

조혈모세포로 형질도입에 있어서 Vesicular Stomatitis G Envelope의 효과

이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

박 지 윤 · 유 은 선

= Abstract =

The Efficiency of Vesicular Stomatitis G Envelope in Transduction into Hematopoietic Stem Cell

Jee-Yoon Park · Eun-Sun Yoo

Department of Pediatrics, College of Medicine, Ewha Womans University

Objectives : Stable gene transfer to human pluripotent hematopoietic stem cells is an attractive strategy for the curative treatment of many genetic hematologic disorders. In clinical trial, the level of gene transfer to this cell population have generally been low.

In this study we have evaluated the efficiency of gene transfer to human umbilical cord blood (UCB) CD34+ cells using vesicular stomatitis virus glycoprotein G(VSV-G) pseudotyped HIV-1 vector.

Method : High titers of replication-defective VSV-G pseudotyped HIV-1 based vector encoding the enhanced yellow fluorescent protein were produced by transient transfection. Human CD34+ cells purified from UCB were incubated with pseudotyped HIV supernatants for 24-48 hours. The transduction efficiency were measured by marker gene expression under the microscopy and flow cytometry.

Results : Transduction rates into CD34+ were low at 0 and 24 hour, reflecting $4.7 \pm 2.4\%$ at 24 hours, they were increased to $5.7 \pm 2.7\%$ at 48 hours.

Conclusion : We demonstrate efficient transduction of purified human UCB CD34+ by HIV vectors pseudotyped with VSV-G. The results extend the lentiviral vector to clinical gene therapy using human pluripotent hematopoietic stem cells.

KEY WORDS : CD34+ · VSV-G · HIV-1 based vector · Lentiviral transduction · Gene therapy.

서 론

조혈기관과 관련된 유전질환의 몇몇은 조혈모세포 동종이식에 의해 성공적으로 치료가 되고¹⁾, 조혈모세포가

유전학적으로 쉽게 접근이 가능하다는 점 때문에 자기복제 기능과 다분화 능력이 있는 조혈모세포에 결합된 유전자를 삽입하여 체내로 주입함으로써 장기적으로 유전질환을 교정하고자 하는 유전자 치료는 1980년 중반이후로 활발하게 제시되어 왔다. 1995년 murine retro-

viral vector를 이용하여 종종 복합면역 결핍증 환자에 서 조혈모세포를 이용한 유전자 치료가 성공적으로 시 도된 이후²⁻⁴⁾ 유전자 치료로 모든 질병을 해결할 수 있 게 되리라는 가능성을 기대하였지만 이후 시행된 여러 동물 실험과 임상 실험의 결과들로 보아 실망적이라 할 수 있다. 향후 사람에서 성공적인 유전자 치료를 실행하 기 위해서는 연구, 보완되어야 할 문제점들이 많은데, 어떻게 효과적으로 유전자를 전달하는가 하는 것이 그 중 하나이다.

현재까지 유전자 전달을 위해서는 표적세포의 염색체 에 삽입되어 지속적으로 유전자를 발현한다는 장점으로 retroviral vector가 보편적으로 사용되어 왔다. 그러나 retroviral vector는 주로 활발히 증식, 분열하는 표적세 포에만 삽입되기 때문에 유전자 치료를 실제 임상에서 사 용하는 경우에는 한계가 있다. 특히 자가갱신(self rene wal), 증식 및 분화의 특성을 가지고 있어 각종 유전대사 질환과 혈액질환의 유전자치료를 주요 표적세포가 되고 있는 조혈모세포는⁵⁾⁶⁾ 세포주기 특성상 휴지기에 있기 때 문에 retroviral vector를 사용하는데 제한이 있다.

Oncoretroviral vector와는 달리 human immunodefi ciency virus-1(HIV-1)를 이용한 lentiviral vector 는 휴지기 단계의 세포나 neuron, 망막세포등과 같이 완 전 분화된 세포로도 세포주기의 조작없이 12~24시간 이내 에 직접적으로 유전자를 전달할 수 있어⁷⁾ 최근 새 로운 유전자 전달 매개체로 각광을 받고 있다. 따라서 본 저자들은 조혈모세포로 유전자를 전달하는 새로운 매개 체로서 HIV vector의 유전자 전달의 효과를 측정함으 로써 앞으로 성공적인 유전자 치료의 임상적용 가능성을 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 제대혈의 채취 및 CD34+ 세포 분리

8명의 산모로부터 질식분만 직후 헤파린 처리된 50 mL 주사기를 사용하여 제대정맥을 천자하여 혈액을 채 취한 다음 Ficoll-Hypaque(SG, 1.077, Phamacia Boi tech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 ×400g에서 30분 간 원심 분리하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵 세포층은 IMDM(Gibco, Grand Island, NY)에 부유시 켜 Petri dish에 분주한 후 60분씩 배양기에서 2회 배 양하여 유착세포(adherent cell)를 제거하였다. CD34+

세포는 high-grade magnetic field와 mini-MACS co lumns(Miltenyi Biotech, Glodbach, Germany)을 사용 한 superparamagnetic microbead(QBEND10)를 사 용하여 분리하였다.

2. Plasmids

본 연구에서 사용한 plasmid로 HIV-YFP는 pHIV- AP와 enhanced yellow fluorescent protein(eYFP)를 재조합하여 만들었다⁸⁾. pHIV-eYFP Δ env Δ Vif Δ Vpr 는 pHIV-AP Δ env Δ Vif Δ Vpr와 eYFP를 재조합하였 으며, pHIV-AP Δ env Δ Vif Δ Vpr는 HIV-1 NL4-3중 Vif/Vpr 부분에서 0.62kb 크기의 부분절단과 gp160 부분에서 1.45kb 크기의 부분절단 후에 재조합으로 제 작하였다⁸⁾.

3. 재조합 바이러스의 획득 및 형질도입

약 5×10^5 개의 293T 세포주(CRL-1573, Rockville, MD, USA)를 직경 60mm 배양접시에 분주하여 배양한 후, 배양 접시 바닥 면적의 70~80% 정도의 세포가 자 라면 상기의 plasmid를 calcium phosphate coprecip itation 방법으로 293T 세포에 형질도입시킨 후 37℃ 5% CO₂ 환경에서 배양하고 약 60시간 후에 상청액을 모은 다음 2,000×g, 5분간 원심분리하여 재조합 바이 러스를 얻었다. 약 1×10^4 개 세포를 24well에 분주하여 HOS 세포주(CRL-1543, Rockville, MD, USA)에 바 이러스 상청액을 DMEM으로 10배로 계단 희석하여 각 각 넣고 3일간 배양한 후 재조합 바이러스 역가를 계산 하였다.

분리된 CD34+ 세포를 24-well plate에 0.5-1× 10^5 개씩 분주한 다음, 15% 우태아혈청(FBS ; GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100 μ g/mL penicillin(GIBCO) 100U/mL streptomycin(GIBCO)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM ; GIBCO)으로 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양하고, 24시간 후에 농축된 재조 합 바이러스(10배 농축)를 넣고 4 μ g/mL polybrene (Sigma)를 첨가하였다. 각 well당 RPMI로 총 500 μ L 로 맞춘 다음 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양하면서 24 시간과 48시간 후에 형질도입의 효과를 유세포기와 면 역형광 현미경으로 분석하였다.

4. 면역형광 현미경과 유세포 분석

세포 배양후 24시간과 48시간 후에 재조합 바이러스

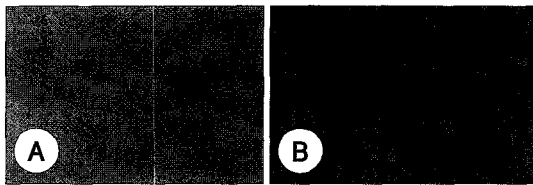


Fig. 1. Microscopy of eYFP-transduced CD34+ cells. Purified CD34+ cells were transduced of culture for 24-48 hours. A : Initial purified CD34+ cell in culture media($\times 10$). B : The transduced CD34+ cell were shown in fluorescence microscopy (Axio-phot, Zeiss) ($\times 20$).

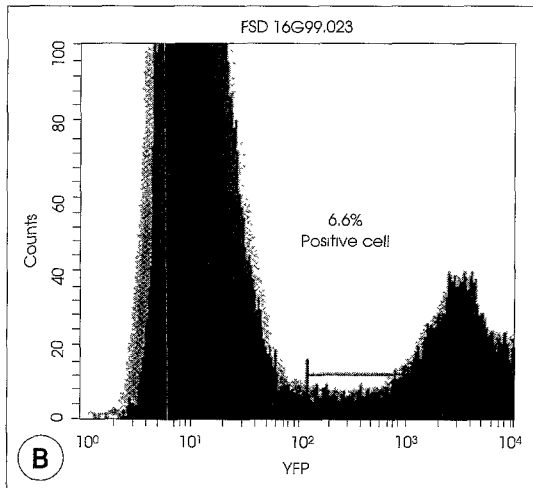
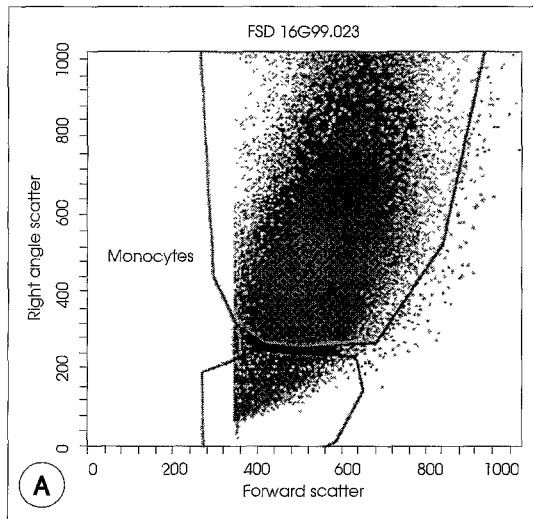


Fig. 2. Flow cytometric analysis of human CD34+ cells infected with lentiviral vector. A : Representative scattergram for the purified mononuclear cells after elimination of adherent cells. B : The percentage of infected cells (eYFP-positive) were measured on human CD34+ cell after transduction of HIV-YFP (VSV-G), pHIV-eYFP Δ env Δ Vif Δ Vpr and pHIV-AP Δ env Δ Vif Δ Vpr.

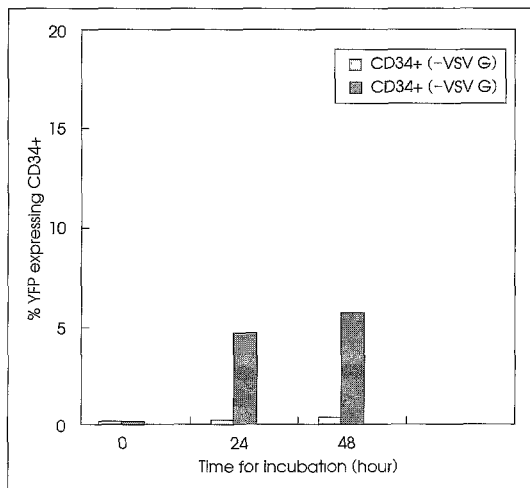


Fig. 3. Transduction of nondividing human CD34 cells by VSV-G pseudotyped HIV-1 based vectors produced in 293T cells.

의 감염 여부를 알기 위해 광학현미경 (Axio-phot, Zeiss) 하에서 yellow fluorescent protein (YFP) 의 형광을 관찰하였고, 또한 세포를 harvest하여 $400\times g$, 5분간 원심 분리한 다음 인산완충식염수 (phosphate buffered saline PBS, pH7.4) 에 채부유하여 FACSCalibur (Beckson-Dickinson, CA) 의 Cell Quest로 YFP 형광을 측정하였다. 총 1×10^4 개의 세포를 분석하였다.

결 과

1. HIV 재조합 바이러스의 역가

각각의 HIV plasmid, 즉 HIV-YFP, pHIV-eYFP Δ env Δ Vif Δ Vpr, pHIV-AP Δ env Δ Vif Δ Vpr와 VSV-G를 293T 세포로의 일시적인 형질도입 후에 얻어진 상청액을 HOS 세포주에서 넣고 배양하여 계산된 HIV 재조합 바이러스의 수는 3.0×10^7 에서 5.0×10^7 IU/mL 이었다.

2. HIV-1 형질도입된 CD34+ 세포의 형광 광학 현미경 소견

재조합 바이러스가 형질 도입된 CD34+ 세포는 eYFP 의 발현에 의해 형광 광학 현미경상에서 초록색 형광을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

3. VSV-G 의 형질도입효과

단핵세포로부터 유착세포를 제거한 후에 얻어진 세포들

중에서 CD34+ 세포의 비율은 $1.6 \pm 0.6\%$ 이었다. 10배로 농축된 HIV 재조합 바이러스가 CD34+ 세포로 형질 도입에 의한 YFP 발현을 유세포분석기로 측정하였는데 (Fig. 2), CD34+ 세포로의 HIV 재조합 바이러스의 형질 도입율은 24시간 후에는 $4.7 \pm 2.4\%$ 였고, 48시간 후에는 $5.7 \pm 2.7\%$ 였다 (Fig. 3). VSVG를 사용하지 않은 경우에는 $0.23 \pm 0.33\%$ 로 저조하였다. 상기의 결과는 각각의 plasmid에서 비슷한 결과를 보였다.

고 찰

조혈모세포로 효과적인 유전자 전달을 위해 필요한 vector로 현재까지 retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus (AAV)와 herpes simplex virus 등이 사용되어 왔는데 이중 Moloney murine leukemia onco-retrovirus (MMLV)는 vector는 숙주세포의 염색체 안으로 안정되게 이입이 되고, 지속적으로 유전자 발현이 되기 때문에 가장 많이 사용되어 왔다. 그러나 MMLV vector를 이용한 조혈모세포로 유전자 전달효과는 murine에서는 50~100%이지만 사람에서는 1% 미만이다. 그 이유는 확실하지 않지만 크게 3가지로 설명될 수 있다. 첫째는 세포분열주기이다. 즉 대부분의 retrovirus는 분열단계의 세포만을 감염시킬 수 있는데, 세포주기가 휴지기 상태 (G0)인 조혈모세포나 근육세포, 신경세포, 망막세포와 같이 완전 분화된 세포로 유전자를 전달하기가 어렵다. 둘째는 재조합 retrovirus가 숙주 세포 내로 침투하기 위해서는 숙주세포의 표면에 있는 특이 수용체인 Pit-1, Pit-2 수용체 (sodium-dependent phosphate symporter; viral binding site)에 결합하여야 하는데, 사람의 조혈모세포는 이런 수용체의 발현이 낮다는 것도 한 이유이다. 셋째, 융합 (fusion), shedding, 역전사, 핵내 이동 및 바이러스 이입과정 중에 어떤 인자의 작용도 한 요인으로 생각할 수 있다. 실제로 retroviral vector를 사용하여 조혈모세포로 형질도입 시에 그 효율을 높이기 위한 방법들이 개발되어져 왔다. Retrovirus와 표적 세포간의 결합을 높이기 위해 retroviral titer를 높이는 방법⁹⁾과 murine 섬유모세포와 함께 조혈모세포를 배양하는 방법이 처음에 시도되어 효율을 높일 수 있었으나 많은 양의 murine 세포를 주입될 가능성과 생체 내에서 복제가능한 바이러스에 대한 추적이 힘들다는 점 때문에 임상에서 사용하기에는 적절하지 못하였다. 최근에

는 재조합 섬유모세포인 CH-296을 사용하여 조혈모세포의 자가복제 능력을 보존하면서 효과적으로 유전자를 전달할 수 있었다¹⁰⁾. 또한 조혈성장인자를 사용하여 세포주기를 조작하는 분열단계로 이끌어내는 방법이 있는데 IL-3, IL-6와 SCF가 처음으로 사용된 조혈성장인자이며 최근에 사용되는 Flt-3와 thrombopoietin은 조혈모세포의 다형성 능력을 보존하면서 동시에 세포를 분화단계로 유도할 수 있어 효과적으로 유전자를 이입시킬 수 있다¹¹⁾. 이런 경우에는 조혈모세포의 증식을 유도하여 형질도입 효과를 증가시킬 수 있는 반면 조혈모세포의 상당 부분은 분화됨으로서 조혈모세포가 갖고 있는 고유 생물학적 특성이 소실되는 문제점이 있다¹²⁻¹⁴⁾. 따라서 이런 문제점을 극복할 수 있는 새로운 vector의 개발이 필요하게 되었다.

최근에 연구되고 있는 lentiviral vector는 미분화 단계의 세포로 세포주기의 조작없이 12~24시간 이내에 직접적으로 유전자를 전달할 수 있는 장점이 있다. 이것은 HIV 유전자중 *vpr* 유전자, *gag* 유전자와 integrase 효소에 의해 만들어지는 이입 전 복합물질이 대상 세포의 핵막을 직접 통과할 수 있는 HIV의 생물학적 특성 때문인데 이런 장점은 retrovirus를 사용하여 조혈모세포로 형질도입할 때 생기는 상기의 문제점을 해결할 수 있게 된다.

본 저자들은 VSV-G 외막에 의한 HIV vector를 사용하여 휴지기 단계의 세포인 CD34+ 세포로 세포주기의 조작없이 12~24시간 이내에 직접적으로 유전자를 전달할 수 있음을 확인하였다. 이런 결과는 다른 연구들에서 보고한 형질도입 효과와 비슷하였다¹⁵⁻¹⁸⁾. 직접적인 형질도입 효과는 VSV-G 외막을 사용하지 않은 경우에는 저조하였는데, 이것은 HIV 바이러스 외막의 특성상 T 세포만을 감염시키기 때문이다. 바이러스가 외막은 대상 세포에 발현된 특이 수용체에 부착하여 세포 내로 들어가는 역할을 한다. 대부분의 CD34+CD38- 세포막에는 amphotropic 수용체에 대한 mRNA 발현치가 낮기 때문에 murine의 amphotropic 외막을 조합하여 사용하는 MMLV vector에 의한 형질도입 효과는 낮다. 최근에는 gibbon ape leukemic virus (GALV) 외막을 사용하여 사람의 조혈모세포로 유전자 도입을 증가시키는 보고가 있다. VSV-G 외막을 pseudotype화한 HIV vector를 사용하여 형질도입시킬 때 조혈성장인자를 사용하는데 이런 경우 형질 도입율이 50% 이상까지 증가한다^{8,12-14)}.

Lentiviral vector는 향후 성공적인 유전자 전달을 약속하는 매개체임이 분명하다. 성공적인 유전자 치료를 위해서는 유전자 전달과 발현 및 안정성에 대해서 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

요 약

목 적 :

조혈모세포에서 viral vector를 이용한 안정된 유전자 전달은 유전성 혈액질환의 유전자 치료의 실현에 우선되어야 한다. 그러나 실제로 조혈모세포의 생물학적 특성 등으로 인해 유전자 도입율이 현저히 낮아 임상적인 적용에는 제한이 있다. 저자들은 조혈모세포로 VSV-G 외막을 사용한 HIV vector의 형질도입 효과를 알아보려고 하였다.

방 법 :

VSV-G를 이용한 HIV-1 vector를 calcium phosphate coprecipitation 방법으로 293T 세포에 형질도입시켜 재조합 농축 바이러스를 얻었다. 분리한 CD34+ 세포에 재조합 농축 바이러스(10배 농축)를 넣은 다음 4 µg/mL polybrene(Sigma)를 첨가하였다. 각 well당 RPMI로 총 500 µL로 맞춘 다음 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하면서 24시간, 48시간 후에 형질도입의 효과를 유세포기와 면역형광 현미경으로 분석하였다.

결 과 :

HIV 재조합 바이러스가 형질도입된 CD34+ 세포는 YFP의 발현으로 초록색의 형광을 나타내었다. 유세포 분석상 CD34+ 세포로 형질도입율은 배양 24시간 후에는 4.7±2.4%였고, 48시간 후에는 5.7±2.7%였다. VSVG를 사용하지 않은 경우에는 0.23±0.33%로 저조하였다.

결 론 :

VSV-G 외막에 의한 HIV vector를 사용하여 CD34+ 세포로 형질도입이 효과적임을 증명하였다. 이런 결과는 조혈모세포를 이용한 유전자 치료의 확대에 기여할 수 있을 것이다.

References

1) Parkman R : *The application of bone marrow transplantation to the treatment of genetic disease. Science*

1986 ; 232 : 1373-1378
 2) Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al : *T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. Science* 1995 ; 270 : 475-480
 3) Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, et al : *Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow from ADA immunodeficient patients. Science* 1995 ; 270 : 470-475
 4) Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM, et al : *Engraftment of gene-modified cells from umbilical cord blood in neonates with adenosine deaminase deficiency. Nat Med* 1995 ; 1 : 1017-1023
 5) Miller DG, Adam MA, Miller AD : *Gene transfer by retroviral vectors occurs only in the cells that are actively replicating at the time of infection. Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 4239-4242
 6) Bregni M, Magni M, Siena S, Di Nicola M, Bonadonna G, Gianni AM : *Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. Blood* 1992 ; 80 : 1418-1422
 7) Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al : *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science* 1996 ; 12 : 263-267
 8) Sutton RE, Wu HT, Rigg R, Bohnlein E, Brown PO : *Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. J Virol* 1998 ; 72 : 5781-5788
 9) Paul RW, Morris D, Hess BW, Dunn J, Overall RW : *Increased viral titers through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines. Hum Gene Ther* 1993 ; 4 : 609-615
 10) Moore KA, Deisseroth AB, Reading CL, Williams DE, Belmont JW : *Stromal support enhances cell-free retroviral vector transduction of human bone marrow long-term culture initiating cells. Blood* 1992 ; 79 : 1393-1399
 11) Hennemann B, Conneally E, Pawliuk R, Leboulch R, Rosejohn S, Reid D, et al : *Optimization of retroviral-mediated gene transfer to human NOD-SCID mouse repopulating cord blood cells through a systemic analysis of protocol variables. Exp Hematol* 1999 ; 27 : 817-825
 12) Nolta JA, Smogorzewska E, Kohn D : *Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction*

- of primitive human hematopoietic cells. Blood* 1995 ; 86 : 101-110
- 13) Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M : *Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 4040-4047
- 14) Luens KM, Travis MA, Chen BP, Hill BL, Scollay R, Murray LJ : *Thrombopoietin, kit ligand and flk2/flt3 ligand together induce increased numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34+Thy-1+Lin- cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. Blood* 1998 ; 91 : 1206-1215
- 15) Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS : *High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. J Virol* 1996 ; 70 : 2581-2585
- 16) Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM : *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 11382-11388
- 17) Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al : *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science* 1996 ; 12 : 263-267
- 18) Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M : *Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 24 : 15266-15271