

## 기관고유연구사업 조기 종료 결과 보고

결 재	과제책임자	과 장	부 장

※ 협조 :

- 사업단 소속 연구직의 경우 국가암관리사업단장
- 연구(의사직), 의사직, 의학물리학직의 경우 소속 센터장

본인이 수행한 2009 ~ 2010 년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	바이러스 담체를 이용한 안전하고 효율적인 간 특이적 유전자 전달 방법에 관한 연구
과제책임자 (소속, 성명)	간담체암 연구과 이 광 응
총연구비	114,000,000천원 ( 2009년: 60,000,000원, 2010년: 54,000,000원)
총연구기간	2009 년 1 월 1 일 ~ 2010 년 3 월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 조기 종료 결과보고서 1부

2010 년 3 월 31 일

과제책임자 이 광 응

## 작성요령

- 반드시 편집순서에 따라 작성하여야 함
- 전년도 연차실적을 포함하여 전체 사업기간에 대한 연구결과와 성과를 중심으로 기술함
- 필요한 경우 소제목을 설정하여 체계적인 형식을 갖추도록 함
- 요약문은 연구목표, 연구내용 및 방법, 연구성과 등을 중심으로 작성함
- 요약문중 중심단어(key words)는 5개 이내로 반드시 기재해야 함
- 번호나 기호를 사용한 보고서 형태로 작성하고 표나 그림을 이용할 수 있음. 단, 동 보고서와 함께 제출하는 전산파일에도 같은 표와 그림이 첨부되어 있어야 함
  
- 인쇄
  - A4용지에 본문 글자 크기는 10 point(표, 그림, 제목 제외)로 인쇄
  - 본 서식 중 좌상단의 편집순서 네모상자와 서식내 표로된 안내문 등 필요하지 않은 내용은 모두 제외
  - [편집순서 4 : 요약문(한글)]을 1페이지로 시작하여야 하며, [편집순서 3 : 목차]에는 정확한 페이지수를 기재하여야 함
  - 반드시 좌절을 하여야 함

# 기관고유연구사업 조기 종료 결과보고서

편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 0910300-2 )

바이러스 담체를 이용한 안전하고 효율적인 간특이적 유전자  
전달 방법에 관한 연구

Effective and Safe liver specific gene delivery method  
using virus vector

과제책임자 : 이 광 응

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

↑  
5cm

↓

바 이 러  
스 담  
체 를  
이 용  
한  
안 전  
하  
고  
효  
율  
적  
인  
특  
간  
이  
유  
전  
자  
달  
방  
법  
에  
관  
한  
연  
구

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 조기 종료 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑  
6cm  
↓

국  
립  
암  
센  
터

↑  
3cm

↓

## 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “ 바이러스 담체를 이용한 안전하고 효율적인  
간특이적 유전자 전달방법에 관한 연구 ” 과제의 최종보고서로 제출합  
니다.

2010. 3 . 31

국립암센터

과 제 책 임 자 : 이 광 응

연 구 원 : 신 광 속

## 목 차

### < 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약문 >

연구분야(코드)				과제번호	0910300-2
과제명	바이러스 담체를 이용한 안전하고 효율적인 간특이적 유전자 전달 방법 에 관한 연구				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2010년 3월 31일			114,000
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일			60,000
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 3월 31일			54,000
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일			
과제책임자	성명	이 광 응	주민등록번호		
	전화번호	031-920-1693	전자우편	kwleegs@korea.com	
색인단어	국문	유전자, 전달, 바이러스, 담체, 간			
	영문	gene, delivery, virus, vector, liver			
<p><b>◆ 연구목표</b></p> <p>&lt;최종목표&gt;</p> <p>본 연구의 최종 목표는 바이러스 담체를 이용한 in vivo 와 ex vivo 방법을 사용하여 간암 특이적인 RNAi system 의 안전하고 효율적인 유전자 전달방법을 개발하고자 함.</p>					
<p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <p>- 2009 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ GFP와 HSV-TK,luciferase gene을 포함하는 adenovirus와 lentivirus제작하였음 (이상진 박사님)</li> <li>○ hepatocyte cell line (Huh7, HCV subgenomic replicon cell, Hep3B, PLC/PRF5, SNU182, SNU387, SNU423, SNU449)에서 GFP이 발현 되는 아데노바이러스를 이용하여 간이식 조건 하에서의 gene delivery efficiency (GFP 발현도를 가지고 형광현미경 및 유세포 분석기를 통하여 확인하였음) 와 독성 확인 (propidium iodide 염색하여 확인)하였음</li> <li>○ conventional systemic delivery (꼬리 혈관에 주입)와 liver specific in vivo delivery (간문맥 혈관주입)를 비교하여 간이식 동물 모델에서의 적절한 이용조건을 확립하고자 하였음.</li> </ul> <p>- 2010 년도</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 간이식 동물 모델에서 ex vivo 방법을 이용한 저온 보존 상태의 간에서 유전자 전달 방법의 최적화 방안 및 적정 조건을 연구하고자 함.</li> <li>○ 사람 간 조직 및 사람 간조직으로부터 분리된 간 세포 내에서 바이러스 담체를 이용하여 간 특이적인 유전자 전달에 관한 효율성을 연구하고자 함</li> </ul>					



◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	0	
IF 합	0	
기타 성과	0	

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

1) 다양한 실험 기법의 확립

- ① 분자 수준의 변화를 확인하기 위한 다양한 gene (GFP, TK, luciferase etc)을 이용한 adenovirus와 lentivirus제작 가능함.
- ② in vivo imaging system (Xenogene; IVIS)의 활용 가능
- ③ 조직샘플을 이용한 Immunohistochemistry 등의 조직학적 연구 가능

2) rat을 이용한 간이식 동물 모델을 이용한 유전자 전달이 가능한 실험 가능

3) 동물 및 사람에서 유전자 수송의 모델 확립

- ① liver specific gene delivery animal model 확립
- ② human liver specific gene delivery model의 기초 확립

4) RNAi system을 이용한 치료제 개발을 위한 기술 축적

- => 간암 유발에 높은 원인인 HCV, HBV virus의 특이적인 siRNA 선정
- => gene delivery model에 적용
- => 간암 환자의 재발 방지 및 간암 치료제 개발 용이

- 간특이적인 체내 유전자 전달로 인한 전신 부작용 감소 및 효율성 증대효과

- 선천성 간대사 이상 환자들 대상으로 바이러스 담체 (lentivirus, adenovirus)를 이용하여 결핍된 효소의 유전자 삽입, 선천성 간대사 이상 치료 가능

- 허혈-재관류 손상 감소 가능

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	이상진, 신광숙, 김성훈, 박상재, 조성연, 김영규, 김석기
	주민등록번호	

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Effective and Safe liver specific gene delivery method using virus vector
<b>Key Words</b>	gene, delivery, adenovirus vector, liver
<b>Project Leader</b>	Lee, Kwang Woong
<b>Associated Company</b>	Absent

**BACKGROUND & PURPOSE:** *Ex vivo* gene delivery into explanted liver grafts represents an opportunity for gene therapy applications but must first be shown safe and effective. Although systemic adenoviral gene transfer has been effective, neutralizing antibody in the serum and viral toxicity limited potential use in clinical trials. To overcome these problems, we have investigated the feasibility of the liver specific delivery method into cold preserved liver grafts prior to transplant using adenovirus vector.

**METHODS:** We investigated the transfection efficiency of green fluorescent protein-expressing adenovirus serotype 5 (Ad5-GFP, 0.1~10 MOI) at cold temperature in vivo and in vitro. Primary hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines (PLCPRF5, HUH7, HEP3B, SNU 182,387, 423, 449, HCV replicon cell) were used for in vitro study. Cold HTK solution with Ad5-GFP was exposed to cold-incubated cells (Pre-cold group) or warm-incubated cells (Cold group) for 1 hour and re-warmed. Warm incubated cells with 1 hour of exposure of warm solution with Ad5-GFP were used as control (Warm group). GFP expression in the cells was analyzed by fluorescence microscopy and flow cytometry. Liver specific portal vein injection of cold HTK solution with Ad5-GFP was done for in vivo study. Sham group and systemic injection group via tail vein were compared. GFP expression in the liver was measured by Xenogen IVIS.

RESULTS: In the in vitro experiments, the most efficient GFP expression level was observed at 0.5 multiplicity of infection (MOI) and transfection efficiency was different between cell types. Transfection efficiency of Ad5-GFP in primary rat hepatocytes was lower than that of Ad5-GFP in HCC cell lines. However, there was no significant difference of cytotoxicity and infection efficiency by Ad5-GFP between Cold(or Pre-Cold) and Warm group. Liver specific in vivo delivery method by portal vein injection (PVI) showed effective imaging of GFP expression using Xenogen IVIS in comparison with conventional systemic delivery (tail vein injection) in animal model.

CONCLUSIONS: Preliminary data demonstrate that liver directed gene delivery into the cold preserved graft using adenoviral vector showed better outcome compared with conventional systemic delivery.

## 편집순서 6 : 연구결과

### 1. 연구의 최종목표

#### <최종목표>

본 연구의 최종 목표는 바이러스 담체를 이용한 in vivo 와 ex vivo 방법을 사용하여 간암 특이적인 RNAi system 의 안전하고 효율적인 유전자 전달방법을 개발하고자 함.

- 1) Green Fluorescent protein(GFP) 및 Herpes-simplex virus type-1 thymidine kinase (HSV-TK), luciferase gene 을 포함하는 adenovirus 와 lentivirus 제작
- 2) 간암세포주에서 gene delivery efficiency 와 독성 확인 (in vitro)
- 3) Conventional systemic delivery 와 liver specific in vivo delivery의 비교를 통한 적절한 조건 확립
- 4) 간이식 동물 모델에서 ex vivo 방법을 이용한 저온 보존 상태의 간에서 유전자 전달 방법의 최적화 방안 및 적정 조건을 연구하고자 함
- 5) 사람 간 조직 및 사람 간조직으로부터 분리된 간 세포 내에서 바이러스 담체를 이용하여 간 특이적인 유전자 전달에 관한 효율성을 연구하고자 함

### 2. 연구의 내용 및 결과

#### 2-1. 연구수행방법

##### <2009년도>

##### (1) adenovirus와 lentivirus제작

공동연구자인 비뇨생식기암 연구과의 이상진 박사에 의뢰하여 adenovirus serotype 5와 Lentivirus에 GFP와 luciferase, sr39TK를 발현하는 gene을 삽입하여 virus를 제작하였음.

##### (2) 간세포를 통한 유전자 전달효율 및 독성 연구

- 1) Hepatoma cellcarcinoma lines(HCC cell lines: Huh7, HCV subgenomic replicon cell, Hep3B, PLC/PRF5, SNU182, SNU387, SNU423, SNU449)에서 GFP가 발현되는 adenovirus (Ad5-GFP)를 이용하여 간이식 조건과 유사한 상황 (온도를 4도로 유지, 바이러스의 처리 시간을 1시간으로 조절하였음)에서의 효과를 알아보았음
  - ① hepatocyte cell line (Huh7, HCV subgenomic replicon cell, Hep3B, PLC/PRF5, SNU182, SNU387, SNU423, SNU449)을 24well에  $2 \times 10^5$  cell를 seeding하였음.
  - ② 16-18시간 후, Ad5-GFP 를 HTK 용액에 희석하여 농도별(multiplicity of infection (MOI) 는 0.1~10으로 사용하였음)로 다른 온도 (4℃, 37℃, precold 4℃)에 infection 한 후, 1, 2, 3days 에 GFP 발현율을 유세포 분석기 및 형광 현미경을 이용하여 측정하였음
  - ③ 세포 독성확인을 위해서는 위와 동일한 방법으로 실험하여 동일한 날짜에 세포를 PI로 염색하여 유세포 분석기 및 형광 현미경을 이용하여 관찰하였음

2) SD rat의 hepatocyte에서 1)과 동일한 실험 시행하였음

다음 단계에서 진행될 실험 동물모델에 Ad5-GFP의 유전자 전달 효과를 알아보기 위하여 진행하였음

① 쥐(200-250g, 7주령)의 간에서 간세포 분리 및 배양하였음

A. 간세포 분리 방법

(a) 쥐간의 간문맥에 catheter를 이용하여 circuit system을 연결함

(b) 용액 I (HEPES buffer +EDTA)을 간에 흘려 보냄

(이때, 유속은 25ml/min으로 5min 간 진행)

(c) 용액 II (HEPES+ CaCl<sub>2</sub>+ 0.05% Collagenase)를 간에 흘려 보냄

(이때, 유속은 20ml/min으로 5min으로 진행하되, 간의 형태를 보고 판단하여 조절)

(d) 쥐간을 적출하여 얼음이 담긴 dish에 놓고 Blade를 이용하여 간을 자름

(e) 이렇게 얻은 간에 PBS를 넣어 Gauze와 Nylon mesh (100μm)로 걸러줌

(f) 원심분리하여 간세포를 얻음 (50g, 1min)

(g) 배지를 첨가하여 trypan blue 로 cell viability를 측정함

B. 간세포 배양 방법

(a) collagen이 coating된 dish에 hepatozyme-SFM(Gibco) 배지를 넣어서 배양함

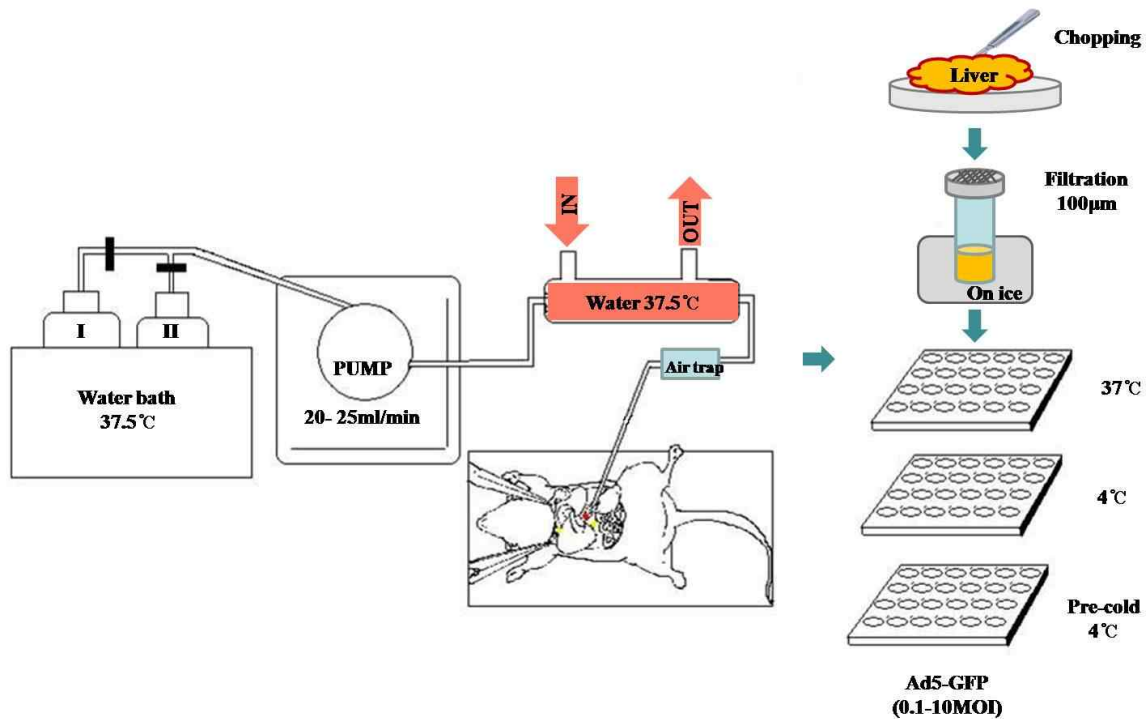


그림 1. 간세포를 통한 유전자 전달효율 및 독성 연구를 위한 실험 방법

(쥐에서 간세포의 분리 및 Ad5-GFP 처리 방법을 나타냄)

### (3) 생체 내 간에 효율적이고 안전한 유전자 전달 방법 연구

1) SD rat을 이용하여 3개의 군으로 나누어 실험을 진행하였음

① 꼬리 정맥을 통한 전신 주입군 (대조군)

② 간 특이적 유전자 전달군

A. 시술방법

(a) 개복 후 간의 유입혈류와 유출혈류를 차단한 후 대정맥을 일부 절개함.

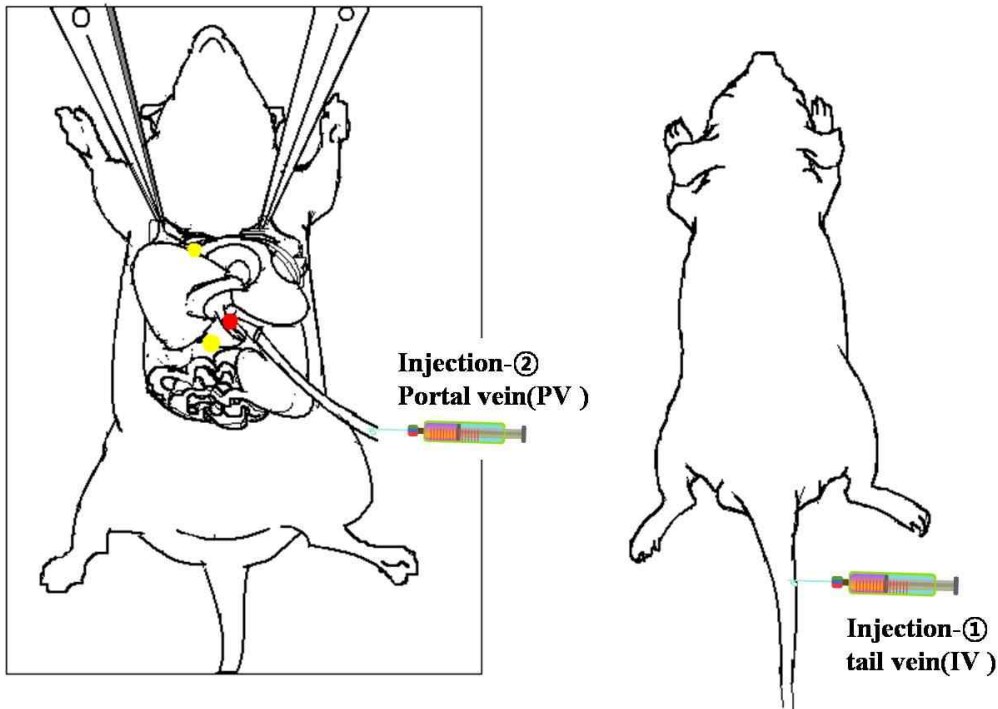
(b) 간문맥을 통해 생리식염수를 흘려보내 간 내부의 혈류를 제거함.

(c) Ad5-GFP가 들어있는 용액을 간문맥을 통해 흘려 간 내부를 채워줌 (15min)

(d) 15분이 지난 후 생리식염수로 간 내부를 씻어냄.

(e) 절개부위를 봉합 후 재관류 시킴.

③ Sham operation군 : B군과 똑같은 시술을 하되, virus를 사용하지 않음.



### 그림 2. 생체 내 간에 효율적이고 안전한 유전자 전달을 위한 실험 방법

2) 생체내 간의 유전자 전달 효율성 측정

1)의 시술 3일 경과 후, in vivo imaging (Xenogen IVIS)을 통하여 간 내의 GFP를 관찰하였음.

### (4) 냉동보존된 체외간에 대한 효율적인 gene delivery법 연구

1) SD rat에서 공여자 간의 구득 : 200-250g의 SD rat의 간에 heparinized cold normal saline 혹은 HTK용액을 간문맥을 통해 관류시킨 후 구득하여, 얼음위에 올려놓는다.

- 2) Ad5-GFP (GFP containing virus)가 들어있는 차가운 생리식염수를 간문맥을 통해 흘려 간 내부를 채운다. 30분이 경과하면, virus가 들어있지 않은 차가운 생리식염수로 조심스럽게 씻어낸다.
- 3) 수혜자가 될 같은 크기의 SD rat에서 자신의 간을 제거한 후 2)번의 공여자 간을 이식한다.
- 4) in vivo imaging system을 이용하여 3일 후에 virus vector의 transfection efficiency를 관찰한다. (xenogen IVIS를 이용)
- 5) In vivo imaging 측정 후, 간조직을 얻어서 조직학적으로 관찰한다.

(5) 사람의 간세포 및 조직에서 virus vector를 이용한 유전자 전달의 가능성 연구

- 1) 사람의 간조직 일부를 얻어, multicatheter를 이용한 two step collagenase법을 이용하여 간세포를 분리한다. 일차배양 시 배양액에 virus 감염시켜 infection efficiency를 본다.
- 2) 사람의 간조직 일부를 얻어 4°C의 HTK solution을 통과시켜 혈액을 제거한 후, GFP - virus vector가 들어있는 HTK solution을 통과시켜 1시간 가량 반응시킨다. 이후 1)번의 two step collagenase를 이용하여 간세포를 분리한다. 일차배양을 하여, GFP 발현 정도를 확인한다.

2-2. 연구수행 내용 및 결과

(1) adenovirus와 lentivirus제작

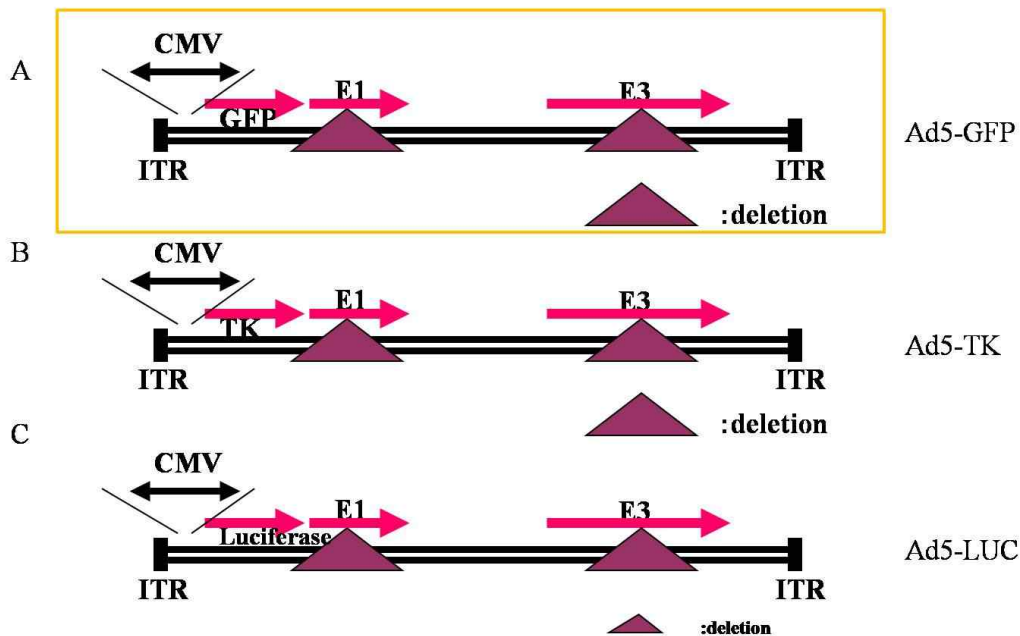


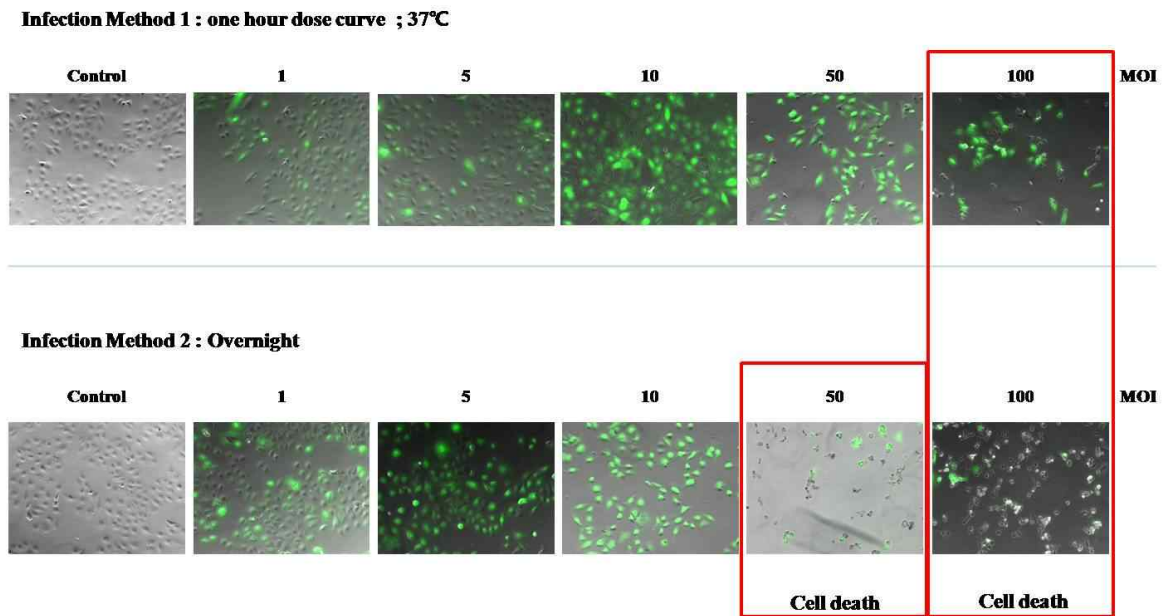
그림 3. 연구에 이용된 GFP (luciferase, TK)를 발현하는 바이러스 모식도

공동연구자인 비뇨생식기암 연구과의 이상진 박사에 의뢰하여 adenovirus serotype 5와 Lentivirus에 GFP와 luciferase, sr39TK를 발현하는 gene을 삽입하여 virus를 제작하였음.

**(2) 간세포를 통한 유전자 전달효율 및 독성 연구**

Ad5-GFP가 본 연구(간 이식 모델)에 유용한 유전자 전달체로 이용이 용이한가를 알아보기 위하여 바이러스의 농도 및 감염 시간과 온도를 조절하여 시행한 결과를 나타낸 것으로 형광현미경으로 관찰한 결과임.

감염방법 1기준 바이러스 infection 온도는 37도로 유지하고 처리 시간은 1시간으로 줄여서 시행한 것이며, 감염 방법 2는 기존 아데노 바이러스의 infection 조건을 참고하여 시행한 결과임(대조군) 위의 실험 결과 37도에서 1시간만 처리하여도 아데노 바이러스의 infection이 가능하며, 간암세포주에 사용이 가능한 농도는 1MOI부터이나, 10 MOI 이상에서는 세포 독성을 나타냄 (PI 염색-죽은 세포를 의미함)



**그림 4. Huh7 cell 에서의 Ad5-GFP의 감염율과 세포독성을 확인한 결과**  
(푸른색; Ad5-GFP, 붉은 색; PI)

따라서 다음 실험에서는 각 간암세포주에서의 농도별 효과를 확인해 보았음 아데노 바이러스의 사용 농도는 0.1-1MOI(0,0.1,0.5,1; 4가지 조건)로 시행하였으며, 37도에서 1시간 처리하였음.



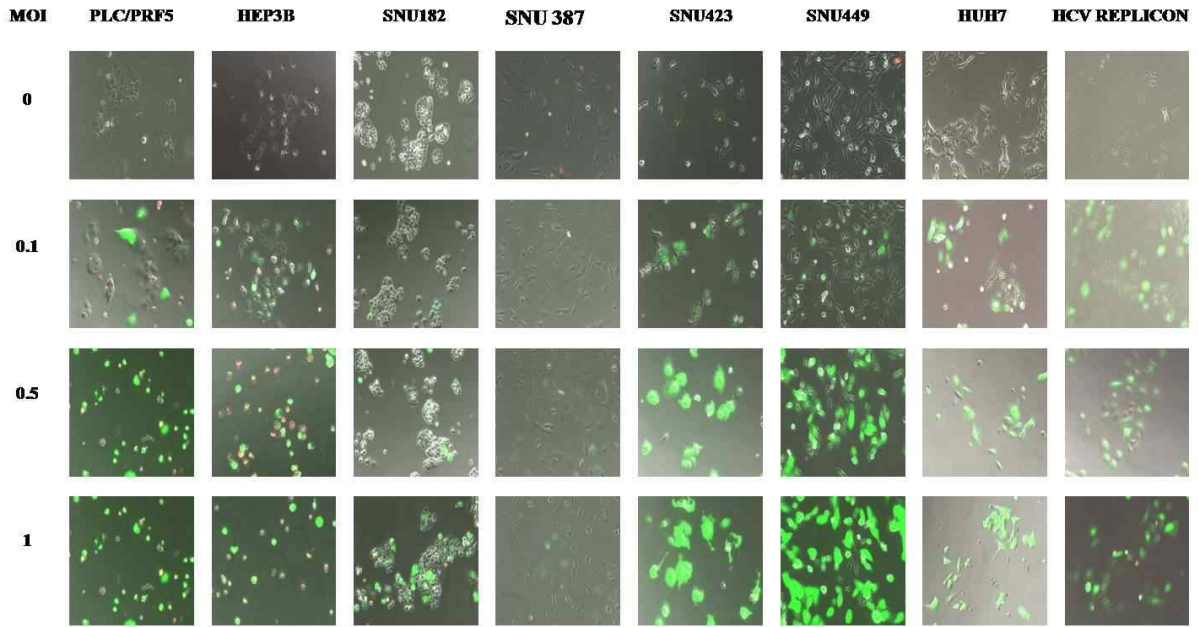


그림 5. 간암세포주에서 아데노 바이러스(Ad5-GFP)의 감염을 및 세포 독성

위 결과로 같은 조건 (37도에서 1시간 infection 시킴) 하에서 간암세포주 별로 다양한 infection efficiency를 가짐을 알수 있음. SNU182와 SNU387에서는 Ad5-GFP의 낮은 infection efficiency를 보였음. (형광현미경으로 관찰한 결과임)

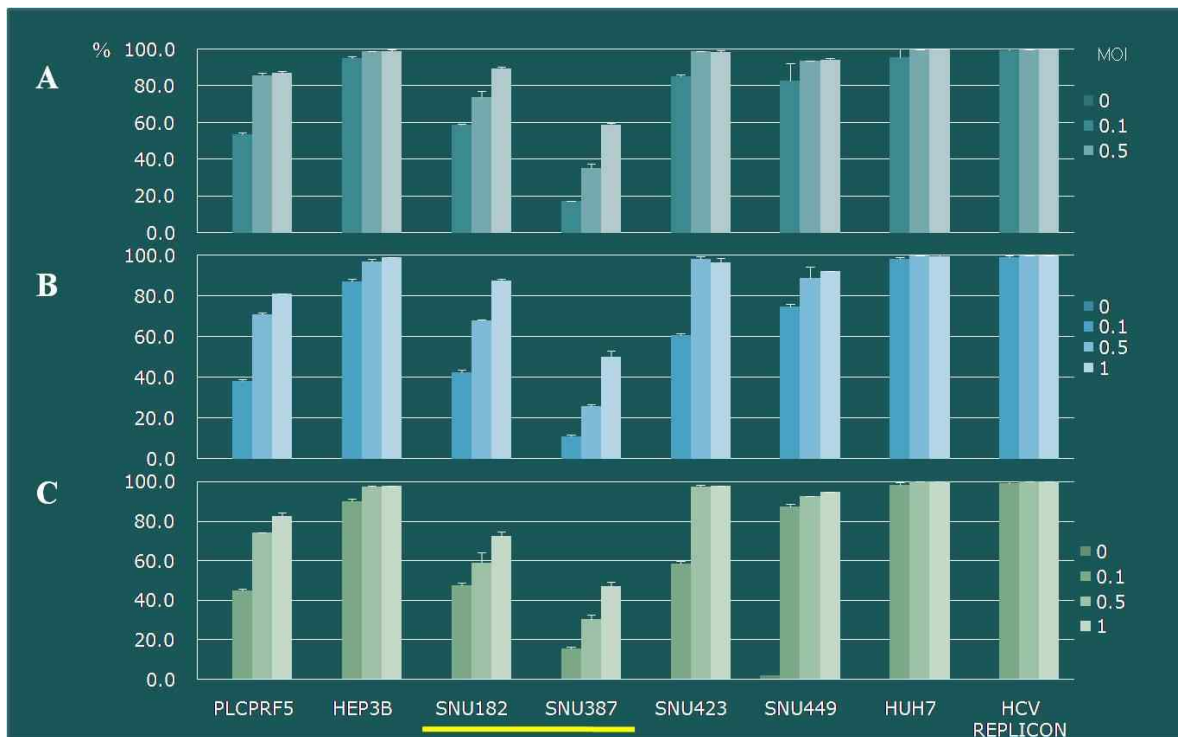
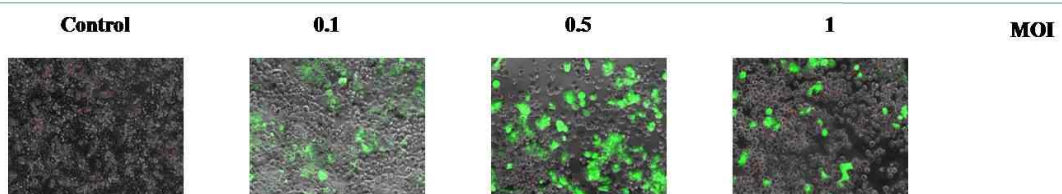


그림 6. 간암세포주에서의 아데노 바이러스(Ad5-GFP)의 감염율

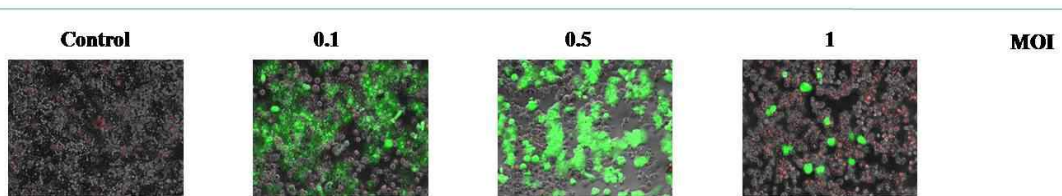
위 실험은 8개의 간암세포주 (PLC/PRF5, HEp3B, SNU182, SNU387, SNU449, huh7, HCV replicon cell)에서 아데노 바이러스의 농도별 (0, 0.1, 0.5, 1 MOI의 4군), 온도별 (A: 37도, B: 4도, C: pre cold 4도)로 나누어 아데노 바이러스의 감염율을 알아본 결과 임. 각 온도별 바이러스는 1시간 incubation한 후, 1XPBS로 세척한 후, 2일 후의 결과임. 아데노 바이러스의 농도별로 높은 감염율을 나타냈음. 낮은 아데노 바이러스 농도 (0.1MOI)에서 SNU 182, SNU387을 제외하고는 50% 이상 infection efficiency를 나타냈으며, 0.5-1MOI에서는 90% 이상의 높은 감염율을 확인하였음. 하지만 각각의 간암세포주별로 온도에 따른 결과를 확인한 결과, A, B, C의 도표에서 큰 차이는 나타나지 않았음. 즉, 8개의 간암세포주를 통한 유전자 전달 효율을 나타낸 실험에서 아데노 바이러스의 infection efficiency는 간암세포주에 따라 다른 양상을 나타냈으며, 농도별로 관찰한 결과 0.1MOI보다는 0.5-1MOI에서 높은 감염율을 나타냈음. 하지만 온도에 따른 큰 영향은 없었음.

우리는 다음 단계로 쥐간에서의 간세포를 분리하여 간암세포주에서 얻은 결과와 비교하였음. 쥐의 간세포(hepatocyte)를 분리하여 사용한 것은 간이식 모델로 쥐를 사용할 예정으로 쥐의 간이식 모델에 적합성 유무를 확인하기 위한 것임.

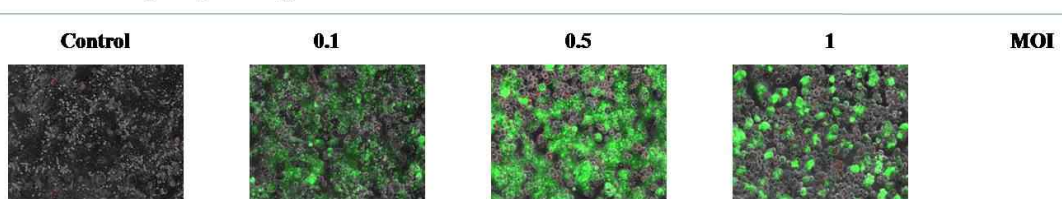
**1 : one hour dose curve ; 37°C**



**2 : one hour dose curve ; 4°C**



**3 : one hour dose curve ; 4°C-precooling for 1hr at 4°C**



**그림7. 쥐의 간세포에서의 Ad5-GFP의 온도별, 농도별 영향**

간암세포주와 유사하게 Ad5-GFP의 농도별로 infection efficiency가 증가하는 결과를 보였으나, 온도별 영향은 나타나지 않았음. 하지만 전체적인 Ad5-GFP의 감염율은 50% 내외로 SNU182와 SNU449간암세포주를 제외한 간암세포주보다 현저히 낮게 나타났음.

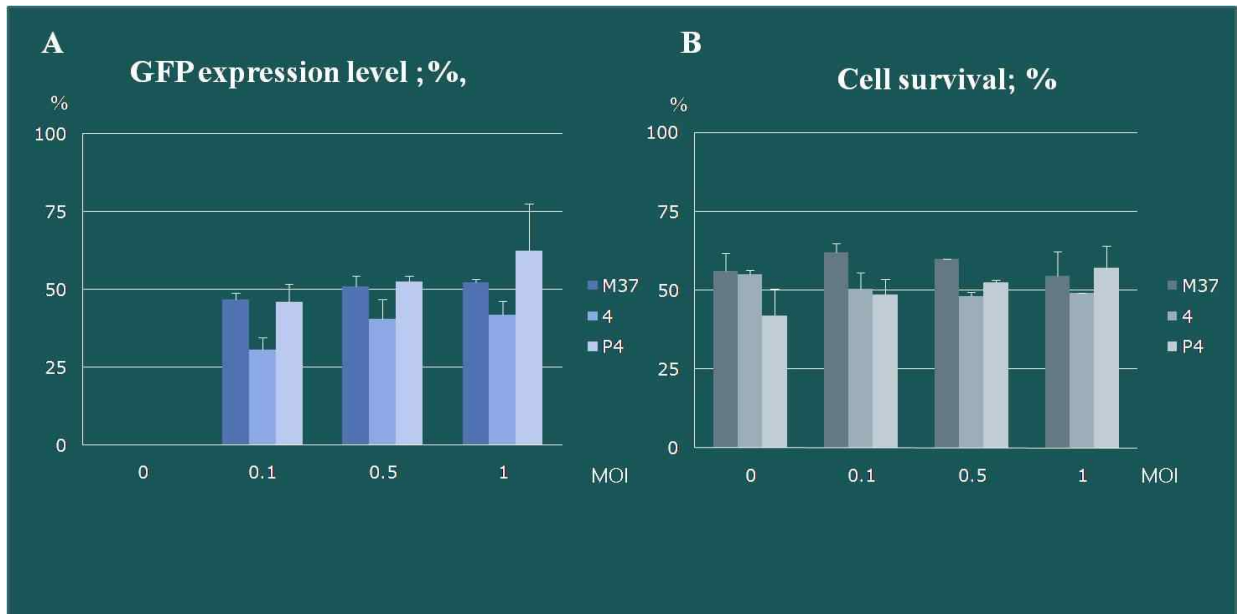


그림 8. 쥐 간에서 분리한 간세포에서 Ad5-GFP 감염율과 세포독성

위의 결과를 종합해 볼 때, 간세포를 통한 유전자 전달효율 및 독성 연구에서 아데노 바이러스는 쥐 간 이식 모델에서의 적용에 유용하리라 판단됨.

(3) 생체 내 간에 효율적이고 안전한 유전자 전달 방법 연구

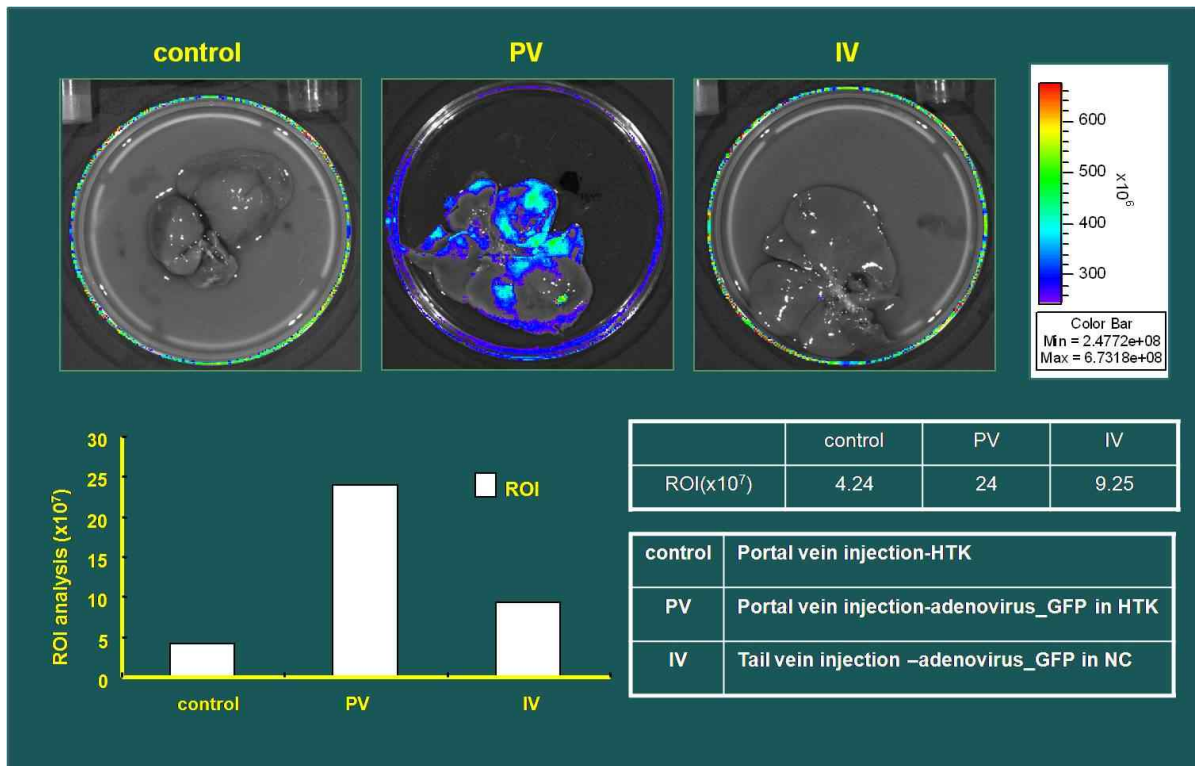
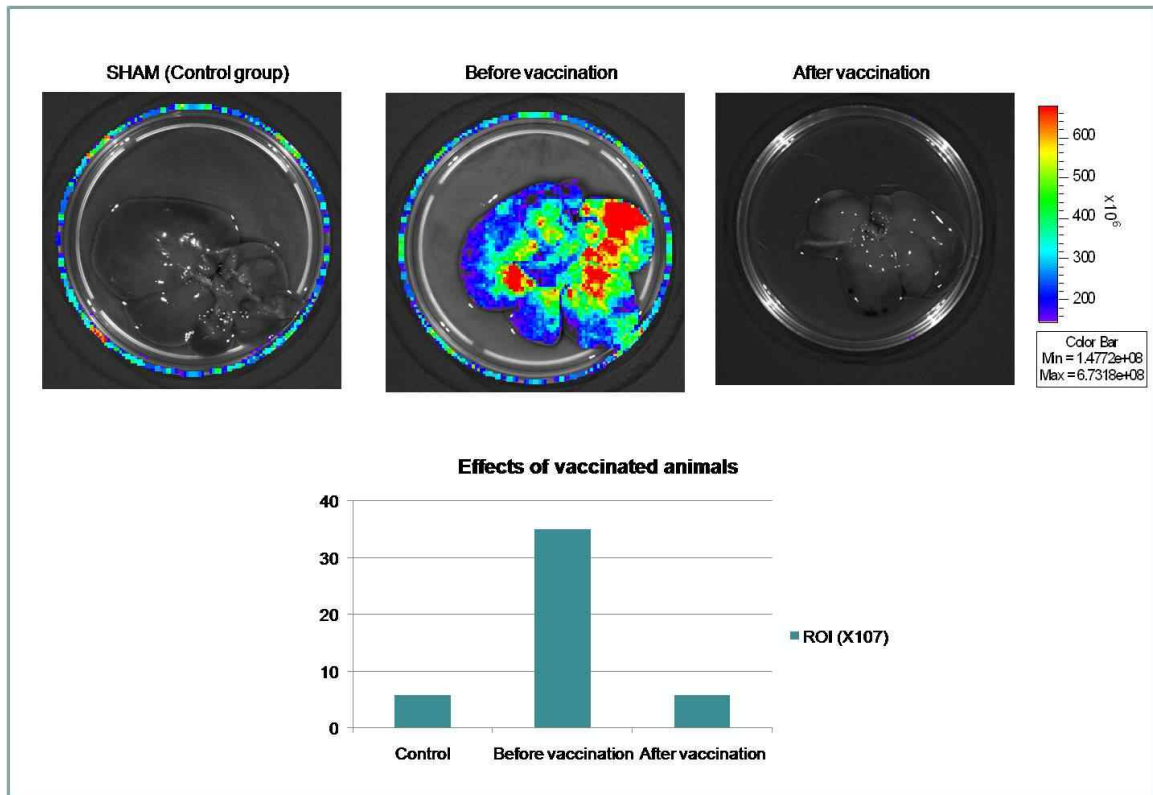


그림 9. Xenogen을 이용한 3가지 군에서의 Ad5-GFP의 발현도

(3가지 군: ① 꼬리 정맥을 통한 전신 주입군 (대조군), ② 간 특이적 유전자 전달군, ③ Sham operation군)

위의 결과에서 보듯, 기존에 사용하고 있는 gene delivery 방법보다 간문맥을 이용한 간에 직접 처리하는 것이 gene delivery에 더 효과적이라고 할 수 있음.



### 그림 10. Vaccination에 따른 Ad5-GFP의 발현도

위의 실험, adenovirus vector 처리 전에 4주령의 SD rat에 2회에 걸쳐 vaccination (ad5-wt type 을 2주 간격으로 주입, 2주 후 9-②와 동일한 실험을 시행) 후의 결과임. vaccination을 실행한 군에는 현저하게 Ad5-GFP의 발현이 억제 되어 나타남.

### (4) 냉동보존된 체외간에 대한 효율적인 gene delivery법 연구

쥐 간이식 모델을 구축하기 위한 수술기구 및 장비를 구축한 상태이며, 냉동보존된 체외간에서의 유전자 전달에 관한 실험은 연구 조기 종료로 인해 쥐 간이식 모델 구축 단계에서 종결되었음.



(5) 사람의 간세포 및 조직에서 virus vector를 이용한 유전자 전달의 가능성 연구

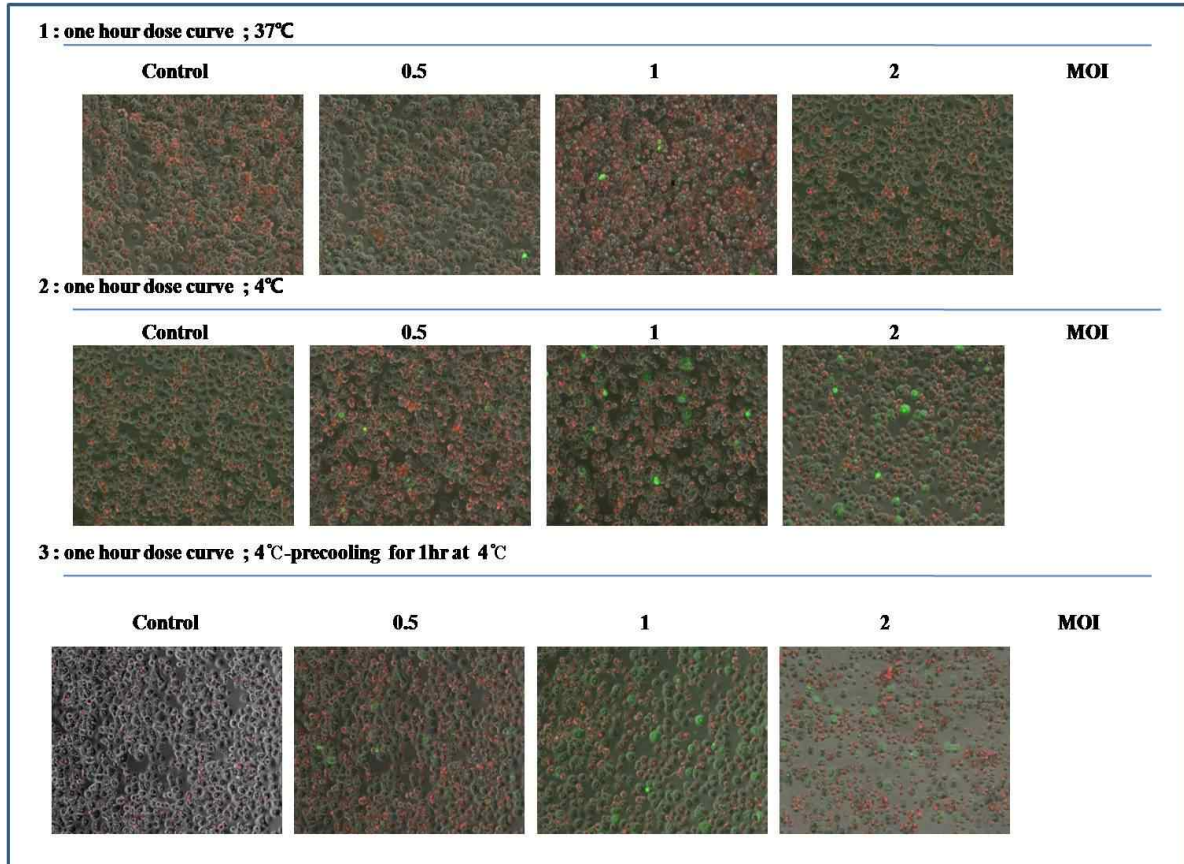


그림11. 사람의 간세포에서의 Ad5-GFP의 온도별, 농도별 영향

간암세포주와 유사하게 Ad5-GFP의 농도별로 infection efficiency가 증가하는 결과를 보였으나, 온도별 영향은 나타나지 않았음. 하지만 전체적인 Ad5-GFP의 감염율은 50% 내외로 쥐간세포와 간암세포주보다 현저히 낮게 나타났음.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

국내·외에서 plasmid 나 siRNA와 같은 유전자를 간과 같은 고형 장기에 주입하여, 여러 효과를 기대하는 유전자 치료에 관한 연구들이 최근 활발히 진행되고 있다. 특히 간절제 시 남은 간이나 간이식 시 이식편인 간에 RNA interference system을 주입하면, 암의 재발을 막거나, B형 또는 C형 바이러스 재감염을 막을 수 있고, 재관류 손상과 면역반응 등을 줄일 수 있는 연구가 진행되어 이를 이용한 유전자 치료제가 개발되고 있는 실정이다. 그러나 이러한 연구의 가장 큰 걸림돌은 효과적이고 안전한 유전자 전달 방법이 없다는 것이다. 동물 실험에서는 다량의 수액을 혈관에 주입하여 간세포막에 손상을 입히고, 동시에 유전자를 전달하는 hydrodynamic gene delivery가 현재 까지 가장 효율적인 방법의 하나로 여겨지고 있으나, 임상에 직접 적용하기에는 위험성이 따르는 문제가 있다. 한편, 아데노바이러스와 같은 담체(vector)를 이용하거나 liposome을 이용하여 전신에 주입하면, 원하지 않는 효과가 나타나거나, 면역체계를 증강시키는 등 여러 부작용이 나타날

수 있다. 따라서 (그림 9)의 실험 결과는 앞서 말한 전신적인 주입 방법인 (hydrodynamic gene delivery)을 보완하여, 전신적인 효과를 원하는 경우가 아니라면, 특정 부분(간 등)에 국한된 유전자 전달방법으로 이러한 문제점을 효과적으로 보완할 수 있다는 것을 시사한다.

또한 간이식 상태 (4℃ 상태)에서의 유전자 전달에 관한 연구는 새로운 유전자 전달 방법으로 본 실험실에서의 (그림 5, 6, 7, 11)의 실험 결과는 간 세포주, 쥐의 간세포 (쥐), 사람의 간세포에서 바이러스 담체의 온도에 따른 효율성의 차이를 보여주지 않으므로, 저온 상태에서의 바이러스 담체를 이용한 전달 방법의 효율성을 시사한다.

따라서 지금까지의 연구 결과, 바이러스 담체를 이용한 in vivo 와 ex vivo 방법을 이용한 유전자 전달 방법은 간암 특이적인 RNAi system와 호환하여 안전하고 효율적인 유전자 전달방법 개발에 유용하게 활용할 수 있다고 판단된다.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

###### 가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Phase II Study of Irinotecan Plus Cisplatin Induction Followed by Concurrent Twice-Daily Thoracic Irradiation With Etoposide Plus Cisplatin Chemotherapy for Limited-Disease Small-Cell Lung Cancer	O O O (교신)	Journal of Clinical Oncology (10.864)	2005; 23(15):3488-94	국외 SCI	0210140
Gefitinib is of more benefit in chemotherapy-naïve patients with good performance status and adenocarcinoma histology: Retrospective analysis of 575 Korean patients	O O O (공동)	Lung Cancer (3.172)	2006; 53(3):339-45	국외 SCI	없음

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

###### 나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

###### 다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
in vivo와 in vitro 상태의 간에서 바이러스 담체를 이용하여 효율적이고 안전한 간 특이적인 유전자 전달 방법 확립	1차년도	○ GFP와 TK, luminescence gene을 포함한 adenovirus와 lentivirus 확보	100	50
		○ hepatocyte cell line에서 gene delivery efficiency 와 독성 확인		
		○ 생체 내 간에 효율적이고 안전한 유전자 전달 방법 확립		
2차년도	○ 냉동 보존된 생체 외 간에 대한 유전자 전달 시 효율성과 독성확인	쥐 간이식 모델을 구축하기 위한 수술기구 및 장비를 구축한 상태이며, 냉동보존된 체외간에서의 유전자 전달에 관한 실험은 연구 초기 종료로 인해 쥐 간이식 모델 구축	50	25

		○ 사람의 간세포 혹은 간조직에 virus vector를 이용한 유전자 전달의 가능성 연구	단계에서 종결되었음.  human에서 hepatocyte cell을 분리하여 adenovirus의 gene delivery efficiency 및 독성 실험을 진행하였으며, 연구 조기 종료로 인하여 실험 종료함.		
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
1. 실험에 이용한 아데노와 렌티 바이러스 및 간암세포주가 확보되었는가의 유무	본 연구에 이용할 gene delivery system인 adenovirus와 lentivirus는 공동연구자인 이상진 박사로부터 확보하여 실험에 적용하고 있음. 실험에 사용하고 있는 간암세포주는 모두 사람에게 유래된 것으로, 흑인, 동양인 (아시아계) 등 다양한 인종으로부터 유래된 균이며, 특히 HCV replicon cell의 경우는 C형 바이러스가 감염된 세포주로 앞으로의 HCV 관련 연구에 도움이 되리라 판단됨. (간암세포주는 ACTT 와 Apath LLC로부터 얻음)
2. liver specific gene delivery method를 적용하기 위한 동물 모델을 확보하였는가의 유무	간이식시에 유용한 유전자 전달 방법을 연구하고자 시행한 본 실험은 기존에 사용되는 hydrodynamic이나 IV 주입을 통한 유전자 전달의 낮은 효율 및 안정성의 문제점을 보완하기에 유용하리라 판단되며, 간이식 동물 모델을 통하여 사람에게 유용한 liver specific gene을 삽입하여 유전자 치료에 적극 활용이 가능하리라 판단 됨.
3. human 에서의 hepatocyte cell 분리 정제 유무	2차년도 연구에서 진행할 사람 간조직에서의 간세포 분리는 HCC 환자를 위한 gene therapy와 관련된 연구에 유용하리라 판단됨.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과



구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

## (2) 연구성과의 활용계획

### -> 간 특이적인 체내 유전자 전달(liver directed in vivo gene delivery)

; 전신 투여에 비해 전신 부작용을 줄이고, 그 효율성을 높힐 수 있음.

- 1) 활동성 B형 및 C형 간염 시, virus에 대한 shRNA를 간세포 내로 전달함으로써 그 역가를 낮추거나 다른 약제와 병합하여, 음성으로 전환할 수도 있음.
- 2) 선천성 간대사 이상 환자들에게 lentivirus에 결합된 효소의 유전자를 넣어 간에 넣어줌으로써, 선천성 간대사 이상을 치료할 수 있음.
- 3) 간내에 존재하는 간암의 치료법의 일환으로 사용될 수 있음.

### -> 체외 유전자 전달 (ex vivo gene delivery)

- 1) HCV siRNA를 이용하여, 현재 치료법이 없어 거의 모든 경우에서 재발하고, 다른 원인질환보다 이식 후 성적이 나쁜 간이식 후 C형 간염의 재발을 억제하거나 방지할 수 있음. (ex vivo vaccination)
- 2) 작은 이식편을 이식함으로써 발생할 수 있는 small for size syndrom을 예방할 수 있는 gene을 delivery하면, 작은 이식편을 사용하더라도 성적을 높힐 수 있음.
- 3) 오랫동안 장기보존액에 보존되어있는 경우 ex vivo gene delivery를 통해 허혈-재관류 손상을 줄일 수 있음.

따라서 위의 연구를 이용한 임상에서의 활용을 위해 쥐의 간이식 모델 및 사람 간조직에서의 효율성에 관한 연구는 반드시 필요한 실정이다.

## 6. 참고문헌

1. An Adenovirus vector for efficient RNA interference-mediated suppression of target genes in Insulinoma cells and pancreatic islets of langerhans. *Diabetes*. 2004 5, 2190-2194
2. Advances in microRNAs: Implications for gene therapists. *Human gene therapy*. 2008 19, 27-37
3. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Advanced drug delivery review* 2007 59, 1263-1276
4. Small interfering RNA Targeted to hepatitis C virus 5'-nontranslated region exerts potent antiviral effect. 2007 81, 669-676
5. Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology* 2007 45, 1413-1421
6. A three-phase algorithm for computer aided siRNA design. *informatica*. 2006 30, 357-364
7. Genetic heterogeneity and efficiency of two different methods of adenovirus-mediated gene transfer in a rat liver transplantation model. *Sug today*. 2006 36,367-375
8. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver specific microRNA. *Science* 2005 309 1577-1580
9. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *Journal of virology* 2005 79, 7050-7058
10. Gene Therapy: Current Status and Prospects. *Biochemistry and molecular biology news*. 2005
11. Knocking down human disease: potential uses of RNA interference in research and gene therapy. *Pediatric research*. 2004 55, 912-913
12. Current status and prospects for gene therapy. *Vox Sanguinis* 2004 87, 73 - 81
13. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line huh7. *Journal of virology* 2003 77, 810-812
14. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*. 1997 277:570-574.
15. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999 285:110-113.
16. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology*. 2000 271:197-204.

## 7. 첨부서류

- 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함