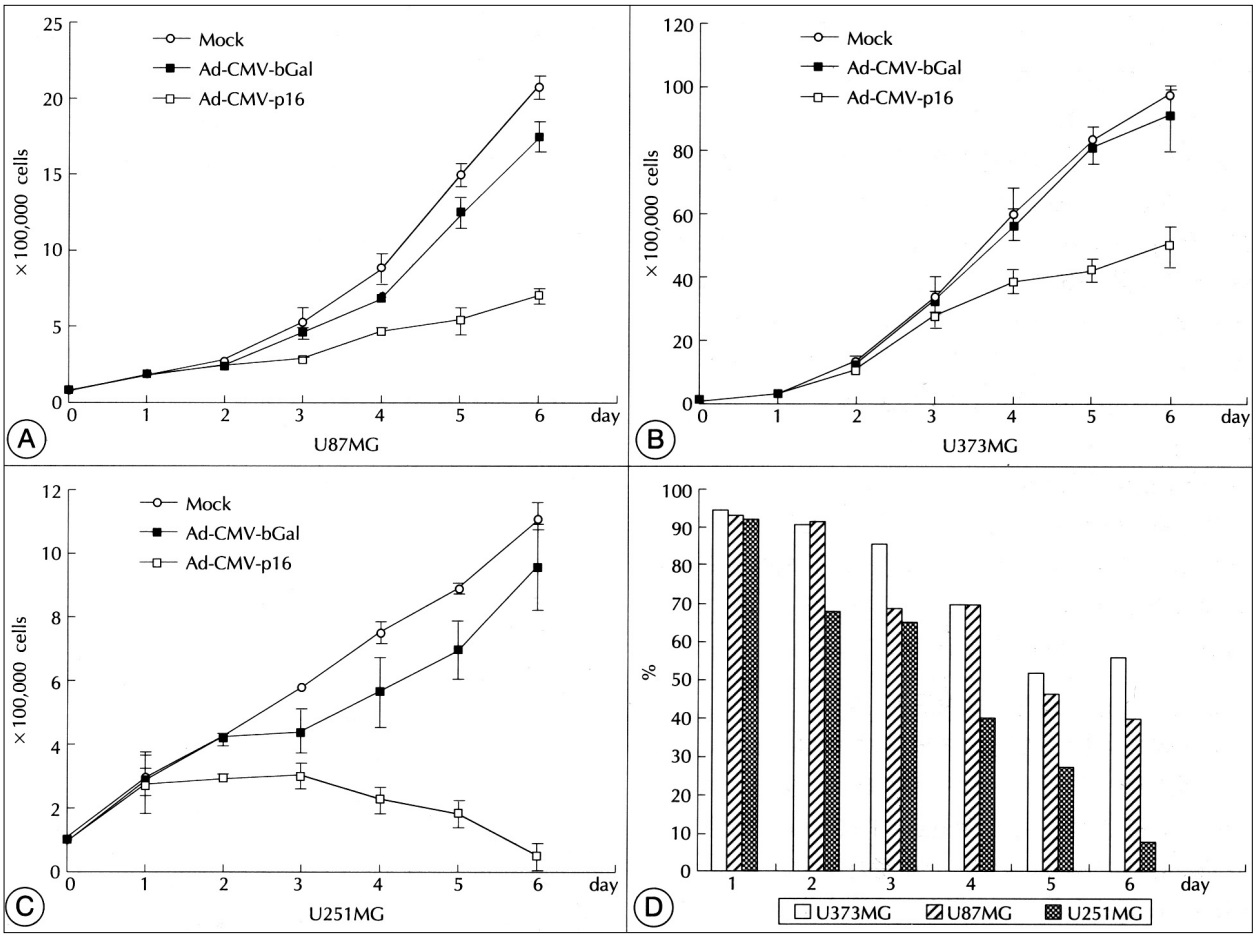

Fig. 3. Growth suppressive effect of Ad-CMV-p16 infection in human glioma cell lines. The cells were plated into 6-well culture plates in triplicate at 1×105 cells per well for 24 hr before viral infection and infected with Ad-CMV-p16 or Ad-CMV-β-gal at 50 moi. Culture medium alone was used for mock infection. Triplicate wells of each treatment were counted every 24hr with hemocytometer, and cell viability was assessed by trypan blue exclusion test. A : U87MG, B : U373MG, C : U251MG, D : Results were normalized in terms of percentage of Ad-CMV-p16 infection with the vector control set to 100% in each case.

킴으로써 결정하였다.

감염되어진 24시간 후 X-gal 염색을 실행하였을 때, 3개의 세포주 모두에서 50 moi에서 95% 이상의 전달 효과를 보였으며, 이런 결과는 아데노바이러스를 이용함으로써 p16을 실험관내에서 신경교종 세포주 안에 직접적으로 전달할 수 있는 가능성을 제시한다(Fig. 1) .

2. 신경교종 세포주에서 아데노바이러스 매개 p16/INK4a의 발현

아데노바이러스를 이용해 넣어준 p16/INK4a 유전자의 발현을 확인한 western blotting의 결과를 보면, U251 MG 및 U87MG는 Ad-CMV-β-gal 대조 군에서 p16의 발현이 없는 반면 Ad-CMV-p16으로 감염된 세포주에서의 p16 유전자의 높은 발현이 관찰되었고, U373MG는 endogenous한 p16의 발현이 있고 Ad-CMV-p16 감염 시 그 발현량이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. 외부 도입 p16 유전자가 세포주 성장에 미치는 효과

Ad-CMV-p16에 의한 특이적인 종양세포 성장 억제 정도를 알아보고자 mock, Ad-CMV-β-gal과 함께 비교하였다. 본 실험에 사용된 세포주 중 U87MG과 U251MG는 homozygous deletion, U373MG는 exon 3 만의 partial deletion을 가지고 있다고 보고되어 있다. 세포는 50 moi로 감염시켰고, 24시간 간격으로 세포 수를 세어 평균을 내어 성장 곡선을 그렸다. 성장 곡선을 살펴보면 mock 과 Ad-CMV-β-gal 군은 유사한 양상이나, Ad-CMV-p16 감염 군에서는 세 가지 세포주 모두에서 세포성장이 억제됨을 알 수 있었다. 감염 6일후 상대적인 성장 억제 율을 조사한 결과 U251MG는 95%, U87MG는 60%, 그리고 U373MG는 45%를 기록하였다(Fig. 3).

4. Flow cytometry에 의한 세포주기 분석

50 moi의 Ad-CMV-p16 감염 후 U87MG와 U373MG에서 세포주기를 검사하였다. 48시간 후 DNA histogram 상 U87MG는 G0-G1 phase가 59%에서 87%로, U373MG는 37%에서 50%로 각각 증가하였고, S phase는 20%에서 6% 및 50%에서 39%로 각각 감소하였다(Fig. 4). 이 결과로 보아 Ad-CMV-p16의 감염으로 G0/G1 세포주기의 정지를 이룰 수 있었고 이러한 기전으로 세포의 성장을 억제할 수 있었다.

고 찰

본 연구는 재조합 아데노바이러스 벡터 Ad-CMV-p16을 이용하여 악성신경교종 세포 내로 p16/INK4a유전자를

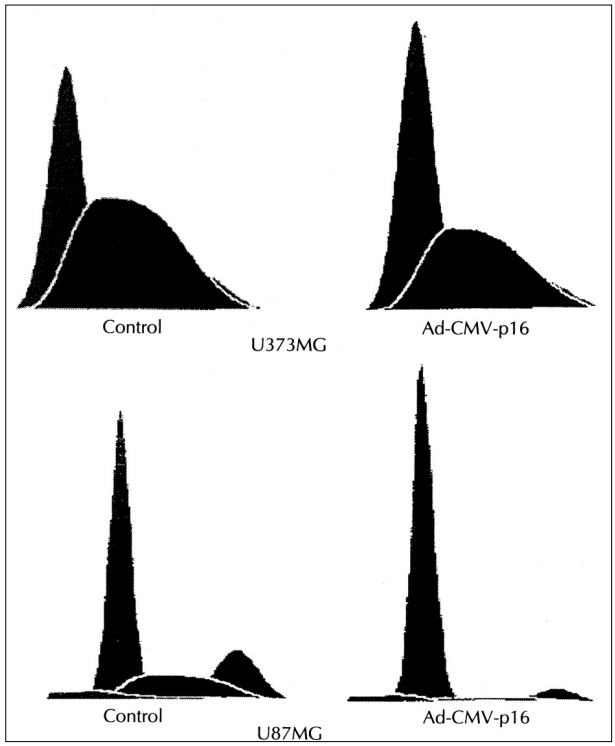

Fig. 4. Cell cycle analysis by quantitative flow cytometric analysis of U373MG and U87MG after the infection of Ad-CMV-p16. Flow cytometric analysis showed marked increase in the proportion of cells in the G0/G1 with concomitant decrease in the S phase in the both cell lines after Ad-CMV-p16 infection compared with control.

전달하는 방법을 제시하고 있다. 대다수의 악성신경교종에서 p16/INK4a는 유전적 이상이 관찰되어왔고, 아데노바이러스 벡터로 악성신경교종세포를 효율적으로 감염시킬 수 있으므로, Ad-CMV-p16을 이용한 악성 신경교종의 유전자치료 가능성이 제안된 바 있다. 우리는 in vitro 실험을 통해 Ad-CMV-p16을 이용한 유전자 전달 후 신경교종 세포주의 성장 억제를 관찰했다.

p16/INK4a는 CDK4, cyclin D1, pRb 등이 포함된 세포주기 조절기전에 관여되어 있다[5)7)12)15)16)18)]. 악성신경교종이나 여기에서 유래된 세포주에서 이들 각 성분들에 이상이 발견된 바 있고, p16유전자의 homozygous한 결손, CDK4의 증폭, Rb의 전사억제 등이 높은 빈도로 존재한다는 것은 pRb의 기능 불활성화가 사실상 대부분의 악성신경교종의 발달에 매우 중요함을 나타낸다[9)11)17)].

이전의 보고를 보면 plasmid를 이용하여 악성신경교종 세포의 p16 활성을 회복시키면 G1 phase를 지나 세포주기가 진행되는 것을 막아 세포 성장이 억제되고[2)], 아데노바이러스를 매개로 하여 악성신경교종 세포주에 p16/INK4a 유전자를 주입한 경우, 암세포의 성장이 억제되고[8)] 침윤성이 억제

되고 MMP-2의 단백질 분해 활성도 감소되는 것 등이 보고되어 있다[4]. 그밖에 p16/INK4a를 발현하는 transfectant clone들이 세포 노화현상을 보이기도 한다고 보고되고 있다[20].

상기 문헌 고찰을 종합하여 보면 p16/INK4a이 신경교종의 유전자치료에 적합한 대상유전자임을 알 수 있다. 따라서 저자들은 이 유전자를 감염율과 발현율이 현재 가장 높은 것으로 알려져 있는 아데노바이러스를 이용하여 실험적 유전자치료법을 검증하고자 하였다.

저자들은 U87MG, U251MG, U373MG 세포주로 Ad-CMV-p16을 전달하여 암세포 성장의 억제를 유도하였고 Ad-CMV-p16 전달세포와 Ad-CMV-β-gal전달 세포 사이의 성장 속도의 차이는 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 flow cytometry를 이용한 분석에서 G1 세포주기 저지 현상에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

각 세포주의 p16/INK4a 유전자 상태는 p16/INK4a 유전자 전달에 대한 반응에 매우 중요한 영향을 미치며. 정상적인 p16유전자를 가지고 있는 세포에서는 성장억제가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[6]. Izumoto등에 의하면 U87MG와 U251MG 세포주는 p16/CDKN2가 homozygous하게 결손 되어 있고 U373MG 세포주에서는 exon3만 결손 되어 있다고 한다[14]. 그러므로 U373MG에서 발현되는 p16은 일부가 잘려나간 p16/INK4a 단백질이다. 이것으로 보아 p16/INK4a 전달에 대한 반응이 다른 두 세포주에서 보다 U373MG에서 더 약하리라고 생각되고, 실제로 U251MG의 95%, U87MG의 60%에 비해 U373 MG에서는 45%의 낮은 성장억제율을 보였다.

또한 아데노바이러스에 의한 감염율이 매우 높고 p16 단백질의 발현이 효율적인 것을 확인할 수 있었다. 아데노바이러스는 레트로바이러스와는 달리 분열하지 않는 세포에도 감염되는 특성이 있어 뇌종양과 같이 분열하는 세포가 적은 종양에서 이상적이라고 할 수 있다[3][21].

결론적으로 말해서, 본 연구에서 p16 결손 뇌신경교종 세포주에 아데노바이러스 벡터를 이용하여 p16/INK4a를 도입시키면 높은 p16의 높은 발현율을 얻을 수 있었고, 종양세포의 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 따라서 Ad-CMV-p16 유전자 치료법은 악성신경교종에서의 유용성이 입증되었고, 악성신경교종 유전자 치료에 활용성이 있을 것으로 사료되었다.

• 논문접수일 : 1999년 8월 9일
• 심사완료일 : 1999년 11월 16일
• 책임저자 : 이 승 훈
139-706 서울 노원구 공릉동 215-4
원자력병원 신경외과
전화 : 02) 970-1235, 전송 : 02) 978-2005
E-mail : nslsh@kcchsun.kcch.re.kr

References

1) Akli S, Caillaud C, Vigne E, et al : *Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. Nat Genet 3 : 224-228, 1993*
2) Arap W, Nishikawa R, Furnari FB, et al : *Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. Cancer Res 55 : 1351-1354, 1995*
3) Brody SL, Crystal RG : *Adenovirus-Mediated in Vivo Gene Transfer. Ann N Y Acad Sci 716 : 90-101, 1994*
4) Chintala SK, Fueyo J, Gomez-Manzano C, et al : *Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer suppresses glioma invasion in vitro. Oncogene 15 : 2049-2057, 1997*
5) Costello JF, Berger MS, Huang HS, et al : *Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. Cancer Res 56 : 2405-2410, 1996*
6) Craig C, Kim M, Ohri E, et al : *Effects of adenovirus-mediated p16 INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells. Oncogene 16 : 265-272, 1998*
7) Fueyo J, Gomez-Manzano C, Bruner JM, et al : *Hypermethylation of the CpG island of p16/CDKN2 correlates with gene inactivation in gliomas. Oncogene 13 : 1615-1619, 1997*
8) Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WKA, et al : *Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells. Oncogene 12 : 103-110, 1996*
9) Giani C, Finocchiaro G : *Mutation rate of CDKN2 gene in malignant gliomas. Cancer Res 54 : 6338-6339, 1994*
10) Gomez-Manzano C, Fueyo J, Kyritsis AP, et al : *Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene products rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. Cancer Res 56 : 694-699, 1996*
11) He J, Olsen JJ, James CD, et al : *Lack of p16/Ink4 or retinoblastoma protein(pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumours and cell lines. Cancer Res 55 : 4833-4836, 1995*
12) Hirama T, Koeffler HP : *Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. Blood 86 : 841-854, 1995*
13) Hunter T, Pines J : *Cyclins and cancer II : cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 79 : 573-582, 1994*
14) Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, et al : *Homozygous deletions of p16INK4A/MTS1 and p15INKB/MTS2 genes in glioma cells and primary glioma tissues. Cancer Letters 97 : 241-247, 1995*
15) Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al : *Deletion of p16 and p15 gene in brain tumours. Cancer Res 54 : 6353-6358, 1994*
16) Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al : *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 368 : 753-756, 1994*

17) Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, et al : *CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in majority of glioblastomas. Cancer Res 54 : 6321-6324, 1994*
18) Serrano M, Hannon GJ, Beach D : *A new regulatory motif in cell-cycle control ausing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366 : 704-707, 1993*
19) Shewach DS, Zerbe LK, Hughes TL, et al : *Enhanced cytotoxicity of antiviral drugs mediated by adenovirus directed transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in rat glioma cells. Cancer Gene Ther 1 : 107-112, 1994*
20) Uhrbom L, Nister M, Westermark B : *Induction of senescence in human glioma cells by p16INK4A. Oncogene 15 : 505-514, 1997*
21) Vile R, Russel SJ : *Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. Gene Ther 1 : 88-98, 1994*