

렌티바이러스와 아데노바이러스를 통하여 쥐의 중간엽줄기세포에 사람 나트륨/옥소 공동수송체 유전자를 전달하였을 때의 발현성능 비교

서울대학교 의과대학 핵의학교실¹, 의학연구원 방사선의학연구소³, 울산대학교 의과대학 미생물학교실²
박소연^{1,*} · 김성진^{2,*} · 이원우^{1,3} · 이희란² · 김현주¹ · 정준기^{1,3} · 김상은^{1,3}

Comparison of Human Sodium/Iodide Symporter (hNIS) Gene Expressions between Lentiviral and Adenoviral Vectors in Rat Mesenchymal Stem Cells

So Yeon Park^{1,*}, Sung Jin Kim^{2,*}, Won Woo Lee^{1,3}, Heuiran Lee²,
Hyun Joo Kim¹, June-Key Chung^{1,3}, and Sang Eun Kim^{1,3}

¹Department of Nuclear Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea;

²Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea;

³Institute of Radiation Medicine, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

*These authors equally contributed to this work.

Purpose: Quantitative comparison of transgene expression within stem cells between lentivirus and adenovirus-mediated delivery systems has not been reported. Here, we evaluated the human sodium iodide symporter (hNIS) gene expression in rat mesenchymal stem cell (rMSC) transduced by lentivirus or adenovirus, and compared the hNIS expression quantitatively between the two delivery systems. **Materials and Methods:** Lentiviral-mediated hNIS expressing rMSC (lenti-hNIS-rMSC) was constructed by cloning hNIS gene into pLenti6/Ubc/V5-DEST (Invitrogen) to obtain pLenti-hNIS, transducing rMSC with the pLenti-hNIS, and selecting with blasticidin for 3 weeks. Recombinant adenovirus expressing hNIS gene (Rad-hNIS) was produced by homologous recombination and transduction efficiency of Rad-hNIS into rMSC evaluated by Rad-GFP was 19.1±4.7%, 54.0±6.4%, 85.7±8.7%, and 98.4±1.3% at MOI 1, 5, 20, and 100, respectively. The hNIS expressions in lenti-hNIS-rMSC or adeno-hNIS-rMSC were assessed by immunocytochemistry, western blot, and I-125 uptake. **Results:** Immunocytochemistry and western blot analyses revealed that hNIS expressions in lenti-hNIS-rMSC were greater than those in adeno-hNIS-rMSC at MOI 20 but lower than at MOI 50. However in vitro I-125 uptake test demonstrated that iodide uptake in lenti-hNIS-rMSC (29,704±6,659 picomole/10⁶ cells) was greater than that in adeno-hNIS-rMSC at MOI 100 (6,168±2,134 picomole/10⁶ cells). **Conclusion:** Despite lower amount of expressed protein, hNIS function in rMSC was greater by lentivirus than by adenovirus mediated expression. Stem cell tracking using hNIS as a reporter gene should be conducted in consideration of relative vector efficiency for transgene expression. (Nucl Med Mol Imaging 2008;42(5):394-400)

Key Words: rat mesenchymal stem cell, lentivirus, adenovirus, human sodium iodide symporter

• Received: 2008. 5. 10. • Accepted: 2008. 6. 20.
• Address for reprints: Won Woo Lee M.D. (Associate Professor)
Department of Nuclear Medicine, Seoul National University
Bundang Hospital, 166 Gumi-ro, Bundang-gu, Seongnam
463-707, Korea
Tel: 82-31-787-7672, Fax: 82-31-787-4018
E-mail address: wwlee@snu.ac.kr

*This work was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) grant funded by the Korea government (MOST) (No. 2008-01386), by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) through the Tumor Immunity Medical Research Center (TIMRC) at Seoul National University College of Medicine, and by grant no. 02-2006-009 from the SNUBH Research Fund.

서 론

중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, 이하 MSC)는 다
중분화능을 가진 부착성 세포로써 골수, 제대혈, 지방 등 다양
한 조직으로부터 추출할 수 있으며 지방세포, 연골세포, 근육
세포, 조골세포 등의 세포로 분화할 수 있다.¹⁾ MSC를 이용한
세포치료는 이들 MSC의 분화능을 이용하여 골, 연골, 근육,
신경세포로 분화를 유도하여 조직 재생을 촉진하고자 하는 것
이며 이러한 목적으로 투여한 MSC가 손상된 조직에 전달되

있는지를 평가하는 줄기세포 추적(stem cell tracking)은 줄기 세포를 이용한 세포 치료에서 매우 중요한 역할을 하고 있다.^{2,3)}

줄기세포 추적을 위한 핵의학적인 방법 중의 하나는 리포터 유전자를 발현하도록 줄기세포를 유전자 조작하고 실험동물에 투여한 후 감마카메라로 영상을 얻는 것이다. 이때 사용할 수 있는 리포터 유전자중 하나가 인간 나트륨/요소 공동수송체(human sodium/iodide symporter, 이하 hNIS) 유전자이다.^{4,6)} hNIS는 원래 갑상선의 세포막에서 발현하여 요소의 섭취를 매개하는 단백질로서 리포터 유전자로 사용할 경우 세포가 I-123, I-124, I-131, Tc-99m를 섭취하도록 유도할 수 있으므로 임상에서 사용하는 감마카메라나 양전자단층촬영스캐너로 영상을 얻어서 줄기세포 추적에 적용할 수 있다.⁷⁻⁹⁾

MSC를 이용한 줄기세포 추적을 위하여 hNIS를 리포터 유전자로 사용하고자 할 때 벡터로서 가장 흔히 사용되는 바이러스는 렌티바이러스(lentivirus)와 아데노바이러스(adenovirus)이다. 레트로바이러스(retrovirus)의 일종인 렌티바이러스는 줄기세포의 유전체(genome)에 통합(integration)되어 오랜 기간 리포터 유전자가 발현하도록 할 수 있고 분열중인 세포와 정지기에 있는 세포 모두에서 유전자 발현을 유도할 수 있다.^{10,11)} 단점으로는 염색체에 통합된 리포터 유전자에 의한 숙주세포 돌연변이의 가능성이 있어서 안정성을 완전하게 담보할 수는 없으며 유전자 전달 효율이 상대적으로 낮다는 것이다. 이에 비하여 아데노바이러스는 리포터 유전자를 유전체에 통합시키지 않고 바이러스 자체로는 거의 독성이 없는 것으로 알려져 있으며 유전자 전달효율이 매우 높다.^{12,13)} 단점으로는 사람이나 실험동물에서 면역반응을 쉽게 유발하여 리포터 유전자의 발현 기간이 상대적으로 짧다.^{7,8)}

어떠한 질병모델에서도 널리 사용될 수 있는 범용의 바이러스 벡터가 없으므로¹⁴⁾ 특정 질병모델에는 특정 바이러스 벡터의 사용이 유용하다는 식의 맞춤형 바이러스 벡터의 개발이 필요하다. 리포터 유전자를 통한 줄기세포 추적을 위하여 사용할 가능한 바이러스 벡터 중에서 가장 널리 사용되는 바이러스 벡터가 렌티바이러스와 아데노바이러스이므로 이들의 유전자 전달 효율을 평가하는 것은 줄기세포 추적의 효율을 높이기 위해서 중요하나 이 둘을 정량적으로 비교한 연구는 보고되지 않았다.

이 연구에서는 리포터 유전자인 hNIS를 쥐의 중간엽줄기세포(rat mesenchymal stem cell, 이하 rMSC)에 전달하여 발현시키고자 할 때 렌티바이러스와 아데노바이러스의 유전자 전달효율을 정량적으로 비교 분석해 보았다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

rMSC는 흰쥐의 골수에서 확립한 것으로 서울대학교 암연구센터에서 제공 받아 사용하였다. 세포배양을 위해 McCoy's 5A(Sigma-Aldrich, USA) 변형배지에 18%의 말혈청(horse serum), 18%의 우태혈청(fetal bovine serum), 3.5 mg/L 하이드로코티손(Sigma-Aldrich, USA), 100mM Na-pyruvate (Invitrogen, USA), 1% MEM 비필수 아미노산 용액 (Invitrogen, USA), 2% MEM 아미노산 용액, MEM-비타민 용액(Invitrogen, USA), 200mM L-glutamin (Invitrogen, USA), 1%의 항생제(Invitrogen, USA), 2% NaHCO₃ (Invitrogen, USA)를 혼합하였고 T75 플라스크를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 항온 항습기에서 배양하였다.

2. 렌티바이러스를 이용한 hNIS발현 rMSC확립

hNIS 유전자를 Ubiquitin C 프로모터 조절을 받는 렌티바이러스 벡터인 pLenti6/Ubc/V5-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA)의 multicloning site에 삽입한 후에(pLenti-hNIS) lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 packing plasmid (gag, pol, vsv-g, rev) (Invitrogen, Carlsbad, CA)와 함께 293FT 세포에 감염시켰다. 감염 24시간 후에 성장 배지(DMEM containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin)로 같이 주었으며 48시간 후 원심 분리하고(3000rpm, 15분) 얻은 cell pellet을 -80°C에 보관 하였다. 렌티바이러스에서 hNIS 유전자가 기능하는 지를 확인하기 위하여 10 μ g/ml의 polybrene을 동시에 처리하여 HT1080 human fibrosarcoma 세포에 감염시킨 후 방사성 요소 섭취를 통해 확인 하였다. hNIS 유전자를 안정적으로 발현하는 rMSC를 확립하기 위하여 pLenti-hNIS를 rMSC에 감염시킨 24시간 후에 7.5 μ g/ml의 blasticidin을 3주 동안 처리하여 hNIS 유전자가 발현되는 rMSC를 선별하고 이를 lenti-hNIS-rMSC라 이름하였다.

3. hNIS발현 아데노바이러스

제조할 아데노바이러스 5형을 기반으로 E1유전자와 E3유전자가 제거되어 분열능력을 상실한 아데노바이러스 벡터에 Ohio대학의 Dr. Jhiang으로부터 제공받은 hNIS 플라스미드를 사용하여 homologous recombination방법으로 CMV 프로모터의 조절을 받는 hNIS발현 아데노바이러스를 제조하였다(Rad-hNIS).⁷⁾ Rad-hNIS의 rMSC에 대한 transduction efficiency는 hNIS대신에 녹색형광단백질(green fluorescent protein, 이하GFP) 유전자를 코딩한 Rad-GFP를 사용하여 형광현미경과 fluorescence-activated cell sorter (FACScan:

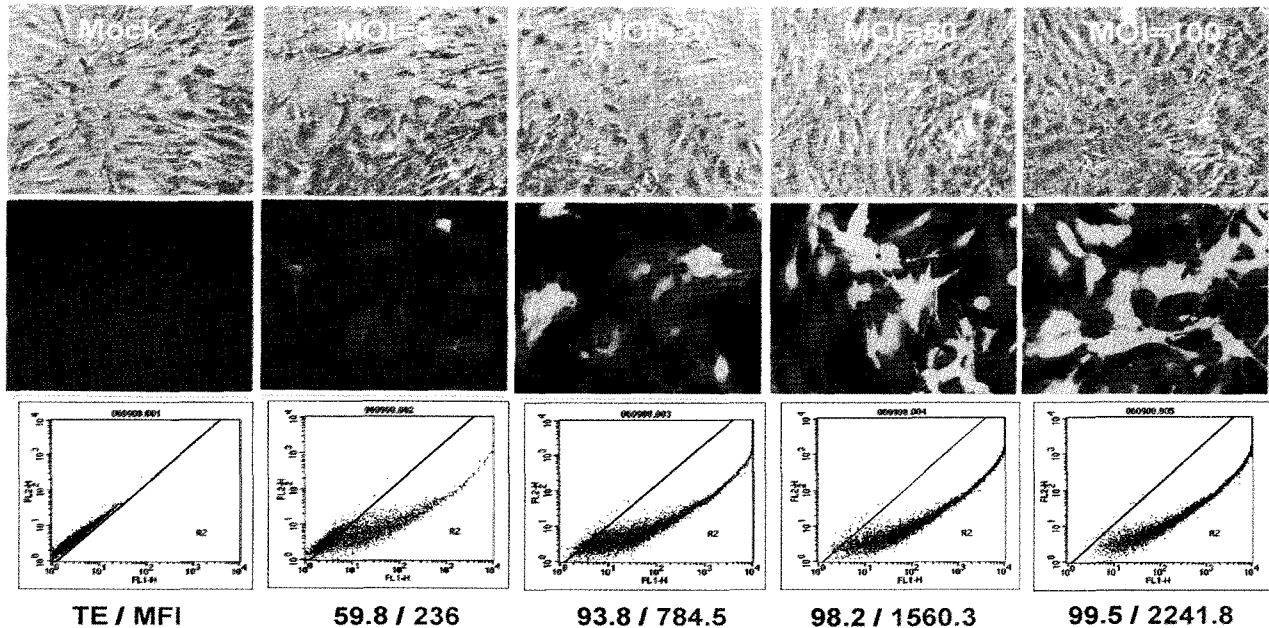


Figure 1. Transduction efficiency using Rad-GFP in rat MSC. Top row is light microscope images (x100), middle low fluorescence images (x200) and bottom row flow cytometry analysis. As MOI of Rad-GFP increased, green fluorescence signal was also found to be enhanced. (MOI=multiplicity of infection)

Becton-Dickinson)로 정량 분석하였다. rMSC에 Rad-GFP를 MOI 5, 20, 50, 100으로 달리하여 48시간 동안 transfection한 뒤 형광 현미경을 통해 세포를 관찰 하였을 때 Rad-GFP의 MOI가 증가 될수록 형광을 가진 세포들이 증가하고 형광의 세기 또한 증가함을 확인하였다(Fig. 1).

4. 면역세포화학(Immunocytochemistry)

Lenti-hNIS-rMSC 혹은 rMSC에 Rad-hNIS를 transfection시킨 후(adeno-hNIS-rMSC at MOI 5, 20, 50, 100) 48시간에 고정용액(4% paraformaldehyde, 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4)을 넣고 상온에서 30분간 고정하였다. 이후 PBS로 세척한 뒤에 2% bovine serum albumin이 첨가된 reagent에서 상온에서 60분간 blocking하였다. 이후에 mouse monoclonal anti-hNIS antibody (mAb-3564, 1:200) (Chemicon, USA)를 처리하고 다시 세척 후에 Cy3이 표지된 secondary anti-mouse antibody (1:1000) (The Jackson Laboratory, USA)를 반응시킨 후 세척하고 형광현미경으로 관찰하였다.

5. Western blot

6-well에 lenti-hNIS-rMSC 혹은 rMSC에 Rad-hNIS 를 transfection시킨 후(adeno-hNIS-rMSC at MOI 5, 20, 50,

100) 48시간에 세포들을 수거하였다. 이후 protease inhibitor (phenylmethylsulfonylfluoride, tosyl-lysylchloromethyl-ketone, and tosylphenylalanyl-chloromethane)가 포함된 lysis buffer (50 mmol/L N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N9-(2-ethanesulfonic acid), 0.15 mol/L NaCl, 0.5% Nonidet P-40)를 이용하여 단백질을 정제 하고 10% reduced sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 이후 polyvinylidene difluoride membrane filter에 transfer한 뒤 Tris-buffered saline Tween (TBST) buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20)에 5% nonfat dry milk를 녹여 상온에서 30분간 blocking 하였다. 그 다음 5% nonfat dry milk을 함유한 TBST에 mouse monoclonal anti-hNIS antibody (mAb-3564, 1:1,000; Chemicon, USA), actin monoclonal antibody (1:5,000; Sigma-Aldrich, USA)를 4°C에서 overnight 반응 하였다. TBST로 3번 세척한 다음 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:3,000)로 60분간 상온에서 반응하였다. 다시 TBST로 3번 세척한 다음 Pierce enhanced-chemiluminescence system (Amersham, IL)을 사용해 1분간 x-ray film에 노출하였다.

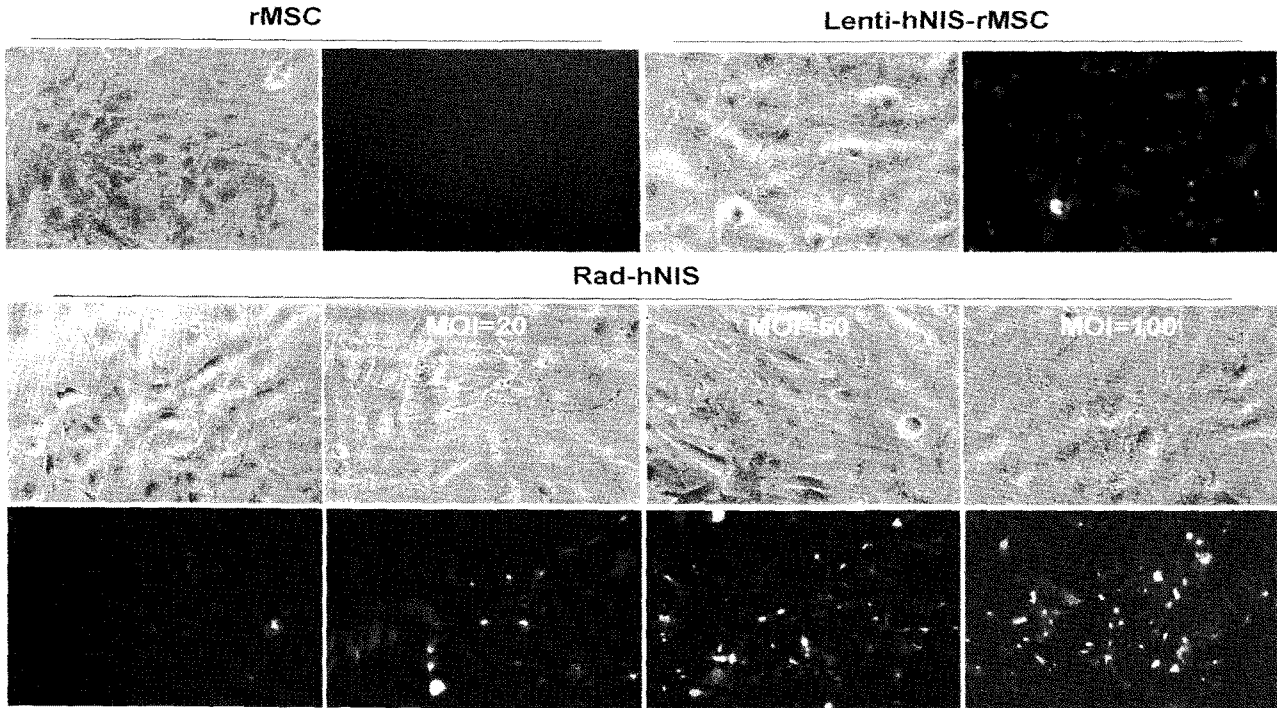


Figure 2. Immunocytochemistry. The intensity of hNIS immunoreactivity in lenti-hNIS-rMSC is greater than that in adenovirus-transduced-rMSC at MOI 20 but lower than at MOI 50 (X1000).

6. 방사성옥소 섭취율 검사

세포주에서 방사성옥소 섭취율은 Weiss 등¹⁵⁾에 의해 확립된 방법을 사용하였다. 비방사능이 20mCi/mmol이 되도록 Na[125]I와 NaI를 혼합한 용액을 만들고 lenti-hNIS-rMSC와 Rad-hNIS로 transfection시킨 rMSC (adeno-hNIS-rMSC)를 키우고 있는 well에 500 μ l를 투여하였다. 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 차가운 HBSS용액으로 두 번 씻어낸 후 trypsin을 처리하여 세포를 수거하였다. 감마카운터(1480 Wizard 3[™]; PerkinElmer)로 방사능을 측정하였다. hNIS 억제제인 NaClO₄(300 μ M)를 첨가하여 방사성옥소의 섭취가 억제되는지를 함께 평가하였다.

결 과

1. rMSC에서 렌티바이러스와 아데노바이러스의 hNIS 발현 비교: Immunocytochemistry

렌티바이러스를 통하여 hNIS를 안정적으로 발현하게 한 lenti-hNIS-rMSC에서 immunocytochemistry를 통하여 hNIS 발현을 평가하고 Rad-hNIS를 MOI 5, 20, 50, 100으로 달리하

여 48시간 동안 처리한 rMSC (adeno-hNIS-rMSC)에서 hNIS의 발현을 평가하여 비교해 보았다. 아데노바이러스의 MOI가 증가할수록 hNIS의 발현량이 증가하였고 lenti-hNIS-rMSC의 발현량은 Rad-hNIS를 MOI 20으로 처리한 경우보다는 높았고 MOI 50보다는 낮았다(Fig. 2).

2. rMSC에서 렌티바이러스와 아데노바이러스의 hNIS 발현 비교: Western blot

Rad-hNIS MOI 2에서도 hNIS 단백질이 발현하는 것을 확인할 수 있었으며(data not shown) MOI가 5, 20, 50, 100으로 증가함에 따라 hNIS 단백질의 발현양도 증가하였다. Lenti-hNIS-rMSC에서의 hNIS 발현은 Rad-hNIS MOI 20과 MOI 50의 중간으로 평가할 수 있었다(Fig. 3).

3. rMSC에서 렌티바이러스와 아데노바이러스의 hNIS 발현 비교: 방사성옥소 섭취율

Rad-hNIS의 MOI가 1, 5, 20, 50, 100으로 증가함에 따라 방사성옥소 섭취율도 219 ± 109 picomole/ 10^6 cells, 665 ± 281 picomole/ 10^6 cells, $2,221 \pm 663$ picomole/ 10^6 cells, $4,326 \pm 1,460$

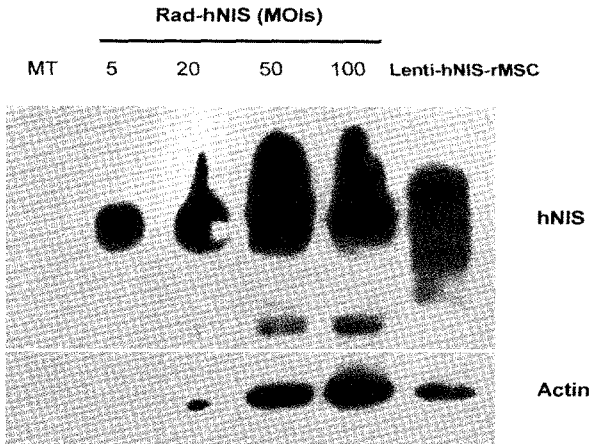


Figure 3. Western blot analysis. As MOIs of Rad-hNIS increased, the hNIS protein expressions also increased. The amount of hNIS expression in the lenti-hNIS-rMSC is more than that in Rad-hNIS MOI 20 but lower than MOI 50. (MT=mock treated)

picomole/10⁶ cells, 6,168±2,134 picomole/10⁶ cells로 증가하였다. Lenti-hNIS-rMSC의 방사성옥소 섭취율은 29,704±6,659 picomole/10⁶ cells으로서 Rad-hNIS MOI 100의 6,168±2,134 picomole/10⁶cells 보다 높았다. hNIS의 억제제인 NaClO₄를 사용하였을 때는 모든 실험에서 방사성옥소 섭취가 억제되었다 (Fig. 4).

고찰

이 연구에서 렌티바이러스와 아데노바이러스를 사용하여 rMSC에 hNIS를 발현하도록 하였을 때 렌티바이러스를 벡터로 사용한 경우 아데노바이러스의 경우보다 단백질의 발현량에 비하여 단백질의 기능은 더 우수함을 알 수 있었다. Lenti-hNIS-rMSC에서 발현하는 hNIS 단백질의 양은 Rad-hNIS를 MOI 20-30으로 rMSC에 감염시킨 48시간 후에 발현하는 단백질 양과 같았으나(Fig. 2, 3) 이때의 방사성옥소 섭취율은 Rad-hNIS MOI 100의 경우보다도 4배 이상 높았다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 rMSC의 줄기세포 추적을 위하여 hNIS유전자를 사용하고자 할 때 렌티바이러스를 벡터로 사용하는 것이 아데노바이러스를 사용하는 것보다 효율적임을 보여준다. 왜냐하면 같은 양의 hNIS 단백질을 발현하도록 유전자 조작한 조건에서 렌티바이러스는 같은 정도의 감마카메라 영상신호를 얻기 위하여 아데노바이러스보다는 적은 양의 방사성동위원소를 필요로 하여 in vivo 실험이나 사람에게 적용할 때 방사선에 의한 피폭량을 줄일 수 있는 장점이 있다. 또한 같은 양

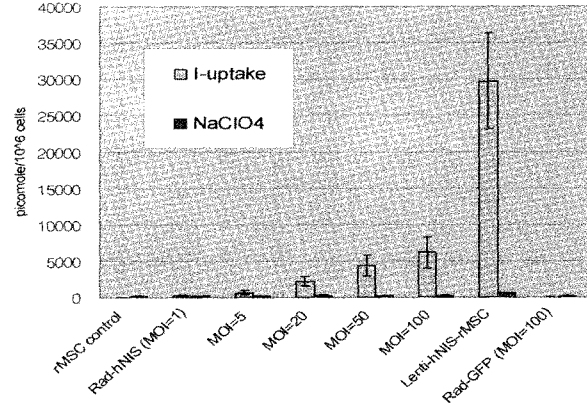


Figure 4. I-125 uptake experiment. Iodide uptake in lenti-hNIS-rMSC is greater than those in adenoviral-transduced-rMSC at each MOI. Concomitant administration of NaClO₄, the hNIS inhibitor, completely inhibits the I-125 uptake in all experiments. Each experiment was conducted in at least 3 times.

의 방사성동위원소를 사용한다면 더 높은 영상/배후 신호비를 얻을 수 있으므로 줄기세포 추적을 위한 영상분석의 정확도를 높일 수 있다. 아데노바이러스를 사용하여 렌티바이러스와 같은 정도의 영상 신호를 얻고자 할 때 같은 양의 hNIS 단백질 발현 조건에서 방사성동위원소의 양을 높이지 않는다면 방사성옥소 섭취율 기준으로 Rad-hNIS의 MOI를 400까지 증가시켜야 하므로(Fig. 4) 이 경우는 아데노바이러스 자체에 의한 줄기세포 독성을 피할 수 없을 것이다.¹⁶⁾

이 연구 결과의 분자생물학적인 기전은 다음과 같이 설명될 수 있을 것이다. 첫째, hNIS는 13개의 trans-membrane domain을 가진 당화단백질(glycosylated protein)로서 나트륨의 세포내로의 inward flux에 힘입어 옥소를 세포내로 섭취하도록 하는 통로 역할을 하고 있다.⁵⁾ 물질의 통로 역할을 하는 막 단백질이므로 단백질의 전체 양보다는 세포막에 분포하는 단백질의 양이 옥소 섭취에 더 중요한 역할을 할 것이다. 따라서 렌티바이러스를 통해 hNIS를 발현하도록 했을 때는 세포막에 존재하는 hNIS단백질의 양이 아데노바이러스의 경우보다 상대적으로 많았을 가능성이 있다. 이는 세포막에서 발현하는 hNIS 분획만을 따로 얻어서 hNIS단백질의 양을 분석하거나 confocal microscopy등으로 세포막과 세포질에 분포하는 hNIS단백질의 양을 구분하여 평가함으로써 규명될 수 있을 것이다.¹⁷⁾ 둘째, hNIS는 당화단백질이므로 glycosylation의 차이에 따라 단백질의 기능에 차이가 발생하였을 가능성도 고려해 보아야 한다. NIS의 glycosylation을 비특이적으로 억제하였을 때 NIS의 기능이 억제된다는 보고와 함께¹⁸⁾ NIS의 glycosyla-

tion위치에 특이적인 돌연변이를 유발하여도 NIS의 기능에 별 다른 영향이 없다는 보고가 함께 있어서¹⁹⁾ 이 부분은 더 연구가 필요하다. 그러나 렌티바이러스와 아데노바이러스라는 서로 다른 바이러스 벡터를 통하여 hNIS의 발현이 유도된 경우에 glycosylation정도가 차이가 나는지 또한 그러한 차이가 기능의 차이로 이어질 수 있는지는 분명하게 알려진 바가 없다. 이 연구의 western blot상에서 lenti-hNIS-rMSC에서는 glycosylation정도에 따라 band가 다양한 크기에 걸쳐서 나타났으나 (Fig. 3) 이러한 결과가 적은 단백질의 양에도 불구하고 기능이 우수한 결과를 설명할 수 있는지는 향후 연구가 뒤따라야 할 것이다. 셋째, 이 연구에서 렌티바이러스는 Ubiquitin C 프로모터의 조절을 받았고 아데노바이러스는 CMV 프로모터의 조절 하에 있었으므로 프로모터에 의한 유전자발현 차이도 고려해 보아야 한다. CMV 프로모터가 다양한 세포 주에서 transgene의 발현을 유도하지만 발현 기간이 짧은 문제가 있어서 우리 연구실에서는 더 오래도록 transgene의 발현을 가능하게 하는 프로모터에 대한 연구를 진행 중이다. 이 연구에 사용한 Ubiquitin C 프로모터는 줄기세포주와 암세포주에서 성공적으로 transgene발현을 유도할 수 있었고 렌티바이러스 벡터와 함께 상용화되어서(pLenti6/UbC/V5-DEST, Invitrogen, Carlsbad, CA) 사용하기에 편리하다. 반면에 아데노바이러스는 CMV 프로모터의 조절을 받는 transgene이 integration된 상태로 많은 양의 바이러스 particles들을 미리 준비해 놓고 실험에 사용할 수 있는 장점이 있다. Transgenic mouse를 확립할 때 Ubiquitin C 프로모터는 CMV 프로모터 보다 더 다양한 조직에서 transgene을 발현하도록 할 수 있으며²⁰⁾ CMV 프로모터에 의한 리포터 유전자 발현이 gene silencing에 의하여 수주 안에 억제 되는데 비하여^{21,22)} Ubiquitin C 프로모터는 수개월까지 유전자 발현을 가능하게 한다.^{23,24)} 그러나 이 연구에서처럼 같은 단백질의 양에도 불구하고 그 단백질의 기능이 더 우수한 것은 전사되는 mRNA의 질적/양적인 면을 고려하지 않고서는 설명하기 어렵고 이 부분은 추가 연구가 필요하다고 생각된다. 다만 CMV 프로모터에 의한 hNIS의 발현은 감염 후 48시간 이면 최대의 발현을 보이는 것으로 되어 있어서⁷⁾ 이 연구에서 Rad-hNIS 감염 후 48시간에 hNIS의 발현을 평가한 것은 CMV 프로모터가 최대로 기능하는 시점이므로 렌티바이러스의 Ubiquitin C 프로모터와 비교를 위한 적절한 시점을 선택하였다고 할 수 있다.

결론적으로 줄기세포 추적에 위하여 hNIS 유전자를 줄기세포에서 발현하도록 유전자 조작하는 경우에 hNIS 유전자 발현의 효율을 최적화할 수 있는 벡터를 사용하여야 할 것이며 이러한 점에 비추어 아데노바이러스 보다는 렌티바이러스

를 사용하는 것이 좀 더 효율적이라는 것을 알 수 있었다. 향후에는 그 기전을 밝히기 위한 추가 실험이 필요할 것으로 생각한다.

요 약

목적: 줄기 세포에서 렌티바이러스와 아데노바이러스를 이용해 유전자를 전달하였을 때 유전자 발현 정도를 정량적으로 비교하는 연구는 보고되지 않았다. 저자들은 쥐의 중간엽줄기세포(이하 rMSC)에 사람 나트륨/옥소 공동수송체(이하 hNIS) 유전자를 렌티바이러스와 아데노바이러스를 통하여 전달하고 발현 정도를 정량적으로 비교해 보았다. **대상 및 방법:** hNIS를 발현하는 rMSC (lenti-hNIS-rMSC)의 생산은 hNIS유전자를 렌티바이러스 벡터인 pLenti/UbC/V5-DEST (Invitrogen)에 클로닝하여 pLenti-hNIS를 얻은 후 rMSC에 감염시켜서 3주간 blasticidin으로 선별하였다. hNIS를 발현하는 재조합 아데노바이러스(Rad-hNIS)는 homologous recombination 방법에 의하여 생산하였으며 Rad-hNIS의 rMSC에 대한 transduction efficiency는 Rad-GFP를 사용하여 MOI 1, 5, 20, 그리고 100에서 평가하였고 그 결과는 각각 19.1±4.7%, 54.0±6.4%, 85.7±8.7%, 그리고 98.4±1.3%이었다. 두 바이러스 전달 시스템에서 hNIS의 발현정도를 immunocytochemistry, western blot 그리고 방사성옥소 섭취실험을 통해 평가하였다. **결과:** Immunocytochemistry와 western blot으로 hNIS 단백질의 양을 비교하였을 때 lenti-hNIS-rMSC에서 발현하는 hNIS 단백질의 양은 Rad-hNIS를 rMSC에 MOI 20으로 감염시킨 경우 보다는 많았으나 MOI 50 보다는 작았다. 그러나 방사성옥소 섭취실험에서 lenti-hNIS-rMSC (29,704±6,659 picomole/10⁶ cells)는 MOI 100의 Rad-hNIS를 rMSC에 감염시킨 경우(6,168±2,134 picomole/10⁶ cells) 보다도 높은 섭취율을 보였다. **결론:** 렌티바이러스를 통하여 hNIS를 rMSC에서 발현하도록 했을 때 아데노바이러스를 전달 벡터로 사용한 경우에 비하여 단백질 발현 양은 상대적으로 적었으나 hNIS의 기능은 더 우수하였다. hNIS를 리포터 유전자로 사용한 줄기세포추적용 벡터에 따른 유전자 발현효율의 차이를 고려하고 시행되어야 할 것으로 생각한다.

References

1. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25: 2896-902.
2. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S,

- Assmus B et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134-9.
3. Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, Chung JK, Lee MC, Lee DS. Tissue distribution of 18F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *J Nucl Med* 2006;47:1295-301.
 4. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458-60.
 5. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80:1083-105.
 6. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med* 2002;43:1188-200.
 7. Lee WW, Moon DH, Park SY, Jin J, Kim SJ, Lee H. Imaging of adenovirus-mediated expression of human sodium iodide symporter gene by ^{99m}TcO₄ scintigraphy in mice. *Nucl Med Biol* 2004;31:31-40.
 8. Yang HS, Lee H, Kim SJ, Lee WW, Yang YJ, Moon DH et al. Imaging of human sodium-iodide symporter gene expression mediated by recombinant adenovirus in skeletal muscle of living rats. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1304-11.
 9. Shah K, Jacobs A, Breakefield XO, Weissleder R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther* 2004;11:1175-87.
 10. Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-7.
 11. Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, Naldini L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:243-60.
 12. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000;81:2573-604.
 13. St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* 2003;10:1135-41.
 14. Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003;21:117-22.
 15. Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* 1984;114:1090-8.
 16. Lee WW, Lee B, Kim SJ, Jin J, Moon DH, Lee H. Kinetics of iodide uptake and efflux in various human thyroid cancer cells by expressing sodium iodide symporter gene via a recombinant adenovirus. *Oncol Rep* 2003;10:845-9.
 17. Mueckler M, Makepeace C. Transmembrane segment 6 of the Glut1 glucose transporter is an outer helix and contains amino acid side-chains essential for transport activity. *J Biol Chem* 2008;283:11550-5.
 18. Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity. *J Biol Chem* 1997;272:18245-9.
 19. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 1998;273:22657-63.
 20. Schorpp M, Jager R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H et al. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res* 1996;24:1787-8.
 21. Loser P, Jennings GS, Strauss M, Sandig V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol* 1998;72:180-90.
 22. Kim YH, Lee DS, Kang JH, Lee YJ, Chung JK, Roh JK et al. Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking. *J Nucl Med* 2005;46:305-11.
 23. Gill DR, Smyth SE, Goddard CA, Pringle IA, Higgins CF, Colledge WH et al. Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther* 2001;8:1539-46.
 24. Kim HJ, Jeon YH, Kang JH, Lee YJ, Kim KI, Chung HK et al. In Vivo Long-Term Imaging and Radioiodine Therapy by Sodium-Iodide Symporter Gene Expression Using a Lentiviral System Containing Ubiquitin C Promoter. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1130-1135.