

최 중  
연구보고서

돼지 생식선줄기세포를 이용한  
이종간 장기이식 모델의 개발

Development of Xenotransplantation Model  
Using Porcine Embryonic Germ Cells

연구기관  
단국대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 생식선줄기세포를 이용한 이종간 장기이식 모델의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4월 24일

주관연구기관명 : 단국대학교

총괄연구책임자 : 심 호 섭

세부연구책임자 : 심 호 섭

연 구 원 : 강 지 현

연 구 원 : 원 지 영

연 구 원 : 허 순 영

연 구 원 : 천 미 색

협동연구기관명 : 포천중문의과대학교

협동연구책임자 : 최 성 준

연 구 원 : 나 득 채

연 구 원 : 김 세 희

연 구 원 : 황 현 진

# 요 약 문

## I. 제 목

돼지 생식선줄기세포를 이용한 이종간 장기이식 모델의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지의 생식선줄기세포를 이용한 이종간 장기이식 모델을 구축하여 체외배양에 의해 이종간 장기이식의 효용성을 세포차원에서 미리 검증하고, 검증된 형질전환 세포를 이용한 핵이식을 통하여 형질전환 수정란을 생산함으로써 이종간 장기이식용 형질전환 돼지의 생산 및 이를 이용한 이종간 장기이식의 실현을 획기적으로 앞당길 수 있을 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

돼지 생식선줄기세포의 핵이식을 통하여 복제의 효율성을 향상시키고, 이종간 장기이식관련 외래유전자가 도입된 돼지의 생식선줄기세포를 분화시킨 다음 초급성 면역 거부반응을 일으키는 인간 항체 및 보체와의 반응을 통하여 이종간 장기이식의 모델을 개발한다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

돼지 생식선줄기세포의 형질전환 및 체외분화를 통하여 이종간 장기이식의 체외모형을 구축하였다. 인간 보체억제인자인 hCD46 및 hCD59 유전자를 도입하여 형질전환이 유도된 돼지 생식선줄기세포의 체외분화 전후에 보체매개 세포용해를 통하여 이종간 장기이식의 효용성을 검증하였다. 이와 같은 체외모형을 이용하여 장차 생산된 형질전환 복제돼지가 이종간 장기이식에 어느 정도 효과적으로 사용될 수 있는지 여부를 예측할 수 있었다. 다음으로 hCD46 및 hCD59 형질전환 돼지 생식선줄기세포를 이용하여 핵이식을 실시한 후 복제수정란의 생산효율과 외래유전자의 도입여부를 확인하여 장차 이종간 장기이식에 효과적으로 이용될 수 있는 형질전환 복제돼지를 생산할 수 있는 기반을 마련하였다. 본 연구에서 얻어진 결과는 비단 hCD46 및 hCD59 뿐만 아니라 이종간 장기이식과 관련된 다양한 유전자를 생식선줄기세포를 이용한 체외모형을 통하여 검증하고 향후 이종간 장기이식의 기초연구 및 형질전환 복제돼지의 생산효율을 향상시키는 데 크게 기여할 것이다.

## SUMMARY

Pigs are considered the most likely source of organs for xenotransplantation due to their anatomical and physiological similarities to humans. Production of transgenic pigs including addition of human complement-regulatory protein genes and deletion of alpha-1,3-galactosyl transferase gene may overcome hyperacute rejection (HAR), the first and currently the most critical immunological hurdle in the development of xenogeneic organs for human transplantation. However, even after resolving HAR in pig-to-human xenotransplantation, a series of other transgenic pigs may be required to alleviate subsequent acute and chronic rejection and incompatibility of porcine proteins to human counterparts. Not only the production of transgenic pigs is labor-intensive, time-consuming and costly but also usefulness of such pigs in transplantation to humans is unpredictable. For these reasons development of reliable in vitro procedure to pre-evaluate effectiveness of transgenic approach would be beneficial. This study was performed to establish an in vitro model of xenotransplantation using porcine embryonic germ (EG) cells, undifferentiated stem cells derived from culture of primordial germ cells. Human complement regulatory protein hCD46 (also known as MCP, membrane cofactor protein) and hCD59 gene under the regulation of cytomegalovirus promoter were separately introduced into porcine EG cells. Transfected cells were selected by antibiotic treatment and confirmed by PCR. To test the resistance of transgenic EG cells to human xenoreactive natural antibody and complement, both transfected and non-transfected EG cells were cultured in medium containing normal human serum. The treatment of human serum did not affect the survival of transgenic EG cells, whereas with the same treatment approximately one half of non-transfected EG cells failed to survive. Transgenic EG cells presumably capable of alleviating HAR were used as nuclear donor for subsequent transfer of nucleus into enucleated porcine oocyte. In vitro development of clone embryos derived from EG cell nuclear transfer was comparable to that from somatic cell nuclear transfer. Analysis of individual nuclear transfer embryos by PCR indicated that over 80% of embryos contained transgene hCD46 and hCD59. The PCR-negative embryos might be due to an incomplete antibiotic selection of cells after transfection. Overall, the results of present study demonstrate that the cell culture-based model of xenotransplantation may secure the usefulness of particular transgenic pigs prior to actual production. Further experiments on differentiation of transgenic EG cells into various cell types, cytolytic analysis of such cells to assess efficiency of xenotransplantation and subsequent production and transfer of transgenic clone embryos to recipients may provide a useful new procedure to accelerate xenotransplantation research.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	7
Section 1. Objectives .....	7
Section 2. Rationale .....	7
1. Technical aspect .....	7
2. Economical and industrial aspect .....	9
3. Social and cultural aspect .....	10
Section 3. Contents and scopes .....	11
Chapter 2. Status of technology .....	12
Section 1. Transgenic animals .....	12
Section 2. Somatic cell nuclear transfer .....	13
Chapter 3. Experimental results and discussion .....	15
Section 1. Experimental methods .....	15
Section 2. Experimental scheme .....	16
Section 3. Experimental results .....	16
1. Transgenesis of porcine embryonic germ cells .....	16
2. In vitro differentiation of porcine embryonic germ cells .....	18
3. Analysis of hyperacute rejection by complement-mediated cytolysis .....	20
4. Production of transgenic clone embryos .....	22
5. Epigenetic analysis of embryonic germ cell nuclear transfer embryos .....	24
Chapter 4. Achievements and contributions .....	27
Section 1. Research objectives and points of evaluation .....	27
Section 2. Achievements and contributions .....	28
1. Achievements .....	28
2. Publications .....	29
3. Contributions to related fields .....	30

Chapter 5. Applications of experimental results .....	31
Section 1. Applicable areas .....	31
Section 2. Types and plans of applications .....	31
Chapter 6. References .....	32

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	7
제 1 절 연구개발의 목적 .....	7
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	7
1. 기술적 측면 .....	7
2. 경제·산업적 측면 .....	9
3. 사회·문화적 측면 .....	10
제 3 절 연구개발의 범위 .....	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	12
제 1 절 형질전환동물 .....	12
제 2 절 체세포복제 .....	13
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	15
제 1 절 연구방법 .....	15
제 2 절 연구내용 .....	16
제 3 절 연구결과 .....	16
1. 돼지 생식선줄기세포의 형질전환 .....	16
2. 돼지 생식선줄기세포의 체외분화 .....	18
3. 보체매개 세포용해에 의한 초급성면역거부반응의 측정 .....	20
4. 형질전환 복제수정란의 생산 .....	22
5. 생식선줄기세포 복제수정란의 후성유전학적 분석 .....	24
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	27
제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점 .....	27
제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	28
1. 목표달성도 .....	28
2. 연구실적 .....	29
3. 관련분야에의 기여도 .....	30

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	31
제 1 절 활용분야 .....	31
제 2 절 활용유형 및 활용방안 .....	31
제 6 장 참고문헌 .....	32



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

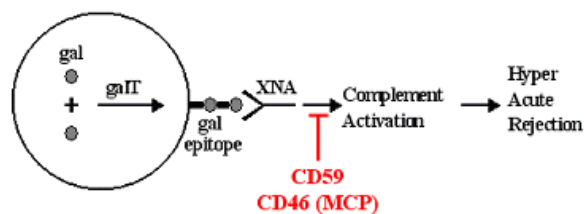
## 제 1 절 연구개발의 목적

돼지 생식선줄기세포의 핵이식을 통하여 복제의 효율성을 향상시키고, 이식관련 외래유전자가 도입된 돼지의 줄기세포를 분화시킨 다음 초급성 면역거부반응을 일으키는 인간 항체 및 보체와의 반응을 통하여 이종간 장기이식의 모델을 개발한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

현재 이종장기이식에 대한 연구는 대다수가 돼지-인간 모델(pig-to-human xenotransplantation)에 집중되어 있다. 그 이유로는 돼지의 장기가 크기 및 생리에 있어서 인간과 유사하고 그간 연구되어 왔던 원숭이의 장기와 달리 가축화가 된지 이천년이 경과하는 동안에 인간으로 전염되는 질병이 발견되지 않은 점, 또 무균상태에서 돼지의 사육이 가능한 점, 돼지가 다산성이며 가격이 저렴한 점 등을 들 수 있다. 돼지의 장기를 인간에 이식하였을 때 가장 큰 난점으로는 초급성거부반응(hyperacute rejection, HAR)이 지적되고 있는데, 이는 돼지 세포의 표면에 있는 항원인 galactose-alpha 1,3-galactose(gal epitope)를 인간혈액 중의 xenoreactive natural antibody(XNA)가 인식하기 때문이다. Gal epitope과 결합한 XNA는 보체(complement)를 활성화 시키며 이로 인하여 초급성거부반응이 일어나 이식한 장기가 사멸하게 된다. 그림에서 보는 바와 같이 돼지에서 gal epitope를 형성시키는 효소는 alpha-1,3-galactosyl transferase(galT)로 알려져 있다.



동물장기 이식 시 거부반응의 약 80%를 점하고 있는 것으로 생각되는 초급성거부반응을 억제하기 위하여 형질전환동물 생산기술을 응용하여 이를 극복하는 방법은 현재 까지 크게 세 가지로 대별할 수 있다.

#### ○보체불활성화

인간에 있어서 보체의 활성화를 억제시키는 단백질(complement downregulators)인 hCD46, hCD59, decay accelerating factor(DAF) 등의 형질전환 돼지를 생산하여 장기를 이식하였을 때 이식된 장기로부터 보체억제인자가 발현되어 초급성거부반응을 방

지하려는 시도가 이루어지고 있다. 대표적인 예로는 BresaGen(Australia)의 hCD46, hCD59 형질전환돼지 및 Nextran(USA)의 DAF 형질전환 돼지를 들 수 있다. 이들 형질전환돼지는 이미 초기 임상실험 단계에 진입한 것으로 알려지고 있다.

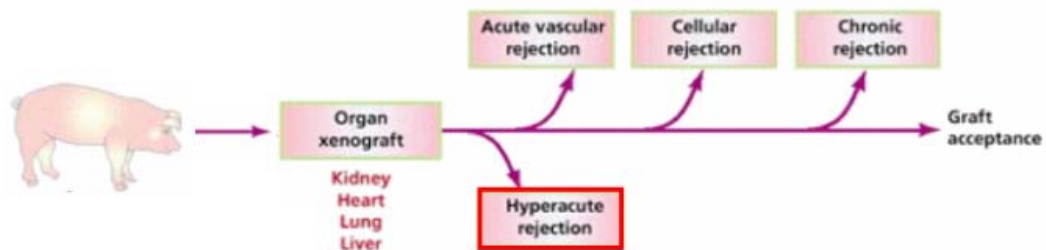
○ 경쟁반응효소

Gal epitope을 만드는 효소인 galT와 같은 기질(substrate)을 놓고 경쟁하는 효소를 발현시켜 gal epitope의 형성을 억제하는 방법이다. 이러한 효소로는 fucosyl transferase(일명 H-transferase, HT) 및  $\alpha$ -galactosidase 등이 있다. 예로는 Sandrin 등(Nat Med 1:1261-1267, 1995)의 보고 및 BresaGen의 HT 형질전환 돼지가 있다.

○ GalT 유전자적중

GalT를 발현시키는 유전자를 삭제하여 gal epitope를 제거하는 방법으로 배아간세포(embryonic stem cell)를 이용하거나 체세포 핵이식(somatic cell nuclear transfer)기술을 이용하여 galT의 유전자적중(gene targeting)을 한다. 배아줄기세포를 이용하여 galT를 발현하지 않는 유전자적중 생쥐가 이미 생산된 바 있으며(Thall 등, J Biol Chem. 270:21437-21440, 1995; Tearle 등, Transplantation, 61:13-19, 1996) 돼지에서도 체세포핵이식기술에 의하여 galT 유전자적중 pig이 생산되었다(PPL Therapeutics 및 Univ. of Missouri). 그밖에 recA 등 재조합효소를 이용하여 전핵내 주입(pronucleus microinjection)에 의한 유전자재조합촉진(enhanced homologous recombination, EHR)에 의해 galT KO pig을 생산하려는 시도도 이루어지고 있다(Anderson and Murray group, UC Davis 및 Pangene Corporation).

국내에서 이종장기이식에 관한 연구는 시작단계이지만 이미 복제 및 형질전환 돼지의 생산이 보고된 바 있어 상당한 수준의 기술력을 갖추고 있는 것으로 평가되고 있다. 그러나 이종간 장기이식에 관한 연구는 그림에서 보는 바와 같이 현재 초급성거부반응을 해결할 수 있는 가능성을 제시하는 정도로, 이제 시작단계에 와 있으며 이러한 연구가 실제적으로 응용되기 위해서는 앞으로 해결하여야 할 더욱 많은 난제를 안고 있다.



이종간 장기이식에 있어서 각 단계별 장애와 해결방안을 아래에 제시하였다.

○ 면역학적 장애

장애의 종류	주요 특성	해결책
초급성 면역 거부반응 (hyperacute rejection)	Xenoreactive natural antibody (XNA, T-cell independent) 또는 non-Gal antibody에 의한 보체활성화	GalT 유전자적중 돼지 및 보체 억제인자 형질전환 돼지의 생산
체액성 급성 면역 거부반응 (acute humoral xenograft rejection)	보체와 무관하게 XNA 또는 항원에 의하여 유발된 항체(T-cell dependent)에 의한 거부 반응	면역억제제
세포성 급성 면역 거부반응 (acute cellular xenograft rejection)	T-cell에 의하여 매개된 거부반응	면역억제제
혈관장애 (vasculopathy)로 인한 만성 거부반응	기전 불명	연구 중

○ 미생물학적 장애

장애의 종류	주요 특성	해결책
병원체의 전이 (microbial transmission)	장기공여 돼지로부터 bacteria 및 virus(CMV, PERV 등)의 감염가능성	근교계 miniature pig 및 무균돼지의 이용 및 조기 이유 (weaning)

○ 생리학적 장애

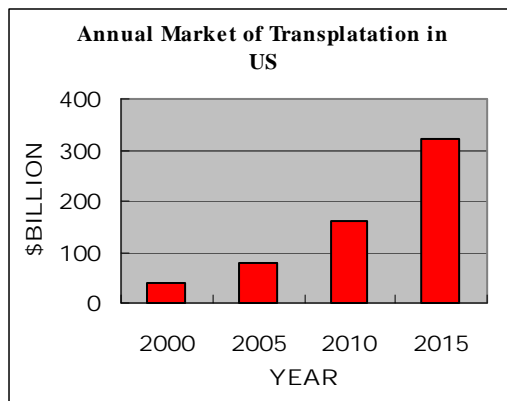
장애의 종류	주요 특성	해결책
기능성 물질의 불일치	인간과 돼지의 기능성물질 (tissue factor, thrombin 등)의 불일치	인간 tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin 형질전환 돼지의 생산

위와 같은 장애를 고려할 때 동물장기이식을 위하여 한 가지 형질전환 동물의 생산이 아닌, galT 유전자적중, 인간 보체억제인자(hDAF, hCD46, hCD59 등), tissue factor-pathway inhibitor, thrombomodulin 등 다양한 형질전환 돼지의 생산 및 육종, 번식이 필수적일 것으로 예상된다. 그러나 여러 종의 형질전환 돼지를 생산, 유지하고 그 유용성을 검증하는 것은 시간 및 비용 측면에서 대단히 비효율적이다. 이에 대한 대안으로 돼지의 줄기세포를 이용한 이종간 장기이식 모델을 구축하여 세포차원에서 이종간 장기이식의 효용성을 미리 검증하고, 검증된 형질전환 세포를 이용한 핵이식을 통하여 형질전환 수정란을 생산한다면 이종간 장기이식의 실현을 획기적으로 앞당길 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

미국에서만 한해 장기이식을 기다리는 환자는 약 6만 5천명으로 추산되며 이 숫자는

장기기증의 부족으로 매년 증가하고 있다(Nature Medicine 3:978, 1997). 그러나 장기의 기증은 연 4천 건 정도에 불과하고 장기이식을 받는다 하더라도 평균 5년 정도를 기다려야 하기 때문에 이 기간 동안 환자의 상태는 사망 또는 악화에 이르게 된다. 우리나라의 경우도 매년 만 명 이상이 장기이식을 기다리고 있는 것으로 추산되고 있다. 이종장기분야의 미국 시장 규모는 2002년 약 42억 달러에서 2007년 약 53억 달러로 전망되며 면역거부반응 등의 문제가 해결된다면 향후 10년 이내 심장 및 신장, 폐 등의 장기를 이식하는 "인간 장기이식 시대" 도래할 것이다. 현재 장기이식을 필요로 하는 환자를 고려해 볼 때 향후 10년 이내 시장규모는 연간 760억 달러로 전망되고 있으며(과학기술부 지정 생명공학정책연구센터 형질전환동물 및 이종장기 기술동향보고서, 2005). 이종간 장기이식이 가능하게 될 경우, 국내는 연 최소 6000억원, 국외는 연 30-40억 달러의 대체효과를 가져올 수 있다(생명·의료기술개발 동향 pp 423, 과학기술정책관리연구소 1998). 장기이식분야의 성장이 연 10-15%에 이르는 현재의 증가추세를 증가를 감안할 때 2015년에 국내에는 연간 약 4조 5000억 원, 국외는 연 320억 달러의 수요가 예상된다.



### 3. 사회·문화적 측면

최근 장기이식기술의 발달은 지금까지 치료가 불가능하였던 여러 질병에 있어서 근원적인 해결책을 제시하고 있다. 그러나 이식용 장기의 공급부족은 치료에 있어서의 어려움뿐만 아니라 장기밀매, 후진국으로부터 장기의 유입 등 사회·문화적인 문제로까지 확대되고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위해 생명공학기술을 이용하여 이식용 장기를 생산하는, 인공장기 (artificial organs), 줄기세포치료(stem cell therapy), 이종장기이식(xenotransplantation) 등 다양한 방법들이 제시되고 있다. 그러나 신기술을 이용한 이식용 장기의 생산에 있어서 가장 큰 난점의 하나는 환자에게 이식하였을 때의 거부반응을 최소화하는 문제이다. 이종장기이식은 장기의 생산범위가 넓은 반면, 이식시의 거부반응을 해결하여야 하는 단점이 있다. 그러나 최근 형질전환동물 생산기술의 발달과 더불어 체세포 복제 등의 방법을 이용하여 동물의 장기에 특이적으로 존재하는 항원을 제거하여 거부반응이 없는 장기를 동물에서 무한정 공급받을 수 있을 것으로 예상되고 있다.

### 제 3 절 연구개발의 범위

#### 1) 돼지 생식선줄기세포의 형질전환

- 돼지 생식선줄기세포주의 수립
- 보체억제인자 hCD46, hCD59 유전자의 도입

#### 2) 형질전환 줄기세포의 체외분화

- hCD46, hCD59 형질전환 줄기세포의 신경세포로의 체외분화

#### 3) 보체매개 세포용해

- 인간 항체와 보체를 이용한 hCD46, hCD59 형질전환 줄기세포의 세포용해

#### 4) 형질전환 줄기세포의 핵이식

- hCD46, hCD59 형질전환 줄기세포의 핵이식에 의한 형질전환 복제수정란의 생산

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

이종간 장기이식이 실현되기 위해서는 galT 유전자적중, 인간 보체억제인자(hDAF, hCD46, hCD59 등), tissue factor-pathway inhibitor, thrombomodulin 등 다양한 형질 전환 돼지의 생산 및 육종, 번식이 필수적일 것으로 예상되며 이를 해결하기 위하여 형질전환 복제돼지의 효율성을 높일 수 있는 기반기술을 아래에 열거하였다.

- 형질전환 동물생산 기술
- 체세포 복제 동물 생산기술
- 고효율 유전자 재조합 기술
- 이종장기 생산 및 이용기술
- 단백질 분리 및 정제 기술
- 유전자 변형 생물체 안전성 검증 기술
- 무균돼지 생산시스템
- 바이오장기생산동물 관리기술
- 형질전환 복제동물 생산효율증진 기술

이종장기이식에 관한 연구는 많은 인력과 비용이 소요되며 다양한 각도에서 접근이 필요한 분야이다. 기존 연구에서 다양하게 얻어진 연구결과를 통합하고 또한 그로부터 새로운 연구방법을 도출해 내어야 할 것이다. 본 연구과제의 수행에 중요한 기술에 있어서 국내·외 연구기관의 기술격차는 아래와 같다.

요소기술	중요도	선진국대비 기술수준
줄기세포	핵심기술	90%
형질전환	핵심기술	90%
핵이식	핵심기술	90%

형질전환동물 생산기술에 의한 장기이식용 돼지의 생산은 위에서 열거한 기술을 조합하는 방향으로 이루어 질 것으로 예상된다. 예를 들면 galT를 발현하는 유전자를 HT 유전자로 치환한다거나 HAR이 방지된 후 다음단계로 나타나는 급성거부반응(acute rejection)을 함께 방지하는 형질전환동물 등을 들 수 있다. 이를 위하여 현재 가장 중요하게 활용되어지고있는 형질전환 및 핵이식기술의 국내외 현황은 다음과 같다.

### 제 1 절 형질전환동물

1980년 Gordon 등에 의해 형질전환 생쥐 (transgenic mouse) 의 생산이 최초로 보고 되었으며 가축에서도 유전자재조합 기술을 이용한 각종의 노력이 시도되어졌다. 특히, 가축의 유즙에 함유된 유용단백질의 대량생산 시도가 계속되어져 현재 최소 50종 이

상의 재조합 단백질이 형질전환된 양, 염소, 돼지, 소 등에서 생산되었다. 이들 중  $\alpha$ 1-antitrypsin, antithrombin III, protein C 등은 임상실험을 거쳤으며 Genzyme Transgenics 의 antithrombin III는 FDA의 승인을 거쳐 조만간 시판될 예정이다. 특히 소의 경우는 lactoferrin 을 생산하는 형질전환 젖소가 네덜란드 및 한국에서 보고된 바 있다. 최근 국내외의 주요 형질전환동물 개발사례는 다음과 같다.

연도	국가	연구자	기술 개발 내용
1991	영국	PPL Therapeutics	$\alpha$ 1-antitrypsin을 면양의 유즙에서 생산. 현재 임상실험 진행중
1991	네덜란드	Pharming	소의 우유에서 인간 락토페린 발현
1991	미국	Ebert 등	Tissue Plasminogen Activator 형질전환 산양
1992	미국	DNX	인간 헤모글로빈을 생산하는 돼지
1992	미국	DNX	돼지의 유즙에서 Protein C 생산, 현재 임상실험중
1993	스위스	Sandoz	Interleukin-2를 발현하는 토끼
1994	미국	Genzyme Transgenics	항 트롬빈 형질전환 산양, 임상실험 완료
1995	미국	Genzyme Transgenics	단일클론 항체생산 산양
1995	네덜란드	Pharming	젖소에서 인간 콜라젠 생산
1996	미국	Nexttran	돼지에서 장기이식 거부반응이 억제된 간장 생산, 임상실험
1997	영국	PPL Therapeutics	Factor IX 형질전환 복제 양
1997	미국	Paleyahda 등	Factor VIII 형질전환 돼지
1997	미국	Korhonen 등	Erythropoietin(EPO) 형질전환 토끼
1998	영국	Immutran	인간 DAF를 발현하는 돼지, 원숭이에 이식거부 반응 실험 진행중
1998	한국	생명공학연구소/ 한미약품/KAIST	인간 G-CSF가 도입된 재래흑염소 생산
1999	호주	CRC	Keratin유전자에 변이를 유도한 면양
1999	미국	Wheeler 등	IGF-I 형질전환 돼지
1999	캐나다	Nexia Biotechnologies	거미줄을 생산하는 산양
2000	영국	PPL Therapeutics	유전자적중에 의한 $\alpha$ 1-antitrypsin 형질전환 면양
2000	미국	Chan 등	GFP 형질전환 원숭이
2002	한국	축산기술연구소	인간 EPO를 생산하는 형질전환 돼지

## 제 2 절 체세포복제

Wilmot 등(1997)이 복제양 돌리의 생산을 보고한 후 지금까지 양, 염소, 소, 돼지, 고양이, 생쥐 등에서 체세포 복제가 이루어졌으며 돼지의 경우에도 연구자들이 섬유아 세포를 이용한 체세포 복제에 성공하였다. 우리나라에서도 다양한 동물종의 복제가 보고된 바 있다 (표 참조). 체세포복제기술을 이용한 형질전환동물 생산의 예는 human coagulation factor IX를 생산하는 양 (Schnieke 등, 1997) 및 human antitrypsin을 생산하는 염소(Baguisi 등, 1999) 등이 있다. 소에서는 marker gene 인  $\beta$ -galactosidase-neomycin resistance fusion gene 발현 복제소가 생산되었으나 (Cibelli 등, 1998) 체세포 복제를 통하여 인간에 유용한 재조합 단백질 생산이 가능한 소는 아직 보고되지 않았다. 현재 주목을 받고 있는 유전자적중 형질전환 복제동물의

생산은 1999년 PPL Therapeutics 에 의한 유전자적중 복제양의 생산이 최초로 보고된 바 있다(McCreath 등, 2000).

연도	국가	연구자	기술 개발 내용
1997	영국	Wilmot 등	면양의 유선상피세포를 이용하여 최초로 체세포 복제
1997	영국	Schnieke 등	체세포 복제에 의해 Factor IX 형질전환 면양생산
1998	미국	Cibelli 등	소의 태아 섬유아세포로부터 복제소 생산
1998	미국	Wakayama 등	생쥐 난구세포를 복제하여 생쥐생산
1998	일본	Kato 등	소의 난관 상피세포 및 난구세포에서 복제소 생산
1999	뉴질랜드	Wells 등	난소 과립막세포 유래의 복제소 생산
1999	프랑스	Renard 등	피부의 섬유아세포로부터 복제소 생산
1999	한국	황 등	자궁세포로부터 젖소의 복제에 성공
1999	한국	황 등	체세포 복제한우 생산
1999	미국	Baguishi 등	인간 항 트롬빈을 생산하는 형질전환 복제 산양 생산
1999	미국	Yang 등	노화된 소의 피부세포로부터 복제소 생산
1999	일본	Shiga 등	근육세포로부터 복제 화우 생산
2000	영국	McCreath 등	유전자적중 복제양 생산
2000	영국	Polejaeva 등	체세포 핵이식에 의한 복제돼지생산
2001	미국	ACT사	체세포 핵이식에 의한 야생소 Gauer의 보존
2002	미국	PPL사	galT 유전자적중 복제돼지 생산
2002	미국	Hematech사	인간항체를 생산하는 형질전환 체세포복제소 생산
2002	한국	김 등	체세포 복제돼지 생산
2003	한국	박 등	GFP 형질전환 복제돼지 생산
2005	한국	이 등	체세포 복제개 생산
2006	한국	김 등	EPO 형질전환 복제돼지 생산
2007	한국	이 등	체세포 복제늑대 생산



## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 연구방법

연구는 크게 4단계로 구분할 수 있으며 그 개요는 아래의 그림에서 보는 바와 같다.

1) **돼지 생식선줄기세포의 형질전환**: 돼지의 생식선줄기세포(Shim 등, 1996)에 이종간 장기이식시 거부반응을 제어할 수 있는 유전자인 hCD46, hCD59 등을 도입하여 형질전환을 유도한다.

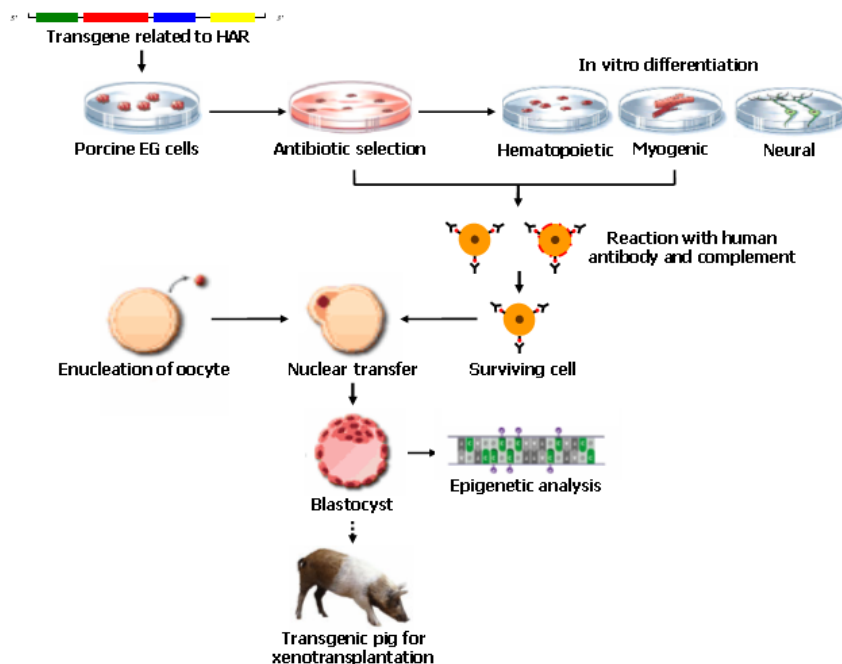
2) **형질전환 줄기세포의 체외분화**: hCD46, hCD59 유전자가 도입된 형질전환 줄기세포를 혈액, 심근, 신경세포 등으로 체외분화를 유도한다.

3) **보체매개 세포용해**: 혈청내의 인간 항체와 보체를 통한 세포용해(complement-mediated cell lysis)에 의하여 이종간 장기이식의 효용성을 검증한다.

4) **형질전환 줄기세포의 핵이식**: 세포용해에서 생존하여 이종간 장기이식의 가능성이 검증된 세포의 핵이식을 통하여 형질전환 복제수정란을 생산한다.

위와 같이 줄기세포를 이용한 순환구조 모델을 통하여 이종간 장기이식의 효용성을 검증하여 돼지를 이용한 바이오장기의 생산효율을 획기적으로 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구과제의 전반적인 기술개발 과정은 아래 그림에서 보는 바와 같다.



## 제 2 절 연구내용

연도별 주요개발 내용은 다음 표와 같다.

구 분	주요 개발내용 및 범위	
1차년도	돼지 생식선줄기세포의 형질전환	- 돼지 생식선줄기세포에 인간 CD46, CD59 유전자의 도입
	돼지 생식선줄기세포의 체외분화	- 형질전환 생식선줄기세포의 체외분화에 의하여 신경전구세포 생산
2차년도	보체매개 면역거부반응 조사	- 보체를 포함한 인간 혈청과 형질전환 생식선 줄기세포를 반응시켜 이종간 장기이식의 면역거부반응 측정
	형질전환 생식선줄기세포의 핵이식	- 형질전환 돼지 생식선줄기세포의 핵이식에 의하여 복제수정란 생산

## 제 3 절 연구결과

### 1. 돼지 생식선 줄기세포의 형질전환

돼지의 태아생식선 줄기세포(EG cells; embryonic germ cells)에 Fig. 1 및 2에서 보는 바와 같은 인간보체억제인자 hCD46 및 hCD59 cDNA를 이용한 transgene construct를 작성하여 도입하였다.

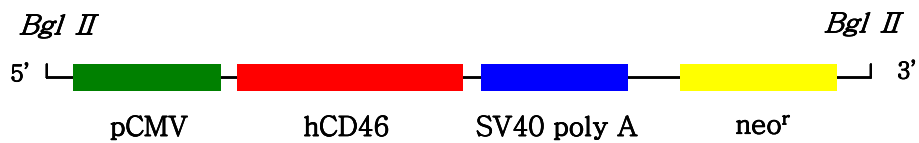


Fig. 1. Human hCD46 transgene construct

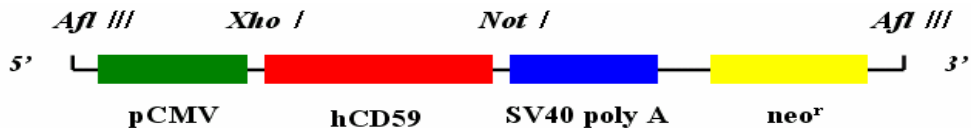
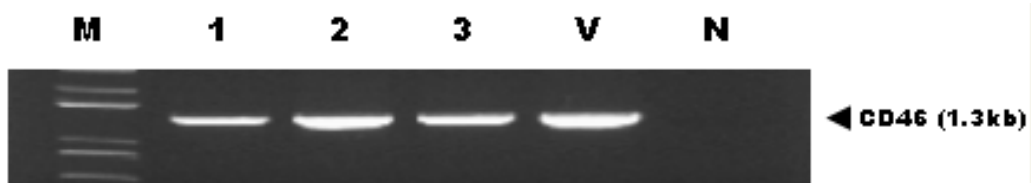


Fig. 2. Human hCD59 transgene construct

외래유전자가 도입된 줄기세포를 배양하고 neomycin analog인 G418을 처리하여 hCD46 및 hCD59 형질전환 줄기세포를 선별하였다. 선별된 줄기세포에 있어서 외래 유전자의 도입 여부를 PCR을 통하여 확인한 결과는 Fig. 3 및 4에서 보는 바와 같다.



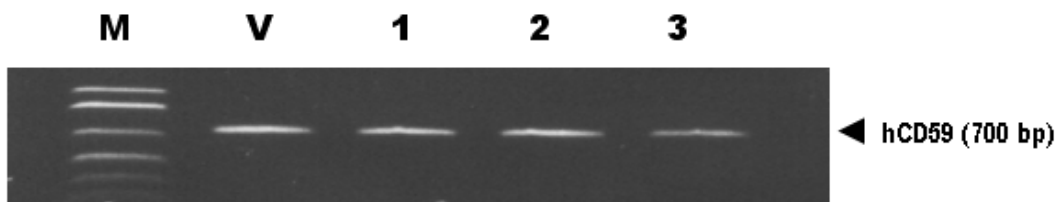
**Fig. 3. PCR screening of hCD46-transfected porcine EG cells**

M : size marker

V : vector containing hCD46 gene

N : normal porcine EG cells for negative control

1-3 : porcine EG cells transfected with hCD46 gene



**Fig. 4. PCR screening of hCD59-transfected porcine EG cells**

M : size marker

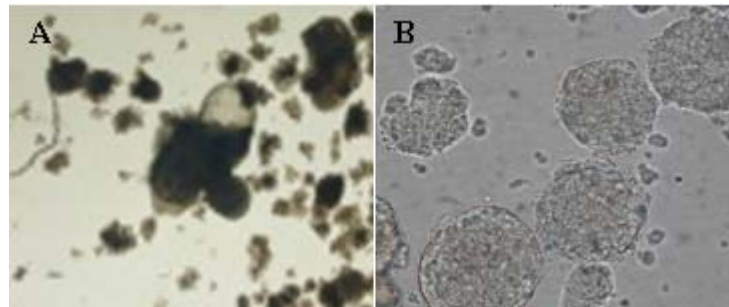
V : vector containing hCD59 gene

1-3 : porcine EG cells transfected with hCD46 gene

## 2. 돼지 생식선줄기세포의 체외분화

돼지 생식선줄기세포는 지지세포를 사용하지 않고 0.2% gelatin이 처리된 세포배양접시에서 수행되었다. 생식선줄기세포는 15%의 FBS(fetal bovine serum; HyClone)와 penicillin(100 U/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml), leukemia inhibitory factor(LIF,  $1 \times 10^3$  units/ml)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL 12800-017)을 사용하여 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다.

돼지 생식선 줄기세포로부터 신경전구세포로의 분화는 자발적 분화와 유도 분화의 2가지 방법에 의하여 수행되었다. 자발적 분화는 혈청 함유 세포배양액에서 분화억제인자인 LIF를 첨가하지 않고 embryoid body(EB)를 형성하여 분화시켰다. 유도분화는 혈청이 함유되지 않은 신경유도 배양액인 N2B27에서 EB를 형성하여 신경계 세포로의 분화를 촉진시켰다. N2B27은 DMEM/F12(1:1)와 Neurobasal medium(Gibco BRL)이 1:1로 혼합된 배양액으로 2mM L-glutamine, N2 supplement(Gibco BRL)와 B27 supplement(Gibco BRL)를 함유하였다. EB는 F-127이 처리된 bacteriological 배양접시에서 trypsin에 의하여 단세포화 된 돼지 생식선줄기세포를 suspension culture에 의하여 형성시켰다. Fig 5에서와 같이 자발적 분화에 의해 형성된 EB는 상당수의 cystic EB를 형성하고 N2B27배양액에서 유도 분화된 EB는 대부분이 simple EB를 형성하였다. 자발적 분화와 유도 분화, 두 방법 모두 돼지 생식선줄기세포의 신경전구세포로의 분화에 효과적이었다.



**Fig. 5. Morphology of embryoid bodies developed from pig EG cells.**

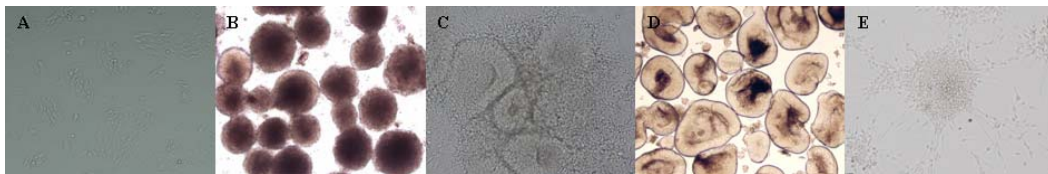
A. Cystic EBs derived from spontaneous differentiation condition. B. Simple EBs derived from induced differentiation condition.

Table 1에서는 위의 2가지 방법을 이용하여 분화된 신경전구세포의 분화율을 나타내었다. 각 실험은 3회씩 실시되었고 Table 1에서 보는 것과 같이 유도 분화에 의한 분화 방법이 약 2배 정도 더 분화율이 높았다. 이 방법은 일반적으로 배아줄기세포의 분화유도 시 이용되는 EB 형성과 재배양의 방법을 이용하였지만 사용된 배양액의 조성 및 조건을 달리하여 신경전구세포의 형성을 향상시킬 수 있었다.

**Table 1. Efficiency for formation of neural rosettes in the replated EBs.**

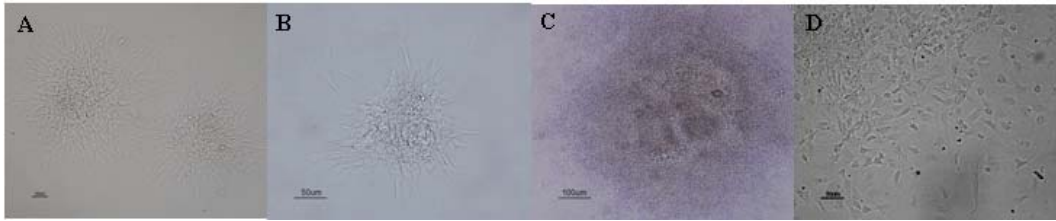
분화방법	Spontaneous differentiation	Induced differentiation
% EBs containing neural precursor cells	10.3%	24.2%

형성된 EB는 재배양을 통하여 신경전구세포로 분화하게 되며 이는 Neurosphere medium (NSM)에서 약 14일 정도 배양하여 분화를 유도하였다. Fig. 6은 돼지 생식선줄기세포로부터 신경전구세포 및 신경세포로의 분화를 보여주고 있다. Fig 6B와 같이 7일령의 EB를 fibronectin이 처리된 세포배양접시에 재배양한 후 약 7일 후부터 Fig. 6C에서와 같은 columnar 신경상피세포 (neural rosettes)가 발달하였다. 이러한 neural rosettes 형태는 신경전구세포의 특징으로 배아의 신경계 발달과정에서 나타나는 neuroepithelium과 형태학적으로 유사하여 형태학적 기준으로 이용된다. 이렇게 분화된 신경전구세포는 물리적 분리에 의하여 신경세포구(neurospheres, NS, Fig 6D)를 형성하며 F-127이 처리된 배양접시에서 suspension 상태로 유지하였다. Fig. 6E는 위의 조건 하에서 분화된 신경전구세포를 fibronectin이 처리된 배양접시에서 약 7일 정도 배양하여 성숙된 신경세포로 종말 분화 시킨 것으로 신경전구세포의 peripheral 부분에서 분화된 신경세포로 부터 neurite가 자라나 있음을 보여준다. 종말 분화는 신경전구세포의 분화에 사용된 NSM에 bFGF (10ng/ml)을 첨가하여 배양한다.



**Fig. 6. Differentiation of pig EG cells into neural precursor cells and neurons.** A. Undifferentiated EG cells. B. EBs. C. Neural rosettes (neural precursor cells). D. Neurospheres. E. Neurons with neurites.

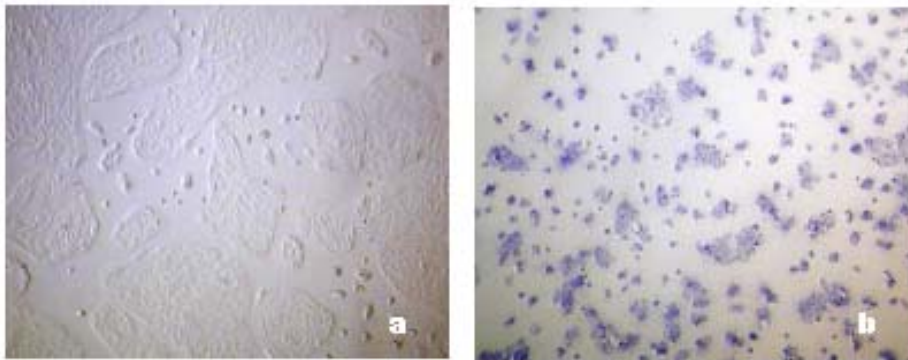
hCD59 형질전환 돼지 생식선줄기세포의 체외분화는 embryoid bodies를 형성하여 분화유도 하였던 정상생식선세포와는 달리 monolayer 배양을 통한 분화유도 방법에 의하여 신경전구세포로 분화 유도되었다. Gealtin이 처리된 배양접시에서 배양된 돼지 생식선세포의 배양액을 retinoic acid(10uM)가 함유된 N2B27배양액에서 7일간 배양한 후 retinoic acid가 결여된 N2B27배양액에서 7일간 더 배양하였다. Fig. 7에서와 같이 세포들이 모여면서 neuroepithelium에 의해 형성된 neural rosettes의 형태를 갖는 신경전구세포로 분화하였다. 신경전구세포는 형태에 따라 물리적으로 분리된 후 Hank's Balanced Salt Solution처리에 의해 단세포화 되어 fibronectin이 처리된 배양접시에 replating을 실시하였다. 배양액은 bGFG(10ng/ml)이 함유된 NS 배양액을 사용하였다.



**Fig. 7. Differentiation of CD59(+)** transgenic pig EG cells into neural precursor cells in monolayer culture. A. Differentiating EG cells. B. Tight aggregation of differentiating pig EG cells. C. Neural rosettes (neural precursor cells). D. Replated pig EG-derived neural precursor cells.

### 3. 보체매개 세포용해에 의한 초급성면역거부반응의 측정

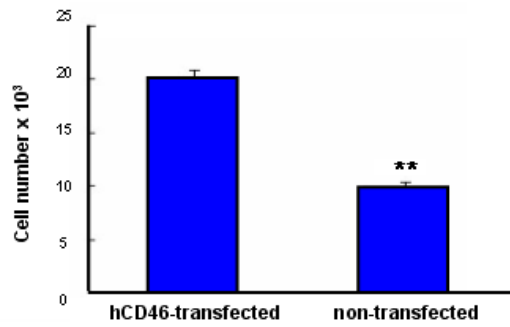
확인된 hDC46 형질전환 줄기세포를 xenoreactive natural antibody(XNA)와 보체를 포함한 인간 혈청과 반응시켜 초급성면역거부반응(HAR; hyperacute rejection)에 대한 저항성을 조사한 결과는 Fig. 8과 9에서 보는 바와 같다. hCD46 형질전환 줄기세포는 대조군 줄기세포와 비교하였을 때 보체매개 세포용해에서 2배 이상의 저항성을 나타내어 장차 이종간 장기이식에 있어 HAR을 극복할 수 있는 가능성을 제시하였다.



**Fig. 8. Complement-mediated cell lysis in hCD46-transgenic EG cells**

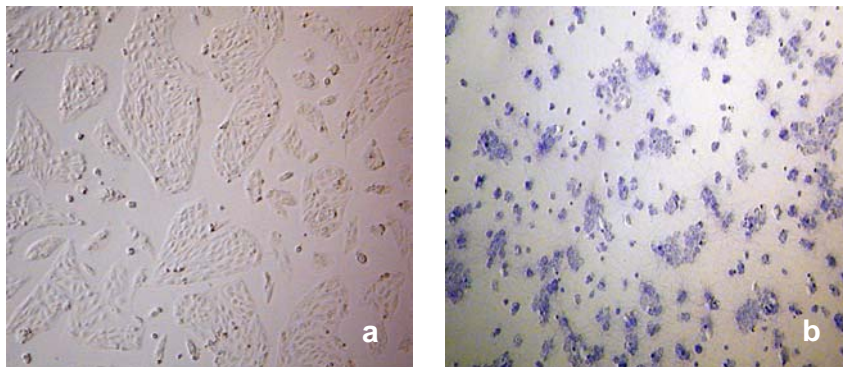
a : hCD46-transfected porcine EG cells

b : Non-transfected porcine EG cells



**Fig. 9.** Survival of hCD46-transgenic and non-transgenic EG cells after reaction with normal human serum (\*\*P<0.01)

마찬가지 방법으로 hCD59 형질전환 돼지 생식선줄기세포의 세포용해를 실시한 결과에서도 형질전환 줄기세포는 이종간 장기이식에 대한 저항성을 나타내었다(Fig. 10 및 11).



**Fig. 10.** Complement-mediated cell lysis in hCD59-transgenic EG cells

a : hCD59-transfected porcine EG cells

b : Non-transfected porcine EG cells



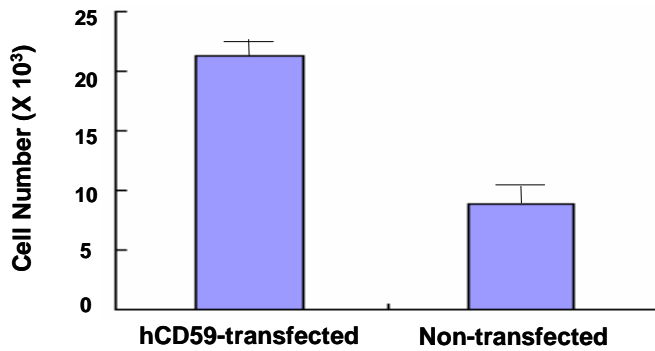


Fig.11. Survival of hCD59-transgenic and non-transgenic EG cells after reaction with normal human serum (\*\*P<0.01)

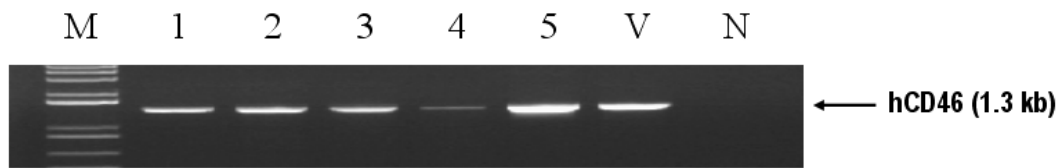
#### 4. 형질전환 복제수정란의 생산

hCD46 형질전환 태아생식선 줄기세포를 탈핵된 돼지의 난자에 도입하여 복제수정란을 생산하고 PCR을 통하여 형질전환 여부를 검정한 결과를 Table 2와 Fig. 12에 나타내었다. 생산된 수정란의 약 80%(25/35)가 hCD46-positive였다. 이와 같이 생산된 수정란을 이종장기이식용 형질전환 복제돼지 생산을 위하여 현재 대리모에 이식하는 과정에 있다.

Table 2. In vitro development and transgene detection in nuclear transfer embryos from hCD46 transgenic EG cells

Transgene construct	No. of oocytes reconstructed	No.(%) of blastocysts	No.(%) of blastocysts with transgene
hCD46	235	35 (14.9)	25 (80.0)





**Fig. 12. PCR screening of transgene in blastocysts from hCD46-transfected EG cells**

M : size marker

1-5 : porcine blastocysts obtained from nuclear transfer of hCD46 transgenic EG cells

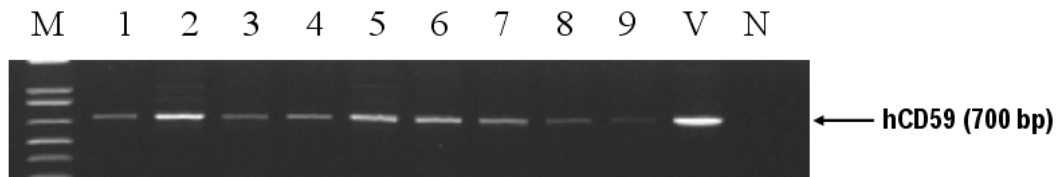
V : vector containing hCD46 gene

N : normal porcine EG cells for negative control

hCD46의 경우와 마찬가지로 방법으로 hCD59 형질전환 태아생식선 줄기세포를 탈핵된 돼지의 난자에 도입하여 복제수정란을 생산하고 PCR을 통하여 형질전환 여부를 검정한 결과를 Table 3과 Fig. 13에 나타내었다. 생산된 수정란의 약 80.6%(25/31)가 hCD59-positive였다.

**Table 3. In vitro development and transgene detection in nuclear transfer embryos from hCD59-transgenic EG cells**

No. of reconstructed oocytes	No.(%) of embryos developed to blastocysts	No.(%) of blastocysts with transgene
253	31 (12.3)	25 (80.6)



**Fig. 13. PCR screening of transgene in blastocysts from hCD59-transfected EG cells**

M : size marker

1-9 : porcine blastocysts obtained from nuclear transfer of hCD59-transgenic EG cells

V : vector containing hCD59 gene

N : normal porcine EG cells for negative control

위 연구결과에 나타난 것과 같이 보체매개 세포용해의 측정에 의해 이종간 장기이식에 있어서 효용성이 입증된 hCD46 및 hCD59 형질전환 생식선줄기세포를 이용하여 형질전환 복제수정란을 생산하였으며, 현재 대리모에 복제수정란을 이식하는 과정에 있다.

##### 5. 생식선줄기세포 복제수정란의 후성유전학적 분석

통상 핵이식에 있어서 공여핵으로 사용되어지는 체세포의 DNA는 매우 높은 수준의 메틸화 양상을 나타내기 때문에 핵이식 이후에 탈메틸화가 진행된다고 하더라도 정상적인 발생을 진행하기에는 불충분한 경우가 많은 것으로 알려져 있다. 이로 인하여 핵이식의 성공률이 대단히 낮으며 여러 가지 기형이 발생하는 원인이 되고 있다. 체세포와 달리 생식선줄기세포는 DNA메틸화의 정도가 낮기 때문에 핵이식이후에 탈메틸화가 진행된다면 정상 수정란과 비슷한 수준의 DNA메틸화를 나타낼 것으로 예상하였다. 실제 돼지의 체세포 및 줄기세포핵이식 수정란과 정상 수정란의 배반포기 발달률을 비교하였을 때 줄기세포핵이식 수정란이 다소 높게 나타났다( $P < 0.05$ , Table 4).

Table 4. In vitro development of somatic and stem cell nuclear transfer embryos

Group	No. of oocytes	No.(%) of Fused oocytes	No.(%) of embryos developed to blastocysts
SCNT	885	501 (56.6)	72 (14.4) <sup>a</sup>
EGCNT	794	518 (65.2)	94 (18.1) <sup>b</sup>
ICSI	74	-	16 (21.6) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>  $p < 0.05$

체세포, 생식선줄기세포, 체세포핵이식수정란, 줄기세포핵이식수정란 및 ICSI 수정란의 DNA 메틸화 정도를 pyrosequencing 방법으로 분석하였다. Microsatellite region (GenBank Z75640)의 9개 CpG site의 메틸화를 분석한 결과 돼지의 생식선줄기세포가 체세포에 비하여 훨씬 낮은 메틸화 정도를 나타내었으며, 생식선줄기세포 유래의 복제수정란 또한 체세포핵이식 수정란에 비하여 절반 정도의 DNA 메틸화를 나타내었다(Fig. 14 및 15). 이는 공여핵세포의 DNA의 메틸화 정도가 낮을수록 체세포핵이식 수정란도 낮은 메틸화 경향을 보이며, 또한 낮은 DNA 메틸화 수준이 수정란의 발달률을 증가시킴을 시사한다고 보여진다.

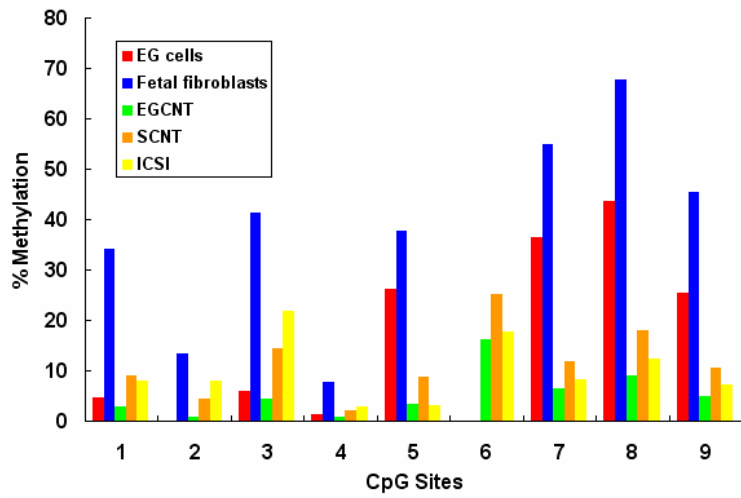


Fig. 14. DNA methylation status of 9 CpG sites at the satellite region

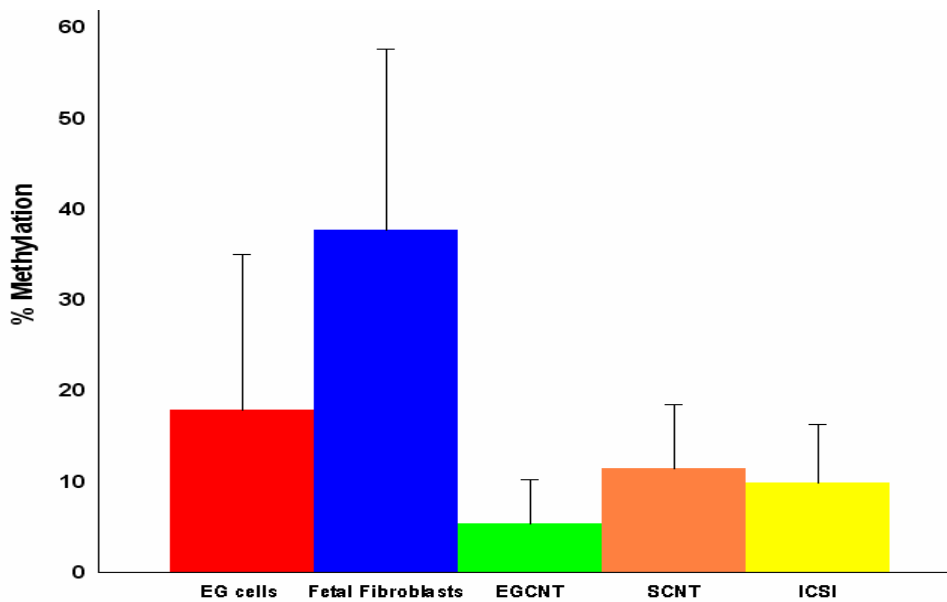


Fig.15. The average DNA methylation degree in nuclear donor cells and embryos

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표 및 평가의 착안점

년도	연구목표	평가착안점
1차년도	돼지 생식선 줄기세포의 형질전환 및 체외분화	hCD46 및 hCD59 유전자의 cloning 및 벡터작성
		hCD46 및 hCD59 유전자의 도입
		생식선줄기세포의 체외분화
2차년도	면역거부반응의 측정 및 돼지 생식선줄기세포 의 핵이식	보체매개 세포용해에 의한 형질전환 줄기세포의 초급성면역거부반응 측정
		생식선줄기세포 복제수정란의 후성유전학적 분석
		hCD46 및 hCD56 형질전환 줄기세포 복제수정란의 생산
최종평가	이종간 장기이식 모델의 개발	돼지 생식선줄기세포를 이용한 이종간 장기이식 모델의 개발

## 제 2 절 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 목표달성도

본 연구과제는 돼지 생식선줄기세포의 핵이식을 통하여 복제의 효율성을 향상시키고, 이식관련 외래유전자가 도입된 돼지의 줄기세포를 분화시킨 다음 초급성 면역거부반응을 일으키는 인간 항체 및 보체와의 반응을 통하여 이종간 장기이식의 모델을 개발할 목적으로 총 2년간에 걸쳐 수행되었다.

이종간 장기이식시 초급성면역거부반응을 제어할 수 있는 인간보체억제인자 hCD46 및 hCD59의 cDNA를 클로닝하고 그로부터 transgene construct를 작성하였다. 작성된 외래유전자를 돼지 생식선줄기세포에 도입하고 체외분화에 의하여 신경전구세포로 분화시켰다. 체외분화 전후에 걸쳐 형질전환 생식선줄기세포를 인간항체 및 보체와의 반응을 통하여 초급성면역거부반응의 억제여부를 조사하였다. hCD46 및 hCD59 형질전환 생식선줄기세포는 보체매개 세포용해반응에서 대조구에 비하여 2배 이상의 저항성을 나타내어 초급성면역거부반응을 억제할 수 있는 가능성을 보였다. hCD46 및 hCD59 형질전환 생식선줄기세포의 핵이식을 통하여 복제수정란을 생산하였으며, 생산된 복제수정란의 약 80%가 외래유전자를 지닌 형질전환 복제수정란으로 판별되었다.

생식선줄기세포 핵이식수정란의 배반포기까지의 발달률은 체세포핵이식에 비하여 유의적으로 높아서 생식선줄기세포 핵이식에 의하여 복제의 효율성을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 생식선줄기세포의 DNA 메틸화는 태아섬유아세포에 비하여 낮은 수준이었으며, 생식선줄기세포 유래의 핵이식 배반포 또한 체세포 유래 핵이식 배반포에 비하여 현저히 낮은 수준이었다. 생식선줄기세포의 복제효율이 높은 것은 줄기세포 및 복제수정란의 낮은 DNA 메틸화와 관련된 것으로 생각된다. 낮은 DNA 메틸화가 복제수정란의 후성유전학적 재프로그래밍을 보다 용이하게 하는 역할을 한 것으로 추측된다.

이상에서 본 바와 같이 본 연구과제에서 목표로 하였던 돼지 생식선줄기세포를 이용하여 복제효율의 향상 및 이종간 장기이식의 체외모델의 개발이 이루어졌으며, 연구과제에서 도출된 결과는 향후 이종간 장기이식을 위한 다양한 형질전환 복제돼지를 보다 빠르고 효율적으로 생산하는데 크게 기여할 수 있을 것이다.

## 2. 연구실적

### 가. 논문

Ahn, K.S., J.Y. Won, S.Y. Heo, J.H. Kang, H.S. Yang and **H. Shim**. 2007. Transgenesis and nuclear transfer using porcine embryonic germ cells. *Cloning Stem Cells* (submitted)

Choi, B.R., B.C. Koo, K.S. Ahn, M. Kwon, J.H. Kim, S.K. Cho, K.M. Kim, J.H. Kang, **H. Shim**, H. Lee, S.J. Uhm, H.T. Lee and T. Kim. 2006. Tetracycline-inducible gene expression in nuclear transfer embryos derived from porcine fetal fibroblasts transformed with retrovirus vectors. *Mol. Reprod. Dev.* 73:1221-1229.

### 나. 학회발표초록

Ahn, K.S., S.Y. Heo, J.Y. Won and **H. Shim**. 2007. Hypomethylation of DNA in nuclear transfer embryos from porcine embryonic germ cells. *Reprod. Fert. Dev.* 19:130 (abstr.).

Won, J.Y., K.S. Ahn, S.Y. Heo, J.K. Park, W.K. Chang and **H. Shim**. 2006. Production of cloned piglets from human CD59-transgenic embryonic germ cells for reduction of hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation. *Proceedings of International Symposium on Developmental Biotechnology* pp. 44 (abstr.).

Ahn, K.S., M. Kwon, B.C. Koo, J.Y. Won, T. Kim and **H. Shim**. 2006. Production of nuclear transfer embryos from porcine fetal fibroblast cells carrying a tetracyclin-inducible transgene. *Reprod. Fert. Dev.* 18:118-119 (abstr.).

Won, J.Y., K.S. Ahn, S.Y. Heo, J.H. Kang and **H. Shim**. 2006. Cytolytic analysis and nuclear transfer of hCD46-transgenic porcine embryonic germ cells to develop an in vitro model of xenotransplantation. *Reprod. Fert. Dev.* 18:212 (abstr.).

Ahn, K.S., S.Y. Heo, Y.M. Han and **H. Shim**. 2005. Hypomethylation of DNA in embryos from stem cell nuclear transfer in pigs. *Proceedings of International Symposium on Developmental Biotechnology*. pp. 120 (abstr.).

Won, J.Y., K.S. Ahn, J.H. Kang and **H. Shim**. 2005. Production of hCD46-transgenic clone embryos using embryonic germ cell nuclear transfer in pigs. *Proceedings of International Symposium on Developmental Biotechnology*. pp. 122 (abstr.).

Ahn, K.S., M.S. Kwon, B.C. Koo, J.Y. Won, S.Y. Heo, T. Kim and **H. Shim**, 2005. Production of cloned embryos using porcine fetal fibroblast cells with tetracycline-inducible expression of transgene. *Reprod. Dev. Biol.* 29:96 Suppl. (abstr.)

Won, J.Y., K.S. Ahn, J.H. Kang and **H. Shim**. 2005. Transgenesis, cytolitic analysis and nuclear transfer of porcine embryonic germ cells to develop in vitro model of xenotransplantation. *Reprod. Dev. Biol.* 29:97 Suppl. (abstr.)

### 3. 관련분야에의 기여도

- 가. 동물복제 효율의 향상
- 나. 형질전환동물 생산기술의 향상
- 다. 고능력 경제동물의 대량생산
- 라. 고부가가치 단백질 의약품의 대량생산
- 마. 인간질환모델 형질전환 동물의 개발
- 바. 희귀동물의 보존
- 사. 환자맞춤형 배아줄기세포 생산기술의 개발
- 아. 이종간 장기이식 기술의 개발
- 자. 발생 및 분화기전의 이해증진



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 활용분야

1. 복제동물 생산과 관련된 연구 및 산업분야
2. 형질전환동물생산과 연관된 연구 및 산업분야
3. 줄기세포 생산과 관련된 연구 및 산업분야
4. 이종간 장기이식과 관련된 연구 및 산업분야
5. 유전자 제작, 보관, 이용과 관련된 연구 및 산업분야
6. 수정란의 이용효율을 향상을 위한 신기술창출 분야
7. 동결 수정란 생산 및 이식기술과 연관된 산업분야
8. Animal bioreactor system 을 이용하는 첨단산업체

### 제 2 절 활용유형 및 활용방안

1. 확립된 첨단기술의 국내외 학술지 논문발표를 통한 연구 및 산업계 보급
2. 난자 체외성숙, 줄기세포 및 체세포의 형질전환, 유전자적중, 핵이식, 복제수정란 생산 및 복제수정란 동결기술의 연구기술로서의 이용
3. 현장전문가를 위한 동결보존 형질전환 복제수정란의 융해 이식기술의 교육
4. 이종간 장기이식용 형질전환돼지의 생산 및 산업화
5. 특허권 획득 및 산업계로 특허실시권 이전
6. 국내외 산업계와 형질전환 복제돼지 생산 및 이용에 대한 공동연구

## 제 6 장 참고문헌

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW and Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol.* 17:456-461.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA and Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA and Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7380.

Maga EA, Sargent RG, Zeng H, Pati S, Zarling DA, Oppenheim SM, Collette NM, Moyer AL, Conrad-Brink JS, Rowe JD, BonDurant RH, Anderson GB, Murray JD. 2003. Increased efficiency of transgenic livestock production. *Transgenic Res* 12:485-496.

Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohny S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IF. 1995. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat Med* 1:1261-1267.

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A and Campbell KHS. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278:2130.

Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 57:1089-1095.

Thall AD, Maly P, Lowe JB. 1995. Oocyte Gal alpha 1,3Gal epitopes implicated in sperm adhesion to the zona pellucida glycoprotein ZP3 are not required for fertilization in the mouse. *J Biol Chem* 270:21437-21440.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ and Campbell KHS, 1997. Viable

offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385:810.

생명·의료기술개발 동향. 1998. 과학기술정책관리연구소.

형질전환동물 및 이종장기 기술동향보고서, 2005 생명공학정책연구센터.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.