대한척추외과학회지 제 8 권 제 4 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 8, No. 4, pp 437~446, 2001

골 형성 유전자 치료
(제 5형 Adenoviral vector를 이용한 Ex Vivo 유전자 치료로 척추 유합 시도시 면역학적 모델)

김학선 · 박희완 · 이환모 · 문성환 · 박진오 · 하중원*
김남현** · 강용호** · Scott D. Boden***

연세대학교 의과대학 정형외과, 의료보험 관리 공단병원 정형외과,*
건양 대학교 정형외과,** Emory Spine Center, Emory University, GA***

Bone Forming Gene Therapy
(Immune Animal Model in Ex Vivo Gene Therapy for Spinal Fusion with Type 5 Adenoviral Delivery of the LIM Mineralization Protein-1 cDNA)

**Hak-Sun Kim, M.D., Hui Wan Park, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D.,
Seong-Hwan Moon, M.D., Jin-Oh Park, M.D., Jung-Won Ha, M.D.*,
Nan-Hyun Kim, M.D.**, Young-Ho Kang, M.D.**, Scott D. Boden, M.D.*****

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
*Department of Orthopaedic Surgery, Il-San Medical Insurance Hospital, Ko-Yang, Korea**
*Department of Orthopaedic Surgery, Konyang University College of Medicine, Taejeon, Korea***
*Emory Spine Center, Department of Orthopaedic Surgery, Emory University, Atlanta, GA, USA****

– Abstract –

Study Design : In vivo study to determine the immune effects to adenoviral vector encoding LMP-1 cDNA in rabbit.
Objective : To quantify the immune effect of Ad5-LMP-1 in the rabbit during the therapeutic gene transfer.
Summary of Literature Review : One of the major limitations in the use of adenoviral vector for gene therapy is the immune response and it made the poor transduction efficiency when re-administrated. Adenoviral antigen plus those derived from transgene expression in transduced cell contribute to cellular, humoral and non-specific immune response constitutes barriers to successful gene therapy. Therefore, the animal immune model will be mandatory to study the immune impact.
Materials and Method : We i.v. injected Ad5-βGal to total 24 adult NZW rabbits; $1x10^8$, $1x10^9$, $1x10^{10}$, $1x10^{11}$v.p. to each 6 rabbits allowed them to develop immune response. Six non-immunized animals were used as control. Adenovirus antibodies were measured at 0, 4, 8, 16, 20 weeks. Group I. 6 control rabbit underwent spinal arthrodesis at 4 weeks (n=3) and 16 weeks (n=3) with 4 million cells and MOI of 4. Group II. 6 rabbit underwent spinal arthrodesis at 4 weeks after injection of 10^8 p.f.u virus (n=3) and 16 weeks (n=3). Group III. six 10^9 immunized rabbits, Group IV. six 10^{10} immunized rabbits, Group V. six 10^{11} immunized rabbits, underwent spinal arthrodesis at 4 and 16 weeks after injection. Total anti-Ad Ig and neutralizing antibody titer was measured on the 0. 4. 8, 16, 20 weeks after injection.

Address reprint requests to
Hak Sun Kim, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Yonsei University
Young-dong Severance Hospital, Young-dong PO Box 1217, Seoul, Korea
Tel : 82-2-3497-3411, Fax : 82-2-573-5393, E-mail : haksunkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 이 논문의 요지는 제 18차 춘계 척추외과 학회(2001)에서 발표되었으며, 우수 구연 논문 상을 수상하였음.

Results : Group I. All 6 non-immunized rabbits had solid spine fusions at 4 and 16 weeks. Group II. All 3 immunized rabbits had not spine fusions at 4 weeks and all three had solid spine fusion at 16 weeks. Group III. None of them (n=6) immunized rabbits had spine fusion at 4 and 16 weeks, but some bone formation was observed at 16 weeks. Group IV, V. None of them immunized rabbits had bone formation. The anti-Ad5 Ig and neutralizing Ab were detected and peaked at the 4 weeks and significantly dropped off 16 weeks after injection.

Conclusion : This experiment revealed that a small dose of adenovirus elicited an enough immune response that inhibited the bone formation. Because majority of human posses the Ab against adenovirus, it will be mandatory to overcome immune response in adenoviral vector gene therapy.

Key Words : Spine fusion, Lim mineralization protein, Gene therapy

서 론

척추의 후외방 유합술은 척추 외과에서 가장 많이 시행되고 있으나, 적게는 10%, 많게는 40%까지 불유합이 보고되고 있다. 이러한 시술의 유합 과정을 알기 위해 가토를 이용한 척추 후외방 유합에 대한 모델이 보고되었다.

또한 최근 분자 생물학과 유전 공학의 발달로 골 대체물질의 개발이 되고, 그중 골형성 단백질은 임상 실험중이며 그의 효능이 증명되고 있다. 이러한 골형성 단백질을 유전자를 이용하여 직접 생체 내에서 만드는 골형성 유전자에 대한 연구가 매우 활발하며, 차세대 치료법으로 각광을 받고 있다. 이중 세포 안에서 골 형성 인자를 만드는 Lim Mineralized Protein-1(LMP-1)을 제 5형 아데노 바이러스 운반체(type 5 adenovirual vector)에 실어 상기한 가토 모델에서 척추 후외방 유합의 성공이 보고되었다[15].

이때 사용하는 아데노 바이러스 운반체(adenoviral vector)는 포유류의 세포에 외부 유전자 발현을 시킬 수 있는 우수한 수단이다. 이 바이러스 운반체의 여러 가지 장점 즉, 정지기에 있는 세포 포함한 여러 단계의 세포에 적용 가능함, 많은 양의 유전자 운반이 가능함, 많은 양의 발현 유전자의 이식이 가능함, 인체의 무해함 등의 많은 장점을 가지고 있다[5,16,17]. 이렇게 아데노 바이러스 운반체는 많은 장점이 있으나, 유전자 치료의 이용시 삽입 유전자[transgene]의 발현 유지 시간이 짧고, 재투입 시에 매우 낮은 transduction 효율의 단점도 있다. 이는 아데노 바이러스의 항원과 삽입 유전자 항원이 인체에서 체액성 면역, 세포 면역 및 비 특이성 면역을 유발하기 때문이며, 이들이 삽입 유전자의 발현을 방해한다[6].

최근 아데노 바이러스의 면역 반응을 극복하기 위한 방법으로 면역 내성 유도[9], 아데노 바이러스 운반체의 미생혈청형 전환[12], 제 3세대 아데노 바이러스 제작 등의 방법이[13] 일부 효과를 얻고 있다. 하나 면역 내성 유도와 바이러스의 혈청형 변화는 많은 시간과 경비가 들고, 제 2, 3세대 아데노바이러스 운반체 제작도 면역 형성을 완전히 제거하지는 못하고 있다. 다른 방법으로는 전신적 면역 억제제나 면역 반응에 중요한 역할을 하는 CD-40에 대한 항체를 투입하는 방법도 연구되어 효과가 보고되고 있다[10,18]. 이러한 방법은 기존에 아데노바이러스에 대해서 면역력이 없는 동물에서는 면역 발생을 억제할 수는 있으나, 실제 인간은 약 80% 이상에서 이미 아데노바이러스에 대해서 항체를 가지고 있다. 따라서 유전자 치료가 효과를 얻기 위해서는 바이러스에 대한 면역력이 있는 동물에서 면역력을 극복하는 방법이 개발되어야 하겠다.

저자 등은 아데노 바이러스 운반체를 이용하여 ex vivo transfection 시켜서 골형성 유전자 치료를 가토에서 성공하였음을 보고한바 있다[15]. 아데노 바이러스 운반체를 체외에서 transfection 시키는 ex vivo 방법은 바이러스가 목표 세포에 충분히 transfection만 된다면 세포성 면역을 피할 수 있다고 보고되었다[1,11]. 이렇게 정형외과 영역에서 성공을 거두는 ex vivo 방법의 아데노 바이러스를 이용한 유전자 치료가 면역학적 현상을 극복할 수 있나 알아보고, 극복할 방법을 찾기 위해서는 이에 대한 면역학적 동물 모델을 만드는 것이 꼭 필요하다.

이 연구의 목표는 가토에 아데노 바이러스를 정맥 주사하여 면역력을 유발시키고, 이의 면역학적 영향과 요추 유합에 미치는 역할을 알아보고, 동물 모델을 만들어 추후 아데노 바이러스 운반체 의 면역학적 문제를 극복하는데 도움이 되는데 있다.

재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

인간 배아 신장 293세포를 Eagle's MEM에서 5~10%의 fetal clone III(Hyclone, CA)과 50 ug 겐타 마이신 이용해서 일렬로 배양 증식하여, Ad5-LMP-1 cDNA의 생성 및 증식에 이용되었다. 재조합 5형 아데노 바이러스를 유전

자 실기 위해서는 번식 능력이 제거했고(▽E1, E3), 제거된 adenovirus 유전자 대신에 치료 유전자로 LMP-1 cDNA를 조합하였다(Adeno-Quest Kit, Quantum Biotechnology, Quebec, Canada). 모든 유전자는 사이토 메갈로 바이러스 촉진자(cytomegalovirus promotor)에 의해 강제로 발현되게 재조합 하였다[11]. 재 조합된 아데노 바이러스는 293세포에서 증식되었다. 증식한 유전자 재조합 아데노 바이러스 운반체는 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통하여 확인하였다. 아데노바이러스 농도는 Multiplicity of infection(MOI)와 plaque forming unit(p.f.u.)를 사용하였고, MOI는 세포당 p.f.u.이고 1 p.f.u.는 대개 10-100 virus particle(v.p.)에 해당하였다.

2. Buffy coat 만들기

가토의 귀 동맥에서 3 ml의 혈액을 채취하여 17 ml의 MEM 용액과 20U/ml 헤파린을 추가하여 50 ml 원형 통에 넣고 1500 rpm으로 원심 분리한다. 이후 혈장 제거후 상층부 약 0.5 ml의 buffy coat 층을 사용한다. 이때 세포의 수는 단핵 임파구(mono nuclear cell)을 세어서 계산하여 총 4백만 개가 되도록 한 다음 여기에 αMEM을 추가하여 총 2 ml가 되게 한다.

3. 가토을 이용한 실험 계획 및 수술 수기

본원의 동물 위원회에서 승인을 얻은 후, 면역학적으로 이상이 없는 30마리의 생후 1년 몸무게 4.0~4.5 kg 암컷 뉴질랜드산 백색 토끼(New Zealand White, NZW)을 이용한다. 가토를 각각 케이지(cage)에 1마리씩 넣고 음식물과 물을 공급한다. 이 중 6마리는 대조 군으로 격리 수용하였다. 나머지 24마리 중 제 2군 6마리는 1×10^{8}의 베타 갈락토스 유전자를 가진 아데노 바이러스(Ad5-βGal)를 정맥 주사하고, 제 3군 6마리는 1×10^{9} Ad5-βGal, 제 4군 6마리는 1×10^{10} Ad5-βGal, 제 5군 6마리는 1×10^{11} Ad5-βGal을 1 ml PBS에 희석하여 정맥 주사하여 제 5형 아데노 바이러스에 대한 면역학적 반응을 야기 시킨다. 바이러스 주입 4주와 16주에 제 5-6요추 후외방 유합술을 실시한다. 이때 수술 방법은 전에 기술한바 같이[12] 양측으로 척추 후배 근육을 벌리고, 횡 돌기를 노출시킨다. 이 노출된 횡 돌기를 전기 드릴(Stryker Instruments, Kalamazoo MI)로 피질 골을 제거한다. 이후 4백만 buffy coat cell에 4.0 MOI로 Ad5-LMP-1을 주입하여 2.0 ml을 만든다. 이렇게 만든 재조합 유전자를 형질 도입(transfection) 시킨 2 ml의 buffy coat를 면역 후 4주군에서는 우측은 15:85 hydroxyapatite and tricalcium phosphate(Integra Lifescience, Plainsboro, NJ) 좌측은 콜라젠 스펀지(Integra Lifescience, Plainsboro, NJ)에 적시여 양측의 횡 돌기 사이에 놓는다. 면역후 16주에 수술한 군에서는 하이드록시 아파타이트가 방사선 검사에서 골형성 여부 판별이 어려워서 양측 모두 콜라젠 스펀지를 이용하였으며, 가토는 술 후 4주에 희생시켜 촉진, 방사선, 조직학적으로 판정하였다.

4. 아데노 바이러스 총 항체 측정

가토 이(耳) 동맥에서 바이러스 주입전, 4주, 8주, 16주, 20주에 약 3 ml의 혈액을 1500 rpm으로 10분간 원심 분리를 시키어서 혈장을 얻어 −70℃에 보관한다. 이 혈장을 1:200으로 희석하여 아데노 바이러스에 대한 총 항체 측정을 위해 ELISA(enzyme linked serum immunoassay)을 이용하였다. ELISA는 96 well Maxisoap(Nunc, Rochester, NY)에 2×10^{8} p.f.u.의 제 5형 아데노 바이러스를 PBS 이용 100 ul로 만들어 각각의 well에 4℃로 8시간에 걸쳐 부착시킨다. 각각의 평판을 PBS-0.05% Tween 20(Sigma, Saint Louis, MO)으로 4차례 씻고, PBS-1% 우 혈장 알부민(bovine serum albumin; Sigma, Saint Louis, MO)로 1시간 동안 처리한다. 1:200 희석의 혈장을 각각 정(well)에 첨가 후 2시간을 배양하고, 상기의 방법으로 각각 4 차례 세척한다. 알카라인 포스파타제가 부착된 가토에 대한 단일 항체(momoclononal anti-rabbit; Sigma, Saint Louis, MO)를 PBS-0.5% 우 혈장 알부민을 1:2,000으로 희석 후 첨가하여 상온에서 2시간 동안 배양한다. 각각 정을 상기한 바와 같이 6차례 세척 후 50 ul 1% 포스파타제 반응액을 상온에서 20~30분 배양하였다. 이후 405 nm에서 MRX Dynatech Microplate reader(Dynatech, Chantilly, VA)를 이용하여 광학 밀도(optical density)를 측정하였다.

5. 아데노 바이러스 중화 항체 측정

혈장에 존재하는 아데노 바이러스 중화 항체 측정을 위해 형광 물질을 발현하는 유전자를 형질도입 시킨 사이토 메갈로 바이러스로 유도된 형광 발현 제 5형 아데노 바이러스 운반체(Ad5-CMV-GFP$_{\triangle E1}$)을 만들었다. 60 mm의 조직 배양 평판(Nunc, Rochester, NY)에 5×10^{5} A293 세포를 24시간 배양하였다. 배양액을 제거 후 2% FCS+2 mM 글로타민이 첨가된 400 ul 페놀 없는 DMEM(Sigma)액을 첨가하였다. 여기에 5 MOI의 농도로 Ad5-CMV-GFP$_{\triangle E1}$로 세포를 감염시키었다. 여기에 제 5형 아데노 바이러스로 면역력을 만든 가토의 혈장을 56℃로 30분간 처리후 10^{-1}, 10^{-2}, 2×10^{-2}, 4×10^{-2}의 농도로 조직 배양 평판에 추가하였다. 이후 이 평판을 37℃, 5% CO_2에서 24 시간 배양 후 감염된 세포에서 형광 물질

(green fluorescent) 발광을 형광 물질 판독기(fluorescent plate reader;Fluoroskan, Cambridge, UK)를 이용 485 nm의 파장에서 판독하였다. 이렇게 하여 표준 곡선을 정한 후 1:200의 희석 혈장에서 시간별 항체의 량을 측정하였다.

6. 방사선 검사

가토의 요추부를 일부 근육과 같이 채취하여 방사선 조사기와 필름의 거리를 90 cm로 하여 촬영하였다. 요추 유합 여부 판정은 본 연구에 직접 참가하지 않은 2인이 유합부 인접 횡 돌기와 골 연결 상태로 판정하였다.

7. 조직학적 검사

각 군의 동물을 희생시키서 얻은 요추를 10% 중화된 버퍼 포르말린에 24 시간 처리 후 70% 알코올에 보관하였다. 이후에 단계적으로 95% 와 100% 알코올으로 수분을 제거 후 실렌으로 청결하게 하였다. 이 조직에는 수술시 착용한 콜라젠과 새로이 형성된 골이 포함되어 있다. 이 조직을 polymethylmethacylate로 함몰(embedded) 시키고 박절기(microtome, Jung Polycut E, Leica, Defield, IL) 이용하여 5 um의 두께로 잘랐다. 이 조직을 1% 메틸렌 블루 와 0.3% 기초 푸신으로 염색하였다. 조직은 남아 있는 콜라젠과 새로 형성된 골 지주를 기준으로 판단하였다. 골 지주가 인접해 있는 두 횡 돌기와 연결되어 있는 경우 유합 된 것으로 판단하였다.

결 과

1. 바이러스 면역 용량 및 시간 경과에 따른 총 항체량

아데노 바이러스에 대한 NZW 가토의 면역 반응을 상기한 ELISA 방법을 이용하여 측정했다. 수술전과 4주, 8주, 16주, 20주 사이에 혈장을 채취하여 면역 글로불린의 량을 측정하였다. 항체의 총량 측정을 위해 1:10, 1:100, 1:200, 1:400 희석 혈장에서 같은 방법을 사용하여 1:200에서 가장 정비례 곡선을 얻었다. 1:200 희석한 혈장의 항체 측정에서 면역 반응 유발을 위해 많은 바이러스를 정맥 주사 할수록 많은 항체가 발견되었고, 1×10^{8} v.p. 면역 시 가장 작은 량의 항체, 1×10^{11}v.p. 면역 시 가장 많은 항체가 검출되었다. 주입한 바이러스 량에 관계없이 정맥 주입후 4주에 가장 강한 면역학적 반응을 보였고, 16주 이후 의미 있게 총 항체량이 줄었다(Fig. 1). 이때 측정한 항체량은 광학 밀도로 하였으므로 절대적인 총량은 아니고 비례적 항체의 증가를 의미한다.

2. 바이러스 면역 용량 및 시간 경과에 따른 혈장 및 buffy coat 중화 항체량

실제 in vivo에서 면역학적으로 영향을 미치는 것으로 추측되는 혈장 및 buffy coat의 작용하는 항체를 아데노 바이러스의 감염력 감소를 기준으로 측정하였다. 일반 세포에 감염시 형광 물질을 발현하는 유전자를 형질도입 시킨 Ad5-CMV-GFP$_{\triangle E1}$을 아데노 바이러스에 가장 잘 감염되는 293 세포를 감염시키고 그의 발현 방해 정도를 측정하였다. 대조군으로 Ad5-CMV-GFP$_{\triangle E1}$을 감염시키지 않은 293 세포에서는 형질 도입 유전자에 의한 형광 물질의 발현이 거의 없었다. 이에 비해 바이러스로 면역시키지 않은 혈장에서는 약 30~40%의 세포에서 형광 물질을 검출할 수 있었다. 그러나 이러한 표시 유전자(marker gene, GFP$_{\triangle E1}$)의 발현은 1×10^{8} v.p. 과 1×10^{9} v.p. 군 모두에서 1:2,000 희석 혈장에서 까지 50% 이하이었다. 1:20,000 희석 혈장에서는 양군 모두에서 의미 있는 차이는 없었다(Fig. 2). Ad5-LMP-1 cDNA을 이용하여 골형성 시도는 ex vivo이므로 이때 받는 실제 면역학적 영향을 알아보기 위하여 buffy coat 에서도 같은 실험을 하였다. 1×10^{8}v.p., 1×10^{9}v.p. 양군에서는 1:50 희석 군에서는 중화 항체의 영향을 받아 표시 유전자의 발현이 50% 이하이었고, 이에 비해 1:500 희석 buffy coat에서도 표시 유전자의 발현이 줄었으나, 50% 이상이었다(Fig. 3).

3. 아데노 바이러스 정맥 주입이 NZW 가토의 척추 유합에 미치는 영향

한 마리 토끼가 마취 후유증으로 수술 후 2일에 죽었고, 나머지 29마리는 희생시킬 때까지 생존하였다. 아데노 바이러스를 주입한 토끼 24마리 전부에서 바이러스량에 일치하는 항체 및 중화 항체가 검출되었다.

바이러스 주입 후 4주에 시행한 요추 유합술 시행한 전례에서 바이러스 량에 관계없이 요추 유합을 얻을 수 없었고, 가장 적은 바이러스(1×10^{8}v.p.) 주입한 2군에서만 소량의 골형성을 관찰 할 수 있었다. 이때 유합 여부의 판정은 실험자가 가토의 요추를 적출후 손으로 움직이어서 양측 횡 돌기 사이의 움직임을 관찰할 수 없고, 방사선 검사와 조직학적 검사에서 근위부와 원위부 횡 돌기까지 형성된 골이 연결되어 있는 것이 같이 관찰 될 때 유합으로 판정하였다. 바이러스 주입 후 급성 면역 반응이 감소한 면역 16주 후에 수술을 시행한 군중 가장 적은 바이러스 주입군인 2군(1×10^{8}v.p.)에서는 요추 유합을 얻을 수 있었다. 그 외에도 바이러스 주입이 적은 3군(1×10^{9}v.p.) 및 4군(1×10^{10}v.p.)에서는 골형성의 흔적을 찾을 수 있었

으나, 가장 많은 바이러스로 면역 반응을 유발시킨 5군(1×10^{11}v.p.)에서는 면역 16주에도 골형성이 전혀 관찰 할 수 없었다. 이는 아데노 바이러스 총 항체와 중화 항체의 량과 일치하는 결과이었다(Table 1, Fig. 4~6).

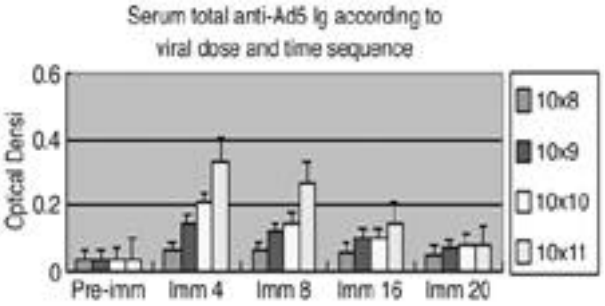

Fig. 1. Kinetics of adenovirus specific antibody response according to viral dose and time sequence. NZW rabbit were immunized with i.v. injections of non-virus, 1×10^{8}, 1×10^{9}, 1×10^{10}, 1×10^{11}v.p. of Ad5-ßGal(CMV promotor). At the indicated times after administration, serum anti-adenovirus immune globulin were measured. Era bars indicated the standard deviation of the mean(n=5).

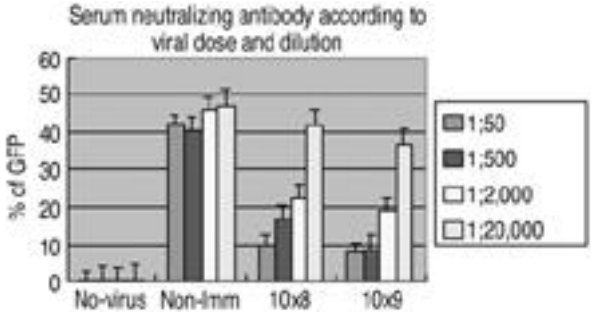

Fig. 2. Inhibitory effects of immune-rabbit sera on adenovirus mediated in vitro infectivity. A293 cell were infected with Ad5-CMV-GFP$_{\triangle E1}$ at an 10 particle per unit(p.f.u.) per cell(10 M.O.I.), in the presence of serial dilution of serum, and the fluorescence emission at 538 nm recorded after infection. Titers are compared to the GFP fluorescence relative to the total recorded in absence of serum. The number of % GFP fluorescence infected with adenovirus with immunized sera was significantly smaller than that infected with adenovirus with non-immunized sera in 1:50, 500, 2,000 dilution.

고 찰

이 연구의 기본적인 가설은 모든 지금까지 유전자 치료에 사용되는 아데노 바이러스 운반체는 면역학적 영향을 많이 받으나, Ad5-LMP-1 cDNA을 이용한 요추 유합의 유전자 치료는 ex vivo 유전자 치료이므로, 기존의 유전자 치료보다 면역학적 반응에 의한 방해를 적게 받을 것이라는 가정이다. 이러한 가정을 하게된 또 하나의 이유는 척추 후외방은 대부분 근육으로 둘려 싸여 있으므로, 항체와 임파구 등이 타 기관에 비해, 예를 들어 폐, 간장 등, 농도가 낮을 것이라는 것이다[3].

인간은 실험실에서 흔히 사용하는 동물인 백서보다 골 재생 능력이 매우 떨어지므로, 백서에서 얻은 유전자

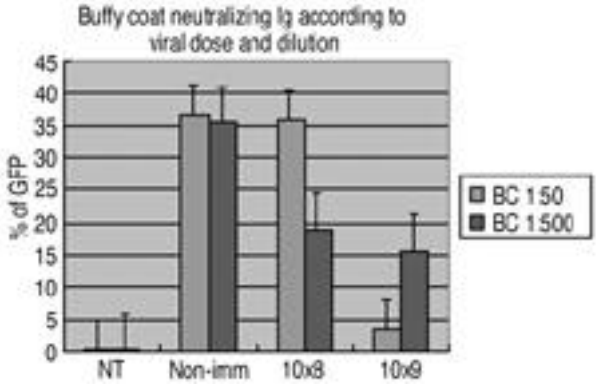

Fig. 3. Inhibitory effects of immune-rabbit buffy coat on an adenovirus mediated in vitro infectivity using same method of figure 2. The number of % GFP fluorescence infected with adenovirus with immunized buffy coat was significantly smaller than infected with adenovirus with non-immunized buffy coat in 1:50 dilution in 1×10^{8} Ad5-ßGal and 1×10^{9} A-5ßGal. However, there was no significant difference between 1:500 dilution in 1×10^{8} Ad5-ßGal and 1×10^{9} ßGal immunized buffy coat.

Table 1. In vivo spine fusion rate in the NZW rabbit according to viral doses and time sequence.

	Immune	Immune 4 weeks	Immune 16 weeks
Group I (n=6)	Non	3/3 fused (+++)	2/2 fused (+++)
Group II (n=6)	1×10^{8}v.p	0/3 fused (+?)	3/3 fused (++)
Group III (n=6)	1×10^{9}v.p	0/3 fused (–)	0/3 fused (+)
Group IV (n=6)	1×10^{10}v.p.	0/3 fused (–)	0/3 fused (+?)
Group V (n=6)	1×10^{11}v.p.	0/3 fused (–)	0/3 fused (–)

+++: Good bone growth, ++: moderate bone growth, +: Some bone growth, –: Absolutely no bone.

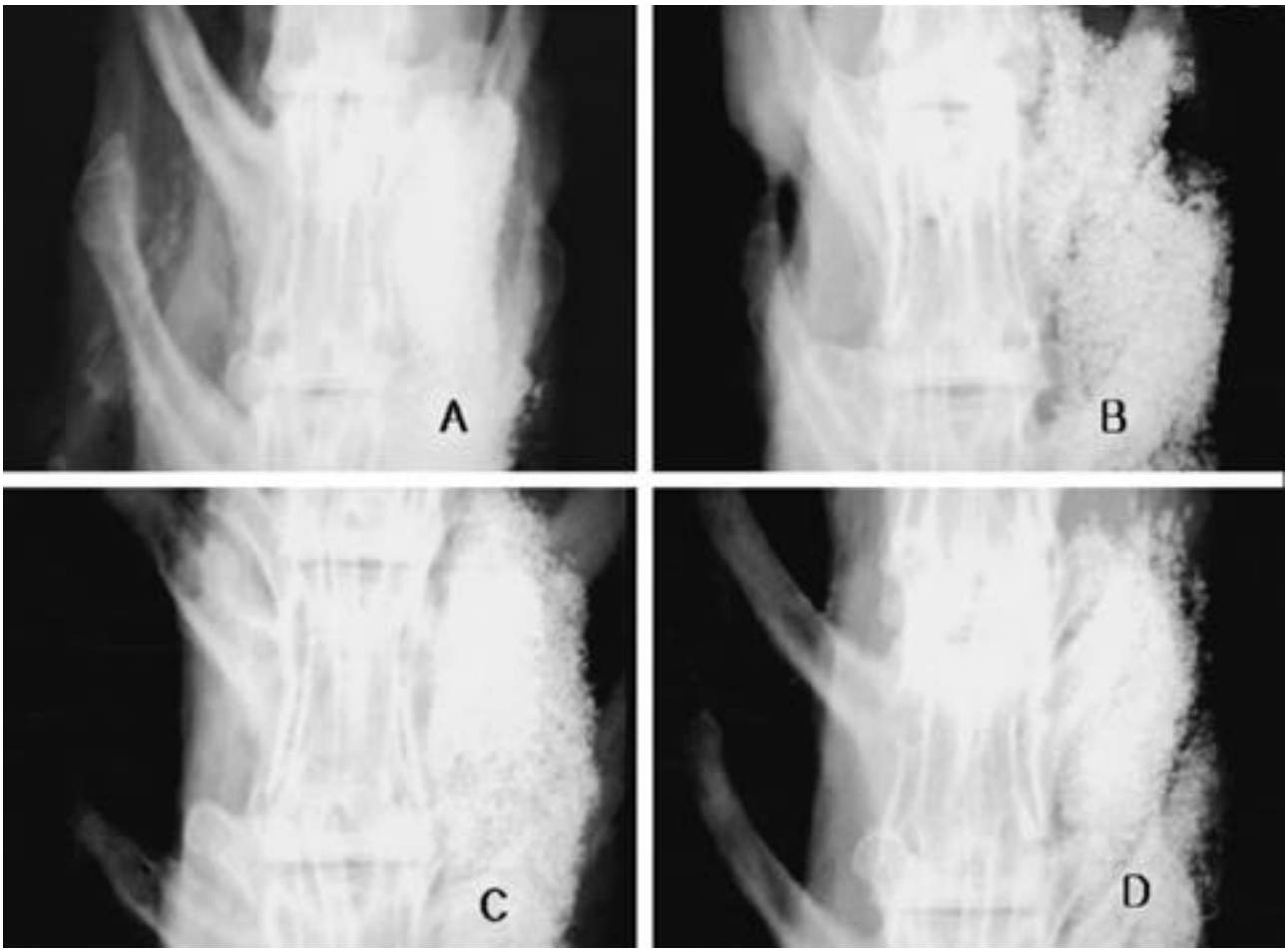

Fig. 4. Comparison of plain radiography 4 weeks after immunization according to immunized viral doses. A is the 1×10^{8}v.p. immunized rabbit, B 1×10^{9}v.p., C 1×10^{10}v.p., D 1×10^{11}v.p. Generally, the bone formation were not observed and small bone formation could be observed at the 1×10^{8}v.p. immunized rabbit. It represents that recent any viral doses effect strong inhibition in bone formation.

치료의 결과를 바로 인간에게 적용하기는 어려우므로 저자 등은 실험 동물로 성공률이 인간과 비슷한 가토를 사용했다. 또한, 저자들은 이미 가토를 이용하여 요추 유합 모델 및 유합률, 유합 시 유전자 발현에 대하여 연구 보고한 바가 있다[12]. 또한 저자들은 같은 모델을 이용하여 Ad5-LMP-1 cDNA을 이용한 유전자 치료로 가토에서 100%의 척추 유합을 보고한바 있다[15]. 그러나, 80% 이상의 사람은 제 2, 5형의 아데노 바이러스에 이미 면역력을 가지고 있으므로, 사람에게 아데노 바이러스 운반체를 이용한 처음 유전자 치료 시도는, 동물에서는 같은 종류 아데노 바이러스로 면역력은 만든 동물에게 시도하는 것과 같다[10]. 저자들이 시행한 ex vivo 형태의 유전자 치료는 in vivo 보다 면역학적 영향을 적게 만을 것으로 추측되나[16], 실제 영향을 직접 평가하는 것이 꼭 필요할 것으로 추측된다.

실제 바이러스가 생체 내에 들어 갈 때 크게 체액 면역, 세포 면역 와 비 특이성 면역이 작용한다. 이때 세포성 면역은 바이러스 항원에 감작된 임파구가, 비 특이성 면역 반응은 간장의 쿠퍼 세포나 killer 세포 등이 관계하나 후자의 2 가지 면역 반응은 바이러스에 이미 감염된 세포에 작용하려면 최소 수일 내지 수주가 소요된다[5,16,17]. 저자들의 발표하지 않은 연구 자료에 의하면 LMP-1의 발현은 2~3일만 지속하면 골형성과 골 유합을 이룰 수 있으므로, 본 저자들의 유전자 치료에서 문제가 되는 것은 체액 면역 반응이다. 바이러스를 중화시키는 중화 항체가 혈장, 특히 buffy coat 내에 존재하는 경우가 가장 큰 영향을 미칠 것을 추측 할 수 있다. 따라서 저자들의 면역학 반응의 분석은 아데노 바이러스 항체 특히, buffy coat 안의 중화 항체에 집중하고 이의 량과 골형성의 량과의 관계를 분석하였다.

학자들이 실험 동물로 가장 많이 사용하는 백서(C57BL/6)는 아데노 바이러스에 대한 면역학적 반응은

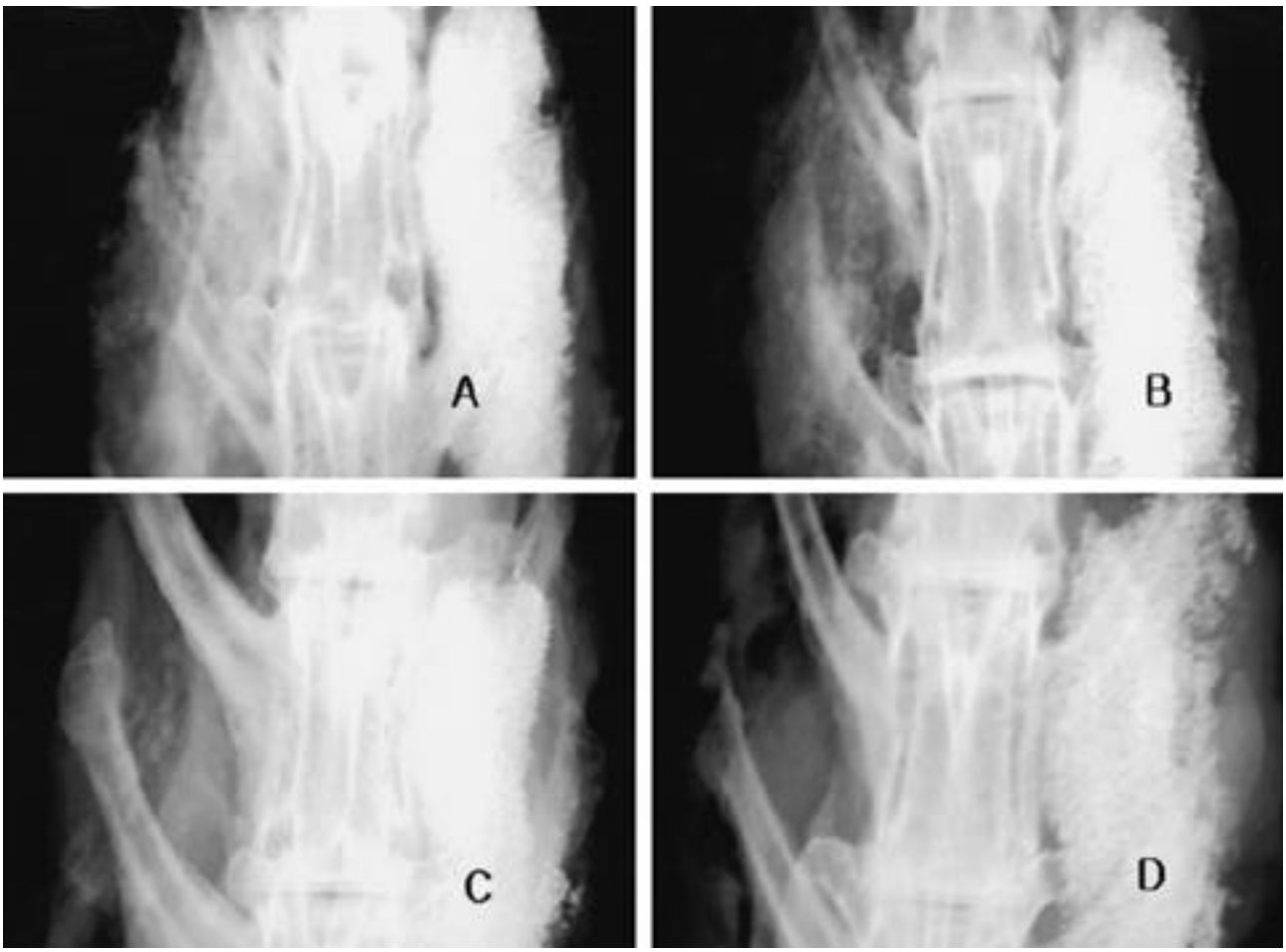

Fig. 5. Comparison of plain radiography 16 weeks after immunization according to immunized viral doses. A is the 1×10^{8}v.p. immunized rabbit, B 1×10^{9}v.p., C 1×10^{10}v.p., D 1×10^{11}v.p. Generally, the more bone formation were observed in small viral doses(**A, B**) It represents that large viral doses effect more strong inhibition in bone formation.

유발 2주 후에 최고이고, 이후 감소한다[3]. 원숭이는 유발 후 5~20주 사이가 최고[4], 사람은 30일~1년 사이가 가장 높은 항체를 보유한다[7]. Turner 등[14]은 NZW 가토의 면역학적 현상을 연구한바 가토의 면역학적 반응은 유발 후 7-28일 사이가 최고조에 달했다가 점차 떨어진다 보고하였다. 백서에서 1×10^{8}v.p.이 충분한 면역 반응을 야기함이 보고되었고, 사람에서는 1×10^{9}p.f.u(종류에 따라 $1\times10^{10}-1\times10^{11}$v.p.)의 바이러스 용량이 충분히 많은 면역반응을 일으킴을 고려시 가토에서 1×10^{9}v.p.이 실제 인간이 감기 걸린 경우와 비슷한 정도의 면역 반응을 일으킴을 추측할 수 있다[7,8]. 따라서 각 동물간의 차이를 고려시 사람에게 adenovirus의 면역 반응이 최고인 때는 가토에서 주입후 약 4주이고, 사람의 감기와 비슷한 정도의 바이러스 주입 량은 1×10^{9}v.p. 임을 알 수 있다. 본 연구에서 아데노 바이러스에 대항 총 면역 글로불린의 량은 주입 후 4주에 최고조에 달했다가 16주 이후부터 급격히 감소하는 것을 보여 추측한 대로이었다. 또한 혈장 내 중화 항체량도 총 아데노 바이러스 면역 글로불린 량과 일치하였다. 저자들의 방법으로 buffy coat을 만드는 경우, 산술적으로 혈장의 약 50배 희석이나, 중간에 원심 분리시키므로 항체의 침착을 감안하면 50~500배 희석으로 추측할 수 있다. 놀랍게도 2군, 3군에서 모두 1:50 희석 buffy coat 안에서 아데노 바이러스 운반체는 50% 이상의 감염력을 소실하였다. 이는 본 유전자 치료가 ex vivo 임에도 불구하고 혈장 중의 극소수 중화 항체가 아데노 바이러스의 감염력에 매우 큰 영향을 미침을 시사한다.

수술 후 마취의 합병증으로 죽은 1 마리를 제외한 대조군 5마리 전부에서 요추유합을 얻을 수 있었음은 Ad5-LMP-1 cDNA가 우리가 사용한 방법으로 요추 유합을 시킴을 증명한다. 하나, 면역 반응이 최고조인 4주 후에 수술한 전군에서, 가장 소량의 바이러스(1×10^{8}v.p.) 주입한 2군 포함한 면역시킨 전(全)군에서 요추 유합을 얻을 수 없었다. 이는 적은 량의 바이러스도 유전자 치료를 방해 할 만큼의 충분한 면역력을 야기 시킴을 증명한다. 또한 면역

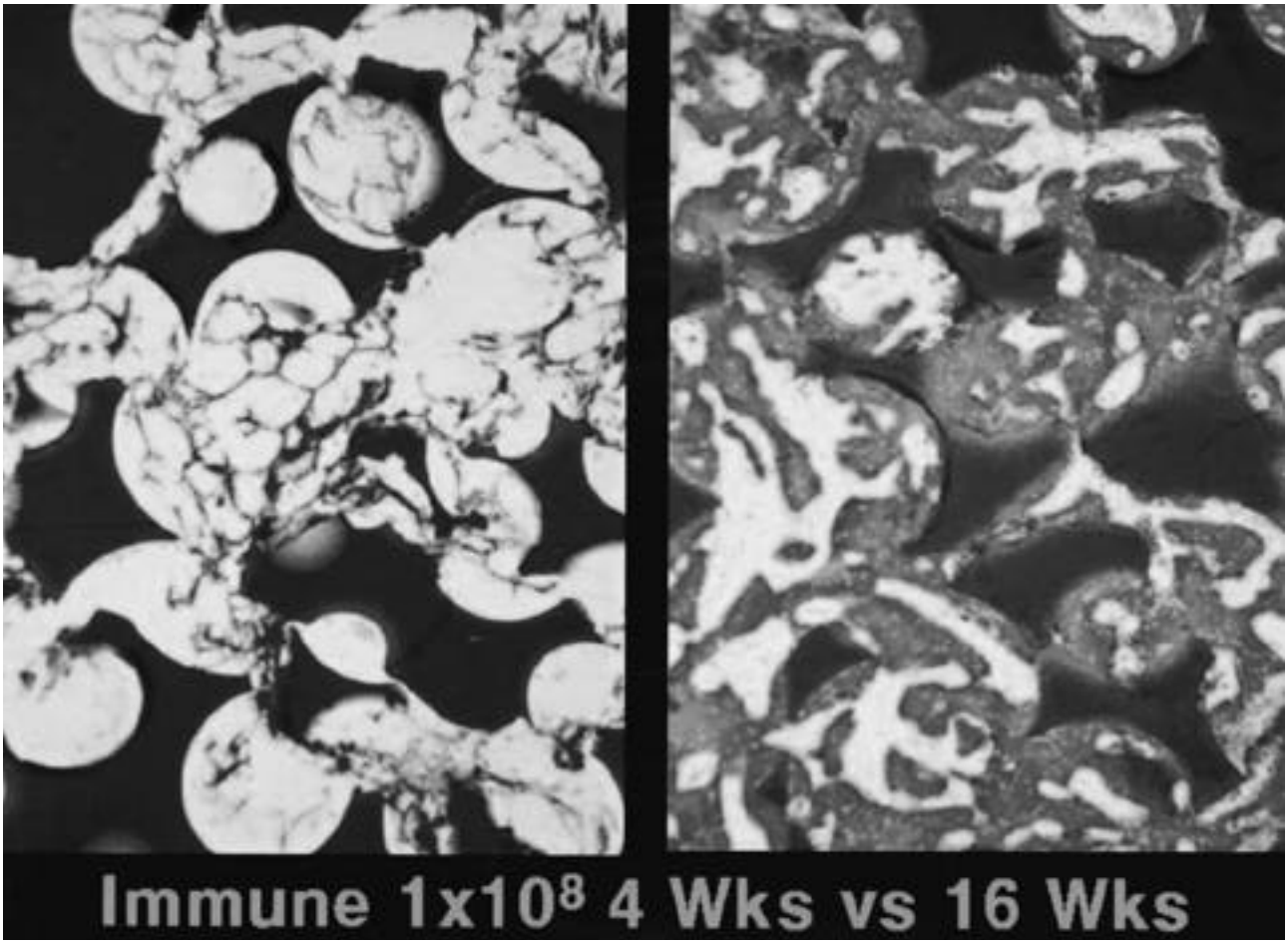

Fig. 6. Comparison of histology at 4 weeks and 16 weeks after immunization in 1×10^{8} Ad5-ßGal immunized group II. Left figure is the histology of 4 weeks after immunization. Right figure is the histology of 16 weeks after immunization. The lots of bone formation were observed in left, but right. It represents that time sequence blunted the impact of immune reaction.

반응이 감소된 16주 후(인간으로 추론하면 1년 후), 에도 가장 소량의 바이러스 주입군인 2군을 제외하고는 요추 유합을 얻을 수 없었다. 다만, 주입한 바이러스 량이 비교적 적은 3군과 4군에서는 소량의 골형성을 관찰할수 있었다. 이러한 골형성 결과는 총 아데노바이러스 면역 글로불린의 량과 일치하는 것이어서 본 유전자 치료에 면역학적 영향을 미치는 면역학적 이유가 체액성 면역 반응이고 그 중 특히 buffy coat 안의 중화항체임을 알수있었다.

결 론

토끼(NZW)에서 1×10^{8}v.p. 이상의 아데노 바이러스 주입은 심한 면역학적 반응을 일으키었으며, 이는 골형성 유전자 치료를 방해하기에 충분하였다. 인간에게서 아데노 바이러스 전달체를 이용하여 뼈를 만드는 유전자 치료가 성공하려면, 80% 이상의 인간이 가지고 있는 아데노 바이러스의 면역 반응을 극복 할 수 있는 방법을 찾아야 하며, 면역 반응은 항체의 량(중화 항체의 량)과 일치하므로, 중화 항체의 극복이 Ex vivo 유전자 치료의 핵심이 될 것으로 시사된다.

REFERENCES

1) **Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC** : *An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model: Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics. Spine 20:412-420, 1995.*
2) **Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC** : *1995 Volvo Award in Basic Sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. Spine. 20:2633-2644, 1995.*
3) **Chen P, Kovesdi I, Bruder JT** : *Effective repeat adminis-*

tration with adenovirus vectors to the muscle. Gene Therapy 7:587-595, 2000.

4) **Chirmule N, Raper SE, Burkly L, Thomas D, Tazelaar J, Hughes JV, Wilson JM** : *Readministration of adenovirus vector in nonhuman primate lungs by blockade of CD40-CD40 ligand interactions. J Virol. 74:3345-3352, 2000.*
5) **Christ M, Lusky M, Stoeckel F, Dreyer D, Dieterle A, Michou AI, Pavirani A, Mehtali M** : *Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. Immunology Letters 57:19-25, 1997.*
6) **Crystal R** : *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. Science 270:404-410, 1995.*
7) **Gahery-Segard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Tursz T, Boulanger P, Guillet JG** : *Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. J Virol. 72:2388-2397, 1998.*
8) **Gahery-Segard H, Juillard V, Gaston J, Lengagne R, Pavirani A, Boulanger P, Guillet JG** : *Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. Eur J Immunol. 27:653-659, 1997.*
9) **Kagami H, Atkinson JC, Michalek SM, Handelman B, Yu S, Baum BJ, O'Connell B** : *Repetitive adenovirus administration to the parotid gland: role of immunological barriers and induction of oral tolerance. Hum Gene Ther. 10:305-313, 1998.*
10) **Kuriyama S, Tominaga K, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yamazaki M, Nagao S, Toyokawa Y, Okamoto S, Fukui H** : *Immunomodulation with FK506 around the time of intravenous re-administration of an adenoviral vector facilities gene transfer into rat liver. Int J Cancer 85:839-844, 2000.*
11) **Mittereder N, March KL, and Trapnell BC** : *Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol 70:7498-7509, 1996.*
12) **Moffatt S, Hays J, HogenEsch H, Mittal SK** : *Circumvention of vector specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: Implications in gene therapy. Virology 272:159-167, 2000.*
13) **Molinier-Frenkel V, Gahery-Segard H, Mehtali M, Le Boulaire C, Ribault S, Boulanger P, Tursz T, Guillet JG, Farace F** : *Immune response to recombinant adenovirus in humans: Capsid components from viral input are targets for vector specific cytotoxic T lymphocyte. J Virol 74:7678-7682, 2000.*
14) **Turner RJ, Held SDE, Hirst JE, Billinghurst G, Wootton RJ** : *An immunological assessment of group housed rabbits. Laboratory Animals 31:362-372, 1997.*
15) **Viggeswarapu M, Boden SD, Liu Y, Hair GA, Ugbo JL, Murakami H, Kim HS, Mayer MT, Hutton WC, Titus L** : *Adenoviral delivery of LIM mineralization protrin-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo. J Bone Joint Surg Am 83:364-376, 2001.*
16) **Waldsworth SC, Zhou H, Smith AE, Kaplan JM** : *Adenovirus vector-infected cells can escape adenovirus antigen specific T-lymphocyte killing in vivo. J Virol 71:5189-5196, 1997.*
17) **Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM** : *Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 91:4407-4411, 1994.*
18) **Ye X, Roinson MB, Pabin C, Batshaw ML, Wilson JM** : *Transient depletion of CD4 lymphocyte improves efficacy of repeated administration of recombinant adenovirus in the ornithine transcarbamylase deficient sparse fur mouse. Gene Therapy 7:1761-1767, 2000.*

국 문 초 록

연구계획 : 아데노 바이러스 벡타는 포유류의 세포에 외부 유전자 발현을 시킬 수 있는 우수한 수단이다. 이러한 아데노 바이러스 운반체는 많은 장점이 있으나, 유전자 치료의 이용시 면역학전 반응 때문에 형질 유전자의 발현 유지 시간이 짧고, 재투입 시에 매우 낮은 transduction 효율을 보인다. 면역학적 연구를 위해 가토를 이용한 면역학적 모델을 만들고자 한다.

연구목표 : 가토에 아데노 바이러스를 정맥 주사하여 면역력을 유발시키고, 이의 면역학적 영향과 요추 유합에 미치는 역할을 알아보고 그의 동물 모델을 만들어 추후 아데노 바이러스 운반체의 면역학적 문제를 극복하는데 도움이 되고자 한다.

재료 및 방법 : 면역학적으로 이상이 없는 30마리의 생후 1년 몸무게 4.0~4.5 kg NZW을 이용한다. 가토를 각각 케이지(cage)에 1 마리씩 넣고 음식물과 물을 공급한다. 이중 6마리는 대조군으로 격리 수용하였다. 나머지 24마리 중 제 2군 6마리는 1×10^{8}의 베타 갈락토스 유전자를 가진 아데노 바이러스(Ad5-βGal)를 정맥 주사하고, 제 3군 6마리는 1×10^{9} Ad5-βGal, 제 4군 6마리는 1×10^{10} Ad5-βGal, 제 5군 6마리는 1×10^{11} Ad5-βGal을 1 ml PBS에 희석하여 정맥 주사하여 제 5형 아데노 바이러스에 면역학적 반응을 야기 시킨다. 바이러스 주입 4주와 16주에 제 5-6요추 후외방 유합술을 실시한다. 바이러스의 총 항체, 중화 항체 및 척추 유합 여부를 평가한다.

결과 : 면역 반응 유발을 위해 많은 바이러스를 정맥 주사 할수록 많은 항체가 발견되었고, 1×10^{8}v.p. 면역 시 가장 작은 량의 항체, 1×10^{11}v.p. 면역 시 가장 많은 항체가 검출되었다. 주입한 바이러스 량에 관계없이 정맥 주입후 4주에 가장 강한 면역학적 반응을 보였고, 16주 이후 의미 있게 총 항체량이 줄었다. 1×10^{8}v.p., 1×10^{9}v.p. 양군에서는 1:50 희석 군에서는 중화 항체의 영향을 받아 표식 유전자 발현이 50% 이하이었다. 이에 비해 1:500 희석 buffy coat에서도 표식 유전자 발현이 줄었으나, 50% 이상이었다. 바이러스 주입 후 4주에 시행한 요추 유합술에서 바이러스 량에 관계없이 전군에서 요추 유합을 얻을 수 없었고, 가장 적은 바이러스(1×10^{8}v.p.) 주입한 2군에서는 소량의 골형성을 관찰 할 수 있었다. 면역 16주 후에 수술을 시행한 군중 가장 적은 바이러스 주입군인 2 군에서는 요추 유합을 얻을 수 있었다. 그 외에도 바이러스 주입이 적은 3군 및 4군에서는 골형성의 흔적을 찾을 수 있었으나, 가장 많은 바이러스로 면역 반응을 유발시킨 5군에서는 면역 16주에도 골형성이 전혀 관찰 할 수 없었다.

결론 : 토끼(NZW)에서 1×10^{8}v.p. 이상의 아데노 바이러스 주입은 심한 면역학적 반응을 일으키었으며, 이는 골형성 유전자 치료를 방해하기에 충분하였다.

색인단어 : 척추 유합, 원형성 단백질, 유전자 치료

※ 통신저자 : 김 학 선
서울특별시 강남구 도곡1동 146-92
연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 정형외과학교실
Tel : 82-2-3497-3411, Fax : 82-2-573-5393, E-mail : haksunkim@yumc.yonsei.ac.kr