

Retrovirus를 이용하여 조혈모세포에 유전자를 전달하기 위한 최적화

김 상 경 · 서 헌 석 · [†]이 종 원 · ²신 동 건 · ³이 재 관 · ³김 현 민 · ⁴김 재 식 · ⁴서 장 수
대구효성가톨릭의대 임상병리과, ¹생화학과, ²내과, ³중앙대학교 생명공학과, ⁴경북의대 임상병리과
(접수 : 1999. 9. 13., 게재승인 : 1999. 10. 18.)

Optimization of Retrovirus Mediated-Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells

Sang-Gyung Kim, Hun-Suk Suh, Jongwon Lee[†], Dong-Gun Shin², Jaegwan Lee³, Hyun-Min Kim³,
Jay-Sik Kim⁴, and Jang-Soo Suh⁴
Department of Clinical Pathology, ¹Biochemistry, ²Internal Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung,
³Department of Biotechnology, Chung Ang University, ⁴Department of Clinical Pathology,
Kyungpook National University, Taegu, Korea
(Received : 1999. 9. 13., Accepted : 1999. 10. 18.)

In this study, optimal conditions to infect CD34 positive cells containing hematopoietic stem cells obtained from cord blood and bone marrow were found using two different retroviral vectors expressing human growth hormone (hGH) and β -galactosidase. CD34 positive cells were successfully infected with recombinant retroviruses only when the CD34 positive cells were co-cultured with packaging cells secreting recombinant retroviruses. To find the highest infection efficiency for the gene transfer, CD34 positive cells from cord blood were co-cultured with packaging cells secreting recombinant retroviruses encoding *E. coli lacZ* gene. The highest infection efficiency was obtained when CD34 positive cells were cultured for 3 days, and then co-culturing was done for another 2 days. When CD34 positive cells from bone marrow were co-cultured with packaging cells secreting recombinant retroviruses encoding hGH gene, the maximum amount of hGH was also secreted at the same conditions found above, i.e. 3 days of culture and 2 days of co-culture. These results show that there are optimal conditions for the gene transfer into hematopoietic stem cells regardless of sources of target cells or retroviral vectors used to infect.

Key Words : gene transfer, retroviral vector, hematopoietic stem cells, co-culture, optimal conditions

서 론

유전자조작을 통하여 환자가 필요한 단백질을 환자 자신으로부터 생산되게 하여 질병을 치료하는 유전자요법이 유전병의 치료나 화상 또는 암의 치료에 많이 시도되고 있다(1, 2). 이러한 유전자요법을 이용한 치료는 체외에서의 유전자조작을 통하여 필요한 유전자가 세포로부터 발현되게 한 다음 이 세포들을 체내로 다시 주입하여 체내에서 발현된 단백질이 소기의 치료목적을 달성되게 하는 *ex vivo* 방법이 많이 이용된다.

이 때 장기간 치료가 필요한 경우에는 무한히 증식할 수 있는

능력을 가지는 모세포에 원하는 유전자를 발현시키는 것이 유리하며 이 중에서도 조혈모세포는 무한히 증식할 수 있는 능력과 혈액내의 다양한 세포로 분화하는 능력을 가지고 있어 특히 유리하다. 이러한 장점들 때문에 조혈모세포에 유전자요법(gene therapy)을 함께 적용하여 유전병이나 백혈병 등의 질병들을 치료하기 위한 시도를 하고 있다(3-5). 이 외에도 조혈세포는 신체의 전신을 돌아다니므로 조혈세포 자체가 잘못되어 생기는 유전병뿐만 아니라 혈우병 등 신체전신에 필요한 단백질이 부족하여 생기는 병의 치료에도 적합하다. 최근에는 다약제내성유전자를 이용하여 고용량 항암요법시 용량제한에 따른 항암제의 골수억제를 극복하려는 시도로 외국에서는 이미 제 1 임상 상까지 시행되고 있는 실정이다. 조혈모세포만을 이용하는 방법은 조혈세포의 이상에서 유래된 유전병이나 백혈병 등의 질병치료를 이미 이용되고 있어 세포 그 자체의 유용성은 입증되어 있으므로 유전자요법과 병행하면 그 효용성이 한층 증가하리라 예상된다(6-8).

[†] Corresponding Author : Department of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung, 3056-6, Dae-myung 4-Dong, Nam-Gu, Taegu 705-034, Korea
Tel : 82-53-650-4471, Fax : 82-53-621-4106
E-mail : leejw@cuth.cataegu.ac.kr

유전자요법에 이용하기 위한 조혈모세포는 사람의 골수와 제대혈에도 다양 존재한다. 골수로부터 조혈모세포를 얻는 것은 여러 번 채취가 가능하다는 장점이 있는 반면에 다른 사람의 골수를 이용하는 동종골수이식(allogenic transplantation)인 경우에는 조직적합성항원(human leucocyte antigen, HLA)이 일치하는 골수 공여자를 찾기가 힘든 단점이 있다(9). 반면에 제대혈로부터 조혈모세포를 얻는 것은 값싸고 면역성이 약해 HLA가 완전하게 일치하지 않아도 되는 장점이 있는 반면에 채취할 수 있는 제대혈의 양에 한계가 있다는 단점이 있다(10). 따라서, 조혈모세포를 이용한 유전자요법이 보다 용이해지기 위해서는 이렇게 두 종류로부터 온 조혈모세포에 대한 유전자전달방법이 모두 확립되어 있어야 한다.

한편, 유전자치료를 고려해야 할 중요한 사항으로는 유전자요법에서 발현시키고자 하는 세포의 적절한 선택 이외에 조혈모세포에 원하는 유전자를 효과적으로 전달하는 것이다(11). 현재 임상시험중인 유전자치료 프로토크의 유전자전달에 retroviral vector를 많이 이용하고 있는데 이는 비교적 큰 유전자를 삽입할 수 있고, 숙주세포에 일단 무작위로 이입되면 세포의 증식 및 분화에 상관없이 이입된 유전자의 지속적인 발현을 기대할 수 있는 장점 때문이다. 반면 높은 역가의 재조합 virus를 얻기가 어렵고 retrovirus의 특성상 활발히 증식하는 세포에 한하여 감염되는 단점이 있다. 따라서, retroviral vector를 이용하여 조혈모세포로부터 원하는 단백질을 생산하여 치료에 이용하기 위해서는 앞에서 언급한 단점을 극복하기 위한 최적조건을 찾아 낼 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 사람성장호르몬(hGH) 유전자와 reporter gene으로 대장균 *lacZ* 유전자가 이미 클로닝되어 있는 재조합 retrovirus를 모델계(model system)로 이용하여 골수와 제대혈로부터 얻어진 사람조혈모세포를 실험실에서 배양하여 감염시키는 최적의 방법을 찾아내고자 하였다.

재료 및 방법

재료

GeneClean II, Wizard DNA Clean-Up System & Wizard Plus Minipreps DNA Purification Kit 및 Qiagen Plasmid Maxi Kit들은 각각 BIO101, Inc.(CA, USA), Promega(WI, USA) 및 Qiagen(CA, USA)들로부터 구매되었다. Dulbecco's Modified Eagles' Medium(DMEM), Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM), fetal bovine serum(FBS), G418, 및 penicillin/streptomycin들은 Gibco BRL(MD, USA)로부터, CD34 양성세포를 분리하는 mini-MACS와 human growth hormone (hGH) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit 및 Methocult H4434들은 Miltenyi Biotech Inc.(Germany), Boehringer Mannheim(Germany) 및 Stem Cell Technologies Inc.(Canada)로부터 각각 구매되었다. CD34 monoclonal antibody(CD34-PE) 및 stem cell factor(SCF)들은 Immunotech(France)과 R & D Systems(MN, USA)으로부터 각각 구매되었다. Recombinant interleukin-3(IL-3), interleukin-6(IL-6), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 및 erythropoietin들은 Sigma(MO, USA)로부터 각각 구매되었다.

Retroviral vectors

본 실험에서는 hGH의 발현은 MFG에 hGH이 클로닝된 MFG-

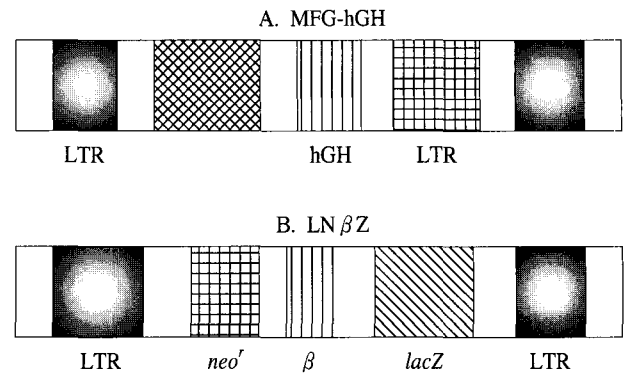


Figure 1. A schematic diagram of retroviral vectors encoding human growth hormone (hGH) and *E. coli lacZ* gene. In MFG-hGH (A), hGH is expressed from the retroviral long terminal repeat (LTR). In LNβZ (B), *Escherichia coli lacZ* gene and *neo'* genes are expressed from rat actin and LTR promoters, respectively. Both vectors are linked to an *E. coli* plasmid, pBR322.

hGH(Figure 1A)가, β-galactosidase의 발현은 쥐의 actin을 만드는 β promoter로부터 일어나는 LNβZ(Figure 1B)가 각각 이용되었다. 이 중에서 MFG vector에는 selectable marker가 없어 selection이 어려운 반면에 MFG는 일반적으로 다른 retroviral vector에 비해 클로닝된 유전자로부터 발현되는 양이 많은 장점이 있다(12).

세포주와 세포배양

생쥐의 배아로부터 유도된 NIH3T3 세포(ATCC CRL1658)와 amphotrophic retroviral packaging cells인 PA317(ATCC CRL9078) 들은 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin 가 들어있는 DMEM에서 5% CO₂가 들어 있는 세포배양기에서 37°C를 유지하면서 배양되었다.

CD34 양성세포의 분리

먼저, CD34 양성세포를 포함하고 있는 단핵세포들은 제대혈과 골수로부터 다음과 같은 방법으로 분리되었다; 제대혈과 골수는 혈액응고를 방지하기 위해 필요한 양(10 U/mL)의 heparin의 존재하에서 각각 버려지는 태반과 정상인으로부터 얻어졌다. 다음에 이들을 각각 같은 양의 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)과 섞은 다음 이 것을 다시 0.9% saline에 녹아있는 같은 양의 3% gelatin과 섞었다. 이 용액을 37°C에서 15분 동안 방치하여 두 층이 확실하게 생겼을 때 상층액을 떠내 이것을 원심분리하였다. 이 때 얻어진 침전물을 HBSS로 씻은 후 단핵세포들은 Histopaque(1.007 g/mL)을 이용한 밀도구배 원심분리로 분리되었다. 얻어진 단핵세포들은 10% FBS를 가지는 IMDM에서 2 시간 동안 배양하여 부착세포들을 제거하였다. 부착되지 않은 세포들은 phosphate-buffered saline(PBS)으로 두 번 씻은 후 최종 부피가 300 μl가 되게 하였다(13, 14). 이들 세포들로부터 CD34 Isolation-Kit(Miltenyi Biotech Inc., Germany)를 이용하여 CD34 양성세포들이 얻어졌다.

CD34 양성세포들의 배양 및 집락형성능 검사(colony assay)

CD34 양성세포(1×10^5 세포/mL)들은 20% FBS, 4 mM L-glutamine, 10 μM hydrocortisone, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 20 ng/mL GM-CSF, 10 ng/mL IL-3, 10 ng/mL

IL-6, 25 ng/mL SCF 및 2.5 U/mL erythropoietin이 들어있는 IMDM의 조성으로 이루어진 배지 3 mL로 60 mm dish에서 배양되었다(15). CD34 양성세포의 조혈모세포로서의 성질을 알아보기 위해 그 집락형성능 검사를 다음과 같이 실시하였다; CD34 양성세포(750개)들을 0.6 mL의 Methocult H4434와 섞은 후 24 well plate에서 14일 동안 배양하였다. 50개 이상의 세포들을 가진 것들을 집락으로 계산하였다.

세포농도가 세포성장과 집락형성에 미치는 영향

제대혈로부터 얻어진 다른 농도의 CD34 양성세포(1.0×10^4 , 2.0×10^4 , 5.0×10^4 및 7.0×10^4 세포/mL)들은 9일 동안 배양되었다. 배양 중 세포농도는 매 3일마다 50 μ l의 배지를 취한 다음 50 μ l의 0.25% trypan blue와 섞어 측정하였으며, 아울러 집락형성능 검사도 시행하였다. 비슷한 실험들이 골수로부터 얻어진 CD34 양성세포에 대해서 한가지 농도(5.0×10^4 세포/mL)에 대해서만 시행되었다.

바이러스 감염

hGH 유전자를 가지는 재조합 retrovirus는 retroviral vector인 MFG-hGH을 packaging cell line인 PA317에 이미 보고된 바 있는 calcium phosphate-mediated transfection(16, 17)에 의해 얻어졌다. 가장 높은 바이러스 titer를 가지는 clone을 얻기 위해 G418에 의해 선택된 colony들을 더 키운 다음 바이러스를 포함하는 상층액으로 NIH3T3 세포(10^6 세포/100 mm dish)에 감염시켰다. 이 때 hGH를 가장 많이 분비하는 clone을 선택하여 최적 조건을 찾는 실험에 이용하였다. 대장균 *lacZ* 유전자를 가지는 재조합 retrovirus인 LN β Z는 이미 이 retrovirus를 분비하도록 만들어진 PA317로부터 얻어졌다. 이 때 바이러스의 titer는 이 바이러스를 NIH3T3에 감염시키고 G418으로 선택한 후 얻어진 colony 수를 측정하여 얻었으며 이 때의 titer는 약 10^5 CFU/mL이었다.

표적세포인 NIH3T3와 CD34 양성세포들에 대한 바이러스의 감염은 바이러스를 가지는 상층액을 이용하거나 또는 바이러스를 분비하는 packaging cell과 동시배양을 하여 이루어졌다. NIH3T3와 CD34 양성세포를 상층액을 이용하여 감염시키는 것은 다음과 같이 이루어졌다: NIH3T3를 상층액으로부터 얻은 virus로 감염시키기 위해 일정수 (2×10^6 세포/mL)의 NIH3T3에 대해 8 μ g/mL의 polybrene 존재하에서 MFG-hGH 바이러스 상층액 (10 μ l, 100 μ l 및 1 mL)으로 24시간 감염시켰다. 감염 24시간 후 새로운 배지로 갈고 난 매 24시간마다 분비되는 hGH를 정량하였다. 한편, CD34 양성세포에 대한 감염은 다음과 같이 이루어졌다: CD34 양성세포 5×10^4 세포/mL를 48시간 동안 배양한 후 polybrene의 존재하에서 바이러스 상층액 1,000 μ l로 24시간 감염시켰다. 감염 24시간 후 새로운 배지로 갈고 난 매 24시간마다 분비되는 hGH를 정량하였다.

한편, 동시배양을 이용한 CD34 양성세포에의 감염은 hGH 유전자를 가지는 retrovirus를 분비하는 PA317(PA317-MFG-hGH)과 대장균 *lacZ* 유전자를 가지는 retrovirus를 분비하는 PA317(PA317-LN β Z)과의 동시에 배양하면서 이루어졌다. 먼저, 대장균 *lacZ* 유전자를 reporter gene으로 이용하여 제대혈 CD34 양성세포의 최적조건을 확립하는 실험은 다음과 같이 이루어졌다: PA317-LN β Z를 35 mm 배양 dish에 배양하여 전체 면적의 약

80% 정도까지 자랐을 때 배지를 교환하였다. 배지 교환 24시간 후에 체외배양된 CD34 양성세포 1×10^5 세포/mL를 8 μ g/mL의 polybrene 존재하에서 동시배양하였다(18). 이 때 동시배양시간과 동시배양 전의 배양시간에 따른 최적조건을 β -galactosidase assay를 통해 다음과 같이 구하였다: 감염시간에 따른 최적조건을 구하기 위해서는 CD34 양성세포를 6일 동안 배양한 후 동시배양시간을 4, 12, 24 및 48시간으로 하였을 때의 감염효율을 측정하였다. 또한, 배양시간에 따른 감염효율을 측정하기 위해서는 CD34 양성세포를 1, 3 및 6일 동안 배양한 후 동시배양시간을 48시간으로 하였을 때의 감염효율을 측정하였다. 한편, PA317-MFG-hGH을 이용하여 CD34 양성세포를 감염시키기 위한 최적 조건의 확인은 다음과 같이 이루어졌다: 먼저, 제대혈로부터 얻은 CD34 양성세포 1×10^5 세포/mL를 3일간 배양한 후 hGH를 생산하는 packaging cell과 48시간동안 동시배양하여 감염시켰다. 감염 후 CD34세포만 분리하여 PBS로 세척한 다음 다시 배양하면서 그 상층액에 분비되는 hGH를 1, 3 및 6일에 각각 정량하였다. 아울러, 골수로부터 온 CD34 양성세포(3×10^5 세포/mL)에 대한 실험도 제대혈로부터 온 CD34 양성세포에 대한 실험과 동일한 방법으로 이루어졌으나 동시배양을 48시간동안 뿐만 아니라 24시간 및 72시간 동안에 대해서도 시행하였다.

정량실험

감염된 표적세포로부터 분비된 hGH의 양은 Boehringer Mannheim(Germany)으로 구매된 hGH ELISA kit를 이용하여 이루어졌다. 한편, 대장균 *lacZ* 유전자를 가지는 재조합 retrovirus를 이용하여 감염효율을 측정하는 실험은 flow cytometer를 이용하여 감염된 세포를 감염되지 않은 세포로부터 분리하여 이루어졌다.

결과 및 고찰

실험의 개략도

재조합 retrovirus로 조혈모세포를 감염시키는 최적조건은 Figure 2와 같은 순서로 진행되었다. 먼저, 사람성장호르몬(hGH) 유전자가 클로닝되어 있는 retroviral vector, MFG-hGH를 PA317 세포에 transfection시켜 virus titer가 가장 높은 packaging cell line을 확립하였다(Figure 2, a). 이렇게 얻어진 재조합retrovirus를 이용하여 표적세포를 감염시키는 방법(Figure 2, b)으로는 virus 상층액을 이용하거나(Figure 2, b.1) 또는 재조합 retrovirus를 생성하는 packaging cell과 동시배양시켜 이루어졌다(Figure 2, b.2).

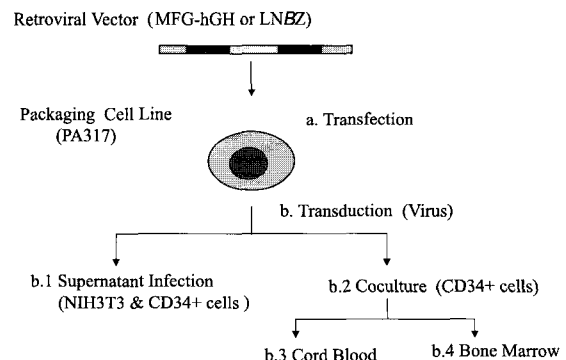


Figure 2. A schematic diagram to infect hematopoietic cells with retroviral vectors. Refer to the text for details.

상층액을 이용한 실험에서의 표적세포로는 NIH3T3와 분리된 CD34 양성세포를 이용하였으며, 동시배양에서의 표적세포로는 제대혈과 골수로부터 분리된 CD34 양성세포를 각각 이용하였다. 한편, 감염된 정도는 상층액을 이용하거나(Figure 2, b.1) 또는 골수로부터 분리된 CD34 양성세포를 이용하는 경우(Figure 2, b.4)에는 hGH을 정량하여 얻어졌고, 제대혈로부터 분리된 CD34 양성세포를 이용하는 경우(Figure 2, b.3)에는 hGH과 β -galactosidase를 정량하여 얻어졌다.

제대혈과 골수로부터 CD34 양성세포의 분리 및 배양

조혈모세포를 이용한 유전자치료의 관건은 적은 시료로부터 가능하면 많은 세포를 확보하는 것과 발현시키기를 원하는 유전자를 이 표적세포에 효율적으로 전달하는 것이다. 많은 세포 특히 CD34 양성세포를 확보하기 위해서는 우선 주어진 source(제대혈과 골수)로부터 가능하면 많은 CD34 양성세포를 분리해 내는 것이 중요하다. 이 때 제대혈로부터 CD34 양성세포를 포함한 단핵세포를 분리하는데는 시간과 돈이 많이 드는 Percoll 또는 Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용한 밀도구배 원심분리법이 많이 이용되었다. 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 우선 값싼 gelatin을 이용하여 그 성능을 비교하였다. 제대혈에 대해 gelatin법을 적용한 결과 3.8×10^6 세포/mL의 단핵세포가 얻어져 1.5×10^6 세포/mL의 단핵세포가 얻어진 Ficoll-Paque법보다 우수하여 본 연구에서는 이 후로 gelatin법을 사용하였다. 한편, 골수로부터 분리하는 경우에도 제대혈의 경우와 유사한 7×10^6 세포/mL의 단핵세포가 얻어졌으며 이는 제대혈과 골수의 단위부피 당 들어있는 세포의 수가 같기 때문인 것으로 사료된다(19).

Gelatin법을 이용하여 제대혈로부터 분리된 단핵세포로부터 다시 CD34 양성세포를 분리한 후 세포배양이 시행되었다(Figure 3). 이 때 retrovirus는 자라는 세포에만 감염하므로, 초기세포농도가 CD34 양성세포의 성장에 미치는 영향이 조사되었다. 뿐만 아니라 CD34 양성세포가 배양 중에 가지는 세포 성장 능력을 알아보기 위해 배양 중인 세포의 집락형성능 검사도 아울러 실시하였다. 세포들은 성장배지에서 세포수가 5.0×10^4 세포/mL일 때 가장 빠르게 자랐으며 9일간의 배양 후에는 그 세포수가 34배 증식하였다(Figure 3A). 하지만 colony를 생성할 수 있는 세포수는 배양 전에 27%인데 반해 배양 9일째에는 2%로 급격하게 감소하였다. 한편, 골수로부터 분리된 CD34 양성세포에 대해서도 가장 빨리 성장하는 세포농도도 5×10^4 세포/mL이었다(data not shown). 이 세포들은 세포배양 3일과 6일 후 각각 5배와 30배 증식한 반면 colony를 형성할 수 있는 세포의 비율은 배양 2일째 27%에서 배양 5일째 12%로 감소하였다. 이러한 결과들은 제대혈과 골수로부터 온 CD 34 양성세포들의 성장 방식이 서로 비슷한 것을 나타낸다.

Retroviral vector를 이용한 유전자요법에서 retrovirus는 자라는 세포에만 감염되므로 유전자발현이 가능하면 많은 세포에서 이루어지도록 하기 위해서는 가능한 한 많은 세포를 빨리 증식시켜서 최종적으로는 감염된 세포를 많이 얻는 것이 중요하다. 하지만, 감염된 세포가 장기간 발현되기 위해서는 가능하면 증식이 가능한 조혈모세포에 감염시켜 발현시키는 것 또한 중요하다. 이 때 유전자요법에 맞는 세포분리 및 배양조건으로는 전체 세포수를 많이 얻을 수 있을 뿐만 아니라 CD34 양성세포도 많

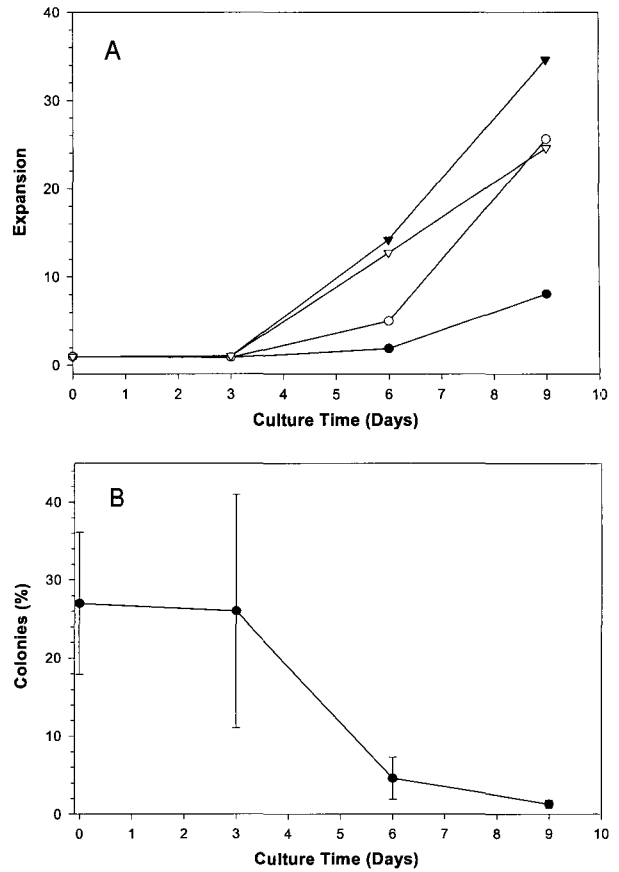


Figure 3. Cell culture of CD34 positive cells obtained from cord blood. (A) Cell growth. Cell numbers were counted at different culture time and depicted as expansion by setting initial cell numbers at 1. Initially, different cell numbers were added; 1×10^4 (●), 2×10^4 (○), 5×10^4 (▼), and 7×10^4 (▽) cells/mL. (B) Colony formation. Cells at different culture time were taken and colony assay was done for initial cell concentration of 5×10^4 cells/mL. Fraction of cells which formed colonies were depicted as colonies (%).

이 얻을 수 있는 조건을 찾아내는 것이 중요하다. 그러나, 본 연구로부터 세포증식과 조혈모세포의 분율은 서로 반비례하는 현상이 관찰되었으므로 유전자요법에 맞는 최적의 배양조건은 다시 찾아내는 것이 중요하여 다음과 같은 실험들을 실시하였다.

상층액을 이용한 표적세포의 감염

hGH을 가지는 재조합 retrovirus가 정상적으로 작용하는지를 알아보기 위해 amphotrophic recombinant retrovirus에 의해 감염이 잘 된다고 알려진 NIH3T3세포를 표적세포로 하여 재조합 retrovirus를 가지는 상층액으로 감염시켰다(Figure 4). 2×10^6 세포들이 10, 100와 1,000 μ l의 상층액으로 감염되었을 때, 감염된 세포들은 assay kit로 측정될 만한 양의 hGH(10 μ g/mL 이상)을 분비하였을 뿐만 아니라 분비되는 양은 배양시간에 따라서 증가하였다. 이러한 결과로부터 재조합 retrovirus들은 세포에 감염하였을 때 정상적으로 작동하는 것을 알 수 있다. 그러나, 제대혈과 골수로부터 분리된 CD34 양성세포가 재조합 retrovirus를 포함하는 상층액으로 감염되었을 때는 10 pg/mL 이하의 hGH이 분비되었다(data not shown). 이러한 현상은 조혈모세포가 NIH3T3보다 성장이 느리고 또한 사람으로부터 온 세포로 인해 감염효율이 낮아 생긴 현상으로 사료된다.

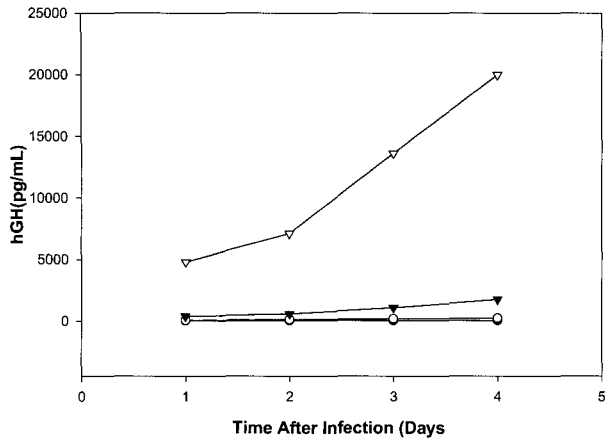


Figure 4. Infection of NIH3T3 cells with supernatant containing recombinant retroviruses. Different volumes of supernatant containing recombinant retroviruses encoding hGH (MFG-hGH) were used to infect 2×10^6 cells/mL of NIH3T3. Concentrations of hGH secreted were measured at different time after infection. Volumes of supernatants used for infection were 0 (●), 10 (○), 100 (▼) and, 1,000 (▽) μL/mL.

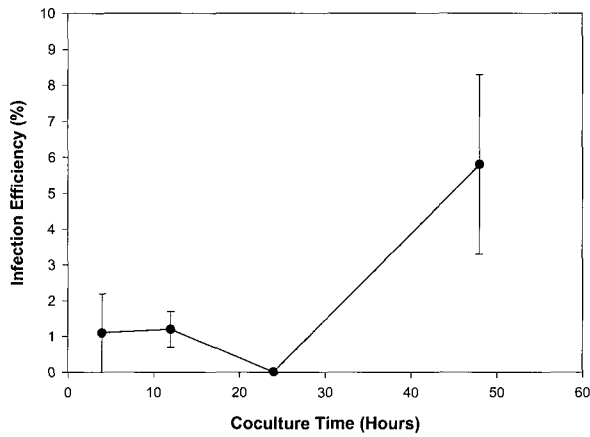


Figure 5. Infection efficiency at different co-culture time by co-culturing CD34 positive cells from cord blood with packaging cells secreting recombinant retroviruses. CD34 positive cells (1×10^5 cells/mL) obtained from cord blood were cultured for 6 days before the target cells were infected by co-culturing different time with packaging cells secreting recombinant retroviruses encoding *Escherichia coli lacZ* gene. Flow cytometer was used to measure fraction of infected cells. Infection efficiency (%) was obtained by dividing infected cells with total cells counted.

동시배양에 의한 CD34 양성세포의 감염

CD34 양성세포에 대한 재조합 retrovirus의 감염율을 높이기 위해 packaging cell로부터 분리되는 재조합 retrovirus가 CD34 양성 세포들에 계속 감염할 수 있는 동시배양방법을 이용하였다. 이러한 동시배양법을 이용하여 CD34 양성세포에 대한 최적조건을 찾아내기 위해 본 연구에서는 hGH를 발현하여 분리하는 것 (MFG-hGH)과 대장균 β-galactosidase를 발현하는 lacZ 유전자를 가지는 것 (LNβZ)의 두 가지 retroviral vector를 이용하여 실험을 수행하였다. LNβZ를 이용하면 표적세포에 대한 virus의 감염효율을 구할 수 있는 장점이 있는 반면에 MFG-hGH를 이용하면 세포전체로부터 분리되는 단백질의 양을 구할 수 있어 실제 유전자요법시 나타나는 현상을 반영하는 장점이 있어 서로 보완적이다.

먼저, 대장균 lacZ 유전자를 이용하여 재대혈로부터 분리된

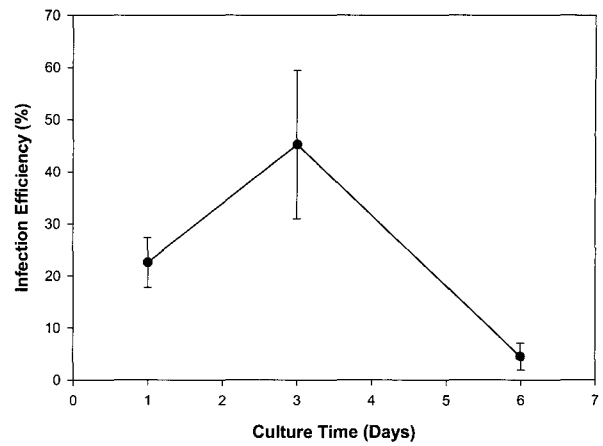


Figure 6. Infection efficiency at different culture time by co-culturing CD34 positive cells from cord blood with packaging cells secreting recombinant retroviruses. CD34 positive cells (1×10^5 cells/mL) obtained from cord blood were cultured for 1, 3 and, 6 days before the target cells were infected by co-culturing for 2 days with packaging cells secreting recombinant retroviruses encoding *Escherichia coli lacZ* gene. Flow cytometer was used to measure fraction of infected cells. Infection efficiency (%) was obtained by dividing infected cells with total cells counted.

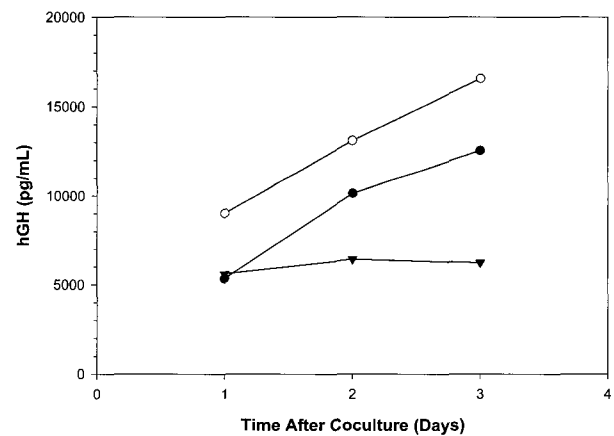


Figure 7. Optimal conditions for infecting CD34 positive cells from bone marrow with recombinant retroviruses encoding MFG-hGH by co-culture. CD34 positive cells (3×10^5 cells/mL) obtained from bone marrow were cultured for 3 days before the target cells were infected by coculturing for 1(●), 2(○) and 3(▼) days with packaging cells secreting recombinant retroviruses encoding hGH gene. After co-culture was done, CD34 positive cells were isolated and cultured. hGH secreted into growth medium was measured at different time after co-culture.

CD34 양성세포가 최대 감염되는 배양조건을 찾아내었다. 동시배양시간에 따른 최대의 감염효율을 찾기 위해 CD34 양성 세포들을 6일간 배양한 후 동시배양에 의해 4, 12, 24 및 48 시간 배양되었다(Figure 5). 본 연구에서는 세포성장속도가 비록 5×10^4 세포/mL에서 최대의 성장속도를 나타내었지만 감염된 세포로부터 분리되는 양을 최대 하기 위해 1×10^5 세포/mL의 세포농도가 사용되었다. 48시간 이상의 동시배양에서는 많은 양의 산이 분리되는 관계로 48시간까지만 배양하였다. 네 가지의 다른 동시 배양시간 중에서 48시간의 동시배양에서 최대의 감염효율을 얻을 수 있었다. 다음에는 동시배양 전의 배양시간에 따른 최대 감염효율을 얻기 위해 1×10^5 세포/mL의 CD34 양성세포들을 1,

3 및 6일간 각각 다른 시간 배양한 후 packaging cell과 48시간 동시배양되었다(Figure 6). 최대의 감염효율은 CD34 양성세포와 packaging cell을 3일 동안 동시배양할 때 얻어졌으며 이 때의 최대 감염효율은 44.6%이었다. 반면에 6일 동안 동시배양되었을 때의 감염효율은 5.5%밖에 되지 않았다. 여기서 동시배양으로 감염이 가능한 것은 상층액을 이용하는 경우에는 retrovirus 자체가 불안정하여 37°C 배양배지에서 그 반감기가 6~8시간 밖에 되지 않아 그 감염이 짧은 시간동안에 일회성으로 그치는 반면에 동시배양을 실시하면 새로운 재조합 retrovirus가 끊임없이 공급되어 그 감염효율을 높일 수 있어 생긴 것이다(20). 뿐만 아니라 packaging cell로부터 분비된 성장 인자들 또한 CD34 세포의 증식을 도와 감염효율을 또한 높였을 것으로도 사료된다(18). 한편, 최대 감염효율이 세포수가 많이 얻어지는 6일 동안의 배양 후의 동시배양보다는 세포성장이 빠른 3일 동안의 배양 후의 동시배양에서 얻어졌다는 것은 세포성장이 retrovirus의 효과적인 감염에 필요하다는 것과 일치하는 결과이다. 또한, Figure 3에서 나타난 것과 같이 배양시간이 길어지면 colony를 형성할 수 있는 조혈모세포의 수가 줄어들므로 동시배양에서 감염된 조혈모세포를 최대로 얻기 위해서는 가능하면 배양시간을 3일보다도 짧게 하는 것이 유리하리라 사료된다. 마지막으로, 세포밖으로 분비되지 않는 대장균 *lacZ* 유전자를 이용하여 얻어진 최적조건(3일간 배양, 2일간 동시배양)을 이용하여 hGH 유전자 (MFG-hGH)를 가지는 재조합 retrovirus를 제대혈로부터 얻어진 CD34 양성세포에 동시배양에 의해 감염시키는 실험을 실시하였다. 위의 조건으로 감염된 세포들을 1, 3 및 6일간 더 배양하면서 분비되는 hGH를 측정하여 결과 각각 약 5,000, 7,000, and 9,000 pg/mL의 hGH로 나타났다(data not shown). 이러한 결과는 hGH를 가지는 재조합 retrovirus도 동시배양에 의해서는 CD34 양성세포에 쉽게 감염할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한, hGH를 가지는 재조합 retrovirus(MFG-hGH)가 골수로부터 얻어진 CD34 양성세포에도 적용될 수 있는가를 조사하였다. 이를 위해 동시배양시간에 따른 효과를 다음과 같이 조사하였다; 3×10^5 세포/mL의 CD34 양성세포들을 3일 동안 배양한 다음 hGH를 분비하는 packaging cell과의 동시배양시간을 1, 2 및 3일 동안 각각 다르게 수행하였다. 동시배양이 끝난 후 감염된 세포들을 분리한 후 또 다른 3일 동안 배양하면서 CD34 양성세포로부터 분비되는 hGH를 측정하였다(Figure 7). 대장균 *lacZ* 유전자에 대해서와 같이 동시배양시간을 2일로 하였을 때 hGH이 최대로 분비되었다. 반면에 동시배양시간을 3일로 하였을 때 분비되는 hGH의 양이 오히려 최소로 나타났으며, 이러한 현상은 앞서서도 이미 언급한 바와 같이 너무 오래 동안 동시 배양하면서 산에 의해 세포들이 손상을 받아 일어난 현상으로 사료된다. 이상의 결과로부터 CD34 양성세포에 재조합 retrovirus를 감염시키는 최적조건을 찾기위해 사용된 reporter gene(대장균 *lacZ*, hGH)이 발현되는 방식에서 차이가 나고 사용된 CD34 양성세포의 source(골수, 제대혈)가 다름에도 불구하고 최대로 감염되는 조건은 동일하게 나타나(3일 배양, 2일 동시배양) 최적조건을 실제 유전자요법에 도 적용될 수 있으리라 사료된다.

요 약

본 연구는 제대혈과 골수로부터 얻은 조혈모세포를 재조합

retrovirus로 감염시킬 때의 최적조건을 human growth hormone (hGH)과 β -galactosidase를 발현하는 두 가지의 다른 retroviral vector를 이용하여 찾았다. Retrovirus는 자라는 세포에만 감염하는 것으로 알려져 있어 이에 대한 최적조건을 구하기 위해 세포 배양을 통해 조혈모세포의 성장곡선을 얻었으며, 또한 감염된 세포를 환자에게 다시 넣는 유전자요법에서는 이 세포가 체내에서 가능하면 조혈모세포의 기능을 가지는 것이 요구되어 이 때 얻어진 세포의 분열능을 나타내는 집락형성 세포분율을 구하였다. 우선, 세포성장에 대해 조사한 결과 초기에 넣은 세포농도가 5×10^4 세포/mL일 때 세포성장속도가 가장 빠른 것으로 나타났다. 그러나, 배양시간이 지남에 따라 집락을 형성할 수 있는 능력은 급격하게 감소하여 유전자요법을 위한 최적조건을 구하기 위해서는 이를 고려한 최적화가 필요하였다. 이를 위한 예비실험으로 감염이 잘 된다고 알려진 NIH3T3 세포에 retrovirus 상층액으로 감염시킨 결과 성공적으로 유전자가 전달된 것을 배지에 분비되는 hGH를 측정하여 확인하였다. 이러한 결과로부터 hGH를 발현하는 재조합 retrovirus는 정상적으로 작동하는 것을 확인하였다. 그러나, 조혈모세포인 경우에는 상층액으로부터 감염을 시킨 결과 감염이 이루어지지 않아 이러한 문제점을 극복하기 위해 조혈모세포와 retrovirus를 분비하는 packaging cell을 동시배양하는 방법을 채택하였다. 제대혈로부터 얻은 조혈모세포와 대장균 *lacZ* 유전자로부터 β -galactosidase를 분비하는 packaging cell을 이용한 경우 동시배양의 경우 조혈모세포를 3일 동안 세포배양을 한 후 이 증식된 세포를 48시간 동안 동시배양하면서 감염시켰을 때 최대의 감염율을 나타내었다. 한편, 골수로부터 얻은 조혈모세포와 hGH를 분비하는 packaging cell과 동시배양시켰을 때 세포농도가 다름에도 불구하고 제대혈에서의 마찬가지로 조혈모세포를 3일 동안 세포배양한 후 48시간 동안 동시배양하는 경우에 hGH이 최대로 분비되었다. 이러한 결과로부터 세포의 source나 세포농도와 관계없이 유전자전달을 통한 단백질 발현에 있어서 최적조건이 존재하였다. 그러나, 이러한 경우에 유전자전달이 완료되는 시점이 배양을 시작하지 5일이 되므로 집락을 형성할 수 있는 세포의 분율이 약 1/3로 감소하였다. 따라서, 이러한 결과를 유전자요법에 적용하는 경우에는 그 목적에 따라 적절한 실험조건을 선정하는 것이 필요하리라 사료된다.

감 사

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(과제번호: 997-020-E0004)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. 이종원, 김장환 (1995), 유전자요법, *생물공학 News*, **2**, 315-329.
2. Chang, P. L. (1995), *Somatic Gene Therapy*, p. 1-6, CRC Press, Boca Raton, FL.
3. Gottesman, M. M., U. A. Germann, I. Aksentijevich, Y. Sugimoto, C. O. Cardarelli, and I. Pastan (1994), Gene transfer of drug resistance genes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **716**, 126-139.
4. Dracker, R. A. (1996), Cord blood stem cells: how to get

- them and what to do with them, *J. Hematother.* **5**(2), 145-148.
5. Lu, L., R. N. Shen and H. E. Broxmeyer (1996), Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **22**(2), 61-78.
 6. Davies, S. M. and J. E. Wagner (1996), Overview: Umbilical cord blood stem cells and transplantation, *Third International Transplants*, p4.
 7. Wagner, J. E., J. Roenthal, R. Sweetman, X. O. Shu, S. M. Davies, N. K. C. Ramsay, P. B. McGlave, L. Sender and M. S. Cairo (1996), Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease, *Blood* **88**(3), 795-802.
 8. Roitt, I., J. Brostoff and D. Male (1996), *Immunology* 4th edit., p. 26.1-26.13, Mosby. London, UK.
 9. Hoffbrand, A. V. and J. E. Pettit (1993), *Essential Haematology*, 3rd edit. Blackwell Scientific Publications. p. 130-140, Oxford, UK.
 10. O'Reilly, R. J., J. A. Hansen, J. Kurtzberg, J. Henslee-Downey, M. Martelli and F. Aversa (1996), Allogenic marrow transplants: approaches for the patient lacking a donor. p. 132-146 In: G. P. Schechter, and J. R. McArthur, (ed.) *Hematology 1996: Education Program of American Society of Hematology*.
 11. Robbins, P. D. (1997), *Gene Therapy Protocols*. p. 213-263, Humana Press. Totowa, NJ.
 12. Byun, J., S. H. Kim, J. M. Kim, S. S. Yu, P. D. Robbins, J. Yim and S. Kim (1996), Analysis of the relative level of gene expression from different retroviral vectors used for gene therapy, *Gene Therapy*, **3**, 780-788.
 13. 성기웅, 최형수, 이재경, 유경하, 전종관, 김석현, 김의중, 박경덕, 박혜정, 박선옥, 장중환, 신희영, 안효섭 (1995), 제대혈이식을 위한 제대혈의 채혈, *대한혈액학회지* **30**(3), 463-472.
 14. 성기웅, 강형진, 이준아, 한효정, 최형수, 박현진, 유은선, 김석현, 유경하, 장중환, 신희영, 안효섭 (1996), 제대혈은행 설립을 위한 제대혈의 적혈구 분리방법에 관한 연구, *대한혈액학회지* **31**(3), 393-400.
 15. 조덕연, 김현수, 박상준, 김중숙, 최지영, 윤환중, 김삼용 (1996), 골수세포의 단기배양을 통한 조혈전구세포의 증폭, *대한혈액학회지* **31**(2), 259-74.
 16. Chen, C. and H. Okayama (1987), High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
 17. Southern, P. J. and P. Berg (1982), Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter, *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327-341.
 18. Licht, T., I. Aksentijevich, M. M. Gottesman and I. Pastan (1995), Efficient expression of functional human MDR-1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells, *Blood* **86**, 111-21.
 19. Hao, Q. L., A. J. Shah, F. T. Thiemann, E. M. Smogorzewska and G. M. Crooks. (1995), A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow, *Blood* **86**, 3745-3753.
 20. Havenga, M., P. Hoogerbrugge, D. Valerio and H. Es (1997), Retroviral stem cell gene therapy, *Stem Cell* **15**, 162-79.