



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

인슐린유사성장인자-1 이형체들을 발현하는  
플라스미드 DNA의 생물학적 활성과  
유전자치료제로서의 활용 가능성 탐색

Investigation of biological activity of insulin-like  
growth factor-1 expressed from plasmid DNA

: Implication of potential application of gene therapy

2022 년 2 월

서울대학교 대학원

자연과학대학 생명과학부

이재만

인슐린유사성장인자-1 이형체들을 발현하는

플라스미드 DNA의 생물학적 활성과

유전자치료제로서의 활용 가능성 탐색

Investigation of biological activity of insulin-like

growth factor-1 expressed from plasmid DNA

: Implication of potential application of gene therapy

지도교수 김 진 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2022 년 2 월

서울대학교 대학원

자연과학대학 생명과학부

이 재 만

이 재 만의 이학석사 학위논문을 인준함

2022 년 2 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 이 건 수 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 김 진 홍 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 최 석 우 \_\_\_\_\_ (인)

## 초 록(Abstract)

인슐린유사성장인자-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)은 다양한 조직에서 세포분열 및 분화 촉진, 단백질 합성을 유도하며, 특히 근육과 신경의 형성 및 재생 과정에서 IGF-1의 기능에 대한 연구가 잘 진행되어 있다. 하지만 생체 내 실험을 포함한 많은 연구에서는 주로 재조합 단백질이나 형질전환 마우스를 이용하였으며, 유전자 전달체를 이용하여 진행한 연구는 보고된 바가 많지 않다. 본 연구에서는 플라스미드 벡터 시스템을 활용하여, 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)를 국소적이고 일시적으로 발현시킨 뒤, IGF-1이 근육과 말초신경의 재생에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

먼저, IGF-1 이형체 서열을 포함하는 플라스미드 DNA(pTx-IGF1 X10)의 mRNA와 단백질 발현양상을 생체 외(in vitro)와 생체 내(in vivo)에서 조사하였다. 그 결과, pTx-IGF1 X10에서 두 종류의 IGF-1 이형체들이 모두 발현되고 있음을 확인하였으며, 플라스미드를 근육주사한 마우스 전경골근에서 IGF-1이 2주에 걸쳐 발현되는 것을 관찰하였다. 다음으로, 발현된 IGF-1이 어떤 형태로 분비되는지 알아보기 위하여, IGF-1을 특이적으로 검출할 수 있는 두 종류의 항체를 선별하였다. 이후 면역침강법과 웨스턴 블랏을 통해 IGF-1의 분비 형태를 조사한 결과, pro-IGF1과 mature IGF-1 모두 분비되고 있음을 확인하였다. 마지막으로, 인간유래 세포와 마우스유래 세포주를 사용하여 IGF-1이 가진 생물학적 활성능을 조사하였다. 그 결과, pTx-IGF1 X10에 의해 발현된 IGF-1은 인간과 마우스의 IGF-1 수용체를 모두 활성화시키는 것을 확인하였다.

이를 바탕으로, 생체 내에서 플라스미드 근육주사에 의해 과발현된 IGF-1이 근육 재생과 신경 재생에 미치는 영향을 연구하였다. 근육 재생에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 코브라의 독에서 분리한 cardiotoxin(CTX)을 전경골근에 투여하여 근 손상을 유도하였다. 근육 손상 3일 전에 투여되어 과발현된 IGF-1은 회복 중인 근육의 무게를 증가시켰으며, 근육 손상 초기에 발현된다고 알려진 근육조절인자들의 발현 시점을 앞당긴 것을 확인하였다. 다음으로, IGF-1이 신경 재생에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 좌골신경에 손상을 가하고 플라스미드를 수술 부위 근처의 근육에 투여한 뒤, 다양한

시점에서 신경의 재생을 관찰하였다. 관찰 결과, 좌골신경과 연결된 감각신경의 재생 정도에는 큰 변화가 없었으나, 운동신경의 재생이 촉진되어 신경근이음부(NMJ)가 더 빠르게 재형성된 것을 확인하였다. 다만, 전체 좌골신경의 회복 정도는 큰 차이가 없었다.

본 연구를 통하여, 플라스미드 DNA 벡터를 이용한 IGF-1 발현 시스템이 의도한 바와 같이 두 종류의 IGF-1 이형체를 발현하는 것을 확인하였다. 또한, 플라스미드를 근육주사하여 생체 내에 전달하는 방식을 통해 과발현시킨 IGF-1이 투여 부위 근처의 근육과 신경의 재생을 촉진시킬 수 있다는 사실을 확인하였다. 본 연구를 통해 얻은 결과들을 통해, 다양한 벡터들과 연구 모델을 사용하여 활발히 연구가 진행 중인, IGF-1을 비롯한 다양한 유전자 치료제 분야의 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

**주요어:** 인슐린유사성장인자-1 (Insulin-like growth factor-1), 유전자 치료 (Gene therapy), 플라스미드 (Plasmid), 신경 재생 (Nerve regeneration), 근육 재생 (Muscle regeneration)

**학 번:** 2017-21641

# 목 차

초 록(Abstract)

목 차

그림 목차

표 목차

## 1. 서론(Introduction)

- 1.1. 인슐린유사성장인자-1 (Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1)
- 1.2. 플라스미드 DNA를 기반에 둔 유전자치료제의 개발 및 선행연구
- 1.3. 본 연구의 개요 및 목적

## 2. 재료 및 방법(Materials and Methods)

### 2.1. 세포 배양

- 2.1.1. 생물학적 시약
- 2.1.2. C2C12 세포주
- 2.1.3. HEK293T/17 세포주
- 2.1.4. SH-SY5Y 세포주
- 2.1.5. HSMM 일차 세포(Primary cell)

### 2.2. 플라스미드 형질주입(Transfection)

- 2.2.1. 플라스미드
- 2.2.2. 형질주입

### 2.3. RNA 추출 및 qRT-PCR

### 2.4. 효소결합면역흡착검사(ELISA)

### 2.5. 면역침강법(Immunoprecipitation)

## 2.6. 웨스턴 블랏(Western blot)

## 2.7. 동물 실험(Animals)

### 2.7.1. 좌골신경 손상 모델(Sciatic nerve crush model)

### 2.7.2. CTX 근육 손상 모델 (CTX-induced muscle regeneration model)

## 2.8. 투과전자현미경(Transmission electron microscopy) 분석

## 2.9. 면역형광법(Immunofluorescence)

### 2.9.1. 신경근이음부(Neuromuscular junction) 염색

### 2.9.2. 내신경섬유(Intra epidermal nerve fiber) 염색

## 2.10. RNA 시퀀싱(sequencing) 분석

## 2.11. 통계 분석 방법

# 3. 실험 결과(Results)

## 3.1. 인간 IGF-1 이형체(isoform) 서열을 포함하는 cDNA 하이브리드의 단백질 발현 패턴 조사

### 3.1.1. 인간 IGF-1 하이브리드 cDNA를 포함하는 pTx-IGF1 X10

### 3.1.2. In vitro에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 단백질의 특성

### 3.1.3. pTx-IGF1 X10에 의해 분비되는 IGF-1의 생물학적 활성

### 3.1.4. In vivo에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 단백질의 특성

## 3.2. 여러가지 마우스 질환모델에서 IGF-1의 적용 가능성 조사

### 3.2.1. IGF-1의 과발현이 신경재생 과정에 미치는 영향

### 3.2.2. IGF-1의 과발현이 근육재생 과정에 미치는 영향

# 4. 논의(Discussion)

# 5. 참고 문헌(References)

## 그림 목차

- 그림 1-1. IGF-1 단백질의 구조와 하위신호전달경로.
- 그림 1-2. IGF-1 genome의 구조 및 이형체의 종류.
- 그림 1-3. IGF-1 및 인슐린 수용체의 구조 및 종류.
- 
- 그림 3-1. IGF1 X10의 유전자 모식도.
- 그림 3-2. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 mRNA 발현 측정.
- 그림 3-3. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 단백질 발현 측정.
- 그림 3-4. 웨스턴 블랏에서 IGF-1에 특이적으로 반응하는 항체 스크리닝.
- 그림 3-5. 면역침강법에서 인간 IGF-1에 특이적으로 반응하는 항체 스크리닝.
- 그림 3-6. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 hIGF-1 단백질 분비 형태.
- 그림 3-7. 인간유래 세포에서의 pTx-IGF1 X10 역가(potency)평가.
- 그림 3-8. pTx-IGF1 X10에 의한 마우스유래 세포주에서의 IGF-1 수용체의 하위 신호전달 경로 변화 확인.
- 그림 3-9. In vivo 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 발현 측정.
- 그림 3-10. In vivo 에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 hIGF-1 단백질 분비 형태.
- 그림 3-11. Crush injury를 가한 좌골신경에서의 IGF-1 발현 패턴.
- 그림 3-12. pTx-IGF1 X10 근육주사가 NMJ 재생에 미치는 영향.
- 그림 3-13. pTx-IGF1 X10 근육주사가 감각신경 재생에 미치는 영향.
- 그림 3-14. pTx-IGF1 X10 근육주사가 좌골신경 재생에 미치는 영향.
- 그림 3-15. pTx-IGF1 X10 근육주사가 근육재생에 미치는 영향.



그림 3-16. pTx-IGF1 X10 근육주사가 근육조절인자들의 발현에 미치는 영향.

그림 4-1. Pro-IGF1-Ea의 분비 과정

## 표 목차

- 표 1-1. 근육 질환에 대한 재조합 인슐성유사성장인자-1의 임상시험 목록.
- 표 2-1. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열
- 표 2-1. 웨스턴 블랏에 사용된 항체 목록

# 1. 서론(Introduction)

## 1.1. 인슐린유사성장인자-1 (Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1)

인슐린유사성장인자-1 (Insulin-like growth factor, IGF-1)은 1921년에 인슐린이 최초로 발견된 이후, 사람의 혈장으로부터 추출되어 소마토메딘-C (somatomedin-C)라는 이름으로 명명되었다(Vassilakos & Barton, 2011). 인슐린유사성장인자(IGF)라는 용어는 인슐린과의 구조적인 유사성에 기반하여 1976년에 처음으로 사용되었으며, 다양한 연구를 통해 DNA 합성 촉진, 프로테오글리칸(proteoglycan) 합성, 단백질 합성 등의 생물학적 중요성을 가지는 것으로 알려졌다(Jones & Clemmons, 1995; Daughaday & Reeder, 1966; Hall & Uthne, 1971; SALLMON & DuVALL, 1970) (**그림 1-1**).

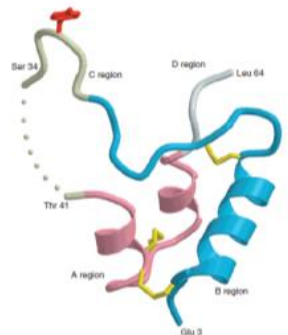
IGF-1 유전자는 6개의 엑손(exon)과 5개의 인트론(intron)으로 구성되어 있으며, 인간 IGF-1의 경우 전체 유전체(genomic) DNA는 약 80kb 크기를 가진다(Bell *et al.*, 1986; Jansen *et al.*, 1983). IGF-1은 대체 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 다양한 이형체를 발현하며, 각 영역의 기능에 따라 신호 펩타이드(signal peptide), mature peptide, E peptide 세 부분으로 구분할 수 있다(Oberbauer, 2013) (**그림 1-2**). 신호 펩타이드에 해당하는 영역은 대체 스플라이싱에 의한 엑손 1과 엑손 2의 포함 여부에 따라 class 1과 class 2로 분류되며, E peptide에 해당하는 영역은 엑손 5과 엑손 6의 스플라이싱 위치에 따라 다양한 조합을 구성하게 된다. IGF-1 수용체와 상호작용하는 영역은 70여개의 아미노산으로 구성된 mature peptide이며, 이를 구성하는 4개의 도메인(BCAD)중에 B(binding) 도메인이 수용체 및 IGF 결합단백질(IGFBP)과의 결합에 관여한다(Gauguin *et al.*, 2008; Magee *et al.*, 1999).

일반적으로 class 1 IGF-1은 분비를 방해하는 긴 신호 펩타이드 서열을 가지고 있기 때문에 주로 자가분비(autocrine) 및 주변분비(paracrine)를 하고, class 2 IGF-1은 효율적으로 분비할 수 있는 전형적인 신호 펩타이드를 가지며, 이로 인해 주로 내분비(endocrine)를 한다고 알려져 있다(Oberbauer, 2013). 대부분의 조직에서는 class 1의 IGF-1 전사체를 발현하며(Adamo *et al.*, 1991b; Lin *et al.*, 1998), 전신을 순환하는 IGF-1의 75% 정도를

Human IGF-1: G P E T L C G A E L V D A L Q I V C G D R G Y F Y F N K P  
 Human proinsulin: F V N Q H L C G S H L V E A L I Y L V C G E R G I F Y T P K

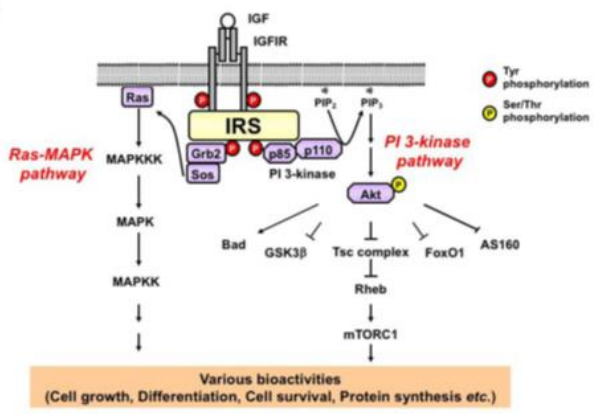
Human IGF-1: T I G Y G S S S R R A P Q T  
 Human proinsulin: T R R E A E D L Q V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A E G S L Q K R

Human IGF-1: G I V D E C F R S C D L R R E T M Y C A P L K P A K S A  
 Human proinsulin: G I V E Q C C T S C I S L Y Q L E N Y C N



(Vassilakos, G., Barton, E. R., 2011)

### IGF1 signaling pathway



(F. Hakuno and S-I. Takahashi, 2018)

그림 1-1. IGF-1 단백질의 구조와 하위신호전달경로.

생산한다고 알려진 간에서는 class 1과 class 2 두 종류의 IGF-1을 모두 발현한다고 보고되어 있다(Schwander *et al.*, 1983).

신호 펩타이드 외에도, IGF-1 유전자의 3' 영역에 위치한 E peptide 역시 IGF-1에 다양성을 부여하는 요소이다. E peptide의 공통 영역에 해당하는 엑손 4의 16개의 아미노산 영역에 더하여, 스플라이소좀(spliceosome)의 인자 부위에 따라 만들어지는 엑손 5와 6의 스플라이싱 변이체는 조합에 따라 인간에서는 3종(Ea, Eb, Ec), 설치류에서는 2종(Ea, Eb)으로 알려져 있다(Philippou, 2014). Class A 전사체(IGF1-Ea)는 주로 간에서 발현되는 pro-IGF1 형태이며, 대부분의 IGF-1이 이에 해당된다(그림 1-2). Class B 전사체(IGF1-Eb)는 인간에서는 다양한 조직에서 발현이 확인되었으나, 다른 종에서는 거의 발견되지 않는다. 마지막으로, Class C 전사체(IGF1-Ec)는 MGF(Mechano Growth Factor)라고 불리기도 하며 운동이나 부상에 의해 골격근(skeletal muscle)이 손상되었을 때, 일시적으로 발현이 증가하는 것이 많은 연구에서 보고되었다(McKoy *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1996; Hill & Goldspink, 2003). MGF는 특히 근육의 성장과 재생에 관련이 깊다고 여겨지고 있다(인간 IGF-1 Ec는 설치류의 IGF-1 Eb와 동등하다.).

E peptide는 furin, PC6A, LPC와 같은 전단백질 전환효소(protein convertase)에 의해 mature peptide에서 분리(cleavage)될 수 있다(Vassilakos & Barton, 2011)(그림 1-2). IGF-1과 IGF-1 수용체와의 상호작용은 mature peptide 영역에서 일어나기 때문에, 초기의 연구에서는 70개의 아미노산에 해당하는 영역인 mature IGF-1을 주로 사용하였다. 하지만, 최근에는 E peptide의 유무에 따라 IGF-1의 기능이 달라질 수 있으며, 심지어 E peptide 단독으로 IGF-1 수용체와 상호작용한다는 연구결과들이 보고되었다(Philippou, 2014). 예를 들어, *in vitro*에서 IGF-1Ea, MGF, mature IGF-1은 세포분열과 분화를 다른 영향을 미칠 수 있으며(Yang, 2002; Philippou, 2009; Brisson, 2012; Fornaro, 2014), *in vivo*에서도 IGF1-Ea 형질전환(transgenic) 마우스가 가진 근전구세포의 분열 및 분화에 관여할 수 있다는 연구결과들도 다수 보고되었다(Coleman, 1995; Rabinovsky, 2003).

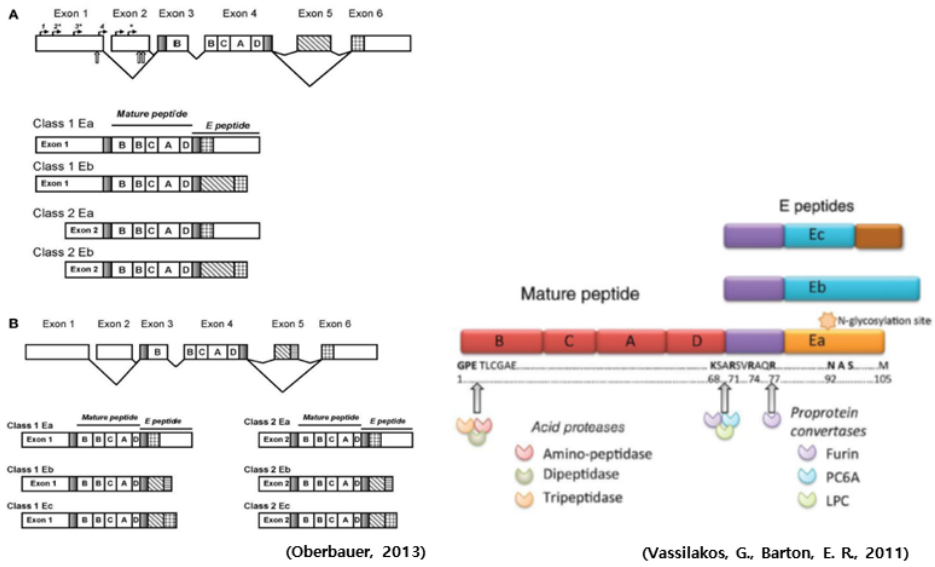


그림 1-2. IGF-1 genome의 구조 및 이형체의 종류. (A: 설치류, B: 인간)

특히, Ea peptide의 경우 유일하게 N-당화(glycosylation)가 일어날 수 있다고 보고되었는데(Duguay *et al.*, 1995), 아직까지 명확하게 기능이 밝혀진 바가 없지만 일반적인 N-당화의 기능을 고려해봤을 때, 세포외기질(ECM)에 IGF-1을 저장하거나 IGF-1의 생물학적 기능을 조절할 것이라 예상되고 있다.

일반적으로 IGF-1 혹은 인슐린이 타겟 세포의 세포막에 위치하는 특정한 수용체에 결합되면, 수용체의  $\beta$ -subunit에 포함된 타이로신 인산화효소(tyrosine kinase)가 활성화된다(그림 1-1). IGF-1의 기능은 IGF-1 수용체, IGF-2 수용체, 인슐린 수용체(IR), IR/IGF-1R 복합체와 같이 여러 수용체를 통해 매개될 수 있으며(그림 1-3), 이 때, mature peptide는 IGF-1 수용체와 가장 높은 결합도(affinity)를 가진다(Hakuno & Takahashi, 2018). IGF-1과의 상호작용을 통해 활성화된 IGF-1 수용체는 차례로 IRS(Insulin Receptor Substrate)1, IRS2, Shc 등을 인산화시킨다. 인산화된 타이로신 잔기들은 Grb2, PI3K와 같이 SH2(Scr homology 2) 영역(domain)을 포함한 신호 분자들에 의해 인식되어 Ras-MAPK-ERK1/2, PI3K-Akt 캐스케이드(cascade)와 같은 다양한 신호전달 경로를 활성화시킨다(Philippou *et al.*, 2014; Hakuno & Takahashi, 2018; Vassilakos & Barton, 2011). 또한 IGF-1은 IGFBP(IGF-1 binding protein)과의 상호작용을 통해 IGF-1의 수송이나 반감기를 조절할 수 있다고 알려져 있다(Jones & Clemmons, 1995). 이와 같이 IGF-1의 생태에는 여러가지 요소들이 관여하며, 이로 인해 활성화된 IGF-1 수용체는 세포성장, 세포분화, 단백질 합성과 같은 다양한 생물학적 기능을 보이게 된다.

IGF-1은 다양한 종류의 조직 및 세포에 영향을 준다고 알려져 있으며, 그 중에서도 근육에서의 IGF-1의 기능은 가장 잘 연구되어 있는 분야 중 하나이다(Oberbauer, 2013). 예를 들어, 근육의 생성과 기능에 관여하는 여러 메커니즘 중에서 IGF-1은 근육의 성장, 분화 등에 필수적인 역할을 담당하고 있으며, 특히 근손상이 발생했을 때 근섬유 사이에 존재하는 근위성세포(myosatellite cell)의 분열과 분화 과정을 조절하여 근육의 재생을 촉진한다고 알려져 있다(Scicchitano, 2009; Philippou, 2007). 또한 IGF-1이 근육이 미치는 영향 외에도, IGF-1이 신경의 재생과 보호에도 중요한 역할을 한다는 연구들이 다양하게 보고되었다(Kanje, 1989; Glazner, 1994; Feldman, 1997;

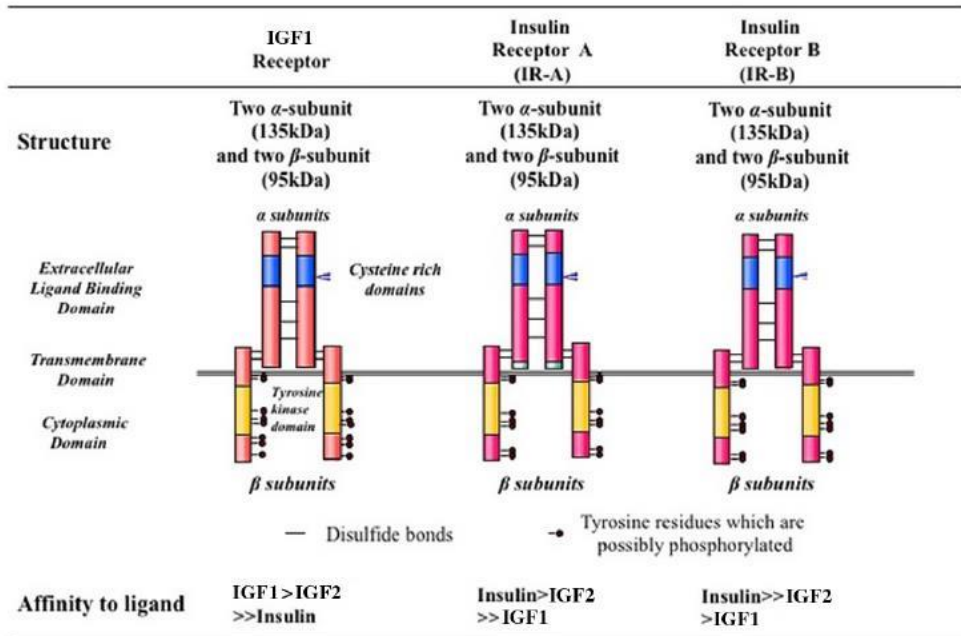


그림 1-3. IGF-1 및 인슐린 수용체의 구조 및 종류 (Hakuno & Takahashi, 2018).



Musarò, 2007). 즉, IGF-1은 다양한 질환을 타겟으로 하는 유망한 치료제 후보가 될 수 있으며, 이에 대한 다양한 시도들이 진행되어 왔다.

## 1.2. 플라스미드 DNA를 기반에 둔 유전자치료제의 개발 및 선행연구

IGF-1를 연구한 많은 문헌들에 의해 IGF-1의 다양한 생물학적 기능들이 밝혀졌으며, 이들은 공통적으로 여러 질병에 대한 잠재적인 치료제로서 IGF-1의 가능성을 제안하고 있다. 다만, 이와 관련된 많은 연구들은 주로 재조합 단백질을 사용하거나 형질전환 마우스를 이용하여 IGF-1에 대한 실험들을 진행해왔다. 약 10분 내외의 짧은 반감기를 가진 IGF-1은 치료제로서 개발하기에는 고려해야할 사항이 많으며(Guler *et al.*, 1989), IGF-1이 가진 발암유발(carcinogenesis)의 가능성을 염두에 둔다면, 너무 오랫동안 IGF-1의 발현을 유지하는 것도 바람직한 전략은 아닐 수 있다(Shanmugalingam *et al.*, 2015). 현재 재조합 IGF-1을 이용하여 다양한 질환 (뒤센근이영양증 (Duchenne's Muscular Dystrophy, DMD), 노인성 근감소증(sarcopenia), 루게릭병(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS))에 대한 임상시험들이 진행되고 있으며 일부 개선효과가 확인되기도 하였지만, 특정 희귀질환에서는 괄목할만한 치료효과를 보이지 못하고 있다(Philippou & Barton, 2014)(표 1-1). 따라서, IGF-1을 치료제로서 사용하기 위해서는 적절한 기간 동안 유의미한 정도의 발현을 유지하는 방법을 고려해야 한다.

외부의 유전자를 체내에서 발현시키기 위한 방법으로는 크게 바이러스성 벡터들을 이용하는 방법과 플라스미드(plasmid) DNA와 같은 비바이러스성 벡터들을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. 이 중, 플라스미드 DNA는 염색체(host chromosome)에 삽입되지 않기 때문에 상대적으로 다른 유전자 발현 벡터들에 비해 안전하다고 알려져 있으며, 연구실의 선행 실험을 통해 생체 내에서 수 주 이내로 대부분의 플라스미드 DNA가 사라지는 것을 확인한 바가 있다. 이러한 플라스미드 DNA의 특징에 착안하여, 본 연구실에서는 외부의 유전자를 생체 내에 전달하기 위한 전달체로서 pCK라고 명명한 플라스미드 DNA 벡터를 제작하였으며(Pyun *et al.*, 2010), 이는 인간거대세포바이러스(Human Cytomegalovirus, HCMV)에서 유래한 프로모터를 포함하도록 개발되어 높은 발현 효율을 지닌 것을 확인하였다(Lee *et al.*, 2000). 연구실의 선행 연구자들은 이와 같은 특징을 가진 pCK 벡터에

간세포성장인자(Hepatocyte Growth Factor, HGF)의 cDNA를 삽입한 플라스미드(pCK-HGF-X7)를 이용하여 HGF의 기능에 대한 많은 연구들을 진행해왔다(Nho *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2018, Choi *et al.*, 2018),

HGF를 과발현시키는 플라스미드(pCK-HGF-X7)를 사용한 선행연구들 중, 마우스의 좌골신경을 실로 묶어 만성적인 통증을 유발시키는 동물모델(CCI, Chronic Constrict Injury)에서 HGF가 만성적인 통증을 감소시키는 것을 확인한 바 있다(Nho *et al.*, 2018). 또한, 이 연구의 연장선으로서 CCI 모델에서 HGF와 더불어 여러가지 유전자를 함께 발현시키는 선행연구를 진행하였으며(data not published), 그 결과 IGF-1을 HGF과 동시에 발현시켰을 때 더욱 큰 통증감소효과가 나타난 것을 확인하였다. 본 학위 논문은 이 선행연구에서부터 시작되었으며, 이를 바탕으로 하여 ‘pTx-IGF1 X10’ 이라고 명명된 플라스미드 DNA 및 그 효능에 대한 연구를 진행하였다.

본 연구 전반에 걸쳐 사용된 IGF-1 과발현 플라스미드 DNA는 pCK의 프로모터 서열의 일부를 삭제한 pTx 벡터에 클로닝되었다. 또한, 본 연구에서는 최종적으로 IGF-1이 주사 부위 근처의 조직에 미치는 영향을 평가하고자 하였기 때문에, 주로 주변분비(paracrine)를 한다고 알려진 IGF-1 class 1 이형체들을 사용하였다. 따라서, class 1-human IGF1-Ea(= rodent IGF1-Ea)와 class 1-human IGF1-Ec(= rodent IGF1-Eb)에 해당하는 두 종류의 IGF-1 이형체들을 발현시키기 위해, 엑손 1(class 1 signal peptide)과 엑손 3, 4(mature peptide), 그리고 엑손 4 이후의 인트론과 엑손 5, 6을 조합한 cDNA 서열을 pTx에 삽입한 플라스미드 DNA를 제작하였다. 이렇게 제작된 858bp의 cDNA를 포함한 pTx-IGF1 X10는 총 3925bp 크기를 가진다.

### 1.3. 본 연구의 개요 및 목적

그 동안 IGF-1에 관해 진행된 많은 문헌들은 주로 형질전환(transgenic) 마우스 혹은 재조합 IGF-1을 사용하여 연구를 진행하였다(Scicchitano, 2009; Philippou, 2007, Kanje, 1989; Glazner, 1994; Feldman, 1997; Musarò, 2007). 하지만, 특정 질환 모델의 치료제 후보 타겟을 선정하기 위해 형질전환 마우스를 사용하는 것은 적합하지 않으며, 재조합 IGF-1을 사용하여

진행 중인 임상시험들은 아직까지 희귀 질환에 대해 큰 성과를 보지 못하고 있다. 따라서, 본 연구는 짧은 기간동안 국소적으로 발현시킨 IGF-1 이형체들이 근육과 말초신경의 재생에 긍정적인 영향을 미칠 수 있는지 알아보려고 하였다. 이를 위해 두 종류의 인간 IGF-1 이형체(class 1-Ea, class 1-Ec)를 발현하는 플라스미드 DNA(pTx-IGF1 X10)를 사용하였다.

본 연구의 세부 과정은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째로, 실험에 사용한 플라스미드 DNA의 생체 외(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서의 IGF-1 발현 양상과 특성을 관찰하고, 생물학적 활성을 지니고 있는지 확인하였다. 두 번째로, 두 가지의 질환 모델을 유도한 뒤 근육에서 국소적으로 발현된 IGF-1가 주변의 손상된 조직 회복을 촉진시킬 수 있을지 조사하였다. 이를 통해, 아직까지 명확한 치료제가 없는 질환들에 대해 IGF-1을 이용한 새로운 치료제의 가능성을 모색하고자 하였다.

Clinical trials for IGF-I and muscle therapy.

Therapeutic target	Subjects	IGF-I isoform	Delivery method	Outcome
<b>Sarcopenia</b>				
	Elderly women (N = 14)	rhIGF-I	15–60 µg/kg SQ BID 1 month	Increased whole body and muscle protein synthesis [2]
	Healthy, nonobese, postmenopausal women over 60 years of age (N = 16)	rhIGF-I	15 µg/kg SQ BID 1 year	No change in body composition, bone density, strength, or memory [4]
<b>GH deficiency</b>				
	Growth hormone deficient young adults (N = 8)	rhIGF-I	60 µg/kg SQ BID 8 weeks	Increased fat-free mass and protein synthesis rates; no effect on skeletal muscle strength [90]
<b>Muscle Wasting/Cachexia</b>				
	Patients with AIDS-associated wasting (N = 60)	rhIGF-I and GH	0 or 5 mg IGF SQ BID 0 or 1.4 mg GH SQ 1D 12 weeks	Single and combined treatments increased lean body mass, with combined GH/rhIGF-I providing the most benefit; GH only improved muscle strength [11]
<b>Diabetes/Metabolism</b>				
	Obese postmenopausal women (N = 33)	rhIGF-I and GH	0 or 15 µg/kg IGF SQ BID 0 or 25 µg/kg GH SQ 1D 12 weeks	Enhanced fat loss [10]
	Type 2 diabetes mellitus subjects (N = 8)	rhIGF-I	80 µg/kg SQ BID 7 days	Improved hepatic and muscle insulin sensitivity [3]
<b>Neuromuscular Disease</b>				
	Amiotrophic lateral sclerosis (ALS) patients (N = 266)	rhIGF-I	5 or 10 µg/kg SQ ID 9 months	Dose-dependent deceleration of pathological progression [5]
	Amiotrophic lateral sclerosis (ALS) patients (N = 124)	rhIGF-I	10 µg/kg SQ ID 9 months	No significant differences in disease progression [1]
	Amiotrophic lateral sclerosis (ALS) patients (N = 9)	rhIGF-I	0.5–3 µg/kg intrathecal every 2 weeks for 40 weeks	Modest but significant beneficial functional effects [8]
	Amiotrophic lateral sclerosis (ALS) patients (N = 330)	rhIGF-I	3 µg/kg SQ BID 2 years	No differences between treatment & placebo groups; major effect of hypoglycemia [9]
	Myotonic dystrophy type 1 patients (N = 15)	rhIGF-I/rhIGFBP3 (IPLEX)	0.5–2 mg/kg SQ 1D 24 weeks	Increased lean body mass; improved metabolism; no increased muscle strength [12]

표 1-1. 근육 질환에 대한 재조합 인슐린 유사 성장 인자-1의 임상 시험 목록 (Philippou & Barton, 2014 에서 발췌)

## 2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

### 2.1. 세포 배양

#### 2.1.1. 생물학적 시약

C2C12, HSMM, SH-SY5Y 세포의 IGF-1 수용체의 활성화를 확인하기 위한 실험에서, R&D systems에서 구입한 재조합 인간 IGF-1 (cat# 291-G1)을 다양한 농도(0~25 ng/ml)로 사용하였다.

#### 2.1.2. C2C12 세포주

C2C12 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. C2C12 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 10% FBS(Gibco, cat# 10091148)와 100U/ml의 항생제(penicillin-streptomycin, Gibco, cat# 12130122), 2mM GlutaMax(Gibco, cat# 35050061)이 포함된 DMEM(Gibco, cat# 10313021)으로 배양하였다.

#### 2.1.3. HEK293T/17 세포주

HEK293T/17 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. HEK293T/17 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 10% FBS(Gibco, cat# 10091148)와 100U/ml의 항생제(penicillin-streptomycin, Gibco, cat# 12130122), 2mM GlutaMax(Gibco, cat# 35050061), 10mM HEPES(Gibco, cat# 15630080)이 포함된 DMEM(Gibco, cat# 10313021)으로 배양하였다.

#### 2.1.4. SH-SY5Y 세포주

SH-SY5Y 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. SH-SY5Y 세포주는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 10% FBS(Gibco, cat# 10091148)와 100U/ml의 항생제(penicillin-streptomycin, Gibco, cat# 12130122), 2mM GlutaMax(Gibco, cat# 35050061), 10mM HEPES(Gibco, cat# 15630080)이 포함된 DMEM(Gibco, cat# 10313021)으로 배양하였다.

#### 2.1.5. HSMM 일차 세포(Primary cell)

HSMM은 인간의 팔과 다리에서 분리한 골격근 근원세포(skeletal muscle

myoblast)로서, Lonza에서 구입하였다. HSMM 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 전용 배양 배지(SkBM<sup>TM</sup>-2 Basal Medium, cat# CC-3246)로 배양하였다.

## 2.2. 플라스미드 형질주입(Transfection)

### 2.2.1. 플라스미드

IGF-1의 발현 비교를 위해 총 다섯 가지 종류의 플라스미드를 사용하였다. : pTx, pTx-IGF1 X10, pTx-IGF1 Ea, pTx-IGF1 Ec, pTx-mature IGF1 이 때, 모든 IGF-1 이형체 cDNA에는 엑손 1이 포함되어 있으며, mature IGF-1의 경우 일반적으로 사용하는 70개의 아미노산 서열이 아닌, E peptide의 공통영역에 해당하는 엑손 4의 16개의 아미노산을 포함하는 서열(총 86개의 아미노산)을 의미한다.

### 2.2.2. 형질주입

C2C12와 HEK293T/17 세포를 IGF-1을 생산하기 위한 세포주로 사용하였다. 6 well 플레이트에 계대 배양한 세포주를 분주한 뒤, 플레이트의 80%를 차지할 때까지 배양하였다. 배양 배지를 새 배지로 교체한 뒤, 시약 생산자의 지시사항에 따라 Lipofectamine 3000(Invitrogen, cat# L3000008)을 사용하여 1 µg의 플라스미드 DNA를 세포에 형질주입하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 48시간 동안 배양한 뒤, 세포배양액과 세포를 각각 수거하여 분석에 사용하였다.

## 2.3. RNA 추출 및 qRT-PCR

배양한 세포와 마우스에서 수거한 전경골근(TA)에서 RNA를 추출하기 위해 Trizol(Invitrogen, cat# 15596026)을 사용하여 세포와 조직을 각각 분쇄하였다. 이 후, chloroform(Junsei, cat# 28560-0350), isopropanol (대정화금, cat# 5035-4400)을 사용하여 이전의 연구에서 사용된 방법에 따라 RNA를 추출하였다(Kim *et al.*, 2018, Lim *et al.*, 2018). 추출한 RNA 1 µg과 Reverse Transcriptase XL(AMV)(Takara, cat# 2620A), Oligo-dT primer(Qiagen, cat# 79237), dNTP(Takara, cat# 4030), RNase inhibitor(Takara, #2313A) 시약을 사용하여 cDNA(complementary DNA)를 합성하였다. 이후, 유전자의 발현량을 측정하기 위하여 TP800(Takara) 기기를 사용하여 qRT-PCR(Quantitative Real-Time

PCR)을 수행하였다. 합성한 cDNA 1  $\mu$ l을 TB Green Premix(Takara, cat# RR820A)와 표 2-1에 표기된 프라이머를 사용하여 증폭한 뒤, GAPDH로 표준화하여 상대정량하였다.

#### 2.4. 효소결합면역흡착검사(ELISA)

형질주입한 세포의 배양액에서 IGF-1을 검출하기 위해 생산자가 제공하는 프로토콜에 따라 hIGF-1 ELISA(R&D systems, cat# SG100B)를 수행하였다. 플라스미드를 근육주사한 전경골근(TA)에서 IGF-1을 검출하기 위해 생산자가 제공하는 프로토콜을 참고하여 hIGF-1 ELISA(R&D systems, cat# DFG100B)를 수행하였다. 마우스 전경골근을 분석하기 위하여, 수거한 전경골근에서 T-PER (Thermo Fisher Scientific, cat# 78510) 단백질 추출 용액, 단백질분해효소 억제제(Protease inhibitor)(Roche, cat# 11697498001), 탈인산화효소 억제제(Phosphatase inhibitor)(Sigma Aldrich, cat# 4906837001)를 사용하여 조직을 용해하였다. 용해된 조직을 4°C, 12,000g 조건에서 15 분간 원심분리한 뒤, 단백질이 포함된 상층액만을 수거하여 분석에 사용하였다.

배양한 세포에서 인산화된 IGF-1 수용체의 양을 측정하기 위하여, 생산자가 제공하는 프로토콜을 참고하여 ELISA(Human phosphor IGF1R DuoSet IC ELISA, R&D systems, cat# DYC1770-5)를 수행하였다. 이를 위해, 플레이트에서 계대 배양한 SH-SY5Y 세포의 배양액을 FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 교체한 뒤, 16시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경에서 배양하였다. C2C12 세포에 형질주입하여 얻은 IGF-1이 포함된 배양액을 SH-SY5Y에 다양한 농도로 30분 간 처리한 뒤, 단백질분해효소 억제제(Protease inhibitor)(Roche, cat# 11697498001)와 탈인산화효소 억제제(Phosphatase inhibitor)(Sigma Aldrich, cat# 4906837001)가 포함된 RIPA(Sigma Aldrich, cat# R0278) 버퍼를 사용하여 단백질을 추출하였다. 세포 용해액을 4°C, 12,000g 조건에서 15 분간 원심분리한 뒤, 단백질이 포함된 상층액만을 수거하여 분석에 사용하였다

#### 2.5. 면역침강법(Immunoprecipitation)

인간 IGF-1을 검출하기 위하여 면역침강법을 적용하였다. 인간 IGF-1의 음성대조군과 양성대조군으로 사용하기 위한 단백질은 각각 재조합 마우스

IGF-1 (GenScript, cat# Z03178-50) 과 재조합 인간 IGF-1 (R&D systems, cat# 291-G1) 을 사용하였다. 사용한 면역침강 키트(Thermo Fisher Scientific, cat# 10007D) 의 지시사항을 참고하여, 2  $\mu$ g의 항체를 사용하고 4  $^{\circ}$ C 조건에서 세포 배양액을 반응시켜 단백질을 분리하였다. 500  $\mu$ l의 세포배양액을 사용하였으며, 마지막에 얻은 추출액은 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

## 2.6. 웨스턴 블랏(Western blot)

배양한 세포 및 배양액과 마우스 전경골근의 단백질을 면역블로팅으로 분석하기 위하여, 단백질분해효소 억제제(Protease inhibitor) (Roche, cat# 11697498001)와 탈인산화효소 억제제(Phosphatase inhibitor) (Sigma Aldrich, cat# 4906837001)가 포함된 RIPA(Sigma Aldrich, cat# R0278) 버퍼를 사용하여 단백질을 추출하였다. 실험군 별로 같은 양의 단백질을 4~12% 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 젤(Invitrogen)에서 전기영동한 뒤, 메탄올(MeOH)로 활성화시킨 PVDF(GE Healthcare, cat# 10600023)에 transfer 하였다. PDVF를 3% BSA가 포함된 0.1% TBST(Thermo Scientific, cat# 28360) 용액에서 1시간 동안 blocking 한 뒤, 1차 항체가 포함된 3% blocking 용액에서 밤새(4  $^{\circ}$ C)동안 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 표 2-2에 표기하였다. 1차 항체에서 반응시킨 PVDF를 0.1% TBST 용액으로 씻어낸 뒤, HRP (horseradish peroxidase)가 연결된 2차 항체(Abcam, cat# ab205718, ab205719) 및 2% skim milk(BD Difco, cat# 232100)가 포함된 0.1% TBST 용액에서 1시간(상온)동안 반응시켰다. ECL(Thermo scientific, cat# 34577) 과 반응시킨 단백질 밴드를 Solo6S(Vilber) 기기에서 분석하였다.

## 2.7. 동물 실험(Animals)

동물 실험을 위해 오리엔트바이오(Korea)와 Janvier Labs(France)에서 구입한 7~8주령의 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 동물들은 일정한 온도(약 25  $^{\circ}$ C)와 12시간의 활동일 주기(light-dark cycle)로 사육되었으며, 모든 동물 실험은 서울대학교(Seoul National University)와 (주)헬릭스미스(Helixmith)의 IACUC(International Animal Care and Use Committee)에서 검토 및 승인된 절차를 준수하며 진행되었다.



Gene	Direction	Primer sequence
Human IGF1-Ea	Forward	CAAGCCTGCCAAGTCAGCTC
	Reverse	TAGTTCTTGTTTCCTGCACTCCCT
Human IGF1-Ec	Forward	GATCTAAGGAGGCTGGAGATGTAT
	Reverse	TTGGTAGATGGGGGCTGATACT
Human GAPDH	Forward	CTGTTCGACAGTCAGCCGCATC
	Reverse	GCGCCCAATACGACCAAATCCG
Mouse GAPDH	Forward	CTGGAAAGCTGTGGCGTGAT
	Reverse	CCAGGCGGCACGTCAGATCC

표 2-1. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열

Antibody	Company	Catalog number
IGF-1 (1)	Abcam	Ab106836
IGF-1 (2)	Santa Cruz	SC-74116
IGF-1 (3,6)	R&D systems	MAB291-100
IGF-1 (4)	Abcam	Ab9572
IGF-1 (5)	Thermo Fishier Scientific	MA1-21539
pAKT(T308)	Cell Signaling Technology	4056
pAKT(S473)	Cell Signaling Technology	9271
AKT(Pan)	Cell Signaling Technology	4691
p-p70S6K(T389)	Cell Signaling Technology	8209
p70S6K	Cell Signaling Technology	2708
pGSK3 $\alpha/\beta$	Cell Signaling Technology	9331
GSK3 $\alpha/\beta$	Cell Signaling Technology	5676
GAPDH	Cell Signaling Technology	2118
Ea-peptide	Abclon	Custom
Ec-peptide	Abclon	Custom
Pax7	Santa Cruz	SC-81648
MyoD	Santa Cruz	SC-32758
MyoG	Santa Cruz	12732
Myh3	Abcam	Ab124205
$\beta$ -tubulin	Abcam	Ab6046
IGF-1R $\beta$	Cell Signaling Technology	9750
pIGF-1R $\beta$ (Y1131)	Cell Signaling Technology	3021

표 2-2. 웨스턴 블랏에 사용된 1차 항체 목록

### 2.7.1. 좌골신경 손상 모델(Sciatic nerve crush model)

마우스의 좌골신경 손상을 유도하기 위해 연구실의 선행연구에서 사용된 방법을 이용하였다(Lee *et al.*, 2019, Ko *et al.*, 2018). C57BL/6 마우스를 2~4%의 이소플루레인(isoflurane)과 1~2%의 산소를 혼합한 가스를 사용하여 호흡 마취를 유도한 뒤, 마우스 오른쪽 허벅지 부위의 가죽과 근육을 수술용 가위와 포셉을 사용하여 절개하였다. 이후, 노출된 좌골신경을 얇은 포셉(약 1mm)으로 15초 간 강하게 집음으로써 물리적 손상을 발생시켰다. 좌골신경의 손상과 동시에 허벅지(thigh)와 전경골근(TA)에 플라스미드를 근육주사 한 뒤, 절개된 근육과 가죽을 봉합하였다. 실험 계획에 따라 좌골신경, 전경골근을 포함한 조직들을 다양한 시점에서 수거하여 분석하였다.

### 2.7.2. CTX 근육 손상 모델 (CTX-induced muscle regeneration model)

마우스의 골격근의 손상을 유도하기 위해, 먼저 C57BL/6 마우스를 2~4%의 이소플루레인(isoflurane)과 1~2%의 산소를 혼합한 가스를 사용하여 호흡 마취를 유도하였다. 이후, PBS(phosphate-buffered saline)에 희석한 10  $\mu$ M CTX(Latoxan, cat# L8102) 50  $\mu$ l를 인슐린 주사기를 사용하여 마우스의 전경골근(TA)에 근육주사하였다. 이후, 실험 계획에 따라 다양한 시점에서 전경골근을 수거하여 분석하였다.

## 2.8. 투과전자현미경(Transmission electron microscopy) 분석

실험이 종료된 마우스를 CO<sub>2</sub>를 사용하여 안락사시킨 뒤, 수거한 좌골신경을 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)와 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)가 포함된 0.05M PBS 고정용액에서 4°C 조건으로 5시간동안 고정시켰다. 고정된 좌골신경을 0.05M PBS로 씻어낸 뒤, 1% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide)이 포함된 0.05M PBS 용액에서 4°C로 2시간동안 후고정시켰다. 검게 변한 시료를 3차 증류수로 씻어낸 뒤, 0.5% 아세트산 우라닐(uranyl acetate)로 어둠에서 밤새도록 Ec bloc 염색을 진행하였다. 다음날, 시료를 4°C에서 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% 에탄올에 차례대로 옮기면서 탈수과정을 진행한 뒤, 마지막으로 산화 프로필렌(propylen oxide)로 4°C에서 10분간 반응시켜 완전히 탈수시켰다. 이후, 농도를 높여가며 산화 프로필렌과 섞은 여러 농도의 Spurr's resin

임베딩(embedding) 용액을 상온에서 시료와 차례대로 반응시켰다. 마지막 임베딩 시에는 100% Spurr's resin 용액을 사용하여 밤새 반응시키며, 다음 날 임베딩 용액을 새로 교체하고, 몰드(mould)에 넣어 70℃ 드라이 오븐에서 밤새 중합반응시켰다. 굳힌 샘플을 서울대학교 NICEM에 의뢰하여 절편을 제작했으며, 이를 바이오투과전자현미경(120kV)(FEI, cat# Talos L120C)를 이용하여 촬영하였다. 촬영된 사진에서 축삭(axon)의 지름을 측정하기 위해, ImageJ 프로그램을 이용하여 분석하였다.

## 2.9. 면역형광법(Immunofluorescence)

### 2.9.1. 신경근이음부(Neuromuscular junction) 염색

실험이 종료된 마우스를 CO<sub>2</sub>를 사용하여 안락사시킨 뒤, 마우스의 장지신근(EDL)을 수거하여 4% 파라포름알데히드(PFA)에서 10분간 고정하였다. PBS에 녹인 0.1M 글라이신(glycine)용액으로 PFA를 제거한 뒤, 장지신근을 여러 조각으로 분리하였다. 샘플을 blocking 용액(5% BSA, 2% Triton X-100)에서 2시간 동안 반응시킨 뒤, 1차 항체( $\alpha$ -BTX: cat# B13423, NF-M: cat# AB1987)를 희석한 blocking 용액에서 4℃ 조건으로 밤새 반응시켰다. 다음날, 시료를 2% Triton X-100 PBS 용액으로 씻어낸 뒤, 2차 항체를 희석한 blocing 용액에서 4℃ 조건으로 밤새 반응시켰다. 다음날, 2% Triton X-100 PBS 용액으로 씻어낸 뒤 슬라이드를 제작하였다. 형광 이미지는 Zeiss 사에서 구매한 LSM 900 공초점 현미경으로 얻어졌다.

### 2.9.2. 내신경섬유(Intra epidermal nerve fiber) 염색

실험이 종료된 마우스를 CO<sub>2</sub>를 사용하여 안락사시킨 뒤, 마우스의 발바닥에서 수거한 신경돌기를 Zabmoni 고정용액(Newcomer supply, cat# 1459A)에서 6시간동안 고정시켰다. 고정된 조직을 PBS로 여러 번 씻어준 뒤, 30% 슈크로오스 용액에 옮겨서 4℃의 조건으로 밤새 탈수과정을 진행하였다. 다음날, 시료를 O.C.T 화합물을 이용해서 얼린 뒤, 30  $\mu$ m 두께로 썬어냈다. 제작된 샘플은 결빙방지용액(30% glycerol, 30% ethylene glycol, PBS)에 넣어 -30℃에서 보관하였다.

샘플을 PBS 용액으로 씻어낸 뒤, 0.3% PBS-T 용액에 녹인 5% BSA blocking 용액으로 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체인 PGP9.5(Proteintech Group, cat# 14730-1-AP)를 rinse 용액(0.3% PBS-T, 1% BSA)에

희석한 뒤, 샘플과 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 4°C 냉장고에서 밤새 반응시켰다. 다음날, 샘플을 rinse 용액으로 씻어내고, 2차 항체를 희석한 rinse 용액을 샘플과 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 4°C에서 밤새 반응시켰다. 이 때, 2차 항체의 활성보호를 위해 어두운 조건에서 실험하였다. 다음날, PBS 용액으로 샘플을 씻어낸 뒤, 핵을 염색하기 위해 DAPI로 포함된 mounting 용액으로 슬라이드를 제작하였다. 형광 이미지는 Zeiss 사에서 구매한 LSM 900 공초점 현미경으로 얻어졌다.

## 2.10. RNA 시퀀싱(sequencing) 분석

실험이 종료된 마우스를 CO<sub>2</sub>를 사용하여 안락사시킨 뒤, 수거한 좌골신경에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Bioneer(Korea)에 의뢰하여 RNA-seq을 진행하였으며, 오픈 소스 프로그램인 Kallisto를 사용하여 분석하였다.

## 2.11. 통계 분석 방법

본 논문에 포함된 데이터들은 mean ± SD 값으로 표시되었고, 반복 실험을 진행한 경우에는 본문에 별도로 표기하였다. 통계 분석이 필요한 경우, one-way ANOVA 또는 two-way ANOVA를 사용하여 통계적 중요도를 비교하였다. P value 가 0.05 이하인 경우에만 통계적으로 유의미한 결과로 해석하였으며, GraphPad Prism 9.0 프로그램을 사용하여 분석하였다.

### 3. 실험결과(Results)

#### 3.1. 인간 IGF-1 이형체(isoform) 서열을 포함하는 cDNA

##### 하이브리드의 단백질 발현 패턴 조사

##### 3.1.1. 인간 IGF-1 하이브리드 cDNA를 포함하는 pTx-IGF1 X10

생체 내에서 IGF-1은 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 만들어지는 N-terminal 영역의 신호 펩타이드와 C-terminal 영역의 E-peptide의 조합에 따라 다양한 이형체(isoform)로 발현되며, 그 중 인간에서는 6 종류, 설치류에서는 4 종류가 존재한다고 알려져 있다 (Oberbauer, 2013) (그림 1-2). pTx-IGF1 X10은 플라스미드 벡터를 기반으로 제작된 IGF-1 하이브리드 구조체(hybrid construct)이며, 두 종류의 인간 IGF-1 이형체(class 1-Ea, class 1-Ec)들을 발현하도록 디자인되었다(그림 3-1). 본 연구에서는 pTx-IGF1 X10에 의해 분비되는 IGF-1의 발현 양상 및 생물학적 활성을 조사하기 위한 일련의 실험들을 수행하였다.

##### 3.1.2. In vitro에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 단백질의 특성

제작한 cDNA 구조체에서 의도한 바와 같이 선택적 스플라이싱에 의해 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)를 생산할 수 있는지 확인하기 위해 pTx-IGF1 X10를 비롯하여 각각의 IGF-1 이형체를 포함하는 플라스미드를 마우스 유래 근육세포주인 C2C12와 인간 유래 신장세포주인 HEK293T/17에 형질주입(transfection)하였다. 이후 각각의 이형체에 특이적인 프라이머를 사용하여 qRT-PCR(Quantitative Real-Time PCR)을 통해 세포에서 생산되는 RNA의 발현량을 조사하였다. 실험 결과, C2C12와 HEK293T/17에서 모두 Ea peptide와 Ec peptide 영역을 포함한 mRNA가 발현되고 있는 것을 확인하였다(그림 3-2, 검은색 표기). 또한, 발현되어 분비되는 IGF-1의 양을 측정하기 위해 모든 인간 IGF-1을 검출하는 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 사용하여 형질주입된 세포주에서 수거한 세포배양액을 분석하였다. 분석 결과, 모든 실험군에서 인간 IGF-1이 잘 분비되고 있음을 확인하였다(그림 3-3, pTx-IGF1 X10 검은색 표기).

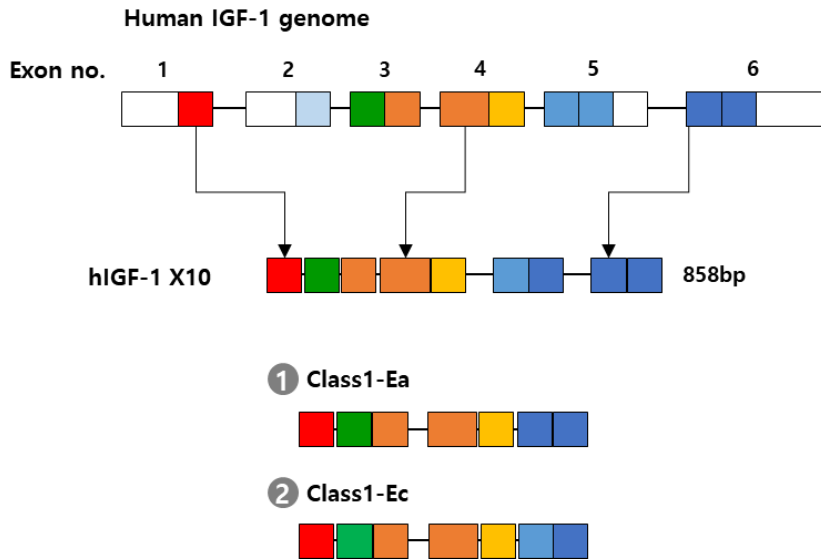


그림 3-1. IGF1 X10의 유전자 모식도.

IGF1 X10은 두 종류의 인간 IGF-1 (class 1-IGF-1 Ea, class 1-IGF-1 Ec)을 발현하도록 디자인되었다. Class 1 signal peptide 영역에 해당하는 exon 1과 mature IGF-1에 해당하는 exon 3, exon 4 및 E-peptide 영역에 해당하는 exon 5, exon 6이 적절히 조합되었다.

IGF-1은 mature IGF-1에 해당하는 부위가 IGF-1 수용체에 결합하며, pro-IGF-1에 포함된 E peptide는 furin을 비롯한 여러가지 전단백질 전환효소(proprotein convertase)에 의해 분리(cleavage)된다고 알려져 있다(Vassilakos & Barton, 2011). IGF-1은 mature IGF-1뿐만 아니라 pro-IGF-1 형태로도 분비된다고 보고된 바가 있기 때문에(Durzyńska *et al.*, 2013), 면역침강법(Immunoprecipitation, IP)과 웨스턴 블랏(Western blot)으로 세포배양액을 분석하여 pTx-IGF1 X10에 의해 발현된 인간 IGF-1이 어떤 형태로 존재하는지 알아보려고 하였다.

이를 위해, 우선 웨스턴 블랏 실험에서 IGF-1을 검출할 수 있는 항체를 선별하였다. 실험의 편의성을 고려하여 플라스미드를 형질주입한 HEK293T/17 세포주에서 추출한 단백질과 두 종류의 재조합 IGF-1을 항체를 선별하기 위한 시료로 사용하였다. 웨스턴 블랏에 사용한 항체들이 모두 mature IGF-1 펩타이드 서열을 항원으로 사용했다는 정보와는 다르게, 웨스턴 블랏 결과에서 상이한 밴드 패턴을 관찰하였다(그림 3-4). 재조합 마우스 IGF-1군을 제외한 모든 군에서 IGF-1이 검출될 것이라는 예상과 달리 세포 시료에 존재하는 pro-IGF-1만을 검출하는 항체(1번)와 재조합 인간 IGF-1만을 검출하는 항체(2번, 3번)들은 후보에서 제외하였다. 이와 달리 모든 실험군에서 pro-IGF-1 및 mature IGF-1(7.7 kDa)을 검출한 4번 항체를 최종 후보로 선정하였다.

다만, 4번 항체는 재조합 마우스 IGF-1까지 검출하였기 때문에(그림 3-4), 면역침강법을 사용하여 세포상층액에 존재하는 인간 IGF-1만을 분리하기 위한 항체를 선별하고자 하였다. 이를 위해 pTx-IGF1 X10을 형질주입한 HEK293T/17 세포주의 세포배양액에서 두 종류의 항-IGF-1 항체를 사용하여 면역침강법을 수행하였다. 면역침강법을 얻은 시료를 1번 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, 6번 항체를 사용한 실험군에서만 glycosylated pro-IGF1 Ea에 해당하는 밴드와 pro-IGF1 Ea 또는 pro-IGF1 Ec로 예상되는 밴드 패턴을 확인할 수 있었다(그림 3-5A). 면역침강법에 사용된 6번 항체가 인간 IGF-1에만 특이적으로 반응하는지 확인하기 위해 IGF-1 서열이 들어있지 않은 플라스미드 벡터를 HEK293T/17 세포주에 형질주입 한 뒤, 수거한 세포배양액에 재조합 인간 IGF-1 혹은 마우스 IGF-1



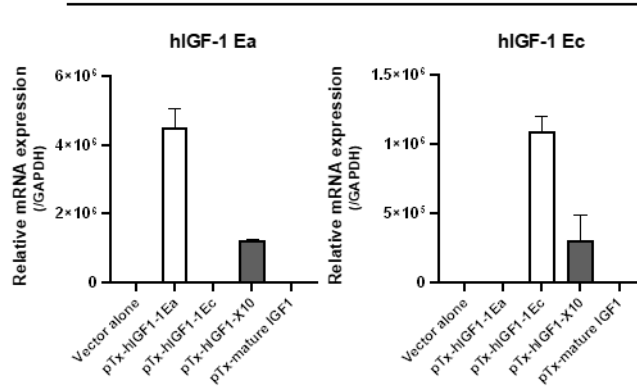
500ng을 첨가하였다. 재조합 IGF-1을 첨가한 세포배양액에서 면역침강법(6번 항체)과 웨스턴 블랏(4번 항체)을 수행한 결과, 재조합 인간 IGF-1을 첨가한 군에서만 mature IGF-1에 해당하는 밴드가 검출되었다(그림 3-5B). 따라서, human IGF-1을 특이적으로 검출하기 위한 항체조합으로 6번 항체(면역침강법)와, 4번 항체(웨스턴 블랏)를 최종으로 선정하였다.

마지막으로, 앞선 실험들을 통해 선정된 항체 조합을 바탕으로 전체 실험군(vector, IGF1-Ea, IGF1 Ec, IGF1 X10, mature IGF-1, recombinant human IGF-1)에 대해 면역침강법과 웨스턴 블랏을 수행하였다(그림 3-6). 그림에서 확인할 수 있듯이, hIGF1 X10 유전자 서열에 의해 발현되어 분비되는 단백질에는 mature IGF-1과 두 종류의 pro-IGF1 (Ea, Ec)을 모두 포함하고 있으며, 특히 pro-IGF1-Ea의 경우 대부분 N-당화(glycosylation)가 일어난 형태로 존재하고 있었다. 이와 같은 IGF-1의 다양한 분비 형태는 pTx-IGF1 X10를 통한 단백질의 발현이 복합적인 생물학적 기능을 보일 가능성을 시사한다.

### 3.1.3. pTx-IGF1 X10에 의해 분비되는 IGF-1의 생물학적 활성

pTx-IGF1 X10에서 발현되는 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)들이 생물학적 활성을 지니고 있는지 확인하기 위해 두 종류의 인간유래 세포를 이용하여 IGF-1 수용체의 인산화를 조사하였다. C2C12(mouse myoblast cell line)에 pTx-IGF1 X10를 형질주입(transfection)하여 얻은 배양액(culture supernatant)을 수거하여 IGF-1의 농도를 ELISA로 측정된 뒤, HSMM(human skeletal muscle myoblast primary cell)과 SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line)에 여러가지 농도로 세포 배양액을 처리하였다. 세포 배양액을 처리하고 30분 후 세포를 수거하였으며, ELSIA를 수행하여 pIGF1R의 농도를 측정하였다(그림 3-7A). 그 결과, HSMM과 SH-SY5Y에서 모두 IGF-1 농도의존적으로 IGF-1 수용체의 활성이 증가하였다. 또한 추출한 단백질을 시료로 하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과, SH-SY5Y에서 pIGR1R(Y1131)의 밴드 세기가 세포 배양액에 포함된 IGF-1의 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다(그림 3-7B).

C2C12



HEK293T/17

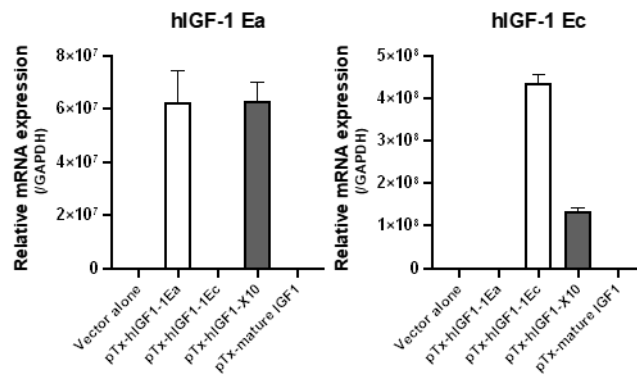


그림 3-2. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 mRNA 발현 측정.

C2C12 세포주와 HEK293T/17 세포주에 서로 다른 human IGF-1 이형체를 발현하는 플라스미드 (pTx, pTx-hIGF1-1Ea, pTx-hIGF1-1Ec, pTx-hIGF1 X10, pTx-mature hIGF-1)를 형질주입 한 뒤, 이들 뒤 배양한 세포들을 수거하였다. 인간 IGF-1의 Ea-peptide와 Ec-peptide에 특이적인 프라이머를 사용하여 qRT-PCR을 통해 두 종류의 인간 IGF-1의 mRNA 발현을 측정하였으며, 결과값은 GAPDH로 보정하였다. 총 2회의 반복 실험(n=3)을 진행하였으며, 그 중 대표적인 실험결과를 나타내었다.

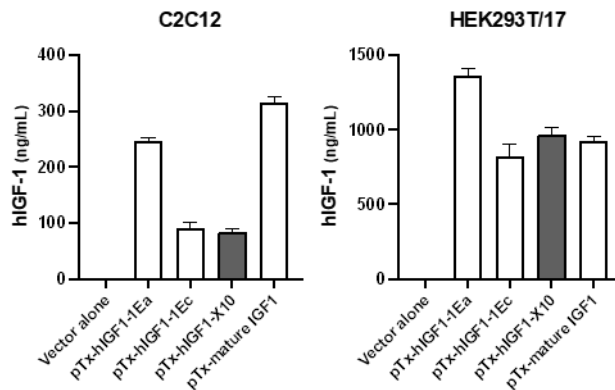


그림 3-3. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 단백질 발현 측정.

C2C12 세포주와 HEK293T/17 세포주에 서로 다른 인간 IGF-1 이형체를 발현하는 플라스미드 (pTx, pTx-hIGF1-1Ea, pTx-hIGF1-1Ec, pTx-hIGF1 X10, pTx-mature hIGF1)를 형질주입 한 뒤, 이를 뒤 수거한 세포 배양액에서 ELISA를 수행하여 인간 IGF-1의 농도를 측정하였다. 총 3회의 반복 실험(n=3)을 진행하였으며, 그 중 대표적인 실험결과를 나타내었다.

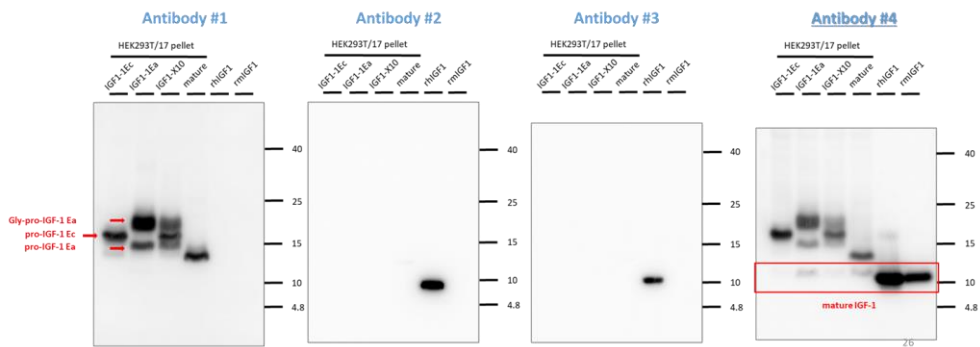


그림 3-4. 웨스턴 블랏에서 IGF-1에 특이적으로 반응하는 항체 스크리닝.

인간 IGF-1 이형체를 발현하는 플라스미드(hIGF1-1Ea, hIGF1-1Ec, hIGF1 X10, mature hIGF1)를 형질주입한 HEK293T/17 세포주에서 발현된 IGF-1와 재조합 IGF-1(recombinant IGF-1)에 모두 반응하는 항체를 선별하기 위하여 4 종류 항체를 이용하여 웨스턴 블랏(Western blot)을 수행하였다. 실험 결과, 모든 샘플과 반응하는 4번 항체를 웨스턴 블랏용 항체로 선정하였다. 2회 이상의 반복 실험을 진행하였으며, 그 중 대표적인 실험결과를 나타내었다.

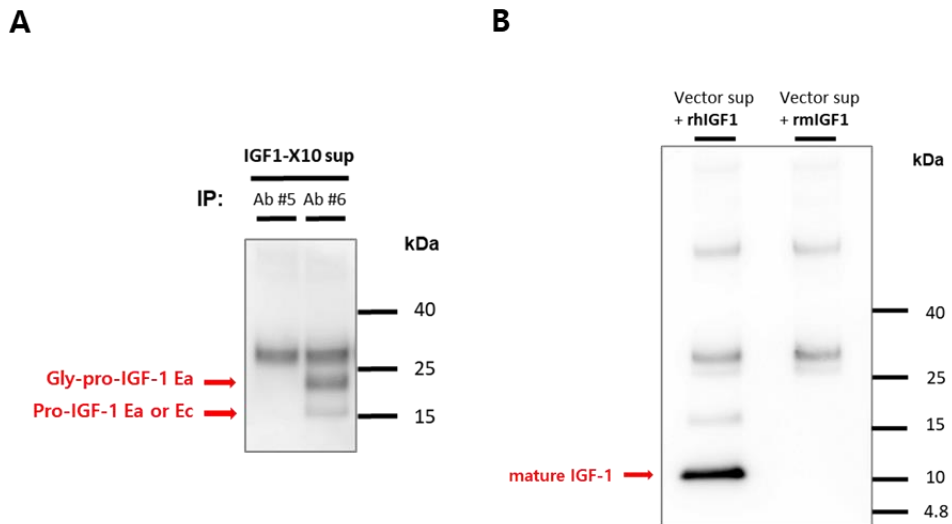


그림 3-5. 면역침강법에서 인간 IGF-1에 특이적으로 반응하는 항체 스크리닝.

IGF-1 이형체를 발현하는 플라스미드를 형질주입한 HEK293T/17 세포주로부터 수거한 세포 배양액을 사용하여 면역침강법(Immunoprecipitation)에서 인간 IGF-1에 특이적으로 반응하는 항체를 선별하였다. (A) IGF1 X10을 포함한 플라스미드를 형질주입하여 얻은 세포 배양액에서 면역침강법을 수행한 뒤, 1번 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다. 6번 항체만이 세포 배양액에 분비된 IGF-1과 반응하였다. (B) IGF-1 유전자가 포함되어 있지 않은 플라스미드를 형질주입하여 얻은 세포 배양액에 재조합 IGF-1 (human, mouse)을 첨가한 뒤, 면역침강법(6번 항체)과 웨스턴 블랏(4번 항체)를 수행한 결과이다. 실험 결과, 사용된 항체 조합이 인간 IGF-1에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다. 세포 배양액에 포함된 모든 IGF-1 농도: 약 500~1000  $\mu\text{g/ml}$ .

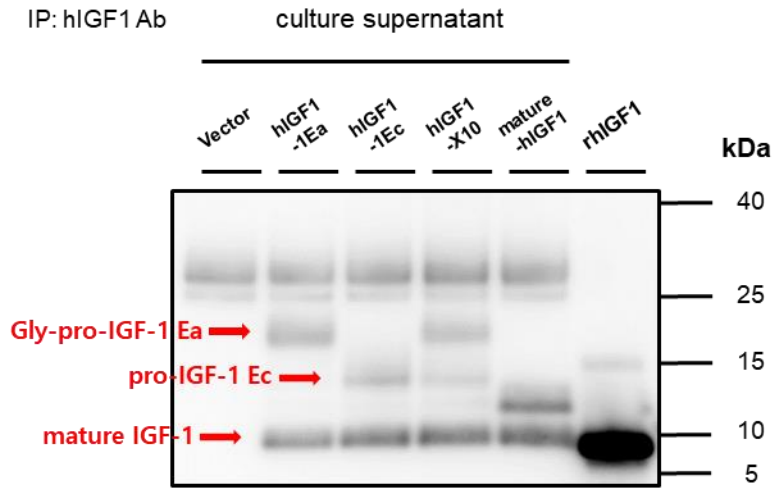


그림 3-6. In vitro 에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 hIGF-1 단백질 분비 형태. 선정된 두 종류의 항-IGF-1 항체를 이용하여 HEK293T/17 세포주에서 수거한 세포 배양액을 분석한 결과이다. 면역침강법(6번 항체)을 이용하여 인간 IGF-1을 추출한 뒤, 웨스턴 블랏(4번 항체)를 통해 인간 IGF-1이 분비되는 형태를 확인하였다. 양성 대조군으로는 재조합 인간 IGF-1을 사용하였다. 세포 배양액에 포함된 모든 IGF-1 농도: 약 500~1000  $\mu$ g/ml.

Mature human IGF-1은 mature mouse IGF-1과 96%의 아미노산 유사도를 보이며, 이종간활성(cross-species activity)을 가진다고 알려져 있다(Sandberg-Nordqvist, A.C. *et al.*, 1992). 추후에 마우스 동물모델을 사용하여 pTx-IGF1 X10의 효능(efficacy)평가를 진행하기 위해 인간 IGF-1 이형체들이 마우스유래세포주의 IGF-1 수용체에 작용하여 하위 신호전달 경로를 변화시킬 수 있는지 조사하였다. 다섯 종류의 플라스미드를 HEK293T/17에 형질주입 한 뒤, 수거한 세포배양액의 농도를 ELISA로 측정하여 25 ng/ml 농도로 희석하였다. 세포배양액을 C2C12에 처리한 뒤 세포를 수거하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 인간 IGF-1이 포함된 세포배양액을 처리한 군에서 IGF-1 수용체의 하위 신호전달 경로로 알려진 ATK, p70S6K, GSK3의 인산화가 크게 증가하였다(그림 3-8). 다만, mTOR, ERK는 실험군간에 큰 차이를 보이지 않았다(data not shown). 실험결과들을 종합하면, pTx-hIGF1-X10에서 분비되는 인간 IGF-1 이형체들은 인간유래세포들과 마우스유래세포주에서 모두 생물학적 활성을 보이고 있다.

#### 3.1.4. In vivo에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 단백질의 특성

플라스미드 벡터를 이용한 유전자 전달체가 적응증(indication)에서 보이는 효능은 전달된 유전자의 생체내 발현율과 연관이 깊다. 따라서, in vitro에서 확인한 바와 같이 pTx-IGF1 X10가 in vivo에서도 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)들을 발현하는 지, 그리고 얼마나 오랫동안 발현하는 지(expression kinetics) 확인하고자 하였다. 먼저, 시간에 따른 IGF-1의 발현량을 조사하였다. 이를 위해 C57BL/6 마우스(군당 6마리)의 전경골근(TA)에 pTx-IGF1 X10을 100 $\mu$ g 근육주사한 뒤, ELISA를 이용하여 2 주차까지의 인간 IGF-1의 발현량을 추적하였다. 사용된 플라스미드 용량은 HGF를 사용한 연구실의 선행연구들을 참고하여 결정하였다(Ko *et al.*, 2018, Choi *et al.*, 2018, Nho *et al.*, 2018). 1일 차에 수거한 근육에서 검출한 IGF-1은 67.5 pg/mg의 평균값을 가지며, 이는 시간이 지남에 따라 점차 증가하여 7일 차에는 117.9 pg/mg이 검출되었다(그림 3-9A). 이후 IGF-1의 발현량은 점차 감소하여 14일 차에는 대부분의 시료에서 ELISA 키트의 최저정량한계(Lower limit of quantitation, LLOQ)이하로 검출되었다. 즉, 한번의 근육주사를 통해 최대 2주까지 IGF-1이 발현되는 것을 확인하였다.

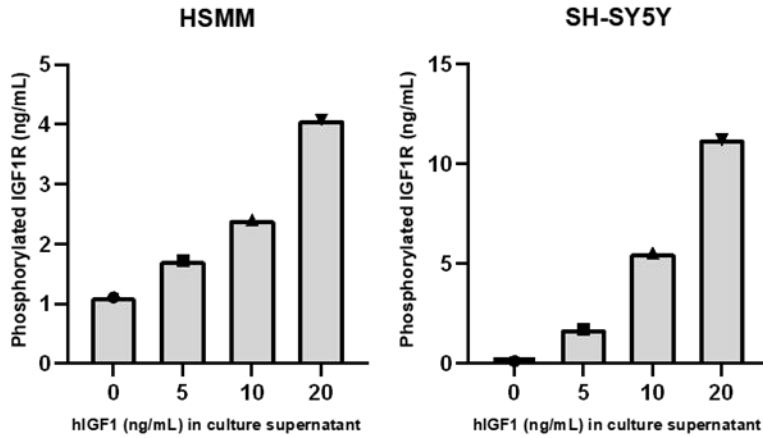
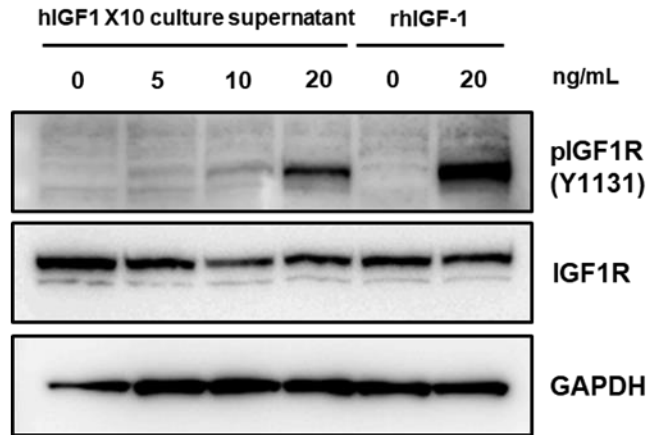
**A****B**

그림 3-7. 인간유래 세포에서의 pTx-IGF1 X10 역가(potency) 평가.

pTx-IGF1 X10에서 발견되는 인간 IGF-1의 생물학적 활성능력을 *in vitro*에서 조사한 결과이다. C2C12 세포주에 pTx-hIGF1 X10을 형질주입하여 수거한 세포배양액을 두 종류의 인간유래세포 (SH-SY5Y: neuroblastoma cell line, HSMM: human skeletal muscle myoblast primary cell)에 농도 별로 30분 간 처리하였다.

(A) IGF-1 수용체의 인산화 정도를 ELISA로 확인한 결과이다. (B) SH-SY5Y 세포를 수거하여 IGF-1 수용체의 인산화 양상을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

대조군으로 제조합 인간 IGF-1 단백질을 처리하였고, GAPDH를 loading control로 사용하였다.



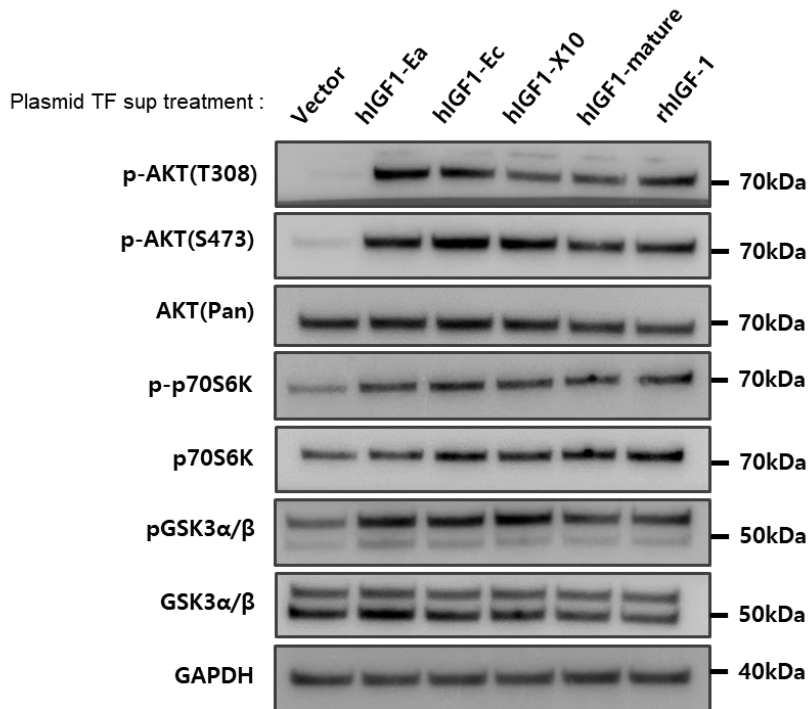


그림 3-8. pTx-IGF1 X10에 의한 마우스유래 세포주에서의 IGF-1 수용체의 하위 신호전달 경로 변화 확인.

pTx-IGF1 X10에서 발현되는 인간 IGF-1 이형체들의 생물학적 활성능력을 마우스유래 세포주(C2C12)에서 조사한 결과이다. HEK293T/17 세포주에 인간 IGF-1을 발현하는 플라스미드(pTx-hIGF1-Ea, pTx-hIGF1-Ec, pTx-IGF1 X10, pTx-hIGF mature)를 형질주입 한 뒤 2일 뒤에 세포배양액을 수거하였다. C2C12 세포주에 각각의 세포배양액을 일정한 농도(25 ng/ml)의 인간 IGF-1을 포함하여 30분 간 처리한 뒤, 세포를 수거하여 IGF-1 수용체의 하위 신호전달 경로의 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 양성대조군으로 재조합 인간 IGF-1 단백질을 처리하였고, GAPDH를 loading control로 사용하였다.

다음으로, IGF-1의 발현이 가장 높았던 시점인 7일 차를 기준으로 하여 플라스미드 DNA의 용량에 따른 단백질의 발현량을 비교하였다. pTx-IGF1 X10을 다양한 농도로 C57BL/6(군당 6마리) 마우스의 전경골근에 근육주사한 뒤, 7일 차에 근육을 수거하여 ELISA를 수행하였다. 주사한 플라스미드 DNA의 농도가 높을수록 IGF-1의 발현량이 증가하였으며( $50 \mu\text{g}$ :  $47.1\text{pg}/\text{mg}$ ,  $100 \mu\text{g}$ :  $108.0\text{pg}/\text{mg}$ ,  $200 \mu\text{g}$ :  $114.4\text{pg}/\text{mg}$ ), 이는  $100 \mu\text{g}$  이후로는 큰 차이가 없었다(그림 3-9B). 즉, *in vivo* 에서 pTx-IGF1 X10은  $0 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ 의 범위에서 농도에 따라 IGF-1의 발현이 증가하며, 이후로는 발현량이 크게 증가하지 않는다. 본 실험결과와 DNA로 인한 염증(*inflammation*) 반응 등의 요소를 고려하여, 이후의 실험에서는 근육 부위당  $100 \mu\text{g}$ 을 투여용량으로 결정하였다.

DNA 용량에 따른 단백질의 발현과 더불어 pTx-IGF1 X10에 의해 *in vivo*에서 발현되는 RNA 양상을 확인하기 위하여 7일 차에 수거한 전경골근에서 RNA를 추출하였다. 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)에 특이적인 프라이머를 사용하여 qRT-PCR을 수행한 결과, 플라스미드 DNA를 근육주사한 군에서 대조군에 비해 Ea-peptide와 Ec-peptide 영역을 포함한 mRNA가 각각 약 60,000배, 1,000배씩 높게 발현되고 있었다(그림 3-9C). 단백질과 mRNA의 발현 양상을 종합하여 살펴보면, *in vitro*와 마찬가지로 *in vivo*에서도 pTx-IGF1 X10에 의해 두 종류의 인간 IGF-1 이형체가 발현되고 있으며 상대적으로 class1-IGF1-Ec에 비해 class1-IGF1-Ea가 더 많이 발현되는 것을 확인하였다.

*In vivo*에서 발현되는 IGF-1의 형태는 다양한 생물학적 기능과 연결될 수 있기 때문에, 전경골근에서 수거한 단백질 추출액에서 면역침강법과 웨스턴 블랏을 수행하여 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 인간 IGF-1의 형태를 확인하고자 하였다. *In vivo* 시료에서의 면역침강법은 앞서 결정된 6번 항체와 더불어 자체적으로 의뢰하여 제작한 항-Ea, 항-Ec 항체를 사용하였다. *In vitro*에서의 결과와 유사하게, 플라스미드 DNA에 의해 발현되는 단백질은 mature IGF-1와 pro-IGF-1 형태 모두 존재하였다(그림 3-10). 다만, 세포 배양액과는 달리 조직 세포 전체에서 추출한 IGF-1이기 때문에, glycosylated pro-IGF1-Ea 외에 pro-IGF1-Ea도 함께 확인되었다.

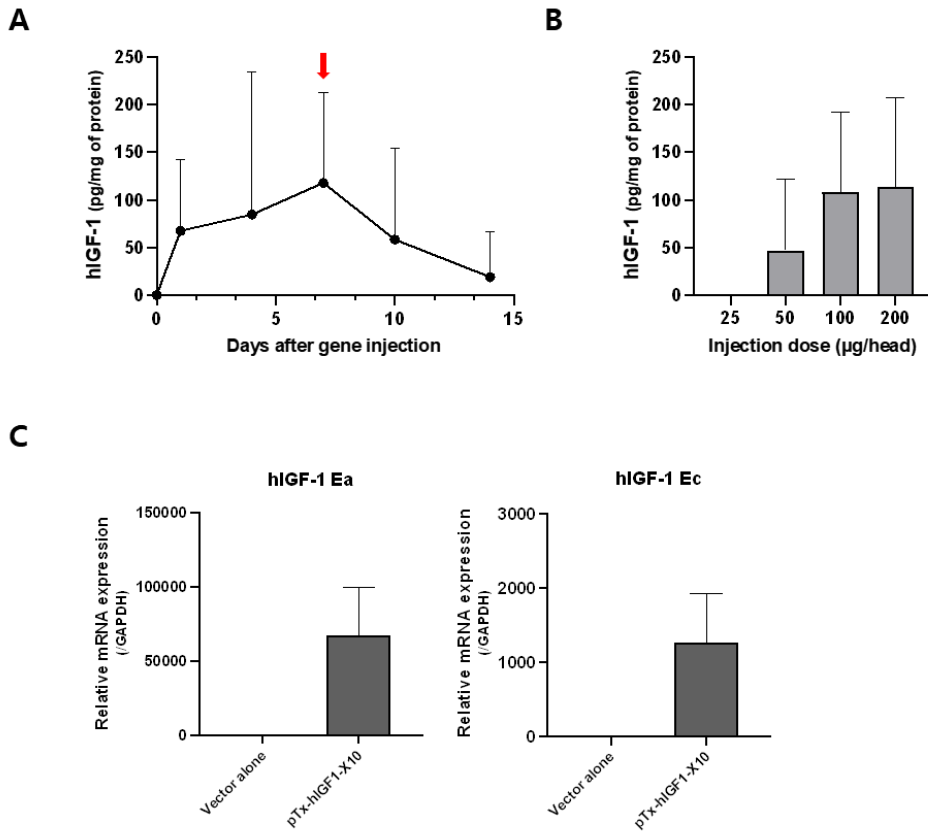


그림 3-9. In vivo 에서 pTx-IGF1 X10에 의한 hIGF-1 발현 측정.

C57BL/6 마우스의 전경골근(Tibialis Anterior, TA)에 pTx-IGF1 X10을 근육주사 한 뒤, mRNA와 단백질의 발현을 조사한 결과이다. (A) pTx-IGF1 X10 100  $\mu\text{g}$ 을 근육주사 한 뒤 1, 4, 7, 10, 14일 차에 전경골근을 수거하였다. ELISA를 통해 인간 IGF-1 단백질의 농도를 측정하였다. 총 2회의 반복 실험(n=6)을 진행하였으며, 그 중 대표적인 실험결과를 나타내었다. (B) pTx-IGF1 X10를 다양한 농도로 근육주사 한 뒤, 7일차에 전경골근을 수거하여 ELISA로 측정한 인간 IGF-1 농도(n=6). (C) pTx-IGF1 X10 100  $\mu\text{g}$ 을 근육주사 후 7일 차에 수거한 전경골근에서 qRT-PCR을 수행한 결과이다. 인간 IGF-1의 Ea-peptide와 Ec-peptide에 특이적인 프라이머를 사용하였으며, 결과값은 GAPDH로 보정하였다(n=6).

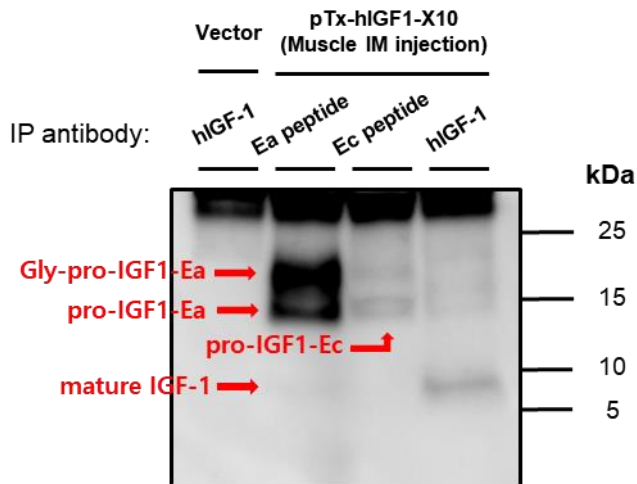


그림 3-10. In vivo 에서 pTx-IGF1 X10에 의해 발현되는 hIGF-1 단백질 분비 형태. 선정된 두 종류의 IGF-1 특이적인 항체(4번, 6번)와 자체적으로 제작한 E-peptide 특이적인 항체를 이용하여 pTx-IGF1 X10이 in vivo에서 발현하는 인간 IGF-1의 단백질 형태를 분석한 결과이다. C57BL/6 마우스의 전경골근(TA)에 pTx-IGF1 X10 100  $\mu$ g을 근육주사하고 7일 뒤 전경골근을 수거하였다. 전경골근에서 얻은 단백질 추출액에서 면역침강법(6번 항체, Ea 항체, Ec 항체)과 웨스턴 블랏(2번 항체)을 수행하여 인간 IGF-1이 분비되는 형태를 확인하였다.

## 3.2. 여러 가지 마우스 질환모델에서 IGF-1의 적용 가능성 조사

앞서 인간유래세포와 마우스유래세포주를 이용한 in vitro 실험들과 마우스를 이용한 in vivo 실험을 통해 pTx-hIGF1 X10을 통해 발현시킨 인간 IGF-1이 인간과 마우스에서 모두 작용하는 것을 확인하였으며, 이는 pTx-IGF1 X10을 마우스를 이용한 질환모델에도 적용할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 잘 알려져 있는 신경손상 모델인 좌골신경 손상 모델 (sciatic nerve injury model)과 근육손상 모델(CTX injury model)을 사용하여 in vivo 에서 과발현시킨 IGF-1이 조직의 재생과정에 영향을 줄 수 있는지 알아보려고 했다.

### 3.2.1. IGF-1의 과발현이 신경재생 과정에 미치는 영향

IGF-1의 과발현이 말초신경의 재생에 영향을 줄 수 있는지 알아보기 위해, 먼저 신경재생 연구에서 널리 사용되는 nerve crush 모델을 사용하여 손상된 신경에서 나타나는 IGF-1의 발현 패턴을 조사하였다. 동물실험에는 8주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하였으며, 대조군(sham)으로는 신경에 손상을 가하지 않고 수술 과정 중 근육 손상만 발생한 마우스를 사용하였다. 좌골신경에 crush injury를 가한 뒤, 여러 시점에서 좌골신경을 수거하여 ELISA 분석을 통해 mIGF-1의 농도를 측정하였다. **그림 3-11A**에서 확인할 수 있듯이, 기본 발현량(약 0.6 ng/mg)에서 신경 손상 이후 4일 차까지 IGF-1의 발현이 증가하였으며(약 2.2 ng/mg), 이는 sham 군에 비해 약 2.1배 높게 발현되었다. 이후 IGF-1의 발현은 28일 차까지 점차 감소하였다. IGF-1이 가장 많이 발현된 4일 차에서 수거한 좌골신경에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과 손상영역(B: bridge)과 뒷영역(D: distal)에서 IGF-1 수용체의 발현이 증가하였으며(**그림 3-11B**), 손상지점의 앞영역(P: proximal)에서는 IGF-1 수용체의 발현이 증가하지 않았다. 증가한 IGF-1 중 이형체들의 발현량 변화를 조사하기 위하여, 손상 4일 차의 좌골신경에서 RNA를 수거하여 RNA 시퀀싱(RNA-Seq)을 수행하였다. 놀랍게도 상대적으로 class 2-Ea와 class 2-Eb(=human class 2-Ec)의 발현량 변화는 크지 않은 반면, class 1-Ea와 class 1-Eb(=human class 1-Ec)의 발현량은 크게 증가하였다(**그림 3-11C**). 이를 종합하면 좌골신경의 손상은 손상영역에서 IGF-1의 발현과 IGF-1 수용체의 발현을 증가시키며, 이는 신경의 재생과

밀접한 연관이 있을 것으로 생각된다.

플라스미드 DNA를 이용한 IGF-1의 과발현이 crush injury에 의해 발생한 신경손상의 회복을 증진시킬 수 있는지 확인하기 위해, 3가지의 조직학적 변화를 관찰하였다. 선행 실험을 통해 좌골신경에 crush injury를 가하면 좌골신경에 월러변성(Wallerian degeneration)이 일어나면서 손상부위 신경의 축삭이 제거되며, 수일 내에 장지신근(Extensor Digitorum Longus, EDL)의 NMJ (Neuromuscular junction) 연결이 사라지고, 마우스의 발바닥 돌기의 표피층에 침투해있던 감각신경이 사라지는 것을 관찰하였다. 이후 좌골신경의 회복이 시작되면서 약 7일차 이후 NMJ의 회복이 확인되었으며, 약 14일 이후 발바닥 돌기의 감각신경이 회복되는 것을 조직염색을 통해 확인하였다. 이와 같은 선행 실험을 바탕으로 좌골신경의 crush injury 이후, pTx-IGF1 X10을 근육주사를 통해 전달하여 신경 재생을 촉진시킬 수 있을지 조사하였다.

8주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하여 좌골신경에 crush injury를 가한 뒤, 수술부위 근처의 허벅지근육(Thigh muscle)과 전경골근(TA)에 각각 100  $\mu$ g(2  $\mu$ g/ $\mu$ l, 50  $\mu$ l)의 pTx-IGF1 X10과 pTx(IGF-1 서열이 없는 벡터) 플라스미드를 근육주사하였다. 이후, 3, 7, 10, 14, 21일 차에 장지신근과 발바닥 돌기(papillae)를 수거하여 NMJ 및 내신경섬유(Intra Epidermal Nerve Fibers, IENF) 염색을 통해 NMJ의 재형성 및 감각신경의 재생정도를 평가하였다. NMJ의 재생은 근섬유의 아세틸콜린 수용체(AchR, 붉은색)와 미세신경섬유(neurofilament, 초록색)이 얼마나 완전히 연결(fully-innervation) 되었는지를 지표로 하여 평가하였다. **그림 3-12A**에서 보이듯이, 좌골신경에 손상을 가한 이후 미세신경섬유가 사라지며, 10일~14일 차 사이에 대부분 회복되어 NMJ가 다시 형성된다. pTx군과 pTx-IGF1 X10 군은 모두 7일 차에 약 6% 정도 연결되어 있었으며, 10일 차에는 각각 38%와 67%까지 회복되었다(**그림 3-12B**). 14일 차 이후로는 대부분 회복되어, 21일 차에서는 두 군간에 차이가 크게 없었다(각각 76%, 86%). 감각신경의 재생은 상피영역(epidermis)에 내신경섬유(IENF, 붉은색)가 회복되어 들어간 영역을 지표로 하여 평가하였다. 이는 14일 차에서 21일 차 사이에 대부분 회복되었으며, pTx군과 pTx-IGF1 X10군에서 육안상 크게 차이가 나지 않았다(**그림 3-13**).

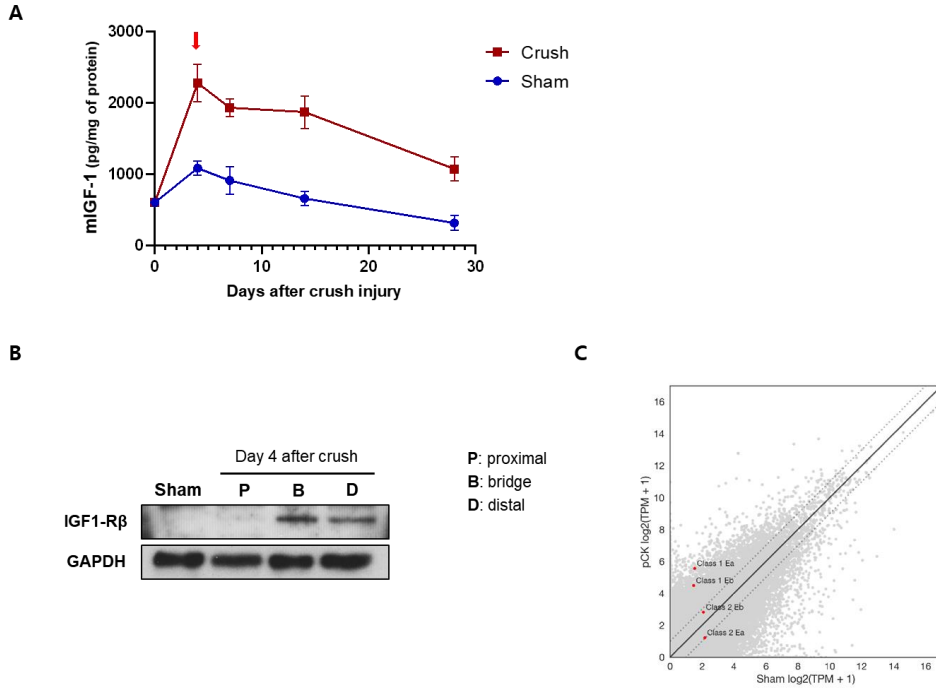
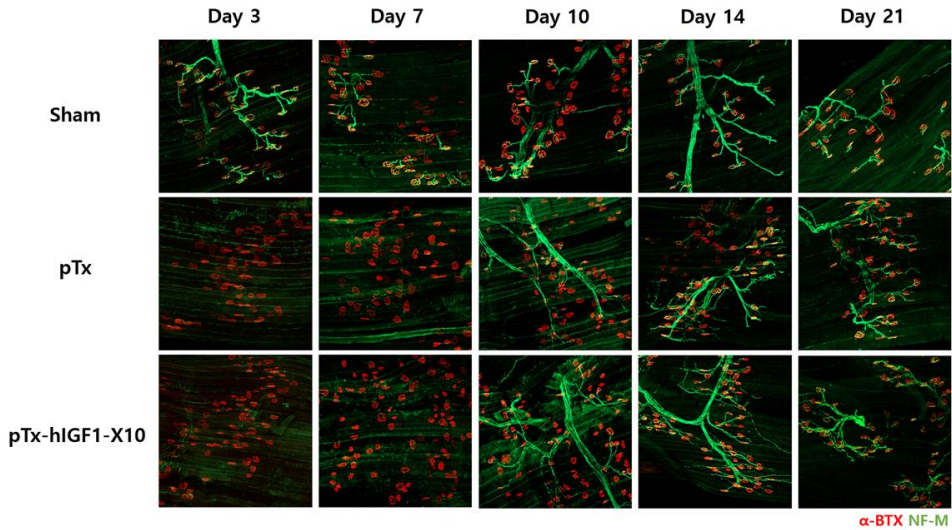


그림 3-11. Crush injury를 가한 좌골신경에서의 IGF-1 발현 패턴

(A) C57BL/6 마우스의 좌골신경 (sciatic nerve)에 crush injury를 가하고 시간에 따라 나타나는 IGF-1의 발현 양상. 4일, 7일, 14일, 28일 차에 좌골신경을 수거한 뒤, ELISA를 수행하여 마우스 IGF-1의 농도를 측정하였다(n=3). (B) Crush injury 이후 4일 차에 조사한 IGF-1 수용체의 발현 양상. (C) Crush injury 이후 4일 차에 수행한 RNA-Seq 분석 결과.

**A**



**B**

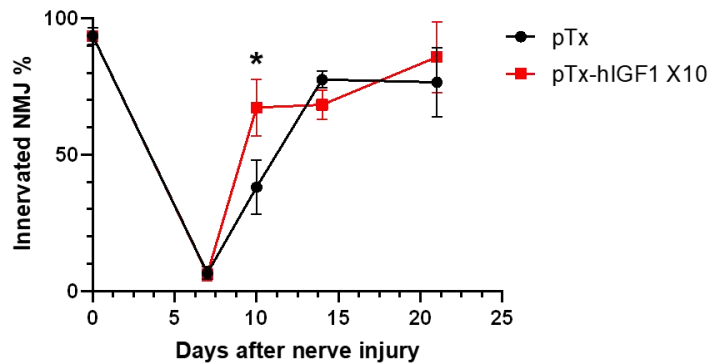


그림 3-12. pTx-IGF1 X10 근육주사가 NMJ 재생에 미치는 영향.

(A) C57BL/6 마우스의 좌골신경 (sciatic nerve)에 crush injury를 가한 뒤, 수술 부위 근처의 허벅지 근육과 전경골근에 pTx-IGF1 X10을 근육주사하였다. 3일, 7일, 10일, 14일, 21일 차에 장지신근 (Extensor Digitorum Longus, EDL)을 수거한 뒤, NF-M(neurofilament, 초록색),  $\alpha$ -BTX(AchR, 붉은색) 항체를 사용하여 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC) 염색을 수행하였다. IGF-1 서열이 없는 pTx 플라스미드가 대조군으로 사용되었다(n=4). (B) Innervated NMJ(Neuromuscular junction)의 비율을 정량화한 그래프이다. \*p < 0.05 (Two-way ANOVA).



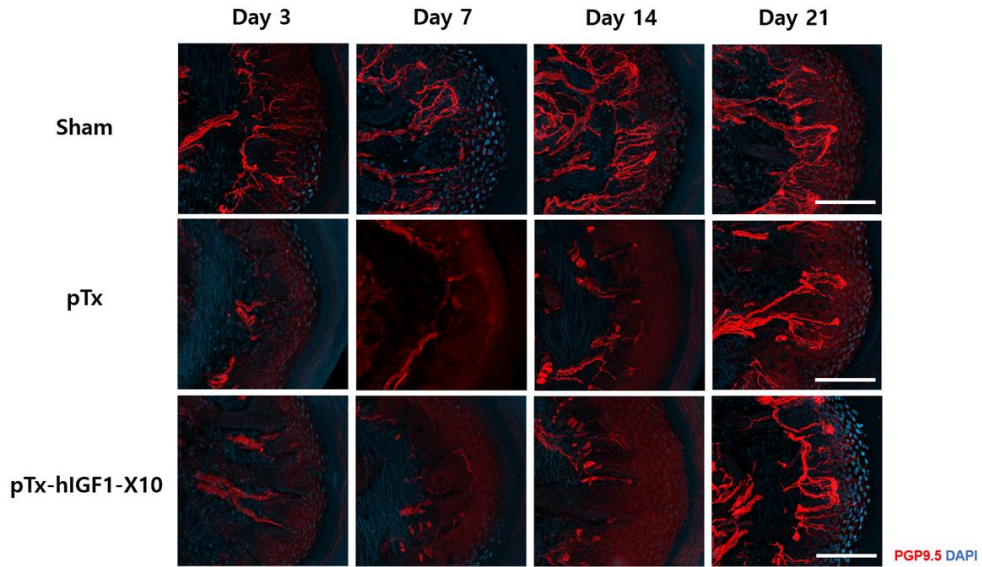


그림 3-13. pTx-IGF1 X10 근육주사가 감각신경 재생에 미치는 영향.

C57BL/6 마우스의 좌골신경 (sciatic nerve)에 crush injury를 가한 뒤, 수술 부위 근처의 허벅지 근육과 전경골근에 pTx-IGF1 X10을 근육주사하였다. 3일, 7일, 10일, 14일 차에 마우스 발바닥 돌기 (papillae)를 수거한 뒤, PGP9.5 (intraepidermal nerve fiber, 붉은색) 항체를 사용하여 면역조직화학 (immunohistochemistry, IHC) 염색을 수행하였다. 핵은 DAPI를 이용하여 염색하였으며, IGF-1 서열이 없는 pTx 플라스미드가 대조군으로 사용되었다 (n=4). Bar = 100  $\mu$ m.

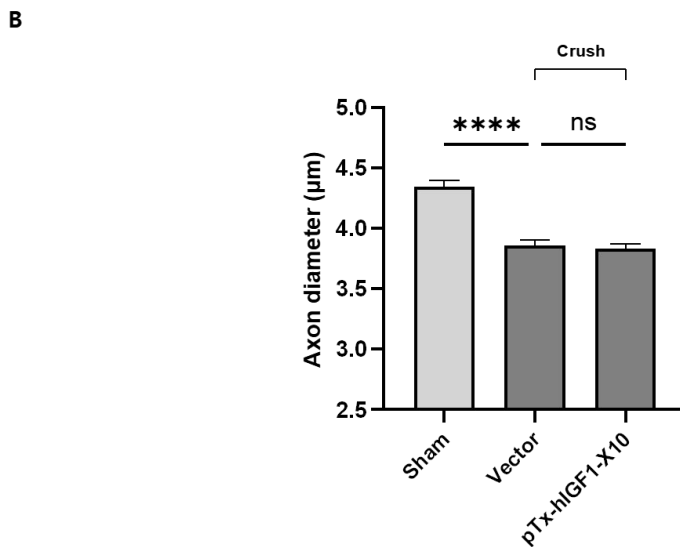
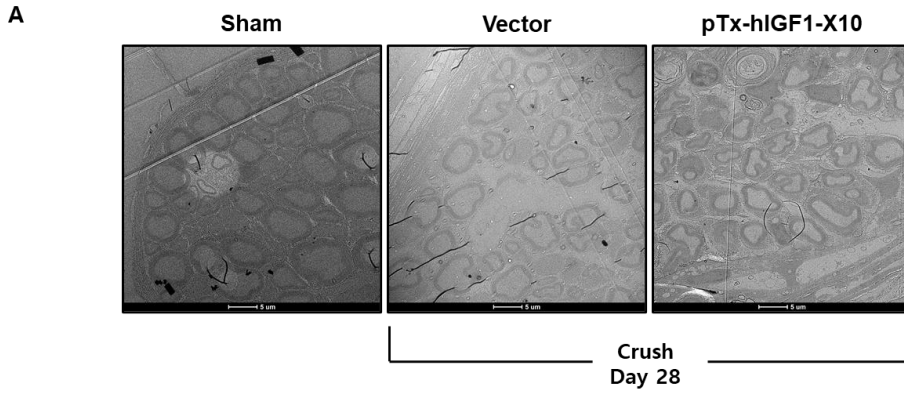


그림 3-14. pTx-IGF1 X10 근육주사가 좌골신경 재생에 미치는 영향.

(A) C57BL/6 마우스의 좌골신경 (sciatic nerve)에 crush injury를 가한 뒤, 수술 부위 근처의 허벅지 근육과 전경골근에 pTx-IGF1 X10을 근육주사하였다. 28일 차에 좌골신경을 수거한 뒤, 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 축삭(axon)의 지름 길이를 분석하였다. IGF-1 서열이 없는 pTx 플라스미드가 대조군으로 사용되었다.

Bar = 5 μm. (B) 축삭의 지름길이를 정량화한 그래프이다. \*\*\*\*p < 0.0001 (One-way ANOVA). n=4, 군당 300~800개의 축삭을 포함한다. 지름의 길이는 ImageJ 프로그램을 이용하여 측정하였다.

마지막으로, crush injury에 의해 손상된 좌골신경을 28일 차에 수거하여 투과전자현미경(TEM) 분석을 통해 좌골신경의 재생정도를 직접적으로 평가하였다. 축삭에 수직으로 자른 좌골신경을 투과전자현미경으로 촬영한 뒤, 각 축삭의 지름 길이를 측정하였다(그림 3-14A). Crush injury를 가한 좌골신경 축삭 지름의 평균치는 sham 군에 비해 크게 감소해 있었으나, 근육주사를 통해 마우스에 pTx를 처리한 군과 pTx-IGF1 X10을 처리한 군의 평균치는 큰 차이가 없었다(그림 3-14B). 본 실험의 결과들을 종합적으로 평가했을 때, 플라스미드 벡터를 통해 과발현시킨 IGF-1은 감각신경의 재생에는 크게 영향을 주지 않았으나, 장지신근에서 운동신경의 재생과 NMJ의 재형성을 촉진시켰다.

### 3.2.2. IGF-1의 과발현이 근육재생 과정에 미치는 영향

IGF-1은 생체 내에서 다양한 역할을 수행하고 있으며, 특히 근육의 생성과 재생에 연관이 있다는 사실에 대해 많은 연구가 진행되었다(Philippou, 2009, Vassilakos, 2011). 플라스미드 DNA의 전달을 통해 과발현된 IGF-1이 근육재생에 기여할 수 있을지 알아보기 위해 cardiotoxin (CTX)을 주사하여 근육손상 모델을 유도하였다. Cardiotoxin은  $Ca^{2+}$ 의 유입(influx)을 통해 근육세포의 괴사(necrosis)를 유발하며, 이는 투여된 근육 전반에 작용한다. 이후 대식세포(macrophage)와 호중구(neutrophil)를 비롯한 면역 세포들이 유입된 후 수 주에 걸쳐 근육이 재생된다(Tidball, 2017). 우선 본 연구실 실험환경에서 CTX로 인한 근육손상 재생 과정을 확인하고자 8주령의 C57BL/6 수컷 마우스의 전경골근(TA)에 CTX를 근육주사 한 뒤, 손상된 근육의 무게 변화를 2주에 걸쳐 조사하였다. 전경골근은 손상 직후 다양한 면역 세포의 유입으로 인하여 근육 무게가 증가하였으며(약 3.2mg/g), 이후 점차적으로 감소하여 약 5일 쯤 이후로는 다시 무게가 증가하기 시작했다(그림 3-15A). CTX에 의한 근육의 무게 변화 양상 및 앞서 확인한 pTx-IGF1 X10의 in vivo 발현양상을 고려하여, 근육 손상을 유도하기 전에 pTx-IGF1 X10 100  $\mu$ g(2  $\mu$ g/ $\mu$ l, 50  $\mu$ l)을 전경골근에 근육주사하여 IGF-1을 과발현시켰다(대조군: pTx). 3일 뒤 동일 부위에 CTX를 근육주사하여 근육 손상을 유발하였으며, 7일 쯤에 전경골근을 수거하여 근육의 무게를 비교하였다. 그림 3-15B에서와 같이, CTX를 투여하지 않은 군(약 2.32mg/g)에 비해

CTX를 유도한 군(약 2.00mg/g)에서는 14% 정도 무게가 감소해 있었다. 또한, pTx-IGF1 X10을 처리한 군(약 2.27mg/g)에서는 pTx를 처리한 군에 비해 약 12% 정도로 무게가 더 증가하였다( $p = 0.081$ , One-way ANOVA).

다음으로, 플라스미드 DNA에 의해 과발현된 IGF-1이 근육의 초기재생 과정에 영향을 미치는지 확인하기 위해 근위성세포(myosatellite cell)의 초기 분화과정에 발현된다고 알려진 몇 가지 분자지표들의 발현을 비교하였다. CTX를 처리하고 1일, 3일 뒤에 전경골근을 수거한 뒤, 이를 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다 (그림 3-16). pTx를 처리한 군에 비해, pTx-IGF1 X10을 처리하였을 시 근육의 분열(proliferation) 및 분화(differentiation) 지표로 알려진 Pax7, MyoD, MyoG의 발현 시점이 더 앞당겨졌으며, 3일 차에서 Myh3(Myosin Heavy Chain 3)의 발현이 증가하였다. 다만, CTX로 인해 손상된 근육부위에서 housekeeping 유전자(GADPH, beta-tubulin)의 발현이 일정하지 않았는데, 이는 세포가 완전히 손상되어 물질대사(metabolism) 과정도 온전치 않기 때문인 것으로 보인다. 본 실험결과들은 플라스미드 발현 벡터를 사용하여 세포 외부에서 전달한 IGF-1이 근육의 재생을 촉진시킬 수 있다는 것을 보여주며, 이는 근위성세포의 분열과 분화의 유도를 통해 이루어진다.

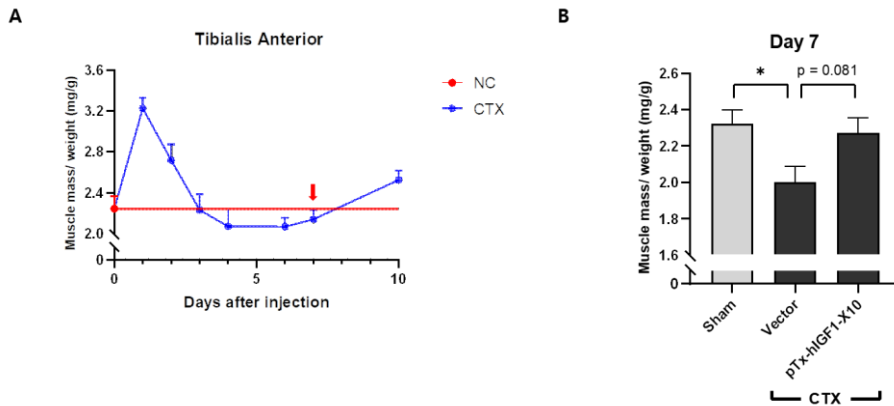


그림 3-15. pTx-IGF1 X10 근육주사가 근육재생에 미치는 영향.

C57BL/6 마우스의 전경골근(TA)에 pTx-IGF1 X10을 근육주사하고 3일 뒤에 CTX injury를 가하였다. 손상된 전경골근은 injury 이후 7일 차에 수거되어 분석되었다. (A) CTX injury를 가했을 시 나타나는 전경골근의 무게변화 양상. (B) 전경골근의 무게를 정량화한 그래프이다(n=6). \*p < 0.05 (One-way ANOVA).

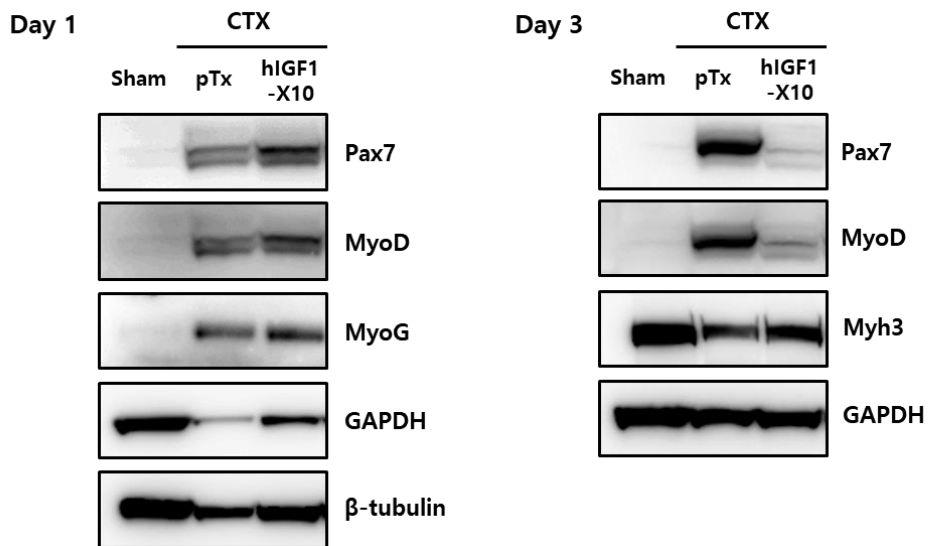


그림 3-16. pTx-IGF1 X10 근육주사가 근육조절인자들의 발현에 미치는 영향.

C57BL/6 마우스의 전경골근(TA)에 pTx-IGF1 X10을 근육주사하고 3일 뒤에 CTX injury를 가하였다. 손상된 전경골근은 injury 이후 1일, 3일 차에 수거되어 웨스턴 블랏을 통해 분석되었다(n=6).

## 4. 논의(Discussion)

본 연구는 유전자를 타겟 조직에 전달하기 위한 방법으로 플라스미드 DNA 벡터를 선정하여, IGF-1의 일시적(transient)이고 국소적(locally)인 발현을 통해 손상된 조직의 회복을 촉진시킬 수 있는 새로운 접근 방법을 제안하고자 하였다. 이를 위해, 우선 두 종류의 IGF-1 이형체(class1-Ea, class1-Ec)를 발현하는 플라스미드(pTx-IGF1 X10)를 제작한 뒤, in vitro와 in vivo에서의 발현 양상과 발현 형태를 조사하였다. 또한, IGF-1 수용체와 하위 시그널링의 변화를 조사하여 발현된 IGF-1이 정상적인 기능(potency)을 가지고 있는 것을 확인하였다. 최종적으로, 플라스미드를 마우스의 체내에 전달하여 발현된 IGF-1이 손상된 근육과 운동신경의 재생을 개선시킬 수 있음을 보여주었다.

IGF-1는 뼈의 성장과 뇌 발달을 포함한 생체 내 다양한 조직의 형성에 중요한 역할을 하며, 특히 근원세포(myoblast)의 성장과 근섬유(muscle fiber) 형성을 포함한 골격근(skeletal muscle)의 성장에서 그 역할이 잘 알려져 있다. 근육과 관련된 질환들(근감소증, ALS, DMD)에 대한 IGF-1의 효능을 테스트하기 위해 현재까지 형질전환 마우스 혹은 유전자 전달체를 사용한 다양한 전임상 시험(preclinical trials)들이 시도되었고(Philippou & Barton, 2014), 많은 연구들에서 마우스의 생존률 증가, 근육의 회복 및 기능의 향상과 같은 효과들을 확인하였다.

위의 예시들을 포함하여, 유전자 치료제 연구 분야에서 유전자를 타겟 세포/조직으로 정확하고 효율적으로 전달하는 것은 매우 중요하다. 현재 대상에게 유전자를 전달하기 위해 다양한 방법들을 사용하고 있으며, 크게 렌티바이러스(Lentivirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노관련바이러스(Adeno-Associated Virus, AAV)를 포함하는 바이러스성 벡터(viral vector)(Bulcha *et al.*, 2021)와 mRNA, 플라스미드 DNA와 같은 비바이러스성 벡터(non-viral vector)로 나눌 수 있다. 바이러스성 벡터는 타겟 조직으로 높은 유전자 전달 효율을 보이지만, 유전자 삽입(genomic integration), 면역원성(immunogenicity), 지속적인 발현으로 인한 종양형성(tumorigenesis)의 가능성이 제시되며, 신약 개발 단계까지 고려한다면 생산과 확장(scalability)이 어렵다는 단점이 있다. 비바이러스성

백터는 상대적으로 유전자 전달 효율이 낮지만, 생체 내에서 수 일 내에 대부분 분해되기 때문에 바이러스성 백터에 비해 높은 안전성을 지닌다. 또한, 유전자 전달체의 사용은 전달체와 유전자를 적용하고자 하는 적응증의 특성을 함께 고려할 필요가 있다. 예를 들어, mRNA와 플라스미드를 사용하여 혈관내피세포성장인자-A(VEGF-A)를 심근경색(myocardial infarction) 마우스 질환모델에 전달한 연구에 따르면, 질환이 유도된 뒤 비바이러스성 백터에 특성에 따라 달라지는 VEGF-A의 발현시점과 지속기간에 의해 마우스의 생존률과 회복양상이 크게 달라지는 것을 확인한 바가 있다(Zangi *et al.*, 2013). 즉, 전달하고자 하는 유전자를 무조건 오랫동안 발현시키기 보다는, 질병의 병리학적 기전을 고려하여 적절한 시점에서 발현시키는 것을 중요하게 고려해야 한다는 것이다. 이러한 점들을 고려하여, 본 연구에서 IGF-1을 전달하기 위한 유전자 전달체로 플라스미드 DNA 백터를 사용하였으며, 플라스미드에서 발현되는 IGF-1의 발현 양상을 고려하여 이를 적용하기에 적합한 동물질환 모델을 선정하였다.

플라스미드 DNA를 유전자 전달체로 사용하는 것은 바이러스성 백터에 비해 높은 안전성을 가지지만, 생체 내에서 수 일 내에 분해되기 때문에 짧은 기간 동안에만 단백질을 발현한다. 따라서 본 연구에서 사용한 pTx-IGF1 X10은 CMV에서 유래한 프로모터를 사용하여 높은 발현 효율을 부여하고자 하였다. 실험 결과에서 확인할 수 있듯이, 세포주 내에 형질주입된 pTx-IGF1 X10은 ~1000 ng/ml에 달하는 많은 양의 IGF-1을 발현하고 있다(그림 3-3). 특히, 분비된 IGF-1은 pro-IGF1과 mature IGF-1을 모두 포함하는 것을 확인할 수 있었는데(그림 3-6), 이는 신호 펩타이드가 제거된 뒤, pro-IGF1이 골지체(Golgi) 내에서 전단백질 전환효소(proprotein convertase)에 의해 E peptide가 분리된 mature IGF-1 상태로 분비되거나, 분리되지 않은 pro-IGF1 상태로 분비될 수 있다는 기존의 보고들과도 일치한다(Philippou & Barton, 2014)(그림 4-1). 특이한 점은, 그림 3-6에서 확인할 수 있듯이 세포 밖으로 분비된 pro-IGF1-Ea는 주로 글리코실화된 상태(glycosylated-pro-IGF1-Ea)로 존재하고 있는데, 이는 세포주 내에서는 pro-IGF1-Ea와 gly-pro-IGF1-Ea가 모두 존재하고 있는 것과는 다른 양상이다(그림 3-4). 글리코실화가 일어난 많은 종류의 세포외(extracellular) 단백질들이 세포외기질(ECM)과 상호작용한다는 점을 고려한다면, pTx-IGF1 X10에 의해



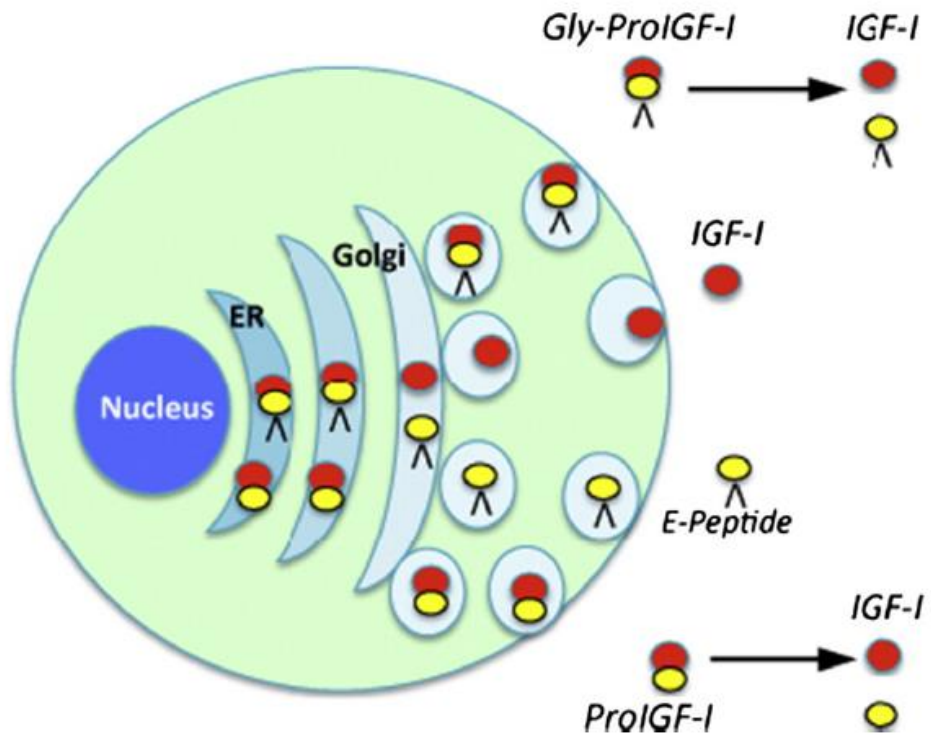


그림 4-1. Pro-IGF1-Ea의 분비 과정 (Philippou & Barton, 2014에서 발췌)

발현된 pro-IGF1-Ea의 글리코실화가 IGF-1의 저장과 관련되어 있을 것이라 추측할 수 있지만, 본 연구에서는 이와 같은 특징이 in vivo의 어떠한 생물학적 기능에 영향을 미칠 지에 대해서는 다루지 않았다.

신호 펩타이드를 포함한 IGF-1의 전체 서열은 약 150여개의 짧은 아미노산 서열로 이루어져 있지만, mature IGF-1과 E peptide의 종류에 따라 기능과 활성화 시키는 하위 신호전달 경로가 조금씩 달라진다고 알려져 있다 (Oberbauer, 2013; Philippou *et al.*, 2014; Brisson & Barton, 2013). 아직까지도 논란의 여지가 많지만, pro-IGF1에서 떨어져 나온 E peptide가 IGF-1 수용체의 활성을 강화시킨다는 보고도 있으며, 심지어 E peptide가 독자적인 수용체를 가지고 있을 것이라도 가설도 제기되었다(Brisson & Barton, 2013). 본 연구에서 사용한 pTx-IGF1 X10는 pro-IGF1 Ea, pro-IGF1 Ec 및 mature IGF-1를 모두 발현시키고 있기 때문에, 단순히 mature IGF-1이나 pro-IGF1 한 종류만을 발현시킨 것보다 더 높은 시너지 효과를 기대하였다. 이에 대해 평가하기 위해, 우선 발현되는 단백질들이 생물학적 활성을 지닌다는 것을 in vitro에서 확인한 뒤, in vivo에서 최대 2주까지 IGF-1의 발현이 유지되는 역동학(kinetics)을 바탕으로 두 가지의 동물질환 모델을 선정하였다.

CTX 근육 손상모델은 2~3주 내에 근육의 재생이 이루어지며, 재생과정 동안 대식세포(macrophage)를 주축으로 하여 다양한 세포에서 IGF-1이 분비된다(Tonkin *et al.*, 2015). 또한, 좌골신경 손상모델도 4~6주 이내의 짧은 기간동안 대부분의 신경들이 회복되며(Ko *et al.*, 2018), 손상 초기에 IGF-1과 IGF-1 수용체의 발현이 증가한다(그림 3-11). 본 연구에서, pTx-IGF1 X10을 통해 과발현시킨 IGF-1은 통계적으로 유의미하지는 않았으나 CTX 근손상 모델에서 주변 근육의 회복을 촉진시켰다. 또한, IGF-1은 좌골신경 손상 모델에서 운동신경의 재생을 촉진시켜 플라스미드의 투여부위에 근접해 있는 장지신근(EDL)의 신경근이음부(NMJ)를 더욱 빠르게 회복시켰다. 다만, 좌골신경과 연결된 감각신경(IENF)의 재생에는 큰 영향을 미치지 못했는데, 이는 발현된 IGF-1과 밀접하게 위치해 있던 전경골근(TA)과 장지신근(EDL)의 운동신경과는 달리 물리적으로 거리가 먼 감각신경의 경우, 재생이 촉진될 정도의 충분한 IGF-1이 도달하지 못한 것으로 예상된다. 즉, 플라스미드 벡터를 통한 유전자 발현에는 타겟 조직과의 물리적인 거리가 매우

중요하다는 것을 암시한다.

본 연구를 통해, 나는 플라스미드를 근육주사하여 과발현시킨 IGF-1이 손상된 근육과 신경의 재생을 촉진시킬 가능성을 확인하였다. 말초 신경이 손상되는 경우, 재생 중인 신경이 빠른 시일 이내에 근육의 운동종판(motor end plate)에 도달하지 못하면, 시냅스후 막(postsynaptic membrane) 영역의 변형이 발생할 수 있으며, 이는 근육의 영구적인 기능 저하로 이어질 수 있다(Li *et al.*, 2020). 손상된 신경은 운동종판에 도달하기까지 하루에 1~3mm 정도의 느린 속도로 재생이 진행되기 때문에(Slavin *et al.*, 2021), IGF-1의 발현을 통해 이루어진 신경재생의 촉진은 여러가지 신경근육장애(neuromuscular disease)의 치료에 유효하게 작용될 수 있을 것이다. 다만, 본 연구에서는 간단한 분자생물학적 분석과 조직학적 분석을 통해서만 재생의 척도를 평가하였기 때문에, 로타로드(rotarod)나 악력기(grip strength meter) 등을 사용하여 통해 마우스의 신경과 근육이 기능적으로 회복되었는지에 대해서도 평가가 진행되어야 한다. 또한, 근육과 신경의 재생에 관여한다고 알려진 다양한 세포 종류들에 대한 자세한 조사들을 통해, 동시에 과발현시킨 IGF-1 이형체들이 조직의 재생에 관여하는 메커니즘을 밝히기 위한 후속 연구들도 필요할 것이다.

현재, 유전자치료제 분야는 급속도로 발전하고 있으며, 최근 승인이 난 척수성근위축증(Spinal Muscular Atrophy, SMA)에 대한 AAV 치료제인 졸겐스마(Zolgensma)를 포함하여, 다양한 질병들에 대한 임상시험이 활발하게 진행되고 있다. 또한, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19) 백신의 주요 전달체 중 하나인 mRNA 뿐만 아니라, endless RNA(eRNA)와 circular RNA 등 수 많은 연구자들에 의해 새로운 유전자 전달체들이 개발되고 있다. 이와 같은 생명과학의 큰 흐름 속에서, 나는 본 연구가 미래에 진행될 다양한 유전자 치료제들의 개발에 있어 하나의 주춧돌이 될 수 있기를 기대한다.

## 5. 참고 문헌(References)

- Adamo, M. L., Ben-Hur, H., Roberts Jr, C. T., & LeRoith, D. (1991). Regulation of start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor-I gene by development, fasting, and diabetes. *Molecular Endocrinology*, *5(11)*, 1677-1686.
- Bell, G. I., Stempien, M. M., Fong, N. M., & Rall, L. B. (1986). Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucleic acids research*, *14(20)*, 7873-7882.
- Brisson, B. K., & Barton, E. R. (2012). Insulin-like growth factor-I E-peptide activity is dependent on the IGF-I receptor. *PLoS One*, *7*, e45588.
- Brisson, B. K., & Barton, E. R. (2013). New modulators for IGF-I activity within IGF-I processing products. *Frontiers in endocrinology*, *4*, 42.
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6(1)*, 1-24.
- Choi, W., Lee, J., Lee, J., Ko, K. R., & Kim, S. (2018). Hepatocyte growth factor regulates the miR-206-HDAC4 cascade to control neurogenic muscle atrophy following surgical denervation in mice. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *12*, 568-577.
- Coleman, M. E., DeMayo, F., Yin, K. C., Lee, H. M., Geske, R., Montgomery, C., & Schwartz, R. J. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, *270(20)*, 12109-12116.
- Daughaday, W. H., & Reeder, C. (1966). Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone. *The*

Journal of laboratory and clinical medicine, *68*(3), 357–368.

Duguay, S. J., Lai–Zhang, J., & Steiner, D. F. (1995). Mutational analysis of the insulin–like growth factor I prohormone processing site. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(29), 17566–17574.

Durzyńska, J., Philippou, A., Brisson, B. K., Nguyen–McCarty, M., & Barton, E. R. (2013). The pro–forms of insulin–like growth factor I (IGF–I) are predominant in skeletal muscle and alter IGF–I receptor activation. *Endocrinology*, *154*(3), 1215–1224.

Feldman, E. L., Sullivan, K. A., Kim, B., & Russell, J. W. (1997). Insulin–like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiology of disease*, *4*(3–4), 201–214.

Fornaro, M., Hinken, A. C., Needle, S., Hu, E., Trendelenburg, A. U., Mayer, A., ... & Russell, A. J. (2014). Mechano–growth factor peptide, the COOH terminus of unprocessed insulin–like growth factor 1, has no apparent effect on myoblasts or primary muscle stem cells. *American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism*, *306*(2), E150–E156.

Gauguin, L., Delaine, C., Alvino, C. L., McNeil, K. A., Wallace, J. C., Forbes, B. E., & De Meyts, P. (2008). Alanine scanning of a putative receptor binding surface of insulin–like growth factor–I. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(30), 20821–20829.

Glazner, G. W., Morrison, A. E., & Ishii, D. N. (1994). Elevated insulin–like growth factor (IGF) gene expression in sciatic nerves during IGF–supported nerve regeneration. *Molecular brain research*, *25*(3–4), 265–272.

Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C., & Froesch, E. R. (1989). Insulin–like growth factors I and II in healthy man. *European Journal of Endocrinology*, *121*(6), 753–758.

Hakuno, F., & Takahashi, S. I. (2018). 40 years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. *Journal of molecular endocrinology*, *61(1)*, T69–T86.

Hall, K., & Uthne, K. (1971). Some biological properties of purified sulfation factor (SF) from human plasma. *Acta Medica Scandinavica*, *190(1-6)*, 137–143.

Hill, M., & Goldspink, G. (2003). Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *The Journal of physiology*, *549(2)*, 409–418.

Jansen, M., Van Schaik, F. M. A., Ricker, A. T., Bullock, B., Woods, D. E., Gabbay, K. H., ... & Van den Brande, J. L. (1983). Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature*, *306(5943)*, 609–611.

Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine reviews*, *16(1)*, 3–34.

Kanje, M., Skottner, A., & Sjo, J. (1989). Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain research*, *486(2)*, 396–398.

Kim, H. K., Bae, M. J., Lim, S., Lee, W., & Kim, S. (2018). A water-soluble extract from *Actinidia arguta* ameliorates psoriasis-like skin inflammation in mice by inhibition of neutrophil infiltration. *Nutrients*, *10(10)*, 1399.

Ko, K. R., Lee, J., Lee, D., Nho, B., & Kim, S. (2018). Hepatocyte growth factor (HGF) promotes peripheral nerve regeneration by activating repair Schwann cells. *Scientific reports*, *8(1)*, 1–14.

Lee, S. H., Kim, S., Lee, N., Lee, J., Yu, S. S., Kim, J. H., & Kim, S. (2019). Intrathecal delivery of recombinant AAV1 encoding hepatocyte growth

factor improves motor functions and protects neuromuscular system in the nerve crush and SOD1–G93A transgenic mouse models. *Acta neuropathologica communications*, *7(1)*, 1–18.

Lee, Y., Park, E. J., Yu, S. S., Kim, D. K., & Kim, S. (2000). Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, *272(1)*, 230–235.

Li, L., Yokoyama, H., Kaburagi, H., Hirai, T., Tsuji, K., Enomoto, M., ... & Okawa, A. (2020). Remnant neuromuscular junctions in denervated muscles contribute to functional recovery in delayed peripheral nerve repair. *Neural regeneration research*, *15(4)*, 731.

Lim, S., Lee, W., Lee, D. S., Nam, I. J., Yun, N., Jeong, Y., ... & Kim, S. (2018). Botanical Formulation HX109 Ameliorates TP–Induced Benign Prostate Hyperplasia in Rat Model and Inhibits Androgen Receptor Signaling by Upregulating Ca<sup>2+</sup>/CaMKK $\beta$  and ATF3 in LNCaP Cells. *Nutrients*, *10(12)*, 1946.

Lin, W. W., & Oberbauer, A. M. (1998). Alternative splicing of insulin–like growth factor I mRNA is developmentally regulated in the rat and mouse with preferential exon 2 usage in the mouse. *Growth Hormone & IGF Research*, *8(3)*, 225–233.

Magee, B. A., Shooter, G. K., Wallace, J. C., & Francis, G. L. (1999). Insulin–like growth factor I and its binding proteins: a study of the binding interface using B–domain analogues. *Biochemistry*, *38(48)*, 15863–15870.

Matsuoka, H., Ebina, K., Tanaka, H., Hirao, M., Iwahashi, T., Noguchi, T., ... & Yoshikawa, H. (2018). Administration of Oxygen Ultra–Fine Bubbles Improves Nerve Dysfunction in a Rat Sciatic Nerve Crush Injury Model. *International journal of molecular sciences* *19(5)*, 1395.

McKoy, G., Ashley, W., Mander, J., Yang, S. Y., Williams, N., Russell, B., &

- Goldspink, G. (1999). Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *The Journal of Physiology*, *516(2)*, 583–592.
- Musarò, A., Dobrowolny, G., & Rosenthal, N. (2007). The neuroprotective effects of a locally acting IGF–1 isoform. *Experimental gerontology*, *42(1–2)*, 76–80.
- Nho, B., Lee, J., Lee, J., Ko, K. R., Lee, S. J., & Kim, S. (2018). Effective control of neuropathic pain by transient expression of hepatocyte growth factor in a mouse chronic constriction injury model. *The FASEB Journal*, *32(9)*, 5119–5131.
- Oberbauer, A. (2013). The regulation of IGF–1 gene transcription and splicing during development and aging. *Frontiers in endocrinology*, *4*, 39.
- Philippou, A., & Barton, E. R. (2014). Optimizing IGF–I for skeletal muscle therapeutics. *Growth Hormone & IGF Research*, *24(5)*, 157–163.
- Philippou, A., Maridaki, M., Halapas, A., & Koutsilieris, M. (2007). The role of the insulin–like growth factor 1 (IGF–1) in skeletal muscle physiology. *in vivo*, *21(1)*, 45–54.
- Philippou, A., Maridaki, M., Pneumaticos, S., & Koutsilieris, M. (2014). The complexity of the IGF1 gene splicing, posttranslational modification and bioactivity. *Molecular Medicine*, *20(1)*, 202–214.
- Philippou, A., Papageorgiou, E., Bogdanis, G., Halapas, A., Sourla, A., Maridaki, M., ... & Koutsilieris, M. (2009). Expression of IGF–1 isoforms after exercise–induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions *in vitro*. *In vivo*, *23(4)*, 567–575.
- Pyun, W. B., Hahn, W., Kim, D. S., Yoo, W. S., Lee, S. D., Won, J. H., ... & Kim, S. (2010). Naked DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor induces collateral artery augmentation in a rabbit model of



limb ischemia. *Gene therapy*, *17(12)*, 1442–1452.

Rabinovsky, E. D., Gelir, E., Gelir, S., Lui, H. U. I., Kattash, M., DeMayo, F. J., ... & Schwartz, R. J. (2003). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *The FASEB Journal*, *17(1)*, 53–55.

Sandberg–Nordqvist, A. C., Ståhlbom, P. A., Lake, M., & Sara, V. R. (1992). Characterization of two cDNAs encoding insulin–like growth factor 1 (IGF–1) in the human fetal brain. *Molecular brain research*, *12(1–3)*, 275–277.

SALMON JR, W. D., & DuVALL, M. R. (1970). In Vitro Stimulation of Leucine Incorporation Into Muscle and Cartilage Protein by a Serum Fraction with Sulfation Factor Activity: Differentiation of Effects from Those of Growth Hormone and Insulin. *Endocrinology*, *87(6)*, 1168–1180.

Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J., & Froesch, E. R. (1983). Synthesis and secretion of insulin–like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology*, *113(1)*, 297–305.

Scicchitano, B. M., Rizzuto, E., & Musarò, A. (2009). Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases: the critical role of IGF–1. *Aging*, *1(5)*, 451.

Shanmugalingam, T., Bosco, C., Ridley, A. J., & Van Hemelrijck, M. (2016). Is there a role for IGF-1 in the development of second primary cancers?. *Cancer medicine*, *5(11)*, 3353–3367.

Slavin, B. R., Sarhane, K. A., Von Guionneau, N., Hanwright, P. J., Qiu, C., Mao, H. Q., ... & Tuffaha, S. H. (2021). Insulin–Like Growth Factor–1: A Promising Therapeutic Target for Peripheral Nerve Injury. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 549.

Tidball, J. G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *17*(3), 165–178.

Tonkin, J., Temmerman, L., Sampson, R. D., Gallego-Colon, E., Barberi, L., Bilbao, D., ... & Rosenthal, N. (2015). Monocyte/macrophage-derived IGF-1 orchestrates murine skeletal muscle regeneration and modulates autocrine polarization. *Molecular therapy*, *23*(7), 1189–1200.

Vassilakos, G., & Barton, E. R. (2011). Insulin-Like Growth Factor I Regulation and Its Actions in Skeletal Muscle. *Comprehensive Physiology*, *9*(1), 413–438.

Yang, S., Alnaqeeb, M., Simpson, H., & Goldspink, G. (1996). Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, *17*(4), 487–495.

Yang, S. Y., & Goldspink, G. (2002). Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS letters*, *522*(1–3), 156–160.

Zangi, L., Lui, K. O., Von Gise, A., Ma, Q., Ebina, W., Ptaszek, L. M., ... & Chien, K. R. (2013). Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature biotechnology*, *31*(10), 898–907.

## Abstract

# Investigation of biological activity of insulin-like growth factor-1 expressed from plasmid DNA

## : Implication of potential application of gene therapy

Jaeman Lee

School of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is well characterized for its roles in promoting cell division and differentiation of various tissues and inducing protein synthesis. In particular, IGF-1 has long been recognized as one of the crucial factors involved in the development and regeneration of muscle and nerve. Most of these studies, however, have mainly used recombinant proteins or transgenic mice, and there are few studies utilizing plasmid DNA as gene therapy approach. In this study, we constructed a plasmid DNA, pTx-IGF1 X10, encoding two types of human IGF-1 (class1-Ea, class-Ec). Then, we investigated the effect of transient and local expression of IGF-1 isoforms on muscle and peripheral nerve regeneration.

First, we investigated the expression kinetics of pTx-IGF1 X10 *in vitro* and *in vivo*. It was found that both types of IGF-1 were expressed from pTx-IGF1 X10, and IGF-1 proteins were maintained for 2 weeks when injected

into mice tibialis anterior (TA) muscle. Next, we screened antibodies capable of specifically capturing human IGF-1 to identify the secretion form of IGF-1. Results from a series of experiments indicated that both pro-IGF1 and mature IGF-1 were secreted from pTx-IGF1 X10. Finally, the biological activities of secreted IGF-1 were investigated using human- or mouse-derived cells, and it was found that IGF-1 expressed by pTx-IGF1 X10 can activate both human and mouse IGF-1 receptor signaling pathways.

Based on these results, the effect of intramuscularly delivered pTx-IGF-1 X10 on muscle and nerve regeneration was further explored. When intramuscularly injected with IGF1-expressing plasmid, the weight of the injured TA muscle was increased in cardiotoxin (CTX)-induced muscle regeneration model. Also, overexpression of IGF-1 accelerated the expression of regulators known to be involved in the early stages of muscle regeneration. Next, we tested the effect of IGF-1 in the sciatic nerve crush model. The plasmid was administered to the muscle near the surgical site, and nerve regeneration was observed at various time points. There were no significant differences in the regeneration of sensory neurons connected to the sciatic nerve. On the other hand, there was notable improvement on the regeneration of motor neurons, leading to the promotion of neuromuscular junction (NMJ) re-innervation. However, there was no significant change in the total regeneration of the sciatic nerve.

Through this study, we confirmed that pTx-IGF1 X10 expresses two IGF-1 isoforms as intended. Furthermore, we found that plasmid-based IGF-1 overexpression can promote regeneration of muscles and peripheral nerves especially near the injection site. Taken together, it appears that the results from our study may contribute to the gene therapy research field of IGF-1, which is being actively studied using various vectors and models.

**Keywords:** Insulin-like growth factor-1, Gene therapy, Plasmid,  
Nerve regeneration, Muscle regeneration

**Student Number:** 2017-21641