

11-1543  
0000-00  
1960-01

발간등록번호  
11-15430000-001960-01

거세마  
후대생산  
시스템  
구축을  
위한  
정원줄기  
세포  
이식기술  
개발

최  
종  
보  
고  
서

2017

농림축산식품부

# 첨단생산기술개발사업

# 거세마 후대생산 시스템 구축을 위한 정원줄기세포 이식기술 개발

최종보고서

2017. 12. 29.

주관연구기관 / 경북대학교  
산학협력단  
협동연구기관 / (주)노아바이오텍

농 립 축 산 식 품 부

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “거세마 후대생산 시스템 구축을 위한 정원줄기세포 이식기술 개발”(개발기간 : 2014 .9 .25 ~ 2017 .9 .24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 11 . 10.

주관연구기관명 : 경북대학교 산학협력단 (최제용) (인)

참여기관명 : (주)노아바이오택 (손중호) (인)

주관연구책임자 : 윤민중

참여기관책임자 : 손중호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	114052-3	해당단계 연구기간	2016. 9. 25. - 2017. 9. 24.	단계구분	(3년차 연구)/ (총 3년차 연구)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	거세마 후대생산 시스템 구축을 위한 정원줄기세포 이식기술 개발			
연구책임자	윤민중	해당단계 참여 연구원 수	총: 11 명 내부: 10 명 외부: 1 명	해당단계 연구개발비	정부:150,000천원 민간:50,000천원 계:200,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 25 명 내부: 23 명 외부: 2 명	총연구개발비	정부:450,000천원 민간:150,000천원 계:600,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경북대학교 산학협력단			참여기업명: 노아바이오텍	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자: 윤민중	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 말(馬)정원줄기세포 이식기법을 이용한 능력이 우수한 거세마의 유전형질을 후대에 전달하는 기술 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 말 정소세포 분화단계별 인식 molecular marker 개발</li> <li>○ 말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 개발</li> <li>○ 정원줄기세포 이식기법개발 및 recipient 모델에 따른 이식 효율성 검토</li> <li>○ 말 정원줄기세포 이식기법을 이용한 정자 생산</li> </ul> </li> <li>● 국내산 말 정액(실온, 냉장) 희석제 개발</li> </ul>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 말/당나귀 분화단계별 정소세포 확인을 위한 molecular marker 정립               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 말 정소 조직 내 미분화정원줄기세포 및 초기정원세포에서 특이적으로 발견되는 Lin28 및 PGP9.5 발견</li> <li>○ 말 post-meiosis germ cell의 확인이 가능한 ACRBP 마커 발견</li> <li>○ 말과 당나귀의 조직 내 정원줄기세포를 확인 가능한 UTF1 마커와 분화된 정원세포와 제1정모세포를 확인할 수 있는 DAZL마커 확보</li> </ul> </li> <li>● Busulfan 처리를 통한 정원줄기세포 이식 recipient 말 모델 개발 기술 확보               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Busulfan 주입 방식 및 적정 용량 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· Busulfan을 5주에 걸쳐 총 15 mg/kg 용량을 분할주입 시</li> <li>- 생존율 100%, 정소세포 제거(약 85%) 효과, 리비도 유지</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● 정원줄기세포 주입 기술 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 정원줄기세포를 효과적으로 주입할 수 있는 방식 및 장치 확보                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· Two-disgestion enzyme을 이용한 최적 정소세포 확보 기술 확립</li> <li>· 일반적으로 타 가축에 시도되고 있는 초음파기계를 이용하여 rete testis에 정원세포를 이식하는 기법은 말에 적용되기 어려움 확인</li> <li>· 정원세포를 말의 정소에 국소 주입하는 기술 확립</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● 말 정원줄기세포 이식을 통한 정자 생산               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 현재 말의 정소에 주입한 줄기세포의 분화를 통한 정자 생산 여부 확인 중</li> </ul> </li> <li>● 국내산 말 정액 희석제 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 정자의 실온 및 냉장 보존이 가능한 국내산 말 정액 희석제 개발                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· 해외 가장 널리 사용되고 있는 INRA96와 비교 시 유사한 실온 및 냉장 보존 효과 확인</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 정소세포 molecular marker를 이용한 말 spermatogenesis와 관련 연구 수행               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기 연구수행으로 개발한 분화단계별 정소세포 marker를 활용하여 정원줄기세포를 확인 및 분리하는 데 활용 가능</li> </ul> </li> <li>● 정원줄기세포 이식기술을 활용한 산업화               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 말 정소 거세 이후 정소를 냉동 보존하는 서비스 실시</li> <li>○ 우수한 능력이 입증된 거세마의 정소를 이식하여 후대를 생산할 수 있는 기술을 활용한 서비스 실시</li> </ul> </li> <li>● 국내산 말 정액 희석제 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2018년 초부터 말 인공수정 희석제로 활용</li> <li>○ 개발된 희석제를 활용한 수태율을 확인한 이후 2019년 초부터 사업화를 통한 시판 실시</li> </ul> </li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	말	정소	정원줄기세포	정자	정액희석제

## 5. 영문 요약문

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>● To develop the technique for the production of offsprings by transplanting spermatogonial stem cells               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ To find molecular markers that identify specific differential stages of germ cells</li> <li>○ To develop the technique to remove endogenous germ cells for recipients</li> <li>○ To develop the ideal technique to transplant horse spermatogonial stem cells into the testes of recipient</li> <li>○ To produce functioning sperm form transplantation</li> </ul> </li> <li>● To Develop the horse semen extenders</li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Finding molecular markers that can be used to identify specific differential stage of germ cells               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ We have found that                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· Lin28 is a molecule specifically expressed in horse spermatogoinal stem cells</li> <li>· PGP9.5 is a molecule expressed in spermatogonia in stallions</li> <li>· ACRBP is a molecule specifically expressed in post-meiotic germ cells</li> <li>· UTF1 is a molecular marker that can identify undifferentiated spermatogoinal stem cells of donkey, and DAZL is also expressed in the primary spermatocyte to spermatid in donkey</li> </ul> </li> <li>○ Developed the techniques to remove endogenous germ cells for recipients                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· We have established the ideal treatment which ablates germ cells in the testes of recipient horses</li> <li>· 5 week-split administrations of busulfan at 15 mg/kg concentrations was effective(about 80% of seminiferous tubules were Sertoli-cell only)</li> </ul> </li> <li>○ Found the ideal techniques to transplant horse spermatogoinal stem cells into the testes of recipients                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· Enzymatic digestion method to harvest stallion germ cells has been established</li> <li>· Direct injection into the testicular parachyma is one way to transplant spermatogonial stem cells</li> </ul> </li> <li>○ The production of functioning sperm using transplantation technique                   <ul style="list-style-type: none"> <li>· We currently evaluate if the recipient horses produce donor spermatogonial stem cells derived sperms using micro-satelite finger printing analysis</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● Develop horse semen extender               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Semen extender used to preserve horse semen at room-temp or cool-temp has been developed. This new semen extender is as effective as INRA96, most popular horse semen extender.</li> </ul> </li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Molecular markers for specific differentiation stages of germ cells               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Further studies on spermatogenesis of horse germ cells can be performed using these markers</li> </ul> </li> <li>● New type of horse breeding business can be run               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Service for cryopreserving germ cells can be offered</li> <li>○ Service for breeding offsprings of gelding whose testes were cryopreserved for transplanting into the recipient stallions</li> </ul> </li> <li>● Horse semen extender               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ This horse semen extender can be used for native horse breeders</li> </ul> </li> </ul>				
Keywords	Horses	Testes	Spermatogonial stem cells	Sperms	Semen extender

## 6. Contents

1. Concepts of the research .....	1
2. Current status of the techniques (domestic and oversea) .....	3
3. Research results .....	4
4. Achievement and contributions .....	95
5. Future plan with techniques .....	104
6. Security level .....	105
7. Lab safety activity .....	105
8. Representative accomplishment .....	106
9. References .....	107

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	1
2. 국내외 기술개발 현황 .....	3
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	4
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	95
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	104
6. 연구개발성과의 보안등급 .....	105
7. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	105
8. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	106
9. 참고문헌 .....	107

<별첨> 자체평가의견서

#### 본문 작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 가. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉔ 등으로 하고, 장은 17 포인트 고딕계열, 절은 15포인트 명조계열, 본문은 11 포인트 명조계열로 합니다. 다만, 본문의 내용중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있습니다.
- 나. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작합니다.
- 다. 본문은 11 포인트 횡으로 작성합니다.
- 라. 쪽 번호는 하단 중앙에 표기하되, 11 포인트로 합니다.
- 마. 각주는 해당 쪽 하단에 8포인트로 표기하며, 본문과 구분하도록 합니다.
- 바. 쪽 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작합니다. 이 경우 삽입물이 있을 때에는 그 삽입물의 크기에 관계없이 1면을 한 쪽으로 하여 일련번호를 붙입니다.
- 사. 한글·한문·영문을 혼용합니다.
- 아. 뒷면지에 주의문을 넣습니다.
- 자. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시하여야 합니다.

## 8. 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.





# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
<p>1-1. 연구개발 목적</p> <ul style="list-style-type: none"><li>● <b>최종 연구 목표</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 말(馬)정원줄기세포 이식기법을 이용한 <u>능력이 우수한 거세마의 유전형질을 후대에 전달하는 기술 개발</u></li></ul></li><li>● <b>세부 연구 목표</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 말 정소세포 분화단계별 인식 molecular marker 개발</li><li>○ 말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 개발</li><li>○ 정원줄기세포 이식기법개발 및 recipient 모델에 따른 이식 효율성 검토</li><li>○ 말 정원줄기세포 이식기법을 이용한 정자 생산</li><li>○ 국내산 말 정액(실온, 냉장) 희석제 개발</li></ul></li></ul> <p>1-2. 연구개발의 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"><li>● <b>우수한 거세마의 유전형질을 후대에 전달,</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 승용마의 경우 수말의 온순성을 위해 정자를 생산하기 전(1세 전, 후)에 거세수술 실시</li><li>○ 거세마의 경우 형질의 우수성이 입증되더라도(대회 입상 등) 우수한 유전형질을 후대에 전달하지 못 함</li><li>○ 거세후 정원세포를 냉동 보관한 후, 필요한 경우 정원줄기세포 이식기술을 이용하여 recipient 말에 주입 후 정자를 생산하고 인공수정기법 등을 이용하여 후대 생산기술 필요</li></ul></li><li>● <b>정원줄기세포를 매개로하여 형질전환 말 생산 기반 구축,</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 정원줄기세포를 이용하여 형질전환 동물을 생산</li><li>○ 형질전환 말 생산 기반을 구축하고 신약개발 동물모델로 사용 가능</li></ul></li><li>● <b>세대 간격 단축 가능</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 말의 현재 세대에서 다음 세대 생산까지 걸리는 기간은 성성숙 완성기간인 4~5년과 임신기간을 합쳐 약 6~7년이 소요됨</li><li>○ 미성숙 수말의 정원줄기세포를 recipient말에 이식하여 생산된 정자를 이용하여 수정을 할 경우 말 개량기간을 약 3~4년 단축 가능</li></ul></li><li>● <b>동물종의 새로운 보존 방식을 개발</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 정원줄기세포는 무한증식이 가능하기 때문에 이를 이용하면 종 보존의 효율성 확보</li></ul></li><li>● <b>수말의 불임마 치료방법 제시 가능</b><ul style="list-style-type: none"><li>○ 정원세포외 다른 세포의 이상으로 수정이 되지 않을 경우 이식을 통해 불임마 정자 생산 가능</li></ul></li></ul>	

● **국내 말생산 효율성을 높이기 위한 말 정액 희석제 확보**

- 현재까지 인공수정기법을 통해 말을 생산하기 위해서는 해외에서 말 정액 희석제를 수입하여 사용
- 수입 희석제의 경우 가격이 비싸고 수입 기간이 길고 절차가 까다로워 일반 농가에서 구입하기 어려움
- 이러한 말생산 현장의 어려움을 해결하기 위해 국내산 말 정액 희석제 개발이 필요한 실정임

1-3. 연구개발 범위

● **말 정소세포 분화단계별 인식 molecular marker 개발**

- 분화단계별 말 정소세포를 구별, 확인, 분리하기 위해 활용할 수 있는 molecular marker 군 확립
  - 말 정소세포(germ cells), 정원줄기세포(undifferentiated spermatogonial stem cells), 분화된정원세포(differentiated spermatogonia), 정모세포(spermatocyte), 정자세포(spermatid)를 구별할 수 있는 특이 발현 분자 확인 및 antibody 확보

● **말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 개발**

- 물리적, 화학적 방식을 이용한 recipient 말의 정소세포 제거 기술 개발
  - 정원줄기세포이식 recipient 모델 생산을 위해 피임제제 방식 및 적정 처리용량, 방식 조사
  - 열처리, Glycerin, Busulfan 등 다양한 방식을 비교분석하여 최적의 정원세포 제거기술 확보
  - 처리에 따른 1) 정원줄기세포 및 정소세포 제거 여부 확인, 2) Sertoli 및 Leydig 세포에 미치는 영향 확인, 3) 말의 건강에 미치는 영향 확인

● **정원줄기세포 이식기법개발 및 recipient 모델에 따른 이식 효율성 검토**

- 정원줄기세포 이식기법개발 및 확립
  - Ultrasound guided injection 방법을 이용한 정원줄기세포 이식기법 정립
- Glycerin 처리를 통한 recipient 모델 이식 효율성 검토
  - Recipient 모델에 따른 정원줄기세포 생착률 비교

● **말 정원줄기세포 이식기법을 이용한 정자 생산**

- 정원줄기세포 이식 기술 개발
  - 성성숙 이전 망아지의 정소에서 정원줄기세포 추출
  - 추출한 정원줄기세포를 정소세포 제거 기법으로 처리 된 recipient 말에 이식
  - Recipient 말의 정액 채취 후 유전자 검사를 통해 donor 유래 정자생산 여부 확인

● **국내산 말 정액(실은, 냉장) 희석제 개발**

- 국내산 말 정액 희석제 개발
  - 국내 기술을 활용한 말 정액 실은, 냉장보존용 희석제 개발하기 위해 채취된 정자를 개발된 희석제에 희석한 후 일정 기간 동안 보존하고 정자의 활력, 생존율, 미토콘드리아상태, 두부상태 등을 확인하여 희석제의 보존 효과 분석 및 비교

## 2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
<p>● <b>말 정소세포 분화단계별 인식 molecular marker 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이번 연구 과제를 통해 분화단계별 말 정소세포를 인식할 수 있는 molecular marker 개발을 독보적으로 수행</li> <li>○ 미분화정원줄기세포로부터 분화정소세포까지 판별할 수 있는 marker를 확보하는 성과를 거둠</li> <li>○ 상기 성과는 말 정원줄기세포이식 기술개발은 물론 말의 spermatogenesis 연구에 적극적으로 활용될 것으로 기대됨</li> </ul>		
<p>● <b>말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ ‘말 정원줄기세포가 제거된, 정원줄기세포 이식 recipient 모델’ 개발 기술은 아직 개발되지 않음</li> <li>○ 말의 불임화 기술로 Indenopyride derivative RTI-4587-073(I)를 활용한 수말 불임기술이 2013년도(Pozor, 2013)에 개발 및 보고되었으나 이 약품을 사용할 경우 처리 71일 만에 정원세포가 다시 복원되기 때문에 말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 생산을 위한 기술로 활용하기에는 부적절하다고 판단됨</li> <li>○ 본 연구팀이 이번 연구과제로 개발한 말 정원세포 제거기술은 국내외적으로 각광을 받을 것으로 기대됨</li> </ul>		
<p>● <b>정원줄기세포 이식기법개발 및 recipient 모델에 따른 이식 효율성 검토</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미국 Middle Tennessee State University에서 진행된 말의 정원줄기세포 이식방법의 효율성을 평가한 연구가 2015년에 석사학위 논문으로 발표됨</li> <li>○ 상기 연구의 결과는 정원세포를 정소중앙에 위치한 vessel을 통해 주입하는 방식보다 tissue안에 국소적으로 주입하는 방식이 더 효과적임을 증명함</li> <li>○ 본 연구팀 또한 정원세포를 말의 정소 중앙에 위치한 vessel에 주입할 경우 타 축종과 비교했을 때 이식 효율성이 떨어지는 것으로 PKH26약품으로 염색된 세포주입을 통해 확증함</li> </ul>		
<p>● <b>말 정원줄기세포 이식기법을 이용한 정자 생산</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미국 Middle Tennessee State University에서 말의 정원세포를 mule에 이식한 실험이 진행되었으나 말 정자 생산을 성공하지 못함</li> <li>○ 그 외 말 정원줄기세포 이식을 통한 정자생산에 대한 시도 및 결과는 발표되지 않음</li> <li>○ 본 연구팀은 이번 농기평 과제를 통해 3마리에 이식을 한 상태이며 현재까지도 정액을 채취한 후 donor 유래 정자생산 여부를 확인하고 있음</li> <li>○ 본 연구팀은 이번 연구과제 수행을 통해 말 정원줄기세포 이식기법 개발 분야에서 선두적인 역할을 수행하고 있음</li> </ul>		
<p>● <b>국내산 말 정액(실은, 냉장) 희석제 개발</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국외에서는 1970년대부터 말 정액 개발을 위한 연구가 수행되어 현재 다양한 말 정액 희석제가 시중에 판매되고 있음</li> <li>○ 하지만 국내에는 아직 말 정액 희석제가 상업적으로 개발된 사례가 없었으며 국내에서는 본 연구팀이 이번 연구과제 수행을 통해 독자적인 기술을 확보하는 성과를 거둠</li> </ul>		

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

#### ○ 연구수행 내용

#### 1. 말 및 당나귀 정소세포 분화단계별 molecular marker 개발

##### 1-1. 말 정원줄기세포 특이 발현 molecular marker 개발(Lin28)

#### ① 연구 배경 및 목적

##### ○ 배경

- 말 정소 내 germ cell을 분화 단계별로 구별하는 데 사용할 수 있는 molecular marker의 개발 필요
- Lin28은 mouse와 human, monkey에서 stem cell marker로 활용 가능

##### ○ 목적

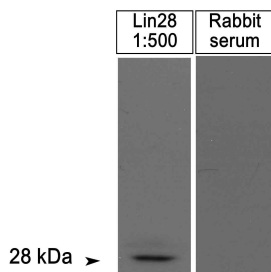
- Lin28이 말의 spermatogonial stem cell에서의 발현 여부 확인
- Reproductive stage에 따른 Lin28 발현 패턴 비교 분석

#### ② 연구 내용 및 방법

- Lin28 antibody가 말 정소의 정원세포의 molecular marker로 사용 가능 여부 분석
- 수말의 reproductive stage에 따른 발현 양상 비교
- Western-blot 기법을 활용하여 Lin28 antibody의 말 조직에 대한 cross-reactivity 조사
- Immunohistochemistry 기법을 활용하여 수말 정소 조직 내 Lin28 발현 양상 조사
- Whole-mount를 통해 Lin28가 발현되는 germ cell developmental stage 확인
- Immunocytochemistry 기법을 이용하여 single cell에서도 Lin28이 발현여부 확인

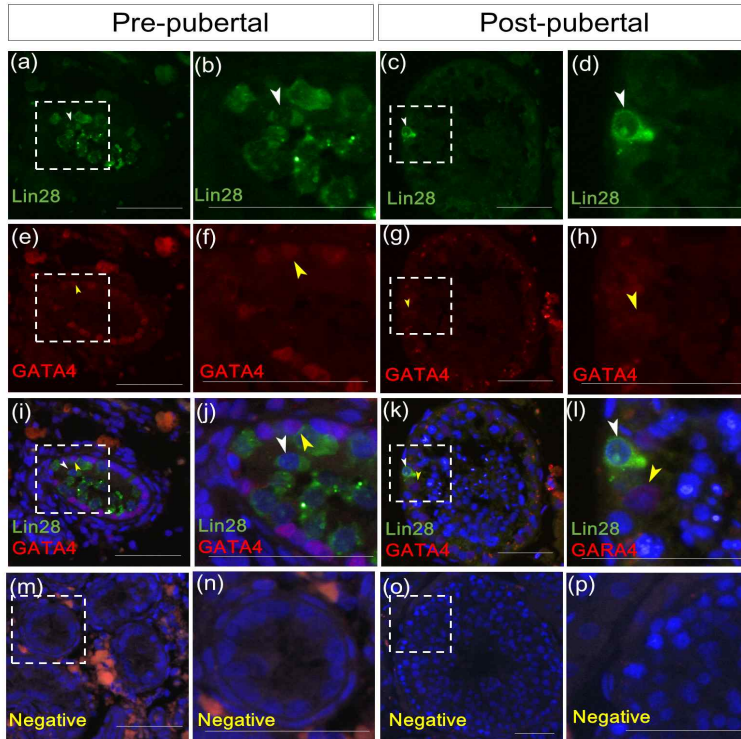
#### ③ 실험결과

- 말 정소조직에 대한 rabbit Lin28 antibody의 cross-reactivity확인



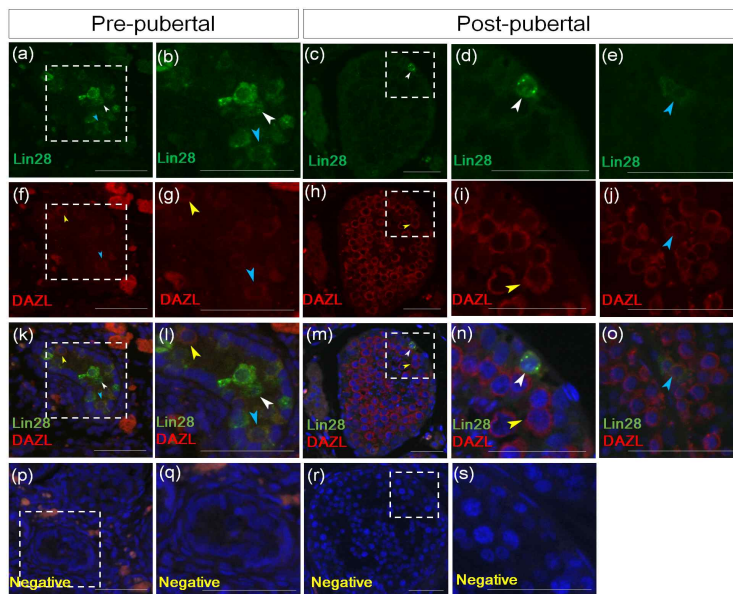
- Rabbit Lin28 antibody가 말 정소조직 내 발현하는 Lin28 단백질 인식 확인 (cross-activity)

○ Reproductive stage에 따른 정소 조직 내 Lin28과 GATA4 발현 양상 비교



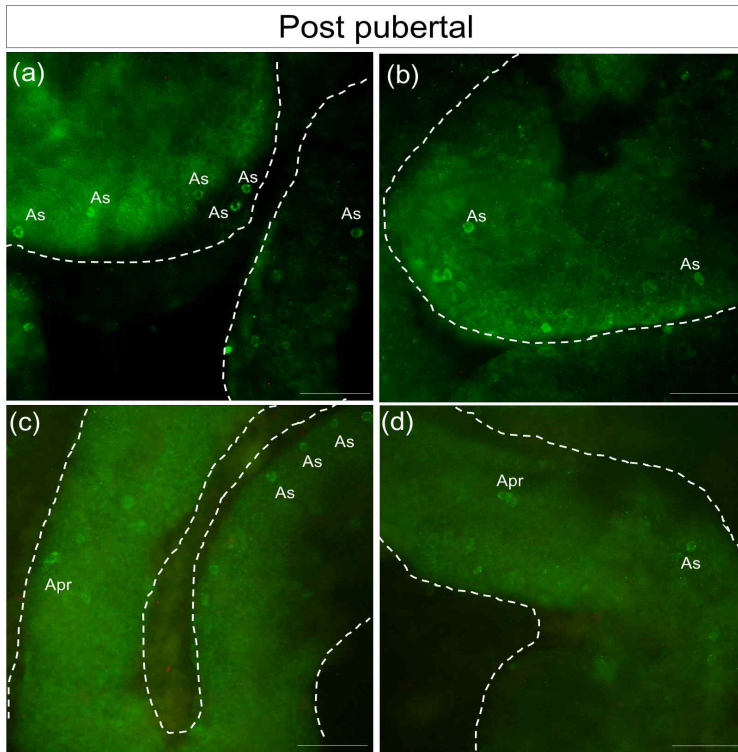
- Lin28은 pre-pubertal, post-pubertal stage 내 germ cells에서 발현
- Lin28은 Sertoli cell에 발현되는 GATA4와 겹치지 않고 germ cell에 발현

○ Reproductive stage에 따른 정소 조직 내 Lin28과 DAZL 발현 양상 비교



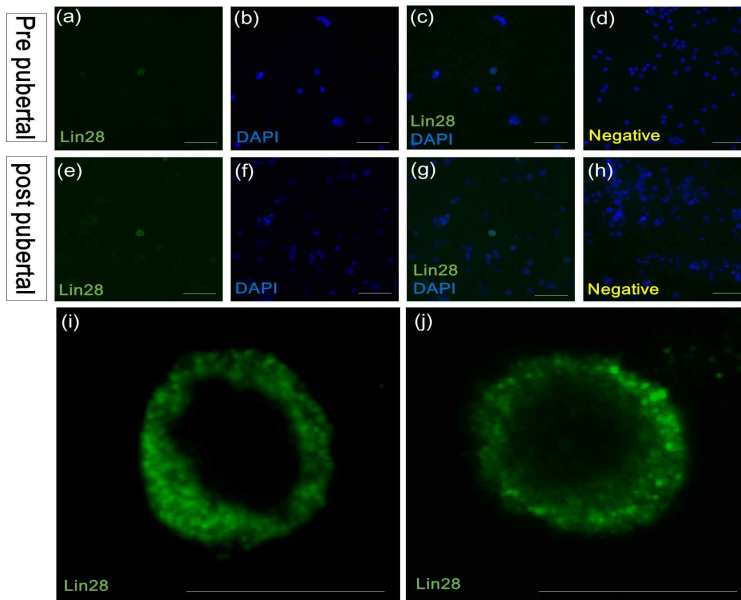
- pre-pubertal, post-pubertal stage에서 Lin28 antibody가 DAZL antibody와 겹치는 germ cell 존재

○ Whole-mount를 통해 실제 정소 조직에서 Lin28 발현 확인



· post-pubertal stage에서 세포가 1개(As), 혹은 2개(Apr)의 세포에서 Lin28 발현

○ Immunocytochemistry 기법을 통해 single cell에서 Lin28 발현 확인



· pre-pubertal, post-pubertal stage에서 Lin28은 세포의 cytoplasm에 발현

④ 결론

- Lin28 antibody는 미분화 정원줄기세포를 인식하는 putative marker로 사용 가능
- Lin28과 DAZL antibody를 함께 사용할 경우 보다 확실하게 미분화 정원줄기세포를 관찰 가능

⑤ 성과

- 상기 연구 결과는 PLoS ONE에 게재됨



RESEARCH ARTICLE

## The Lin28 Expression in Stallion Testes

Geumhui Lee<sup>1</sup>\*, Heejun Jung<sup>2</sup>\*, Minjung Yoon<sup>1,2\*</sup>

1 Department of Horse, Companion, and Wild Animal Science, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea, 2 Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea

### 1-2. 말 정소내 spermatogonia 인지 marker 개발

① 연구 목표

- 말 정소 내 spermatogonia를 인지할 수 있는 molecular marker 확립

② 연구 배경

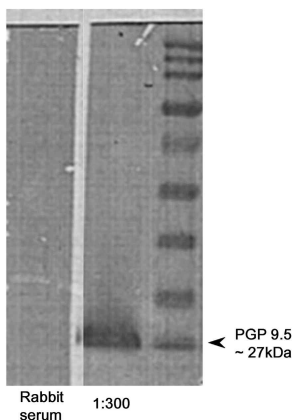
- 말 정소 내 germ cell 중 각 분화 단계별 germ cell을 구별하는 데 사용할 수 있는 molecular marker의 개발 필요
- 이러한 marker는 immunohistochemistry 기법을 활용하여 tubule 내 spermatogenesis 상태를 확인 할 수 있고 또한 분화 단계별 germ cell을 분리하는 데 사용 가능

③ 연구 내용

- PGP9.5 antibody가 spermatogonia의 molecular marker로 사용 가능 여부 분석
- 수말의 reproductive stage에 따라 수말의 정소조직을 구분
- Immunohistochemistry 기법을 활용하여 수말 정소조직 내 PGP9.5 발현 양상 조사
- Western-blot 기법을 활용하여 PGP9.5 antibody의 말 조직에 대한 cross-activity 조사

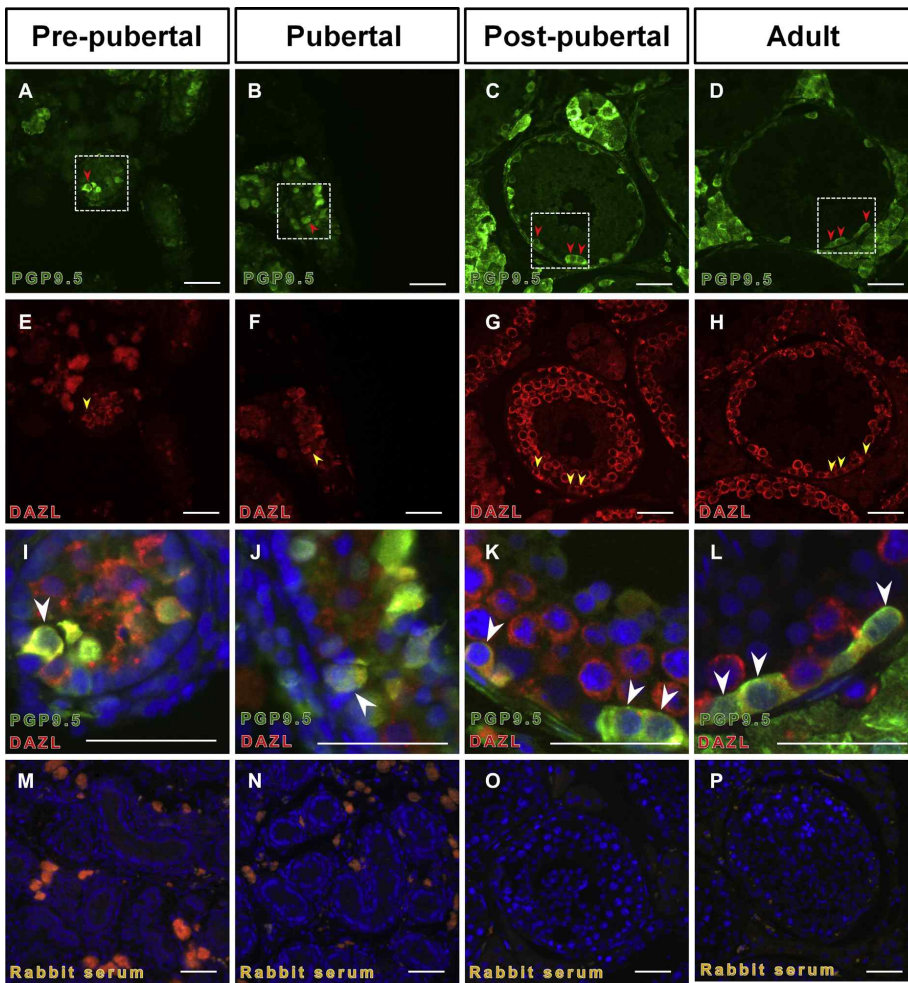
④ 연구 결과

- rabbit PGP9.5의 말정소조직에 대한 cross-activity확인





□ Reproductive stage에 따른 PGP9.5 발현양상



○ PGP9.5는 말 정소의 early stage differentiated spermatogonia에서 발현

⑤ 성과

· 상기 연구 결과는 Journal of Equine Veterinary Science 에 게재됨



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Journal of Equine Veterinary Science**

journal homepage: [www.j-evs.com](http://www.j-evs.com)



**Localization of PGP9.5 in equine testes**

Hee-jun Jung<sup>2,\*</sup>, Minjung Yoon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Horse, Companion and Wild Animal Science, Sangju, Republic of Korea  
<sup>2</sup> Department of Animal Science Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea

### 1-3. 말 post-meiotic germ cell 인지 marker 개발

#### ① 연구 목표

- 말 정소 내 post-meiotic germ cell을 인지할 수 있는 molecular marker 확립

#### ② 연구 배경

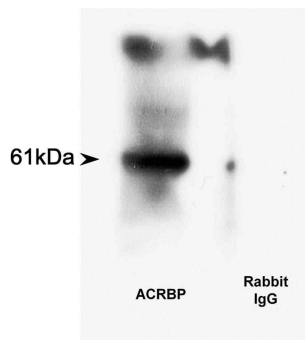
- 말 정소 내 germ cell 중 각 분화 단계별 germ cell을 구별하는 데 사용할 수 있는 molecular marker의 개발 필요
- 이러한 marker는 immunohistochemistry 기법을 활용하여 tubule 내 spermatogenesis 상태를 확인 할 수 있고 또한 분화 단계별 germ cell을 분리하는 데 사용 가능
- 이러한 molecular marker는 본 연구에서 glycerin으로 처리한 정소의 post-meiotic germ cell이 탈락 여부를 객관적으로 판단할 수 있는 지표로 사용 가능

#### ③ 연구 내용

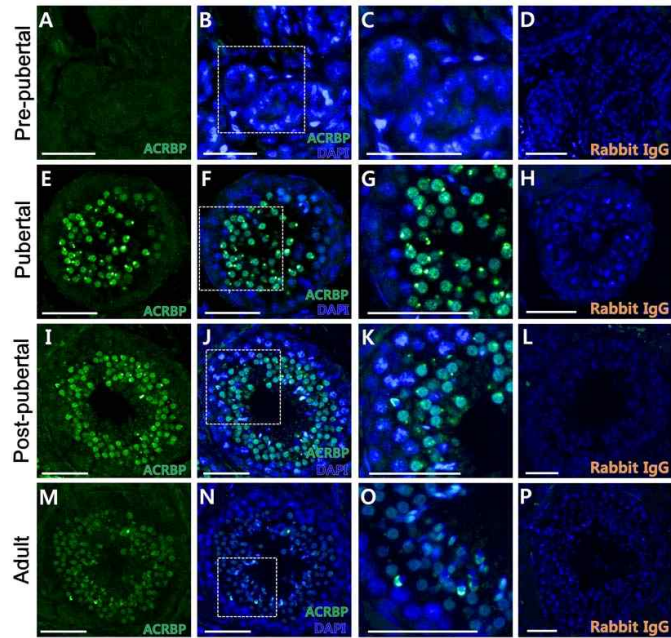
- ACRBP antibody가 post-meiotic germ cell의 molecular marker로 사용 가능 여부 분석
- 수말의 reproductive stage에 따라 수말의 정소조직을 구분
- Immunohistochemistry 기법을 활용하여 수말 정소조직 내 ACRBP 발현 양상 조사
- Western-blot 기법을 활용하여 ACRBP antibody의 말 조직에 대한 cross-activity 조사

#### ④ 연구 결과

- rabbit ACRBP의 말정소조직에 대한 cross-activity확인

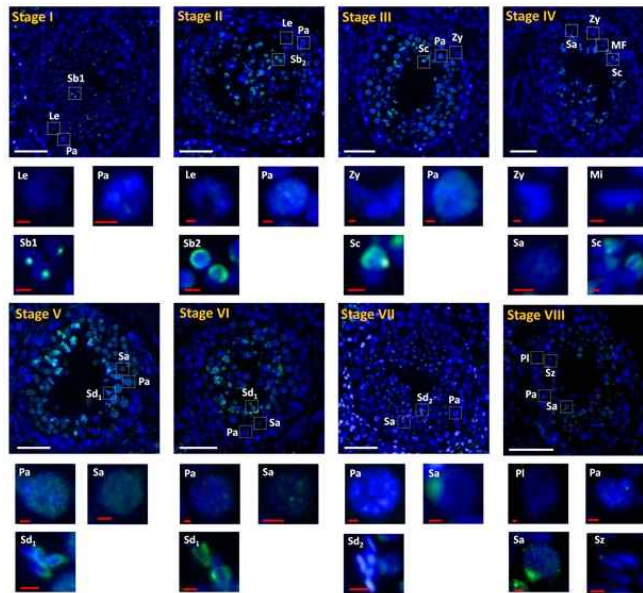


□ Reproductive stage에 따른 ACRBP 발현양상



- ACRBP 항체의 경우 성성숙 전 단계의 germ cell에서는 발현되지 않음
- 반면에 성성숙 및 이후 단계의 germ cell에서 발현됨. 그러므로 ACRBP antibody는 post-meiotic germ cell의 marker로 사용가능

□ Tubule stage에 따른 ACRBP 발현양상



- ACRBP staining pattern을 각 tubule stage 별로 관찰한 결과 primary spermatocyte, secondary spermatocyte, round spermatid에서 발현하는 것을 확인하였고, spermiogenesis 단계 중에는 정자의 두부 생성단계 별로 침체형성패턴과 동일한 양식으로 발현 확인

□ 분리된 germ cell에서의 ACRBP 발현(result from Immunocytochemistry)

⑤ 결론

- 말의 post-meiotic cells(secondary spermatocyte, round spermatid)에서 ACRBP 발현
- Rabbit ACRBP antibody는 말의 post-meiotic cell을 식별하는 데 사용 가능하기 때문에 수말의 성숙 여부 확인 및 glycerin 등의 처리에 의한 정소 내 변화양상을 객관적으로 확인하는 데 사용 가능

⑥ 성과

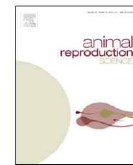
- 상기 연구 결과는 Animal Reproduction Science에 게재됨



Contents lists available at ScienceDirect

## Animal Reproduction Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)



### Acrosin-binding protein (ACRBP) in the testes of stallions

JT kim<sup>a,1</sup>, HJ Jung<sup>a,1</sup>, H Song<sup>b</sup>, MJ Yoon<sup>a,c,\*</sup>



<sup>a</sup> Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Horse, Companion and Wild Animal Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Republic of Korea

#### 1-4. 당나귀 정원세포에서의 UTF1과 DAZL 단백질 발현 양상 확인(molecular marker로 사용 가능)

① 연구 배경 및 목적

- 배경
  - 당나귀의 정소 내 생식세포의 분화 단계별로 구별하는 데 사용할 수 있는 molecular marker의 개발
  - 이러한 marker는 immunohistochemistry 기법을 활용하여 tubule 내 spermatogenesis 상태를 확인 할 수 있고, 또한 분화 단계별 germ cell을 분리하는 데 사용 가능

- 목적

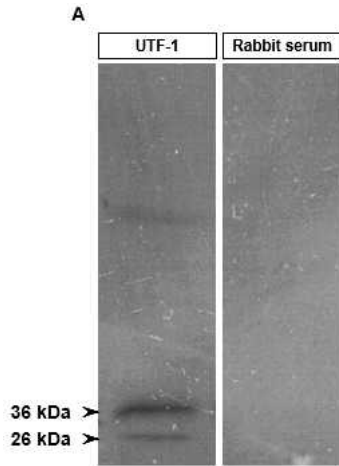
- UTF-1과 DAZL이 당나귀의 spermatogonia를 확인하는 마커로써 사용 가능 여부 확인

② 연구 내용 및 방법

- UTF-1 antibody가 당나귀 정소의 정소세포의 molecular maker로 사용 가능 여부 확인
- Immunohistochemistry 기법을 활용하여 당나귀 정소조직 내에 UTF-1의 발현 패턴 확인
- Western-blot 기법을 활용, UTF-1 antibody의 당나귀 정소조직과의 cross activity 확인

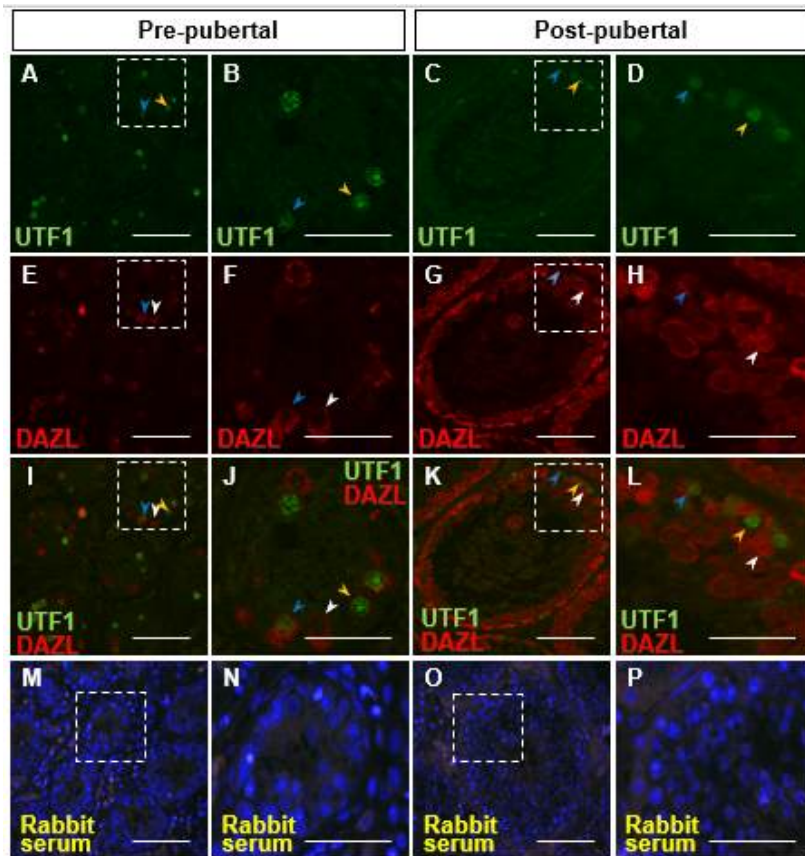
③ 실험결과

○ 당나귀 정소조직에 대한 UTF-1 antibody의 cross-activity확인



○ Reproductive stage에 따른 정소 조직 내 UTF-1과 DAZL 발현 양상 비교

- UTF-1은 pre-pubertal, post-pubertal에서 발현되는 것 확인
- 생식세포에서 UTF-1과 DAZL 발현 패턴의 결과를 종합해보았을 때 UTF-1는 early stage spermatogonia에서 발현되는 것을 확인



④ 결론

- UTF-1은 당나귀의 early stage spermatogonia에 발현되며 조직상에서 생식세포를 확인하는 데 molecular marker로 활용 가능

⑤ 성과

- 상기 연구 결과는 Reproduction in Domestic Animal에 게재됨

ORIGINAL ARTICLE

WILEY **Reproduction in Domestic Animals**

## Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1) and deleted in azoospermia-like (DAZL) expression in the testes of donkeys

YS Lee<sup>1,\*</sup> | HJ Jung<sup>2,\*</sup> | MJ Yoon<sup>1,2</sup>

### 2. 정원줄기세포 이식을 위한 Recipient model 말 생산 기술 개발 (말 정소세포 제거기술 개발)

#### 2-1. 국소열처리가 말 정소 내 정원세포에 미치는 영향(선행연구 1)

① 연구 범위

- 말 정소에 국소적으로 열처리를 가했을 때 정원세포에 미치는 영향 확인

② 연구 방법

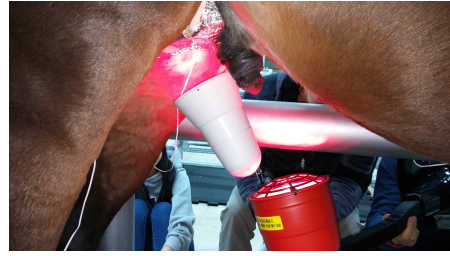
- 정소는 체온보다 3~4도 낮은 온도에서 정상적인 정자생산성을 유지하지만 고온에 노출될 경우 정자의 생산성이 감소하고 기형정자 발생 등 정자생산(spermatogenesis)성이 저하됨
- 실험쥐의 정소를 고온(48도)으로 30분 이상 처리할 경우 정원세포가 사멸하여 정원세포가 없는 tubule 생성이 가능 함
- 적외선조사기를 사용하여 말정소에 국소열처리 실시하여 열스트레스가 말의 정소에 미치는 영향에 대한 실험 실시

공통 처리	수말 1 (페르세롱, 나이 4살)		수말 2(더러브렛, 나이 4살)	
	왼쪽	오른쪽	왼쪽	오른쪽
1회당 48도 30분	1회	연속 2회(2일)	연속 3회(3일)	연속 4회(4일)

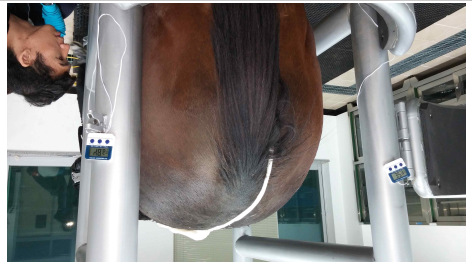
- 열처리 전후 정소 크기 측정 및 비교
- 열처리 한 달 후에 거세수술을 통해 정소를 제거
- 정소 내 조직을 paraformaldehyde로 고정한 후에 H&E 염색법으로 조직 염색 실시
- 열처리에 따른 spermatogenesis 상태 확인



보정틀을 이용한 말 보정



적외선 조사기를 이용한 열처리



정소에 부착된 온도계로 처리온도 확인



정소에 부착된 온도계로 처리온도 확인

#### ④ 연구 결과

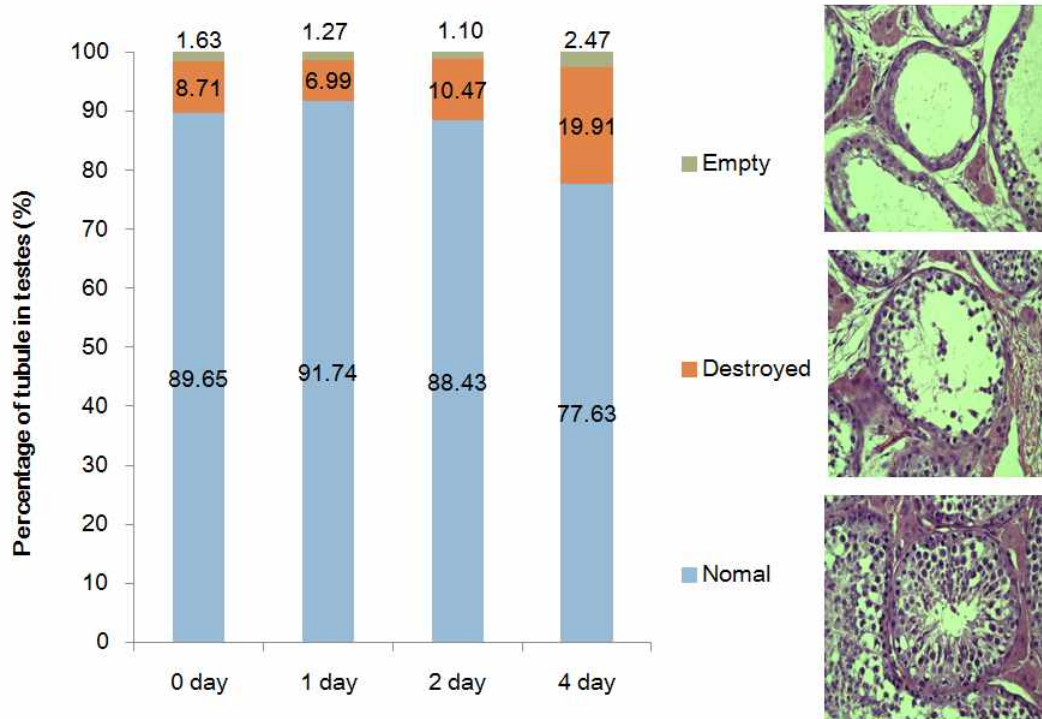
##### ○ 열처리에 따른 정소 사이즈 변화

		열처리 전	열처리 1개월 후
0회(대조구)	폭(cm)	5	4
	길이(cm)	7.5	7.8
1회	폭(cm)	5.5	4.8
	길이(cm)	8.5	7.8
2회	폭(cm)	4	4.2
	길이(cm)	8	9.2
4회	폭(cm)	4.5	3.8
	길이(cm)	10.2	8.5

- 대조구는 열처리 전 후에 크게 정소 사이즈가 변하지는 않음
- 열처리 4회 실시 한 경우 약간 처리 후에 정소가 작아지는 경향을 보임(길이 10.2 cm → 8.5 cm)

##### ○ 열처리에 따른 정소 내 조직 변화

- \* 정소 당 seminiferous tubule 단면적 총 1000 여개 관찰
- 열처리 횟수가 늘어남에 따라 비정상적인 tubule 형태 다소 증가
- 하지만 control과 비교 시 1일 및 2일 처리된 정소는 크게 차이가 없음
- 4일 동안 지속적으로 열처리한 정소에서 empty tubule 및 destroyed spermatogenesis tubule이 각각 2.47 및 19.91% 발견
- 열처리 영향이 미비하므로 정원줄기세포 이식을 위한 recipient 말로서는 사용하기에는 이상적이지 않음



2-2. 국소 NaCl 처리가 말 정소내 정원세포에 미치는 영향(선행연구 2)

① 연구 범위

- 말정소에 국소 NaCl을 처리할 경우 정원세포에 미치는 영향 확인

② 연구 방법

- 2% 이상 NaCl 용액은 고장액으로 정소의 화학거세약물로 사용 가능
- 삼투압이 다르기 때문에 정원세포 제거 가능

③ 연구 내용

- 말을 대상으로 실험하기에는 여러 여건상 어려움이 있어 실험하기 다소 용이한 흑염소를 대상으로 실험을 수행함
- Post-pubertal 흑염소(n=2, 정소 4개)를 대상으로 실험 수행

일련번호	처리 (All treatment was autoclaved)	용량 (cc)	주사바늘 (gauge)	주입방법	거세시점 (처리 후)	비고
1	PBS	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
2	5% NaCl	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
3	7.5% NaCl	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
4	10% NaCl	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	



- 처리 2-3주 후 거세수술을 실시하여 정소를 제거하고 절개하여 정소 내 상태 확인
- 정소조직을 절개하여 4% paraformaldehyde에 고정하여 H&E 염색을 실시




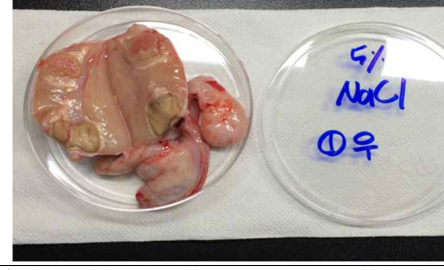
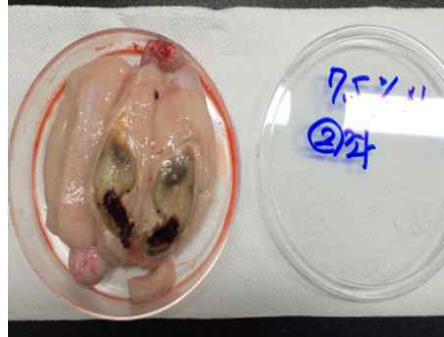
말 보정 후 정소에 약품 처리

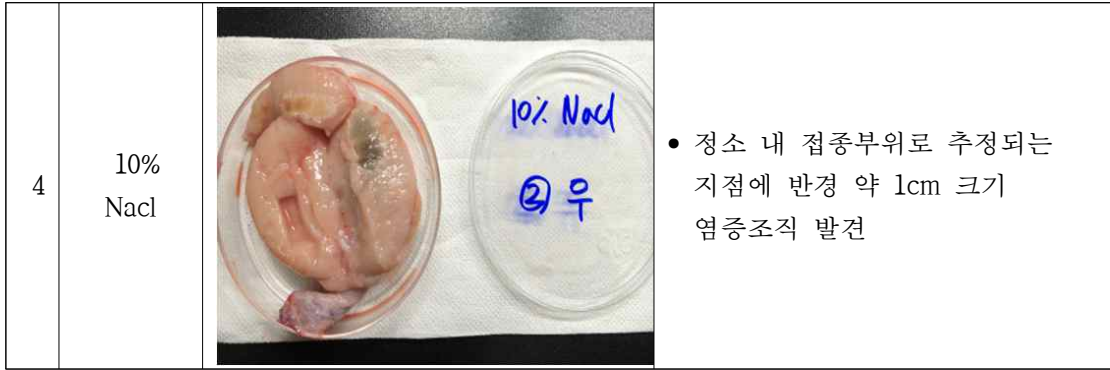


말 보정 후 정소 거세 수술

④ 연구 결과

- NaCl 처리에 따른 염소의 정소상태 확인

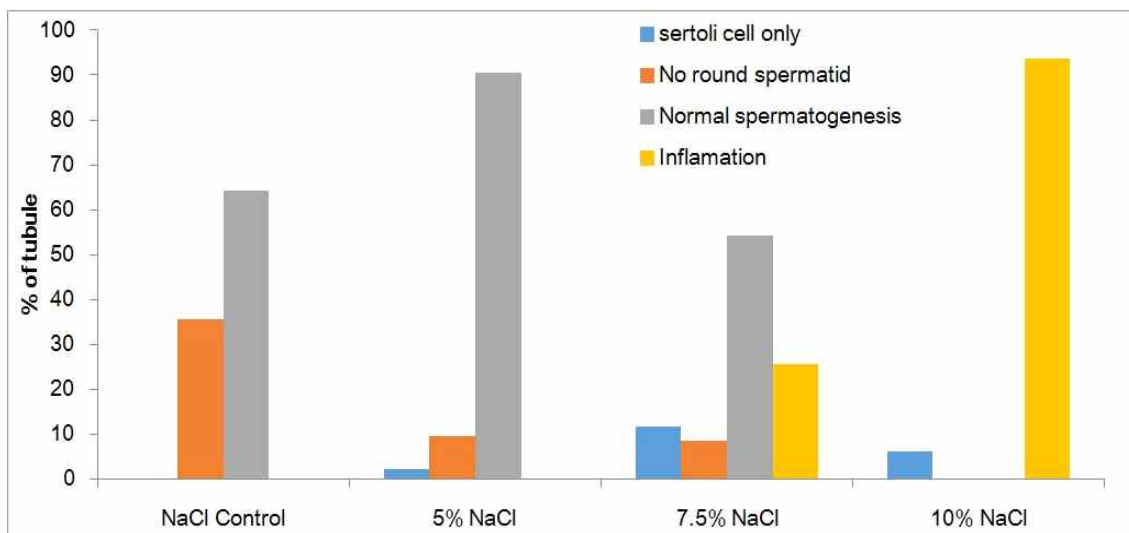
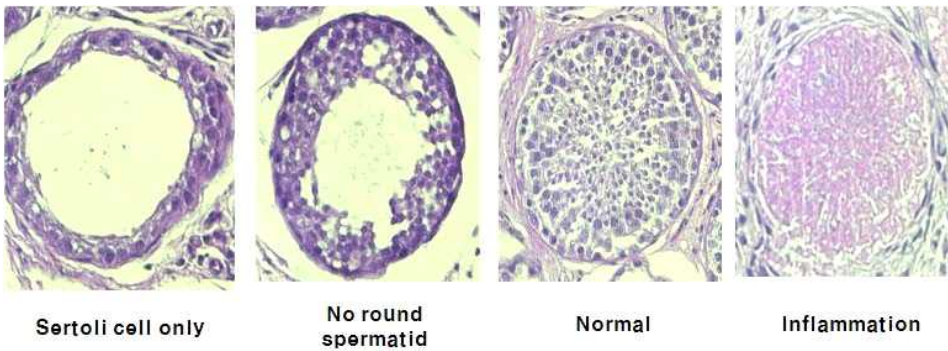
일련번호	처리	결과	
		사진	설명
1	PBS		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 별다른 특이한 사항 없이 전체적으로 건강한 조직 발견</li> </ul>
2	5% NaCl		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정소 내 집중부위로 추정되는 두 곳에 반경 약 1cm 크기의 염증조직 발견</li> </ul>
3	7.5% NaCl		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정소 내 집중부위로 추정되는 곳에 반경 약 1cm 크기 염증조직이 발견됨</li> <li>• 집중부위로 추정되는 곳에 붉은색 괴사조직 발견</li> </ul>



○ 실험결과(종합)

- 신속하게 주사약물 투여(fast injection) 시 접종부위 조직 괴사 발생
- 주사약물 투여 부위 반경 약 1 cm 부위만 염증반응 발생
- 염증부위 외 부분은 NaCl 처리에 크게 영향 받지 않음

○ H&E 염색 조직 결과 아래와 같이 4가지 종류의 다양한 tubule의 단면적 형태가 관찰됨



\* 정소 당 seminiferous tubule 단면적 총 500 여개 관찰

- 다양한 NaCl 농도 처리에 따른 tubule 형태
  - PBS로 처리된 정소에는 대부분(65% 이상)의 tubule에서는 정상 spermatogenesis가 발견되었고 약 35% tubule에서 round spermatid가 존재하지 않는 tubule 발견, 그 외 다른 형태의 tubule은 발견되지 않음
  - 5, 7.5, 10%로 처리된 정소에서는 염증(괴사) 주변 부위 위 다른 부분에서는 정상적인 tubule이 발견됨
  - 각 정소마다 염증(괴사)부위가 발견되었으며 이러한 괴사 부분의 대부분은 ‘no germ cell with inflammation’형태의 tubule이 발견됨

○ 실험결론

- 5, 7.5, 10% NaCl 처리는 자기정소세포가 제거(setoli cell only tubule)하지 못함
- 15 gauge 주사바늘을 이용하여 신속하게 약물을 주입할 경우 괴사가 심하게 발생

**2-3. Slow injection 방식의 국소 NaCl처리가 정원세포에 미치는 영향(선행연구 3)**

① 연구 목적

- 염소의 정소에 NaCl을 천천히 주입할 때 정소내 미치는 영향 확인

② 연구 방법 및 내용

- Fast injection 방식으로 NaCl을 처리하였을 때 injection site에 괴사가 발견됨
- 작은 주사바늘(26gauge)로 천천히 NaCl을 처리하였을 때 결과를 알아보고자 연구 수행
- Post-pubertal 흑염소(n=1, 정소 2개)를 대상으로 실험 수행

일련 번호	처리 (All treatment was autoclaved)	용 량 (cc)	주사바늘 (gauge)	주입방법	거세 시점 (처리 후)	비고
1	2% NaCl	15	26	정소 중앙부위에 바늘을 깊숙이 주입하고 천천히 빼면서 slow injection (1 cc/min) 방식으로 약물 투여	3주	
2	10% NaCl	15	26		3주	

- 처리 2-3주 후 거세수술을 실시하여 정소를 제거하고 절개하여 정소 내 상태를 확인
- 정소조직을 절개하여 4% paraformaldehyde에 고정하여 H&E 염색을 실시



말 보정 후 정소에 약품 처리 I



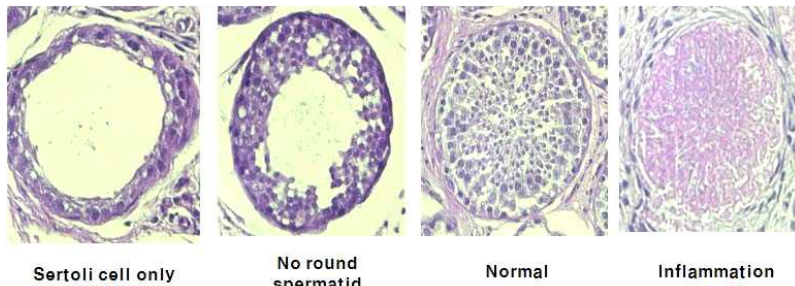
말 보정 후 정소에 약품 처리 II

④ 연구 결과

○ NaCl 처리에 따른 정소상태

일련 번호	처리	결과	
		사진	설명
1	2% NaCl		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대체적으로 조직 상태가 양호하고 (firm) 괴사부분은 발견되지 않음</li> <li>• 약간의 흰색부분(fibrosis)이 rete testis 부분에 발견됨</li> </ul>
2	10% NaCl		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대체적으로 건강한 조직이 발견됨</li> </ul>

○ H&E 염색 조직 결과 아래와 같이 4가지 종류의 다양한 tubule의 단면적 형태가 관찰됨

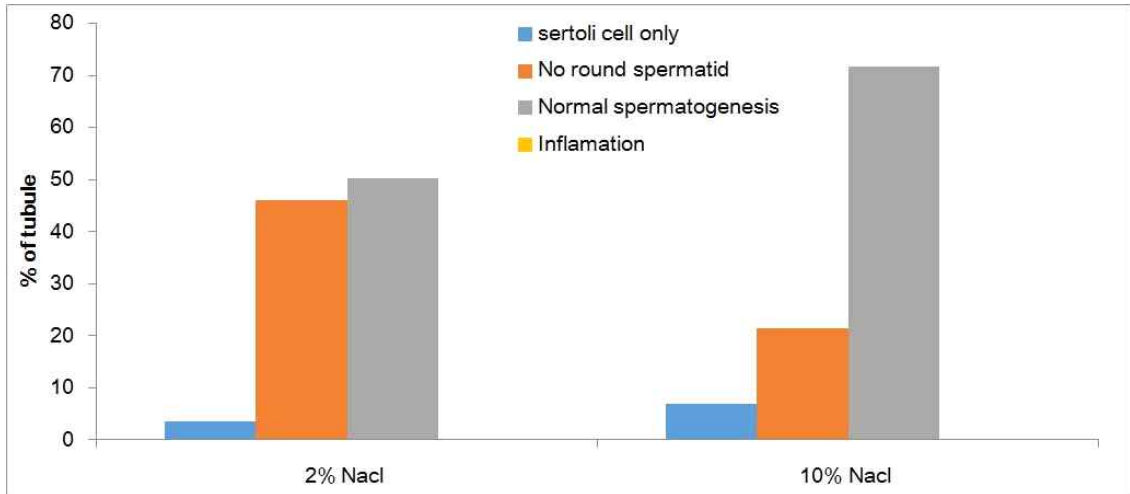


Sertoli cell only

No round spermatid

Normal

Inflammation



\* 정소 당 seminiferous tubule 단면적 총 500 여개 관찰

- Slow injection 방식으로 주입할 경우 괴사부분이 발생하지 않는 것을 확인
- 하지만 NaCl처리로는 germ cell이 제거된 tubule을 확보하기 어려움

#### 2-4. 국소 glycerin처리가 정원세포에 미치는 영향(선행연구 4)

##### ① 연구 목적

- 말의 정소에 국소 glycerin처리할 시 정소세포에 미치는 영향 확인

##### ② 연구 방법

- 실험동물의 경우 정소를 glycerin (10-70%)으로 처리할 경우 정원세포가 제거된 seminiferous tubule이 발견되었음
- Glycerin 처리는 Leydig 세포에는 영향을 주지 않아 응성호르몬 생산량이 줄어들지 않기에 응성의 리비도에 영향을 미치지 않음

##### ③ 연구 내용

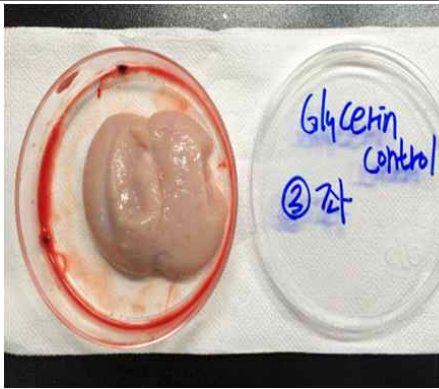

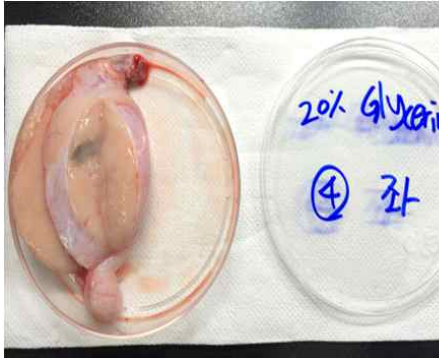

- Post-pubertal 흑염소(n=2, 정소 4개)를 대상으로 실험 수행

일련 번호	처리 (All treatment was autoclaved)	용량 (cc)	주사바늘 (gauge)	주입방법	거세 시점 (처리 후)	비고
1	PBS	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
2	10% glycerin	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
3	20% glycerin	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	
4	30% glycerin	10	20	신속하게 2회 주입(각 5 cc)	2주	

- 처리 2주 후 거세수술을 실시하여 정소를 제거하고 절개하여 정소 내 상태를 확인
- 정소조직을 절개하여 4% paraformaldehyde에 고정하여 H&E 염색을 실시

④ 연구 결과

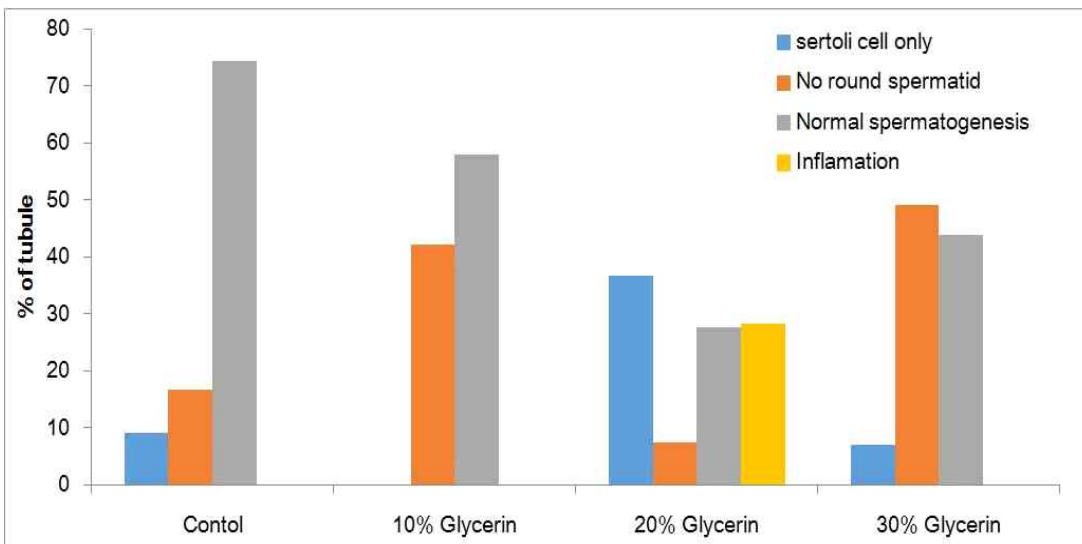
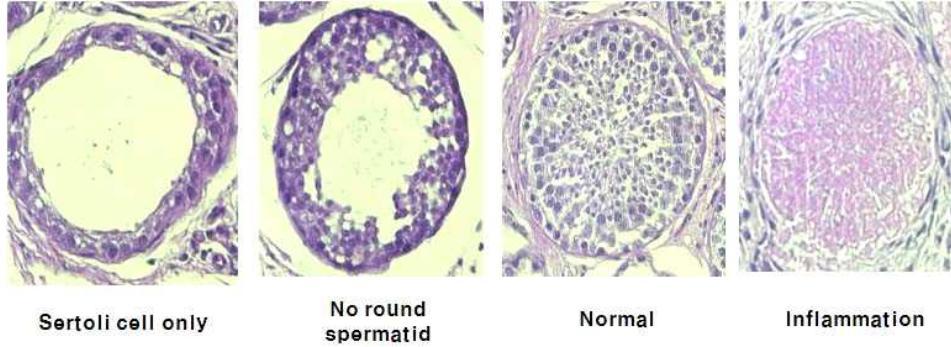
- Glycerin 처리에 따른 정소상태

일련번호	처리 (autoclaved)	결과	
		사진	설명
1	PBS		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 별다른 특이한 사항 없이 전체적으로 건강한 조직이 발견됨</li> <li>• 접종부위에 괴사 조직이 발견됨</li> </ul>
2	10% Glycerin		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 별다른 이상 없이 정상적인 건강한 조직이 발견되었음</li> </ul>
3	20% Glycerin		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정소 내 접종부위로 추정되는 곳에 반경 약 1cm 크기 염증조직이 발견됨</li> </ul>
4	30% Glycerin		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정소 내 접종부위로 추정되는 지점에 반경 약 1cm 크기 염증조직 및 괴사조직이 발견됨</li> </ul>

○ 실험결과

- 신속하게 주사약물 투여(fast injection) 시 접종부위 조직 괴사 발생
- 주사약물 투여 부위 반경 약 1 cm 부위만 괴사반응 및 염증 발생

○ H&E 염색 조직 결과 아래와 같이 4가지 종류의 다양한 tubule의 단면적 형태가 관찰됨



\* 정소 당 seminiferous tubule 단면적 총 500 여개 관찰

○ 실험결과

- 10% glycerin으로 처리된 정소의 경우 정상적인 tubule이 전체 약 60%였고 다른 나머지 40% tubule은 round spermatid가 존재하지 않는 형태
- 20% glycerin으로 처리된 정소에서 정상적인 spermatogenesis를 보인 tubule은 40% 미만으로 낮았고 반면에 Sertoli cell로만 구성된 tubule이 가장 많음
- 30% glycerin으로 처리된 정소의 경우, round spermatid가 없는 tubule이 정상적인 spermatogenesis를 보인 tubule보다 더 많이 발견됨
- 15 gauge 바늘을 이용하여 신속하게 처리 시에는 접종부위에 염증반응이 유발되는 것을 확인

○ 착안점

- Glycerin으로 처리할 경우 Nacl로 처리했을 때 보다 tubule 내 정원세포를 제거하는 데 효

과가 있음을 확인

- 주사바늘을 15 gauge보다는 가는 바늘을 사용하고 신속하게 처리하기 보다는 분당 투여량을 미리 정한 후 서서히 주입해야 함

## 2-5. Slow injection 방식의 국소 Glycerin 처리가 정원세포에 미치는 영향(선행연구 5)

### ① 연구 목적

- 정소에 glycerin을 천천히 주입할 경우 정원세포에 미치는 영향 확인

### ② 연구 방법

- 이전 연구에서 fast injection 방식으로 Glycerin을 처리하였을 때 injection site에 염증이 발생하거나 괴사조직이 발견되었음.
- 작은 주사바늘(26 gauge)로 서서히 접종하는 방식으로 약물처리를 할 때 정소조직에 미치는 영향을 알아보려고 선행연구 수행

### ③ 연구 내용

- Post-pubertal 흑염소(n=3, 정소 6개)를 대상으로 실험 수행

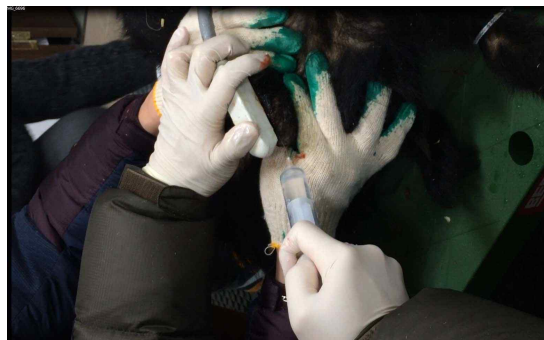
일련 번호	처리 (All treatment was autoclaved)	용량 (cc)	주사바늘 (gauge)	주입방법	거세 시점 (처리 후)	비고
1	10% Glycerin	10	26	Rete testis에 바늘을 주입하고 slow injection (1 cc/min) 방식으로 약물 투여	3주	
2	10% Glycerin	10	26		8주	
3	10% Glycerin	15	26	정소 중앙부위에 바늘을 깊숙이 주입하고 천천히 빼면서 slow injection (1 cc/min) 방식으로 약물 투여	3주	
4	20% Glycerin	15	26		3주	
5	35% Glycerin	15	26	Rete testis에 바늘을 주입하고 slow injection (2 cc/min) 방식으로 약물 투여	4주	
6	70% Glycerin	12	23	정소 5개 부위에 바늘을 깊숙이 주입하고 천천히 빼면서 slow injection (2 cc/min) 방식으로 약물 투여	4주	



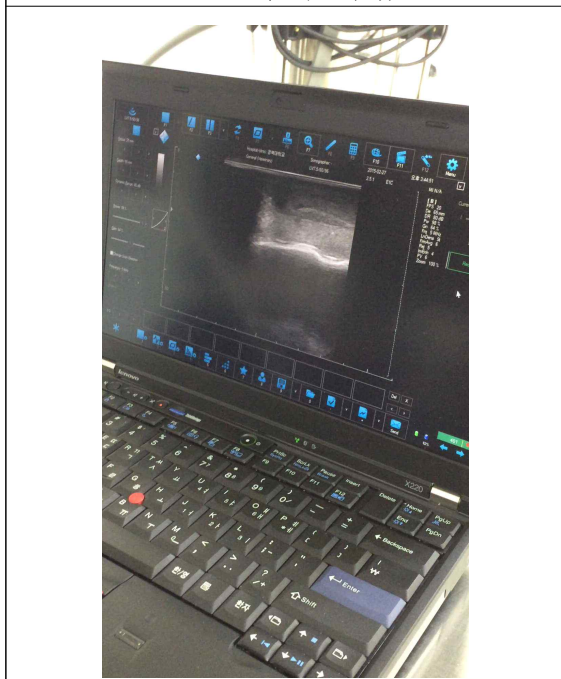
- 여러 가지 용량의 glycerin을 주입방식을 달리하여 (rete testis injection vs random injection 방식) 염소정소에 처리
- 2개월 안에 정소조직을 4% paraformaldehyde에 고정하여 H&E 염색 실시



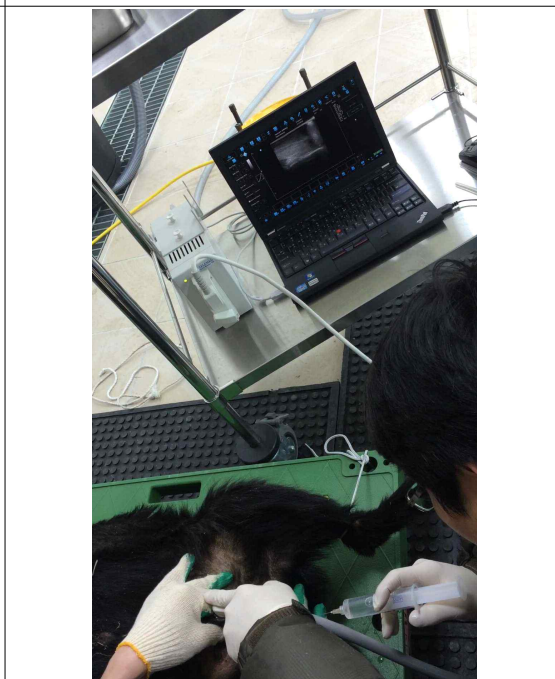
염소 보정 및 초음파기계를 이용한 rete testis 내 약물주입



26 gauge를 이용한 염소정소 내 약물주입





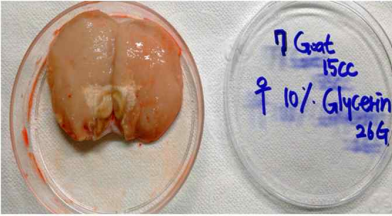
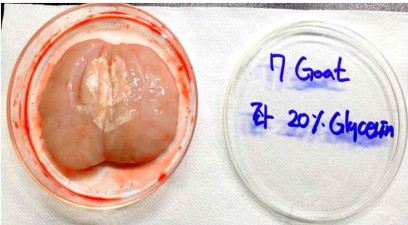
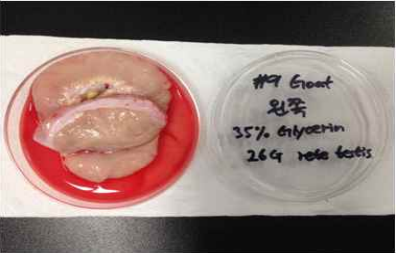
초음파기계를 이용한 rete testis 위치 확인



초음파기계를 이용한 rete testis injection

④ 연구 결과

○ Glycerin 처리에 따른 정소상태

일련번호	처리	결과		
		처리방식	사진	설명
1	10% Glycerin (3주 후 거세)	Rete testis에 바늘을 주입하고 slow injection (1cc/min) 방식으로 서서히 약물 투여		<ul style="list-style-type: none"> <li>대체로 건강한 조직이 발견되었고 별다른 괴사조직은 발견되지 않음</li> </ul>
2	10% Glycerin (8주 후 거세)			<ul style="list-style-type: none"> <li>대체로 건강한 조직이 발견되었고 별다른 괴사조직은 발견되지 않음</li> </ul>
3	10% Glycerin (07 우)	정소 중앙부위에 바늘을 깊숙이 주입하고 천천히 빼면서 slow injection (1cc/min) 방식으로 서서히 약물 투여		<ul style="list-style-type: none"> <li>Rete testis 주변에 염증조직이 발견됨. 염증조직 주변에 흰색조직이 발견됨</li> <li>겉 표면에 흰색조직이 발견됨</li> </ul>
4	20% Glycerin (07 좌)			<ul style="list-style-type: none"> <li>흰색조직이 rete testis 주변에서 다수 발견됨</li> <li>흰색조직 외 다른 부분에서는 정상적인 조직상태를 나타냄</li> </ul>
5	35% Glycerin (09 좌)			<ul style="list-style-type: none"> <li>Rete testis 주변에 뚜렷하게 흰색조직이 발견되었음. 또한 정소 외곽주변에도 흰색조직 발견</li> </ul>
6	70% Glycerin (09 우)	정소 중앙부위에 바늘을 깊숙이 주입하고 slow injection (1cc/min) (5회 나눠 주입하여		<ul style="list-style-type: none"> <li>Rete testis 주변에 뚜렷하게 흰색조직 발견</li> </ul>

정소 전체로 약물이  
퍼질 수 있도록  
주입)

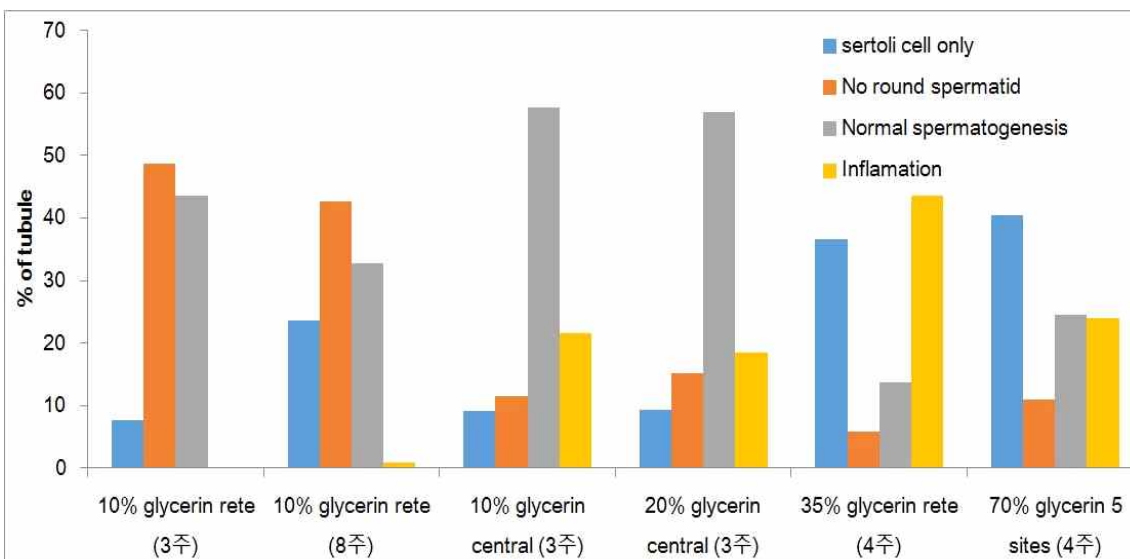


- Rete testis에 바늘을 위치하고 slow injection 방식으로 약물을 투여할 경우 injection pressure에 의한 괴사조직은 발생하지 않음
- Glycerin의 농도가 높게 처리될수록 희색조직의 분포가 더 넓게 발견됨. 특히 rete testis 주변에 흰색조직 형태가 주로 발견됨
- Rete testis로 주입하는 방식이나 정소 중앙에 깊숙이 넣었다가 천천히 빼면서 주입하는 방식이나 크게 차이가 없음

○ 착안점

- Glycerin으로 처리할 경우 Nacl로 처리했을 때 보다 tubule 내 정원세포를 제거하는 데 효과가 있음
- 주사바늘을 15 gauge보다는 26 gauge 주사바늘을 사용하고 신속하게 주입하기 보다는 분당 투여량을 미리 정한 후 서서히(분당 1cc) 주입해야 injection site의 조직 괴사를 방지할 수 있음

○ H&E 염색조직 분석결과 아래와 같은 결과가 도출됨



\* 정소 당 seminiferous tubule 단면적 총 500 여개 관찰

○ 실험결과

- 10-20% glycerin으로 처리할 때보다 35-70%로 처리할 경우 inflammation 조직이 다수 발견되었지만 Sertoli cell only tubule 단면적이 월등하게 많이 발견되었음
- 35% glycerin 으로 처리할 때보다 70%로 처리할 경우 Sertoli cell only tubule이 더 많이 발견되었고 inflammation tubule 단면적도 적게 발견되었음

※ 선행연구결과에 따라 본 연구 사용하기로 결정한 말 정소 처리방법

- 70% glycerin을 26 gauge를 사용하여 분당 1cc 주입

2-6. 70% glycerin 국소 주입을 통한 정원줄기세포이식 recipient 말 모델 생산(본 연구 1)

□ 본 연구 주요내용 및 결과

① 연구 목적

- 70% glycerin 처리를 통한 정원줄기세포이식 recipient 말 생산기술개발

② 연구 배경 및 방법

- 이식 시 정원줄기세포가 tubule에 안착하고 spermatogenesis를 개시하기 위해서는 자기 정원세포가 제거된 정소를 가진 recipient 말의 생산기술 개발이 필요함
- 일반적으로 endogenous germ cell을 제거하기 위하여 busulfan 약품이 사용됨
- 실험동물 및 대, 중, 소 동물을 busulfan을 처리해도 영구적으로 endogenous germ cell이 제거되지 않고 시간이 지나면 다시 spermatogenesis가 회복됨
- 또한 busulfan 약품처리는 정맥주사를 통한 systemic treatment이기 때문에 정소에 있는 spermatogonial stem cell 뿐만 아니라 조혈줄기세포도 제거하여 폐사하는 경우 발생
- 그러므로 busulfan을 대체할 수 있는 화학적, 물리적 방법을 개발 필요
- 소 및 염소의 정소에서 자기 정원세포를 제거하기 위해 방사선처리 방법이 사용되지만 국내에서는 살아있는 말의 정소를 방사선으로 처리할 수 있는 시설 부재
- 그러므로 간단한 방법으로 자기정원세포를 제거할 수 있는 기술 개발 필요
- 노새의 경우 spermatogenesis가 완전하게 이루어지지 않고 1st primary spermatocyte 단계에서 정지되기 때문에 정자 생산 불가
- 그럼에도 불구하고 사정은 가능하기 때문에 말 정원줄기세포 이식대상동물로 적절
- 정원줄기세포를 노새에 이식할 경우 노새가 사정한 정자의 100%는 말 정원줄기세포 유래 정자이기 때문에 recipient 로 사용가능
- 하지만 seminiferous tubule이 자기 germ cell인 spermatogonia와 1st primary spermatocyte로 채워져 있기 때문에 이식된 spermatogonial stem cell이 tubule의 basement membrane 에 안착하기가 물리적으로 어려움
- 그러므로 100% 정소의 endogenous germ cells은 제거하지 못하더라도 이식부위인 rete testis 주변의 seminiferous tubule 내 기존 germ cells을 제거할 수 있는 기술 개발이 필요함

- 본 연구팀은 선행연구를 데이터로 바탕으로 70% glycerin, slow injection method로 정소를 처리할 경우 Sertoli cell only tubule 생성이 가능 할 것으로 예상하고 말 6마리를 대상으로 본 연구를 실시하였음
- 말 정원줄기세포 이식을 위한 recipient 모델 조건
  - 자기정자를 생산하지 못하거나 적게 생산
  - Donor spermatogonial stem cell이 seminiferous tubule basement membrane에 안착 될 수 있도록 rete testis 주변에 자기 germ cell이 제거된 tubule 보유
  - Donor spermatogonial stem cell이 이식되었을 때 full spermatogenesis가 이루어 질 수 있도록 testicular niche(Leydig or Sertoli cells)가 온전하여야 함
  - Donor spermatogonial stem cell 이식 후에도 발기, 승가, 사정이 가능해야 함

③ 연구 내용

○ 실험기간: 2015년 2월~8월

○ 공시동물[70% glycerin 처리그룹(n=3), PBS 처리그룹(n=3)]

일련번호	마명	출생 년월일 (나이)	품종	처리 시 체중(kg)	모색
1	담양전설	2011-2-28(4세)	더러브렛	500	밤색
2	썬메이커	2011-5-17(4세)	더러브렛	534	밤색
3	사랑드림	2010-3-12(5세)	더러브렛	500	밤색
4	히든몬스터	2012-5-09(3세)	더러브렛	460	밤색
5	대천왕	2011-2-10(4세)	더러브렛	461	흑갈색
6	연주연승	2010-2-25(5세)	더러브렛	467	갈색

○ 실험기간 중 사료급여

	알파파견초	말 전용 농후사료(천하제일사료)
일일 급여 회수	3회	1회
회당 급여량	약 2.5kg/회	약 3kg/회
급수	자유급수	

○ 공시동물 사양관리

- 마사에 도착한 말은 1-3개월 환경적응 기간을 갖고 실험 실시
- 환경적응 기간 동안 마사 및 번식장 환경에 적응하는 훈련 및 의빈대 승가 조련 실시
- 의빈대 승가조련이 완료된 말을 대상으로 실험 실시
- 두 달에 한 번 발굽관리를 실시(삭제)



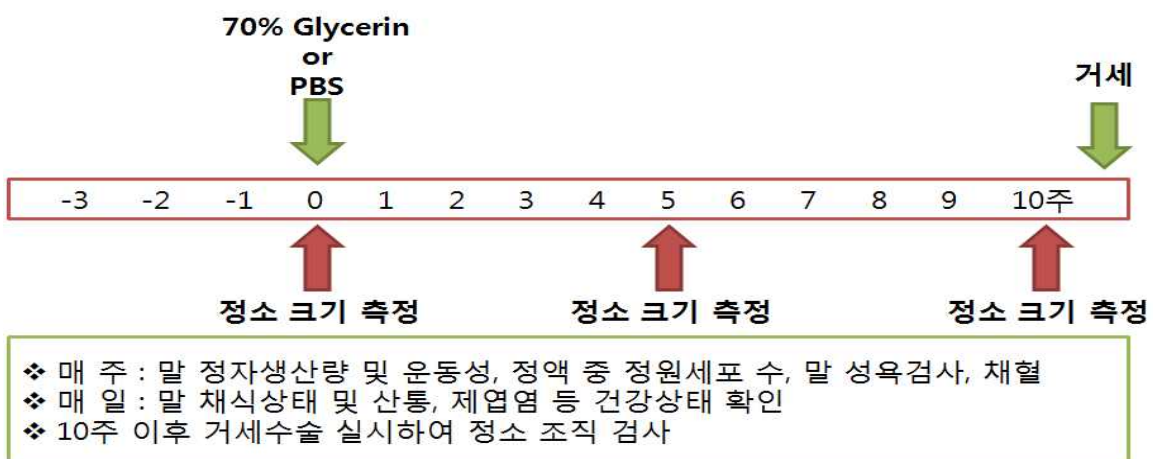
실험대상 말(6마리) 및 마사시설(경북대학교 생태환경대학 부속목장 말 연구동)

- 마방에서 사육하는 것을 원칙으로 하되 하루에 1회 패독에 방마
- 1일 1회 30분 이상 운동 실시 및 말 수장(grooming)관리 실시

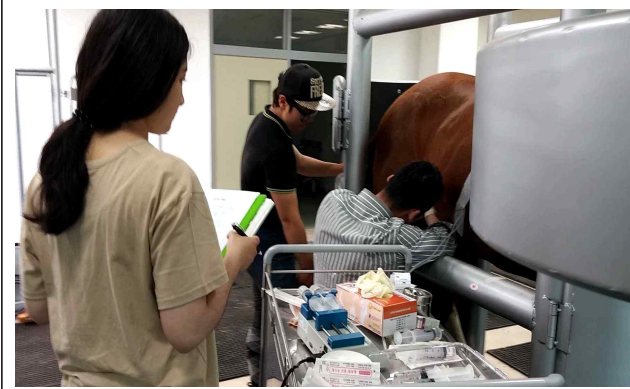
○ 처리방법

- 의빈대 승가 훈련을 마친 말을 대상으로 임의로 그룹지정
- 70% glycerin(50 ml) 및 PBS(50 ml) 처리 3주 전 정액채취, 리비도 검사, 혈액채취 실시
- 해당 약물을 정소에 서서히 일정량을 주입하기 위하여 infusion pump를 이용하였으며 분당 1 ml 용량 주입
- 처리 10주 후 거세수술을 실시하여 정소를 제거하고 정소조직에 대한 H&E 검사 실시

○ 실험 일정



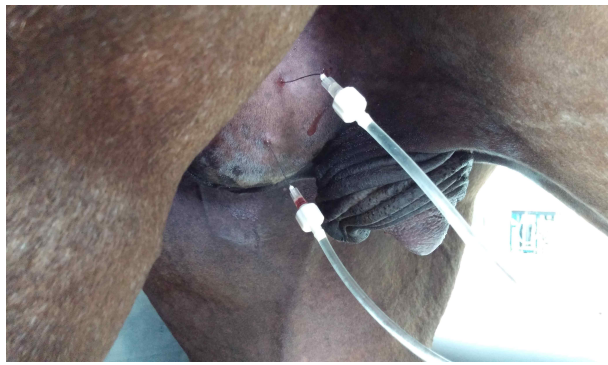
○ 실험수행사진



Glycerin 및 PBS 처리과정



Infusion pump 사용



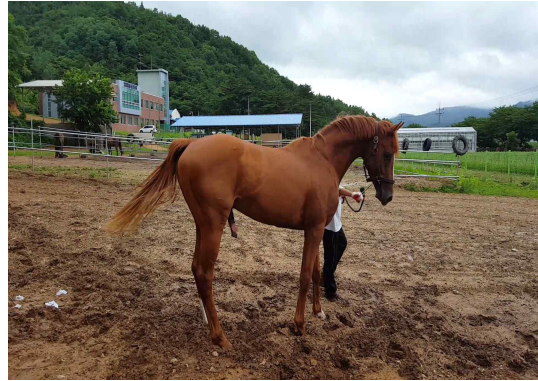
26 gauge 바늘을 이용한 약물 주입

처리 10주 후 거세수술

○ 정액채취과정



1. Handler와 함께 수말 입장



2. 수말이 암말을 보고 받기



3. 물과 휴지로 생식기 세척



4. 수말 의빈대 승가



5. AV를 이용한 정액채취

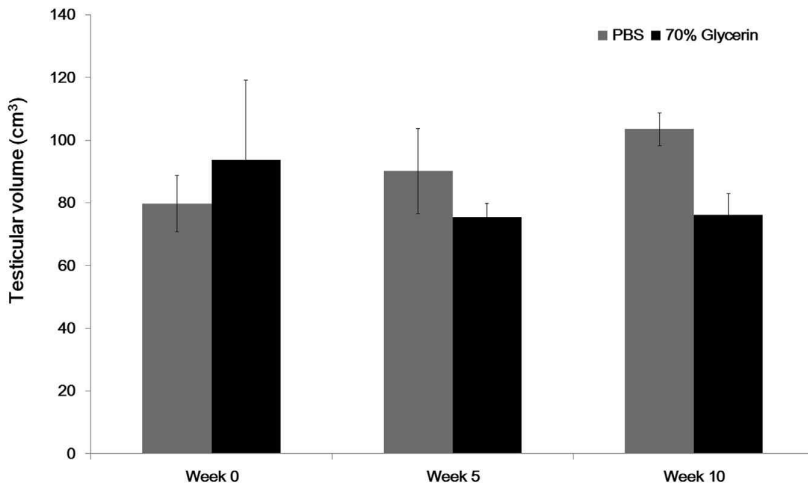


6. 정액 채취 확인



④ 연구 결과

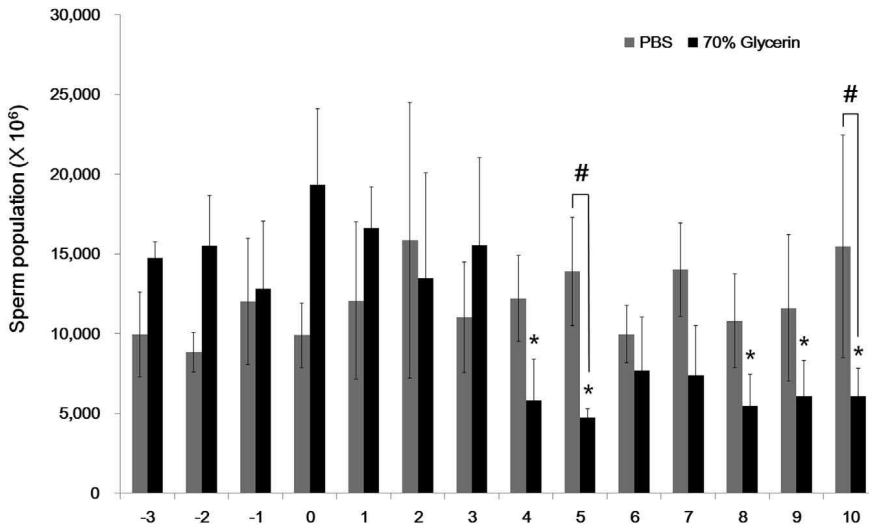
○ 정소크기 비교



- 70% glycerin 으로 처리한 정소의 부피가 PBS로 처리한 정소보다 적은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않음

○ 70% glycerin(50 ml)/PBS(50 ml) 처리에 따른 정자생산 및 운동성

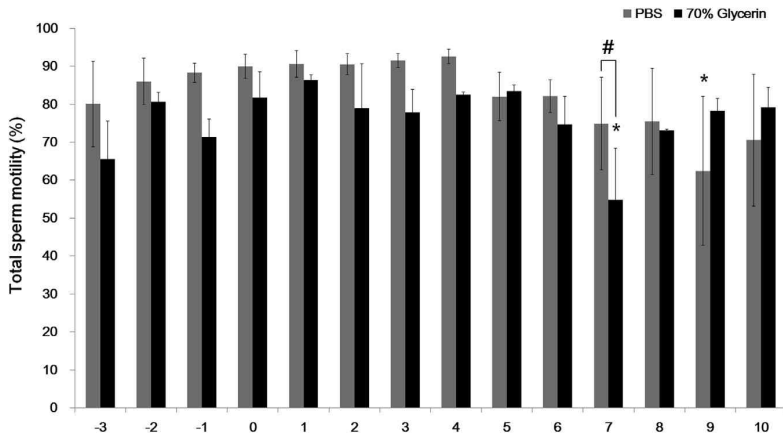
- 정자생산량 변화



※ Day 0 결과는 glycerin/PBS 처리 전 결과, Day 1 결과는 처리 후 일주일 경과 후 결과

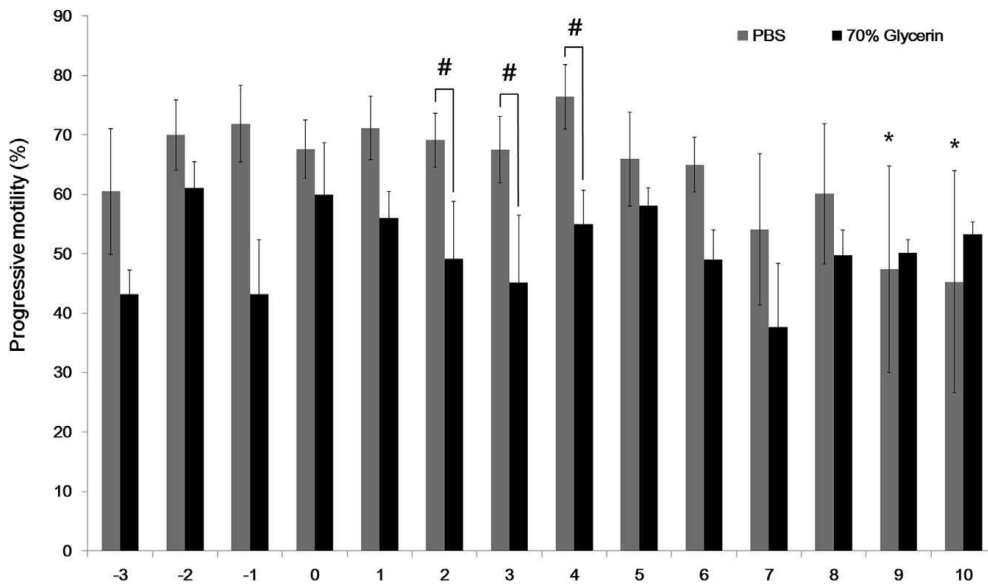
- 70% glycerin으로 처리된 수말(n=2)의 경우 처리 2주 후부터 정자 생산량 감소 시작
- 연구기간 마지막인 10주 째 까지 PBS 처리 그룹(n=3)과 비교해 70% glycerin 처리 그룹의 정자생산량이 줄어든 것 확인
- 이는 70% glycerin을 정소에 직접 주입할 경우

○ 정자 total motility 변화



- 70% glycerin 및 PBS 처리 그룹 말의 정자 total motility는 차이가 없음을 확인

○ 정자 progressive motility 변화

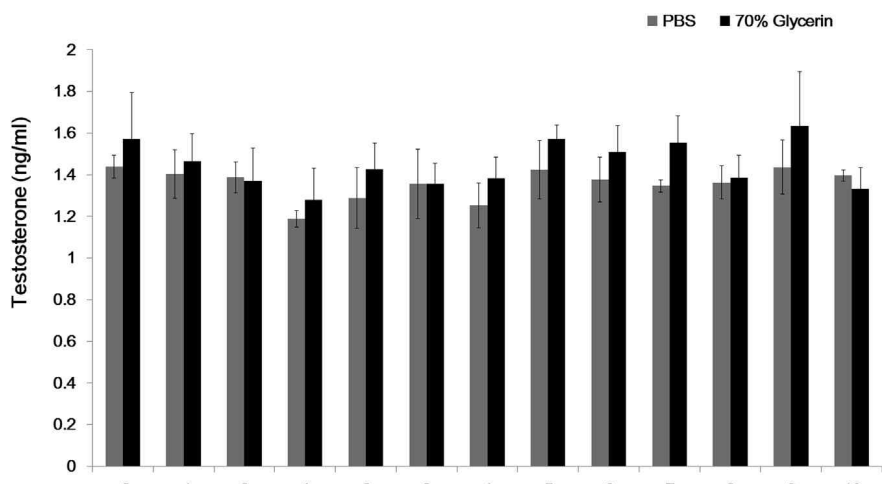


- 70% glycerin 및 PBS처리 그룹 말의 정자 progressive motility는 차이가 없음을 확인
- 상기 결과와 같이 정자 motility에 크게 변화가 없는 결과는 70% glycerin 처리에 의해 testicular niche(Leydig cells or Sertoli cells)가 크게 영향을 받지 않음

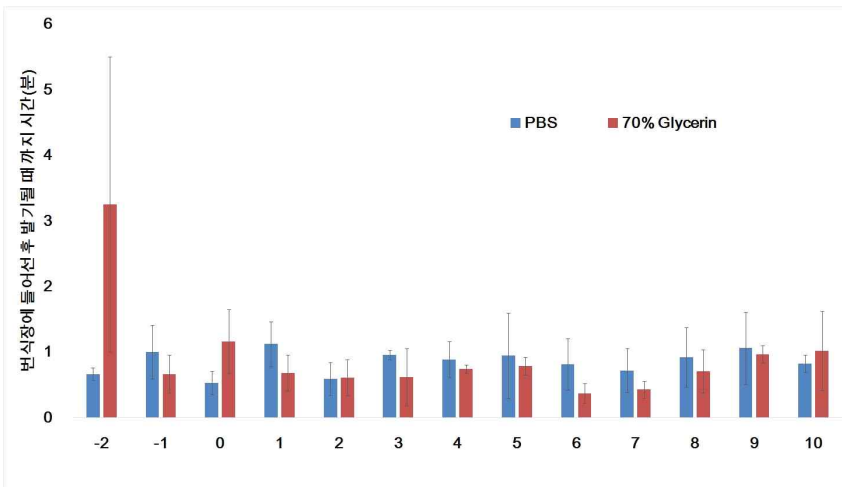
○ 70% glycerin/PBS 처리에 따른 수말의 혈중 testosterone 농도 및 리비도 검사

리비도 평가를 위한 모니터링 항목
번식장 입장 시점부터 발기하는데 걸리는 시간
성기 세척 이후 증가하는 데 걸리는 시간
사정할 때 까지 증가 횟수

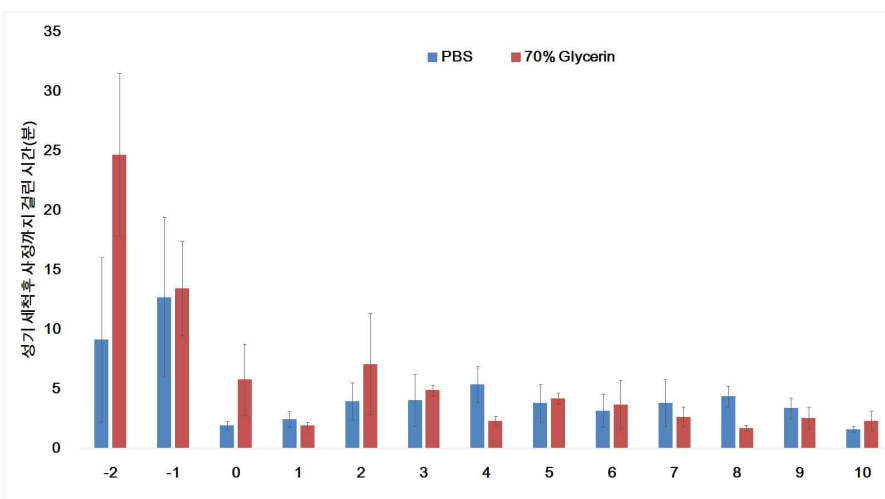
<Transplantation 후 70% glycerin과 control group간 testosterone 농도 비교>



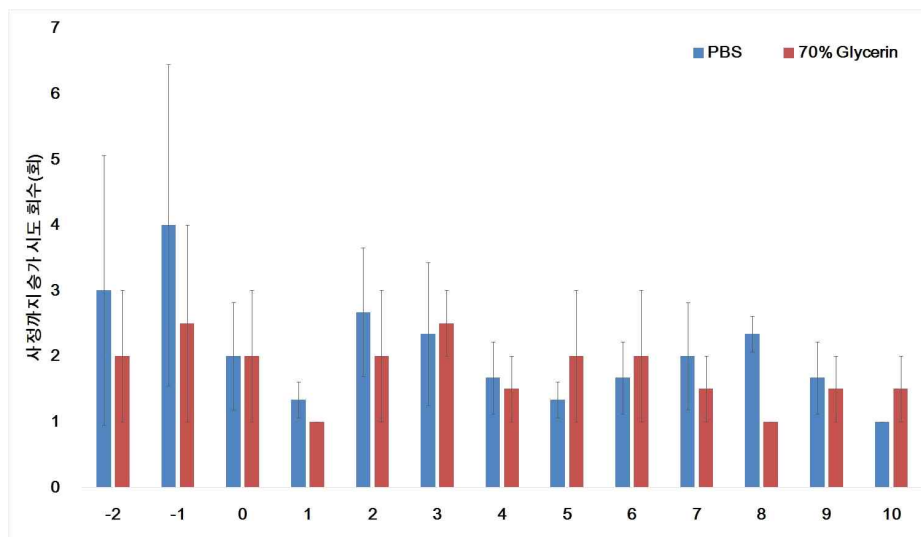
<Transplantation 후 70% glycerin과 control group간 발기까지 걸린 시간 비교>



<Transplantation 후 70% glycerin과 control group간 사정하기까지 걸린 시간 비교>



<Transplantation 후 70% glycerin과 control group간 사정하기까지 증가횟수 비교>


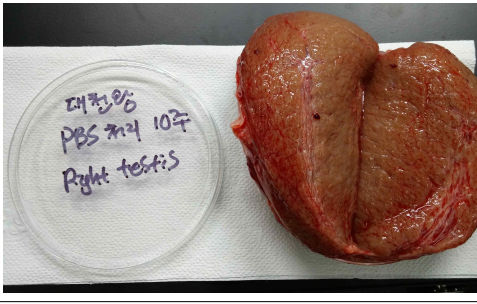



- 두 그룹간의 리비도에는 크게 차이는 없는 것 확인

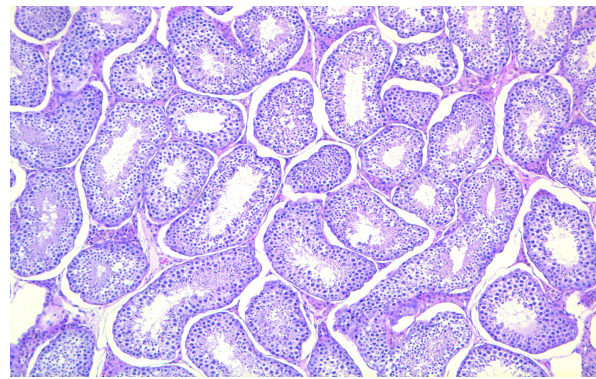
<결론>

- 70% glycerin를 이용하여 말 정소에 국소 처리 시 PBS로 처리한 그룹과 말의 정자성상 및 수말의 리비도가 크게 차이가 나타나지 않음
- 70% glycerin 및 PBS처리 그룹 말의 번식장에 들어선 후 발기될 때 까지 걸린 시간은 차이가 없음을 확인
- 70% glycerin 및 PBS처리 그룹 말의 성기 세척 후 사정까지 걸리는 시간은 차이가 없음을 확인
- 70% glycerin 및 PBS처리 그룹 말의 사정할 때 까지 의빈대 증가 시도 횟수는 차이가 없음을 확인
- 상기 결과로 말의 정소를 70% glycerin로 처리하여도 혈중 Testosterone 농도 변화를 야기하지 않고 말의 성욕에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨

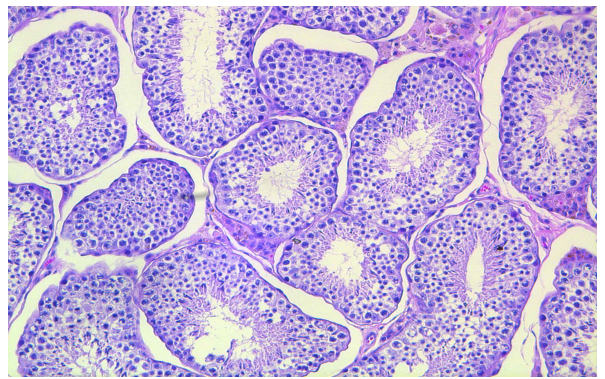
○ 70% glycerin 및 PBS 처리에 의한 정소조직변화 비교분석(처리 후 10주)

일련번호	처리	결과	
		사진	설명
1	PBS		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 별다른 특이한 사항 없이 전체적으로 건강한 조직이 발견됨</li> <li>• 전신마취 후 절개하여 국소 마취제에 의한 조직 손상 무</li> </ul>
2	PBS		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전반적으로 조직상태가 양호하나 간간이 정소 조직 내 섬유성 조직이 발견됨</li> <li>• 전신마취 후 절개하여 국소 마취제에 의한 조직 손상 무</li> </ul>
3	70% Glycerin		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 정소 내 약 2 cm 반경크기의 섬유화된(fibrosis) 조직이 발견됨</li> <li>• 국소마취제인 리도케인을 정소에 접종하여 rete testis 하단부에 조직괴사가 발생함</li> </ul>

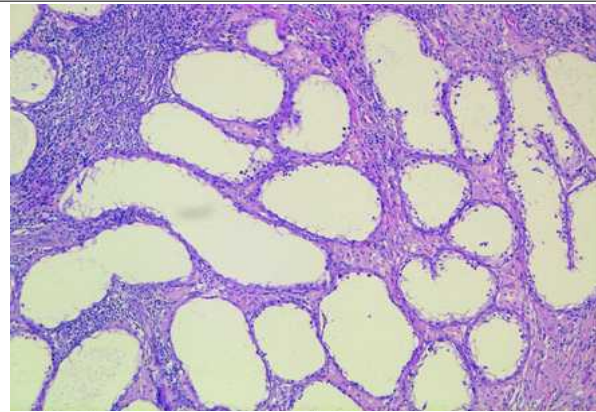
○ H&E 염색법을 이용한 조직 염색



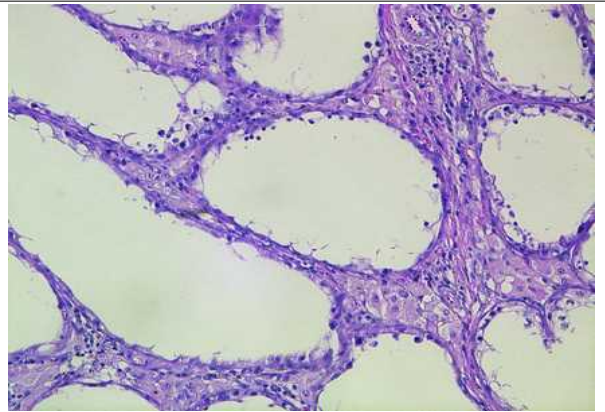
Normal spermatogenesis (100X)



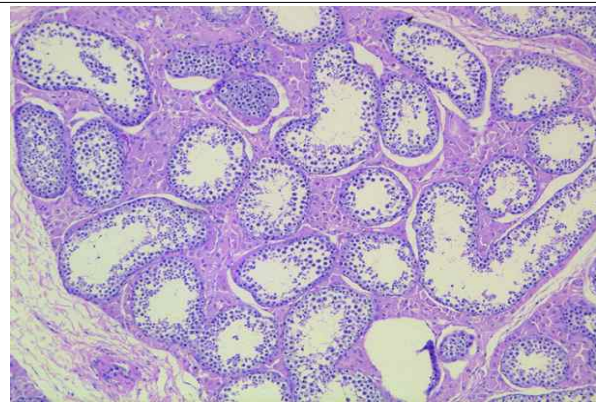
Normal spermatogenesis (200x)



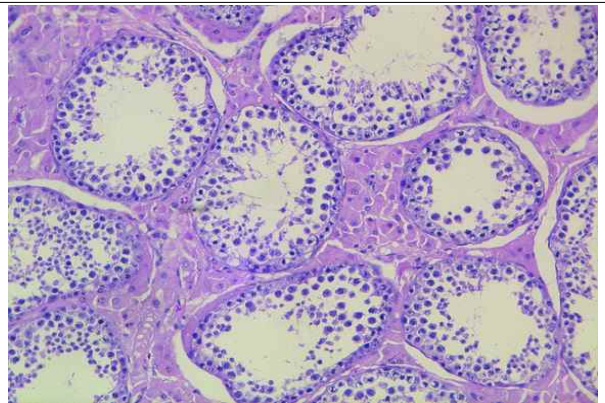
Sertoli cell only (100x)



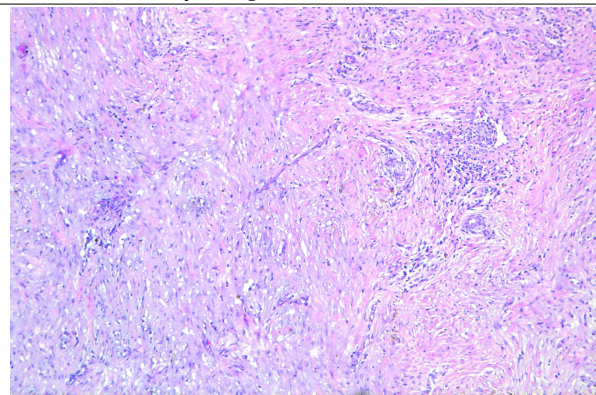
Sertoli cell only (200x)



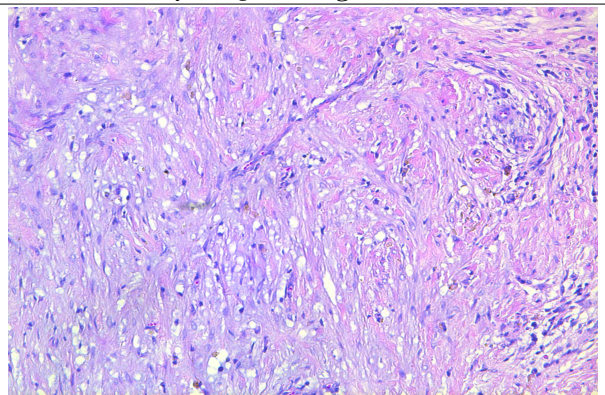
Destroyed spermatogenesis (100x)



Destroyed spermatogenesis (200x)



Fibrosis tissue (100x)



Fibrosis tissue (200x)

○ H&E 염색법을 이용한 조직 염색 결과

Group	Treatment				Control				
	Horse ID	T1	T2	T3	Mean ± SEM	C1	C2	C3	Mean ± SEM
Normal spermatogenesis (%)		67.4	88	85.1	80.17 ± 6.44	98.5	87.2	99.3	95 ± 3.91
Sertoli cell only (%)		30.9	5.3	1.4	12.53 ± 9.25	1.1	2.7	0	1.27 ± 0.78
Damaged spermatogenesis (%)		1.5	6.8	13.3	7.2 ± 3.41	0.2	9.8	0.5	3.5 ± 3.15

Abbreviation: SEM, standard error of mean.

- 70% glycerin 처리마의 경우 seminiferous tubule 단면 총 5000개, PBS처리마의 경우 seminiferous tubule 단면 총 3000개 씩 분석 실시
- T1말의 경우 70% glycerin를 이용하여 처리할 경우 tubule 단면적 중 약 30%가 넘는 tubule이 Sertoli cell only tubule 상태를 보였음
- 하지만 T2 및 T3말의 경우 각각 5.3, 1.4% tubule 만 Sertoli cell only tubule로 판별됨
- 평균적으로 약 20% tubule에서 germ cell이 제거되거나 spermatogenesis가 방해됨
- PBS 처리마의 경우 3000개 tubule 단면 중 약 1.27% 만이 sertoli cell only tubule 임
- 위 결과를 토대로 70% glycerin으로 정소에 국소 처리할 경우 동일한 방식을 사용하더라도 개체차이가 크게 발견되었음. 이는 국소 마치이기 때문에 동일한 방식을 적용한다고 하더라도 효과가 다르게 나타나는 것이라 판단됨

○ 결과: 70% Glycerin을 말의 정소에 주입하는 방식은 정소내 endogenous germ cells을 제거하기는 하지만 전체 tubule의 약 20%만 효과를 보이는 등 효율성이 떨어지고 또한 개체에 따라 효능의 차이가 커서 이상적인 방식으로 볼 수 없음

2-7. Endogenous germ cell 제거 효과를 극대화 할 수 있는 대체 방법 개발 (70% glycerin 처리 횟수 증가에 따른 효과, 선행연구 6)

① 연구 배경 및 목적

○ 배경

- 70% glycerin을 정소에 국소 처리 할 경우 endogenous 정소세포가 부분적으로 제거되기 때문에 이 효과를 제고하기 위한 대체 방법 개발 필요

○ 목적

- 70% glycerin 정소 국소 처리 횟수 증가에 따른 염소 정소 내 정원세포 제거 효과 확인

② 연구 내용 및 방법

- 염소를 전신 마취한 이후 정소에 70% glycerin을 일주일 간격으로 총 2회 처리
- 처리 4주 이후에 거세를 실시하고 정소 내부 상태 확인

③ 연구 결과

- 70% glycerin 정소 국소 처리 횟수 증가에 따른 염소 정소 내 정원세포 제거 효과 확인

○ 70% glycerin 2회 처리 후 정소 형태 관찰

1주 간격으로 70% glycerin으로 2회 처리된 정소

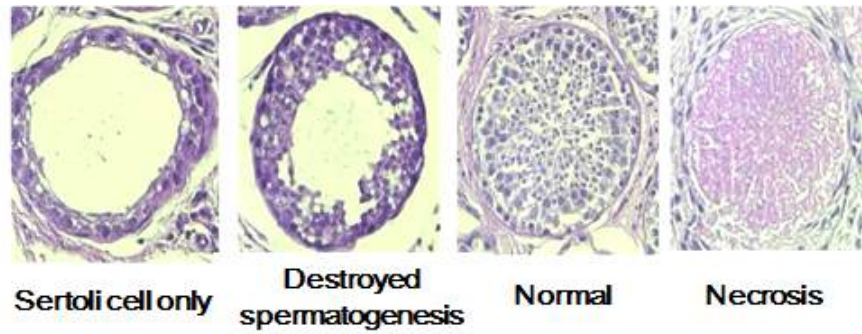


- 조직이 연하고 삼출물 다소 발견됨
- 정소 내 처리부위로 추정되는 두 곳 주변에서 반경 약 1cm 크기의 염증조직 발견됨
- 염증조직 주변으로 백색조직이 발견됨



○ H&E 염색이후 정소 조직 관찰

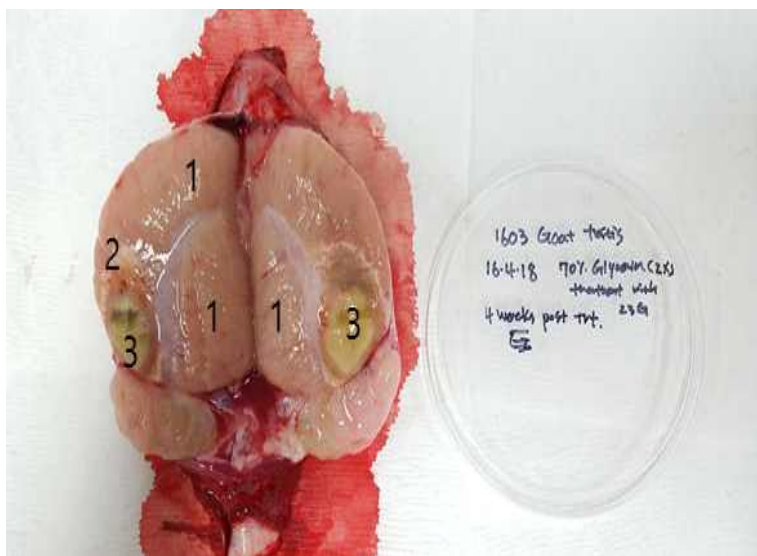
- 정소조직을 고정 후 H&E 기법으로 염색하여 seminiferous tubule 형태 관찰 및 비교
- 정소 단면적 내 round tubule 100개를 랜덤하게 관찰하여 seminiferous tubule 내 germ cell의 형태에 따라 Normal, Sertoli cell only, Destroyed spermatogenesis, Necrosis 등 4가지로 구분하여 분석



- Normal한 tubule은 타원형의 구조를 갖으며 tubule 내 결함이 없는 형태
- Destroyed spermatogenesis는 타원형의 구조에 결함이 보이고 일부 손실이 생긴 형태
- Sertoli cell only는 tubule의 구조 내 cell이 결여되어있고 세포벽 쪽으로 sertoli cell만이 남은 형태
- Necrosis는 tubule이 심한 염증반응을 보이는 형태

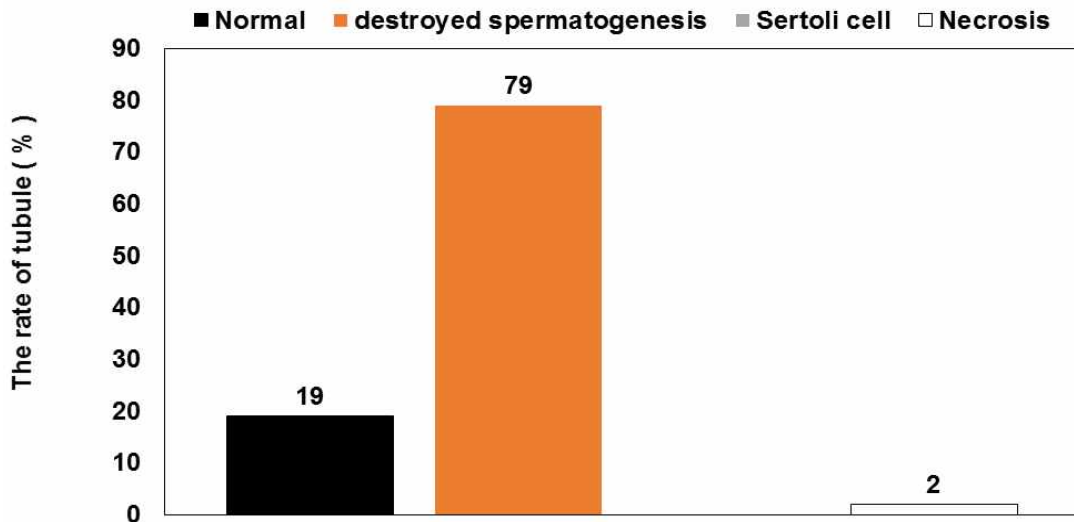
○ 70% glycerin 2회 처리 후 정소 H&E 구분

1주 간격으로 70% glycerin으로 2회 처리된 정소

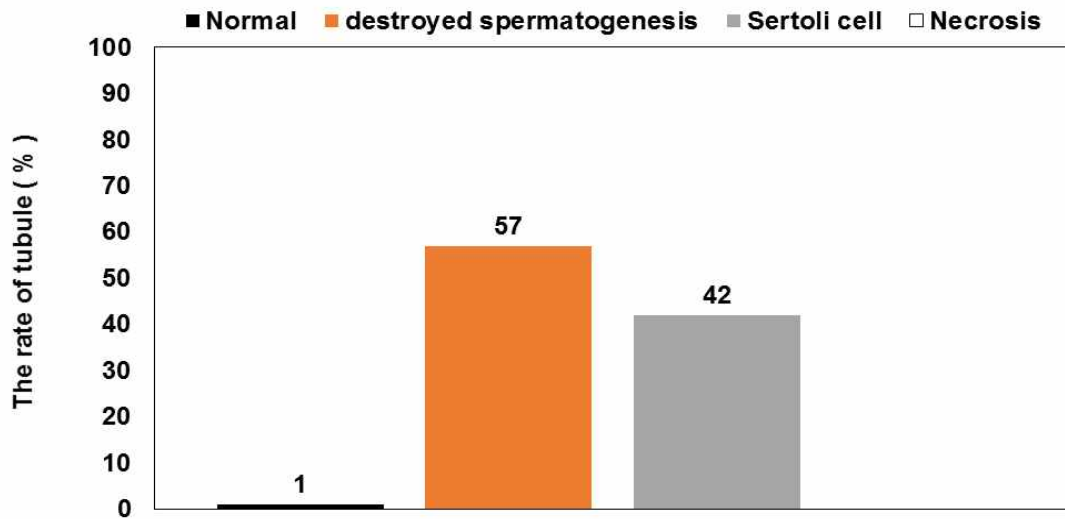


1. 정상조직
2. 백색조직
3. 염증조직

○ 1주 간격 70% glycerin 2회 처리 후 정소 정상조직 결과



- 1주 간격으로 70% glycerin으로 2회 처리된 정소의 정상조직에서는 destroyed spermatogenesis가 다수 관찰되었고 normal한 tubule이 소수 관찰됨

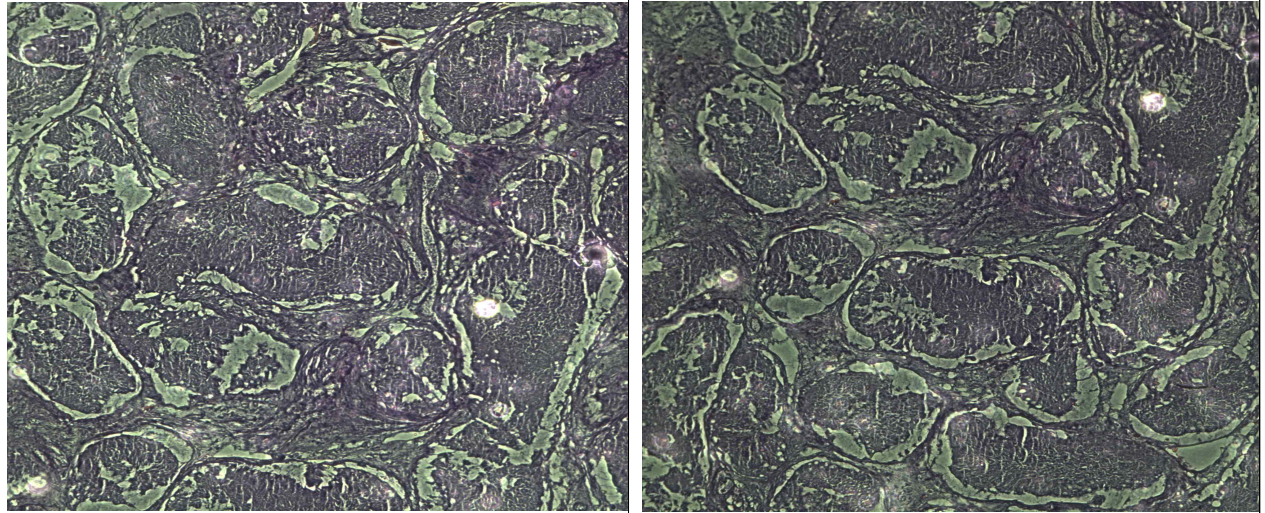


○ 1주 간격 70% glycerin 2회 처리 후 정소 백색조직 결과

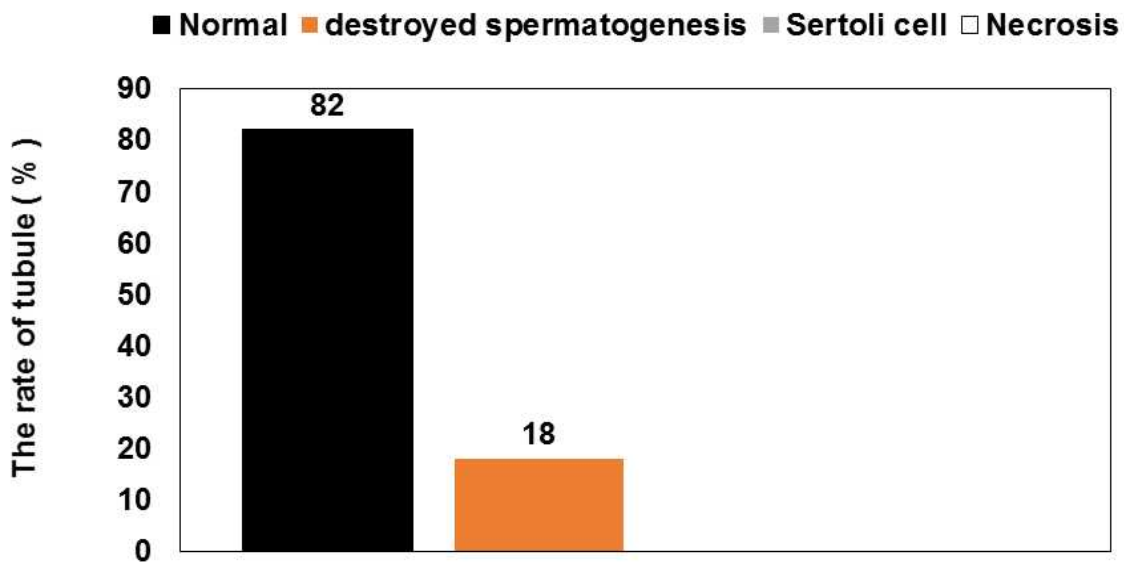
- 백색조직에서는 destroyed spermatogenesis tubule이 다수 관찰되었으며 sertoli cell only 또한 다수 관찰되었지만 normal한 tubule은 미량 관찰

- 1주 간격 70% glycerin 2회 처리 후 정소 염증조직 결과
  - Tubule 내 cell 형태가 관찰되지 않고 necrosis와 fibrosis가 발생한 것으로 판단

1주 간격 70% glycerin 2회 처리 정소 염증조직 Light microscope 관찰 사진



- 1주 간격 70% glycerin 2회 처리 정소 PKH 26 donor 염소 조직 testis 결과



- 다수의 normal tubule이 관찰되었었고 적은 destroyed spermatogenesis가 관찰

- 1주 간격 70% glycerin 2회 처리 결론

- 정상조직에서는 destroyed spermatogenesis가 다수 발견되었지만 sertoli cell only tubule 이 발견되지 않았으며 염증반응에 의해 necrosis와 fibrosis가 발생하기 때문에 1주 간격 70% glycerin 2회 처리는 부적합하다고 판단

## 2-8. Endogenous germ cell 제거 효과를 극대화 할 수 있는 대체 방법 개발(정소 내 busulfan 국소처리에 따른 효과, 선행연구 7)

### ① 연구 배경 및 목적

#### ○ 배경

- 1년차 과제 수행으로 개발한 70% glycerin을 활용한 endogenous germ cell 제거 방법은 정소 내 endogenous germ cell을 부분적으로 제거하는 데 효과가 있으나 정소 전체적으로 endogenous germ cell을 제거하지 못함
- 그러므로 말 정소 전체적으로 endogenous germ cell을 제거할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 선행연구를 추가 실시
- 또한 2016년에 국소적으로 busulfan을 처리할 경우 recipient 동물의 건강에는 영향을 미치지 않는다고 정소 내 endogenous germ cell의 제거가 가능하다는 결과가 보고됨 (Testicular Busulfan Injection in Mice to Prepare Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation Is Safe and Non-Toxic, (YuShen Quin and coworkers, PLoS One, 2016)
- 그러므로 국소적 busulfan 처리가 말 정소내 endogenous germ cell을 제거하는 데 효과가 있는지 확인하기 전에 염소를 대상으로 처리효과 검사

#### ○ 목적

- 국소적 busulfan 처리가 염소 정소 내 정원세포 제거 여부 실험

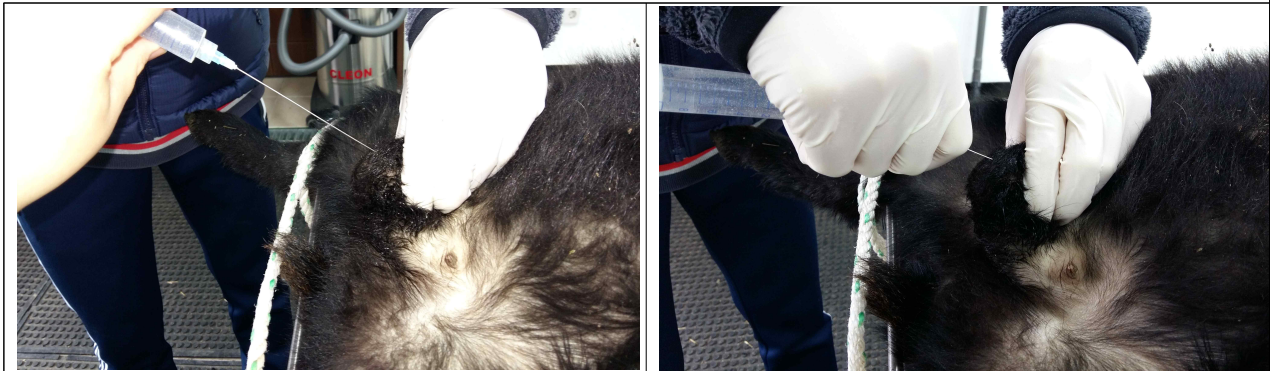
### ② 연구 내용 및 방법

- 6 mg/kg 농도의 busulfan을 사용하여 염소 정소에 1회 국소처리 후 2주 뒤 거세해서 조직학적 검사 실시
- 10 mg/kg 농도의 busulfan을 사용하여 왼쪽 정소에 1회, 오른쪽 정소에 2회 국소처리 후 2주 뒤 거세해서 조직학적 검사 실시
- 10 mg/kg 농도의 busulfan을 사용하여 염소 정소에 3회 국소처리 후 1주 뒤 거세해서 조직학적 검사 실시

처리		주사 바늘	염소(post-pubertal)		거세 실시
농도	방법		왼쪽 정소	오른쪽 정소	
6 mg/kg	(1회, 15 cc/회)	26 gauge	DMSO + D.W (증류수)	Busulfan + (DMSO + D.W)	첫 회 처리 후 4주
10 mg/kg	(주 1회 총 2회, 17 cc/회 주입)		1회 Busulfan + (DMSO + D.W)	2회 Busulfan + (DMSO + D.W)	
10 mg/kg	(주 1회 총 3회, 15 cc/회 주입)		3회 Busulfan + (DMSO)	3회 Busulfan + (DMSO)	

- Busulfan 처리 후 거세수술을 통해 정소를 제거
- 정소 조직을 4% paraformaldehyde로 고정한 후에 H&E 염색법으로 조직 염색 실시
- Busulfan처리에 따른 spermatogenesis 상태를 확인

③ 실험수행사진



염소 정소에 busulfan 국소처리

④ 연구 결과

○ Busulfan처리에 따른 정소 내 조직 변화

6 mg/kg busulfan 1회 처리	
Busulfan 국소 처리된 정소	DMSO+PBS (control) 국소 처리된 정소
10 mg/kg busulfan 2회 처리	
Busulfan 1회 국소 처리된 정소	Busulfan 2회 국소 처리된 정소
10 mg/kg busulfan 3회 처리	
없음	없음

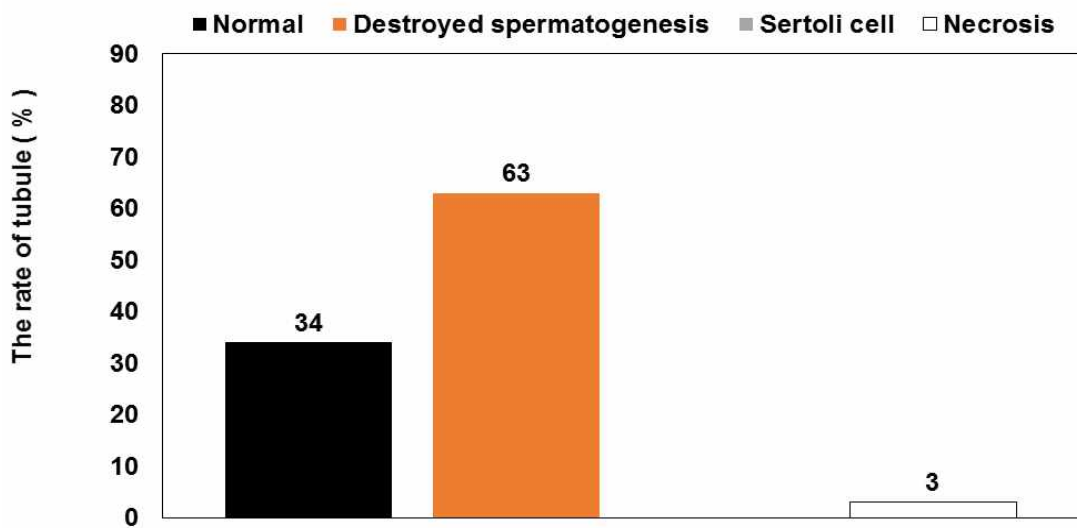
- 2주 뒤, 15cc 1회 처리된 각 정소에서 조직학적 차이 없음
- 농도를 10 mg/kg으로 높이고 1회 busulfan 처리 후, 2주 뒤에 같은 양을 한 번 더 처리하기로 함
- 2회 처리한 정소에는 물이 많이 나왔으며, 일부 백색조직과 섬유화된 조직은 1회 처리한 정소에서도 발견됨
- Busulfan (10 mg/kg)을 1주 단위로 3회 처리 후, 1주 뒤에 거세한 정소는 심하게 부패되어 있었으며 정상조직을 찾아보기 어려움

- Busulfan 처리는 endogenous germ cell을 제거하는데 적합하지 않다는 결론을 내리고 70% glycerin을 처리하기로 함

○ H&E 염색이후 정소 조직 관찰

- 정소조직을 고정 후 H&E 기법으로 염색하여 seminiferous tubule 형태 관찰 및 비교
- 정소 단면적 내 round tubule 100개를 랜덤하게 관찰하여 seminiferous tubule 내 germ cell의 형태에 따라 Normal, Sertoli cell only, Destroyed spermatogenesis, Necrosis 등 4가지로 구분하여 분석

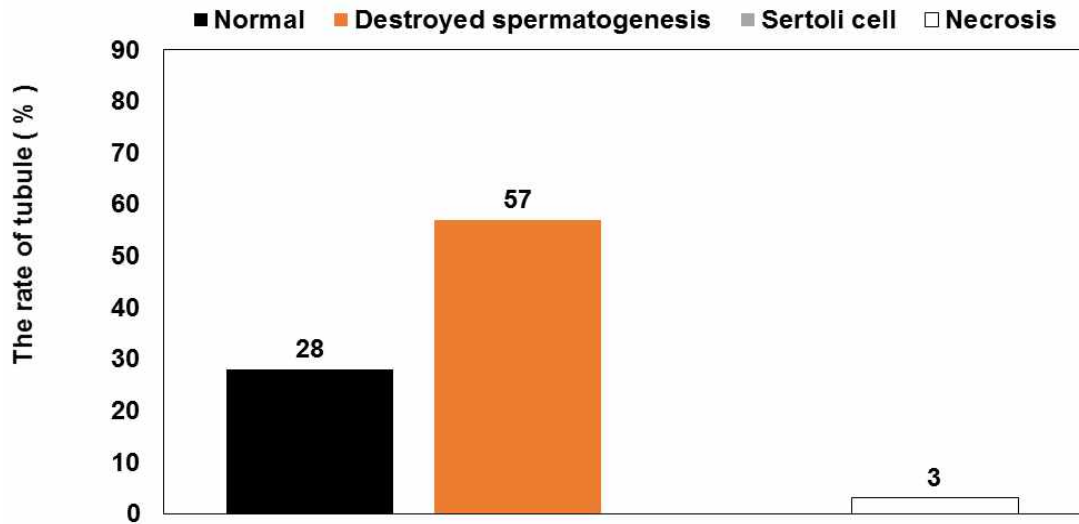
○ DMSO + PBS (control) 1회 처리한 조직의 H&E 관찰 결과



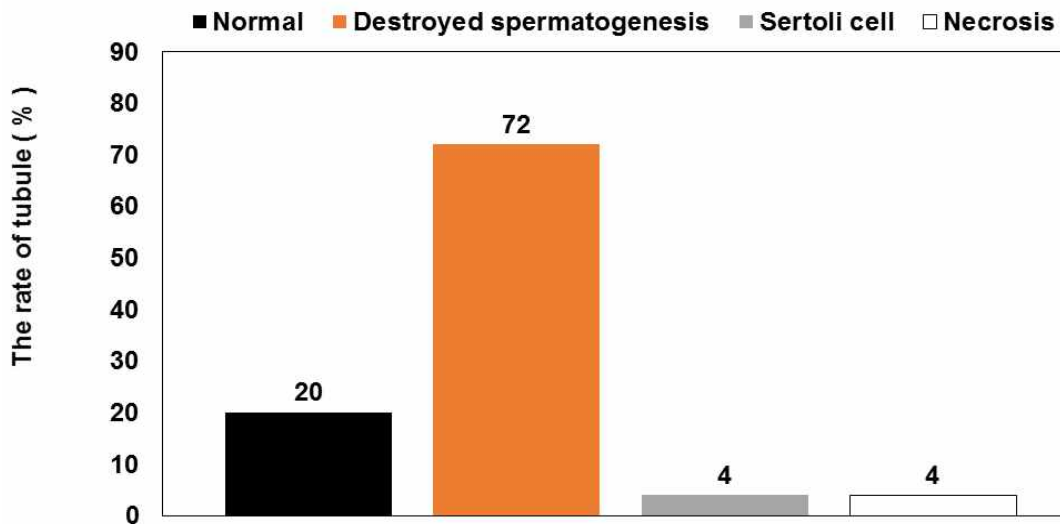
- Normal한 tubule에 비하여 destroyed spermatogenesis tubule이 다수 관찰되었으며 destroyed spermatogenesis tubule에 비하여 적지만 normal한 tubule도 발견

○ Busulfan 1회 처리한 조직의 H&E 관찰 결과

- Normal tubule에 비하여 destroyed spermatogenesis tubule이 다수 관찰되었고 normal한 상태의 tubule은 비교적 적게 관찰됨
- DMSO + PBS (control) 1회 처리한 결과와 비교하였을 때 큰 차이를 나타내지 않았으며 Sertoli cell tubule이 관찰되지 않음
- 비슷한 destroyed spermatogenesis tubule 수치를 보이는 이유는 testis가 외부 물질이 유입되면서 피해를 받은 것으로 판단되며, busulfan에 의한 피해는 크지 않을 것으로 판단됨
- 차후 실험에서는 Busulfan 투여 용량을 늘려 sertoli cell tubule이 나타나는지 확인 필요



○ Busulfan 1회 국소 처리된 정소 중 육안 상 정상적인 조직 H&E 관찰 결과



- 대체로 Destroyed spermatogenesis tubule이 다수 관찰되었고 비교적 적은 normal tubule이 관찰됨

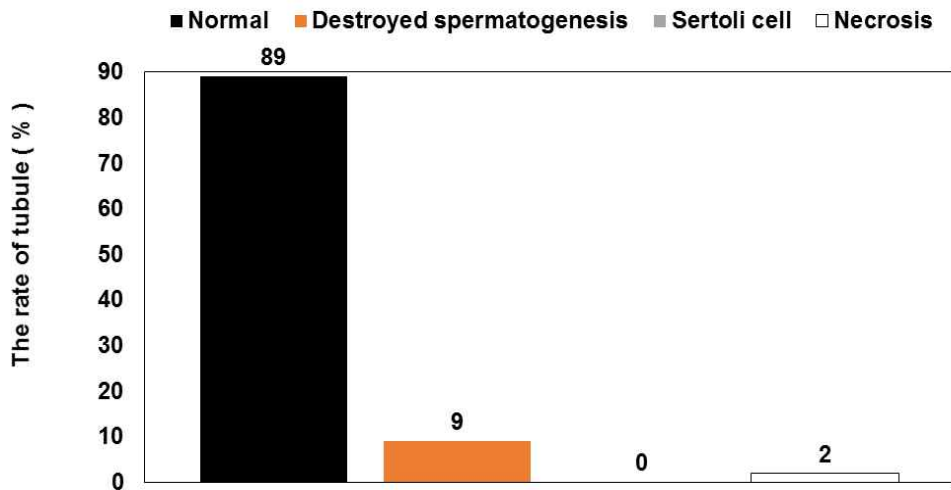
○ Busulfan 1회 국소 처리된 정소 중 육안 상 섬유화된 조직의 중심부분 H&E 관찰 결과

- 대체적으로 normal 한 tubule이 다수 관찰되었고 상당히 적은 normal tubule이 관찰
- 일부 fibrosis된 부분이 관찰은 되지만 그 수가 많이 적음

○ Busulfan 1회 국소 처리된 정소 중 육안 상 섬유화된 조직의 바깥부분 H&E 관찰 결과

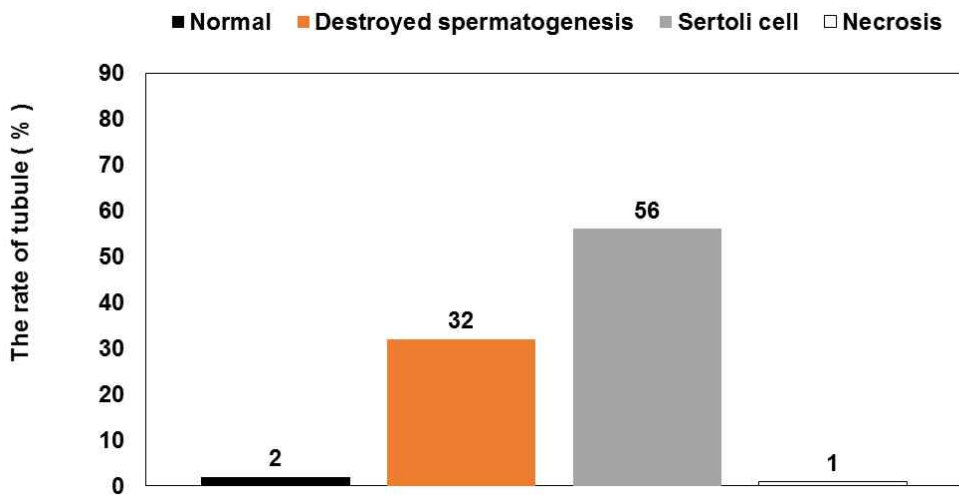
- 조직이 전체적으로 necrosis와 fibrosis가 진행되어 tubule 내의 cell 관찰이 어려움.





- Busulfan 1회 국소 처리는 정소 내 destroyed spermatogenesis 생성에는 큰 영향을 주는 것으로 판단되나 이는 국소적인 형상으로 판단되며 busulfan에 영향을 미치지 않는 곳은 normal tubule이 지배적임.
- 또한 tubule의 necrosis와 fibrosis를 진행시켜 정소의 기능에 악영향을 줄 가능성이 크다고 판단됨

○ Busulfan 2회 처리한 정소의 육안 상 정상적인 조직 H&E 관찰 결과



- Busulfan 2회 처리한 정소에서 육안 상으로 정상적인 조직의 H&E 관찰한 결과 조직 내에서 비교적 높은 Sertoli cell tubule 수치를 보이고 있고 destroyed spermatogenesis 된 tubule 또한 상당히 많은 부분 차지한 것을 관찰
- 그러나 정소의 다른 부위에서는 necrosis와 fibrosis가 상당히 많이 진행되어 tubule 내 cell 형상을 확인 할 수 없었으며 tubule과 tubule 사이 공간에 상당히 많은 cell들이 삼출된 것을 확인

○ Busulfan 3회 처리한 조직의 H&E 관찰 결과

- Busulfan 3회 처리한 조직에서는 normal, sertoli cell only, destroyed spermatogenesis tubule이 미량 관찰이 되었으나 조직 전체적으로 necrosis가 진행되어 조직 관찰이 어려움
- 이러한 결과로 봤을 때에는 Busulfan의 3회 처리는 sertoli cell only tubule 생성보다 necrosis 발생을 진행시키기 때문에 비효과적이라고 볼 수 있음
- 그러나 이것은 염소에게서 얻은 실험 결과이기 때문에 정소의 구조적으로 다른 말에게서 다른 결과를 도출 할 가능성이 있고, Busulfan의 2주간 처리에서 sertoli cell only tubule이 다량 관찰이 되었기에 이를 기준으로 차후 실험을 설계

**2-9. 방사선 처리가 염소의 정자형성에 미치는 영향 확인(선행연구 8)**

① 연구 배경

- 방사선 처리는 정소 내 정자형성퇴화를 위해 mice (van den Aardweg et al, 1983; Creemers et al, 2002; Giuili et al, 2002), rat (Shuttlesworth et al, 2000), monkey (Schlatt et al, 2002), bulls (Lzadyar et al, 2003), ram (Oatley et al, 2005) 에 처리되어 왔음
- Bull calves에는 10-14 Gy, ram에는 12 Gy를 처리하였을 때, 세정관 내 정자형성을 퇴화시키는 효과가 있음을 확인함
- 미니어처홀스를 대상으로 방사선 조사기를 활용한 국소 처리를 통한 endogenous germ cell 제거 효과를 살펴보기 전 미니어처홀스와 크기가 비슷한 염소를 대상으로 예비실험 실시

② 연구 내용

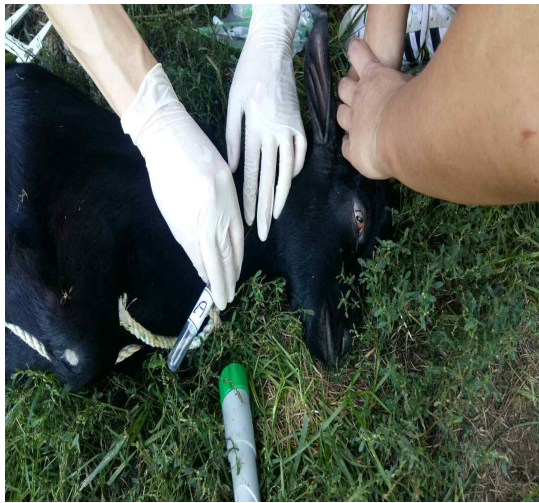
- 염소 2마리를 활용하여 10 혹은 15 Gy 방사선을 정소에 처리
- Ram의 경우, 처리 후 2달 뒤부터는 퇴화된 정원줄기세포가 점차적으로 회복되어 (Oatley et al, 2005) 거세시키는 처리 후, 6주가 적당할 것으로 판단되어 처리 전과 처리 후 3, 6주 시 biopsy를 통해 조직변화를 관찰하고, 정소크기 변화, testosterone 호르몬 변화 관찰



염소 고정




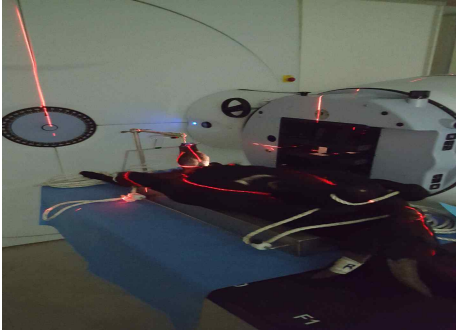
정소 조직 샘플링 (biopsy)



혈액 샘플링



정소 크기 측정

	
방사선 조사기	정소 고정
방사선 조사 컨트롤러	염소 고정
	
방사선 조사 I	방사선 조사 II

③ 연구 결과

○ 정소크기변화

처리 전 정소크기 (cm)						
	왼쪽			오른쪽		
	높이	길이	폭	높이	길이	폭
A	4	8	4.4	4.2	7	5
B	4.5	6.5	3.5	3.5	7	4

처리 3주 후 정소크기 (cm)						
	왼쪽			오른쪽		
	높이	길이	폭	높이	길이	폭
A	4	7.8	3.9	3.5	7.5	3.9
B	2.8	5	3.4	3.6	6.3	4.4

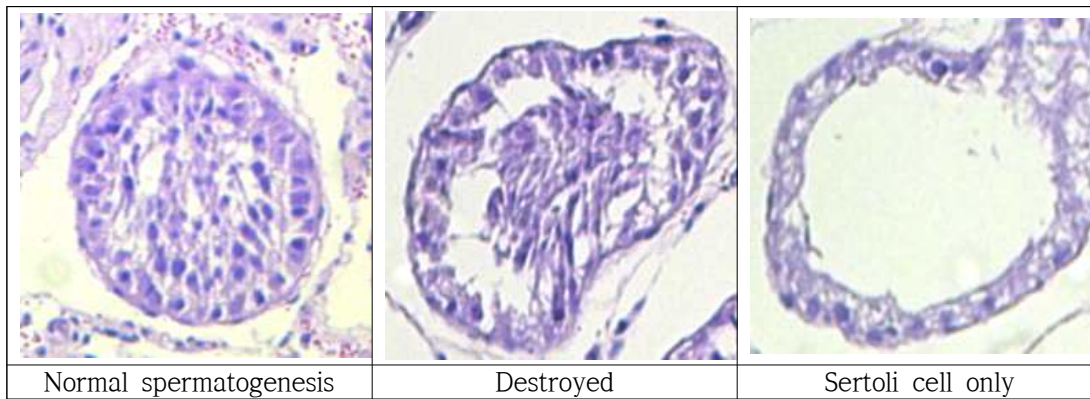
처리 6주 후 정소크기 (cm)						
	왼쪽			오른쪽		
	높이	길이	폭	높이	길이	폭
A	4	7.5	4	3.3	3.6	5.3
B	3.2	5.6	3	3.3	5	3.5

○ 처리전후 방사선 조사량과 기간에 따른 정소부피 변화

	Before	1 month post	2 month post
15 Gy	130.05	90.74	91.36
10 Gy	72.00	66.86	42.60

※ 방사선 조사 이후 정소의 크기와 부피가 줄어드는 것 확인

○ 방사선 조사에 따른 정소 내 정자형성과정(spermatogenesis) 변화 형태



○ 정소에 방사선 조사 후 정자형성과정에 미치는 영향을 관찰하기 위해 3가지 형태 (Normal spermatogenesis, Destroyed, Sertoli cell only)를 기준으로 분류

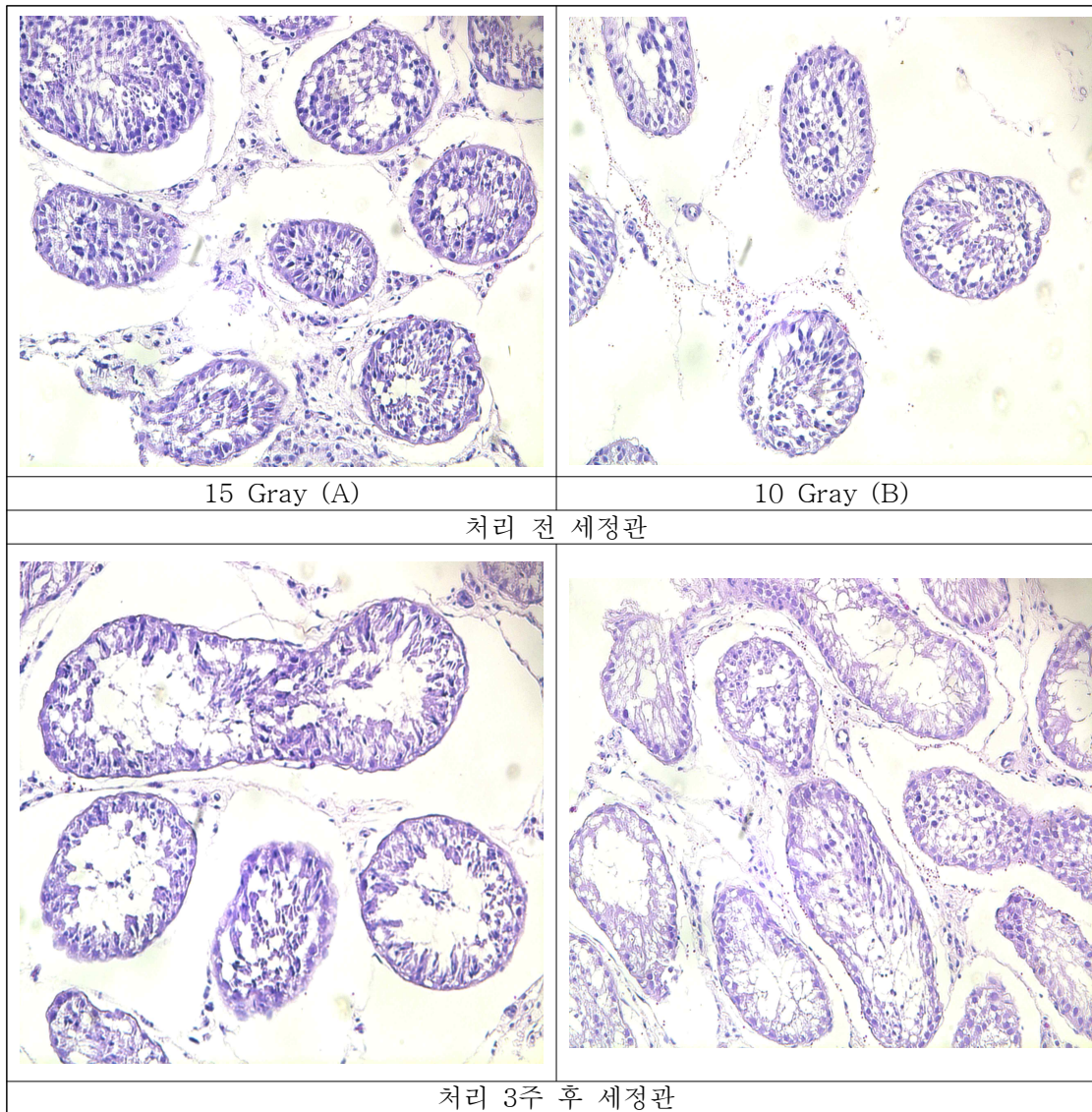
○ 처리 전, 처리 후 3, 6주 간격으로 관찰하였으며 biopsy를 통해 부분적으로 조직 확보 후 H&E 염색을 실시하여 수량화

○ 방사선 조사량과 조사 후 기간에 따른 세정관 형태별 분포도

기간	Types of seminiferous tubule treated with 15 Gray (100%)		
	Normal	Destroyed	Sertoli cell only
처리 전	100		
3주 후	31.4	68.6	
6주 후		<b>93.86</b>	<b>6.14</b>

기간	Types of seminiferous tubule treated with 10 gray		
	Normal	Destroyed	Sertoli cell only
처리 전	100		
3주 후	5.17	59.48	35.34
6주 후		<b>48.78</b>	<b>51.22</b>

○ 방사선 조사와 기간에 따른 정소 내 정자형성과정(spermatogenesis) 변화

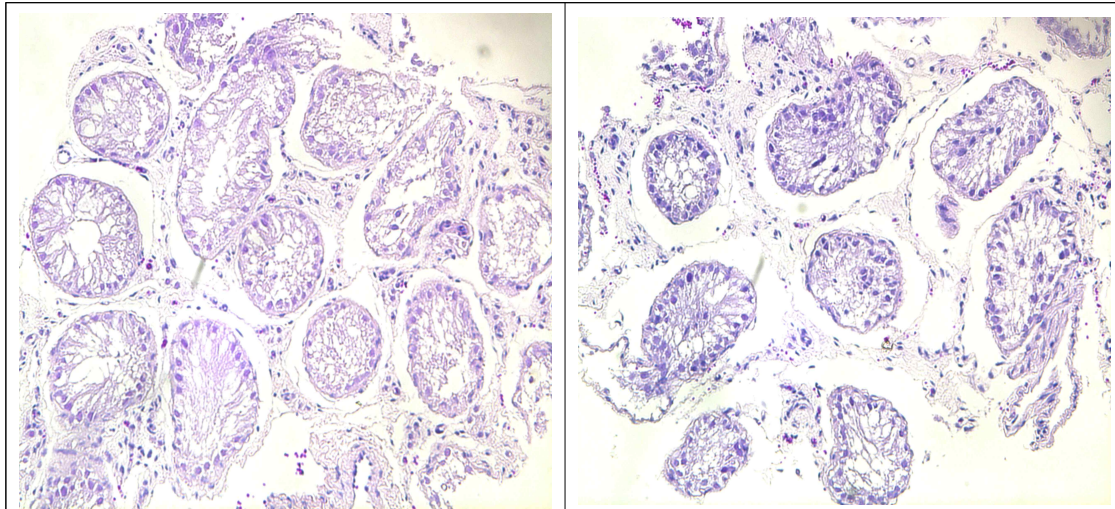


15 Gray (A)

10 Gray (B)

처리 전 세정관

처리 3주 후 세정관



처리 6주 후 세정관

- 정소크기가 3주째에 소량 줄었으나 조사량에 따른 변화는 없음
- 15 Gray를 조사한 정소에는 3주째 Sertoli cell only의 tubule 형태가 관찰되지 않았으며 10 Gray를 조사한 정소에서 더 많은 Sertoli cell only 형태의 tubule이 관찰됨
- 15 Gray보다는 10 Gray로 조사하는 것이 recipient 모델 개발에 더 적합할 것으로 판단됨
- 하지만 아래의 한계성의 이유로 방사선 조사기를 이용한 endogenous germ cell 방식은 미니어쳐홀스에 적용하기 어렵다는 결론 도출
  - 가축의 정소를 방사선 조사기로 처리하기 위해 전신마취 후 수술대에 약 3~4분간 미동도 없이 자세를 유지해야함. 염소의 경우 전신마취 후 미동도 없이 오랜 시간동안 수술대에 앉아 있지만 말의 경우 순간적으로 발길질을 하거나 마취 이후에도 깨어날 수 있어 상시 사람이 말을 누르고 있어야하기 때문에 불가능 할 것으로 판단
  - 또한 방사선이 횡축으로 조사되기 때문에 다리를 벌린 상태에서 양 다리 위쪽으로 정소가 돌출되어야 함. 염소의 경우 정소가 복부로부터 거리상 많이 떨어져 있기 때문에 가능하지만 말의 경우 정소가 복부에 3/1정도 잠복되어있기 때문에 다리를 벌린 상태에서 다리 위쪽으로 돌출시키기 매우 어려울 것으로 판단

## 2-10. Busulfan 정맥주입이 말 정소 내 endogenous germ cell에 미치는 영향 확인(본연구 2)

### ① 연구 범위

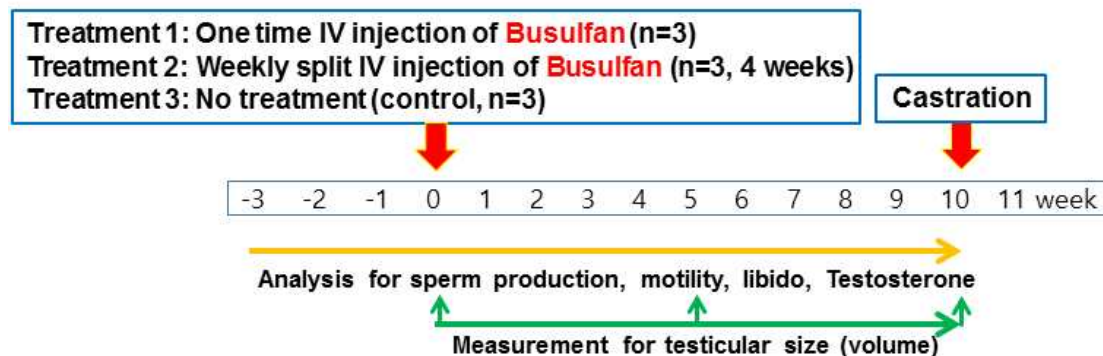
- Busulfan 치료로 인한 recipient의 폐사율을 최소화하기 위해 전체 용량 1회 주입과 낮은 농도로 분할 정맥 주사 방식을 비교하여 정원줄기세포 이식에 적합한 recipient model stallion 생산 기술 개발

### ② 연구 배경

- Busulfan은 알킬화제로서 항암치료제로 활용
- 세포내의 핵산(DNA, RNA)과 반응하여 핵분열에 있어 저해작용 유도
- 실험쥐의 경우 6mg/kg의 busulfan을 정소에 처리하였을 때 생식세포 제거 효과 확인
- 총 15 mg/kg 농도의 busulfan을 주 2회로 5주동안 분할주입

### ③ 연구 내용

- 총 처리할 busulfan concentration(15 mg/kg)을 1주에 2회에 나눠 전량을 주입하거나 2.5 mg/kg으로 몸무게 대비로 맞춘 회당 2회씩 5주동안 분할 정맥투여
- 처리 전 -1주, 4주, 8주 간격으로 정액을 추출하여 sperm concentration, progressive and total motility, 리비도 측정 비교
- 회당 50 ml의 DMSO를 활용하여 처리할 busulfan 가루를 용해 후, catheter로 바늘을 jugular vein에 주입시킨 후 5 cc/min의 속도로 주입
- 처리 후 11주 뒤에 hemi-castration을 실시한 후 정소 조직을 4% PFA에 고정한 뒤 H&E staining 실시





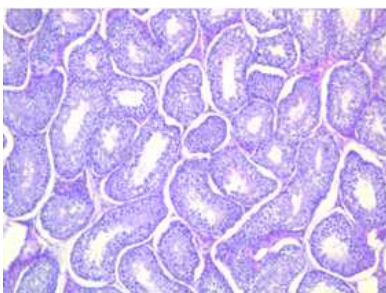
④ 연구 수행 사진



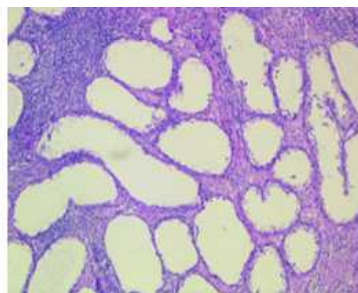
⑤ 연구 결과

- Busulfan 처리 후 거세한 정소조직을 H&E 염색하여 그림과 같이 3가지의 type: normal spermatogenesis, Sertoli cell only, destroyed로 분류하여 500개의 tubule의 상태 확인

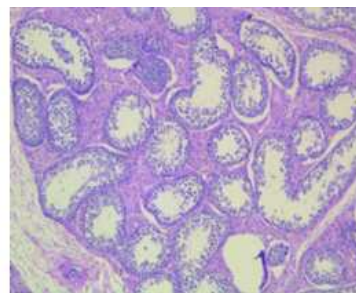
Types	One time IV injection of Busulfan (15 mg/kg BW)				Weekly split IV injection of Busulfan (15 mg/kg BW)				Control			
	T1	T2	T3	Mean ± SEM	T1	T2	T3	Mean ± SEM	C1	C2	C3	Mean ± SEM
Normal (%)	0			67.4	4.8	15.8	21	13.8±4.7	98.2	100	97.6	98.8±0.9
Sertoli cell only (%)	99.4	Dead	Dead	30.9	85.2	71.2	41	65.8±13	0	0	0	0
Damaged (%)	0.6			1.5	10	13	38	20.3±8.8	1.8	0	2.4	1.4±0.7



Normal spermatogenesis



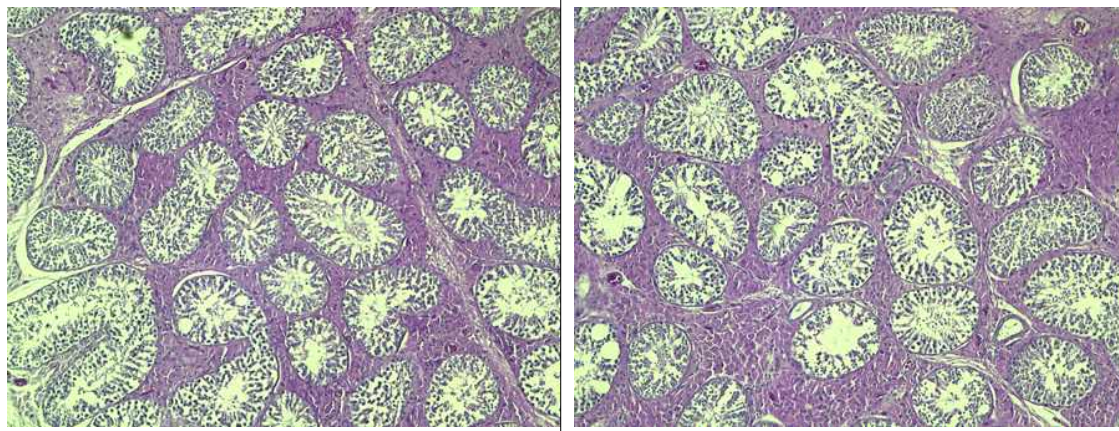
Sertoli cell only



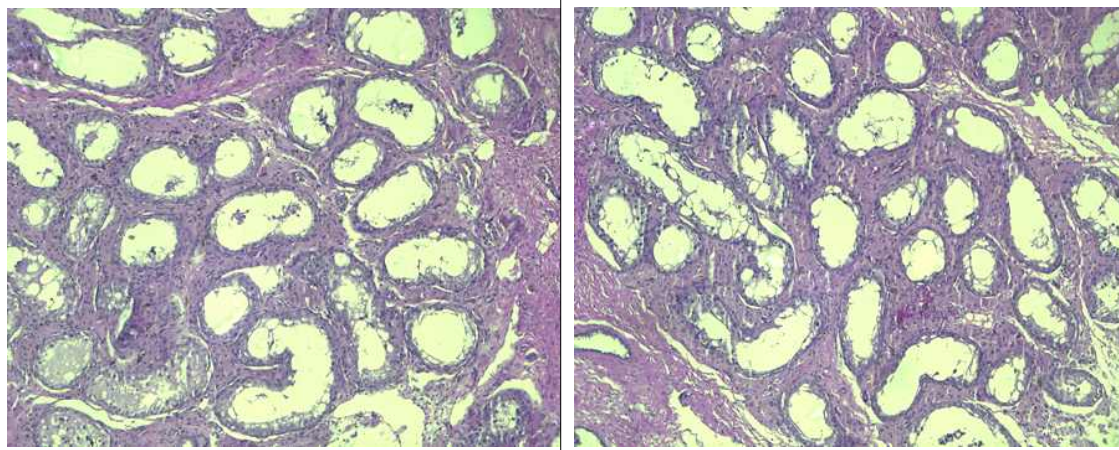
Destroyed spermatogenesis

- 1주일 내 2회에 걸쳐 15 mg/kg BW 용량을 전량 주입한 그룹에서는 3마리 중 2마리가 폐사하였으니 다른 1마리는 처리 이후에도 계속 생존함(생존율 33.3%)
- 1주일 내 전량 주입한 그룹 말 중 3주후 폐사한 말에서 채취한 정소의 경우 Normal 67.4%, Sertoli cell only 30.9%, Damaged 1.5% tubule이 발견됨

○ 유일하게 생존한 말의 경우 Sertoli cell only type tubule이 99.4%가 발견됨

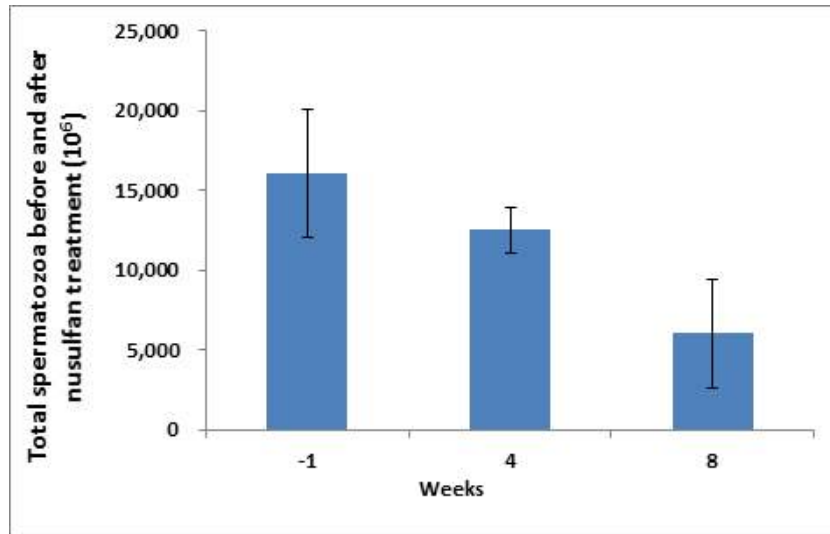


Seminiferous tubules at 3 weeks after busulfan treatment (1 time injection group)

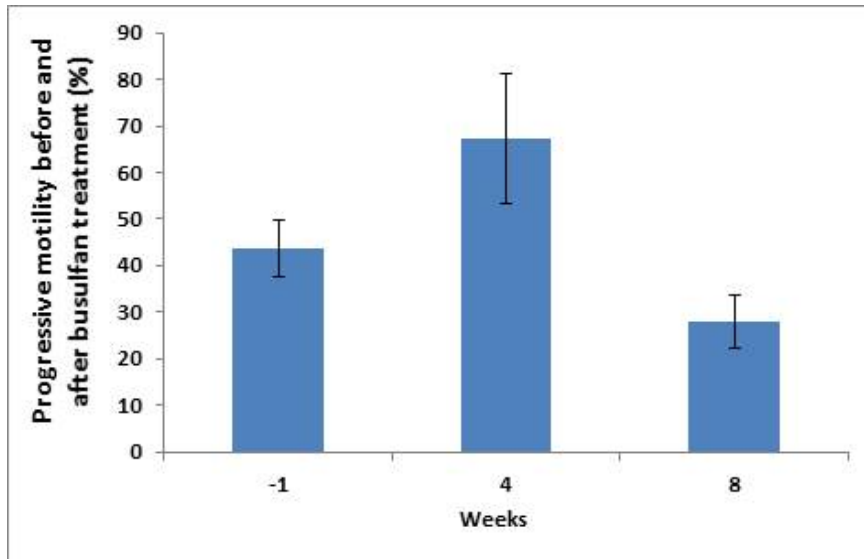


Seminiferous tubules at 9 weeks after busulfan treatment (1 time injection group)

- 5주 동안 분할 주입된 말의 경우 생존율은 100%였고 건강상 문제점도 발견되지 않음
- 3마리 중 2마리의 경우 관찰된 tubule 중 70% 이상이 Sertoli cell only tubule로 확인
- 5주 동안 분할 주입된 말의 경우 평균적으로 약 85% tubule이 busulfan 주입에 의해 영향을 받아 germ cell이 제거되거나 제거되고 있는 중으로 확인
- 상기 처리 방식은 말 정원줄기세포 이식을 받을 말 모델을 생산하는 데 효과적임이 입증



○ 개체 간 차이는 있으나 busulfan 처리 후 8주까지 총 정자수가 감소함



○ 정자의 직선운동성 또한 busulfan 처리 후 8주까지 감소하는 경향을 보임

Time for erection after entering the breeding shed(min)	-1	4	8
빅파이어	1	1	1
천둥이	1	5	2

Time for semen collection after washing (min)	-1	4	8
빅파이어	27	30	19
천둥이	4	2	6

○ Busulfan 처리 이후에도 수말의 리비도는 크게 변하지 않음

### 3. 정원줄기세포 이식기법개발

#### ※ 배경

- Donor spermatogonial stem cell을 transplantation한 이후에 recipient 말의 seminiferous tubule 내에 안착률을 제고하기 위해서는 recipient 말의 endogenous germ cell을 제거하여야 함
- 실험동물에 busulfan (Yusheng Qin, Dong Wang, 2015)과 glycerin (Suleiman A. Igdoura, John P. Wiebe, 1994)을 처리하여 endogenous germ cell을 제거하는 연구가 수행됨
- 1년차 연구수행으로 개발한 70% glycerin 국소처리를 통한 recipient 말 생산방법의 효과와 고안된 ultrasound guided spermatogonial stem cell injection 방식의 효율성을 확인하기 위한 연구수행이 필요함
- 이식된 donor spermatogonial stem cell (SSCs)의 안착여부를 확인하기 위하여 PKH-26 (red fluorescence)으로 donor germ cell을 염색한 후 이식을 실시하고 recipient 정소내 donor 세포의 안착률을 비교하는 방식이 활용되고 있음

#### 3-1. Testis로부터 single germ cell 확보 기술 확립

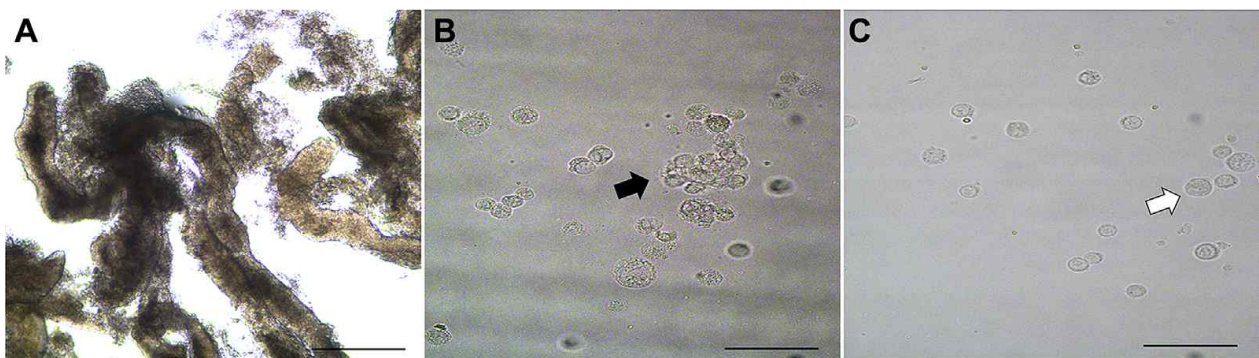
##### ① 연구 목표

- 말 정소로부터 정소세포를 분리하는 기술 개발

##### ② 연구 내용 및 방법

- Collagenase와 Trypsin EDTA를 사용하여 말 정소로부터 정소세포를 분리
- 말정원줄기세포 마커인 UTF1과 정소세포 마커인 VASA를 이용하여 순도 확인

##### ③ 실험결과



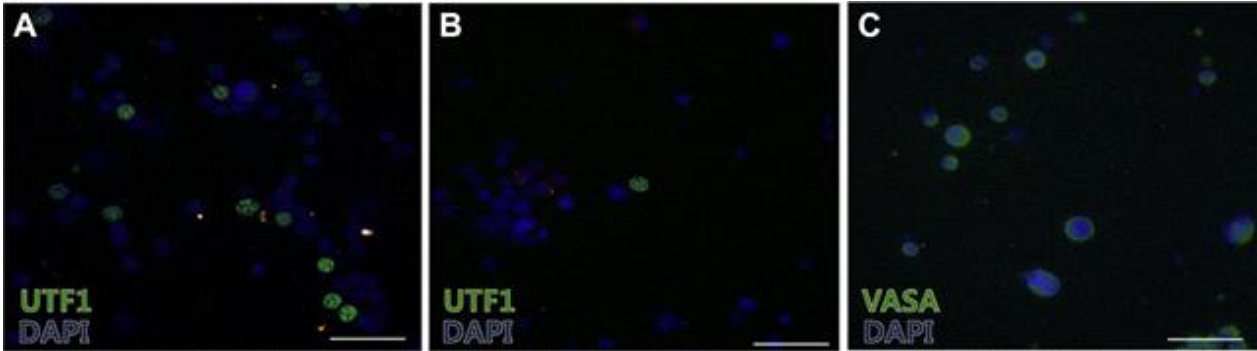
A: after collagenase digestion

B: after trypsin EDTA digestion

C: after filtration

	Pre-pubertal (n=5)	Post-pubertal (n=5)
Viability(%)	89.98 ± 1.78	89.85 ± 1.5
Recovered germ cell population(10 <sup>6</sup> )	899.8 ± 72.63	1,164.6 ± 159.09

○ 두 개의 다른 enzyme으로 digest한 결과 viability가 약 89%인 germ cell 확보



Cell types	Pre-pubertal (n=3)	Post-pubertal (n=3)
UTF1 positive (%)	6.43 ± 0.63a	0.12 ± 0.04b
VASA positive (%)	91 ± 0.4a	88 ± 1.6a

○ 말 정원줄기세포 마커인 UTF1에 염색된 germ cell은 pre-pubertal 정소로부터 약 6.43%, post-pubertal 정소로부터 약 0.12% 확보

○ 말 정소세포 마커인 VASA에 염색된 germ cells은 pre-pubertal 정소로부터 약 91%, post-pubertal 정소로부터 약 88% 확보

#### ④ 연구 결과

○ Collagenase와 Trypsin EDTA를 혼합하여 사용할 경우 높은 순도의 germ cell을 확보할 수 있음

#### ⑤ 연구 성과

○ 상기 연구결과는 Journal of Equine Veterinary Science 에 게재됨



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: [www.j-evs.com](http://www.j-evs.com)



Original Research

Isolation of Germ Cells From Testes of Stallions Using Collagenase and Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic Acid



Heejun Jung<sup>a</sup>, Minjung Yoon<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal and Biotechnology Science, College of Animal Science, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Horse, Companion and Wild Animal Science, Kyungpook National University, Sangju, Republic of Korea

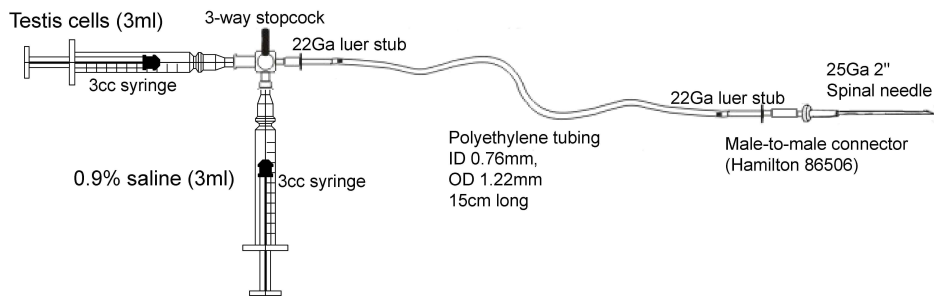
### 3-2. Trypan blue 염색약 주입을 통해 ultrasound guided rete testis injection 기법 확립 여부 확인(선행연구)

#### ① 연구 목표

- 정소세포 이식 도구 및 초음파기계를 활용하여 말의 rete testis로 donor germ cell을 주입하는 기술 확립 여부 확인

#### ② 연구 내용 및 방법

- 정소세포 이식 도구



[Ultrasound-guided rete testis injection tool]

#### ○ 성공적 주입 여부 확인 방법

- Trypan blue regent를 MEMa meium과 1: 2 비율로 희석하고 rete testis를 통해 정소내 주입
- 주입 후 곧바로 정소를 제거하고 절개하여 정소 내 염색 형태 확인

#### ③ 실험 수행 사진



정소크기 측정



Ultrasound를 활용한 rete testis 모니터링

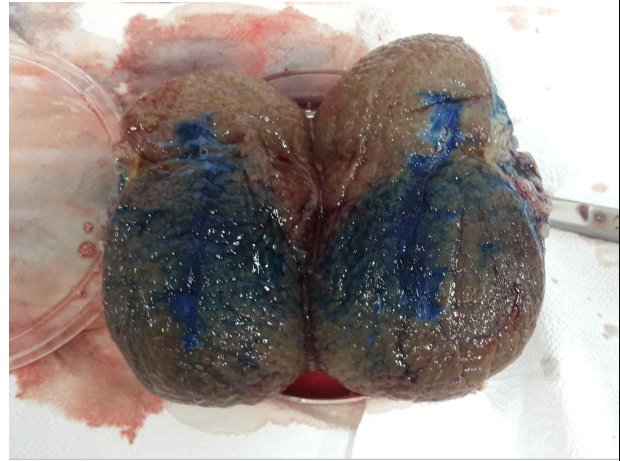


3 way-cock을 활용한 trypan blue 주입

- Ultrasound guided injection technique을 통해 rete testis 위치 확인
- Trypan blue (15 ml)을 2 way-cock을 활용하여 recipient rete testis를 통해 주입

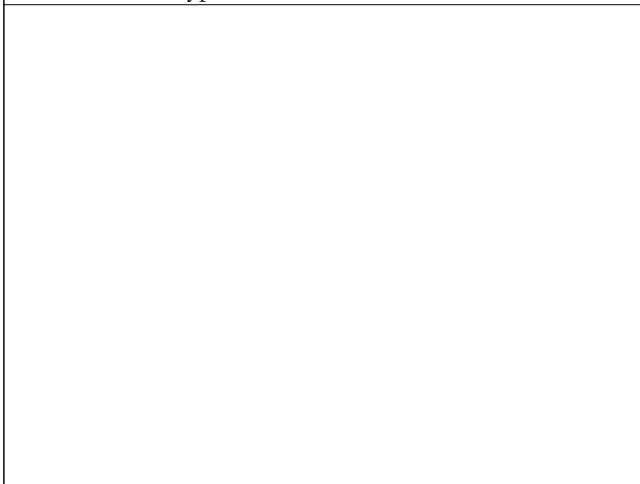
#### ④ 연구 결과

- 말 정소의 rete testis가 전반적으로 진하게 염색된 것을 확인
- Rete testis를 기점으로 주변 말 정소조직이 전반적으로 염색된 것을 확인
- 이러한 실험결과를 통해 본 연구팀이 고안한 injection tool과 초음파 기계를 활용하여 말 정소의 rete testis를 통해 정소세포를 이식할 수 있는 기술 확보



Trypan blue가 주입된 정소

Rete testis를 통해 주입된 trypan blue



Recipient 정소에 transplantation된 trypan blue



### 3-3. 염소를 대상으로 정원세포이식기술 활용 가능 여부 확인(선행연구)

- PKH26 형광 염색 기법을 이용하여 정원세포가 recipient 정소의 seminiferous tubule 내 안착 여부 모니터링

#### ① 연구 목표

- 초음파를 활용하여 말의 정소에 정원줄기세포를 주입하는 기술을 직접 말에 적용하기 전에 중소가축인 염소를 대상으로 상기 기술의 적합여부 확인
- 정원줄기세포를 주입하는 기구세팅과 방식을 염소의 정소를 대상으로 테스트
- 성공적인 정원줄기세포 주입을 위해 1차 연도에 개발한 endogenous germ cell 제거 기술의 효과 확인
- Donor 정소세포의 recipient 정소 내 안착여부를 확인할 수 있는 monitoring system을 확립하기 위해 PKH26 형광염색 약품 적정 사용 농도 및 방법 정립

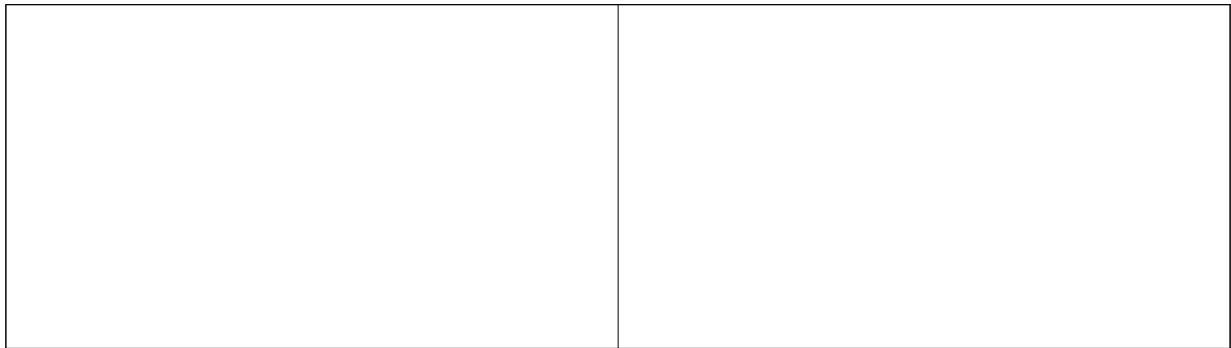
#### ② 연구 내용 및 방법

- 거세수술로 제거된 donor 염소의 정소에서 two-enzyme germ cell isolation 기법을 활용하여 single 정소세포 확보(실험실 자체 프로토콜 정립)
- 여러 농도의 PKH26 염색약품을 single 정소세포에 다양한 방식으로 처리하여 최적의 염색 농도 및 처리(incubation time) 방법 확보
- 자일라진 약품을 이용하여 염소를 전신 마취하고 70% glycerin(15 ml)을 1cc/min의 속도로 정소에 2회 국소적으로 처리

빈도	주사바늘	염소 (post-pubertal)	
		왼쪽	오른쪽
2회 15 cc 처리	26 gauge (1cc/min)	70% glycerin	

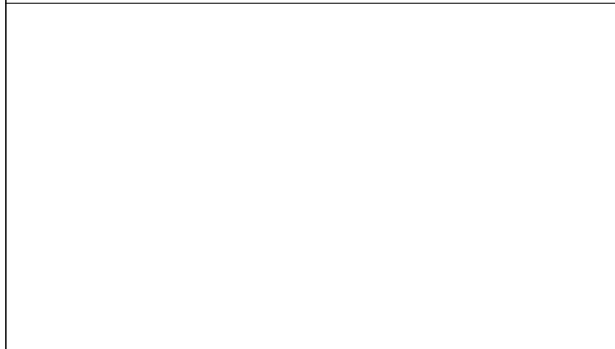
- Glycerin 처리 4주 후 PKH26으로 염색된 donor germ cell을 이식장치와 초음파기계를 활용하여 염소의 rete testis에 이식
- 이식된 정소를 2주 후 거세한 후 two-enzyme digestion technique을 이용하여 seminiferous tubule 분리
- Whole-mounting하여 염소의 seminiferous tubule 내에 PKH26에 염색된 germ cell 안착 여부 확인

③ 실험 수행 사진



염소 마취 후 보정

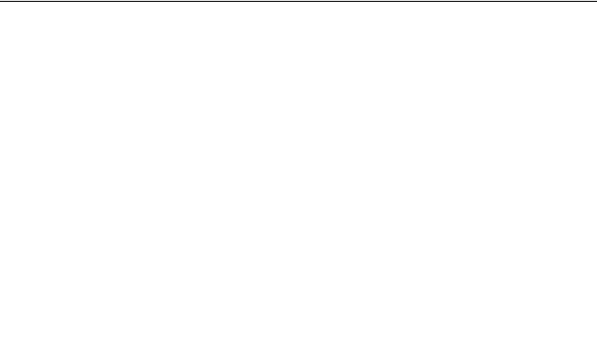
26 gauge를 이용하여 glycerin 처리



70% glycerin 처리

Infusion machine을 활용한 1cc/min 처리

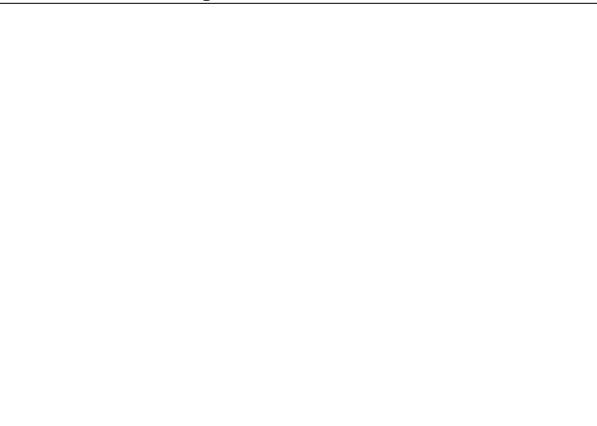
2주 후



Ultrasound를 활용하여 PKH-26으로 염색된 정소세포를 recipient 염소의 정소에 이식



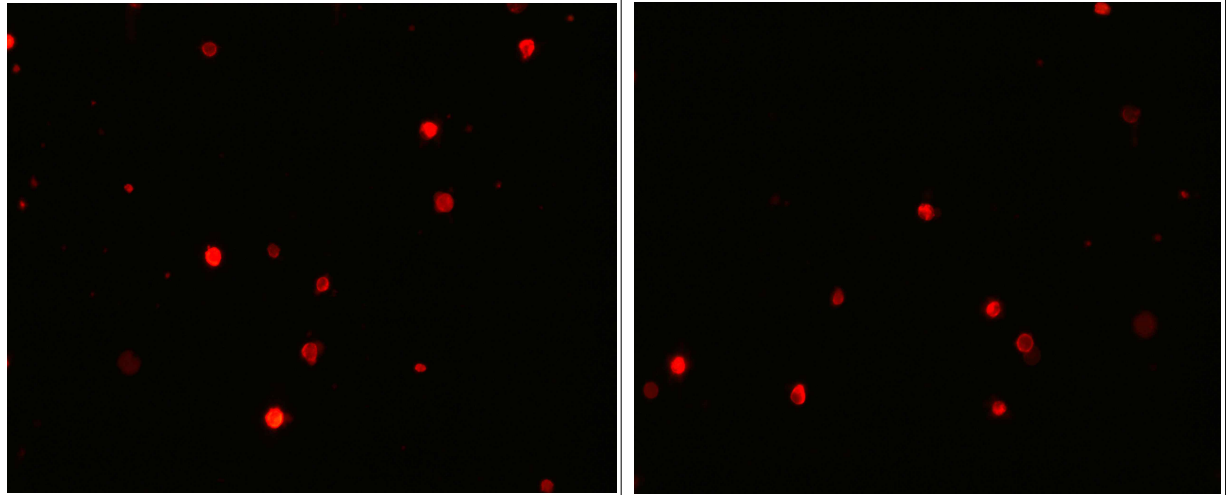
Rete testis 모니터링



PKH-26으로 염색된 정소세포주입

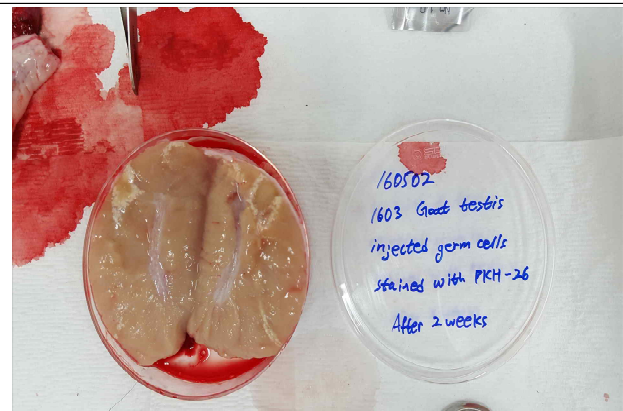
④ 연구 결과

○ 말 single germ cell이 PKH-26에 염색되는 것을 확인함



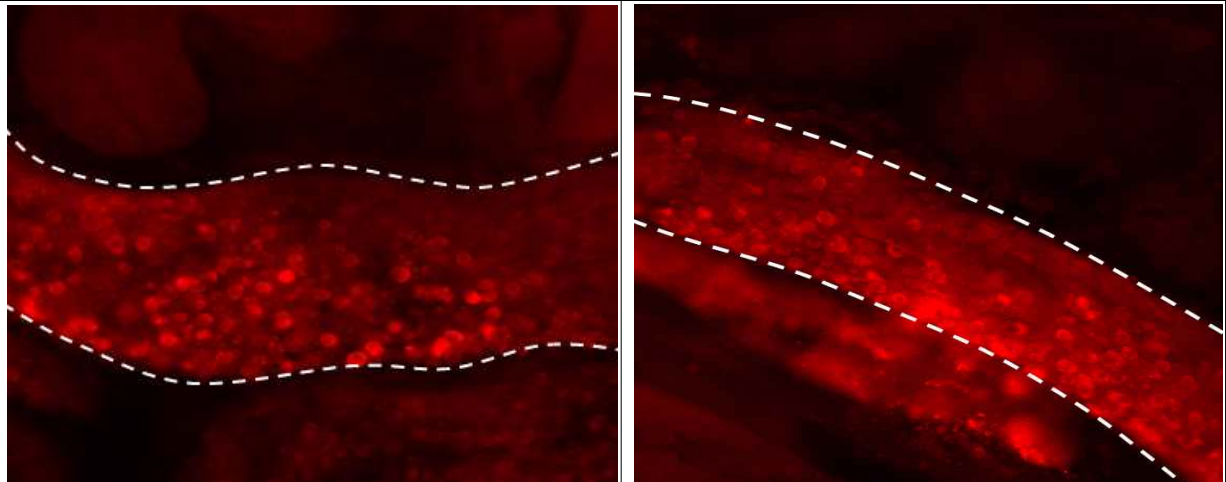
*in-vitro*상에서 PKH-26을 활용한 말 single germ cell 염색  
(germ cell의 cytoplasm부위에서 형광염색 확인)

○ PKH-26 염색된 donor germ cell이 recipient seminiferous tubule에서 발현하는 것을 확인함으로서 rete testis를 통한 이식기술 확립



- 정소 내 70% glycerin 접종 부위로 추정되는 두 곳에 반경 약 1cm 크기의 백색 조직이 발견됨
- Rete testis가 정소의 중앙부분에서 확연히 발견되었고 약간 팽창되어 있는 것을 확인

PKH-26 염색한 germ cell이 TP처리된 정소



Recipient 염소의 seminiferous tubule내 PKH-26으로 염색된 donor 정소세포 존재 확인

### 3-4. 말을 대상으로 정원세포이식기술 활용 가능 여부 확인

- 말을 대상으로 PKH26 형광염색약품으로 염색된 정원세포를 이식한 후 seminiferous tubule 내에 정원세포의 안착 여부 확인

#### ① 연구 목표

- 70% glycerin으로 처리한 recipient 말 정소의 seminiferous tubule안에 donor 정소세포 안착 여부 확인(n=1, 말 ID: 연주연승)

#### ② 연구 내용 및 방법

- 1년차 연구결과 고안된 70% glycerin 정소 국소처리 방식을 이용하여 recipient 말 준비 (더리브렛 경주 퇴역마 이용)
- 70% glycerin 처리된 recipient 말의 정소 내 donor 정소세포 안착 효율성을 판단하기 위하여 아무런 처리를 하지 않은 말(control)의 정소에 PKH26으로 염색된 정소세포 주입 (n=1, 말 ID: 대천왕)
- 염소를 대상으로 실시한 선행연구로 확립된 PKH26 염색방법을 이용하여 말 germ cell 염색
- 2015년(1년 전)에 난지축산연구소에서 거세된 이후 냉동 보존된 pre-pubertal 제주산마 정소세포를 donor germ cell로 활용
- 초음파 기계를 이용하여 PKH26으로 염색된 donor 정소세포를 recipient 말의 rete testis 에 주입
- 염색된 donor 정소세포를 이식한 지 1주일 후 거세수술을 통해 정소 제거
- 정소조직을 collagenase로 digestion하여 seminiferous tubule 확보
- 형광현미경을 이용하여 seminiferous tubule에 안착한 PKH26에 염색된 정원세포 존재 여부를 확인 및 비교

③ 연구 사진



마취



보정



정소 크기 측정



정소 세척



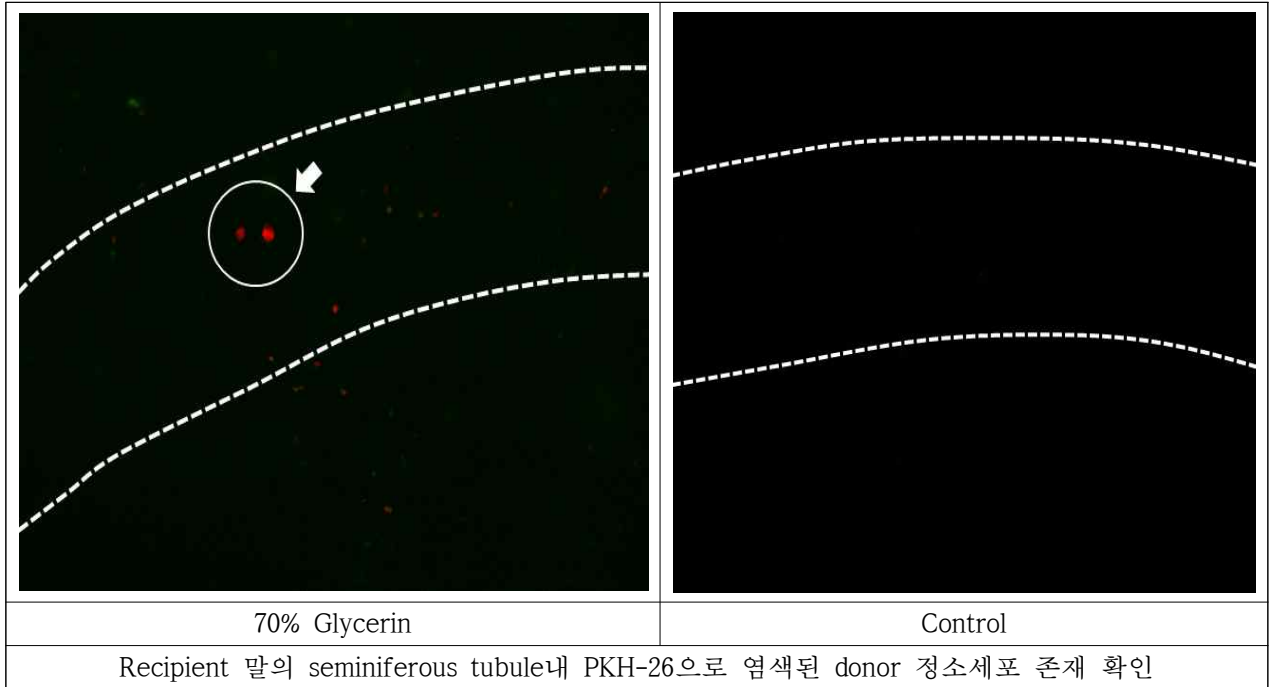
Rete testis 모니터링



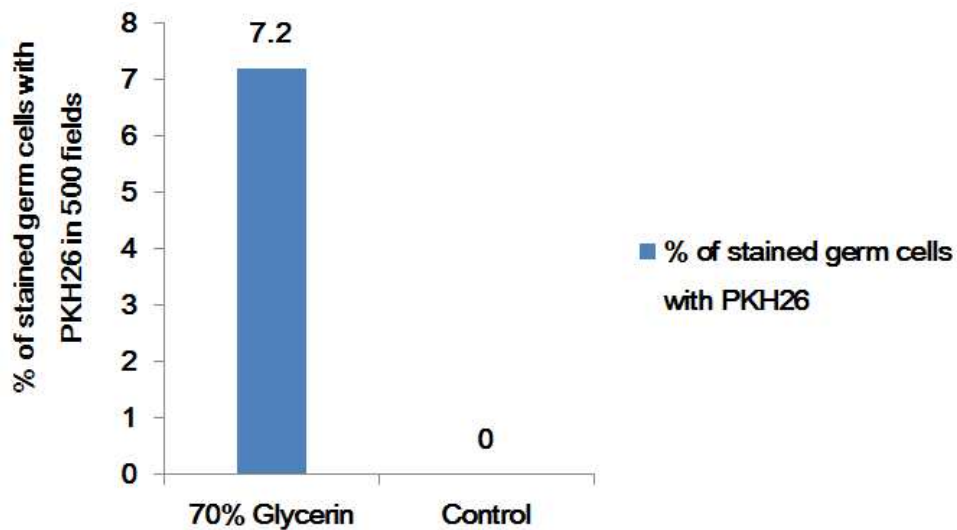
Donor germ cell 주입

④ 연구 결과

- 70% glycerin으로 처리된 정소의 seminiferous tubule 내에 PKH26에 염색된 germ cell 존재 확인



- PKH26으로 염색된 germ cell을 whole mounting상에서 counting 실시
- 현미경상 처리그룹 당 총 500 field를 counting 하여 70% glycerin(treatment)에서는 7.2%(36/500), DMSO(control)에서는 0%(0/500)의 염색된 germ cell 관찰



4-1. 정원줄기세포이식을 통해 recipient 말로부터 donor 유래 정자 생산 여부 확인

① 연구 목표

- 본 연구 결과로 확립된 ultrasound guided rete testis germ cell transplantation 기법을 활용하여 70% glycerin으로 처리한 recipient 말 정소로부터 donor 유래 정자 생산 여부 확인

② 연구 내용 및 방법

- Donor 말 정원세포 확보(제1세부 연구과제)
  - 성성숙 전 단계의 제주산마(1.5-2년 령)의 정소에서 정원줄기세포 확보(거세수술 로 제거된 제주난지축산연구소에서 사육중인 제주산마의 정소를 항공택배로 수령)
  - Two-enzyme tissue digestion 방법으로 정소에서 정원세포 확보
  - 확보된 정원세포를 이식 전까지 냉장보관하고 3-4시간 이내로 이식 실시

그룹	처리
Donor	Pre-pubertal 제주산마(검정모색, 유전자형: EE or Ee) 
Recipient (n=6)	밤색(유전자형: ee homozygous) 및 흑갈색 더러브렛 경주퇴역마 처리: 70% glycerin(n=3) 혹은 PBS(n=3) 

- Recipient 수말에 따른 정원줄기세포 유래 정자생산여부 및 효율성을 확인하기 위하여 70% glycerin으로 처리된 recipient 수말과 PBS로 처리된 수말에 각각 정원줄기세포를 이식하고 recipient 수말에 따른 정원줄기세포 유래 정자생산성 비교 분석

<정원세포 주입 세부 내용>

Recipient 처리 방식	Recipient Horse ID	Donor Horse (제주산마) ID	주입세포수 (10 <sup>6</sup> )	총 주입량(ml)	Cell solution (ml) MEMa + 10% FBS	Dnase (ul)
국소 70% Glycerin Group	담양전설	073(Ee)	500	15	14.85	150 ul
	강자의미소	071(EE)	500	15	14.85	150 ul
	쎄메이커	074(Ee)	500	15	14.85	150 ul
PBS Group	히든몬스터	070(EE)	500	15	14.85	150 ul
	대천왕	070(EE)	500	15	14.85	150 ul
	연주연승	075(Ee)	500	15	14.85	150 ul

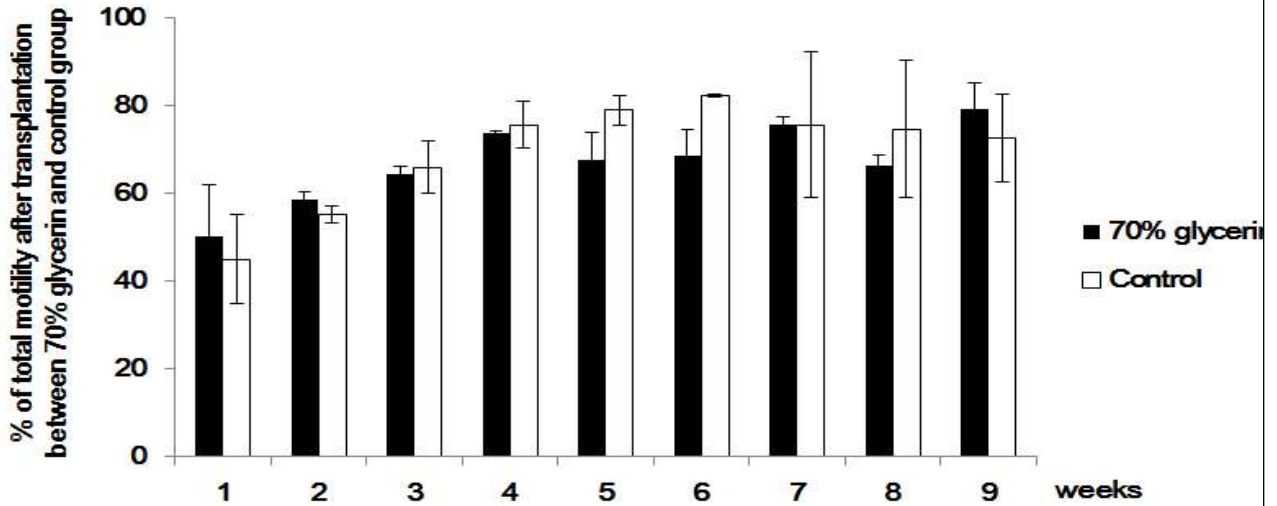
- Ultrasound guided rete testis germ cell injection 기술을 이용하여 recipient 말에 주입
  - 별다른 외과적 수술 없이 주사기와 적절한 주사바늘을 이용하여 말의 정소 안에 위치한 central vessel 안으로 정원줄기세포를 이식할 수 있는 ultrasound-guided injection 방법 활용
  - 전신마취를 실시하고 정소 및 주변 부위를 베타딘 용액으로 소독 실시
  - Ultrasound probe로 central vessel의 위치를 확인한 후 주사바늘을 주입하고 약간의 공기를 불어 넣어 rete testis에 주사바늘이 위치하고 있음을 확인한 후에 서서히 정원세포 주입
  
- 주입된 정원세포로부터 생성된 정자 생산 여부 확인
  - 정원줄기세포 이식 2달 후부터 정액을 채취 후 정자 snap freezing 실시
  - Recipient 말의 자기정원세포가 100% 제거 되지 않기 때문에 사정 시 recipient 말의 정자와 donor 정원줄기세포 유래 정자가 동시에 생산될 것이기에 생산된 정자에 donor 정원줄기세포 유래 정자의 유무를 genotyping을 통해 확인
  - Donor 말의 조직, recipient 말의 혈액, 이식 후 recipient 말의 정자를 샘플로 microsatellite fingerprint 기법을 이용하여 recipient 정액 안에 donor 유래 정자의 존재 확인



③ 연구 결과

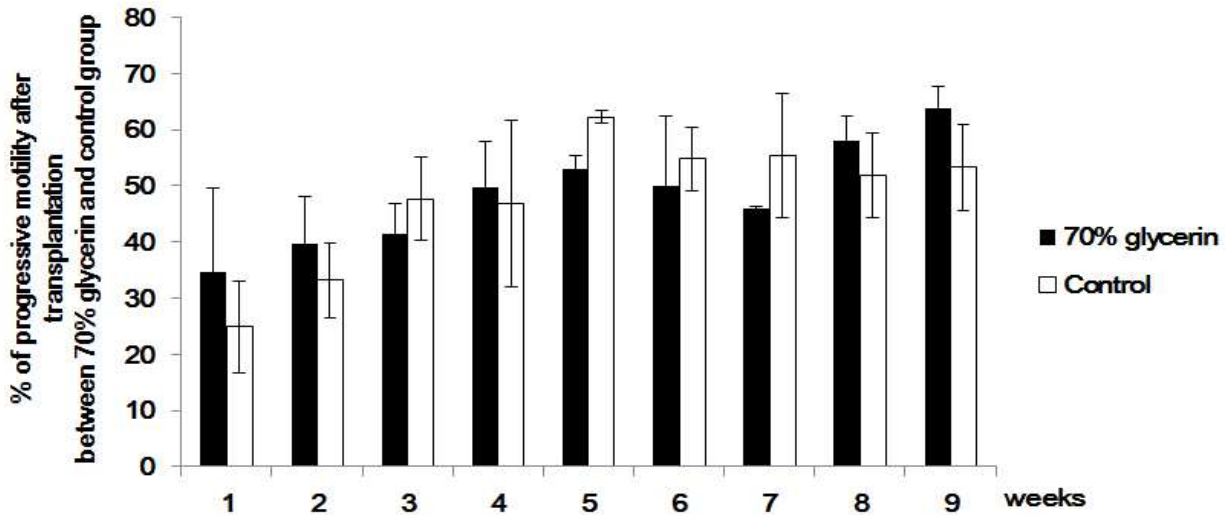
○ 70% glycerin group과 control group간 정소세포 이식 이후 정자성상 비교

<Donor 정소 세포 이식 이후 70% glycerin과 control group간 총정자운동성 비교>



· 두 그룹간의 정자의 총 운동성 차이 없음

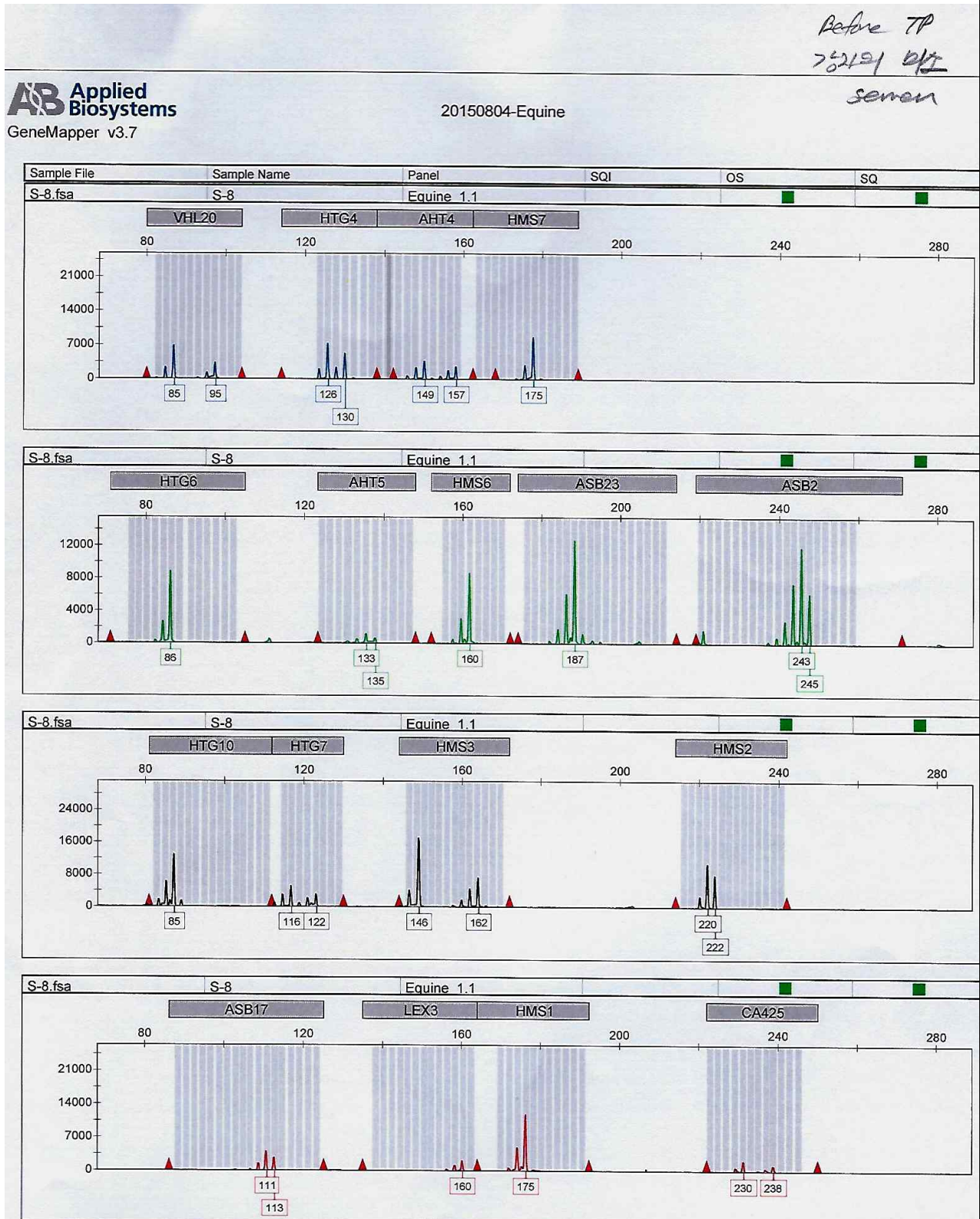
<Transplantation 후 70% glycerin과 control group간 정자직선운동성 비교>



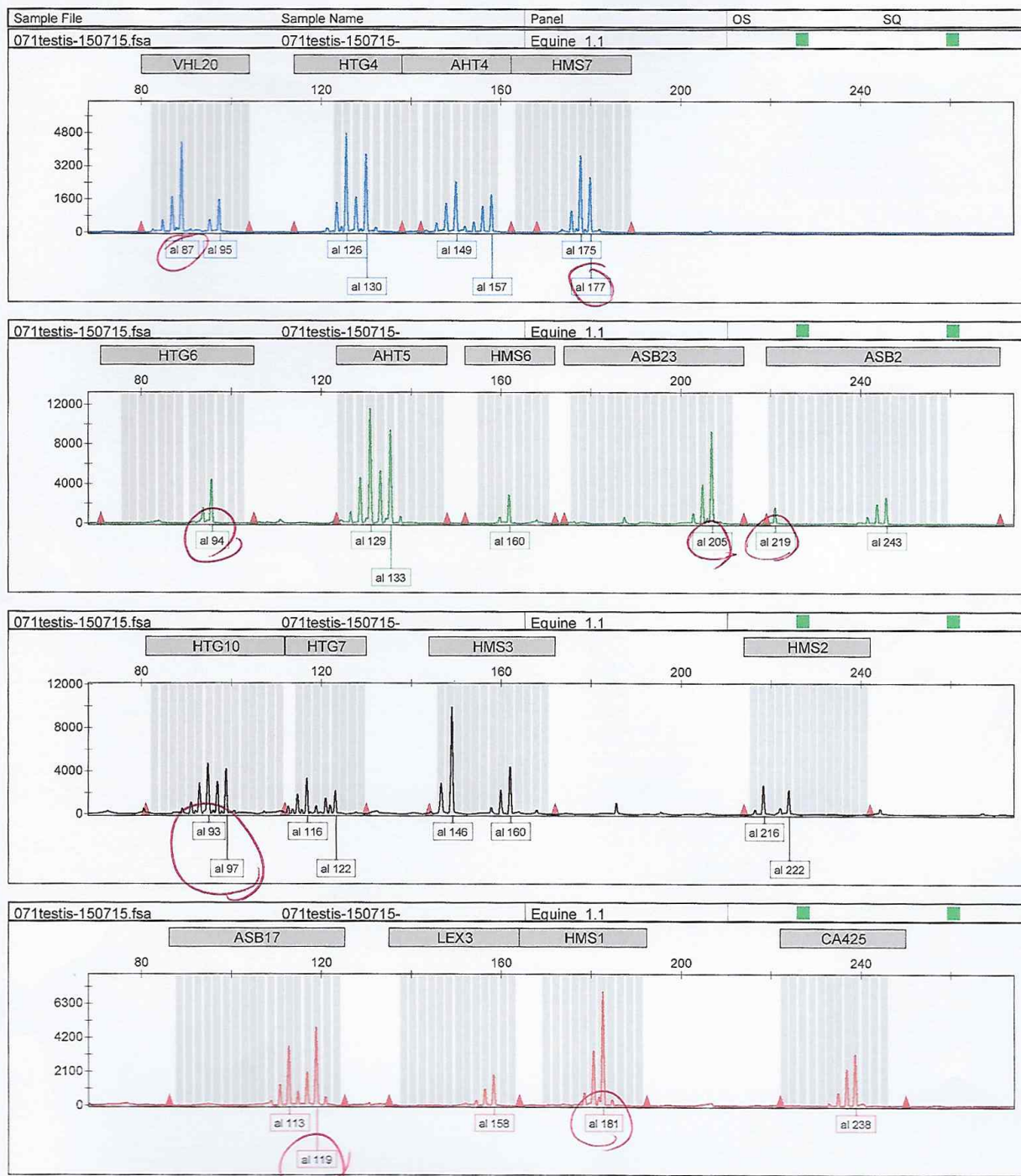
· 두 그룹간의 정자의 직선 운동성 차이 없음

○ Genotyping을 활용한 donor 유래 정자 생산 여부 확인 system 확립

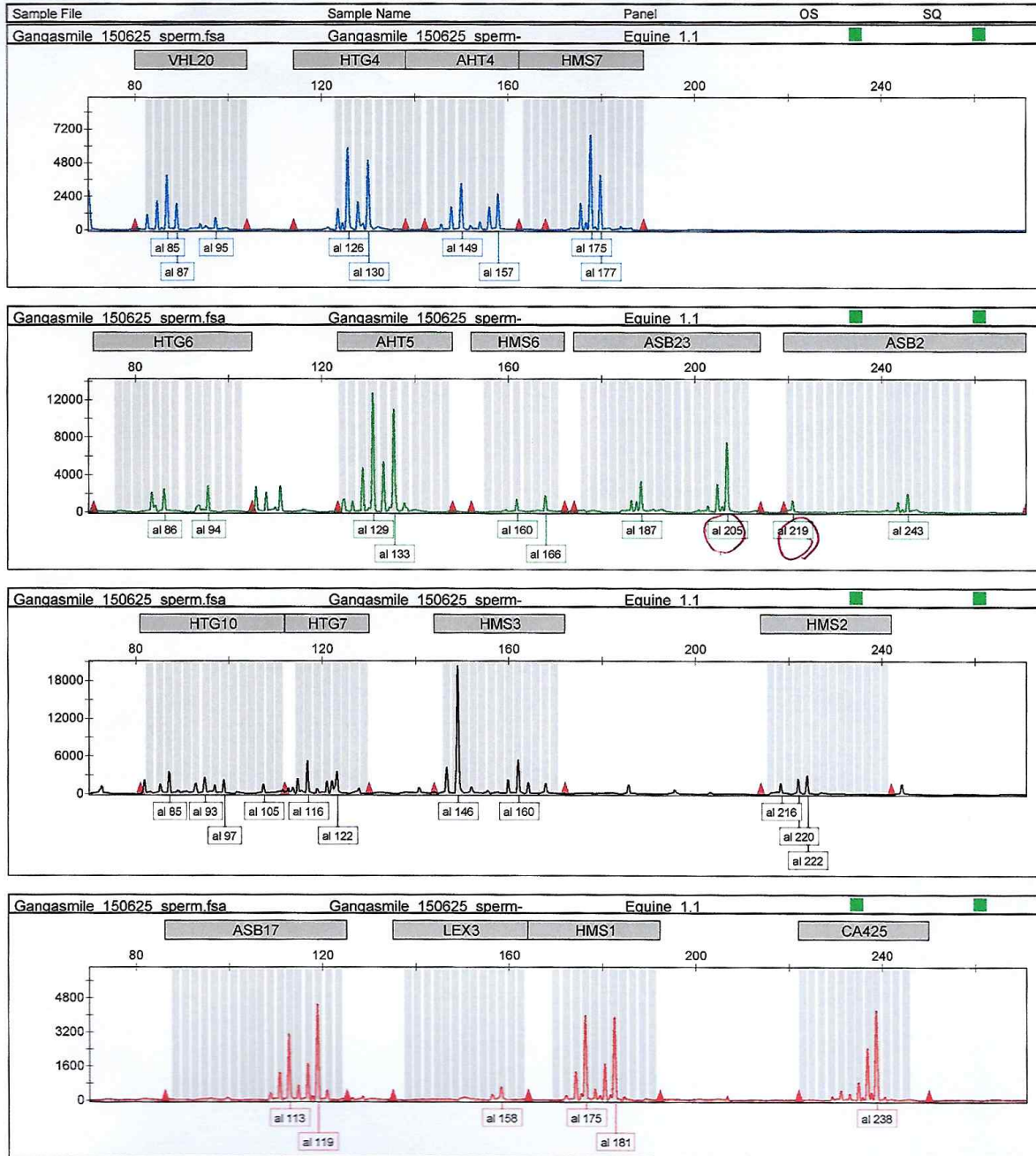
- Sample: 강자의미소 이식 전 정자



- Sample: 강자의미소에 이식된 071 donor testicular tissue



- Sample: 강자의미소 정자샘플과 071 donor testicular tissue 혼합 샘플(positive control)



결과)

- 강자의미소 정자샘플과 071 donor testicular tissue 혼합 샘플을 대상으로 genotyping을 실시한 결과, 각 프라이머에 대한 강자의미소 특이 패턴과 더불어 071 donor horse의 특이 패턴이 발견됨(recipient 말의 정소 내 donor 유래 정자 생산 여부를 확인할 수 있는 genotyping system 확립)

○ Recipient 정액의 genotyping 비교 대상 샘플

Donor testicular tissue	Donor germ cell 이식 전 recipient 수말 정액 샘플	Donor germ cell 이식 후 recipient 수말 정액 샘플
073(Ee)	담양전설	이식 두 달 이후 약 7개월 동안 채취된 20개 정액 샘플
071(EE)	강자의미소	이식 두 달 이후 약 6개월 동안 채취된 14개 정액 샘플
074(Ee)	썬메이커	이식 두 달 이후 약 8개월 동안 채취된 22개 정액 샘플
070(EE)	히든몬스터	이식 두 달 이후 약 9개월 동안 채취된 24개 정액 샘플
070(EE)	대천왕	이식 두 달 이후 약 5개월 동안 채취된 25개 정액 샘플
075(Ee)	연주연승	이식 두 달 이후 약 5개월 동안 채취된 8개 정액 샘플

결과)

- 약 120개 정자 샘플을 대상으로 genotyping을 실시한 결과 이식 후 수말 정액 샘플에서 donor 제주마의 발현 양상은 확인할 수 없었음
- 이번 실험에서는 정원줄기세포이식을 통해 donor 유래 정자 생산 실패

#### 4-2. Busulfan 처리 이후 Intra-testicular spermatogonial stem cell injection을 통한 donor 유래 정자 생산 실험

##### ① 연구 범위

- Busulfan 처리로 endogenous germ cell이 퇴화된 recipient 수말의 정소에 donor spermatogonial stem cell 이식 후 donor 유래 정자 생산

##### ② 연구 배경

- 15 mg/kg의 busulfan을 한 번에 처리한 group은 폐사율이 높았지만 2.5 mg/kg으로 분할 처리한 group은 한 마리도 폐사하지 않고 높은 endogenous germ cell 퇴화율을 나타냄
- Ultrasound guided vessel injection의 경우 donor 유래 sperm 생산을 실패하였기에 intra-testicular injection 방법을 활용하여 정소조직에 donor 줄기세포를 직접적으로 처리함
- Endogenous germ cell 퇴화율이 가장 높다고 판단된 busulfan 처리 후 11주차에 이식 처리함
- 수말의 spermatogenesis 기간은 약 2달 이므로, 이식 후 2달 뒤 정액을 채취해 genotyping 분석을 실시함

##### ③ 연구 내용

- Donor testicular tissue를 분리하여  $1,000 \times 10^6$  cells를 국소 주입함
- 진정제 자일라진 25 ml을 정맥투여 하여 진정시킨 후 연구 진행
- Infusion 주입기를 활용해 2 cc/min 속도로 주입함
- 주입 후 recipient 정액 채취 후 DNA 분석함

##### ④ 연구 수행 사진



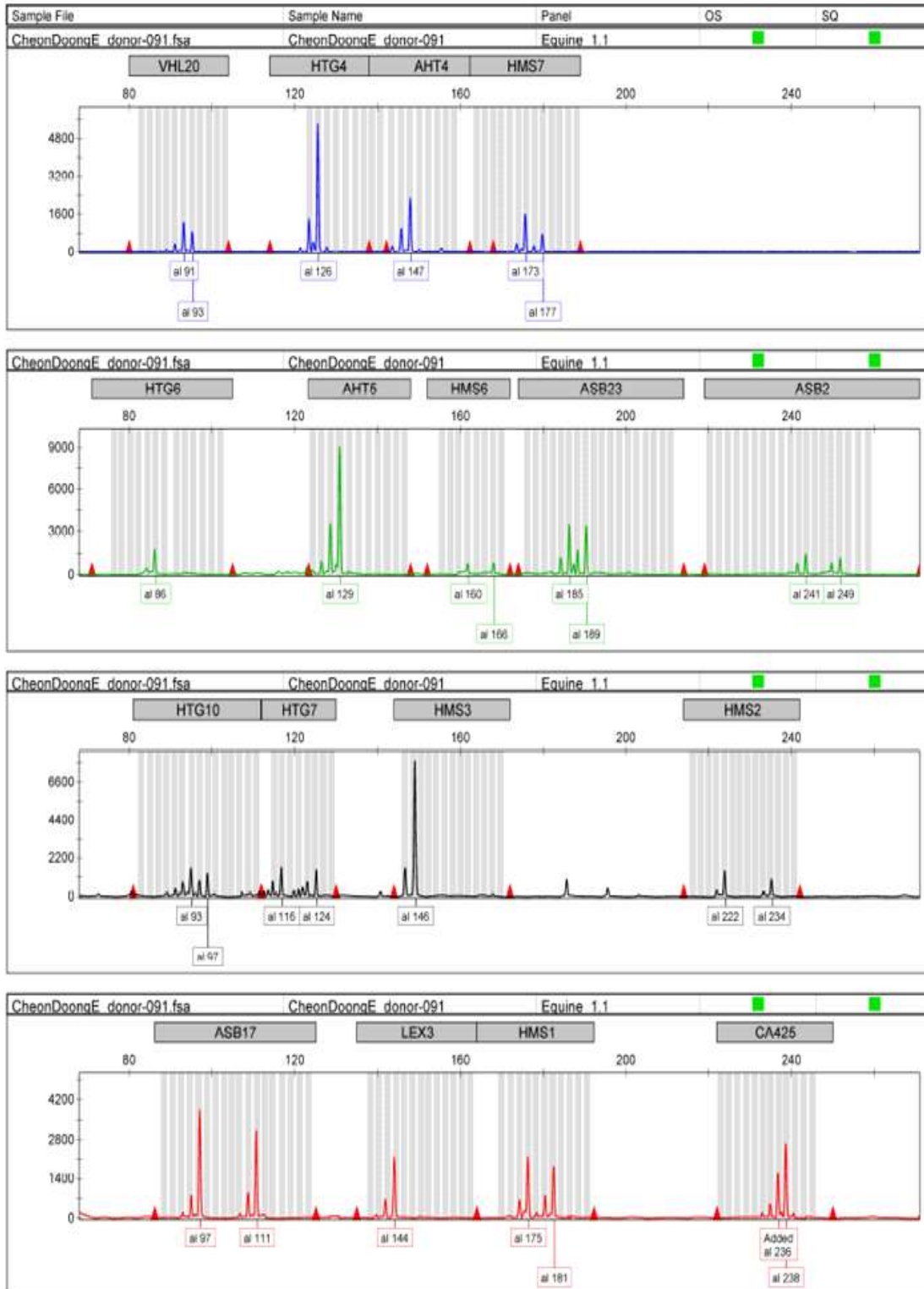


⑤ 연구결과

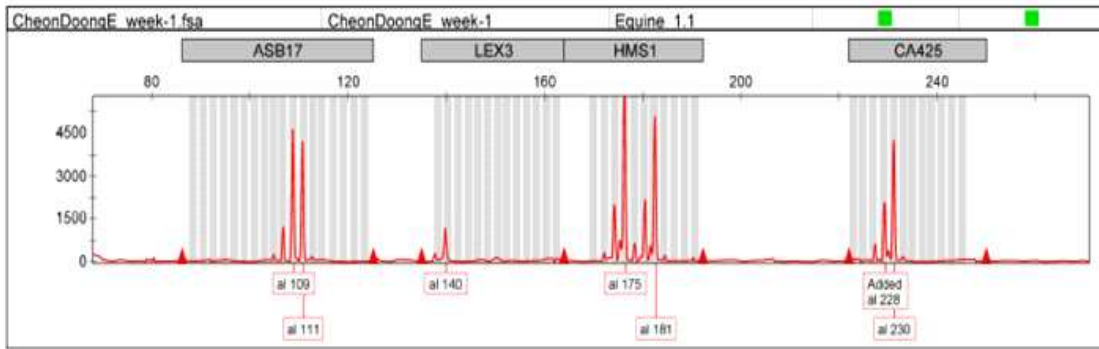
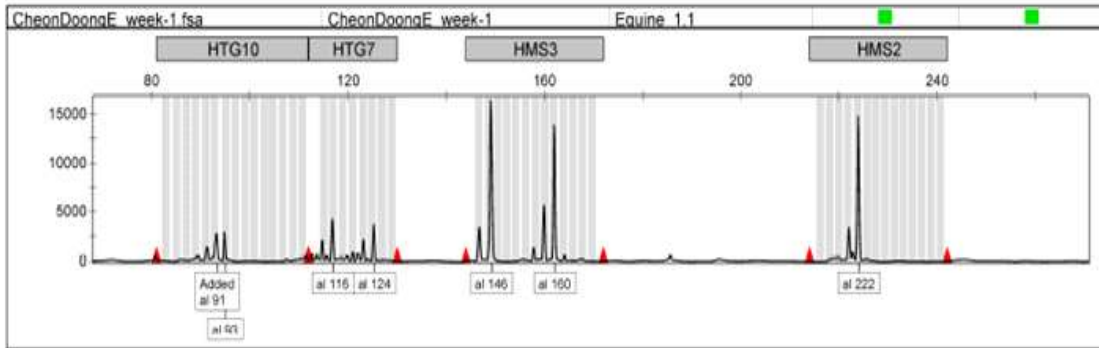
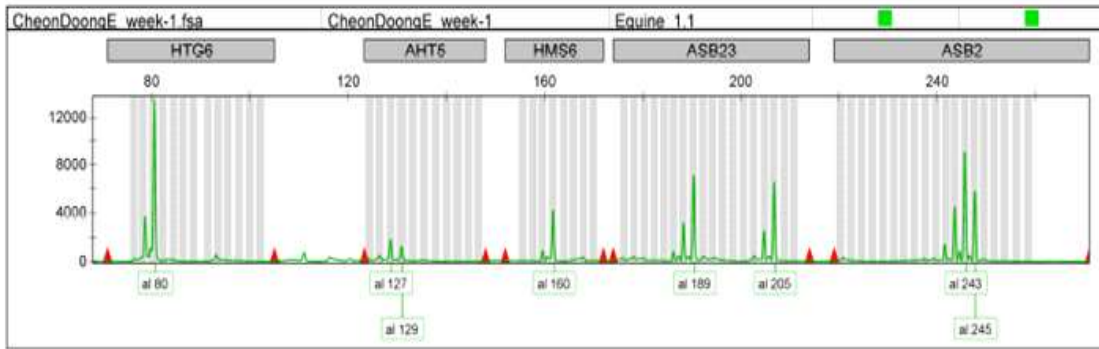
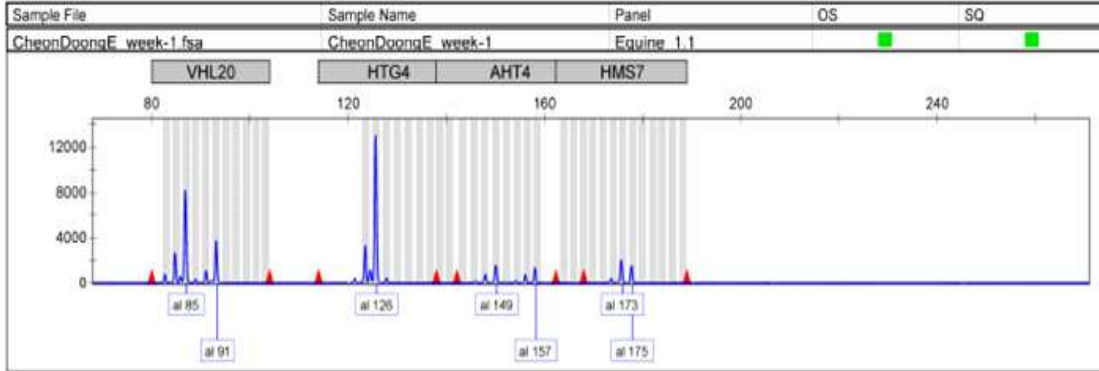
○ Genotyping분석을 위한 정액 sample 표

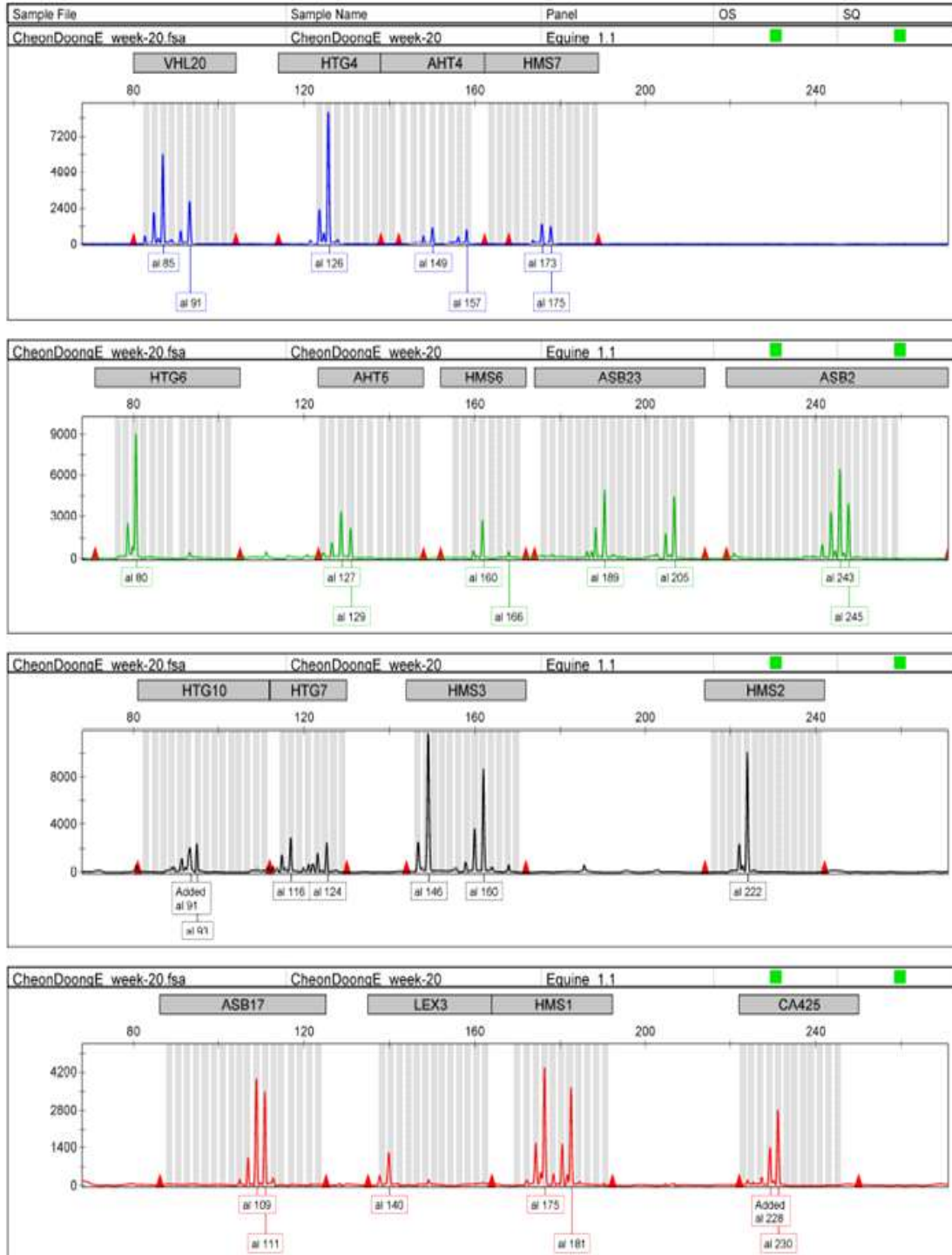
Donor testicular tissue	Donor germ cell 이식 전 recipient 정액 (대조군)	Donor germ cell 이식 후 recipient 정액 (실험군)
090	빅파이어	이식 후 13, 16주된 정액 샘플
091	천둥이	이식 후 8, 16, 19주된 정액 샘플

※ 3번째 말인 퍼펙트로즈는 정원줄기세포를 이식한지 약 2 달이 경과하였으며 번식장의 암말과 환경적응문제로 정액채취가 원활하게 진행되지 않는 상황임 -현재 지속적인 훈련을 통해 정액채취 가능한 말로 전환중임









- Recipient 정액 샘플을 대상으로 genotyping을 수행한 결과 정원출기세포 이식 후 donor 유래의 발현양상은 확인할 수 없었음
- 염소의 경우, 이식 후, 약 26주 뒤에 donor gene이 발견된 경우가 있으므로 조금 더 경과를 지켜 볼 필요가 있음

## 5. 국내산 말 정액(실온, 냉장) 희석제 개발(참여기업과의 공동연구 결과)

### 5-1. 국내산 말 정액 실온 보존 희석제 개발

#### ① 연구 목표

- 국내산 말 정액희석제 개발

#### ② 연구 배경

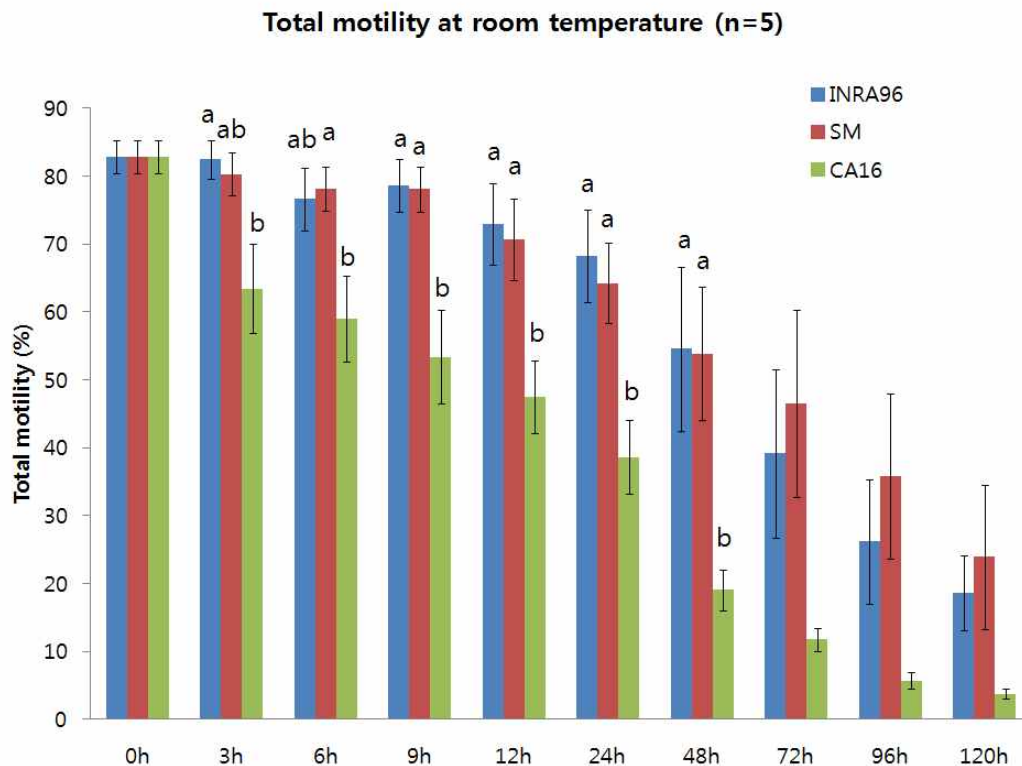
- 국내 말산업이 발전됨에 따라 인공수정기법을 활용한 말번식이 활발히 이루어질 것으로 예상됨
- 하지만 현재 국산 희석제가 존재하지 않으며 전량 외국에서 수입하여 사용하고 있음
- 외국에서 수입할 경우 높은 단가와 주문 후 물건을 수취할 때 까지 약 한 달 정도 시간이 소요되어 국내산 말 정액희석제를 개발에 대한 필요성이 고취되고 있음

#### ③ 연구 내용

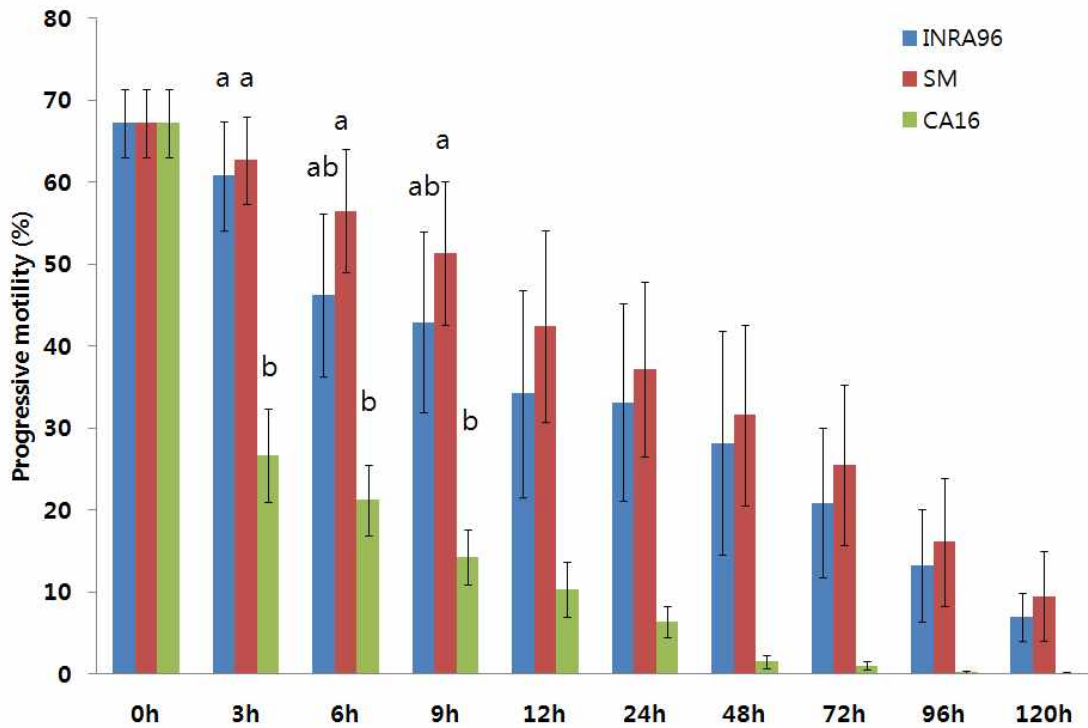
- 노아바이오텍에서 말 정액희석제로 사용가능한 후보 희석제 개발
- 현재 전세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 말 정액희석제인 INRA96 제품과 노아바이오텍에서 새로 개발한 두 개의 희석제(SM과 CA16)를 비교평가 실시
- 정액의 실온 및 냉장 보관 시 정자의 총운동성 및 직진운동성의 변화를 비교/관찰

#### ④ 연구 결과

- 실온(15 °C) INRA96 vs SM vs CA16 희석제에 따른 정자 운동성 변화



Progressive motility at room temperature (n=5)



- 말정액을 각각의 희석제에 희석하여 실온보관 시 INRA96와 SM으로 희석된 정자의 총운동성과 직선운동성은 차이가 없음
- INRA96와 SM으로 희석되어 보관된 정자의 경우 보관 후 약 48시간 동안 직선운동선이 약 30% 이상 유지됨
- 하지만 CA16으로 희석된 정자의 경우 3시간 이후부터 급격하게 운동성 저하

⑤ 결론

- SM 희석제의 경우 수입 말정액 희석제인 INRA96 대체제로 사용 가능함
- 추후 추가실험과 임상실험을 거쳐 말 생산현장에 사용될 수 있을 것으로 전망됨

※ 상기 연구결과는 한국동물자원과학회 춘계학술대회 초록으로 채택되었으며 포스터 발표 (2015년 8월 25-26일)

※ 현재 SM 희석제는 국내 말정액희석제로 특허출원을 완료하였으며 특허등록 진행중

## 5-2. 국내산 말 정액 냉장 보존 희석제 개발(참여기업과의 공동연구 결과)

### ① 연구 목적

#### ○ 목적

- 국내산 말 정액희석제를 활용한 말 정액 냉장보존 체계 구축

### ② 연구 내용 및 방법

#### ○ 정액 채취와 희석

- 더러브렛 4두를 공시동물로 이용하였고 인공질을 사용하여 정액채취
- 정액희석은 INRA 96, SM, CA 16을 1:4 비율(희석제 4 : 정액 1)로 희석하여 4℃에 저장
- 실험은 희석시점을 시작점으로 24시간마다 1회씩 각각의 실험을 수행하며 4일간 지속적으로 실시

#### ○ 운동성 및 직진 운동성

- Light microscope에 설치되어있는 CASA program로 정자의 운동성과 직진운동성 측정

#### ○ 침체 충실성

- 100 mOsm의 sucrose solution을 사용하여 정자 침체의 충실성 관찰
- 정자 침체의 상태가 정상적이면 100 mOsm의 sucrose solution에 의해 꼬리가 Coiled되고 정자 침체의 상태가 비정상적이면 100 mOsm의 sucrose solution에 반응하지 않아 Uncoiled 상태
- Light microscope를 사용하여 200마리의 정자 중 Coiled된 정자의 비율을 측정

#### ○ 생존율

- 정자 생존율 검사는 SYBR-14 / Propidium iodide 형광염색시약을 활용한 double staining 기법을 활용
- 정자 생존율 검사 확인은 florescent microscope와 flow cytometry를 활용
- Florescent microscope
  - Florescent microscope로 관찰시 Alive 정자는 SYBR-14에 염색되어 녹색형광을 띠고 Dead 정자는 PI에 염색되어 적색형광을 띰
  - Florescent microscope로 관찰하여 200마리 정자 중 녹색형광을 띠는 정자의 비율을 측정
- Flow cytometry
  - Flow cytometry를 활용하여 SYBR-14에 염색되었는지 PI에 염색되었는지에 따라 program에 따라서 분류되며 정자가 아닌 물질은 따로 분류


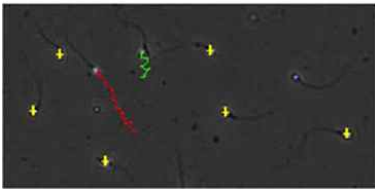
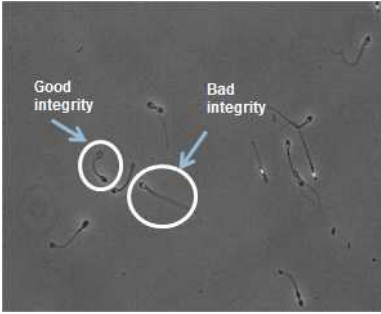
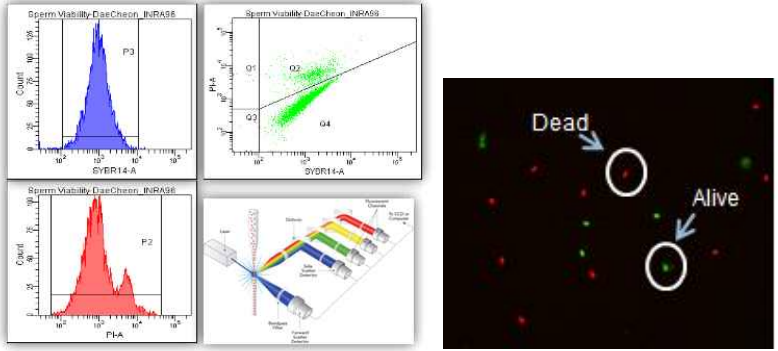
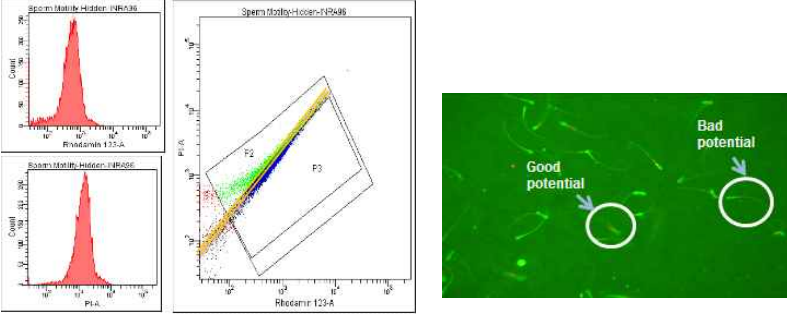
#### ○ 미토콘드리아 막 온전성

- 미토콘드리아 막 온전성은 JC-1 형광염색시약으로 염색 후 florescent microscope를 활용하여 관찰하는 방법과 Rhodamin 123 형광염색시약으로 염색 후 flow cytometry의 program을 활용하는 방법을 이용
- JC-1
  - 미토콘드리아 막이 정상이면 JC-1에 염색되어 florescent microscope로 관찰 시 미토콘드리아가 주황색을 나타내지만 미토콘드리아 막이 정상적이지 않다면 JC-1이 염색되지 않아 florescent microscope로 관찰 시 형광을 나타내지 않음
  - Florescent microscope로 관찰하여 200마리 정자 중 주황색을 띠는 정자의 비율을 측

정

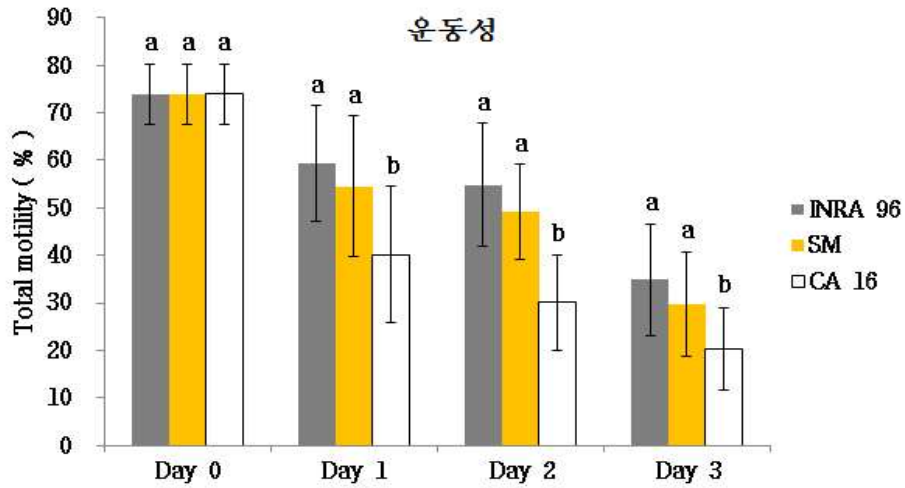
· Rhodamin 123

- JC-1과 마찬가지로 미토콘드리아 막이 온전하면 Rhodamin 123이 염색되어 flow cytometry의 program에 따라 분류됨

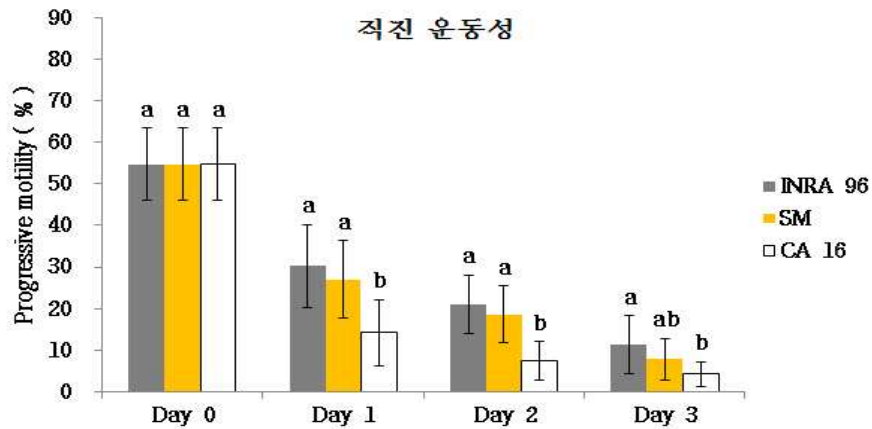
정자성상 검사항목	검사방법	
운동성 및 직진 운동성	Light microscope with CASA program	 
침체 충실성	100 mOsm sucrose solution	
생존율	SYBR/PI staining	
미토콘드 리아 막 온전성	JC-1 staining/ Rhodamin123 staining	

④ 연구 결과

○ 총 운동성 및 직진 운동성

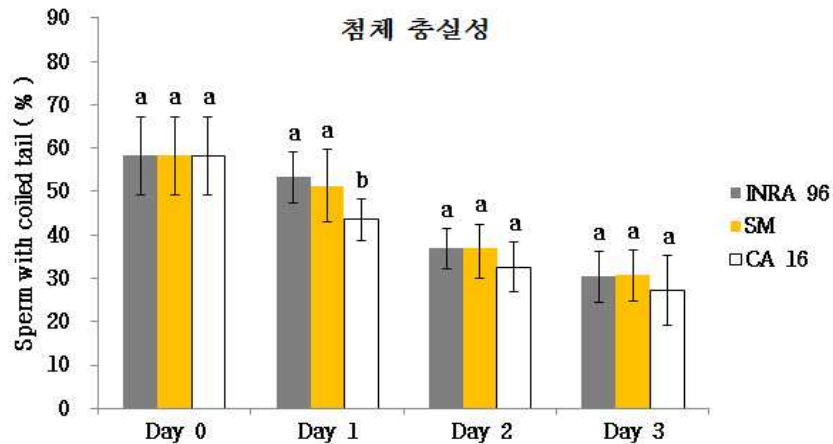


- 정액희석제 INRA 96과 SM 간의 운동성 평가에서는 유의차가 나타나지 않았지만 INRA 96과 CA 16 간에서는 Day 1부터 Day 3까지 유의차가 나타남



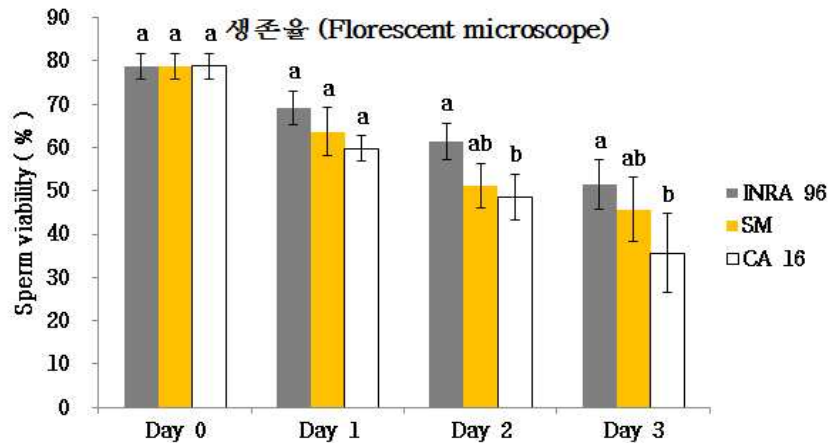
- INRA 96과 SM 간의 직진 운동성 평가에서는 유의차가 나타나지 않았고, INRA 96과 CA 16의 평가는 Day 1에서부터 Day 3까지 유의차가 나타남

○ 침체 충실성



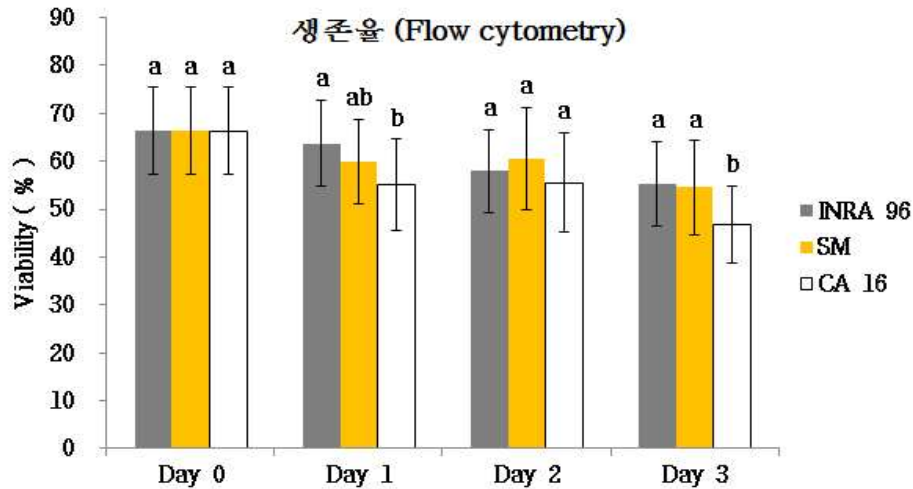
- INRA 96과 SM 간의 침체 충실성 평가에서는 유의차가 나타나지 않았고 INRA 96과 CA 16 간의 침체 충실성 평가에서도 Day 1에서는 유의차가 나타났지만 Day 2, Day 3에서는 유의차가 나타나지 않음
- CA 16이 INRA 96과 Day1에서는 유의차가 나타났지만 이후 실험에서 유의차가 나타나지 않은 이유는 실험 결과에서는 차이가 나타났지만 통계 프로그램에서는 유의차를 인정하지 않았기 때문에 이러한 결과가 나타남

○ 생존율



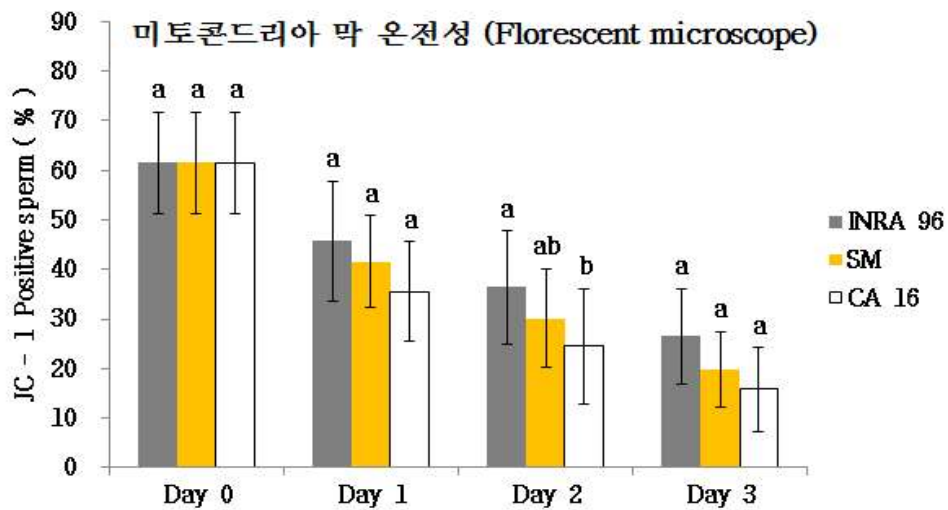
- Florescent microscope로 측정된 생존율에서는 INRA 96과 SM간의 유의차는 없었지만 INRA 96과 CA 16간의 유의차가 Day 2부터 나타남



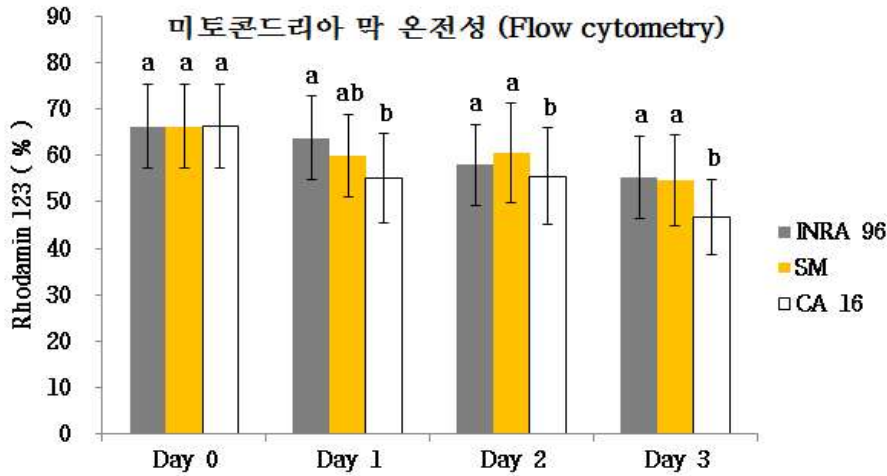


· Flow cytometry로 측정 한 생존율에서는 INRA 96과 SM간의 유의차는 없었지만 INRA 96과 CA 16간의 유의차가 Day 1과 Day 3에서 나타남

○ 미토콘드리아 막 온전성



· Florescent microscope로 측정 한 미토콘드리아 막 온전성 실험에서는 INRA 96과 SM간의 유의적 차이는 나타나지 않았고 INRA 96과 CA 16간의 유의차는 Day 2를 제외하고는 나타나지 않음



- Flow cytometry로 측정된 미토콘드리아 막 온전성 실험에서는 INRA 96과 SM간의 유의적 차이는 나타나지 않았지만 INRA 96과 CA 16간의 유의차는 Day 1부터 시작하여 Day 3까지 나타남

### 5-3. 국내산 말 정액 냉동 보존 희석제 개발(참여기업과의 공동연구 결과)

#### ① 연구 목적

##### ○ 목적

- 국내산 말 정액희석제를 활용한 말 정액 냉동 보존 가능성 탐구

#### ② 연구 내용 및 방법

##### ○ 정액 채취와 희석

- 더러브렛 3두를 공시동물로 이용하였고 인공질을 사용하여 정액채취
- 정액희석은 INRA 96 혹은 SM 을 이용하여 1:2 비율(정액 1: 희석제 2)로 희석한 후 E-Z cushion 용액위에 주입하고 centrifuge 기계를 이용하여 1000 x g 속도로 10 분 동안 회전
- 상층액을 제거한 후 침전된 정자를 채취하여 아래의 동결희석제와 함께 처리하여 동결함

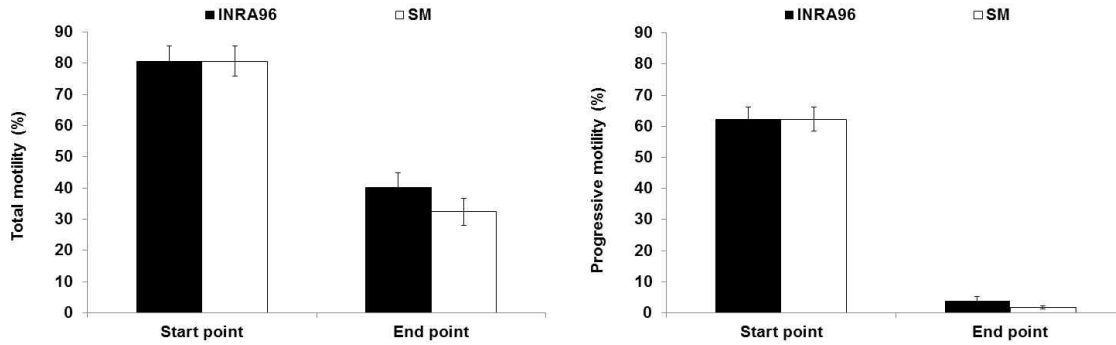
ID	Base solution	Addition
Solution 1	INRA96	2 % egg yolk and 2.5 % glycerol
Solution 2	SM	2 % egg yolk and 2.5 % glycerol

- 동결된 말 정액은 37 °C에서 25초간 용해된 뒤 정자 성상을 관찰하였음

### ③ 연구 결과

#### ○ 정자 운동성과 직진 운동성 비교

**Motility** analyzed using a light microscope with CASA program

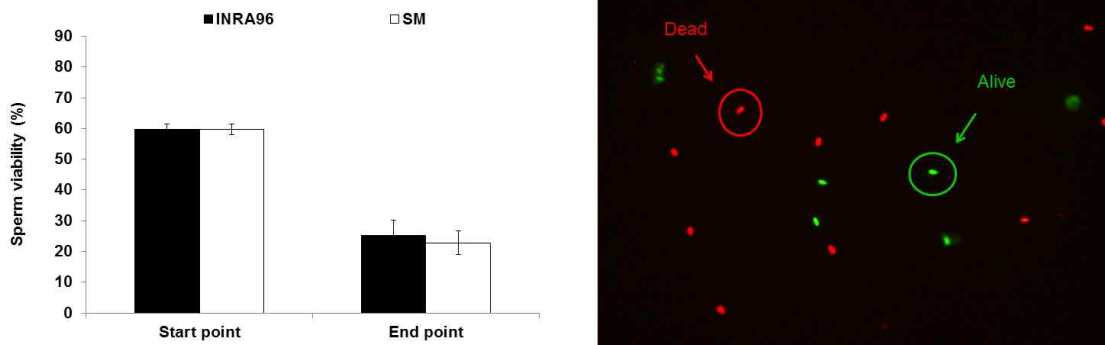


- INRA96와 비교할 때 SM희석제를 기반으로 frozen/thawed 된 정자의 운동성 및 직선 운동성에는 큰 차이가 없었음

#### ○ 정자 생존성 비교

### **Viability**

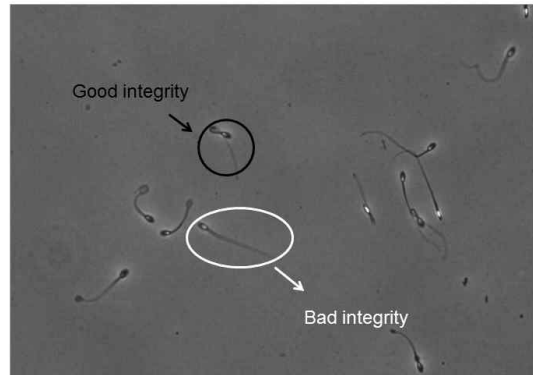
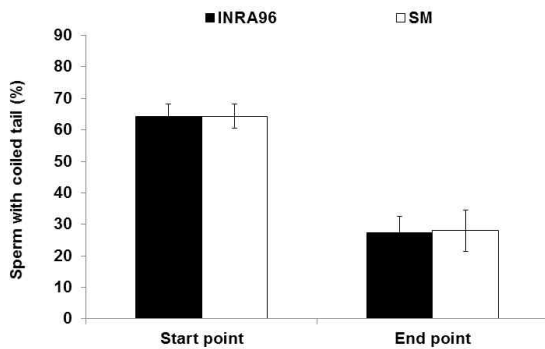
SYBR-14 / PI staining analyzed using a fluorescent microscope



- INRA96와 비교할 때 SM희석제를 기반으로 frozen/thawed 된 정자의 생존율에는 큰 차이는 없으나 생존율이 약 30% 미만으로 매우 낮게 기록됨

○ 침체 충실성 비교

Membrane integrity analyzed using 100 mOsm sucrose solution

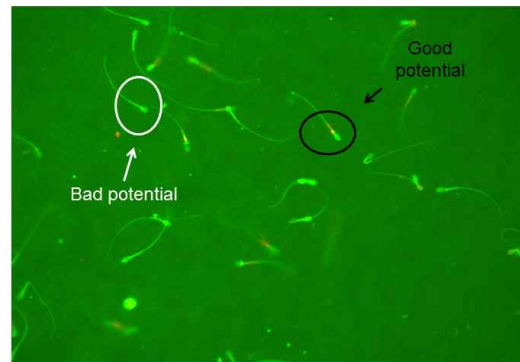
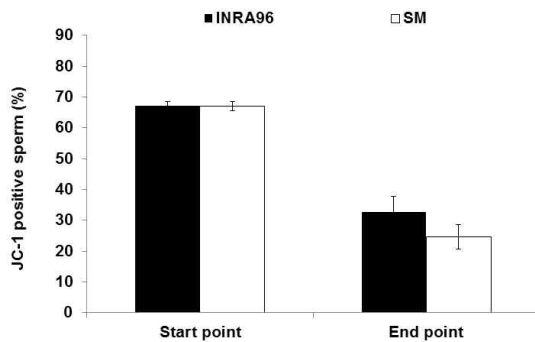


- 침체 충실성 또한 INRA96와 비교할 때 SM희석제를 기반으로 frozen/thawed 된 정자 경우 큰 차이는 없으나 약 30% 미만으로 매우 낮게 기록됨

○ 미토콘드리아막 온전성 비교

Mitochondria membrane potential

JC-1 staining analyzed using a fluorescent microscope



- INRA96와 비교할 때 SM희석제를 기반으로 frozen/thawed 된 정자의 미토콘드리아막 온전성은 큰 차이는 없으나 약 30% 미만으로 매우 낮게 기록됨

④ 연구 결론

- INRA96와 비교했을 때 동결용해제로 base solution으로 SM희석제를 사용하는 것도 가능할 것으로 판단되지만 2 % egg yolk 과 2.5 % glycerol만 첨가한 동결제로는 상업적으로 사용 불가능함

## II. 연구개발성과

### 1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자명	학술지명	Vol. (No.)	국내외	SCI 여부
2015	Acrosin-binding protein (ACRBP) in the testes of stallions	JT kim, HJ Jung, H Song, MJ Yoon	Animal Reproduction Science	163	국외	Yes
2016	Protein Gene Product 9.5 Expression in Stallion Testes	HJ Jung, MJ Yoon	Journal of Equine Veterinary Science	45	국외	Yes
2016	Isolation of Germ Cells From Testes of Stallions Using Collagenase and Trypsin-Ethylene diaminetetraacetic Acid	HJ Jung, MJ Yoon	Journal of Equine Veterinary Science	43	국외	Yes
2016	The Lin28 Expression in Stallion Testes	Geumhui Lee, Heejun Jung, Minjung Yoon	PLOS One	11(10)	국외	Yes
2016	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1) and deleted in azoospermia-like (DAZL) expression in the testes of donkeys	YS Lee, HJ Jung, MJ Yoon	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1) and deleted in azoospermia-like (DAZL) expression in the testes of donkeys		국외	Yes

## 2. 특허 성과

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2016. 07.13	ACRBP 항체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 정소세포 동정용 조성물	윤민중 정희준 김정태	대한민 국	10-2016- 0088452
2016. 07.13	VASA 항체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 정소세포 동정용 조성물	윤민중 정희준	대한민 국	10-2016- 0088775
2016. 07.13	PGP9.5 항체를 유효성분으로 포함하는 포유동물의 정소세포 동정용 조성물	윤민중 정희준	대한민 국	10-2016- 0088451
2016. 07.13	말 정액 장기보존을 위한 희석제	윤민중 손중호 정희준 원종신	대한민 국	10-2016- 0088776

\* 출원: 출원연도, 특허명, 출원인, 출원국, 등록·기탁번호 / 등록: 등록연도, 특허명, 등록인, 등록·기탁번호

## 3. 사업화 성과

### ◎ 정원줄기세포 이식 기술

#### - 사업화 실적

- 현재 정원줄기세포를 활용한 거세마의 후대 생산 기술은 개발중에 있기 때문에 본 연구의 성공여부를 확인 한 후 추가적인 임상 실험을 거쳐 사업화를 진행할 계획

#### - 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	0	1	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	0	100
국외	0	0	100		
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	노새를 recipient model로 활용한 말 정원줄기세포 이식을 통한 정자생산 기술 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

◎ 말 정액 희석제 개발

- 사업화 성과 및 매출실적

- 말 정액 희석제는 아직 임상실험을 수행하지 않은 관계로 사업화를 개시하지 못하고 있는 실정임.
- 2018년 3월부터 말 인공수정 시 본 개발품을 활용하여 임상실험을 실시 한 후 2019년도부터 본격적으로 사업화를 실시할 계획임

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	0.2	0.4	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	70	80
국외			10	15	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	말 정액 동결희석제 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
4-1. 목표달성도				
세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	연구결과	달성도 (%)
· 말 정소세포 분화단계별 molecular marker 개발	· 말 미분화정원줄기세포 molecular marker 개발	· Western blot 기법을 이용하여 항체의 cross-activity 확인	· Lin28는 pre-pubertal, post-pubertal stage 내 germ cells에서 발현하는 것을 확인 · Lin28은 sertoli cell에 발현되는 GATA4와 겹치지 않고 germ cell에 발현되는 것을 확인 · pre-pubertal, post-pubertal stage에서 Lin28 antibody가 DAZL antibody와 겹치는 germ cell이 존재 · post-pubertal stage에서 세포가 1개(As), 혹은 2개(Apr)의 세포에 Lin28이 발현	100
	· 말 spermatogonia molecular marker 개발	· 성장 단계별 정소 내 해당 molecule 발현 확인	· PGP9.5의 항체를 이용할 경우 수말의 spermatogonia를 식별할 수 있는 사실 발견	
	· 말 post-meiotic 정소세포 molecular marker 개발	· Whole-mounting staining 방식을 확인하여 specific germ cell stage 확인	· ACRBP 항체의 경우 성성숙 전 단계의 germ cell에서는 발현되지 않음 · 반면에 성성숙 시 및 이후 단계의 germ cell에서 발현됨. 그러므로 ACRBP antibody는 post-meiotic germ cell의 marker로 사용가능 · ACRBP staining pattern을 각 tubule stage 별로 관찰 한 결과 primary spermatocyte, secondary spermatocyte, round spermatid에서 발현하는 것을 확인 하였고, spermiogenesis 단계 중에는 정자의 두부 생성단계 별로 침체형 성패턴과 동일한 양식으로 발현되는 것을 확인	100
	· 당나귀 미분화정원줄기세포 및 분화된 정원세포 구분 가능한 molecular marker 개발		· UTF-1은 pre-pubertal, post-pubertal에서 발현되는 것을 확인함 · 생식세포에서 UTF-1과 DAZL 발현 패턴의 결과를 종합해보았을 때 UTF-1는 early stage spermatogonia에서 발현되는 것을 확인함	100



세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	연구결과	달성도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 정원줄기 세포이식을 위한 recipient 말 생산 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 70% glycerin 국소처리가 말 정소에 미치는 영향</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin 처리가 말의 정자생산에 미치는 영향(총정자생산량, 정자활력도, 리비도, testosterone 량 측정)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin(70%) 처리(n=3) 후 말의 총 정자생산량이 감소하는 것을 확인</li> <li>· Glycerin 처리 후 총정자운동성(total motility)과 직진운동성(progressive motility)은 변함이 없음을 확인</li> <li>· Glycerin 처리는 말의 리비도(번식장 입장 후 발기 시간, 성기세척 후 사정까지 시간, 사정할 때 까지 증가회수)에 영향을 미치지 않음을 확인</li> <li>· Horse testosterone specific ELISA를 이용하여 호르몬 수치를 측정한 결과 control 그룹과 차이가 없음을 확인</li> </ul>	100
		<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin 처리가 말의 정소조직 내 endogenous germ cell에 미치는 영향</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin을 국소적으로 말 정소에 처리할 경우 자기정원세포가 제거된 seminiferous tubule 생성 확인하였으나 효과가 그리 크지 않고, 효과의 개체별 차이가 커서 이상적인 처리 방법이 아니라고 판단됨</li> </ul>	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin 처리가 말의 건강에 미치는 영향(처리 후 체온, 호흡수, 심박수, 채식, 산통, 제염염 발병 여부 확인)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Glycerin 처리 전후 말의 체온, 호흡수, 심박수는 변하지 않음</li> <li>· Glycerin 처리 전 3주와 처리 후 10주 동안 glycerin 처리로 인한 채식행동 및 질병은 발생하지 않음을 확인</li> </ul>	

세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	연구결과	달성도 (%)
<p>· 정원줄기 세포이식을 위한 recipient 말 생산 기술 개발</p>	<p>· Busulfan 정맥주입이 말 정소 내 endogenous germ cell에 미치는 영향 확인</p>	<p>· 적정 busulfan처리 방법과 용량 확인</p>	<p>· 15 mg/kg 용량을 5주 동안 분할 주입할 경우 생존율 100%</p>	100
		<p>· Busulfan 처리가 말의 정자생산에 미치는 영향(총정자 생산량, 정자활력도)</p>	<p>· Busulfan 처리 시 정자생산량과 운동성이 감소하는 것 확인</p>	
		<p>· Busulfan 처리가 말의 정소조직 내 endogenous germ cell에 미치는 영향</p>	<p>· Busulfan 처리 시 평균 약 85% tubule이 Sertoli cell only 및 destroyed tubule로 확인됨</p>	
		<p>· Busulfan 처리가 말의 건강에 미치는 영향(처리 후 체온, 호흡수, 심박수, 채식, 산통, 제염염 발병 여부 확인)</p>	<p>· Busulfan을 1주안에 전량 투여할 경우 생존율은 33.3%임(3마리중 2마리 폐사)          · Busulfan을 5주간 분할 처리할 경우, 처리 전후 말의 체온, 호흡수, 심박수는 변함이 없음을 확인          · Busulfan 처리 전 3주와 처리 후 10주 동안 busulfan 처리로 인한 채식행동 및 질병은 발생하지 않음을 확인</p>	

세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	연구결과	달성도 (%)
· 정원줄기세포 이식 기법 확립	· Ultrasound guided core-vessel injection 기법 확립	· 정소로부터 single germ cell 확보를 위한 최적의 방식 구축	· Collagenase와 Trypsin EDTA를 복합적으로 사용할 경우 순도가 높은 수말의 정소세포를 확보할 수 있음	100
		· 이식 적정 기구 및 약품 정립	· 정원줄기세포 주입 시 적절한 기구로는 일반 주시기와 수액세트, 3 way cock을 사용하여 주입 · 적정 약품으로는 분리된 세포를 10% FBS를 첨가된 MEMa 세포배양액에 혼합하여 주입 · DNase를 첨가하여 세포 응집 억제 효과	
		· 세포주입시간 및 방법 정립	· 약물을 이용하여 말을 전신 마취한 다음 밧줄로 다리를 고정 · 초음파기로 정소의 내부를 살피며 정소의 vessel을 확인 후 26 gauge needle을 이용하여 주입 · 정소 주입 시 monitoring을 위해 주입 초반부 및 중반에 공기를 주입하여 bubble 생성을 유도하여 정소내 세포 주입 여부 확인	
		· 이식 후 recipient 말 건강상태 모니터링	· 이식 후 recipient 말의 건강상태(열 발생 및 맥박, 호흡수)는 이상이 없음을 확인	

세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	연구결과	달성도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>정원줄기 세포 이식 기법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>70% Glycerin 및 PBS 처리된 말을 대상으로 Ultrasound guided core-veessel injection 실시에 따른 정원줄기 세포 생착률 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Donor 유래 정원세포 생착률을 비교하여 70% glycerin 처리를 통한 recipient 생산 및 Ultrasound guided core-vessel injection 효율성 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>70% glycerin으로 처리 시 PKH26으로 염색된 donor 유래 germ cell의 생착된 것 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>관찰할 500개 field 중에 36개 field에서 PKH26에 염색된 germ cell이 확인됨</li> </ul> </li> <li>반대로 control 정소에서는 PKH26으로 염색된 germ cell을 찾을 수 없었음</li> <li>하지만 Field 별 PKH26으로 염색된 세포수가 매우 적음</li> </ul>	100
	<ul style="list-style-type: none"> <li>정원세포 국소주입 기법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>세포주입 방식 정립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>진정제 약물을 이용하여 말을 마취한 선체로 말의 뒷다리를 받줄로 고정</li> <li>26 guage needle을 이용하여 정소 내 깊숙이 주입한 후 서서히 위치를 옮기면서 세포 이식</li> </ul>	

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>정원줄기 세포이식을 통해 recipient 말로부터 donor 유래 정자 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>70% glycerin 국소처리된 recipient 말 대상말 Ultrasound guided core-vessel injection 효능 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>말 3마리의 정소에 70% glycerin을 처리하고 또 다른 말 3마리의 정소에는 PBS로 처리한 후 제주마의 정소에서 추출된 정원세포를 Ultrasound guided core-vessel injection 기법으로 주입 후 정액채취</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>6마리 수말에서 채취한 120여개 정액 샘플을 대상으로 micro-satellite fingerprinting 기법을 활용하여 genotyping을 실시한 결과 이식 후 수말 정액 샘플에서 donor 제주마의 발현 양상은 확인할 수 없었음</li> <li>이번 실험에서는 정원줄기세포이식을 통해 donor 유래 정자 생산 실패</li> </ul>	100
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Busulfan 정맥주사 처리된 recipient 말 정소에 국소이식 효능 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>말 3마리를 대상으로 15 mg/kg 용량으로 정맥혈을 통해 5주 동안 처리 10~11주가 경과되는 때에 제주마의 정소에서 추출된 정원세포를 정소에 국소이식 후 정액 채취</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2마리 수말에서 채취한 5개의 정액샘플을 대상으로 채취한 120여개 정액 샘플을 대상으로 micro-satellite fingerprinting 기법을 활용하여 genotyping을 실시한 결과 이식 후 수말 정액 샘플에서 donor 제주마의 발현 양상은 확인할 수 없었음</li> <li>현재 해당 수말로부터 지속적으로 정액을 채취하고 있으며 추후 몇 달간은 추가로 채취한 후 결과를 살펴보고 성공여부를 확인할 계획임</li> </ul>	50

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도 (%)
· 국내산 말 정액 희석제 개발	· 신개발 말정액희석제 (SM)이 실온보관 시 정액성상에 미치는 영향 조사 연구	· SM을 이용하여 말 정액을 실온 보관 시 시간에 따른 정자의 morphology, acrosome integrity, mitochondrial DNA fragmentation 변화 확인	· SM희석제로 정자를 희석하고 5일 동안 정자의 성상을 확인한 결과 SM을 이용하여 정자의 실온보관이 가능함을 확인	100
		· 해외 말 정액 희석제인 INRA96 와 효과 비교 분석	· INRA96와 비교했을 때 정자실온보존을 위한 희석제로 사용이 가능함을 확인	
	· 신개발 말정액희석제 (SM)이 냉장 보관 시 정액성상에 미치는 영향 조사 연구	· SM을 이용하여 말 정액을 냉장 보관 시 시간에 따른 정자의 morphology, acrosome integrity, mitochondrial DNA fragmentation 변화 확인	· SM희석제로 정자를 희석하고 48시간 동안 정자의 성상을 확인한 결과 SM을 이용하여 정자의 냉장보관이 가능함을 확인	100
		· 해외 말정액 희석제인 INRA96 와 효과 비교 분석	· INRA96와 비교했을 때 정자냉장보존을 위한 희석제로 사용이 가능함을 확인	

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 말/당나귀 정소세포 분화단계별 molecular marker 개발
  - 본 연구를 통해 발견된 분화단계별 정소세포 marker는 말의 spermatogenesis 과정을 이해하기 위한 실험을 수행하는 데 매우 중요하게 활용될 것으로 기대됨
  - 또한 당나귀의 정원줄기세포에서 발현하는 marker를 발견하여 추후 당나귀의 정원줄기세포를 활용한 정자생산 기법 개발에 적극 활용될 것으로 기대됨
  
- 정원줄기세포이식을 위한 recipient 말 생산 기술 개발
  - 중소가축 및 대가축을 대상으로 recipient 종축 생산 기술 중 가장 안정적인 방식은 방사선 처리였으나 국내에는 상기 목적으로 활용가능한 방사선 장비가 없기 때문에 적용하기가 어려움이 있음
  - 본 연구과제로 개발한 Busulfan 분할처리를 통한 recipient 말 생산기술은 소, 돼지, 염소 등 다양한 종축을 대상으로 recipient 모델을 생산하는 데 다양하고 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 판단되어 이 분야에 기여도가 매우 크다고 확신함
  
- 정원줄기세포 이식 기법 확립
  - Collagenase와 Trypsin EDTA를 사용하여 정소로부터 germ cell을 확보하는 기술은 추후 수말 germ cell 연구에 다양하게 활용될 것임
  - 말에는 효능이 크지 않지만 본 연구에서 개발한 정원줄기세포 이식 기법은 다른 가축을 대상으로 정원줄기세포를 주입 할 때 동일하게 적용할 수 있을 것으로 확신함. 흑염소의 경우 본 연구팀에서 확인한 이식 기법을 활용할 시 완벽하게 정소에 이식 가능하다는 것으로 확인함
  - 또한 말을 대상으로 국소적으로 이식할 수밖에 없기 때문에 이번 연구를 통하여 국소이식기법의 효과를 확인할 수 있다는 데 큰 기여를 했다고 판단됨
  
- 정원줄기세포이식을 통해 recipient 말로부터 donor 유래 정자 생산
  - 70% glycerin 처리 이후 ultrasound guided core-vessel 주입 기법으로는 정원줄기세포 유래 정자생산이 실패하였으나 이러한 실패를 기반으로 성공적인 기술이 개발될 것으로 확신함
  - Busulfan 처리 이후 국소이식 방식이 성공할 경우 우수한 유전인자를 가지고 있는 거세마의 후대를 생산하는 기술로 국내외 적극적으로 활용될 것으로 기대됨
  
- 국산 말 정액 희석제 개발
  - 본 연구를 통해 개발한 말 정액 희석제는 국내 인공수정기법을 활용하여 말 생산 시 국내산 희석제로 적극 활용될 것으로 기대됨
  - 또한 실험으로 통해 쌓은 노하우는 추후 말 정액동결희석제 개발하는 데 유용하게 활용될 것으로 기대됨

○ 종합적 기여도

- 외국 선진국에 비하여 국내 말산업은 매우 열악한 상황이었으며 이에 따라 수말을 대상으로 연구를 수행하는 경우도 거의 없었음. 하지만 이번 연구를 통해 국내 말 관련 연구 수준을 한 층 향상시키는데 기여함
- 또한 연구를 수행하기 위해 갖춘 수말과 정액채취 장비 등을 이용하여 학생은 물론 지역 말생산 농가에 말 정액 채취 기술을 전파하는 데 적극 기여함



## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>○ 추가 연구의 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 이식된 정원줄기세포가 recipient 말의 정소에 안착하고 안정적으로 정자로 분화하는 데 시간이 오래 걸릴 것으로 예상되기 때문에 과제가 종료된 이후에도 이식이 완료된 말을 대상으로 정액을 채취하고 genotyping을 통해 정원줄기세포 유래 정자 생산 여부 확인 필요</li> <li>· 이식된 정원줄기세포 유래 정자 생산되면 정자의 수정능을 확인하기 위하여 정자를 암말에 주입하고 임신 가능여부를 확인하는 추가 연구 필요</li> <li>· Endogenous germ cell이 재생산되어 donor 유래 정자와 함께 사정되는 부분을 해결하기 위하여 노새를 대상으로 동일한 실험이 수행되어야 함</li> <li>· 본 연구를 통해 개발한 말 정액 실온 및 냉장 희석제를 이용하여 인공수정을 통해 수태율을 확인하는 실험이 추가로 수행되어야 함</li> <li>· 개발된 희석제에 첨가제를 추가하여 국내산 말 동결 희석제 개발하기 위한 추가 연구가 필요함</li> </ul> <p>○ 타 연구에의 응용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 연구 수행을 통해 개발한 molecular marker를 이용하여 in-vitro상에서 말의 정원줄기세포가 정자로 분화되는 과정과 이에 관여하는 인자 및 호르몬을 규명하는 연구를 수행할 수 있을 것으로 판단됨</li> <li>· 본 연구의 예비실험을 흑염소를 대상으로 수행하면서 아래와 같은 기술을 확보함 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 흑염소의 endogenous germ cell을 제거하는 기술</li> <li>- 흑염소의 정소에서 정원세포를 분리하는 기술</li> <li>- 흑염소의 rete testis를 통해 정소세포를 주입하는 기술</li> <li>- 흑염소 정소 거세 기술</li> </ul> </li> <li>· 상기 기술된 기술을 활용하여 국내산 흑염소의 종을 보존하거나 개량종의 정원줄기세포를 이식하는 기술에 응용 가능하리라 사료됨</li> </ul> <p>○ 기업화 추진 방안</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 연구를 통해 개발된 기술을 특허 등록 후 노아바이오텍에 기술을 이전할 계획임</li> <li>· 노아바이오텍에서는 첨단 말생산 기술을 활용하여 전문 기업화를 추진 할 계획임 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 거세후 말 정소 동결보존</li> <li>- 말 정소로부터 정원세포 분리</li> <li>- Recipient 말 생산 기술</li> <li>- 말 정소세포 이식 기술</li> </ul> </li> <li>· 본 과제수행을 통해 개발된 국내산 말정액희석제의 경우 2019년도부터 국내 말 정액희석제로 공급이 가능하리라 판단됨</li> </ul>	

## 6. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 보안		

### 작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 신규 인력 채용 계획 및 활용 방안은 공고일 이후 동 과제에 참여하기 위해 신규 인력을 채용하는 경우 채용 계획 및 해당 연구원의 역할 분담 등에 대해 작성(신규 인력 채용 계획이 있는 경우에 한해 작성)

## 7. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11	
○ 경북대학교 안전교육센터에서 운영하는 연구실안전교육을 정기적으로 받음 - 실험실 안전에 취약할 수 있는 학사과정 연구원을 중심으로 집중 교육 실시			
이름	직위	안전교육이수시간	비고
정희준	박사과정 연구원	3	
원종신	석사과정 연구원	6	
이예성	학사과정 연구원	30	
이금희	학사과정 연구원	42	
권류림	학사과정 연구원	42	
오병훈	학사과정 연구원	30	
○ 과제수행기간동안 경북대학교 생태환경대학 교직원으로 구성된 실험실 안전관리팀이 분기당 1회 실험실을 방문하여 전반적인 실험실 안전과 상황발생 시 대피요령 등에 대한 교육 실시			
○ 과제책임자인 지도교수는 수시로 실험실 안전상태를 확인하고 참여연구원을 대상으로 관련 교육 실시			

## 8. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	The Lin28 Expression in Stallion Testes	경북대학교	교신 저자	PloS one	2.806	2016.10.31	단독	SCIE/
2	논문	Acrosin-binding protein (ACRBP) in the testes of stallions	경북대학교	교신 저자	Animal Reproduct ion Science	1.605	2015.11.10	단독	SCI/
3	특허	말 정액 장기보존을 위한 희석제	경북대학교	발명 자	출원				대한민국
4	학회 발표	Effects of intratesticular injection of 70% glycerin in stallions; sperm production, motility, testicular volume, spermatogenesis, testosterone, and libido	경북대학교	주저 자	미국 Society for the Study of Reproduct ion		2016.7.19	단독	
5	학회 발표	Transplantation of spermatogonial stem cell (SCC) in stallions	경북대학교	발표 자	미국 American Society of Andrology		2017.4.23	단독	

## 9. 참고문헌

코드번호	D-14
○ Pozor MA1, Macpherson ML, McDonnell SM, Nollin M, Roser JF, Love C, Runyon S, Thomas BF, Troedsson MH. Indenopyride derivative RTI-4587-073(l): a candidate for male contraception in stallions. <i>Theriogenology</i> . 2013 Dec;80(9):1006-16.	
○ Hirayanagi Y1, Qu N, Hirai S, Naito M, Terayama H, Hayashi S, Hatayama N, Kuramasu M, Ogawa Y, Itoh M. Busulfan pretreatment for transplantation of rat spermatogonia differentially affects immune and reproductive systems in male recipient mice. <i>Anatomical science international</i> . 2015 Sep;90(4):264-74.	
○ Qin Y1, Liu L1, He Y1, Wang C2, Liang M3, Chen X1, Hao H1, Qin T1, Zhao X1, Wang D1. Testicular Busulfan Injection in Mice to Prepare Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation Is Safe and Non-Toxic. <i>PLoS one</i> . 2006 Feb 12;11(2):30148388.	
○ Panahi M1, Keshavarz S2, Rahmanifar F3, Tamadon A1, Mehrabani D1, Karimaghahi N1, Sepehrimanesh M4, Aqababa H2. Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. <i>Veterinary research forum</i> . 2015 Fall;6(4):273-8.	
○ Qin Y1, Liu L1, He Y1, Ma W2, Zhu H1, Liang M3, Hao H1, Qin T1, Zhao X1, Wang D1. Testicular injection of busulfan for recipient preparation in transplantation of spermatogonial stem cells in mice. <i>Reproduction, fertility, and development</i> . 2016 Oct;28(12):1916-1925.	
○ Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. <i>National Academy of Sciences</i> . 1994 Nov 22;91(24):11303-7.	
○ Igdoura SA1, Wiebe JP. Suppression of spermatogenesis by low-level glycerol treatment. <i>Journal of andrology</i> . 1994 May;15(3):234-43.	
○ Shuttlesworth GA1, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. <i>Endocrinology</i> . 2000 Jan;141(1):37-49.	
○ van den Aardweg GJ, de Ruiter-Bootsma AL, Kramer MF, Davids JA. Growth and differentiation of spermatogenetic colonies in the mouse testis after irradiation with fission neutrons. <i>Radiation Research</i> . 1983 Jun;94(3):447-63	
○ Brinster RL1, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 1994 Nov 22;91(24):11298-302	
○ Brinster RL1. Germline stem cell transplantation and transgenesis. <i>Science</i> . 2002 Jun 21;296(5576):2174-6	
○ Jiang FX1, Short RV. Male germ cell transplantation in rats: apparent synchronization of spermatogenesis between host and donor seminiferous epithelia. <i>International Journal of Andrology</i> . 1995 Dec;18(6):326-30.	
○ Ogawa T1, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. <i>Biology of Reproduction</i> . 1999 Feb;60(2):515-21.	
○ Dobrinski I1, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. <i>Biology of Reproduction</i> . 1999 Nov;61(5):1331-9	
○ Izadyar F1, Spierenberg GT, Creemers LB, den Ouden K, de Rooij DG. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. <i>The Journal of the Society for</i>	

Reproduction and Fertility. 2002 Jul;124(1):85-94

- Oatley JM1, de Avila DM, McLean DJ, Griswold MD, Reeves JJ. Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes. *Journal of Animal Science*. 2002 Jul;80(7):1925-31
- Honaramooz A1, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biology of Reproduction*. 2003 Oct;69(4):1260-4.
- Dobrinski I1, Avarbock MR, Brinster RL. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Molecular Reproduction Development*. 2000 Nov;57(3):270-9.
- Honaramooz A1, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Molecular Reproduction Development*. 2003 Apr;64(4):422-8.
- Schlatt S1, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Nieschlag E. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. 2002 Jan;17(1):55-62.
- Nagano M1, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biology of reproduction*. 2001 May;64(5):1409-16.
- Nagano M1, Patrizio P, Brinster RL. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertility and sterility*. 2002 Dec;78(6):1225-33.
- Nagano M1, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *National Academy of Science*. 2001 Nov 6;98(23):13090-5.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 거세마 후대생산 시스템 구축을 위한 정원줄기세포 이식기술 개발 (영문) Development of horse spermatogonial stem cell transplantation technique to produce offsprings of gelding					
주관연구기관	경북대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 경북대학교 말/특수동물학과		
참 여 기 업	노아바이오테크		총 연 구 기 간	(성명) 윤민중		
총연구개발비 (600,000 천원)	계	600,000 천원	총 참 여 연구 원 수	2014. 9. 25 ~ 2017. 9. 24( 3년 월)		
	정부출연 연구개발비	450,000천원		총 인 원	25	
	기업부담금	150,000천원		내부인원	23	
	연구기관부담금			외부인원	2	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>- 본 연구의 최종목표는 말 정원줄기세포 이식기법을 이용하여 능력이 우수한 거세마의 유전형질을 후대에 전달하는 기술을 개발하는 것임. 이러한 기술을 성공적으로 활용되기 위하여 개발되어야 하는 기술로는 1) 정원줄기세포 이식을 위한 recipient 말 생산 기술, 2) 정원줄기세포 주입 기술, 3) 정원줄기세포 이식을 통한 donor 유래 정자 생산 기술 등 다양한 기술이 성공적으로 개발되어야 함.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>- 본 연구팀은 busulfan 약품을 이용하여 말 정소의 endogenous germ cell을 제거하는 기술을 개발하는 데 성공하였으며 여러 테스트를 통해 정원줄기세포를 주입하기에 적절한 장치와 방식을 개발하였음. 또한 이식된 정원줄기세포 유래 정자생산 여부를 확인하기 위하여 더러브렛 말 3마리에 제주마에서 제거된 정소에서 분리된 정소세포를 이식하고 더러브렛 말에서 제주마의 정자 생산 여부를 확인중임. 또한 본 연구를 수행하면서 말의 정원줄기세포를 인지하는 molecular marker인 Lin28과 spermatogonia를 인지하는 PGP9.5, post-meiotic germ cell을 인지하는 ACRBP를 발견하였음. 또한 국내 최초로 말 정액의 실온, 냉장 보존이 가능한 말 정액희석제를 개발하였음.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>- 본 연구를 통해 발견된 특이 분화 단계별 정소세포 마커를 활용하여 말 정소세포 발달 과정과 관여 인자들에 대한 연구를 수행할 계획임</p> <p>- 정원줄기세포 이식을 통한 거세마생산 기술이 성공한다면 특허 신청과 더불어 기술의 효율성을 높일 수 있는 추가연구를 수행하고, 해외 말산업 선진국인 독일 및 미국의 말 번식 산업체와 연계하여 산업화를 추진할 계획임</p> <p>- 말정액희석제의 경우 2018년 번식계절에 말 인공수정 시 사용하여 임상실험을 거친 후에 2019년 번식시즌부터 상품화하여 말 생산농가에 보급할 계획임</p>						

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15		
			과제번호	114052-3		
사업구분	농식품기술개발사업					
연구분야			과제구분	단위		
사업명	첨단생산기술개발사업			주관		
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음		
과제명			과제유형	(기초,응용,개발)		
연구기관			연구책임자	윤민중		
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계	
	1차년도		150,000	50,000	200,000	
	2차년도		150,000	50,000	200,000	
	3차년도		150,000	50,000	200,000	
	계		450,000	150,000	600,000	
참여기업	노아바이오텍					
상대국		상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 : 2017년 11월 10일

### 3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
경북대학교 말/특수동물학과	조교수	윤민중

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	윤민중
----	-----

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체 평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구과제를 통해 개발한 말을 대상으로 정원줄기세포 이식기술은 국내외에서 아직 수행되지 않은 유일한 연구결과로 우수성과 창의성이 우수하다고 평가함

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 더러브렛 recipient 말로부터 이식된 제주마 정원줄기세포유래 정자를 아직 발견하지 못 했지만, 추후 정자 생산이 규명된다면, 개발된 결과는 거세마의 우수한 유전능력을 후대에 전달할 수 있는 기술을 산업화 할 수 있는 기반을 마련하는 데 매우 중요하게 활용될 것으로 평가됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구에서 개발한 분화단계별 정소세포 인지 마커를 활용하여 말 spermatogenesis와 관련된 다양한 연구수행 가능
- 또한 busulfan을 활용하여 endogenous germ cell을 제거하는 기술은 말 뿐만 아니라 다른 중소대 가축의 endogenous germ cell을 제거하는 기술로 활용될 수 있을 것으로 판단됨
- 현재 국내에서 개발/생산되는 말 정액희석제가 없기 때문에 본 연구에서 개발한 희석제는 국내 말 생산효율성을 높이는 데 활용될 것으로 판단됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구팀은 실험하기 매우 어렵고 위험한 수말을 대상으로 도전적인 연구를 성실하게 수행하였음
- 특히 연구결과를 얻기 위해 흑염소를 대상으로 여러 가지 다양한 시도를 실시하였고 이 과정에서 추후 활용될 수 있는 추가적 연구 결과를 확보하였음
- 또한 채취된 정액을 이용하여 국내산 말 희석제를 개발하는 추가적인 연구 성과를 거둠

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구팀은 계획된 연구 성과물을 조기에 달성하였고 추가적인 연구성과도 달성할 것으로 판단됨



## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
말 정소세포 분화단계별 인식 molecular marker 개발	20	20	
말 정원줄기세포 이식 recipient 모델 개발	20	20	
정원줄기세포 이식기법개발	20	15	
말 정원줄기세포 이식기법을 이용한 정자 생산	20	10	
국내산 말 정액 희석제 개발	20	20	
합계	100점	85점	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 아직 이식된 정원줄기세포로부터 분화된 정자 생산 여부에 대한 결론을 낼 수는 없지만 말 정소의 endogenous germ cell을 제거하는 기술과 종의 해부학적 특성을 고려한 정원줄기세포 이식 방법 확립만으로도 본 연구 과제를 통해 얻은 획기적인 연구개발 결과라 판단됨
- 또한 추가로 말 정원줄기세포 및 정원세포 특이 분자와 이를 인지할 수 있는 항체를 개발하였으며 post-meiotic 정소세포를 인지할 수 있는 마커는 추후 말 spermatogenesis 연구에 다양한 목적으로 사용될 것일 판단됨
- 본 연구를 수행하면서 개발한 국내산 말 정액 희석제는 추가 임상실험을 통해 2019년도에는 말생산 현장에 사용될 수 있을 것으로 판단됨
- 국내 대학에서 최초로 수말 번식과 관련된 연구를 수행하였으며 이를 통해 학과 재학생뿐만 아니라 말생산 농가를 대상으로 다양한 교육적 재료로 활용되었음
- 본 연구를 수행하며 많은 시행착오와 실패를 겪었으나 이러한 경험은 추후 더 좋은 연구기획과 결과를 낼 수 있는 초석으로 사용되리라 판단됨

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 3년차 연구시 정상적인 리비도를 갖춘 실험대상 수말을 확보하는 데 많은 시간이 걸렸으며 실험 중 처리와 상관없이 수말이 폐사하는 사고가 발생하여 실험일정이 연기가 됐습니다. 이로 인해 2017년 5월경에 정원줄기세포 이식을 실시하였고 8월부터 정액 genotyping을 실시하고 있습니다.
- 정원줄기세포이식 후 정자로 발달되기까지 8~9개월 정도 걸리기 때문에 아직 정원줄기세포유래 정자 생산 성공 여부를 결론내지 못 하고 있습니다.
- 대가축을 대상으로 임상실험을 실시하다보니 실험결과도출이 지연된 점을 양해해주시길 부탁드립니다.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 이식된 정원세포유래 정자가 성공적으로 생산되면 사용된 기술들에 대해 특허 출원을 실시할 계획임. 또한 추가 연구로 노새를 대상으로 기술을 적용하여 정원세포유래 정자 생산 여부를 확인할 계획임. 이러한 기술이 확증되면 기술이전을 통해 말 정원줄기세포 보존, 분리, 이식, 생산을 바탕으로 한 사업화를 실시할 계획임. 미국과 유럽국가의 말번식산업체와 연계하여 사업을 시작하는 것을 검토 중
- 말 정액희석제의 경우 2018년 3월부터 실제 말 인공수정 임상테스트를 한 이후 2019년 3월부터 제품화하여 판매할 계획임

#### IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

현재 개발된 연구결과는 아직 특허 출원중이거나 등록심사를 받고 있는 중이기에 연구결과에 대한 보안이 필요하다고 판단됨

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	거세마 후대생산 시스템 구축을 위한 정원줄기세포 이식기술 개발			
주관연구기관	경북대학교 산학협력단		주관연구책임자	윤민중
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	450,000천원	150,000천원		600,000천원
연구개발기간	2014년 9월 25-2017년 9월 24일			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 말 분화단계별 정소세포 확인을 위한 molecular marker 발견	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 말 정소 조직 내 미분화정원줄기세포를 확인 가능한 Lin28 발견</li> <li>· 말 정소 조직 내 spermatogonia를 확인할 수 있는 PGP9.5 발견</li> <li>· 말 정소 조직 내 post-meiosis germ cell 확인 가능한 ACRBP 발견</li> <li>· 말과 당나귀의 조직 내 정원줄기세포를 확인 가능한 UTF1과 분화된 정원세포와 제1정모세포를 확인할 수 있는 DAZL 발견</li> </ul>
② 말 정원줄기세포 이식을 위한 recipient 말 모델 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Two-enzyme digestion을 활용한 germ cell 확보 protocol 정립</li> <li>· Busulfan 처리를 통한 정원줄기세포 이식 recipient 말 모델 개발 기술 개발</li> </ul>
③ 말을 대상으로 한 정원줄기세포 주입 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 말 종 특이성을 고려한 정소 국소 이식방법 개발</li> </ul>
④ 말 정원줄기세포 이식을 통한 정자 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 현재 말의 정소에 주입한 줄기세포의 분화를 통한 정자 생산 여부 확인 중</li> </ul>
⑤ 국내산 말 정액 희석제 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 정자의 실온 및 냉장 보존이 가능한 국내산 말 정액 희석제 개발</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	1	1		1					1		3			4	7	3				
연간내 달성실적	4										5			10	5	2				
달성율(%)	400	0		0					0		166			250	71	66				

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	· 말 정소 조직 내 미분화정원줄기세포를 확인 가능한 Lin28 발견
②	· 말 정소 조직 내 spermatogonia를 확인할 수 있는 PGP9.5 발견
③	· 말 정소 조직 내 post-meiosis germ cell 확인 가능한 ACRBP 발견
④	· 당나귀의 조직 내 정원줄기세포를 확인 가능한 UTF1과 분화된 정원세포와 제1정모세포를 확인할 수 있는 DAZL 발견
⑤	· Two-enzyme digestion을 활용한 germ cell 확보 protocol 정립
⑥	· Busulfan 처리를 통한 정원줄기세포 이식 recipient 말 모델 개발 기술 개발
⑦	· 말 종 특이성을 고려한 정소 국소 이식방법 개발
⑧	· 정자의 실은 및 냉장 보존이 가능한 국내산 말 정액 희석제 개발

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	√					√				
②의 기술	√					√				
③의 기술	√					√				
④의 기술	√					√				
⑤의 기술				√						
⑥의 기술	√					√	√			
⑦의 기술		√				√				
⑧의 기술		√				√	√	√		

\* 각 해당란에 v 표시

## 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 말/당나귀의 분화단계별 germ cell을 specific하게 인지할 수 있는 마커를 개발함에 따라 특정 differentiation 단계에 있는 germ cells을 확인하고 확보하는 기술을 개발 할 수 있을 것으로 기대됨.</li> <li>· 이러한 마커들을 이용하여 stallion germ cell spermatogenesis 과정과 관련한 연구를 실시 할 수 있을 것으로 기대 됨</li> </ul>
②의 기술	
③의 기술	
④의 기술	
⑤의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 기술을 이용하여 높은 순도의 말 germ cell을 확보할 수 있으며 이는 이식은 물론 in vitro culture study를 실시하는 데 유용하게 활용할 것으로 기대됨</li> </ul>
⑥의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 기술을 이용할 경우 안전하게 말의 정소내 endogenous germ cell을 제거할 수 있음. 상기 기술의 개발은 말 정원줄기세포 이식을 통한 거세마의 후대 생산의 핵심이 되는 기술로서 매우 의미가 있다고 판단됨. 상기 기술은 다른 중소대가축의 정소세포를 제거하는 데 적용될 수 있을 것으로 기대됨.</li> </ul>
⑦의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 말의 정소형태의 특성상 정소세포의 국소 이식이 유일하게 가능한 기술로 활용될 것으로 판단됨. 말 정원줄기세포 이식을 통한 후대마 생산을 위한 주요 기술로 활용 되리라 판단됨.</li> </ul>
⑧의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 연구과제로부터 개발한 말 정액 희석제의 경우 실온 및 냉장 정액 보관용으로 사용이 적절하여 2018년부터 말 인공수정 현장에서 사용될 수 있을 것으로 기대 됨. 상품화를 통해 일반 말생산 농가에서도 본 제품을 사용할 수 있도록 할 계획 임</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1	1		1						1		3		4	7	3			
연구기간내 달성실적	4											5		10	5	2			
연구종료 후 성과창출 계획	1	2		1						1		2		2	2	1			

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	말 정원줄기세포 이식을 통한 정자 생산 기법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2020년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	현재 이식된 줄기세포로부터 정자 생산 여부 확인 후, 노새를 대상으로 동일한 연구 수행하여 산업화 가능성 타진		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	말 정액 장기보존을 위한 희석제		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2019년
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	2018년도에 말 인공수정 시 임상시험을 수행하고 수태율 결과에 따라 2019년에 기술이전을 실시할 계획임		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전시 선행조건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)