

# 성체 개에서 분리된 췌장세포에 PDX-1/VP16 유전자 과발현을 이용하여 베타세포로의 분화 유도

가톨릭대학교 의과대학 내분비대사내과 교실, 가톨릭대학교 의과대학 외과<sup>1</sup>

유영혜·박순철<sup>1</sup>·이승환·박헌석·함동식·이마리·김지원·송기호·윤건호

PDX-1/VP16 Overexpression Induce the Transdifferentiation of Canine Adult Pancreatic Cells into Beta-cells

Young-Hye You, Sun Cheol Park<sup>1</sup>, Seung-Hwan Lee, Heon-Seok Park, Dong-Sik Ham, Marie Rhee, Ji Won Kim, Ki-Ho Song, Kun-Ho Yoon.

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Surgery<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea*

## - Abstract -

**Background:** A major obstacle of islet transplantation is an inadequate supply of insulin-producing tissue. Ad-PDX-1/VP16 overexpression and Exendin-4 treatment have been proved the effects on differentiation and proliferation of pancreatic stem cells. But, the study is insufficient using adult animal pancreatic stem cells.

**Methods:** Pancreatic cells were prepared from the non-endocrine fraction of canine pancreases. This cells were cultivated free floating state and monolayer culture after dispersion. The floating pancreatic cells were transplanted under the kidney capsule of normoglycaemic nude mice. The dispersed pancreatic cells were infected with Ad-PDX-1/VP16 or Ad-GFP. After infection, those cells were transplanted of nude mice. After transplantation, mice were treated with either 1 nmol/kg exendin-4 or saline solution by intraperitoneal injection for 10 days.

**Results:** The relative volume of the beta-cells in the grafts of the free floating cultured pancreatic cells were  $23.4 \pm 13.1\%$  at two weeks and  $5.2 \pm 2.0\%$  at eight weeks. At two weeks after transplantation, the relative volume of insulin-positive cells in the grafts of dispersed pancreatic cells were  $28 \pm 5.7\%$ ,  $20.5 \pm 0.7\%$  and  $31 \pm 1.4\%$  in control, GFP and PDX-1/VP16 treated groups respectively. At eight weeks after transplantation, the relative volume of insulin-positive cells in the grafts were  $11.8 \pm 5.9\%$ ,  $8 \pm 7.3\%$  and  $16.6 \pm 7.4\%$  in control, GFP and PDX-1/VP16 treated groups respectively. Exendin-4 treatment didn't show any additive effects on transdifferentiation of pancreas stem cell into beta-cells.

**Conclusion:** The expansion and transdifferentiation were not observed after the transplantation of the free floating cultured pancreatic cells. PDX-1/VP16 overexpression induces the transdifferentiation of adult pancreatic cells into beta-cells. However Exendin-4 treatment hasn't any effects on the expansion and transdifferentiation of the cells in the grafts. (J Kor Diabetes Assoc 31:51~62, 2007)

**Key Words:** Ad-PDX-1/VP16, Beta-cell, Exendin-4, Pancreatic exocrine cell, Transdifferentiation, Transplantation

## 서 론

당뇨병은 완치가 어려운 만성 질환으로, 세계적으로 환자가 폭발적으로 증가하고 있으며<sup>1,2)</sup>, 우리나라도 예외가 아니다. 고혈당을 극복할 수 있는 충분한 양의 췌도 이식은 인슐린 결핍형 당뇨병을 근본적으로 치료할 수 있다. 이러한 개념 하에 제1형 당뇨병환자를 대상으로 동종 췌장이식이 시행되고 있으나 이식에 필요한 공여췌장의 절대적 부족으로 인해 활성화되지 못하고 있다<sup>2,3)</sup>. 췌도 이식의 난관을 극복하고 이를 활성화하기 위해서는 새로운 췌도 이식원의 개발이 절실하다. 이를 위해서 이중 이식<sup>4)</sup>, 배아줄기세포<sup>5,6)</sup>, 췌장 내 성체 줄기세포를 이용한 베타세포로의 분화 유도 및 증식<sup>7)</sup>에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 췌장 절제술이나 약물 투여를 통해 췌장의 일부를 제거하거나 파괴한 후 재생을 보이는 일부 실험동물 모델에서 췌장의 90% 이상을 차지하는 췌장 선포세포 (Pancreatic acinar cell)와 췌관세포 (Pancreatic ductal cell)들이 베타세포의 증식에 관여한다는 증거들이 보고된 바 있다<sup>8)</sup>. 따라서 췌장 내 존재하는 성체 줄기세포가 향후 유용한 췌도 이식원으로서의 가능성을 가지고 있음을 시사하고 있다. 그러나 이러한 연구들은 주로 태아 췌장 조직 또는 신생돼지를 이용한 연구들인데 이들은 증식 및 분화 능력이 뛰어난 장점이 있으나 증식과 분화에 많은 시간이 소요되며 특히 사람 태아 췌장의 경우 취득이 매우 제한적이다<sup>9)</sup>. 반면 성인 췌장에서 이식에 필요한 췌도를 분리한 다음 버려지게 되는 외분비세포들은 췌도 분리 과정 중에서 손쉽게 확보할 수 있으므로 이를 베타세포로 증식 분화시킬 수 있는 기술이 안정적으로 확보된다면 췌도이식을 획기적으로 발전시킬 수 있을 것이다. 그러나 성체에서 분리된 외분비세포를 이용하여 베타세포로의 전이 분화를 성공한 연구 결과는 매우 제한적이다<sup>10,11)</sup>.

최근 췌장 특이적 전사인자들을 다양한 줄기세포들에 전달함으로써 베타세포로의 분화를 유도하거나 췌도의 기능을 강화하고자 하는 연구가 다양하게 진행되고 있다. 췌장 발생에 관여하는 여러 전사인자들 중 PDX-1 (pancreas duodenum homeobox factor 1)은 췌장 발생에 가장 중요한 전사인자로 전장 내배엽세포들이 췌장을 형성하는 초기 단계에 발현하고, 이 유전자를 발현하는 세포들만이 특이적으로 췌장으로 분화한다는 보고가 있다<sup>12)</sup>. 또한 PDX-1은 췌장세포에서 발현하는 다양한 전사인자들의 발현을 조절하여 베타세포로의 분화를 유도하며 동시에 분화된 베타세포의 기능을 유지하는 데에도 필수적인 인자이다<sup>13)</sup>. 선포세포나 간장 세포 같은 비 베타세포에서도 PDX-1의 발현 유도가 베타세포로의 분화를 유도한다는 연구가 있다<sup>14)</sup>. 90% 췌장 절제 모델 위에서 췌장이 재생하는 동안 PDX-1은 췌관 세포와 췌도에서 높게 발현된다. 이는 PDX-1이 성체 췌장에서 내분비 재생에 필수적이며, 췌관 세포가 내분비 세포로

분화하도록 유도하는 중요한 인자라는 증거가 된다<sup>15)</sup>. 그러나 유전자를 이용한 세포 내 PDX-1 유전자 전달은 핵 내 PDX-1의 다양한 유전자 전사 조절 효과가 제한적인 단점이 있다<sup>16)</sup>. 이러한 문제를 보완하고자 PDX-1의 전사를 강화할 수 있는 재조합 유전자로서 PDX-1/VP16이 고안되었으며, 이는 간에서 인슐린을 생산하는 세포를 유도하는데 효과적이고, 유전자 전달을 통하여 당뇨 쥐에서 당내성이 개선되었다는 연구가 보고된 바 있다<sup>17,18)</sup>.

GLP-1은 소장에서 분비되어 혈당조절에 관여하는 장내 호르몬으로 식후 인슐린 분비를 증가시키며 또한 췌장 베타세포의 증식을 촉진하고 선포세포와 췌관세포에서 베타세포의 신생을 촉진한다<sup>19-21)</sup>. 최근에는 설치류에서 GLP-1의 투여가 췌장의 전사인자인 PDX-1의 발현을 높여 베타세포의 증식을 촉진한다는 보고가 있었으나<sup>22)</sup>, GLP-1의 혈중 반감기는 약 2분 정도로 매우 짧은 한계를 갖고 있다. 도마뱀의 침샘에서 분리된 Exendin-4라는 물질은 GLP-1과 같은 기능을 가지고 있으면서 천연 호르몬보다 더 강력하고 효과가 오래 지속되며, GLP-1보다 반감기가 훨씬 길다는 것이 보고되어, Exendin-4는 이미 임상에서 당뇨병환자의 치료 약제로 사용되기 시작하고 있다<sup>23)</sup>. 그러나 PDX-1 유전자의 발현과 Exendin-4의 병합 투여가 어떠한 효과를 보일지에 대한 연구는 없다. 또한 이제까지 대부분의 연구는 설치류를 이용한 소동물에서 시행되었으므로 이 결과를 사람의 경우로 판단하기에는 많은 무리가 있는 것 역시 사실이다.

본 연구는 PDX-1/VP-16 유전자 과발현과 Exendin-4 투여가 대동물의 성체에서 얻은 선포세포의 증식과 베타세포로의 분화를 유도할 수 있는가에 대하여 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료

개 췌장에서 선포세포를 분리 및 배양하기 위해 Hanks' balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 이상 GIBCO, Grand Island, NY), Dissociation medium (Sigma Chemical, St. Louis MO), 그리고 Collagenase P (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)를 사용하였다. DMEM (8 mM glucose) 배양액에는 nicotinamide (1,220 mg/L), HEPES (2,380 mg/L), bicarbonate (2,000 mg/L), L-glutamin (600 mg/L), fetal bovine serum (FBS ; 100 mL/L), 그리고 항생제 (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL; 이상 Sigma Chemical, St. Louis, MO)를 첨가하였다. 아테노바이러스를 증식하기 위하여 MEM 배양액에 bicarbonate (2,200 mg/L), fetal bovine serum (FBS ; 100 mL/L), 그리고 항생제 (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL; 이상

Sigma Chemical, St. Louis, MO)를 첨가하였다. 바이러스를 정제하기 위해서 cesium chloride를 사용하였다. 면역염색을 위하여 polyclonal rabbit anti-pancytokeratin, polyclonal guinea pig anti-insulin (이상 Zymed, San Francisco, CA), rabbit anti-human  $\alpha$ -amylase (Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였고 이차 항체로는 biotin-conjugated anti-guinea pig IgG, avidin-biotin complex (이상 Vectastain<sup>®</sup> ABC kit, VECTOR Laboratory, Burlingame)을 사용하였다.

## 2. 췌장세포 분리 및 배양

개 (Beagle, 10~15 kg)를 저녁부터 12시간 금식 시키고 Rumpun (0.15 ml/kg, 바이엘)과 Ketamine (16 mg/Kg, 유한양행)으로 마취하고 난 후 췌장을 적출하였다. Collagenase P (1 mg/mL in HBSS, 3~4 mL/mg of pancreas)를 췌관 내로 서서히 주입한 후 충분히 부풀 췌장을 분리 챔버에 넣고 연동펌프를 이용해 미리 준비해 둔 37℃ HBSS를 챔버 내로 순환시키면서 부드럽게 챔버를 흔들어 주었다. 챔버에서 나온 소화된 조직을 HBSS (5% FBS 함유)가 들어있는 시험관 (conical tube, TPP<sup>®</sup>, Switzerland)에 하나씩 모아 원심분리 하였다 (2000 rpm, 1분, 4~6회). 1.100과 1.077의 비중을 지닌 자당 용액과 모아진 췌장소화 용액을 차례로 혼합한 후 세포분리기 (SEPAX, Biosafe SA, Switzerland)를 작동시켜 미리 준비해 둔 50 ml conical tube에 순서대로 모았다<sup>24,25</sup>. 췌도 분리 후 남은 췌관세포와 선포세포들을 수거하였다. 이렇게 하여 얻은 췌장세포 일부는 150 mm 배양용기 (NUNC<sup>™</sup>, Roskilde, Denmark)에 세포를 분주하여 부유 배양하였다. 나머지 췌장세포는 10 mL의 Dissociation medium이 담겨진 50 mL 용기 내에서 5 mL 피펫 (Greiner Bio-One, Austria)으로 여러 차례 흡입과 배출을 세계 시도하여 단일세포로 분리하였다. 세포를 세워서 150 mm 배양용기에  $2 \times 10^7$  개 세포를 분주하였다. 10% FBS가 들어있는 DMEM 배양액을 이용하여 2일 간격으로 배양액을 교체하면서 일주일간 배양하였다. 또 배양된 췌장세포의 특성을 분석과 mRNA 발현 양상을 분석하기 위해 췌장세포를 6 well 배양용기 (NUNC<sup>™</sup>, Roskilde, Denmark)에  $1.5 \times 10^6$  개 세포로 분주하고 배양하였다.

## 3. 아데노바이러스 정제 및 증식

본 실험에서 사용한 재조합바이러스 인 Ad-PDX-1/VP16와 Ad-GFP는 Dr. Kaneto (Osaka University Graduate School of Medicine, Japan)로부터 제공받았다. HEK 293 세포 (KCLB<sup>®</sup> Korean Cell Line Bank, Korea)가 100 mm 배양용기에 80~90% 자라면 아데노바이러스를 MEM 배양액에 넣고 2시간 후에 5% FBS가 들어있는 MEM 배양액으로 교체하였다. 48 시간 후 세포가 30~40% 떨어지면 수거

하여 원심분리 (1000·rpm, 5분)하고 침전물에 10 mM Tris-Cl/pH 7.9을 넣어 5 mL로 만들었다. 세포를 깨뜨린 후 원심분리 (2500 rpm, 30분)하여 상층액을 얻었다. 바이러스를 포함하고 있는 상층액은 CsCl 밀도 1.4와 1.2 각각 3.47 mL와 2.6 mL를 바이러스와 혼합하여 초고속원심분리 (35000 rpm, 90분, 4℃)로 농축하였다. 추출한 바이러스를 Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Dialysis Cassette (PIERCE, USA)에 넣은 후 PBS에 투석하였고 마지막에 바이러스 저장 용액 (10 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Sucrose/pH8.0)으로 2 시간 동안 투석하였다. 투석 후 바이러스는 분주하여 -70℃ 저장하였다. 바이러스 농도는 Adeno-X<sup>™</sup> rapid titer kit (Clontech)를 이용하여 측정하였다.

## 4. 췌장세포에 아데노바이러스 처리

일주일간 배양한 췌장세포에 아데노바이러스를 처리하였다. Ad-PDX-1/VP16과 Ad-GFP를 각각 100 MOI로 12 시간 처리하고, 배양액은 최소량 15 mL 정도 넣어주었다. 12 시간 후에 배양액을 교체하였다. 바이러스 처리 후 48 시간에 발현 정도를 확인하고, 단일 세포로 되어있는 세포를 Dissociation medium을 이용하여 배양용기에서 떼어 50mL 튜브에 세포만 담고 10% FBS가 들어있는 DMEM 배양액 2 mL을 첨가하여 2시간 동안 37℃의 CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하면서 재결합시켰다.

## 5. 유세포 분석 (Flow Cytometry analysis)

배양한 췌장세포에서 아데노바이러스의 발현 정도를 알아보기 유세포 분석을 실시하였다. 바이러스를 처리하고 48시간 후에 세포들을 수거하여 1% FBS가 첨가된 PBS (pH 7.4)로 1회 세척한 후 다시 1 mL PBS 용액에 넣은 뒤 유세포분석기 (FACScalibuer, FACScan<sup>™</sup>, Becton & Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)를 이용하여 Ad-PDX-1/VP16과 Ad-GFP의 발현 정도를 확인하였다.

## 6. 면역결핍 생쥐에 이식

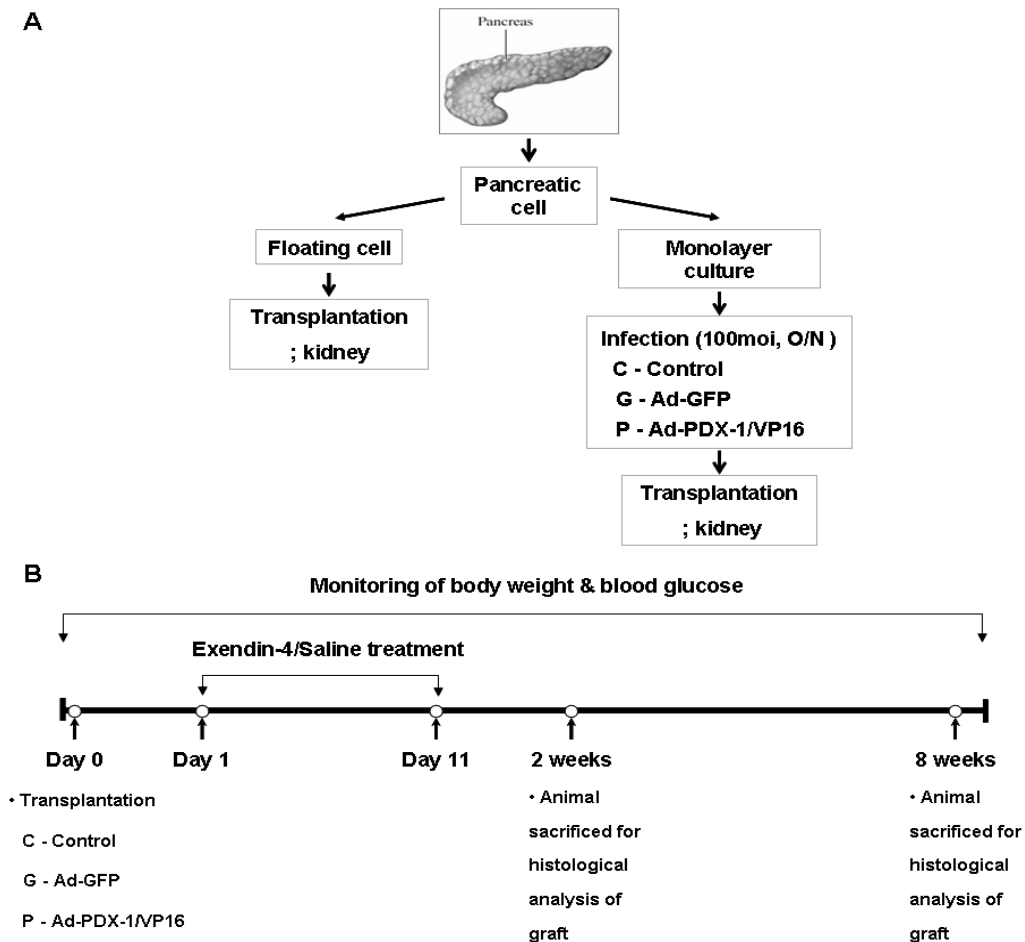
면역결핍 생쥐 (BALB/cSlc-nu, Japan SLC, Inc., Japan)를 Rumpun (23 mg/mL, 바이엘)과 Ketamine (50 mg/mL, 유한양행)이 1:5의 비율로 혼합한 후 다시 생리식염수 (0.9% Sodium chloride, 중외제약)로 1:1 로 희석한 마취제를 0.1 cc 복강에 주사하여 마취시켰다. 이식에 사용한 세포는 일단 크게 부유 배양한 세포와 단일 세포로 분리한 후 아데노바이러스를 처리한 세포로 나누었다. 부유 배양한 세포는 2일 동안 배양하고 이식하였다. 단일세포로 분리한 세포는 다음의 세가지 군으로 분류하였다; 제1군 췌장세포 (대조군), 제2군 Ad-PDX-1/VP16을 과발현시킨 췌장세포, 제3군 Ad-GFP를 과발현시킨 췌장세포. 한 쪽 신장에는 제2

군과 제3군을 이식하고 다른 한쪽 신장에는 제1군을 이식하였다. 신장을 드러낸 후 26 G needle을 이용하여 신장 피막을 절개하였다. 신장 피막 하에 각 세포의 3,000 IEq (islet equivalents = number of islets if all had a diameter of 150  $\mu$ m) 씩<sup>26)</sup> PE-50 tube (Becton Dickinson)을 이용하여 이식하였다. 이식 후 10일 동안 GLP-1의 장기간 유도체인 Exendin-4 (1 nmol/kg, Sigma, St. Louis, MO) 100  $\mu$ L를, 대조군은 생리식염수 100  $\mu$ L를 복강으로 매일 주입하였다. 이식 후 두 군을 2주, 8주에 신장에서 이식편을 채취하였다 (Fig. 1).

## 7. 면역염색

췌장세포의 분화 및 배양한 세포의 형태학적인 특징과 배양된 세포가 베타세포로 분화되었는지 알아보기 위하여 면역염색을 시행하였다. 이식편을 10% 중성 포르말린

(Sigma, St. Louis, MO) 용액으로 상온에서 16시간 동안 고정하고 파라핀으로 포매한 후, 파라핀 블록은 박절기 (Microtome DSC1, LEICA, Japan)를 이용, 4  $\mu$ m 두께로 박절하였다. 일차 항체인 guinea pig anti-insulin (1:100)으로 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 뒤 biotin-conjugated anti-guinea pig IgG 이차 항체에 30분 동안 반응시키고, avidin-biotin complex 반응을 수행하고, DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma, St. Louis, MO)를 수 초간 처리하여 발색 후, 대조 염색으로 헤마톡실린 염색을 시행하였다. 배양된 세포의 특성을 알아보기 위해 6 well 배양용기에 4 일간 배양한 췌장세포를 3번 반복하여 면역염색을 실행하였다. 베타세포 및 알파세포 등 내분비세포와 췌장세포를 관찰하기 위해 상피세포의 표지자인 rabbit anti-Pancytokeratin (1:100) 항체, guinea pig anti-insulin (1:100) 항체와 rabbit anti-human  $\alpha$ -amylase



**Fig 1.** Schematic of experimental design.

A, General scheme of pancreatic cell culture system were separated into two groups: floating and monolayer culture. In monolayer culture, we used an Adenovirus for PDX-1 expression. Ad-GFP was used as an adenoviral control; B, Schematic diagram of experimented design. On day 0, Ad-GFP or Ad-PDX-1/VP16 infected pancreatic cell were transplanted under the kidney capsule of normoglycaemic nude mice. After 1 day, nude mice was treated with a daily injection of Exendin-4 (1 nmol/kg, 100  $\mu$ L) or saline (0.9% NaCl, 100  $\mu$ L) for 10 days. Finally, all grafts were harvested on the 2 weeks and 8 weeks.

(1:1000) 항체를 이용하여 형광 염색을 시행하였고, DAPI로 핵 염색을 실시하였다. 2차 형광 항체로는 anti-rabbit FITC, anti-guinea pig Rhodamin (1:100)을 사용하였다. 면역염색이 끝난 조직은 anti-fading reagent를 이용하여 봉입하고, 공초점현미경 (confocal microscope; BIORAD MRC 1024; BIORAD, MO, UK)을 이용해서 관찰하였다.

## 8. 베타세포 비율 측정

조직 내 베타세포의 상대적 비율은 광학 현미경하에서 200 배율 렌즈를 통하여 비디오 화면으로 투시한 다음 point count법으로 측정하였다<sup>27)</sup>.

## 9. RNA 분리와 cDNA 합성

mRNA 발현 양상을 분석하기 위해 6 well 배양용기에 있는 췌장세포에 아데노바이러스를 처리하고, 2일 후에 DMEM 배양액 (10% FBS 함유)에 10 nM Exendin-4 (Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 3일간 배양하였다. 대조군으로는 DMEM 배양액 (10% FBS 함유)에 3일간 배양하였다. 그 후 얻어진 시료들로부터 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)용액을 이용하여 총 RNA를 분리하였고, 정량 (UV/VIS Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop)하였다. 시료들에서 분리한 RNA 1 µg을 Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer, dNTP Mix (10 mM each)와 혼합하고 여기에 5X strand buffer, 100 mM dithiothreitol (DTT), RNase OUT™ (40 units/µL), 그리고 SuperScript™ II Reversetranscriptase (200 units; 이상 모두 Invitrogen, Carlsbad, CA)를 차례로 넣어 잘 섞은 후 25℃에서 10 분, 42℃에서 1시간, 90℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

## 10. Semi-quantitative RT-PCR 분석

본 연구를 위한 PCR primer sequence는 Table 1과 같다. Perfect PreMix (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan)에 위에서 합성한 cDNA를 첨가하여 PCR를 수행하고, 반응 산물의 분석을 위하여 일부를 2% agarose gel에 전기영동하여 위치를 확인한 후 밝기 정도를 densitometer VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 측정하여 정량화하였다. mRNA 발현 수준을 정량화하기 위하여 GAPDH와의 상대적 비율을 산출하여 도식화하였다.

## 11. 통계적 검증

모든 분석 결과는 평균 ± 표준오차 (standard error)로 표시하였고 각 군 간의 비교는 *t*-test를 이용하여 검정하였으며 *P* 값 0.05 이하를 유의 수준으로 하였다.

## 결 과

### 1. 배양된 췌장세포의 특성 분석

#### 1) 부유 배양한 췌장세포 특성

개의 췌도를 분리하고 남은 췌장세포를 부유 배양하였다. 부유 배양된 세포의 종류를 구별하고자 상피 세포 표지자인 pancytokeratin과 선포세포 표지자인  $\alpha$ -amylase 항체 및 인슐린 등의 호르몬 항체로 면역 염색하였다. 배양용기 내 세포의 44.3 ± 19.2%는 pancytokeratin 항체에, 52.7 ± 5.4%는  $\alpha$ -amylase 항체에, 2.9 ± 3.8%는 인슐린 항체에 염색되었다.

#### 2) 단일세포로 배양한 췌장세포 특성

췌장세포를 단일세포로 분리한 후 첫 2일 동안은 소수의 세포들만이 배양용기의 바닥에 부착되고 세포의 증식을 제대로 관찰할 수 없었지만, 세포 배양 2일 이후에는 세포들이 부착하여 증식을 시작하였다. 각 배양 용기 당 세포의 70.5 ± 20.1%는 pancytokeratin 항체로, 28.1 ± 7.8%는 amylase 항체로 염색되었으며, 2.5 ± 3.1%는 인슐린 항체로 염색되었다.

### 2. 성체 개 췌장 세포에 대한 유전자 전달 효율 분석

개 췌장에서 분리한 췌장세포에 아데노바이러스 Ad-PDX-1/VP16을 처리하고 48시간 후에 발현 정도를 확인하였다 (Fig. 2A). 현미경상으로 발현 정도를 확인한 결과 Ad-PDX-1/VP16이 발현 정도가 Ad-GFP보다 약하게 보이지만, 모든 세포들이 발현하였다. 그리고 유세포 분석을 통하여 GFP 발현정도를 확인한 결과 췌장세포에 Ad-GFP는 72%, Ad-PDX-1/VP16은 78% 발현하였다 (Fig. 2B).

**Table 1.** PCR Primer Sequences and Their Product Size

Primer		Sequences (5'-3')	Product Size (bp)	Annealing temperature (°C)
Insulin	sense	CAAGCAGGTCCTCACCCC	151	58
	antisense	CACACCAGGTACAGCGCC		
PDX-1	sence	GTCCTGGAGGAGCCCAAC	360	58
	antisense	GCAGTCCTGCTCAGGCTC		
GAPDH	sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	60
	antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

### 3. 단층배양된 성체 개 췌장세포에 대한 유전자 전달 및 Exendin-4 처리에 따른 인슐린, PDX-1 mRNA 발현 양상

췌장세포에 아데노바이러스를 처리하고, 2일 후에 DMEM 배양액 (10% FBS 함유)에 10 nM Exendin-4 (Sigma, St. Louis, MO)를 처리하여 3일간 배양한 췌장세포에서 Ad-PDX-1/VP16 유전자 전달에 의하여 PDX-1 유전자가 과발현된 것을 확인하였다 (Fig 3A, B). Exendin-4 처리하지 않은 군에서는 PDX-1 유전자의 과발현에 의하여 인슐린의 발현 양상이 통계적으로 유의하게 증가하였다. Exendin-4의 처리는 PDX-1과 인슐린 발현 수준에 변화를 유도하지는 못하였다 (Fig 3A, C).

### 4. 췌장세포에서 베타세포로의 분화 정도

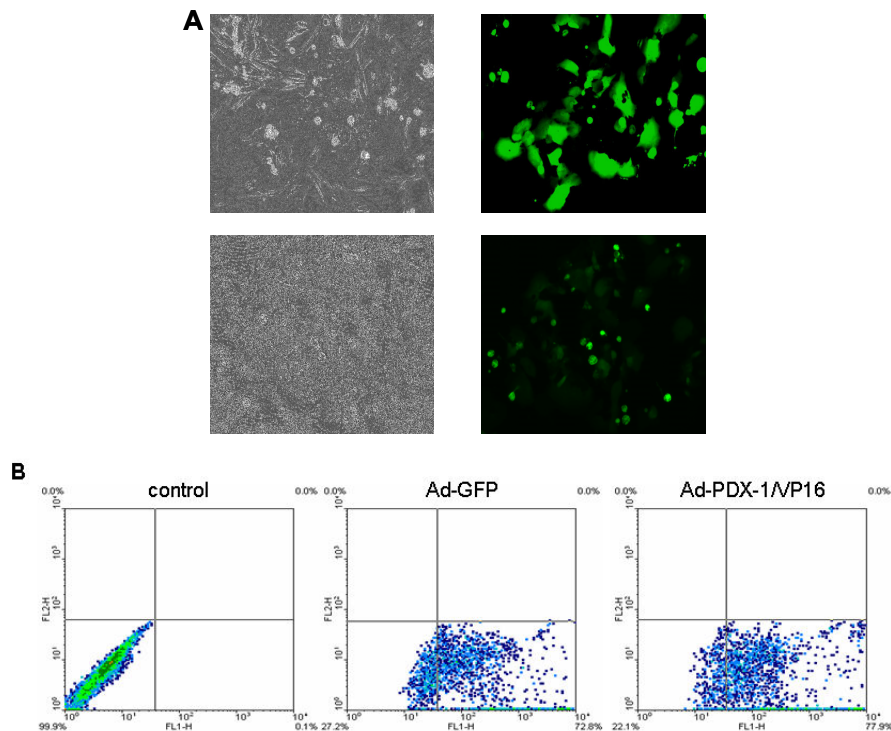
#### 1) 부유 배양한 췌장세포 이식 후 베타세포로의 분화 정도

부유 배양한 췌장세포를 정상 누드 생쥐의 신장 피막하에 이식한 다음 췌장세포에서 베타세포로의 분화정도를 확인하기 위해 인슐린 항체를 이용하여 면역 염색을 실시한 다음 point count법을 사용하여 베타세포 비율을 확인하였다. 이식 전 부유 배양한 세포에서 인슐린 발현 세포의 비율

은  $4 \pm 3.1\%$ 였다. 이식 후 2주에 채취한 이식편에서 베타세포는  $23.4 \pm 13.1\%$  (Fig. 4B), 이식 후 8주에 채취한 이식편에서 인슐린을 발현하는 세포는  $5.2 \pm 2.0\%$ 였다 (Fig. 4C). 이식 전에 비하여 이식 후 2주에 베타세포 비율이 유의하게 증가하였으나 8주에 채취한 이식편에서 베타세포 비율은 유의하게 감소하였다 (Fig. 4D).

#### 2) 단일세포로 배양한 췌장세포 이식 후 베타세포로의 분화 정도

이식에 사용한 세포는 대조군, Ad-GFP과 Ad-PDX-1/VP16 도입군 등 3군으로 분류하였다. 이들 세포를 정상 누드 생쥐의 신장 피막 하에 이식한 다음 다시 생리식염수 처리군과 Exendin-4 처리군으로 분류하여 총 6군을 비교 분석하였다. 각 군에서 췌장세포 이식 후, 2주, 8주에 이식편을 얻어 인슐린 항체를 이용하여 면역염색을 시행하였다 (Fig. 5A,B). 두 시기의 생리식염수 처리군 ( $n = 10$ ) 과 Exendin-4 처리군 ( $n = 10$ ) 조직을 각각 수거한 다음 point count법을 이용하여 이식편 내 베타세포의 양을 정량하였다. 이식 후 2주된 이식편에서 인슐린 발현 세포를 정량한 결과 생리식염수 처리군 중 대조군에서  $28 \pm 5.7\%$ , Ad-GFP군에서  $20.5 \pm 0.7\%$ , Ad-PDX-1/VP16군에서  $31 \pm 1.4\%$ 였다. Exendin-4 처리군의 대조군에서는  $21 \pm 6.1\%$ , Ad-GFP

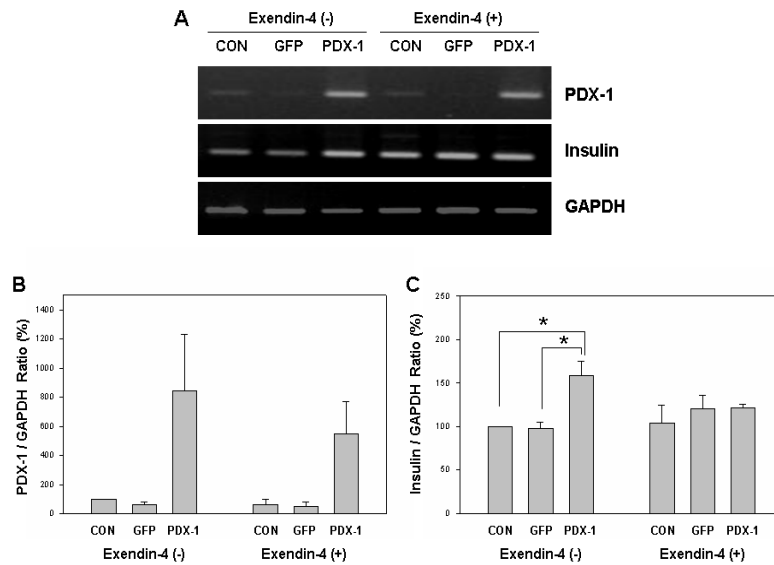


**Fig 2.** Adenovirus-mediated expression of GFP and PDX-1 in the pancreatic cell. Ad-GFP (A, top) and Ad-PDX-1/VP16 (A, bottom) were visible 48 hours after infection in about 80% and 70%, respectively. (B) Flow cytometric analysis of virus expression. GFP<sup>+</sup> cells were isolated in adenovirus-infected disperse pancreatic cells.

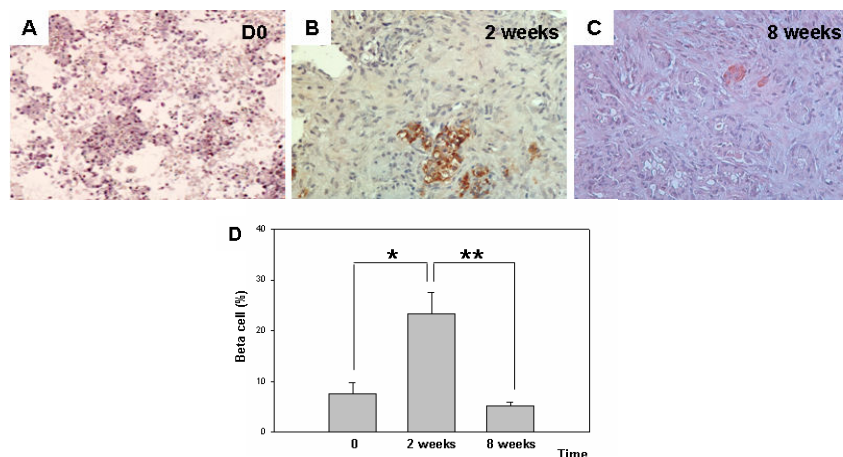
군에서  $16.7 \pm 4.9\%$ , Ad-PDX-1/VP16군에서  $20.3 \pm 5.5\%$ 였다. 2주째 실험군에서 PDX-1/VP16를 감염시킨 군이 대조군보다 인슐린 발현 세포가 3% 증가한 것을 관찰할 수 있었으나 유의성은 보이지 않았으며, Ad-GFP군과 비교하여 Ad-PDX-1/VP16군에서는 유의하게 증가하였다. 하지만 Exendin-4가 베타세포로의 분화정도에 미치는 효과는 대조군에 비하여 의미 있는 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 5C).

이식 후 8주된 이식편에서 인슐린 발현 세포를 정량한

결과 생리식염수 처리군 중 대조군에서  $11.8 \pm 5.9\%$ , Ad-GFP군에서는  $8 \pm 7.3\%$ , Ad-PDX-1/VP16군에서  $16.6 \pm 7.4\%$ 였다. Exendin-4 처리군의 대조군에서는  $10.9 \pm 3.7\%$ , Ad-GFP군에서  $6.2 \pm 5.9\%$ , Ad-PDX-1/VP16군에서  $14.9 \pm 3.9\%$ 였다. 8주째 실험군 ( $n = 10$ )에서는 PDX-1/VP16를 감염시킨 군이 대조군보다 인슐린 발현 세포가 5% 증가한 것을 관찰할 수 있었으나 2주에 비하여 감소하였고, 대조군과 PDX-1/VP16를 감염시킨 군과는 유의성은 보이지 않았다. 그러나 Exendin-4에 의한 효과에서는



**Fig 3.** Effect of exendin-4 on beta-cell specific gene expression in canine pancreatic cells. PDX-1 and insulin were estimated by RT-PCR. The bar graphs show quantification of the results of real-time PCR. The mRNA levels of these genes were normalized to GAPDH (B, C). Results are expressed as means  $\pm$  S.E for  $n = 3$  independent experiment. \*  $P \leq 0.05$ .



**Fig 4.** Insulin immunohistochemical staining in pancreatic cell graft. (A) The canine pancreatic cells were stained with insulin immunohistochemical staining at 0 day. The canine pancreatic cells of graft was stained with insulin immunohistochemical staining at 2 week (B) and 8 weeks (C). (D) Beta-cell percentage in transplanted pancreatic cell of graft. (Original magnification  $\times 400$ )

\*  $P \leq 0.05$ .

\*\*  $P \leq 0.001$ .

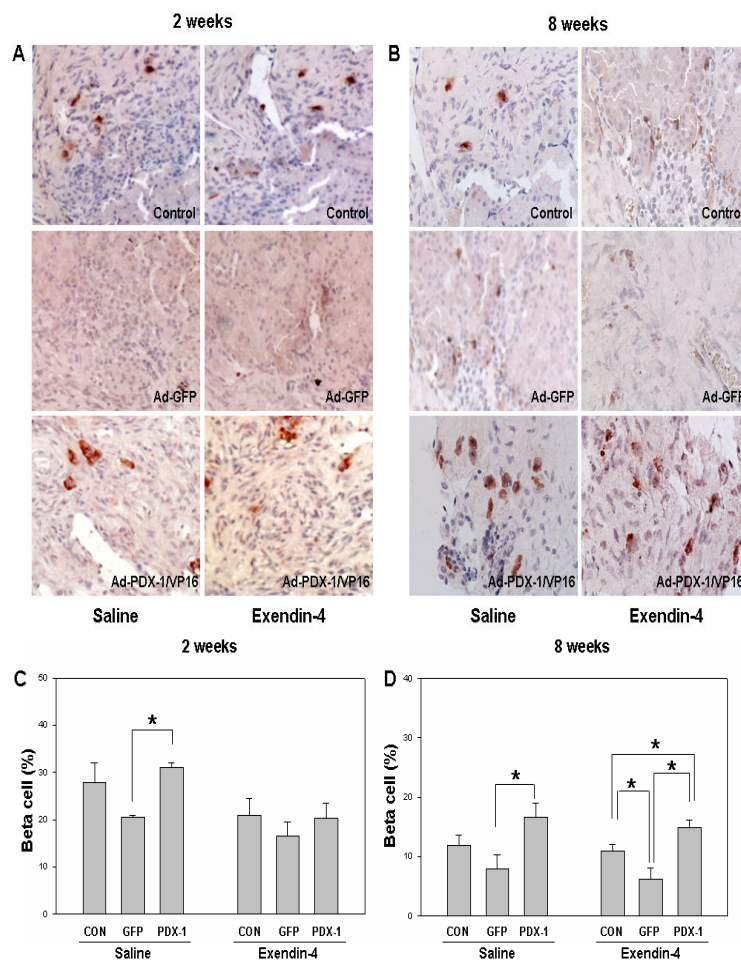
대조군과 비교하여 PDX-1/VP16을 감염시킨 군이 유의하게 증가하였다 (Fig. 5D).

## 고 찰

인슐린 결핍을 보이는 당뇨병환자의 근본적인 치료를 위해서는 고혈당을 극복할 수 있는 필요한 만큼의 베타세포를 보충하거나 베타세포의 재생을 유도하는 것이 가장 근본적인 치료 방법이다. 이를 위해서 동종 췌장이식이 시행되고 있다<sup>1,2,3)</sup>. 그러나 최근에는 췌장이식에 비해 비용이 적게 들며 시술이 간편하면서, 안전하고 반복이식이 가능한 췌도 이식이 임상에서 시도되고 있다. 췌도 이식은 매우 제한적으로 시행되고 있는데 가장 큰 이유는 이식에 필요한 공여 췌장의 심각한 부족과 이식 후 면역학적 및 비면역학적 기전으로 인한 이식 췌도의 손상이다<sup>9)</sup>.

이를 극복하기 위하여 다양한 분야의 연구가 진행되고

있다. 그 중에 하나로 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 배아줄기세포를 이용하여 인슐린을 발현하는 췌도나 베타세포로 분화시키는 연구가 진행되고 있는데<sup>5)</sup>, 선택분화의 문제점, 안전성 및 윤리적인 문제점 때문에 임상 적용이 용이하지는 않다. 성체줄기세포는 이미 다양한 분화 능력이 알려졌고, 배아줄기세포와 같은 윤리적인 문제가 없으며, 자가 세포 이식 역시 가능하므로 면역학적 거부 반응이 없는 장점이 있다. 즉 성체줄기세포는 개발 즉시 임상적용의 가능성이 높아 주목받고 있다. 다양한 성체줄기세포의 연구 중 성체 사람 췌관세포를 이용하여 췌도로 분화시켜서 인슐린을 분비하는 베타세포로 증식 및 분화를 시키는 연구가 진행되고 있다<sup>7)</sup>. 본 연구실에서는 이미 신생돼지 췌장에서 분리된 세포들이 대부분 췌관세포로 구성되어 있으며 이들은 왕성한 증식능과 분화능을 가지고 있으므로 매우 유용한 대체 췌도 이식원이라는 것을 보고한 바 있다<sup>29)</sup>. 그러나 이식 후 증식 및 분화에 많은 시간이 걸리고 이종이식 후 인



**Fig 5.** Insulin immunohistochemical staining in pancreatic cell graft and the effect of exendin-4. (A) The canine pancreatic cells were immunohistochemically stained for insulin at 2 weeks. (B) The canine pancreatic cells of graft were stained for insulin at 8 weeks. Beta-cells percentage in the transplanted pancreatic cell graft at 2 weeks (C) and 8 weeks (D). (Original magnification  $\times 400$ )

\*  $P \leq 0.05$ .

수공통 감염에 대한 안전성과 이종이식 면역거부 반응의 극복이 임상적용에 문제이다. 따라서 감염의 위험과 면역거부 반응이 적은 동종 췌관세포를 베타세포로 증식 분화시킬 수 있다면 빠른 시일 내에 임상적용이 가능하다. 이전 보고에 의하면 췌도를 분리하고 버려지는 췌장세포들을 단층 배양함으로써 췌관세포를 얻을 수 있으며 배양조건을 조절함으로써 췌관세포를 베타세포로 전이분화시킬 수 있었다<sup>10)</sup>. 그러나 이 연구는 다른 연구자들에 의하여 재현되지 않고 있으며 소량의 베타세포만이 배양됨으로 임상적용에 한계가 있다. 따라서 성체에서 분리된 췌관세포를 효과적으로 증식 분화시킬 수 있는 방법의 개발이 절실한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 성체 대동물에서 추출된 췌장 세포를 배양한 다음 베타세포로 분화 유도를 연구하였다. 먼저 개의 췌도를 분리하고 버려지는 췌장세포의 특성을 알아보기 위해 단일세포로 분리하였다. 첫 2일 동안은 소수의 세포들만이 배양용기의 바닥에 부착되고 세포의 증식을 관찰할 수 없었지만, 세포 배양 2일 이후에는 세포들이 부착하여 증식을 시작하였다. 이 배양된 세포의 종류를 구별하고자 상피세포 표지자인 pancytokeratin과 선포세포 표지자인 amylase 항체 및 인슐린 등의 호르몬 항체로 면역 염색하였다. 배양 용기 내 세포의 70.5 ± 20.1%는 pancytokeratin 항체로, 28.1 ± 7.8%는 amylase 항체로 염색되었으며, 2.5 ± 3.1%는 인슐린 항체로 염색되었다. 따라서 배양된 췌장세포의 대부분이 췌관세포로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 신생돼지 췌장에서 분리된 세포들이 단일 배양하면 각 배양 용기 당 세포의 75.2 ± 15.1%는 pancytokeratin, 19.6 ± 4.9%는 호르몬 항체로 염색된 이전 연구 결과와<sup>28)</sup> 비교해 유사한 소견을 보이나 선포 세포가 유의하게 많았으며 베타세포의 비율은 상대적으로 적었다. 이는 개에서 분리한 췌장 세포의 경우 췌도를 분리하고 남은 세포들을 배양하였기 때문에 베타세포의 양이 상대적으로 적을 것으로 추측할 수 있었다. 또한 신생돼지 세포에 비하여 선포세포가 많고 췌관세포가 적은 이유는 다음과 같이 추측해 볼 수 있다. 신생돼지의 췌장세포를 분리하여 배양하는 경우 췌장 선포세포의 급격한 사멸과 동시에 현격한 췌관세포의 증식과 선포세포에서 췌관 세포로의 전이분화(transdifferentiation)가 일어난다. 그러나 성체에서 분리한 췌장 선포 세포의 경우 이러한 전이분화의 능력이 상대적으로 적으며 췌관세포의 증식 역시 제한적일 것으로 추정되어 선포세포가 그대로 생존하고 췌관세포의 증식 또한 적어 이와 같은 차이가 발생하는 것으로 생각된다. 이에 대해서는 향후 자세한 분석이 이루어져야 한다.

신생돼지 췌장세포집락(porcine NPCCs)의 경우 수일간 부유 배양 이후에 nude 생쥐의 신장 피막하에 이식한 다음 8주와 54주가 경과하게 되면 각각 약 40%, 90% 이상의 이

식편이 베타세포로의 전이분화와 증식이 발생한다<sup>29)</sup>. 반면 본 실험에서 보이듯이 성체 개의 췌장세포를 부유 배양하여 이식한 결과 이식 전 약 4 ± 3.1%인 베타세포의 양은 이식 후 2주에 채취한 이식편에서 23.4 ± 13.1%까지 증가하였으나 이식 후 8주에서는 5.2 ± 2.0%로 다시 감소하는 것을 보였다. 이는 이식 시에 포함되어 있던 베타세포들이 이식 후 증식하여 일시적인 증가 양상을 보였으나 이식 후 장기간이 지속되며 점차 이식편의 섬유화가 증가되고 췌관세포의 증식과 전이분화가 일어나지 않아 시간이 지나며 다시 감소한 것으로 생각된다. 이러한 결과는 태아기와 성체에서 분리된 췌장세포들의 현격하게 다른 특성을 반영하는 것으로 생각된다. 즉 성체에서 분리한 췌관세포는 비교적 취득이 용이하고 동종 혹은 자가 이식이 가능한 유용한 이식원이기는 하나, 태아기에 분리된 세포와는 달리 증식과 분화능이 매우 제한적이라는 것을 시사하므로 이들 세포를 다시 활발하게 증식과 분화할 수 있는 상태로의 전환이 필요할 것이다.

성체 췌관세포의 분화능력을 높이기 위해 유전자 전달을 이용하는 연구가 많이 보고되고 있다. 유전자 전달로서는 췌장 특이적 전사인자인 NeuroD, Ngn3 (Neurogenin 3), PDX-1, MafA를 이용하여 많은 시도들이 있으나<sup>14,18)</sup> 가장 기본은 PDX-1 유전자 전달이다. 그 중 PDX-1은 췌장 발생에 가장 중요한 전사인자로 전장 내배엽세포들이 췌장 전구 세포일 때 발현하는데 PDX-1을 발현하는 세포들로부터 주변 간질세포들과의 상호작용을 통하여 배부와 복부 췌장돌기를 형성하고 이들이 다시 융합되어 성숙한 췌장으로 발달한다. 점차 PDX-1의 발현이 사라지면서 p48을 발현하는 세포들은 선포세포로 분화하고 PDX-1과 Ngn3를 발현하는 세포들은 내분비세포로 분화하게 된다<sup>12)</sup>. 또 PDX-1은 베타세포로 분화에 중요한 역할을 하며 몇몇의 베타세포와 연관된 유전자를 조절하여 정상적인 베타세포의 기능을 유지시킨다는 보고가 있다. 본 연구에서도 PDX-1 유전자를 성체 개 췌장세포에 도입하였다. 유세포 분석을 통하여 유전자 전달 정도를 확인한 결과 거의 모든 세포에 PDX-1이 감염된 것을 확인할 수 있었다. 또 췌장세포에 베타세포 특이적 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 확인하였다. Ad-PDX-1/VP16 유전자 전달에 의하여 PDX-1 유전자가 과발현된 것을 확인하였다. 또한 PDX-1 유전자 전달군에서 인슐린 유전자의 발현이 증가되는 것으로 보아 유전자의 전달이 인슐린 유전자의 전사와 췌관세포에서 베타세포로의 전이 분화를 촉진할 가능성을 예측할 수 있었다.

다양한 유전자 전달 이외에도 베타세포로 분화하기 위해 다양한 분화 유도 물질 처리하는 연구가 많이 보고되었다. 그 중에 Activin A, All-trans Retinoic acid를 이용하여 분화시키는 연구가 보고되었으며<sup>30)</sup>. 또 Betacellulin과 GLP-1를 이용하여 베타세포로 분화시켰다는 연구가 많이 보고되

고 있다<sup>31)</sup>. 특히 GLP-1은 생체 내에서 분비되어 혈당조절에 관여하는 호르몬으로 인슐린 분비를 증가시켜 포도당 농도에 따른 인슐린 분비를 증강시키는 특징이 있다. 또 사람 태아의 췌장으로 췌도 양 세포 덩어리 (Islet-like cell clusters)를 누드 쥐 신장 피막 하에 이식을 하고 Exendin-4를 10일간 처리를 하면 베타세포로의 조직 재생이 증가하고 베타세포 집단이 증가하는 것이 보고되었다<sup>32)</sup>. 이러한 배경 하에 Exendin-4가 베타세포로 분화 유도에 효과가 있는지 알아보기 위해서, 본 연구에서 개 성체 췌장세포에서 PDX-1 유전자를 도입하고 누드 생쥐에 이식한 후 Exendin-4 혹은 생리식염수를 주입하여 비교 분석하였다. 이식 후 2주된 이식편에서 인슐린 발현 세포가 증가하고 8주된 이식편에서 감소하는 경향을 보이는 것은 췌장세포를 부유 배양하여 이식한 결과와 마찬가지로 이식 시에 포함되어있던 베타세포들이 이식 후 증식하여 증가 양상을 보였으나 이식 후 장시간이 지속되며 점차 이식편의 섬유화가 증가되어 다시 감소한 것으로 사료된다. 이식 후 8주된 이식편에서 인슐린 발현 세포를 정량한 결과 생리식염수 처리군의 대조군에서  $11.8 \pm 5.9\%$ , GFP-adenovirus군에서  $8 \pm 7.3\%$ , PDX-1/VP16-adenovirus군에서  $16.6 \pm 7.4\%$ 였다. PDX-1/VP16-adenovirus 처리군에서 GFP-adenovirus에 비하여 베타세포의 상대적 비율이 유의하게 증가된 양상을 보였다. 대조군과 PDX-1/VP16-adenovirus 처리군에서는 유의성이 보이지 않았지만 adenovirus 독성이 있기 때문에 GFP-adenovirus와 비교하여 PDX-1/VP16-adenovirus 처리군에서 유의하게 증가한 양상을 보이므로 PDX-1/VP16-adenovirus가 베타세포로의 분화를 유도한 것으로 평가된다. 그러나 이러한 결과는 신생돼지 췌장 조직을 이식한 다음 8주에 관찰되는 약 40%에 비해서는 매우 낮은 결과였다. 한편 Exendin-4 처리군에서 이식편 내 베타세포의 상대적 비율은 대조군에서  $10.9 \pm 3.7\%$ , GFP-adenovirus군에서  $6.2 \pm 5.9\%$ , PDX-1/VP16-adenovirus군에서  $14.9 \pm 3.9\%$ 였다. 생리식염수 처리군에서는 Ad-PDX-1군에서 Ad-GFP군에 비하여 인슐린분비세포가 더 많았으나, Exendin-4 처리는 대조군에서나 바이러스 처리군 모두에서 의미 있는 효과를 보이지 않았다. 이는 exendin-4가 Ad-PDX-1군의 인슐린분비세포의 분화효과를 억제시킨 것이 아니라 다만 exendin-4 효과가 불충분하다고 생각된다. 선행연구와 달리 Exendin-4의 처리가 효과가 없는 이유는 불분명하나 Exendin-4의 용량, 처리기간 등의 문제와 성체에서 분리 배양된 췌장세포의 특성 때문인 것으로 추정된다. 결론적으로 본 연구에서는 개 성체 췌장세포를 베타세포로 분화시키기 위해 Ad-PDX-1/VP16과 exendin-4를 이용한 결과 Exendin-4의 처리는 유의한 효과를 보이지 않은 반면 Ad-PDX-1/VP16은 개의 성체에서 분리된 췌장세포를 베타세포로 유의하게 분화시키는 것을 관찰하였다. 다만 전이 분화율이 태아조직에 비하여 현저히 낮음으로 성체에

서 분리된 췌관세포를 췌도 이식에 적용하기 위해서는 전이 분화와 증식을 증가시킬 수 있는 추가적인 방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

연구배경 : 제1형 당뇨병의 치료를 위한 췌도 이식의 임상적용 활성화를 위하여 선결되어야 할 문제가 이상적인 이식원의 개발이다. 이를 위하여 췌장 줄기세포에 대한 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 대동물인 개의 췌장에서 췌도를 제거한 다음 얻은 세포들에 PDX-1의 과발현과 Exendin-4 처리가 베타세포로의 전이분화에 미치는 효과를 분석하고자 하였다.

방법 : 췌장세포는 개 췌장에서 췌도 분리과정에서 췌도를 분리하고 남은 세포 구획에서 분리하였다. 이 세포들에 재조합아테노바이러스를 과발현 시킨 다음 정상 면역결핍생쥐의 신장 피막 하에 이식을 하였다. 이식 24시간 후부터 한 군은 Exendin-4 ( $1 \text{ nmol/kg}$ ), 다른 군은 saline을 복강으로 10일 동안 매일 주입하였다. 2주와 8주에 각 군의 이식편을 채취하고 면역 염색을 하였다. 분리된 세포들을 분석하기 위하여 상피세포 표지자인 cytokeratin과 췌장 내분비 호르몬 및  $\alpha$ -amylase 항체를 사용하여 면역 염색하였고, RT-PCR로 PDX-1과 인슐린 유전자 발현을 확인하였다.

결과 : 부유 배양한 췌장세포를 정상 누드 생쥐의 신장 피막 하에 이식 후 이식편에서 베타세포는 2주와 8주에 각각  $23.4 \pm 13.1\%$ 와  $5.2 \pm 2.0\%$ 였다. 단층 배양한 개 췌장세포에 Ad-GFP와 Ad-PDX-1/VP16을 감염시킨 결과 Ad-GFP와 Ad-PDX-1/VP16가 각각 72%와 78%의 세포에 전달된 것을 확인하였다. 대조군과 각 유전자를 과발현 시킨 췌장세포를 이식한 후 2주 이식편에서의 인슐린 발현하는 세포는 대조군 (28%), GFP (20.5%), PDX-1/VP16 (31%), control+Ex-4 (19.5%), GFP+EX-4 (15%), PDX-1/VP16+EX-4 (17.5%)였다. 2주째 실험군에서 GFP를 감염시킨 군과 비교하여 PDX-1/VP16을 감염시킨 군에서는 유의 있게 증가하였다. 8주 이식편에서의 인슐린 발현하는 세포는 생리식염수 처리군에서 대조군 (11.8%), GFP (8%), PDX-1/VP16 (16.6%)였고, Exendin-4 처리군에서 대조군 (10.9%), GFP (6.2%), PDX-1/VP16 (14.9%)였다. 8주째 생리식염수 처리군에서는 PDX-1/VP16을 감염시킨 군과 GFP군이 유의한 차이를 보였으며 Exendin-4 처리군에서는 대조군과, GFP 처리군에 비하여 PDX-1/VP16을 감염시킨 군에서 베타세포의 상대적 비율이 유의하게 증가하였다. 그러나 Exendin-4 처리는 유의한 효과가 없었다.

결론 : 성체 개에서 분리한 췌장세포를 부유 배양한 후 이식하였으나 신생 췌장조직 이식 시 관찰되었던 세포의 증식과 베타세포로의 전이 분화는 관찰되지 않았다. 반면 단층

배양 된 성체 개에서 분리된 췌장세포에 PDX-1/VP16 과발현 시킨 결과 베타세포로의 분화가 관찰되었다. 그러나 Exendin-4 처치는 이식편의 증식이나 베타세포로의 전이 분화에 유의한 효과가 없었다.

#### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 바이오 이종장기개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (A04-0004-AZ1205-06A3-00160B)

본 연구에서 사용한 재조합바이러스를 주신 Dr. Kaneto (Osaka University Graduate School of Medicine, Japan)께 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

- Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y: *Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:1595-608, 2005
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S: *Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. J Clin Endocrinol Metab* 88(5):2300-8, 2003
- 서선희, 고승현, 윤건호: 정상과 당뇨병 쥐에서 췌장소도 베타세포의 재생. *당뇨병* 24:S8-15, 2000
- Davalli AM, Ogawa Y, Scaglia L, Wu YJ, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC: *Function, mass, and replication of porcine and rat islets transplanted into diabetic nude mice. Diabetes* 44:104-11, 1995
- Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F: *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes* 49:157-62, 2000
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R: *Differentiation of embryonic stem cells to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. Science* 292:1389-94, 2001
- Lin HT, Chiou SH, Kao CL, Shyr YM, Hsu CJ, Tarng YW, Ho LLT, Kwok CF, Ku HH: *Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. World J Gastroenterol* 12(28): 4529-35, 2006
- Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S: *Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy. Diabetes* 37:232-6, 1998
- 윤건호: 췌장줄기세포에 대한 최근 연구동향. *대한해부학회지* 37(2):123-31, 2004
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ: *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7999-8004, 2000
- Song KH, Ko SH, Ahn YB, Yoo SJ, Chin HM, Kaneto H, Yoon KH, Cha BY, Lee KW, Son HY: *In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. BBRC* 316:1094-100, 2004
- Miyatsuka T, Kaneto H, Shiraiwa T, Matsuoka TA, Yamamoto K, Kato K, Nakamura Y, Akira S, Takeda K, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Sandgren EP, Kawaguchi Y, Wright CV, Yoshio Fujitani: *Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. Genes & Dev* 20: 1435-40, 2006
- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK: *Minireview: Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. Endocrinology*, 146(3):1025-34, 2005
- Kaneto H, Miyatsuka T, Nakatani Y, Matsuoka TA: *PDX-1 and MafA: Key Transcription Factors in Pancreas. Am. J. Biotechnol. Biochem.*, 1(2):54-63, 2005
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S: *The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. Diabetes* 48: 507-13. 1999
- Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM: *Experimental Conversion of Liver to Pancreas. Current Biology*, 13:105-15, 2003
- Cao LZ, Tang DQ, Horb ME, Li SW, Yang LJ: *High glucose is necessary for complete maturation of Pdx1-VP16-Expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells. Diabetes* 53:3168-78, 2004
- Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Hori M, Yamasaki Y: *PDX-1/VP16 fusion protein, together With NeuroD or Ngn3,*

- markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. Diabetes* 54:1009-22, 2005
19. 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
  20. Kodama S, Toyonaga T, Kondo T, Matsumoto K, Tsuruzoe K, Kawashima J, Goto H, Kume K, Kume S, Sakakida M, Araki E: *Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during  $\beta$  cell regeneration in STZ-treated mice. BBRC* 327:1170-8, 2005
  21. Drucker D: *Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Molecular Endocrinology* 17:161-71, 2003
  22. Stoffers DA, Kieffers TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: *Insulintropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. Diabetes* 49:741-8, 2000
  23. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG: *Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. Regulatory Peptides* 117:77-88, 2004
  24. 양태영, 정인경, 오승훈, 이상훈, 김동준, 함종렬, 김병준, 안규정, 김성주, 정재훈, 민용기, 이명식, 이문규, 김광원: 개의 췌도이식 후 췌도생존에 영향을 미치는 인자. *대한내과학회지* 57(suppl. II):159, 1999
  25. 양태영, 정인경, 오승훈, 이상훈, 김동준, 함종렬, 김병준, 안규정, 김성주, 정재훈, 민용기, 이명식, 이문규, 김광원: 개의 췌장소도 자가이식 결과에 영향을 미치는 인자들. *당뇨병* 24:170-9, 2000
  26. Sutherland DE, Gores PF, Hering BJ, Wahoff D, McKeehen DA, Gruessner RW: *Islet transplantation: an update. Diabetes Metab Rev*, 12:137-50, 1996
  27. Weibel ER: *Stereologic methods. In practical methods for biologic morphometry. London, Academic Press*, 1:101-61, 1978
  28. 서선희, 윤건호, 권혁상, 이정민, 홍옥기, 송기호, 유순집, 손현식, 강무일, 차봉연, 이광우, 손호영, 강성구: 단층배양된 신생돼지 췌관세포의 장기간 3차원 배양. *당뇨병* 26:383-95, 2002
  29. Yoon KH, Quickel RR, Tatarkiewicz K, Ulrich TR, Hollister-Lock J, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC: *Differentiation and expansion of beta cell mass in porcine neonatal pancreatic cell clusters transplanted into nude mice. Cell Transplantation*, 8:673-89, 1999
  30. Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, Deng H: *Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. Stem Cells*, 23: 656-62, 2005
  31. Li L, Yi Z, Seno M, Kojima I: *Activin A and Betacellulin: Effect on rgeneration of pncreatic  $\beta$ -Cells in nonatal streptozotocin-treated rats. Diabetes*, 53:608-15, 2004
  32. Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A: *Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells. J Clin Endocrinol Metab* 87: 4775-81, 2002