

이자섬 세포의 발달과 베타세포의 분화에서 clusterin의 역할

인하대학교 의과대학 해부학교실, 고려대학교 의과대학 약리학교실¹

홍석우·Ranjan KC·이 송·신용재¹·민본홍¹·박인선

The Roles of Clusterin on Morphogenesis of Beta Cells During Pancreas Regeneration

Seok-Woo Hong, Ranjan KC, Song Lee, Yong-Jae Shin¹, Bon-Hong Min¹, In-Sun Park

Department of Anatomy and Center for Advanced Medical Education by BK21 project¹, College of Medicine, Inha University; and Department of Pharmacology & BK21 program for Medical Sciences², College of Medicine, Korea University

- Abstract -

Clusterin is a highly glycosylated heterodimeric glycoprotein that plays diverse biological roles in various organs. The secreted clusterin has been established as a major form of the protein that exerts diverse tissue effects. For instance, clusterin is known to act in cell protection through the actions of extra-cellular molecular chaperones. In the extracellular milieu, clusterin participates in specific interactions with a diverse array of native biological molecules including LRP-2 (Lipoprotein receptor-related protein 2, also known as gp330 or megalin), which is involved in ligand endocytosis at the surfaces of certain epithelia.

Clusterin is expressed transiently in developing and differentiating endocrine pancreatic cells and might be involved in pancreas development. This transient expression of clusterin at specific time points of pancreas development and cell differentiation during pancreas regeneration implies that the protein is a regulatory factor for cytodifferentiation as well as for replication. A specific action of the clusterin in the reconstruction and remodeling of the endocrine pancreas has been demonstrated. It also strongly stimulates duct cell differentiation into insulin-secreting cells under in vitro culture conditions. Clusterin appears thus as a potent regulator of insulin cell morphogenesis. (**J Kor Diabetes Assoc 31:1~8, 2007**)

Key Words: Beta cells, Clusterin, Development, Differentiation, Duct cells, Insulin, Regeneration

다기능 단백질 clusterin

Clusterin 단백질은 사람과 동물의 여러 기관 및 조직에서 발현되는 단백질로서, 조직 내에서도 미세환경 (microenvironment)에 따라 다르게 발현되는 특징을 가진 다기능 단백질로 알려져 있다¹⁾. 이 단백질은 고환의 rete testis에서 처음 분리되어 정자를 응집시키는 역할로 인하여 “세포응집인자 (cell clustering or aggregating factor)”로 알려졌으며, 이러한 기능이 혈액의 백혈구세포와 고환의 버팀세포 (Sertoli cell)에서도 발견되어 지금의 “clusterin”이란 이름을 얻게

되었다²⁻⁵⁾. 특히 Silkensen⁵⁾ 등은 clusterin이 신장상피세포의 응집 및 부착을 유도하며, 신장세포 손상 시 세포와 세포 (cell-cell) 또는 세포와 기저층 (cell-substratum)을 연결하고, 상피세포 세포막을 안정시키는 기능을 증명하였다. 그러나 clusterin 또는 이와 유사한 구조를 가진 단백질들이 여러 조직에서 다양한 이름과 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있는데, 양의 정액에서는 세포집성에 관련된 기능을 가진 clusterin으로 알려져 있으며, 쥐의 경우 고환의 버팀 세포와 거세된 전립선에서는 각각 SGP-2, TRPM-2로 명명되어 불리고 있다^{3,6,7)}. 사람에서는 알츠하이머 병에 걸린 뇌에서

* This study was supported by Korea Ministry of Science & Technology - Bio Discovery to In-Sun Park.

Table 1. Alternative Names of Clusterin

Name	Location & action
Clusterin*	Seminal fluid / cell aggregation
SGP-2 [†]	Sertoli cells of testis
TRPM-2 [†]	Castrated prostate
pADHC-9 [‡]	Alzheimer brain
CLI [†]	Inhibitor of complement/ mediated cell lysis
Apo J [†]	Serum/ apolipoprotein
XIP8 [‡]	Nuclear form/radiation induced cell death

* Sheep

†Rat

‡Human

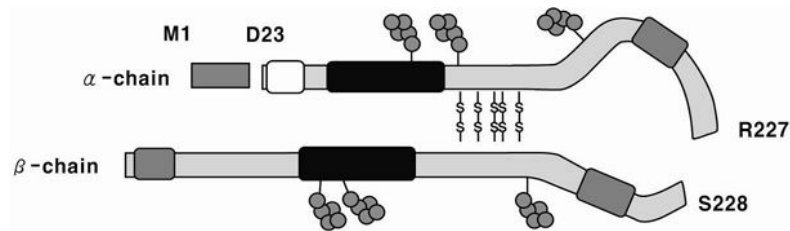


Fig 1. Protein structure of clusterin.

■ Hydrophobic signal seq. (1-22).

□ alternative second initiation translation site (M34); may escape glycosylation and be targeted to nucleus.

■ Two coiled-coil α helices (residues 40-99 and 318-350).

● Human; six N-linked glycosylation sites: alpha subunit (86, 103, and 145) and beta subunit (291, 354, and 374). Rat; six N-linked glycosylation sites: alpha subunit (290, 144) and beta subunit (290, 327, 353, and 373).

■ Amphipathic α helices (residues 173-184, 234-250, 424-441).

* This figure is modified from SE Jones & C jomary/ The int.

pADHC-9과 세포용해 억제 기능을 가지는 CLI, 혈청 안에 존재하는 Apo J, 방사선 손상에 의해 죽는 세포 핵에서는 XIP8로 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾ (Table 1).

Clusterin 단백질의 구조

Clusterin은 생화학적으로 매우 독특한 당단백질구조를 지니고 있는데, 매우 긴 알파나선구조와 이량체 형성에 필요한 아미노 말단을 가지고 있다. 사람에서 clusterin단백질의 생성은 8번 염색체 p21-p12부위에 존재하는 단독 유전자로부터^{5,12-14)} 모두 449개의 peptide chain이 번역되면서 만들어지며 이 아미노산 서열의 첫 부분 (1-22)은 신호펩타이드 (signal peptide)이다. 세포 내 내형질세포망 (endoplasmic reticulum)에서 이 clusterin peptide chain에는 상당한 번역 후 수식 (post-translational modification)이 일어나게 되는데 signal peptide가 분리되고 나머지 peptide 부위에서는 R227-S228가 부위가 나뉘어져 두 개의 소단위체 (α -, β -unit)가 구성되는 이형 이량체 단백질 (heterodimeric protein)의 형태가 되며, 소단위체 하나의 크

기는 40 kDa 정도이며 전체적으로 약 80 kDa의 크기를 가진다. Clusterin의 두 개의 소 단위체 즉, α -와 β -unit에는 각각 cystein이 모여 있는 부위가 있어 여기에서 상대방 소단위체를 이어주는 5개의 이황화 결합 (disulfide linkage)이 형성되게 된다. ER과 Golgi체에서 clusterin peptide chain의 여섯 부위에서 당화 (glycosylation)가 일어나게 되어 고당화 단백질로 완성되게 된다. 완성된 clusterin 단백질에는 세 개의 양친매성 나선구조영역 (amphipathic α -helices) 과 2개의 잠정적 이핵 결합구조 (dinucleotide-binding domains) 등이 있다 (Fig. 1). 이렇게 합성된 clusterin은 분비과립 (secretory vesicle)에 축적되며 일반적으로 세포 밖으로 분비되지만, 경우에 따라서는 핵으로 이동하기도 한다.

정상췌장조직에서 clusterin은 매우 제한적으로 발현된다. 본 연구자들은 clusterin이 사람과 여러 실험동물 모델 동물의 췌장조직 중 도관과 췌장선포조직을 포함한 모든 외분비조직에서는 발현되지 않으며 이자섬 (췌장소도, Langerhans islet)에 존재하는 알파세포에서 미량으로 발현하는 것을 관찰 하였으며, 특히 clusterin 단백질이 이 세포의 분비과립에서 glucagon과 같이 존재하며 분비되는 양상을 미세구조적

으로 관찰하였다 (Fig. 2). 이미 알려진 대로 clusterin은 조직의 생리학적 환경에 따라 매우 다양한 역할을 한다는 점을 생각할 때, 정상 췌장에서의 clusterin의 제한된 발현은 이 단백질이 정상생리기능에서 보다, 췌장조직의 발생과정이나, 비정상적인 생리환경에서 보다 많이 발현되고 그에 대응하는 독특한 작용을 할 것으로 예측할 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구자들은 췌장의 발생 및 재생과정과 비정상적인 생리환경에서 췌장 내 clusterin의 발현과 그 역할을 추적하였다.

당뇨병 동물모델에서 췌장 clusterin의 발현

Streptozotocin (STZ)은 이자섬 내 베타세포의 선택적 파괴를 통하여 실험적 당뇨병을 유발하는 물질이다^{15,16}. 본 연구자들은 실험을 위하여 성체 흰쥐에 STZ를 처리하여 제1형 당뇨병을 유발시켰으며, 제2형 당뇨병을 유발시키기 위해서는 생후 1~2일의 신생 흰쥐에 STZ를 주입하였다. STZ에 의한 제1형 당뇨병모델은 고용량 (65 mg/kg)을 단회 투여하여 베타세포를 급속히 괴사 (necrosis)시키는 방법과 적은 양 (35~40 mg/kg)를 5회 걸쳐 주입하여 림프구의 침윤을 통한 췌도염 (insulinitis)의 유발시키는 방법을 사용하였다^{17,18}. 이러한 당뇨병모델의 이자에서는 단기적으로는 베타세포의 손실과 고혈당을 나타내지만 장기적으로는 이자섬 세포들은 재형성과 고혈당의 완화가 나타나게 된다. 성체 흰쥐에 많은 양의 STZ를 목정맥 (jugular vein)에 한 번에 주입하였을 때 STZ의 세포독성에 의하여 6시간 후부터 핵이 노출되며 세포간 연결이 파괴되면서 세포사멸이 시작되며, 72시간 이내에 거의 모든 베타세포가 소실된다. 이 기간 동안 이자섬 내에서 베타세포와 같이 있는 알파세포들에서 clusterin의 발현이 급격하게 증가되며 이러한 세포들은 손상을 받지 않는 현상을 나타낸다. 또한 STZ투여 72시간 이후부터 이자섬 세포들, 특히 알파세포에서 세포증식이 나타나기 시작하며, 7일 후에는 이들 세포들이 급격히 증식

되어 이자섬의 거의 모든 부분을 차지하게 되며, 소수의 베타세포만 존재하게 된다. 이렇게 증식하는 알파세포에서 clusterin이 과발현되는 양상이 지속되고 있었으며, 이는 이 단백질의 발현이 세포의 사멸을 차단시켜주는 세포방어작용을 하는 것은 물론 세포의 증식을 유도하는 생활성 인자 (bioactive factor)임을 나타내는 것이다. 한편 적은 양의 STZ를 5회에 나누어 주입한 성체 흰쥐의 이자에서는 베타세포의 사멸양상이 다소 달랐다. 이 경우 이자섬의 베타세포에서는 5일 투여기간 중 초기 2~4일 사이에 전형적인 세포자연사 (apoptosis) 현상이 나타나며 동시에 림프구 침윤에 의한 insulinitis가 발생했다. 그러나 대용량 단회 투여의 경우와는 달리 소용량 분할 투여한 당뇨병모델의 경우 이자섬에서는 알파세포는 물론 베타세포도 어느 정도 재생되는 것으로 나타났다. 이는 STZ투여 종료직후 베타세포의 수가 이자섬당 평균 3.7개 정도 이던 것이 투여 3주와 5주에 각각 9.4 및 15.4개로 증가하는 현상으로 알 수 있었다. 이 경우에도 clusterin은 알파세포에서 과발현되고 있었지만 소수의 베타세포에서는 인슐린과 함께 발현되는 모습을 관찰할 수 있었으며, 이러한 세포는 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)에 양성인 모습이었다. 이는 clusterin이 STZ에 의해 파괴된 이자섬에서 알파세포는 물론 베타세포의 재생에도 관여함을 증명하는 것이다.

또한 신생 흰쥐에서 STZ투여로 제2형 당뇨병을 유발한 모델에서는 앞에서 기술한 제1형 당뇨병모델에서 보다 이자섬세포의 사멸이 현저히 느리게 나타나는 반면 베타세포의 재생과 인슐린의 분비의 복구가 잘 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. STZ를 투여한 신생 흰쥐에서 초기 3주 동안 베타세포와 알파세포가 동시에 사멸되지만 이 시기 이후에서는 베타세포가 현저하게 늘어나면서 5주 후에는 거의 정상 수준의 분포를 나타내, 다른 모델 보다 베타세포의 재생이 양호한 것으로 분석 되었다. 특히 이자조직에서는 이자섬을 이루지 않은 베타세포들이 도관주변에 많이 출현하는 소위 'duct-associated islet cell'의 형태로 나타나 이들 세포들이

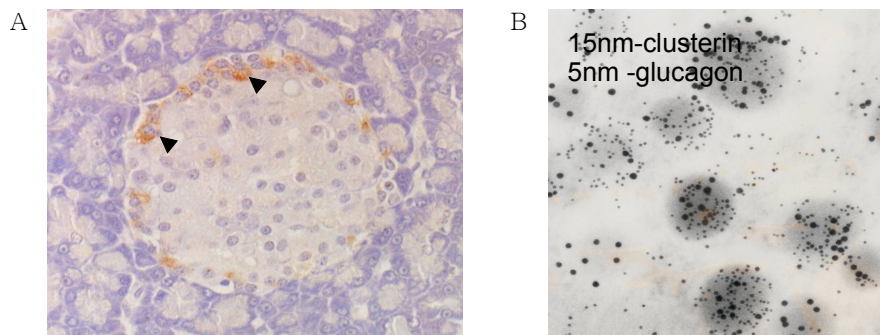


Fig. 2. Clusterin expression in normal pancreatic tissues. The protein was detected in the alpha-cells of the rat pancreatic islet at the light (A) and electron microscopic (B) levels. Clusterin was located with glucagons in the same secretory granules of the alpha cells (B).

기존 이자섬의 세포에서 단순 증식하는 것이 아니라 도관의 전구세포 또는 줄기세포에서 신생 (neogenesis)되고 있음을 암시하고 있었다. 이러한 베타세포의 재생은 인슐린의 분비를 증가시켜 정상수준으로 회복시키는 것으로 나타났다. 이 모델에서 실험 후기에 나타나는 베타세포의 재생과 인슐린의 분비회복은 실험 초기 STZ에 의한 베타세포의 감소와 고혈당에 대한 상쇄작용으로 볼 수 있으며, 이러한 현상에는 clusterin의 발현이 영향을 주는 것으로 보인다. 이 모델에서 clusterin 발현의 증가는 STZ 주입 후 3~5주 사이에 주로 알파세포에서 관찰된다. 이러한 당뇨병모델에서 나타나는 clusterin의 발현변화는 이 단백질이 이자섬의 알파세포는 물론 인슐린을 분비하는 베타세포의 증식, 신생에 기여함을 나타낸다. 그러므로 본 연구자들은 clusterin이 이자에 잠재적으로 존재하는 내인성 성장인자 (endogenous growth factor)로서 이자섬 세포의 증식을 자극하고, 이자섬 손상 후 베타세포의 양적 항상성을 유지하는데 필수적 요소가 됨을 주장하는 바이다. 따라서 clusterin은 당뇨병의 발병과 관련하여, 일차적으로 이자섬 세포들을 사멸위험으로부터 보호하고, 이차적으로는 이자섬의 파괴 및 손상 후 이를 재구성하여 베타세포의 양적 항상성을 유지하게 함으로서 이자섬의 기능을 복구시키는 역할을 하는 것으로 보인다.

이자의 발생과정 중 clusterin의 발현

본 연구자들은 이자의 발생과정에서 clusterin이 이자섬의 형성과 연계되어 있을 것으로 생각하였다. 이러한 가설을 증명하기 위하여 흰쥐를 실험대상으로 clusterin의 발현 양상과 변화를 관찰하였다. 이를 위하여 임신 중인 흰쥐로부터 여러 단계의 태아와 이자 조직을 분리하였다. 성체조직에서 clusterin은 뇌, 간장, 심장 및 폐 조직에서 다량으로 발현됨을 본 연구자들도 확인하여 이 단백질이 여러 조직과 기관에서 발현하는 ubiquitous protein임을 확인하였다. 그러나 흥미롭게도 이들 조직의 발생과정에서는 clusterin이 전혀 발현되지 않았으며, 성체에서는 발현이 되지 않았던 이자조직에서만 clusterin mRNA의 발현을 northern blot 분석으로 확인하였다. 발생과정의 이자에서 clusterin은 초기발생기 (E14) 보다는 중기발생기 (E16-18)로 이동하면서 발현이 증대되었고 출생 직후에 가장 많이 발현되는 것으로 나타났다. Western blot분석을 통하여 관찰한 clusterin 단백질의 발현은 이 단백질의 구조적 변화를 나타내 주는데, E16의 체장에서는 clusterin의 두 chain이 분리되지 않은 상태로 나타나지만, E18에서는 clusterin 단백질의 α -unit과 β -unit이 분리되어 있음을 보여주고 있고 출생직후의 이자에서는 오직 α -unit만이 발현됨이 관찰되었다. 이는 clusterin의 소단위체 분리 (internal cleavage)가 이자의 발생과 연계되어 있음을 시사하는 것이다. 이에 따라 본 연구자들은 이

자조직을 clusterin의 α -소단위체에 결합하는 특이적 항체를 사용한 면역세포화학법을 통하여 세포 내 clusterin의 발현 양태를 관찰하였다. 관찰 결과 발생 12일의 초기태아에서, 전장 (foregut) 근처에 이자원기 (pancreatic primordium)가 관찰되었고 glucagon을 발현하는 세포들이 관찰되었다. 이 시기의 세포들에서는 clusterin이 발현되지 않았다. 그러나 발생중기 (E14)의 태아 이자에서는 소수의 내분비세포에서만 clusterin의 발현이 매우 약하게 관찰되었고 이들 세포는 glucagon을 분비하는 알파세포였다. 이후 16일 태아의 이자에서 베타세포의 출현과 함께 본격적인 clusterin의 발현이 시작되었으며, 이 시기에는 clusterin을 발현하는 세포는 glucagon과 인슐린도 동시에 가지고 있는 미분화 내분비세포였다¹⁹⁾. 그러나 clusterin은 E18 이후 임신말기 이자의 이자섬에서 발현되지 않았으며, 이러한 현상은 신생 흰쥐의 이자에서도 계속되어 생후 2일째 clusterin의 발현은 glucagon을 발현하는 알파세포, 즉 이자섬조직의 주변부에 국한되었고, 인슐린 발현 베타세포가 존재하는 이자섬 조직의 중심부에서는 clusterin의 발현이 관찰되지 않았다. 이는 이자의 발생과정에서 clusterin의 일시적인 발현은 이자세포의 증식 및 분화에 clusterin이 관여함을 제시한다. 특히, 인슐린 및 glucagon 발현세포, 즉 미분화 내분비세포에서 clusterin이 발현되는 양상과 이 시기에서 발현되는 clusterin은 internal cleavage 등 단백질 구조의 변화를 나타내는 점 등은 이 단백질이 이자섬 형성 및 이자섬 세포분화에 관여함을 나타내고 있다.

이자의 재생과정에서 clusterin의 발현

당뇨병은 기본적으로 베타세포의 손상 또는 기능상실에 기인하여 발생한다. 그러나 베타세포는 일반적으로 신생 (neogenic growth)이 아닌 기존의 세포에서 단순 증식되는 방식으로 세포수의 항상성이 유지되는 것으로 알려져 있어^{20,21)}, 베타세포의 조직재생 (regeneration)을 이용한 당뇨병치료 연구는 잘 이루어지지 않고 있다. 그러나 발생과정에서 이자는 매우 활발한 조직신생을 나타내고 있음을 볼 때, 성체에서도 상황에 따라 베타세포를 포함한 이자조직의 재생이 유도 될 수 있을 것으로 생각된다. 성체조직의 재생불능은 기본적으로, 도관 세포에 존재하는 줄기세포 또는 미분화 세포들의 증식 및 분화능력 상실에서 비롯되는 것으로 보인다. 그러므로 도관 줄기세포의 증식 및 분화를 자극하는 방법으로 이자조직의 재생을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 이자조직의 재생은 조직에 대한 손상을 유도한 후 나타나는 생체복구기능을 기대할 수 있는데, 조직손상은 STZ나 alloxan과 같은 베타세포 특이적 독성물질에 의한 내분비조직 파괴나, 실험동물을 이용한 이자 부분절제술 (sub-total pancreatectomy)과 체도관 결찰을 통한 이자염 유발과 같은

물리적 방법이 이용될 수 있다²²⁻²⁴). 본 연구자들은 알려진 바와는 달리 이자 조직이 상황에 따라 역동적인 조직재생을 하고 있으며, 여기에는 베타세포를 포함한 이자 내분비세포들이 활발히 신생 (neogenesis)를 통하여 증식됨을 관찰하였다. 이자조직의 신생을 통한 재생 (neogenic regeneration)은 실험적 방법에 의하여 유도될 수 있으며 흰쥐를 이용한 이자 부분절제술 (sub-total pancreatectomy)에 의해 이자조직의 전형적인 신생과 재생을 관찰할 수 있다²²⁻²⁴). 이 모델은 수술을 통하여 이자의 선포조직과 내분비조직을 포함한 대부분의 실질조직을 제거하는 반면 도관부는 최대한 보존 시킴으로 잔존하는 도관상피에서 베타세포의 분화 및 증식 즉 신생 (neogenesis)을 유도하는 모델이다. 이 모델에서 조직의 재생은 시술 24시간 후부터 관찰되기 시작하여 2~4주까지 지속되는 것을 볼 수 있다. 이자 부분절제술에 의한 재생의 양상은 기존에 존재하던 세포와 복제보다는 도관상피세포의 증식과 분화를 통한 재생이 주요 경로인 것으로 보인다. 즉, 조직재생의 초기에는 물리적인 제거로 인하여 염증반응이 보이는 부위를 중심으로 광범위하게 나타난다. 이자조직의 신생은 시기적으로 구분이 가능하며, 수술 후 3일을 정점으로 초기증식기 (proliferation dominant phase)와 후기 분화기 (differentiation dominant phase)로 구분된다. 초기증식기에는 수술로 인하여 염증반응이 나타나는 부위를 중심으로 작은 소도관 (ductule) 또는 소관 (tubule)들이 생기고 이들이 계속 증식되어 신생영역 또는 소엽 (neogenic lobule)이 형성되었다. 이러한 신생조직, 특히 소도관 또는 소관을 이루는 상피세포들은 거의 대부분 PCNA에 표지되는 등 매우 활발한 세포증식을 나타냈다. 이에 비하여 수술 후 1~4주에 이르는 분화기 (differentiation dominant phase)에는 신생영역이 감소하는 반면, 신생된 세포들이 기능세포로 분화되어 정상 이자조직으로 분화된 영역이 계속 증가하였다. 이자부분절제에 의해 신생되는 이자조직에는 내분비세포의 출현과 이들에 의한 이자섬 형성이 관찰된다. 수술 3일 후 3~4개의 베타세포 또는 알파세포가 신생조직에 매우 드물게 출현하며 7일이 경과하면서 이자섬을 형성하기 시작한다. 이후 신생 이자섬은 주변세포들이 선포 또는 도관상피로 점차 분화되어 정상이자 소엽 내의 이자섬으로 성숙되었다. 이자섬 형성과정에서 내분비세포들은 동종의 세포들끼리 무리를 짓게 되며 시간이 지남에 따라 베타세포들은 중앙부에 위치하며 알파세포를 포함한 비베타세포들은 주변부에 존재하게 된다²⁵). 이러한 조직재생의 결과로 이자 부분절제술 후 나타나는 조직의 양상을 보면, 조직재생이 일어나는 부위 (neogenic area or lobule)와 기존 조직 부위로 명확히 구분되어 있다.

본 연구자들은 전술한 이자조직의 신생과정에서 clusterin이 특이적으로 발현되는 것을 관찰하였다. 이때 clusterin은 처음 신생이 시작되는 곳과 이미 신생이 종료된 조직에서는

발현되지 않았으며, 오직 세포들이 분화되고 있는 영역 (differentiating area)에서만 관찰되었는데, 특히 도관상피에 연결되어 새로 형성되고 있는 선포세포 (acinar cell)에서 주로 발현되었으며 새로이 형성된 이자섬의 알파세포에서도 clusterin 발현이 보였다. 이러한 clusterin 발현 선포세포는 이자 부분절제술 전에 주입한 BrdU (Bromodeoxyuridine)에 표지되었는데, 이는 도관상피세포가 이자의 내분비 또는 외분비 세포로 분화하고 있음을 나타내는 것이며, clusterin이 재생 중인 이자조직에서 세포의 분화와 관련되어 있음을 의미한다. 이 모델에서 clusterin은 조직의 재생이 가장 활발한 시기 (시술 3일 후)에 가장 높은 clusterin 단백질과 mRNA 발현이 나타나며 그 후 급속히 감소하는 현상을 나타냈으며, 이는 조직에서 관찰된 양상과 일치 하였다. 이는 clusterin이 이자조직의 재생을 주도하는 주인자 (major factor)임을 나타내는 것이라 할 수 있을 것이다^{26,27}).

Clusterin에 의한 도관 상피세포의 증식

본 연구자들은 clusterin에 의한 세포의 증식과 분화작용을 *in-vitro*에서 관찰하기 위하여 흰쥐 이자도관상피세포를 분리하여 clusterin-cDNA의 이입 (transfection)으로 clusterin을 과발현 시킨 후 이 세포들의 증식과 분화양상을 분석하였다. 배양되는 이자도관 세포들은 1차원적 cell-explant를 형성하였으며, clusterin을 과발현 시킨 explant들은 clusterin을 과발현 시키지 않은 대조군에 비하여 그 외양의 확산속도가 현저히 빨라 세포의 증식이 증가되는 것을 알 수 있었고, 이를 형태 측정한 결과 clusterin을 과발현 시킨 실험군에서 CK-20 (cytokeratin-20) 양성인 도관 상피세포의 증식이 2.5배 증가함을 확인하였다²⁵). 이와 같은 clusterin cDNA가 이입된 explant의 주변부에서 PCNA에 표지된 증식세포가 더 많이 관찰되는 현상과 일치하는 것으로 clusterin이 췌장도관세포의 증식을 유도함을 증명하고 있다²⁸).

Clusterin에 의한 인슐린분비 베타세포로 분화 유도

Clusterin의 분화 유도 기능은 지금까지 수 차례 보고되었는데³⁰⁻³²), 이자섬 재생 및 태아 이자의 발생과정에서 이자섬의 형성 및 분화에 관여한다는 내용이었다. Clusterin을 통한 분화유도를 증명하기 위하여 앞에서 기술한 바와 같이 흰쥐의 도관세포를 분리하여, 배양과정에서 clusterin cDNA를 형질전환 시켰다. Clusterin을 과발현 시키지 않은 대조군의 explant에서 자연적으로 분화되는 베타세포는 거의 없었으나 clusterin이 과발현된 실험군에서 인슐린 발현 세포의 수는 대조군 보다 6.9배 증가하였다 (6.62 insulin cells vs 0.95 insulin cells/ 1000 explant cells). 또한 glucagon

양성세포도 clusterin의 과발현에 따라 2배 정도 더 많이 분화되고 있음을 나타내고 있어 clusterin이 베타세포뿐 아니라 비베타세포의 분화에도 관여하고 있음을 보여주었다. 이에 따라 배양액에서 측정된 인슐린 양도 clusterin 과발현에 따라 8배정도 증가하였고, 인슐린과 c-peptide의 mRNA 발현도 증가되었다. 특히 clusterin에 의해 분화된 베타세포는 세포막에 GLUT-2 (glucose transporter-2)를 발현하고 있음이 면역세포화학적으로 확인되어 이 세포들이 glucose 자극에 반응할 수 있음을 시사하고 있었다. 그러므로 이 세포들에 glucose 농도 경사 (0, 5, 10, 15, 20 mmol/L)로 자극한 결과 이에 상응하여 인슐린의 분비량이 증가하는 현상을 확인 하였다.

본 연구자들이 clusterin 단백질의 기능을 확인하기 위해 cell explant에 직접 분리한 clusterin 단백질을 투여 하였을 때, clusterin 농도 증가 (0, 1, 10, 100 ng/mL)에 따라 인슐린 세포로의 분화가 현저히 증가하는 것을 관찰 하였으며, 이는 clusterin이 세포 내에서 작용하는 것이 아니라, 성장인자와 같이 세포외부에서 도관세포를 베타세포로 분화를 유도하는 결분비작용 (paracrine action)을 하고 있다는 것을 시사하는 것이다. 본 연구자들이 clusterin이 과발현된 배양 배지에서 clusterin 항체로 단백질을 제거하였을 때 베타세포로의 분화가 소실됨이 관찰되었는데 이는 clusterin의 세포 외 작용기전을 다시 한번 확인시켜 주고 있었다.

Clusterin의 작용기작

Clusterin의 기능에 따른 기작에 대하여 정확히 밝혀지지는 않았지만, 성장인자 (growth factor)에 의하여 조절된다고 알려졌다³³⁻³⁵⁾. TGF-beta는 AP-1 (activator protein-1)을 통하여 clusterin 유전자의 발현을 유도하고, clusterin은 직접 TGF-beta 수용체의 세포 내 부분에 결합하여 신호전달 및 수용체의 processing에 역할을 할 것으로 사료된다. 이는 clusterin이 성장인자의 조절을 받아, 세포의 증식과 분화를 조절하는 신호전달물질로서 작용함을 제시하고 있다. 따라서 clusterin은 이차 조직의 신생 (neogenic regeneration) 과정에서 두 가지 기능을 가지며, 첫째는 clusterin이 자가분비 작용 (autocrine)을 통하여 선포세포의 분화를 유도할 수 있다는 가능성과, 둘째는 결분비작용 (paracrine)을 통하여 도관세포의 복제와 분화를 조절하는 것이다.

결 론

Clusterin은 다양한 기관 및 세포에서 관찰되고, 중요한 생물학적 기능을 가지고 있다. 그 예로, 세포자연사나 세포 독성에 의한 재구성에도 clusterin이 관여한다고 보고되었다. 본 연구자들은 다른 어느 장기에서 보다 이 단백질이 이차

에서 매우 다양하고 유효한 기능을 나타내고 있음을 관찰하였다. 본 중설에서는 clusterin이 이차의 발달과 이차성 재생에 능동적으로 관여하고, *in-vivo* 및 *in-vitro* 실험에서 도관세포를 자극하여 이 세포의 자가증식 및 인슐린 분비세포로 분화를 유도하는 중요한 기능이 있음을 물론 베타세포의 기능을 유지하는데 필요한 중요 단백질을 설명하였다. 이는 당뇨병 치료를 위해 연구되고 있는 줄기세포 및 체도이식을 이용한 당뇨병 세포치료 분야에서 clusterin이 베타세포보호 물질, 베타세포분화유도 물질 및 베타세포기능유지물질로 이용될 수 있음을 시사하는 것이다.

참 고 문 헌

1. Hsieh SY, Chen WY, Shih TC, Yeh JY, Jeng JT: *Dys-regulation of clusterin in human hepatoma is not associated with tumorigenesis but is secondary to cell response to external tresses. Mol Carcinog 43:100-7, 2005*
2. O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, Tenniswood M: *Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis Cell Death Differ 10:914-27, 2003*
3. Balschuk O, Burdzy & Fritz: *Purification and characterization of a cell- aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. J Biol Chem 258:7714-20, 1983*
4. Fritz IB, Burdzy K, Setchell B & Balschuk O: *Ram rete testis fluid contains a protein (Clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. Biology of Reproduction 28:1283-388, 1983*
5. Slawin K, Sawczuk IS, Olsson CA: *Chromosomal assignment of the human homologue encoding SGP-2Buttvan RBiochem Biophys Res Commun 15:160-4, 1990*
6. Collard MW, Griswold MD: *Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. Biochemistry 26:3297-303, 1987*
7. Leger JG, Montpetit ML, Tenniswood MP: *Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. Biochem. biophys. Res. Commun 147:196-203, 1987*
8. May PC, Johnson SA, Poirier J, Lampert-Etchells M, Finch CE: *Altered gene expression in Alzheimer's disease brain tissue. Can J Neurol Sci 16:473-6, 1989*
9. Duguid JR, Bohmont CW, Liu N, Tourtellotte WW: *Changes in brain gene expression shared by scrapie*

- and Alzheimer disease. Proc. N&n. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7260-4, 1989
10. DeSilva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, Albers HW, Smith WR, Harmony JAK: *A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. J. biol. Chem* 265:13240-7, 1990
11. Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, Boothman DA: *Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5907-12, 2000
12. Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, Grzeschik KH, Ingletti C, Corti A, Sichel G: *The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. Genomics* 10:151-6, 1991
13. Tobe T, Minoshima S, Yamase S, Choi NH, Tomita M, Shimizu N: *Assignment of a human serum glycoprotein SP-40,40 gene (CLI) to chromosome 8. Cytogenet Cell Genet* 57:193-5, 1991
14. Wong P, Taillefer D, Lakins J, Pineault J, Chader G, Tenniswood M: *Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. Eur J Biochem* 221:917-25, 1994
15. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE: *Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. Proc Soc Exp Biol Med* 26:201-5, 1967
16. Cantenys D, Portha B, Dutrillaux MC, Hollande E, Roze C, Picon L: *Histogenesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. An immunocytochemical study. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 35:109-22, 1981
17. Like AA, Appel MC, Williams RM, Rossini AA: *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies. Lab Invest.* 38:470-86, 1978
18. Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A: *A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. Diabetes* 30:424-9, 1981
19. Park IS, Bendayan M: *Characterization of the endocrine cells in the pancreatic-bile duct system of the rat. Anat Rec* 232:247-56, 1992
20. Bouwens L, Braet F, Heimberg H: *Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. J Histochem Cytochem* 43:245-53, 1995
21. Hellerström C, Swenne I, Anderson A: *Islet cell replication and diabetes. In Lefebvre PJ, Pipeleers DG, eds. The Pathology of the Endocrine Pancreas in Diabetes. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag* 141-70, 1998
22. Plachot C, Movassat J, Portha B: *Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. Histochem Cell Biol* 116:131-9, 2001
23. 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
24. Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI: *Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. J Clin Invest* 99:2100-9, 1997
25. Min BH, Kim BM, Lee SH, Kang SW, Bendayan M, Park IS: *Clusterin expression in the early process of pancreas regeneration in the pancreatectomized rat J Histochem Cytochem* 51:1355-65, 2003
26. Calvo EL, Bernatchez G, Pelletier G, Iovanna JL, Morisset J: *Downregulation of IGF-I mRNA expression during postnatal pancreatic development and overexpression after subtotal pancreatectomy and acute pancreatitis in the rat pancreas. J Mol Endocrinol* 18:233-42, 1997
27. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S: *Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. Endocrinology* 136:5461-8, 1995
28. Kim BM, Kim SY, Lee S, Shin YJ, Min BH, Bendayan M, Park IS: *Clusterin induces differentiation of pancreatic duct cells into insulin-secreting cells. Diabetologia* 49:311-20, 2006
29. Jin G, Howe PH: *Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta. J Biol*

- Chem* 272:26620-6, 1997
30. Suh E, Wang Z, Swain GP, Tenniswood M, Traber PG: *Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G149-56, 2001
31. Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M: *Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:211-25, 2000
32. French LE, Chonn A, Ducrest D et al: *Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis. J Cell Biol* 122:1119-23, 1993
33. Jin G, Howe PH: *Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos. Eur J Biochem* 263:534-42, 1999
34. Gutacker C, Klock G, Diel P, Koch-Brandt C: *Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. Biochem J* 339:759-66, 1999
35. Reddy KB, Jin G, Karode MC, Harmony JA, Howe PH: *Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein/clusterin in epithelial cells. Biochemistry* 35:6157-63, 1996