

**혈관 신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의  
유전자 치료 기술 개발**

Development of angiogenic gene therapy for  
ischemic cardiovascular diseases

성균관대학교

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “혈관 신생 축진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술 개발  
과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 8. 20.

주관연구기관명 : 성균관대학교

주관연구책임자 : 김 덕 경

연 구 원 : 변 종 회  
" : 최 진 호  
" : 서 원 희  
" : 장 형 석  
" : 김 경 리  
" : 이 재 영  
" : 신 인 순  
" : 이 정 선  
" : 장 신 이  
" : 김 정 민

## 보고서 초록

과제관리번호	M1-0203-00-0048	해당단계 연구기간	2002.6.25. ~ 2004.6.24.	단계 구분	(1단계) / (총2단계)
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실 사업			
	세부사업명	국가지정연구실 사업			
연구과제명	중 과제명	혈관신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술 개발			
	세부(단위)과제명	혈관신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술 개발			
연구책임자	김 덕 경	해당단계 참여연구원수	총 : 12 명 내부 : 6 명 외부 : 6 명	해당단계 연구비	정부: 520,000 천원 기업:            천원 계: 520,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
47					
<p>본 연구실은 동맥 수준 (artery)의 새로운 혈관을 만들고자 1) 혈관신생 유전자의 복합적인 투여 기술 개발과, 2) 최근 혈관신생에 관여한다고 알려진 혈관내피전구세포 (endothelial progenitor cell; EPC)의 특성 연구를 통하여 "혈관신생 치료법 (therapeutic angiogenesis)"이 아닌 "동맥신생 치료법 (therapeutic arteriogenesis)"을 개발하고자 하였다.</p> <p>지난 2년간의 연구를 통하여 대표적으로</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 혈관신생에 관여하는 전사인자인 Egr-1을 이용하여 복합적인 혈관신생유전자들을 과발현시켜 혈관신생을 유도함으로써 하지 허혈을 감소시킬 수 있음을 증명하였고</li> <li>2) 다양한 혈관신생유전자들의 혈관신생능 (angiogenic potential)을 테스트할 수 있는 간편하고 효율적인 angiogenesis assay법을 개발하였으며</li> <li>3) 허혈에 의하여 유전자 발현이 turn-on/off 되는 hypoxia-inducible vector를 제조하였고</li> <li>4) EPC의 배양법과 기능 분석법을 확립하여 만성신부전 환자에서 EPC의 수 감소와 혈관형성능이 저하되었음을 보고하였고</li> <li>5) 동맥경화 유발 물질인 C-reactive protein (CRP)에 의하여 EPC의 혈관형성능 및 동맥형성능이 감소함을 증명하였다.</li> </ol> <p>1단계 연구기간동안 총 9 편의 논문이 완성되었고, 출판기준으로 전체 SCI IF는 18.1 이다. 그밖에 1건의 산업화를 위한 임상시험 실적, 17 건의 국내외 학회발표, 다양한 공공기능 수행 실적 등이 있다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	허혈, 심혈관 질환, 혈관 신생, 유전자 치료, 병합요법, 혈관내피전구세포, 동맥형성			
	영 어	ischemia, cardiovascular diseases, angiogenesis, gene therapy, combined therapy, endothelial progenitor cell, arteriogenesis			

## 요 약 문

### I. 제 목

혈관신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

동맥경화로 인한 허혈성 심혈관 질환은 심근 경색증, 뇌경색, 급성 사지 허혈과 같이 생사를 결정하거나 사지를 절단 하여야하는 심각한 질환으로서 성인 사망률의 1위를 차지하며, 국내에서도 생활양식의 서구화로 인하여 발병인구가 점차 증가하고 있다. 또한 사회, 경제적으로도 21세기 세계적 질병 부담률 1위를 차지하는 노화의 필수현상이다. 동맥경화는 비가역적이므로 완치가 불가능하며, 기존의 허혈성 심혈관 질환의 치료법인 약물치료, 수술치료 등에 반응하지 않거나 실패한 경우, 더 이상의 치료법이 없이 환자는 사망에 이르게 되어 소위 “no option patient”를 위한 새로운 치료전략이 필요하다.

최근 혈관신생 (angiogenesis)의 기전이 밝혀짐에 따라 허혈 부위에 혈관신생인자 (angiogenic factor)의 유전자를 투여하여 혈관이 자라나게 함으로써 측부혈류 (collateral circulation)를 증가시켜 허혈성 심혈관질환을 치료하고자 하는 새로운 시도가 이루어지는데 이를 “혈관신생 유전자치료법 (血管新生 遺傳子治療法; therapeutic angiogenic gene therapy)이라 한다.

혈관신생에 의한 허혈의 감소는 만들어지는 동맥의 크기가 클수록 비례하게 되는데 현재의 단일 혈관신생인자를 투여하는 기술로는 모세혈관, 또는 세동맥 수준의 작은 혈관이 만들어지는데 지나지 않아 치료효과가 경미하다. 이를 극복하기 위하여 본 연구실은 다양한 서로 다른 기전의 혈관신생인자들을 복합적으로 투여하여 소동맥 보다 큰 동맥의 형성 (arteriogenesis)을 촉진시키는 유전자 치료법을 개발하고자 한다. 본 연구실은 지난 5년간 “혈관신생 유전자치료법”을 환자 치료에 도입하고자 연구를 지속하여, 2001년 6월부터 심한 하지 허혈성 질환 환자를 대상으로 VEGF 유전자치료 임상시험을 국내 최초로 수행 중인 바, 혈관신생관련 연구를 수행하기에 좋은 여건을 갖고 있다. 본 연구는 최근 급속도로 발전하고 있는 혈관신생의 분자생물학적인 기초연구를 임상 치료에 접목시키는 중간 단계의 “Translational Research”로서 허혈성 심혈관 치료의 새로운 paradigm을 제공할 것으로 사료된다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1. Angiogenesis/arteriogenesis에 관여하는 유전자들의 기능과 상호작용에 대한 분자생물학적 연구
2. 혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관신생 assay 확립
3. 허혈에 따른 세포방어 기전 관여 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구
4. 혈관내피전구세포 (Endothelial progenitor cell, EPC)를 이용한 혈관신생 연구

- 연차별 연구목표 및 내용 -

구분	연구목표	연구내용
1차년도 (’02)	Angiogenesis/Arteriogenesis 관여 유전자들의 기능과 상호작용 연구	- 기존 혈관신생인자들의 혈관신생 능력 조사 1. 혈관신생인자 유전자 확보 2. 내피세포, 혈관평활근세포의 증식, 이동, 세포사, tube formation에 대한 작용 비교
	혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관신생 assay 확립	1. <i>Ex vivo</i> skeletal muscle assay 확립 2. <i>In vivo</i> mice hind-limb ischemia model 확립
	허혈에 따른 세포방어 기전 관여 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구	1. 허혈 유도 유전자들의 cDNA microarray 결과를 분석, 유전자들의 발현변이 조사 2. 허혈에 반응하는 유전자의 cis-element 탐색
	혈관내피전구세포(Endothelial progenitor cell, EPC)기능 연구	EPC의 배양법 및 기능 분석법 확립

구분	연구목표	연구내용
2차년도 (’03)	Angiogenesis/arteriogenesis관여 유전자들의 기능과 상호작용 연구	- 혈관신생 유전자들간의 synergism과 antagonism을 <i>ex vivo</i> angiogenesis assay로 분석 - 허혈 동물 모델에서의 검증
	혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관신생 assay 확립	- <i>Ex vivo</i> explanted skeletal muscle assay의 세포 특이적 detection법 개발 - <i>In vivo</i> mouse hindlimb ischemia model에서 angiogenesis/arteriogenesis의 정량법 개발
	허혈에 따른 세포방어 기전 관여 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구	- cDNA microarray 결과의 심층 분석 - 허혈에 반응하는 cis-element 탐색
	혈관내피전구세포(EPC)의 이동, 기능, 분화 연구	- EPC의 phenotypic marker 분석 - 심혈관질환에서 EPC의 특성 변화 연구
외부유전자가 전달된 EPC의 기능 분석	- Adenovirus로 Egr-1 유전자를 전달시킨 EPC의 기능 분석	

IV. 연구개발결과

번호	세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	Angiogenesis/arteriogenesis 관련 유전자들의 기능과 상호작용 연구	VEGF, bFGF, Ang 1, Ang 2, CTGF, Egr-1, Nab1, Nab2 유전자들의 기능 및 상호작용을 분석하였고, Egr-1이 indlimb ischemia시 혈류회복 및 혈관형성에 중요함을 밝힘.	100
2	혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관 신생 assay법 개발	Skeletal muscle explant에 근거한 새로운 <i>ex vivo</i> angiogenesis assay를 개발하였고, mouse hindlimb ischemia model을 이용한 <i>in vivo</i> angiogenesis assay도 확립함	100
3	허혈에 따른 세포 방어 기전 관련 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구	C2C12 세포에서 microarray 분석을 통해 허혈시 발현이 증가되는 유전자들을 발굴하였고, 산소분압에 따른 발현량을 조사하였으며, 허혈과 hypoxia-mimetics에 의해 그 발현이 수십배 증가되는 새로운 chimeric enhancer vector를 제조하였음	100
4	혈관내피전구세포 (EPC)의 기능연구	EPC의 배양법을 확립하였고, 만성신부전과 CRP에 의한 기능 (증식,이동,분화) 변화를 분석하였음	100
5	외부유전자가 전달된 혈관내피전구세포의 기능연구	Adenovirus를 이용한 EPC의 감염조건 최적화 및 Egr-1 유전자 전달시 세포상의 변화를 조사하였음	100

## V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구진의 연구결과는 전임상시험을 거쳐 혈관신생치료 신약개발에 지속적으로 이용될 예정이다. 이를 위하여 동아제약, 연세대와 공동 연구를 진행 중이다. 특히 본 연구진이 개발 또는 확립한 *ex vivo* angiogenesis assay 및 mouse hindlimb ischemia model은 국내에서 angiogenesis 관련 연구를 하는 다른 연구진들에게 이미 전파되어 활용되고 있으며, 타 연구진이 찾아낸 새로운 혈관신생관련/억제 물질, 또는 형질변환 mice들의 혈관신생능 (angiogenic potential)을 본 연구진이 공동연구를 통하여 테스트하여 주고 있다.

## S U M M A R Y

(영 문 요약 문)

### **Development of combined angiogenic gene therapy for ischemic cardiovascular diseases**

Cardiovascular diseases are the leading cause of death and the number of patients suffering from ischemic diseases are growing rapidly. The narrowing and/or occlusion of blood vessel following atherosclerosis prevents free flow of blood and necessarily entails ischemic injury to the organ such as heart, brain and limb. The clinical symptoms of ischemia ranges from stable/unstable anginas to acute ischemic syndrome such as acute myocardial infarction where the initial mortality reaches upto 50 % if left untreated. The clinical outcome of ischemic disease is altered by the collaterals which alleviate the severity of ischemia by bypassing blood flow around the clogged region.

#### Early growth response factor-1 (Egr-1) gene therapy

Here, we sought to develop a novel angiogenic strategy where formation of collaterals is stimulated by combined administration of angiogenic growth factors. To facilitate such combination effects, a novel transcription factor, Egr-1, that can induce expression of multiple angiogenic genes such as bFGF, PDGF-A, PDGF-B, IGF-II, and TGF- $\beta$ 1, was used together with its constitutively active form, Egr-1\*. *In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* analyses of Ad-Egr-1\* confirmed its angiogenic potential as evidenced by increased proliferation/migration of endothelial cells, promiscuous sprouting from the explanted skeletal muscle, and enhanced tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. With its important role in vascular recovery after occlusion, Egr-1\* represents a potential target for therapeutic revascularization.

#### Development of a potent hypoxia-inducible vector

A potent chimeric enhancer vector that allows hyper-elevated expression of target genes under hypoxic condition was created. The new chimeric enhancer approach combines different cis-acting elements, such as the early growth response factor-1 (Egr-1)-binding site (EBS), the metal-response element (MRE) from metallothionein-I, and the hypoxia-response element (HRE) from phosphoglycerate kinase 1, to achieve highly inducible expression from the



minimal SV40 promoter. One of the optimized combinations (EBS-MRE-3HRE) displayed a hypoxic induction ratio of 69, conferring robust and tightly regulated gene expression. The expression induced from this novel chimeric vector was significantly higher than the expression from the HCMV promoter in most of the cells tested. High-level expression was also induced by various hypoxia mimetics, including deferoxamine, which is widely used clinically. With its hyper-induction capacity and versatile means of modulation, our chimeric enhancer vector should be an invaluable tool for the gene-based treatment of cancer and ischemic diseases.

#### Development of a gene-based angiogenesis assay

A novel angiogenesis assay that offers simple and reproducible means of quantifying angiogenic activity of certain genes was developed. The new method utilizes explant culture of skeletal muscle that had been transfected with the plasmid harboring gene of interest coupled with the optimized procedure of electroporation. The new assay could successfully predict *in vivo* behavior of connective tissue growth factor in muscle including its interaction with VEGF. Considering the fact that most angiogenesis assays are limited in their clinical relevance and often lack quantification, our method would be very useful in evaluating putative pro-angiogenic and/or anti-angiogenic genes.

#### Endothelial progenitor cell (EPC) dysfunction in chronic renal failure (CRF)

Increased risk of cardiovascular disease in patients with CRF has been explained by accelerated atherosclerosis and impaired angiogenesis, in which EPC may play key roles. We hypothesized that altered EPC biology may contribute to the pathophysiology of CRF. Indeed, CRF patients showed markedly decreased numbers of EPC (44.6%) and colonies (75.3%) when compared to the controls ( $p < 0.001$ ). These findings were corroborated by 30.5% decrease in EPC migratory function in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) ( $p = 0.040$ ) and 48.8% decrease in EPC incorporation into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) ( $p < 0.001$ ). In addition, Framingham's risk factor score of both CRF ( $r = -0.461$ ,  $p = 0.010$ ) and normal group ( $r = -0.367$ ,  $p = 0.016$ ) significantly correlated with the numbers of EPC. The circulating EPC level was significantly lower in CRF patients than in normal group under the same burden of risk factors ( $p < 0.001$ ). A significant correlation was also observed between dialysis dose (Kt/V) and EPC incorporation into HUVEC

( $r=0.427$ ,  $p=0.004$ ). These results indicate that EPC biology, which is critical for neovascularization and the maintenance of vascular function, is altered in CRF.

#### C-reactive protein (CRP)-induced EPC dysfunction

CRP, a predictor of future cardiovascular diseases, has been reported to damage the vascular wall by inducing endothelial dysfunction and inflammation. This proatherogenic CRP was speculated to have a role in attenuating angiogenic functions of human endothelial progenitor cells (EPCs), possibly impairing vascular regeneration and increasing cardiovascular vulnerability to ischemic injury. Herein, we investigated the direct effect of CRP on angiogenic activity and gene expression in human EPCs. Incubation of EPCs with human recombinant CRP significantly inhibited EPC migration in response to vascular endothelial growth factor, possibly by decreasing the expression of endothelial nitric oxide synthase and subsequent nitric oxide production. In addition, CRP-treated EPCs showed the reduced adhesiveness onto an endothelial cell monolayer. When assayed for the gene expression of arteriogenic chemo-cytokines, CRP substantially decreased their expression levels in EPC, in part due to the upregulation of suppressors of cytokine signaling proteins. These results suggest that CRP directly attenuates the angiogenic and possibly arteriogenic functions of EPCs. This CRP-induced EPC dysfunction may impair the vascular regenerative capacity of EPCs, thereby leading to increased risk of cardiovascular diseases.

#### Functions of genetically modified EPC

Optimal conditions of adenovirus infection into EPC was examined using Ad-LacZ virus. The optimal dose was 500 MOI and no salient morphological changes or toxicities were observed with Ad-Egr-1 and Ad-eGFP, suggesting that transgenes can be safely introduced via adenovirus into EPC. Following overexpression of Egr-1, upregulated expression of FGF-2, IGF-II, PDGF-B, and CSF\_1 were observed.

Through these combined applications of genetic and cellular approaches, novel treatment modalities for ischemic cardiovascular diseases will be sought. The successful results from these efforts can be distributed with certain conditions to the researchers in Korea.

# C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Submission sheet .....	1
Abstract .....	2
SUMMARY .....	3
SUMMARY (English) .....	7
CONTENTS (English) .....	10
CONTENTS .....	11
Chapter 1 Summary of Research Proposal .....	12
Chapter 2 Status of Technology Development .....	17
Chapter 3 Research Methods and Results .....	19
Chapter 4 Progress and Contribution to Relevant Fields .....	28
Chapter 5 Application Plan for Research Results .....	30
Chapter 6 Science and Technology Informations from Abroad Collected during Research Developments .....	31
Chapter 7 References .....	32

## 목 차

제출문 .....	1
보고서 초록 .....	2
요약문 .....	3
SUMMARY (영문요약문) .....	7
CONTENTS (영문목차) .....	10
목차 .....	11
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	28
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	30
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	31
제 7 장 참고문헌 .....	32

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

### 가. 기술적 측면

#### 허혈성 심혈관질환이란?

동맥경화는 노화의 필수적인 현상으로 나이가 들수록 진행되는 우리 모두가 앓고 있는 병이다. 혈관이 동맥경화에 의하여 좁아지거나 막혀서 일어나는 허혈성 심혈관질환은 심근, 다리, 뇌의 혈류 장애를 초래하여 협심증, 파행증상, 일과성 뇌졸중을 일으키며, 동맥경화 plaque가 파열되면 혈전 생성으로 인한 불안정형협심증, 심근경색증, 급성 사지허혈, 뇌경색과 같은 병을 일으킨다. 급성 심근경색증의 경우 치료하지 않았을 경우 초기 사망률이 50%에 이르며, 급성 사지허혈의 경우 다리를 절단해야하며 급성 뇌경색의 경우 급사 또는 사지마비를 유발하게된다 (1-3).

#### 허혈성 심혈관 질환 치료법의 한계: “No option patient”에게는 새로운 치료 전략이 필요

이와 같은 허혈성 심혈관질환을 치료하는 방법은 크게 세 가지로서, 첫째, 약물요법, 둘째, 경피적관동맥성형술 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PTCA), 셋째, 관상동맥우회술 (coronary artery bypass graft; CABG)이며 환자가 일반적인 약물요법에 반응하지 않을 때 PTCA나 CABG의 방법을 사용하게 된다. 그러나 이러한 치료법은 항상 시행할 수 있는 것은 아니며, 기존의 치료에 적응증이 안되거나 기존의 치료법에 반응하지 않는 “no option patient”가 전체 환자의 약 20%에 이르게 된다. 이들은 결국, 심근경색, 뇌경색, 심부전 등으로 사망하거나, 다리를 절단하게 되어 현재 한계에 도달한 허혈성 심혈관 질환의 치료에 새로운 치료전략의 개발이 절실히 요구된다 (4-7).

#### 허혈성 심혈관질환 환자에서 혈관신생 치료법은 새로운 치료 전략이다.

좁아지거나, 막힌 혈관을 대신하여 새로운 혈관을 만들기 위하여 혈관생성인자 (angiogenic factor) 그 자체, 또는 그를 만드는 유전자를 허혈부위에 투여하여 측부혈관의 형성을 증진시킴으로서 허혈성심질환을 치료하고자 하는 새로운 시도가 이루어지고 있는데 이를 "혈관신생 치료법 (血管新生 治療法; therapeutic angiogenesis)"이라 한다 (4, 8-14). 본 연구에서는 효율적인 혈관신생 치료법을 개발하고자 한다.

#### 혈관생성인자 (angiogenic factor)의 종류

혈관내피세포의 분열, 이동, 분화를 유도하는 혈관생성인자에는 VEGF (vascular

endothelial growth factor), FGF (fibroblast growth factor), Del-1 (Developmentally regulated endothelial locus) protein, HGF (hepatocyte growth factor, 일명 scatter factor), PD-EGF (platelet-derived endothelial cell growth factor), TGF (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor), CTGF (connective tissue

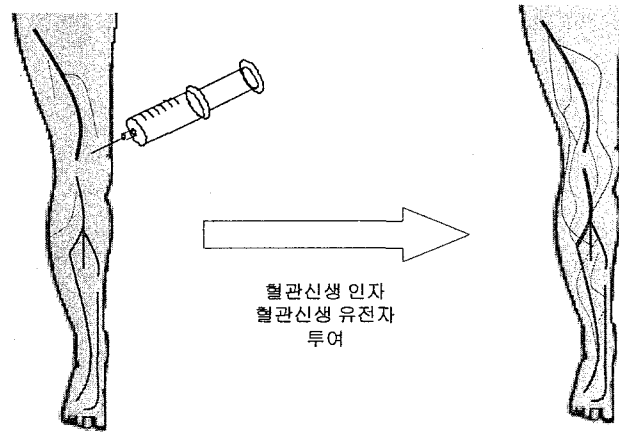


그림 1 혈관신생 치료법 (Therapeutic Angiogenesis)

growth factor) 등이 있으며, 혈관의 maturation에 관여하는 angiopoietin, 동맥혈관을 만드는 Ephrin 등도 혈관생성에 중요한 역할을 한다. 현재의 혈관신생치료 임상시험들은 이들 중 단일 인자만을 이용하고 있다 (8-12).

**혈관신생 치료법의 현재 기술로는 충분한 arteriogenesis가 일어나지 않는다:  
“Combined angiogenic therapy”의 필요성**

혈관신생 (angiogenesis)은 기존 존재하는 혈관에서 새로이 혈관내피세포로만 구성된 모세혈관이 만들어지는 것을 뜻하며, arteriogenesis는 모세혈관의 주위를 평활근세포가 덮

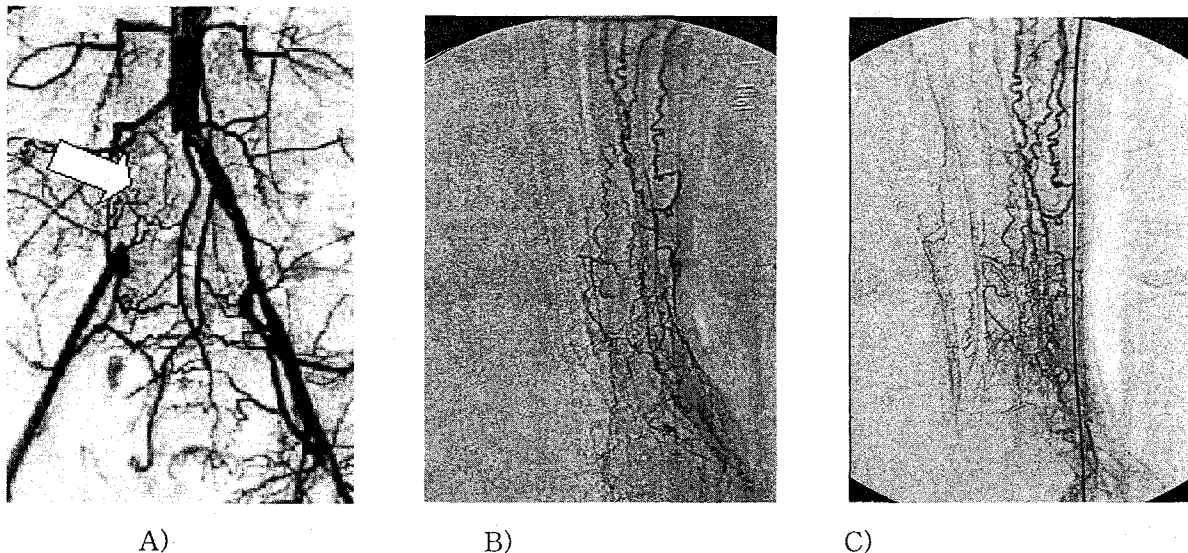


그림 2 Arteriogenesis의 중요성. A) 우장골동맥 (화살표)가 100% 막혀있으나 arteriogenesis가 양성하여, 큰 동맥의 측부혈관의 발달로 협착 이하 부위에 혈류가 다시 흐르고 있고, 환자는 경미한 허혈 증상만을 호소하였다. B) 본 연구진의 임상시험에 포함된 우측 족부궤양 환자로서 발목 부위의 모든 혈관이 막혀 있고 경미한 측부혈류가 보인다. C) VEGF165 혈관신생 유전자치료 이후 혈관신생에 의하여 작은 세동맥들의 증가가 관찰되나, 혈류의 증가가 충분하지 않아 족부궤양은 호전되지 않았다.

고 혈관의 내경이 증가하고 벽의 두께도 증가되어 세동맥 이상의 혈관이 만들어지는 것을 뜻한다. 혈관신생 치료법에 의하여 만들어진 혈관이 실제로 혈류를 늘려 허혈 증상을 경감하기 위하여는 arteriogenesis, 특히 직경 100 um 이상의 소동맥보다 큰 혈관이 만들어 져야 한다. 그러나 현재 진행 중인 외국의 혈관신생 치료법 임상시험 (8-12) 이나, 본 연구진에 수행하고 있는 VEGF165 유전자를 이용한 임상시험 결과에 의하면 새로이 형성되는 혈관은 모세혈관 내지는 매우 가는 세동맥 수준에 지나지 않아 혈관신생 치료법이 성공하기 위하여는 보다 더 효율적인 방법의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 혈관신생인자들의 상호작용을 연구하여 병합요법을 통한 고효율의 “혈관신생 병합치료법 (combined angiogenic therapy)”을 개발하고자 한다.

**간편하고 효율적인 혈관신생 assay법이 필요하다.**

고효율의 “혈관신생 병합치료법”의 개발을 위하여는 무엇보다도 다양한 혈관신생인자의 단독 또는 병합 투여 효과를 측정할 수 있는 assay법이 중요하다. 기존의 *in vitro*, *in vivo* angiogenesis assay는 실제 질환 모델이 아닌 단점이 있다. 혈관신생 치료법의 유효성을 평가하기 위한 허혈성 심혈관질환 동물 모델은 ameroid constrictor를 이용한 돼지의 만성 허혈성 심혈관질환 모델, 토끼의 hind-limb 허혈 모델 등이 있으나, 한 가지 혈관신생인자를 테스트하는데 만도 6개월 이상이 소요된다. 따라서 본 연구진은 본 연구진이 setup 중인 *ex vivo* angiogenesis assay model과 mice hindlimb ischemia model을 더 개발하여, “혈관신생 병합치료법”의 개발에 활용하고자 한다.

**혈관신생인자의 투여 방법으로는 유전자치료법이 더 현실적이다.**

혈관신생인자의 투여는 재조합 단백 (peptide)를 투여하는 “단백요법”과 치료 유전자를 치료 부위에 전이시켜 치료 단백을 생산하게 하는 “유전자요법”의 두 가지가 있다. 단백요법에 비하여 유전자요법은 다음과 같은 면에서 유리한 점이 있다. 1) 단백요법은 인체에 주입하기 위하여는 고순도의 단백을 다량 사용하여야 하므로 막대한 비용이 든다. 2) 측부혈관 형성을 위하여는 peptide를 single bolus injection하는 것보다는 적은 용량의 단백을 지속적으로 투여하는 것이 바람직한데 유전자요법은 한번의 투여로 지속적인 효과를 얻을 수 있다. 3) 유전자요법의 경우 hypoxia-responsive element 등의 regulatory element를 이용하여 혈관신생 치료유전자의 유전자발현의 생리적인 조절이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 “혈관신생 병합 유전자치료법 (Combined Angiogenic Gene Therapy; CAGET)”을 개발하고자 한다.

**유전자요법의 성공을 위하여는 안전하며, 효율적인 벡터의 개발이 중요하다.**

유전자요법의 성패를 결정하는 가장 중요한 요인 중의 하나는 대상 질환에 적합한 벡터의 선정이다. 현재 유전자치료 기술이 대중화/산업화되고 있지 못한 가장 큰 이유는 기존에 사용되고 있는 벡터들이 안전하고 효율적으로 유전자를 전달할 지 못하기 때문이다. 특히 1999년 미국 펜실베이니아대학의 James Wilson 그룹에 의한 ornithine

transcarbamylase (OTC) 결핍 환자의 유전자요법 임상시험에서 아데노바이러스를 투여받은 환자 한 명이 원인을 알 수 없는 폐부전과 간부전으로 사망하게 됨에 따라 아데노바이러스를 이용한 유전자요법의 안정성에 큰 문제가 제기되고 있다. 본 연구실에서는 가장 안전하며, 한국의 현실로 임상적용이 가능한 naked DNA (eukaryotic expression vector)를 유전자 전달 벡터로 사용하고있다. 그러나 기존 naked DNA를 이용한 유전자 전달의 단점인 저효율성, 단기간의 유전자 발현을 극복하기 위하여, in vivo electroporation, lipoplex, 바이러스 벡터 등을 이용 유전자 전달 효율을 증대하여 효율적인 “혈관신생 병합 유전자치료법”을 개발한다.

**지적재산권의 확보를 위하여는 새로운 치료유전자/조절유전자의 개발이 필요하다.**

우리나라에서 신약 개발이나 유전자요법을 개발하는데 있어서 가장 취약한 것이 한국이 특허를 가지고 있는 기능성 유전자가 없다는 것이다. 위에 열거한 다양한 혈관신생인자들도 국내에서 특허를 갖고 있는 것은 없다. 또한 hypoxia에 반응하는 유전자 조절 시스템인 hypoxia-responsive element 등도 다 특허가 걸려 있어, 지적재산권 확보를 위하여는, 새로운 치료유전자, 새로운 hypoxia의 기전, 새로운 hypoxia-responsive element 등의 개발이 필수적이며, 본 연구에서는 hypoxia에 반응하는 유전자들을 cDNA microarray 기법을 이용 발굴하여, 새로운 유전자 및 hypoxia에 반응하는 새로운 유전자 발현 기전을 연구하고자 한다.

## 나. 경제·사회·산업적 측면

### 21세기 세계적 질병부담 1위 심혈관질환

심혈관질환은 전세계적으로 사망원인의 수위를 차지하고 있다. 심혈관계질환은 이미 선진국은 물론 많은 개발도상국가의 성인과 노인들의 주요 사망원인으로 대두되었으며, 이로 인한 신체적 장애와 생산력의 감소 나아가, 의료비 상승 등은 범세계적인 보건 문제로 인식되고 있다. 즉, 지구상 인구 중 발생하는 전체 사망의 30%를 차지하며 연간 1500만명을 사망케하고 있으며 이보다 더 많은 수의 사람들을 불능으로 만들고 있다. 미국의 경우 세 명의 사망 중 하나가 심장질환에 의한 것으로 매년 75만 명이 심장질환으로 사망하고 있다. 1998년도 연령군별 전체사망에 대한 관상동맥성 심장질환의 사망백분율은 연령증가에 따라 증가하여 35~44세군에서 19%였던 것이 85세 이상군에서는 53%로 증가하였다.

국내에서도 산업화와 생활 방식의 서구화에 따르는 식이 습관의 변화, 영양 상태의 개선, 노인 인구의 증가 등은 국내에서도 질병 발생 양상의 변화를 가져와 동맥경화에 의한 허혈성 심혈관 질환이 급증하고 있다. 1999년 우리 나라의 연간 사망구성비를 보면 심혈관계질환이 23.3%로써 사망률 1위를 차지하고 있어 악성신생물 (암)에 의한 사망률 21.3%보다 높은 것을 알 수 있다. 즉 네 명의 사망 중 하나가 심질환에 의한 것으로 매년 5만 7천명이 심혈관질환으로 사망하고 있다.

심혈관질환 환자 중 기존의 치료법에 적응증이 되지 않거나, 치료에 실패한 “no



option patient"로서 다리를 절단하여야 하는 환자는 미국에서 연간 120,000명, 심근경색으로 사망하는 환자는 연간 200,000명에 달하는 것으로 알려져 있다. 국내 통계는 없으나, 국내 인구의 말초동맥질환 및 관상동맥질환 인구가 약 10%라고 가정할 때 "no option patient"는 연간 약 100,000명에 달할 것으로 추정된다.

국민건강보험 통계자료실 "98 의료보험급여비" 분석결과에 따르면 심장질환, 뇌혈관질환으로 지급된 급여액수는 공무원, 교원의 경우만 해도 각각 90년 57억원, 69억원이던 것이 97년 각각 258억원, 360억원으로 연 평균 21-24%의 증가 추세에 있다. 또한 순환기계 질환 (동맥경화증, 고혈압)의 기존에 개발된 약들의 시장 규모는 약물만 1999년 한해 7996억원에 달하여 (보건복지부 2000년 통계연감), 엄청난 시장 규모를 가지고 있다.

## 1-2. 연구개발의 범위

본 연구진은 허혈성 심혈관질환의 새로운 치료법 개발을 위하여,

- [1]. angiogenesis /arteriogenesis에 관여하는 유전자들의 역할과 기능에 대한 분자 생물학적인 연구와 이들의 상호작용이 세포에 미치는 영향을 연구하고
- [2]. 간편하고 효율적인 허혈성질환, angiogenesis assay 모델을 개발, 다양한 혈관신생인자의 조합을 테스트하며,
- [3]. 효율적인 유전자 전달 방법을 개발하고,
- [4]. hypoxia에 의한 유전자 발현 기전을 연구하여, 새로운 치료유전자와 hypoxia-responsive element를 발굴하여

궁극적으로 "혈관신생 병합 유전자치료법 (Combined Angiogenic Gene Therapy: CAGET)"을 개발하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 2-1. 국외의 연구 개발 실적

#### 혈관신생 치료법 연구개발 실적

허혈성질환의 혈관신생 유전자요법은 현재 심혈관치료의 새로운 개념의 새로운 치료법으로 임상시험 성적이 현재까지 발표된 어떠한 유전자요법의 효과보다도 뛰어나다. 따라서 혈관생성인자의 특허를 갖고 있거나 심장에 우수한 벡터 테크놀로지를 갖고 있거나 혈관신생 치료법을 연구하여 왔던 연구자들이 대부분 벤처회사를 설립하였고, 그들이 대부분 세계 굴지의 제약회사에 합병되어 연구개발에 박차를 가하고 있다. 이를 두고 미국 Stanford 대학의 순환기내과 과장인 Judith Swain 박사는 다음과 같은 표현하고 있다. "The biotechnology and device companies are all salivating over potential of these therapies".

Table 1. 신혈관조성 유전자요법 개발 회사

벡터	신혈관조성인자	연구자	관련 회사
naked DNA	VEGF-2	Jeffrey Isner	Human Genome Sciences
adenovirus	VEGF121	Ronald Crystal	Warner Lambert
adenovirus	FGF-5	Kirk Hammond	Schering AG
adenovirus	FGF-4		Berlex Laboratories
unknown	HIF-1		Genzyme General
unknown	FGF-1		Rhone-Poulenc Rorer

HIF-1; hypoxia inducible factor-1

현재 이들 회사 및 다수의 연구 그룹에 의하여 혈관신생 치료법의 연구가 진행 중이며, 임상시험은 1상 또는 2상 임상시험이 진행 중이다.

#### 허혈성 심혈관 질환에서의 유전자치료 연구

1) 고지혈증의 치료를 위한 지질대사 관련 유전자, 2) 혈관신생 치료를 목적으로 측부혈관의 형성을 증가시키기 위한 혈관신생 촉진 물질의 유전자, 3) 재협착을 예방하기 위한 세포성장 억제 또는 세포분열주기 관련 유전자 등의 유전자요법이 전임상시험, 임상시험 중이다. 2000년도 전세계 임상시험 프로토콜 중 심혈관질환의 비율은 7%로서 암, 대사성 질환에 이어 3위를 차지하는 것을 보더라도 기존 치료가 불가능한 심혈관 질환을 유전자요법을 통하여 치료하고자 노력하고 있음을 알 수 있다.

## 국내의 연구개발 실적

최근 국내에서도 동맥경화 및 허혈성 심혈관 질환에 대한 관심이 급증되면서 이들 질환에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 연세대 장양수교수팀은 이들 질환의 관련 유전자를 찾기 위한 보복부 유전체사업단 연구를 수행하고 있으며, FGF를 adenovirus를 이용 혈관신생 유전자치료를 하고자 기초 연구 및 동물실험 중이다. 또한 혈관신생에 대한 기초 연구는 포항공대 고규영교수, 서울대학 김규원교수, 강원대 권영근교수 등에 의하여 수행되고 있다. 고규영교수는 VEGF와 angiopoietin의 복합 유전자치료가 혈관신생을 증가시킴을 보고한 바 있다.

유전자치료 기법에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어져 여러 연구기관에서 retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus vector와 같은 viral vector를 이용한 유전자치료를 연구하고 있으며, cationic liposome, biodegradable polymer 등을 이용한 물리적인 유전자 전달 증가 방법이 연구되고 있다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 3-1. Angiogenesis/arteriogenesis 관련 유전자들의 기능과 상호 작용 연구

기존에 혈관형성에 중요하다고 알려진 hVEGF165, hVEGF121, mVEGF164, mVEGF120, connective tissue growth factor (CTGF), Ang 1, Ang 2 등의 유전자들을 확보하였고, 본 연구진이 혈관형성에 중요할 것으로 가정한 Egr-1 (15, 16)과 그것의 corepressor들인 Nab1, Nab2 (mEgr-1, hEgr-1, mNab1, mNab2, hNab1, hNab2) 등의 유전자들을 RT-PCR을 통해 클로닝하였다. 이들의 cDNA를 HCMV promoter가 있는 발현벡터 (pShuttle-CMV (AES1021)에 subcloning한 후 293 세포주에서 transient transfection study를 하였고 (그림 3A), Western blot 분석을 통해 원하는 유전자가 예상대로 발현됨을 확인하였다. 또 Egr-1의 치료효과를 극대화하고자 Egr-1의 repressor domain의 293번 아미노기를 Ile에서 Phe으로 치환하여 Nab2 repression을 받지 않는 constitutively active form인 Egr-1\*을 제작하였다. Ad-Easy system을 이용하여 Ad-Egr-1\*를 제조하였으며, 이의 angiogenic activity를 *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 등에서 차례로 확인하였다 (그림 4). 이 연구를 통해 Egr-1이 허혈부위에서의 혈류재형성에 중요하고, Egr-1의 과량발현을 통해 혈관신생의 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

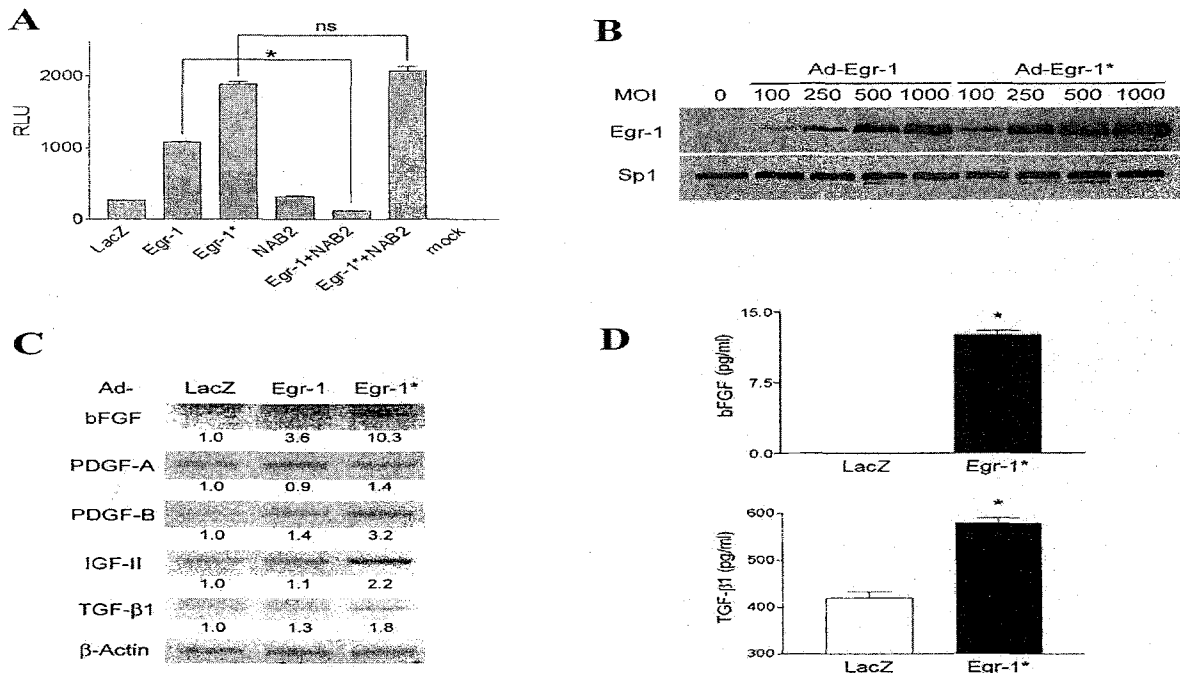


그림 3 Egr-1\*에 의한 multiple angiogenic gene의 upregulation. Egr-1의 대표적 target gene인 tissue factor promoter를 이용한 functional study를 통해 Egr-1\*가 Egr-1과 달리 NAB2에 의해 억제되지 않고(A, cotransfection with luciferase reporter fused to TF promoter), 대등하거나 많은 양의 Egr-1 단백을 생성하며 (B, wetern blot), 보다 높은 수준으로 target gene들의 induction을 유도함 (C, D)을 보여주고 있다. Egr-1\*는 Egr-1의 repressor domain의 293번 아미노기가 Ile에서 Phe으로 바뀐 형태이다.

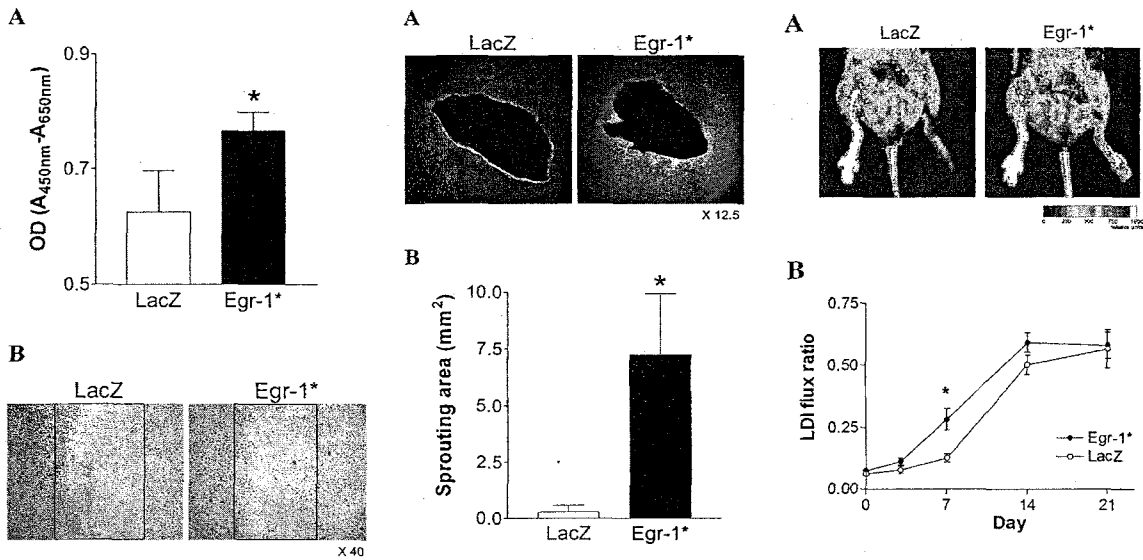


그림 4 *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation of Ad-Egr-1\* for angiogenic activity. 왼쪽 패널; Ad-LacZ, Ad-Egr-1\* 등으로 감염시킨 skeletal myocyte와 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)을 coculture하여 HUVEC의 증식 (A)과 이동(B)을 본 실험. 중간 패널; Ad-LacZ, Ad-Egr-1\* 등으로 감염시킨 mouse의 tibialis anterior muscle을 matrigel상에 explant culture하여 뻗어나오는 세포들을 관찰한 실험. 7일째에 찍은 사진 (A)과 이를 정량한 그래프 (B). 오른쪽 패널; mouse hindlimb ischemia model에 Ad-LacZ, Ad-Egr-1\* 주입 후 날짜별로 혈류를 조사한 실험 7일째의 Laser doppler imaging (A)과 3, 7, 14, 21째 LDI flux ratio를 정량한 그래프 (B)

### 3-2. 혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관 신생 assay법 개발

#### 효율적이고도 간편한 *ex vivo* angiogenesis assay 방법 개발

Naked plasmid를 mouse의 *tibialis anterior* muscle에 injection하고 electroporation을 한 뒤 적출하여 growth factor-reduced matrigel에서 explant 배양시 수일 후 sprouting되는

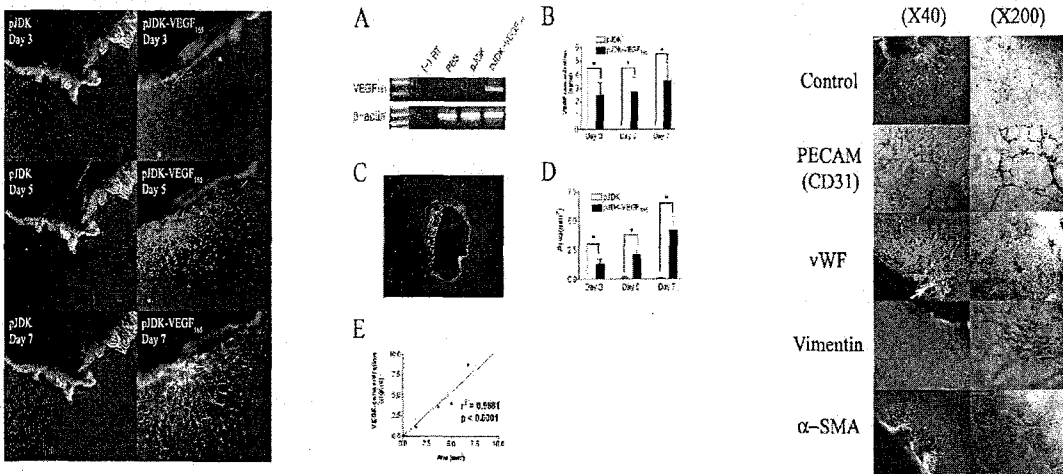


그림 5 새로운 *ex vivo* angiogenesis assay법 개발. Skeletal muscle explant에서의 VEGF 발현 및 sprouting area와 secreted VEGF와의 상관성. Sprouting된 capillary-like structure의 immunostaining.

정도와 세포들의 migration, tubule formation 정도를 현미경으로 관찰한 결과 대조군에서는 거의 sprouting이 없었던 반면, hVEGF를 주입한 군에서는 현저한 sprouting 및 network 형성을 관찰할 수 있었다 (그림 5). 이 방법은 정량적이어서 sprouting된 면적과 분비된 VEGF의 양간에는 통계적으로 유의한 상관관계가 얻어졌고 (그림 5E), explant 내에서의 VEGF 발현도 확인되었다 (그림 5A). Sprouting된 capillary-like structure는 주로 endothelial cell임이 판명되었고 (positive for CD31, vWF, and vimentin), smooth muscle cell은 관찰되지 않았다 (negative for alpha-smooth muscle actin). 이 분석법의 유용성 검증을 위해 CTGF의 angiogenic activity를 조사한 결과 (그림 6), 그 자체로는 약한 혈관생성인자이지만, VEGF와 조합시에는 VEGF의 활성을 크게 저해함을 확인할 수 있었다. 이런 CTGF의 특성은 mouse hindlimb ischemia model에서도 그대로 재현되어, 본 연구진이 개발한 분석법이 매우 유용함을 확인할 수 있었다.

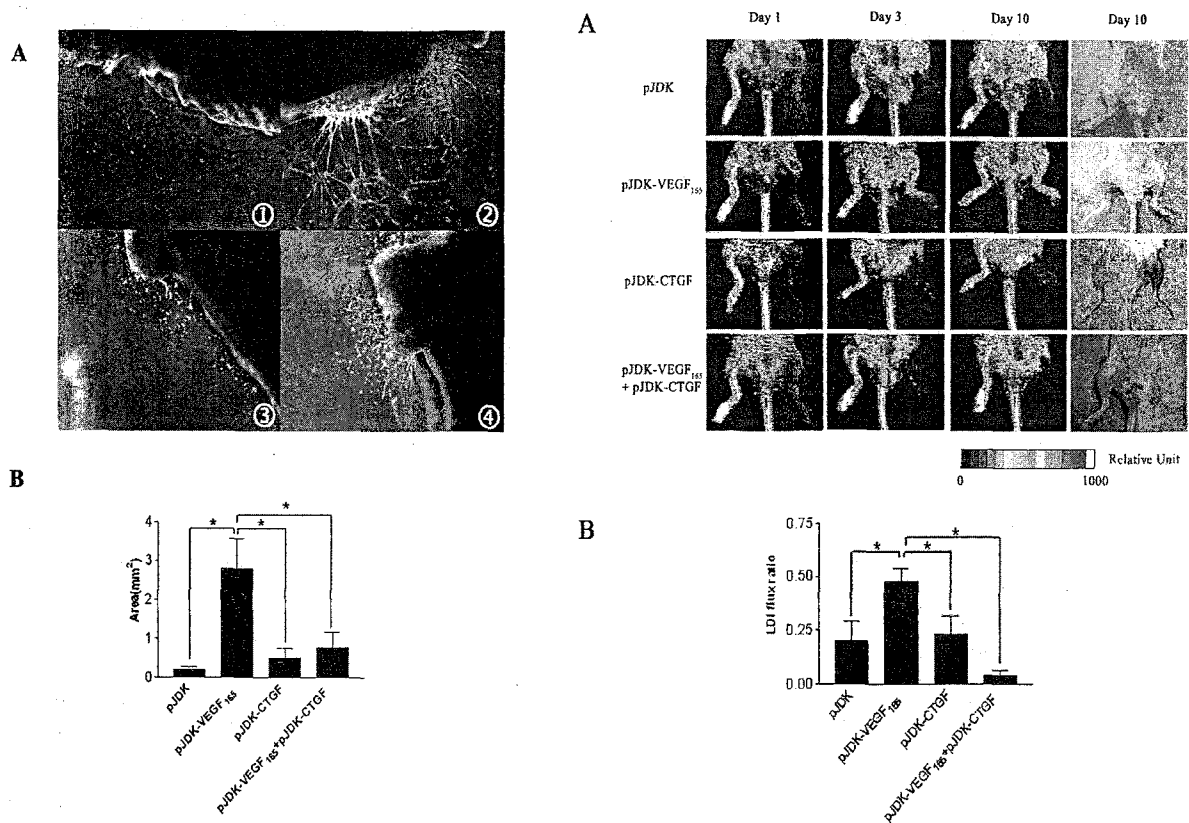


그림 6 Novel angiogenesis assay의 validation. 왼쪽 패널: (A) ①; control, ②; VEGF, ③; CTGF, ④; VEGF + CTGF. (B) sprouting area를 정량한 그래프. 오른쪽 패널: hindlimb ischemia model에서의 in vivo angiogenic activity 검증, LDI imaging (A)과 LDI flux ratio를 정량화한 그래프

### In vivo angiogenesis assay 방법 확립

Mouse 다리의 femoral artery를 제거하여 하지허혈모델을 개발하였고, Laser Doppler Image를 이용하여 하지혈류를 측정하는 방법을 확립하였다(그림 7). 이 모델에 혈관신생에 관련된 유전자를 electroporation으로 주입시 혈관신생에 따른 허혈의 감소정도를 쉽게 조사할 수 있으며, 이 방법은 기존의 CAM, corneal assay와 달리 본 연구가 치료코자하는 질병모델의 한 종류로서 시술과 혈류측정이 간단하며 비교적 안정적인 결과를 얻을

수 있는 장점이 있다.

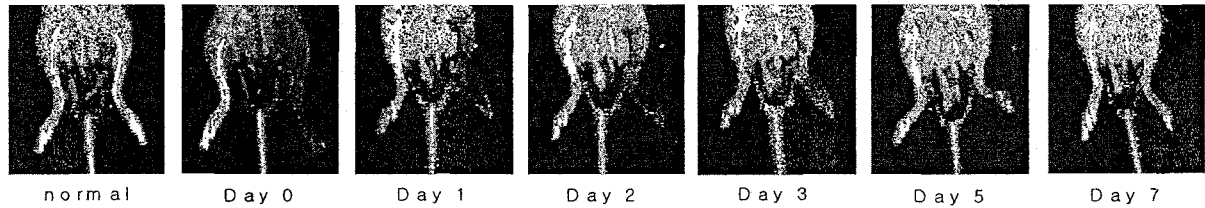


그림 7 왼쪽다리 동맥을 결찰하여 허혈이 생긴 8주령 쥐 (C57BL/6)의 Laser doppler imaging. 수술 전에는 양쪽다리가 모두 혈류가 온전하나 (normal), 수술 바로 후부터 3일경까지는 결찰된 왼쪽 다리에 혈류가 거의 관찰되지 않음 (파란부분). 그러나 7일에는 혈류가 자연적으로 많이 개선되었음.

### 3-3. 허혈유도 유전자 발현에 대한 연구 및 hypoxia-inducible vector의 개발

#### C2C12 세포에서의 허혈유도 유전자들의 cDNA Microarray 분석

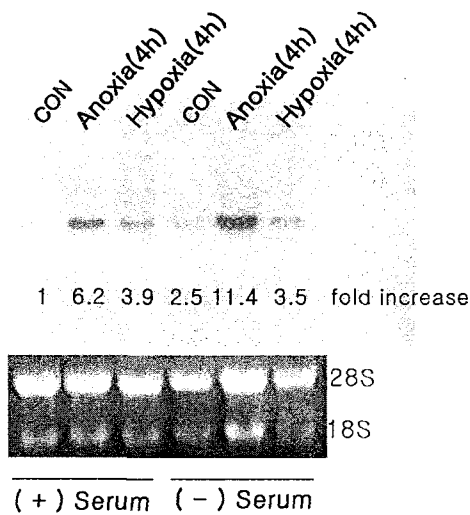


그림 8. 산소분압과 serum이 NDRG-1 유전자 발현에 미치는 영향 (RNA blot analysis)

했고 serum이 제거되어도 증가하는 양상이 관찰되었다 (그림 8). 이 NDRG-1의 promoter를 조사한 결과 HRE, MRE, EBS, SRE, AP-1 등의 많은 DNA motif가 5' UTR 부위에 존재함이 밝혀졌다.

#### 허혈에 반응하는 cis-element의 chimera를 이용한 hypoxia-inducible vector 제조

Hypoxic condition에서 upregulation되는 유전자를 이용한 허혈반응 유전자 조절 시스템의 개발을 위해 기존에 많이 연구된 hypoxia response element (HRE) 이외에 추가적으로 허혈 반응성을 보이는 Egr-1 binding site (EBS), metal response element (MRE) 등을

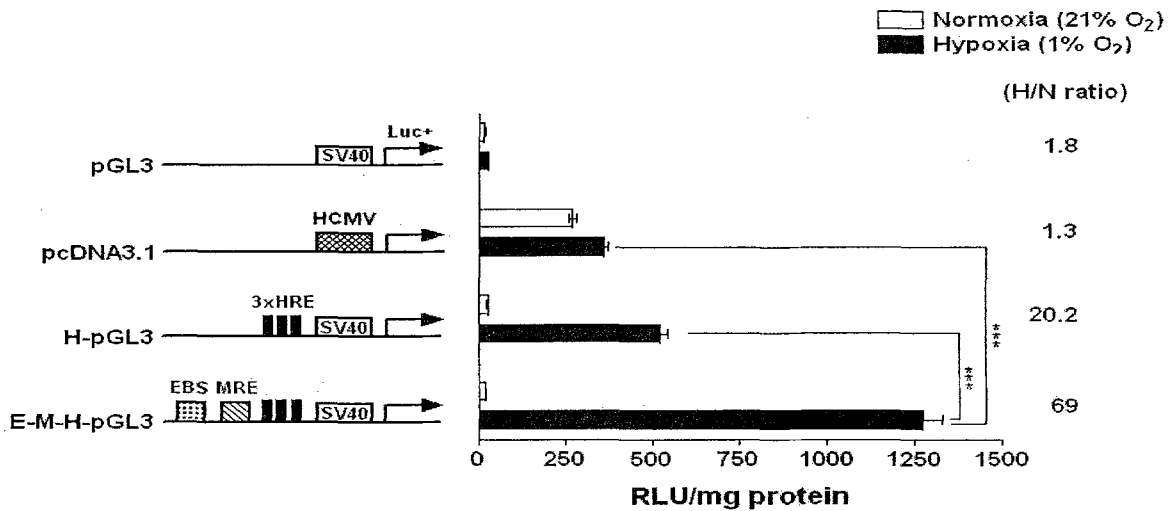


그림 9 Effect of three enhancer combination on hypoxia-responsiveness

이용한 inducible expression system을 개발하였다 (그림 9). 이 EBS-MRE-3xHRE combination은 69배의 높은 induction fold를 보였고, HCMV-driven expression 보다 2-3 배 높은 발현량을 보여, 아주 우수한 inducible system으로 평가된다. 다른 angiogenic gene인 bFGF를 발현시켜도 비슷한 양상이 얻어졌으며 (그림 10 왼쪽 패널), 실제 임상에서 사용되는 deferroxamine (DFX)을 hypoxia-mimetics로 사용한 경우에도 hypoxia와 동일한 결과를 얻었고, 다른 metal에 의한 modulation도 가능함을 확인할 수 있었다 (그림 10 오른쪽 패널).

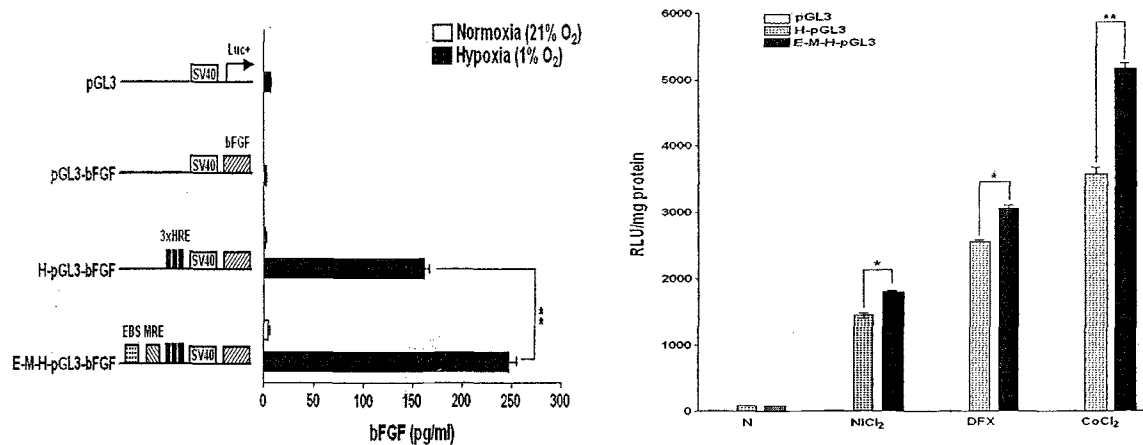


그림 10 bFGF cDNA를 이용한 허혈 반응성 검증 (왼쪽패널)과 hypoxia-mimetics (DFX, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>)를 이용한 induction (오른쪽 패널)

### 3-4. 혈관내피전구세포(EPC)의 기능연구

#### EPC의 배양법 확립 및 기능분석

EPC는 말초혈액 또는 제대혈액이나 골수에서 Ficoll-Hypaque를 이용한 밀도구배법으로 단핵구를 분리한 후 (그림11 왼쪽패널) 이를 내피세포의 성장에 최적화된 EGM-2 (Biowhitaker) 배지에서 배양하여 얻었으며, 특징적인 spindle-shape, cluster formation



등을 관찰할 수 있었다 (그림 11 오른쪽 패널).

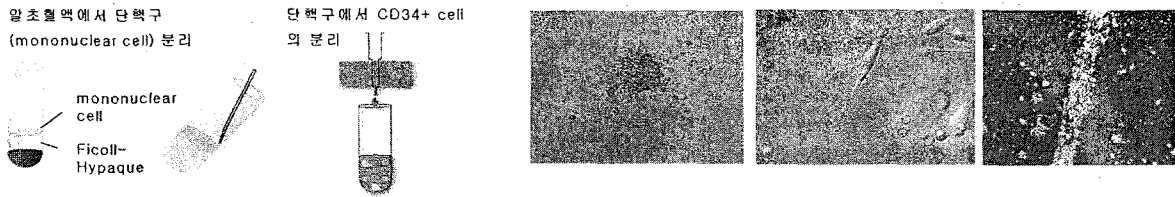


그림 11 밀도구배법에 의한 혈액에서의 단핵구 분리 및 EPC에 특징적인 cluster formation, spindle-shape, & line formation

본 연구진은 EPC의 기능분석방법으로 (i) acetylated LDL 및 UEA-1 lectin 의 double positive 에 의한 내피세포로서의 성질의 증명 (그림 12A), (ii) Matrigel 에서 HUVEC과 공배양을 하여 혈관신생의 in vitro 모델에서 tube formation 에 참여하는 정도의 평가 (그림 12B), (iii) Modified Boyden chamber에서 여러 cytokine 에 의한 EPC의 이주 (migration) 기능의 평가 (그림 12C) 등을 개발하였다.

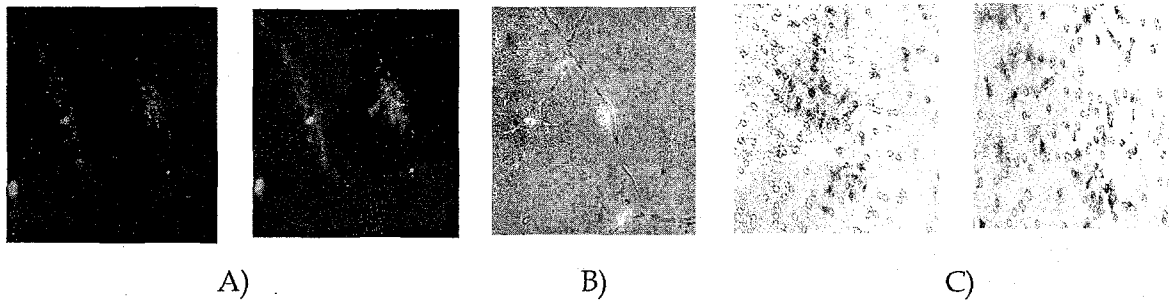


그림 12 A) acetylated LDL-DiI (적색형광) 및 UEA-1 Lectin-FITC (녹색) 의 염색으로 증명한 내피 세포로서의 성질. B) Matrigel에서 HUVEC과 공배양하여 혈관신생의 in vitro 모델에서 tube formation에 참여하는 EPC (DiI 형광표지), C. Modified Boyden chamber에 의한 세포 이주 분석 (VEGF + FGF를 준 군 [왼쪽 그림]에서 대조군 [오른쪽 그림]에 비하여 현저히 높은 migration 정도를 보임).

### EPC 분화과정중의 세포표면 marker들의 분석

혈관내피세포에 발현되는 marker로서 CD31, Tie2, Flt-1, KDR, vWF, VE-cadherin 등이 알려져 있으나 이 중 일부 marker (CD31, Flt-1)의 경우 내피세포뿐 아니라 monocyte에서도 발현된다. 이와 같이 내피세포와 monocyte는 여러 세포표면 marker들을 공유하고 있어 EPC의 분화를 연구하는데 특별한 주의가 필요하다. 따라서 본 연구진은 말초혈액에서 얻은 EPC의 배양과정 중의 분화과정을 내피세포의 특이적인 marker들의 발현

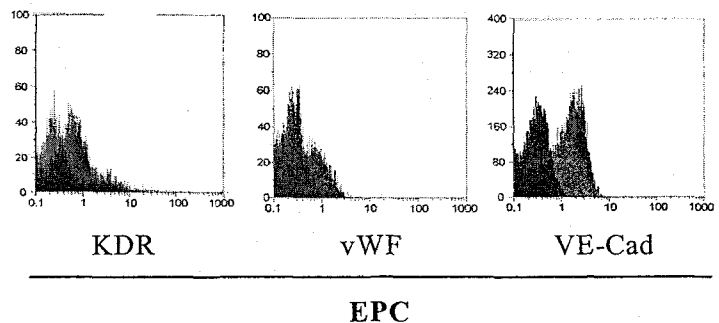


그림 13. In vitro 배양과정 중 EPC에서 혈관내피세포 marker들의 발현

정도를 측정함으로써 연구하였다. 그 결과 EPC는 배양과정 중에 KDR (VEGFR2), vWF, VE-cadherin의 발현이 증가하며 (그림 13), 또한 내피세포의 고유기능인 nitric oxide의 생산도 EPC에서 일어나는 것을 DAF-2DA 형광물질로 확인하였다.

### EPC와 심혈관질환과의 관계

말초 혈액 내에 순환하는 EPC는 조직의 허혈부위로 회귀하여 주로 혈관신생에 관여하는 것으로 생각되고 있으며 최근에는 혈관내피전구세포의 수나 기능 등 여러 생물학적 요소들이 동맥경화질환의 주요 위험인자인 혈관내피기능과도 관련성이 높은 것으로 알려지고 있다 (17). 이에 대표적인 동맥경화질환인 말기신부전 환자 (CRF) 에서의 EPC의 수 및 기능을 정상인과 비교 조사하였으며, 또한 강력한 심혈관위험인자로 알려진 C-반응성 단백질 (CRP)의 EPC에 대한 직접적인 영향에 대하여 연구하였다.

#### (1) 만성신부전 환자에서 EPC의 수 감소와 혈관형성능(Angiogenic Function)의 저하

만성 신부전 환자에서 심혈관계 질환의 위험 증가는 동맥경화 진행의 가속과 신혈관생성의 손상에 기인한다고 알려져있다. 이에는 혈관신생과 혈관내피기능의 보존에 중요한 역할을 하는 EPC의 수와 기능 등 생물학적 변화가 관여하고 있을 것으로 가정되어 말기신부전 환자 (CRF) 에서 EPC의 수 및 기능들을 정상인과 비교하여 연구하였다. 그 결과 만성 신부전 환자에서 혈액 내 EPC 수가 감소되어 있고 EPC의 이동능, 편입능과 같은 혈관 형성능도 저하되어 있음을 관찰하였다 (그림 14).

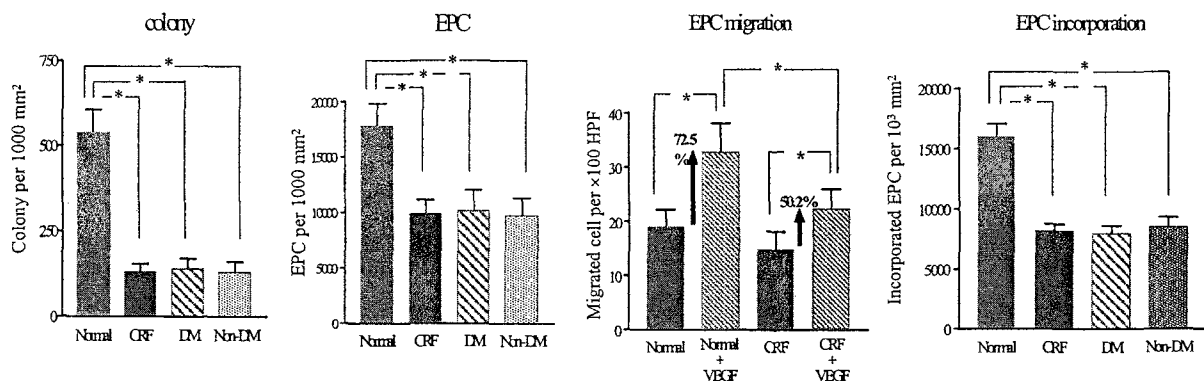


그림 14 만성 신부전 환자군과 정상인에서 EPC colony, number, migration, incorporation 분석

또한 동일한 관상동맥위험도 조건하에서도 혈액내 EPC의 수는 정상 대조군 보다 만성 신부전 환자군에서 유의하게 적었으며 이는 혈액 내 EPC의 비정상 기능이 만성 신부전 환자에서 심혈관계 질환의 진행에 중요한 역할을 한다는 것을 강하게 암시하여 준다 (그림 15).

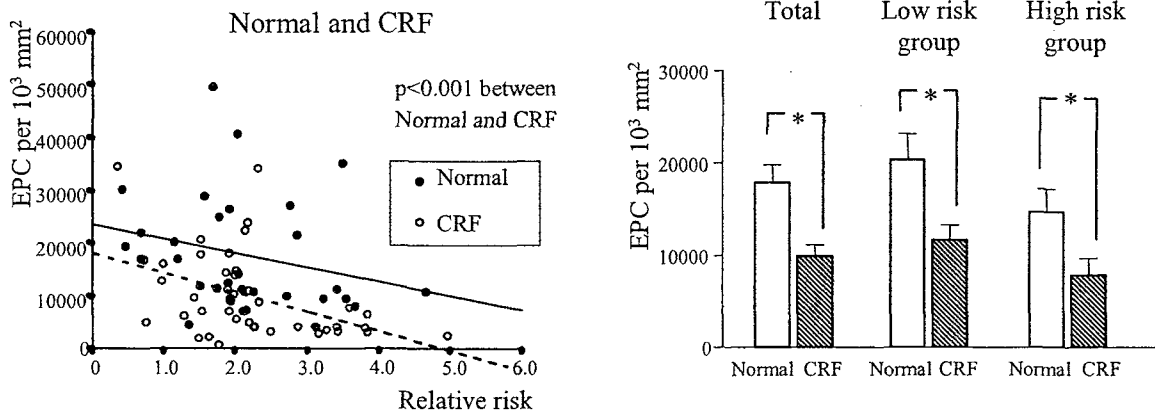


그림 15 만성 신부전 환자 및 정상군에서 관상동맥 위험도와 EPC 수 사이의 상관관계

(2) C-reactive protein (CRP)에 의한 EPC의 혈관형성능 및 동맥형성능 저하

CRP는 심혈관질환 발생빈도의 강력한 지표로 알려진 물질이며 최근 연구에서는 직접적으로 내피세포의 혈관형성기능을 저하시켜 혈관 손상을 초래하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 이러한 동맥경화유발성 CRP가 EPC의 혈관치유 기능을 약화시킬 것으로 가정하여 EPC의 혈관신생 기능에 대한 CRP의 역할을 조사하였다. 그 결과 EPC의 이동능, 내피세포와의 adhesion이 CRP에 의해 유의성 있게 감소되는 것을 관찰하였고, 또한 동맥형성에 중요한 chemo-cytokine의 발현을 선택적으로 감소시켰으며 이러한 CRP의 영향은 EPC에서의 eNOS, ICAM1 SOCS등의 유전자 발현 정도의 변화로 설명되었다 (그림 16, 17). 이러한 결과는 CRP가 직접적으로 EPC의 혈관치유기능을 저하시켜 심혈관질환 진행을 촉진시킬 수 있다는 것을 암시한다

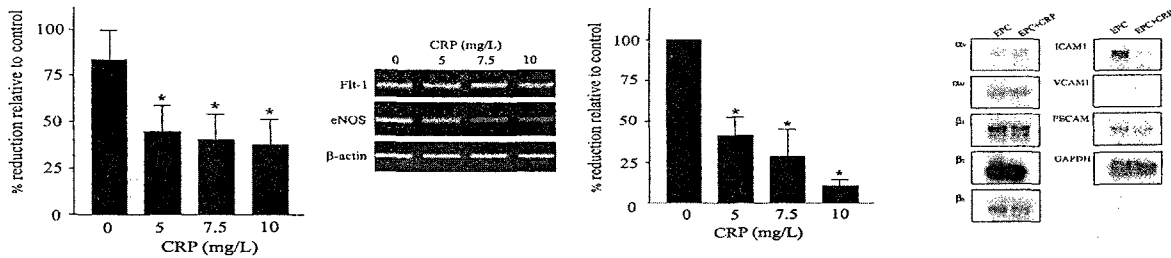


그림 16 CRP에 의한 EPC의 이동능, 내피세포와의 부착능 (adhesion) 변화 분석

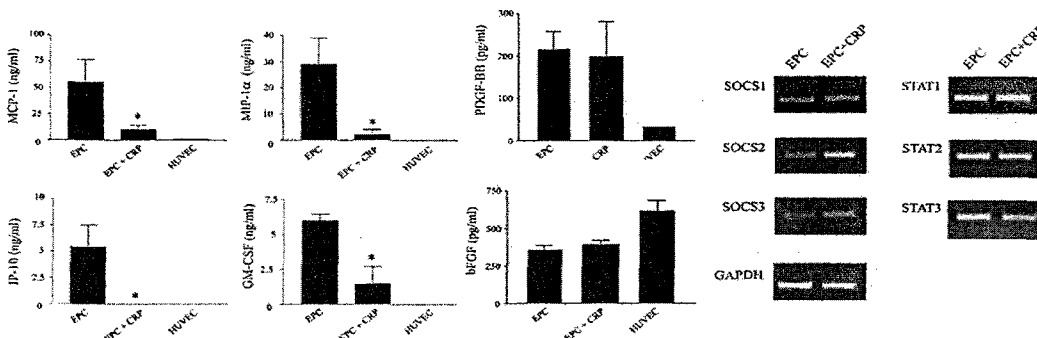


그림 17 CRP에 의한 EPC의 chemo-cytokine 발현 변화 및 SOCS 발현변화 분석

### 3-4. 외부유전자가 전달된 EPC의 기능연구

Ad-LacZ 를 이용하여 EPC 감염조건을 조사한 결과 500 MOI가 최적 dose 이었고 (그림 18 왼쪽 패널), Ad-Egr-1 감염시 세포형태상의 변화 및 독성이 관찰되지 않았으며 (그림 18 가운데 패널), Ad-eGFP 감염시에도 건강하게 자라 adenovirus를 이용한 외부유전자 전달이 EPC에서 효율적임을 확인하였다. Ad-Egr-1이 전달된 EPC에서 Egr-1 단백질이 과발현되었고, 그결과 FGF-2, IGF-II, PDGF-B, CSF-1 등의 유전자 발현이 증가함을 관찰하였다 (그림 18 오른쪽 패널).

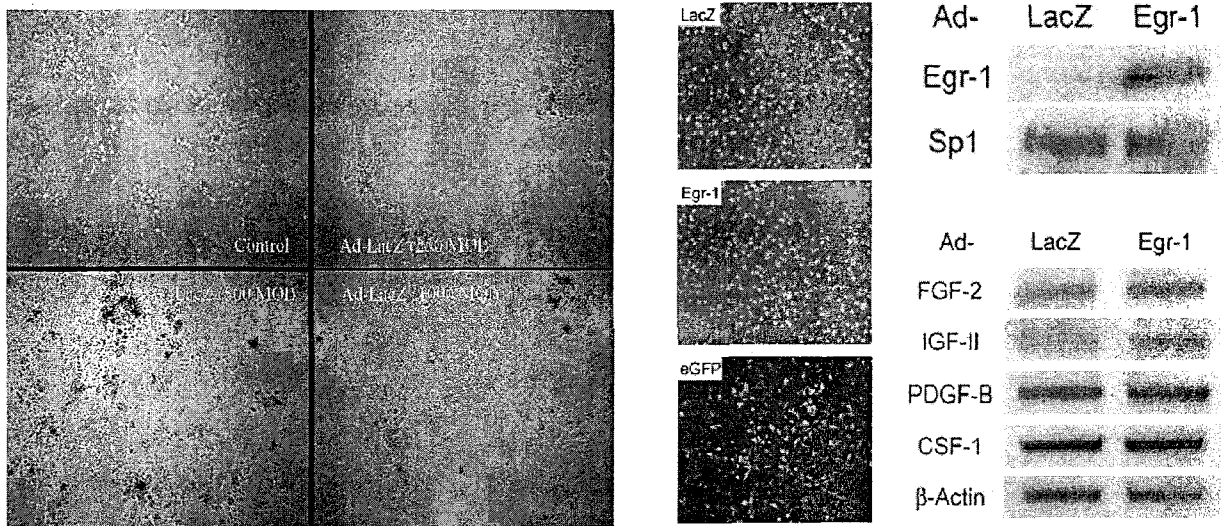


그림 18 EPC로의 adenovirus 감염조건 최적화 및 감염된 EPC로부터의 cytokine 발현 변화 분석

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 4-1. 연구개발목표의 달성도

연도	세부연구목표	평가의 착안점	자체평가
1 차 년 도	Angiogenesis/Aarteriogenesis 관여 유전자들의 기능과 상호작용 연구	기존 혈관신생인자들의 혈관신생능력 조사	기존 및 새로운 혈관신생인자들을 확보하였음 (100 % 달성)
	혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관신생 assay 확립	Ex vivo 및 in vivo assay를 개발 및 확립	새로운 ex vivo assay를 개발하였고, in vivo assay 확립함 (100 % 달성)
	허혈에 따른 세포방어 기전 관여 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구	허혈유도 유전자들의 발현변이 분석 및 허혈반응 cis-element 탐색	허혈유도 유전자들의 microarray 분석을 통해 허혈시 발현이 증가하는 유전자들을 찾아 분석함 (100 % 달성)
	혈관내피전구세포(EPC)의 기능 연구	EPC의 배양법 확립 및 기능 연구	말초혈액으로부터 EPC를 분리배양하였고 그 동정 및 기능분석법을 확립함 (100 % 달성)
2 차 년 도	Angiogenesis/Aarteriogenesis 관여 유전자들의 기능과 상호작용 연구	혈관신생유전자들간의 상호작용 분석 및 허혈동물모델에서의 검증	VEGF와 CTGF의 상호작용 및 Egr-1의 혈관신생능을 분석하였고 허혈동물모델에서 검증함 (100 % 달성)
	혈관신생 치료법 연구를 위한 혈관신생 assay 확립	Ex vivo, in vivo assay의 개선	Ex vivo assay의 sprouting cell 동정 및 in vivo hindlimb ischemia model의 혈류 측정함 (100 % 달성)
	허혈에 따른 세포방어 기전 관여 유전자 탐색 및 허혈 유도 유전자 발현 기전 연구	허혈 반응 유전자의 분석 및 허혈반응 cis-element 분석	허혈반응성이 큰 NDRG-1 유전자의 프로모터를 분석해 허혈반응 motif를 찾았고, 이중 일부를 조합해 허혈반응성이 큰 유전자 발현체를 제조함 (100 % 달성)
	혈관내피전구세포(EPC)의 이동, 기능, 분화 연구	EPC의 marker 분석 및 심혈관질환에서 EPC 분석	EPC의 marker 및 심혈관질환에서 EPC의 수와 기능에 대해 분석함 (100 % 달성)
종 합	외부유전자가 전달된 EPC의 기능분석	Ad-Egr-1이 전달된 EPC의 기능분석	Ad-Egr-1의 최적 MOI를 정하고 감염된 EPC의 기능을 분석함 (100 % 달성)
	혈관신생 병합 유전자 치료법 개발	새로운 혈관신생유전자 치료제를 찾고, 허혈반응 벡터를 개발하며, 혈관신생분석법을 개발하였는가?	Ad-Egr-1*의 혈관신생능을 동물허혈모델에서 검증하였고, 허혈반응성이 뛰어난 신규 벡터를 제조하였으며, 새로운 angiogenesis assay를 개발함 (100 % 달성)
합	혈관내피전구세포(EPC)를 이용한 세포 및 세포/유전자 치료법 개발	EPC의 배양 및 기능 분석법을 확립하고 외부유전자가 전달된 EPC의 기능을 분석하였는가?	EPC의 배양 및 기능 분석법을 확립하였으며, Ad-Egr-1이 전달된 EPC의 기능을 분석하였음 (100 % 달성)

## 4-2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

허혈성 족부질환으로 환자들을 대상으로 VEGF 유전자를 주입해 치료하는 제 1상 임상 시험을 성공적으로 마쳤으며, 이들 통해 혈관신생유전자 요법의 안정성이 검증되었고, 치료효과로는 총 9명 환자들 대다수에서 통증이 줄어들고, 혈류흐름이 개선되었으며, 일부 환자에서는 궤양이 줄어들어 등의 소견을 얻었다. 이 결과를 바탕으로 식약청과 삼성서울병원 윤리위원회의 인가를 받아 동아제약과 산업화를 위한 2상 임상시험을 진행 중인 바, 본 연구에서 나오는 결과들은 유관분야의 기술력 확대와 자생력 배양에 큰 도움을 줄 것으로 사료된다.

본 연구진이 개발한 새로운 *ex vivo* angiogenesis assay는 세계적으로도 그 중요성을 인정받아 영국 LeadDiscovery사에 의해 *TherapeuticAdvances*에 review될 article로 초대되어 소개될 예정이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 1단계 연구결과는 충분한 전임상 동물시험을 거쳐 향후 혈관신생치료 신약개발에 이용될 예정이다. 이를 위하여 동아제약, 연세대와 공동 연구를 진행 중이며, 특히 본 연구진이 개발/확립한 *ex vivo* angiogenesis assay 및 mouse hindlimb ischemia model은 국내에서 angiogenesis 관련 연구를 하는 다른 연구진들에게 이미 기술전수되어 활용되고 있으며, 타 연구진이 찾아낸 새로운 혈관신생관련/억제 물질, 또는 형질변환 mice들의 혈관신생능 (angiogenic potential)을 본 연구진이 공동연구를 통하여 테스트하여 주고 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

혈관신생관련연구는 전세계적으로도 활발히 연구되고 있다. 그간의 대표적인 angiogenic factor이었던 VEGF, bFGF, Ang 1, HGF 이외의 다른 새로운 angiogenic factor를 연구하거나, Prox-1, Hox gene 같은 transcription factor 들도 점차로 많이 혈관신생연구에 원용되고 있다. 그간 혈관신생 유전자 요법은 심혈관 질환 치료의 새로운 치료법으로서 뛰어난 임상시험 성적을 거뒀지만, 최근 EPC, monocyte등을 이용한 세포치료법들도 좋은 결과들을 보여주고 있어 앞으로는 이 두 치료법이 상호 협동/보완적인 관계로 갈 가능성이 많을 것으로 사료된다. 특히 혈관신생을 angiogenesis, arteriogenesis, vasculogenesis의 세형태로 구분할 때 현재까지 유전자 치료만으로 vasculogenesis는 얻기 힘들므로, EPC/monocyte등을 유전자치료와 병합한 방법이 매우 효과적인 혈관신생 요법이 될 것으로 기대되고 있다 (그림 19). 아울러 cytokine therapy, 기존의 drug therapy도 새로운 치료법들의 효과를 증대시키는데 훌륭히 사용될 것이다.

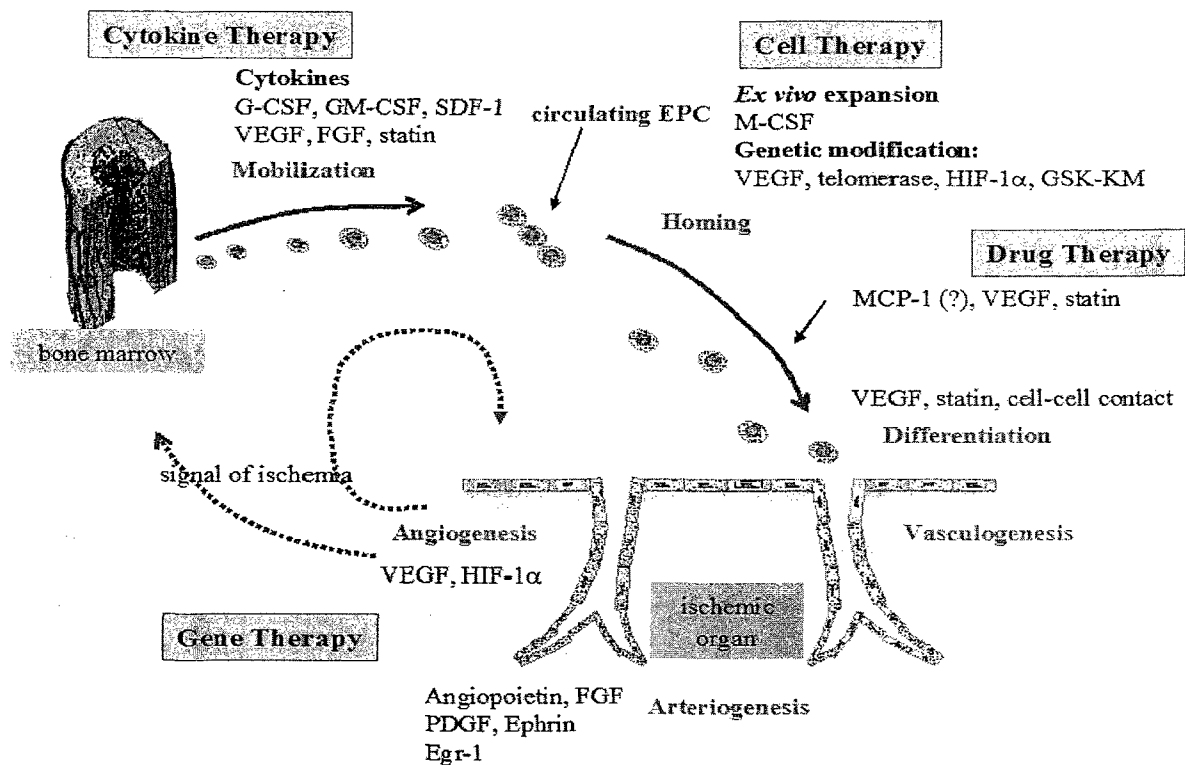


그림 19. 효과적인 혈관신생연구를 위한 다양한 접근방법들



## 제 7 장 참고문헌

1. 김덕경. 말초혈관질환. 이영우편저. 순환기학 pp332-358, 일조각, 2001.
2. 김덕경, 김현중. 허혈성 질환의 혈관신생 유전자치료. 생화학 분자생물학 소식 2001;8:9-14
3. 김덕경, 권현철. 허혈치료에 있어 혈관신생 치료법. 내분비 2001;16:328-338
4. Hirsch DD, Pantely GA. Therapeutic angiogenesis: just the basic fact(or)s, please. J Am Coll Cardiol 1997;29:1107-1108.
5. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17:605-619.
6. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. Nat Med 1997;3:158-164.
7. Simons M, Ware JA. Food for starving hearts. Nat Med 1996;2:519-520.
8. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. Circulation 2000;102:E73-86.
9. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation 1998;98:2800-2804.
10. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation 1999;100:468-474.
11. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes

collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-1123.

12. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998;28:964-973.

13. Park SW, Gwon HC, Jeong JO, Kang HS, You JR, Cho SS, Lee MJ, Lee YJ, Kim S, Kim DK. Intracardiac Echocardiographic Guidance and Monitoring during Percutaneous Endomyocardial Gene Injection in Porcine Heart. *Hum Gene Ther* 2001;12:893-903.

14. Byun J, Heard JM, Huh JE, Park SJ, Jung EA, Jeong JO, Gwon HC, Kim DK. Efficient expression of the vascular endothelial growth factor gene in vitro and in vivo, using an adeno-associated virus vector. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:295-305.

15. Oettgen P. Transcriptional regulation of vascular development. *Circ Res.* 2001;89:380-388.

16. Svaren J, Ehrig T, Abdulkadir SA, Ehrenguber MU, Watson MA, Milbrandt J. Egr1 target genes in prostate carcinoma cells identified by microarray analysis. *J Biol Chem* 2000;275:38524-38531.

17. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocytic lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ. Res.* 2003;93:980-989.

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

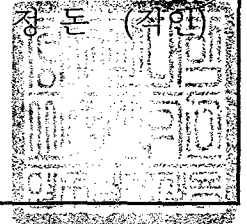
사업명	중사업명	국가지정연구실 사업		
	세부사업명	국가지정연구실 사업		
과제명	혈관신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술 개발			
연구기관	성균관대학교	연구책임자	김 덕 경	
총연구기간	2002년. 6월. 25일. ~ 2004년. 6월. 24일. (24개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	520,000		520,000	
기술분야	생명공학 (BT)			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ( )	2. 기술이전(√)	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용( )
	5. 선행 및 기초연구 ( )	6. 기타목적활용 (교육연구)(√)	7. 활용중단(미활용)( )	8. 기타 ( )

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.  
2. 기술요약서 1부

2004 년 8 월 20일

연구책임자 : 김 덕 경  
연구기관장 : 서 장 돈



과학기술부장관 귀하

[첨부1]

## 연구결과 활용계획서

### 1. 연구목표 및 내용

기존의 허혈성 심혈관 질환의 치료법인 약물치료, 수술치료 등에 반응하지 않거나 실패한 경우, 더 이상의 치료법이 없이 환자는 사망에 이르게 되어 소위 "no option patient"를 위한 새로운 치료전략이 필요하다. 본 연구진은 허혈성 심혈관 질환의 새로운 치료법의 개발을 위하여, 1) angiogenesis /arteriogenesis에 관여하는 유전자들의 역할과 기능에 대한 분자 생물학적인 연구와 이들의 상호작용이 세포에 미치는 영향을 연구하고, 2) 간편하고 효율적인 허혈성질환, angiogenesis assay 모델을 개발, 다양한 혈관신생인자의 조합을 테스트하며, 3) 효율적인 유전자 전달 방법을 개발하고, 4) hypoxia에 의한 유전자 발현 기전을 연구하여, 새로운 치료유전자와 hypoxia-responsive element를 발굴하여 궁극적으로 "혈관신생 병합 유전자치료법 (Combined Angiogenic Gene Therapy; CAGET)"을 개발하고자 한다.

본 연구는 최근 급속도로 발전하고 있는 혈관신생의 분자생물학적인 기초연구를 임상 치료에 접목시키는 중간 단계의 "Translational Research"로서 허혈성 심혈관 치료의 새로운 paradigm을 제공할 것으로 사료된다.

### 2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

#### 가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원번호	공고일자 출원일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
클로트리마졸을 포함하는 혈관재협착 예방 및 치료용 약학 조성물 및 스텐트	Korea 10-2002-0041305	2002. 7. 15.	김덕경, 권현철, 장형석	한국	

#### 나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

다년간의 전임상연구 및 임상시험 관련 지식들이 있음

라. 발생품 및 시작품 내역

(해당사항 없음)

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국명	SCI게재 여부 (IF)
Exp Mol Med	Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation	2002년 9월 1일	34	대한 생화학 분자생물학회	한국	O (1.2)
Exp Mol Med	Improved expression by cytomegalovirus promoter/enhancer and behavior of vascular endothelial growth factor gene after myocardial injection of naked DNA	2002년 9월 1일	34	대한 생화학분자 생물학회	한국	O (1.2)
순환기	전기자극에 의한 유전자 전달 골격근을 이용한 간편하고 정량적인 혈관신생 유전자 평가 시스템 개발	2003년 4월 1일	33	대한 순환기 학회	한국	X
Mol Ther	A novel <i>ex vivo</i> angiogenesis assay that is based on electroporation-mediated naked plasmid DNA delivery to skeletal muscle	2004년 3월 1일	9	American Society of Gene Therapy	미국	O (SCIE) (6.3)
Arterioscler Thromb Vasc Biol	Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure	2004년 6월 1일	24	American Heart Association	미국	O (6.4)
Biophys Biochem Res Commun	C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells	2004년	In Press	Academic Press	미국	O (2.9)
J Korean Med Sci	Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes	2004년	In Press	The Korean Academy of Medical Sciences		O (SCIE) (0.633)
계: 7 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

(외국학회 발표)

학술발표제목	발표자	학술회의 명칭 (국명)	일 시
Aldosterone upregulates connective tissue growth factor expression via mineralocorticoid receptor and p38 MAPK pathway in cardiac myoblast cells	이영삼	2003 AHA meeting (Florida, USA)	2003. 10. 9. - 10.
C-reactive protein inhibits the endothelial progenitor cell survival, migration, and adhesion onto endothelial cells	서원희	2004 International Vascular Biology Meeting (Canada)	2004. 6. 1. - 5.
A novel <i>ex vivo</i> angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle	장형석	2004 International Vascular Biology Meeting (Canada)	2004. 6. 1. - 5.
Development of a novel drug-coated stent using curcumin as antiproliferative drug	장형석	2004 International Vascular Biology Meeting (Canada)	2004. 6. 1. - 5.
Development of versatile mammalian expression vectors that respond to hypoxia	이재영	2004 International Vascular Biology Meeting (Canada)	2004. 6. 1. - 5.
계: 5 건수			

## (국내학회 발표)

학술발표제목	발표자	학술회의명칭 (국명)	일시
Upregulation of connective tissue growth factor gene expression by aldosterone in cultured cardiac myoblast cell line, H9c2	이영삼	대한순환기학회 (한국)	2002. 10. 10
Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease (PAD)	김현중	대한순환기학회 (한국)	2002. 10. 10
Development of a novel angiogenesis assay using naked DNA-transfected skeletal muscle explants	장형석	대한순환기학회 (한국)	2002. 10. 10
Adenoviral-mediated delivery of Egr-1 gene upregulates a set of angiogenesis-related genes and increases tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia	이영삼	대한순환기학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Development of versatile mammalian expression vectors that respond to hypoxia	이재영	대한순환기학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Endothelial progenitor cells from patients with end-stage renal disease exhibit impaired proliferation, migration, and incorporation into vascular structures	최진호	대한순환기학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Connective tissue growth factor expression is increased in lung of the rat treated with monocrotaline: implications for pulmonary hypertension and its treatment	이영삼	대한순환기학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Overexpression of early growth response factor-1 induces angiogenesis in muscle and increases blood flow in a murine model of hindlimb ischemia	변종희	한국분자세포 생물학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
p38 MAPK pathway as well as mineralocorticoid receptor is involved in aldosterone-mediated upregulation of connective tissue growth factor expression in cardiac myoblast cells	이영삼	한국분자세포 생물학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Expression of connective tissue growth factor is upregulated in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension	이영삼	한국분자세포 생물학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Development of a novel angiogenesis assay based on explant culture of the skeletal muscle transfected with naked DNA by electroporation	장형석	한국분자세포 생물학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.
Analysis of endothelial progenitor cells from the patients with end-stage renal disease reveals decreased number and impaired function	김경리	한국분자세포 생물학회 (한국)	2003. 10. 9. - 10.



### 3. 연구성과

가. VEGF 유전자 치료 임상시험을 (주) 동아제약과 함께 성공적으로 수행하여 오고 있음.

나. 첨단기술 및 정보의 제공

(1) pJDK vector 제공: 연세대 장양수교수, 포항공대 성영철교수, KAIST 고규영교수, 울산의대 이휘란교수, 이기업교수, 성균관의대 이명식교수, 계명대의대 박종구교수

(2) Egr-1 관련 발현 벡터들을 제공  
: 포항공대 김경태 교수 (pSC-hEgr-1, pSC-hNAB1, pSC-hNAB2)

(3) naked DNA의 유전자효율을 극대화시키는 electroporator 기술전수  
: 울산의대 이기업교수, 국립보건원

### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

VEGF 임상시험 제 1상을 2003년 6월에 완료하였고 2004년부터 제 2상을 시행중이다.

나. 활용방법

현재 제 2상의 임상시험이 진행 중이므로, 아직 가시적인 기술이전 및 활용계획의 단계가 아님.

다. 차년도이후 활용계획

현재 진행중인 임상시험이 수년 내에 성공리에 종결될 경우, 이와 관련된 know-how를 산업화할 예정이다. 또 본 과제에서 도출되는 혈관신생치료, 유전자의 기능 연구방법, 유전자 발현 제어 기술, 유전자 전달 기술, 혈관내피전구세포 배양 및 특성 분석법, 전구세포 이용 유전자 전달법 등은 지적 재산화할 것이며, 또 이를 최소한의 비용으로 국내 연구자들에게 제공하여 국내 의과학연구의 수준 제고에 일조할 계획이다.

### 5. 기대효과

- 향후 활용에 따른 기술적, 사회·경제적 파급효과 -

본 연구결과가 성공적일 경우 본 연구의 결과가 성공적일 경우 다른 치료대안이 없는 "no option patient"들의 치료에 실질적 도움을 줄 것으로 기대되며, 이에 대한 유전자

치료 및 전구세포치료 기술을 원용함으로써 유전질환과 만성 난치성 질환들의 치료에도 이용될 수 있을 것이다. 아울러 본 연구에서 개발/축적한 유전자 치료/전구세포치료 know-how들은 첨단 임상기술로서 국내의 학제적 임상연구에 널리 활용될 수 있을 것이다. 경제적인 면에서는 외국에서 개발되고 있는 비싼 유전자/세포 치료 비용 (1인당 약 10,000불)을 국산화를 통해 절감하는 효과가 있다.

#### 6. 문제점 및 건의사항

(해당사항 없음)

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

1. 유전자의 혈관신생능력을 간편하게 조사할 수 있는 새로운 혈관신생분석법
2. 허혈과 증금속으로 발현을 유도할 수 있는 고효율의 유전자 발현 벡터

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0203-00-0048			
과제명	혈관신생 촉진을 이용한 허혈성 심혈관 질환의 유전자 치료 기술 개발			
사업명	국가지정연구실 사업			
세부사업명	국가지정연구실 사업			
연구기관	성균관대학교	기관유형	학	
참여기관(기업)				
총연구기간	2002. 6. 25. ~ 2004. 6. 24.			
총연구비	정부( 520,000 )천원    민간(         )천원    합계 ( 520,000 )천원			
연구책임자 1	성명	김 덕 경	주민번호	
	근무기관 부서	성균관대학교 의과대학 내과학교실	E-mail	dkkim@smc.samsung.co.kr
	직위/직급	교수	전화번호	02-3410-3413
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	변 종 회	소속/부서	성균관대학교 의과대학 의학과
	직위/직급	연구조교수	E-mail	jonghoe@smc.samsung.co.kr
	전화번호	02-3410-6827	FAX	02-3410-6829
	주소	삼성서울병원 별관 8층 분자치료연구센터 (135 - 710)		

## ■ 기술의 주요내용 (1)

### [기술의 개요]

혈관신생유전자 요법 및 항암요법의 개발에 있어 혈관신생을 촉진 및 억제시킬 수 있는 유전자들의 탐색 및 발견은 매우 중요하다. 기존의 angiogenesis assay들은 주로 단백질이나 약물 등을 test할 수 있었던 반면, 유전자들을 직접 검사하지는 못했다. 본 기술은 mouse의 골격근과 naked DNA + electroporation을 이용하여 특정 유전자들 및 그들 조합의 혈관신생 능력을 검증하는 분석법이다. 발현능이 우수한 pJDK vector를 이용하여 테스트할 유전자를 발현시키고, naked DNA의 낮은 전달효율을 제고시키기 위해 전기충격 (electroporation)을 이용한다. 혈관신생능력은 growth factor-reduced matrigel 상에서 explant culture하여 skeletal muscle 주위로 뻗어나오는 sprouting cell들의 면적을 측정하여 결정한다. VEGF<sub>165</sub> 유전자를 이용한 실험에서 재현성있는 분석 결과들이 얻어졌고, 새로운 angiogenesis assay로 예측한 CTGF 유전자의 angiogenic capacity가 *in vivo* hindlimb ischemia에서 그대로 재현되었다. 따라서 이 gene-based angiogenesis assay가 매우 유용한 혈관신생유전자 분석법임을 보여주고 있다.

### <기술적 특징>

- (1) 유전자 전달에 의한 angiogenesis assay로서 pro-/anti-angiogenic gene therapy에 많은 도움을 줄 수 있는 분석법임
- (2) 유전자 발현 효율이 좋은 AAV ITR을 함유한 pJDK vector를 사용
- (3) 최적화된 전기충격을 가해 부작용 최소화 및 유전자 전달 효율 극대화를 이룸
- (4) Explant culture상에서 sprouting cell들을 실시간으로 관찰할 수가 있음

### [용도 · 이용분야]

- (1) 새로운 혈관신생 촉진 유전자의 screening
- (2) 새로운 혈관신생 억제 유전자의 screening
- (3) 유전자 조합들이 갖는 혈관신생 및 억제능을 측정

## ■ 기술의 주요내용 (2)

### [기술의 개요]

허혈특이적 발현 벡터는 고형암 및 혈관신생치료에 유용하게 사용될 수 있는데, 본 연구에서는 EBS (5'-CTAGCCGCCCTCG-CT-3'), MRE (5'-CTAGCAGGGAGCTCTGCACTCCGCCCGAAAAGT-3') 등을 HRE (5'-CTAGCGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTCTGTCAGGACGTGACAT-3')와 조합함으로써 기존의 벡터보다 우수한 허혈 특이적 발현을 유도하고 고효율의 유전자 발현을 매개하며, 허혈이외의 여러 자극으로 유전자 발현을 유도할 수 있는 새로운 유핵발현벡터를 개발하였다. EBS, MRE 등은 단독으로는 허혈 반응성이 미미하지만, 1) HRE와 조합시에 뛰어난 허혈 특이적 유전자 발현을 나타내는 점이 주목할 만하고, 2) EBS, MRE, HRE 세 DNA motif의 순서를 최적화하여 가장 우수한 EBS-MRE-HRE design (E-M-H)을 얻었으며, 3) E-M-H의 우수성을 HeLa, C2C12, LLC1 등의 여러 세포주에서 검증하였고, 4) Luciferase 이외에 bFGF등의 therapeutic gene을 사용할 때도 그 우수성이 확인되었으며, 5) 허혈이외에도  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , deferoxamine 등의 다양한 자극으로도 유전자 발현을 유도할 수 있는 점 등이 새로운 발견들이다.

### <기술적 특징>

- (1) EBS-MRE-HRE 조합은 기존에 보고된 바 없는 새로운 chimeric combination으로 허혈에 의한 유도 발현 정도가 HRE에만 의존한 벡터보다 우수함
- (2) Induction된 절대적 발현량도 널리 사용되는 HCMV promoter보다 높음
- (3) 금속 등의 다양한 다른 자극에 의해 높은 유도 발현을 매개할 수 있음

### [용도·이용분야]

- (1) 고형암 치료시 허혈특이적인 항암유전자의 발현
- (2) 허혈 부위에서의 새로운 혈관신생 촉진 치료법
- (3) 다양한 스트레스에 대한 유도발현 기작 연구





■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술  
(해당사항 없음)

[ 기술개요 ]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[ 기술을 도출한 과제현황 ]

과제관리번호				
과제명				
사업명				
세부사업명				
연구기관		기관유형		
참여기관(기업)				
총연구기간				
총연구비	합계 : ( )백만원 - 정부 : ( )백만원    민간 : ( )백만원			
연구책임자	소속		성명	
	전화번호		E-mail	
연구개발 주요내용				