

IBM 이식을 통한 골수 조혈 줄기 세포에의 효과적인 유전자 도입

이현주¹ · 이용수¹ · 김혜선¹ · 김유경¹ · 김재환¹ · 박진기² · 정학재² · 장원경² · 김동구^{1,†}

¹포천중문의과대학교 차 줄기세포 연구소, ²축산과학원 응용생명공학과

Efficient Gene Delivery into Hematopoietic Stem Cells by Intra-Bone Marrow Injection of Retrovirus

Hyun-Joo Lee¹, Yong-Soo Lee¹, Hye-Sun Kim¹, Yu-Kyung Kim¹, Jae-Hwan Kim¹, Jin-Ki Park², Hak-Jae Chung², Won-Kyong Chang² and Dong-Ku Kim^{1,†}

¹Graduate School of Life Science and Biotechnology, College of Medicine, CHA Stem Cell Institute, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

²Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

Efficient gene transfer into hematopoietic stem cells is a great tool for gene therapy of hematopoietic disease. Retrovirus have been extensively used for gene delivery and gene therapy. However, current *in vitro* gene transfer has some obstacles such as induction of differentiation, loss of self-renewal capacity, and down-regulation of homing efficiency for *in vivo* hematopoietic stem cells transplantation. To overcome these problems, we developed efficient *in vivo* retroviral transfer technique by direct intra-bone marrow injection (IBM). We identified effective retrovirus gene transfer in bone marrow hematopoietic cells *in vitro*. Two weeks after retrovirus transfer via IBM injection, we observed stable EGFP gene expression in bone marrow, lymph node, spleen, and liver cells. In addition, 6.4±2.7% of hematopoietic stem/progenitor cells were expressed EGFP transgene from flow cytometry analysis. Our results demonstrate that *in vivo* retrovirus gene transfer via IBM injection can provide a viable alternative to current *ex vivo* gene transfer approach.

(Key words : Hematopoietic stem cells, *In vivo* gene transfer, IBM injection, Retrovirus)

요 약

조혈 줄기 세포에의 효과적인 유전자 전달은 유전자 치료의 새로운 가능성을 제시할 수 있다. 레트로바이러스를 이용한 유전자 전달 기술은 많은 기초 연구와 임상 시도가 이루어진 대표적인 바이러스이다. 그러나 현재 사용되고 있는 *in vitro* 에서의 조혈 줄기 세포에의 유전자 도입은 조혈 줄기 세포의 분화 유도, 자기 복제 능력과 homing 능력의 저하 등 많은 문제점이 있다. 본 연구는 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로서 마우스의 대퇴골에 직접 레트로바이러스를 이식하는 IBM (Intra-Bone Marrow) 방법을 이용하여 조혈 줄기 세포에의 효과적인 유전자 도입을 시도하였다. IBM 이식 2주 후 마우스의 각 조직을 분석한 결과, 골수뿐 아니라 림프절, 비장, 간장 세포 등에서 유전자가 안정적으로 발현하는 것을 관찰하였다. 또한, 6.4±2.7%의 골수조직 존재 조혈줄기/전구세포에서 도입된 유전자가 안정적으로 발현하고 있는 사실을 확인하였다. 본 연구의 결과를 바탕으로 IBM 이식 방법을 이용한 생체 조직 내 레트로바이러스의 유전자 도입은 조혈 줄기 세포를 이용한 유전자 치료에 매우 효과적인 방법이라는 사실을 시사해주고 있다.

서 론

조혈 줄기 세포는 자신과 동일한 능력을 지닌 세포로 분열할 수 있는 자기 복제 능력(self-renewal)과 성숙한 기능

성의 모든 혈구세포로 분화할 수 있는 다 분화능력(multi-differentiation)을 가진 세포이다. 조혈 줄기 세포는 선천성 유전질환이나 또는 후천성 면역 결핍증 같은 난치성 질환 치료를 위한 유전자 도입 세포로서 이용되어져 왔다(Dunbar 등, 1996; Ballas 등, 2002; Engel 등, 2003). 현재까지의

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오 그린 21사업 연구비(2005-041-034-790) 및 세포응용사업단(SC3240)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-3468-3583, E-mail: dokukim@cha.ac.kr

줄기세포를 이용한 유전자 치료 기술은 주로 바이러스를 이용하였으며, 특히 레트로바이러스를 이용한 유전자 도입 기술 개발은 많은 기초 연구와 임상 시도가 이루어져 왔다 (Cornetta 등, 1997; Cavazzana 등, 2000; Hacein 등, 2002). 줄기세포에의 유전자 도입 효능증진을 위해서 다양한 기술 개발이 이루어져 왔으며, 대표적인 기술로서는 바이러스 pseudotype의 modification, cytokine combination, 또한 fibronectin 등을 이용해 보다 높은 효율의 유전자 도입 방법 등이 시도되어져 왔다(Hanenbergl 등, 1996; Kiem 등, 1998; Abonour 등, 2000). 레트로바이러스는 일단 세포 내로 전달이 되면 핵 내의 염색체와 결합이 되어 장기간에 걸쳐서 안정된 유전자 발현을 유도할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 CD34 양성세포의 사람 조혈 줄기 세포를 이용한 유전자 도입을 통하여 약 40건 이상의 임상 시험 유전자 도입 시도가 이루어졌다(Rosenberg 등, 2000; Kohn 등, 2003). 그러나 장기간에 걸친 다양한 연구와 노력에도 불구하고 고 효율의 유전자 전달 및 안정적인 유전자 도입을 위해서는 아직 많은 한계점과 문제점 극복이 필요로 한다. 시험관에서 시행되는 조혈 줄기 세포에의 유전자 전달 방법은 조혈 줄기 세포의 시험관 배양에 따른 제한된 조혈인자 투여로 인한 줄기세포로의 특성인 자기 복제 능력과 다분화 능력의 상실 및 생체 이식시 골수 조직에의 homing 조절 접촉인자의 발현 변화 등의 문제점이 발생되며, 그 결과 매우 낮은 생체 조혈 재생 능력이 관찰된다(Peters 등, 1995; Szilvassy 등, 1999). 또한, 시험관 배양 조혈 줄기 세포를 일반적인 정맥 주입을 통한 생체 이식으로는 대부분의 세포가 골수에 이동하지 못하고 심방, 심실, 허파 등의 조직으로 이동된다(Wright 등, 2001; Wagers 등, 2002; Jetmore 등, 2002). 그 결과, 이식된 조혈 줄기 세포에 비하여 극히 적은 양의 조혈 줄기 세포만이 골수로 homing 하게 되어 낮은 조혈세포 재생 능력의 원인이 된다. Takahashi Yahata의 보고에 따르면 마우스 골수조직에 인간 조혈 줄기 세포의 직접 이식 방법(IBM: Intra-Bone Marrow Injection)을 이용하게 되면 조혈 줄기 세포의 골수조직으로의 이동 능력과 성숙 조혈 세포의 재생 능력이 정맥 주입에 비해 15배 이상의 높은 효율을 나타내었다. 또한, 골수에서 채취한 조혈 줄기 세포를 2차 마우스의 골수조직에 이식을 실시한 결과 고 효율의 조혈 재생 효능이 관찰되었다(Yahata 등, 2003).

본 연구는 골수조직에 직접적으로 레트로바이러스를 이식함으로써 시험관에서의 조혈 줄기 세포 배양으로 인해서 발생하는 줄기세포의 특성 변화 등의 문제점을 해결함과 동시에 고 효율의 조혈 줄기 세포에의 유전자 도입 방법을 개발하고자 하였다. 골수조직에의 직접 이식 기법인 IBM 이식으로 레트로바이러스의 생체 조혈 줄기 세포 및 조혈 세포에의 유전자 전달 효능을 검증하였다. 레트로바이러스를 IBM 이식한 후 조혈 줄기 세포에서 6.4±2.7% 비율의 유전자 도입 효능이 관찰되었으며, 이차 조혈기관인 비장, 림프관 및 간장 조직에서도 도입된 유전자의 발현이 관찰되었다.

재료 및 방법

실험 동물

본 연구에서 이용된 동물모델은 7주령 C57BL/6J 마우스를 이용하였고, 포천중문의과대학교 세포유전자 치료연구소의 SPF(specific pathogen-free) 사육실에서 멸균된 깔짚, 물과 사료를 공급하여 사육하였다. 사육실 조건으로 온도는 24~26°C, 습도는 45~55%로 유지하였다. 도찰된 마우스는 최소 일주일간 적응시켜 사용하였다.

세포주와 세포배양

293GPG packaging 세포는 10% 우태아혈청(FBS; GIBCO), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 ng/ml Tetracyclin, 2 ng/ml Puromycin, 800 ng/ml G418을 포함한 DMEM (GIBCO) 배지에서 5% CO₂의 세포배양기에서 37°C를 유지하면서 배양되었다.

레트로바이러스의 생산(Onodera 등, 1997)

레트로바이러스 생산을 위해서 3 µg의 pGCDN-samIR-ESE-GFP (MSCV) plasmid vector를 lipofectamine (in-vitrogen)을 이용하여 293GPG packaging cell line에 transfection 하고 여러 번의 FACS sorting (FACS vantage SE, Becton Dickinson, CA)을 통하여 고 효율의 유전자를 발현하는 세포만 분리하여 배양하였다. 사용된 레트로바이러스 벡터는 Tet-off의 inducible 시스템으로 사용하기 48시간 전에 tetracycline을 제거하고 48시간 동안 virus particle을 모았다. 바이러스의 역가는 5×10⁶의 293T 세포에 serial dilution한 바이러스 상층액을 infection하여 48시간 후 EGFP의 발현을 FACS로 분석하였다. 마우스 골수조직에의 바이러스 도입을 위하여 레트로바이러스는 50,000g, 4°C, 4시간 동안 초 원심분리를 실시하여 농축하였다.

시험관 골수 조혈 세포에의 레트로바이러스 유전자 도입

시험관에서의 골수 조혈세포에의 레트로바이러스 유전자 도입 효능 검증을 위하여 C57BL/6J 마우스의 골수조직을 채취하고 세포를 부유하여 DMEM 배지로 두 번 세척하여 세포를 카운팅하였다. 세척된 골수 조혈세포를 10% 우태아 혈청(FBS; GIBCO), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 10 ng/ml SCF (Peprotech), 10 ng/ml IL-6를 포함하는 α-MEM 배지에서 1×10⁶의 골수 조혈세포를 48시간 동안 배양하였다. 레트로바이러스의 infection은 80 ng/ml의 Polybrene 존재 하에서 12시간 배양을 통하여 실시하고 48시간 후 유세포분석기를 이용해 EGFP의 발현 효율을 분석하였다.

레트로바이러스의 골수 생체 이식

C57BL/6J 마우스는 레트로바이러스 골수조직 이식 2일 전에 γ-ray 방사선기로 600cGy의 방사선 조사를 실시하였다. 마취된 마우스의 골수조직에 27게이지의 주사기를 이용하여 한 마리당 20 µl(virus titer, 7.0×10⁷/ml)의 레트로바이러스를 대퇴골에 주입하였다.

면역 염색과 유세포분석

레트로바이러스를 통해 EGFP 유전자가 도입된 마우스의 골수 조혈세포의 검증은 유세포분석을 통하여 실시하였다. 또한, 레트로바이러스가 도입 2주 후 마우스의 흉선, 비장, 림프관, 간 조직을 채취하여 메쉬로 단세포 분리를 시행하였다. 혈액 및 조직에서 채취한 세포는 항체 면역 염색

용액(PBS containing 2% FBS, 0.05% NaN₂)에 부유하여 사용하였다. 면역 염색에 있어서 human과 mouse의 조혈 줄기 세포의 마커는 많은 차이가 있다. Human cord blood에서 조혈 줄기 세포를 purification할 때 CD34⁺는 h마커를 사용하나, 본 실험에서 사용된 세포는 mouse의 bone marrow 조혈 줄기 세포를 분리하였기에 c-Kit, Sca-1, Lin⁻의 마커를 이용하였다(lin⁻: committed lineage, CD11b for monocyte, Ter119 for erythrocyte, CD3 for T cells, B220 for B cells). 또한, mouse의 bone marrow 안에 존재하는 각 계열의 세포의 유전자 도입을 분석하기 위해 myeloid 계열의 세포는 CD11b, lymphoid 계열은 B220의 마커를 이용하여 하였다(Burger 등, 2003). 면역 염색은 4℃의 암실에서 30분간 반응 후 면역 염색 용액으로 두 번 세척을 실시하였다. 유전자 도입의 효율은 유세포 분석기인 FACS vantage SE를 이용하여 분석을 시행하였다.

결 과

시험관 레트로바이러스 유전자 도입 효능

EGFP를 발현하는 레트로바이러스의 골수 조혈 줄기 세포 및 전구세포에의 유전자 도입 효능을 검증하기 위하여 C57BL/6 마우스의 골수세포를 10ng/ml의 SCF와 IL-6가 포함된 α -MEM 배지에서 48시간 동안 배양시킨 후 EGFP-레트로바이러스와 함께 12시간 동안 배양하였다. 유전자 도입 효능은 48시간 배양 후 유세포 분석으로 확인하였다. 그 결과, 배양 골수 조혈 세포의 21.6±2.8%에서 도입된 EGFP의 발현이 관찰되었다. EGFP 양성을 나타내는 조혈세포를 특이적인 항체로 면역 염색을 시행하여 분석한 결과 그 중 75.8±17.2%가 CD11b 양성의 골수계 세포였으며, 3.4±1.3%가 B 림프구 세포인 B220 양성의 세포임을 관찰하였다. 또한, 전체 골수 세포 중 EGFP를 발현하면서 Sca-1 양성인 조혈줄기/전구세포는 9.1±2.1%의 세포가 존재한다는 사실이 관찰되었다.

IBM 이식을 통한 레트로바이러스 유전자 도입

골수조직에의 IBM 이식을 통한 레트로바이러스 유전자 도입 효능을 조사하기 위하여 시험관에서 고 효율의 유전자 도입이 검증된 레트로바이러스를 이용하여 골수조직에의 IBM (Intra-bone marrow) 이식을 시행하였다. 600cGy의 방사선 조사를 통하여 골수 존재 성숙 조혈세포를 제거함과 동시에 활발한 조혈 줄기 세포의 증식을 유도하였다.

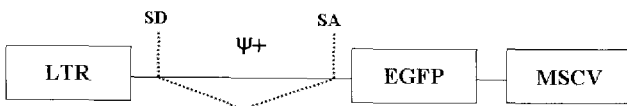


Fig. 1. Structure of retrovirus vector. The retroviral vector GCsap contains the MLV LTR with intact slice donor and splice acceptor sequences. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA was inserted between NcoI and NorI sites of GCsap to generate EGFP (MLV). The 3'LTR of the vector was replaced with the corresponding MSCV fragment to make EGFP(MSCV). Gene sequences present in each vector are labeled as follows: Ψ+, Packaging signal; SD, splice donor SA, splice acceptor.

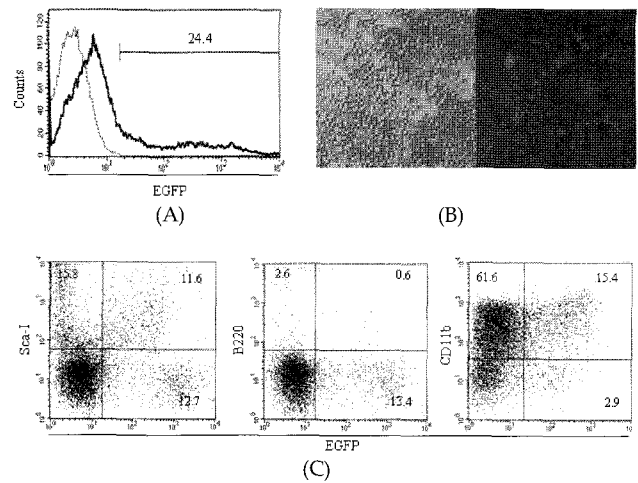


Fig. 2. In vitro retrovirus gene transfer into bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells. Retrovirus gene transfer efficiency was assessed with primary bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells by flow cytometry analysis (A). Phase-contrast (left) and fluorescent (right) image of cells was shown after infection at 48 hours from viral infection (x100) (B). Retroviral gene delivery efficiency in bone marrow hematopoietic lineage cells were analyzed by EGFP expression with staining of specific monoclonal antibodies(Sca-1 for hematopoietic stem/progenitor cells, B220 for B lymphocytes, and CD11b for myeloid lineages) (C).

방사선 조사 후 레트로바이러스 투여군(RV) (n=5)과 PBS (-) 투여 대조군(n=5) 마우스 골수조직에 IBM 방법으로 바이러스 주입을 실시하였다. IBM이식 2주 후 마우스의 골수 조직에서 세포를 분리하여 유세포 분석기를 통하여 EGFP의 발현 정도를 분석하였다. Fig. 3과 같이 레트로바이러스 주입 마우스에서 3.4±0.2%의 골수 조혈 세포에서 EGFP의 발현이 관찰되었다. 또한, 골수조직 존재 골수계 세포 마커인 CD11b 항체로 면역 염색을 실시하여 분석한 결과, 2.5±0.5%의 유전자 도입이 관찰되었다. 골수 조직 림프구세포인 B 세포에서는 매우 낮은 유전자 도입이 확인되었다. IBM 이식을 통하여 골수 존재 조혈 줄기 세포에서의 레트로바이러스 유전자 도입 효능 분석은 조혈 줄기 세포 특이 항체인 c-Kit과 Lin(CD4, CD8, B220, CD11b, Ter119) 면역 염색을 통하여 조사하였다. Fig. 4와 같이 레트로바이러스 주입 2주 후에 골수를 분석한 결과 6.4±2.7%의 조혈 줄기 세포(c-Kit⁺Lin⁻)에서 EGFP의 발현이 관찰되었다.

마우스 생체 조혈조직에서의 레트로바이러스 유전자 도입 효능

골수 주입방법에 의한 조혈 줄기 세포로 유전자 도입 효능을 검증하기 위해서 조혈 줄기 세포로부터 분화 유도된 성숙 조혈세포가 이차 조혈기관인 흉선, 비장, 림프절, 간 조직에서 존재하는 조혈세포를 분석하였다. 레트로바이러스 주입 2주 후에 마우스의 각 조직에서 세포를 분리하여 유세포 분석기를 이용해 분석을 실시하였다. Fig. 5와 같이 흉선에서는 1.0±0.2%의 EGFP 양성의 세포가 관찰되었으며, 특히 44.5±17.8%의 CD8 세포에의 유전자 도입이 관찰되었다. 또한, 성숙 T 림프구 세포인 CD3 양성세포에서는 65.1± 20.7%의 높은 비율로 도입된 EGFP의 발현이 검증되

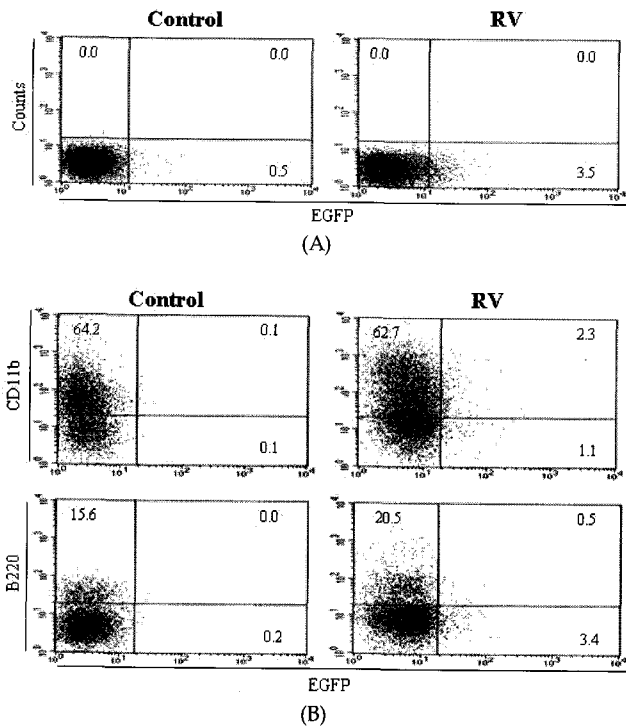


Fig. 3. In vivo gene transfer into bone marrow hematopoietic cells by intra-bone marrow injection. Retrovirus expressing EGFP was inoculated by intra-bone marrow injection into C57BL/6 mice directly. Total bone marrow hematopoietic cells were harvested from femur and tibia of hind legs after 2 weeks from postinjection. EGFP expression was determined in bone marrow and stained with anti-murine CD11b Ab for myeloid lineages and anti-murine B220 Ab for B lymphoid lineages for flow cytometry analysis. (A) Data was indicated total EGFP positive cells in bone marrow (A), and EGFP expression in myeloid cells (CD11b⁺) and B lymphocytes (B220⁺) (B).

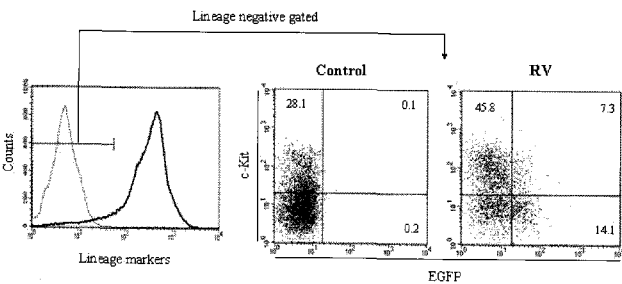


Fig. 4. Retrovirus gene delivery into hematopoietic stem/progenitor cells. Total hematopoietic cells from bone marrow of retrovirus injected mice by intra-bone marrow injection were stained with c-Kit and lineage markers (CD11b, B220, CD3, Ter119) for flow cytometry analysis. The efficiency of retroviral gene delivery into hematopoietic stem/progenitor cells was determined by EGFP expression in c-Kit positive cells after gated out lineage positive mature hematopoietic cells.

었다. 비장조직에서는 EGFP 양성세포가 10.5±0.9%의 비율로 존재하고 있었으며, CD3 양성 T 면역세포는 39.1±4.3%, CD11b 양성 골수계 세포에서는 11.6±6.6%, B 림과

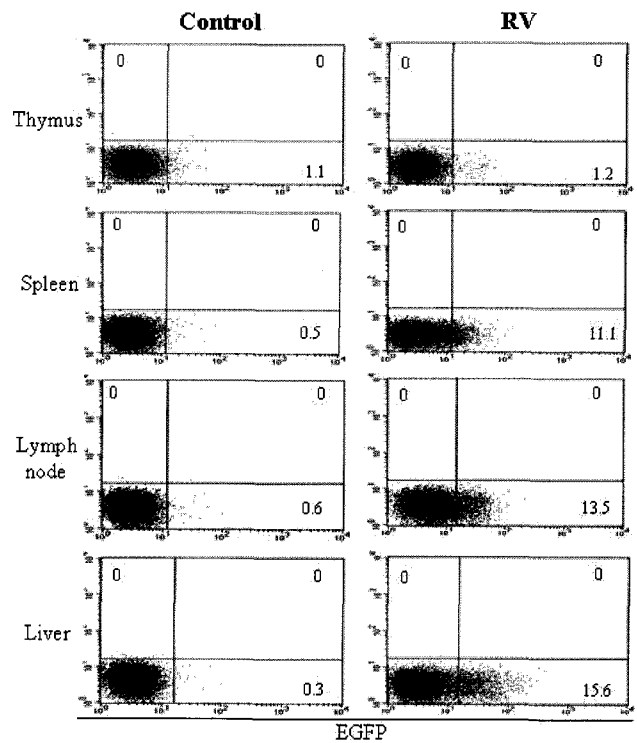


Fig. 5. Efficiency of retroviral gene transfer into hematopoietic organs. Retrovirus injected into bone marrow cavity of C57BL/6 mice directly. After 2 weeks from injection, each hematopoietic organs was investigated EGFP expression label with flow cytometry. Data was indicated the efficiency of retroviral gene delivery in indicated hematopoietic organs, thymus, spleen, lymph node, and liver.

구 세포는 7.5±2.8%에서 EGFP의 발현이 관찰되었다. 림과 절에서는 20.2±11.7%의 세포가 EGFP 양성세포로 CD3 양성 T 림과구 세포는 59.3±23.3%, CD11b 양성 골수계 세포는 9.3±2.7%, B220 양성 B 림과구 세포의 7.1±5.6%의 비율의 유전자 도입 효율을 나타내었다. 간장에서는 16.3±0.9%의 세포에서 레트로바이러스의 유전자 도입 효율을 나타내었다. 본 연구 결과, IBM을 통한 레트로바이러스의 도입은 진정한 조혈 줄기 세포로 유전자가 전달된 것을 확인하였다.

고 찰

레트로바이러스는 1990년 선천성 중증 복합 면역결핍증 환자의 조혈세포에 유전자 도입이 최초로 시행된 이후, 줄기세포에 유전자 도입을 위해서 가장 많이 이용되어지고 있는 대표적인 바이러스이다(Culver 등, 1994). 그러나 현재까지 레트로바이러스를 이용한 조혈 줄기 세포에 유전자 도입 효율은 극히 낮아 선천성 또는 후천성 유전자 질환 치료를 위한 임상 적용에는 많은 문제점을 내포하고 있다. 본 연구는 지금까지의 시험관에서 시행되었던 레트로바이러스 이용 조혈 줄기 세포에 유전자 도입 효율을 향상시키고 더불어 시험관 배양시에 발생하는 조혈 줄기 세포의 자기 복제 능력과 다분화 능력 저하 등의 문제점 극복

을 위해서 생체 마우스 골수조직에의 IBM 이식 방법을 통하여 조혈 줄기 세포 및 조혈세포에의 고 효율의 유전자 도입 효능을 검증하였다. Fig. 2에서와 같이 본 연구에서 사용된 Murine stem cell virus (MSCV) promoter가 다른 promoter와 비교했을 때 조혈 줄기 세포에의 발현 효율이 높다는 사실이 관찰되었다(Kaneko 등, 2001). 시험관에서의 결과와 같이 IBM 이식을 통한 레트로바이러스의 유전자 도입 효율을 조사한 결과, 6.4±2.7%의 골수 내 조혈 줄기 세포인 c-Kit⁺Lin⁻ 세포에서 EGFP 양성이 관찰되었다(Fig. 4). 이 결과는 IBM으로 주입한 레트로바이러스가 골수 조직 내에서 매우 효과적으로 조혈 줄기 세포에 도입되어 발현하고 있다는 사실을 보여주고 있다. 또한, 600cGy의 반 치사량의 방사선 조사를 통하여 골수 내의 성숙 조혈 세포를 치사 유도하여 적은 농도의 레트로바이러스만으로도 효과적인 조혈 전구 세포 및 조혈 줄기 세포에의 유전자를 도입을 실시하였다. 유세포 분석을 통하여 이차적인 조혈조직에의 유전자 도입 효율을 분석한 결과, 흉선, 비장, 림프절과 간장 조직에서도 고 효율의 유전자 도입 효능이 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 렌티바이러스를 이용한 마우스 조혈세포에의 유전자 도입과 비교했을 때보다 효율이 좋은 것을 보여준다(Worsham 등, 2006). 본 연구 결과를 통하여 IBM을 통한 레트로바이러스의 도입은 조혈 줄기 세포로 유전자가 전달되어 끊임없는 hematogenesis를 통한 진정한 유전자 치료의 가능성을 제시하였다. 본 연구에 이용된 IBM 이식 방법은 Hagglund 연구팀에 의한 정맥주입과 비교 실험을 통하여 체대혈 유래의 조혈 줄기 세포와 같이 낮은 조혈 재생 능력을 지닌 세포에 적합하다는 사실이 보고되었다(Kushida 등, 2001). 골수 직접 이식을 통해 생체 이식된 조혈 줄기 세포의 능력을 비교 검증한 결과 IBM 이식은 44개의 중에 1개, 정맥주입은 660 개 중에 1개의 비율로 조혈 줄기 세포가 존재하고 있다는 사실이 밝혀졌다(Takashi 등, 2003). 이는 IBM 이식이 정맥주입에 비하여 조혈 줄기 세포의 조혈 재생 능력 유지에 대단히 유효하다는 사실을 뒷받침해 주고 있다(Nelson 등, 1997; Porada 등, 2000). 본 연구의 레트로바이러스의 IBM 이식 방법을 이용한 조혈 줄기 세포 유전자 도입의 시도는 선천성 유전질환 치료 및 유전자 도입을 통한 난치성 조혈 질환 치료를 위한 새로운 유전자 치료 방법으로서 대단히 중요한 의의를 지니고 있다. 먼저, IBM 이식은 조혈 줄기 세포 혹은 전구세포에의 고 효율의 유전자 도입이 가능하며, 조혈 줄기 세포의 자기 복제 및 다 분화 능력을 유지한 상태에서 유전자 도입이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 또한, 장기간에 걸친 유전자 도입을 위한 조혈 줄기 세포의 시험관 배양으로 인하여 유발될 수 있는 염색체 변형과 세포 특성 변화와 같은 부작용을 방지할 수 있는 장점을 지니고 있다. 그러나 바이러스의 양적인 문제점과 골수 직접 이식에 따른 고통의 동반을 해결하기 위한 개선 연구가 필요로 하다. 또한, Retroviral vector를 이용한 유전자 치료에 있어서 insertional mutagenesis의 안전성 문제가 따른다. X-linked severe combined immuno-deficiency 환자에서의 임상 적용에서 20명 중 3명의 환자의 유전자가 도입된 조혈 줄기 세포에서 T 세포의 leukemia가 발생했다. 하지만 이 transgene인 IL2RG 유전자 자체가 oncogenesis를 일으켰을 가능성이 보고되었다. Lentiviral vector를 이용한 실험에서도 15마리 중 5마리(33%)가 T 세포의 leukemia가 발생한 반면, control인 mock vector를 도입시킨 마우스에서는 leukemia가 발생하지 않았기 때문이다. 따라서 이 lymphoma는 virus vector의 insertional mutagenesis가 아닌 사용한 transgene의 intrinsic한 oncogene으로 보여진다(Pike 등, 2006).

따라서 본 연구 방법은 인간에의 임상적용에 있어서 보다 효과적인 IBM 방법을 통한 유전자 전달 기법으로 생체 내에서 다양한 유전자의 조혈 줄기 세포의 자기 복제 및 분화 조절 기전을 연구하기 위한 좋은 수단으로 활용될 수 있으며, 효과적인 생체 유전자 전달 방법으로서 현재의 *ex vivo* 유전자 도입의 문제점을 극복할 수 있는 효과적인 대안 방법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Dunbar CE (1996): Gene transfer to hematopoietic stem cells: implications for gene therapy of human disease. *Annu Rev Med* 47:11-20.
2. Ballas CB, Zielske SP, Gerson, SL (2002): Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J Cell Biochem Suppl* 38: 20-28.
3. Engel BC, Kohn, DB (2003): Gene therapy for inborn and acquired immune deficiency disorders. *Acta Haematol* 110:60-70.
4. Cornetta K, Fan Y (1997): Retroviral gene therapy in hematopoietic diseases. *J Clin Apheresis* 12:187-193.
5. Cavazzana CM, Hacein BS, Saint BG, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Deist FL, Fischer A (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.
6. Hacein BAS, Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, Villartay JP, Thrasher AJ, Wulfraat N, Sorensen R, Dupuis GS, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana CM (2002): Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med* 346:1185-1193.
7. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA (1996): Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian. *Nat Med* 2: 876-882.
8. Kurre P, Morris J, Horn PA, Harkey MA, Andrews RG, Kiem HP (1998): Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 92:1878-1886.
9. Abonour R (2000): Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6:652-658.10.
10. Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem

- HP, Candotti F, Tisdale J, Rivière I, Blau CA, Richard RE, Sorrentino B, Nolta J, Malech H, Glorioso J (2003): American Society of Gene Therapy (ASGT) ad hoc subcommittee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 8:180-187.
11. Rosenberg SA, Blaese RM, Brenner MK, Deisseroth AB, Ledley FD, Lotze MT, Wilson JM, Nabel GJ, Walker R (2000): Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum Gene Ther* 11:919-979.
 12. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL (2001): Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294:1933-1936.
 13. Wagers AJ, Allsopp RC, Weissman IL (2002): Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin^{low}Thy1.1^{low}Sca-1^{c-kit} hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 30:176-185.
 14. Jetmore A, Plett PA, Tong X (2002): Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34⁺ cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood* 99:1585-1593.
 15. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T (2003): A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 15: 2905-2913.
 16. Burger JA, Spoo A, Dwenger A, Burger M, Behringer D (2003): CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34⁺ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *Br J Haematol* 122:579-89.
 17. Peters SO, Kittler ELW, Ramshaw HS, Quesenberry PJ (1995): Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp Hematol* 23:461-469.
 18. Szilvassy SJ, Bass MJ, Zant GV, Grimes B (1999) Organ selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by *ex vivo* expansion. *Blood* 93:1557-1566.
 19. Onodera M, Yachie A, Nelson DM, Welchlin H, Morgan RA, Blaese RM (1997): A simple and reliable method for screening retroviral producer clones without selectable markers. *Hum Gene Ther* 8:1189-1194.
 20. Culver KW (1994): The first human gene therapy experiment. *Gene therapy-A handbook for physician*. Marry Ann Liebert 1:33-40.
 21. Kaneko S, Onodera M, Fujiki Y, Nagasawa T, Nakauchi H (2001): Simplified retroviral vector GCsap with murine stem cell virus long terminal repeat allows high and continued expression of enhanced green fluorescent protein by human hematopoietic progenitors engrafted in NOD/SCID Mice. *Human gene therapy* 12:35-44.
 22. Worsham DN, Schuesler T, Kalle CV, Pan D (2006): *In vivo* gene transfer into adult stem cells in unconditioned mice by in situ delivery of a lentiviral vector. *Mol Ther* 14:514-524.
 23. Kushida T, Inaba M, Hisha H (2001): Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97: 3292-3299.
 24. Nelson DM, Metzger ME, Donahue RE, Morgan RA (1997): *In vivo* retrovirus mediated gene transfer into multiple hematopoietic lineages in rabbits without preconditioning. *Hum Gene Therapy* 8:747-754.
 25. Porada CD, Tran ND, Zhao Y, Anderson WF, Zanjani ED (2000): Neonatal gene therapy: transfer and expression of exogenous genes in neonatal sheep following direct injection of retroviral vectors into the bone marrow space. *Exp Hematol* 28:642-650.
 26. Pike-OK, Ridder D, Weerkamp F, Baert MR, Thrasher AJ, Wagemaker G, van Dongen JJ, Staal FJ (2006): Gene therapy: Is IL2RG oncogenic in T-cell development?. *Nature* 21:443-444.

(접수일자: 2007. 11. 20 / 채택일자: 2008. 1. 9)