

유전성 대사질환의 동물모델에서의 유전자 치료

국립보건원 유전질환과

정 성 철

서 론

유전자 치료는 일반적으로 유전물질을 도입하여 환자의 질병의 치료 또는 임상증상의 개선을 목적으로 한다. 유전자 치료의 기본 개념 중의 하나는 바이러스를 유전전달물질로 변형하여 목적하는 세포에 연구하고자 하는 유전자를 전달하는 것이다. 바이러스의 유전자의 특성에 따라 유전자 치료에 사용되는 gene therapy vectors는 RNA viral vector와 DNA viral vector로 구분된다. RNA viral vector는 murine leukemia virus 같은 retrovirus에서 유도된 것인데 이 vector의 단점은 분열하지 않는 세포에는 유전자를 도입하는 것이 불가능하다는 것이다.

이런 문제점은 human immunodeficiency virus 같은 lentivirus에서 유도된 새로운 retrovirus의 사용으로 극복될 수 있다. 그러나 아직 lentivirus의 임상에서의 응용성은 그 안전성 여부가 충분히 검토되지 않아 활용에 있어 제약이 따른다. 가장 흔하게 사용되는 DNA virus vector는 adenovirus와 adeno-associated virus인데 adenovirus는 분열하는 세포와 분열하지 않는 모든 세포에 유전자를 전달할 수 있고 또한 전달할 수 있는 유전자의 크기도 30 Kb로써 종양 및 다양한 유전질환의 치료에 응용할 수 있는 잠재력을 가지고 있음에도 불구하고 유전자 도입 후 1-2주 후부터 중화항체의 생성으로 인해 급격하게 활성이 상실되는 단점을 가지고 있다. 이에 반해 adeno-associated virus는 현재 유전자 전달 매체로서 주목 받게 하는 여러 가지 특징을 갖고 있다. 이 바이러스는 감염되어 혈청학적으로 이 바이러스에 양성을 보이는 성인이 전체의 85%를 차지할 정도로 이 바이러스의 분포가 광범위함에도 불구하고 이 바이러스와 관련된 임상적 질병은 아직 발견되지 않는 비병원성 바이러스로써 분열

하는 세포 및 간과 뇌세포와 같은 비분열 세포에도 유전자를 효율적으로 도입할 수 있는 바이러스다. 더욱이 이 바이러스는 배양된 세포에 있어서나 인간에 있어서 모두 염색체 특정위치에 integration(인간의 경우 chromosome 19q13.3)되어 장기간 발현할 수 있고, 광범위한 host range를 보유하고 있으며 환경의 변화 및 다른 virus에게 치명적일 수 있는 열악한 환경에 대해 높은 안정성을 가지고 있다. 이런 특징들로 인해 이 adeno-associated virus는 유전자 치료에 있어서 유전자 전달 매체로서 높은 관심의 대상이 되어 현재 이 바이러스로 진행된 연구로는 Fabry disease, cystic fibrosis, Parkinson disease, muscular dystrophy, Hemophilia B, Hemophilia A 등이 있고 Hemophilia B의 경우 현재 임상 시험이 상당히 진행된 상태로서, 시험결과 매우 긍정적인 결과를 보였다는 논문이 발표되었다. 본 연구에서는 선천성 대사 이상 질환 중 하나인 페닐케톤뇨증(phenylketonuria) 및 호모시스틴뇨증(homocystinuria)을 대상으로 하여 adeno-associated viral vector를 이용한 질환모델 마우스에 있어서의 유전자 치료의 성공 및 임상에 있어서의 응용 가능성을 연구하였다.

선천성 대사 이상 질환

1. 페닐케톤뇨증(phenylketonuria, PKU)

페닐케톤뇨증은 상염색체 열성질환으로 페닐알라닌 수산화 효소(phenylalanine hydroxylase, PAH)의 결핍에 의하여 발현된다. 페닐알라닌(phenylalanine)은 필수 아미노산으로써 주로 간에서 생성되는 페닐알라닌 수산화 효소에 의해 분해되어 타이로신(tyrosine)으로 전환되어 여러 생물화학적반응에 사용되는 물질들의 공급원으로 제공된다. 그러나 페닐케톤뇨증 환자의 경우 이 효소가 결핍 또는 부족하여 체내에 과량의 페

Table 1. 현재 유전자 치료에 이용되는 Viral Vector의 특성

Viral system	Adenovirus	Retrovirus	Lentivirus	AAV
Maximum insert size	30 Kb	7.0 Kb	7.0-8.0 Kb	4.0-5.0 Kb
Chromosomal integration	No	Yes(random)	Yes(random)	Yes(site specific : native AAV)
Duration of expression	Short	Short	Long	Long
Titer	10^{10} - 10^{11}	10^6 - 10^7	10^8	10^{11} - 10^{14}
Immunologic problem	Strong	Few	None/few	Rare
Target cells	Dividing/ non-dividing	Only Dividing cells	Dividing/ non-dividing	Dividing/ non-dividing

닐알라닌이 축적되어 페닐피루빈산(phenylpyruvic acid)으로 되거나 페닐에틸아민(phenylethylamine)으로 탈탄산화된다. 현재 이 과량의 페닐알라닌과 이로 인한 대사산물들은 정상적인 대사와 뇌의 손상을 일으키는 것으로 보고되고 있다. 이 질환의 환자의 경우 출생시에는 정상으로 보이나 점차 지능저하가 진행되어 생후 1년 경과시에 IQ가 50 정도로 떨어지는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 지능저하가 심하고 멜라닌 색소 감소에 의한 담갈색의 머리카락과 흰 피부를 갖는 것을 특징으로 한다. 이외에도 소두증, 두드러진 상악골과 넓은 치아간격, 예나멜 저형성증, 성장지연 등이 치료받지 않은 환자들에게 흔한 소견이다. 진단은 Guthrie의 세균 억제 분석방법이 신생아 선별검사에 널리 사용된다. 정확한 선별검사를 위해 혈액은 생후 48-72 시간 후 채취해야 하며 위음성 가능성을 줄이기 위해 단백질을 섭취 후 시행하는 것을 권장한다.

현재 치료의 개념으로 임상에서 응용되는 치료법은 저페닐알라닌 식이요법이 있다. 이 치료법의 경우 집중적인 영양관리와 잦은 혈중 페닐알라닌의 측정이 필요하다. 식이요법을 성공적으로 시행하는 경우 정상적인 혈중 페닐알라닌 유지가 가능하며 이 질병에 따른 특징적인 증상이 발현되지 않는다. 하지만 이 식이요법의 경우 환자 및 가족들에게 정신적으로 경제적으로 큰 부담을 부여하고 또 환자의 부적절한 감정상의 문제 발생으로 인한 사회성결여에도 기여하는 등 여러 문제점을 안고 있는 것이 현실이다. 따라서 저페닐알라닌 식이요법의 순응도는 성장함에 따라 감소되고 특히 사춘기에 포기하는 환자들이 증가하여 뇌백질의 저수화나 탈수화 등 심각한 증상이 발현된다. 이외에도 페닐케톤뇨증의 여자 환자가 임신한 경우 철저한 식이관리가 되지 않으면 임신부의 혈류를 통해 태아에게 고농도의 페닐알라닌이 전달되어 태아의 발달에 장

애가 일어나고 태아의 뇌에도 치명적인 손상을 일으킨다. 따라서 현재 유일한 치료법으로 존재하는 식이요법이라는 삶의 질을 고려하지 않는 치료법을 대체하여 근원적인 치료효과를 거둘 수 있는 치료법의 개발이 절실하게 요구되어지는 현실에 부응하여 페닐케톤뇨증에 대한 많은 연구가 활발하게 진행하게 되었다. 그중 대표적으로 정상적인 페닐알라닌 수산화효소를 체내에 도입하는 유전자 치료가 연구되었는데 이 방법이 성공하게 되면 페닐케톤뇨증 환자들은 정상적인 식생활을 하면서도 정상인으로서의 삶을 영위할 수 있다. 유전자 치료에 대한 연구로서 지금까지는 DNA/protein complex, retrovirus 및 adenovirus를 이용하여 target으로 하는 세포 및 기관에 유전자를 도입하는 연구를 실시하였다. 그러나 위의 방법들은 그 효율이 매우 낮거나 in vivo에서 그 효력을 장기간 지속하지 못하는 단점들이 있어서 이런 단점을 극복하고자 다음과 같은 연구를 진행하였다.

2. 호모시스틴뇨증(Homocystinuria)

Homocystinuria는 선천성 대사질환의 하나로 CBS (Cystathionine β -synthase) 유전자의 결핍으로 urine 내의 homocysteine과 methionine의 농도를 증가시켜 질병을 일으키며 삼염색체 열성을 유전된다고 알려져 있다. Homocystinuria 환자는 지능저하, ectopia lentis, 골격계의 이상과 생명에 치명적인 혈관에 혈전증 등의 다양한 임상증상을 보인다. CBS 효소가 결핍된 환자의 치료방법으로 저농도의 methionine이나 cysteine의 공급을 이용한 식이요법이나 homocysteine의 level을 낮추기 위해 CBS 효소의 cofactor인 pyridoxine(Vit. B6)이나 methyl donor의 하나인 betaine을 이용한 약물치료가 알려져 있다. 그러나 약물요법의 경우 반복투여를 해야 하며 모든 환자에게 효과적이지

못하다는 단점을 가지고 있으며 현재 연구되고 있는 치료법 중에서 유전자 치료에 대한 시도는 보고되고 있지 않다. CBS 효소 homocysteine과 serine을 cystathionine을 형성하는데 관여하는 효소로써 염색체 21번에 위치하고 있고, 551개의 아미노산으로 이루어져 있으며 63 kDa의 subunit으로 구성되어 있는 homotetramer의 형태를 갖는다.

Adeno-associated virus vector를 이용한 페닐케톤노증의 유전자 치료

1. rAAV-hPAH vector의 제작 및 in vitro 실험

정상적인 페닐알라닌 수화효소를 체내에 도입하기 위해 우선 human phenylalanine hydroxylase 유전자를 포함하는 recombinant adeno-associated virus를 제작하였다. 유전자 발현을 유도하기 위해 human elongation factor 1- α promoter가 사용되었고 transcript의 안전성을 높여주기 위하여 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE)를 같이 cloning 하여 pAAV-PAH-WPRE를 제작하였다. 제작된 vector는 calcium phosphate법을 이용하여 293T cell에 transfection하여 virus를 생성하였고, 48시간 후에 CsCl₂ density gradient ultracentrifuge를 이용하여 rAAV-PAH를 정제 및 농축하

였다. Physical titration을 하기 위하여 real time PCR을 이용하였다. 이런 방식으로 생성된 rAAV-PAH는 그 생성 여부 및 활성도를 확인하고자 in vitro 실험을 실시하였다. Phenylalanine hydroxylase를 발현하지 않는 NIH3T3 cell에 rAAV-PAH를 infection 시키고 phenylalanine hydroxylase 발현여부 및 그 활성도를 측정하였을 때 Fig. 1, 2와 같이 phenylalanine hydroxylase가 정상적으로 발현되었을 것과 활성도를 보이는 것을 확인하였다(Fig. 1, 2).

2. Mouse model을 이용한 실험

In vitro에서 phenylalanine hydroxylase의 발현 여부와 활성도가 확인되었으므로 in vivo 실험을 실시하였다. in vivo 실험은 PKU 마우스 모델인 PAH^{enu2}를 사용하였다. 이 마우스는 PAH 유전자에 missense mutation(F263S)으로 인해 행동 장애, hypopigmentation 및 상승된 혈중 Phe 농도(>20 mg/dL) 등 인간의 PKU의 특징적 phenotype을 거의 반영하는 질병 모델로써 PKU 연구에 주로 사용되는 마우스 모델이다. 생성된 rAAV-PAH를 1E+11군(low titer), 1E+12군(high titer)의 두 군으로 나누어 PAH^{enu2} 마우스의 hepatic portal vein을 통해 주입하였다. 치료 효과를 확인하는 time point는 2주, 5주, 15주 및 25주로 하였고, 효과적인 치료 여부에 대한 평가는 hypopigmentation의 교정, 간추출물의 효소활성도 및 혈중

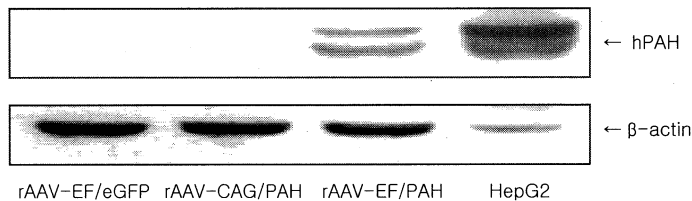


Fig. 1. Western blotting에 의한 phenylalanine hydroxylase 발현 확인.

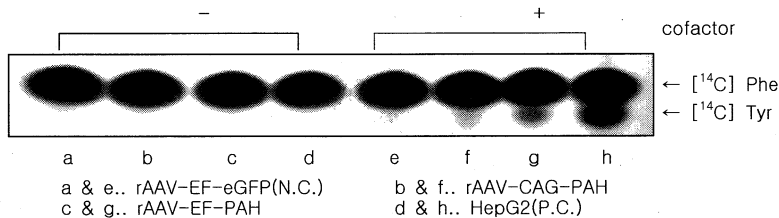


Fig. 2. Enzyme assay를 통한 효소 활성도 확인(TLC image).

[Phe]를 통해 알아보았다. 현재 실험이 진행 중인 상태이지만 2주 및 5주에 대한 실험 결과를 살펴보면 고농도군의 경우 투여 후 약 10일부터 coat color가 갈색에서 검은색으로 변화하기 시작하여 약 2주를 전후해서는 완전히 검은색의 coat color로 바뀌었고(Fig. 3), 혈중 [Phe] 농도도 2주부터 유의성 있는 감소를 나타내다가 5주째에서는 therapeutic level인 0.3 mM 이하로 확인되었다(Fig. 4). 또한 간 추출물에 의한 효소 활성 검사에서도 2주째에는 normal 대조군의 10%, 5주째에는 17%의 활성을 나타내었다(Fig. 5). 한편 저농도에서는 2주에는 혈중 [Phe] 및 효소활성도 모두의 결과에서 동일하게 치료 효과가 없는 것으로 보이고, 다만 시간이 경과 후 재조합 바이러스의 발현 효율이 극대화 되는 시점인 5주째에 이르러서 혈중농도나 효소활성도에 있어서 그 활성도를 보여주긴 했으나 therapeutic level에 속한 수준은 아니었다(Fig. 4, 5). 이외에도 투여경로변경에 의한 rAAV-PAH의 치료효과를 확인하기 위하여 마우스의 둔부에 rAAV-PAH를

투여하였다. 그 결과 1E+12(high titer)을 투여했을 때 hepatic portal vein으로 저농도를 투여했을 때와 유사한 결과를 보여주었다(Fig. 4, 5).

Homocystinuria의 유전자치료

Adeno-associated virus type 2를 기본 바이러스로 하여 원인 유전자인 CBS cDNA를 cloning하여 plasmid를 제작하였다. CBS 효소의 경우 regulatory domain이 효소의 활성을 억제한다는 보고를 근거로 각각 full length의 CBS 유전자 외에 해당유전자를 인위적으로 돌연변이와 일부를 삭제한 것을 제작하여 각각의 효과를 비교하고자 하였다. 사용된 promotor로는 human elongation factor 1- α enhancer/promotor를 사용하였고 전사 후 RNA의 안정성을 높여주기 위하여 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element(WPRE)를 넣어준 pAAV-CBS-WPRE를 제작하였다. 제작된 vector를 293T cell에 Adenovirus-free triple plasmid transfection 시키고 48시간 후에 CsCl₂ density gradient ultracentrifuge를 이용하여 rAAV를 production하였다. Quantitative PCR 방법을 이용하여 재조합 바이러스의 physical titer를 구하고 NIH3T3 cell를 감염시켜 유전자의 발현 여부와 효소의 활성도를 측정하였다(Fig. 6, 7).

CBS 유전자의 발현을 western blotting을 이용하여 확인하였고(Fig. 6) thin layer chromatography (TLC)를 이용하여 효소의 활성도를 측정한 결과 full length의 CBS cDNA가 가장 높은 활성도를 보였고 효소의 coactivator인 SAM을 넣어 주었을 때 약 1.5-

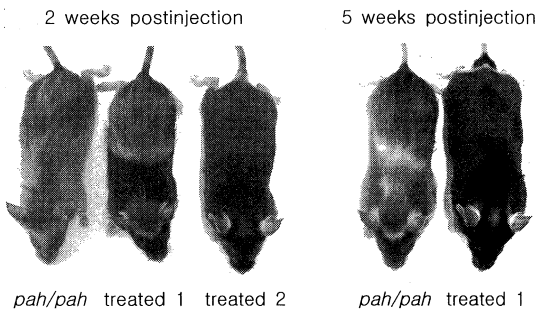


Fig. 3. Coat color 변화에 의한 치료 효과 확인.

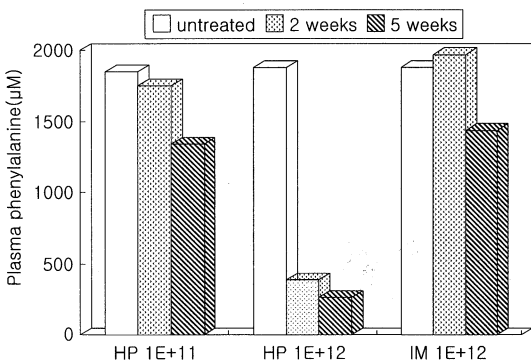


Fig. 4. HPLC법을 이용한 혈중내 phenylalanine 농도 측정.

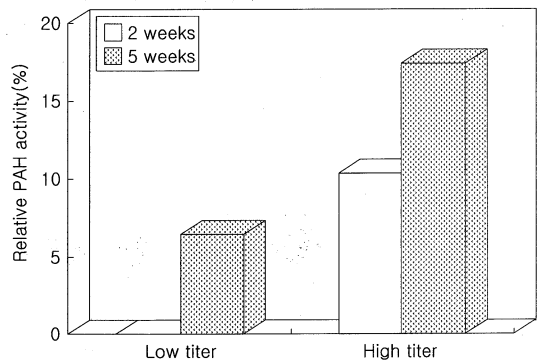


Fig. 5. Enzyme assay를 통한 간추출물내 PAH 효소 활성도 측정.

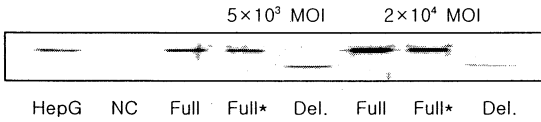


Fig. 6. Western blotting을 이용한 CBS 유전자의 발현 여부.

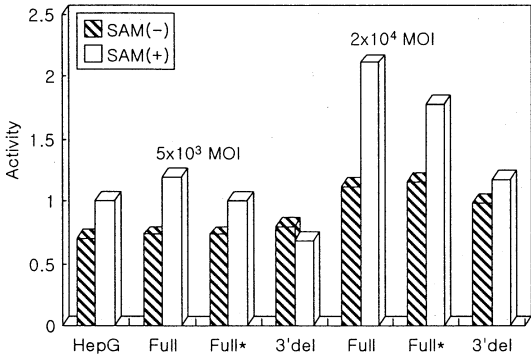


Fig. 7. Enzyme assay를 통한 CBS 효소의 활성화 측정.

2배 정도 효소의 활성도가 증가하는 것을 관찰하였다. 반면 regulatory domain을 돌연변이 시킨 것은 full length의 CBS cDNA의 효소활성과 비슷하였으나 효소의 일부가 결실된 것에서는 HepG 수준의 효소활성도를 보였으나, SAM에 의한 효소의 활성도에는 영향을 주지 못했다. 이를 통해 SAM이 CBS 효소에 결합하는 부위가 효소의 regulatory domain임을 알 수 있었다. In vitro study를 통해 재조합 바이러스의 기능을 확인하고 질환모델 마우스를 이용하여 치료효과가 있는지를 다음의 방법으로 확인하였다.

Homocystinuria mouse는 CBS 유전자에 대한 targeted disruption에 의해 제작된 knockout mouse 로써 심각한 성장저해, 간기능의 장애, 짧은 수명 등의 특징을 보이고 plasma내의 homocystine의 농도가 정상 약 40배에 해당된다.

CBS 효소는 주로 간에서 합성되는 효소로써 CBS 유전자를 이용한 동물모델의 치료는 간문맥으로 재조합바이러스를 주사하는 것이 일반적인 방법이나, Homocystinuria mouse의 경우 수명이 약 14일 정도밖에 되지 않기 때문에 투여경로를 intramuscular로 정한 후 수명연장에 효과가 있는지 대조군과 비교하여 보았다. 치료를 받지 않은 대조군의 경우 평균 14.5일인 반면 full length의 rAAV-CBS의 경우는 18.4일,

regulatory의 일부를 삭제시킨 rAAV-CBS는 17.5일로 3-4일의 수명을 연장시켰다.

결 론

페닐케톤뇨증의 rAAV-PAH에 의한 유전자치료를 있어서 이상의 결과를 종합해 보면 실험이 진행 중인 상태에서 최종적인 결론에 도달할 순 없으나 현재까지의 결과는 기존의 다른 viral vector를 이용한 연구에 의해 얻어진 결과에 비해 상당히 우수하고 지속적이고 부작용 없는 결과를 도출한 것으로 사료된다. 한가지 중요한 것은 그 치료효과를 극대화 시키고 궁극적으로 목표한 수준의 결과를 유도하기 위해 상당히 높은 titer의 재조합 바이러스가 페닐케톤뇨증의 치료에 필요한 것으로 보인다. 그 이유는 간에서 만들어지는 비정상 phenylalanine hydroxylase에 의한 dominant negative 효과에 의한 것으로 추정된다. 즉 phenylalanine hydroxylase는 기능을 발휘하기 위해 dimer나 tetramer로 존재하는 데 그 기능을 잃은 비정상의 endogenous phenylalanine hydroxylase가 외부에서 도입된 정상 phenylalanine hydroxylase의 oligomerization에 같이 관여하여 그 효율을 낮추기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 그러나 titer를 높이면 이 문제는 극복되어지는 문제임을 결과를 통해 알 수 있다.

투여경로변경에 의한 rAAV-PAH의 치료효과를 확인하기 위하여 마우스의 둔부에 rAAV-PAH를 투여하는 실험을 실시하였으나 결과는 만족할 만한 결과를 보여주지 못하였다. 만약 이 경로가 hepatic portal vein으로 도입하는 것과 같은 효과를 거둔다면 그 동안 간으로의 효과적 도입을 위해 반드시 실시하였던 수술 등의 번거로운 과정을 생략할 수 있어서 rAAV를 이용한 유전자 치료에 한층 더 밝은 전망과 이용가치를 부여할 수 있을 것이라는 기대로 이 실험을 실시하였으나 앞의 결과에서 보여주었듯이 hepatic portal vein으로 저농도를 투여했을 때와 같은 결과를 나타내었다. 즉 Muscle directed therapy의 경우 hepatic portal vein을 통한 간으로의 도입에 비해 약 1/10의 감소된 효율을 나타내는 것으로 알 수 있다. 이런 감소된 효과는 phenylalanine hydroxylase가 세포질 내에만 존재하는 효소여서 infection된 muscle 내에서 발현되어 존재하다가 혈류를 통해 유입되는 phenyla-

lanine을 대사하는데 간과 muscle의 혈류의 양의 차이로 인해 phenylalanine clearance rate이 간에 비해 muscle에서 낮은 것으로 추정된다. 이를 개선하기 위해 앞으로 alternative serotype을 찾거나, muscle에서 강력하게 transgene을 유도할 수 있는 promoter에 대한 연구를 계속해야 할 것이다. 또한 PKU 여자 환자의 경우 환자 자신의 문제 이외에 임신에 의해 태아에게도 불행한 영향을 미치게 되는 이중의 문제를 안고 있으므로 PKU 여자 환자를 효과적으로 치료할 수 있는 방법을 개발해야 할 것이다. 여자 환자의 경우 hormone를 비롯해 생리적으로 남자 환자와 많은 차이가 있어서 유전자 치료에 대한 susceptibility에 차이가 있을 것으로 생각되어지므로 PKU 여자 환자에 대한 효과적인 치료를 위해 앞으로 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

호모시스틴뇨증에 있어서도 앞으로 homocystinuria mouse의 효과적인 유전자치료를 위해서는 재조합 바이러스 투여경로를 달리하여 그 치료효과를 알아보고자 한다.

이상을 종합해보면 AAV는 간과 관련된 대사성 이상질환에 있어서 다른 delivery system 즉 adenovirus 및 nonviral vector를 이용한 유전자치료보다 지속적이면서도 높은 치료효과를 제공하는 것으로 생각되어진다. 대부분의 대사성 이상 질환의 경우 신생아 초기에 발견하여 적절한 치료를 실시할 경우 정상인으로서의 삶을 영위할 수 있다는 것을 고려하면, 페닐케톤뇨증이나 호모시스틴뇨증 이외의 다른 대사이상질환에 대해서도 AAV vector system을 이용한 유전자 치료의 효용 및 활용방안에 대한 연구를 지속해야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Mudd SH, Levy HL, Skovby F, et al. pp693-734, 1995.
- 2) Kery V, Bukovska G, Kraus JP. J Biol Chem 1994;269:25283-8.
- 3) Kruger WD, Cox DR. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:6614-8.
- 4) Angela Matthews, Trevor N. Johnson, et al. J Clin Pharmacol. 2002;54:140-6.
- 5) Ruma Banerjee, et al. Biochimica et Biophysica Acta. 2003;1647:30-5.
- 6) Taoka S, West M, et al. Biochemistry 1999;38:7406.
- 7) Crawford M, Gibbs D, Sheppard D. J Inherit Metab Dis 1981;12:392-7.
- 8) Murthy LI, Berry HK. Biochem Med 1975;12:392-97.
- 9) Robson KJ, Chandra T, MacGillivray RT, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:4701-5.
- 10) Lenke RR, Levy HL, et al. N Engl J Med 1980;303:1202-8.
- 11) Ishibashi S, Brown MS, et al. J Clin Invest 1993;92:883-93.
- 12) Herz J, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2812-6.
- 13) Smith-Arica JR, Bartlette JS. Curr Cardiol Rep 2001;3:43-9.
- 14) Zhao, et al. Mol Biotechnol 2001;19:229-37.
- 15) Liebert MA. Human Gene Therapy 1999;10:2445-50.
- 16) Carter PJ, Samulski RJ. Int J Mol Med 2000;6:17-27.
- 17) Roli, et al. J Virol 2000;74:4612-20.
- 18) High KA. Ann N Y Acad Sci 2001;953:64-74.
- 19) Pfeifer A, Verma IM. Annu Rev Genom Hum Genet 2001;2:177-211.
- 20) Clark KR. Kidney Int 2002;61:9-15.