

난소절제마우스 모델에서 RANK-Fc 레트로바이러스를 이용한 유전자요법이 골소실에 미치는 효과

단국대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교 의과대학 내과학교실¹

김도희 · 신찬수¹

Retrovirus Mediated Gene Transfer of RANK-Fc Ameliorates Bone Loss in a Mouse Ovariectomy Model of Osteoporosis

Dohee Kim, Chan Soo Shin¹

*Department of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine; and
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine¹*

ABSTRACT

Background: Interactions between the receptor activator of the NF- κ B ligand (RANKL) and its receptor, RANK, are important in the terminal differentiation and activation of osteoclasts. In the current investigation, we examine the feasibility of using genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs), C3H10T1/2 cells as a platform for the sustained systemic delivery of therapeutic proteins into the circulation in an osteoporosis model, and investigate retroviral-mediated gene therapy of RANK-Fc as a means of ameliorating ovariectomy (OVX)-induced bone resorption.

Methods: C3H10T1/2 cells were transduced with a MSCV-based retroviral vector containing cDNA of a fusion protein combining the extracellular domain of murine RANK with the human immunoglobulin constant domain (MSCV-RANK-Fc-eGFP). Young adult female mice were subjected to OVX or sham surgery, followed by treatment with transduced cells or PBS 4 weeks later. The expression of RANK-Fc by these cells was assessed, both *in vitro* and *in vivo*. Total bone mineral density (BMD) was measured and GFP expression was examined.

Results: Transduced cells produced biologically active RANK-Fc *in vitro* and *in vivo*. Mice that were subjected to OVX followed by treatment with cells transduced with MSCV-RANK-Fc-eGFP 4 weeks later contained no significant but higher total BMD than either the control vector or PBS-treated mice after 8 weeks. Higher GFP expression was attained in the liver, spleen, and intra-abdominal fat of mice treated with MSCV-RANK-Fc-eGFP.

Conclusion: The data collectively indicate that C3H10T1/2 cells are effectively transduced with a MSCV-based retrovirus, and are capable of secreting biologically active RANK-Fc *in vitro* and *in vivo*. Moreover, gene therapy facilitating the sustained delivery of RANK-Fc may be an effective method to reverse OVX-induced osteoporosis. (J Kor Soc Endocrinol 21:192~203, 2006)

Key Words: Gene therapy, Mesenchymal stem cell (MSC), Osteoporosis, Ovariectomy (OVX), Receptor activator of NF- κ B (RANK),

접수일자: 2005년 2월 22일

통과일자: 2005년 11월 29일

책임저자: 신찬수, 서울대학교 의과대학 내과학교실

서 론

골다공증은 골량 및 골질의 감소로 골 강도가 감소되어 골절이 발생하기 쉬운 질환으로[1] 그에 합병되는 골절과 후 유증으로 인해 높은 사망률과 이환율을 초래하며 우리나라에서도 평균 수명이 점차 증가함에 따라 여성 노인층의 인구가 증가하여 폐경 후 골다공증이 국민 보건상의 문제로 대두되고 있다. 골다공증에 대한 기존 치료는 칼슘의 보충, 비스포스포네이트(bisphosphonate), 에스트로겐(estrogen)을 이용한 호르몬 대체요법, selective estrogen receptor modulators (SERMs), 칼시토닌(calcitonin) 등 골 흡수 억제제를 투여하여 가속적인 골 흡수를 지연시키거나 감소시키는 정도이다[2~4].

골흡수에 중요한 역할을 하는 파골세포가 성숙한 세포로 분화, 활성화되기 위해서는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)나 조골세포의 표면에 발현되는 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)와 파골세포의 표면에 발현되는 RANK의 상호작용이 중요하며 RANKL이 증가되는 경우에는 파골세포가 활성화되어 골흡수가 발생한다[5~6]. 한편 osteoprotegerin (OPG)은 골수간질 세포나 조골세포에서 분비되는 수용성 수용체로서 RANKL과 결합하여 파골세포의 RANK-RANKL의 상호작용에 의한 신호전달체계를 억제함으로써 파골세포를 세포자연사(apoptosis)시켜 궁극적으로 골흡수를 감소시킨다[6~7]. RANK 신호전달체계는 파골세포의 분화, 활성, 생존에 필수적이며 OPG 유전자를 knockout 시킨 동물에서는 심한 골다공증이 발생하고[8], RANKL이나 RANK가 결핍되어 있는 마우스나, OPG-Fc나 수용성 형태인 RANK-Fc를 과발현시킨 형질변경(transgenic) 마우스에서는 파골세포를 형성하지 못하기 때문에 심한 골화석증(osteopetrosis)이 발생한다[7,9~11]. 또한 난소를 절제하여 에스트로겐이 결핍된 상태나 골관절염 또는 악성종양의 골 전이 병변에 재조합 OPG나 monoclonal anti-RANKL antibody를 투여하면 골흡수를 감소시키거나 예방할 수 있다고 보고되고 있으며[12~16], 최근 OPG나 monoclonal anti-RANKL antibody에 관한 임상시험의 결과는 골다공증의 치료제로서의 가능성을 뒷받침하고 있다[17~18].

RANK-Fc는 RANK의 세포외영역(extracellular domain)과 사람의 면역글로불린 G1 (IgG1)의 Fc 부분을 융합하여 만든 것으로, 수용성 RANK만 투여한 경우보다 반감기가 길어지는 이점이 있다[19]. RANK-Fc 융합 단백질을 주사하면 조골세포의 표면에 있는 RANKL과 결합하여 파골세포의 RANK와 조골세포의 RANKL이 상호 작용하는 것을 억제함으로써 파골세포의 생성 및 활성화를 억제하여 골밀도를 증가시키고 다발골수종이나 악성종양의 골 전이 병변

에서 관찰되는 골흡수를 감소시키는데, 이런 효과는 OPG-Fc만큼이나 크다고 보고되고 있다[20~22]. RANK와 그 유도체인 RANK-Fc가 OPG와 다른 점은 RANK는 RANKL에만 결합하지만 OPG와 OPG-Fc는 RANKL 이외에 도처에서 발현되는 막결합 TNF homologue인 TNF- α related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)에도 결합한다[23]. 시험관 내(in vitro)에서 골수종 세포나 전립선 암세포에서는 OPG가 TRAIL에 의해 매개되는 세포자연사를 억제한다고 보고된 바 있다[24~25]. 생체 내(in vivo)에서 TRAIL이 OPG에 결합하는 생리적 중요성에 대해서는 아직 잘 알려진 바 없으나 OPG가 파골세포에 의한 골흡수를 억제하는 효과가 TRAIL에 의해 어느 정도 감소될 가능성이 있다. 따라서 악성종양에서 이러한 목적으로 OPG를 사용하는 것은 적절하지 않을 수 있다. 또한 단백질 형태로 주입을 하면 IgG Fc와 융합하여 반감기를 증가시키더라도 그 효과가 일시적이며, 골다공증은 수십 년 동안 치료를 해야 하는 만성질환이기 때문에 반복주입이 필요하다는 점 이외에도, 정제가 복잡하고 생물학적 활성도가 불안정하며 항체 생성 및 독성 등이 재조합 단백질의 일반적인 문제점들이다[26]. 따라서 최근에는 주입횟수를 줄일 수 있는 유전자치료(gene therapy) 또는 세포치료(cell therapy)의 필요성이 대두되고 있다.

이러한 배경을 바탕으로 본 연구에서는 재조합 RANK-Fc 유전자를 레트로바이러스(retrovirus)를 통해 C3H10T1/2 세포에 형질도입(transduction)시킨 후 양측 난소를 절제시켜(ovariectomy, OVX) 에스트로겐이 결핍된 C3H 마우스에 주사 후 골 흡수 감소 효과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 동물

7주령 된 암컷 C3H 마우스(Orient corporation)를 구입하여 서울대학교병원 임상의학연구소 전임상실험실의 지침을 따랐고 스케줄에 맞추어 ketamine (50 mg/kg, Yuhan, Seoul, Korea)과 xylazine (15 mg/kg, Bayer, Seoul, Korea)을 이용하여 마취 후 해당검사를 하고 경추탈골을 하여 안락사 시켰다.

2. RANK-Fc 레트로바이러스의 제작

마우스 RANK의 세포외영역(Met1-Pro213)과 사람의 IgG1 Fc영역이 Bgl II로 연결되어 있는 마우스 RANK-Fc cDNA를 PCR을 통해 증폭하고 증폭된 절편(fragment)을 murine stem cell virus (MSCV)-internal ribosome entry site (IRES)-enhanced green fluorescent protein (eGFP) (pMSCV-eGFP) 레트로바이러스 벡터(vector) 내 MSCV의

long terminal repeat (LTR) 하부의 EcoR I/Not I 부위에 삽입하여 결과적으로 pMSCV-RANK-Fc-IRES-eGFP (pMSCV-RANK-Fc-eGFP)를 제작하였다. 이 시스템에서는 MSCV LTR에 의해 유전자 발현이 조절된다. 증폭된 RANK-Fc 코딩부위의 염기서열은 염기서열분석(sequencing)을 이용하여 확인하였다. pMSCV-IRES-eGFP 레트로바이러스 벡터와 RANK-Fc cDNA와 단백질은 각각 Dr. Ronald L. Johnson (University of Alabama at Birmingham, AL, USA)와 충남대학교 노재량 교수님께 얻었다.

레트로바이러스를 만들기 위해 293T 세포에 레트로바이러스 벡터인 pMSCV-RANK-Fc-eGFP (RANK-Fc) 나 pMSCV-eGFP (대조군)과 pMD-gag-pol, pMD-VSVG 벡터를 각각 4 µg씩 동시에 Lipofectamine Plus (Invitrogen, Geand Island, N.Y., USA)를 이용해 형질도입시키고, 48시간 후 세포배양액을 회수하여 각각 MSCV-RANK-Fc-eGFP와 MSCV-eGFP 레트로바이러스를 획득하여 -80℃에 얼렸다.

3. 세포 배양

C3H10T1/2 세포(American Type Culture Collection)는 C3H 마우스의 다능성(pluripotential) 배아 중간엽줄기세포로 표준 배양조건에서는 미성숙 섬유모세포와 유사한 형태를 지니고 적절한 조건에서는 조골세포나 지방세포 등으로 분화될 수 있다. C3H10T1/2 세포는 5% CO₂, 37℃에서 10% fetal bovine serum (FBS; Cambrex, Walkersville, MD, USA)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA)으로 배양하였으며 2~3일마다 새로운 배양액으로 교환하였다.

4. RANK-Fc 과발현 C3H10T1/2 세포주 확립

RANK-Fc를 과발현하는 C3H10T1/2 세포주를 확립하기 위해 C3H10T1/2 세포를 60%정도 confluent해지도록 6 well plate에 분주 후 RANK-Fc 레트로바이러스를 polybrene (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 함께 넣고 2일에 걸쳐 총 4회 원심분리(2800 rpm, 32℃, 90분)하여 형질도입시켰다. 3시간 후 바이러스 용액을 제거하고 새로운 배지로 갈아준 후 배양을 지속하고, 이 형질도입된 세포를 형광현미경(Olympus IX70; Olympus America Inc., Melville, NY, USA)이나 fluorescence activated cell sorter (FACS; FACS Vantage SE; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용해 green fluorescent protein (GFP) 발현을 확인함으로써 간접적으로 RANK-Fc의 발현 정도를 확인하였으며, GFP 발현 세포를 sorting하여 RANK-Fc를 과발현하는 stable cell population을 얻어내었다. 대조군으로 MSCV-eGFP를 형질도입시킨 C3H10T1/2 세포가 이용되었다.

5. RANK-Fc 효과의 생물학적 검증

마우스의 OVX는 약물이나 물질이 에스트로겐 결핍과 관련된 골 소실을 개선시킬 수 있는가를 평가하는 표준 방법으로 이미 잘 알려져 있다. 따라서 레트로바이러스를 이용한 RANK-Fc 유전자요법이 OVX에 의한 골소실을 개선시킬 수 있는지 확인하기 위해 연구 0일째 무작위로 두 군으로 나누어 한 군은 마우스의 양측 난소를 제거하고(OVX 군, n = 14) 나머지 한 군은 절개(sham op 군, n = 4)만 하고 4주 후에 OVX군을 무작위로 세 군으로 나누어 1회당 4×10^6 cells/0.2 mL씩 RANK-Fc 과발현 C3H10T1/2 세포(OVX + RANK-Fc)와 대조군 레트로바이러스로 감염된 세포(OVX + GFP), 0.2 mL의 PBS (OVX + vehicle)를 각각 총 4회 복강 내 주사하였다. 또한 Sham op 군도 같은 방법으로 0.2 mL의 PBS를 총 4회 주사하였다. 본 연구는 수술 후 12주 동안(복강주사 후 8주 동안) 지속하였다.

연구시작 0주, 4주, 6주, 8주, 12주에 마우스를 전신마취 후 Lunar PIXImus 골밀도 측정기(GE Lunar, software version 2.0; Madison, WI, USA)를 이용하여 전체 골밀도(bone mineral density, BMD, g/cm²)와 체성분(body composition)을 측정하였고 복강주사 후 2주, 4주, 8주에 후안와정맥총(retro-orbital capillary)에서 혈액을 채취하였고 X-ray는 연구 12주째인 안락사 시키기 전에 시행하였다. 채취한 혈액은 원심분리 후에 혈청을 분리하여 -80℃에 보관하였고 RANK-Fc가 혈액 내로 분비되는 정도를 ELISA를 이용하여 정량하였다.

6. 조직에서 GFP 발현 세포의 위치 확인

안락사를 시킨 마우스의 대퇴골과 머리덜개뼈(calvaria)와 연조직(간, 비장, 장, 췌장, 내장지방, 신장, 폐, 심장, 뇌)을 적출하여 박리 후에 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 고정하고 대퇴골과 머리덜개뼈는 15% EDTA로 탈석회화(decalcification)시켰다. 그 후 에탄올을 점차 농도를 높여 탈수시키고 xylene으로 제거 후 파라핀으로 고정하고 5 µm로 절개 후 차광하고 형광현미경(Olympus IX51; Olympus America Inc., Melville, N.Y., USA)으로 GFP 발현을 확인하였다.

골수로부터 얻은 세포에서 GFP 발현을 확인하기 위해 안락사 시킨 마우스의 대퇴골과 경골을 적출하여 박리 후에 뼈의 양쪽 끝을 절단 후 27 게이지 바늘을 삽입하고 10% FBS가 포함된 alpha minimum essential medium (αMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 mL로 골수를 씻어 내렸다. 세포를 70 µm nylon 필터로 여과하고 260 g에서 5분 동안 원심분리 후 25 cm² flask에 1 mL당 1×10^6 유핵세포를 20% FBS가 포함된 DMEM으로 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 처음 일주일 동안은 그대로 두었다가 그 후에는

2~3일마다 새로운 배양액으로 바꾸면서 부작세포만을 배양하여 형광현미경으로 GFP 발현을 확인하였다.

7. RANK-Fc 발현 확인

1) Western blot

시험관 내에서 RANK-Fc의 발현을 확인하기 위해 RANK-Fc 과발현 세포 용해물(lysates)과 배양액을 회수하여 Western blot을 시행하였다. 세포 배양액은 Western blot을 하기 전에 마우스 RANK 항체(R&D System, Minneapolis, MN, USA)로 면역침전(immunoprecipitation)을 하였다. 이를 위해서 배양액 1 mL당 마우스 RANK 항체(1 µg/mL, R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 4℃에서 10~16시간 동안 처리한 뒤 우무접합체부유액(agarose conjugate suspension) (Protein A/G; Santa Cruz, CA, USA) 20 µL를 4℃에서 10~16시간 동안 처리하고 원심분리 후 침전물을 세척 후 2배 전기영동 샘플완충액 40 µL를 추가한 후 5분간 끓이고 세포 용해물과 함께 10% 겔에서 SDS-PAGE 분석을 시행하였다. nitrocellulose 막으로 옮긴 후 1차 항체로 마우스 RANK 항체와 human IgG Fc 특이항체(1:1000, Jackson immunoresearch Lab Inc., West Grove, PA, USA)를 반응시킨 후 2차 항체로 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 항 염소 항체(1:3000, Santa Cruz, CA, USA)와 반응시킨 뒤 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 화학발광검사를 시행하였다.

2) ELISA

96 well microplate에 마우스 RANK 항체(1 µg/well)를 4℃에서 10~16시간 동안 코팅하고 0.5% PBS-Tween으로 세척 후 희석한 세포배양액과 마우스 혈청 100 µL를 4℃에서 10~16시간 동안 반응 후 세척하고 2시간 동안 실온에서 HRP-conjugated human IgG Fc 항체(1:5000, Jackson Lab., West Grove, PA, USA)를 처리했다. 다시 plate를 세척 후 tetramethylbenzidine base (TMB, Sigma, St. Louis, MO,

USA)를 실온에서 20분간처리하고 1M H₂SO₄를 추가한 후 microplate reader set (ThermoMax., Scientific Surplus, Belle Mead, NJ, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계분석

SPSS (Version 11.5; SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였고 각 시점에서의 네 그룹 간 골밀도의 비교는 Kruskal-Wallis test 비모수검정법을 이용하여 분석하였고 두 개의 수술 군에 따른 비교는 Mann-Whitney test 비모수검정법을 사용하였다. 모든 통계학적 분석에서 $P < 0.05$ (two-sided)인 경우만 유의하게 판정하였고 모든 데이터를 mean ± SD로 표기하였다.

결 과

1. RANK-Fc 레트로바이러스의 제작

RANK-Fc의 지속적인 과발현이 골흡수에 미치는 효과를 알아보기 위해 RANK-Fc 유전자를 레트로바이러스 MSCV LTR의 하부와 IRES-eGFP cassette의 상부에 삽입하여 RANK-Fc를 코딩하는 레트로바이러스 벡터를 제작하였다 (Fig. 1). 이 시스템에서는 RANK-Fc 유전자와 eGFP 유전자가 IRES에 의해 연결되어 있어서 하나의 promoter인 MSCV LTR에 의해 공통으로 전사조절되고 하나의 bicistronic mRNA로부터 RANK-Fc와 eGFP가 발현되므로 GFP의 발현을 확인함으로써 RANK-Fc의 발현을 간접적으로 알 수 있다. 대조군 레트로바이러스벡터는 레트로바이러스 감염에 의한 효과를 배제하기 위해 실험 전반에 걸쳐 RANK-Fc가 삽입되지 않은 pMSCV-IRES-eGFP (pMSCV -eGFP) 벡터를 이용하였다.

2. RANK-Fc 과발현 세포의 확립 및 시험관 내 발현 확인

RANK-Fc를 과발현하는 세포를 확립하기 위해 C3H10T1/2

pMSCV-IRES-GFP

(control retrovirus)



pMSCV-RANK-Fc-IRES-GFP

(RANK-Fc retrovirus)



Fig. 1. Schematic representation of retroviral vectors. RANK-Fc cDNA is located downstream of MSCV LTR and upstream of IRES-eGFP cassette, allowing the bicistronic expression of both RANK-Fc and eGFP.

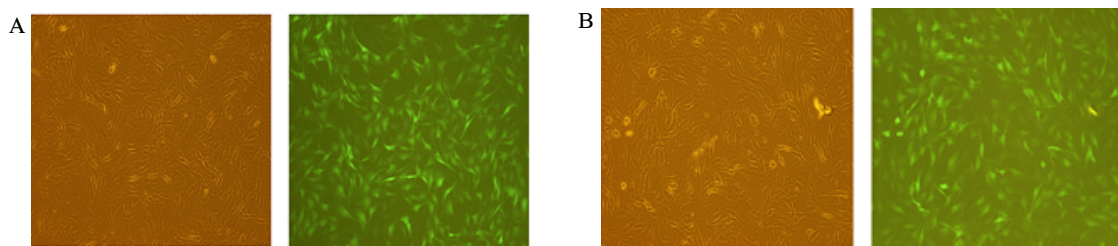


Fig. 2. Expression of GFP in transduced C3H10T1/2 cells. The left panels depict light microscopy images, and right panels show images at the same position under fluorescent light. Cells transduced with MSCV-RANK-Fc-eGFP (A) and MSCV-eGFP (B) express GFP (98.3% and 85.3%, respectively) (magnification $\times 100$).

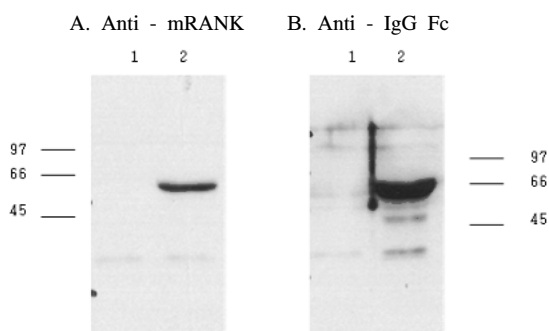


Fig. 3. Cellular expression of RANK-Fc *in vitro*. Western blot analysis of cellular lysates from transduced Chinese hamster ovarian (CHO) cells. Blots were probed with goat polyclonal anti-mouse RANK antibody (A) and goat polyclonal anti-human IgG Fc fragment-specific antibody (B). Lane 1, pMSCV-eGFP-transduced CHO cells; lane 2, pMSCV-RANK-Fc-eGFP-transduced CHO cells. The numbers on the both sides indicate molecular size markers in kDa.

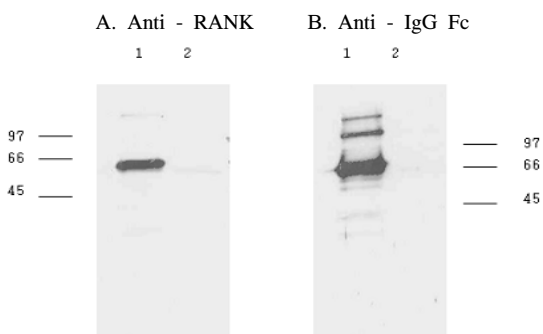


Fig. 4. Western blot analysis of RANK-Fc secreted from C3H10T1/2 cells transduced *in vitro*. Protein samples from conditioned medium were immunoprecipitated with goat polyclonal anti-mouse RANK antibody and resolved by SDS-PAGE. Blots were probed with goat polyclonal anti-mouse RANK antibody (A) and goat polyclonal anti-human IgG Fc fragment-specific antibody (B). Lane 1, MSCV-RANK-Fc-eGFP-transduced C3H10T1/2 cells; Lane 2, MSCV-eGFP-transduced C3H10T1/2 cells. The numbers on the right signify molecular size markers in kDa.

세포에 MSCV-RANK-Fc-eGFP 레트로바이러스를 형질도입시키고 형광현미경으로 GFP 발현을 확인하였다. RANK-Fc와 eGFP 유전자가 같은 promoter에 의해 전사조절되기 때문에 GFP 양성인 세포는 RANK-Fc 발현을 간접적으로 증명한다. MSCV-RANK-Fc-eGFP나 MSCV-eGFP 레트로바이러스로 형질도입된 세포는 강한 GFP 신호가 관찰되었으나(Fig. 2A, B) 형질도입되지 않은 세포는 관찰할 수 없었다. FACS를 이용하여 GFP 양성인 세포를 분리하였고 효율(transduction efficiency)은 RANK-Fc 과발현세포가 98.3%, 대조군 세포가 85.3%이었다.

세포용해물과 면역침전시킨 세포배양액에서 Western blot법을 이용하여 각각 RANK-Fc의 세포 내 발현 및 분비됨을 확인하였다. RANK-Fc를 과발현하는 경우에는 대조군에 비해 약 60 kD 크기에서 띠가 관찰되었다(Fig. 3, 4).

3. OVX 모델에서 RANK-Fc 과발현이 골밀도에 미치는 효과

7주령 된 암컷 C3H 마우스를 OVX하고 4주 후에 에스트로겐 결핍에 의한 두 가지 큰 생리적 변화를 확인할 수 있었다. 첫번째는 모든 OVX 마우스가 Sham op 마우스에 비해 골밀도와 골량(bone mineral content, BMC)이 유의하게 낮았으며(Fig. 5A, B, $P < 0.01$) 둘째, 체중과 체지방분율(body fat mass [%])이 더 높았다(Fig. 5C, D, $P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively).

OVX 4주 후에 OVX에 의한 에스트로겐 결핍의 충분한 효과를 확인하고 이들 마우스를 무작위로 3그룹으로 나누어 RANK-Fc 과발현세포(OVX + RANK-Fc), 대조군 레트로바이러스로 감염된 세포(OVX + GFP), PBS (OVX + vehicle)를 각각 주사하고 Sham op군에도 같은 방법으로 동량의 PBS를 격일로 총 4회 주사하였다(Fig. 6A). 레트로바이러스 감염에 의한 효과 및 세포 자체에 의한 효과를 배제하기 위해 대조군 레트로바이러스로 감염된 세포와 PBS를 주사하여 OVX후 RANK-Fc가 골밀도에 미치는 효과를 비교하였다. OVX 4주 후 OVX 3군 간에 골밀도 차이는 없었으나 Sham op군에 비해서는 의미있게 골밀도가 감소하

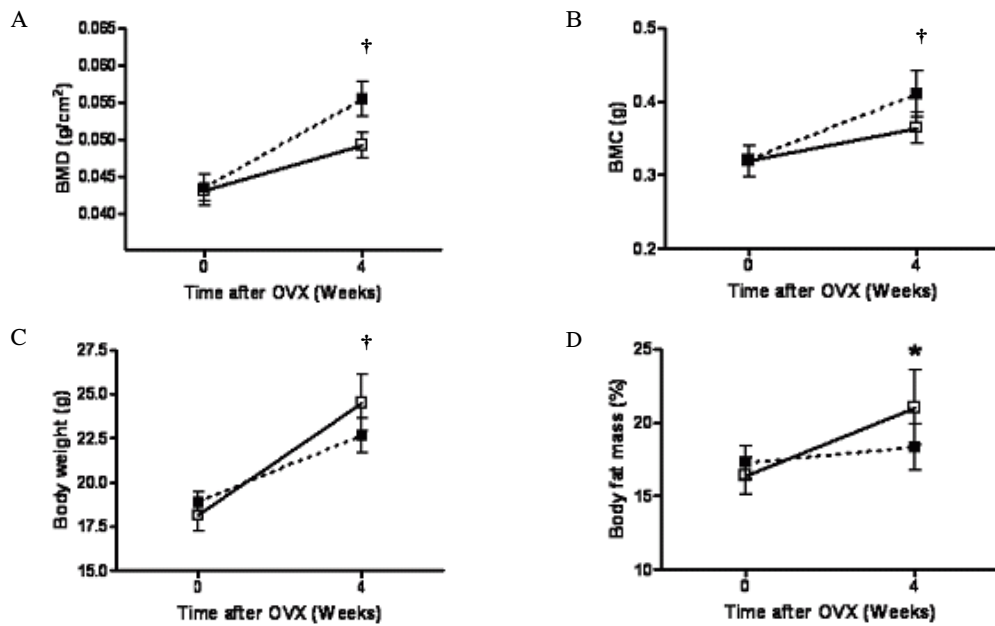


Fig. 5. Systemic physiologic changes observed at 28 days after OVX. Six week-old female C3H mice were sham operated [closed square, n = 4] or ovariectomized [open square, n = 14], and bone mineral density (BMD) (A), bone mineral content (BMC) (B), body weight (C), and body fat mass (D) were measured at baseline and four weeks after the operation. Data are expressed as means and standard deviations.

* $P < 0.05$, OVX group vs. sham op group (non-parametric Mann-Whitney test).

† $P < 0.01$, OVX group vs. sham op group (non-parametric Mann-Whitney test).

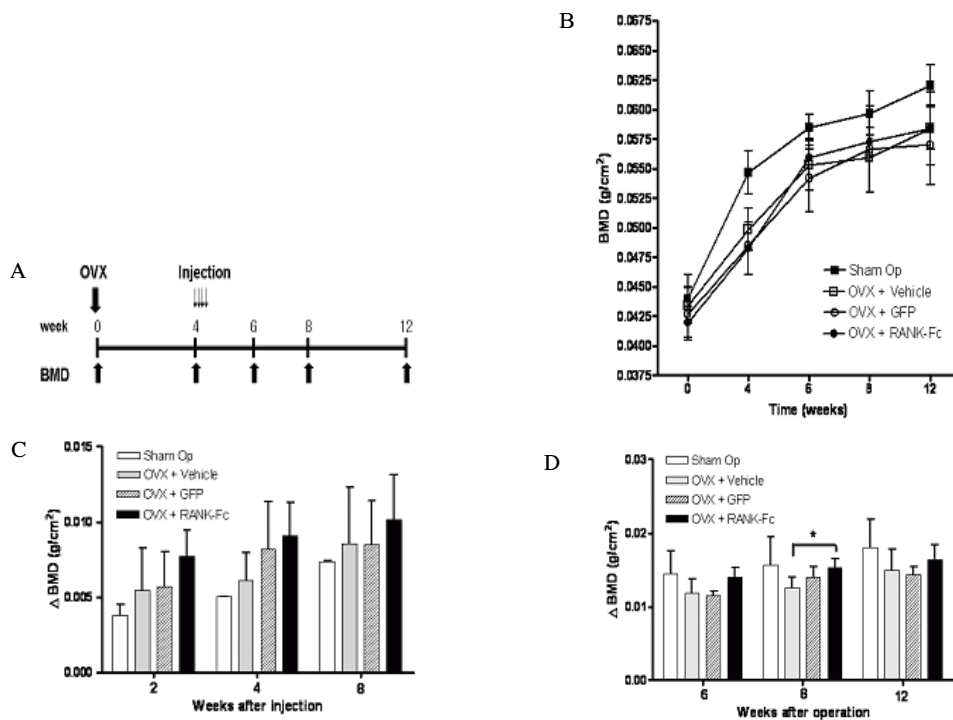


Fig. 6. RANK-Fc prevents the progression of established osteopenia in C3H mice. A, Schematic representation of the experimental protocol; B, The effect of RANK-Fc on bone mineral density over time. Sham op (closed square, n = 2); OVX + Vehicle (open square, n = 3); OVX + GFP (open circle, n = 2); OVX + RANK-Fc (closed circle, n = 4); C, Changes in bone mineral density after injection; D, Changes in bone mineral density, compared to the baseline. Sham op (open bar, n = 2); OVX + Vehicle (gray bar, n = 3); OVX + GFP (slashed bar, n = 2); OVX + RANK-Fc (black bar, n = 4). Data are expressed as means and standard deviations.

* $P < 0.05$, OVX + RANK-Fc vs. OVX + Vehicle (non-parametric Kruskal-Wallis test).

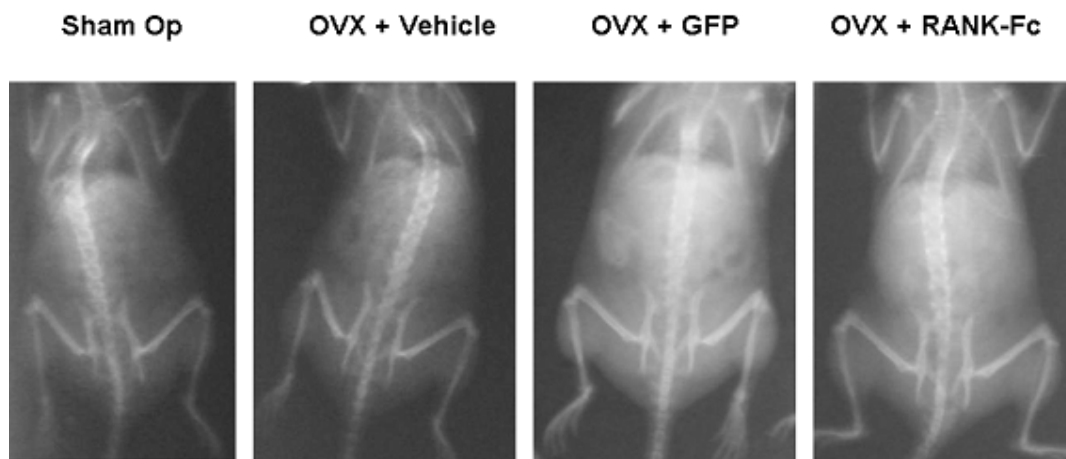


Fig. 7. Whole-body radiographs in C3H mice. C3H mice were injected i.p. with transduced C3H10T1/2 cells or PBS at 4 weeks after OVX or sham op. No significant differences in radiodensity were evident after 8 weeks.

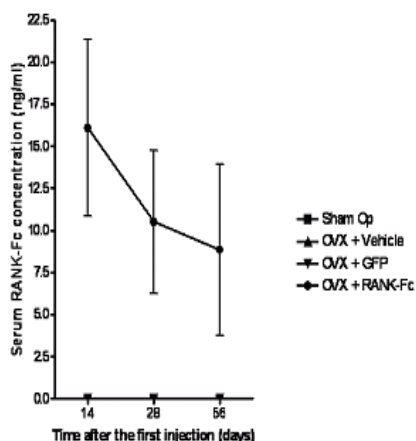


Fig. 8. Production of RANK-Fc in mice. C3H10T1/2 cells were transduced with MSCV-RANK-Fc-eGFP and MSCV-eGFP. Eleven week-old C3H mice were administered transduced cells or PBS on Days 0, 2, 4, and 6 at 4 weeks after OVX. Serum RANK-Fc levels were measured by ELISA on Days 14, 28, and 56 after the first injection. Data are expressed as means and standard deviations (n = 2-4/group).

었고, 주사 후 2주, 4주, 8주에 측정된 골밀도는 "OVX + RANK-Fc"군에서 다른 OVX군에 비해 유의하게 골밀도가 증가되지는 못했지만 증가되는 경향을 보였고(Fig. 6B, C) 특히 수술 후 8주째(주사 후 4주)에는 "OVX + vehicle"군에 비해 유의하게 골밀도 증가량이 높았다(Fig. 6D). 궁극적으로 "OVX + RANK-Fc"군에서는 OVX로 인해 발생한 골밀도 감소가 RANK-Fc를 주사 후 더 이상의 감소를 억제했을 뿐만 아니라 골밀도가 증가되는 경향을 초래했다. 하지만 시행한 X-ray에서는 그룹 간의 차이를 관찰할 수 없었다

(Fig. 7).

4. 생체 내에서 RANK-Fc 발현 확인

RANK-Fc 과발현 세포가 주사한 후 생물학적 활성도를 지닌 RANK-Fc를 지속적으로 혈액 내로 분비하는지를 확인하고 증가된 골밀도의 효과가 RANK-Fc에 의한 것임을 입증하기 위해 주사 후 2주, 4주, 8주째에 마우스의 혈청을 채취하여 ELISA를 시행하여 RANK-Fc의 농도를 정량하였다. RANK-Fc를 주사한 마우스에서만 RANK-Fc가 측정되었으며 측정된 혈청 RANK-Fc 농도는 주사 후 2주 후에 16.08 ± 5.24 ng/mL로 가장 높았으며 그 후에 점차적으로 감소하여 주사 후 8주 후에는 8.83 ± 5.08 ng/mL로 측정되었다(Fig. 8). 이것은 세포배양액에서 ELISA로 측정된 RANK-Fc 농도의 1/50에 해당되었다.

5. 생체 내 RANK-Fc 생성 세포의 확인

GFP는 RANK-Fc와 달리 세포 밖으로 분비되지 않고 주로 핵 내에 위치하는 세포 내 단백질로 발현하기 때문에 조직에서 GFP의 발현을 확인함으로써 간접적으로 RANK-Fc를 발현하는 세포의 생체 내 위치를 확인할 수 있다. C3H10T1/2 세포는 cell line이긴 하지만 중간엽줄기세포이므로 주사 후에 이 세포들이 골수로 가서 조골세포로 분화되어 골밀도가 증가되는지를 확인하기 위해 안락사 시킨 마우스의 대퇴골 및 여러 연조직에서 형광현미경으로 GFP 발현을 확인하였다. 그 중 간(Fig. 9A), 비장(Fig. 9B), 내장지방(Fig. 9C)에서는 강한 GFP 신호를 관찰할 수 있었으나, 대퇴골을 비롯한 다른 조직에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 10A). 또한 대퇴골의 골수로부터 얻은 세포에서도 GFP를 관찰할 수 없었다(Fig. 10B).

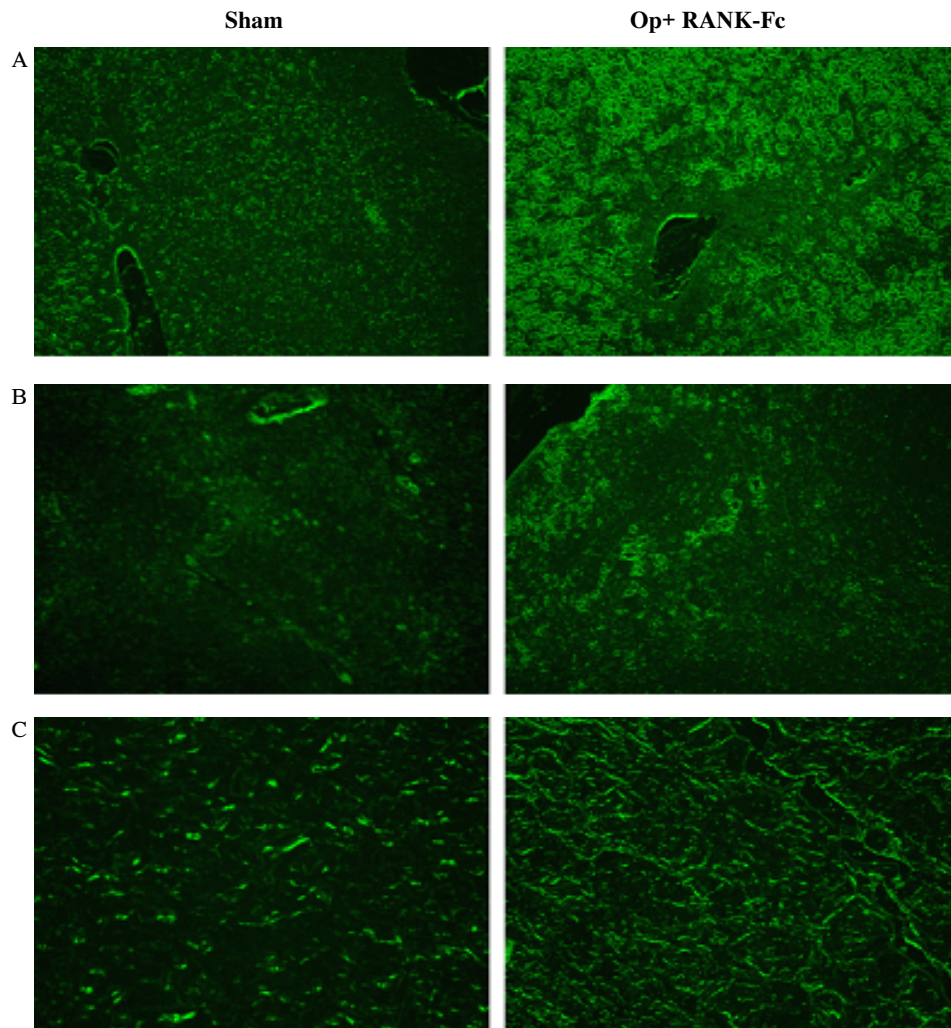


Fig. 9. Localization of RANK-Fc-secreting cells in tissue sections of transduced C3H10T1/2 cell transplants. C3H10T1/2 cells were infected with MSCV-RANK-Fc-eGFP *in vitro*, and transplanted into ovariectomized C3H mice. After 8 weeks *in vivo*, transplants were harvested and prepared for the histological evaluation of GFP expression. Higher expression of GFP was attained in liver (A), spleen (B), and intra-abdominal fat (C) in "OVX + RANK-Fc" mice (right), compared with that in corresponding tissues from "sham op" mice (left) (magnification $\times 100$).

고 찰

본 연구의 목적은 골다공증 모델에서 RANK-Fc를 이용한 유전자요법의 가능성 및 치료효과를 알아보기 위한 것으로 유전자 조작을 가한 C3H10T1/2 세포를 이용하여 마우스 중간엽줄기세포가 치료 단백질을 지속적으로 혈액 내로 분비하는 세포매개체로서의 가능성을 살펴보고 RANK-Fc가 OVX에 의해 감소된 골밀도를 유의하지는 않지만 증가시키는 경향을 확인하였다.

유전자요법의 3가지 주된 문제점은 효율성, 형질도입된 세포의 분리 및 이식유전자의 발현 기간이다. 본 연구에서는 C3H10T1/2 세포로의 유전자전달 효율성이 약 90% 전후로 이전의 중간엽줄기세포에 레트로바이러스를 가지고 실

험한 연구에서 18~65%로 보고된 것보다 높다[27~28]. 유전자전달 효율성을 향상시키기 위해 많은 방법들이 이용되고 있는데 그 중 한 방법이 본 연구에서 시행한 원심분리이다. 이것은 아마도 세포막을 교란시키고 세포에 바이러스의 부착을 촉진하고 국소농도를 증가시킴으로써 효율성을 높일 수 있다고 알려져 있다[28~29]. 정보제공(reporter) 및 분리표지자(selectable marker)로서 이용된 GFP는 기질이나 보조인자와 같은 다른 물질을 필요로 하지 않으며 다른 조작이 필요 없이 세포 자체를 형광현미경이나 흐름세포측정(flow cytometry)을 이용하여 확인이 가능하므로 측정이 용이하며 세포 독성도 거의 없다고 알려져 있으며[30] 본 연구에서도 그러하였다.

중간엽줄기세포는 몇 가지 특징들을 가지고 있는데 배양

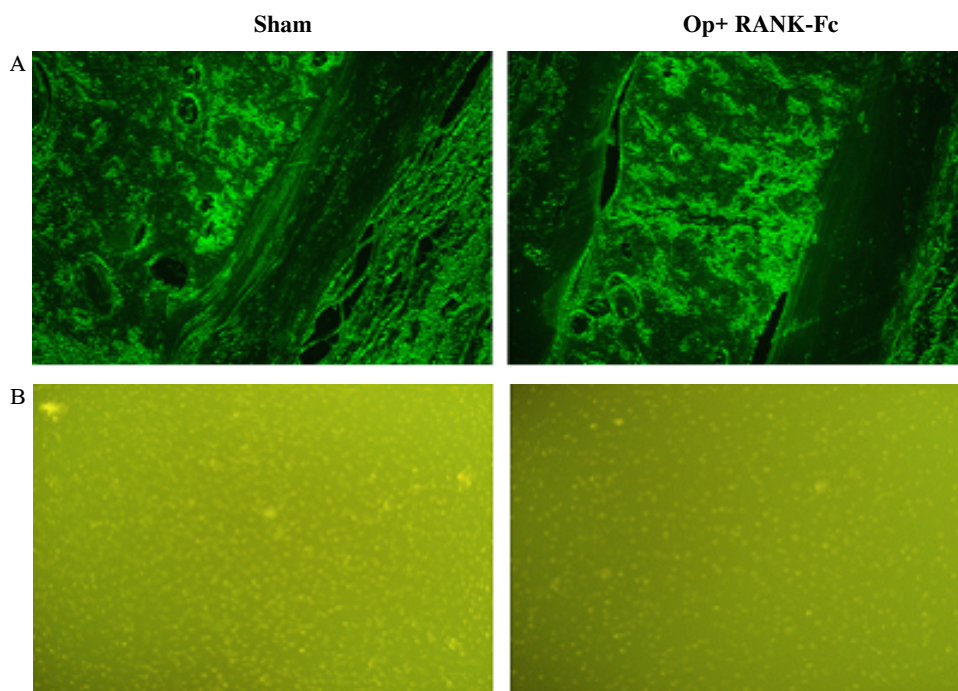


Fig. 10. Localization of RANK-Fc-secreting cells in bone and bone marrow of transplants of transduced C3H10T1/2 cells. C3H10T1/2 cells were infected with MSCV-RANK-Fc-eGFP in vitro, and transplanted into ovariectomized mice. After 8 weeks in vivo, femurs were harvested and prepared for histological evaluation of GFP expression (A), or freshly isolated cell culture from bone marrow was obtained (B) No GFP signal was detected in the "sham op" (left) and "OVX + RANK-Fc" (right) groups (magnification $\times 100$).

접시에 부착해서 자라기 때문에 골수의 조혈모세포와 분리 배양이 가능하고 시험관 내에서 비교적 쉽게 배양이 가능하고 조혈모세포의 증식을 지지하고 적절한 조건하에서 조골 세포나 지방세포, 연골, 근육 등으로 분화될 수 있다. 또한 골수채취로 비교적 쉽게 얻을 수 있고 환자 본인의 세포를 이용하므로 면역억제제의 사용이 불필요하며 배아줄기세포에서 관찰되는 종양발생의 증거도 없다[25]. 따라서 중간엽줄기세포를 이용한 유전자요법이나 세포치료가 유망한 치료방법으로 대두되고 있다. 골대사 분야에서 중간엽줄기세포를 이용한 치료전략을 크게 3가지로 나누어 볼 수 있는데 첫째는 중간엽줄기세포를 국소적으로 골 결손이 있는 부위에 직접 주사하여 재건하는 방법이다. 둘째는 본 연구에서 처럼 유전자요법이 있는데 방법상 두 가지로 치료유전자를 중간엽줄기세포에 삽입하여 치료단백질을 분비하는 매개체로 이용한다는 점은 동일하지만, 하나는 세포가 전신순환을 통해 골수로 가서 단백질을 분비하는 방법과 다른 하나는 불활성물질로 둘러싸여 치료단백질만 확산을 통해 혈액 내로 분비되어 치료효과를 나타낼 수 있다. 마지막으로 세포 치료인데 중간엽줄기세포를 전신으로 주입하여 골수로 갈 뿐만 아니라 뼈나 연골과 같은 조직에서 재증식 할 수 있다 [31~32]. 주사한 중간엽줄기세포가 골수로 가서 안정되게

이식(engraft)되고 다른 조직으로 분화될 수 있는지에 관해서는 아직까지 많은 논란이 있다. 이렇게 다른 결과가 나타나는 이유는 현재까지 모든 문제를 분명하게 해명할 수는 없지만 몇 가지 일반적인 점들로 설명하고 있는데, 첫째는 engraftment 수준이 일반적으로 낮기 때문에 이를 발견할 수 있는 표지자가 충분히 민감하고 안정적이어야 한다는 점, 둘째 빨리 자라는 배아나 신생아, 조직손상이 있는 경우를 제외하곤 engraftment 수준이 낮는데 어떤 종류나 얼마나 심한 정도의 조직손상이 engraftment를 촉진시킬 수 있는지 모른다는 점, 마지막으로 실험에 이용된 세포나 조건들의 미묘한 차이점, 예를 들면 세포를 분리하는데 이용된 동물의 종(species)이나 세포주의 차이, 주입된 세포 주기나 수, 세포배양조건, 골수 절제(ablation) 조건들의 차이 등으로 설명하고 있다[32~33].

본 연구에서는 GFP 신호가 간, 비장, 내장지방에서는 관찰되었으나 대퇴골 조직절편이나 골수로부터 배양한 세포에서는 관찰할 수 없었다. 이를 설명할 수 있는 방법으로 C3H10T1/2 세포가 cell line이라는 단점이 있지만 위에서 언급한 이유들로 일부 설명할 수 있다. 특히 engraftment 수준이 매우 낮기 때문에 형광현미경으로 GFP를 확인하는 방법이 충분히 민감하지 않을 수 있다. 따라서 보다 더 민감하

고 특이적인 표지자, 예를 들면 종이나 성별에 특이적인 표지자를 fluorescence in situ hybridization (FISH)을 이용하여 정량할 수 있다[32~33].

본 연구에서는 RANK-Fc가 골에 미치는 효과가 비교적 작았고 유의하지는 않지만 골밀도를 증가시키는 경향이 있었다. 비교적 효과가 적은 이유로는 연구기간이 짧고 대상 샘플 수가 적으며 최대골밀도에 도달하기 전에 빨리 성장하는 기간 동안 연구가 진행되었기 때문에 충분한 효과를 평가하기 어려웠을 수 있다. 또한 유전자요법의 한 가지 문제점인 시간에 따라 이식유전자 발현이 감소한다는 점으로도 설명할 수 있다. 본 연구에서 측정된 혈청 RANK-Fc 농도는 주사 후 2주째 가장 높다가 점차적으로 감소하였는데 주사 후 기간별로 골밀도의 증가량을 살펴보면, 다른 군에 비해 처음 2주 동안 골밀도의 증가량이 가장 높은 경향을 보였고, 그 후에는 증가하긴 하지만 증가량이 완만하였다. 현재까지의 보고에 의하면 생체 내에서 형질도입된 세포를 주사 후 최고 4개월까지 이식유전자 발현을 확인하였으며 [34~35] 이렇게 시간이 지남에 따라 발현이 감소되는 이유로는 promoter의 불활성화, 형질도입된 세포의 소실 등이 있다고 알려져 있다[27].

결론적으로 본 연구는 유전자 조작을 가한 C3H10T1/2 세포가 복강 내 주사 후 면역계통을 통해 간이나 비장에서 지속적으로 RANK-Fc를 분비함으로써 중간엽줄기세포를 이용한 유전자요법의 세포매개체로서의 가능성을 확인하였으며 또한 RANK-Fc를 이용하여 RANK 신호전달체계를 차단함으로써 OVX에 의한 더 이상의 골밀도의 감소를 막고 유의하지는 않지만 대조군에 비해 골밀도가 증가되는 경향을 확인하였다. 본 연구를 토대로 더 큰 치료효과를 얻기 위해서 향후 지속적인 추가연구가 필요할 것으로 생각되며 이러한 연구가 향후 줄기세포를 이용한 골다공증 및 다른 골대사 질환의 근본적인 치료 전략을 수립하는 데에 응용될 수 있는 기반기술이 될 것으로 기대된다.

요 약

배경: 파골세포의 분화 및 활성화에는 RANK/RANKL/OPG 시스템이 중요하게 작용한다. OVX에 의한 골다공증 C3H 마우스 모델에서 RANK-Fc 레트로바이러스를 이용한 유전자요법이 골감소에 미치는 효과를 확인하고 C3H10T1/2 세포의 세포매개체로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

방법: 마우스 RANK의 세포외영역과 사람의 IgG1의 Fc 부분을 융합한 재조합 RANK-Fc 유전자를 레트로바이러스 벡터를 통해 C3H10T1/2 세포에 형질도입시킨 후 OVX 후 4주가 지난 C3H 마우스에 복강 내 주사한 뒤에 골밀도를 측정하였고 RANK-Fc 발현을 시험관 내와 생체 내에서 측

정하였으며 생체 내 RANK-Fc 발현세포의 위치를 확인하였다.

결과: Western blot을 이용하여 형질도입된 세포의 RANK-Fc 발현 및 분비를 확인하였고 ELISA를 이용하여 마우스의 혈중 RANK-Fc 농도를 측정된 결과 2주 후에 가장 높았고 8주까지 서서히 감소하였으나 측정 가능하였다. OVX 4주 후에 RANK-Fc 과발현 세포를 복강 주사한 마우스가 OVX를 시행한 다른 대조군에 비해 유의하지는 않지만 골밀도 증가량을 증가시키는 경향을 보였다. 간, 비장, 내장지방 조직에서는 GFP의 발현이 관찰되었으나 대퇴골 및 골수에서는 GFP 양성 세포를 확인하기 어려웠다.

결론: 유전자 조작을 가한 C3H10T1/2 세포를 이용하여 마우스 중간엽줄기세포가 치료 단백질을 지속적으로 혈액 내로 분비하는 세포매개체로서의 가능성을 확인하였고 RANK-Fc가 OVX에 의해 이미 감소된 골밀도를 유의하지는 않지만 증가시키는 경향을 확인하였다.

감사의 글

pMSCV-IRES-eGFP 레트로바이러스 벡터를 주신 Dr. Ronald L. Johnson (University of Alabama at Birmingham, Alabama, U.S.A.)과 RANK-Fc cDNA와 단백질을 주신 충남대학교 노재량 교수님께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. The NIH consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 285:785-795, 2001
2. Lopez FJ: New approaches to the treatment of osteoporosis. Curr Opin Chem Biol 4:383-393, 2000
3. Fleisch H: Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev 19:80-100, 1998
4. Morley P, Whitfield JF, Willick GE: Parathyroid hormone; an anabolic treatment for osteoporosis. Curr Pharm Des 7:671-689, 2001
5. Takahashi N, Udagawa N, Suda T: A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/ TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun 256: 449-455, 1999
6. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med 79:243-253, 2001

7. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR: Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319, 1997
8. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268, 1998
9. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323, 1999
10. Li J: RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1566-1571, 2000
11. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3540-3545, 1999
12. Bolon B, Carter C, Daris M, Morony S, Capparelli C, Hsieh A, Mao M, Kostenuik P, Dunstan CR, Lacey DL, Sheng JZ: Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Mol Ther* 3:197-205, 2001
13. Kostenuik PJ, Bolon B, Morony S, Daris M, Geng Z, Carter C, Sheng J: Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses established osteopenia in ovariectomized mice. *Bone* 34:656-664, 2004
14. Nakashima T, Wada T, Penninger JM: RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15:280-287, 2003
15. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin; potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone disease. *Cancer* 92:460-470, 2001
16. Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C, Mizokami A, Fu Z, Westman J, Keller ET: Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 107:1235-1244, 2001
17. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Fermand JP, Harousseau JL, Lipton A, Mariette X, Williams CD, Nakanishi A, Holloway D, Martin SW, Dunstan CR, Bekker PJ: A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 97(Suppl 3):887-892, 2003
18. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi HM, Dunstan CR: The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Mineral Res* 16:348-360, 2001
19. Byrn RA, Mordenti J, Lucas C, Smith D, Marsters SA, Johnson JS, Cossum P, Chamow SM, Wurm FM, Gregory T, Groopman JE, Capon DJ: Biological properties of a CD4 immunoadhesion. *Nature* 344: 667-670, 1990
20. Sordillo EM, Pearse RN: RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer* 97(Suppl 3):802-812, 2003
21. Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR: Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor κ B-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 61:2572-2578, 2001
22. Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liao DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y: Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11581-11586, 2001
23. Emery JG, McDonnell P, Burke MB: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273:14363-14367, 1998
24. Shipman CM, Croucher PI: Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 63:912-916, 2003
25. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL: Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human

- prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:1619-1623, 2002
26. Ko KS, Lee MH, Koh JJ, Kim SW: Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Mol Ther* 4:313-316, 2001
27. Allay JA, Dennis JE, Haynesworth SE, Majumdar MK, Clapp DW, Shultz LD, Caplan AI, Gerson SL: LacZ and interleukin-3 expression in vivo after retroviral transduction of marrow-derived human osteogenic mesenchymal progenitors. *Hum Gene Ther* 8:1417-1427, 1997
28. Ding LM, Saylor R, Munshi NC: The stromal cell as a vehicle for ex vivo gene transfer. *Blood* 89:446-456, 1997
29. Chuah MKL, Brems H, Vanslembrouck V, Collen D, Vandendriessche T: Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther* 9:353-365, 1998
30. Persons DA, Mehaffey MG, Kaleko M, Nienhuis AW, Vanin EF: An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood Cells Mol Dis* 24: 167-182, 1998
31. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74, 1997
32. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL: One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(Suppl 1):11917-11923, 2003
33. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ: Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1142-1147, 1998
34. Bianco, P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192, 2001
35. Krebsbach PH, Zhang K, Malik AK, Kurachi K: Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human factor IX model. *J Gene Med* 5:11-17, 2003