

아데노바이러스 유전자치료벡터의 생식독성 연구

이규식* · 곽승준 · 김순선 · 이이다 · 석지현 · 채수영 · 정수연 · 김승희 · 이승훈² · 박귀례¹

국립독성연구원 생식독성팀 · ¹면역독성팀, ²용인대학교 생명과학과

유전자치료벡터의 주입시 생식세포를 통한 다음 세대로의 전달 가능성은 안전성 측면에서 관심을 증대시키고 있다. 특히 전립선암이나 난소암의 치료시 바이러스를 생식기관에 인접한 부위에 주입하여야 하므로 그 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 유전자치료를 많이 이용되는 아데노바이러스를 매개로 하여 tumor suppressor 유전자인 p53을 발현하는 아데노바이러스 벡터를 제조하여 이를 투여시 생식장기를 포함한 주요 장기조직에의 분포와 germ cell을 통한 차세대로의 전달 가능성 등의 생식독성을 조사하였다. *In vivo biodistribution study*를 위하여 Ad-CMV- β -gal 혹은 Ad-CMV-p53를 마우스 암·수의 복강에 주사한 후 생식장기를 포함한 주요 장기에서 아데노바이러스 유래 DNA 검출 및 RNA 발현 여부를 PCR과 RT-PCR로 각각 확인하였다. 그 결과 간 및 비장과 같은 일반 장기에서도 주입한 외부유전자의 DNA가 검출되거나 RNA가 발현되었을 뿐만 아니라, 정낭, 전립선, 부고환, 난소 및 자궁 등의 생식장기에서도 주입한 외부유전자가 검출되거나 발현되는 것으로 나타났다. Real-time PCR을 이용하여 각 장기에서의 투여된 아데노바이러스 벡터는 시간 의존적으로 감소되는 것을 정량하였다. Ad-CMV-p53를 암·수 마우스의 난소와 고환에 각각 직접 주사하여 교배시킨 후 그 후세대의 DNA를 분리하여 주입한 아데노바이러스 유래의 DNA를 검색한 결과, 어떠한 차세대에서도 주입한 아데노바이러스 유래의 DNA가 검출되지 않았다. 한편 생식장기에서의 PCR 및 RT-PCR signal 유래 vector의 위치를 확인하기 위해 매우 감도가 높은 *in-situ* PCR로 조사한 결과 고환의 경우 간질조직으로의 전달은 일어나나 정세관 내에는 아데노바이러스 벡터가 전달되지 않으며, 난소에서도 아데노바이러스 벡터는 난포 내의 난자에 전달되지 않고 기질조직에 존재하는 것으로 확인되었다. 결론적으로 복제 능력이 결여된 아데노바이러스를 매개로 한 유전자치료제는 생식 장기에서 검출되더라도 다음 세대로 전달될 가능성은 대단히 낮음을 제시한다.

Key words □ adenoviral vector, germ-line transmission, reproductive toxicity

유전자치료 분야는 Human Genome Project로 인해 얻어진 인간유전자의 방대한 정보를 기초로 새로운 유전자를 환자의 세포 내로 주입시켜 유전자 결함을 교정하여 유전적 질병을 예방하거나 치료하는 수준을 넘어 AIDS, 암, 감염성 및 퇴행성질환의 치료 분야까지 질적·양적으로 괄목할 만한 주목을 받고 있다. 그러나 1999년 미국 펜실베이니아 대학에서 OTC (ornithine transcarbamylase) 결핍환자에 대한 임상시험 도중 환자가 사망하고, associated adenovirus vector (AAV)를 이용한 hemophilia B 치료에서 vector로부터의 DNA가 지원자의 seminal fluid에 10주 동안 감지되어 벡터가 정자 안으로 삽입될 수 있다는 사실도 보고되었다(8). 더 나아가 프랑스의 SCID (Severe combined immunodeficiency disorder) 환자에 레트로바이러스를 매개로 한 유전자 치료에서 oncogene의 유발로 추정되는 leukemia의 발병 사례 이후로 유전자치료제에 대한 안전성 문제가 더욱 크게 대두되고 있다(11).

유전자치료에 대한 생식·발생독성의 문제는 인체에 도입된 외부유전자가 순환과정을 통하여 생식세포나 모체를 통해 태아에게 전달되어 유해한 영향을 미칠 가능성이 높으므로 유전자치료

제의 안전성에 대하여 논의될 때 가장 중요하게 다루어져야 하는 문제임에도 불구하고, 국내·외적으로 벡터의 germ-line transmission 가능성에 대한 안전성정보는 미비한 실정이다(2, 4, 10, 15, 18, 19, 20). 특히, 난소 및 전립선과 같이 생식기관에 유발된 암의 치료를 위해서 직접 장기에 바이러스를 주입하는 경우 주입된 바이러스가 germ cell로 전달될 가능성은 피할 수 없기 때문에 부작용을 일으킬 위험성에 대해 많은 논의가 이루어지고 있다(1, 5, 6, 7, 12, 13). 현재 대부분의 국가에서는 생식 세포 안에 의도적으로 유전자를 전달하는 것은 비윤리적인 것으로 간주하고 있고 직접 germ cell이나 배자로의 유전자치료 시도 (utero gene therapy)는 비의도적인 변화가 신생아에게 영향을 미칠 수 있기 때문에 somatic cell만을 이용한 유전자치료제가 임상적으로 허가되고 있다(16, 17). 그러나 태아에서의 높은 세포분열, 체세포보다 쉽게 면역에 피할 수 있다는 장점이 있으며 향후 20년 이내에 germ-line gene therapy가 환영을 받을 수 있기 때문에 다양한 유전자치료제의 안전성 평가 기준이 요구되고 있다(3).

따라서 본 연구에서는 유전자치료를 많이 이용되는 복제능력이 결여된 아데노바이러스를 매개로 하여 tumor suppressor 유전자인 p53을 삽입한 아데노바이러스 벡터를 제조하여 이를 투여시 생식장기를 포함한 주요 장기조직에서의 분포, 지속성, 삽입

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-380-1789, Fax: 82-2-352-9446
E-mail: gsrhee@kfda.go.kr

외부유전자 변화량(clearance) 및 germ cell 등을 통한 차세대로의 전달 가능성 등에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

6주령의 Balb/c 암·수 마우스를 바이오제노믹스에서 공급받아 식품의약품안전청 동물사육시설 내에서 일정 기간 동안 순화시켜 실험에 사용하였으며, 온도 23±3°C, 습도 55±5%, 12시간 명암주기의 사육조건을 유지하였다.

세포배양

Human embryonic kidney cell line인 293 cell은 10% fetal bovine serum을 포함하는 DMEM media를 이용하여 CO₂ 배양기에서 배양하여 바이러스를 증식시키는데 사용하였다.

p53 및 β-gal 유전자 발현 벡터의 제조 및 아데노바이러스 생산

1.8 kbp의 human p53 cDNA를 pShuttle-CMVpA의 multiple cloning region의 BglII site에 삽입시켜 pShuttle-CMV-p53을 만들었다. pShuttle-CMV-p53 (혹은 pShuttle-CMV-β-gal)와 아데노바이러스 벡터 pJM17을 바이러스 생산 세포주인 293 cell에 calcium phosphate method로 co-transfection시켜 plaques이 형성되면 그 배지를 1×10⁷-1×10¹³까지 단계별로 희석하여 293 cell이 배양중인 96 well plate에 각각 1 μl씩 감염시켰다. Replication-competent adenovirus (RCA)가 없는 바이러스를 선택하기 위하여 single plaque가 형성된 well의 배지에 대하여 RCA assay (replication-competent adenovirus assay)를 실시한 후 선택된 well의 배지를 150 mm culture dish에 배양중인 293 cell에 감염시켜 아데노바이러스를 증식하여 Ad-CMV-p53과 Ad-CMV-β-gal을 생산하였다. 최종적으로 CsCl density gradient ultracentrifugation을 통해 농축 후 dialysis하여 바이러스를 정제하고 20% glycerol을 첨가하여 -70°C에 보관하였다. PCR방법으로 replication-competent adenovirus (RCA) assay를 실시하여 RCA-negative clone을 재확인하였다.

바이러스 주입 및 장기별 DNA, RNA 분리

아데노바이러스(Ad-CMV-β-gal 혹은 Ad-CMV-p53)를 암·수 Balb/c 마우스에 마리당 1×10⁹ PFU의 농도로 복강 내에 주사한 후 1, 4, 7, 15, 30 및 60일째에 부검하여 생식장기를 포함한 주요 장기를 적출하여 DNeasy tissue kit (Qiagen, USA)을 이용하여 DNA를 분리하였으며, RNeasy mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다.

PCR analysis

조직에서 추출한 100 ng의 genomic DNA와 0.2 μM의 각각의 primer를 포함하는 PCR mixture를 만들었으며, 반응 조건은 95°C에서 15분간 방치하여 최초의 heat activation을 일으킨 후,

94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1회로 하여, 35회 증폭시킨 후 반응 산물을 확인하기 위하여 2% agarose gel에서 전기영동 후 Uvipro (Uvutec, Cambridge, UK)를 이용하여 결과를 분석하였다. 외부유전자로 삽입한 p53 및 β-gal을 확인하기 위해 primer sequence는 각각 5'-ATGCTGTCCCCGGACGAT-3' (forward)와 5'-GATGGG CCTCCGGTTCAT-3' (reverse), 5'-CTGCACCATTCGCGTTACG-3 (forward)와 5'-GGAAGGCCAGACGCGAAT-3' (reverse)를, 외부유전자가 삽입된 부위 밖의 아데노바이러스 벡터를 확인하기 위해 5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3' (forward), 5'-CATCTGAAC-TCAAAAGCGTGG-3' (reverse)를 사용하였다. 한편 RCA assay에 사용한 β-gal primer는 5'-CTGTATGAACGGTCTGGTCT-3' (forward)와 5'-AGTCCGAAAGTGCTA-3' (reverse)이고, RCA assay의 E1a primer로는 5'-AGCTGATCGAAGAGGTACTG-3' (forward)와 5'-GAGTCACAGCTATCCGTAC-3' (reverse)를 사용하였다.

Real-time PCR analysis

Ad-p53 및 Ad-β-gal을 투여 후 각 장기에 잔류하는 바이러스의 양을 조사하기 위한 primer와 probe는 Applied Biosystems (Foster city, CA, USA)에서 구입하였다. PCR 반응은 p53 및 β-gal의 경우 20 μl 용액에 20× p53 or β-gal primer/probe 1.0 μl, 2× Taq Man universal master mix 10 μl, 900 nM primer, 240 nM probe, 0.6 μM template를 혼합하여 반응시켰다. Probe는 5' end에 형광 reporter dye인 FAM(6-carboxyfluorescein), 3' end에 quencher dye인 nonfluorescein을 사용하였다. 반응 조건은 50°C에서 2분간 UNG (Urasil-N-Glycosylase)를 활성화시키고 95°C에서 10분간 방치하여 최초의 Taq activation 및 UNG을 deactivation한 후, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing을 1회로 하여 40회 증폭시켰다.

각 장기에 시간대 별로 잔류하는 Ad-CMV-p53의 양은 정제한 제조한 아데노바이러스로부터 p53이 함유된 genomic DNA을 분리하여 표준곡선을 만들어 절대정량 방법으로 측정하였다. 마우스의 diploid genome size는 약 50억 bp (약 62.5 ng)이고, 이것을 마우스의 diploid당 약 36,000 bp인 Ad-CMV-p53(약 36,000 bp)의 1 copy가 약 0.448 pg에 해당되는 것을 기준으로 정하였다. 아데노바이러스를 투여하지 않은 마우스의 비장으로 분리한 genomic DNA를 diluent로 사용하여 각 100부터 0.0001 copy number (serial 10 dilution) solution을 준비하고 exponential하게 PCR plot이 시작되는 cycle number (Ct)를 기준으로 한 표준곡선을 작성하였다.

In-situ PCR analysis

4.0 μm 두께의 조직을 *in situ* PCR glass (Fisher Scientific, USA)에 부착 후 xylene에 15분간 wax를 제거하고, mounted된 조직은 37°C에서 15분간 proteinase K (250 μg/ml)로 분해하였다. 조직에 남아 있는 용액은 일련의 알코올로 탈수하였다. 50 μl PCR 반응 용액은 10× PCR buffer, 4.0 mM MgCl₂, 10 Unit

Taq Polymerase, 200 μ M dATP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dCTP, 160 μ M dTTP, 40 μ M Digoxigenin-11-dUTP, 2% bovine serum albumin, p53의 sense and antisense primer (0.6 μ M)를 혼합한 후 slide cover slip으로 덮고 *in situ* 전용 PCR system (MJ Research, Watertown, MA, USA)에서 95°C에서 10분간 방치하고 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 20회 증폭시켰다.

Digoxigenin이 표지된 증폭 PCR 산물은 alkaline phosphate anti-digoxigenin (1:200)으로 37°C에서 2시간 반응시키고 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indophosphatase (NBT/BCIP, Boeringer Mannheim, Germany)로 발색시켜 확인하였다. 음성대조로 Taq polymerase 또는 probe가 결여된 것을 사용하였다.

Germ-line transmission study

Germ-line transmission study를 위해서 Balb/c 암·수 마우스를 마리당 1×10^9 PFU의 농도로 각각 5마리의 마우스 등쪽 및 복강 부위를 절개하여 ovary 및 rete testis내에 직접 주사한 후 다시 봉합한 후 암컷은 21일째, 수컷은 25일째 되는 날 교배시켜 다음날 아침 질전(vaginal plug)이 확인된 암컷을 임신 0일로 하였다. 임신 12일째에 마우스의 자궁을 적출하여 멸균한 PBS가 담긴 petri dish에 옮긴 후, 배자를 꺼내어 eppendorf tube에 담아 homogenization 시킨 후, DNeasy tissue kit (Qiagen, USA)을 이용하여 DNA를 분리하였다.

결 과

p53 및 LacZ 유전자 발현 벡터의 제조 및 아데노바이러스 생산

암세포에 대한 성장 억제 효과가 있는 것으로 알려진 p53을 발현하는 아데노바이러스를 만들기 위하여 pShuttle-CMV-p53를 아데노바이러스 벡터 pJM17과 동시에 바이러스 생산 세포주인 293 cell에 co-transfection시켜 multiple virus clone을 얻었다. 제조한 아데노바이러스를 바이러스의 replication이 가능한 packaging cell line인 293 cell에 transfection시켜 *in vivo* 실험을 위한

충분한 양의 바이러스를 생산하였다. 복제 가능 바이러스 존재 여부를 조사하기 위하여 replication-competent adenovirus (RCA) assay를 실시한 결과 Ad-CMV-p53 및 Ad-CMV- β -gal에 대하여 replication 관련 유전자인 *E1a*가 검출되지 않음을 확인하였다 (Fig. 1).

Plaque-formation assay를 실시하여 Ad-CMV-p53 및 Ad-CMV- β -gal에 대해 각각 1.31×10^9 PFU/ μ l, 6.78×10^9 PFU/ μ l의 titer를 결정하였다.

Biodistribution study

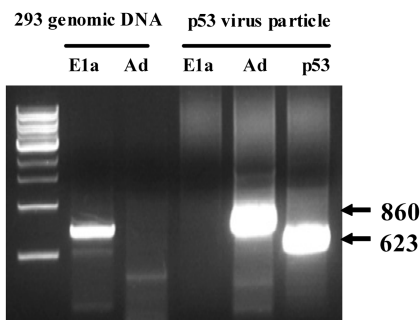
제조한 아데노바이러스에 대한 *in vivo* biodistribution study를 위하여 암·수 Balb/c 마우스에 1×10^9 PFU의 농도로 Ad-CMV- β -gal 혹은 Ad-CMV-p53을 복강 내에 주사한 후 1, 4, 7, 15, 30 및 60일째에 각 장기를 적출하였다. 이 기간 중 아데노바이러스를 주사한 어떠한 동물에서도 뚜렷한 임상적인 독성 증상은 관찰되지 않았다. 생식장기를 포함한 주요 장기에서 아데노바이러스 유래의 DNA 검출 및 RNA 발현 여부를 PCR과 RT-PCR로 각각 확인하였다. Ad-CMV-p53을 투여한 경우, 암·수 마우스 모두 투여 후 1일에서 4일까지는 testis, epididymis, ovary 및 uterus 등 생식장기를 포함하여 주요 장기에서 p53 DNA가 검출되었다. 30일째에는 liver, spleen을 제외한 생식장기에서는 PCR signal이 점차 감소하며 60일째에는 signal이 주요 장기에서도 나타나지 않았다 (Fig. 2).

한편, *GAPDH* DNA에 대한 PCR 분석 결과는 모든 시료에서 동일한 정도로 검출되었다 (자료 미제시).

삽입한 유전자와 벡터와의 조각내 발현의 관련성을 조사하고자 아데노바이러스 벡터의 primer로 PCR한 결과 투여 후, 단시간에서는 모든 장기에서 발현되는 것으로 관찰되었으며 전립선, 간, 비장을 제외한 모든 조직에서 30일째 이후에는 발현되지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

대조군으로 사용한 Ad-CMV- β -gal의 경우, 수컷 마우스의 생식장기인 고환 및 부고환의 약한 signal을 제외하고는 p53의 PCR 결과와 동일한 결과를 보였다 (Fig. 4). 반면, PBS를 주사한 대조군 동물에서는 어떤 장기에서도 signal이 나타나지 않았다 (자

Ad-CMV-p53



Ad-CMV-LacZ

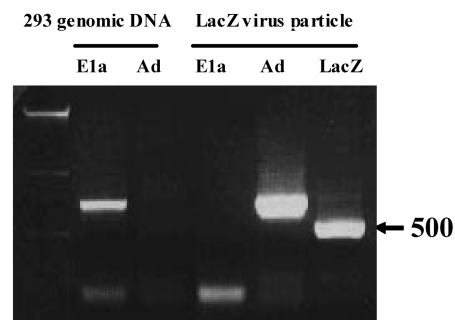


Fig. 1. Analysis of replication competent adenovirus by PCR after propagation of Ad-CMV-p53 and Ad-CMV- β -gal.

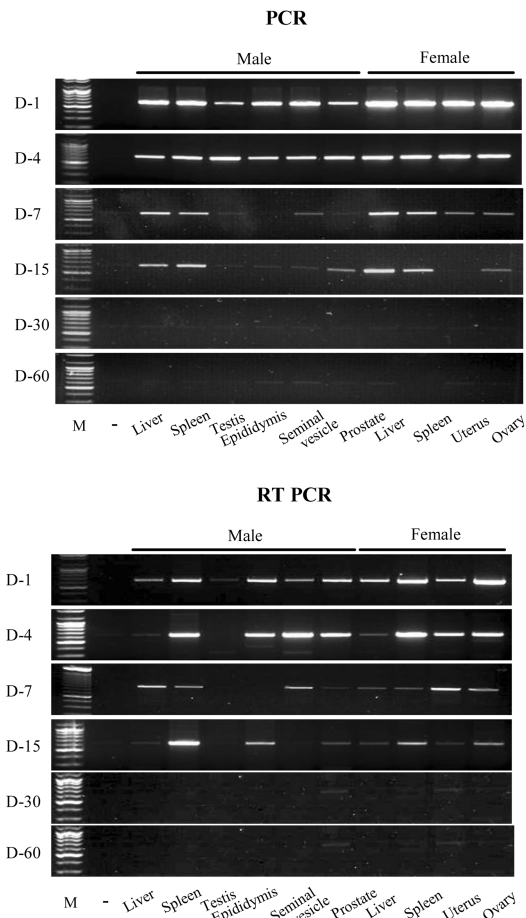


Fig. 2. PCR and RT-PCR analysis of Ad-CMV-p53 (1×10^9 PFU) in male and female mouse tissues after IP injection.

료 미세시). 한편, RT-PCR 결과는 시간대 별로 나타난 PCR 결과와 동일하게 β -gal의 RNA 발현이 확인되었다.

위의 결과로 미루어 아데노바이러스 벡터를 복강 투여하면 간, 비장 및 폐와 같은 일반 장기에서도 주입한 외부유전자가 검출 혹은 발현되며, 고환, 부고환, 정낭, 전립선, 난소 및 자궁 등의 생식장기에서도 일정 기간 동안 외부유전자가 발현되는 것으로 보아 다음 세대로 전달될 가능성이 있을 것으로 예상된다.

Real-time PCR study

Real-time PCR로 투여 후 장기 내에 잔류하는 p53 및 β -gal의 cDNA양은 각 copy number에서 exponential하게 PCR 산물을 형성하는 threshold cycle number (Ct)를 기준으로 한 standard curve를 만들어 측정하였다.

Ct value는 target cDNA 양에 반비례로 일직선(log scale)으로 증가하며 본 실험조건에서의 real-time PCR assay의 detection limit은 약 0.0001 copy number로 나타났다(Fig. 5A). 투여 후 아데노바이러스 벡터의 분포는 아데노바이러스의 일반적인 liver tropism과 일치하며 비교적 비장에도 지속적으로 나타나고 있다.

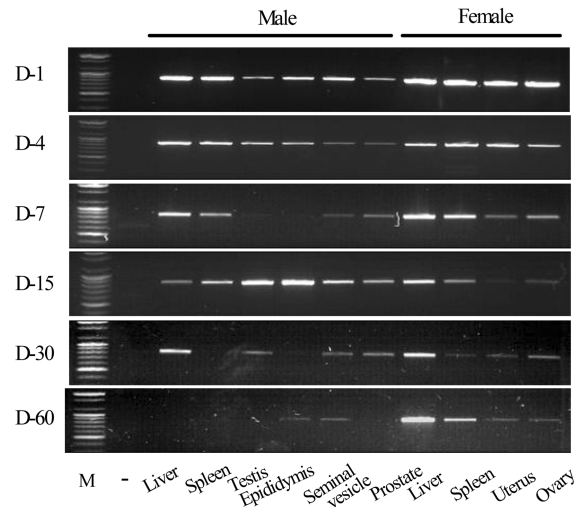


Fig. 3. PCR analysis of Ad-CMV-p53 backbone biodistribution in various tissues after IP injection. Biodistribution analysis of Ad-CMV-p53 by PCR in various tissues after IP injection.

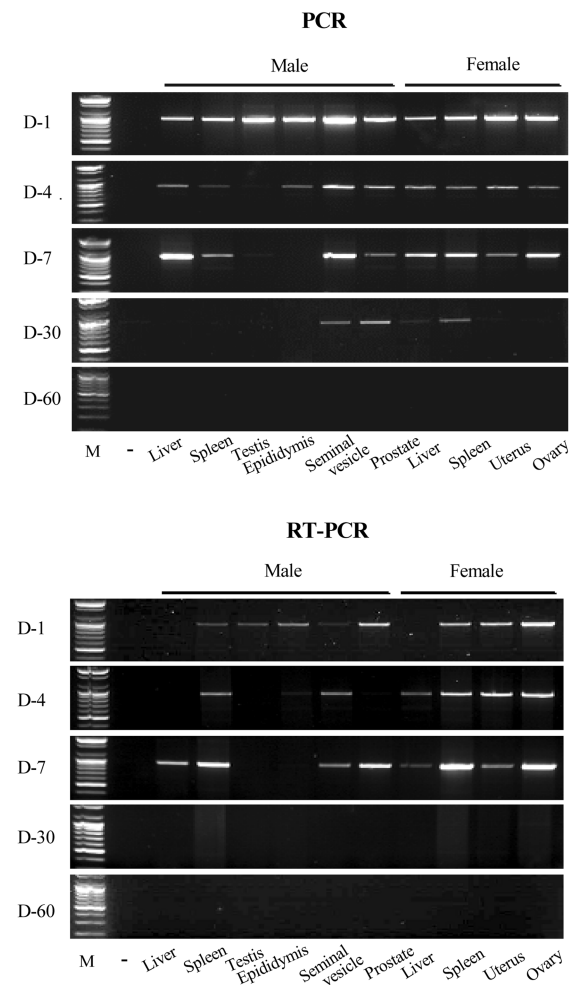


Fig. 4. PCR and RT-PCR analysis of Ad-CMV- β -gal (1×10^9 PFU) in male and female mouse tissues after IP injection.

아데노바이러스의 변화량은 시간 의존적으로 감소되며 60일째에는 모든 장기에서 관찰되지 않았다(Fig. 5B and C).

In-situ PCR study

임신 중 생식장에서 PCR 또는 RT-PCR signal이 감지되면 투여한 외부유전자가 다음 세대로 전달되는 germ cell에 분포하는 것인지 아니면 germ cell이 아닌 생식장기를 구성하는 그 외

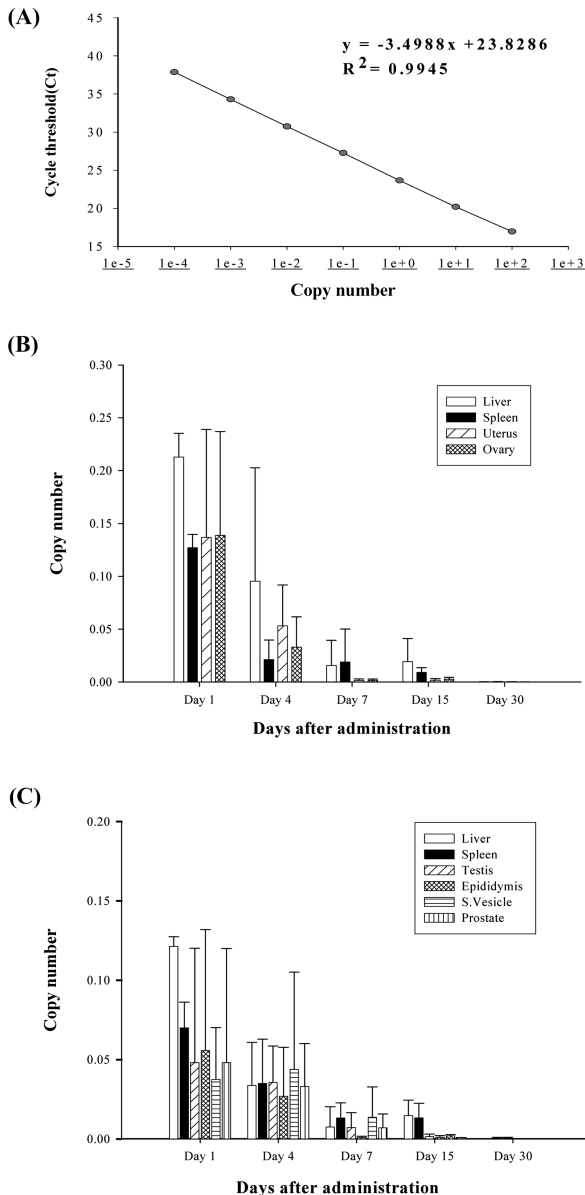


Fig. 5. (A) Standard curve of serial 10 fold dilution of p53 cDNA from 100 to 0.0001 copy number. The PCR cycle at which the fluorescent signal crossing baseline is considered to be the threshold cycle (Ct), plotted on the y axis. (B) and (C) are quantification and distribution analysis of p53 in male and female mouse tissues after IP injected Ad-CMV-p53, respectively (n=4)

다른 cell들에 분포한 것인지를 확인하는 실험이 필요하며 특히, 직접 장기 내로 직접 투여하는 벡터는 생식세포로 벡터가 전달 되는지 반드시 고려해야 한다.

본 실험에서는 생식세포(spermatocyte and oocyte), Sertoli cell, Leydig cell을 각각 분리하여 분석하고자 시도하였으나 기술적으로 분리한 세포의 purity 등의 문제점이 있어 가장 민감한 분석 방법 중의 하나인 *in-situ* PCR을 이용하였다. 생식장기에서의 p53 DNA의 분포위치를 분석한 결과, 고환에서 정세관 tubule 내에는 아데노바이러스 벡터가 전달되지 않으며 주로 간질조직에서 PCR 양성 반응이 관찰되었다. Ovary에서도 아데노바이러스 벡터는 follicle내의 oocyte에 전달되지 않고 stromal tissue에 존재하는 것으로 확인하였다(Fig. 6).

Germ-line transmission study

전형적으로 아데노바이러스는 체세포에 감염한 후 염색체에 삽입되지 않는 것으로 알려져 있으나(14), 부모세대에 주입한 외부유전자가 다음 세대에 전달되는지를 확인하기 위하여 Ad-CMV-β-gal 혹은 Ad-CMV-p53을 Balb/c 마우스에 마리 당 1×10^9 PFU의 농도로 암·수 각각 5마리의 고환 및 난소 내로 직접 주사한 후 암컷은 21일째, 수컷은 25일째 되는 날 교배시켰다. 임신 12일째의 배지에서 DNA를 분리하여 p53 및 β-gal DNA의 발현 여부를 조사하였다. 교배시키기 전 투여 시기는 마우스 암컷의 난자형성과 수컷의 정자형성 기간을 고려하여 결정하였다. 그 결과, Fig. 7에 나타난 것처럼 어떠한 배지에서도 부모세대에 투여한 Ad-CMV-β-gal 혹은 Ad-CMV-p53에 대한 DNA는 검출 되지 않았다.

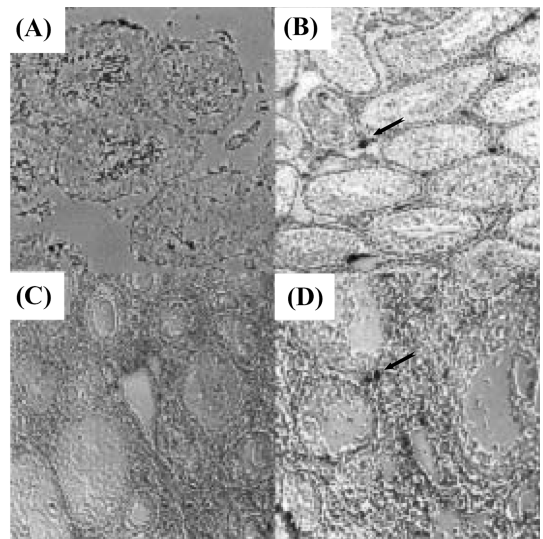


Fig. 6. *In-situ* PCR analysis in gonad tissues. Dark dots by arrow [(B) testis and (D) ovary] indicate the localization of Ad-CMV-p53 DNA by *in-situ* PCR. No reaction were shown in control [(A) testis and (C) ovary].

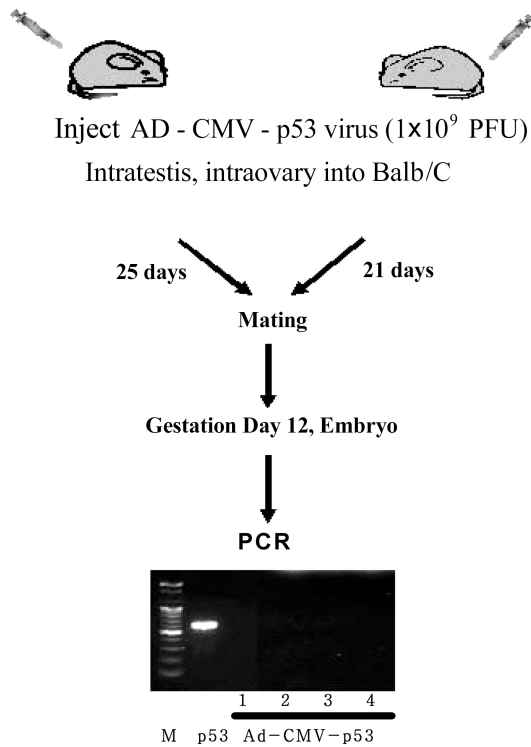


Fig. 7. Germ-line transmission study. The male and female mated day 25 and day 21 after IP injection of Ad-CMV-p53, respectively ($n=5$). Control group received saline. Harvest embryos at day 12 of gestation and analyzed by PCR. Identify the absence of amplified p53 PCR products of 623 bp in control and Ad-CMV-p53 lane. The number are represented experiment number of litter mates embryo pooled.

고 찰

현재 아데노바이러스를 포함한 이상적인 유전자치료제 개발의 목표는 다른 조직에 유해영향 없이 목표로 삼은 조직 또는 세포에 효과적으로 유전자치료제 벡터를 전달시킨 후 원하는 치료 목적에 맞게 장기간 유전자를 발현시킬 수 있는 유전자치료제 개발이다. 아데노바이러스의 경우 비교적 높은 역가를 유지하면서 다양한 세포로 전달될 수 있는 장점은 있으나 면역원성 유발로 인한 발현시간의 제약은 안전성·유효성 측면에서 해결되어야 할 문제점을 갖고 있다. 바이러스를 이용한 유전자치료제와 관련된 생식·발생독성의 문제는 치료의 목적으로 도입된 유전자가 생식 세포나 모체를 통해 태자에게 전달되어 유해한 영향을 미칠 가능성이 있기 때문에 안전성을 논의할 때 가장 예민하게 다루어져야 하는 분야이다.

이런 점에서 유전자치료제의 전신투여 후 *in vivo* 안전성 측면에서 두가지 중요하게 고려되어야 할 사항으로 유전자의 non-target 조직으로의 생체내 분포 정도와 생식선으로의 벡터의 유포 (dissemination)이다. 일반적으로 유전자치료제는 크게 치료단백질을 만들어 내는 전달유전자와 세포나 조직으로 이들 유전자를 전달할 능력을 갖춘 벡터로 구분할 수 있다. 미국 FDA에서도

유전자치료제와 같은 유전자전달제품의 독성연구에서도 각각 전달유전자에 대해서는 RT-PCR, 벡터에 대해서는 PCR로 생체내 분포에 대한 적절한 방법으로 명기하고 있다(15). 본 연구 결과에서도 생식장기를 포함한 주요장기에서 PCR 및 RT-PCR 결과 모두 양성적인 신호가 관찰되고 있다. 이론적으로 벡터의 프로모터가 세포내에서 활성화 되어 전달유전자를 발현하기 때문에 시간 경과에 따라 동일한 발현 신호로 나타날 것으로 예상되었지만 본 연구에서 전달유전자 발현 기간과 transduction된 벡터의 신호 기간과는 일치되지 않고 있음을 보여주고 있다(Fig. 3). 이들 유전자 발현의 단축은 숙주 세포의 면역세포의 작용보다는 viral genome이 episomal하게 위치하고 있는 세포내 endonuclease에 의한 영향과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 약물학적 치료 역할을 상실한 벡터가 불필요하게 생체 내에 잔류한다는 것은 독성학적 영향을 유발할 수 있다는 가능성 때문에 안전성 측면에서 더 많은 연구가 진행되어야 한다. 한편 독성학적 관점에서 바이러스 벡터의 입자의 양이나 반감기에 대한 정보는 생체내 분포에서 의도되지 않은 조직이나 부작용을 예상하는데 있어 중요한 지표로 활용할 수 있다. 본 연구에서는 1×10^5 세포 중 삽입유전자로 p53을 포함하고 있는 1개의 아데노바이러스 정도가 있어도 감지할 수 있는 감도를 가진 정량적 real-time PCR로 시간이 경과됨에 따라 조직 속에 잔류하는 아데노바이러스 벡터를 측정하였다. 생식장기 보다는 일반적으로 대사 및 면역 장기인 간이나 비장에 많은 양이 잔류하는 것으로 관찰되었으며 7일 이후부터는 점진적으로 양이 급감하고 있음을 관찰되었고 PCR 결과와도 양호한 상관성을 보여주고 있으나 시간 경과 시 잔류되는 벡터의 양을 측정하기에는 본 실험에서 사용한 real-time PCR이 정확한 정보를 제공하고 방법임을 보여주고 있다.

아데노바이러스를 포함한 대부분의 유전자치료제에 있어 민감한 사항은 생식선을 통한 다음 세대로의 전달가능성에 대한 우려이다. 레트로바이러스와 같이 유전자삽입이 어려운 아데노바이러스의 경우 지금까지 생식세포를 통한 전달 가능성은 희박하다고 알려져 있다. 그러나 난소암이나 전립선암 치료시 투여 방법으로 직접 조직 내로 투여하는 경우 정자나 난자에 비의도적으로 오염될 가능성은 높다. 본 연구자의 선행 연구에서 1×10^8 역가의 아데노바이러스 벡터를 대상으로 복강 투여 후 다음세대로의 전달가능성을 조사한 결과 13일째의 어떤 태자에서도 아데노바이러스에 삽입된 p53 유전자는 관찰되지 않아 이번 시험에서는 1×10^9 PFU 농도를 직접 각각의 고환과 난소에 투여하였다. 이 경우 교미시기에 생식기관에서 바이러스 벡터는 존재하고 있으나, 생식선 전달은 되지 않는 것으로 미루어 아데노바이러스에 의한 정자의 감염은 일어나지 않음을 시사하고 있다. 생식기관에서의 아데노바이러스의 세포내 정확한 잔류 위치를 알아보기 위해 solution-phase PCR의 단점을 보완한 *in-situ* PCR을 사용한 결과 수컷 생식세포가 잔류할 수 있는 세정관내에서는 양성적인 신호가 관찰되지 않았고 암컷의 경우도 난자의 follicle내에는 아데노바이러스 벡터가 존재하지 않는 것으로 관찰되어 생식세포가 직접 바이러스 벡터와 접촉할 가능성을 매우 낮음을 보여

주고 있고 이런 결과는 아데노바이러스 벡터를 직접 고환에 주입했을 때 Leydig 세포에 발현되는 반면에 세정관내에 투여할 경우에는 생식세포와 구조적으로 밀접하게 접촉되어 있는 Sertoli 세포에 발현되었다는 보고와 일치되는 것으로 사료된다(9). 그러나 *in-situ* PCR의 경우 조직 절편의 두께가 5 µm 이하로 비교적 감도가 높아도 생식기관내에 아데노바이러스 벡터가 전달되는 양이 다른 장기에 비교해서 적기 때문에 세포 또는 조직 당 잔류하는 양이 낮을 경우 PCR을 통해 감지될 수 있을 정도로 충분히 증폭되기는 어렵다는 단점이 있어 정확한 바이러스의 위치 평가는 한계가 있을 수 있다. 이런 점을 보완하기 위해 수컷의 경우 고환을 구성하고 있는 조직을 세부적으로 분리하여 각각 interstitial fluid, seminiferous tubule, sperm 및 tunica albuginea 에서의 PCR로 증폭하여 아데노바이러스가 잔류하는 위치를 확인하여 *in-situ* PCR 결과를 보완 설명할 수 있다고 본다.

지금까지 수행한 결과에 근거하여 부모세대에 아데노바이러스를 매개로 주입한 외부유전자는 생식장기 등에서 검출되거나 발현되더라도 다음세대로의 전달 가능성은 매우 낮을 것으로 사료된다.

감사의 말

This research was supported by a grant (2003) from the Korea Food and Drug Administration

참고문헌

1. Arruda, V.R., P.A. Field, R. Milner, L. Wainwright, M.P. DeMiguel, P.J. Donovan, R.W. Herzog, T.C. Nichols, J.A. Biegel, M. Razavi, M. Dake, D. Huff, A.W. Flake, L. Couto, M.A. Kay, and K.A. High. 2001. Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol. Ther.* 4, 586-591.
2. Blanchard, K.T. and K. Boekelheide. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis *in vivo*. *Biol. Reprod.* 56, 495-500.
3. Gene therapy and the germline. 1999. *Nature Medicine* 5, 245.
4. Gordon, J.W. 1998. Germline alteration by gene therapy: Assessing and reducing the risks. *Mol. Med. Today* Nov, 468-470.
5. Gordon, J.W. 2001. Direct exposure of mouse ovaries and oocytes to high doses of an adenovirus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Mol. Ther.* 3, 557-564.
6. Gura, T. 2002. Gene therapy and the germ line. *Mol. Ther.* 6, 2-4.
7. Hall, S.J., N. Bar-Chama, S. Ta, and J.W. Gordon. 2000. Direct exposure of mouse spermatogenic cells to high doses of adenovirus gene therapy vector does not result in germ cell transduction. *Hum. Gene Ther.* 11, 1705-1712.
8. Kay, M. 2002. Recombinant DNA advisory committee, Tab 2243 Draft issue brief, March 7-8.
9. Kojima, Y., S. Sasaki, Y. Umemoto, Y. Hashimoto, Y. Hayashi, and K. Kohri. 2003. Effects of adenovirus mediated gene transfer to mouse testis *in vivo* on spermatogenesis and next generation. *J. Urol.* 170, 2109-2114.
10. Lehrman, S. 1999. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518.
11. NIH Report. 2002. Assessment of adenoviral vector safety and toxicity. *Human Gene Ther.* 13, 3-13.
12. Paielli, D.L., M.S. Wing, K.R. Rogulski, J.D. Gilbert, A. Kolozsvary, J.H. Kim, J. Hughes, M. Schnell, T. Thompson, and S.O. Freytag. 2000. Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse. *Mol. Ther.* 1, 263-274.
13. Timme, T., S.J. Hall, R. Barrios, S.L. Woo, E. Aguilar-Cordova, and T.C. Thompson. 1998. Local inflammatory response and vector spread after direct intraprostatic injection of a recombinant adenovirus containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy in mice. *Cancer Gene Ther.* 5, 74-82.
14. Tsukui, T., Y. Kanegae, I. Saito, and Y. Toyoda. 1996. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nat. Biotechnol.* 14, 982-985.
15. Verdier, F. and J. Descotes. 1999. Preclinical safety evaluation of human gene therapy products. *Toxicol. Sci.* 47, 9-15.
16. Verma, I.M. 2001. Germline gene therapy: Yes or No? *Mol. Ther.* 4, 1.
17. Verma, I.M. 2002. Success and setback: Another adverse event. *Mol. Ther.* 6, 565-566.
18. Wilson, J.M. and N.A. Wivel. 1999. Potential risk of inadvertent germ-line gene transmission. *Human Gene Ther.* 10, 1593-1595.
19. Wood, D.M. 1999. Biodistribution of adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to mouse. *Cancer Gene Ther.* 6, 367-372.
20. Ye, X.M., G.P. Gao, C. Pabin, S.E. Raper, and J.M. Wilson. 1998. Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Human Gene Ther.* 9, 2135-2142.

(Received May 1, 2007/Accepted July 11, 2007)

ABSTRACT: Potential Reproductive Toxicity Study of p53 Expressing Adenoviral Vector in Mice
 Gyu-Seek Rhee*, Seung-Jun Kwack, Soon-Sun Kim, Rhee-Da Lee, Ji-Hyun Seok, Soo-Young Chae, Soo-Youn Chung, Seung-Hee Kim, Seung-Hoon Lee², and Kui-Lea Park¹
 (Division of Reproductive and Developmental Toxicology, ¹Division of Immunotoxicology, National Institute of Toxicological Research, KFDA, Seoul 122-704, Korea, ²Dept. of Biological Science, YongIn University, Yongin 449-714, Korea)

The possibility of inadvertent introduction of therapeutic gene expressing viral vectors has raised safety concerns about germ-line infection. Particularly, for indications such as prostate cancer and ovarian cancer, the proximity of the point of viral administration to organs of the reproductive system raises concerns regarding inadvertent germ-line transmission of genes carried by the virus vector. To evaluate the safety of *in vivo* adenovirus mediated gene transfer, we explored the biodistribution, persistence and potential germ-line transmission of p53-expressing adenovirus (Ad-CMV-p53). Both male and female Balb/c mice were injected with 1×10^9 PFU of Ad-CMV-p53. The PCR analysis showed that there were detectable vector sequences in liver, kidney, spleen, seminal vesicle, epididymis, prostate, ovary, and uterus. The RT-PCR analysis for detecting inserted gene, p53 showed that Ad-CMV-p53 viral RNA were present in spleen, prostate and ovary. Direct injected male and female mice of adenovirus vector into testis and ovary were mated and their offspring were evaluated for germ-line transmission of the adenoviral vector. The PCR and RT-PCR analysis showed no evidence of germ-line transmission, although vector sequences were detected in DNA extracted from gonadal tissues. Real-time PCR result confirmed a significant decrease of adenovirus in gonad tissues 1 week after injection. We have also analysed the cell specific localization of viral DNA in gonad tissues by using *in-situ* PCR. Positive signals were detected in interstitial tissue but not in seminiferous tubule in sperm. In the case of ovary, adenovirus signal were localized to the stromal tissue, but no follicular signals were observed. Together, these data provide strong evidence that the risk of the inadvertent germ-line transmission of vector sequences following intraperitoneal or direct injection into genito-urinary system of adenovirus is extremely low.