

유전자 조작 근육모세포에서의 포도당 자극에 의한 인슐린 분비

경희대학교 의과대학 내과학교실

오승준 · 우정택 · 김성운 · 김진우 · 김영설

Glucose Regulated Production of Human Insulin in Genetically Modified Myoblast Cell Line (C2C12)

Seungjoon Oh, Jeong-Taek Woo, Sung Woon Kim, Jin-Woo Kim, Young Seol Kim

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Background: To develop somatic gene therapy model for diabetes mellitus, it is the most important to control it by glucose concentration. In order to develop the myoblasts that produce insulin by glucose concentration, the transfection of genes of human insulin, rat glucokinase and rat GLUT2 was conducted using C2C12, the murine myoblast cell line.

Methods: pMLC-hINSmut plasmid vector to which human insulin cDNA was inserted in C2C12 cell line, pCB7/GLUT2 and pCB7/GK to which GLUT2 and glucokinase were inserted. Based on the inserted gene, C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK and C2C12/INS-GK-GLUT2 were prepared. In each cell line, its mRNA and protein expression were measured. Also, the capability of producing insulin in low glucose (2.7 mM) and high glucose (25 mM) were compared.

Results:

1. It was observed that C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK, C2C12/INS-GK-GLUT2 cell line expressed mRNA and protein of transfected genes, respectively.
2. As for the insulin production depending on the glucose concentration in C2C12/INS, it slightly increased from $0.049 \pm 0.003 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ to $0.197 \pm 0.022 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$. However, in C2C12/GK-GLUT2-INS, it showed the most evident increase: from $0.251 \pm 0.074 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ to $1.325 \pm 0.221 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$.
3. The expression of insulin gene decreased in proportion to the insulin production capability, reaching the minimum point at the 8th week.

Conclusion: Genetically engineered murine myoblast secreted insulin depending on the glucose concentration in vitro and was able to cause its decrement when transplanted. However, it should be continued to study the method to maintain the consistent genetic expression in somatic cell therapy. (J Kor Endocrinol Soc 21:526~535, 2006)

Key Words: Glucokinase, GLUT2, Insulin, Myocyte

서 론

제1형 당뇨병은 자가면역 기전에 의해 췌장의 세포가 파괴되는 질환이며, 만성적인 고혈당에 의하여 케톤산혈증과 당뇨병의 합병증을 유발한다. 혈당조절을 하기 위해 당뇨병

접수일자: 2006년 2월 1일
통과일자: 2006년 12월 21일
책임저자: 오승준, 경희대학교 의과대학 내과학교실

환자에서의 인슐린 보충 요법은 주사기를 사용하는 인슐린 주사가 가장 전통적이며, 부족한 인슐린을 체내에 공급해 주기 위한 또 다른 시도로는 췌장이식이나 췌도세포의 이식을 고려할 수 있다. 췌장이식은 공여자를 구하기 어렵다는 점, 또한 현재는 이식 성공률이 1년 내 80% 정도로 많이 높아졌으나[1], 췌장 외분비 효소의 처리 문제, 성공하더라도 평생 면역억제제를 복용하여야 하는 등의 제한점을 갖는다[2]. 췌도세포 이식은 사람이나 돼지의 췌장에서 소도세포를 분리하고 이식 수여자의 면역시스템에 감지되지 않도록 특수한 레진에 싸서 이식하는 방법이 개발 중에 있으나[3,4], 췌도세포의 포도당 감지, 생존기간, 이식된 췌도세포의 인슐린 분비장애 문제 등 해결해야 할 문제가 산재하여 있다[5,6]. 이러한 문제를 해결하는 방법의 돌파구는 결국 어떻게 인슐린을 분비하는 세포가 주변의 포도당 농도에 적절히 반응하여 적당량의 인슐린을 분비하느냐는 것이다.

위에서 이미 기술한 다양한 방법들은 공여자가 존재하거나 동물의 췌도세포를 얻고 가공해야 하는 단점이 있지만,

자신의 근육세포를 생검하여 인슐린 분비에 관련된 다양한 유전자를 모두 주입시켜 다시 체내에 주입하면 주변의 포도당 농도에 반응하여 인슐린을 분비할 수 있고 이식에 대한 거부반응을 회피할 수 있으며, 특별한 공여자가 필요 없고 간단한 근육주사로 이식을 완료할 수 있는 장점을 갖는다.

현재까지 근육세포에 인슐린 혹은 전구인슐린(proinsulin) 유전자를 주입한 시도는 세계적으로 Yamasaki 등[7]과 Gros 등[8]에 의하여 시도되기 시작하였으며, 그 후 다양한 연구자들에 의하여 연구되었다[9~13]. 그러나 이들의 연구들 중 일부는 근육세포가 인슐린을 분비하여 혈당을 조절시킬 수 있는 가능성을 보여 주긴 하였다. 그러나 인슐린 분비 조절을 위한 기구로서 테트라사이클린 반응 단위(tetracycline responsive element)를 도입하여 테트라사이클린 등의 항생제의 의해 인슐린 분비를 증가시킬 수는 있지만 주변의 혈당을 직접 감지하여 생리적 인슐린을 분비시키는 단계까지는 이루어지지 않는 상태이다.

저자 등은 새로운 당뇨병 치료 방법을 개발하기 전 단계

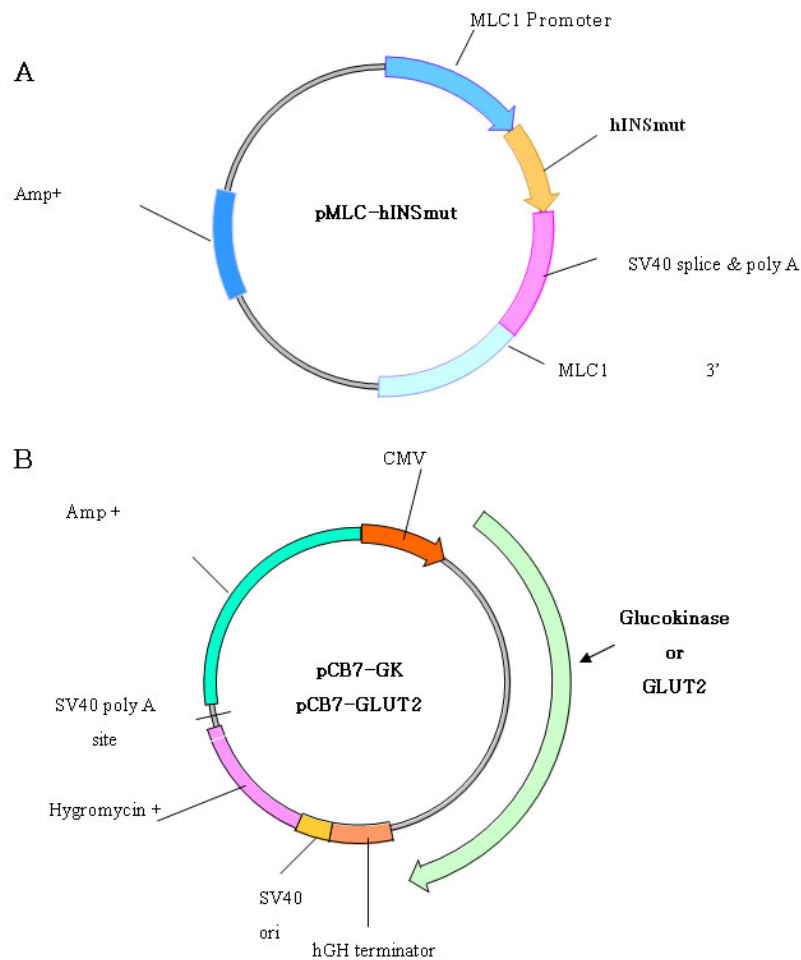


Fig. 1. Schematic of expression plasmids. A. generalized map of plasmid used for expression of human insulin; B. generalized map of plasmids used for expression of rat glucokinase, or rat GLUT2.

의 실험으로써 생쥐 근육모세포에 주변 포도당 농도를 감지하여 인슐린을 분비할 수 있도록 인슐린 유전자를 비롯한 혈당 감각 기구로서 glucokinase 및 GLUT2 유전자를 주입한 한 근육모세포를 만들고자 다음과 같은 실험을 하였다.

방 법

1. 플라스미드의 구성

돌연변이 된 사람 전구인슐린 cDNA가 삽입된 플라스미드 (pMLC-hINSmut)는 스페인의 Riu 박사(Universitat Autònoma de Barcelona, Spain)로부터[8], 쥐의 GLUT2 (pCB7/GLUT2), glucokinase (pCB7/GK)가 삽입된 플라스미드는 미국의 Clark 박사(BetaGene, Inc, TX, USA)로부터 기증 받았다[14].

pMLC-hINSmut는 furin 인지부위를 갖고 있는 돌연변이 된 전구인슐린 cDNA가 삽입되어 있다. 생체에 존재하는 furin이라는 효소를 이용하여 전구인슐린의 A쇄와 B쇄가 절단될 수 있도록, furin이 인지하는 부위인 Arg-X-Lys-Arg를 사람 전구인슐린 유전자에 A쇄와 B쇄에 해당하는 위치에 삽입되어 있다. 그리고 돌연변이 된 사람 인슐린 유전자를 조절하는 promoter로는 근육세포에서 세포 특이적으로 유전자를 발현시키기 위하여 myosin-light chain 1 (MLC1) promoter를 사용하였고, 발현을 증가시키기 위하여 사람 인슐린 유전자 하위에 MLC1 3' enhancer가 위치해 있는 구조로 되어 있다.

쥐 GLUT2와 glucokinase cDNA가 삽입된 플라스미드 상위에는 안정적인 유전자 주입 후 지속적인 유전자 발현을 위하여 cytomegalovirus (CMV) promoter가 위치하고 유전자 주입된 세포를 선택하기 위해 hygromycin resistance gene이 삽입되어 있다(Fig. 1).

2. 세포 배양 및 플라스미드 Transfection

생쥐에 이식하기 위한 유전자 조작 근육세포를 만들기 위해 생쥐 근육모세포주인 C2C12세포를 사용하였다. C2C12 세포는 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 1.0 mM sodium pyruvate가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO-BRL, USA)에 10% (vol/vol) fetal bovine serum

(GIBCO-BRL, USA)을 첨가한 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO₂가 공급되는 세포 배양기에서 배양하였다.

유전자 주입 후 유전자가 삽입된 세포를 선택하기 위한 항생제의 적정농도를 구하기 위해 geneticin (G418, Invitrogen, UK)과 hygromycin (100 mg/mL, Invitrogen, UK)에 대한 사멸곡선을 작성하였다. 6 well plate에 C2C12 세포가 약 20% 정도의 밀도가 되도록 배양한 다음 각각의 항생제에 대하여 0, 100, 300, 500, 800, 1,000 µg/mL의 농도로 배지에 항생제를 섞어 세포가 7일 만에 완전히 사멸되는 농도를 선택하였다. Geneticin은 500 µg/mL이었으며, hygromycin은 300 µg/mL이었다.

유전자 주입은 리포좀 유전자 주입 키트인 FuGene 6 (Roche, Germany)을 사용하였다. 주입된 유전자가 들어간 세포를 선택하기 위하여 유전자 주입 48시간 후 배지를 hygromycin 300 µg/mL이 되도록 교환하여 일주일간 배양하였다. Hygromycin이 포함된 배지에서 자라난 세포는 각각 glucokinase, GLUT2, glucokinase와 GLUT2가 삽입된 세포로 성장하여 인슐린 유전자를 삽입할 수 있도록 60 mm 배양 접시에 50~70%가 되도록 배양한 후, 다시 동일한 방법으로 유전자를 주입하였다. pMLC-hINSmut vector는 유전자 주입된 세포를 선택하기 위한 항생제 내성 유전자를 갖고 있지 않기 때문에, geneticin을 이용하여 유전자 주입된 세포를 선택하기 위하여 pMLC-hINSmut 5 µg과 pCI-neo vector (Promega, Cat No. E-1841, USA) 1 µg을 cotransfection 시킨 후 geneticin 500 µg/mL이 섞인 배지에서 세포를 배양하여 glucokinase-insulin, GLUT2-insulin, glucokinase-GLUT2-insulin이 삽입된 세포를 제작하였다.

항생제에서 선택된 세포들에서 인슐린을 발현시키기 위해서는 근육모세포에서 근육세포로 분화시키는 과정이 필요하기 때문에 인슐린을 측정하기 4일 전에 2% 말혈청(horse serum)이 첨가된 DMEM으로 바꿔 근육세포로 분화되도록 하였으며, 이들 세포를 이용하여 실험을 진행하였다.

3. RT-PCR을 이용한 유전자 발현 측정

60 mm 배양접시에 가득 차도록 성장한 각각의 세포들을 RNazol B (TEL-TEST Inc, TX, USA) 용액 500 µL를 넣고 세포를 수거하여 1.5 mL 튜브에 넣었다. RNA를 추출

Table 1. Sequences of PCR primer sets used to amplify each cDNA in this study

cDNA	Site	Primer (sense and antisense)	Fragment size
Pronsuln		5'-GGAATTCTGCCATGGCCCTG-3'	388 bp
		5'-GAATTCCTCGAGGTCGACGG-3'	
Glucokinase	+180 -1927	5'-TCTAGAGGCCACCGGTCTCT-3'	1775 bp
		5'-GGATCCTCTAGAGGATCCCC-3'	
GLUT2	-108 +1835	5'-TCTAGAGGATCTGGTACCAC-3'	1996 bp
		5'-TCCCAAGCTTATAACGTGCT-3'	

한 후, 역전사(reverse transcription) 반응은 200 μ L PCR tube에 1 μ g total RNA, 25 mM $MgCl_2$ 4 μ L, $10 \times$ RNA PCR 완충액 2.0 μ L, 10 mM dNTP 2 μ L, 20 U RNase inhibitor, 5 U AMV Reverse Transcriptase XL (TAKARA Inc, Japan), 2.5 pM Oligo dT-Adaptor primer 1 μ L, RNase free dH_2O 를 넣고 반응 총량이 20 μ L가 되게 하였다. 역전사 과정은 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, USA)를 이용하여 60 $^{\circ}C$ 에서 30분 반응시키고, 99 $^{\circ}C$ 에서 5분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다.

역전사시킨 DNA를 이용한 PCR을 위하여, 인슐린, glucokinase, GLUT2 유전자에 대한 각각의 시발제(primer)를 합성하였으며(Table 1), 200 μ L PCR tube에 역전사 반응물 4 μ L, 25 mM $MgCl_2$ 3 μ L, $10 \times$ RNA PCR 완충액 5 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, 2 U TaKaRa LA Taq (TAKARA, Japan) 30 pmol sense primer 1 μ L, 30 pmol antisense primer 1 μ L, dH_2O 를 넣어 반응용량이 50 μ L가 되게 하였다. PCR 증폭은 Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer-Cetus, USA)을 이용하여 반응 혼합 용액을 94 $^{\circ}C$ 5분간 가열하여 변성시키고, 이후 cycle부터는 변성(denaturing) 반응 94 $^{\circ}C$ 1 분, 결합(annealing) 반응 56 $^{\circ}C$ 1 분, 연장(extension) 반응 72 $^{\circ}C$ 1분씩 25회 반복하고 마지막 과정에서 못다 한 연장반응을 위하여 72 $^{\circ}C$ 에서 5분간 반응하였다. 반응 종료 후 반응액 중 5 μ L를 1% 한천 겔에 전기영동하여 반응산물을 확인하였으며, Gel Doc 2000 (BioRad Inc, USA)을 이용하여 영상을 분석하였다.

4. Western blot

Glucokinase와 GLUT2는 세포외부로 분비되는 단백질이 아니기 때문에 이들이 단백질로 발현되는지를 알아보기 위해 Western blot을 시행하였다.

우선 세포에서 단백질을 추출하기 위하여 100 mm 배양 접시에 가득 차도록 성장한 C2C12/INS-GK, C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK-GLUT2와 쥐의 췌장에서 분리한 췌도세포를 phosphate buffered saline로 3회 세척한 후 50 mM HEPES NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% triton X-100, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride로 구성된 세포 용해 완충액(cell lysis buffer)를 500 μ L씩 넣은 후 상온에서 10분간 방치한 후 세포들을 scraper로 긁어 모아 1.5 mL 튜브에 넣었다. 14,000 g로 4 $^{\circ}C$ 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액만 분리하여 -20 $^{\circ}C$ 에 시료를 보관하였다. 각각의 단백질의 양은 Lowry 법(BioRad DC Protein assay kit, BioRad, USA)을 사용하여 측정하였다.

각 시료들을 50 μ g씩 덜어 $5 \times$ sample buffer (60 mM 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM

2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 섞은 뒤 95 $^{\circ}C$ 에서 3분간 변성시킨 뒤 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis를 100V에서 3시간 동안 시행하였다. 전기영동된 겔 판을 nitrocellulose막에 4 $^{\circ}C$ 에서 30 V로 16시간 동안 전기흡착 시켰다. 전기흡착이 제대로 되었는지는 Ponceau S로 염색하여 단백질들의 band가 nitrocellulose막에 있는 것을 확인한 후 TBST buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 세척하여 다시 탈색시켰다. Nitrocellulose막의 비결합 부위를 차단시키기 위하여 차단 용액(blocking solution, 1% bovine serum albumin이 포함된 TBST 용액) 30 mL을 넣고 1시간 동안 안구형 진탕기(orbital shaker) 위에서 1시간 동안 천천히 흔들어 주었다. 용기에 든 차단 용액을 제거한 후 TBST buffer로 10분간 3회 세척한 후 일차 항체인 rabbit anti-GLUT2 antibody (Santa Cruz, Cat No. sc-9117, USA)와 rabbit anti-glucokinase antibody (Santa Cruz, Cat No. sc-7908, USA)를 각각 1:500으로 희석한 TBST buffer에 넣고 1시간 동안 안구형 진탕기에서 흔들며 상온에서 반응시켰다. 이후 1차 항체 용액을 제거한 뒤, TBST buffer로 약 10분간 3회 세척한 후 2차 항체 혼합용액(horse reddish peroxidase가 붙은 goat anti-rabbit antibody 1:2000 희석액)을 넣고 다시 1시간 동안 상온에서 안구형 진탕기에서 반응시켰다. 다시 TBST 용액으로 10분씩 3회 세척 후 발색을 위해 ECL Western blotting kit (Amersham life science, USA)를 사용하여 면역염색을 시행하였다. 면역염색 후 발색하는 형광에 의해 X-ray 필름에 30초간 노출시킨 뒤 현상하여 떠를 확인하였다.

5. 고농도 및 저농도 포도당에서의 인슐린 분비 측정

유전자 주입이 끝난 C2C12/INS, C2C12/INS-GK, C2C12/INS-GLUT2, 2C12/INS-GK-GLUT2 세포를 60 mm 배양접시 각각 두 개에 10^6 개씩 분주한 후 2% 말혈청이 함유된 DMEM 배지에 3일간 배양하였다. 배양 접시를 phosphate buffered salt 용액(GIBCO-BRL, USA)으로 2회 세척한 후 2.7 mM (50 mg/dL) 포도당이 함유된 DMEM 배지와 25 mM (400 mg/dL) 포도당이 함유된 DMEM 배지 3 mL로 교환하였다. 1시간이 지난 후 배지에서 100 μ L를 채취하였다. 인슐린은 방사면역측정법(Insulin RIABEAD II, DINABOT Co., Japan)을 사용하여 측정하였다.

6. 통계 처리

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 군 간 비교는 비모수 통계 방법인 Mann-Whitney U test를 실시하였으며, 동일군 내의 변동은 Wilcoxon sign rank test를 통하여 분석하였다. 통계적 의미는 P값이 0.05 미만인 경우로 하

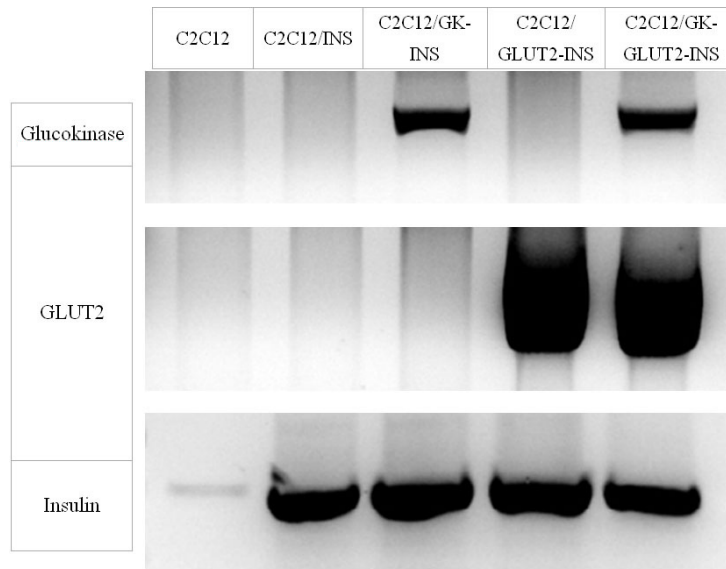


Fig. 2. RT-PCR analysis of insulin, glucokinase, GLUT2 mRNA in C2C12 derived cell lines at 8th week after transfection. In the C2C12/GK-GLUT2-INS cell line in which glucokinase, GLUT2 and insulin gene were all transfected, all of three genes were expressed and other cells expressed mRNA depending on inserted genes.

었다.

결 과

1. 유전자 조작된 세포주의 유전자 발현

음성 대조군인 C2C12 세포주에서는 인슐린과 glucokinase, GLUT2의 mRNA의 발현이 없었지만, C2C12/INS-GK에서는 인슐린과 glucokinase의 mRNA가 발현되었으며, C2C12/INS-GLUT2에서는 인슐린과 GLUT2가, C2C12/INS-GK-GLUT2에서는 세가지 유전자의 mRNA가 모두 발현됨을 확인하였다(Fig. 2).

2. Glucokinase와 GLUT2의 단백질 발현

C2C12 세포주를 대조군으로 사용하고 glucokinase 유전자만 transfection시킨 C2C12/GK, glucokinase와 인슐린 유전자를 transfection시킨 C2C12/INS-GK, 인슐린과 glucokinase, GLUT2 유전자를 모두 이식시킨 C2C12/INS-GK-GLUT2와 C2C12/INS-GLUT2 세포주에 대하여 토끼의 anti-glucokinase antibody를 사용하여 Western blot을 한 결과 음성 대조군으로 사용한 C2C12 세포주와 C2C12/INS-GLUT2 세포주에서는 glucokinase가 발현되지 않았으며, 나머지 glucokinase가 transfection된 세포주에서는 60 kDa 위치에서 glucokinase가 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A).

한편 GLUT2 유전자에 대해서 토끼의 anti-GLUT2 antibody를 사용하여 Western blot을 시행한 결과 음성 대조

군으로 사용한 C2C12 세포주와 C2C12/INS-GK 세포주는 60 kDa 위치의 GLUT2에 해당되는 띠가 보이지 않았으나, GLUT2 유전자를 transfection시킨 C2C12/GLUT2, C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK-GLUT2 세포주에서는 GLUT2가 발현되었다(Fig. 3B).

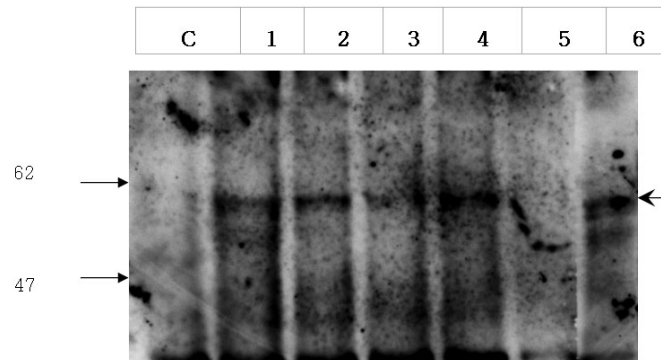
3. 고농도와 저농도에서의 인슐린 분비능의 비교

C2C12/INS, C2C12/GLUT2-INS, C2C12/GK-INS, C2C12/GK-GLUT2-INS를 각각 2.5 mM과 27 mM 포도당이 포함된 배지(serum free)에서 각각 한 시간씩 방치한 후 배지 속에 포함된 인슐린의 양을 측정해 본 결과, C2C12/INS는 $0.049 \pm 0.003 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.197 \pm 0.022 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 거의 증가하지 않았다. 그러나 C2C12/GLUT2-INS는 $0.052 \pm 0.047 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.363 \pm 0.128 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 증가하였으며, C2C12/GK-INS는 $0.233 \pm 0.069 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.731 \pm 0.239 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 증가하였다. 한편 C2C12/GK-GLUT2-INS는 $0.251 \pm 0.074 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $1.325 \pm 0.221 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 가장 뚜렷한 증가를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 4).

4. 인슐린 분비능의 지속 기간

pMLC-hINSmut vector가 transfection된 후 2주 뒤부터 2주 간격으로 24시간 동안의 인슐린 생산량과 mRNA 발현을 관찰한 결과 시간에 2주째 $135.5 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/day}$ 로 가장 높았으며, 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소하여 4주째

A. Glucokinase



B. GLUT2

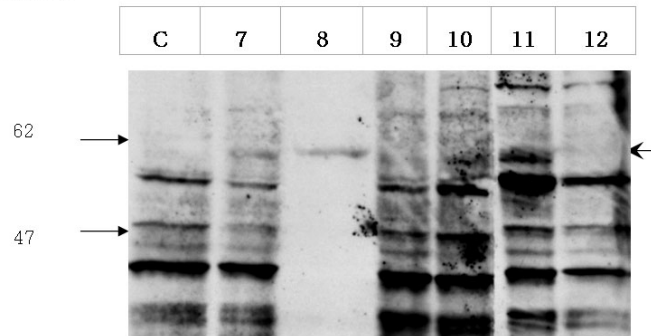


Fig. 3. Western blot analysis of glucokinase or GLUT2 protein in C2C12-derived cell line at the 8th week after transfection. The arrow in the right side of the figure indicates glucokinase in Fig. 3A and GLUT2 in Fig. 3B, respectively. C, C2C12; 1 and 2, C2C12/GK; 3 and 4, C2C12/INS-GK; 5, C2C12/INS-GLUT2; 6, C2C12/INS-GK-GLUT2; 7 and 8, C2C12/GLUT2; 9 and 10, C2C12/INS-GLUT2; 11, C2C12/INS-GK-GLUT2; 12, C2C12/INS-GK.

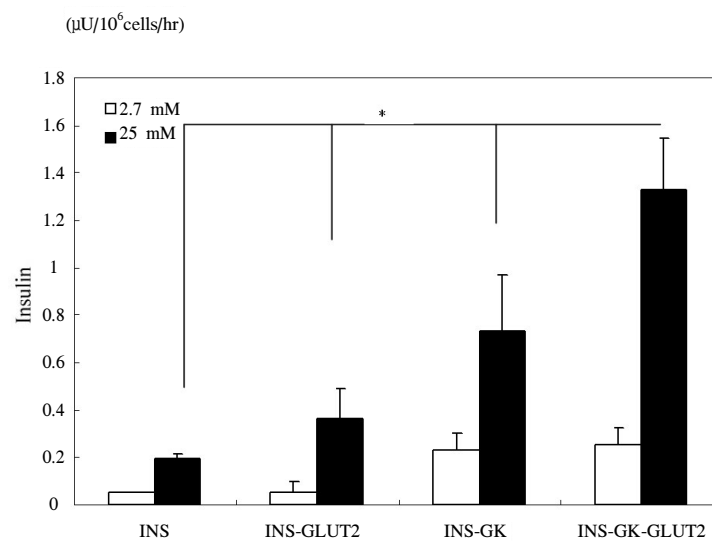


Fig. 4. Effect of glucose concentration on insulin secretion in C2C12 cell lines overexpressing insulin gene and GLUT2 or glucokinase gene or both at 8th week after transfection ($n = 4$). * $P < 0.05$.

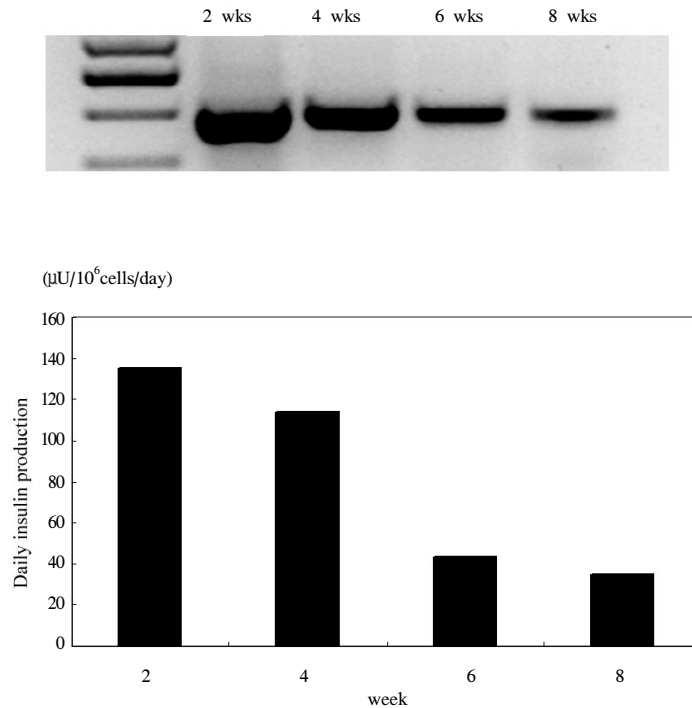


Fig. 5. RT-PCR analysis of insulin mRNA and daily insulin production in C2C12 derived cell line.

114.0 $\mu\text{U}/10^6$ cells/day, 6주째 43.5 $\mu\text{U}/10^6$ cells/day, 8주째 34.5 $\mu\text{U}/10^6$ cells/day로 현저히 인슐린의 생산 및 mRNA 발현이 떨어지는 소견을 보였다(Fig. 5).

고 찰

포도당 농도에 반응하여 정상적인 인슐린을 분비하는 이상적인 유전공학적 세포에 요구되는 조건들로는 첫째, 포도당 감지기구(glucose-sensing apparatus)인 GLUT2와 glucokinase가 존재하여야 한다. 둘째, 포도당에 고친화성 hexokinase의 발현이 약해야 한다. 셋째로는 전구인슐린에서 효율적으로 인슐린으로 전환되는 과정에 필요한 효소가 필요하며(prohormone convertase, PC2, PC3). 넷째, 포도당이나 그 밖에 인슐린 분비를 자극하거나 억제하는 물질들에 대해 정상적인 인슐린 분비반응을 보여야 한다. 그러나 이와 같은 조건을 전부 만족하는 체도 베타세포를 대신할 세포는 존재하지 않기 때문에 가장 적은 조작을 가하여 베타세포와 유사한 기능을 할 수 있는 다양한 시도들이 시작되었다.

저자 등은 본 연구에서 C2C12 근육세포주를 사용하였다. 이는 생쥐 근육세포주인 C2 세포주의 한 subclone이다[15]. 이 세포주는 매우 빠르게 증식하는 특징이 있기 때문에 유전자 전달에 용이하며, 클론을 선택하기 쉽고, 분화시킬 경우 더 이상 증식하지 않는 근육세포로 분화가 되는 특징을 갖는다. 전달된 인슐린 유전자 cDNA는 A쇄와 B쇄에

해당하는 부위에 furin이 인식할 수 있도록 유전자가 돌연변이 되어 있어 인슐린이 전구인슐린이 아닌 성숙된 사람 인슐린을 혈중으로 분비할 수 있도록 하였다. 또한 인슐린을 주변의 포도당 농도에 반응하여 분비시키기 위한 시도로 포도당 감지기구로서 glucokinase 유전자와 GLUT2 유전자를 사용하였다. 각각의 유전자들을 단계별로 차별화 하여 전달한 세포를 배양하여 2.5 mM과 27 mM 포도당이 포함된 배지에서 각각 1시간씩 자극한 결과 C2C12/INS는 $0.049 \pm 0.003 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr에서 $0.197 \pm 0.022 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr로 거의 증가하지 않았다. 그러나 C2C12/GLUT2-INS는 $0.052 \pm 0.047 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr에서 $0.363 \pm 0.128 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr로 증가하였으며, C2C12/GK-INS는 $0.233 \pm 0.069 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr에서 $0.731 \pm 0.239 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr로 증가하였다. 한편 C2C12/GK-GLUT2-INS는 $0.251 \pm 0.074 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr에서 $1.325 \pm 0.221 \mu\text{U}/10^6$ cells/hr로 가장 뚜렷한 증가를 보였다. 예상대로 포도당 감지기구가 모두 전달된 세포주인 C2C12/GK-GLUT2-INS에서는 기저치의 약 5.3배의 인슐린 분비가 이루어졌다. 또한 인슐린 유전자와 GLUT2 유전자를 전달한 세포주보다 인슐린과 glucokinase 유전자를 전달한 세포주가 포도당 농도가 증가함에 따라 보다 많은 인슐린을 분비하여 인슐린 분비 시 GLUT2에 비하여 glucokinase가 보다 큰 역할을 한다는 사실을 추측할 수 있었다. 그러나 체도세포가 동일한 포도당 농도의 자극을 받아 분비하는 정도의 인슐린 분비능의 증가가 본 실험에서는 이루어지지 않았다. 유전자 조작에 의한 이와 같은 ex-vivo 유

전자 치료가 생체에 적용되기 위해서는 좀 더 많은 개발이 필요할 것으로 보인다. 그리고 인슐린 유전자만을 전달한 C2C12/INS에 비하여 모든 유전자가 다 주입된 C2C12/GK-GLUT2-INS의 기저 인슐린 분비량이 왜 많은지는 현재 실험에서 그 이유를 알기는 어려웠다.

과거에 유전자 조작을 한 세포를 이식시키기 위한 시도로 신경내분비세포나 간세포를 가장 많이 이용하였다. 이 중 간(肝)세포를 조작한 연구의 경우[16], glucokinase와 GLUT2가 세포에서 발현되므로 포도당에 대한 인슐린 분비를 조절할 수 있으리라는 가정 하에 실험이 시도되었다. 그러나 간세포는 분비과립을 갖고 있지 않으므로 인슐린 분비 전 저장에 이루어질 수 없다는 문제가 있었다. 따라서 포도당에 대한 초기 인슐린 분비의 증가는 기대할 수 없으며 단지 일정한 양의 인슐린만 분비할 수 있다[17]. 또한 간세포는 prohormone convertase가 없으므로 전구인슐린에서 인슐린으로 만들 수 없어 생체 활성도가 떨어지는 전구인슐린만을 분비하는 결정적인 단점을 갖는 것이 해결되어야 할 문제로 남게 되었다[17].

그러나 다음 단계로 유전적으로 조작된 세포들을 이식시키는 방법상의 문제를 간과할 수는 없다. 만일 완전하게 동작하는 세포를 개발하였다 하더라도 생착이 잘 되지 않거나 이식이 용이하지 않다면 생체 내에서의 정상 작동을 기대하기 어렵기 때문이다. 그렇기 때문에 이식을 간단하게 할 수 있는 점을 먼저 생각한다면 근육세포가 가장 쉬울 수 있다. 근육세포는 근육주사로 간단하게 이식할 수 있으며, 생착할 경우 그 부위에서 myotube를 형성하여 주위의 혈관 등에 연결되어 있으므로 인슐린을 분비하여 생체 내로 쉽게 전달할 수 있는 장점이 있다. 그러나 근육세포가 인슐린을 분비하기 위해서는 인슐린 분비를 위한 여러 가지 유전자(인슐린, glucokinase, GLUT2, PC2, PC3)가 모두 부족하다는 큰 단점을 갖고 있다. 또한 근육세포는 호르몬을 분비하는 내분비기관 내 세포와 다른 구조를 갖고 있기 때문에 제대로 호르몬을 분비할 수 있을까 하는 의문도 갖게 한다. 그러나 1991년에 사람 성장호르몬을 생쥐 근육모세포인 C2C12 세포주에 유전자 주입시켜 성장호르몬을 분비시킬 수 있었다는 두 편의 논문이 발표되었다[18,19]. 이것은 근육세포도 유전자 조작을 통하여 내분비 기관으로서의 역할을 수행할 수 있다는 하나의 가능성을 보여 주었으며, 성장호르몬은 인슐린보다 분자량이 크기 때문에 인슐린 역시 유전자 조작을 가할 경우 충분히 분비될 수 있다는 것을 시사하는 실험이었다. 위에서 기술한 대로 C2C12 세포주는 근육모세포인 관계로 세포자체적으로 glucokinase와 GLUT2가 발현되지 않으므로 조작된 세포주들의 삽입된 유전자가 제대로 발현이 되고 있는지 알아보기 위해 RT-PCR과 Western blot을 시행하였다. 그 결과 아무 조작을 가하지 않은 C2C12 세포주에서는 두 가지 유전자 모두가 발현되지

않는 것이 확인되었으며, 나머지 유전자들을 전달받은 세포주들은 전달받은 유전자의 종류에 따라 두 가지 유전자가 각각 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나 위에서도 기술된 바처럼 조작된 유전자가 계속적으로 영구히 발현되지는 않는(transient expression) 관계로 가장 먼저 전달된 glucokinase의 발현이 가장 미약하였다.

이와 유사한 실험을 시행한 Gros 등[8]은 myosin light chain promoter를 이용하여 동일한 돌연변이 인슐린 유전자의 발현을 시킨 결과 $100 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 의 인슐린 분비능을 갖는 C2C12 근육모세포주를 만드는데 성공하였다. 이는 단일 플라스미드를 이용한 유전자 전달을 하여 본 연구에서 시도한 세 가지 플라스미드를 동시에 한 세포에 전달하는 방법에 비해 유전자 전달의 효율이 높은 것이 그 이유인 것으로 보인다. 그러나 본 연구에서 만들어진 유전자 조작 근육세포의 이식은 포도당 농도에 따라 인슐린 분비가 증가되는 점이 다른 연구에 비해 생리적이라는 점은 개선되었지만, 인슐린의 생산 효율이 떨어진다는 사실은 개선해야 할 가장 큰 과제로 남는다.

전달된 인슐린 유전자가 발현된 기간은 유전자 전달 2주째 $135.5 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/day}$ 로 최대 인슐린 분비가 이루어졌다. 그러나 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 경향을 관찰할 수 있었으며, 유전자 주입 후 8주째 $34.5 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/day}$ 로 현저히 인슐린의 생산이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이는 일반적으로 일시적 transfection이 수일 내지 1주일 정도 발현이 유지되는데 반하여 상대적으로 긴 기간 동안 유지되었다. 같은 플라스미드를 사용한 Gros 등[8]도 1.5개월 동안 인슐린 분비가 된 것을 확인하였고, CMV/insulin 유전자를 근육세포에 transfection시켰던 Simonson 등[12]도 transfection 후 30일째 인슐린의 분비가 측정되지 않는 수준까지 떨어졌던 것을 비교한다면 상대적으로 장시간 동안 인슐린을 안정적으로 분비한 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구는 유전자 조작된 근육모세포주가 주변의 포도당 농도를 감지하여 인슐린을 생산 및 분비할 수 있다는 하나의 가능성을 보여 주었다. 또한 이러한 세포주는 췌도세포와 똑같은 양상의 인슐린 분비를 보여 주는 것은 비록 실패하였지만, 현재의 인슐린 치료가 갖고 있는 단점을 극복할 수 있는 하나의 가능성을 제시하였다고 사료된다.

요 약

연구 배경: 당뇨병을 치료하기 위한 세포이식을 하는데 있어 가장 중요한 것은 포도당에 의해 조절되는 것이다. 포도당에 반응하는 유전자는 현재 여러 종류가 있지만, 췌도세포에서는 glucokinase와 GLUT2가 그 역할을 하고 있다. 저자는 포도당에 의해 인슐린을 생산하는 근육모세포를 개발하기 위하여 생쥐 근육모세포 세포주인 C2C12를 이용하여 사

람 인슐린, 쥐 glucokinase, 쥐 GLUT2 유전자를 transfection 시켰다.

방법: C2C12 세포주에 사람 인슐린 cDNA가 삽입된 pMLC-hINSmut 플라스미드와 쥐 GLUT2와 glucokinase가 삽입된 pCB7/GLUT2와 pCB7/GK를 transfection시켜 안정된 세포주를 얻었다. 각각의 삽입된 유전자에 따라 C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK, C2C12/INS-GK-GLUT2 세포주를 만들었다. 이들 세포주에 대하여 각 유전자의 mRNA 및 단백질 발현을 관찰하였다. 그리고 저농도 포도당(2.7 mM)과 고농도 포도당(25 mM)에서의 인슐린 생산능을 비교하였다. C3H 생쥐에 streptozotocin으로 당뇨병을 유발시킨 뒤 C2C12/INS-GK-GLUT2 세포주를 이식한 후 혈당의 변화를 관찰하였다.

결과

1. C2C12/INS-GLUT2, C2C12/INS-GK, C2C12/INS-GK-GLUT2 세포주는 각각 transfection된 유전자의 mRNA와 단백질을 발현하여 transfection 후 유전자가 성공적으로 작동함을 확인할 수 있었다.

2. 포도당 농도에 따른 인슐린 생산은 C2C12/INS는 $0.049 \pm 0.003 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.197 \pm 0.022 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 거의 증가하지 않았다. C2C12/GLUT2-INS는 $0.052 \pm 0.047 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.363 \pm 0.128 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 증가하였으며, C2C12/GK-INS는 $0.233 \pm 0.069 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $0.731 \pm 0.239 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 증가하였다. 한편 C2C12/GK-GLUT2-INS는 $0.251 \pm 0.074 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 에서 $1.325 \pm 0.221 \mu\text{U}/10^6 \text{ cells/hr}$ 로 가장 뚜렷한 증가를 보였다($P < 0.05$).

3. 인슐린 유전자의 발현은 시간이 지남에 따라 인슐린 생산능과 함께 비례하여 감소하였으며, 8주째 현저히 감소되는 양상을 보였다.

결론: 유전자 조작된 생쥐 근육모세포는 포도당 농도에 따라 인슐린을 분비하였으며, 이식시 혈당 저하를 시킬 수 있었다. 그러나 이러한 체세포 이식 치료는 유전자 발현을 지속적으로 유지시킬 수 있는 방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sutherland DE, Gruessner AC, Gruessner RW: Pancreas transplantation: a review. *Transplant Proc* 30:1940-1943, 1998
2. Pancreas transplantation for patients with type 1 diabetes: American Diabetes Association. *Diabetes Care* 23(suppl 1):S85, 2000
3. Panza JL, Wagner WR, Rilo HLR, Rao RH, Beckman EJ, Russell AJ: Treatment of rat pancreatic islets with

- reactive PEG. *Biomaterials* 21:1155-1164, 2000
4. Aomatsu Y, Nakajima Y, Ohyama T, Kin T, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, Nagao M, Tatekawa Y, Sho M, Ikeda N, Kanokogi H, Kobayashi T, Urizono Y, Yamada T, Shibaji T, Kanamura T, Ogawa S, Iwata H, Nakano H: Efficacy of agarose/polystyrene sulfonic acid microencapsulation for islet xenotransplantation. *Transplant Proc* 32:1071-1072, 2000
5. Liu EH, Herold KC: Transplantation of the Islets of Langerhans. *New Hope for Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. Trends Endocrinol Metab* 11:379-382, 2000
6. Zwillich T: Diabetes research. Islet transplants not yet ready for prime time. *Science* 289:531-533, 2000
7. Yamasaki K, Sasaki T, Nemoto M, Eto Y, Tajima N: Differentiation-induced insulin secretion from nonendocrine cells with engineered human proinsulin cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 265:361-365, 1999
8. Gros L, Riu E, Montoliu L, Ontiveros M, Lebrigand L, Bosch F: Insulin production by engineered muscle cells. *Hum Gene Ther* 10:1207-1217, 1999
9. Arcelloni C, Falqui L, Martinenghi S, Stabilini A, Pontiroli AE, Paroni R: Processing and release of human proinsulin-cleavage products into culture media by different engineered non-endocrine cells: a specific assessment by capillary electrophoresis. *J Endocrinol* 166:437-445, 2000
10. Scougall KT, Shaw JA: Tetracycline-regulated secretion of human insulin in transfected primary myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 304:167-175, 2003
11. Shaw JA, Delday MI, Hart AW, Docherty HM, Maltin CA, Docherty K: Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to non-neuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle in vivo. *J Endocrinol* 172:653-672, 2002
12. Simonson GD, Groskreutz DJ, Gorman CM, MacDonald MJ: Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum Gene Ther* 7:71-78, 1996
13. Wilson MO, Scougall KT, Ratanamart J, McIntyre EA, Shaw JA: Tetracycline-regulated secretion of human (pro) insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *J Mol Endocrinol* 34:

- 391-403, 2005
14. Clark SA, Quaade C, Constandy H, Hansen P, Halban P, Ferber S, Newgard CB, Normington K: Novel insulinoma cell lines produced by iterative engineering of GLUT2, glucokinase, and human insulin expression. *Diabetes* 46:958-967, 1997
 15. Yaffe D, Saxel O: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270:725-727, 1977
 16. Mitanecz D, Doiron B, Chen R, Kahn A: Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes. *Endocr Rev* 18:520-540, 1997
 17. Vollenweider F, Irminger JC, Gross DJ, Villa-Komaroff L, Halban PA: Processing of proinsulin by transfected hepatoma (FAO) cells. *J Biol Chem* 267: 14629-14636, 1992
 18. Barr E, Leiden JM: Systemic delivery of recombinant proteins by genetically modified myoblasts. *Science* 254:1507-1509, 1991
 19. Dhawan J, Pan LC, Pavlath GK, Travis MA, Lanctot AM, Blau HM: Systemic delivery of human growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. *Science* 254:1509-1512, 1991