

EBV-유래 에피솜 벡터를 이용한 유전공학적으로 제조된 K-세포에서 포도당농도 의존적인 인슐린 분비

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 성모자애병원¹, 면역생물학연구소², 분자유전학교실³

김주희[†]·문성대^{1,†}·고승현·안유배·송기호·임향숙³·이숙경²·유순집·손현식
윤건호·차봉연·손호영·김성주³·한제호¹

Glucose-dependent Insulin Secretion from Genetically Engineered K-cells
Using EBV-based Episomal Vector

Ju-Hee Kim[†], Sung-Dae Moon^{1,†}, Seung-Hyun Ko, Yu-Bai Ahn, Ki-Ho Song, Hyang-Sook Lim³,
Sook-Kyung Lee², Soon-Jip Yoo, Hyun-Shik Son, Kun-Ho Yoon, Bong-Yun Cha,
Ho-Young Son, Sung-Joo Kim Yoon³, Je-Ho Han¹

Department of Internal Medicine, Our Lady of Mercy Hospital¹, The Catholic University of Korea;
Research Institute of Immunobiology² and Research Institute of Molecular Genetics³, The Catholic University of Korea

- Abstract -

Background: Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease resulting in destruction of the pancreatic beta cells. Insulin gene therapy for these patients has been vigorously researched. The strategy for achieving glucose-dependent insulin secretion in gene therapy relies on glucose-responsive transcription of insulin mRNA and the constitutive secretory pathway of target non-beta cells. We observed that genetically engineered K-cells using Epstein-Barr virus (EBV)-based episomal vector can produce glucose-regulated insulin production.

Methods: Green fluorescent protein (GFP) or rat-preproinsulin (PPI) expression cassette transcriptionally controlled by the promoter of glucose dependent insulinotropic peptide (GIPP) is fused to pCEP4 containing the origin of replication (oriP) and Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). CMV promoter was replaced by subcloning the GIPP into pCEP4 to generate pGIPP/CEP4. Two recombinant EBV-based episomal vectors, pGIPP/GFP/CEP4 and pGIPP/PPI/CEP4, were constructed. pGIPP/GFP/CEP4 and pGIPP/PPI/CEP4 containing K-cell specific GIPP were co-transfected into STC-1. K-cell was isolated from the clonal expansion of the fluorescent cells selected by hygromycin treatment in STC-1, and were analyzed for the expression of glucokinase (GK) or transcription factors involved in pancreas development. K-cells concurrently transfected with pGIPP/PPI/CEP4 and pGIPP/GFP/CEP4 were analyzed for the transcripts of PPI by RT-PCR, and for the glucose dependent insulin expression by immunocytochemistry or insulin assay using ultra-sensitive rat-specific insulin ELISA kit.

Result: STC-1 was stably-transfected with pGIPP/GFP/CEP4 along with pGIPP/PPI/CEP4. Genetically selected fluorescent K-cells expressed GK and transcription factors involved in pancreas development. And K-cells transfected with pGIPP/PPI/CEP4 contained detectable levels of PPI transcripts and showed glucose-dependent immunoreactive insulin secretion.

Conclusion: We identified genetically engineered K-cells which exert a glucose-dependent insulin expression using EBV-based episomal vector. The similarities between K-cells and pancreatic beta cells support that K-cells may make effective and ideal targeting cells for insulin gene therapy or alternative cell therapy. (J Kor Diabetes Assoc 31:9~21, 2007)

Key Words: Epstein-Barr virus-based episomal vector, GIP promoter, Insulin gene therapy, K-cell,

접수일자: 2006년 11월 18일, 통과일자: 2006년 12월 18일, 책임저자: 한제호, 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 내과

* 본 연구는 2003년 가톨릭대학교 내과학교실 내과연구재단연구비 및 2005년 대한당뇨병학회 제1회 당뇨병 특별연구비 지원으로 이루어졌음.

†본 연구에 동일하게 기여함.

서 론

췌장 베타세포의 선택적인 파괴에 의한 인슐린 결핍이 원인인 제1형 당뇨병에서 정상 혈당을 유지하기 위한 방법으로 식이요법, 경구혈당강하제, 다환인슐린요법 등이 이용되고 있으나, 생리적인 혈중 인슐린농도를 유지하기에는 한계가 있다. 그 동안 근본적인 당뇨병 치료를 위해 췌도이식과 함께 유전공학 기술을 이용한 인슐린 유전자 치료법이 시도되어 왔다. 인슐린 유전자 치료법은 자가면역기전을 극복하기 위해 비베타세포인 표적세포에 인슐린 유전자를 트랜스펙션시켜 인슐린을 분비하게 하는 방법이다.

성공적인 인슐린 유전자 치료를 위해서는 여러 가지 해결되어야 할 과제들이 있다. 그 중에서도 췌장 베타세포를 대체할 수 있는 비베타세포의 발견이 무엇보다 중요하다^{1,2)}. 비베타세포는 도입된 인슐린 유전자로부터 인슐린이 생성되고 분비되는 일련의 생리학적 기전이 췌장 베타세포와 유사 혹은 동일하여야 하며, 세포바깥의 미세한 혈당변화에 예민하게 반응하여야 할 뿐만 아니라 세포 속으로 들어온 포도당을 해당할 수 있어야 한다. 또한, 전구인슐린을 인슐린으로 전환시키는 엔도펩티다아제를 분비하여야 하며, 저장된 인슐린을 세포 밖으로 방출시키는 세포외유출 기능도 있어야 한다^{1,3,4)}. 즉, 목적유전자를 표적세포에 트랜스펙션만 시켜주면 그 치료효과가 나타나는 타 질환의 유전자 치료법과는 달리 비베타세포를 이용하여야 하는 인슐린 유전자 치료법은 표적세포의 선택이 매우 중요하다.

지금까지 인슐린 유전자 치료를 위해 표적세포로 이용해진 비베타세포로는 간세포, 뇌하수체세포 등이 있다^{5,6)}. 간세포는 혈당감지 작용을 하는 글루코키나아제를 발현하지만 엔도펩티다아제를 발현하지 않기 때문에 생성된 비활성 전구인슐린을 활성인슐린으로 전환시키는 기능이 없다. 또한 세포외유출 기능이 없기 때문에 간세포를 이용한 인슐린 유전자 치료의 결과는 만족스럽지 못하였다^{5,7-9)}. 반면 뇌하수체세포는 엔도펩티다아제를 발현하고 세포외유출 기능을 갖추고 있지만 혈당감지작용이 없으며, 인슐린 분비가 뇌하수체 세포에서 분비되는 스테로이드 호르몬에 의해 억제되기 때문에 인슐린 유전자 치료를 위한 완벽한 표적세포로 이용되지 못하였다^{6,10,11)}.

최근 인슐린 유전자 치료를 위한 이상적인 표적세포로 소개된 K-세포는 거대한 내분비기관으로써 위, 십이지장, 공장에 널리 분포하고 있으면서 glucose-dependent insulinotrophic peptide (GIP)를 분비하여 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 돕는 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁸⁾. 생쥐의 장종양에서 분리된 K-세포가 인슐린 유전자치료의 이상적인 표적세포로 소개된 이유는 글루코키나아제를 발현하여 세포내로 들어온 포도당을 감지하는 작용이 있으며, 1형과 2형의 엔도펩티다아제를 분비하는 것은 물론 세포외유출 기능도 있

기 때문이다^{1,4,8,14,19,20)}.

인슐린 유전자 치료의 성공을 위한 또 다른 요소로는 인슐린 유전자를 표적세포로 전달해 주는 적절한 유전자 전달계가 필요하다. 현재까지는 인슐린 유전자를 표적세포에 전달하기 위해 아데노바이러스를 주로 사용해 왔으나 바이러스 단백질에 대한 면역반응 때문에 인체에 적용하기에는 유해할 뿐만 아니라 표적세포에 전달된 인슐린 유전자의 발현이 짧은 단점이 있었다.

최근 인체에 비교적 안전할 뿐만 아니라 비교적 큰 크기의 유전자도입이 가능하면서 지속적인 유전자의 발현이 가능한 Epstein-Barr virus (EBV)-based episomal 벡터가 사용되고 있다²¹⁻²³⁾. 따라서 본 연구자들은 GIP 프로모터에 의해 Green fluorescent protein (GFP) 및 전구인슐린의 전사가 조절되도록 유전자카세트를 제작하여 EBV-유래 에피솜 벡터에 도입한 후 이질성의 장내분비세포인 STC-1 세포에 트랜스펙션시켜서 순수한 K-세포를 분리하고자 하였으며 분리된 장 K-세포에서는 포도당 농도에 따른 인슐린 분비가 이루어지는지를 관찰해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 쥐 췌장에서부터 췌도 분리

Sprague-Dawley 쥐의 췌관으로 collagenase (1 mg/mL, Roche, Karlsruhe, Germany)를 첨가한 Medium 199 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 7 mL를 주입하고 부푼 췌장을 떼어 37°C에서 25분간 소화시켰다. 이를 500 µm mesh에 통과시키고 ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 이용하여 원심분리를 하였고 중간층의 세포를 취하였다.

2. RNA 및 genomic DNA의 분리

RNA 분리를 위해 쥐의 췌도 혹은 K-세포를 Trizol reagent (Invitrogen)에 녹이고 chloroform을 첨가하여 12,000 g에서 15분 동안 원심분리를 한 후 상층액에 isopropyl alcohol을 섞어 RNA를 침전시켰다. RNA 침전물을 diethyl pyrocarbonate를 처리한 증류수에 녹이고 분광광도계로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도 및 순도를 측정하였다. DNA 분리를 위해서는 쥐의 비장 1 g을 갈아서 1x SSCE (15 mM NaCl, 1 mM sodium citrate, 10mM EDTA) 19 mL, 20% SDS 1 mL, proteinase K (25 mg/mL) 15 µL에 녹이고, 37°C에서 하룻밤 동안 흔들어서 있었다. Phenol: chloroform: isoamylalcohol = 25 : 24 : 1을 이용하여 DNA 층을 분리하고 2 M sodium acetate (pH 4.8)와 ethanol로 침전시킨 후 살균된 3차 증류수에 녹였다. 분리된 DNA는 분광광도계에서 RNA와 같은 방법으로 흡

광도를 측정하여 농도 및 순도를 측정하였다.

3. cDNA 합성 및 polymerase chain reaction (PCR)

추출한 RNA로부터 first strand cDNA 합성은 SuperScriptTM II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen), RNaseOUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)와 Random 프라이머 (Invitrogen)를 사용하여 SuperScriptTM II RNase H- Reverse Transcriptase의 설명서를 따라 진행하였다. GIP 프로모터는 쥐의 genomic DNA로부터 PCR로 증폭하여 얻었다. 프라이머 염기서열은 forward; (5')-GGT ACC ATC TCT CCA GTC CCT TCC TC-(3')와 reverse; (5')-GAA TTC TTG CTT CAA GAC CCT GTG-(3')이며¹³⁾, 증폭반응은 섭씨 94도에서 30초, 58도에서 30초, 72도에서 1분 30초로 모두 35회 반복하였다. 그리고 전전구인슐린 유전자는 쥐의 체도에서 분리한 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 PCR로 증폭하였다. Forward 프라이머 염기서열은 (5')-GCT ACA ATC ATA GAC CAT-(3')이고, reverse 프라이머 염기서열은 (5')-GGC GGG GAG TGG TGG ACT C-(3')이며²⁴⁾, 증폭반응은 섭씨 94도에서 30초, 50도에서 45초, 72도에서

30초로 모두 35회 반복하였다. 그리고 K-세포와 쥐의 베타 세포로부터 췌장의 발달과 베타세포의 기능에 관여하는 것으로 알려진 전사인자들의 발현을 조사하기 위해서는 Kohtaro 등^{25,26)}의 방법에 따라 프라이머쌍들을 제작하였으며 증폭반응은 섭씨 94도에서 30초, 50도에서 45초, 72도에서 30초로 모두 35회 반복하였다.

4. GIP 프로모터와 전전구인슐린 유전자의 부차클로닝

PCR로 증폭하여 얻은 GIP 프로모터 (GIPP)와 전전구인슐린 (PPI) 유전자를 우선 pCR2.1 TOPO TA 벡터에 삽입시켜서 각각의 pGIPP/CR2.1과 pPPI/CR2.1 벡터를 클로닝하였으며, 이는 다시 42℃에서 30초간 열충격을 주어 Top10 세포에 형질전환하였다. 이 과정은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)를 이용하여 설명서에 따라 실험을 하였다. 벡터 내로 삽입된 PCR 산물들의 방향은 GIPP 혹은 PPI 유전자와 염기서열이 상보적인 forward 프라이머와 벡터의 염기서열에 상보적인 M13 reverse 프라이머를 이용하여 각각 PCR로 증폭하여 확인하였으며 증폭반응은 앞에서 설명한 방법을 반복하였다. 방향이 확인된 집락들은 염기서열 확인 후, ampicillin 50 µg/mL이 첨가된 LB 배지에서 키운 후 20% 농도로 glycerol을 첨가하여 -70℃에 저장해 두었다.

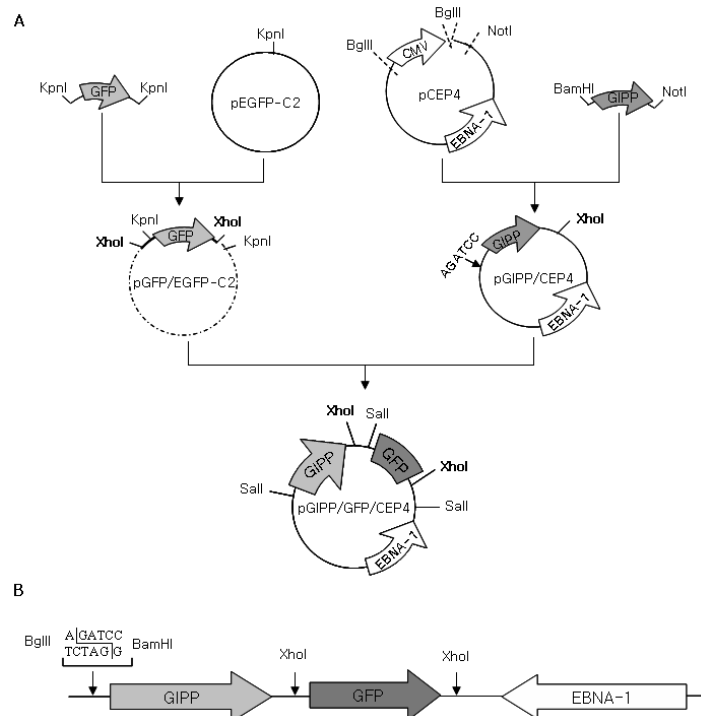


Fig. 1. Schematic representation of the cloning steps employed to produce the pGIPP/GFP/CEP4 vector. (A) EBV-based plasmid (pCEP4) vector containing the EBV nuclear antigen 1 (EBNA-1) and the origin of replication (oriP). CMV promoter excised as BglII/NotI was replaced by rat GIP promoter (GIPP) which was digested with BamHI and NotI from pGIPP/CR2.1. Then, GFP fragment excised with XhoI from pGFP/EGFP-C2 was fused to the XhoI restriction site of pGIPP/CEP4 to generate pGIPP/GFP/CEP4. (B) Linear structure of the pGIPP/GFP/CEP4 showing the BglII/BamHI cloning site.

5. 플라스미드 벡터의 제작

1) pGIPP/GFP/CEP4

GFP 유전자는 이숙경 박사 (가톨릭의과연구소 면역생물학연구실)로부터 기증받은 pEBVGFP 벡터²²⁾를 KpnI으로 절단하여 얻었으며, 이 유전자를 pEGFP-C2 (Clontech, Mountain View, CA) 벡터의 KpnI 자리에 삽입하였다. 이 때 pEGFP-C2 벡터는 KpnI으로 절단 후, SAP (Alkaline Phosphatase, shrimp, Roche)으로 5' 말단을 탈인산화함으로써 자가연결을 막았다. 이렇게 제작된 pGFP/EGFP-C2 벡터를 DH5a 내로 형질전환하였으며 집락을 선별하여 저장하였다. 다음은 pCEP4 (Invitrogen) 벡터에서 BglIII와 NotI에 의해 제거된 CMV 프로모터 자리에 pGIPP/CR2.1 벡터를 BamHI과 NotI으로 절단하여 얻은 GIPP 절편을 연결하여 pGIPP/CEP4 벡터를 제작하였다 (Fig. 1A의 오른쪽 팔). 이 때 pCEP4 벡터의 BglIII 자리는 pGIPP/CR2.1로부터 얻은 절편의 BamHI 자리와 상보적으로 연결된다 (Fig. 1B). pGIPP/CEP4 벡터를 다시 DH5a에 형질전환하여 얻은 집락들로부터 플라스미드 DNA를 추출하였으며 제한효소로 소화하여 삽입된 유전자를 확인하였다 (자료 생략). 그런 다음 pGIPP/CEP4 벡터의 XhoI 자리에, 앞서 제작한 pGFP/EGFP-C2 벡터를 XhoI으로 절단하여 얻은 GFP 절편을 삽입하여 pGIPP/GFP/CEP4 벡터를 완성하였다 (Fig. 1A). 완성된 벡터는 다시 DH5-a에 형질전환하였고 선별된 집락은 앞에서 설명한 바와 같이 -70℃에 저장하고 염기서열 분석으로 확인하였다.

2) pGIPP/PPI/CEP4

pPPI/CR2.1로부터 증폭된 PPI 유전자를 pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA)의 BamHI과 XhoI 자리 사이에 삽입하여 pPPI/bluescript II를 제작하였다. 이 때 PPI 유전자의 증폭에 사용된 forward 프라이머 염기서열 (5'-GCG CGG ATC CGC CAT GGC CCT GTG GAT-3')은 개시 코돈을 포함하는 인슐린 유전자 14 염기에 Kozak 염기서열과 클로닝을 위해 BamHI 염기서열을 부가하였고, reverse 프라이머 염기서열 (5'-GCG CCT CGA GTC AGT TGC AGT AGT T-3')은 종결코돈을 포함하는 14 염기에 XhoI 염기서열을 부가시켜 제작하였다. 두 프라이머의 5' 말단에는 GCGC를 넣어 줌으로써 PCR의 정확도를 증가시켰다. 증폭반응은 섭씨 94도에서 30초, 55도에서 30초, 72도에서 30초로 모두 30회 반복하였다. 제작이 완성된 pPPI/bluescript II 벡터는 DH5-a로 형질전환한 후 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 확인된 집락으로부터 분리된 플라스미드 DNA는 NotI과 XhoI으로 절단하였고 여기서 얻은 절편을 앞에서 제작해 둔 pGIPP/CEP4 벡터의 NotI과 XhoI 자리에 연결하여 pGIPP/PPI/CEP4 벡터를 완성하였다 (Fig. 2A, B). 완

성된 벡터는 동일한 방법으로 DH5-a에 형질전환하였고 염기서열 분석으로 확인하였다.

3) pPPI/GEX

pPPI/Bluscript II를 BamHI과 XhoI으로 소화하여 얻은 PPI 절편을 pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL)의 BamHI과 XhoI 제한효소 자리에 삽입하여 pPPI/GEX 벡터를 제작하였다 (Fig. 2A, C). 이렇게 제작된 벡터는 다시 동일한 방법으로 DH5-a에 형질전환하였고 염기서열 분석으로 확인하였다.

6. 염기서열 분석

완성된 벡터들의 염기서열 분석은 ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 PCR 반응을 시키고 ABI3100 Prism automatic sequencer (Applied Biosystems)로 염기서열을 읽었다 (분석자료 생략).

7. 대장균에서 인슐린의 발현유도 및 Western blot

인슐린의 발현을 확인하기 위하여 pPPI/GEX를 BL21 (DE3) [F⁻ ompT hsdSb (rB-mB-) gal dcm] 균주로 도입하였다. 이것을 50 µg/mL 농도의 ampicillin을 포함하는 LB 배지 5 mL에서 12시간 배양한 후 18 mL의 LB배지로 희석하여 600 nm 파장에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 37℃에서 더 배양하였다. 인슐린의 발현을 유도하기 위하여 1 mM의 isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG; Amresco Inc., Solon, Ohio)를 넣은 다음 2시간 더 키운 후, 2500 rpm으로 25분간 원심분리하여 대장균을 수거하였다. 이렇게 모아진 대장균을 1 µg/mL의 aprotinin과 leupeptin (Amresco Inc.)을 포함하고 있는 buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM NaCl) 1 mL에 용해하였으며 15분간 얼음에 보관하였다가 초음파로 완전히 용해하였다. 이것을 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 Glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences)와 반응시킴으로써 GST-인슐린만을 분리하였다. 이렇게 분리한 단백질을 15% SDS polyacrylamide 겔에 전개시킨 후 PVDF membrane으로 옮기고 1차 항체로 GST 항체 (1:1000, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) 및 다클론 쥐인슐린 항체 (1:400, Santa Cruz biotechnology)를 사용하였으며, 2차 항체로 anti-mouse HRP (horseradish peroxidase) (1:5000, Amersham Biosciences) 및 anti-rabbit HRP (1:5000, Amersham Biosciences)로 Western blot을 시행하여 발현을 관찰하였다.

8. 세포배양 및 트랜스펙션

모든 세포는 5%의 CO₂, 37℃의 세포배양기에서 배양하

였으며 배지는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM에서 계대배양하였다. STC-1 세포주는 Dr. Hanahan (University of California, San Francisco)으로부터 기증받았다. STC-1 세포는 100 mm 배양접시에서 계대배양하였으며 90% 정도로 세포가 자랐을 때 트랜스펙션을 시행하였다. 즉, 배양접시에 키워둔 STC-1 세포를 PBS로 씻은 후 혈청이 없는 DMEM 1.5 mL에 lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) 60 μ L를 희석하고 또 다른 tube에 pGIPP/GFP/CEP4 12 μ g과 pGIPP/PPI/CEP4 12 μ g을 혈청이 없는 DMEM 1.5 mL에 녹인 후, 이 두 용액을 섞어서 20분간 두어 만들어진 DNA-Lipofectamin™ 2000 복합체 3 mL를 STC-1 배양접시에 넣어주고 혈청을 포함하지 않은 DMEM 2 mL를 첨가하여 앞뒤로 흔들어 주었다. 5시간 후 20% FBS, 2% penicillin-streptomycin을 함유하고 있는 DMEM 5 mL를 첨가하였다. 다음날 PBS로 DNA-Lipofectamin™ 2000 복합체를 씻은 후 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 든 DMEM으로 갈아주었다.

9. STC-1 세포에서 순수 K-세포의 분리

pGIPP/GFP/CEP4와 pGIPP/PPI/CEP4를 STC-1 세포 안으로 동시에 트랜스펙션시키고 48시간 후 hygromycin 200 μ

L/mL를 포함하는 배양액에서 계대배양하였으며, hygromycin의 농도를 서서히 높여 최종 농도는 600 μ g/mL가 되게 하였다. 3주 후, 살아남은 세포가 큰 클론을 형성하면, 형광을 띄는 클론만을 pipette으로 24 well plate로 옮기고 각 클론들을 계대배양하였다. 형광현미경하에서 형광을 발하는 세포들만 모인 세포주를 순수한 K-세포로 간주하였다. 형광을 발하는 세포주를 중에서 RT-PCR로 PPI transcripts를 발현하는 세포주를 선별하였고 이 세포주를 pGIPP/GFP/CEP4와 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 동시에 트랜스펙션된 K-세포로 간주하였다.

10. Western blot에 의한 글루코키나아제의 발현 분석

100 mm 접시에서 계대배양된 K-세포를 PBS로 씻은 후 lysis buffer 200 μ L에 용해시키고 13,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하였다. 단백질을 포함한 상층액을 새 튜브로 옮기고 Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 Bradford 법으로 단백질의 농도를 측정하였다. 단백질 20 μ g을 SDS polyacrylamide 겔에 전개시킨 후 PVDF membrane으로 옮기고 글루코키나아제의 발현을 확인하기 위하여, 일차항체로 쥐의 글루코키나아제에 대한 다클론 항체 (1:500, Santa Cruz biotechnology)

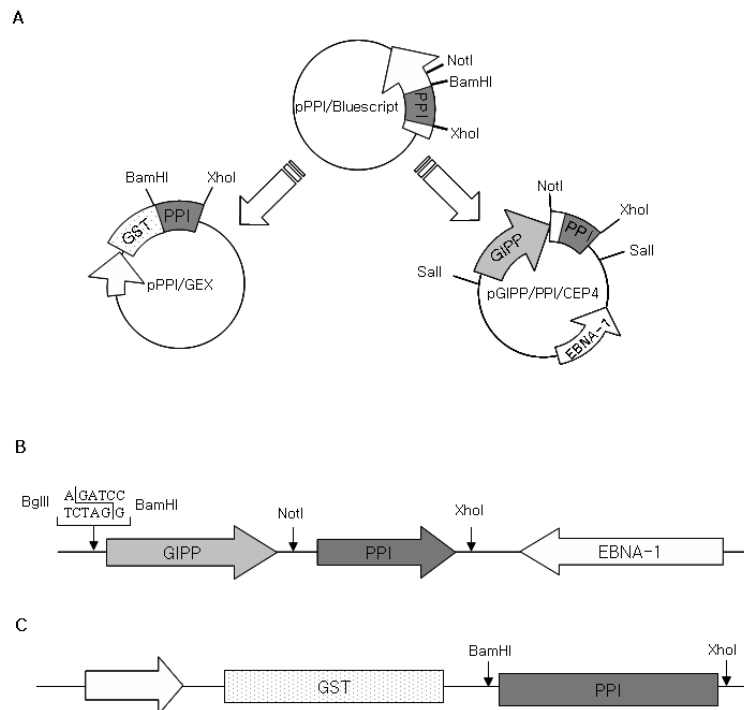


Fig. 2. Schematic representation for the construction of insulin gene expression cassettes.

(A) Rat preproinsulin (PPI) cDNA amplified by the primer set including BamHI and XhoI site was incorporated into the pBluescript or pGEX vector. From the pPPI/Bluescript vector, PPI was excised as a NotI/XhoI and purified by agarose gel electrophoresis. Then PPI fragment was fused to the NotI/XhoI restriction site of the pGIPP/CEP4 vector to generate pGIPP/PPI/CEP4. (B), (C) Linear structure of the pGIPP/PPI/CEP4 and pPPI/GEX vector, respectively.

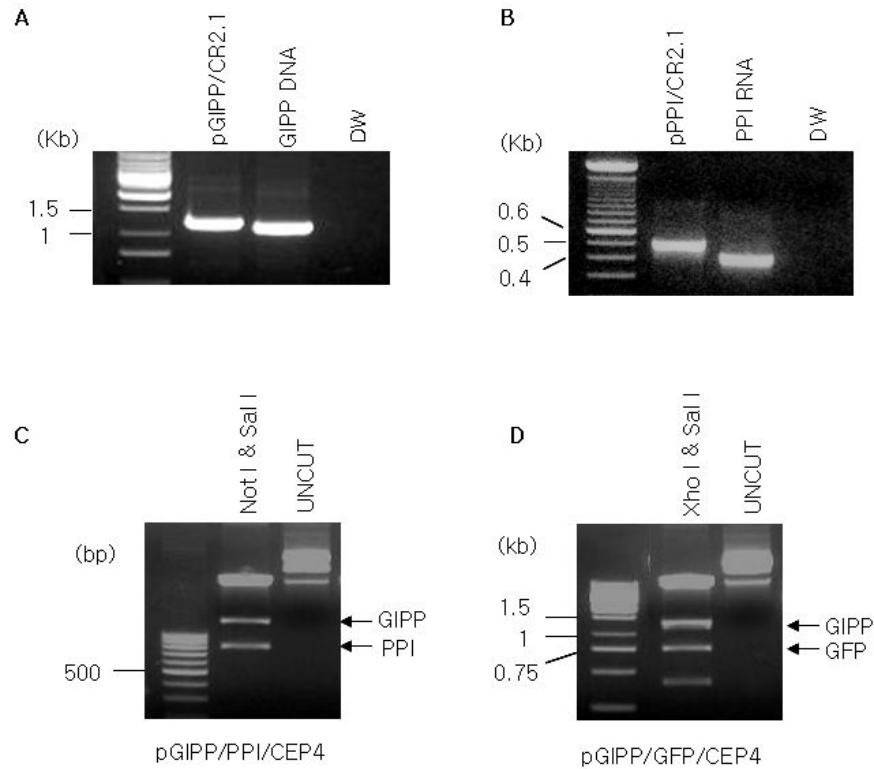


Fig. 3. Confirmation of cloned vector.

A, PCR analysis of rat GIPP from pGIPP/CR2.1 vector; B, PCR analysis of rat PPI from pPPI/CR2.1 vector. GIPP or PPI gene is shown well incorporated into pCR2.1 TOPO Vector; C, pGIPP/PPI/CEP4 digested with NotI and SalI; D, Cloned expression vector of pGIPP/GFP/CEP4 digested with XhoI and SalI respectively. GIPP or PPI, and GIPP or GFP were digested well, and the nucleotide sequences were confirmed by sequence analysis (data not shown).

를 5% skim milk, 0.05% Tween-20을 포함하는 TBS 용액에 희석하여 반응하였으며, 이차항체로는 anti-rabbit HRP를 사용하였다. 그 후 membrane을 electrochemiluminescence법을 이용하여 ECL Western blotting detection reagent (Amersham Biosciences)로 1분간 반응시킨 후 X선 필름에 감광시켜 글루코키아나제의 발현양을 조사하였다. 그 후 membrane은 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, 100 mM 2-Mercaptoethanol을 포함하는 용액에서 30분간 70°C로 유지해 줌으로써 모든 항체를 떨어뜨렸고, 이것을 다시 항- β -actin 단일항체 (1:4000, Sigma-Aldrich)로 반응시키고 이차항체로 anti-mouse HRP와 반응시킴으로써 β -actin 단백질의 발현양을 확인하여 대조군으로 이용하였다.

11. 인슐린의 발현분석

1) 전전구인슐린 분석을 위한 RT-PCR

pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 트랜스펙션된 K-세포를 60 mm 배양접시에서 포도당이 5 mM인 DMEM에서 36시간 배양한 후, 배지를 각각 5, 10, 15, 25 mM glucose가 함유된 DMEM으로 교환해 주었다. 2시간 뒤에 RNA를 뽑아

cDNA를 합성한 후 앞서 설명한 전전구인슐린 프라이머로 25 cycle의 PCR을 시행하였다.

2) 인슐린 발현을 위한 면역세포화학염색

6 well 배양용기에 coverslip을 넣고 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 트랜스펙션된 K-세포를 분주하여 가득 자란 것이 확인되면 5 mM 농도의 포도당이 함유된 DMEM에서 40시간 배양한 후 각 well에 5, 10, 15, 25 mM의 포도당이 함유된 DMEM으로 교환해 주고 2시간 후 PBS로 3회 세척한 후 채빨리 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하였다. 이어서 0.2% Triton X-100 (A.G. Scientific, San Diego, CA)으로 세포막을 permeation시킨 후 autofluorescence를 없애기 위해 1 mg/dL의 NaBH₄로 10분간 배양하였다. 비특이 반응을 피하기 위해 donkey serum으로 처리하였고 1차 항체인 polyclonal guinea pig anti-insulin (Zymed, San Francisco, CA)을 4°C에서 하룻밤 동안 처리한 후 rhodamin-phalloidin 형광물질을 표지한 anti-guinea pig Rhodamin (Vector Laboratory, Burlingame, CA)으로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그리고 일부 세포는

DAPI (4',6'-diamidino-2phenylindole)로 핵을 대조염색한 후에 동일초점 현미경 (confocal microscopy)으로 관찰하였다.

3) 인슐린의 농도 측정

pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 트랜스펙션된 K-세포주를 12 well plate에 2.5×10^5 cell/well을 분주하고 다음 날 5 mM 농도의 포도당이 포함된 DMEM으로 교체하여 36시간 둔 후, 인슐린 분비를 측정하였다. 먼저 세포를 KRB (Krebs Ringer Bicarbonate) Buffer (119 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 2.54 mM CaCl_2 , 1.19 mM MgCl_2 , 1.19 mM KH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 0.1% BSA)로 씻은 후 KRB buffer로 37°C, 0.5% CO_2 배양기에서 4시간 배양하였다. 포도당 5, 10, 15, 25 mM을 함유한 KRB buffer로 교체하고 2시간 배양 후¹²⁾, 짧게 원심분리하여 상층액만을 취함으로써 세포를 완전히 제거하였다. 그리고 Rat Insulin ELISA Kit, Ultra-sensitive (Alpco, Windham, NH)를 사용하여 취해진 상층액 내의 인슐린의 농도를 측정하였다.

12. 통계처리

인슐린 농도 측정은 3종의 3회 반복 실험을 통해 얻었으며, 그 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였다. 두 군 사이에 각각의 포도당농도에 따른 인슐린 농도의 비교는 Mann-whitney 검정을 사용하였다.

결 과

1. GIP 프로모터와 전전구인슐린 유전자의 확립

GIP 프로모터는 쥐의 genomic DNA로부터 PCR로 증폭하여 얻었고 전전구인슐린 유전자는 쥐의 췌장에서 분리한 mRNA로부터 first strand cDNA를 합성한 후 PCR로 증폭하여 얻었다. 이들 각각의 유전자들은 pCR2.1 벡터 속으로 잘 삽입되었으며 완성된 벡터는 TOP10 세포 내로 형질전환이 잘 되었다. 각각의 유전자가 바른 방향으로 삽입된 벡터만을 찾기 위하여 흰색을 띄는 집락들은 벡터의 염기서열에 상보적인 M13 reverse 프라이머와 인슐린 혹은 GIP 프로모터의 염기서열에 상보적인 forward 프라이머를 이용하여 각각 PCR 반응을 시켰다. 유전자가 원하는 방향으로 삽입된 집락의 PCR 산물은 벡터 자신의 염기서열이 포함되어 원래의 유전자 크기보다 90 bp 정도 크게 관찰되었으며 확인된 집락은 염기서열 분석으로 확인하였다 (Fig. 3A, B).

2. 플라스미드 벡터의 제작

pCEP4를 토대로 두 개의 플라스미드 DNA가 제작되었다. CMV 프로모터가 제거된 자리에 GIP 유전자의 프로모터가 삽입됨으로써 포도당 농도에 반응하여 전전구인슐린 혹은 GFP 유전자가 발현되도록 각각 고안하였으며 여기서 GIP 프로모터는 mRNA 앞 1153 bp와 5'UTR 7 bp를 포함한다¹³⁾. 완성된 pGIPP/PPI/CEP4는 NotI와 SalI으로 소화시킴으로써 벡터 안으로 삽입된 GIPP와 PPI유전자를 확인하였다. GIPP는 1324 bp의 절편에 포함되며, PPI는 775 bp의 절편에

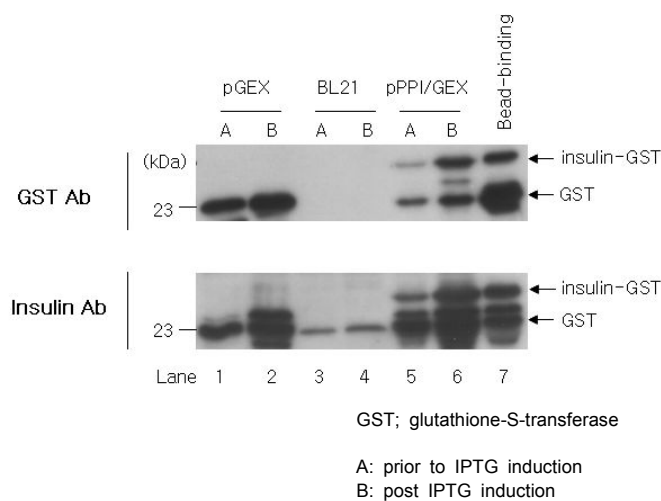


Fig. 4. Expression of insulin from pPPI/GEX vector in Escherichia coli.

Western blot analysis of insulin from Escherichia coli expressing GST only (lanes 1, 2), negative control (lanes 3, 4), GST-tagged insulin (lanes 5, 6), and bead binding GST-tagged insulin (lane 7) were separated on 15% (w/v) SDS PAGE. Arrows indicate the induced GST only (lane 1-2) and GST-tagged insulin (lane 5-7). GST or rat-insulin antibody recognized a GST or GST-tagged insulin. A, lysates prior to IPTG induction; B, lysates after IPTG induction.

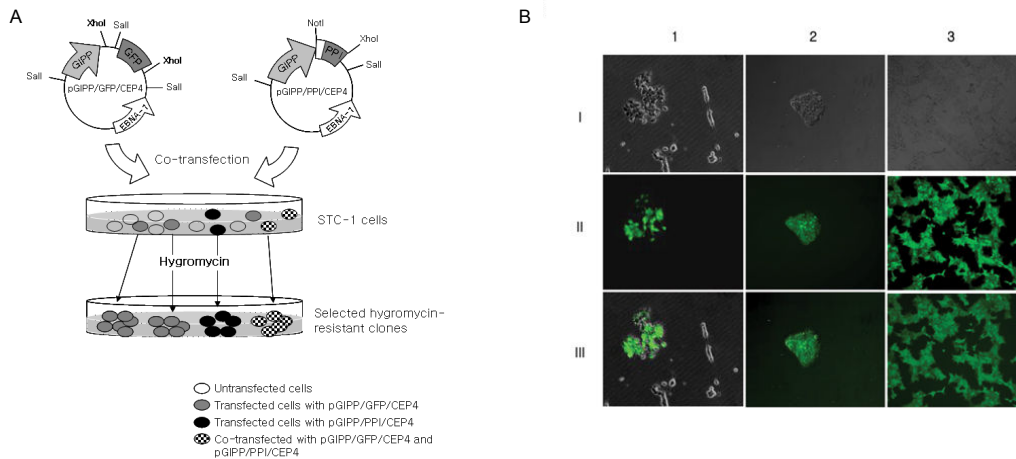


Fig. 5. Isolation of K-cell from STC-1 cell line.

A, Schematic diagram of the isolation steps employed to separation from the K-cells; B, Fluorescence microscopic findings of the isolated K-cells from STC-1. Phase-contrast (I), fluorescence (II), and merge (III) micrographs of the STC-1 cells co-transfected with pGIPP/GFP/CEP4 and pGIPP/PPI/CEP4. Transfected cells with pGIPP/GFP/CEP4 emit green fluorescence (1), transfected cells formed a clone (2), and continuously subcultured cells (K-cells) emit green fluorescence (3).

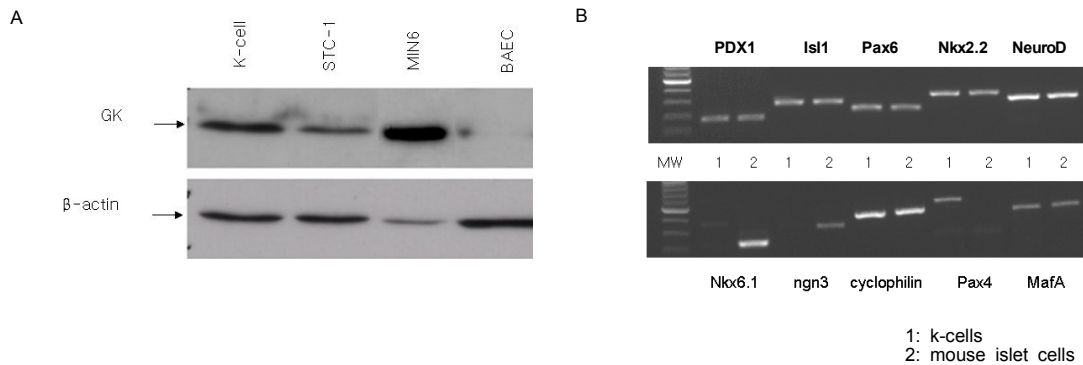


Fig. 6. Western blot analysis and RT-PCR analysis in K-cell.

A, Western blot analysis of glucokinase (GK) expression in K-cell and STC-1. Bovine aortic endothelial cell (BAEC) was used as a negative control and MIN6 was used as a positive control. More GK is expressed in K-cells than in STC-1, but not in BAEC; B, RT-PCR analysis of transcription factors related to pancreas development and β-cell functions represent K-cell is comparable to mouse islet cells. Nkx 6.1 and ngn3 were not expressed in K-cells. Pax4 was in K-cell but not in mouse islet cells. Lane MW: 2 ug 1-kb ladder; lane 1: k-cells; lane 2: mouse islet cells.

포함되어 관찰되고 있다 (Fig. 2A, 3C). pGIPP/GFP/CEP4는 XhoI과 SalI로 소화시켜 확인하였다. 즉, 1331 bp 절편이 GIPP를 포함하고 있으며, 768 bp 절편은 GFP를 포함하고 있다. GIPP 유전자와 GFP 유전자 사이의 XhoI과 SalI 절편은 26 bp로 겔에서 관찰되지 않았다 (Fig. 1A, 3D). 그 후, pPPI/GEX 벡터를 BL21 균주에 형질전환시켜서 인슐린의 발현을 유도한 후 세포를 용해하여 GST 및 다클론 쥐인슐린 항체로 Western blot을 시행함으로써 인슐린이 올바르게 발현되는지를 확인하였다. GST 항체로 Western blot을 시행한 결과 대조군인 pGEX에서 발현하는 GST보다 pPPI/GEX에서 더 큰 크기의 단백질 발현이 관찰되었으며, 이것은 인슐린과 GST의 융합단백질이 발현되기 때문이다.

여기서 BL21 균주는 엔도펩티다아제를 발현하지 않으므로 GST가 융합된 인슐린은 C-펩티드가 분할되지 않은 비활성 형태로 12 kD 위치에서 관찰되었다. 이것을 다시 인슐린 항체로 Western blot을 한 결과 융합된 단백질이 인슐린임을 확인하였다 (Fig. 4).

3. STC-1으로부터 순수한 K-세포의 분리

STC-1은 여러 종류의 장내분비세포가 섞여 있는 생쥐의 소장 종양세포에서 분리한 장내분비세포주이다²⁷⁾. 이 세포들 중에서 K-세포는 GIP를 발현하는 세포로 이들 혼합 장내분비세포에 GIP 프로모터와 GFP 융합유전자를 실은 벡터를 트랜스펙션시키면 K-세포 특이적인 GFP 발현을 나타

낸다¹²⁾. 따라서 pGIPP/GFP/CEP4 벡터와 pGIPP/PPI/CEP4 벡터를 STC-1 세포에 동시에 트랜스펙션시킨 후 hygromycin 200 μ L/mL를 포함하는 배양액에서 계대배양함으로써 트랜스펙션된 세포들만 일차적으로 선별하였다 (Fig. 5A). 여기서 살아남은 세포는 pGIPP/GFP/CEP4 벡터와 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 동시에 혹은 각각에 의해 트랜스펙션된 세포이다. 이 세포들이 자라서 클론을 형성하였을 때 형광을 발하는 클론을 피펫으로 따서 계대배양함으로써 GFP를 발현하는 순수한 K-세포를 분리하는데 성공하였다. 분리된 세포는 형광현미경하에서 관찰하였으며 모든 세포가 형광을 발하는 K-세포임을 확인하였다 (Fig. 5B).

4. 글루코키나아제 및 전사인자의 발현

순수하게 분리한 K-세포와 혼합 장내분비 세포주인 STC-1, 양성대조군으로 MIN6 세포, 그리고 음성대조군으로 BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cell)에서 글루코키나아제의 발현을 Western blot 법으로 확인한 결과, BAEC에서는 글루코키나아제의 발현을 볼 수 없었고, STC-1과

K-세포에서만 글루코키나아제가 발현되었으며 STC-1에서 보다 순수하게 분리한 K-세포 집단에서 더 많은 양의 글루코키나아제가 발현되는 것을 관찰함으로써 K-세포가 분리되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A). 또한, 췌장 베타세포의 발달에 관여하는 것으로 알려진 전사인자들의 발현을 RT-PCR법으로 확인한 결과 Nkx6.1과 ngn3를 제외한 여러 전사인자들이 베타세포뿐만 아니라 K-세포에서도 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, Pax4는 K-세포에서만 발현되는 것이 확인되었다 (Fig. 6B).

5. 전전구인슐린 mRNA 및 인슐린의 발현

STC-1 세포에 pGIPP/GFP/CEP4 및 pGIPP/PPI/CEP4 벡터를 동시에 트랜스펙션시킨 후 hygromycin에 의해 선별된 K-세포 클론들 중에서 전전구인슐린을 발현하는 세포 클론을 찾을 수 있었으며 (Fig. 7A), 이 클론을 계대배양하여 포도당이 첨가되지 않은 DMEM에서 자라게 한 후 5, 10, 15, 25 mM의 glucose를 함유한 DMEM으로 교환해 주고 2 시간 후 세포를 용해시켜 전전구인슐린에 대한 RT-PCR을

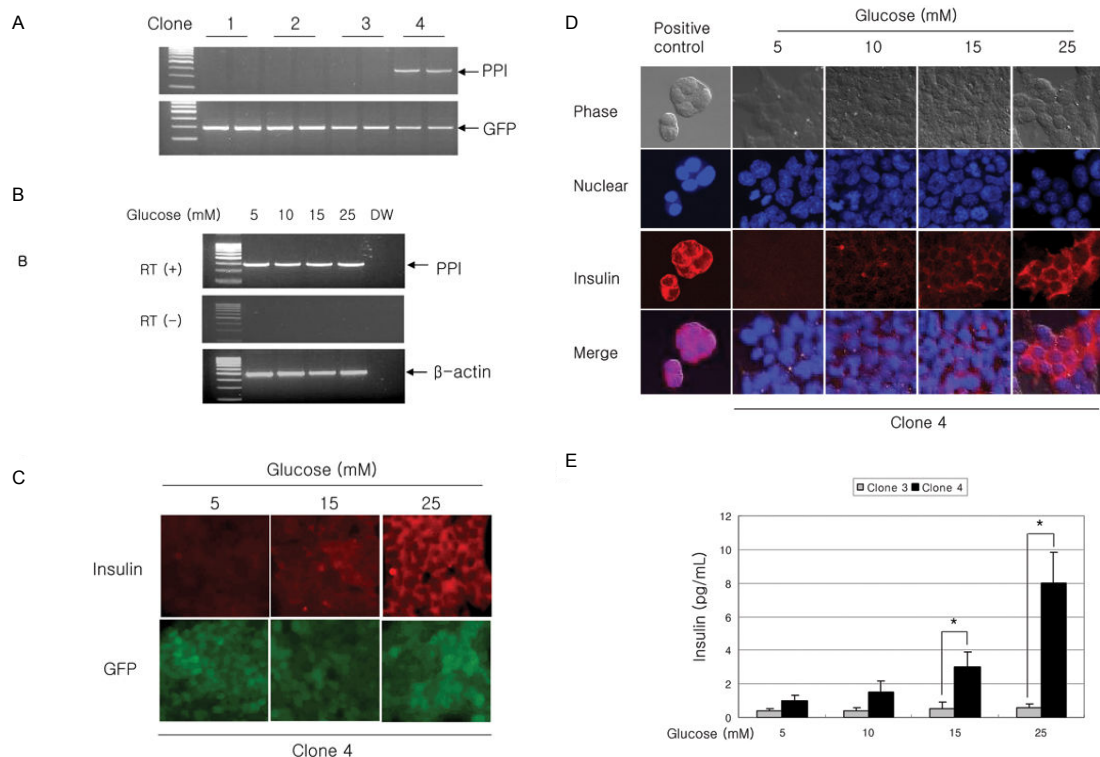


Fig. 7. Insulin secretion analysis from K-cells.

A, RT-PCR for the selection of rat-preproinsulin mRNA in four different clones. K-cells transfected with pGIPP/PPI/CEP4 (in clone 4 only) expressed preproinsulin mRNA; B, RT-PCR analysis for preproinsulin mRNA from clone 4 cells in response to glucose. Samples were prepared either in the presence (+) or absence (-) of reverse transcriptase (RT); C, D, Immunocytochemical staining for insulin expression from the co-transfected with pGIPP/GFP/CEP4 and pGIPP/PPI/CEP4. Insulin expression showed glucose dependent manner. E, Effects of glucose on the insulin secretion from K-cells stably transfected with the pGIPP/PPI/CEP4 (clone 4 cells) compared with the pGIPP/GFP/CEP4 (clone 3 cells). Results are means \pm SD from three independent triplicate experiments in each group.

* $P < 0.01$ vs clone 3.

시행한 결과 포도당 농도에 따른 발현의 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 7B). 그러나 인슐린 항체로 면역세포화학염색을 하여 형광현미경으로 관찰한 결과 포도당농도 의존적으로 인슐린이 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, 또한 이들 세포는 모두 GFP를 발현하는 것으로 보아 STC-1 세포에 pGIPP/GFP/CEP4 및 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 동시에 트랜스펙션된 K-세포임을 확인할 수 있었다 (Fig. 7C). 또한 일부 세포는 핵을 대조 염색하여 동일초점 현미경으로 관찰한 결과, K-세포의 세포질 내에 포도당농도 의존적으로 인슐린이 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 7D), 이 K-세포들에서 효소결합면역흡수법으로 인슐린 분비량을 측정한 결과 포도당농도 의존적으로 인슐린이 분비되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7E).

고 찰

지금까지 인슐린 유전자 치료에 대한 여러 연구들에서 그 결과가 만족스럽지 못했던 이유로는 인슐린 유전자를 표적세포에 전달하기 위해 사용한 벡터가 완전하지 않았거나, 인슐린 유전자를 표적세포에 제대로 전달하여도 인슐린 유전자의 발현기간이 짧았기 때문이며, 비베타세포인 표적세포가 혈당농도 의존적으로 인슐린을 분비하는 기능을 다하지 못했기 때문으로 생각된다. 최근 소개된 장 K-세포는 비베타세포이지만 췌장 베타세포와 기능면에서 가장 비슷한 표적세포로 알려져 있다¹⁾. 본 연구자들은 베타세포의 발생과 성장에 관여하는 것으로 알려진 일부 전사인자들의 발현을 K-세포와 베타세포에서 비교 관찰한 결과 Nkx6.1, ngn3 그리고 Pax4를 제외하고는 두 세포에서 거의 유사한 발현을 관찰할 수 있어서 K-세포가 인슐린 유전자치료를 위한 이상적인 표적세포임을 시사하는 결과를 얻었다 (Fig. 6B). 그리고 지금까지 유전자 치료에 많이 사용되어 온 아데노바이러스 벡터는 발현기간이 짧은 단점^{12,28)} 외에 세포독성 때문에 결국에는 인체에 적용하기가 어려울 것이다. 그러나, 본 연구자들이 이용한 Herpes 바이러스의 일종인 EBV 벡터는 정상 인체에 존재하면서 호스트의 면역기능이 약해졌을 때 발병하는 특성을 지닌 비교적 인체에 독성이 적은 벡터로 알려져 있으며, 아데노바이러스 벡터를 이용했을 때보다 목적하는 유전자의 발현기간이 보다 긴 것으로 알려져 있다²²⁾. 지금까지 이상적인 표적세포로 알려진 K-세포에서 EBV-유래 에피솜 벡터를 이용하여 인슐린 유전자 치료를 시도한 연구는 아직 없으며, 이전의 연구들이 사람 인슐린 유전자의 발현을 동물에서 관찰한 결과 인슐린 항체 등으로 인해 지속적인 혈당조절이 이루어지지 못했던 단점을 극복하기 위해 본 연구자들은 쥐의 게놈 GIP 프로모터와 쥐의 전전구인슐린 유전자를 EBV-유래 에피솜 벡터에 삽입하여 재조합벡터를 완성하였으며 K-세포에 트랜스펙션시킨 결과

포도당농도 의존적인 인슐린의 분비가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7C-E).

pCEP4는 oriP와 EBNA-1 유전자를 가지고 있어서 염색체-DNA에 삽입되지 않고도 오랜 기간 동안 목적유전자를 발현할 수 있다. 본 연구자들은 STC-1에 pGIPP/GFP/CEP4를 트랜스펙션하여 4개월까지 계대배양하여 보았으나 여전히 녹색형광이 모든 세포에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, pGIPP/PPI/CEP4가 동시에 트랜스펙션된 K-세포에서는 지속적인 인슐린 발현을 관찰할 수 있어서 (자료 생략), 아마도 K-세포의 유전체내로 GFP 혹은 전전구인슐린 유전자가 합체되었을 가능성이 시사되어 현재 이에 대한 추가실험을 진행하고 있다. 또한 pCEP4는 약 10.2 Kb 정도의 큰 벡터로써 비교적 큰 유전자도 운반할 수 있어서 인슐린 유전자 치료법에도 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

GIP는 식후 인슐린분비를 유도하는 호르몬으로, 인슐린과 거의 동시에 분비되며 혈당농도에 따라 빠르게 반응한다. 그러므로 GIP 유전자의 프로모터를 인슐린 유전자에 융합시키면 혈당농도에 빠르게 반응하여 인슐린을 발현하게 할 것으로 생각되며, 또한, GIP 프로모터는 세포 특이적 발현을 하는 프로모터로 알려져 있어서^{12,13)} 이질성의 장내분비 세포주인 STC-1 세포로부터 보다 순수한 K-세포의 분리에 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 본 연구에서 GIP 프로모터가 GFP 혹은 전전구인슐린 유전자의 발현을 조절하도록 재조합벡터를 제작하여 이질성의 장내분비세포주인 STC-1 세포에 트랜스펙션시킨 결과 K-세포 특이적인 유전자발현이 이루어 지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5, 6). 또한 K-세포는 췌장 베타세포와 가장 비슷한 성격을 지닌 장의 내분비세포로 인슐린 유전자 치료의 이상적인 표적세포로 주목받아 왔다^{1,12,13)}. 그 이유는 K-세포가 베타세포처럼 프로호르몬 전환효소를 발현하기 때문에 인슐린 유전자를 조작할 필요가 없으며, 췌장 베타세포가 글루코키나아제를 분비하여 당대사속도를 조절하거나 혈당감지기 역할을 하는 것처럼, K-세포에서 발현되는 글루코키나아제도 혈당농도에 반응하는 혈당감지 작용이 있을 것으로 시사되기 때문이다^{12,13)}. 따라서, K-세포가 혈당의존적으로 GIP를 분비하며 합성된 GIP를 세포외로 방출하는 기능을 가지고 있기 때문에 K-세포를 유전공학적으로 조작하면 혈당농도에 따른 이상적인 인슐린 분비를 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 지금까지 인슐린 유전자 치료에서 사람 인슐린 유전자를 실험동물에 도입한 결과 인슐린의 발현이 오래 지속되지 못하였다. 본 연구자들은 쥐의 인슐린 유전자를 사용하여 후속 연구에서 문제가 될 인슐린 항체의 생성을 극복해 보고자 하였다. 아직 실험동물에 적용하기 전 단계이긴 하지만 실험동물에서 인슐린의 장기적인 발현을 유도하기 위해서는 동종의 인슐린 유전자를 도입하는 것이 보다 효과적일 것이다. 또한, 인슐린 유전자 치료에서 포도당 농도에 따라 인슐린 유전자를

발현시키기 위해 여러 종류의 프로모터가 사용되어 왔으나 아직 생리적인 인슐린의 분비유도에는 어려움이 있었다. K-세포는 GIP 프로모터에 의한 혈당감지 작용을 함과 동시에 프로호르몬 전환효소를 발현하기 때문에 활성 인슐린을 합성할 수 있으며 포도당이 흡수되었을 때 합성 후 저장된 인슐린을 빠르게 세포외로 방출할 수 있어서 K-세포를 이용한 인슐린 유전자 치료는 혈당농도 의존적인 인슐린 분비를 유도할 것으로 생각된다. 본 연구는 이질성의 장내분비세포인 STC-1 세포주에 pGIPP/GFP/CEP4 벡터와 pGIPP/PPI/CEP4 벡터를 동시에 트랜스펙션시켜 GFP에 의해 형광을 발하는 K-세포를 순수하게 분리함과 동시에, 이렇게 분리한 K-세포 클론들 중 RT-PCR법으로 전전구인슐린 mRNA를 발현하는 K-세포 클론을 선별하였으며 면역세포화학법 및 인슐린농도 측정법으로 포도당농도 의존적인 인슐린 분비를 관찰한 실험연구이다. 그 결과, 배양 K-세포에서 전전구인슐린 mRNA의 전사를 확인하였으며 포도당농도 의존적인 인슐린 분비가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었으나 합성된 인슐린으로부터 분할된 C-펩티드의 측정은 이루어지지 않아서 향후 이에 대한 추가실험이 있어야 할 것으로 생각된다. 그리고 인슐린을 발현하도록 조작된 K-세포는 쥐의 종양세포에서 분리한 세포이기 때문에 쥐의 신장피막 혹은 복강에 이식하면 종양형성이 될 것이므로 종양에서 분비되는 인슐린도 혈당변화에 의존하는지에 대한 동물실험이 추가되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 EBV-유래 에피솜 벡터를 이용하여 유전공학적으로 제조된 K-세포에서 포도당농도 의존적인 인슐린 분비가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었으며 K-세포는 인슐린 유전자 치료를 위한 표적세포로서 유용하게 사용될 것으로 생각된다. 향후 완전한 인슐린분비기작을 K-세포에서 이루게 되면 췌장 베타세포를 대체할 수 있는 세포치료에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 자가면역 기전에 의한 췌장 베타세포의 파괴로 인슐린 결핍을 일으키는 제1형 당뇨병을 치료하기 위해 비 베타세포를 이용한 인슐린 유전자 치료법이 활발히 연구되고 있으나 아직 미흡한 상태이다. 인슐린 유전자 치료에서 포도당농도 의존적인 인슐린 분비를 구현하려면 목적하는 비베타세포에서 포도당농도 의존적인 인슐린의 전사조절이 이루어져야 하며 인슐린의 분비경로는 베타세포와 유사하도록 조작해 주어야 한다. 본 연구에서는 EBV-유래 에피솜 벡터를 이용하여 유전공학적으로 제조된 장내분비 K-세포에서 포도당농도 의존적인 인슐린 분비가 이루어지는 것을 관찰하고자 하였다.

방법: Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) 프

로모터가 Green fluorescent protein (GFP) 및 전전구인슐린의 전사를 조절하도록 두 개의 유전자 카세트를 제작하고 EBV 유래인 pCEP4 벡터에 각각 융합시켜 두 종류의 재조합 벡터를 완성하였다 (pGIPP/GFP/CEP4, pGIPP/PPI/CEP4). 두 벡터를 장의 내분비혼합세포주인 STC-1 세포주에 동시 트랜스펙션시켰으며 녹색형광을 발현하는 순수한 K-세포를 분리하여 계대배양하였다. 이 세포에서 Western blot 법으로 글루코키나아제의 발현과, 각종 베타세포 특이 전사인자의 발현을 RT-PCR 법으로 관찰하였다. 이어서 녹색형광을 발현하면서 RT-PCR로 전전구인슐린을 발현하는 세포주 즉 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 동시에 트랜스펙션된 K-세포에서 면역세포화학법 및 효소결합면역흡수법으로 포도당농도 의존적인 인슐린의 분비가 이루어지는 것을 관찰하였다.

결과: pGIPP/GFP/CEP4가 트랜스펙션된 STC-1 세포로부터 형광을 띄는 세포만을 분리하여 Western blot에 의한 글루코키나아제의 발현 및 RT-PCR 법에 의한 베타세포의 발달에 관여하는 전사인자들을 조사한 결과 K-세포는 췌장 베타세포와 매우 유사하였다. 그리고 pGIPP/PPI/CEP4 벡터가 동시에 트랜스펙션된 K-세포에서는 전전구인슐린의 발현과 함께 포도당농도 의존적인 인슐린의 분비가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

결론: EBV-유래 에피솜 벡터를 이용한 유전공학적으로 제조된 K-세포에서 안정적으로 포도당농도 의존적인 인슐린의 분비를 유도할 수 있었으며, 췌장 베타세포와 유사한 K-세포는 인슐린 유전자치료의 이상적인 표적세포로 이용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 K-세포에서 보다 완벽한 인슐린분비기작이 이루어진다면 췌장 베타세포를 대체할 수 있는 세포치료에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Yoon JW, Jun HS: *Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes*. Trends Mol Med 8:62-8, 2002
2. Morral N: *Gene therapy for type 1 diabetes*. New approaches. Minerva Med 95:93-104, 2004
3. 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
4. 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
5. Nett PC, Sollinger HW, Alam T: *Hepatic insulin gene*

- therapy in insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Transplant* 3:1197-203, 2003
6. 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
7. Olson DE, Paveglio SA, Huey PU, Porter MH, Thule PM: *Glucose-responsive hepatic insulin gene therapy of spontaneously diabetic BB/Wor rats. Hum Gene Ther* 14:1401-13, 2003
8. Yoon JW, Jun HS: *Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. Trends in Molecular Medicine* 8:62-8, 2002
9. Thule PM, Campbell AG, Kleinhenz DJ, Olson DE, Boutwell JJ, Sutliff RL, Hart CM: *Hepatic insulin gene therapy prevents deterioration of vascular function and improves adipocytokine profile in STZ-diabetic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E114-22, 2006
10. Stewart C, Taylor NA, Docherty K, Bailey CJ: *Insulin delivery by somatic cell gene therapy. J Mol Endocrinol* 11:335-41, 1993
11. Bailey CJ, Davies EL, Docherty K: *Prospects for insulin delivery by ex-vivo somatic cell gene therapy. J Mol Med* 77:244-9, 1999
12. 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
13. 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
14. Bailey CJ, Flatt PR, Kwasowski P, Powell CJ, Marks V: *Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. Acta Endocrinol (Copenh)* 112:224-9, 1986
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. Deacon CF: *What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? Regul Pept* 128:117-24, 2005
17. Irwin N, Gault VA, Green BD, Greer B, McCluskey JT, Harriott P, O'Harte FP, Flatt PR: *Effects of short-term chemical ablation of the GIP receptor on insulin secretion, islet morphology and glucose homeostasis in mice. Biol Chem* 385:845-52, 2004
18. Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froquel P, Thorens B: *Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. Diabetes* 44:1202-8, 1995
19. Buchan AM, Polak JM, Capella C, Solcia E, Pearse AG: *Electronimmunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. Histochemistry* 56:37-44, 1978
20. Buffa R, Polak JM, Pearse AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C: *Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. Histochemistry* 43:249-55, 1975
21. Min KA, Lee SK, Kim CK: *Improved gene expression pattern using Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid and cationic emulsion. Biomaterials* 26:1063-70, 2005
22. 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
23. Kim YD, Park KG, Morishita R, Kaneda Y, Kim SY, Song DK, Kim HS, Nam CW, Lee HC, Lee KU, Park JY, Kim BW, Kim JG, Lee IK: *Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter. Gene Ther* 13:216-24, 2006
24. Egea JC, Hirtz C, Gross R, Lajoix AD, Traskawka E, Ribes G, de Periere DD: *Preproinsulin I and II mRNA expression in adult rat submandibular glands. Eur J Oral Sci* 108:292-6, 2000
25. Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Okumachi A, Ishizaki K, Oyama K, Kawauchi 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
26. Kajihara M, Sone H, Amemiya M, Katoh Y, Isoqai M, Shimano H, Yamada N, Takahashi S: *Mouse MafA, homologue of zebrafish somite Maf 1, contributes to the specific transcriptional activity through the insulin promoter. Biochem Biophys Res*

- Commun* 312:831-42, 2003
27. Boylan MO, Jepeal LI, Jarboe LA, Wolfe MM: *Cell-specific expression of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide gene in a mouse neuroendocrine tumor cell line. J Biol Chem* 272:17438-43, 1997
28. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW: *Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. Nature* 408:483-8, 2000