

'01 춘계학술발표회 논문집

한국 원자력학회

방사요오드표지 IVDU의 세포내 섭취와 분포

Intracellular Uptake and Distribution of radiolabeled Iodovinyl Deoxyuridine (IVDU) for Gene Therapy Monitoring

원자력병원

서울시 노원구 공릉동 215-4

최태현, 이태섭, 이수진, 우광선, 정위섭, 최창운, 임상무

요약

약제 감수성 유전자 치료 방법은 HSV1-TK 유전자를 종양세포에 발현시켜 HSV1-TK에 특이한 항바이러스 제제를 투여함으로써 선택적인 세포살상 효과를 나타내는 방법이다. IVDU는 유용한 HSV1-TK의 기질로서 평가되고 있다. Hepatoma cell line 인 MCA와 HSV1-TK 유전자 발현을 유도한 MCA-TK에서의 IVDU의 세포내 섭취정도와 세포내 소기관에서의 분포를 관찰하여 선택적 기질로서의 가치를 평가하고자 한다.

abstract

We have evaluated a useful synthetic radiolabeled nucleoside substrate, (E)-5-2(2-[125I]iodovinyl) uracil deoxyuridine (IVDU), for herpes simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV1-TK). Cellular uptake of these labeled compounds was observed in vitro. low uptake was showed in MCA cell line and high uptake was observed in Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase(HSV1-tk) gene tranduced MCA(MCA-tk) cell line. Intracellular distribution of ¹²⁵I-IVDU was differently occurred in the MCA and MCA-TK cell line, respectively. Main distribution of MCA cells is in cytosol, and that of MCA-TK cells was in mitochondria and nuclei. For HSV1-tk system, We confirmed that IVDU was incorporated into DNA synthesis.

서론

Nucleoside 변형체는 종양 발생과 바이러스 감염 여부를 비침습적인 방법을 이용하고자 연구되어 왔다^{1,2,3}. 5-FU, IUdR⁴의 경우는 종양영상을 목적으로, ACV, DHPG(GCV), BVDU, IVDU등은 바이러스 감염시 치료 약제로 사용되어지고 있는 것들이다. 최근에는 유전자 치료시 치료경과를 관찰하는 수단으로 연구되어 지고 있다^{5,6}. 대표적으로 유전자 치료 경과 추적용의 체계인 약제 감수성 유전자 발현 방법과 핵의학적 방법을 연결한 연구들이 있다^{5,7}. 약제 감수성 유전자 요법은 Herpes Simplex Viurs type-1 thymidine kinase (HSV1-tk)의 유전자를 치료하고자 하는 종양세포에 전달하여 발현시킨다. 발현된 개체에 HSV1의 항바이러스 제제인 ganciclovir(GCV)를 투여하여 HSV1-tk만이 발현된 조직만을 죽이는 방법

이다. 여기서 HSV1-TK는 GCV를 선택적으로 인산화하여, 인산화된 GCV의 형태가 종양세포의 DNA 합성에 참여하는 등의 방법으로 세포를 죽음에 이르게 한다. 자살 유전자 치료 (suicide gene therapy)인 HSV1-TK 체계는 유전자 치료의 모니터링과 평가에 이용하기 적당하며, 이용되기 위해서 다음과 같은 기본적인 조건들이 충족되어야 한다. 1) 영상을 획득하고자 하는 조직에 HSV1-TK 유전자가 전달되어 충분한 HSV1-TK가 발현되어야 한다. 2) 선택성이 강하고, 민감한 기질(substrate)로서의 nucleoside 변형체들이 사용되어야 한다. 3) 사용되는 nucleoside 변형체인 기질이 투여되는 양과 혈액 내에서의 반감기가 적당하여야 한다. 종양에 대한 유전자 치료 전략에서 특히 중요한 것은 HSV1-TK의 선택적 기질이 될 수 있는 특이성이 높은 nucleoside 변형체를 만들고 평가하는 것이다. acyclic guanosine analogue인 GCV가 가장 효과적으로 사용되어져 왔으나, 현재는 5-substituted uracil nucleoside 변형체들이 TK가 발현된 HSV1 감염 세포에서 더 효과적인 것이 밝혀졌다^{1,8)}. 이 중에서 in vitro 상에서 가장 높은 섭취를 나타내는 5-(2'-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)는 HSV1의 효과적인 inhibitor로 개발되었고⁸⁾, 동물에서의 대사과정이 연구되었다²⁾. IVDU는 높은 in vitro 상에서의 섭취에도 불구하고, in vivo상의 불안정성을 이유로 다른 변형체들로 대체되어지고 있다⁹⁾. 그러나 HSV1-TK의 종양세포 내 높은 발현 기술과 IVDU의 빠른 체내 분포의 성질은 IVDU의 유용성을 나타낼 수 있다. 본 실험에서는 IVDU가 HSV1-TK 발현 세포를 대상으로 in vitro상에서 섭취와 세포 내 소기관에서의 분포가 어떻게 이루어지는 지 관찰함으로써 세포 내 섭취 기전을 살펴보고자 한다.

방법

1. 5-(2'-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU) ¹²⁵I 표지와 정제

Reaction vial에 acetonitrile에 20% acetic acid가 들은 용액에 ICl(0.154mmole) 20 μ l을 넣고, 곧이어 Na¹²⁵I 370MBq, 30 μ l을 넣는다. 역시 같은 용액에 녹인 전구체 5-(2-(Trimethylsilyl)vinyl)-2'-deoxyuridine(TMS-VDU) (0.73mmole) 20 μ l를 넣고, 실온에서 20분간 반응시킨다. HPLC를 사용하여 분리 정제하였다. 컬럼은 μ bondapak C18 (3.9 \times 300mm, waters, USA)을 사용하였고, 전개용액은 물과 acetonitrile의 gradient를 사용하였다. 전개액(A=acetonitrile, B=DW)을 1분에서 5분은 10%A, 90%B의 등속으로 전개하고, 5분에서 10분까지는 40%A, 60%B의 구배로 전개한다. 10분에서 25분까지는 40%A, 60%B의 등배로 전개하고, 254nm의 파장으로 흡광도를 측정하고, GABI(raytest, Germany)를 사용하여 flow-through 모니터링하여 방사능을 측정하였다. fraction collector를 이용하여 1분에 1개의 tube가 되게 수집한 다음 ¹²⁵IVDU의 HPLC 상 위치에 해당하는 tubes를 거두어 dose calibrator로 방사능을 확인한 뒤, 질소가스로 완전히 날려 saline으로 재건하였다.

2. ¹²⁵I-IVDU의 세포내 섭취

¹²⁵I로 표지한 IVDU를 wild type MCA 세포와 HSV-tk를 발현시킨 MCA-tk 세포와 함께 배양하여 세포내 섭취능을 비교한다. 15분, 30분, 60분, 120분, 240분, 480분마다 3개의 플라스크를 사용하고, 각 세포주를 약 1 \times 10⁶ 개씩 플라스크에 넣고, 방사표지된 화합물을 120 μ Ci/ml 사용하여 배양액으로 총 4ml 만들어 각 플라스크에 100 μ l(5 μ Ci)씩 약물을 투여한다.

37°C에서 배양하면서 시간이 경과하는 대로 세포를 세척 한 다음 방사능을 측정하였다.

3. ^{125}I -IVDU의 세포 소기관 분포

세포내 소기관의 분포를 관찰하기 위하여 MCA, MCA-TK 종양세포를 각각 3개 flask에 ^{125}I -IVDU를 넣은 뒤 37°C에서 배양하였다. 4시간 경과한 후, 각 flask의 세포들을 10mM Phosphate buffered saline(PBS) pH7.4로 세척한 후, sonicator(Fisher, model300)를 사용하여 종양세포를 파괴하였다. 파괴된 세포들은 Ultracentrifuge(Beckman, L8-70M)를 사용하여 $700\times g$, 10분 동안 원심분리한다. crude nuclei 성분은 침전시켜 얻고, 상층액을 다시 $7000\times g$, 10분 동안 원심분리하여 침전물에서 crude mitochondria를 얻고, 상층액은 $105000\times g$, 100분 동안 원심분리 하여 침전물은 crude microsome을 상층액은 cytosol을 얻어 각 fractions의 방사능을 계측한다.

결과

1. 5-(2'-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU) ^{125}I 표지와 정제

표지 전구체인 SiMe_3 -VDU의 방사성동위원소 표지 실험은 ^{125}I 를 사용하여 수행하였다. 표지수율 98%의 결과를 HPLC analysis를 사용하여 확인하였다(Fig 1).

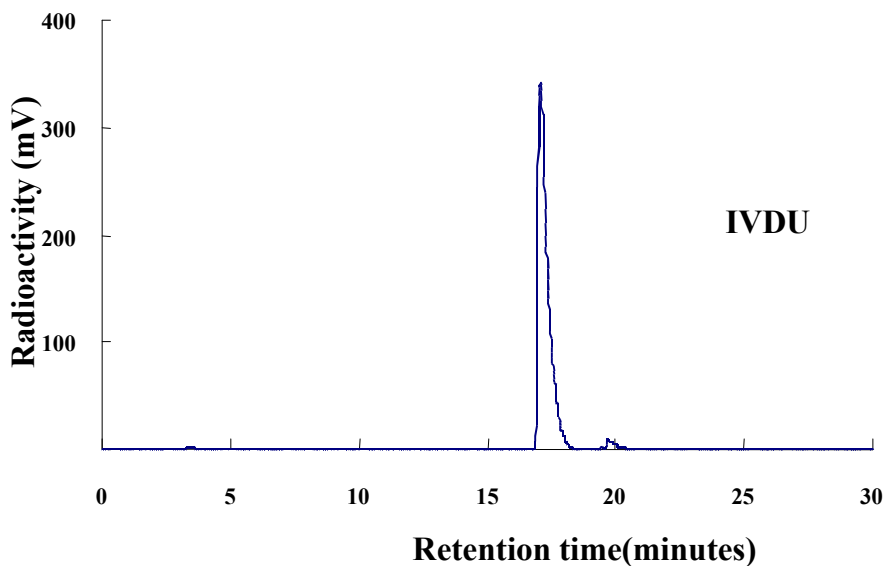


Fig 1. HPLC radiochromatogram of ^{125}I -IVDU

2. ^{125}I -IVDU의 세포내 섭취

IVDU의 세포 섭취능 비교는 %injected dose/gram으로 계산하였을 때, HSV-tk가 발현되지 않은 MCA 세포주의 섭취능보다 HSV-tk가 발현된 MCA-TK 세포주의 섭취능이 MCA 세포주의 섭취능을 기준으로 비교하여 높은 섭취능이 나타나는 것을 관찰하였다(Fig 2). IVDU는 MCA에서 보다 MCA-tk

에서의 섭취가 15분, 30분, 60분, 120분, 240분, 480분에서 약 10, 13, 10, 29, 25, 30배로 높게 섭취되었다.

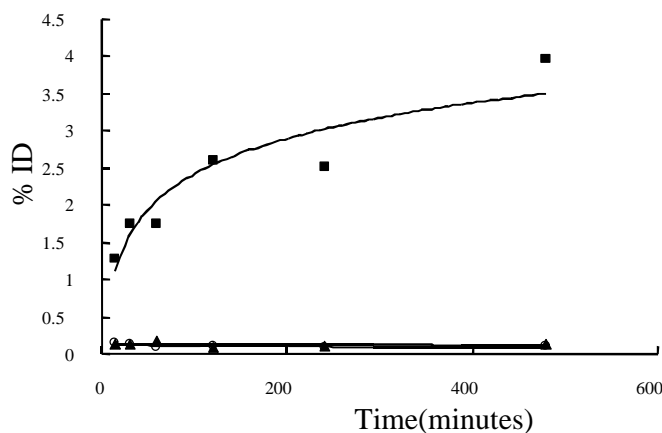


Fig 2. In vitro cell uptake of ^{125}I -IVDU in MCA and MCA-TK cells.
(upper line : MCA-tk cell line, lower line : MCA cell line)

3. ^{125}I -IVDU의 세포 소기관 분포

^{125}I -IVDU를 MCA, MCA-TK cells과 배양한 후 ultracentrifuge를 사용하여 세포내 구획을 nuclei, mitochondria, microsome, cytosol로 분리하여, 각각의 방사능을 측정하여 전체 방사능을 100%로 놓고, 각 구획의 섭취 %를 비교하였다. 먼저 MCA cells에서의 섭취 비율은 nuclei 2.7%, mitochondria 1.5%, microsome 0.8%, 그리고 cytosol에서 67%를 나타내었다. 섭취된 물질의 대부분이 cytosol내에 존재하였다.

MCA-TK cells 에서는 nuclei 40%, mitochondria 21%, microsome 4.9%, cytosol 29%로 MCA와는 달리 cytosol 외의 세포내 구획으로 이동하였음을 알 수 있다.

Table 1. Cell organelles distribution of ^{125}I -IVDU

% Unit (n=3)

	MCA	MCA-TK
Nuclei	2.74 ± 0.56	40.57 ± 10.77
Mitochondria	1.59 ± 0.28	21.54 ± 8.30
Microsome	0.88 ± 0.13	4.97 ± 0.37
Cytosol	67.19 ± 14.08	29.84 ± 3.42

결론

유전자치료시 투여한 유전자의 발현 정도를 monitoring 할 수 있는 선택적 기질로서 ^{125}I -IVDU를 제조하였다. 세포내 섭취와 세포 소기관에서의 분포 실험을 통해 HSV1-TK가 발현된 MCA hepatoma cell line에서 TK의 IVDU에 대한 선택적인 인산화 과정을 통한 DNA 합성과정의 참여를 예측할 수 있었다. IVDU의 구조상 uracil의 5' 위치상의 vinyl기의 도입이 HSV1-TK의 선택성에 가장 잘 부합하기 때문인 것으로 생각되었다. IVDU가 in vivo상에서의 적용가능한지의 여부는 nucleoside 변형체들 중에서 안정성 도입을 위한 기타 변형체들과의 비교와 실제 in vivo 실험을 통해 알 수 있을 것이다. 또한 종양 세포의 영상에 이용되는 thymidine analogue인 5-iodo-deoxyuridine(IUdR)과의 비교 실험을 통해 HSV1-TK 기질에 대한 선택 기준을 확립할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. E. Clercq. Biochemical Aspects of the Selective Antiherpes Activit of Nucleoside Analogues. *Biochemical Pharmacology* 33: 2159-2169, 1984
2. J. Mercer, L. Xu, E. Knaus, L. Wiebe. Synthesis and Tumor Uptake of 5- ^{82}Br -and 5- ^{131}I -Labeled 5-Halo-1-(2-fluoro-2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)uracils. *J. Med. Chem.* 32:1289-1294, 1989
3. M. Robins, S. Manfredini, S. Wood, R. Wanklin, B. Rennie, S. Sacks. Nucleic Acid Related Compounds. 65. New Syntheses of 1-(β -D-Arabinofuranosyl)-5(E)-(2-iodovinyl)uracil (IVARA) from Vinylsilane Precursors. Radioiodine uptake as a Marker for Thymidine Kinase Positive Herpes Viral Infections. *J. Med. Chem.* 34:2275-2280, 1991
4. C. Foulon, Y. Zhang, S. Adelstein, A. Kassis. Instantaneous Preparation of Radiolabeled 5-Iodo-2'-deoxyuridine. *Appl. Radiat. Isot.* 46: 1039-1046, 1995
5. J. Tjuvajev, R. Finn, K. Watanabe, R. Joshi, T. Oku, J. Kennedy, et al. Noninvasive Imaging of Herpes Virus Thymidine Kinase Gene Transfer and Expression: A Potential Method for Monitoring Clinical Gene Therapy. *Cancer Research* 56: 4087-4095, 1996
6. J. Tjuvajev, G. Stockhammer, R. Desai, H. Uehara, K. Watanabe, B. Gansbacher, et al. Imaging the Expression of Transfected Genes in vivo. *Cancer Research* 55: 6126-6132, 1995
7. U. Haberkorn, M. Bellemann, L. Gerlach, I. Morr, H. Trojan, G. Brix, et al. Uncoupling of 2-fluoro-2-deoxyglucose transport and phosphorylation in rat hepatoma during gene therapy with HSV thymidine kinase. *Gene Therapy* 5: 880-887, 1998

8. J. Samuel, M. Gill, T. Iwashina, D. Tovell, D. Tyrrell, E. Knaus, et al. Pharmacokinetics and Metabolism of E-5-(2-[¹³¹I]Iodovinyl)-2'-deoxyuridine in Dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29: 320-324, 1986

9. K. Morin, E. Atrazheva, E. Knaus, L. Wiebe. Synthesis and Cellular Uptake of 2'-Substituted Analogues of (E)-5-(2-[¹²⁵I]Iodovinyl)-2'-deoxyuridine in Tumor Cells Transduced with the Herpes Simplex Type-1 Thymidine Kinase Gene. Evaluation as Probes for Monitoring Gene Therapy. *J. Med. Chem.* 40: 2184-2190, 1997