

LNCX Retroviral Vector를 이용한 CD34⁺골수세포 neoR 유전자 Transfer

연세대학교 의과대학 내과학교실, 연세암연구소*

민유홍 · 김성철 · 김연수* · 한지숙 · 고윤웅

= Abstract =

LNCX Retroviral Vector-mediated neoR Gene Transfer into CD34⁺ Bone Marrow Cells

Yoo Hong Min, M.D., Seong Cheol Kim, M.D., Yeon Soo Kim, PhD.*
Jee Sook Hahn, M.D. and Yun Woong Ko, M.D.

*Department of Internal Medicine and Institute for Cancer Research,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : The hematopoietic stem cells have been one of the major targets for designing human gene therapy of genetic disorders and malignant diseases. As a step toward the clinical application of gene transfer into hematopoietic stem cells, we have infected LNCX retroviral vector into purified CD34⁺ bone marrow cells and examined the effect of fibronectin on transduction.

Methods : CD34⁺ bone marrow cells were purified in 3 normal marrow donors by immunomagnetic microbead methods, and subsequently primed with stem cell factor(SCF), interleukin-3(IL-3), interleukin-6(IL-6) for 48 hours. After priming, CD34⁺ bone marrow cells were cultured at a density of $2 \times 10^5/5\text{mL}$ in supernatant containing neoR gene inserted LNCX retroviral vector for 72 hours. Cultures were supplemented with protamine, SCF, IL-3 and IL-6. Every 24 hours, cells were spun down and resuspended in fresh retroviral supernatant, protamine and growth factors. After retroviral-mediated gene transfer, clonogenic assay and polymerase chain reaction(PCR) analysis were taken.

Results :

- 1) At clonogenic assay, hematopoietic colonies were found in all LNCX retroviral-infected CD34⁺ cells-plated culture, irrespective of use of G418(0.9mg/mL), but in Mock-infected CD34⁺ cells plated culture, any colonies were not observed with use of G418. After retroviral-mediated gene transfer, no major shift in colony composition was found.
- 2) PCR analysis revealed amplified neoR gene band in LNCX retroviral-infected colonies, but not in Mock-infected colonies.

민유홍 : 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세의대 세브란스병원 내과

Tel : (02)361-5438, Fax : (02)332-0718

3) LNCX retroviral-transduction efficiency(neoR %) was 14.8% in G418 clonogenic assay. Transduction efficiency was increased into 20.8% by use of fibronectin.

Conclusion : We showed effective LNCX retroviral-infection into normal CD34⁺ bone marrow cells, which were separated with immunomagnetic microbead methods, and primed with SCF, IL-3 and IL-6 in fibronectin-coated culture flask. These preclinical data have contributed to the basis of ongoing gene transfer into hematopoietic stem cells.

Key Words : Hematopoietic stem cells, LNCX retroviral-infection, Gene therapy

서 론

조혈세포는 근자에 활발히 시도되고 있는 유전자 치료의 주된 표적세포 중 대표적인 세포이며, 이는 조혈세포가 계통발생학적인 측면에서 세포생물학적 특성이 비교적 잘 알려져 있고, 자가갱신(self renewal), 증식 및 분화 특성을 갖는 조혈모세포의 분리가 일부 가능해졌으며, 조혈촉진인자 사용으로 세포의 증식을 촉진할 수 있는 등 효과적인 유전자 transduction이 가능하기 때문이다. 이와 연관하여 유전질환이나 악성종양의 치료적 측면에서 조혈세포를 이용한 유전자 치료가 활발히 시행되기 시작하였으며¹⁾, 아울러 골수이식 및 말초혈액 조혈모세포이식시 유전자 표식된 조혈모세포를 이식함으로써 조혈모세포의 생착 등 조혈기능 회복기전을 연구할 수 있게 되었으며, 급성 백혈병 등 악성 혈액종양의 경우 조혈모세포이식후 재발기전까지도 밝혀낼 수 있게 되었다²⁾. 초기에는 골수 조혈모세포가 근본적으로 활발히 증식 분열하는 세포가 아니고, 효과적인 유전자 transfer 방법이 개발되지 않아 유전자 transduction 및 표식에 어려움이 있었으나, 이후 immunomagnetic bead, avidin-biotin column 등으로 분리한 조혈모세포를 retroviral vector 혹은 adeno-associated virus(AAV) vector 등을 이용하여 원하는 유전자를 효과적으로 transduction하는 방법론적인 개선이 이루되었다³⁾.

CD34세포표면항원은 장기골수배양 개시세포, high-proliferative potential colony-forming cell (HPP-CFC), colony-forming unit granulocyte-

macrophage(CFU-GM) 및 burst-forming unit erythroid(BFU-E) 등 조혈모세포에 선택적으로 표현되며^{4,5)}, CD34⁺세포 이식시 CD34⁺세포와 달리 골수생착이 유도되었던 연구결과로 볼 때^{6,7)}, CD34⁺세포가 조혈모세포 기능을 갖고 있으며, 조혈모세포 이식시 조혈원으로 이용될 수 있음을 물론, 유전자 치료의 중요한 표적세포가 될 수 있음을 제시하는 것이다.

Retrovirus는 RNA 바이러스로서 현재 임상실험 중인 프로토콜의 거의 대부분이 retroviral vector를 이용하고 있다. 이들 retroviral vector는 주로 Moloney murine leukemia virus(MMLV)를 모체로 하여 재조합한 것이며, 7.0kb까지의 비교적 큰 유전자를 삽입할 수 있고, 숙주세포에 일단 무작위로 이입되면 세포증식 및 분화에 상관없이 지속적으로 이입된 유전자의 발현을 기대할 수 있다는 장점이 있다. 반면 높은 역가의 재조합 retrovirus를 얻기가 어려우며, retrovirus의 특성상 활발히 증식하는 세포에 한하여 transduction efficiency가 높다는 것이 단점으로 지적되고 있다³⁾. 미숙 조혈모세포는 대부분 Go세포주기 등 휴지기에 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 이러한 세포에 retroviral vector를 이용한 유전자 transfer시 그 transduction efficiency가 낮을 가능성이 높다. 따라서 미숙 조혈모세포에 선택적으로 작용하는 stem cell factor(SCF) 및 interleukin-3(IL-3), interleukin-6(IL-6) 등으로 조혈모세포를 자극한 다음 retroviral vector를 이용한 유전자 transfer를 시행시 그 효율성을 높일 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

저자들은 정상인의 골수세포에서 immunoma-

genetic microbead 방법을 이용하여 CD34⁺세포를 분리한 다음, SCF, IL-3 및 IL-6를 병용 첨가하여 neo 표식유전자가 삽입된 LNCX retroviral vector로 CD34⁺골수세포에 neo 유전자 transfer를 시행하였으며, 아울러 fibronectin 처리가 transduction efficiency를 증가시킬 수 있는지를 검토하였기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. CD34⁺ 정상 골수세포분리

본 연구는 3명의 동종 골수이식 공여자에서 채취한 골수세포를 대상으로 하였으며, Ficoll-Hypaque(Nycomed, Norway: S.G. 1.077)을 이용하여 단핵세포를 분리한 다음, 10% 우테아혈청(FBS; GIBCO, USA)이 포함된 Iscove's modified Dulbecco 배양액(IMDM; GIBCO)에 부유하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 2시간 방치하여 부착세포를 제거하였다. RPMI 배양액(GIBCO)으로 세척후, 2% FBS이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)에 부유하여 4°C에 10분간 방치한 다음, immunomagnetic microbead 방법을 사용하여 CD34⁺세포를 분리하였다^{8, 9)}. 약술하면 부착세포가 제거된 정상 골수 단핵구를 4°C 0.5% bovine serum albumin (BSA; GIBCO)과 5mM EDTA(Sigma, USA)가 포함된 PBS에 분주하되, 세포농도는 4×10⁸/300μL를 초과하지 않도록 하였다. 1×10⁸세포당 Fc-receptor blocking reagent(human IgG; Miltenyl Biotec, USA) 100μL와 anti-CD34 단일클론항체(clone 8G12, IgG1; Miltenyl Biotec, USA) 100μL를 첨가한 다음 4°C에서 15분간 배양하였다. 이후 colloidal supermagnetic miniMACS(Miltenyl Biotec, USA)를 첨가하여 4°C에서 15분간 배양한 다음 MiniMACS separation column(type MS, Miltenyl Biotec, USA)에 세포를 주입하였다. PBS로 세척 후 column을 magnetic으로부터 분리해 내어 column내 포착된 CD34⁺세포를 멸균한 주사기로 밀어내었다. 분리된 CD34⁺세포는 10% FBS가 포함된 IMDM 배양액에 부유하고, hemocytometer로 세포수를 계산한 다음,

flow cytometry를 이용하여 CD34⁺세포순수도를 측정하였다. 분리된 CD34⁺정상 골수세포의 순수도는 FACScan instrument(Becton Dickinson)를 이용한 직접 면역형광법으로 측정하였다. 단일클론항체는 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 anti-CD34(anti-HPCA-2; Becton Dickinson, USA)를 사용하였으며, Consort 30 Data Management Program list mode에서 최소한 10,000개의 events를 분석하였는 바, CD34⁺세포군의 순수도는 90% 이상이었다.

2. CD34⁺세포 priming

Retroviral infection 48시간전 2×10⁵/mL개의 CD34⁺골수세포를 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1% BSA, 1% L-glutamine이 포함된 IMDM 배양액이 들어 있는 25cm² 배양기에 분주하고, 50ng/mL SCF, 20ng/mL IL-3, 50ng/mL IL-6를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양을 시행하였다. 배양된 세포는 세척후 retroviral vector를 이용한 유전자 transfer를 시행하였다.

3. LNCX retroviral infection

본 실험에 사용된 retroviral vector LNCX는 neomycin 내성 유전자(neoR gene)가 삽입되어 있으며, PA317-LNCX(Fig. 1) amphotropic packaging cell line을 10% FBS가 포함된 고당질 Dulbecco's modified Eagle 배양액(DMEM)으로 3일간 배양한 후 배양상청액을 수집, 여과하여 얻었다.

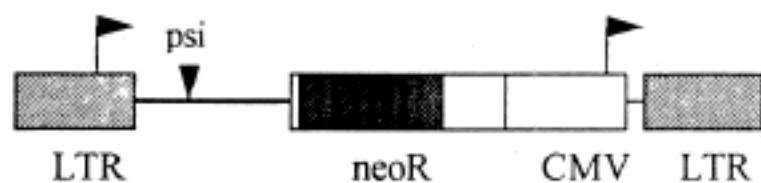


Fig. 1. Schematic diagram of LNCX retroviral vector.

LTR : long terminal repeat; psi : packaging signal, neoR : bacterial neomycin phosphotransferase gene; CMV : cytomegalovirus promoter

viral titer는 $1\sim5\times10^6$ cfu/mL였으며, L+S-extended method를 사용하여 helper virus가 합성되지 않았음을 확인하였다¹⁰⁾. Cytokine으로 prestimulation된 $2\times10^5/5mL$ 의 CD34⁺골수세포를 10% FCS, 2mM L-glutamine 및 4μg/mL protamine sulfate(Sigma, USA)가 포함된 고당질 DMEM 배양액에 부유하고, fibronectin (GIBCO)이 coating된 25cm² 배양기내에서 LNCX retroviral vector를 이용한 neoR 유전자 transfer을 72시간 동안 시행하였다. MOI 비율은 2:1로 유지하였으며, transduction efficiency를 높이기 위해 배양기내 50ng/mL SCF, 20ng/mL IL-3, 50ng/mL IL-6를 첨가하였으며, 24시간마다 세포를 수집 원침한 후 신선한 LNCX retroviral vector, protamine sulfate, cytokine이 포함된 배양액으로 바꾸어 주었다. 72시간후 transduction된 세포를 채취하여 4°C PBS로 2회 세척후 10% FBS가 포함된 IMDM 배양액에 부유하여 clonogenic assay를 시행하였다. 매 실험마다 transduction의 efficiency를 비교하기 위해 fibronectin이 coating되지 않은 배양기에서도 LNCX infection을 시행하였으며, LNCX가 포함되지 않은 10% DMEM 배양액으로 Mock infection을 시행하였다.

4. Clonogenic assay

골수 단핵세포($2\times10^5/mL$), infection전 분리한 CD34⁺골수세포 ($2\times10^3/mL$) 및 infection후 채취한 CD34⁺세포($2\times10^3/mL$)를 대상으로 0.9% methylcellulose를 이용한 semisolid clonogenic assay를 시행하였으며, MethoCult GF "complete" with Growth Factors(HCC4434; StemCell Tech., Vancouver, Canada)를 사용하였다. G418(GIBCO)을 추가한 경우 G418 active concentration은 0.9mg/mL로 하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 14일간 배양한 후 도립현미경으로 세포수 40개 이상으로 이루어진 콜로니수를 측정하였으며, micropipet을 사용하여 콜로니를 흡인채취한 다음, 증합효소연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 시행하였다.

5. Polymerase chain reaction

개별적으로 흡인채취한 콜로니는 10% FBS이 포함된 4°C PBS에 부유하고, 1.5mL microfuge tube에 넣어 4°C, 1,000g에서 5분간 원침하였다. 세척후 20μL의 증류수에 부유한 다음, 10분간 99°C로 가열하고 proteinase K(0.4mg/mL)를 첨가하여 55°C에서 60분간 효소처리하였다. 다시 10분간 99°C로 가열한 다음, 100μL lysis buffer(0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 5mM Tris pH 8.4)를 첨가하고 위와 동일한 방법으로 proteinase K로 처리하였다.

분리한 10μL의 DNA는 GeneAmp PCR Reagent Kit(Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, CT)를 사용하여 PCR을 시행하였으며, 1μg template DNA, 10x PCR buffer, 200mM dNTPs, 5 units Taq DNA polymerase, 1mM neoR primer가 reaction mixture로 사용되었다. Neomycin phosphotransferase 유전자에 대한 amplification primer는 한국생공에서 제조한 5'-TCC ATC ATG GCT GAT GCA ATG CGG-3', 5'-GAT AGA AGG CGA TGC GCT GCG AAT-3' primer를 사용하였다. PCR 과정은 먼저 95°C에서 2분간 처리한 다음, 95°C, 1분간의 denaturation, 55°C, 1분간의 annealing, 72°C, 1분간의 extension을 40 cycle 시행하고, 72°C에서 10분간 처리한 후 종료하였다. DNA 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며, UV illumination하에서 neoR 유전자 증폭여부를 관찰하였다.

결 과

1. CD34⁺골수세포의 LNCX retroviral infection후 clonogenic assay

CD34⁺골수세포를 대상으로 72시간 LNCX retroviral infection후 시행한 semisolid clonogenic assay에서 3명의 정상 CD34⁺골수세포 모두 G418 처리와 무관하게 콜로니를 관찰할 수 있었으며, Mock infection에서는 G418 처리시 어떠한 콜로니도 관찰할 수 없었다(Table 1)(Fig. 2). 또한 in-

Table 1. Clonogenic Analysis after LNCX Retrovirus-and Mock-infection

BM sample	G418(-)		G418(+)	
	LNCX retrovirus	Mock	LNCX retrovirus	Mock
IPN	78.3 ± 8.1	134.2 ± 6.5	12.3 ± 8.9	0
2PN	102.0 ± 1.4	194.0 ± 9.3	13.0 ± 5.6	0
3PN	85.3 ± 7.3	112.0 ± 10.2	14.3 ± 5.2	0

Results are expressed as a mean number of colonies ± SD per 2×10^3 CD34⁺ cells/mL of triplicate cultures.

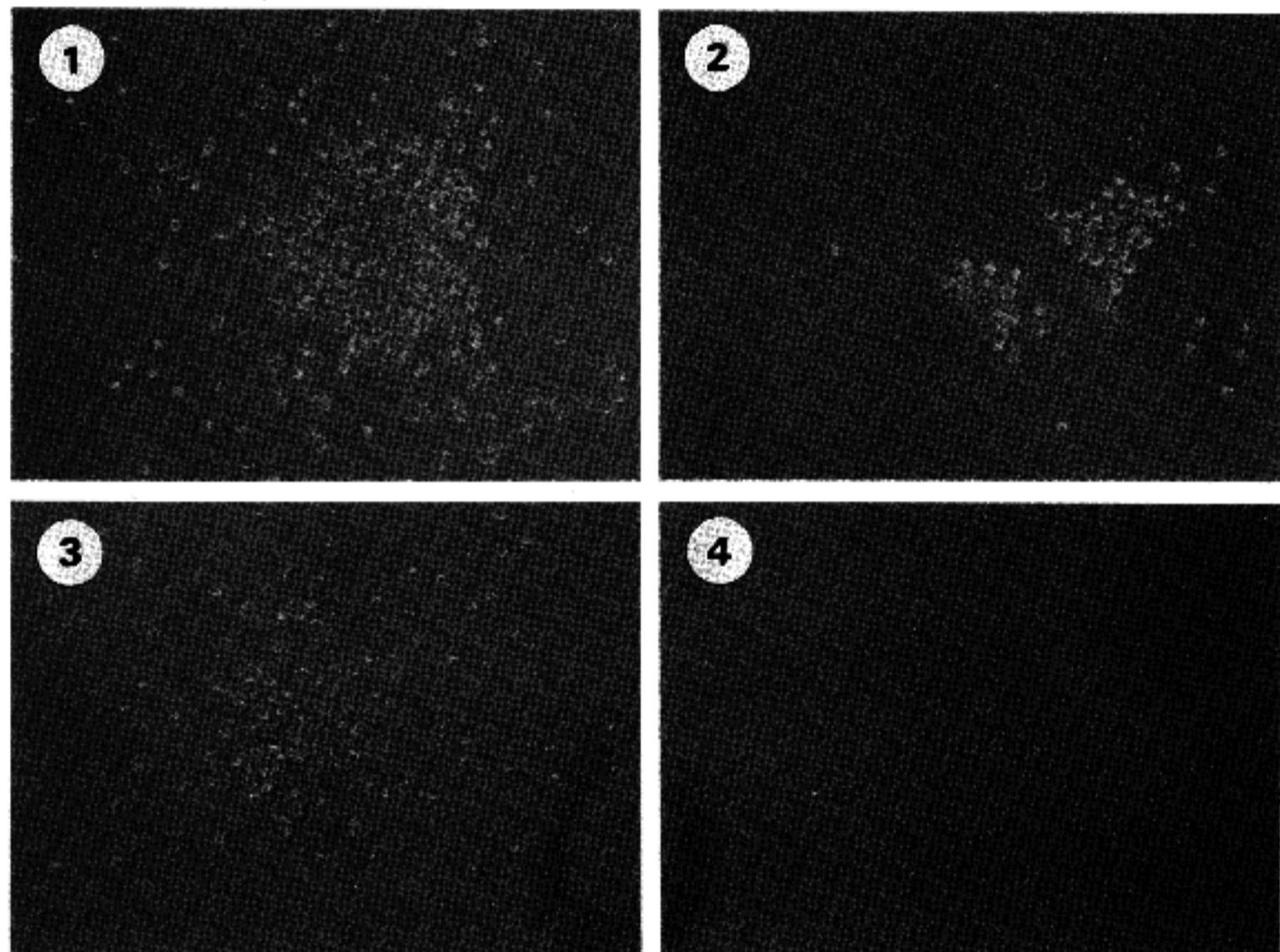


Fig. 2. Photomicrograph of hematopoietic colonies grown from LNCX retroviral- and Mock-infected CD34⁺ cells purified from bone marrow.

- 1 ; LNCX retrovirus-infected colony without G418
- 2 ; LNCX retrovirus-infected colony with G418
- 3 ; Mock-infected colony without G418
- 4 ; Mock-infected colony with G418

fection 전 분리한 CD34⁺골수세포에서 배양된 콜로니와 infection 후 LNCX retrovirus를 함유한 CD34⁺세포에서 배양된 콜로니간의 콜로니 구성에는 차이가 없었다(Table 2).

2. PCR을 이용한 neoR 유전자 증폭 여부

흡인체취된 콜로니에서 DNA를 추출하여 PCR로 증폭하였을 때, LNCX retroviral infection된 콜

Table 2. Numbers and Composition of Hematopoietic Colonies per 2×10^3 CD34⁺ Bone Marrow Cells after 14 days of Culture in Semi-solid Medium

n	CFU-GM	BFU-E	Mixed	Colony efficiency
Controls (without transfection)				
9	368.7 ± 46.8	49.3 ± 28.2	38.7 ± 13.3	22.8 ± 9.6
After transduction and plating in medium without G418				
9	118.3 ± 59	15 ± 13.2	8.0 ± 2.6	7.1 ± 8.6
After transduction and plating in medium with G418				
9	11.7 ± 4.0	5.0 ± 0	0.7 ± 0.5	0.9 ± 0.5

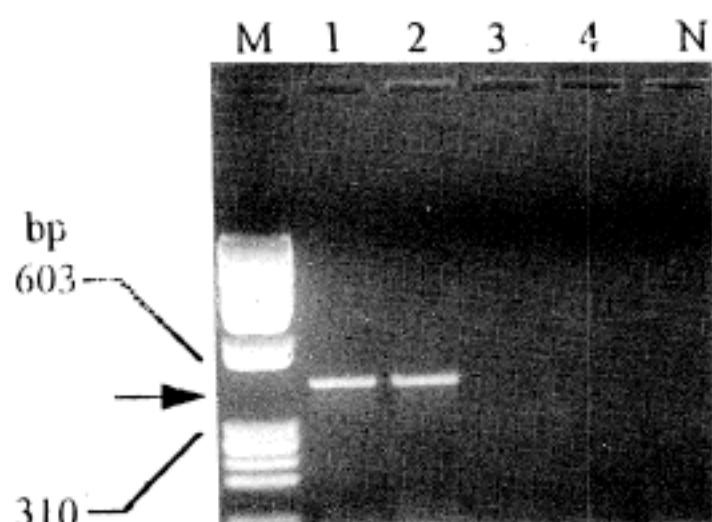


Fig. 3. PCR analysis for the presence of the neoR gene of hematopoietic colonies grown from LNCX retroviral-and Mock-transfected CD34⁺ cells purified from bone marrow. The arrow indicated the 433 bp-amplified neoR gene band.
 1 ; LNCX retrovirus-transfected colony without G418
 2 ; LNCX retrovirus-transfected colony with G418
 3 ; Mock-transfected colony without G418
 4 ; Mock-transfected colony with G418
 M ; Molecular-weight marker DNA(ψ X174 RF DNA/Hae III digest)
 N ; Negative control

로니에서는 G418(+)와 G418(-) 둘다에서 증폭된 neoR 유전자 band(433 bp)를 보여 주었으나, Mock infection에서는 어떠한 DNA band도 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

3. CD34⁺골수세포의 LNCX retroviral transduction efficiency

LNCX retroviral transduction efficiency는 G418 (-)에서 자란 총 콜로니수와 G418(+)에서 자란 콜로니수의 비(neoR %)로 산출하였는데, fibronectin을 처리하지 않았을 때 transduction efficiency는 14.8%였으며, fibronectin을 처리했을 때는 20.7%로 transduction efficiency가 증가하는 소견을 보였다(Table 3).

고 찰

유전자 치료시 원하는 유전자를 표적세포에 삽입시키기 위해서는 반드시 특정 vector가 필요하며, 물리, 화학적 방법을 이용한 유전자 transfer의 낮은 효율과 이입된 유전자의 일관성을 해결하고 보다 간편하게 임상에서 사용하기 위해 근자에는 바이러스 vector가 보편적으로 이용되고 있다. 이 중 retroviral vector를 이용한 유전자 transfer는 가장 많이 임상적으로 사용되고 있는 방법이며, 대표적인 MMLV의 경우 GAG, POL, ENV 유전자를 제거하고 그 위치에 치료목적으로 이입하고자 하는 유전자 및 유전자 이입이 된 세포만을 선택하기 위한 선택 표지 유전자(selectable marker gene)를 삽입하여 retroviral vector를 재조합 합성하게 되는 것이다. Retrovirus는 일단 숙주세포에 감염되면 숙주의 염색체에 무작위로 삽입되게 되는데, 이입된

Table 3. Retroviral Transduction Efficiency of CD34⁺ Bone Marrow Cells

BM sample	Fibronectin(-)			Fibronectin(+)		
	neoR	CFU-C/total CFU-C*	neoR% [†]	neoR	CFU-C/total CFU-C	neoR%
IPN	12/78		15.4	15/56		26.8
2PN	13/102		12.7	28/188		14.9
3PN	14/85		16.5	26/127		20.5
Mean±SD			14.8±1.9			20.7±5.9

* Number of CFU-C(colony-forming unit colonies) growing in G418 per 2×10^3 cells plated divided by number of CFU-C growing per 2×10^3 cells plated without G418

† % CFU-C growing in G418 compared to total CFU-C growing without G418

유전자는 지속적으로 발현되며 세포가 증식 분열할 경우 이입된 새로운 유전형질이 그 딸세포에도 유전되기 때문에 한번의 유전자요법으로 장기간의 치료효과를 기대할 수 있는 조혈모세포 유전자 transfer에 바람직한 vector로 생각되고 있다. 본 연구에 사용된 LNCX retroviral vector는 역시 MMLV를 재조합한 것이며, 5'LTR와 cytomegalovirus(CMV) promotor를 가지고 있기 때문에 2개의 유전자를 삽입 표현시킬 수 있다. 일단 이번 연구에서는 CD34⁺골수세포에 neomycin 내성 유전자 삽입 및 그 표현만을 검토하려 하였기 때문에 CMV promotor로 발현될 수 있는 위치에는 특정 유전자를 삽입시키지 않았으며, 본 연구결과로 neomycin 내성 유전자의 transduction efficiency 및 발현을 확인할 수 있었으며, 이후 특정 cytokine 유전자를 추가로 삽입시켜 그 표현에 따른 생물학적 변화를 연구하고 있는 중에 있다.

그간의 쥐 혹은 사람의 조혈모세포를 대상으로 한 retrovirus-mediated gene transfer 연구결과를 볼 때 infection 전 조혈모세포의 전처치 및 infection 시 용해성 혹은 기질세포 분비성 조혈촉진인자를 사용함으로써 transduction efficiency를 증가시킬 수 있는 것은 확실해 보인다^[11]. 그러나 아직은 휴지기에 주로 존재하는 조혈모세포의 특성상 transduction efficiency는 10%~35% 정도에 불과하기 때문에^[11~14], 조혈모세포를 표적세포로 한 retroviral infection의 transduction efficiency를 높이기 위해

서는 retroviral vector의 역기를 올려야 함은 물론, 조혈모세포의 순수분리를 통한 transduction efficiency의 증가, 조혈촉진인자 사용을 통한 조혈모세포의 증식 촉진 그리고 transduction의 조건 개선 등이 효과적으로 이루어져야 한다.

CD34세포표면항원은 장기골수배양 개시세포, HPP-CFC, CFU-GM 및 BFU-E 등 조혈모세포에 선택적으로 표현되며^[4, 5], CD34⁺세포 이식시 CD34⁺세포와 달리 골수생착이 유도되었던 연구결과로 볼 때^[6, 7], CD34⁺세포가 조혈모세포 기능을 갖고 있으며, 조혈모세포 이식시 조혈원으로 이용될 수 있음은 물론, 유전자 치료의 중요한 표적세포가 될 수 있다. CD34⁺세포만을 대상으로 유전자 transfer를 시행하는 의의는 조혈모세포 기능을 갖고 있지 않은 세포가 포함될 경우 표적세포 대 retrovirus 역자를 맞추어 효과적인 infection을 유도하기 위해서는 매우 많은 양의 retroviral vector 함유 배양상청액이 필요하기 때문에 임상적으로 적용하기에는 많은 문제점을 안고 있으며, infection을 저해하는 세포군이 포함될 가능성도 배제할 수 없기 때문이다. 골수 혹은 말초혈액 CD34⁺세포를 대상으로 유전자 transfer를 시행하여 CFU-C를 관찰한 결과 약 20%~30%의 transduction efficiency를 보인다^[15].

조혈모세포의 활발한 증식을 통한 retroviral infection의 증가는 최근 유전자재조합방법으로 클로닝된 다양한 조혈촉진인자를 병용하므로써 가능하게 되었다. 특히 SCF는 c-kit 수용체의 배위자

(ligand)로서 장기골수배양 개시세포, HPP-CFC, CD34⁺HLA-DR⁻세포 등 미숙조혈모세포에 선택적으로 작용하며, IL-3, GM-CSF 등의 조혈촉진인자와 병용시 증식 자극효과가 synergistic하게 증가하는 것이 관찰되고 있어 retroviral vector gene transfer시 효과적인 조혈촉진인자로 생각되고 있다. 본 연구에서는 infection전 표적세포를 조혈촉진인자로 priming할 경우 유전자 transduction의 efficiency가 증가하였다는 연구결과에 착안하여¹⁶⁾, infection 48시간전부터 SCF+IL-3+IL-6를 병용하여 CD34⁺세포를 자극하였으며, LNCX infection시에도 24시간 마다 동일한 조혈촉진인자를 보충하여 유전자 transduction efficiency를 높였다. 조혈촉진인자가 어떤 기전에 의해 retroviral infection을 증가시키는지는 amphotropic retrovirus의 세포수용체가 규명되지 않았기 때문에 아직 확실히는 알 수 없으나, 세포증식 및 분열로 retroviral infection이 증가되는 것을 우선 생각할 수 있고, CD34⁺세포의 경우 언급한 조혈촉진인자 사용시 retrovirus의 세포막 부착이 증가되었던 연구결과도 겸토될만 하다¹⁷⁾.

Retroviral gene transfer시 표적세포에 retrovirus 부착능을 높이기 위해 polybrene이 많이 쓰였으나, 최근에는 조혈모세포 손상을 줄이기 위해 protamine sulfate가 이러한 목적으로 많이 사용되고 있다¹⁸⁾. 일부 고역가의 vector producing 세포주 자체로 infection을 시행할 경우 배양상청액으로 infection된 경우에 비해 transduction efficiency가 높으나, 이 경우 부착기전으로 인한 조혈모세포의 손실, packaging세포주를 검사함으로서 transduction의 위양성 소견을 보일 수 있고, 실제적으로 적은 세포만을 처리할 수 있기 때문에 임상적으로 사용하기는 어렵고, 따라서 현재 FDA 공인된 유전자치료 프로토콜은 모두 retrovirus 배양상청액을 쓰고 있다. Retroviral infection시 조혈모세포의 세포주기를 활성화시키고, 증식을 촉진하기 위해 다양한 조혈촉진인자가 사용되고 있다는 것은 이미 전술하였으나, 조혈촉진인자에 의한 활성화 신호는 기질세포 혹은 세포외 기질이 존재할 때 보다 효과적으로

조혈모세포에 전달되며, 장기골수배양 시행시에도 원시 조혈모세포는 주로 기질세포층에 근접하여 존재 증식하기 때문에^{19~21)}, transduction efficiency를 증가시키기 위해서는 기질세포 혹은 세포외 기질이 필요하다고 생각되고 있다. 이러한 근거로 많은 연구가 동종 골수를 장기골수배양한 후 형성된 기질세포층을 방사선처리하고, 이 상태에서 조혈모세포를 중증하여 retroviral infection을 시행하기도 한다¹⁴⁾. 그러나 동종 골수세포로 기질세포층을 형성하기까지는 최소한 2~3주가 소요되며, 조혈모세포가 기질세포에 부착될 경우 infection 종료시 회수하기가 어려운 점 등 실제 배양상의 문제점이 수반될 수 있기 때문에 근래에는 배양기에 세포외기질을 입힌 다음 infection을 시행하는 방법이 사용되고 있다^{22, 23)}. 본 연구에서는 human plasma fibronectin으로 배양기를 coating한 다음 retroviral gene transfer를 시행하였는 바, fibronectin 처리하지 않은 조건에 비해 fibronectin 처리후의 transduction efficiency가 높음을 관찰하였으며(14.8% vs 20.7%), 이러한 결과는 Williams 등²²⁾의 연구와 거의 유사한 것이다.

정상인의 CD34⁺골수세포를 대상으로 한 본 연구에서는 neoR 표지 유전자 transduction efficiency는 G418 콜로니 검사상 14.8%(fibronectin 처리시 20.7%)로 관찰되었다. Transduction efficiency를 분석하기 위해서는 G418 콜로니 검사와 neoR 유전자 band 검색을 위한 PCR 검사가 동시에 시행되는 것이 바람직한 바, G418 콜로니 검사는 transfer된 neoR 유전자 발현을 관찰하기 위해 필수적이며, 반면 PCR 검사는 유전자 삽입 자체를 분석하는 측면에서는 G418 콜로니 검사에 비해 PCR 검사가 예민도가 높으며 검사 표준화 가능성 이 더 높다고 판단되기 때문이다²⁴⁾. 또한 본 연구에서 retroviral infection후 콜로니 구성은 infection 전과 큰 차이가 없었는데, 이는 Lu 등²⁵⁾의 연구와 같은 소견으로, 사용된 세포분리방법 및 유전자 transfer과정이 조혈모세포의 증식 및 분화에 큰 영향을 끼치지 않음을 보여 준다.

본 연구에서는 정상인의 골수세포에서 CD34⁺세

포를 immunomagnetic microbead 방법으로 분리한 다음, SCF, IL-3, IL-6로 자극하여 fibronectin-coated 배양기내에서 LNCX retroviral vector를 이용하여 CD34⁺세포에 neomycin 내성 유전자를 효과적으로 삽입하였고, clonogenic assay 및 PCR을 통해 neoR 표지 유전자 삽입 및 발현을 확인하였다. 따라서 앞으로 활발하게 시행될 CD34⁺조혈모세포를 표적세포로 한 유전자치료의 실험적인 기초를 제공하였기에 보고하는 바이다.

요 약

연구배경 : 조혈세포는 최근 유전질환 및 악성 종양에 있어서 활발히 시도되고 있는 유전자 치료의 주된 표적세포 중 대표적인 세포로 주목받고 있다. 이에 저자 등은 neo 표식유전자가 삽입된 LNCX retroviral vector로 CD34⁺골수세포에 neo 유전자 transfer를 시행하였으며, 아울러 fibronectin 처리가 transduction efficiency를 증가시킬 수 있는지를 연구하였기에 보고하는 바이다.

방 법 : 3명의 동종 골수이식 공여자에서 채취한 골수세포를 대상으로 immunomagnetic microbead 방법을 이용하여 CD34⁺세포를 분리한 다음, stem cell factor(SCF), interleukin-3(IL-3), interleukin-6(IL-6)를 병용 첨가하여, 48시간 priming을 시행하였다. Priming 후 $2 \times 10^5/5\text{mL}$ 의 CD34⁺골수세포를 이용하여 72시간 동안 LNCX retroviral-infection을 시행하였으며, 매 24시간마다 세포를 수집 원침한 후 신선한 LNCX retroviral vector, protamine sulfate, growth factors가 포함된 배양액으로 바꾸어 주었다. 72시간후 infection된 세포를 채취하여 clonogenic assay 및 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 시행하였다.

결과 :

1) 72시간 LNCX retroviral infection 후 시행한 semisolid clonogenic assay에서 CD34⁺골수세포 모두에서 G418 처리와 무관하게 콜로니를 관찰할 수 있었으나, Mock infection에서는 G418 처리시 어떠한 콜로니도 관찰할 수 없었다. 또한 LNCX

retroviral-infection 후 배양된 콜로니의 구성에는 큰 변화가 없었다.

2) neoR 유전자 유무를 관찰하기 위한 PCR 분석에서 LNCX retroviral infection된 콜로니에서는 G418(+)와 G418(-) 둘다에서 증폭된 neoR 유전자 band를 보여 주었으나, Mock infection에서는 어떠한 DNA band도 관찰할 수 없었다.

3) LNCX retroviral transduction efficiency(neoR %)는 G418 콜로니 검사상 fibronectin을 처리하지 않았을 때 14.8%였으며, fibronectin을 처리했을 때는 20.7%로 transduction efficiency가 증가하는 소견을 보였다.

결 론 : 이상의 결과로 저자 등은 정상인의 골수 세포에서 CD34⁺세포를 immunomagnetic microbead 방법으로 분리한 다음, SCF, IL-3, IL-6로 자극하여 fibronectin-coated 배양기내에서 LNCX retroviral vector를 이용하여 CD34⁺세포에 neomycin 내성 유전자(neoR)가 효과적으로 삽입함을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 앞으로 활발하게 시행될 CD34⁺조혈모세포를 표적세포로 한 유전자 치료의 실험적인 기초를 제공하였기에 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

- 1) Anderson WF: *Human gene therapy*. Science 256:808-813, 1992
- 2) Rill DR, Moen RC, Buschle M, Bartholomew C, Foreman NK, Mirto J, Krance RA, Ihle JN, Brenner MK: *An approach for the analysis of relapse and marrow reconstitution after autologous marrow transplantation using retrovirus-mediated gene transfer*. Blood 79: 2694-2700, 1992
- 3) Miller AD: *Human gene therapy comes of age*. Nature 357:455-460, 1992
- 4) Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR: *Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human*

- bone marrow. *Exp Hematol* 15:10-17, 1987
- 5) Brandt J, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R: Characterization of a human hematopoietic progenitor cells capable of forming blast cells containing colonies in vitro. *J Clin Invest* 82:1017-1027, 1988
- 6) Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamaz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, Thomas ED: Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77:1717-1722, 1991
- 7) Bensinger WI, Berenson RJ, Andrews RG, Buckner CD, Spitzer G, Garcia-Lopez J, Bernstein ID, Hansen JA: Engraftment after infusion of CD34 enriched marrow cells. *Int J Cell Cloning* 10:176-178, 1992
- 8) Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High-gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238, 1990
- 9) Min YH, Lee ST, Lee BK, Chong SY, Lee S, Hahn JS, Ko YW: Differential response of CD34-positive acute myelogenous leukemic blasts to the costimulating effects of stem cell factor with GM-CSF and/or IL-3. *Yonsei Med J* 36:26-36, 1995
- 10) Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF: Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Human Gene Ther* 2:5-12, 1991
- 11) Nolta JA, Kohn DB: Comparison of the effects of growth factors on retroviral vector-mediated gene transfer and the proliferative status of human hematopoietic progenitor cells. *Human Gene Ther* 1:257-262, 1990
- 12) Hughes PFD, Eaves CJ, Hogge DE, Humphris RK: High efficiency gene transfer to human hematopoietic cells maintained in long-term marrow culture. *Blood* 74:1915-1922, 1989
- 13) Dick JE, Kamel-Reid S, Murdoch B, Doedens M: Gene transfer into normal human hematopoietic cells using in vitro and in vivo assays. *Blood* 78:624-634, 1991
- 14) 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* 79:1393-1399, 1992
- 15) Cassel A, Cottler-Fox M, Doren S, Dunbar CE: Retroviral-mediated gene transfer into CD34-enriched human peripheral blood stem cells. *Exp Hematol* 21:585-591, 1993
- 16) Nolta JA, Crooks GM, Overell RW, Williams DE, Kohn DB: Retroviral vector-mediated gene transfer into primitive human hematopoietic progenitor cells: Effects of mast cell growth factor(MGF) combined with other cytokines. *Exp Hematol* 20:1065-1071, 1992
- 17) Crooks GM and Kohn DB: Growth factors increase amphotropic retrovirus binding to human CD34+ bone marrow progenitor cells. *Blood* 82:3290-3297, 1993
- 18) Flosshove M, Banerjee D, Mineishi S, Li MX, Bertino JR, Moore MAS: Ex vivo expansion and selection of human CD34+ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *Blood* 85:566-574, 1995
- 19) Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ: Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive progenitors in the adherent layer. *Blood* 62:291-297, 1983
- 20) Verfaillie C, Blakomer K, McGlave P: Purified primitive human hematopoietic cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* 172:509-520, 1990
- 21) 민유홍, 고윤웅, 이선주, 한지숙: 과립구-단구

- 집락촉진인자가 급성백혈병 골수세포 장기배양에 미치는 영향. 대한내과학회잡지 44:327-346, 1993
- 22) Williams DA, Rios M, Stephen C, Patel VP: *Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment interactions.* Nature 352: 438-441, 1991
- 23) Moritz T, Patel VP, Williams DA: *Bone marrow extracellular matrix improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors.* J Clin Invest 93:1451-1457, 1994
- 24) Bregni M, Magni M, Siena S, Nicola MD, Bonadonna G, Gianni AM: *Human peripheral blood hematopoietic progenitor cells are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer.* Blood 80:1418-1422, 1992
- 25) Lu M, Maruyama M, Zhang N, Levine F, Friedmann T, Ho AD: *High efficiency retroviral-mediated gene transduction into CD34⁺ cells purified from peripheral blood of breast cancer patients primed with chemotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Human Gene Ther 5:203-208, 1994