

## 줄기 세포 분야의 유전자 치료 연구 동향

오유경<sup>†</sup> · 정형민<sup>1</sup>

포천 중문 의과대학교 의학과 미생물학 교실, <sup>1</sup>포천 중문 의과대학교 세포 유전자 치료 연구소  
(2002년 4월 30일 접수 · 2002년 6월 11일 승인)

### Current trends of stem cell-mediated gene therapy

Yu-Kyoung Oh<sup>†</sup> and Hyung Min Chung<sup>1</sup>

Department of Microbiology and Institute of Medical Research, College of Medicine,  
Pochon CHA University, Kyonggi-do 487-800,

<sup>1</sup>Cell and Gene Therapy Research Institute, Pochon CHA University, Seoul, Korea

(Received April 30, 2002 · Accepted June 11, 2002)

**ABSTRACT**—Recently, stem cell-mediated gene therapy is emerging as a novel therapeutic approach. For the successful gene modification of stem cells, the development of a suitable gene transfer technique needs to be preceded. This review focuses on the various gene transfer techniques based on nonviral and viral vectors, and physical methods. The advantages and disadvantages of each gene transfer method are compared, and the general properties of these vectors are discussed in relation to the gene transfer in stem cell research. This review also highlights the therapeutic application of stem cell-mediated gene therapy. The choice of gene transfer vectors may vary depending on the type of the stem cells and the target of stem cell therapy. Of various gene transfer methods, viral vector-based gene therapy has been emphasized due to the higher transfection efficiency. The current status and up-to-date findings of stem cell-mediated gene therapy are discussed in the viewpoint of the various targets of stem cell therapy such as the modification of stem cell potency, the acceleration of regeneration process and the formation of expressional organization.

**Keywords**—stem cell, gene therapy, viral vectors, nonviral vectors

최근 우리 몸을 구성하는 세포 및 조직의 근간이 되는 줄기 세포에 대한 연구들이 관심을 끌고 있다. 줄기세포는 미분화 상태에서 일정기간 동안 자신과 동일한 세포를 지속적으로 만들어 낼 수 있는 성질과 적당한 조건하에서는 특정한 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다. 줄기세포는 그 기원에 따라 embryonic stem cell(배아 줄기세포)과 adult stem cell(성체 줄기세포)로 구분될 수 있다. Human embryonic stem cell은 인간 생명체로 발생할 수 있는 배아로부터 만들어지기 때문에 많은 윤리적인 문제점을 가지고 있으나 adult stem cell에 비하여 세포증식 및 분화 능력이 우수한 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> Adult stem cell은 골수, 혈액, 뇌, 피부 등에서 얻을 수 있어 윤리적인 문제가 적으나 embryonic stem cell에 비하여 한정된 분화능력(multipotency)을 가지고 있다. Adult stem cell중 가장 연구가 많이 진행된 것은 hematopoietic stem cell(혈액 줄기 세포)이며 최근 mesenchymal stem cell, neuronal stem cell에 대한 연구들도 활

기를 띠고 있다.<sup>2,3)</sup>

줄기세포에 대한 연구와 함께, 생명과학 분야에서는 다양한 분야의 유전체 연구 사업들이 진행되면서 각종 질병의 병인으로 작용하는 유전자들이 속속 발견되고 있다. 그러나 이러한 연구 결과들을 임상적인 치료나 예방효과로 연결짓기 위해서는 기능이 소실되거나 변형된 유전자를 correction하는 유전자를 체내에 도입하여 기능을 정상화시키거나 치료 기능을 활성화 시켜주는 유전자 transfer technique에 대한 연구, 즉 유전자 치료분야의 연구가 병행되어야 한다. 따라서 최근 수년간 이 분야에 대한 관심 및 연구 결과들이 급증하고 있으며 이 분야의 전문 journal들도 여러 가지가 발간되게 되었다. 유전자 치료 연구가 활발히 수행되는 질환 대상으로는 종양, 유전적인 대사질환, 신경 질환, AIDS, 기타 감염질환을 들 수 있으며 최근 stem cell의 분리 및 differentiation에 대한 연구가 축적됨에 따라 치료 유전자가 도입된 stem cell therapy 분야의 연구도 흥미있는 결과들이 보고되고 있다.

본 논문에서는 이러한 유전자/세포 치료분야에서 핵심 기술중 하나로 인정되는 유전자 전달 방법에 대하여 각 전달

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 031)542-6671, E-mail : ohykcha@hanmail.net

방법의 일반적인 작용원리, 특징, 장단점, 이제까지의 개발동향, 앞으로 해결해야할 문제점들을 살펴보고 이러한 유전자 치료가 stem cell분야에서는 어떻게 연구되고 있는지 gene-modified stem cell therapy가 응용되는 분야에 대해서 논의해보고자 한다.

**유전자 전달 기술: nonviral, viral, physical method**

유전자 치료의 궁극적인 목표는 살아있는 세포를 유전적으로 modification하여 유익한 치료 결과를 얻는 것이다. 유전자 치료 연구에서는 결함이 있는 유전자를 대체하거나 감염성 질환이나 종양에 대항하는 특정 기능을 가지는 유전자를 세포 내로 도입하는 방법을 연구한다. 유전자 치료의 주 연구분야는 특정 질병에 치료효과를 나타내는 유전자를 도입하거나, 항암제 등에 저항성을 나타내도록 정상세포의 저항기능을 증강시키거나, 각종 유전성 질환자에 변형되거나 소실된 유전자를 대체하는 분야로 요약할 수 있다.

유전자 치료법은 크게 *in vivo*와 *ex vivo* 두가지로 구분된다. *In vivo gene therapy*는 치료 유전자를 직접 체내에 주입하는 것이고 *ex vivo gene therapy*는 일차적으로 목적 세포(예, stem cell)를 *in vitro*에서 배양하고 이들 세포에 유전자를 도입시킨 다음 유전자 변형된 세포를 다시 체내로 주입하는 것이다. 현재 stem cell-mediated gene therapy 연구분야에서는 *in vivo* 보다는 *ex vivo*의 방법이 주로 많이 사용되고 있다. 성공적인 유전자 치료를 위하여 필수적인 것은 도입된 유전자가 안전하고 부작용 없이 치료효과를 나타낼 수 있을 정도로 발현이 지속되는 것이다. 또한 면역반응을 유발하지 않아 반복투여가 가능해야할 것이며, *in vivo gene therapy*에서는 치료 유전자가 체내에서 목적하는 세포나 organ에 표적화되는 targeting 기능을 가지는 것이 요구된다.<sup>4)</sup>

유전자 전달 기술은 크게 바이러스를 수송체로 사용하는

viral vector-based transfer method, 합성 인지질이나 합성 양이온성 고분자등을 사용하는 nonviral delivery technique, 그리고 세포막에 일시적인 전기자극을 가하여 유전자를 도입하는 electroporation 등의 physical method로 구분된다. 각각의 기술을 안전성, immunogenicity, 유전자 발현 효율(transfection efficiency), 발현 지속 기간등으로 구분해 볼 때 바이러스 수송체는 기타의 기술에 비하여 안전성이 낮고 면역원성이 높아 반복투여시 부작용을 유발할 수 있는 가능성이 높으나 유전자 발현 효율이 높고 발현 지속기간이 비교적 긴 장점이 있다. 바이러스성 수송체가 liposome과 같은 비 바이러스성 수송체 보다 발현 효율이 우수한 요인으로는 세포내의 trafficking pathway가 다른 점을 들 수 있다. 예로서 retroviral vector의 경우 세포의 cytosol 내로 유전자가 직접 들어가고 lysosome을 거치지 않는 점들이 높은 발현 효율에 기여한다(Figure 1). Electroporation 방법은 세포막에 일시적인 전기 충격을 가하여 생성된 pore내로 naked DNA를 주입시키는 방법으로 안전성이 높고 stem cell 등의 다양한 세포 내로 확실하게 유전자가 주입되는 장점이 있으나 유전자가 chromosome내로 integration되는 효율이 낮고 발현기간이 transient한 편이다. Transduction하려는 목적 세포를 *in vitro*에서 isolation 해주어야하는 단계를 거쳐야 하며 *ex vivo gene therapy*만이 가능한 한계점이 있다. 또한 전기적 충격으로 손상된 세포막으로 인한 세포의 viability 저하문제도 해결해야할 과제이다. Bone marrow progenitor cell에 electroporation방법으로 유전자를 도입할 경우 S-phase에 있는 세포수가 많을수록 transfection efficiency가 높다는 것이 알려져 있다.<sup>5)</sup>

**Nonviral vectors**

Immunogenicity가 낮아서 반복투여가 가능하고 안전성이

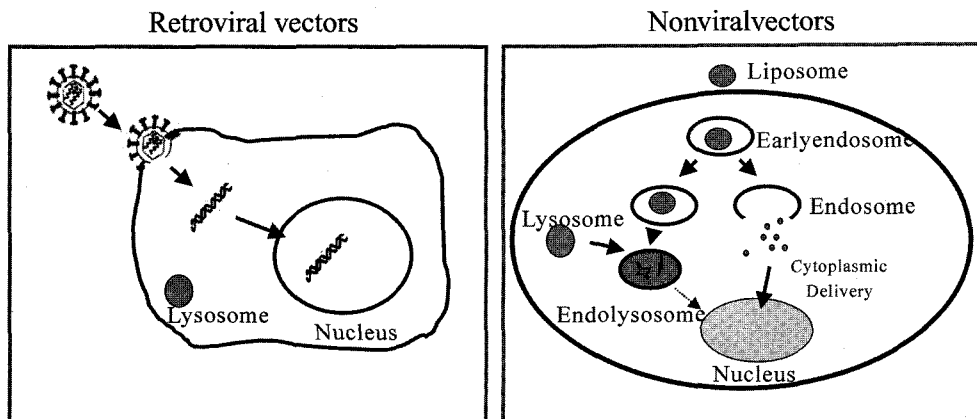


Figure 1-Intracellular trafficking pathways of DNA delivered by viral or nonviral vectors.

높은 장점이 있는 비 바이러스성 유전자 수송체 연구는 인지질로 구성된 리포솜 나노입자를 이용하는 방법과 양이온성 고분자를 이용하는 방법으로 크게 구분할 수 있다.

**Liposome**-유전자 전달을 위하여는 인지질로서 DOTMA 나 DOTAP등의 양이온성 인지질을 혼합하여 liposome 나노입자를 제조하게 된다. Liposome의 일반적인 제법은 아래와 같다.<sup>6)</sup> Chloroform에 녹인 인지질 및 cholesterol을 적당한 molar ratio로 혼합하여 진공이 걸려있는 rotary evaporator상에서 유기용매(chloroform)를 날려보내면 인지질들로 구성된 얇은 지질막이 형성된다. 이 지질막에 buffer를 넣고 약 5-20분간 지질막을 hydration시킨 다음 vortexing하여 인지질 입자들로 구성된 crude suspension을 형성한다. 인지질 입자들의 크기를 균질하게 하기 위하여 100 nm 내지 400 nm사이의 polycarbonate membrane filter를 extruder내부에 놓고 수회 extrusion한다. 1-2 ml 미만의 리포솜 용액 제조에는 Avestin이나 Avanti회사의 mini-extruder가 주로 사용되며 10 ml 이상의 대량의 리포솜 용액 제조를 위하여는 Northern Lipids사의 extruder가 적당하다. 이렇게 제조된 리포솜은 인지질 성분으로 첨가하여준 DOTMA나 DOTAP과 같은 양이온성 인지질의 하전으로 인하여 전체적인 하전도가 양성으로 변하게 된다. 양이온성의 리포솜에 phosphate잔기로 인하여 음이온성을 나타내는 plasmid DNA를 일정 비율로 혼합하면 목적하는 유전자와 양이온성 리포솜의 복합체가 형성된다.

유전자와 복합체를 형성한 liposome은 세포내로 endocytosis된 다음 endosome compartment내에 체류하게 된다. Endocytosis결과 형성된 endosome은 수분 내에 lysosome과 fusion하며,<sup>7)</sup> 이 때 lysosome의 각종 digestive 효소들이 fusion된 vesicle내에 존재하는 유전자등의 세포내 유입물질을 분해하게된다. 따라서 endosome에서 얼마나 많은 비율의 유전자가 cytoplasm으로 escape해 나오는지 유전자 전달 효율을 결정하는데 중요한 인자가 된다.<sup>8)</sup> Liposome으로 전달된 유전자가 endosome에서 분해되어 핵 내부로 유전자를 수송하는 효율이 떨어지는 단점을 개선하기 위하여 최근 비 바이러스성 유전자 수송체에 cytoplasm으로 escape하는 성질을 부여하려는 시도들이 진행되고 있다(Figure 1). 예로서 인지질로 구성된 비 바이러스성 수송체에 endosome 막에 pore를 형성하는 listeriolysin이라는 listeria균의 성분 물질을 분리 정제하여 같이 수송해줄 경우, 세포 내로 수송된 물질이 endosome에서 cytoplasm으로 전달되는 효율이 현저히 증강되는 것이 보고된 바 있다.<sup>9)</sup> 또한 pH-sensitive liposome을 제조하여 pH가 낮아지면 liposome 구조가 불안정해지면서 물질을 방출하는 방법도 보고되었다.<sup>10)</sup>

Liposome vector는 viral vector에 비하여 안전성이 현저

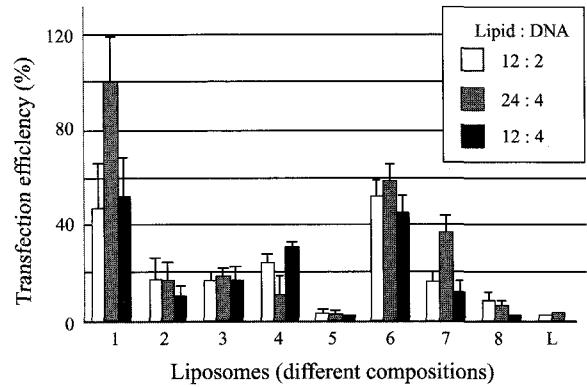


Figure 2-Transfection efficiency of liposome-mediated gene delivery in human hair follicle cells. (Data from reference no. 11).

히 높고 수송하는 유전자의 크기에 별로 제한을 받지 않는 장점이 있으나 liposome으로 세포내 전달된 유전자 발현 효율이 낮은 점은 앞으로 보다 개선해야 할 사항이다. Stem cell 관련 분야에 liposome을 사용하여 유전자를 전달하는 연구는<sup>11)</sup> human hair follicle progenitor 세포에 liposome을 유전자 전달체로 사용하여 성공적인 in vivo transfection결과를 얻은 것이 보고된 바 있다(Figure 2).

이 경우 liposome의 lipid조성 및 hair cycle의 growing stage가 transfection efficiency에 중요한 인자로 작용하는 것이 관찰되었다. 또한 CD34+ hematopoietic stem cellstroma 또는 fibroblast monolayer에 부착시킨 경우 liposome의 유전자 전달 효율이 증가되는 것이 보고되었다.<sup>12-13)</sup>

**Cationic polymer**-양이온성 고분자를 비 바이러스성 수송체로 사용하는 경우, 가장 큰 장점은 제조 방법의 간편성이다. 수송체와의 복합체를 형성하기 위하여는 양이온성 고분자가 commercially available한 경우 이를 구입하여 일정 농도의 용액으로 녹이거나 희석한 다음 이를 수송하려는 유전자와 vortexing하여 수분간만 방치하면 모든 단계가 끝나기 때문이다. 이러한 초 간편성으로 최근 양이온성 고분자를 비 바이러스성 유전자 수송체로 연구하는 group들이 증가하고 있다. 유전자 수송체용 양이온성 고분자로는 초기에는 poly-L-lysine, spermine 등이 많이 연구되었으나 최근에는 polyethylenimine, chitosan 등이 더 많이 연구되고 있다.

Polyethylenimine (PEI)의 구조는 linear한 구조와 branch type의 구조로 나뉠 수 있다. 연구자에 따라서는 linear한 구조의 PEI와 branch type의 PEI가 유전자 전달 효율면에서 차이가 난다고 보고한 경우도 있으나 아직까지는 linear 구조와 branch type이 많이 혼용되어 연구되고 있다. PEI는 그 구조중의 nitrogen으로 인하여 양이온성을 띄게 되며 따라서 음이온성인 유전자와 단시간 내에 이온성 복합체를 형

성하게된다. PEI와 유전자가 복합체를 형성하였는지 확인할 수 있는 방법은 zeta potential을 측정하여도 가능하나 이러한 고가의 측정기가 구비되어 있지 않은 연구실에서는 간편하게 0.2-0.4% agarose gel상에 전기영동을 하여 확인할 수 있다. 복합체를 형성하지 않은 plasmid유전자의 경우 migration이 정상적으로 진행되며 ethidium bromide 염색에 의하여 형광을 띠게 되나 PEI와 복합체를 형성한 유전자의 경우 그 charge에 의하여 migration이 유전자와 반대방향으로 진행되게 되며 ethidium bromide 염색 시에도 형광 활성을 나타내지 않는 특징이 있다.

PEI는 분자량에 있어서도 25 KDa, 75 KDa, 150 KDa등 여러 가지가 시판되고 있으나 현재 가장 많이 사용되며 유전자 효율이 높다고 알려진 것은 분자량 22-25 Kd의 PEI이다. Linear PEI는 Fermentas사에서 ExGen 500이라는 제품명으로 시판하기도 한다. PEI를 이용한 유전자 전달 효율은 liposome과 달리 medium중 serum의 존재 여부에 영향을 받지 않는 차이점이 있다. 유전자를 PEI와 복합체 형태로 체내 투여한 경우 유전자의 체내 체류 시간 및 발현 지속시간이 naked DNA에 비하여 현저히 증가되는 것이 관찰되었다.<sup>14)</sup> PEI를 유전자 수송체로 사용하는 경우, 유전자 발현 효율은 PEI와 유전자의 배합비율(N/P ratio)에 따라서 크게 영향을 받게된다. 유전자의 발현 효율이 증가되는 원인으로 PEI가 endosome 내부의 산도를 증가시키는 buffering 역할을 해주어 유전자의 분해 속도를 저하시키며 PEI와 복합체를 형성하는 유전자는 세포 내로의 수송량, 핵 내로의 수송양이 증가되고 핵산 분해효소에 대하여 안정한 점들이 분석되었다.<sup>15)</sup>

최근 stem cell 연구분야에서는 human embryonic stem cell에 nonviral vector로 PEI를 사용할 경우 LipofectAMINE Plus 등의 cationic lipid-based liposome이나 물리적인 전기자극을 가하는 electroporation 방법보다 유전자를 transfection시키는 효율이 현저히 증가된다는 것이 보고되었다.<sup>16)</sup> 이러한 보고는 이제까지 viral vector가 주로 사용되었던 stem cell 연구분야에 nonviral vector를 적용할 수 있는 가능성을 제시해주었다(Figure 3).

tion시키는 효율이 현저히 증가된다는 것이 보고되었다.<sup>16)</sup> 이러한 보고는 이제까지 viral vector가 주로 사용되었던 stem cell 연구분야에 nonviral vector를 적용할 수 있는 가능성을 제시해주었다(Figure 3).

### Viral vectors

바이러스 수송체의 경우 RNA virus-based vector와 DNA virus-based vector로 구분되며 retroviral vector, lentiviral vector가 주요 RNA viral vector이고 DNA virus vector로는 adenovirus와 adeno-associate vector가 많이 사용된다. 이외에도 herpes simplex viral vector, alpha viral vector들이 연구되고 있다.

바이러스 vector가 nonviral vector보다 일반적으로 gene transfer efficiency가 우수한 이유는 전달하려는 유전자를 함유한 바이러스 vector들이 바이러스의 고유한 증식기전으로 인하여 cytoplasm으로 유전자를 전달하는 효율이 높기 때문이다. 한편 nonviral vector들은 세포내로 endocytosis된 다음 lysosome내에서 분해되어 유전자가 cytoplasm으로 수송되는 효율이 떨어지고 따라서 핵 내로의 유전자 수송도 낮아져서 효율이 떨어지게 된다. 차세대 vector로는 gene transfer 효율이 우수한 viral vector의 장점과 안전성이나 면역반응 면에서 우수한 nonviral vector의 장점을 모두 가지는 hybrid vector의 개발이 요구된다. 현재 많이 연구되는 바이러스 수송체 각각을 대상으로 이들의 특징을 간략히 살펴보면 아래와 같다.

**Adenoviral vector**-다양한 종류의 mammalian cell에 유전자 전달 효율이 높은 바이러스 수송체로서 일반적인 유전자 치료 연구에서는 가장 많이 사용되어온 vector였으나,<sup>17)</sup> 최근 임상 실험 도중 사망자가 발생하여 이를 이용한 유전자 전달 연구가 위축된 경향이 있다. Stem cell 연구분야에서는 endothelial progenitor cell, mesenchymal stem cell, neural stem cell등 비교적 다양한 종류의 stem cell에 유전자를 도입하는데 사용되었다. 비교적 짧은 발현기간으로 인하여 주로 regenerative process에 관련하는 cytokine이나 growth factor 유전자를 stem cell에 도입하는데 사용되었다. 앞으로 adenoviral vector의 pathogenicity를 더 줄이는 연구가 필요하다.

**Adeno-associated viral vector (AAV vector)**-AAV는 nonpathgenic vector로서 유전자를 전달하는 host 세포의 범위가 넓고 반복투여시 면역 부작용이 작으며 유전자 발현 기간이 긴 장점이 있다. 따라서 현재 AAV를 유전자 수송체로 이용한 여러 가지의 유전자 치료 연구가 임상 단계에까지 진행되어 현재 cystic fibrosis질환에 대하여 임상 1상 실험중이

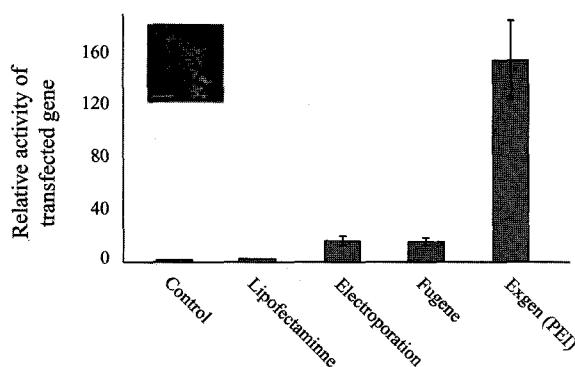


Figure 3-Transfection of embryonic stem cells using nonviral vectors. (Data from reference no. 16).

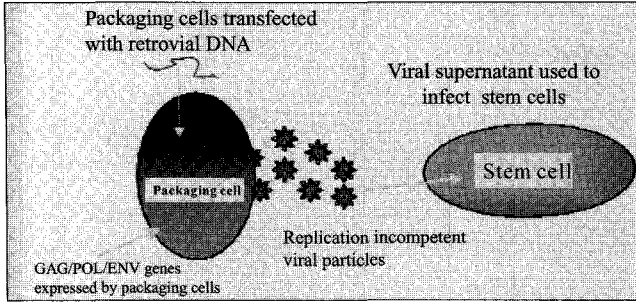


Figure 4-Transfection of stem cells using retroviral vectors (Reference no. 19 참조).

다.<sup>18)</sup> 최근 AAV에서 변형가능한 capsid region들이 알려지면서 AAV를 특정한 세포로 표적화시키는 가능성들이 연구되고 있다. AAV가 유전자 발현을 지속시키는 능력은 면역기능이 저하된 host에서 1년간 지속된 보고가 있고 hematopoietic stem cell(HSC)에도 유전자 전달이 보고된 예가 있다.

**Retroviral vector**-바이러스 수송체로 많이 연구되고 사용되는 vector이다. Retrovirus로는 murine leukemia virus가 많이 사용되어 왔다. Retroviral vector로 유전자를 전달하기 위하여는 retroviral plasmid내로 목적하는 유전자를 삽입하고 이를 packaging cell 내로 수송한 다음 바이러스가 생산되어 나온 supernatant를 stem cell에 가하는 방법이 사용된다(Figure 4). 이렇게 전달된 유전자는 host cell의 chromosome내로 비 가역적으로 integration하는 특징이 있어서 세포의 유전자 발현이 장시간 지속되는 장점이 있다. 그러나, retrovirus에 의한 유전자 전달은 분열하지 않는 세포에 대한 유전자 전달 효율이 매우 낮은 한계성이 있다.<sup>19)</sup> 따라서 stem cell로의 gene transfer에서도 HSC에 사용하기 위해서는 HSC의 division을 촉진시키는 cytokine의 병용이 필요하다. 특히 retroviral vector는 embryonic stem cell에서는 전달효율이 낮은 것으로 알려져 있다.

**Lentiviral vector**-이제까지의 유전자 치료 연구에서는 murine leukemia retroviral vector가 많이 사용되었으나 기존의 retroviral vector의 주요한 단점은 분열하지 않는 세포에서는 유전자 발현 효율이 매우 낮다는 점이다. Retrovirus의 일종인 lentivirus는 1990년대 후반부터 개발되기 시작한 비교적 새로운 retrovirus 수송체로서 HIV backbone을 modification한 것이다. 기존의 retroviral vector들과 달리 세포분열 주기에 영향을 받지 않아 분열이 활발한 세포뿐만 아니라 분열이 활발하지 않은 세포에서도 유전자 발현효율이 비교적 좋다.<sup>20-21)</sup> 따라서 HSC등과 같이 분열이 느린 세포에도 다른 바이러스성 수송체 보다 발현 효율이 좋아 최근 HSC,<sup>22-23)</sup> keratinocyte<sup>24)</sup>를 이용한 세포 치료 분야에서 유전

자 전달용 수송체로서 연구가 활발히 진행되고 있다.

또한 Lentiviral vector를 자가적으로 불활성화 시키는(self-inactivating) 특징을 부여하고 체내 세포에 특징적으로 존재하는 비 바이러스성 promoter를 사용하여 유전자 변형이 된 progeny 세포에서의 유전자 발현을 특이적으로 조절할 수도 있다는 최신 결과가 보고되었다.<sup>25)</sup> 연구 연한이 짧아서 lentiviral vector를 이용한 임상 연구는 아직 시도되지 않고 있으나 작년 미국의 NIH에서 lentiviral vector의 첫 임상 protocol에 대한 검토가 진행중이나 가장 관심이 되는 사항은 안전성에 관한 문제로서 비록 이 vector가 replication-incompetent form으로 design된 것이기는 하지만 pathogenic한 HIV를 backbone으로 사용하기 때문이다.

**Herpes simplex viral vector**-Herpes simplex virus(HSV)는 신경조직에 친화성이 큰 neurotropic DNA 바이러스로서 유전자 수송체로서의 가능성은 1994년경부터 연구가 시작되었다. HSV는 genome size가 152 kb이며 여러 가지 유전자들을 발현시킬 수 있는 특징이 있다. HSV는 말초 신경계의 sensory neuron에서 latent phase로 장시간 존재하며 이 기간중에는 신경세포의 정상기능에 영향을 미치지 않고 핵 중에서 chromosome외부의 안정한 episomal element로 존재한다. Replication-defective HSV를 수송체로 사용하여 reporter 유전자의 발현기간을 연구한 결과 신경계에서 1년 이상 유전자 발현이 지속되는 것이 연구되었다.

이런 연구결과들에 기반하여 HSV vector는 주로 파킨슨 병, 신경재생, 만성 통증, peripheral neuropathy와 같은 신경계의 질환을 치료 또는 예방하는 용도로 많이 연구되고 있다. 또한 HSV의 경우 유전자 발현기간이 수 개월간 지속되는 특징은 최근 stem cell 연구 분야에도 새롭게 응용되는 부분이다. HSV를 수송체로 이용하여 stem cell 내에 전신 치료효과를 나타내는 유전자를 도입하거나 stem cell에 세포분화 관련 유전자를 encoding하는 HSV를 감염시켜 세포를 유전적으로 modification하여 stem cell의 세포 분화를 조절하는 연구들이 진행중이다.<sup>26)</sup> 또한 최근에는 HSV가 장기간 유전자 발현을 지속하는 특징을 이용하여 신경 세포가 아닌 다른 조직에의 유전자 치료에도 HSV를 수송체로서 사용하는 가능성들이 연구되고 있다. 최근 신장질환이나 근육질환에 대한 유전자 치료에 HSV를 수송체로 사용하는 결과가 발표된 바 있다. 앞으로의 경향은 HSV에서의 유전자 발현 효율을 증강하고 바이러스의 독성을 더욱 줄이는 연구들이 진행될 것으로 전망된다.

**Gene-modified stem cell therapy의 연구동향**

Stem cell을 target 대상으로 하는 유전자 치료 연구는

stem cell의 isolation, identification, 및 proliferation연구가 최근 활발히 진행되면서 시작된 분야로서 유전자 치료분야에서도 그 potential은 타 분야보다 현저히 크나 아직 연구가 초기단계에 있다. Autologous stem cell내로 특정기능을 가지는 유전자를 안정하게 도입하는 것은 유전적 질환이나 후천적 질환 모두에 매우 효과적인 치료법이다. 그러나 이러한 stem cell-mediated 유전자 치료에서 치료기능을 가지는 유전자를 치료효과를 나타내기 위해 적절한 수준으로 발현을 조절하는 방법, transduce된 stem cell이 분화될 때 single lineage의 progeny세포에서만 유전자가 발현되도록 유전자 발현을 조절하는 방법은 아직 극복해야 할 문제이다. 현재, 도입된 유전자의 낮은 발현을 및 발현양, 발현 지속시간이 짧은 점을 극복하기 위하여 vector design을 개선하는 방법들이 연구되고 있다.

Gene-modified stem cell therapy는 현재 여러 가지로 다양하게 진행되고 있으나 그 target에 따라 크게 네가지 분야로 구분할 수 있다. 1) stem cell 자체를 target으로 하는 경우로서 고령이거나 유전적으로 결함이 있는 adult에서 분리된 stem cell 자체의 transcription이나 효소들에 관련된 유전자를 modification하여 stem cell을 potentiation한다. 2) 유전자가 도입된 stem cell이 differentiation 되어 형성되는 progeny cell을 target으로 하는 경우로서 혈관계통의 유전질환 치료나 유전적으로 결함이 있는 장기를 대체할 수 있다. 3) regeneration 반응을 촉진시키는 것을 목적으로 하는 경우로서 주로 growth factor나 cytokine 등을 일시적으로 발현하도록 제작한다. 예로는 endothelial progenitor cell에서의 혈관신생 촉진,<sup>27)</sup> neural stem cell에서의 neurogenesis 촉진,<sup>28)</sup> mesenchymal stem cell에서의 bone regeneration 촉진 등을 들 수 있다. 4) 체내에서 전신적으로 치료효과를 나타내는 유전자를 발현하도록 목적하는 경우로서 이 경우 치료 유전자가 도입된 stem cell이 체내로 transplantation된 다음 이들 유전자를 발현하는 조직을 형성하고 치료 물질을 전신적으로 분비하게 된다.<sup>29)</sup>

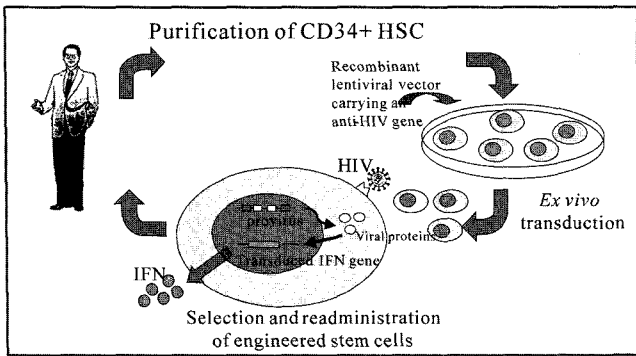
**Embryonic stem cell에서의 유전자 전달 연구 동향-** Embryonic stem(ES) cell에 유전자를 도입하는 연구는 유전자의 기능 및 발현 조절 등을 분석하는데 매우 중요하나 HSC 등 adult stem cell 분야에 비하여 연구가 초기단계에 있다. 그 원인으로는 embryonic stem cell 자체가 일반 연구실에서 쉽게 얻어질 수 없는 것이므로 embryonic stem cell 연구가 일정 수준이 되는 연구실에서 다른 연구실과 collaboration등으로 유전자 치료연구를 진행하지 않고는 연구결과를 얻기가 어렵기 때문이다. 또한 embryonic stem cell에 대한 유전자 치료 연구는 embryonic stem cell의 특

정상 life-long 유전자 발현이 요구되는 경우가 많으나 현재 까지 전반적인 유전자 치료분야에서 개발된 바이러스성 또는 비 바이러스성 유전자 수송체의 경우 이렇게 장시간으로 유전자를 발현할 수 있는 수송체가 개발되어 있지 않은 점도 그 연구가 부진한 이유 중의 하나이다. 특히 다른 분야의 유전자 치료 연구에서 많이 사용되어온 retroviral vector의 경우 ES cell에서는 de novo DNA methylation기전으로 인하여 transcription이 억제되어 유전자 발현 효율이 낮다는 것이 알려져서 ES cell-directed gene therapy에 적합한 새로운 vector의 개발이 요구된다.

최근 ES cell에 gene transfection efficiency를 높이기 위해 시도된 nonviral vector로서는 전술한 바와 같이 cationic polymer인 PEI가 cationic lipid-based vector나 electroporation보다 효과적인 것이 보고된 바 있으며,<sup>16)</sup> viral vector로는 retrovirus계열의 새로운 vector로서 mouse stem cell viral vector가 있다.<sup>30)</sup> 또한 lentiviral vector도 ES cell에서 기존의 murine leukemia retroviral vector 보다 gene silencing 현상이 줄어들고 transfection efficiency가 효율적으로 증강되며 도입된 유전자가 여러 passage동안 발현이 지속되는 것이 보고되었다.<sup>31)</sup>

**Hematopoietic stem cell (HSC)에서의 유전자 전달 연구 동향-** HSC는 각종 혈액 관련 질환 치료나 면역반응 조절에 유용한 표적 세포이다. HSC-mediated gene therapy 분야는 주로 장기간에 걸쳐 분화하는 progenitor 세포로 유전자를 효과적으로 수송하거나 HSC의 특정 progeny세포들에만 유전자 발현을 국한시키는 연구들이 진행되고 있다. HSC에 유전자 수송체로서 murine leukemia virus와 같은 기존의 retroviral vector를 사용한 연구는 임상적으로 큰 효과를 나타내지 못하고 있어 lentiviral vector를 이용한 연구들이 시작되고 있다. 한편 보다 진보된 개념의 stem cell therapy 연구결과로서<sup>25)</sup> HSC에 lentiviral vector를 사용하여 antigen-presenting cell에서만 발현을 유도하는 HLA DR promoter를 사용하여 세포내로 도입된 유전자의 발현을 조절할 경우, HSC의 특정 progeny 세포에서만 유전자 발현이 장시간 지속되는 것을 보고하였다.<sup>23)</sup>

Gene-modified HSC therapy의 또 다른 중요한 임상 응용분야는 AIDS치료이다. HSC는 T 세포나 monocyte로 분화되는 능력이 있으므로 HSC에 anti-HIV-1 gene으로 불리는 유전자를 도입하여 HIV의 발현을 방지하는 성질을 부여한다면 AIDS치료에 새로운 장을 열 수 있을 것으로 기대된다. 현재까지 기존의 retroviral vector를 이용하여 HSC에 anti-HIV-1 gene을 도입한 연구결과는 임상 실험에서 큰 효과를 나타내지 못하였으나 lentiviral vector를 이용하여 anti-



**Figure 5**—Anti-HIV gene-modified hematopoietic stem cell therapy (Reference no. 32 참조).

HIV-1 gene을 transduction을 시킨 HSC를 이용할 경우 HIV에 감염된 세포가 HIV에 저항하는 성질을 가지는 치료효과가 보다 효율적이고 지속적으로 나타날 것으로 기대되고 있다(Figure 5).<sup>32)</sup>

*Neural stem cell 또는 mesenchymal stem cell에서의 유전자 전달 연구 동향*—Neural stem cell을 이용한 유전자 치료는 현대 의학으로는 완치가 어려운 신경계통의 질환들이 대상이 되므로 성공시에 그 사회적 및 상업적 파급효과가 매우 큰 분야이다. Neural stem cell에 외부 유전자를 도입하여 세포 치료하는 방법은 주로 neurodegenerative disease를 대상으로 진행되어 왔으며 retroviral vector를 이용하여 nerve growth factor 유전자가 transduce된 neural stem cell을 사용하여 *in vivo*에서 neuroprotective effect가 관찰된 바 있다.<sup>28-33)</sup> Mesenchymal stem cell therapy 분야에서는, adenoviral vector를 이용하여 BMP(bone morphogenic protein) 유전자가 도입된 stem cell을 이용하여 bone regeneration 효과를 거둔 연구들이 최근 보고되고 있다.<sup>34)</sup>

### 결 론

본 논문에서는 일반적인 유전자 치료 연구분야에서 사용되는 유전자 수송체 기술중 바이러스를 수송체로 사용하는 경우와 비 바이러스성 합성 물질을 수송체로 사용하는 경우에 대하여 그 원리 및 특징들을 세부적으로 알아보았다. 또한, stem cell을 target cell로 사용하여 유전자 치료를 수행할 경우 각 stem cell 연구 분야에서 이제까지 유전자 치료 분야의 연구가 진행된 현황 및 문제점을 살펴보았다. Stem cell에 유전자 치료를 응용하기 위하여는 무엇보다도 안전성이 확보되어 있으면서도 유전자 발현시간이 지속적인 유전자 수송체의 개발이 급선무라는 점을 지적하고 싶다. 또한 stem cell-mediated 유전자 치료를 성공적으로 수행하기 위

하여 stem cell 분리 및 배양 기술뿐만 아니라 transgenic mouse를 이용한 질환 모델의 설정, 특정 치료 목적의 stem cell에 적합한 유전자 수송체의 선정 및 유전자/promoter cloning 기술들이 종합적으로 연계되는 것이 필수적이다.

### 감사의 말씀

이 논문은 보건복지부 보건의료기술 진흥사업의 지원 (01-PJ1-PG3-21500-0008)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) P.J. Donovan, J. Gearhart, The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, **414**, 92-97 (2001).
- 2) J. Nichols, Introducing embryonic stem cells. *Curr. Biol.*, **11**, 503-505 (2001).
- 3) R. Lovell Badge, The future for stem cell research. *Nature*, **414**, 88-91 (2001).
- 4) E.H. Kaji and J.M. Leiden, Gene and stem cell therapies. *JAMA*, **285**, 545-550 (2001).
- 5) K.E. Matthews and A. Keating, Gene therapy with physical methods of gene transfer. *Transfus. Sci.*, **17**, 29-34 (1996).
- 6) Y.K. Oh and R. Straubinger, Cellular retention of liposome-delivered compounds modulated by a probenecid-sensitive anion transporter. *Pharm. Res.*, **14**, 1203-1209 (1997).
- 7) Y.K. Oh and J.A. Swanson, Different fates of phagocytosed particles following delivery into macrophage lysosomes. *J. Cell Biol.*, **132**, 585-593 (1996).
- 8) R.I. Mahato, A. Rolland and E. Tomlinson, Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.*, **14**, 853-859 (1997).
- 9) K.D. Lee, Y.K. Oh, D.A. Portnoy and J.A. Swanson, Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7249-7252 (1996).
- 10) M.S. Hong, S.J. Lim, Y.K. Oh and C.K. Kim, pH-sensitive, serum-stable and long-circulating liposomes as a new drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 51-58 (2002).
- 11) A. Domashenko, S. Gupta and G. Cotsarelis, Efficient delivery of transgenes to human hair follicle progenitor cells using topical lipoplex. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 420-423 (2000).
- 12) H. Keller, C. Yunxu, G. Marit, M. Pla, J. Reiffers, J. Theze and P. Froussard, Transgene expression, but not gene delivery, is improved by adhesion-assisted lipofection of hematopoietic cells. *Gene Ther.*, **6**, 931-938 (1999).
- 13) G. Marit, Y. Cao, P. Froussard, J. Ripoche, M. Dupouy, A. Elandaloussi, F. Lacombe, F.X. Mahon, H. Keller, M. Pla, J. Reiffers and J. Theze, Increased liposome-mediated gene transfer into haematopoietic cells grown in adhesion to stromal

- or fibroblast cell line monolayers. *Eur. J. Haematol.*, **64**, 22-31 (2000).
- 14) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang, C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.*, **8**, 1587-92 (2001).
  - 15) Y.K. Oh, D.C. Suh, J.M. Kim, H.G. Choi, K.S. Shin and J.J. Ko, Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther.*, in press (2002).
  - 16) R. Eiges, M. Schuldiner, M. Drukker, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor and N. Benvenisty, Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr. Biol.*, **11**, 514-518 (2001).
  - 17) F.L. Graham, Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol. Today*, **21**, 426-28 (2000).
  - 18) P.E. Monahan and R.J. Samulski, AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther.*, **7**, 24-30 (2000).
  - 19) G. Daly and Y. Chernajovsky, Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Mol. Ther.*, **2**, 423-34 (2000).
  - 20) D. Trono, Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.*, **7**, 20-3 (2000).
  - 21) G.L. Jr. Buchsacher and F. Wong-Staal, Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, **95**, 2499-2504 (2000).
  - 22) N.B. Woods, H. Mikkola, E. Nilsson, K. Olsson, D. Trono, Karlsson, S. Lentiviral-mediated gene transfer into haematopoietic stem cells. *J. Intern. Med.*, **249**, 339-343 (2001).
  - 23) R. Pawliuk, K.A. Westerman, M.E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E.E. Bouhassira, S.A. Acharya, J. Ellis, I.M. London, C.J. Eaves, R.K. Humphries, Y. Beuzard, R.L. Nagel and P. Leboulch, Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science*, **29**, 2368-2371 (2001).
  - 24) U. Kuhn, A. Terunuma, W. Pflutzner, R.A. Foster and J.C. Vogel, In vivo assessment of gene delivery to keratinocytes by lentiviral vectors. *J. Virol.*, **76**, 1496-1504 (2002).
  - 25) Y. Cui, J. Golob, E. Kelleher, Z. Ye, D. Pardoll and L. Cheng, Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, **99**, 399-408 (2002).
  - 26) E.A. Burton, J.B. Wechuck, S.K. Wendell, W.F. Goins, D.J. Fink and J.C. Glorioso, Multiple applications for replication-defective herpes simplex virus vectors. *Stem Cells*, **19**, 358-377 (2001).
  - 27) H. Iwaguro, J. Yamaguchi, C. Kalka, S. Murasawa, H. Masuda, S. Hayashi, Silver M, Li, T, J.M. Isner and Asahara, T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation.*, **105**, 732-738 (2002).
  - 28) G. Andberg, Z. Kokaia, A. Bjorklund, O. Lindvall, and A. Martinez-Serrano, Amelioration of ischaemia-induced neuronal death in the rat striatum by NGF-secreting neural stem cells, *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2026-2036 (1998).
  - 29) T. Asahara, C. Kalka and J.M. Isner, Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.*, **7**, 451-547 (2000).
  - 30) S.R. Cherry, D. Biniszkiwicz, L. van Parijs, D. Baltimore and R. Jaenisch, Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 7419-7426 (2000).
  - 31) A. Pfeifer, M. Ikawa, Y. Dayn and I.M. Verma, Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 2140-2145 (2002).
  - 32) B.C. Engel and D.B. Kohn, Stem cell directed gene therapy. *Front. Biosci.*, 426-33( 1999).
  - 33) M.F. Philips, G. Mattiasson, T. Wieloch, A. Bjorklund, B.B. Johansson, G. Tomasevic, A. Martinez-Serrano, P.M. Lenzlinger, G. Sinson, M.S. Grady and T.K. Mackintosh, Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury. *J. Neurosurg.*, **94**, 765-774 (2001).
  - 34) G. Turgeman, D.D. Pittman, R. Muller, B.G. Kurkalli, S. Zhou, G. Pelled, A. Peyser, Y. Zilberman, I.K. Moutsatsos and D. Gazit, Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J. Gene Med.*, **3**, 240-251 (2001).