

# 스트렙토조토신 유발 당뇨병 백서에서 HVJ-리포솜과 Epstein-Barr Virus Plasmid를 이용한 인슐린 유전자 치료

계명대학교 의과대학 내과학교실, 의학연구소<sup>1</sup>, 홍부외과학교실<sup>2</sup>

김용득<sup>1</sup> · 박근규 · 한성욱 · 안종덕<sup>1</sup> · 이효정<sup>1</sup> · 김미정 · 김혜순 · 박남희<sup>2</sup> · 이인규

## Insulin Gene Therapy Using HVJ-liposome and Epstein-Barr Virus Plasmid in Murine Streptozotocin Induced Diabetes

Yong-Deuk Kim<sup>1</sup>, Keun-Gyu Park, Seong-Wook Han, Jong Doek Ahn<sup>1</sup>, Hyo-Jung Lee<sup>1</sup>,  
Mi-Jung Kim, Hye-Soon Kim, Nam-Hee Park<sup>2</sup>, In-Kyu Lee

*Department of Internal Medicine, Institute for Medical Science<sup>1</sup>,  
Department of Chest Surgery<sup>2</sup>, Keimyung University, School of Medicine, Daegu, Korea*

### - Abstract -

**Background:** Despite improvement in insulin preparation and delivery, the use of insulin therapy alone to maintain normal glucose concentration and prevent the development of diabetic complication is not easy. Therefore, there has been considerable interest in developing gene therapy to supply insulin. We investigated that the administration of hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome complex, containing human insulin construct into the portal vein to control the blood glucose level in murine streptozotocin (STZ)-induced diabetes.

**Methods:** Human insulin gene was delivered to STZ-induced diabetic rats through the portal vein using HVJ-liposome containing Epstein-Barr virus (EBV) replicon-based plasmid (pEB). Blood glucose and body weight were measured after insulin gene delivery. The animals were sacrificed 28 days later and the livers were collected for immuno-histochemical staining of insulin. In addition plasma insulin and C-peptide levels were measured.

**Results:** Significant decrease in blood glucose levels and an increase in insulin and C-peptide levels were observed in the insulin gene transfection group as compared to the control group. Immunohistochemical staining of insulin also showed significant differences between these two groups.

---

접수일자: 2003년 6월 10일, 통과일자: 2003년 9월 30일, 책임저자: 이인규, 계명대학교 동산의료원 내분비내과

\* 본 연구는 2001년도 대한당뇨병학회 연구비(오츠카 연구비) 지원으로 이루어졌음

**Conclusion:** This study demonstrated the possibility of insulin gene therapy through the portal vein using pEB and HVJ-liposome method to produce a sustained improvement of diabetic glucose metabolism (**J Kor Diabetes Assoc 27:405~413, 2003**).

**Key Words:** Insulin gene therapy, pEB (Epstein-Barr virus replicon-based plasmid, HVJ (hemagglutinating virus of Japan)-liposome

## 서 론

자가면역에 의해 췌장 베타세포가 대부분 파괴되어 발생하는 제1형 당뇨병은 고혈당을 조절하기 위해 인슐린과 동시에 인슐린 치료가 필요하고<sup>1,2)</sup>, 인슐린 저항성으로 시작되는 제2형 당뇨병의 경우도 초기에는 식사 조절과 경구용 혈당강하제를 이용하여 혈당을 조절할 수 있으나 결국에는 베타세포의 인슐린 분비 저하로 인슐린 치료가 필요하게 된다<sup>3)</sup>. 지금까지 다양한 인슐린 제제의 발달과 함께 인슐린을 체내로 투여방법이 개발되어 왔으나 기존의 인슐린 단독 치료만으로 당뇨병 환자들이 정상 혈당을 유지하고 당뇨병성 신증, 망막증 등의 만성 합병증을 완전히 예방하기에는 현실적인 어려움이 많다<sup>4)</sup>. 이에 당뇨병을 근원적으로 치료하기 위한 노력으로 최근 발달한 분자생물학적 기술을 이용한 인슐린 유전자 치료가 활발히 연구되고 있다.

췌장 베타세포가 남아 있지 않는 제1형 당뇨병과 진행된 제2형 당뇨병을 대상으로 인슐린 유전자 치료를 하기 위해서는 비베타세포를 표적으로 하여 인슐린 유전자를 전달하고 인슐린 발현을 유도하여 혈당을 조절하여야 한다. 비베타세포를 대상으로 한 인슐린 유전자 치료는 인슐린 유전자를 비베타세포에 전달하였을 때 혈당 변화에 따라 인슐린 발현 정도를 조절할 수 있는 가와 비베타세포에서 인슐린 유전자에 의해 발현된 프로인슐린이 생체 활성도가 높은 인슐린으로 전환될 수 있는지가 문제점으로 지적되어 왔다<sup>5)</sup>. 그리고 장기간 안정적으로 인슐린 유전자의 발현이 이루어지도록 하는 것도 인슐린 유전자 치료가 해결해야 할

문제점이었다. 지금까지 연구된 바에 의하면 안정적인 인슐린 유전자 전달 표적 기관으로 간세포<sup>6~10)</sup>나 근육세포<sup>11~13)</sup> 등이 주로 연구되고 있고 유전자 전달을 위한 매개체로서 adenovirus, retrovirus, adeno-associated virus (AAV) 등의 바이러스 벡터<sup>11~17)</sup>와 리포솜 같은 비바이러스 벡터<sup>18,19)</sup>를 이용한 유전자 치료가 시도되고 있다. 본 연구팀은 바이러스 벡터를 이용한 유전자 전달의 단점을 극복하고 좀더 효율적인 유전자 전달 방법을 찾기 위해 1989년 일본 오사카대학의 Kaneda 연구팀이 개발하여 현재까지 유전자 치료에 많이 응용하고 있는 hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-리포솜을 이용하여 유전자를 전달하였다<sup>20)</sup>. 그리고 유전자 치료의 효과가 장기간 지속되도록 하기 위해 유전자가 핵 내에서 안정적으로 발현되도록 하는 것으로 알려진 Epstein-Barr virus (EBV) replicon-based plasmid (pEB)를 제작하여 사용하였다<sup>19)</sup>.

## 대상 및 방법

### 1. HVJ-리포솜의 제조

음이온 리포솜을 제조하기 위해 cholesterol (Chol), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), phosphatidylcholine (ePC), sphingomyeline (eSph), phosphatidylserine (bPS)를 이용하였다. Chol, DOPE, ePC, eSph, bPS를 50:13.3:13.3:13.3:10의 무게 비율로 혼합하여 10 mg을 만들고 1 mL의 클로로포름에 녹인 다음 증발기를 통해 지질이 유리용기에 얇게 퍼질 때까지 휘발시켜 지질막을 만든다. 여기에 인체 인슐린 유전자 전달 매개체 200 g을 첨가하여 30초간 격렬히

혼합한 후 37℃ 항온수조에서 30초간 정치하는 과정을 8번 반복한다. 위 혼합물을 0.4  $\mu$ m 및 0.2  $\mu$ m syringe filter를 이용하여 여과하여 unilamellar 리포솜으로 만든 후 얼음에 꽂아 30분간 정치한다. 25,000 hemagglutinating unit의 정제된 HVJ를 자외선을 조사하여 불활성화시킨 후 준비된 리포솜과 섞어서 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨다. 배양동안 2 mL의 30% (w/v) sucrose 용액을 초원심 분리관에 넣어 sucrose 밀도구배를 준비한다. 여기에 반응시킨 HVJ-리포솜 혼합액을 올리고 25,000 rpm에서 2시간 동안 4℃에서 원심분리한다. 원심분리 후 30% sucrose 용액 상층에 위치하는 HVJ-리포솜을 조심스럽게 회수하여 4℃에서 보관하여 실험에 사용한다.

## 2. Plasmid DNA의 제조

인체 인슐린 유전자를 함유하고 있는 pEBAct-HINS plasmid는 Dr. Kaneda (Osaka University, Osaka, Japan)로 부터 기증받아서 사용하였다. 이 plasmid의 제작 방법은 다음과 같다. 먼저 pcDNA 3 (Invitrogen, San Diego, CA, USA)의 Bgl II site에 OriP와 EBNA-1 염기서열을 가진 p205의 Cla I-Nar I 단편을 클로닝 해서 pEB 벡터를 만들었다. pAct-CAT 유래의 chicken  $\beta$ -actin promoter 부위를 pEB 벡터의 CMV promoter와 교체하여 pEBAct 벡터를 제작하였다<sup>19)</sup>. 다음으로 인체 태아섬유모세포의 DNA를 이용한 genomic DNA library에서 스크리닝하여 pAct 벡터에 클로닝되어 있는 인체 인슐린 유전자의 BamHI-EcoRI 단편 (1.6kb)을 pEBAct 벡터에 클로닝하여 pEBAct-HINS를 완성하였다<sup>21)</sup>.

## 3. 인슐린 유전자 발현 확인

Cos-1 세포에 인슐린 pEBAct-HINS와 Lipofec Amine 2000을 1:3의 비율로 혼합하여 DNA:lipid 복합체를 형성시키고 이를 무혈청배지를 처리한 세포에 처리하여 5시간 동안 배양하였다. 5시간 배양 후 PBS buffer로 세포내로 전달되지 않은 DNA:lipid 복합체를 씻어내고 10% FBS를 포함한 DMEM 배지로 교체하여 2일간 배양하였다. 인슐린 유전자의 발현을 확인하기 위하여 항인슐린 항체 (Santa Cruz, CA, USA)를

이용하여 면역세포화학법으로 염색하였다.

## 4. 당뇨병 백서에서 인슐린 유전자 전달

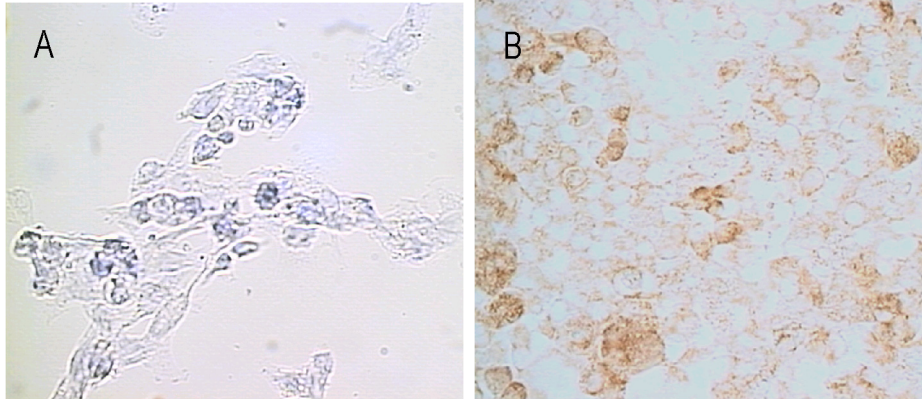
7주령에 해당하는 250 g의 백서에 스트렙토조토신 (90 mg/kg in PBS buffer)을 복강내로 투여하여 당뇨병을 유발시키고 스트렙토조토신 투여 3일 후 백서를 8시간 금식 시킨 다음 혈당을 측정하였다. 이 중 혈당이 16.7 mmol/L 이상 측정되는 백서를 대상으로 간문맥으로 pEBAct-HINS를 함유한 HVJ-리포솜을 주입한 것을 유전자 전달군 (n=4)으로 pEBAct-HINS를 함유하지 않은 HVJ-리포솜을 주입한 것을 대조군 (n=4)으로 하였다.

## 5. 유전자 전달 후 백서의 혈당과 인슐린, C-펩타이드 및 체중 측정

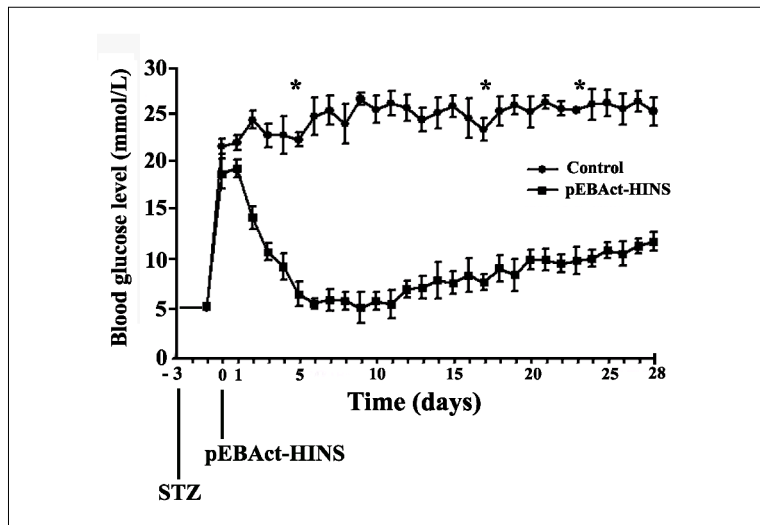
유전자 전달 후 매일 체중과 혈당을 측정하였다. 유전자 전달 28일째 인슐린과 C-펩타이드의 측정을 하였으며 인슐린은 <sup>125</sup>I-인슐린 이중항체 방사성 면역 측정 장비 (Techno Genetics, Milano, Italy)를 이용해 측정하였고 C-펩타이드는 <sup>125</sup>I-C-펩타이드 이중 항체 방사성 면역측정 키트 (Techno Genetics, Milano, Italy)로 측정하였다.

## 6. 유전자 전달 후 백서 조직의 면역조직학적 염색

백서의 조직에서 인슐린 발현을 조사하기 위해 유전자 전달 28일 후 당뇨병 백서에서 간을 적출하여 인체 인슐린 항체 (Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 면역조직학적 염색을 실시하였다. 파라핀 포매된 백서의 간 조직을 4  $\mu$ m 두께로 잘라서 슬라이드에 붙인 다음 탈파라핀을 거쳐 흡수하였다. 메탄올에 희석한 3% 과산화수소수 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01 M 인산염 완충액에서 10분간 세척하였다. 인체 인슐린 1차 항체를 37℃에서 15분간 반응시키고 DAB로 발색한 다음 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.



**Fig. 1.** Expression of transfected human insulin gene in Cos-1 cells. Immunohistochemical stain of human insulin in Cos-1 cell transfected with pEBAct-control vector (A), and transfected with pEBAct-HINS (B).



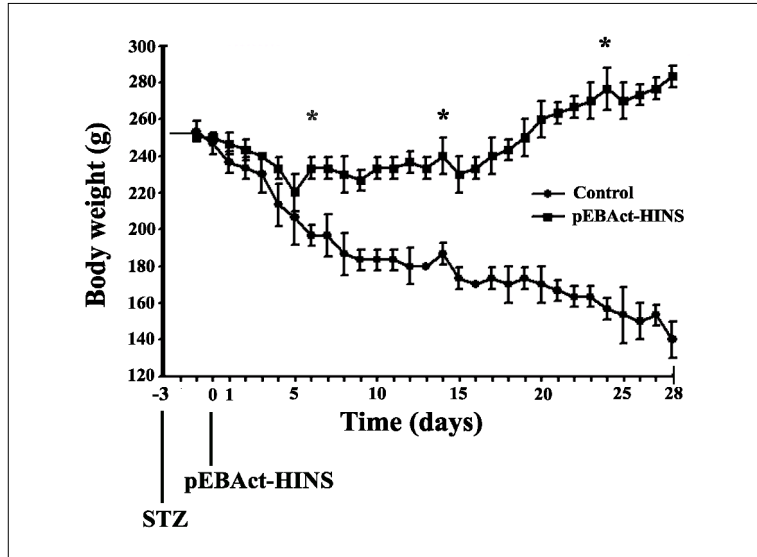
**Fig. 2.** Effect of pEBAct-HINS transfection on fasting blood glucose concentrations in STZ-induced diabetic rat. Control, STZ-induced diabetic rat injected with HVJ-liposome only (n=4); pEBAct-HINS, STZ induced diabetic rat transfected with HVJ-liposome containing pEBAct-HINS (n=4). Values are means S.E.M (\*  $p < 0.001$  compared to control).

## 결 과

### 1. 인슐린 유전자 발현 확인

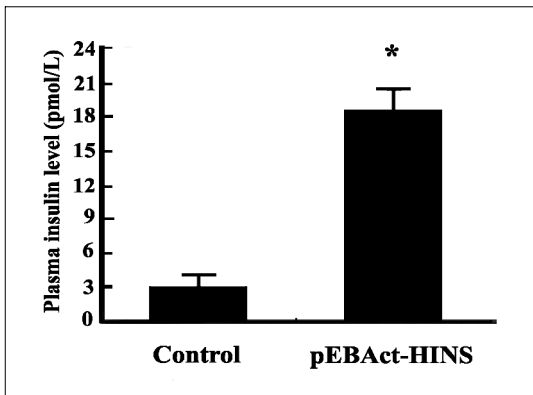
pEBAct-HINS가 세포내에서 인슐린을 발현하는지를 조사하기 위하여 인슐린 비발현 세포인 Cos-1 세포

에 LipopectAmine 2000을 이용하여 전달하고 3일 후 인슐린이 발현되는 지를 면역화학 염색법으로 조사한 결과 pEBAct-HINS를 처리한 Cos-1 세포에서 인체 인슐린이 발현됨을 확인하였다(Fig. 1).



**Fig. 3.** Effect of pEBAct-HINS transfection on body weight in STZ-induced diabetic rat. Control, STZ-induced diabetic rat injected with HVJ-liposome only (n=4); pEBAct-HINS, STZ induced diabetic rat transfected with HVJ-liposome containing pEBAct-HINS (n=4). Values are means S.E.M.

\* p < 0.001 compared to control.



**Fig. 4.** Effect of pEBAct-HINS transfection on plasma insulin level in STZ-induced rat. Control, STZ-induced diabetic rat injected with HVJ-liposome only (n=4); pEBAct-HINS, STZ induced diabetic rat transfected with HVJ-liposome containing pEBAct-HINS (n=4). Values are means S.E.M.

\* p < 0.001 compared to control.

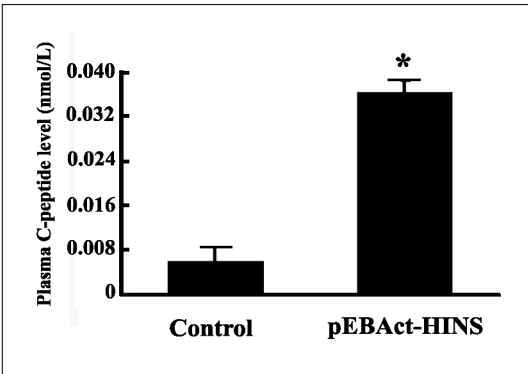
## 2. 인슐린 유전자 전달군과 대조군에서 혈당 및 체중 비교

혈당은 유전자 전달 2일째부터 유전자 전달군에서 감소하기 시작하여 7일간 정상 수준으로 유지되다가 이후 점차 증가하기 시작하여 28일째 혈당이 11 mmol/L 이상으로 증가하였다 (Fig. 2). 체중에 있어서 당뇨병 유발 후 대조군의 체중은 지속적으로 감소한 데 비하여 유전자 전달군은 초기에 체중이 감소하다가 유전자 전달 5일 후 혈당이 정상으로 조절되면서 더 이상 감소되지 않았으며 이후 점차적으로 증가하였다 (Fig. 3).

## 3. 인슐린 유전자 전달군과 대조군에서 인슐린 및 C-펩타이드 비교

유전자 전달군의 혈당감소 및 체중증가가 전달된 인슐린 유전자에 의한 것인지를 확인하기 위해서 백서의 혈중 인슐린 농도를 측정하였다. 대조군에서는 인

슐린이 거의 측정되지 않은 반면 유전자 전달군에서는 인슐린이 현저히 높게 측정되었다(Fig. 4). 또한 인슐린 유전자에 의해 발현되는 프로인슐린이 인슐린으로 전환 가능한 지를 알아 보기 위해 C-펩타이드를 측정하였는데 대조군은 거의 측정되지 않았으나 유전자 전달군에서는 현저히 높게 측정되었다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Effect of pEBAct-HINS transfection on plasma C-peptide level in STZ-induced rat. Control, STZ-induced diabetic rat injected with HVJ-liposome only (n=4); pEBAct-HINS, STZ induced diabetic rat transfected with HVJ-liposome containing pEBAct-HINS (n=4). Values are means S.E.M.

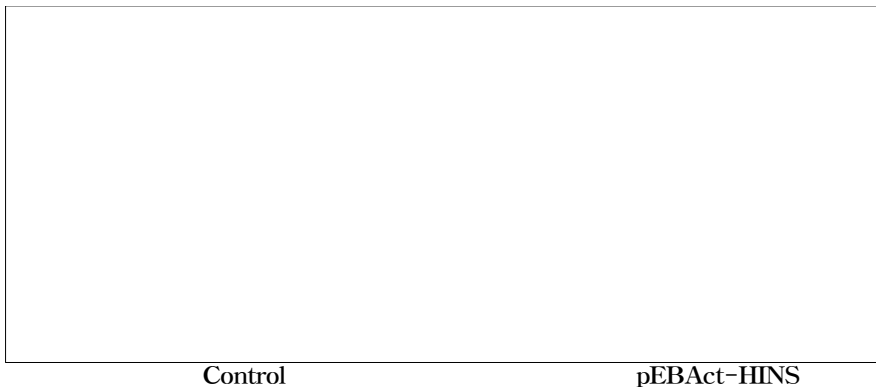
\*  $p < 0.001$  compared to control.

#### 4. 인슐린 유전자 전달군과 대조군간의 표적기관의 면역조직학적 소견 비교

유전자 전달군과 대조군의 간을 적출하여 인체 인슐린에 대한 면역조직학적 염색을 실시한 결과 유전자 전달군의 간 조직에서는 인슐린이 발현된 반면 대조군에서는 발현되지 않았다(Fig. 6).

#### 고 찰

인슐린 유전자 치료가 성공하기 위해서는 다음과 같은 조건이 충족되어야 한다. 첫째, 효과적인 인슐린 유전자 전달법이 확립이 되어야 하고 둘째, 혈당 변화에 반응하여 인슐린의 발현과 분비를 조절하는 기능이 있어야 하며 셋째, 프로인슐린이 활성형 인슐린으로 전환하는 과정을 매개할 수 있는 생화학적 기능이 있어야 하고, 마지막으로 췌장의 베타세포와 비슷한 특성을 가진 표적세포가 있어야 한다<sup>22)</sup>. 이러한 문제점에 대하여 연구자들은 HVJ-리포솜을 이용한 유전자 전달 방법이 인슐린 유전자 치료에 효과적인지를 알아 보고 pEB를 이용한 인슐린 유전자를 전달법이 혈당을 지속적으로 조절하는지를 관찰하였다. 그리고 프로인슐린을 발현하는 인슐린 유전자를 혈당 감식체계를 가진 간세포에 전달하였을 때 인슐린에 비해 활성이 낮



**Fig. 6.** Expression of pEBAct-HINS in rat liver tissues. Immunohistochemical staining of insulin in control and pEBAct-HINS transfected rat liver at 28 days after HVJ-liposome transfection. The arrows indicate insulin-positive hepatocytes. All figures at 200 magnification.

은 프로인슐린이 생체내에서 효과적으로 혈당을 조절할 수 있는지를 조사하였다.

이미 여러 논문에서 유전자 전달 매개체로 비바이러스 벡터인 리포좀을 HVJ에 결합시킨 HVJ-리포좀을 사용하여 그 우수성을 입증하였고 표적 기관에서 상당히 안정적이고 효율적인 유전자 발현을 유도할 수 있다고 보고되었다<sup>20,21)</sup>. 본 연구에서도 HVJ-리포좀을 이용하여 기존의 바이러스 전달 매개체가 가지고 있던 무작위성 유전자 전달의 위험성이 없이 충분한 치료효과를 얻을 만큼의 유전자 전달 효과를 보여주었다. 인슐린 유전자의 치료 지속 시간에 있어서는 Kaneda 등이 pAct-HIN plasmid로 인슐린 유전자를 문맥정맥으로 투여하여 유전자 치료를 실시한 결과 간에서 인슐린 유전자가 7일 후 사라졌으며 혈중 인슐린도 7일에서 8일 사이에 최고치를 보이다가 급격히 감소하여<sup>7)</sup> 성공적인 인슐린 유전자 치료를 위해서는 전달된 유전자가 장기간 발현 될 수 있는 방법이 개발되어야 할 필요성이 제기되었다. 표적세포에 전달된 유전자가 장기간 발현되도록 하기 위한 방법으로 retroviral 벡터를 이용하여 전달된 유전자를 표적세포의 유전자에 융합시키는 방법이 있는데 이 경우 전달된 유전자가 무작위로 표적세포 유전자에 융합 되어 발암성, 성장장애, 세포사멸 등을 유발할 수 있어 유전자 치료에는 제한점이 있는 것으로 보인다<sup>23)</sup>. 최근 재조합 AAV를 이용하여 인슐린 유전자를 간 문맥으로 전달하여 장기간 성공적으로 혈당을 조절한 보고가 있으나<sup>24)</sup> 장기간 인슐린 유전자가 발현되도록 하기 위해서는 많은 연구가 필요한 상태이다. 본 연구진은 숙주의 세포핵내의 염색체에 결합하지 않으면서 잠복감염을 일으키는 특성을 가진 유전자 전달매개체로 pEB를 이용하여 인슐린 유전자를 전달함으로써 28일 동안 장기간 혈당이 안정적으로 조절되는 것을 확인하였으며 EBV replicon에 포함된 유전자가 장기간 발현할 수 있음을 확인하였다.

표적장기로서 간세포는 췌장 베타세포와 동일한 혈당 감식 체계를 가지고 있는 장점이 있지만 프로인슐린을 인슐린으로 가공시키는 효소가 없는 것으로 알려져 있다<sup>25,26)</sup>. 프로인슐린은 활성형 인슐린에 비해 10% 미만의 생물학적인 효과를 가지므로<sup>27)</sup> 간세포를 표적

세포로 하여 인슐린 유전자 치료를 실시하였을 때 생산된 프로인슐린이 혈당조절을 효과적으로 할 수 있는지에 대한 의문이 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 인슐린 수용체에 잘 결합하도록 C chain 대신에 turn-forming motif를 가진 7개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드로 대체된 돌연변이 프로인슐린을 개발하여 특별한 가공 없이 활성도가 인슐린의 40~50%나 되는 돌연변이 프로인슐린을 발현시켜 장기간 혈당 조절이 가능하였다는 보고가 있었다<sup>24)</sup>. 그리고 쥐를 대상으로 cDNA 변이를 유발하여 췌장 외 다른 장기에서도 분비되는 furin에 의해 프로인슐린이 분해되도록 하여 인슐린 활성을 높인 연구도 있었다<sup>28,29)</sup>. 본 실험에서는 프로인슐린을 분비하는 인슐린유전자를 백서의 문맥혈관으로 주입하여 유전자 치료를 시행하였는데 유전자 치료를 시행한 백서의 혈액에서 당뇨병을 유발하지 않은 정상군과 유사한 양의 C-펩타이드를 검출할 수 있었으나 유전자 치료를 시행하지 않은 대조군에서는 혈액내에서 C-펩타이드가 아주 낮은 농도로 검출되었다. Morishita 등도 비슷한 벡터를 사용하여 쥐의 꼬리정맥을 통해 유전자 치료를 실시한 경우에서도 C-펩타이드의 검출이 가능하였다고 보고하였다<sup>21)</sup>. 이러한 결과는 체내에서 프로인슐린이 인슐린으로 전환되었다는 것을 보여주나 어떤 장기에서 프로인슐린 분해효소가 작용하여 이러한 결과를 나타내었는지 더 연구가 필요한 상태이다. 간세포보다 접근이 용이한 근육 세포를 이용한 인슐린 유전자 치료 연구도 보고되었는데 간세포와 비교하여 근육 세포를 이용하여 인슐린 유전자 치료를 하였을 때 치료 유전자의 이입 효율이 높고 좀 더 장기간에 걸쳐 안정적으로 인슐린 유전자 발현이 유도되었으나 간세포와 달리 혈당 감시 체계가 없고, 또한 프로인슐린이 인슐린으로 가공되는 데 필요한 효소가 없는 것도 문제점으로 남아있다<sup>11,31)</sup>.

이상의 본 연구 결과를 종합하면 스트랩토토신으로 당뇨를 유발시킨 백서에 인슐린 유전자를 포함한 pEB를 HVJ-리포좀을 이용하여 간문맥을 통해 전달하면 표적장기인 백서의 간에서 지속적으로 인슐린을 생산하여 혈당을 효과적으로 낮출 수 있음을 확인하였다.

## 요 약

**연구배경:** 지금까지 다양한 인슐린 제제의 발달과 함께 인슐린을 체내로 투여방법이 개발되어 왔으나 인슐린 단독 치료만으로 당뇨병 환자들이 정상 혈당을 유지하고 당뇨병성 합병증을 완전히 예방하기에는 현실적인 어려움이 많다. 이에 당뇨병을 근원적으로 치료 하기 위한 노력으로 인슐린 유전자 치료가 활발히 연구되고 있다. 본 연구진은 스트랩토조토신으로 당뇨를 유발한 백서에서 HVJ-리포좀과 pEB를 이용한 유전자 치료의 효용성을 연구하였다.

**방법:** 스트랩토조토신으로 당뇨를 유발한 백서에 pEBAct-HINS를 함유한 HVJ-리포좀을 간문맥을 통하여 주입하고 혈당과 체중을 매일 측정하였다. 유전자 전달 28일째 백서를 희생시켜서 간을 적출하여 면역조직화적 염색을 하였고 쥐의 혈액을 채취하여 인슐린과 C-펩타이드를 측정하였다.

**결과:** 혈당은 대조군에 비하여 유전자 전달군에서 현저히 감소하였고 당뇨병 유발 후 감소하던 체중은 혈당이 조절되면서 증가하였다. 인슐린과 C-펩타이드는 유전자 전달군에서 대조군에 비하여 현저히 증가되어 있었다. 인체 인슐린에 대한 면역조직화적 염색 결과 유전자 전달군의 간조직에서 인슐린이 발현된 반면 대조군에서는 발현되지 않았다.

**결론:** 스트랩토조토신으로 당뇨를 유발시킨 백서에서 인슐린 유전자를 포함한 pEBAct-HINS를 HVJ-리포좀을 이용하여 인슐린 유전자를 전달하면 백서의 간에서 지속적으로 인슐린을 생산하여 효과적으로 혈당을 낮출 수 있음을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. Thivolet C: *New therapeutic approaches to type 1 diabetes: from prevention to cellular or gene therapies.* Clin Endocrinol 55:565-574, 2001
2. Atkinson MA, Eisenbarth GS: *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.* Lancet 358:221-229, 2001
3. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring

HU: *Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance.* Endocr Rev 21:585-618, 2000

4. Vajo Z, Fawcett J, Duckworth WC: *Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs.* Endocr Rev 22:706-17, 2001
5. Dong H, Woo SL: *Hepatic insulin production for type 1 diabetes.* Trends Endocrinol Metab 12:441-446, 2001
6. Thule PM, Liu JM: *Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats.* Gene Ther 7:1744-1752, 2000
7. Kaneda Y, Iwai K, Uchida T: *Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver.* J Biol Chem 264:12126-12129, 1989
8. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL: *Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin.* Proc Natl Acad Sci USA 92:3293-3297, 1995
9. Chen R, Meseck ML, Woo SL: *Auto-regulated hepatic insulin gene expression in type 1 diabetic rats.* Mol Ther 3:584-590, 2001
10. Dong H, Morral N, McEvoy R, Meseck M, Thung SN, Woo SL: *Hepatic insulin expression improves glycemic control in type 1 diabetic rats.* Diabetes Res Clin Pract 52:153-163, 2001
11. Shah R, Sidner RA, Bochan MR, Jindal RM: *Reversal of diabetes in streptozotocin-treated rats by intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus containing rat prepro-insulin II gene.* Transplant Proc 31:641-642, 1999
12. Bartlett RJ, McCue JM: *Adeno-associated virus based gene therapy in skeletal muscle.* Methods Mol Biol 133:127-156, 2000
13. Kon OL, Sivakumar S, Teoh KL, Lok SH, Long YC: *Naked plasmid-mediated gene transfer to skeletal muscle ameliorates diabetes mellitus.* J Gene Med 1:186-194, 1999



14. Shifrin AL, Auricchio A, Yu QC, Wilson J, Raper SE: *Adenoviral vector-mediated insulin gene transfer in the mouse pancreas corrects streptozotocin-induced hyperglycemia. Gene Ther* 8:1480-1489, 2001
15. Yamaguchi M, Kuzume M, Matsumoto T, Shimura H, Matsumiya A, Nakano H, Takeda M, Sanada Y, Kumada K: *Adenovirus-mediated insulin gene transfer improves nutritional and post-hepatectomized conditions in diabetic rats. Surgery* 127:670-678, 2000
16. Prasad KM, Yang Z, Bleich D, Nadler JL: *Adeno-associated virus vector mediated gene transfer to pancreatic beta cells. Gene Ther* 7:1553-1561, 2000
17. Yang YW, Kotin RM: *Glucose-responsive gene delivery in pancreatic Islet cells via recombinant adeno-associated viral vectors. Pharm Res* 17: 1056-1061, 2000
18. Tomita N, Morishita R, Higaki J, Tomita S, Aoki M, Ogihara T, Kaneda Y: *In vivo gene transfer of insulin gene into neonatal rats by the HVJ-liposome method resulted in sustained transgene expression. Gene Ther* 3:477-482, 1996
19. Saeki Y, Wataya-Kaneda M, Tanak K, Kaneda Y: *Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ liposomes. Gene Therapy* 5:1031-1037, 1998
20. Kaneda Y, Saeki Y, Morishita R: *Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? Mol Med Today* 5:298-303, 1999
21. Morishita R, Gibbons GH, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ: *Systemic administration of HVJ viral coat-liposome complex containing human insulin vector decreases glucose level in diabetic mouse: A model of gene therapy. Biochem Biophys Res Commun* 273:666-674, 2000
22. Yoon JW, Jun HS: *Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. Trends Mol Med* 8:62-68, 2002
23. Levis PF, Emerman M: *Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. J Virol* 68:510-516, 1993
24. 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* 408:483-488, 2000
25. Thule PM, Liu J, Phillips LS: *Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. Gene Ther* 7:205-214, 2000
26. Kahn A: *Converting hepatocytes to beta-cells : a new approach for diabetes? Nat Med* 6:505-506, 2000
27. Hadjidakis DJ, Raptis SA: *Proinsulin as a possible therapeutic agent. Hormone Metab. Res* S26:131-137, 1992
28. Yanagita M, Hoshino H, Nakayama K, Takeuchi T: *Processing of mutated proinsulin with tetra-basic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines. Endocrinology* 133:639-644, 1993
29. Mitancher D, Chen R, Massias JF, Porteu A, Mignon A, Bertagna X, Kahn A: *Regulated expression of mature human insulin in the liver of transgenic mice. FEBS Letters* 421:285-289, 1998
30. Nishigori T, Yanagita M, Takeuchi T: *Proinsulin cleaved by furin is processed to chromatography mature insulin by carboxypeptidases in non-neuroendocrine cell. Peptides* 17:789-796, 1993
31. Yin D, Tang JG: *Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle in vivo. FEBS Lett* 495:16-20, 2001