

KAERI/RR-1400/94

망막아세포종 세포주에 Rb-1 유전자 이입

KAERI

韓國原子力研究所

제 출 문

소 장 귀하

본 보고서를 “ 망막아세포종 세포주에 Rb-1 유전자 이입 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1994 년 12 월 19 일

연구실명: 소 아 과

연구책임자: 최 상 욱

연구원: 함 용 호

김 미 희

감수 위원: 유 상 렬

요 약 문

I. 제 목

망막아세포종 세포주에 Rb-1 유전자 이입

II. 연구의 목적 및 중요성

Rb-1 유전자 변성에 의한 Rb 단백질의 비활성화가 망막아세포종 발생에 결정적인 역할을 하므로 이 Rb-1 유전자를 망막아세포종 세포주에 in vitro transfer 하여 종양발생을 억제하고자 한다.

III. 연구의 내용 및 범위

- 1) 세포주 구입 및 배양: Y-79 (ATCC No: HTB-18, Human retinoblastoma) 와 WERI-Rb-1 (ATCC No: HTB-169, Human retinoblastoma) 세포주를 각각 RPMI 1640 배지와 우태혈청에서 배양한다.
- 2) Viral vector (pLRbRNL) 준비
- 3) packaging cell line 에 viral vector transfection 한다.
- 4) 망막아세포종 세포주에 virus transduction

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

Rb vector 를 Ca-P 방법을 사용하여 packaging cell line 인 CRIP 에 transfection 시켰으며 G-418 내성 clone 을 ring cloning 으로 selection 하였다. 모두 19 개의 clone 을 얻을 수 있었으며 각각을 배양시켰다. 이 중 high titer의 virus 를 생산할 수 있는 clone 을 찾기 위하여 NIH3T3 cells 에 transduction 시켜 colony count 한 결과 high(218), middle(127), low(6) 의 결과를 얻을 수 있었다. 이 중 high titer 인 CRIPRb2-5(colony count 218) 의 상층액을 망막아세포종 세포주에 transduction 시켰다.

SUMMARY

I. Project Title

In vitro Rb-1 gene transfer to retinoblastoma cell lines

II. Objective and Importance of the Project

The inactivation of Rb protein produced by mutation of Rb-1 gene is a critical step in the tumorigenesis of retinoblastoma. Therefore we tried to inhibit the tumorigenicity by transferring the Rb-1 gene to retinoblastoma cell lines. With this result we can treat the retinoblastoma patients who relapsed with conventional therapy or bilateral diseases.

III. Scope and Contents of the Project

- 1) Prepare the retinoblastoma cell lines(Y-79 and WERI-Rb-1) and subculture in the RPMI 1640 medium and fetal bovine serum
- 2) prepare the viral vector(pLRbRNL)
- 3) viral vector transfection to packaging cell line
- 4) virus transduction to retinoblastoma cell lines

IV. Results and Proposal for Applications

After transfection of the Rb-vector to packaging cell line(CRIP) by Ca-P precipitation method, we could select nineteen colonies of G-418 resistant clone by ring cloning. Each colony was transduced to NIH3T3 cells to select the one which produces high titer virus. After NIH3T3 cell transduction, we could get 218 colony counts for high, 127 for middle, and 6 for low viral titer. With the supernatant of the high viral titer colony(CRIPRb2-5), we could transduce retinoblastoma cell lines.

목 차

제 1 장 서 론 1

제 2 장 본 론 2

제 1 절 운영내용 및 방법 2

제 2 절 운영결과 및 고찰 4

제 3 장 결론 및 건의사항 6

참 고 문 헌

제 1 장 서 론

망막아세포종은 소아에 발생하는 안구내 종양중 가장 많은 빈도를 차지하는 악성 종양이다. 이 종양은 5 세 이전에 대부분이 진단되어 병원을 찾게되며 일반적으로 치료에 잘 반응하여 생존율이 높다. 그러나 이미 종양이 시신경을 지나 중추신경계를 침범하거나 전신적인 전이가 있을 경우 혹은 양안에 동시에 발생한 경우는 치료가 불가능할 경우가 많다. 이 질환은 40 % 가 유전적으로 양안에 발생하는 경향이 있으나 germ line mutation 이 아니더라도 질병은 양안을 침범할 수 있다. 이 질환의 분자적 병인론으로 염색체 13q14 에 위치하는 Rb-1 유전자의 변성이 알려진 후 이 유전자를 분리하여 구조와 기능을 밝히고 이 유전자 변성이 발암과정에 기여함도 알 수 있게 되었다(Friend et al., 1986; Gallie et al., 1991). 즉 이 유전자의 4.7-kb mRNA transcript 가 소실되거나 변성되어 있음을 발견하였고 더우기 이 유전자내의 소실도 찾을 수 있었다(Lee et al., 1987). 반면 인체의 발암기전에는 다수의 유전적 변성이 관여하고 있음이 밝혀졌으나(Peto et al., 1990), 유독 망막아세포종에서는 오직 하나의 유전자 변성만이 알려져있다(Stanbridge, 1992). 따라서 이 유전자를 암세포에 이입하여 망막아세포종을 치료할 수 있을것 으로 생각되어 이 실험을 시작하였으며 최근 nude mouse 의 안구, anterior chamber 에 이 유전자를 투입한 암세포의 성장이 억제되는 보고와(Madreperla et al., 1991), 실험적 뇌종양 모델의 치료로 retroviral producing cell 을 사용하여 gene transfer 한 보고(Culver et al., 1992)가 있어 더욱 가능성이 높으리라 사료된다.

제 2 장 본 론

제 1 절 운영내용 및 방법

1. 세포주 구입 및 배양

Y-79(ATCC No: HTB-18, Human retinoblastoma) and WERI-Rb-1(ATCC No: HTB-169, Human retinoblastoma) 를 American type culture collection 에서 구입하여 RPMI 1640 배지와 우태혈청으로 37° C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. Retroviral vector 준비

Molony murine leukemia virus 의 gag, pol, env 유전자 대신 Rb cDNA 와 selectable marker 유전자인 neomycin 내성유전자(Neo^r) 을 삽입하여 재조합한 것이다. 즉 retrovirus 의 5' LTR(long terminal repeat) 이 Rb cDNA 유전자를 promote 하고 Rous sarcoma virus promoter 는 Neo^r 유전자를 promote 하도록 설계되어 있다. Neo^r 유전자를 획득한 세포는 neomycin analogue 인 G-418(geneticin, GIBCO-BRL사) 에 내성을 획득하므로 이 특성을 이용하여 Rb 유전자 이입 후 G-418 에 내성을 획득한 Rb 유전자가 이입 된 세포만 생존하므로 selection 이 가능하다.

3. Packaging cell line 에 viral vector transfection

Rb 유전자를 재조합한 retrovirus 를 포함하고 있는 plasmid 를 (pLRbRNL) packaging cell line 인 CRIP 에 transfection 시키는데 Ca-P method 를 사용한다.

가. CRIP cell 을 함유하는 10 cm dish 4 개를 준비하여 약 2 주간 배양한다.

나. transfection 하기 3 시간전에 media change

다. 4 개 dish 당 2 ml 의 Ca-P-DNA 를 준비한다.

- 라. 10 x HBS soln, transfection Q water 와 NaOH 를 섞어 2 ml 가 되게 한다.
- 마. 두개의 시험관 tube 를 준비하고 각각 a, b 라고 명명한다.
- 바. a 에는 phosphate soln 과 1 x HBS 를 넣고 b 에는 carrier DNA, plasmid DNA 및 Q water 를 넣는다.
- 사. b 에 Ca soln 을 두번에 나누어 잘 섞이게 투입한다.
- 아. a 에 1 ml tube 로 air bubbling 하면서 b 의 내용물을 섞는다.
- 자. 상온에 20 분간 둔다.
- 차. 1 ml 씩 을 각각의 petri dish 에 넣은 후 10-12 시간 배양한다.

4. Viral titer assay

- 가. NIH3T3 cell 을 dish 당 1×10^5 cell 이 되게 준비한다.
- 나. 상층액 1.5 ml 에 media 를 섞어 전부 2.5 ml 가 되게 한다.
- 다. 4°C 에서 5 분간 1000 rpm 으로 원심분리한다.
- 라. 0.45 um filter 한 후 얼음에 보관한다.
- 마. 1:1000 polybrene 2.5 ml 씩 투여한다.
- 바. NIH3T3 cell 의 media 를 제거하고 상층액과 polybrene mixture 를 투여한다.
- 사. 37°C , 2 시간 배양한 후 7.5 ml 의 media 를 추가한다.
- 아. 2 일간 배양한다.
- 자. trypsinize 하고 split 1:10 한 후 G-418 600 ug/ml media 로 selection 한다.
- 차. 성장시킨 후 giemsa stain 하여 colony 를 count 한다.
- 아. $(\text{colony count/vol. of supernatant}) \times 10/4 = \text{viral titer}(\text{cfu/ml})$

- 5. 망막아세포종 세포주에 viral titer 가 가장 높은 colony 의 상층액으로 transduction 시킨다.

제 2 절 운영결과 및 고찰

1. 운영결과

- 가. Rb vector(Fig. 1) 를 Ca-P 방법을 사용하여 packaging cell line 인 CRIP 에 transfection 시켰으며 G-418 내성 clone 을 ring cloning 방법으로 selection 하였다. 이 결과 모두 19 개의 colony 를 얻을 수 있었다(Fig. 2, 3, 4).
- 나. 이 중 high titer 의 virus 를 생산하는 colony 를 찾기 위하여 NIH3T3 cells 에 transduction 시켜 colony count 한 결과 high(218), middle(127), low(6) 의 세 colony 를 얻을 수 있었다(Fig. 5).
- 다. high titer 인 colony forming unit 218 의 상층액으로 망막아세포종 세포주에 transduction 시켰다.

2. 고찰

다른 악성 종양과 비교하면 일차성 안구내 종양은 드물다. 또한 가장 흔한 안구내 종양은 uveal melanoma 와 망막아세포종으로 알려져 있다. 이 중 uveal melanoma 는 대부분이 성인에서 보고되나 망막아세포종은 오직 신생아나 소아에서 보고된다. 이 종양은 망막에서 기원하며 망막세포는 2-3 세가 되면 완전히 분화하여 망막아세포종은 older children 이나 성인에서는 발생되지 않기 때문이다(Horsthemke, 1992). 망막아세포종의 발생과 염색체 13q14 에 위치하는 Rb 유전자의 변성이 관련 있음이 보고되고(Friend et al., 1986; Gallie et al., 1991) 이 유전자가 만들어내는 110 kd nuclear phosphoprotein 이 세포증식을 억제하는 기능이 있음이 밝혀졌다(Sager, 1989). 즉 Rb 유전자는 종양억제 유전자로 작용하지만 이 유전자외의 다른 종양억제 유전자는 밝혀지지 않고 있다(Stanbridge, 1992). 이러한 사실은 인간종양의 발생기전에 다른 여러가지 종양억제 인자가 작용하고 있는 multistep or multi-hit carcinogenesis 학설(Peto et al., 1990) 에는 적용되지 않는 현상이다. 따라서 이 Rb 유전자를 망막아세포종 세포주에 이입하여 종양발생을 억제하여 궁극적으로 종양이 발생한 환자에게 치료적 응용을 할 수 있으리라 사료된다. Huang 등은(Huang et

al., 1988) 망막아세포종 세포주인 WERI-Rb27 과 osteosarcoma 세포주인 Saos-2 에 Rb 유전자를 부여하여 이 유전자의 기능을 관찰하였다. 우선 이들은 두개의 amphotropic retrovirus 를 만들었는데 하나는 Rous sarcoma virus promoter 의 조절을 받는 neomycin 내성 유전자와 moloney murine leukemia virus 의 long terminal repeat 의 조절을 받는 Rb cDNA 를 recombinant 시킨 곳과 다른 하나는 control 로 Rb cDNA 대신 Lux 를 대치시킨것이다. 대조군과 비교하여 Rb 유전자가 이입된 세포주에서 6 배 많은 soft agar colony 를 형성하였으며 cell viability test 상 Lux 는 nude mouse 에서 5/5, 2/2 의 종양발생을 보였으나 Rb 를 부여안 경우 0/5, 0/2 로 종양발생을 관찰할 수 없었다. 즉 Rb gene 은 endogeneous Rb 유전자가 불활성화 되어 있는 세포주들에서 종양발생을 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 Madreperla 등은(Madreperla et al., 1991) retroviral transduction 으로 Rb expression 을 회복한 망막아세포종 세포의 tumorigenicity 를 관찰하였다. 이 종양 세포를 severe combined immunodeficient mouse 의 안구, anterior chamber 에 주입 하였으며 그 결과 Rb expressing 망막아세포종 세포는 종양을 형성하지 못하였으나 Rb-negative 인 WERI-Rb27 은 급속히 종양을 형성하였다. 즉 Rb 유전자 불활성화가 망막아세포종의 성장에 결정적임을 시사하였다. 여기에 근거를 두고 성인의 종양인 prostate carcinoma 세포주에 retrovirus-mediated gene transfer 로 Rb expression 을 회복시킨 결과 이 세포주의 배양상에서는 성장속도가 변하지 않았으나 nude mice 에서 종양을 형성하지 못하였다 (Bookstein et al., 1990). 이러한 결과에 근거하여 망막아세포종 세포주인 WERI-RB-1 과 Y-79 를 대상으로 Rb cDNA recombined retroviral vector 를 사용한 in vivo gene transfer 를 시도하였다. 그러나 retrovirus 가 안전하고 modification 이 가능하여 helper virus 를 생성하지 못하고 noninfectious 하게 할 수 있으나 이 유전자가 stem cell 에 integration 하지 못하고 결국 그 sequence 가 사라지거나 insertional mutagenesis 가 올 수 있다는 것이다. 이런 문제점들이 해결되어야 유전자 치료의 효율은 증진될 수 있다.

제 3 장 결 론 및 건의사항

1. 결 론

가. 인간의 망막아세포종 세포주인 WERI-Rb-1 과 Y-79 를 사용하여 RPMI 1640 배지와 10 % 우태혈청에서 배양시켰다.

나. retroviral vector 는 Molony murine leukemia virus 의 gag, pol, env 유전자 대신 Rb cDNA 와 selectable marker 유전자인 neomycin 내성유전자(Neo^R) 을 삽입하여 재조합한것이다. 즉 retrovirus 의 5' LTR(long terminal repeat) 이 Rb cDNA 유전자를 promote 하고 Rous sarcoma virus promoter 는 Neo^R 유전자를 promote 하도록 설계하였다. Neo^R 유전자를 획득한 세포는 neomycin analogue 인 G-418(geneticin, GIBCO-BRL사) 에 내성을 획득하므로 이 특성을 이용하여 Rb 유전자 이입 후 G-418 에 내성을 획득한 Rb 유전자가 이입 된 세포만 생존하므로 selection 이 가능하다.

다. packaging cell line 인 CRIP 에 재조합된 retroviral vector 를 transfection 시켜 target cell 을 transduction 시킬 retrovirus 를 생산하였다.

라. 가장 많은 virus titer 를 얻기 위하여 각 colony 에서 얻은 virus 를 함유하는 상층액으로 NIH3T3 cells 을 transduction 시켜 high(218), middle(127), low(6) 의 결과를 얻을 수 있었다.

마. 이 virus 를 사용하여 target cells 인 망막아세포종 세포주를 transduction 시켰으며 결과를 기다리는 중이다.

2. 건의사항

세포를 배양하고 적절한 vector 를 준비하며 이 vector 를 transfection 시키고 궁극적으로 target cells 에 transduction 시키기 위하여는 많은 시간과 정교한 기술이 요구된다. 무엇보다 세포배양시 오염을 방지하기 위하여는 각자의 clean bench 가 절대적으로 필요하다. 이러한 여건을 만족시켜 제대로 된 실험을 진행시키고 제때에 결과를 발표하기 위한 최소한의 인력보충과 재원이 절실히 요구된다고 생각한다.

REFERENCES

Bookstein R, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH: Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 247:712-715, 1990

Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM: In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256:1550-1552

Friend SH, Bernards S, Rogeli S, Weiberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646, 1986

Gallie BL, Dunn JM, Chan HSL, Hamel PA, Phillips RA: The genetics of retinoblastoma. *Pediatr Clin North America* 38:299-315, 1991

Horsthemke B: Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 63:1-7, 1992

Huang HJS, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EVHP, Lee WH: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* 242:1563-1566, 1988

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EYH: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, Identification, and sequence. *Science* 235:1394-1399

Madreperla SA, Whittum-Hudson JA, Prendergast RA, Chen PL, Lee WH: Intraocular tumor suppression of retinoblastoma gene-reconstituted retinoblastoma cells. *Cancer Research* 51:6381-6384, 1991

Peto J, Easton D: The contribution of inherited predisposition to cancer incidence. *Cancer Surveys* 9:395-416, 1990

Sager R. Tumor suppressor genes. The puzzle and the promise. *Science* 246:1406-1412, 1989

Stanbridge EJ: Functional evidence for human tumor suppressor genes: Chromosome and molecular genetic studies. *Cancer Surveys* 12:5-24, 1992

Retroviral Vector

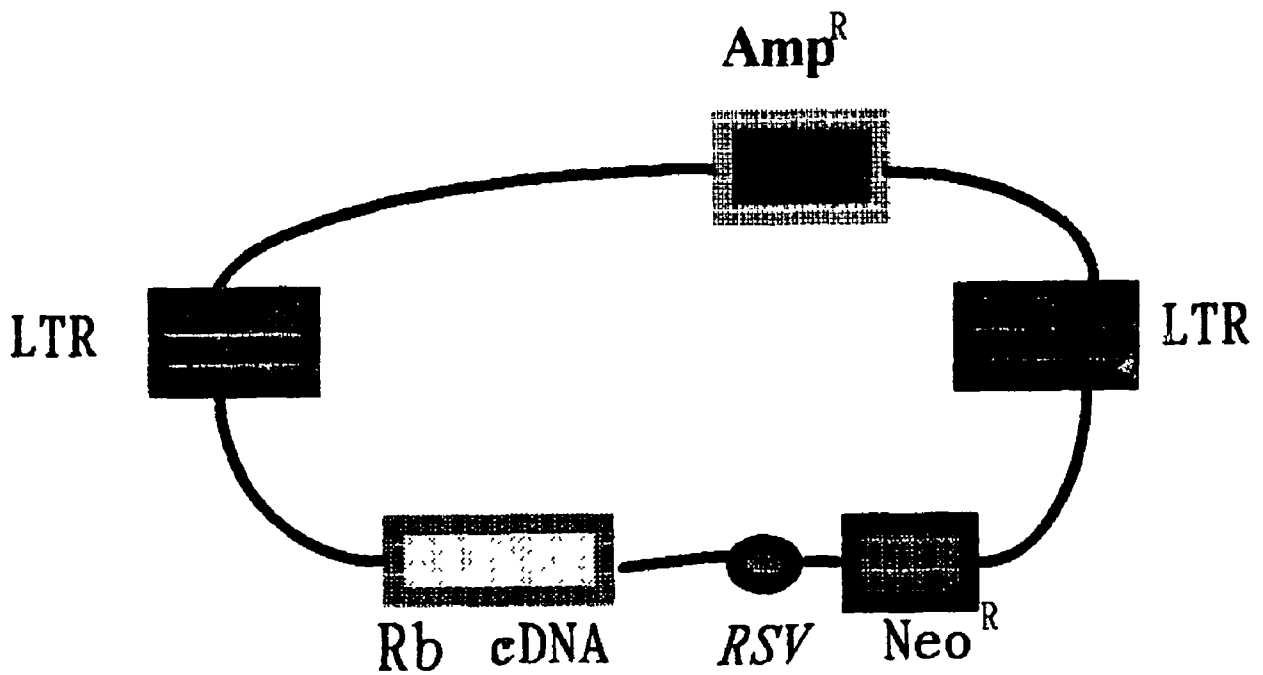


Fig.1 Retroviral vector used for Rb gene transfer to retinoblastoma cell lines. LTR indicates long terminal repeat, RSV, Rous sarcoma virus, Neo, neomycin, amp, ampicillin.

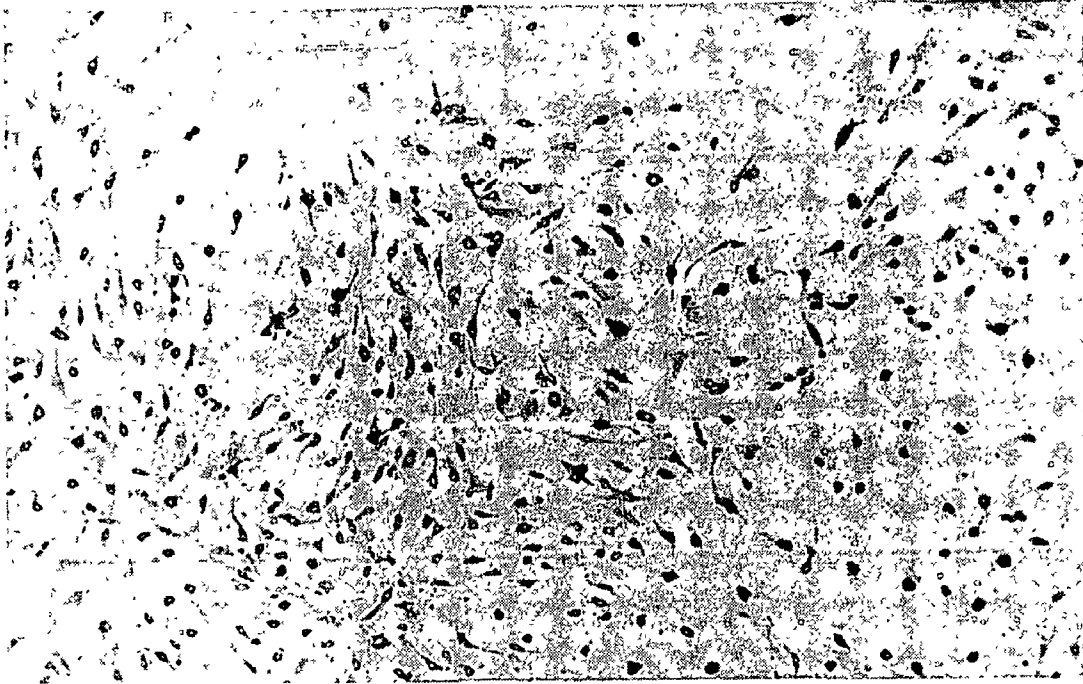


Fig. 2 Rb vector was transfected to packaging cell line(CRIP). After selection with G-418 contained media, 19 colonies were isolated by ring cloning method. One of them which had Rb and Neo genes survived and showed CRIP cell growing(x40).

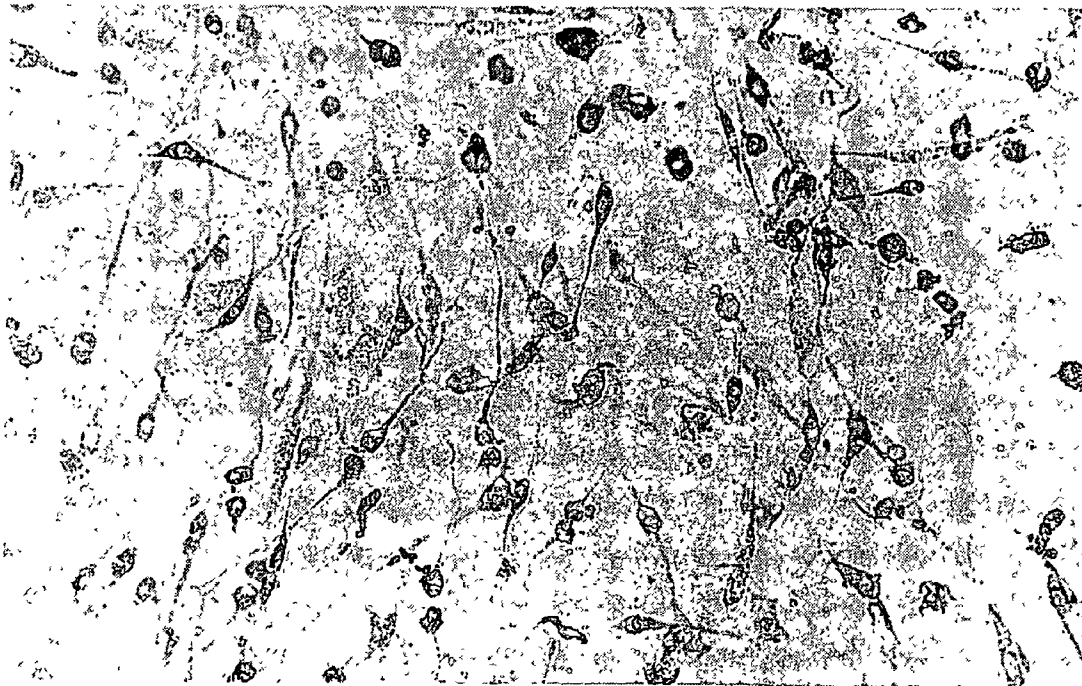


Fig. 3 same as Fig. 2(x100).

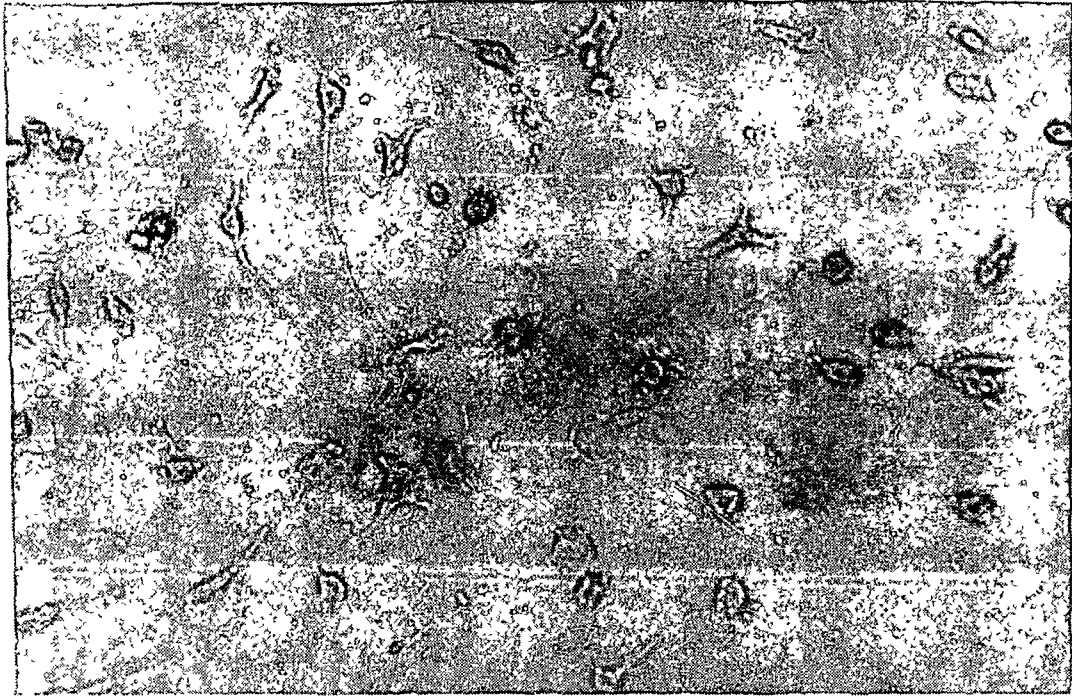


Fig.4 CRIP cells poorly transfected with Rb and Neo genes are progressing to die.

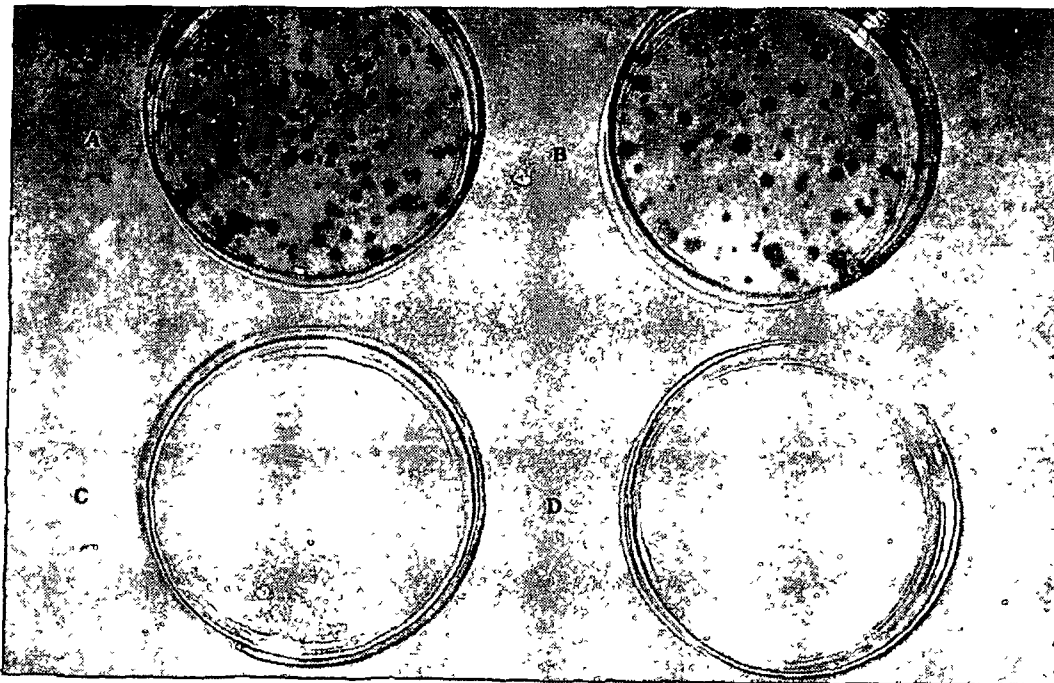


Fig.5 NIH3T3 cells transfected with retrovirus recombined Rb and Neo genes to select the high titer producing colony. A. high(218), B. middle(127), C. low(6), D. control(0). (colony count)

서 지 정 보 양 식			
수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제 코드
KAERI/RR-1400/94			
제목 / 부제	망막아세포종 세포주에 Rb-1 유전자 이입		
연구책임자 및 부서명	최 상 욱 (소아 1 과)		
연구자 및 부서명	함 용 호 (생화학연구실) 외 1 명		
발행지	서 울	발행기관	한국원자력연구소
페이지	15 p	도표	유 (v), 무 ()
참고사항	'94 원자력병원 기본연구		
비밀여부	공개 (v), 대외비 (), 금비밀		보
연구위탁기관	과학기술처	계	
초록 (300 단어내외)	<p>Rb vector 를 Ca-P 방법을 사용하여 packaging cell line 인 CRIP 에 transfection 시켰으며 G-418 내성 clone 을 ring cloning 으로 selection 하였다. 모두 19 개의 clone 을 얻을 수 있었으며 각각을 배양시켰다. 이 중 high titer 의 virus 를 생산할 수 있는 clone 을 찾기 위하여 NIH3T3 cells 에 transduction 시켜 colony count 한 결과 high(218), middle(127), low(6) 의 결과를 얻을 수 있었다. 이 중 high titer 인 CRIPRb 2-5(colony count 218) 의 상층액을 망막아세포종 세포 주에 transduction 시켰다.</p>		
주제명 키워드(10 단어 내외)	망막아세포종, retroviral vector packaging cell line, transfection transduction		

중
7

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code		
KAERI/RR-1400/94					
Title/Subtitle	In vitro Rb-1 gene transfer to retinoblastoma cell lines				
Project Manager and Dept.	Sang-Wook Choi (Dept. of Pediatrics)				
Researcher and Dept.	Yong-Ho Ham (Div. of Biochemistry) et al.				
1 person					
Pub. Place	Seoul	Pub. Org.	KCCH, KAERI	Pub. Date	April 1995
Page	15 p	Fig. and Tab.	Yes (v), No ()	Size	26 cm
Note	'94 KCCH Research Project				
Classified	Open (v), Outside (), Class		Report Type	Research Report	
Sponsoring Org.	MOST		Contract No.		
Abstract (About 300 words)	<p>After transfection of Rb-vector to packaging cell line(CRIP) by Ca-P precipitation method, we could select nineteen colonies of G-418 resistant clone by ring cloning. Each colony was transduced to NIH3T3 cells to select the one which produces high titer virus. After NIH3T3 cells transduction, we could get 28 colony counts for the high, 127 for the middle, and 6 for the low viral titer. With the supernatant of the high viral titer colony(CRIPRb 2-5), we transduct retinoblastoma cell lines.</p>				
Subject Keywords (about 10 words)	<p>Retinoblastoma, retroviral vector packaging cell line, transfection transduction</p>				

망막아세포종 세포주에 Rb-1 유전자 이입

1994年 12月 24日 印刷

1994年 12月 30日 發行

發行人 申 載 仁

發行處 韓國 原子力 研究所

大田直轄市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회