

L형 칼슘통로 α_{1D} 이형 이형접합 유전자 적중 쥐에서 부분 췌장 절제 후 췌장 베타세포의 증식과 분화

가톨릭대학교 의과대학 내분비대사 내과¹, 면역생물학 연구소², 서울대학교 의과대학 미생물학교실³

최윤희¹, 윤일희³, 서선희², 임동준¹, 조재형¹, 권혁상¹, 차봉연¹, 손호영¹, 박정규³, 윤건호^{1,2}

Proliferation and Differentiation of Pancreatic β Cells in L-type Calcium Channel α_{1D} Subunit (Ca_v1.3) Heterozygous Knock Out Mice After Partial Pancreatectomy

Yoon-Hee Choi¹, Il-Hee Yun³, Sun Hee Suh², Dong-Jun Lim¹, Jae-Hyuung Cho¹, Hyuk-Sang Kwon¹, Bong-Yun Cha¹, Ho-Young Son¹, Chung-Gyu Park³, Kun-Ho Yoon^{1,2}

Department of Internal Medicine¹, Immunology & Cell Biology Core Laboratory², The Catholic University of Korea; and Department of Microbiology and Immunology³, Tumor Immunity Medical Research Center, Transplantation Research Institute Seoul National University College of Medicine

Abstract

Backgrounds: L-type voltage-dependent calcium channel (LTCC) plays a crucial role in insulin secretion from pancreatic β cells through Ca²⁺ influx. In the recent report, LTCC Ca_v1.3 subtype homozygous knock out mice showed impairment of postnatal pancreatic beta cell development as well as insulin secretion.

Methods: We performed 90% partial pancreatectomy in heterozygous Ca_v1.3 knock out mice to investigate the effect of partial deficiency of Ca_v1.3 gene on beta cell regeneration in the adult. Glucose homeostasis, metabolic profiles including serum insulin and lipid levels and morphologic changes of pancreatic islets were studied.

Results: 90% Partial pancreatectomy induced glucose intolerance only in the heterozygous knock out mice at 8 weeks after surgery. Distribution of islet size was significantly different between two groups after partial pancreatectomy; median value of islet size of heterozygote was larger than that of wild type (642.8 μ m² vs 1459.8 μ m², $P < 0.01$). The frequency of single beta cell unit, considered as a unit of β cell neogenesis, was much lower in heterozygote than that of wild type (41% vs 23.3%, $P < 0.05$).

Conclusion: These data suggest that Ca_v1.3 gene deficiency is specifically associated with impairment of beta cell regeneration, especially neogenesis and eventual glucose intolerance in the 90% partial pancreatectomized mice. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:208~219, 2007)

Key Words: Beta cell neogenesis, Ca_v1.3, L-type voltage-dependent calcium channel (LTCC), Partial pancreatectomy,

서 론

제2형 당뇨병의 발병기전은 인슐린저항성, 즉 증가된 인슐린분비 요구에 대한 췌장 베타세포의 보상적 인슐린분비의 결함으로 설명되고 있다. 정상 상태에서는 인슐린저항성이 증가함에 따라 인슐린분비가 증가됨으로써 정상 또는 정

상에 가까운 혈당이 유지되는데 이런 역동적인 조절이 적절하게 이루어지지 않음으로써 당뇨병이 유발되는 것이다. 이런 조절 이상의 원인으로는 유전적인 요인, 노화 및 환경적인 요인이 관련되어 있다고 알려져 있다¹⁾. 최근 당뇨병을 유발하는 유전적인 요인에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 후보 유전자의 하나로 췌장 베타세포의 칼슘이온통

로와 인슐린의 세포외 방출에 관련된 일련의 단백질들이 거론되고 있다²⁾. 췌장 베타세포는 혈중 포도당 상승에 반응하여 인슐린을 분비하는 특징적인 능력을 가지고 있으며 여기에는 인슐린유전자뿐만 아니라 여러가지 고유한 유전자가 적절히 발현되어야 한다.

췌장 베타세포에서 인슐린의 분비는 L형 전압의존성 칼슘이온통로(voltage-dependent calcium channel, LTCC)를 통한 칼슘의 세포 내 유입으로 인해 이루어진다. 즉, 혈중 포도당, 아미노산, 설폰요소제 항 당뇨병제 등의 인슐린분비 자극이 베타세포 내의 ATP/ADP 비율의 증가를 일으키고 이것은 K_{ATP} 이온 통로를 닫아 이로 인해 세포막 탈분극이 일어나 LTCC가 열려 칼슘이 세포 내로 유입되어 유입된 칼슘에 의해 인슐린의 세포외 방출이 초래되는 것이다³⁻⁵⁾. LTCC는 신경세포에서 신경 흥분-전사를 연결하는 중요한 조절인자로 $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ (α_{1C} , α_{1D})의 두 가지 아형이 주된 역할을 한다. Dihydropyridine 계통의 약제에 의해 이온 통로가 차단되고 비교적 강한 탈분극에 의해 활성화되며 비활성화 되는 시간이 느린 특징을 가지고 있고 신경세포 외에도 베타세포를 포함하여 혈관 평활근세포, 심방세포에 존재하는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾. 베타세포에 존재하는 $Ca_v1.2$ 와 $Ca_v1.3$ 의 두 가지 아형 중 어떤 아형이 인슐린분비에 주된 역할을 하는지에 대해서는 아직까지 연구자에 따라 상이한 결과를 보이고 있다^{9,10)}. 최근 $Ca_v1.3$ 유전자 결핍 형질 전환 생쥐($\alpha_{1D}^{-/-}$)의 표현형을 관찰한 연구에 의하면 이 쥐는 출생 시부터 청력 소실을 보이고 심전도 검사상 서맥, 부정맥 등의 SA 결절 기능 이상을 나타냈으나 기저 혈당 및 혈청 인슐린 값은 정상 쥐와 큰 차이를 보이지 않았다¹¹⁾. 그러나 다른 연구자에 의한 $\alpha_{1D}^{-/-}$ 는 정상 쥐에 비하여 저체중, 저인슐린혈증을 보였고, 당부하 검사상 내당능장애, 출생 후 췌장에서 췌도 크기 및 췌도 베타세포수의 감소, 베타세포 증식의 저하를 보여 $Ca_v1.3$ 유전자가 췌장의 베타세포 증식에 필요한 요소 중의 하나임을 시사하였다¹²⁾.

췌장 절제 쥐는 제2형 당뇨병의 동물 모델의 하나다. 이

모델은 90% 췌장을 절제하였음에도 불구하고 경한 고혈당이 유발되는 특징을 가지고 있는데 이것은 췌장 절제 후 췌장 내에 존재하는 전구세포들이 췌장절제에 의한 신호 자극을 받아 외분비 및 내분비 세포로 증식 및 전이분화되어 베타세포의 양이 증가되기 때문으로 설명되고 있다¹³⁾. 따라서 부분 췌장절제 모델은 성체에서 췌장조직의 재생을 연구하는데 매우 유용한 동물모델로 사용되고 있다.

본 연구는 이형접합 유전자결핍 생쥐(heterozygous α_{1D} knock out mice; $\alpha_{1D}^{+/-}$) 및 정상 쥐에서 부분 췌장절제 후 각 시기에 따라 당부하 검사 및 인슐린 측정을 통해 내당능 및 인슐린분비의 변화를 살펴보고, 잔여 췌장 조직에서 베타세포가 증식하고 분화하는 과정을 시기에 따라 형태학적으로 관찰하여 비교 분석함으로써 $Ca_v1.3$ 유전자의 베타세포 증식 및 발달에 대한 역할을 규명하고자 실시되었다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

C57BL/6J 쥐를 동형접합 α_{1D} 유전자결핍 형질 전환 생쥐($\alpha_{1D}^{-/-}$)와 교배하여 얻은 이형접합 α_{1D} 유전자결핍 형질 전환 생쥐($\alpha_{1D}^{+/-}$)를 제공받아 실험에 이용하였다. $\alpha_{1D}^{-/-}$ 쥐는 고식적인 유전자 적중방법(gene-targeting method)을 통하여 얻은 것이다^{4,15)}. $\alpha_{1D}^{+/-}$ 쥐는 외견상으로 야생형 정상쥐와 큰 차이를 보이지 않았고 정상 활동도를 보였다.

PCR을 이용하여 실험쥐의 유전자 이상을 검정하였다(Fig. 1). 사용한 PCR primer sequence는 forward 5'CCATGAGCACGTCTGCACCC3', reverse 5'TGAAGCACAGATGGCAAATGAG3', mutant 5'GTGGTTTCAAATGTGTCAG3'였다.

실험은 16~20주의 $\alpha_{1D}^{+/-}$ 성체 쥐를 실험군으로 사용하였으며 모든 실험에서 성과 연령을 맞춘 야생형 정상 형제쥐를 대조군으로 이용하였다. 실험군은 18마리, 대조군은 11마리였다. 동물은 12시간 명암주기의 환경에서 사육하였으

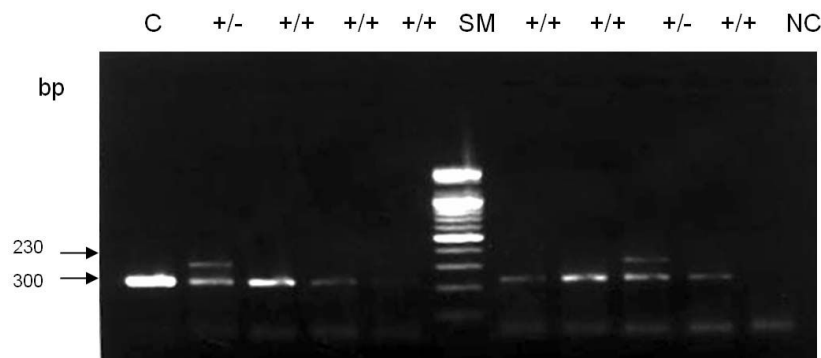


Fig. 1. α_{1D} genotyping of animals. PCR of tail DNA showed wild type (+/+) and heterozygote (+/-). C, normal C57BL/6J mouse used as control animal; SM, size marker; NC, negative control of PCR.

며 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물 관리와 조작은 가톨릭 의대의 동물관리 규정에 따랐다.

2. 췌장절제

금식시킨 쥐를 체중을 잰 뒤 염산 케타민(Ketamin)으로 마취한 후 90% 췌장절제를 실시하였다. 복강을 열어 췌장의 복부 중앙기시부와 위장 대만부를 포함하여 총췌관 이하까지 면봉으로 부드럽게 비벼 제거한 후 췌관을 노출시킨 뒤 췌관을 따라 1~2 mm를 남기고 췌장을 절제하여 남은 췌장이 약 10%가 되도록 하였다¹⁶⁾. 이 같은 방법으로 췌장절제 후 복부 절개 부위를 봉합하고 복강을 닫았다.

수술 당일 정상 형제쥐 7마리 및 $a_{1D}^{+/+}$ 14마리에서 동일한 방법으로 90%의 췌장을 절제하여 절제 부위 및 잔여 부위의 췌장을 바로 수거하여 무게를 측정하여 비교하였다. $a_{1D}^{+/+}$ 의 10% 부위 33.1 ± 2.9 mg, 90% 부위 227.9 ± 9.7 mg이었고 정상 형제쥐는 10% 부위 31.9 ± 1.4 mg, 90% 부위 230.8 ± 12.4 mg 으로, 두 군 각각 평균 87.4% 및 87.7%, 전체 $87.6 \pm 0.41\%$ 가 절제되어 약 90% 췌장절제 범위가 합당함을 알 수 있었다. 상기 쥐의 10% 부위를 췌장절제술 전 췌장조직으로 이용하였고 실험 대상 대조군 및 실험군 쥐를 같은 범위의 췌장절제술 후 3일, 8주째 잔여 췌장을 수거하여 각각 무게를 측정한 후 얻은 조직을 염색 후 관찰하여 잔여 췌장에서 췌장 주변 지방, 결합 조직 등의 환산 무게를 제거하고 수술 후 췌장 무게를 계산하였다.

3. 혈당 및 인슐린, 혈청 지질 농도 측정

췌장절제술 후 1주 간격으로 체중 및 혈당을 측정하여 실험군 및 대조군에서의 변화를 비교하였다. 혈당은 금식하지 않은 상태에서 아침에 측정하였다. 혈당측정은 간헐혈당기인 Roche사의 Glucotrend (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. 또한 수술 전, 수술 후 3일, 8주째 잔여 췌장 회수 직전 정맥으로부터 채혈하여 혈당 및 인슐린, 혈청 지질 농도를 측정하였다. 인슐린측정은 Linco사의 rat/mouse insulin ELISA kit (Linco Research Inc., St. Charles, Mo.)를 이용하였고 쥐 인슐린을 표준값으로 사용하였다.

혈청 포도당 농도는 hexokinase법, 혈청 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 유리지방산은 효소법을 이용하여 측정하였다.

4. 당부하 검사

모든 쥐는 췌장절제 전, 후 3일, 8주째 복강 내 당부하 검사(intraperitoneal blood glucose tolerance test; IPGTT)를 실시하여 내당능장애 및 당뇨병의 유발여부를 평가하였다. 검사는 대상 쥐를 12시간 이상 금식시킨 후 기저 혈당을 측정하고 복강 내로 25% 포도당 용액 2 g/kg을 투여한

후 30분 간격으로 2시간까지 혈당을 측정하였다.

5. 인슐린부하 검사

인슐린저항성을 측정하기 위하여 실시한 인슐린부하검사(insulin tolerance tests; ITT)는 수술 전, 수술 후 8주째 실시하였다. 8시간 금식 후 대상 쥐의 기저 혈당 측정 후 복강 내로 체중 kg 당 1 IU의 사람 인슐린(Velosulin[®] HM; Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark)을 투여 후 5분 간격으로 60분 동안 혈당을 측정하여 인슐린감수성을 비교하였다.

6. 잔여 췌장 조직 내 베타세포의 형태학적 관찰

수술 후 3일, 8주째에 쥐의 잔여췌장조직을 얻어 무게를 측정한 후 포르말린 고정액에 하룻밤 고정하고 흐르는 물에 세척하여 파라핀 블록과 미세박편을 얻었다. 이 조직을 베타세포의 관찰을 위하여 streptavidin-biotin-peroxidase법으로 면역조직 염색을 실시하였다. 과정을 요약하면 항인슐린 항체(polyclonal guinea pig anti-insulin antibody; 최종희석 배수 1:200) (Zymed laboratories Inc. San Francisco, CA.)로 하룻밤 반응 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색 하였다. 베타세포의 상대적인 양은 췌장의 무게와 point count법을 이용하여 구한 베타세포의 비율을 이용하여 환산하였다^{17,18)}. Point count 법은 100배율 화면의 현미경(Olympus BH-2)에 연결된 일정한 간격으로 90개의 점이 화면에 표시되어 있는 비디오 모니터를 보면서 각 조직표본 당 10,000개 이상의 점에 위치한 세포를 세는 것이다. Weibel에 의하면 측정하고자 하는 면적이 조직 내 균일하게 분포한다고 가정할 때 조직 내 1%를 차지하는 부위의 면적은 10,000 점을 셀 경우 오차율(expected relative probable error)이 2%에 해당한다고 되어 있다¹⁹⁾. 상기 방법으로 전체 췌장 영역에 해당하는 점의 수 중에서 항인슐린 항체로 염색된 점의 수의 비율을 산출하여 잔여 췌장의 무게를 곱하여 베타세포를 상대적으로 정량하였다. 두 군 간 췌장 소도의 상대적 크기는 planimetry를 이용하여 비교하였다. 인슐린으로 염색된 베타세포 부위를 췌장 소도로 간주하였으며 크기는 영상분석기(Optimas 6.5; Media Cybernetics, Tempe, AZ.)로 측정하였다. 인슐린에 염색되지만 세포군을 이루지 않고 한 개의 세포로 따로 존재하는 세포는 단일 베타세포(solitary beta cell)로 간주하였고 각각의 세포 면적을 측정하였다. 췌장에서 각 췌장소도는 크기에 따라 네 군으로 나누었다. 즉, (1) 단일 베타세포 단위(single beta cell unit, SCU)군: 단일 베타세포(solitary beta cell) 및 세포수 약 3개 미만의 소도로서 단일 베타세포의 평균 단면적의 3배에 해당함. (2) 작은 소도(small islet, SI)군: 세포수 약 7~10개 미만의 소도로서 단일베타세포 단면적의 7배에 해당함 (3) 중간 크기

소도(medium sized islet, MI)군: 그 이상의 크기로 구성되어 있으며 SCU를 제외한 대조군 소도의 중앙값보다 작은 크기의 소도 (4) 큰 소도(large sized islet, LI)군: 그 이상 크기의 소도의 네 군으로 분류하였다. 이 중 SCU는 단편적이 약 $400 \mu\text{m}^2$ 미만 크기로 어떤 자극에 의한 췌장 베타세포 신생(neogenesis) 시 췌장 내에 나타나 큰 크기의 성숙된 췌장 소도로 분화 증식 하는 전단계의 단위로 생각되고 있다²⁰⁾.

7. 통계분석

측정한 자료의 모든 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계적 검정은 SPSS 11.0 프로그램(Chicago, IL.)을 이용하였고 Student t test나 one-way ANOVA 검정기법 및 Bonferroni 보정을 사용하여 각 군을 비교하였고, 두 군 간 중앙값은 Mann-Whitney test를 이용하였다. $P < 0.05$ 인 경

우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 췌장 절제 후 체중 및 혈당의 변화

췌장절제 후 체중은 대조군 및 실험군에서 모두 일시적으로 감소하였으나 1주 후부터는 서서히 증가하는 추세를 보였다. 수술 전 혈당은 두 군 간 차이가 없었으며 수술 후 약 4주까지는 두 군에서 점차 증가하는 양상을 보이다가 4주 후부터는 감소하였으며 실험군에서 대조군에 비하여 높은 경향을 보였다(Fig. 2).

2. 인슐린 및 혈청 지질 농도의 변화

혈당 및 인슐린은 수술 전 후 두 군 간 유의한 차이를 보

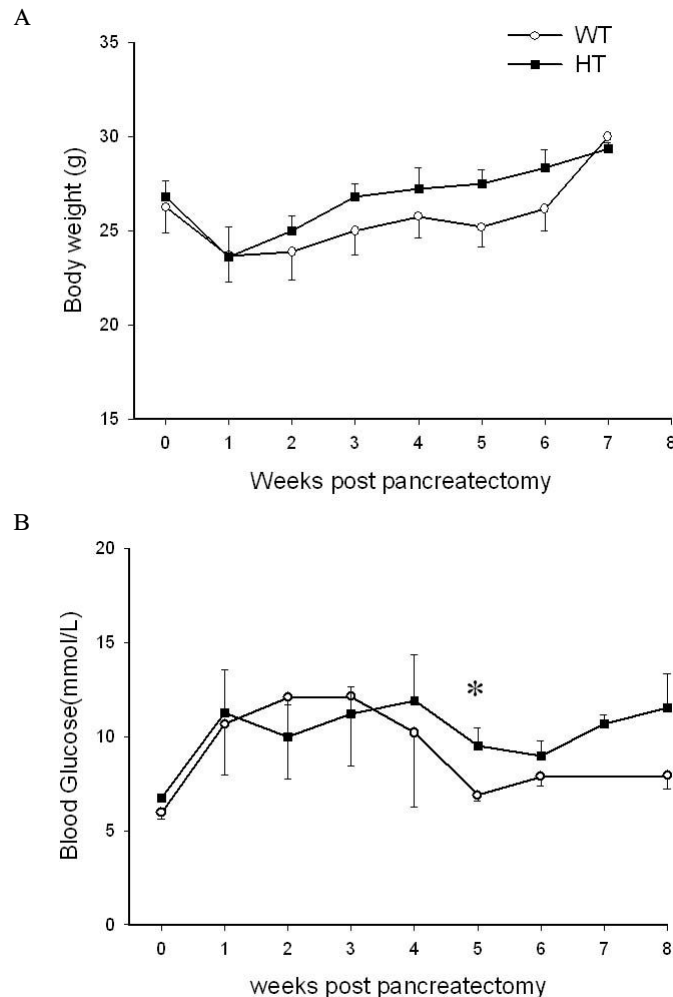


Fig. 2. Comparison of changes in body weight and fed whole blood glucose levels after partial pancreatectomy between wild type and heterozygote. A, Body weights temporarily decreased after operation and then gradually increased throughout experiment in both groups. B, Whole blood glucose levels were measured at fed state in the morning with portable glucometer weekly. Blood glucose levels increased one week after operation in both groups and maintained in HT and gradually decreased after 3 weeks in WT. WT, wild type; HT, heterozygote. * $P < 0.05$.

이지 않았으며 수술 전후의 혈청 지질 농도 역시 각 군 간에서 유의한 차이가 없었다(Table 1).

3. 당부하 검사 및 인슐린부하 검사

췌장절제술 전 실험군과 대조군의 내당능은 통계적으로

유의한 차이는 없었다(Fig. 3). 결과를 제시하지 않았지만 췌장절제 3일 후 잔여 췌장 조직 수거 직전 실시한 당부하 검사도 두 군 간의 차이가 없었다. 그러나 절제 8주 후에 실시한 당부하 검사에서는 실험군의 혈당이 대조군에 비하여 높은 경향을 보였으며 특히 포도당 투여 90분 후 통계적으로

Table 1. Biochemical and hormonal parameters of wild type (WT) and heterozygote (HT) of α_{1D} Knock out mice before, 3 days and 8 weeks after partial pancreatectomy

Group	Day 0		Day 3		Week 8	
	WT	HT	WT	HT	WT	HT
Blood glucose (mmol/L)	13.0 \pm 1.7	12.3 \pm 1.1	8.6 \pm 0.3	7.8 \pm 1.8	11.9 \pm 1.6	11.9 \pm 2.2
Insulin (ng/ml)	1.3 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2
Total cholesterol (mmol/L)	2.15 \pm 0.29	2.26 \pm 0.22	2.88 \pm 0.24	2.84 \pm 0.3	2.6 \pm 0.32	2.49 \pm 0.4
Triglyceride (mmol/L)	0.67 \pm 0.3	0.37 \pm 0.11	0.44 \pm 0.13	0.24 \pm 0.12	0.36 \pm 0.09	0.42 \pm 0.07
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.88 \pm 0.2	2.04 \pm 0.16	2.1 \pm 0.3	2.37 \pm 0.25	2.33 \pm 0.29	1.92 \pm 0.27
Free fatty acid (μ Eq/L)	1734 \pm 241	1722 \pm 252	1,399 \pm 68	1,082 \pm 129	2,260 \pm 300	1,940 \pm 214

Data are mean \pm standard error.

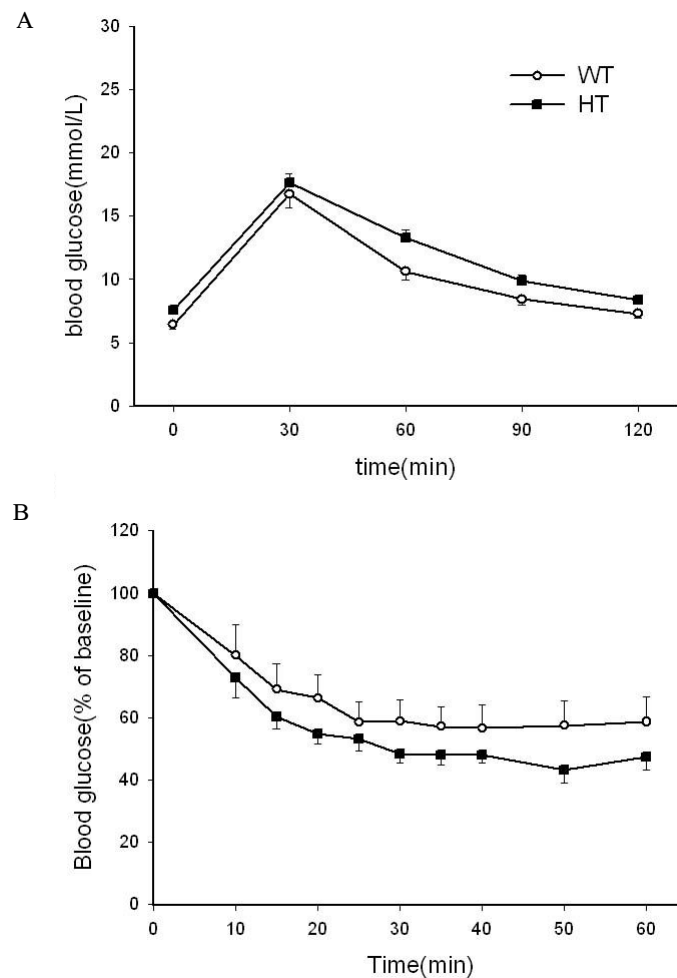


Fig. 3. Comparison of baseline IPGTT and ITT between wild type and heterozygote. A, Glucose tolerance test before pancreatectomy showed no significant differences between two groups. WT, wild type, n = 14; HT, heterozygote, n = 39. B, Glucose disappearance rate after insulin injection showed no significant differences between groups. WT, n = 12; HT, n = 11. IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test.

유의하게 증가하였다. 인슐린부하 검사 후의 혈당 감소도는 췌장 절제술 전 후에 두 군 간 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

4. 잔여 췌장의 양적 변화

수술 전 후 췌장 양의 변화를 각 군에서 관찰한 결과 췌장의 무게는 실험군에서 8주 짜 대조군에 비해 증가하는 경

향을 보였으나 두 군 간에 유의한 차이는 없었다(Table 2).

5. 잔여 췌장 베타세포의 양적 변화

췌장 조직 표본을 현미경하에서 100배 배율로 관찰하면 서 point-count 법으로 베타세포의 양을 측정하였다. 잔여 췌장 조직은 수술전 대조군 28.5 mg, 실험군 29.5 mg에서

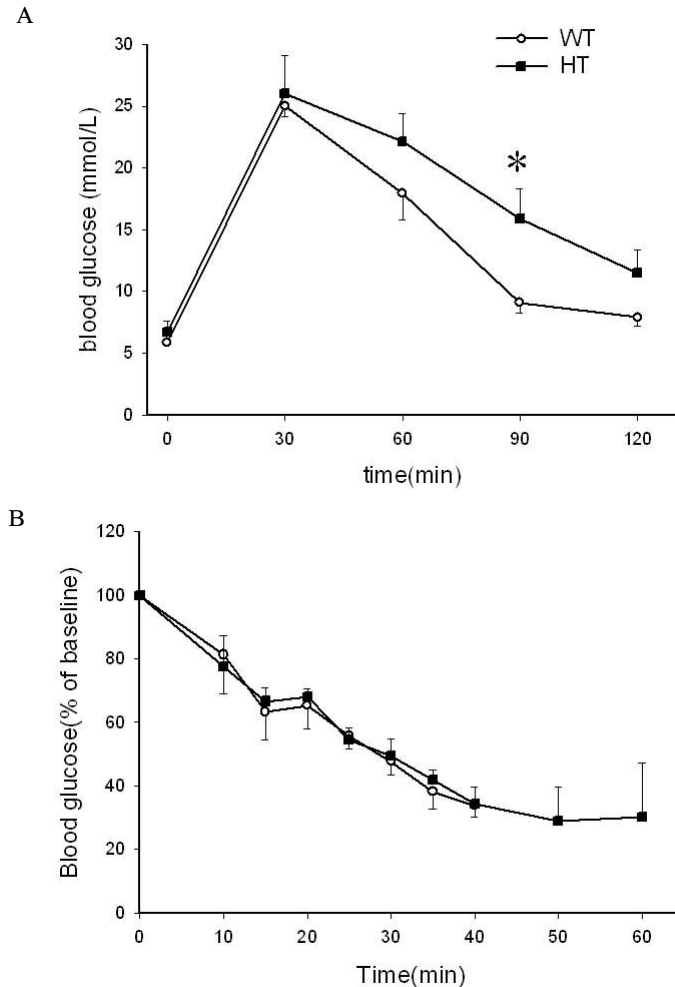


Fig. 4. Comparison of IPGTT and ITT performed 8 weeks after partial pancreatectomy between wild type and heterozygote. A, Blood glucose levels during glucose tolerance test after pancreatectomy in WT and HT groups. Blood glucose level of HT at ninety minute during GTT was significantly higher than that of WT. In each group, n = 5. B, Glucose disappearance rates after insulin injection were not different between groups. In each group, n = 5. WT, wild type; HT, heterozygote. IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test. * $P < 0.05$.

Table 2. Total pancreatic weight and beta cell mass in remnant pancreatic tissue of wild type (WT) and heterozygote (HT) of α_{1D} knock out mice before and 3 days, 8 weeks after 90% partial pancreatectomy

parameters	Day 0		Day 3		Weeks 8	
	WT	HT	WT	HT	WT	HT
Weight of remnant pancreas (mg)	28.5 ± 5.4	29.2 ± 1.5	35.2 ± 2.6	33.8 ± 2.6	50.9 ± 5.5	60.6 ± 5.9
Beta cell/pancreas area (%)	0.64 ± 0.2	0.33 ± 0.1	-	-	1.97 ± 0.4	1.82 ± 0.5
Beta cell mass (mg)	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.03	-	-	0.98 ± 0.25	1.03 ± 0.2

Data are mean ± standard error.

수술후 3일째 대조군 35.2 mg, 실험군 33.8 mg으로 증가하였고 수술 후 8주에는 50.9 mg, 60.6 mg으로 증가하였다. 잔여 조직 내에서 환산한 베타세포 양은 수술 전 0.16 mg, 0.1 mg 이었으며 수술 후 8주 짜 0.98 mg, 1.03 mg로 두 군 간의 차이는 없었다(Table 2).

6. 베타세포의 형태학적 구분에 따른 비교 분석

췌장 절제 8주 후에 잔여 췌장 조직을 면역조직학적 방법으로 염색 후 영상분석기로 췌장 소도의 크기를 측정하였다. 대조군과 실험군 사이에 췌장 소도의 분포 양상은 차이를 보였다. 대조군의 췌장소도 크기의 중앙값은 $642.8 \mu\text{m}^2$ 인 반면 실험군의 중앙값은 $1459.8 \mu\text{m}^2$ 로 유의한 차이를 보였다($P < 0.01$) (Fig. 5). 또한 췌장에 걸쳐 산재해 있으며 췌장 소도를 형성하지 않으면서 인슐린에 염색이 되는 한 개의 세포 즉 단일 베타세포(solitary beta cell)의 크기 또한 실험군에서 유의하게 높게 나타났다(Table 3).

췌장 소도를 크기에 따라 네 군으로 분류하여 비교한 결과 실험군에서 SCU군에 속하는 소도의 비율은 대조군에 비해 유의하게 낮았으나($41 \pm 2.7\%$ vs $23 \pm 5.1\%$, $P < 0.05$) 이에 반해 상대적으로 큰 크기의 소도인 SI의 비율은 대조

군과 실험군에서 각각 16.52 ± 2.23 , $19.48 \pm 2.83\%$ 로, MI는 각각 $11.52 \pm 2.3\%$, $17.88 \pm 3.73\%$ 로, LI는 각각 $31.0 \pm 4.4\%$, $39.33 \pm 4.0\%$ 로 나타나 실험군이 대조군에 비해 높은 경향을 보였다(Fig. 6, 7).

고 찰

췌장 베타세포에서 인슐린의 분비는 LTCC를 통한 칼슘의 세포내 유입으로 인해 이루어진다⁵⁾. 베타세포에 존재하는 $\text{Ca}_v1.2$ $\text{Ca}_v1.3$ 의 두 가지 아형 중 어떤 아형이 인슐린분비에 주된 역할을 하는지에 대해서는 아직까지 연구자에 따라 상이한 결과를 보이고 있다. Iwashima 등은 췌장 베타세포 LTCC를 구성하는 mRNA 분석 후 $\text{Ca}_v1.3$ 아형이 주된 구성 요소임을 보여주어 최근까지 인슐린분비에는 $\text{Ca}_v1.3$ 아형의 중요성이 강조되어 왔다^{6,9,21)}. 그러나 Schulla 등은 췌장 베타세포에서만 선택적으로 $\text{Ca}_v1.2$ 유전자를 결핍시킨 유전자결핍 쥐에서 베타세포의 기능을 관찰한 결과 인슐린의 세포외 방출의 장애를 통해 제1기 인슐린분비(first-phase insulin secretion)의 소실이 나타남을 보여줘 $\text{Ca}_v1.2$ 아형이

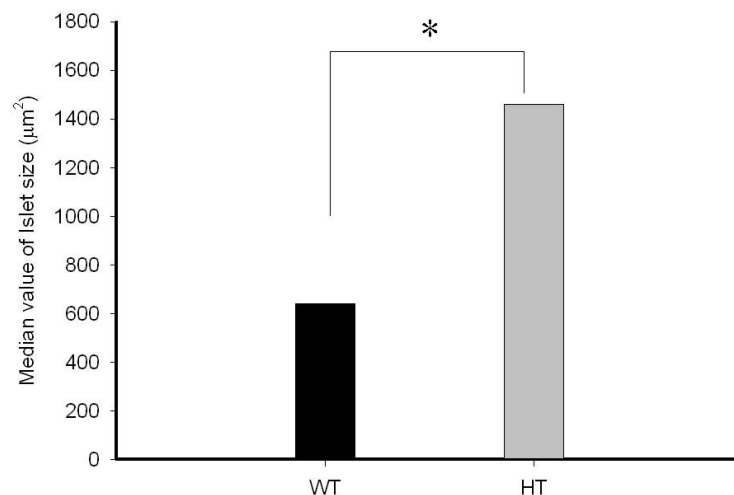


Fig. 5. Median value of islet size in wild type and heterozygote groups. $n = 5$ in wild type (WT), $n = 6$ in heterozygote (HT). * $P < 0.05$.

Table 3. Cross-sectional areas of solitary β cells and islets in wild type (WT) and heterozygote (HT) at 8 weeks after 90% partial pancreatectomy

Islet size group	WT (μm^2)	HT (μm^2)
SCU	204.0 ± 8.7	216.0 ± 10.8
solitary β cell	131.6 ± 8.5	$163.5 \pm 12.1^*$
SI	681.7 ± 21.8	687.4 ± 23.0
MI	$1,846.7 \pm 108.0$	$1,850.8 \pm 76.0$
LI	$15,064.8 \pm 1620.4$	$15,830.4 \pm 1349.8$

Data are mean \pm standard error. SCU, single β cell unit; SI, small sized islet; MI, medium sized islet; LI, large sized islet. * $P < 0.05$ between wild type and heterozygote.

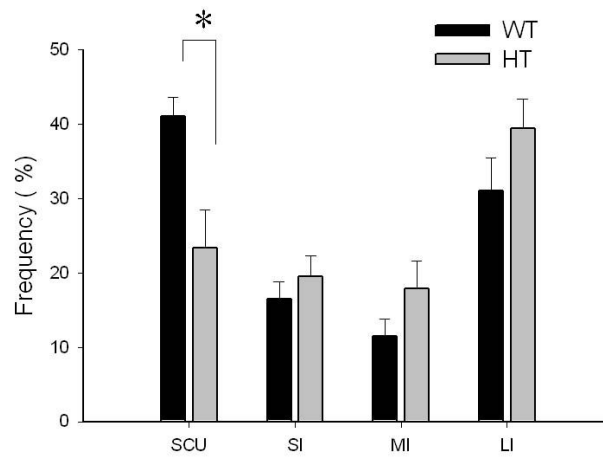


Fig. 6. Islet size distribution in wild type and heterozygote groups. Frequency of SCU (single cell unit), SI (small islet), MI (medium-sized islet), and LI (large-sized islet) in both groups. Proportion of SCU was less in HT than WT. Size of islets in HT group has a tendency to be larger than that of WT. $n = 5$ in wild type (WT), $n = 6$ in heterozygote (HT). * $P < 0.05$.

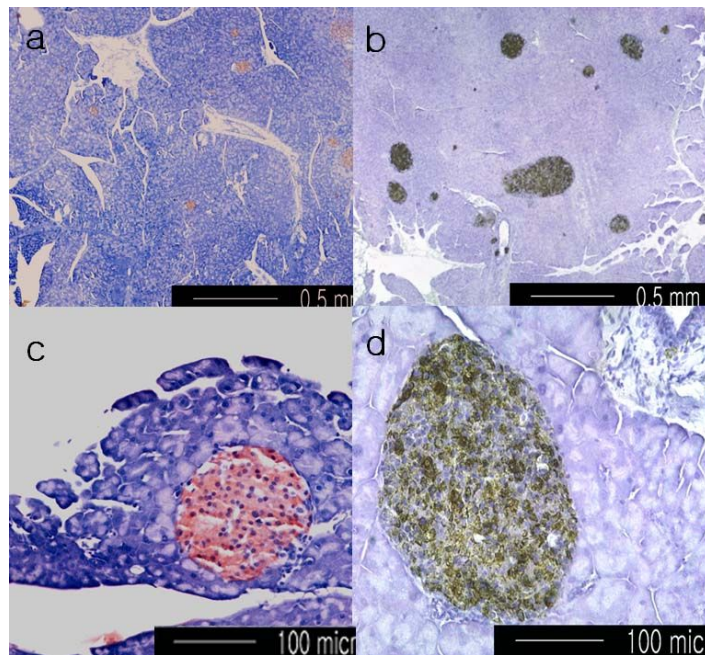


Fig. 7. Immunohistochemical stain of islet with anti-insulin antibody. Relatively larger sized islets were observed in the heterozygote (HT) (b,d) than wild type (WT) (a, c).

주된 역할을 할 것으로 주장한 바 있다²⁾. 그러나 최근 $Ca_v1.3$ 아형 유전자 결핍모델에서 청력저하, 심장 전도 이상이 보고되었는데, 이와 함께 Namkung 등은 유전자 결핍 쥐에서 출생 후 췌장의 베타세포 형성에 장애가 있으며 이로 인한 내당능장애와 인슐린분비 저하를 보여주어 $Ca_v1.3$ 아형 유전자가 인슐린분비에 관여할 뿐 아니라 베타세포의 증식과 분화에도 중요한 역할을 함을 시사하였다^{11,12)}. 본 실험은 유전자 결핍쥐에서 베타세포 재생자극에 대한 반응을 관찰하고자 하였으나 이미 베타세포의 양이 부족한 동형접

합체를 대상으로 대조군과 비교하여 정량화하는 것은 어려울 것으로 생각되어 $Ca_v1.3$ 아형 유전자의 부분적 결핍이 예상되는 이형접합생쥐를 대상으로 하여 당대사 및 인슐린 저항성 및 췌장에서의 증식자극에 대한 베타세포의 반응을 췌장 절제 모델을 통하여 야생형 쥐와 비교 분석함으로써 $Ca_v1.3$ 아형 유전자가 췌장 베타세포의 형성에 기여하는 바를 알아보하고자 고안하였다.

90% 췌장 절제 쥐 모델은 췌장의 증식과 재생, 분화의 과정을 연구하는데 적합한 동물 모델로, 췌장 절제 후 수일

내 고혈당이 발생하고, 시간이 경과하면서 체중과 잔여 췌장의 무게가 증가되고 이와 평행하게 베타세포의 수와 양도 증가되는데 90% 절제 후 8주가 경과하면 정상 췌장에 비해 잔여 췌장의 무게는 27%, 베타세포 질량은 42%에 달하는 것으로 알려져 있다^{13,22}. 췌장 절제 후 고혈당 자극에 의한 베타세포의 보상적 증가가 α_{1D} 아형 유전자 결핍이 있는 경우에 어떻게 변화되는지 관찰함으로써 α_{1D} 아형 유전자가 베타세포 증식에 미치는 영향을 적절히 평가할 수 있을 것으로 생각되었다.

본 실험에 사용된 생쥐는 Namkung 등의 실험에 사용하였던 이형접합쥐로부터 유래된 쥐였는데¹², 이형접합쥐에서도 안과적 기형이 적은 비율에서 관찰되어 이전의 보고와는 차이를 보였다. 그러나 췌장절제 전 실시한 기본 데이터는 혈당, 인슐린, 당부하검사, 베타세포 양 등에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 췌장 절제 후 대상쥐의 혈당 및 체중 변화를 살펴보면 췌장절제술 후 수일 후 고혈당이 발생하였고 체중도 서서히 증가하였으며 잔여 췌장의 무게도 두 군 모두에서 점점 증가하였다. 하지만 Bonner-Weir 등¹³의 보고와는 달리 조직 소견상 수술 후 3일째 보이는 것으로 되어 있는 국소 재생부위가 뚜렷하게 나타나지 않아 어느 정도 생쥐-쥐 간의 종의 차이가 있을 것으로 생각되었다. 수술 후 4주경부터는 혈당이 점차 떨어지는 경향을 보였고 이는 시간이 갈수록 실험군에서 더 두드러졌다. 실제로 췌장절제 후 혈당의 변화는 다양하며 심한 고혈당이 지속되는 경우 및 정상으로 회복되는 경우도 관찰될 수 있다고 되어 있으며 이는 췌장절제 시 위에 연결한 위엽(gastric lobe) 부위의 절제 정도에 따라 차이를 보인다고 알려져 있다²³.

췌장 절제 8주 후 실시한 당부하 검사에서 두 군 간에 유의한 내당능의 차이를 보였는데 이는 인슐린부하 검사로는 설명되지 않아 인슐린저항성의 차이보다는 췌장의 인슐린분비의 차이에 의한 것으로 생각되었다. LTCC가 인슐린 과립의 세포의 분비에 직접 관여하는 통로이므로 베타세포 내 유전자 발현의 차이에 의해 두 군 간에 인슐린분비 기능이 차이가 나리라고 유추할 수 있다. 실제로 동형접합체 유전자 결핍쥐에서는 공복 및 포도당 자극 인슐린분비가 현저히 감소되어 있었다¹². 당뇨병 모델쥐인 Zucker diabetic fatty rat을 대상으로 한 연구에서도 췌장소도의 LTCC $Ca_v1.2$ $Ca_v1.3$ 아형의 m-RNA발현 및 인슐린분비가 감소되어 있어 당뇨병 발생과 연관성을 보여준 바 있다²⁴. 비록 두 군에서 췌장소도에서 포도당 자극 인슐린분비 및 베타세포에서의 LTCC의 발현정도를 직접 측정하지 않았으므로 인슐린분비의 정도를 정확히 비교 논할 수는 없으나 췌장 절제 전에는 당대사 항상성의 차이를 발견할 수 없었으므로 췌장 절제에 의한 자극 자체가 두 군 간 당대사 차이를 유발하는 어떤 변화를 초래하였을 것으로 생각되었다.

췌장의 베타세포 양을 결정하는 요소들에는 베타세포의

증식(replication), 크기의 증가(hypertrophy), 베타세포의 신생(neogenesis), 베타세포의 세포사 특히 apoptosis 등이 있다²⁵. 본 실험에서 수술 8주 후 베타세포의 양은 두 군 모두 증가하였으나 두 군 간에 의미 있는 차이를 보이지는 않았다. 그러나 단일 베타세포 단위(single beta cell unit, SCU)는 $\alpha_{1D}^{+/+}$ 군에서 의미 있게 낮았고 상대적으로 LI의 비율이 높았다. SCU는 단일 세포(solitary beta cell)를 포함하여 약 1~3개 정도의 세포로 이루어진 세포군을 지칭하며 이와같은 췌장 소도 외 작은 세포군의 개념은 Bouwens 등이 9명의 뇌사자의 췌장을 형태학적으로 분석한 논문에서 자세히 언급되어 있다. SCU의 의미는 아직 완전히 정립되어 있지는 않지만 췌관 세포 중 전구세포로부터 유래되는 것으로 생각되고 있고 태생 전, 출생 직후에 높은 빈도로 나타나며 췌장 재생 시 다시 나타나 베타세포 신생의 단위로 추정되고 있다^{13,20}. 즉, 본 실험의 결과로는 두 군 모두 증가된 혈당에 반응하여 보상적으로 베타세포의 양이 늘어나 적응하는 과정을 겪었으나 $\alpha_{1D}^{+/+}$ 군은 대조군에 비해 단일 베타세포 단위로부터 비롯되는 베타세포의 신생이 상대적으로 적은 것을 알 수 있다. 베타세포의 신생은 베타세포가 아닌 그 전구체(progenitor) 또는 간세포(stem cell)부터 베타세포로 분화되는 과정을 일컬으며 90% 췌장 절제 모델 등의 내분비 또는 외분비 췌장세포의 심한 손상이 있을 경우에 나타나는 것으로 알려져 있다²⁰. 췌장 절제 후 재생된 조직의 베타세포에서는 세포수의 증식(hyperplasia)과 비후(hypertrophy)의 두 가지 과정이 모두 발생하는 것으로 되어 있다²³. 실험군에서 신생의 비율이 적고 췌장 소도의 크기가 큰 경향을 보이는 것은 이미 존재하던 췌장소도가 베타세포의 양을 보상한 것으로 생각되며 본 실험에서는 각 베타세포의 크기와 수를 측정하지 않았으므로 두 과정 중 어느 과정이 더 주된 역할을 하였는지는 정확한 판단이 어려워 추가적인 실험이 뒷받침되어야 할 것이다. 하지만 따로 존재하는 단일 베타세포(solitary beta cell)의 크기가 결핍군에서 유의하게 크게 나타난 것은 베타세포 신생이 부족한 데 대한 하나의 보상작용으로 나타난 세포 비후를 시사한다. 베타세포 비후는 당뇨병 모델에서 관찰되는 현상으로 내당능장애와 연관성이 알려져 있으며 췌장 절제 후 GLP-1 (glucagon like peptide) 유사체를 투여한 경우 베타세포 비후가 개선되고 당뇨병의 발생을 막을 수 있다는 보고가 있다²⁶. 베타세포 신생의 저해로 인한 세포의 비후가 두 군 간 베타세포의 전체 양은 의미 있는 차이가 없음에도 불구하고 $\alpha_{1D}^{+/+}$ 군에서 관찰된 내당능 장애를 설명할 수 있는 하나의 요인으로 추정된다. 물론 동형접합체 유전자 결핍군에서 인슐린분비 장애가 있음이 이미 밝혀진 바 있어¹² 이형접합체에서도 베타세포 기능의 이상이 존재하고 이것이 내당능 장애 발생에 기여했을 가능성도 배제할 수 없다. 고혈당이 지속되면 베타세포 분화에 관련된 유전자의 발현이 떨어지고 이로 인해 거꾸로 베타

세포 신생이 저해된다고 알려져 있어²³⁾ 본 실험에서 $\alpha_{1D}^{+/-}$ 군의 베타 신생 저해가 두 군간 췌장절제 정도 차이로 인한 혈당의 차이로 인해 나타난 결과 뿐으로도 생각할 수 있겠으나 본 실험에서는 300 mg/dL 이상의 심한 고혈당이 계속 지속된 경우는 실험에서 제외하였고 두 군 간의 혈당 차이도 크지 않았으므로 그 가능성은 희박할 것으로 판단되었다.

췌장 절제술 후에 나타나는 췌장조직의 증식은 두 가지 과정을 거쳐 재생된다고 가정하고 있는데 첫째는 췌관 상피 세포나 췌관 상피세포에 존재하는 전구세포가 새로운 췌장 소엽으로 증식하는 것이고 또 한 가지는 기존의 분화된 내분비 및 외분비 세포가 증식하는 것이다¹³⁾. 췌장절제 모델을 통한 연구에서 수술 수일 후 작은 췌관 양 구조로 이루어진 국소 재생 부위가 나타나며 10일 경 소실되는데 잔여 췌장의 양도 이 과정과 평행하게 증가되는 것으로 알려져 있어²²⁾ 주로 췌관 세포 전구체가 분화함으로써 베타세포가 증가하는 것이 주된 베타세포 신생 과정으로 생각되고 있다¹³⁾. $\alpha_{1D}^{+/-}$ 군은 이런 전구세포에 의해 새로운 췌장조직으로 증식하는 정도가 정상쥐에 비해 떨어져 있는 것으로 간주할 수 있다.

베타세포의 신생 및 증식의 변화는 췌장 절제 이외에도 지속적인 고혈당의 자극²⁷⁾, E2F1 유전자 결핍 쥐²⁸⁾, BETA2/neuroD 유전자 결핍쥐²⁹⁾, GLP-1결핍³⁰⁾ 등의 여러 가지 상황에서도 보고되고 있다. 제2형 당뇨병에서 이러한 베타세포의 신생이나 증식의 저해가 병태생리에 중요한 요소의 하나임은 주지의 사실이다. 그러나 제2형 당뇨병은 복잡한 병태생리를 통해 발병하고 다유전자형 질환으로 알려져 있어^{31,32)}, 원인이 되는 유전자를 찾는 것은 용이하지 않은 것이 현실이다. 현재까지 MODY (maturity onset diabetes of young) 당뇨병의 원인이 되는 것으로 알려져 있는 유전자들 즉, 대사효소인 glucokinase, 전사인자인 hnf-1, hnf-3, ipf-1, neuroD/BETA2 등이 베타세포의 기능에 영향을 미친다고 알려져 있다³³⁻³⁶⁾. 이 외에도 베타세포의 기능에 영향을 미칠 가능성이 있는 유전자는 얼마든지 존재할 가능성이 있으며 직접 베타세포의 인슐린분비능과 관계가 없어도 세포의 재생이나 교체율에 영향을 미치는 유전자 역시 그 변이나 손상에 의해 베타세포의 양에 변화를 초래하여 당뇨병을 유발할 수 있다고 생각되고 있다³⁷⁾. 한 예로 SNAP receptor (SNARE) protein의 하나인 syntaxin 1A의 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism)이 제2형 당뇨병 발병 연령 및 인슐린요구량과 연관관계가 있다는 보고가 있다³⁸⁾. 단순히 본 실험결과로 $\alpha_{1D}^{+/-}$ 유전자 변이가 사람에서 제2형 당뇨병의 원인 중 하나라고 결론짓기는 어렵다. 그러나 Namkung 등¹²⁾의 연구에서 보여준 동형접합체에서의 췌장 베타세포 형성 장애나 본 연구에서의 이형접합체에서의 췌장 베타세포 신생 장애는 $\alpha_{1D}^{+/-}$ 유전자의 절대적, 또는 부분적 결핍이 어떤 자극이나 다른 유전자와의 복합적

인 상호관계를 통하여 개체의 복잡하고 미묘하게 유지되는 기능성 베타세포의 양의 변화를 초래하여 당대사의 이상을 유발하여 제2형 당뇨병의 발생 내지는 발생된 당뇨병의 경과에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

결론적으로 $\text{Ca}_v1.3$ 아형의 유전자의 결핍은 췌장 절제 쥐에서 내당능의 장애를 가져오는데 그 기전에는 보상적 췌장 베타세포의 재생과정 중 특히 베타세포 신생의 이상이 연관되어 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 췌장 베타세포에서 인슐린의 분비는 L형 전압 의존성 칼슘이온통로(L-type voltage-dependent calcium channel; LTCC)를 통한 칼슘의 세포 내 유입을 통해 이루어진다. LTCC의 아형 중 $\text{Ca}_v1.3$ 아형의 유전자가 결핍된 쥐에서 췌장 베타세포의 인슐린분비뿐 아니라 출생 후 췌장 베타세포의 형성에 장애가 있어 이 유전자와 당뇨병과의 연관성이 제시되고 있다.

방법: $\text{Ca}_v1.3$ 아형 유전자의 부분적 결핍이 성체 쥐에서 베타세포 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이형접합 $\text{Ca}_v1.3$ 아형 유전자 결핍쥐에서 췌장 절제술을 실시하여 시간의 변화에 따른 내당능 및 인슐린저항성을 평가하고 잔여 췌장 조직을 형태학적으로 관찰하여 베타세포를 정량하고 췌장소도를 크기 별로 나누어 분포를 정상쥐와 비교 분석하였다.

결과: 1) 90% 췌장 절제 후 유전자 결핍쥐에서 정상쥐에 비하여 포도당 부하 후 유의한 혈당상승을 보였다. 2) 90% 췌장 절제 8주 후 유전자 결핍쥐에서 정상쥐보다 췌장소도의 크기가 컸다(췌장 소도 크기 중앙값; $642.8 \mu\text{m}^2$, vs $1459.8 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$). 3) 유전자 결핍쥐에서 단일 베타세포 단위의 비율이 정상쥐에 비해 낮아(41% vs 23.3%, $P < 0.05$) 베타세포 신생의 정도가 낮은 것으로 나타났다.

결론: $\text{Ca}_v1.3$ 아형의 유전자의 결핍은 췌장 절제 쥐에서 내당능의 장애를 가져오는데 이는 보상적 췌장 베타세포의 재생과정 중 특히 베타세포 신생의 이상으로 인한 결과로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Kahn SE: The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4047-58, 2001
2. Schulla V, Renström E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnusson MA, Obermüller S, Olofsson C, Salehi A, Wendt A,

- Klugbauer, Wolheim CB, Rorsman P, Hofmann F: *Impaired insulin secretion and glucose tolerance in β cell-selective Cav1.2 Ca^{2+} channel null mice. EMBO 22:3844-54, 2003*
3. Smith PA, Rorsmann P, Ashcroft FM: *Modulation of dihydropyridine -sensitive Ca^{2+} channels by glucose metabolism in mouse pancreatic beta-cells. Nature 342:550-53, 1989*
4. Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ämmälä C, Bokvist K, Rorsman P: *Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. J Cell Biochem 55S:54-65, 1994*
5. Sher E, Giovnnini F, Codignola A, Passafaro M, Giorgi-Rossi P, Volsen S, Craig P, Davalli A, Carrera P: *Voltage-operated calcium channel heterogeneity in pancreatic β cells: physiopathological implications. J Bioenerg Biomemb 35:687-96, 2003*
6. Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI: *Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. Proc Natl Acad Sci 94:584-88, 1992*
7. Kollmar R, Montgomery LG, Fak J, Henry LJ, Hudspeth AJ: *Predeominance of the α_1D channels of hair cells in the chicken's cochlea. Proc Natl Acad Sci 94:14883-88, 1997*
8. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perea-Reyes E, Schwarz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien TW: *Nomenclature of voltage-gated calcium channels. Neuron 25:533-35, 2000*
9. Yang SN, Larsson O, Bränström R, Bertorello AM, Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Köhler M, Meister B, Berggren PO: *Syntaxin 1 interacts with the LD subtype of voltage-gated Ca^{2+} channels in pancreatic β cells. Proc Natl Acad Sci 96:10164-69, 1999*
10. Barg S, Xiaosong M, Eliasson L, Galvanovskis J, Göpel SO, Obermüller S, Platzer J, Renström E, Trus M, Atlas D, Striessnig J, Rorsman P: *Fast exocytosis with few Ca^{2+} channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. Biophys J 81:3308-23, 2001*
11. Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephen K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J: *Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. Cell 102: 89-97, 2000*
12. Namkung Y, Skrypnik N, Neong MJ, Lee T, Lee MS, Kim HL, Chin H, Suh PG, Kim SS, Shin HS: *Requirement for the L-type Ca^{2+} channel α_{1D} subunit in postnatal β cell generation. J Clin Invest 108: 1015-22, 2001*
13. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE: *A second pathway for regeneration of the adult exocrine and endocrine pancreas: a possible recapitulation of embryonic development. Diabetes 42: 1715-20, 1993*
14. Namkung Y, Smith SM, Lee SB, Skrypnik NV, Kim HL, Chin H, Scheller RH, Tsien RW, Shin HS: *Targeted disruption of the Ca^{2+} channel β_3 subunit reduces N- and L-type Ca^{2+} channel activity and alters the voltage-dependent activation of P/Q-type Ca^{2+} channels in neurons. Proc Natl Acad Sci 95: 12010-15, 1998*
15. Cho CH, Kim SS, Jeong MJ, Lee CO, Shin HS: *The Na^+-Ca^{2+} exchanger is essential for embryonic heart development in mice. Mol Cell 10:712-22, 2000*
16. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC: *Partial pancreatectomy and subsequent defect in glucose-induced insulin release. J Clin Invest 71:1544-53, 1983*
17. Weibel ER: *Principals and methods for the morphometric studies of the lung and other organs. Lab Invest 12:131-55, 1963*
18. Bonner-Weir S: *β cell turnover. Its assessment and implications. Diabetes 50:S20-4, 2001*
19. Weibel ER: *Stereologic methods. In practical methods for biologic morphometry. Vol. 1. p. 101-61, London, Academic press, 1978*
20. Bouwens L, Pipeleers DG: *Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. Diabetologia 41:629-33, 1998*
21. Iwashima Y, Kondoh-Abiko A, Seino S, Takeda J, Eto M, Polonsky KS, Makino I: *Reduced levels of messenger ribonucleic acid for calcium channel, glucose transporter-2, and glucokinase are associated with alterations in insulin secretion in fasted rats. Endocrinology 135:1010-17, 1994*
22. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S: *Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. Diabetes 37:232-36, 1988*
23. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir G: *Chronic*

- hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes. J Biol Chem* 274:14112-21, 1999
24. Roe MW, Worley JF III, Tokuyama Y, Philipson LH, Sturis J, Tang J, Dukes ID, Bell GI, Polonsky KS: *NIDDM is associated with loss of pancreatic β -cell L-type Ca^{2+} channel activity. Am J Physiol* 270 (Endocrinol Metab 33):E133-40, 1996
25. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S: *Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas: Estimation with simple mathematical model. Diabetes* 44:249-56, 1995
26. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir: *Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes* 48:2270-76, 1999
27. Lipsett M and Finegood DT: *β cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. Diabetes* 51:1834-41, 2002
28. Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J: *Impaired pancreatic growth, β cell mass, and β cell function in E2F1-/- mice. J Clin Invest* 113:1288-95, 2004
29. Huang H, Chu K, Nemoz-Gaillard E, Elberg D, Tsai MJ: *Neogenesis of β cells in adult BETA2/NeuroD deficient mice. Mol Endocrin* 16:541-61, 2002
30. De Leon D, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA: *Role of endogenous Glucagon-Like Peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. Diabetes* 52:365-71, 2003
31. Permutt MA: *Use of DNA polymorphism for genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus. Baillieres Clin Endocrinol Metab* 5:495-26, 1991
32. MaCarthy MI, Froguel P: *Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E217-25, 2002
33. Bell GI, Pilkis SJ, Polonsky KS: *Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus. Annu Rev Physiol* 58:171-86, 1996
34. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI: *Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature* 384:458-60, 1996
35. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI: *Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 β gene (TCF2) associated with MODY. Nature Genet* 17:384-85, 1997
36. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF: *Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. Nature Genet* 15:106-10, 1997
37. Bonner-Weir S: *Perspective: Postnatal pancreatic β cell growth. Endocrinology* 141:1926-29, 2000
38. Tsunoda K, Sanke T, Nakagawa T, Furuta H, Nanjo K: *Single nucleotide polymorphism (D68D, T to C) in the syntaxin 1A gene correlates to age at onset and insulin requirement in type II diabetic patients. Diabetologia* 44:2092-97, 2001