

혈관 질환에 대한 분자 생물학적 치료

제명대학교 의과대학 내과학교실

이 인 규

Molecular Approach in Vascular Disease

In Kyu Lee

Department of Internal Medicine Keimyung University, Taegu, Korea

당뇨병 환자에 있어서 대부분의 만성 합병증은 혈관의 이상과 관련이 있다. 특히 대혈관 합병증은 당뇨병과 관련되어 있지 않은 동맥경화증과 더불어 현대 사회의 가장 흔한 사망의 원인 중에 하나로 알려져 있다. 지난 반세기 동안 동맥경화증을 예방 및 치료하기 위한 여러 가지 연구 결과로 효과적인 예방, 진행의 억제 및 이환된 혈관의 대치 이식술 등의 여러 가지 방법이 알려지고 있다. 이 글에서는 최근 들어 많은 연구가 이루어지고 있는 세포부착 분자물질(adhesion molecule), 전사 인자(transcription factor) 등에 대한 유전자 치료를 통하여 동맥경화증을 치료하려고 하는 성공적인 시도에 관하여 문헌 고찰을 통한 연구 동향을 기술하고자 한다.

혈관 질환의 병리 기전을 정확히 이해하기 위하여서는 건강한 정상 혈관의 구조와 대사의 평형을 이루는 여러 가지 기능을 이해하여야 한다. 혈관은 혈관내피세포와 그 직하부 중막층(media layer)에 위치하는 혈관평활근세포, 결합조직(connective tissue)으로 구성된 외막층(adventitial layer)으로 구성되어 있다. 혈관내피세포는 혈액과 혈관벽 사이에 존재하며, 혈액의 흐름을 조절하고 그 이상을 감지하여 그 신호를 전달하며 혈액의 양, 혈관벽의 탄력성, 혈액의 응고, 혈관 세포의 성장 및 고사, 백혈구의 부착 등 여러 가지 조절에 관여한다¹⁾. 혈관평활근세포는 혈관활성화 물질(vasoactive

substance)에 반응하여 혈관벽의 수축을 조절하고, 시토킨(cytokine)의 분비 및 다른 성장조절인자의 분비 등의 기능이 있으며, 섬유아세포와 더불어 세포외 기질 및 단백분해효소인 protease를 만들어 혈관의 구조를 형성하는데 중요한 역할을 하고 있다²⁾.

동맥경화증을 동반한 폐쇄성 혈관질환은 혈관의 중막층(media layer)과 혈관내피세포의 사이 즉 내막층(intima layer)에 혈관평활근세포, 염증 세포 및 세포외 기질이 축적되는 현상(neointima formation)으로 시작된다. 그러므로 혈관 질환에 대한 유전자 치료는 이런 "neointima formation"을 방지하거나 진행을 억제시키거나, 형성을 역전시키는 데에 그 목표를 두고 있다³⁾.

혈관내피세포의 기능 이상(Dysfunction in Vascular Endothelial Cell)

혈관내피세포의 기능 이상은 혈관의 확장 기능에 이상을 초래하며 혈관 내벽에 혈관내피세포가 부착될 가능성을 증가시킨다¹⁾. 그러므로 혈관내피세포의 손상은 혈관의 수축, 혈소판-혈전의 형성 및 염증 세포의 침착을 초래한다. 이러한 이상은 세포 산화환원상태(redox state)의 이상, 고지혈증, 산화 스트레스(oxidative stress), 당뇨병 및 고혈압 등이 관여한다¹⁾. 즉 고지혈증, 당뇨병 환자의 당화종산물 등은 superoxide 음이온

을 생성하고 이는 LDL의 산화를 유발하여 동맥경화증을 촉진시킨다. 또한 혈관활성인자 angiotensin II 등도 반응산소기(reactive oxygen species)를 생성하여 같은 현상을 유발한다. 이러한 현상들을 종합하여 볼 때, 산화스트레스에 대한 유전적인 민감도 차이로 나타나는 반응의 차이가 동맥경화증을 유발하는데 중요하다고 사료된다⁴⁾.

혈관내피세포의 산화-환원 전환 과정의 이상은 혈관내피세포에 염증세포의 부착을 증가시킨다. 이런 과정에 관여하는 중요한 전사인자로 알려진 nuclear factor kappa B(NF- κ B)는 산화스트레스로 인해 발생한 유리산소기에 의해 증가되며⁵⁾, vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 등의 세포부착분자물질⁶⁾과 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 등의 chemokines 등의 표현(expression)의 상승작용을 유발한다⁷⁾.

또 산화-환원 전환 과정의 이상으로 나타나는 반응산소기의 발생 증가는 Nitric oxide(NO)의 분해를 증가시켜 혈관확장 작용에 장애를 초래한다. 그리고 NO는 이 외에도 혈관평활근세포의 성장 및 이동(migration)의 억제역할, NF- κ B 활성도, VCAM-1과 MCP-1의 표현(expression)에도 관여한다고 알려져 있으므로 반응산소기 생성은 이런 현상 모두에 역효과를 나타내게 된다. 그러므로 혈관내피세포의 두 가지 이상 - 혈관확장의 이상 및 부착성(adhesiveness)의 증가 - 은 NO 활성도의 저하와 밀접한 연관이 있다¹⁾.

이상에서 볼 때 혈관내피세포의 산화환원상태의 변화는 고지혈증, 혈관내피세포 기능의 이상과 밀접한 관련을 가지고 있으며 동맥경화증의 생성에 중요한 인자로 작용한다고 생각된다. 그러므로 동맥경화증의 치료 및 예방에 혈관내피세포의 산화환원상태의 적절한 조절이 매우 중요하며 이를 통한 치료가 시도되고 있다.

세포와 세포 그리고 세포외 기질과의 상호작용의 이상(Dysregulated Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions)

정상적인 혈관내피의 표면은 integrin이 매개하는 혈관내피세포와 주변세포와 기질의 상호작용으로 혈액내

의 세포 즉 혈소판, 백혈구 및 적혈구 등이 부착하지 못하게 되어 있다. 그러므로 integrin과 어떤 기질의 상호작용을 조절함으로써 neointima 형성을 억제할 수 있다. 동물실험에서 혈관내피세포의 고사를 방지하고 혈관평활근세포의 혈관내층으로 이동을 유도하는 integrin α V β 3을 7E3항체(IIb/IIIa integrin의 길항제) 투여로 억제시키면 혈관벽의 손상을 줄일 수 있다고 한다⁸⁾. 비정상적인 혈관에서는 selectin family(특히 P-selectin), ICAM-1, Platelet activating factor(PAF), cytokine(interleukin-1) 등이 증가하며 혈관벽에 여러 세포들의 부착이 증가한다. 그리고 이들의 증가에는 NF- κ B와 Egr-1 등의 전사인자가 중요한 역할을 담당하고 있다⁹⁾.

세포성장과 세포사망의 이상(Dysregulated Cell Growth and Cell Death)

앞에서 언급한 바와 같이 혈관질환의 근본적인 이상은 혈관내막(intima)의 공간에 세포 및 그 외 물질의 침착으로 neointima를 형성하고 이로 인하여 세포의 성장과 세포 사망사이의 균형을 깨뜨리게 되는 것이다. 그리고 이런 이상은 PDGF, TGF β 1, bFGF, Angiotensin II 등의 인자들이 관여하고 있다. 이러한 인자들은 그들의 작용을 나타내는데 서로 중첩적으로 작용하므로 현재까지 이들 인자중에 1개를 억제하여 혈관의 손상을 억제하려는 노력은 실패하였다. 예를 들면 Angiotensin II는 GTPase-binding protein(G protein)-coupled 수용체 및 tyrosine kinase 수용체와 서로 작용한다^{10~12)}.

그리고 intima의 세포증식은 세포의 고사기전의 이상과 관련이 있다¹³⁾. 예를 들면 bFGF는 혈관내피세포 생존을 증가시키며 PDGF, Angiotensin II는 혈관평활근세포의 생존을 증가시킬 뿐 아니라 세포의 성장을 촉진한다. Mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 phosphoinositol 3-kinase도 세포고사로 억제시키는 신호전달에 관여한다¹⁰⁾. 반면에 JNK kinase는 고사로 촉진시킨다¹⁰⁾. Integrin α V β 3도 혈관세포의 생존에 중요하다⁸⁾. 그러므로 혈관내피의 손상을 치료하려면 세포고사를 촉진시키는 인자를 증가시키고 그 반대요인을 억제시키는 시도가 고려되어야 한다.

Table 1. Molecular Therapies for Vascular Diseases: Pathologic Bases and Potential Therapeutic Targets

Pathologic event	Therapeutic target
Endothelial dysfunction	NO inducer or donor : antioxidants
Endothelial injury	VEGF : FGF
Cell activation and phenotypic modulation	MEF-2 and GAX modulators : NF- κ B antagonists : cell cycle inhibitors
Dysregulated cell growth	E2F decoys: RB mutants: cell cycle inhibitors
Dysregulated apoptosis	Bax or CPP32 inducers : Bcl-2 inhibitors: integrin antagonists
Thrombosis	IIb/IIIa blockers: tissue factor inhibitors: anti-thrombin agents
Plaque rupture	Metalloproteinase inhibitors : leukocyte adhesion blockers
Abnormal cell migration	Integrin antagonists : PDGF blockers : plasminogen activator inhibitors
Matrix modification	Metalloproteinase inhibitors, plasmin antagonists : matrix protein cross-linking modifiers

혈관세포 표현형의 조절(Modulation of Vascular Cell Phenotype)

Neointima를 형성하는 혈관평활근세포는 표현형이 달라져 있다. 이때의 세포는 myogenic differentiation과 관련된 전사인자가 증가되어 있고 성장인자, 세포고사와 관련된 유전자, integrin, 세포기질 단백, 단백분해효소 등이 전반적으로 증가되어 있다^[14]. 반면 혈관중막평활근세포(medial smooth muscle cell)로 분화시 표현되는 homeobox gene Gax 유전자는 억제되어 있다. 동물실험에서 풍선성형술후에 Gax 유전자를 혈관평활근세포에 주입하면 혈관평활근세포의 증식을 억제하며 neointima 형성을 방지한다^[14]. 반대로 muscle 특이유전자를 조절하는 전사인자인 MEF-2를 주입하면 neointima 형성을 촉진한다. 그러므로 평활근세포의 표현형을 조절하는 전사인자를 조절할 수 있다면 혈관질환의 치료를 시도해 볼 수 있다고 사료된다^[14].

재협착, 혈관질환의 치료에 대한 향후의 도전과 그 방향(Future Directions and Challenges in Vascular Therapeutics)

가장 많이 시도되고 있는 폐쇄성 혈관질환의 치료는 혈관이식술과 협착부위에 풍선을 넣고 확장시키는 방

법 및 국소 방사선 조사요법이다. 그러나 시술후 3~6개월 혹은 수년내에 30~50%의 경우에 neointima 형성, 혈전의 형성으로 재협착이 나타난다는 점이 문제다. Table 1은 최근 시도되고 있는 혈관 치료에 대한 여러 가지 분자 생물학적인 방법 및 그 치료목적을 나열한 것이다. 이런 분자 생물학적인 치료는 대부분 급성 시기에 단기 억제 요법으로 시도된다. 반면에 동맥경화증의 발생 및 진행은 서서히 장기간 진행된다. 그러므로 이론적으로 이상적인 치료가 되기 위해서는 동맥경화증 형성의 초기 단계에 중요한 시발점을 차단하여 지속적인 효과를 나타나게 하는 것이다.

현재 시도되고 있는 치료방법 중 한 가지는 풍선확장술 실시 시에 혈관내피세포가 손상되므로 혈관내피세포에서 생성되는 NO synthase 유전자들을 풍선성형술 직후에 주입하는 방법이다. 이렇게 하면 국소적으로 NO가 생성되고 이때 생성된 NO에 의해 혈관평활근세포의 증식억제 및 이동억제 neointima 형성에 필요한 기질 생성이 억제된다^[15,16]. 그외의 방법들로는 Herpes simplex virus thymidine kinase(HSV-TK) 유전자를 손상된 부위에 주입하고 ganciclovir를 복용시키면 역시 neointima 형성을 억제할 수 있다^[17]. 그리고 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Cdc2, C-Myb와 C-Myc를 억제하는 antisenseoligonucleotide를 국소적으로 주입하여 같은 효과를 볼 수 있다^[18]. 또한 세포주기 조절에 관여하는 E2F 전사인자에 대한

“decoys”(E2F cis element sequence를 포함한 double strand oligonucleotide) 투여로도 같은 효과를 볼 수 있으며, p21(dominant-negative Ras mutant) 등을 이용하여서도 같은 결과를 얻을 수 있다¹⁹⁾. 이상을 종합하여 볼 때 현시점에서 재협착 방지를 막기 위한 효과적인 시도는 intravascular stenting 및 위에서 언급한 증식억제치료(antiproliferative therapy)중의 하나를 시도하는 것으로 생각된다.

REFERENCE

- Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM: *The intima: Soil for atherosclerosis and restenosis*. *Circulation Research* 77:445-465, 1995
- Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA: *Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells*. *J of Biological Chemistry* 270:12563-12568, 1995
- Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liau G: *Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model*. *Am J of patholo* 147:267-277, 1995
- Alexander RW: *Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis : Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective*. *Hypertension* 25:155-161, 1995
- Liao F, Andalibi A, Allayee JH, Fogelman AM, Lusis AJ: *Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice*. *J Clin Invest* 94:877-884, 1994
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D: *Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice*. *J Clin Invest* 96:1395-1403, 1995
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM: *Vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells*. *J Clin Invest* 92:1866-1874, 1993
- Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA: *Integrin αVβ3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. *Cell* 79:1157-1164, 1994
- Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T: *Egr-1-induced endothelial gene expression: A common theme in vascular injury*. *Science* 271:1427-1431
- Xia Z, Dicken M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME: *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. *Science* 270:1326-1331, 1995
- Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM: *The Adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins*. *J Clin Invest* 95:713-724, 1995
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T: *Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction*. *Science* 270:296-299, 1995
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM: *Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest* 95:2266-2274, 1995
- Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel NE: *Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury*. *Science* 265:781-784, 1995

15. Ferguson JJ: *Meeting highlights: Nitric Oxide donors.* *Circulation* 90:4, 1994
16. Simons M, Edelman ER, Dekeyser JL, Langer R, Roseburg RD: *Antisense C-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo.* *Nature* 359:67-70, 1992
17. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogiwara T, Dzau VJ: *Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia.* *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 90:8474-8478, 1993
18. Shi Y, Fard A, Galeo A, Hutchinson HG, Vermani P, Dodge GR, Hall DJ, Shaheen F, zalewski A: *Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury.* *Circulation* 90:977-951, 1994
19. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM: *Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty.* *J Clin Invest* 96:2260-2268, 1995