대한방사선의학회지 2003;48:131 - 139

간질환의 유전자치료를 위한 효과적인 아데노바이러스벡터의 간내 전달방법으로서 젤폼절편을 사용한 간동맥색전술의 유용성: 개에서의 예비 동물 실험[1]

이 진 화·박 병 호·김 찬 성

목적: 아데노바이러스매개체는 간세포와 같이 정지세포에 침투하여 유전자물질을 전달할 수 있는 좋은 매개체이다. 하지만 높은 농도의 아데노바이러스매개체의 사용은 간독성과 심한 면역반응을 나타내기도 한다. 이에 부작용을 최소화 할 수 있는 적은 농도의 아데노바이러스매개체를 임상에서 널리 사용하고 있는 간동맥색전법으로 효과적인 간내 전달이 이루어지는지를 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 인형 아데노바이러스 제5형을 이용하여 바이러스가 복제에 필요한 유전자인 E1 부분을 제거하고 E1 부분에 β-galactosidase 유전자를 넣어, 자가 복제가 불가능한 바이러스로 재조합하고, 293 세포주에서 증폭시켜 정제한 adv.CMV.LacZ (이하 LacZ - adv)를 실험동물 한 마리 당 2×10^{11} particles/kg의 농도로 준비하였다. 몸무게 10 kg 전후의 잡종 개 두 마리를 좌간엽동맥에 주입하는 젤폼절편의 크기 (3×2×2 mm, 2×1×1 mm)에 따라 실험개 - I, II로 분류하였고, 전신마취하에 좌간엽동맥을 3F 미세카테터로 초선택하였다. 준비된 LacZ - adv를 젤폼절편에 완전흡수시켜 선택된 좌간동맥으로 주입하여 좌간동맥이 색전이 이루어지도록 하였다. 비슷한 몸무개의 잡종개 한 마리는 대조실험개 (실험개 - III)로 젤폼절편없이 LacZ - adv만을 좌간동맥내로 주입하였다. 시술 전, 하루, 3일에 혈액학적 병리소견을 얻기 위해 채혈하고, 3일 후에 안락사시켜 간조직을 얻은 뒤, 간의 각 절편에서 X - gal 염색을 하여 간세포내 유전자전달에 의한 염색 유무, 염색 정도를 병리학자가 판단하였다.

결과: 젤폼절편의 크기가 큰 실험개 - I은 X - gal 염색이 간문 근처의 큰혈관 주위의 간세포에 덩어리져 염색되었고, 작은 크기의 젤폼절편의 실험개 - II는 간 전체에 걸쳐 골고루 X - gal 염색이 되는 것을 발견할 수 있었다. 그러나 간동맥 색전없이 LacZ - adv를 주입한 대조실험개 (실험개 - III)의 간은 X - gal에 염색되는 간세포를 발견하기 힘들었다. 실험개 - I, II, III 모두 현미경시야에서 간세포의 괴사나 염증반응은 발견할 수 없었고, 혈액검사 소견상 염증반응을 나타내는 소견은 보이지 않았다. 혈청학적 간기능 검사에서 SGOT, SGPT 수치가 시술 1일째 약간 증가하였으나, 시술 3일째는 시술 이전의 상태로 회복되었다.

결론: 젤폼절편의 크기를 작게하여 실시한 간동맥색전술은 LacZ - adv의 간내 전달방법으로 아주 효과적이며, 안전한 방법이라고 생각된다.

간은 다양한 종류의 대사성 질환과 종양을 포함하며 기존의 치료법에 한계가 있기 때문에 유전자치료를 시도할 수 있는 좋은 대상이다. 이러한 유전자치료가 성공적으로 이루어지기 위해서는 많은 난관이 있다. 예를 들어 유전자의 조작, 유전자의 전달방법, 유전자의 목표세포내 침투법, 효과적이며 안전한 전달유전자 발현, 그리고 발현되는 전달유전자의 조절 등이다 (1, 2). 이중에서도 가장 문제가 되는 것은 유전자 전달의 효율성에 관한 것이다 (3). 유전자전달을 위해 다양한 매개체 (vector)를 사용하고 있으나 유전자의 효과적인 전달과 발현을 위해선 바이러스를 매개체로 이용하는 것이 좋은 것으로 되어 있다 (1, 2, 4 - 7). 많은 바이러스 중 증식 불가능한 재조합아데노바이러스매개체(adenovirus vector, 이하 adv)는 세포분열을 하지 않는 세포에 감염되는 장점을 가지고, 체내 주입 후 간에 급격히 농축되는 장점이 있기에 간의 질환을 위한 유전자치료에 가장 좋은 매개체로 알려져 있다 (1, 2, 8 - 10).

하지만 유전자 전달을 위해 사용하는 adv의 농도가 너무 높을 경우 adv 자체에 의한 독성효과, 염증반응, 면역반응 등이 문제가 될 수 있으며, 너무 낮을 경우 효과적인 간세포내에

[1]동아대학교 의과대학 진단방사선과학교실
이 논문은 2002년 8월 12일 접수하여 2002년 9월 26일에 채택되었음.

adv의 전달이 되지 않아 유전자 발현이 문제가 될 수 있다. 이를 극복하기 위해 adv에 유전적 변형을 가하거나, 치료하고자 하는 숙주의 면역반응을 억제하기도 하고, 주입방법을 바꿔보는 등의 노력이 있어왔다(11-14). 그러나 adv를 이용한 유전자치료의 임상실험 도중 발생한 Gelsinger의 죽음(15, 16)은 adv의 주입에 따른 부작용을 최소화하기 위해 여러 가지 부가적인 방법을 사용하더라도 adv의 절대적 주입 농도를 낮추어, 바이러스 독성으로 인한 부작용을 최소화하는 것이 중요하다는 것을 일깨워주었다.

간암의 치료방법 중 간동맥색전술은 1970년대 말 일본 학자에 의해 알려지기 시작하면서 현재까지 간암의 가장 효과적인 치료방법 중의 하나로 알려져 있다. Kan(17)은 간동맥을 통해 리피오돌을 주입하고 젤폼으로 간동맥을 색전한 경우 간세포는 간문맥에 의해 혈류공급을 받으며, 간동맥을 통해 주입된 리피오돌은 젤폼으로 간동맥의 혈류를 막음으로써 간의 동모양혈관수준(sinusoid level)에서 오랫동안 저류된다는 사실을 동물실험을 통해 증명하였다.

이에 저자는 현재 임상에서 사용하고 있는 간동맥색전술의 방법을 인용하여, adv로 적신 젤폼절편으로 간동맥을 색전하면, 이어 들어오는 간동맥의 혈류를 막아 주입된 adv와 간세포 접촉시간이 오랫동안 유지될 것이며, 따라서 적은 농도의 adv를 사용하더라도 효과적인 간내 유전자물질의 전달이 이루어 질 것으로 가정하여, 중간 크기의 동물을 이용한 간동맥색전법으로 adv의 효과적인 간내 전달이 이루어지는지를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

아데노바이러스 발현을 측정하기 위한 지표로 사용하기 위해 사용한 adv.CMV.LacZ(이하 LacZ-adv)는 인형 아데노바이러스 제5형을 이용하여 바이러스 복제에 필요한 단백을 생성하는 유전자인 E1 부분을 제거하여 자가 복제가 불가능한 바이러스에 β-galactosidase 유전자를 이전에 보고된 방법으로 재조합하였다(18). 바이러스 벡터는 사람 태아 신장 세포주인 293 세포주(ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)에서 증폭시켜 cesium chloride density gradient centrifugation에 의하여 정제하고 dialysis하여 -80。C에서 보관하였다. Stock의 titer는 293 세포주에서 plaque titration에 의하여 결정하였다. 실험동물 한 마리 당 LacZ-adv의 농도는 2×10^{11} particles/kg을 사용하였다.

실험동물은 9.5-11 kg의 몸무게를 가진 잡종견 세 마리를 암수의 구별없이 실험에 사용하였다. 이중 두 마리는 adv 주입시 간동맥의 색전을 유도한 실험군(실험개-I, II)으로 사용하였으며, 한 마리는 adv를 간동맥의 색전없이 간동맥내에 주입한 대조실험(실험개-III)으로 사용하였다.

개를 하루동안 금식을 시킨 뒤, 럼푼®(Xylazine hydrocholoride, 바이엘코리아주식회사, 경기도, 한국) 1.5 ml/kg와 케타민®(Ketamin HCl, 유한양행, 경기도, 한국) 20 mg/kg를 개의 대퇴부 근육에 주사하여 전처치를 실시한 뒤, 수술대에 앙아위로 눕히고, 개의 주둥이에 마취용 마스크를 씌운 뒤, 폐쇄회로식 전신흡입마취기로 흡입 마취제인 에어레인®(Isoflurane, 일성신약, 서울, 한국) 1.5%와 산소 0.1 l/min를 약 10분간 공급하여 충분한 전신마취를 유도하였으며, 시술 시작 후 에어레인® 0.5%와 1.5%의 농도로 개의 마취 상태를 보아가며 마취를 유지시켰다. 모든 개의 생체실험은 무균방법으로 시행하였으며, 시술 전, 도중, 시술 후 감염이 발생하지 않도록 최대한의 조치를 하였다.

개의 서혜인대 1 cm하방의 부위에서 우장골동맥을 선택하여 천자한 뒤 대동맥내에 035" Terumo guidewire®(Terumo Inc, Tokyo, Japan)를 위치시키고 4F Cobra 카테터(Terumo, Tokyo, Japan)를 진행시킨 후 수용성 조영제 Hexabrix®(Guerbet, Paris, France)와 DSA혈관촬영기를 이용하여 동축법으로 좌간엽동맥을 초선택하여 혈관조영검사를 시행하였다(Fig. 1).

LacZ-adv와 젤폼의 혼합은 20×60×7 mm의 크기의 수술용 젤폼(Gelfoam®, absorbable gelatin sponge USP, Pharmacia & Upjohn, Kalamzoo, U.S.A.)을 3×2×2 mm의 크기와 2×1×1 mm의 크기로 썰어 각각 준비된 수술용 용기에 넣은 뒤,

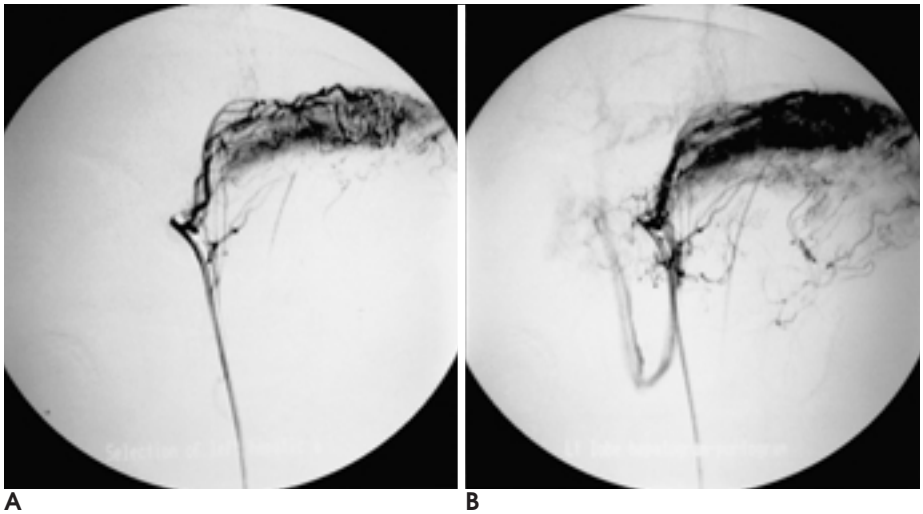


Fig. 1. Superselective catheterization of left hepatic lobar artery using 3 F microcatheter with coaxial method.
A. The artery supplying left lobes was noted.
B. It shows normal portal venous return of contrast media through hepatic tissue.

2 ml의 생리식염수에 농축되어 있는 LacZ - adv와 섞었다. 이것을 5 cc의 일회용주사기에 넣고, 다시 2 cc의 수용성조영제인 Hexabrix 를 섞어 3F 미세카테터 (S - P microcatheter®, Terumo, Tokyo, Japan)를 통하여 주입할 수 있도록 준비하였다.

실험개 - I은 좌간동맥에 거치되어 있는 3F 미세카테터를 통하여 3×2×2 mm의 크기로 준비된 젤폼 - LacZ - adv 수용액을 좌간동맥안으로 천천히 주입하였다. 실험개 - II는 2×1×1 mm 크기의 젤폼에 적셔있는 LacZ - adv를 같은 방법으로 좌간동맥안으로 주입하였다. 주입시 DSA혈관촬영기의 투시를 통하여 좌간엽으로 들어가는 LacZ - adv이 적셔져 있는 혼합물이 다른 혈관으로 역류되지 않도록 조심하였다. 모든 용액이 다 주입한 뒤 카테터내에 남아있을 수도 있는 용액의 완전 주입을 위하여 1cc의 조영제로 카테터를 관류시키고, 효과적인 색전을 확인하기 위하여 혈관조영술을 이어 실시하였다(Fig. 2).

대조실험개(실험개 - III)는 위와 동일한 방법으로 준비한 다음, 10 cc 일회용주사기에 2 cc의 LacZ - adv 수용액을 넣고, 8 cc의 Hexabrix®를 섞어 총량이 10 ml가 되도록 한 뒤, 3F 미세카테터를 통해 LacZ - adv 수용액이 역류되지 않도록 투시로 관찰하며 약 2분에 걸쳐 천천히 주입하였다. 전량이 주입된 뒤, 생리식염수로 카테터 내부를 관류시킨 뒤 혈관조영검사를 실시하였다.

시술을 끝낸 뒤 카테터를 제거하고, 혈관을 결찰하여 출혈을 방지하고 피부를 봉합하고 소독하였다. 마취에서 깨어나는 것을 확인한 뒤 사육장으로 돌려보냈다.

모든 개는 간기능 상태의 변화를 알기 위하여 시술 전과, 시술 하루 뒤, 희생 전에 일반혈액검사 및 혈액도말검사를 위하여 3 cc의 피를 CBC 채혈관에 채혈하였고, 간기능검사를 시행하기 위하여 3 cc의 혈청화학검사용 채혈관에 채혈을 하였다.

시술 3일째에 럼푼 3 ml/kg와 케타민 40 mg/kg를 개의 대퇴부 근육에 주사하여 전처치 뒤, 과량의 마취로 안락사시켰다. 안락사 즉시 개복하여 실험동물의 간을 떼어내었다.

떼어낸 간을 좌측부터 우측으로 일련의 번호를 주어 7개의 간엽(No. I - No. VII)을 분리하였다(Fig. 3). 각각의 간엽에 대하여 간문(hepatic hilum) 부위로부터 말초부위(periphery)까지 1 cm 내지 1.5 cm 간격으로 4 부위를 절제하여 중심에서 말초로 감에 따라 일련의 번호를 부가하였다(예; lobe No. I - 1, lobe No. I - 4). X - gal 염색(Sigma, U.S.A.)을 위하여 다시 절편을 만들어서 flash - frozen하여 4 μm 내지 6 μm의 두께로 잘라서 X - tra™ slide (Surgipath, Richimond, IL, U.S.A.)에 부착하였다. 실험개 I, II와 III에 대하여 동일하게 시행하였다.

동결절편에서 얻은 조직을 phosphate buffered saline (PBS)에 잠시 담근 후에 0.5% glutaraldehyde에 실온에서 10분간 고정하였다. $MgCl_2$를 포함한 PBS에서 2회에 걸쳐 5분 내지 10분간 세척한 후 X - gal 용액을 37℃에서 4시간 이상 처치하였다. 흐르는 물에 약 10분간 세척한 후, Meyer's hema - toxylin으로 15초간 후염색을 한다. 다시 흐르는 물에 10분간 씻은 후 70%, 80%, 90% 그리고 100%의 alcohol로 탈수한

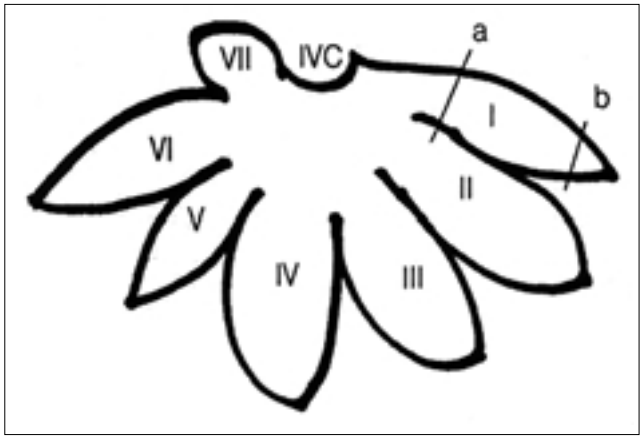
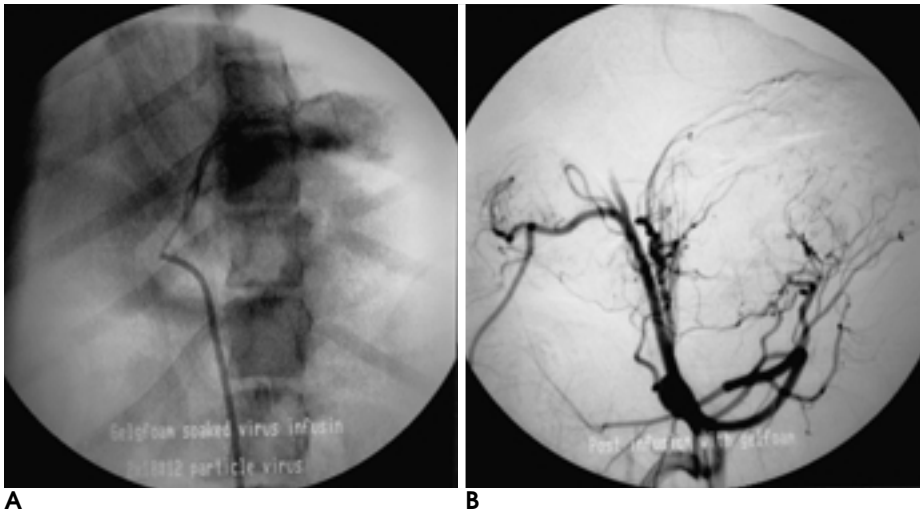


Fig. 3. Numbering of hepatic lobes of dog. From left to right, the lobes are numbered in order. For microscopic examination, sequential cross sections are made from the center(hilum) of lobe (a) to distal part of lobe (b).



A B

Fig. 2. A. Embolization of left hepatic artery by gelfoam particles which were soaked by adenovirus vector of 2×10^{11} particles/kg.
B. Control angiography of postembolization. The left hepatic artery was almost occluded by the gelfoam particles.

후 xylene에서 2회 청명시켰다. 봉입액을 떨어뜨리고 cover glass를 덮은 후 현미경하에서 관찰하였다. 관찰 후 4。C의 어두운 곳에 보관하였다.

X-gal 염색에서 세포질 혹은 핵에 청색으로 염색된 경우가 β-glalactosidase 유전자 표식자를 가진 아데노바이러스가 존재함을 나타낸다. 간조직을 구성하고 있는 개개의 세포 즉 간세포, 쿠퍼세포, 담도 상피세포, 혈관 내피세포 등에 대한 구분은 2인의 병리학자가 판독한 후 일치된 의견을 보이는 세포들만 대상으로 분석하였다. 주입된 LacZ-adv 독성에 의해서 발생할 수 있는 간세포의 괴사, 염증세포의 침윤 등에 대한 일반적인 병리소견은 기본적인 Hematoxylin-eosin염색을 이용하였고 위와 같은 방법으로 판독하였다.

바이러스의 감염정도를 정량적으로 알기 위해, X-gal 염색 후 얻은 100배 영상사진을 분석자료로 이용하였다. 간의 각 엽의 간문부와 말단부의 위치가 다른 부위 다섯 곳을 임의로 선정하여 Automatic Image Analysis System (Carl Zeiss, Oberkochem, Germany)을 사용하여 X-gal염색이 되어 있는 부위와 정상적인 부위의 비율을 planimetric method로 분석하였다.

결 과

실험군

실험개-I (3×2×2 mm의 크기의 젤폼절편을 이용)의 경우 간엽 No. II의 간문 주위인 II-1에 군집하여 있는 X-gal (+) 세포들을 관찰하였고 (Fig. 4), 말초부위로 갈수록 X-gal (+) 세포들이 희박해지면서 가장 말초부위 (No. II-3, 4)에서는 관찰되지 않았다. 간문 주위의 청색으로 염색된 세포들의 군집을 자세히 관찰하면, 핵이 둥글고 세포질이 풍부하며 다각형의 간세포가 대부분이며, 핵이 작고 약간 타원형의 쿠퍼세포가 섞여 있었다. 간엽 No. I, III, IV, V, VI에서는 X-gal (+) 세포들은 전혀 관찰되지 않았다. 간엽 No. VII-2에서 한 곳에 X-gal (+) 세포가 7개 내지 8개 모여있는 것을 관찰할 수 있었다.

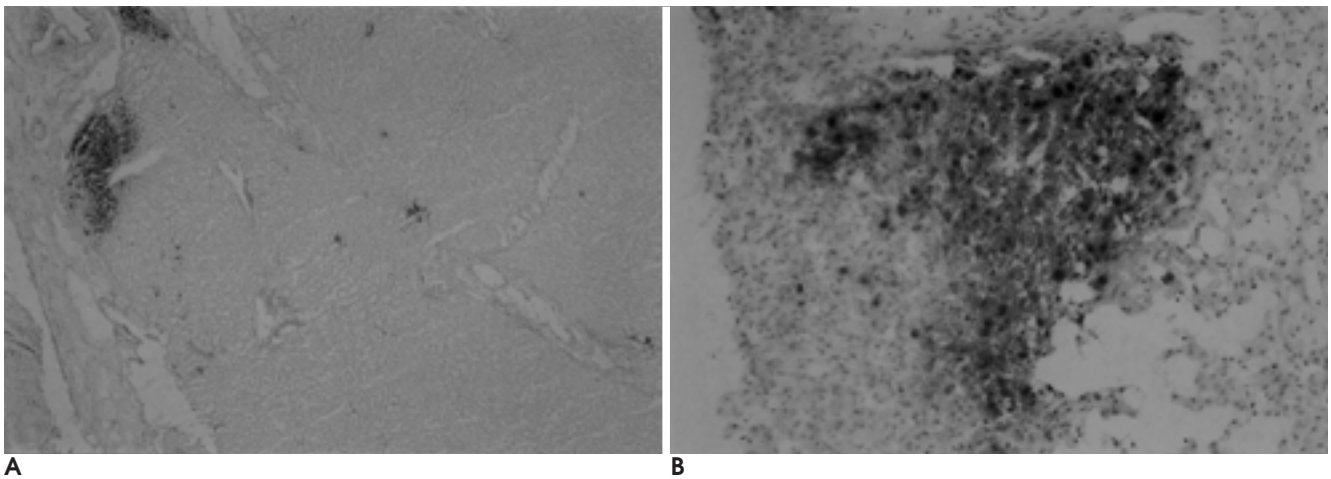
실험개-II (2×1×1 mm의 크기의 젤폼절편을 이용)의 경우 7개의 간엽 모두에서 간문에서 말초부위까지 균일하게 X-gal (+) 세포들이 관찰되었고, 간엽 No. II에서 X-gal (+) 세포들의 분포도가 가장 높았으며 염색강도도 가장 강하였다 (Fig. 5A, B). 고배율하에서 관찰하였을 때 X-gal (+) 세포들은 간세포 혹은 쿠퍼세포이었다 (Fig. 5C). 실험개-II의 전체 간내 Laz-adv의 발현 정도는 100배 영상사진을 Automatic Image Analysis System을 이용하여 planimetric method로 분석한 결과는 전체 간엽에서 1.9±1.7 %에서 11.6±2.3%의 범위로 나타났으며, 가장 높은 간엽은 No. II로서 11.6±2.3%이었고, 가장 낮은 간엽은 No. IV로서 0.6±0.5%로 나타났다 (Fig. 6).

대조 실험개

대조 실험개 (실험개-III)는 간의 전엽에서 거의 X-gal (+) 세포가 관찰되지 않았으나 (Fig. 7A), 간엽 No. VII-2에서 아주 드물게 X-gal (+) 세포들(Fig. 7B)이 관찰되었다. 실험개-III의 전체 간내 Laz-adv의 발현 정도는 100배 영상사진을 Automatic Image Analysis System을 이용하여 planimetric method로 분석한 결과는 전체 간엽에서 0.01%이하로 나타났다.

일반병리소견의 분석

실험군 및 대조 실험개의 모든 현미경시야에서 간세포의 괴사나 염증반응은 발견할 수 없었다. 혈액검사 소견상 염증반응을 나타내는 소견은 보이지 않았다 (Table 1). 혈청학적 검사로 간기능을 평가하였는데 간기능의 지표로 이용되는 SGOT, SGPT의 변화는 시술 1일째 약간 증가하였으나, 시술 3일째는 시술 이전의 상태로 회복하였다 (Table 2).



A B

Fig. 4. X-gal staining of lobe No. II in Experimental dog-I (A; ×40, B; ×200). Grouped X-gal (+) cells locate at hilum, patchily(A, Left. side), and X-gal (+) cells are scaresly observed toward periphery(**A**, Right. side). Under higher magnification, X-gal (+) cells are mainly hepatocytes and sometimes Kupffer cells (**B**).

고 찰

아데노바이러스가 비증식성 세포에 효과적으로 유전자를 전달할 수 있으며, 취급하기 용이하고, 고순도의 바이러스를 합성해낼 수 있다는 장점 때문에 수십년 동안 주목을 받아왔다(1 - 15, 19 - 23). 아데노바이러스는 간, 소화기, 근육, 심장, 폐, 뇌세포 등 생체내 많은 세포조직을 감염시킬 수 있으나, 전달방법에 따라 다른 감염분포를 일으키며 이미 다양한 상피세포로 구성된 조직에 효과적으로 유전자를 전달할 수 있는 좋은 도구로 개발되었다(19 - 23). 특히 아데노바이러스는 폐의 상피세포에 대한 자연적 향성(tropism) 때문에 폐에 발생하는 다양한 유전적 질환의 유전자치료를 위한 매개체로 각광을 받아왔다(19, 23). 1990년에 Stratford - Perricaudet(20)이 in vivo에서 쥐의 간에 아데노바이러스를 준 경우 간세포 내로 유전자가 전달될 수 있다고 발표하였고, 이어서 Jaffe 등(9)이 생쥐를 이용한 생체 동물실험에서 아데노바이러스에 의한 유전자전달에 의해 생쥐 간세포에서 human α1 - antitrypsin 생성이 된다는 것을 발표하였다.

하지만 아데노바이러스의 주입은 많은 독성문제를 일으킬 수 있고 면역학적 문제를 일으켜 아데노바이러스의 연속적인 주입을 힘들게 하는데, 특히 아데노바이러스 자체에 의한 간독성이 문제가 된다. Li 등(24)의 쥐를 이용한 in vivo 연구에서 이들은 한 개의 세포 당 100개의 virus particles(100

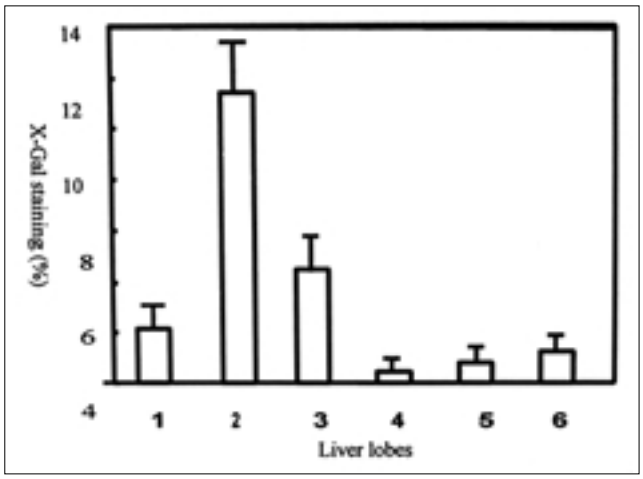
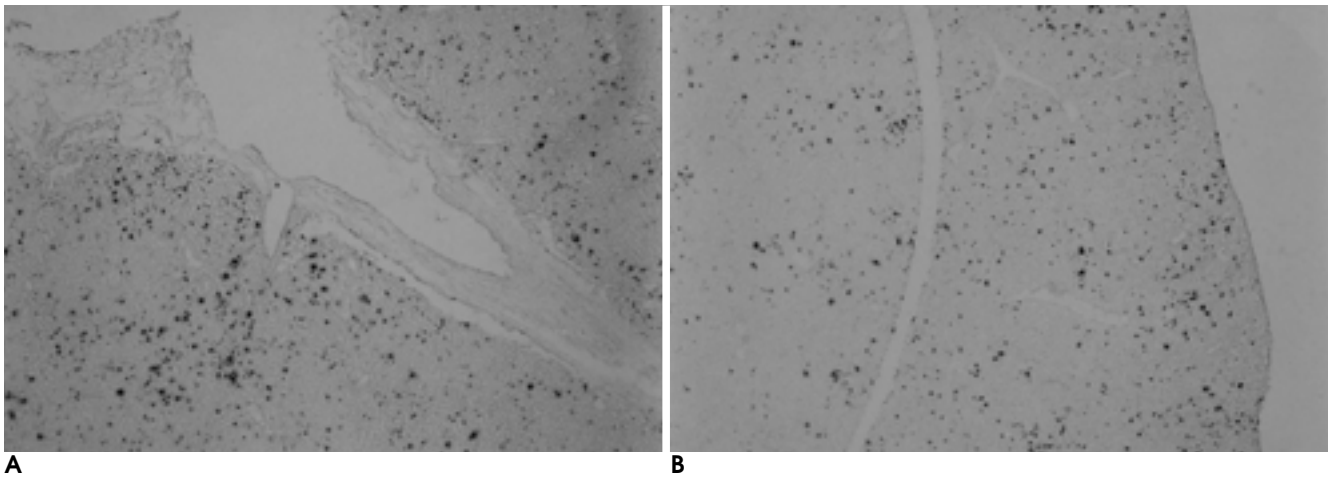
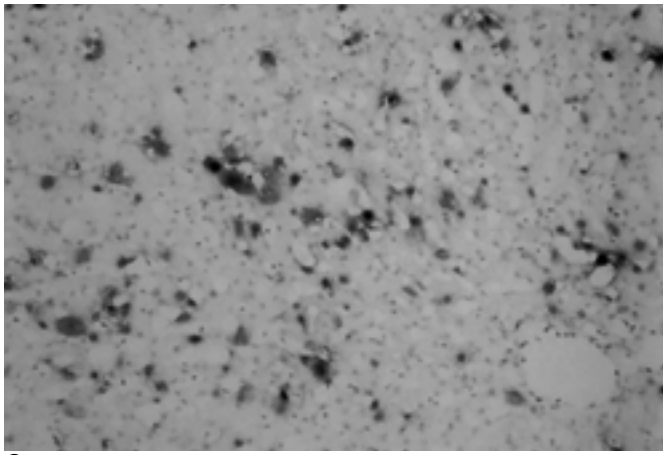


Fig. 6. The result of image analysis of X-gal (+) cells at each lobe of liver of experimental dog-II (Embolized at left hepatic artery by 2×1×1 mm gelfoam particles soaked with LacZ-adv)



A **B**



C

Fig. 5. X-gal staining of lobe No. II in Experimental dog-II (A; × 40, B; ×40, C; ×200). Even scattering distribution from hilum (**A**) to periphery (**B**) of X-gal (+) cells is noted. Among 7 lobes, lobe No. II represents the highest distribution and the highest intensity of X-gal (+) cells. Higher magnification reveals that X-gal (+) cells are hepatocytes or Kupffer cells (**C**). The expression ratio of X-gal(+) cells is 11.6±2.3% by planimetric method.

Table 1. Complete Blood Component Before and After Infusion of adv.CMV.LacZ

	Experiment I*			Experiment II**			Control dog		
Day(s) of blood Sampling / CBC	0	1	3	0	1	3	0	1	3
WBC	16.4	9.7	15	12.7	13.8	13.4	14.2	15.4	12.6
RBC	5.46	6.3	6.8	4.78	5.1	7.38	6.13	6.2	6.8
HB	12.6	14.6	16	7.8	13.5	17.2	14.3	13.2	12.5
HCT	36.7	42.4	44.9	25.3	30.1	49.4	41.8	40.5	43.5
PLT	110	162	170	254	251	151	256	210	250
MCV	67.1	67.3	66	52.8	70.2	66.9	68.1	70.2	71.4
MCH	23.1	23.2	23.6	16.3	28.5	23.3	23.3	30.1	24.1
MCHC	34.3	34.5	35.7	30.8	30.6	34.8	34.2	31.5	33

* ; Experimental dog which has the left hepatic arterial embolization with gelfoam particles sized 3×2×2 mm, soaked with 2×10^{12} particles/ kg of adenoviral vector

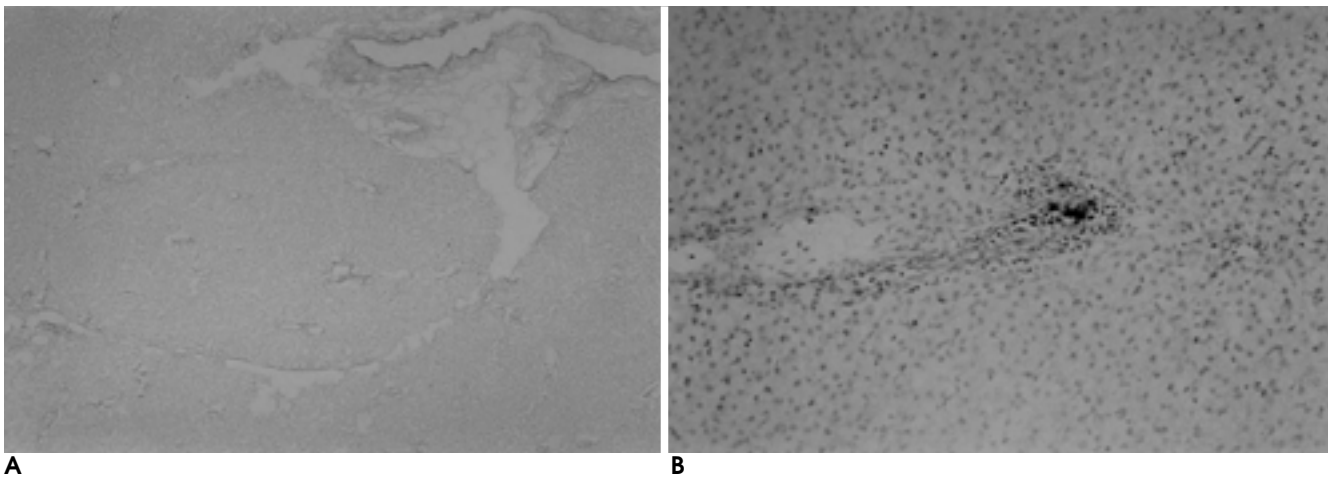
**; Experimental dog which has the left hepatic arterial embolization with gelfoam particles sized 2×1×1 mm, soaked with 2×10^{12} particles/ kg of adenoviral vector

Table 2. Serum Chemistry Changes Before and After Infusion of adv.CMV.LacZ

	Experiment I*			Experiment II**			Control dog		
Day(s) of blood Sampling / Chemistry	0	1	3	0	1	3	0	1	3
Glucose	98	79	90	175	160	152	138	160	135
Creatinine	1.4	0.8	0.8	0.9	0.6	0.7	0.9	0.7	0.7
BUN	25	14	15	13	8	8	12	10	11
Protein total	6.5	6.8	6.7	5.6	8	7	6.5	5.5	6.1
Albumin	3.8	3.7	3.5	2.4	3	3.9	3.7	3.2	2.6
SGOT	49	117	46	24	78	52	37	81	51
SGPT	83	141	75	46	57	14	24	75	41
Billirubin Total	0.4	0.3	0.7	0.3	0.3	0.7	0.3	0.3	0.5
Billirubin Direct	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.4

* ; Experimental dog which has the left hepatic arterial embolization with gelfoam particles sized 3×2×2 mm, soaked with 2×10^{12} particles/ kg of adenoviral vector

**; Experimental dog which has the left hepatic arterial embolization with gelfoam particles sized 2×1×1 mm, soaked with 2×10^{12} particles/ kg of adenoviral vector



A **B**

Fig. 7. X-gal staining of lobe No. VII of control dog(A; ×40, B; ×100). In control liver, no detectable X-gal (+) cell is noted on whole lobes except lobe No. VII. On lobe No. VII, X-gal (+) cells are nearly absent at hilum(**A**). Only two foci (**B**) around the periportal area are recognized. The expression ratio of X-gal(+) cells is under 0.1% by planimetric method.

multiplicity of infection, 이하 MOI)의 간문맥내 주입은 95% 이상의 간세포에 유전자물질을 전달해 줄 수 있지만, 10 - 100 MOI로 주입된 경우 바이러스에 의한 세포독성이 발생하여 대부분의 세포가 수 시간내에 죽었다고 하였다. Lieber 등(25)의 연구에선 같은 농도의 아데노바이러스를 말초혈관으로 주입한 경우 주입 후 2일 이내의 SGPT 수치가 정상수치의 15배 가까이 상승하였다고 보고하였다. 저자의 본 연구의 전 단계 실험에서도 쥐의 간문맥으로 4×10^{12} particles/kg의 아데노바이러스 주입 후 GOT/GPT 수치는 24일 후 급격히 증가하지만 4×10^{11} particles/kg 주입시 거의 증가하지 않았음을 관찰하였다(미발표자료임). 따라서 높은 농도의 바이러스를 주입하는 것은 바이러스 자체의 독성으로 인해 간세포 괴사를 초래하거나 개체를 사망시킬 수도 있다. 그러므로 효과적이면서도 개체에 안전한 농도의 아데노바이러스를 전달해 주는 것이 필요하다.

아데노바이러스를 말초혈관을 통해 주입한 경우 생체내의 순환 탐식세포나 망상내피세포계와 같은 고정탐식세포에 의해 제거된다. 전신 혈류를 타고 간에 농축된 아데노바이러스는 쿠퍼세포를 활성화시켜 주입 후 첫 24시간 이내에 90%이상의 아데노바이러스가 쿠퍼세포에 의해 모두 제거되며, 쿠퍼세포에 의한 아데노바이러스에 대한 면역방어기능만 작용하게 하여 오히려 아데노바이러스의 두번째 주입시 심한 부작용만 초래하게 한다(25 - 27). 따라서 첫번째 아데노바이러스의 주입에서 효과적인 유전자전달을 위해선 쿠퍼세포 및 면역반응을 일으키는 탐식세포를 포화시키고 남을 정도의 아데노바이러스를 주입하거나, 쿠퍼세포와 탐식세포의 면역반응 감작을 방해하기 위해 이들을 포화시키는 물질을 사용하여 숙주의 면역작용을 일시적으로 정지시키는 등의 사전작업을 하여야 유전자를 간세포내로 효과적으로 주입할 수 있게 된다(13). 그러므로 적은 농도의 아데노바이러스를 이용하여 간세포로 효과적인 유전자물질을 전달하기 위해선 전달방법의 개선이나 개발이 중요하다.

효과적으로 간세포에 유전자물질을 전달하기 위해 간문맥을 직접 도관하여 주입하는 방법이 많은 연구자들에 의해 시도되었다. 하지만 in vivo에서 간문맥을 통한 아데노바이러스의 주입 방법에도 불구하고 연구자들에 의해 1% - 100%(9, 23)의 간내 유전자 전달율이 다르게 발표되었다. 본 연구의 전단계 실험(preliminary study)에서도 쥐의 간문맥으로 4×10^{11} particles/kg를 주입한 3일 후의 β-galactosidase의 발현율은 5 %미만이었다(미발표자료임). 저자를 포함한 이러한 실험들 사이에서 유전자물질의 간내 발현율이 차이가 크게 나는 것은 어떤 이유일까? 저자의 생각으론 이들의 in vivo 실험방법에서 간문맥을 통한 주입방법은 동일하지만 개와 생쥐라는 실험동물의 차이 이외에도 아데노바이러스 주입 방법의 차이가 간내 유전자물질의 발현정도가 다르게 나타난 이유일 것으로 여겨진다. 즉 저자와 Li 등(24)의 연구에서는 아데노바이러스를 간동맥 혹은 간문맥에 주입 후 젤폼으로 간동맥 혹은 간문맥을 막았다. Li 등(24)은 그들의 연구에서 젤폼을 사용한 이유를 정확히 기술하지 않았지만, 저자의 생각으론 젤폼을 사용함으로서 간내 혈류의 흐름이 일시적으로 제한되거나 막힘으로써 발생한 현상으로 생각된다.

저자들이 주입한 아데노바이러스의 농도는 2×10^{11} particles/kg으로 다른 연구자들이 생쥐에 주입한 양의 20배에 해당한다. 하지만 생쥐와 개의 간 부피를 비교한다면, 실제 본 실험에 주입한 아데노바이러스의 농도는 생쥐의 주입에 필요한 농도의 1/10 - 1/100에 불과한 아주 적은 농도이다. 따라서 본 실험에서 사용한 바이러스의 양은 간기능에 대한 바이러스 독성을 최소화할 수 있는 농도로 여겨진다.

적은 농도로 주입하였으나 간동맥을 색전하지 않은 대조실험개는 간에서 X-gal에 염색되는 간세포가 거의 발견되지 않았다. 그러나 간동맥을 색전한 실험군의 간에서는 X-gal에 염색되는 간세포를 관찰할 수 있었다. 특히 젤폼절편의 크기를 작게하여 실시한 실험개는 색전술을 시행하였던 좌측의 간엽 No I, II, III을 중심으로 간문부터 말초까지 비교적 균일하게 X-gal (+) 세포들의 군집이 관찰되었고, 나머지의 간엽에도 밀도가 낮고 강도가 약하지만 비교적 균일하게 X-gal (+) 세포를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 Automatic Image Analysis System을 이용한 planimetric method의 분석자료인 Fig. 7에 잘 나타나 있는데, 간동맥의 가지 중 초선택한 No. II 간엽에 집중적인 LacZ-adv의 섭취율을 보이고, 간의 우엽보다는 좌엽에 더 많은 섭취율을 보이고 있다. 이것은 젤폼절편을 사용한 간동맥의 색전 방법이 아데노바이러스의 유전자 전달율에 많은 차이를 낼 수 있다는 것을 보여주는 증거라 할 수 있다.

젤폼절편을 이용한 간동맥 색전으로 이렇게 현저한 유전자 전달율의 차이를 보이는 이유로 1) 간동맥이 젤폼절편을 사용하여 색전됨으로써 동맥혈이 차단되어 아데노바이러스의 간내 빠른 제거가 방지되었으며 2) 간내 혈류의 흐름이 한시적으로 제한되거나 막혀 젤폼절편에 적셔져 있는 아데노바이러스와 간세포의 접촉시간이 길게 유지되었고, 3) 전체 농도는 적지만 간혈류저장고(hepatic blood resevoir)에 머물고 있는 아데노바이러스의 수는 충분히 높아 쿠퍼세포를 포화시키고도 남을 정도의 아데노바이러스들이 간내에 유지되었기 때문으로 추정하며, 4) 간의 내부에는 아주 풍부한 측부혈행이 발달되어 있고, 간동맥의 색전이 발생하면 수분-수시간 내에 측부혈행이 열리는 것으로 되어 있기에, 좌엽의 간동맥을 색전하며 주입한 아데노바이러스가 우엽전체에도 발현한 것으로 추정한다. 하지만 좌엽동맥의 색전 때 투시촬영상에선 발전견할 수 없었지만 미세하게 젤폼절편이 역류되어 우측 간동맥의 혈류를 막아 우측 간세포에 들어갔을 가능성도 배제할 수는 없다.

저자의 실험개-I의 X-gal 염색소견에 나타났듯이 젤폼의 절편크기를 크게 한 경우 아데노바이러스에 의한 유자전달이 간 전체에 걸쳐 관찰되지 않고 국소적으로 군집되어 관찰되었으며, 특히 간문부에 집중적으로 유전자전달이 되어있는 것으로 관찰되었다. 이는 젤폼절편의 크기가 큰 경우에 젤폼절편에 적셔져 있는 아데노바이러스의 입자가 많았고, 큰 젤폼절편에 의해 혈류가 급격히 차단되어 간의 변연부로 혈류가 원활히 공급되지 않아 아데노바이러스가 변연부로 전파되지 못하였기 때문에 간문부에 국소적으로 섭취된 것으로 보인다.

간동맥색전술을 이용한 저농도 아데노바이러스의 주입법은 다른 연구자의 결과와 달리, 간독성도 없거나 미미한 것으로 보인다. 그 이유로 실험군과 대조군의 간기능 검사의 추이에서 두 군간의 SGPT/SGOT의 변화가 없었으며 시간에 따른 SGPT/SGOT의 변화도 크지 않았으며 3일만에 정상범위로 돌아왔다는 것으로 알 수 있으며, 현미경 소견에서 간세포의 괴사나 염증이 실험동물간의 어디에서도 발견되지 않았다. 따라서 간동맥색전술을 이용한 아데노바이러스의 유전자전달법은 적은 농도의 아데노바이러스를 사용하더라도 안전하며 효과적인 유전자전달을 얻을 수 있는 방법이라는 것을 알 수 있다.

본 연구는 실험동물 수가 너무 적다는 점, 아데노바이러스 유전자발현의 정성적 분석이 더욱 정확해야 하고 장기시간에 따른 발현율의 변화 분석이 되지 않았다는 점, 그리고 연속주입시 발생할 수 있는 항원-항체 반응에 따른 발현율의 변화에 대한 조사가 이루어지지 않았다는 제한점을 가지고 있다. 또한 아데노바이러스에 대한 숙주의 반응이 유전자적 배경이 다른 동물들 사이에서 매우 다르며, 인간에게도 개체마다 다를 것으로 여겨진다. 하지만, 저자의 연구가 아데노바이러스 주입에 따른 초기 독성을 줄이면서, 간질환을 위한 유전자 치료에 실질적으로 안전하고 효과적인 방법으로써 응용될 수 있으리라 생각된다.

결론적으로 2×10^{11} particles/kg 농도인 LacZ-adv를 젤폼절편에 적셔 간동맥내 주입하여 간동맥의 색전을 이용하는 유전자전달법은 비록 젤폼절편의 크기에 따라 유전자전달율이 다르게 나타날 수 있으나, 색전없이 간동맥내로 같은 농도의 LacZ-adv를 단순 주입하는 것보다 간내 세포들에게 유전자를 효과적이고, 안전하게 전달할 수 있는 방법이라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Crystal RG. Transfer of genes to human: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995;270:404-410
2. Ferry N, Heard JM. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:1975-1981
3. Shiratori Y, Kanai F, Osashi M, Omata M. Strategy of liver-directed gene therapy: present status and future prospects. *Liver* 1999; 19:265-274
4. Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* 1988;263:14621-14624
5. Chiou HC, Tangco MV, Levine SM, et al. Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialogycoprotein-polylysine carriers. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5439-5446
6. Erbacher P, Roche AC, Monigny M, Midoux P. Putative role of choroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/ lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 1996;225: 186-94
7. Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr JP. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligand: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1744-1748
8. Kasahara N, Dozy AM, Kan YW. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interaction. *Science* 1994;266: 1373-1376
9. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, et al. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet* 1992;1:372-378
10. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, Alvira M, Buttrick PM, Leinward LA. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1994;1:395-402
11. Ilan Y, Saito H, Thummala NR, Chowdhury NR. Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis* 1999;1:49-59
12. Yang Y, Greenough K, Wilson JM. Transient immune blockade prevents formation of neutralizating antibody to recombinant adenovirus and allows repeated gene transfer to mouse liver. *Gene Ther* 1996;3:412-420
13. Ilan Y, Attavar P, Takahashi M, et al. Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long term gene therapy in Gunn rats. *J Clin Invest* 1996;98:2640-2647
14. Weiner HL. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10762-10765
15. McCarthy M. US FDA rejects defence of gene therapy trial. *Lancet* 2000;355:997
16. Teramoto S, Ishii T, Matsuse T. Crisis of adenoviruses in human gene therapy. *Lancet* 2000;355:1911-1912
17. Kan Z. Dynamic study of iodized oil in the liver and blood supply to hepatic tumors. An experimental investigation in several animals species. *Acta Radiol (suppl)* 1996;408:1-25
18. Setoguchi Y, Danel C, Crystal RG. Stimulation of erythropoiesis by in vivo gene therapy: physiologic consequences of transfer of the human erythropoietin gene to experimental animal using an adenovirus vector. *Blood* 1994;84:2649-2953
19. Gilardi P, Courtney M, Pavirani A, Perricaudet M. Expression of human alpha1-antitrypsin using a recombinant adenoviirus vector. *FEBS* 1990;267:60-62
20. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990;1:241-256
21. Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc Natl Aca Sci USA* 1992;89:25781-2584
22. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 1991;252:431-434
23. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992;68:143-155
24. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:403-409
25. Lieber A, He CY, Meuse L, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 1997;71:8798-8807
26. Wolff G, Worgall S, van Rooijen N, Song WR, Harvey RG, Crystal RG. Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ. *J Virol* 1997;71:624-629
27. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44

대한방사선의학회지 2003;48:131 - 139

J Korean Radiol Soc 2003;48:131 - 139

Usefulness of Intra-arterial Embolization Method Using Gelfoam Particles in Effective Gene Transduction of Adenoviral Vector for Liver-directed Gene Therapy: an Preliminary Animal Study in Dogs[1]

Jin Hwa Lee, M.D., Byeong Ho Park, M.D., Chan Sung Kim, M.D.

[1]*Department of Diagnostic Radiology, College of Medicine, Dong-A University*

Purpose: Liver-directed gene therapy is being actively pursued and developed as a method of treating various liver diseases. A number of aspects, including gene intervention, an efficient gene delivery system, and stable transgene expression are key to the success of the chosen strategy, and to overcome problems in these areas, several tactics can be used. In this study, we assess the utility of transarterial embolization using gelfoam particles soaked in an adenovirus vector as a gene-delivery method.

Materials and Methods: Using the angiographic approach, three dogs each weighing 9.5 - 11 kg were superselectively catheterized at the left hepatic artery using a 3-F microcatheter and the coaxial method. Two of the dogs were embolized at the left hepatic artery using 3×2×2-mm and 2×1×1-mm gelfoam particles soaked in 2×10^{11} particles/kg of recombinant adv.CMV.LacZ (LacZ-adv). The left hepatic artery of the remaining animal, used as a control, was infused with the same dose of lacZ-adv in the same way as before but without embolization of the left hepatic artery. Three days after embolization or the infusion of LacZ-adv, the dogs were sacrificed prior to harvest of the entire liver for the evaluation of gene transduction.

Results: X-gal staining of the liver tissue obtained was positive for hepatocytes, but the pattern and degree of gene transduction differed according to gelfoam particle size. Where this was 3×2×2 mm, gene transduction along the liver hilum varied, but where 2×1×1-mm particles were used, transduction was more even. No pathologic hepatic tissue injury or inflammation was apparent, and control liver tissue was not stained by X-gal. Serum SGOT and SGPT levels were slightly higher one day after the procedure, but had normalized by day 3.

Conclusion: Intrahepatic transarterial embolization using gelfoam particles soaked in LacZ-adv appears to be a good method for effective liver-targed gene therapy.

Index words : Liver, gene therapy
Intervention, intra-arterial embolization
Animal study

Address reprint requests to : Byeong Ho Park, M.D., Department of Diagnostic Radiology, Dong-A University Hospital, 1,3-ga, Dongdaesin-dong, Seo-Ku, Pusan 602-103 Korea.
Tel. 82-51-240-5378 Fax. 82-51-253-4931