

허혈성 심혈관질환 환자의 혈관신생 유전자치료

성균관대학교 의과대학 내과학교실 심혈관질환 분자치료연구실

김 현 중 · 김 덕 경

Angiogenic Gene Therapy in Patients with Ischemic Cardiovascular Diseases

Hyun-Joong Kim, MD and Duk-Kyung Kim, MD

Laboratory of Cardiovascular Molecular Therapy, Department of Medicine,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) and peripheral vascular disease (PVD) are significant medical problems worldwide, including Korea. Although substantial progress has been made in prevention and treatment of these diseases, particularly CAD, there are still a large number of patients, who despite maximal medical treatment have substantial symptomatology, so are not suitable for mechanical revascularization. Therapeutic angiogenesis represents a novel, conceptually appealing, treatment option for these patients. Consequently, there are several different products in clinical trials looking at the various angiogenic growth factors. A number of small, mostly open-labeled phase I or I/II, studies have been conducted with adeno- and plasmid-based vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) gene constructs in CAD and PVD. Although these studies have provided intriguing indications of the possibility of new vessel formation, and that these new vessels could be functional, these studies have been too small to allow definite conclusions on their potential efficacy to be drawn. Although, larger scale placebo-controlled studies of gene transfer are in progress. Future clinical studies will be required to determine the optimal dose, formulation, route of administration and combination of growth factors, as well as the requirement for endothelial progenitor cell, or stem cell supplementation, to provide effective and safe therapeutic angiogenesis. This exciting new field is reviewed, with special emphasis on clinical trials. (**Korean Circulation J 2003;33(1):7-14**)

KEY WORDS : Gene therapy ; Angiogenesis factor ; Peripheral vascular disease ; Myocardial ischemia.

서 론

허혈성 심혈관 질환은 우리나라에서 사망 원인의 수위를 다투고 있는 질환으로 생활습관의 서구화에 따라 점차 그 중요성이 점차 증대되고 있다. 심혈관 질환을 가진 환자가 늘어나는 것 이외에도 의학 수준의 향상으

로 오랜 기간 동안에 생존하여 치료를 받는 심혈관질환 환자가 많아지면서 자연적으로 이전보다 병의 중증도가 점차 심해지는 양상을 보이고 있다. 특히 이미 여러 차례에 걸쳐 혈관확장술이나 혈관우회술을 받았지만 이에 실패한 환자나 혈관이 너무 작아서 시술이 불가능한 경우, 다른 동반 질환으로 인하여 수술이 불가능한 경우에는 현재로는 별다른 치료 방법이 없는 실정이다. 최근의 약물치료, 심혈관중재술, 혈관우회술의 기술적 발달로 인하여 이러한 문제가 어느 정도 극복되고는 있지만 결국에는 사망에 이르거나 말초동맥질환 환자

교신저자 : 김덕경, 135-710 서울 강남구 일원동 50
성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 순환기내과학교실
전화 : (02) 3410-3419 · 전송 : (02) 3410-3849
E-mail : dkkim@smc.samsung.co.kr

의 경우에는 사지의 일부를 절단해야만 하는 상황까지 이를 수도 있다. 이러한 경우의 환자를 'no option patient'라고 하는데 전체 심혈관질환 환자의 10~15%를 차지한다. 이러한 환자들의 치료를 위하여 여러 노력이 이루어지고 있는데 그 중의 일환으로 최근에 개발되어 각광을 받는 치료가 혈관신생 유전자치료이다.

본 론

측부혈관(Collateral vessel)

허혈성 심혈관 질환의 대표적인 것으로는 심장에서 발생하는 협심증, 심근경색 등이 있고 말초혈관에서 동맥경화에 의해 발생하는 동맥경화성 동맥폐색증(arteriosclerosis obliterans)과 혈관염에 의해서 발생하는 버거씨병(Buerger's disease) 등이 있다. 이러한 병은 동맥의 협착 혹은 폐색으로 인하여 말단장기에 충분한 양의 혈액이 공급되지 못하기 때문에 발생하는 것으로 말단 장기에 얼마만큼의 혈액이 공급되는냐에 따라서 환자의 증상이 달라질 수 있다.¹⁻³⁾ 측부혈관의 발달은 생체 방어 기전의 일종으로 기존에 만들어져 있던 혈관이 필요에 의해서 열리게 되는 'collateral recruitment'와 이전에는 없던 혈관이 허혈에 의해 새로이 만들어지는 'collateral growth'로 나누어 진다. 따라서 원위부 동맥이 완전히 폐색되어 이를 통한 혈액의 공급이 전혀 이루어지지 않음에도 불구하고 측부혈관(collateral vessel) 발달이 되어 있다면 환자는 이로 인한 허혈증상을 경하게 혹은 거의 호소하지 않을 수도 있다. 이렇게 만들어진 측부혈관은 큰 동맥 대신에 말단 장기에 혈류를 공급하여 좁아져서 환자의 증상을 호전 시키고 장기의 세포괴사를 막아 환자의 예후에 큰 영향을 끼치게 된다. 그러나 이러한 측부혈관의 형성은 누구에게서나 똑같이 일어나는 것은 아니며 여러 인자가 복합적으로 작용하여 발생되므로 그 발생을 미리 예측할 수는 없다.

혈관신생 유전인자

측부혈관의 발생을 자극하는 여러가지 생화학적 인자들이 알려져 있다. 대표적인 것으로 VEGF(vascular endothelial growth factor), FGF(fibroblast growth factor), Del-1 (Developmentally regulated endothelial locus) protein, HGF(hepatocyte growth factor, 일명 scatter factor), PD-EGF(platelet-derived endo-

thelial growth factor), angiopoietin, TGF(transforming growth factor), EGF(epidermal growth factor) 등이 있는데 그 중에서 VEGF, basic FGF(bFGF), HGF가 대표적인 물질로 가장 먼저 임상실험의 대상이 되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 이 중에서 VEGF는 mRNA의 alternative splicing에 의하여 서로 다른 4개의 isoform(VEGF₂₀₆, 189, 165, 121)이 존재하는데 이들간의 bioactivity는 비슷하지만 염기도와 heparin 결합 정도에 따라서 활성도가 다르다고 알려져 있다. 이 중에서 VEGF₁₆₅와 VEGF₁₂₁이 임상실험에서 주로 사용되고 있다. VEGF는 허혈에 의한 저산소증으로 인하여 유전자 발현이 증가되는 물질로 내피세포의 성장을 강력하게 유도하고 내피세포의 이동을 증가시키며 혈관의 투과성(vascular permeability)을 증가시키고 urokinase type-plasminogen activator, tissue type-plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, collagenase와 같은 단백분해효소의 분비를 촉진시키는 기능을 가지고 있다.^{7,8)} VEGF 수용체는 내피세포에만 특이적으로 존재하는데 최근에는 tyrosine kinase activity를 가지는 2개의 수용체, Flt-1과 Flk-1/KDR이 발견되었다. 이들은 extracellular portion에 7개의 immunoglobulin-like domain이 있으며, 1개의 transmembrane domain과 intracellular tyrosine kinase domain으로 구성되어 있다. 이러한 VEGF 수용체 역시 허혈에 의해 그 발현이 증가되어 VEGF에 대하여 혈관신생이 효과적으로 일어날 수 있게 한다.⁵⁾

bFGF는 16kDa의 단백질로 혈관 내피세포의 성장을 촉진하여 혈관생성을 유도하며, VEGF와는 다르게 평활근과 fibroblast와 같은 다양한 혈관세포의 증식을 일으켜, 보다 두껍고 굵은 혈관의 발달을 유도하게 된다(arteriogenesis). 또한 혈관벽의 heparan sulfate와 고효율로 결합하여 조직내에서 반감기가 매우 긴 특징을 가지고 있다.⁵⁾

HGF는 혈관의 평활근을 자극하지 않고 내피세포만 증식하도록 하는 물질로 강력한 혈관신생인자로 알려져 있다.⁹⁾ HGF는 MMP-1과 plasminogen activator의 분비를 증가시키는 역할을 하기도 한다. 보고에 따라서는 HGF는 인간의 대동맥 내피세포에 대해서는 VEGF보다도 강력하게 혈관신생을 유도한다고 보고되기도 하였다. 특히 HGF의 수용체인 c-met은 허혈조직에서는 발현이 증가되어 HGF의 혈관신생을 더욱 증가시키

는 효과가 있다. FGF와 HGF는 VEGF와는 다르게 혈관의 투과성을 증가시키지는 않으므로 VEGF 투여시 발생하는 부종과 같은 부작용이 일어나지 않는다.

혈관신생 유전자 치료법

측부혈관의 형성은 넓은 의미에서 혈관신생(angiogenesis)의 한 형태로서 최근 들어 혈관신생의 세포, 분자생물학적인 기전이 밝혀짐에 따라, 혈관신생인자(angiotrophic factor) 그 자체, 또는 그를 만드는 유전자를 허혈부위에 투여하여 측부혈관의 형성을 증진시킴으로써 현재 허혈성 심혈관질환 치료법의 한계성을 극복하고자 하는 새로운 시도가 이루어지고 있는데 이를 “혈관신생 치료법(血管新生 治療法 ; therapeutic angiogenesis)”이라 한다.¹⁰⁾

유전자 전달 방법

혈관신생 유전자를 원하는 부위까지 전달하기 위한 여러 가지 방법이 개발되었으나 아직 현재까지 이상적인 방법은 없는 상태이다. 원하는 유전자를 조직에 전달하기 위해서는 이를 운반할 수 있는 벡터가 필요한데 이들 중에서 adenovirus는 매우 손쉽고 고효율로 유전자를 전달할 수 있는 장점이 있으나 adenovirus의 자체적인 병리학적 위험성 때문에 우리나라의 실정에서 사용하기 어려운 점이 많다. 또다른 방법인 plasmid naked DNA는 사용하기가 매우 쉽고 안전하다는 장점이 있으나 adenovirus나 AAV에 비해서는 유전자 전달효율이 많이 떨어지는 단점이 있다. 따라서 이러한 점을 극복하기 위해 유전자의 발현을 증가시키는 몇 가지 방법이 연구되고 있는데 대표적인 것으로 강력한 프로모터를 사용하여 plasmid의 유전자 발현률을 높이는 방법이 있다.¹¹⁾¹²⁾ 이러한 plasmid 프로모터에는 바이러스 프로모터, 유핵세포 내에 항상 유전자발현을 유도하는 housekeeping 유전자의 프로모터, 특정 조직에서의 유전자 발현을 결정하는 조직-특이적 프로모터 등이 있다. 또한 프로모터 부위에 adeno-associated virus(AAV)의 ITR(inverted terminal repeat)을 추가하면 유핵발현벡터의 유전자 발현을 더욱 증가시키는 것으로 알려지고 있어 이를 이용한 새로운 plasmid의 개발이 이루어지고 있다.¹³⁾ 이외에도 skeletal muscle에 naked DNA를 주입한 후 전기자극(electroporation)을 시행하면 유전자의 발현과 기간을 크게 증

가시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 전기자극에 의해 유전자 전달이 증가되는 기전은 확실하게 밝혀져 있지 않으나 muscle fiber의 permeability를 증가시키는 것과 전기자극이 자체적으로 naked DNA의 이동을 촉진시키는 것으로 설명되고 있다.

이렇게 만들어진 유전자를 원하는 장기에 투여하기 위한 여러가지 방법이 있다. 관상동맥이나 하지의 동맥 내에 유전자를 투입하여 관류시키는 방법은 adenovirus에 주로 사용되는 방법으로, 이는 혈관조영술을 가지고 있는 곳에서 비교적 쉽게 거의 모든 환자에게 시행할 수 있는 장점이 있다. 그러나 이러한 방법은 투여한 유전자의 일부가 전신순환에 섞여 들어가므로 전신적 부작용이 발생할 수 있다. 또한 이 방법은 세포내로 매우 낮은 유전자 전달률을 보이는데 bFGF adenovirus를 관상동맥을 통하여 주입하는 경우 1시간 동안에 겨우 0.9%의 유전자 만이 전달되며 24시간 후에 남아 있는 유전자는 겨우 0.05% 밖에 되지 않는다.¹⁵⁾

원하는 부위에 유전자를 근육 내로 직접 주입하는 방법은 naked DNA, adenovirus에 이용되며, 비교적 간단하고 유전자가 국소적으로 작용하기 때문에 전신적으로 올 수 있는 부작용을 줄일 수 있다.¹⁶⁾ 이 방법은 직접 동맥으로 유전자를 주입하는 방법에 비하여 유전자의 전달 효율이 높으며 시간이 경과하여도 유전자가 조직 내에서 지속하여 오랜 시간동안 유전자가 조직 내에서 작용할 수 있게 해주는 장점이 있다. 동맥경화성 동맥폐쇄 질환이나 버거씨병의 경우에는 유전자를 직접 손이나 다리 부위에 근육주사하여 간단하게 시행할 수 있지만 심장의 경우에는 심장에 직접 유전자를 주입하기 위해서 개흉술을 시행해야 하므로 수술 자체에 따른 위험이 있으며 반복적으로 시행하기에는 어려운 제한점이 있었다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 최근에는 경피적으로 혈관 내에 카테터를 삽입하여 좌심실 내에서 심내막으로부터 유전자를 주입하는 방법이 소개되었는데 이를 “Percutaneous Transluminal Gene Transfer(PTGT)”라 한다.¹⁷⁾ 이 방법은 유전자의 국소적 전달이 효과적이면서도 큰 수술이 필요하지 않아서 주목을 받고 있다. PTGT를 이용하여 효율적으로 안전하게 심근내로 유전자를 전달하기 위하여는 PTGT 카테터를 원하는 부위에 주입하기 위해서 특별한 guidance 시스템이 필요하게 된다. 여기에는 electromechanical mapping(NOGA 시스템), 엑스선 투시(flu-

oroscropyguided method), 심근내 초음파도(intracardiac echocardiography-guided method) 등이 있는데 각각의 방법에 따른 장단점이 있다. 특히 이중에서 심근내 초음파도를 이용한 유전자 주입은 말단부에 초음파 프루브가 달린 특수 카테터를 이용하며, 우심실 내에서 실시간으로 좌심실 내부를 모니터링하여 유전자 주입 부위를 판정하는데 효율적으로 쓸 수 있지만 아직까지는 실험적인 방법으로 임상실험에는 제한적으로 쓰이고 있다.¹⁸⁾

말초혈관 질환에서의 혈관신생 치료의 임상실험 결과

VEGF를 통하여 혈관생성을 촉진시켜 측부혈관을 증진함으로써 허혈성 말초동맥질환을 치료할 수 있을 것이라는 가설은 미국의 Jeffrey Isner에 의하여 처음 제안 되었고 여러 동물실험 결과가 보고된 이후로 유사한 연구결과들이 많이 발표되어¹⁰⁾¹²⁾ 이러한 결과를 바탕으로 말초혈관환자를 대상으로한 VEGF를 이용한 임상실험 결과들이 보고되었다.

Baumgartner 등¹⁹⁾은 잘 아물지 않는 허혈성 궤양과 휴식기 통증이 있는 9명의 환자 10개의 허혈성 다리에 VEGF₁₆₅의 naked DNA를 말초혈관질환의 허혈 부위 근육에 직접 주입하였는데, 평균 6개월 추적관찰 시 임상 증상의 호전과 Ankle-Brachial Index(ABI)의 호전, 평균 걷을 수 있는 시간의 향상과 혈관조영술 상에서 새로이 형성된 측부혈관이 관찰되었다. 이 연구는 1상 임상실험으로 전 환자에서 중양이나 당뇨병성 망막증은 관찰되지 않아서 말초동맥질환에서 VEGF₁₆₅를 이용한 유전자 치료가 안전하고 효과적이라고 보고하였다.

버거씨 병에 대해서도 1상, 2상 임상실험이 이루어졌는데 버거씨 병을 가진 7명의 환자, 8개의 다리(5 ; 발가락 괴저, 2 ; 광범위 전족부 괴저, 1 ; 휴식통)에 VEGF₁₆₅ plasmid DNA를 근육내 투여하여 치료효과와 안전성을 연구하였다.²⁰⁾ 발가락 괴저를 가진 5명 모두에서 궤양이 감소하였으며, 휴식기 통증이 감소하였고 보행 능력이 향상되어 단계적 운동부하검사에서 5분 동안 걸을 수 있었다고 보고하였다. 하지만 광범위한 전족부 괴저를 가진 2명의 환자는 괴저가 지속적으로 진행되어 무릎아래 절단을 시행하였다. 혈관조영술 및 MRA를 이들 환자에게서 시행한 결과 200~800 μ m 크기의 새로운 측부 혈관들이 형성되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 phVEGF₁₆₅의 근육내 유전자 치료는

버거씨 병으로 인한 심한 사지 허혈, 특히 휴식통과 발가락에 제한된 궤양을 가진 환자의 치료에 효과가 있으며 안전한 치료방법임을 보고하였다.

최근에 결과가 발표된 TRAFFIC 연구는 말초혈관질환에서 처음으로 시도된 placebo controlled study 로써 170명의 간헐적인 파행증상을 나타내는 말초동맥질환 환자들을 대상으로 rFGF-2(30 μ g/kg) 단백질을 하지의 동맥 내로 1회 또는 2회 투여하였다. 결과는 투여한지 90일째에 rFGF-2를 투여한 군에서 peak walking time 이 투여 전에 비해 1.77분 증가한 반면 대조군에서는 0.6분이 증가하는데 그쳐 rFGF-2를 투여한 군의 peak walking time이 의미있게 증가하였다. 또한 ABI도 rFGF-2를 투여한 군에서 대조군에 비해 의미있는 상승을 보였다. 그런데 rFGF-2를 1회만 투여한 군과 30일 후에 같은 양의 rFGF-2를 한차례 추가로 투여한 군 사이에서는 peak walking time이나 ABI의 추가적인 상승은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 rFGF-2에 의해 혈관신생이 의미있게 일어난다는 증거를 보여주었으나 rFGF-2의 추가 투여에 따른 이점을 보여주지 못해 향후 투여용량과 횟수에 대한 연구가 필요할 것이라는 점을 시사하였다.²¹⁾

혈관신생 유전자 치료를 이용한 허혈성 심장질환의 임상 실험 결과

Losordo 등²²⁾은 그룹은 1상 임상시험으로 심한 심근 허혈의 증세(class IV)가 있고 심혈관조영술 상 허혈성 심질환으로 진단 받았으나 기존의 치료에 효과가 없는 성인 20명에게 최소흉부절개술을 시행 후 VEGF₁₆₅의 naked DNA를 심근에 직접 주입하였다. 그 결과 모든 환자에서 니트로글리세린의 사용이 유의하게 감소하였고, single photon emission computed tomography (SPECT)-sestamibi 영상에서도 심근허혈이 호전되었다. 시술 전후 혈압, 심박동수의 유의한 변화 및 시술 전후 심근경색 등이 없었다. 이를 바탕으로 현재 electromechanical mapping을 guidance 시스템으로 하여 PTGT를 이용한 제 2 상 임상시험이 진행 중으로 중간 결과는 호의적인 것으로 알려져 있다.

Rosengart 등²³⁾은 역시 1상 임상시험으로 adenovirus를 벡터로 이용하여 VEGF₁₂₁ cDNA를 허혈성심질환이 있는 환자에게 적용하였다. 환자가 심장혈관우회로술을 시행 받는 중에 혈관우회로술이 불가능한 부

위의 심근에 직접 VEGF 유전자를 주입하였는데 시술과 관련되어 심근손상, 부정맥 발생, 심낭삼출액의 증가, 국소심근운동 이상과 같은 합병증이 관찰되지 않았다. 환자들은 시술 후 협심증의 정도가 감소하고 관동맥조영술과 부하 sestamibi 검사상 심근허혈이 호전되는 양상을 보여 유전자 요법의 안정성과 치료 효과를 보고하였다. 현재 제2상 임상시험이 진행 중이다.

VIVA(VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis) 제2상 임상시험은 Genentech 회사가 주관한 허혈성심질환 단백질요법의 첫 번째 randomized, double-blind placebo-controlled study이다. 환자 178명을 세 군으로 무작위 배정 후 placebo, rhVEGF 17 ng/kg/min(저용량군), rhVEGF 50 ng/kg/min(고용량군)을 관상동맥과 정맥내로 투여하였다. 60일 경과 후 관찰결과, 세 군 모두에서 운동시간, 협심증의 정도, 삶의 질(quality of life)이 유의하게 개선되었으며, 각 군간의 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 120일 후 관찰결과, 대조군에서의 개선효과는 감소되는 경향을 보인 반면, VEGF 고용량 투여군에서는 개선효과가 지속되어 대조군에 비하여 흉통의 유의한 개선($p=0.04$) 및 운동시간의 개선경향($p=0.17$)이 관찰되었다. 장기적인 안전성과 유효성을 관찰하기 위해 환자 102명의 맹검을 유지하며 1년 동안 관찰한 결과 세 군 모두 120일 이후엔 흉통의 개선효과가 약간 저하되는 경향을 보였지만, 1년 경과 후 VEGF 투여군에서는 흉통의 개선효과가 유지되는 경향을 보였다. 또한, rhVEGF 투여군에서의 사망률, 심근경색, 혈관재건술(PTCA, CABG, TMR), 암환자 발생률, 이상반응 발현률을 관찰한 결과 대조군과 유사하였으며, 특히 rhVEGF 고용량 투여군에서의 암환자 발생률과 이상반응 발현률은 대조군에 비하여 유의적으로 낮음이 관찰되었다. 결론적으로 장기간(1년 이상)의 관찰 결과에서도 협심증 환자에서의 VEGF 단백질 투여 혈관신생치료법은 안전하였다.²⁴⁾

FIRST(FGF-2 Initiating Revascularization Support Trial) 제2상 임상시험은 Chiron 회사의 무작위, 이중맹검, 대조군 연구이다. PTCA나 CABG의 적응이 되지 않는 심한 허혈성심질환 환자($n=337$)를 대조군과 치료군으로 나누어 rFGF-2 단백질(0.3, 3.0 또는 30 g/kg)을 관동맥 내 1회 투여하였을 경우 치료 후 90일, 180일에 치료군에서 협심증이 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 단, 처음

에 증상이 심하거나 고령인 환자에서 협심증의 이러한 감소경향은 더욱 뚜렷하였다.²⁵⁾

허혈성심질환 유전자요법의 첫번째 무작위, 이중맹검, 대조군 연구로써 AGENT(Adenovirus GENe Therapy) 제2상 임상시험 결과가 발표되었다. 대상은 NYHA Class II, III 협심증 환자($n=60$)로 adenovirus 5 FGF-4(Ad5 FGF-4 $3.2 \times 10^8 - 3.2 \times 10^{10}$ viral particle)를 관상동맥 내에 주입하였다. 치료군($n=60$)은 대조군($n=19$)에 비하여 12주 후에 운동부하 검사 시간이 약 30% 향상되었다. 이러한 향상은 adenovirus에 대한 antibody의 농도가 낮은 환자와 처음에 운동부하 검사시간이 10분 미만인 환자군에서 더욱 뚜렷하였다. 투여 후 일부에서는 발열과 같은 가벼운 부작용이 있었으나 심각한 부작용은 관찰되지 않아 adenovirus FGF-4의 주입은 매우 안전한 것으로 평가되었다.²⁶⁾

지금까지의 결과로 미루어 볼 때 혈관신생 단백질 혹은 유전자를 이용한 혈관신생치료는 단기간 뿐만 아니라 장기간의 추적관찰에서도 안전한 것으로 생각된다. 대부분의 1상 임상시험에서는 혈관신생치료법이 환자의 통증의 경감과 운동능력의 향상, 허혈로 인한 궤양 혹은 괴저가 호전되는 양상을 보였으나 일부 2상 실험들 중에는 이러한 기대에 미치지 못하는 결과가 발표되기도 하였다. 이러한 결과들로 인해 혈관신생인자를 이용한 치료에는 여러가지가 고려되어야 하는 것으로 생각된다. 혈관신생인자를 단백질과 유전자 중에서 어떤 형태로 주입할 것인가에 관한 문제에서 최근의 의견에 의하면 유전자 형태로 투여하는 것이 보다 손쉽고 비교적 장기간에 걸쳐서 여러 번의 반복투여 없이 지속적으로 조직 내에서 혈관신생인자의 농도를 유지할 수 있다는 점에서 단백질 보다는 유전자 형태로 혈관신생인자를 전달하는 것이 효율적이다. 위에서 기술한 연구들 중에서 실제로 용량-반응 관계(dose-response relationship)를 보인 결과가 없었다는 점에서 투여량과 투여방법의 중요성이 크다고 여겨지는데 혈관신생을 최대로 일으키기 위해서는 어떤 용량으로 몇 차례에 걸쳐서 어떤 간격으로 투여해야 하는지에 관한 연구가 거의 없는 실정이다. 또한 최근의 다른 연구에서 너무 고용량의 혈관신생인자의 투여는 오히려 혈관신생을 방해할 수도 있다고 보고하기도 하여 혈관신생인자의 투여량과 투여방법은 앞으로도 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되고 있다. 그러나 최근의 TRAFFIC, AGENT

의 연구에 힘입어 혈관신생치료는 실제로 인체 내에서 작용하여 새로운 혈관을 만들고 이로 인해 환자의 증상을 호전시키고 예후를 개선할 수 있는 새로운 치료 방법의 가능성이 높아지고 있다. 다만 좀 더 확실한 효과가 증명되기 위해서는 향후의 2상, 3상 임상실험 결과들을 지켜 보아야 할 것으로 생각된다.

Combined arteriogenic gene therapy

최근의 사지허혈이나 심근허혈을 호전시키기 위한 측부혈관의 생성 연구는 단순한 모세혈관 수준의 혈관만을 발달시키는 수준(angiogenesis)이 아니라 세동맥(arteriole) 이상의 실질적인 기능을 할 수 있는 동맥신생(arteriogenesis)에 초점이 맞추어 지고 있다. 실제로 많은 경우에서 VEGF가 조직내에서 높은 농도로 오랜 기간 동안 작용하더라도 조직에 충분한 혈액을 공급할 수 있는 기능적인 혈관이 만들어 지는 대신에 혈관종(hemangioma)과 같은 미세한 혈관만이 생성되어 실질적인 조직 허혈을 개선시키지 못하기도 한다.²⁷⁾ 이러한 기능적인 혈관들은 어느 한 단계, 한 인자에 의해서만 완전하게 발생하는 것이 아니라 여러 단계를 거치면서 여러 인자들의 복합적인 상호작용에 의해 만들어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 기능적인 혈관을 만들기 위해서는 VEGF나 FGF 이외에도 여러 인자들을 복합적으로 “사용하는 복합 동맥신생 유전자 치료(combined arteriogenic gene therapy)”가 필요하게 되며 이를 이용한 여러 동물실험 결과들이 보고되어 있다.

Xin 등²⁸⁾에 의하면 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 VEGF와 HGF를 동시에 주입하였을 때 VEGF 혹은 HGF를 단독으로 처리하였을 때보다 내피세포의 tube formation이 더욱 촉진되는 것으로 관찰되었으며 rat cornea assay에서도 VEGF와 HGF의 혼합투여는 혈관신생에 의해 발생하는 혈관면적이 더욱 넓은 것으로 나타났다. 또한 이러한 VEGF와 HGF는 동시에 투여한 경우 anti-apoptotic gene인 Bcl-2, A1의 mRNA를 증가시켜 보다 많은 내피세포들이 생존할 수 있도록 한다는 사실을 알아내었다. 따라서 VEGF와 HGF의 혼합투여는 서로 상승효과를 일으켜 단독으로 사용하는 경우보다 혈관신생을 더욱 더 촉진시키는 것으로 보고하였다.

Chae 등²⁹⁾은 VEGF와 angiopoietin-1의 naked

DNA를 동시에 투여시 각각의 투여보다 혈관신생을 증가시킨다고 보고하였으며, Visconti 등³⁰⁾은 VEGF, angiopoietin-1, 2를 over-expression 시킨 transgenic mice를 이용하여 심장에서의 혈관신생의 정도를 비교하여 보면 VEGF와 angiopoietin-1을 동시에 발현시킨 mice에서 VEGF나 angiopoietin-1을 단독으로 발현시킨 경우보다 심장근육내에서 생성된 모세혈관의 수가 증가하는 반면 VEGF, angiopoietin-1, angiopoietin-2를 모두 발현 시킨 mice에서는 모세혈관의 수가 증가하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 VEGF와 angiopoietin-1이 동시에 과발현 되는 경우에는 혈관신생의 개시에 상승작용을 일으키지만 angiopoietin-2는 VEGF에 의한 혈관신생효과를 상쇄시키는 것으로 나타났다.

이처럼 여러 가지의 혈관신생인자를 복합하여 투여하는 경우에는 VEGF와 HGF 혹은 angiopoietin-1의 경우에서처럼 서로 상승작용을 일으켜 혈관신생을 더욱 증가시키기도 하지만 angiopoietin-2와 같이 혈관신생을 방해하기도 한다. 따라서 기능적인 혈관을 만들기 위한 복합 동맥신생 유전자 치료를 위해서는 여러 인자가 필요하지만 어떤 인자를 어떤 방법으로 복합하여 투여하느냐는 향후 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

혈관신생 치료법의 문제점 및 향후 발전방향

이처럼 혈관신생 치료법이 허혈성 심혈관 질환의 새로운 치료법으로 많은 각광을 받고 있으나 이 방법이 확고한 치료법으로 자리잡기 위하여는 아직도 해결하여야 할 많은 문제점들이 있다. 첫째, angiogenesis에 대한 분자생물학적인 기전을 아직 완전히 모른다. 둘째, 신생혈관이 측부혈관으로서 기능을 하기 위하여는 모세혈관이 아닌 세동맥(arteriole) 이상의 근성동맥(muscular artery)이 만들어져야 한다. 이를 위해서는 위에서 기술한 복합 동맥신생 유전자 치료나 최근 시도되는 내피전구세포(endothelial progenitor cell ; EPC)를 이용한 혈관신생치료가 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 보다 많은 혈관신생인자들이 밝혀져야 하며 기존의 혈관신생유전자로 알려진 유전자들에 대해서도 여러 혈관신생유전자 상호간에 어떤 작용을 하는지에 대해서 밝혀져야 한다. 즉 어떤 조합으로 이들을 투여하면 효율적이며 안정적으로 오래 지속될 수 있

는 측부혈관이 형성되는지에 대한 연구가 필요하다. 셋째, 주입한 또는 유전자로부터 만들어진 혈관신생인자가 전신적인 순환을 하여 원하지 않는 다른 부위에 혈관신생을 일으켜 암의 전이나, 당뇨병성 망막증의 악화, 동맥경화 죽상중의 괴열과 같은 부작용을 일으킬 수 있으므로 유전자 투여는 허혈부위에 최소한의 양을 국소적으로 투여하는 방법이 바람직하다. 넷째, 혈관신생인자 투여 후 발생한 측부혈관이 지속적으로 유지되는지, 아니면 혈관신생인자의 작용기간이 지나면 퇴화(regression)되므로 반복적인 혈관신생인자의 주입 또는 장기적인 발현이 필요한지에 대한 연구결과가 없다. 다섯째, 허혈성질환 시 생리적인 혈관신생인자 수용체 발현 변동에 대한 지식이 부족하다. 여섯째, 무엇보다도 위의 “유전자요법” 임상시험 결과들이 아직은 제 1 상, 2 상 임상 시험의 결과들로서 대규모의 3상 임상시험의 결과가 나올 때까지는 치료 효과를 확신할 수 없다. 일곱째, 최근에 각광을 받고 있는 EPC를 이용한 혈관신생 치료법은 주입한 골수세포가 어떤 기전으로 주변의 조직에 합쳐져 새로운 혈관을 만들어 내는지, 그리고 이때 분비되는 cytokine들은 어떠한 것들이 있으며 동시에 주입된 다른 계열의 immature mesenchymal stem cell은 혈관신생에 어떤 역할을 하는지에 관한 연구들이 향후 선행되어야 할 것이다.

결 론

혈관신생인자를 이용한 혈관신생 치료법은 기존의 치료에 반응하지 않던 환자들에게 새로운 치료 방법을 제시하였다는 점에서 매우 고무적인 일이다. 또한 혈관신생 치료법은 분자생물학의 발달이 실제 임상치료에 응용됨을 보여주는 좋은 본보기로서 허혈성심혈관 치료의 새로운 paradigm을 제시하였다는데 중요한 의미가 있다. 앞으로 혈관신생치료가 더욱 발전하여 그 효용성을 인정 받게 되면 치료의 대상이 이른바 no optional patient에게만 국한되는 것이 아니라 기존의 방법으로 치료 받고 있는 일반 환자에게도 PTA나 bypass surgery를 대체할 수 있는 치료 전략으로 사용되며 이들 치료법과 병행하는 adjunctive therapy로 사용될 수 있을 것이다. 그러나 혈관신생 치료의 효용성이 완전히 증명되기 위해서는 앞으로 2상, 3상의 추가적인 임상연구의 결과가 필요하다. 특히 복합 동맥신생 유전자 치

료법과 EPC를 사용한 혈관신생요법은 기존의 유전자 치료에 비해 보다 효과적이며 기능적인 혈관신생을 만들 수 있을 것으로 생각되지만 향후 이에 관한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 유전자치료 ; 혈관신생인자 ; 말초동맥질환 ; 심근허혈.

본 논문은 과기부 국가지정연구실(NRL) 사업의 연구비(M1-0203-00-0048 to DK Kim)로 이루어 졌음.

REFERENCES

- 1) Mukherjee D, Bhatt DL, Roe MT, Patel V, Ellis SG. *Direct myocardial revascularization and angiogenesis: how many patients might be eligible?* *Am J Cardiol* 1999;84:598-600.
- 2) Eckstein RW, Gregg DE, Pritchard HW. *The magnitude and time of development of the collateral circulation in occluded femoral, carotid and coronary arteries.* *Am J Physiol* 1941; 132:351-61.
- 3) Simons M, Ware JA. *Food for starving hearts.* *Nat Med* 1996;2:519-20.
- 4) Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinnors BL. *Angiogenesis assays: problems and pitfalls.* *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:167-72.
- 5) Folkman J, Klagsbrun M. *Angiogenic factors.* *Science* 1987;235:442-7.
- 6) Folkman J, Shing Y. *Angiogenesis.* *J Biol Chem* 1992;267: 10931-4.
- 7) Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis.* *J Clin Invest* 1989;84:1470-8.
- 8) Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells.* *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:902-6.
- 9) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. *Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease.* *Gene Ther* 2001;8:181-9.
- 10) Hirsch DD, Pantely GA. *Therapeutic angiogenesis: just the basic factors, please.* *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1107-8.
- 11) Doll RF, Crandall JE, Dyer CA, Aucoin JM, Smith FI. *Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors.* *Gene Ther* 1996;3: 437-47.
- 12) Lee Y, Park EJ, Yu SS, Kim DK, Kim S. *Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases.* *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:230-5.
- 13) Miralles VJ, Cortes P, Stone N, Reinberg D. *The adenovirus inverted terminal repeat functions as an enhancer in a*

- cell-free system. *J Biol Chem* 1989;264:10763-72.
- 14) Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4262-7.
 - 15) Laham RJ, Rezaee M, Post M, Sellke FW, Braeckman RA, Hung D, Simons M. *Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. Drug Metab Dispos* 1999;27:821-6.
 - 16) Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. *Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus. Circulation* 2000;102:E73-86.
 - 17) Gwon HC, Jeong JO, Kim HJ, Park SW, Lee SH, Park SJ, Huh JE, Lee Y, Kim S, Kim DK. *The feasibility and safety of fluoroscopy-guided percutaneous intramyocardial gene injection in porcine heart. Int J Cardiol* 2001;79:77-88.
 - 18) Park SW, Gwon HC, Jeong JO, Byun J, Kang HS, You JR, Cho SS, Lee MJ, Lee Y, Kim S, Kim DK. *Intracardiac echocardiographic guidance and monitoring during percutaneous endomyocardial gene injection in porcine heart. Hum Gene Ther* 2001;12:893-903.
 - 19) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. *Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation* 1998;97:1114-23.
 - 20) Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. *Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. J Vasc Surg* 1998;28:964-73.
 - 21) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. *Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomized trial. Lancet* 2002;359:2053-8.
 - 22) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. *Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation* 1998;98:2800-4.
 - 23) Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. *Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation* 1999;100:468-74.
 - 24) Timothy H. *One year after patients with severe myocardial ischemia received VEGF in VIVA trial. American Heart Association's Scientific Sessions, 2000*
 - 25) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. *Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. Circulation* 2002;105:788-93.
 - 26) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. *Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. Circulation* 2002;105:1291-7.
 - 27) Carmeliet P. *VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? Nat Med* 2000;6:1102-3.
 - 28) Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME. *Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. Am J Pathol* 2001;158:1111-20.
 - 29) Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. *Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2573-8.
 - 30) Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. *Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8219-24.