대한척추외과학회지 제 8 권 제 3 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 8, No. 3, pp 195~201, 2001

아데노바이러스를 이용한 IGF-1, TGF-ß1 유전자 전달에 대한 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응

이환모 · 박문수 · 김 향 · 김학선 · 강응식 · 김남현 · 문성환

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

Responsiveness of Human Intervertebral Disc Cells in Matrix Synthesis To Adenovirus-Mediated Gene Transfer(IGF-1, TGF-ß1 Encoding Genes)

Hwan-Mo Lee, M.D., Moon-Soo Park, M.D., Hyang Kim, M.D., Hak-Sun Kim, M.D., Eung-Shick Kang, M.D., Nam-Hyun Kim, M.D., Seong-Hwan Moon, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

– Abstract –

Background : Genetic modification of cells through gene transfer gains popularity as a sophisticated delivery system in the management of musculoskeletal disease. Anabolic growth factors like IGF-1 BMP-2 OP-1, and TGF-ß1 were candidate for therapeutic purposus for regenerating matrix of intervertebral disc. TGF-ß1, OP-1 and BMP-2 share same pathway i.e. Smad while IGF-1 utilize P13K pathway. Accordingly it is logical to use two cytokine encoding genes which using different signal transduction pathway to upregulate matrix synthesis.

Purpose : To elucidate the anabolic effect of the combination gene transfer(IGF-1 and TGF-ß1 encoding gene) to human disc cells, cultured in alginate beads.

Materials and Methods : Lumbar and cervical intervertebral disc tissue was obtained from surgical disc procedure from fifteen patients. After isolation and culture of the cells, cultures were transduced with first, Adenovirus-TGFß1 construct(Ad/TGF-ß1) and Ad/IGF-1 respectively, second, with combination of two viral constructs(Ad/TGF-ß1+Ad/IGF-1). Cultures treated with saline and Ad/luciferase served as control. Then cultures were incorporated into alginate beads. Exogenous TGF-ß1(2 ng/ml) and IGF-1(100 ng/ml) were administered also. Newly synthesized proteoglycan was assessed using S35 incorporation using chromatography on Sephadex G-25 in PD-10 column

Results : In cultures transduced with single therapeutic gene construct, there were statistically significant 2.9 fold(Ad/TGF-ß1) and 1.8 fold(Ad/IGF-1) increase in newly synthesized proteoglycan comparing control($p<0.05$). In culture transduced with double combination of therapeutic gene construct, there were 3.9 fold(Ad/TGF-ß1+Ad/IGF-1) increase in newly synthesized proteoglycan comparing control($p<0.05$). Culture treated with TGF-ß1(2ng/ml) showed 3.9 fold increase and IGF-1(100 ng/ml) 2.9 fold increase, TGF-ß1+IGF-1 4.2 fold increase in proteoglycan synthesis compared to control.

Conclusion : Combination gene therapy provided efficient mechanism of upregulating matrix regeneration of the human intervertebral disc cells.

Key Words : Combination gene therapy, Intervertebral disc, Proteoglycan, TGF-ß1, IGF-1

Address reprint requests to
Seong-Hwan Moon, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
#134 Shinchon-dong, Soedaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel : 82-2-361-5649, Fax : 82-2-363-1139, E-mail : shmoon@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 부분적으로 2000년도 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의하여 지원되었음.

서 론

척추 추간판의 퇴행성 변화와 이에 연관된 척추의 질환들은 환자에게 심대한 고통을 끼치며 이로 인한 의료비용도 나날이 증가하고 있다[1]. 척추 추간판의 퇴행성 변화는 부분적으로 점차적인 당단백과 2형 교원질의 감소에 의한 수핵내의 수분 분압 감소에 기인하며[2,13,15] 결과적으로 척추 후관절 및 척추체에 전반적인 퇴행성 변화를 일으키게 된다[3].

현재까지 척추 추간판의 퇴행성 질환의 치료로 척추 추간판의 퇴행성 변화를 예방한다든지 퇴행성 변화를 역행시켜 추간판을 정상에 가깝게 회복시킨다든지 하는 근원적인 치료는 시행되지 않았다. 여러 종류의 성장 인자들(transforming growth factor-β1, osteogenic protein-1, insulin like growth factor-1)을 시험관내의 추간판 조직에 주입하여 기질의 생성을 자극한 실험들이 시도되었다[10,20,22,23]. 이러한 기질 생성 능력을 가진 성장 인자들은 추간판 기질 재생에서 효과적인 방법으로 제시되기도 하였으나 성장 인자의 일회의 주입 및 도포로 지속적인 치료효과를 기대하기는 어렵다.

유전자의 조작 및 바이러스 재조합 기술의 발전으로 이제는 체세포로 유전자를 전달하여 생물학적 효과를 기대하는 치료법이 각광을 받고 있다[6-8]. 이러한 유전자 치료법은 원하는 유전자를 체내에 전달하여 유전자 발현을 유도함으로서 지속적인 내인성 산물을 체내에 공급하는 세련된 약물 공급기전이다.

최근 아데노바이러스를 이용한 표식 유전자를 정상 동물의 추간판에 전달하여 장기적으로 유전자가 발현됨이 보고되었고[19] 또한 transforming growth factor-β1(TGF-β1)의 유전자를 토끼의 추간판 세포에 전달하여 생체 내에서 치료 유전자의 발현 및 발현된 TGF-β에 의한 생체내 추간판의 기질 생성의 증가가 보고되었다[18]. 이와 병행하여 시험관에서 배양된 인간의 추간판 세포에 아데노바이러스를 이용한 표식 유전자를 전달하여 아데노바이러스에 대한 인간 추간판 세포의 감수성도 보고되었다[16,17].

추간판의 기질 재생에 효과적인 성장 인자 중 TGF-β1, BMP-2, OP-1은 TGF계통으로서 Smad라 불리는 같은 세포내 신호전달기전을 가진다[12]. 이에 반해 세포 생존성에 중요한 역할을 하는 IGF-1은 P13K 경유 NF-κB를 이용하여 유전자 조절에 관여하여 효과를 나타낸다[11]. 치료적 성장 인자를 선택함에 있어 같은 세포내 신호전달 체계를 가지는 물질보다는 다른 신호 전달 체계 가지는 성장 인자를 복합하는 것이 이론적으로 효과적인 상승 작용을 일으킬 수 있다. 그리하여 본 연구의 목적은 TGF-β1과 IGF-1 유전자 및 단백을 각각 혹은 동시에 인간의 추간판 세포 배양에 투여하여 당단백 생성 반응을 연구하였다.

연구 대상 및 방법

1. 추간판 조직 채취 및 배양

요추 및 경추 추간판 탈출증, 경추 척수증, 요추 척추관 협착증, 경추 및 요추의 외상성 골절, 흉요추 척추 측만증 등의 척추 질환 및 외상으로 수술을 시행한 15명의 환자를 대상으로 하였다. 추간판의 수핵 및 내측 섬유륜 부위의 조직을 채취하였다. 척추관내로 탈출된 추간판 조직은 엄격히 제외하고 역시 척추 연골판 조직도 육안으로 제외하였다. 채취된 추간판 조직은 수술 전 자기공명영상검사상 퇴행정도를 분류하여 퇴행의 지표로 삼았다[9].

채취된 추간판 조직은 혈액 및 체액을 제거하기 위해 Geys balanced salt solution(GBSS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)으로 세척한 후 통상 체취 후 20분 이전에 수술실에서 실험실로 옮겼다. 추간판 세포는 순차적 효소적 소화법으로 조직에서 분리하였다[4]. 순차적 효소적 소화법을 간단히 요약하면, 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썬 다음 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, GIBCO-BRL, Grand Island, NY), 0.2% pronase(Calbiochem, La Jolla, CA), 0.004% deoxyribonuclease II type IV(DNAse, Sigma, St. Louis, MO)를 포함한 Hams F-12 medium and Dulbeccos Modified Eagle Medium(F12/DMEM, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 37℃에서 60분간 소화 시켰다. F12/DMEM으로 세척 후 상기의 효소 용액에서 pronase를 0.02% collagenase type II(Sigma, St. Louis, MO)로 대치시킨 제2의 효소용액으로 역시 37℃에서 12시간 정도 소화시킨다. 분리된 추간판 세포는 F12/DMEM으로 세척후 Nylon 여과지(pore size 75 um)를 사용하여 부유 조직을 제거하였다. 세포 생존성 검사 및 세포밀도를 계산한 후 5×10^5 세포/ml의 밀도로 24 well plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ)에서 배양하였다[14]. 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin(all antibiotics from GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 함유한 F12/DMEM을 사용하였다. 추간판 세포는 3주간 37℃ 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

2. 아데노바이러스

E1 및 E3 유전자 부분이 결여돼 성장이 제한된 제 5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식

유전자로 luciferase, 치료 유전자로 TGF-β1 그리고 IGF-1유전자가 재조합되었다. 이 모든 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현된다. 재조합된 아데노바이러스는 human embryonic kidney 293 cell에서 증식되었다.

추간판 세포의 기질 재생 능력 효과를 알기 위해서는 아데노바이러스-TGF-β1(Ad/TGF-β1)와 아데노바이러스-IGF-1(Ad/IGF-1)를 사용하였다. 아데노바이러스의 농도는 원칙적으로 multiplicity of infection(MOI)를 사용하였다. MOI라 함은 세포당 plaque forming unit(PFU)로 정의한다.

3. 시험관내 아데노바이러스 감염 술식

3주간 배양된 추간판 세포에서 배양액을 제거한 다음 GBSS로 세번 세척 후 총 농도 75MOI를 이루는 적절한 조합의 아데노바이러스를 포함한 GBSS를 첨가하고 37℃에서 60분간 감염시킨다. 아데노바이러스 첨가 전 및 첨가 후, 혹은 추가 배양 후 세포 생존성 검사 및 평균 세포수 측정을 실시한다.

4. 유전자 조작된 추간판 세포의 3차원 배양

0.15M NaCl용액에 1.2%의 low viscosity alginate gel (Kelco, Chicago, IL)를 상온에서 서서히 녹인 후 Trypsin으로 유리된 추간판 세포를 mililiter당 백만개의 비율로 alginate gel에 균등히 섞는다. 22 gauge 주사바늘을 통해 102 mM $CaCl_2$ 용액에 alginate gel 및 세포 혼합물을 방울 방울 떨어뜨려 순간적으로 굳게

한다. 고형화된 algiante gel-세포 방울을 $CaCl_2$ 용액에 10분 정도 배양하여 완전한 polymerization을 유도한다. 0.15M NaCl 용액에 세척한고 F12/DMEM 배양액에 3번 세척한다. Alginate bead는 24 well culture plate각 well에 10개씩 넣고 세포 배양액은 10% FBS, 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin을 함유한 F12/DMEM을 사용하여 48시간 37℃ 및 5%의 CO_2하에서 배양하였다.

5. 실험군 정의

한개의 치료적 유전자만 전달한 군은 75 MOI의 Ad/TGF-β1, 75 MOI의 Ad/IGF-1를 투여한 각각의 배양으로 정하였다. 두 개의 치료적 유전자를 조합하여 동시에 전달한 군은 Ad/TGF-β1(37.5 MOI)와 Ad/IGF-1(37.5 MOI) 조합하여 전체 바이러스 농도를 75 MOI로 처리한 군으로 정하였다. 치료적 유전자를 전달한 배양은 먼저 단층 배양에서 유전자를 전달하고 이 배양을 3차원 배양으로 전환하였다.

성장 인자의 효과를 보는 실험군에서는 추간판 세포 배양을 먼저 3차원 배양으로 전화시킨 뒤 성장 인자를 배양액에 투여하였다. TGF-β1(2 ng/ml)과 IGF-1(100 ng/ml)를 각각 투여하여 기질 생성 반응을 보고 다음으로 두 성장 인자를 동시에 투여하여 TGF-β1(2 ng/ml)+IGF-1(100 ng/ml) 기질 생성 반응을 보았다. Ad/luciferase를 투여한 것은 바이러스 대조군이며 생리식염수를 투여한 것은 전체 대조군으로 삼았다.

6. 새로 생성된 당단백 측정

3차원 배양에는 방사선동위원소 S35를 포함한 배양액(serumless medium, Newman-Tytell)으로 교체하고 4시간 추가 배양 후 0.15M NaCl 용액으로 세척 후 55mM Na Citrate를 alginate bead에 첨가하여 37°C에서 10분간 유지하여 alginate gel을 용해시킨다. 용해된 alginate gel을 4°C에서 Guanidine HCl 분해를 48시간 실시한다. 방사선동위원소로 표식되는 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)으로 통과시켜 순차적으로 scintillation mixture(Ultima Gold, Packard, Meriden, CT)를 첨가하여 PD-10 column으로 유출되는 용액을 채취한 후 제 2, 3, 4 용액의 scintillation 활성을 측정하여 새로이 생성된 당단백의 농도를 구한다.

7. 자료 정리 및 통계

모든 자료의 정리와 분석은 SPSS(SPSS Inc, Chicago IL)를 사용하고 각 군간의 비교는 student t-test 및 ANOVA를 이용하였고 사후 분석은 Fisher's LSD post hoc test를 사용한다. 통계적 유의 수준은 $P<0.05$로 정한다.

결 과

1. 세포 생존률

일차 배양 후 추간판 세포 생존율은 95%정도였고 유전자 전달 및 alginate gel에 의한 3차원 배양 등의 술식 후에 추간판 세포의 세포 생존율은 90%정도로 크게 감소되지 않았다.

2. 단일 치료적 유전자 전달군(TGF-β1, IGF-1)의 당단백 생성

75 MOI 농도의 Ad/TGF-β1로 유전자 조작을 한 세포 배양군에서는 생리식염수에 처리한 대조군과 Ad/luciferase 대조군에 비해 2.9배의 당단백 생성 증가가 있었다 ($p<0.05$). 75 MOI 농도의 Ad/IGF-1로 유전자 조작을 한 세포 배양군에서는 대조군들에 비해 1.8배의 당단백 생성 증가가 있었다($p<0.05$)(Fig. 1).

3. 두가지 치료적 유전자 혼합 전달군 (TGF-β1 gene + IGF-1 gene)의 당단백 생성

37.5 MOI 농도의 Ad/TGF-β1와 37.5 MOI 농도의 Ad/IGF-1를 혼합 감염시킨 세포 배양군에서는(전체 바이러스 농도는 75 MOI) 대조군에 비해 3.9배의 당단백 생성 증가가 관찰되었다($p<0.05$)(Fig. 1).

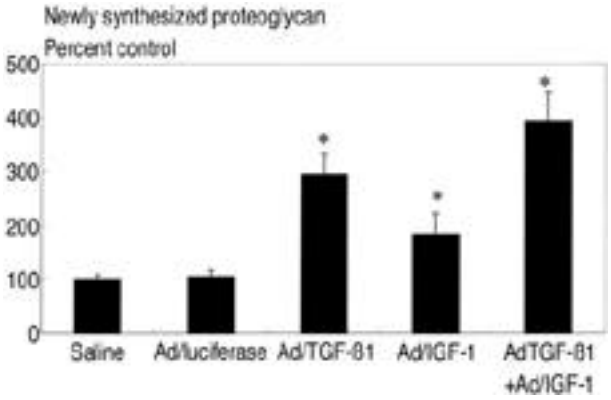

Fig. 1. Newly synthesized proteoglycan in three dimensional culture of human intervertebral disc cells presented as percent control. Adenovirus-TGF-beta1 construct(Ad/TGF-ß1) with an MOI of 75 showed 2.9 fold increase, adenovirus-IGF-1 construct(Ad/IGF-1) with an MOI of 75 showed 1.8 fold increase, Ad/TGF-ß1+AdIGF-1 with an MOI of 75 showed 3.9 fold increase in newly synthesized proteoglycan compared to saline and viral control. *:$p<0.05$

4. 한가지 성장 인자만 투여한 군의 당단백 생성

2 ng/ml의 TGF-β1를 투여한 배양은 대조군들에 비해 3.9배의 당단백 생성 증가가 관찰되었다($p<0.05$)(Fig. 2). 100 ng/ml의 IGF-1을 투여한 배양은 대조군에 비해 약 2.9배의 당단백 생성 증가가 관찰되었다($p<0.05$)(Fig. 2).

5. 두가지 성장 인자를 동시 투여한 군의 당단백 생성

2 ng/ml TGF-β1와 100 ng/ml의 IGF-1을 동시 투여한 배양에서는 대조군에 비해 4.2배의 당단백 생성증가를 볼 수 있었다($p<0.05$)(Fig. 2).

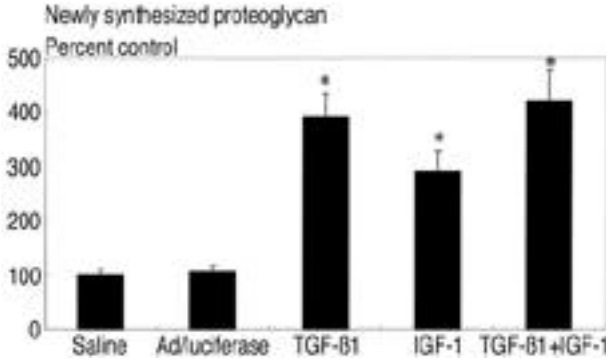

Fig. 2. Newly synthesized proteoglycan in three dimensional culture of human intervertebral disc cells presented as percent control. TGF-ß1(2 ng/ml) showed 3.9 fold increase, IGF-1(100 ng/ml) showed 2.9 fold increase, and TGF-ß1(2 ng/ml) + IGF-1(100 ng/ml) showed 4.2 fold increase in newly synthesized proteoglycan compared to saline and viral control. *:$p<0.05$

고 찰

유전자 치료가 연구와 임상에 도입되면서 처음에는 유전질환이나 말기 암 등에 치료가 시도되었으나 점차 외상성 질환 및 퇴행성 질환을 포함하는 일반적인 질환에도 적용의 범위가 넓어지고 있다. 예를 들어 발목 인대 파열로 수주간 외고정으로 치료할 것을 인대의 섬유세포에 세포 증식 및 기질 생성을 촉진시키는 성장 인자를 내인적으로 생산하게 하는 유전자를 주입하여 인대의 재생기간을 단축하고 재생된 인대의 조직도 손상 전 정상상태에 가깝게 조작하는 수단이 유전자 치료를 이용함으로서 이제는 가능해졌다[6].

척추 추간판 영역에서는 Wehling 등[24]은 레트로바이러스를 이용하여 소의 추간판의 연골양세포에 표식 유전자를 체외 전달법(ex-vivo appraoch)으로 전달시켜 추간판 조직에 유전자 치료의 가능성을 제시하였으며 Reinecke 등[21]은 역시 레트로바이러스를 이용하여 추간판 탈출증시 탈출된 인간의 추간판 조직을 배양하여 역시 표식 유전자를 감염시켜 인간에게도 유전자 치료의 가능성을 증명하였다. 이에 반하여 Nishida 등[19]은 가토의 추간판 세포 배양 및 생체에서 아데노바이러스를 이용하여 성공적으로 표식 유전자가 발현됨을 보고하였으며 특이 이 연구는 직접적 유전자 전달법으로서(direct in-vivo appraoch)서 체외 세포 배양 및 유전자 조작된 세포의 재 이식이 필요 없는 간편하고 효율적인 방법으로 인정되었다. 또한 같은 연구에서 Nishida 등[19]은 면역학

적으로 완전한 가토의 생체내에서 표식유전자가 최소 12주 이상 발현됨을 조직학적으로 보고하여 추간판 조직의 면역학적 특이성 및 아데노바이러스에 의한 직접적 접근법의 간편성을 보고하였다. 그 이후 같은 연구그룹에서 치료적 유전자를 역시 가토에 주입하여 치료적 유전자 처치가 추간판 조직 내에 기질 생성을 향상시킴을 보고하였다[18]. 이러한 실험 동물을 이용한 보고 이외에도 Moon 등[16]은 인간의 추간판 조직을 배양한 후 다양한 표식 유전자 및 치료 유전자를 감염시켜 그 타당성 및 인간 세포의 아데노바이러스에 대한 감수성, 그리고 시험관내 기질 생성과 같은 생물학적 효과를 증명하였다. 그러나 Moon 등[16]의 연구는 단일 유전자를 전달시켜 기질 생성 능력을 본 것이며 또한 배양도 2차원적 평면 배양을 하여 유전자 치료의 생물학적 효과를 결론적으로 보고하였다고 볼 수는 없다. 본 연구는 기질 생성능력이 있으면서 서로 다른 세포내 신호전달 기전을 가지는 TGF-β1과 IGF-1를 선택하고 이를 발현하게 하는 유전자를 인간의 추간판 세포에 전달하고 유전자 조작된 세포를 삼차원적으로 배양하여 당단백 생성이라는 생물학적 반응을 알아본 것이다.

본 연구에서 단일 치료적 유전자를 감염시킨 세포 배양군에서는 Ad/TGF-β1의 경우에 대조군에 비해 2.9배 증가된 당단백 생성증가를 보였고 같은 농도의 바이러스인 경우에도 Ad/IGF-1은 1.8배의 당단백 생산 증가가 있었다. 즉 본 연구에서 사용된 두 가지 성장 인자의 발현은 공히 의미 있는 기질 생산 능력이 있음이 증명되었다.

두 가지의 치료적 유전자를 혼합 감염시킨 경우에는 단일 치료적 유전자 감염군보다 높은 당단백 생성 능력을 보였다. 즉 Ad/TGF-β1와 Ad/IGF-1 혼합군일 때 대조군에 비해 3.9배의 기질생성증가를 보였다. 이러한 다중 유전자 치료의 의미는 동일한 생물학적 반응을 얻기 위하여 최소의 바이러스를 사용할 수 있는 기전을 제시한다고 볼 수 있다.

TGF-β1(2 ng/ml)와 IGF-1(100 ng/ml)를 동시에 투여하였을 때 4.2배의 당단백 생성 증가가 있었는데 기대한 만큼의 상승(synergistic)작용이나 부가(additive)작용의 효과는 볼 수 없었지만 단일 성장 인자의 투여보다는 높은 기질 생성 반응을 보여 혼합 투여가 치료적 기전으로 유용하리라 생각된다. 성장 인자 단백 투여와 성장 인자 유전자 전달에 의한 기질 생성에 있어 기질 생성반응이 다소 달랐는데 이는 유전자 전달에 의한 유전자 발현 및 그에 따른 생물학적 반응에 시간이 걸리기 때문으로 생각된다. 성장 인자 단백 투여는 즉시 생물학적 효과를 얻을 수 있으므로 단백 투여 및 유전자 전달을 단순 비교하는 것은 무리가 있으리라고 생각된다.

바이러스 농도와 기질 생성 반응의 비선형성은 각 치료적 유전자의 상승작용을 규명하는데 어려움을 주었다. 현재까지 제시된 성장인자들에 의한 상승작용의 기전은 각 성장 인자가 고유의 수용기 및 기전으로 생물학적 반응을 일으키나 최종 효과는 각 성장 인자들의 상호 보완적인 효과의 총합 이라고 제시되었다[5]. 본 연구에서 규명된 혼합 유전자 전달에 의한 증가된 생물학적 반응은 이미 제시된 기전에 더하여 수용기 포화라는 기전을 추가 할 수 있을 것으로 사료된다. 즉 단일 치료적 유전자를 과다 발현 시켰을 때 당연히 유전자 산물인 성장인자의 생성이 증가하고 이는 어느 정도 기질 생성 증가라는 생물학적 반응을 일으킬 수 있지만 어느 정도 한계이상에서는 수용체가 포화되고 생성된 성장 인자가 비활성화되는 효과를 통해 결국 더 이상 기질 생성이 증가되지 않는 상태에 도달된다. 이에 반하여 혼합 유전자 전달군의 경우 각 치료적 유전자를 포함한 바이러스 농도는 혼합되는 바이러스 종류에 따라 비례적으로 감소하여 유전자 발현 산물은 그에 따라 감소되며 이에 따라 고원화 반응을 회피할 수 있는 기전이 제공됨으로서 최종 기질 생성은 단일 유전자 과다발현 때 보다 증가될 수 있다고 유추할 수 있다. 특히 본 연구에서 선택한 TGF-β1과 IGF-1은 각기 다른 세포내 신호전달기전을 가지고 있다. 즉 TGF-β1, BMP-2, OP-1(BMP-7) 등은 TGF 계통에 속하는 성장 인자로서 역시 TGF 계통 수용체에 결합하여 주로 Smad를 통해서 신호 전달되어 세포 유전자 발현에 관여한다. 세포 생존성에 중요한 역할을 하는 IGF-1은 P13K 경유 NF-κB를 이용하여 유전자 조절에 관여하여 효과를 나타낸다[11,12]. 이러한 상이한 세포내 신호전달 기전에도 불구하고 강력한 상승작용은 보이지 않았는데 이는 아마 이러한 두 성장 인자도 핵내 유전자 발현 조절 단계에서 세포내 신호가 집중됨으로서 상승작용이 소실된 것으로 생각된다.

다중 유전자 치료의 장점은 첫째, 생체내의 실제 상황처럼 여러 성장 인자가 독립적 혹은 상호 보완적으로 작용하여 생물학적 반응을 일으키는 것이며, 둘째, 한가지 성장 인자의 과다 발현에 의한 독성, 전신 효과, negative feedback 등의 부작용을 피할 수 있고, 셋째, 저농도의 바이러스의 혼합만으로 고농도의 단일 유전자 전달군과 비슷한 기질 생성을 보인다면 전체적으로 투여되는 바이러스 농도를 줄일 수 있으므로 전신적인 안정성이나 세포 독성을 피할 수 있는 효과가 있다. 이에 반하여 다중 유전자 치료의 단점으로는 추간판 변성과 같은 만성적인 경과를 취하는 병의 경우 낮은 바이러스 농도로 전체적인 유전자 전달량이 감소되어 장기 유전자 발현에 어려움이 있을 수 있다.

본 연구는 인간의 추간판 세포를 표현 형질을 잘 유지해주는 삼차원적 배양법으로 체외 배양하여 여기에 치

료적 유전자 전달의 효과를 연구하였음으로 생체 실험 이전에 시행되어야할 유전자 전달의 시험관내 반응을 효과적으로 규명하였다고 볼 수 있다. 그러나 기질 생성 반응을 당단백에만 집중하여 연구함으로서 교원질의 생성 및 대사에 대한 규명이 제외된 것이 단점으로 지적될 수 있다. 비록 시험관내에서 치료적 유전자 전달의 효과가 규명되었다고는 하나 원론적으로는 결국 실험동물을 사용한 생체 실험이 시행되어야 치료적 유전자의 최종 치료적 효과를 규명할 수 있으며 이는 유전자 치료의 임상적용에 필수적인 요소이다.

결 론

두 가지 치료적 유전자 TGF-β과 IGF-1 유전자를 동시에 전달하였을 때 인간의 추간판 세포에서 효과적인 기질 생성을 얻을 수 있었다.

REFERENCES

1) **Borenstein D** : *Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheumatol, 4:226-32, 1992.*
2) **Buckwalter JA** : *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 20:1307-1314, 1995.*
3) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, McNeill TW and Huckman MS** : *Discs degenerate before facets. Spine, 15:111-113, 1990.*
4) **Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF and Oegema TR** : *Identification of heterogenous cell populations in normal human intervertebral disc. J Anat, 186:43-53, 1995.*
5) **Crabb ID, O'Keefe RJ, Edward Puzas J and Rosier RN** : *Synergistic effect of transforming growth factor beta and fibroblast growth factor on DNA synthesis in chicken growth plate chondrocytes. J Bone Miner Res, 5:1105-1112, 1990.*
6) **Evans CH and Robbins PD** : *Possible orthopaedic applications of gene therapy. J Bone Joint Surg, 77-A:1103-1114, 1995.*
7) **Evans CH and Robbins PD** : *Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop, 367:S410-8, 1999.*
8) **Evans CH and Robbins PD** : *Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. Rheum Dis Clin North Am, 25:333-44, 1999.*
9) **Eyre D, Benya P, Buckwalter J, Frymoyer JW and Gordon SL** : *Intervertebral disc: Part B. Basic science perspective. In New Perspectives in Low Back Pain. Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeon, 147-207, 1989.*
10) **Gruber HE, Fisher EC, Desani B, Stasky AA, Hoelscher G and Hanley EN** : *Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-b1. Exp Cell Res, 235:13-21, 1997.*
11) **Hanahan D and Weinberg RA** : *The Hallmarks of Cancer. Cell, 100:57-70, 2000.*
12) **Itoh S, Itoh F, Goumans M-J and Dijke PT** : *Signalling of transforming growth factor-ß family members through Smad protein. Eur J Biochem, 267:6954-6967, 2000.*
13) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210, 1981.*
14) **Maldonado BA and Oegema TR** : *Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. J Orthop Res, 10:677-690, 1992.*
15) **Melrose J, Ghosh P, Taylor TK, Hall A, Osti OL, Vernon-Roberts B and Fraser RD** : *A longitudinal study of the matrix changes induced in the intervertebral disc by surgical damage to the annulus fibosus. J Orthop Res, 10:665-676, 1992.*
16) **Moon SH, Kang JD, Nishida K, Gilbertson LG, Niyibizi C, Smith PN, Knaub MA, Robbins PD and Evans CH** : *Human cervical intervertebral disc cells are susceptible to adenovirus-mediated gene therapy. Proceedings of Cervical Spine Research Society, p150-153, 1999.*
17) **Moon SH, Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Muzzonigro TS, Knaub MA, Robbins PD and Evans CH** : *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable in-vitro by adenovirus-meidated gene transfer: Implications for the clinical management of intervertebral disc disorder. Spine, 25:2573-2579, 2000.*
18) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon S-H, Suh J-K, Vogt MT, Robbins PD and Evans CH** : *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor ß1 encoding gene. Spine, 24:2419-2425, 1999.*
19) **Nishida K, Kang JD, Suh J-K, Robbins PD, Evans CH and Gilbertson LG** : *Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: Implication for the treatment of intervertebral disc degeneration. Spine, 23:2437-2443, 1998.*
20) **Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K,**

Matsui H and Tsuji H : *Atocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insuline-like growth factors-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. J Orhtop Res, 14:690-699, 1996.*

21) **Reinecke JA, Wehling P, Robbins P, Evans CH, Sager M, Schulze-Allen G and Koch H** : *In vitro transfer of genes in spinal tissue. Zeitschrift fur Orthopadie und Ihre Grenzgebiete, 135:412-416, 1997.*

22) **Takegami K, Matuda K, Kumano F, An H, Chiba K, Pankaj D, Sampath TK and Thonar EJ-MA** : *Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced chemonucleolysis. 45th Annual Meeting Trans Orthop Res Soc, 201, 1999.*

23) **Thompson JP, Oegema TR and Bradford DS** : *Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth facors. Spine, 16:253-260, 1991.*

24) **Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, Evans CH and Reinecke JA** : *Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. Spine, 22:1092-1097, 1997.*

국 문 초 록

연구배경 : 유전자 전달에 의한 세포의 유전자 조작방법은 최근 근골격계의 질환의 치료에서 섬세한 약물전달 방법으로 각광 받고 있다. IGF-1, BMP-2 OP-1, TGF-β1은 추간판 조직의 기질 재생에 효과적인 성장 인자로 알려져 있다. BMP-2, OP-1, TGF-β1은 TGF 계통으로 같은 세포내 신호전달 기전을 가지고 있다. 이에 반해 IGF-1은 상이한 신호전달 기전을 이용한다.

연구목적 : 세포내 신호전달 기전이 다른 IGF-1과 TGF-β1 단백 및 유전자를 사용하여 인간 추간판 세포의 기질 생성 반응을 보았다.

대상 및 방법 : 15명의 환자에서 추간판 술식을 시행하고 요추 및 경추 추간판 조직을 채취하였다. 효소 분해로 추간판 세포를 분리하여 평면 배양하고 여기에 단일 유전자 전달군으로 아데노바이러스 TGFβ1(Ad/TGF-β1), Ad/IGF-1를 각각 감염시켰다. 이중 유전자 전달군에서는 세포배양에 Ad/TGF-β1+Ad/IGF-1 조합을 감염시켰다. Ad/luciferase 와 생리식염수 처리군은 대조군으로 정하였다. TGF-β1(2 ng/ml)과 IGF-1(100 ng/ml)도 세포 배양에 투여하여 성장인자 단백의 효과도 조사하였다. 새로 생성된 당단백은 S35 방사선 동위원소를 이용한 PD-10 column chromatography로 정량하였다.

결과 : 새로 생성된 당단백은 대조군에 비해 Ad/TGF-β1감염군에서 2.9배, Ad/IGF-1 감염군에서 1.8배($p<0.05$) Ad/TGF-β1+Ad/IGF-1 혼합 감염군에서는 대조군에 비해 3.9배의 당단백 생산 증가가 있었다($p<0.05$). TGF-β1는 3.9배, IGF-1은 2.9배, TGF-β1+IGF-1 동시 투여시는 4.2배의 당단백 생성증가가 있었다($p<0.05$).

결론 : TGF-β1, IGF-1 유전자 전달법은 인간의 추간판 세포의 기질 재생에 효과적인 기전을 제공한다.

색인단어 : 다중 유전자 치료, 추간판, 당단백, TGF-β1, IGF-1

※ 통신저자 : 문 성 환
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel : 82-2-361-5649, Fax: 82-2-363-1139, E-mail: shmoon@yumc.yonsei.ac.kr