

방사선 치료에 내성이 유도된 두경부 편평세포암에 대한 종양살상 헤르페스 바이러스의 유전자 치료 효과*

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

김세현 · 최은창 · 이진석 · 천제영 · 변형권 · 송기재 · 김광문

= Abstract =

Therapeutic Effect of Oncolytic Herpes Simplex Virus on Induced Radioresistant Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*

Se-Heon Kim, M.D., Eun Chang Choi, M.D., Jin Seok Lee, M.D., Je Young Chun, M.D.,
Hyung Kwon Byun, M.D., Ki Jae Song, M.D., Kwang-Moon Kim, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Introduction : The sensitivity of tumor cells to radiotherapy is a critical determinant of local control and potential cure in advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). The emergence of radioresistant tumor cells is an obstacle to cancer therapy. Most radioresistant cells have a higher proportion of cells in the S-phase of the cell cycle and a lower apoptotic fraction than radiosensitive cells. HSV replication is increased in cells that have higher S-phase fractions. NV1066 is an oncolytic herpes simplex virus type-1 mutant. We hypothesized that NV1066 replication and cytotoxicity are increased in radioresistant cells. The purpose of this study is to evaluate the antitumor efficacy of NV1066 to treat radioresistant HNSCC.

Methods : Radioresistant cells were selected by treating five HNSCC cell lines with repeated conventional fractionated doses of radiation (2Gy/day), using a Cs-137 irradiator, up to a cumulative dose of 70Gy. Clonogenic cell survival and S-phase fractions were compared between radioresistant and parental radiosensitive cells. The two cell populations were then treated with NV1066 to examine viral replication, by the viral plaque assay and viral cytotoxicity.

Results : Fractionated irradiation resulted in the selection of radioresistant cells. Radioresistant cells had a higher S-phase fraction (42.9%) compared to parental cells (26.2%). NV1066 replication in radioresistant cells was 7.4 times higher than in parental cells ($p < 0.01$). Treatment with NV1066 resulted in increased cytotoxicity of 24.5% in radioresistant cells compared to parental cells ($p < 0.05$).

Conclusion : NV1066 showed increased viral replication and cytotoxicity in radioresistant HNSCC cell lines. These findings suggest a potential clinical application for this oncolytic viral therapy as treatment for radioresistant head and neck cancers.

KEY WORDS : Gene therapy · Herpes simplex virus · Radiation · Head and neck neoplasm.

서 론

진행된 두경부 종양의 주된 치료 방법은 수술과 방사선 치

료이나, 지난 30년간 수술 및 방사선 치료법의 발달에도 불구하고 환자의 생존률은 의미 있는 증가를 보이지 못했다. 치료 실패의 가장 큰 원인은 암의 국소 재발인데, 이를 좌우하는 가장 중요한 요인은 종양세포의 방사선 치료에 대한 민

*본 연구는 2005학년도 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

교신저자 : 김세현, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 2228-3600 · 전송 : (02) 393-0580 E-mail : shkimmd@yumc.yonsei.ac.kr

감도이다¹⁾. 특히 방사선 치료 도중 종양세포군에서 출현하는 방사선 치료에 내성(radioreistant)이 있는 종양세포의 존재 유무가 중요한데, 이러한 종양세포는 전이를 잘 일으킬 뿐만 아니라 추가적인 방사선 치료나 항암 치료에 잘 반응하지 않으므로, 두경부 종양의 궁극적 치료율을 떨어뜨리는 중요한 원인이 된다²⁾³⁾. 현재까지 이러한 상황에 대한 뚜렷한 치료 방법은 없으며, 기존의 치료법과는 다른 새로운 치료방법의 개발이 시급한 실정이다.

최근 두경부종양 영역에서 유전적으로 변형된 종양살상 헤르페스 바이러스를 이용한 유전자 치료에 대한 연구가 희망적인 실험결과를 보여주고 있다⁴⁻⁸⁾. 이는 종양 살상 능력이 있으며 또한 종양에 특이성이 있는 바이러스를 유전공학적으로 생성하여 암 치료에 도입하려는 시도이다. 이상적인 바이러스 모델은 다양한 암종에 작용하며, 복제가 가능하고, 독성이 적고, 항바이러스 치료를 받기 쉬워야 한다⁹⁾. 종양살상 헤르페스 바이러스는 다음과 같은 여러 장점을 가지고 있다. 첫째, 열에 민감하여 발열 시 바이러스 복제가 억제되고, 둘째, acyclovir, gancyclovir와 같은 항바이러스 제제에 감수성이 높으므로 치료 시 야기될 수 있는 바이러스의 과도 증식에 의한 부작용을 치료하기 용이하다. 셋째, 바이러스 내의 다수의 유전자 대변이로 인하여 HSV로의 자연적인 전환은 거의 되지 않으며, 넷째, 감염의 지표로 lacZ 유전자 또는 green fluorescent protein(GFP) 유전자 등을 발현하도록 조작되어 있어 바이러스의 증식을 간접적으로 확인 할 수 있다는 장점이 있다⁹⁾.

이 중 대표적인 예가 NV1066 바이러스이다. NV1066 바이러스는 헤르페스 바이러스의 일종으로 유전자 ICP0와 ICP4 및 γ 34.5 loci 유전자 부분이 소실되고, 대신 표식 유전자인 CMV-EGFP 삽입된 다변이 바이러스이다. NV1066는 한쪽 부분의 γ 34.5 loci 유전자 소실로 인하여 바이러스의 신경 독성을 없앴으나, 바이러스의 증식 능력에는 큰 변화가 없다⁹⁾.

두경부 편평세포암에서 종양 살상 헤르페스바이러스의 종양세포 살상 능력은 바이러스와 종양세포의 비율이 1 : 1일 때 즉 Multiplicity Of Infection(MOI) 1에서 90% 이상의 종양살상 능력이 있는 것으로 보고되고 있으며, 바이러스 증식에 가장 중요한 요소중의 하나는 종양세포의 세포 주기 중 S-phase 부분으로 S-phase 부분이 높은 세포주일수록 바이러스의 증식이 활성화 된다¹⁰⁾. 방사선 치료에 민감한 세포 주기는 G2/M phase이며, G1/S phase는 방사선 치료에 가장 저항성이 있는데, NV1066 바이러스는 S-phase 주기의 세포에서 증식이 왕성하게 일어나므로 두 치료는 서로 상호 보완적 관계를 가지며, 연구자 등은 방사선 치료와 종양 살상 바이러스의 병합치료가 서로 상승작용을 나타낸다는 것을 보고한 바 있다⁵⁾.

본 연구의 목적은 두경부 편평세포암종 세포주들을 이용하여, 임상적 조건과 유사한 방사선 치료(200cGy/day, Total dose of 7,000cGy) 후 생존하는 세포들을 선택하여, 두경부 편평세포암종 치료의 난제인 방사선 치료에 내성이 있는 세포에서의 NV1066 종양살상 바이러스의 치료 효과를 알아보고자 한다.

연구 방법

1. 세포주(Cell Lines) 선택 및 처치

본 연구에서는 5가지의 두경부 편평세포암종 세포주들이 사용되었다. 4가지 세포는 인간 두경부편평상피세포암종 세포주로, 2가지는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA ; SCC 15, SCC 25)에서 구입하오며, 2가지 세포주(MSKQLL1, MSKQLL2)는 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center에서, 분리하여 특성화 한 것이다. SCC VII 세포주는 미국 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center로부터 기증 받은 것으로 C3H/HeJ 쥐에서 자연적으로 발생한 편평세포암종 세포주이다. 세포주들은 37℃, 5% CO₂의 환경에서 10% fetal calf serum(FCS)이 들어 있는 minimal essential media(MEM) 배지에서 배양되었으며, 세포주에 따라 일주일에 한번 내지 두 번 계대 배양하였다.

2. 방사선치료에 대한 내성을 유도한 두경부 편평세포암 세포주들의 생성

방사선 치료에 내성이 있는 세포를 만드는 방법은 임상적 치료 환경과 최대한 유사한 방법으로 한번에 2G씩 조사한 후 살아남은 세포를 계대 배양하여 세포주에 따라 2일에서 4일 후 T-75 플라스크에서 세포의 밀도가 50%정도 되는 증식기에 다시 2G의 방사선 조사를 계속하는 방법으로 5개 세포주에서 모두 총 35회에 걸쳐 전부 7,000cGy를 조사 하였으며, 살아남은 세포를 실험에 이용하였다. 이렇게 하여 얻어진 세포주들은 모세포와 구분하기 위하여 각각 RR-SCC15, RR-SCC25, RR-MSKQLL1, RR-MSKQLL2, RR-SCCV II로 표기 하고자 한다.

3. NV1066 바이러스의 제조

NV1066 바이러스는 헤르페스 바이러스의 일종으로 유전자 ICP0와 ICP4 및 γ 34.5 loci 유전자 부분이 소실되고, 대신 표식 유전자인 CMV-EGFP 삽입된 다변이 바이러스이다. 바이러스의 증식이 활발히 일어나는 아프리카 green monkey의 신장세포(Vero cell ; ATCC)에서 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 이용하여 바이러스를 배양한다. 바이러스의 정량화는 Vero 세포주에서의 플라크형성 단위(plaque forming unit, pfu)에 근거하여 시행하였으며, 사용할 때까지 -80℃에 보관한다. G207 바이러스는 Memo-

rial Sloan-Ketterin Cancer Center의 Surgical Oncology Laboratory에서 기증 받았다.

3. MTT 세포독성 연구(Cytotoxicity Assay)

종양세포의 살상능력을 분석 하는데 있어 단순히 혈구 측정기를 이용하여 Trypan blue 염색을 하여 생존해 있는 세포를 계수할 수 있으나 이것은 주관적이며, 아치사의 손상을 입은 세포의 상태를 정확히 대변할 수 없으므로 본 실험에서는 MTT(3-(4,5-Dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-Diphenyl tetrazolium Bromide, SIGMA #2128) cytotoxicity assay를 시행하였다. 편평한 96-well 용기(Falcon Plastics, 3075)에 $200\mu\text{l}$ 의 부피로 5×10^3 개의 종양 세포를 각 실험군에 따라 이식하며, 약 12~18시간 배양 후 세포가 안전하게 세포배양 용기에 착상된 것을 확인하였다. 필요한 실험별로 세포를 처치 후 의도된 시간에 상층액을 제거하고 인산완충용액을 이용하여 세척 후, MTT($50\mu\text{g}$ MTT/ $200\mu\text{l}$)가 섞인 배양액을 넣고 4~6시간 배양하였다. 이때 실험 군을 5개의 두경부편평세포암종 세포주별로 2가지로 나누어 각각에 대한 NV1066바이러스의 종양살상 효과를 측정하였다. 각 군의 구성은 대조군, 즉 아무런 처치를 하지 않은 두경부 편평세포암종 세포주에서 NV1066 바이러스를 처치한 군과 실험군인 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세

포주에서 NV1066 바이러스를 처치한 군으로 나누어지며, 각 그룹에 있어서 생존 세포의 비율을 Day 4에 MOI(multiplicity of infection) of 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2에서 각각 측정하여 비교하였다. MTT는 살아있는 세포에서 Mitochondrial dehydrogenase에 의하여 보라색의 결정체를 형성하므로, 상층액 제거 후, 결정을 DMSO로 용해 시켜 그 농도를 Spectrophotometry를 이용하여 520nm 파장에서 분석하였으며, 각 실험은 4회 반복 실시하였다.

4. *in vitro* 바이러스 배양 연구(Viral Proliferation Assay)

대조군인 방사선을 조사하지 않은 5개의 두경부 편평세포암종 세포주(SCC15, SCC25, MSKQLL1, MSKQLL2, SCCVII) 군과 7,000cGy 실험군인 방사선을 조사한 후 생존한 방사선 치료에 내성이 유도된 5개의 두경부 편평세포암종 세포주 군(RR-SCC15, RR-SCC25, RR-MSKQLL1, RR-MSKQLL2, RR-SCCVII)에서 G207 바이러스의 증식 정도의 차이를 알아보기 위하여, NV1066바이러스 처치 4일 후(Day 4) 세포와 배양액을 수집하였다. 수집된 배양액 및 세포를 동결 및 해동 작업을 3~4회 실시하여 세포막을 붕괴시켜 세포 내 헤르페스바이러스를 유리시킨 다음 배양액을 -80°C 에 보관 하였다. NV1066 바이러스에 민감한 Vero 세포를 6개의 용기(6 well plate, Costar)에 한 용기 당 1×10^6 개의 세포밀

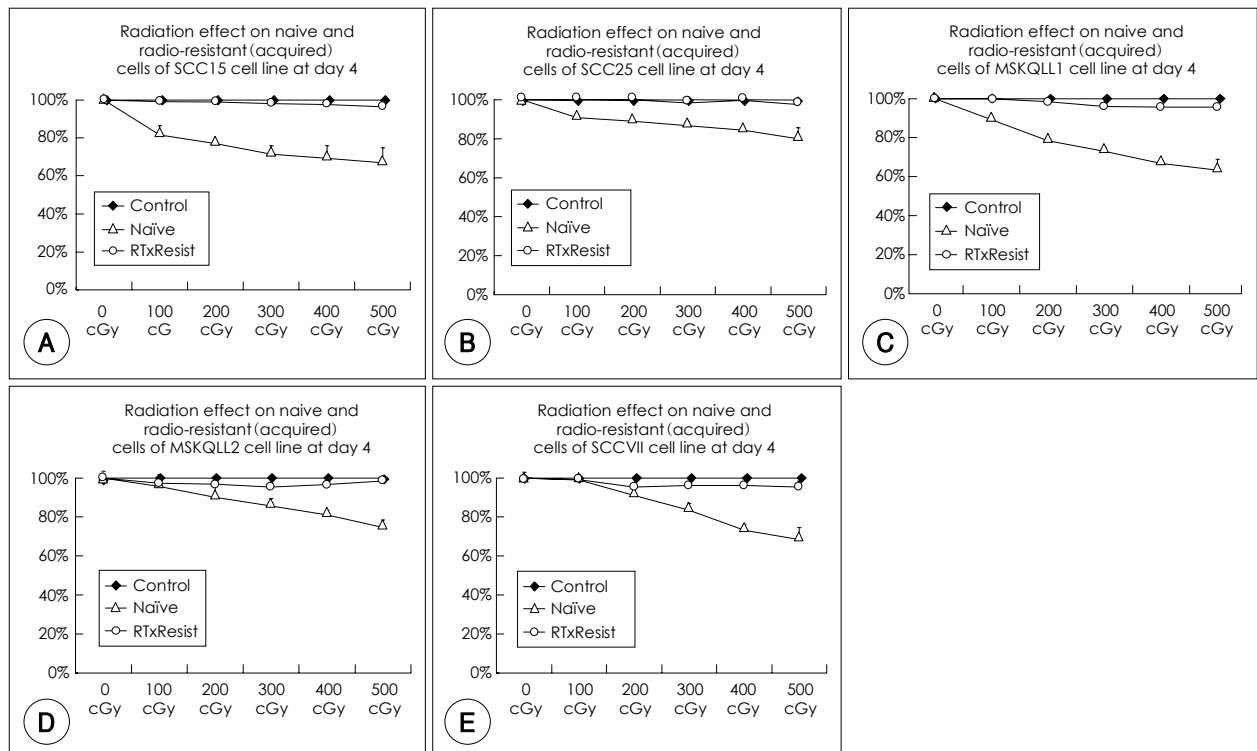


Fig. 1. Clonogenic cell survival between parent and radio-resistant cell lines after radiation Tx. A : SCC15 vs RR-SCC15, B : SCC25 vs RR-SCC25, C : MSK QLL1 vs RR-MSKQLL1, D : MSK QLL2 vs RR-MSK QLL2, E : SCCVII vs RR-SCCVII. Radioresistant cells were selected by treating five HNSCC cell lines with repeated conventional fractionated doses of radiation (2Gy/day), using a Cs-137 irradiator, up to a cumulative dose of 70Gy. Fractionated irradiation resulted in the selection of radioresistant cells. RR-SCC15 : Radio-Resistant SCC15, RR-SCC25 : Radio-Resistant SCC25, RR-MSKQLL1 : Radio-Resistant MSKQLL1, RR-MSKQLL2 : Radio-Resistant MSKQLL2, RR-SCCVII : Radio-Resistant SCCVII.

도로 이식하고 24시간 배양하였고, 인산완충용액으로 세척 후, 실험 전 얼음 속에서 서서히 녹인 배양액 샘플을 일정 비율의 농도로 희석 후 Vero 세포에 감염시켰다. 2시간 배양 후 2ml의 DME agarous 혼합 배지를 첨가하고, 2일간 배양하였다. 2ml의 Neutral red solution(Sigma N2889)을 첨가 후 빛을 차단한 상태에서 2일간 배양하고, 각 세포주별로 바이러스의 플라크(plaque) 숫자를 세는 방법을 이용하였다.

결 과

1. 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세포주와 원(naive) 모세포(parent cell) 간 방사선 치료에 대한 민감도 비교

임상적 치료 환경과 최대한 유사한 방법으로 2G/day 씩 조사하여 살아남은 세포를 선택하는 방법으로 35회에 걸쳐 전부 7,000cGy를 조사한 후 살아남은 세포를 선택하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 세포주를 가지고 100cGy, 200cGy, 300cGy, 400cGy, 500cGy의 방사선을 각각 조사한 뒤 방

사선에 대한 민감도를 측정하였다. 500cGy 방사선 조사 4일 후 SCC15의 66%만이 생존하였으나, RR-SCC15은 96%가 생존하였다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 SCC25는 81%, MSKQLL1은 68%, MSKQLL2는 74%, SCCVII은 68%가 생존한 반면, RR-SCC25는 95%, RR-MSKQLL1은 95%, RR-MSKQLL2는 98%, RR-SCCVII은 95%가 생존하여 모세포 보다 월등하게 방사선 치료에 대한 내성을 보였다(Fig. 1).

2. 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세포주와 원(naive) 모세포(parent cell) 간 방사선 조사 후 세포고사의 정도 비교 및 세포 주기(cell cycle) 비교

증식기의 모세포의 경우 세포주기 중 S-phase를 차지하는 세포의 비중이 SCC15에서는 33%였으나, 증식기의 RR-SCC15의 경우는 S-phase를 차지하는 세포의 비중이 48%로 증가되어 있었다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 SCC25는 31%, MSKQLL1은 30%, MSKQLL2는 30%의 S-phase를 보인 반면, RR-SCC25는 42%, RR-MSKQLL1은 40%, RR-MSKQLL2는 37%

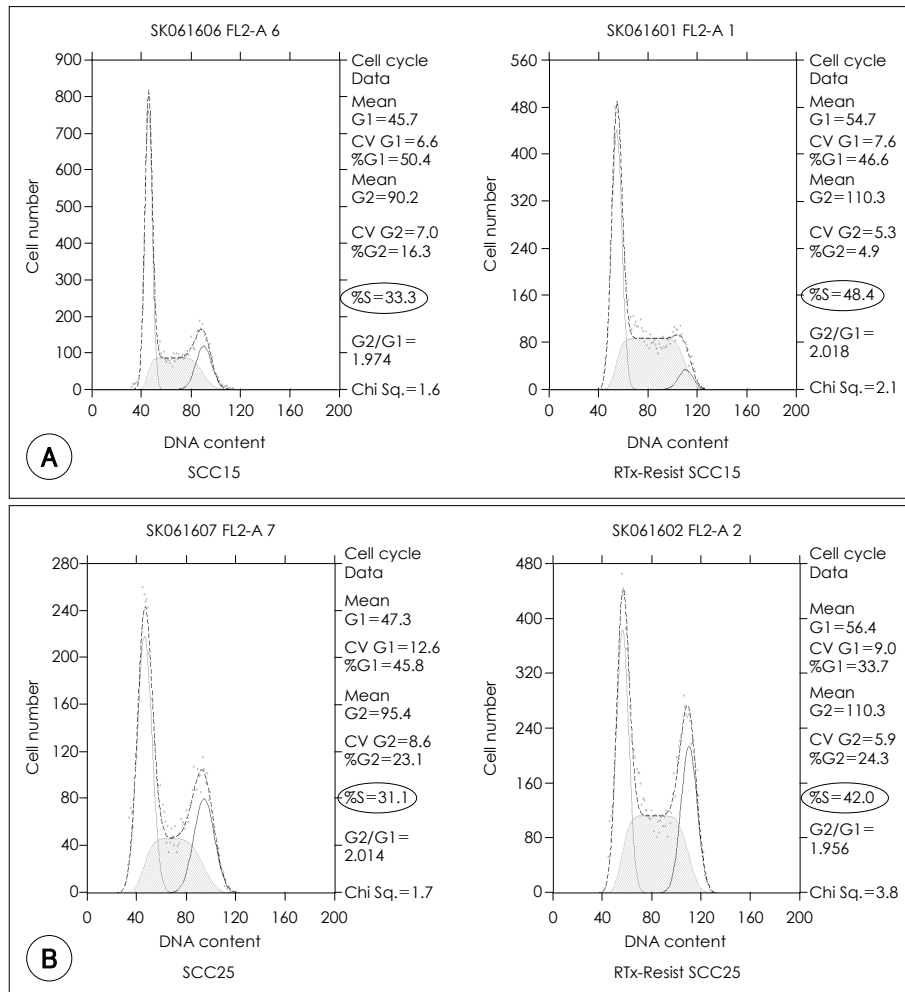


Fig. 2. Compare the cell cycle between parent and radio-resistant cell lines by flow cytometry. A : SCC15 vs RR-SCC15, B : SCC25 vs RR-SCC25. Radioresistant cells had a higher S-phase fraction (Average : 42.9%) compared to parental cells (Average : 26.2%).

의 S-phase을 보여 방사선 치료에 내성이 있는 세포주에서. 모세포 보다 월등하게 S-phase의 부분이 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

3. 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세포주와 원(naive) 모세포(parent cell) 간 NV1066 종양살상 바이러스를 이용한 유전자 치료 효과

5개의 세포주를 대상으로 아무런 처치를 하지않은 모세포와 방사선 치료에 내성을 유도한 세포주들에 대한 NV1066의 치료 효과를 비교하였다. MOI를 MOI=0.05, MOI=0.1, MOI=0.5, MOI=1, MOI=2로 달리하여 바이러스를 감염시켰으며, 4일 후 각각의 세포주에서 세포의 생존율을 비교하였다. MOI=0.1로 바이러스를 감염시킨 4일 후 SCC25의 91%가 생존하였으나, RR-SCC25는 45%만이 생존하였다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 SCC15는 36%, MSKQLL1은 95%, MSKQLL2는 31%, SCCVII은 99%가 생존한 반면, RR-SCC15는 17%, RR-MSKQLL1은 68%, RR-MSKQLL2는 12%, RR-SCCVII은 82%만이 생존하여 모세포 보다 월등하게 NV1066의 치료에 대한 민감도가 증가하였다. 이와 같은 현상은 좀더 높은 MOI인 MOI=1에서도 비슷한 결과를 보였는데, MOI=1로 바이러

스를 감염시킨 4일 후 SCC25의 50%가 생존하였으나, RR-SCC25는 21%만이 생존하였다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 SCC15는 6%, MSKQLL1은 51%, MSKQLL2는 11%, SCCVII은 70%가 생존한 반면, RR-SCC15는 2%, RR-MSKQLL1은 25%, RR-MSKQLL2는 6%, RR-SCCVII은 45%만이 생존하여, 여러 비율의 MOI에서 모두 NV1066의 치료에 대한 민감도가 증가함을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

4. 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세포주와 원(naive) 모세포(parent cell) 간 NV1066 종양살상 바이러스의 증식 능력 비교(direct viral titrating)

연구자 등은 방사선 치료에 내성이 유발된 두경부 편평세포암 세포주에서 NV1066 바이러스의 종양살상 능력이 의미 있게 증가함을 관찰 할 수 있었다. 이와 같은 실험 결과를 토대로 과연 바이러스의 증식이 얼마만큼 증가 되었는지를 각각의 세포주들을 MOI=0.01로 감염 시키고 48시간 후 viral titrating 방법으로 바이러스의 수를 정량적으로 분석하여 비교하여 보았다.

RR-SCC25는 모세포인 SCC25에 비해 바이러스의 수가 8.1배 증가 되어 있었다. RR-SCC15는 모세포인 SCC15에

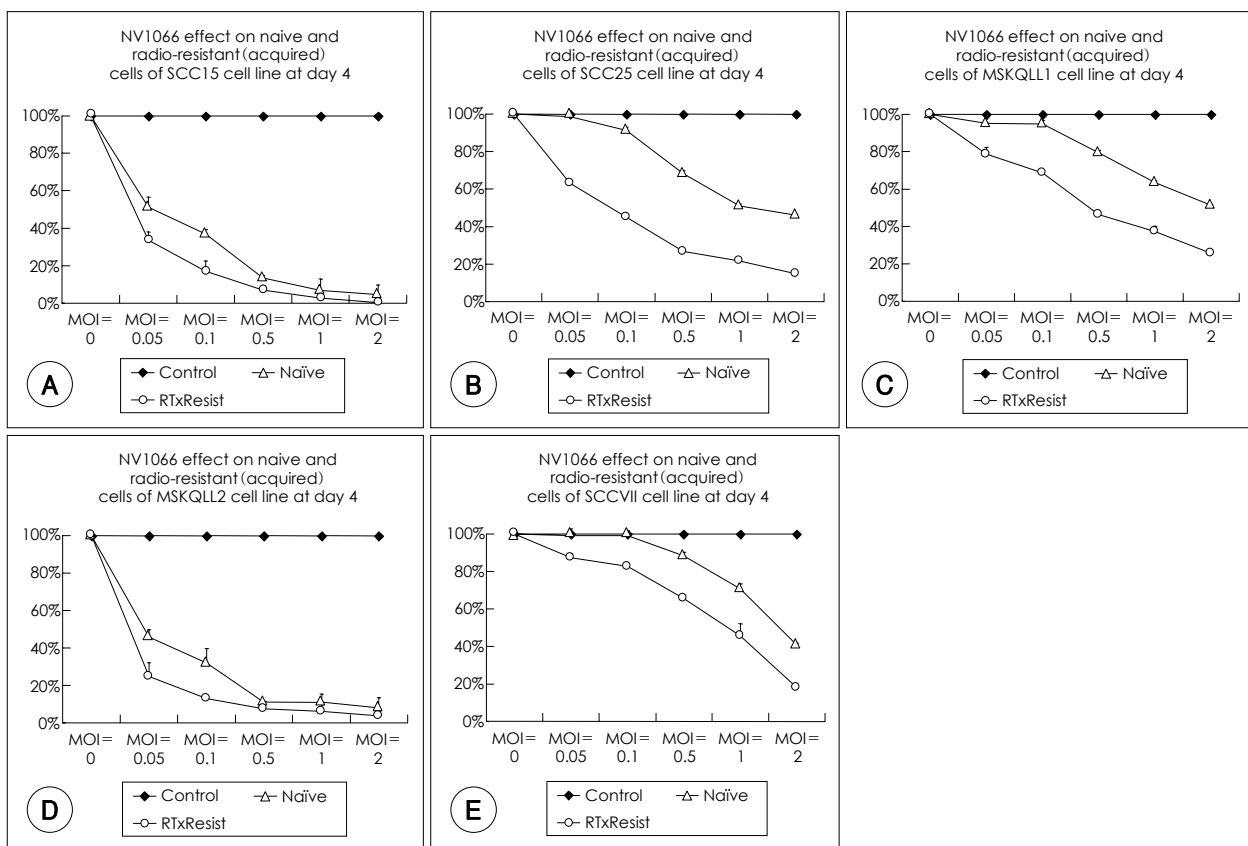


Fig. 3. Compare the sensitivity to the oncolytic virus between parent and radio-resistant cell lines by in vitro cytotoxicity assay. A : SCC15 vs RR-SCC15, B : SCC25 vs RR-SCC25, C : MSK QLL1 vs RR-MSKQLL1, D : MSK QLL2 vs RR-MSK QLL2, E : SCCVII vs RR-SCCVII. Treatment with NV1066 resulted in increased cytotoxicity of 24.5% in radioresistant cells compared to parental cells ($p < 0.05$).

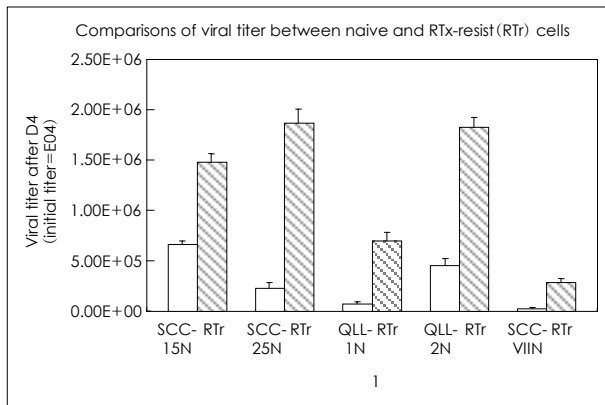


Fig. 4. Compare the viral proliferation between parent and radioresistant cell lines by viral titrating assay. NV1066 replication in radioresistant cells was average 7.4 times higher than in parental cells ($p < 0.01$).

비해 바이러스의 수가 2.2배, RR-MSKQLL1은 모세포인 MSKQLL1에 비해 바이러스의 수가 9.7배, RR-MSKQLL2는 모세포인 MSKQLL2에 비해 바이러스의 수가 4.0배, RR-SCCVII은 모세포인 SCCVII에 비해 바이러스의 수가 12.9배 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고찰

두경부 편평세포암 치료의 주된 실패 원인은 방사선 치료에 저항이 있거나 내성이 유발된 세포의 존재이다. 이들은 치료 후 미세 잔존암으로 남아 있다. 원발 병소의 재발 및 국소전이율 유발하고 환자의 생존율에 결정적 역할을 한다. 특히 방사선 치료 도중 종양세포군에서 출현하는 방사선 치료에 내성(radioresistant)이 있는 종양세포의 존재 유무가 중요한데, 이러한 종양세포는 전이를 잘 일으킬 뿐만 아니라 추가적인 방사선 치료나 항암 치료에 잘 반응하지 않으므로, 두경부 종양의 궁극적 치료율을 떨어뜨리는 중요한 원인이 된다²³⁾. 아직까지 이러한 상황에 대한 뚜렷한 치료 방법이 없는 상태로, 연구자들은 유전자 조작에 의해 만들어진 종양살상 헤르페스 바이러스인 NV1066를 가지고 인위적으로 방사선 치료에 내성을 유도한 두경부 편평세포암종 세포주들에 대한 치료효과를 관찰하였다.

방사선 치료에 내성이 있는 세포를 만드는 방법은 임상적 치료 환경과 최대한 유사한 방법으로 한번에 2G씩 조사한 후 살아남은 세포를 계대 배양하여 세포주에 따라 2일에서 4일 후 T-75 플라스크에서 세포의 밀도가 50% 정도 되는 증식기에 다시 2G의 방사선 조사를 계속하는 방법으로 5개 세포주에서 모두 총 35회에 걸쳐 전부 7,000cGy를 조사하였으며, 살아남은 세포를 실험에 이용하였다. 이러한 방법은 종양세포의 방사선에 대한 민감도를 측정하는데 유효하며, 일시에 7,000cGy를 조사하는 방법보다 종양세포의 Reassortment,

Repair, Repopulation과 Recruitment 현상을 유발한다는 점에서 임상적 환경과 유사하며, 방사선 치료에 내성이 있는 세포를 선택적으로 취하는데 유용한 방법이다¹¹⁾¹²⁾. 이렇게 하여 방사선 치료에 내성을 유도한 세포주들을 만들어 실질적으로 방사선 치료에 내성이 생긴 것인지를 검증한 결과 500 cGy 조사 4일 후 95~98%의 생존율을 보였으며 이는 같은 조건에서 68~81%의 생존율을 보인 모세포보다 의미 있게 방사선 치료에 대해 저항성이 생겼음을 확인할 수 있었다.

문헌 보고에 의하면 방사선 치료에 잘 반응하지 않는 종양세포는 방사선 조사 후 세포 고사가 잘 일어나지 않으며, 세포 주기 중 S-phase의 부분이 많다고 한다¹³⁾. NV1066의 증식이 세포고사가 잘 일어나지 않으며 세포주기 중 S-phase의 부분이 많은 세포에서 잘 일어난다는 사실은 이미 밝혀져 있다¹⁰⁾¹⁴⁾. 이는 앞서 언급한 바와 같이 종양살상 헤르페스 바이러스인 NV1066의 증식에 매우 유리한 조건이다. 연구자들은 방사선 치료에 내성을 유도한 두경부 편평세포암종 세포주와 그것의 원 모세포와의 세포 주기를 비교하였으며, 증식기의 모세포의 경우 세포주기 중 S-phase를 차지하는 세포의 비중이 SCC15에서는 33%였으나, 증식기의 RR-SCC15의 경우는 S-phase를 차지하는 세포의 비중이 48%로 증가되어 있었다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 방사선 치료에 내성이 있는 세포주에서 모세포보다 월등하게 S-phase의 부분이 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 방사선 치료에 내성을 유도한 세포주들에서 S-phase가 증가함으로써 종양살상 헤르페스 바이러스 증식에 필요한 조건을 제공하여 NV1066의 종양세포 살상 능력을 증가시킬 수 있다고 생각할 수 있다.

5개의 세포주를 대상으로 모세포와 방사선 치료에 내성을 유도한 세포주들에 대한 NV1066의 치료 효과를 비교하기 위하여, 각각의 세포주에서 세포의 생존율을 비교하였다. MOI=0.1로 바이러스를 감염시킨 4일 후 SCC25의 91%가 생존하였으나, RR-SCC25은 45%만이 생존하였다. 나머지 4세포주에서도 비슷한 결과를 보였는데 같은 조건에서 SCC15는 36%, MSKQLL1은 95%, MSKQLL2는 31%, SCCVII은 99%가 생존한 반면, RR-SCC15는 17%, RR-MSKQLL1은 68%, RR-MSKQLL2는 12%, RR-SCCVII은 82%만이 생존하여 모세포보다 월등하게 NV1066의 치료에 대한 민감도가 증가하였다. 이와 같은 연구 결과는 다음과 같이 해석할 수 있다. 방사선 치료는 주로 세포 고사의 유발이 주된 세포사의 기전이나 NV1066 바이러스는 세포고사의 기전과는 상관 없이 감염된 세포를 살상시키며 오히려 세포고사가 일어나지 않는 세포에서 더 증식이 왕성하게 일어난다¹⁴⁾. 또한 방사선 치료에 민감한 세포주기는 G2/M phase이며, G1/S phase는 방사선 치료에 가장 저항성이 있는데, NV1066 바이러스는 S-phase 주기의 세포에서 증식이 왕성하게 일어

나므로 두 치료는 서로 상호 보완적 관계를 가지며, 이러한 이론적 근거로 연구자 등은 방사선 치료와 종양 살상 바이러스의 병합치료가 서로 상승작용을 나타낸다는 것을 보고한 바 있다⁵⁾.

결 론

이상의 결과를 종합하여 보면 방사선 치료에 내성을 유도한 두경부 편평세포암종 세포주들은 임상적으로 쓰이는 방사선 용량의 치료에 의미있게 증가된 내성을 보였으며, 세포주기 중 s-phase의 부분이 상승되어 있었다. 이는 NV1066 바이러스의 증식에 좋은 환경을 제공해 주는 것이며, 실험결과 모세포 보다 방사선 치료에 내성을 유도한 두경부 편평세포암종 세포주들이 NV1066 바이러스 치료에 의미 있게 민감한 반응을 보였다. 연구자 등은 기존의 연구 결과를 근거로 방사선 치료에 내성이 있는 두경부 편평세포암종 세포주에서 종양살상 NV1066 바이러스의 유전자 치료가 효과적이라는 가설을 검증하였고, 이는 기존 치료 방법의 주된 실패 원인을 해결하는 새로운 치료법으로 자리 매김 할 수 있으리라 기대하며, 궁극적으로 두경부편평세포암종 환자의 생존율을 높이는 새로운 치료법으로서의 가능성을 보여주었다고 생각한다.

중심 단어 : 두경부종양 · 유전자치료 · 종양살상 헤르페스 바이러스 · 방사선치료.

References

- 1) Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier JW, Hars VI: *Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer N. Engl J Med.* 1998;338:1798-1804
- 2) Girinsky T, Lubin R, Pignon JP, Chavaudra N, Gazeau J, Dubray B: *Predictive value of in vitro radiosensitivity parameters in head and neck cancers and cervical carcinomas: preliminary correlations with local control and overall survival. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;25:147-148
- 3) West CM, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD: *Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. Br J Cancer.* 1993;68:819-823
- 4) Kim SH, Carew JF, Kooby DA, et al: *Combination gene therapy using multiple immunomodulatory genes transferred by a defective infectious single-cycle herpes virus in squamous cell cancer. Cancer Gene Ther.* 2000;7:1279-1285
- 5) Kim SH, Wong RJ, Kooby DA, et al: *Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Cancer.* 2005;41 (2):313-322
- 6) Carew JF, Kooby DA, Halterman MW, Federoff HJ, Fong Y: *Selective infection and cytolysis of human head and neck squamous cell carcinoma with sparing of normal mucosa by a cytotoxic herpes simplex virus type 1 (G207). Hum Gene Ther.* 1999;10:1599-1606
- 7) Wong RJ, Kim SH, Joe JK, Shah JP, Johnson PA, Fong Y: *Effective treatment of head and neck squamous cell carcinoma by an oncolytic herpes simplex virus. J Am Coll Surg.* 2001;193:12-21
- 8) Wong RJ, Joe JK, Kim SH, Shah JP, Horsburgh B, Fong Y: *Oncolytic herpesvirus effectively treats murine squamous cell carcinoma and spreads by natural lymphatics to treat sites of lymphatic metastases. Hum Gene Ther.* 2002;13:1213-1223
- 9) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL: *Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. Nature Med.* 1995;1:938-943
- 10) Kooby DA, Carew JF, Halterman MW, et al: *Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). FASEB.* 1999;13:1325-1334
- 11) Pearce AG, Segura TM, Rintala AC, Rintala-Maki ND, Lee H: *The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells. Radiat Res.* 2001;156 (6):739-750
- 12) Lambin P, Malaise EP, Joiner MC: *Might intrinsic radioresistance of human tumour cells be induced by radiation? Int J Radiat Biol.* 1996;69 (3):279-290
- 13) Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J: *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. Nature Gen.* 2002;30:290-294
- 14) Schang LM, Philips J, Schaffer PA: *Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. J Virol.* 1998;72 (7):5626-5637