

Transferrine peptide ligand로 개량된 아데노바이러스를 이용한 신경전구세포로의 유전자 전달 효율 조사

정인실*

한서대학교 생물학과

신경전구세포를 이용한 퇴행성 뇌질환의 세포치료나 유전자치료에서 효율적인 유전자 전달을 목적으로 개량된 아데노바이러스 벡터의 실용 가능성을 쥐의 해마에서 유래된 신경전구세포를 이용하여 조사하였다. 외피단백질을 조작한 개량 아데노바이러스 벡터는 분화 전과 후의 신경전구세포로 1 세대 아데노바이러스 벡터에 비해 6 배 정도 유전자를 효율적으로 전달하였다. 또한 바이러스의 감염은 신경전구세포가 신경세포나 신경아교세포로 분화하는데 영향을 미치는 않았다. 따라서 신경전구세포를 이용한 신경질환의 세포치료나 유전자 치료에서 개량된 아데노바이러스로 유전자를 전달하면 치료의 효율성을 향상시킬 수 있을 것이다.

Key words □ adenovirus, differentiation, neuronal precursor cells, stem cell therapy

배아나 성체에서 유래되는 줄기세포는 자가 재생(self-renewal) 능력이 있고 특정한 기능을 가지는 세포로 분화할 수 있기 때문에 난치병 치료제로서 관심을 끌고 있다. 최근에는 성체에도 신경전구세포가 있다는 것이 확인되고 있으며 신경전구세포는 인간의 경우 일생동안 중추신경계에서 유지되며 성체의 뇌에서 발생, 분화한다(1, 2). 따라서 이러한 신경줄기세포의 발생과 분화를 조절하여 신경재생을 촉진함으로써 퇴행성 신경질환을 치료할 수 있는 가능성이 대두되고 있으며 실제 여러 종류의 뇌질환 치료 모델에서 시도되고 있다(3, 4, 5). 신경전구세포를 이용한 신경질환의 치료에는 직접 신경전구세포로 치료물질을 주입하는 *in vivo* 방법과 신경전구세포를 특정세포로 분화하도록 조작한 후 치료부위에 이식하는 *ex vivo* 방법, 즉 세포치료가 있다(1). 어느 경우이던 치료효과를 극대화하기 위하여 신경전구세포로의 효율적인 유전자전달이 필수적이다.

분화된 신경세포로 유전자전달이 어렵기 때문에 신경질환의 치료에는 분열하는 세포 뿐 아니라 최종 분화된 세포에도 감염할 수 있는 아데노바이러스가 유전자전달 매체로 자주 이용되고 있다(6, 7). 아데노바이러스 벡터는 체내에 주입할 때 효율적으로 유전자를 전달하고 바이러스벡터의 제조가 다른 방법에 비해 간편할 뿐만 아니라 다른 바이러스 매개체에 비해 세포독성이 낮아 안전하며 높은 농도로 정제될 수 있다. 또한 레트로바이러스와 달리 삽입 돌연변이의 위험도가 낮다는 장점도 있다(8). 그러나 현재 이용되고 있는 1 세대 아데노바이러스 벡터의 문제점 중 하나는 비특이적인 유전자전달에 기인한 치료유전자의 효과 감소와 이를 해결하기 위한 유전자의 반복투여로 야기되는 고비

용 문제 및 부작용이다. 실제 중추신경질환과 말초신경질환 모델에서 2차 이상의 virus 주입 후 아데노바이러스에 대한 염증반응이 발생하는 것으로 보고되었다(9). 또한 우리는 1 세대 아데노바이러스를 이용하여 분화된 신경세포로 유전자를 전달할 때 그 효율이 분열하고 있는 세포로 유전자를 전달할 때와 비교해 10 배 이상 감소하는 것을 관찰하였다(10).

지금까지 이용된 아데노바이러스 벡터는 바이러스의 외피단백질 fiber와 자연 수용체인 CAR (Coxsackievirus B and adenovirus receptor)의 결합에 의해 세포에 침입하므로 CAR의 발현정도가 특정 세포로의 유전자 전달 효율에 크게 영향을 준다. 따라서 CAR의 발현과 관계없이 이미 분화된 신경세포등과 같이 특정 세포로 표적하도록 고안된 개량 아데노바이러스 벡터의 개발이 활발히 진행되고 있다(11). 우리는 이와 같은 문제점을 개선하기 위하여 transferrin 수용체(TfR)와 결합할 수 있는 transferrine peptide ligand (Tf)를 아데노바이러스 외피 단백질인 fiber에 부착하여 TfR이 발현되는 세포로 표적할 수 있는 개량된 바이러스를 제조하였다(Tf-AdLac, 12). TfR-Tf system은 targeted drug delivery를 위하여 활발히 연구되었고 뇌질환 치료에는 TfR이 blood-brain barrier (BBB) endothelial cell에 많이 발현되어 있는 것이 잘 알려져 있으므로 BBB를 극복할 수 있는 좋은 약물전달방법이다(13). 우리는 이미 신경아교세포와 같이 transferrin이 많이 발현되는 세포로 개량된 아데노바이러스 벡터가 유전자를 효율적으로 전달하는 것을 관찰하였다(12). 본고에서는 개량된 아데노바이러스를 퇴행성 뇌질환의 유전자치료에 이용할 수 있는 가능성을 타진하기 위해 쥐의 해마에서 유래된 신경전구세포를 이용하여 바이러스의 유전자 전달 효율을 측정하고 바이러스가 신경전구세포의 분화능(differentiation potential)에 미치는 영향을 조사하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-660-1341, Fax: 041-688-3403
E-mail: ijoung@hanseo.ac.kr

재료 및 방법

세포배양

흰 쥐 배아의 해마에서 기원하는 신경전구세포 HiB5와 생쥐의 해마에서 분리한 신경전구세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA), 100 u/ml penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Life Technologies, USA)을 이용하여 33°C, 7% CO₂조건의 배양기에서 분화 전 계속하여 분열하도록 유지하였다. 신경세포로의 분화를 유도할 때 20ng/ml의 혈소판 유래 성장인자(PDGF, Upstate Biotechnology, USA)를 첨가한 무혈청 배지 N2 (Sigma, USA)로 갈아주고 39°C, 7% CO₂ 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 293세포는 ATCC (American Type of Cell Collection, USA)에서 분양받았으며 10% FBS, 100 u/ml penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

바이러스 배양 및 감염

제조합 아데노바이러스 AdLac과 Tf-AdLac (12)은 293 세포에서 증폭시키고 CsCl 밀도구배원심분리에 의해 정제하여 -80°C에 보관하였다. 아데노바이러스는 293 세포에서 감염가(infectious unit)를 결정 한 다음 실험에 사용하였다. 분화 전의 세포는 33°C에서 2% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 바이러스를 2시간 동안 감염시키고 정상배지로 바꾸어 준 후 48시간 동안 배양하였다. 분화를 유도한 세포는 바이러스를 39°C, N2 배지에서 감염시키고 PDGF가 포함된 N2 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 바이러스는 50 multiplicity of infection (MOI)로 감염시켰다.

X-gal 염색

AdLac과 Tf-AdLac을 감염시켜 배양한 세포는 4°C, 0.25% glutaraldehyde 용액에서 10분 동안 고정시키고 생리식염수로 씻어준 다음 X-gal 염색용액(1M Na₂HPO₄, 1M NaH₂PO₄, 1M MgCl₂, 20 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside (X-gal), 50 mM K₃Fe(CN)₆, 50 mM K₄Fe(CN)₆)을 넣은 후 37°C에서 밤새 반응시켰다.

β-galactosidase 효소 활성 측정

바이러스를 감염시킨 HiB5 세포에 reporter lysis buffer (0.5% Triton X-100, 137 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.5)를 첨가하여 용출시킨 후 상층액을 취하였다. 96 well plate 각 well에 상층액과 2X assay buffer (200 mM sodium phosphate pH 7.3, 2 mM MgCl₂, 100 mM β-mercaptoethanol, 8 mg/ml o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)를 50 μl씩 넣고 37°C에서 30분 반응시킨 다음 1M Na₂CO₃ 100 μl를 첨가하여 반응을 중지시키고 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상용의 β-galactosidase (Promega, USA)를 이용하여 작성한 표준 곡선에 따라 각 시료의 활성을 결정하여 이를 단백질 1 μg 당 milliunit(mu)로 나타내었다.

면역형광염색 분석

HiB5 세포에 Tf-AdLac를 33°C에서 100 MOI로 감염시키고 24시간 후 PDGF가 포함된 N₂ 배지로 갈아주고 39°C에서 48시간 동안 배양시켜 분화를 유도하였다. 세포는 2.7% 파라포름알데히드로 10분간 고정하고 0.25% Triton X-100 으로 20분간 permeabilization 한 후, 5% normal goat serum을 함유한 PBS 용액을 사용하여 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체로 anti-Pan neurofilament (1:1000d, Sternberger, USA), anti-MAP2 (1:250d, Sigma, USA), anti-GFAP (1:400d, Sigma, USA), anti-β-galactosidase (1:1500d, Oncogene, USA) 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시키고 Oregon-green이나 Texas-red가 결합된 2차 항체 (Molecular Probes, USA)로 1차 항체를 검출하였다. 세포의 핵은 DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole)로 5분간 염색하여 Leitz Orthoplan 형광현미경 (USA)을 이용해 사진촬영을 하였다.

결과 및 고찰

뇌질환을 위한 세포치료나 유전자치료를 목적으로 이용할 때 개량된 아데노바이러스 벡터가 기존의 1세대 아데노바이러스 벡터와 비교해 효율적인 유전자 전달능력이 향상되었는가를 신경전구세포를 이용하여 관찰하였다. 흰 쥐 배아의 해마에서 유래된 HiB5 세포와(14) 생쥐의 해마에서 유래된 신경전구세포는 온도민감성(temperature sensitive) SV40 T-항원을 발현하는 레트로바이러스로 감염시켜 만들었으므로 저온인 33°C에서 10% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에 배양할 때는 분열하지만 쥐의 정상체온인 39°C로 옮기고 무혈청 배지(serum-free media)인 N2 배지에서 배양하면 분열을 멈춘다. 이 조건에서 대부분의 세포가 사멸하지만 일부는 신경세포로 분화되는데 우리는 혈소판 유래 성장인자(platelet derived growth factor, PDGF)를 첨가하면 HiB5 세포의 사멸이 감소하고 신경세포로의 분화가 촉진되는 것을 확인하였다(15). 표지자로 *E.coli*의 LacZ를 삽입한 제조합 아데노바이러스를 분열하고 있는 상태와 분화된 신경전구세포에 각각 감염하고 유전자 발현 효율을 X-gal 염색과 효소활성측정을 통해 조사하였다.

흰쥐의 신경전구세포 HiB5(Fig. 1A, B)와 생쥐 신경전구세포(Fig. 1E, F)의 분화 전 분열 조건인 33°C에서 50 MOI로 세포에 바이러스를 감염하였을 때 1세대 아데노바이러스인 AdLac에 비해 개량된 아데노바이러스 Tf-AdLac의 유전자 전달 능력이 우수함을 알 수 있었다. 그러나 신경전구세포를 39°C에서 PDGF가 함유된 N2 배지로 48시간 동안 배양하여 분화를 유도한 후 동일한 MOI로 바이러스를 감염시켰을 때 AdLac의 유전자 전달효율이 현저히 감소하였다(Fig. 1C, G). Tf-AdLac도 분화된 신경세포로의 유전자전달 효율은 감소하였으나 AdLac에 비해 효율적으로 유전자를 전달하는 것을 관찰하였다(Fig. 1D, H). Tf-AdLac이 분화된 신경세포보다 분열하고 있는 신경전구세포에서 유전자전달 효율이 우수한 이유는 아데노바이러스의 외피 단백질인 fiber에 부착한 transferrin ligand가 transferrin 수용체(TfR)에 결합함으로써 바이러스를 세포로 유도하기 때문인 것으로 생각된다.

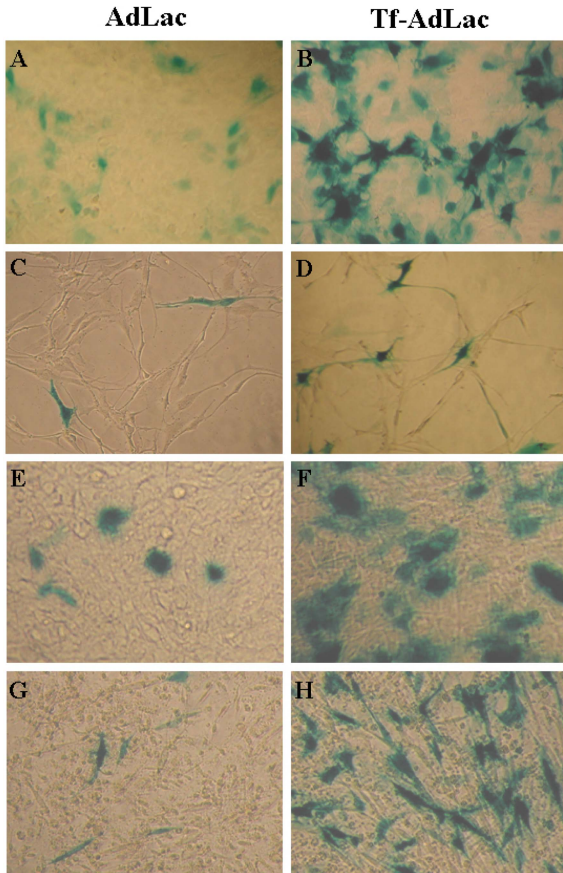


Fig. 1. Viral transduction of β -galactosidase into neuronal precursor cells derived from hippocampus from rat and mouse detected by X-gal staining. Rat hippocampal cell line HiB5 (A~D) and mouse hippocampal cell line (E~F) were infected with AdLac (A, C, E, G) or Tf-AdLac (B, D, F, H) and expressions of β -galactosidase were visualized in blue stained cells. Cells were either infected in the proliferating state at 33°C (A, B, E, F) or in the differentiated state at 39°C (C, D, G, H). Magnification, 200X.

다. 실제 분열하고 있는 HiB5 세포에서 transferrin 수용체가 많이 발현되어 있고 분화된 후에는 그 양이 분화 전에 비해 현저히 감소되어 있는 것을 Western Blot 분석과 125 I로 표지된 transferrin을 이용한 binding assay를 통해서 확인하였다(자료 미제시). 다음으로 β -galactosidase 효소활성 측정을 이용하여 개량된 아데노바이러스의 유전자전달 효율이 1 세대 바이러스에 비해 얼마나 향상되었는가를 정량적으로 조사하였다. 앞의 X-gal 염색에서 관찰한 바와 같이 Tf-AdLac은 HiB5 세포가 분화한 상태에서 분화 전에 비해 유전자 전달 능력은 현저히 감소하였다. 그러나 Tf-AdLac은 AdLac에 비해 분화 전과 후의 HiB5세포에서 모두 유전자전달 효율이 6배정도 높은 것을 관찰하였다(Fig. 2).

위의 결과로 외피 단백질을 변형시킨 아데노바이러스 벡터가 1세대 아데노바이러스에 비해 분화가 일어난 신경세포로 보다 효율적으로 유전자를 전달함을 알 수 있었다. 그러나 분화 이전

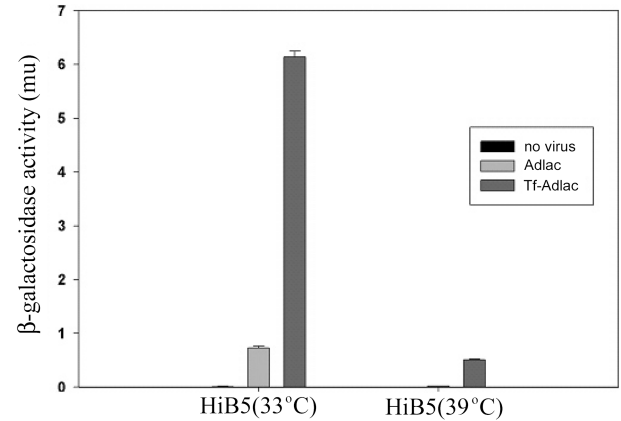


Fig. 2. Virus-mediated transduction of β -galactosidase into HiB5 cells measured by enzyme assay. The enzyme activities in AdLac- or Tf-AdLac-infected HiB5 cells were measured and presented as milliunit (mU) in a μ g of protein. Data shown represent the average and standard deviation of three independent experiments.

의 신경전구세포에 비해 유전자 전달 효율은 현저히 감소하였다. 따라서 개량된 아데노바이러스 벡터는 신경전구세포를 조작하여 신경질환을 치료하는 세포치료방법에서 더욱 효과적인 것으로 생각된다. 신경전구세포를 이용한 유전자치료에서 중요한 전제조건은 유전자전달 매체가 세포의 분화능에 변화를 주지 않아야 한다는 점이다. 이 가능성을 조사하기 위해 Tf-AdLac을 33°C에서 HiB5에 감염시키고 24시간 후 배지를 PDGF가 함유된 N2

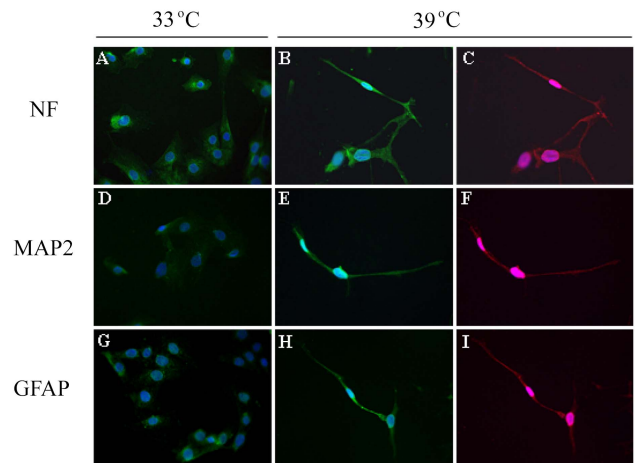


Fig. 3. Immunofluorescence characterization of HiB5 cells, infected with Tf-AdLac at 33°C and grown 2 days in N₂ medium at 39°C. The expression of neuronal or astroglial markers such as NF, MAP2, and GFAP are not observed in HiB5 cells grown at 33°C (A, D, G). However, expression of marker proteins are detected in cells infected with Tf-AdLac at 33°C and grown 2 days in N₂ medium at 39°C (B; NF, E; MAP2, and H; GFAP). Same population counter stained with Texas-red for the expression of β -galactosidase is shown in C, F, I, respectively. Nucleus stained with DAPI is visualized in blue. Magnification: 400X.

배지로 바꾸어 준 후 39°C에서 48시간 동안 배양하고 면역형광 염색 분석을 통해 신경세포로의 분화를 조사하였다. 전구세포단계인 33°C에서 배양한 HiB5 세포에서는 신경 특이적 표지자인 신경세사(neurofilament, NF), MAP2 (microtubule-associated protein 2)와 신경아교세포 특이적 표지자인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)의 발현을 관찰할 수 없었으나(Fig. 3 A, D, G) 분화조건에서 배양했을 때 신경 표지단백질의 발현이 유도되었다(Fig. 3B, E, H). 또한 분화된 같은 신경세포에서 β -galactosidase의 발현을 관찰할 수 있었으므로(Fig. 3C, F, I) 개량된 아데노바이러스가 HiB5의 분화능에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이상의 결과는 현재 부각되고 있는 신경전구세포를 이용한 뇌질환의 치료에서 개량 아데노바이러스를 이용하면 유전자전달 효율을 향상시킬 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 따라서 개량 아데노바이러스를 이용하여 특정한 형태의 신경으로 분화를 유도할 수 있는 유전자를 신경전구세포에 전달하면 보다 효율적인 치료효과를 얻을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (R01-2003-000-11694-0)의 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

1. Vats, A., R.C. Bielby, N.S. Tolley, R. Nerem, and J.M. Polak. 2005. Stem cells. *Lancet* 366, 592-602.
2. Johansson, C.B., S. Momma, D.L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, and J. Frisen. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
3. Silani, V. and M. Corbo. 2004. Cell-replacement therapy with stem cells in neurodegenerative diseases. *Curr. Neurovasc. Res.* 1, 283-289.
4. Dubois-Dalcq, M., C. Ffrench-Constant, and R.J. Franklin. 2005. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron* 48, 9-12.
5. Lindvall, O., and Z. Kokaia. 2005. Stem cell therapy for human brain disorders. *Kidney Int.* 68, 1937-1939.
6. Breakefield X.O. 1993. Gene delivery into the brain using virus vector. *Nature genetics* 3, 187-189.
7. Heistad, D.D., and F.M. Faraci. 1997. Gene therapy for cerebral vascular disease. *Stroke* 27, 534-539.
8. Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet. 1999. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotech.* 10, 440-447.
9. Thomas, C.E., D. Birkett, I. Anozie, M.G. Castro, and P.R. Lowenstein. 2001. Acute direct adenoviral cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Molecular Therapy* 3, 36-46.
10. Joung, I., H.S. Kim, J.S. Hong, H. Kwon, and Y.K. Kwon. 2000. Effective gene transfer into regenerating sciatic nerves by adenoviral vectors: Potentials for gene therapy of peripheral nerve injury. *Mol. Cells* 10, 540-545.
11. Wickham, T.J. 2000. Targeting adenovirus. *Gene Ther.* 7, 110-114.
12. Joung, I., G. Harber, K.M. Gerecke, S.L. Carroll, J.F. Collawn, and J.A. Engler. 2005. Improved gene delivery into neuroglial cells using a fiber-modified adenovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1182-1187.
13. Li, H., H. Sun, and Z.M. Quin. 2002. The role of transferrin-transferrin-receptor system in drug delivery and targeting. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 206-209.
14. Renfranz, P., M. Cunningham, and R.D. McKay. 1991. Region specific differentiation of hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* 66, 713-729.
15. Joung, I., H.J. Kim, and Y.K. Kwon. 2005. p62 modulates Akt activity via association with PKC ξ in neuronal survival and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 654-660.

(Received March 1, 2006/Accepted March 14, 2006)

ABSTRACT: Modified Adenovirus Mediated Gene Transfer to Neuronal Precursor Cells

Insil Joung (Department of Biology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea)

Neuronal precursor cells may provide for cell replacement or gene delivery vehicles in neurodegenerative disease therapy. One impediment to treating neuronal diseases is finding ways to introduce genes into neurons effectively. It is shown here that fiber-modified adenovirus vector delivered gene to neuronal precursor as well as differentiated neuronal cells more efficiently than first-generation adenoviral vector. Moreover, fiber-modified adenoviral vector transduced precursor cells retained the potential for differentiation into neurons and glia *in vitro*. These results show the potential of modified adenoviral vector in the improved gene delivery to neurons in direct gene therapy protocols. In addition it holds promise for the use of genetically manipulated stem cells for the therapy of neuronal diseases.