

재조합 Adeno-associated Virus 제작과 효율적 신조직 감염

계명대학교 의과대학 의학유전공학교실

최 순 연 · 박 종 구

Production of Recombinant Adeno-associated Virus and Gene Transfer to the Renal Tissue

Soon Youn Choi, Jong Gu Park, Ph.D.

Department of Medical Genetic Engineering,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Abstract : Recombinant viral vectors based on the nonpathogenic parvovirus, adeno-associated virus (AAV), have a number of attractive features for the purpose of gene therapy including the lack of cytotoxicity, the ability to transduce non-dividing cells and its long-term transgene expression. In this study, we studied if recombinant AAV (rAAV-LacZ and rAAV-hIL10) vectors could efficiently transduce cells both *in vivo* and *in vitro*. We initially examined AAV-mediated gene transfer in HeLaRC32 cells *in vitro*. Expression of transgenes in rAAV was evaluated by RT-PCR (rAAV-hIL10) and X-gal staining. We then studied if rAAV was effective in transducing renal tissue by direct injection of rAAV harboring the β -galactosidase gene (1×10^{10} physical particles/injected kidney) into the left kidney of mice. To assess gene transfer, the transduced renal tissue of mice was stained with X-gal. Based on visual assessment of X-gal staining, The expression of the β -galactosidase gene was mainly localized in tubular epithelial cells and Bowman's capsular epithelial cells. The expression of the β -galactosidase gene in the renal tissue was detected for more than one month after the transduction of rAAV. These results suggest that rAAV vectors can be effective for transgene expression in the renal tissue.

Key Words : Adeno-associated virus, IL-10, Renal tissue

서 론

오늘날 전세계적으로 심장 질환, 뇌졸중에 의한 사

망률은 지난 15년 동안 감소되고 있는 반면, 말기 신 질환을 가진 환자는 매년 73,000명씩 급속도로 증가 되는 실정이다[1]. 이는 질병의 진행을 막기 위한 효

과적인 방법이 없기 때문이다. 신질환 치료와 예방을 위하여 기대되는 방법 중의 하나가 유전자 치료이며, 근본적인 수준에서 질병 치료의 잠재력을 가진다. 그러나, 근년에 시도되었던 대부분의 유전자 치료 방법은 괄목할만한 효과를 나타내지 못했다[2]. 실패의 주요 원인은 형질도입 후에 유전자의 발현 정지, 원하는 부위로의 유전자 도입의 어려움 등 벡터 자체와 기술상의 문제에 기인한다[3].

신질환은 신장의 해부학적, 구조학적 차원에서 질병이 발생하는 부위와 원인인자 등에 의하여 다양한 이름으로 명명되어지나, 비슷한 병리적 특성을 가지고 있다[4]. 근년에 들어 신조직 손상의 원인인자로 transforming growth factor-beta (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-6 (IL-6) 그리고 platelet derived growth factor (PDGF) 등과 같은 화학적 매개인자가 제시되고 있다[5]. 예를 들면, proliferative/crescentic 형태의 신질환의 경우 Th1 (T helper 1)에서 생성되는 사이토카인이 사구체의 손상부위로 단핵구를 유입시켜 활성화된 대식세포로의 형질전환을 촉진하며, 여기에서 생성된 TNF- α , interleukin-1 (IL-1)은 연쇄적 염증 반응을 유발한다[6]. 신질환에 대한 유전자 치료는 이러한 매개체(염증매개체, 사이토카인, 성장인자)의 작용을 방해하는 방법으로 진행되고 있다. 본 실험에서는, Th1와 Th2 (T helper 2)에서 생성되는 사이토카인의 생성을 조절하는데 증추적인 역할을 하는 interleukin-10 (IL-10)을 신질환 치료의 연구에 이용하고자 생산하였다. IL-10은 주로 CD4+세포, Th2 세포, 단핵구, B 세포에서 생성되며, interferon-gamma (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), TNF- α 의 작용을 방해하여 신손상부위로 T 세포와 단핵구의 유입을 감소시킴으로서 항염증 효과를 나타낸다[7,8]. 즉, IL-10은 IL-2, IFN- γ 등을 생산하는 Th1 사이토카인의 잠재적인 억제자인 동시에 Th2 사이토카인의 활성인자이다.

신질환 치료를 위한 특정 유전자 도입기술은 형질도입을 원하는 세포나 조직에 최소한의 독성을 가진 반면, 장기간에 걸친 유전자 발현이 가능해야 한다. 따라서, 질병에 효과를 나타내는 외부유전자를 신장의 원하는 부위로 운반하기 위해 바이러스성·비 바이러스

성 벡터 등이 이용되었다. 그러나 기존에 사용되었던 유전자 치료의 벡터 기술은 임상학적 응용을 막는 몇 가지의 장애요소가 있었다. 예를 들면, 세포의 비효율적인 형질도입, 운반된 유전자나 벡터에 의해 생성되는 강한 면역반응, 원하는 세포로만의 특이적인 운반 능력 결핍, 유전자의 무작위적인 삽입에 의한 돌연변이 발생의 두려움 등이다. 결국, 오늘날의 많은 연구들은 치료 유전자의 운반을 위한 벡터의 개발과 조직 특이적인 발현에 중점을 두고 있다.

본 실험에서 사용한 재조합 adeno-associated virus (AAV) type 2는 기존에 사용된 바이러스 벡터로서 단점을 일부 개선한 것이다. AAV는 cis로 작용하는 inverted terminal repeats (ITRs) 사이에 치료 유전자 외의 다른 구조 유전자를 가지고 있지 않으므로 불필요한 단백질의 생성을 막아 면역반응이 거의 유발되지 않는다. AAV는 세포 분열의 유·무와 상관없이 형질을 도입할 수 있으므로, 세포가 완전히 분화된 신조직으로의 도입이 효과적일 것이라 기대된다[9,10]. 또한 인간에게 질병을 야기 시키지 않는 비병원성으로 알려져 있다.

본 실험에서는 3종류의 벡터를 세포내로 형질 도입하여 재조합 AAV의 생성과 신조직에서의 유전자 발현을 확인함으로써 재조합 AAV를 이용한 신질환 치료의 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재조합 AAV 생산에 사용된 플라스미드

AAV transgene 플라스미드인 ACP-LacZ [11] 혹은 ACP-hIL10은 β -galactosidase 혹은 IL-10 유전자를 가지고 있으며, 유전자 양쪽에 145 bp ITRs를 가진다. pXX2 [10]은 AAV 보조 플라스미드로서 야생형 AAV에서 ITRs 부분만 제외한 rep와 cap 유전자를 가지고 있다. pXX6 [10]은 단지 adenovirus의 major late promoter와 adenovirus terminal protein gene을 제외한 E1a, E1b, E2a, E4, VA 유전자만 가지고 있다. 이들 플라스미드는 SURE *Escherichia coli* (Stratagene, 미국)에서 증폭하였

으며, Mega DNA purification kit (QIAGEN, USA)을 사용하여 플라스미드를 대량으로 정제하였다.

2. 세포배양과 아데노바이러스

293, 293sz 세포주는 인간의 배아 신세포에서 유래되어졌고, HeLaRC32 세포는 AAV의 Rep/Cap 유전자를 발현하는 유방암 세포주이다. 이들 293, 293sz, HeLaRC32 세포주는 55 °C, 30분간 열처리한 fetal bovine serum (FBS, HyClone사, USA)과 penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL; Gibco-BRL, 미국)이 포함된 minimum essential medium (MEM, JBI, 한국)에서 배양하였다. 아데노바이러스는 293 세포주에서 증폭시켜 사용하였다.

3. 재조합 Adeno-associated Virus 생산

재조합 AAV (rAAV-LacZ, rAAV-hIL10)는 293sz 세포주에 앞에서 언급된 세 종류의 벡터, ACP-LacZ (ACP-hIL10), pXX2, pXX6를 triple-cotransfection하여 만들었다. 형질 도입하기 24시간 전, 293sz 세포주는 10 cm 세포 배양접시에 대략 70-80% 되게 심었다. 각 벡터는 1:1:1 동일 molar ratio로 2.5 M CaCl₂와 섞은 다음, 2 × HEPES buffer와 15분-20분 반응시킨 후 반응물을 세포에 넣었다. 6시간 후 세포는 배지를 교체하여 72시간 연장 배양시킨 후 모았다. 수집한 세포 현탁액은 세포파쇄 후 원심분리를 통하여 일부 세포 파편을 제거시켰다. 상층액은 새로운 튜브에 옮겨 2번의 ammonium sulfate precipitation {(NH₄)₂SO₄, Sigma, 미국} 방법을 사용하여 바이러스를 침전시켰다[12]. 침전된 바이러스는 1.37 g/mL CsCl 용액으로 분산시켜, 1.5 g/mL CsCl 용액 위에 바이러스 시료를 얹은 후, SW-41 roter (Beckman, 미국)에서 15 °C 288,000 x g (41,000 rpm)로 48시간 동안 원심분리 하였다. 분리된 바이러스층은 농축 후 10% glycerol (USB, 미국)을 포함하는 1 x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.1) 용액에서 24시간 투석한 후 적당량으로 나누어 -70 °C에 보

관하였다.

성 적

1. 재조합 바이러스의 입자수 결정

재조합 바이러스의 농도는 유전자의 발현 정도와 기간에 중요한 영향을 미치므로 높은 농도의 재조합 AAV를 확보하는 것은 외부 유전자의 효과적 도입에 중요한 요인이 된다. 따라서 본 연구에서는 생산된 재조합 AAV의 농도를 우선적으로 결정하고자 하였다. Slot blot hybridization을 통한 재조합 바이러스 (rAAV-LacZ, rAAV-hIL10)의 입자수 계산은 실험과 방법에서 제시한 바를 따랐다. 제작된 재조합 AAV 바이러스 농도는 바이러스 지놈 DNA의 점 밀도 차를 이용하여 확인하였다(Fig. 1). 먼저 기존에 농도를 알고 있는 플라스미드 조각의 점 밀도 차를 slot blotting 자료를 바탕으로 기준 그래프를 그렸다. 재조합 바이러스 시료의 점 밀도에 해당하는 지점을 기준 그래프에서 확인하여 아보가드로수의 법칙에 따라 바이러스의 농도를 계산하였다. 그 결과 양쪽 시료 모두 1×10^{12} particles/mL를 얻었다(Fig. 2). 생산된 바이러스의 농도는 적정수준이 되었으므로 본 연구에 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

2. 재조합 AAV-hIL10의 세포 내 발현과 바이러스 유전자의 확인

생산된 재조합 AAV-hIL10이 정확한 벡터 구조를 지녔는지를 확인하기 위해 RT-PCR과 PCR을 실시하였다. 본 실험에 사용한 RNA는 재조합 AAV가 감염된 HeLaRC32 세포에서 분리하여 사용하였으며 재조합 바이러스 DNA는 제작된 바이러스 particles에서 분리 정제하였다. RT-PCR과 PCR의 두 실험에는 동일한 한쌍의 primers를 사용하여 반응을 실시하였다. 증폭결과 535 bp DNA 단편이 플라스미드와 RNA의 증폭에서 공통적으로 관찰되었다. 이러한 결과는 재조합 바이러스가 감염된 세포에서 인체형 IL-10의 전사체가 생산되는 것을 나타내며 결과적으로 재조합 바이

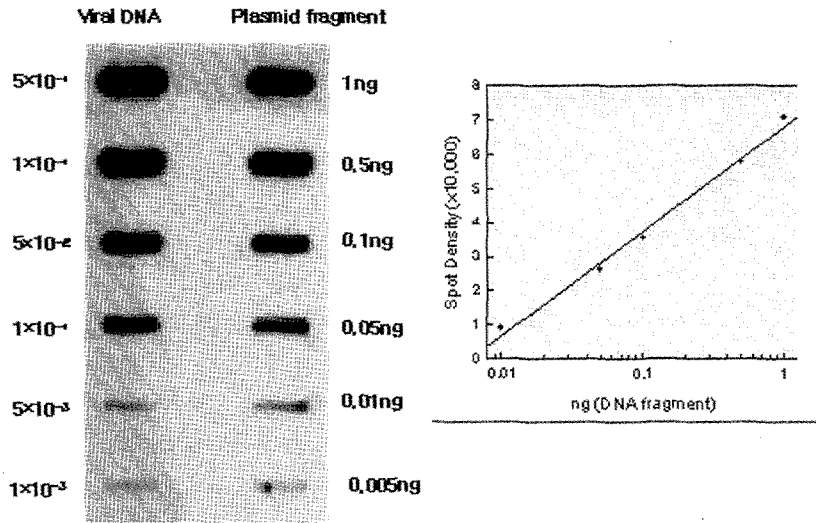


Fig. 1. Physical titration using slot blot hybridization of recombinant AAV. Titers were determined by the comparison of the densitometric signal strengths of the recombinant AAV of unknown titers to those of serially diluted standard plasmid.

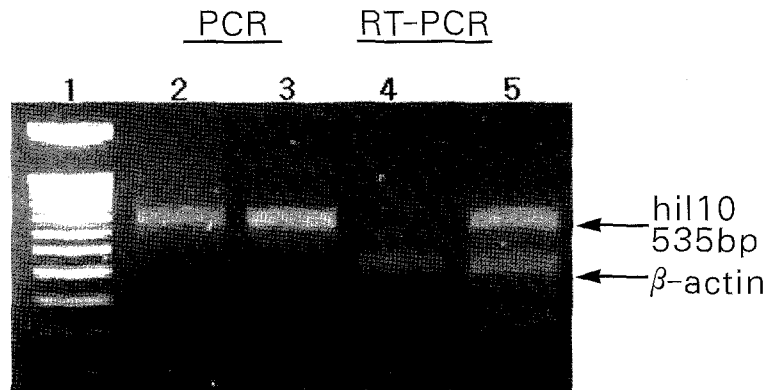


Fig. 2. PCR and RT-PCR to confirm recombinant AAV-hIL10. HeLaRC32 cells were cotransduced with recombinant AAV-hIL10 and wild type adenoviruses (25 moi). Total RNA were extracted 24 hr after the cotransduction. Viral DNA was obtained as described in Materials and Methods. Each product was subjected to either RT-PCR or PCR. Lane 1: 100 bp ladder marker; lane 2: ACP-hIL10 plasmid; lane 3: rAAV-hIL10 viral DNA; lane 4: HeLaRC32 without transduction; lane 5: HeLaRC32 with rAAV-hIL10 transduction.

리스가 성공적으로 세포에 감염함을 나타내었다. 대조군 실험으로 ACP-hIL10 transgene 플라스미드를 transfection한 세포에서는 역시 동일한 크기의 증폭

된 DNA 단편을 관찰하였다. 반면에 형질도입이 되지 않은 세포주에서는 증폭된 DNA를 관찰할 수 없었다.

3. 재조합 AAV-LacZ을 통한 신조직으로의 형질도입

상기한 것처럼 *in vitro* 실험에서 재조합 AAV의 유전자 발현 능력과 정제된 정도를 확인하였다. 다음으로 제작된 재조합 AAV-LacZ가 과연 신조직에 감염하여 외부에서 주입된 유전자를 효과적으로 발현하는지를 조사하였다. 신조직에 1×10^{10} 개의 바이러스 입자를 주입한 다음, β -galactosidase 단백질의 발현

기간과 감염 형태를 확인하였다. 먼저 시각적으로 단백질의 발현 정도를 보기 위해 X-gal 용액으로 염색된 신장을 관찰하였다. 그 결과 신조직으로 바이러스를 주입한 3일 후 X-gal 용액으로 염색한 신장은 진한 푸른색으로 나타났고, 시간이 경과함에 따라 푸른색은 점점 옅어지다 4주 쯤 아주 약해졌다(Fig. 3). 해부학적 측면에서, 신조직은 주로 보우만 주머니의 상피세포와 세뇨관 상피세포에서 β -galactosidase가 발현됨을 확인하였다(자료 생략).

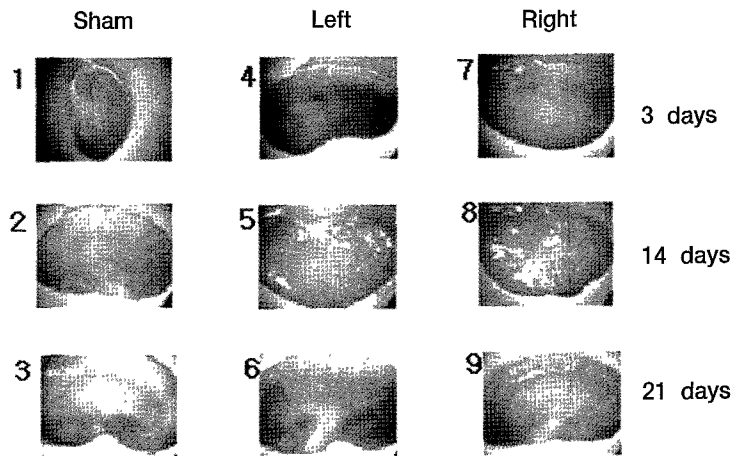


Fig. 3. The duration of β -galactosidase expression after *in vivo* gene transfer. Viral particles of recombinant AAV-LacZ (1×10^{10}) were injected into the renal parenchymal tissue of ICR mice. Mice were then sacrificed from day one to two months. β -Galactosidase expression was evaluated by X-gal staining. Photographs of the X-gal stained tissue were taken using a digital camera. Panels 1-3: sham; panels 4-6: recombinant AAV-LacZ transduction; panels 7-9: contralateral kidney.

고 찰

본 실험에서는 신질환 치료의 연구를 위해 IL-10을 가진 재조합 AAV와 대조군으로 β -galactosidase 유전자를 가진 벡터를 생산하였다. 재조합 AAV-LacZ는 8주령된 ICR 생쥐의 왼쪽 신장에 주입한 후, 절취한 신장을 X-gal 용액으로 염색하여 외형적, 해부학적 β -galactosidase의 발현의 조사에 사용하였다. 실험의 결과, 사구체, 혈관구조, 간질부분에서는 단백질의 발

현을 관찰할 수 없었으며, 단지 세뇨관과 보우만 주머니의 상피세포에서만 확인이 가능하였다. 이것은 잘 분화된 신우와 사구체 기저막과 같은 해부학적 요소 등에 의해 신장으로 유전자 도입 시 각 부분의 구조학적 차이에 기인할 것으로 추정한다. 그리고 재조합 바이러스의 유전자 발현은 적어도 1달 정도 지속되었는데, 이것은 비교적 높은 수준의 형질 도입이 가능한 재조합 아데노바이러스 벡터가 조직에 주입한 후 2주 이내에만 유전자 발현이 관찰된 점을 감안하면 상당히

항상된 수준이다(다른 곳에 보고될 예정임). 또한 재조합 아데노바이러스의 주입은 형질 도입된 세포에 대한 림프구 침윤 등에 따른 사이토카인의 분비를 야기시킨다고 보고되고 있다[13]. 그러나 재조합 AAV는 ITRs를 제외한 불필요한 단백질을 가지고 있지 않아 세포성 면역반응이 거의 유발되지 않고, 형질도입의 유·무와 상관없이 건강한 세포형태를 유지하였다.

유전자 운반의 효율은 재조합 AAV 벡터의 양에 매우 의존한다. 예를 들면, 사용된 바이러스 양에 대한 감염성 입자수가 2×10^6 로 현저하게 역시 이하로 존재할 경우, 조직으로 유전자 발현 능력은 거의 상실된다. 또한, 세포의 형태에 따라 약간의 차이는 있으나, 재조합 AAV 한개 세포에 형질도입하기 위해서 10^6 개 이상의 바이러스 입자가 필요하다[14]. 따라서, 재조합 AAV를 이용한 *in vivo* 실험을 하고자 할 때 높은 입자수의 바이러스가 요구된다. 많은 연구자들은 바이러스 입자수를 증가시키기 위해 여러 가지 방법들을 시도하였다. 주로 유전자 도입 후, 형질 도입된 세포주의 회수 시간, 적절한 보조 플라스미드의 양(XX6), 유전자 도입 방법 등의 인자들이 고려되었다. 본 연구에서는 상기한 여러 조건들을 감안하여 재조합 AAV를 생산하였으며 보고된 수준의 바이러스 생산을 관찰하였다. 다른 방법으로는 재조합 AAV를 통한 형질 도입시 발현을 향상시키기 위해서 아데노바이러스 E4ORF6 유전자를 이용하기도 한다[15,16]. 이러한, 바이러스의 생산 방법들이 보다 안정화, 실용화된다면 고품질의 재조합 AAV의 생산을 기대할 수 있을 것이다. 본 실험에서 실행된 β -galactosidase 유전자를 가진 재조합 AAV를 통한 신조직으로의 형질도입 결과, AAV는 효과적인 유전자 운반 매개체로 확인되었다. 따라서, 항염증 효과를 나타내는 사이토카인 IL-10을 가진 재조합 AAV는 다음에 진행될 신질환 치료에 효과적일 것이라 기대된다.

요 약

본 실험에서는 신질환 질병모델의 *in vivo* 실험을 위해서 IL-10과 대조군으로 LacZ 유전자를 가진 재조합 AAV를 생산하였다. 또한, 신조직에서 유전자 운

반 매개체로서의 재조합 AAV의 타당성을 확인하였다. 생산된 재조합 바이러스는, *in vitro*상에서 바이러스의 감염성과 유전자 발현 능력을 평가하였다. *In vitro* 실험에서 평가된 재조합 바이러스는 *in vivo* 실험에 사용되었다. 재조합 AAV를 8 주령 된 ICR 생쥐 왼쪽 신장의 실질조직으로 직접 주입한 후, 마취사 시켜 절취한 신장을 X-gal 용액으로 염색하였다. 그 결과, 신장은 β -galactosidase 유전자 발현을 일개월간 관찰할 수 있었다. 또한, 광학현미경상에서 해부학적으로 조직의 염색된 부위를 관찰한 결과는 다음과 같았다. 주로 β -galactosidase 유전자로 형질 도입된 신조직은 세뇨관 상피세포와 보우만 주머니의 상피세포 주위에 편중되어 나타났으나, 사구체, 모세혈관, 간질에서 단백질의 발현은 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 재조합 AAV가 신조직의 유전자 도입 매개체로서 이용 가능하며, 사이토카인 IL-10을 이용한 신질환 치료에 효과적일 것이라 기대된다.

참 고 문 헌

1. Imai E, Isaka Y: Strategies of gene transfer to the kidney. *Kidney Int* 1998; **53**: 264-72.
2. Imai E: Gene therapy approach in renal disease in the 21st century. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**(Suppl 5): 26-34.
3. Benign A, Tomason S, Lutz J, Amuchastegui S, Capogrossi MC, Remuzzi J: Nonviral and viral gene transfer to the kidney in the context of transplantation. *Nephron* 2000; **85**: 307-16.
4. Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, Veno S, Ikeda M, Minota S, et al.: Gene transfer into rat renal cells using adeno-associated virus Vectors. *Am J Nephrol* 2000; **20**: 242-7.
5. Langer JC, Klotman ME, Hanss B, Tulchin N, Rrנגgeman LA, Klotman PE, et al.: Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential *in vivo* gene delivery. *Exp Nephrol* 1998; **6**: 189-94.
6. Meguid A, Nahas EL: Growth factors and glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1992; **40**(Suppl 36): S15-20.

7. Burdin N, Rousset F, Banchereau J: B-cell-derived IL-10: production and function. *Enzymol* 1997; **11**: 98-111.
8. Yamano S, Scott DE, Huang LY, Mikolajc Zyk M, Pillemer SR, Chiorini JA, *et al.*: Protection from experimental endotoxemia by a recombinant adeno-associated virus encoding interleukin-10. *J Gene Med* 2001; **3**: 450-7.
9. Klotman ME: Adeno-associated viral vectors: background and technical aspects. *Exp Nephrol* 1997; **5**: 514-20
10. Xiao X, Li J, Samulski RJ: Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; **72**: 2224-32.
11. Maeda Y, Ikeda U, Ogasawara Y, Vrebe M, Takizawa T, Saito T, *et al.*: Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 514-21.
12. Hermens Win TJMC, Brake OT, Dijkhuizen PA, Sonnemans Marc AF, Grimm D, Kleinschmidt, *et al.*: Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nerve system. *Human Gene Therapy* 1999; **10**: 1885-91.
13. Minter RM, Ferry MA, Rectenwald JE, Bahjat FR, Oberholzer A, Oerholzer C, *et al.*: Extended lung expression and increased tissue localization of viral IL-10 with adenoviral gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 277-82
14. Malik P, McQuiston SA, Yu X, Pepper KA, Krall WJ, Podsakoff GM, *et al.*: Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J Virol* 1997; **71**: 1776-83.
15. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ: Second-strand synthesis is a rate limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996; **70**: 3227-34.
16. Fisher KJ, Gao G, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM: Transduction with recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy is limited by leading strand synthesis. *J Virol* 1996; **70**: 520-32.