

아데노바이러스를 이용한 내분비 질환의 재생 요법

시카고 노스웨스턴 의과대학 내분비내과

이 은 직

Endocrine Regeneration Therapy using Adenoviral vector

Eun Jig Lee

Endocrinology, Metabolism & Molecular Medicine

Northwestern University, Feinberg School of Medicine 303 East Superior Street

서 론

재생요법 (regeneration therapy)은 내분비호르몬 결핍질환의 궁극적인 치료로 미래에 널리 이용될 전망이다. 크게 시험관 내 (in vitro), 생체의 (ex vivo), 및 생체내 (in vivo) 재생요법 등 3가지 범주로 나뉜다[1]. 시험관 내 재생요법은 이미 확립된 세포주나 태아줄기세포 (embryonic stem cell) 및 조직특이성 성체줄기세포에서 분화된 세포를 생체에 이식하는 방법이며, 대부분 면역억제제를 병용하여야 한다. 생체의 재생요법은 환자 자신의 줄기세포를 획득하여 체외에서 분화를 유도한 뒤 다시 환자에게 이식하는 방법으로 면역억제제를 쓰지 않아도 되는 장점이 있다. 생체내 재생요법은 손상된 조직을 환자 몸안에서 재생을 유도하거나 줄기세포로부터 새롭게 분화를 유도하는 방법으로 약물요법 및 유전자치료를 이용할 수 있다.

재생요법이 이용될 수 있는 내분비호르몬 결핍질환은 뇌하수체호르몬결핍, 갑상선호르몬결핍, 원발성부신피질호르몬결핍, 및 인슐린의 절대결핍에 의한 제1형 당뇨병 등이며, 위에서 열거한 방법의 단독 및 병용한 연구가 많이 진행되고 있으며, 본문에서는 유전자치료를 응용한 생체내 재생요법에 대해 소개하고자 한다.

Current status and preclinical models

최근까지 유전자치료를 전달된 유전자에서 발현된 단백질이 주로 치료작용을 하는 개념이었다. 즉 만성질환 및 유전성 결핍질환에서 해당 세포에 결핍된 유전자를 전달하면, 그 유전자에서 생성된 단백질이 세포의 기능을 정상화시키게 된다. 그러나 발현된 단백질의 양이 조절되지 않기 때문에 과잉 및 과소 치료를 가져올 수 있다. 예를 들어 인슐린 결핍성 제1형 당뇨병의 치료로 인슐린유전자를 전달하여 혈

당을 조절한 실험동물 모델[2]에서 혈당이 때에 따라서는 충분한 조절이 되지 않거나, 또는 인슐린이 과량 생성되어 저혈당을 보인 경우가 있다. 이를 극복하기 위해 인슐린의 생성을 조절할 수 있는 promoter를 사용하기도 하였으나[3], 시시각각 변하는 실제 혈당의 조절은 인슐린 생성의 조절보다는 췌장소도의 베타세포에서 생성된 인슐린 분비의 조절에 의하므로 이 또한 혈당 조절을 완전하게 하지 못한다는 단점이 있다. 이에 반해 베타세포의 분화에 필요한 유전자를 유전자전달 벡터를 통해 생체의 줄기세포에 전달한다면 분화된 완전한 세포를 얻을 가능성이 있어, 이에 대한 연구가 활발히 이뤄지고 있다.

최근 Ferber 등[4]은 췌장의 발생과 소도세포 기능에 중요한 역할을 하는 pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1) 유전자를 아데노바이러스를 이용하여 당뇨병이 유발된 생쥐의 간에 전달하여 혈당강하를 관찰한 바 있는데, 생쥐의 간에서 추출한 mRNA에서 췌장 베타세포에서 볼 수 있는 인슐린유전자의 활성화 및 파라핀 조직에서 면역염색상 인슐린을 검출한 바 있다. 그 후로 Kojima 등[5]은 면역반응이 적은 삼세대 아데노바이러스를 이용하여 PDX-1을 전달한 결과 췌장 내분비 세포분화뿐만 아니라 외분비세포의 분화도 촉진됨을 발견하였고, 이 결과 생성된 트립신 (trypsin) 이 심한 간손상을 유발하고 분화된 인슐린분비세포를 파괴함을 관찰하였다. 한편 소도세포의 발달에 중요한 NeuroD (BETA2) 유전자 및 소도 성장촉진 유전자인 betacellulin을 당뇨병이 유발된 생쥐에 동시에 전달하여 4개월간 혈당이 조절됨을 보고했는데, 간 조직에서 인슐린 분비세포 및 소도의 분화를 관찰했다. 인슐린 분비세포는 문맥삼각 (portal triads)의 주변에서 검출되었고, 소도는 간의 캡슐 (capsule) 밑에서 관찰되었는데, 분화된 소도에는 인슐린뿐만 아니라 다른 소도세포 호르몬인 글루카곤 (glucagons) 및 소마토스타틴 (somatostatin) 등이 검출되었다.

이렇게 전달된 전사인자 유전자는 생쥐 전체 간세포의 50~70%에서 발현되나 인슐린분비세포는 간 조직의 1.0% 미만에서 발견되는데, 이는 어떤 특정세포 즉 분화능력이 있는 줄기세포에서 기원되었음을 암시한다. 문맥삼각 주위에는 간줄기세포가 존재하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 저자 등[8]은 같은 방법을 사용하였을 때 다른 호르몬 생성도 촉진하는지, 또 이런 분화과정을 규명하기 위하여 뇌하수체 전사인자 (pituitary transcription factor-1, Pit-1) 유전자를 아데노바이러스를 이용하여 생쥐의 간에 전달한 결과 프로락틴분비세포 (lactotrope)의 분화를 관찰한 바 있는데, 초기에 문맥삼각주위에서 발견된 프로락틴분비세포는 간줄기세포의 표지자들을 발현하고 있었다 (Fig. 1). 이는 Pit-1 유전자가 전달된 간줄기세포에서부터 분화가 시작됨을 의미한다. 프로락틴분비세포는 시간이 지남에 따라 증식을 하고, 점차로 중심정맥으로 이동함을 관찰했는데, 이는 정상 간세포의 생성과 성장과정[9,10]을 밟는 것으로 생각된다. Koj-

ima 등 (5)이 4개월 후 발견한 분화된 소도는 간의 캡슐하 부인테 정확한 기원을 추적하기 위해서는 더 연구가 필요하다.

한편 Pit-1 유전자는 뇌하수체 성장호르몬, 갑상선자극호르몬분비세포의 분화에도 필수적인데, Pit-1이 전달된 암컷 생쥐의 간에서 프로락틴분비세포로 분화됨을 관찰하였는데, 이는 성장호르몬분비세포나 갑상선 자극호르몬 분비세포로 분화를 위해서는 다른 유전자의 발현[11,12]도 필요함을 의미한다. 최근 베타세포특이성 전사인자 유전자들의 상호 보완적인 작용이 인슐린유전자 활성화에 상승적으로 작용한다는 보고가 있었으며[13,14], 따라서 2~3가지 전사인자 유전자를 동시에 전달한다면 보다 효과적인 내분비호르몬 분비세포의 분화를 유도할 가능성이 있다. 실제 PDX-1, neurogenin 3 (NGN3), 및 NeuroD 등을 아데노바이러스를 이용하여 당뇨병 생쥐에 단독 및 병용 투여한 결과, 병용 투여한 경우 혈당조절 및 인슐린유전자 활성화에 효과적임을 관

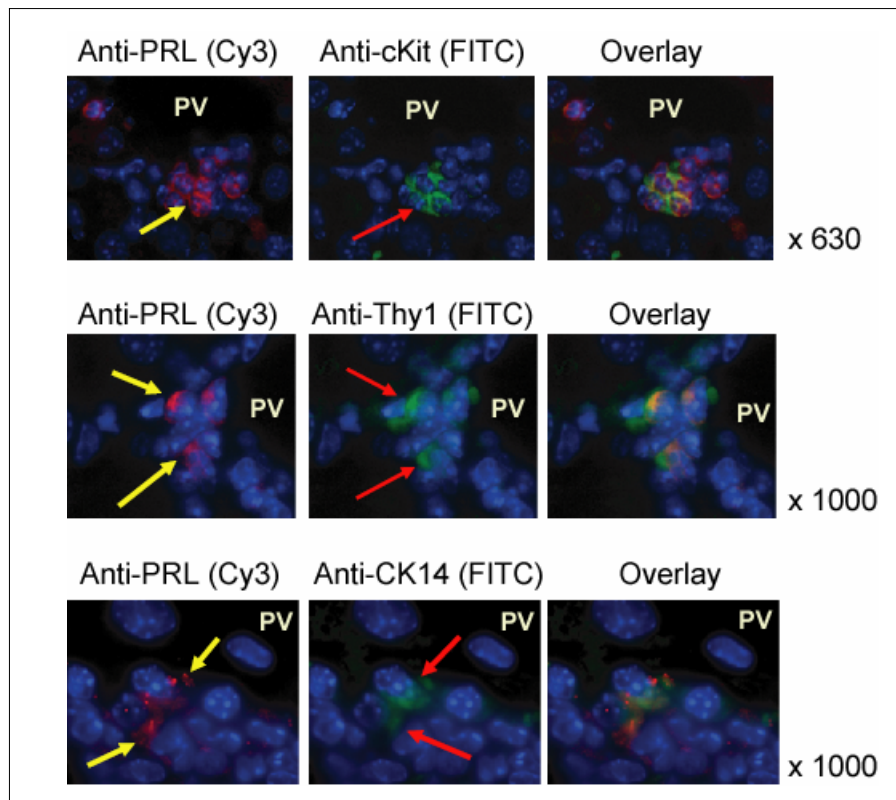


Fig. 1. Colocalization of prolactin (PRL) with stem cell markers in livers of mice treated with Ad-Pit-1. Paraffin sections of livers of mice at day 5 after treatment were analyzed by double immunofluorescence staining for PRL with c-kit, thy-1, or cytokeratin 14. Cells with red fluorescent cytoplasm express PRL (yellow arrow in left panel) and cells with green fluorescent cytoplasm (red arrow in center panel) express c-kit (upper), thy-1 (middle) or cytokeratin 14 (lower). PV: Portal vein. Upper and middle panels are 630 x magnification and lower panel is 1000 x magnification. Lactotrope cells express hepatic stem cells marker at the initial stage of differentiation. Reprinted from (8) with permission.

찰하였다[15]. 하지만 병용 투여하는 경우 과량의 바이러스 투여로 치명적이므로, 여러 전사인자 유전자를 1개의 벡터에서 발현시키는 방법 개발 등 실제 당뇨병의 치료에 사용되기까지는 많은 연구가 필요하다.

Strategy overcoming disadvantage of adenoviral vector

아데노바이러스에 의해 전달된 유전자는 숙주세포의 게놈(genome)에 통합되지 않기 때문에 장기간 유전자의 발현이 필요한 만성 및 유전병 질환의 치료에는 적합하지 않다. 최근에 개발된 제3세대 아데노바이러스 벡터는 약 1년 동안 유전자의 발현이 관찰되었으나[16], 숙주의 유전자에 통합되지 않는다면, 빠르게 분화 및 증식하는 세포에서는 궁극적으로는 전달된 유전자가 소멸된다. 이러한 단점을 극복하기 위해 숙주의 게놈에 통합(integration)능이 있는 다른 바이러스의 통합 단위(unit)를 아데노바이러스의 게놈에 삽입한 hybrid 벡터가 개발되었다. 즉 치료유전자 발현카세트를 레트로바이러스(retrovirus)의 long terminal repeat (LTR), 혹은 아데노바이러스의존바이러스(adeno-associated virus,

AAV)의 inverted terminal repeat (ITR)로 둘러싸고, 이들을 다시 아데노바이러스의 게놈에 삽입하게 되면 hybrid 벡터(Fig. 2)가 완성된다[17,18].

AAV는 레트로바이러스와는 달리 질병을 일으키지 않고 인체세포의 제 19번 염색체에 선택적으로 통합되므로, 만성 질환의 유전자치료벡터로 도입되었다[19~22]. 이런 AAV의 장점에도 불구하고, 실제 임상에 적용할 때 많은 양의 바이러스를 증식시키고 정제하는 과정이 쉽지 않고, 증식을 위해 사용했던 아데노바이러스를 제거해야 하는 문제도 있다. AAV와 아데노바이러스의 각각 장점을 통합한 아데노바이러스-아데노바이러스의존바이러스(Ad/AAV) hybrid 벡터는 숙주세포의 게놈에 유전자를 통합시킬 수 있고, 많은 양의 바이러스를 용이하게 증식 및 정제할 수 있어 향후 유전자전달 벡터로 많이 사용될 것으로 기대된다. 특히 AAV의 ITR과 Rep78을 같이 병용할 경우 인체세포의 제 19번 염색체에 선택적으로 삽입되며 (Fig. 2)[17,18,23], 제3세대 아데노바이러스를 기본으로 한 hybrid 벡터나 mini-hybrid 벡터는 면역성을 제거하였으므로 숙주의 면역반응에 의해 유전자를 발현하는 세포가 제거될 가능성을 줄일 수 있다 [24].

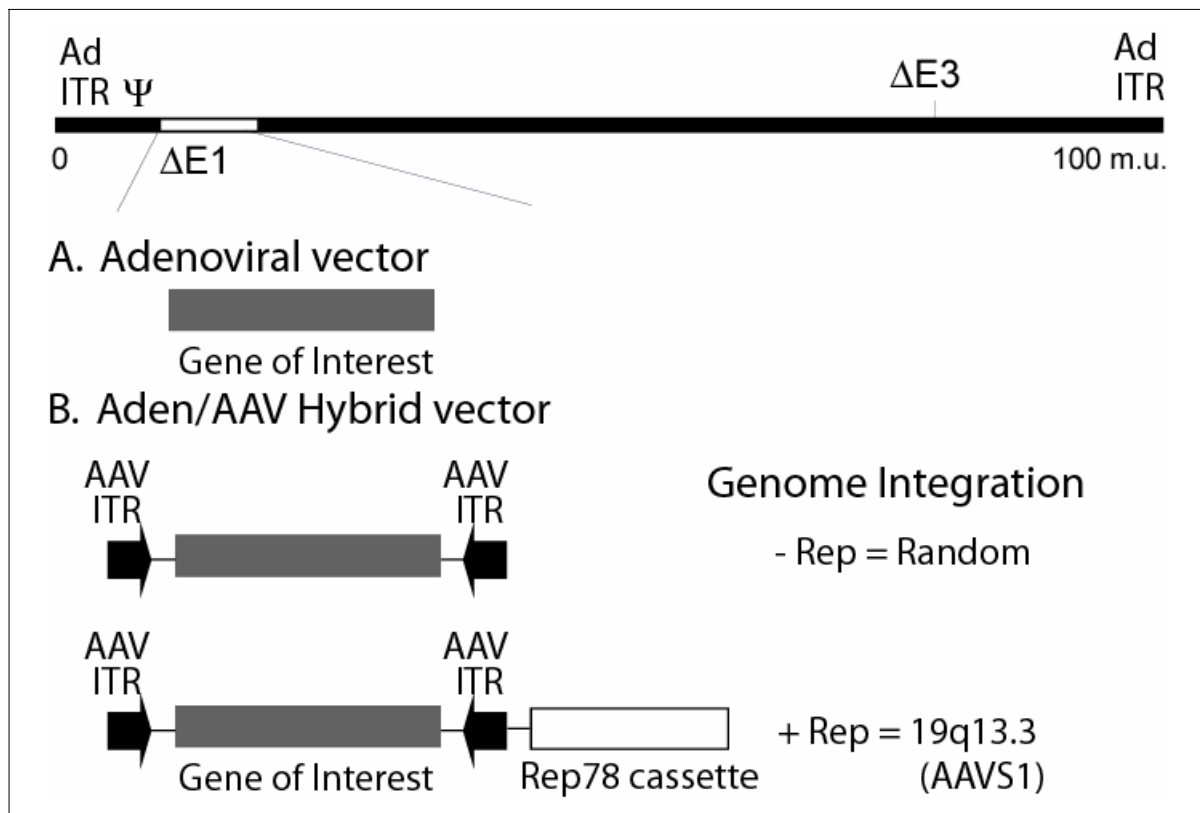


Fig. 2. Adenoviral vector and Ad/AAV hybrid vectors carrying gene of interest. Infection of cells with Ad/AAV hybrid vector enables precise excision of the AAV inverted terminal repeat (ITR)-flanked gene from adenoviral genome, subsequently integration into the host genome occurs. In the presence of Rep78 expression unit, transgene is predictably integrated into the AAVS1 locus on human chromosome 19.

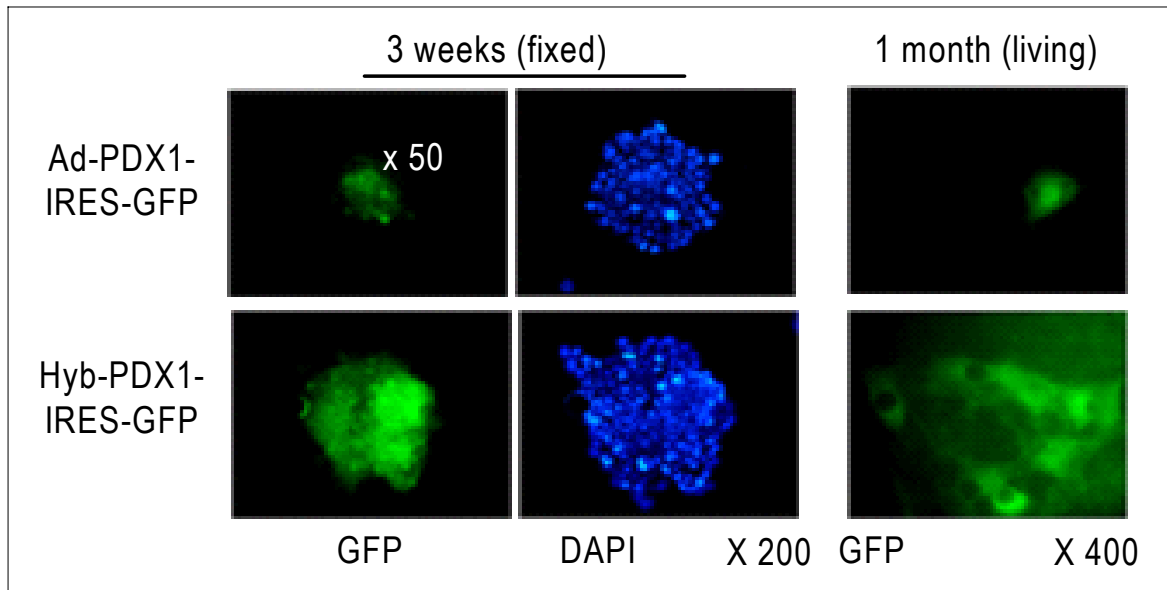


Fig. 3. GFP expression in HepG2 cells infected with adenovirus or Ad/AAV hybrid vectors carrying pancreas-duodenum homeobox 1 (PDX1)-internal ribosomal entry site (IRES)-green fluorescent protein (GFP). GFP was more abundantly expressed in HepG2 cells infected with Ad/AAV hybrid vector. (not published data)

최근 저자는 PDX-1 유전자와 green fluorescent protein (GFP) 유전자를 encephalomyocarditis 바이러스의 internal ribosomal entry site (IRES)로 연결한 bicistronic cassette를 Ad/AAV hybrid 벡터에 삽입한 뒤 이를 HepG2 세포에 감염한 결과, 장기간 GFP의 발현을 관찰한 바 있는데 (Fig. 3), 이를 이용해서 줄기세포 분화를 유도한다면 분화된 인슐린분비 세포의 기원과 운명을 추적할 수 있는 가능성이 있다. 또한 IRES[25]를 이용하면 여러 필수 전사인자 유전자를 한 개의 벡터 (multi-cistronic vector)에서 발현시킬 수 있는 장점이 있다.

결론 및 전망

본문에서 소개한 세포재생요법은 유전자치료방법을 응용한 세포치료법으로 아직 초기의 시도단계에 머물고 있다. 향후 줄기세포의 분화에 필요한 전사인자 유전자와, 분화 및 성장 촉진유전자 등에 대한 지속적인 연구가 필요하며, 생체내 각 장기의 줄기세포만 선택적으로 표적하여 결핍된 호르몬분비세포로 분화를 촉진하는 방향으로 연구가 진행될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Yamaoka T: Regeneration therapy of pancreatic beta cells: towards a cure for diabetes? *Biochem Biophys Res Commun* 296:1039-1043, 2002
2. Matsumoto T, Yamaguchi M, Kuzume M, Matsumiya

- A, Kumada K: *Insulin gene transfer with adenovirus vector via the spleen safely and effectively improves posthepatectomized conditions in diabetic rats.* *J Surg Res* 110:228-234, 2003
3. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW: *Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue.* *Nature* 408:483-488, 2000
4. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A: *Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia.* *Nat Med* 6:568-572, 2000
5. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L: *NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice.* *Nat Med* 9:596-603, 2003
6. Zhang Y, Bai XF, Huang CX: *Hepatic stem cells: existence and origin.* *World J Gastroenterol* 9:201-204, 2003
7. Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, Theise ND: *Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells.* *J Hepatol* 39:357-364, 2003
8. Lee EJ, Russell T, Hurley L, Jameson JL: *Pit-1 induces transient differentiation of adult hepatic stem*

- cells into prolactin-producing cells in vivo. Mol Endocrinol* 19:964-971, 2005
9. Zajicek G, Ariel I, Arber N: *The streaming liver. III. Littoral cells accompany the streaming hepatocyte. Liver* 8:213-218, 1988
10. Arber N, Zajicek G, Ariel I: *The streaming liver. II. Hepatocyte life history. Liver* 8:80-87, 1988
11. Drolet DW, Scully KM, Simmons DM, Wegner M, Chu KT, Swanson LW, Rosenfeld MG: *TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. Genes Dev* 5:1739-1753, 1991
12. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE: *GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. Nat Genet* 4: 227-232, 1993
13. Glick E, Leshkowitz D, Walker MD: *Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. J Biol Chem* 275:2199-2204., 2000
14. Aramata S, Han SI, Yasuda K, Kataoka K: *Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. Biochim Biophys Acta* 1730:41-46, 2005
15. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y: *PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. Diabetes* 54:1009-1022, 2005
16. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S: *Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. Nat Genet* 18:180-183, 1998
17. Surosky RT, Urabe M, Godwin SG, McQuiston SA, Kurtzman GJ, Ozawa K, Natsoulis G: *Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. J Virol* 71:7951-7959, 1997
18. Sun BD, Chen YT, Bird A, Amalfitano A, Koeberl DD: *Long-term correction of glycogen storage disease type II with a hybrid Ad-AAV vector. Mol Ther* 7:193-201, 2003
19. Samulski RJ, Sally M, Muzyczka N: *Adeno-associated viral vectors. In The development of human gene therapy Friedmann T, Ed. Cold Spring harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, p. 131-171*
20. Buning H, Nicklin SA, Perabo L, Hallek M, Baker AH: *AAV-based gene transfer. Curr Opin Mol Ther* 5:367-375, 2003
21. Carter PJ, Samulski RJ: *Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. Int J Mol Med* 6:17-27, 2000
22. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA: *Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. Embo J* 10:3941-3950, 1991
23. Recchia A, Parks RJ, Lamartina S, Toniatti C, Pieroni L, Palombo F, Ciliberto G, Graham FL, Cortese R, La Monica N, Colloca S: *Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2615-2620, 1999
24. Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA: *Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. J Virol* 73:9314-9324, 1999
25. Douin V, Bornes S, Creancier L, Rochaix P, Favre G, Prats AC, Couderc B: *Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. BMC Biotechnol* 4:16, 2004