

아데노바이러스를 이용한 쥐의 재조합 IL-10 (Ad:ratIL-10)의 거부반응 억제효과

계명대학교 의과대학 *외과학교실, †병리학교실, ‡의과학연구소

조원현^{*,†} · 김형태^{*,†} · 박관규^{†,‡} · 최영국[‡] · 박종구^{*,‡}

= Abstract =

Effect of Adenovirus Mediated Rat Interleukin-10 (Ad:ratIL-10) Gene Transfer in Mouse-to-rat Skin Graft

Won Hyun Cho, M.D.^{*,†}, Hyoung Tae Kim, M.D.^{*,†}, Kwan Kyu Park, M.D.^{†,‡}
Young Kook Choi[‡] and Jong Gu Park, Ph.D.^{*,‡}

Departments of *Surgery, †Pathology and ‡The Institute for Medical Science
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Purpose: IL-10, one of the potent Th2 cytokine, has strong anti-inflammatory reaction and immunosuppression action by stabilization of polarized Th2 cell gene expression and blocking of function of antigen presenting cells. The aims of this study were to investigate the immunosuppressive effect of recombinant adenovirus mediated rat IL-10 (Ad:ratIL-10) in mouse to rat skin graft. **Methods:** The transgene expression of the recombinant adenovirus was confirmed by X-gal staining of Ad:LacZ infected skin graft. The skin graft was done between mouse and rat after 1 hour infection of donated skin with Ad:ratIL-10, which was already been produced in our Institute for Medical Science. Checked gene expression in grafted skin by in situ RT-PCR and systemic blood by ELISA on day 1, 3, 5 and 7. Immunosuppressive effect of the Ad:ratIL-10 was evaluated by graft survival and compared with control group which was infected by saline. **Results:** Transgene expression of recombinant adenovirus was peak on third day of skin graft and became disappeared on day 5 and 7. The same expression was confirmed by in situ RT-PCR of Ad:ratIL-10 infected skin graft. The systemic blood level of infected Ad:ratIL-10 checked by ELISA was undetectable but their expression checked in culture cell line of HeLa cell was 275 ng/mL on day 5. Mean grafted skin survival was 6.0 ± 0.7 days in Ad:ratIL-10 group but statistically indistinguishable to control group of infection with saline (5.6 ± 0.6 days, $p > 0.05$). **Conclusion:** In summary, the Ad:ratIL-10 alone, infected in grafted skin, was peak on day 3 after graft but showed no immunosuppressive effect on mouse-to-rat skin graft.

Key Words: Skin graft, Recombinant IL-10, Adenoviral vector

서 론

장기 이식이 각종 장기의 말기부전증에 치료방법

책임저자 : 조원현, 대구시 중구 동산동 194번지
계명대학교 의과대학 외과학교실
우편번호: 700-712, Tel: 053-250-7325
Fax: 053-250-7322

본 연구는 1998년도 계명대학교 의학유전연구소 특수과
제연구비의 일부 보조로 이루어졌음.

으로 인정되면서 기증 장기의 부족현상을 해결하기
위해 새로운 면역억제제의 개발이나 면역관용상태
유발에 관심이 모아지고 있다. 최근 면역관용의 유
도방법으로 거부반응을 일으키는 Th1 세포대신 면
역억제능력이 있는 것으로 알려진 Th2 세포(IL-4, 5,
10)를 증가시킴으로 Th1/Th2 구성의 변화를 유도해
서 이식된 장기에 대해 면역관용상태를 유지하여 이
종이식을 성공시키려는 노력이 진행되고 있다(1,2).
특히 유전자조작 기법이 발전됨에 따라 특별한 기능

을 가진 물질들을 체내에 주입이 가능하고 이를 통해 질병의 치료 혹은 예방이 가능하게 되었다(3-6). 이식분야에서도 여러 종류의 사이토카인을 바이러스 벡터를 이용해서 재조합 한 후 이식장기에 투여함으로써 장기이식 후 초기에 발생하는 초급성 거부반응을 억제하려는 노력이 심장(7), 폐(8), 간(9), 피부(10,11) 등의 동물이식실험을 통해 진행되고 있고, 인간의 재조합 IL-10 임상적용도 Huhn등(12)에 의해 보고되었다. IL-10의 항염증반응과 면역억제 능력은 특히 polarized Th2세포의 유전자발현을 안정화하고 항원 발현세포의 기능을 차단함으로써 IL-2, IFN gamma 등 세포의 활성화를 억제하여 거부반응을 예방할 수 있다고 보고되었으나, Qian등은 IL-10 투여가 오히려 거부반응 촉진이라는 결과를 보고하고 있어 아직도 IL-10의 정확한 작용기전과 역할을 모두 설명하지 못하고 있다. 저자들은 RT-PCR을 통해 쥐의 IL-10 cDNA를 획득하고, 이를 아데노바이러스 벡터를 이용해서 재조합시킨 Ad:ratIL-10을 제작하였고, 이식시 이식장기에 Ad:ratIL-10을 감염시켜 이식수혜자 체내에서 면역억제효과를 나타낼 수 있는지를 알아보기 위해 실험을 시행하였다.

방 법

1) 세포주의 배양

아데노바이러스 생산을 위해 사용된 293세포주(Microbix Biosystem, Canada)는 10% FBS (GibcoBRL), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)을 포함하는 MEM배지(GibcoBRL)에서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

2) 면역작용 억제성 재조합 아데노바이러스 제작

(1) 쥐의 IL-10의 RT-PCR 클로닝: 실험에 이용된 rat IL-10은 6~10주된 Lewis rat의 비장 림프구로부터 total RNA를 분리한 후 Access RT-PCR™ (Promega, USA) kit를 이용하여 cDNA를 증폭하였다. RT-PCR 산물은 PBS-SK⊕ (Stratagene, USA)의 *Xba*I, *Eco*RI 클로닝 부위에 삽입하였다. 확보된 cDNAs는 핵산 염기배열 결정을 통해서 cDNAs의 진위와 돌연변이 여부를 검정하고 염기배열상 이상이 없는 것을 선택하였다.

(2) IL-10 표현 adenovirus shuttle vectors 제작: PBS-SK⊕에 cloning되어 있는 IL-10 cDNA는 *Xho*I과 *Xba*I으로 절단된 후 gel에서 분리한다. 분리된 IL-10 cDNA는 *Xho*I과 *Xba*I으로 절단된 pAd-YC2 shuttle vector에 클로닝하였으며 CMV promoter의 조절하에서 쥐의 IL-10 cDNA encode시켰다. 재조합 아데노바이러스는 293세포주에 pJM17 rescue vector와 rat IL-10 또는 LacZ cDNA를 가진 shuttle vector를 함께 cotransfection시켜 제작하였다.

(3) Adenoviral plaque 분리, 농도결정 및 바이러스 증폭: Adenovirus 감염 24시간 전 60 mm dish에 5×10^6 의 293세포를 배양한다. 수확된 crude adenovirus를 PBS에서 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석한 후 293세포에 1시간 동안 감염한다. 2×MEM과 1% agarose로 혼합한 용액으로 감염된 293세포 위에 상층한다. 세포를 7일간 배양한 후 나타난 plaques를 분리하고 순수한 virus분리를 위해서 plaques를 세 번 반복 분리한다. Plaque 분리되어서 1차 증폭된 virus의 농도 결정은 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석한 후 앞서 설명한 것과 동일한 방법으로 agarose overlay를 이용하여 결정된다. 증폭된 virus는 stock virus로서 보관되고 실제 실험을 위해서는 stock virus를 재 증폭하여 사용한다. 재 증폭을 위해서는, 감염된 세포를 2일 후에 수확한 후 세 차례의 freeze-thaw를 거쳐서 세포를 완전히 파괴한 후 아데노바이러스를 포함하는 cell lysates를 확보한다. 확보된 crude 아데노바이러스는 농도를 결정한 후 후속 실험에 사용한다.

(4) 재조합 adenovirus 농축과 DNA 분리: 증폭된 아데노바이러스를 1×10^6 의 293세포에 10 multiplicity of infection (moi)로 감염한다. 2일 동안 배양 후 250 ml 원심분리 tube에 옮겨 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리한다. 침전된 세포를 PBS로 resuspend한 후 2.5 ml의 5% sodium deoxycholate를 혼합한다. 용해된 세포를 homogenizer로 분쇄해서 cellular DNA를 파괴한다. 여기에 1.8 ml의 포화된 CsCl를 첨가한 후 35,000 rpm에서 16시간 원심분리 후 바이러스를 추출한다. 분리된 아데노바이러스는 dialysis후 농도가 결정된다. 아데노바이러스 DNA는 Hirt등의 방법에 따라 분리한다. 2×10^6 의 293세포에 10 moi의 virus를 감염시킨다. 2일후 1 ml의 lysis buffer를 첨가한 후 용해된 세포에 5 M NaCl 250 µl를 첨가하고 4°C에서 12시간동안 배양하였다. 293세포의 genomic DNA

의 제거는 4°C 13,000 rpm 원심분리에 의하여 이루어진다. DNA를 포함한 상층액을 분리한 후 침전된 DNA를 PCR을 위하여 사용한다. PCR product는 1% agarose gel에서 그 실체를 검정한다.

3) Rat IL-10의 RT-PCR과 *in situ* RT-PCR

RT-PCR은 Access™ RT-PCR (Promega, USA)을 사용하여 제작회사가 제시한 방법에 따라 수행하였다. cDNA합성은 48°C에서 45분간 수행하였고, PCR반응은 94°C에서 30초, 52°C에서 1분, 68°C에서 2분간 반응하였으며 35회 반복하였다. RT-PCR과 *in situ* RT-PCR에 사용한 primers는 5' primer (ACCATGCCTG GCTCAGCACTGCTAT)와 3' primers (TAGATGCCGG GTGGTTC AATTITTC)를 사용하였다. PCR 수행산물은 1.5%의 agarose gel에 전기영동한 후, ethidium bromide 염색으로 UV 투조기(-)에서 확인하였다. *In situ* RT-PCR은 급냉한 조직을 절편후에 digoxigenin conjugated dUTP를 사용하여 RT-PCR을 수행하였고, anti-digoxigenin-alkaline phosphatase를 반응한 후 BCIP/NBT로 발색반응하였다.

4) Southern blotting

Southern blotting은 ECL (BM, Germany)을 사용하여 제작자가 제시한 방법에 따라 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.4 N NaOH 용액에서 nylon membrane (Zeta probe, USA)에 transfer하였고, prehybridization 용액 (5×SSC, 0.1% hybridization component, 0.02% SDS, 20 fold diluted liquid block)에서 42°C, 1 시간동안 반응하였다. Prehybridization 용액에 fluorescein-11-dUTP가 결합된 probe를 16시간동안 반응하였고, 세척과정을 거친 후 anti-fluorescein horse radish peroxidase를 30분 동안 반응하였다. Solution 1, 2 혼합물을 1분 동안 반응한 후, X-ray film에서 signal을 발전하였다.

5) 이식할 피부에 대한 재조합 Ad:ratIL-10 및 대조군 바이러스 감염방법

IL-10을 표현할 재조합 아데노바이러스(이하 Ad:ratIL-10)의 농도는 10⁹ pfu/ml로 하여 감염 대상 조직의 단위 세포당 10 혹은 100 moi로 바이러스 농도를 조정한 후 이식편을 500 μl Ad:ratIL-10용액에 1 시간 담귀 놓은 후 이식하였다.

6) Rat IL-10의 측정방법(ELISA)

세포주 또는 혈청 내에서의 IL-10 농도는 제작자가 제시한 방법에 따라 수행하였고 요약하면 아래와 같다. 96-well plate에 rat IL-10에 대한 항체를 코팅한 후 4°C에서 24시간동안 배양하였다. Plate를 PBS-tween20으로 세척한 후, 시료 또는 표준시료를 1시간동안 반응하였다. 여기에 biotinylated anti-rat IL-10 항체와 avidin-horseradish peroxidase 복합체를 1시간동안 반응시킨 후, 2, 2'-Azino-bis-(3-ethybenzthiazoline-6-sulfonic acid)를 첨가하여 405 nm에서 효소활성을 측정하였다.

7) 이종 피부이식

ICR-mouse를 공여쥐로 하여 entobar를 복강 내 주사하여 마취한 후 복부에서 직경 1 cm 정도의 피부를 진피층만 절제하여 Ad:IL-10 PBS (10⁹/pfu)에 담그고 1시간동안 감염시킨다. 실험군은 수혜쥐인 Lewis rat (n=5)를 같은 방법으로 마취하여 배부에서 직경 1 cm 정도의 피부(진피전층)를 절제해 낸 후 mouse에서 절제하여 Ad:ratIL-10에 감염시킨 피부를 이식해 준다. Ad:ratIL-10의 감염 정도와 시기를 확인하기 위해 실험군의 이식 전에 Ad:LacZ로 감염시켜 확인하였다(n=5). 대조군(n=5)은 생리식염수에 같은 방법으로 감염시킨 후 이식해 준다. 이식된 피부는 5-0 dermalon으로 8군데를 고정해 주고 외부자극이나 감염으로부터 예방하기 위해 콜로디온으로 얇게 덮어 준다.

8) 감염된 재조합 바이러스의 확인

감염된 재조합 바이러스에 의한 transgene의 표현은 피부이식 3일 후에 이식된 쥐를 다시 마취하여 이식편을 절제한 후 일부는 RT-PCR을 위해 냉동보관하고 나머지는 광학현미경하에 염색하여 이식상태를 확인하기 위해 formalin액에 보관하였다. *In situ* RT-PCR은 Access™ RT-PCR system으로 시행했고, 혈액내의 IL-10 농도를 확인하기 위해 이식후 1, 2, 3, 7일째 수혜쥐의 안구 내측에서 피펫으로 채혈하여 ELISA kit (Biosource International, Camarillo, California)를 이용하여 검사했다. 대조군의 Ad:LacZ의 피부감염정도를 조사하기 위해 β-gal (β-galactosidase) 염색을 시행했다.

Fig. 1. Ad:LacZ expression in grafted skin. X-gal staining of grafted skin infected recombinant adenovirus harbouring beta galactosidase cDNA. It started around hair follicle (A) on day 1 and spread whole dermis on day 3 (B), but disappeared on day 5 and 7 (A: on day 1; B: on day 3; C: on day 5; D: on day 7 after skin graft).

9) 재조합 Ad:ratIL10의 피부생착에 관한 효과

이식된 쥐를 매일 관찰하여 이식 피부의 색깔 변화와 탄력정도를 보고, 생착여부와 기간을 결정하였고 조직검사로 확인하였다.

결 과

1) LacZ의 피부감염상태

면역억제 사이토카인을 발현하는 재조합 아데노바이러스를 사용하여 피부이식을 시행하기에 앞서 제작된 재조합 바이러스의 감염성을 파악하고자 하였다. 이러한 목적을 위해 재조합 바이러스의 감염 후

감염된 조직의 현미경적 관찰이 용이하게 이루어질 수 있도록 β -galactosidase를 발현하는 Ad:LacZ를 사용하였다. Ad:LacZ의 감염 후에 조직을 절편하여 이식한 후 1일, 3일, 5일, 7일째 이식된 피부를 다시 절제하여 X-gal 용액(1.5 mM potassium ferricyanide, 1.5 mM potassium ferrocyanide, 1% X-gal)에 37°C에서 1일간 잠복 염색시켰다. 염색결과 감염 3일째 푸른색 염색이 가장 현저하였고, 이후 5일째는 발현이 현저히 감소되어 7일 후에는 염색을 관찰할 수 없을 정도였다(Fig. 1A, B, C, D).

2) 조직과 세포상에서의 Ad:ratIL-10 감염

위의 실험에서 재조합 아데노바이러스는 포피세포를 감염할 수 있으며 삽입된 유전자를 단기간 동안이지만 효과적으로 발현할 수 있음을 관찰하였다. 다음으로 면역억제성 cytokine인 IL-10이 삽입된 재조합 아데노바이러스를 제작하여 조직이식 연구에 사용하였다. 일차적으로 제작된 아데노바이러스가 세포 내에서 쥐의 IL-10의 mRNA를 표현하는지를 확인하기 위하여 HeLa세포에 10 moi로 감염하였다. 감염 24시간 후 전체 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과 555 bp의 증폭된 DNA band를 확인할 수 있었다. 반면 감염되지 않은(mock infected) 세포와 Ad:LacZ가 감염된 세포에서는 IL-10을 확인할 수 없었다. 증폭된 DNA band는 hybridization primer를 이용하여 southern blotting으로 IL-10 DNA임을 확인

하였다(Fig. 2A, B). 후속적으로 조직에서 rat IL-10의 발현 정도를 확인하기 위하여 Ad:ratIL-10을 감염 후 *in situ* RT-PCR을 수행하였다. Ad:ratIL-10이 감염된 조직에서는 IL-10 mRNA가 높은 수준으로 생성되었음이 암갈색 반점에서 확인할 수 있었다. 암갈색으로 나타나는 염색은 알칼리성 인산화효소반응이 나타나는 것을 보여주며 증폭된 mRNA에 상보적인 primers가 결합하였음을 나타낸다(Fig. 3A, B). 반면에 Ad:null로서 감염된 대조군에서는 RT-PCR 후에 이러한 염색이 관찰되지 않았다. 이러한 사실은 단지 Ad:ratIL-10이 감염된 조직에서만 IL-10 mRNA가 생성됨을 명확히 나타내고 있다.

3) ELISA를 이용한 IL-10 발현 측정

재조합 Ad:ratIL-10의 감염 후 과연 감염된 세포에서 rat IL-10이 생성되는지를 조사하였다. 일차적으로 배양세포주인 HeLa세포에 10 moi로 Ad:ratIL-10을 감염한 후 rat IL-10 발현정도를 ELISA를 사용하여 확인하였다. 감염 5일 후에 약 275 ng/mL의 rat IL-10이 표현됨을 확인하였다(Table 1). 그러나 Ad:ratIL-10의 감염 후 피부이식을 한 쥐에서는 이식 직후, 1일, 3일, 5일 7일 후의 ELISA 조사에서 IL-10의 수치는 전기간을 통해 측정이 불가능하였다. 이는 IL-10의 감염을 이식할 피부에만 국한시켰기 때문에 혈액에서는 측정할 정도의 rat IL-10이 생성되지 않은 것으로 생각된다.

4) 이식피부의 성적과 광학현미경적 소견

Ad:ratIL-10 감염군의 피부 생착기간은 평균 6.0 ± 0.7 일로서 대조군의 5.6 ± 0.6 일보다 약간 길었으나

Fig. 2. RT-PCR amplification of IL-10 transcript. A. Rat IL-10 message was detected as a PCR band of 500 bp (M, size marker; 1, mock cells; 2, Ad:LacZ infected cells; 3, Ad:ratIL-10 infected cells). B. The amplified DNA band was reconfirmed by Southern hybridization. Amplified DNA band obtained from Ad:ratIL-10 infected cells was detected with a hybridization primer derived from a sequence without overlapping with PCR primers.

Table 1. Rat IL-10 in cell culture and grafted rat

	IL-10 level*
HeLa cell culture (day 5)	275 ng/mL
Skin grafted rat (day 1, 3, 5)	undetectable

*by ELISA.

Table 2. Survival time of grafted skin

Control group	Ad:ratIL-10	p value
5.6 ± 0.6 days	6.0 ± 0.7 days	$p > 0.05$

Fig. 3. IL-10 expression was detected by *in situ* RT-PCR. Skin tissue post infection of Ad:ratIL-10 was subjected to 35 cycles of *in situ* RT-PCR. A. Tissue was infected with Ad:null (mock infection). B. Tissue was infected with Ad:ratIL-10 showing patches of dark brown spots on the apical region of the tissue.

Fig. 4. The microscopic findings of grafted skin 6 days after graft. A. Marked inflammatory cell infiltration at grafted skin with focal tissue edema suggest rejection (H & E, $\times 100$). B. Severe lymphoplasma cell infiltration at grafted skin down to underlying graft bed (H & E, $\times 200$).

통계적인 차이는 없었다($p > 0.05$)(Table 2). 광학현미경적 소견으로는 절제된 이식피부에서 염증성 변화가 Ad:ratIL-10 처리군에서 훨씬 저명하게 관찰되었다. 이러한 사실은 재조합 아데노바이러스 자체에 의한 면역작용에 기인한 것으로 사료된다. 이식 후 3일째 및 7일째 피부 절제 후 H&E 염색한 결과 심한 면역세포들의 침윤이 두드러졌으며 문합 부위 주위에는 다핵 중성구들의 침윤도 있었다. 이식된 조직편은 이식 후 3일경에는 생존해 있었으나 7일경에는 모두 괴사되었다(Fig. 4).

고 찰

IL-10은 T 림파세포 중 Th2군에 속하는 사이토카인으로서 항 염증성 반응과 면역억제능력이 탁월한 사이토카인인데 여러 가지 T 세포와 항원발현세포(antigen presenting cell)들의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다. 현재까지의 실험에서 IL-10은 이식에서 거부반응을 예방할 수 있고 그 기전은 극화된 Th2 유전자의 발현을 안정화하고, 항원발현세포의 기능

을 차단함으로써 IL-2나 IFN gamma와 같은 Th1세포의 활성화가 억제되어 생긴다고 생각하고 있다. 특히 Strom 등은 IL-4와 IL-10이 극화된 Th2형 유전자세포들의 발현을 안정시키면서 Th1형 세포들의 활성화를 예방하는 것으로 보고했다(1). 그외에도 IL-10은 TNF-alpha와 IL-12의 생성을 억제하고, B7 발현, ICAM-1 유전자 전사, class II 주조직적합성 항원의 down regulation에 관여한다고 알려져 있다. 또 IL-8을 비롯한 염증성 물질들의 생성을 억제함으로써 항염증성 반응을 나타내며 조직의 치유과정에서 세포외간질(extracellular matrix)의 파괴와 재건축 과정에 관여하여 제1형 콜라겐 유전자의 down regulation, 콜라게나제, stromelysin의 up-regulation을 시키고, 엘라스틴 유전자를 발현하는 것으로 알려져 있다(6).

이런 기전을 배경으로 IL-10을 장기이식 후 면역억제 효과를 얻기 위해 실험적으로 사용해 오고 있는데 특히 쥐의 심장이식이나 폐이식 등에서 효과를 보고하고 있다(7,8). 실험동물의 IL-10을 체내에 주입하기 위해 저자들이 이용한 벡터는 아데노바이러스였는데 이는 복제결손(replication deficient)이 쉽고, 여러 가지 세포에 이입이 쉽고, 적어도 7.5 kb의 exogenous DNA가 포함될 수 있도록 하는 조작이 가능하고, 특히 인체사용시 아데노바이러스 감염으로 인한 종양발생의 빈도가 낮다는 이점이 있다. 따라서 아데노바이러스를 vector로 사용한 재조합 IL-10의 감염은 전신감염에 영향을 주지 않고 이식장기 또는 조직 내에 Th2 계통의 사이토카인인 IL-10의 비율을 높여서 거부반응을 억제시키고 결과적으로 생착에 도움을 줄 것으로 예상된다(2).

이와 같은 유전자 조작치료의 효과를 보기 위해 피부를 많이 이용하는데 이것은 비교적 쉽게 조직을 이용할 수 있고 또 조직의 획득이 쉬울 뿐 아니라 이식 등에 대한 결과를 눈으로도 확인할 수 있다는 장점을 갖고 있기 때문이다. 또한 유전자치료의 경우 피부에 이입된 유전자의 발현율이 높아야 목적하는 성적을 기대할 수 있는데 이 목적에 적합한 조직이 피부이기 때문이다. 피부에 유전자 조작물질을 어떻게 이입시키느냐에 대해 이미 많은 문헌보고가 있었다.

최근 피부에 대한 유전자치료는 여러 가지 벡터를 이용해서 체외에서 유전자를 자가세포에 주입하고, 이렇게 유전자 조작된 세포를 수혜자에게 이식해주

는 방법을 이용하고 있다. 재조합 아데노바이러스 벡터의 사용방법에 대해 Setoguchi 등(15)은 체외에서 표피 각화세포에 주입한 후 이식하기도 하고 체내에서 직접 사용하기도 하였다. 체내에 직접 사용할 경우는 체외주입보다 간편하고 덜 침습적이라는 장점이 있다. 즉 아데노바이러스 벡터를 직접 피하지방층에 주입할 경우 손쉽게 표피각화세포층(keratinocyte)과 섬유아세포, 평활근세포 등과 피부부속기관 등에 유전자를 이입시킬 수 있으나 단점으로는 유전자침투가 고르게 이루어지지 않는다는 점이다. 이것은 각각의 조직세포에 고르게 바이러스가 노출될 수 없고 또한 노출되더라도 바이러스에 대한 감수성이 각각 다르기 때문으로 생각된다. 지금까지 피부에 유전자를 주입하는 방법은 직접 피부부위에 주사하는 법(16,17), Jet 주사법(18), 입자충격법(19), 리포솜(liposome) 이용한 유전자 전달법(20), 미세주사침을 이용한 직류전원에 의한 진동을 이용하는 법(21), micro-seeding법(22) 등이 있는데 단순한 피하 주사나 국소 침투법을 사용할 때보다는 진동이나 충격에 의한 반복 주사에 의한 투여가 효과가 좋은 것으로 알려져 있다.

저자들이 이용한 재조합 IL-10은 복제결손형으로서 바이러스의 증식으로 인한 염증반응을 없애고 이식초기에 발생하는 초급성 거부반응에 대한 IL-10의 효과를 보기 위하여 이식조직에 국한하여 감염시켰다. 이런 관계로 Ad:IL-10의 혈중치를 측정할 ELISA 검사에서는 측정이 불가할 정도로 낮은 수치를 보여서 피부에 직접 감염시킨 Ad:IL-10이 전신에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러나 Ad:IL-10에 감염시킨 피부의 이식성적은 예상과는 달리 대조군에 비해 전혀 차이를 나타내지 않았다. 이는 IL-10의 감염된 용량자체가 면역효과를 내기에 충분치 않았거나 또는 너무 소량 감염되었거나, 아니면 IL-10을 투여했더라도 Th1, 2세포 평형에 변화를 가져오지 못해 면역억제효과가 충분치 않았다고 생각할 수 있다. 다른 가능성은 재조합 아데노바이러스의 자체적 항원성에 의해서 IL-10의 면역억제 효과가 제한되었을 수 있다. 실제 재조합 바이러스가 감염된 조직에서 염증이 악화되었고 면역세포의 침윤이 발견되었다.

이미 Xing 등(5), Boehler 등(8)은 기관지이식을 시행한 실험쥐에서 근육내에 주사한 복제결손 아데노바이러스 재조합 IL-10이 충분히 transgene mRNA를 발

현하고 주사 후 수일간 IL-10 단백을 혈중으로 배출한 것을 보고하면서 이식조직에서 멀리 떨어진 부위에 시행한 유전자감염 방법으로도 이식조직에 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. 그리고 유전자 발현의 정도가 복강내 주사보다는 근육내 주사를 시행시 투여후 일정기간 혈중농도를 유지함을 보여주었다. 따라서 저자들이 이식피부에 국한시켜 발현시키기로 시도한 Ad:IL-10의 효과가 이식 피부의 생착연장에 영향을 주지 못한 것이 전신 혈중농도 유지에 실패한 때문으로도 생각할 수 있다.

또 용량면에서도 일부 보고에서는 IL-10 투여 자체나 투여용량에 따라 전혀 반대의 결과를 보고하고 있다. 즉 Anderson등(23)이나 Huhn등(12)은 IL-10을 대량으로 투여시는 면역억제효과보다는 오히려 면역활성화 효과가 더 강력하게 나타난다는 보고가 있어서 IL-10의 투여시는 용량의 결정에 주의를 요한다고 보고했다. 그리고 Qian등(13)은 IL-10을 복강내 투여한 동종이식 쥐의 생존기간이 짧고, 거부반응의 빈도가 많은 것으로 보고하면서 이것이 IL-10의 T, B세포에 대한 자극효과 때문에 공여세포특이성 세포독성 T임파구의 활성화와 동종항체(alloAb)치의 증가가 일어나서 발생한다고 했다. 이들은 1998년 다시 anti-IL-10 antibody를 투여한 결과 동종이식한 쥐의 생존율이 증가됨을 보고하였고, 그 기전을 항 IL-10 항체가 동종항체반응을 감소시키기 때문으로 보고 있다. 또한 IL-10의 투여시기도 효과에 영향을 주는데 이는 짧은 반감기를 가진 사이토카인이 어떻게 병의 진행을 필요한 시기에 차단할 수 있는가와 관계가 있다. Boehler등(8)의 보고를 보면 IL-10을 폐 이식 직후에 사용한 군보다는 이식 후 5일째 시작한 군에서 기도 섬유성 폐쇄의 발생을 가장 효과적으로 억제하였다고 보고하였다.

대체로 동향성 이종 피부이식의 경우 특별한 처치를 하지 않았을 경우 이식 후 4~5일에 거부반응을 일으켜 괴사하는 것으로 알려져 있다. 그리고 저자들의 Ad:IL-10 감염 후 이식편에서 바이러스의 발현이 가장 많았던 시기가 이식 후 3일째인 것을 보면 IL-10에 의한 거부반응 억제효과를 보기에는 적절한 투여시기라고 생각된다. 그러나 감염 1일, 5일째의 바이러스 발현이 현저히 떨어지는 것으로 보아 만일 국소부위 바이러스 감염을 이식후 주기적으로 계속할 수 있다면 면역억제에 다른 결과를 초래할 수도

있지 않을까 생각할 수 있다. 그리고 면역반응이 전신반응인 것을 생각하면 이식조직에만 감염을 시킬 것이 아니고 Ad:IL-10을 전신 투여한다면 다른 결과를 기대할 수도 있을 것이다.

요 약

아데노바이러스를 vector로 한 재조합 IL-10 (Ad:ratIL-10)이 동향성 이종이식에서 거부반응 억제효과를 갖는지 알아보기 위해 ICR-mouse의 피부를 절제하여 Ad:ratIL-10에 감염시킨 후 Lewis rat에 이식하여 생착정도를 조사하였다. 감염된 바이러스의 발현은 10^9 pfu/mL 농도에서 60분 감염시 이식 3일째에 절정을 보였고, 이식 5일 및 7일째는 다시 소멸된 것을 알 수 있었다. 쥐의 IL-10을 배양세포주에 감염시켰을 때 발현정도는 감염 후 5일째에 275 ng/mL 정도였으나, 생체에서 감염시킨 피부를 이식한 후 측정된 혈중농도는 ELISA검사에서 이식 후 어느 날에도 측정되지 않을 정도로 소량이어서 국소감염된 Ad:ratIL-10의 전신 효과는 없음을 보여 주었다. Ad:ratIL-10 감염군의 피부생착기간은 6.0 ± 0.7 일로 대조군의 5.6 ± 0.6 일보다 약간 길었으나 통계적 유의성은 없었다 ($p > 0.05$).

REFERENCES

- 1) Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro R, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, Bushell A: The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol* 8: 688-693, 1996
- 2) Bromberg JS: IL-10 immunosuppression in transplantation. *Curr Opin Immunol* 7: 639-643, 1995
- 3) Choate KA, Khavari PA: Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther* 8: 1659-1665, 1997
- 4) Khavari PA, Krueger GG: Cutaneous gene therapy. *Dermatol Clin* 15: 27-35, 1997
- 5) Xing Z, Ohkawara Y, Jordana M, Graham FL, Gaudie J: Adenoviral vector-mediated interleukin-10 expression in vivo: intramuscular gene transfer inhibits cytokine responses in endotoxemia. *Gene Ther* 4: 140-149, 1997
- 6) Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J: Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J*

- Clin Invest 94: 2489-2492, 1994
- 7) Brauner R, Nonoyama M, Laks M, Drinkwater DC Jr, McCaffery S, Drake T, Berk AJ, Sen L, Wu L: Intracoronary adenovirus-mediated transfer of immunosuppressive cytokine genes prolongs allograft survival. J Thorac Cardiovasc Surg 114: 923-933, 1997
- 8) Boehler A, Chamberlain D, Xing Z, Slutsky AS, Jordana M, Gauldie J, Liu M, Keshavjee S: Adenovirus-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits post-transplant fibrous airway obliteration in an animal model of bronchiolitis obliterans. Hum Gene Ther 9: 541-551, 1998
- 9) Li W, Fu F, Lu L, Harula SK, Fung JJ, Thomson AW, Qian S: Systemic administration of anti-interleukin-10 antibody prolongs organ allograft survival in normal and presensitized recipients. Transplantation 66: 1587-1596, 1998
- 10) Sykes M, Sachs DH, Nienhuis AW, Pearson DA, Moulton AD, Bodine DM: Specific prolongation of skin graft survival following retroviral transduction of bone marrow with an allogeneic major histocompatibility complex gene. Transplantation 55: 197-202, 1993
- 11) Jensen UB, Jensen TG, Jensen PKA, Rygaard J, Hansen BS, Fogh J, Kolvraa S, Bolund L: Gene transfer into cultured human epidermis and its transplantation onto immunodeficient mice: an experimental model for somatic gene therapy. J Invest Dermatol 103: 391-394, 1994
- 12) Huhn RD, Radwanski E, O'Connell SM, Sturgill MG, Clarke L, Cody RP: Pharmacokinetics and immunomodulatory properties of intravenously administered recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers. Blood 87: 699, 1996
- 13) Qian S, Li W, Li Y, Fu F, Lu L, Fung JJ, Thomson AW: Systemic administration of cellular interleukin-10 can exacerbate cardiac allograft rejection in mice. Transplantation 62: 1709-1714, 1996
- 14) Qin L, Chavin KD, Ding Y, Favaro JP, Woodward JE, Lin J, Tahara H, Robbins P, Shaked A, Ho DY, Sapolsky RM, Lotze MT, Bromberg JS: Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Transplantation 59: 809-816, 1995
- 15) Setoguchi Y, Ari Jaffe H, Danel C, Crystal RG: Ex vivo and In vivo gene transfer to the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vectors. J Invest Dermatol 102: 415-421, 1994
- 16) Raz E, Carson DA, Parker SE: Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9519-9523, 1994
- 17) Hengge UR, Chan EF, Foster RA, Walker PS, Vogel JC: Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. Natur Genet 10: 161-166, 1995
- 18) Furth PA, Shamay A, Hemnighausen L: Gene transfer into mammalian cells by jet injection. Hybridoma 14: 149-152, 1995
- 19) Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC: Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. Proc Natl Acad Sci USA 88: 2276-2730, 1991
- 20) Li L, Hoffman RM: The feasibility of targeted selective gene therapy of the hair follicle. Natur Med 1: 705-706, 1995
- 21) Ciernik IF, Krayenbuhl BH, Carbone DP: Puncture-mediated gene transfer to the skin. Hum Gene Ther 7: 893-899, 1996
- 22) Eriksson E13. Raz E, Carson DA, Parker SE: Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9519-9523, 1994
- 23) Anderson BO, Moore EE, Banerjee A: Phospholipase A2 regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure. J Surg Res 56: 199, 1994