B형간염바이러스 X 유전자를 표적으로 하는 렌티바이러스 매개 short hairpin RNA의 항바이러스 효과

서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 내과

김진욱 · 이상협 · 박영수 · 정숙향 · 김나영 · 이동호

Abstract

Inhibition of *in vitro* hepatitis B virus replication by lentivirus-mediated short-hairpin RNA against HBx

Jin-Wook Kim, M.D., Sang Hyub Lee, M.D., Young Soo Park, M.D.,
Sook-Hyang Jeong, M.D., Nayoung Kim, M.D., Dong Ho Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul,
Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Backgrounds/Aims: Hepatitis B virus (HBV) replicates via RNA intermediates, which could serve as targets for RNA interference (RNAi). Vector-mediated short-hairpin RNA (shRNA) can induce sustained RNAi in comparison to small interfering RNA. Lentiviral vector is known to induce prolonged RNAi with high transduction efficiency. In this study, we sought to test the *in vitro* efficacy of shRNA delivered by a lentiviral vector in suppressing the replication of HBV. **Methods:** Two shRNA sequences against the hepatitis B viral protein HBx (sh1580 and sh1685) were cloned downstream of the U6 promoter in an HIV-based plasmid to generate third-generation lentiviral vectors. HepAD38 cells were transduced with anti-HBx lentiviral vectors, and HBV replication was induced for 5 days. HBV DNA was isolated and quantified using real-time PCR. **Results:** Lentiviral vectors encoding the shRNA against HBV transduced HepAD38 cells with high efficacy. The total intracellular HBV DNA content was significantly reduced by both sh1580 and sh1685 (2.9% and 12.0%, respectively; $P<0.05$). HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) was also suppressed significantly (19.7% and 25.5%, respectively; $P<0.05$). **Conclusions:** Lentivirus-mediated delivery of shRNA against HBx can effectively suppress the replication of HBV and reduce HBV cccDNA in cell culture systems. (**Korean J Hepatol** 2008;15:15-24)

Key words: Hepatitis B virus; Lentivirus; MicroRNAs; RNA interference; siRNA

◇ Received September 3, 2008; revised February 2, 2009; accepted February 17, 2009

◇ Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; HBx, hepatitis B x protein; PCR, polymerase chain reaction; RNAi, RNA interference; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA

◇ Corresponding author: Jin-Wook Kim, E-mail: kimjw@snuh.org; Phone: 031) 787-7009; Fax: 031) 787-4051
주소: 경기도 성남시 분당구 구미동 300, 분당서울대학교병원 소화기내과 (우)468-802

※ This work was supported by The GlaxoSmithKline Research Fund of the Korean Association for the Study of the Liver (2005 GlaxoSmithKline Academic Scholarship of the Korean Association for the Study of the Liver).

서 론

RNA interference(RNAi)는 세포 내에서 RNA를 매개로 하여 염기서열에 특이적으로 표적 유전자의 발현을 조절하는 기전이다. 두 가닥의 RNA(double stranded RNA)가 RNaseIII enzyme Dicer에 의하여 21개의 염기로 이루어진 small interfering RNA(siRNA)로 처리된 후 RNaseH core enzyme argonaute와 결합하여 RNA-induced silencing complex(RISC)를 형성하며, 이는 상보적 염기서열의 전령 RNA(messenger RNA)를 분해함으로써 특이적으로 표적 유전자의 posttranscriptional gene silencing(PTGS)을 유도한다.¹

B형간염바이러스(hepatitis B virus; HBV)는 세포 내 증식 과정 중 역전사 과정을 거치며, 역전사의 주형이 되는 RNA intermediate는 siRNA의 표적이 될 수 있으리라 추론할 수 있다. 실제로 세포 배양 및 생쥐 모델에서 siRNA가 HBV RNA를 분해함으로써 HBV의 증식을 억제할 수 있음이 여러 보고에서 확인되었다.²⁻⁶ 초기의 HBV에 대한 RNAi 관련 연구는 대부분 합성 siRNA(double stranded RNA oligonucleotide)를 이용하였는데, 합성 siRNA를 이용한 RNAi는 시험관 내에서 표적 염기서열에 대한 dsRNA를 직접 세포에 핵산전달감염(transfection)시킴으로써 단시간 내에 특정 핵산서열에 의한 유전자 발현 억제 효과를 스크리닝할 수 있다는 장점이 있으나, 반감기가 짧아 유전자 발현 억제 효과가 2~3일간 정도만 유지되므로 지속적인 항바이러스 효과를 나타내기 위해서는 다량의 합성 dsRNA를 반복 주입하여야 하는 문제점이 있다. Short hairpin RNA(shRNA)를 이용한 RNAi의 경우, 합성 dsRNA를 직접 주입하는 대신 hairpin 구조의 단일가닥 RNA를 전사하는 플라스미드 DNA를 이용하며 세포 안으로 주입된 DNA로부터 전사된 shRNA는 microRNA와 유사한 처리 과정을 거쳐 최종적으로 siRNA로 변환된다.^{7,8} 세포 내에 주입된 DNA가 잔존하는 동안 계속적으로 shRNA의 전사가 일어나므로 siRNA보다 오래 RNAi가 유지되지만, naked plasmid로부터 shRNA가 전사되려

면 표적 세포의 핵으로 plasmid가 이동하여야 하므로 활발히 분열하는 세포에서만 plasmid의 핵 내 전달이 가능하다. 또한, 주입된 foreign DNA는 다양한 경로로 세포 내에서 비활성화되어 장기적인 발현을 기대하기 어렵다.

렌티바이러스(lentivirus)는 retroviral vector의 일종으로 분열하지 않는 세포도 형질도입(transduction)이 가능하며 주입된 유전자는 수개월 이상 발현이 가능하므로,⁹ RNAi를 장기간 유지시키는 데 유리한 장점을 가진다.¹⁰

본 연구에서는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 HBV x protein 유전자(HBx)를 표적으로 하는 shRNA를 세포 내에 발현시킨 후, 유발된 RNAi에 의하여 HBV의 증식이 억제되는지를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

1 HBx gene에 대한 shRNA의 제작

HBx 유전자 염기서열을 표적으로 하는 21개 핵산의 siRNA 서열은 Ambion사(Austin, Tx, USA)의 web-based program을 이용하여 스크리닝하였으며 (siRNA Target Finder, http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), 이 중 기존의 보고^{11,12}에서 효과적으로 HBV를 억제하였던 두 개의 염기서열(1580-1604, TGCACCTTCGCTTCACCTCTGCACGT 1685-1705, AACGACCGACCTTGAGGCCTA)을 선택하였다(표 1, 그림 1).

2. shRNA를 발현하는 렌티바이러스 벡터의 제작

각각의 표적 염기서열에 대한 short hairpin RNA(shRNA) expression cassette는 polymerase chain reaction(PCR)으로 합성하였다.^{10,13,14} Human U6 promoter sequence를 가지는 pTZ U6+1 plasmid를 template로 하여 5' U6 universal primer(5'-ATAAGAATGCGGCCGCCCCGGGGATCCAAGGTCGGG-3')와 표적 염기서열을 포함하는 3' primer(표 1)를 사용하여 기존의 보고와 동일한 방법으로 증폭하였다.^{10,15} 증폭된 PCR product를 1%

Table 1. Primer sequences for the generation of shRNA-expressing cassettes against HBX gene

Name	Sequence	Location*
Scrambled shRNA ⁴⁶	5'-GGAAGATCTAGAAAAAAGCACCTATAACAACGGTAGCTACACAACTACCGT TTGTTATAGGTGCCGGTGTTCGTCCTTTCCACAAG-3'	
sh1580 ¹¹	5'-GGAAGATCTAGAAAAAATGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTTCTCTTGAA ACGTGCAGAGGTGAAGCGAAGTGCACCGGTGTTCGTCCTTTCCACAAG-3'	1580-1604
sh1685 ¹²	5'-GGAAGATCTAGAAAAAACGACCGACCTTGAAGCCTACTACACAAATAGGCC TCAAGGTCCGTCGCCGGTGTTCGTCCTTTCCACAAG-3'	1685-1705

Underlined nucleotides indicate siRNA sequences (sense) for scrambled control and target area in HBX gene. Italicized nucleotides indicate loop sequence of shRNA.

*Nucleotide numbering is based on the reference sequence AF286594.

Figure 1. Organization of the HBV genome with respect to shRNA sequences targeting HBV RNA. The four arrows indicate major open reading frames, and vertical bars indicate the initiation sites of each transcript of HBV. The target sequences of two shRNAs (sh-1580 and sh-1685) are marked on the X gene area.

agarose gel에서 전기영동으로 분리하여 3세대 렌티바이러스 backbone plasmid(pHIV7-GFP PL, 그림 2)¹⁰의 *NotI* / *XbaI* restriction enzyme site에 클로닝하였으며, 염기서열 분석을 통하여 해당 sh-RNA expression cassette가 삽입되었음을 확인하였다. 합성된 재조합 렌티바이러스 backbone plasmid는 core packaging plasmid(pMDLg/pRRE, pRSV-Rev)와 envelope plasmid(pMD2.VSVG)와 함께 calcium phosphate를 이용하여 293FT packaging cell line(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 핵산 전달감염시켰으며,¹⁶ 16시간이 경과한 후 배양액을 교환하여 24시간 동안 추가로 배양한 후 상청액을

Figure 2. HIV7 lentiviral backbone plasmid. PCR-amplified shRNA shuttle cassettes are cloned into the polylinker area.

얻어 real-time reverse transcriptase(RT)-PCR 법으로 렌티바이러스 genomic RNA titer를 정량하였다.¹⁷ 요약하면, 배양 상청액 100 μ L로부터 Trizol(Invitrogen) 1 mL를 이용하여 RNA를 추출한 후 10 μ L의 증류수에 녹였다. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPPE)에 대한 primer(WPRE1277F, 5'-CCGTGTGCAGGCAACGTG-3; WPRE1361R, 5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3')와 probe(WPRE-1314P, 5'-FAM-TGCTGACGCAACCCCCACTGT-TAMRA-3')¹⁷를 사용하여 one-step real-time RT-qPCR을 시행하였으며,¹⁸ PCR 반응의 조성(20 μ L)은 다음과 같다: ABI real time PCR master mix(1x, Applied Biosystems, Foster City, USA), forward and reverse primer 800 nM, probe 200

nM, RNase OUT 1 U/ μ L, SuperScript III RT (Invitrogen) 5 U/ μ L, RNA template 2 μ L. PCR cycle 은 역전사 과정을 50°C에서 30분, 95°C 10분으로 시행하였으며, 이후 PCR 증폭을 40 cycle(95°C 15 초, 60°C 1분) 시행하였다.

3. *In vitro* model of HBV replication and transduction of lentiviral vectors in HepAD38 cells

시험관 내 HBV 증식의 모델로는 HepG2 세포를 기반으로 tetracycline-responsive CMV-IE promoter로 조절받는 HBV genome을 가지는 HepAD38 cell¹⁹을 이용하였다. 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's/F-12 medium(GIBCO Invitrogen)을 이용하였고 10% fetal bovine serum, 50 μ g/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 0.3 μ g/mL tetracycline, 400 μ g/mL G418(Invitrogen)을 첨가하였다. 12-well tissue culture plate에 1×10^5 /mL의 세포를 분주하고 7일 동안 배양한 후 2개의 60 mm tissue culture dish에 계대배양하였으며, 이 때 dish당 1×10^9 개의 lentiviral particle을 polybrene(4 μ g/mL, Sigma - Aldrich Chemical Co., St. Louis, MI)과 함께 배양액에 첨가하였다. 다음날부터 5일간 배양액에서 tetracycline을 제거하여 HBV replication을 유도하였다. 형광현미경으로 green fluorescent protein(GFP) 발현을 확인하였으며, 200배 시야에서 전체 세포 중 형광을 보이는 세포를 비교하여 핵산전달 효율을 확인하였다. 한 개의 tissue culture dish로부터 genomic DNA extraction kit(Bioneer, 대전, 대한민국)를 이용하여 DNA를 분리, 20 μ L의 증류수에 녹인 후 1 μ L를 total HBV DNA 정량에 이용하였다. 나머지 한 dish로부터 HepAD38 cell의 세포핵에서 단백질을 결합된 DNA 분획을 Hirt extraction^{20,21}을 이용하여 제거하여 단백질과 결합하지 않은 HBV covalently closed circular DNA(HBV cccDNA) 분획을 분리하였다. Plasmid-safe DNase(Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA)를 이용하여 contaminating chromosomal DNA를 제거한

후 20 μ L의 증류수에 녹여 1 μ L를 HBV cccDNA 정량에 이용하였다.

HBV에 대한 렌티바이러스 매개 shRNA의 장기적 억제 효과를 확인하기 위하여, 2주간 HBV 발현을 유도시킨 HepAD38 세포를 96-well tissue culture plate에 well당 1×10^3 개씩 분주한 후 곧 이어 sh1580 렌티바이러스를 2×10^8 particles/well의 농도로 넣어 transduction시켰으며, tetracycline이 포함된 배양액에서 4주간 계대배양하였다. Lentiviral transduction 자체가 HepAD38 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 동일한 수(5×10^5 /dish)의 sh1580 주입 HepAD38 세포와 control HepAD38 세포를 60 mm tissue culture dish에 분주한 후 1주간 배양하였으며, trypsin 처리로 세포를 얻어 trypan blue염색 후 total / viable cell number를 구하였다. Trizol을 이용하여 RNA를 분리한 후 3 μ g의 RNA를 random hexamer를 시발체로 하여 SuperScriptIII RT로 역전사하였으며, 60 ng에 해당하는 cDNA를 이용하여 아래에 기술된 HBS gene real-time quantitative PCR로 HBV RNA를 정량하였고, GAPDH로 보정하여 상대적 cDNA 양을 계산하였다. GAPDH 정량에 이용한 primer / probe는 다음과 같다: forward(500 nM), 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; reverse(500 nM), 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'; probe 5'-FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-TAMRA.

HBV relaxed circular DNA와 HBV cccDNA의 정량은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 real-time quantitative PCR assay로 측정하였다. 세포 내 HBV DNA의 총량은 HepAD38 cell로부터 분리한 총 DNA를 이용하여 HBs gene 부위에 대한 real-time quantitative PCR을 시행하였으며,²² 사용된 primer와 fluorescent probe의 염기서열은 다음과 같다: HBV rcDNA-forward, 5'-CACATCAGGATTCCTAGGACC-3'; HBV rcDNA-reverse, 5'-GGTGAGTGATTGGAGGTTGG-3'; probe, 5'-FAM-CAGA

Figure 3. Green fluorescent protein (GFP) expression in HepAD38 cells transduced with shRNA-encoding lentivirus. Fluorescence images were superimposed on light-microscopy images to assess transduction efficiency. Control cells without lentiviral transduction showed no fluorescence (A), whereas cells transduced with lentivirus encoding scrambled shRNA (B), sh-1580 (C), and sh-1685 (D) exhibited uniform cytoplasmic expression of GFP, demonstrating a lentiviral transduction efficiency of more than 95% (magnification $\times 200$). The images are representative of three independent experiments.

GTCTAGACTCGTGGTGGACTTC-TAMRA-3'. 반응 조건은 총 20 μ L의 반응액으로 맞추어 Taq-Man[®] Universal PCR Master Mix(1x, Applied Biosystems), template 1 μ L, forward / reverse primer 500 nM, probe 200 nM로 사용하였다. 반응 cycle은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 동안 반응시킨 후 95°C에서 20초, 60°C에서 1분으로 45 cycle 증폭하였다. HBV sequence를 가지는 pAM6 plasmid(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} /mL의 농도로 만들어 standard로 이용하였으며, 정량에 이용된 DNA의 총량(이용된 세포의 수)을 보정하기 위하여 β -globin에 대한 real-time PCR을 동시에 시행하였다.²³ β -globin-forward, 5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'(final 900 nM); β -globin-reverse, 5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'(final 900 nM); β -globin-probe, 5'-FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3'(final 200nM).

HBV cccDNA의 정량은 chimeric primer를 이용한 기존의 보고대로 시행하였다.²⁴ 요약하면, chimeric primer(5'-tcgctttcgggtcctcatgcAacgtgc-3')를 이용하여 HBV DNA(+) strand에 대한 상보적 DNA를 합성하였으며 반응 조건은 다음과 같다: 10 μ L reaction당 1 $\times$ PCR reaction buffer, 500 nM chimeric primer, 200 nM each dNTP, 1 U Hot-StarTaq DNA polymerase(Qiagen Korea, 서울, 대한민국), 1 μ L DNA template. 94°C에서 7분간 initial denaturation시킨 후 94°C에서 20초, 50°C에서 20초, 72°C에서 45초로 15 cycle 증폭시켰다. 1 차반응의 산물 3 μ L를 이용하여 real-time quantitative PCR을 시행하였으며 반응 조건은 다음과 같다: 10 μ L reaction당 TaqMan[®] Universal PCR Master Mix(1x, Applied Biosystems), forward primer 5'-tcgctttcgggtcct-3'(500 nM), reverse primer 5'-GCACCTCTCTTTACGCGGT C-3'(500 nM), probe 5'-FAM-CCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCG-3'-TAMRA(250 nM). 반응 cycle은

Figure 4. Quantification of HBV DNA in HepAD38 cells transduced with shRNA-encoding lentivirus. Real-time quantitative PCR was performed to measure the total HBV DNA (A) and HBV cccDNA (B). Final results are normalized against β -globin, which was measured simultaneously to ensure an identical DNA input for each group. Data are mean and SD values of triplicate samples from two independent experiments. * $P < 0.05$ vs. scrambled shRNA.

50°C에서 2분, 95°C에서 10분 동안 반응시킨 후 93°C에서 10초, 62°C에서 35초로 45 cycle 증폭하였다.

통계분석은 independent *t*-test를 이용하였으며, MedCalc(version 9.6.3.0, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. HepAD38 cell에서 shRNA-encoding lentivirus의 형질도입 효율

shRNA를 발현하는 렌티바이러스를 HepAD38 cell에 형질도입시킨 후 5일째에 형광현미경을 이용하여 GFP 발현을 확인하였을 때 렌티바이러스를 처리하지 않은 대조 세포에서는 형광신호를 관찰할 수 없었으나 scrambled shRNA 및 HBV에 대한 shRNA를 encoding하는 렌티바이러스를 첨가한 culture dish에서는 대부분 세포의 세포질에서 GFP 발현을 확인할 수 있었다(그림 3).

2. 렌티바이러스를 매개로 주입된 HBx-targeting shRNA가 HBV의 증식에 미치는 영향

Lentivirus를 매개로 HBx에 대한 shRNA를 형질도입한 HepAD38 cell로부터 핵산을 분리하여

정량적 PCR로 HBV DNA의 발현을 측정하였을 때 세포 내 총 HBV DNA는 scrambled shRNA와 비교하여 2.9%(sh1580) 및 12.0%(sh1685)로 감소하였다($P < 0.05$, 그림 4A). 세포핵으로부터 분리한 HBV cccDNA를 정량적 PCR로 측정한 결과, HBV cccDNA 역시 scrambled shRNA 투여군과 비교하였을 때 HBV에 대한 shRNA를 발현시킨 세포에서 19.7%(sh1580) 및 25.5%(sh1685)로 감소하였다($P < 0.05$, 그림 4B).

sh1580의 장기적 항 HBV 효과를 lentiviral transduction 후 5주째에 real-time RT-PCR법으로 평가하였을 때, sh1580을 주입한 HepAD38 세포에서는 HBV RNA의 발현이 대조군에 비하여 유의하게 억제되었다(100% vs 48.5%, $P = 0.005$, 그림 5). Trypan blue염색 후 계수한 세포 수는 대조군과 sh1580 주입군 간에 차이가 없었으며(5.81×10^6 vs 6.32×10^6 , $P = 0.685$), non-viable cell도 두 군 모두 1% 미만으로 차이를 보이지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 렌티바이러스 벡터를 이용하여 HBV에 대한 shRNA를 HepAD38 cell에서 발현시켰을 때 HBV의 증식을 효과적으로 억제할 수 있

Figure 5. Quantification of HBV RNA in HepAD38 cells at 5 weeks after transduction with the sh1580-encoding lentivirus. Real-time quantitative RT-PCR was performed to measure the total HBV RNA. Data are mean and SD values of triplicate samples. * $P < 0.05$ vs. control.

음을 확인하였다. 시험관 내 실험과 동물실험 결과 RNAi가 여러 가지 바이러스를 효과적으로 억제할 수 있음이 알려지면서 새로운 항바이러스 치료제로 응용될 가능성이 제시되었다.²⁵ 현재 HIV-1 등 몇몇 바이러스 질환에 대한 핵산 기반 치료(nucleic acid-based therapy)의 임상시험이 진행 중이며 HBV의 경우 shRNA를 encoding하는 plasmid를 이용한 제1상 임상시험이 시작되어,²⁵ RNAi를 이용한 HBV 억제에 대한 연구는 향후 임상적 응용 가능성이 매우 높은 transitional research 분야이다. 하지만 RNAi가 임상적으로 바이러스 질환의 치료에 이용되기 위해서는 안전성과 효율성 면에서 아직 해결되어야 할 과제가 많다. 안전성 면에서는 목표로 하는 유전자 이외의 다른 유전자들의 발현에 영향을 미치는 소위 'off-target effect'를 고려하여야 하며, 유사한 염기서열의 유전자 억제, 인터페론 시스템 활성화, 세포 내 microRNA pathway의 포화에 의한 영향 등이 off-target effect의 원인으로 제시되었다.^{26,27} 또한, RNAi를 만성 바이러스간염의 치료에 응용하려면 간세포로의 전달 효율을 높여야 하는데, 1) 외부에서 주입된 핵산 치료제가 표적 장기(간)의 모든 세포에 충분한 양이 효과적으로 전달되어야 하며, 2) 간세포 내

최종 작용 부위까지(핵 또는 세포질) 분해되지 않고 이동되어야 하고, 3) HBV 감염을 치료하는 경우 cccDNA가 희석, 제거될 때까지 장기간 치료 효과가 유지되어야 하기 때문이다. HBV에 대한 siRNA를 이용한 RNAi 관련 기존 보고들은 대부분 siRNA 주입 후 2~3일 이내에 표적 mRNA를 측정하였으며,^{3,28} 이는 siRNA의 작용 기간이 수일 정도로 짧기 때문이다. siRNA의 화학적 구조를 변형시켜서 반감기를 늘리고 약력학적 지표를 개선시킬 수 있으나,²⁹ 유전자 발현 억제 효과가 감소하며,³⁰ 장기적인 반복 주사가 필요한 점은 여전히 현실적인 제한 요소가 된다.

shRNA를 이용한 RNAi의 경우, RNA polymerase III promoter로 조절되는 플라스미드가 표적세포의 핵에서 pre-miRNA와 유사한 루프를 가지는 단일 가닥 RNA로 전사된 후 Exportin-5에 의하여 세포질로 이동하여 Dicer에 의하여 처리 과정을 거치면서 siRNA로 변환된다.²⁵ HBV에 대한 shRNA를 이용한 기존의 보고의 경우 시험관 내 핵산전달에는 calcium phosphate⁴⁵ 혹은 liposome^{12,31,32}을 이용하였으며, 동물실험에서는 정맥 주입 시 일시에 높은 압력을 가하여 간세포로 핵산전달을 유도하는 hydrodynamic injection법이 이용되었다.^{4,32} 하지만 이러한 핵산전달 방법은 모두 임상적으로 적용할 수 있는 방법이 아니며, 플라스미드 단독 주입으로는 효율적인 핵산전달을 기대하기 어렵다. 설령 성공적으로 핵 안으로 플라스미드가 전달되었다 하더라도, siRNA보다는 작용 시간이 길지만 HBV를 근치할 정도의 장기적인 발현을 기대하기 힘들다.³³

유전자치료에 사용되는 바이러스 벡터를 RNAi에 응용한다면 생체 내에서 핵산전달의 효율을 높일 수 있을 것이 기대되는 바, 레트로바이러스,³⁴ 아데노바이러스,^{11,35} adeno-associated virus^{36,37} 등의 벡터를 이용한 RNAi가 효과적임이 보고되었다. HBV의 경우 prototype foamy virus,³⁸ 아데노바이러스,³⁹ adeno-associated virus³⁸ 등을 이용하여 수주에서 수개월까지 RNAi에 의한 억제 효과가 유지될 수 있었다.

렌티바이러스 벡터는 기존의 레트로바이러스 벡터와는 달리 분열하지 않는 세포에도 높은 효율로 유전자 전달이 가능하며, 전달된 유전자를 장기간 발현시킬 수 있다는 장점이 있다.^{9,10,40} 또한 cis-acting element를 분리하여 별도의 플라스미드로 전달하는 방법을 채용함으로써 replication competent lentiviral vector의 생성을 최소화하였으며, 3세대 이후의 렌티바이러스는 스스로 불활성화되는(self-inactivating) 특징이 있어 역전사 후 proviral DNA의 복제가 불가능하게 되어 안전성 면에서도 기존의 레트로바이러스 벡터보다 현저히 개선되었다.⁴⁰ HIV 감염 환자를 대상으로 렌티바이러스 벡터를 이용한 유전자치료의 제1상 임상시험에서 특별한 부작용은 관찰되지 않았으며,⁴¹ 현재 제2상 임상시험이 진행 중이다(<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

렌티바이러스를 이용하여 shRNA를 세포 내에 전달한 경우 표적 유전자가 3주 이상 억제됨이 보고되어,⁴² RNAi를 장기간 유지시키기 위해 적합한 특성을 가지고 있다. 본 연구에서는 형질주입 후 5일까지 shRNA에 의한 항HBV 효과가 유지됨을 확인하여 통상의 siRNA oligonucleotide보다 긴 작용 시간을 보였으며, 계대배양 결과 5주까지 HBV의 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 렌티바이러스를 이용하여 HBV에 대한 antisense RNA와 hammerhead ribozyme를 전달함으로써 HBV의 증식을 억제한 보고가 있었으나,⁴³ 렌티바이러스를 매개로 하는 HBV에 대한 RNAi는 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서 정립한 렌티바이러스 매개 shRNA 모델은 HBV에 대한 장기적인 RNAi의 효과를 규명하는 연구에 응용될 수 있으며, 향후 유전자 이입에 의한 항HBV치료의 전임상 및 임상시험을 계획하는 경우 이론적인 근거로서 이용될 수 있다.

본 연구에서는 total intracellular DNA 및 cccDNA를 정량하여 shRNA의 항HBV 효과를 평가하였으며, HepAD38 세포는 염색체에 HBV genome을 포함하고 있으므로 genomic DNA에 의한 contamination의 가능성을 생각해 볼 수 있다. 하

지만, 연구자의 실험 결과 HepAD38 cell에서 HBV relaxed circular DNA / HBV cccDNA ratio가 $10^2 \sim 10^4$ 정도이므로(자료 미 제시) 세포당 HBV cccDNA가 1 copy 이상임을 고려하면 genomic DNA의 오염에 의한 영향은 미미한 것으로 판단된다.

기존에 lipofectamine을 이용하여 shRNA expression cassette를 Huh7 세포에 transduction시킨 연구 결과에서는 HBsAg 분비를 대조군의 5% 미만으로 감소시킴을 보고하였는 바,¹¹ 본 연구에서도 2.9%로서 유사한 정도의 HBV 억제 효과를 보였다. 하지만 HBV RNA를 정량하였을 때에는 대조군의 35% 수준으로 억제되었으며,¹¹ 본 연구에서도보다 장기간 배양 효과이지만 48.5%의 억제 효과를 관찰하여, RNA 수준과 downstream의 relaxed circular DNA 및 단백질 수준의 억제 효과 간에는 차이가 있을 것으로 예상된다. 장기간 shRNA 투여로 인하여 HBV genome의 돌연변이가 유발될 가능성을 생각해 볼 수 있으며, 이에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서 선택한 HBV X protein 유전자(HBx) 부위는 전사, 신호전달, 세포주기, 단백질 분해, 세포자멸 등 다양한 기능을 나타내는 조절인자로 알려져 있다. 하지만 HBV의 4개의 open reading frame으로부터 전사되는 major transcript는 모두 공통의 poly A 부위에서 끝나게 되어 3' 말단 부위에 동일한 염기서열을 공유하고 본 연구에 이용된 shRNA는 모두 이 공통 서열 부위를 표적으로 하므로(그림 1), 본 연구에서의 HBV DNA 억제 효과가 X 유전자 transcript에 작용하였기 때문인지, 혹은 HBV genome 역전사의 주형으로 작용하는 pregenomic RNA에 작용하여 나타났는지는 본 연구 결과만으로는 확인이 불가능하여 추가 연구가 필요한 부분이다.

흥미롭게도, 본 연구 결과 HBV에 대한 shRNA는 relaxed circular DNA뿐 아니라 cccDNA의 양도 유의하게 감소시킴을 확인할 수 있었다. HBV에 대한 shRNA가 cccDNA를 억제하는 기전으로는 shRNA가 세포질 내 HBV RNA에 작용하여 viral nucleocapsid의 생성을 억제함으로써 세포핵

으로의 recycling 과정을 차단하였기 때문에 생각되나, 염색체에 삽입된 HBV 유전자로부터 전사되는 mRNA에 직접 작용하여 HBV pregenomic RNA를 감소시켰을 가능성도 고려할 수 있다. Viral nucleocapsid로부터 HBV cccDNA의 재공급이 차단된 상태에서 HepAD38 cell이 지속적으로 분열하게 되면 세포당 HBV cccDNA의 개수는 희석, 감소하게 된다.⁴⁴ 최근 한 연구에서 HBV에 대한 siRNA를 encoding하는 플라스미드를 주입하여 4일째에 약 50%의 HBV cccDNA를 감소시킬 수 있음이 보고되었으며,⁴⁵ 저자는 nuclear localizing signal의 억제가 HBV genome의 핵내 이동을 차단하여 cccDNA의 감소를 초래하였을 것으로 제시하였다. shRNA에 의한 HBV cccDNA 감소 효과의 기전과 의미에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

요 약

배경/목적: RNA interference는 double stranded RNA가 상보적인 mRNA를 억제하는 세포 내 방어 기전으로서, small interfering RNA가 HBV RNA를 억제할 수 있음이 알려졌다. 바이러스 벡터를 이용하여 전달된 shRNA는 siRNA에 비하여 보다 지속적인 RNAi를 유도할 수 있다. 렌티바이러스 벡터를 이용한 RNAi는 높은 효율로 장기적인 유전자 억제 효과를 나타낸다. 본 연구에서는 렌티바이러스를 이용하여 전달된 shRNA가 HBV의 증식을 억제할 수 있는지를 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** HBx 유전자에 대한 두 종류의 shRNA를 렌티바이러스 벡터에 삽입하여 HepAD38 cell에 전달한 후 real-time PCR로 HBV DNA를 정량하였다. **결과:** HBV에 대한 shRNA를 encoding하는 렌티바이러스 벡터는 효율적으로 HepAD38 cell을 감염시켰다. HBV에 대한 shRNA는 세포 내 총 HBV DNA를 2.9~12%로 감소시켰으며, HBV cccDNA 또한 19.7~25.5%로 유의하게 억제하였다. **결론:** 렌티바이러스를 매개로 하는 RNAi는 세포 내에서 효과적으로 HBV의 증식을 차단할 수 있다.

색인단어: B형간염바이러스, 렌티바이러스, micro-RNAs, RNA interference, siRNA

참고문헌

1. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 2005;579:5822-5829.
2. Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 2003;8:769-776.
3. Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 2003;543:51-54.
4. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21:639-644.
5. Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770.
6. Ying C, De Clercq E, Neyts J. Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:482-484.
7. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553.
8. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* 2002;8:842-850.
9. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997;17:314-317.
10. Li MJ, Rossi JJ. Lentiviral vector delivery of recombinant small interfering RNA expression cassettes. *Methods Enzymol* 2005;392:218-226.
11. Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, et al. Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther* 2006;13:411-421.
12. Ren GL, Bai XF, Zhang Y, Chen HM, Huang CX, Wang PZ, et al. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication by expressed siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:1051-1059.
13. Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002;8:1454-1460.
14. Scherer LJ, Yildiz Y, Kim J, Cagnon L, Heale B, Rossi JJ. Rapid assessment of anti-HIV siRNA efficacy using PCR-derived Pol III shRNA cassettes. *Mol Ther* 2004;10:597-603.
15. Kim JW, Zhang YH, Zern MA, Rossi JJ, Wu J. Short hairpin RNA causes the methylation of transforming

- growth factor- β receptor II promoter and silencing of the target gene in rat hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:292-297.
16. Follenzi A, Naldini L. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 2002;346:454-465.
17. Lizée G, Aerts JL, Gonzales MI, Chinnasamy N, Morgan RA, Topalian SL. Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther* 2003;14:497-507.
18. Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 2006;6:34.
19. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1715-1720.
20. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 1967;26:365-369.
21. Zhang YY, Summers J. Low dynamic state of viral competition in a chronic avian hepatitis B virus infection. *J Virol* 2000;74:5257-5265.
22. Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, Hosui A, Jinushi M, Miyagi T, et al. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication. *J Hepatol* 2006;44:267-274.
23. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-775.
24. Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun F. A quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003;112:45-52.
25. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 2007;25:1435-1443.
26. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441:537-541.
27. Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:81-108.
28. Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003;38:842-850.
29. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005;23:1002-1007.
30. Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, et al. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2705-2716.
31. Chen Y, Du D, Wu J, Chan CP, Tan Y, Kung HF, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:398-404.
32. Wu HL, Huang LR, Huang CC, Lai HL, Liu CJ, Huang YT, et al. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005;128:708-716.
33. Chen Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res* 2008;25:72-86.
34. Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14943-14945.
35. Arts GJ, Langemeijer E, Tissingh R, Ma L, Pavliska H, Dokic K, et al. Adenoviral vectors expressing siRNAs for discovery and validation of gene function. *Genome Res* 2003;13:2325-2332.
36. Tomar RS, Matta H, Chaudhary PM. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* 2003;22:5712-5715.
37. Chen CC, Ko TM, Ma HL, Wu HL, Xiao X, Li J, et al. Long-term inhibition of hepatitis B virus in transgenic mice by double-stranded adeno-associated virus 8-delivered short hairpin RNA. *Gene Ther* 2007;14:11-19.
38. Moore MD, McGarvey MJ, Russell RA, Cullen BR, McClure MO. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med* 2005;7:918-925.
39. Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:773-778.
40. Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 2007;36:184-204.
41. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17372-17377.
42. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 2002;13:2197-2201.
43. Nash KL, Alexander GJ, Lever AM. Inhibition of hepatitis B virus by lentiviral vector delivered antisense RNA and hammerhead ribozymes. *J Viral Hepat* 2005;12:346-356.
44. Dandri M, Petersen J. Hepatitis B virus cccDNA clearance: killing for curing? *Hepatology* 2005;42:1453-1455.
45. Li GQ, Gu HX, Li D, Xu WZ. Inhibition of Hepatitis B virus cccDNA replication by siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:404-408.
46. Shin D, Kim SI, Kim M, Park M. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs targeted to the viral X gene in mice. *Virus Res* 2006;119:146-153.