

제1형 당뇨병 쥐 모델에서 유전공학적 제조 K-세포 이식을 통한 당뇨병의 치료

가톨릭대학교 내과학교실¹, 가톨릭대학교 의과학연구원 면역생물학교실²

심주연¹ · 김주희¹ · 안유배¹ · 송기호¹ · 한제호¹ · 차봉연¹ · 이숙경² · 문성대¹

Treatment of Type 1 Diabetes through Genetically Engineered K-cell Transplantation in a Mouse Model

Ju-Yeon Sim¹, Ju-Hee Kim¹, Yu-Bae Ahn¹, Ki-Ho Song¹, Je-Ho Han¹, Bong-Yun Cha¹, Sook-Kyung Lee², Sung-Dae Moon¹

¹Department of Internal Medicine, Incheon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Incheon,

²Research Institute of Immunobiology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Abstract

Background: K-cells function as targets for insulin gene therapy. In a previous study, we constructed EBV-based plasmids expressing rat preproinsulin controlled by glucose-dependent insulintropic polypeptide promoters. In the present study, we attempted to correct hyperglycemia in vivo using genetically engineered K-cells in a mouse model of type 1 diabetes.

Methods: K-cells expressing insulin were transplanted under the kidney capsules of STZ-induced diabetic mice. The blood glucose levels and body weights of the experimental animals were measured daily. After four weeks, the mice were injected intra-peritoneally with 2 g/kg glucose following a 6 hr fast. Blood glucose levels were measured immediately following glucose injections. All animals were sacrificed at the end of the glucose tolerance study, and pancreas and graft-bearing kidney tissue samples were stained with antibodies against insulin, glucagon, and C-peptide.

Results: The body weights of K-cell-transplanted diabetic mice increased after transplantation, whereas those of untreated diabetic control mice continued to decline. The blood glucose levels of K-cell-transplanted diabetic mice decreased gradually during the two weeks following transplantation. After intra-peritoneal injection of glucose into K-cell-transplanted diabetic mice, blood glucose levels increased at 30 minutes, and were restored to the normal range between 60 and 90 minutes, while untreated control diabetic mice continued to experience hyperglycemia. Kidney capsules containing transplanted K-cells were removed, and sections were stained with anti-insulin antibodies. We detected insulin-positive cells in the kidney capsules of K-cell-transplanted diabetic mice, but not in untreated control mice.

Conclusion: We detected glucose-dependent insulin secretion in genetically engineered K-cells in a mouse model of type 1 diabetes. Our results suggest that genetically modified insulin producing K-cells may act as surrogate β -cells to effectively treat type 1 diabetes. (Korean Diabetes J 33:466-474, 2009)

Key words: Epstein-Barr virus, Gastric inhibitory polypeptide, Gene therapy, K-cell, Plasmid

서 론

제1형 당뇨병은 자가면역기전에 의해 췌도의 베타세포가 선택적으로 파괴됨에 따라 인슐린 결핍으로 고혈당이 되며 적절한 치료에도 불구하고 만성합병증으로 진행하여 삶의 질이 저하되는 질환이다. 당뇨병의 치료 혹은 합병증의 발생을 지연시키기 위해서는 정상수준의 혈당조절을 하도록 권고하고 있으나 식이요법, 경구혈당강화제, 다회인슐린요법 등에도 불구하고 정상수준의 혈당을 유지하는 데는 한계가 있다. 최근에는 당뇨병을 근본적으로 치료하기 위한 췌도이식, 줄기세포치료, 유전공학기술을 이용한 인슐린 유전자 치료법 등이 시도되고 있지만 아직 미흡한 실정이다.

인슐린 유전자 치료법은 자가면역기전을 피하기 위해 비 베타세포인 표적세포에 인슐린 유전자를 전달하여 인슐린 분비를 유도하는 방법으로 췌도세포의 인슐린 분비기능을 최대로 모방하는 기술이다^{1,2)}. 비 베타세포에 전달된 인슐린 유전자로부터 인슐린이 분비되도록 유도하되 베타세포가 혈당 변화에 민감하게 인슐린을 분비하는 것처럼 인위적인 조작을 가하여야 한다³⁾. 왜냐하면, 인슐린 치료에 사용되는 비 베타세포는 베타세포처럼 엔도펩티다제를 분비하여 전구인슐린을 인슐린으로 전환하여야 하며 저장된 인슐린을 세포 외로 방출하는 세포외유출능을 가지고 있어야 하기 때문이다³⁻⁵⁾.

지금까지 인슐린 유전자치료를 위해 사용된 표적세포^{6,7)} 중 가장 베타세포와 유사했던 세포로는 위, 십이지장, 공장 등에 널리 분포하고 있으면서 커다란 내분비기관을 이루고 있는 K-세포이다⁸⁻¹⁰⁾. K-세포는 glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)를 분비하며 췌도의 베타세포에서 인슐린의 분비를 촉진한다. 최근 인슐린 유전자치료를 위해 사용되고 있는 K-세포는 생쥐의 장 종양에서 분리한 세포로서 글루코카나제를 분비하여 포도당을 감지하고 엔도펩티다제의 분비는 물론 인슐린의 세포외유출능도 있는 것으로 알려져 있다^{3,8,9)}.

저자들은 인체에 비교적 안전하면서도 큰 유전자의 도입이 가능하며 도입된 유전자의 지속적인 발현이 유지되는 Epstein-Barr virus (EBV)-유래 에피솜 벡터¹¹⁻¹³⁾를 사용하여 K-세포를 유전공학적으로 변환하여 포도당농도 의존적으로 인슐린 분비를 유도한 실험실 연구결과를 발표한 바 있다¹⁴⁾. 따라서, 본 연구에서는 유전공학적으로 인슐린이 분비되도록 변환한 K-세포를 스트렙토조토신으로 유발한 제1형 당뇨병 쥐의 신장 피막에 이식하여 혈당농도 의존적으로 인슐린이 분비되는지를 확인함으로써 당뇨병의 치료를 위한 인슐린 유전자치료를 가능성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양 및 트랜스펙션

Dr. Hanahan (University of California, San Francisco) 으로부터 기증받은 STC-1 세포주로부터 순수한 K-세포만을 분리하기 위하여, 쥐의 GIP 프로모터와 전구인슐린 융합유전자(Fig. 1)를 포유동물세포주 발현벡터에 클로닝한 후 STC-1 세포주에 트랜스펙션하였으며, 이 중 hygromycin에 내성을 보이는 K-세포만을 분리하여 실험에 사용하였다. 트랜스펙션은 배양접시에 STC-1 세포가 90% 정도 자랐을 때 세포를 PBS로 씻어낸 후 혈청이 포함되지 않은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 DNA-Lipofectamin TM 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 희석한 후, GIP 프로모터와 전구인슐린 융합유전자가 클로닝된 포유동물세포주 발현벡터를 첨가하였다¹⁴⁾. 대조군으로는 GIP 프로모터와 green fluorescent protein (GFP) 융합유전자가 클로닝된 발현벡터를 트랜스펙션 실험에 사용하였다(Fig. 1). 실험에 사용된 모든 세포는 5%의 CO₂, 37℃의 세포배양기에서 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 DMEM으로 채워진 배양접시에서 계대배양한 후 사용하였다.

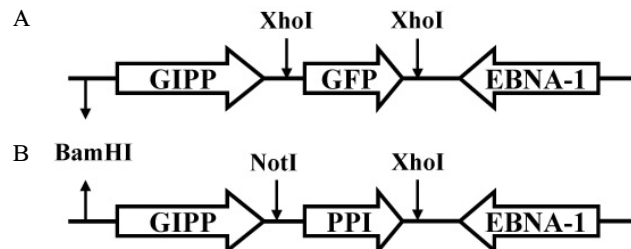


Fig. 1. Schematic presentation of the construct which is EBV-based plasmid expressing PPI or GFP transcriptionally controlled by GIP promoter (GIPP). A. Plasmid expressing GFP as control. B. Plasmid expressing PPI. GFP, green fluorescent protein; GIP, glucose dependent insulintropic peptide; PPI, preproinsulin.

2. 실험 동물 및 당뇨병 유도

모든 BALB/c Nude 마우스는 오리엔트 바이오(Seoul, Korea)에서 제공받았으며 생후 5주된 수컷을 이용하였다. 가톨릭대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인과 함께 동물 보호법(Animal welfare act)을 준수하였으며 모든 실험 마우스는 가톨릭대학교 성의교정 동물실에서 사육하였다. 마우스는 정상군과 당뇨병군 그리고 당뇨병군의 일부는 K-세포를 이식한 치료군 등으로 분류한 후 실험을 하였다. 당뇨병군은 당뇨병을 유발시키기 위하여 16시간 동안 금식시킨 뒤 Streptozotocin (STZ; Sigma, St. Louis, MO, USA) 150 mg/kg을 10 mM sodium citrate buffer (pH4.5) 용액에 녹인 뒤 살균된 여과기에서 여과한 후 복강에 주사하였다¹⁵⁾. 3일 뒤 혈당이 250 mg/dL 이상된 마우스를 당뇨병이 유도된 것으로 간주하였다.

3. Nude 마우스에 K-세포 이식과 사육

당뇨병이 유발된 마우스 중에서 이식군은 무작위로 선정하였으며 인슐린을 발현하는 K-세포를 마우스의 왼쪽 신장 피막에 약 1×10^6 개 이식하였다. 즉, 미리 배양접시에서 배양된 K-세포를 트립신 EDTA로 분리한 후 DMEM으로 풀어주고 1,000 rpm으로 90초간 세포를 가라앉힌 뒤 상층의 DMEM을 제거하였다. 다시 새로운 DMEM을 2 mL 첨가하여 풀어주었으며, 트리판블루로 염색한 후 세포의 수를 계산하였다. 약 1×10^6 개의 K-세포를 얇은 판에 넣고 1,500 rpm으로 3분간 가라앉혀서 판의 끝 쪽에 위치하도록 하였다. 마우스의 왼쪽 후 복부를 절개하여 신장을 밖으로 꺼낸 후 바늘로 신장 피막에 상처를 내고 상처 난 부위에 초정밀 주사기(Hamilton, Reno, NV, USA)를 이용하여 K-세포를 이식하였다. 이식한 상처부위로부터 K-세포가 밖으로 나오지 않도록 신장 피막을 봉하고, 신장을 원래 위치에 넣은 후 피부를 봉합하였다. 이식하지 않은 당뇨병군은 당뇨병 치료군에 대한 대조군으로 삼았다. 모든 마우스는 매일 꼬리 정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈당기(Accu-Chek Go; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)로 혈당 변화를 기록하였고 동시에 체중을 측정하면서 30일 동안 키웠다.

4. 당부하 검사

30일 동안 키운 모든 마우스를 12시간 동안 금식시킨 뒤, 포도당(2 g/kg)을 녹인 생리식염수를 마우스의 복강 안으로 주사하였다. 포도당 주사 후 0, 15, 30, 60, 90, 120분마다 꼬리 정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈당기로 혈당을 측정하였다.

5. 면역조직화학염색

K-세포를 이식한지 30일이 경과한 후 모든 마우스에서 당부하검사를 시행하였고 안락사 시킨 후 신장과 췌장을 적출하였다. 적출한 신장과 췌장은 10% 포르말린으로 24시간 동안 고정한 후, 파라핀에 포매하였다. 신장과 췌장 조직을 4 μ m 두께로 잘라서 100% 자일렌으로 파라핀을 제거한 후 수화시킨 뒤, 실온에서 3% H₂O₂/MeOH에 30분 동안 반응시켜서 조직 내의 과산화효소를 제거하였다. PBS로 세척 후, 정상 goat 혈청으로 실온에서 30분 동안 반응시킴으로써 비특이적 항원-항체 결합을 제거하였다. 1차 항체처리에는 다클론 기니픽인슐린 항체(1:200; Invitrogen)와 다클론 글루카곤 항체(1:100, Invitrogen), 그리고 다클론 C-peptide 항체(1:200; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)로 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 2차 항체는 horseradish peroxidase (인슐린, 글루카곤 & C-peptide; Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA)를 1시간 동안 실온에서 반응시킨 뒤, DAB (3,3'-diaminobenzidine) 용액에 1분 동안 처리한 후 증류수로 씻은 뒤 표본을 제작하였고 광학현미경으로 관찰하였다.

6. 면역조직형광염색

4 μ m 두께의 신장과 췌장 조직을 면역조직화학염색법과 동일한 방법으로 100% 자일렌으로 파라핀을 제거한 후 수화시킨 뒤, 조직 내의 과산화효소를 제거하였다. 이어서 PBS로 세척 후, 정상 당나귀 혈청으로 실온에서 15분 동안 반응시킴으로써 비특이적 항원-항체 결합을 제거하였다. 각 조직의 염색은 인슐린 항체(Invitrogen)를 1차 항체로 하였고 2차 항체로는 Rhodamine (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA)으로 염색한 뒤 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 핵염색을 하였다. 염색한 각 조직은 공초점현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

7. 통계분석

각각의 실험은 3회 반복하였으며 결과는 평균값 \pm 표준편차로 표시하였다. 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하였으며 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 혈당 및 몸무게 변화

Citrate 완충액에 150 mg/kg의 STZ를 녹여 마우스의 복

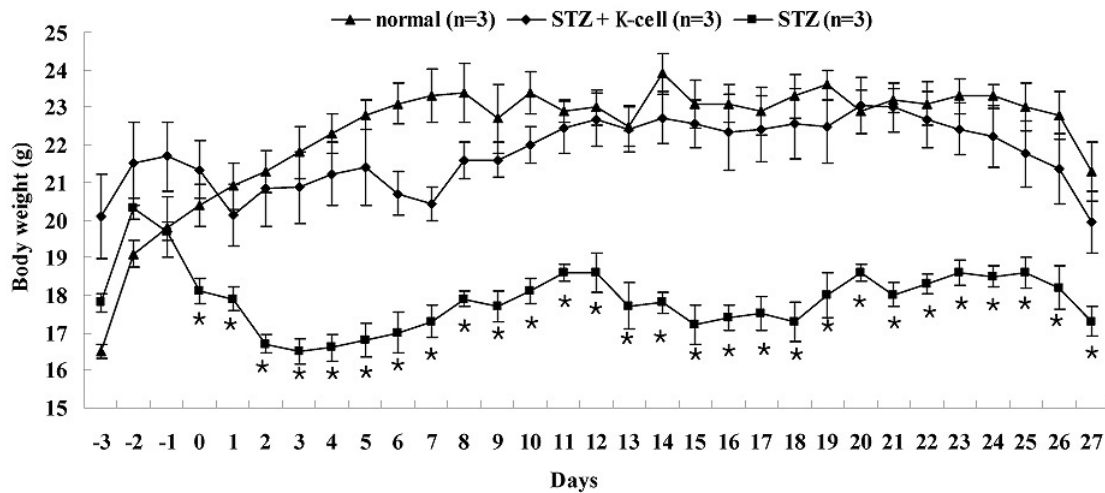


Fig. 2. Average of body weight variation. Experiments on all nude mice were measured body weight every day. Body weight changes of normal control mice and K-cell transplanted diabetic mice were similarly increased, but only untreated STZ-induced diabetic mice maintain low body weight (16~19 g). Values are means. K-cells were transplanted at day 0. * $P < 0.05$ vs. normal control mice or K-cell transplanted diabetic mice group.

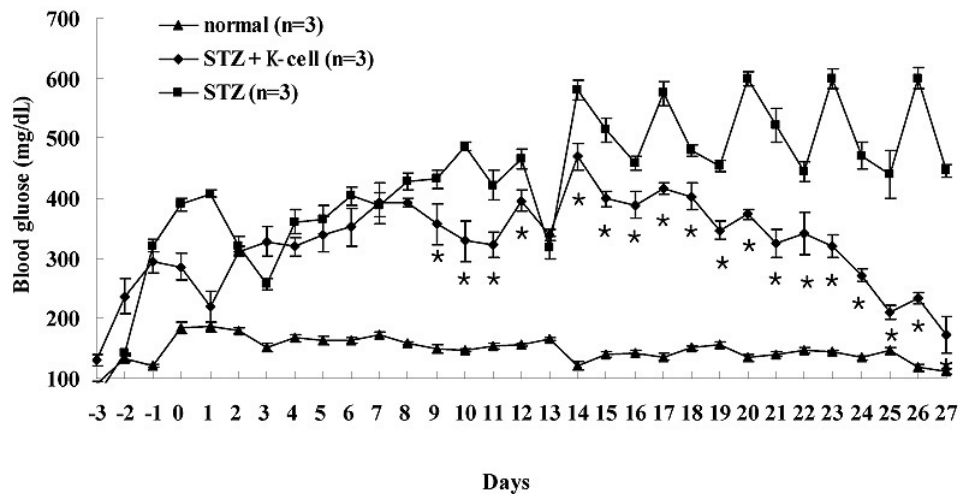


Fig. 3. Blood glucose level after K-cell transplantation. Glucose levels of normal control mice show within normal limits (less than 180 mg/dL). Those of untreated STZ-induced diabetic mice were irregular and constant high level. Similarly, those of K-cell transplanted diabetes mice were high, but it was getting lower gradually during the experimental period. Values are means. K-cells were transplanted at day 0. * $P < 0.05$ vs. untreated STZ-induced diabetic mice group.

강에 주사한 후 3일 만에 모든 마우스의 혈당이 300 ± 50 mg/dL로 상승하였다. 정상군과 K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 몸무게가 점차 증가하였으나, STZ를 주사한 당뇨병군은 두 군과 비교하여 시간이 경과하여도 체중이 증가하지 않았으며 실험기간 동안 낮게 유지되었다(Fig. 2). 또한, K-세포를 이식한 마우스는 K-세포가 증식함에 따라 왼쪽 하복부에 지름 1~2 cm 정도의 종괴를 형성하였다(자료 생략).

그리고 정상군에서는 대체로 정상범위의 혈당분포를 유지하고 있었으나, STZ를 주사한 군에서는 지속적으로 혈당이 높게 측정되었다. K-세포를 이식한 군에서는 STZ만을 주사한 군에서보다 혈당이 서서히 낮아지면서 이식 후 2주 경부터는 감소폭이 더 커지면서 200 mg/dL 이하로까지 떨어졌다(Fig. 3).

2. 당부하검사

K-세포를 이식한 날로부터 30일이 지난 뒤 실험에 사용된 모든 마우스를 대상으로 12시간 동안 금식시킨 뒤 식염

수에 2 g/kg의 포도당을 녹여 복강에 주사하였다. 그리고 각 마우스에서 몸무게를 측정하였으며 주사한 시점으로부터 0, 10, 20, 30, 60, 90분마다 혈당변화를 관찰하였다. 정상 군과 K-세포를 이식한 군에서는 서로 유사한 내당력을 보

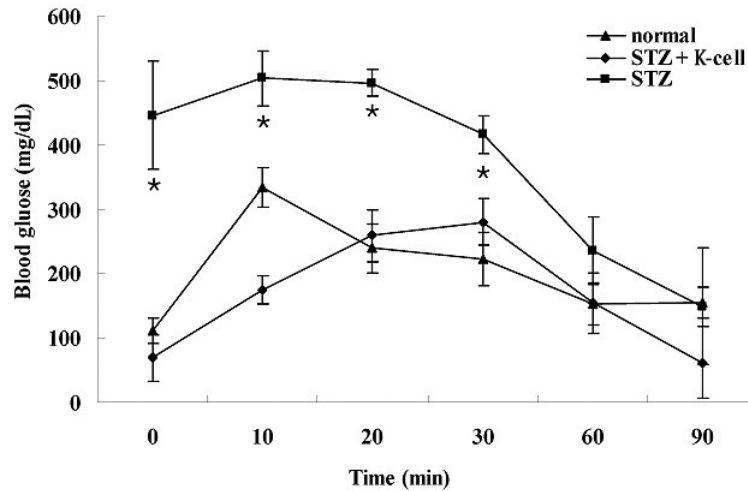


Fig. 4. Glucose tolerance tests of normal control mice and K-cell treated diabetic mice or untreated STZ-induced diabetic mice. Values are means of each group (n = 3). * $P < 0.05$ vs. normal control mice or K-cell transplanted diabetic mice group.

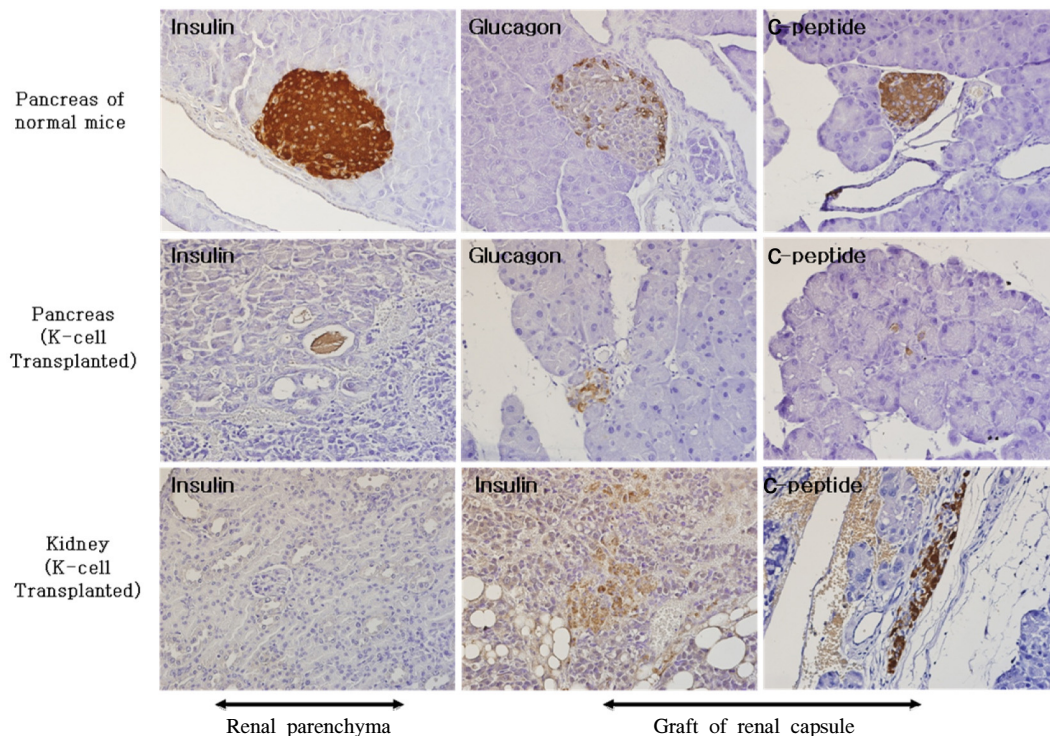


Fig. 5. Immunohistochemistry of insulin expression in graft-bearing kidney and pancreas of the normal control mice, untreated STZ-induced diabetic mice or K-cell transplanted diabetic mice ($\times 400$).

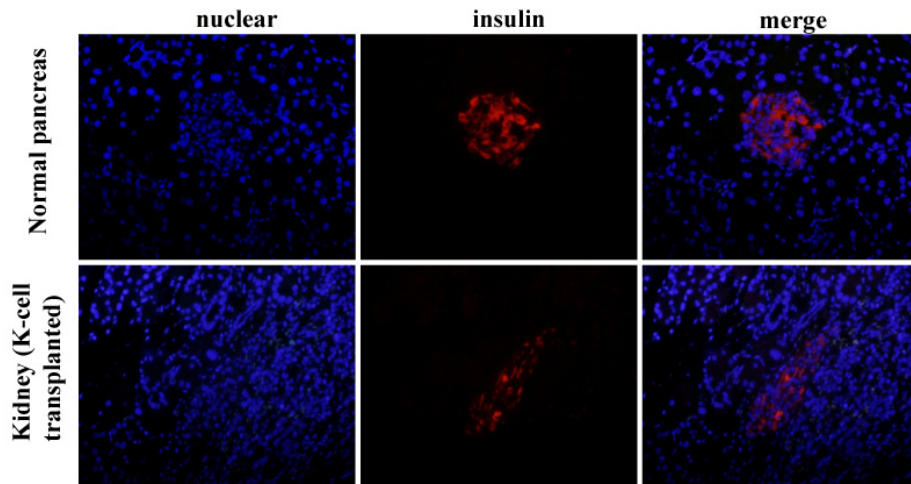


Fig. 6. Immunofluorescence study for insulin expression in pancreas and graft-bearing kidney of normal control mice, untreated STZ-induced diabetic mice or K-cell transplanted diabetic mice ($\times 400$).

였으나 STZ만을 주사한 군에서는 지속적으로 포도당 불내성을 보였다(Fig. 4).

3. 면역조직염색 결과

DAB 염색과 면역형광염색을 한 결과, 두 염색의 결과는 일치하였다. 췌장조직과 신장조직에서 염색을 하였으며, 정상 췌장에서는 인슐린과 글루카곤, C-peptide 모두에 염색이 되었지만 STZ를 주사한 마우스의 췌장에서는 췌도가 파괴되어 인슐린은 물론 글루카곤, C-peptide 모두에 염색이 되지 않았다. 그러나, K-세포를 이식한 신장조직의 종괴에서는 면역조직화학염색에서 인슐린과 C-peptide 모두에서 염색이 되었으며(Fig. 5) 이를 다시 면역형광염색법으로 재차 확인할 결과 인슐린이 발현되는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

이전 연구에서 본 연구자들은 쥐의 GIP 프로모터와 전전구인슐린의 융합 유전자를 EBV-유래 에피솜 벡터에 클로닝한 후 STC-1 세포주에 트랜스펙션하여 인슐린을 분비하는 순수한 K-세포를 분리한 바 있으며, 이 K-세포에서 포도당농도 의존적으로 인슐린이 분비되는 것을 시험관 내에서 확인한 바 있다¹⁴⁾. 본 연구에서는 생체 내에서도 K-세포가 혈당농도 의존적으로 인슐린의 분비가 원활하게 이루어지면서 당뇨병이 치료될 수 있는지를 확인하고자 하였다.

K-세포 이식에 따른 면역거부반응을 피하기 위하여

BALB/c Nude 마우스를 이용하였으며 인슐린을 분비하도록 만든 K-세포가 생체 내에서 착상하여 혈당농도 의존적인 인슐린을 분비하면서 당뇨병이 치료되는지를 확인해 본 연구이다. 이전의 인슐린 유전자 치료 연구에서 표적이 된 유전자는 사람의 인슐린 유전자였지만^{8,9,16)} 본 연구에서는 쥐의 전전구인슐린 유전자를 사용하였다. 그 이유는 정상 베타세포에서 인슐린이 생성되는 과정과 유사한 전전구인슐린에서 전구인슐린을 거쳐서 최종적으로 인슐린이 생성되는 과정을 K-세포에서 구현해 보고자 하였으며, 또한 사람대신 쥐의 인슐린을 사용함으로써 생체이식 후 분비되는 인슐린이 마우스의 체내에서 자가항체가 생성되는 것을 차단 혹은 최소화하기 위해서였다. Han 등도 본 연구의 내용과 유사한 결과를 발표한 바 있으나¹⁷⁾ 본 연구와의 차이점은 이들은 인슐린 발현의 전사조절을 위해 GIP 프로모터만으로는 인슐린의 분비가 충분하지 않아서 GIP 유전자의 인터론 일부를 GIP 프로모터의 C-말단에 융합하였으며 벡터의 CMV 프로모터와 GIP 프로모터를 치환하는 과정에서 CMV 프로모터의 일부를 남겨두었다. 그러나 본 연구에서는 Han 등이 사용한 방법과 달리 CMV 프로모터 전부를 GIP 프로모터로 치환하였으며 그 결과 GIP 프로모터만으로도 인슐린의 분비가 충분히 이루어지는 것을 볼 수 있어서 후에 이에 대한 규명이 필요할 것으로 생각된다.

누드 마우스의 안정적인 당뇨병 유발을 위해 150 mg/kg의 STZ를 복강 내에 주사하였으며 고혈당(300 ± 50 mg/dL)이 된 것을 확인한 후 실험을 하였다. 당뇨병이 유발된 마우스의 신장 피막에 인슐린을 분비하는 K-세포를 이식한 결과 정상군에서처럼 몸무게가 점차 증가하였으며(Fig. 2), 이

식 2주 후에는 지속적인 혈당감소가 관찰되었으나(Fig. 3), STZ를 주사한 당뇨병군에서는 뚜렷한 체중감소와 함께 고혈당이 지속되었다. 또한, 당부하검사에서도 K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 정상군과 유사한 내당력을 보였으나 STZ만을 주사한 당뇨병군에서는 지속적으로 포도당 불내성을 보였다(Fig. 4).

그리고 실험 대상이 된 모든 마우스의 췌장과 신장을 적출하여 면역조직염색을 통하여 인슐린의 분비를 확인하였다. 그 결과, K-세포를 이식한 당뇨병군과 K-세포를 이식하지 않은 당뇨병군의 췌장에서는 베타세포가 파괴됨으로써 인슐린이 분비되지 않는 것을 알 수 있었지만, K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 K-세포가 이식된 신장에서 인슐린이 분비되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 6). 이로써 본 연구자들이 인슐린이 분비되도록 만든 K-세포를 마우스의 신장 피막에 이식한 결과 생체 내에서도 일정기간 혈당농도 의존적인 인슐린이 분비되어 당뇨병이 치료되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 본 연구는 이식된 K-세포가 종양을 형성하여 자라면서 과도하게 인슐린이 분비되면서 저혈당이 유발된 것과 마우스의 건강이 좋지 않아 혈중 인슐린 농도를 동시에 측정하지 못한 제한점이 있다. 그리고 이식 기간동안 K-세포를 이식한 당뇨병군은 정상군과 비교했을 때 체중은 서로 비슷하였으나 외모상으로는 매우 마른 상태였다. 즉, K-세포가 이식된 당뇨병쥐에서 종괴 무게와 종양부하에 따른 과도한 인슐린 분비로 저혈당이 유발되었으며 가중된 이화상태로 먹이섭취가 증가한 것 등이 실험결과에 서로 영향을 주었을 가능성이 있다. 따라서, 보다 체적이 큰 실험동물에서 동일한 실험을 반복하되 혈당과 함께 인슐린, C-peptide 농도를 동시에 측정하게 되면 좀 더 분명한 결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 엔도펩티다제에 의한 인슐린의 처리과정도 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 K-세포가 혈당농도 의존적으로 인슐린이 분비되는 것을 생체 내에서도 확인할 수 있었으나, 이식한 K-세포가 이식부위에서 종양을 형성하면서 종양부하의 증가로 저혈당을 유발하기 때문에 결국 인체에 적용하기에는 어려움이 있을 것으로 생각된다. 그러나, 앞으로 인체의 줄기세포에서 K-세포의 분리가 가능해지면 본 연구에서 시도된 방법을 보다 유용한 당뇨병의 치료법으로 발전시킬 수 있을 것으로 생각된다.

STC-1 세포주는 마우스의 장종양세포에서 분리한 세포이기 때문에 동물에 이식할 경우 종양이 발생하였다^{8,16,17)}. 이들 연구자들도 발생한 종양에 대해 인슐린분비를 확인한 것 외에는 다른 병리조직학적인 검사는 시행하지 않았다.

그러나 본 연구자들은 이전의 GFP를 발현하도록 제작한 K-세포를 신장 피막에 이식하여 K-세포의 생착을 확인하는 과정에서 종괴가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며 때어낸 종괴를 형광현미경으로 관찰한 결과 종괴전체에서 형광을 발하는 것을 확인할 수 있었다(자료 생략). 따라서 커다란 종괴 전부가 GFP를 발현하는 K-세포로 구성되어 있음을 알 수 있었으나 후에 종괴의 성상에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구는 EBV-유래 에피솟 벡터를 이용한 유전공학적인 제조 K-세포 이식을 통해 안정적인 인슐린 분비가 이루어지는 것을 생체실험을 통해 확인해 보았으며 또한, K-세포를 이용한 유전자치료를 제1형 당뇨병의 치료를 위한 대체베타세포의 가능성이 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 인슐린 유전자 치료법의 이상적인 표적세포로 K-세포가 알려져 있다. 이전 연구에서 본 연구자들은 EBV-유래 에피솟 벡터를 이용하여 K-세포에서 포도당농도 의존적인 인슐린 분비가 이루어지는 것을 실험실 환경에서 확인한 바 있다. 본 연구에서는 스트렙토조토신(STZ)으로 유발된 제1형 당뇨병 쥐의 신장 피막에 유전공학적으로 제조된 K-세포를 이식하여 당뇨병이 치료되는지를 관찰해 보았다.

방법: 인슐린이 분비되도록 제조된 K-세포를 STZ으로 유도된 BALB/c Nude 마우스의 신장 피막에 이식한 후 혈당과 몸무게를 측정하였다. 마우스는 정상군과 STZ으로 유도된 당뇨병군 그리고 당뇨병군의 일부는 K-세포를 이식한 치료군 등으로 분류하여 실험을 하였다. 이식 4주 후 모든 마우스에서 6시간 동안 금식한 후 2 g/kg의 포도당을 복강내로 주사하여 당내성검사를 하였다. 당내성검사가 끝나자마자 모든 마우스의 신장과 췌장을 적출하여 인슐린, 글루카곤, C-peptide 등으로 면역조직화학염색 및 면역형광염색을 한 후 그 결과를 분석하였다.

결과: STZ을 복강에 주사한 마우스는 주사 3일 후 혈당이 300 ± 50 mg/dL로 상승하였다. 정상군과 K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 몸무게가 점차 증가하였으나, STZ만을 주사한 당뇨병군에서는 실험기간 동안 낮게 유지되었다. 그리고 정상군에서는 정상범위의 혈당분포를 유지하였으나, STZ만을 주사한 당뇨병군에서는 지속적으로 혈당이 높게 유지되었다. 그리고 K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 STZ만을 주사한 군에서보다 혈당이 서서히 떨어졌으며 이식 2주 후부터는 급격히 감소하였다. 당부하검사 결과 정상군과

K-세포를 이식한 당뇨병군에서는 서로 유사한 내당력을 보였으나 STZ만을 주사한 군에서는 지속적으로 포도당 불내성을 보였다. 조직면역검사 결과 정상군의 췌장에서는 인슐린과 글루카곤, C-peptide 모두에 염색이 되었지만 STZ만을 주사한 마우스의 췌장에서는 췌도파괴로 인슐린은 물론 글루카곤, C-peptide 모두에 염색이 되지 않았다. 그러나, K-세포를 이식한 당뇨병군의 신장에서는 면역조직화학염색에서 인슐린과 C-peptide 모두에서 염색이 되었으며 면역형광염색에서도 인슐린이 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

결론: 유전공학적으로 제조된 K-세포가 마우스 신장 피막에 착상되어 혈당농도 의존적으로 인슐린을 분비하여 당뇨병이 치료되는 것을 생체 내에서도 확인할 수 있었으며, EBV-유래 에피솜백터를 이용한 유전공학적 조제 K-세포는 제1형 당뇨병의 치료를 위한 대체베타세포로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구를 위해 K-세포를 기증해 준 Dr. Hanahan (University of California, San Francisco) 교수께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Levine F, Leibowitz G: *Towards gene therapy of diabetes mellitus. Mol Med Today* 5:165-71, 1999
- Morral N: *Gene therapy for type 1 diabetes. New approaches. Minerva Med* 95:93-104, 2004
- Yoon JW, Jun HS: *Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. Trends Mol Med* 8:62-8, 2002
- Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, Martin S, Carroll R, Chan SJ: *The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. Diabetes Metab* 22:94-104, 1996
- Tang SC, Sambanis A: *Development of genetically engineered human intestinal cells for regulated insulin secretion using rAAV-mediated gene transfer. Biochem Biophys Res Commun* 303:645-52, 2003
- Nett PC, Sollinger HW, Alam T: *Hepatic insulin gene therapy in insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Transplant* 3:1197-203, 2003
- Stewart C, Taylor NA, Green IC, Docherty K, Bailey CJ: *Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. J Endocrinol* 142:339-43, 1994
- 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
- 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
- Corbett JA: *K cells: a novel target for insulin gene therapy for the prevention of diabetes. Trends Endocrinol Metab* 12:140-2, 2001
- Min KA, Oh ST, Yoon KH, Kim CK, Lee SK: *Prolonged gene expression in primary porcine pancreatic cells using an Epstein-Barr virus-based episomal vector. Biochem Biophys Res Commun* 305:108-15, 2003
- Son JK, Oh ST, Cho SK, Yoon KH, Lee SK: *Mechanism of prolonged gene expression by Epstein-Barr virus-based plasmid in porcine cells. Xenotransplantation* 13:560-5, 2006
- Mizuguchi H, Hosono T, Hayakawa T: *Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. FEBS Lett* 472:173-8, 2000
- 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
- Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G: *Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. Diabetologia* 49:2948-58, 2006

16. Zhang Y, Yao L, Shen K, Xu M, Zhou P, Yang W, Liu X, Qin X: *Genetically engineered K cells provide sufficient insulin to correct hyperglycemia in a nude murine model. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 40:149-57, 2008*
17. Han J, Lee HH, Kwon H, Shin S, Yoon JW, Jun HS: *Engineered enteroendocrine cells secrete insulin in response to glucose and reverse hyperglycemia in diabetic mice. Mol Ther 15:1195-202, 2007*