대한척추외과학회지 제 9 권 제 2 호
Journal of Korean Spine Surg.
Vol. 9, No. 2, pp 84~90, 2002

# 추간판내 유전자 전달에 의한 전신 면역 반응

문성환 · 김 향 · 권언혜 · 박의현 · 이환모 · 한수봉 · 김남현

**Lars G. Gilbertson*, James D. Kang***

연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh*

# Host Immune Responses to Intradiscal Gene Transfer

**Seong-Hwan Moon, M.D., Hyang Kim. B.S., Eun-Hae Kwon M.S.,
Eu-Hyun Park, M.D., Hwan-Mo Lee, M.D., Soo-Bong Hahn, M.D.,
Nam-Hyun Kim, M.D., Lars G. Gilbertson*, Ph.D., James D. Kang*, M.D.**

*Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea
University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA**

– Abstract –

Purpose : To elucidate host immune responses to intradiscal gene transfer.

Materials and Methods : Twenty rabbits were utilized. Ad/luciferase (adenovirus construct) were injected into nucleus pulposus of lumbar vertebrae. Group 1 received intradiscal injection of Ad/luciferase only, Group 2 received subcutaneous and intradiscal injection simultaneously, Group 3 received subcutaneous injection then intradiscal injection with 2 weeks interval. Blood samples were obtained serially after injection. Animals were sacrificed at 7 weeks. Antibody to adenovirus in peripheral blood was measured with ELISA and transgene expression was measured with standard luciferase kits.

Results : All rabbits in the Group 2 and 3 exhibited increased production of neutralizing antibody. There were clearly two subgroups in Group 1, three rabbits exhibited production of antibody but remaining three rabbits showed little or no production of antibody. All rabbits showed robust increase in transgene expression regardless of titer of neutralizing antibody.

Conclusion : The intervertebral disc is favorable site for adenovirus-mediated gene transfer escaping from systemic immunity.

Key Words : Intradiscal Gene Therapy, Immune Responses.

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 연세대학교 의과대학 신진 교수 연구비(#2001-03)로 지원되었음.

## 서 론

척추 추간판의 퇴행성 변화와 그에 연관된 척추의 질환들 환자에게 심대한 고통을 끼치며 이로 인한 의료비용도 나날이 증가하고 있다[4, 32]. 추간판의 퇴행성 변화는 당단백 (proteoglycan)과 2형 교원질 (type II collagen)의 감소에 의한 수핵 (nucleus pulposus) 내의 수분 분압 감소에 기인하며[5, 15, 17, 18, 27] 이로 인하여 척추의 전반적인 퇴행성 변화를 일으키게 된다[6]. 현재까지 척추 추간판의 퇴행성 질환의 치료로는 보존적 요법이나 주로 퇴행된 추간판을 수술로 제거하였는데 이런 수술 방법에 관련된 척추의 불안정성은 골이식으로 이환된 척추부위를 유합하는 치료 일색이었다[1, 16, 19]. 즉 척추 추간판의 퇴행성 변화를 예방한다거나 혹은 재생시키는 근원적인 치료는 시행되지 않았다. 이와는 대조적으로 여러 종류의 성장 인자들 (transforming growth factor-ß1, osteogenic protein-1, insulin like growth factor-1)을 시험관내의 추간판 조직에 주입하여 기질의 생성을 자극한 실험들이 시도되었으며[14, 29, 30], 이러한 성장 인자들의 기질(matrix) 생성능력은 추간판 퇴행에 가능한 치료법으로 제시되기도 하였다. 이런 긍정적인 치료 효과에도 불구하고 성장인자는 일회의 주입 및 도포로 지속적인 치료효과를 기대하기는 어려우며 의미 있는 치료 농도를 유지하기 위해서 계속적인 성장 인자의 침습적인 주입이 필요하지만 이는 임상적으로 거의 불가능하다.

한편 생물학적으로 중요한 단백질의 유전자의 염기서열이 밝혀지고 이러한 유전자의 조작 및 바이러스 재조합 기술의 발전으로 이제는 체세포로 유전자를 전달하여 생물학적 효과를 기대하는 유전자 치료법이 각광을 받고있다[10, 11, 28]. 유전자 치료는 외부에서 원하는 유전자를 전달체(vector)를 이용해서 세포내로 전달하고 강제로 지속적으로 유전자를 발현하게 하고 원하는 산물을 내인적으로 생산하게 하여 생물학적 효과를 지속적으로 얻는 치료개념이다[2, 7, 9, 12, 22, 23]. 유전자 치료의 경우는 한번의 유전자 전달로도 지속적인 유전자 발현을 유지하여 만성 경과를 취하는 질환에 특히 그 강점을 발휘하는 세련된 약물공급기전의 하나이다.

이러한 획기적인 유전자 치료를 퇴행성 추간판 질환에 적용시키기 위해서는 거쳐야할 단계가 있다. 시험관내 실험 및 실험 동물을 이용한 생체내 실험이 필요하며 퇴행성 추간판 질환을 야기한 실험 동물에서 유전자 요법의 치료 효과를 입증해야한다. 이러한 순서에 입각하여 표식 및 치료적 유전자를 가토의 추간판 세포에 전달하여 생체내에서 표식 및 치료 유전자의 발현 및 발현된 치료적 유전자에 의한 생체내 추간판의 기질 생성의 증가가 보고되었으며[24, 25] 인간 추간판 세포의 표식 유전자를 함유한 아데노바이러스에 대한 감수성[21]과 단층 배양된 추간판 세포에서의 치료적 유전자의 생물학적 반응[20] 등이 보고되었다.

이제 까지 보고된 추간판 조직의 유전자 요법의 타당성 및 효용성을 배경으로 향후 시행될 유전자 치료의 임상적 시도이전에 규명되어야할 문제가 있다. 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달은 심한 전신 면역 반응을 일으키며 이로 인하여 장기적인 전달 유전자의 발현을 얻을 수 없었다[31, 33, 34]. 전달 유전자의 장기 발현은 만성 경과를 취하는 추간판 변성과 같은 질환인 치료에는 필수적임을 고려하면 정상 면역학적 상태에서 장기간 전달 유전자 발현은 중요한 문제로 대두된다. 이러한 맥락에서 면역학적으로 정상인 가토에 표식 유전자를 전달하였을 때 6개월간 전달 유전자가 발현됨을 보고되었는데[25] 이는 전신 면역 기전에 관계없이 전달 유전자가 장기간 발현됨을 시사하였다. 그러나 이 연구에서는 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달에 대한 염증 반응, 항체 생성, 전신 감작된 경우의 유전자 발현 등은 밝혀지지 않았다. 그리하여 본 연구에서는 순순히 추간판내 유전자 전달의 면역학적반응을 탐구하여 추간판 조직이 면역 특이조직인지를 규명하기 위하여 연구를 진행하였다.

## 연구재료 및 방법

E1 및 E3 유전자부분이 결여돼 성장이 제한된 제5형 아데노바이러스를 사용하였다. E1 유전자 부위에 표식 유전자로 luciferase, βgalactosidase 유전자가 재조합되었다. 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되었다. 재조합된 아데노바이러스는 human embryonic kidney 293 cell에서 증식되었다.

실험동물은 New Zealand White Rabbit (female 3kg)을 사용하였다. 두 마리에서는 전달 유전자의 발현을 조직학적으로 증명하기 위하여 아데노바이러스-βgalactosidase (lacZ) 재조합체 (Ad/lacZ)를 추간판에 주입하여 유전자 발현을 분석하였고, 여섯 마리는 아데노바이러스-luciferase 재조합체 (Ad/luciferase)를 추간판에만 주입한 군(제 1 군), 여섯 마리는 Ad/luciferase를 피하조직 및 추간판에 동시에 주입한 군 (제 2 군), 여섯 마리는 먼저 Ad/luciferase를 피하조직에 주입하고 2주 후 다시 추간판에 Ad/luciferase를 주입한 군 (제 3 군)으로 나누어 사용하였다. 제 1 군은 추간판내 국소적 유전자 전달이 전신 면역반응을 일으키는지 알기 위함이고, 제 2 군은 바이러스의 피하주입으로 일어나는 전신적 면역학적 반

응이 추간판내의 전달 유전자 발현에 영향을 미치는지를 알기 위함이며, 제 3 군은 바이러스의 피하주입으로 전신 면역 반응을 유도하고 난 후 감작된 숙주가 이차적으로 전달된 유전자가 추간판내에서 발현하는지를 알아보기 위함이었다.

전신마취하에 좌측 후복막 도달법으로 실험동물의 추간판을 노출시켰다. Ad/luciferase ($10^6$ PFU)을 포함한 15ul 생리 식염수용액을 28gauge 주사기로 노출된 제 2-3, 3-4 요추 추간판에 주입하였다. 추간판내 수핵부위에 정확히 주입되었는지를 확인하기 위해서는 수핵내 양압력으로 주사기가 뒤로 반등하는 현상을 이용하였다. 수술 후 가토는 사육장에서($4000\ cm^2$) 자유롭게 사육되었다. 수술 후 3, 7, 14, 21, 42일째 말초 혈관에서 동맥혈이 채취되었으며 혈청을 분리하여동결 보관되어 후에 항체 생성을 측정하였다. 실험동물은 수술 후 42일째 ketamine (25.0 mg/kg) 근육주사와 sodium phenobarbital (1.2g/kg) 정맥주사로 희생되었다. 추간판을 채취하고 정량 후 전달 유전자(luciferase) 발현 정량에 사용하였다.

MaxiSorp immunoplate (Nunc)에 100ul의 phosphate buffer saline(PBS)에 함유된 107 PFU의 Ad/luciferase를 각 well에 주입하고 4 ℃에서 하루 밤 보관하였다. 0.05% Tween-20 (Sigma)를 함유한 PBS로 각 well을 씻은 다음 비특이적인 단백질 반응을 포화시키기 위해 탈지유 200 ul을 첨가하고 상온에서 1시간 보관하였다. 1:100으로 희석된 혈청을 100 ul의 탈지유에 썩은 후 각 well에 주입하고 3시간 동안 상온에서 보관하였다. 다시 전술한 방법으로 3번 씻은 다음 1:500으로 희석된 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Sigma)를 주입하고 상혼에서 2시간 동안 보관하였다. 그 이후 6번 씻어낸 다음 PBS에 함유된 1% phosphate substrate (Sigma)를 투여하고 상온에서 30분간 반응시켰다. Optical density는 450 nm에서 측정하였다.

luciferase 표식 유전자 발현은 standard luciferase assay kit (Promega)를 사용하였다. 채취된 수핵 조직에 200uL의 Cell culture lysis buffer (25 mM Tris-phosphate, pH 7.8, 2 m Mdithiothreitol, 2 mM diaminocyclohexane-tetraacetic acid, 10% glycerol, and 1% Triton X-100)를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 원심분리용기에 옮겨서 12,000G로 30초 동안 원심분리하고 상층액을 분리한 후 여기에 luciferase assay reagent를 첨가하여 발광 반응을 일으켰다. 30초 동안의 발광 현상을 luminometer (Automat LB 953, EG &G, Gaithersburgh, MI)를 이용하여 측정하였으며 측정 단위는 Relative light unit (RLU)로 표시하였다. βgalactosidase (lacZ) 표식 유전자 발현은 아래와 같은 조직염색 방법으로 확인하였다. 바이러스를 주입한 후 3, 6주 후 각각의 실험동물을 희생시키고 추간판의 수핵 조직을 채취한 후 액체 질소로 급속 냉각시킨다. Cryostat을 이용하여 10 um 굵기로 조직 표본을 절단한 다음 0.5% glutaraldehyde를 이용하여 4 ℃에서 15분간 고정한다. PBS를 사용하여 고정액을 제거하고 X-Gal substrate를 첨가하여 37 ℃ 에서 2시간 보관한다. 조직 표본은 eosin을 사용하여 배경 염색을 하였고 염증세포 및 신생혈관의 관찰을 위해 hematoxylin-eosin 염색을 추가하였다. 광학 현미경(Nikon, Labophot-2, Japan) 으로 LacZ 발현 및 염증 반응의 유무를 관찰하였다.

모든 자료의 정리와 분석은 SPSS (SPSS Inc, Chicago IL)를 사용하고 항체 생성량 및 추간판내 유전자 발현량과의 관계는 Pearson correlation analysis를 사용하였다.

## 결 과

### 1. βgalactosidase(lacZ) 유전자 발현 및 조직학적 소견

Ad/lacZ(106 PFU)를 요추 추간판에 주입하고 3, 6주에

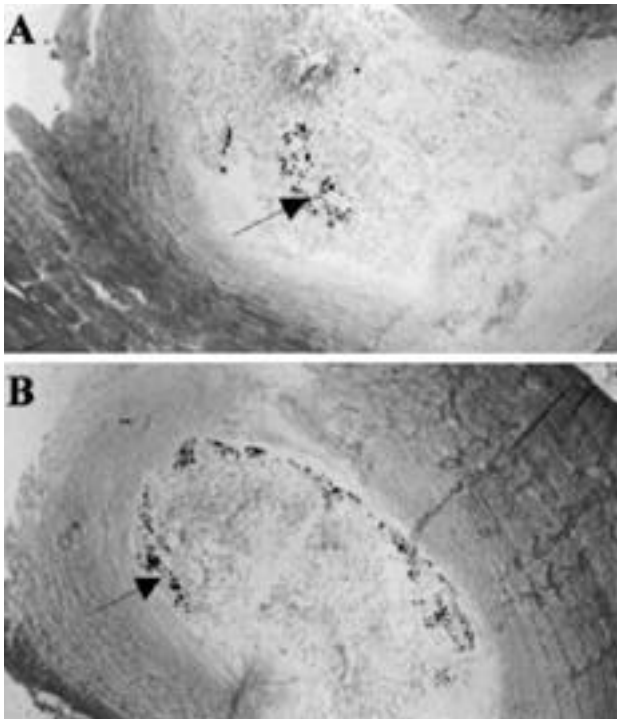


**Fig. 1**. Qualitative analysis of intradiscal transgene expression of **A**) 3 weeks, **B**) 6 weeks after direct application of Ad/lacZ into lumbar intervertebral discs of adult New Zealand white rabbits. There were strong transgene expresson indicated by the arrow (dark staining, originally blue color) in the nucleus pulposus without evidence of infiltration of inflamatory cell and neovascularization (X-Gal staining with counter staining with hematoxylin-eosin, Original magnification ×100).

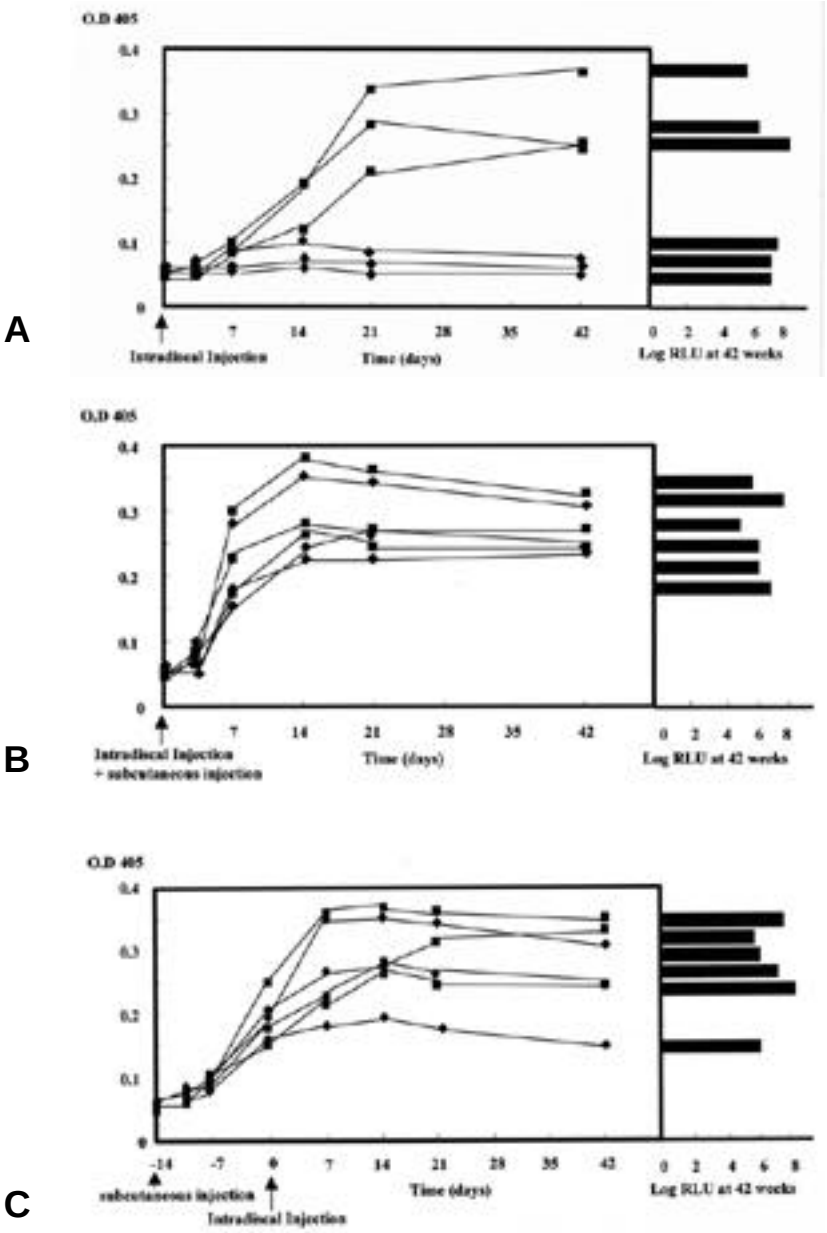


**Fig. 2.** Sequential production of specific antibody for adenoviral proteins in peripheral blood as function of time. Transverse bar chart on the right denote intradiscal transgene expression in each individual rabbit. **A**: Three rabbits injected with Ad/luciferase produced little or no neutralizing antibody while remaining three rabbits showed production of antibody (likely due to leakage of adenovirus from injected disc). **B**: Six rabbits in Group 2 after simultaneous injection of Ad/luciferase into subcutaneous tissue and intervertebral disc produced neutralizing antibody in significant amount. **C**: Six rabbits in Group 3 were immunized two weeks prior to intradiscal gene transduction with injection of Ad/luciferase into subcutaneous tissues. All rabbits showed significant amount of transgene (luciferase) expression.

희생시킨 실험 동물의 추간판 조직에서 푸른색을 띄는 lacZ가 발현되는 세포를 다량 발견할 수 있었으며 그 빈도는 3주와 6주 두 표본간 차이는 없었다. 조직 표본에서 수핵 세포 이외의 염증 세포나 신생혈관 형성 등은 전 관찰 구역에서 발견되지 않았다(Fig. 1).

### 2. Ad/luciferase에 대한 항체 생성과 전달 유전자 발현

바이러스를 주입하기 이전에 채취한 혈액에서 의의 있는 항체 생성은 발견되지 않았다.

제 1 군에서는 확연하게 두 가지의 양상을 보였다. 첫 번째는 추간판내 바이러스 주입 후 전혀 항체 생성이 없

는 양상이었으며 두 번째는 바이러스 주입 후 피하주입군과 비슷한 전신 항체 생성 반응을 보인 양상이었다 (Fig. 2A). 항체 생성이 된 경우는 확실한 기전은 밝혀지지는 않았지만 아마 추간판내 바이러스 주입 후 미량의 바이러스가 주입된 주사 경로를 통해 새어나옴으로서 전신 감작이 일어났을 것으로 추정할 수 있다.

제 2 군 및 제 3 군의 모든 실험 동물은 의의 있는 항체 생성을 보였으며 특히 바이러스의 피하주입 후 2-3주에 항체 생산이 최대치를 보였으며 그 이후 서서히 감소되는 경향이었다 (Fig. 2B, C).

제 1, 2, 3 군 공히 항체 생성량과는 무관하게 추간판내 luciferase 유전자의 발현은 강력하게 유지되었다 ($p=0.170$) (Fig.2A, B, C).

## 고 찰

기초 연구 및 임상에서 최근 각광을 받고 있는 유전자 전달을 이용한 질환의 치료는 유전자 조작에 의해 생물학적 반응을 유도한다는 장점에도 불구하고 극복해야 할 문제들이 있다. 유전자 치료가 임상적으로 성공하기 위해서는 첫째, 목표 기관 혹은 조직으로 효율적인 유전자 전달이 이루어져야하며, 둘째, 전달된 유전자는 충분한 양 (치료적 농도)의 유전자 발현 산물이 충분한 기간 동안 생산 되어야하고, 셋째, 이러한 모든 조작이 전신적 혹은 국소적으로 부작용이 없어야 한다는 것 등이 충족되어야만 한다. 저자들의 이전 연구들에서 추간판내 유전자 전달법이 전술한 첫번째와 두 번째의 요구를 만족시켰는데[20, 21, 24, 25] 이는 추간판내 유전자 치료가 추간판 변성의 가능한 치료법임을 시사하는 것이다. 그러나 과연 왜 추간판내로 전달된 유전자가 효율적으로 발현되고 특히 숙주의 면역반응을 강력히 유도하는 아데노바이러스를 이용했음에도 전달 유전자의 장기 발현이 가능한지에 대한 순수 학문적 규명은 안되었다. 즉 외부에서 투입된 강력한 항원성 물질이 숙주에 의해 거부되지 않으려면 숙주가 면역 결핍 (immunodeficiency) 상태에 있거나 면역 기능이 정상인 숙주라면 면역 특이(immune privilege) 조직에 항원이 주입되면 된다. 추간판 조직이 면역 특이성을 가질 것이라는 추정은 임상적 연구에서 제시되기도 하였다. 가령 탈출된 추간판은 강력한 염증반응을 일으키며 이로 인하여 신경근 병변이 생기고 특히 격리된 추간판 조직은 임상적으로 서서히 흡수될 수 있음이 관찰되었는데[3, 13] 이는 추간판 수핵 조직이 면역 특이성을 가지기 때문에 평생 전신 면역 기전에 감작되지 않고 있다가 추간판 섬유륜의 파괴 등으로 원래의 자리에서 탈출되어 척수강으로 노출되면 비로소 전신 면역 기전에 포착되어 강력한 면역거부 반응이 일어나고 이로 인하여 상기의 임상증상을 야기한다고 추론할 수 있다. 그리하여 저자들은 연구를 진행함에 앞서 척추 추간판 조직이 면역특이 조직일 것이라는 가정을 세웠다. 즉 추간판 조직은 물리적 혹은 면역학적으로 항체 전달 세포(antigen presenting cell, macophage)의 접근을 막고 전신적으로는 감작된 경우라도 항체나 면역 세포들이 추간판 조직내로 침투가 안되어 면역학적 거부반응을 피할 수 있으리라는 가정이다.

본 연구에서 LacZ의 발현을 조직학적으로 관찰하였는데 바이러스 주입 후 6주까지 유전자 발현의 감소가 없었고 특히 감염된 세포주위로 염증을 의심할만한 소견 (염증세포 침윤, 신생 혈관 형성)은 관찰되지 않았는데 이는 강력한 항원인 아데노바이러스와 βgalactosidase자체에 전혀 면역학적 거부 반응이 일어나지 않았음을 증명한다. 물론 보다 과학적인 접근법은 T, B 임파구의 표식자로 염색하여 규명해야하나 실제 추간판조직에서 수핵세포만 관찰되었음으로 T, B 임파구의 표식자를 이용한 조직 염색은 진행하지 않았다. 제 3 군의 실험의 경우 즉 피하조직에 바이러스를 주입하여 전신 감작을 일으키고 충분한 전신 항체 생산을 유도하고 난 후 이차적으로 추간판내 같은 바이러스를 주입했을 때 만일 추간판 조직이 면역학적으로 정상적인 조직이라면 당연히 급격한 거부 반응을 일으키고 주입된 바이러스에 의한 유전자의 발현은 생길 수가 없다. 그러나 본 연구 결과에 의하면 전신 감작된 경우에도 추간판내 유전자 발현은 같은 강력하게 지속적으로 유지됨을 알 수 있었다. 이는 전신 순환중인 항체와 면역세포가 전혀 추간판 조직에 접근 못하였음을 증명하는 결과이다. 제 1 군의 실험에서 추간판내 바이러스를 주입하였지만 전혀 전신적인 항체를 생산하지 않은 실험동물이 있었는데 이는 만약 외부 주입된 바이러스가 유출없이 추간판 조직내로 완전히 머물 수만 있다면 전신 면역반응을 일으키지 않음을 증명하는 결과이다.

본 연구의 결과는 추간판내 유전자 전달이 어떤 기전으로 장기 발현하는지를 면역학적 기초하에 설명할 수 있었으며 또한 추간판 조직의 면역학적 특이성을 밝힘으로서 추간판에 관련된 기초 의학의 발전에도 기여했다고 할 수 있다. 향후 추간판 조직의 면역학적 특성을 증명하기 위해서는 최근 연구가 진행되는 Fas, FasL 의 역할과 정상 추간판 조직과의 관련성이 탐구되어야 할 것이다.

## 결 론

추간판은 면역학적 특이성을 가지며 이는 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달에 대해 전신 거부 반응이 없

**으며 감작된 경우에도 면역 기능이 추간판내에는 영향을 미치지 못함으로 결과적으로 장기적인 전달 유전자의 발현을 가능하게 되고 이는 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달법이 추간판 질환의 치료에 이용할 수 있는 이상적인 방법임을 시사한다.**

## REFERENCES


1) **Adams MA, May S, Freeman BJ, Morrison HP and Dolan P** : *Effects of backward bending on lumbar inter - vertebral discs. Relevance to physical therapy treatments for low back pain. Spine, 25:431-437, 2000.*
2) **Barr E and Leiden JM** : *Systemic delivery of recombi - nant proteins by genetically modified myoblasts. Science, 254:1507-509, 1991.*
3) **Bobechko WP** : *Auto-immune response to nucleus pulpo - sus in the rabbit. J Bone Joint Surg Br, 47:574-580, 1965.*
4) **Borenstein D** : *Epidemiology, etiology, diagnostic evalua - tion, and treatment of low back pain. Curr Opin Rheuma - tol, 4:226-32, 1992.*
5) **Buckwalter JA** : *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine, 20:1307-1314, 1995.*
6) **Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, McNeill TW and Huckman MS** : *Discs degenerate before facets. Spine, 15:111-113, 1990.*
7) **Day CS, Bosch P, Kasemkijwattana C, Menetrey J, Moreland MS, Fu FH, Ziran B and Huard J.** : *Use of muscle cells to mediate gene transfer to the bone defect. Tissue Eng, 5:119-125, 1999.*
8) **De Wet JR, Wood KV, Deluca M, Helinski DR and Subramani S** : *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol Cell Biol, 7:725-737, 1987.*
9) **Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM and Blau HM** : *Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. Science, 254:1509-1512, 1991.*
10) **Evans CH and Robbins PD** : *Possible orthopaedic appli - cations of gene therapy. J Bone Joint Surg Am, 77:1103-1114, 1995.*
11) **Evans CH and Robbins PD** : *Genetically augmented tis - sue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop, 367:S410-8, 1999.*
12) **Evans CH and Robbins PD** : *Potential treatment of osteoarthritis by gene therapy. Rheum Dis Clin North Am, 25:333-44, 1999.*
13) **Gertzbein SD** : *Degenerative disk disease of the lumbar spine: immunological implications. Clin Orthop, 129:68-71, 1977.*
14) **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.*
15) **Hardingham TE and Adams P** : *A method for the deter - mination of hyaluronate in the presence of other gly - cosaminoglycans and its application to human interverte - bral discs. Biochem J, 159:143-147, 1976.*
16) **Herkowitz HN, Abraham DJ and Albert TJ** : *Manage - ment of degenerative disc disease above an L5-S1 segment requiring arthrodesis. Spine, 24:1268-1270, 1999.*
17) **Lipson SJ and Muir H** : *Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. Spine, 6:194-210, 1981.*
18) **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.*
19) **Modic MT :** *Degenerative disc disease and back pain. Magn Reson Imaging Clin N Am, 7:481-491, 1999.*
20) **Moon SH, Kang JD, Nishida K, Gilbertson LG, Evan CH and Robbins PD** : *Human cervical intervertebral disc cells are susceptible to adenovirus-mediated gene therapy. Proceedings of Cervical Spine Research Society. 150-153, 1999.*
21) **Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, Knaub M, Muzzonigro T, Robbins PD, Evans CH and Kang JD** : *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable in-vitro by adenovirus-meidated gene transfer: Implica - tions for clinical management of intervertebral disc disor - der. Spine, 25:2573-9, 2000.*
22) **Moullier P, Bohl D, Heard JM and Danos O** : *Correc - tion of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. Nat Genet. 4,154-159, 1993.*
23) **Naffakh N, Henri A and Villeval JL** : *Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblast. Pro Natl Acad Sci. 92:3194-3198, 1995.*
24) **Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon SH, Suh JK, 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 β encoding gene. Spine, 24:2419-2425, 1999.*

25) **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.*

26) **Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H and Tsuji H** : *Autocrine/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 Orthop Res, 14:690-699, 1996.*

27) **Pearce RH, Grimmer BJ and Adams ME** : *Degenera - tion and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. J Orthop Res. 5:198-205, 1987.*

28) **Robbins PD and Ghivizzani SC** : *Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther. 80:35-47, 1998.*

29) **Takegami K, Matuda K and Kumano F.**: *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.*

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

31) **Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E and Leiden JM** : *Immune responses to tansgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. Nat Med, 2:545-550, 1996.*

32) **Waddell G** : *Low back pa in: A twentieth century health care enigma. Spine, 21:2820-2825, 1996.*

33) **Yang Y, Haeker SE, Su Q and Wilson JM** : *Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle. Human Mol Genetic, 5:1703-1712, 1996.*

34) **Yang Y. Nunes FA. Berencsi K. Furth EE. Gonczol E and Wilson JM** : *Cellular immunity to viral antigens lim - its E1-detected adenovirus for gene therapy. Proc Nat Acad Sci, 91:4407-4411, 1994.*

**국 문 초 록**

**연구목적** : 추간판내 유전자 치료의 전신 면역 반응과 추간판내 유전자 발현에 대한 항체 생성 반응을 알기 위하여 연구를 진행하였다.

**대상 및 방법** : 20마리의 성숙한 가토를 대상으로 하였으며 아데노바이러스-luciferase를 가토의 요추 추간판에 주사하였다. 1 군은 바이러스를 추간판내에만 주입한 군이며 2 군은 추간판 및 피하조직에 동시에 바이러스를 주입한 군이며 3 군은 피하주사 2 주 후 추간판에 바이러스를 주입한 군으로 하였다. 바이러스 주입 후 날짜별로 말초혈액을 채취하여 ELISA법으로 항체를 검출하였다. Standard luciferase kit으로 유전자 발현을 측정하였다.

**결과** : 2, 3군의 가토는 전부가 항체를 생성하였다. 1군은 3마리에서 항체 생성을 보인 반면에 나머지 3마리에서는 항체생성이 없었다. 모든 가토에서 항체 생성과 관계없이 추간판내의 전달된 유전자는 강하게 발현되었다.

**결론** : 추간판은 전신 면역반응에 영향을 받지 않으므로 아데노바이러스를 이용한 유전자 전달에 적합한 조직이다.

**색인단어** : 추간판내 유전자 치료, 면역 반응

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