

석 중  
연구보고서

생리활성물질(EPO, LIF)의 효율적 생산을 위한  
불멸화 세포주 및 발현벡터 개발

Development of Animal Cell Line and Expression  
Vector for Human Bioactive Protein (EPO, LIF)  
Production System

서울대학교

농림자료실



0012424

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생리활성물질(EPO, LIF)의 효율적 생산을 위한 불멸화 세포주 및 발현 벡터 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 최윤재 교수

세부연구책임자 : 최윤재 교수

연 구 원 : 김선명, 한정아,  
이창훈, 이남경,  
이철호, 백삼열,  
김경현, 김은배,  
곽성욱

# 요 약 문

## I. 제 목

생리활성물질(EPO, LIF)의 효율적 생산을 위한 불멸화 세포주 및 발현벡터 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

생리활성 단백질 생산 host로서 이용 가능한 동물 불멸화상피세포주 및 효율적인 외래 단백질 대량발현 벡터 시스템의 개발

### 2. 연구개발의 필요성

고 부가가치의 생리활성단백질 및 치료용 항체를 대량생산하는 동물세포배양 기술은 활성이 있는 당쇄 부가 단백질의 가장 효율적인 생산기술로 알려져 있으나 현재 이용되고 있는 세포주들은 그 수가 한정되어 있어 외국에 로열티를 지급해야만 사용 가능한 실정이며 primary 세포를 생체로부터 분리하여 사용할 경우 필요한 세포를 분리, 회수, 대량 확보를 위한 생산비용의 증가가 필연적인 상황이다.

이러한 문제를 극복하기 위해서는 유용 단백질을 효율적으로 대량생산 할 수 있는 우수한 세포주를 독자적으로 개발하는 것이 시급한 과제로, 최근의 유전공학 및 세포공학의 발달은 세포가 가지는 여러 가지 한계성을 용이하게 극복할 수 있는 길을 열어주었고, 세포의 성장 및 분열을 위해 필요한 유전자들이 밝혀짐에 따라 이러한 유전자를 이용하여 정상적인 세포가 가지는 한계성을 극복하여 무한한 분열능력을 획득한 세포를 생리활성물질과 백신생산을 위한 virus host로 사용하였을 때 안전성확보 및 비용절감의 효과를 얻을 수 있으며, 이러한 세포주의 개발로 생리활성단백질 생산경쟁에서 국가적 우위를 차지하고 관련 산업의 국가경쟁력을 제고시킬 수 있다.

따라서 본 연구에서는 세포의 불멸화 유도 기법을 이용하여 체세포 가운데서도 단백질의 합성 및 분비에 효율적일 것으로 판단되는 상피세포 중에서 항 후

인체용 의약품/백신 생산 및 동물 산업에 유용하게 활용 가능한 단백질 자원을 대량생산 할 수 있는 잠재력을 지닌 젓소의 유선상피세포와 돼지의 신장 상피세포의 불멸화를 통해 생리활성단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 안정적인 세포주의 확립과 아울러 효과적인 단백질 대량발현 벡터 시스템을 구축하고 그 효율성을 규명하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 동물(소, 돼지)불멸화 상피세포주의 개발을 위한 primary세포의 분리, 배양기법 확립

- 가. Swine kidney tissue로부터 epithelial cell을 분리하고 배양하는 기법을 확립한다.
- 나. Bovine mammary gland로부터 epithelial cell 분리하고 배양하는 기법을 확립한다.

#### 2. 불멸화상피세포주의 개발, 특성규명

- 가. 세포의 불멸화와 관련된 유전자원을 확보하고 이러한 유전자를 이용하여 세포의 불멸화를 유도할 수 있는 벡터를 구축한다.
- 나. 구축된 불멸화 유도 벡터를 상피세포에 도입하여 불멸화된 상피세포주를 확립한다.
- 다. 확립된 세포주의 생리적 특성과 분자 유전학적 특성 규명을 통해 세포 불멸화 여부를 검정한다.

#### 3. 개발된 불멸화상피세포주의 생리활성단백질 발현확인 및 생리활성 측정

- 가. 개발된 불멸화상피세포주에서 단백질 생산시에 특이적으로 작동할 수 있는 프로모터 및 유전자 자원을 이용하여 모델 약물 단백질인 Human EPO 또는 LIF를 효과적으로 발현시킬 수 있는 벡터 시스템을 구축한다.
- 나. 확립된 불멸화상피세포주에 외래 단백질 생산 벡터시스템을 도입한 후 생리활성단백질의 mRNA 및 단백질 발현 검정을 통해 생산효율이 높은 재조합 불멸화상피세포주를 선발한다.
- 다. 재조합 불멸화상피세포주로부터 생산된 생리활성 단백질의 생리적 활성을 검정한다.

#### IV. 연구개발 결과

본 연구에서는 먼저 세포의 불멸화 유도 기법을 이용하여 체세포 가운데서도 단백질의 합성 및 분비에 효율적인 것으로 판단되는 상피세포주의 불멸화를 통해 외래 생리활성단백질의 발현을 효율적이고 안정적으로 지속할 수 있는 세포주의 확립을 시도하였다.

돼지의 신장조직에서 유래한 상피세포와 젓소의 유선조직에서 유래한 상피세포를 대상으로 불멸화를 유도한 결과, 돼지의 신장으로부터는 세포의 연속 계대 배양을 통하여 자발적으로 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-Spon), SV40LT Ag (SKE-SV40LT) 및 hTERT (human telomerase)의 발현을 통하여 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-hTERT) 등 3종류의 불멸화된 세포주를 확립하였고, 젓소의 유선조직으로부터 SV40LT Ag (BMGV), SV40LT Ag 및 hTERT의 발현 (BMGVTE)을 통하여 불멸화에 도달한 2종류의 불멸화된 세포주를 확립하였다.

이들 세포는 1) 초대배양세포에 비하여 세포성장속도가 약 2배 정도 가속화되는 양상을 보였고, 2) 형태적인 측면에서 초대배양세포와 유사한 형태학적 특징을 유지하고 있음이 확인되었으며, 3) 생리적인 측면에서도 상피세포의 표지 단백질인 cytokeratin이 불멸화 유도 후에도 높은 수준으로 발현하는 것으로 나타났고, 4) 노화와 연관된 생리적 특징을 보이는 세포가 관찰되지 않았으며, 5) soft agar assay를 통한 암세포적 특징 보유 여부를 검정한 결과, 확립된 세포주가 암세포가 아닌 불멸화된 세포주임을 최종적으로 확인 할 수 있었다.

한편, 본 연구를 통해 확립된 불멸화 세포주의 주요 생리적 특징을 살펴보면, 불멸화된 신장 상피세포주에서는 신장조직 가운데 proximal tubular 부위에서 생성되는 분화인자인 plasminogen activator 및 gamma-glutamyl transpeptidase 유전자의 발현이 확인되었다. 젓소의 유선상피세포에서는  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 확인되었고, insulin 첨가시 세포의 성장이 촉진됨을 확인하였으며, EGF와 insulin을 함께 처리할 경우 이러한 촉진효과가 향상됨을 확인하였다. 또한 confluent 상태에서 혈청농도를 1/4로 낮추었을때  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

다음으로는, 본 연구를 통해 확립된 불멸화세포주를 활용하여 human EPO 또는 LIF와 같은 유용 생리활성 단백질을 발현하기 위한 벡터 시스템을 구축하여 항생제를 이용한 선발을 통해 mRNA 및 protein 수준에서 EPO 및 LIF를 지속적으로 발현하는 재조합 세포주를 선발하였고 이들 재조합 세포주에서 생산된 EPO 및 LIF의 생리활성유무를 검정하였다.

돼지 신장 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 murine renin promoter와 젓소 유선 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는

bovine  $\beta$ -casein promoter를 도입한 단백질 대량발현 벡터 시스템을 구축한 후, 확립된 각각의 불멸화상피세포주로부터 모델 생리활성 단백질인 EPO와 LIF의 발현효율을 검정한 결과, 우수한 상용 단백질 대량발현 시스템인 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포주와 CMV promoter의 조합에 필적할 만한 높은 단백질 발현효율을 보여 주었으며, 생산된 단백질은 고유의 기능을 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 토대로, 세포의 연속적인 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화를 유도하는 기법과 아울러 SV40LT Ag 및 hTERT의 과발현은 동물유래 상피세포의 효율적인 불멸화기법의 하나임을 확인하였으며, 또한 이들 불멸화된 세포주가 정상세포주와 유사한 특징을 가지고 있는지를 검증함으로써 확립된 불멸화 세포주가 초대 배양세포주의 고유한 특성을 유지하면서 지속적인 증식이 가능한 효율적인 세포모델로 사용될 수 있고, 외래 단백질을 효과적으로 발현할 수 있음을 증명하였다.

## V. 연구개발 결과 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 확립된 3종의 돼지 신장 유래의 불멸화세포주인 SKE-hTERT, SKE-Spon 및 SKE-SV40LT와 2종의 젓소 유선 유래의 불멸화세포주인 BMGV 및 BMGVTE 는 각 세포주에 특이적으로 단백질 발현을 유도할 수 있도록 설계된 외래 단백질 대량 발현 벡터 시스템과의 조합을 통해, 향 후 이들 동물세포주를 생체반응기(bioreactor)로 이용하여 다양한 생리활성 단백질 및 백신을 효과적으로 생산하는데 폭넓게 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 본 연구를 통해 개발된 세포주와 관련기술의 산업적 활용을 용이하도록 하기 위해서는 다음과 같은 사항에 대한 면밀한 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

### 1. 경제가축 유래의 불멸화상피세포주 구축과 관련된 기술 및 자원의 확충

현재까지 실험동물인 설치류나 인간 유래의 세포를 제외하고 경제가축 유래의 불멸화세포주를 확립한 사례는 세계적으로도 희소한데, 그 가장 큰 이유는 경제가축 유래의 세포 생리를 연구할 수 있는 특이적인 항체, 유전자 및 단백질 데이터 베이스의 미비 등을 들 수 있다. 본 연구에서 경제가축 유래의 불멸화상피세포주를 개발함에 있어서도 이러한 연구의 기초가 되는 유효자원의 미비가 효율적인 연구에 큰 걸림돌이었음을 지적할 수 있는데, 이러한 문제를 해결하기 위해서는 향 후 경제가축 유래의 유전자 및 단백질의 체계적인 데이터 베이스의 구축과, 생리현상 규명을 위한 다양한 분자 자원 확보 및 기술 확충이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

### 2. 산업화 기반을 다지기 위한 내실 있는 후속연구

본 연구를 통해 제시한 경제가축 유래의 불멸화세포주의 개발을 실제 산업적으로 활용하기 위해서는 본 연구에서 중점적으로 다루었던 세포 생리학적 기전 규명 연구에서 한단계 더 나아가 경제적이고 효율적인 외래단백질 생산공정의 확립과 산업적 효용성에 대한 면밀한 검토 및 연구가 필수적이므로, 가능하다면 향 후 생물공학 및 공정개발을 전문적으로 수행하는 연구그룹과의 공조를 통해 본 연구에서 얻은 연구결과 및 연구산물을 실제 산업적으로 실용화 할 수 있는 추가연구를 건의하고자 한다.

## SUMMARY

Cultivated mammalian cells have become the dominant system for the production of recombinant proteins for clinical applications because of their capacity for proper protein folding, assembly and post-translational modification. Thus, the quality and efficacy of a protein can be superior when expressed in mammalian cells versus other hosts such as bacteria, plants and yeast.

Epithelial cells are associated with the major functional role of many tissues and have been a focus of interest in the development of *in vitro* models for many years. So immortalized but not transformed epithelial cells are valuable tools in *in vitro* model research but also a good resource to produce secretory protein such as hormones and antibodies, although there are limited number of established cell lines from domestic animal.

This study was conducted to establish immortal epithelial cell lines from swine kidney tissue and bovine mammary tissue. To immortalize primary epithelial cells SV40LT Ag (Simian virus 40 large T antigen) and hTERT (human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit) were used.

Three lines of immortalized swine kidney epithelial cells were established by long term subculture of primary cells and introduction of SV40LT Ag and hTERT into primary cells. These immortalized lines were examined to show some characteristics of kidney epithelial cells and not to show tumor-like properties.

Unlike swine kidney epithelial cells, spontaneous immortalized cells could not be established but two lines of immortalized bovine mammary epithelial cells were established by introduction of SV40LT Ag and hTERT into primary cells. These lines of immortalized bovine mammary epithelial cells showed some characteristics of mammary epithelial cells and did not show tumor-like properties.

### **1. Establishment of immortal swine kidney epithelial cells and characterization of immortalized cells**



Using normal swine kidney epithelial (SKE) cells that were shown to be senescent at passages 12 to 14, we have established one lifespan-extended cell line and two lifespan-extended cell lines by exogenous introduction of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT) and simian virus 40 large T-antigen (SV40 LT Ag), all of which maintained epithelial morphology and express cytokeratin, a marker of epithelial cells. SV40LT- and hTERT-mediated immortalized cell lines appeared to be smaller and exhibited more uniform morphology relative to primary and spontaneously-immortalized SKE cells. We determined the *in vitro* lifespan of primary SKE cells using a standard 3T6 protocol. There were two steps of the proliferation barrier at 12 and 20, in which a majority of primary SKE cells appeared enlarged, flattened, vacuolated, and  $\beta$ -galactosidase-positive, all phenotypical characteristics of senescent cells. Lifespan-extended SKE cells were eventually established from most of the cellular foci, which is indicative of spontaneous cellular conversion at passage 23. Beyond passage 25, the rate of population doubling of the established cells gradually increased. At passage 30, immortal cell lines grew faster than primary counterpart cells in 10% FBS-DMEM culture conditions, and only SV40LT-transduced immortal cells grew faster than primary and other SKE immortal cells in 0.5% FBS-DMEM. These lifespan-extended SKE cell lines failed to grow in an anchorage-independent manner in soft-agar dishes.

## **2. Establishment of immortal bovine mammary epithelial cells and characterization of immortalized cells**

Primary bovine mammary epithelial (BMG) cell line was established from the normal 3-year-old Holstein cow mammary parenchyma tissue at lactation period. When plated on plastic, the cells assumed a monolayer, cobblestone, epithelial like morphology, with close contact between the cells. There were three steps of the proliferation barrier at passage 7, 12 and 19, in which a majority of primary BMG cells appeared enlarged, flattened, vacuolated, and  $\beta$ -galactosidase-positive, all phenotypical characteristics of senescent cells and at passage 19 most of cells stopped proliferation. Two lifespan-extended cell lines by exogenous introduction of simian virus 40 large T-antigen (SV40 LT Ag) alone or simian virus 40 large T-antigen (SV40 LT Ag) and the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). The positive staining of primary and immortalized BMG cells with anti-cytokeratin antibodies and the negative staining of SMA suggest that these cell lines are of epithelial origin; no

detectable conversion from epithelial to myoepithelial-like cells occurred through the cell passages and immortalization process and showed some characteristics such as  $\beta$ -casein expression.

### **3. Construction of EPO/LIF overexpression vector system**

In order to produce human pharmaceutical proteins such as EPO and LIF from the established immortal cell lines, the protein overexpression vector systems were constructed based on an eukaryotic protein expression vector system, pcDNA 5 (invitrogen). Newly constructed vectors contained the tissue specific promoters such as murine renin promoter and bovine  $\beta$ -casein promoter for application in swine kidney epithelial cell line and bovine mammary epithelial cell line respectively. CMV promoter was used as a positive control. Each vector system also included MAR (matrix attachment region) sequence originated from chicken genome for reducing positional effect caused by random integration of the vectors into host genome and improving transcription efficiency of the target genes. EPO or LIF genes were inserted in multi-cloning site of the vectors under the position of MAR sequence and each tissue specific promoter.

### **4. Establishment of immortal epithelial cells producing human EPO/LIF**

Swine kidney epithelial cells, which showed the characteristics of primary kidney epithelial cells stably like a human embryo kidney cells, 293, the investigation of the possibility of host cells for bioactive protein production will be a challenge. To reach this goal, the overexpression system which contains chicken lysozyme matrix attachment region, designated as pcDNA-Pex, were developed with variations of promoter element to compare the promoter efficiency. Human EPO/LIF production was detected by RT-PCR, western blotting and their biological activity was confirmed by TF-1 cell culture.

# CONTENTS

<b>Abstract</b> .....	2
<b>Summary</b> .....	7
<b>Contents (English)</b> .....	10
<b>Contents</b> .....	14
<b>I. Introduction</b> .....	18
<b>II. Research Background</b> .....	21
<b>III. Reserch Contents and Results</b> .....	26
1. Annual Research Plan .....	26
2. Establishment of isolation and cultivation technique of primary cells .....	27
1) Research Methods .....	27
(1) Isolation and cultivation of Swine Kidney Epithelial (SKE) cells .....	27
(2) Isolation and cultivation of Bovine Mammary Epithelial (BMG) cells .....	28
(3) Mycoplasma Detection .....	29
(4) Soft Agar Assay .....	30
2) Research Results .....	31
(1) Isolation and cultivation of Swine Kidney Epithelial (SKE) cells .....	31
(2) Isolation and cultivation of Bovine Mammary Epithelial (BMG) cells .....	32
(3) Mycoplasma Detection .....	33
(4) Soft Agar Assay .....	33
3. Vector Construction for Immortalization .....	41
1) Research Methods .....	41
2) Research Results .....	42
(1) Construction of SV40LT expression vector .....	42
(2) Construction of hTERT expression vector .....	44
(3) Construction of c-myc expression vector .....	46
(4) Construction of H-rasV12 expression vector .....	47

4. Selection and Characterization of Immortalized Epithelial cells .....	49
1) Research Methods .....	49
(1) Introduction of vectors by Transduction or Lipofection for Immortalization .....	49
① Introduction of vectors by Transduction for Immortalization .....	50
② Introduction of vectors by Lipofection for Immortalization .....	51
(2) Characterization of Immortalized SKE and BMG cells .....	51
① Cell growth rate of Immortalized cells .....	51
② Cell Cycle Analysis .....	53
③ Transformation Assay .....	54
③-1 Oncogenic H-ras gene overexpression .....	54
③-2 DNA Damage Response .....	55
③-3 Soft Agar Assay .....	55
2) Research Results .....	55
(1) Immortalization of SKE cells by Gene Delivery .....	55
(2) Immortalization of BMG cells by Gene Delivery .....	56
(3) Characterization of Immortalized SKE cells .....	57
① Cell Growth Rate and Growth Factor Dependency .....	57
② Cell Cycle Analysis by FACS .....	57
③ Telomerase Activity .....	57
④ Cytokeratin Expression .....	58
⑤ Kidney-specific Marker gene Expression .....	58
⑥ Transformation Assay .....	59
(4) Characterization of Immortalized BMG cells .....	60
① Cell Growth Rate and Growth Factor Dependency .....	60
② Cell Cycle Analysis by FACS .....	60
③ Cytokeratin Expression .....	61
④ Mammary gland-specific Marker gene Expression .....	61
⑤ Transformation Assay .....	61
5. Construction of Bioactive protein overexpression Vectors .....	80
1) Research Methods .....	80
(1) Introduction .....	80
(2) Cloning of Overexpression vector Basic Elements .....	81
① Renin Promoter .....	81
② $\beta$ -casein Promoter .....	83

③ CMV Promoter .....	83
④ MAR Sequence .....	83
(3) Cloning of Human EPO and LIF Gene .....	84
(4) Construction of EPO/LIF Overexpression Vectors .....	85
2) Research Results .....	85
(1) Construction of Bioactive protein overexpression Vectors .....	85
① Cloning of Murine Renin Promoter and Luciferase Assay .....	86
② Cloning of Bovine $\beta$ -casein Promoter .....	87
③ Cloning of Chicken MAR Sequence .....	87
④ Construction of Overexpression Vector with Basic Elements .....	88
(2) Cloning of Human EPO and LIF Gene .....	88
① Cloning of Human EPO Gene .....	88
② Cloning of Human LIF Gene .....	89
(3) Construction of EPO/LIF Overexpression Vectors .....	89
① Construction of pcDNA-PexR-EPO/LIF Vectors .....	89
② Construction of pcDNA-PexB-EPO/LIF Vectors .....	90
③ Construction of pcDNA-PexC-EPO/LIF Vectors .....	90
6. Establishment of Bioactive protein-producing Immortalized Epithelial cells .....	101
1) Research Methods .....	101
(1) Establishment of Human EPO-producing Immortalized Epithelial cells .....	101
① Transfection and Selection .....	101
② RT-PCR Analysis .....	102
③ Western Blotting Analysis .....	103
④ Biological Activity Test .....	104
(2) Establishment of Human LIF-producing Immortalized Epithelial cells .....	105
① Transfection and Selection .....	105
② RT-PCR Analysis .....	105
③ Western Blotting Analysis .....	105
④ Biological Activity Test .....	105
2) Research Results .....	106
(1) Establishment of Human EPO-producing Immortalized Epithelial cells .....	106

(2) Identification of Human EPO mRNA Expression .....	107
(3) Identification of Human EPO Protein Expression .....	107
(4) Establishment of Human LIF-producing Immortalized Epithelial cells .....	107
(5) Identification of Human LIF mRNA Expression .....	108
(6) Identification of Human LIF Protein Expression .....	108
(7) Biological Activity Test .....	109
① Biological Activity Test for EPO .....	109
② Biological Activity Test for LIF .....	110
 IV. Achievement of Research Goal and Its Contribution .....	120
 V. Application Plan of Research Results .....	126
 VI. External Technical Information During Research .....	130
 VII. References .....	133

# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	2
Summary .....	7
Contents .....	10
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	18
제 1 절 연구개발의 목적 .....	18
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	18
제 2 장 국내·외 기술개발 현황 .....	21
제 1 절 국내 기술개발 현황 .....	21
제 2 절 국외 기술개발 현황 .....	23
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	26
제 1 절 연도별 연구개발의 목표 및 내용 .....	26
제 2 절 Primary세포의 확보 및 분리/배양기법의 확립 .....	27
1. 실험방법 .....	27
가. Swine kidney epithelial (SKE) cell의 분리, 배양 .....	27
나. Bovine mammary epithelial (BMG) cell의 분리, 배양 .....	28
다. Mycoplasma detection .....	29
라. Soft agar assay .....	30
2. 연구결과 .....	31
가. Swine kidney epithelial (SKE) cell의 분리, 배양 .....	31
나. Bovine mammary epithelial (BMG) cell의 분리, 배양 .....	32
다. Primary cell의 mycoplasma 감염여부 test 결과 .....	33
라. Soft agar assay 결과 .....	33
제 3 절 불멸화유도를 위한 백터구축 .....	41
1. 실험방법 .....	41
2. 연구결과 .....	42
가. SV40LT gene의 cloning 및 발현 백터의 구축 .....	42

나. hTERT gene의 cloning 및 발현 벡터의 구축 .....	44
다. c-myc gene의 cloning 및 발현 벡터의 구축 .....	46
라. H-rasV12 gene의 cloning 및 발현 벡터의 구축 .....	47
제 4 절 불멸화유도를 위해 구축된 벡터의 세포내 도입, 불멸화상피세포주의 선발, 세포특성규명 .....	49
1. 실험방법 .....	49
가. 불멸화 유도 유전자의 lipofection 및 retroviral transduction을 통한 primary epithelial cell의 불멸화유도 .....	49
1) 유전자 도입 vector의 transduction 및 transfection을 통한 불멸화의 유도 .....	49
가) Transduction에 의한 불멸화유도 vector의 도입 .....	50
나) Transfection에 의한 불멸화유도 vector의 도입 .....	51
나. 불멸화유도된 SKE 및 BMG cell의 세포특성 규명 .....	51
1) 불멸화유도에 따른 세포성장속도의 변화 측정 .....	51
2) Cell cycle analysis .....	53
3) 불멸화세포의 정상성 검증 .....	54
가) Oncogenic H-ras gene의 과발현을 통한 불멸화세포주의 정상성 검증 .....	54
나) DNA damage 유도시 세포생존률 측정을 통한 불멸화세포주의 정상성 검증 .....	55
다) Soft agar assay .....	55
2. 연구결과 .....	55
가. 외래유전자의 도입에 의한 SKE cell의 불멸화유도 .....	55
나. 외래유전자의 도입에 의한 BMG cell의 불멸화유도 .....	56
다. 불멸화된 SKE cell의 세포특성 규명 .....	57
1) Cell growth rate의 변화양상 및 growth factor dependency 검증 ..	57
2) Cell cycle analysis by FACS .....	57
3) Telomerase activity test .....	57
4) Cytokeratin expression 검증 .....	58
5) Kidney-specific marker 유전자 발현 검증 .....	58
6) 불멸화된 SKE cell의 transformation 여부 검증 .....	59
가) Transformation assay 결과 .....	59
나) Doxorubicin treatment 결과 .....	59
다) Soft agar assay 결과 .....	60
라. 불멸화된 BMG cell의 세포특성 규명 .....	60



1) Cell growth rate의 변화양상 및 growth factor dependency 검증	60
2) Cell cycle analysis by FACS	60
3) Cytokeratin expression 검증	61
4) Mammary gland-specific marker 유전자 발현 검증	61
5) 불멸화된 BMG cell의 transformation 여부 검증	61
가) Soft agar assay 결과	61
제 5 절 생리활성단백질 생산을 위한 overexpression 벡터 구축	80
1. 실험방법	80
가. 생리활성단백질 생산을 위한 overexpression vector 구축 개요	80
나. Overexpression vector 구성요소의 cloning	81
1) Renin promoter	81
2) $\beta$ -casein promoter	83
3) CMV promoter	83
4) MAR sequence	83
다. Human EPO 및 LIF의 cloning	84
라. Human EPO/LIF expression vector의 구축	85
2. 연구결과	85
가. Overexpression vector 구성요소의 cloning 및 vector 구축	85
1) Murine renin promoter의 cloning 및 luciferase assay	86
2) Bovine $\beta$ -casein promoter의 cloning	87
3) Chicken MAR sequence의 cloning	87
4) Overexpression vector의 구축 (basic vector)	88
나. Human EPO 및 LIF의 cloning	88
1) Human EPO의 cloning	88
2) Human LIF의 cloning	89
다. Human EPO/LIF expression vector의 구축	89
1) pcDNA-PexR-EPO 및 pcDNA-PexR-LIF의 구축	89
2) pcDNA-PexB-EPO 및 pcDNA-PexB-LIF의 구축	90
3) pcDNA-PexC-EPO 및 pcDNA-PexC-LIF의 구축	90
제 6 절 생리활성단백질 생산하는 불멸화상피세포주의 확립	101
1. 실험방법	101
가. Human EPO protein을 생산하는 불멸화상피세포주의 확립	101
1) PexC-EPO hyg, PexR-EPO hyg 및 pcDNA hyg vector의 stable transfection	101
2) Human EPO 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 기법확립	102

3) Human EPO 유전자의 발현을 확인하기 위한 Western blotting 기법 확립 .....	103
4) TF-1 cell line을 이용한 생산된 EPO protein의 biological activity test .....	104
나. Human LIF protein을 생산하는 불멸화상피세포주의 확립 .....	105
1) PexC-LIF hyg, PexR-LIF hyg 및 pcDNA hyg vector의 stable transfection .....	105
2) Human LIF 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 기법확립 ..	105
3) Human LIF 유전자의 발현을 확인하기 위한 Western blotting 기법 확립 .....	105
4) TF-1 cell line을 이용한 생산된 LIF protein의 biological activity test .....	105
2. 연구결과 .....	106
가. Human EPO protein을 생산하는 불멸화상피세포주의 구축 .....	106
나. Human EPO mRNA의 발현확인 .....	107
다. Human EPO protein의 발현확인 .....	107
라. Human LIF protein을 생산하는 불멸화상피세포주의 구축 .....	107
마. Human LIF의 mRNA의 발현확인 .....	108
바. Human LIF protein의 발현확인 .....	108
사. 생성된 human protein의 biological activity test .....	109
1) 불멸화세포주에서 생산된 EPO protein의 biological activity test ..	109
2) 불멸화세포주에서 생산된 LIF protein의 biological activity test ..	110
제 4 장 연구개발목표의 달성도 및 기술발전 기여도 .....	120
제 1 절 연구개발목표 달성 .....	120
제 2 절 연구개발목표의 달성도 .....	123
제 3 절 기술발전 기여도 .....	124
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	126
제 1 절 연구결과 활용계획 .....	126
제 2 절 추가 연구의 필요성 .....	128
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	130
제 7 장 참고문헌 .....	133

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

생리활성 단백질 생산 host로서 이용 가능한 동물 불멸화 상피세포주 및 효율적인 외래 단백질 대량발현 벡터 시스템의 개발

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

진핵생물(eukaryote) 유래의 단백질이 그 기능을 수행하기 위해서는 세포 내에서의 post translational modification 과정이 필수적이기 때문에 동물세포배양기술은 현재 고 부가가치 생리활성단백질 및 치료용 항체를 대량생산하기 위한 가장 효율적인 생산기술이다. 그러나 현재 단백질 대량생산을 위해 사용되고 있는 상용 세포주들은 그 수가 한정되어 있고, 외국에 로열티를 지급해야만 사용할 수 있는 실정이며, 이를 피하기 위해 생체조직으로부터 세포를 분리한 뒤 초대배양(primary cell culture)하여 사용할 경우에는 필요한 세포를 분리, 회수, 대량 확보하기 위한 생산비용의 증가가 필연적인 상황이다.

최근 세포생물학 및 유전공학 기술의 급속한 발달로 세포의 성장 및 분열과정에 필요한 유전자들의 기능 밝혀짐에 따라 이러한 유전자를 인위적으로 도입하거나 그 활성을 조절해 정상적인 세포가 가지는 수명의 한계성을 극복한 무한한 분열능력을 획득한 불멸화세포주를 유용 생리활성 단백질의 생산이나 백신생산을 위한 virus host로 사용하였을 때 안전성확보 및 비용절감의 효과를 얻을 수 있어 이미 산업체에서 활용되고 있는 사례가 보고되고 있다. 이러한 유전공학 및 세포공학에 의해 개발된 불멸화된 세포는 분열능력이 매우 향상되지만 세포의 형태적 및 생리적인 고유기능을 보유하고 있어 암세포와는 구별되는 생리적인 특징을 가지는 세포로 정의할 수 있으며 여러 가지 산업적 및 학문적 응용성에 가능성을 보여주고 있다.

상피세포(epithelial cell)는 단백질의 생산 및 분비 기능이 잘 발달되어 있어 외래 단백질을 대량생산하는 숙주세포로서의 잠재력이 매우 높은 반면, 체외배양

조건이 비교적 까다롭기 때문에 현재까지 그 이용성에 많은 제약이 있었다. 따라서 현재까지 정립된 세포공학 및 유전공학의 기술을 적용하여 자연적 또는 인위적인 유전자 도입에 의한 외래 단백질 생산에 효율적인 불멸화상피세포주를 개발하고 그 공정을 확립한다면 동물세포배양산업 분야의 기술 발전에 획기적인 전기를 제공할 것으로 기대되고 있다.

## 2. 경제·산업적 측면

동물세포배양산업은 미국, 유럽, 일본등 선진국에서는 활발하게 성장을 지속하고 있는 분야이며 국내에서는 아직 초기발전단계에 있는 것으로 평가되나 향후 주도적 산업으로 발전할 것으로 예상되는 분야이다. 동물세포배양산업은 단일품목으로 최대 38억달러 이상의 큰 시장 및 높은 부가가치를 획득할 수 있는 고부가가치 사업으로 전체 세계시장규모에 있어서 2005년 현재 약 370억 달러에 이르는 것으로 추정되고 있다. 따라서 동물세포배양기술은 산업화에 있어 매우 중요한 기술이며 선진국과의 경쟁에서 낙후되지 않기 위해서는 지속적으로 발전, 확립되어야 할 기술이다.

한편, 높은 부가가치를 획득하기 위해서는 생리활성단백질들의 판매가를 낮추는 시도 또한 병행되어야 한다. 판매가를 낮추기 위해서는 생산성이 높은 세포주의 개발과 효율적인 공정개발을 통해 단위부피당 생산성을 높이는 방법을 개발하는 일이 필수적으로, 본 연구에서 추구하는 고생산성 세포주의 개발은 생리활성단백질 생산경쟁에서 우위를 차지하고 관련 산업의 국가경쟁력 제고를 위해서도 매우 절실히 요청되는 과제이다.

## 3. 사회·문화적 측면

현대 사회는 삶의 질을 중시하는 시대이다. 삶의 질을 향상시키기 위해서는 주거, 식품, 의료 등 사회 전반에 걸쳐 커다란 방향전환이 이루어져야 한다. 특히 그 중에서도 의료 부분은 앞으로 생명공학의 발전과 더불어 커다란 변화를 겪을 전망이다. 이러한 인류의 의료 복지 개선에 있어서 가장 먼저 해결해야 할 점은 누구나 치료의 혜택을 누릴 수 있는 ‘치료의 보편성’일 것이다. 이를 이루기 위해서는 무엇보다도 시급한 것은 치료제의 경제적 생산이라고 할 수 있다. 경제적이고 효율적인 세포배양기술의 확립은 바로 이러한 치료의 보편성을 획득할 수 있는 하나의 지름길이 될 수 있다.

생리활성단백질 및 치료용 항체 생산과 관련한 동물세포배양기술은 주요 생물 의약품의 생산 및 활용을 촉진하여 삶의 질과 건강증진을 도모하고 궁극적으로

개인과 국가의 이익을 증대시킬 수 있을 것으로 예상된다. 삶의 수준이 높아져 감에 따라 건강 및 의료에 대한 관심의 증대로 각종 치료제의 수요가 급증하게 될 것이며, 치료제나 진단제 등의 생산에 있어 동물세포의 이용이 불가피하기 때문에 동물세포배양기술을 이용한 고부가가치 생물약품의 생산은 더 많은 사람에게 의료혜택이 돌아갈 수 있는 밑거름이 될 수 있다.

이러한 생리활성단백질이나 치료용 항체를 생산하는데 있어 동물세포배양기술의 밑거름이 되는 새로운 세포주의 개발은 그 응용범위에 있어 사회전반에 미치는 혜택이 매우 클 것으로 예상되며 반드시 확립되어야 할 기술분야라고 판단된다.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제약 산업 및 바이오산업의 경쟁력을 결정하는 가장 중요한 요인은 고부가가치 신약개발에 있다. 선진국으로 분류되는 국가의 경우 예외 없이 제약 산업이 고도로 발전되어 자체개발 신약을 다수 보유하고 있으며, 이들 제품을 전 세계 시장에 독점공급하고 여기서 발생하는 막대한 수익을 연구개발에 재투자하여 또 다른 신약을 창출하는 과정을 반복함으로써 자체 개발신약을 보유하고 있지 못한 국가를 압도하고 있다. 전 세계 의약품 시장의 증가에 영향을 끼치는 요인 중에 중요하게 등장하고 있는 것은 바이오의약품(Biotech drug) 시장의 빠른 성장이다. 이 분야는 지난 10년간 4.4배나 시장이 성장하였으며 2002년에는 310억불 시장으로 전체 의약품 시장의 8%를 차지하였다. 바이오의약품은 유전자재조합, 세포융합, 세포배양 등 생명공학기술을 이용하여 생산되는 호르몬제제, 혈액관련제제, 항암제, 항생제, 성장인자 등의 치료제와 백신, 진단약 등을 일컫는다.

최근 생명공학기술을 이용한 신약개발 연구는 단백질체학(Proteomics)이나 생물정보학(Bioinformatics)등의 연구를 통하여 얻어진 정보를 통해 이루어진다. 특히 조합화학(Combinatorial chemistry), 고효율 검색(HTS; High throughput screening)과 관련된 다양한 기술들이 개발되어 설계된 화합물군(Compound library)을 이용해 미리 그 신약을 합성하고, 약효를 평가하는 기술까지 발전하였다. 각국은 이러한 신약개발을 보다 빠르고 효율적으로 최적화하기 위해 생물-화학정보학 기술을 이용한 정보분석 시스템을 사용함으로써 대량의 생리활성 후보물질들을 예측하고 이를 상업화하여 신약개발의 경쟁력을 강화하고자 노력하고 있다.

### 제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 1999년 말에 위암 치료용으로 판매가 승인된 SK제약의 선플라 주를 필두로 2004년 8월 현재까지 국내 신약 7건 및 미국 FDA 승인 1건등 괄목할 만한 성장을 이루었다. 또한 대웅제약에서 자체적으로 개발한 상피성장인자인 이지에프(EGF)는 국내 생명공학 신약 1호로 평가받고 있고 최근 중동 및 아시아 지역을 대상으로 판매범위를 넓혀나가고 있다.
2. LG화학(interferons, CSF, hGH, EPO), 녹십자(hGH, insulin), 제일약품(CSF), 제일제당(interferon  $\alpha$ ), 대웅제약(insulin), 동아제약(hGH, interferon  $\alpha$ , EPO,

CSF), 태평양(CSF) 등에서 대부분 특허가 만료된 제네릭 제품이나 외국의 다국적 제약회사와의 합작 형태로 판매되고 있다.

3. 한편, 국내 신약 연구개발을 주도하던 LG·CJ·SK 등 대기업들이 사업을 축소하고, 한미 자유무역협정(FTA) 협상에서 미국측의 신약 특허권 연장 요구로 '국내 제약산업이 자칫 뿌리째 흔들릴 것'이란 우려가 제기되고 있는 실정이다. 연구기간만 10년 이상 걸리는 성공 가능성이 희박한 신약연구이지만 기술력을 바탕으로 한 바이오 벤처기업들이 활발한 연구를 진행하고 있다.

1) 레고캠 바이오사이언스는 우리나라에서 최초로 글로벌 신약 '팩티브'를 개발한 LG생명과학 출신들이 뭉쳐 지난 5월 설립한 회사로, 신약개발을 위해 타켓에 맞는 열쇠(마스터 키)를 먼저 만들어 약이 될만한 구조를 찾아가는 전략으로 신약개발 전 단계까지는 레고캠이 가진 노하우를 필요로 하는 기업들에게 전수하고 서로의 역량에 맞게 역할 분담을 해서 추진하기위해 다국적 제약기업, 정부출연연구소, 벤처기업 등과 협력모델을 만들어 갈 방침으로 알려졌다.

2) 바이오큐어팜은 다국적 제약기업이 독점하고 있는 '인터페론 알파'를 일정량의 혈중농도로 필요한 시간만큼 일정부위에 투여되도록 개량한 DDS(Drug Delivery System)체형으로 만들어 미국, 서유럽 등 생명공학 분야의 선진국 시장 대신 동유럽, 중동, 동남아시아 등에 진출하여 수출로만 200만 달러 실적을 올렸고 독일계 회사인 라인 미나팜(Rhein Minapharm)사와 생물의약품 기술이전에 대한 MOU를 체결했다고 발표했다. 이와 함께 동물세포에서 EPO 생산, 재조합 세균에서 인터페론 알파와 베타, 재조합 효모에서 당뇨병 족부궤양(PDGF) 치료제, 신규 항암제(TIMP-2)을 개발하고 있다.

3) 씨지케이(CGK)는 김태국 KAIST 교수가 개발한 살아있는 세포 내에서 약분자와 표적 단백질의 상호작용을 이미지화해 분석할 수 있는 기술로 2005년 7월 '살아 있는 세포내에서 분자간 상호작용을 라이브로 검출하는 자성 나노프로브 기술(A Magnetic Nanoprobe Technology for Detecting Molecular Interactions in Live Cells)'이라는 제목으로 사이언스 지에 발표한 기술을 바탕으로 하여 이미 출시된 약의 새로운 적응증을 찾아 신규 치료제로 개발하여 신약개발을 앞당길 수 있는 산업화에 가장 근접한 혁신적 기술로 평가받고 있다.

4) 에이프로젠에서는 치료용 항체를 개발하고 있는데 B형 간염 치료용 인간화 항체와 대장암 치료용 항체를 개발했으며, 현재 이를 대량 생산하기 위한 세포주

를 개발중이다.

4. 동물세포배양을 이용한 단백질의 생산은 여러 장점을 지닌 CHO cell이 널리 사용되고 있으며 국내에서도 CHO cell의 생산효율향상을 위한 개선의 노력은 꾸준히 지속되어 오고 있으나 CHO cell에 견줄만한 새로운 세포주의 개발은 그 시도조차 거의 보고되어 있지 않다. 현재까지 CHO cell을 이용하여 생산되어 판매 허가를 받은 생리활성단백질로는 tPA(1987), EPO(1989), G-CSF(1991), Factor VIII(1992), DNase I(1993), Glucocerebrosidase(1994), FSH(1995), IFN $\beta$ (1996)등이며 국내에서는 현재 EPO가 CHO cell을 이용하여 생산, 판매되고 있다.

CHO cell의 단백질생산량은 0.01-0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 보고되고 있으며 특히 DHFR유전자가 불활성화된 DUKX-B11 clone의 경우 MTX를 이용한 amplification system을 이용하여 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 생산이 가능한 것으로 보고되고 있다. 이러한 CHO cell의 유용성은 amplified gene이 염색체내에 안정적으로 삽입되어 장기간 배양시에도 유지가 되며, 다양한 종류의 단백질들이 안정적으로 높은 수준의 발현양을 나타내며, 무혈청배지 및 부유배양으로의 적응이 비교적 용이하고, 5,000 리터이상의 대규모배양이 가능한 점등을 꼽을 수 있어서 유전적인 추가조작을 통해 CHO cell을 생산성을 개량시키기 위한 시도가 지속적으로 연구되어 오고 있다. 이러한 여러 장점을 지닌 CHO cell은 앞으로도 활발하게 이용될 것으로 예상되나, 더 많이 이용될수록 지불해야할 로열티는 증가하게 된다.

5. 본 연구실에서는 최근 5년여간 소, 돼지의 primary 세포들에 대한 연구를 실시하여 왔으며 이를 통해 불멸화상피세포주의 개발에 대한 연구기반을 확립하고 있는 과정에 있다. 이러한 연구기반을 바탕으로 하여 새롭게 확립한 세포주들의 특성에 대한 연구 및 세포주의 불멸화 과정에 관여하는 기작에 대한 연구, 이를 이용한 효율적인 불멸화 기법에 대한 연구와 생리활성단백질 생산능력에 대한 연구를 실시하여 이들 세포주의 산업적 이용가능성을 제시하고자 한다.

## 제 2 절 국외 기술개발 현황

이미 오래전에 단백질 의약품 분야의 잠재성과 시장성을 자각한 구미 선진국에서는 약 20년 전부터 이에대한 다양한 연구 개발 노력이 이루어지고 있다. 기업체를 통한 괄목할 만한 연구 성과는 백터의 구축에서부터 생산과정에 이르기까지 구체적인 내용이 전혀 공개되고 있지 않다.



1. 세계 제 1의 생명공학회사로 평가받고 있는 암젠사는 2005년 9월 현재 개발 중인 단백질 치료제가 암, 감염증, 혈액학, 신경학, 대사병 등 5가지 분야에서 20여 가지가 넘는다.
2. 암젠사에 이어 세계 제 2의 생명공학 회사로 평가받고 있는 제넨텍사는 1995년에 아이텍사와 공동으로 Non-Hodgkin's B-cell lymphoma 치료용 항체(리톡산) 개발에 착수하여 1997년에 미 FDA의 승인을 받았고 같은해 유방암 치료제로 개발된 인간화 단클론 항체인 허셉틴이 판매승인을 받았으며, 이어 2003년에는 천식치료제 졸레어와 psoriasis 치료제 랩티바가 각각 FDA의 승인을 획득하였다.
3. 미국의 카이론사는 감염증과 암 관련 치료제, 백신 및 혈액 테스트 키트분야에 연구를 집중하고 있으며, 대표적인 의약품으로 1990년대 초반에 FDA의 승인을 얻은 프로루킨과 베타세론을 들 수 있다. 주력분야중 하나인 혈액테스트 관련 분야의 대표적인 제품으로는 Procleix를 들 수 있는데 1999년도에 상품화에 성공한 이래 꾸준한 매출 증가를 보이고 있다.
4. 최초의 재조합 단백질 의약품인 휴물린을 개발한 일라이 릴리사는 1996년에 인슐린 아날로그인 휴마로그를 개발하여 미 FDA의 승인을 획득하는등 재조합인슐린 분야는 물론 인체 재조합 성장 호르몬 시장에서도 독보적인 존재로 군림하고 있다.
5. 미국 국립노화연구소(National Institute on Aging)의 Richard Hodes 박사 연구팀에 의해 진핵세포 염색체 끝 부분을 보호하는 말단소체를 연장시키는 telomerase라는 효소가 정상적인 면역반응에 핵심적인 역할을 한다는 연구결과가 International Congress of Genetics 저널에 발표되었다(2003년).
6. 미국 LA 캘리포니아 대학의 Juli Feigon 박사 연구팀은 telomerase 가운데 RNA Pseudoknot의 삼차원 구조를 결정하여 “Structure of the Human Telomerase RNA Pseudoknot Reveals Conserved Tertiary Interactions Essential for Function”이라는 제목으로 Molecular Cell 저널에 발표하였다(2005년).
7. 독일 National Research center for Biotechnology의 Peter Mueller 박사 연구팀은 doxycycline에 의해 조절되는 reversible immortalization system을 이용하

여 proliferation controlled cell line의 개발이 가능함을 보이고 EPO의 생산에 효율적으로 이용될 수 있다는 연구결과를 Cytotechnology 저널에 발표하였다(2005년).

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 연도별 연구개발의 목표 및 내용

본 연구과제의 연도별 연구개발의 목표와 내용은 표 1과 같다.

표 1. 연구과제의 연도별 연구개발의 목표와 내용

개발연도	연구목표	주요 연구내용
1차년도	동물(소, 돼지) 불멸화 상피세포주의 개발을 위한 primary 세포의 분리, 배양기법 확립 및 불멸화 유도를 위한 벡터구축	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Swine kidney epithelial cell의 분리, 배양기법 확립</li> <li>2. Bovine mammary epithelial cell의 분리, 배양기법 확립</li> <li>3. 불멸화유도를 위한 벡터구축</li> </ol>
2차년도	불멸화 상피세포주의 개발 및 이들 세포주의 특성규명	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Swine kidney epithelial cell의 불멸화유도</li> <li>2. Bovine mammary epithelial cell의 불멸화유도</li> <li>3. 불멸화된 Swine kidney epithelial cell의 특성규명</li> <li>4. 불멸화된 Bovine mammary epithelial cell의 특성규명</li> </ol>
3차년도	불멸화 상피세포주에서 생리활성단백질(EPO, LIF) 생산을 위한 효율적인 발현벡터 구축과 생리활성단백질 발현효율 검정 및 생리활성 측정	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 생리활성단백질 생산을 위한 Overexpression vector 구축</li> <li>2. 생리활성단백질을 생산하는 불멸화 상피세포주의 확립</li> <li>3. 생산된 생리활성단백질의 단백질 발현 및 생리활성확인</li> </ol>

## 제 2 절 Primary cell의 확보, 분리/배양기법의 확립

### 1. 실험방법

가. Swine kidney epithelial (SKE) cell의 분리, 배양

Kidney로부터 cortical tissue를 분리하여 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)으로 3회 세척한 후 분리한 cortical tissue를 잘게 자른후 250-, 150-, 75-um sieve를 이용하여 연속적으로 걸러내었다. Digestion solution (0.1% type II collagenase, 0.2% trypsin, 0.01% deoxyribonuclease)을 flask내에 HBSS로 세척한 조직과 함께 넣고 200 rpm, 37°C, 20 분간 처리하고 이러한 처리를 cortical tissue가 분해될 때까지 3회 반복하여 분리된 세포를 150g, 10분간 원심분리하여 회수하였다. DMEM, 10% FBS, 5ug/ml insulin, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 2.5ug/ml fungizone이 첨가된 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1주일간 배양한 후 limiting dilution 기법을 이용하여 cloning을 실시하였다. 확보한 clone은 cell morphology 관찰 및 epithelial cell의 marker인 cytokeratin staining을 실시하여 positive clone을 선발하였다 (그림 1). Swine kidney epithelial cell의 *in vitro* life span을 알아보기 위하여 100-mm culture dish에 3×10<sup>5</sup> cells을 seeding하여 6일간 배양 후 세포수를 측정하고 회수된 세포를 같은 조건으로 연속 계대 배양하는 3T6 protocol을 사용하여 매 계대시마다 population doublings (PDs)를 계산하였고 이들 PDs를 합산하는 방식으로 SKE cell의 *in vitro* life span을 산출하고자 하였다.

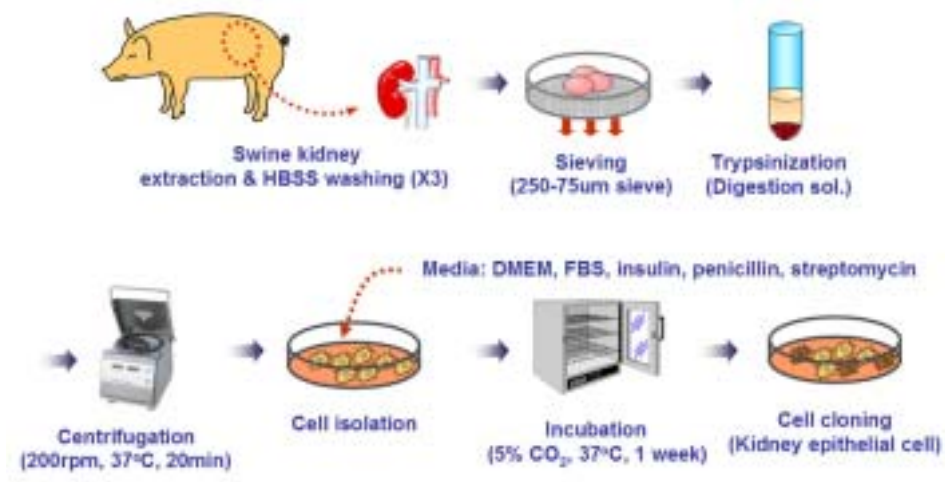


그림 1. Swine kidney epithelial cell 분리/초대배양 과정의 모식도

#### 나. Bovine mammary epithelial (BMG) cell의 분리, 배양

Lactating holstein cow로부터 primary mammary gland tissue를 절개하여 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)으로 유즙을 세척하고 Digestion solution (0.1% type II collagenase, 0.2% trypsin, 0.01% deoxyribonuclease)을 flask내에 HBSS로 세척한 조직과 함께 넣고 200 rpm, 37°C, 60 min간 처리, 분리된 세포를 150um sieve로 걸러내었다. Alpha MEM, 5% FBS, 5ug/ml insulin, 1ug/ml hydrocortisone, 1mM non-essential amino acid solution, 100U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 2.5ug/ml fungizone이 첨가된 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1주일간 배양한 후 limiting dilution 기법을 이용하여 epithelial morphology를 보이는 clone을 분리하고 cyokeratin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) staining을 통해 cyokeratin-positive,  $\alpha$ -SMA-negative clone을 선발하였다 (그림 2).

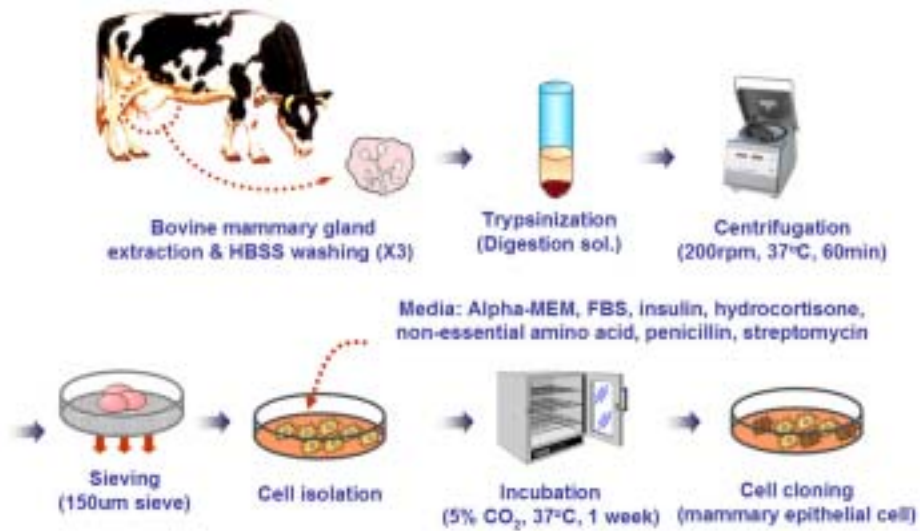


그림 2. Bovine mammary epithelial cell 분리/초대배양 과정의 모식도

#### 다. Mycoplasma detection

Mycoplasma 감염은 세포의 정상적인 성장을 방해하며 단백질을 생산을 위한 세포주는 mycoplasma-free 상태이어야 하므로 mycoplasma group-specific 16S rRNA sequence를 바탕으로 제작한 primer를 이용한 PCR을 통해 mycoplasma 감염여부를 확인하였다.

Primer sequence는 아래와 같다.

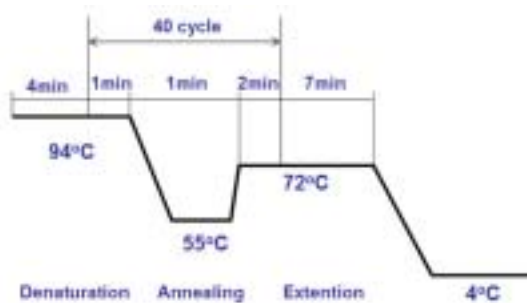
Forward primer: 5'-gggagcaaacaggattagatacct-3'

Reverse primer: 5'-tgcacatctgtcactctgttaacctc-3'

Product size : 280bp

PCR 조건은 아래와 같다.

Initial Denaturation : 94°C, 4min
Denaturation : 94°C, 1min
Annealing : 55°C, 1min      X40
Extension : 72°C, 2min
Final Extension : 72°C, 7min



#### 라. Soft agar assay

확보한 primary cell 가운데 내생 virus에 의한 transformation이 일어난 cell 이 포함되어 있는지를 판별하기 위하여 transformed cell이 agarose상에서 자랄 수 있는 형질을 획득하는 특성을 이용한 soft agar assay를 실시하였다. 1.6%(w/v)의 bottom agar solution을 만든 후 autoclave해서 water bath를 이용하여 55°C까지 식히고 55°C까지 가열한 2X DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)과 혼합한 다음 6-well에 2X DMEM과 혼합된 agar solution을 2ml씩을 부은 후 실온에서 20분간 식히고 CO<sub>2</sub> incubator에서 O/N 배양하였다 (박테리아 오염 여부의 확인). 50ml conical tube에 0.7% top agar solution 4ml, 2X DMEM 4ml, 2×10<sup>4</sup>개/ml로 준비된 세포현탁액 1ml 및 FBS 1ml을 혼합하여 pipetting으로 잘 섞은 후 이중 1ml씩을 전날 준비한 bottom agar가 coating된 plate에

seeding하였다. 현미경을 이용하여 매일 관찰을 실시하고 2주간 배양 후 colony 형성여부를 점검하였다 (그림 3).

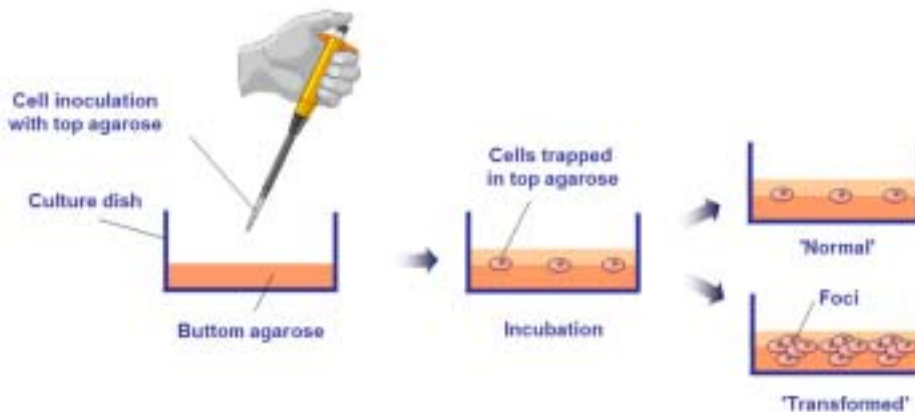


그림 3. Soft agar assay의 원리.

## 2. 연구결과

### 가. Swine kidney epithelial cell의 분리, 배양

그림 1은 primary swine kidney epithelial cell을 2번 계대 배양후 촬영한 사진으로 배양초기에는 epithelial cell에 비해 상대적으로 증식이 빠른 fibroblast cell의 선점을 저해하기 위하여 5% serum 농도에서 배양하면서 세포의 증식을 유도하였고 epithelial cell의 확인후에는 세포의 증식을 원활하게 촉진하고자 serum 농도를 10%로 상향조정하여 epithelial morphology를 가지면서도 세포의 증식이 가능한 population이 유지되도록 유도하였다(그림 4). 이러한 세포의 적응유도기간을 거치는 동안 cell population doubling time은 100시간 이상으로 분열속도가 매우 느림을 관찰하였다. 이 기간동안에는 세포형태의 변화 및 SA- $\beta$ -gal staining시 강하게 염색된 세포들을 다수 확인할 수 있었다(그림 5).

그림 6은 primary cell (p5)을 3T6 protocol에 의해 배양을 지속하면서 각각의 계



대과정에서 PDs (population doublings)를 산출하고 이들 PDs를 합산한 결과이다. 계대배양과정에서 약 2회 가량 세포성장이 정체되는 기간이 출현하였으며 (p10-p14, p18-p23), 이러한 현상은 세포의 불멸화과정에서 빈번하게 보고되고 있는데 이러한 정체기를 거치는 과정에서 지속적인 분열이 가능한 세포군이 우점하여 선발되는 과정을 겪은 것으로 추측되고 이런 과정을 통해 선발된 세포군은 primary SKE cell에 비하여 빠른 속도로 분열을 지속하면서도 초기 세포의 모양을 유지하는 특성을 보였다(그림 6의 내부 사진 참조). 앞서 기술한 배양조건에서 이러한 세포군이 출현하기까지는 적어도 10번의 세포분열이 필요하다는 결론을 내릴 수 있었으며 (그림 6의 세로축 참고) 기존의 확립된 세포주들의 선택을 참고해 볼 때 이들 세포군은 일종의 세포주로 확립되었을 것으로 사료된다.

#### 나. Bovine mammary epithelial cell의 분리, 배양

그림 7은 primary bovine mammary epithelial cell을 low density seeding(5,000cell/10-mm culture dish)을 통해 형성된 여러 colony들을 보여주고 있다. 전형적인 epithelial type의 morphology를 보여주고 있으며, 크기가 비교적 작고 밀집되어 있는 형태의 세포들과 핵에 비해 세포질의 크기가 매우 큰 세포들과 세포질 내에 vacuoles들을 많이 함유한 노화된 형태를 보이는 세포들이 혼재되어 있다. Bovine mammary epithelial cell의 경우, swine kidney epithelial cell과는 달리 고농도의 serum을 첨가하여 배양하였음에도 불구하고(17% FBS) 세포의 senescence가 매우 일찍 나타났으며(1번 계대후 바로 나타남) cell population doubling이 매우 더디게 진행되어 3T6 protocol에 의한 계대배양이 불가능하여 100-mm culture dish에  $10^6$  cell정도씩 seeding하여 80% confluency에 도달하면 계대하는 방식으로 배양을 지속하였다. 이러한 방식으로 p5에서 p19까지 도달하는데 약 9개월이 소요되었다 (그림 8). p9 시기에서 세포의 성장이 비교적 빠르게 진행되는 세포군이 선발되었으나, 세포 노화정도의 지표중 하나인 SA- $\beta$ -gal staining의 결과는 계대가 거듭됨에 따라 staining되는 세포의 비율이 계속 증가하는 경향을 보였으며 p19에 이르러서는 대다수의 세포가 별다른 분열

양상을 보이지 않는 채로 정체된 상황에 이르렀고 모든 세포가 SA- $\beta$ -gal staining의 결과에서 양성반응을 보였다. Bovine mammary epithelial cell은 p19에서 세포분열이 거의 일어나지 않았으며 더 이상 계대배양을 지속하지 못하였다. Bovine mammary epithelial cell의 경우 2차례의 선발과정을 거친 후 활발하게 분열하는 세포군을 형성한 swine kidney epithelial cell의 경우와 달리 자발적인 불멸화과정에 도달한 세포를 확보하지 못하였다. Mammary epithelial cell의 mitogen으로 알려져 있는 EGF (Epidermal Growth Factor) 및 insulin의 첨가에 따른 세포성장과 17% FBS의 첨가에 따른 세포성장이 거의 유사한 결과 (그림 9)를 미루어 보았을 때 이는 배양조건의 미비함 보다는 mammary epithelial cell의 고유한 특성으로 사료되며 이는 확립된 bovine cell line이 매우 적다는 기존의 연구결과와 더불어서 향후 연구에 있어 개선되어야 할 부분으로 남아있다.

#### 다. Primary cell의 mycoplasma 감염여부 test

Passage 1의 bovine mammary epithelial cell 및 Passage 3의 swine kidney epithelial cell로부터 genomic DNA를 추출하여 추출한 genomic DNA를 template로 사용하여 mycoplasma group-specific 16S rDNA sequence를 바탕으로 제작한 primer를 이용한 PCR을 통해 mycoplasma 감염여부를 확인한 결과 primary swine kidney epithelial cell 및 bovine mammary epithelial cell에서 모두 mycoplasma-specific DNA가 검출되지 않았으며 이는 mycoplasma에 감염되지 않았다는 간접증거로 판단하였다 (그림 10).

#### 라. Soft agar assay 결과

Primary cell을 대상으로 한 soft agar assay를 실시한 결과, colony를 형성한 세포를 관찰할 수 없었으며(그림 11) 이는 primary cell가운데 animal endogenous virus 감염에 의한 transformed cell이 포함되어 있지 않다는 간접적인 증거라고 판단된다.

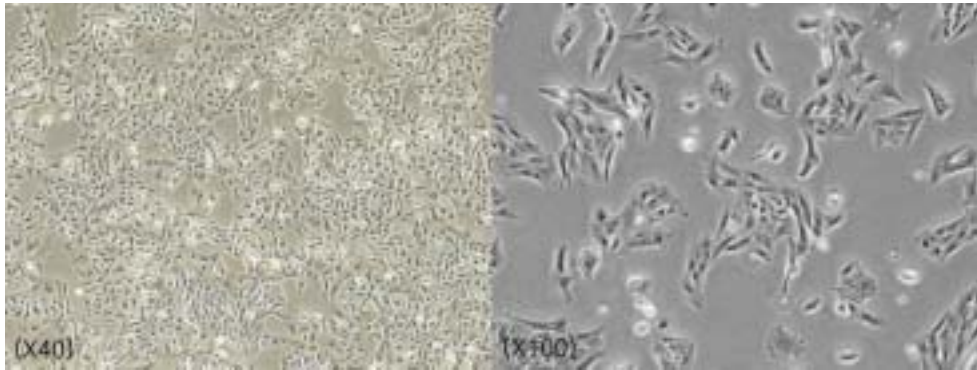


그림 4. Primary swine kidney epithelial cell의 사진

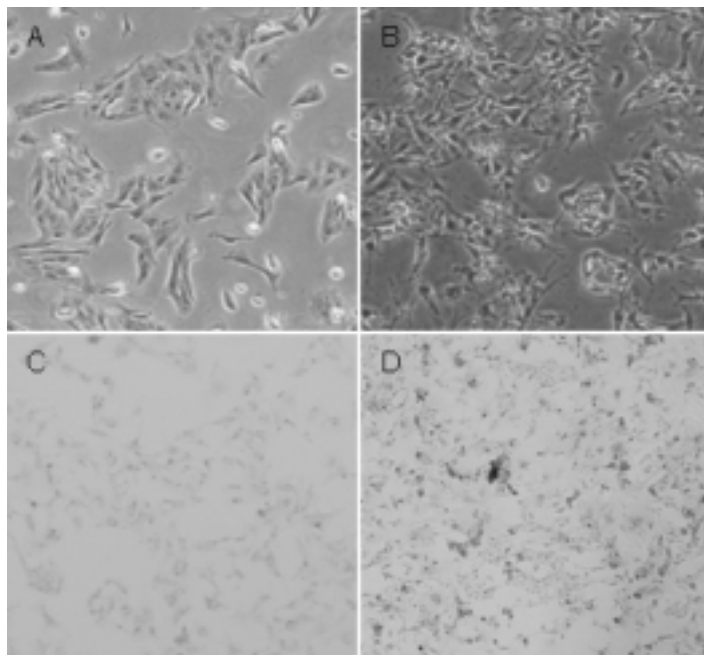


그림 5. Presenescent SKE (p5), senescent SKE (p12) cell의 morphology 및 SA-β-gal staining 결과

A) SKE p5, B) SKE p12, C) SKE p5 SA-β-gal staining, D) SKE p12 SA-β-gal staining

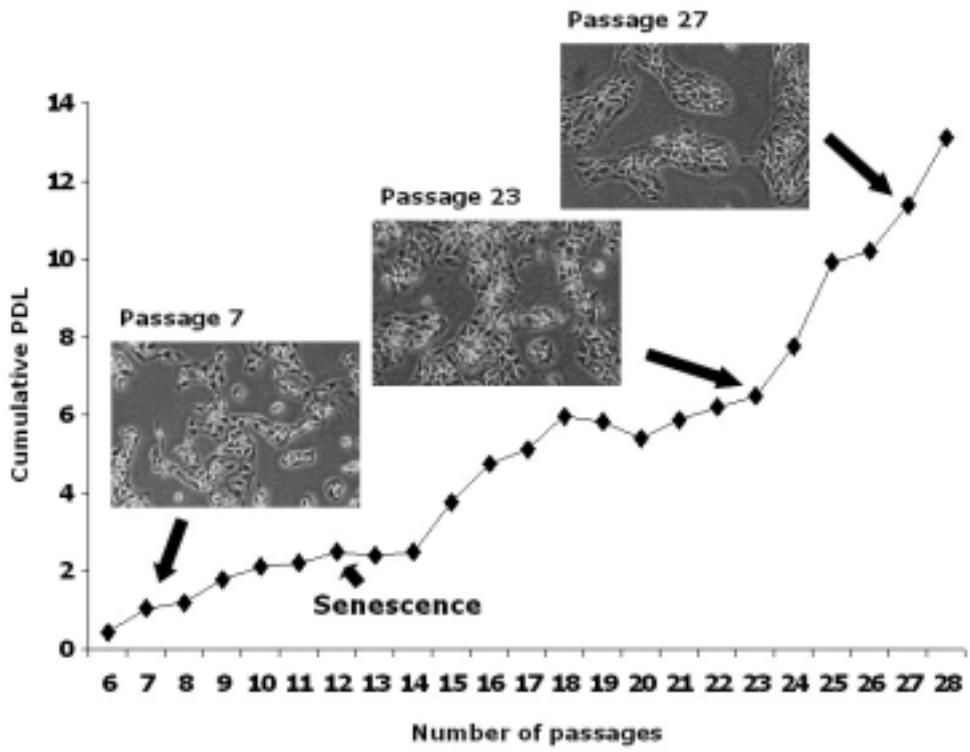


그림 6. Primary swine kidney epithelial cell의 자발적인 불멸화과정 및 이들 세포의 대표적인 모습. PDL (Population Doubling Level)

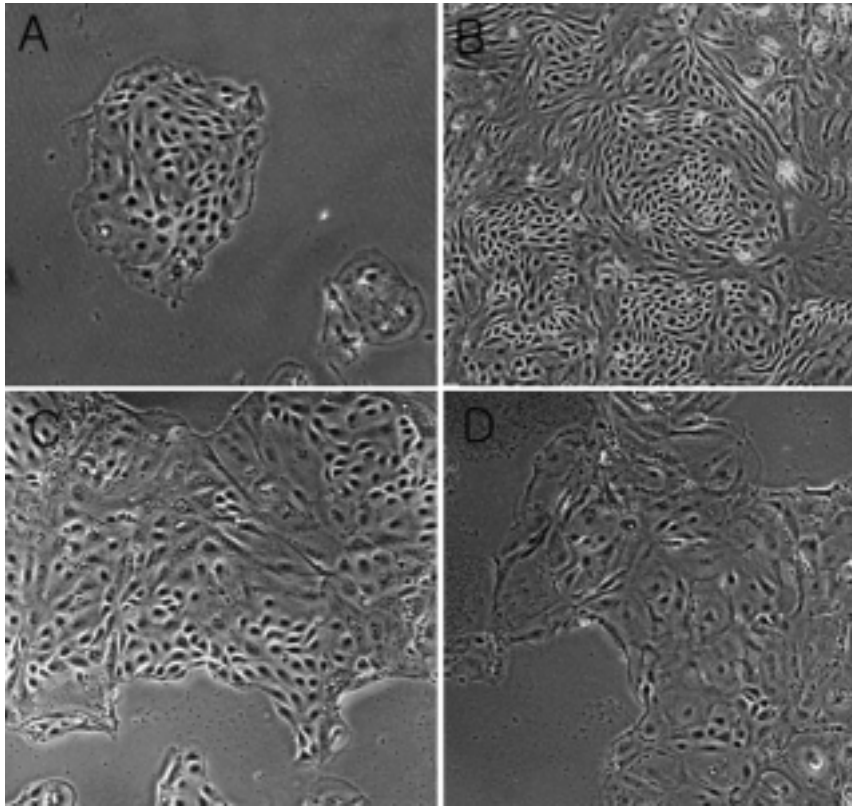


그림 7. Primary bovine mammary epithelial cell의 사진. A) p5 (presenescent, low density), B) p5 (presenescent, high density), C) p15 (senescent), D) p19 (senescent)

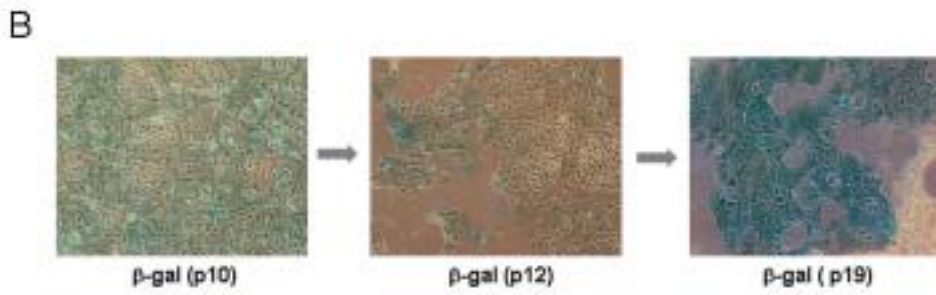
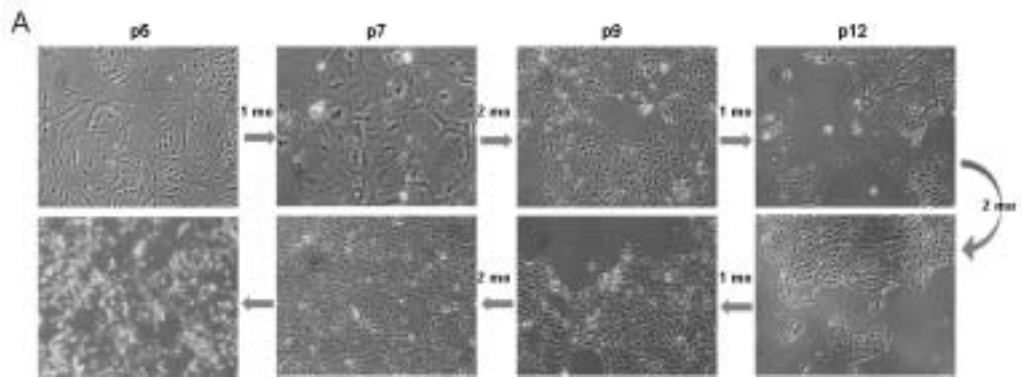


그림 8. Bovine mammary epithelial cell의 계대배양 과정 및 SA-β-gal staining 결과

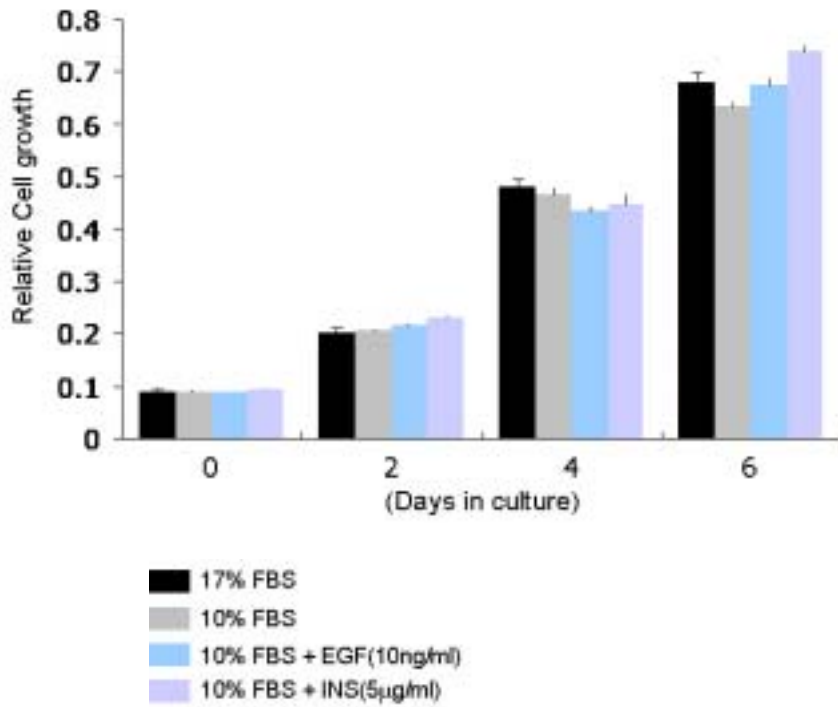


그림 9. Bovine mammary epithelial cell의 growth media 조성이 세포성장에 미치는 영향

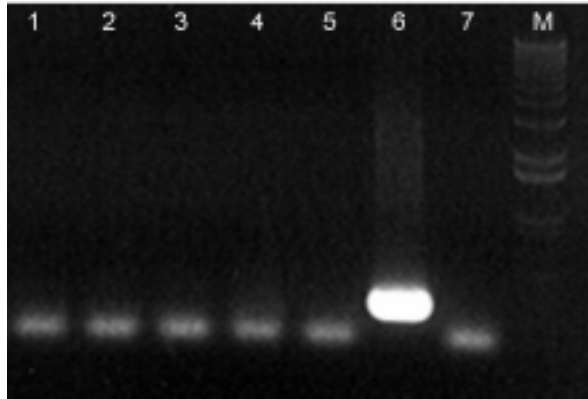


그림 10. Mycoplasma group-specific PCR 결과

1-2) Primary bovine mammary epithelial cells, 3-5) Primary swine kidney epithelial cells, 6) +ve control, 7) -ve control



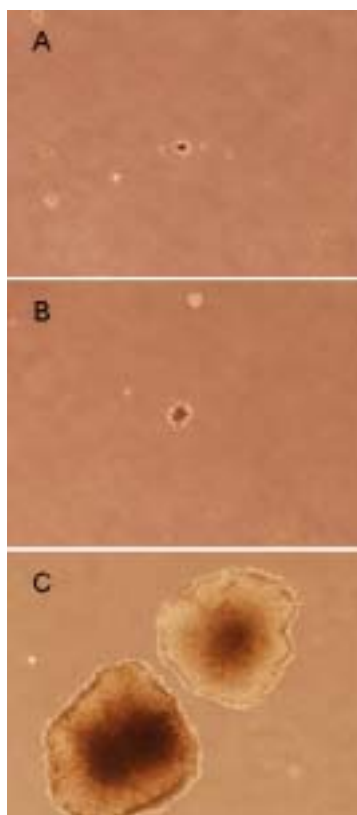


그림 11. Primary cell의 soft agar assay 결과

A) Primary bovine mammary epithelial cell, B) primary swine kidney epithelial cell, C) HeLa cell(+ve control)

이상의 결과를 요약하면, 1) Swine kidney tissue 및 Bovine mammary gland tissue에서 상피세포를 분리, 배양할 수 있는 조건을 확립하였으며, 2) 이들 세포가 mycoplasma-free, untransformed normal cell임을 확인하였다.

## 제 3 절 불멸화유도를 위한 벡터구축

### 1. 실험방법

세포 불멸화 유도에 사용되는 SV40 LT (Simian Virus40 Large Tumor antigen), hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), c-myc (V-MYC avian Myelocytomatosis viral-related oncogene), H-rasV12 (oncogenic H-ras)의 유전자를 확보하기 위해 GenBank에 보고된 sequence를 바탕으로 하여 primer를 제작하였다 (표 2 참조). SV40 LT는 COS-7 cell line, hTERT는 HeLa cell line, c-myc은 mouse embryonic fibroblast cell line, oncogenic H-ras는 T24 cell line으로부터 각각 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 증폭하였으며, TA-cloning을 거쳐 형질전환된 bacteria clone을 screening하여 plasmid prep후 sequencing한 후 결과를 Blast search를 통해 각각의 sequence를 확인하였고, 반복실험을 통한 여러 clone의 확보를 통해 정확한 sequence를 가진 clone을 선발하였다. 각각의 유전자 cloning에 사용한 primer set의 sequence는 다음과 같다.

SV40LT

Forward : 5'-atggataaagttttaacagagagg-3'

Reverse : 5'-ttatgtttcaggttcaggggga-3'

c-myc

Forward : 5'-atgccctcaacgtgaactt-3'

Reverse : 5'-ttatgcaccagagtttcgaa-3'

H-rasV12

Forward : 5'-atgacggaatataagctggt-3'

Reverse : 5'-tcaggagagcacacacttgc-3'

hTERT Forward : 5'-atgccgcgcgctccccgctg-3' Reverse : 5'-tcagtccaggatggtcttga-3'
---

Cloning 한 SV40 LT는 제한효소인 *BamH I*을 이용하여 pBabe puro vector에 삽입하였고 hTERT는 *EcoR I* 및 *Sal I*을 이용하여 pBabe neo vector 및 pCI neo vector에 삽입하였다. c-myc은 *EcoR I*을 이용하여 pBabe neo vector에 삽입하였고 H-rasV12는 *BamH I* 및 *Sal I*을 이용하여 pBabe puro vector에 삽입하였다.

표 2. 본 연구에서 세포 불멸화 유도에 이용된 유전자의 특성

유전자명	기 원(origin)	기 능	비 고
SV40 LT Ag	Virus	Rb 및 p53의 조절기능 약화	Cos7 cell
hTERT	Human	Telomere 유지 및 세포성장 촉진	HeLa cell
c-myc	Mouse	세포분열 및 세포사멸 촉진	MEF cell
H-rasV12	Human	세포분열, 암 유발, 세포노화유발	T24 cell

## 2. 연구결과

### 가. SV40LT (Simian Virus 40 Large Tumor antigen) 발현 벡터의 구축

RT-PCR을 통하여 증폭한 SV40LT DNA를 정제한 후 pBabe puro vector의 *BamH I* 위치에 ligation하여 pBabe SV40LT puro vector를 구축하였다 (그림 12).





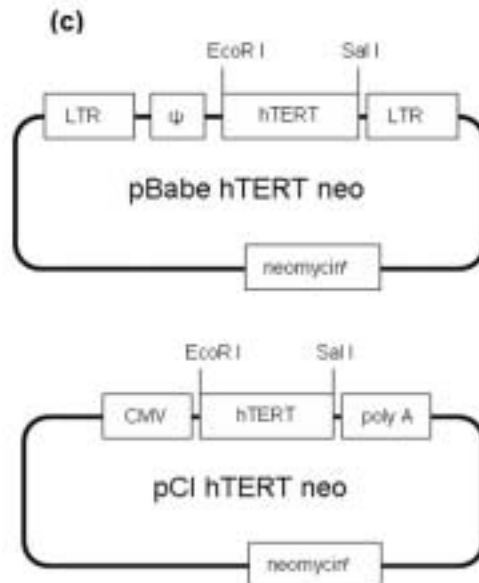
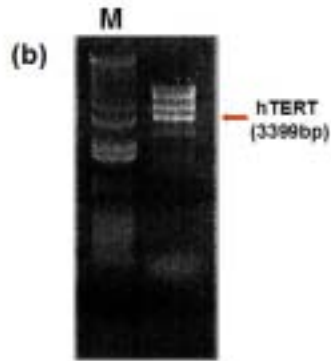


그림 13. pBabe hTERT neo vector/ pCI hTERT neo vector construction. (a) hTERT cDNA 염기서열, (b) RT PCR을 통해 증폭한 hTERT DNA의 전기영동 사진 (M: molecular marker), (C) pBabe hTERT neo vector 및 pCI hTERT neo vector 의 모식도 (CMV: cytomegalo virus promoter , poly A: poly-adenylation signal).

다. *c-myc* (V-MYC avian Myelocytomatosis viral-related oncogene) 발현벡터의 구축

RT-PCR을 통하여 증폭한 *c-myc* DNA를 정제한 후 *EcoR* I을 이용하여 pBabe neo vector에 삽입하여 각각 pBabe *c-myc* neo vector를 구축하였다 (그림 14).

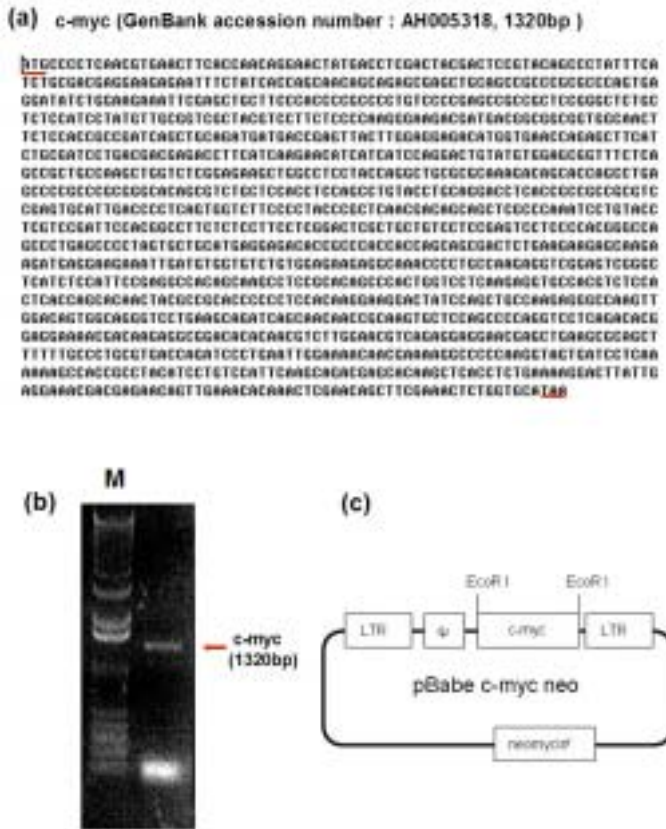


그림 14. pBabe *c-myc* neo vector construction. (a) *c-myc* cDNA 염기서열, (b) RT PCR을 통해 증폭한 *c-myc* DNA의 전기영동 사진 (M: molecular marker), (C) pBabe *c-myc* neo vector의 모식도 (LTR: long terminal repeat sequence,  $\Psi$ : packaging signal)

라. H-rasV12 (V-HA-RAS Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) 발  
현백터의 구축

RT-PCR을 통하여 증폭한 H-rasV12 DNA를 정제한 후 pBabe puro vector의  
*Bam*H I 및 *Sal* I에 ligation하여 pBabe H-rasV12 puro vector를 구축하였다 (그  
림 15).

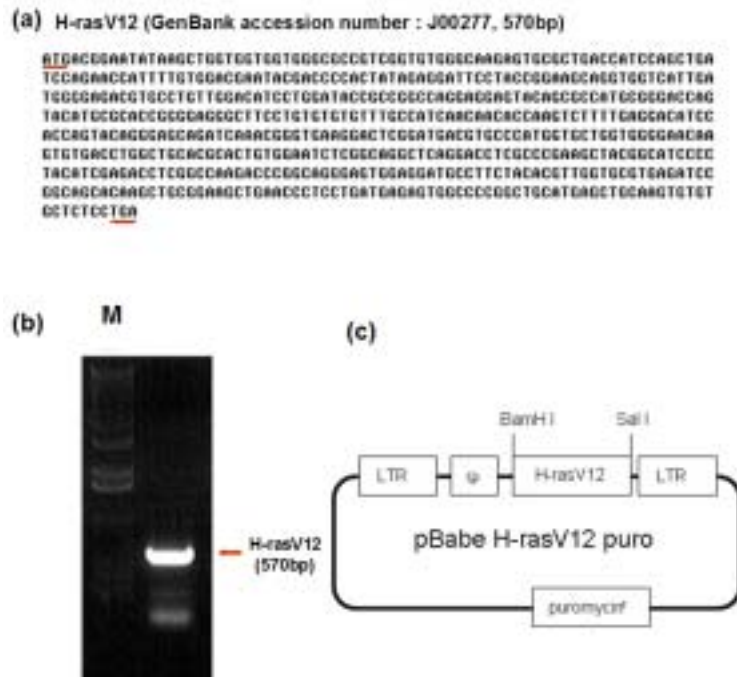


그림 15. pBabe H-rasV12 puro vector construction. (a) H-rasV12 cDNA 염기  
서열, (b) RT PCR을 통해 증폭한 H-rasV12 DNA의 전기영동 사진 (M:  
molecular marker), (C) pBabe H-rasV12 puro vector의 모식도 (LTR: long  
terminal repeat sequence, Ψ: packaging signal)



이상의 결과를 요약하면, primary cell의 불멸화를 유도하기 위하여 세포의 불멸화를 유도할 수 있는 4가지 유전자 (SV40LT Ag, hTERT, c-myc, H-rasV12)를 cloning하고 이들 유전자의 세포내 효율적인 도입을 위한 retrovirus system을 이용할 수 있도록 발현 벡터를 구축하였다.

구축한 벡터의 목록은 다음과 같다.

1. SV40LT Ag 발현벡터

pBabe SV40LT puro

2. hTERT 발현벡터

pBabe hTERT neo, pCI hTERT neo

3. c-myc 발현벡터

pBabe c-myc neo

4. H-rasV12 발현벡터

pBabe H-rasV12 puro

## 제 4 절 불멸화유도를 위해 구축된 벡터의 세포내 도입, 불멸화상피세포주의 선발, 세포 특성규명

### 1. 실험방법

가. 불멸화 유도 유전자의 lipofection 및 retroviral transduction을 통한 primary epithelial cell의 불멸화유도

1) 유전자 도입 vector의 transduction 및 transfection을 통한 불멸화의 유도

세포의 불멸화과정은 엄격하게 관리되는 세포의 분열조절에 연관된 여러 유전자들이 재조정되는 단계를 거치는 것으로 알려져 있어 그 발생빈도가 매우 희박하다. 따라서 불멸화유도를 위한 유전자도입방법은 가능하면 효율적인 방법을 사용해야 할 필요성이 존재하는데 본 연구에서는 기존의 transfection 에 비해 세포내 유전자의 전달효율이 훨씬 우수한 것으로 알려져 있는 retroviral vector system을 세포의 불멸화유도에 이용하고자 하였다. Retrovirus에 의한 유전자의 도입은 여러 system이 개발되어 왔으며 본 연구에서 사용한 system은 replication-incompetent virus를 생산하는 packaging cell line을 통한 것으로 infection과는 차별된 개념인 transduction이라는 용어로 설명할 수 있다. 불멸화 유전자의 도입에 사용한 retroviral vector system에는 promoter 역할을 하는 5' LTR (long terminal repeat) 및 poly A signal 역할을 하는 3' LTR이 도입하려는 유전자의 양 말단에 위치해 있으며 항생제 내성 유전자가 별도의 promoter를 통해 발현되는 형태로 packaging cell line에서 생산된 viral protein들이 도입한 vector의 packaging signal에 의해서 조합되어 도입한 vector를 유전정보로 갖는 replication-incompetent virus가 생성되도록 유도할 수 있다. 이렇게 생성된 virus는 포유동물의 세포에 공통적으로 존재하는 RAM1 또는 GALV receptor를 통해 세포내로 유입되어 transfection에 비해서 세포에 덜 toxic하고 보다 높은 효율로 유전자를 세포내로 전달할 수 있다. 그러나 이 system의 단점은 virus내

에 집어넣을 수 있는 유전자의 크기가 제한되어 있다는 것이다. 본 연구에 사용한 유전자 가운데 hTERT의 경우는 크기가 큰 이유로 (3.4kb) transduction system이 아닌 transfection을 이용하여 유전자를 도입하였다.

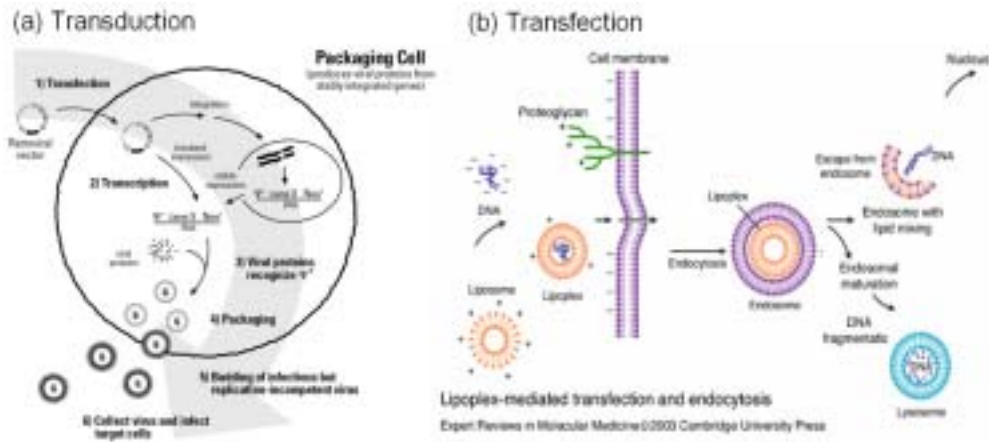


그림 16. Transduction 및 transfection 방법의 개요.

구체적인 실험방법은 다음과 같다 (그림 16 참조).

가) Transduction에 의한 불멸화유도 vector (pBabe SV40LT puro, pBabe c-myc neo, pBabe H-rasV12 puro)의 도입

구축된 각각의 불멸화유도 vector를 함유한 retrovirus를 생성하기 위하여 packaging cell line인 PT67을 대수성장기까지 배양하였다. 각 vector를 3ug씩 Lipofectamine2000 reagent (Invitrogen)를 이용하여 PT67 cell line에 transfection을 실시하였다. Transfection을 실시 24시간 후부터 각각의 항생제에 대한 resistant clone을 selection하였다 (3ug/ml puromycin, 1주간; 600ug/ml G418, 2주간). Selection한 PT67 cell에서 각 불멸화유도 유전자들의 발현을

RT-PCR을 이용하여 확인하고 확인한 PT67 cell을 대수성장기까지 배양한 후 48시간동안 media의 교환없이 배양하고 생성된 retrovirus를 함유하고 있는 media를 생성된 retrovirus particle은 통과할수 있으나 PT67 cell은 통과할 수 없는 pore size 0.45um syringe filter를 이용하여 수집하여 target cell인 SKE (p5) 및 BMG (p9)의 media로 사용하였다. Media를 수집한 PT67 cell에는 fresh growth media를 공급하여 24시간 간격으로 2차, 3차 transduction을 수행하였다. 3차 transduction까지 실시 후 각각의 항생제에 대한 resistant clone을 selection 하였다 (3ug/ml puromycin, 1주간; 600ug/ml G418, 2주간). 확보된 resistant clone들에 대하여 SV40LT, c-myc, H-rasV12의 발현여부를 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

나) Transfection에 의한 불멸화유도 vector (pCI hTERT neo)의 도입

불멸화 유도 유전자의 도입을 위해 1차 년도에 획득한 primary세포를 대수성장기까지 배양하였다. 별도의 tube에서 serum-free DMEM에 3ug의 DNA를 희석하고 같은 volume의 serum-free DMEM에 lipofectamine2000 reagent를 희석하여 둘을 서로 섞어 20분간 실온에서 정치시켜 DNA/liposome complex를 준비하였다. SKE (p5)및 BMG (p9)cell에 DNA/liposome complex를 첨가한 후 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 성장배지로 교체하여 남은 liposome을 제거하였다. 24시간 후 600ug/ml 농도의 G418에 의한 selection을 개시하였으며 2주일간 selection후 확보된 resistant clone들에 대하여 hTERT의 발현여부를 RT-PCR을 통하여 확인하였다.

나. 불멸화 유도된 SKE 및 BMG cell의 세포특성 규명

1) 불멸화유도에 따른 세포성장속도의 변화 측정

불멸화된 세포는 분열자극에 활발하게 분열함으로써 같은 조건에서 배양 하였을때 primary 세포에 비하여 세포의 성장속도가 증가하는 경우가 많다. 세포의 성장속도를 비교하기 위한 방법에는 여러 가지가 있으나 본 연구에서는 crystal

violet staining을 이용하는 방법을 채택하였다. Crystal violet은 세포의 지방질 성분과 결합하여 세포를 자주색으로 물들이는 protein stain으로 소수성을 띄고 있어 물에 용해되지 않으며 건조 시킨후 장기간 보존할 수 있고 10% acetic acid solution을 이용하면 세포에 결합한 stain을 용출하여 OD를 측정하여 정량화 할 수 있는 장점이 있다. 따라서 세포성장속도의 상대적인 비교분석을 용이하게 실행할 수 있어 불멸화과정에 따른 세포성장속도의 변화를 비교하기 위한 방법으로 사용하였다.



그림 17. Crystal violet staining을 이용한 cell growth rate analysis 모식도

구체적인 실험방법은 다음과 같다 (그림 17 참조). 12-well plate를 이용하여 10,000 cell/well (10% FBS; normal condition), 25,000 cell/well (0.5% FBS; low serum condition)의 개수만큼 0일부터 6일까지 48시간 간격으로 세포를 준비하였다 (처리구당 3반복). 세포를 seeding한 후 12시간이 지났을 때를 Day 0로 설정하고 48시간 간격으로 sample을 준비하였다. Media를 완전히 제거 후 PBS로 2

회 washing하고 PBS 제거 후 10% neutral buffered formalin solution을 well당 1ml씩 첨가한 후 실온에서 20분간 정치하였다 (세포고정). Formalin solution을 제거 후 2ml의 DW를 이용하여 washing하고 DW를 완전히 제거한 후 0.01% crystal violet solution 1ml을 첨가하여 실온에서 20분간 staining하였다. 통에 받아놓은 물에 plate를 행구고 물기가 완전히 제거되도록 O/N 건조를 실시하였다. 이러한 과정으로 Day 6일까지 준비한 sample에 10% acetic acid solution을 2ml씩 첨가 후 shaker에서 1시간이상 교반하여 dye를 용출 시킨 후 1ml씩을 cuvette에 옮겨 담고 595nm에서 OD값을 측정하였다. Day 0 또는 day 2의 값을 이용하여 측정값을 normalization 하였다.

## 2) Cell cycle analysis

PI (Propidium Iodide)는 nucleic acid stain의 하나로 double strand DNA와 결합 하였을때 fluorescence가 20-30배 증가한다. PI staining후 PI incorporation에 의해 발생하는 fluorescence를 이용하여 Flow cytometry를 하면 cell cycle 분석이 가능하다. Cell cycle 가운데 S phase는 DNA합성이 일어나는 구간으로 전체 cell cycle가운데서 매우 짧은 비중을 차지하는데 PI staining에 의한 DNA 양의 상대비교를 통해 세포군 가운데 S phase에 위치한 세포의 비율을 알 수 있다. S phase의 비율이 증가하는 것은 그만큼 분열중인 세포가 많다는 증거이므로 primary cell과 불멸화된 세포에서의 S phase의 비율을 비교하면 불멸화된 세포가 활발하게 분열하는 현상을 설명하는 것이 가능하다. PI는 살아있는 세포의 세포막을 통과할 수 없으므로 세포의 고정(fixation)과정이 필요하고 RNA와도 결합하므로 RNase의 처리가 필요하다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

대수성장기의 세포를 회수하여 counting을 실시하고  $10^6$ 개의 세포를 원침, 상층액을 버리고 1ml의 70% cold ethanol을 tube를 흔들며 주면서 cell pellet에 방울방울 떨어뜨린 후 4°C에서 O/N 고정하였다. Fresh 한 PI staining solution 10ml (8.5ml staining buffer (0.1% BSA)+ 1ml RNase (0.1%)+ 0.5ml PI stock solution (1mg/ml))을 준비하여 tube를 가볍게 vortexing후 3000rpm에서 10분간 원침후 상층액을 버리고 vortexing으로 남아있는 ethanol을 이용해 세포를 풀어

준 후 0.5-1ml의 staining solution을 첨가 후 vortexing, 빛이 차단된 곳에서 30 분간 정치하여 staining 후 collection tube로 옮기고 FACS (Fluorescence activated cell sorting) analysis를 실시하였다.

### 3) 불멸화세포의 정상성 검증

#### 가) Oncogenic H-ras gene의 과발현을 통한 불멸화세포주의 정상성 검증

세포의 불멸화과정은 암세포가 되기 위한 전단계로 인식되고 있다. 불멸화된 세포에 암유발유전자를 과발현 시킬 경우 정상세포에 비하여 훨씬 높은 빈도로 암세포가 출현하지만 모든 불멸화된 세포가 암세포화 되는것은 아니다. 본 연구에서 확보한 불멸화 세포주가 암세포화 되었는지를 확인하기 위하여 암세포의 중요한 특징중의 하나인 contact-inhibition의 소실여부를 판단하고자 하는 실험을 실시하였다. Contact-inhibition은 세포가 confluent 상황에서 더 이상의 세포 분열이 이루어지지 않도록 조절되는 현상을 말하는데 이는 cell cycle의 조절이 정상적으로 이루어지고 있음을 의미한다. Cell cycle의 조절이 정상적으로 이루어지지 않을 경우 세포 표면에서 내부로 신호를 전달해주는 G protein signaling molecule인 H-ras의 oncogenic한 형태인 H-rasV12의 과발현을 통한 지속적인 signal 전달시 이러한 contact-inhibition현상이 소실되어 foci의 형태로 세포가 계속 자랄 수 있는 현상이 나타난다. 따라서 본 연구에서는 확립된 불멸화세포주의 cell cycle조절이 정상적으로 이루어지고 있는지를 확인하고자 하는 방법의 하나로 H-rasV12의 transient transfection을 통한 transformation assay를 실시하였다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

10cm dish당  $10^6$ 개의 세포를 seeding한 후 세포가 골고루 퍼지도록 잘 흔들어 주고 12시간 정도 후에 현미경으로 관찰하여 세포가 골고루 잘 안착되었는지를 확인하였다. Lipofectamine을 이용하여 세포에 H-rasV12 plasmid를 transfection 하고 이튿날 1:3 또는 1:2의 비율로 세포를 split하고 14일간 배양 하여 세포가 confluent한 상태로 자라도록 유도하였다. 세포수의 과다에 따른 영양분고갈로 인한 세포괴사를 예방하기 위해 적어도 2일에 한번은 배지를 교환하였다. 14일간

배양한 세포는 PBS로 2회 washing 한 후 neutral buffered formalin solution (10%)을 이용하여 세포를 10분간 고정시킨 후, Giemsa stain과 PBS를 1:1로 혼합한 staining solution을 이용하여 5분간 염색 후 물로 헹궈내고 건조시킨 후 foci의 생성유무를 점검하였다.

나) DNA damage 유도시 세포생존률 측정을 통한 불멸화세포주의 정상성 검증  
정상세포는 DNA damage를 입었을 경우 p53 protein이 activation되어 cell cycle arrest, DNA repair의 기능들을 수행하거나 cell death를 유도하기도 한다. 불멸화된 세포에서는 cell cycle arrest의 기작에 변형이 생겼을 가능성이 매우 높는데 이러한 변형이 일어날 수 있는 부위는 매우 다양하며 그 가운데에는 p53 protein의 기능에 이상이 생기는 경우도 포함되는데 이렇게 중요한 p53 protein 기능의 정상성 유무를 판단하기위한 research tool은 아직 human, mouse model에서만 잘 확립되어 있다. 따라서 본 연구에서는 세포에 'doxorubicin'이라는 DNA-damaging chemical 처리시 cell death의 비율을 점검하는 방법을 통해 간접적으로 p53 protein의 작동여부를 판단하는 기준으로 사용하였다.

다) Soft agar assay

이미 primary cell 가운데 내생 virus에 의한 transformation이 일어난 cell이 포함되어 있지 않음을 확인 하였으나, 세포의 불멸화는 세포의 transformation이 일어나기 위한 전제조건이므로 불멸화세포주에 대하여 soft agar assay를 재 실시하였다. 구체적인 실험방법은 앞서 언급한 바와 같다.

## 2. 연구결과

가. 외래유전자의 도입에 의한 swine kidney epithelial cell의 불멸화유도

세포의 분열을 촉진하는 유전자들의 과발현을 통한 불멸화 유도는 cloning한 human telomerase catalytic subunit(hTERT), simian virus 40 large Tumor



antigen(SV40LT), c-myc, H-rasV12등의 stable transfection을 통하여 시도하였다. 이들 가운데 c-myc을 도입한 경우 계대를 거듭 할수록 사멸하는 세포가 많아지는 특성을 보였으며, H-rasV12를 도입한 경우 오히려 세포의 분열을 억제하는 양상을 보여 항생제를 이용한 선발이 어려웠다. SV40LT를 도입한 세포들은 hTERT의 존재유무와 상관없이 세포의 분열속도가 높아지고 안정적으로 유지됨을 확인하였고(100 population doubling이상 유지), hTERT 또한 SV40LT에 비해서 분열속도는 약간 느린 편이나 역시 세포의 불멸화를 촉진함을 알 수 있었다. 그림 18은 이들 세포의 형태를 보여주고 있다. 자발적인 불멸화유도(SKE-Spon), SV40LT의 도입에 의한 불멸화유도(SKE-SV40LT), hTERT의 도입에 의한 불멸화유도(SKE-hTERT) 세포 모두 primary swine kidney epithelial cell과 유사한 morphology를 유지하고 있음을 알 수 있다.

#### 나. 외래유전자의 도입에 의한 bovine mammary epithelial cell의 불멸화유도

Primary cell에 비하여 SV40LT가 도입된 세포는 붙어 자라는 epithelial 세포의 특성은 그대로 유지하고 있음을 그림 19a를 통해 알 수 있다. SA- $\beta$ -gal staining을 실시해본 결과, primary cell에 비해 staining 된 세포를 거의 발견할 수 없었다. Dilution 기법을 이용해 subclone을 분리 하였고 대표적으로 3개의 clone을 선발하여 계속 실험을 진행하였다. BMG cell은 hTERT 단독에 의한 불멸화가 불가능하였는데, 이는 primary BMG cell의 세포성장속도가 SKE cell에 비하여 상대적으로 더 느리고 따라서 transfection efficiency가 전반적으로 낮은 상황이었어서 불멸화세포주의 확립 자체가 다른 세포에 비해 어려운 bovine mammary epithelial cell의 고유한 특성에 기인하는 것으로 사료된다. 따라서 차선책으로 SV40LT Ag을 발현시켜 불멸화유도한 BMGV cell에 hTERT를 transfection하여 BMGV cell의 유전적인 안정성을 증대시키는 방향으로 실험을 진행하였다. 불멸화된 BMGV cell을 대상으로 한 transfection이었지만 역시 transfection efficiency가 매우 낮았고 분열이 활발한 세포에 비해 selection 기간이 2배 이상 소요되는 문제점이 발생하였다. 선발한 세포는 BMGVTE라 명명하

었다. BMGVTE cell 또한 BMG cell의 고유한 형태적 특징을 유지함을 관찰하였다(그림 19b).

다. 불멸화된 swine kidney epithelial cell의 세포 특성 규명

### 1) Cell growth rate의 변화양상 및 growth factor dependency 검증

동일한 조건에서 배양시 불멸화된 swine kidney epithelial cell line들은 primary cell에 비하여 세포성장속도가 2배이상 빨라졌으며 (그림 20, upper panel), 특히 SV40LT의 도입에 의하여 불멸화된 세포의 경우 성장배지내에 growth factor를 낮춘 조건 (0.5% FBS)하에서도 일반 배양조건 (10% FBS)과 유사한 성장속도를 보임을 알 수 있었다 (그림 20, lower panel).

### 2) Cell cycle analysis by FACS

PI staining 통한 cell cycle 분석결과 primary cell에 비하여 불멸화된 상피세포주는 S phase에 존재하는 세포의 비율이 3배가량 증가했음을 알 수 있었다 (그림 21). 이는 빨라진 세포성장속도가 활발한 세포분열에서 기인함을 증명한다.

### 3) Telomerase activity test

Telomerase는 염색체의 말단인 telomere를 유지하는 기능을 하는 효소로서 telomere의 유지는 지속적인 세포분열을 위해 확보되어야할 전제조건으로 보고되고 있다. 본 연구에서 사용한 hTERT gene은 human 유래의 telomerase로서 대개의 telomerase는 성체가 되면서 그에 수반하는 세포의 분화과정에서 발현이 되지 않게끔 조절되는데, species에 따라서 성체가 되어도 각 세포에서 telomerase를 발현하는 종류도 보고되고 있다. TRAP assay를 통해 측정된 SKE cell에서의 telomerase activity는 primary cell에서도 검출이 되었는데 (그림 22), 연구수행과정 중에 Fradiani 등 (2004)은 kidney를 포함한 돼지의 여러 조직에서 telomerase activity가 존재한다는 것과 돼지의 telomere의 길이가 사람과 생쥐의 중간정도에 해당한다는 결과를 보고한 것과 일치한다. 이상의 결과들은 hTERT

에 의한 swine kidney epithelial cell의 불멸화에 있어서는 telomere의 안정화 효과보다는 세포성장 촉진효과가 더 큰 영향을 미친 것으로 추측이 가능하며 telomerase의 세포성장 촉진효과도 현재 여러 cell system에서 다수 보고되고 있다.

#### 4) Cytokeratin 발현 검증

외래유전자의 도입으로 불멸화가 유도된 SKE cell들이 비록 epithelial morphology를 유지하고 있지만 epithelial cell로서의 특성을 유지하고 있는지 확인하기 위해 각 세포주에서 cytokeratin의 발현수준을 western blotting을 이용하여 점검하였다. 그림 23에서 보는바와 같이 primary cell 및 외래유전자의 도입으로 불멸화유도된 세포주들에서 모두 cytokeratin이 발현하고 있음을 확인하였다.

#### 5) Kidney-specific marker 유전자 발현 검증

불멸화과정으로 인한 kidney 유래의 세포의 특성에 변화가 있는지를 확인하는 방법의 하나로 kidney에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 발현양상을 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 점검하였다. 그림 24에서 보는바와 같이 primary cell 및 외래유전자의 도입으로 불멸화유도된 세포주들에서 모두 kidney-specific gene이 발현됨을 확인하였다. 발현양상을 분석한 유전자는 GGT1 (Gamma Glutamyl Transpeptidase), PLAU (Plasminogen activator)으로 gamma glutamyl transpeptidase는 glutathione의 대사에서 중요한 역할을 하는 plasma membrane bound enzyme이며 상피세포의 표면에서 분비나 흡수에 관여하며 kidney, pancreas, intestine등에서 높은 activity를 보이는 것으로 보고되어 있다. 사용한 primer sequence는 다음과 같다.

Swine GGT1 (NM 214030)  
forward primer: 5'-CGGATCAGTGGAATCCTGTT-3',  
reverse primer: 5'-ATGGCCTGTACCACACCAAT-3'

Swine PLAU (NM 213945)  
forward primer: 5'-CCACCCACTGCTTCATCAAT-3',  
reverse primer: 5'-CACAGCATTTTGGTGGTGAC-3'

Swine  $\beta$ -actin (AY 550069 )  
forward primer: 5'-GGCATCCACGAAACTACCTT-3',  
reverse primer: 5'-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'

6) 불멸화된 SKE cell의 transformation 여부 검증

불멸화된 SKE cell이 untransformed되었다는 것을 증명하기 위해 3가지의 assay를 실시하였다.

가) Transformation assay

Oncogenic H-ras가 과발현되면 normal cell의 경우 senescence가 유도되지만 Rb pathway나 p53 pathway가 손상되어 있을 경우 세포간의 contact inhibition이 망가지면서 세포괴를 형성할 수 있음이 보고되어 있다. 불멸화된 SKE cell에 oncogenic H-ras gene을 transfection한 후 confluent 상태로 2주간 배양한 결과 positive control인 INK-null mouse astrocyte cell과는 대조적으로 세포괴의 형성으로 인한 foci가 생성되지 않았다 (그림 25).

나) Doxorubicin treatment

불멸화세포주에 온전한 DNA damage checkpoint system이 존재하는지 여부를 확인하기 위해 DNA damaging reagent인 doxorubicin을 처리한 결과, 불멸

화세포주 또한 DNA damage로 인한 세포사멸유도 기작을 가지고 있는 것으로 판단된다(그림 26).

#### 다) Soft agar assay

암세포인 HeLa cell이 anchorage-independent foci를 형성한 것에 비해 불멸화된 SKE cell에서는 foci가 형성되지 않았으며 이는 이들 세포가 정상성을 유지하고 있는 증거로 판단된다 (그림 27).

### 라. 불멸화된 BMG cell의 세포특성 규명

#### 1) Cell growth rate의 변화양상 및 growth factor dependency 검증

동일한 조건에서 배양시 불멸화된 bovine mammary epithelial cell들은 primary cell에 비하여 세포성장속도가 약 2배가량 빨라진것을 확인하였다 (그림 28a). SKE cell과 달리 BMG cell은 SV40LT Ag에 의해 불멸화 된 다음에도 여전히 높은 serum 요구도를 보였다(그림 28a). 그러나 SKE cell의 경우와 같이 SV40LT Ag에 의해 불멸화된 BMG cell (BMGV)은 primary BMG cell에 비하여 세포의 분열속도가 매우 향상되었고 senescence의 징후를 보이는 세포들도 더 이상 관찰되지 않았다. 이렇게 향상된 세포분열능력은 low density seeding assay를 통해서도 확인할 수 있었다(그림 28b). 또한 그림 29에서 보는바와 같이 BMGVTE cell은 BMGV cell에 비해 상대적으로 세포분열속도가 느렸으며 BMGV cell과 유사하게 mammary epithelial cell의 mitogenic growth factor들인 EGF, Insulin들을 처리 하였을 때 성장이 촉진되는 특성을 나타내었다.

#### 2) Cell cycle analysis by FACS

PI staining 통한 cell cycle 분석결과 primary cell에 비하여 불멸화된 상피세포주는 S phase에 존재하는 세포의 비율이 2배가량 증가했음을 알수 있었다(그림30). 이는 빨라진 세포성장속도가 활발한 세포분열에서 기인함을 증명한다.

### 3) Cytokeratin expression 검증

외래유전자의 도입으로 불멸화가 유도된 BMGV cell이 epithelial cell로서의 특성을 유지하고 있는지 확인하기 위해 각 세포주에서 cytokeratin의 발현수준을 immunofluorescence 및 western blotting을 이용하여 점검하였다. 그림 31에서 보는바와 같이 primary cell 및 외래유전자의 도입으로 불멸화유도된 세포주들에서 모두 cytokeratin이 발현하고 있음을 확인하였다. 그림 31b에서 보는 바와 같이 같은 상피세포주이지만 SKE cell과 BMG cell에서 발현하는 cytokeratin의 type은 서로 다를 수 있다.

### 4) Mammary gland-specific marker 유전자 발현 검증

대표적인 milk protein인  $\beta$ -casein의 발현을 점검해 본 결과, lactogenic hormone 처리는 별 영향을 미치지 못하였으나 혈청농도를 낮추었을 때 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 32A). Prolactin 처리시 prolactin receptor의 발현이 증가하는 현상으로 보아 positive feedback loop mechanism은 일부분 유지하고 있는 것으로 사료된다(그림 32B).  $\beta$ -casein gene의 induction으로 대표되는 분화유도조건에서 세포의 형태변화는 관찰되지 않았다(그림33).

### 5) 불멸화된 BMG cell의 transformation 여부 검증

#### 가) Soft agar assay

Positive control인 293T cell이 anchorage-independent foci를 형성한 것에 비해 불멸화된 BMG cell에서는 foci가 형성되지 않았으며 이는 이들 세포가 정상성을 유지하고 있는 증거로 판단된다 (그림 34).

이상의 결과를 요약하면, 돼지의 신장으로부터는 세포의 연속 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-Spon), SV40LT Ag (SKE-SV40LT) 및 hTERT (human telomerase)의 발현을 통하여 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-hTERT)등 3종류의 불멸화된 세포주를 확립하였으며 젓소의

유선으로부터도 SV40LT Ag (BMGV), SV40LT Ag 및 hTERT의 발현 (BMGVTE)을 통하여 불멸화에 도달한 2종류의 불멸화된 세포주를 확립하였다.

이들 세포는 1) 초대배양세포에 비하여 세포성장속도가 약 2배 가량 빨라졌음을 확인하였으며, 2) FACS analysis를 통하여 S phase의 비율이 primary cell에 비하여 약 2배 가량 증가하였음을 확인하였고, 3) 형태적으로 초대배양세포와 유사한 모양을 유지하고 있으며, 4) 노화와 연관된 형태를 보이는 세포가 관찰되지 않았고, 5) soft agar assay를 통하여 암세포가 아닌 불멸화된 세포임을 확인하였으며, 6) 상피세포의 표지단백질인 cytokeratin이 높은 수준으로 발현이 유지되고 있음을 확인하였다.

불멸화된 신장 상피세포주에서는 신장조직 가운데 proximal tubular 부위에서 생성되는 분화인자인 plasminogen activator 및 gamma-glutamyl transpeptidase 유전자의 발현이 확인되었다. 젖소의 유선상피세포에서는  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 확인되었고 insulin 첨가시 세포의 성장이 촉진됨을 확인하였으며 EGF와 insulin을 함께 처리할 경우 이러한 촉진효과가 향상됨을 확인하였다. 또한 confluent 상태에서 혈청농도를 1/4로 낮추었을때  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 증가함을 관찰하였다.

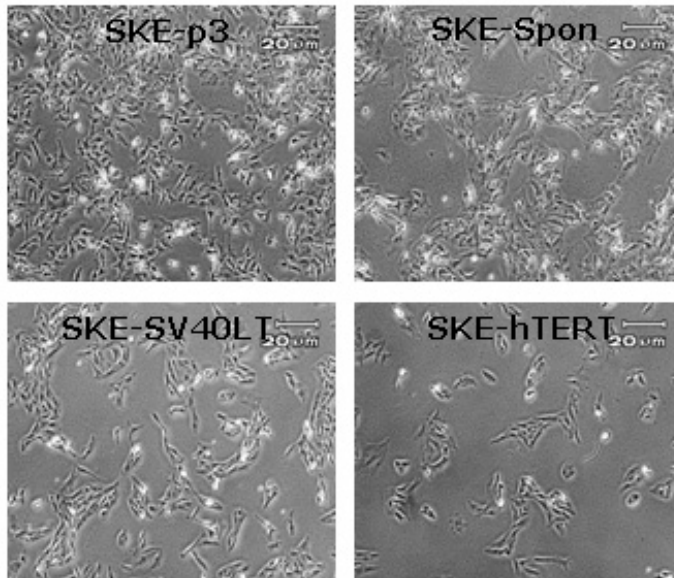


그림 18. Primary (p3) 및 불멸화된 swine kidney epithelial cell의 형태적 특징  
(×40, phase contrast)



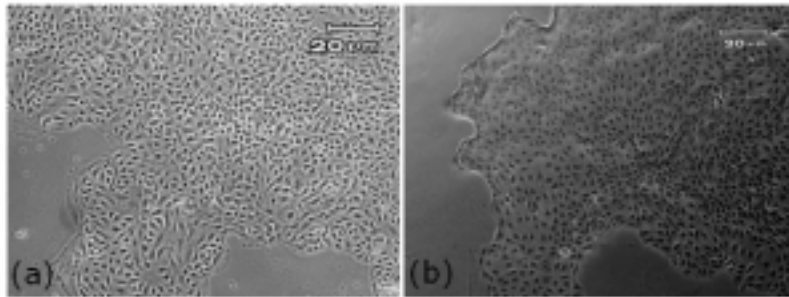


그림 19. 불멸화된 bovine mammary epithelial cell의 형태적 특징 ( $\times 40$ , phase contrast)

(a) BMGV (SV40LT에 의해 불멸화유도); (b) BMGVTE (SV40LT & hTERT에 의해 불멸화유도)

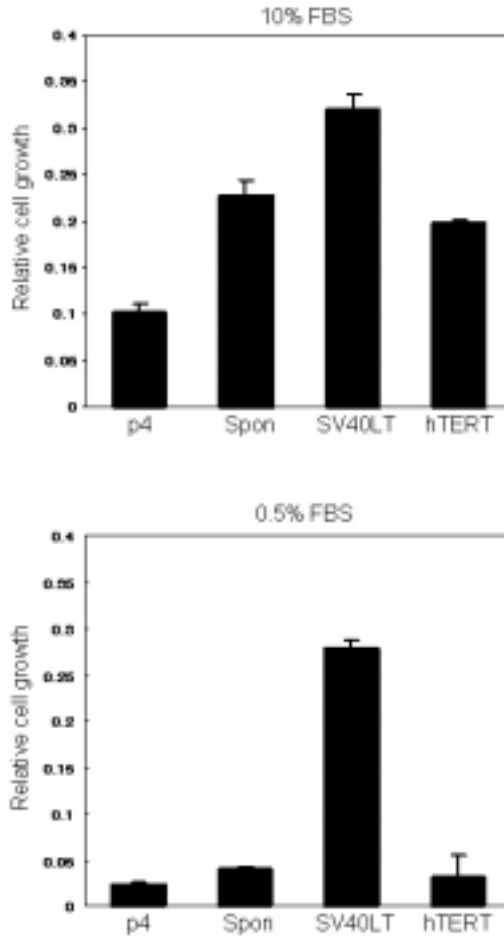


그림 20. Primary (p4) 및 불멸화된 swine kidney epithelial cell의 세포성장특성 비교.

(6일간 배양후 crystal violet staining, OD 측정, normalization by Day 0)

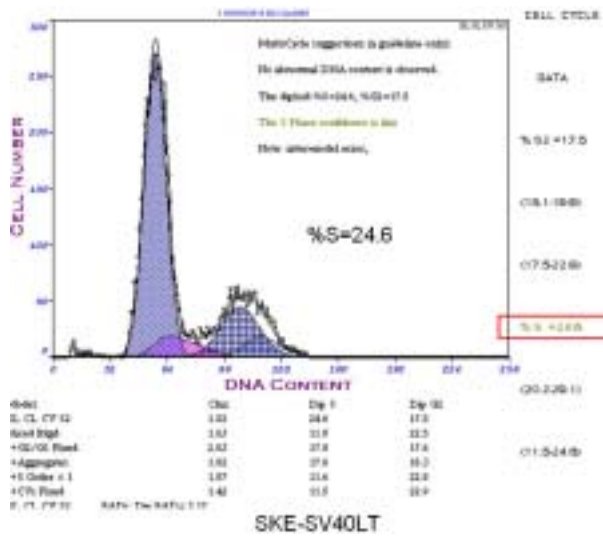
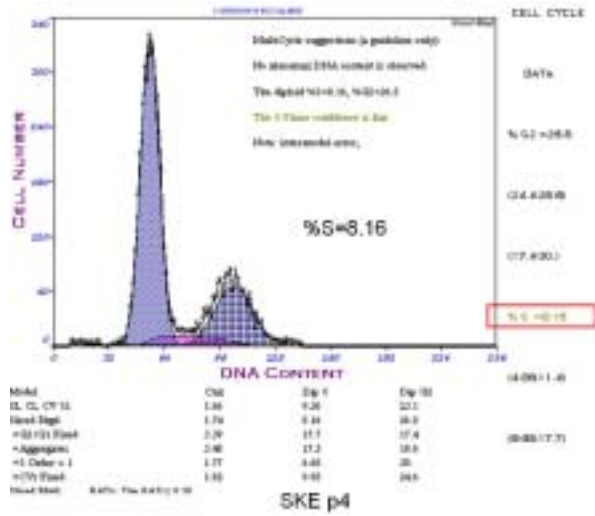


그림 21. PI staining 및 FACS analysis를 통한 SKE primary, immortalized epithelial cell cycle analysis결과

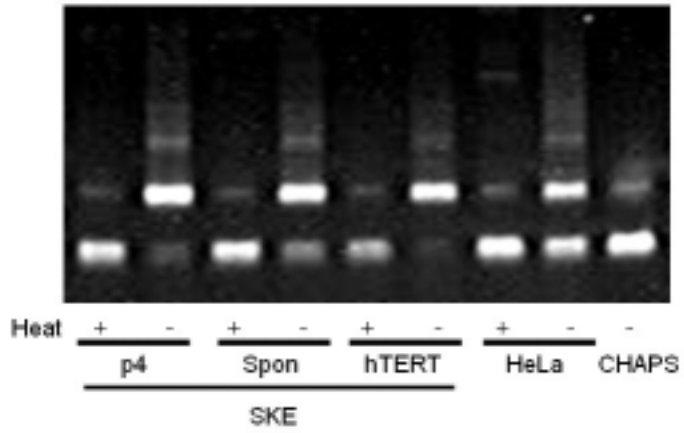


그림 22. Telomerase activity 측정을 위한 TRAP assay 결과.

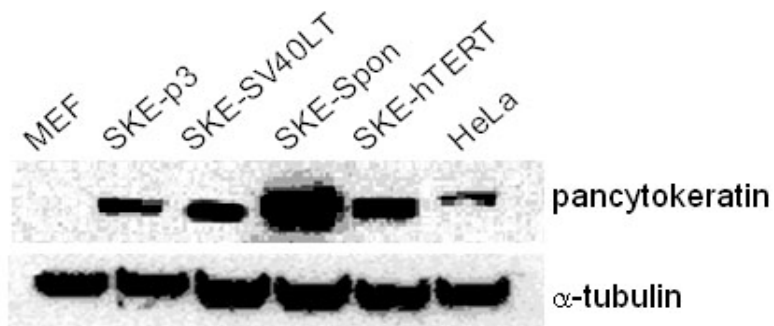


그림 23. 불멸화된 SKE cell에서 western blotting을 통한 cytochrome c 발현 검증 (Primary Ab : anti-pancytokeratin (C11, SantaCruz, 1:500), 50 $\mu$ g/lane) MEF : Mouse embryonic fibroblast (-ve control), HeLa : +ve control

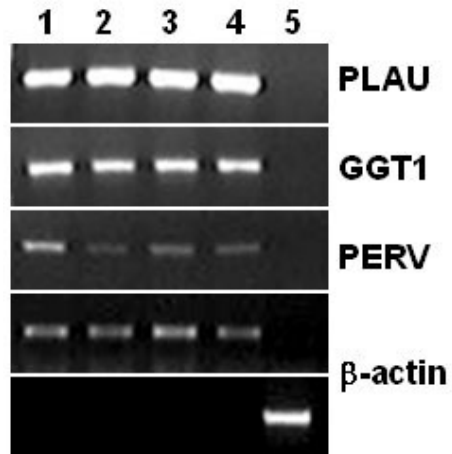


그림 24. Kidney epithelial cell-specific marker gene expression 확인을 위한 semi-quantitative RT-PCR 결과.

1) SKE p3, 2)SKE-Spon, 3)SKE-SV40LT, 4)SKE-hTERT, 5)MEF

PLAU(plasminogen activator), GGT1(Gamma glutamyl transpeptidase 1)

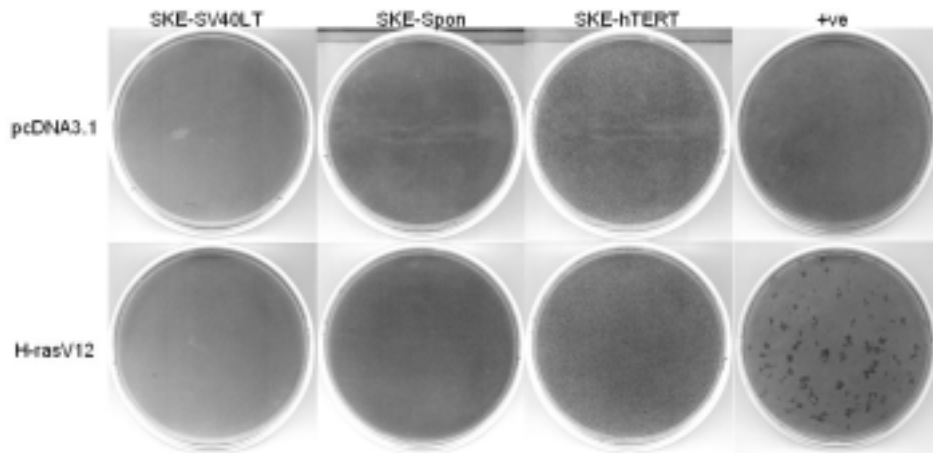


그림 25. 불멸화된 SKE cell에서의 transformation assay 결과.

+ve : INK-null mouse astrocyte cell

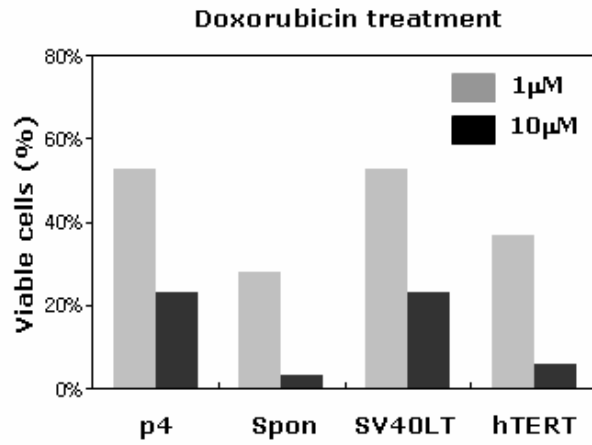


그림 26. SKE cell에 대한 doxorubicin treatment 결과.



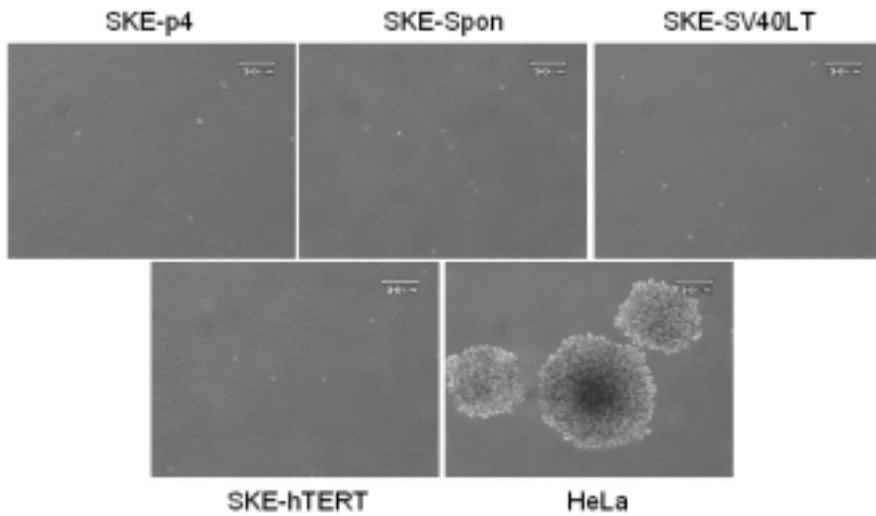


그림 27. Primary 및 불멸화된 SKE cell의 soft agar assay 결과  
 SKE-Spon (그림 6 참조), SKE-SV40LT (SV40LT에 의해 불멸화유도),  
 SKE-hTERT (hTERT에 의해 불멸화유도), HeLa (positive control)

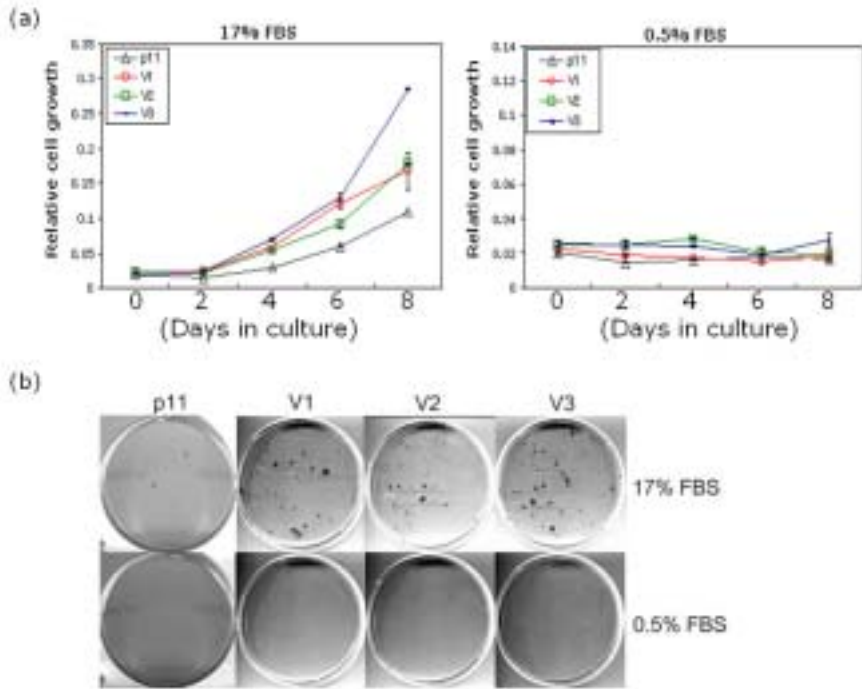


그림 28. Primary (p11) 및 불멸화된 bovine mammary epithelial cell의 세포성장 특성 비교.

(a) Primary 및 불멸화된 BMG cell의 relative growth rate (8일간 배양후 crystal violet staining, OD 측정, normalization by Day 0), (b) Low density seeding assay결과

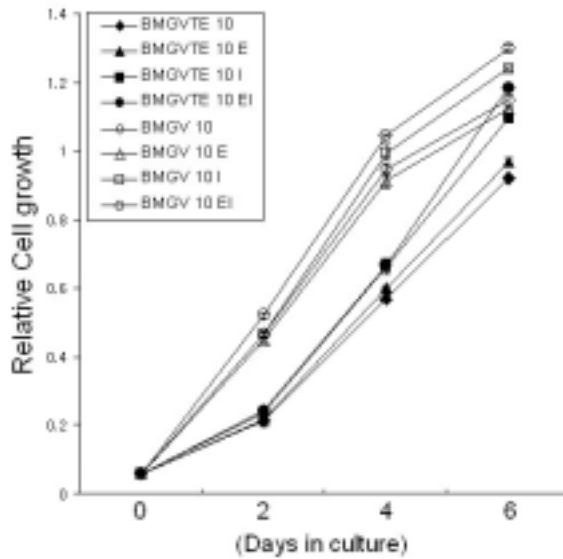


그림 29. Mitogenic hormone이 불멸화된 bovine mammary epithelial cell의 세포 성장특성에 미치는 영향 비교분석.

6일간 배양후 crystal violet staining후 OD 측정된 결과 (normalization by Day 0), E : Epidermal growth factor, I : Insulin, Seeding density :  $4 \times 10^4$ /well (12-well culture plate)

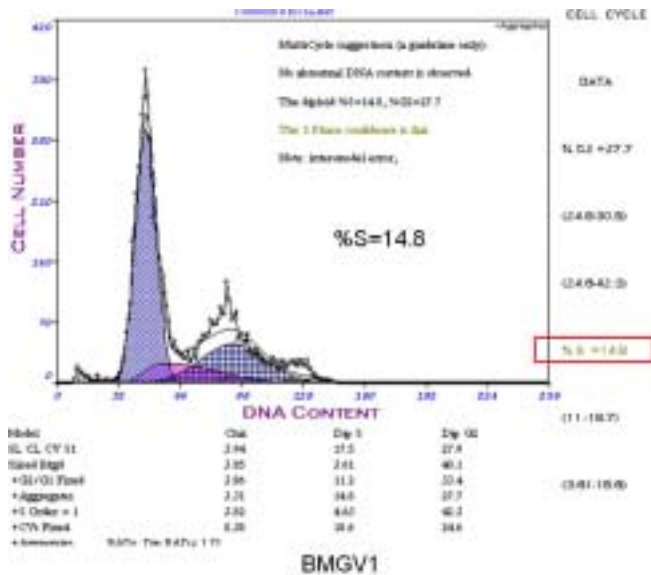
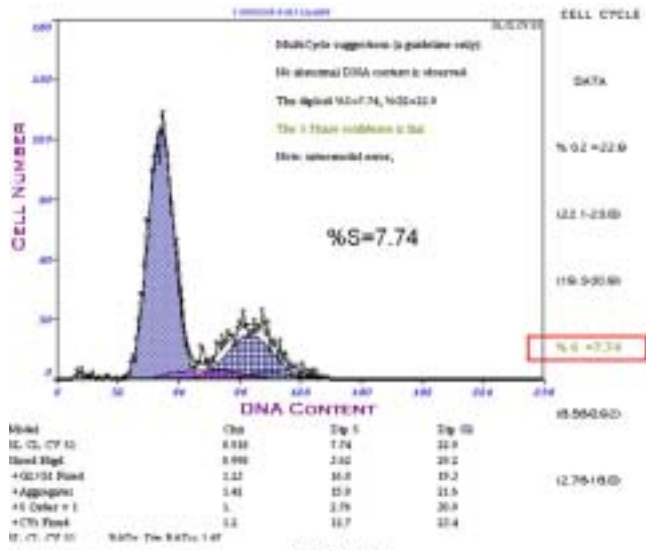


그림 30. PI staining 및 FACS analysis를 통한 BMG primary, immortalized epithelial cell cycle analysis결과

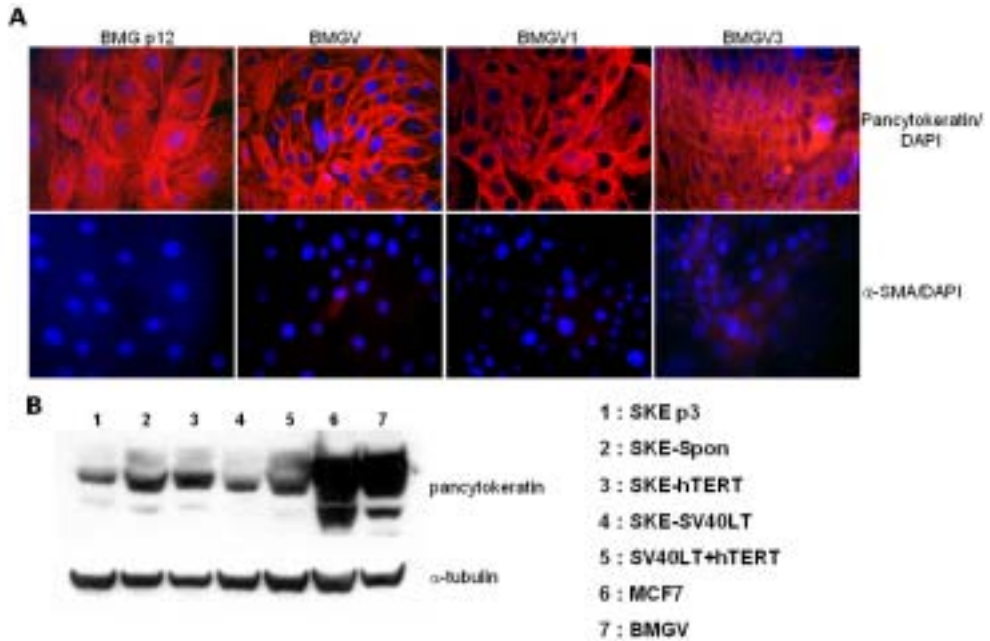


그림 31. 불멸화상피세포주에서의 cytokeratin expression 확인

a) Immunofluorescence technique을 이용한 BMG cell에서의 cytokeratin expression 확인. α-SMA : myoepithelial cell-specific marker protein, DAPI : nucleus staining; b) Western blotting을 이용한 SKE cell 및 BMG cell에서의 cytokeratin expression 확인. MCF7 : human mammary epithelial cell line

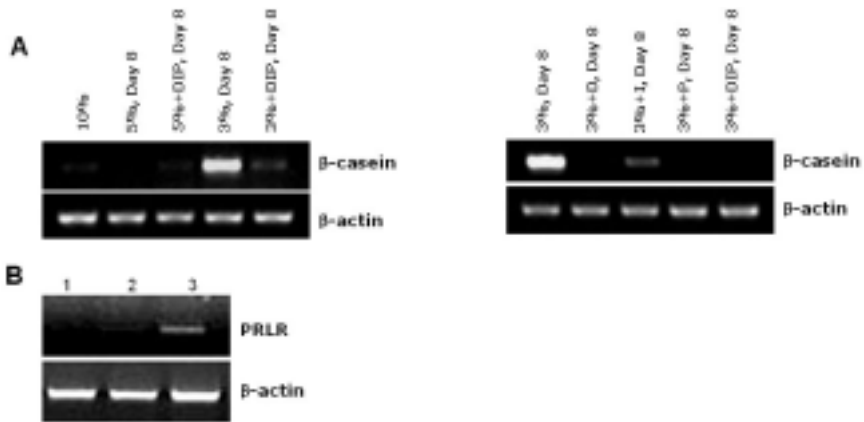


그림 32. Mammary epithelial cell-specific marker gene expression 확인을 위한 semi-quantitative RT-PCR 결과.

D(Dexamethasone), I(Insulin), P(Prolactin), PRLR(Prolactin Receptor)

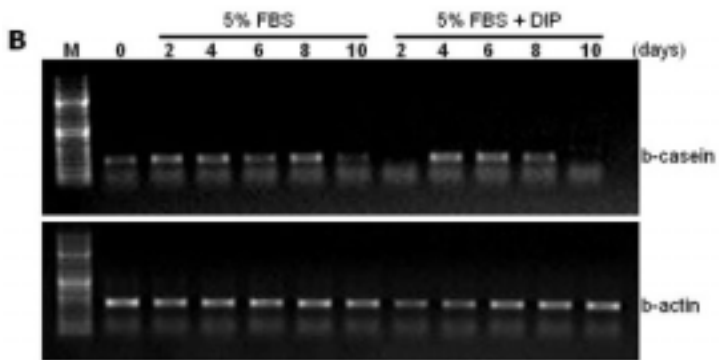
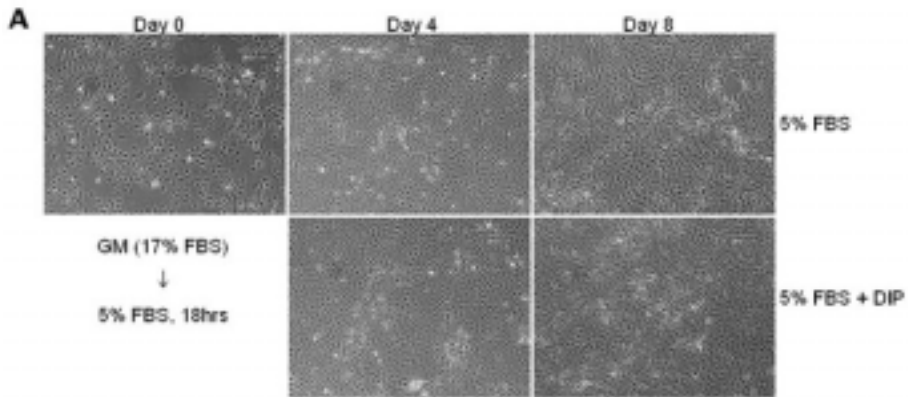


그림 33. Mammary epithelial cell-specific marker gene expression 확인을 위한 BMGV cell의 분화유도 및 semi-quantitative RT-PCR 결과.

a) 분화유도조건 및 분화배지에서 배양한 BMGV cell의 형태, b) 분화유도시 beta-casein gene의 발현양상

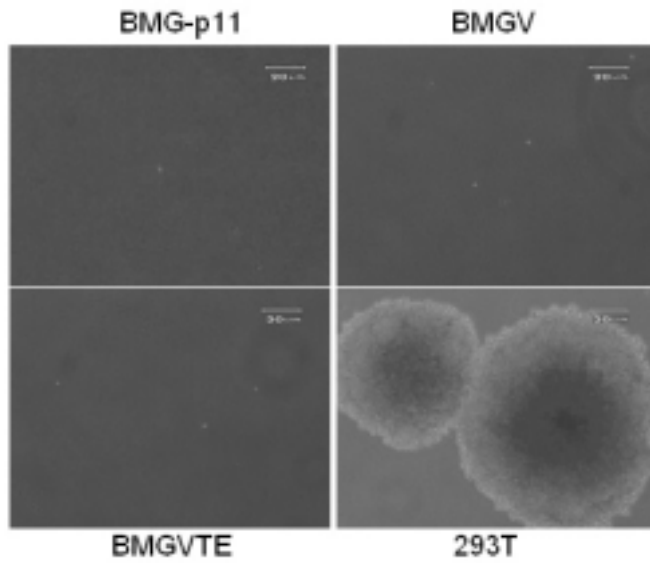


그림 34. Primary 및 불멸화된 BMG cell의 soft agar assay 결과  
 BMGV (SV40LT에 의해 불멸화유도), BMGVTE (SV40LT & hTERT에 의해 불멸화유도), 293T (positive control)



# 제 5 절 생리활성단백질 생산을 위한 overexpression 벡터 구축

## 1. 실험방법

가. 생리활성단백질 생산을 위한 overexpression vector 구축 개요

불멸화된 상피세포주에서 인간유래의 생리활성단백질을 효율적으로 생산하기 위하여 eukaryotic protein expression vector system인 pcDNA 5 (invitrogen)를 기반으로 overexpression vector system을 구축하였다. Promoter는 기존의 CMV promoter 외에 swine kidney epithelial cell에서의 발현을 목적으로 한 renin promoter와 bovine mammary epithelial cell에서의 발현을 목적으로 한  $\beta$ -casein promoter가 사용되었다. Chicken 유래의 matrix attachment region은 vector의 특성상 random integration으로 인한 position effect의 영향으로부터 target gene의 발현을 보호하기 위한 목적으로 사용되었다. 생리활성단백질 생산 유전자는 전술한 chicken MAR와 3종의 promoter의 하부의 multi-cloning site에 삽입 되도록 구성하였다. Overexpression vector system 구축 모식도는 그림35과 같다.

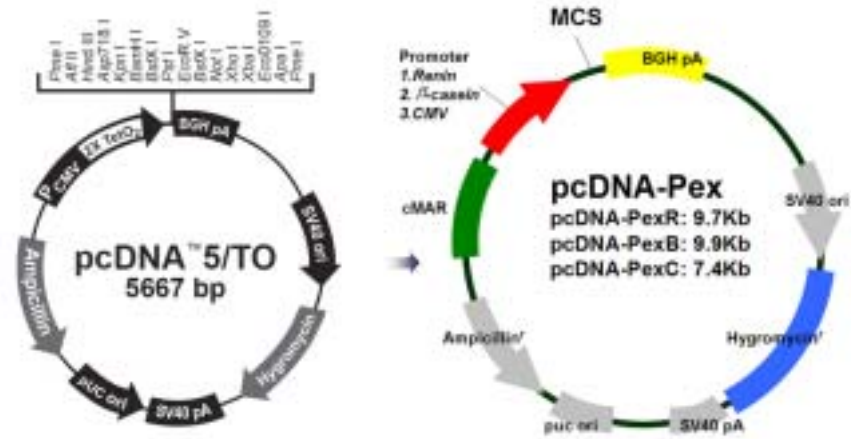


그림35. 생리활성 단백질 over expression vector, pcDNA-Pex의 구성 모식도. PCMV: cytomegalo virus promoter; BGH pA: bovine growth hormone poly-adenylation signal; SV40 ori: simian virus 40 promoter; SV40 pA: simian virus 40 poly-adenylation signal; cMAR: Chicken matrix attachment region; pcDNA-PexR: renin promoter 보유; pcDNA-PexB: β-casein promoter 보유; pcDNA-PexC: CMV promoter 보유.

#### 나. Overexpression vector 구성요소의 cloning

##### 1) Renin promoter

Swine kidney epithelial cell에서의 protein 발현을 위해 murine renin promoter를 cloning하였다. Renin은 kidney에서 일어나는 주요 생리작용중 하나인 renin-angiotensin system에 의한 혈압조절 및 전해질 균형조절에 있어 중요한 작용을 하는 단백질로서 kidney에서 발현하는 것으로 잘 알려져 있다. 최근 Pan *et al.* (2004)에 의해 -2.6kb에 enhancer element가 존재하는 것으로 보고되

어 본 연구에서 이 부분을 cloning하여 이용하였다. GenBank에 보고되어 있는 mouse Ren-1c gene의 5' regulatory sequence (accession number : M34190)를 참고하여 -2860에 위치하는 enhancer element까지 함유할 수 있도록 primer set 을 제작하였다.

Primer sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -agtagacaccaggagatgac-3'

Reverse : 5' -taagagctgtgtagcccaga-3'

Cloning 된 murine renin promoter의 작동여부와 효율검정을 위해 Dual-Glo kit (Promega)을 이용하여 luciferase assay를 실시하였다. Luciferase는 대표적인 reporter protein으로 functional protein의 생산에 있어 post translation processing과정이 필요하지 않고 monomer로 작용하여 transcript의 효율이 enzyme activity와 직접적인 연관을 이루고 있어 많이 이용되고 있는 protein으로 본 연구에서 사용한 assay system에서는 기질이 다른 두 종류의 luciferase (firefly luciferase 및 renilla luciferase)를 이용하여 동일한 sample을 대상으로 하여 순차적으로 activity를 측정하게 되는데 target regulatory sequence는 firefly luciferase의 activity를 통해서 검정하고 assay 결과에 중요한 변수로 작용하는 transfection efficiency에 따른 영향은 renilla luciferase activity의 측정을 통한 normalization으로 최소화하는 체계로 구성되어 있다(그림 36 참고).

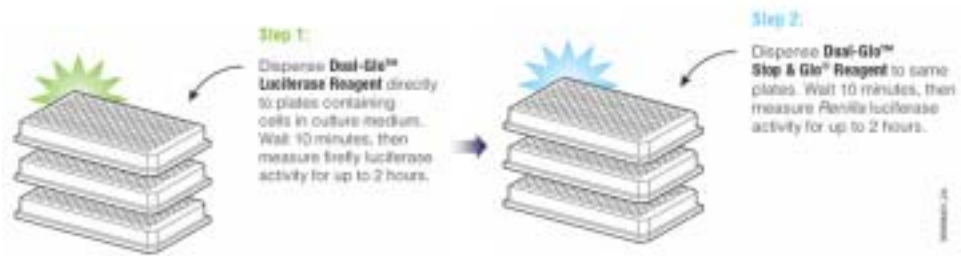


그림 36. Dual-Glo™ Luciferase assay 방법의 개요

## 2) $\beta$ -casein promoter

Bovine mammary epithelial cell에서의 protein 발현을 위해 bovine  $\beta$ -casein promoter region을 cloning하였다.  $\beta$ -casein은 mammary epithelial cell에서 합성되는 주요 milk protein의 하나로 유선내에서 외래 단백질을 발현시키고자 하는 목적으로 많이 채택하는 promoter 가운데 하나가  $\beta$ -casein promoter이다. 본 연구에서 사용한 promoter는 transgenic mouse model을 이용한 효능검정에서 유선조직에 특이적인 발현을 유도할 수 있다고 최근 보고된 바 있다(Naruse et al. 2005).

## 3) CMV promoter

CMV promoter의 경우에는 pcDNA5 vector가 보유하고 있는 것을 그대로 차용하였다. CMV promoter는 eukaryotic cell에서 광범위하게 사용되는 고효율의 promoter로써 본 연구에서는 조직 특이적 promoter인 murine renin promoter와  $\beta$ -casein promoter와의 단백질 발현 효율을 비교하기 위한 positive control로 사용되었다.

## 4) MAR sequence

MAR (Matrix Attachment Region)sequence는 nuclear matrix와 상호작용을 할 수 있는 DNA sequence로 정의할 수 있다. 현재까지 보고된 MAR의 기능은 open chromatin의 조절, enhancer로서의 기능, methylation status의 조절등에

관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용한 MAR는 chicken lysozyme gene에서 유래한 것으로 Phi-Van et al. (1990)이 외래유전자의 발현시 다양한 promoter로부터 transcription을 증가시키고 position effect를 완화시키는 기능이 있다고 보고한 바 있는 sequence를 사용하였다.

#### 다. Human EPO 및 LIF의 cloning

EPO(erythropoietin)은 kidney 및 liver에서 주로 생산되는 조혈촉진인자로 신장의 기능에 문제가 있는 환자들에게는 매우 중요한 의약단백질이며 LIF(leukemia inhibitory factor)는 stem cell의 분화억제나 자궁내 태아의 착상을 촉진하는 불임치료제로서 모두 glycosylated protein으로 유전자의 크기가 그리 크지 않고 발현양 및 biological activity의 측정이 비교적 잘 확립되어 있으므로 target protein으로 선정하였다.

Human genomic DNA로부터 EPO gene (2047bp) 및 LIF gene (3045bp)을 PCR을 통해 증폭하고 TA cloning을 실시한 후 sequencing을 실시하여 mutation이 없는 EPO gene clone을 선발하였다. LIF의 경우, non-specific amplification으로 인한 mutation이 빈번한 발생으로 cDNA의 발현유도로 전략을 수정하여 750bp의 cDNA를 증폭하고 확보하였다.

Human EPO amplification을 위한 primer의 설계는 GenBank NM\_000799 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -atgggggtgcacggtgagta-3'
Reverse : 5' -tcatctgtcccctgtcc-3'

Human LIF amplification을 위한 primer 설계는 NM\_002309 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -atgaaggtcttgcgcgagg-3'

Reverse : 5' -tgccaggcacctcgg-3'

#### 라. Human EPO/LIF expression vector의 구축

구축된 SKE(swine kidney epithelial cell)과 BMG(bovine mammary epithelial cell)를 이용하여 EPO 및 LIF 단백질을 대량생산하기 위한 개별적인 overexpression vector를 구축하였다. SKE의 경우에는 murine renin promoter, BMG의 경우에는  $\beta$ -casein promoter 하에 단백질 생산 유전자가 위치하도록 하여 각각 조직 특이적인 발현이 유도될 수 있도록 vector를 구성하였고 발현효율의 객관적인 검정을 위해 CMV promoter에 의해 단백질이 발현되는 positive control vector를 구성하였다. 본 연구를 통해 구축된 EPO 및 LIF 과발현 vector system의 목록은 아래와 같다 (표 3).

표 3 . 생리활성 단백질 overexpression vector 목록

Cell type	Vector name	Description
SKE	pcDNA-PexR-EPO	murine renin promoter, EPO 생산 vector
	pcDNA-PexR-LIF	murine renin promoter, LIF 생산 vector
BMG	pcDNA-PexB-EPO	$\beta$ -casein promoter, EPO 생산 vector
	pcDNA-PexB-LIF	$\beta$ -casein promoter, LIF 생산 vector
공용	pcDNA-PexC-EPO	CMV promoter, EPO 생산 vector
	pcDNA-PexC-LIF	CMV promoter, LIF 생산 vector

## 2. 연구결과

### 가. Overexpression vector 구성요소의 cloning 및 vector 구축

### 1) Murine renin promoter의 cloning 및 luciferase assay

준비된 primer를 이용하여 mouse genomic DNA를 template로 PCR을 통해 2880bp의 renin promoter region을 증폭하고 TA-cloning을 실시하였다. Target protein overexpression vector 구축 및 luciferase assay를 위한 reporter vector 구축을 위하여 필요한 제한효소 site를 양 말단에 생성시키기 위해 cloning된 renin promoter region을 제한효소 *Not* I을 이용하여 pcDNA3.1 vector로 subcloning을 실시하였다 (그림 37).

한편 cloning한 renin promoter region이 transcription을 효율적으로 유도할 수 있는지를 검증하기 위하여 reporter protein인 luciferase를 이용한 assay를 수행하기 위하여 그림 38 (upper pannel)과 같은 vector를 구축하였다. Assay 과정은 다음과 같다. Enhancer를 포함한 promoter region (RN-2880)과 enhancer가 제거된 promoter region (RN-1750)을 내재하는 firefly luciferase vector를 구축하여 24-well culture dish에 대수 성장기의 SKE cell 및 NIH3T3 cell line을 준비하고 각 1ug의 DNA를 transient transfection을 실시하였다. Transfection efficiency에 따른 차이를 normalization하기 위해 SV40 promoter로 발현이 유도되는 renilla luciferase 50ng씩을 cotransfection 하였다. transfection을 진행하는 과정은 앞선 3절에서 언급한바와 동일하고 transfection후 48시간 후에 growth media를 제거하고 PBS로 washing한 후 DMEM 100ul씩을 분주하고 assay reagent (Promega)를 100ul씩 첨가하여 10분간 반응 시킨 후 luminescence용 96-well plate에 50ul씩 분주하여 luminometer를 이용하여 firefly luciferase activity를 측정하였다. 여기에 각 well 당 동일한 volume의 stop & glo reagent를 첨가하여 잘 섞은 후 10분간 반응시키고 renilla luciferase activity를 측정하였다. 측정된 firefly luciferase activity를 renilla luciferase activity 측정치로 나누어 normalization하고 얻은 값을 대상으로 하여 SV40 promoter control construct의 측정치를 100으로 환산하여 각 측정치를 상대적인 luciferase activity로 환산한 후 비교하였다. 그림 38 (lower pannel)은 luciferase assay 결과로 SKE cell과 NIH3T3 cell을 대상으로 하여 cloning한 renin promoter (enhancer 존재유무에

따른 2종류의 construct(구축)를 strong promoter의 하나인 SV40 promoter와 비교하여 실행한 것이다. SKE cell내에서 control로서 사용한 SV40 promoter & enhancer construct의 luciferase activity를 100으로 환산하여 보았을때 enhancer를 포함한 renin promoter region은 SV40 promoter & enhancer construct에 비해서 약 80% 수준의 transcription을 유도함을 알 수 있다. enhancer의 존재여부는 발현수준에 큰 영향을 미친다고는 볼 수 없으나 약 20% 정도의 향상효과를 나타냄을 확인하였다. Renin promoter region은 kidney 유래의 cell line이 아닌 NIH3T3에서도 50% 수준의 발현을 유도함을 확인할 수 있었는데 이는 renin protein의 발현이 kidney에만 국한된 것이 아님을 생각해 보았을 때 가능한 현상으로 해석할 수 있다. 본 연구에서 promoter의 cloning을 실시한 목적은 tissue-specific한 promoter의 탐색 이라기보다는 불멸화세포주에서 유전자의 발현을 원활하게 유도하기 위한 promoter의 탐색이므로 이러한 목적에 부합하는 결과라고 사료된다.

## 2) Bovine $\beta$ -casein promoter의 cloning

준비된 primer를 이용하여 bovine genomic DNA를 template로 PCR을 통해 3127bp의  $\beta$ -casein promoter region을 증폭하고 TA-cloning을 실시하고 sequencing을 실시하였다 (그림 39). Bovine  $\beta$ -casein promoter amplification을 위한 primer 설계는 X14711 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -GATCTGACTCATTTGGAAAAG-3'
Reverse : 5' -AAGGAGGAGCTGAATGGATA-3'

## 3) Chicken MAR sequence의 cloning

준비된 primer를 이용하여 chicken genomic DNA를 template로 PCR을 통해 1658bp의 chicken matrix attachment region을 증폭하고 TA-cloning을 실시하고



sequencing을 실시하였다 (그림 40). Chicken matrix attachment region amplification을 위한 primer 설계는 X98408 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다. Subcloning의 편의를 위하여 Forward primer 5' 말단에 *Bam*H I, Reverse primer 5' 말단에 *Xba* I site를 내재하였다..

Forward : 5' -GGATCCATAATATAACTGTACCAG-3'
Reverse : 5' -AAAGATTGAAGCACAGACACAGG-3'

#### 4) Overexpression vector의 구축 (basic vector)

위의 과정을 통해 cloning된 각각의 구성요소를 pcDNA 5 vector에 삽입하여 SKE와 BMG cell에서의 단백질발현을 위한 vector를 구성하였다 (그림 41a,b). Cloning한 murine renin promoter는 subcloning 한 pcDNA3 vector로부터 *Not* I 으로 절단하여 *Not* I으로 절단한 pcDNA 5 vector에 삽입하였다. Cloning한 bovine  $\beta$ -casein promoter는 *Sac* II enzyme 처리후 klenow enzyme처리를 통해 3' 말단을 blunt end로 만들고 *Spe* I 으로 절단하여 *Spe* I 및 *EcoR* V enzyme 으로 절단한 pcDNA 5 vector에 삽입하였다(blunt end를 이용한 결합으로 *EcoR* V site 지워짐). Cloning한 chicken matrix attachment region sequence는 pGEM T easy vector로부터 *Bam*H I 및 *Xba* I으로 절단하여 *Bgl* II, *Spe* I으로 절단한 pcDNA-PexR (compatible end를 이용한 결합으로 enzyme site 지워짐)에 삽입하고 *Bam*H I 및 *Spe* I으로 절단한 pcDNA-PexB (compatible end를 이용한 결합으로 *Spe* I site 지워짐)에 삽입하였다. 구축한 vector를 확인하기 위하여 pcDNA-PexR vector를 *EcoR* V로 절단하여 8.6kb + 1.1kb의 band를 확인하였고, pcDNA-PexB vector를 *Bgl* II로 절단하여 5.4kb + 4.5kb의 band를 확인하였다 (그림 41c,d).

### 나. Human EPO 및 LIF의 cloning

#### 1) Human EPO의 cloning

Human genomic DNA로부터 EPO gene (2047bp)을 PCR을 통해 증폭하고 TA cloning을 실시한 후 sequencing을 실시하여 mutation이 없는 EPO gene clone을 선발하였다 (그림 42). Human EPO amplification을 위한 primer의 설계는 GenBank에서 NM\_000799 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -atgggggtgcacggtgagta-3'
Reverse : 5' -tcatctgtcccctgtcc-3'

## 2) Human LIF의 cloning

LIF의 경우, non-specific amplification으로 인한 mutation의 빈번한 발생으로 cDNA의 발현유도로 전략을 수정하여 750bp의 cDNA를 증폭하고 확보하였다 (그림 43). Human LIF amplification을 위한 primer 설계는 NM\_002309 sequence를 참고하였으며 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5' -atgaaggtcttgcgcgagg-3'
Reverse : 5' -tggccaggcacctcgg-3'

## 다. Human EPO/LIF expression vector의 구축

구축된 pcDNA-PexR, pcDNA-PexB 및 pcDNA-PexC vector에 cloning한 EPO 또는 LIF sequence를 삽입하였다.

### 1) pcDNA-PexR-EPO 및 pcDNA-PexR-LIF의 구축 (그림 44)

Cloning한 EPO를 *Spe* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexR vector를 *Xba* I으로 절단하여 ligation하였다(compatible end간의 결합으로 enzyme site 지워짐). Cloning한 LIF를 *Not* I 및 *Apa* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexR vector를 *Not* I 및 *Apa* I으

로 절단하여 ligation 하였다.

### 2) pcDNA-PexB-EPO 및 pcDNA-PexB-LIF의 구축 (그림 45)

Cloning한 EPO를 *Spe* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexB vector를 *Xba* I으로 절단하여 ligation하였다(compatible end간의 결합으로 enzyme site 지워짐). Cloning한 LIF를 *Not* I 및 *Apa* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexB vector를 *Not* I 및 *Apa* I으로 절단하여 ligation 하였다.

### 3) pcDNA-PexC-EPO 및 pcDNA-PexC-LIF의 구축 (그림 46)

Cloning한 EPO를 *Spe* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexC vector를 *Xba* I으로 절단하여 ligation하였다(compatible end간의 결합으로 enzyme site 지워짐).

Cloning한 LIF를 *Not* I 및 *Apa* I으로 절단하여 pBluescript II vector로부터 분리하고 pcDNA-PexC vector를 *Not* I 및 *Apa* I으로 절단하여 ligation 하였다.

이상의 결과를 요약하면, 불멸화상피세포주에서 외래단백질의 효율적인 발현을 유도하기 위한 여러 구성요소들을 cloning하여 eukaryotic expression vector인 pcDNA vector를 기반으로 한 overexpression vector의 구축을 완료하였다. Cloning한 vector element와 이를 통해 완성한 vector는 다음과 같다.

#### 1. Cloning한 vector element

- 1) Chicken Matrix Attachment Region (MAR)
- 2) Murine Renin Promoter
- 3) Bovine  $\beta$ -casein Promoter
- 4) Human EPO genomic DNA
- 5) Human LIF cDNA

#### 2. 구축한 Overexpression vector 목록 (표 3 참조)

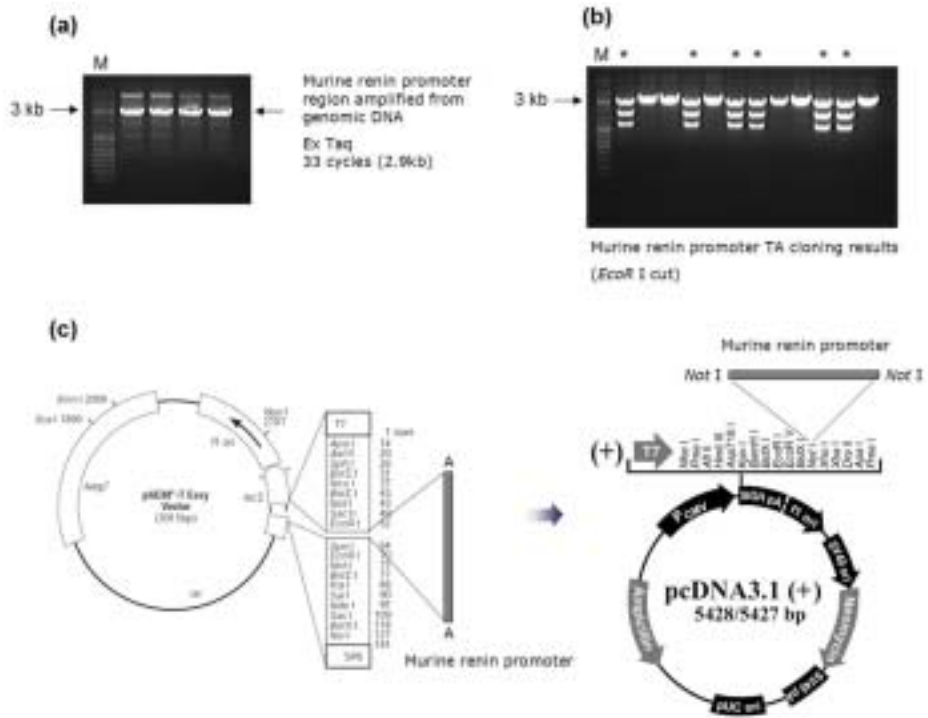


그림 37. Murine renin promoter region의 cloning 및 subcloning. M: molecular marker, \* : positive clones.

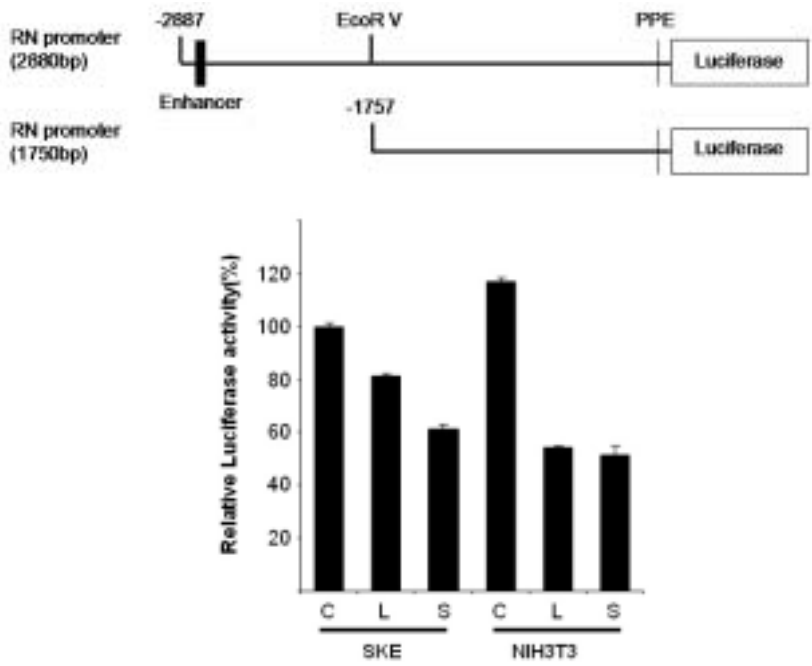


그림 38. Renin promoter region을 이용한 luciferase assay 결과

PPE : proximal promoter element; C : SV40 promoter & enhancer(control); L : RN-2880 promoter; S : RN-1750 promoter; SKE : swine kidney epithelial cell; NIH3T3 : murine fibroblast cell line



(a) Chicken MAR (GenBank accession number : X98406, 1658bp)

```

gggt aak hae l e haw t g t aac g y t t t g g t t t w t haw t g t p e r t p e g p p r t t o r t e t p r t g r t o p e a e a e p p e r t t g g p e e r t g e e t
g e e g g t p e t g g t g e e e g g t g p e e e t g e e e e t e e t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
g g t t e e t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
g o o t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t
t h e t e g h t g p r t t t g e e g p r t t g e t t e g t g t g t t e e t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
g t e g t p e g p r t t o t t g g t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t
e e t e r t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
g e e t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
t e t e g t e e t t t t e t e g e e t t e g t e g t t g g t t e t t g t t t g h t e g g e t h a e e g p r t t e e e t t t h o t e g e g e p e t e r t e e g t e e g g p p t t g t t e
e e t e g g t t e e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
e h o e e g g e g t t e g e t e e e e g t p e t e t t o t t e e e p e t e g e e t t o t t e e t e g t t g p e t e g g e p e e g e e t g e t t e t t e t
t t g p e e t t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
t g t t g e e e r t t e e t e g e e e t e e t e g e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t e e t
e t h o e e p e e t e t e t o e e t e g t t g g p e e t t e t e e e e e t t e g e e g t e g e e t e g e t t e e t e t e g e e e e g e e e p e e g t t o t t e e g t t g g e t t
t t t t e e t t g g e t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t
e t e g e e e e e t t e t g e e e e g t t g g e e e g t e g e e e t e g e e e g t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e g e t e e e

```

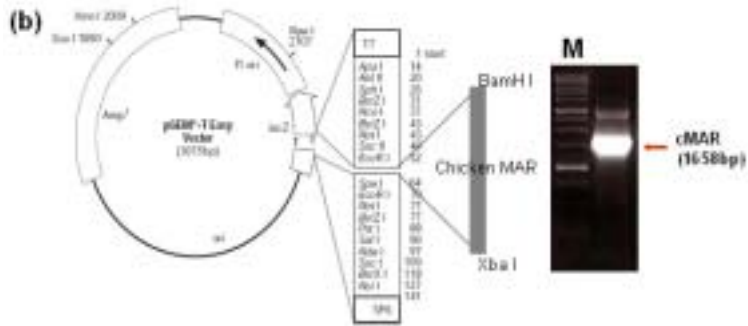


그림 40. Chicken MAR sequence의 cloning

(a) 확보한 chicken MAR sequence, (b) PCR을 통한 chicken MAR sequence의 amplification 결과

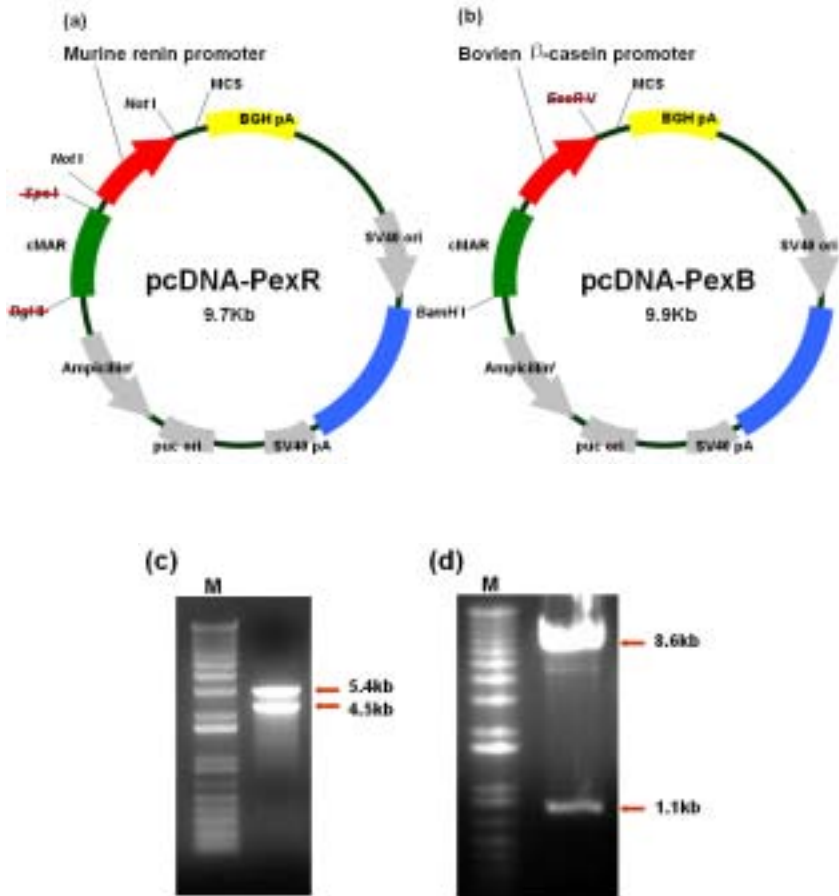


그림 41. Overexpression vector (basic vector)의 구축. (a) pcDNA-PexR: murine renin promoter 보유 vector, (b) pcDNA-PexB: bovine  $\beta$ -casein promoter 보유 vector, (c) pcDNA-PexR 구축 확인, (d) pcDNA-PexB 구축 확인.





(a) Human LIF (GenBank accession number : NM\_002309, 750bp)

```

atgagggatctggggggagggttctgtccocctgctgttggcttctgocctggaacctggggggggggccocctcccccacocctgtccag
ccocctgtgcccacagcccocccctgtcccaccccaccctcagccaccgtccagggccaccctggccaccgtcccagggagtcocccagccctctt
ctctctctctctctcccccgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
accgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
tcaccccccgtgcccctccagcccccaccggtcccaccccccgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
ccagtcocccctgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
gggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
ccagggtgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
tcocctccocctgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg

```

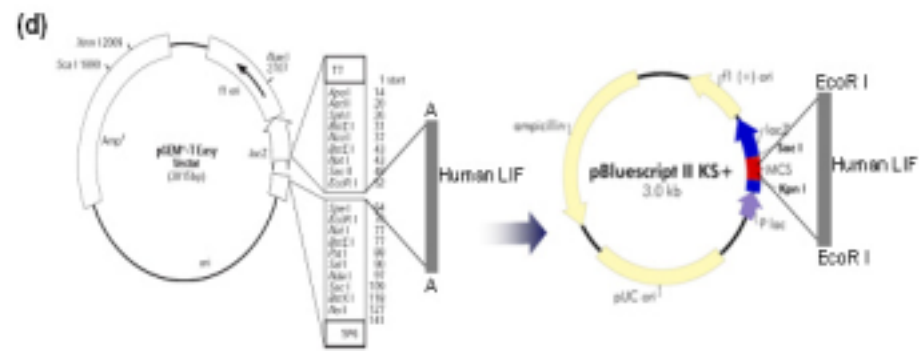
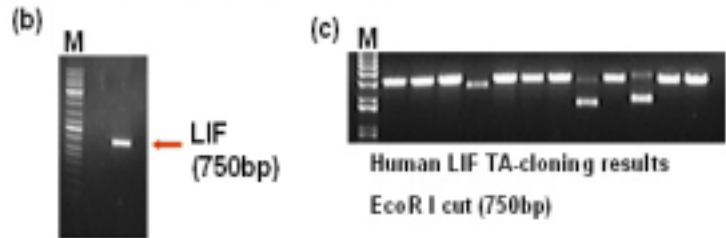


그림 43. Human LIF sequence의 cloning. (a) 확보한 human LIF sequence, (b) PCR에 의한 LIF gene의 amplification 결과, (c) TA-cloning을 통한 clone 선발 과정, (d) Overexpression vector에 삽입하기 위한 subcloning 과정의 모식도.

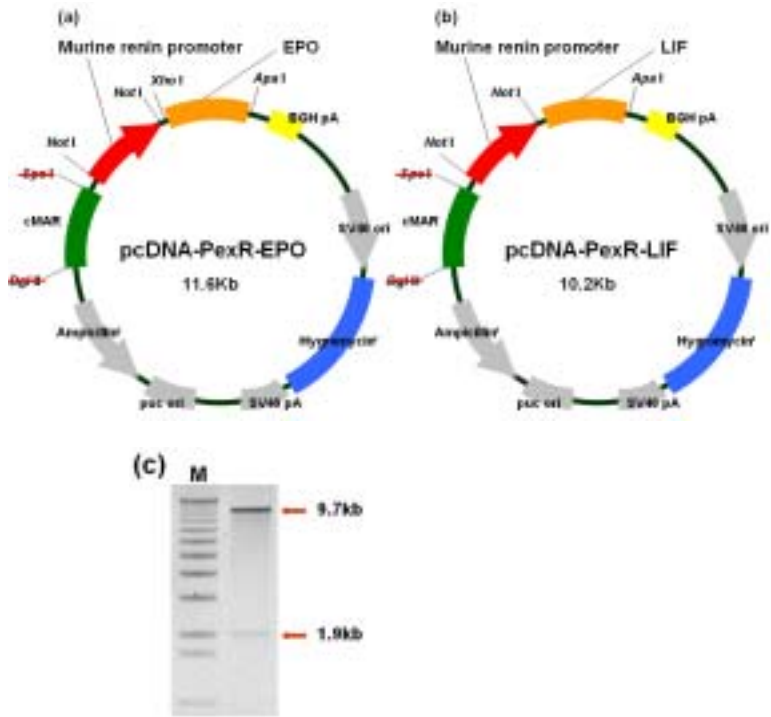


그림 44. pcDNA-PexR-EPO 및 pcDNA-PexR-LIF vector의 구축  
 (a) pcDNA-PexR-EPO: murine renin promoter가 내재된 EPO expression vector, (b) pcDNA-PexR-LIF: murine renin promoter가 내재된 LIF expression vector, (c) pcDNA-PexR-EPO 구축 확인(*Kpn* I cutting)

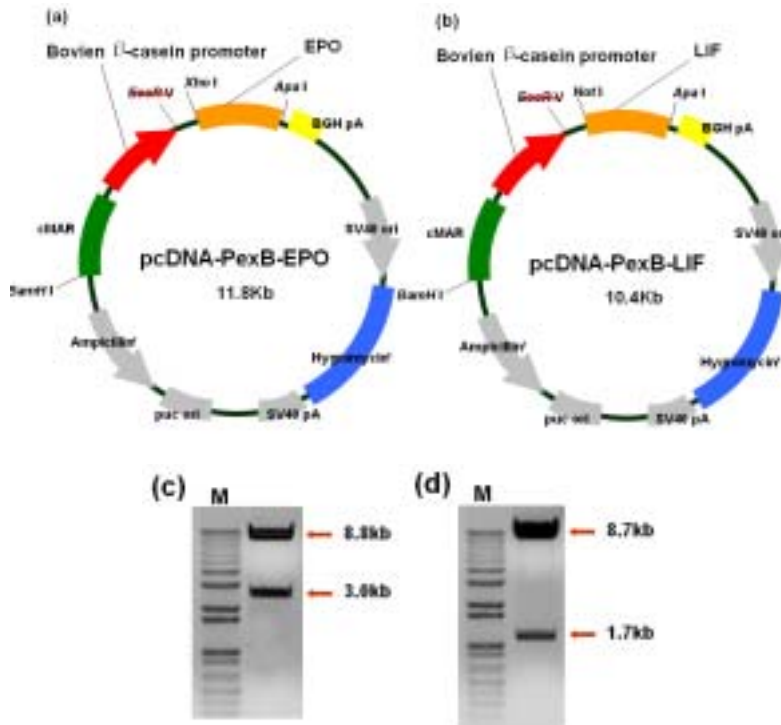


그림 45. pcDNA-PexB-EPO 및 pcDNA-PexB-LIF vector의 구축

(a) pcDNA-PexB-EPO: bovine β-casein promoter가 내재된 EPO expression vector, (b) pcDNA-PexB-LIF: bovine β-casein promoter가 내재된 LIF expression vector, (c) pcDNA-PexB-EPO 구축 확인(*Xba* I & *Apa* I cutting), (d) pcDNA-PexB-LIF 구축 확인(*Kpn* I & *Apa* I cutting)

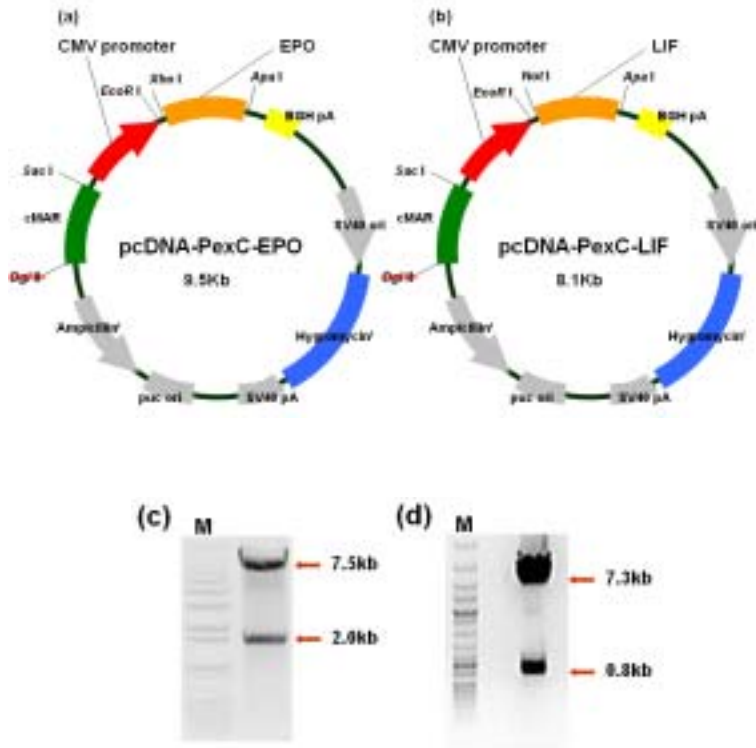


그림 46. pcDNA-PexC-EPO 및 pcDNA-PexC-LIF vector의 구축

(a) pcDNA-PexC-EPO: CMV promoter가 내재된 EPO expression vector, (b) pcDNA-PexC-LIF: CMV promoter가 내재된 LIF expression vector, (c) pcDNA-PexC-EPO 구축 확인(*Sca* I & *Apa* I cutting), (d) pcDNA-PexC-LIF 구축 확인(*Not* I & *Apa* I cutting)

## 제 6 절 생리활성단백질을 생산하는 불멸화상피세포주의 확립

### 1. 실험방법

가. Human EPO protein을 생성하는 불멸화상피세포주의 확립

1) PexC-EPO hyg, PexR-EPO hyg 및 pcDNA hyg vector의 stable transfection

Human EPO를 생산하는 불멸화상피세포주를 확립하기 위하여 불멸화된 SKE-hTERT cell에 PexC-EPO hyg, PexR-EPO hyg 및 pcDNA hyg vector를 liposome을 이용하여 transfection하였다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

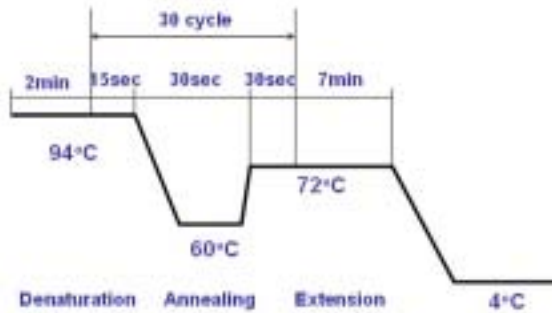
6-well culture dish에 SKE-hTERT cell을  $3 \times 10^5$  개씩 seeding한 후 overnight 배양을 통해 세포를 안착시킨 후 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) reagent를 이용하여 각 3ug의 DNA를 transfection하였다. Transfection을 실시하기에 앞서 각 well당 fresh growth media 2ml로 배지를 교환하고 한 튜브에 250ul의 Opti-MEM I medium (Invitrogen)에 3ug의 DNA를 희석하고 다른 튜브에 같은 양의 Opti-MEM I medium에 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 reagent 10ul를 희석한 후 5분경과 후에 두 개의 튜브를 서로 섞어 DNA-liposome complex의 형성을 유도하기 위해 실온에서 20분간 방치하였다. 형성된 complex를 세포가 위치한 well에 점적하고 incubator에서 3시간 배양후 fresh growth media로 교체하여 DNA-liposome complex를 제거하였다. SKE-hTERT cell과의 발현수준을 비교하기 위해 CHO-K1 cell line에 대하여 PexC-EPO hyg 및 pcDNA hyg vector를 같은 요령으로 transfection 하였다. Transfection을 실시한 다음날부터 hygromycin B solution (Invitrogen)을 이용하여 stable clone을 선발하였다. 선발에 사용한 hygromycin B의 최종농도는 SKE-hTERT cell line의 경우 250ug/ml

이였으며 CHO-K1 cell line의 경우 300ug/ml의 강도로 2주간 selection 하여 resistant clone을 선발하였다.

## 2) Human EPO 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 기법확립

Hygromycin B selection을 통해 선발한 SKE-hTERT cell line 및 CHO-K1 cell line을 100-mm culture dish에서 80% confluent 상태로 배양한 다음, Trizol (Invitrogen) reagent를 이용하여 RNA를 추출하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다. 1ml의 Trizol reagent를 성장배지 제거후 PBS washing한 cell위에 첨가하여 cell lysis를 유도한 후 cell scraper를 이용하여 1.5ml eppendorf tube에 수집한 후, chloroform 200ul를 첨가하여 homogenization하고 실온에서 5분간 배양하였다. 12000×g, 4℃ 조건에서 15분간 원심 분리한 후 분리된 투명한 층의 용액을 DEPC 처리된 tube에 옮겨 담고 500ul의 isopropyl alcohol을 첨가 후 실온에서 10분간 배양하고 12000×g, 4℃ 조건에서 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 75% Ethanol solution을 이용하여 washing 한 후 건조하여 100ul의 RNase-free water에 녹인 후 OD를 이용한 RNA농도를 측정하였다.

추출한 total RNA를 이용하여 EPO 유전자의 발현수준을 검증하기 위해 cDNA를 합성하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다. 추출한 total RNA 3ug에 Oligo(dT) 5nmoles을 첨가한 후 70℃, 10분간 반응시킨 후 신속히 냉각시켰다. 여기에 10mM DTT 및 500uM dNTP를 첨가하고 Superscript II (Invitrogen) reverse transcriptase 200unit을 첨가하여 42℃, 50분간반응시킨 후 70℃, 15분간 반응하여 첨가한 enzyme을 heat inactivation 하였다. 합성한 cDNA는 1/20 volume (1ul)을 PCR에 template로 사용하였다. Human EPO의 mRNA 수준을 확인하기위한 PCR 조건은 다음과 같다.



사용한 primer의 sequence는 다음과 같다.

Forward : 5'-tgtggataaagccgtcagtg-3'

Reverse : 5'-ccggaggaaattggagtaga-3'

### 3) Human EPO protein의 발현을 확인하기 위한 Western blotting 기법확립

Hygromycin B selection을 통해 선발한 SKE-hTERT cell line 및 CHO-K1 cell line을 100-mm culture dish에서 80% confluent 상태로 배양한 다음, Trypsin-EDTA를 이용하여 cell pellet을 수집한 후 RIPA lysis buffer를 이용하여 total protein을 추출하였다. 사용한 RIPA lysis buffer의 조성은 다음과 같다. 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris (pH 7.4), 1 tablet protease inhibitor (Roche), NaF (1M) 20ul, NaOVA (0.2M) 5ul, Glycerol Phosphate (1M) 20ul for 10ml.

추출한 protein을 10% Bis-Tris gel, MOPS running buffer 조건에서 각 lane별로 50ug씩의 protein을 loading하여 separation시킨 후, Towbin solution (25ml 1M Tris pH 8.3, 14.41gram glycine, 200ml 100% methanol for 1L)을 이용하여 PVDF membrane에 semi-solid transfer system (BioRad)을 이용하여 transfer하였다. 5% skim milk, 10mM Tris pH 7.4를 함유한 blocking buffer를 이용하여 실온에서 1시간 blocking을 실시한 후 Primary EPO antibody (Santacruz H-162)를 1:250의 비율로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. TBS (Tris



buffered saline) solution을 이용하여 10분간 3회 washing후 secondary antibody (anti-rabbit IgG)를 1:5000의 비율로 희석하여 실온에서 1시간 배양하였다. TBS solution을 이용하여 10분간 3회 washing후 Supersignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce)을 이용하여 5분간 반응시킨 후 X-ray film 을 통하여 발현수준을 검증하였다.

#### 4) TF-1 cell line을 이용한 생성된 EPO protein의 biological activity test

TF-1 (Human Erythroleukemia, ATCC CRL-2003) cell line은 1987년에 T. Kitamura등에 의해 확립된 cell line으로 35세 erythroleukemia 환자의 bone marrow로부터 확립되었다. TF-1 cell은 EPO, GM-CSF, IFN-gamma, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, LIF, NGF, OSM, SCF, TNF-alpha and TPO와 같은 hematopoietic growth factor에 반응하여 성장이 촉진됨이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 생성된 EPO protein이 TF-1 cell line의 성장을 촉진하는지를 검증하고자 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 노란색을 띠는 tetrazolium salt 의 한 종류인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid)가 세포내 대사활동에 의하여 보라색의 formazan crystal로 변형되는 현상을 이용하여 세포의 성장 및 그에 따른 대사활동의 성적을 발색반응을 통하여 간단하게 계량화할 수 있는 장점을 가지고 있다. 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

96-well tissue culture plate (flat bottom)에 test 하고자 하는 medium (24hrs preincubation, 0.2um-filtered)과 control로서 2ng/ml 농도의 hGM-CSF를 포함하는 medium을 50ul씩 넣고 30분간 preincubation하였다. 각 well당  $5 \times 10^3$  cells/50ul로 준비한 TF-1 cell을 첨가하고 48시간동안 배양하였다. 각 well당 10ul의 MTT labeling reagent (final concentration 0.5mg/ml)를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 각 well당 100ul의 solubilization solution (10% SDS in 0.01M HCl)을 첨가하고 overnight 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 570nm에서의 흡광도를 측정하였다.

나. Human LIF protein을 생성하는 불멸화상피세포주의 확립

1) PexC-LIF hyg, PexR-LIF hyg 및 pcDNA hyg vector의 stable transfection

Human LIF를 생산하는 불멸화상피세포주를 확립하기 위하여 불멸화된 SKE-hTERT cell에 PexC-LIF hyg, PexR-LIF hyg 및 pcDNA hyg vector를 liposome을 이용하여 transfection하였다. 구체적인 실험방법은 EPO의 경우와 동일하다.

2) Human LIF 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 기법 확립

Hygromycin B selection을 통해 선발한 SKE-hTERT cell line 및 CHO-K1 cell line을 100-mm culture dish에서 80% confluent 상태로 배양한 다음, Trizol (Invitrogen) reagent를 이용하여 RNA를 추출하였다. 구체적인 방법은 EPO의 경우와 동일하다.

사용한 primer의 sequence 다음과 같다.

Forward : 5'-atagtcgtgtaccttggcacct-3'

Reverse : 5'-tgacagcccagcttcttctt-3'

3) Human LIF protein의 발현을 확인하기 위한 Western blotting 기법 확립

Hygromycin B selection을 통해 선발한 SKE-hTERT cell line 및 CHO-K1 cell line을 100-mm culture dish에서 80% confluent 상태로 배양한 다음, Trypsin-EDTA를 이용하여 cell pellet을 수집한 후 RIPA lysis buffer를 이용하여 total protein을 추출하였다. 구체적인 방법은 EPO의 경우와 동일하다.

4) TF-1 cell line을 이용한 생성된 LIF protein의 biological activity test

TF-1 (Human Erythroleukemia, ATCC CRL-2003) cell line은 1987년에 T. Kitamura등에 의해 확립된 cell line으로 35세 erythroleukemia 환자의 bone marrow로부터 확립되었다. TF-1 cell은 EPO, GM-CSF, IFN-gamma, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, LIF, NGF, OSM, SCF, TNF-alpha and TPO와 같은 hematopoietic growth factor에 반응하여 성장이 촉진됨이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 생성된 LIF protein이 TF-1 cell line의 성장을 촉진하는지를 검증하고자 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 노란색을 띠는 tetrazolium salt의 한 종류인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid)가 세포내 대사활동에 의하여 보라색의 formazan crystal로 변형되는 현상을 이용하여 세포의 성장 및 그에 따른 대사활동의 유무를 발색반응을 통하여 간단하게 계량화할 수 있는 장점을 가지고 있다. 구체적인 실험방법은 EPO의 경우와 동일하다.

## 2. 연구결과

### 가. Human EPO를 생산하는 불멸화상피세포주의 구축

4절에서 언급한바와 같이 human EPO protein을 생산하기위해 구축한 vector system을 불멸화된 상피세포주에 도입하여 hygromycin selection을 통해 hygromycin-resistant clone을 선발하였다. 각 overexpression vector system의 목적은 Table 3에 소개한 바와 같다. 불멸화된 swine kidney epithelial cell line 가운데서 transfection 과정에서 가장 효율적인 결과를 나타낸 것은 SKE-hTERT cell line이었으며 구축한 protein expression vector system에 의해 외래 단백질이 생산됨을 확인할 수 있었다. Hygromycin에 의해 선발한 각 clone의 대표적인 사진은 그림 47과 같다.

#### 나. Human EPO mRNA의 발현확인

Hygromycin selection을 통해 선발한 불멸화상피세포주에서 human EPO mRNA가 발현하는 것을 확인하기 위해 semi-quantitative RT-PCR를 이용하여 human EPO mRNA의 발현을 검증하였다. RT-PCR결과 CHO-K1 cell line에서 CMV promoter를 이용하여 발현하는 human EPO mRNA는  $\beta$ -actin의 1.49배에 달하였다. SKE cell line에서는 CMV promoter를 이용하여 발현하는 human EPO mRNA는  $\beta$ -actin의 1.38배에 달하였으나 renin promoter를 이용하여 발현하는 human EPO mRNA 1.46배보다 낮았다. 즉 SKE cell line에서 renin promoter가 CMV promoter 보다 human EPO mRNA 발현효율이 높았지만 CHO-K1 cell line 보다는 낮은 경향을 보여주고 있다.

#### 다. Human EPO protein의 발현확인

Human EPO protein의 발현수준을 비교하기 위하여 실시한 western blotting을 실시했다. Western blotting의 결과, 약 35kDa 크기의 위치에서 EPO protein의 존재를 확인할 수 있었다. 발현량을 비교하면 mRNA 발현수준과 같이 SKE cell line에서 renin promoter를 사용한 것이 CMV promoter를 사용한 것보다 많은 human EPO protein을 발현하였지만 CHO-K1 cell line에서 CMV promoter를 이용하여 발현시킨 human EPO protein 보다 적었다. (그림 48. lane 3과 4).

#### 라. Human LIF protein을 생산하는 불멸화상피세포주의 구축

EPO의 경우와 마찬가지로 human LIF protein을 생산하기 위해 구축한 vector system을 불멸화된 상피세포주에 도입하여 hygromycin selection을 통해 LIF가 over-expression된 것으로 사료되는 clone을 선발하였다. 각 over-expression vector system의 목적은 표 3에 소개한 바와 같다. Hygromycin에 의해 선발한 각 clone의 대표적인 사진은 그림 49와 같다.

#### 마. Human LIF mRNA의 발현확인

Hygromycin selection을 통해 선발한 불멸화상피세포주에서 human LIF mRNA가 발현하는 것을 확인하기 위해 semi-quantitative RT-PCR를 이용하여 human LIF mRNA의 발현을 검증하였다. RT-PCR결과 CHO-K1 cell line에서 CMV promoter를 이용하여 발현하는 human LIF mRNA는  $\beta$ -actin의 1.00배에 달하였다. SKE cell line에서는 CMV promoter를 이용하여 발현하는 human LIF mRNA는  $\beta$ -actin의 1.17배에 달하였으나 renin promoter를 이용하여 발현하는 human LIF mRNA 1.28배보다 낮았다. 즉 SKE cell line에서 renin promoter가 CMV promoter 보다 human LIF mRNA 발현효율이 높았으며 CHO-K1 cell line 보다도 높은 경향을 보여주고 있다.

#### 바. Human LIF protein의 발현확인

Human LIF protein의 발현수준을 비교하기 위하여 western blotting을 실시했다. Western blotting의 결과 역시 약 35kDa 크기의 위치에서 LIF protein의 존재를 확인할 수 있었다. LIF protein의 발현양상 또한 EPO발현 system과 유사한 결과를 보였는데, 기존의 널리 사용되는 CMV promoter와 본 연구에서 새로이 cloning한 renin promoter를 사용하는 overexpression vector system간의 차이를 비교해보면, SKE cell 내에서는 renin promoter를 사용하는 것이 CMV promoter를 사용하는 것에 비해 더 효율적임을 확인할 수 있었다(그림 50. lane 3과 4). 본 연구에서 확립한 불멸화상피세포주와 외래단백질 생산에 널리 이용되는 CHO-K1 cell line의 생산효율을 CMV promoter를 사용하여 비교한 결과, protein 수준에서는 현저한 차이를 보였다. 이결과는 mRNA 발현과 차이를 보이고 있지만 cell line상에서의 translation 차이인 것으로 사료된다. LIF protein의 경우 vector control (lane 2)에서 mRNA는 검출되지 않았으나 protein에서 존재가 확인되었는데 이는 SKE-hTERT cell에서 발현된 내생 LIF protein이 human

LIF protein antibody와의 cross reactivity에 의해 검출된 결과로 사료된다.

#### 사. 생성된 human protein의 biological activity test

불멸화상피세포주를 통해 생산된 EPO, LIF의 생리활성을 알아보기 위하여 EPO, LIF 등 여러 growth factor에 성장이 촉진되는 것으로 알려져 있는 human erythroleukemia cell line인 TF-1 cell line을 이용하여 생산된 EPO, LIF의 생리활성여부를 검증하였다. MTT assay의 결과의 신빙성을 검증하기 위하여 TF-1 cell의 growth medium (RPMI 1640 medium +10% FBS+ hGM-CSF 2ng/ml)에 첨가되는 hGM-CSF를 dose별로 첨가하여 MTT assay를 수행하였다. 0.01ng/ml 부터 10ng/ml까지 다양한 범위의 농도로 처리한 결과, 권장농도인 2ng/ml수준으로 처리할 경우 최대 성장성적에 수렴하는 결과를 보임을 확인할 수 있었다(그림 51).

##### 1) 불멸화세포주에서 생산된 EPO protein의 biological activity test

EPO protein의 경우 166개의 아미노산으로 구성된 mature peptide가 분비되는 secretion protein이므로 human EPO gene을 발현하는 불멸화세포주의 경우 생성된 EPO protein이 growth medium내로 분비될 것이라는 점에 근거하여 confluent상태까지 배양한 형질전환된 불멸화세포주를 10% FBS를 포함한 fresh growth medium으로 교체한 후 24시간동안 배양하였다. Growth medium을 수거하여 pore size 0.2um syringe filter를 이용하여 cell 및 cell debris를 제거한후 MTT assay를 위하여 96-well culture plate에 50ul씩을 옮겨담은 후 이후 assay를 수행하였다. 그림 52에서 보는바와 같이 positive control인 hGM-CSF 처리구와 비교하여 보았을때 불멸화세포주에서 생산된 EPO가 분리과정을 거치지 않았음에도 불구하고 TF-1 cell의 성장을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다. RT-PCR이나 Western blotting의 결과와는 다소 다른 양상을 보인것이 negative control로 사용한 SKE-hTERT-pcDNA hyg의 경우인데, RT-PCR이나 western blotting의 결과에서는 검출이 되지 않았지만, kidney tissue는 성체에서 EPO가

생성되는 주요 기관으로 알려져 있어 host 유래의 endogenous EPO의 생성이 이러한 성장촉진효과를 유도했을 가능성이 있다. 또다른 하나의 가능성은 medium 내에 TF-1 cell 의 성장을 촉진하는 다른 growth factor들의 존재가능성인데, TF-1 cell은 앞에서도 언급했듯이 다양한 growth factor들에 의해 성장이 촉진될 수 있어 비록 human EPO가 생성되었지만 host cell에 의해 생성된 다른 growth factor들에 의한 영향일 가능성도 배제할 수 없을 것으로 사료된다. 이는 LIF의 western blotting 결과와도 연관되어 해석할 수 있을 것으로 사료된다. 불멸화상 피세포주와의 비교를 위해 사용한 CHO-K1 cell의 경우 western blotting결과에서 알 수 있었듯이 EPO protein의 발현양이 상대적으로 높았던 결과가 biological activity test에서도 반영된 것으로 해석할 수 있다. 아울러 비록 유의적인 차이가 보이진 않으나 SKE-hTERT cell을 통하여 발현된 EPO 또한 TF-1 cell의 성장을 촉진하였을 것으로 사료되고 이러한 경향은 CMV promoter를 사용한 vector system보다는 renin promoter를 사용한 vector system의 경우 좀 더 효과적인 경향을 나타내었다.

## 2) 불멸화세포주에서 생산된 LIF protein의 biological activity test

LIF protein의 경우 7개의 glycosylation site가 존재하는 것으로 알려진 secretion protein이므로 EPO의 경우와 마찬가지로 human LIF gene을 발현하는 불멸화세포주의 경우 생성된 LIF protein이 growth medium내로 분비될 것이라는 점에 근거하여 confluent상태까지 배양한 형질전환된 불멸화세포주를 10% FBS를 포함한 fresh growth medium으로 교체한 후 24시간동안 배양하였다. Growth medium을 수거하여 pore size 0.2um syringe filter를 이용하여 cell 및 cell debris를 제거한후 MTT assay를 위하여 96-well culture plate에 50ul씩을 옮겨담은 후 이후 assay를 수행하였다. 그림 53에서 보는바와 같이 LIF의 경우 또한 앞선 EPO의 경우와 마찬가지로 negative control로 사용한 SKE-hTERT-pcDNA hyg의 경우에도 TF-1 cell의 성장을 촉진하는 효과를 나타내었음을 알 수 있다. 이는 western blotting결과에서도 알 수 있듯이 host 유래의 endogenous LIF의 생성이 이러한 성장촉진효과를 유도했을 가능성이 있다.

또다른 하나의 가능성은 medium내에 TF-1 cell 의 성장을 촉진하는 다른 growth factor들의 존재가능성인데, TF-1 cell은 앞에서도 언급했듯이 다양한 growth factor들에 의해 성장이 촉진될 수 있어 비록 human LIF가 생성되었지만 host cell에 의해 생성된 다른 growth factor들에 의한 영향일 가능성도 배제할 수 없을 것으로 사료된다. 이는 LIF의 western blotting 결과와도 연관되어 해석할 수 있을 것으로 사료된다. 비교를 위해 사용한 CHO-K1 cell의 경우 western blotting결과에서 알 수 있었듯이 LIF protein의 발현양이 상대적으로 높았던 결과가 biological activity test에서도 반영된 것으로 해석할 수 있다. 아울러 비록 유의적인 차이가 보이진 않으나 SKE-hTERT cell을 통하여 발현된 LIF 또한 TF-1 cell의 성장을 촉진하였을 것으로 사료되고 이러한 경향은 vector control에 비해서는 차이를 보였으나 CMV promoter를 사용한 vector system과 renin promoter를 사용한 vector system의 차이를 보이지는 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼때, TF-1 cell line에 의한 biological activity test의 결과는 생체시스템의 복잡성에 기인하는 결과라고 사료된다.

이상의 결과를 요약하면, human EPO, LIF overexpression vector를 불멸화된 상피세포주인 SKE-hTERT에 lipofection을 통하여 도입하고, human EPO, LIF를 생산하는 Swine kidney epithelial cell line을 확립하였으며, RT-PCR, Western blotting을 통하여 각각 mRNA, protein 수준에서 human EPO, LIF가 생성됨을 확인하였다. 생성된 EPO, LIF의 생리활성을 검증하기 위하여 TF-1 cell의 proliferation 촉진정도를 MTT assay를 통해서 측정해본 결과, EPO-producing SKE cell line의 경우, negative control에 비하여 CMV promoter를 사용한 경우 약 13%, renin promoter를 사용한 경우 약 20%가량 성장을 촉진시켰음을 확인하였고 LIF의 경우, negative control에 비하여 CMV promoter를 사용한 경우 약 21%, renin promoter를 사용한 경우 약 24%가량 성장을 촉진시켰음을 확인하였다.



각 단계별 연구를 통해 얻은 결론을 종합하면,

1. Swine kidney tissue 및 bovine mammary gland tissue로부터 primary epithelial cell을 성공적으로 분리하였다.
2. 연속계대배양을 통한 자발적인 불멸화상피세포주 라인 1개 (SKE-Spon)와 구축한 불멸화유도백터의 도입을 통해 SV40LT and/or hTERT에 의해 불멸화된 상피세포주를 각 2개씩 (SKE-SV40LT, SKE-hTERT, BMGV, BMGVTE)확립하였다.
3. 이들 불멸화된 상피세포주의 성장특성 및 primary cell과 비교한 세포특성 분석을 통해 확립된 세포주가 primary cell에 비하여 성장속도 및 세포수명이 증가하였으나 세포의 특성을 유지한 정상세포에 가까운 특성을 유지함을 증명하였다.

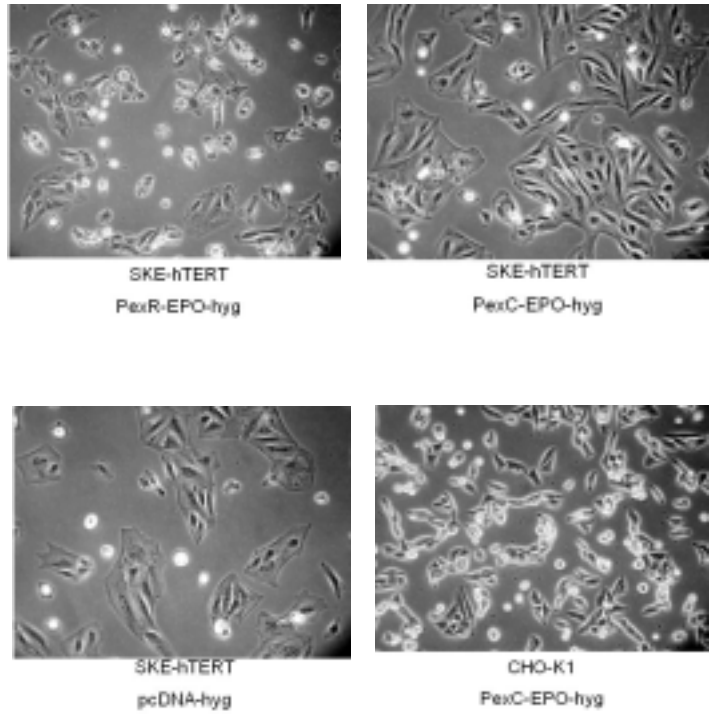


그림 47. Human EPO gene을 과발현시킨 불멸화상피세포주 및 CHO-K1 cell line의 대표적인 세포사진

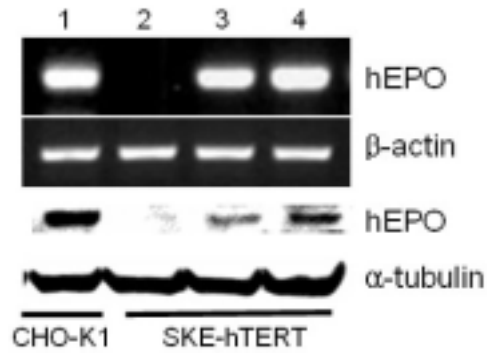


그림 48. Human EPO gene의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 및 western blotting 결과.

1. CHO-K1 (pcDNA-PexC-EPO), 2. SKE-hTERT (pcDNA), 3. SKE-hTERT (pcDNA-PexC-EPO), 4. SKE-hTERT (pcDNA-PexR-EPO)

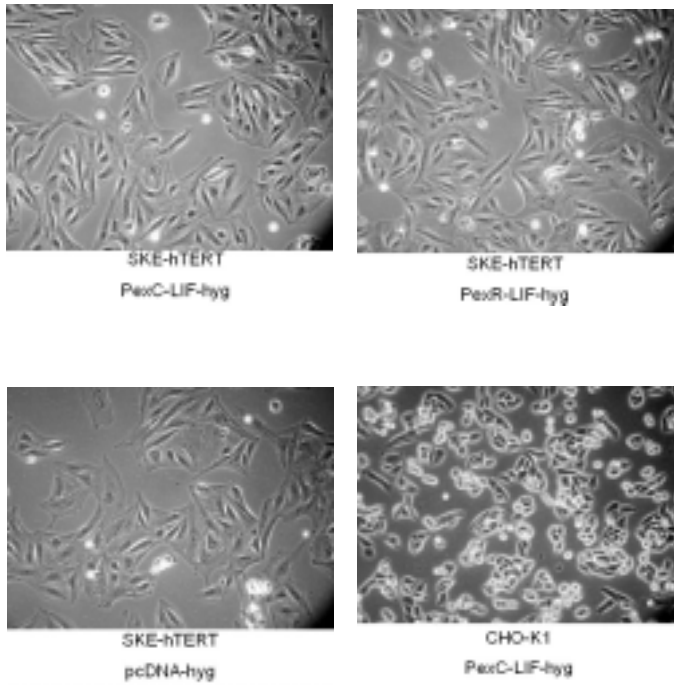


그림 49. Human LIF gene을 과발현시킨 불멸화상피세포주 및 CHO-K1 cell line의 대표적인 세포사진

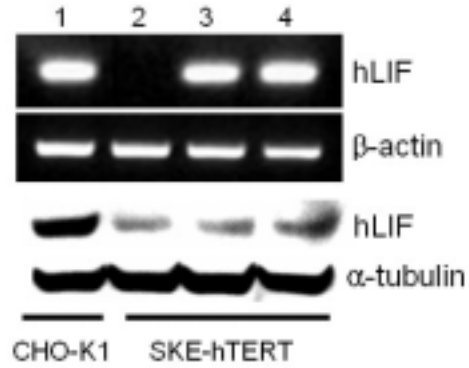


그림 50. Human LIF gene의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 및 western blotting 결과.

1. CHO-K1 (pcDNA-PexC-LIF), 2. SKE-hTERT (pcDNA), 3. SKE-hTERT (pcDNA-PexC-LIF), 4. SKE-hTERT (pcDNA-PexR-LIF)

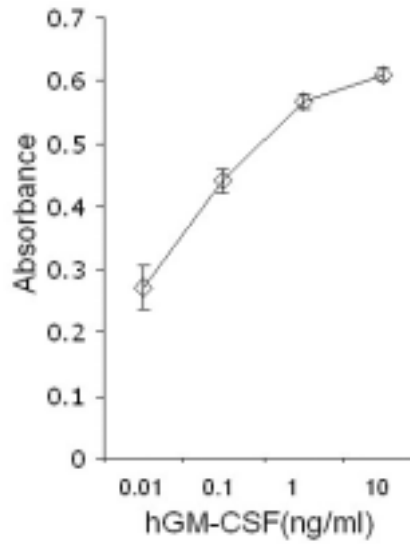


그림 51. TF-1 cell을 이용한 MTT assay 방법 test

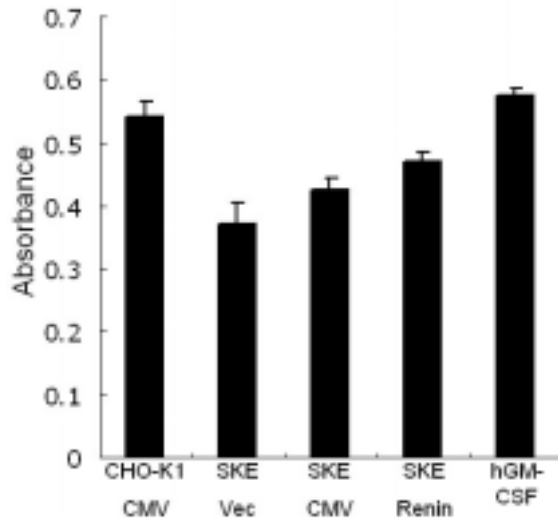


그림 52. 형질전환된 불멸화상피세포주에서 분비된 EPO가 TF-1 cell의 성장에 미치는 영향분석.

CMV : pcDNA-PexC-EPO, Vec : pcDNA, Renin : pcDNA-PexR-EPO,  
 hGM-CSF : hGM-CSF 처리구(2ng/ml)

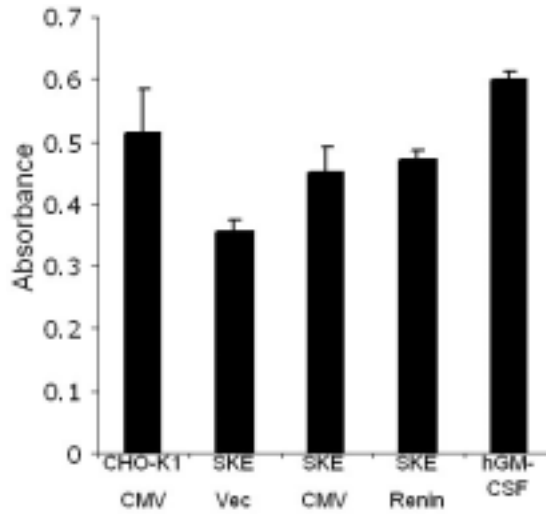


그림 53. 형질전환된 불멸화상피세포주에서 분비된 LIF가 TF-1 cell의 성장에 미치는 영향분석.

CMV : pcDNA-PexC-LIF, Vec : pcDNA, Renin : pcDNA-PexR-LIF,  
hGM-CSF : hGM-CSF 처리구(2ng/ml)



## 제 4 장 연구개발목표의 달성도 및 기술발전 기여도

### 제 1 절 연구개발목표 달성

본 연구의 최종목표는 세포의 불멸화 유도 기법을 이용, 체세포 가운데서도 단백질의 합성 및 분비에 효율적인 것으로 판단되는 상피세포주의 불멸화를 통해 외래 생리활성단백질의 발현을 효율적이고 안정적으로 지속할 수 있는 세포주를 확립하고, 확립된 불멸화세포주를 이용하여 유용 생리활성 단백질의 효율적인 생산시스템을 구축하는 것으로 논리적인 가설설정과 체계적인 실험설계에 입각한 연구수행을 통해 본 연구가 추구하는 목표를 성공적으로 완료하였다고 판단된다.

최종목표를 달성하기 위한 단계별 목표는,

1. 불멸화상피세포주의 개발을 위한 primary 세포의 분리, 배양기법 확립 및 불멸화유도를 위한 벡터구축,
2. 불멸화상피세포주의 개발 및 이들 세포주의 특성규명,
3. 불멸화상피세포주에서 human EPO, LIF의 생산을 위한 효율적인 발현벡터 구축과 생리활성단백질 발현효율 검정 및 생리활성 측정으로 요약할 수 있으며, 각 단계별 연구개발 목표 달성내용은 아래와 같다.

1. 동물(소, 돼지) 불멸화 상피세포주의 개발을 위한 primary 세포의 분리, 배양 기법 확립 및 불멸화 유도를 위한 벡터구축완료 (100% 완료)

Swine kidney 및 Bovine mammary gland에서 상피세포를 성공적으로 분리하고, 지속적으로 배양 가능한 조건을 확립하였으며, 이들 세포의 불멸화를 유도할 수 있는 유전자 발현 벡터를 성공적으로 구축하였다.

2. 불멸화상피세포주의 개발 및 이들 세포주의 특성규명 (100% 완료)

돼지의 신장조직에서 유래한 상피세포와 젓소의 유선조직에서 유래한 상피세포를 대상으로 세포의 불멸화를 유도하고 그 특성을 규명하였다.

가. 돼지의 신장으로부터는 세포의 연속 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-Spon), SV40LT Ag (SKE-SV40LT) 및 hTERT (human telomerase)의 발현을 통하여 불멸화에 도달한 세포주 (SKE-hTERT)등 3종류의 불멸화된 세포주를 확립하였다.

나. 젓소의 유선으로부터 SV40LT Ag (BMGV), SV40LT Ag 및 hTERT의 발현 (BMGVTE)을 통하여 불멸화에 도달한 2종류의 불멸화된 세포주를 확립하였다.

다. 본 연구를 통해 확립된 불멸화세포의 특성을 간략히 기술하면,

- 1) 초대배양세포에 비하여 세포성장속도가 약 2배 정도 가속화되는 양상을 보였고,
- 2) 형태적인 측면에서 초대배양세포와 유사한 형태학적 특징을 유지하고 있음이 확인되었으며,
- 3) 생리적인 측면에서도 상피세포의 표지 단백질인 cytokeratin이 불멸화 유도 후에도 높은 수준으로 발현하는 것으로 나타났고,
- 4) 노화와 연관된 생리적 특징을 보이는 세포가 관찰되지 않았으며,
- 5) soft agar assay를 통한 암세포적 특징 보유 여부를 검정한 결과, 확립된 세포주가 암세포가 아닌 불멸화된 세포주임을 최종적으로 확인 할 수 있었다.

한편, 본 연구를 통해 확립된 불멸화세포주의 주요 생리적 특징을 살펴보면, 불멸화된 신장 상피세포주에서는 신장조직 가운데 proximal tubular 부위에서 생성되는 분화인자인 plasminogen activator 및 gamma-glutamyl transpeptidase 유전자의 발현이 확인되었다. 젓소의 유선상피세포에서는  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 확인되었고, insulin 첨가시 세포의 성장이 촉진됨을 확인하였으며, EGF와 insulin을 함께 처리할 경우 이러한 촉진효과가 향상됨을 확인하였다. 또한 confluent 상태에서 혈청농도를 1/4로 낮추었을때  $\beta$ -casein 유전자의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

3. 불멸화상피세포주에서 human EPO, LIF의 생산을 위한 효율적인 발현벡터 구축과 생리활성단백질 발현효율 검정 및 생리활성 측정 (100% 완료)

본 연구를 통해 확립된 불멸화세포주를 활용하여 human EPO 또는 LIF와 같은 유용 생리활성 단백질을 발현하기 위한 벡터 시스템을 구축하여 항생제를 이

용한 선발을 통해 mRNA 및 protein 수준에서 EPO 및 LIF를 지속적으로 발현하는 재조합 세포주를 선발하였고 이들 재조합 세포주에서 생산된 EPO 및 LIF의 생리활성유무를 검정하였다. 돼지 신장 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 murine renin promoter와 젓소 유선 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 bovine  $\kappa$ -casein promoter를 도입한 단백질 대량 발현 벡터 시스템을 구축한 후, 확립된 각각의 불멸화상피세포주로부터 모델 생리활성 단백질인 EPO와 LIF의 발현효율을 검정한 결과, 우수한 상용 단백질 대량발현 시스템인 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포주와 CMV promoter의 조합에 필적할 만한 높은 단백질 발현효율을 보여 주었으며, 생산된 단백질은 고유의 기능을 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 토대로, 세포의 연속적인 계대배양을 통하여 자발적으로 불멸화를 유도하는 기법과 아울러, SV40LT Ag 및 hTERT의 과발현은 동물유래 상피세포의 효율적인 불멸화기법의 하나임을 확인하였으며, 또한 이들 불멸화된 세포주가 정상세포주와 유사한 특징을 가지고 있는지를 검증함으로써 확립된 불멸화 세포주가 초대 배양세포주의 고유한 특성을 유지하면서 지속적인 증식이 가능한 효율적인 세포모델로 사용될 수 있고, 외래 단백질을 효과적으로 발현할 수 있음을 증명함으로써 본 연구의 최종목표와 각 단계별 목표를 100% 달성하였다고 판단된다.

## 제 2 절 연구개발목표의 달성도

연구과제의 연구개발목표 달성도는 표 4와 같다.

표 4. 연구과제의 연구개발목표 달성도

연구년도	연구개발목표	달성도
1차년도	동물(소, 돼지) 불멸화 상피세포주의 개발을 위한 primary 세포의 분리, 배양기법 확립 및 불멸화 유도를 위한 벡터구축	100%
	1. Swine kidney epithelial cell의 분리, 배양기법 확립	100%
	2. Bovine mammary epithelial cell의 분리, 배양기법 확립	100%
	3. 불멸화유도를 위한 벡터구축	100%
2차년도	불멸화 상피세포주의 개발 및 이들 세포주의 특성규명	100%
	1. Swine kidney epithelial cell의 불멸화유도	100%
	2. Bovine mammary epithelial cell의 불멸화유도	100%
	3. 불멸화된 Swine kidney epithelial cell의 특성규명	100%
	4. 불멸화된 Bovine mammary epithelial cell의 특성규명	100%
3차년도	불멸화 상피세포주에서 생리활성단백질(EPO, LIF) 생산을 위한 효율적인 발현벡터 구축과 생리활성단백질 발현효율 검정 및 생리활성 측정	100%
	1. 생리활성단백질 생산을 위한 Overexpression vector 구축	100%
	2. 생리활성단백질을 생산하는 불멸화상피세포주의 확립	100%
	3. 생산된 생리활성단백질의 생리활성 확인	100%

## 제 3 절 기술발전 기여도

본 연구에서는 돼지 신장상피세포와 젓소 유선상피세포를 분리, 초대배양하여 연속적인 계대배양을 통해 자연적으로 세포의 불멸화 특성을 획득한 세포주의 개발과 함께, 염색체말단(telomere)의 길이를 유지할 수 있는 유전자인 telomerase가 지속적으로 발현할 수 있도록 하거나 세포분열을 지속적으로 촉진할 수 있는 SV40LT Ag과 같은 단백질들의 발현유도를 통해 인위적인 불멸화를 유도한 동물상피세포주를 개발하였다. 또한 유용 생리활성 단백질을 생산할 수 있는 단백질 대량발현 벡터 시스템을 구축하여 확립된 불멸화세포주에 형질전환을 통해 세포주로부터 생리활성단백질인 EPO (Erythropoietin)와 LIF (Leukemia Inhibitory Factor)의 발현을 확인함으로써 불멸화세포주를 이용한 외래 생리활성 단백질의 생산 가능성을 검증하였다.

본 연구를 통해 축적된 동물세포주의 불멸화와 관련한 제반 기술과 자원은 앞으로 이러한 기법을 이용한 보다 다양한 생물종에서의 산업적으로 유용한 불멸화세포주의 개발의 초석이 될 것으로 확신하며, 본 연구의 성공적 결과는 향후 세포배양기법을 통해 생산할 수 있는 유용 단백질의 후보군을 다양화함으로써 동물세포배양산업의 활성화를 위한 기반기술 확충에 기여하였다고 판단된다.

본 연구결과를 통하여 축적된 연구기술발전 분야는 아래와 같다.

### 1. 특정 장기 유래의 상피세포를 이용한 세포불멸화 유도 공정의 확립

본 연구에서는 체내 여타 장기에 비해 단백질 생산기구가 잘 발달된 동물의 신장 및 유선 유래의 상피세포를 분리하여 배양함으로써 유용 생리활성 단백질을 대량생산할 수 있는 숙주세포로 활용 가능한 5종의 불멸화상피세포주를 개발하였다 (돼지신장유래 : SKE-hTERT, SKE-Spon, SKE-SV40LT, 젓소유선유래 : BMGV, BMGVTE). 특히 체세포 가운데서도 배양이 까다로운 상피세포의 culture system 구축과 함께 이들 세포의 자연적 또는 인위적 불멸화 유도 공정 확립은 향후 동물 및 인간의 특정 장기로부터 다양한 세포주의 분리, 배양 및 불멸화 유도를 통한 세포주 확립 연구를 보다 효율적으로 수행할 수 있는 기술적 기반을 마련할 수 있게 하였다. 이는 생리활성물질 생산을 위한 bioreactor로서의 세포주 개발 연구에 중요한 단서를 마련하는 계기이며, 또한 세포의 불멸화에 관여하는 특이적인 세포내 기작을 연구하는 유용한 도구로써 사용될 수 있기 때문에 동일 연구 분야의 연구자들에게 분양함으로써 연구의 synergy를 기대할 수 있다.

## 2. 불멸화 유도에 관여하는 유전자군의 특성에 대한 학술적 지식기반 심화

본 연구에서는 선행연구자들에 의해 세포의 불멸화에 관여하는 것으로 보고된 바 있는 telomerase 및 SV40 바이러스 유래의 특정 항원이 생물종의 다양성과 관계없이 동물세포의 불멸화 유도에 폭넓게 활용될 수 있는 구체적인 증거를 제시함으로써 기존 학설의 일반화와 지식심화에 기여하였다. 한편 본 연구를 통해 구축된 세포불멸화 관련 유전자 발현 벡터 시스템은 본 연구에서 뿐만 아니라 향후 세포의 불멸화가 어떠한 세포 생리적 기작을 통해 유도되는가를 규명하는 연구에 이용될 수 있으며, 또한 세포의 불멸화를 연구하고자 하는 연구자들에게 공급함으로써 다양한 생물종에서의 산업적으로 유용한 불멸화세포주의 개발의 가속화에 기여할 수 있게 하였다.

## 3. 외래 단백질 대량발현 벡터 시스템 구축을 통한 산업화 기반기술 확충

본 연구에서는 돼지 신장 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 murine renin promoter와 젓소 유선 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 bovine  $\beta$ -casein promoter를 도입한 조직 특이적 단백질 대량 발현 벡터 시스템을 구축하였다. 이들 단백질 발현 벡터 시스템은 본 연구를 통해 확립된 불멸화상피세포주를 통해 모델 생리활성 단백질인 EPO와 LIF를 단백질 고유의 생리적 기능을 유지하면서 성공적으로 생산할 수 있는 것으로 밝혀짐으로써 그 효용성이 검증되었다. 향후 본 연구를 통해 구축된 조직 특이적 단백질 발현 벡터 시스템의 프로모터 하부에 다양한 생리활성 단백질 생산 유전자를 적용한다면 유용 단백질의 산업적 대량생산을 위한 효율적인 cell bioreactor 시스템 및 animal bioreactor 시스템 구축의 중요한 토대가 될 것으로 확신한다.

아울러 본 연구를 통해 검증된 특정 조직 특이적으로 작동하는 프로모터 및 유전자를 이용한 효과적인 외래단백질 발현 효율 제고 방안은 세포배양을 통한 유용 단백질 생산과 관련한 후속연구자들의 전략설정에 하나의 합리적인 지표로써 기여할 것으로 생각된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 연구결과 활용계획

본 연구를 통해 개발된 돼지 및 젓소 유래의 불멸화세포주인 1)SKE-hTERT, 2)SKE-Spon, 3)SKE-SV40LT, 4)BMGV, 5)BMGVTE와 조직 특이적 단백질 발현 기작을 보유한 외래 단백질 대량생산 벡터 시스템의 결합은 향후 동물세포주를 bioreactor로 이용하여 다양한 생리활성 외래단백질을 효과적으로 생산할 수 있는 동물세포배양산업의 활성화에 크게 활용될 수 있을 것이다. 이들 산물의 활용분야를 보면 아래와 같다.

#### 1. 불멸화상피세포주의 활용

본 연구를 통해 구축된 불멸화상피세포주 (Swine kidney 유래 및 bovine mammary gland 유래)는 암세포주의 특성을 보이지 않고 정상세포주에 가까운 특성을 나타내면서 무한증식 할 수 있는 장점을 보유하고 있으므로, 현재까지 자연적인 세포의 경우 그 수명의 유한성에 의해 연구에 많은 제약이 있었던 상피세포의 물질운송 기전, 단백질 분비기전 및 신호전달 체계 등, 동물상피세포의 세포 생리적 기작 연구와 상피세포를 숙주로 이용한 외래 단백질 및 백신 생산에 관한 연구 등에 폭 넓게 활용할 수 있다.

#### 2. 불멸화유도기술 및 불멸화유도 벡터의 활용

본 연구를 통해 축적된 동물세포의 불멸화에 관련된 기술 및 본 연구를 통해 구축한 불멸화유도 관련 유전자 생산 벡터 시스템은 향후 다른 생물종 또는 다른 기관 유래의 primary cell을 이용하여 불멸화세포주를 개발하려는 연구에 있어서 중요한 기초자료로써 활용할 수 있다.

#### 3. Human EPO 및 Human LIF 생산을 위한 발현벡터의 활용

본 연구를 통해 구축된 Human EPO 및 Human LIF 생산을 위한 발현벡터 시스템(CMV promoter, Renin promoter,  $\beta$ -casein promoter 등 3종류의 promoter를 각각 사용하여 구축)은 불멸화상피세포주에 도입하여 그 자체로써 고부가가치

생리활성 단백질 약물인 EPO와 LIF의 산업적 대량생산에 직접적으로 활용할 수 있으며, 향 후 벡터 내의 EPO 및 LIF 생산 유전자 위치에 다양한 생리활성 단백질 및 백신으로 활용 가능한 항원 단백질을 대체 삽입하여 생산함으로써 동물 세포배양산업의 핵심인 cell bioreactor의 중추 자원으로 활용할 수 있다.

본 연구를 통해 구축된 불멸화상피세포주 및 외래단백질 대량발현 시스템의 조합을 적용하여 향 후 생산 가능한 단백질 약물 및 백신의 예는 아래 표 5에 정리 하였다.

표 5. 생리활성 단백질 및 백신 생산 숙주로서의 불멸화세포주의 활용계획

적 용	단백질 약물	백신
인체	BCL2-family: 세포자연사멸 조절(항암작용) Calcitonin: 골다공증 치료제 EGF: 상처치료, 조직 재생 치료제 EPO: 조혈작용, 빈혈치료제 Factor VIII, IX: 혈액응고제 FSH/LH: 불임 치료제 G-CSF, GM-CSF: 조혈촉진, 면역력 증가 hGH: 성장촉진, 노화방지 hTPO: 혈소판 생성촉진 IGF-1: 성장촉진 Interleukins: 면역력 활성화 Insulin: 제1형 당뇨병 치료제 Interferons: 백혈병, 항바이러스, 항간염 Lactoferrin: 면역강화, 항생/항균제 TGF: 조직 재생 촉진 TPA: 혈전증, 급성 뇌졸중 치료	Cholera 백신 식중독 예방/치료 백신 ( <i>Vivrio</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> 등) 간염백신 influenza 백신 홍역 백신 소아마비 백신 뇌염 백신 풍진 백신 * 병원체가 virus인 경우 백신으로 virus 또는 특정 단백질 항원 생산, 병원체가 bacteria일 경우 특정 단백질 항원 생산.
경제동물	bST(GH): 젖소 유량증진 FSH/LH: 가축 번식장애 치료제 Prolactin, Oxitocin: 비유 촉진제	PED/TGE 백신 (돼지) 송아지, 어린돼지 설사 관련 바이러스 및 병원균 예방/치료 백신 ( <i>Rota virus</i> , <i>Pavo virus</i> , <i>Corona virus</i> , <i>Enterovirus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Mycobacterium</i> 등) 구제역 백신 부루셀라 백신 조류독감 백신 탄저 백신 결핵 백신 * 병원체가 virus인 경우 백신으로 virus 또는 특정 단백질 항원 생산, 병원체가 bacteria일 경우 특정 단백질 항원 생산.



## 제 2 절 추가 연구의 필요성

본 연구에서는 경제가축인 돼지와 젓소의 특정 장기로부터 유래한 세포를 이용하여 자연적 또는 인위적인 세포불멸화 유도를 통해 불멸화세포주의 개발 가능성 여부를 타진하고 이러한 과정을 통해 개발된 불멸화세포주를 숙주로 이용하여 EPO와 LIF 같은 외래 모델 생리활성 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 제반 기술을 확립하였다. 따라서 이러한 자원과 경험을 바탕으로 향 후 아래와 같은 추가 연구를 실시한다면 기존의 유용 단백질 및 백신생산이 주가 되는 동물세포배양산업의 발달 촉진과 아울러, 경제가축의 생산성 향상에 관련있는 생리기작의 세포수준 연구의 질적인 향상을 도모할 수 있을 것으로 생각된다.

### 1. 불멸화세포주 개발 대상의 확대

본 연구에서는 외래 단백질 생산을 위한 숙주세포로 이용할 목적으로 단백질 생산 기구가 잘 발달되어 있는 것으로 알려진 돼지의 신장과 젓소의 유선조직 유래의 상피세포를 중심으로 불멸화세포주를 개발하였다. 불멸화세포주는 외래단백질의 효율적인 생산숙주로서의 활용 뿐 아니라 체내의 다양한 생리기작 규명과 관련한 세포수준의 연구에 있어서도 중요한 도구로 이용할 수 있으므로, 본 연구에서 확립한 불멸화동물세포주 개발 기술을 응용한 경제가축의 다양한 조직에서 유래하는 불멸화세포주의 확립은 경제가축의 생산성 향상에 관련하는 요인을 분자수준에서 규명할 수 있는 한 차원 높은 자원으로 활용할 수 있다.

가령, 향 후 소의 뇌조직 유래의 불멸화세포를 구축한 후 변형 프리온(prion) 단백질의 영향에 관한 연구를 통해 광우병의 발생기작 등을 연구하는 것 등은 그 좋은 예가 될 수 있을 것이다.

### 2. 외래 단백질 생산을 극대화하기 위한 단백질 발현기작의 연구

본 연구에서는 돼지 신장 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 murine renin promoter와 젓소 유선 상피세포에서 특이적인 단백질 발현을 유도할 수 있는 bovine  $\beta$ -casein promoter를 도입한 조직 특이적 단백질 대량 발현 벡터 시스템을 구축하여 이러한 시스템이 외래 단백질 대량생산에 상용적으로 활용되는 CHO cell 시스템에 근접하는 단백질 생산능력을 보유하고 있는 것을 보여 주었다. 그러나 정상적인 세포에 있어서 외래 단백질을 인위적으로 생산하도록 유도하는 것은 극심한 스트레스를 유발하는 과정임을 간과해서는 안될

것이다. 따라서 동물세포를 숙주로 외래 단백질을 효율적으로 대량생산하기 위해서는 세포의 단백질 생산과 분비 기작에 대한 정확한 이해를 통해 외래 단백질 생산이 배양세포에 미칠 수 있는 악영향을 최소화 할 수 있는 연구가 반드시 병행되어야 한다. 조건적 단백질 발현 유도 시스템 (inducible protein expression system), ER 스트레스 기전과 같은 단백질 생산시 세포 소기관에서의 프로세싱 과정에 대한 심층적 연구 등이 그 한 예가 될 수 있을 것이다.

### 3. 효율적인 외래 유전자 도입 기술 개발에 관한 연구

동물세포를 통해 외래 단백질을 효율적으로 발현하기 위해서는 우선 외래 단백질을 생산하는 벡터 시스템이 세포 내에 효과적으로 도입되는 것이 필수 전제 조건이다. 동물세포를 생산숙주로 하는 cell bioreactor 시스템이 상용화 되기 위해서는 large size protein의 세포발현 효율을 높이기 위한 효과적인 유전자 도입 기법 (gene delivery method)의 개발과 함께 세포 내로 유입된 벡터 시스템이 안정적으로 세포핵 내에 정착할 수 있는 효과적인 유전자 적중 (gene targeting) 시스템에 대한 추가연구가 있어야 할 것으로 판단된다.

### 4. 경제가축 유래의 유전자 및 단백질 자원의 데이터 베이스 구축

본 연구를 수행하는데 가장 큰 난관 중 하나는 결과를 대조하고 분석하는데 활용할 수 있는 경제가축 유래의 유전자 및 단백질 자원의 데이터 베이스가 미비하다는 점이었다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 향후 경제가축 유래의 유전자 및 단백질의 체계적인 데이터 베이스의 구축과, 생리현상 규명을 위한 다양한 분자 자원의 확보 및 기술 확충이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생물의약품의 여러 가지 생산기술 가운데 하나인 동물세포 산업화기술(animal cell biotechnology)은 유전자가 조작된 인간 및 동물세포를 대량으로 배양하여 고부가가치의 생물산업 제품 특히 생물의약품을 생산하거나 각종 생리활성 물질 또는 의약품의 발견 및 개발에 주로 활용되는 기술로서 최근에는 유전자 및 세포치료의 개발로 인해 산업화 기술로서의 중요성이 더욱 증대되고 있다. 이들 분야의 본 연구와의 관련 최근 연구 동향을 보면 아래와 같다.

1. 불멸화 세포주를 구축하는 기술은 자발적인 불멸화(spontaneous immortalization)와 불멸화 관련 유전자(hTERT, SV40LT, HPV16 E6/E7, Ad5 E1a, E2a등)를 도입하는 방법들이 사용되고 있다. 자발적인 불멸화는 Hayflick등이 세포를 지속적으로 계대배양하면서 일부세포들이 senescent를 넘으며 자발적으로 지속적인 분열을 하는 현상을 발견하면서 도입한 방법이다. hTERT유전자를 도입하는 방법은 Bodnar등이 처음으로 사용한 방법으로 telomere의 shortening을 방어하면서 불멸화를 유도하는 방법이다. 또한 SV40LT, HPV16 E6/E7, Ad5 E1a/E2a등과 같은 암 virus유래의 단백질을 사용하는 방법은 최근에도 세포의 불멸화를 유도하는데 사용되고 있다(Jin등, 2006).

2. Expression vector는 대부분 강력한 viral promoter나 cellular promoter/enhancer를 이용한다. 대부분의 expression vector는 효율적인 발현을 위해 promoter와 cDNA coding sequence 사이에 적어도 하나의 intron sequence를 집어넣는 경우가 많다 (Le Hir등, 2004). 동물세포에서 외래유전자를 발현시키고자 할 때, 많은 경우에 인접한 condensed chromatin에 의한 영향으로 silencing이 일어나는 경우가 많은데 (position effect), 이러한 position effect의 부정적인 영향을 극복하기 위해 scaffold/matrix attachment region, ubiquitous chromatin elements, conserve antirepressor elements등의 cis-regulatory element를 사용하는 전략이 활발히 연구되고 있으며 (Girod등, 2003; Antoniou등, 2003; Kwaks등, 2003), 또다른 방법으로 histone deacetylation을 차단시키기 위한 butyrate를 사용하는 방법등이 보고되었다.

3. 현재 생명과학기술의 발달로 여러 가지 단백질약물들의 개발이 현실화 되었고, 이런 단백질 약물의 시장이 산업화 되고 있다. 1995년 미국의 Technology catalysts사의 전망에 의하면 단백질의약품 시장규모는 2000년 70~210억 달러, 2010년 390~1,579억 달러에 달할 것으로 추정했다. 구체적인 예를 들면 2002년도 세계 insulin 시장규모는 45억 달러이며, GH의 세계 시장규모 16.8억 달러이며 단백질 계열의 항암제 시장규모는 130억 달러다. 또 소의 GH인 bST는 2004년 기준으로 세계시장규모가 4~5억달러이며 시장규모가 지속적으로 상승하는 추세이다. 면역조절제 시장규모는 매년 13% 이상 고속성장하고 있으며 TPA, G-CSF, 혈액응고인자(Factor VIII, Factor IX), EPO와 같은 혈액 유래 세포조절 단백질군의 세계 시장규모는 약 70억 달러(2000년)에 달하며 대부분 2000년대 중반 특허기한 만료로 인해 향후 후발주자에 의한 제너릭(generic)시장 경쟁이 치열해질 것으로 전망된다. 노인인구의 증가로 인한 심혈관계 질환 치료제의 수요는 해마다 급증하여 2005년 세계 시장규모가 760억 달러에 달한다. 이외에 해마다 15억명 이상의 사람이 감염되는 *Vivrio*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E.coli* 등에 대한 백신개발과 어린이축의 폐사를 일으키는 *Rota virus*, *Pavo virus*, *Corona virus*, *Entero virus*, *Salmonella*, *E.coli*, *Clostridium*, *Mycobacterium* 등에 대한 백신생산이 시급하다. 따라서 이들과 관련된 동물세포산업화기술의 중요성은 더더욱 증대되고 있다.

4. 한편, 동물세포배양에서 세포배양용 배지의 원가가 너무 높다. 이러한 고가의 원가를 낮추는 방안으로 무혈청 배지를 활용한 동물세포의 현탁 배양공정이 시도 되고 있지만 현재까지 성공한 바는 없다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 앞으로 여러 가지 발암 유전자를 도입하여 배지중의 성장인자와 세포와 세포 및 matrix에 대한 의존도를 낮추면서 세포의 성장을 유도할 수 있는 방법들이 시도 되고 있다. 예를 들면 BCL-2와 같은 세포사멸 억제 유전자를 도입하여 현탁 배양을 유도하는 방법이 실시되고 있다(Arden등, 2004).

5. 미국의 경우, 동물세포배양 시장은 제약사나 벤처사들이 자체적인 설비투자를 늘리기보다는 계약 생산방식을 통하여 목적 산물을 생산하고 있으며, 전임상이나 임상시료를 제조할 때부터 산업시장이 형성되고 있다. 이것은 새로운 시설이나 인건비 등에 대한 투자보다는 계약생산시 제품의 경제적 생산에 대한 것뿐만 아니라 이미 cGMP 및 FDA 규정에 맞도록 허가된 시설을 이용함으로써 신뢰도를 높이는 이점이 있어 이런 계약생산 방식이 빠른 증가를 하고 있다. 실제로 최근 25~30개의 계약 연구·생산기업들(contract firms)이 동물세포배양 배지를 이용

해 상당한 양의 생물공정을 수행하고 있다.

6. 동물세포 유래의 의약품 개발시 공정개발 단계별로 고려해야 할 중요한 기술적 사안들을 보면 다음과 같다.

1) 동물세포배양 공정체계의 구축

- (1) 숙주 세포주 선정과 생산용 세포주 선발 및 적용은 큰 영향을 주는 사안이므로 신중히 선택해야한다.
- (2) 배양 및 정제공정의 선정은 제품의 품질과 생산성 측면에서 그 접근을 시도하여야 한다.
- (3) 경제적 가치를 중심으로 한 시장규모를 파악하고 향후 10년 이상의 시장 점유율을 예상하고, 이에 따른 생산규모를 선정하여 이를 통해 pilot plant 실험단계에서의 세포주의 생산성을 근거로 하여 배양방법 및 규모를 결정한다.
- (4) IND(임상 시험 허가)의 준비때 까지 확립된 제조 공정에 대해 전 과정이 문서화되어 있어야 한다.

2) 공정개발 단계의 품질보증 업무의 중요성

의약품 생산을 위한 공정개발의 경우 최종적으로 GMP 체제하에서 제품생산을 목표로 한다. 그러므로 공정개발 단계에서부터 GMP 규정에 따른 각종 제조관련 문서의 확립, 기록, 보관 및 보증 업무가 필요하다.

3) 기술제휴를 활용한 개발 효율성의 극대화

생물의약품, 특히 동물세포를 이용한 의약품 개발은 다른 신약들에 비해 많은 개발비용과 설비투자비용을 요구하고, 개발기간도 비교적 장기적이므로 개발 관련 위험 부담이 매우 큰 단점이 있다. 생물산업의 선진국인 미국의 경우 생물의약 발전의 역사는 바로 자본과 기술력을 내세운 기업간의 M&A 또는 기술제휴 역사로 설명되고 있다. 그만큼 최근 10여 년간 이러한 제도를 적절히 활용하여 개발관련 위험 부담을 최소화하고, 제품마다 세계 최고 기술을 반영함으로써 고품질, 저생산비의 우수한 신약 개발을 가속화시켜 오고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

Antoniou M, Harland L, Mustoe T, Williams S, Holdstock J, Yague E, Mulcahy T, Griffiths M, Edwards S, Ioannou PA, Mountain A, Crombie R. 2003. Transgene encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and H NRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing. *Genomics*. 82:269–279.

Arden N, Betenbaugh MJ. 2004. Cell Engineering blocks stress and improves biotherapeutic production. *Bioprocessing* 3:23-28

Baumrucker CR, and Stemberger BH. 1989. Insulin and insulin-like growth factor-I stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue in vitro. *J. Anim. Sci.* 67:3503–3514.

Beamer PD, and Simon J. 1983. Mammary carcinoma in a cow. *Vet. Pathol.* 20:509– 510.

Ben Porath I, and Weinberg RA. 2004. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* 113:8 - 13.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279:349 - 352.

Broccoli D, Young JW and de Lange T. 1995. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9082 - 9086.

Choi CS, Murtaugh MP, Molitor TW. 1990. Establishment of transformed swine fibroblast cell lines using SV40 large T antigen. *Arch. Virol.* 115:227–237.

Collier RJ, Bauman DE, and Hays RL. 1977. Lactogenesis in explant cultures of mammary tissue from pregnant cows. *Endocrinology*. 100:1192–1200.

Coursen JD, Bennett WP, Gollahon L, Shay JW, and Harris CC. 1997. Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp. Cell Res.* 235:245 - 253.

Cuisset L, Tichonicky L, and Delpech MA. 1998. Protein phosphatase is involved in the inhibition of histone diacetylation by sodium butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 246:760–764.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 : 9363–9367.

Fradiani PA, Ascenzioni F, Lavitrano M, Donini P. 2004. Telomeres and telomerase activity in pig tissues. *Biochimie.* 86:7–12.

Gaush CR, Hard WL, Smith TF. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp. Biol. Med.* 122:931–935.

Gertler A, Weil A, and Cohen N. 1982. Hormonal control of casein synthesis in organ culture of the bovine lactating mammary gland. *J. Dairy Res.* 49:387 – 398.

Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Rossiello MR, Colucci M, Semeraro N, Grandaliano G, Schena FP, Ursi M, Cerullo G. 1999. Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 56:461–470.

Girod PA, and Mermod, N. 2003. Use of scaffold/matrix-attachment regions for protein production. In *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells.* (ed. Makrides, S.C.) 359–379 (Elsevier Science BV, Amsterdam).

Govorkova EA, Murti G, Meignier B, de Taisne C, Webster RG. 1996. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol.* 70:5519–5524.

Greenberg RA, Chin L, Femino A, Lee KH, Gottlieb GJ, Singer RH, Greider CW, DePinho RA. 1999. Short dysfunctional telomeres impair umorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell.* 97:515–525.

Gstraunthaler G, Steinmassl D, Pfaller W. 1990. Renal cell cultures: a tool for studying tubular function and nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* 53:1–7.

Gstraunthaler GJ. 1988. Epithelial cells in tissue culture. *Ren. Physiol. Biochem.* 11:1–42.

Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25:585–621.

Howlett AR, and Bissell MJ. 1993. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epith. Cell Biol.* 2:79–89.

Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. 1976. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro.* 12:670–677.

Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, Clark SJ, Reddel RR. 1998. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer. Res.* 58:3508 - 3512.

Huynh HT, Robitaille G, and Turner JD. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) and in vitro model for bovine lactation. *Exp. Cell. Res.* 197:191–199

Jin X, Lee J, Kwak S, Lee S, Jung J, Kim T, Xu C, Hong Z, Li Z, Kim S,



Pian X, Lee D, Yoon J, You S, Choi Y, and Kim H. 2006. Establishment and characterization of Three Immortal Bovine Muscular Epithelial Cell Lines. *Mol. Cells.* 21:29-33.

Jung JC, Lee SM, Kadakia N, and Taub M. 1992. Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium. *J. Cell. Physiol.* 150:243 - 250.

Kim H, Farris J, Christman SA, Kong BW, Foster LK, O'Grady SM, Foster DN. 2002. Events in the immortalizing process of primary human mammary epithelial cells by the catalytic subunit of human telomerase. *Biochem J.* 365:765-772.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, and Shay JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266:2011 - 2015.

Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M. 2001. Differences in intracellular sites of action of Adriamycin in neoplastic and normal differentiated cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47:51-56.

Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 396:84 - 88.

Kwaks TH, Barnett P, Hemrika W, Siersma T, Sewalt RG, Satijn DP, Brons JF, van Blokland R, Kwakman P, Kruckeberg AL, Kelder A, Otte AP. 2003. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 21:553-558.

Le Hir H, Nott A, Moore MJ. 2004. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochem. Sci.* 28:215-220.

Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. 1998.

Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* 12:3008 - 3019.

Loumaye E. 1998. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *Hum. Reprod. Update* 4:862–881.

Makrides SC. 1999. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr. Purif.* 17:183–202.

Mutskov V, and Felsenfeld G. 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine. *EMBO J.* 23:138–149.

Nandi S, Guzman RC, and Yang J. 1995. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:3650–3657.

Naruse G, Yoo SK, Kim SM, Choi YJ, Lee HM, and Jin DI. 2005. Analysis of tissue-specific expression human type II collagen cDNA driven by different size of upstream region of  $\beta$ -casein promoter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* In press.

Pan L, Jones CA, Glenn ST, Gross KW. 2004. Identification of a novel region in the proximal promoter of the mouse renin gene critical for expression. *Am J Physiol. Renal. Physiol.* 286:1107–1115.

Ringold G, Dieckmann B, and Lee F. 1981. Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the *Escherichia coli* XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:165–175.

Rozen S, and Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386

Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. 2001. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. *J Virol.* 75:9517–9525.

Smogorzewska A, and de Lange T. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21:4338 - 4348.

Stampfer MR, Garbe J, Nijjar T, Wigington D, Swisshelm K, Yaswen P. 2003. Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines. *Oncogene.* 22:5238–5251.

Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O'Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. 2003. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat. Genet.* 33:492 - 496.

Todaro GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 17:299–313

Van Steensel B, Smogorzewska A, and de Lange T. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 92:401 - 413.

Wang J, Feng H, Huang XQ, Xiang H, Mao YW, Liu JP, Yan Q, Liu WB, Liu Y, Deng M, Gong L, Sun S, Luo C, Liu SJ, Zhang XJ, Liu Y, Li DW. 2005. Human telomerase reverse transcriptase immortalizes bovine lens epithelial cells and suppresses differentiation through regulation of the ERK signaling pathway. *J Biol Chem.* 280:22776–22787.

You S, Moon JH, Kim TK, Kim SC, Kim JW, Yoon DH, Kwak S, Hong KC, Choi YJ, Kim H. 2004. Cellular characteristics of primary and immortal canine embryonic fibroblast cells. *Exp. Mol. Med.* 36:325–335.

Zahn-Zabal M, Kobr M, Girod PA, Imhof M, Chatellard P, de Jesus M, Wurm

F, Mermod N. 2001. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.* 87:29-42.

Zavizion B, van Duffelen M, Schaeffer W, and Politis I. 1996. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* 32:138-148

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12:2424-2433.