

핵의학적 리포터 유전자 영상

전남대학교 의과대학 핵의학교실
민 정 준

Radionuclide Reporter Gene Imaging

Jung-Joon Min, M.D., PhD.

Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Recent progress in the development of non-invasive imaging technologies continues to strengthen the role of molecular imaging biological research. These tools have been validated recently in variety of research models, and have been shown to provide continuous quantitative monitoring of the location(s), magnitude, and time-variation of gene expression. This article reviews the principles, characteristics, categories and the use of radionuclide reporter gene imaging technologies as they have been used in imaging cell trafficking, imaging gene therapy, imaging endogenous gene expression and imaging molecular interactions. The studies published to date demonstrate that reporter gene imaging technologies will help to accelerate pre-clinical model validation as well as allow for clinical monitoring of human diseases. (Korean J Nucl Med 38(2):143-151, 2004)

Key Words: Reporter gene, Imaging

서 론

인간 게놈 프로젝트의 일차적 완성으로 인해 인간 게놈의 해독이 이루어짐으로써 인간 유전자의 기능적인 측면과 유전자 발현의 진단 및 치료 등 의학적 이용에 관심이 모아지고 있다. 따라서, 생명 과학 분야에서는 우리 몸의 생물학적 과정에 연관되어 발현되는 유전자에 대한 연구가 폭발적으로 이루어지고 있는 바 질병의 발생은 유전자 발현의 정상적인 조절에 이상이 생긴 세포들이 표현형으로 전환되는데 기인한다고 믿어지고 있다. 유전자 발현 영상은 외부에서 세포 내로 전달한 유전자를 영상화하는 것과 원래 우리 몸에 존재하는 유전자를 영상화하는 두가지의 방법이 있다. 현재 적용되고 있는 대부분의 리포터 유전자 영상법은 전자의 범주에 해당한다고 할 수 있다. 최근 몇 년사이에 앞에서 설명된 분자 영상 기기와 리포터 유전자를 이용하여 유전자 발현의 생체 내 위치, 기간, 정도를 평가하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

리포터 유전자 영상법의 일반적 특성

리포터 유전자(reporter gene)란 유전자의 발현물질을 어떤 방법으로든 검출할 수 있는 유전자로서 유전자 발현에 관여하는 촉진자/증강인자(promoter/enhancer)를 연구하는데, 유발 촉진자(inducible promoter)에 의한 유전자 발현 여부를 연구하는데, 또 내재 촉진자(endogenous promoter)의 하위에 리포터 유전자를 두고 내재 유전자(endogenous gene)의 발현을 연구하는데 이용되어 왔다. 그동안 사용되어 왔던 리포터 유전자로는 chloramphenicol acetyl transferase (CAT), alkaline phosphatase, -galactosidase 유전자(lac Z) 등을 들 수 있다. 하지만 이들 리포터 유전자의 발현여부를 알기 위해서는 발현된 조직을 적출하거나 혈액을 채취해야 하는 번거로움이 있고, 반복 검사가 힘들거나, 발현된 세포나 조직의 위치, 발현 기간, 발현 강도 등을 생명체 내에서 종합적으로 모니터 하는데 한계가 있다.

생명체 내 실험에 사용되던 리포터 유전자로는 green fluorescent protein (GFP)과 luciferase로 이 유전자의 발현에 의한 형광(fluorescence) 또는 생물 발광(bioluminescence)으로 유전자 발현의 정보를 제공한다. 빛의 투과가 용이한 동물 모델에서는 적절한 장비에 의한 영상화가 가능하지만, 단층 영상의 구성이 어렵고 인간 모델에 이용하는데 한계가 있다. 핵의학 영상방법은 특유의 높은 예민도를 고려해 볼 때 유전적 정보의

• Received: 2004. 4. 6. • Accepted: 2004. 4. 10.
• Address for reprints: Jung-Joon Min, M.D., PhD., Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School, 7 Hakdong, Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea
Tel: 062) 379-7271, Fax: 062) 223-1666
E-mail: jjminmd@hanmail.net

위치, 발현 기간, 발현 강도를 모니터할 가장 적절한 영상 방법으로 위에서 설명한 여러 제한점들을 해결해 줄 것으로 기대되어 꾸준히 연구되어 왔다. 특히 리포터 탐색자(reporter probe)를 방사성 표지하여 리포터 유전자의 발현을 영상화한다는 방법의 간편성과 확실성때문에 많은 분자 영상학자들로 하여금 핵의학적 기법에 매력을 갖게 한다.¹⁾

이상적인 리포터 유전자/탐색자는 다음의 특징을 가져야 한다.

- (1) 리포터 유전자는 면역반응을 피하기 위해 포유동물의 세포에 존재하되 발현은 하지 않아야 한다.
- (2) 특정 리포터 탐색자는 특정 리포터 유전자가 발현된 세포에만 선택적으로 축적되어야 한다.
- (3) 리포터 유전자가 발현되지 않을 때는 리포터 탐색자가 축적되지 않아야 한다.
- (4) 리포터 유전자 생산물에 의해 면역 부작용이 일어나지 않아야 한다.
- (5) 리포터 탐색자는 생명체 내에서 안정해야 한다. (리포터 탐색자가 생명체 내에서 말단 대사물로 대사될 경우 이 탐색자 축적의 정량분석이 어렵기 때문이다.)
- (6) 리포터 탐색자는 혈액 내에서도 비 특이적으로 섭취된 세포에서 빨리 배출되어야 한다.
- (7) 리포터 탐색자는 영상 목적의 용량에서 세포 독성을 가지지 않아야 한다.
- (8) 리포터 유전자의 크기는 매개체에 삽입할 수 있을 정도의 크기를 유지해야 한다.
- (9) 리포터 탐색자는 표적 세포의 세포막을 용의하게 통과하여야 한다.
- (10) 리포터 탐색자의 영상 신호는 리포터 유전자의 mRNA/ 단백질의 발현 정도와 높은 상관관계를 가져야 한다.

모든 리포터 유전자/탐색자가 이런 조건을 다 충족할 수는 없다. 각각의 시스템마다 장, 단점이 있으므로 적용목적에 따라 시스템의 선택이 이루어져야 한다.

리포터 영상법의 분류

핵의학적 리포터 유전자는 크게 효소 유전자와 수용체 유전자로 나눌 수 있다. 효소 유전자는 리포터 탐색자와 반응할 효소를 발현하는 유전자로 cytosine deaminase (CD), herpes simplex type 1 thymidine kinase (HSV1-tk)가 여기에 해당되고, 수용체 유전자는 dopamine 2 receptor (D2R), human type 2 somatostatin receptor (hSSTR2), sodium/iodide symporter

(NIS)가 여기에 속한다. 그 기본 개념은 Fig. 1에서 설명하였다.

1. Cytosine deaminase 리포터 유전자

Cytosine deaminase(CD)는 가장 처음 연구되었던 리포터 유전자로 cytosine을 탈아민화하여 uracil로 변환하는 효소이다. 포유동물의 세포에는 이 CD가 존재하지 않으므로 cytosine이 uracil로 변환되지 않는다. CD가 발현된 세포에 5-fluorocytosine을 주입할 경우 세포독성이 있는 5-fluorouracil로 변환되므로 종양모델에서 유전자 치료목적으로 CD와 5-fluorocytosine이 연구되어 왔다.²⁾ CD를 리포터 유전자로 사용한 첫 연구에서 6-[³H]-5-fluorocytosine을 리포터 탐색자로 사용하여 CD가 발현된 인간 아교모세포종(human glioblastoma) 세포에서만 6-[³H]-5-fluorouracil로 변환되어 있음을 확인했다. 6-[³H]-5-fluorocytosine은 세포 내에 매우 느린 속도로 섭취되고 배설되므로 리포터 탐색자로 적합하지 않을 것으로 생각된다. 앞으로 이런 점들을 보완할 새로운 탐색자가 개발되어야 CD가 리포터 유전자로 이용될 수 있을 것이다.

2. Herpes-simplex virus type-1 thymidine kinase 리포터 유전자

포유류의 thymidine kinase는 세포질과 미토콘드리아에 존재한다. 이 효소는 ATP의 γ -인산염을 deoxythymidine으로 전달하여 deoxythymidine monophosphate (dTMP)로 전환한다. 세포가 단순포진 바이러스(herpes simplex virus)에 감염되면 이 바이러스의 thymidine kinase (herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)가 발현된다(이하 본문에서 HSV1-TK는 효소를, HSV1-tk는 유전자를 지칭하기로 한다.). 바이러스의 thymidine kinase는 포유류의 thymidine kinase에 비해 기질 특이성이 약해서 deoxythymidine 뿐 아니라 퓨린, 피리미딘 뉴클레오티드를 인산화시킨다. 인산화된 뉴클레오티드는 세포 내에 포획된다.³⁾

Acyclovir (9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine)는 HSV-TK에 의해 특이적으로 인산화되는데 단순포진 바이러스 감염의 가장 성공적인 치료제 중 하나이다. HSV-TK에 의해 형성된 acyclovir monophosphate는 다시 guanylate kinase에 의해 인산화되어 acyclovir diphosphate가 되고, 그 밖의 여러 효소에 의해 acyclovir triphosphate가 된다.⁴⁾ Acyclovir triphosphate는 DNA 합성에 이용되어 DNA내로 통합되면 바이러스 DNA polymerase를 강력히 억제하는데 결과적으로 DNA 합성이 중지되어 세포가 사망하게 된다. 그 밖의 HSV1-TK와 반응하

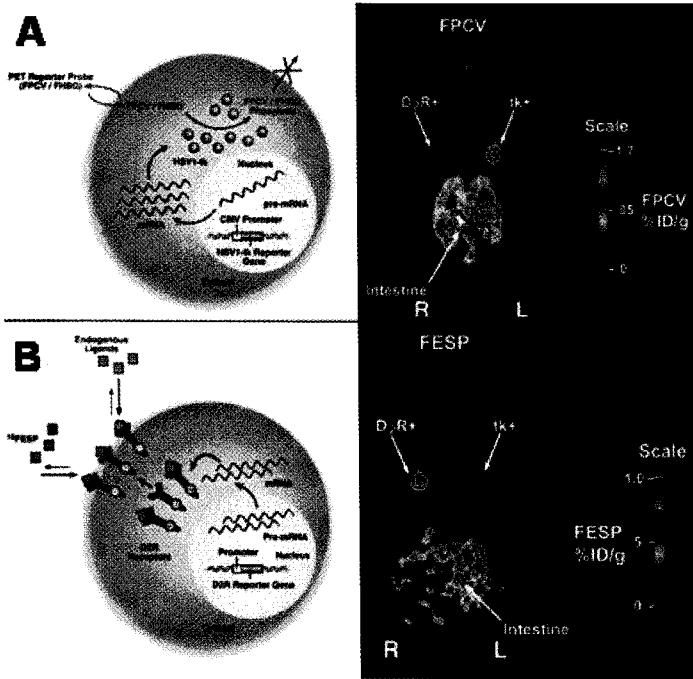


Fig. 1. Two categories of reporter gene imaging. (A) Enzyme-based PET imaging. ^{18}F -fluoropenciclovir (^{18}F -FPCV) or other acycloguanosines are substrate molecular probes phosphorylated by the herpes simplex virus type I thymidine kinase (HSV1-TK) enzyme to result in intracellular trapping of the probe in cells expressing the *HSV1-tk* gene. (B) Receptor-based PET imaging. ^{18}F -FESP is a ligand molecular probe interacting with the dopamine-2-receptor (D2R) to result in trapping of the probe on/in cells expressing the *D2R* gene. Images of the same mouse are shown in A and B. The images show two reporter genes (*HSV1-tk* and *D2R*) in the same mouse and imaged with two different reporter probes (^{18}F -FPCV for HSV1-TK and ^{18}F -FESP for D2R). These images show specific accumulation of probes in a mouse carrying a tumor stably expressing *HSV1-tk* on the left shoulder and a separate tumor stably expressing *D2R* on the right shoulder. The accumulation of ^{18}F -FPCV and ^{18}F -FESP in each tumor reflects trapping caused by *HSV1-tk* and *D2R* expression, respectively. The color scale (%ID/g) indicates the percentage of injected dose that accumulates per gram of tumor.

는 기질로 ganciclovir (9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine)과 penciclovir (9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbutyl)guanine)가 합성되어 바이러스 감염에 대한 효과가 입증된 바 있다. 지금까지 설명한 독특한 기전을 이용하여 HSV1-tk를 리포터 유전자로, 방사성 표지된 뉴클레오시드를 리포터 탐색자로 이용하고 있다(Fig. 1A).

HSV1-TK에 반응하는 기질로서 리포터 유전자 발현 영상의 탐색자는 크게 두가지, 즉 thymidine 계열 (예: 5-iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1--D-arabinofuranosyl-5-iodouracil (FIAU))과 acycloguanosine 계열(예: 9-(4-[^{18}F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)-guanine ([^{18}F]FHBG))로 나눌 수 있다. 이 리포터 탐색자가 HSV1-TK가 발현되어 있는 세포 내로 섭취되면 효소에 의해 인산화되어 세포 내에 포획된다(Fig. 1A).

Thymidine 계열 리포터 탐색자인 FIAU는 [^{131}I] 또는 [^{124}I]로 방사성 표지하여 사용할 수 있는데, HSV1-TK가 발현된 세포에 특이적으로 축적되어 임상적으로 이용이 가능할 것으로 예측되어왔다.⁵⁾ 최근에는 신경교종 환자의 종양세포에 HSV1-tk 플라스미드를 리포좀 매개에 의해 전달하고 [^{124}I]FIAU로 영상화 하는데 성공하였다.⁶⁾ FIAU는 acycloguanosine derivatives 계열의 탐색자에 비하여 HSV1-TK 발현세포에 더 강하게 섭취되는 것으로 알려지고 있으나, 포유세포의 TK와도 비특이적으로 반응하는 것으로 알려져 있다.

Acycloguanosine 계열의 최초의 탐색자 acyclovir (ACV)로부터 ganciclovir (GCV), penciclovir (PCV)까지 HSV1-TK

발현세포에 선택적으로 잘 섭취되는 탐색자를 개발하여 왔고, 최근에는 PCV의 결사슬에 [^{18}F]을 표지한 [^{18}F]FHBG가 높은 비방사능을 갖는 것으로 알려졌다. 특히 HSV1-tk의 돌연변이 유전자인 HSV1-sr39tk에 대해서 acycloguanosine 계열의 탐색자의 친화도가 크게 높아 FHBG가 HSV1-sr39tk 발현 세포에 높은 섭취를 보이고 오랫동안 저류되며, HSV1-tk에 대한 FIAU의 친화도를 증가하는 것으로 알려지고 있다.^{7,8)}

3. 도파민-2 수용체 리포터 유전자

도파민-2 수용체(dopamine-2 receptor, D2R)는 뇌의 striatum과 뇌하수체에 존재한다. D2R과 반응하는 리간드로는 D2R 길항제인 3-(2'-[^{18}F]-fluoroethyl)spiperone ([^{18}F]FESP)가 PET용으로, [^{123}I]iodobenzamine이 SPECT 용으로 연구되고 있다(Fig. 1B). D2R이 발현된 쥐의 간세포에 [^{18}F]FESP의 섭취는 D2R mRNA의 발현도와 높은 상관관계를 보였다.⁹⁾

이 시스템의 문제점으로는 인위적으로 발현된 수용체가 몸안의 도파민과 결합하여 도파민 작용의 효과를 일으킬 수 있다는 점이다. 최근 이 문제를 해결하기 위해 리간드와 반응하지만 그 신호가 핵으로까지 전달되지 않는 돌연변이 수용체를 개발하였다.¹⁰⁾ D2R 수용체는 G 당단백질 연결 수용체(G glycoprotein coupled receptor, GPCR)로 리간드가 결합하면 여러 이차적 전달자(secondary messenger)와 protein kinase의 역할을 매개로 그 효과가 세포 내에서 나타난다. 돌연변이 수용체는 이러한 신호 연결이 끊어져 있어 리간드가 결합하더라도 세포 내에

서 그 효과는 나타나지 않게 된다.

4. Human type 2 somatostatin receptor (hSSTR2) 리포터 유전자

hSSTR2 역시 리포터 유전자로 최근 연구되어 지고 있다.¹¹⁾ 리포터 탐색자로서 [¹¹¹In]Octreotide, [^{99m}Tc]P829, and [^{99m}Tc]P2045가 이용되고 있고, hSSTR2 발현 세포에서 [^{99m}Tc]P2045의 축적이 가장 우수한 것으로 보고되었다.

5. Sodium/iodide symporter 리포터 유전자

갑상선에서 옥소의 이동 통로로 알려진 sodium/iodide symporter (NIS)를 리포터 유전자로 사용하려는 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다.^{12,13)} 이 방법의 장점은 기존의 방사성 옥소([¹²³I], [¹³¹I]) 또는 [^{99m}Tc]pertechnetate를 이용하여 손쉽게 영상화 할 수 있다는 점이다. 또 하나의 장점으로 이 유전자의 발현이 세포의 생화학적 환경에 영향을 미치지 않는다는 점이다. 옥소는 갑상선을 제외한 대부분의 세포에서 대사되지 않으며, NIS 발현으로 인한 세포 내의 Na⁺의 증가도 세포에 대한 영향이 없는 것으로 알려져 있다.

일정한 유전자의 발현에 대한 영상신호의 강도가 높을수록 진단 예민도를 높일 수 있기 때문에 영상 신호의 강화(signal amplification)는 유전자 발현 영상의 가장 중요한 관심사이다. 수용체 리포터 영상법의 경우, 하나의 mRNA가 여러 개의 수용체를 만든다는 점에서 영상 신호의 강화가 용의하다 할 수 있다. 효소 리포터 영상의 경우, 하나의 mRNA가 여러 효소 분자를 만들고 또 하나의 효소 분자는 여러 개의 리포터 탐색자를 포획하기 때문에 가장 효과적인 강화효과를 이룰 수 있다.¹⁾

리포터 유전자 영상법의 적용

1. 세포 추적 영상(Imaging cell trafficking)

질병의 과정에 있어서 면역 세포의 이동에 관한 정보는 이들 면역 세포의 역할에 대한 이해와 나아가 치료 계획을 세우는데 절대적으로 필요하다. 그러므로, 생명체 내에서의 세포 추적 영상은 면역학적 연구 및 종양학의 연구에 중요한 위치를 차지하게 되었다. 예를 들면, 백혈구 영상은 감염 또는 염증의 병터를 정확히 진단하는데 이용되어 왔다. 면역세포의 생체 내 분포와 이동 경로는 입양 면역요법(adoptive immunotherapy)의 효과 관정에 매우 중대한 사항이므로, 면역 세포의 방사성 표지에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 또한 암 분야에서는 종양 세포의 이동과 부착, 전이 등에 관한 병태 생리학적인 기전을 명확

히 하기 위해 세포 추적 영상이 이용되어 왔다.

핵의학 영상방법, 즉 PET와 SPECT는 높은 예민도, γ -선의 조직 투과능력, 공간 해상능 등을 고려할 때 세포 추적 영상에 적합한 것으로 생각되었다. 초기의 세포 추적 영상은 외부에서 방사성 동위원소로 표지된 세포를 주사한 뒤 일정 시간동안 촬영하였다. 하지만 이 방법은 두가지의 제한점이 있다. 첫째, 사용된 방사성 동위원소의 반감기가 상대적으로 짧을 때 영상 신호를 얻을 수 있는 시간이 제한되어 있다는 점이다. 특히 반감기가 짧은 PET용 방사성 핵종으로 표지 했을 경우 세포 주사 후 6시간 이내에만 영상 신호를 얻을 수 있다. 둘째, 방사성 표지된 세포가 분열을 함으로써 영상 신호가 희석될 수 있다는 점이다. 이러한 제한점을 극복하기 위해 고안된 방법은 세포에 리포터 유전자를 발현시킨 다음 체내에 주사하는 방법이다. 리포터 유전자는 세포 분열과 함께 복제되기 때문에 세포 자체에 표지할 때 발생하는 영상 신호의 희석을 피할 수 있다. 또한 일단 리포터 유전자가 발현된 표적 세포를 주사한 다음, 리포터 탐색자(방사성 약물)는 촬영하고자 하는 시기에 반복 투여가 가능하므로 짧은 반감기에 따른 영상 신호의 감소를 피할 수 있다.¹⁴⁾ 비교적 반감기가 긴 PET 용 방사성 핵종인 [⁶⁴Cu]pyruvaldehyde-bis(*N*⁴-methylthiosemicarbazone) ([⁶⁴Cu]PTSM)으로 세포를 표지하는 방법도 보고되었다.¹⁵⁾

면역 세포의 체내 이동을 여러 질환 모델에서 영상화하려는 시도가 있다. 종양, 자가 면역질환, 결체조직 질환 등을 모델로 해서 질환 특이적인 면역세포를 얻고 이 면역세포들에 리포터 유전자를 전달시킨 다음 같은 질환을 가진 동물 모델에 주사하여 면역세포의 이동을 영상화하는 방법이다. Dubey 등¹⁶⁾은 동물 모델에 murine sarcoma virus로 육종 모델을 만든 다음 이 종양에 특이적인 T 림프구에 HSV1-sr39tk 리포터 유전자를 전달하여 종양을 영상화하는데 성공했다. Koehne 등¹⁷⁾은 Epstein-Bar virus (EBV) 특이 T 림프구가 EBV 양성인 종양을 추적하는 것을 PET으로 영상화하였다. Le 등¹⁸⁾은 HSV1-sr39tk가 발현된 골수세포를 이용하여 백혈병 발생에 BCR-ABL 유전자의 역할을 규명하였다.

최근 관심을 끌고 있는 줄기세포 요법에도 리포터 유전자 영상법이 유용하게 사용될 전망이다. 줄기세포에 리포터 유전자를 발현시킨 다음, 이를 장기에 이식한 후 리포터 탐색자를 이용하여 줄기세포의 존재 여부를 모니터링 한다.^{19,20)} Wu 등¹⁹⁾은 심근 모세포(H9c2)에 HSV1-sr39tk 리포터 유전자를 아데노바이러스 매개로 전달한 다음 심근에 이식하고 수일 동안 이식된 세포의 심근 내 존재를 microPET와 광학 영상기기를 이용하여 모니터링 하였다(Fig. 2).

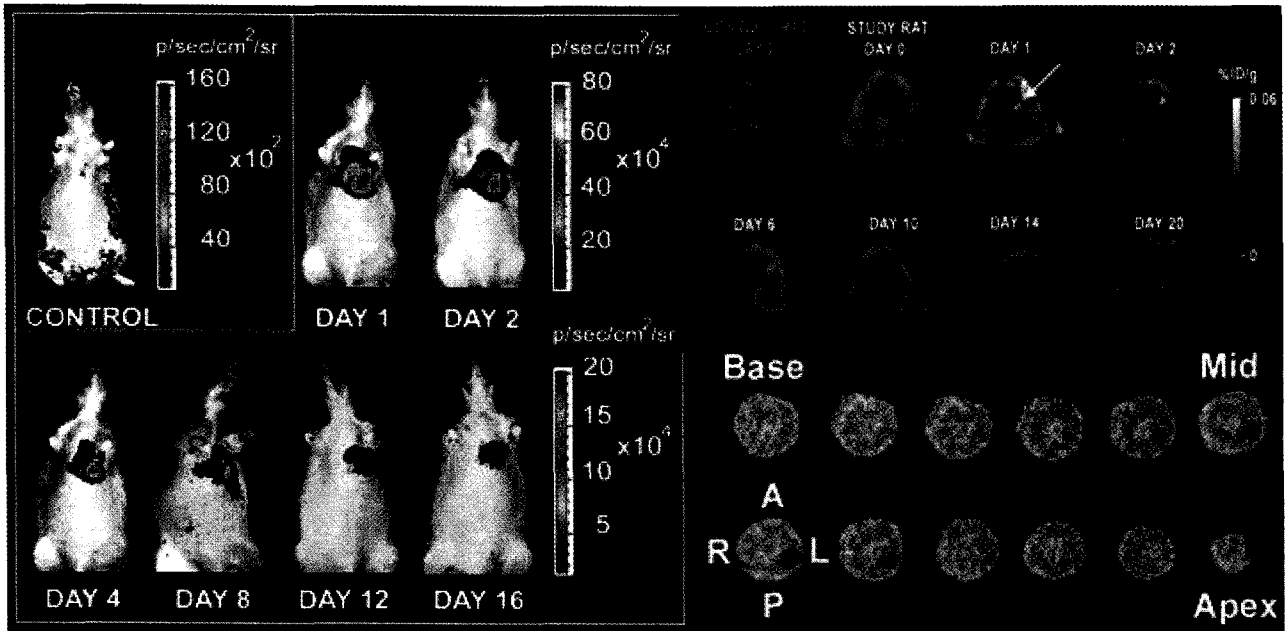


Fig. 2. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals. (Left) Optical imaging shows a representative rat transplanted with embryonic cardiomyoblasts expressing firefly luciferase reporter gene that emits significant cardiac bioluminescence activity at days 1, 2, 4, 8, 12, and 16. Control rat has background signal only. (Right Upper) Micro PET imaging shows a representative rat transplanted with cardiomyoblasts expressing HSV1-sr39tk reporter gene, whereby the locations, magnitude, and survival duration were monitored by longitudinal imaging of ¹⁸F-FHBG reporter activity (arrow). (Right lower) Autoradiography of the same study rat confirms trapping of ¹⁸F radioactivity by transplanted cells at the lateral wall at finer spatial resolution (50 μm). A, anterior wall; L, lateral wall; P, posterior wall; R, right ventricular wall. Reproduced with permission from Wu et al.¹⁹⁾

2. 유전자 치료 영상(Imaging gene therapy)

치료목적으로 전달한 유전자가 표적 세포 내에 적절히 발현하는 것이 유전자 치료에 있어 가장 중요한 문제이다. 따라서 치료 유전자의 발현 여부를 영상으로 확인하고자 하는 시도가 이루어졌다. 이 유전자 치료 영상은 직접 영상법과 간접 영상법으로 나눌 수 있다. 직접 영상법은 치료 목적으로 전달한 유전자가 영상 탐색자를 포획할 수 있는 리포터 유전자의 역할까지 하는 것으로 HSV1-tk가 가장 적절한 예이다. HSV1-tk는 자살 유전자 치료법(suicide gene therapy)으로 사용되는데, 이 유전자를 발현하는 세포는 acyclovir 등의 약물에 의해 사망하게 된다. 이 유전자를 발현하는 세포는 FIAU 또는 FHBG 등 리포터 탐색자를 포획하므로 발현여부를 영상화 할 수 있다.⁶⁾

하지만 모든 치료 유전자가 리포터 유전자의 역할까지 겸할 수 없기 때문에 치료 유전자의 발현여부를 리포터 유전자를 통하여 간접적으로 예측하는 방법인 간접 영상법이 고안되었다.²¹⁾ 이 방법에서 리포터 유전자 발현의 정량치는 치료 유전자의 발현의 양을 정확히 예측할 수 있어야한다. 이 영상법의 장점은 여러 치료 유전자와 리포터 유전자를 결합시킬 수 있으므로 치료 방법에 따라 다양하게 적용할 수 있다는 점이다. 다음은 현재까지 고안되어 온 간접 영상법을 간단히

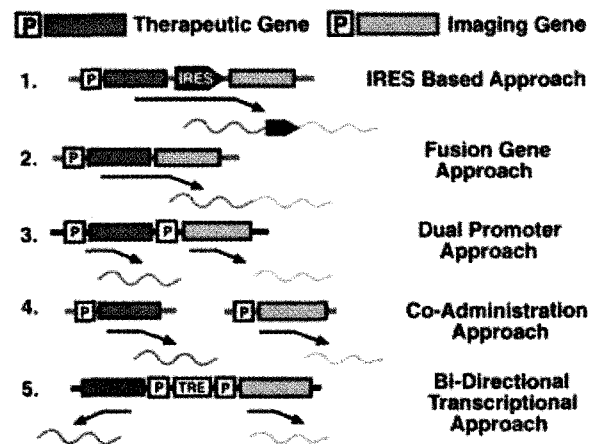


Fig. 3. Five different strategies for imaging gene therapy with therapeutic gene and reporter gene.

정리하였다 (Fig. 3).

1) IRES 방법(IRES based approach)

이 방법에서는 한개의 유전자를 internal ribosomal entry sites (IRES)의 상위에 다른 유전자를 하위에 두어 두 유전자를 함께 발현시키는 방법이다. 두 유전자는 동일한 촉진자의 조

질을 받아 전사되고 번역되어 단백질을 각각 발현하게 된다. 이 방법의 장점으로서는 제작이 간편하여 치료 유전자에 따라 적용 시키기가 쉽다는 점이다. 하지만 IRES 하위의 유전자 발현이 상위 유전자에 비하여 약화되는 경향이 있어 리포터 유전자를 하위에 둘 경우 영상의 예민도가 떨어질 수 있다.²²⁾ 최근 D2R과 HSV1-tk를 각각 상위와 하위에 두는 방법이 고안되었다.^{23,24)}

2) 융합 유전자 방법(Fusion gene approach)

융합 유전자(fusion gene)는 두개 이상의 유전자를 하나의 융합 유전자로 만들어 궁극적으로 이 유전자들의 정보를 하나의 단백질로 발현시키는 방법이다. 치료 유전자와 리포터 유전자를 하나의 단백질로 발현시킬 경우 두 유전자 발현은 높은 상관관계를 보이는 장점이 있으나, 이 융합 단백질이 각각의 유전 정보를 완전히 기능화하지 못하는 경우가 있어 일반화하는데 어려움이 있다.^{25,26)} 지금까지 HSV1tk-GFP,^{27,28)} DHFR-HSV1tk,²⁹⁾ HSV1tk-LacZ,³⁰⁾ DHFR-GFP³¹⁾ 등 많은 융합 유전자들이 제작되었다. 최근에는 1개의 PET 리포터 유전자(truncated HSV1-tk)와 2개의 광학 리포터 유전자(hrluc, DsRed)를 융합시킨 3중 융합 유전자가 제작되었다.²⁶⁾

3) 이중 촉진자 방법(Dual-promoter approach)

두개의 다른 유전자를 각각의 촉진자의 조절을 받으며 하나의 매개체에 두는 방법이다. 이 방법은 IRES를 이용하는 방법에서 나타나는 하위 유전자의 약화현상을 피할 수 있는 방법이나, 두 촉진자의 활성이 다를 경우 두 유전자의 발현의 상관관계가 낮을 수 있고, 세포 내에서 촉진자의 돌연변이가 일어날 경우 전사능력이 변할 수 있다는 단점이 있다.

4) 이중 매개체 전달 방법(Co-administration approach)

치료 유전자와 리포터 유전자를 각각 다른 매개체로 전달하지만 동일한 종류의 촉진자의 조절을 받도록 하는 방법이다. 이 방법은 가장 쉽게 두 유전자를 동일 세포에 전달할 수 있고, 전달된 두 유전자 발현의 상관관계가 높다는 장점이 있다. 하지만 각각의 매개체에 있는 촉진자 사이의 트랜스 효과에 의해 리포터 유전자의 발현이 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다.³²⁾

5) 양방향 전사 방법(Bidirectional transcriptional approach)

Tetracycline-responsive element (TRE)의 양쪽에 minimal CMV 촉진자의 조절을 받는 두 유전자를 두는 방법이다. 이 유

전체의 전사능력은 TRE에 결합하는 rtetR-VP16이라는 transactivator에 의해 강화되는데, rtetR-VP16은 tetracycline이나 doxycycline의 존재 하에서만 TRE와 결합한다. 이 방법은 IRES를 이용한 방법에서의 하위 유전자 약화현상을 피할 수 있다는 장점이 있고, 두 유전자 발현의 상관관계가 매우 우수하여 현재까지 개발된 방법 중 가장 우수한 방법으로 여겨지고 있다. 또한 이 방법은 유전자의 발현을 임의로 유도할 수 있으므로, 양방향 발현 유도 유전자 영상법(imaging of bi-directional inducible gene expression)이라고도 부른다.³³⁾

3. 내인성 유전자 발현 영상법 (Imaging endogenous gene expression)

대부분의 리포터 유전자 영상법에서 리포터 유전자는 constitutive promoter인 CMV 촉진자에 의해 발현이 유도되었다. 이 촉진자로는 리포터 유전자가 변함없이 발현되므로 특정 내인성 유전자의 발현을 추적할 수는 없다. Green 등³⁴⁾은 알부민 유전자의 촉진자(*alb*)에 의해 유도되는 리포터 유전자(HSV1-tk)를 이용하여 체내의 알부민 유전자의 변화를 측정하였다. 표적으로 삼은 내인성 유전자의 촉진자와 리포터 유전자를 융합시킨 유전자를 만들면 내인성 유전자의 발현을 모니터 할 수 있을 것으로 가정하고 종양 특이 촉진자(예, CEA, PSA, p53)에 리포터 유전자를 융합시켜 종양 유전자를 추적하였다.^{28,35)} 이들 조직/종양 특이 촉진자는 CMV 촉진자에 비해 전사 작용의 유도 능력이 매우 약한 특성이 있어 여기에서 유도되는 리포터 유전자 영상의 예민도가 떨어지는 단점이 있다. 최근 약한 예민도를 극복하기 위해 촉진자에 의한 전사작용을 강화시켜주는 방법이 고안되었다.³⁶⁾ 강력한 전사 활성 도메인(transcription activation domain)인 VP16과 DNA 결합 도메인(DNA-binding domain)인 GAL4의 융합 유전자를 조직 특이 촉진자의 조절 하에 만들고, GAL4 결합 부위(GAL4 binding site)에 이 융합 유전자의 생성물인 융합 단백질이 결합할 때 리포터 유전자가 발현되는 시스템으로 2 단계 전사 강화(two step transcriptional amplification, TSTA) 시스템이라 부른다(Fig. 4A).³⁶⁻³⁸⁾ TSTA 시스템으로 리포터 유전자의 발현을 12배~50배 정도 증가시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 또한 전립선 조직 특이 촉진자인 PSA의 주요 조절 성분(key regulating element)을 다중 결합(multimerization)시킨 촉진자를 제작하여 리포터 유전자의 발현을 강화시킨 방법도 고안되었다.³⁹⁾

내인성 유전자의 발현을 영상화하는 또 다른 전략으로는 리포터 유전자를 C-말단과 N-말단으로 분리하는 방법이다.⁴⁰⁾ 분

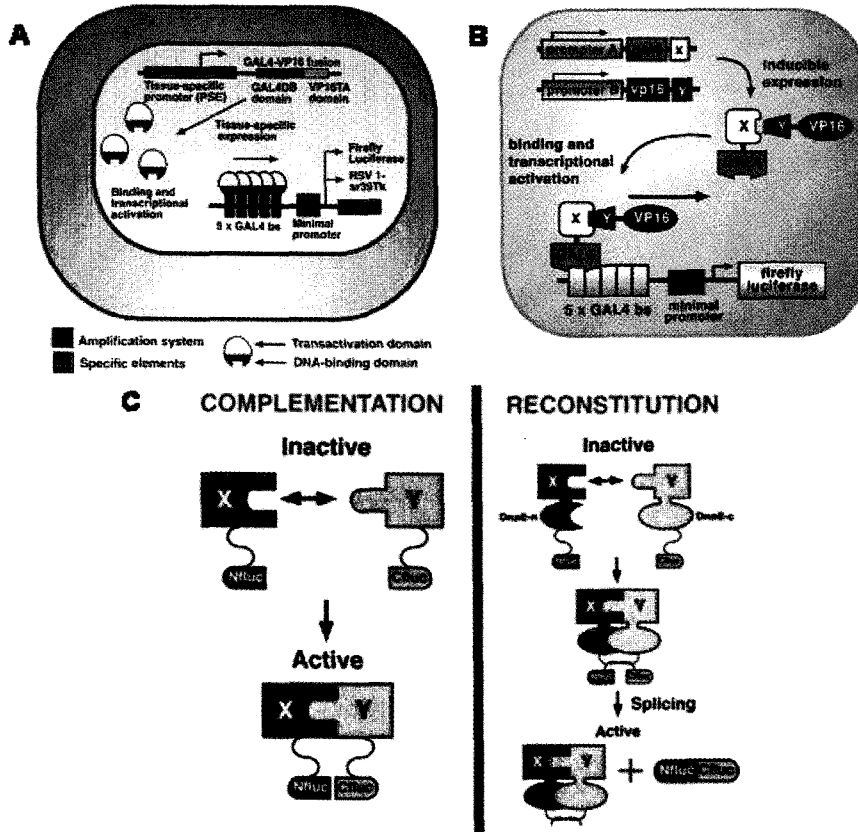


Fig. 4. Imaging molecular interactions (A) Schematic diagram of the TSTA system. The first step involves the tissue-specific (e.g., PSE) expression of the GAL4-VP16 fusion protein. In the second step, GAL4-VP16, in turn, drives target gene expression under the control of GAL4 response elements in a minimal promoter (shown are five GAL4 binding sites (bs)). Transcription of the reporter gene, either *Fluc* or *HSV1-sr39Tk*, leads to reporter protein, which in turn leads to a detectable signal in the presence of the appropriate reporter probe. The use of the GAL4-VP16 fusion protein can potentially lead to amplified levels of the reporter protein (FLUC or HSV-sr39TK) and therefore an increase in imaging signal. (B) Imaging protein-protein interaction in living mice. Schematic diagram of the system for imaging the interaction of proteins X and Y. The first step involves the vectors pA-gal4-x and pB-vp16-y, which are used to drive transcription of *gal4-x* and VP16-Y through use of promoters A and B. In the second step, the two fusion proteins GAL4-X and VP16-Y interact because of the specificity of protein X for protein Y. Subsequently, GAL4-X-Y-VP16 binds to GAL4-binding sites (five GAL4-binding sites (bs) are available) on a reporter template. This leads to VP16-mediated transactivation of Firefly luciferase reporter gene expression under the control of GAL4 response elements in a minimal promoter. The NF- κ B promoter was used for either pA or pB and TNF-mediated induction. (C) Schematic diagram of two strategies for using split reporters to monitor protein-protein interactions. Complementation-mediated restoration of firefly luciferase activity. N-terminal half of firefly luciferase is attached to protein X through a short peptide FFAGYC, and the C-terminal half of firefly luciferase is connected to protein Y through the peptide CLKS. Interaction of protein X and Y recovers *Fluc* activity through protein complementation. Split Intein (DnaE)-mediated protein splicing leads to firefly luciferase reconstitution. The N-terminal half of firefly luciferase is connected to the N-terminal half of DnaE (DnaE-n) with peptide FFAGYC. The N-terminal half of DnaE in turn is connected to protein X. Similarly, the C-terminal half of firefly luciferase is connected to the C-terminal half of DnaE (DnaE-c) with peptide CLKS, and the C-terminal half of intein is in turn connected to protein Y. The interaction of proteins X and Y mediates reconstitution through splicing of the N and C halves of DnaE. Reproduced with permission from Gambhir et al.^{36,40,41)}

리 리포터(C-말단 및 N-말단) 유전자를 매달은 올리고 핵산염이 표적으로하는 mRNA에 결합할 경우 두 개의 분리된 리포터가 서로 접근하여 결합함으로써 온전한 리포터로 결합되어 영

상 신호를 생성한다는 가설에 의한 것이다. 최근에는 트랜스 짜집기(trans-splicing) 현상을 이용하여, 특정 염기서열의 mRNA에 결합하는 Pre-trans splicing molecule (PTM)을 이

용하는 방법도 시도되고 있다.

4. 입자 상호작용 영상법(Imaging molecular interaction)

입자 간의 상호작용을 영상화하는 예들, 즉 GAL4-VP16의 상호작용을 영상화하는 방법은 앞에서 설명하였다.

단백질들의 상호작용을 규명하는 것은 세포 내에서 일어나는 신호전달 등의 생물학적 기전을 규명하거나, 약물 작용의 기전을 규명하는데 있어 중요성을 갖는다. Ray 등⁴¹⁾은 NF-κB 촉진자로부터 유도되는 두개의 융합 단백질(VP16-MyoD와 GAL4-ID)이 서로 결합하여 작용하는 것을 입증하였다(Fig. 4B). Paulmurugan 등^{40,42)}은 상호 작용을 알고자 하는 단백질의 하방에 분리 리포터를 붙이는 방법을 이용하여 complementation과 reconstitution 방법을 이용하여 두 개의 단백질이 상호 작용을 영상화하였는데, 이 방법들은 주로 광학 영상용 리포터를 이용하여 연구되어 왔다(Fig. 4C).

앞으로의 전망

핵의학 기법을 이용한 리포터 영상법은 앞으로 더 많은 발전이 기대되는 분야이다. 조직 특이 촉진자와 리포터 유전자의 융합기술은 유전자를 특정 조직에 선택적으로 발현시킬 수 있을 것이고, 유전자의 발현을 강화시킬 수 있는 방법들의 개발로 조직별로 선택적으로 발현된 리포터 유전자의 영상화가 가능해질 것이다. 유전자의 전사과정을 매개하는 여러 활성인자와 결합부위가 밝혀짐에 따라 세포 내의 다양한 신호 전달 체계를 영상화하는 것이 가능해질 것이고 특정 약물에 대한 세포의 반응을 생체 내에서 모니터 할 수 있을 것이다. 특정 mRNA의 염기 서열에 선택적으로 결합하는 antisense oligodeoxynucleotide 영상법은 PTM (pre-trans splicing molecule), 분리 리포터 유전자 등의 개발로 실제적인 영상화가 가능해질 것으로 기대된다. 유전자 전달 방법의 발달은 다양한 종류의 세포에 리포터 유전자를 전달하여 세포 추적 영상을 통하여 암, 면역질환 등의 영상화에 이용될 것으로 기대된다. 유전자 및 단백질 분리 및 재결합 기술의 발달은 세포 내 단백질들의 상호작용을 영상화할 수 있을 것이고, 신호 전달 체계의 이해를 넓히는데 이용될 것이다. 여러 유전자의 융합기술의 발달로 시험관 내의 미세 영상과 생명체 내의 영상을 하나의 융합 유전자가 발현하는 세포들로 수행하는 다용도 영상이 실현될 것이다. 이러한 새로운 영상법의 성공을 위해서는 위해서는 영상의학분야와 기초과학분야의 끊임없는 협조와 공동연구가 필요하다고 생각된다.

References

1. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;17:545-80.
2. Haberkorn U, Oberdorfer F, Gebert J, Morr I, Haack K, Weber K, et al. Monitoring gene therapy with cytosine deaminase: in vitro studies using tritiated-5-fluorocytosine. *J Nucl Med* 1996;37:87-94.
3. Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 1995;55:6126-32.
4. Gambhir SS, Herschman HR, Cherry SR, Barrio JR, Satyamurthy N, Toyokuni T, et al. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia* 2000;2:118-38.
5. Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *J Nucl Med* 2002;43:1072-83.
6. Jacobs A, Voges J, Reszka R, Lercher M, Gossmann A, Kracht L, et al. Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet* 2001;358:727-9.
7. Min JJ, Iyer M, Gambhir SS. Comparison of [¹⁸F]FHBG and [¹⁴C]FIAU for imaging of HSV1-tk reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:1547-60.
8. Gambhir SS, Bauer E, Black ME, Liang Q, Kokoris MS, Barrio JR, et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2785-90.
9. MacLaren DC, Gambhir SS, Satyamurthy N, Barrio JR, Sharfstein S, Toyokuni T, Wu L, Berk AJ, Cherry SR, Phelps ME, Herschman HR. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. *Gene Ther* 1999;6:785-91.
10. Liang Q, Satyamurthy N, Barrio JR, Toyokuni T, Phelps MP, Gambhir SS, et al. Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction. *Gene Ther* 2001;8:1490-8.
11. Zinn KR, Chaudhuri TR. The type 2 human somatostatin receptor as a platform for reporter gene imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:388-99.
12. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-200.
13. Min JJ, Chung JK, Lee YJ, Shin JH, Yeo JS, Jeong JM, et al. In vitro and in vivo characteristics of a human colon cancer cell line, SNU-C5N, expressing sodium-iodide symporter. *Nucl Med Biol* 2002;29:537-45.
14. Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hematol* 2001;29:1353-60.
15. Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps ME, et al. Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3030-5.
16. Dubey P, Su H, Adonai N, Du S, Rosato A, Braun J, et al. Quantitative imaging of the T cell antitumor response by positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1232-7.
17. Koehne G, Doubrovin M, Doubrovina E, Zanzonico P, Gallardo HF, Ivanova A, et al. Serial in vivo imaging of the targeted

- migration of human HSV-TK-transduced antigen-specific lymphocytes. *Nat Biotechnol* 2003;21:405-13.
18. Le LQ, Kabarowski JH, Wong S, Nguyen K, Gambhir SS, Witte ON. Positron emission tomography imaging analysis of G2A as a negative modifier of lymphoid leukemogenesis initiated by the BCR-ABL oncogene. *Cancer Cell* 2002;1:381-91.
 19. Wu JC, Chen IY, Sundaresan G, Min JJ, De A, Qiao JH, et al. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography. *Circulation* 2003;108:1302-5.
 20. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003;108:863-8.
 21. Min JJ, Gambhir SS. Gene therapy progress and prospects: noninvasive imaging of gene therapy in living subjects. *Gene Ther* 2004;11:115-25.
 22. Yu Y, Annala AJ, Barrio JR, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, et al. Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. *Nat Med* 2000;6:933-7.
 23. Chen IY, Wu JC, Min JJ, Sundaresan G, Lewis X, Liang Q, et al. Micro-positron emission tomography imaging of cardiac gene expression in rats using bicistronic adenoviral vector-mediated gene delivery. *Circulation* 2004;109:1415-20.
 24. Liang Q, Gotts J, Satyamurthy N, Barrio J, Phelps ME, Gambhir SS, et al. Noninvasive, repetitive, quantitative measurement of gene expression from a bicistronic message by positron emission tomography, following gene transfer with adenovirus. *Mol Ther* 2002;6:73-82.
 25. Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res* 2003;63:1160-5.
 26. Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* 2004;64:1323-30.
 27. Jacobs A, Dubrovin M, Hewett J, Sena-Esteves M, Tan CW, Slack M, et al. Functional coexpression of HSV-1 thymidine kinase and green fluorescent protein: implications for noninvasive imaging of transgene expression. *Neoplasia* 1999;1:154-61.
 28. Dubrovin M, Ponomarev V, Beresten T, Balatoni J, Bornmann W, Finn R, et al. Imaging transcriptional regulation of p53-dependent genes with positron emission tomography in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9300-5.
 29. Mayer-Kuckuk P, Banerjee D, Malhotra S, Dubrovin M, Iwamoto M, Akhurst T, et al. Cells exposed to antifolates show increased cellular levels of proteins fused to dihydrofolate reductase: a method to modulate gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3400-5.
 30. Jacobs A, Tjuvajev JG, Dubrovin M, Akhurst T, Balatoni J, Beattie B, et al. Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type I mutant vectors in vivo. *Cancer Res* 2001;61:2983-9.
 31. Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:164-73.
 32. Yaghoubi SS, Wu L, Liang Q, Toyokuni T, Barrio JR, Namavari M, et al. Direct correlation between positron emission tomographic images of two reporter genes delivered by two distinct adenoviral vectors. *Gene Ther* 2001;8:1072-80.
 33. Sun X, Annala AJ, Yaghoubi SS, Barrio JR, Nguyen KN, Toyokuni T, et al. Quantitative imaging of gene induction in living animals. *Gene Ther* 2001;8:1572-9.
 34. Green LA, Yap CS, Nguyen K, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, et al. Indirect monitoring of endogenous gene expression by positron emission tomography (PET) imaging of reporter gene expression in transgenic mice. *Mol Imaging Biol* 2002;4:71-81.
 35. Qiao J, Dubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, et al. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther* 2002;9:168-75.
 36. Iyer M, Wu L, Carey M, Wang Y, Smallwood A, Gambhir SS. Two-step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14595-14600.
 37. Zhang L, Adams JY, Billick E, Ilagan R, Iyer M, Le K, et al. Molecular engineering of a two-step transcription amplification (TSTA) system for transgene delivery in prostate cancer. *Mol Ther* 2002;5:223-32.
 38. Qiao J, Dubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, et al. Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. *Gene Ther* 2002;9:168-75.
 39. Adams JY, Johnson M, Sato M, Berger F, Gambhir SS, Carey M, et al. Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging. *Nat Med* 2002;8:891-7.
 40. Paulmurugan R, Umezawa Y, Gambhir SS. Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living subjects by using reporter protein complementation and reconstitution strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15608-13.
 41. Ray P, Pimenta H, Paulmurugan R, Berger F, Phelps ME, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive quantitative imaging of protein-protein interactions in living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3105-10.
 42. Paulmurugan R, Massoud TF, Huang J, Gambhir SS. Molecular imaging of drug-modulated protein-protein interactions in living subjects. *Cancer Res* 2004;64:2113-9.