

## 장내분비 K-세포에서 인슐린-발현세포로의 분화

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

이에스더 · 유준모 · 이민경 · 류경렬 · 고승현 · 안유배 · 문성대 · 송기호

### Transdifferentiation of Enteroendocrine K-cells into Insulin-expressing Cells

Esder Lee, Jun Mo Yu, Min Kyung Lee, Gyeong Ryul Ryu, Seung-Hyun Ko, Yu-Bae Ahn, Sung-Dae Moon, Ki-Ho Song

Department of Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

#### Abstract

**Background:** Despite a recent breakthrough in human islet transplantation for treating type 1 diabetes mellitus, the limited availability of donor pancreases remains a major obstacle. Endocrine cells within the gut epithelium (enteroendocrine cells) and pancreatic  $\beta$  cells share similar pathways of differentiation during embryonic development. In particular, K-cells that secrete glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) have been shown to express many of the key proteins found in  $\beta$  cells. Therefore, we hypothesize that K-cells can be transdifferentiated into  $\beta$  cells because both cells have remarkable similarities in their embryonic development and cellular phenotypes.

**Methods:** K-cells were purified from heterogeneous STC-1 cells originating from an endocrine tumor of a mouse intestine. In addition, a K-cell subclone expressing stable Nkx6.1, called "Kn4-cells," was successfully obtained. In vitro differentiation of K-cells or Kn4-cells into  $\beta$  cells was completed after exendin-4 treatment and serum deprivation. The expressions of insulin mRNA and protein were examined by RT-PCR and immunocytochemistry. The interacellular insulin content was also measured.

**Results:** K-cells were found to express glucokinase and GIP as assessed by RT-PCR and Western blot analysis. RT-PCR showed that K-cells also expressed Pdx-1, NeuroD1/Beta2, and MafA, but not Nkx6.1. After exendin-4 treatment and serum deprivation, insulin mRNA and insulin or C-peptide were clearly detected in Kn4-cells. The intracellular insulin content was also increased significantly in these cells.

**Conclusion:** K-cells are an attractive potential source of insulin-producing cells for treatment of type 1 diabetes mellitus. However, more experiments are necessary to optimize a strategy for converting K-cells into  $\beta$  cells. (Korean Diabetes J 33:475-484, 2009)

**Key words:** Differentiation, Enteroendocrine cells, K-cell, Nkx6.1 protein, Pancreatic beta-cell

#### 서론

제1형 당뇨병은 인슐린을 분비하는 췌도(pancreatic islet)

내 베타세포가 자가 면역 기전에 의하여 파괴됨에 따라 인슐린이 절대적으로 결핍되어 고혈당이 발생하고 결국에는 많은 합병증이 유발되는 만성질환이다<sup>1-3)</sup>. 제1형 당뇨병은

접수일자: 2009년 10월 9일, 통과일자: 2009년 11월 24일

교신저자: 송기호, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, E-mail: kihos@catholic.ac.kr

\* 이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2009-0071570).

일생 동안 인슐린 주사와 함께 철저한 자가 관리가 필요한 질환으로 일상생활에 심한 제약이 유발하여 삶의 질을 현저히 저하시키고, 많은 합병증으로 인한 사회적, 경제적 손실이 지대하다. 현재까지 시행되는 치료법으로는 다회 인슐린 주사, 인슐린 펌프, 인공췌장기 등이 있으나 혈당조절이 효과적으로 장기간 유지되는 경우는 거의 불가능한 실정이며, 인슐린 주사에 따른 저혈당의 발생이 치료에 큰 걸림돌이다. 제1형 당뇨병 완치를 위한 치료법으로는 췌도이식(islet transplantation)과 췌장이식(pancreas transplantation)이 매우 제한적으로 시행되고 있으나 췌장 공여자가 절대적으로 부족하고, 이식 후 면역학적 및 비면역학적 기전으로 인해 이식 췌도의 손상이 문제가 되고 있다<sup>3-7</sup>. 따라서 이 문제점을 극복하고자 새로운 완치법으로 줄기세포 등을 이용한 세포치료법, 유전자치료법 등이 시도되고 있다.

세포치료법은 줄기세포를 포함한 비베타세포를 베타세포로 분화 유도하는 것이다<sup>7,8</sup>. 현재까지 췌관세포(pancreatic duct cell), 췌장 선세포(pancreatic acinar cell), 골수세포(bone marrow cell), 간세포(liver cell) 등이 연구되어 왔다. 그러나, 대부분의 연구결과를 살펴 보면 비베타세포로부터 분화된 “인슐린-분비세포”는 원래의 베타세포에 비해 인슐린 양이나 인슐린 mRNA가 현저히 낮았으므로 이에 대한 많은 개선과 함께 추가 연구가 필요한 실정이다<sup>8-12</sup>.

발생학적으로 췌장은 전장(forgut)으로부터 유래하며 전장의 내배엽에서 기원한 세포들은 증식, 분화하여 췌관을 형성하고 이 췌관세포는 다시 외부의 환경 인자와 수많은 전사인자들과의 복합적이고도 순차적인 발현을 거쳐 성체의 췌장을 구성하는 3가지 종류의 췌관세포, 소화효소를 분비하는 선세포, 주로 인슐린을 분비하는 췌도세포(베타세포) 등으로 분화된다. 베타세포의 발생과 분화에 관여하는 필수 전사인자로는 Pdx1, Ngn3, NeuroD1/ Beta2, Nkx6.1 등이 잘 알려져 있다<sup>10,11,13,14</sup>.

한편, 장내분비세포는 장상피세포(intestinal epithelial cell)의 1%를 차지하지만 양으로 보면 신체 내에서 가장 많은 내분비조직이다. 내배엽에서 기원하며 MATH1, Ngn3, Nkx6.1 등이 발현되면서 여러 종류의 장내분비세포로의 분화가 이루어지며 베타세포 및 장내분비세포는 발생에서 기원, 전사인자의 발현 등이 매우 유사하다. 특히, glucose-dependent insulintrophic polypeptide (GIP) 호르몬을 분비하는 K-세포는 glucokinase, proconvertase 1/3 (PC1/3), proconvertase 2 (PC2), Pdx-1 발현 등의 베타세포와 유사한 독특한 특성을 갖고 있다<sup>15-18</sup>.

따라서 저자들은 K-세포의 생물학적인 특성이 베타세포

와 매우유사하다는 점에 착안하여 이를 베타세포로 분화시키고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. K-세포 분리 및 배양

K-세포의 순수 분리는 이전의 연구에서 저자들이 보고한 방법대로 시행하였다<sup>19</sup>. 간단히 요약하면, 생쥐의 소장 중앙 세포에서 분리한 복합 장내분비세포주인 STC-1을 Dr. Hanahan (University of California, San Francisco)으로부터 기증받았으며 이 세포를 Epstein-Barr virus 유래 백터를 이용하여 GIP promoter와 green fluorescent protein (GFP) 유전자를 삽입함으로써 K-세포를 순수하게 분리하였다.

K-세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배양액에 배양하였다. DMEM 배양액에는 4.5 g/L D-Glucose, 584 mg/L L-glutamine, 25 mM HEPES (1M HEPES 25 mL/L), 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함되었으며, 모든 배양은 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 조건에서 이루어졌다.

### 2. Nkx6.1을 안정적으로 발현하는 K-세포 클론의 확보

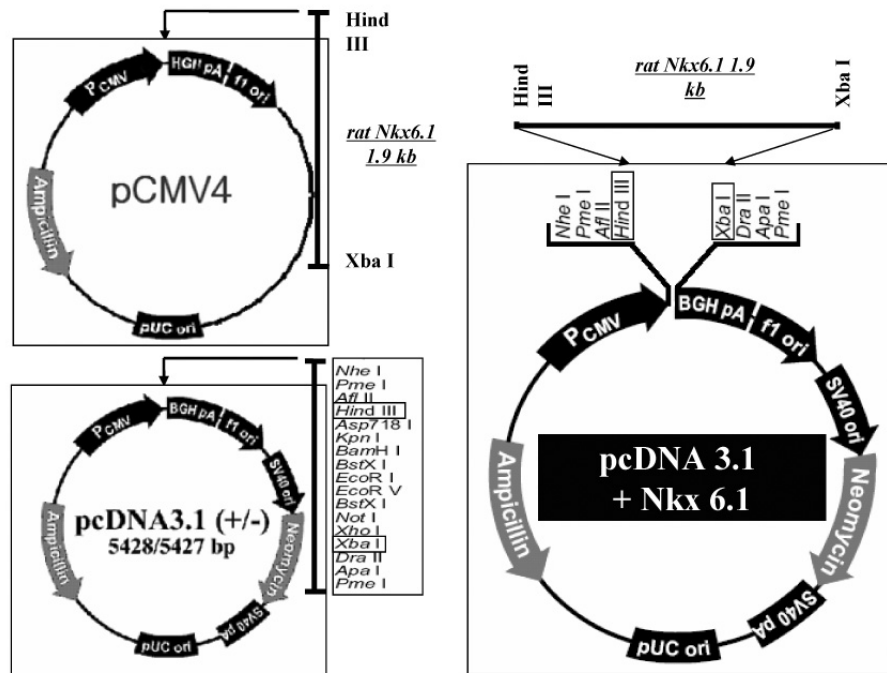
덴마크의 Hagedorn Research Institute의 Dr. Serup으로부터 쥐 Nkx6.1 full length cDNA (1.9kb) 플라스미드를 기증받았다. 이 플라스미드 벡터(pCMV4 - Nkx6.1)에서 Hind III와 Xba I으로 자른 Nkx6.1 cDNA를 다시 pcDNA 3.1 플라스미드 벡터에 삽입하여 새로운 벡터(pcDNA 3.1 + Nkx6.1)를 제작하였다(Fig. 1).

K-세포를 미리 분주하여 60~70% 배양되면 pcDNA 3.1-Nkx6.1 플라스미드를 주입(transfection)시키고 48시간 후에 G418 (400 ug/mL)이 포함된 배지로 옮겨 G418내성 콜로니(colony)를 계대클로닝(subcloning)하여 여러 종류의 K-세포의 클론을 확보하였다. 이 중에 Nkx6.1의 mRNA 발현을 조사하여 Nkx6.1의 발현이 높은 클론을 “Kn4-세포”로 명명하여 실험에 이용하였다. 대조군으로서는 Nkx6.1 cDNA가 없는 빈 pcDNA 3.1 플라스미드 벡터를 주입하였으며 이 클론은 “K\_pcDNA-세포”로 명명하였다.

### 3. 유전자 발현조사(RT-PCR)

#### 1) RNA 분리 및 cDNA 합성

RNA 분리를 위해 생쥐에서 분리한 췌도나 배양한 세포를 Trizol reagent kit (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 즉, Trizol



**Fig. 1.** Design of Nkx6.1-expressing vector. The Nkx6.1-expressing vector (pcDNA3.1 + Nkx6.1) was made as shown in this cartoon.

reagent에 녹여 세포를 깨고, bromochloropropane을 첨가하여 원심분리 후 RNA를 침전시키기 위해 상층액과 isopropanol을 혼합 후 에탄올을 사용하여 불순물을 세척하고 diethyl pyrocarbonate 처리한 증류수에 녹여 총 RNA를 분리하였다. 분리 후 Spectrometry (UV/VIS Spectrophotometer ND-1000; Nanodrop, Silmington, DE, USA)로 정량하였다. 0.5~1 ug의 RNA를 85℃에서 3분 반응하고 5X First-Strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.1 M dTT (Invitrogen), 50 ug/uL Random hexamer (Invitrogen), 10 mM dNTP (Invitrogen), RNaseOUT™ (40 U/uL, Invitrogen), SuperScrip™ II Reverse Transcriptase (200 U/uL, Invitrogen)를 차례로 넣어서 잘 섞은 후 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 95℃에서 10분으로 역전사시켜 cDNA를 합성하였다.

## 2) PCR

합성된 cDNA로부터 TEMPase HOT Start Master Mix (Ampligon) 등을 이용한 PCR 방법으로써 여러가지 유전자를 증폭하였다. 대조유전자로는 cyclophilin 등을 이용하였다(Table 1). PCR 산물은 1~2% agarose gel에서 전기영동함으로써 특정 유전자의 발현을 반정량하여 분석하였다.

## 4. 시험관내 분화유도

K-세포 또는 Kn4-세포가 60~70% 자라면 분화를 유도하기 위해서 FBS가 없는 배양액으로 바꾸었다. 이 배양액에는 584 mg/L L-glutamine, 2.438 g/L sodium bicarbonate, 0.1% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 mM nicotinamide (Sigma), 500 uL ITS (5 ug/mL insulin, 5 ug/mL transferrin, 5 ng/mL [ $3.0 \times 10^{-8}$  M] sodium selenite; ITS, Roche, Germany)가 포함되었다. 또한, 추가로 exendin-4, betacellulin, activin A 또는 hepatocyte growth factor 등을 각각 처리하여 분화 유도를 시도하였다.

## 5. 면역세포화학염색(Immunocytochemistry)

면역세포화학염색을 하기위해 세포를 12 well 배양용기 (NUNC™; Roskilde, Denmark)에 코팅된 커버 슬립(cover slip)을 넣고 분주 배양하였다. 부유 배양하는 세포는 수거하여 4% (para)formaldehyde (PFA)로 상온에서 10분 동안 고정하고 세척한 후 Phosphate Buffered Saline (PBS)에 0.2% TritonX-100 희석한 것을 상온에서 20분 동안 처리한 후 세척하였다. 블로킹 전에 C-펩타이드 면역염색은 10 mM citrate buffer로 37℃에서 1~1시간 30분 동안 처리하

**Table 1.** Sequences of primers and PCR conditions

Primer		Sequences (5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Cycles (n)
Cyclophilin	Sense	AAC CCC ACC GTG TTC TTC	400	55	30
	Antisense	TGC CTT CTT TCA CCT TCC C			
Insulin 1	Sense	TAG TGA CCA GCT ATA ACC AGA G	289	58	35
	Antisense	ACG CCA AGG TCT GAA GGT CC			
Insulin 2	Sense	AGC CCT AAG TGA TCC GCT ACA A	388	55	30
	Antisense	AGT TGC AGT AGT TCT CCA GCT G			
Isl1	Sense	CAC TAT TTG CCA CCT AGC CAC	256	50	35
	Antisense	AAA TAC TGA TTA CAC TCC GCA C			
MafA	Sense	CAC CAC GTG CGC TTG G	405	50	50
	Antisense	CAG AAA GAA GTC GGG TG			
NeuroD1/Beta2	Sense	ACT CCA AGA CCC AGA AAC TGT C	276	59	40
	Antisense	ACT GGT AGG AGT AGG GAT GCA C			
Nkx 2.2	Sense	GTC CGG AAC CAT GTC GCT GA	318	56	35
	Antisense	GAC TTG GAG CTC GAG TCT TG			
Nkx6.1 (mouse)	Sense	ACT TGG CAG GAC CAG AGA GA	224	59	40
	Antisense	AGA GTT CGG GTC CAG AGG TT			
Nkx6.1 (rat)	Sense	TCT TCT GGC CTG GGG TGA TG	284	55	30
	Antisense	GGC TGC GTG CTT CTT TCT CCA			
Pax6	Sense	AAC AAC CTG CCT ATG CAA CC	206	56	35
	Antisense	ACT TGG ACG GGA ACT GAC AC			
Pdx-1	Sense	ATT CTT TGC CAA CAG GTC TA	173	50	40
	Antisense	AAT GAA ATG GAA ACA TCG AC			

고 상온에서 20분 동안 블로킹을 시행하였다. 베타세포의 표지자로 polyclonal guinea pig anti-insulin (1:200; Zymed, San Francisco, CA, USA), rabbit anti-c-peptide (1:100; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)에 대한 1차 항체를 4℃에서 하루 동안 처리하였다. 2차 형광 항체로는 anti-guinea pig rhodamine (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), anti-rabbit Texas Red (1:50, Jackson ImmunoResearch Laboratories)을 사용하였다. 핵은 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 염색하였다. 면역 염색이 끝나고 면역형광 현미경 또는 공초점 현미경(Confocal microscope; BIORAC MRC 1024; BIORAC, MO, UK)을 이용하여 관찰하였다.

## 6. 세포내 인슐린 양 측정

세포내의 인슐린 양을 측정하기 위해서 배양액을 제거하고 Krebs-Ringer bicarbonate 버퍼(25 mM HEPES, 115 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% BSA, 5 mM glucose)로 세포를 세척한 후 acid ethanol을 첨가하여 sonication으로 세포를 깨고 4℃에서 하루가 지난 후에 Rat/Mouse Insulin ELISA kit

(Linco Research, St. Charles, MO, USA)를 이용하여 인슐린 농도를 측정하였다. 동시에 단백질의 양도 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용한 Bradford 분석 방법으로 측정하여 세포 내 인슐린 양을 보정하였다.

## 7. 통계분석

두 군 간의 연속변수를 비교하기 위해서 Student's T-test 및 Wilcoxon's rank sum test를 시행하였고, P값이 0.05 이하를 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 췌도-특이적인 전사인자들의 발현

RT-PCR을 이용하여 췌도-특이적인 전사인자들의 발현을 분석하였다. 대조군인 생쥐 췌도와 비교하였을 때 K-세포는 Pdx-1, NeuroD1/Beta2, MafA, Pax6, Isl1, Nkx 2.2가 모두 발현하였다. 그러나, Nkx6.1은 K-세포에서는 발현되지 않았다(Fig. 2). 따라서 이미 기술한대로 Nkx6.1을 안정적으로 발현하는 K-세포의 클론(Kn4-세포)을 추가로 얻어

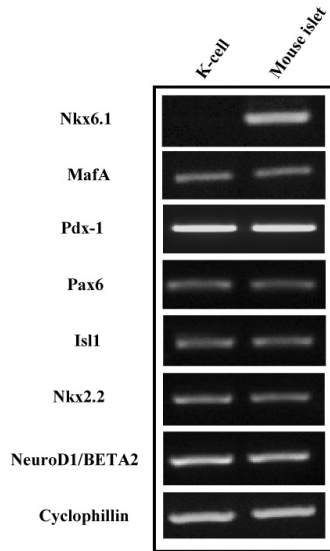
서 실험에 사용하였다.

## 2. 베타세포로의 분화 유도

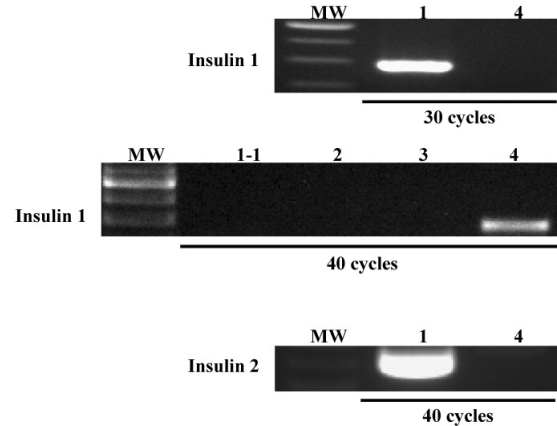
먼저 K-세포가 60~70% 자라면 7일 동안 FBS가 없는 배

양액으로 바꾸고 exendin-4, nicotinamide를 첨가하여 베타 세포로의 분화를 유도하였다.

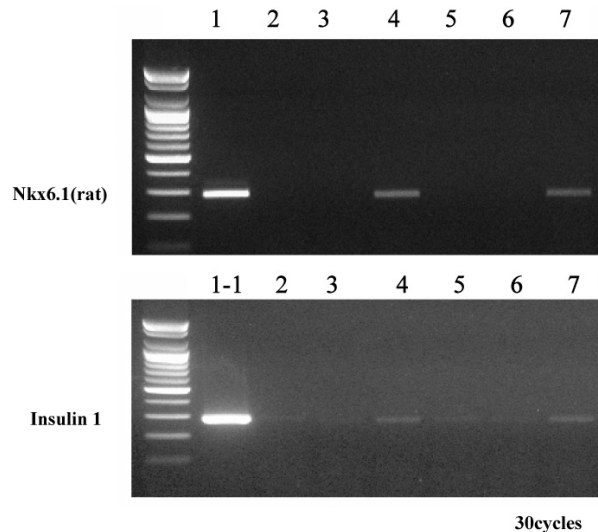
RT-PCR 결과에서 insulin 1 mRNA는 30 cycle에서는 보이지 않았지만, 40 cycle에서는 뚜렷한 insulin 1 mRNA



**Fig. 2.** RT-PCR of transcription factors mRNA. K-cells were found to express transcription factors which were all present in mouse islets except Nkx6.1.



**Fig. 3.** RT-PCR of insulin 1 mRNA. Insulin1 band was weakly detected in K-cells after 7 day-treatment with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4 in serum-free medium. 1, Mouse islets; 1-1, K-cells; 2, K-cells, 7 days in serum-free medium; 3, K-cells, 7 days in serum-free medium with 10 mM nicotinamide; 4, K-cells, 7 days in serum-free medium with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4.

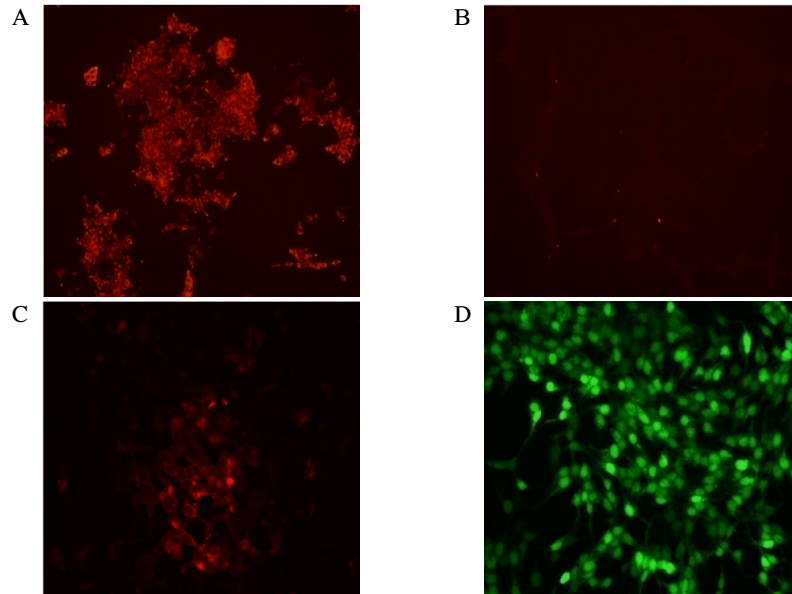


**Fig. 4.** RT-PCR of insulin 1 and Nkx6.1 mRNA. Insulin1 band was clearly detected in Kn4-cells after 7 day-treatment with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4 in serum-free medium. 1, Rat islets; 1-1, Mouse islets; 2, K-cells, 7 days in serum-free medium; 3, K\_pcdNA-cells, 7 days in serum-free medium; 4, Kn4-cells, 7 days in serum-free medium; 5, K-cells, 7 days in serum-free medium with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4; 6, K\_pcdNA-cells, 7 days in serum-free medium with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4; 7, Kn-4 cells, 7 days in serum-free medium with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4.

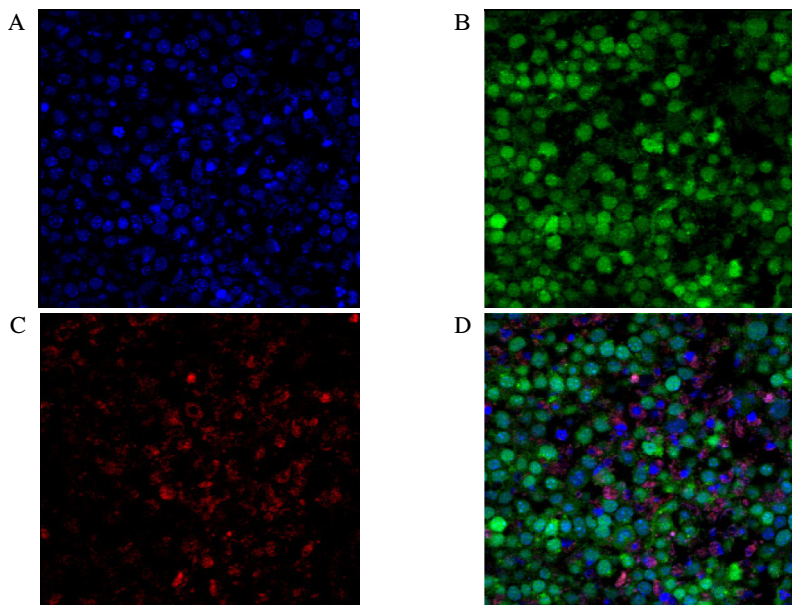
의 발현을 확인할 수 있었다. 그러나, 이상의 결과는 FBS가 없는 상태에서 nicotinamide, exendin-4를 모두 처리했을 경우에만 관찰되었다(Fig. 3). Insulin 2 mRNA의 발현은 관찰되지 않았다. 또한, betacellulin, activin A, 또는 hepatocyte

growth factor는 뚜렷한 효과가 없었다(결과 제시안함).

다음으로, K-세포, K\_pcDNA-세포와 Kn4-세포에서 각각 베타세포로의 분화를 유도하고 RT-PCR을 시행하여 비교하였다. Kn4-세포에서는 K-세포 또는 K\_pcDNA-세포와 달리



**Fig. 5.** Fluorescent microscopy for insulin immunocytochemistry in K-cells and transdifferentiated Kn4-cells. Some of differentiated Kn4-cells were found to be insulin-positive (A, Insulin staining in Ins-1 cells,  $\times 200$ ; B, Insulin staining in K-cells,  $\times 200$ ; C, Insulin staining in differentiated Kn4-cells,  $\times 400$ ; D, GFP expression,  $\times 400$ ).



**Fig. 6.** Confocal microscopy for C-peptide immunocytochemistry in transdifferentiated Kn4-cells. Some of differentiated Kn4-cells were found to be C-peptide-positive (A, Nuclei staining with DAPI; B, GFP expression; C, C-peptide staining; D, Merged image,  $\times 400$ ).



Nkx6.1의 뚜렷한 발현을 확인할 수 있었다. 또한, insulin 1 은 30 cycle의 PCR 조건에서 Kn4-세포에서만 뚜렷한 발현이 관찰되었으며 K-세포, K\_pcDNA-세포에서는 거의 발현되지 않았다(Fig. 4).

Fig. 5는 인슐린 면역세포화학염색의 면역형광 현미경 소견이다. 양성 대조군으로 쥐 베타세포주인 Ins-1 세포를 이용하였다. K-세포에서는 인슐린의 발현은 관찰되지 않았으나, 분화가 유도된 Kn4-세포에서 인슐린이 양성으로 염색된 세포들이 다수 발견되었으며 대부분의 세포는 GFP를 발현하고 있었다. 또한, 인슐린 발현을 재확인하고자 C-펩타이드 면역세포화학염색을 실시하고 공초점 현미경으로 관찰한 결과 인슐린 염색과 비슷한 결과를 얻었다(Fig. 6). C-펩타이드가 양성인 세포의 비율(C-펩타이드 양성인 세포/DAPI 양성인 세포)은 9~14%이었다. 인슐린 또는 C-펩타이드와

GFP 염색은 대부분 colocalization이 되지 않았다.

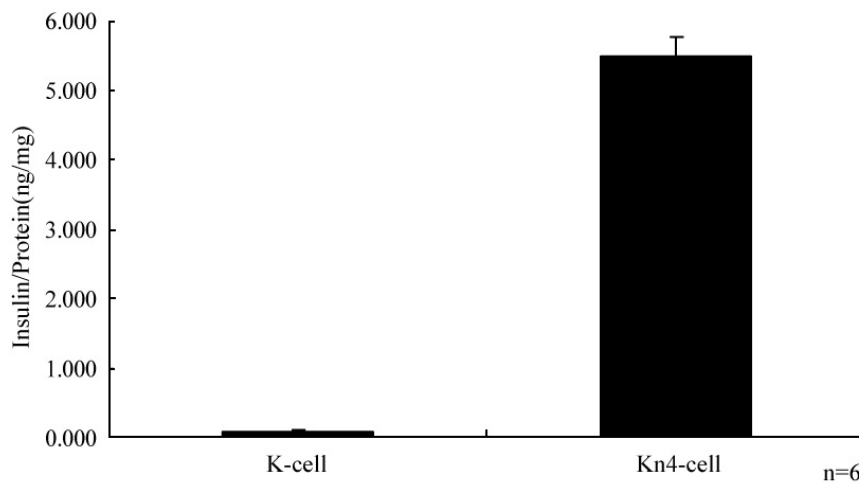
세포내 인슐린 양을 측정된 결과, 분화가 유도된 Kn4-세포의 인슐린양은 K-세포에서보다 현저하게 높았다(Fig. 7).

육안관찰상 분화유도 과정에서 세포사(cell death)가 관찰되었으며 trypan blue를 이용하여 조사하였을 때 세포사는 약 40%이었다(Fig. 8).

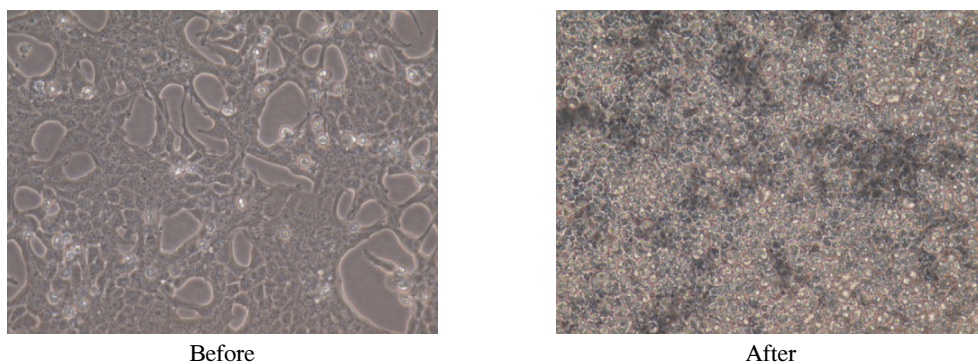
## 고 찰

본 연구는 장내분비세포의 하나인 K-세포가 시험관 내 조건에서 인슐린을 발현하는 세포로 분화가 가능함을 증명하였다.

인크레틴 호르몬인 GIP를 분비하는 K-세포는 발생학적으로 베타세포와 비슷한 전사인자의 조절을 받을 뿐 아니라,



**Fig. 7.** Intracellular content of insulin. Insulin content was significantly higher in transdifferentiated Kn4-cells as compared with K-cells. \*  $P < 0.05$ .



**Fig. 8.** Cell morphology of Kn4-cells before and after 7 day-treatment with 10 mM nicotinamide and 10 pM exendin-4 in serum-free medium ( $\times 400$ ).

베타세포에 특이적으로 발현하는 glucokinase, PC1/3, PC2, Pdx-1 등의 발현함이 알려져 있다. 본 연구에서도 베타세포의 분화, 기능에 중요한 전사인자들의 발현을 RT-PCR로 조사한 결과, Pdx-1, NeuroD1/Beta2, MafA, Pax6, Isl1, Nkx2.2가 K-세포에서도 발현됨을 관찰하였다. 그러나, 태생 후에는 베타세포에서만 발현하는 것으로 알려진 Nkx6.1은 발현되지 않았다. 따라서 저자들은 K-세포와 베타세포가 세포학적 특성이 매우 유사하다는 데에 착안하여 K-세포가 특정한 조건에서는 베타세포로 분화 또는 전환될 수 있다는 가설을 검증하고자 하였다.

베타세포로의 분화를 유도하기 위해서 무혈청 상태에서 nicotinamide, exendin-4, betacellulin, activin A, 또는 hepatocyte growth factor를 첨가하였다. 이상의 조건은 다른 연구들에서 베타세포의 분화를 유도내지는 촉진시킴이 알려져왔다<sup>3,7,12,20-33</sup>. 또한, K-세포에서는 발현되지 않는 Nkx6.1 전사인자를 안정적으로 발현하도록 하기 위해 Nkx6.1 벡터를 제작하고 이를 transfection시킨 후 이미 기술한 바와 같이 Nkx6.1을 지속적으로 발현하는 K-세포 클론(Kn4-세포)을 얻었다. 그 결과, Kn4-세포에서 nicotinamide, exendin-4를 처리했을 경우에 뚜렷한 insulin 1 mRNA의 발현이 RT-PCR에서 확인되었다. Insulin 2 mRNA의 발현은 관찰되지 않았다. 인슐린 또는 C-펩타이드 면역염색에서도 인슐린 또는 C-펩타이드가 양성으로 염색된 세포들이 다수 발견되었다. 따라서 K-세포가 특정한 시험관내 조건에서는 베타세포로 분화가 됨을 확인할 수 있었다. 공초점 현미경 관찰상 인슐린 또는 C-펩타이드와 GFP 염색은 대부분 colocalization이 되지 않았는데 이는 GFP 발현은 GIP promoter의 활성화에 의존적이기 때문에 Kn4-세포가 인슐린 또는 C-펩타이드를 발현하는 세포로 분화가 이루어지면 아마도 GFP 발현이 소실되기 때문일 것으로 추측한다. 세포내 인슐린양도 분화가 유도된 Kn4-세포에서 증가됨을 관찰하였다. 그러나, 세포내 인슐린양은 생쥐의 췌도에서의 인슐린양(인슐린 / 총 단백질양 = ~250 ug/mg)<sup>34</sup>에 비해서는 현저히 낮았다. 이와 같이 인슐린양이 낮은 사실로 보아 분화가 유도된 Kn4-세포는 아직은 베타세포로의 분화가 완성되지 않은 미분화상태임을 시사한다. 또한, 분화유도 과정에서 많은 세포가 사멸됨이 관찰되었는데 이 때문에도 세포내 인슐린양이 적게 나왔을 것이라고 판단된다. 다만, 배양액에 첨가한 ITS에 포함된 인슐린때문에 인슐린 측정값이 실제 값보다 높았을 수 있다. 향후에 베타세포의 분화를 좀 더 확인하기 위해서 전자현미경적 관찰이나 포도당 및 여러 인슐린분비 촉진물질 등에 의한 인슐린 분비능을 자세하게 조사

할 계획이다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 K-세포가 특정한 조건에서 인슐린을 발현하는 세포로 분화가 가능하므로 제1형 당뇨병의 세포치료법으로서 유용할 것임을 시사한다. 그러나, 베타세포로의 분화를 극대화하기 위한 최적의 분화 프로토콜의 개발이 필요하다.

## 요 약

**연구배경:** 최근 제1형 당뇨병 치료법으로 췌도 이식의 새로운 발견에도 불구하고 췌장 공여자가 부족한 것이 여전히 중요한 장애물이다. 장상피에 존재하는 내분비세포(장내분비 세포)와 췌장 베타세포는 발생과정에서 유사한 분화경로를 공유한다. 특히, GIP를 분비하는 K-세포는 베타세포에서 관찰되는 중요한 단백질들이 많이 발현됨이 알려져있다. 따라서 저자들은 K-세포의 생물학적인 특성이 베타세포와 매우 유사하다는 점에 착안하여 이를 베타세포로 분화시키고자 본 연구를 시행하였다.

**방법:** 생쥐 췌장의 내분비 종양으로부터 기원한 복합 STC-1세포에서 K-세포를 순수 분리하였다. 또한, 안정적으로 Nkx6.1을 발현하는 K-세포 클론("Kn4-세포"로 명명)을 성공적으로 확보하였다. 혈청이 없는 조건에서 exendin-4를 처리함으로써 K-세포 또는 Kn4-세포가 시험관내에서 베타세포로 분화하도록 유도하였다. 인슐린 mRNA와 인슐린 단백질의 발현은 RT-PCR과 면역세포화학염색으로 조사하였다. 세포내 인슐린양도 측정하였다.

**결과:** K-세포에서 RT-PCR과 western blot 분석을 통하여 glucokinase와 GIP가 발현함을 확인하였다. RT-PCR의 결과에서 K-세포에서는 Pdx-1, NeuroD1/Beta2, MafA mRNA가 발현됨을 확인하였으나 Nkx6.1은 발현하지 않았다. Kn4-세포를 혈청이 없는조건에서 exendin-4를 처리한 결과, 인슐린 mRNA와 인슐린 또는 C-펩타이드 단백질이 뚜렷이 발현됨을 관찰하였다. 또한 세포내 인슐린양도 유의하게 증가하였다.

**결론:** K-세포는 특정한 조건에서 인슐린을 발현하는 세포로 분화가 되므로 장차 제1형 당뇨병의 세포치료법으로써 활용될 가능성이 있다.

## 참 고 문 헌

1. Ko SH, Lee WY, Lee JH, Kwon HS, Lee JM, Kim SR, Moon SD, Song KH, Han JH, Ahn YB, Yoo SJ, Son



- HY: *Clinical characteristics of diabetic ketoacidosis in Korea over the past two decades. Diabet Med* 22:466-9, 2005
2. Ko SH, Song KH, Kim SR, Lee JM, Kim JS, Shin JH, Cho YK, Park YM, Jeong JH, Yoon KH, Cha BY, Son HY, Ahn YB: *Long-term effects of a structured intensive diabetes education programme (SIDEPE) in patients with Type 2 diabetes mellitus-a 4-year follow-up study. Diabet Med* 24:55-62, 2007
3. You YH, Park SC, Lee SH, Park HS, Ham DS, Rhee M, Kim JW, Song KH, Yoon KH: *PDX-1/VP16 Overexpression induce the transdifferentiation of canine adult pancreatic cells into beta-cells. J Korean Diabetes Assoc* 31:51-62, 2007
4. Ko SH, Ryu GR, Kim S, Ahn YB, Yoon KH, Kaneto H, Ha H, Kim YS, Song KH: *Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. Transplantation* 85:323-30, 2008
5. Yatoh S, Dodge R, Akashi T, Omer A, Sharma A, Weir GC, Bonner-Weir S: *Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells. Diabetes* 56:1802-9, 2007
6. Song KH, Kim MM, Lee MK, Ryu GR, Ko SH, Moon SD, Ahn YB, Yoon KH, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Chin HM: *Differentiation of pancreatic beta cells from human pancreatic duct cells derived from a partial pancreas tissue. J Korean Diabetes Assoc* 31:236-42, 2007
7. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R: *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science* 292:1389-94, 2001
8. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M: *Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. Nat Biotechnol* 21:763-70, 2003
9. Song KH, Ko SH, Ahn YB, Yoo SJ, Chin HM, Kaneto H, Yoon KH, Cha BY, Lee KW, Son HY: *In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. Biochem Biophys Res Commun* 316:1094-100, 2004
10. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H: *Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature* 400:877-81, 1999
11. Jensen J: *Gene regulatory factors in pancreatic development. Dev Dyn* 229:176-200, 2004
12. Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B: *Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. Stem Cells* 24:258-65, 2006
13. Kritzik MR, Krah T, Good A, Krakowski M, St-Onge L, Gruss P, Wright C, Sarvetnick N: *Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. Mol Cell Endocrinol* 164:99-107, 2000
14. Bonner-Weir S, Weir GC: *New sources of pancreatic beta-cells. Nat Biotechnol* 23:857-61, 2005
15. Corbett JA: *K cells: a novel target for insulin gene therapy for the prevention of diabetes. Trends Endocrinol Metab* 12:140-2, 2001
16. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfe MM, Kieffer TJ: *Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. Science* 290:1959-62, 2000
17. Ramshur EB, Rull TR, Wice BM: *Novel insulin/GIP co-producing cell lines provide unexpected insights into Gut K-cell function in vivo. J Cell Physiol* 192:339-50, 2002
18. Gagnon J, Mayne J, Mbikay M, Woulfe J, Chrétien M: *Expression of PCSK1 (PC1/3), PCSK2 (PC2) and PCSK3 (furin) in mouse small intestine. Regul Pept* 152:54-60, 2009
19. Kim JH, Moon SD, Ko SH, Ahn YB, Song KH, Lim HS, Lee SK, Yoo SJ, Son HS, Yoon KH, Cha BY, Son HY, Kim SJ, Han JH: *Glucose-dependent insulin secretion from genetically engineered K-cells using EBV-based episomal vector. J Korean Diabetes Assoc* 31:9-21, 2007
20. Jeon SY, Baek KH, Kim YS, Park CG, Kwon HS, Ko SH, Song KH, Yoo SJ, Son HS, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Yoon KH: *Differentially up-regulated genes in proliferating porcine neonatal*

- pancreas cells caused by epidermal growth factor. J Cell Biochem* 91:354-64, 2004
21. Yasuda M, Yamamoto M, Ochiai H, Eguchi Y, Arishima K: *Effect of growth factors on development of fetal islet B-cells in vitro. J Vet Med Sci* 69:807-11, 2007
22. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I: *Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. J Clin Invest* 97:1647-54, 1996
23. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Ii S, Moritani M, Hata J, Sugino H, Noji S, Itakura M: *Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. J Clin Invest* 102:294-301, 1998
24. Mashima H, Yamada S, Tajima T, Seno M, Yamada H, Takeda J, Kojima I: *Genes expressed during the differentiation of pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. Diabetes* 48:304-9, 1999
25. Mashima H, Shibata H, Mine T, Kojima I: *Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. Endocrinology* 137:3969-76, 1996
26. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK: *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16105-10, 2002
27. Cheon SJ, Kim JI, Lee JS: *Effects of growth factors and kinase inhibitors on the properties of human adipose-stromal cells in different culture conditions. Cell Biol Int* 32:784-91, 2008
28. Gao X, Song L, Shen K, Wang H, Niu W, Qin X: *Transplantation of bone marrow derived cells promotes pancreatic islet repair in diabetic mice. Biochem Biophys Res Commun* 371:132-7, 2008
29. Kodama S, Toyonaga T, Kondo T, Matsumoto K, Tsuruzoe K, Kawashima J, Goto H, Kume K, Kume S, Sakakida M, Araki E: *Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during beta cell regeneration in STZ-treated mice. Biochem Biophys Res Commun* 327:1170-8, 2005
30. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG: *Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. Regul Pept* 117:77-88, 2004
31. Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A: *Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells. J Clin Endocrinol Metab* 87:4775-81, 2002
32. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: *Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes* 48:2270-6, 1999
33. De León DD, Crutchlow MF, Ham JY, Stoffers DA: *Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. Int J Biochem Cell Biol* 38:845-59, 2006
34. Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Okumachi A, Ishizaki K, Oyama K, Kawaguchi M, Ishizuka N, Iwanaga T, Seino S: *Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15116-21, 2005