

당뇨병성 족부궤양 유전자 치료를 위한 새로운 Epidermal Growth Factor (EGF) 플라스미드 클로닝

백인제 임상의학연구소 분자치료 실험실¹, 인제대학교 의과대학 내분비대사내과², 메리놀병원 내분비대사내과³

정혜숙¹ · 윤창신¹ · 권민정^{1,2} · 김미경^{1,3} · 이순희^{1,2} · 고경수² · 이병두² · 박정현^{1,2}

Cloning of Novel Epidermal Growth Factor (EGF) Plasmid for Gene Therapy on Diabetic Foot Ulcer

Hye Sook Chung¹, Chang Shin Yoon¹, Min Jeong Kwon^{1,2}, Mi Kyung Kim^{1,3}, Soon Hee Lee^{1,2}, Kyung Soo Ko², Byung Doo Rhee², Jeong Hyun Park^{1,2}

Molecular Therapy Lab, Paik Memorial Institute for Clinical Research;

Department of Internal Medicine, Inje College of Medicine¹; and

Department of Internal Medicine, Maryknoll General Hospital²

Abstract

Background: Epidermal Growth Factor (EGF) is one of the important growth factors involved in the epithelialization during cutaneous wound healing. Peptide EGF has been used for the treatment of diabetic foot ulcer. But the inferiority of cost-effectiveness and the inconvenience of daily application might have restricted its wide clinical usage. EGF gene therapy could dramatically improve the efficacy and inconvenience through long-term expression and bypassing the EGF degradation by hostile non-specific proteinases expressed in the wound bed.

Methods: EGF DNAs were amplified via PCR. For the more effective secretion from the transfected cell, we inserted furin cleavage site into EGF plasmids. The efficacy of novel plasmid p β -EGF was verified by transfection into the various animal cell lines, and the biologic potency of expressed EGF was confirmed via phosphorylation of PI3K and GSK3 β by Western blotting.

Results: We tested various kinds of human EGFs. One of the human EGF isoforms, EGF⁸²⁸ including a membrane-anchoring domain was successfully released as the mature EGF protein in the cell culture media. Also EGF plasmid including furin cleavage site showed more than 2-fold increased EGF expression compared with the sequence without furin cleavage site.

Conclusion: In conclusion, these findings suggest that mature EGF could be released easily out of cells by modifying EGF DNA sequence. Our novel EGF plasmid DNA could markedly increase the efficiency of non-viral gene therapy for diabetic foot ulcer. (KOREAN DIABETES J 32:131~140, 2008)

Key Words: Diabetes mellitus, Epidermal growth factor, Gene therapy, Wound healing

서론

정상적인 상처회복과정은 염증 반응, 육아조직의 형성,

신생 상피세포와 신생혈관 형성 등 3가지 단계로 이 기전들이 적절히 이루어졌을 때 완전 치유가 가능하지만 당뇨병성 족부궤양 환자들의 경우 이들 모든 기전에 장애가 있어 정

상인들보다 혈관생성이나 육아조직의 형성이 매우 늦어짐으로써 2차 감염에 의해 최악의 경우 절단을 해야 하는 경우가 발생한다. 심각한 보건학적 및 경제적 문제를 야기할 수 있는 당뇨병성 족부궤양을 효과적으로 치료하기 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, 그 중에서 성장 인자를 이용한 치료법이 활발히 연구되어 지고 있다.

성장 인자(Growth factor)는 다양한 세포들의 활성을 유도함으로써 악성 또는 만성적 상처 치료에 있어 가능성을 열어 주었다. 성장 인자는 치료과정에서 세포의 분열과 이동, 신생혈관생성 등 세포활성에 필요한 많은 요소들을 조절한다. 이러한 과정에 관련된 성장 인자들로는 epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF)^{1,2)}, fibroblast growth factor (FGF)^{3,4)}, keratinocyte growth factor (KGF)⁵⁻⁸⁾, transforming growth factor- β (TGF- β)^{2,4,9)}, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)^{10,11)}, vascular endothelial growth factor (VEGF)^{12,13)} 등이 있다.

EGF는 1962년 쥐의 침샘에서 가장 처음으로 발견되었으며 사람의 EGF (human EGF: hEGF)는 1975년에 분리되었다^{14,15)}. Mature EGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있으며 3개의 이황산 결합을 이루고 있다^{16,17)}. 상처가 치료되는 과정에서 EGF의 역할은 상피세포와 섬유아세포에 있는 EGF 수용체와 결합하여 혈소판, 대식세포, 단핵세포 등의 활성화에 관여하는데, 이로써 상피세포의 증식, 분화와 신생혈관 형성, 많은 세포주에서 DNA, RNA, protein 합성과 같은 다양한 생물학적 현상들을 일으켜 상처 회복 과정을 향상시킨다¹⁸⁻²⁰⁾. 다양한 이전의 결과들을 토대로 EGF가 피부 상처 치료에 큰 효과가 있음을 확인하였고²¹⁻²³⁾ DNA의 재조합 기술을 통하여 단백질을 합성하여 현재 임상에서 사용하고 있다²¹⁾. 하지만 재조합 EGF 단백질을 상처 부위에 도포하는 방법은 상처 내부로 침투되기 전에 상처 부위에 과도하게 발현되는 비특이적 matrix metalloproteinase들에 의해 대부분의 EGF 단백질들이 분해 되어 EGF 기능의 효율성이 떨어지고, 이를 극복하기 위해 보다 많은 양의 도포가 필요하다. 아울러 상처에서 장시간 생물학적 활성을 유지하기 위해 매일 상처 부위에 도포해야 하는 불편함을 감수해야 한다.

이를 보완할 수 있는 방법으로 최근 유전자 치료가 많은 각광을 받고 있다. 유전자 치료는 상처에 DNA를 직접 투여하여 상처부위의 세포들에서 장시간 안정적으로 필요한 단백질을 발현시켜 상처 치유효과를 효율적으로 증진시킬 수 있다. DNA를 세포 내로 전달하는 기술적 방법에 따라 유전

자 치료는 크게 바이러스 전달체(viral carrier)를 사용하는 방법과 비바이러스 전달체(non-viral carrier)를 사용하는 것으로 나눌 수 있다. 비바이러스 유전자 치료 방법은 바이러스 전달체 방식이 가진 생물학적인 위험과 부작용들을 최소화 할 수 있고, 대량생산 및 운송과 보관이 용이하다는 장점들이 있는 반면 유전자 전달 효율이 현저히 낮다는 단점이 있다. 비바이러스 유전자 치료 방법의 효율을 높이기 위해 많은 연구들이 이루어지고 있는데, 이들 중에서 비바이러스 유전자 치료 시 필수적으로 사용하게 되는 플라스미드 DNA의 구조를 개량함으로써 현저히 효율을 증대시킬 수도 있음이 알려져 있지만 기술적인 난점들 때문에 많은 연구들이 이루어지지 않고 있다.

1994년 Cytomegalovirus promoter와 human growth hormone (hGH) secretory signal peptide를 붙인 mature EGF sequence 플라스미드 DNA를 사용한 피부 상처 유전자 치료 연구가 보고되어 있었다²¹⁾. 저자들은 Cytomegalovirus (CMV) promoter 보다 보편적으로 효율이 더 높으면서 동물세포들에서 보다 광범위한 활성을 가진 chicken beta actin promoter를 사용하고 다양한 human EGF isoform들을 모두 확인하여 가장 효율적인 isoform을 선택하였으며, 재조합 단백질의 세포 내 ER trafficking을 극복하기 위해 furin cleavage site를 넣어 더 많은 단백질이 쉽게 분비될 수 있는 플라스미드를 새로이 제작하여 비바이러스 유전자 치료에서의 효과를 더욱 개선시키고자 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

Human Embryo Kidney (HEK) 293, NIH3T3, 그리고 A549 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Gibco, CA)에서, Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포는 F-12 Coon's modification 배지(Sigma, CA)에 배양하였다. 모든 세포주들은 37°C, 95% 공기와 5% CO₂ 상태에서 10% 우태아 혈청(Gibco, CA)에서 유지시켰다.

2. EGF 클로닝

Human EGF DNA는 홍콩대학교 Dr. Siu-Yuen Chan에게서 기증 받아 클로닝을 하였다. Human mature EGF 플라스미드를 이용하여 p β -EGF¹⁵⁹와 p β -Furin EGF¹⁵⁹를, Human Full length EGF를 이용하여 p β -EGF⁸²⁸과 p β -Furin EGF⁸²⁸를 클로닝하였다. Primer sequence는 Table 1에 정

Table 1. Primer sequences used for human EGF Cloning

	Primer (5' → 3')
Furin sequence	ATGCGGGGACGGCGG
Mature EGF-Forward	CCGAATTCATGCTCACTCTTATC
Mature EGF-Reverse	AAAAGCGGCCGCTCACTGCGTCTCCATTTG
EGF-Forward	AATAGTGACTCTGAATGTCCCCTG
EGF-Reverse	GCGCAGTTCACCACTTCAG

리하였다. PCR premix (Invitrogen, CA)를 사용하여 먼저 EGF¹⁵⁹는 95℃에서 10분간 변성을 시킨 후 94℃에서 30초 변성, 57℃에서 결합, 68℃에서 확장을 30사이클, 68℃에서 7분간 더 확장한 다음 PCR 생성물을 얻고, Furin EGF¹⁵⁹는 94℃에서 30초 변성, 40℃ 결합, 68℃ 확장 후 PCR 생성물을 얻었다. EGF⁸²⁸은 2개의 부분으로 나누어 얻었다. 1. signal peptide, 2. Mature EGF부분에 transmembrane domain과 cytoplasmic domain를 붙였다. 먼저 Full length EGF에서 signal peptide (56℃ 결합)와 transmembrane domain과 cytoplasmic domain (56℃ 결합)를 분리해내고 변성과 확장은 앞의 PCR 생성물을 만드는 조건과 동일하게 하였다. 이렇게 분리해 낸 PCR 생성물은 다시 mature EGF와 반응시켜 EGF⁸²⁸과 Furin-EGF⁸²⁸를 만들었다.

3. pβ-EGF 플라스미드를 이용한 대장균 DH5α의 형질 변환

각각 만들어진 생성물들과 pβ-vector를 EcoR I, Not I 제한 효소로 처리한 후 T4 DNA ligase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 4℃에서 16시간 동안 ligation을 하였다. Ligation된 플라스미드를 DH5α (Invitrogen, CA)에 transformation을 42℃에서 90초간 반응 시킨 후 1시간 37℃ 배양기에서 키웠다. 항생제가 포함된 고형배지에서 overnight 키운 후 mini-prep kit (Qiagen, CA)를 이용하여 플라스미드를 정제하고 플라스미드를 확인하기 위해 EcoR I, Not I (DCC-bionet, Gyeonggi-do, Korea)으로 자른 1% Agarose gel에서 전기영동 한 다음 SL-20 DNA Image Visualizer (Seoulin Scientific Co., Ltd.)를 이용하여 확인하였다.

4. In vitro Transfection

6-well plate를 사용하여 각각의 세포를 면적의 80%가 되도록 배양하여 24시간 후에 세포가 안정화 되면 transfection을 수행하였다. transfection을 하기 전에 serum이 없는 배지에 1시간 배양시켰다. Transfection reagent로 Branched-PEI (Sigma, MO)를 사용하였고 DNA 양은 10 ug, DNA/BPEI의 조건은 Nitrogen/Phosphate 비율을 5로

하였다. DNA/BPEI 복합체를 30분간 실온에서 반응 시킨 뒤 세포에 넣고 5시간 배양한 뒤에 10% 우태아 혈청이 포함된 배지로 바꾸어 주고 48시간 키운 뒤 배지는 e-튜브에 보관하고 세포는 PBS로 한번 씻어주고 mammalian tissue lysis/Extraction reagent (Sigma, MO)를 이용하여 단백질을 분리하였다.

5. EGF 단백질을 정량하기 위한 ELISA 실험

EGF 단백질의 양은 Quantikine human EGF ELISA kit (R&D, MN)를 사용하여 측정하였다. 샘플을 well당 200 uL를 가한 후 2시간 실온에서 반응 시킨 뒤 wash buffer로 3번 씻고 EGF conjugate 200 uL를 넣고 1시간 실온에서 반응 시킨다. 또 wash buffer로 3번 씻고 substrate solution 200 uL를 넣은 다음 색의 변화를 관찰한다. 30분 뒤 stop solution 50 uL를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 540 nm 파장에서 각각 보정하였다. 모든 실험은 Student t-test로 유의성을 평가하였다.

6. 발현된 EGF의 생물학적인 활성 측정

NIH3T3 세포를 사용하여 EGF 단백질을 세포 배양액 내로 발현시키고 발현된 EGF가 포함되어 있는 세포 배양액을 사람의 폐암세포이며 EGF 수용체가 많이 있는 A549 세포에 첨가하여 분자생물학적 변화를 Western blot으로 확인하였다. A549세포를 PBS로 한번 씻어주고 lysis buffer로 단백질을 분리해 4℃에서 12000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 분리해 내고 BCA kit로 단백질을 정량한 다음 Western blotting을 한다. 10% 또는 12% SDS page를 사용하였고 단백질 양은 한 well당 30 ug를 로딩하였다. PVDF membrane에 transfer를 한 다음 5% Skim milk/0.1% TTBS (Tris-base 2.42 g, NaCl 8 g, Tween 20 1 mL)로 blocking을 하고 1차 antibody, PI3K와 GSK3β (Cell Signaling, MA)를 4℃에서 overnight 반응시킨다. Rabbit 2차 antibody (Bio-Rad, CA)는 실온에서 1시간 반응시키고 AP-conjugated substrate kit (Bio-Rad, CA)를 이용하여 발색시킨다.

결 과

1. p β -EGF 유전자 클로닝

사람의 염색체 내에 있는 EGF 유전자는 N 말단부터 signal peptide, prepro-region, mature EGF, 그리고 transmembrane domain과 cytoplasmic domain (membrane-anchoring domain)으로 이루어져 있다(Fig. 1). 세포 내의 단백질 합성 과정에서 EGF 단백질은 827개의 아미노산으로 전환되어 세포 밖으로 분비되면서 단백질 가수분해 과정을 거쳐 53개의 아미노산만을 가지는 6 kDa 크기의 mature EGF 단백질이 만들어진다^{24,25}. 우리는 6 kDa의 mature EGF에 해당하는 mature EGF (159 bp)와 여기에 membrane-anchoring domain이 포함된 EGF (828 bp)를 만들어 두 플라스미드의 차이점을 보고자 하였다. 또 강력한 promoter의 사용시 흔히 나타나는 재조합 단백질의 ER에서의 막힘 현상을 극복하기 위해 furin cleavage site를 넣었다(Fig. 1B, 1D). Vector는 in vitro 및 in vivo에서 일정한 발현 정도를 보이는 chicken β -actin promoter가 포함된 p β -vector를 사용하였다. 우선 클로닝을 하기 위해 p β -vector의 multi-cloning site를 관찰하여 vector에는 존재하지만 EGF sequence에는 없는 EcoR I 과 Not I 제한효소를 처리한 후 p β -vector와 EGF 유전자를 ligation하여 플라스미드를 분리해 냈다. 완성된 플라스미드들은 EcoR I 과 Not I 제한효소로 확인하였다(Fig. 2).

2. EGF 단백질의 발현

클로닝된 EGF 플라스미드가 다양한 세포주에서 발현이 되는지 확인하기 위하여 HEK 293, CHO, NIH 3T3 세포주에 각각 transfection한 다음 배지와 세포를 용해시켜 얻은 단백질을 분리해 내어 Human EGF ELISA kit를 이용하여 EGF 발현을 확인하였다. 그 결과, EGF¹⁵⁹는 단백질이 세포 내에서만 존재하지만 반면 EGF⁸²⁸는 세포 내에서 만들어진 EGF가 세포 밖으로 배출됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 furin cleavage site가 포함된 EGF⁸²⁸의 경우 포함되지 않은 EGF⁸²⁸보다 더 많은 EGF 단백질을 발현시키는 것을 볼 수 있었다. 특히 HEK 293 세포주에서는 furin site의 존재 유무에 따라 발현율이 2배 정도의 차이를 보였다(Fig. 3A). 따라서 EGF는 EGF 유전자에 membrane-anchoring domain을 가지고 있어야만 세포 밖으로 단백질을 배출될 수 있으며 furin site는 세포에서의 발현을 더욱 높일 수 있음을 확인 할 수 있었다.

3. 과발현 시킨 EGF 단백질의 생물학적 기능

과발현 시켜 세포 밖으로 배출된 EGF 단백질이 내생의 EGF 단백질과 같은 생물학적 기능을 가지는 확인하기 위하여, EGF가 EGF 수용체와 만나 신호가 활성화될 때 인산화의 영향을 받는 하계 신호전달 물질인 PI3K와 GSK3 β 의 변화를 Western blotting으로 관찰하였다²⁶. A549 세포주는 Human Lung Carcinoma 세포주로 EGF 수용체가 과량으로 발현되어 있어 EGF 단백질의 기능을 알아보기에 가장

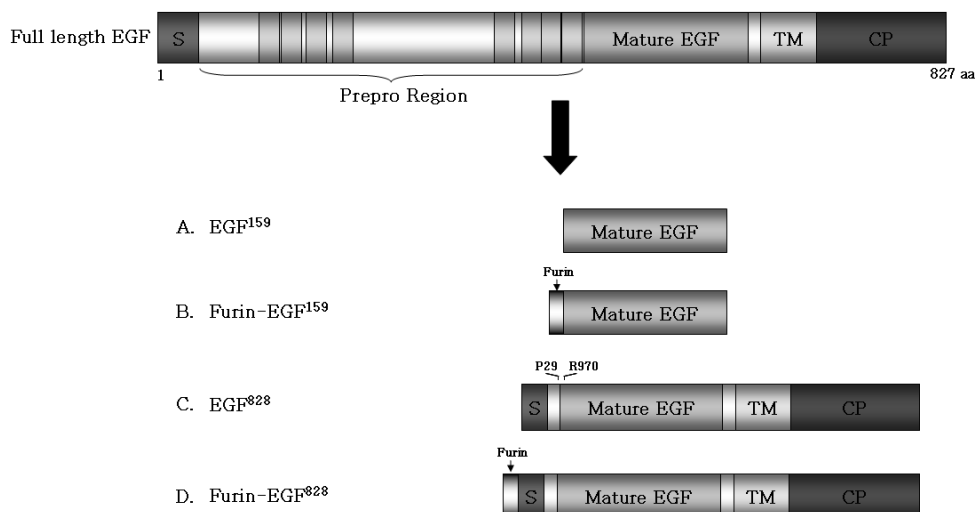


Fig. 1. EGF structures. Original EGF sequence is composed signal peptide, prepro region, mature EGF, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain (CP). Only mature EGF sequence (EGF¹⁵⁹) (A) and mature EGF included Furin site (Furin-EGF¹⁵⁹) (B). EGF excluded prepro region in full-length EGF (EGF⁸²⁸) (C) and EGF828 included Furin site (D).

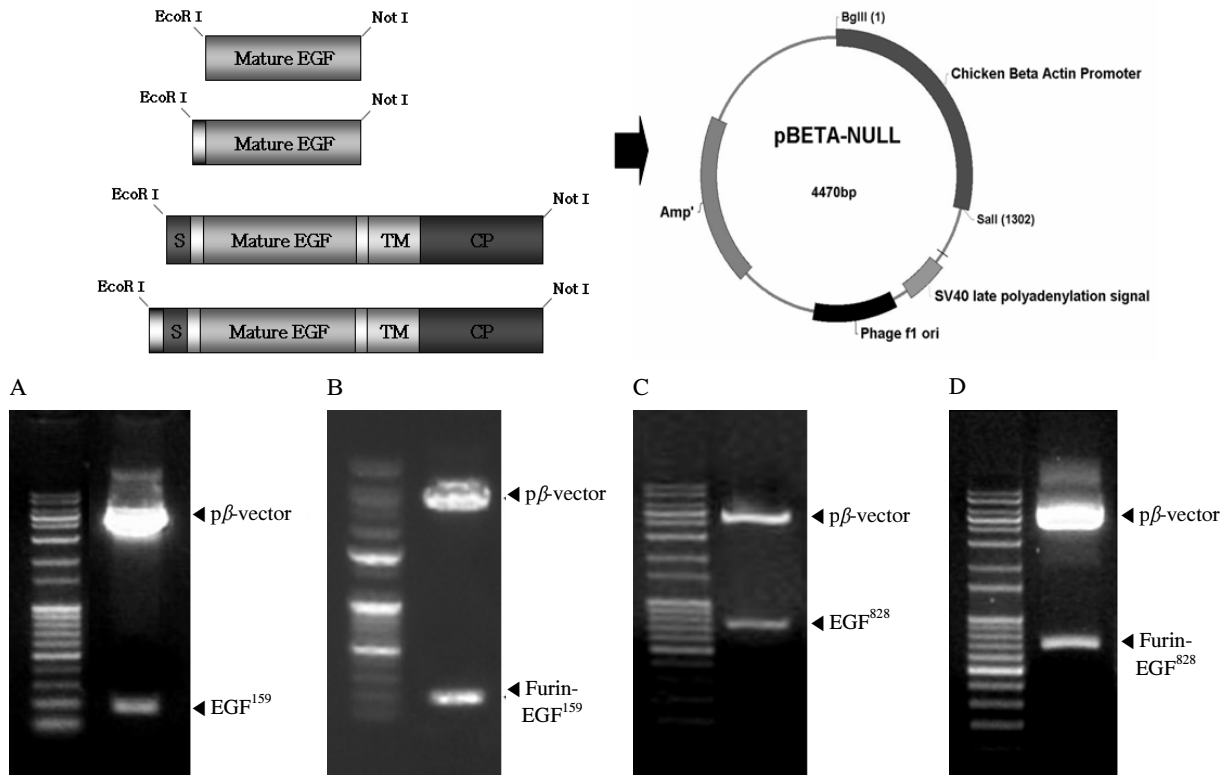


Fig. 2. pβ-EGF plasmid cloning. EGFs and pβ vector including chicken β actin promoter was cut by EcoR I and Not I restriction enzyme and ligated with T4 DNA ligase. Completed plasmids re-confirmed by EcoR I and Not I enzymes. pβ-vector size is 4.0 kbp. pβ-EGF¹⁵⁹ (A) and pβ-Furin EGF¹⁵⁹ (B). pβ-EGF⁸²⁸ (C) and pβ-Furin EGF⁸²⁸ (D).

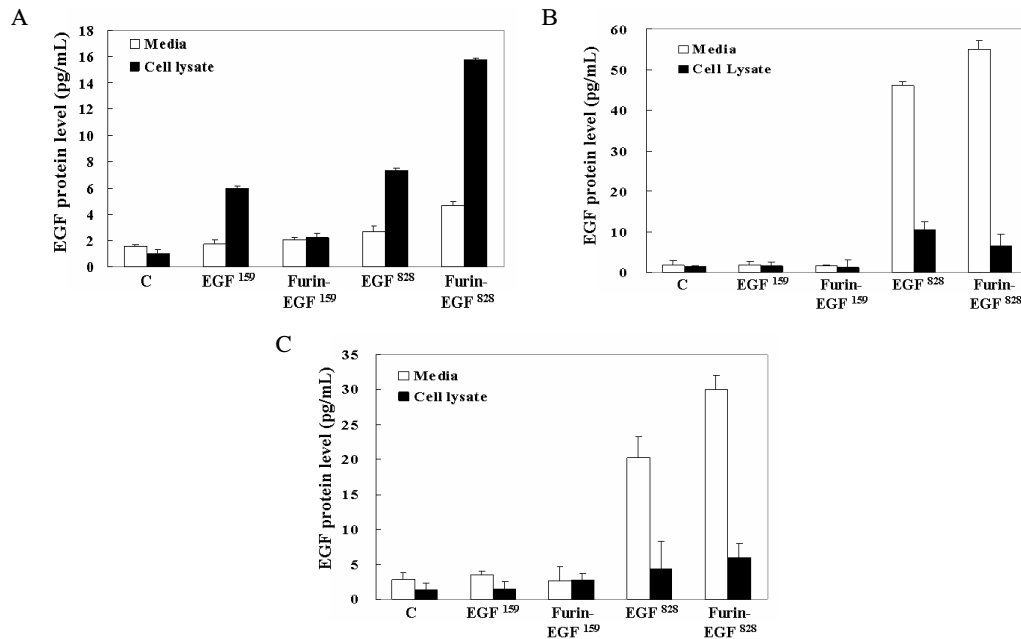


Fig. 3. EGF expression in diverse cell lines. EGF plasmid containing furin site in N-terminal and cytoplasmic domain and transmembrane domain in C-terminal highly increased released hEGF protein in culture medium in HEK293 cells (A), CHO cells (B), and NIH3T3 cells (C).

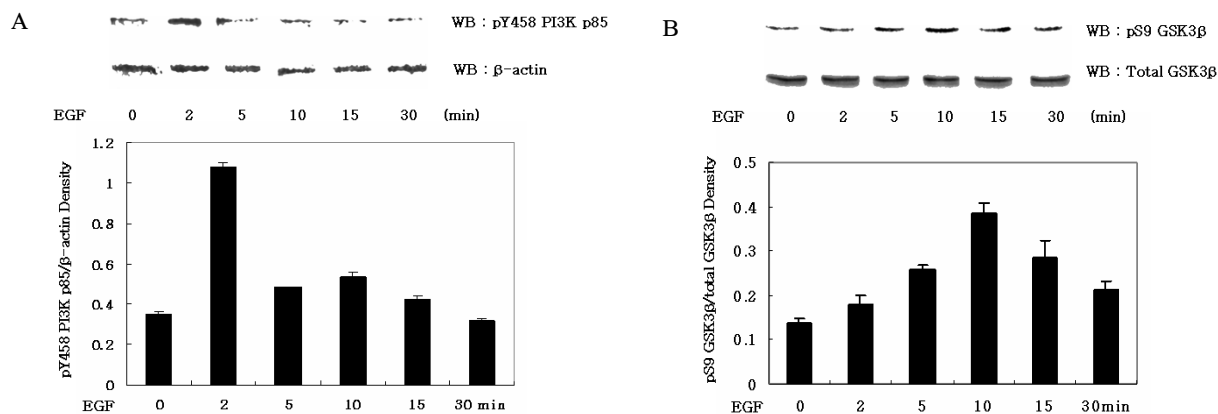


Fig. 4. Biological function of soluble hEGF protein in A549 cell. Cells were treated with 70 pg/mL EGF for a variety of time prior to extraction. Phosphorylation of GSK3 β and PI3K was determined in immunoblot. After treated EGF, phosphorylation of PI3K (A) was maximum at 2 min and GSK3 β (B) was at 15 min.

적합한 세포주라고 생각하여 선택을 하였다. A549 세포주의 배지와 같이 사용되는 NIH3T3 세포주에 furin-EGF⁸²⁸를 transfection하여 48시간 뒤 배지만을 분리해 내어 A549 세포주에 2, 5, 10, 15, 그리고 30분 반응을 시켰다. 그 결과 PI3K는 2분에서 인산화가 가장 높았고 시간이 지날수록 점점 감소하였다(Fig. 4A). GSK3 β 의 경우는 인산화가 점점 증가하다가 10분에서 가장 높았고 그 뒤 점차 감소하였다(Fig. 4B). PI3K와 GSK3 β 의 인산화되는 과정에서 시간에 차이를 보이는 것은 PI3K는 EGF 신호가 활성화 될 때 처음으로 인산화가 일어나는 단백질이며 GSK3 β 는 PI3K, PDK, PKB 등의 단백질을 거쳐 인산화가 일어남으로 그 차이를 보일 수 있다. 이로써 p β -EGF828를 통해서 발현된 EGF는 내생의 EGF와 같이 생물학적으로 적절한 기능을 보임을 본 실험에서 확인하였다.

고 찰

EGF 수용체의 신호전달은 정상 세포뿐만이 아니라 악성 종양 세포에서 세포의 성장, 분화, 운동성 등을 조절하는데 중요한 역할을 한다. EGF 수용체의 신호 전달이 비정상적으로 활성화되면 종양형성, 전이, 혈관 생성 등에 관여하여 암을 일으키거나 더욱 악화시킨다²⁷⁻²⁹). 그러나 당뇨병성 족부궤양같이 혈관생성이나 대식세포, 단핵세포들의 활성이 떨어져 있는 세포에 어느 일정 시간 동안만 EGF 수용체의 신호전달을 활성화 시켜주면 정상 세포나 악성 종양 세포와 달리 표피의 재생성과 신생혈관 생성을 적절하게 증가시켜 치료효과를 볼 수 있다.

EGF 수용체는 tyrosine kinase 수용체이며 ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3), ErbB-4 (HER4)로 나뉜다. 이들 수용체 리간드로는 EGF, TGF- α , Heparin-binding EGF, amphiregulin, epigen, neuregulin-1 등이 있다³⁰⁻³⁴). 이중 EGF는 ErbB-1 수용체에만 결합하여 신호전달을 활성화 시키는 리간드이다. EGF는 총 829개의 아미노산 중에 분리 과정을 통해 53개 아미노산(mature EGF)만이 신호전달에 영향을 주게 된다. 그렇다고 mature EGF sequence만이 중요한 것은 아니다. 보고에 따르면 full-length EGF sequence 중에 membrane-anchoring domain이 존재하지 않을 경우에는 EGF가 세포 밖으로 배출되지 않음이 증명되어 있다³⁵⁻³⁷). 또한 2000년에 EGF 고유의 membrane-anchoring domain이 아닌 HB-EGF의 membrane-anchoring domain을 붙였을 경우에는 EGF가 plasma membrane이 아닌 nuclear membrane에 존재한다고 보고된 바 있다³⁸). 본 연구에서도 EGF159는 세포 내에서만 발현이 되는 반면 EGF⁸²⁸만 세포 밖으로 EGF 단백질이 배출되는 것을 볼 수 있었는데 이는 membrane-anchoring domain이 EGF 단백질의 plasma membrane으로 이동함에 있어 도움을 줌으로써 세포 밖으로 배출됨에 매우 중요한 역할을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. EGF가 세포 밖으로 배출되는 과정이 중요한 이유는 autocrine/paracrine으로써 자기 자신뿐만이 아니라 이웃하는 세포에게도 영향을 주어 그 효과를 더욱 증가시킬 수 있기 때문이다.

Furin은 Arg-X-Lys-Arg sequence를 가지며 autocatalytic cleavage가 더 활발하게 작용을 하여 소포체에서의 단백질 전송을 높여 준다^{39,40}). 그래서 우리는 EGF159, EGF828에 furin cleavage site를 더 추가하여 발현율의 변화를 관찰해 보았다. 그 결과 furin site가 포함되지 않은 플라스미드보다

2배 이상 단백질이 더 많이 발현되는 것을 볼 수 있었다. 반면 EGF159는 같은 양의 DNA를 세포 transfection을 하였는데 발현율이 EGF828보다 그리 높지 않았다. 이는 EGF159는 만들어지는 동시에 세포 자신에 의해 바로 소모 될 가능성도 있고 또는 6 kDa으로 단백질이 매우 작기 때문에 다른 단백질 보다 protease에 의한 영향을 보다 많이 받아 빨리 proteolysis될 가능성도 높을 것이다.

몇 가지 연구들에서 EGF는 상처치료를 매우 좋은 효과를 가진다고 알려져 있다²¹⁻²³⁾. 2 ug의 EGF 유전자를 투여했을 경우 mitogenic 활성이 대조군에 비해 5배 이상 증가하였으며 10일이 지나서야 상처가 치료되는 대조군에 비해 EGF 유전자를 투여한 군에서는 8일이면 완벽하게 치유됨을 관찰하였다. 하지만 유전자 상처치료의 경우 시간이 지날수록 발현율이 떨어짐으로 당뇨병성 족부궤양과 같은 곳에서는 같은 시간 내에 더 많은 EGF 단백질을 만들어 낼 수 있는 EGF 유전자가 필요하다. 또한 EGF 유전자뿐만이 아니라 국내에서도 EGF 단백질을 상처 부위에 도포하는 형태의 치료제가 이미 개발이 되어 당뇨병성 족부 궤양의 치료에 효과가 있었다²³⁾. 하지만 이러한 단백질 제제는 전술한 것과 같이 상처 부위에 과발현되는 비특이적 단백분해 효소들에 의해 대부분 빠른 시간 내에 분해되고, 단백질 자체의 상처 투과력이 낮아 실제 필요량의 수십 배를 도포해야만 하는 문제가 있고, 상처에서의 효과 지속 시간이 짧아 매일 도포해야 하는 불편함이 있다. 치료용 단백질을 특수한 화학물질로 처리하여 상처 부위에서 지속적으로 소량씩 분비되도록 하는 controlled release formulation의 경우 역시 단백분해 효소들에 의한 분해를 피할 수는 없고, formulation에서 분비되는 단백질이 시간이 지남에 따라 변성되어 생물학적인 효능이 점점 감소될 수 있는 점, 그리고 이러한 formulation으로 상처 부위를 덮는 경우 상처 부위의 드레싱이 어렵고 지속적으로 만들어지는 배출물들이 원활히 배출되지 못하는 등의 단점들이 있어 아직까지는 본격적으로 실용화되고 있지 못하다.

유전자 치료는 이러한 단점들을 모두 효과적으로 극복할 수 있는 새로운 치료 방법이다. 하지만 유전 물질을 세포 속으로 전달하는 기술적인 방법들의 단기 및 장기적인 안전성 때문에 아직 악성종양을 제외한 영역에서의 상용화 연구는 미미한 수준이다. 비바이러스 전달 방식을 사용하는 유전자 치료 방법은 단기 및 장기적인 안전성 부분에서 월등하지만 효과의 미약함 때문에 아직 실용화되고 있지 못하다. 본 연구는 당뇨병성 족부궤양의 치료에 이미 효과가 있는 것으로 검증된 EGF를 플라스미드 구조의 변경에 의해 비바이러스

유전자 치료 방법을 통한 발현 효율을 실제 임상에서 사용할 수 있는 수준까지 증대시킨 것으로 가까운 장래에 실제 임상진료에서 사용할 수 있기를 기대한다.

요 약

연구배경: EGF는 혈관생성이나 종양생성, 전이 등으로 암을 악화시킬 수 있는 유전자이지만 비정상적으로 EGF 수용체의 활성이 떨어져 있는 당뇨병환자에게는 표피의 재생성을 유도하여 피부상처회복을 촉진시켜주는 중요한 성장인자이다. 현재 판매되고 있는 Peptide EGF는 당뇨병성 족부궤양 상처치료에 유용하게 사용되고 있지만 가격이 매우 비싸고 임상치료에 있어 효율성이 떨어진다. 또한 매일 도포해야 하는 불편함으로 임상에서 사용하기에는 불편하다. EGF 유전자 치료는 이러한 단점들을 극복하여 한 번의 투여로 상처의 회복을 기대할 수 있다.

방법: 각각의 EGF 유전자를 만들기 위해 PCR 방법을 통해 생성, 증폭시켰으며 p β -vector에 클로닝하기 위해 제한효소 EcoR I 과 Not I 을 사용하였다. 클로닝된 유전자들은 여러 종류의 세포주에 BPEI polymer를 이용하여 transfection을 하고 Human EGF ELISA kit로 단백질 양을 측정하였다. 그리고 Western blotting을 통하여 EGF의 생물학적 기능을 관찰하였다.

결과: EGF¹⁵⁹와 EGF⁸²⁸를 p β -vector에 클로닝하여 만들었으며 ELISA 실험을 통해 단백질 생성을 확인하였다. 그 결과 EGF¹⁵⁹는 세포 안에서만 발현이 되지만 EGF⁸²⁸은 발현된 단백질이 세포 밖으로까지 배출되었으며 furin cleavage site를 포함한 EGF 유전자는 포함하지 않은 EGF 유전자보다 그 발현율이 2배 이상 차이가 나는 것을 볼 수 있었다. 또한 배지 속으로 배출된 EGF 단백질은 EGF 수용체의 하계 신호전달물질인 PI3K와 GSK3 β 의 인산화를 Western blotting 실험을 통하여 관찰함으로써 생물학적 기능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

결론: p β -furin EGF⁸²⁸은 생물학적으로 활성이 있는 EGF의 발현 효율을 높여 당뇨병성 족부 궤양의 비바이러스 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK: Stimulation of granulation tiussue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic

- rats. *J Clin Invest* 76:2323-9, 1985
2. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RN, Deuel TF: *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms.* *J Cell Biol* 109:429-40, 1989
3. Knighton DR, Phillips GD, Fiegel VD: *Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor.* *J Trauma* 30:S134-44, 1990
4. Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, D'limi S, Vallat VP, Valentino L, Fahev T 3rd, Hawes A, Kingston G, Madden MR: *Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound healing.* *J Exp Med* 178:865-78, 1993
5. Werner S, Breeden M, Hubner G, Greenhalgh DG, Longaker MT: *Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse.* *J Invest Dermatol* 103:469-73, 1994
6. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S: *Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1524-9, 1995
7. Kopp J, Wang GY, Kulmburg P, Schultze-Mosgau S, Huan JN, Ying K, Seyhan H, Jeschke MD, Kneser U, Bach AD, Ge SD, Dooley S, Horch RE: *Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF.* *Mol Ther* 10:86-96, 2004
8. Broadley KN, Aquino AM, Hicks B, Ditesheim JA, McGee GS, Demetriou AA, Woodward SC, Davidson JM: *Growth factors bFGF and TGF β accelerate the rate of wound repair in normal and in diabetic rats.* *Int J Tissue React* 10:345-53, 1988
9. Quaglini D Jr, Nanney LB, Ditesheim JA, Davidson JM: *Transforming growth factor- β stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: incisional wound model.* *J Invest Dermatol* 97:34-42, 1991
10. Greenhalgh DG: *The role of growth factors in wound healing.* *J Trauma* 41:159-67, 1996
11. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL: *Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers.* *Br J Surg* 90:133-46, 2003
12. Deodato B, Arsic N, Zentilin L, Galeano M, Santoro D, Torre V, Altavilla D, Valdembrì D, Bussolino F, Squadrito F, Giacca M: *Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing.* *Gene* 9:777-85, 2002
13. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, Capogrossi MC: *Adenovirus-mediated VEGF(165) gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice.* *Gene Ther* 9:1271-7, 2002
14. Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S: *Epidermal growth factor. Physical and chemical properties.* *J Biol Chem* 247:5928-34, 1972
15. Savage CR Jr, Hash JH, Cohen S: *Epidermal growth factor: Location of disulfide bonds.* *J Biol Chem* 248:7669-72, 1973
16. Gregory H: *Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor.* *Nature* 257:325-7, 1975
17. Cohen S, Carpenter G: *Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties.* *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1317-21, 1975
18. Servold SA: *Growth factor impact on wound healing.* *Clin Podiatr Med Surg* 8:937-53, 1991
19. Brown GL, Curtsinger L 3rd, Brightwell JR, Ackerman DM, Tobin GR, Polk HC Jr, George-Nascimento C, Valenzuela P, Schultz GS: *Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor.* *J Exp Med* 163:1319-24, 1986
20. Carpenter G, Cohens S: *Epidermal growth factor.* *Annu Rev Biochem* 48:193-216, 1979
21. Andree C, Swain WF, Page CP, Macklin MD, Slama J, Hatzis D, Eriksson E: *In vivo transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair.* *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12188-92, 1994
22. Brazzell RK, Stern ME, Aquavella JV, Beuerman RW, Baird L: *Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:336-40, 1991
23. Hong JP, Jung HD, Kim YW: *Recombinant human*

- epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. Ann Plast Surg 56:394-8, 2006*
24. Thorne BA, Plowman GD: *The heparin-binding domain of amphiregulin necessitates the precursor pro-region for growth factor secretion. Mol Cell Biol 14:1635-46, 1994*
 25. Goishi, K, Higashiyama S, Klagsbrun M, Nakano N, Umata T, Ishikawa M, Mekada E, Taniguchi N: *Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. Mol Biol Cell 6:967-80, 1995*
 26. Saito Y, Vandenheede JR, Cohen P: *The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. Biochem J 303:27-31, 1994*
 27. Konturek A, Barczynski M, Cichon S, Pituch-Noworolska A, Jonkisz J, Cinchon W: *Significance of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor in development of papillary thyroid cancer. Langenbecks Arch Surg 390:216-21, 2005*
 28. Xu K, Shu HK: *EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas. Cancer Res 67:6121-9, 2007*
 29. Rothhut B, Ghoneim C, Antonicelli F, Soula-Rothhut M: *Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase. Biochimie 89:613-24, 2007*
 30. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW: *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. Cell 110:763-73, 2002*
 31. Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring J, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D: *The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. Genes Dev 12:1825-36, 1998*
 32. Britsch S: *The neuregulin-1/ErbB signaling system in development and disease. Adv Anat Embryol Cell Biol 190:1-65, 2007*
 33. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takavama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K: *Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. J Biol Chem 270:7495-500, 1995*
 34. Wong ST, Winchell LF, McCune BK, Earp HS, Teixido J, Massague J, Herman B, Lee DC: *The TGF-alpha precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. Cell 56:495-506, 1989*
 35. Wiley HS, Woolf MF, Opresko LK, Burke PM, Will B, Morgan JR, Lauffenburger DA: *Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization. J Cell Biol 143:1317-28, 1998*
 36. Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P: *Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. J Biol Chem 278:45255-68, 2003*
 37. Wong RW, Kwan RW, Mak PH, Mak KK, Sham MH, Chan SY: *Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. J Biol Chem 275:18297-301, 2000*
 38. Dong J, Wiley HS: *Trafficking and proteolytic release of epidermal growth factor receptor ligands are modulated by their membrane-anchoring domains. J Biol Chem 275:557-64, 2000*
 39. Creemers JW, Vey M, Schafer W, Ayoubi TA, Roebroek AJ, Klenk HD, Garten W, Van de Ven WJ: *Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 270:2695-702, 1995*
 40. Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K, Nakyama K: *Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor*

- cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. J Biol Chem 266:12127-30, 1991*
41. Deodato B, Arsic N, Zentilin L, Galeano M, Santoro D, Torre V, Altavilla D, Valdembri D, Bussolino F,

Squadrito F, Giacca M: *Recombinant AAV vector encoding human VEGF165 enhances wound healing. Gene Ther 9:777-85, 2002*