

318016  
-5

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
농생명산업기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004346-01

인  
체

질  
환  
모  
델

중  
대  
동  
물

개  
발

2022

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

# 인체 질환모델 중대동물 개발

2023.05.23.

주관연구기관 / 충북대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 크로넥스(주)  
협동연구기관 / 아부다비생명공학연구원

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인체 질환모델 중대동물 개발”(개발기간 : 2018. 04. 01 ~ 2022. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 05. 23.



주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 김양훈 (인)  
협동연구기관명 : 크로넥스(주) (대표자) 손영준 (인)  
협동연구기관명 : 아부다비 생명공학연구원 (대표자) KHALIFA ABDULLA (인)  
ABULRAHEEM MOHAMED  
ALQUBAISI



주관연구책임자 : 현상환

협동연구책임자 : 이상철

협동연구책임자 : 손영범

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급						
										일반[ ], 보안[ ]						
중앙행정기관명						사업명										
전문기관명 (해당 시 작성)						사업명 내역사업명 (해당 시 작성)										
공고번호						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)										
						연구개발과제번호										
기술 분류	국가과학기술 표준분류		1순위 동물 생명공학 LB0603	50%	2순위 동물 번식/발생 LB0604	30%	3순위 수의 해부/조직 LB0707	20%								
	농림식품과학기술분류		1순위 동물 생명공학 AB0102	50%	2순위 동물 번식/발생 AB0103	30%	3순위 수의기초 RB0101	20%								
총괄연구개발명 (해당 시 작성)			국문													
			영문													
연구개발과제명			국문		인체 질환모델 중대동물 개발											
			영문		Development of Large Animal Model for Human Disease											
주관연구개발기관			기관명		충북대학교 산학협력단		사업자등록번호		301-82-16304							
			주소		(28644)충북 청주시 서원구 충대로 1(개신동)		법인등록번호		150171-0001816							
연구책임자			성명		현상환		직위		교수							
			연락처		직장전화		휴대전화									
					전자우편		국가연구자번호		1010 1356							
연구개발기간			전체		2018. 04. 26 - 2022. 12. 31( 4 년 9 개월)											
			단계 (해당 시 작성)		1단계											
			n단계													
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금				
		연구개발비		연구개발비		지방자치단체		기타( )								
		현금		현금		현금		현금		현금		현금				
		현물		현물		현물		현물		현물		현물				
총계		1,900,000		52,000		574,000				1,952,000		574,000				
1단계		1년차		300,000		10,000		90,000				310,000				
		2년차		400,000		14,000		126,000				414,000				
		3년차		400,000		14,000		126,000				414,000				
		4년차		400,000		14,000		126,000				414,000				
		5년차		400,000		-		106,000				400,000				
										506,000						
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)			기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고			
공동연구개발기관			크로넥스(주)		이상철		소장						역할			
			아부다비 생명공학연구원		손영범		연구팀장						공통			
위탁연구개발기관			고려대학교 산학협력단		김형기		교수						기관유형			
													공통			
연구개발기관 외 기관													위탁			
													대학			
연구개발담당자 실무담당자			성명		오동진		직위						연구원			
			연락처		직장전화				휴대전화							
					전자우편				국가연구자번호				12401083			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023 년 02 월 07 일

연구책임자: 현 상 환 (인)

- 주관연구개발기관의 장: 충북대학교 산학협력단장 (직인)
- 공동연구개발기관의 장: 크로넥스(주) 대표이사 (직인)
- 공동연구개발기관의 장: 아부다비 생명공학연구원장 (직인)
- 위탁연구개발기관의 장: 고려대학교 산학협력단장 (직인)

## 최종보고서

보안등급  
일반( ), 보안( )

중앙행정기관명 전문기관명 (해당 시 작성)		사업명		사업명 내역사업명 (해당 시 작성)							
광고번호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 동물 생명공학 LB0603	50 %	2순위 동물 번식/발생 LB0604	30 %	3순위 수의 해부/조직 LB0707	20 %				
	농림식품과학기술분류	1순위 동물 생명공학 AB0102	50 %	2순위 동물 번식/발생 AB0103	30 %	3순위 수의 기초 FB0101	20 %				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		인체 질환모델 중대동물 개발							
		영문		Development of Large Animal Model for Human Disease							
주관연구개발기관		기관명		충북대학교 산학협력단		사업자등록번호		301-82-16304			
		주소		(28644)충북 청주시 서원구 충대로 1(개신동)		법인등록번호		150171-0001816			
연구책임자		성명		현상환		직위		교수			
		연락처		직장전화 전자우편		휴대전화		국가연구자번호			
연구개발기간		전체		2018. 04. 26 - 2022. 12. 31( 4 년 9 개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계							
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구필비 외 지원금	
		현금		현금 현물		지방자치단체		기타( )			
총계		1,900,000		52,000 574,000						1,952,000 574,000 2,526,000	
1단계		1년차		300,000 10,000 90,000						310,000 90,000 400,000	
		2년차		400,000 14,000 126,000						414,000 126,000 540,000	
		3년차		400,000 14,000 126,000						414,000 126,000 540,000	
		4년차		400,000 14,000 126,000						414,000 126,000 540,000	
		5년차		400,000 - 106,000						400,000 106,000 506,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
공동연구개발기관		크로넥스(주)		이상철		소장				비고	
		아부다비 생명공학연구원		손영범		연구팀장				역할 기관유형 공동 중소기업	
위탁연구개발기관		고려대학교 산학협력단		김형기		교수				공동 기타 위탁 대학	
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명		오동진		직위		연구원			
		연락처		직장전화 전자우편		휴대전화		국가연구자번호			
								12401083			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023 년 02 월 07 일

연구책임자:            현 상 환

주관연구개발기관의 장:    충북대학교 산학협력단장 (직인)  
 공동연구개발기관의 장:    크로넥스(주) 대표이사 (직인)  
 공동연구개발기관의 장:    아부다비 생명공학연구원장 (직인)  
 위탁연구개발기관의 장:    고려대학교 산학협력단장 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명							총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명 (해당 시 작성)							연구개발과제번호	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 동물 생명공학 LB0603	50 %	2순위 동물 번식/발생 LB0604	30 %	3순위 수의 해부/조직 LB0707	20%	
기술 분류	농림식품 과학기술분류	1순위 동물 생명공학 AB0102	50 %	2순위 동물 번식/발생 AB0103	30 %	3순위 수의기초 RB0101	20%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명	인체 질환모델 중대동물 개발							
전체 연구개발기간	2018.04.26 - 2022.12.31							
총 연구개발비	총 2,526,000천원 (정부지원연구개발비: 1,900,000천원, 기관부담연구개발비: 626,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계	기초[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 응용[ <input type="checkbox"/> ] 개발[ <input type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ <input type="checkbox"/> ]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	최신의 생명공학기술 유전자 제어기법 활용을 통해 신약개발단계에서 시간과 비용을 줄일 수 있고, 인체 질환의 유전형 및 표현형을 나타내는 흑색종 중대동물(돼지 및 개) 질환모델을 개발하여 농생명 바이오자원의 활용도 증진 및 농축산분야의 신성장산업 모델을 제시하고자 함						
	전체 내용	<p>&lt;1차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 형질전환 돼지 생산을 위한 영향인자 분석</li> <li>▶ Optogenetic-FGFr 도입 돼지세포주 개발 조건 분석을 위한 시험관내 돼지세포주에서의 광유전학 응용기반 기술 개발 및 구축</li> <li>▶ 흑색종 모델돼지 개발을 위한 품종선발 및 생산 기반 구축</li> <li>▶ 흑색종 모델견 생산을 위한 체세포 형질전환 기법 및 체세포 핵이식 기법의 최적화 조건 확립</li> <li>▶ Ras 유전자 기반 흑색종 모델견 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가</li> </ul> <p>&lt;2차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 in vitro 평가 시스템 개발</li> <li>▶ Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 돼지세포주 개발 조건 분석</li> <li>▶ 형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈 영향인자 분석</li> <li>▶ 흑색종 질환모델견 생산 및 자견의 관리 시스템 확보</li> <li>▶ Ras 기반 흑색종 모델견 생산</li> <li>▶ Ras 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 핵공여원으로써의 유효성 검증</li> </ul> <p>&lt;3차년도&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지 생산 및 특성분석</li> <li>▶ Cre/LoxP inducible system 을 활용한 흑색종모델 in vitro 평가 시스템 개발</li> <li>▶ 유도만능줄기세포주 활용 Optogenetic-FGFr-Oncogene을 통해 유도된 흑색종의 특성분석</li> <li>▶ 흑색종 질환모델 중대동물의 특성 분석 및 관리 체계 구축</li> <li>▶ Ras 기반 흑색종 모델견의 유효성 평가</li> <li>▶ 형질전환 모델견 대량 생산을 위한 기반 기술 확립</li> <li>▶ Ras 기반 흑색종 모델견의 유효성 평가</li> <li>▶ Safe harbor locus 유전자 타게팅 기법을 적용한 Braf 유전자 기반 흑색종 발병 시스템 개발</li> </ul>						

연구개발 목표 및 내용	전체 내용	<4차년도> ▶ 흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증 ▶ Cre/LoxP inducible system 을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발 ▶ Braf 기반 흑색종 모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발 ▶ 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립 ▶ Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 태아세포주 염색체 및 특성분석 ▶ Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 암수 종양모델 세포주 개발 및 활용 ▶ 전임상 흑색종 질환모델 중대동물(돼지, 개) 유효성 검증 ▶ Braf 기반 흑색종 모델건 생산 및 유효성 평가 ▶ 체세포 핵이식 기법을 활용한 형질전환 모델건 재복제 기술 최적 화 ▶ Braf 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 핵공여원으로써의 유효성 검증 ▶ Braf 기반 흑색종 모델건 생산 및 유효성 평가 <5차년도> ▶ 흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증 ▶ Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가 ▶ 전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 생산라인 및 상용화 기반 구축 ▶ Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 모델의 전임상 동물 모델로의 생산라인 구축 및 상용화 ▶ 전임상 흑색종 질환 모델건으로써의 활용도 검증
-----------------	-------	--

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 종양모델 중대동물(돼지, 개) 생산</li> <li>● Optogenetics-FGF receptor iPSC 활용 <i>in vitro</i> 평가시스템</li> <li>● 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 기반 형질전환 세포주 수립</li> <li>● 흑색종모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</li> <li>● Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 모델의 전임상 동물 모델로의 생산라인 구축</li> </ul>											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 형질전환 생산효율 향상으로 인한 생명공학 기술의 실용화를 가속화</li> <li>● 유전자발현조절기술, 중대동물 질환모델 및 생산기술의 특허</li> <li>● 질환모델 개발 및 후속연구에 따른 관련제품의 수입 대체</li> <li>● 신약개발 및 발병기전 연구, 실험동물 분야 확대</li> <li>● 전임상시험 신약개발 단계에서의 적용</li> <li>● <i>In vitro</i> 모델 개발을 통한 환자맞춤형 종양 치료의 현실화 가능</li> <li>● 국내 질환모델 생산 및 관련기술 첨단 벤처산업의 활성화</li> <li>● 안정적 질환모델 산업기반 구축 및 부가가치 제고</li> </ul>											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	24	2						생명 정보	생물 자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)			ZEUS 등록번호	
국문핵심어 (5개 이내)	흑색종		광유전학		체세포핵이식		유도만능 줄기세포		인간질환 모델동물			
영문핵심어 (5개 이내)	Melanoma		Optogenetic		Somatic cell nuclear transfer		Induced pluripotent stem cells		Human disease model animal			

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	11
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	24
4. 목표 미달 시 원인분석 .....	264
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	265
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	267

별첨 자료

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1) 국내외 악성피부종양 흑색종

- ▷ **흑색종(melanoma)**은 피부의 색소 생성 멜라닌 세포의 악성 종양이며 멀리 떨어진 장기로 전이하는 매우 공격적인 특성을 보이는 종양임
- ▷ 이미 연구가 많이 진행된 폐암, 간암, 유방암 및 대장암 등에 비해 **동양인에서의 발병 및 전이기전 정보가 부족하며, 암말기시 치료가 전무함**
- ▷ **악성흑색종을 포함한 신규 피부암 환자의 발생건수는 2010년 6,739건에서 2013년 7,677건으로 4년간 약 938건(13.9%)이 증가해 연 평균 3%씩 증가하는 추세임**
- ▷ **전체 피부암 환자 사망률 75%로 가장 심각한 악성 종양인 흑색종은 조직발생학적 신경능선세포 유래의 멜라닌 세포로부터 발생하여 조직학적으로 피부의 진피, 안구 중간층, 속귀, 질 상피층, 수막, 뼈 및 심장에 분포하며 악성 전이 특성을 가지고 있음**
- ▷ 2013년 악성흑색종의 발생률은 10만명당 3.0건이었고, 기타 피부암의 발생률은 10만명당 12.0건이며, **피부암 중 악성도가 가장 높은 악성흑색종의 경우에도 환자수가 꾸준히 늘어 2009년 2,819명에서 2013년 3,761명으로 33.4% 증가함**
- ▷ 다수의 선진국에서는 해마다 흑색종의 발생빈도가 높아지고 있으며 40대 이상에서는 급격히 증가하는 양상을 보이고 있음

- ▷ 최근 흑색종 치료법의 발전에도 불구하고 예후는 여전히 불량하며, 원격 전이가 있는 환자의 경우 5년 생존율은 16%임
- ▷ 한국인들의 경우에도, 급격한 기후변화 및 오존층 파괴에 따라 자외선에 급격하게 노출되고 있으며, 또한 불명확한 원인으로 악성흑색종 발병률이 점차 증가하고 있어, 이러한 **원인 분석 및 미래 기후변화에 따른 정부차원의 대응책 마련이 시급함**
- ▷ **국내 건강보험심사평가원 (그림 1)에 따르면, 악성 흑색종으로 병원에서 진료 받은 사람이 2007년 1천894명에서 2011년 2천576명으로 5년간 36.0% 증가하였으며, 연평균 8.0% 증가추세를 보이고 있음**

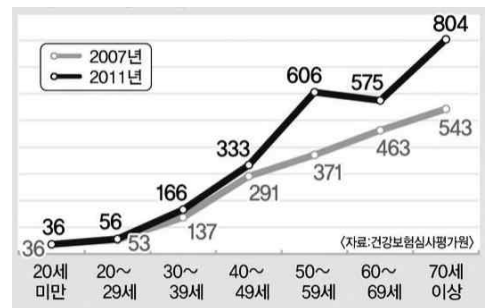


그림 1. 2007~2011년 악성흑색종 발병 건수 (건) 건강보험심사평가원

## 2) 흑색종 연구 현황

- ▷ 흑색종(Melanoma)은 멜라닌세포(melanocyte)에서 유래되는 악성 종양으로, 발병의 원인으로는 지속적인 자외선 노출, 나이, 유전적 변이 등이 있음 (Hunter Shain 등, 2016)
- ▷ 최근에는 차세대 염기서열(Next-generation sequencing) 분석기법의 발달로 다양한 종류의 종양이 가진 유전적 특성을 분석하여 분류체계화를 진행하고 있음(Kamps 등, 2017)
- ▷ 흑색종의 경우, 2015년 331명 환자의 흑색종 조직으로 DNA, RNA, 단백질 수준에서 체계적 분석하여 BRAF 돌연변이, RAS 돌연변이, 돌연변이 NF1가 가장 빈번하게 관찰되는 것을 확인하였고, BRAF 돌연변이, RAS 돌연변이, 돌연변이 NF1, 트리플-WT(wild-type)의 4가지 흑색종 하위분류체계를 완성하였음(그림 2)
- ▷ 이를 기반으로 각 하위분류별 특징적 신호체계의 변이 및 조직병리학적 특성을 분석하고 특정 항암제의 약효를 통합 분석하여 맞춤형 항암요법의 개발을 위한 연구가 활발히 진행 중에 있음



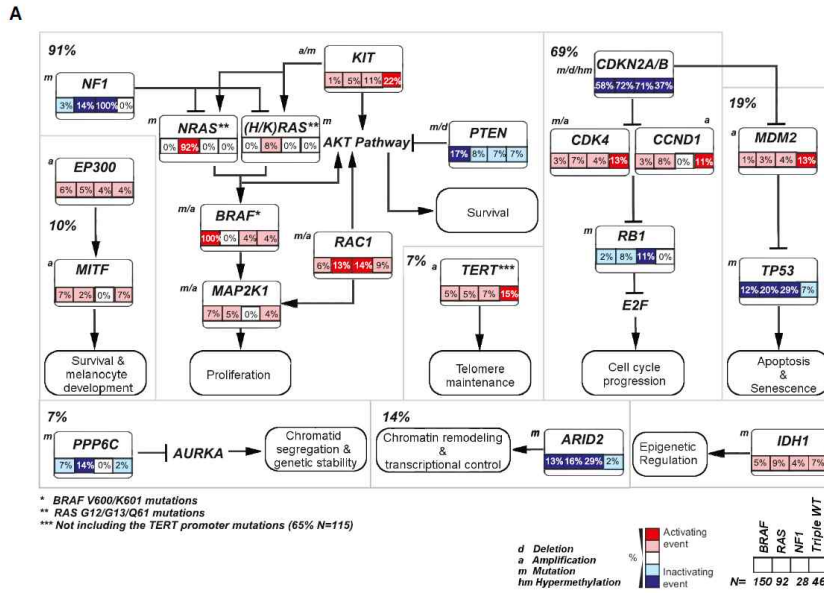


그림 2. 흑색종 환자에서 빈번하게 관찰되는 돌연변이 유전자 및 신호체계의 변화 (Cancer Genome Atlas Network, 2015)

### 3) 흑색종 치료제 개발 현황 및 한계

- ▷ 전 세계 중 북미지역이 최대 발병하고 있어 선진국형 증양으로 인식되어, 제약기업 주도하 신약개발 관련 연구개발이 활발히 이뤄지고 있음
- ▷ 흑색종은 악성 전이특성으로 뇌를 포함한 신경계로의 전이시 주요 사망원인으로 알려져 있음
- ▷ 현재까지 개발된 진단기법으로, 병리 조직검사, 흑색종 세포 표지자 진단, 3기 이상의 환자에서는 자기공명영상(MRI), 컴퓨터 단층촬영(CT) 또는 양전자방출 단층촬영(PET) 같은 영상 검사 등을 이용하여 예후나 치료에 적용하고 있음
- ▷ 주로, 증양 3기 이상의 진행시 사용되는 항암요법으로 가장 널리 알려진 방법은 다카바진이 있으나 다카바진 치료에 따른 연명기간은 6.4개월이며, 2011년에 FDA는 흑색종 표적 항암제인 BRAF 억제제 vemurafenib (Zelboraf®)를 승인하였음
- ▷ 이러한 vemurafenib (Zelboraf®) 흑색종 항암제 개발에도 불구하고 예후는 여전히 불량하며, 악성 전이가 있는 환자의 경우 5년 생존율은 16%임
- ▷ 현재까지, 발병기전 기설연구를 통해 개발된 BRAF 표적 약물은 단기간에 증양 성장 및 진행을 억제하는 효과는 있지만 그 효과 지속적이지 않고 전이성 질환이 재발 되고 있는 수준임
- ▷ 흑색종 전이는 MEK, PDGFR, RAS, COT 또는 AKT 경로의 재 활성화 또는 과도한 활성화에 기인하며, 증양 줄기 세포의 이종 집단의 존재에 의해 더욱 복잡한 양상을 보이고 있음
- ▷ 최근 부가적인 면역요법이 개발되고 있으나, 심근염 부작용으로 인한 사망 및 일부 암세포에만 효과가 있는 한계를 보이고 있음(표 1)

표 1. 흑색종 면역항암제 개발 현황

회사	약 이름	적용증	작용기전	부작용 및 한계	비고
BMS	옵디보 (Opdivo)	흑색종 1차 치료제	면역 체크포인트 단백질들을 찾아내 암세포의 면역회피 기능 마비	일본에서 옵디보 승인	2015년 FDA 승인
	여보이 (Yervoy)	비소세포폐암 2차 치료제		이후 3명이 심근염(1명 사망)	
	흑색종 1차 치료제	일부 암세포에만 효과			
MSD	키트루다 (Keytruda)	흑색종 1차 치료제	종양 부위 PD-L1 발현율이 50%	2015년 FDA 승인	
		비소세포폐암 1차 치료제	이상여야 사용 가능		
암젠	임리직 (IMLYGIC)	악성 흑색종 1차 치료제	유전자조작 거친 바이러스를 활용해	일부 암세포에만 효과	2015년 FDA 승인
신라젠	펙사벡 (Pexa-Vec)	간암치료제로 임상 진행 중	암세포 공격	임상시험 단계	임상3상 진행 중

- ▷ 빠르게 전이된 경우 증상의 완화를 위해 방사선 요법이 쓰이기도 하며, 뇌로 전이된 경우에는 테모졸로마이드를 투여하지만 효과는 미비한 수준임

### 4) 개발된 흑색종 연구모델의 현황 및 한계

- ▷ 흑색종 발병기전 및 분자학적수준에서의 유전자 작동기전, 증양진행 과정 등을 이해하기 위해선, *in vitro* 및 *in vivo* 실험시스템 개발이 필요함

- ▷ 1990년 이전까지는 대부분 자외선이나 7,12-Dimethylbenzanthracene(DMBA)와 같은 발암유도물질을 이용하여 마우스에서 흑색종을 유도한 모델을 이용하였음
- ▷ 이후에 다양한 유전공학 기술이 발달함에 따라 형질전환동물모델이 이용 가능해져 많은 흑색종에 관한 마우스 모델들이 제시되었음(표 2)
- ▷ 이들은 흑색종이 가진 병리학적인 특징을 잘 나타낼 수 있도록 다양한 유전공학적 모델링을 통해 이루어짐
- ▷ 흑색종은 약 25~50% 정도가 모반(Nevus)에서 발달되는 것으로 알려져 있음 (Bevona 등, 2003; Garcia-Cruz 등, 2009). 또한 빈번하게 변이가 나타나는 BRAF<sup>V600E</sup>, Hras, Kras, Nras 만을 멜라닌세포에 발현시키면 대부분은 양성종양에 해당하는 dermal nevus가 형성되며 일부 악성 흑색종이 형성됨이 보고되고 있음(Broome Powell 등, 1999; Ackermann 등, 2005; Dankort 등, 2009; Dhomen 등, 2009; Goel 등, 2009; Monahan 등, 2010)
- ▷ 대부분의 종양과 마찬가지로, 종양 억제 유전자인 p53, Arf, Rb 신호체계를 억제시킨 모델의 경우 종양유전자의 발현으로 악성 흑색종이 형성되며, 자외선, DMBA, TPA 등의 처리를 통해 종양발달을 더욱 가속시킬 수 있다고 알려져 있음(Ackermann 등, 2005; Dankort 등, 2009; Delmas 등, 2007; Dhomen 등, 2009; Goel 등, 2009; Ferguson 등, 2010; Monahan 등, 2010; Nogueira 등, 2010). 이밖에도 다양한 유전적 변이를 통해 흑색종 동물 모델이 현재까지 제시되었음
- ▷ 이와 같은 흑색종 동물모델을 연구에 활용하여 종양발생기전, 종양발달에 대한 분자생물학 및 세포생리학적 이해도를 넓혀가고 있으며, 진단기법, 치료법 및 예방법 개발에 필수적인 밑거름을 제공하고 있는 것은 사실임
- ▷ 이처럼 대부분 개발된 흑색종 모델은 다양한 유전적 변이를 통한 마우스 모델(Genetically engineered mouse models, GEMM)이며, 이들은 흑색종의 발달, 진행 및 전이에 있어 특정 유전자의 기능에 따른 조직병리학적·분자세포생물학적 특징의 변화를 조사하는데 광범위하게 사용되고 있음

표 2. 흑색종 연구를 위한 형질전환 마우스 모델

Model	Promoter	Target Genes	Notes	Reference
Mt-Ret	Metallothionein	Ret	UV	Kato M et al. 1998
Tyr-Hras <sup>G12V</sup>	Tyrosinase	Hras	UV, DMBA, TPA combination	Broome Powell M et al. 1999
Tyr-rtTA;TetOp-Hras <sup>G12V</sup> ;Cdkn2a <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Hras, Cdkn2a	Tetracycline-inducible system	Chin L et al. 1999
Mt-Hgf, Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup>	Metallothionein	HGF	UV	Noonan FP et al. 2001;
	-	Cdk4	UV	Sotillo et al. 2001
Dct-Grm1	Dopachrome tautomerase	metabotropic glutamate receptor 1		Pollock P et al. 2003
Tyr-Nras <sup>Q61K</sup> ;p16 <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Nras, p16		Ackermann J. et al. 2005
Tyr-β-catenin <sup>S1A</sup> Tyr-Nras <sup>N61K</sup>	Tyrosinase	β-catenin;Nras		Delmas V et al. 2007
Tyr-CreER; Braf <sup>CA/wt</sup> Pten <sup>loxP/loxP</sup>	Tyrosinase	Braf, Pten	Cre-recombinase	Dankort D et al. 2009
Tyr-CreER; LSL-Braf <sup>V600E</sup> ;p16 <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Braf, p16	Cre-recombinase	Dhomen N et al. 2009
Tyr-BrafV600E; Cdkn2a <sup>-/-</sup> orp53 <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Braf & Cdkn2a or p53		Goel VK et al. 2009
Tyr-CreER; LSL-Kras <sup>G12D</sup> ; p53 <sup>loxP/loxP</sup> orp16 <sup>loxP/loxP</sup>	Tyrosinase	Kras & p53 or p16	Cre-recombinase	Monahan K et al. 2010
Tyr-Hras <sup>V12G</sup> ; Tyr-rtTA; tet0-Cre; Ikbb <sup>loxP/loxP</sup> ; Ink4a/Arf <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Hras, Ikbb, Ink4a/Arf	Tetracycline-inducible system, Cre-recombinase	Yang et al. 2010
Tyr-Nras <sup>Q61K</sup> ; Cdk4 <sup>R24C/R24C</sup> orArf <sup>-/-</sup>	Tyrosinase	Nras & Cdk4 or Arf	UV	Ferguson B et al. 2010
Tyr-H-Ras <sup>V12G</sup> ; Ink4a/Arf <sup>-/-</sup> ;Pten <sup>+/-</sup>	Tyrosinase	Hras, Ink4a/Arf, Pten		Nogueira C et al. 2010

- ▷ 다른 전임상모델과는 달리, GEMM은 보다 정확한 예측 인자로 제안 되나, 다수의 GEMM을 활용한 다양한 연구에도 불구하고 흑색종 항암제 개발 연구분야에서는 다음과 같은 한계를 보이고 있음

- ① 일부 마우스 계통은 중대동물(돼지,개)보다 고가인 경우도 있으며, 설치류의 종특이성으로 인한 전임상결과의 신뢰도가 상대적으로 낮음
- ② 다수의 GEMM의 경우, 다양한 조직 및 장기에 종양이 발생하여, 생산된 모델의 유효성 검증에 제한적인 경우가 많음

- ③ 또한, 일부 형질전환 기법의 경우, 생산된 모델 개체의 불임 등 생식기 발생에도 해로운 영향을 미쳐, **후대검증 및 계대생산이 불가능하며, 원하는 유전자형 및 표현형을 얻는 것이 불가능한 경우가 다수임**
- ④ 현재 상당수의 흑색종 관련 연구들은 모델동물을 기반으로 한 *in vivo* 검증체계를 적용해왔으나, 대부분의 흑색종 모델동물은 설치류를 이용한 GEMM 모델로 사람과의 유전자, 세포, 조직, 장기 및 생물분류학적인 이질성으로 **인체에서 나타나는 다양한 분자·생리학적 특성, 병리학적인 현상의 부재 및 전이기전 등의 차이로 인해 실제 환자에서 나타나는 다양한 종양관련 현상을 완벽히 재현하기에는 어려운 모델로 인식되고 있음**
- ⑤ 이러한 GEMM 모델들은 개발된 치료제에 대한 **통상 생물학적 모델로써 전임상단계 초기 단계에만 국한되어 적용되고 있는 실정임**

▷ 현재까지 개발된 GEMM은 일반적인 흑색종의 유전적 변이만이 반영 되었을 뿐, 최근 연구동향에 따라 세분화되고 있는 악성 흑색종 분류체계를 반영한 모델은 전무한 수준임

## 5) 흑색종 돼지모델 연구개발의 필요성

- ▷ 국내 양돈산업의 규모와 생산량은 2009년부터 2014년까지 5년간 양돈생산액(5.4 → 5.0조)과 출하량(9.6 → 9.9백만)이 정체되고 있는 실정임. 1차산업의 생산 정체성을 극복하고, **농생명 바이오자원의 활용도를 증진하기 위한 혁신적 4차산업 농축산기술 개발이 필요한 시점임**
- ▷ 의학 및 기초생명과학계 등 다양한 최신 생명공학분야로 응용가능한 고부가가치 수익모델인 **인체 질환모델 중대동물 개발분야는 농축산분야의 신성장 산업체계로의 활로를 제시하고 국가의 차세대 성장동력으로 전세계 무한경쟁 속에서 바이오산업을 주도할 수 있는 주요기술임**
- ▷ 돼지는 해부·생리학적 측면에서 설치류보다 사람과 유사한 주요대상동물로 인식되고 있으며, 이를 활용한 질환모델 생산에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있음
- ▷ 현재까지 **흑색종 중대동물은 개발된바 없으며**, 중대동물 모델이 갖는 장점 및 해당모델을 이용하는 경우 현존하는 흑색종 마우스 질환모델에 비해 신약개발에 있어 다양한 화합물 스크리닝 및 치료기전 규명에 이점이 존재하는바, 본 연구팀은 여러 중대동물 중 **인체질환모델로써 적합한 돼지를 이용하여 흑색종 질환모델을 생산하고자 함**

- ① 기존 보고에 의하면, **흑색종은 돼지나 개에서는 흔히 관찰되며, 이들을 제외한 다른 가축에서는 흔하지 않은 질병임**
- ② 특히, 돼지에서 선천적으로 흑색종이 발병하는 경우에는 **동시다발성이며, 몸통에서 주로 관찰되며, 그 크기는 작은 반점부터 직경 5cm가 넘는 종양 덩어리까지 임상학적 다양한 표현형을 보이고 있음**
- ③ 돼지 흑색종의 경우 **10~15% 악성이며, 다양한 기관으로의 전이를 보이고 있어 악성 흑색종 전이 기전 연구에 활용 가능함**
- ④ 또한, 전 세계적으로 **Rhesus 및 Cynos 등의 영장류 (NHPs) 동물 실험의 규제가 강화되고 있는 추세이며, 이에 반하여 산업동물인 돼지는 도축시 버려지는 난소와 생식세포를 활용한 연구가 용이하며, 다태동물로써 한 번에 최대 12마리까지 모델 동물을 생산할 수 있어, 국제적 실험동물 복지 및 윤리 기준에 부합할 뿐 만 아니라 생산 효율성에 있어 최적의 질환모델 동물로 제시되고 있음**
- ⑤ 인체 질환모델로써 돼지 수명은 12년 이상으로 2년~3년에 불과한 마우스에 비해 6배 이상 길어 **오랜 기간이 소요되는 흑색종 유도, 전이기전 및 항암제 연구개발에 유용함**

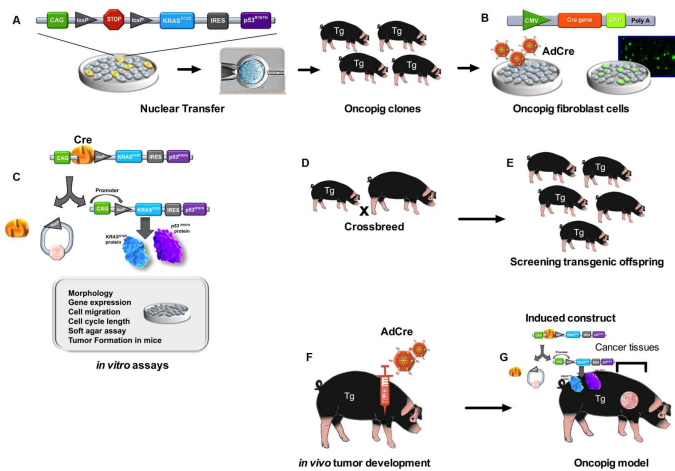
## 6) 흑색종 개 모델 연구개발의 필요성

- ▷ **종양 전문가 그룹에서 마우스 및 랫트 등의 설치류 질환모델의 단점을 극복하고, 인체 종양 질환의 표현형을 가장 잘 분석할 수 있는 실험동물로 개를 제시하고 있음**
- ▷ 90년대부터, **수의학 종양 전문가들은 자연적으로 종양이 발생한 반려견이 가장 좋은 인체종양 모델 동물로 보고된 바 있음(Knapp and Waters, 1997; MacEwen, 1990)**
- ▷ 최근 보고에 따르면, 개에서 발병된 골육종, 유선종양, 두경부암, 방광암, 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin lymphoma), 전립선암, 폐암 및 구강 악성 흑색종 등이 조직병리학적으로 인체종양 양상과 유사하여 **인체종양에 관한 중개의학적 연구수단으로서의 가치가 있음(Hansen & Khanna, 2004, Khanna & Hunter, 2005, Paoloni & Khanna, 2008)**
- ▷ 또한, 개는 **설치류에 비해 인간과의 DNA와 단백질 서열 등의 유전적 거리가 가까운 점이 주요한 장점이며, 돼지와 함께 인체장기의 해부생리학적 유사성으로 인하여 종양연구에 유용함**

- ① 개에서 발생하는 질병은 약 450가지로 알려져 있는데, **이중 약 360가지 정도의 질환이 사람에서의 유사성이 있다고 밝혀짐 (Deli et al., 2015)**
- ② **인체종양모델로서 개는 최적의 조건을 갖춘**

- a. 각 품종은 유전적으로 소수의 조상으로부터 유래하며 유전적 동질성이 높음
  - b. 유전자 sequence가 mice보다 사람과 더 가까움
  - c. 사람과 음식, 생활환경, 면역학적 특징을 공유함
  - d. 특히 종양에 있어서, 다양한 고형암과 혈액암에서 사람과의 유전적, 병리생태적, 조직학적 특징을 공유함
  - e. 특정 종양들의 발생률이 사람과 유사함
  - f. 사람과 유사한 종양을 가지면서도 수명이 짧고 질병(종양)의 진행이 빨라 생존기간과 치료효과를 연구하기 경제적, 시간적으로 수월함 (Joshua et al., 2015)
- ③ 개 흑색종 조직은 피부침습적 증식, 외피의 궤양을 동반하지 않는 양상 등 사람과 조직학적 특징이 유사하며, 개의 흑색종은 사람에서의 non-UV dependent type melanoma의 모델로 유용할 것으로 여겨짐 (Gillard et al., 2013)
- ④ 특히 인간 흑색종과 개의 흑색종은 세포 수준에서의 유사한 신호 전달 경로를 가지고 있음
- AKT mTOR pathway 활성화 (Hay, 2005; Kent et al., 2009; Turri-Zanoni et al., 2013)
  - 수용체 tyrosine kinase KIT 이상 (Murakami et al., 2011; Newman et al., 2012; Rivera et al., 2008; Tsao et al., 2012; Turri-Zanoni et al., 2013)
  - Cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현의 상향 조절 (Becker et al., 2009; Martínez et al., 2011)
  - Wnt/ b-catenin pathway 조절장애 (Han et al., 2013; Larue and Delmas, 2006)
  - Chondroitin sulphateproteoglycan 4 (CSPG4) 발현 (Mayayo et al., 2011; Price et al., 2011)
- ▷ 설치류에서 발병한 종양 표현형에 비해 인체종양을 잘 반영 할 수 있는 종양모델건은 보다 더 유사한 임상적 표현형, 종양 생물학 및 조직 병리학적 특성을 나타내고 있음
  - ▷ 실제 인체종양 진행속도보다 빠르게 진행되어 연구시간을 단축시키는데 매우 유리한 연구 모델이 될 수 있음
  - ▷ 또한, 종양모델건을 통한 발병·전이기전 및 항암제 개발 연구는 설치류모델보다 높은 신뢰도를 보여 종양분야 중개의학적 가치가 상당함
  - ▷ 이처럼 흑색종 모델건이 가진 많은 장점에도 불구하고, 현재까지 흑색종 모델건은 개발되어 있지 않은바, 본 연구팀은 최신의 생명공학기법을 활용한 흑색종 모델건을 생산하고자 함

### 7) Cre-LoxP system 기법 활용 종양모델 연구개발의 필요성



- ▷ 최신의 생명공학 기술인 Cre-LoxP system 기법은 가장 강력하고 널리 사용되는 조건적 유전자 발현 유도 기술임 (Gu et al, 1994)
- ▷ 이는 Cre-recombinase에 의해 재조합이 되어 조직 및 시간 특이적 유전자 발현을 가능하게 하여 인체의 다양한 조직 및 기관에서 선택적으로 종양을 유발하는 동물모델개발의 최적 전략 기술임 (Schook et al., 2015)
- ▷ 또한, 최신 종양모델 개발에 있어, 최신 Crispr/Cas9 유전자편집기법과의 융합을 통한 개발과정의 단순화, 낮은 비용 및 타겟팅 효율성을 통한 중대동물 모델링에 새로운 전략을 제시하고 있음 (그림 3)

그림 3. Cre-LoxP system기법 활용 중대동물 종양모델 개발

인체 암 질환 사망률 중 원발성 종양에 의한 사망보다는 전이로 인해 사망하는 경우가 90% 이상을 차지하고 있으며, 현재 개발된 모델동물을 통한 전이기전 및 치료제 개발연구에 한계가 있음. 이에 전이성을 대표하는 흑색종 중대동물 모델을 개발하고 이를 위한 다학제간 유기적 공동연구진 구성이 필요함

따라서, 본 연구팀의 형질전환 돼지 및 개 생산기술을 활용한 종양유전자제어 흑색종 질환모델을 개발함으로써, *in vivo* 및 *in vitro* 흑색종 모델 시스템을 구축하고, 이를 통한 악성 흑색종 발병기전 및 항암제 개발 실용화 연구를 위한 기반을 수립하고자 함

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 1차년도 (2018년)

기관	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
충북대학교 산학협력단	<주관 및 1세부>  최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델 돼지 개발	형질전환 돼지 생산을 위한 영향인자 분석	흑색종모델로써 최적의 품종 선발 및 공여핵원 세포주 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>효율적 질환모델세포주 수립을 위한 40일령 돼지 태아의 초대배양</li> <li>흑색종 특성 비교 분석을 위한 자연발생 반려견 유래 흑색종 세포주 획득</li> </ul>
			흑색종모델 돼지생산을 위한 <i>in vitro</i> 배아생산기술 개선 및 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 VEGF 처리로 인한 <i>in vitro</i> 배아 생산 효율 증대</li> </ul>
			효율적인 흑색종모델 생산을 위한 최적의 배아이식 프로토콜 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>제 1세부 연구팀과 제 2협동 기관 간 최적의 대리모선발 및 배아이식 프로토콜 수립</li> </ul>
	<주관 및 1세부>  Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 <i>in vitro</i> 질환모델 구축	Optogenetic-FGFr 도입 돼지세포주 개발 조건 분석을 위한 시험관내 돼지세포주에서의 광유전학 응용기반 기술 개발 및 구축	안정적인 외래 유전자 도입 및 발현을 위한 safe harbor locus targeting system 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 Optogenetic module을 삽입하기 위한 Donor 벡터 제작</li> </ul>
			Homologous recombination 효율 및 적합성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>최적의 Homologous recombination을 유도하기 위한 guide RNA 벡터 제작</li> </ul>
			Optogenetic-FGFr 유도 흑색종유발 삽입체개발 및 시스템도입 공여세포주 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>Porcine smooth muscle 세포를 이용하여 Porcine iPSC 수립</li> </ul>
(주)크로넥스	<2협동>  전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축	흑색종 모델돼지 개발을 위한 품종선발 및 생산기반 구축	흑색종모델 돼지 생산을 위한 대리모의 체계적 공급 프로토콜 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 모델 돼지 생산을 위한 대리모 공급라인 확보 및 프로토콜 확립 완료</li> </ul>
			질환모델 돼지 생산을 위한 대리모 선발 프로토콜 확립 및 사양기법 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>대리모 선발 프로토콜 확립 및 사양 기법 개선 완료</li> </ul>
			흑색종모델 돼지생산을 위한 배아이식 프로토콜 최적화 및 배아이식 기반 시설 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>크로넥스 생산 시설내 배아이식 기반 시설 구축 완료 미 배아이식 프로토콜 확립</li> </ul>
아부다비 생체공학연구원	<1협동>  유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발	흑색종 모델건 생산을 위한 체세포 형질전환 기법 및 체세포 핵이식 기법의 최적화 조건 확립	유전자가 도입된 세포주를 공여핵원 사용시 체세포 복제 효율 저하 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phytosphingosin-1-phosphate (P1P)의 난모세포의 체외 성숙 효율 향상 효과 분석 결과 난자 성숙을 증가효과 (논문 진행 50%)</li> </ul>
			모델건 복제에 공여핵원 다양화 및 다변화	<ul style="list-style-type: none"> <li>태아 섬유아세포 확보 6주 확보, 자견 섬유아세포 3주 확보</li> </ul>
			모델건 복제에 외과적 난자 획득과 이식 방법 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>체세포 복제된 중형견종에서 초음파로 태아 계측을 통한 계측 수식 확립 (논문 진행 80%)</li> </ul>
고려대학교 산학협력단	<위탁>  흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발	Ras 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가	모델건에서의 Ras 유전자 기반 흑색종 유도 시스템의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 유전자 및 SV40 Large T 항원을 이용한 종양유발 유전자 카세트 최적화</li> <li>개에서 유래한 세포에서 RAS 기반 흑색종 유도 시스템 작동 여부 검증</li> </ul>

			<p>흑색종 모델건에 적용 가능한 흑색종 유도 벡터 시스템 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAS 유전자 및 SV40 Large T 항원을 이용한 RAS 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 제작</li> <li>• RAS 기반 흑색종 유발 유전자 벡터를 도입한 개 섬유아세포주를 확립하여 수암생명공학원에 전달</li> </ul>
			<p>선택적 유도가 가능한 개 멜라닌 세포 특이적 유전자 재조합 시스템 제작</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개 및 돼지의 유전체에서 멜라닌 세포에서 특이적으로 발현하는 Tyrosinase 프로모터 서열 확보</li> <li>• 개 및 돼지의 Tyrosinase 프로모터 서열의 유효성을 <i>in vitro</i> 수준에서 검증</li> </ul>

2) 2차년도 (2019년)

기관	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
<p>충북대학교 산학협력단</p>	<p>&lt;주관 및 1세부&gt;  최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델 돼지 개발</p>	<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델 돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 <i>in vitro</i> 평가시스템 개발</p>	<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 돼지 생산을 위한 SCNT 전능세포 생산효율 개선 및 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 난자의 체외성숙배지내 <math>Cu^{2+}</math> 처리를 통해 SCNT 배아 생산 효율 증대</li> <li>• 돼지 난모세포의 IVM 기간동안 <math>Cu^{2+}</math> 처리했을 때, 핵성숙률이 증가함</li> <li>• 돼지 난모세포의 IVM 기간동안 <math>Cu^{2+}</math> 처리했을 때, 세포질 내 GSH가 증가함</li> </ul>
			<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 돼지 섬유아세포에 <b>optogenetic dimerization module</b> 도입 및 시스템검증</li> <li>• CIB1과 CRY2를 optogenetic-FGFr-Oncogene 시스템에 도입하여 흑색종 유발 모델을 생산하기 위해 optogenetic dimerization의 유효성을 검증함</li> <li>• <b>Optogenetic-FGFr 삽입 유도만능줄기세포주를 이용하여 SCNT 수행</b></li> <li>• Optogenetic-FGFr 삽입 유도만능줄기 세포주를 이용하여 SCNT를 실시하였으나, 비교군에 비해 유의적으로 낮은 배반포 형성율이 나타남</li> <li>• 이에 대한 대안으로 Optogenetic-FGFr 삽입 세포주를 섬유아세포로 분화시킨 후, SCNT 실시 전략을 마련함</li> </ul>
		<p>&lt;3차년도 목표&gt; Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</p>		<p>(추가) 멜라닌 세포 특이적 프로모터의 돼지 섬유아세포내 도입 및 검증</p>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환모델 돼지 생산</b></li> <li>• 형질전환 세포주를 공여 핵원으로 사용하여 SCNT 형질전환 배아를 생산한 후 대리모돈에 이식함.</li> <li>• 배아이식 119일 후 총 5마리의 돼지를 얻었으며 PCR로 두 vector 삽입 여부를 확인함</li> <li>• PCR 결과, Vector1 (pTYR-CreER<sup>T2</sup>)에 해당하는 CreER<sup>T2</sup> 밴드와 Vector2 (Loxp-DSred-Loxp-EGFP)에 해당하는 DSred와 EGFP 밴드가 모두에서 확인됨</li> <li>• <b>멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환 돼지로부터 pTYR positive 세포주 및 Primary culture프로토콜 수립</b></li> <li>• 태어난 형질전환 돼지 중 No.1, No.2, No.3번 돼지의 Skin과 No.2번 돼지의 eye를 얻어 primary culture를 진행함</li> </ul>	
	<p>&lt;주관 및 1세부&gt;  Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 <i>in vitro</i> 질환모델 구축</p>	<p>Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 돼지세포주 개발 조건 분석</p>	<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 유발 시스템 도입 세포주 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>확립된 piPSC 세포주 배양 조건 검증</b></li> <li>• 확립된 piPSC를 배양하기 위하여 human ES 배양 조건과 동일한 환경에서 LIF 유무에 따른 차이를 확인함</li> <li>• <b>확립된 piPSC 세포주 pluripotency 유지 검증</b></li> <li>• LIF를 첨가하지 않은 human ES 배양 조건으로 최소 20 계대를 유지함</li> </ul>
				<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 모델 유도만능줄기세포주</p>

			수립을 통한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발	수립하였음. <ul style="list-style-type: none"> <li><i>in vitro</i> 평가 시스템 개발을 위한 opto 반응 유도 검증</li> <li>13개의 세포주 수립 이후, 빛 자극에 대한 반응을 확인하여 <i>in vitro</i> 평가 시스템을 개발하였음.</li> </ul>
진코바이오	<2협동> 전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF 생산라인 및 상용화 기반 구축	형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈 영향인자 분석	효율적인 흑색종 모델 동물의 임신 및 분만을 위한 프로토콜 확립 및 사양기법 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈의 영향인자 분석</li> <li>형질전환 돼지 생산을 위한 사양기법 구축</li> <li>형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈의 사양기법 구축 완료</li> </ul>
			흑색종질한 돼지생산 및 자돈의 관리 시스템 구축 및 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 돼지 생산을 위한 수정란 이식</li> <li>흑색종 질한 돼지 생산 및 검증</li> <li>생산된 형질전환 돼지 관리 시스템 구축</li> <li>생산된 형질 전환 돼지의 관리 시스템 구축 완료</li> <li>우수동물생산시설 인증 획득(식약처)</li> </ul>
			대량생산 기반 구축을 위한 모델 자돈 사양기법 개선	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 형질전환 동물의 사양 기법 확립</li> <li>형질전환 동물의 관리를 위한 병성검증 시스템 개발</li> <li>형질전환 개체 검증을 위한 부검 프로토콜 확립</li> </ul>
아부다비 생명공학연구원	<1협동> 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 모델 개발	흑색종 질한모델건 생산 및 자견의 관리 시스템 확보	모델건 유도만능 줄기세포 와 배반포의 유전자 발현 양태를 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>CytoTune Sendai (SeV) 바이러스 유전자 이용해서 모델건 iPSCs 유도 분석</li> <li>모델건의 배아 줄기세포와 유사한 부분적 리프로그래밍 세포주 확립함</li> <li>아스코르브산 (AA)과 레티노산 (RA)은 초기 모델건 세포주의 리프로그래밍에서 상피화 촉진</li> <li>AA, RA의 처리는 모델건에서 5-hmC : 5-mC에 영향을 주어 줄기세포로 가는 중간 단계 상피화를 촉진함을 확인함</li> </ul>
			흑색종 모델 자견의 안정적인 성장을 위한 자견 관리 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>복제 자견의 출산 방법에 따른 자견 Appar 스코어링 시스템 적용</li> <li>분양 양상에 따른 Appar 점수와 산자수, 생시체중, 임신기간이 상관관계를 지님을 검증함</li> </ul>
		Ras 기반 흑색종 모델건 생산	Safe harbor locus 유전자 타게팅 기법을 적용한 Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반흑색종 모델 형질전환 세포주</li> <li>8마리의 대리모를 사용하여 2개 Ras 및 Braf 유전자 기반태아 세포주를 확보함</li> </ul>
고려대학교 사학협업단	<위탁> 흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발	Ras 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 공여핵원으로써의 유효성 검증	Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 기반 흑색종 개 모델 생산을 위한 모델 세포주 제작</li> <li>RAS 기반 흑색종 유발 유전자 벡터를 도입한 형질전환 개 세포주를 아부다비 생명공학연구원에 전달하였음.</li> <li>핵이식을 수행하여 형질전환 개 태아를 생산함.</li> <li>유래 세포주를 확보하여 분석함.</li> <li>3차 년도에 기획했던 Safe harbor locus 타게팅 시스템을 적용한 Ras 기반 흑색종 유발 벡터를 개발함</li> </ul>
			흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델건 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 기반 흑색종 돼지 모델 생산을 위한 모델 세포주 제작</li> <li>낮은 형질 전환 효율에 따라 Safe harbor locus targeting 기법을 활용한 Ras 기반 흑색종 유발 벡터 시스템을 개발하여 세포주를 개발 중임</li> <li>흑색종 유도 벡터 시스템 중 하나인 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 및 <i>in vivo</i> 검증을 위한 세포주 구축</li> <li>멜라닌 세포 특이적 CreER 재조합 유도시스템 렌티바이러스 벡터 시스템 개발 및 생산 완료함</li> <li>RAS 및 BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템과 함께, 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도시스템 도입</li> <li>돼지 멜라닌 세포 특이적 CreER 재조합 유도시스템의 <i>in vivo</i> 검증을 위한 형질전환 핵공여 돼지 세포</li> </ul>



				<ul style="list-style-type: none"> <li>제작완료함</li> <li>흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델건 생산을 위한 세포 제작 중임</li> </ul>
		<p>Safe harbor locus 유전자 타게팅 기법을 적용한 Braf 유전자 기반 흑색종 발병 시스템 개발</p>	<p>Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>인간 돌연변이 Braf에 의해 흑색종이 발병할 수 있을지 과발현을 통해 검증</li> <li>인간 돌연변이 Braf에 의해 미니돼지와 개 유래 세포에서 하부신호 활성화 및 세포의 암세포화 경향 확인함</li> </ul>
			<p>안정적 형질전환 개체 생산을 위한 Safe harbor locus 유전자 타게팅 기술 개발과 Ras 및 Braf 유전자 기반 시스템에 적용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>개와 미니돼지의 Safe harbor locus 표적 CRISPR/Cas9 벡터 시스템 구축</li> <li>최적의 개 및 미니돼지의 Safe harbor locus 표적 guide RNA 서열 확보 및 이를 도입한 CRISPR/Cas9 벡터 시스템 구축함</li> <li>제작한 시스템 Safe harbor locus targeting 시스템을 활용해 FLP/FRT 재조합 시스템 도입 핵공여 세포주 제작</li> <li>제작한 시스템 Safe harbor locus targeting 시스템을 활용해 FLP/FRT 재조합 시스템 도입 핵공여 세포주 제작 및 유효성을 검증함</li> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템에 FLP/FRT 재조합 시스템 도입</li> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템에 FLP/FRT 재조합 시스템 개발 완료함</li> </ul>

3) 3차년도 (2020년)

기관	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
충북대학교 산학협력단	<p>&lt;주관 및 1세부&gt;</p> <p>최신의 유전자제거기법 활용을 통한 흑색종 질환모델 돼지 개발</p>	<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델 돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 <i>in vitro</i> 평가시스템 개발</p>	<p>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포의 특성 및 분화능분석</b></li> <li>• Opto-FGFr piPS 세포에서 만능성 마커 유전자 발현이 FGf 첨가해준 piPS 세포와 유사함을 확인하였고 three germ layer로의 분화능력 또한 확인하였음</li> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포의 SCNT 후 <i>in vitro</i> 평가</b></li> <li>• SCNT 실시후 Optogenetic-FGFr 배아의 평균 cleavage rate는 55.4%, 배반포 발달률은 10.7%로 조사됨</li> <li>• <b>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주 확립</b></li> <li>• SCNT를 통해 얻은 Optogenetic-FGFr piPS cell 유래 배반포 10개 중 8개가 feeder layer 위에 attachment 되었고 1개의 배아줄기세포 colony 형성</li> <li>• Seeding 12일차에 subculture하여 배아줄기세포 안정화 실시함</li> </ul>
			<p>분자생물학적 기법을 통한 흑색종 모델 배아줄기세포주 내 Optogenetic-FGFr-Oncogene 시스템의 유효성검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포의 oncogene system 검증</b></li> <li>• Blue light자극에 따라 Opto-FGFr piPSC에서 ERK1/2 활성화가 증가하는 것을 확인하였음</li> </ul>
		<p>흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지 생산</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포를 이용한 SCNT 수행 및 대리모돈에 배아 이식 진행</b></li> <li>• Opto-FGFr iPSC를 핵 공여 세포주로 사용하여 SCNT를 2회 수행(4차년도 후속실험 예정)</li> <li>• 총 2회 SCNT 진행: 120개(1회) 및 123개(2회)의 배아를 이식하였고 배아이식 후 임신진단키트 검사 결과가 양성으로 나왔음.</li> </ul>
		<p>In vivo에서 효율적인 Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 위한 암실조건 및 광학 조건 도출 분석</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>In vitro에서 효율적인 Optogenetic-FGFr 유도를 위한 광학 조건 도출</b></li> <li>• 1uW/mm2광량 조건에서 1분간격으로 blue light를 조사할 때 ERK1/2의 Phosphorylation이 유의적으로 증가함</li> <li>• <b>In vivo에서 효율적인 Optogenetic-FGFr 유도를 위한 광학 조건 도출</b></li> <li>• 산자 생산 후 in vivo에서 효율적으로 Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 위한 광학조건을 도출할 예정</li> </ul>
		<p>Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 통한 흑색종 발병 확인</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포를 공여핵 세포로 이용하여 핵이식 후 배아를 대리모에 이식</b></li> <li>• COVID-19 여파로 충분한 이식수술을 시행하지 못함. 따라서 4차년도 후속실험 예정)</li> </ul>
		<p>Reclone system을 적용을 통한 흑색종 모델 SCNT배아의 생산효율 개선</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Optogenetic-FGFr piPS 세포를 공여핵 세포로 이용하여 핵이식 후 배아를 대리모에 이식</b></li> <li>• COVID-19 여파로 충분한 이식수술을 시행하지 못함. 따라서 4차년도 후속실험 예정)</li> </ul>
		<p>흑색종 특성 비교 분석을 위한 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 생물자원 확보</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 생물자원 확보</b></li> <li>• 초대배양 기법을 활용하여 흑색종 세포주 수립</li> <li>• <b>자연발생 흑색종 돼지 모델 유래 섬유아세포의 체세포 핵이식을 통한 체외발달률 조사</b></li> <li>• 체세포 핵이식 실시 후 얻어진 평균 cleavage rate은 67.9%, 배반포 발달률은 46.2%로 나타났음. 향후 ET를 통한 자연발생 흑색종 돼지 모델주 구축시도.</li> </ul>
		<p>비침습적 영상진단을 통한 질환표현형 분석</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hras 돼지모델의 PET/CT을 이용한 특성분석</b></li> <li>• Cre/LoxP inducible system 개체를 통해 PET/CT를 진행하여 특성분석 실시</li> </ul>
		<p>Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발 (4차년도 연구내용을 3차년도에 수행함)</p>	<p>형질전환 모델 생식능력 검증방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hras 돼지모델의 CASA를 이용한 정자성상 분석법 개발</b></li> <li>• Hras 돼지모델에서 회수된 정액을 CASA를 통해 정자성상 분석 실시하여 형질전환 돼지 생산 후 생식능력 평가에 대한 지표로 사용하고자 함</li> </ul>
		<p>&lt;주관 및 1세부&gt;</p>	<p>유도만능줄기세포주</p>	<p>흑색종 모델 iPSC세포주에서 발생한</p>

	<p>Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 in vitro 질환모델 구축</p>	<p>활용 Optogenetic-FGFr-Oncogene을 통해 유도된 흑색종의 특성 분석</p>	<p>중앙 세포주 선별</p> <p>흑색종 모델 iPS세포주에서 발생한 중앙 세포주 유전적 특징 비교분석</p> <p>흑색종에서 활성화 되는 관련 신호 활성화 및 특징적 유전자 발현 패턴 분석</p>	<p><b>확인하였음</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>차년도에 동일한 방법으로 흑색종 모델 iPS 세포주를 구축하여 세포주를 선별할 예정임</li> <li><b>기존 수립한 Opto-FGFr piPSC의 정상 핵형을 확인하였고, pluripotency marker (pOct4, pNanog, pSox2, pLin28a)의 mRNA 및 protein 발현을 확인하였음</b></li> <li>차년도에 흑색종 모델 iPS 세포주를 구축한 후 흑색종 특이적인 마커의 유전자 발현을 확인할 예정임</li> <li>선행연구를 통해 Opto-FGFr piPSC line을 blue light 하에서 배양하였을 때 전형적인 colony morphology 및 FGf signaling의 downstream에 존재하는 ERK1/2 protein의 phosphorylation을 확인함으로써 Optogenetic FGf activation을 검증하였음</li> <li>차년도에 흑색종 모델 iPS 세포주를 수립하여 흑색종에서 잘 알려진 BRAF signaling pathway의 activation을 확인할 예정</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>중대동물</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>&lt;협동&gt;</b></p> <p>전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축</p>	<p>흑색종 질환모델 중대동물의 특성 분석 및 관리 체계 구축</p>	<p>모델 중대동물의 통합적 표현형 분석: 신경, 생리, 혈액, 운동, 행동, 질병 패턴 등</p> <p>모델 중대동물의 흑색종 조직병리 및 분자병리학적 검증</p> <p>전임상 연구를 위한 흑색종 질환 대체 동물모델로서의 유효성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>흑색종 질환 동물의 표현형 분석</b></li> <li>비침습적 영상진단에 의한 흑색종 질환동물모델의 중앙 형성 확인</li> <li><b>흑색종 질환동물모델의 혈액학적 분석</b></li> <li>흑색종 질환동물 모델의 혈액학적 표현형 분석 완료</li> <li><b>흑색종 질환동물모델의 생리학적 분석</b></li> <li>흑색종 질환동물 모델의 생리학적 표현형 분석 완료</li> <li><b>자연발생 유래 흑색종 돼지 모델 확보</b></li> <li>양돈농가에서 내원한 자연발생 (Duroc, 40일령, 수컷) 흑색종 개체 확보</li> <li><b>중앙 유발 중대동물 모델의 조직병리 표현형 분석</b></li> <li>흑색종 중대동물의 조직병리학적 분석 완료</li> <li><b>중앙 유발 중대동물 모델 분자병리학적 분석</b></li> <li>생산된 중앙 유발 동물의 조직병리 분석 진행 중</li> <li>중앙 유발 동물의 분자병리학적 분석 수행 중에 있으며 생산된 후대 검증 중앙 유발 계통 라인과 함께 분석을 수행할 예정임</li> <li><b>유효성 검증을 위한 동물의 대량 생산, 육종</b></li> <li>유효성 검증을 위한 중앙 유발 계통 라인의 생산 및 육종(수컷 11두, 암컷 7두)</li> <li>전임상 연구의 대체동물로써 유효성 검증을 위해 생산된 중앙 유발 계통 라인의 성장 단계별 표현형 분석 중에 있음</li> <li><b>중앙 유발 중대동물 모델 생산을 위한 수정란</b></li> <li>이식 12회 완료</li> <li><b>전임상 연구를 위한 중앙 유발 동물모델의 병성검사 시스템 확립</b></li> <li>중앙 유발 중대동물 품질 관리를 위한 병성검정 시스템 구축 완료</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>아부다비</b></p> <p style="text-align: center;"><b>중대동물</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>&lt;협동&gt;</b></p> <p>유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 모델건 개발</p>	<p>Ras 기반 흑색종 모델건 생산</p> <p>Ras 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가</p> <p>형질전환 모델건의 생산을 위한 기반 기술 확립</p>	<p>개량된 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석</p> <p>생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도</p> <p>Ras 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</p> <p>형질전환 모델건 대량생산을 위한 체세포, 생식세포 확보 및 보관의 최적화 조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>개 흑색종 모델 생산을 위해 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석</b></li> <li>2세부(위탁)에서 구축한 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 도입 세포주를 사용하여 형질전환 개의 fetus 확보</li> <li><b>생산된 모델 건에서 흑색종 발병 유도</b></li> <li>형질전환 개 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함</li> <li><b>생산된 모델 건에서 흑색종 병변으로 병리 및 조직학적 검증</b></li> <li>형질전환 개 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함</li> <li><b>공여세포와 난자의 미토콘드리아 compatibility에 따른 체세포 복제 효율 분석</b></li> <li>공여세포와 난자의 미토콘드리아 DNA의 incompatibility에 따른 분석결과 임신율, 세포대사 및 세포생존율이 감소 (논문진행 50%)</li> <li><b>모델건 복제에 외과적 난자 획득 방법 및 관리 개선</b></li> <li>동결 건조된 돈 태반 추출물 급여를 통한 항상 치유 개선효과 (논문진행 50%)</li> <li><b>유전자가 도입된 세포주를 공여핵원으로 사용시 체세포 복제 효율 저하 분석</b></li> <li>Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)의 난모세포의 체외 발달 효율 향상 효과 분석 결과 난자 발달을 증가 효과</li> <li><b>모델건 복제에 공여핵원의 다양화</b></li> <li>동결보호제 없이 동결된 조직으로부터 섬유아세포 확보, 복제 산자 생산</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>&lt;위탁&gt;</b></p>	<p>Ras 기반 흑색종 모델</p>	<p>Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>개 흑색종 모델 생산을 위해 Safe harbor locus 유전자 타겟팅 기법을 활용한 RAS, BRAF 유전자 기반</b></li> </ul>

<b>고려대학교 산학협력단</b>	흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발	핵공여 세포주 제작	형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축	<b>흑색종 유발 유전자 발현 시스템 도입</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>개 섬유아세포를 이용해 safe harbor locus 유전자 타겟팅 기법을 활용한 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템을 도입하여 검증된 형질전환 모델 세포주 확보 완료</li> <li>미니 돼지 흑색종 모델 생산을 위해 plasmid vector 직접 도입을 통한 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템 도입</li> <li>미니돼지 섬유아세포를 이용해 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템을 도입하여 검증된 형질전환 모델 세포주 확보 완료</li> </ul>
			흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델견 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 개, 미니돼지 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입하여 최종 모델 세포주 구축</li> <li>각 흑색종 유발 유전자 발현 시스템이 도입된 개와 돼지 세포에 멜라닌 세포 특이적 CreER 발현 시스템 도입 및 검증 완료</li> </ul>
			Sleeping beauty transposon 시스템을 적용한 흑색종 유발 유전자 전달 시스템 및 핵공여 세포주 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>제작한 모델 세포들이 체세포 핵이식의 효율이 좋지 않아, 그동안 문제가 되었던 배양기간에 따른 세포 노화 문제를 해결하기 위해 효율적이고 빠른 유전자 도입 시스템을 도입하고자 Sleeping beauty transposon 시스템을 도입</li> <li>Sleeping beauty transposon 시스템의 효율성 검증 완료</li> <li>흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템에 Sleeping beauty transposon을 적용한 시스템 구축 완료</li> <li>이를 활용한 세포주 구축 진행 중</li> </ul>
		Ras 기반 흑색종 모델의 유효성 평가	생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 견 및 모델 돼지에서 흑색종 발병 유도</li> <li>형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함</li> </ul>
			Ras 유전자 기반 모델견의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 견 및 모델 돼지에서 흑색종 발병 유도</li> <li>형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함</li> </ul>
				<ul style="list-style-type: none"> <li>발병된 흑색종 유전학, 조직학적 분석</li> <li>형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함</li> </ul>

4) 4차년도 (2021년)

기관	세부과제명	세부연구 목표	연구개발 수행내용	연구결과
충북대학교 산학협력단		흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증	유전자원 보존을 위한 정액동결 프로토콜 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>항산화제 처리를 통한 정액동결 프로토콜 수립</b></li> <li>• 기존의 정액동결 프로토콜에서 항산화제 처리를 추가하여 정액동결을 시도하였음</li> </ul>
			질환모델돼지의 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>질환모델돼지의 정액채취 후 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능 평가</b></li> <li>• 현재 정액동결 프로토콜에 있어서 기술적인 문제점으로 인해 차년도로 계획 변경함</li> </ul>
			암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hras 돼지모델의 자연교배를 통한 계대전달 확인</b></li> <li>• Cre/LoxP inducible system 개체를 이용하여 자연교배를 통해 흑색종 유전자의 계대 전달 확인하였음</li> </ul>
			흑색종 질환모델 내 종양유발 분석 및 종양의 안정적인 분리를 위한 수술기법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>자연발생 돼지 유래 흑색종 개체의 흑색종 분리 수술 및 분리된 조직 특성분석</b></li> <li>• 자연발생 흑색종 두류 개체를 활용하여 흑색종을 안정적으로 분리하는 수술기법을 개발하였음</li> <li>• 분리된 조직에서 melanin 세포 색소침착 및 다수의 neutrophil 침윤 및 세포의 이형성을 관찰하였음</li> </ul>
			비침습적 영상진단을 통한 질환 표현형 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hras 돼지모델의 PET/CT을 이용한 특성분석</b></li> <li>• Cre/LoxP inducible system 개체를 통해 PET/CT를 진행하여 특성분석 실시하였음 (3차년도에 조기달성)</li> </ul>
	<주관 및 1세부> 최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델 돼지 개발	Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발	Ras 기반 흑색종 Cre/LoxP inducible 질환모델돼지 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ras 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 및 대리모돈에 배아 이식 진행</b></li> <li>• 1협동(위탁)에서 구축한 Ras기반 유전자 도입 세포주를 사용하여 SCNT 진행 후 <i>in vitro</i>에서 발달률을 평가하였음</li> <li>• Ras기반 세포주를 사용하여 SCNT 진행 후 대리모돈에 배아 이식 3회 진행하였음</li> </ul>
			흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주를 활용한 흑색종 질환모델돼지 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>3차년도에 수립된 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 세포주를 이용한 SCNT 수행 후 대리모돈에 배아 이식 진행</b></li> <li>• 세포주를 활용하여 SCNT 수행 후 대리모돈에 1회 배아 이식하였음.</li> </ul>
			Braf 기반 흑색종 모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 배아줄기세포 수립 및 특성분석</b></li> <li>• 1협동(위탁)에서 구축한 2가지 종류의 Braf기반 유전자 세포주(SB-Dppb, SB-3PA)를 사용하여 SCNT 진행 후 각각 <i>in vitro</i>에서 발달률을 평가하였음</li> <li>• SCNT 진행 후 얻은 배반포를 활용하여 2가지 세포주 유래의 Braf기반 흑색종 유발 유전자가 삽입된 배아줄기세포주를 수립 및 특성 분석하였음</li> </ul>
		Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가 (5차년도 연구내용을 4차년도에 수행함)	Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 흑색종 모델돼지 생산 및 분석</b></li> <li>• 1협동(위탁)에서 구축한 2가지 종류의 Braf기반 유전자 세포주(SB-Dppb, SB-3PA)를 사용하여 SCNT 진행 후 대리모돈에 SB-Dppb 세포주 3회 이식, SB-3PA 세포주 3회 배아 이식하였음</li> <li>• SB-Dppb 세포주 유래 돼지 1회 생산, SB-3PA 세포주 1회 생산하여 산자들을 분석하였음</li> <li>• SB-3PA #4 개체의 세포주를 활용하여 SCNT 진행 후 <i>in vitro</i> 발달률 평가 및 대리모돈 이식을 통해 재복제 시도하였음</li> </ul>
			제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>초대 배양을 통한 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립</b></li> <li>• 효율적인 질환모델 생산을 위해 임신 후 50일령의 제주 재래돼지 태아를 수집하여 초대배양을 통해 세포주 확립하였음</li> </ul>
	<주관 및 1세부> Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 <i>in vitro</i> 질환모델 구축	Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 태아세포주 염색체 및 특성분석	제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 염색체 및 특성분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 염색체 및 특성분석</b></li> <li>• 총 4 종류의 세포주를 확립하였으며, 염색체 및 특성분석을 진행하였음</li> </ul>
			제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립</b></li> <li>• JNFCs의 암수 개체별로 oncogene 도입된 형질전환 세포주를 수립 및 FACS 활용하여 sorting 진행하였음</li> </ul>
			제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립</b></li> <li>• JNFCs의 암수 개체별로 oncogene 도입된 형질전환 세포주를 수립 및 FACS 활용하여 sorting 진행하였음</li> </ul>

		종양모델 세포주 개발 및 활용		
쥬크로텍스	<2협동> 전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축	전임상 흑색종 질환모델 중대동물( 돼지, 개) 유효성 검증	인간질환 모델 중대동물 기반 비임상 평가를 위한 실용화 전략 수립 및 구축 - 치료기술 효능 및 안전성 평가 기준 확립 - 인간 치료 기술 비임상 평가를 위한 자원 관리 체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>비임상 시험 평가를 위한 종양 유발 중대동물 기원 Primary cell line 구축</li> <li>종양 유발 동물의 지방, 심장, 신장, 대장, 소장, 폐, 근육, 위, 흉선, 기도로부터 Primary cells를 분리하여 비임상 시험을 위한 세포주를 구축함.</li> <li>구축된 세포를 이용한 항암제 및 약물을 독성을 평가하기 위한 평가 시스템 구축 중.</li> <li>약물의 침투 및 투과성을 평가하기 위해 돼지 피부를 이용한 Franz cell membrane 개발 및 시제품 개발.</li> <li>Franz cell membrane 시제품의 제품 규격화 및 상용화.</li> <li>형질전환 동물 생산용 대리모의 개량 및 제품화</li> <li>비임상 시험 평가를 위한 제재 재래 흑돼지 유래 Primary 세포주의 개발 및 제품화</li> </ul>
			흑색종 질환모델동물의 후대 검증을 통한 생산 라인 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>유효성 검증 및 후대 검증을 위한 종양 유발 자돈의 계대 생산 및 육종</li> <li>종양 유발 동물의 3세대까지 계대 생산을 완료 함.</li> <li>1~3세대 총 43두 생산(male 23두, female 20두).</li> <li>종양 유발 계대 생산 자돈의 후대 검증_총복대 현상한 교수 연구팀에서 분석</li> <li>종양 유발 동물의 생산을 위한 대리모 사양 관리 및 유지. 후보 대리모돈 60두 상시 유지.</li> <li>종양 유발 동물의 생산을 위한 수정란 이식_당해년도 11회 수정한 이식 진행.</li> <li>자연 발생 흑색종 돼지 세포주를 이용한 자돈 생산</li> <li>Braf 기반 흑색종 모델 돼지 생산 및 사양 관리. 유효성 검증_총복대 현상한 교수 연구팀 수행</li> </ul>
아파타미 생체공학연구소	<1협동> 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발	Ras 기반 흑색종 모델건 생산	개량된 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>개 흑색종 모델 생산을 위해 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석</li> <li>2세부(위탁)에서 구축한 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 도입 세포주를 사용하여 형질전환 개 생산</li> </ul>
			생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 RAS 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도</li> <li>생산된 모델건 모두 UV 조명에서 표지인자인 EGFP의 발현을 확인</li> <li>생산된 모델건에서 종양형성 확인</li> </ul>
		Ras 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	Ras 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 유전자 기반 모델 건의 병리 조직학적 검증</li> <li>미세바늘흡입검사 및 종양조직에 대한 병리조직학 분석</li> </ul>
		Braf 기반 흑색종 모델건 생산	개량된 Braf 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>개 흑색종 모델 생산을 위해 Braf 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석</li> <li>2세부(위탁)에서 구축한 Braf 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 도입 세포주를 사용하여 형질전환 개 생산</li> </ul>
			생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도	<ul style="list-style-type: none"> <li>개 흑색종 모델 생산을 위해 Braf 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석</li> <li>체세포 핵이식을 통하여 모델건 생산</li> <li>생산된 Braf 유전자 기반 형질전환 모델건에서 흑색종 발병 유도</li> <li>40H-tamoxifen 경구투여에 따른 흑색종 유도</li> </ul>
		Braf 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	Braf 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 건에서 흑색종 병변으로 병리 및 조직학적 검증</li> <li>40H-tamoxifen 경구투여에 따른 흑색종 유도 중</li> </ul>
		체세포 핵이식 기법을 활용한 형질전환 모델건 재복제 기술 최적화	Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건의 체세포 및 생식세포 구축 및 분석</li> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건으로부터 세포주 확보</li> <li>모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 구축 기술 개발</li> <li>급속동결된 조직으로부터 줄기세포 확보 및 특성 분석</li> <li>생식세포를 확보하기 위해 형질전환 모델건으로부터 난자 및 정자 회수 방법 분석 및 최적화 (논문진행 50%)</li> </ul>
	흑색종 모델 유래 세포의 체세포 핵이식 기법 재적용을 통한 모델건 재복제 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>공여세포와 난자의 미토콘드리아 compatibility에 따른 체세포 복제 효율 분석</li> <li>공여세포와 난자의 미토콘드리아 DNA의 incompatibility에 따른 분석결과 임신을, 세포대사 및 세포생존율이 감소</li> <li>모델건 복제에 외과적 난자 획득 방법 및 관리 개선</li> <li>동결 건조된 돈 태반 추출물 급여를 통한 창상 치유</li> </ul>		

				<ul style="list-style-type: none"> <li>개선효과 (논문진행 50%)</li> <li>체세포 복제된 중형견종에서 초음파로 태아 계속</li> <li>초음파를 사용하여 복제 개의 분만일을 예측 및 분석하였음</li> </ul>
고려대학교 산학협력단	<p>&lt;위탁&gt;</p> <p>흑색종 유도 시스템을 도입한 중대 동물 형질전환 세포주 개발</p>	<p>BRAF 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 핵공여원으로써의 유효성 검증</p>	<p>BRAF 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>F-RMCE 시스템을 활용한 흑색종 유도 시스템 도입 검증 및 효율 비교</li> <li>Safe harbor locus 유전자 타겟팅 기법을 활용한 F-RMCE 시스템으로 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템 도입 및 형질전환 모델 세포주 확보</li> <li>Sleeping beauty (SB) transposon 시스템을 적용한 흑색종 유발 유전자 전달 시스템 개발</li> <li>SB transposon 시스템을 적용한 흑색종 모델건 제작용 핵 공여세포 구축</li> <li>SB transposon 시스템을 적용한 흑색종 돼지 모델 제작용 핵 공여세포 구축</li> <li>형질전환 세포의 장기 배양에 따른 문제 발생 확인</li> <li>SB transposon 기반 흑색종 유발 단일 벡터 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt;SBone-CMV-LGL-DSH-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템)</li> <li>-&gt;SBone-CMV-LGL-DdpB-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (Braf 기반 흑색종 돼지 모델 시스템)</li> <li>-&gt;SBone-CMV-LGL-DSH-dogTYR-CreER<sup>T2</sup> (Ras 기반 흑색종 개 모델 시스템)</li> <li>-&gt;SBone-CMV-LGL-DdpB-dogTYR-CreER<sup>T2</sup> (Braf 기반 흑색종 개 모델 시스템)</li> </ul> </li> <li>SB transposon 흑색종 유발 단일 벡터 시스템을 도입한 핵공여세포 확립</li> <li>개 섬유아세포주에 SBone-CMV-LGL-DSH-dogTYR-CreER<sup>T2</sup> 도입한 형질전환 세포주 (재)아부다비생명공학원 손영범 박사 연구팀에 전달.</li> <li>돼지 섬유아세포주에 SBone-CMV-LGL-DSH-pigTYR-CreER<sup>T2</sup>와 SBone-CMV-LGL-DdpB-pigTYR-CreER<sup>T2</sup>를 도입한 형질전환 세포주 충북대학교 현상환 교수 연구팀에 전달.</li> </ul>
			<p>BRAF 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주의 핵공여원으로서의 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 유발 유전자 발현벡터 시스템이 도입된 형질전환 개 생산을 통해 핵공여원의 유효성을 검증</li> <li>SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE를 가진 모델건 4마리 생산 성공함.               <ul style="list-style-type: none"> <li>-&gt; SB-DdpB #1, #2, #3, #4 Dog.</li> </ul> </li> <li>BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 개 분석 완료</li> <li>흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 개, 미니돼지 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 최종 모델 세포주 구축 완료</li> <li>생산된 BRAF 기반 흑색종 최종 모델 돼지 생산 및 분석 완료를 통한 세포주 유효성 평가</li> </ul>
		<p>Braf 기반 흑색종 모델건 생산 및 유효성 평가</p>	<p>Braf 유전자 기반 모델건의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 4-OH-tamoxifen 처리를 하여 종양 발생 유도 중임.</li> <li>흑색종 병리조직 검증은 종양 발병 이후 수행 예정.</li> <li>&lt;제1협동연구&gt; 내용에 포함</li> </ul>
		<p>Ras 기반 흑색종 모델의 유효성 평가</p>	<p>생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델건 생산 및 모델 유래 세포 분석을 통한 모델 유효성 검증.</li> <li>&lt;제1협동연구&gt; 내용에 포함</li> </ul>
				<p>Ras 유전자 기반 모델에서 유도한 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증</p>

5) 5차년도 (2022년)

기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
충북대학교 산학협력단	<주관 및 1세부>  최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델 돼지 개발	흑색종 모델돼지의 유효성 및 발달을 통한 후대검증	RAS 기반 흑색종 질환모델돼지 특성분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 배아줄기세포 수립</li> <li>1협동(위탁)에서 제주 재래돼지 태아 섬유아세포 (Jeju native pig fetal fibroblast, JNPF)를 활용하여 RAS 기반 유전자 도입 세포주(JNPF-DSH)를 구축하였고, 이를 이용해 SCNT 진행 후 <i>in vitro</i>에서 발달률을 평가함</li> <li>SCNT 진행 후 얻은 배반포를 활용하여, RAS기반 흑색종 유발 유전자가 삽입된 배아줄기세포주를 수립 및 특성 분석하였음</li> </ul>
			질한모델돼지의 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 대리모돈에 배아 이식</li> <li>RAS 기반 세포주(JNPF-DSH)를 이용하여 SCNT 진행 후 대리모돈에 4회 배아 이식하였음</li> </ul>
			암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>질한모델돼지의 정액채취 후 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능 평가</li> <li>제주재래 돼지 기반 BRAF 흑색종 모델 개체가 아직 성숙이 오지 않았으므로 추후 성숙 후 진행할 예정임</li> <li>Myo-inositol을 이용한 돼지 정액 냉장보관 방법 개발</li> <li>비타민 B1 복합체 그룹에 속하는, Myo-inositol을 정액 보존제에 첨가함으로써 미치는 영향을 연구함</li> <li>돼지 정자의 냉장 저장 기간동안 2mg/mL Myo-inositol 처리는 항산화 관련 유전자를 증가시킴으로써 미토콘드리아의 활성을 증진시키고, 이는 정자의 운동성, 원형질막 및 첨체의 안전성에 도움을 준 것으로 시사됨</li> </ul>
			비침습적 영상진단을 통한 질환 표현형 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 돼지모델의 자연교배를 통한 계대전달 확인</li> <li>Cre/LoxP inducible system 개체를 이용하여 자연교배를 통해 흑색종 관련 oncogene의 계대 전달을 확인함</li> </ul>
	Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가	Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증	유카탄 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 MRI를 이용한 특성 분석</li> <li>유카탄 기반 BRAF 흑색종 모델돼지에서 이상 표현형이 나타남에 따라, 비침습적으로 판단할 수 있는 MRI (Magnetic Resonance Imaging) 검사를 활용함</li> </ul>
			제주재래 돼지 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>유카탄 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증</li> <li>SB-3PA-DPB #4 개체 복제 생산 및 분석 진행함. 총 2마리의 산자 생산 및 유전자 삽입 여부를 판단함</li> <li>SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 유효성을 검증함. 특이 형질로 인하여, 핵형 분석 및 조직학적 검사를 실시함</li> <li>제주재래 돼지 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증</li> <li>JNPF-DppB 세포주를 이용한 SCNT 수행과 <i>in vitro</i> 평가 진행함. 발달간의 유의적인 차이는 발견하지 못함</li> <li>SCNT 수행 후 <i>in vitro</i>에서 생산된 배반포를 이용하여 배아줄기세포 수립 및 특성분석하였음</li> <li>JNPF-DppB 개체 생산 및 분석, 총 2번의 배아이식결과 총 7마리의 산자를 생산하였고, 1마리 사산. 3마리는 폐사하였음. 모든 개체에서 유전자 삽입여부를 판단함</li> <li>JNPF-DppB 개체의 유효성 검증. 흑색종 모델 돼지의 <i>in vitro</i>에서 유효성을 판단하기 위해, 초대배양을 통해 섬유아세포를 구축함. JNPF-DppB piglet #2에서 자발적인 종양유도가 일어나, 조직검사 및 유전자 발현수준을 조사함. 흑색종 모델 돼지의 <i>in vivo</i>에서 유효성을 판단하기 위해, 구강으로 타목시펜을 처리하였음</li> </ul>
	<주관 및 1세부>  Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 <i>in vitro</i> 질환모델 구축	Optogenetic-FGFr-Oncogene 흑색종 <i>in vitro</i> 모델 활용 플랫폼 구축	효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 프로토콜 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 프로토콜 수립</li> <li>효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 basement membrane matrix, 계대 배양 및 동결 조건 확립</li> <li>Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 basement membrane matrix 조건 확립</li> <li>Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 계대 배양 및 동결 조건 확립</li> <li>분화된 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 상태 검증</li> <li>Matrix 조건에 따라 분화된 iPS를 3배엽 관련 마커 면역염색을 통해 확인함</li> </ul>
			분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 활용한 <i>in vitro</i> 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>인터루킨 (Interleukin, IL)-7을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용(<i>in vitro</i> culture, IVC) 배지 조성 개발</li> <li>돼지배아의 체외배양 시스템을 향상시키기 위해, IL-7를 체외배양 기간에 처리함으로써 유효성을 평가하였음</li> </ul>



				<ul style="list-style-type: none"> <li>• 분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 세포를 이용하여 SCNT 후 <i>in vitro</i> 평가</li> <li>• 분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 세포를 이용하여, SCNT를 진행 후 배아 발달을 평가하였음</li> </ul>
전근로보육사	<p>&lt;협동&gt;</p> <p>전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF 생산라인 및 상용화 기반 구축</p>	<p>전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 생산라인 기반</p>	<p>흑색종 모델 중대동물의 대량 생산을 위한 라인 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 형매교배 및 근친교배를 통해 흑색종 모델 중대동물 계통을 조성함</li> <li>• F1 세대 총 21두(male: 12, female: 9)를 생산함.</li> <li>• 형매교배를 통해 F2세대 59두(male:39, female:20)를 생산함</li> <li>• F2간 형매교배를 통해 F3세대 11두(male:7, female:4)를 생산 함</li> <li>• 총 14회 자돈 91두(male: 48en, female: 43두)를 생산하였으며, 대량 생산을 위해 육종 중에 있음</li> </ul>
			<p>흑색종 모델 중대동물 상용화 생산 표준 프로토콜 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동물 새육관련 표준작업지침서 8종 확립</li> <li>• 사육시설 유지 관리 표준작업지침서 5종 확립</li> <li>• 질환모델 동물의 수의학적 관리 표준작업지침서 20종 확립</li> <li>• 질환모델 동물의 병성검사 표준작업지침서 13종 확립</li> <li>• 시험장비 운용 표준작업지침서 15종 확립</li> <li>• 사육 종사가 교육 표준작업지침서 확립</li> </ul>
			<p>흑색종 모델 중대동물의 상용화 기반 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기 구축된 실험동물 생산시설(청주BRC)에서 흑색종 모델 중대동물을 생산 중에 있음</li> <li>• 현재 흑색종 모델 질환동물 65두를 육종 중에 있음</li> <li>• 신규 동물 생산 시설(1000두 규모) 및 연구 시설을 제주도에 구축 중에 있음</li> <li>• 신규 시설 건축 진행률 30%이며 연내 완공 목표로 함</li> </ul>
아부다비 페넌지화연구센터	<p>&lt;협동&gt;</p> <p>유전자 재조합 기법을 활용한 흑색종 모델건 개발</p>	<p>RAS 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가</p>	<p>RAS 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생산된 RAS 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도</li> <li>• RAS 유전자 기반 모델 건의 병리 조직학적 검증</li> <li>• 미세바늘흡입검사 및 중앙조직에 대한 병리조직학 분석</li> </ul>
		<p>BRAF 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가</p>	<p>BRAF 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BRAF 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도 및 병리 조직학적 검증</li> </ul>
		<p>RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가</p>	<p>RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건의 체세포 구축</li> </ul>
		<p>전임상 동물 모델로의 생산라인 구축 및 상용화</p>	<p>흑색종 모델건 생산 라인 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 형질전환건 생산을 위한 분만 전/후 대리모 관리 및 산자관리 매뉴얼 확립</li> <li>• 신생 복제산자의 생존율을 높이기 위한 가이드라인 구축</li> <li>• 형질전환 복제건 생산 효율 증진을 위한 수정란 이식 방법 구축</li> </ul>
고려대학교 산학협력단	<p>&lt;위탁&gt;</p> <p>흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발</p>	<p>Ras 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가</p>	<p>Ras 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ras 모델건의 흑색종 발병 확인</li> <li>• Ras 모델돼지의 경우 영어 세포주의 부적합성 확인.</li> <li>• &lt;제1세부 및 제1협동연구&gt; 내용에 포함</li> </ul>
		<p>Braf 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가</p>	<p>Braf 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현재 4-OH-tamoxifen 처리를 하여 중앙 발생 유도 중임.</li> <li>• &lt;제1세부 및 제1협동연구&gt; 내용에 포함</li> </ul>
		<p>전임상 질환 모델건으로 모델건의 유효성 검증</p>	<p>전임상 연구를 위한 흑색종 질환 대체 동물모델 로써의 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 분석</li> <li>• 도입된 벡터 시스템 발현 유지를 모델돼지의 섬유아세포로 분석</li> <li>• Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 유래 섬유아세포를 활용한 유전자 발현 벡터 시스템의 유효성 평가</li> <li>• Cre-3NLS 추가 도입 후 유전자 재조합 확인</li> <li>• Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지모델의 유효성 평가</li> <li>• <i>In vitro</i>에서 Cre-3NLS 도입 후 하위 신호기전 활성화 검증</li> <li>• Tamoxifen을 처리하여 중앙 발생 유도중임.</li> <li>• 의도하지 않은 중앙이 발생한 개체에 대한 조직학적 분석</li> </ul>

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

##### 1차년도 연구수행 결과



### 제1 세부과제

### 충북대학교 산학협력단

최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델돼지 개발

**세부목표** : 형질전환 돼지 생산을 위한 영향인자 분석

#### 연구내용1

흑색종모델로써 최적의 품종 선발 및 공여핵원 세포주 수립

#### ▣ 효율적 질환모델세포주 수립을 위한 40일령 돼지 태아의 초대배양

- 질환모델세포주 수립 및 질환모델 돼지 생산에 있어 가장 큰 장벽은 세포노화임
- 정상 섬유아세포주에 원하는 연구자가 원하는 유전자들을 transfection시키고 항생제 selection하는 과정에서 이미 대다수 세포들은 데미지를 받게 됨
- 또한, 하나의 유전자형을 가지는 세포를 선별하고 특성분석을 위해 single colony selection 또는 FACS를 통해 sorting까지 진행하게 되면 세포의 Passage는 매우 높아짐
- Passage가 높아진 세포는 노화가 진행되어 증식속도가 현저히 떨어지며, 이를 이용하여 SCNT를 실시하게 되면 복제배반포 발달율이 현저히 떨어짐
- 따라서, 우리는 이러한 문제를 해결하기 위해 40일령의 fetal 돼지를 획득하고 Primary culture를 진행하였음
- 이렇게 수립된 porcine Fetal Fibroblast는 증식속도도 매우 빠르며 형태적으로 fresh한 특성을 보임
- 이 후, 흑색종 질환 모델 세포주 수립에는 기수립된 porcine Fetal Fibroblast 세포주를 이용함

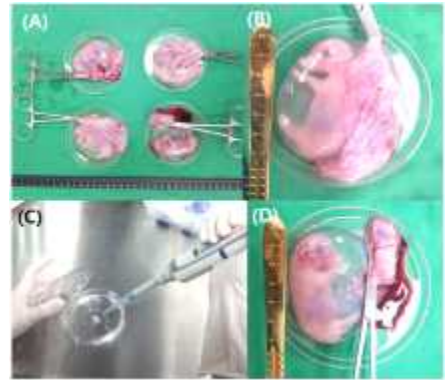


그림. Primary culture of porcine embryonic fetal fibroblasts.

#### ▣ 흑색종 특성 비교 분석을 위한 자연발생 반

##### 려견 유래 흑색종 세포주 획득

- 개는 인간과 생활환경을 공유하는 대표적인 동물로써, 설치류에 비해 인간과의 DNA 서열 및 단백질 서열 등의 유전적 거리가 가깝고 특히 자연적으로 발생하는 종양의 경우는 인체종양보다 진행속도가 빠르므로 종양연구 시간을 단축시키는데 매우 유리한 연구 모델 동물이 될 수 있음
- 특히 개에서 발병된 흑색종은 조직병리학적으로 인체종양 양상과 유사하므로 인체종양에 관한 중개 의학적 연구수단으로서의 가치가 충분함 (Hansen & Khanna, 2004, Khanna & Hunter, 2005, Paoloni & Khanna, 2008)
- 제 1세부 연구팀에서는 충북대 동물병원에 내원한 환자 (Miniature Schnauzer, 11세, ♂)의 종양 조직을 샘플링 하여 초대배양을 실시하였음. 조직 병변은 크게 상완부, 견갑부, 전완부 쪽에서 육안 상으로 확인할 수 있을 만큼 크게 나타났으며, 병변 부위의 조직을 샘플링 하여 각각 병리학적 진단



그림. 동물병원에 내원한 환자의 병변 확인.

(A) 불규칙적인 margin을 갖고 있는 과립형 mass (B) 명확한 margin을 갖고 있는 상완부 mass.

및 초대배양을 실시하였음

- H&E staining 및 IHC에 사용한 항체는 크게 2가지인데 Desmin은 근섬유아세포(Myofibroblast)에서 sarcoma로 분화될 때 발현되는 단백질이고, S100a는 desmoplastic melanoma에서 강하게 발현되는 단백질임
- 병리 진단 결과, Desmin-negative하고 S100-positive한 악성 결합조직형성 흑색종 (Desmoplastic melanoma)으로 진단되었음
- 이는 매우 희귀한 피부암 아형이고 고밀도 기질 및 특정 돌연변이가 존재하지 않지만 UV에 노출되면 매우 높은 돌연변이율을 나타내는 것이 특징인 종양임

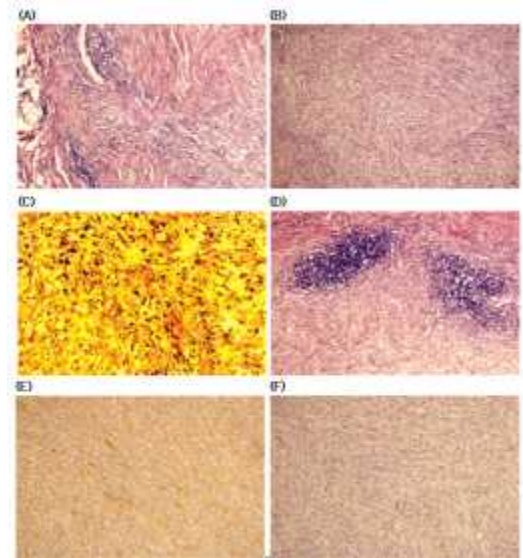


그림. 조직병리학적 진단 결과.

(A) Noncapsulated mass는 육종과 비슷한 모양으로 관찰되었으며 진피층에 침투되어 있음 (B) 섬유아세포 같은 interlacing bundle이 확인됨 (C) 일부 조직은 pigment를 함유하고 있으나 거의 관찰되지 않았음 (D) 풍부한 fibrogenous stroma를 가진 결절성 림프성 응집체가 관찰됨 (E) 산재된 형태로 염색된 S100a-positive한 사진 (F) Desmin-negative한 사진

### ※ Melanoma Primary Culture Protocol

- ① Sample를 적당한 크기로 잘라서 HBSS washing 후 Petri Dish로 옮긴다.
- ② Petri Dish에 옮겨서, HBSS를 조금 부은 다음 포셉과 블레이드를 사용해 잘게 chopping. 괴사한 조직은 제거하고 성상 별로 나눠 isolation
- ③ HBSS를 추가로 좀 더 부어준 후 조직과 함께 15ml tube로 옮긴다.
- ④ 3000rpm에 2min Centrifuge
- ⑤ HBSS 제거 후, 0.25% trypsin을 조직이 잠길 정도로 넣어준다.
- ⑥ CO<sub>2</sub> incubator에서 1h 30m ~ 2hr incubation
- ⑦ Trypsin inactivation
- ⑧ 3000rpm에 2min Centrifuge
- ⑨ 배지를 모두 뽑아낸 후 HBSS 넣고 Centrifuge (3000rpm에 2min) 2번 정도 한다.
- ⑩ DMEM+10% FBS+Anti-Anti(2x) 조건에서 배양.
- ⑪ Cell이 일정량 이상 뺏어나오면 조직제거.

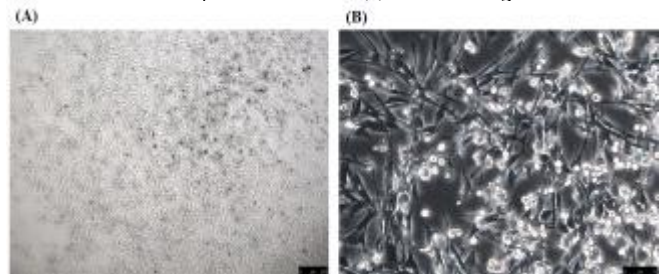


그림. 초대배양 후 관찰된 악성 흑색종 세포주 사진.

(A) 매우 활발한 세포분열능을 보이는 흑색종 세포주 모습 (X50) (B) 200배율로 확대한 모습

- 초대배양 후, 획득한 흑색종 세포주는 매우 활발히 증식하였으며 추후 PCR 및 면역염색 등을 통하여 유전자 발현 분석 및 세포주의 특성분석을 시행할 예정임
- 향후 흑색종 유도 벡터 시스템을 도입한 형질전환 돼지 또는 개 세포주와 자연 발생한 종양세포주의 표현형 비교 및 특성분석에도 유용하게 활용될 것으로 보여짐

## 연구내용2

## 흑색종모델 돼지생산을 위한 *in vitro* 배아생산기술 개선 및 검증

### ▣ VEGF 처리로 인한 *in vitro* 배아 생산 효율 증대

- 혈관내피세포성장인자 (VEGF)는 성체의 혈관 생성과정 뿐만 아니라 배아 발생 단계에서 혈관발달을 조절하는 중요한 인자임
- 특히 VEGF는 돼지의 단위생식 (Parthenogenesis) 과정에서 발생하는 apoptosis 과정을 감소시키고, MAPK signaling pathway를 활성화시켜 생식세포 성숙을 촉진하는 인자로 알려져 있음 (Yan L et al., 2012)
- 선행연구를 바탕으로 본 연구팀에서는 체외배양 배지에 VEGF 및/또는 FBS를 첨가하여 배아 발달율을 확인하였음
- VEGF 및 FBS를 체외배양 배지에 같이 첨가하였을 경우에 배아 발달률이 유의적으로 크게 향상되는 것으로 보아 (약 51%), 체외배양 배지에 VEGF 및 FBS를 같이 첨가하는 것은 *in vitro* 배아 생산 효율을 증대시킬 수 있으며 더

나아가 형질전환동물을 생산하기에 앞서, 체세포핵이식 기법으로 생산된 배아의 낮은 발달을 및 산자율을 극복하기 위한 연구에도 활용 가능할 것임

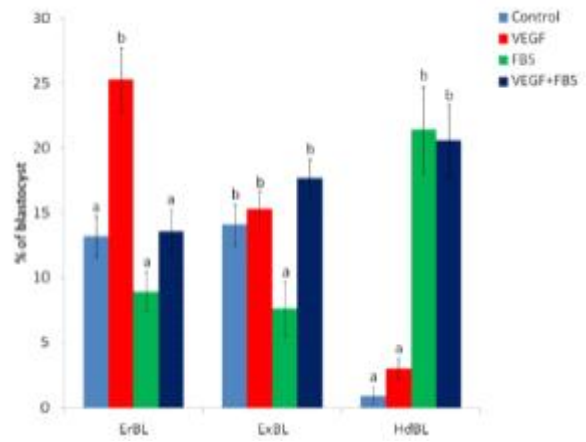


그림. 돼지의 체외수정 (IVF) 배아 발달에 있어, 체외배양 배지에 VEGF 또는 FBS, VEGF+FBS 첨가가 미치는 영향

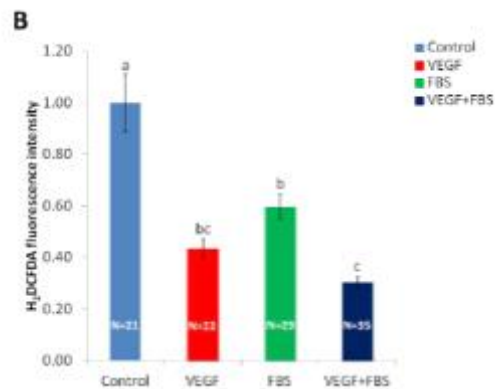
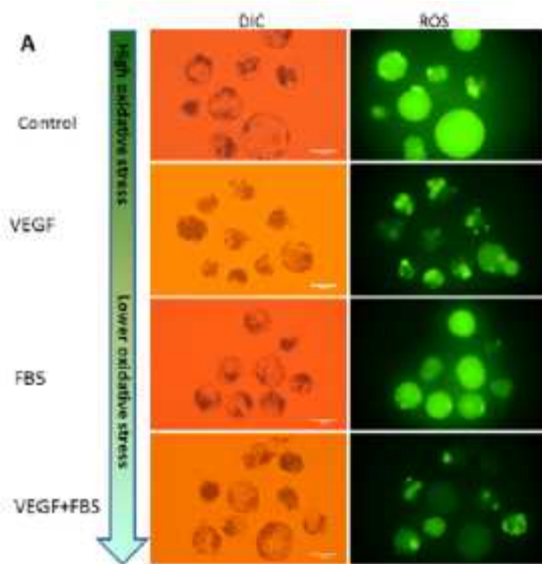


그림. 돼지 체외수정 배아의 세포질 발달에 있어, 체외배양 배지에 VEGF 또는 FBS, VEGF+FBS 첨가가 미치는 영향.

표. 돼지 배아의 체외배양 배지 (PZM-5)에 VEGF 및/또는 FBS를 첨가하였을 때의 배아 발달을 평가.

Treatment	Total oocyte culture	Cleavage (%)	Blastocyst (%) <sup>a</sup>	Average blastomere/BL
Control	355	239 (67.69 ± 3.42)	96 (28.18 ± 1.93) <sup>a</sup>	44.94 ± 2.84 <sup>a</sup>
VEGF	384	284 (73.76 ± 3.18)	164 (43.53 ± 2.03) <sup>b</sup>	61.94 ± 3.26 <sup>b</sup>
FBS	362	255 (69.27 ± 3.06)	139 (37.94 ± 1.86) <sup>b</sup>	107.89 ± 7.25 <sup>b</sup>
VEGF + FBS	383	286 (75.76 ± 3.18)	197 (51.82 ± 1.80) <sup>b</sup>	132.33 ± 6.73 <sup>b</sup>

a,b) Values with different superscripts in the same column are significantly different (p < 0.05).  
<sup>a</sup> Percentage of total oocyte cultured.

### 연구내용3

### 효율적인 흑색종모델 생산을 위한 최적의 배아이식 프로토콜 수립

#### ▣ 제 1세부 연구팀과 제 2협동 기관 간 최적의 대리모선발 및 배아이식 프로토콜 수립

- 제 1세부 연구팀과 제 2협동 기관은 흑색종 모델 생산에 앞서 최적의 대리모선발과 배아이식 프로토콜 수립을 위해, 총 3번의 SCNT 복제배아이식 수술을 실시함
- 그 중 1회를 제외한 나머지 2회에서 모두 임신이 진단되었음
- 이는 대리모 선발 및 배아이식환경 모두 최적의 상태에서 이뤄진 결과로 보여짐
- 추후 질환모델세포주가 수립되면 본 배아이식 프로토콜을 적용하여 질환모델 생산할 예정임



그림. 배아이식 수술 준비.

(A)와 (B) 대리모돈 준비 및 이식 수술 준비, (C)와 (D) 난포의 직경 측정

(A)

일차 : 2018.08.31	수컷 : SH	피: D
사육도 번호 : 56-10	체중 : 95kg	생년 : 2017-10-12 5월경
배양상태 : 배양기상	난포 크기 : 7-9mm	난포경량 : 4.5g (적당)
직접상태 : 경도 양호	비교 : 00대	
개체 : mcherry-IPSC-Chimera		임신단 배양경우 : 63M/34eor - 97 4cell / 8cell - 92
임의사항 : 직계계통 / 181008 임신확인		

(B)



(C)

일차 : 2018.10.18	수컷 : SH	피: 0
사육도 번호 : 78-54	체중 : 100kg	생년 : 2017년경
배양상태 : 배양기상	난포 크기 :	난포경량 :
직접상태 : 경도 양호	비교 : 00대	
개체 : mcherry-IPSC-Chimera		임신단 배양경우 : 11u-75 4cell/8cell -
임의사항 : 직계계통 / 대리모돈 임신 확인		

(D)

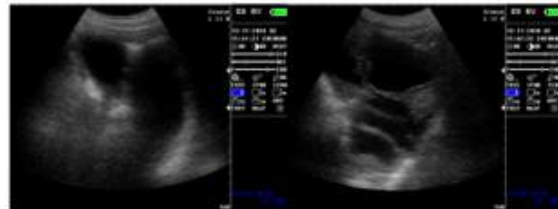


그림. 배아이식 수술 후 임신 진단된 개체 확인.

(A) 18년 08월 31일자 배아이식 수술일지, (B) 18년 08월 31일자로 임신한 개체의 초음파 사진, (C) 18년 10월 19일자 배아 이식 수술일지, (D) 18년 10월 19일자로 임신한 개체의 초음파 사진



# 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

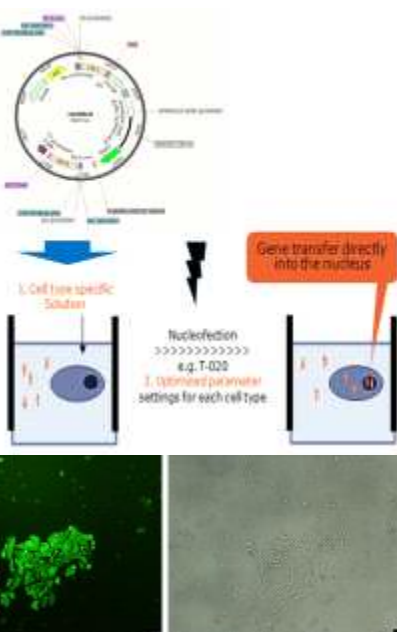
Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 *in vitro* 질환모델 구축

**세부목표** : Optogenetic-FGFr 도입 돼지세포주 개발 조건 분석을 위한 시험관내 돼지세포주에서의 광유전학 응용기반 기술 개발 및 구축

**연구내용1** 안정적인 외래 유전자 도입 및 발현을 위한 safe harbor locus targeting system 구축

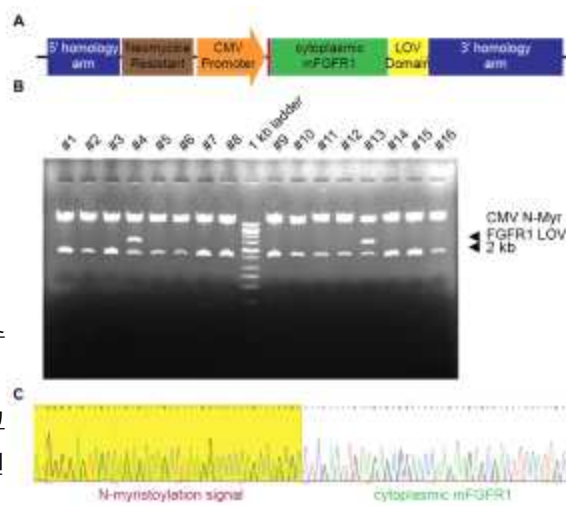
## 안정적인 외래 유전자 도입에 필요한 safe harbor locus targeting system 구축

- CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 safe harbor 지역에 삽입하기 유무를 확인하기 위해 쉽게 확인할 수 있는 형광단백질 발현 유전자를 도입함
- Transfection의 효율을 극대화시키기 위하여 Nucleofection 기법을 도입함
- Safe harbor 지역에 형광단백질 유전자를 포함하고 있는 카세트가 세포주의 염색체에 삽입이 되면 GFP 단백질이 발현되는 것을 통하여 쉽게 확인할 수 있음
- 선행연구의 결과, 인간세포의 safe harbor 지역과 돼지세포에서의 safe harbor 지역에는 차이가 있는 것을 확인함. 돼지세포에 적용이 가능한 safe harbor 지역인 ROSA26 locus를 선별



## 돼지세포에 적용 가능한 safe harbor locus target 벡터 시스템 제작

- Optogenetic module을 돼지 세포의 pROSA26 지역에 삽입하기 위한 homologous arm sequence 확보
- Optogenetic module은 kncok-in 세포주를 쉽게 선별하기 위하여 항생제 저항 유전자를 포함하였으며, 지속적인 발현을 유도에 필요한 CMV promoter를 도입하였음. 그리고 FGF signaling pathway를 활성화시키기 위한 광활성 유발인자인 LOV 도메인과 FGF 수용체를 사용하여 하위 신호전달 체계를 조절할 수 있도록 제작하였음
- pROSA26 서열 사이에 Optogenetic module을 삽입시키고 이를 확인하기 위하여 제한효소로 DNA를 절단 후 삽입된 크기의 밴드 유무를 확인후 DNA 서열을 통하여 벡터 시스템이 제작되었는지를 최종 확인하였음



**연구내용2**

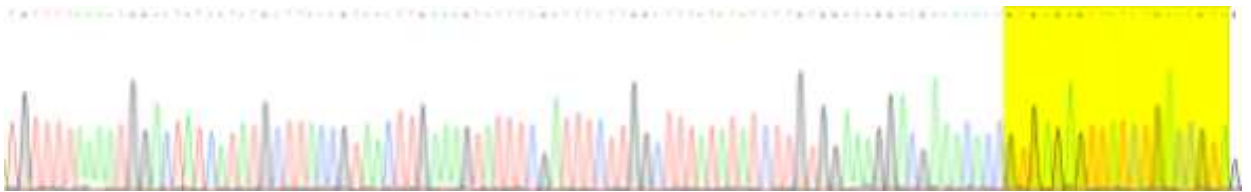
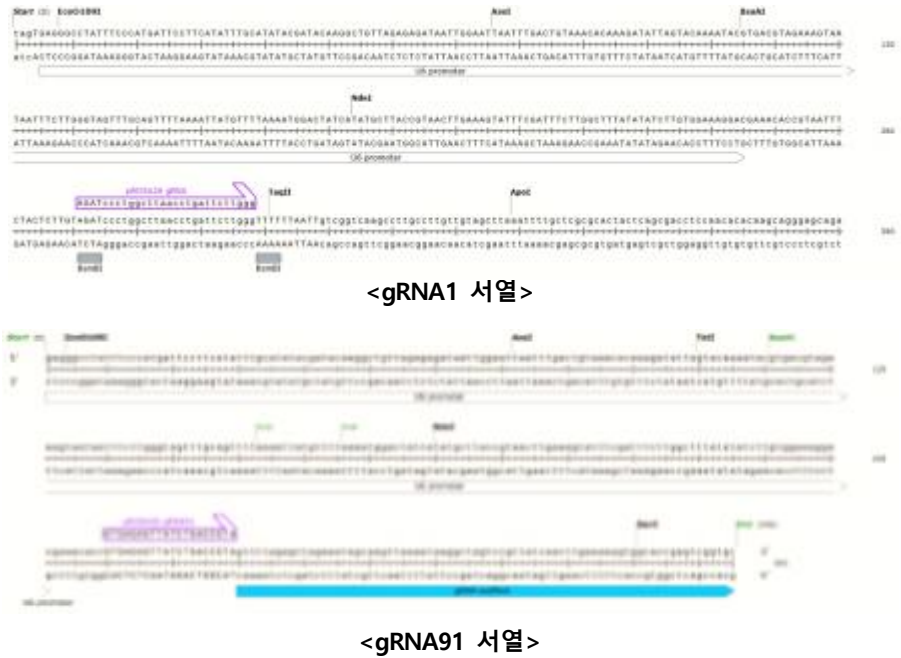
Homologous recombination 효율 및 적합성 검증

## Homologous recombination을 유도하기 위한 guide RNA 제작

- Homologous recombination을 유도하기 위해서는 세포주의 DNA 절단이 필요한데 이를 유도하기 위하여

guide RNA가 필요함

- guide RNA는 단백질이 아닌 RNA 자체가 기능을 가지고 있는 메카니즘으로써 U6 promoter에 의해서 전사가 유도되어야 함
- 또한, 선행연구의 결과, guide RNA는 다른 자리 절단과 같은 부작용을 가지고 있기 때문에 검증된 guide RNA를 사용하기 위해서 2가지의 서로 다른 guide RNA를 제작하였음



**연구내용3**    **Optogenetic-FGFR 유도 흑색종유발 삼입체개발 및 시스템도입 공여세포주 확립**

**■ 모델 돼지 세포에서 Optogenetic FGFR 유도를 위한 공여세포주 확립**

- Optogenetic module 을 삽입할 공여세포주를 확립하기 위하여 smooth muscle cell을 사용하여 줄기세포를 유도하였음
- FGF signaling pathway 활성이 줄기세포의 유지에서 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 줄기세포의 확립이 중요

**■ Porcine iPS 세포주 수립**

- Porcine smooth muscle cell에 genomic DNA integration이 일어나지 않는 sendai virus를 이용하여 Porcine iPS 세포를 유도함
- Porcine iPS 세포를 유도한 이후 분화능을 유지하기 위한 culture condition을 확립하였음

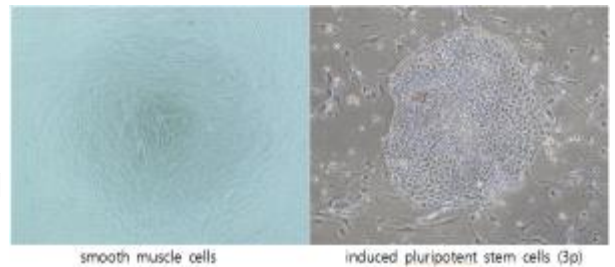


그림. 기수립된 Porcine iPS 세포주.



## 제2 협동과제

(주)크로넥스

전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축

**세부목표 : 흑색종 모델돼지 개발을 위한 품종선발 및 생산 기반 구축**

**연구내용1** 흑색종모델 돼지 생산을 위한 대리모의 체계적 공급을 위한 프로토콜 확립

### ▣ 흑색종모델 돼지 생산을 위한 대리모 관리 시설 구축

- 제주 축산진흥원 및 영농법인 해피팜스와 대리모돈 공급 계약 체결을 통하여 우수한 대리모돈의 대량 확보 시스템 구축
- 크로넥스(주)의 사양관리 프로그램을 통한 대리모돈을 그룹관리 체계 구축
- 개체별 체형 확인 및 등지방 측정, 지제 및 발굽 확인, 발정 횟수 기록 등 체계적 관리 시스템을 통하여 안정된 대리모돈 공급 라인 조성
- 크로넥스(주) 자체 생산 라인을 통하여 상시 40두 가량을 대리모돈으로 사용 가능한 안정된 대리모돈 공급 라인 조성 및 관리 체계 구축함
- 형질전환 돼지 생산을 위한 최적의 후보돈 선발을 위하여 일령, 체중 및 발정 시기 및 지제 확인을 통하여 최적의 대리모돈 선발에 필요한 정보를 수집하고 이를 통해 우수한 개체를 선별하여 수정란 이식 및 임신 진단 판단까지 사양 관리하는 시스템 구축

**연구내용2** 질환돼지모델 돼지 생산을 위한 대리모 선발 프로토콜 확립 및 사양기법 개선

### ▣ 후보돈 선발을 위한 체계적 자돈 생산 시스템 구축

- 형질전환 된 수정란 이식을 하기 위한 대리모돈의 선발은 자돈이 태어나는 시기에 생시 체중이 높고, 활동성이 강한 강건한 자돈을 1차 선발하였으며, 이유시에는 이유체중이 높고 체형이 좋은 개체들을 2차 선발함
- 자돈들을 비육구간까지의 생산성을 비교하여 후보 돈 선발에서 중요한 생산성, 등지방, 지제 등을 확인하여 대리모로 사용할 수 있게 3차 선발하여 대리모돈으로 공급하는 시스템을 구축함

### ▣ 대리모돈 관리시스템 구축

- 형질전환 돼지를 위한 대리모돈 선발은 후보돈이 40~50kg 정도 약 6개월령에 도달한 시점에 선발하여 등지방 두께, 발정횟수, 외음부 및 지제 확인 후 70~80kg 10~12개월령까지 사료 급여량 조절과 체형관리를 통해 대리모돈으로써 적합한 상태로 사양하며 형질전환 돼지 생산용 대리모돈으로 체계적인 공급하는 시스템을 구축
- 형질전환 자돈 사양관리 시스템 개발, 형질 전환 암수 개체의 번식 및 계대생산 시스템 구축



대리모돈 선발을 위한 자돈 관리 체계 구축



후보 대리모돈 그룹관리 및 사양 관리 체계 구축

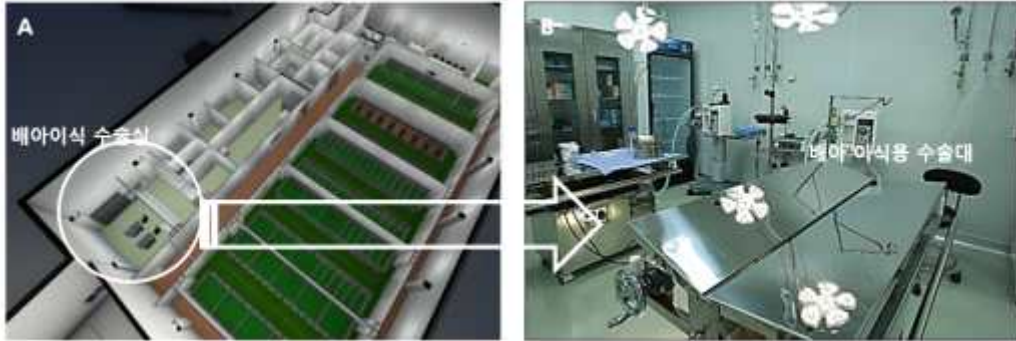


### 연구내용3

### 흑색종모델 돼지생산을 위한 배아이식 프로토콜 최적화 및 배아이식 기반 시설 구축

#### 배아이식 기반 시설 구축 완료

- 형질전환 수정란 이식을 위한 배아이식 수술 공간 및 기타 제반 시설을 크로넥스(주) 실험동물 생산 시설 내에 구축함



#### 배아이식 프로토콜 확립 및 최적화



배아이식 이식 프로토콜 최적화

임신 진단 초음파 결과

#### 배아이식 시행 결과 및 임신 진단 결과

No.	Data	Recipient	Ovary Status	Donor cells	No. of transferred embryos (NT+PA)	Pregnancy			Delivery (114d)	Pregnancy kit test	Ultrasound test
						27-29d	34-35d	60d			
1	04.27	#D5-6	Pre-ovulation	V4-male	284 (200+84)	05.23 +	05.31 +	06.25 +	08.18		
2	05.04	#S12-5	Mid-ovulation	V4-male	237 (149+88)	05.24 + 05.31 -	06.07 -	07.02 -	08.25		
3	05.11	#A7-1	Post-ovulation	V4-male	247 (173+74)	06.07 +	06.14 +	07.09 +	09.01		
4	05.18	#5-F	Mid-ovulation	V4-male	362 (236+126)	06.14 +	06.21 +	07.16 +	09.08		
5	06.01	#A11-5	Post-ovulation	V4-female	229 (157+72)	06.27 +	07.05 +	07.30 +	09.22		
6	06.08	#J4-19	Post-ovulation	V4-female	425 (144+281)	07.05 +	07.12	08.06	10.05		
7	06.15	#J33-5	Post-ovulation	V4-female	402 (163+239)	07.12	07.19	08.13	10.12		



# 제1 협동과제

## 아부다비 생명공학연구원

### 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발

**세부목표 : 흑색종 모델건 생산을 위한 체세포 형질전환 기법 및 체세포 핵이식 기법의 최적화 조건 확립**

#### 연구내용1

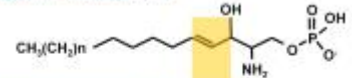
유전자가 도입된 세포주를 공여핵원 사용시 체세포 복제 효율 저하 분석

#### ▣ Phytosphingosin-1-phosphate (P1P)의 난모세포의 체외 성숙 효율 향상 효과 분석

##### a. P1P의 구조

- 개과 동물의 난자는 얻기도 쉽지 않고, 난소에서 분리해내서 실험실에 배양하더라도 성숙상태로 가져가기 위한 체외 배양기법이 확립되어 있지 않음.
- 따라서, 타 동물에서 활용되는 다양한 인자를 통해서 개 난자의 체외 성숙 방법을 찾고자하고 그 대안으로 P1P라는 물질을 첨가함으로써 체외 성숙 효율을 증진코자 함.
- 잠재적으로 IVP에 영향을 미칠 수 있는 다양한 생물학적 활성 화합물 중 우리는 생물 활성 지질 매개체 인 phytosphingosine 1- 인산염 (P1P; PhS1P)에 관심을 집중됨.
- 이는 식물에서 풍부하게 관찰되고 동물에서는 더 적은 인산화 된 형태의 Phytosphingosine.
- 최근 P1P는 대량 생산이 가능하고, 비용이 절감되며, 용해도가 증가 할 수 있는 기술이 발전함으로써 화장품의 물질로 관심이 고조됨.
- P1P는 구조적 및 기능적으로 아날로그 스프링 고신 1- 인산염 (S1P)과 많은 유사점을 공유합니다. P1P (PhS1P, Phytosphingosine1-phosphate)와 DhS1P (dihydroshingosine1-phosphate)의 두 가지 천연 S1P 유사체가 존재함.
- P1P는 스프링고이드 긴 사슬 염기에 존재하는 C-4의 추가적인 수산기를 제외하고는 DH-S1P와 유사한 구조를 가지고 있음.
- 이 구조적 유사성 때문에 P1P는 이전에 S1P 수용체, G- 단백질 결합 수용체의 계열과 상호 작용하는 것으로 나타남.
- 특히 S1P가 5 개의 S1PR1-5 모두에 결합하는 반면, P1P는 특히 S1PR1과 S1PR4에 더 높은 친화성을 갖는 모든 S1P 수용체에 결합함.

a. Shingosine-1-Phosphate



b. Dihydro-shingosine-1-Phosphate



c. Phyto-shingosine-1-Phosphate

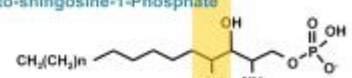


그림. S1P, DhS1P와 P1P의 구조

##### b. P1P의 기능

- 일반적으로 S1P 시그널링은 phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), mitogen-activated protein kinase (MAPK) / 세포 외 신호 조절 키나아제 (ERK), 단백질 키나아제 C (PKC) 경로의 조합적 활성화를 통해, S1P는 다양한 생물학적 맥락에서 다른 기능을 수행함.
- 세포 사멸과 생존에서, S1P는 anti-apoptotic gene Bcl-2와 Mcl1 transcript level을 증가시키는 반면, pro-apoptotic Bad와 Bax 단백질은 down-regulation함.
- S1P와 마찬가지로 P1P는 세포 증식, 이동 및 수용체에 대한 제한이 있음에도 불구하고 OS 유도 손상의 억제에도 유사한 효과를 보임.
- 이전의 연구들은 P1P가 Akt와 JNK를 조절함으로써 OS에 의해 유발 된 세포 성장 정지를 약화시키고 p38 키나아제와 PI3K를 조절하여 주화성 이동을 자극하며 ERK 매개 경로를 통해 연골 세포 증식을 촉진한다는 것을 보여줌.

##### c. P1P의 생식기관에서 역할

- 인간에서 난포액 내 S1P의 농도는 임신 결과와 양의 상관 관계가 있으며, 마우스 및 쥐에서는 S1P가

화학 요법 및 방사선 요법과 같은 외부 자극으로부터 얻은 손상으로부터 난소를 보호.

- S1P 수용체가 없는 경우, 배아 혈관 신생에 대한 S1P 수용체의 역할을 나타내는 부분적인 배아의 치사율과 혈관 이상이 생쥐에서 발견됨.
- 시험 관내에서 난 모세포 성숙에 대한 S1P의 작용을 시험하기 위한 모델로서, 다양한 연구가 S1P의 다양한 농도에 의해 보충된 IVM을 수행함.
- 쥐 및 돼지 연구에서 S1P 처리는 배설률을 향상시키고 배반포 세포 사멸을 예방함으로써 발달 능력을 부분적으로 증가.
- 소에서, S1P는 IVM 동안 열 충격에 노출된 난 모세포의 생존과 난 모세포 능력을 향상.
- 분자 연구에 의하면 S1P의 anti-apoptotic 효과는 PI3K/Akt pathway의 인산화에 의한 육아종 세포의 OS 유도성 세포 사멸 억제.
- 세포 증식, 분화 및 항세포 사멸에 일반적으로 관여하는 PI3K/Akt 경로를 활성화시키는 수많은 다른 물질이 존재.
- 상피 세포 성장 인자 (EGF)와 같은 P1P / S1P와 PI3K 촉진 성장 인자 사이의 상관 관계는 비생식계에서 특징적으로 나타남.
- 섬유아세포에서 P1P는 p-Akt 및 p-ERK 활성화를 통한 EGF와의 상승적인 관계를 나타내며 상처 치유와 세포 증식을 촉진.
- 혈관 평활근에서는 S1P가 상피 세포 성장 인자 수용체 (EGFR)의 발현을 촉진 시키나 [39], 위암 세포에서는 S1P가 EGFR의 활성화 인자 인 EGF의 방출을 유도.
- EGF는 종적 확대 및 관련 매개 변수에 영향을 줌으로써 감퇴 재개를 부분적으로 개선하기 위해 재생산에서 잘 연구된 요소이므로 EGF와 P1P 사이의 상승 관계의 검증이 필요.
- S1P 매개시그널링에 대한 지식의 진보에도 불구하고, S1P의 아날로그 P1P의 효과를 조사하는 연구가 부족함.

#### d. 난구 세포 및 난모세포에서 S1P 수용체의 발현

- 이전의 연구들은 P1P의 효과가 세포 표면에 존재하는 S1P 수용체에 결합함으로써 조정된다는 것을 보여줌.
- 돼지 meiotic resumption에 대한 P1P의 효과를 조사하기 전에, 난구세포 및 난모세포에서 S1P 수용체 S1PR1-4의 유전자 발현이 확인.
- 돼지의 게놈에있는 4 개의 S1PR1-4 유전자가 모두 PCR에 의해 확인.
- S1PR1-4 RNA 전 사체의 존재 여부를 추가로 시험하기 위해 적혈구와 난모세포에서 RT-PCR을 수행.
- P1P 수용체 중 S1PR2와 S1PR3 전 사체는 난구 세포와 난모세포 모두에서 발현되었으며, S1PR1은 난구 세포에서만 발현되었으며 난모세포에서는 발현되지 않음.
- S1PR4는 난구 세포나 난모세포에서 발현되지 않음
- 이와 같이, P1P 수용체 S1PR1-3의 존재가 확인되어, P1P가 시험 관내에서 돼지 난모세포의 성숙에 영향을 줄 수 있다는 가설이 형성됨.
- 돼지 난 모세포 감수 분열에 대한 P1P의 잠재적 효과를 시험하기 위해, IVP 동안 다양한 농도의 P1P가 보충되었고, 난 모세포는 IVM 후 핵 단계에 대해 평가함.
- 1000 nM (1 μM) 군의 MII stage oocytes의 비율은 대조군, 10nM 및 50nM 군의 MII 속도보다 유의하게 높음 (P < 0.05).
- 대조적으로, 100 nM과 1000 nM P1P 그룹 사이의 MII 속도에서 유의한 차이는 발견되지 않음 (표 2).
- 더 높은 농도가 감퇴 성 성숙에 더 유의한 효과를 가질 수 있는지를 조사하기 위해, 5 μM P1P의

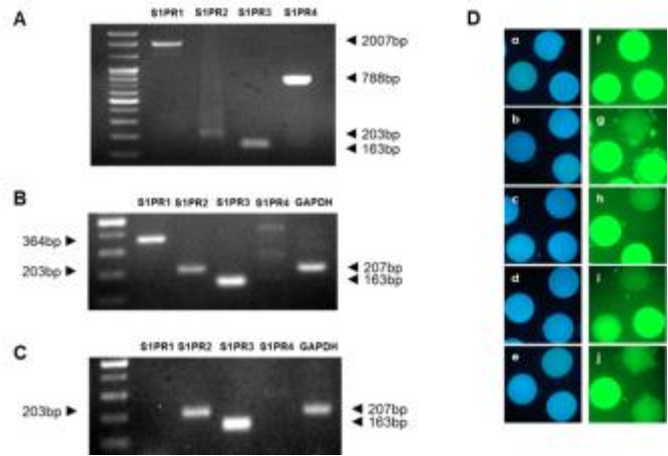


그림. 성숙 난구 세포 및 난 모세포에서의 P1P 수용체 (S1PR1-R4) 유전자 발현의 동정. 적혈구 및 난 모세포에서의 (A) 게놈 DNA (gDNA) 및 (B, C) 상보적 DNA (cDNA) 중합 효소 연쇄 반응 분석

효과를 추가적으로 시험함.

- 1 $\mu$ M P1P와 달리, 5 $\mu$ M P1P의 보충은 비 처리 대조군에 비해 감수 분열 성숙을 유의 적으로 개선하지 못함.
- 테스트 농도에서, 100nM ~ 1000nPP 보충은 감수 분해 성숙을 촉진하는데 가장 유익한 효과를 나타냄.

**표 2. 돼지 난모세포의 핵 성숙에 대한 P1P 처리의 효과**

P1P concentration (nM)	No. of oocytes cultured for IVM(4)*	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	GVBD	MI	AI/TI	MII
0	195	51 (26.2 $\pm$ 6.1)b	2 (1 $\pm$ 0.6)	12 (6.2 $\pm$ 2.7)	5 (2.6 $\pm$ 0.5)	125 (64.1 $\pm$ 4.8)a
10	188	33 (17.6 $\pm$ 1.2)b	4 (2.1 $\pm$ 0.9)	18 (9.7 $\pm$ 1.5)	2 (1.1 $\pm$ 0.6)	131 (69.5 $\pm$ 3.4)a
50	192	33 (17.3 $\pm$ 2.7)b	2 (1.1 $\pm$ 1.1)	21 (10.9 $\pm$ 3.3)	4 (2.1 $\pm$ 0.9)	132 (68.6 $\pm$ 5.1)a
100	187	28 (15.1 $\pm$ 3.4)a,b	10 (1.1 $\pm$ 0.6)	10 (5.4 $\pm$ 2.2)	2 (1.0 $\pm$ 1.0)	145 (77.3 $\pm$ 5.4)a,b
1000	193	13 (5.1 $\pm$ 2.0)a	0 (0.0)	11 (5.7 $\pm$ 1.3)	3 (1.6 $\pm$ 0.5)	166 (86.0 $\pm$ 1.1)b

The data are mean $\pm$ SEM

\*Replication number

a,bValues with different superscripts within a column differ significantly(p<0.05)

Abbreviation: AI/TI, anaphase I/telophase I; GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; M I, metaphasel; M II, metaphase II

- 돼지 난모세포의 감수 분해 성숙에 대한 P1P의 효과는 우리가 위에서 관찰된 효과에 책임이 있는 분자 경로의 특성을 더욱 밝히도록 자극.
- 이전 연구에서 섬유아세포 세포에 중요한 분자 경로에서 EGF 및 P1P와 같은 성장 인자의 상승 작용이 보고됨.
- IVM에서의 EGF의 광범위한 사용을 고려하여 우리는 감수 분열의 존재 또는 부재 하에서 P1P의 효과를 실험함으로써 EGF와의 상승 효과에 기인하여 감수 분열 및 성숙에서의 P1P의 효과가 부분적으로 있는지 조사함.
- EGF의 존재 하에서, MII 속도는 이전에 증명된 바와 같이 1 $\mu$ M P1P가 보충되었을 때 상당히 더 높음.
- 대조적으로, P1P 보충은 EGF가없는 경우 감수 분열 성숙에 유의한 영향을 미치지 않음 (표 3).
- 종합하여, 이러한 관찰은 감퇴 성 성숙 촉진에 대한 P1P의 효과가 부분적으로 EGF와의 상승적 관계에 달려 있음을 시사함.

**표 3. 핵 성숙에 대한 EGF 부재에 따른 IVM 동안의 P1P 치료 효과**

P1P concentration (nM)	No. of oocytes cultured for IVM(4)*	No. (%) of oocytes at the stage of					
		GV	GVBD	MI	AI/TI	MII	
EGF(-)	0	41 (15.4 $\pm$ 1.9)	2 (0.8 $\pm$ 0.4)	35 (12.9 $\pm$ 1.6)c	6 (2.2 $\pm$ 0.8)	183 (68.7 $\pm$ 2.0)a	
	1	268	31 (11.3 $\pm$ 3.9)	1 (0.3 $\pm$ 0.3)	29 (11.1 $\pm$ 2.1)b,c	3 (1.1 $\pm$ 0.7)	204 (76.2 $\pm$ 2.5)a,b
EGF(+)	0	265	35 (12.8 $\pm$ 7.6)	0 (0.0)	21 (8.0 $\pm$ 1.0)a,b	4 (1.5 $\pm$ 0.7)	205 (77.6 $\pm$ 3.3)b
	1	268	18 (6.6 $\pm$ 1.7)	0 (0.0)	16 (5.8 $\pm$ 0.9)a	1 (0.4 $\pm$ 0.4)	233 (87.2 $\pm$ 2.5)c

The data are mean $\pm$ SEM, \*Replication number

a,bValues with different superscripts within a column differ significantly(p<0.05)

Abbreviation: AI/TI, anaphase I/telophase I; GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; M I, metaphasel; M II, metaphase II

- 핵 성숙 외에도, 난모세포 성숙을 평가할 때 고려해야 할 또 다른 중요한 요소는 세포질의 능력임.
- 세포 내 ROS 및 GSH 수준은 일반적으로 세포 증식 및 사망에 영향을 미치는 OS를 평가하기 위한 매개 변수로 연구되어옴.
- 우리는 IVM 동안 P1P의 다양한 농도로 치료 MII oocyte 그룹의 세포 내 GSH와 ROS 수준을 특징.
- 도 3에서, 난모세포의 GSH 수준은 대조군과 치료군간에 유의 한 차이를 나타내지 않음 (P <0.05).
- 이와 대조적으로 ROS 수준은 용량 의존적으로 감소함.
- 100 nM과 1000 nM P1P 처리구에서 난모세포의 세포 내 ROS 수준은 대조군에 비해 유의하게 감소 (P > 0.05).
- 이러한 결과는 P1P 보충이 GSH 수준과 무관하게 메커니즘에 의해 IVM 동안 돼지 난모세포의 ROS 수준을 감소 시킨다는 것을 제안함.

■ 태아 섬유아세포 확보 6주 확보, 자견 섬유아세포 3주 확보

a. 태아세포 확보

- 태아 섬유아세포는 체세포 복제에 공여핵원으로 사용되어옴.
- 유전자를 삽입하려면 몇 번의 계대 배양을 통해 유전자가 삽입된 컬러니의 선발과정이 필수적인데, 체세포의 짧은 수명은 선발 과정 중에 자연적인 노화를 유발하게 됨.
- 노화된 체세포는 개복제 효율을 저하 시킴.
- 이번 멜라노마 모델건 생산을 위해서는 복합적인 유전자가 삽입되어야 함으로 더 강도 높은 선발이 필수 불가결한 상황.
- 위탁 연구기관인 고려대학교에서 확립한 964CAG-LGL-DSH가 삽입된 세포주를 이용해 복제 배아를 작성하고 대리모에 이식함.
- 243개의 복제 배아를 만들고 총 16마리의 대리모에 이식함.
- 그 중 7마리의 대리모가 임신하였고 임신율은 43.8%로 9개의 임신낭이 초음파 상으로 확인됨 ( 표 4).

표 4. 태아 회수를 위해 수행된 복제란 이식 횟수

No. of transferred fused embryo	No. of embryo transfer	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of sac	Cloning efficiency (%)
243	16	7	43.8	9	3.7

- 현재 3두의 대리모 (HD7634, AS4331, AS4342)는 만기 출산까지 유지하여 2018년 12월 초에 출산 예정 ( 표 5).
- 건강하게 태어나 복제자견으로부터 섬유아세포를 확립하는 작업을 수행할 예정.

표 5. 공여핵원 확보를 위한 964CAG-LGL-DSH 복제 태아 회수

No.	이식일	Surrogate ID	Nulliparous/Multiparous	Fused emb.	ET emb.	P/D Result	No. of sac	태아 회수 일령
1	2018-10-02	HD7636	M	12	42	(+)	1	30
2	2018-10-02	AS4319	M	16	41	(+)	1	30
3	2018-10-04	AS4299	N	21	52	(-)	-	-
4	2018-10-04	HD7634	M	18	47	(+)	1	-
5	2018-10-05	AS4360	M	15	46	(-)	-	-
6	2018-10-06	AS4331	M	18	52	(+)	1	-
7	2018-10-08	AS4342	M	19	53	(+)	1	-
8	2018-10-08	AS4326	N	22	59	(-)	-	-
9	2018-10-10	HD7625	M	15	52	(-)	-	-
10	2018-10-10	AS4350	M	19	50	(+)	1	30
11	2018-10-11	HD7642	M	17	51	(-)	-	-
12	2018-10-11	HD7643	M	14	48	(-)	-	-
13	2018-10-12	HD7644	M	8	38	(-)	-	-
14	2018-10-12	HD7645	M	17	40	(-)	-	-
15	2018-10-13	AS4372	N	16	43	(+)	3	30
16	2018-10-13	AS4374	M	8	31	(-)	-	-

- 그 외에 HD7636, AS4319, AS4350, AS4372는 임신 중기에 외과적으로 태아를 회수함

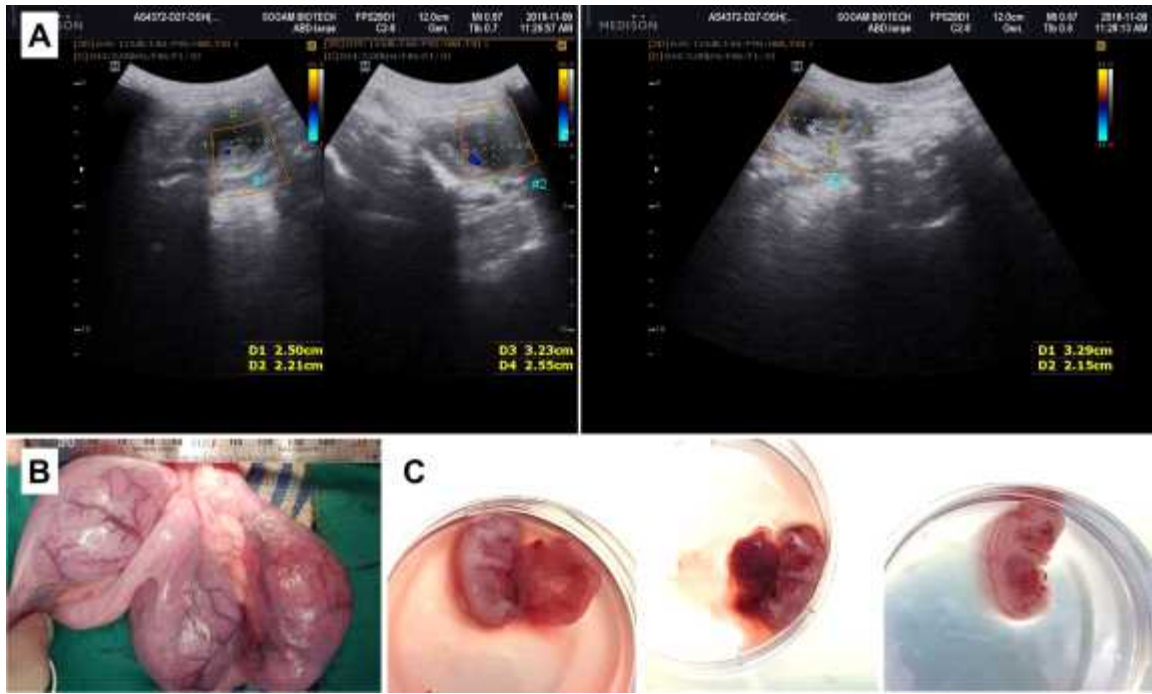


그림. 2018년 10월 13일에 이식된 AS4372대리모의 초음파 영상 (A); 3개의 임신낭을 확인 (B) 30일령에 태아를 회수하기 위해 외과적 접근, 3개의 임신낭이 있는 임신 자궁, (C)각 회수된 태아.

## 연구내용3

## 모델견 복제에 외과적 난자획득과 이식 방법 개선

### ▣ 체세포 복제된 중형견종에서 초음파로 태아 계측

#### a. 초음파 태아 계측의 필요성

- 개 복제의 경우, 초기 임신 진단은 복제 성공 여부를 확인하는 중요한 단계이며 태아계측을 통한 발달 상태를 평가하는 것이 중요.
- 개 복제에 관한 많은 연구 보고에도 불구하고 복제된 배아가 대리모에 이식된 후, 태아 어떻게 발달되는지에 관한 정보는 거의 없음.
- 초음파 검사는 임신 진단 및 태아 발달 모니터링에 유용하고 비침습적인 기술임.
- 정상 임신에서 초음파 검사의 특징은 임신 단계에 의해 확인된다는 것이 증명됨.
- 재태 연령이 알려진 태아의 생존력과 임신 유지는 이러한 기술로 결정됨.
- 임신 초기의 임신 주머니의 내부 융모막 직경(ICC)과 임신 후기의 양측 지름(BP)은 임신 주 산기 평가에 임상적으로 유용한 정보를 제공함.
- 복제 개에서는 임신 이래로 재태 연령을 정확하게 산정 할 수 있기 때문에 복제 배아가 대리모의 자궁에서 발생하는지 여부를 결정하기위한 이전 공식을 통해 지표로 사용가능.

#### b. 개번식 생리의 특징

- 개과 동물의 경우 수정시기의 모호한시기 때문에 분만 기일을 정확하게 예측이 쉽지 않음.
- 개과 동물은 난자가 배란후 상태로 성숙되기까지 2 ~ 3일이 걸림.
- 정자는이 기간 동안 암컷 생식 기관에서 운동성을 유지할 수있음.
- 배란과 수정 사이에는 상당한 시간 차이가 있을 수 있으며,이 종에서 임신의 시작을 결정하기가 어려움.
- 그럼에도 불구하고 많은 수의사가 임신 기간 중 초음파로 얻은 태아의 해부학 적 구조에 따라 출산 일을 결정하고자 함.
- 대규모 품종의 경우 예측된 분만 날짜를 계산하기위한 몇 가지 공식이 제안됨.
- Milani의 수식과 Gropetti의 수식이 품종 특정 회귀선은 각각 7 건의 임신과 40 건의 임신에서 도출됨.
- Luvoni와 Grioni의 공식의 수정 된 버전인 비특이적 다중 품종은 대형 품종 개에 적용될 수 있음.
- 또한, 자궁과 태아의 초음파 측정을 사용하면 효과적인 산과적 치료 및 태아 집중 치료가 가능함.

**c. 복제 동물에서 태아계측이 가지는 의미**

- 복제는 여러 동물은 초기 임신 실패율은 높음.
- 소의 초기 임신 부작용은 부적절한 혈관 형성을 포함한 태반 발달 합병증과 관련이 있으며, 후기 태아 사망은 hydrallantois, 요관 영양액의 과도한 축적 및 체액 조성의 비정상과 관련이 있음.
- Hydrorallantois와 요 막액의 이상뿐만 아니라 태반 증식과 출생 체중 증가는 세 번째 임신과 태아 사망과 관련이 있음.
- 과메틸화와 hypo-methylation 모두 관찰되었으며, 이것은 SCNT 임신에서 발달 장애와 상대적으로 낮은 출생률의 주요 요인으로 여겨지고 있음.
- SCNT 이후에 관찰 된 메틸화 패턴의 큰 변화는 많은 요인들로 인해 세포 재프로그램에서 상당한 정도의 가변성을 나타냄.
- 메틸화 패턴이 hydrallantois 또는 placentomegaly와 관련이 있는지는 아직 알려지지 않았음.
- 태아의 크기와 다른 관찰에 관여하는 메틸화된 유전자가 관여함.

**d. 복제견에서 태아계측**

- 지금까지 개과 동물의 복제 태아의 건전성과 생존력을 평가하기 위한 프로토콜은 아직 확립되지 않음.
- 다른 산업 동물의 복제에서는 이식 전 체외 배양을 통해 포 배율을 확인하거나 임신 후 초음파를 사용하여 태아의 건강을 관찰하기 위한 많은 연구가 수행되어옴.
- 개과 동물의 보조 생식 기술에서, 체외 배양(IVC) 프로토콜의 부족은 이식 전에 배아의 건정성을 확인하는 것을 어렵게 만들.

따라서 본 연구에서는 독일 셰퍼드(GS)와 벨기에 말리노(BM)의 두 가지 세포주를 이용하여 임신율과 복제 효율을 비교함.



- 본 연구에서는 출생 체중과 출산 일과 같은 생식 매개 변수를 확인하기 위해 임신 중기의 체세포 핵 이식에서 태어난 태아의 내부 용모막 직경(ICC)을 초음파를 이용하여 평가 함.

**그림. 태어난 지 27 일 된 복제 된 개의 내부 용모 직경 (tICC 및 lICC)의 초음파 검사.** A. 이식 후 63 일째 490g으로 출산 (lICC × tICC; 35.8mm × 23.4mm). B. 이식 후 60 일째 750g으로 출산 (lICC × tICC; 45.8mm × 31.34mm). C. 이식 62 일 후 650g으로 출산(lICC × tICC; 55.4mm × 26.8mm). 해당 복제견은 출생 한 후 거대 태아증으로 폐사.

- 태아의 측정은 배아 이식 날짜에 대한 지식이 없어도 한 명의 초음파 검사자가 수행함.
- 측정은 초음파 장비에 통합 된 전자 캘리퍼스를 사용하여 검사 할 때 또는 기계 캘리퍼스를 사용.
- 임신 주머니의 태아 ICC에 근거한 세로축의 직경 (lICC로 표시)과 가로 축의 직경 (tICC) (그림).
- 각 검사에서 ICC는 trophoblastic decidual 반응의 한 쪽에서 수직으로 만든 두 개의 ICC 측정값의 평균을 취하여 결정.

**e. GS와 BM의 임신율과 복제 효율**

- 서로 다른 개체로부터 얻은 2개의 GS 유도 세포주 (TR 및 TA) 및 2개의 BM 유도 세포주 (BR 및 DI)를 체세포 핵 이식을 위한 공여 핵으로 사용함 (표 6).
- 사용된 GSD 세포주 중 1,434 개의 재구성 배아를 TR의 89 개 대리모에 이식하였고, 441 개의 재구성 배아를 TA의 28 개 대리모에 이식.
- 사용된 BMD 세포주 중 재구성 된 배아 1,765 개를 BR 118에 대한 118 명의 대리모에 이식하여 재구성 한 배아를 DI의 53 개 대리모에 이식.
- 임신율에는 유의 한 차이가 없었고 DI 세포주는 다른 세포주에 비해 높은 복제 효율을 보임.

표 6. BM과 GS에 따른 임신율과 복제 효율.

Breed	Donor cell	No. of embryos transferred	No. of surrogates	Embryo transfer		Parturition
				No. of pregnancies †		
				At mid-term (%)	To term (%)	No. of births (%) ‡
GS	TR	1434	89	23 (25.8)	17 (19.1)	23 (1.6)a
	TA	441	28	5 (17.9)	5(21.4)	6 (1.4)b
BM	BR	1765	118	25 (21.2)	25 (21.2)	31 (1.8)a
	DI	838	53	19 (35.8)	18 (34.0)	34 (4.1)c

abc Superscript designates significant difference by column (P<0.05)

† Percentage based on the number of surrogates.

‡ Percentage based on the number of embryo transferred.

† † Percentage based on the number of birth.

f. ICC의 태아 측정과 출산 일 추정

- ICC의 종축과 횡축을 측정.
- IICC는 모든 범위에서 tICC보다 상당히 깊다.
- 분만 전 약 40 일부터 복제 태아의 임신 주머니는 성장하는 태아의 길이 때문에 구형에서 난형으로 발달하기 시작.
- GS와 BM의 IICC와 tICC의 측정은 Luvoni and Grioni (2000), Milani et al. (2013), Groppetti et al. (2015) 등. tICC는 Milani와 Luvoni-Grioni 측정 사이에 있으며, IICC는 Milani 보다 모든 연령대에서 높음.
- 조기 태아 측정은 복제 된 강아지의 생년월일을 예측하는 데 사용되었습니다. tICC는이 예측 방법에 사용됨 (표 7).
- Milani 공식의 경우 GS와 BM의 예측 속도는 30 % 미만.
- Groppetti의 식을 이용하여 74.1 % ± 2 일, BM에서 Luvnoi의 식을 이용하여 63.1 % ± 2 일의 정확도로 가장 높은 예측율을 보임.

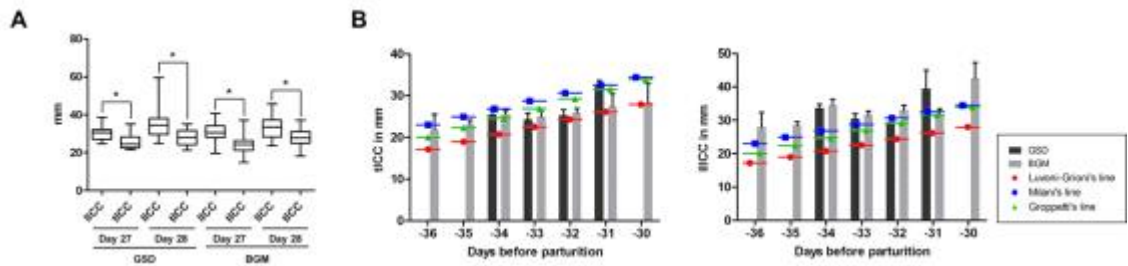


그림. IICC 및 tICC의 측정법. A. 이식 후 27 일째 및 28 일째 ICC. 별표는 유의 한 차이를 나타냄 (p <0.05). B. 임신 중기의 세 가지 태아계측에 따른 GS와 BM의 ICC.

표 7. 다른 예측 방정식에 따라 복제 된 GS 및 BM 강아지의 tICC를 사용하여 예상 출산 날짜의 정확성

Standard regression line	GS		BM	
	Accuracy/total number observed (%)		Accuracy/total number observed (%)	
	±1 day	±2 days	±1 day	±2 days
Luvoni and Grioni	10/29 (34.5)	16/29 (55.2)a	18/65 (27.7)a	39/65 (66.0)a
Milani et al.,	3/29(10.3)	8/29 (27.6)b	10/65 (15.4)b	17/65 (26.2)b
Groppetti et al.,	10/29(34.5)	23/29 (79.3)a	24/65 (36.9)a	36/65 (55.4)a

a,b,c Superscripts indicate significant differences in each column (P<0.05).

Luvoni and Grioni's formula; dpb = 45.628 - 0.556 × mm

Milani's formula; dpb = 48.121 - 0.5237 × mm

Groppetti's formula; dpb = 44.76 - 0.434 × mm

dpb; days before parturition





## 제 2 위탁과제

고려대학교 산학협력단

흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발

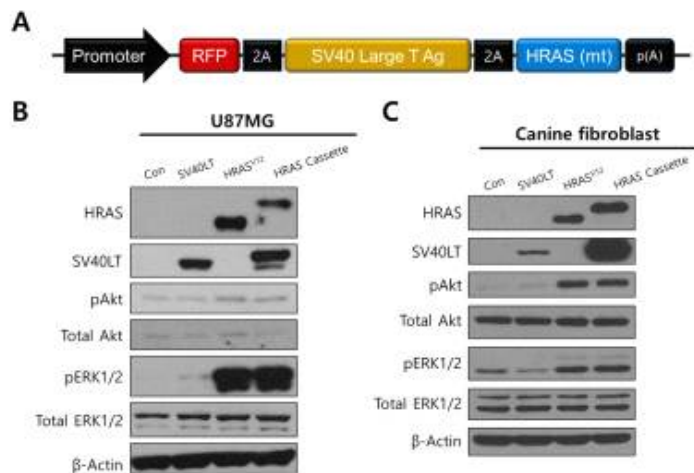
**세부목표** : 최신의 유전자 재조합 기법 적용을 통한 Ras/Braf 유전자 기반 흑색종 중대동물 형질전환 세포주를 구축하고 검증함

### 연구내용1

Ras 유전자 기반 흑색종 모델견 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가

#### ■ Ras 기반 흑색종 유발 시스템 구축 및 검증

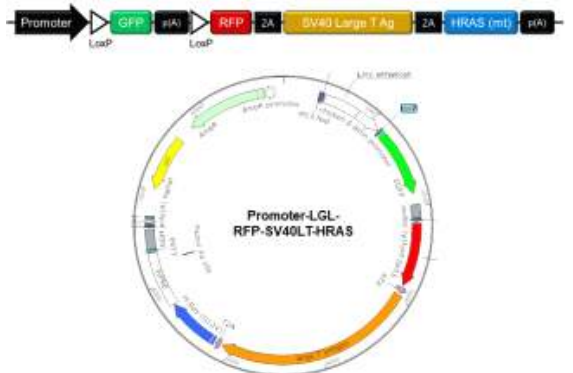
- 유전자 클로닝 기법을 이용해 효율적인 Ras 기반 흑색종 유발 시스템을 구축을 위해 2A peptide에 의한 다유전자 발현 시스템을 적용함. 시스템의 발현 유무를 확인할 수 있는 Red fluorescence protein (RFP) 유전자와 종양 억제 신호를 불활성화 하는 SV40 Large T antigen (SV40LT) 와 항시 활성화 돌연변이 HRAS 유전자를 도입한 단일 벡터를 구축하여 흑색종을 유발 시킬 수 있는 시스템을 확립함.
- 인간 암세포주인 U87MG와 개의 섬유아세포주에 Ras기반 흑색종 유발 유전자 카세트를 도입하여, 각 유전자가 발현되는지 검증하고 돌연변이 HRAS에 의해 활성화되는 AKT와 ERK1/2의 인산화 정도를 웨스턴블라팅 기법으로 검증함.



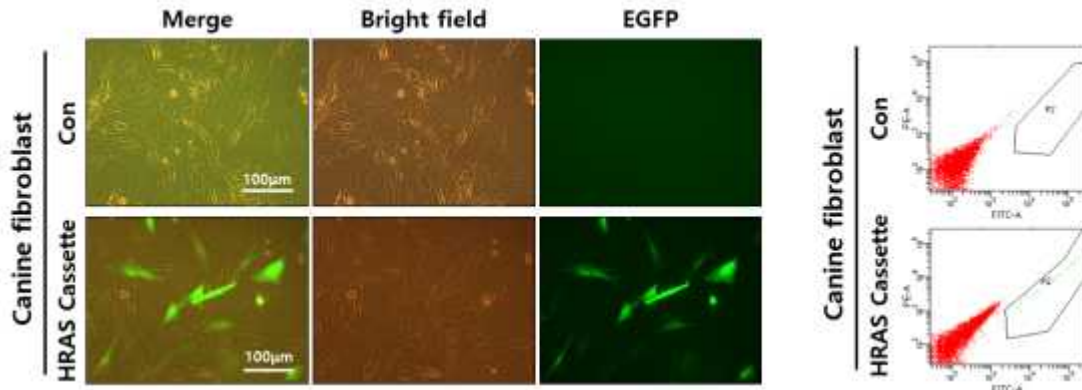
### 연구내용2

흑색종 모델견에 적용 가능한 흑색종 유도 벡터 시스템 제작

- CreER/LoxP 재조합 기술을 이용한 멜라닌 세포 특이적인 발현 조절 시스템 적용을 위해 LoxP-GFP-Stop-LoxP 서열을 발현 프로모터와 흑색종 유발 유전자 카세트 사이에 도입함. 구축된 시스템은 재조합 전에는 GFP 만을 발현하다가, Cre 재조합효소에 의해 재조합되면 2A peptide에 의해 연결된 흑색종 유발 유전자들이 발현될 수 있도록 함.

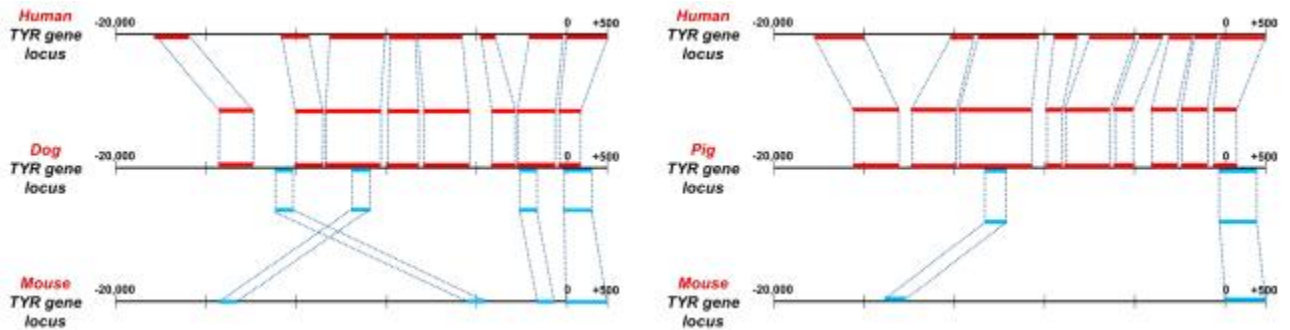


- 선행 연구를 통해, 일반적으로 빨리 세포노화가 진행되는 포유류의 정상세포들은 형질전환 유도 및 선별 과정을 오래 견디지 못하는 경향을 관찰하였음. 세포 노화가 진행된 체세포는 핵공여세포로 이용되기에는 적합하지 않음. 이에 본 연구팀은 개발한 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템을 1차적으로 도입한 개체를 체세포 핵이식 기법을 통해 구축하고자 계획하였음.
- 개발한 promoter-LGL-RFP-SV40LT-HRAS(mt) 흑색종 유발 유전자 벡터를 개의 정상섬유아세포에 도입하였음. 도입된 세포는 GFP를 발현함을 확인하였으며, 이를 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 장비를 이용해 GFP positive 한 세포를 확보함.
- 이를 제 1 협동 연구팀인 수암생명공학연구소에 전달함.

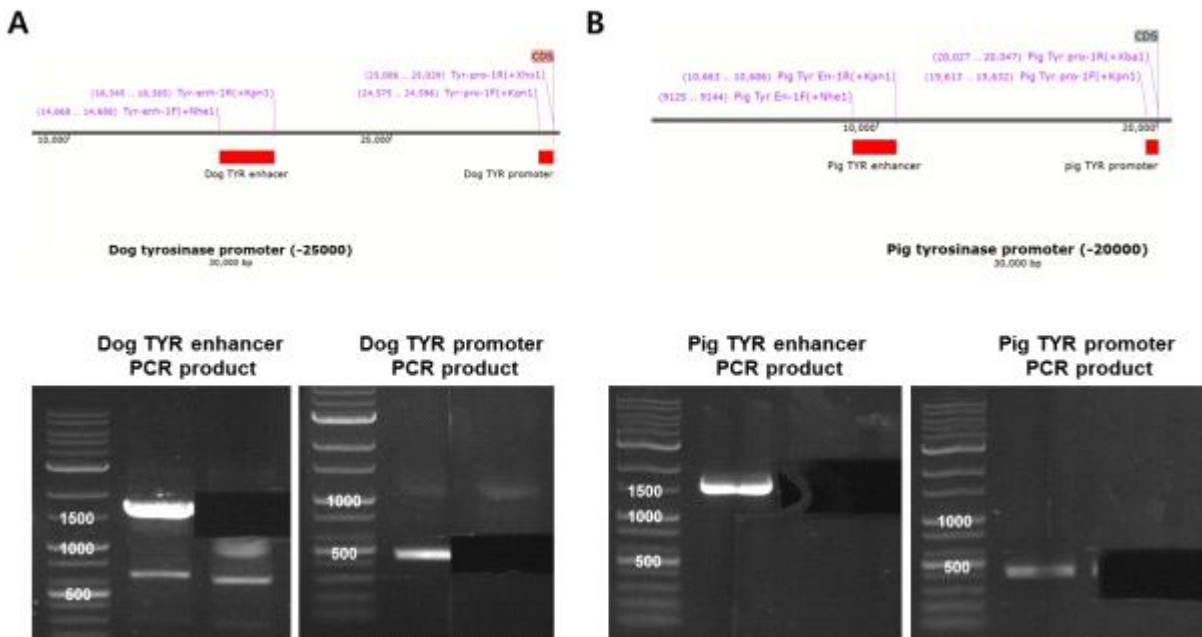


**연구내용3**      선택적 유도가 가능한 개 멜라닌 세포 특이적 유전자 재조합 시스템 제작

■ 개 및 돼지의 멜라닌 세포 특이적 발현 조절 서열 확보



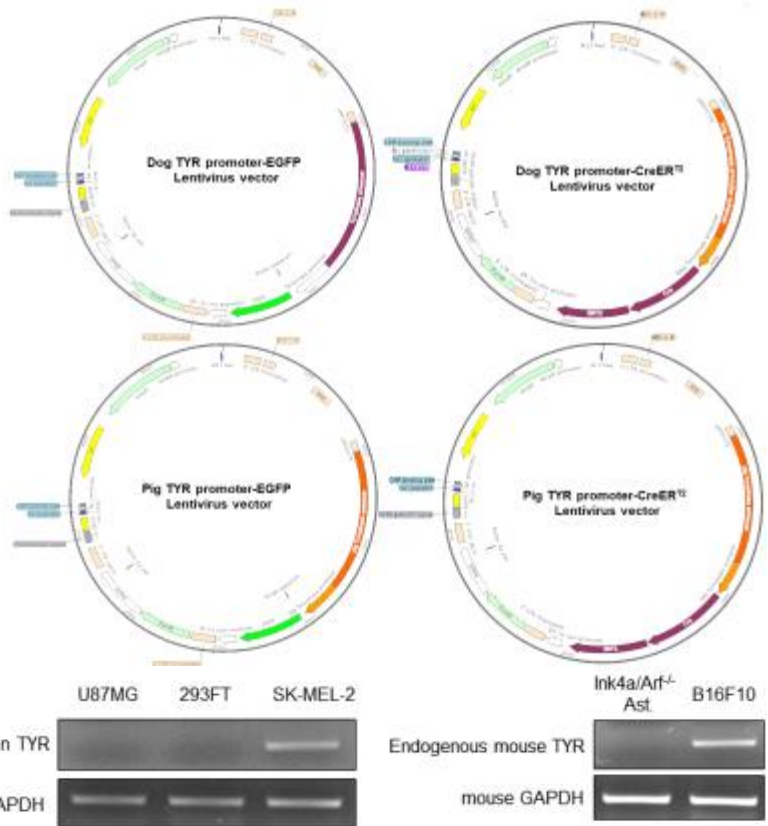
- 멜라닌 세포 특이적 발현 시스템 구축을 위해 멜라닌 세포 특이적 유전자 중 하나인 Tyrosinase (TYR) 유전자를 이용함. TYR 유전자의 발현 조절 서열 (프로모터; promoter) 서열을 확보하기로 결정함.
- 지금까지의 연구에서는 많은 동물 모델에서 사용한 TYR 프로모터 서열은 인간의 유전체에서 유래한 것임. 멜라닌 세포에 보다 정확하고 특이적인 발현을 유도하기 위해 개와 돼지 유전체에서 유래한 프로모터 서열을 확보하기로 결정함.
- 인간의 TYR 프로모터 서열 부분, 쥐의 TYR 프로모터 서열을 각각 개 및 돼지의 TYR 프로모터 서열과 비교해본 결과, 두 종의 프로모터 모두 인간의 TYR 서열과 유사함을 확인하였음.



- 인간의 TYR 프로모터 서열과 유사한 서열을 개와 돼지의 유전체에서 PCR 증폭을 통해 확보함.

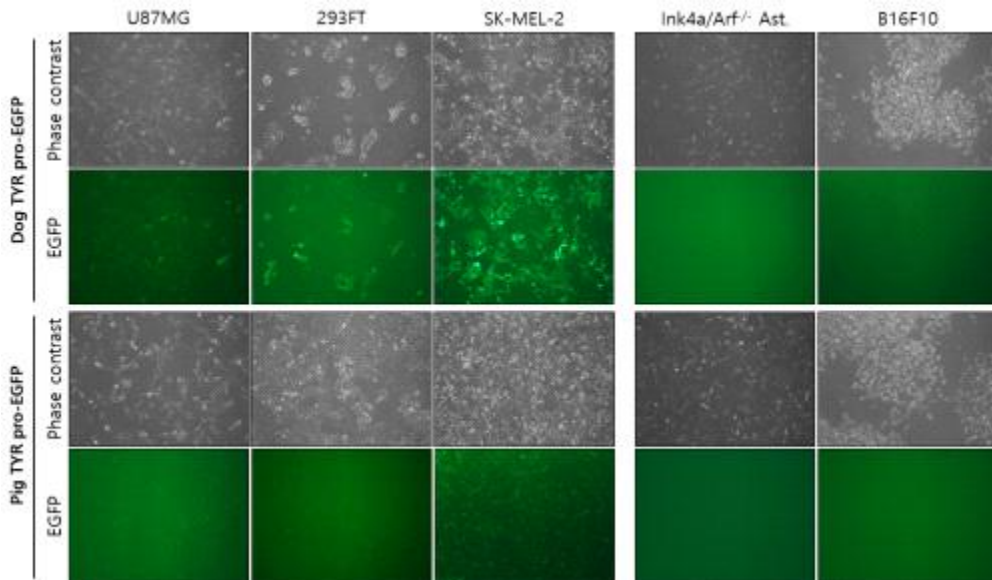
**▣ 개 및 돼지의 TYR 프로모터 서열을 이용한 EGFP 및 CreER 발현 시스템 구축**

- 확보한 개와 돼지의 TYR 프로모터 서열의 기능 검증을 위해 리포터 유전자로 이용할 EGFP 유전자와 흑색종 종양 모델에 적용할 CreER 유전자를 도입하여 멜라닌 세포 특이적 EGFP 및 CreER 유전자 발현 시스템을 구축함.



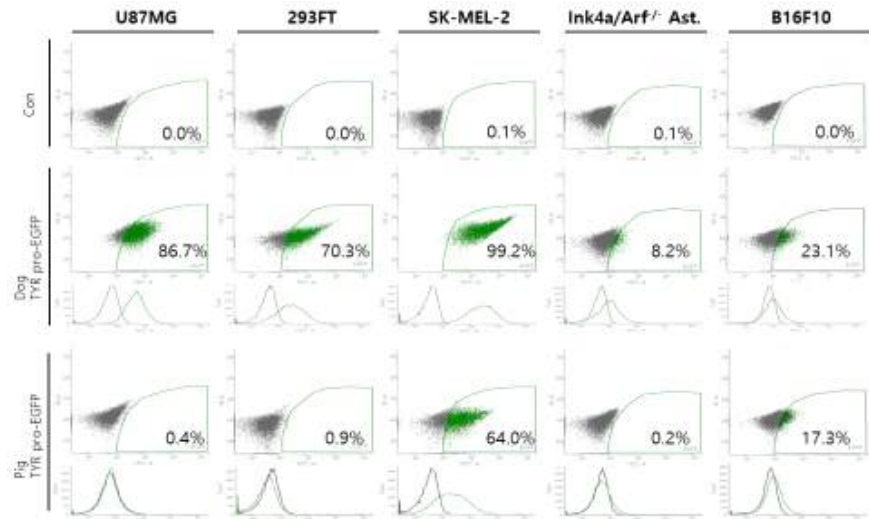
**▣ 개 및 돼지의 TYR 프로모터 서열을 이용한 EGFP 및 CreER 발현 시스템 검증**

- 현재 확립된 개와 돼지의 멜라닌 세포나 흑색종 세포주가 없어, 인간과 쥐의 흑색종 세포주를 이용하여 구축된 TYR 프로모터 서열의 유효성을 검증함.
- 우선 내제 Tyrosinase의 발현량을 semi-PCR 기법을 통해 확인해 본 결과, 인간 흑색종 세포주인 SK-MEL-2와 쥐 흑색종 세포주인 B16F10에서 Tyrosinase 발현이 높음을 확인함. 이를 이용해 추가적인 프로모터 서열의 유효성 검증 실험을 진행하기로 결정함.



- 구축한 개 TYR 프로모터-EGFP 및 돼지 TYR 프로모터-EGFP를 각각의 세포에 lentivirus 시스템을 통해 도입함.
- 이후 개와 돼지의 TYR 프로모터에 의해 발현조절되는 EGFP의 발현양을 측정하기 위해 형광현미경을 이용해 관찰함.
- 그 결과, 인간 흑색종 세포주인 SK-MEL-2에서 상대적으로 강하게 발현되는 GFP를 관찰함. 이에 반해, 쥐 흑색종 세포주인 B16F10은 흑색종 세포주임에도 불구하고 GFP가 거의 관찰이 되지 않음.
- 추가로, FACS 장비를 이용해 GFP의 발현을 확인함.

- 그 결과, 형광 이미지 결과와 마찬가지로 인간 흑색종 세포주인 SK-MEL-2에서 GFP를 발현하는 세포의 비율이 가장 높음을 확인할 수 있었음. 쥐 흑색종 세포주인 B16F10의 경우, Ink4a/Arf null 정상세포에 비해 상대적으로 높은 비율의 세포가 GFP를 발현하고 있음을 확인함.



Sample		Mean fluorescence intensity (MFI)	Sample		Mean fluorescence intensity (MFI)
U87MG	Control	63.7 ± 2.5	U87MG	Control	63.7 ± 2.5
	Dog TYR pro-EGFP	656.3 ± 11.0		Pig TYR pro-EGFP	73.3 ± 2.1
293FT	Control	46.7 ± 0.6	293FT	Control	46.7 ± 0.6
	Dog TYR pro-EGFP	551.3 ± 15.0		Pig TYR pro-EGFP	38.3 ± 2.3
SK-MEL-2	Control	36.3 ± 1.2	SK-MEL-2	Control	36.3 ± 1.2
	Dog TYR pro-EGFP	4320.3 ± 133.9		Pig TYR pro-EGFP	514.3 ± 12.6
Ink4a/Arf <sup>-/-</sup> Ast.	Control	52.3 ± 1.2	Ink4a/Arf <sup>-/-</sup> Ast.	Control	52.3 ± 1.2
	Dog TYR pro-EGFP	117.3 ± 5.0		Pig TYR pro-EGFP	60.7 ± 0.6
B16F10	Control	82.7 ± 2.3	B16F10	Control	82.7 ± 2.3
	Dog TYR pro-EGFP	150.7 ± 4.0		Pig TYR pro-EGFP	136.7 ± 1.5

- 추가로, FACS 데이터에서 세포 형광 세기의 평균값인 MFI (mean fluorescence intensity) 값을 확인해 본 결과, 인간 흑색종 세포주인 SK-MEL-2에서 GFP가 가장 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었음. 이에 반해, 쥐 흑색종 세포주인 B16F10의 경우, GFP를 발현 강도는 그리 높지 않음을 확인함.
- 이와 같은 결과는 쥐에 비해 인간의 TYR 프로모터 서열이 개와 돼지의 TYR 프로모터 서열과 유사성이 높은데서 기인한 것으로 판단함.
- 이 결과를 통해, 본 연구팀이 구축한 개 및 돼지 TYR 프로모터 서열이 멜라닌 세포에 특이적으로 강하게 발현됨을 *in vitro* 수준에서 확인 할 수 있었음.
- 본 연구팀은 *in vivo* 수준에서 개 및 돼지 TYR 프로모터 서열의 유효성을 추가 검증하고, 최종 흑색종 모델에 적용할 흑색종 특이적 CreER/LoxP 재조합 시스템에 도입하고자 함.



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델돼지 개발

**세부목표** : Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 *in vitro* 평가시스템 개발

### 연구내용1

Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 돼지 생산을 위한 SCNT 전능세포 생산효율 개선 및 *in vitro* 평가 시스템 개발

#### ▣ 돼지난자의 체외 성숙배지내 Cu<sup>2+</sup> 처리를 통해 SCNT배아 생산 효율 증대

- 체내에는 다양한 미량원소들이 존재하며 그 예로 아연, 구리, 철, 칼슘, 마그네슘 등이 있음.
- Cu<sup>2+</sup>는 redox reaction에서 electron transfer intermediate으로 작용을 하고 oxidative enzyme과 reductase enzyme의 필수적인 cofactor로도 작용함.
- 선행연구에 의하면 bovine oocyte maturation 과정에 Cu<sup>2+</sup>를 첨가했을 때, cumulus cell의 DNA damage를 감소시키고 oocyte와 cumulus cell 내에 존재하는 GSH-GSSG content를 증가시켰다는 연구결과가 있음. 특히 *in vitro* maturation(IVM) 동안에 6ug/mL의 Cu<sup>2+</sup>를 첨가했을 때, bovine oocyte의 발달능력이 향상되었고, 이는 blastocyst rate이 증가된 것에 의해 나타남 (S.J. Picco 등, 2012).
- 다른 연구에서는 bovine IVM 동안 배지에 Cu<sup>2+</sup>를 첨가하였을 때, IVM 이후 cumulus cell의 DNA integrity를 향상시켰으며 반대로 apoptosis는 감소시켰다는 결과가 있음(D.E. Rosa 등, 2016).
- 이러한 선행연구들을 바탕으로 돼지 난모세포의 체외 성숙기간동안 Cu<sup>2+</sup>를 처리하여 핵성숙과 세포질성숙에 미치는 영향을 평가함.
- 0ug/mL(control), 0.7ug/mL, 1.4ug/mL, 2.8ug/mL Cu<sup>2+</sup>를 각각 배양배지에 처리했을 때, 0.7ug/mL Cu<sup>2+</sup> group에서 Metaphase II stage에 있는 난자의 확률이 유의적으로 증가했으며, 이를 통해 Cu<sup>2+</sup>가 핵성숙에 영향을 미친다는 것을 알 수 있음.

#### 표. 돼지 난모세포의 체외성숙기간 동안 Cu<sup>2+</sup> 처리 후 핵성숙 평가결과

copper concentration (ug/mL)	No. of oocytes cultured for maturation*	Mean ± SEM (%) oocytes at the stage of			
		Germinal vesicle	Metaphase I	Anaphase and telophase I	Metaphase II
0	216	7.4±1.6 <sup>a</sup>	3.7±1.4	3.2±0.8	85.7±3.02 <sup>a</sup>
0.7	209	1.9±0.8 <sup>b</sup>	2.3±0.9	1.0±0.5	94.9±1.92 <sup>b</sup>
1.4	215	2.4±1.4 <sup>b</sup>	3.7±1.5	0.9±0.9	93.0±1.20 <sup>a, b</sup>
2.8	198	1.5±0.8 <sup>b</sup>	3.4±1.5	2.5±0.9	92.6±3.01 <sup>a, b</sup>

\* Four replicates.

a, b Values with different superscripts within a column differ significantly (P < 0.05).

- 세포질 내 Glutathione(GSH)와 Reactive oxygen species(ROS) 양을 측정 한 결과, GSH의 경우 1.4ug/mL에서 유의적으로 증가하였고, ROS는 Cu<sup>2+</sup>를 첨가한 세 그룹에서 증가함. 이를 통해 Cu<sup>2+</sup>가 GSH를 증가시킴으로써 세포질 성숙에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있음.

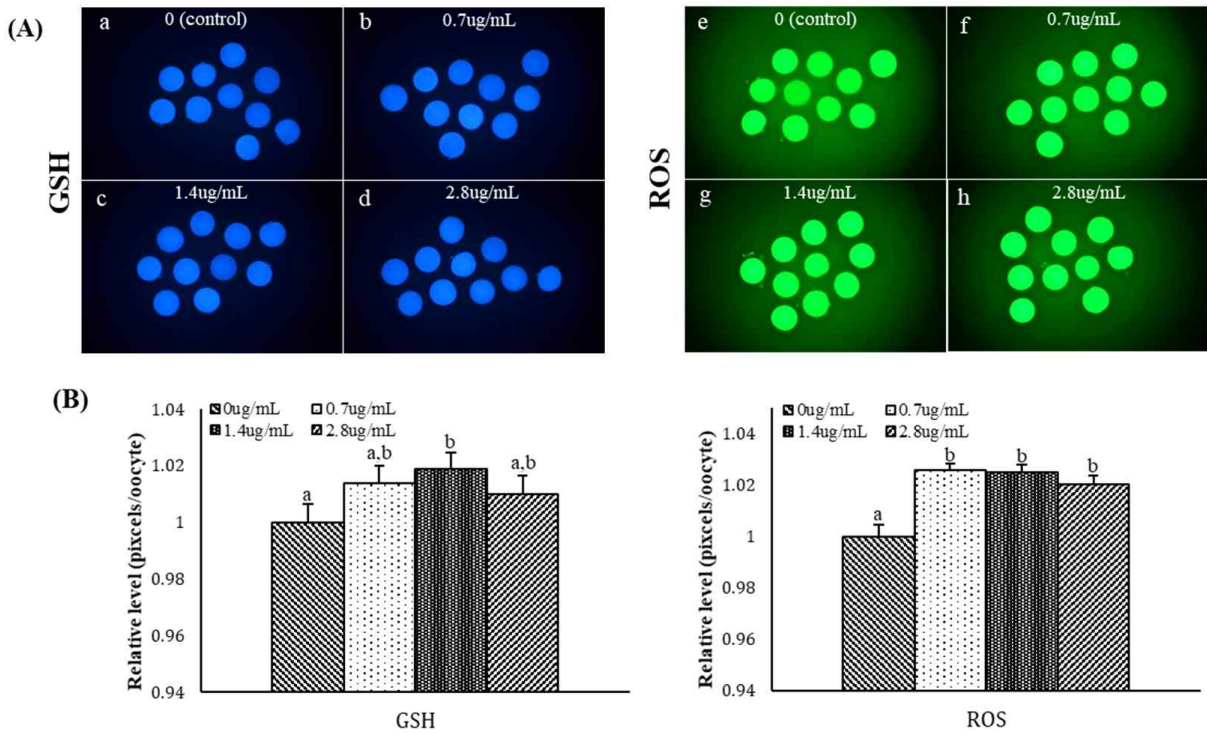


그림. 세포질 내 GSH 및 ROS 측정 결과

- 앞선 결과들로 보아 체외배양 배지에  $Cu^{2+}$ 를 첨가함으로써 핵성숙과 세포질 성숙을 향상시킴으로써 *in vitro* 배아 생산 효율을 증대시킬 수 있으며, 이를 통해 형질전환 돼지를 생산하는 데 있어 도움을 줄 것으로 생각되어짐.

**연구내용2** Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 *in vitro* 평가 시스템 개발

■ 돼지 섬유아세포에 optogenetic dimerization module 도입 및 시스템검증

- Optogenetics를 이용해서 단백질 간의 상호작용을 유도하고, 결과적으로 dimerization을 형성하여 단백질의 기능을 switch on 할 수 있음. dimerization module로 Arabidopsis CIB1과 cryptochrome2 (CRY2)를 이용. CRY2는 blue light-absorbing photosensor이며 photoexcited state일 때 CIB1과 결합한다는 특징이 있음.
- Optogenetics CIB1과 CRY2를 Cre-LoxP system 시스템에 도입하여 흑색종 모델을 생산할 수 있음.
- Opto시스템을 도입하기전에 돼지 섬유아세포주에서 optogenetic dimerization의 유효성을 검증하고자 함.
- 시험관내 검증을 위해 vector1 (pmCherry-CRY2-CreN)과 vector2 (pmCherry-CIBN-CreC)를 LDLG (CMV-LoxP-DsRed-LoxP-EGFP) 섬유아세포주에 transfection 진행하였음.
- 세포주 내 Optogenetic dimerization 유효성 검증을 위해, 450nm파장의 blue light를 이용, light level 10, 2 sec, delay 3min, Total 24h으로 설정하였음.
- Transfection후 특정 파장의(450nm) 빛을 24h 조사후 형광을 관찰하였음.
- 그 결과 일부세포에서 mCherry형광이 off되고 EGFP의 발현이 나타남을 확인할 수 있었음.

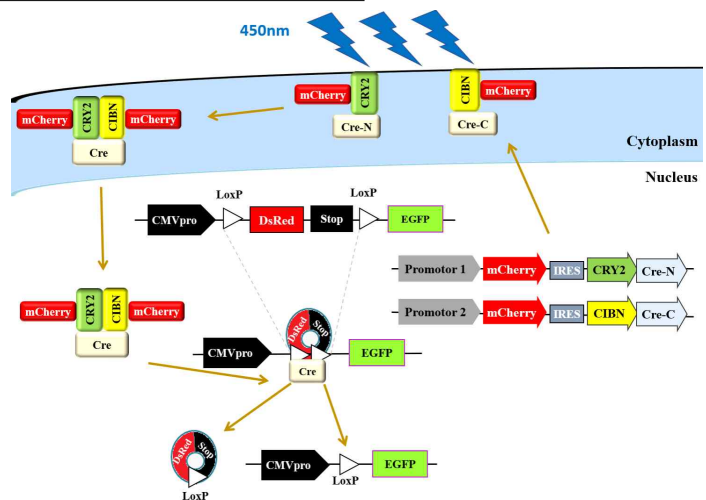


그림. CIB1,CRY2 dimerization module과 Cre-LoxP system을 접목시킨 모식도

- 이를 통해 CIB1과 CRY2이 dimer를 형성하고 Cre-N domain과 Cre-C domain 또한 dimer를 형성함으로써 recombinase 활성을 얻은 Cre 효소가 핵으로 들어가 LoxP site 인식 후 절단하고 그래서, DsRed를 발현 하던 세포가 EGFP를 발현하게 된 것으로 생각됨.



그림. Porcine LDLG세포주 활용 Optogenetic dimerization 유효성 검증. (a) bright field, (b) DsRed and (c) EGFP.

### ▣ Optogenetic-FGFr 삽입 유도만능줄기세포주를 이용한 SCNT 수행

- 수립된 Optogenetic-FGFr piPSCs를 공여세포주로 사용하여 돼지 난자에 SCNT 수행하려 했으나, 세포가 끈적거리고 짧은시간에 다시 뭉쳐지는 현상이 나타나 공여세포주로 사용하는데 어려움이 발생함.
- 이에 대한 해결방안으로 Optogenetic-FGFr piPSCs를 임의로 분화시킨 후 공여세포주로 사용하여 돼지 난자에 SCNT 수행하였음.
- Optogenetic-FGFr SCNT 배아를 대리모돈에 이식하였고, 일부는 *in vitro*에서 배아발달률을 평가함.
- 1번의 배아이식을 수행했고, 3주 후 재발정 결과가 나왔음.
- *in vitro*에서 배아발달률을 평가한 결과, 분할율은 73.7%로 매우 우수하나, 배반포 형성율이 13.2%로 매우 낮게 나타났으며 배아의 quality가 매우 좋지 못함.
- 따라서, 섬유아세포로 분화를 유도시킨 후 SCNT실시하는 전략을 대안으로 마련하였음.



그림. 분화전 Opto-FGFr 돼지 유도만능줄기세포주

표. *in vitro*에서의 Opto-FGFr SCNT 배아발달 평가.

NT Date	Egg Num.	MIH rate (%)	Enucleated (H)	Fused (%)	No. of cleavage (%)				early(%)	expended(%)	hatched(%)	BL form.	Cell line
					2	4	8	Total(%)					
190705	120	96 (80.0)	197 (SW+D)	118 (59.9)	12	11	5	28 (73.7)	5	0	0	5 (13.2)	Opto-FGFR1 piPS P20

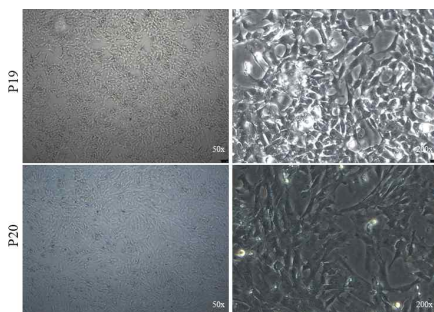


그림. 공여세포주로 활용한 분화된 Opto-FGFr 돼지 유도만능줄기세포주



그림. Opto-FGFR SCNT 배반포

# 세부목표 : (3차년도) Cre/LoxP inducible system 을 활용한 흑색종모델 *in vitro* 평가 시스템 개발

## 연구내용1 (추가) 멜라닌 세포 특이적 프로모터의 돼지 섬유아세포주내 도입 및 검증

### ■ 멜라닌 세포 특이적 프로모터 (Cloud pTYR-CreERT2+LDLG)를 갖는 형질전환 돼지섬유아세포주 수립

- 흑색종모델 돼지를 생산하기 위해서는 원하는 시기에 멜라닌 세포에서만 종양형성이 유도되는 시스템이 필요함. 그를 위해서는 멜라닌 세포 특이적인 프로모터를 이용하여 종양유전자를 과발현 시켜야함. 멜라닌 세포 특이적 프로모터에는 TYRP1, MITF, Tyrosinase 프로모터가 있으며 종양유전자로는 Ras, Braf 등이 존재함. 원하는 시기에 종양을 유도하기 위해서 Cre-Loxp system을 사용해 약물(Tamoxifen) 처리 후에만 종양유전자가 과발현 될 수 있음.
- 흑색종 모델에 사용할 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 *in vivo* 및 *in vitro*에서 검증하고자 함.
- 이를 위해 돼지 세포주에 두 가지 vector 도입. vector1은 멜라닌 세포 특이적 프로모터 (pTyrosinase promoter)와 CreERT2 유전자가 존재 (pTYR-CreERT2-EF-puro), vector2는 DSred와 EGFP 유전자가 존재하고 DSred 사이에 Cre recombinase가 인식해서 자를 수 있는 LoxP site 존재 (Loxp-DSred-Loxp-EGFP).
- Tamoxifen을 처리할 경우 멜라닌 세포에서만 발현되는 Cre recombinase가 효소활성을 갖게 되어 LoxP site를 자르게 되고, DSred를 발현하던 세포는 EGFP 형광을 발현. 따라서 vector2의 길이와 형광발현의 변화로 Cre recombinase 활성 여부를 확인할 수 있음.
- 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 돼지세포주를 얻기 위해서 Transfection을 통해 두 vector 도입 후 항생제와 Flow cytometry 통해 선별 및 검증함.

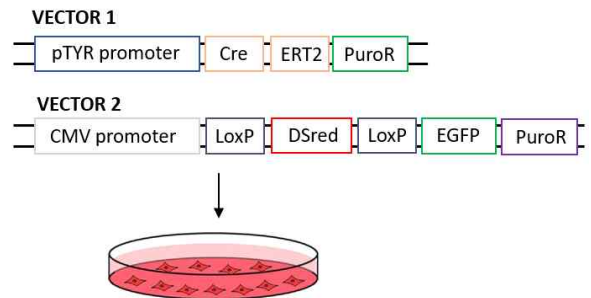
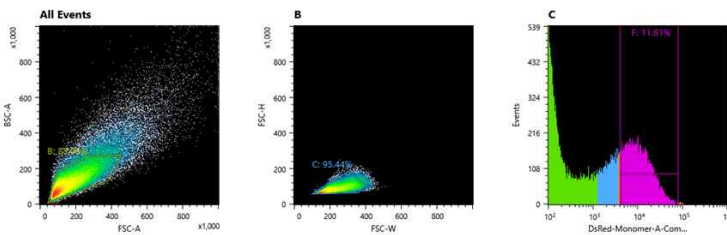


그림. Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주 생산



Name	Events	%Parent	%Total
All Events	100,000	0.00%	100.00%
B	83,961	83.96%	83.96%
C	80,135	95.44%	80.14%
F	9,306	11.61%	9.31%
E	10,400	12.39%	10.40%
D	82,103	82.10%	82.10%

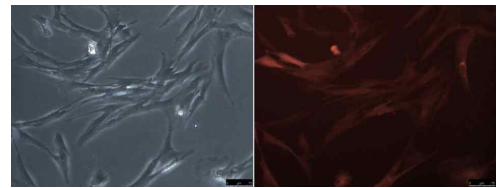


그림. DSred 형광을 발현하는 Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주 획득

그림. Flow cytometry를 이용한 형질전환 세포주 sorting

### ■ 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환모델 돼지 생산

- 멜라닌세포 특이적 프로모터를 갖는 Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주를 공여핵원으로 사용하여 SCNT 형질전환 배아를 생산한 후, 대리모돈의 발정주기에 맞추어 이식함.
- 배아이식 후 초음파와 임신 키트를 사용해 임신여부 진단했을 때 양성결과 나옴.
- 배아이식 119일 후 총 5마리의 돼지가 태어났고 그 중 한 마리는 사산. 5마리의 탃줄을 얻어서 genomic DNA 추출한 후 PCR로

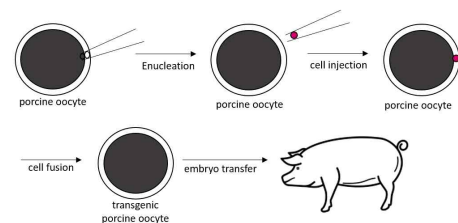


그림. SCNT 및 형질전환 배아 이식 모식도



두 vector 삽입 여부 확인.

- 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환모델 돼지 태줄 gDNA PCR을 통한 유전자 분석결과, Vector1 (pTYR-CreERT2-EF-puro)에 해당하는 CreERT2 밴드와 Vector2 (Loxp-DSred-Loxp-EGFP)에 해당하는 DSred와 EGFP 밴드가 모두에서 확인됨.

일자: 2019.05.16	술자: SH	보조: D
수란돈 번호: D9-22	체중: 90~100kg	생년: 20개월
배란상태: 배란직전	자궁상태: 경도 양호	이식된 배아갯수: 2-4 cells-46, 1cells - 77



그림. 형질전환배아이식 수술 결과. 이식시 자궁 및 난포의 상태(a), 초음파 사진(b,c)



그림. 배아이식 119일 후 출산한 형질전환 돼지 5마리 사진 (No.5 piglet 분만중 사산).

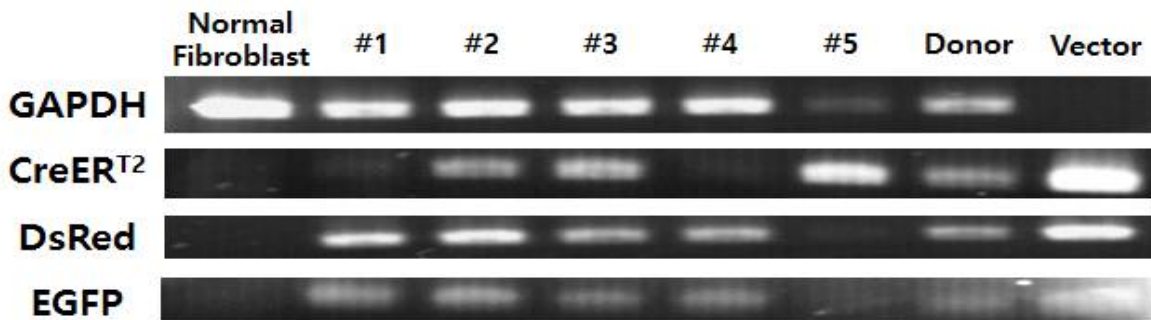


그림. 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환모델 돼지 태줄 gDNA PCR을 통한 유전자 분석결과

▣ 멜라닌 세포 특이적 프로모터를 갖는 형질전환 돼지로부터 pTYR positive 세포주 및 Primary culture프로토콜 수립

- 흑색종을 조직특이적으로 유발하기 위해서는 멜라닌 세포에서만 종양 유전자가 발현되어야함.
- Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 형질전환 돼지에는 멜라닌 세포 특이적 유전자인 Tyrosinase에 대한 promoter가 외부유전자로 삽입되어 있음.
- 세포 수준에서 Tyrosinase promoter의 작동여부를 확인하기 위해 형질전환 돼지로부터 조직을 얻어 primary culture를 진행해 세포를 얻고자함. 조직 중 Skin (Melanocytes, Epidermal cells)과 Retina (Pigment epithelium)에서 Tyrosinase가 발현된다는 선행연구결과가 있음.

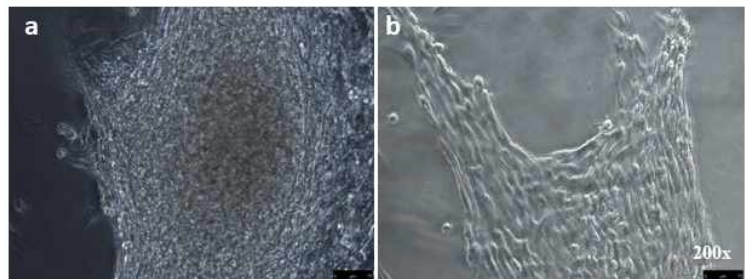


그림. 멜라닌 세포 특이적 프로모터 모델 돼지 Retina 유래세포주. (a) ECM-coated plate, (b) Geltrex-coated plate

조직 중 Skin (Melanocytes, Epidermal cells)과 Retina (Pigment epithelium)에서 Tyrosinase가 발현된다는 선행연구결과가 있음.

- 이에, 태어난 형질전환 돼지 중 No.1, No2, No.3번 돼지의 Skin과 No.2번 돼지의 eye를 얻어 primary culture를 진행하였음.

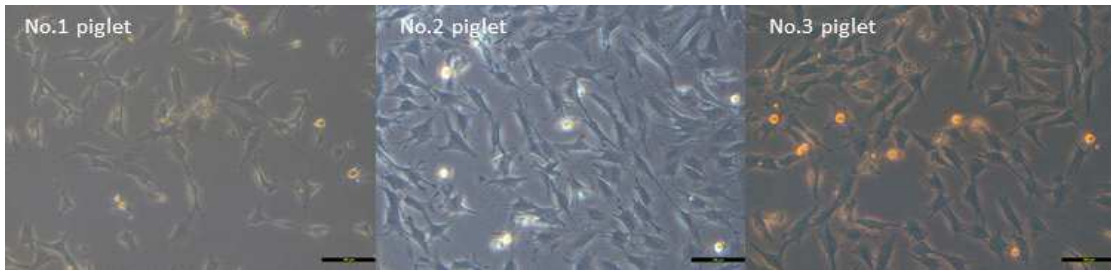


그림. 멜라닌 세포 특이적 프로모터 모델 돼지 Skin 유래 섬유아세포주.

* Porcine ear skin fibroblast primary culture 방법	*Porcine retinal pigment epithelial (RPE) cell primary culture 방법
① ear 조직을 70% Ethanol, DPBS(with 2X anti-anti)로 washing해준 후 주변 털 제거. ② 물리적으로 연골을 제거한 후 가위를 이용해 피부조직 잘게 자르기. ③ Epidermis와 dermis를 분리하기 위해 dispase 또는 protease에 조직을 담근 후 4°C에서 overnight. ④ dispase 또는 protease를 제거해주고 Trypsin 처리 후 5분동안 37°C에서 incubation(조직해리). ⑤ FBS가 있는 DMEM 배지로 Trypsin 불활성화 후 배지제거. ⑥ DMEM(with 5%FBS, 2X anti-anti) 배지에서 조직 culture. ⑦ 2일 후 조직으로부터 세포가 뿔어 나왔는지 확인.	① 먼저 Collagen type 4 + fibronectin mixture (1;1)를 cell culture dish에 코팅 (37°C에서 최소 1시간 ~ overnight 코팅). ② 안구 중에서도 posterior eye cup을 분리해내어 작게 chopping 한 후, 1mg/ml collagenase type 1 solution을 넣고 37°C에서 1시간 incubation. ③ Serum inactivation 한 후에 Neuroretina 부분은 제거하고, Bruch's membrane 쪽의 RPE 부분만 isolation. ④ HBSS로 최소 3번 washing. ⑤ (DMEM/F12 + B27 supplement) 또는 (DMEM + 15% FBS) 배지 조건에 250 ng/ml bFGF를 추가로 넣어 37°C incubator에서 배양. ⑥ 배지는 이들에 한 번씩 교환.

**연구내용2** 흑색종 Cre/LoxP inducible 배아줄기세포주 수립을 통한 *in vitro* 평가 시스템 개발

▣ Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주 이용한 SCNT 수행 및 pES 수립

- 멜라닌세포 특이적 프로모터를 갖는 Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주를 공여핵원으로 사용하여 Somatic cell nuclear transfer (SCNT) 후 형질전환 배아 생산.
- 형질전환 배아를 체외에서 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 39°C 조건에서 체외 배양 7일 후 배반포 획득.

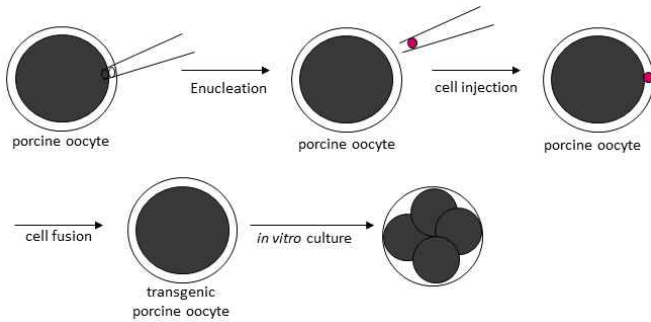


그림. SCNT 및 형질전환 배아의 체외 배양 모식도

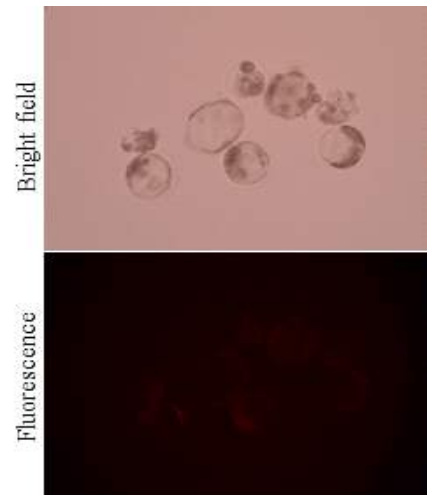


그림. Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 세포주 활용 SCNT 배반포의 DsRed발현

- 배반포를 MEF (Mouse embryonic fibroblast) feeder layer가 있는 plate에 seeding하여 Cloud pTYR-CreERT2+LDLG에 대한 pES(Embryonic stem) cell 수립.
- 배아줄기세포주의 특성분석을 위해 AP염색 및 배아체 (Embryoid bodies) 형성을 검증함.

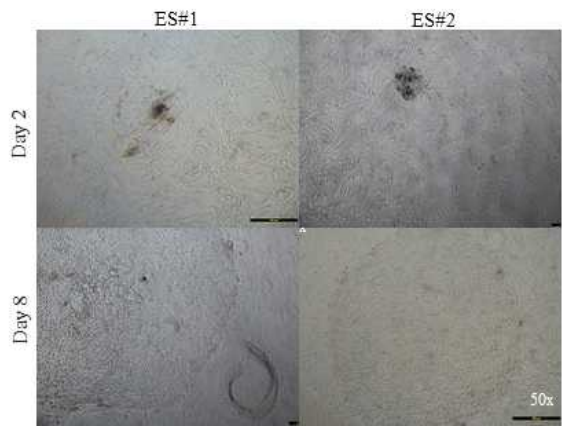


그림. SCNT배반포를 통해 얻어진 Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 배아줄기세포주

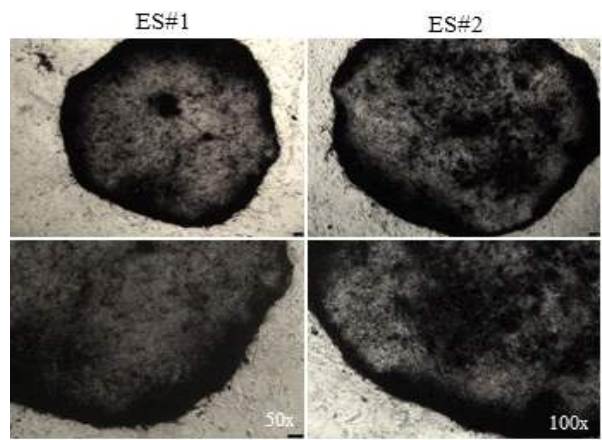


그림. Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 배아줄기세포주 AP stain 결과

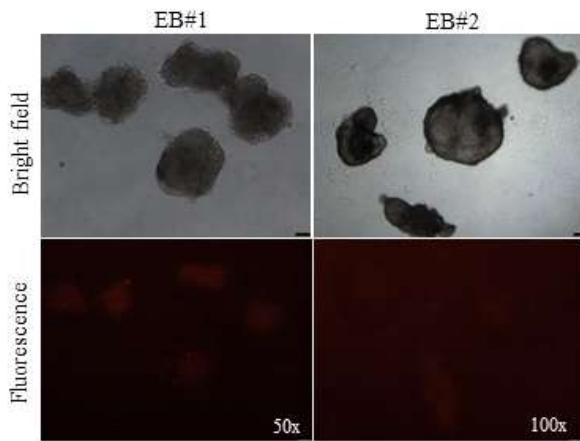


그림. Cloud pTYR-CreERT2+LDLG 배아줄기세포주 유래 배아체 형성



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

Opto-FGFr 공여세포주 및 iPSC 세포주 수립을 통한 흑색종 *in vitro* 질환모델 구축

**세부목표 : Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 돼지세포주 개발 조건 분석**

### 연구내용1

Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 유발 시스템 도입 세포주 검증

#### ▣ 확립된 piPSC 세포주 배양 조건 검증

- Porcine iPSC(piPSC) 배양기법은 아직까지 효율적인 프로토콜이 확립, 보고된바 없으며, 이에, 대표적으로 human ES 배양 조건과 mouse ES 배양 조건을 비교하고, DMEM-F12를 기본으로 하여 LIF 유무 및 FGF 유무 등으로 분류하여 배양조건에 대한 영향인자를 분석할 수 있음.
- 확립된 piPSC를 배양하기 위하여 human ES 배양 조건과 동일한 환경에서 LIF 유무에 따른 차이를 확인하였음.

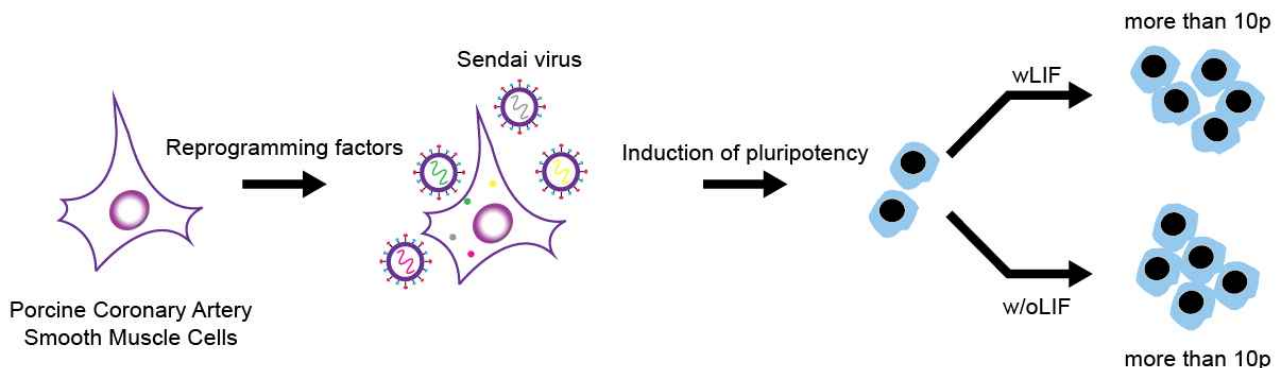


그림. Generation of induced pluripotent stem cells from porcine smooth muscle cells.

#### ▣ 확립된 piPSC 세포주 Pluripotency 유지 검증

- LIF를 첨가한 조건에서는 유도만능줄기세포의 고유 성질인 만능성(pluripotency)이 감소하고 분화되는 경향을 보이고 LIF를 첨가하지 않은 조건에서는 만능성이 유지되는 것으로 분석되었음.
- 처리군 중 LIF를 첨가하지 않은 human ES 배양 조건으로 최소 20 계대를 유지하고 있으며, 이는 장기 계대배양에서도 만능성이 유지됨을 검증하였음.
- 현재 20 계대를 넘었음에도, iPSC 세포 유래 콜로니 형태를 유지하고 있으며, 이에 따른 만능성 정도를 사전 검증하기 위하여 Alkaline phosphatase를 확인하였음.
- 또한, 20 계대 이후의 세포들을 이용하여 분화능 및 특성 분석할 예정임.

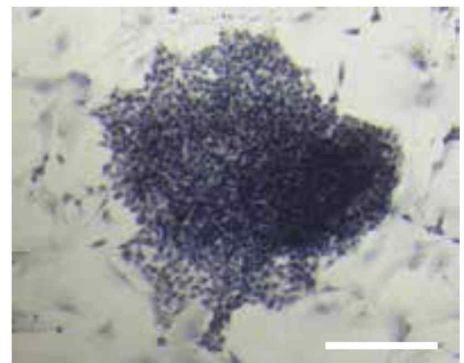


그림. Staining of Alkaline phosphatase

### 연구내용2

Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 모델 유도만능줄기세포주 수립을 통한 *in vitro* 평가 시스템 개발

#### ▣ Optogenetic-FGFr 삽입 유도만능줄기 세포주 수립

- 빛을 조사하였을 경우에만 단백질 간의 상호작용이 유도되고, 결과적으로 oligomerization을 형성하여

단백질의 기능을 turn on 할 수 있는 optogenetics를 이용하였음.

- 안정적인 외래유전자 발현을 유도하기 위하여, 돼지세포에서 많이 사용되고 있는 safe harbor region인 ROSA26을 타겟으로 제작한 벡터 시스템을 사용하였음.
- 효율적인 knock in을 위하여 최신기법인 CRISPR/Cas9 시스템과 nucleofection을 이용하였음.
- 벡터시스템에 포함되어 있는 항생제 저항 유전자의 발현을 이용하여 항생제를 처리하였을 경우 벡터시스템이 삽입된 세포주만이 선별적으로 살아남도록 제작하였음.
- Optogenetic-FGFr 시스템을 사용하여, 돼지만능줄기세포에 도입하였음.
- 총 4회 반복 실험을 수행하였고, 최종 13개의 세포주를 수립하였음.

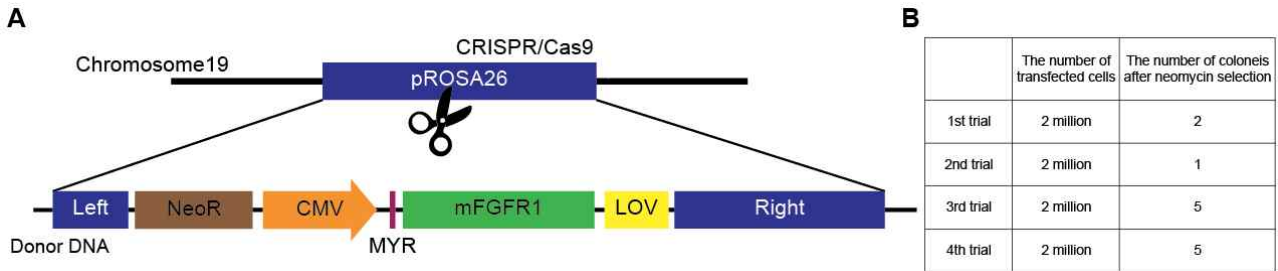


그림. Establishment of Opto-FGFR porcine pluripotent stem cells. (A) The construct for the pROSA26 target system. (B) The number of transfected cells and colonies formed after puromycin selection in each trial.

#### ▣ *in vitro* 평가 시스템 개발을 위한 Opto반응 유도 검증

- 총 13개의 Opto-FGFr 돼지유도만능줄기세포주의 수립 후, 빛 자극에 대한 반응을 단백질수준에서 확인하였음.
- 그 결과 ERK1/2 Pathway가 Blue light에 의해 활성화됨을 확인하였음.
- 13개의 세포주 중 빛의 자극에 민감하게 반응하는 세포주를 선별하여 이후 실험에 적용하였음.

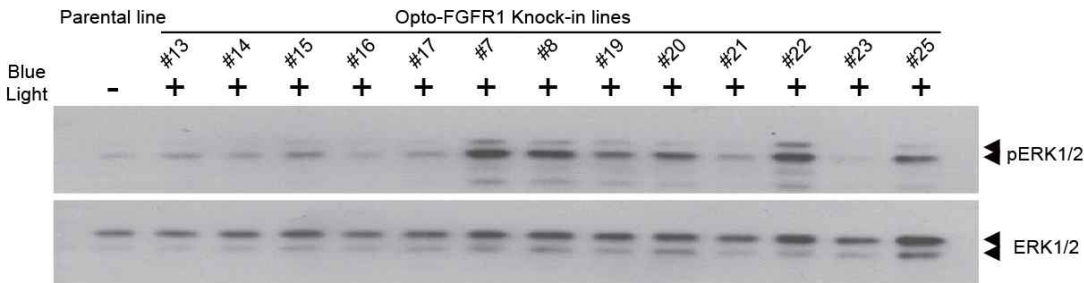


그림. Phosphorylation ratio of ERK1/2 with blue light illumination.



## 제2 협동과제

(주)크로넥스

전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축

**세부목표 : 형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈 영향인자 분석**

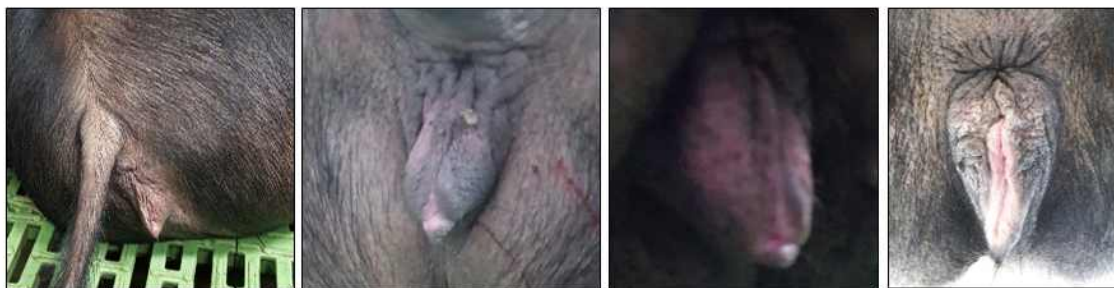
### 연구내용1

효율적인 흑색종모델 동물의 임신 및 분만을 위한 프로토콜 확립 및 사양기법 구축

#### ▣ 형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈의 영향인자 분석

- 형질전환 돼지를 위한 대리모돈 선발은 후보돈이 40~50kg 정도 약 6개월령에 도달한 시점에 선발하였음.
- 등지방 두께, 발정회수, 외음부 및 지제 확인 후 70~80kg 10~12개월령까지 사료 급여량 조절과 체형관리를 통해 대리모돈으로써 적합한 상태로 관리사양하였으며, 형질전환 돼지 생산용 대리모돈으로 체계적인 공급하는 시스템을 구축하였음.
- 크로넥스(주) 자체 생산 라인을 통하여 상시 40두 가량을 대리모돈으로 사용 가능한 안정된 대리모돈 공급 라인 조성 및 관리 체계를 구축하였음.
- 형질전환 돼지 생산을 위한 최적의 후보돈 선발을 위하여 일령, 체중 및 발정 시기 및 지제 확인을 통하여 최적의 대리모돈 선발에 필요한 정보를 수집하고 이를 통해 우수한 개체를 선발하여 수정란 이식 및 임신 진단 판단까지 사양 관리하는 시스템을 구축하였음.
- 형질전환 배아 이식 (Embryo transfer, ET) 시점에 후보 대리모돈의 배란 시기 조절은 ET 후 임신 성공률과 밀접한 상관관계가 있음. 후보 대리모돈의 배란을 유도하는 방법은 호르몬제제를 이용한 방법, 출산돈의 자돈 이유를 통한 방법, 약제를 이용해 임신돈의 유산을 통한 배란 유도 법이 있음. 본 연구진은 수정란 이식 5일 전 후보돈의 자돈 이유를 통해 배란을 유도하는 방법과 후보 대리모돈 중 자연 발정된 개체를 선별하여 후보 대리모돈으로 사용하는 프로토콜을 확립 함. 대리모돈의 발정은 외음부를 육안 관찰하여 평가 하였음.

#### [대리모돈 발정 단계별 외음부 모습]



미발정

발정 초기

발정 중기

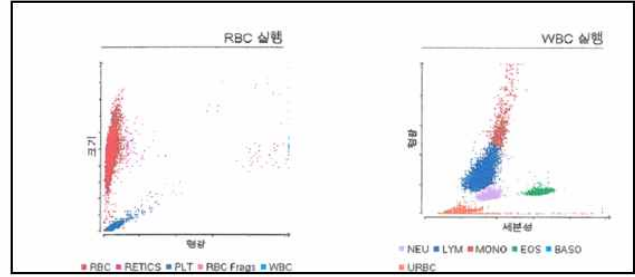
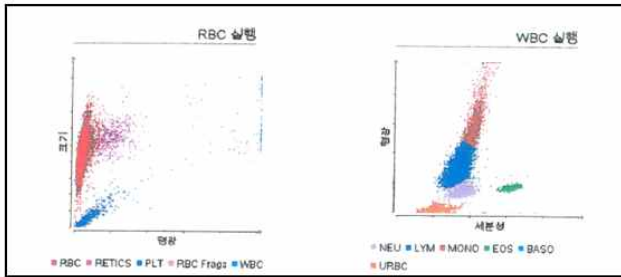
발정 말기

- 우수한 후보 대리모돈의 선발 및 공급을 위하여 혈액학적/생화학적 지표를 평가하여 대리모돈의 선발 영향 평가 시스템을 구축하였음.
- 대리모돈 효과적인 관리 및 생산된 자돈 관리와 관련하여 식약처로부터 우수동물생산 시설 인증을 획득 하였음.

[혈액학적 분석 결과]

12W

24W



Comparison of Erythrocyte Indices Between Conventional Pigs and M-Pigs		
Test Name	Conventional Pigs	CRONEX M-Pigs®
No. of erythrocyte (M/ $\mu$ l)	6.03 $\pm$ 0.53	7.54 $\pm$ 0.17
PCV (%)	29.42 $\pm$ 2.55	37.47 $\pm$ 0.83
MCV (fl)	48.83 $\pm$ 1.50	49.71 $\pm$ 0.84
Hemoglobin (g/dl)	8.96 $\pm$ 0.86	13.30 $\pm$ 0.96
MCH (pg)	14.75 $\pm$ 0.40	17.62 $\pm$ 0.45
MCHC (g/dl)	30.38 $\pm$ 1.10	35.5 $\pm$ 0.70
RDW (%)	26.05 $\pm$ 0.70	26.02 $\pm$ 0.59

PCV-packed cell volume; MCV-mean corpuscular volume; MCH-mean corpuscular hemoglobin; MCHC-mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW-red cell distribution width.

Number of Leukocytes Between Conventional Pigs and M-Pigs		
Test Name	Conventional Pigs	CRONEX M-Pigs®
Leucocytes (K/dl)	18.78 $\pm$ 2.95	14.75 $\pm$ 0.96
Neutrophils (K/dl)	8.97 $\pm$ 1.79	7.90 $\pm$ 0.52
Eosinophils (K/dl)	0.11 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.04
Basophils (K/dl)	0.03 $\pm$ 0.008	0.07 $\pm$ 0.007
Lymphocytes (K/dl)	9.23 $\pm$ 1.26	6.59 $\pm$ 0.59
Monocytes (K/dl)	0.44 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.05

[생화학적 분석 결과]

Comparison of Serum Biochemical Analysis Between Conventional Pigs and M-Pigs		
Test Name	Conventional Pigs	CRONEX M-Pigs®
Total protein (mg/l)	6.18 $\pm$ 0.27	8.53 $\pm$ 0.51
Albumin (mg/dl)	2.63 $\pm$ 0.17	3.14 $\pm$ 0.22
Total bilirubin (mg/dl)	0.14 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.00
Blood urea nitrogen (mg/dl)	16.50 $\pm$ 0.93	10.25 $\pm$ 3.54
Creatinine (mg/dl)	1.28 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.16
Cholesterol (mg/dl)	31.60 $\pm$ 5.95	64.57 $\pm$ 6.88



제 6 호

### 우수실험동물생산시설 지정서

- 1. 명 칭(상 호) : 크로넥스㈜
- 2. 소 재 지 : 충청북도 청주시 흥덕구 강내면 황탄리길 110
- 3. 대 표 자 : 손영준

「실험동물에 관한 법률」 제15조제1항 및 같은 법 시행규칙 제17조에 따라 위와 같이 우수실험동물생산시설로 지정합니다.

2019 년 7 월 31 일

식품의약품안전





▣ 형질전환 자돈 생산을 위한 수정란 이식 및 형질전환 돼지의 생산과 관리 시스템 구축

- 생산된 형질전환 돼지의 사양 관리
- 최적의 후도돈 선발 및 환경을 유지함으로써 수정란 이식방법을 통하여 형질전환 자돈을 생산하였음.
- 형질전환 돼지를 생산한 대리모는 형질전환 수정란을 이식할 당시의 월령은 16~24개월령이며, 체중은 90~100kg 이었음.
- 형질전환 자돈의 생산성을 증가시키기 위하여 일반 돼지 사양관리 및 사료 급여 프로그램을 적용하지 않고, 일령 및 체중을 고려하여 사양관리 및 사료급여 프로그램을 적용하였음.
- 태어난 형질전환 자돈은 체중이 10kg에 도달 시까지는 대용유를 급여하고, 10kg 이후에는 자돈 사료 프로그램을 적용하였음. 현재까지 11회 수정란 이식을 시행하였고 3두가 임신 되었으며 2두는 자돈을 생산하였고 1두는 형질전환 검증을 위하여 6 주차에 희생하여 fetus를 수집하였음.

표. 수정란 이식 일정 및 결과

No	Transfer date	Recipient	Ovary status	pregnancy	Delivery date
1	2018-08-31	S6-10	Mid-ovulation	Yes	2018-12-21
2	2018-09-14	S12-7	Post-ovulation	Yes	2018-11-30
3	2018-10-19	M-54	Mid-ovulation	No	
4	2019-03-28	M-41	Post-ovulation	No	
5	2019-04-04	J11-16	Post-ovulation	No	
6	2019-04-17	S12-3	Mid-ovulation	No	
7	2019-05-16	D9-22	Post-ovulation	Yes	2019-09-11
8	2019-05-24	D10-1	Mid-ovulation	No	
9	2019-07-05	E3-15	Post-ovulation	No	
10	2019-09-05	M-43	Post-ovulation	No	



[임신통의 초음파 사진]

- 2018년 12월 21일 태어난 자돈은 총 8두(암컷:4, 수컷: 4)이며 3두는 검증용으로 희생하였고 1두는 2019년 3월 6일 폐사하여 현재 4두가 생존 중에 있음.
- 2018년 9월 14일 수정란 이식 후 임신 된 개체는 형질전환 검증을 위하여 11월 30일 희생하여 fetus를 확인 한 결과 5두 임신 중이었으며 fetus를 적출하여 검증에 이용하였음.
- 2019년 9월 11일 태어난 자돈은 총 5두이며 1두가 사산되어 출산 되었음.
- 2019년 9월 11일 태어난 자돈 4두는 출산 3일경부터 설사가 발생하여 신생자돈시기의 소화기 문제로 폐사 하였음.

출산일	2018년 12월 21	2018년 11월 30일	2019년 9월 11
대리모 월령	16개월령	22개월령	18개월령
대리모 체중	95kg	92kg	98kg
총 분만 두수	8	5	5
희생 두수	3(검증용으로 희생)	5(검증용으로 희생)	5두(신생자돈 설사)

생존 두수	4	0	0
-------	---	---	---

- 2019년 9월 11에 분만한 자돈을 제외한 돼지의 생시 체중 0.76~1.48kg으로 일반 돼지와 유사하였음.
- 생후 4주차 평균 체중은 5.56kg이었고 8주차 체중은 평균 14.37kg, 20주차 체중은 52.92kg으로 일반 돼지에 비해 낮은 수치를 보이나 이는 일반 양돈 농가와 다른 사료 성분 및 급이 시스템이 기인한 것으로 판단되며 성장에 따른 특이할 만한 건강의 이상은 관찰 되지 않음.



[2018년 12월 21일 출산 자돈 모습]



[2019년 9월 11일 출산 자돈 모습]

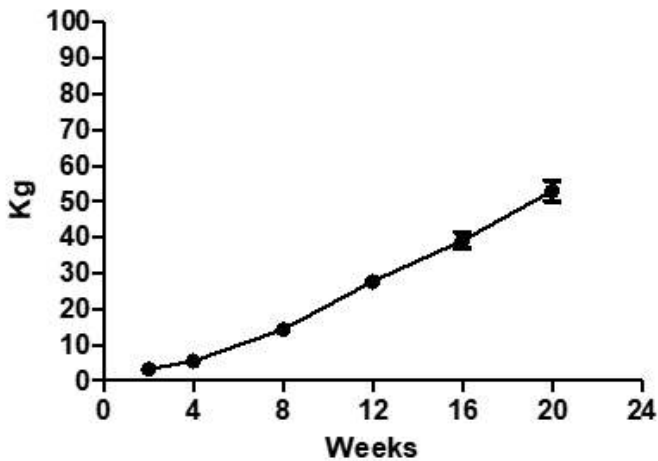


그림. 출산된 형질전환 자돈의 체중 변화

#### ▣ 생산된 흑색종 모델동물의 사양관리 시스템

##### ● 포유 자돈의 사양 관리

##### - 돼지 젖의 분비 및 출산 전 대리모돈의 관리

어미돼지(대리모)의 젖꼭지는 복부 양쪽에 12~14개가 있다. 돼지에서 젖이 나오는 기전은 새끼돼지가 어미 젖을 자극하거나 찾는 소리를 내면 어미는 신경자극을 받아 신경물질이 뇌하수체 후엽에 전달되어 옥시토신이라는 젖 분비 호르몬이 분비되어 젖이 나오게 된다. 일반적으로 돼지 젖은 우유에 비해 단백질, 지방 및 고형물의 함량을 높게 함유하고 있다. 따라서 대리모로 쓰이는 어미돼지는 비교적 짧은 기간에 진한 젖을 많이 생산하므로 대리모의 사양관리에 특히 유의하여야 한다.56

**- 포유 횟수**

분만 후 어미돼지가 포유 시키는 횟수는 일반돼지와 같이 분만 후 3일까지는 1일 24회, 1주일까지는 26회 정도이고, 그 후 차츰 감소하여 이유 시에는 1일 17회 정도가 된다. 어미돼지가 젖을 분비하는 시간은 분만 후 3일까지는 22~47초 정도이며, 이유 전에는 11초 정도이므로 외부 환경에 민감하게 반응하는 출산 모돈 (대리모)의 경우 충분한 포유를 할 수 있도록 관리 시 특별한 주의를 기울인다.

**- 포유 자돈의 관리**

포유기 자돈은 생리적으로 피하지방이 적고 피모가 조밀하지 않아 스스로 외부 환역에 대한 체온 조절 능력이 약하고 질병에 대한 면역기능이 없으므로 소화기 및 호흡기 질병에 항상 노출되어 있으므로 인위적으로 최적 환경을 만들어야 한다.

크로넥스(주)의 동물 관리 시설은 시설내 온/습도가 일정하게 유지 될 수 있도록 시스템을 유지하고 출생 직후의 자돈 보온을 위하여 보온등을 추가 설치하여 자돈 보온에 각별히 유의하여 관리한다.

**표. 포유 자돈의 적정 온도 및 습도**

일령 또는 체중	온도 범위	최적 온도	습도
출생 직후	30~35	35	60~70
1주일령	25~30	25	60~70
1주일~이유전	20~25	20~25	60~80

**자돈의 사료 공급**

새끼 돼지는 출생 직후에는 어미젖에 의존하여 자라지만 생후 1~2주령이 지나면 체중이 2배 이상 급속히 성장함으로 발육에 필요한 영양소를 보충하여 주어야 한다.

자돈 사료의 공급은 생후 1~2주후 대용유를 급이하여 포유에서 사료

**- 자돈의 빈혈 예방**

출생시 자돈은 약 40mg의 철분을 가지고 있으나, 자돈이 1일 헤모글로빈의 생성에 소요되는 양이 많아 빈혈증에 걸리기 쉬우므로, 이를 예방하기 위하여 철분주사를 실시한다. 빈혈증 예방을 위해 생후 1~3일과 10~14일 2차에 걸쳐 각 100mg/두씩 대퇴부 또는 목 부위 근육에 주사하여 빈혈증에 걸리지 않도록 주의한다.

**● 이유 자돈의 사양 관리**

**- 이유 전 행동**

이유 후 즉각 이유 전 자돈이 요구했던 만큼 가능하면 많이 섭취하기 위해 노력하는 습관이 매우 중요하다. 모든 자돈들은 각자의 급수기, 급이기를 이용하여 하고 사료를 먹거나 물을 마시는데 경쟁을 최소화하여야 하며 따뜻한 액상의 사료를 먹거나 마실 수 있게 한다. 또한 자돈들은 무리지어 물을 마시거나 잠을 자는 경향을 보이며 개체별로 인식하지 못하고 그룹으로 인식하는 경향을 보인다. 이유 시기는 8~10주에 시행한다.

**- 이유 자돈의 환경 관리**

자돈에 있어 최초로 부딪치는 최대의 스트레스는 이유이다. 즉, 어미와 떨어져 새로운 환경으로부터 모유에서 고택사료 섭취와 급수기를 통한 차가운 음수, 돈군의 재편성등으로 초조와 불안한 환경에서 생활하여야 하므로 이유 돈사는 온도와 습도의 관리가 적절히 조절되는 시설을 이용한다. 이유 자돈은 추위에 매우 민감하고 이유 및 각종 스트레스로 인하여 사료섭취량 감소로 체온유지에 어려움을 겪을 수 있다. 따라서, 적정한 온도 및 습도를 유지하여 체온 유지를 위한 에너지 손실을 최소화할 수 있게 한다.

표. 이유 자돈에 대한 적정 온도 및 습도

일령 또는 체중	온도 범위	최적 온도	습도
이유시	25~30	25	60~80
이유~35kg	18~22	21	50~80
35kg 이상	15~20	18	40~60

**- 이유 자돈의 영양 관리**

이유 시 급여되는 사료는 이유 초기 대리모돈의 젖과 비슷한 영양성분의 사료를 급여하면서 서서히 사료 순차 기간을 두고 점차 성장단계에 맞는 젖먹이사료로 급여한다. 그리고 자돈의 빠른 성장률과 지방축적을 위해서는 사료 섭취량을 증가시키기 위해 기호성과 소화율이 좋은 사료를 공급해야 하며, 자돈 성장기에 사료 교체에 따른 스트레스를 많이 받을 수 있기 때문에 첨가제(유기산제, 생균제, 효소제 등)을 이용하여 소화를 도와 자돈의 성장이 향상될 수 있도록 한다. 그리고, 자돈 성장기부터 사육관리자는 사료 공급을 통해 경계심을 줄여주고 사람과 친근감이 생길 수 있도록 관리한다.

**- 이유 자돈의 위생관리**

돼지를 사육함에 있어 질병을 예방하고 생산성을 높이기 위해서는 동물의 생리적 기능을 이해하고 최적의 사육환경을 유지하며, 돈군에 대한 세심한 관리로 병원균의 침입 방지, 프로그램화된 예방접종 실시 등의 대책이 수립되어야 한다. 사육관리자는 사육환경에 대한 돼지의 성장과 돈군의 건강상태를 성장 단계별로 예측하면서 관리에 임하고 재발 될 수 있는 관리 상의 오류를 최소화하기 위해 사전 점검과 기록하는 습관을 가져야 한다. 일반적으로 건강한 자돈의 상태는 연령에 알맞게 발육을 하고, 사람이 가까이 가면 사료를 먹기 위해 소리를 지르며, 사료를 남기지 않고, 원기가 있고 다른 돼지와 같이 행동하고 보행이 바르며, 체표와 피모에 광택이 있고, 눈은 생기가 있게 빛나고 콧등이 습하며, 설사나 변비, 이취가 없고, 체온(37.5~39.5℃) 과 맥박(60~80회/분), 호흡(20~30회/분)이 정상을 유지한다. 이유 자돈의 사육 두수를 고려하지 않고 밀사를 하거나, 자돈 돈군의 재편성시 돈사소독을 체대로 실시하지 못하는 등의 문제로 여러 가지 질병을 유발 시킬 수 있으므로 각별히 주의하여 이로 인한 질병의 발생하지 않도록 각별히 주의한다. 외부로부터 작업원이나 작업 물품으로 인한 병원균 차단을 위해 크로넥스(주)에서 준비된 표준 작업 지침서에 따라 입출입 관리하며 사내 구비된 예방접종 프로그램을 적용하여 질병으로부터 자돈을 보호한다.

**● 육성돈의 사양 관리**

자돈의 이유 시부터 체중 20kg(3개월)까지의 육성은 그 이후 성장 및 건강에 큰 영향을 주므로 이유 후 2~3 일간은 환경이 급변하여 식욕이 떨어지고 거동이 불안하며 이유 후 2주령까지는 설사와 피부 질환 등이 발생하기 쉽고 포유기간에 비해 증체가 낮아질 수 있다. 따라서 이 기간에는 동물들이 스트레스를 받지 않도록 세심한 주의를 기울인다.

**- 사료 급여**

이유 후의 자돈에 대하여 정량급여를 할 때는 하루에 2회(오전/오후) 나누어 공급하고 1회 사료 급여량은 5~6분 내에 섭취하는 사료량을 공급한다.

사료 공급량은 크로넥스(주)의 표준작업지침서에 제시된 양에 따라 공급한다.

	<b>Standard Operating Procedures</b>	문 서 번 호	SOP-PM-EX06
<b>동물실험시설의 질병관리 (포유자돈) 표준작업지침서</b>		개 정 번 호	01
		작 성 일	2015.09.30
SOP for disease management of animal experimental facilities (piglets)		관 련 기 준 서	

## 동물실험시설의 질병관리 (포유자돈) 표준작업지침서

(Standard Operating Procedures for disease management of animal experimental facilities (piglets) in BRC)

문서정보 (Document Information)			
문서번호 Document No.	SOP-PM-EX06	개정번호 Revision No.	01
제정일 Written Date	2015.09.30	개정일 Revision Date	2015.09.30
제정자 Written by		개정자 Revised by	
문서 효력발생일* Effective Date	최종 승인 완료 후 14 일 이후	문서 차기검토일 Review Date	효력발생일로부터 1 년 후
문서 배포처(배포수) Document Distribution	BRC 전 부서		

\*시행일:

	<b>Standard Operating Procedures</b>	문 서 번 호	SOP-PM-EX01
<b>동물사육시설 사료, 음수관리에 관한 표준작업지침서</b>		개 정 번 호	01
		작 성 일	2015.09.30
SOP for laboratory animal feeding and drinking water in CRONEX BRC		관 련 기 준 서	

## 동물사육시설 사료, 음수관리에 관한 표준작업지침서

(Standard Operating Procedures for laboratory animal feeding and drinking water in BRC)

문서정보 (Document Information)			
문서번호 Document No.	SOP-PM-EX01	개정번호 Revision No.	01
제정일 Written Date	2015.09.30	개정일 Revision Date	2015.09.30
제정자 Written by		개정자 Revised by	
문서 효력발생일* Effective Date	최종 승인 완료 후 14 일 이후	문서 차기검토일 Review Date	효력발생일로부터 1 년 후
문서 배포처(배포수) Document Distribution	BRC 사육관리부		

\*시행일:

### - 음수

동물에 대한 물 공급은 정상적인 발육과 체내대사에 있어서 없어서는 안 될 중요한 요소이다. 돼지가 물 요구량은 기온의 변화, 발육 정도 및 섭취하는 사료의 종류에 따라 다르나, 보통 사료 섭취량의 3~5배의 양을 섭취하므로 항상 깨끗한 물을 먹을 수 있게 하여야 한다.

크로넥스(주)의 동물 사육 시설은 신선한 음수가 공급될 수 있도록 3중 필터 시스템이 구비된 자동화 된 음수 공급 라인이 구축 되어 있어 음수 공급에 차질이 발생하지 않도록 시설 관리에 각별한 주의를 기울여

야 한다.


표. 돼지의 음수량

계절	평균체중(kg)	음수량(L)	사료섭취에 대한 비율	체중에 대한 비율
여름	50	11.5	5.0	23.0
봄/가을	50	8.0	4.0	16.0
겨울	50	5.0	2.5	10.0

표. 크로벡스(주) 사양관리 시스템 유지를 위한 표준작업지침서 목록

번호	구분	제목	비고
1	동물 사육관리 관련 SOPs	동물사육시설 사료, 음수 표준작업지침서	완료
2		동물실험시설 출입절차 표준작업지침서	
3		개체식별 및 계통유지관리 표준작업지침서	
4		동물사육시설 위생관리 표준작업지침서	
5		동물사육시설 소독 표준작업지침서	
6		종사자 위생관리 표준작업지침서	
7		동물 운송 표준작업지침서	
8		폐기물처리 표준작업지침서	
9		긴급상황 시 대처 표준작업지침서	
11	시설 유지 보수 관련 SOPs	공기조화장치(AHU) 유지/관리 표준작업지침서	구비 완료
12		차량제독기 유지/관리 표준작업지침서	
13		보일러 유지/관리 표준작업지침서	
14		음수 정화 시스템 유지/관리 표준작업지침서	
15		폐수처리 시설 유지/관리 표준작업지침서	
16	수의학적 관리 관련 SOPs	동물 보호법 관련 방침	구비 완료
17		동물복지 관련 방침	
18		격리 안정화와 분리	
19		미니피그의 고통과 스트레스 최소화 가이드라인	
20		돼지 일반 외과	
21		임신돈의 난소 자궁절제술	
22		미니피그의 SPF 유도	
23		미니피그 건강상태 모니터링	
24		부검 및 사후변화 평가	
25		진단 치료 및 질병 관리	
26		실험동물의 마취관련	
27		질병관리(포유자돈)	
28		질병관리(자돈)	
29		질병관리(육성돈)	
30	실험동물의 안락사 관련		
31	병성검사 관련 SOPs	돼지홍막폐렴 진단 표준검사진단법	구비완료
32		구제역 NS type 표준검사진단법	
33		구제역 0 type 표준검사진단법	
34		글래서씨병 표준검사진단법	
35		인플루엔자 H1N1 표준검사진단법	
36		돼지유형성설사 표준검사진단법	
37		TGEV/PRCV 표준검사진단법	
38		PCV 2형 표준검사진단법	
39		PRRSV 표준검사진단법	
40		오제스키병 표준검사진단법	
41		TGEV_항원검사법(PCR) 표준검사진단법	
42		CSFV_항원검사법(PCR) 표준검사진단법	
43		PRRSV_항원검사법(PCR) 표준검사진단법	
44	시험장비 사용 및 유지 관련 SOPs	마이크로플레이트리더(MR01) 사용 및 유지관리 방법	구비 완료
45		고압증기멸균기(AC01) 사용 및 유지관리 방법	
46		혈액생화학분석기(CA01) 사용 및 유지관리 방법	
47		혈구분석기 사용 및 유지관리 방법	
48		원심분리기(CT01) 사용 및 유지관리 방법	

49		건조기(D001) 사용 및 유지관리 방법	
50		전기영동기(EP01) 사용 및 유지관리 방법	
51		젤락(GD01) 사용 및 유지관리 방법	
52		인큐베이터 사용 및 유지관리 방법	
53		미량저울(MB01) 사용 및 유지관리 방법	
54		마이크로원심분리기(MCT01) 사용 및 유지관리 방법	
55		플라즈마멸균기(PS01) 사용 및 유지관리 방법	
56		유전자증폭기(TC01) 사용 및 유지관리 방법	
57		초순수제조장치(UP01) 사용 및 유지관리 방법	
58		항온수조(WB01) 사용 및 유지관리 방법	
59	교육관련 SOPs	종사자 교육에 관한 표준작업지침서	구비완료

	<b>Standard Operating Procedures</b>	문서번호	SOP-VET-10
<b>SPF 미니피그의 사육 및 관리</b>		개정번호	02
SPF MINIPIG HOUSING, CARE of CRONEX MINIPIGS		작성일	2019.06.18
		관련기준서	POL-PM

## SPF 미니피그의 사육 및 관리

(SPF MINIPIG HOUSING, CARE in CRONEX MINIPIGS)

문서정보 (Document Information)			
문서번호 Document No.	SOP-PM-FMDV_NS01	개정번호 Revision No.	02.
제정일 Written Date	2019.06.03.	개정일 Revision Date	2019.06.18.
제정자 Written by	크로넥스 윤기홍 수의사	개정자 Revised by	크로넥스 윤기홍 수의사.
문서 효력발생일* Effective Date	최종 승인 완료 후 14 일 이후	문서 차기검토일 Review Date	효력발생일로부터 1년 후
문서 배포처(배포수) Document Distribution	BRC 시설 전 부서		

\*시행일:

\*구분:

Approval of this document shall be the responsibility of the following functional area representatives of CT GMP Party.

검토 및 승인 (Approval Signatures / Dates)			
작성(Written by)	수의사 Job Title	윤기홍 Name	2019.06.18 Date

### 연구내용3

### 대량생산 기반 구축을 위한 모델 자돈 사양기법 개선

#### ▣ SPF 동물 생산을 위한 병성검증 시스템 구축

- 실험동물의 SPF화 확립은 결과 해석을 위한 실험의 신뢰성 제고 및 재현성 확보 측면에서 매우 중요하게 여겨 짐. 생산된 형질전환 동물의 상업화 및 대량 생산 라인 조성을 위하여 Specific Pathogen Free (SPF) 병성 검증 시스템을 구축 중에 있음.
- 바이러스성/세균성 감염에 대한 진단방법을 개발하고 표준화를 진행 함. SPF 병성검사 항목의 설정은 FELASA (Federation of European Laboratory Animal Sciecnce Associations)와 National SPF Swine Accerdtiting Agency의 가이드라인을 따름.

## 병성 검증 항목

바이러스성 항원 검사	박테리아 검사	기생충 검사
1. PRRSV(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 돼지 생식기 호흡기 증후군	1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 폐렴	1. Mites(응, 개선충)
2. CFSV(Classical swine fever virus) 돼지 열병 (완재/결판 가능)	2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 돼지 흉막 폐렴	2. Louse(이)
3. FMDV(Foot and mouth disease virus) 구제역(완재 두가지 Type)	3. <i>Brucella</i> 돼지 흉막 폐렴	3. <i>Toxoplasma gondii</i>
4. PRV(Pseudorabies virus) 오제스키 병	4. <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> 돼지 단독	4. Chlamydia
5. JEV(Japanese encephalitis virus) 일본 뇌염	5. <i>Haemophilus (Glasser's disease)</i> 글래스러시병	5. Ticks(진드기)
6. PPV(Porcine parvovirus) 돼지 바이러스 감염증	6. <i>Lawsonia intracellularis</i> 돼지축식상장염	
7. PEDV(Porcine epidemic diarrhea virus) 돼지 유행성 설사		
8. IV(influenza virus)		
9. TGEV(Transmissible gastroenteritis of swine virus) 돼지 전염성 위장염		
10. Encephalomyocarditis virus		
11. <i>Pooreia Circovirus 2</i> 돼지 전신성 소모성 질병		

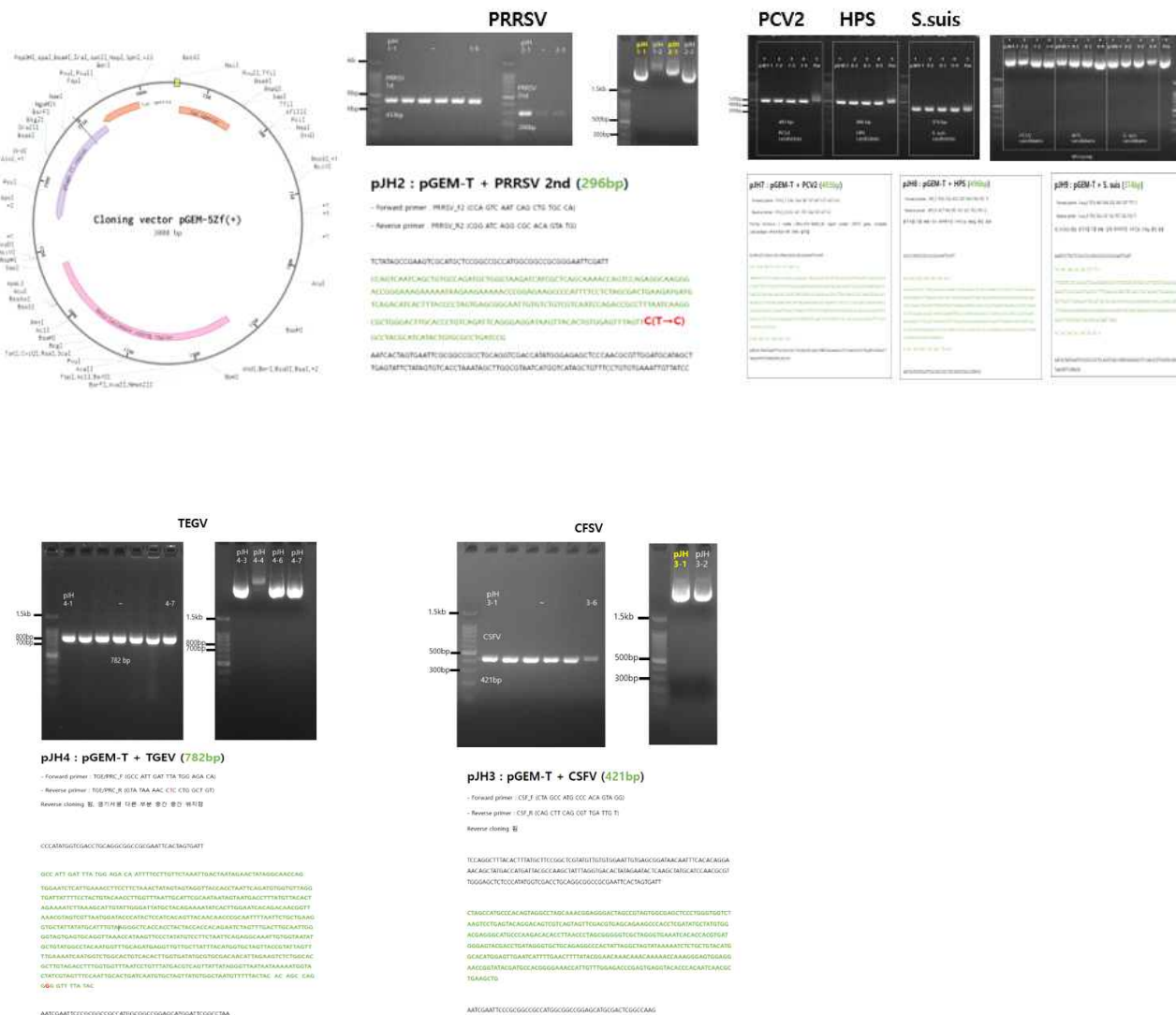
PCR법, Serum: ELISA, 표준 적합법 5-7 일, 검사면 혹은 장항원 PCR 가능 혹은 부검

Reference

FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations
National SPF Swine Accrediting Agency, Inc. (National SPF Agency)

In their acceptance criteria, 7 main specific growth retarding diseases and conditions are controlled,  
 -pneumonic lesions 폐렴 병변  
 -turbinate atrophy 비개골의 위축  
 -Mange 개선충(응)  
 -Lice 이  
 -swine dysentery 돼지 설사병  
 -Pseudorabies  
 -Brucellosis 브루셀라병


- 바이러스성/박테리아성 감염의 검경 및 검경 표준화를 위하여 PRRSV, TGEV, CFSV, PCV, HPS, *Streptococcus suis*의 양성 대조군 제작을 완료함.





▣ **형질 전환 동물의 부검 프로토콜 확립**

- 형질전환 동물의 부검 및 사후변화 평가를 수행하기 위한 SOP를 구축함.
- 생산된 자돈의 관리를 위한 건강상태 모니터링 SOP를 구축.

	<b>Standard Operating Procedures</b>	문 서 번 호	SOP-VET-15
<b>부검 및 사후변화 평가</b>		개 정 번 호	02
		작 성 일	2019.06.18
NECROPSY and POST-MORTEM EXAMINATION of CRONEX MINIPIGS		관 련 기 준 서	POL-PM

## 부검 및 사후변화 평가

(NECROPSY and POST-MORTEM EXAMINATION of CRONEX MINIPIGS)

문서정보 (Document Information)			
문서번호 Document No.	SOP-VET-15	개정번호 Revision No.	02
제정일 Written Date	2019.06.12.	개정일 Revision Date	2019.06.18.
제정자 Written by	크로넥스 윤기홍 수의사	개정자 Revised by	크로넥스 윤기홍 수의사.
문서 효력발생일*	최종 승인 완료 후 14 일 이후	문서 자기검토일	효력발생일로부터 1 년 후

	<b>Standard Operating Procedures</b>	문 서 번 호	SOP-VET-11
<b>미니피그 건강상태 모니터링</b>		개 정 번 호	02
		작 성 일	2019.06.18
HEALTH MONITORING of CRONEX MINIPIGS		관 련 기 준 서	POL-PM

## 미니피그 건강상태 모니터링

(HEALTH MONITORING in CRONEX MINIPIGS)

문서정보 (Document Information)			
문서번호 Document No.	SOP-VET-11	개정번호 Revision No.	02
제정일 Written Date	2019.08.05.	개정일 Revision Date	2019.06.18.
제정자 Written by	크로넥스 윤기홍 수의사	개정자 Revised by	크로넥스 윤기홍 수의사.
문서 효력발생일* Effective Date	최종 승인 완료 후 14 일 이후	문서 자기검토일 Review Date	효력발생일로부터 1 년 후
문서 배포처(배포수) Document Distribution	BRC 시설 전 부서		

\*시행일:

\*구분:

*Approval of this document shall be the responsibility of the following functional area representatives of CT GMP Party.*

검토 및 승인 (Approval Signatures / Dates)			
작성(Written by)	수의사 <small>Ink Title</small>	윤기홍 <small>Name</small>	2019.06.18 <small>Date</small>



## 제1 협동과제

아부다비 생명공학연구원

유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발

**세부목표 : 흑색종 질환모델건 생산 및 자건의 관리 시스템 확보**

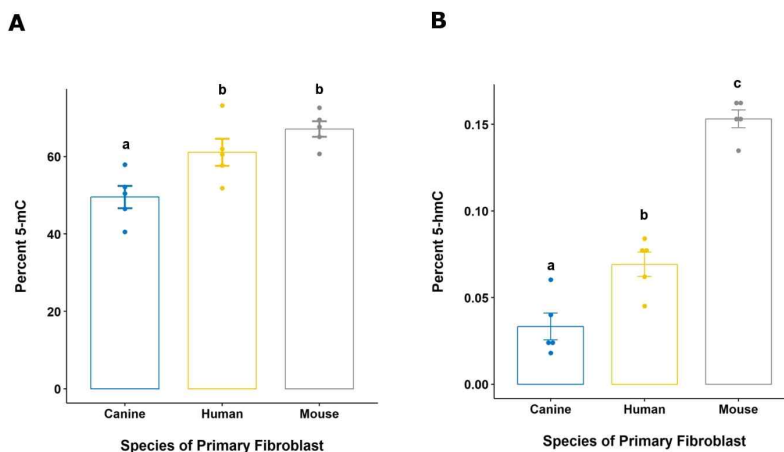
### 연구내용1

### 실험건 유도만능 줄기세포 와 배반포의 유전자 발현 양태를 분석

- 비투과성으로 디자인된 효율적인 CytoTune Sendai 바이러스 유전자 전달 시스템을 이용하여, 실험건 섬유아세포의 DNA 탈메틸화가 촉진되는지 확인함.
- 실험건의 태아 섬유아세포 재프로그래밍의 초기에 TET- 매개 5-hmC 생성을 향상시키는 생리학적 대사물에 의해 강화 함로서 중간엽 상피 전환 기능 (mesenchymal-to-epithelial transition, MET)이 촉진됨.

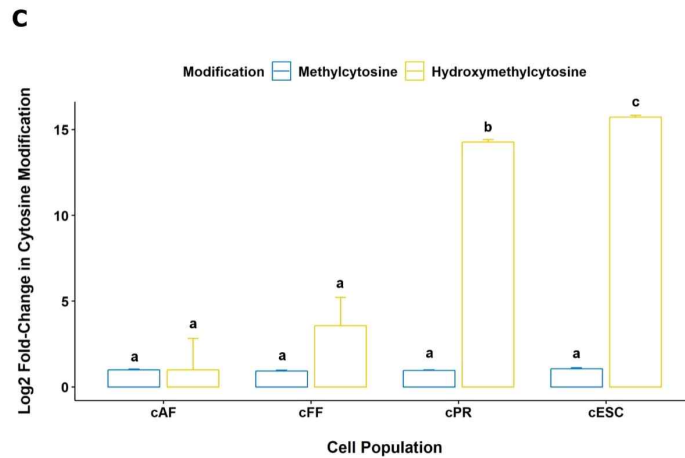
#### ■ 5hmC 실험건, 사람 및 마우스의 섬유아세포 비교

- TET 활성화는 메틸 사이토신 (5-mC)에서 5-하이드록시 메틸 사이토신 (5-hmC)으로의 전환을 용이하게 함으로써 체세포의 리프로그래밍 역할을 한다고 여겨짐.
- 포유동물 체세포 게놈에서 글로벌 시토신 메틸화 (DNMT에 의해 촉매 화) 또는 시토신 하이드 록시 메틸화 (TET에 의해 촉매화)의 정도가 다른지 확인하기 위해, 실험건과 사람, 마우스의 섬유아세포의 5mC 및 5hmC 수준의 비교 분석을 수행.
- 각 어셈블리에서 CpG 디 뉴클레오티드 밀도에 대해 조정 된 5- 메틸 시토신의 백분율이 실험건, 인간 및 마우스에서 일차 섬유아세포 사이에서 현저히 다르다는 것을 발견함 (그림 A,  $F = 9.68$ ,  $P = 3.13 \times 10^{-3}$ ).
- 총 게놈 메틸화는 인간 신생아 BJ1 섬유 아세포 (그림 A,  $P = 3.67 \times 10^{-2}$ ) 또는 CF1 마우스의 배아 섬유 아세포 (그림 A,  $P = 2.60 \times 10^{-3}$ )와 비교하여 실험건 섬유아세포에서 유의하게 더 낮음.
- 시토신 하이드록시 메틸화의 정도는 인간 섬유아세포 및 실험건 섬유아세포에 비해 마우스 섬유 아세포에서 유의하게 더 높았음(그림 B,  $P = 3.7 \times 10^{-6}$  및  $P = 1.0 \times 10^{-7}$ ). 또한, 5 hmC 수준은 또한 실험건 섬유아세포에 비해 인간 섬유아세포에서 더 높음(그림 3B,  $P = 6.83 \times 10^{-3}$ ).



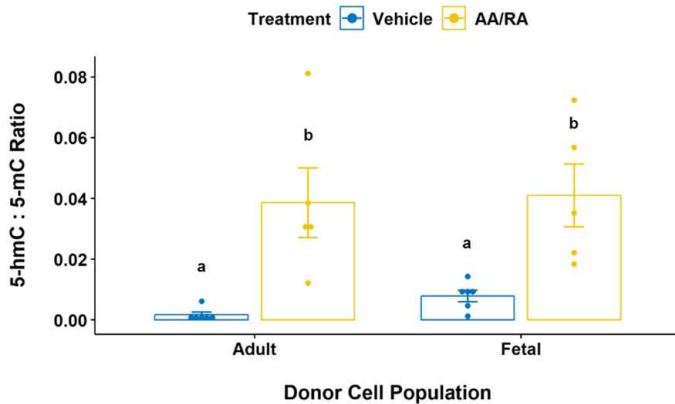
- Basal 5-hmC는 cFF와 cAF간에 유의한 차이가 없었으며 ( $P=0.98$ ), 분화 된 세포 집단은 다능성 cESC ( $P < 1 \times 10^{-7}$ ) 및 전이성을 갖는 실험건 체세포유래 리프로그래밍 유사줄기 세포 (canine partially reprogrammed stem cell; cPR) 세포와 비교하여 더 낮은 5-hmC (~ 150 배)를 나타냄. (그림 C,  $P < 1 \times 10^{-7}$ ). 이들 결과는 정상 상태 시토신 변형 수준, 특히 5-hmC가 개체에 따른 종 및

연령에 영향을 받고 iPSC를 생성하는 영향을 미칠 수 있음을 시사함.

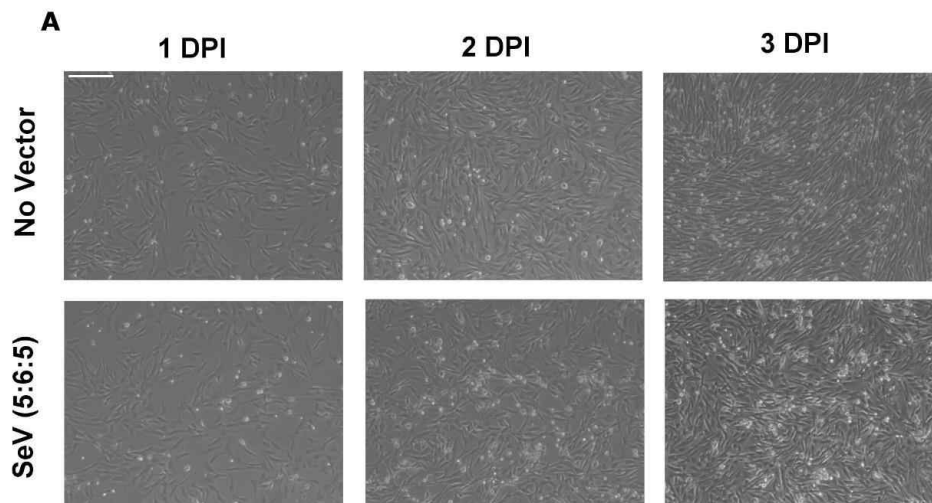


**▣ 아스코르브산 (AA)과 레티노산 (RA)은 초기 실험견 세포주의 리프로그래밍에서 상피화를 촉진함**

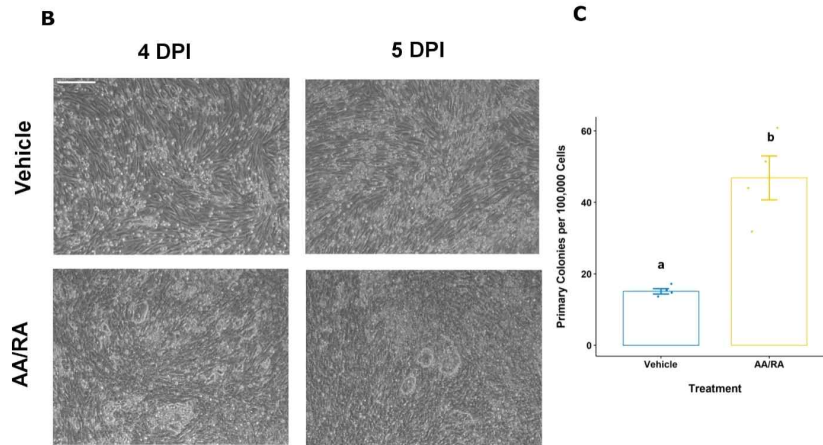
- AA / RA로 처리 된 cAF 및 cFF의 이변량 분석은 공여세포의 연령이 아닌 처리 ( $P = 1.03 \times 10^{-4}$ ) ( $P = 0.535$ )가 5-hmC : 5-mC 비율에 유의하게 영향을 미치는 것을 확인함 (그림 S3).



- 3세대 cFF 세포는 우수한 성장 속도로 인해 공여핵원 후보군으로 선택됨.
- 바이러스 형질 도입 후 처음 48 시간 동안, 형질 도입되지 않은 대조군 세포에 비해 SeV 형질 도입 된 cFF에서 약간 더 높은 세포 독성 수준을 관찰됨 (~ 8 % 대 ~ 20 %, 시각적 기록) (그림A).



- AA / RA 또는 SeV처리 24 시간 후, 형질 도입 된 cFF는 과증식성 상태로 들어감.
- AA / RA로 처리하고 SeV 형질 도입된 cFF는 4-DPI에 의해 상피 특성을 갖는 작은 군집을 나타내었고, 이는 크기 및 빈도가 5-DPI만큼 증가함 (그림 B).
- 흥미롭게도, AA / RA- 처리 된 세포가 MEF 피더세포에 계대 배양할 때, 더 많은 1 차 콜로니를 형성한다는 것을 관찰함 (그림 C, P = 0.0286).



- 체세포 표면 마커와 표면 마커를 모니터링함으로써 생산적인 리프로그래밍 세포주를 분리함.
- 실험견 섬유 아세포 집단은 CD90 / THY1 (그림 A) 및 CD44 / ECMR-III (그림 B)과 같은 중간엽 세포 유형의 특징적인 면역 반응성 당단백질 항원 결정기임.
- 체세포 유형 사이에 더 높은 단계의 리프로그래밍을 위해서는 배아줄기세포와 유사한 과메틸화된 조직-특이적 유전자와 양의 상관 관계가 있음.
- 또한, 배아 및 태아 세포주는 종종 분화된 성체 세포와 비교하여 이소성 트랜스팩터가 더 적은 경우에 더욱 효율적으로 리프로그래밍됨.
- 실험견에서 성체 또는 태아 섬유아세포, 부분적으로 리프로그래밍된 세포 또는 ES 세포 사이의 게놈 CpG 디뉴클레오티드 사이에서 5-mC의 비율의 차이를 발견하지 못함.
- 그러나, 5-hmC 수준은 체세포 섬유 아세포보다 cES 및 cPR 세포와 관련이 있음을 밝힘.
- 흥미롭게도, 실험견 섬유아세포는 인간 및 마우스 섬유 아세포와 비교하여 5-hmC에서 결핍됨.
- 이것은 부분적으로 산화에 이용 가능한 5mC 기질의 세포 전체의 수준을 낮추거나, 배양 기간 또는 개체 차이일 가능성이 있음.

## 연구내용2

## 흑색종 모델 자견의 안정적인 성장을 위한 자견 관리 시스템 구축

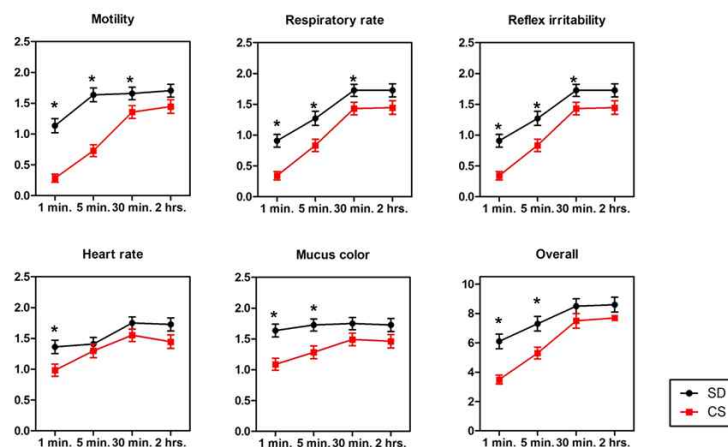
### ▣ 복제 자견의 출산 방법에 따른 자견 Apgar 스코어링 시스템 적용

- Apgar 점수는 신생자견의 생존력을 확인하고 즉각적인 수의사의 개입이 필요한 시점 제공하기 위해 평가 프로토콜 제시하였음.
- 종들 사이의 해부학적 및 생리학적 차이는 개별 종 특성에 따라, Apgar 스코어링에 대한 조정이 필요함.
- 이 수정된 Apgar 점수 시스템은 다양한 동물의 신생동물의 생후 순환장애를 평가하는 데 사용되어 옴.
- 소에서 변형 된 Apgar는 육체 능력 (흡입, 입식 및 음주 행동) 및 혈액 화학 (젖산, 포도당, 면역 글로불린, pH, 염기 과량, pCO<sub>2</sub>)과 병행하여 신생아 송아지의 생존력을 평가하기 위해 제안됨.
- 수정된 Apgar 점수 시스템은 의료 검사와 더불어 신생자견 생존력에 대한 신속한 수의학적 중재에 성공적으로 적용되어 옴.
- 자연 생식과는 달리, 복제견에서는 잠재적인 실험자견과 실험대리모견 간의 생리적인 불일치를 포함하여 복제 자견의 활성화에 대한 장벽이 내재함.

- 복제견 모델 생산 효율은 여전히 낮은 수준이지만, 배아에서 건강한 신생자견까지 생산 효율을 개선하기 위한 최적 조건에 대한 분석을 수행하였음.
- 복제견의 생존 가능성에 대한 보고는 거의 없었으며 평가 프로토콜이 제시된 바가 없음.
- 따라서, 적절한 산과학적 처치 및 간섭을 평가하고 복제견 특화된 기준으로 보완하였으며, 수정된 Apgar 방법을 확립하였음.
- Apgar scoring system
  - 분만 후, 실험견의 ID 식별, 생시 체중 측정 및 실험견의 모체 찾기 행동을 관찰함.
  - Apgar 점수는 심박수, 호흡, 과민성 반사, 운동 및 막점액 색을 기준으로 평가.
  - 각각의 실험견 총 점수가 그들의 Apgar 점수로서 평가된 5개의 변수로부터 각각에 대해 0 내지 2의 점수가 주어졌다.
  - 7-10의 점수는 실험자견이 호흡/순환기계에 장애가 없는 높은 점수.
  - 중간 점수는 4에서 6까지이며 중간 정도의 장애를 겪는 것으로 간주.
  - Apgar 점수가 3 이하인 실험자견이 심한 고통을 겪는 것으로 간주.

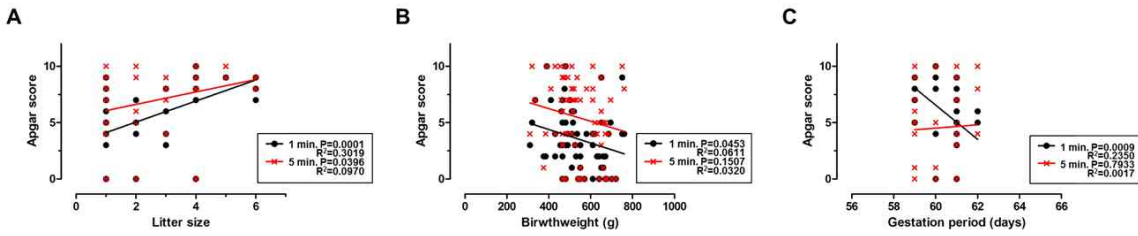
### ▣ 제왕절개 (CS) 와 자연분만 (SD)에 따른 Apgar 점수의 개별 구성 요소에 따른 점수

- 시간에 따른 Apgar 점수의 개별 구성 요소의 변화가 관찰됨.
- SD 그룹의 자견은 출생 후 1 분에서 30 분까지의 개별 운동성, 호흡 수 및 반사 자극성은 CS보다 유의적으로 높음
- SD 그룹에서는 1분의 심박수와 1분에서 5분의 점막의 색이 유의적으로 높음.
- SD와 CS의 평균 Apgar 점수는
  - 1 분 SD vs. CS:  $6.1 \pm 0.5$  vs.  $3.5 \pm 0.3$
  - 5 분 SD vs. CS:  $7.3 \pm 0.5$  vs.  $5.3 \pm 0.4$ ,
  - 30 분 SD vs. CS:  $8.5 \pm 0.5$  vs.  $7.5 \pm 0.5$ ,
  - 2 시간 SD vs. CS:  $8.6 \pm 0.5$  vs.  $7.7 \pm 0.5$ .
- 30 분 후에 대부분의 매개 변수가 1.5 이상으로 회복되었으며, 30 분까지 이 점수로 회복되지 않은 모든 실험자견은 생존하지 못했다.



### ▣ Apgar 점수와 실험자견 매개 변수의 상관 관계

- Apgar 점수와 실험자견 매개 변수 사이의 상관 관계를 조사함.
- SD 그룹은 1 분과 5 분에서 Apgar 점수는 실험신생자견의 크기와 양의 상관 관계를 보임.
- 생시 1 분에서 Apgar 점수는 출생 체중과 임신 기간 사이에 음의 상관 관계를 보임.



- 수의학 전문 저널(Theriogenology, Animal reproduction of Science)에 투고했으나, 추가적인 데이터 요청으로 현재 새로운 데이터 수집중.
- Apgar 점수를 토대로 형질전환 복제 자견을 집중 관리하고, 형질전환의 특성을 지닌 품종을 선발하고자 함.
- 연구원 내에 자견을 집중적으로 관리하는 시설이 이미 갖추어져 있고, 24시간 3교대를 통해 모유 섭취량 대비 체중 증가량을 기록하고 있음.
- 고려대학교 연구진들과 공동으로 육안으로 확인되는 특성 뿐만 아니라 분자 유전학적인 분석을 통해서 선발함.

**세부목표 : Ras 기반 흑색종 모델견 생산**

**연구내용1 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포핵이식 기법 적용으로 모델견 생산/생산된 흑색종 질환 모델견의 흑색종 발병 유도**

**▣ Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주**

- 당초 계획은 위탁연구기관은 고려대학교와 함께, Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 모델견을 생산하기로 하였으나, 중간단계에 복제견을 생산하기보다 세포주를 확보하는 것이 우선이라는 판단함.
- 체세포핵이식 기술을 통해 모델견을 생산했을 시, 사후 관리에 상당한 비용과 인력이 투입되는 경제적인 문제점 및 생검 시에 윤리적인 문제가 야기 될 수 있음.
- Ras 기반의 세포주를 이용해서 복제배아를 작성하고 이를 대리모견에 이식후, 임신 27일령에 제왕절개를 통해 회수함.
- 표. 성숙난자의 외과적 회수 결과

Date	Surgery		Retrieved oocytes					SCNT			ET Emb.
	Flushin g	ET	Total	Mat.	Imm.	Aged	Rup.	Enu.	Fusion	Fused	
19/7/4	9	2	89	22	9	54	4	82	73	29	73
19/7/5	9	2	102	29	0	63	10	92	88	41	88
19/7/6	9	2	112	46	11	52	3	108	100	40	100
19/7/8	8	2	103	39	9	47	8	94	88	37	88
계	35	8	406	136	29	216	25	376	349	147	349

- 총 35마리의 난자 공여견으로부터 406개의 난자가 회수가 되었고 136개의 성숙난자가 회수됨.
- 체세포 복제에 활용가능한 난자 376개가 사용되어 147개의 복제배아를 작성함.
- 표. 복제 배아의 외과적 이식 결과

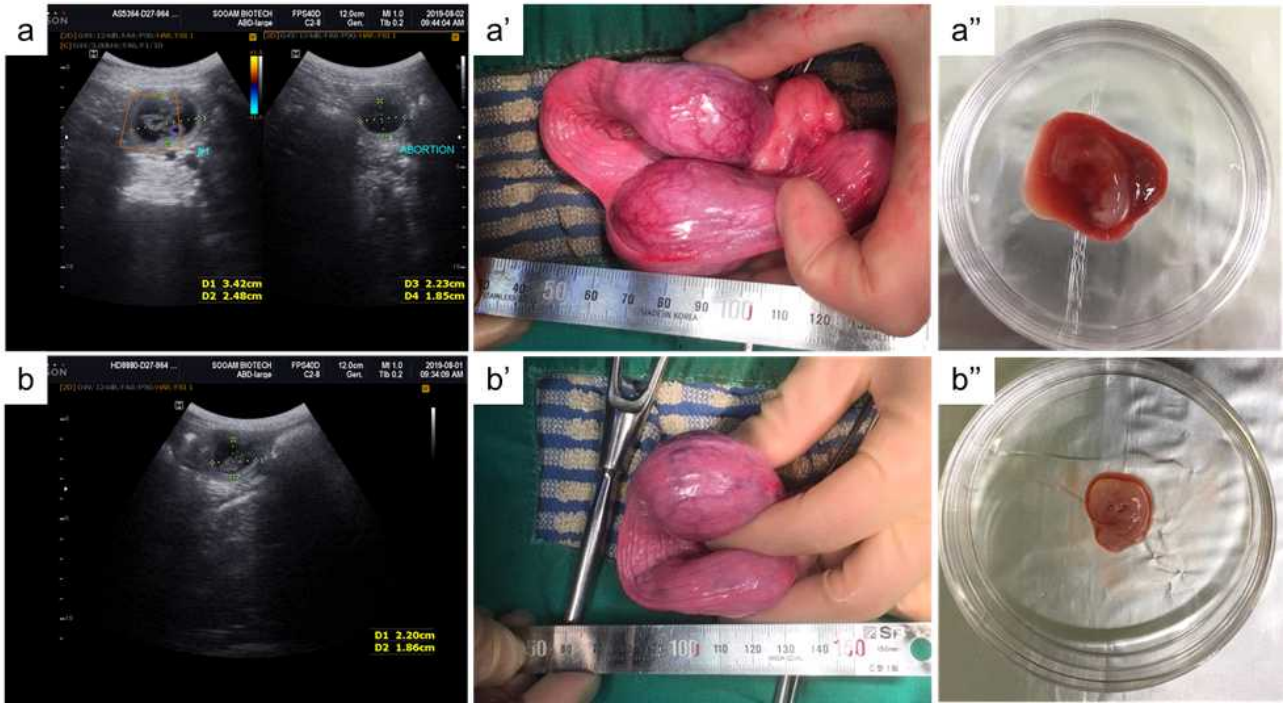
No.	Surrogate mother			
	이식일	Recipient ID	Parity	ET site
1	19/7/4	HD8864	경산	Lt
2	19/7/4	HD8848	경산	Lt
3	19/7/5	HD8880	경산	Lt
4	19/7/5	HD8835	경산	Lt
5	19/7/6	AS5342	경산	Lt
6	19/7/6	AS5364	경산	Lt
7	19/7/8	AS5354	경산	Lt
8	19/7/8	AS5370	초산	Lt

- 총 8마리의 대리모건을 사용함. 대부분의 대리모건은 임신 경험이 있는 경산이고 모두 왼쪽 난관으로 이식됨.
- 체세포 복제시 사용된 공여핵원의 정보와 이후 이식된 배아의 수

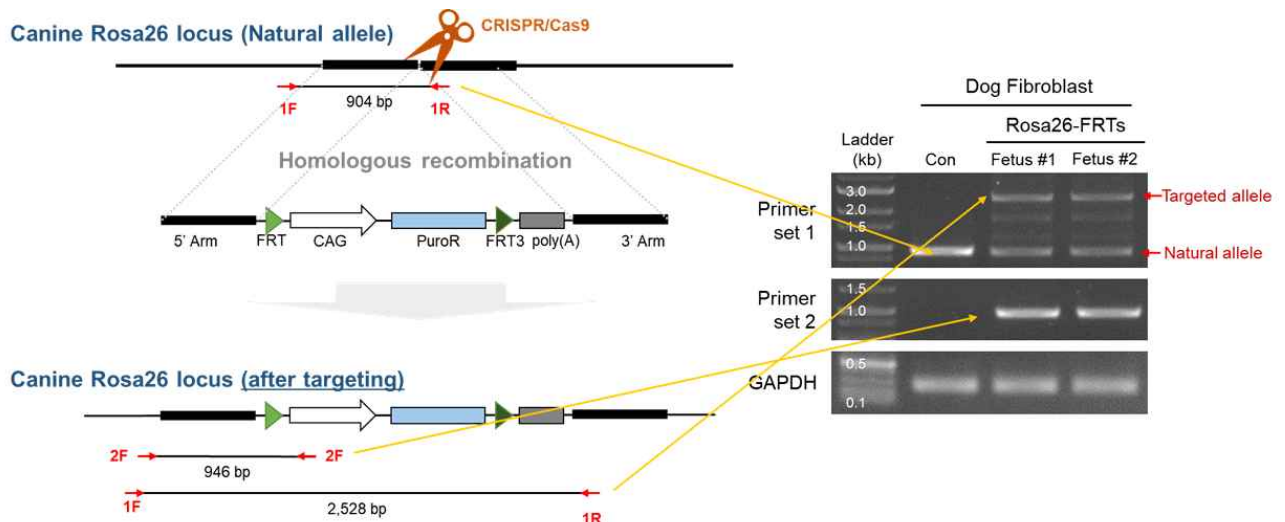
No.	Embryo			
	Fused 배아	ET 배아	Donor cell	Cell passage
1	15	41	964 Rosa 26	7
2	14	32	964 Rosa 26	7
3	20	44	964 Rosa 26	7
4	21	44	964 Rosa 26	7
5	26	49	964 Rosa 26	7
6	14	51	964 Rosa 26	7
7	16	45	964 Rosa 26	7
8	21	43	964 Rosa 26	7

- 147개의 복제배아가 성공적으로 융합이 되었고, 349개의 난자가 8마리의 대리모에 이식이 됨.
- 복제에 사용된 공여핵원은 위탁 연구기관인 고려대학교에서 생산된 Rosa기반 모델 세포주임.
- 임신 진단 결과 및 태아의 개수

No.	Pregnancy Diagnosis			
	Date of PD	Gestational period	PD result	No. of sac
1	19/7/31	27	-	-
2	19/7/31	27	-	-
3	19/8/1	27	+	1sac, 1abortion
4	19/8/1	27	-	-
5	19/8/2	27	-	-
6	19/8/2	27	+	1sac, 1abortion
7	19/8/5	28	-	-
8	19/8/5	28	-	-



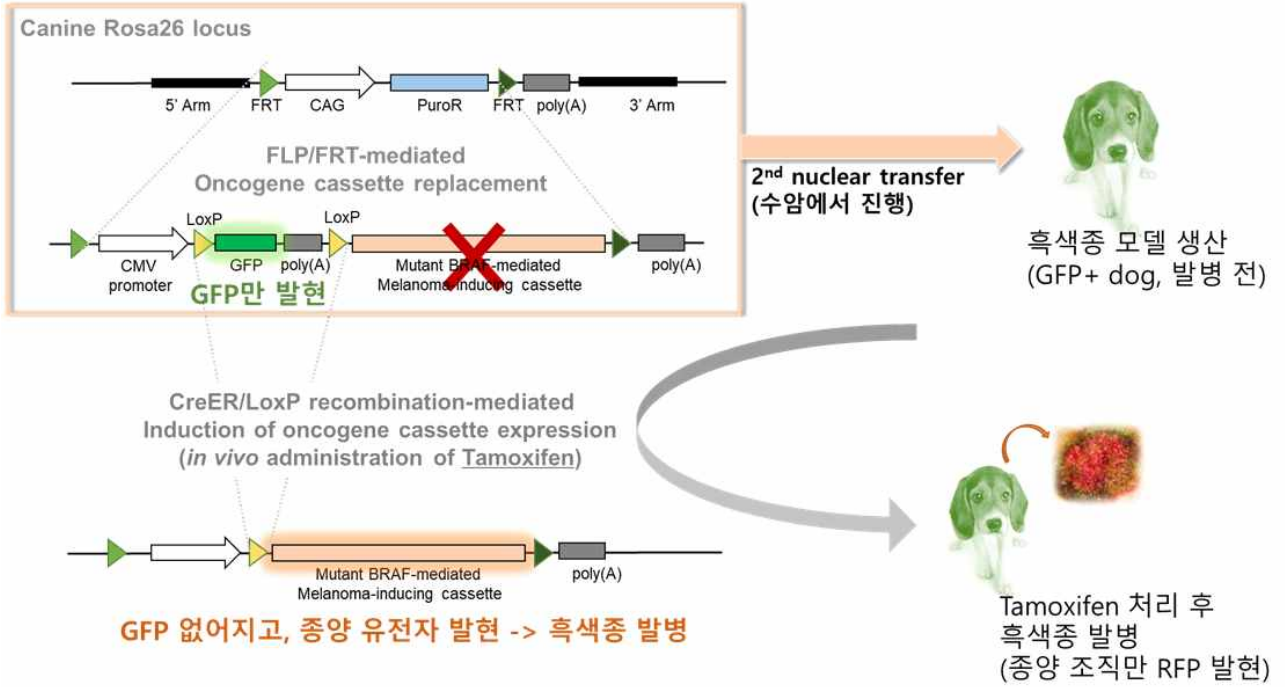
- 배아 이식 후, 27-28일령에 초음파 임신 진단으로 태아를 확인하고 8마리의 대리모 중 2마리가 임신 양성이 확인되어 바로 제왕절개 수술을 시도함.
- 초음파 상으로 2두의 대리모에서 각각 1개의 임신낭, 2개의 임신낭이 확인되었으나, 제왕절개시 각 1개의 태아가 확인되어, 초대배양을 실시함.



- 초대배양을 마친 동결 세포는 위탁 연구기관으로 분양이 되었고, 두 태아 세포 모두 CRISPR/Cas9 기법으로 건 특이적인 Rosa26 locus가 표적된 것을 확인함.



**Cell line construction (고려대에서 진행)**



- 중간 산물로 생산된 Rosa26 locus가 삽입된 초대배양 세포를 통해, 다음 단계로 CreER/LoxP 시스템을 도입하여 모델견이 확립되었을 때, Tamoxifen을 투여로 어느 시기에든 발병을 유도할 수 있는 세포주를 생산하고 이를 체세포 핵이식의 공여핵원으로 사용할 계획임.



## 제2 위탁과제

고려대학교 산학협력단

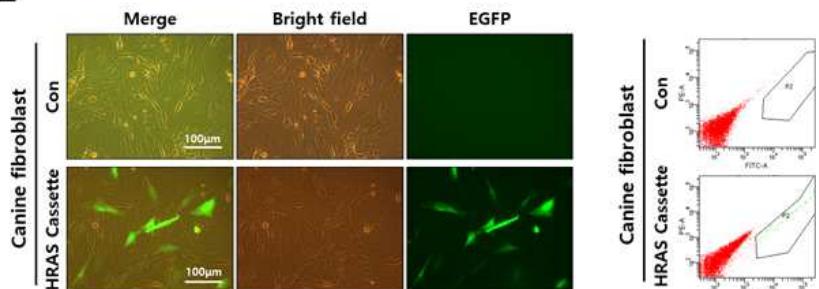
흑색종 유도 시스템을 도입한 증대동물 형질전환 세포주 개발

**세부목표** : Ras 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 공여 핵원으로써의 유효성 검증

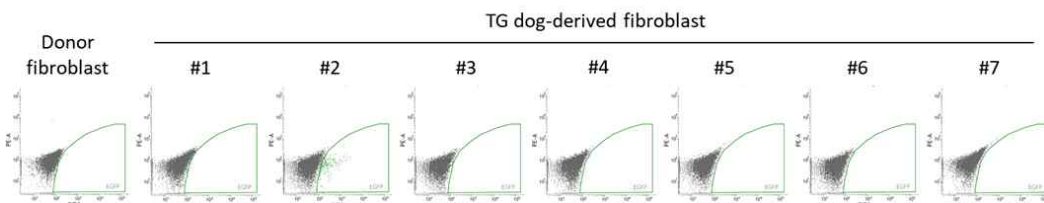
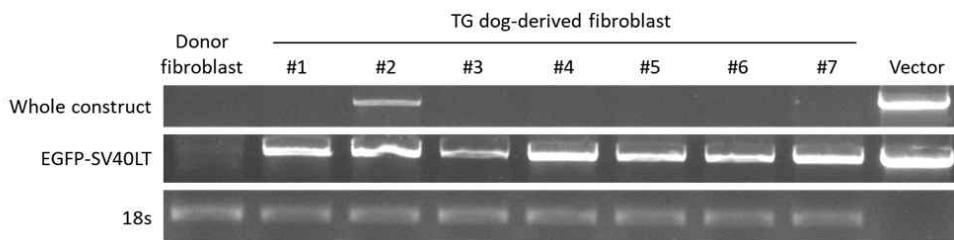
### 연구내용1

Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환견, 미니돼지 세포주 구축

#### ▣ Ras 기반 흑색종 유도 벡터시스템 도입 형질전환견 세포주 구축 및 태어난 형질전환견 분석



- 1차년도에 Ras 기반 흑색종 유도 벡터시스템을 도입한 GFP 발현을 하는 형질전환견 세포주를 아부다비 생명공학연구원으로 보냈음(1차년도 결과).
- 아부다비생명공학연구원에서 모델 세포주를 이용해 핵이식을 수행하여, 성공적으로 임신에 성공함.



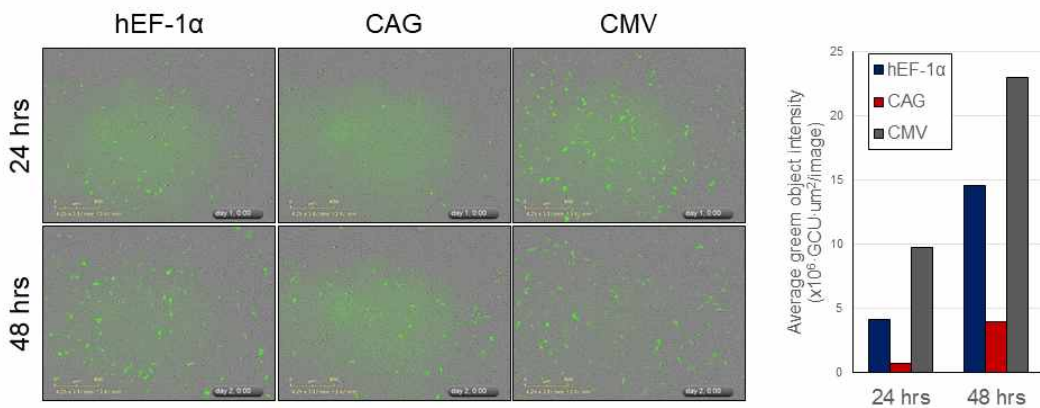
- 총 6마리의 실험견 태아와 1마리의 태어난 실험견 유래 세포를 확보하여 유전체 분석을 실시함.
- 그 결과, 7개 세포 모두 도입한 유전자가 들어있는 것으로 확인이 되었으나, 이 중 흑색종을 일으키는 데 필요한 벡터 시스템 전체가 들어간 것은 #2 한 개체인 것으로 확인됨.
- 추가로, 현미경을 통해 모든 세포를 GFP 발현을 확인하였으나, 현미경으로 관찰 가능한 GFP 발현을 하는 세포가 하나도 없었음. 이를 다시 검증하고자 Fluorescence activating cell sorting (FACS) 장비를 이용해 GFP 발현을 확인하였으나 #2번만이 미세한 GFP 발현이 되고 있었으나, 대다수는 GFP 발현이 확인되지 않는 것을 확인하였음.
- 이 결과를 통해, 흑색종 유발 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 서열인 CAG 프로모터는 개과 동물에서 유전자 발현에는 적합하지 않다고 결론을 내렸음.
- 추가적으로 임신된 7마리의 개체 중 1 개체만이 전체 시스템이 도입된 것으로 확인된 만큼 큰 사이즈의 플라스미드 벡터가 온전히 유전체에 삽입되는 효율이 매우 좋지 않다는 것을 확인하였음.

**■ Ras 기반 흑색종 유도 벡터시스템 도입 형질전환 미니돼지 세포주 구축**

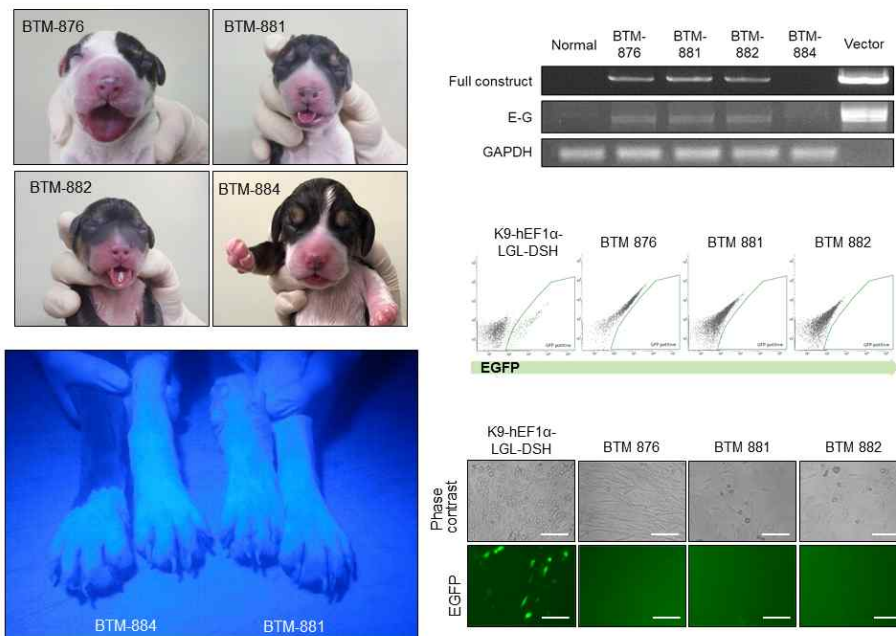
- 실험견 유래 세포와 마찬가지로 미니돼지 유래 세포에 동일한 Ras 기반 흑색종 유도 벡터시스템을 도입하여 GFP를 발현을 하는 형질전환 미니돼지 세포를 확보하고자 하였으나, 대다수는 in vitro의 세포주 제작 과정에서 빠르게 GFP 발현이 꺼져버리는 현상을 관찰하였음.
- 이 결과를 통해, 실험견과 마찬가지로 흑색종 유발 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 서열인 CAG 프로모터는 돼지와 동물에서도 외부 유전자의 발현을 유도하는데에는 적합하지 않다고 결론을 내렸음.

**■ Ras 기반 흑색종 유도 벡터시스템의 보완**

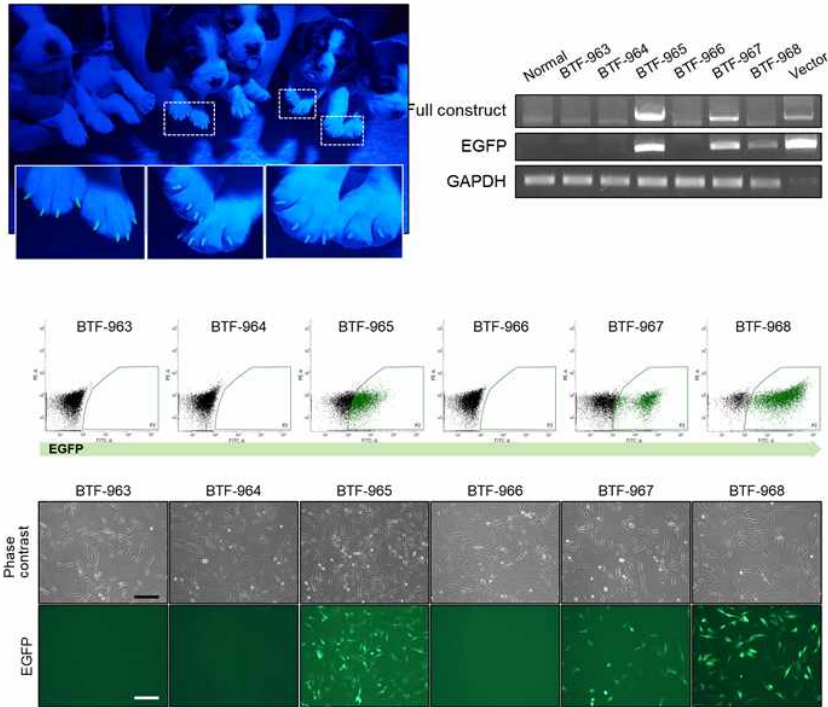
- 기존에 계획했던 CAG 프로모터 서열이 형질전환 쥐 모델에서 안정적인 발현을 유도한다는 선행 보고들과는 달리 개와 돼지에서는 적합하지 않음을 확인하였음. 이에 다른 대체 프로모터 서열을 사용하기로 결정함. 일반적으로 많이 사용하는 human EF-1 $\alpha$  프로모터와 CMV 프로모터 서열의 유효성을 실험견 모델에서 검증하기로 함.



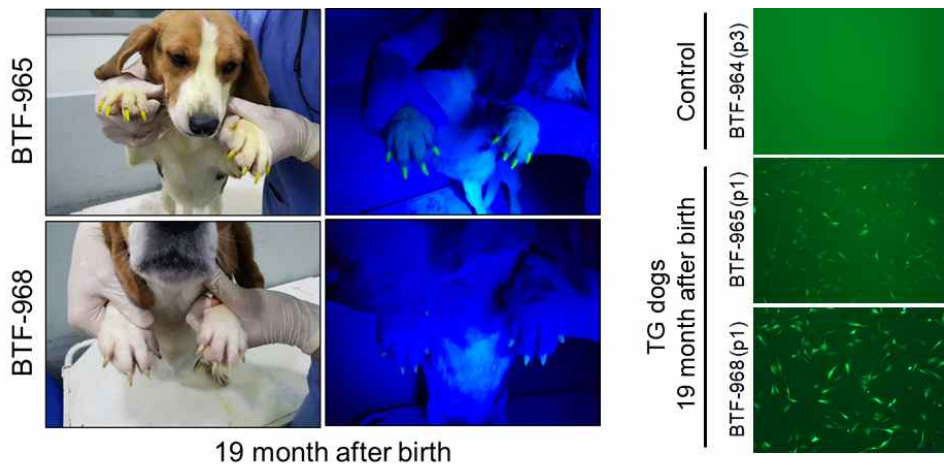
- EGFP 유전자를 리포터 유전자로 활용하여 hEF-1 $\alpha$ , CAG, CMV 프로모터 서열을 in vitro 수준에서 실험견 섬유아세포에 도입하여 형광 발현 정도를 비교한 결과, CMV 프로모터가 가장 효과적으로 발현을 유도하는 것으로 확인하였음.
- 체세포 핵이식을 통해 태어난 형질전환 실험견에서 프로모터 활성을 GFP 발현을 통해 검증하기로 하였음.



- 우선 hEF-1 $\alpha$  프로모터 서열에 의한 GFP 발현을 관찰한 결과, 형질전환된 개체와 세포 수준 모두에서 EGFP 발현이 silencing 된 것을 확인하여, 적합한 프로모터 서열이 아님을 확인함.



- 다음으로, CMV 프로모터 서열에 의한 GFP 발현을 관찰한 결과, 형질전환 된 개체와 세포 수준 모두에서 EGFP 발현이 잘 되는 것으로 확인하여, 적합한 프로모터 서열로 결정함.
- human EF-1 $\alpha$  와 CMV 프로모터의 활성 정도를 비교검증 한 결과를 현재 PLoS One 저널에 투고 중임.



CMV 프로모터 서열이 일반적으로 methylation에 의한 silencing이 잘 나타나는 것으로 알려져 있어, in vivo에서 EGFP 발현이 지속적으로 나타나는지 검증하기 위해 생후 19개월에 다시 분석해본 결과, EGFP 발현이 잘 나타나는 것을 확인하였음. 따라서 CMV 프로모터 서열이 개 모델에서 적합한 프로모터 서열임을 확인하였음.

실험 결과에 따라, 기존 벡터 시스템에 적용되었던 CAG 프로모터 서열을 CMV 프로모터 서열로 치환하는 클로닝을 수행하였음.

- 국제 학술지 Plos one에 고려대학교 공동으로 투고하여 리뷰 진행중.

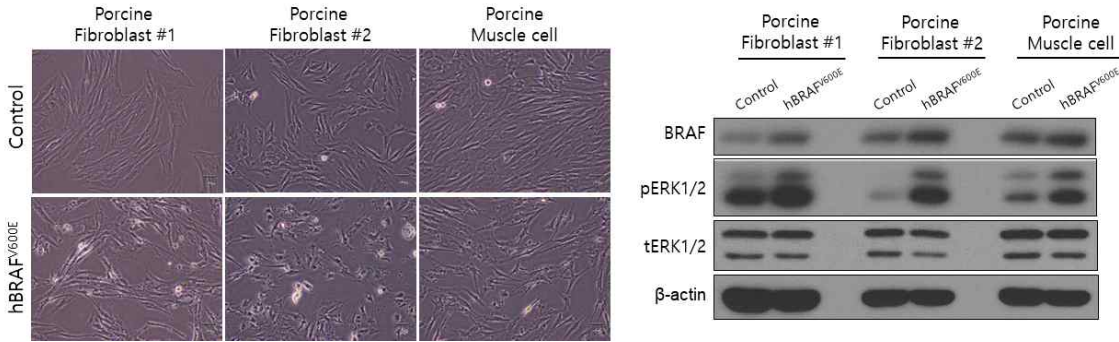
### ▣ 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델견 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축

- 상기 문제에 따라, 흑색종 유도 벡터 시스템이 도입 된 실험견과 돼지 모델 유래 세포에 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템을 도입하는 것은 3차 년도 내용으로 계획 변경 됨.

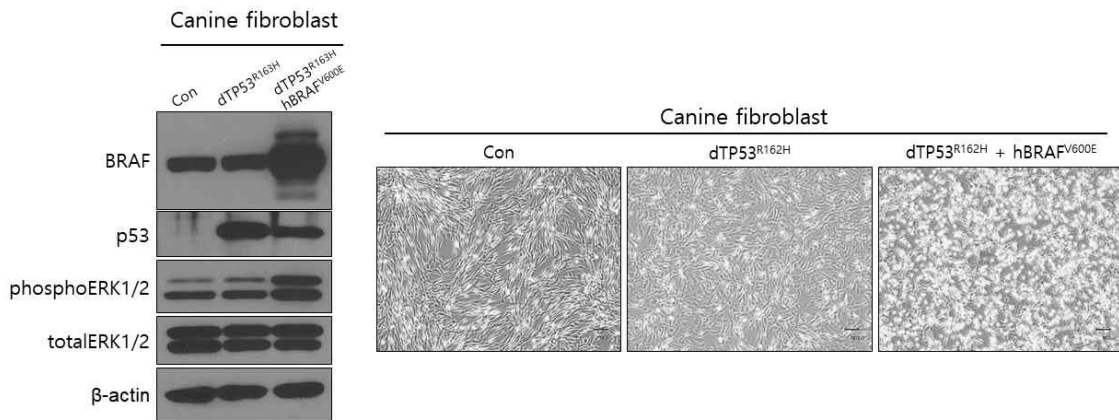
## 연구내용2

Safe harbor locus 유전자 타게팅 기법을 적용한 Braf 유전자 기반 흑색종 발병 시스템 개발 (3차 년도 내용)

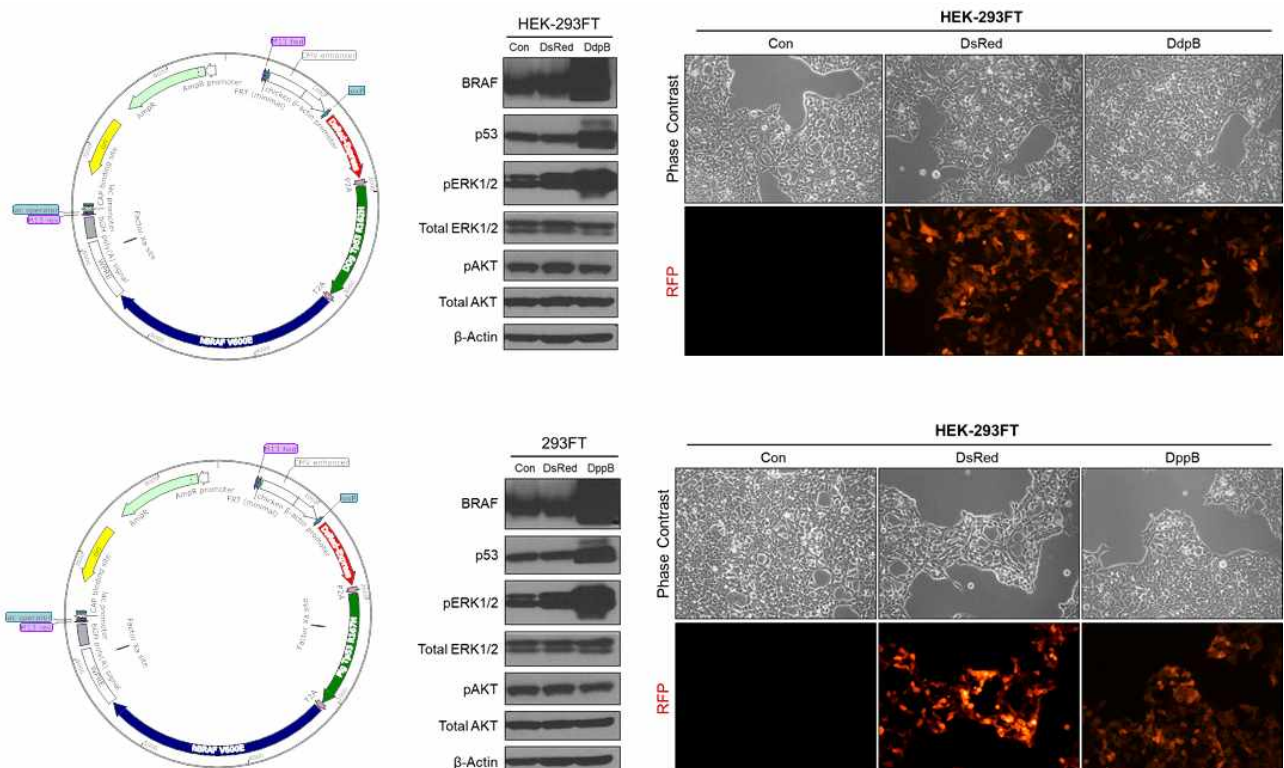
### ■ Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가(3차 년도 내용)



- 인간의 돌연변이 Braf 유전자가 돼지모델에 적용 가능한지 판별하기 위해 미니돼지에서 유래한 섬유아세포와 근육 세포에 돌연변이 Braf 유전자를 도입하여 대표적인 하부 신호인 MAP kinase pathway가 활성화 되는지 western blot 기법으로 검증함.



- 인간의 돌연변이 Braf 유전자가 개모델에 적용 가능한지 판별하기 위해 개에서 유래한 섬유아세포 돌연변이 Braf 유전자와 돌연변이 p53을 도입하여 대표적인 하부 신호인 MAP kinase pathway가 활성화 되는지 western blot 기법으로 검증하였으며, 세포의 모양이 암세포와 같이 변하는 경향을 관찰하였음.



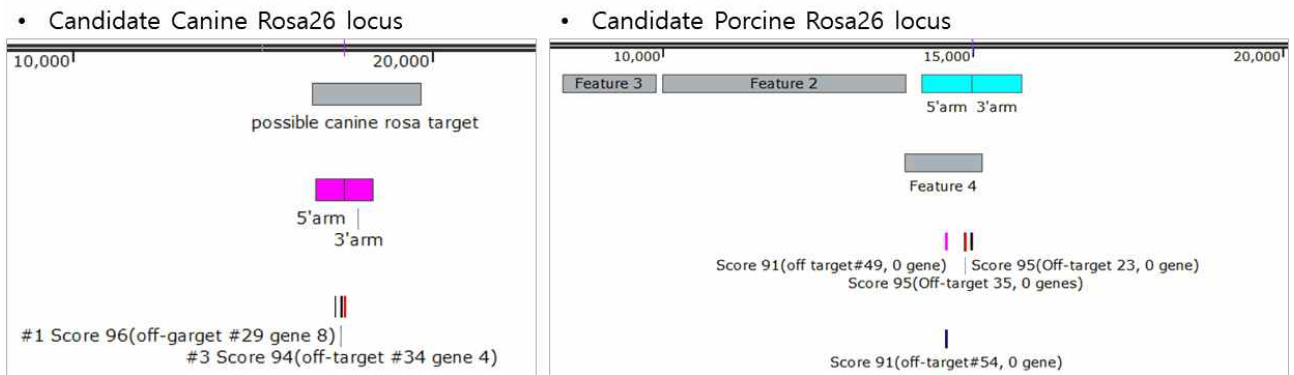
- 유전자 클로닝 기법을 이용해 효율적인 Braf 기반 흑색종 유발 시스템 구축을 위해 2A peptide에 의한 다유전자 발현 시스템을 적용함. 시스템의 발현 유무를 확인할 수 있는 Red fluorescence protein (RFP) 유전자와 돌연변이 p53, 항시 활성화 돌연변이 HRAS 유전자를 도입한 단일 벡터를 구축하여 흑색종을 유발시킬 수 있는 시스템을 확립함.
- HEK-293FT세포에 Braf기반 흑색종 유발 유전자 카세트를 도입하여, 각 유전자가 발현되는지 검증하고 돌연변이 Braf에 의해 활성화되는 ERK1/2의 인산화 정도를 western blot 기법으로 검증함.

**안정적 형질전환 개체 생산을 위한 Safe harbor locus 유전자 타게팅 기술 개발과 Ras 및 Braf 유전자 기반 시스템에 적용(3차 년도에 개발 할 내용 포함)**

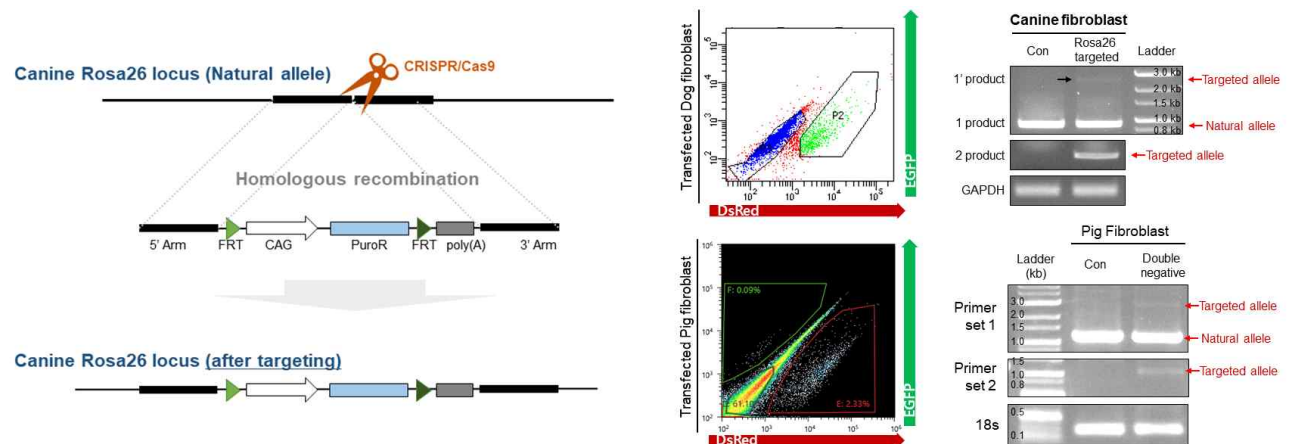
- 안정적 형질전환 개체 생산을 위한 Safe harbor locus 유전자 타게팅 기술 개발 및 Braf 유전자 기반 시스템에 적용

**1) Safe harbor locus에 FLP/FRT 재조합 도입**

- 도입 시스템의 낮은 발현 수준과 도입되는 시스템의 큰 사이즈로 인해 일부만 잘려 유전체체 들어가는 문제에 따라 이를 극복하고자 하는 방안을 강구함. 벡터시스템의 도입의 효율을 높이기 위해 BRAF 기반 흑색종 발병 시스템에 적용 예정이었던 기술을 Ras 기반 흑색종 발병 시스템에도 적용하기로 결정함. CRISPR/Cas9 기술과 FLP/FRT 재조합 기술을 이용해 개의 Safe harbor locus에 타게팅하는 기술을 Ras 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템에도 적용하기 위한 시스템 개발을 진행함.



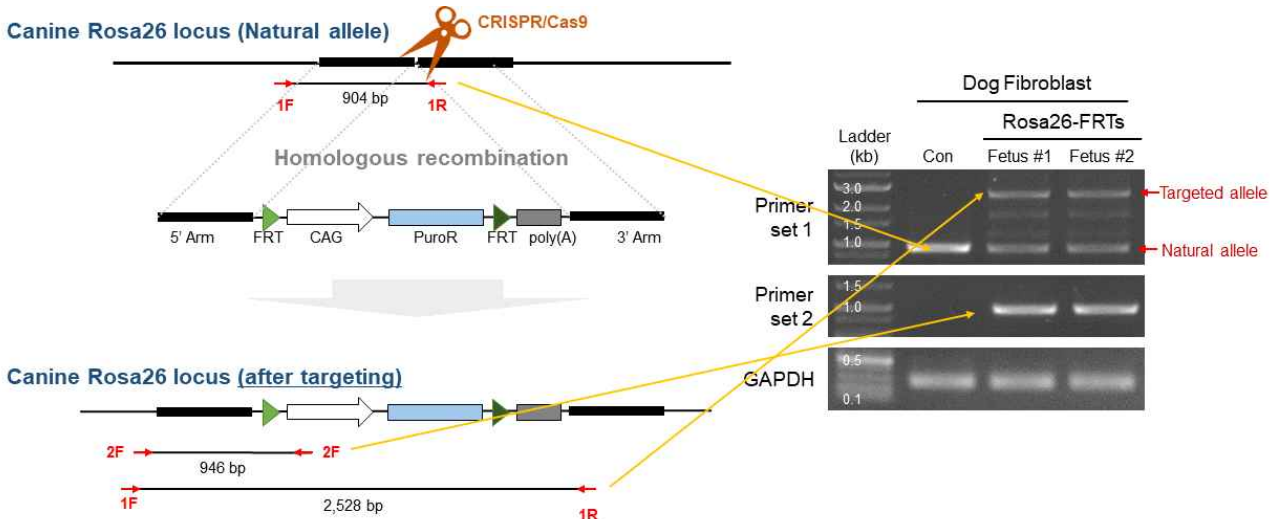
- 도입유전자가 안정적으로 발현할 수 있다고 알려진 Safe harbor locus인 ROSA26 locus를 실험견과 돼지의 유전체에서 찾음. 이 부위를 CRISPR/Cas9으로 타게팅 하기 위해 off-target 효과가 가장 적은 위치를 찾아 guide RNA 서열을 확보해 CRISPR/Cas9 벡터 시스템에 적용함.



- CRISPR/Cas9 vector system에 의해 표적 유전체 부위가 잘리면, homologous recombination에 의해

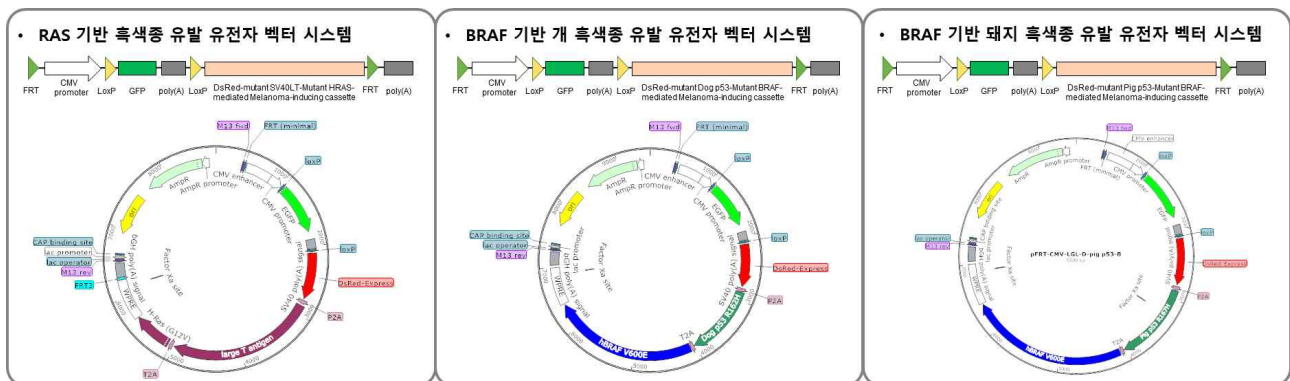
의도하고자 하는 유전자 서열에 대한 template DNA를 함께 넣어주면 의도된 서열이 knock-in 되는 현상을 이용함. 이에 CRISPR/Cas9-EGFP 벡터 시스템과 homologous arm을 가진 5' arm-FRT-CAG-puroR-FRT-poly(A)-3' arm-PGK-DsRed 서열을 함께 transfection 뒤 puromycin을 처리하여 selection을 진행함.

- 이후 FACS 장비를 통해 double negative cell population을 얻어 PCR 분석을 진행하여 knock-in이 제대로 된 population이 있음을 확인하고, 형질전환 되었을 것으로 예상하는 개 세포는 아부다비 생명공학연구원의 정연우 실장 연구팀에, 돼지세포는 충북대학교 현상환 교수 연구팀에 각각 전달함.



- 아부다비 생명공학연구원의 정연우 실장 연구팀에서 핵이식을 진행하여 임신된 태아 2 두에서 유래한 세포를 얻어 분석한 결과 두 개체 모두 의도한 형질전환모델임을 확인함.
- 돼지세포는 충북대학교 현상환 교수 연구팀에서 핵이식을 진행 중이며, 태어난 개체를 분석하여 의도한 형질전환체 유래 세포 확보하면 이를 활용해 Ras 및 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템에 FLP/FRT 재조합 시스템을 도입하고자 함.

## 2) Ras 및 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 벡터에 FLP/FRT 재조합 시스템 도입



- Ras 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템과 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템에 FLP/FRT 재조합 시스템에 의해 safe harbor locus에 삽입될 수 있도록 벡터 제작을 완료함.
- 개의 TP53 유전자 표적 CRISPR/Cas9 벡터 시스템을 활용해 만든 TP53 녹아웃 개 세포주를 캐나다의 Applied Biological Materials (ABM) Inc. 에 licensing 이전을 진행하고 있음.
- 개의 Safe harbor locus인 Rosa26 locus에 FRT-FRT3 재조합 서열을 녹인한 모델을 생산하여 FRT-FLP 재조합 기반 효율적 형질전환 모델건 생산 기술에 관한 특허 출원과 논문 출판을 계획 중임.



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델돼지 개발

**세부목표** : Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 *in vitro* 평가 시스템 개발

**연구내용1** Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 *in vitro* 평가 시스템 개발

### Optogenetic-FGFr piPS 세포의 특성 및 분화능분석

- 체내에는 다양한 미량원소들이 존재하며 그 예로 아연, 구리, 철, 칼슘, 마그네슘 등이 있음.
- 2차년도에 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 piPSC의 ROSA26 locus (safe harbor locus)에 OptoFGFR1을 포함한 외래 유전자 카세트를 도입하였음 (2차년도 기수립함).
- 3차년도에는 20개대 이상 유지되는 Opto-FGFr piPSC를 가지고 분화능 및 특성분석 진행하였음.
- 수립된 piPSC에 Blue light를 2시간마다 5분씩 노출시킨 후 pluripotency marker인 pOct4, pNanog, pSox2, pLin28a의 유전자 발현수준을 확인했을 때, FGF2 protein을 첨가해준 piPSC에서의 유전자 발현수준과 유사하였음.
- 수립된 piPSC의 정상성 평가를 위해 핵형분석을 진행한 결과, 정상 핵형(38,XX)으로 검증됨.
- 3주 동안 Blue light에 노출시킨 Opto-FGFr piPSC를 시험관내 분화 유도시, 외배엽, 중배엽, 내배엽 관련 유전자들의 발현이 높게 나타나는 것을 볼 수 있었음(삼배엽층 모든 세포로 분화할 수 있는 분화능 검증).

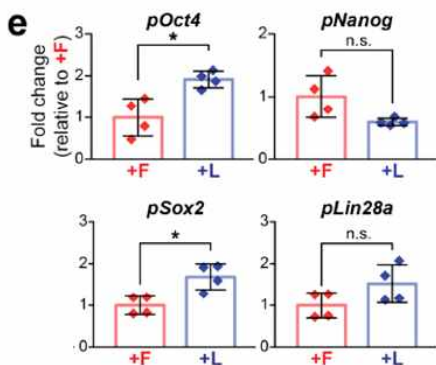


그림. Opto-FGFr piPSC의 Pluripotency marker 유전자 발현확인 결과



그림. Opto-FGFr piPSC의 핵형분석 결과

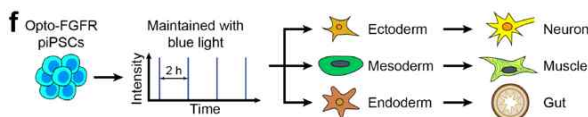


그림. Opto-FGFr piPSC 분화에 대한 모식도

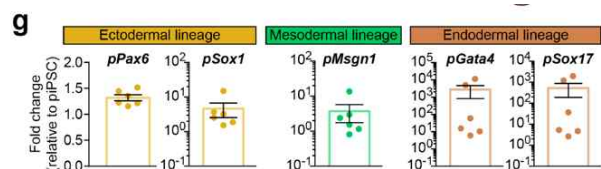


그림. Three germ layer로 분화시킨 Opto-FGFr piPSC에서의 lineage specific 유전자 발현 결과



### ▣ Optogenetic-FGFr piPS 세포의 SCNT 후 *in vitro* 평가

- 형질전환동물을 생산하기에 앞서, 체세포핵이식 기법으로 생산된 배아의 체외 발달률을 조사함으로써 이후 산자생산효율을 예측할 수 있음.
- Optogenetic-FGFr 유도만능줄기세포를 섬유아세포로의 분화를 유도하여 체세포 핵이식의 공여세포로 이용하여 *in vitro* 발달률을 평가함.
- 형질전환 배아를 체외에서 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 39°C 조건에서 체외 배양 7일 후 배반포 획득함.

표. Developmental competence of SCNT-reconstructed embryo using Opto FGFR1 piPS nuclear donor cells

Type of donor cell	replicate	MI1		fusion		No of oocyte cultured	cleavage				total (%)
		total	(%)	total	(%)		2~3 cell (%)	4~5 cell (%)	6~8 cell (%)	Fragment (%)	
Opto	1	99 /119	83.2	78 /91	85.7	75	49.3	16.0	6.7	14.7	72.0
FGFR1	2	68 /112	60.7	39 /62	62.9	39	30.8	0.0	7.7	48.7	38.5
piPS	3	95 /120	79.2	61 /83	73.5	61	8.2	32.8	14.8	0.0	55.7
<b>Average</b>		<b>262 /351</b>	<b>74.4</b>	<b>178 /236</b>	<b>74.0</b>	<b>175</b>	<b>29.4</b>	<b>16.3</b>	<b>9.7</b>	<b>21.1</b>	<b>55.4</b>

표. Developmental competence of SCNT-reconstructed embryo using Opto FGFR1 piPS nuclear donor cells

Type of donor cell	replicate	blastocyst								No. of cell in blastocyst
		early	(%)	expanded	(%)	hatched	(%)	total	(%)	
Opto	1	0	0.0	8	100.0	0	0.0	8	10.7	38.9
FGFR1	2	2	100.0	0	0.0	0	0.0	2	5.1	38.9
piPS	3	7	70.0	3	30.0	0	0.0	10	16.4	seeding
<b>Average</b>		<b>9</b>	<b>56.7</b>	<b>11</b>	<b>43.3</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>20</b>	<b>10.7</b>	<b>38.9</b>

- 체세포 핵이식은 평균 70%이상 성숙률을 보이는 난자를 이용하였으며, 세포융합률은 평균 74.0%를 나타내었다.
- 핵이식 이후 2일째 cleavage rate를, 7일째에 배반포 발달률을 조사함.
- Cleavage rate는 평균 55.4%로 나타났으며, 2~3세포기는 29.4%, 4~5세포기는 16.3% 6~8세포기는 9.7%의 비율로 조사됨.
- 배반포 발달률은 평균 10.7%로 나타났으며, 초기배반포의 비율은 56.7% 확장배반포는 43.3% 그리고 배반포의 평균 세포수는 38.9%로 조사됨.
- 유카탄 섬유아세포를 기반으로 하여 Optogenetic-FGFr-t2a egfp 발현 세포를 새롭게 제작하여 체세포 핵이식 후 *in vitro*에서 발생능력을 평가하고 이식할 예정임.
- Opto FGFR1 piPS를 공여세포로 하여 체세포 핵이식 후 배반포 발달율은 평균 10.7%로 확인되었음, 이후 착상전 배아발달능력이 더 우수한 세포주를 이용하여 이식하여 착상 및 산자생산 효율을 개선할 계획임.

### ▣ Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주 확립

- Optogenetic-FGFr이 삽입된 배아줄기세포를 수립하기 위해 Optogenetic-FGFR1 piPS cell을 임의로 분화시킨 후 공여세포주로 이용하여 SCNT를 진행하였음.
- 체외에서 7일 동안 배아를 culture하여 얻은 배반포를 zona-free 상태로 만들어 준 후 feeder layer 위에 seeding 하여 bFGF-dependent한 조건으로 culture하였음.
- 총 10개의 배반포 중 8개가 feeder layer에 attachment 되었으며 culture 8일차에 배아줄기세포와 유사한 모양의 colony가 관찰되었음.
- Culture 12일차에 배아줄기세포를 여러 clump로 나누고 subculture를 통해 안정화시키고자 하였음.

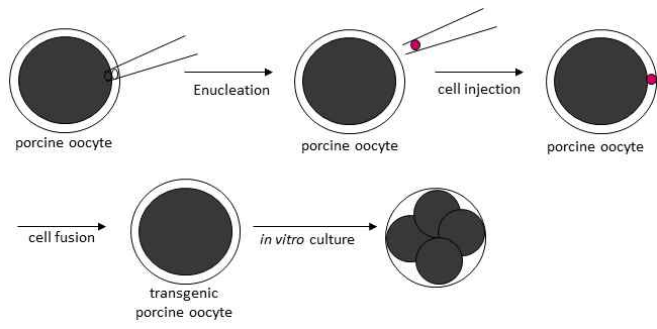


그림. SCNT 및 형질전환 배아의 체외 배양 모식도

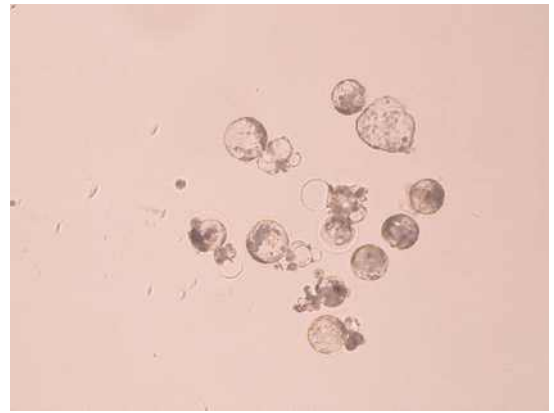


그림. Opto FGFR1 piPS으로 SCNT 배반포 사진 (총 10 개의 배반포를 seeding 함)

- Seeding 후 2일째 pES 콜로니 형성 확인함
- Attach된 배반포의 비율은 8/10 (80%)로 나타남.

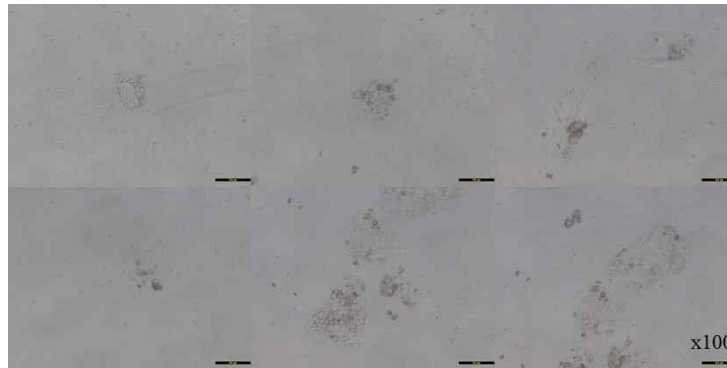


그림. seeding 후 2일째 pES 콜로니 형성 모습 [Passage 0]

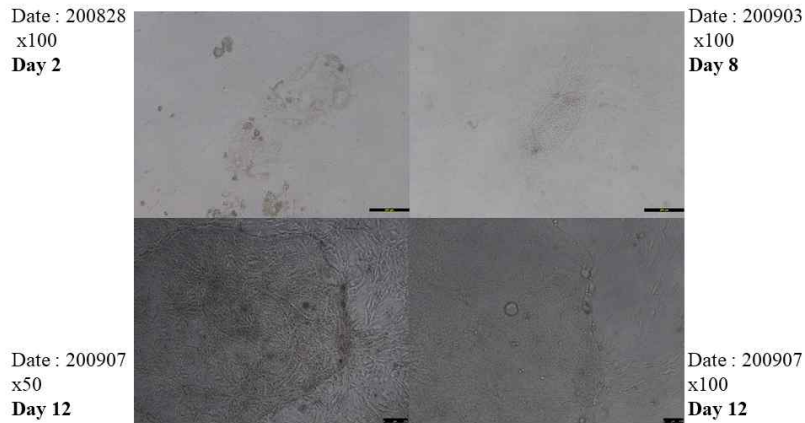


그림. Seeding 2~12일동안 콜로니의 형태변화 관찰 [Passage 1]

- seeding 후 12일째 pES 안정화를 위한 subculture를 진행함.

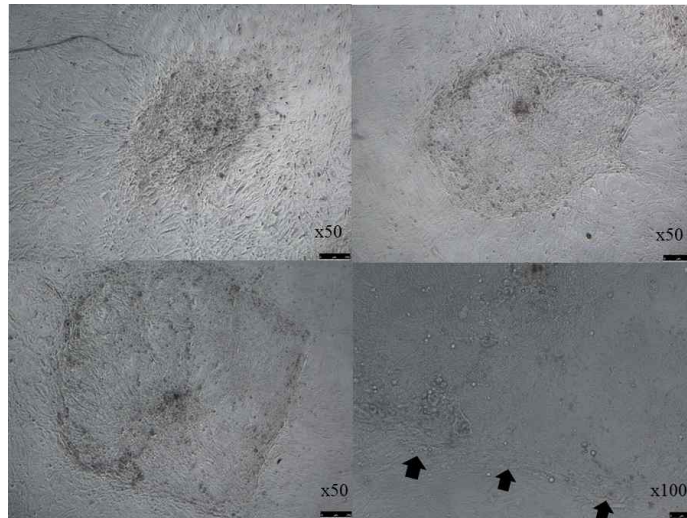


그림. Second subculture 후 콜로니 형태 [Passage 2]

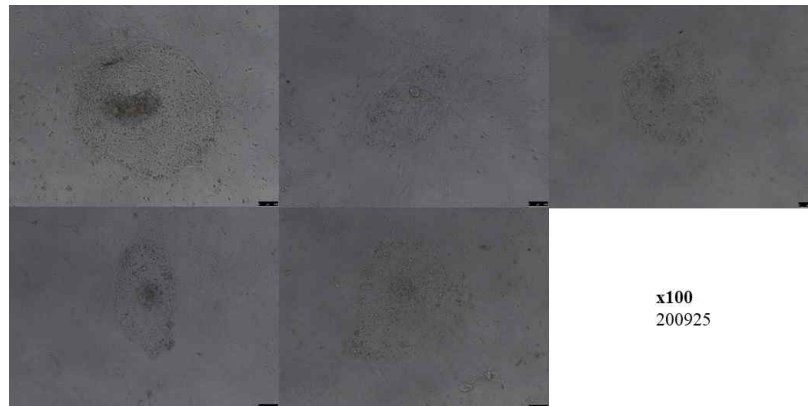


그림. third subculture 후 콜로니의 모습 [Passage 3]

- pES subculture [P3] 점점 분화되어 특성분석을 위한 각각 샘플링을 진행하여 동결보존함.
- 특성분석은 추후 진행 예정.
- Optogenetic-FGFr1 piPS cell을 대신해 Optogenetic-FGFr1 fibroblast cell line을 구축하여 체세포 핵 이식 후 배아줄기세포주를 구축하여 분자생물학적, 면역 또는 생화학적 줄기세포 마커를 통한 분석을 진행할 계획임.

## 연구내용2

분자생물학적 기법을 통한 흑색종 모델 배아줄기세포주 내 Optogenetic-FGFr-Oncogene 시스템의 유효성검증

### ▣ Optogenetic-FGFr piPS 세포의 oncogene system 검증

- 2차년도에 총 13개의 Opto-FGFr piPSC를 기수립하였으며, 빛 자극에 대한 반응을 단백질 수준에서 확인하기 위해 Blue light 자극 이후 ERK1/2 Pathway의 활성화 (pERK1/2)를 확인하였음. ERK1/2는 암세포의 survival과 angiogenesis 등을 조절하는 pathway로 알려져 있음.
- 3차년도에는 Blue light 자극에 따라 Opto-FGFr piPSC에서 ERK1/2 활성도가 증가함을 검증하였으며, Opto-FGFr 유전자가 도입되지 않은 parental line에서는 Blue light 자극 후에도 ERK1/2 활성도가 증가하지 않음을 확인하였음.

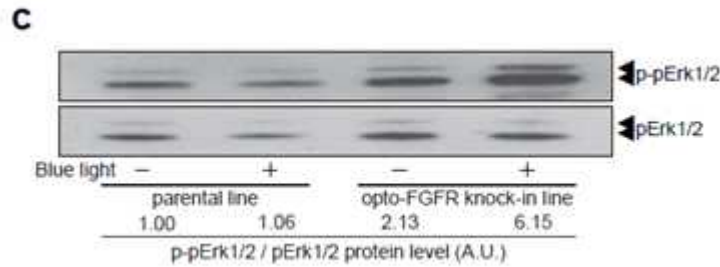


그림. Blue light illumination에 따른 Opto-FGFR piPSC에서의 Erk1/2의 인산화

**세부목표 : 흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지 생산 및 특성분석**

**연구내용1**

**흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지 생산**

**Optogenetic-FGFr piPS 세포를 이용한 SCNT 수행 및 대리모돈에 배아 이식 진행**

- 흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지를 생산하기 위해 Opto-FGFr iPS를 핵 공여 세포주로 사용하여 SCNT를 2회 수행하였음 (4차년도 후속실험 예정)
- 총 2회 SCNT 진행: 120개(1회) 및 123개(2회)의 배아를 이식하였고 배아 이식 후 임신진단키트 검사 결과가 1차 실험은 양성, 2차 실험은 음성으로 나왔음.

표. Developmental competence of SCNT-reconstructed embryo using Opto FGFR1 piPS nuclear donor cells

Type of donor cell	replicate	MI		fusion		No of oocyte cultured	cleavage			total (%)
		total	(%)	total	(%)		2~3 cell (%)	4~5 cell (%)	6~8 cell (%)	
Opto FGFR1 piPS	1	177 /240	73.8	150 /177	84.7	30	26.7	23.3	13.3	63.3

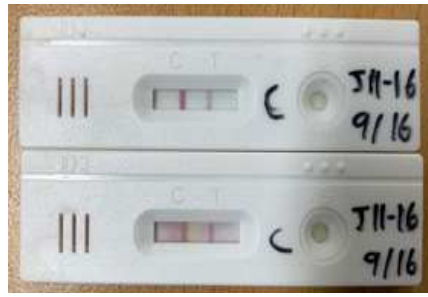
표. Developmental competence of SCNT-reconstructed embryo using Opto FGFR1 piPS nuclear donor cells

Type of donor cell	replicate	blastocyst							
		early	(%)	expanded	(%)	hatched	(%)	total	(%)
Opto FGFR1 piPS	1	4	13.3	1	3.3	0	0.0	5	16.7

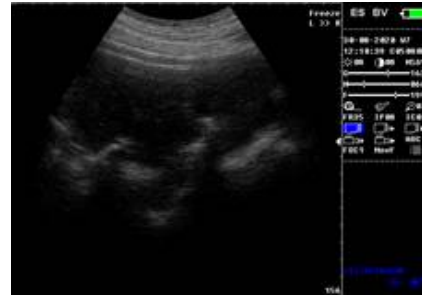
- 현재 모델동물 생산을 위해 다양한 방식의 유전자 도입법이 적용되고 있으며 난모세포의 품질개선 및 체세포 핵이식 과정의 개선, 수란돈의 다양화 등 다각도로 접근하여 모델동물 생산 효율을 높이는 방안을 마련하고 있음.
- 기존에 생산된 형질전환돼지를 활용하여 후대검증 프로토콜을 마련하고 있으며 F1, F2 개체를 통해 유전자 전달을 확인함. 추후 모델 동물 생산시 준비된 프로토콜을 이용하여 검증할 예정임.



그림. 1차 이식 당시 난소 상태



1차 이식 임신진단키트 결과



1차 이식 초음파 진단 결과



2차 이식 당시 난소 상태



2차 이식 임신진단키트 결과



2차 이식 초음파 진단 결과

**연구내용2** *in vivo*에서 효율적인 Optogenetic-FGFr-Oncogene유도를 위한 암실조건 및 광학 조건 도출 분석

■ *In vitro*에서 효율적인 Optogenetic-FGFr 유도를 위한 광학 조건 도출

- Optogenetic-FGFr system을 이용하여 다양한 blue light 조건을 검토함

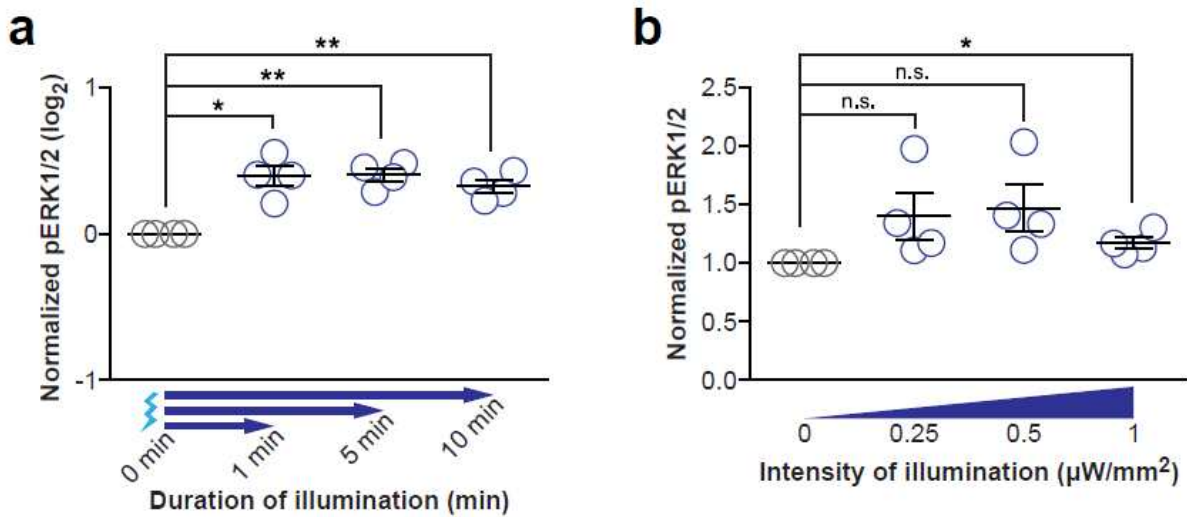


그림. 청색광 조명에 의한 Opto-FGFR hESC에서 ERK1/2의 인산화.(a, b) (n = 4; \*\*, p 값 <0.01; \*, p 값 <0.05)

- Optogenetic-FGFr hESC에서 광학조건을 검토한 결과 1uW/mm<sup>2</sup>광량 조건에서 1분간격으로 blue light를 조사할 때 ERK1/2의 Phosphorylation이 유의적으로 증가하는 것을 확인함.

■ *In vivo*에서 효율적인 Optogenetic-FGFr-Oncogene유도를 위한 암실조건 및 광학 조건 도출

- Optogenetic-FGFr piPS 세포를 공여핵 세포로 이용하여 핵이식 후 배아를 대리모에 이식할 예정임.
- 산자 생산 후 *in vivo*에서 효율적으로 Optogenetic-FGFr-Oncogene유도를 위한 광학조건을 도출할 예정임.

### 연구내용3

### Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 통한 흑색종 발병 확인

- Opto-FGFr-oncogene piPS를 핵공여 세포로 사용하여 SCNT를 진행한 후 배아이식을 통해 흑색종 질환모델 돼지를 생산할 수 있음.
- Opto-FGFr-oncogene이 삽입된 흑색종 질환모델 돼지의 사육 환경에 기존 수립한 최적의 Blue light 파장 및 노출 시간을 적용시킨 장비를 도입하여 흑색종 관련 유전자의 optogenetic activation을 유도하고자 함.
- 흑색종 질환모델 돼지의 피부에 병변이 나타났을 때 자연발생 유래 흑색종 돼지 모델의 병리학적 진단방법에 따라 흑색종 발병여부를 확인할 예정임.

### 연구내용4

### Reclone system을 적용을 통한 흑색종 모델 SCNT배아의 생산효율 개선

#### ▣ Optogenetic-FGFr piPS를 이용한 SCNT 유래 흑색종 모델생산 (진행중)

- Optogenetic-FGFr piPS 세포를 공여핵 세포로 이용하여 핵이식 후 배아를 대리모에 이식할 예정임.

#### ▣ Optogenetic-FGFr piPS 유래 흑색종 산자에서 조직 채취 및 공여핵으로 이용

- 산자 생산능력 분석 및 태어난 산자로부터 조직을 회수하여 다시 체세포 핵이식을 통해 흑색종 모델을 생산할 예정임.

### 연구내용5

### 흑색종 특성 비교 분석을 위한 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 생물자원 확보

#### ▣ 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 생물자원 확보

- 흑색종 유도 벡터 시스템을 도입하여 형질전환 세포주를 수립하고, 핵 공여원으로써 형질전환 체세포주를 사용할 수 있는지에 대한 유효성 평가를 하는 것은 매우 중요함.
- 흑색종 모델 동물의 개발 및 흑색종 유도 형질전환 세포주의 유효성 검증에 있어서, 자연 발생한 흑색종 세포주가 positive control로 존재한다면, 보다 실효성 높은 형질전환 모델 동물 생산이 가능할 것임.
- 한편, 돼지에서 선천적으로 흑색종이 발병하는 경우에는 주로 몸통에서 동시다발적으로 발생하는 것을 관찰할 수 있음.

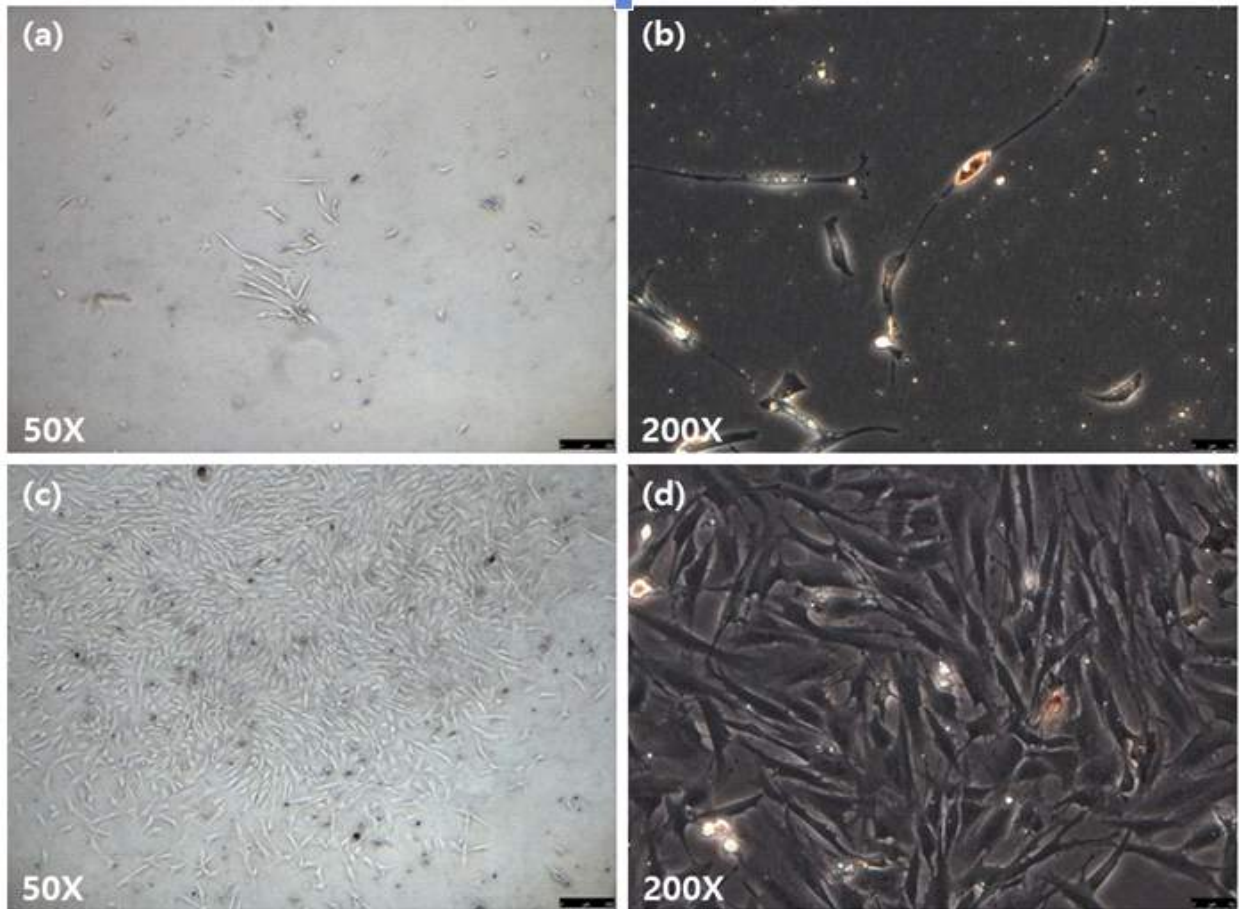


그림. 초대배양으로 구축된 돼지의 자연발생 흑색종 세포주의 모습. (a, c) Duroc 유래 초대배양 흑색종 세포주, (b,d) 흑색종 세포주 중 색소상피세포 (skin pigment cell)를 확대한 모습

- 초대배양으로 획득한 돼지 흑색종 세포주 중에서 진한 갈색의 색소를 가진 색소 상피 세포 (Skin pigment cell) 또한 일부 관찰되었음 (Fig. / 수립방법 삽입)
- 기 구축한 자연발생 흑색종 세포주의 기본 특성분석 및 이를 공여세포로 활용한 돼지 배아 이식수술을 진행중임

#### ▣ 자연발생 흑색종 돼지 모델 유래 섬유아세포의 체세포 핵이식을 통한 체외발달률 조사

- 자연발생 흑색종 돼지 모델로부터 채취된 세포를 SCNT의 공여세포로 이용하여 in vitro 발달률을 평가함
- 형질전환동물을 생산하기에 앞서, 체세포핵이식 기법으로 생산된 배아의 체외 발달률을 조사함으로써 이후 산자생산효율을 예측할 수 있음
- 형질전환 배아를 체외에서 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 39°C 조건에서 체외 배양 7일 후 배반포 획득함

그림. Developmental competence of SCNT-reconstructed embryo using congenital porcine malignant melanoma cells

replicate	MII (%)			fusion (%)			≥ 2-cells (%)			blastocysts/ cleavaged oocytes (%)		dimermeter of blastocyst (um)	
1	109	/130	83.8	74	/90	82.2	46	/74	62.2	8	/20	40.0	143.7
2	125	/140	<b>89.3</b>	87	/105	<b>82.9</b>	64	/87	<b>73.6</b>	11	/21	<b>52.4</b>	<b>144.4</b>
	234	/270	86.6	161	/195	82.5	110	/161	67.9	19	/41	46.2	144.0

- 체세포 핵이식은 평균 86.6%이상 성숙률을 보이는 난자를 이용하였으며, 세포융합률은 평균 82.5%를 나타남
- 핵이식 이후 24시간째 cleavage rate를, 7일째에 배반포 발달률을 조사함
- Cleavage rate는 평균 67.9%로 나타났으며, 배반포 발달률은 평균 46.2%, 배반포의 지름은 평균

144.0um로 조사됨.

- 이후 체세포 핵이식을 통해 자연발생 흑색종 돼지 모델을 구축하여, 형질전환 흑색종 돼지의 대조구로의 사용이 가능함

**세부목표: Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발 (4차년도 목표를 3차년도에 수행)**

**연구내용1 비침습적 영상진단을 통한 질환표현형 분석**

**▣ Hras 돼지모델의 PET/CT을 이용한 특성분석**

- 흑색종의 경우, 2015년 331명의 실제 환자의 흑색종 조직으로 DNA, RNA, 단백질 수준에서 체계적 분석하여 BRAF 돌연변이, RAS 돌연변이, 돌연변이 NF1가 가장 빈번하게 관찰되는 것을 확인하였고, BRAF 돌연변이, RAS 돌연변이, 돌연변이 NF1, 트리플-WT(wild-type)의 4가지 흑색종 하위분류체계가 완성이 되었음
- 본 연구에서는 이 중 BRAF와 RAS신호 활성화에 의한 흑색종 발병 모델을 구축하고자 하며, 이 유전자들은 실제 환자에서의 실제 흑색종 발병과 상당히 연관이 있음이 알려져 있음. 이러한 선행연구들을 통해 Ras와 Braf 유전자를 조절하는 것은 비임상 연구모델 개발에 적합할 것으로 사료됨.
- 형질전환 돼지의 특성분석을 위한 PET/CT (positron emission tomography/computed tomography) 검사 활용방안 검토
- Cre/LoxP inducible system 개체인 TG#5(Cloud CMVep-LGL-DSH#7-TG#5)를 PET/CT를 통해 특성분석함

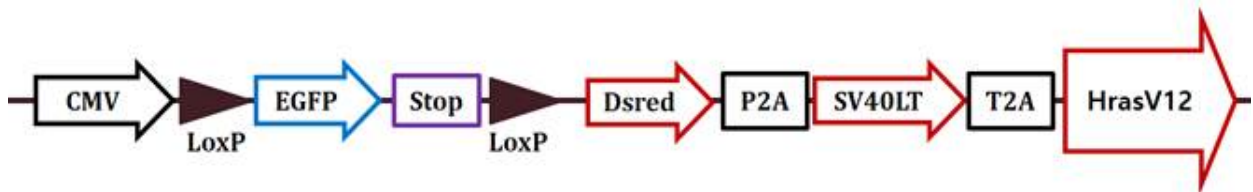


그림. Cloud CMVep-LGL-DSH#7-TG#5 개체의 벡터

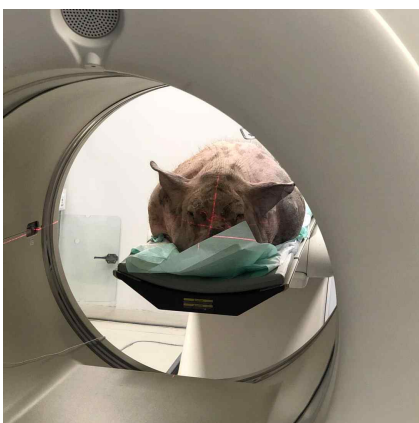
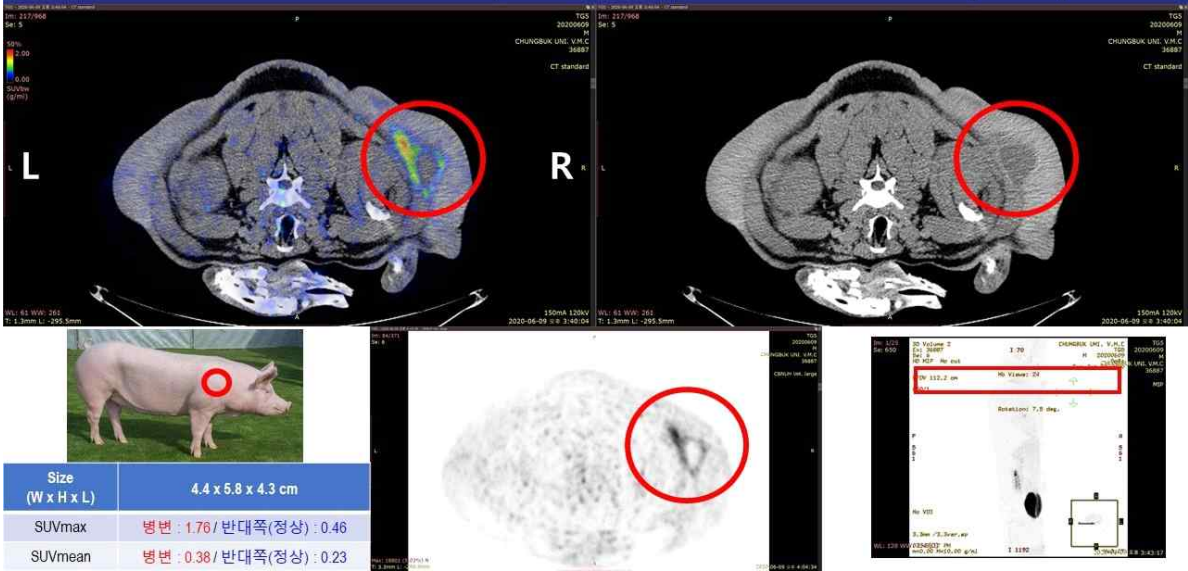


그림. PET/CT 형질전환 돼지의 PET/CT 촬영중인 모습

- Rt. Scapular region cutaneous에서 hypermetabolic status의 mass가 2개 확인됨
- Cranial scapular region cutaneous mass의 size는 4.4 x 5.8 x 4.3 cm (wide x height x length)이며, SUVmax는 평균적으로 1.71, SUVmean은 평균적으로 0.51로 확인되었으며, 동일 위치의 반대쪽 (정상부위)에서는 SUVmax는 평균적으로 0.51, SUVmean은 평균적으로 0.21로 확인되어, 해당 부위가 정상 조직에 비해 glucose metabolism이 증가된 것이 확인됨



## Cutaneous mass (Cranial part of Rt. Scapula)



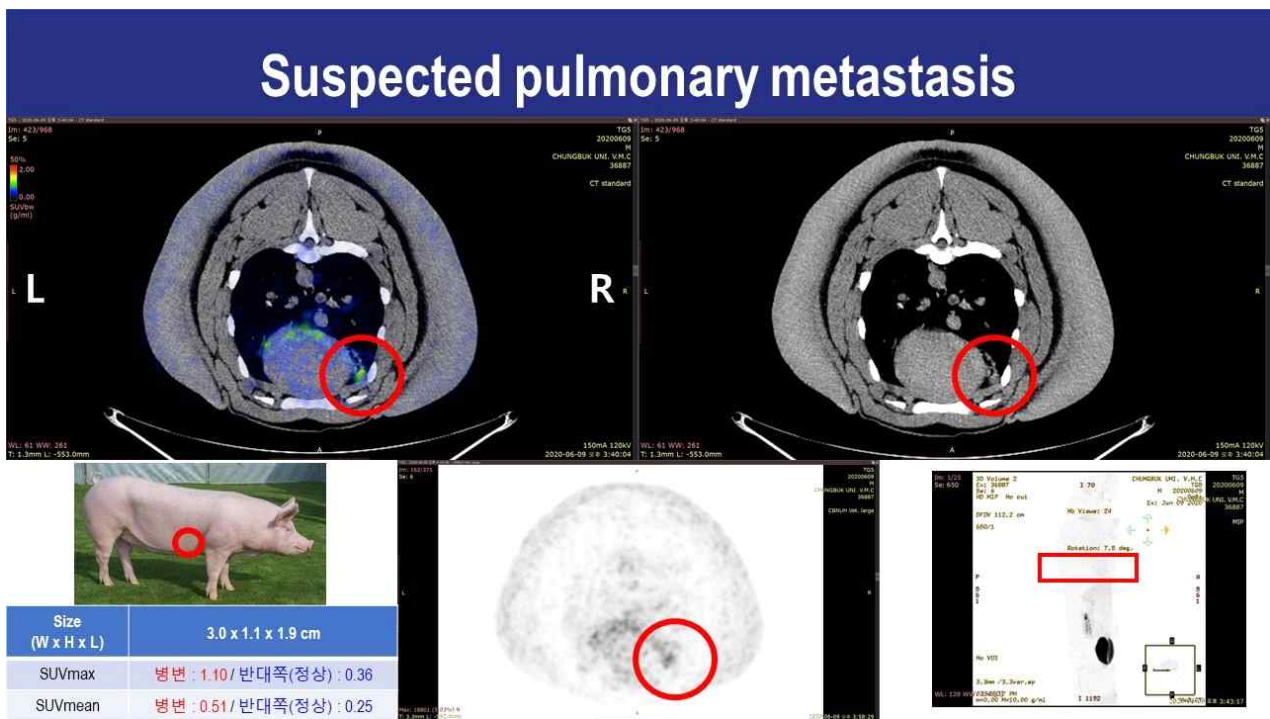
- 이러한 결과의 가능성 있는 원인으로는 해당 부위의 종양, 염증이며, 특히 CT상에서 특별히 조영증강이 관찰되지 않은 점, mass 중앙부위의 hypodense area가 관찰된 점, mass 중앙부위의 FDG uptake의 증가가 관찰되지 않은 점을 토대로 종양 중앙부의 necrosis 혹은 abscess의 존재가 의심됨.
- Caudal scapular region cutaneous mass의 size는 5.2 x 9.9 x 3.8 cm (wide x height x length)이며, SUVmax는 평균적으로 2.77, SUVmean은 평균적으로 0.69로 확인되었으며, 동일 위치의 반대쪽 (정상부위)에서는 SUVmax는 평균적으로 0.52, SUVmean은 평균적으로 0.26로 확인되어, 해당 부위가 정상 조직에 비해 glucose metabolism이 증가된 것이 확인됨.

## Cutaneous mass (Caudal part of Rt. Scapula)

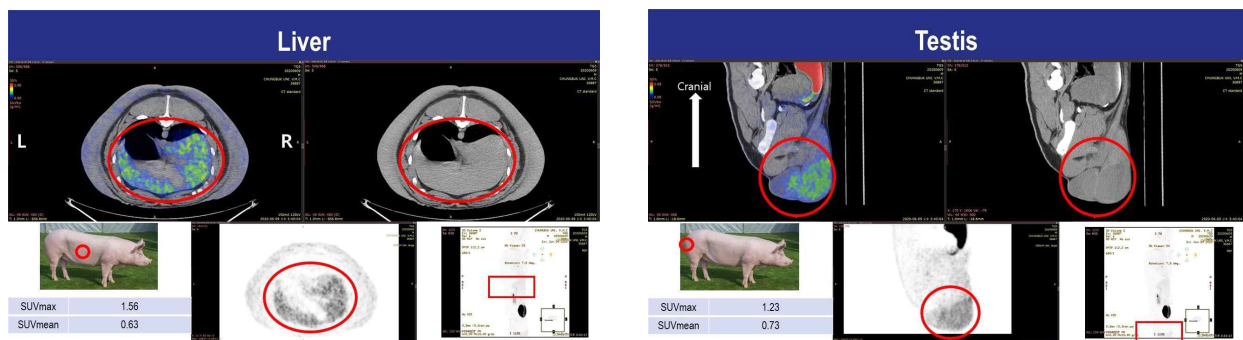


- 해당 mass는 CT상에서 중앙부에 hypodense area가 마찬가지로 관찰되었지만, cranial scapular region cutaneous mass와는 다르게 중앙부위에서 FDG uptake 증가가 관찰됨.
- 전신림프절에서 FDG uptake 증가는 관찰되지 않아 림프절로의 전이 가능성은 낮다고 판단됨.
- 우측 심장 apex 및 base 사이 우측편에 3.0 x 1.1 x 1.9 cm 크기의 mass가 관찰되었으며, SUVmax는 평균

적으로 1.28, SUVmean은 평균적으로 0.68로 glucose metabolism이 증가 된 것이 확인됨.



- 해당 mass는 종양의 metastasis 가능성이 있으나, 마취 중 움직임으로 인한 artifact, 혈관일 가능성 또한 배제할 수 없음.
- 특이적으로 liver와 testis가 다른 장기들에 비해 FDG uptake의 증가가 관찰되었으나, 장기 전반적으로 증가되어 전이의 가능성은 떨어진다고 판단되며, 생리적으로 증가했을 가능성이 높다고 판단됨.



- 그 밖에 Kidney, urinary bladder의 FDG uptake의 증가소견이 있었으나 FDG의 배설경로가 urinary system이기 때문에 이처럼 관찰된 것으로 판단됨.
- 비침습적 PET/CT 영상진단을 통한 질환표현형을 분석할 수 있는 시스템을 마련함.

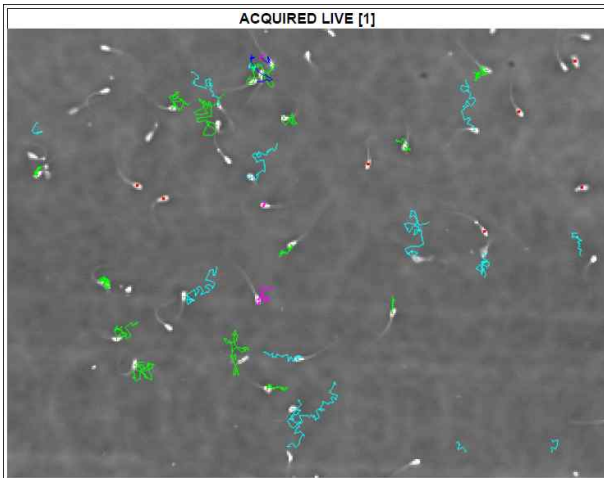
## 연구내용2

### 형질전환 모델 생식능력 검증방법 확립

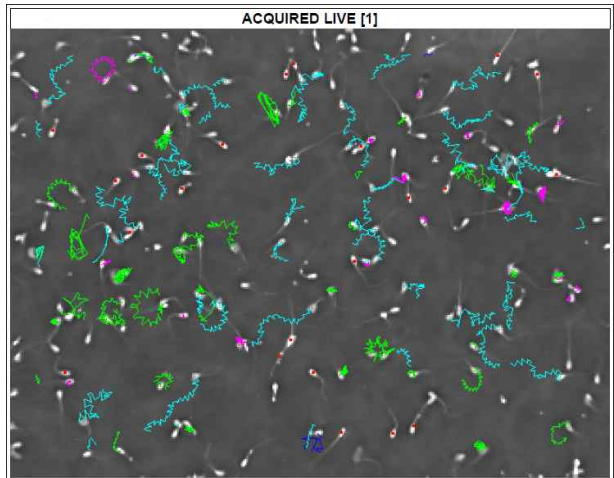
#### ▣ Hras 돼지모델의 CASA를 이용한 정자성상 분석법 개발

- 형질전환 돼지로부터 채취된 정액의 검사방법은 아직까지 보고된 바가 없음.
- 따라서 본 연구는 형질전환 돼지로부터 회수된 정액을 컴퓨터 정액분석(CASA; computer assisted semen analysis) 장비를 이용하여 정자 성상을 분석함.

일반돼지정액



TG#5



**COUNT SUMMARY**

Category	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Total	126	171.6	171.6 ±7.65	100
Motile	97	132.1	132.1	77
Progressive	49	66.8	66.8	39

**VELOCITY DISTRIBUTION**

Category(Abbr)	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Rapid	83	113.1	113.1	66
Medium	14	19.1	19.1	11
Slow	17	23.2	23.2	13
Static	12	16.3	16.3	10

**MEAN VALUES**

Parameter	Value	Units	Standard Deviation
Path Velocity	VAP	84.5	μm/s
Prog. Velocity	VSL	44.0	μm/s
Track Speed	VCL	169.9	μm/s
Lateral Amplitude	ALH	9.5	μm
Beat Frequency	BCF	30.0	Hz
Straightness	STR	53	%
Linearity	LIN	28	%
Elongation		50	%
Area		8.7	μm sq

**COUNT SUMMARY**

Category	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Total	270	367.8	367.8 ±13.49	100
Motile	232	316.0	316.0	86
Progressive	162	220.7	220.7	60

**VELOCITY DISTRIBUTION**

Category(Abbr)	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Rapid	218	297.0	297.0	81
Medium	14	19.1	19.1	5
Slow	8	10.9	10.9	3
Static	30	40.9	40.9	11

**MEAN VALUES**

Parameter	Value	Units	Standard Deviation
Path Velocity	VAP	117.9	μm/s
Prog. Velocity	VSL	75.4	μm/s
Track Speed	VCL	210.0	μm/s
Lateral Amplitude	ALH	8.1	μm
Beat Frequency	BCF	34.9	Hz
Straightness	STR	63	%
Linearity	LIN	38	%
Elongation		53	%
Area		9.2	μm sq

그림. CASA를 이용하여 정액 성상검사결과

- CASA를 이용하여 정액 성상검사결과 형질전환돼지의 정자의 운동성이 86%로 대조구 시판정액의 운동성 77%에 비해 높은 수치를 보였으며 각종지표에서 특이적 이상소견은 보이지 않았음.
- 형질전환 돼지 생산 후 생식능력 평가를 위해 CASA 분석기법을 활용을 고려해 볼수 있을 것으로 사료 됨.
- Hras 돼지모델의 CASA 데이터 이외에도 sperm DNA fragment Assay, 형태학적 특성, 체외수정 후 체외발 달 등이 추가적으로 조사될 예정임.

1. VAP, average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ). Time-averaged velocity of a sperm head along its average path. This path is computed by smoothing the curvilinear trajectory according to algorithms in the CASA instrument; these algorithms vary between instruments, so values may not be comparable among systems.
2. VSL, straight-line (rectilinear) velocity ( $\mu\text{m/s}$ ). Time-averaged velocity of a sperm head along the straight line between its first detected position and its last.
3. VCL, curvilinear velocity ( $\mu\text{m/s}$ ). Time-averaged velocity of a sperm head along its actual curvilinear path, as perceived in two dimensions in the microscope. A measure of cell vigour.
4. ALH, amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ ). Magnitude of lateral displacement of a sperm head about its average path. It can be expressed as a maximum or an average of such displacements. Different CASA instruments compute ALH using different algorithms, so values may not be comparable among systems.
5. BCF, beat cross frequency (Hz). The average rate at which the curvilinear path crosses the average path.
6. STR, straightness. Linearity of the average path,  $\text{VSL/VAP}$ .
7. LIN, linearity. The linearity of a curvilinear path,  $\text{VSL/VCL}$ .

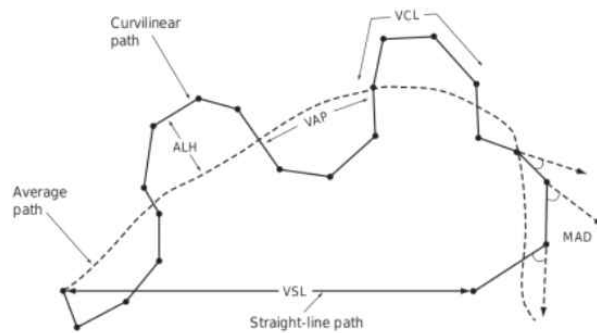


그림. Standard terminology for variables measured by CASA systems



## 제1 세부과제

### 충북대학교 산학협력단

#### Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 *in vitro* 질환모델 구축

**세부목표** : 유도만능줄기세포주 활용 Optogenetic-FGFr-Oncogene을 통해 유도된 흑색종의 특성분석

#### 연구내용1

#### 흑색종모델 iPS세포주에서 발생한 종양 세포주 선별

- CRISPR/Cas9 system을 이용하여 piPSC의 pROSA26 safe-harbor locus에 opto-FGFr cassette를 삽입하였음.
- pROSA26 locus에 Opto-FGFr을 삽입하고자 두 개의 gRNA를 제작하여 pROSA26의 첫 번째 intron을 target화 할 수 있게 하였음.
- Blue light로 자극을 주면서 배양한 Opto-FGFr piPSC는 piPSC-colony morphology를 20주 이상 유지하였고, dark condition에서 배양한 Opto-FGFr piPSC는 3주 이후 분화되었음. 이것을 통해 blue light로 유도된 Optogenetic FGFr activation이 만능성을 유지할 수 있음을 확인하였음.
- 차년도에 동일한 방법으로 흑색종 모델 iPS 세포주를 구축하여 세포주를 선별할 예정임.

#### 연구내용2

#### 흑색종모델 iPS세포주에서 발생한 종양 세포주 유전적 특징 비교분석

- 기존 수립한 Opto-FGFr piPSC의 정상 핵형을 확인하였고, pluripotency marker (pOct4, pNanog, pSox2, pLin28a)의 mRNA 및 protein 발현을 확인하였음.
- 수립한 Opto-FGFr piPSC를 체외에서 분화를 유도했을 때 외배엽, 중배엽, 내배엽 관련 유전자의 mRNA 발현이 높게 나타났으며, three germ layer에 속하는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 확인.
- 차년도에 흑색종 모델 iPS 세포주를 구축한 후 흑색종 특이적인 마커의 유전자 발현을 확인할 예정임.

#### 연구내용3

#### 흑색종에서 활성화 되는 관련 신호 활성화 및 특징적 유전자 발현 패턴 분석

- 선행연구를 통해 Opto-FGFr piPSC line을 blue light 하에서 배양하였을 때 전형적인 colony morphology를 보이는 것을 확인함.
- 또한 FGF signaling의 downstream에 존재하는 ERK1/2 protein의 phosphorylation을 확인함으로써 Optogenetic FGFr activation을 검증하였음.
- 차년도에 흑색종 모델 iPS 세포주를 수립하여 흑색종에서 잘 알려진 BRAF signaling pathway의 activation을 Blue light 여부에 따라 단백질 수준에서 검증할 예정임.



## 제2 협동과제

(주)크로넥스

전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축

세부목표 : 흑색종 질환모델 중대동물의 특성 분석 및 관리 체계 구축

### 연구내용1

모델 중대동물의 통합적 표현형 분석

#### ▣ 흑색종 질환 동물의 표현형 분석

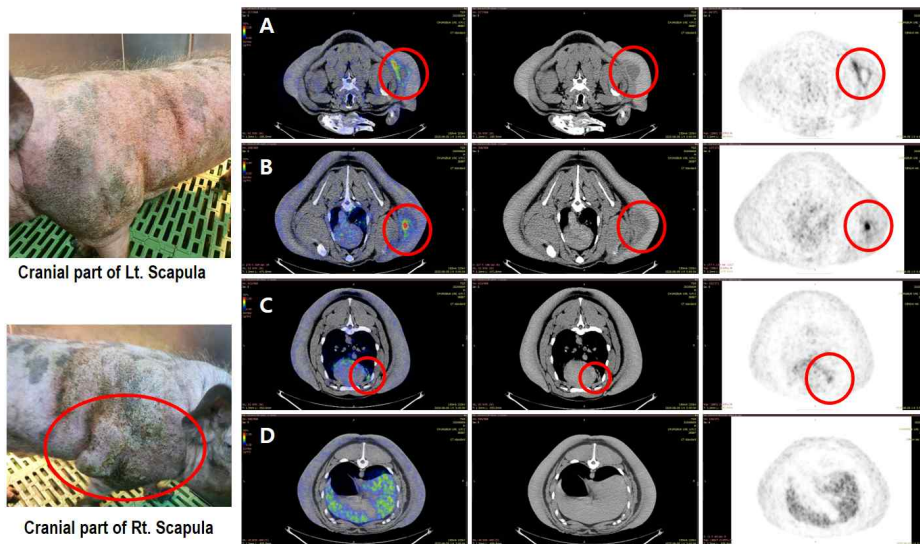


그림. PET/CT 분석 결과. A) Cutaneous mass (Cranial part of Rt. Scapula), B) Cutaneous mass (Caudal part of Rt. Scapula), C) Suspected pulmonary metastasis, D) Liver

- 생산된 암 유발 형질 전환 동물에 대하여 비침습적 영상진단(PET-CT) 수행하여 표현형 분석을 수행함
- PET/CT 확인 결과 우측 견갑골 지역의 피부 조직에서 hypermetabolic status의 mass가 2개 확인되었으며 우측 심장 apex 및 base 사이 우측편에 종양 전이로 의심되는 mass 1개를 확인함.
- Cranial scapular region cutaneous mass의 size는 4.4 x 5.8 x 4.3 cm (wide x height x length)이며, SUVmax는 평균적으로 1.71, SUVmean은 평균적으로 0.51로 확인되었으며, 동일 위치의 반대쪽 (정상부위)에서는 SUVmax는 평균적으로 0.51, SUVmean은 평균적으로 0.21로 확인되어, 해당 부위가 정상 조직에 비해 glucose metabolism이 증가 된 것이 확인됨.
- 이러한 결과의 가능성 있는 원인으로는 해당 부위가 종양 혹은 염증일 가능성을 나타내며, 특히 CT상에서 특별히 조영증강이 관찰되지 않은 점, mass 중앙부위의 hypodense area가 관찰된 점, mass 중앙부위의 FDG(Fluorodeoxyglucose) uptake의 증가가 관찰되지 않은 점을 토대로 종양 중앙부의 necrosis 혹은 abscess의 존재가 의심됨.
- 추가적인 FNA(fine needle aspiration)검사 진행하여 조직학적 병변을 감별을 수행할 예정임.
- Caudal scapular region cutaneous mass의 size는 5.2 x 9.9 x 3.8 cm (wide x height x length)이며, SUVmax는 평균적으로 2.77, SUVmean은 평균적으로 0.69로 확인되었으며, 동일 위치의 반대쪽 (정상부위)에서는 SUVmax는 평균적으로 0.52, SUVmean은 평균적으로 0.26로 확인되어, 해당 부위가 정상 조직에 비해 glucose metabolism이 증가 된 것이 확인 됨. cranial scapular region cutaneous mass와는 다르게 중앙부위에서 FDG uptake 증가가 관찰되어 종양이 의심되며, mass 중앙부위에 대한 추가적인 FNA 검사를 통해 조직학적 병변을 감별할 예정임.
- 전신 림프절에서 FDG uptake의 증가는 관찰되지 않았으며 림프절로의 전이는 관찰되지 않음.

- 우측 심장 apex 및 base 사이 우측편에 3.0 x 1.1 x 1.9 cm 크기의 mass가 관찰되었으며, SUVmax는 평균적으로 1.28, SUVmean은 평균적으로 0.68로 glucose metabolism이 증가 된 것이 확인 증양 가능성을 확인함.
- Liver와 testis가 다른 장기들에 비해 FDG uptake의 증가가 관찰되었으나, 장기 전반적으로 증가되어 전이의 가능성은 떨어진다고 판단되며, 생리적으로 증가했을 가능성이 높다고 판단됨.
- Kidney, urinary bladder의 FDG uptake의 증가가 관찰되었으나 FDG의 배설경로가 urinary system이기 때문인 것으로 확인됨.

**▣ 암유발 형질전환 동물의 혈액학적/생화학적 표현형 분석**

- 암유발 형질전환 동물의 혈액학적 혈구세포의 수 및 생화학적 지표를 대조군 정상 개체와 비교한 결과 정상적인 기준치 내에서 유사한 경향을 나타내었으며 유의적인 차이점을 확인할 수 없었음.
- 지속적인 분석을 통해 혈액학적/생화학적 표현형을 관찰할 예정임.

**표. 생화학적 분석 결과**

Comparison of Serum Biochemical Analysis Between Normal Pigs and Cancer induced pig			
Test items	Reference values	Normal pig	Cancer induced pig
GLU [mg/dL]	66.3~347.55	96.44±36.61	81.4
CREA [mg/dL]	0.75~2.12	1.44±0.25	1.05
BUN [mg/dL]	4.91~20.87	15.22±19.76	18.50
BUN/CREA	3.92~26.79	15.6±2.63	17.61
PHOS [mg/dL]	4.65~14.33	9.8±0.69	8.13
Ca [mg/dL]	8.67~12.34	10.7±1.49	11.8
T P [g/dL]	5.07~8.65	8.53±0.82	8.40
ALB [g/dL]	3.13~5.03	3.8±0.62	3.50
GLOB [g/dL]	1.32~4.24	4.23±1.20	4.43
ALB/GLOB	0.9~3.47	0.76±0.32	0.79
ALT [U/L]	11.3~49.85	36.88±1.25	31.50
ALKP [U/L]	10.9~516	176±21.5	163
GGT [U/L]	22.15~505.45	71±6.26	45.2
TBIL [mg/dL]	0.06~0.69	0.29±0.15	0.2
CHOL [mg/dL]	18~79	81.29±4.85	78.83
AMYL [U/L]	250.73~2320.68	780.57±0.80	729

**표. 혈액학적 분석 결과**

Comparison of Erythrocyte Indices Between Normal Pigs and Cancer induced pig			
Test Name	Reference values	Normal Pigs	Cancer induced pig
RBC [M/ $\mu$ l]	5.00~8.00	7.8 ± 0.6	8.2
HCT [%]	32.0~50.0	42.6 ± 5.1	48.3
HGB [g/dL]	10.7~16.7	13 ± 1.7	12.6
MCV [fL]	50.0~68.0	54.3 ± 2.2	55.4
MCH [pg]	17.0~21.0	16.5 ± 0.9	17.4
MCHC [g/dL]	30.0~34.0	30.5 ± 0.6	31.5
RETIC [K/ $\mu$ l]	0.0~100.0	34 ± 16.7	39.2
WBC [K/ $\mu$ l]	11.00~22.00	22.2 ± 2.3	21.5
NEU [K/ $\mu$ l]	4.48~7.52	10.4 ± 2.4	8.1

LYM [K/ $\mu$ l]	6.60~18.70	10.3 $\pm$ 1.0	11.6
MONO [K/ $\mu$ l]	0.30~1.25	1.1 $\pm$ 0.3	1.1
EOS [K/ $\mu$ l]	0.20~1.10	0.5 $\pm$ 0.2	0.7
BASO [K/ $\mu$ l]	0.00~0.20	0	0
PLT [K/ $\mu$ l]	300~700	242.4 $\pm$ 66.5	236

## 연구내용2

## 모델 중대동물의 흑색종 조직병리 및 분자병리학적 검증

### ▣ 자연발생 유래 흑색종 돼지 모델 확보

- 선천적으로 흑색종이 발병된 돼지는 주로 Duroc 그리고 Sinclair, Hormel, Libechov minipig 품종에서 유전적으로 발병하며 이와 같은 개체의 세포주 구축은 형질전환 흑색종 돼지와 비교하였을 때 대조구로 이용 되어질 수 있어 활용가능성이 높음.
- 제 1세부 연구팀에서는 충북 소재 양돈농가에서 내원한 환자 (Duroc, 40일령, 수컷)의 종양 조직을 샘플링 하여 초대배양을 실시하였음. 조직 병변은 육안 상으로 확인할 수 있을 만큼 (성인주먹크기) 크게 나타났으며, 병변 부위의 조직을 샘플링 하여 각각 병리학적 진단 및 초대배양을 실시함.



그림. 품종: Duroc / 성별, 수컷(거세돈) / 일령: 40일령 (20.08.31 기준) / 체중: 10kg / 병변 사이즈: 11cm (성인주먹크기)



그림. 바이옵시 편지를 이용한 조직 회수

- 메데토미딘(Medetomidine; 진정제): 70ul/kg, 리도카인(국소마취제): 부위당 100~200ul, 아티파메졸 (Atipam; 진정완화제): 35ul/kg 처치함.
- 4mm 바이옵시편지를 이용하여 귀조직 5개, 종양의심부위 6개를 채취함. (아래표 참조)



조직채취 부위	채취수량	Primary culture	조직검사	Paraffin block
귀	5	3	2	
병변	6	2	2	2

**▣ 종양 유발 중대동물의 조직병리학적 표현형 분석**

- 채취된 피부 punch biopsy 조직 2단면에 대한 병리조직학적 검사 결과, 진피와 피하 조직 일부에 걸쳐서 종양성 종괴의 일부가 관찰되었음. 종괴 내부에서 관찰된 종양세포의 형태, 증식 양상, 종양세포의 세포질 내 관찰된 다량의 멜라닌 과립 등을 토대로 흑색종으로 진단되었으며, 종양세포의 비교적 낮은 분화도, 일부에서 관찰되는 침습적인 성장 양상 등을 고려하였을 때, 악성의 흑색종일 가능성이 높을 것으로 사료됨.

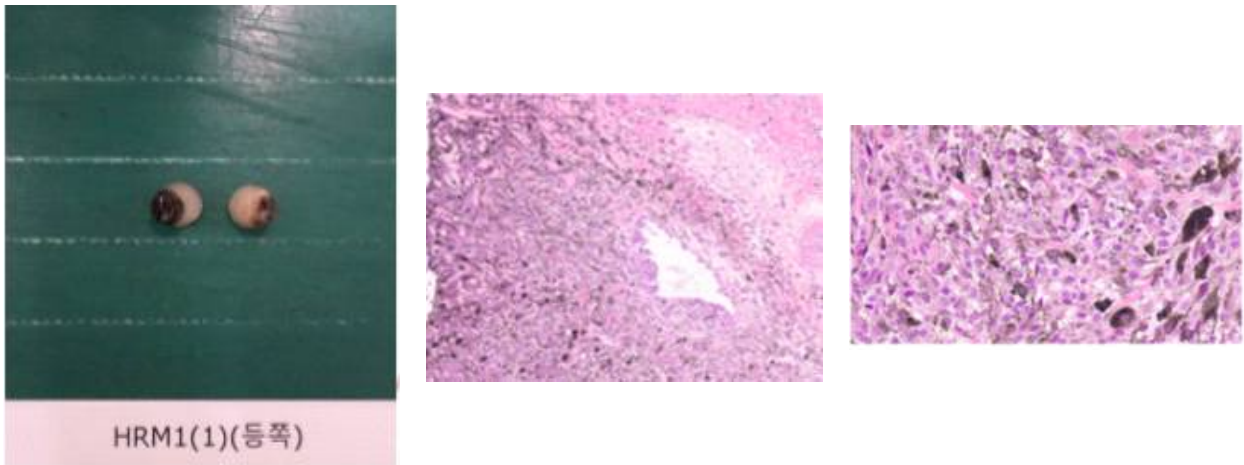


그림. 흑색종 의심 조직 사진

- 돼지에서 흑색종은 본 예와 같은 Duroc 그리고 Sinclair, Hormel, Libechov minipig 와 같은 품종에서 선천적으로 발생할 수 있으며, 유전될 수 있다고 알려져 있음. 이러한 흑색종은 자연적으로 퇴행할 수도 있지만, 일부는 퇴행하지 않고, 악성 종양의 성향을 보이며 주변 림프절이나 다른 장기로 전이될 수 있다고 알려져 있음. 본 예의 경우, 악성 흑색종의 가능성이 높을 것으로 사료되며, 검사 단면 상, tumor emboli 소견은 관찰되지 않았으나 절제술 이후에도 재발, 다른 부위로의 전이에 대한 지속적인 예후 관찰이 필요할 것으로 사료됨.

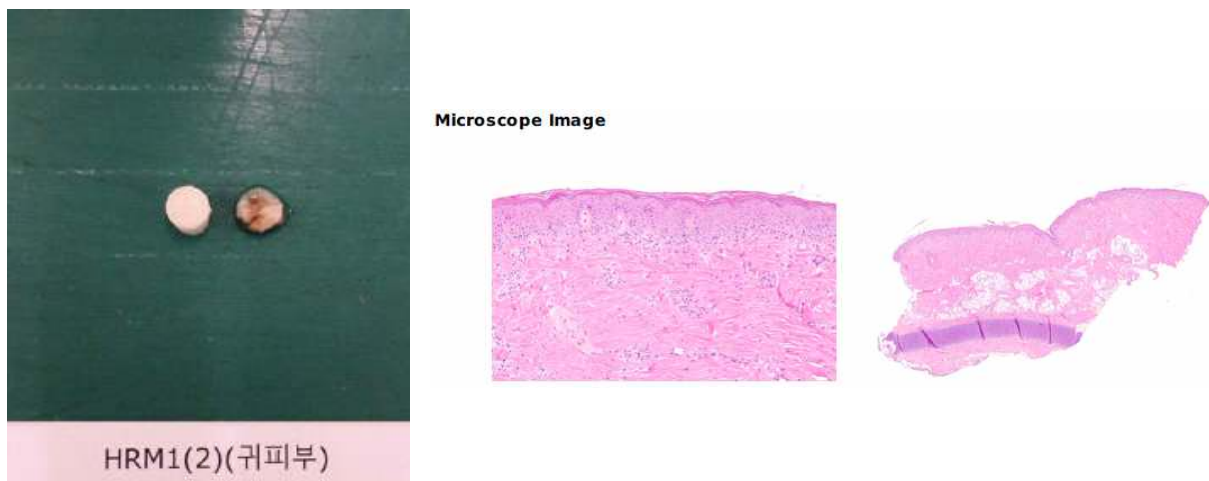


그림. 흑색종 의심돼지의 정상세포조직 사진

- 귀 피부 조직 3단면에 대한 병리조직학적 검사 결과, 진피와 피하 조직 및 연골 조직이 포함되어 있었음

며, 조직내에서 의심되는 전이성 흑색종을 포함한 종양 소견은 관찰되지 않았음.

- 일부 진피에서 미약한 fibroplasia 소견과 표피의 미약한 과증식 소견이 관찰되었으나 이는 특정 질환에 대한 소견은 아닌 것으로 사료되며, 조직에서는 뚜렷한 염증 소견도 관찰되지 않았음.
- 이 조직을 통해 체세포 핵이식의 공여세포로 사용하여 자연발생 흑색종 모델을 구축할 예정임.
- 생산된 종양 유발 동물의 조직병리학적 분석을 위해 미세바늘흡입검체 채취법을 통해 종양 의심 부위를 샘플링하고 조직분석하여 종양의 형성 유무 및 진행 정도 분석할 예정임.
- 차년도에는 흑색종 세포주 특허기탁을 비롯한 지적재산권 확보를 위한 연구가 수행될 예정임.
- 자연발생 흑색종 모델의 PET/CT 분석을 통해 흑색종 부위의 glucose metabolism를 비롯한 종양특성분석 및 전이양상 등을 조사할 예정임.



그림. 생산된 종양 유발 동물 모습

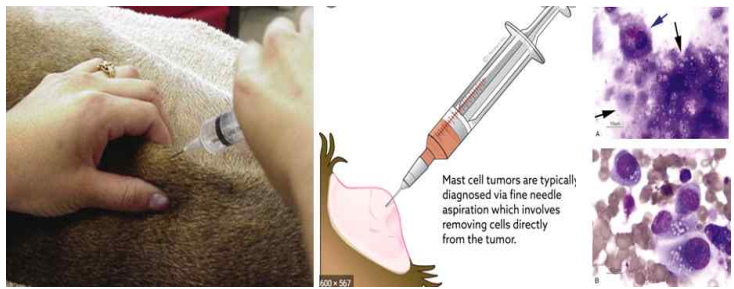
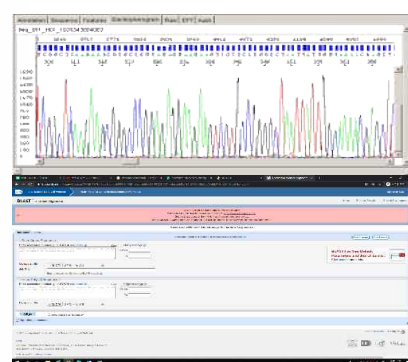
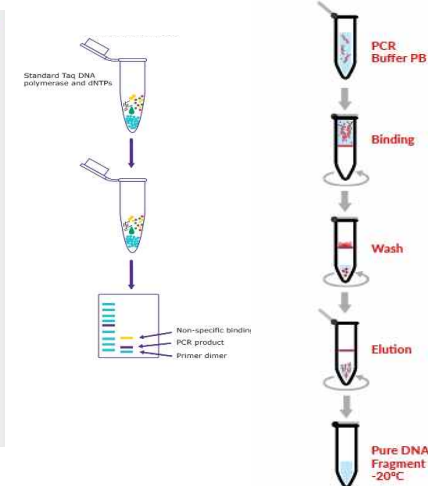
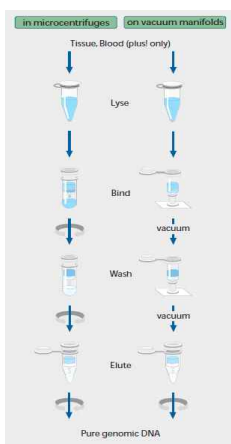


그림. 미세바늘흡입 검체 채취 모식도

### ▣ 종양 유발 중대동물의 분자병리학적 표현형 분석

- 생산된 종양 유발 동물의 체세포조직 및 수정란 이식에 사용된 형질전환세포주의 Genomic DNA로부터 PCR과 RFLP를 수행하여 생산된 종양 유발동물의 형질전환 유무를 확인 중에 있음.
- 종양 유발 형질전환 동물로 확인되면 확인된 동물의 target gene을 유전자 증폭/정제하고 염기서열을 분석하여 분자적 수준에서 종양 유발 동물의 형질전환 유무를 분석할 예정임.
- 생산된 종양유발 동물 및 후대 검증을 위해 조성된 종양모델라인 계통군의 분자병리학적 분석을 위하여 관련 종양관련 단백질 발현 수준을 immunohistochemistry 방법을 이용하여 분석할 예정임.

#### Workflow



➡ Assessment of Transgenic Pig (K/O or K/I)

그림. Genomic DNA로부터 PCR과 RFLP를 수행하여 생산된 종양 유발모델의 형질전환 유무 확인 방법 모식도

**▣ 유효성 검증 및 후대 검증을 위한 종양 유발 자돈의 생산 및 육종**

- 생산된 암유발 형질전환 동물의 유효성 검증 및 후대 검증을 위하여 계통 라인 구축하고 있음.
- 기생산된 종양유발 모델(수컷)과 크로넥스의 미니피그를 교배하여 heterogeneous type의 자손을 얻고 형매교배 및 근친교배를 통하여 후대 검증을 위한 종양모델라인 계통을 구축 중에 있음.
- 현재 총 3회 자돈의 생산이 완료 되었으며, 형매 교배 및 근친교배를 위한 후보돈 생산을 위하여 육종 중에 있으며, male 11두, female 7두 총 13두의 자돈을 생산하여 육종 중에 있으며 생산된 자돈의 유효성 검증을 위해 각 개체의 성장 단계별 표현형을 확인 중에 있음.

번호	모돈	웅돈	출산일	출산 두수	성별
1	E7-32	CY-5	2020-02-21	4	Male:3, Female:1
2	E7-32		2020-08-07	8	Male:4, Female:4
3	F6-27		2020-10-17	6	Male:4, Female:2



그림. 후대 검증을 위해 조성된 계통군 모습

**▣ 종양 유발 중대 동물 생산을 위한 수정란 이식**

- 종양 유발 중대동물모델 생산을 위한 수정란 이식을 실시 함.
- 종양 유발 중대동물모델의 자돈 생산을 위하여 대리모돈은 개발된 프로그램을 적용하여 영양인자 분석을 수행하였고 경산돈 위주로 선발 함. 월령은 16~24개월령, 체중 90~100kg로 영양 및 자돈 생산 성적이 우수한 개체를 선별하여 수정란 이식을 수행함.
- 현재까지 12회 수정란 이식을 시행하였음.

No.	Surrogate mother			
	이식일	Recipient ID	Parity	ET site
1	2020-03-13	S6-2	경산	Lt
2	2020-04-01	E6-13	경산	Lt
3	2020-04-23	S12-2	경산	Lt
4	2020-05-14	SF-2	경산	Lt
5	2020-05-28	E3-25	경산	Lt
6	2020-07-02	F5-12	초산	Lt
7	2020-07-31	M-44	경산	Lt
8	2020-08-21	J11-16	경산	Lt
9	2020-09-03	F10-41	경산	Lt
10	2019-09-11	F6-14	경산	Lt
11	2020-09-23	F5-48	초산	Lt
12	2020-10-08	E1-4	경산	Lt

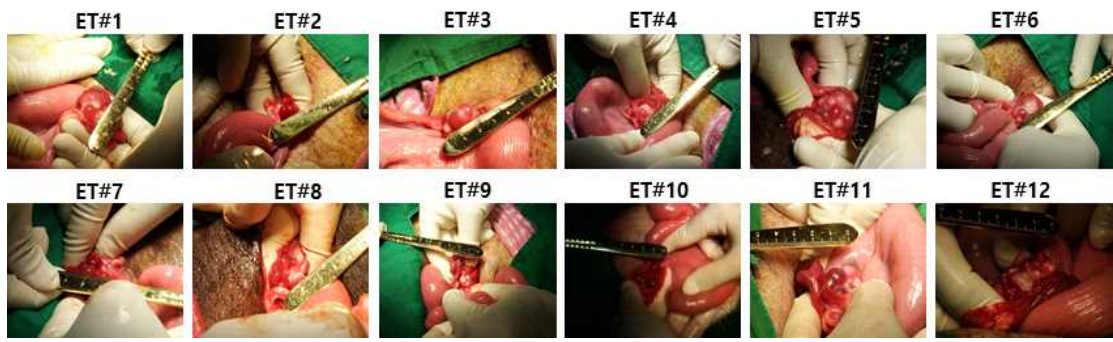


그림. 종양 유발 증대동물 생산을 위한 수정관 이식 현황

▣ 전임상 연구를 위한 종양 유발 동물모델의 병성검사 시스템 확립

- 실험동물의 SPF화 확립은 결과 해석을 위한 실험의 신뢰성 제고 및 재현성 확보 측면에서 매우 중요하게 여겨 짐.
- 바이러스성/세균성 감염에 대한 진단방법을 개발하고 표준화를 진행 함. SPF 병성검사 항목의 설정은 FELASA (Federation of European Laboratory Animal Sciecne Associations)와 National SPF Swine Accerdtiting Agency의 가이드라인을 따름.
- 바이러스성/박테리아성 감염의 검경 및 검경 표준화를 위하여 바이러스성 및 세균성 병원균의 양성 대조 균을 제작을 완료함.

	바이러스	PCR	ELISA
1	PRRSV (돼지생식기 호흡기 중후군 바이러스) porcine reproductive and respiratory syndrome virus	√	√
2	CFSV (돼지 열병) Classical Swine Fever Virus	√	
3	Porcine Parvovirus (파보바이러스) PPV Porcine parvovirus	√	
4	PCV2 (돼지싸코바이러스 2형) Porcine circo virus 2	√	√
5	TGEV 돼지 전염성 위장염 Transmissible Gastroenteritis Virus	√	√
6	PEDV (돼지 유행성 설사) Porcine Epidemic Diarrhea Virus	√	√
7	Swine Influenza H1N1 (인플루엔자) Swine Influenza Virus	√	√
8	Rota virus 로타바이러스 Rota virus	√	
9	FMDV (구제역) Foot and Mouth Disease Virus		√

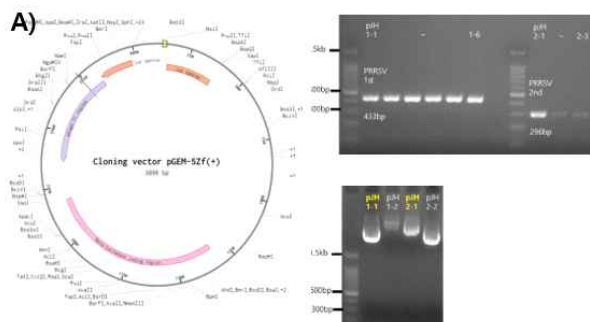
	세균	PCR	ELISA
1	돼지단독 Erysipelothrix rhusiopathiae	√	
2	파스튜렐라증 Pasteurella multocida A, D	√	√
3	마이코플라즈마 폐렴 Mycoplasma hyopneumoniae	√	√
4	액티노바실러스성흉막폐렴 Actinobacillus pleuropneumoniae serotype	√	√
5	글래서씨병 Haemophilus parasuis	√	√
6	연쇄상구균증 Streptococcus	√	
7	돼지위축성비염 Atropic rhinitis : Bordetella bronchiseptica 균	√	응집

그림. 바이러스성 및 세균성 병성 검사 구축 항목

표. 병성 검사를 위한 primer sequence 및 양성대조군 제작을 위한 template

종류	Forward primer	Reverse primer	Template	Product size
PRRSV (1st)	ATG GCC AGC CAG TCA ATC A	TGG CCC TAA TTG AAT AGG TGA	인겔백 피알알예스 생독 백신	433 bp
PRRSV (2nd)	CCA GTC AAT CAG CTG TGC CA	CGG ATC AGG CGC ACA GTA TG	인겔백 피알알예스 생독 백신	296 bp
CSFV	CTA GCC ATG CCC ACA GTA GG	CAG CTT CAG CGT TGA TTG T	프로백 돼지열병 단독 백신	421 bp
TGEV	GCC ATT GAT TTA TGG AGA CA	GTA TAA AAC CTC CTG GCT GT	프로백 티알2 백신	782 bp
PEDV	GTC TTA CAT GCG AAT TGA CC	CAA CCT TAT AGC CCT CTA CA	수이샷 PED-SM 백신	525 bp
PPV	CCA TAC ACA CCA GCA GCA CC	ACC TGA GCT GGC CTA ATT GC	프로백 돼지파보 백신	455 bp
PCV2	CAC GGA TAT TGT AKT CCT GGT CG	CGC ACC TTC GGA TAT ACT G	에이알-엑스 백신	493 bp
RV	AAA GAT GCT AGG GAC AAA ATT G	TTC AGA TTG TGG AGC TAT TCC A	프로백 티알2 백신	309 bp
SIV	ATG AGY CTT YTA ACC GAG GTC GAA ACG	TGG ACA AAN CGT CTA CGC TGC AG	수이샷 플루-3 백신	244 bp
Actinobacillus pleuropneumoniae	GGC GTG GTT TAT GTC ACC GGC A	CGT TCC CGC CCC AAT CTT TGC T	레모백 백신	667 bp
Hemophilus parasuis	TGG CGG ACG GGT GAG TAA TGC T	ACT TAA GTC ACC GCC TGC GTG C	수이샷 올레스 백신	498 bp
Streptococcus	TCA AAC GAG CGC GGC GTT TTT C	TGG TGA CAT CGG TGT CGG TGG T	수이샷 올레스 백신	374 bp
Erysipelothrix rhusiopathiae	CGA TTA TAT TCT TAG CAC GCA ACG	TGC TTG TGT TGT GAT TTC TTG ACG	프로백 백신	937 bp
Mycoplasma	GGG CCG ATG AAA CCT ATT AAA ATA GCT	GCC GCG AAA TTA AAT ATT TTT AAT TGC ATC CTG	수이샷 올레스 백신	948 bp
Pasteurella multocida	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	수이샷 올레스 백신	460 bp
Atropic rhinitis	CCC CCG CAC ATT TCC GAA CTT C	AGG CTC CCA AGA GAG AAA GGC TT	수이샷 올레스 백신	164 bp

- SPF 양성대조군의 제작은 시판되는 백신으로부터 해당되는 병원체의 유전자를 추출한 후 유전자를 증폭하여 타겟 유전자를 확보하고 T vector에 삽입하여 cloning을 완료하였으며 PCR 항원검사를 위한 양성 판정 기준 체계를 구축함.
- 바이러스 및 세균에 대한 병성검증을 위하여 바이러스성 항원 8종, 세균성 항원 7종에 대해 PCR 검출법을 확립하였으며, 이중 바이러스성 항원 6종 및 세균성 항원 5종에 대하여 항체검출법(ELISA) 확립하여 병성검사시스템의 신뢰도를 높임.



B) pJH2 : pGEM-T + PRRSV 2nd (296bp)

- Forward primer : PRRSV\_F2 (CCA GTC AAT CAG CTG TGC CA)  
 - Reverse primer : PRRSV\_R2 (CGG ATC AGG CGC ACA GTA TG)

TCTATAGCCGAAGTCGCATGCTCCGCCGCATGGCCGCCGGAATTCGATT

CCAGTCAATCAGCTGTGCCAGATGCTGGTAAAGTATCGCTCAGCAAAACCCAGTCCAGAGGCAAGGG  
 ACCGGAAAGAAAATAAAGAAGAAAACCCGGAGAGGCCCATTTCTCTAGGAGCTGAAGATGATG  
 TCAGACATCACTTACCCCTAGTGAAGCGCAATTGTCTGTCTCAATCCAGACCGCTTAAATCAAGG  
 CGCTGGGACTTGCACCCCTGCAGATTCAGGGAGGATAAGTACACTGTGGAGTTAGTCT(T→C)  
 GGCTACGCATCATACTGTGGGCTGTACCG  
 AATCACTAGTGAATTCGGCCGCCCTGCAGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGGCTGGATGCATAGCT  
 TGAGTATCTATAGTGCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCTATAGCTGTTCTCTGTGAAATGTATCC

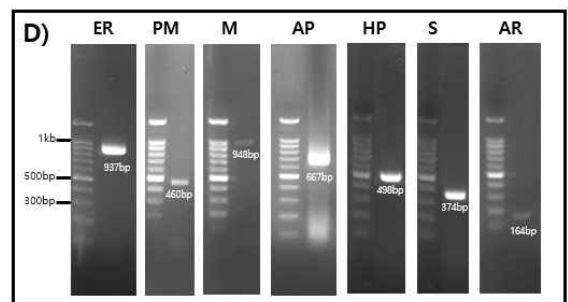
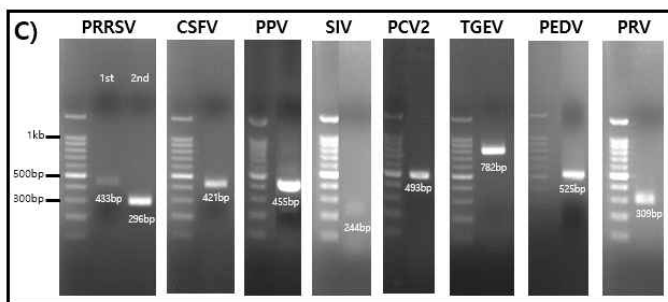


그림. A) Cloning vector 및 PRRSV RT-PCR 결과, B) Cloning 된 PRRSV의 Sequencing data. A) 바이러스성 항원의 양성대조군 RT-PCR 결과, PRRSV: Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome virus, CSFV: Classical swine influenza virus, PPV: Porcine Pavo Virus, SIV: Swine Influenza virus, PCV2: Porcine circo virus, TGEV: Transmissible gastroenteritis virus, PEDV: Porcine epidemic diarrhea virus, PRV: Porcine rota virus, B) 세균성 항원의 양성대조군 RT-PCR 결과, ER: Erysipelothrix rhusiopathiae, PM: Pasteurella multocida, M: Mycoplasma, AP: Actinobacillus pleuropneumoniae, HP: Hemophilus parasuis, S: Streptococcus, AR: Atropic rhinitis

▣ 생산된 종양 동물 모델동물의 사양관리 시스템 확립 및 운영

- 흑색종 종대모델동물 사육 시설 구축 및 운영

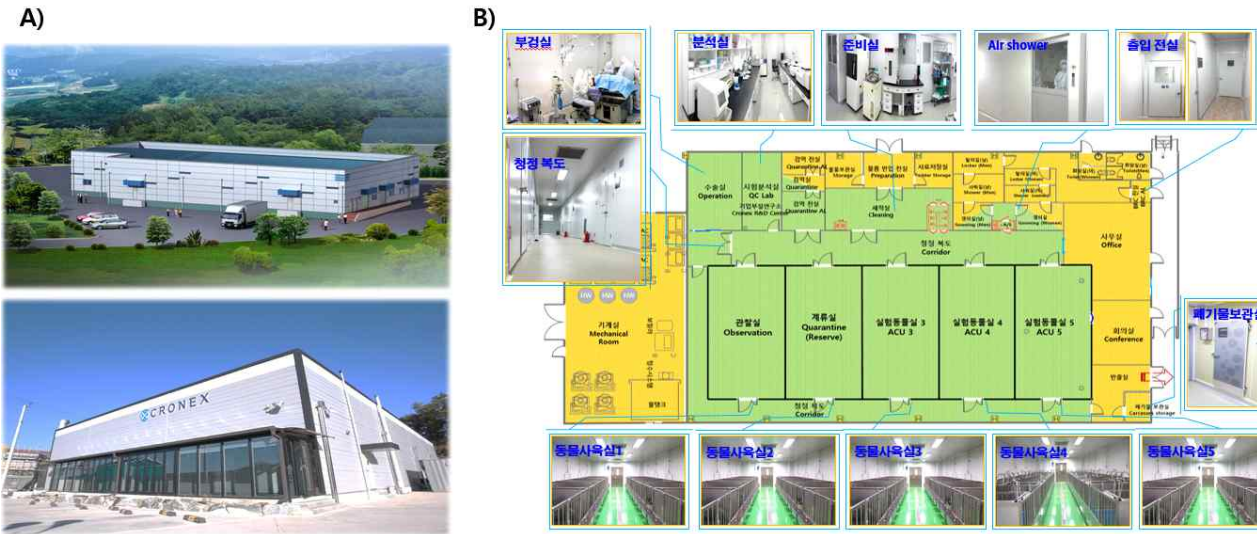


그림. 크로넥스 실험동물 SPF 사육 및 생산 시설. A) 크로넥스 Bio Resource Center 조감도 및 전경, B) 크로넥스 SPF 사육 및 생산 시설 내부 구조 및 내부 설비

- 흑색종 중대모델동물 사양관리를 위해 연면적 963.213m<sup>2</sup> 공간에 동물 사육실, 수술실, 부검실, 기계실 등 용도별로 분리 구획된 시설을 구축 완료함.
- 청정도의 유지를 위하여 각 공간별 소독 및 공조가 가능하게 설계되어 있으며, UV살균 및 역삼투압방식으로 정수된 물, 방사선조사된 사료가 공급되어 동물 내부 오염을 최소화 함.
- 개발된 표준작업지침서를 동물생산 및 관리 업무에 엄격히 적용하여 사람으로 인한 오염의 위험성도 최소화 함.
- 최대 500마리의 실험용 돼지의 사육이 가능하며, 65.886m<sup>2</sup>의 동물 생산실이 5개 있으며 최대 100마리의 동물 수용이 가능하도록 구축함.

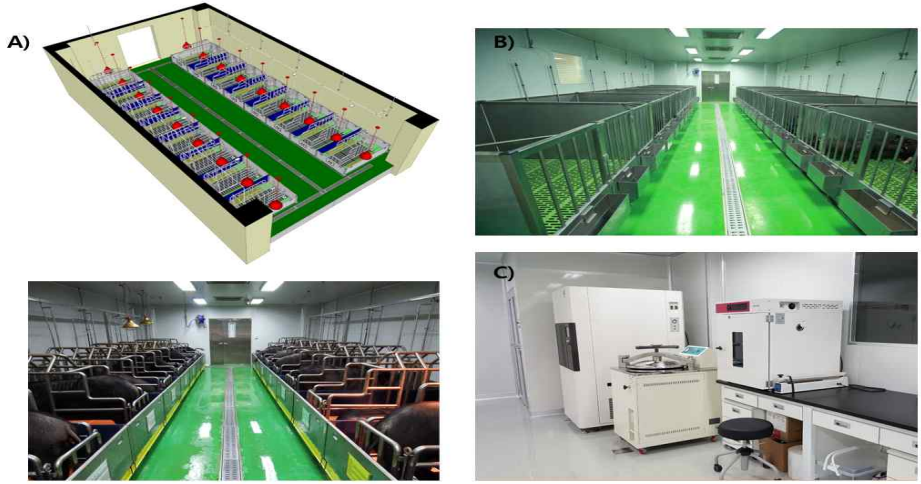


그림. 실험동물사육 및 생산 시설. A) 임신돈 사육실 모식도 및 임신돈 사육실, B) 자돈 및 실험동물 사육실, C) 멸균 및 준비실

- 당사가 구축한 시스템 적용 시 기존 대비 생산 관리 효율성이 증진되었고(타 시설의 경우 2명의 작업 종사자가 15~20두 가량 사육관리 가능하나 당사 시스템 적용 시 1명의 종사자로 200~300 두 사육 관리 가능함), 에너지 비용 절감은 물론 환경친화적으로 작업자뿐만 아니라 실험동물의 Well-being까지 고려한 최첨단 실험동물실의 운영 시스템 구축 뿐만 아니라 생물학적 멸균, 비임상 연구 대행, 다양한 유효성 평가를 위한 시스템을 구축함.



그림. SPF 실험동물 사육시설 및 실험 시설. A) 사육시설 출입 전실, B) Air shower, C) 사육실 청정 복도, D) 실험동물 수술실, E) 시험분석실



## 제1 협동과제

## 아부다비 생명공학연구원

### 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발

**세부목표** : Ras 기반 흑색종 모델건 생산

#### 연구내용1

개량된 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석

#### ▣ 개 흑색종 모델 생산을 위해 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석

##### a. Safe harbor locus인 Rosa26 locus에 F-RMCE 재조합 유도시스템을 도입하여 구축된 세포주를 사용한 복제건 태아세포 확보

- 태아 섬유아세포는 체세포 복제에 공여핵원으로 사용되어옴.
- 유전자를 삽입하려면 몇 번의 계대 배양을 통해 유전자가 삽입된 콜로니의 선발과정이 필수적인데, 체세포의 짧은 수명은 선발 과정 중에 자연적인 노화를 유발하게 됨.
- 노화된 체세포는 개복제 효율을 저하 시킴.
- 이번 멜라노마 모델건 생산을 위해서는 복합적인 유전자가 삽입되어야 함으로 더 강도 높은 선발이 필수 불가결한 상황.
- 위탁 연구기관인 고려대학교에서 2년차에 확립한 safe harbor locus인 Rosa26 locus에 FLP/FRT 재조합 유도 시스템(Flippase Recombinase mediated cassette exchange system [F-RMCE])을 도입한 세포주를 이용해 복제 배아를 생산하고 대리모에 이식함.
- 147개의 복제 배아를 만들고 총 8마리의 대리모에 이식함.
- 그 중 2마리의 대리모가 임신하였으며, 임신 27일차에 제왕절개를 통하여 fetus를 확보하였음 (표).

표. 태아 회수를 위해 수행된 복제란 이식

Subjected to SCNT	Fused & transferred (%)	No. of oocyte donor dog	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of sac	Cloning efficiency (%)
349	147 (42.1)	8	2	25.0	2	1.4

- Fetus에서 섬유아세포를 확보하여 F-RMCE 재조합 유도시스템이 도입된 섬유아세포 확보
- 2위탁연구팀인 고려대에서 흑색종 모델을 생산할 수 있는 형질전환 핵공여원 세포를 제작할 수 있도록 확보된 세포 제공

##### b. 멜라닌 세포 특이적 CreER/LoxP 재조합 시스템을 도입하여 구축된 세포주를 사용한 체세포 핵이식

- 2세부 위탁기관인 고려대에서 Ras 및 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터와 멜라닌 세포 특이적 CreER/LoxP 재조합 시스템을 한꺼번에 도입할 수 있다고 판단하여 두 벡터 시스템을 도입한 세포를 제작하여 제공받음.
- 그 중 Ras에 의해 발병되는 흑색종 모델을 우선 생산하고자 구축된 Ras 기반 흑색종 유발 시스템이 도입된 모델 세포주를 사용하여 복제 배아를 생산하고 대리모에 이식하였음.
- 95개의 복제 배아를 만들고, 총 6마리의 대리모에 이식함.
- 이식한 대리모에서 임신은 확인되지 않았으며, 이에 대하여 고려대와 함께 원인을 분석하였음.



- 현재까지 개과 동물에 적용되는 체세포 핵이식 기법을 사용하여 생산된 복제 배아의 체외 배양 기술은 개발되지 않았기 때문에, 복제배아를 바로 대리모에 이식하는 방법으로 진행하고 있음.
- 이에, 이식된 형질전환 복제배아가 정상적으로 발달되는지의 여부를 초기에 초음파를 통하여서 임신여부를 확인하고 있음. 이외에, 대리모로부터 발달중인 태아를 수거하여 분석을 하는 과정은 윤리적인 문제 및 원인분석에 따른 실효적인 성과에 영향을 미칠것이라 판단하여 수행하지 않았음.
- 이전 선행 연구 중에 체세포 핵이식 과정에서의 형질전환 핵공여원의 fusion 율은 복제 배아가 정상적으로 임신이 되고 발달하는데 있어 중요한 요소임을 확인하였음. 이번에 제작한 형질전환 핵공여세포의 fusion 율이 상당히 낮음을 확인하였고, 고려대 연구팀과 함께 사용된 핵공여세포의 실패할 요인이 될 수 있는 현 전략의 문제점 등을 분석해 보았으며 형질전환 과정에서 직간접적인 영향으로 핵공여세포의 상태가 좋지 않았다고 결론을 내림. 따라서 핵공여세포의 상태를 최대한 좋게 유지하여 더욱 짧은 시간에 형질전환을 유도하기 위해, Transposon 매개 유전자 도입 시스템을 기반으로 한 형질전환 모델 세포주를 제작할 전략을 고안하였음. (제 2 위탁과제 내용 참조)

**표. 멜라닌 세포 특이적 CreER/LoxP 재조합 시스템 세포주를 사용하여 수행된 복제란 이식**

Subjected to SCNT	Fused & transferred (%)	No. of oocyte donor dog	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of sac	Cloning efficiency (%)
277	95 (34.3)	6	0	0.0	0	0.0

## 연구내용2

### 생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도

- 생산된 모델 건에서 흑색종 발병 유도
  - 형질전환 개 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함
- 설치류의 종특이성으로 인한 전임상 결과의 신뢰도가 상대적으로 낮는데, 이는 사람과의 유전자, 세포, 조직, 장기 및 생물분류학적인 이질성으로 인체에서 나타나는 다양한 분자·생리학적 특성, 병리학적인 현상의 부재 및 전이기전 등의 차이로 인해 실제 환자에서 나타나는 다양한 종양관련 현상을 완벽히 재현하기에는 어려운 모델로 인식되고 있음. 이러한 제한점들에서 인간과 보다 유사한 이점이 있는 중대 동물 돼지와 개를 활용한 흑색종 모델이 기존 마우스 모델에 비해 훨씬 유용할 것이라고 예상되며 질환 모델 구축 후 전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 생산라인 및 상용화 기반 구축을 5차년도에 시행할 예정임.

### 세부목표 : 형질전환 모델건의 생산을 위한 기반 기술 확립

## 연구내용1

### 형질전환 모델건 대량생산을 위한 체세포 생식세포 확보 및 보관의 최적화 조건 확립

#### ▣ 공여세포와 난자의 미토콘드리아 compatibility에 따른 체세포 복제 효율 분석

##### a. 미토콘드리아

- 미토콘드리아는 진핵세포의 세포질 내에 뚜렷한 두 개의 막으로 둘러싸여 있는 세포 내 소기관으로, 내막의 독특한 지질 조성으로 세포 내 물질이 자유로이 왕래할 수 없음.
- 이러한 내막의 불투과성으로 인하여 미토콘드리아 매트릭스와 막 공간 사이에 수소이온 농도의 불균형이 발생하고, 이러한 화학적 불균형이 생체 에너지 합성의 원동력으로 이용되어 ATP를 생산함.
- ATP의 생성은 세포의 유형이나 산소의 존재 유무에 따라서 미토콘드리아 내에서 TCA 회로 및 산화적 인산화 과정을 통하여 주로 이루어진다고 보고됨.

- 체세포 복제를 통한 발달 과정에서 세포는 산화적 인산화를 통해 생성된 ATP를 주 에너지원으로 사용하며, 체내에서의 증식 및 사멸, 항상성 유지 등에 이용됨.
- 이에 체세포 복제 과정에서의 미토콘드리아 대사 연구의 필요성이 대두되고 있음.
- 미토콘드리아는 핵에 존재하는 DNA와는 별도로 자기 자신의 DNA를 보유하고 있으며, 모계유전을 통하여 세포질 유전에 관여함.
- 모계유전의 특성으로 인해, 체세포 복제 과정에서 공여 세포와 난자 세포의 세포질 및 미토콘드리아 구성에 불일치성이 발생함.
- 그러나, 현재까지 공여세포와 난자의 상이한 미토콘드리아 DNA에 따른 대사 및 발달에 대한 연구는 미흡함.

**b. 이종의 공여세포 및 난자의 사용에 따른 태아 특성 변화**

- 공여세포와 난자의 상이한 미토콘드리아 DNA에 대한 영향을 확인하기 위하여, 개과동물인 리카온의 섬유아세포를 공여핵원으로 사용하여, 개의 난자에 SCNT 후 배아를 생산하였으며, 이를 모견에 이식하였음.

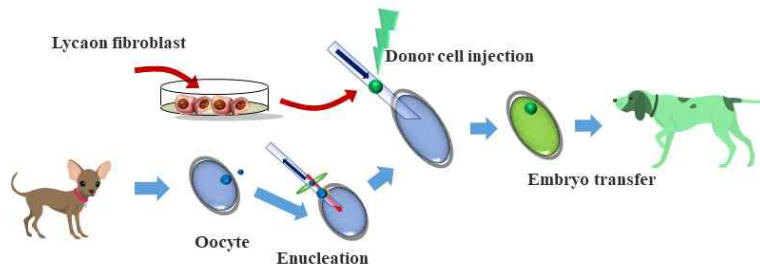


그림. SCNT 및 배아 이식 모식도

- 그 결과 41일까지는 모견에서 임신이 유지되었으며, fetus를 적출하여 특성 분석을 수행하였음.
- 수정된 리카온-개 fetus는 개와 리카온 모두의 미토콘드리아 DNA mtDNA를 가지고 있었으며, 이중 개의 mtDNA를 주로 나타내었으며, 리카온의 genome DNA (gDNA)를 나타내었음 (그림).

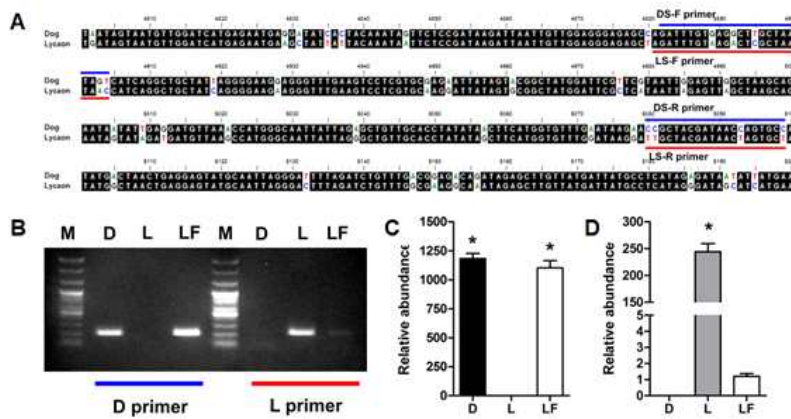


그림. 미토콘드리아 DNA의 정량화 분석

- 성체견, 성체리카온, iSCNT lycaon fetus, SCNT canine fetus의 세포대사를 분석해본 결과, 산화적 인산화 (OXPHOS)의 지표인 basal respiration를 포함하여, ATP production, proton leak, spare respiratory capacity가 모두 다른 군에 비하여 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였음 (그림).

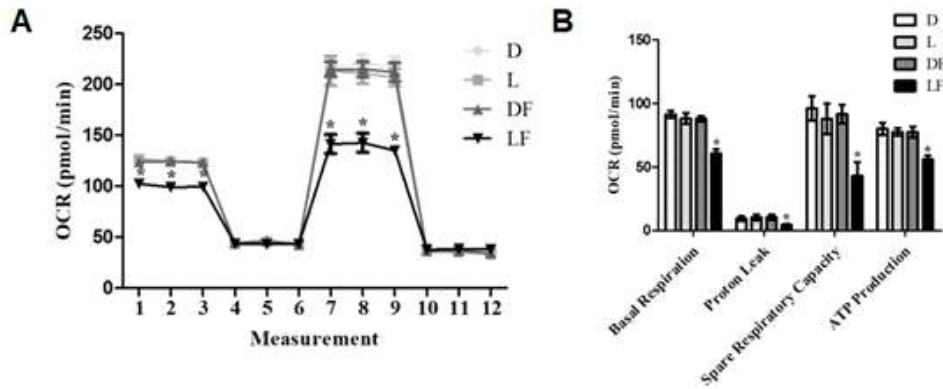


그림. 성체견 (D), 성체리카온 (L), SCNT canine fetus (DF), iSCNT lycaon fetus (LF) 세포의 Oxygen consumption rate (OCR) 분석 결과

- 구축된, 리카온 - 개 fetus의 피부로부터 분리한 섬유아세포에서 세포주기, 미토콘드리아의 외막 투과성을 분석하였음. 구축된 리카온 - 개 섬유아세포는 cell arrest의 지표인 G0/G1기가 유의적으로 증가하였으며, DNA가 복제되는 S기가 유의적으로 감소하였으며, 미토콘드리아의 외막 투과성 또한 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였음 (그림).

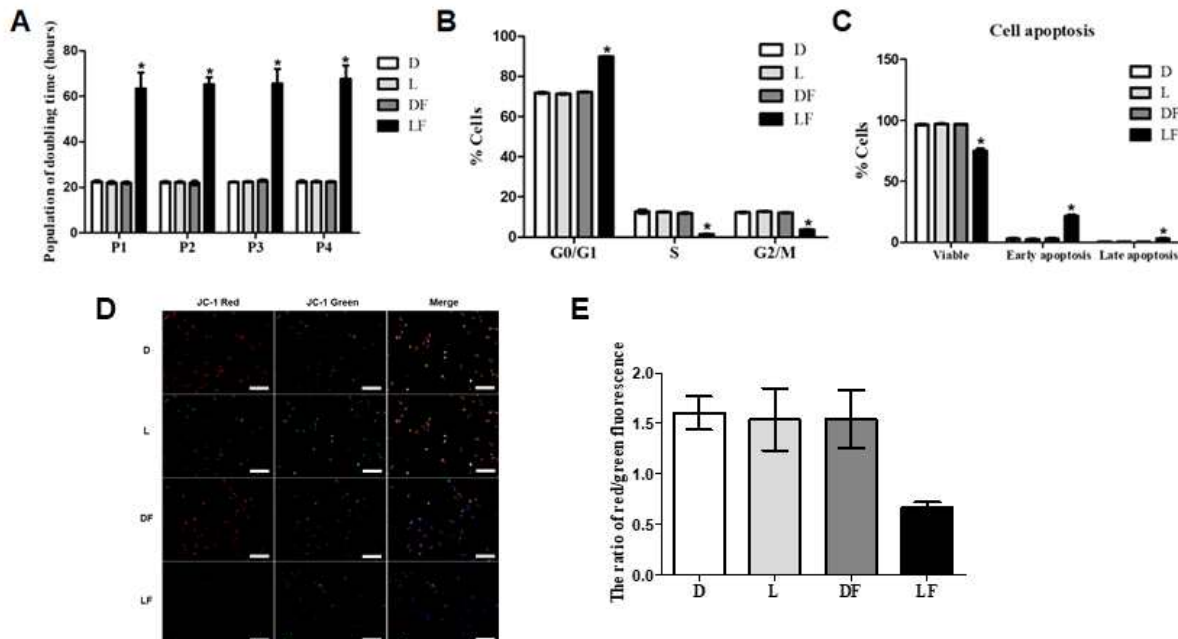


그림. 성체견 (D), 성체리카온 (L), SCNT canine fetus (DF), iSCNT lycaon fetus (LF) 세포의 세포주기 및 미토콘드리아 외막 투과성 분석 결과

- 앞선 결과들로 보아, 공여세포와 난자의 heterogenous한 gDNA와 mtDNA의 조건에서 SCNT를 수행한 결과, 핵과 난자의 비 호환성은 세포의 대사에 악영향을 주었으며, 이에 따라 태아가 사망하였다고 판단됨.
- 추후 질환모델건의 생산에 앞서, 공여세포의 난자의 gDNA와 mtDNA의 호환성을 분석한 후 연구를 수행할 계획임.

### ■ 모델견 복제에 외과적 난자 획득 방법 및 관리 개선

#### a. 침습적 수술에 따른 외과적 난자 획득 이식 방법

- 개과 동물의 난자는 실험실에서 배양하더라도 성숙상태로 가져가기 위한 체외 배양기법이 확립되어 있지 않음.
- 따라서, 침습적인 수술을 통하여 난자를 획득하여 체세포 복제에 사용함.
- 마찬가지로, 배아이식 과정에서도 침습적인 수술이 요구됨.
- 이러한 외과적인 수술은 공여견에게 악영향을 줄 수 있으며, 결과적으로 복제의 효율성에 문제가 도출될 수 있음

- 창상 치유의 과정은 크게 3가지 연속되고 중첩된 과정으로 되어 있으며, 염증(Inflammation), 증식(Proliferation), 성숙(Maturation) 단계로 나누어 짐.
- 염증단계에서는 swelling 과정과 면역인자들에 의하여 감염이 방지되며, clotting 과정을 통하여 출혈을 방지함.
- 증식과정에서는 새로운 조직과 ECM을 형성하며, 성숙 과정에서는 collagen I, III의 도움을 받아 상처를 완전히 닫아주는 역할을 한다고 알려져 있음.
- 이에, 복제견에서의 침습적 수술에 의한 상처 치유 일련의 과정들의 분석에 기반하여 물질 급여를 통한 회복 방법에 대한 연구를 수행하였음.

**b. 돈 태반**

- 돈 태반은 Interleukin-1, Interleukin-2, TGF-beta와 같은 다양한 면역 보조인자들이 존재하며, 태아의 성장에 필요한 다량의 EGF 및 FGF를 포함하고 있음.
- 또한, 여러 형태의 스테로이드성 계열 호르몬을 가지고 있어, 상처의 치유에 도움을 줄 수 있는 물질로 관심이 고조됨.
- 본 연구진은 이러한 특성들에 근거하여 돈 태반을 후보물질로 선정하였음.
- 안정적인 돈태반의 공급을 위하여, 경기도 내 HACCP 인증 농가를 선정후, 이로부터 위생적으로 안전한 돈태반을 주기적으로 공급을 받고 있음.
- 필요 성분의 추출을 위하여, 돈 태반은 동결건조 및 grinding 이후, 열수 추출을 하였으며, homogenization 이후 buffer를 이용하여 추출을 통해 나온 혼합 물질을 사료로 이용하였음.
- 앞서 언급된 추출과정에서 에탄올 세척과 약제 등급의 위생 소독 필터를 이용한 filtration을 거쳐 유해인자 (박테리아, 바이러스 등)을 제거하였음.

**c. 동결 건조된 돈 태반 추출물 급여에 따른 창상 치유 개선 효과 분석**

- 제 2세부 연구팀에서는 난자 회수 및 배아 이식견을 선정하고, 수술 과정에서 발생하는 상처의 회복속도를 평가하였음. 정확한 회복속도를 측정하기 위하여 창상 size 및 체중을 반영하여 Normalization을 진행하였음.



Group	Individual No.	Weight	Initial wound size	Parity
C1	AS3277	36.4kg	4.5cm	multiparity
C2	AS3281	35.45kg	4.6cm	nullipara
C3	HD6733	37.2kg	4.4cm	multiparity
C4	AS3257	37.75kg	4.5cm	multiparity
T1-1	AS3304	36.75kg	4.1cm	multiparity
T1-2	HD6750	40.8kg	3.0cm	multiparity
T1-3	AS3321	35.42kg	4.0cm	multiparity
T1-4	AS3312	36.3kg	4.0cm	multiparity
T2-1	HD6738	41.6kg	4.5cm	multiparity
T2-2	HD6736	41.3kg	3.9cm	multiparity
T2-3	HD6758	34.78kg	4.3cm	multiparity
T2-4	AS3317	33.4kg	4.6cm	nullipara

**그림. 창상 크기 및 몸무게를 반영한 규격화**

- 혈액 검사 결과 대조군(control)에 대비하여 0.3% 돈태반 추출물을 급여한 군 (T2)에서 초기 염증에 대응하는 Neutrophil의 수치가 크게 증가하였으며, Globulin/Albumin 수치도 증가함으로써, 염증성 반응이 더욱 활발하게 일어나고 있음을 확인하였음.

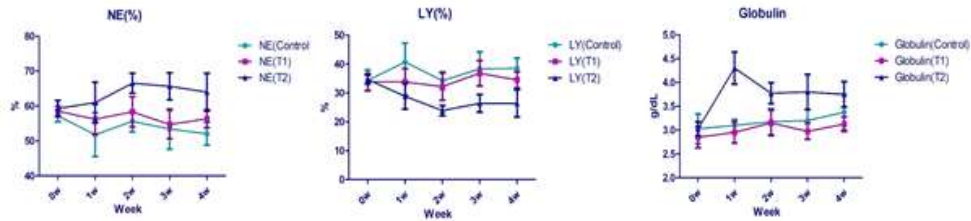


그림. 창상 발생 이후 돈태반 추출물 급원에 따른 혈액 지표 변화

- ELISA 분석 결과, 염증 반응에 있어 핵심적인 매개 인자인 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 증가 양상이 확인되었으며, 이에 대한 반작용으로 발생한 anti-inflammatory cytokine인 IL-10 또한 증가하는 것으로 보아, wound healing process가 높은 강도로 나타나는 것을 확인하였음.

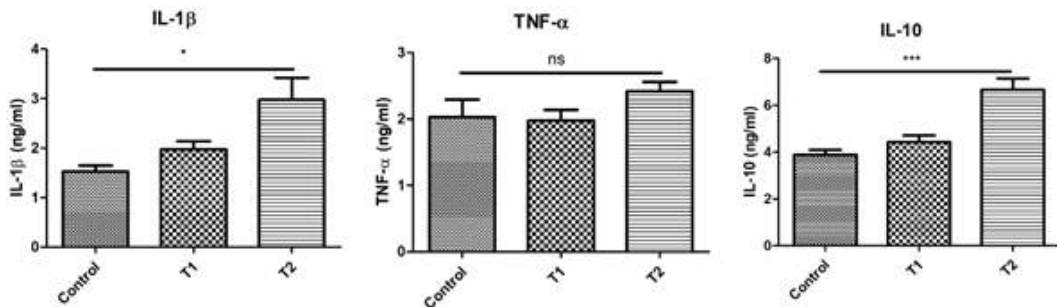


그림. 돈태반 추출물 급여 처리에 따른 사이토카인 발생량

- 대조군에서는 절개면이 접합되는 데까지 평균 9.75일이 소모된 반면, 0.3% 돈 태반 추출물 급여군 (T2)에서는 평균 7.25일이 소모되었음. 또한, 조직의 reconstruction에 관여하는 MMP-1, MMP-2 유전자의 발현 양상 또한 증가하는 것을 확인하였음.

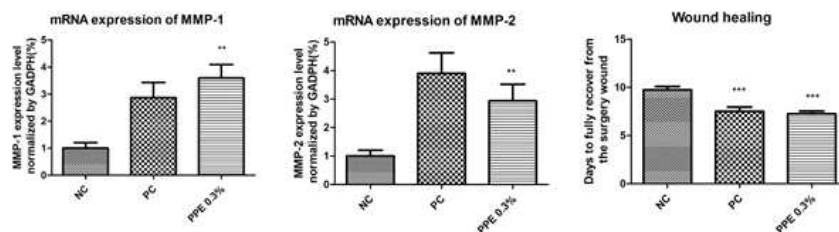


그림. 돈 태반 추출물 급여 처리에 따른 회복 속도 및 창상치유 유전자 지표 변화

- 결론적으로, 돈 태반 추출물 급여시에 창상 치유능이 향상되는 것으로 보아, 외과적 난자 획득 및 이식 후 고농도의 돈 태반 추출물을 급여하는 것이, 공여견 및 대리모의 상처 치유 효율을 증대 시킬 수 있으며, 이는 모델견 생산을 효율성을 높이기 위한 연구에도 활용 가능할 것이라 판단됨.

## ▣ 유전자가 도입된 세포주를 공여핵원으로 사용시 체세포 복제효율 저하 분석

### a. G-CSF

- 개과 동물의 난자는 확보가 쉽지 않고, 난소에서 분리하여 실험실에 배양하더라도 성숙 상태로 가져가기 위한 체외 배양기법이 확립되어 있지 않음.
- 따라서, 타 동물에서 활용되는 다양한 인자를 통해서 개 난자의 체외 성숙 방법을 찾고자 하며 그 대안으로 G-CSF 라는 물질을 첨가함으로써 체외 성숙 효율을 증진코자 함.
- G-CSF는 hematopoietic growth factor family에 속한 다발성 사이토카인으로 선행 연구 결과에 따르면 G-CSF는 사람의 난자 및 배아 발달 능력을 예측할 수 있는 biomarker로 보고됨.

### b. G-CSF 처리에 따른 배아 발달의 영향

- 돼지의 Luteal phase 유래 자궁 및 수난관 조직, Follicular phase 유래 자궁 및 수난관 조직, cumulus

cells, IVF 유래 Blastocysts, 그리고 PA 유래 Blastocysts 내 G-CSF 와 G-CSF-R의 발현 여부를 확인한 결과, PA 유래 Blastocysts를 뺀 모든 sample에서 G-CSF 유전자가 발현함을 확인할 수 있었고 또한 cumulus cell과 PA 유래 Blastocysts를 뺀 모든 sample에서 G-CSF-R 유전자가 발현함을 확인함 (그림).

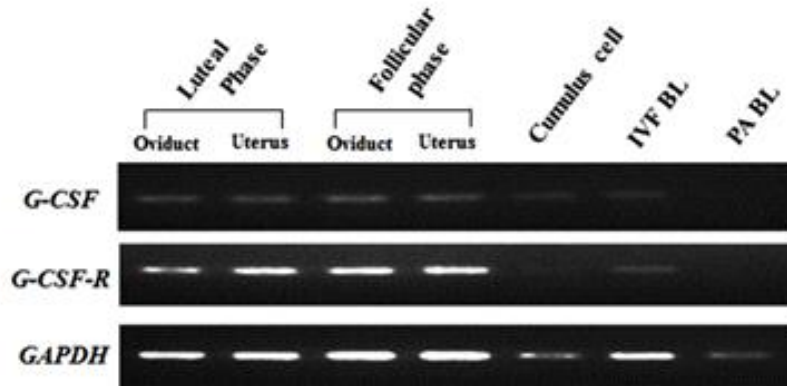


그림. RT-PCR 기법을 통한 G-CSF 및 그 수용체 (G-CSF-R) 발현 여부 확인

- PA 실행 후 각 농도별 (0, 10, 50, 100ng/mL) hrG-CSF를 embryo culture media에 처리, 2일 째 cleavage rate 및 7일 째 Blastocyst formation rate 및 Blastocyst의 세포 수를 확인 결과 cleavage rate와 blastocysts formation rate에는 유의미한 차이를 보이지 않았지만 50ng/mL group에서 Blastocysts의 세포 수가 유의적으로 증가하였음을 확인함 (그림).
- IVF 실행 후 각 농도별 (0, 10, 50, 100ng/mL) hrG-CSF를 embryo culture media에 처리하였고 2일 째 cleavage rate를 및 7일 째 Blastocyst formation rate 및 Blastocyst의 세포 수를 확인 결과 cleavage rate는 차이를 보이지 않았지만, 10ng/mL group에서 Blastocyst formation rate가 control group보다 향상되었으며, 10ng/mL group에서 Blastocyst의 세포 수가 유의적으로 증가하였음을 확인함.

hrG-CSF Concentration (ng/mL)	No. of oocytes Cultured (4)*	No. (%) of embryos developed to		Blastocyst cell Number (N)
		Cleaved (%) <sup>†</sup>	Blastocyst (%) <sup>†</sup>	
0	144	127 (88.5)	46 (31.8)	44.0 ± 1.1(26) <sup>a</sup>
10	142	126 (88.4)	50 (35.0)	48.1 ± 1.0(31) <sup>bc</sup>
50	158	143 (90.2)	45 (28.2)	49.2 ± 1.0(25) <sup>c</sup>
100	141	125 (88.8)	46 (32.5)	44.9 ± 1.2(24) <sup>ab</sup>

hrG-CSF Concentration (ng/mL)	No. of oocytes Cultured (3) *	No. (%) of embryos developed to		Blastocyst cell Number (N)
		Cleaved (%) <sup>†</sup>	Blastocyst (%) <sup>†</sup>	
0	88	62(70.5)	17(19.3)	44.3 ± 3.0(17) <sup>ab</sup>
10	87	57(65.5)	25(28.7)	62.5 ± 4.5 (23) <sup>c</sup>
50	91	58(63.7)	21(23.1)	58.4 ± 6.9(21) <sup>bc</sup>
100	83	52(62.7)	14(16.9)	41.0 ± 2.9(14) <sup>a</sup>

그림. hrG-CSF 처리 농도에 따른 돼지 PA (A) 및 IVF (B) 유래 난자의 체외 발달에 미치는 영향

- SCNT 실행 후 배양 배지에 10ng/mL hrG-CSF를 7일간 처리 후, cleavage rate와 blastocysts formation rate를 확인 결과, hrG-CSF 처리군에서 blastocyst formation rate가 증가하는 것을 확인하였으며, total cell number의 증가 및 apoptotic cell number 및 index가 유의적으로 감소하는 것을 확인함 (그림).

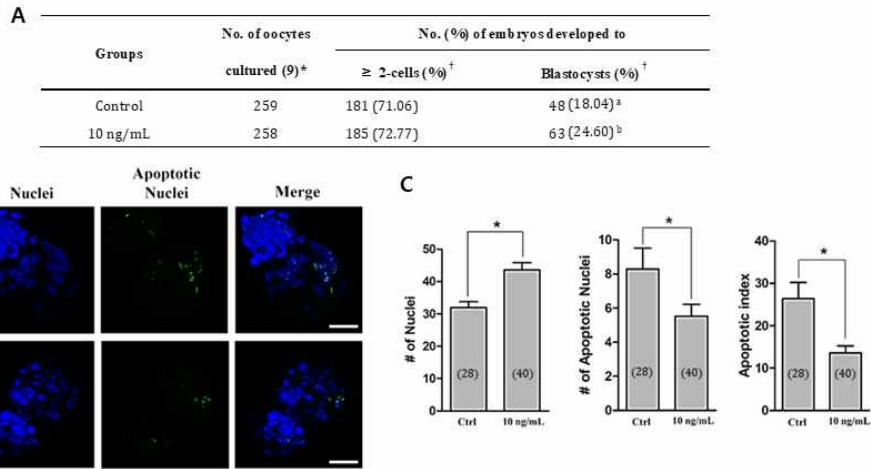


그림. hrG-CSF가 SCNT 유래 배반포의 total cell number과 apoptotic cell에 미치는 영향

- 앞선 결과들을 종합해 보면, G-CSF 및 G-CSF-R가 돼지의 자궁, 수란관 및 배아 내에서 발현함을 입증하였으며, hrG-CSF를 돼지 배양 배지에 처리 후 배아 발달률 향상을 확인하였음.

### ▣ 모델견 복제에 공여핵원의 다양화

#### a. 동결된 조직으로부터 섬유아세포 확보

- 섬유아세포는 체세포 복제에 공여핵원으로 널리 사용되어 왔음.
- 조직은 동결되는 과정에서 세포 내부의 물이 크리스탈 모양으로 결정화되면서 손상을 입히게 되는데, 일반적으로 침투성 동결보호제를 처리하여 세포 내부의 물을 탈수화 하는 과정을 거쳐서 조직 및 세포를 동결을 시키게 됨.
- 그러나, 조직을 동결보호제로 처리하는 과정이 복잡하다는 것과 DMSO 등의 일부 침투성 동결보호제가 상온에서 세포 독성이 있다는 것이 문제점으로 제기되고 있음.
- 이에, 본 연구에서는 동결보호제를 처리하지 않은 동결조직으로부터의 섬유아세포를 구축하였으며, 신선조직 유래 섬유아세포와 비교하여 세포 특성을 분석하였음.
- 또한, 이로부터 구축된 동결조직 유래 섬유아세포를 사용하여 복제 산자를 생산하였음.

#### b. 확보된 섬유아세포를 사용하여 복제 산자 생산

- 동결보호제 없이 약 1 - 4일간 동결 보존된 조직에서 섬유아세포를 분리 후 증식하였음.
- 동결조직으로부터 분리된 세포는 신선 조직에 비하여 세포 증식 속도가 저하되었으며, 전체 세포 수와 80% 밀집도에 도달하는 데까지의 시간이 증가하였음 (그림).
- 또한, 모든 동결조직 군에서 세포 노화 표지자인 SA-β-gal의 유전자 발현이 증가하였으며, 편평하고 불규칙한 세포 모양이 관찰되었음 (그림).
- 동결조직 군에서 세포의 초기 및 후기 apoptosis의 비율이 증가하였음.

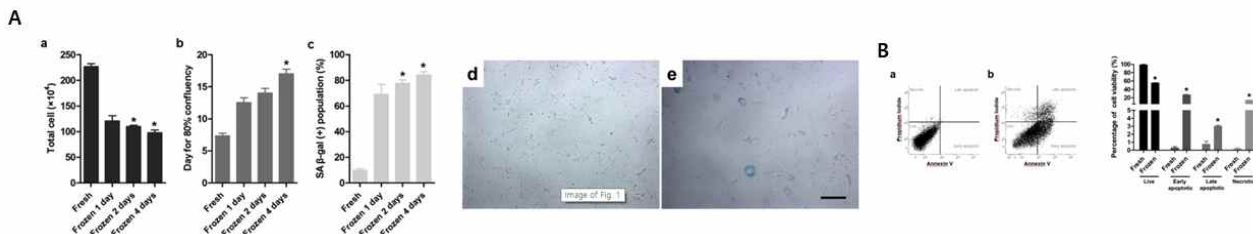


그림. 동결조직 및 신선조직 유래의 세포 증식능 및 apoptosis 분석

- 동결조직 유래 세포군에서 pluripotency maker인 SOX2, NANOG, REX01, DPPA2의 발현량이 유의적으로 감소하였으며, stemness 관련 유전자인 HDAC, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, MECP의 발현량이 감소하였음 (그림).
- 또한, 동결조직 군의 복제효율 및 임신효율이 신선 조직군에 비하여 감소하는 것을 확인하였음 (그림)

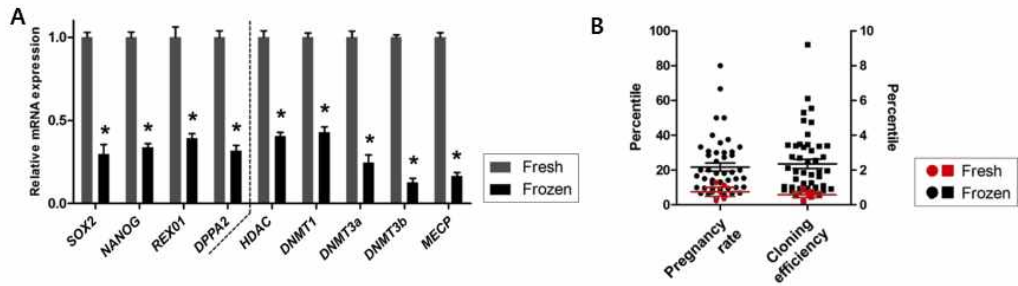


그림. 동결조직 및 신선조직 유래의 세포 유전자 발현 및 복제효율 분석

- 앞선 결과들을 보아, 동결보호제 처리를 하지 않은 단기간의 조직 동결의 경우에도 성공적으로 섬유아 세포를 구축할 수 있었으며, 체세포 복제를 통한 산자를 생산하였음. 이는 추후 모델건의 대량 생산에 있어서 활용 가능할 것이라 판단됨.





## 제 2 위탁과제

고려대학교 산학협력단

흑색종 유도 시스템을 도입한 증대동물 형질전환 세포주 개발

**세부목표** : Ras 기반 흑색종 모델 핵공여 세포주 제작

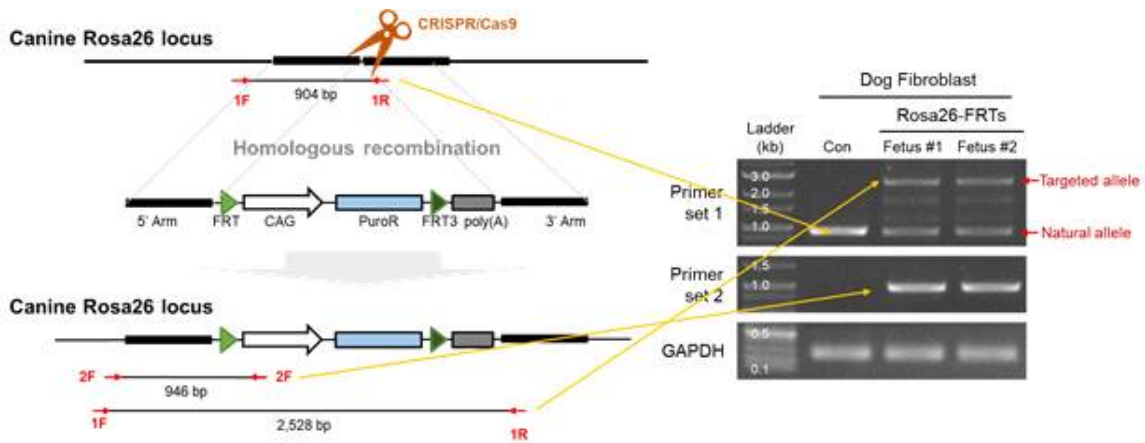
### 연구내용1

Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축

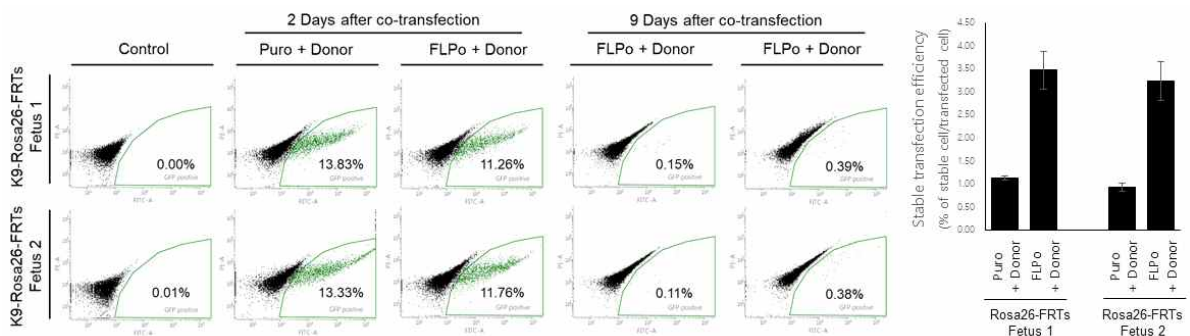
▣ 개 흑색종 모델 생산을 위해 Safe harbor locus 유전자 타겟팅 기법을 활용한 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템 도입

가) Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축

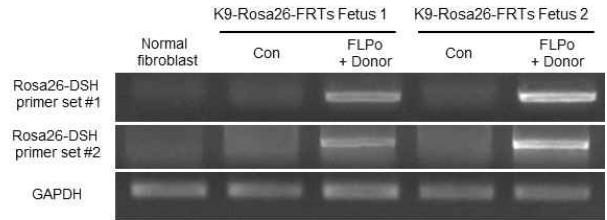
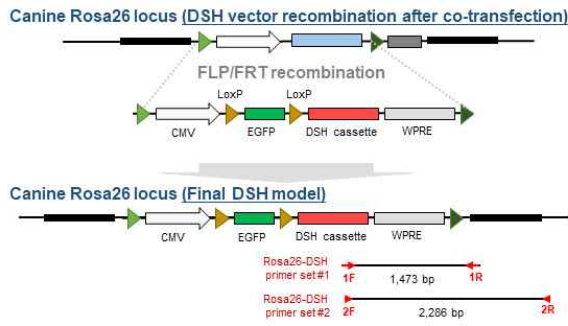
a) Safe harbor locus targeting F-RMCE 시스템 검증



- 2차 년도에 CRISPR/Cas9 시스템을 이용해 개발한 safe harbor locus인 Rosa26 locus에 FLP/FRT 재조합 유도 시스템 (Flippase Recombinase mediated cassette exchange system [F-RMCE])을 도입한 모델을 개발하였음. 임신 된 두 개 태아 유래 세포주를 확보하고, 각각 K9-Rosa26-FRTs Fetus1와 K9-Rosa26-FRTs Fetus2 로 명명함 (1차년도 결과).

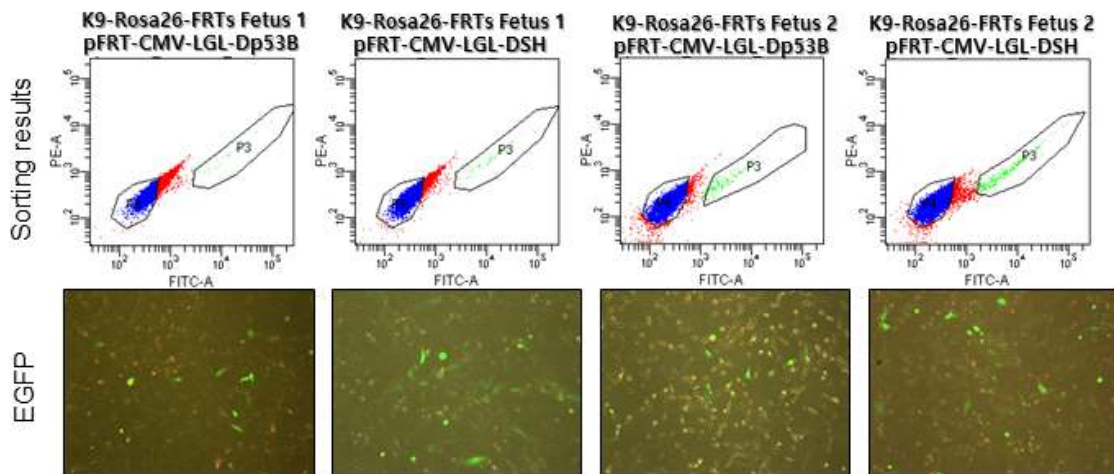


- 개발한 F-RMCE 시스템의 유효성을 검증하기 위해 FLP/FRT 재조합이 가능하도록 개발된 Hras 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템을 활용함. 오랜 기간 EGFP가 발현이 되는 stable cell line의 형성 비율을 FACS 장비로 관찰한 결과, 약 3배의 효율을 보임.

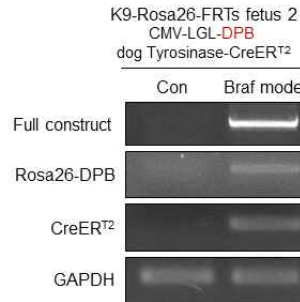
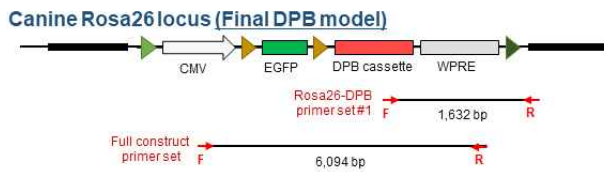
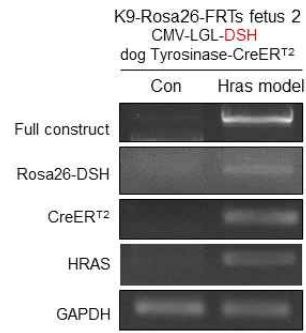
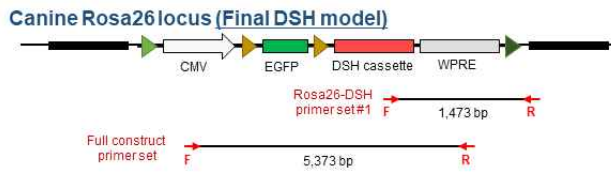


- Donor template인 Hras 기반 흑색종 유발 벡터 시스템이 F-RMCE 시스템에 의해 도입이 되었는지 검증하고자 PCR 검증을 수행하여, safe harbor locus인 Rosa26 locus에 시스템이 제대로 도입이 되었음을 검증하였음.

▣ 흑색종 모델 생산을 위한 개 형질전환 세포주 구축



- Ras 및 Braf 기반 흑색종 유발 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주를 구축하기 위해 두 카세트를 F-RMCE 시스템으로 도입하고, stable 하게 EGFP를 발현하는 세포주를 FACS를 통해 분리함. 이 중 K9-Rosa26-FRTs Fetus 2 세포가 더욱 정상적으로 오래 culture가 가능하여 이를 통해 모델을 개발하고자 하였음.

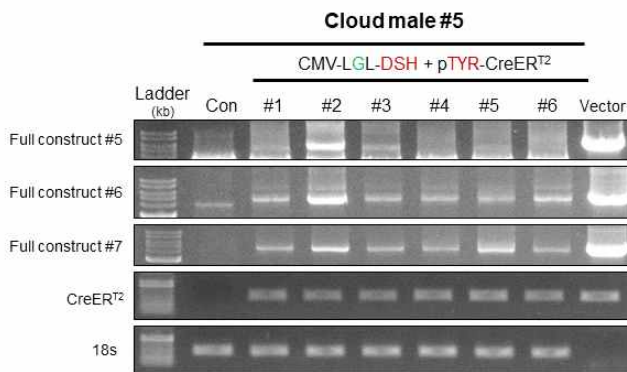


- 추가로 멜라닌 세포 특이적 CreER/LoxP 재조합 시스템을 도입하여 최종 모델 세포주를 구축하고 각 construct의 도입 여부를 genomic DNA PCR 기법으로 검증 완료함.

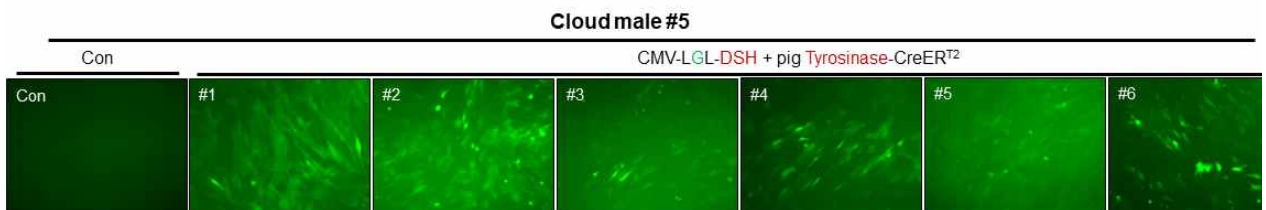
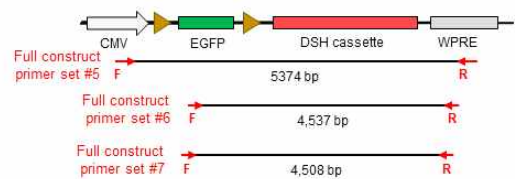
## 연구내용2

흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델견 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축

### HRas 기반 흑색종 미니 돼지 모델 생산을 위한 형질전환 세포주 구축

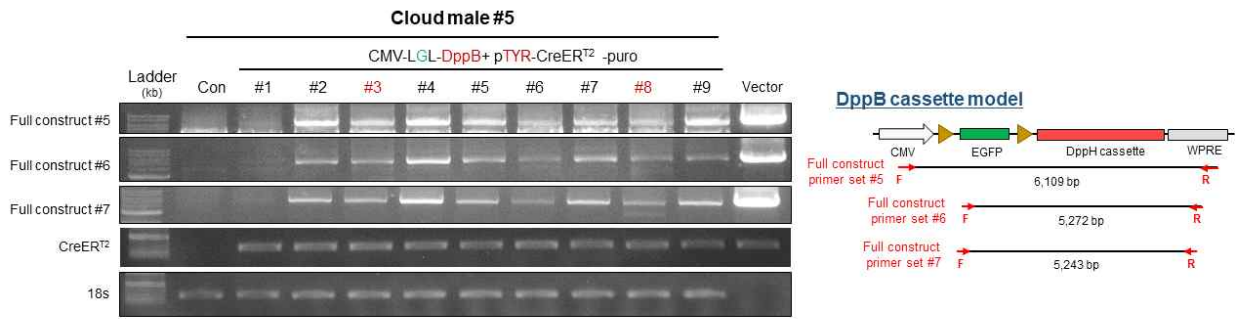


#### DSH cassette model

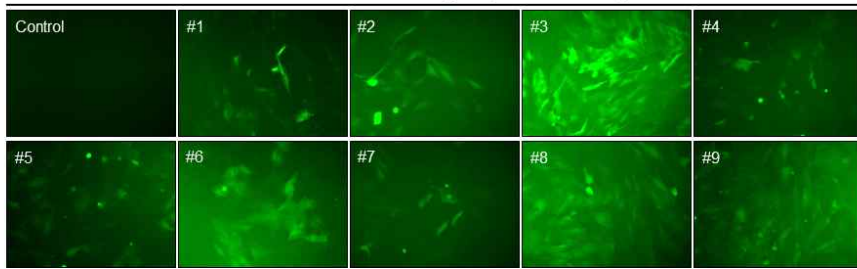


- HRas에 의해 발병하는 흑색종 미니돼지 모델을 개발하기 위해 최종 개발한 미니돼지 유래 섬유아세포에 개발한 HRas 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템을 electroporation 기법으로 도입하고, 멜라닌 세포 특이적 CreER 발현 벡터시스템을 lentiviral vector 시스템으로 도입하여, 유전자 도입 여부를 PCR 기법을 통해 검증 완료함.

### Braf 기반 흑색종 미니 돼지 모델 생산을 위한 형질전환 세포주 구축



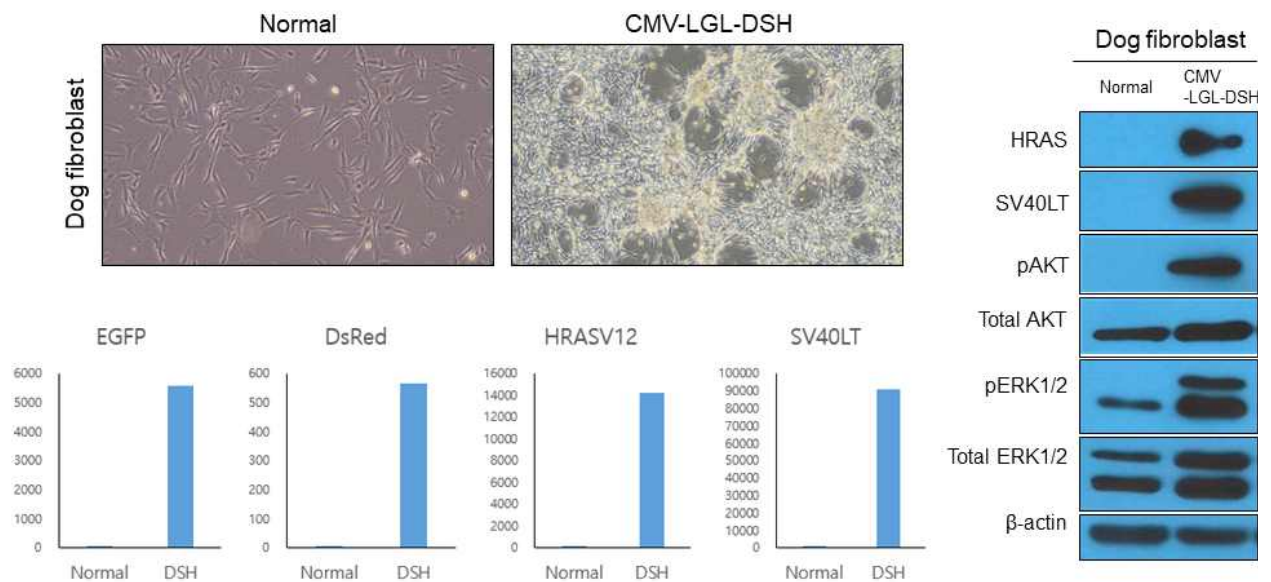
Cloud male #5 - CMV-LGL-DppB+ pTYR-CreERT<sup>2</sup>-puro



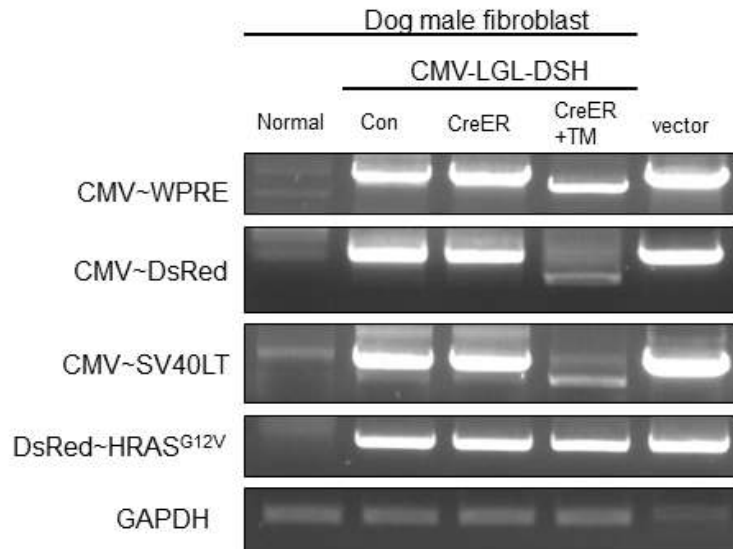
- Braf에 의해 발병하는 흑색종 미니돼지 모델을 개발하기 위해 최종 개발한 미니돼지 유래 섬유아세포에 개발한 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템을 electroporation 기법으로 도입하고, 멜라닌 세포 특이적 CreER 발현 벡터시스템을 lentiviral vector 시스템으로 도입하여, 유전자 도입 여부를 PCR 기법을 통해 검증 완료함.

**연구내용3** Sleeping beauty transposon 시스템을 적용한 흑색종 유발 유전자 전달 시스템 및 핵공여 세포주 개발

▣ Plasmid 벡터를 활용하여 구축한 Ras 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템의 문제 확인

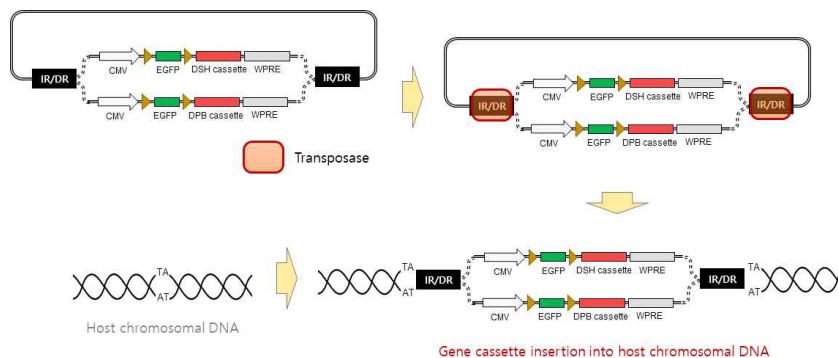


- EGFP positive 세포 중 일부가 일정 기간 배양기간을 거치면 암세포화가 되는 경향이 관찰 되었으며, 이 세포들의 성장이 너무 빠르기 때문에 암세포화 된 세포들이 우점하는 경향이 발생함. mRNA 및 protein 분석을 통해 Cre/LoxP 재조합 이전에는 발현되지 않아야 할 DsRed, SV40LT, HRASG12V 가 발현 되는 것을 관찰하였음.

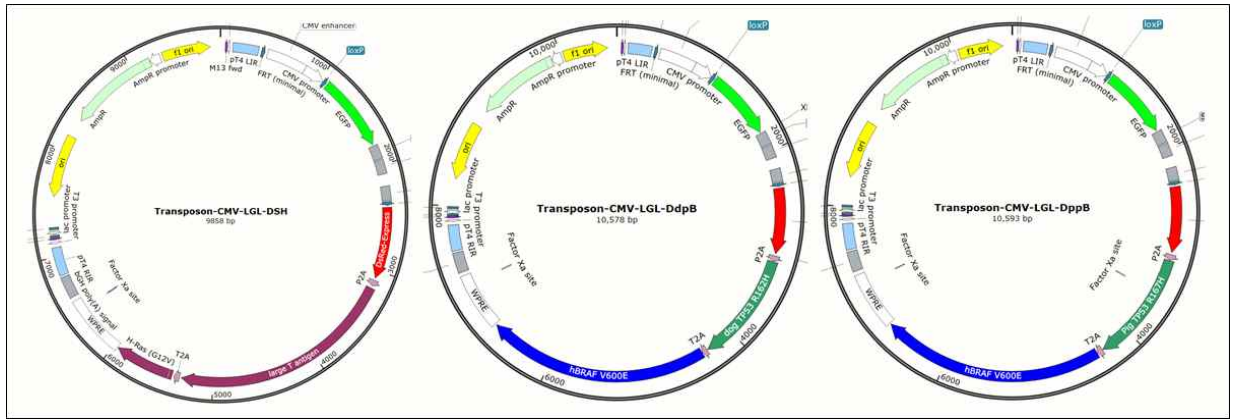


- Cre 재조합효소 없이 재조합이 일어나 DsRed, SV40LT, HRASG12V 가 발현되는지 검증을 하고자 genomic DNA 분석을 하였으나, 추가적인 CreER 의 발현 및 tamoxifen의 처리 없이는 재조합이 일어나지 않음을 확인하였음.
- 이에 두 가지 가능성을 고찰함. 1) 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템은 plasmid 를 통해 도입을 하는데, 세포내 환경이 plasmid DNA가 intact 하게 존재하기 어려워 뒤의 일부만 도입 되어 발현이 될 가능성. 2) LoxP 사이에 있는 EGFP-stop 서열에 있는 transcriptional terminator인 stop 서열이 완벽히 transcription을 끝내지 못해 뒤에 발현되지 않아야 할 유전자가 발현이 될 가능성.
- 몇 차례의 반복을 수행하였으나 같은 현상이 발견되에 현 시스템으로는 안정적인 형질전환 핵 공여세포주를 구축할 수 없다는 판단을 내림. 도입 초기에는 암세포화가 나타나지 않았고 종양유전자들이 발현되지 않았기 때문에 벡터 자체가 문제가 되지 않을 수 있으나, 일부 논문들이 하나의 transcriptional termination signal은 기능이 조금 약할 수 있고, 삽입된 locus의 주변 서열 의해 발현이 영향 받을 수 있을 가능성을 제기하여 조금 더 보완하기 위한 시스템을 고려함.
- 따라서, 최대한 빠르게 많은 세포에 안정적으로 gene cassette가 도입이 될 수 있는 시스템으로 transposon 시스템을 적용하기로 결정함.

**Transposon 시스템을 활용한 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템 개발**



- 이전에 개발한 CMV-LGL-DSH 및 CMV-LGL-DPB 벡터 시스템을 Sleeping beauty transposon 시스템을 적용하여 위와 같은 유전자 도입 시스템을 구축하고자 실험 계획을 변경함.



- CMV-LGL-DSH 및 CMV-LGL-DPB 벡터 시스템을 sleeping beauty transposon 시스템 적용에 앞서 EGFP 뒤의 transcriptional terminator인 STOP 서열을 두 개 더 추가하여 비특이적인 종양유발 유전자가 발현되지 않도록 벡터 시스템을 개량함. 최종적으로 sleeping beauty transposon을 적용한 흑색종 개와 돼지 모델에 적용될 Hras 및 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템 최종 개발을 완료함.

## 세부목표 : Ras 기반 흑색종 모델의 유효성 평가

### 연구내용1

### 생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석

#### ■ 생산된 모델 견 및 모델 돼지에서 흑색종 발병 유도

- 형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함.
- 코로나19 및 아프리카 돼지열병으로 연구에 어려움이 있음. 우리는 여러 흑색종 모델 중 가장 인간 멜라노마를 특성을 반영하는 세포주(Cloud SB-DppB tpTYR-CreER)를 선별하여 최종 모델 동물 생산 및 제품화에 집중할 계획임.

### 연구내용2

### Ras 유전자 기반 모델견의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증

#### ■ 생산된 모델 견 및 모델 돼지에서 흑색종 발병 유도

- 형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함.

#### ■ 발병된 흑색종 유전학, 조직학적 분석

- 형질전환 개, 미니돼지 모델이 생산되지 않아 일정에 따라 차년도로 계획 변경함.



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델돼지 개발

**세부목표** : 흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증

### 연구내용1

유전자원 보존을 위한 정액동결 프로토콜 수립

#### ▣ 항산화제 처리를 통한 정액동결 프로토콜 수립

- 질환모델 유전자원의 반영구적 보존을 위한 생식세포 동결이 필요함
- 돼지 동결정액의 경우 주입정자수, 주입횟수, 개체에 따른 동결성 및 품종, 동결보존기간, 동결보존 형태 등에 따라 응해 후 정액의 품질에 차이가 발생하고 액상정액에 비해 수태율이 낮게 나타나는 것으로 보고됨에 따라 효율적인 정액동결 프로토콜 수립이 요구됨
- 본 연구팀에서는 돼지 정자의 동결보존법으로 희석액에 글리세롤, OEP(ORVUS ES PASTE) 및 난황을 첨가하여 액체질소 증기로 동결하는 방법을 사용함

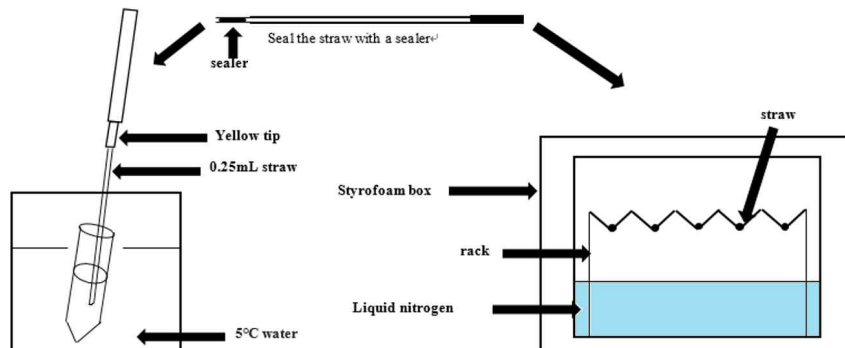


그림. 돼지 동결정액 프로토콜 모식도

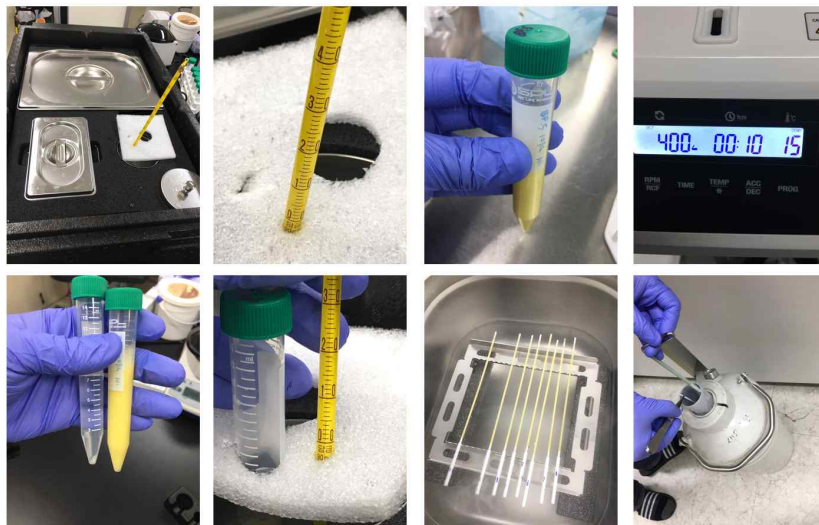


그림. 돼지 동결정액 프로토콜 수행 과정

■ **질환모델돼지의 정액채취 후 정액동결 및 *in vitro* 수정능 평가**

- 형질전환 돼지로부터 의빈대를 이용하여 수압법으로 정액을 채취함
- 정액은 한달 간격으로 3회 정액을 수집하여 정자의 활력을 검토함

표. 사정 과정에 따른 사정량 분석

TG#5 개체	사정량 (ml)
최초 사정분	20~25
농후 정액분	50~80
맑은 정액분	70~150
교양물질분	20~25

표. 액상정액 검사

개체번호	사출정액량	정자농도	정자활력	pH
TG#5	190.7 ml	2.1 x 10 <sup>8</sup>	>85%	7.0~7.2

- 액상정액은 정자의 생존기간을 연장하고 세균의 증식을 억제하기 위하여 바로 희석함

표. 정액의 희석방법

- ① 원 액상정액과 같은 온도의 희석액(DURAGEN, Magapor)을 1:1로 서서히 희석한다.
- ② 1차 희석 후 희석한 용기에 호일을 씌운 뒤 액상정액 정보를 기록한다.
- ③ 희석액을 항온수조에서 꺼내 1차 희석 액상정액과 같은 온도가 되게 방치한다.
- ④ 2차 희석은 1차 희석 후 15분~20분이 지난 뒤에 1차 희석 액상정액에 희석액을 1:1비율로 희석한다.
- ⑤ 목표제조량이 될 때까지 15~20분 간격으로 희석액을 첨가한다. (3차희석)
- ⑥ 희석 액상정액 방치 시 반드시 호일 등 뚜껑을 씌워 이물질이 들어가는 것을 방지한다.
- ⑦ 채취한 액상정액이 혼동되지 않도록 컵 표면과 호일 뚜껑에 액상정액 정보를 필히 기록한다.
- ⑧ 제조가 완료된 액상정액은 제조실 내에서 (25°C이상 유지) 1시간 가량 방치하여 서서히 온도를 낮춘 후 액상정액 보관고(17°C)에 넣는다. 보관고의 온도가 일정하게 유지되는지 1일 1회 확인한다.

표. 정액 동결스트로우 크기에 따른 동결정액의 용해 후 활력 분석

Replicate	0.25 ml (motility %)	0.5 ml (motility %)
1	18	15
2	21	19
3	15	15
계	18	16.3

- 정액 동결스트로의 크기에 따른 용해 정자의 활력차이는 0.25 ml은 18%, 0.5 ml 16.3%로 유의적 차이가 없었음

표. 돼지 정자 동결배양액 종류에 따른 용해 후 정자 활력 분석

Medium	동결정액 용해시 정자활력(%)
BF5	5
Commercial (minitube사)	19



표. 돼지 정자 응해시 배양액 종류에 따른 응해 후 정자 활력 분석

Medium	동결정액 응해시 정자활력(%)
BTS	7
Hulsen solution	10
Commercial media (minitube)	19

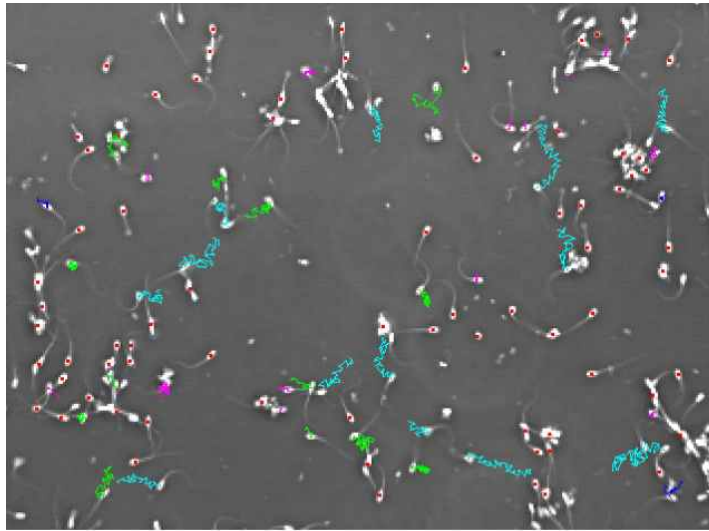


그림. 최적 조건에서의 형질전환 돼지 CASA 분석, 활력 19%, 직진운동성 정자 10%

- 일반적으로 돼지 정액 동결보존을 다른 축종과 달리 40% 내외의 응해된 정자는 생존이 불가능하며 활력도 20~40%로 급격히 감소됨
- 실험실에서 제조한 동결배양액에 비해 상업적으로 판매되는 동결배양액을 통한 효율이 높은 것으로 조사됨
- 우리의 실험결과 동결 응해 후 정자의 생존성을 확인함으로써 형질전환 돼지의 생식세포 보존을 위한 수단으로 활용이 가능함
- 추후 체외수정 또는 세포질내 정자 주입술을 통해 동결정액의 활용성 검토함

**연구내용3** 암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립

▣ Hras 돼지모델의 자연교배를 통한 계대전달 확인

- 생산된 흑색종 질환모델 개체가 자연교배를 통해 흑색종 유발 유전자의 계대 전달이 유지된다면, 흑색종의 발병기전 및 종양 진행 과정을 밝히기 위해 사용될 뿐만 아니라, 특히 모델로서 상업적인 가치도 있음
- Hras유전자가 삽입된 질환 모델 돼지(Yucatan, ♂)와 제주 재래 흑돼지(♀)를 이용하여 *in vivo*상에서 종양 유발 유전자가 계대전달 되는지 확인하기 위해 자연교배 실시하였음
- 결과로서 F1 세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자)는 총 4마리의 자손으로, 암컷 1두(GY-1)와 수컷 3두(GY-2, 3, 4)를 후대 생산하였음
- 종양 유발 유전자의 계대전달 여부를 확인하기 위해 각 개체의 조직에서 gDNA를 추출하여 PCR 분석하였음, 그 결과 GY-2, 3, 4 개체에서 EGFP와 종양 유발 유전자인 Hras<sup>V12</sup>의 삽입이 확인되었으나, 암컷 한 마리(GY-1)에서는 확인되지 않았음. 종양 유발 유전자가 삽입된 수컷 세 마리에서 Hras유전자가 삽입된 질환 모델 Founder (Yucatan, ♂) 개체와 같은 표현형인 상완 어깨 부위 skin tumor 양상이 관찰됨
- 추가로 다음 세대에서도 계대전달을 확인하기 위해 GY-2, 3, 4 × GY-1의 교배를 통해서 F2 세대를 생산하였음. 총 5마리가 태어났으며 수컷 세 마리(GY2-1, 2, 3)와 암컷 두 마리(GY2-4, 5)가 태어났음
- F2 세대에서도 종양 유발 유전자의 계대전달을 확인하기 위해 각 개체의 조직에서 gDNA를 추출하여 PCR 분석하였음. 그 결과 이전 F1 세대와는 다르게 종양 유발 유전자가 삽입된 것을 확인하지 못함. 이러한 문제는 후성유전학(epigenetis) 관점에서 유전자의 계대 전달 과정 중 DNA 메틸화로 인해서 발생한 것

으로 시사됨

- 현재까지 후대검증 분석결과, 모델동물의 상용화 고려시 Founder 세포주 보존을 통한 Recloning 전략과 함께 F1 세대까지는 교배과정을 통한 후대 모델동물 생산 전략이 가능함
- 추가적인 다른 F1 세대와 F2 및 F3 세대 생산과 함께, 후대검증 진행중임

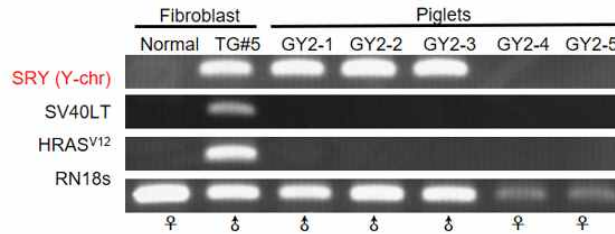


그림. TG#5 개체 F2 산자 gDNA PCR 결과



**F1**  
Birth : 20.02

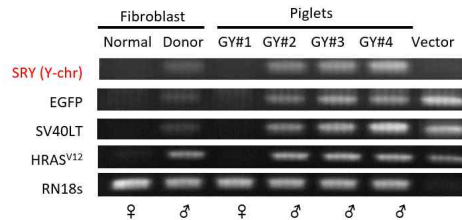


Fig. Analysis results of disease model piglets with born through natural mating.

F1 : GY#1(♀) X GY 2,3,4 (♂)

**F2**  
Birth : 20.12.26



그림. TG#5 개체 산자 분석 및 모식도

**연구내용4** 흑색종 질환모델 내 종양유발 분석 및 종양의 안정적인 분리를 위한 수술기법 개발

▣ 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체의 흑색종 분리 수술 및 분리된 조직 특성분석

- 종양의 안정적인 분리기법 개발을 위한 자연발생 흑색종 모델을 이용한 종양 제거 수술기법을 구축함
- 문헌에 따르면 선천성 흑색종을 돼지의 경우 약 10~15%는 악성으로 인접한 림프절이나 폐로의 전이 증상 보임. 85~90%는 종양에 대한 세포매개성 면역반응에 의해 자연적으로 치유되어 재발하지 않음
- 돼지에서 선천적으로 발병하는 경우에는 동시다발성(multicentric)인 경우가 많고 몸통에서 주로 관찰됨. 그 크기는 작은 반점부터 직경 5cm가 넘는 종양 덩어리까지 매우 다양함

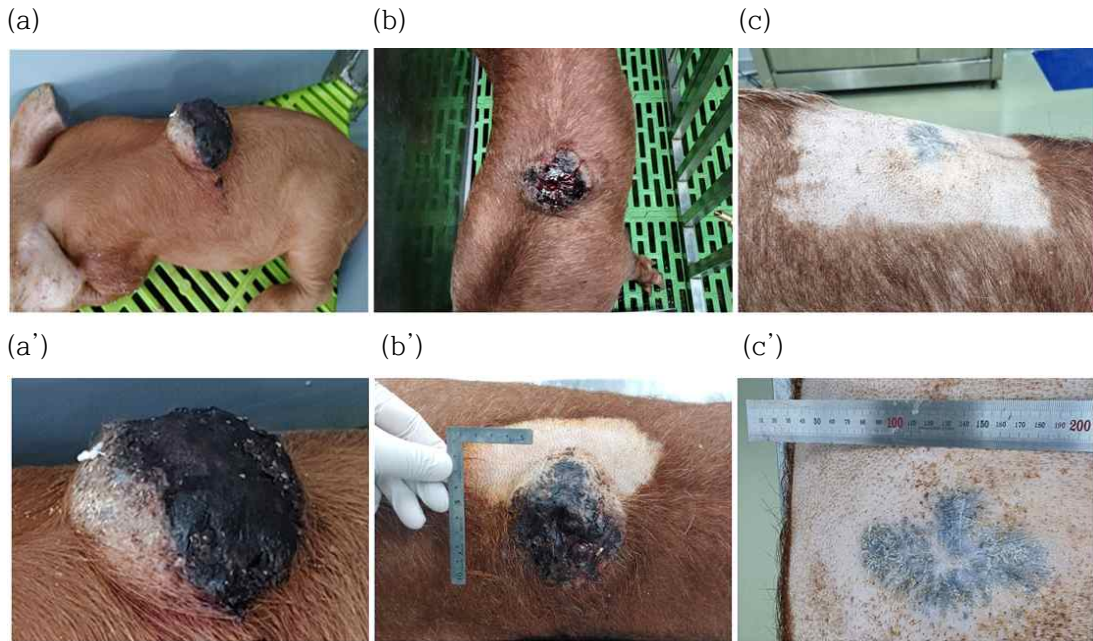


그림. 자연발생 흑색종 질환모델 확보 및 종양 진행 양상 관찰 (a, a'): Duroc / 성별, 수컷(거세돈) / 40일령 (20.08.31 기준) / 체중: 10kg / 병변 사이즈: 직경 11cm (b, b'): 4개월령 (21.01.18 기준) 병변사이즈 과사진행 (c, c'): 6개월령 (21.05.10 기준) / 자연적 치유상태로 진단

- 14개월령(21.09.24 기준)의 자연발생 흑색종 모델 동물을 이용한 종양 제거 수술을 진행



그림. 자연발생 흑색종 모델의 종양제거 수술. (a) 수술장면, (b) 시술부위, (c) 종양부위절개, (d) 종양제거, (e) 봉합, (f) 수술 후 처치

- 종양제거수술 이후 1, 3, 12일차 예후를 관찰함
- 염증반응 없이 정상적으로 치유되는 것을 확인함
- 조직학적 사진 및 소견은 제2협동 크로넥스 연구결과 중 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체의 조직병리 및 분자병리학적 검증에서 기술하였음



그림. 종양제거수술 이후 예후 (A) 1일차, (B) 3일차, (C) 12일차

**세부목표:** Cre/LoxP inducible system 을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발

**연구내용1** Ras 기반 흑색종 Cre/LoxP inducible 질환모델돼지 생산

▣ Ras 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 배아줄기세포 수립 및 대리모돈에 배아 이식 진행

a. Ras 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 *in vitro* 평가

Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



그림. Ras 기반 세포주 Cloud SB1-DSH pTYR-CreER의 벡터 모식도

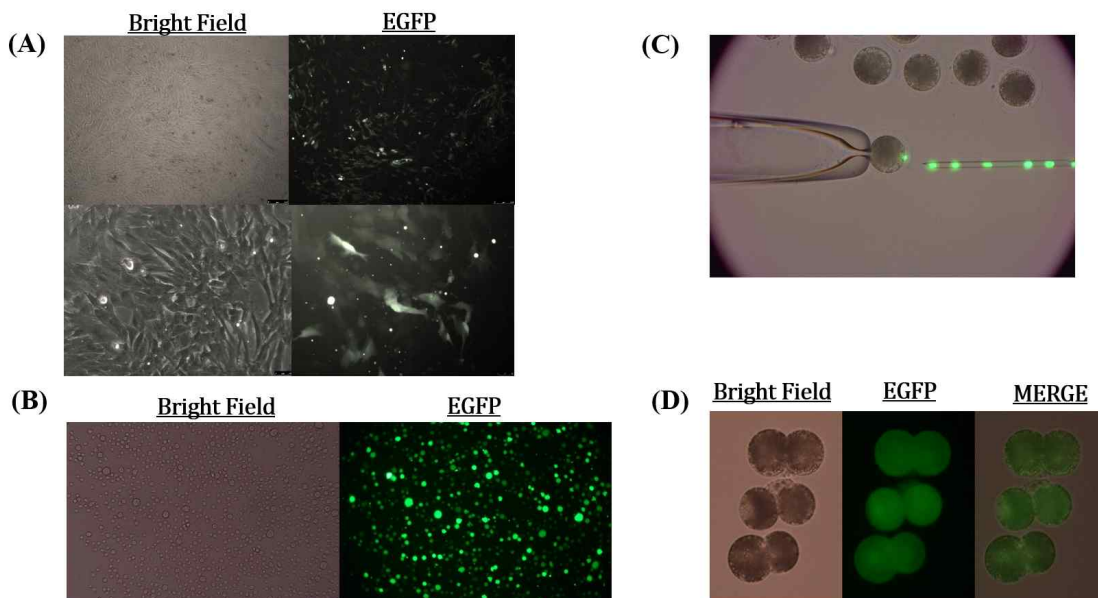
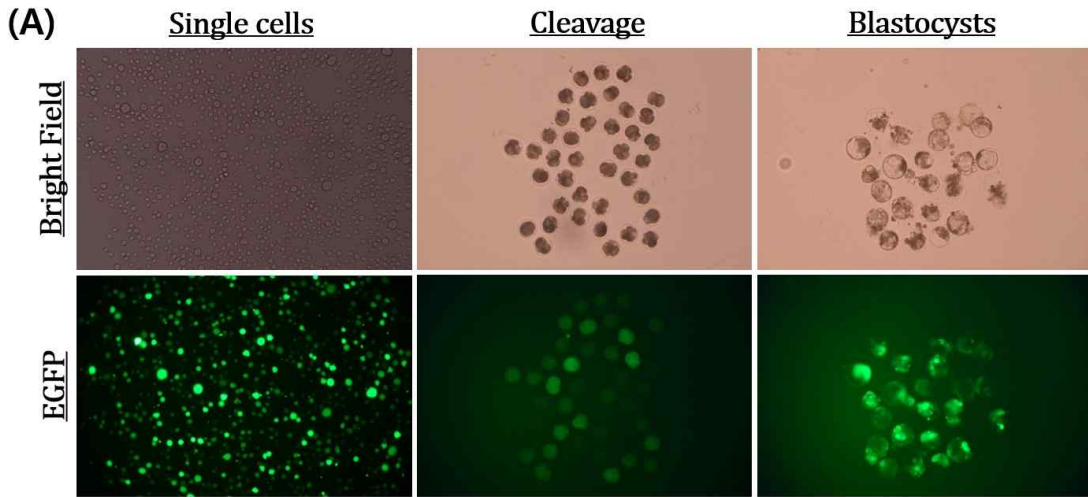


그림. Ras 기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)를 활용한 SCNT. (A) Ras 기반 세포주, (B) Single cells 수준에서 세포 상태 및 EGFP 발현 확인, (C) SCNT 수행 시 Ras기반 세포주를 핵이 제거된 난자에 도입, (D) SCNT 24시간 후 2세포기 배아 및 EGFP 확인

- 위탁기관 고려대학교에서 구축한 Ras기반 유전자 도입 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)를 이용하여 SCNT를 진행하였음
- Cell culture 상에서 및 SCNT 진행 시 single cells 수준에서 EGFP가 세포주에서 잘 발현되는 것을 확인하였음. 또한, SCNT 진행 24시간 후 2세포기 배아에서도 EGFP 발현을 관찰하였음
- 생식세포 체외 성숙 체계의 정상성 및 효율성 검증하기 위해 *in vitro*에서 배아 발달을 확인하였음. SCNT 후 2일 후에 분할률과 7일 후에 배반포 형성률을 평가하였음



(B)

Trial	Egg Num.	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	BL form.	Cell line
				2	4	8	Total (%)					
1	105	105	85 (81.)	23	12	4	39 (45.9)	1 (1.2)	2 (2.4)		3 (3.5)	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER P11
2	75	75	55 (73.3)	16	14	5	35 (63.6)	4 (7.3)	3 (5.5)		7 (12.7)	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER P13
3	122	122	95 (77.9)	25	33	6	64 (67.4)	10 (10.5)	8 (8.4)		18 (18.9)	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER P14
4	74	74	58 (78.4)	17	18	8	43 (74.1)	6 (10.3)	6 (10.3)		12 (20.7)	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER P12

그림. Ras 기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가

- SCNT 후 *in vitro*에서 발달능을 평가했을 때. cell의 fusion rate는 평균 78%, SCNT 후 2일째 분할률은 평균 63%, 배반포 형성률은 SCNT 후 7일째 평균 14%로 조사되었음

b. Ras 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 대리모돈에 배아 이식

- Ras기반 질환모델 돼지를 생산하기 위해 Ras 기반 세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 배아 이식하여 대리모돈에 총 3회의 Embryo transfer를 실시하였음

표. Ras 기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배관상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여핵원	계대	비고	재발정진단		(조음파) 임신진단		진단 키트	분만예정일 (+114)	특이사항	
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자				결과
2021-05-13	E7-32	2018-07-25	크로넥스	DJ	배관 직후	8-10	211	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P10	크로넥스	2021-06-03	2021-06-10	재발정 6/21		양성	2021-09-04		
2021-05-26	20-107	2020-02-13	크로넥스	DJ	배관 직전	8-10	175	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P12	크로넥스	2021-06-16	2021-06-23	-	2021-06-22	태낭 확인	양성	2021-09-17	후보돈 (출산이력 없음)
2021-06-23	G1-4	2020-01-14	크로넥스	DJ	배관 직후	8-10	136	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P13	크로넥스	2021-07-14	2021-07-21	-				2021-10-15	


### Embryo Transfer (20차)

개발확인일 : 21.06.03  
분만에정일 : 21.09.04

일자 : 2021.05.13      술자 : 크로넥스 흥진기      보조 : DJ  
수란돈 번호 : E7-32      체중 : 90~100 kg      생년 : 18/7/25  
배란상태 : 배란직후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 20차 수술

세포주 : Cloud SBI-DSH pTYR-CreER P10      이식된 배아갯수 : 211 개  
05.12 Cleavage embryos 34개  
05.13 Fusion + Non-Fusion embryos 177개

특이사항 : 출산이력 3산



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)		
					2	4	Total (%)
21.05.12	120		83	66 (79.5)	34		34 (91.5)
21.05.13	240		177	119 (67.3)			

### Embryo Transfer (21차)

개발확인일 : 21.06.16  
분만에정일 : 21.09.17

일자 : 2021.05.26      술자 : 크로넥스 흥진기      보조 : DJ  
수란돈 번호 : 20-107      체중 : 90~100 kg      생년 : 20/02/13  
배란상태 : 배란직전      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 21차 수술

세포주 : Cloud SBI-DSH pTYR-CreER P12      이식된 배아 개수 : 175 개  
05.26 Fusion embryos 143개 +  
non-fusion embryos 32개

특이사항 : 후보돈 (출산이력 없음)



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)		
					2	4	Total (%)
21.05.26	240		175	143 (81.7)			

### Embryo Transfer (22차)

개발확인일 : 21.07.14  
분만에정일 : 21.10.15

일자 : 2021.06.23      술자 : 크로넥스 흥진기      보조 : DJ  
수란돈 번호 : G1-4      체중 : 80~90 kg      생년 : 20/01/14  
배란상태 : 배란직후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 22차 수술

세포주 : Cloud SBI-DSH pTYR-CreER P13      이식된 배아 개수 : 136 개  
06.23 Fusion embryos 107개 +  
non-fusion embryos 29개

특이사항 : 후보돈 (출산이력 없음)



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)		
					2	4	Total (%)
21.06.23	180		136	107 (78.7)			

그림. Ras 기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)의 Embryo Transfer

- 21.05.13 이식 일자에서 이식 후 25일차에 임신진단 키트 양성을 확인 하였으나, 태낭은 미관찰 되었음. 해당 대리모돈은 21.06.21(이식 후 28일차)에 대리모돈의 재발정이 확인됨에 따라 임신이 안된 것을 확인하였음



그림. 2021.05.13 이식 대리모돈의 임신 진단. (A) 이식 후 25일차 임신진단 키트 양성, (B) 이식 후 25일차 태낭 미관찰

- 2021.05.26 이식 일자에서 28일째에 임신진단 키트의 양성파 검사와 초음파 검사시 태낭이 확인 되었고, 그 뒤로 대리모돈의 재발정이 없음에 따라 임신이 된 것으로 판단하였음. 하지만, 분만에정일(2021.09.17) 뒤에도 출산을 하지 않았으며, 임신 중~말기에 태낭이 관찰되지 않음에 따라 유산된 것으로 판단됨

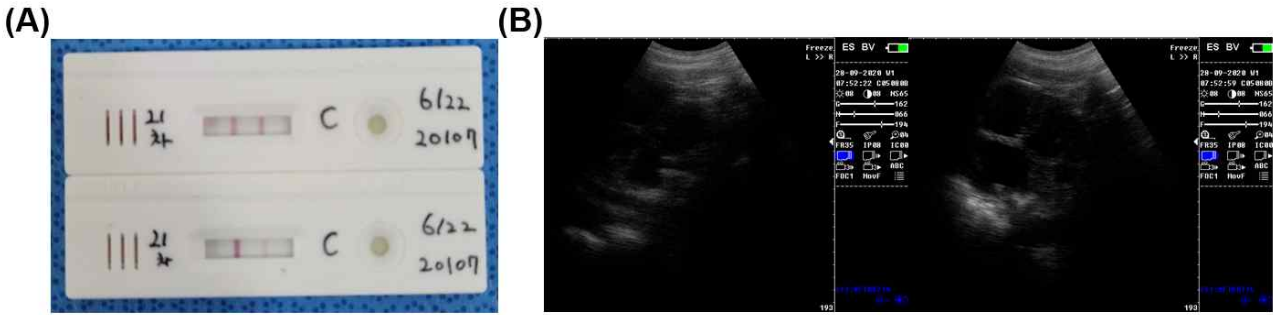


그림. 2021.05.26 이식 대리모돈의 임신 진단. (A) 이식 후 28일차 임신진단 키트 양성, (B) 이식 후 28일차 태낭 관찰

- 해당 Ras기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)를 이용하여 Embryo Transfer 후 산자 생성에 있어서 문제가 있는 것으로 판단되어, 5년차에 Ras 기반 다른 세포주를 사용하여 시도할 예정임

**연구내용2**      **흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주를 활용한 흑색종 질환모델돼지 생산**

**3차년도에 수립된 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 세포주를 이용한 SCNT 수행 후 대리모돈에 배아 이식 진행**

- 3차년도에 흑색종 자연발생 돼지 유래 생물자원을 확보하고, 초대 배양을 통해서 섬유아세포를 확보했음. 해당 섬유아세포를 활용하여 SCNT를 통해 *in vitro* 발달능이 정상적으로 되는 것을 확인하였음

**Embryo Transfer (16차)** 개발확인일 : 21.02.03  
분만예정일 : 21.05.07

일자 : 2021.01.13      술자 : 크로넥스(홍진기)      보조 : DJ


수란돈 번호 : E6-24      체중 : 100 kg      생년 : 18/06/19

배란상태 : 배란직후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :

자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 16차 수술

세포주 : 자연발생 melanoma duroc fibroblast      이식된 배아갯수 : 175 개  
01.13 Fusion embryo 140개  
Non-fusion embryo 35개

특이사항 : 실험이력 없음



NT Date	Egg Num.	MIH rate (%)	Enucleated		Fused (%)			No. of cleavage (%)		
			2	4	8	2	4	8	Total(%)	
21-01-13	240		175	140	(80.0)					

그림. 흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주의 Embryo Transfer

- 따라서, 흑색종 자연발생 돼지 유래 섬유아세포를 공여세포로 활용해 SCNT 후 대리모돈에 배아 이식하여 태어난 산자에게 유전적으로 흑색종이 발병되는지 확인하기 위해 Embryo Transfer (이식일자 : 21.01.13)를 진행함
- Embryo Transfer 1회 진행하였고, 이식 후 26일차 임신 진단키트 양성 확인과 이식 33일차 태낭 형태가 관찰됨에 따라 임신된 것으로 판단함
- 분만예정일(21.05.07)보다 늦은 이식 후 121일차(21.05.14) 양수가 터진 것을 확인했지만, 태아의 출산은 확인하지 못한 상태로 태반이 확인됨. 이후, 이식 후 125일차(21.05.18)에 태아의 생존이 어렵다고 판단하여 제왕절개를 시도하였고 사산 개체 1두 관찰됨. 태아의 등에는 흑색종 자연발생 개체처럼 특이사항을 발견할 수 없었음

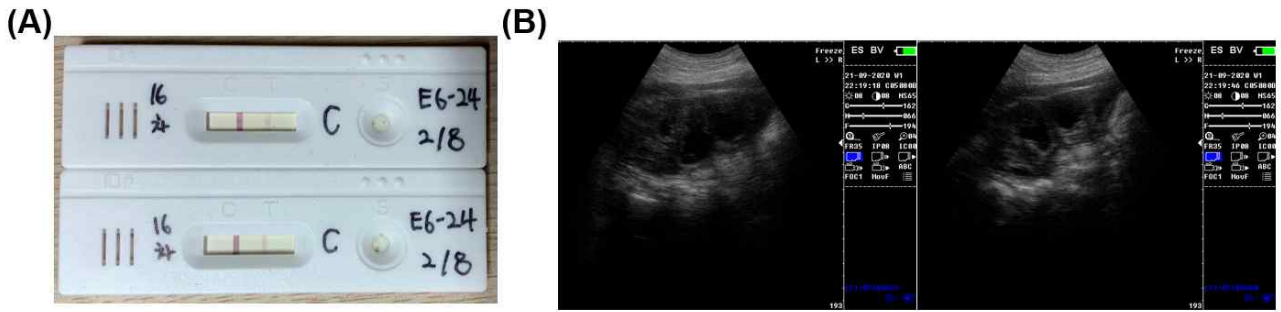


그림. 흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주의 Embryo Transfer 후 대리모돈의 임신 진단. (A) 이식 후 26일차 임신진단 키트 양성, (B) 이식 후 33일차 태낭 관찰

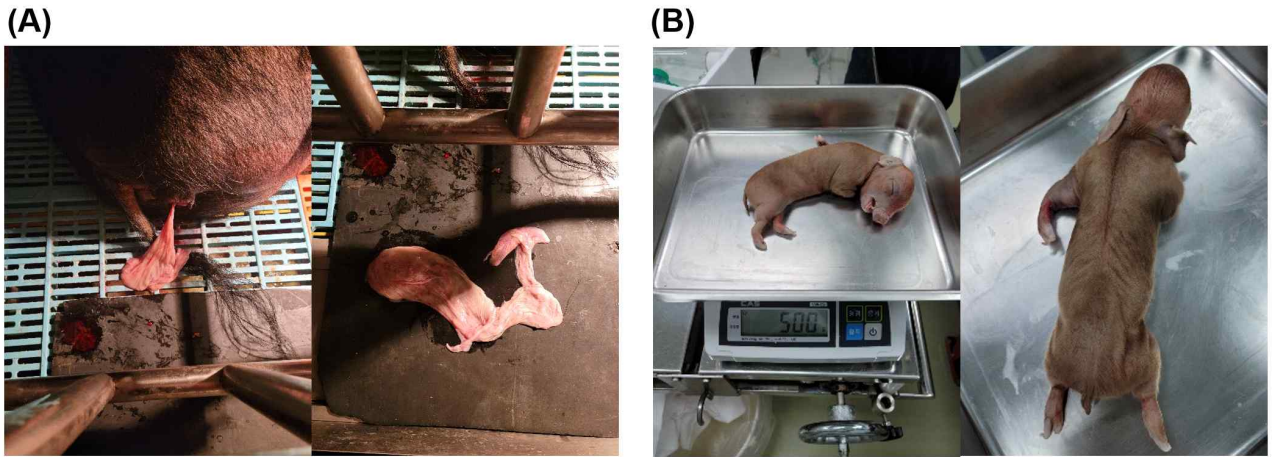


그림. 흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주의 Embryo Transfer 후 대리모돈의 제왕절개. (A) 이식 후 121일차 양수 및 태반 확인, (B) 이식 후 125일차 제왕절개 후 사산 개체 1두 관찰

- 수립된 흑색종 자연발생 돼지 유래 섬유아세포는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)로 기탁 완료하였음 (표, 기탁번호 : BP1912244)

표. 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원) 기탁 목록

기탁번호	생물자원명	분리번호	연구과제명	연구책임자	비고
BP1912242	melanomaTG+Cre F1#4	melanomaTG+Cre F1#4	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포주
BP1912243	melanomaTG-Cre F1#2	melanomaTG-Cre F1#2	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포주
BP1912244	NOMduroc	NOMduroc	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포주

**세부목표: Braf 기반 흑색종 모델 *in vitro* 평가 시스템 개발**

**연구내용1 Braf 기반 흑색종 모델 배아줄기세포주를 수립을 통한 *in vitro* 평가 시스템 개발**

▣ Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 배아줄기세포 수립 및 특성분석

- 두 종류의 Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행과 *in vitro* 평가
  - 위탁기관 고려대학교에서 구축한 Braf기반 세포주는 Cloud SB-DppB tpTYR-CreER(SB-DppB)와 Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER(SB-3PA-DPB)임. SB-3PA-DPB 모델 세포주는 SB-DppB의 세포주 벡터에서 EGFP 뒷부분 SV40 pA가 3개인 것을 제외하고는 같은 형식의 벡터임
  - 두 종류 모두 Braf기반 유전자 도입(BRAF<sup>V600E</sup>) 세포주이며 각각의 세포주를 이용하여 SCNT를 진행 후 *in vitro*에서 배아 발달을 확인하였음



➤ Brf 기반 돼지 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



➤ 멜라닌 세포 특이적 CreERT2 발현 시스템 (Lentivirus)



그림. Brf기반 세포주 Cloud SB-DppB tpTYR-CreER(SB-DppB)의 벡터 모식도

가. SB-DppB 세포주의 *in vitro* 발달능 평가

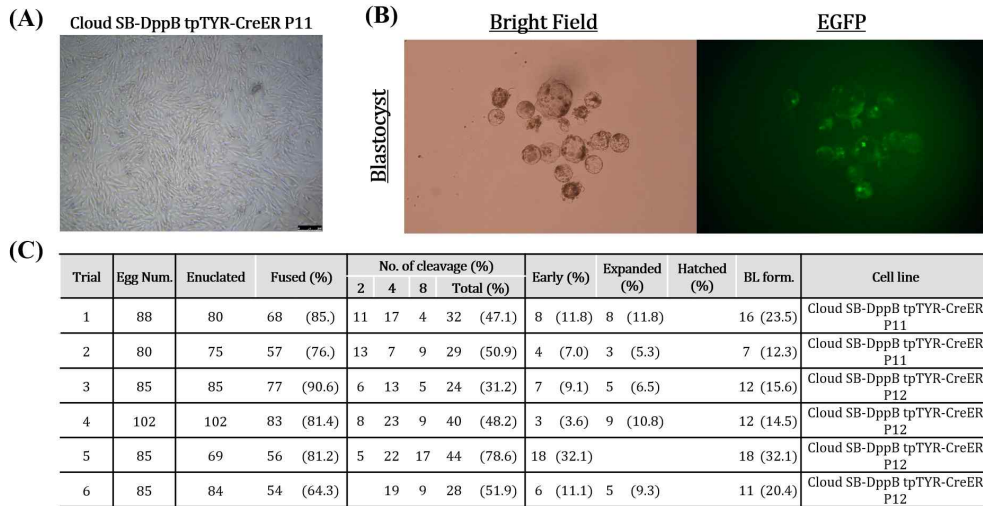
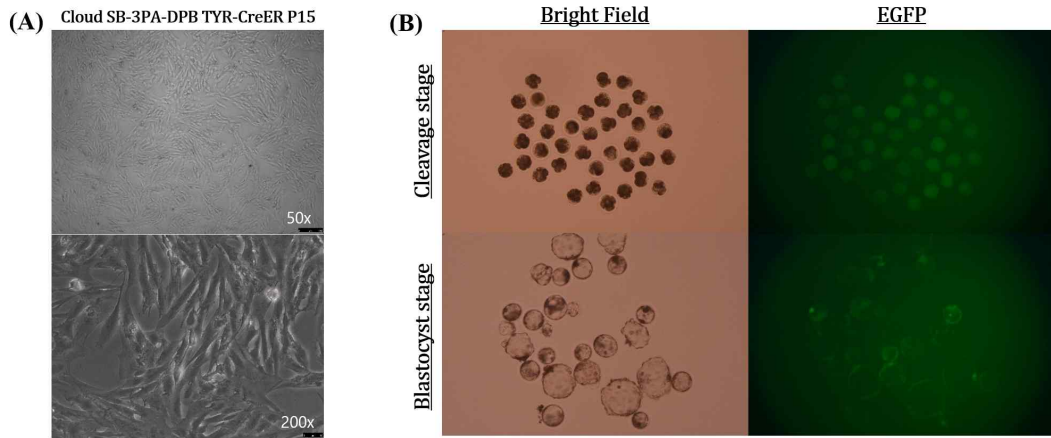


그림. Brf 기반 세포주 Cloud SB-DppB tpTYR-CreER(SB-DppB)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가. (A) SB-DppB 세포주의 모습, (B) SCNT 후 7일차에 배반포 형태 및 EGFP 발현 확인, (C) SB-DppB 세포주의 SCNT 후 발달능 평가

- SCNT 후 배아의 정상적인 발달을 평가하기 위해 SCNT 후 2일차에 분할률 및 7일차에 배반포 형성률을 평가하였음
- SB-DppB 세포주를 이용하여 총 6회 SCNT를 수행했으며 분할률은 평균 51.3%이고 배반포 형성률은 평균 19.7%인 것을 확인하였음. SCNT 후 7일차에 배반포에서 EGFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었음

나. SB-3PA-DPB 세포주의 *in vitro* 발달능 평가

- 배아의 정상적인 발달을 평가하기 위해 SCNT 후 2일차에 분할률 및 7일차에 배반포 형성률을 평가하였음
- SB-3PA-DPB 세포주를 이용하여 총 7회 SCNT를 수행했으며 분할률은 평균 54.6%이고 배반포 형성률은 평균 19.3%인 것을 확인하였음. SCNT 후 2일차와 7일차에서 분할 및 배반포에서 EGFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었음



(C)

Trial	Egg Num.	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	Bl. form.	Cell line
				2	4	8	Total (%)					
1	101	101	71 (70.3)	15	16	10	41 (57.7)	3 (4.2)	5 (7.0)		8 (11.3)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P15
2	71	71	51 (71.8)	3	17	8	28 (54.9)	3 (5.9)	7 (13.7)		10 (19.6)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P15
3	91	91	66 (72.5)	10	13	13	36 (54.5)	5 (7.6)	10 (15.2)		15 (22.7)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P15
4	91	91	59 (64.8)	11	11	8	30 (50.8)	3 (5.1)	6 (10.2)		9 (15.3)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P15
5	83	83	56 (67.5)	7	14	17	38 (67.9)	6 (10.7)	9 (16.1)		15 (26.8)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P14
6	86	86	56 (65.1)	7	9	6	22 (39.3)	4 (7.1)	2 (3.6)		6 (10.7)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P14
7	67	67	42 (62.7)	7	16	1	24 (57.1)	7 (16.7)	5 (11.9)		12 (28.6)	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P16

그림. Braf 기반 세포주 Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER(SB-3PA-DPB)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가. (A) SB-3PA-DPB 세포주의 모습, (B) SCNT 후 2일차 분할, 7일차에 배반포 형태 및 EGFP 발현 확인, (C) SB-3PA-DPB 세포주의 SCNT 후 발달능 평가

b. 두 종류의 Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용한 배아 줄기세포 수립 및 특성분석

- 두 종류의 Braf 기반 세포주인 SB-DppB와 SB-3PA-DPB를 이용하여 SCNT 실시한 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용하여 Mouse Embryonic Fibroblast(MEF)에 Whole Seeding을 진행함. SB-DppB 세포주에서는 2개의 배아줄기세포주(SB-DppB pES cells #1, 2), SB-3PA-DPB 세포주에서는 1개의 배아줄기세포주(SB-3PA-DPB pES cells #1)를 수립하였음

가. SB-DppB 세포주의 배아줄기세포 수립 및 특성분석

① SB-DppB pES cells #1 특성분석

- SB-DppB 세포주를 이용해 SCNT 후 7일차 *in vitro* 생산된 배반포를 MEF에 whole seeding을 진행함. Seeding 후 6일차부터 돼지 배아줄기세포의 특성인 Primed 한 형태를 관찰하였음



그림. SB-DppB pES cells #1의 Seeding 후 수립 모습

- 수립된 SB-DppB pES cells #1 세포주의 만능성을 확인하기 위해서 Alkaline Phosphatase(AP) 염색과 OCT4와 같은 만능성 유전자를 면역염색을 통해 확인했을 때, 모두 positive를 나타내었음
- 일반적으로 돼지 배아줄기세포는 Primed 한 형태를 보이며, bFGF-dependent한 특성을 보임. 수립된 SB-DppB pES cells #1 세포주에서 정상적인 분화능을 확인하기 위해 bFGF가 없는 배지에서 10일 동안 배양 후 Embryoid Bodies(EB)가 형성되는 것을 확인하였음. 또한, 형성된 EB가 삼배엽 분화능을

가지는지 확인하기 위해 Cytokeratin17(내배엽 마커), Desmin(중배엽 마커), PAX6(외배엽 마커)를 면역염색을 통해 특성분석을 수행하였음

- gDNA PCR을 통해 종양 유발 유전자의 삽입 여부를 확인하였음. 그 결과 SB-DppB 공여세포주와 마찬가지로 종양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup>가 삽입된 것을 확인함. 하지만, 종양을 유발하기 위해 필요한 CreER<sup>T2</sup>는 삽입이 되지 않았음

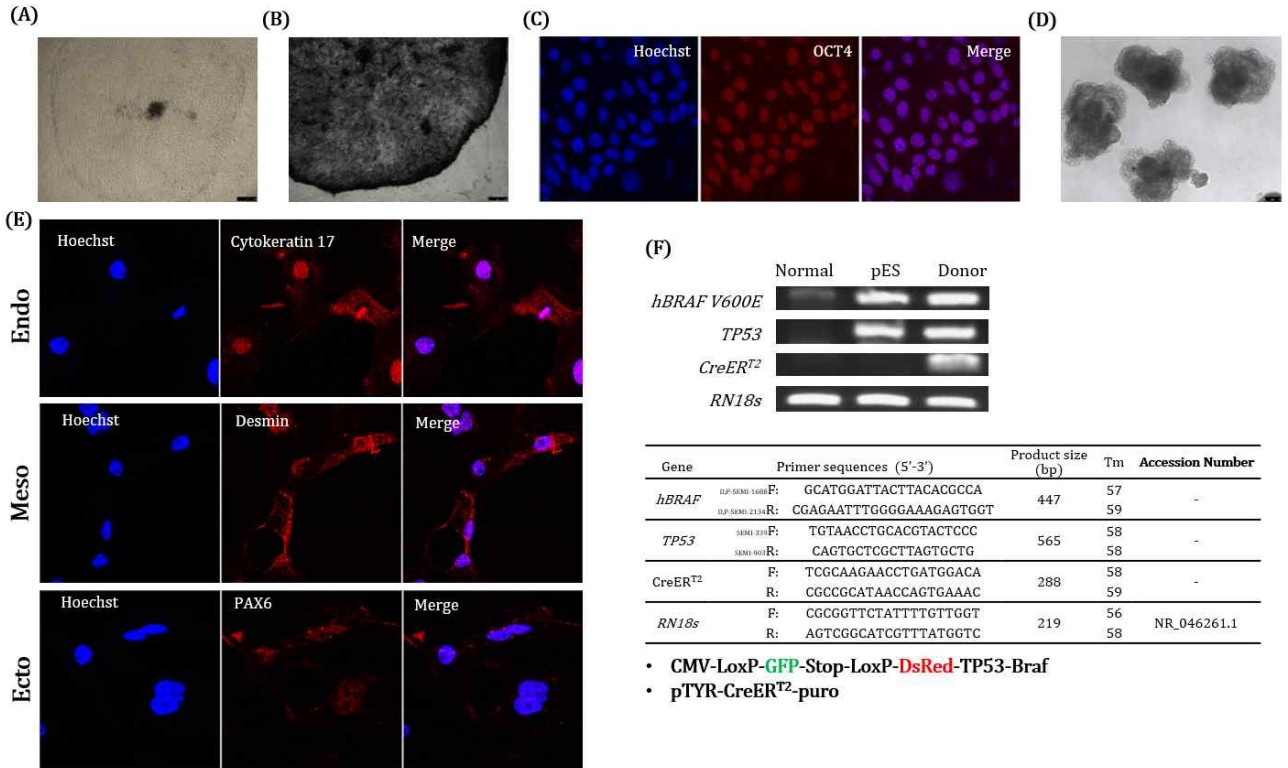


그림. SB-DppB pES cells #1의 특성분석. (A) 계대 2의 SB-DppB pES cells #1 모습, (B) AP 염색, (C) OCT4 면역염색. (D) EB 형성, (E) 삼배엽 분화능 면역염색, (F) gDNA PCR 유전자 삽입 여부 확인

## ② SB-DppB pES cells #2 특성분석

- SB-DppB pES cells #1에서와 동일한 특성 분석을 진행함. Seeding 후 3일차 배아줄기세포 형태를 관찰하였음

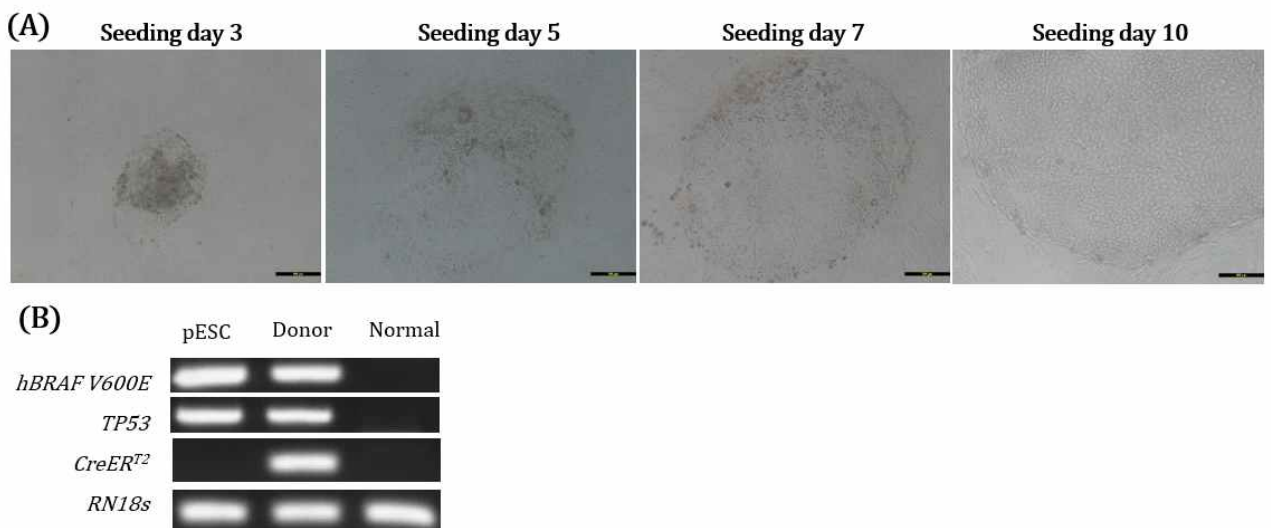


그림. SB-DppB pES cells #2의 Seeding 후 수립 모습 및 분석. (A) Seeding 후 10일차까지의 모습. (B) gDNA PCR 유전자 삽입 여부 확인

- gDNA PCR를 통해서 종양 유발 유전자를 확인했을 때 SB-DppB pES cells #1 세포주와 같은 결과로 종양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup>는 삽입이 되었으나, CreER<sup>T2</sup>는 삽입이 되지 않았음. 이 결과는 *in vivo* 데이터와 동일하게 확인되었음 (Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증 'SB-DppB 흑색종 모델 돼지 관련 내용' )

나. SB-3PA-DPB 세포주의 배아줄기세포 수립 및 특성분석

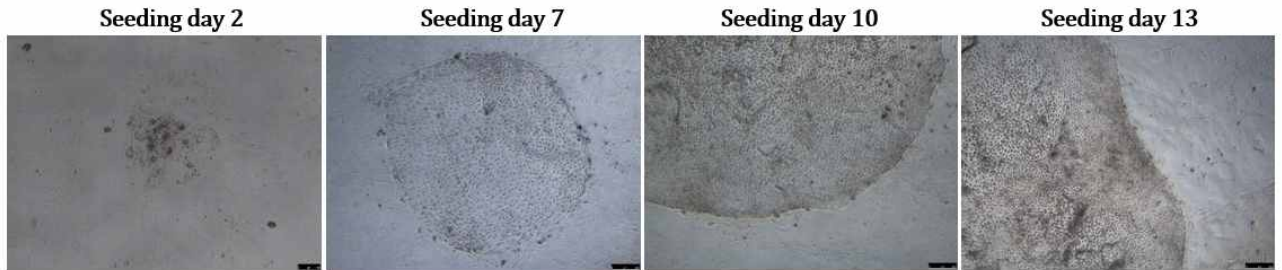


그림. SB-3PA-DPB pES cells #1의 Seeding 후 수립 모습

- SB-3PA-DPB 세포주를 이용해 SCNT 후 7일차 *in vitro* 생산된 배반포를 MEF에 whole seeding을 진행함. Seeding 후 7일차부터 돼지 배아줄기세포의 특성인 Primed 한 형태를 관찰하였음
- 수립된 SB-3PA-DPB pES cells #1 세포주의 만능성을 확인하기 위해서 Alkaline Phosphatase(AP) 염색과 OCT4와 같은 만능성 유전자를 면역염색을 통해 확인했을 때, 모두 positive를 나타내었음
- 수립된 SB-3PA-DPB pES cells #1 세포주에서 정상적인 분화능을 확인하기 위해 bFGF가 없는 배지에서 10일 동안 배양 후 EB가 형성되는 것을 확인하였음. 또한, 형성된 EB가 삼배엽 분화능을 가지는지 확인하기 위해 Cytokeratin17(내배엽 마커), Desmin(중배엽 마커), PAX6(외배엽 마커)를 면역염색을 통해 특성분석을 수행하였음

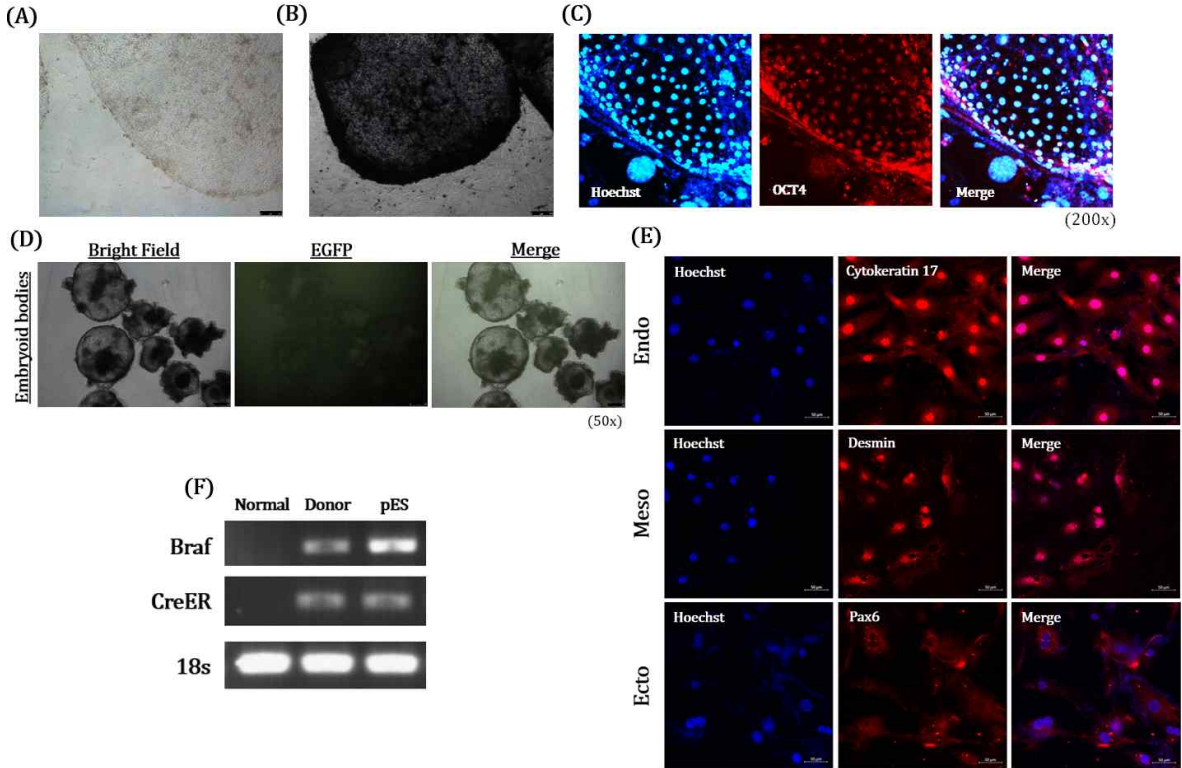


그림. SB-3PA-DPB pES cells #1의 특성분석. (A) 계대 2의 SB-3PA-DPB pES cells #1 모습, (B) AP 염색, (C) OCT4 면역염색. (D) EB 형성, (E) 삼배엽 분화능 면역염색, (F) gDNA PCR 유전자 삽입 여부 확인

- gDNA PCR을 통해 종양 유발 유전자의 삽입 여부를 확인하였음. 그 결과 종양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup>가 삽입된 것을 확인함. 또한, SB-DppB pES cells와는 다르게 종양을 유발하기 위해 필요한 CreER<sup>T2</sup>가 삽입된 것을 확인하였음. 이 결과는 *in vivo* 데이터와 동일하게 확인되었음 (Braf 기반 흑색종 모델돼

**세부목표: Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가**

**연구내용1**

**Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증**

**■ Braf 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 흑색종 모델돼지 생산 및 분석**

**a. Cloud SB-DppB tpTYR-CreER(SB-DppB) 세포를 이용한 흑색종 모델돼지 생산 및 분석**

가. SB-DppB 세포를 이용한 SCNT 후 대리모돈에 배아이식

- Braf 기반 흑색종 모델돼지를 생산하기 위해 SB-DppB 세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 총 3회의 Embryo Transfer를 실시하였음

**표. Braf 기반 세포주(SB-DppB)의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식**

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배란상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여핵원	계대	비고	재발정진단			(초음파)임신진단		진단 키트	분만예정일 (+T14)	특이사항
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2020-11-27	L1-1909	2018-12-04	SH	DJ	배란직전	8-10	138	0	Cloud SB-DppB tpTYR-CreER	P13	송백농장	2020-12-18	2020-12-25	재발정			2021-03-21	11/25 2-8cell 31, 11/27 fusion 107 / 경산돈	
2020-12-09	F6-27	2019-06-17	SH	DJ	배란직전	8-10	135	0	Cloud SB-DppB tpTYR-CreER	P13	크로넥스	2020-12-30	2021-01-06	재발정	태낭 없음	양성	2021-04-02	Fusion 135/ 실험이력 없는 경산돈, 14차 수술	
2020-12-11	F5-34	2019-05-23	SH	DJ	배란직전	8-10	168	30	Cloud SB-DppB tpTYR-CreER	P13	크로넥스	2021-01-01	2021-01-08	-	태낭 확인	양성	2021-04-04	경산돈 (실험 이력 없음), 15차 수술	

**Embryo Transfer** 재발확인일: 20.12.08  
분만예정일: 21.03.21

일자: 2020.11.27      술자: SH      보조: DJ  
 수란돈 번호: L1-1909      체중:      생년: 18.12.04  
 배란상태: 배란직전      난포 크기: 8-10 mm      난포갯수:        
 자궁상태: 양호      비고: 송백농장  
 세포주: Cloud SB-DppB tpTYR-CreER P13      이식된 배아갯수: 138 개  
 1. 11/25 Braf 2-8 cell: 31  
 2. 11/27 Braf fusion: 107

특이사항: 경산돈



**Embryo Transfer** 재발확인일: 20.12.30  
분만예정일: 21.04.02

일자: 2020.12.09      술자: SH      보조: DJ  
 수란돈 번호: F6-27      체중: 80-90 kg      생년: 19/6/17  
 배란상태: 배란직전      난포 크기: 8-10 mm      난포갯수:        
 자궁상태: 경도양호      비고: 크로넥스 14차 수술  
 세포주: Cloud PB-DppB tpTYR-CreER P13      이식된 배아갯수: 135 개  
 12.09 NT, Fusion embryos

특이사항: 경산돈 (실험이력 없음)

NT Date	Egg Num	MI rate (%)	Enucleated		Fused (%)		No. of cleavage (%)						
			2	4	8	Total	2	4	8	Total			
12.09	120		97	72	54	54							
12.09	120		91	68	74.7								




**Embryo Transfer** 재발확인일: 21.01.01  
분만예정일: 21.04.04

일자: 2020.12.11      술자: SH      보조: DJ  
 수란돈 번호: F5-34      체중: 80-90 kg      생년: 19/5/23  
 배란상태: 배란직전      난포 크기: 8-10 mm      난포갯수:        
 자궁상태: 경도양호      비고: 크로넥스 15차 수술  
 세포주: Cloud PB-DppB tpTYR-CreER P13      이식된 배아갯수: 168 개  
 12.10 NT, Cleavage 90개  
 12.11 NT, Fused embryos 78개  
 12.11 NTC 30개

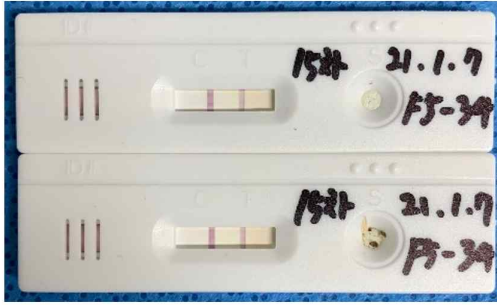
특이사항: 경산돈 (실험이력 없음)

NT Date	Egg Num	MI rate (%)	Enucleated		Fused (%)		No. of cleavage (%)					
			2	4	8	Total	2	4	8	Total		
12.10	120		97	72	74.2	54	54					
12.10	120		78	65	83.3	36	36					
12.11	120		179	108	60.3	3	8	8	19	63.3		



**그림. Braf 기반 세포주(SB-DppB)의 Embryo Transfer**

(A)



(B)



그림. 20.12.11 이식 대리모돈의 임신 진단. (A) 이식 후 28일차 임신진단 키트 양성, (B) 이식 후 28일차 태낭 관찰

- 20.12.11 이식 일자에서 이식 후 28일차에 임신진단키트 양성과 태낭이 관찰되었음. 그 이후 대리모돈에 특이사항 없이 분만예정일 21.04.04 보다 3일 뒤인 21.04.07에 총 5두 산자를 생산하였음

나. SB-DppB 흑색종 모델돼지 생산 및 분석

- SB-DppB 흑색종 모델돼지는 총 5마리가 생산되었음. 각각 산자의 탯줄 샘플을 활용하여 gDNA PCR를 통해 종양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup> 뿐만 아니라, EGFP, DsRed, CreER<sup>T2</sup>가 삽입이 되었는지 확인하였음
- 다른 유전자들은 삽입이 되어 있는 것을 확인했으나, 흑색종을 선택적으로 유발하기 위해 필요한 CreER<sup>T2</sup>는 삽입이 안된 것을 확인하였음. 이 결과는 *in vitro*에서 수립된 SB-DppB pES cells #1, 2 배아줄기세포와 동일함 (Braf 기반 흑색종 모델 *in vitro* 평가 시스템 개발 'SB-DppB 세포주의 배아줄기세포 수립 및 특성분석' )

(A)



(B)

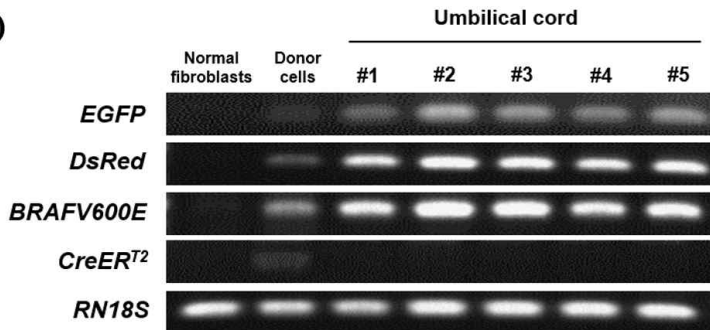


그림. Braf 기반 SB-DppB 흑색종 모델돼지 생산 및 분석. (A) SB-DppB 흑색종 모델돼지, (B) gDNA PCR 분석

- 각각 산자별로 형광램프를 통해 EGFP가 발현되는 것을 확인하였고, 샘플된 탯줄을 초대배양하여 세포주를 구축하였음

- 생산된 SB-DppB 흑색종 모델돼지는 현재 어미 개체인 제주 재래 돼지와는 달리 공여 세포원의 개체인 Yukatan 개체로서 품종차이로 인하여 SB-DppB 흑색종 모델돼지의 몇몇 개체는 정상적인 포유 활동을 하지 못하였음. 따라서, 종양 유발하기 전에 폐사하는 개체(#2, 4, 5)가 발생하여 장기 등 조직 검사를 실시하였지만, 특이사항은 발견하지 못하였음

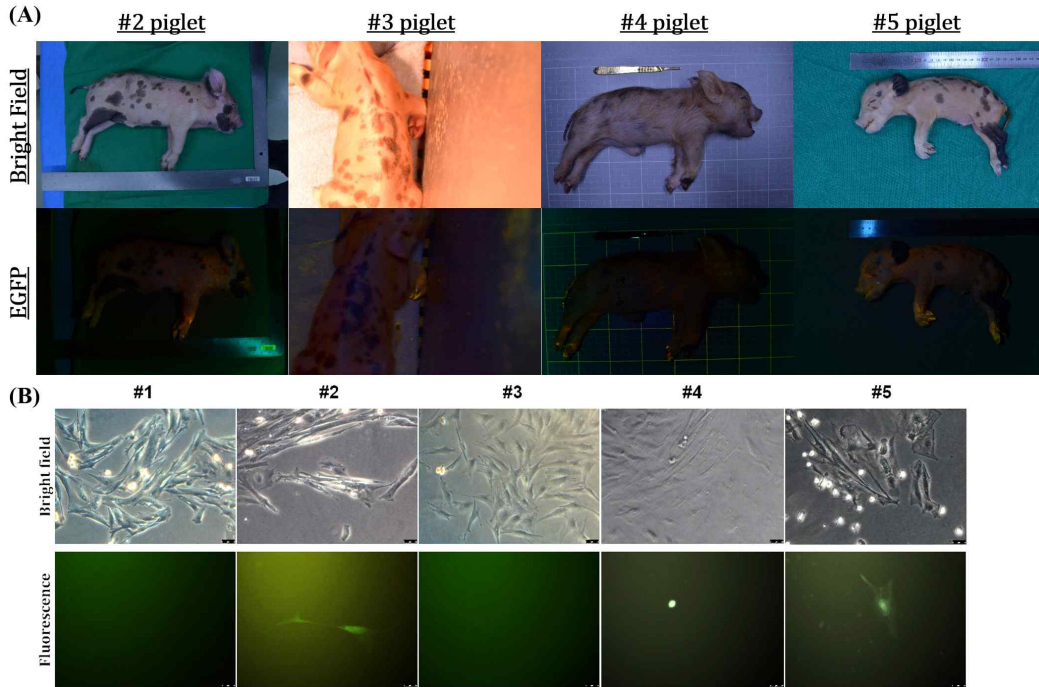


그림. Braf 기반 SB-DppB 흑색종 모델돼지 EGFP 발현 및 태줄 세포주 구축. (A) SB-DppB 흑색종 모델돼지 #2-5의 EGFP 발현, (B) SB-DppB 흑색종 모델돼지 #1-5의 태줄 세포 및 EGFP 발현

- 생산된 SB-DppB 흑색종 모델돼지 #3 개체를 활용하여 타목시펜 처리를 통해 산자의 종양유도 분석을 진행함. 생후 20일 후에 타목시펜을 4일 동안 경구 투여 및 5일 동안 Skin 투여를 진행하였음. 총 9일 동안 타목시펜을 처리한 후 희생하여 조직 분석을 실시하였으나, 산자에서 유전자 재조합 현상은 발견할 수 없었으며 종양 또한 발병하지 않았음. 이 결과는 CreER<sup>T2</sup>가 삽입이 안되어 있으므로 재조합 현상이 일어나지 않는 것으로 판단되어짐

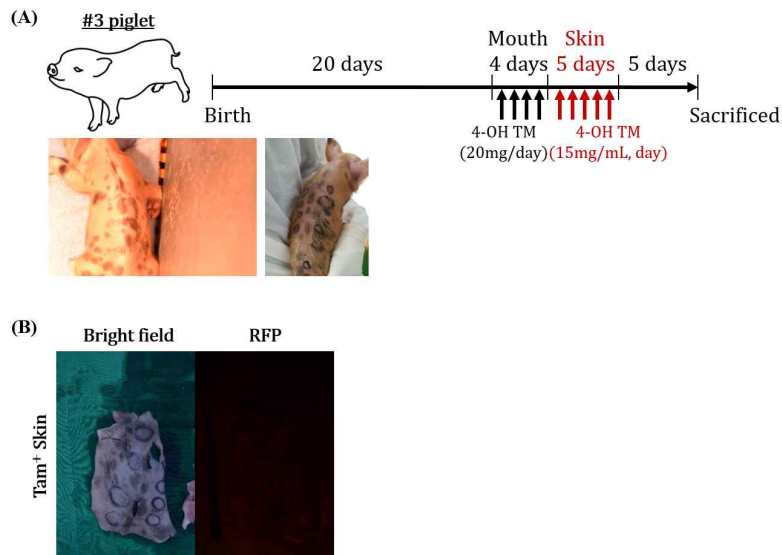


그림. Braf 기반 SB-DppB 흑색종 모델돼지 #3 개체 타목시펜 처리를 통한 종양 유도 분석, (A) 타목시펜 처리 모식도, (B) 타목시펜 처리 Skin에서 RFP 발현 확인

- #3 개체의 희생 후 타목시펜 처리된 Skin를 초대 배양을 통해 세포주를 구축하였음. *in vivo*에서 결과와 동일하게 *in vitro*상에서도 재조합 현상은 관찰되지 않았음

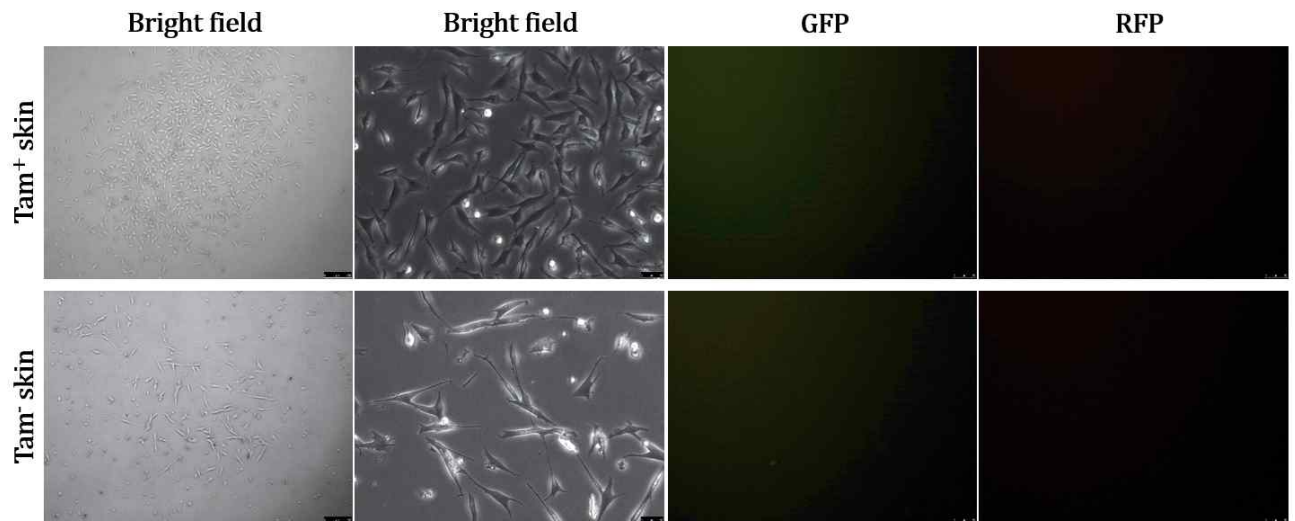


그림. Braf 기반 SB-DppB 흑색종 모델돼지 #3 개체 타목시펜 처리 후 Skin 초대 배양 및 형광 분석

- 각 개체의 털줄, Melanocytes, 섬유아세포들은 개체별로 샘플링되어 세포주들을 구축하고 저장해놓은 상태임

표. Cryogenic vial information - Primary culture derived cells

Cell lines	Tissue origin	Name	Quantity
Umbilical cord cells	Umbilical cord	Cloud SB-DppB TYR-CreER #1 털줄 P0 / P1 (CL)	1 / 1
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #2 털줄 P0 (JY)	2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #3 털줄 P0 (CL)	1
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #4 털줄 P0 / P1 (JY)	2 / 2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 털줄 P0 (SH)	2
Melanocytes	Ears, body	Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 White Mix Melanocyte P0 / P1 (HR)	2 / 2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 Black Epi Melanocyte P0 / P1 (HR)	2 / 2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 Black Mix Melanocyte P0 / P1 (HR)	2 / 2
		SB-DppB TG#5 melanocyte black P0 (MR)	5
		SB-DppB TG#5 melanocyte white P0 (MR)	5
		Cloud SB-DppB TG#2 melanocyte white P0 (MR)	2
		Cloud SB-DppB TG#2 melanocyte black P0 (MR)	2
		Cloud SB-DppB #2 melanocyte white P1 (HR)	2
		Cloud SB-DppB TG#4 melanocyte P0 (MR)	5
Fibroblasts	Ears	Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 Ear fibroblast P0 / P1 (HR)	2 / 2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #5 Ear fibroblast P1 (SH)	4
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #2 Ear fibroblast P1 (HR)	2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #2 Ear fibroblast P0 (SH)	2
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #4 Ear fibroblast P0 (HR)	1
		Cloud SB-DppB TYR-CreER #4 Ear fibroblast P0 (JY)	1

- 현재 SB-DppB 흑색종 모델돼지 #1 개체는 사육관리중이며, CreER<sup>T2</sup>의 삽입만 제외하고 종양 유발 유전자인 BRAF<sup>V600E</sup>는 삽입이 되어 있는 상태임. 추후에 완전한 개체를 만들기 위해 *in vivo*상 CreER<sup>T2</sup> 도입 전략 수립함
- SB-DppB 흑색종 모델돼지 #1 개체의 섬유아세포는 초대배양을 통해서 구축해놓은 상태이며, 해당 세포주는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)로 기탁 완료하였음 (기탁번호 : BP1912243)





그림. Braf 기반 SB-DppB 흑색종 모델돼지 #1 개체

b. Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER(SB-3PA-DPB) 세포를 이용한 흑색종 모델돼지 생산 및 분석

가. SB-3PA-DPB 세포를 이용한 SCNT 후 대리모돈에 배아이식

- Braf 기반 흑색종 모델돼지를 생산하기 위해 SB-3PA-DPB 세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 총 3회의 Embryo Transfer를 실시하였음

표. Braf 기반 세포주(SB-3PA-DPB)의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배란상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여핵원	계대	비고	재발정진단			(조음파)임신진단		진단 키트	분만예정일 (+114)	특이사항
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2021-03-19	F6-26	2019-06-17	SH	DJ	배란후	8-10	211	30	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER	P15	크로넥스	2021-04-09	2021-04-16	재발정				2021-07-11	실험이력 없음, NTC 30개
2021-04-01	F12-27	2019-12-13	크로넥스	DJ	배란전	8-10	125	0	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER	P17	크로넥스	2021-04-22	2021-04-29	-	2021-05-21	태낭 확인	음성	2021-07-24	실험이력&출산이력 없음
2021-05-07	20-198	2020-04-02	크로넥스	DJ	배란직전	8-10	188	0	Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER	P14	크로넥스	2021-05-28	2021-06-04	-	2021-06-08	태낭 확인	음성	2021-08-29	

**Embryo Transfer (17차)** 재발확인일 : 21.02.03  
분만예정일 : 21.05.07

일자 : 2021.03.19      술자 : SH      보조 : DJ  
수란돈 번호 : F6-26      체중 : 85-90kg      생년 : 2019.06.17  
배란상태 : 배란후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도비약      비고 : 크로넥스 17차 수술

세포주 : Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P15      이식된 배아갯수 : 211 개  
03.17, 03.18 Cleavaged embryos 111개      03.19 Fusion embryos 100개

특이사항 : 실험이력 없음, NTC 30개

NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated		Fused (%)			No. of cleavage (%)		
			2	4	8	Total	2	4	8	Total
210317	120		109	76	109(83)	40	21	8	39	(51.3)
210318	240		179	127	172(85)	72			94	(52)
210319	240		197	130	166(84)	4	8	1	15	(26)



**Embryo Transfer (18차)** 재발확인일 : 21.02.03  
분만예정일 : 21.05.07

일자 : 2021.04.01      술자 : 크로넥스 흥진기      보조 : DJ  
수란돈 번호 : F12-27      체중 : 85-95kg      생년 : 2019.12.13  
배란상태 : 배란전      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 18차 수술

세포주 : Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P17      이식된 배아갯수 : 125 개  
03.29 Cleavaged embryos 38개      03.20 Fusion embryos 87개

특이사항 : 실험이력&출산이력 없음

NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated		Fused (%)			No. of cleavage (%)		
			2	4	8	Total	2	4	8	Total
210329	120		82	89	70	26	11	1	38	(29.4)
210330	200		182	137	160(88)					



**Embryo Transfer (19차)** 재발확인일 : 21.05.28  
분만예정일 : 21.08.29

일자 : 2021.05.07      술자 : 크로넥스 흥진기      보조 : DJ  
수란돈 번호 : 20-198      체중 : 85-95 kg      생년 : 20/4/2  
배란상태 : 배란직전      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 19차 수술

세포주 : Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER P14      이식된 배아갯수 : 188 개  
05.05 Cleavaged embryos 157개      05.06 Fusion + Non-Fusion embryos 173개

특이사항 : 실험이력&출산이력 없음

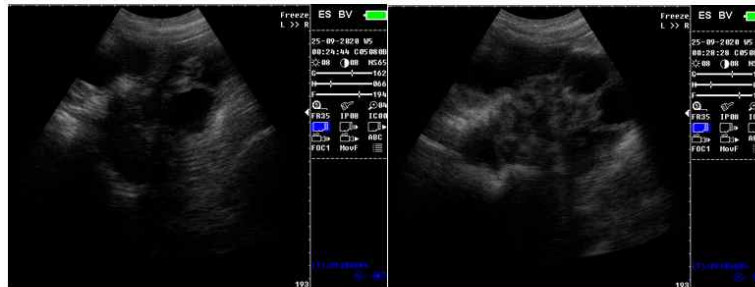
NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated		Fused (%)			No. of cleavage (%)		
			2	4	8	Total	2	4	8	Total
21.05.05	100		61	63	70(5)	13			14	(14)
21.05.07	220		173	129	174(8)					



그림. Brf 기반 세포주(SB-3PA-DPB)의 Embryo Transfer

- 21.04.01 이식일자와 21.05.07 이식일자의 대리모돈에서 각각 25일경, 31일경에 태낭을 확인할 수 있었음. 하지만, 21.04.01 이식일자의 대리모돈만 출산을 하여 산자를 생산하였고, 21.05.07 이식일자의 대리모돈은 유산된 것으로 판단됨

(A)



(B)



그림. 21.04.01, 21.05.07 이식일자의 태낭관찰. (A) 21.04.01 이식 후 25일경 태낭 관찰, (B) 21.05.07 이식 후 31일경 태낭관찰

나. SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 생산 및 분석

- 21.04.01 이식 후 21.08.03 (125일경) SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 5마리를 생산하였으나, 2마리는 출산 직후 폐사하였음. 5마리 이외에 비정상적으로 나온 개체들도 확인하였음. 각 개체의 탯줄을 통해 gDNA 추출 후 PCR를 통해서 증양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup>와 이전 SB-DppB 모델에서 문제가 있었던 CreER<sup>T2</sup>를 분석하였음
- 분석결과 #3, 4, 5, 7에서 CreER<sup>T2</sup>를 포함한 모든 유전자가 삽입된 것을 확인하였으며, 이 중에서 기형없는 정상개체는 #4 개체임. 이에 이전 연구에서 CreER<sup>T2</sup> 삽입되지 않았던 문제를 해결하였으며, 목적인 BraF 기반 흑색종 모델 돼지를 생산하였음
- 태어난 모든 개체에서 EGFP 발현은 정상적으로 되는 것으로 확인되었고, 폐사한 개체들의 조직검사에서 특이사항은 없었음

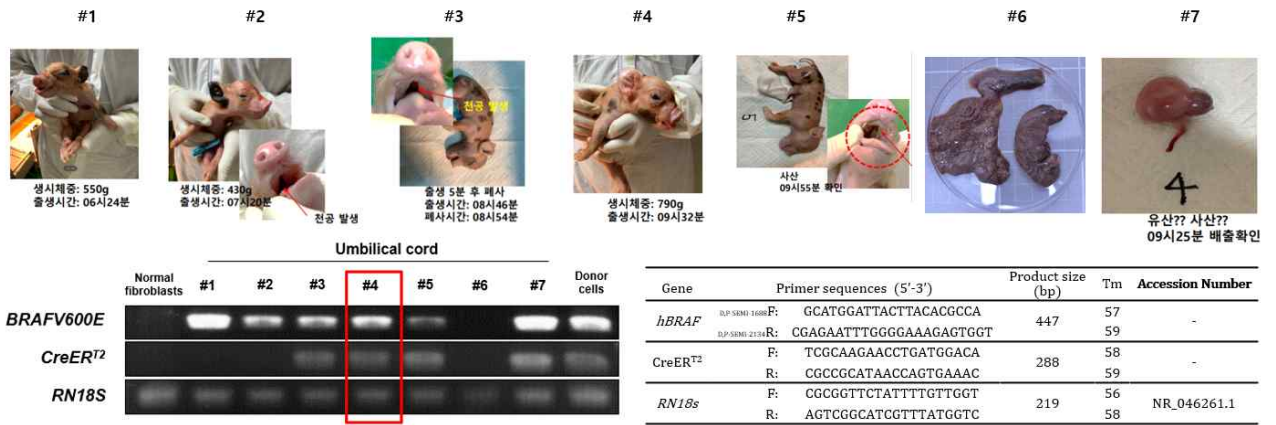


그림. SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지의 gDNA PCR 분석

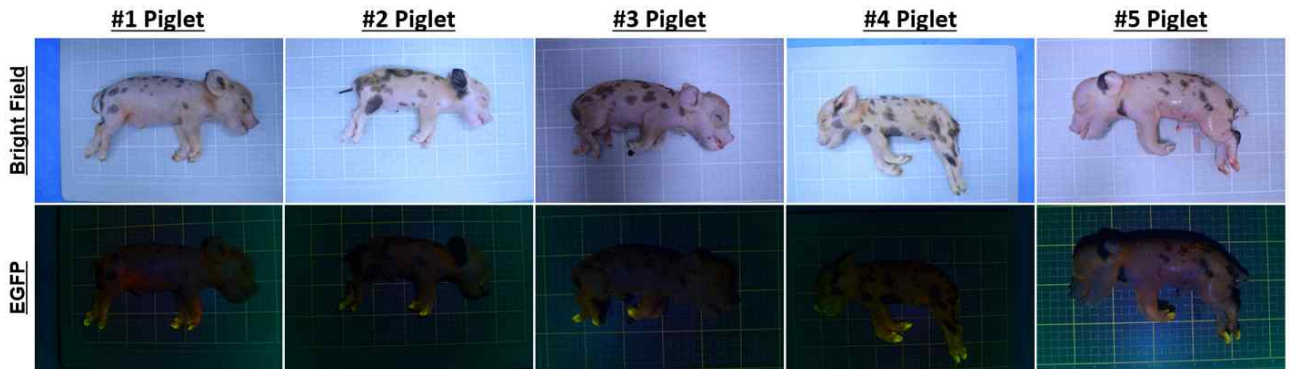


그림. SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지의 EGFP 발현 확인

- 태어난 개체들의 탯줄, melanocytes, 섬유아세포는 초대배양을 통해서 구축해놓은 상태임
- 특히, SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 #4의 개체의 구축된 섬유아세포 및 melanocytes에서 EGFP, RFP를 확인했을 때, 시험관내 유전자 재조합 분석을 진행함
- SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 #4 개체의 섬유아세포는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)로 기탁 완료하였음 (기탁번호 : BP1912242)

표. Primary culture information

Cell lines	Tissue origin	Cell information	No. vials	
Umbilical cord cells	Umbilical cord	SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#1	탯줄 P0 (SH)	3
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#3	탯줄 P0 (JY)	1
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#4	탯줄 P0 (JY)	1
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#5	U.cord P0 (MR)	4
Melanocytes	Ears, body	SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#1	White-melanocyte P0 (SH)	1
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#2	White-melanocyte P0 (HR)	3
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#2	Black-melanocyte P0 (HR)	3
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#3	White-melanocyte P0 (SH)	5
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#3	Black-melanocyte P0 (SH)	4
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#4	White-melanocyte P0 (HR)	6
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#5	White-melanocyte P0 (HR)	4
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#5	Black-melanocyte P0 (HR)	3
Fibroblasts	Ears	SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#1	Ear fibroblast P0 (Ali, JY)	6
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#2	Ear fibroblast P0 (Ali)	5
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#2	Skin fibroblast P0 (HR)	2
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#3	fibroblast P0 (MR)	3
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#4	fibroblast P0 (HR)	4
		SB-3PA-DPB TYR-CreER TG#5	fibroblast P0 (MR)	4

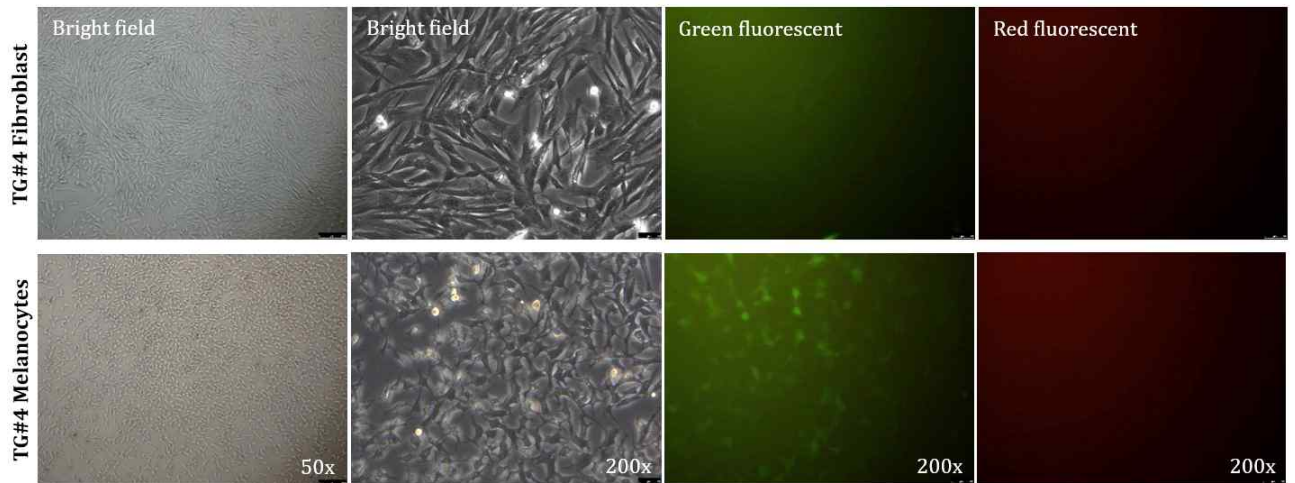
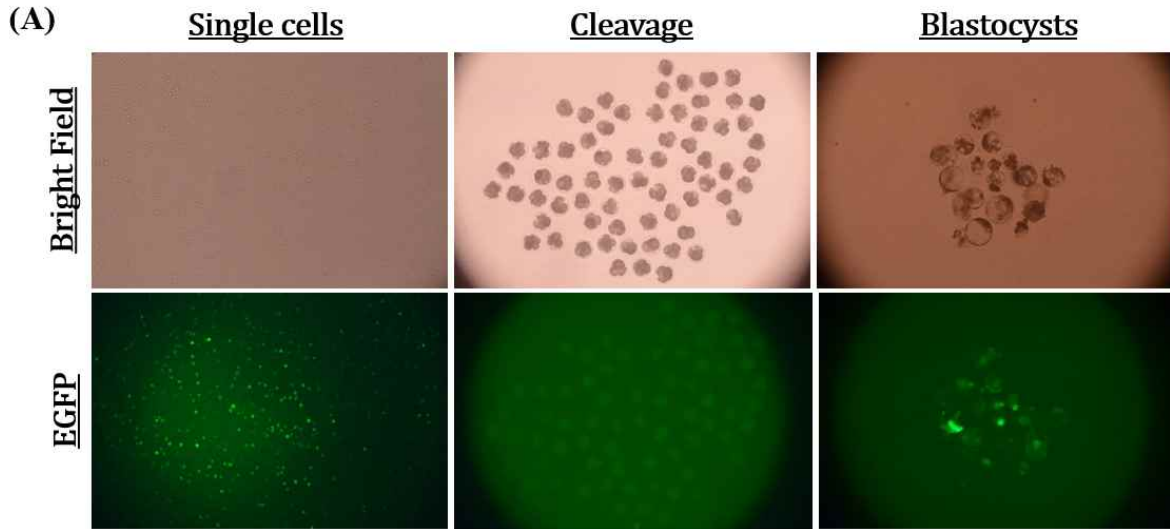


그림. SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 #4 개체의 섬유아세포 및 Melanocytes에서 형광 발현 확인

- 완전한 모델이 생산되었으나, 이전 SB-DppB 모델처럼 어미돼지와 품종이 다른 관계로 인하여 포유에 문제가 있었음. 따라서, 태어난 자돈 개체들을 효율적으로 케어하기 위해 대용유 혹은 대체제의 급이 프로토콜 수립이 필요함

c. SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포를 이용한 SCNT 후 대리모돈 배아이식하여 재복제 시도

- Braf 기반 SB-3PA-DPB 흑색종 모델돼지의 안정적인 생산 전략 구축을 위해 SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지의 태어난 개체 중 종양 유발 유전자와 CreER<sup>T2</sup>가 모두 삽입되어 있고 정상적인 개체인 #4의 섬유아세포주를 증식 확립하여 동결보존하였으며, 이를 이용하여 재복제를 수행하였음
- SB-3PA-DPB #4 개체의 세포를 이용하여 SCNT 후 배아의 정상적인 발달을 평가하였음



(B)

Trial	Egg Num.	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	BL form.	Cell line
				2	4	8	Total (%)					
1	120	99	75 (75.7)	7	29	10	46 (61.33)	2 (2.7)	1 (1.3)		3 (4.)	3PA #4 Piglet fibroblast P2
2	120	104	84 (80.77)	5	44	18	67 (79.76)	8 (9.5)	7 (8.3)		15 (17.9)	3PA #4 Piglet fibroblast P3
3	120	74	59 (79.73)	6	28	8	42 (71.19)	6 (10.2)	4 (6.8)		10 (16.9)	3PA #4 Piglet fibroblast P3
4	240	205	183 (89.27)	3	15	3	21 (70.00)	3 (10.0)	6 (20.0)		9 (30.)	3PA #4 Piglet fibroblast P9

그림. SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가. (A) SB-3PA-DPB #4 개체 세포주의 Single cells과 SCNT 후 분할 및 배반포의 모습, (B) SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포의 SCNT 후 발달능 평가

- SCNT는 총 4회 수행했으며 분할률은 평균 70.6%이고 배반포 형성률은 평균 17.2%인 것을 확인하였음. 또한, SCNT 후 2일차에 분할 및 7일차에 배반포에서 EGFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었음
- SB-3PA-DPB #4 개체를 재복제하기 위해 #4 섬유아세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 총 4회의 Embryo Transfer 실시하였음. 추후 대리모돈의 임신여부를 확인할 예정임

표. SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배관상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여핵원	개체	비고	재발정진단			(조음파)임신진단		진단 키트	분만예정일 (+114)	특이사항
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2021-09-09	F10-12	2019-10-10	크로넥스+SH	DJ	배란후	8-10	167	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P4	크로넥스	2021-09-30	2021-10-07	-		음성	2022-01-01	난관 진입시 어려움으로 ampulla 부근 주입, 후보돈 (출산이력 없음)	
2021-09-16	D-25	2017-12-06	크로넥스	DJ	배란 직전	8-10	145	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P5	크로넥스	2021-10-07	2021-10-14	재발정 10/12		음성	2022-01-08		
2021-10-20	GY-1	2020-02-21	SH	DJ	배란중	8-10	153	30	3PA #4 piglet fibroblast HR	P9	크로넥스	2021-11-10	2021-11-17				2022-02-11	수술할때 대장 문제 있었음	
2021-11-10	H2-10	2021-02-12	크로넥스	DJ	배란 직후	8-10	157	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P12	크로넥스	2021-12-01	2021-12-08				2022-03-04	초산돈	

### Embryo Transfer (25차)

재발확인일 : 21.09.30  
분만예정일 : 22.01.01

일자 : 2021.09.09      술자 : SH + 크로넥스 박상욱      보조 : DJJ  
수란돈 번호 : F10-12      체중 : 90~100 kg      생년 : 19/10/10  
배란상태 : 배란후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 23차 수술

세포주 : 3PA #4 piglet fibroblast HR P4      이식된 배아 개수 : 167개  
09.09 Fusion embryos 136개 + non-fusion embryos 31개

특이사항 : 난관 진입시 어려움으로 Ampulla 부근 주입, 후보돈 (출산이력 없음)



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)			
					2	4	8	Total (%)
200	167		167	130 (11.44)				

### Embryo Transfer (26차)

재발확인일 : 21.10.07  
분만예정일 : 22.01.08

일자 : 2021.09.16      술자 : 크로넥스 홍진기      보조 : DJJ  
수란돈 번호 : D-25      체중 : 110~120 kg      생년 : 17/12/06  
배란상태 : 배란직전      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 24차 수술

세포주 : 3PA #4 piglet fibroblast HR P5      이식된 배아 개수 : 145개  
09.16 Fusion embryos 130개 + non-fusion embryos 15개

특이사항 : 경산돈



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)			
					2	4	8	Total (%)
210916	220		145	130 (99.60)				


### Embryo Transfer (27차)

재발확인일 : 21.11.10  
분만예정일 : 22.02.11

일자 : 2021.10.20      술자 : SH      보조 : DJJ  
수란돈 번호 : GY-1      체중 : 80~90 kg      생년 : 20/02/21  
배란상태 : 배란중      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 25차 수술

세포주 : 3PA #4 piglet fibroblast HR P9      이식된 배아 개수 : 153개  
10.20 Fusion embryos 153개

특이사항 : 경산돈, NTC 30개, 대장 문제



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)			
					2	4	8	Total (%)
211020	240		205	183 (89.21)	15	3	21 (70)	

### Embryo Transfer (28차)

재발확인일 : 21.12.01  
분만예정일 : 22.03.04

일자 : 2021.11.10      술자 : 크로넥스 홍진기      보조 : DJJ  
수란돈 번호 : H2-10      체중 : 80~90 kg      생년 : 21/02/12  
배란상태 : 배란직후      난포 크기 : 8-10 mm      난포갯수 :  
자궁상태 : 경도양호      비고 : 크로넥스 26차 수술

세포주 : 3PA #4 piglet fibroblast HR P12      이식된 배아 개수 : 157개  
11.10 Fusion embryos 120개 Non-fusion embryos 37개

특이사항 : 초산돈



NT Date	Egg Num.	MI rate (%)	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)			
					2	4	8	Total (%)
211110	180		157	120 (76.43)				

그림. SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포의 Embryo Transfer



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

### Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 *in vitro* 질환모델 구축

- Optogenetic-FGFr piPSCs를 공여세포주로서 SCNT를 수행시, 융합율 및 배아발달률이 현저히 낮은 문제 점을 해결하기 위해 섬유아세포로 분화시켜 SCNT하고자 하였음

No.	piPSC media (hESC media)	Fibroblast media	Days
1	DMEM/F12 + 20% KSR (100%)	DMEM high+ 10% FBS (0%)	For 3 days
2	DMEM/F12 + 20% KSR (75%)	DMEM high+ 10% FBS (25%)	For 3 days
3	DMEM/F12 + 20% KSR (50%)	DMEM high+ 10% FBS (50%)	For 3 days
4	DMEM/F12 + 20% KSR (25%)	DMEM high+ 10% FBS (75%)	For 3 days
5	DMEM/F12 + 20% KSR (0%)	DMEM high+ 10% FBS (100%)	~ 1 months

**\*\*\*Never passaging!!!  
Only change the media**

그림. Induction of fibroblast differentiation from Opto-FGFR1 piPSCs

- 배양 조건에 있어서 분화시 섬유아세포를 확보하기 위한, CM 조건, Non-CM 조건으로 비교 검증 실시함

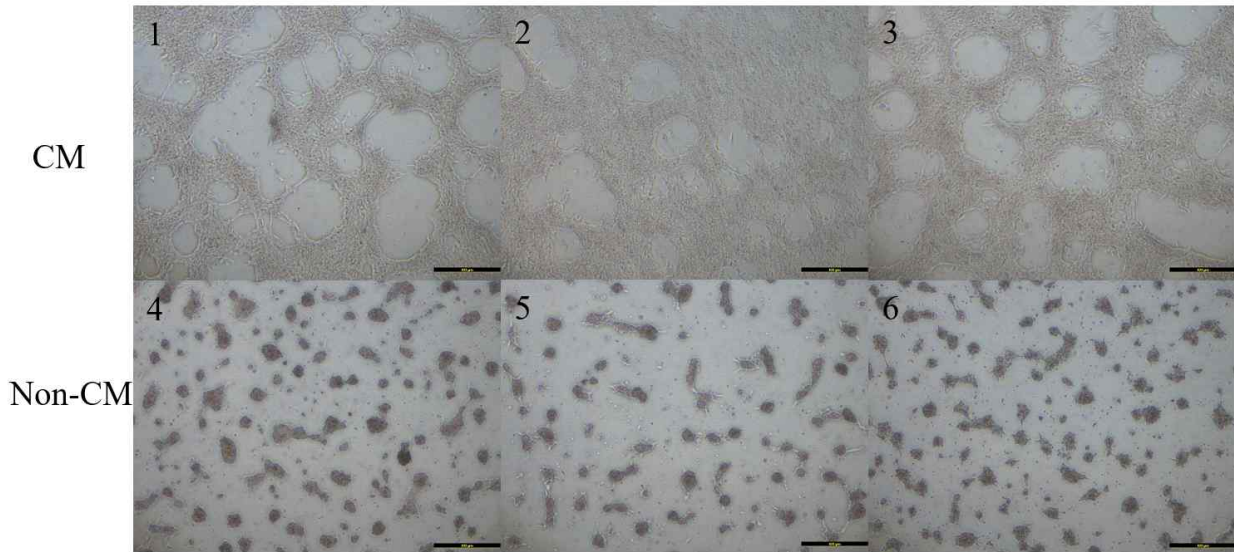


그림. Opto fibroblast P0 - Day 1

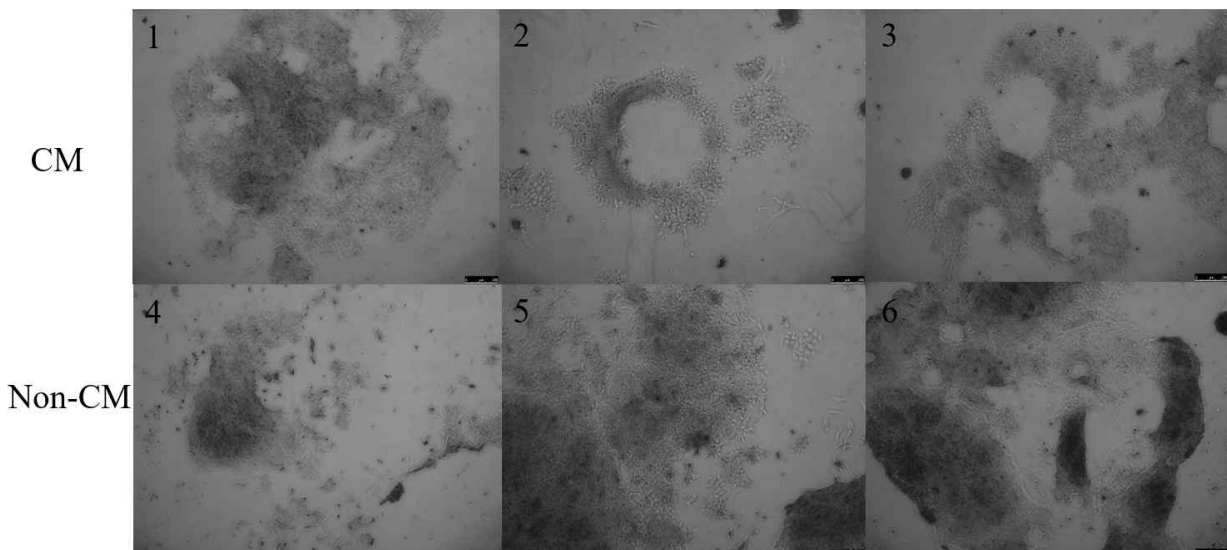


그림. Opto fibroblast P0 - Day 6

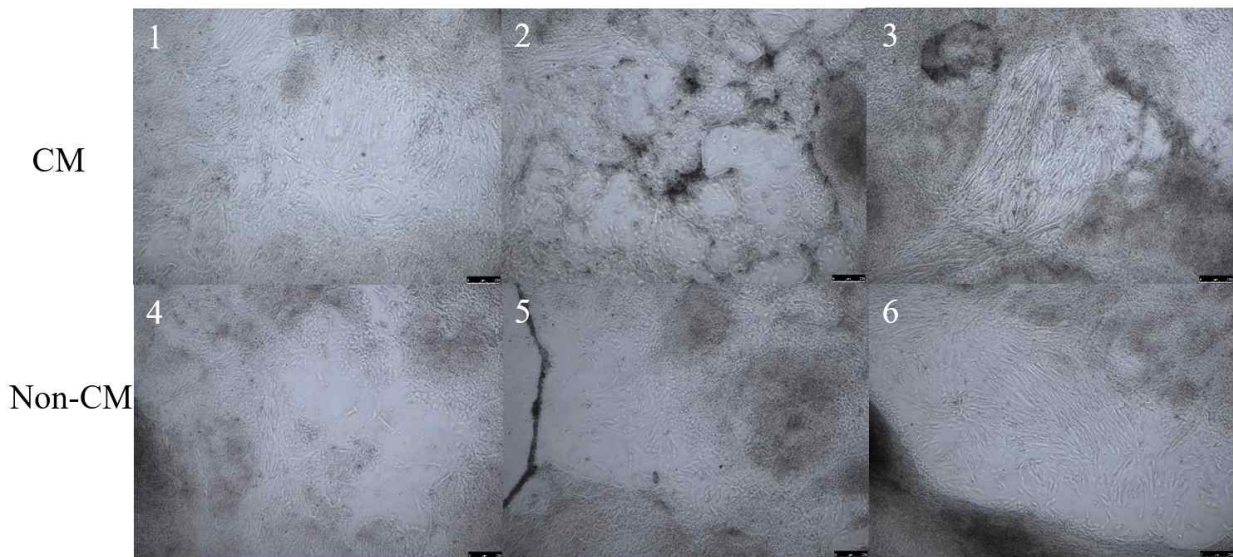
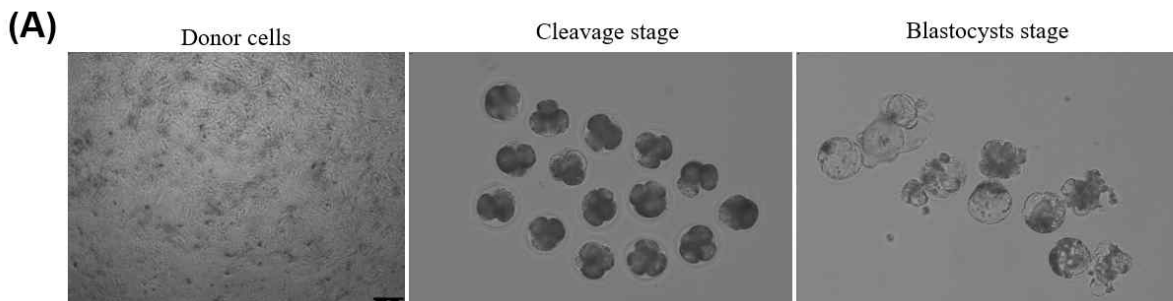


그림. Opto fibroblast P0 – Day 27

- 최대 Day 35 까지 계대 배양을 실시하지 않고, 지속적으로 배양을 통해 배양 조건이 충족하지 않는 piPSCs는 자연스럽게 제거가 되고, 그 중에서 섬유아세포로 분화된 세포들만 이용하였음
- 35일 배양 후 각 세포들은 계대 배양을 통해 유지가 되었고, 그 이후 SCNT를 실시한 뒤 *in vitro* 발달능을 평가하였음. 총 5회 실시 결과, SCNT 후 2일차 분할율은 48.86%이고, 7일차의 배반포 형성률은 8.4%를 기록했으며 낮은 quality의 배아가 생산되었음



(B)

Trial	Egg Num.	Enucleated	Fused (%)	No. of cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	BL form.	Cell line	
				2	4	8	Total (%)						
1	120	77	77	62 (80.5)	19	15	1	35 (56.5)	4 (6.45)	3 (4.84)	1 (1.61)	8 (12.9)	Opto-FGFR1 CM #3 P3
2	120	58	58	51 (87.9)	11	16	1	28 (54.9)	4 (7.84)			4 (7.84)	Opto-FGFR1 CM #3 P4
3	120	80	80	62 (77.5)	12	15	2	29 (46.8)	1 (1.6)	4 (6.5)	0 (0.0)	5 (8.1)	Opto-FGFR1 #1 P2
4	120	85	85	47 (78.3)	6	7	2	15 (31.9)	0	0	0	0	Opto-FGFR1 #1 P2
5	120	77	77	59 (76.6)	17	13	2	29 (54.2)	5 (8.5)	2 (3.4)	1 (1.7)	8 (13.6)	Opto-FGFR1 #3 P4

그림. Opto-fibroblast 이용한 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가

- 따라서, 각각 해당 연차별로 (2019, 2020년도) Optogenetic-FGFR piPSCs를 활용하여 흑색종 모델 돼지를 생산하기에는 번거로움과 효율적인 측면에서 많은 어려움이 있음. 2종 이상의 종양모델 개발 목표 달성을 위해 Braf 및 Ras 두 개의 종양 모델 개발로 집중하고, 협동기관의 실용화 연계를 위하여 크로넥스 보유품종인 제주재래돼지 형질전환 세포주 개발 연구내용으로 대체하고자 변경을 요청하였음





## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환세포주 수립 및 종양모델 활용

### 연구내용1

제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립

#### ▣ 초대 배양을 통한 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립

- 제주 재래흑돼지는 성축의 체중이 100kg 미만의 돼지로 세계적으로 15종 정도로 알려져 있으나 실제 실험용으로 사용되는 종은 매우 제한적임
- 제주 재래흑돼지의 장점은 사람과 해부학적·생리학적(체중, 장기크기 및 형태, 치아 등)으로 매우 유사하며 임신기간이 짧고 다산으로 대량생산이 가능하며, 반려동물에 비해 윤리적 거부감이 작은 이점이 있음
- 제주 재래흑돼지를 이용한 사람질환 모델 재현을 통해 토종 돼지를 이용한 실험동물 활용 영역을 확대하고자 함
- 임신 50일령 제주 재래돼지에서 총 5두의 태아를 적출하였음
- 정상적인 형태로 체장이 약 7.5cm~9cm인 태아 4두를 이용하여 세포주 구축에 이용함
- 두부, 내장, 다리, 꼬리를 제거 후 초대배양을 실시하였음

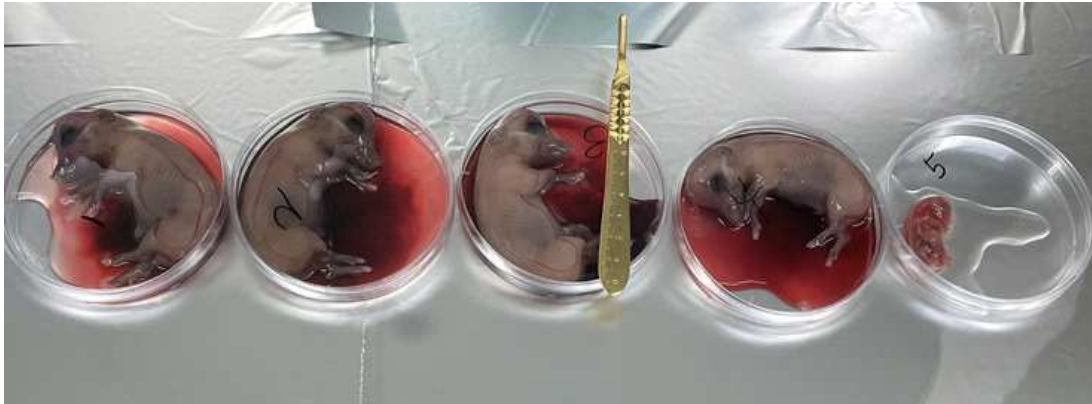
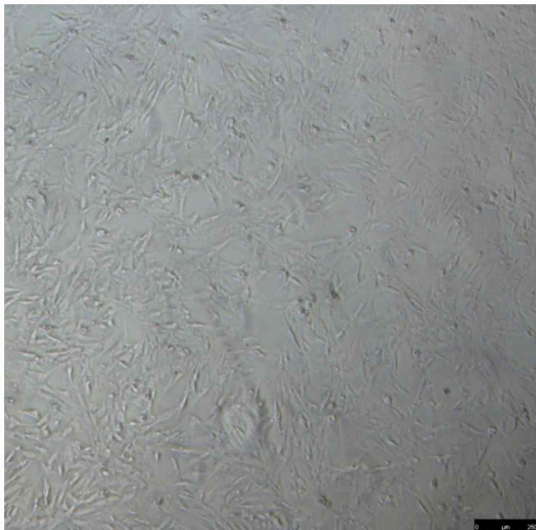


그림. 제주 재래돼지의 태아 적출

(a)



(b)

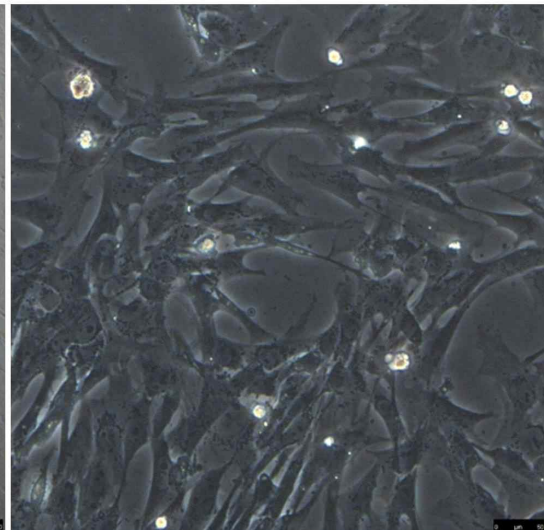


그림. 제주 재래돼지의 초대배양을 통한 세포주 구축, 50X (a), 200X (b).

■ 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 염색체 및 특성분석

- 제주 재래 흑돼지 태아 섬유아세포 (JNFCs)를 확보 후 추후 SCNT에 적용하기 위해 정상적인 핵형을 가지는지 분석이 필요함
- 핵형분석(Karyotyping) 결과, 4개의 세포주 모두 정상적인 핵형을 가지는 것으로 분석되었고, #1은 암컷, #2, 3, 4는 수컷으로 확인되었음

**REPORT OF CYTOGENETIC ANALYSIS**

검체명	#2 P1	접수	2021년 09월 06일
		보고	2021년 09월 11일
검체		의뢰처	중북대학교 수의과대학 발생생물공학lab(김미연)

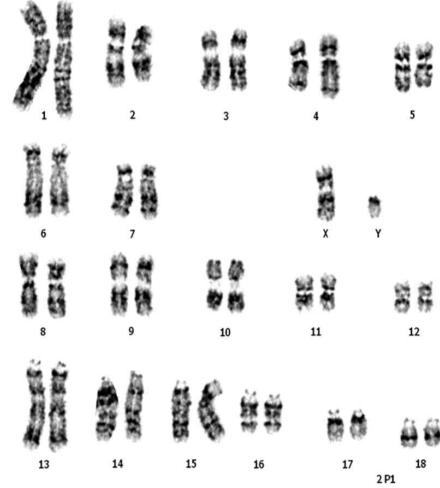
**Result**

Karyotype	38,XY	검사방법 (Processing)	GTG-Banding
관찰 세포 수 (Number of Cells Observed)			
염색체 수 측정 (counted)	20		
염색체 구조 분석 (Analyzed)	5		
분석 분식 (Karyogramed)	2		

**Interpretation**

20개의 중기핵판을 관찰하여 38,XY 핵형을 얻었습니다.  
반복되는 개수 혹은 구조 이상은 관찰되지 않았습니다.

※ 현미경 하에서 관찰하기 어려운 미세한 염색체 이상이나 빈도가 지극히 낮은 모자이시즘의 경우 발견되지 않을 수 있으며, 염색체 구조 이상의 표기가 실재와 다를 수 있습니다.



**REPORT OF CYTOGENETIC ANALYSIS**

검체명	#1 P1	접수	2021년 09월 06일
		보고	2021년 09월 11일
검체		의뢰처	중북대학교 수의과대학 발생생물공학lab(김미연)

**Result**

Karyotype	38,XX	검사방법 (Processing)	GTG-Banding
관찰 세포 수 (Number of Cells Observed)			
염색체 수 측정 (counted)	20		
염색체 구조 분석 (Analyzed)	5		
분석 분식 (Karyogramed)	2		

**Interpretation**

20개의 중기핵판을 관찰하여 38,XX 핵형을 얻었습니다.  
반복되는 개수 혹은 구조 이상은 관찰되지 않았습니다.

※ 현미경 하에서 관찰하기 어려운 미세한 염색체 이상이나 빈도가 지극히 낮은 모자이시즘의 경우 발견되지 않을 수 있으며, 염색체 구조 이상의 표기가 실재와 다를 수 있습니다.



그림. #1 및 #2 태아 섬유아세포의 핵형 분석 및 성별확인

- 초대배양을 통해 확보된 태아섬유아세포의 증식력을 검토함
- 세포주 Doubling time 분석을 통한 증식 능력이 우수한 세포주 선별하여 추후 흑색종 기반 세포주를 제작하려고 함

<세포 Doubling time 분석 방법>

1. 총  $13.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>를 1ml/well의 배양 배지와 함께 12-well 조직 배양 플레이트(3중)에 플레이트링하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24, 48, 72 및 96시간 동안 인큐베이션 한다.

3. 각 시점에서, 세포를 2ml/well를 PBS 1X로 1회 세척하고, 0.5ml/웰 트립신/EDTA로 분리하고, 완전 배양 배지에서 1.5ml/샘플에 재현탁시키고, 혈구계산기를 이용하여 계수한다.

3. 테스트한 모든 샘플에 대해 세 가지 다른 세포 수 값을 얻음. (각각 M, T, TS 및 TE).

- 분석 결과 암컷인 #1 세포주가 가장 증식 능력이 좋았고, 수컷 개체 중 #3, 4 세포주는 같은 증식력을

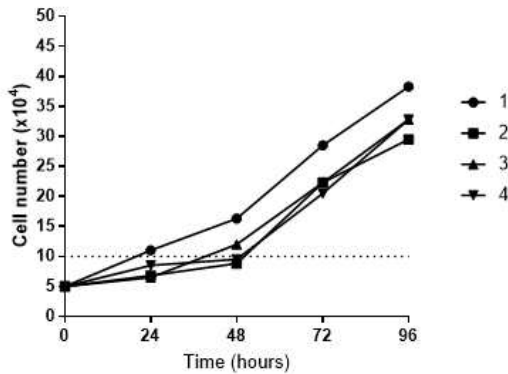
보였음. 따라서, 추후 사용될 세포주는 제주 재래 섬유아세포주 #1과 #3으로 제작될 예정임

표. Cell concentrations for various cell lines according to incubation time

Cell line	Incubation time (hours)				
	0	24	48	72	96
1 (Female)	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$11 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$16.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$28.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$38.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$
2 (Male)	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$6.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$8.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$22.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$29.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$
3 (Male)	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$6.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$12 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$22.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$32.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$
4 (Male)	$5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$8.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$9.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$20.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$	$32.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$

(a)

(b)



Cell line	Doubling time (hours)
1 (Female)	32.7
2 (Male)	37.5
3 (Male)	35.4
4 (Male)	35.4

그림. Cell growth curves (a) and doubling times for different cell lines (B)

- 구축된 세포주의 동결 보존을 통한 반영구적 유전자원 확보체계 구축함
- 구축된 세포를 이용하여 흑색종 형질전환 세포주를 구축하였음

표. Information of established fetal fibroblast cell lines derived from Jeju-island native pigs

Cell lines	Sex	Passaging	etc.
No.1	F (♀)	More than 2	MR : P0 (5 vials)
No.2	M (♂)	More than 2	HR : P0 (3 vials)
No.3	M (♂)	More than 2	MR : P0 (5 vials)
No.4	M (♂)	More than 2	HR : P0 (3 vials)

### 연구내용3

Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 암수 종양모델 세포주 개발 및 활용

#### ▣ 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립

- 암(♀), 수(♂) 각 세포에 각각 RAS 및 BRAF 기반 흑색종 유발 시스템을 트랜스포존 시스템을 활용해 도입하여 다음 세포주를 제작함
  - > Jeju pig ♀-SBone-DSH-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (암컷 RAS 기반 흑색종 모델)
  - > Jeju pig ♀-SBone-DppB-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (암컷 BRAF 기반 흑색종 모델)
  - > Jeju pig ♂-SBone-DSH-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (수컷 RAS 기반 흑색종 모델)
  - > Jeju pig ♂-SBone-DppB-pigTYR-CreER<sup>T2</sup> (수컷 BRAF 기반 흑색종 모델)

Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



Braf 기반 흑색종 돼지 모델 시스템

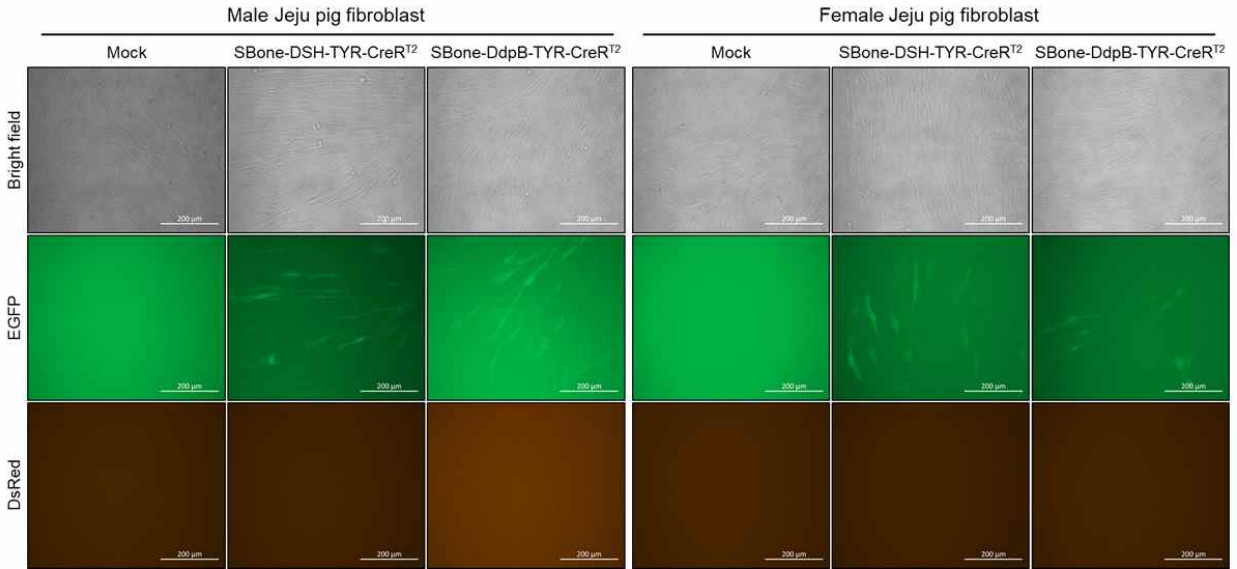
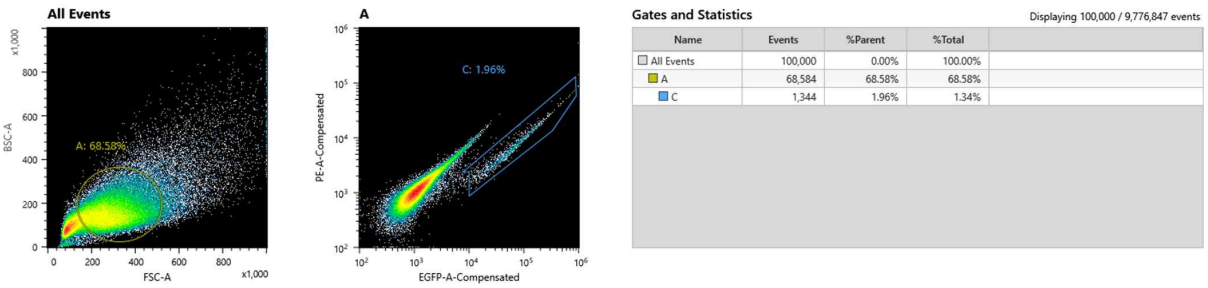


그림. 제주 재래돼지 태아 세포주 암(♀, 수(♂) 각 세포에 각각 RAS 및 BRAF 기반 흑색종 유발 시스템 도입

- 각각 세포주들의 SCNT시 효율성을 높이기 위해서, 유세포 분리기를 이용하여 EGFP positive한 세포주들만 sorting하여 배양 진행하였음
- Oncogene이 삽입된 #3 (수컷) 제주 재래돼지 태아 세포주의 EGFP positive가 RAS기반 세포주는 약 1.96%, BRAF기반 세포주는 약 1.69%로 나타남

(A)



(B)

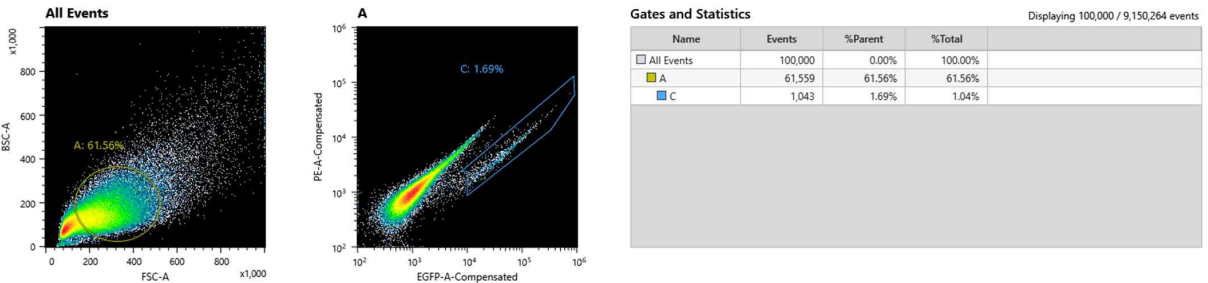


그림. Oncogene이 삽입된 #3 (수컷) 제주 재래돼지 태아 세포주의 sorting. (A) RAS기반 시스템 도입 세포주, (B) BRAF 기반 시스템 도입 세포주

- 유세포 분리기를 이용하여 sorting 진행 후 배양을 통해서 각각 세포주들의 EGFP 발현을 확인하였음. 추후 SCNT를 진행하여 *in vitro* 발달능 평가 및 대리모돈에 배아식 진행할 예정임

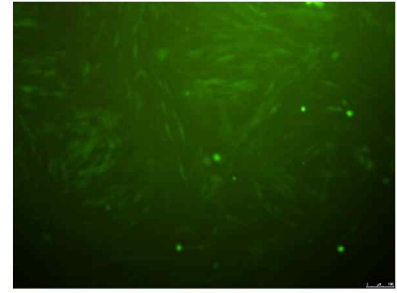
**Jeju #1-SBone-DSH-pigTYR-CreERT2 (Hras)**



(x50)



(x100)

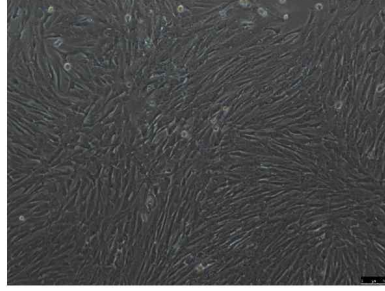


(x100)

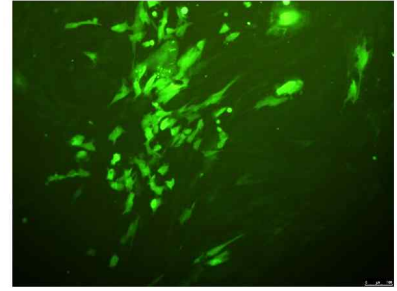
**Jeju #1-SBone-Dppb-pigTYR-CreERT2 (Braf)**



(x50)



(x100)



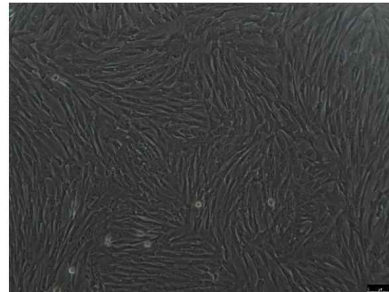
(x100)

그림. Oncogene이 삽입된 #1 (암컷) 제주 재래돼지 태아 세포주의 Sorting 후 배양 Day 5의 모습

**Jeju #3-SBone-DSH-pigTYR-CreERT2 (Hras)**



(x50)



(x100)

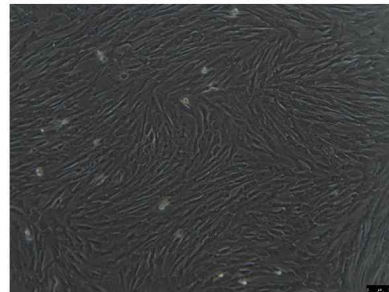


(x100)

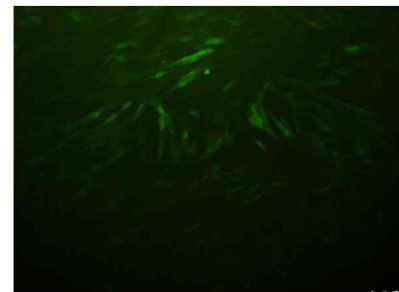
**Jeju #3-SBone-Dppb-pigTYR-CreERT2 (Braf)**



(x50)



(x100)



(x100)

그림. Oncogene이 삽입된 #3 (수컷) 제주 재래돼지 태아 세포주의 Sorting 후 배양 Day 5의 모습



## 제2 협동과제

(주)크로넥스

전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축

**세부목표 : 전임상 흑색종 질환모델 중대동물 유효성 검증**

**연구내용1** 인간질환 모델 중대동물 기반 비임상 평가를 위한 실용화 전략 수립 및 구축

### ▣ 비임상 시험 평가를 위한 종양 유발 중대동물 기원 primary 세포주 구축

- 인체 조직에서 primary cell을 배양하여 연구를 수행하는 이유는 primary cell culture의 상태가 in vivo의 환경과 유사하게 세포가 생물학적 특성을 지닐 수 있다는 점에서 Living system에서 세포의 역할에 대하여 많은 연구 결과를 얻어 낼 수 있는 장점이 있어, Primary cell culture을 이용한 연구가 많이 진행되고 있음
- primary cell을 이용하여 연구를 진행하는 경우, 체외에서 전 임상 및 internal 혹은 intracellular communication에 대한 연구에 매우 유용하게 이용되는 이유는 primary cell이 조직에서 보여주는 생물학적 특성을 대변하는 역할을 하기 때문에 in vivo에서 해결하지 못하는 다양한 연구를 수행하는 점에서 매우 유용하게 이용되기 때문에 특히 암 발생 원인 규명, Parkinson's disease, 만성 질환 등의 병태 생리 기전규명을 위한 연구 소재로 이용되고 있음
- primary cell은 대부분 정상 염색체를 갖고 있기 때문에 유전체 변이 분석에 이용될 수 없지만, 후생 유전체학 연구에 이용될 수 있기 때문에 primary cell의 활용에 있어서 매우 중요한 역할을 할 수 있음.
- 본 연구진은 생산된 종양 유발 동물로의 지방, 심장, 신장, 대장, 소장, 폐, 근육, 피부, 위, 흉선, 기도에서 세포를 분리하여 Primary cell line을 구축함
- 간, 뼈, 뇌, 눈, 췌장, 혈관 등에서 분리 된 Primary cell line의 구축을 진행 중에 있음

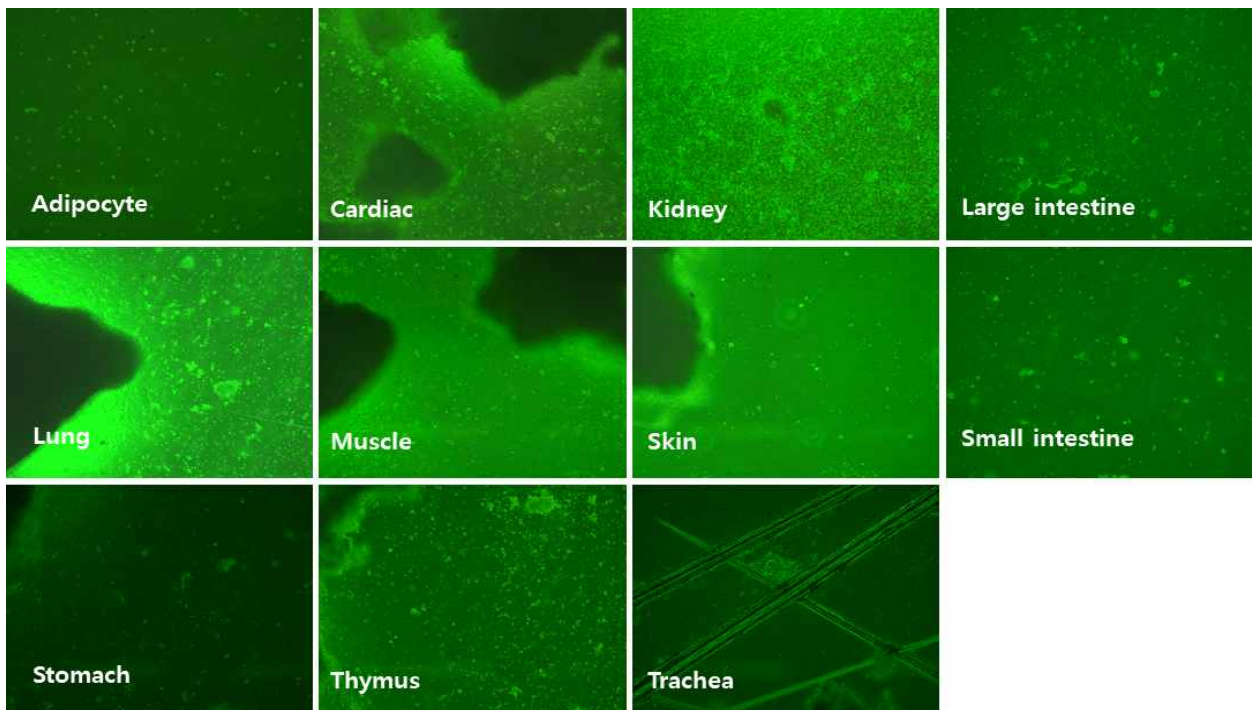


그림. Primary cell line 구축

**▣ 비임상 시험 평가를 위한 돼지 유래 Primary 세포주 개발 및 제품화**

- 돼지는 영장류 외에 유전적, 대사적, 장기 구조 및 생리적 특성이 인간과 가장 유사한종으로 임상시험과 이종 장기이식에 활용되어 유용성을 입증받음
- CRONEX M-pig(제주 재래 흑돼지)은 일반 돼지보다 크기가 작아 인체 구조와 더 유사하며 자생종으로 나고야 의정서의 영향을 받지 않아 세포 은행과 바이오 소재 개발에 최적의 종임.
- CRONEX M-pig 태아(출산 7일전)에서 조직 및 장기 별로 primary cell을 분리/배양하고, 대량으로 생산한 후 액체질소 보관을 통해 세포주 은행을 구축함
- 시장 수요와 개발 활용도가 높은 근육, 피부, 지방, 혈관조직에서 분리하고 배양 한 primary cell line의 사업화를 진행하고 있음



그림. 세포주 개발 및 제품화 과정

**▣ 형질전환 동물 생산용 대리모의 개량 및 제품화**

- 현재 대리모로 사용 중인 제주 재래흑돼지의 경우 난소가 일반 돼지에 비해 등쪽(dorsal)으로 깊게 자리하고 있어 수정란 이식을 위한 난소의 탐색이나 복강 밖으로 노출 시 어려움이 있음
- 대리모돈과 자돈의 품종이 달라 유두가 모유 섭취에 적합한 크기가 아닐 경우 모유 섭취가 어려워 영양 결핍이 나타나고 생존률이 낮아짐. 따라서, 태어난 자돈의 효율적인 관리를 위한 대리모돈의 개량 및 대체 사양 관리 기법 개발이 필요함

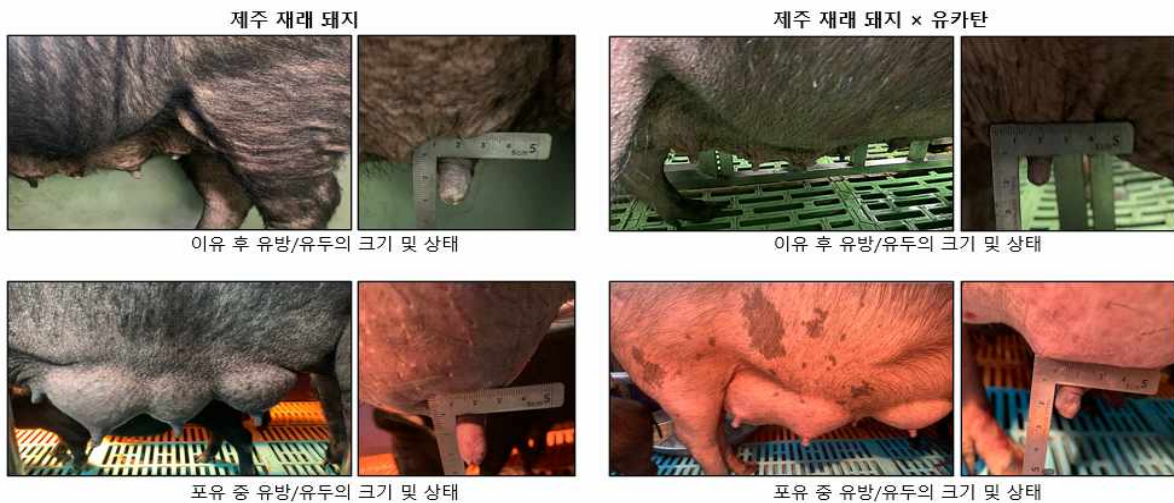


그림. 개량 대리모돈의 유방/유두 크기 및 상태

- 제주 재래흑돼지와 유카탄종의 자연교배를 통해 생산된 F1세대 모돈의 경우 유두 크기가 유카탄 자돈이

포유 가능한 크기로 작아진 것을 확인함

- 수정란 이식 시술 편의성 및 임신 성공률 향상, 생산된 자돈을 효율적으로 케어하기 위하여 제주 재래 흑돼지와 유칸탄종을 자연교배하여 모돈의 개량을 진행하였고 제품화 축군을 구축함.
- 또한, 태어난 자돈 중 포유불량 개체(위축 또는 허약 개체)의 효과적 관리를 위해 산양유를 이용한 인공 포유 방법을 개발하여 구축함
- 주요 거래처: 생명공학연구원, 제주대학교, 충북대학교, 미래셀바이오 등

**▣ 비임상 약물 침투 및 투과 시험 평가를 Franz Cells Membrane 개발 및 생산**

- Franz cells membrane은 시험관 내 약물 침투 및 투과를 평가하기 위하여 널리 사용되는 평가 시료임
- 실험동물의 피부로부터 다양한 규격의 Franz cell membrane을 규격화 및 표준화 작업을 거쳐 시제품을 개발하였고 현재 상품화(품명:CN-FCT-skin0) 된 제품의 판매를 진행하고 있음



그림. Franz cell Membrane 제품

- Franz cell Membrane 제품 규격.

구 분	Specification
Resource	CRONEX M-pig
size	[1cm x 1cm] 부터0.5cm 단위(최대 6cm)
Thickness	400~1200um
Storage	-80 C

- 주요 거래처 및 2021년 매출 현황: (단위: 원)

거래처	공급가액	부가세	합계
(주)블루코어컴퍼니	2,200,000	220,000	2,420,000
(주)주빅	1,500,000	150,000	1,650,000
가천대학교 산학협력단	8,420,000	842,000	9,262,000
내츄럴엔도텍	1,500,000	150,000	1,650,000
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단	4,500,000	450,000	4,950,000
디지털서울오에이	2,250,000	225,000	2,475,000
엘지전자(주)	6,000,000	600,000	6,600,000
제일 헬스사이언스 주식회사	1,500,000	150,000	1,650,000
제일약품	6,000,000	600,000	6,600,000
주식회사 엘앤씨바이오	16,000,000	1,600,000	17,600,000
한미약품(주)	3,000,000	300,000	3,300,000
총합계	52,870,000	5,287,000	58,157,000



▣ 유효성 검증 및 후대 검증을 위한 종양 유발 자돈의 생산 및 육종

- 생산된 암유발 형질전환 동물의 유효성 검증 및 후대 검증을 위하여 계통 라인 구축하고 있음
- 기생산된 종양유발 모델(수컷)과 크로넥스의 미니피그를 교배하여 heterogeneous type의 자손을 얻고 형매교배 및 근친교배를 통하여 후대 검증을 위한 종양모델라인 계통을 구축 중에 있음
- 결과로서 F1 세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자)는 총 18마리의 자손으로, 암컷 7마리와 수컷 11마리가 생산되었음
- F1 세대 간 형매 교배를 통하여 총 21두의 자손으로 암컷 11마리와 수컷 10마리의 F2 세대를 생산하였음
- F2 세대 간 형매 교배를 통하여 총 5두의 자손으로 암컷 3마리와 수컷 2마리를 생산하였고 암컷은 생후 1일 폐사(미숙개체, 생시 체중 0.3kg)하였음
- 종양 유발 유전자의 계대전달 여부를 확인하기 위해 각 개체의 조직에서 gDNA를 추출하여 PCR 분석하였음, 그 결과 F1 세대 GY-2, 3, 4 개체에서 EGFP와 종양 유발 유전자인 Hras<sup>V12</sup>의 삽입이 확인 함, 암컷 한 마리(GY-1)에서는 확인되지 않았음. 종양 유발 유전자가 삽입된 수컷 세 마리에서 아버지 개체(Yucatan)와 어깨 부분에 비슷한 표현형을 가지는 것을 확인함
- 추가로 다음 세대에서도 계대전달을 확인하기 위해 GY-2, 3, 4 × GY-1의 교배를 통해서 F2 세대를 생산하였음. 총 5마리가 태어났으며 수컷 세 마리(GY2-1, 2, 3)와 암컷 두 마리(GY2-4, 5)가 태어났음
- F2 세대에서도 종양 유발 유전자의 계대전달을 확인하기 위해 형매 교배(부:GY-2 x 모:GY-1)로 생산 자돈 각 개체의 조직에서 gDNA를 추출하여 PCR 분석하였음. 그 결과 이전 F1 세대와는 다르게 종양 유발 유전자가 삽입된 것을 확인하지 못함. 현재 다른 F2 세대 및 F3 자손에서 분석 중에 있음
- 현재 총 7회 총 43두의 자돈이 생산(male 23두, female 20두)이 완료되었으며, 종양모델 동물의 비임상 상용화 위하여 육종 중에 있음

번호	모돈	웅돈	출산일	출산 두수	성별	세대
1	E7-32	CY-5	2020-02-21	4	Male:3, Female:1	F1
2	E7-32		2020-08-07	8	Male:4, Female:4	
3	F6-27		2020-10-17	6	Male:4, Female:2	
4	GY-1	GY-2	2020-12-26	5	Male:3, Female:2	F2
5	GY-9	GY-5	2021-05-18	6	Male:3, Female:3	
6	GY-1	G5-34	2021-08-20	10	Male:4, Female:6	F3
7	GY2-1	GY2-4	2021-11-29	5	Male:2, Female:3	
		합	계	43	Male:23, Female:20	

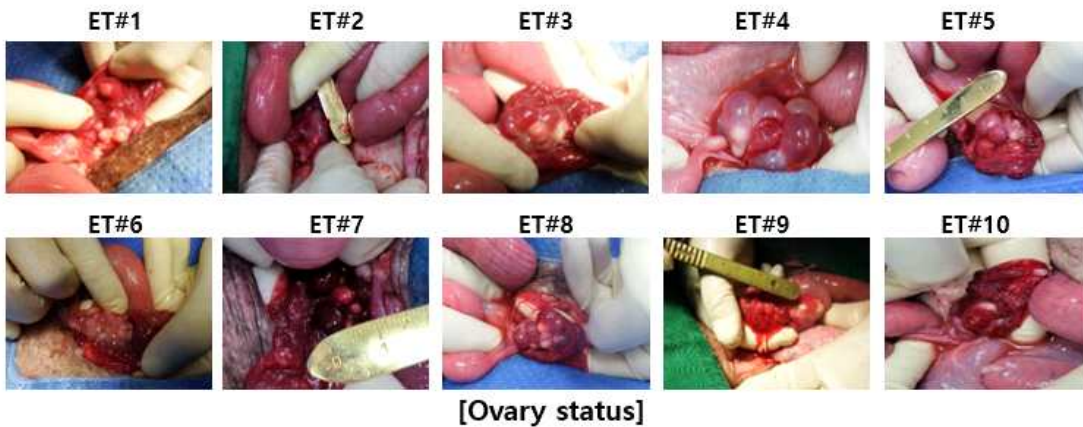


그림. 종양 유발 동물의 상용화를 위한 축군 조성

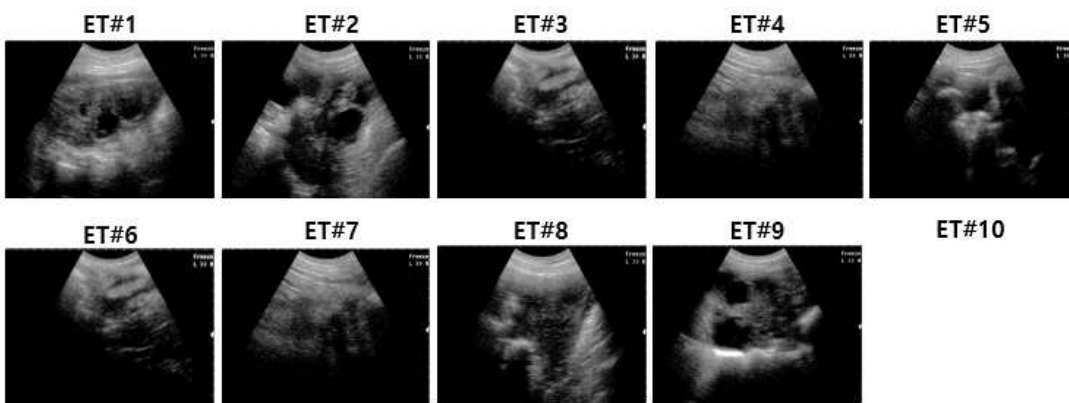
**▣ 종양 유발 중대 동물 생산을 위한 수정란 이식**

- 종양 유발 중대동물모델 생산을 위한 수정란 이식을 실시 함
- 종양 유발 중대동물모델의 자돈 생산을 위하여 대리모돈은 개발된 프로그램을 적용하여 영양인자 분석을 수행하였고 경산돈 위주로 선발 함. 월령은 16~24개월령, 체중 90~100kg로 영양 및 자돈 생산 성적이 우수한 개체를 선별하여 수정란 이식을 수행함
- 현재까지 11회 수정란 이식을 시행하였음

No.	Surrogate mother					
	이식일	ID	Parity	난포상태	ET site	임신유무
1	2021-01-13	E6-24	초산	배란후(중기)	Lt	임신
2	2021-03-19	F6-26	초산	배란후(중기)	Lt	비임신
3	2021-04-01	F12-27	초산	배란전(초기)	Lt	임신
4	2021-05-07	20-198	초산	배란전(후기)	Lt	임신
5	2021-05-13	E7-32	경산	배란후(초기)	Lt	비임신
6	2021-05-26	20-107	초산	배란전(초기)	Lt	비임신
7	2021-06-23	G1-4	초산	배란후(초기)	Lt	비임신
8	2021-09-09	F10-12	초산	배란후(초기)	Lt	비임신
9	2021-09-16	D-25	경산	배란전(후기)	Lt	비임신
10	2021-10-20	GY-1	경산	배란후(중기)	Lt	임신
11	2021-11-10	H2-10	초산	배란후(초기)	Lt	



[Ovary status]



[Ultrasound imaging]

그림. 종양 유발 중대동물 생산을 위한 수정란 이식 현황

**▣ 종양 유발 중대 동물 생산의 생산 및 관리**

- 흑색종 자연 발생 돼지 유래 세포주를 활용한 흑색종 질환모델 돼지 생산 1두
  - 2021.01.13. 이식 후 2021.05.14.(123일차)에 1두 생산
  - 양수 배출 후 출산이 진행 되지 않아 제왕절개 시행하였으나 사산 된 상태로 확인됨
  - 개체를 회수하여 관련 분석 진행\_충북대 현상환 교수 연구진 수행
- Cloud SB-DppB tpTYR-CreER(SB-DppB) 세포를 이용한 흑색종 모델돼지 생산 및 사양관리 함

- 2020.12.11 이식 후 2021.04.07(117일차)에 총 5마리 산자를 생산하고 자돈 사양 관리 수행
- 사양 관리 중 생산된 자돈의 유효성 검증 수행\_충북대 현상환 교수 연구진 수행
- SB-3PA-DPB 흑색종 모델돼지 생산 및 사양관리
- 2021.21.04.01 이식 후 2021.08.03 (125일차) SB-3PA-DPB 흑색종 모델 돼지 7마리를 생산하였으며, 2마리는 출산 직후 폐사함
- 사양 관리 중 생산된 자돈의 유효성 검증 수행\_충북대 현상환 교수 연구진 수행

### ▣형질전환 생산을 위한 출산 전/후 대리모 관리 및 자돈관리 매뉴얼 확립

- 출산 전/후 대리모 관리

1. 출산 전 준비사항 및 출산 징후 관찰

- 출산 전 준비사항 - 출산예정일 2~3일전 보온등 설치 및 \*스마트캠 설치
  - \*스마트캠- 대리모 행동 관찰용&외음부 변화 및 양수 터짐 확인 관찰용 -카메라 2대 설치
- 출산 징후 관찰 - 유즙분비상태 확인/ 행동변화(통증시-안절부절)/ 식욕감퇴/ 잦은 배변활동/ 잦은 음수 섭취/ 외음부변화상태 확인

2. 출산 후 조치사항 및 모돈 관리

- 출산 후 조치사항 - 태반 배출 확인 후 옥시토신 3~4ml 투여
  - 모돈 체중에 따라 항생제(바이트릴)&대사촉진제(카토살) 처방
- 출산 후 모돈 관리 - 유즙분비상태 확인, 식욕상태 확인, 포유거부 행동확인(공격성 확인)

3. 분만 지연시 조치사항

- 출산예정일 일주일 경과 및 양수가 터지고 2시간이상 경과시 - 분만유도제 투여(루텔라이즈)
- 1~2두 분만후 분만 간격이 30분이상 지연시(태반 미배출 상태시) 초음파 장비로 태아 유/무 확인 - 자궁수축제 투여(옥시토신)
- 옥시토신 투여 후 20~30분 경과 시에도 분만이 지연되면, 손 소독 후 윤활제를 발라 외음부에 넣어 태아를無理하게 당기지 말고 견인진행.

- 출산 전/후 자돈 관리

1. 출생 전 준비사항

- 준비 용품: 카메라, 저울(자돈 체중 측정용), 텃줄 클램프, 김타올&수건, Tray(자돈 사이즈), 수술도구(텃줄 샘플링시 필요도구)
- 준비 약품: 포도당 주사액(5%), 비강용 가나마이신, 바이트릴 자돈용(경구용), 식염수
- 인공포유 진행시 준비사항: 대용유(골드맘마), 초유밀, 비오타민, 급이그릇 및 젖병, 전기포트, \*초유 확보 필요 (출산모돈-착유진행/냉동보관 필요)\*

2. 출생 후 조치방법

- 김타올&수건으로 자돈 외부 및 구강 클리닝(체온 유지 필요 및 이물질 제거)
- 텃줄 클램프를 이용하여, 텃줄 봉합 후 텃줄 샘플링 진행
- 자돈을 Tray에 넣고 저울을 이용하여, 무게(체중)측정
- 비강용 가나마이신, 바이트릴 자돈용(경구용) 처치
- 회복 후 초유 섭취 확인 (초유 섭취 불가시 확보해둔 초유 강제 급이)

- 자돈 포유상태 확인 및 인공포유 진행 방법

1. 포유 상태 확인

- 자가포유 활동 시 젖을 오래 물고 스스로 젖 마사지를 하여 섭취 여부 확인/ 자가포유 활동은 관찰되나

젖을 오래 물지 못하며, 자가 포유 능력 떨어질 시 지속적인 포유 유도 및 포유 유도시 자돈 자세 보정 필요 (자가포유 활동은 활발하나 모유 섭취량이 부족해 보일 시 추가적으로 대용유 급이- 케이지내 급이그릇 비치하여 자가 섭취 유도)

2. 인공포유 진행 방법: 자가 포유 능력 불가 및 포유 유도 시에도 모유 섭취 불가 시 진행

일령	급이시간(급이횟수)	급이사료	사료급이량(1일)
1~3일령	2시간 간격 (12번)	초유	120~360ml
3~7일령(1주차)	2~3시간 간격 (8~12번)	대용유 초유밀1/2 (1일 4~6포) 비오타민1/2 (1일 1포)	체중100g 당 혼합대용유 6ml
7~14일령(2주차)	3시간 간격 (8번)	대용유 초유밀1/2 (1일 4포) 비오타민1/2 (1일 1포)	체중100g 당 혼합대용유 6~7ml
14~21일령(3주차)	3~4시간 간격 (6~8번)	대용유 + 자돈사료2호(갈아서 분유에 극소량혼합) 초유밀1/2 (1일 3~4포) 비오타민1/2 (1일 1포)	체중100g 당 혼합대용유 7ml 자돈사료 입질 시작
22~28일령(4주차)	주간 4시간 간격 (4번) 야간 급이 6~8시간 간격(1~2번)	대용유 + 자돈사료2호	1:1 비율로 혼합 급이
29일령~	주간(오전/점심/오후-3번) 야간 급이 중지	자돈사료 2호	200g

• 백신접종프로그램

3일령	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
철분제 /바이코кс	PRRS		PCV /MG		AP (1차)		AP (1차)		ER /HC

• 백신 제품 목록 및 접종량

백신 종류	제품명	제조회사	접종량
PRRS	베링거PRRS	베링거인겔하임	1 mL
써코+마이코	PCV M하이오	한국MSD	2 mL
흥막폐렴	헤모백	베타코리아	2 mL
단콜	돼지열병단독	코미팜	1 mL

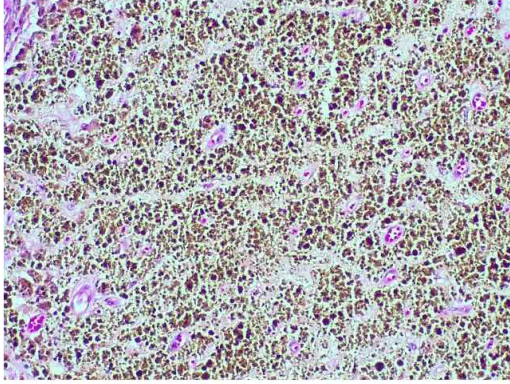
**연구내용3**

**모델 중대동물의 흑색종 조직병리 및 분자병리학적 검증**

**■ 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체의 조직병리 및 분자병리학적 검증**

- 흑색종 유발 시스템을 도입하여 형질전환 세포주를 수립하고, 수립된 세포주가 정상적으로 작동한 뒤 형성된 종양이 어떤 종류인지 판단하는 것은 중요함
- 흑색종 모델 동물의 개발 및 흑색종 유도 후 발생한 종양에 대한 유효성 검증에 있어서, 자연 발생한 흑색종 조직을 활용한다면, 흑색종 모델 동물에서 발생한 종양을 비교 검증할 수 있는 대조군이 될 수 있음
- 따라서, 자연발생 돼지 유래 흑색종 조직을 통해 positive control이 될 수 있는 조직병리학적 검증을 시행함

(A)



(B)

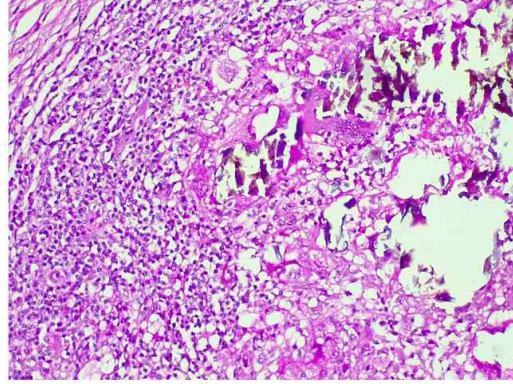


그림. Tumor x200. (A) Melanin세포 색소침착, (B) Neutrophil 침윤 및 세포의 이형성 관찰

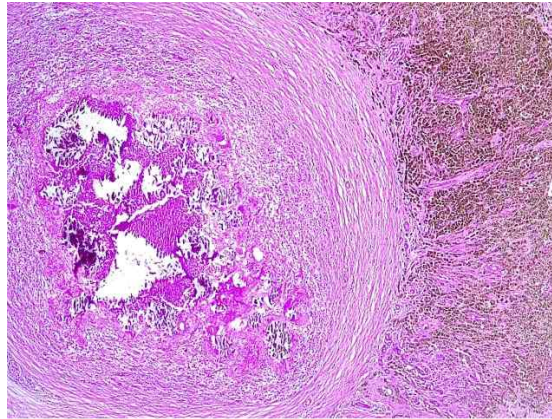


그림. Melanocytoma with multiple pyogranuloma x40

- 조직병리학적 검사 결과, Melanin 세포의 색소침착 및 Neutrophil 침윤과 다수의 debris 및 calcium 침착, giant cell 분포 등 전형적인 흑색종 소견이 관찰되었음



## 제1 협동과제

## 아부다비 생명공학연구원

### 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발

#### 세부목표 : Ras 기반 흑색종 모델건 생산

#### 연구내용1

개량된 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석

#### ▣ 개 흑색종 모델 생산을 위해 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석

- a. F-RMCE 재조합 유도시스템을 도입한 RAS 유전자 기반 형질전환 세포주를 사용하여 흑색종 모델 생산
- 위탁 연구기관인 고려대학교와 3차년도에 공동으로 확립한, fetus 유래 F-RMCE 재조합 유도시스템이 도입한 섬유아세포를 확립 후, 흑색종 모델을 생산할 수 있는 형질전환 핵공여원 세포를 제작할 수 있도록 확보된 세포 제공하였음
  - 이를 기반으로, 위탁 연구기관인 고려대학교에서 3년차에 확립한 FLP/FRT 재조합 유도 시스템 (Flippase Recombinase mediated cassette exchange system [F-RMCE])을 활용한 RAS 기반 흑색종 형질전환 세포주를 이용해 복제 배아를 생산하고 대리모에 이식함
  - 174개의 복제 배아를 만들고 총 10마리의 대리모에 이식함
  - 그 중 2마리의 대리모가 임신하였으며, 총 2마리의 산자가 태어남

표. Ras 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위해 수행된 복제란 이식

Subjected to SCNT	Fused & transferred (%)	No. of oocyte donor dog	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of sac	Cloning efficiency (%)
380	174 (52.9)	10	1	10.0	2	1.15

- 산자들의 유전자 도입율은 100%가 나타났고, FRT-CMV-LGL-DSH-WPRE-FRT3를 제작하여 Flippase vector 와 함께 도입하였음. 그 결과, Rosa26 locus에서 cassette exchanging 된 것을 genomic DNA PCR 분석을 통해 확인하였음 (제 2 위탁과제 내용 참조)

#### 연구내용2

#### 생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도

#### ▣ 생산된 RAS 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도

- 효과적으로 흑색종 모델건을 생산하기 위해서 새로운 흑색종 유발유전자 카세트인 SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA를 도입한 세포주로 체세포 핵이식을 수행하여 모델건을 생산함
- 태어난 2마리의 복제견 모두 UV 조명에서 표지 인자인 GFP의 발현이 확인됨



그림. 흑색종 모델 생산용 형질전환 복제건의 GFP 발현 확인

- GFP가 확인된 2두 모두 약 2~3주일령에서 종양으로 병변을 확인하였음. 종양병변은 육안상으로 확인할 수 있을 만큼 크게 나타났으며, 전이 및 증식이 매우 빠르게 관찰됨



그림. 흑색종 모델 생산용 형질전환 복제건 종양 병변 사진

- 종양병변이 관찰된 후, 1주일 내에 두 형질전환 복제건은 폐사하였음
- 생산된 종양 유발 동물의 조직병리학적 분석을 위해 미세바늘흡입검체 채취법 및 피부 조직에서 punch biopsy를 수행하여 병리조직학적 검사를 수행하였음

### 세부목표 : RAS 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가

#### 연구내용1

#### RAS 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

##### ▣ RAS 유전자 기반 모델건의 병리 조직학적 검증

- 미세바늘흡입검체를 통한 흡인물의 세포학적 검사 결과 피부에 있는 단핵구인 histiocyte가 주종으로 관찰되었음. 이를 토대로, 멜라닌결핍 흑색종 (amelanotic melanoma)으로 진단되었음
- 채취된 종양 조직에 대한 병리조직학적 검사 결과, necrosis와 phagocytic cell을 보이는 골수 유래 종양이 관찰되었으며, 핵의 다형성 및 유사분열은 존재하지만, 거대세포는 관찰되지 않았음. 또한, 속한 증식속도 및 일부에서 관찰되는 침습적인 성장 양상 등을 고려하였을 때, 악성 종양으로 판별됨

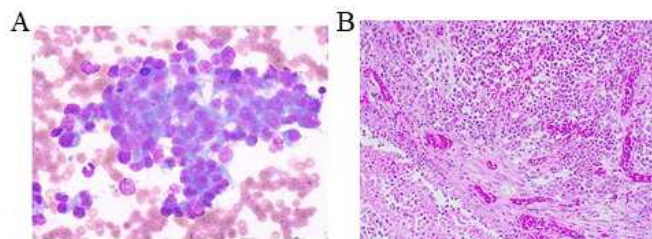


그림. 생산된 형질전환 모델건의 종양 세포학적 검사 (A) 및 조직 병리학적 분석 (B)

- 면역조직화학염색 (immunohistochemistry)결과 melanoma marker인 Melan A에는 음성 반응을 보였으나, melanocyte의 핵 내에 발현되는 SOX10에는 양성 반응을 보였음. 또한, 조직 병리학적 분석결과 멜라닌의 침착은 확인되지 않았음

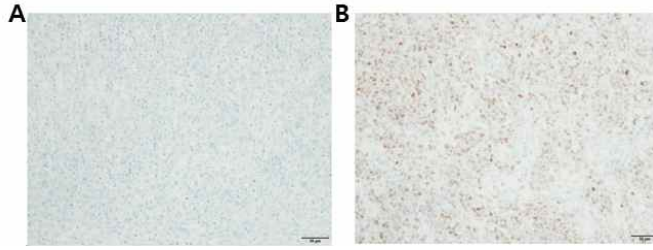


그림. 생산된 형질전환 모델건의 Melan A (A) 및 SOX10 (B) 면역조직화학검사

- 또한, 본 형질전환 복제건에서는, 부검 결과 내부장기로의 전이는 발견되지 않았음. 이에, 멜라닌결핍 흑색종 (amelanotic melanoma)으로 판단됨
- 본 결과에 대한 검증을 위하여, 추가적으로 196개의 복제 배아를 만들고 총 6마리에 이식을 하였으며, 현재 임신유지 상태에 있음

### 세부목표 : BRAF 기반 흑색종 모델건 생산

#### 연구내용1

개량된 BRAF 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석

#### ▣ 개 흑색종 모델 생산을 위해 BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석

##### a. BRAF 기반 종양 유발 유전자 발현 시스템인 SB-CMV-LGL-DdpB 가 도입된 형질전환 강아지 생산

- 사용된 비글견 유래 섬유아세포의 짧은 세포 수명으로 인해, 2차 SCNT 전략을 통해 최종 흑색종 모델을 생산하기로 하였음
- 1차 벡터 시스템인 BRAF 기반 종양 유발 유전자 발현 시스템인 SB-CMV-LGL-DdpB를 도입한 세포를 위탁 연구기관에서 제작하여 제공 받음
- 147개의 복제 배아를 만들고 총 10마리의 대리모에 이식함
- 그 중 2마리의 대리모가 임신하였으며, 총 4 마리의 산자가 임신 됨을 확인함
- 그 결과, SB-CMV-LGL-DdpB가 도입된 4 마리의 SB-DdpB #1, #2, #3, #4 강아지를 생산함

##### b. SB-CMV-LGL-DdpB 가 도입된 SB-DdpB #3 강아지 유래 섬유아세포주에 멜라닌 세포 특이적 CreER<sup>T2</sup> 발현 유도 시스템을 도입한 세포를 활용해 BRAF 기반 흑색종 모델건 생산

- SB-CMV-LGL-DdpB가 도입된 SB-DdpB #1, #2, #3, #4 강아지를 위탁 연구기관인 고려대학교에서 분석한 결과 #3번 강아지의 형광 발현 및 형질이 잘 나타나는 것을 확인하여, SB-DdpB #3 강아지 유래 섬유아세포주에 멜라닌 세포 특이적 CreER<sup>T2</sup> 발현 유도시스템을 도입한 세포를 제공받음
- 174개의 복제 배아를 만들고 총 10마리의 대리모에 이식함
- 그 중 5마리의 대리모가 임신하였으며, 총 10마리의 산자가 태어남

표. BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위해 수행된 복제란 이식

Subjected to SCNT	Fused & transferred (%)	No. of oocyte donor dog	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)	No. of sac	Cloning efficiency (%)
499	174 (38.7)	10	5	50.0	10	5.75

- 산자들의 유전자 도입율은 100%가 나타났고, BRAF 기반 종양 유발 유전자 발현 시스템인 SB-CMV-LGL-DdpB 와 멜라닌 세포 특이적 CreER<sup>T2</sup> 발현 유도 시스템인 dog TYR-CreER<sup>T2</sup>의 존재 여부를



## 연구내용2

### 생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도

#### ■ 개 흑색종 모델 생산을 위해 BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석

- 효과적으로 흑색종 모델건을 생산하기 위해서 새로운 흑색종 유발유전자 카세트인 SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA를 도입한 세포주로 체세포 핵이식을 수행하여 모델건을 생산함

#### ■ 생산된 BRAF 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도

- 흑색종 모델의 전임상 실험은 일반적으로 연구에서 사용된 멜라닌 세포 특이적 CreER<sup>T2</sup> 발현 시스템을 사용하여, 마우스 등의 설치류에서 시행되고 있음
- 형질전환 마우스에서 흑색종을 유도하기 위하여, 사용되는 4OH-tamoxifen은 일반적으로 피부도포법 및 복강 내 주사가 많이 사용됨. 그러나, 이를 형질전환건에 적용하기에는 체중, 피부면적 및 관리와 같은 부분에서 피부도포법은 적합하지 않으며, 복강 내 주사 또한 개에서는 접근성이 떨어지는 방법임
- 이에 본 연구에서는, BRAF 유전자 기반 형질전환 모델건의 흑색종을 유도하기 위하여 경구투여 방법을 선정하였으며, 기존의 문헌을 참조로 이에 대한 프로토콜을 구축하였음
- 생산한 형질전환 건의 연령, 체중 및 건강상태를 고려하여 약 30 ~ 60일령 건에 4OH-tamoxifen 경구투여를 통하여 흑색종 유도 전략 구축함

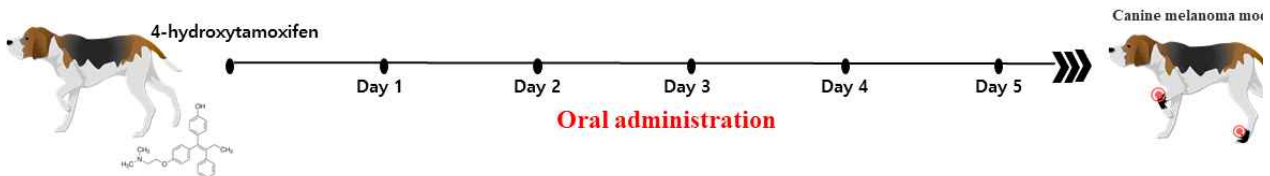


그림. 형질전환 복제건의 흑색종 유도 프로토콜

### 세부목표 : Braf 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가

## 연구내용1

### Braf 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

- 생산한 형질전환건을 15 mg/kg의 4OH-tamoxifen 5일 동안 경구투여를 통하여 흑색종 유도중에 있으며, 병변발현을 관찰 중에 있음

### 세부목표 : 체세포 핵이식 기법을 활용한 형질전환 모델건 재복제 기술 최적화

## 연구내용1

### RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보

#### ■ RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건의 체세포 생식세포 구축 및 분석

- 앞서 언급된 RAS 및 BRAF 유전자 기반 형질전환건의 피부조직에서 중간엽 줄기세포주를 구축하였음
- 구축한 세포주는, plasmid vector의 정상적 삽입 및 세포특성을 분석하기 위하여 제2위탁연구기관인 고



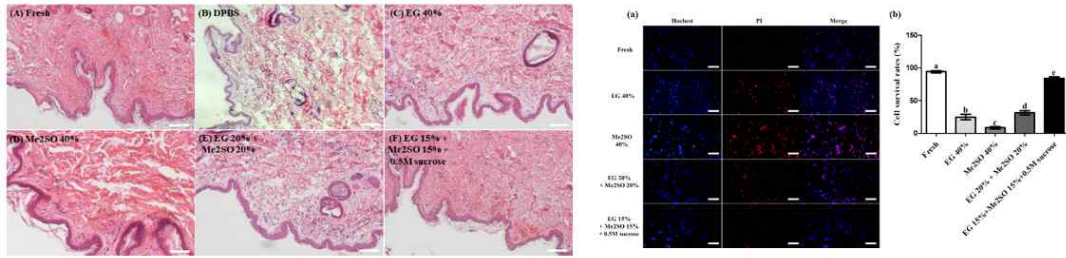


그림. 동결조직 및 신선조직의 조직손상 분석 및 세포 생존율 분석

- 앞선 결과에 따라, 15% EG +15% Me2SO + 0.5M sucrose 그룹이 가장 급속동결에 적합한 조건이라 판단하여 추가적인 실험을 수행하였음
- 신선조직 및 동결조직 유래 중간엽줄기세포는 MSC positive marker인 CD44, CD90에 대해 유사한 양성 발현을 나타내었으며, negative marker인 MHC II는 거의 발현하지 않았음

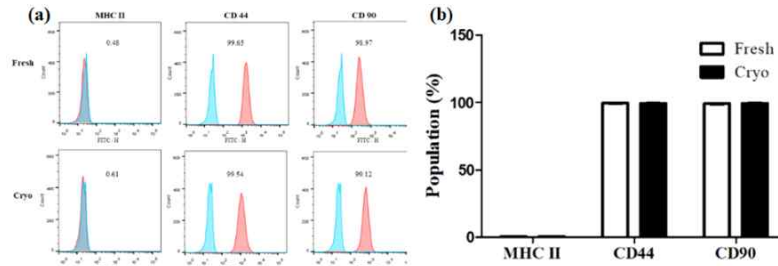


그림. 동결조직 및 신선조직유래 중간엽 줄기세포의 marker 분석

- 동결조직으로부터 분리된 중간엽줄기세포는 신선 조직과 유사한 세포모양, 증식 속도 및 apoptosis 비율을 나타내었음

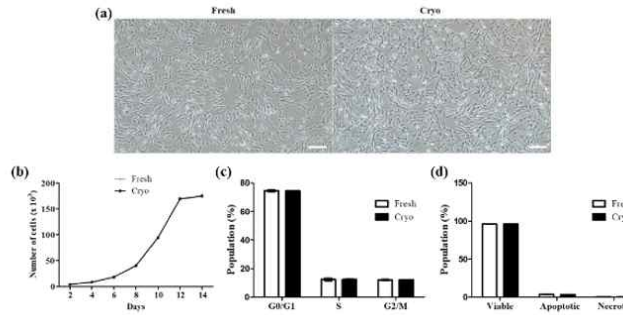


그림. 동결조직 및 신선조직유래 중간엽 줄기세포의 marker 분석

- 동결조직 유래 세포군과 신선조직 유래 세포군은 pluripotent marker인 OCT4, SOX2, NANOG의 발현량이 유사하였으며, pro-apoptotic marker인 BAX 및 anti-apoptotic marker인 BCL2, BIRC5의 발현이 유사하였음

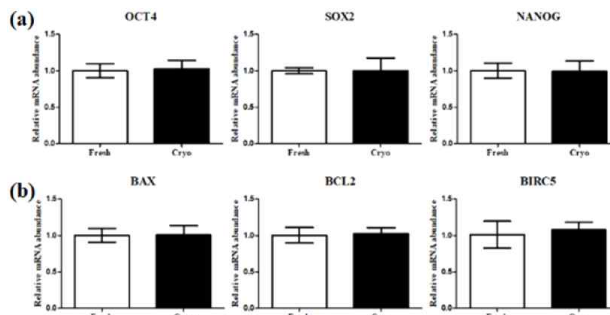


그림. 동결조직 및 신선조직유래 중간엽 줄기세포의 유전자 발현 분석

- 동결조직 및 신선조직 유래 중간엽 줄기세포는 지방 및 조골세포로 분화되었으며, 지방 및 조골세포 특이적 유전자의 mRNA 발현 수준에는 유의적인 차이가 나타나지 않았음

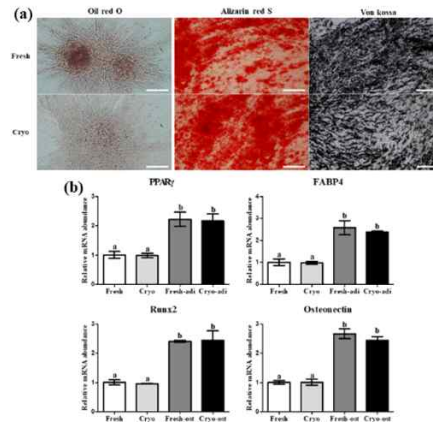


그림. 동결조직 및 신선조직 유래 중간엽 줄기세포의 지방 및 조골 세포 분화능 분석

- 또한, 급속동결에 따른 세포의 미토콘드리아 손상 유발을 평가하기 위하여, 미토콘드리아 막 전위를 측정하였음. 동결조직 및 신선조직 유래 중간엽 줄기세포의 막 전위는 유사하였음

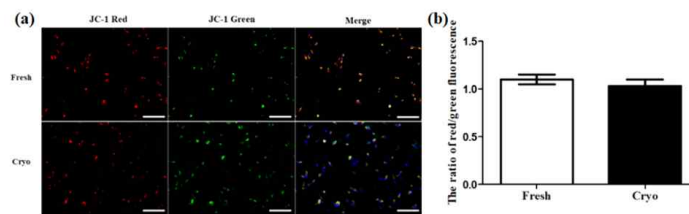


그림. 동결조직 및 신선조직 유래 중간엽 줄기세포의 미토콘드리아 막 전위 분석

- 앞선 결과들을 보아, 15% EG +15% Me2S0 + 0.5M sucrose 동결보호제 각테일을 처리한 조직의 급속동결에서 성공적으로 중간엽 줄기세포를 구축하였으며, 세포특성 또한 신선조직 유래 세포군과 유사하였음. 이는, 재생의학 분야에서 자가세포치료원으로서의 사용뿐만 아니라, 추후 흑색종 모델건의 대량 생산에 있어서 활용 가능할 것이라 판단됨

▣ 생식세포를 확보하기 위해 형질전환 모델건으로부터 난자 및 정자 회수 방법 분석 및 최적화

- 발정주기가 시작된 암캐의 혈액의 혈청 프로게스테론 농도를 측정, 2 ng/ml가 초과한 개체의 난소를 초음파로 관찰하여 난포의 rupture를 확인 후 난자를 72 ~ 96시간 내에 회수하였음
- human amyloid precursor protein (hAPP)와 human phosphoenolpyruvate carboxykinase (hPEPCK)를 과발현시킨 형질전환 수캐를 3일간 금욕시킨 후, manual stimulation으로 두 번째 사정액을 회수, TALP 용액으로 750 g에서 원심분리 후 세척하였음. 형질전환 모델건은 GFP로 표지인자를 식별하였음
- 회수된 정자는 fresh dilution, swim-up, percol gradient의 세 가지 방법으로 희석하였음
- 희석된 정자는 CASA를 통하여 motility, progressive motility, average path velocity (VAP), linear velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), straightness coefficient (STR), linear coefficient (LIN), mean amplitude of head lateral displacement (mALH), frequency of head displacement (BCF)의 9가지 파라미터를 분석한 결과, 모든 지표가 percol과 swim up 방법이 fresh dilution보다 높게 확인됨

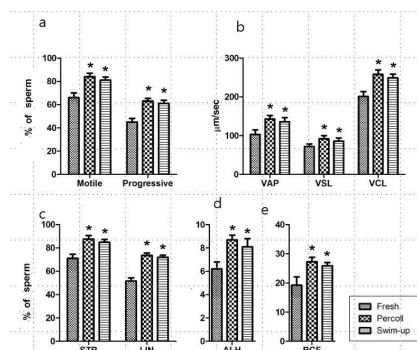


그림. 정자의 회수 및 희석방법에 따른 CASA 분석

- fresh dilution, swim-up, percol gradient으로 희석된 정자는 회수된 난자와 IVF를 수행, 12시간 이후 대리모에 이식하였음. 이식 7일 후 embryo를 회수하였으며, in vivo에서 착상 전 발달을 분석하였음. percoll gradient와 swim up 방법이 fresh dilution보다 높은 발달율이 확인됨

표. IVF 유래 canine embryo의 in vivo에서의 착상 전 발달율

Sperm treatment	No. of surrogates	Number of embryos				Number of embryos developed to Blastocyst (%)‡
		Transferred	Recovered (%)†	Cleaved (%)‡	Morula (%)‡	
Fresh	5	59 (11.8 ± 2.39)	44 (74.58)	18 (40.90)	11 (25.0)	0 (0.0)
Percoll gradient	5	70 (14.0 ± 1.87)	55 (78.57)	36 (65.45)	3 (5.46)	15 (27.27)*
Swim-up	5	65 (13.0 ± 1.87)	49 (75.38)	31 (63.27)	6 (12.25)	7 (14.29)*

- 또한, embryo를 회수 하지 않고 착상 이후, 임신율을 분석 할 결과 percoll gradient군은 다른 군에 비해 유의적으로 높은 임신율과 출산율이 확인됨

표. IVF 유래 canine embryo의 이식 후 임신율 및 출산율

Sperm treatment	No. of surrogates	Number. of pregnancies (%)†		No. of oocyte donors	In vitro fertilization		
		On Day 30	Full Term‡		Number of embryos transferred (mean±SD)	Sac observed (%)‡	Offspring born (%)‡
Fresh	5	0 (0.0)	0 (0.0)	9	66 (13.1±1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
Percoll gradient	5	2 (28.6)*	2 (28.6)*	11	102 (14.6±3.9)	6 (4.4)*	6 (4.4)*
Swim-up	7	0 (0.0)	0 (0.0)	12	109 (15.6±2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

- IVF에 의해 생산된 형질전환 견은 발톱에서 GFP를 발현하였으며, human amyloid precursor protein (mhAPP)와 human phosphoenolpyruvate carboxykinase (hPEPCK)를 발현하였음

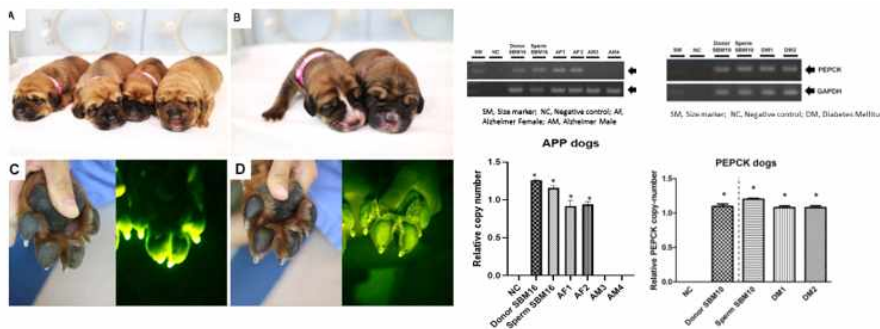


그림. IVF에 의해 형성된 형질전환 모델견의 GFP 발현 및 유전자 발현

- 본 연구에서 생산된 흑색종 모델견 또한, 상기 방법을 사용하여 분석 후 대량생산을 수행할 계획임

**세부목표 : 체세포 핵이식 기법을 활용한 형질전환 모델견 재복제 기술 최적화**

**연구내용1**

흑색종 모델 유래 세포의 체세포 핵이식 기법 재적용을 통한 모델견 재복제 기술

▣ 공여세포와 난자의 미토콘드리아 compatibility에 따른 체세포 복제 효율 분석

a. 미토콘드리아

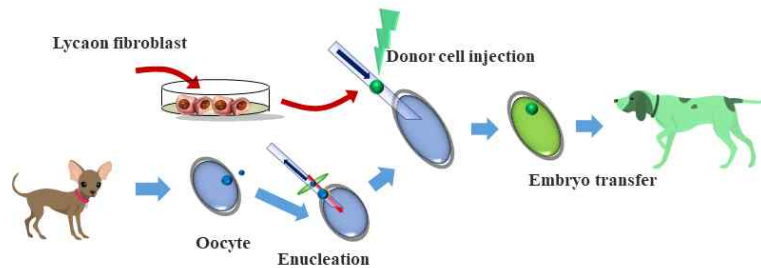
- 미토콘드리아는 진핵세포의 세포질 내에 뚜렷한 두 개의 막으로 둘러싸여 있는 세포 내 소기관으로, 내

막의 독특한 지질 조성으로 세포 내 물질이 자유로이 왕래할 수 없음

- 이러한 내막의 불투과성으로 인하여 미토콘드리아 매트릭스와 막 공간 사이에 수소이온 농도의 불균형이 발생하고, 이러한 화학적 불균형이 생체 에너지 합성의 원동력으로 이용되어 ATP를 생산함
- ATP의 생성은 세포의 유형이나 산소의 존재 유무에 따라서 미토콘드리아 내에서 TCA 회로 및 산화적 인산화 과정을 통하여 주로 이루어진다고 보고됨
- 체세포 복제를 통한 발달 과정에서 세포는 산화적 인산화를 통해 생성된 ATP를 주 에너지원으로 사용하며, 체내에서의 증식 및 사멸, 항상성 유지 등에 이용됨
- 이에 체세포 복제 과정에서의 미토콘드리아 대사 연구의 필요성이 대두되고 있음
- 미토콘드리아는 핵에 존재하는 DNA와는 별도로 자기 자신의 DNA를 보유하고 있으며, 모계유전을 통하여 세포질 유전에 관여함
- 모계유전의 특성으로 인해, 체세포 복제 과정에서 공여 세포와 난자 세포의 세포질 및 미토콘드리아 구성에 불일치성이 발생함
- 그러나, 현재까지 공여세포와 난자의 상이한 미토콘드리아 DNA에 따른 대사 및 발달에 대한 연구는 미흡함

**b. 이종의 공여세포 및 난자의 사용에 따른 태아 특성 변화**

- 공여세포와 난자의 상이한 미토콘드리아 DNA에 대한 영향을 확인하기 위하여, 개과동물인 리카온의 섬유아세포를 공여핵원으로 사용하여, 개의 난자에 SCNT 후 배아를 생산하였으며, 이를 모견에 이식하였음



**그림. SCNT 및 배아 이식 모식도**

- 그 결과 41일까지는 모견에서 임신이 유지되었으며, fetus를 적출하여 특성 분석을 수행하였음
- 수정된 리카온-개 fetus는 개와 리카온 모두의 미토콘드리아 DNA mtDNA)를 가지고 있었으며, 이중 개의 mtDNA를 주로 나타내었으며, 리카온의 genome DNA (gDNA)를 나타내었음

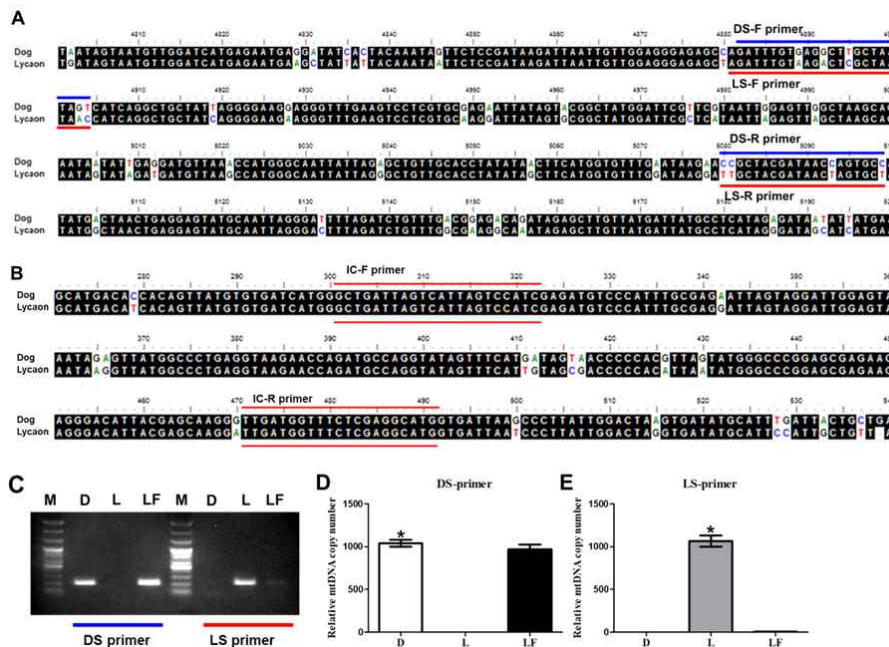


그림. 미토콘드리아 DNA의 정량화 분석

- 성체견, 성체리카온, iSCNT lycaon fetus, SCNT canine fetus의 세포대사를 분석해본 결과, 산화적 인산화 (OXPHOS)의 지표인 basal respiration를 포함하여, ATP production, proton leak, spare respiratory capacity가 모두 다른 군에 비하여 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였음

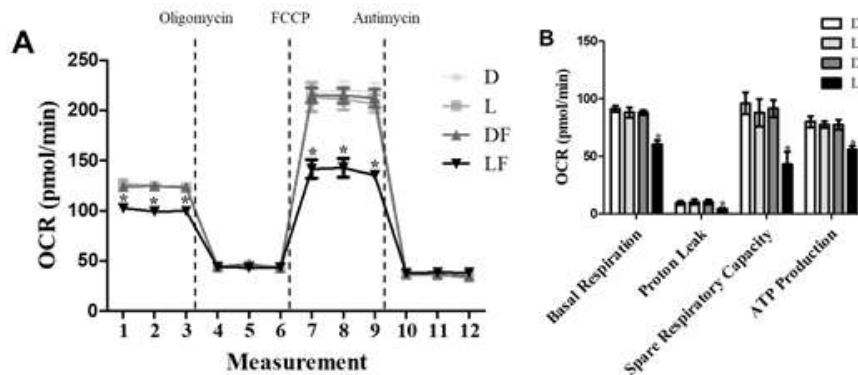


그림. 성체견 (D), 성체리카온 (L), SCNT canine fetus (DF), iSCNT lycaon fetus (LF) 세포의 Oxygen consumption rate (OCR) 분석 결과

- 구축된, 리카온 - 개 fetus의 피부로부터 분리한 섬유아세포에서 세포주기, 미토콘드리아의 외막 투과성을 분석하였음. 구축된 리카온 - 개 섬유아세포는 cell arrest의 지표인 G0/G1기가 유의적으로 증가하였으며, DNA가 복제되는 S기가 유의적으로 감소하였으며, 미토콘드리아의 외막 투과성 또한 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였음

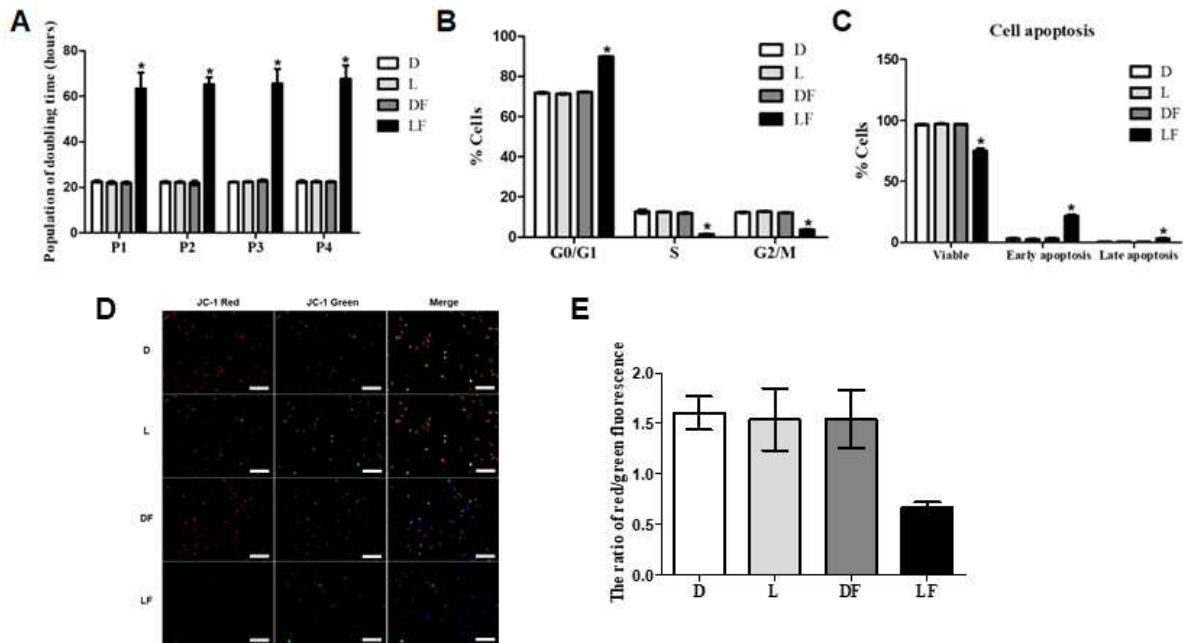


그림. 성체견 (D), 성체리카온 (L), SCNT canine fetus (DF), iSCNT lycaon fetus (LF) 세포의 세포주기 및 미토콘드리아 외막 투과성 분석 결과

- 앞선 결과들로 보아, 공여세포와 난자의 heterogenous한 gDNA와 mtDNA의 조건에서 SCNT를 수행한 결과, 핵과 난자의 비 호환성은 세포의 대사에 악영향을 주었으며, 이에 따라 태아가 사망하였다고 판단됨
- 추후 질환모델건의 생산에 앞서, 공여세포의 난자의 gDNA와 mtDNA의 호환성을 분석한 후 연구를 수행할 계획임

#### ▣ 모델견 복제에 외과적 난자 획득 방법 및 관리 개선

##### a. 침습적 수술에 따른 외과적 난자 획득 이식 방법

- 개과 동물의 난자는 실험실에서 배양하더라도 성숙상태로 가져가기 위한 체외 배양기법이 확립되어 있지 않음
- 따라서, 침습적인 수술을 통하여 난자를 획득하여 체세포 복제에 사용함
- 마찬가지로, 배아이식 과정에서도 침습적인 수술이 요구됨
- 이러한 외과적인 수술은 공여견에게 악영향을 줄 수 있으며, 결과적으로 복제의 효율성에 문제가 도출될 수 있음
- 창상 치유의 과정은 크게 3가지 연속되고 중첩된 과정으로 되어 있으며, 염증(Inflammation), 증식(Proliferation), 성숙 (Maturation) 단계로 나누어 짐
- 염증단계에서는 swelling 과정과 면역인자들에 의하여 감염이 방지되며, clotting과정을 통하여 출혈을 방지함
- 증식과정에서는 새로운 조직과 ECM을 형성하며, 성숙 과정에서는 collagen I, III의 도움을 받아 상처를 완전히 닫아주는 역할을 한다고 알려져 있음
- 이에, 복제견에서의 침습적 수술에 의한 상처 치유 일련의 과정들의 분석에 기반하여 물질 급여를 통한 회복 방법에 대한 연구를 수행하였음

##### b. 돈 태반

- 돈 태반은 Interleukin-1, Interleukin-2, TGF-beta와 같은 다양한 면역 보조인자들이 존재하며, 태아의 성장에 필요한 다량의 EGF 및 FGF를 포함하고 있음
- 또한, 여러 형태의 스테로이드성 계열 호르몬을 가지고 있어, 상처의 치유에 도움을 줄 수 있는 물질로 관심이 고조됨
- 본 연구진은 이러한 특성들에 근거하여 돈 태반을 후보물질로 선정하였음
- 안정적인 돈태반의 공급을 위하여, 경기도 내 HACCP 인증 농가를 선정후, 이로부터 위생적으로 안전한



돈태반을 주기적으로 공급을 받고 있음

- 필요 성분의 추출을 위하여, 돈 태반은 동결건조 및 grinding 이후, 열수 추출을 하였으며, homogenization 이후 buffer를 이용하여 추출을 통해 나온 혼합 물질을 사료로 이용하였음
- 앞서 언급된 추출과정에서 에탄올 세척과 약제 등급의 위생 소독 필터를 이용한 filtration을 거쳐 유해인자 (박테리아, 바이러스 등)을 제거하였음

c. 동결 건조된 돈 태반 추출물 급여에 따른 창상 치유 개선 효과 분석

- 제 2세부 연구팀에서는 난자 회수 및 배아 이식견을 선정하고, 수술 과정에서 발생하는 상처의 회복속도를 평가하였음. 정확한 회복속도를 측정하기 위하여 창상 size 및 체중을 반영하여 Normalization을 진행하였음



Group	Individual No.	Weight	Initial wound size	Parity
C1	AS3277	36.4kg	4.5cm	multiparity
C2	AS3281	35.45kg	4.6cm	nullipara
C3	HD6733	37.2kg	4.4cm	multiparity
C4	AS3257	37.75kg	4.5cm	multiparity
T1-1	AS3304	36.75kg	4.1cm	multiparity
T1-2	HD6750	40.8kg	3.0cm	multiparity
T1-3	AS3321	35.42kg	4.0cm	multiparity
T1-4	AS3312	36.3kg	4.0cm	multiparity
T2-1	HD6738	41.6kg	4.5cm	multiparity
T2-2	HD6736	41.3kg	3.9cm	multiparity
T2-3	HD6758	34.78kg	4.3cm	multiparity
T2-4	AS3317	33.4kg	4.6cm	nullipara

그림. 창상 크기 및 몸무게를 반영한 규격화

- 혈액 검사 결과 대조군(control)에 대비하여 0.3% 돈태반 추출물을 급여한 군 (T2)에서 초기 염증에 대응하는 Neutrophil의 수치가 크게 증가하였으며, Globulin/Albumin 수치도 증가함으로써, 염증성 반응이 더욱 활발하게 일어나고 있음을 확인하였음

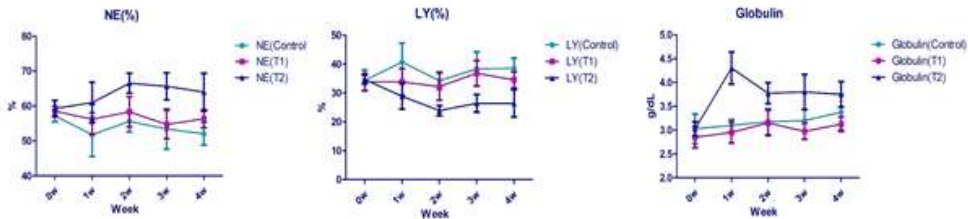


그림. 창상 발생 이후 돈태반 추출물 급여에 따른 혈액 지표 변화

- ELISA 분석 결과, 염증 반응에 있어 핵심적인 매개 인자인 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 증가 양상이 확인되었으며, 이에 대한 반작용으로 발생한 anti-inflammatory cytokine인 IL-10 또한 증가하는 것으로 보아, wound healing process가 높은 강도로 나타나는 것을 확인하였음

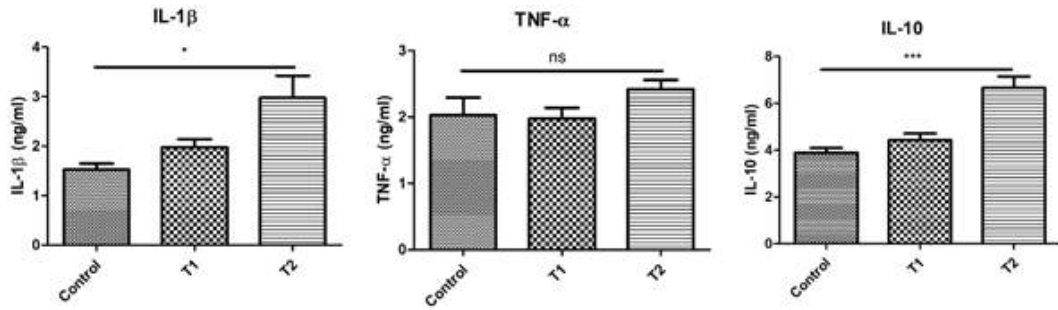


그림. 돈태반 추출물 급여 처리에 따른 사이토카인 발생량

- 대조군에서는 절개면이 접합되는 데까지 평균 9.75일이 소모된 반면, 0.3% 돈 태반 추출물 급여군 (T2)에서는 평균 7.25일이 소모되었음. 또한, 조직의 reconstruction에 관여하는 MMP-1, MMP-2 유전자의 발현 양상 또한 증가하는 것을 확인하였음

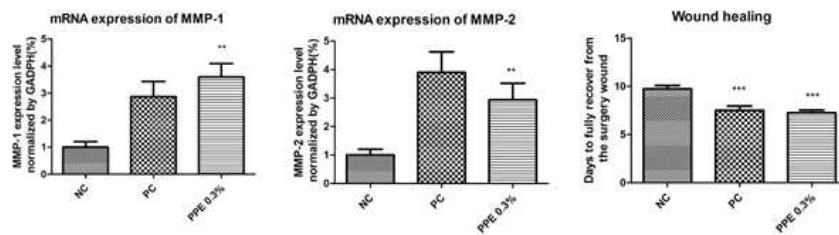


그림. 돈 태반 추출물 급여 처리에 따른 회복 속도 및 창상치유 유전자 지표 변화

- 결론적으로, 돈 태반 추출물 급여시에 창상 치유능이 향상되는 것으로 보아, 외과적 난자 획득 및 이식 후 고농도의 돈 태반 추출물을 급여하는 것이, 공여견 및 대리모의 상처 치유 효율을 증대 시킬 수 있으며, 이는 모델견 생산을 효율성을 높이기 위한 연구에도 활용 가능할 것이라 판단됨

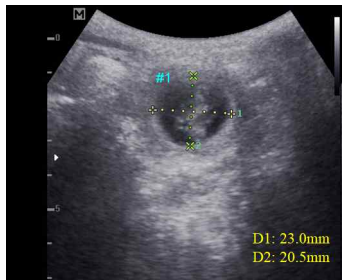
## ▣ 체세포 복제된 중형견종에서 초음파로 태아 계측

### a. 초음파 태아계측의 필요성

- 개 복제의 경우, 초기 임신 진단은 복제 성공 여부를 확인하는 중요한 단계이며 태아계측을 통한 발달 상태를 평가하는 것이 중요
- 다른 산업 동물의 복제에서는 임신 후 초음파를 사용하여 분만일 예측 및 태아의 건강을 관찰하기 위한 많은 연구가 수행되어 왔으나, 개 복제에 관한 많은 연구에도 불구하고 복제된 배아가 대리모에 이식된 후, 태아의 착상 및 발달에 관한 연구는 보고되지 않았음
- 개과 동물에서 이러한 분만 예측 모델은 주로 자연적으로 임신된 중소형견의 초음파 측정을 통하여 분만일을 추정하였으며, 현재까지 체세포 핵 이식 (SCNT)를 통해 생산된 복제견을 사용한 연구는 수행되지 않았음
- 개 복제는, 낮은 복제 효율과 높은 임신초기 유산율 및 체외 배양 (IVC) 시스템의 부재에 따른 수정 시기를 확인할 수 없다는 점에서 정확한 분만 예정일의 예측이 어려움
- 현재까지 중형견에서 초음파 측정을 사용하여 분만예정일을 예측하기 위한 몇 가지 공식 (Luvoni and Grioni, Milani et al., and Gropetti et al.)이 보고되었음
- 초음파 검사는 임신 진단 및 태아 발달 모니터링에 유용하고 비침습적인 기술이며, 정상 임신에서 초음파 검사의 특징은 임신 단계에 의해 확인된다는 것이 증명됨
- 재태 연령이 알려진 태아의 생존력과 임신 유지는 이러한 기술로 결정되며, 임신 초기의 임신 주머니의 내부 용모막 직경 (IIC, tIC)은 임신 주 산기 평가에 임상적으로 유용한 정보를 제공함
- 복제 개에서는 임신 이래로 재태 연령을 정확하게 산정 할 수 있기 때문에 복제 배아가 대리모의 자궁에서 발생하는지 여부를 결정하기 위한 이전 공식을 통해 지표로 사용가능
- 본 연구에서는 독일 셰퍼드 (GS) 세포주를 이용하여, 상기 언급된 3가지 공식을 사용하여, 복제견의 분만 예정일을 예측하였으며, 이에 대한 정확도를 분석하였음

**b. 복제견에서 태아계측이 가지는 의미**

- 임신 초기의 임신 주머니 내부 용모막 직경 (ICC)에 따른 분만 예정일을 예측하기 위하여, 중형견인 독일 셰퍼드 (GS)의 섬유아세포를 공여핵원으로 사용하여, 개의 난자에 SCNT 후 배아를 생산하였으며, 이를 모견에 이식하였음
- 분만 40일 전부터 복제 태아의 임신 주머니는 성장하는 태아의 길이 때문에 구형에서 난형으로 발달하기 시작하였음
- 초음파를 사용하여 내부 용모막 직경을 측정하였으며, 임신 주머니의 태아 ICC는 trophoblastic decidual 반응의 한 쪽에서 수직으로 만든 두 개의 ICC 측정값의 평균을 계산하여 결정하였음



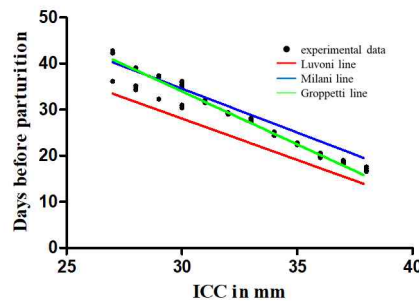
**그림. 분만 35일전 복제견의 내부 용모막직경 (ICC 및 uCC)의 초음파 검사**

- 복제견의 실제 분만 날짜를 기반으로 기존에 보고된 세 가지 분만예정일 예측 공식과 비교 분석하여 정확도를 예측하였음
- Groppetti et al. 공식은 분만일 예측에서 가장 높은 정확도(± 1일: 87.0%, ± 2일: 100.0%, SEE: 0.7 일)를 보인 반면, Luvoni 및 Grioni 공식은 가장 낮은 정확도(± 1일: 0.0%, ± 2일: 44.4%, SEE: 2.9 일)를 나타내었음

**표. 복제견의 분만 날짜를 예측하는 세 가지 공식의 정확성**

	Accuracy	Luvoni and Grioni	Milani et al.,	Groppetti et al.,
ICC	±1 day	0/54 (0.0%)	25/54 (46.3%)	47/54 (87.0%)
	±2 days	24/54 (44.4%)	50/54 (92.6%)	54/54 (100.0%)
	SEE (days)	2.9	1.2	0.7

- 복제견에서 측정된 용모막 직경에 따른 세 가지 공식으로 예측한 분만예정일 값의 회귀선을 분석한 결과 또한, Groppetti et al. 공식은 가장 높은 정확도를 나타내었음



**그림. 복제견의 용모막 내경 (ICC)과 분만 전 일령의 회귀선 분석결과**

- 복제견의 실제 분만일과 예상 분만일 간의 평균 절대차 (MAD) 비교 및 분석 결과, Groppetti et al. 공식은 가장 낮은 평균 절대차 (0.5일)이 관찰되었으며, 모든 그룹간에 유의적 차이가 관찰되었음

표. 복제건의 분만 날짜를 예측하는 세 가지 공식의 정확성

	Average 1	Average 2	P-value,
ICC	Luvoni and Grioni (MAD: 0.9)	Miliani et al. (MAD: 0.7)	< 0.001
	Luvoni and Grioni (MAD: 0.9)	Groppetti et al. (MAD: 0.5)	< 0.001
	Miliani et al. (MAD: 0.7)	Groppetti et al. (MAD: 0.5)	< 0.001

- 앞선 결과들로 보아, Groppetti et al. 공식은 독일 셰퍼드에서의 분만예정일을 예측하는데 가장 적합한 분석방법으로 확인되었음
- 추후, 중형견인 질환모델비글견의 생산과정에서의 분만일 또한, 상기 공식으로 예측할 계획임



## 제2 위탁과제

고려대학교 산학협력단

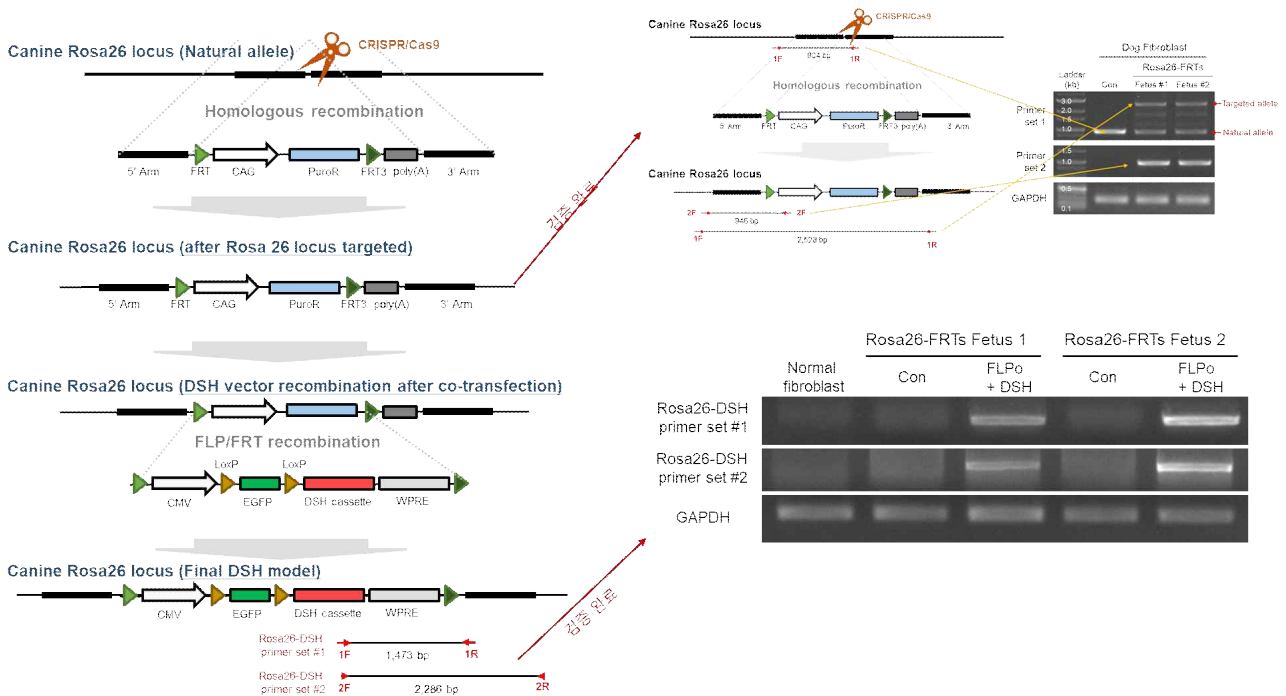
흑색종 유도 시스템을 도입한 증대동물 형질전환 세포주 개발

**세부목표 : BRAF 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 핵공여원으로써의 유효성 검증**

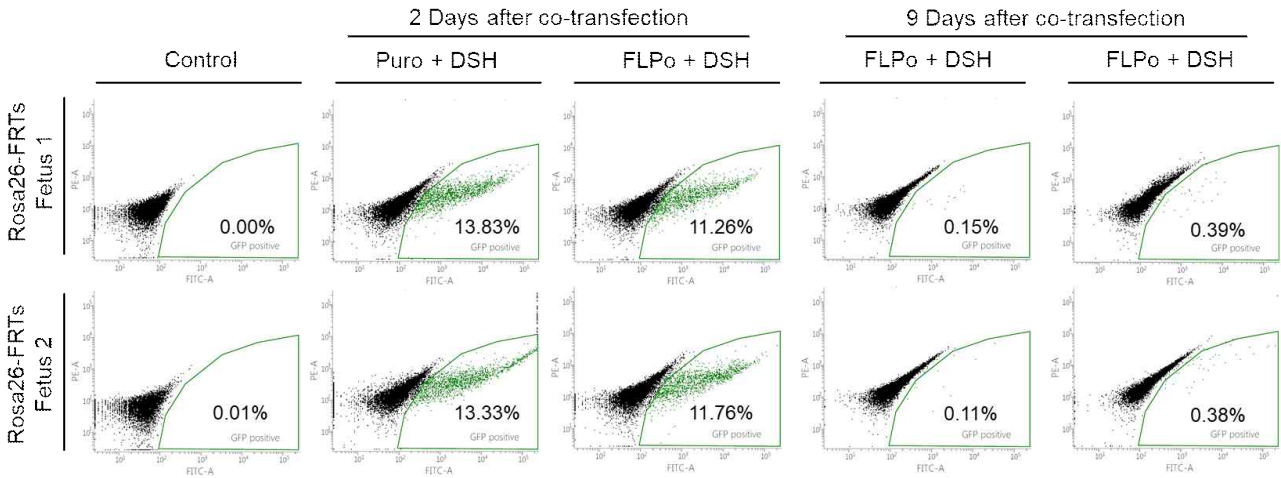
### 연구내용1

BRAF 기반 흑색종 유도 시스템을 도입 형질전환 세포주 구축 (RAS 기반 흑색종 모델도 포함)

#### □ F-RMCE 시스템을 활용한 흑색종 유도 시스템 도입 검증 및 효율 비교

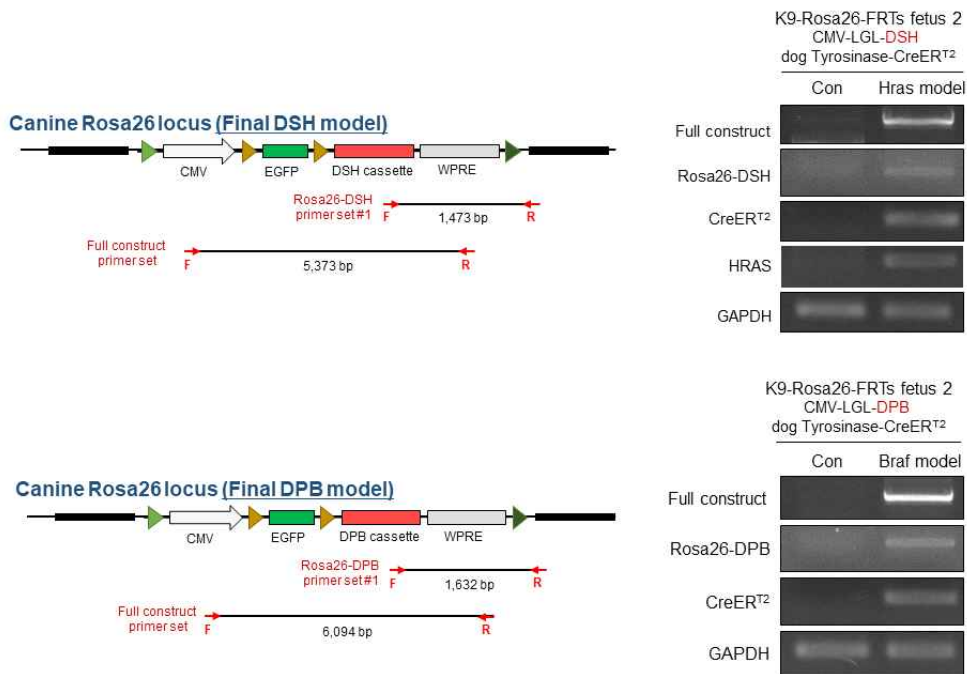


- 3 차년도와 4차년도에 걸쳐 CRISPR-Cas9 시스템을 활용하여 safe harbor locus인 Rosa26 locus에 flippase에 의해 재조합이 가능한 cassette (FRT-CAG-PuroR-FRT3-poly A)를 도입하기 위한 실험을 진행하였음
- Rosa26 locus를 특이적으로 타겟팅할 수 있는 가이드 RNA를 디자인하고, CRISPR/Cas9 벡터 시스템 및 donor template (FRT-CAG-PuroR-FRT3-poly A)와 함께 개 섬유아세포에 도입을 함. 이 시스템의 원리는 Cas9에 의해 표적 부위에 double strand break가 일어나면 donor template를 활용해 homologous-directed repair 기전에 의해 도입하고자 하는 서열이 knock-in이 되는 현상을 활용한 것임
- 이렇게 제작된 세포는 (재)아부다비생명공학원에 전달하여 SCNT 핵공여세포로 활용되어 최종 두 체의 fetus (Rosa26-FRTs Fetus 1 & Fetus 2)를 확보하였음. genomic DNA를 분석한 결과 두 allele 중 하나만 targeting이 된 heterogeneous knock-in model임을 확인했음
- 이후 태아 섬유아세포를 확보하여 FRT-CMV-LGL-DSH-WPRE-FRT3를 제작하여 Flippase vector와 함께 도입하였음. 그 결과, Rosa26 locus에서 cassette exchanging 된 것을 genomic DNA PCR 분석을 통해 확인하였음



- plasmid 기반 random integration에 기반한 도입 방법과 Flippase에 의해 cassette exchanging에 기반한 도입 방법의 효율 비교를 위해 Flippase가 있거나 없는 조건에서 형질전환 stable cell line이 형성되는 비율을 비교하고자 하였음
- plasmid 상태로 도입된 유전자가 호스트 세포 유전체 내에 도입이 되려면 최소 1주일 이 필요한 것으로 예상하여 detection 시기는 transfection 이후 9일 뒤 실험을 진행함. 그 결과, 약 2.5배 더 높은 효율로 stable cell line이 형성됨을 확인하였음
- 제작한 시스템은 plasmid 기반 도입 방법에 비해 높은 형질전환율을 보여주며, 도입 유전자가 안정적으로 발현이 된다고 알려진 safe harbor locus인 Rosa26 locus를 타겟팅할 수 있는 시스템을 개발했음을 증명하였음. 본 시스템은 Flippase-Recombinase Mediated Cassette Exchanging (F-RMCE) 시스템으로 명명함

**■ Safe harbor locus 유전자 타겟팅 기법을 활용한 F-RMCE 시스템으로 RAS, BRAF 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 시스템 도입 및 형질전환 모델 세포주 확보**



- 위에서 개발한 F-RMCE 시스템을 활용해 Ras 및 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 벡터 시스템을 도입하였고, genomic DNA PCR 검증을 통해 정상적으로 cassette exchanging이 일어났음을 확인하였음.
- 제작된 세포는 SCNT를 위해 (재)아부다비생명공학원에 전달함

■ Sleeping beauty (SB) transposon 시스템을 적용한 흑색종 유발 유전자 전달 시스템 개발

➢ Braf 기반 돼지 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



➢ Braf 기반 개 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



➢ Ras 기반 돼지/개 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)

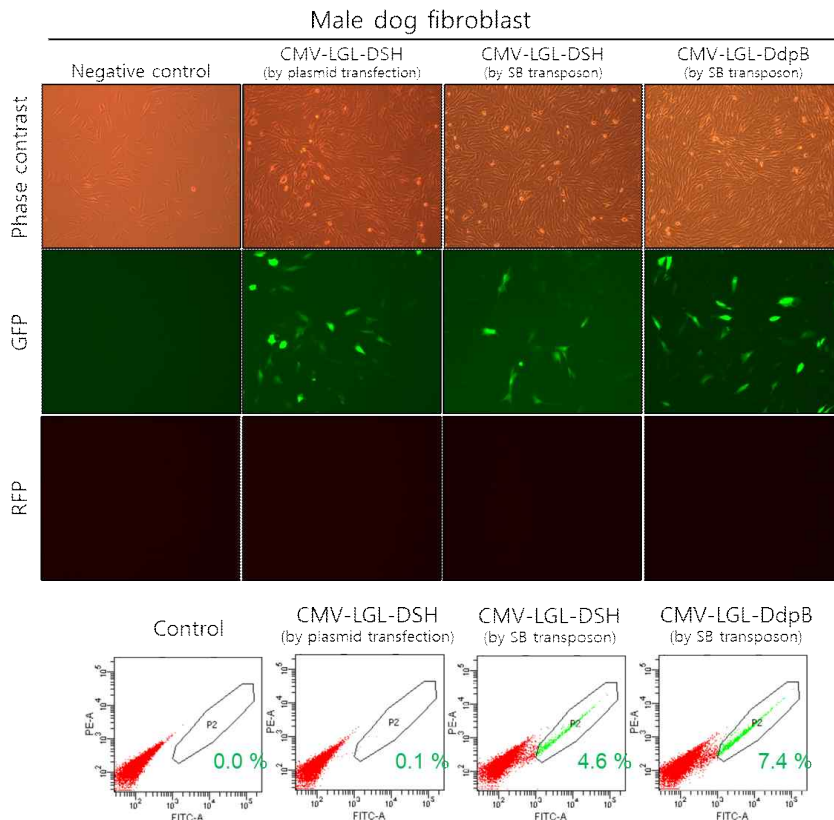


➢ 멜라닌 세포 특이적 CreERT2 발현 시스템 (Lentivirus)



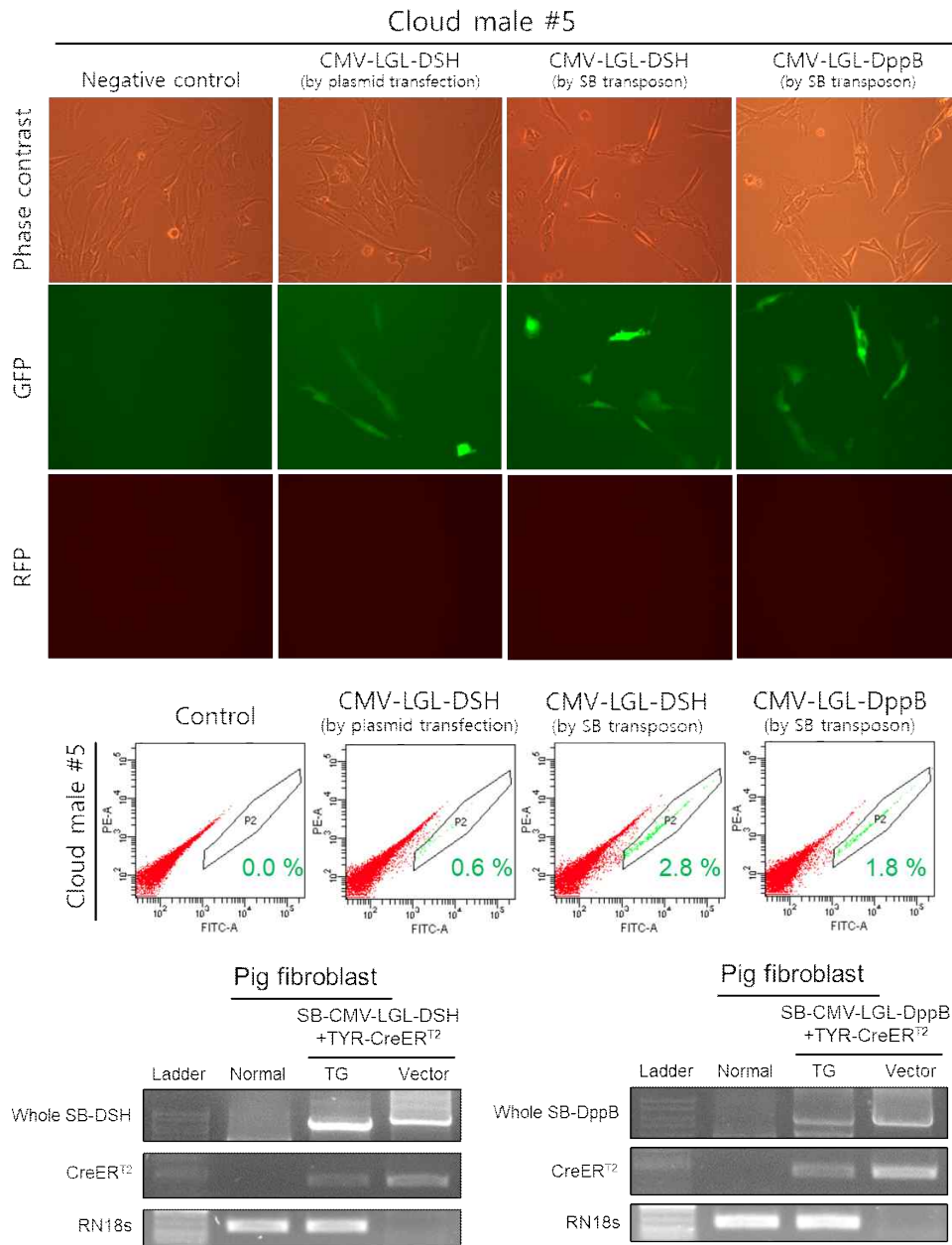
- 전년도에 문제가 되었던 일부 종양 유전자가 발현이 되는 세포군의 빠른 증식속도로 인해 전체 세포주를 체세포 핵이식을 수행할 수 없는 상황이 반복되었음. 이에 조금더 안정적이고 효율적으로 벡터시스템을 도입할 수 있도록 sleeping beauty transposon 시스템을 도입하였고, 위 흑색종 유도 시스템을 two vector 시스템을 디자인하고 제작하였음

■ SB transposon 시스템을 적용한 흑색종 모델견 제작용 핵공여세포 구축



- 개 섬유아세포에 새로 디자인한 transposon 기반 시스템 도입전략을 통해 형질전환 SCNT 핵공여세포를 제작하고 EGFP-positive population을 확보함
- 제작한 세포는 (재)아부다비생명공학원 손영범 박사 연구팀에 전달

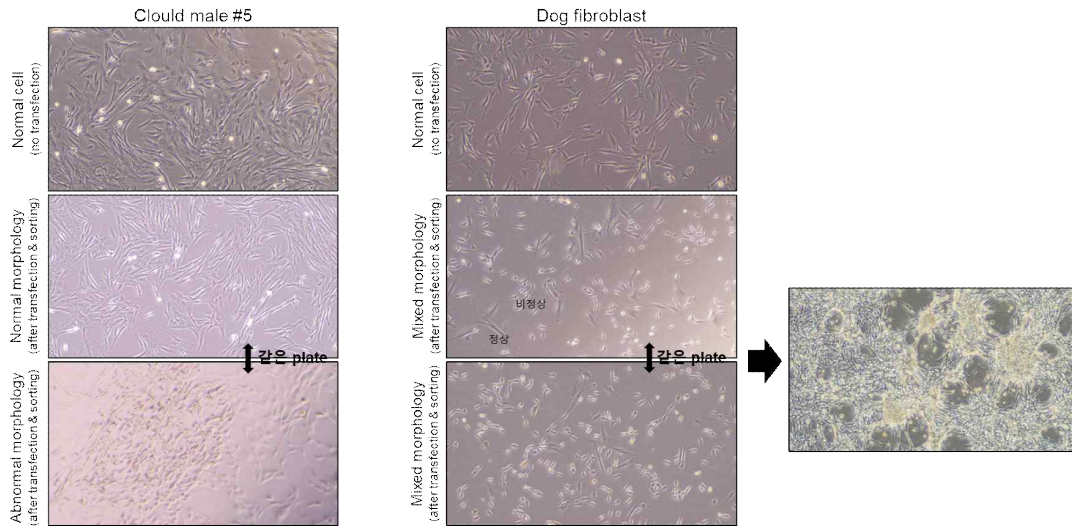
■ SB transposon 시스템을 적용한 흑색종 돼지 모델 제작용 핵공여세포 구축



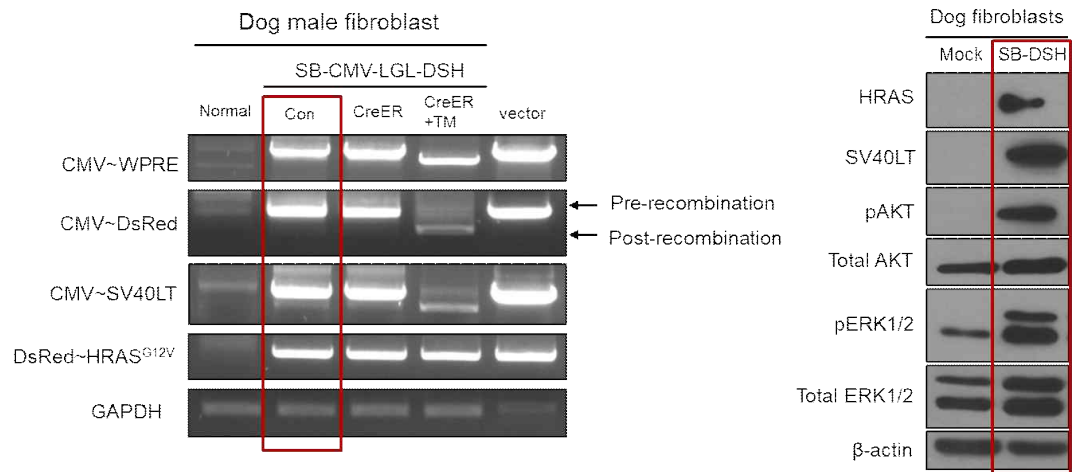
- 같은 방법으로 돼지 섬유아세포에 새로 디자인한 transposon 기반 시스템 도입전략을 통해 형질전환 SCNT 핵공여세포를 제작하고 EGFP-positive population을 확보함. 이 세포들 genomic DNA PCR 분석을 통해 두 SCNT 형질전환 핵 공여세포는 도입이 잘 되었음을 확인함



▣ **형질전환 세포의 장기 배양에 따른 문제 발생 확인**



- 지금까지 기본 plasmid vector 시스템을 기반으로 세포에 시스템을 도입하는 방법에 비해 월등하게 암 세포화 군집이 나타나는 양상은 줄어들었지만, transposon 시스템을 활용하더라도 동일하게 같은 문제는 지속적으로 반복되었음

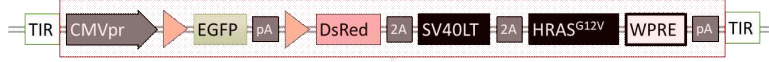


- 암세포화된 세포를 실험을 통해 확인 결과, Cre 가 추가로 도입된 상태가 아니기 때문에 유전자가 재조합이 된 것은 아님을 확인하였으나 SB-CMV-LGL-DSH 벡터시스템에 있는 SV40LT 및 돌연변이 HRAS가 발현이 됨을 확인하였음. 하지만 문제의 원인을 정확히 파악은 할 수가 없었음
- 이는 세포에 시스템을 도입하고, selection 과정을 거치고 분석을 위한 충분한 세포를 확보하는데는 여전히 어려운 상황이 되었음. 이는 세포 내에서 불안정한 plasmid vector를 이용하는 시스템의 한계로 예상이 되며 이를 감안하고 더욱 빠르게 실험을 진행하는 방법을 고민해야 했음

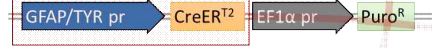
## SB transposon 기반 흑색종 유발 단일 벡터 시스템 구축

### Previous GBM/melanoma inducing system

1. Inducible oncogene expression cassette via SB transposon system



2. Tissue-specific CreERT2 expression cassette via lentiviral vector system



### Current GBM/melanoma inducing system

\* Inducible oncogene expression & Tissue-specific CreERT2 expression cassette via 1 vector SB transposon system



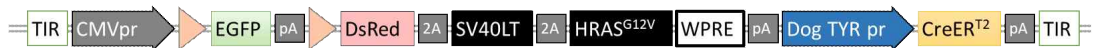
Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



Braf 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



Ras 기반 흑색종 개 모델 시스템

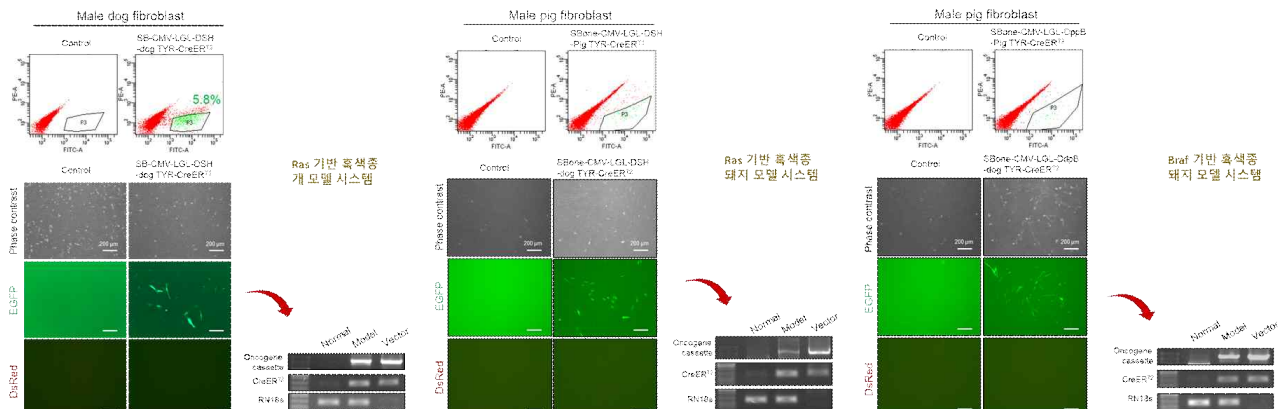


Braf 기반 흑색종 개 모델 시스템



- 현재 개발된 종양 유전자 발현 벡터 시스템은 플라스미드 기반으로 도입이 될 수밖에 없는 상황임. 지금까지 봐왔던 패턴으로 보았을 때, 도입된 모든 세포가 다 암세포화가 되는 패턴은 아니었기에, 불분명한 이유로 인해 일부 세포만이 문제가 되는 것으로 인식이 되었음
- 따라서 본 연구팀은 SCNT를 위한 형질전환 핵공여세포제작 기간을 줄이는 방법밖에 없다고 판단하여, 형질전환 과정을 최소화 할 수 있도록 하고자 하였음. 이전까지 두 개의 벡터 시스템으로 도입하고자 했던 방식에서 하나의 벡터로 만든 transposon 시스템을 개발하고자 하였음
- 이는 개와 돼지 두 종의 종양 모델에 모두 적용할 수 있도록 하여, Ras 및 Braf 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 개발하였음

## SB transposon 기반 흑색종 유발 단일 벡터 시스템을 도입한 핵공여세포 확립



- 개발한 Ras 및 Braf 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 활용해 형질전환 핵공여세포를 제작하고자 하였음
- Braf 기반 흑색종 모델건의 경우, 1차 벡터인 Braf 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터시스템을 도입한 개체를 생산하여 2차 벡터인 dog TYR-CreERT2 벡터를 만드는 과정을 진행하였기에 제외하였음
- 그 외에 Ras 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 도입한 개 섬유아세포주와 Ras 및 Braf 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 도입한 돼지 섬유아세포주를 제작하여 각각 (재)아부다비생명공학원 손영범 박사 연구팀과 충북대학교 현상환 교수 연구팀에 전달하였음

**연구내용2** BRAF 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주의 핵공여원으로써의 유효성 평가

**▣ 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 개 생산을 통한 세포주 유효성 검증**

➢ Braf 기반 돼지 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



➢ Braf 기반 개 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



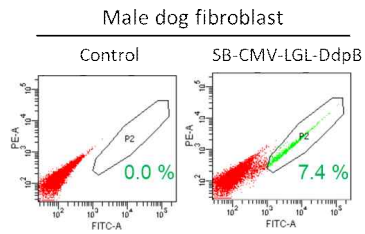
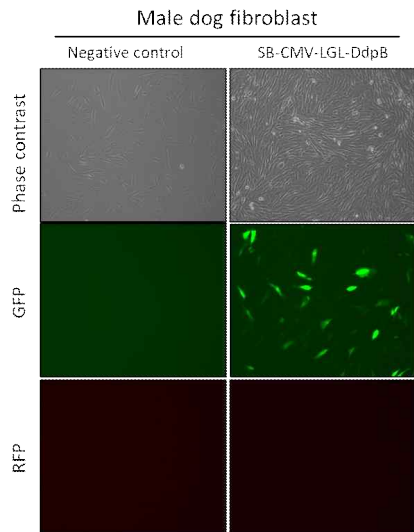
➢ Ras 기반 돼지/개 흑색종 유도 벡터 시스템 (Transposon)



➢ 멜라닌 세포 특이적 CreERT2 발현 시스템 (Lentivirus)

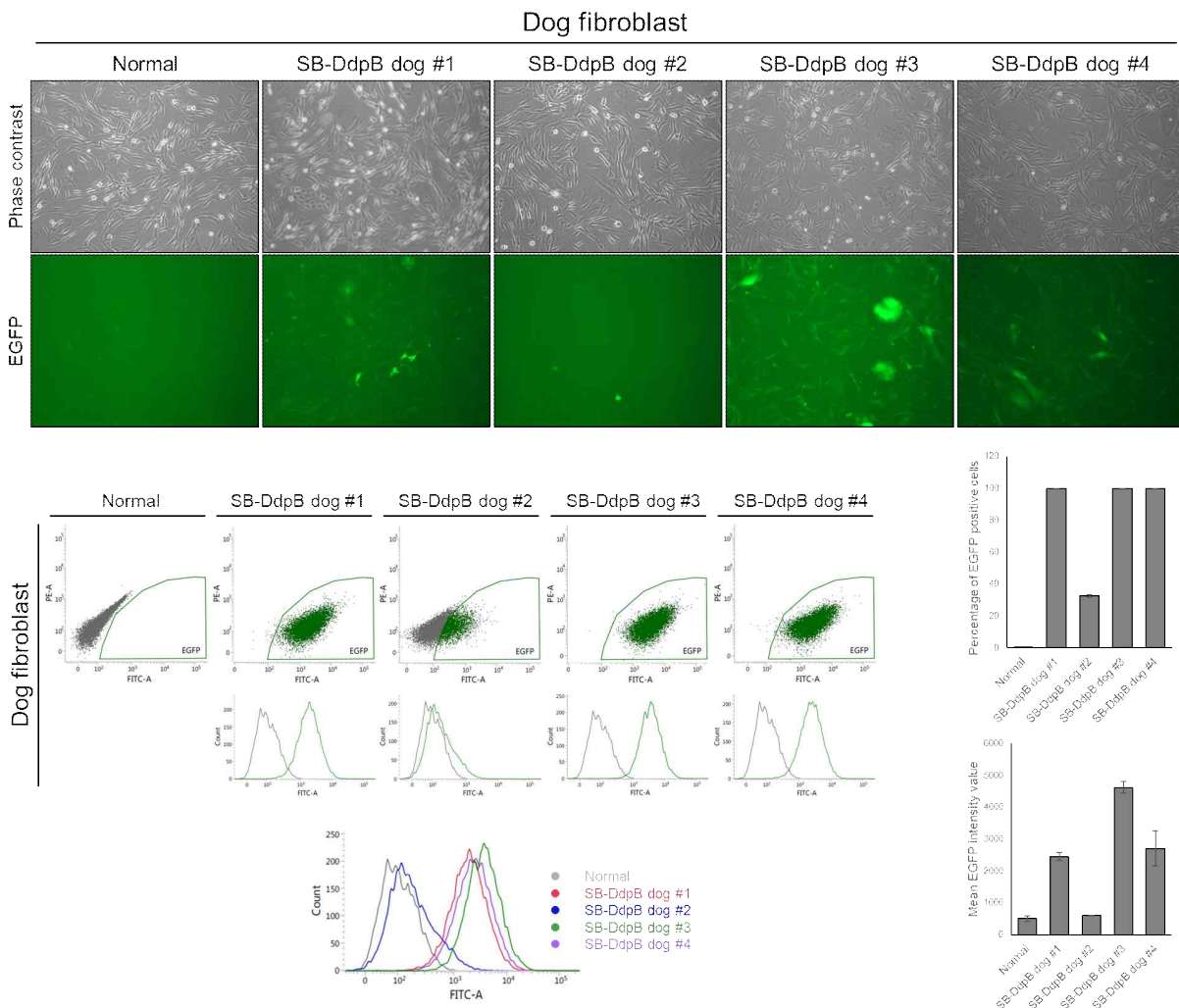


- 플라스미드 벡터가 무작위적으로 유전체에 도입하는 전략으로 시스템 도입하는 방법은 partial integration과 느린 integration 속도 등의 문제로 세포가 재조합을 유도하지 않더라도 암세포화가 진행되는 경우가 빈번하게 발생이 되었었음
- 이를 해결하기 위해 전년도에 sleeping beauty (SB) transposon 시스템을 도입하여 흑색종 유도 시스템을 제작하고 멜라닌 세포 특이적 CreERT<sup>2</sup> 발현 시스템에는 PiggyBac (PB) transposon 시스템을 도입하여 제작하였으며, 이를 활용해 흑색종 종양 모델 제작을 진행하고자 하였음
- 개 섬유아세포는 짧은 세포 수명으로 인해 두 번째 시스템인 멜라닌 세포 특이적 CreERT<sup>2</sup> 발현 시스템은 도입하지 않고 SCNT를 우선 수행하여 1차 모델을 제작하고, 이 모델을 활용해 PB-dog TYR promoter-CreERT<sup>2</sup>를 도입하고 다시 SCNT를 수행하여 최종 모델을 제작하는 전략을 채택하게 되었음. 통합 트랜스포존 벡터 시스템 제작 이전에 SB-CMV-LGL-DdpB를 도입한 1차 모델 제작을 성공을 통해, 핵공여세포의 유효성을 판단할 수 있었음
- BRAF 기반 흑색종 모델건 제작은 2차 체세포 핵이식 기법을 활용하여 진행하기로 함

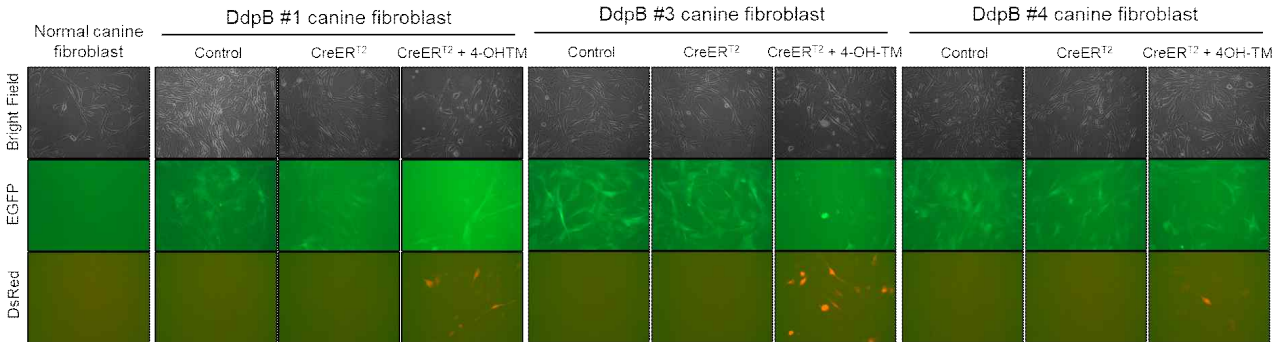


- Braf 기반 흑색종 유도 벡터 시스템인 SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE transposon 시스템을 전기천공법 (electroporation) 기법을 통해 도입하였으며, EGFP-positive 한 세포를 FACS 장비를 통해 sorting을 진행함. 이 세포들을 1차 SCNT에 활용할 핵공여세포로 활용하고자 하였으며, 제작된 세포는 (재)아부다 비생명공학원으로 보냈음

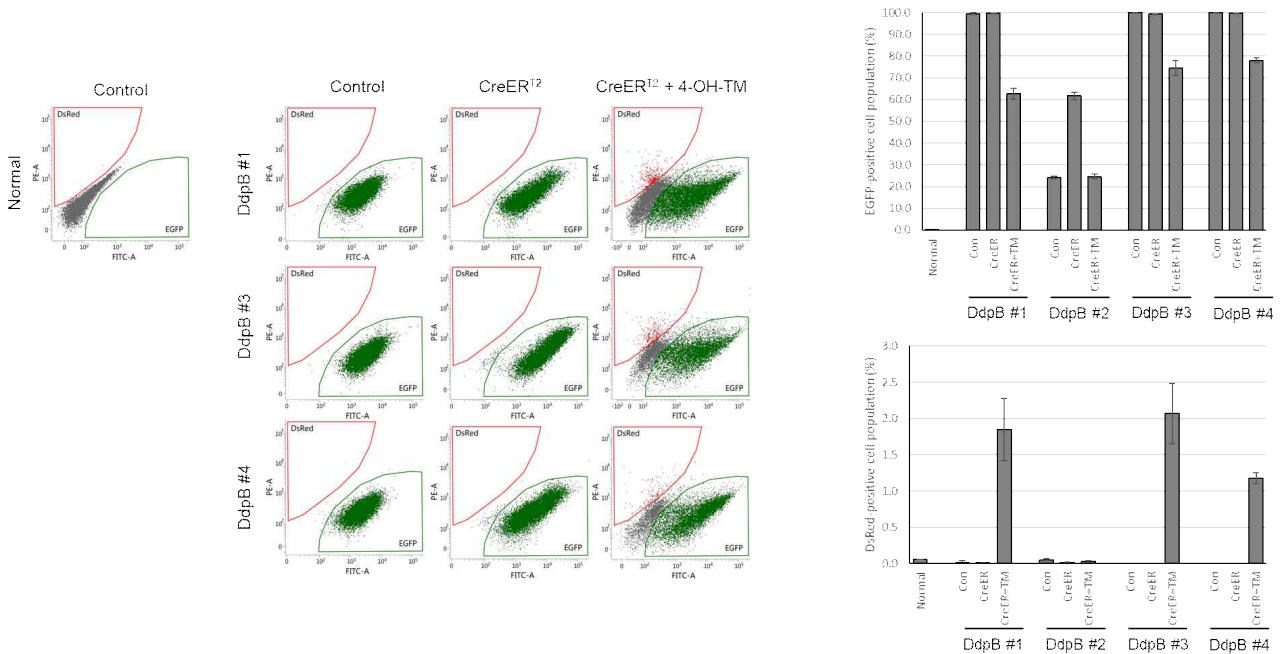
▣ BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 개 분석



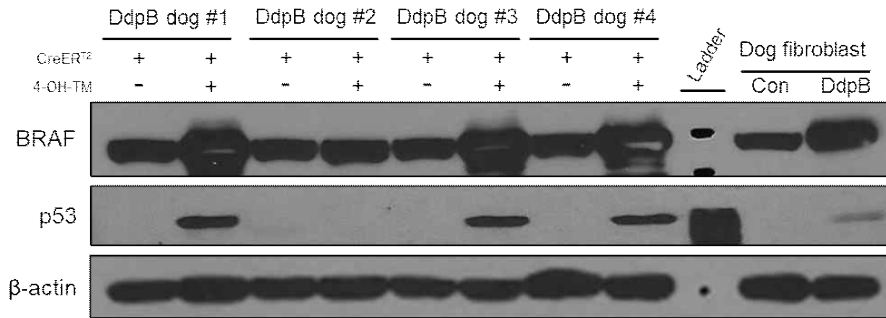
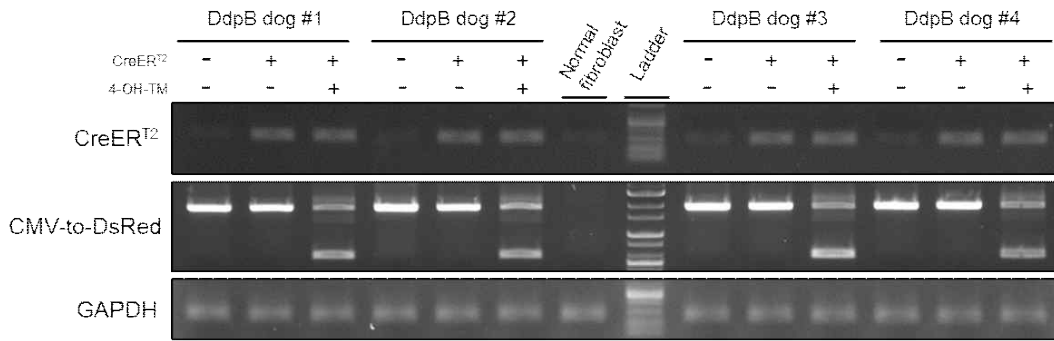
- (재)아부다비생명공학원에서 SCNT를 수행하여 총 4마리의 TG 강아지(SB-DdpB Dog #1, #2, #3, #4)를 확보함. 이 4마리의 강아지의 피부조직에서 fibroblast를 확보하여 분석을 위해 세포를 전달받음
- 우선 EGFP 발현 여부를 형광현미경과 FACS를 통해 확인을 함. 그 결과, 형광의 밝기는 SB-DdpB Dog #3가 가장 강했으며 SB-DdpB Dog #2은 EGFP의 발현이 거의 관찰이 되지 않았음



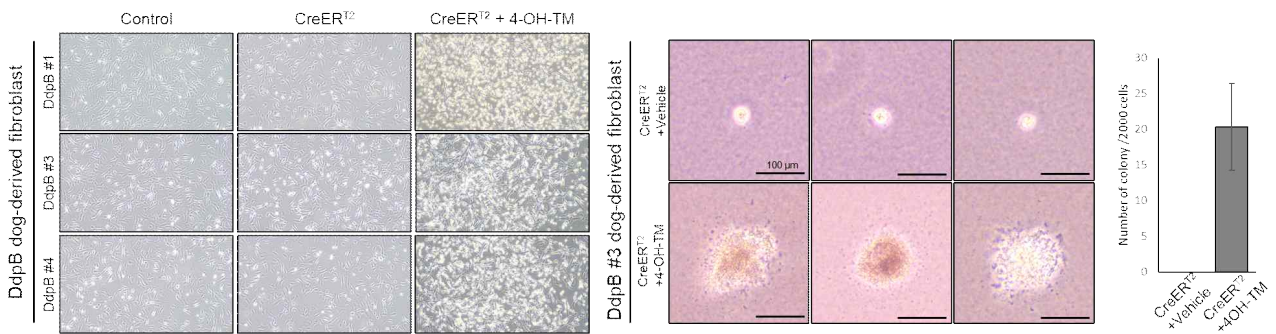
- SB-DdpB Dog #1, #3, #4 유래 세포에 CreER<sup>T2</sup>을 추가로 도입하여 4OH-tamoxifen을 처리하고 형광현미경을 통해 관찰한 결과, 모두 DsRed가 관찰이 된 것으로 보아 도입한 SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE 시스템이 Cre에 의해 적절하게 재조합이 일어났음을 예상할 수 있었음



- 이와 같은 결과는 FACS 분석을 통해서도 동일한 결과를 확인할 수 있었음

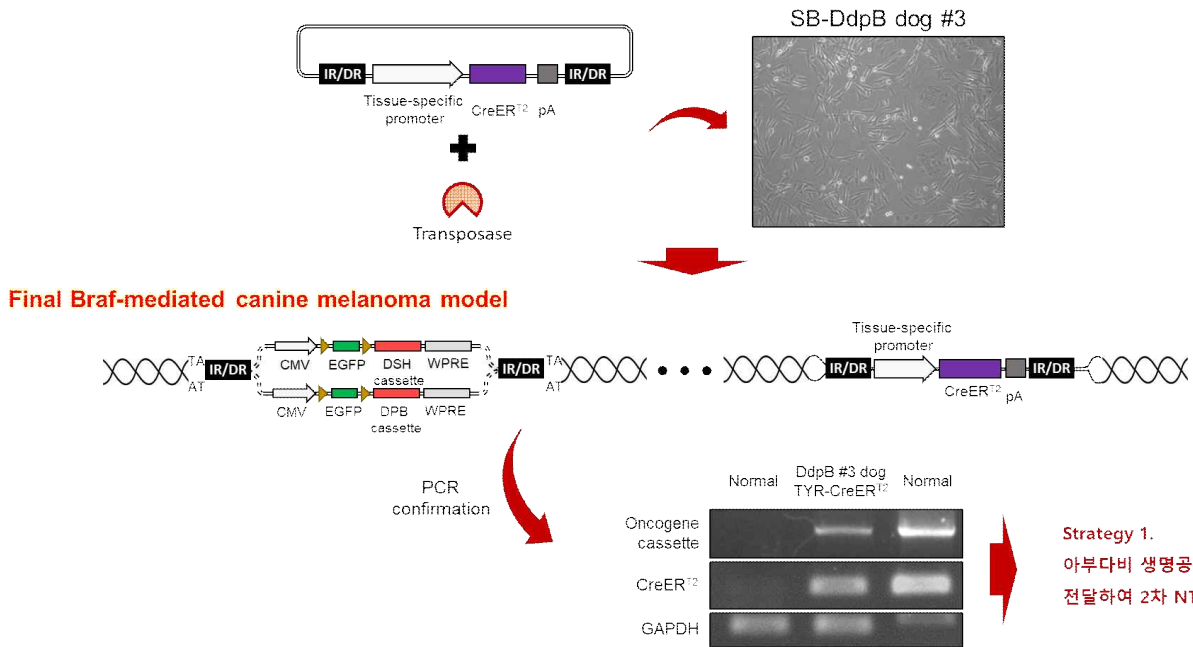


- 재조합 여부를 정확히 판단하기 위해 각 세포의 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 진행함. 그 결과, CreER<sup>T2</sup> 도입과 함께 4-OH-TM을 처리한 세포들에서만 재조합된 서열이 증폭된 PCR 산물을 관찰할 수 있었음.
- Western blot을 통해서 종양 유전자로 활용한 mutant BRAF와 p53이 동일한 세포군에서 관찰됨을 확인하였음.

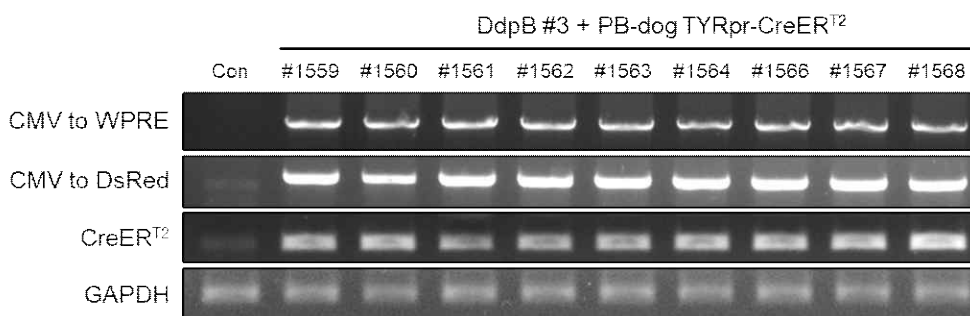


- 또한, CreER<sup>T2</sup> 도입과 함께 4-OH-TM을 처리한 세포들의 경우 세포 모양이 매우 바뀌는 것을 확인하였으며, 암세포의 대표적인 특징 중 하나인 anchorage-independent cell growth를 획득했음 역시 확인하였음.
- 이 결과들을 통해, 1차 모델로 생산된 4마리의 TG 강아지(SB-DdpB Dog #1, #2, #3, #4)는 Braf 기반 흑색종 유도 벡터 시스템인 SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE이 정상적으로 도입되었음을 확인했으며, in vitro 수준에서 Cre 재조합을 통해 각 세포들이 암세포화가 되는 것을 확인하였음.
- 즉, 4마리의 TG 강아지(SB-DdpB Dog #1, #2, #3, #4)는 종양 모델로 활용한 개체들을 증명함.

**■ 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 개, 미니돼지 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 최종 모델 세포주 구축 완료**

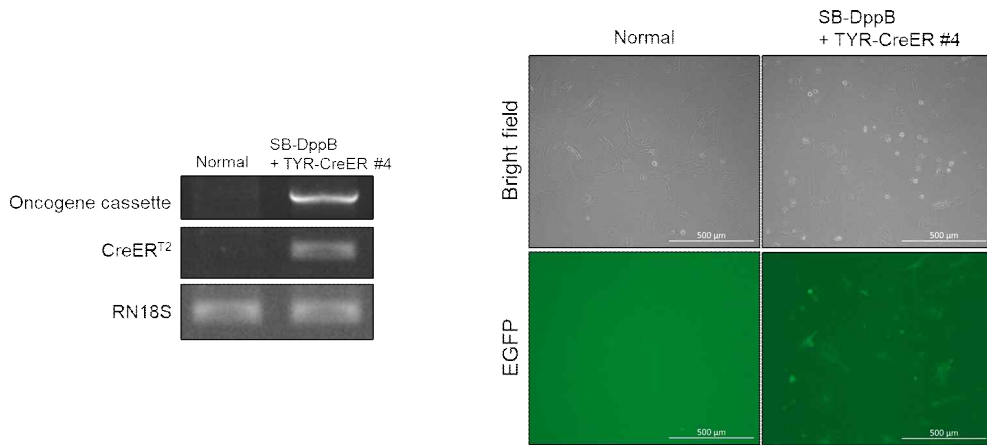


- 이전 결과에서, 4마리의 TG 강아지(SB-DdpB Dog #1, #2, #3, #4) 중 #3 개체의 EGFP 발현이 가장 강했으며, 암세포화 되는 경향도 조금 더 뚜렷했음을 확인했음
- 따라서, 본 연구팀은 2번째 시스템인 PB-dog TYR promoter-CreER<sup>T2</sup>-puro를 SB-DdpB dog #3 유래 세포에 도입을 하여 최종 모델을 만들기 위한 실험을 진행함
- PB-dog TYR promoter-CreER<sup>T2</sup>-puro를 PiggyBac transposon 시스템을 통해 도입하고 항생제인 puromycin으로 selection을 진행함. 일부 세포를 확보하여 genomic DNA PCR 분석을 진행하여 CreER<sup>T2</sup>가 관찰이 잘 되어 (재)아부다비생명공학원에 세포를 전달하여 SCNT를 수행함

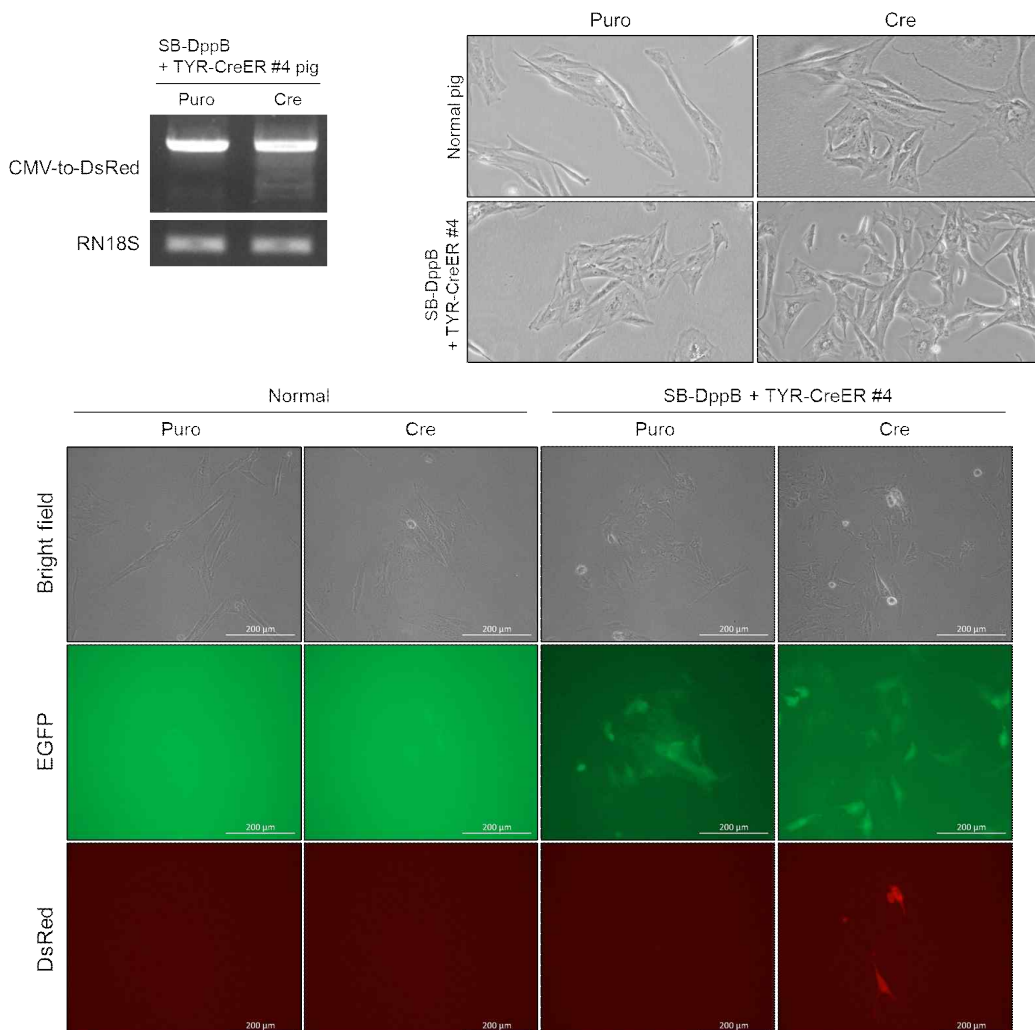


- 그 결과 총 10마리의 BRAF 기반 흑색종 모델견(#1559~#1568)이 태어났으며, #1565를 제외한 강아지는 모두 정상적으로 두 시스템이 도입된 것으로 확인이 됨. #1565 개체의 경우, 세포 상태가 좋지 못해 genomic DNA를 추출하지 못해 다시 분석 진행할 예정임
- 현재 (재)아부다비생명공학원 손영범 박사 연구팀에서 4-OH tamoxifen을 투여하여 종양 발병 유도하고 있으며, 종양 발병 이후 병리조직학적 분석에 들어갈 예정임

▣ 생산된 BRAF 기반 흑색종 최종 모델 돼지 생산 및 분석을 통한 세포주 유효성 평가



- 통합벡터 시스템을 개발하기 전 본 연구팀이 개발한 SB-CMV-LGL-DppB-WPRE + pig TYR promoter-CreER<sup>T2</sup> (SB-DppB+pTYR-CreER)를 따로 도입한 핵공여세포를 활용해 충북대 현상환교수 연구팀에서 형질전환 돼지 생산에 성공하였음
- 그 중 SB-DppB+pTYR-CreER #4 돼지만이 기형이 발견되지 않았으며, 두 벡터 시스템이 잘 들어가있는 것을 확인하였음. 이에 테스트를 위해 SB-DppB+pTYR-CreER #4 돼지에서 섬유아세포를 확보하여 분석을 진행하기로 함
- genomic DNA PCR 분석을 통해 두 시스템이 모두 유전체에 삽입이 되어있음을 확인하였으며, EGFP 형광도 잘 관찰됨을 확인할 수 있었음





- 도입한 종양 유발 유전자 발현 벡터 시스템에 의해 종양세포화가 잘 나타나는지 검증을 하기 위해, SB-DppB+pTYR-CreER #4 유래 세포에 Cre-3NLS 유전자를 추가로 도입하여 바로 유전자 재조합을 유도하고자 하였음
- genomic DNA를 분석한 결과, PCR 산물의 밴드가 뚜렷하지는 않지만 재조합이 된 것으로 보임
- Braf의 경우 암세포 경향성이 아주 크지가 않아 세포에는 변화 크게 나타나지는 않음
- 다만 형광현미경을 통해 관찰을 수행을 해보았을 때, Cre-3NLS를 추가한 세포에서만 재조합에 의해 나타나야하는 DsRed 빨강형광유전자가 발현이 되는 것을 관찰하였음
- 이에 관해서는 추가 실험을 진행하고 있음

**세부목표 : BRAF 기반 흑색종 모델건 생산 및 유효성 평가**

**연구내용3**

**Braf 유전자 기반 모델건의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증**

**▣ 4-OH-tamoxifen 처리를 통한 종양 발생 유도 진행중임**

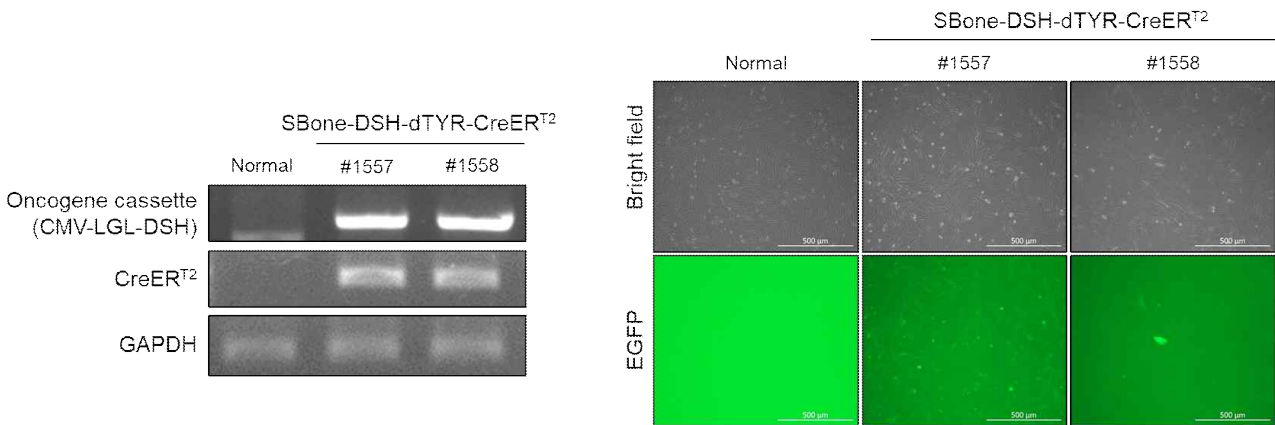
- 흑색종 병리조직 검증은 종양 발병 이후 수행 예정

**세부목표 : RAS 기반 흑색종 모델의 유효성 평가**

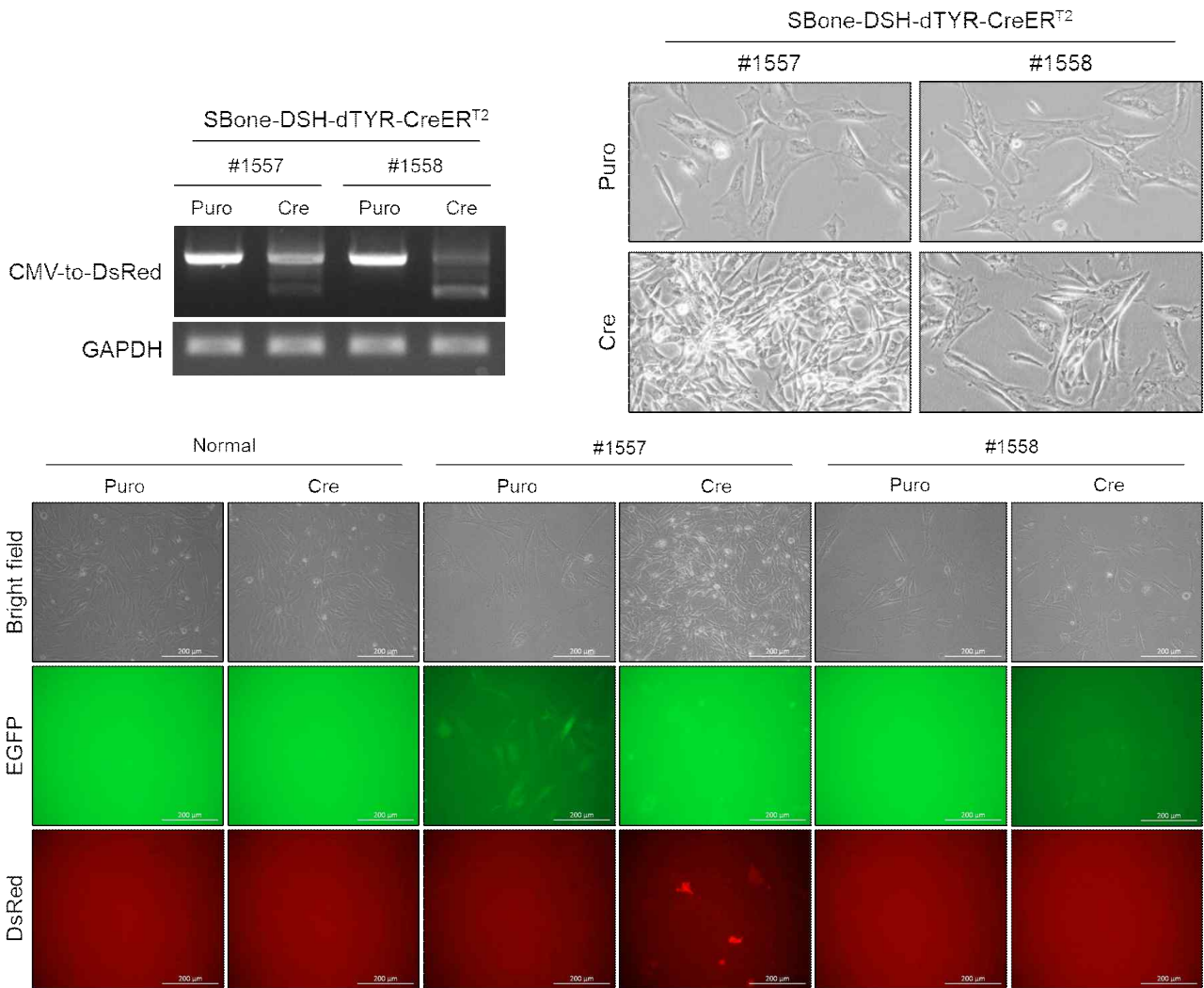
**연구내용4**

**생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석**

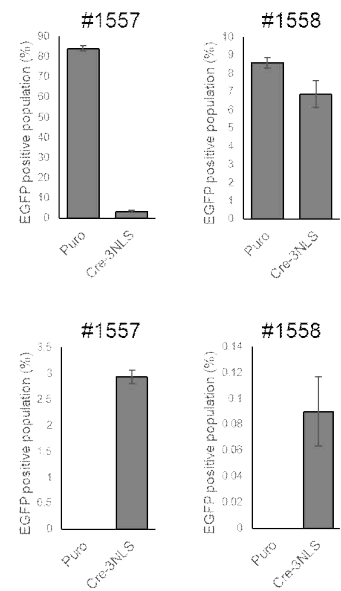
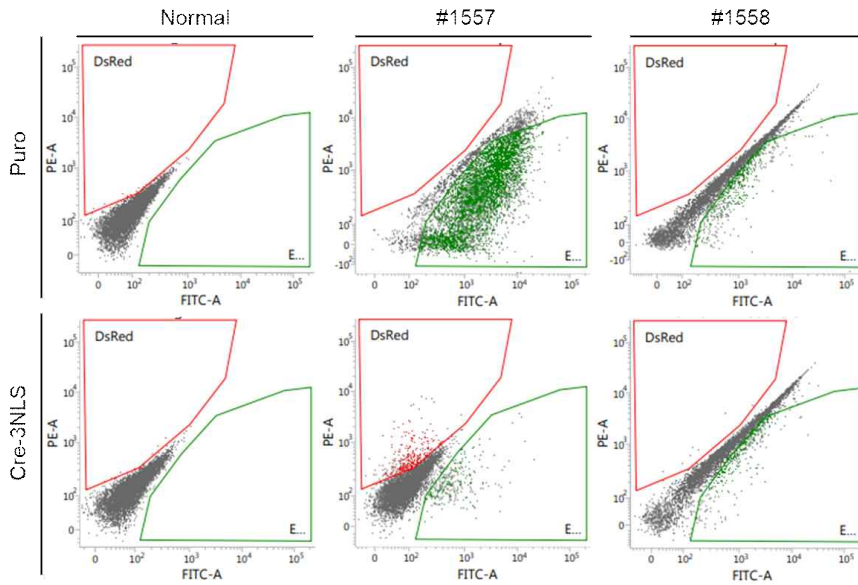
**▣ 생산된 모델 건 생산 및 모델 유래 세포 분석을 통한 모델 유효성 검증**



- Sleeping beauty transposon 시스템을 활용하여 제작한 CMV-LGL-DSH-WPRE-dogTYR-CreERT<sup>2</sup> (SBone-DSH-dTYR-CreERT<sup>2</sup>) 벡터를 도입한 세포주를 (재)아부다비생명공학원에 보내 2 마리의 강아지가 태어나 SBone-DSH-dTYR-CreERT<sup>2</sup> #1557과 #1558로 식별함
- 태어난 2 마리의 강아지 모두 전체 시스템이 도입 여부는 PCR 분석을 통해 확인되었으며, EGFP의 발현 역시 관찰이 되나, #1558 유래 세포의 경우 발현이 매우 약한 것을 확인함



- 도입한 종양 유발 유전자 발현 벡터 시스템에 의해 종양세포화가 잘 나타나는지 검증을 하기 위해, #1557, #1558 두 개체로부터 세포를 확보하여 Cre-3NLS 유전자를 추가로 도입하여 바로 유전자 재조합을 유도하고자 하였음
- #1557, #1558 두 개체 유래 세포 모두 PCR 결과를 통해 재조합된 서열이 증폭됨을 확인하였음
- 다만 #1557 유래 세포의 경우, 명확한 세포의 변화가 나타났지만, #1558의 경우 세포모양의 변화가 뚜렷하게 관찰이 되지 않았음
- 무엇보다도 형광현미경을 통해 관찰을 수행을 해보았을 때, #1557에 Cre-3NLS를 추가한 세포에서만 재조합에 의해 나타나야하는 DsRed 형광유전자가 발현이 되는 것을 관찰하였음. 이에 반해 #1558 유래 세포는 DsRed 발현이 관찰되지 않음



- 추가로, Cre-3NLS를 도입한 세포들에서 형광 발현 양상이 어떻게 나타나는지 관찰을 하기 위해 FACS를 통해 분석을 진행함. 앞선 결과와 마찬가지로 #1557의 경우, 재조합 이전 상황에서는 강한 EGFP가 관찰이 되다가 재조합 이후에는 DsRed-positive population 이 약 3%가 나타남을 확인할 수 있었음. 이에 반해 #1558의 경우는 재조합 이전 상황에서도 약 8% 정도의 세포만이 EGFP positive population으로 확인이 되었으며 그 강도도 매우 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 재조합 이후에는 극히 적은 수의 세포가 DsRed-positive 한 것으로 확인이 됨
- 이 결과를 통해, 도입한 시스템에는 큰 문제가 없으나 CMV 프로모터에 의해 조절이 되는 EGFP 및 DSH construct의 발현 강도에 따라 형광의 발현과 종양유전자 발현에 따른 암세포화 경향이 뚜렷하게 나타남을 확인할 수 있었음
- 다만, 선행연구 결과(PLoS One. 2020; 15(6): e0233784.)에 따르면, in vivo 환경과 in vitro 환경에서는 도입 유전자의 발현 여부가 다를 가능성이 있어, 정확하게는 in vivo 개체 수준에서 EGFP 발현이 지속적으로 관찰이 되는지 확인이 필요할 것으로 판단됨



## 제1 세부과제

충북대학교 산학협력단

최신의 유전자제어기법 활용을 통한 흑색종 질환모델돼지 개발

**세부목표:** 흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증

### 연구내용1

RAS 기반 흑색종 Cre/LoxP inducible 질환모델돼지 특성분석

#### ▣ RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 및 배아줄기세포 수립

##### a. RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 *in vitro* 평가

- 1협동(위탁) 고려대학교에서 제주 재래돼지 태아 섬유아세포 (Jeju Native Pig Fetal Fibroblast, JNPFF)를 활용하여, RAS 기반 흑색종 유발 시스템을 트랜스포존 시스템을 활용해 도입하여 세포주 (JNPFF-DSH)를 제작함 (4차년도 내용)

Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템

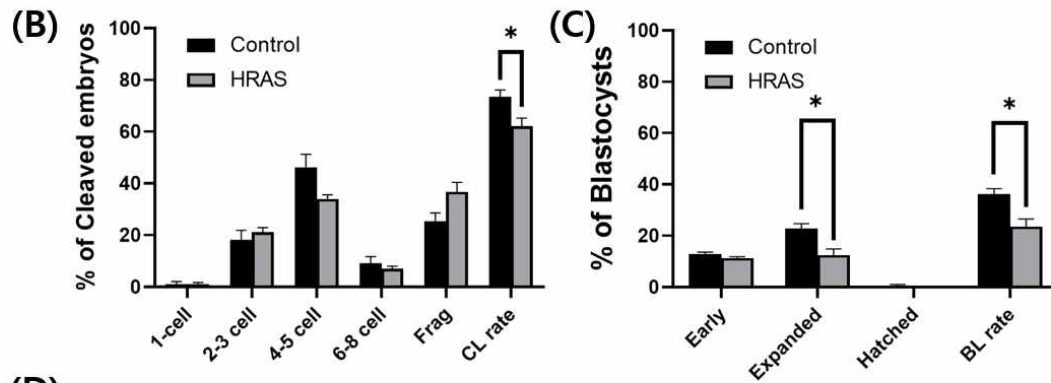
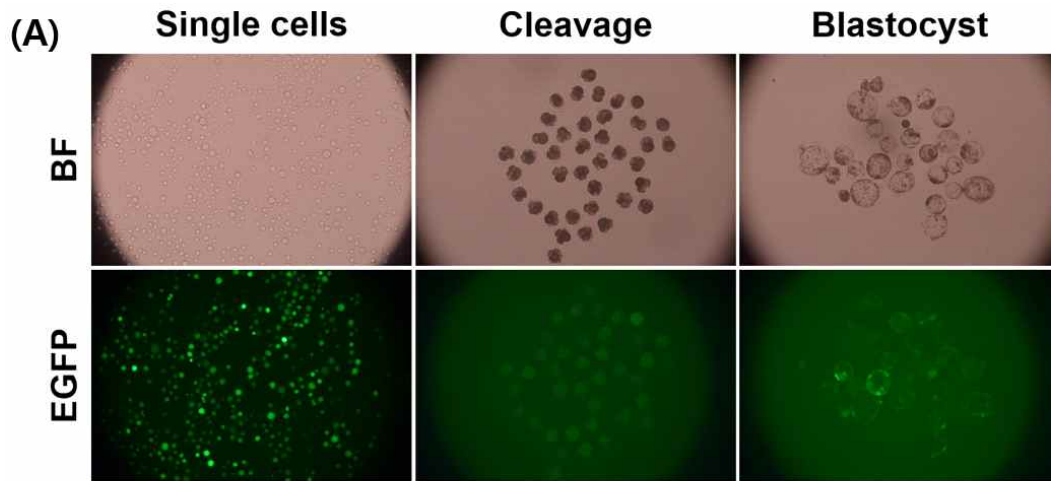


그림. RAS 기반 세포주 JNPFF SB-DSH pTYR-CreER (JNPFF-DSH)의 벡터 모식도

- 배아의 정상적인 발달을 평가하기 위해 JNPFF-DSH 세포주를 활용하여 체세포 핵이식(Somatic cells nuclear transfer, SCNT)을 진행하였음

표. RAS 기반 세포주(JNPFF-DSH)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가

Trial	Egg Num.	Enucleated (M)	Fused (%)	No. of Cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	BL form. (%)	Cell line
				2	4	8	Total (%)					
1	180	63	52 (82.54)	8	13	7	28 (53.85)	12 (23.1)	4 (7.7)		16 (30.8)	#3 ♂ JNPFF P10
		(50)	62	52 (83.87)	8	16	2	26 (50.00)	6 (11.5)	8 (15.4)		14 (26.9)
2	180	60	50 (83.33)	12	24	2	38 (76.00)	6 (12.0)	10 (20.0)		16 (32.)	#3 ♂ JNPFF P10
		(50)	63	56 (88.89)	13	21	5	39 (69.64)	7 (12.5)	10 (17.9)		17 (30.4)
3	180	68	63 (92.65)	7	34	7	48 (76.19)	9 (14.3)	14 (22.2)	1 (1.59)	24 (38.1)	#3 ♂ JNPFF P11
		(50)	68	59 (86.76)	14	21	3	38 (64.41)	6 (10.2)	5 (8.5)		11 (18.6)
4	180	73	57 (78.08)	11	21	7	39 (68.42)	7 (12.3)	15 (26.3)		22 (38.6)	#3 ♂ JNPFF P11
		(50)	75	68 (90.67)	12	21	5	38 (55.88)	8 (11.8)	8 (11.8)		16 (23.5)



(D)

Donor cell line	No. of Oocytes	Fused (%) <sup>†</sup>	No. (%) <sup>*</sup> of Embryos developed to	
			≥ 2-Cell	Blastocyst
Control donor	201	170 (84.7 ± 4.3)	125 (73.5 ± 2.6) <sup>a</sup>	62 (36.2 ± 2.1) <sup>a</sup>
♂ JNFCs-DSH	206	186 (90.4 ± 1.9)	115 (62.1 ± 3.2) <sup>b</sup>	44 (23.6 ± 2.9) <sup>b</sup>

그림. RAS 기반 세포주(JNPF-DSH)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가. (A) JNPF-DSH의 single cells 모습과 SCNT 후 2일차 분할, 7일차의 배반포 형태 및 EGFP 발현 확인. (B) 각 세포주의 SCNT 후 2일차 분할 패턴 및 7일차 배반포 형성을 확인. (D) Control 세포와 JNPF-DSH 세포주의 SCNT 후 발달능 평가

- JNPF-DSH 세포주를 이용하여, SCNT 진행 시 single cells 수준에서 EGFP가 세포주에서 잘 발현되는 것을 확인하였고, SCNT 후 2일 뒤 분할 상태 및 7일 뒤 배반포 상태에서도 EGFP 발현을 관찰하였음
- 종양 유전자가 삽입되지 않은 일반 control 세포주 (JNPF)와 JNPF-DSH 세포주의 총 4회 SCNT 후 각각 배아 발달능을 비교했을 때, Fusion rate에서는 차이가 없었음
- 하지만, 분할률 및 배반포 형성을 모두 JNPF-DSH 세포주를 사용하였을 때, control 세포주에 비해 유의적으로 감소되는 것으로 확인됨

b. RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용한 배아줄기세포 수립 및 특성분석

- RAS 기반 세포주인 JNPF-DSH를 이용하여 SCNT 실시한 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용하여 배아줄기세포 수립을 실시함
- 생산된 배반포를 mouse embryonic fibroblast(MEF)에 whole seeding을 실시함. seeding 후 2일차에 MEF에 부착된 배반포를 확인할 수 있었으며, 7일차부터 배아줄기세포주 집락형성을 관찰할 수 있었음

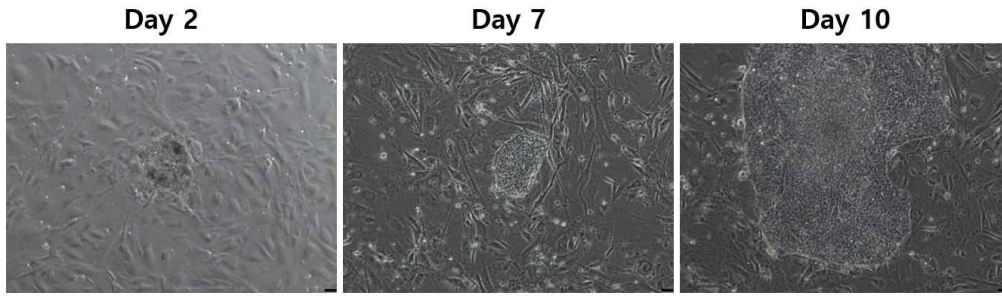


그림. JNPFF-DSH pES cells #1의 seeding 후 수립 모습

- 수립된 JNPFF-DSH pES cells #1의 만능성을 확인하기 위해, alkaline phosphatase(AP) 염색과 만능성 관련 유전자인 SOX2, OCT4, SSEA4, NANOG를 면역염색을 통한 검증시, 모두 positive를 나타내었음
- gDNA PCR를 통해 JNPFF-DSH에 삽입된 종양 유발 유전자의 삽입 여부를 확인하였음. 공여세포주와 마찬가지로 JNPFF-DSH pES cells #1에서도 EGFP, HRAS<sup>G12V</sup>, CreER<sup>T2</sup>가 삽입된 결과를 확인함
- JNPFF-DSH pES cells #1를 이용하여 정상적인 분화능을 확인하기 위해, bFGF를 제거한 배지에서 10일 동안 배양하였음. embryonic bodies(EB)가 정상적으로 형성되었으며, EGFP도 발현되었음
- 수립된 EB를 이용하여, 삼배엽 관련 유전자인 Cytokeratin 17, TUJ1, Vimentin를 면역염색을 통해 특성 분석을 수행하였고, 모두 positive를 나타내었음

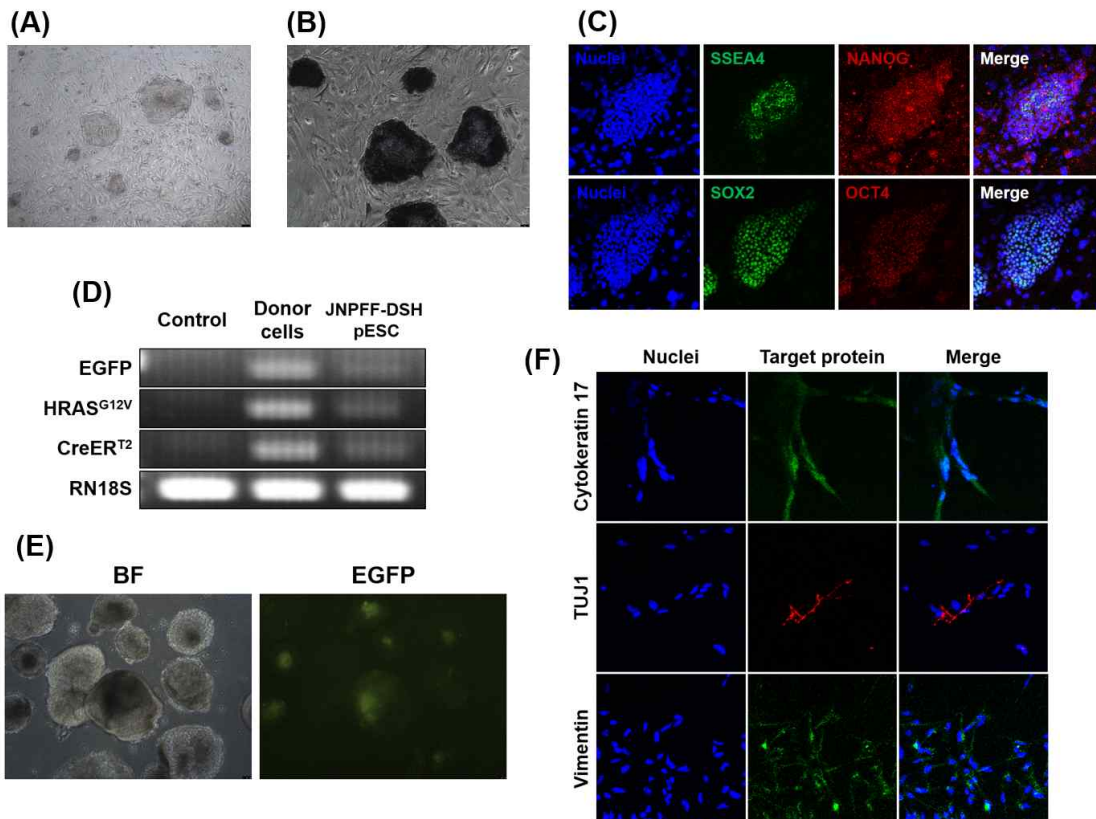


그림. JNPFF-DSH pES cells #1의 특성분석. (A) 계대 1의 JNPFF-DSH pES cells #1의 모습, (B) AP 염색, (C) SSEA4, NANOG, SOX2, OCT4 면역염색, (D) gDNA PCR 유전자 삽입 여부 확인, (E) EB 형성, (F) 삼배엽 분화능 면역염색

#### ▣ RAS 기반 Cre/LoxP 세포를 이용한 SCNT 수행 후 대리모돈에 배아 이식

- RAS 기반 흑색종 모델 돼지를 생산하기 위해, JNPFF-DSH 세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 총 4회 embryo transfer를 실시하였음



표. RAS 기반 세포주(Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식 (4차년도 내용)

이식일자	개체번호	생년월일	배란상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여역원	계대	비고	재발정진단			(조음파)임신진단		진단 키트	분만예정일 (+114)	특이사항
										1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2021-05-13	E7-32	2018-07-25	배란 직후	8-10	211	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P10	크로넥스	2021-06-03	2021-06-10	재발정 6/21			양성	2021-09-04	
2021-05-26	20-107	2020-02-13	배란 직전	8-10	175	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P12	크로넥스	2021-06-16	2021-06-23	-	2021-06-22	태낭 확인	양성	2021-09-17	후보돈 (출산이력 없음)
2021-06-23	G1-4	2020-01-14	배란 직후	8-10	136	0	Cloud SB1-DSH pTYR-CreER	P13	크로넥스	2021-07-14	2021-07-21					2021-10-15	

- 또한, RAS 기반 세포주(JNPFF-DSH 혹은 Cloud SB1-DSH pTYR-CreER)에서도 특이점이 발견됨. 트랜스포존 시스템을 통해 벡터를 세포주 내로 도입하고, 초기 계대(P7-10)에서는 CreER이 recombination 되는 현상을 관찰할 수 없었으나(RFP 미발현), 10 계대 이상부터는 recombination이 되는 현상이 나타남(RFP 발현)
- 이러한 문제점으로 인해 RAS 기반 산자를 생산하기 위한 Embryo transfer는 초기 계대(P7-10)의 세포주를 이용하여 SCNT 후 이식을 진행했으나, 결과적으로 산자를 생산하지 못했음

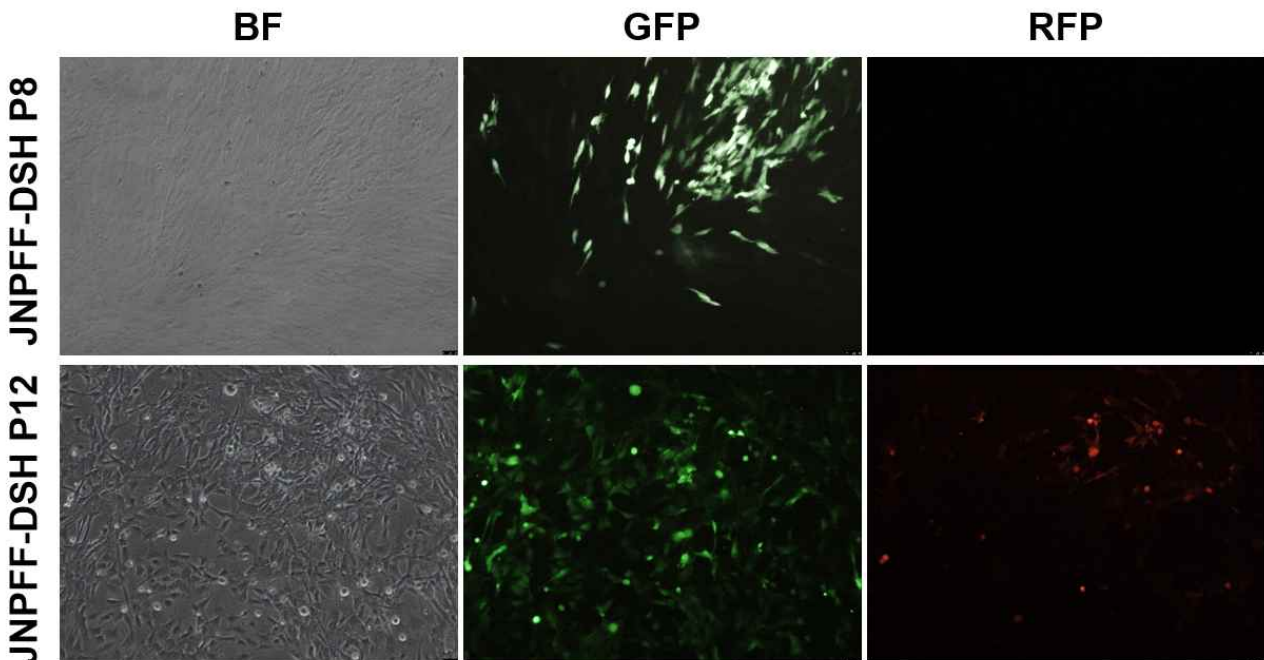


그림. RAS 기반 세포주(JNPFF-DSH)의 자발적인 recombination

- 따라서, 본 연구팀은 RAS기반 세포주(JNPFF-DSH)를 공여 세포주로서 이용할 시, control 세포주에 비해 유의적으로 배아 발달율이 감소하는 결과와 SCNT 유래된 배반포를 이용한 배아줄기세포주 형성실험을 통해 시험관내 배반포 발달예측지표(배반포의 자궁내 착상여부 및 삼배엽 형성)를 개발하였음
- 시험관내 예측지표 결과와 마찬가지로, SCNT 후 배아를 대리모돈에 이식함으로써 재발정이 오지 않는 것을 보아 자궁에 착상 및 태낭 형성까지 가능한 것은 확인하였지만, 결과적으로는 분만예정일이 초과했음에도 불구하고 산자는 확인할 수 없었음
- 또한, 공여 세포주의 후기 계대로 넘어갈수록 자발적인 recombination이 일어남에 따라 의도하지 않은 HRAS<sup>G12V</sup>의 유도를 확인하였음. 결과들을 종합하여, RAS기반 세포주는 멜라노마 특이적 질환모델을 생산하기에 부적합하다고 판단함

연구내용2

질환모델돼지의 정액동결 및 *in vitro* 수정능평가

▣ 질환모델돼지의 정액채취 후 정액동결 및 *in vitro* 수정능 평가



- 4차년도 연구결과로 정액동결 프로토콜을 수립하였음. 하지만, 제주재래 돼지 기반 BRAF 흑색종 모델 개체가 아직 성숙이 오지 않았으므로 추후 성숙 후 진행할 예정이며, 관련 추가연구로 Myo-inositol 활용 정액 냉장보관 실험을 아래와 같이 수행하였음

**▣ Myo-inositol을 이용한 돼지 정액 냉장보관 방법 개발**

- 동결보존은 장기적으로 정액을 보존하기 위한 일반적인 방법임. 하지만, 동결보존을 이용하여 돼지 정액을 보존할 시에 40~50%의 정자가 사멸할 수 있음. 이는, 다른 축종에 비해, 돼지는 동결/해동 과정을 수행할 시 낮은 생존율을 가지고 있음
- 따라서, 대안적인 방법으로 냉장 보존(17℃)은 돼지 정액을 좀 더 쉽고, 짧은 기간에 안정적 상태로 보관하는 방법이 될 수 있음. 정액보존 방법에 관한 연구는 인공수정의 시간적 및 지리적 한계를 극복할 수 있음
- 돼지 정액 보존에 있어서 가장 영향을 많이 미치는 것은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)임. 과도한 ROS 생성은 정자 운동성을 감소시키고, 상태를 악화시킬 수 있음. 이전 연구에서 정액보존제에 항산화제를 첨가하는 것이 산화스트레스로부터 돼지 정자를 보호하는 효율적인 방법이라고 보고됨 (Bathgate R., 2011)
- 충북대학교 연구팀은 질환모델의 정액을 좀 더 효율적으로 보관하기 위해서, 천연에 존재하는 이노시톨 중 가장 활동적인 형태로 비타민 B1 복합체 그룹에 속하는, Myo-inositol을 정액 보존제에 첨가함으로써 미치는 영향을 연구함
- 우선, 냉장 저장기간에(0~7일) 따라 여러 가지 농도의 Myo-inositol (2, 4, 5, 6 mg/mL)를 정액 보존제와 함께 처리함으로써 운동성을 CASA(Computer assisted sperm analysis)를 이용해서 측정하였음. 측정결과, 2 mg/mL Myo-inositol 그룹에서 control 그룹에 비해 유의적으로 저장기간에 따라 운동성이 높은 것으로 확인이 됨

**표. Myo-inositol 처리가 돼지 정자의 운동성과 직진성에 미치는 효과**

Parameter	Treatment (mg/mL)	Time of storage (days)				
		0	1	3	5	7
Total motility (%)	0	87.4 ± 0.5	82.8 ± 1.8	62.8 ± 3.1 <sup>ab</sup>	50.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	38.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
	2	87.4 ± 0.5	84.1 ± 1.0	70.5 ± 4.3 <sup>b</sup>	58.6 ± 1.2 <sup>b</sup>	48.9 ± 2.5 <sup>b</sup>
	4	87.4 ± 0.5	83.2 ± 0.6	66.0 ± 2.4 <sup>ab</sup>	55.9 ± 2.3 <sup>ab</sup>	45.5 ± 3.7 <sup>ab</sup>
	6	87.4 ± 0.5	84.5 ± 1.4	64.5 ± 1.5 <sup>ab</sup>	52.5 ± 3.3 <sup>ab</sup>	44.7 ± 4.2 <sup>ab</sup>
	8	87.4 ± 0.5	83.8 ± 1.9	60.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	50.9 ± 2.7 <sup>ab</sup>	42.9 ± 1.8 <sup>ab</sup>
Forward progressive motility (%)	0	72.9 ± 1.0	70.0 ± 2.8	48.5 ± 1.8 <sup>b</sup>	37.3 ± 2.6	27.4 ± 1.9
	2	72.9 ± 1.0	68.3 ± 2.3	55.7 ± 3.6 <sup>c</sup>	44.5 ± 1.8	33.4 ± 2.4
	4	72.9 ± 1.0	68.9 ± 1.7	48.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	41.8 ± 3.6	30.8 ± 3.9
	6	72.9 ± 1.0	64.7 ± 2.8	45.3 ± 2.5 <sup>ab</sup>	39.9 ± 4.1	27.9 ± 3.2
	8	72.9 ± 1.0	63.3 ± 2.2	40.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	37.9 ± 2.9	30.9 ± 1.9

<sup>a-c</sup> Values in the column with different superscript letters differed significantly ( $p < 0.05$ ).

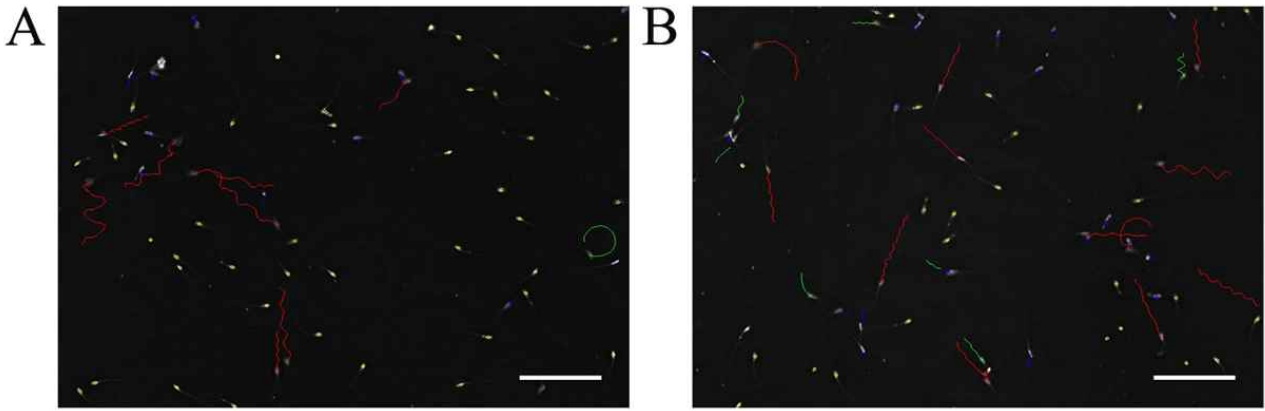


그림. 7일째의 대조군 A와 처리군 (2 mg/mL) B의 정자 운동성. 빠른, 중간 및 느린 움직임은 빨간색, 녹색 및 파란색으로 표시. 움직이지 않는 정자는 노란색으로 표시됨.

- 다음으로, 정자의 생존률을 판단할 수 있는 LIVE/DEAD kit를 사용하여 냉장기간동안 각 농도의 Myo-inositol에 대한 효과를 확인하였음
- 냉장기간 1일차에 대조군에 비해 2, 6, 8 mg/mL Myo-inositol 그룹에서 생존률이 유의적으로 높아지는 것을 확인했으며, 2 mg/mL Myo-inositol 그룹은 3일차와 7일차에서도 대조군에 비해 유의적으로 생존율이 향상하는 것을 확인하였음

표. Myo-inositol 처리가 돼지 정자의 생존률에 미치는 효과

Treatment (mg/mL)	% of sperm viability				
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
0	86.0 ± 1.4	80.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	80.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	79.1 ± 1.0	70.2 ± 2.7 <sup>a</sup>
2	86.0 ± 1.4	84.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	88.0 ± 1.6 <sup>b</sup>	82.9 ± 0.9	81.6 ± 1.6 <sup>b</sup>
4	86.0 ± 1.4	84.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	83.9 ± 1.5 <sup>ab</sup>	79.2 ± 3.1	74.9 ± 1.8 <sup>ab</sup>
6	86.0 ± 1.4	84.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	84.2 ± 2.4 <sup>ab</sup>	78.7 ± 2.3	74.9 ± 2.1 <sup>ab</sup>
8	86.0 ± 1.4	85.1 ± 1.5 <sup>b</sup>	83.8 ± 1.6 <sup>ab</sup>	77.6 ± 6.4	72.9 ± 3.5 <sup>a</sup>

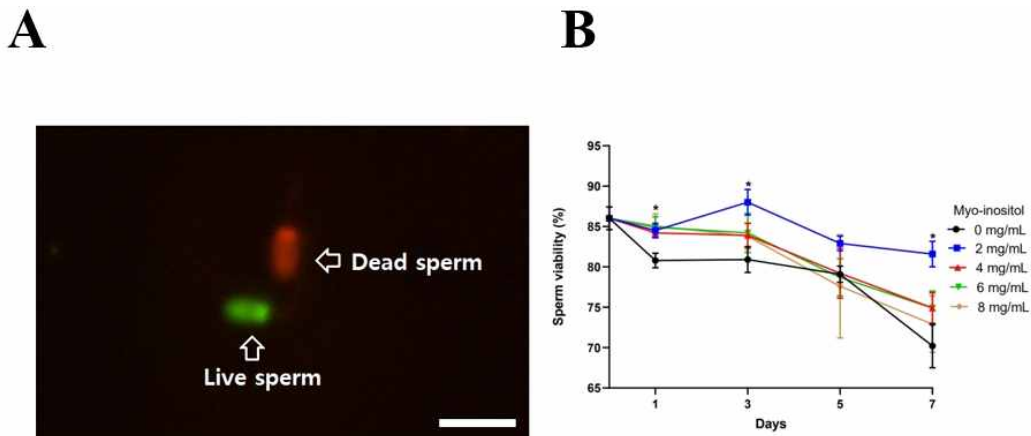


그림. LIVE/DEAD 키트로 염색한 정자 생존력의 형광 이미지

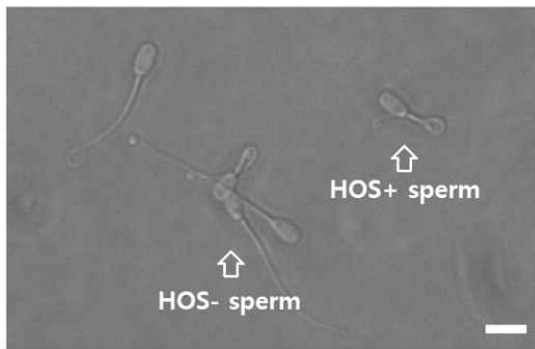
- 정자의 원형질막의 안전성은 수정과정에 있어서 중요한 역할을 할 수가 있음. 따라서, 다양한 농도의 Myo-inositol 처리 후 원형질막의 안전성도 확인하였음
- 2 mg/mL Myo-inositol 처리 5일차 및 7일차에서 대조군에 비해 유의적으로 정자 원형질막 안전성이 증가하는 것을 확인하였음

표. Myo-inositol 처리가 돼지 정자의 원형질막 안전성에 미치는 효과

Treatment (mg/mL)	% of sperm plasma membrane integrity				
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
0	59.2 ± 4.1	52.4 ± 1.9	45.8 ± 2.9 <sup>ab</sup>	39.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	38.6 ± 0.8 <sup>a</sup>
2	59.2 ± 4.1	57.9 ± 1.9	54.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	49.9 ± 2.9 <sup>b</sup>	49.9 ± 4.3 <sup>b</sup>
4	59.2 ± 4.1	58.7 ± 3.5	47.4 ± 2.8 <sup>ab</sup>	48.4 ± 1.8 <sup>bc</sup>	45.3 ± 3.3 <sup>ab</sup>
6	59.2 ± 4.1	49.9 ± 6.8	43.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	40.6 ± 3.6 <sup>ab</sup>	39.4 ± 2.6 <sup>a</sup>
8	59.2 ± 4.1	55.3 ± 3.1	43.1 ± 4.5 <sup>a</sup>	41.4 ± 2.3 <sup>ab</sup>	41.5 ± 2.0 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup> Values in the column with different superscript letters differed significantly ( $p < 0.05$ ). The experiment was replicated six times.

A



B

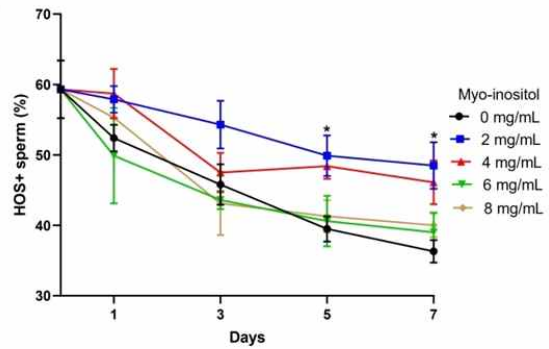


그림. 저삼투압 팽창 분석으로 염색된 정자의 이미지

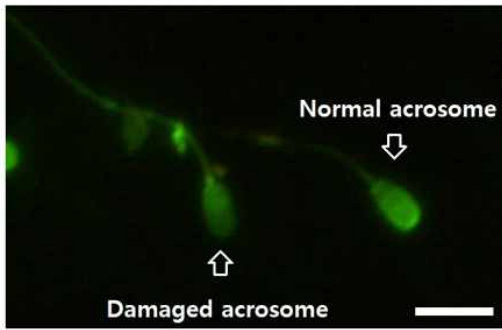
- 정자의 첨체의 안전성도 수정과정에 있어서 중요한 지표가 될 수 있음. FITC-PNA kit를 사용하여 다양한 농도의 Myo-inositol 처리 후 정자 첨체 안전성을 평가하였음
- 냉장기간이 늘어날수록 정자 첨체의 안전성은 대조군과 처리군 모두 점진적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 2 mg/mL Myo-inositol 처리 7일차에서 대조군에 비해 유의적으로 정자 첨체의 안전성이 증가하는 것을 확인하였음

표. Myo-inositol 처리가 돼지 정자 첨체 안전성에 미치는 효과

Treatment (mg/mL)	% of sperm acrosome integrity				
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
0	95.9 ± 0.2	92.1 ± 0.9	88.9 ± 1.6	88.0 ± 2.3	85.2 ± 1.6 <sup>a</sup>
2	95.9 ± 0.2	93.4 ± 1.9	92.3 ± 1.6	91.6 ± 0.9	91.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
4	95.9 ± 0.2	92.2 ± 1.1	89.1 ± 1.4	90.1 ± 2.7	90.3 ± 1.5 <sup>ab</sup>
6	95.9 ± 0.2	92.2 ± 2.9	89.2 ± 1.5	85.8 ± 1.6	87.8 ± 2.8 <sup>ab</sup>
8	95.9 ± 0.2	91.5 ± 2.9	87.6 ± 2.4	87.4 ± 1.6	86.4 ± 1.6 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Values in the column with different superscript letters differed significantly ( $p < 0.05$ ). The experiment was replicated six times.

A



B

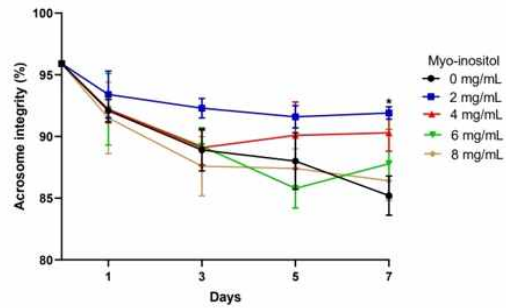


그림. FITC-PNA 키트로 염색한 정자 첨체 안전성의 형광 이미지

- 돼지 정자의 미토콘드리아 활성은 항산화 효과와 밀접한 연관성이 있음. 따라서, 정자의 냉장기간 동안 Myo-inositol 처리가 미토콘드리아의 활성에 영향을 미칠 수 있는지, 확인하기 위해 Rd123 및 PI 염색을 이용하여 확인함
- Myo-inositol 처리 후 7일차에 2 및 6 mg/mL 그룹에서 대조군에 비해 유의적으로 미토콘드리아 활성이 증가하는 것을 확인함. 4 및 8 mg/mL 그룹에서는 대조군과 유의적인 차이 없이 증가하는 경향성만 확인되었음

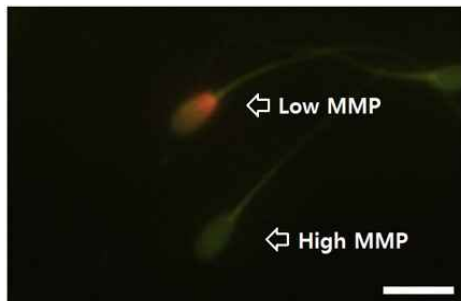
표. Myo-inositol 처리가 돼지 정자 미토콘드리아 활성에 미치는 효과

Treatment (mg/mL)	% of sperm with high MMP				
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
0	94.3 ± 0.0	91.4 ± 0.8	89.8 ± 1.2	90.4 ± 2.3	83.4 ± 1.4 <sup>a</sup>
2	94.3 ± 0.0	92.6 ± 1.7	92.7 ± 2.8	92.3 ± 2.7	89.5 ± 1.4 <sup>c</sup>
4	94.3 ± 0.0	92.4 ± 1.0	92.6 ± 3.1	92.3 ± 1.9	84.5 ± 0.8 <sup>ab</sup>
6	94.3 ± 0.0	90.1 ± 2.3	90.6 ± 2.6	88.8 ± 2.4	88.6 ± 1.2 <sup>bc</sup>
8	94.3 ± 0.0	92.9 ± 1.4	92.2 ± 1.2	88.9 ± 1.1	84.7 ± 2.4 <sup>ab</sup>

boar semen.

<sup>a-c</sup> Values in the column with different superscript letters differed significantly ( $p < 0.05$ ). The experiment was replicated four times.

A



B

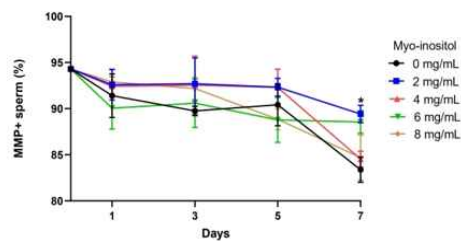


그림. Rhodamine 123(Rd123) 및 Propidium iodide(PI) 염색을 사용한 정자의 미토콘드리아 막전위 (MMP)의 Epifluorescence 이미지

- 위의 실험을 바탕으로 돼지 정자의 냉장 저장 기간동안 Myo-inositol의 적당한 처리 농도는 2 mg/mL로 판단됨. Myo-inositol 처리 후 돼지 정자의 유전자 발현 수준을 확인하기 위해 정량 PCR (qPCR) 분석을 통해, 항산화 관련 유전자(*NRF2*, *NQO1*, *GSR*, *GCLC*, *KEAP1*)를 냉장 저장 7일차의 대조군과 2mg/mL Myo-inositol 처리된 정자를 비교하였음

- 결과적으로 항산화 관련 유전자 NRF2 및 GCLC가 2mg/mL Myo-inositol 처리군에서 대조군에 비해 유의적으로 유전자 발현이 증가하는 것을 확인함

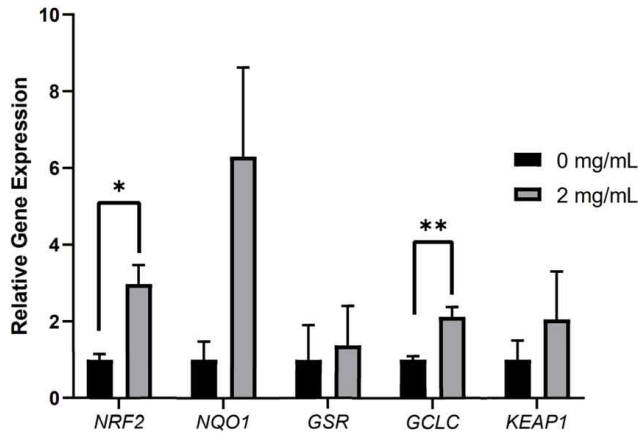


그림. 산화 스트레스와 관련된 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준

- 모든 결과를 바탕으로, 돼지 정자의 냉장 저장 기간동안 2mg/mL Myo-inositol 처리는 항산화 관련 유전자를 증가시킴으로써 미토콘드리아의 활성을 증진시키고, 이는 정자의 운동성, 원형질막 및 첨체의 안정성에 도움을 준 것으로 시사됨
- 이와 같은 결과는 돼지 정액을 좀 더 쉽고, 짧은 기간에 안정적 상태로 보관하는 방법이 될 수 있음. 더불어서, 인공수정의 시간적 및 지리적 한계를 극복할 수 있음

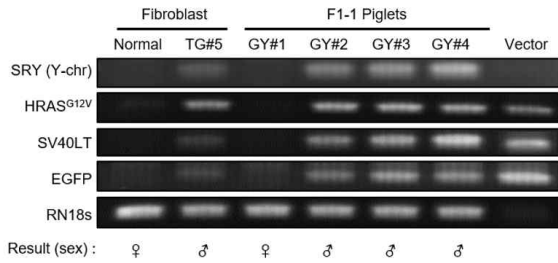
### 연구내용3

### 암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립

#### ▣ 형질전환 돼지모델의 자연교배를 통한 계대전달 확인

- 4차년도 연구결과에서, Hras유전자가 삽입된 질환 모델 돼지(Yucatan, ♂, TG#5)와 제주 재래 흑돼지(♀)를 이용하여 *in vivo*상에서 종양 유발 유전자가 계대전달 되는지 확인하기 위해 자연교배 실시하였음
- 결과로서 F1-1세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자)는 총 4마리의 자손으로, 암컷 1두(GY#1)와 수컷 3두(GY#2, 3, 4)를 후대 생산하였음 (4차년도 내용)
- F1-1세대(GY#1-4)에서는 GY#1을 제외하고 GY#2,3,4에서는 종양 유발 유전자인 HRAS<sup>GV12</sup>가 정상적으로 삽입된 것으로 확인됨. 하지만, F1-1세대끼리 교배하여(GY#2-4 × GY#1) 다음세대인 F2-1(GY#2-1,2,3,4,5)에서는 HRAS<sup>GV12</sup> 유전자가 삽입이 된 것을 확인하지 못함 (4차년도 내용)
- 추가적으로 계대간의 유전자 전달이 F1에서 정지되는지 혹은 계속 이뤄질 수 있는지 분석하기 위해 자연교배를 통해 추가적인 산자들을 생산함. 우선 F1-2세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자, GY#9,10,11,12)와 F1-3 세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자, GY#14,16,18)에서 각 개체의 조직 gDNA를 추출하여 PCR 분석하였음
- 그 결과, F1-2세대(GY#9,10)와 F1-3세대(GY#14,16)에서 HRAS<sup>GV12</sup>가 전달이 되었고, F1에서 oncogene의 전달률은 약 63.6%임

**(A) F1-1**



F1 (piglets)  
 Total : 11  
 Oncogene : 7 (63.6%)  
 Non-oncogene : 4 (36.3%)

**(B) F1-2, F1-3**

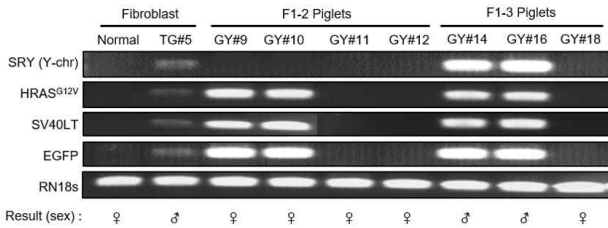


그림. TG#5 개체 F1 산자 gDNA PCR 결과. (A) F1-1세대의 PCR 결과. (B) F1-2, F1-3세대의 PCR 결과

- F2 계대에서도 이러한 유전자가 전달되는지 확인하기 위해, F2-2세대 (F1-2세대(GY#9, 암컷) × 제주 재래돼지 (수컷))를 자연교배를 통해 생산하였음. F2-1 결과와는 다르게, F2-2세대에서는 HRAS<sup>G12V</sup>가 정상적으로 유전자 전달이 되는 것을 확인하였음
- F2-2세대(1Y#2-8,9,10,13)에서 유전자 계대 전달이 되는 것을 확인하였고, 이는 수컷과 암컷에 상관없이 유전자 도입이 되었음

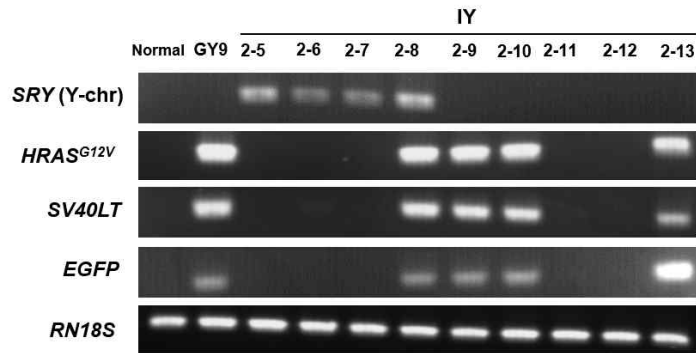


그림. TG#5 개체 F2 산자 gDNA PCR 결과

- 추가적인 유전자 계대 전달을 확인하기 위해 F2-2세대 개체들의 UV를 통한 형광유전자 발현을 확인하였음. 원래의 종양이 삽입된 유카탄 개체(TG#5)뿐만 아니라, 그 계통의 F2-2세대에서도 EGFP의 발현이 확인되었음

(A) TG#5

(B) IY

NC

IY#2-9

IY#2-10

IY#2-13



그림. TG#5 개체와 F2-2세대 산자들의 EGFP 발현 확인. (A) TG#5 개체, (B)F2-2세대의 IY#2-9, 10, 13에서 EGFP 발현 확인. 화살표, 형광 발현.

- 유전자가 삽입된 F2-2 개체의 조직을 샘플링하여, 초대배양을 통해 섬유아세포를 구축하였음. 각 개체 유래된 섬유아세포에서도 형광 유전자가 발현하는 것을 확인할 수 있었음
- 특히, IY#2-9개체의 섬유아세포는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)으로 기탁 완료하였음 (기탁번호 : BP1915993)

표. 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원) 기탁 목록

기탁번호	생물자원명 / 분리번호	연구과제명	과제책임자	비고
BP1915993	CMV-EGFP-DSH F2 piglet fibroblast	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포주

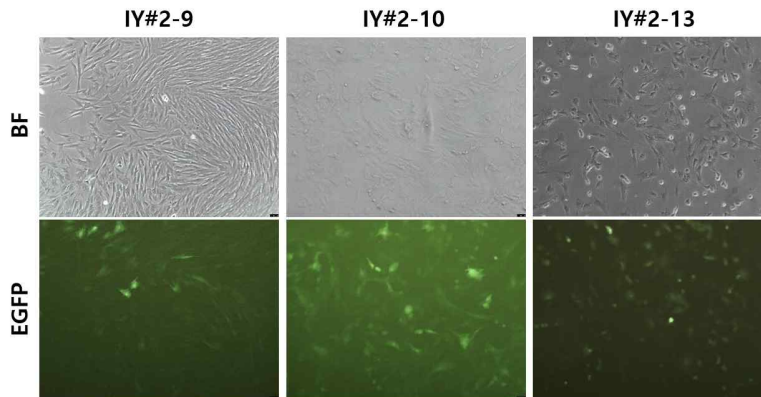


그림. F2-2세대 산자들의 세포주 구축

표. F2-2세대 산자들의 초대배양 정보

Cell type	Cell line	Passage	No. of vial
Skin fibroblast	TG5 piglet F2 IY#2-9	3	2
Skin fibroblast	TG5 piglet F2 IY#2-10	1	1
Skin fibroblast	TG5 piglet F2 IY#2-13	0 or 1	3

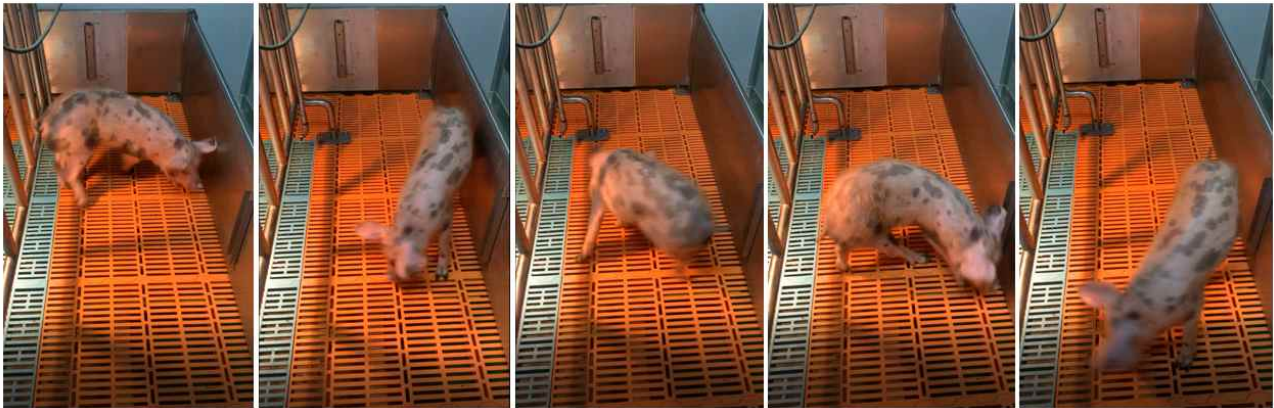
- HRAS<sup>G12</sup> 유전자가 삽입된 개체를 활용하여 계대간 유전자 전달이 되는 것을 확인하였음. 추후, BRAF 유전자가 삽입된 제주 재래돼지 모델을 활용하여, 다음과 같은 방법으로 유전자의 계대 전달이 되는지 추후 확인할 예정임

**연구내용4**

**비침습적 영상진단을 통한 질환 표현형 분석**

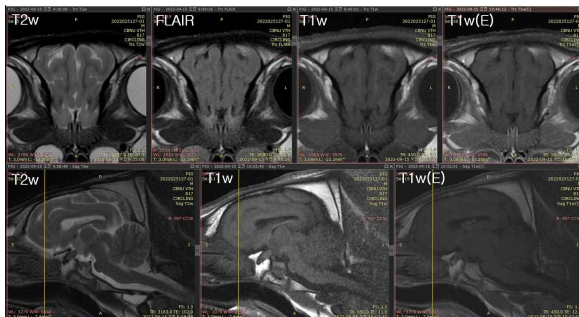
**▣ SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 MRI를 이용한 특성 분석**

- 흑색종은 외부적으로 종양이 확인되는 것뿐만 아니라, 전이성이 있을시(악성의 유무), 림프절, 폐, 간 등 여러 조직으로 전이될 가능성이 있음
- 5차년도에 생산된 유카탄 기반 BRAF 흑색종 모델 돼지(SB-3PA-DPB reclone)에서 몸무게의 더딘 체증증가와 사육공간을 계속 선회하는 증상이 나타남 (세부목표: BRAF 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가 내용)

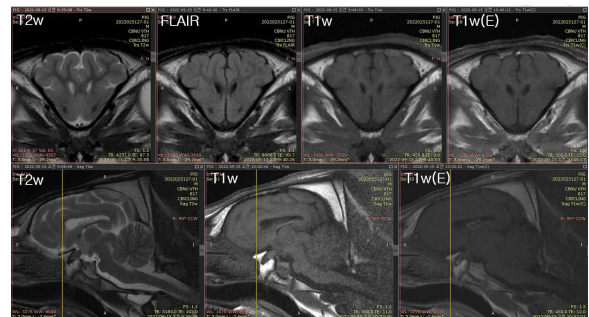


**그림. SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 선회하는 증상**

- 일반적인 유카탄 개체에 비해, 체중의 체증증가가 느리고, 크기가 작은 것은 연구팀에서 삽입한 벡터로 인하여 왜소증(Dwarfism)을 유발했을 가능성이 있음
- 또한, 선회하는 증상은 뇌의 이상으로 인해 발생할 수 있는 현상임. 따라서, 다음과 같은 표현형이 나타나는 원인이 흑색종으로 기인한 전이로서 발생한 것인지 확인하기 위해, 비침습적으로 판단할 수 있는 MRI (Magnetic Resonance Imaging) 검사를 활용함

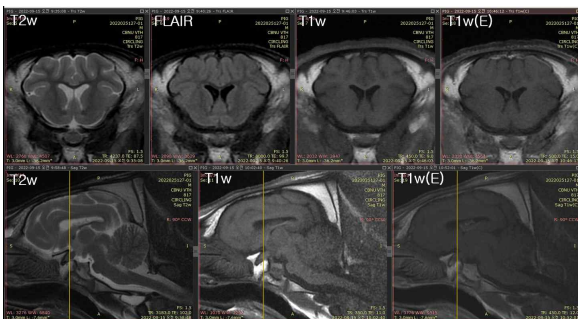


**그림. 전두엽(Frontal lobe) 관찰 1.** 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

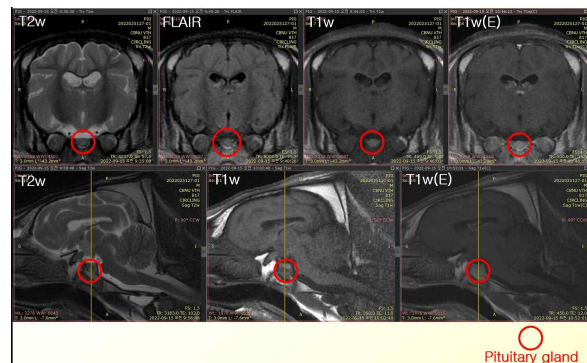


**그림. 전두엽(Frontal lobe) 관찰 2.** 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

- SB-3PA-DPB reclone TG#1의 전두엽(Frontal lobe)은 MRI 검사상 특별한 소견을 관찰할 수 없었음



**그림. 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes) 관찰 1.** 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view



**그림. 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes) 관찰 2, 시상(Thalamus) 1, 뇌하수체(Pituitary gland) 관찰.** 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view



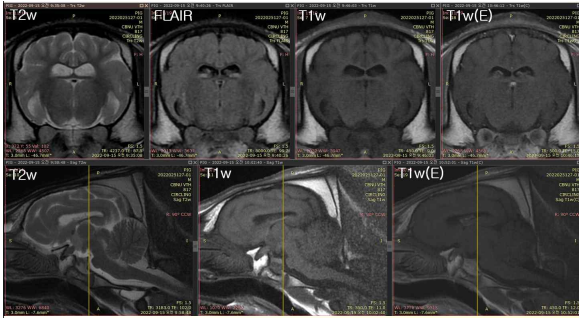


그림. 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes) 관찰 3, 시상(Thalamus) 2. 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

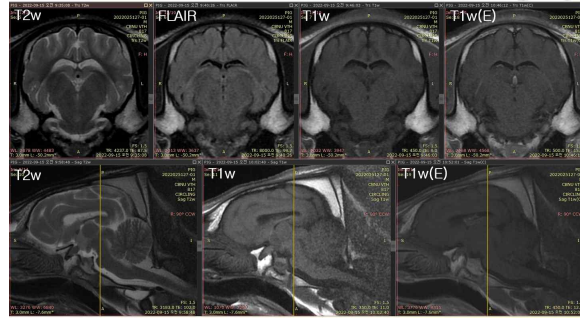


그림. 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes) 관찰 4, 뇌줄기(brainstem (midbrain&pon)) 1. 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

- SB-3PA-DPB reclone TG#1의 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes), 시상(Thalamus), 뇌하수체(Pituitary gland), 뇌줄기(brainstem (midbrain&pon))는 MRI 검사상 특별한 소견을 관찰할 수 없었음

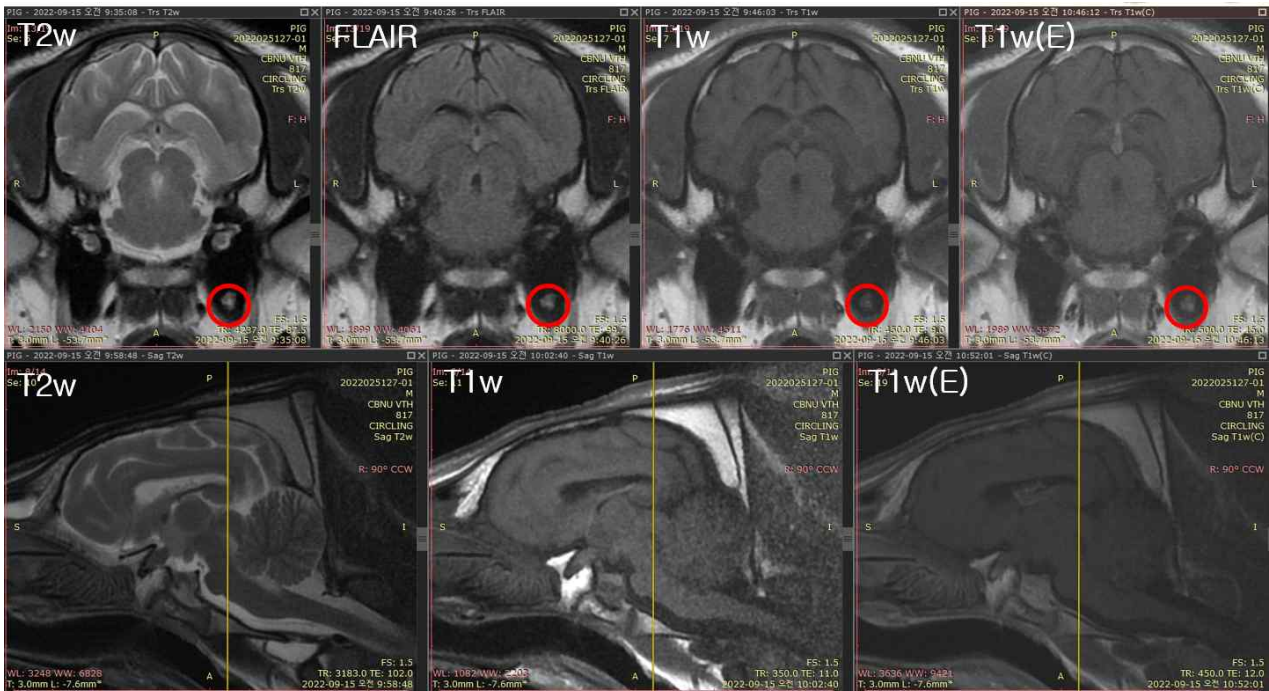


그림. 두정엽(Parietal lobes) & 측두엽(Temporal lobes) 관찰 5, 뇌줄기(brainstem (pon 2)), 고실(Tympanic bullae). 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

- SB-3PA-DPB reclone TG#1의 왼쪽 고실(tympanic bulla)에서 다각형(polygonal) 형태의 병변(lesion)이 관찰됨 (빨간색 동그라미)

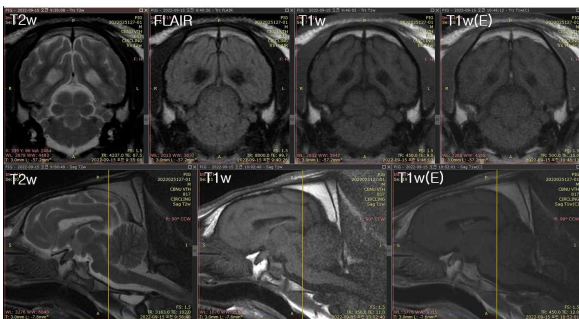


그림. 후두엽(Occipital lobe) 1, 소뇌(cerebellum) 1, 뇌줄기(brainstem (medulla oblongata. 연수. 1)). 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

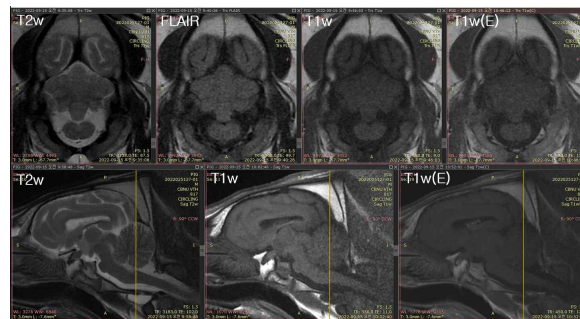


그림. 후두엽(Occipital lobe) 2, 소뇌(cerebellum) 2, 뇌줄기(brainstem (medulla oblongata. 연수. 2)). 위 : Transverse view, 아래 : Sagittal view

- SB-3PA-DPB reclone TG#1의 후두엽(occipital lobe), 소뇌(cerebellum), 뇌줄기(brainstem (medulla oblongata, 연수)는 MRI 검사상 특별한 소견을 관찰할 수 없었음
- 해당 개체에서 뇌종양(Brain tumor)의 경우 일반적으로 T2w&FLAIR sequence에서 hyperintense한 signal을 보이는 well defined marginated lesion이 관찰이 되는 경우가 많으며, 조영제 주입 후 조영 증강되는 경우가 많음. 또한, 추가적으로 mass effect, peritumoral edema, ventricular distortion 등의 특징을 보일 수 있으나, 본 증례에서는 해당 특징들이 관찰이 되지 않았음
- 선회하는 증상의 경우 편측성의 forebrain or vestibular system or cerebellum 병변에 의해 유발이 될 수 있음
- 본 개체의 경우 forebrain, cerebellum, brain stem에는 특별한 병변이 관찰이 되지 않았으나, vestibular system의 일부인 중이내에 T2w와 FLAIR sequence에서 hyper intense한 병변이 관찰이 되었기 때문에 중이 문제로 인해서 선회하는 증상이 나타났을 수 있음
- 하지만, vestibular system으로 인한 선회증의 경우, 다른 전정계증상인 nystagmus, head tilt, leaning, falling 등의 증상이 동반이 되는 경우가 많기 때문에 임상증상과 함께 고려해야할 것으로 생각됨
- 왜소증(Dwarfism)의 경우 Pituitary dwarfism에서 Pituitary gland의 영상학적 특징은 gland의 크기가 작거나(pituitary hypoplasia) cyst가 관찰이 되는 것임. 하지만, 본 개체에서는 cyst가 관찰이 되지 않음
- Pituitary hypoplasia를 진단하기 위해서는 정상 Yucatan miniature pig의 pituitary gland 크기의 정상범위와 비교를 해야 하나, 현재 정상범위가 알려지지 않아 비교할 수 없음
- 또한, dwarfism을 유발할 수 있는 다른 내분비질환(hypothyroidism, hypo- and hyper-adrenocorticism, diabetes mellitus)과 GI disorders, exocrine pancreatic insufficiency, 간 질환, 신장질환, 심장병과 같은 질환 등에 대한 감별이 필요함
- 따라서, MRI를 통해 비침습적 영상진단으로 SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체는 좌측 중이쪽에서 이상소견이 관찰됨. 하지만, 왜소증 관련 뇌하수체와 기타 다른 뇌종양 관련 병변은 확인할 수 없었음

## 세부목표: BRAF 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가

### 연구내용1

### BRAF 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증

#### ▣ 유카탄 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증

##### a. SB-3PA-DPB #4 개체 복제 생산 및 분석 (SB-3PA-DPB reclone)

- BRAF 기반 흑색종 모델 돼지를 생산하기 위해, Cloud SB-3PA-DPB TYR-CreER(SB-3PA-DPB) 세포주를 이용해 SCNT 후 대리모돈에 이식하여, 총 5마리의 산자를 생산하였음 (4차년도)
- 5마리의 산자 중, 생존 3마리 중 유전자가 완전히 삽입된 개체는 #4 개체임
- SB-3PA-DPB #4 개체의 세포는 초대배양을 통해서 세포주를 구축하였음. 초기 계대의 세포주를 이용하여 SCNT 후 발달률 평가와 총 4회의 Embryo Transfer를 실시하였음 (4차년도)

표. SB-3PA-DPB #4 개체 섬유아세포의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배관상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여역원	계대	비고	재발정진단			(조음파)임신진단		진단키트	분만예정일 (+114)	특이사항
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2021-09-09	F10-12	2019-10-10	크로넥스 + SH	DJ	배란후	8-10	167	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P4	크로넥스	2021-09-30	2021-10-07	-		음성		2022-01-01	난관 진입시 어려움으로 ampulla 부근 주입, 후보돈 (출산이력 없음)
2021-09-16	D-25	2017-12-06	크로넥스	DJ	배란 직전	8-10	145	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P5	크로넥스	2021-10-07	2021-10-14	재발정 10/12		음성		2022-01-08	
2021-10-20	GY-1	2020-02-21	SH	DJ	배란중	8-10	153	30	3PA #4 piglet fibroblast HR	P9	크로넥스	2021-11-10	2021-11-17					2022-02-11	수술할때 대장 문제 있었음
2021-11-10	H2-10	2021-02-12	크로넥스	DJ	배란 직후	8-10	157	0	3PA #4 piglet fibroblast HR	P12	크로넥스	2021-12-01	2021-12-08					2022-03-04	초산돈

- 2021.10.20. 이식일자의 대리모돈에서 47일경 태낭을 확인할 수 있었음.

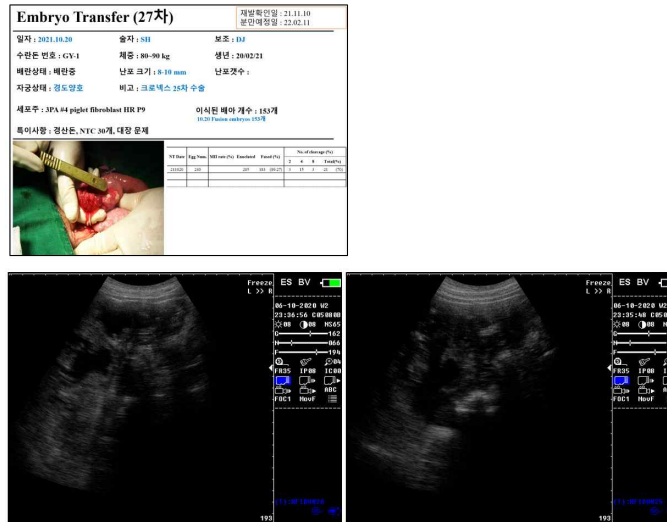


그림. 2021.10.20. 이식 및 이식 후 47일경 태낭관찰.

- 21.10.20. 이식 후 22.02.14. (117일경) SB-3PA-DPB #4 재복제 개체(SB-3PA-DPB reclone)를 2마리 생산하였음. 각 개체의 생시체중은 #1 (720g), #2 (850g)으로서 이전 태어난 개체들보다는 양호함
- 유전자 삽입 여부를 판단하기 위해, 각 개체의 탯줄을 통해 gDNA 추출 후 PCR를 통해서 형광유전자(EGFP), 종양유발유전자 BRAF<sup>V600E</sup>와 CreER<sup>T2</sup>를 분석하였음. 분석 결과 두 마리 모두 모든 유전자가 삽입된 것을 확인하였음. 따라서, 재복제를 통해 유카탄 기반 BRAF 흑색종 모델 돼지를 생산하였음

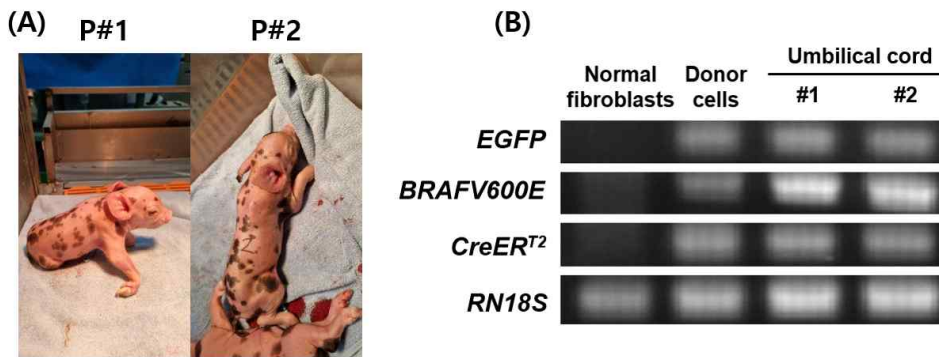


그림. SB-3PA-DPB reclone TG 개체 생산. (A) SB-3PA-DPB reclone 개체 사진, (B) gDNA PCR 분석.

- 각 개체 유래 탯줄을 초대배양을 통해서 세포주 구축하였고, 형광발현(EGFP)을 통해서 세포주에 유전자 삽입여부를 확인하였음. 세포주 뿐만 아니라, 각 개체에서도 EGFP가 정상적으로 발현이 되는 것을 확인함

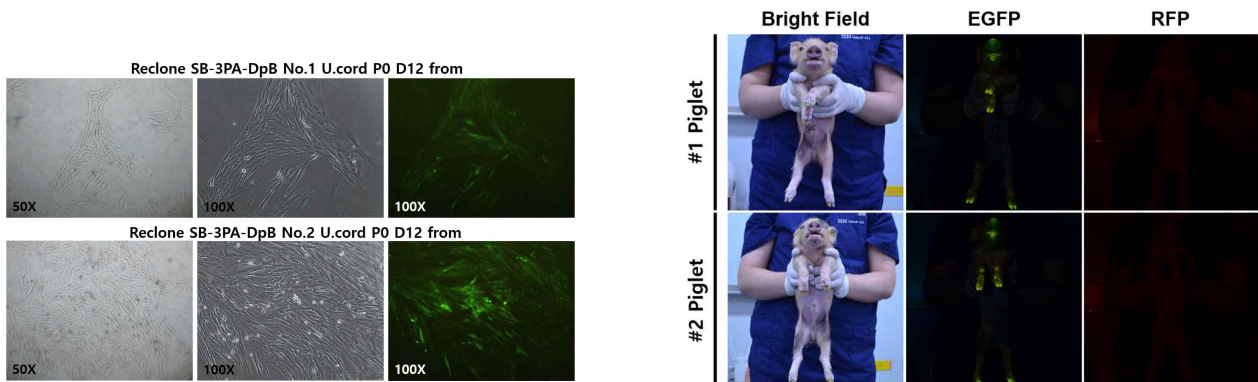


그림. SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 탯줄 초대배양

그림. SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 EGFP 발현 확인

b. SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 유효성 검증

- SB-3PA-DPB reclone TG 개체들의 BRAF 기반 흑색종 모델로서의 유효성을 평가하기 위해, 우선 *in vitro* 에서 유도가 될 수 있는지 확인이 필요함. 따라서, 각 개체 유래의 섬유아세포를 초대배양을 통해 구축하였고, EGFP 발현 되는 것을 확인하였음

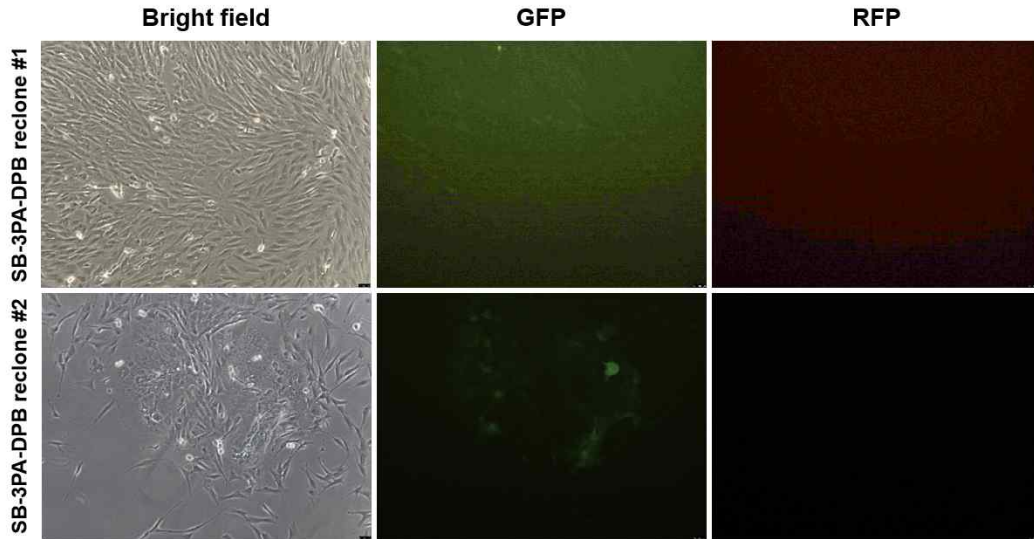


그림. SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 섬유아세포 초대배양

표. SB-3PA-DPB reclone TG 개체의 초대배양 정보

Cell lines	Tissue origin	Cell information	No. vials
Umbilical cord-derived cells	Umbilical cord	SB-3PA-DPB TYR-CreER reclone TG#1 Umbilical cord	P0, 4 vials
Umbilical cord-derived cells	Umbilical cord	SB-3PA-DPB TYR-CreER reclone TG#2 Umbilical cord	P0, 4 vials
Skin fibroblast	Ear	SB-3PA-DPB TYR-CreER reclone TG#1 Fibroblast	P3, 4 vials
Skin fibroblast	Head skin	SB-3PA-DPB TYR-CreER reclone TG#2 Fibroblast	P1, 4 vials

- SB-3PA-DPB reclone TG 개체들의 세포주는 위탁기관인 고려대학교 산학협력단에서 *in vitro*에서 삽입된 벡터에 대한 유효성 검증 분석(위탁기관 고려대 연구결과 참조)
- SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 몸무게 증가량에 특이성을 보임. 다른 유카탄 기반 형질전환 개체(BRAF 기반 SB DppB TG#1, 4차년도 생산)에 대비해서 몸무게의 증체가 더딘 것을 확인함. SB DppB TG#1 개체는 7개월령에 36kg 이지만, SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체는 7개월령에 13.2kg임. 보고된 내용에 따르면, 유카탄 7개월령의 평균 몸무게(Journal of Animal Breeding and Genomics, 2021)는 27kg~28kg 인 것에 비해 SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체는 정상체중의 48%인 수준임

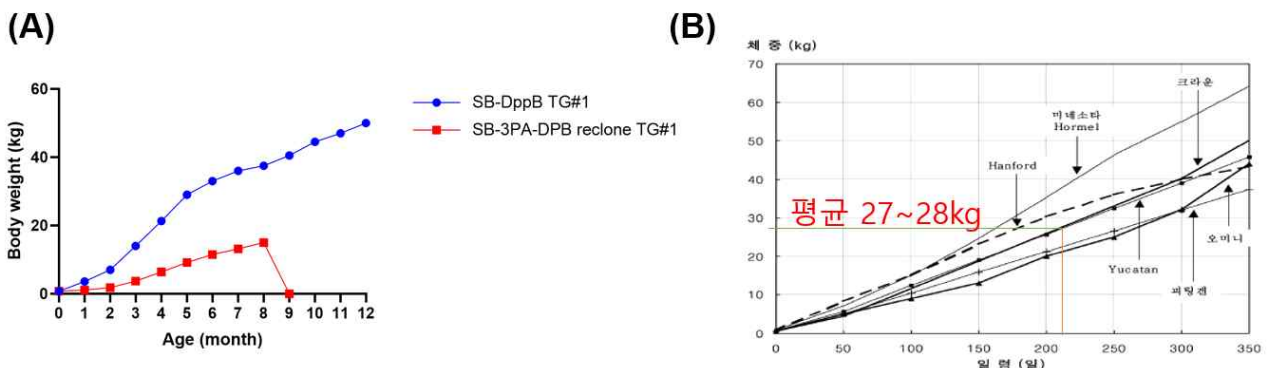


그림. 유카탄 기반 BRAF 흑색종 모델 돼지의 체중 증가표. (A) SB DppB TG#1와 SB-3PA-DPB reclone TG#1의 체중 증가표. (B) 여러 가지 돼지 종들의 평균 체중 증가표 (Journal of Animal Breeding and Genomics, 2021)

- 또한, SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 특이사항으로 케이지 공간에서 계속 선회하는 증상을 확인하였음. 보통 선회하는 현상은 뇌의 이상이 발생함에 나타날 수 있음. 따라서, 이와 같은 특이적인 표현형이 나타나는 원인을 확인하기 위해 MRI를 통해서 이상 여부를 확인하였음 (세부목표 : **흑색종 모델 돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증, 연구내용4-비침습적 영상진단을 통한 질환표현형 분석**). 결과로서, 좌측 중이쪽에서 이상 소견이 관찰됨. 하지만, 뇌하수체와 기타 다른 뇌종양 관련 병변은 확인할 수 없었음
- 몸무게 증가 패턴과 선회하는 표현형이 염색체의 이상으로 발생한 것인지 확인하기 위해, SB-3PA-DPB reclone 개체 관련된 세포주 모두 핵형 분석을 실시하였음. Cloud SB-3PA-DPB (공여세포주), Cloud SB-3PA-DPB TG#4 (재 복제시 이용된 세포주), SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체의 섬유아세포를 각각 비교하였음. 하지만, 다른 개체와 비교하여 염색체 관련 특이적인 부분은 확인할 수 없었음

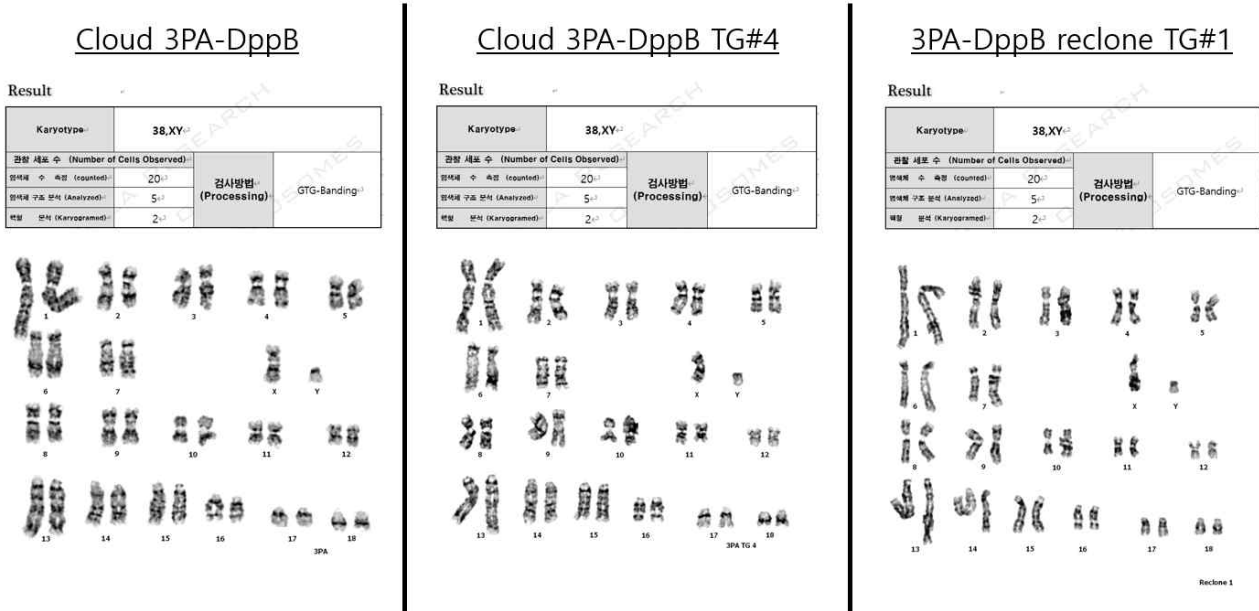


그림. SB-3PA-DPB reclone 개체 관련 세포주의 핵형 분석

- 결과적으로, MRI 촬영에서 좌측 중이쪽의 이상 소견을 보이고, 핵형 분석시 특이한 점을 발견할 수 없었으므로, 이와 같이 선회하는 증상은 중이내 병변으로 인해 나타났을 것으로 추정됨
- SB-3PA-DPB reclone TG#2 개체는 22.05.28. 생후 104일경 폐사하였음. 부검 당시 장기내 및 피부에 특이적인 소견은 발견하지 못하였으며, EGFP는 발현되나, RFP는 발현되지 않는 것으로 확인됨



그림. SB-3PA-DPB reclone #2 개체의 폐사 및 형광발현 확인

- SB-3PA-DPB reclone TG#1 개체는 22.11.04. 생후 264일경 폐사하였음. 폐사하기 전, 사료섭취 불량 및 계속 선회하는 증상이 나타났음. 부검 당시 장기 내 특이적인 부분(간 및 소장)은 샘플링하여 조직학적 분석을 진행하였음
- 조직학적으로 관찰했을 때, 간에서는 심한 다발성 만성 염증이 확인되었고, 소장에서는 심한 다발성 궤양과 함께 광범위한 염증 소견이 관찰됨. 이에 따른 현상은, 초기 자돈 사육당시 개체들의 성장이 더딘 관계로 인큐베이터에서 사육을 진행하였음. 그 당시 외부인자의 유입으로 인해 다음과 같은 결과를 나

타내었을 것으로 추측됨



그림. SB-3PA-DPB reclone #1 개체의 폐사 및 형광발현 확인

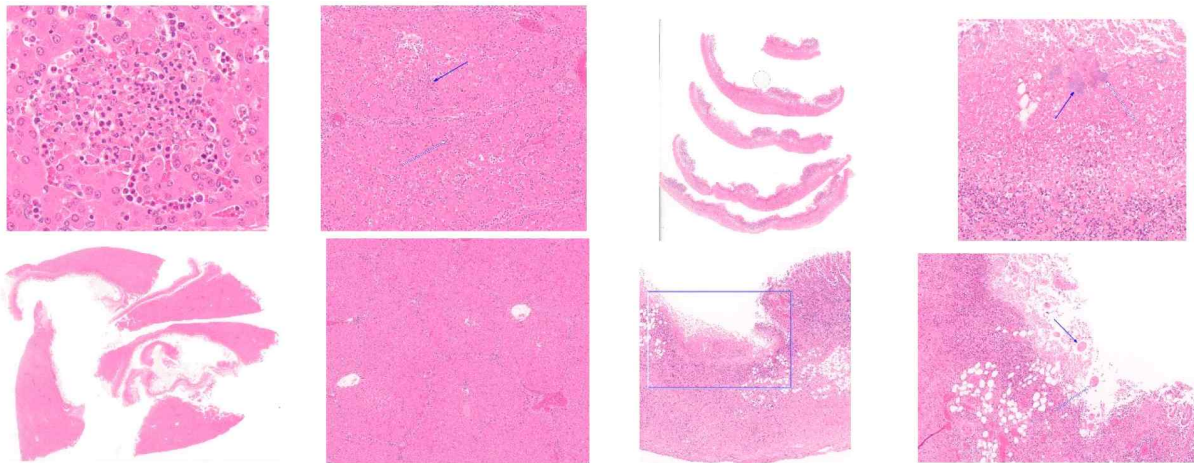


그림. SB-3PA-DPB reclone #1 개체의 간 조직검사

그림. SB-3PA-DPB reclone #1 개체의 소장 조직검사

- 충북대학교 연구팀에서 생산한 유카탄 기반 흑색종 모델 돼지는 모돈(제주재래돼지) 포유시, 자돈의 suckling 능력 부족, 입천장의 천공, 앞다리 기형, 증체량 불량 등 문제점이 발생하였음
- 따라서, 충북대학교 연구팀은 유카탄 기반으로 흑색종 모델 돼지를 생산하기에는 많은 제한사항이 있어, 협동기관의 실용화 연계를 위하여 크로넥스 보유품종인 제주재래 돼지 종을 이용하였음. 4차년도에 구축한 제주 재래돼지 태아 세포주(JNPFF)를 기반으로 BRAF 흑색종 모델 돼지를 생산하였음

▣ 제주재래 돼지 기반 BRAF 개체 생산 및 유효성 검증

a. JNPFF-DppB 세포주를 이용한 SCNT 수행과 *in vitro* 평가

- 4차년도 내용으로, 1협동(위탁) 고려대학교에서 제주 재래돼지 태아 섬유아세포(JNPFF)를 활용하여, BRAF 기반 흑색종 유발 시스템을 트랜스포존 시스템을 활용해 도입하여 세포주(JNPFF-DppB)를 제작함
- JNPFF-DppB 세포주를 이용하여 배아의 정상적인 발달을 평가하기 위해 체세포 핵이식(SCNT)을 진행하였음

Braf 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



그림. BRAF 기반 세포주 JNPFF SB-DppB pTYR-CreER (JNPFF-DppB)의 벡터 모식도

- JNPFF-DppB 세포주를 이용하여, SCNT 진행 시 single cells 수준에서 EGFP가 세포주에서 잘 발현되는 것을 확인하였고, SCNT 후 2일 뒤 분할 상태 및 7일 뒤 배반포 상태에서도 EGFP 발현을 관찰하였음
- HRAS 기반 세포주인 JNPFF-DSH와는 달리, 분할률 및 배반포 형성률 모두 JNPFF-DppB 세포주를 사용하였을 때, control 세포주에 비해 유의적인 차이는 관찰할 수 없었음. 따라서, BRAF기반 세포주인 JNPFF-DppB는 배아발달에 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨

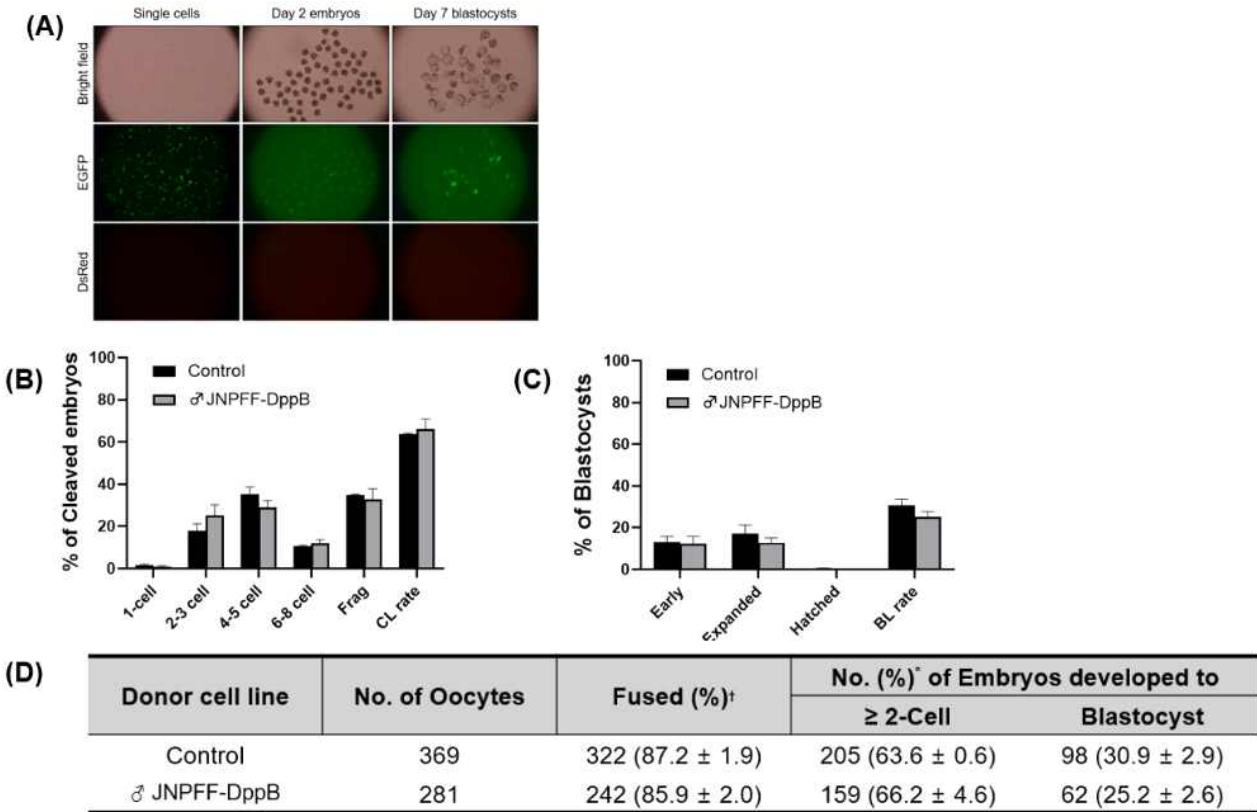


그림. BRAF 기반 세포주(JNPFF-DppB)의 SCNT 후 *in vitro* 발달능 평가. (A) JNPFF-BRAF의 single cells 모습과 SCNT 후 2일차 분할, 7일차의 배반포 형태 및 EGFP 발현 확인. (B) 각 세포주의 SCNT 후 2일차 분할 패턴 및 7일차 배반포 형성률 확인. (D) Control 세포와 JNPFF-DppB 세포주의 SCNT 후 발달능 평가

b. JNPFF-DppB 세포주를 이용한 SCNT 수행 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용한 배아줄기세포 수립 및 특성분석

- JNPFF-DppB 세포주를 이용하여 SCNT 실시한 후 *in vitro*에서 생산된 배반포를 이용하여 배아줄기세포 수립을 실시함
- 생산된 배반포를 MEF에 whole seeding을 실시함. seeding 후 3일차에 MEF에 부착된 배반포를 확인할 수 있었으며, 5일차부터 두 가지 라인의 배아줄기세포주 집락형성을 관찰할 수 있었음

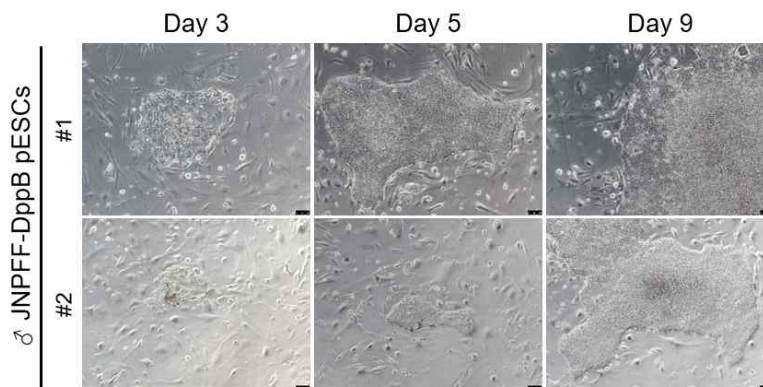


그림. JNPFF-DppB pES cells #1, #2의 seeding 후 수립 모습

- 수립된 두 가지 라인의 JNPFF-DppB pES cells의 만능성을 확인하기 위해, alkaline phosphatase(AP) 염색과 만능성 관련 유전자인 SOX2, OCT4, SSEA4, NANOG를 면역염색을 통해 확인하였을 때, 모두 positive를 나타내었음
- 각 배아줄기세포주 유래 gDNA를 이용하여 유전자 삽입여부를 확인하기 위해 PCR를 실시함. 공여세포주와 마찬가지로 JNPFF-DppB pES cells #1, #2에서도 EGFP, BRAF<sup>V600E</sup>, CreER<sup>T2</sup>가 삽입된 것을 확인함

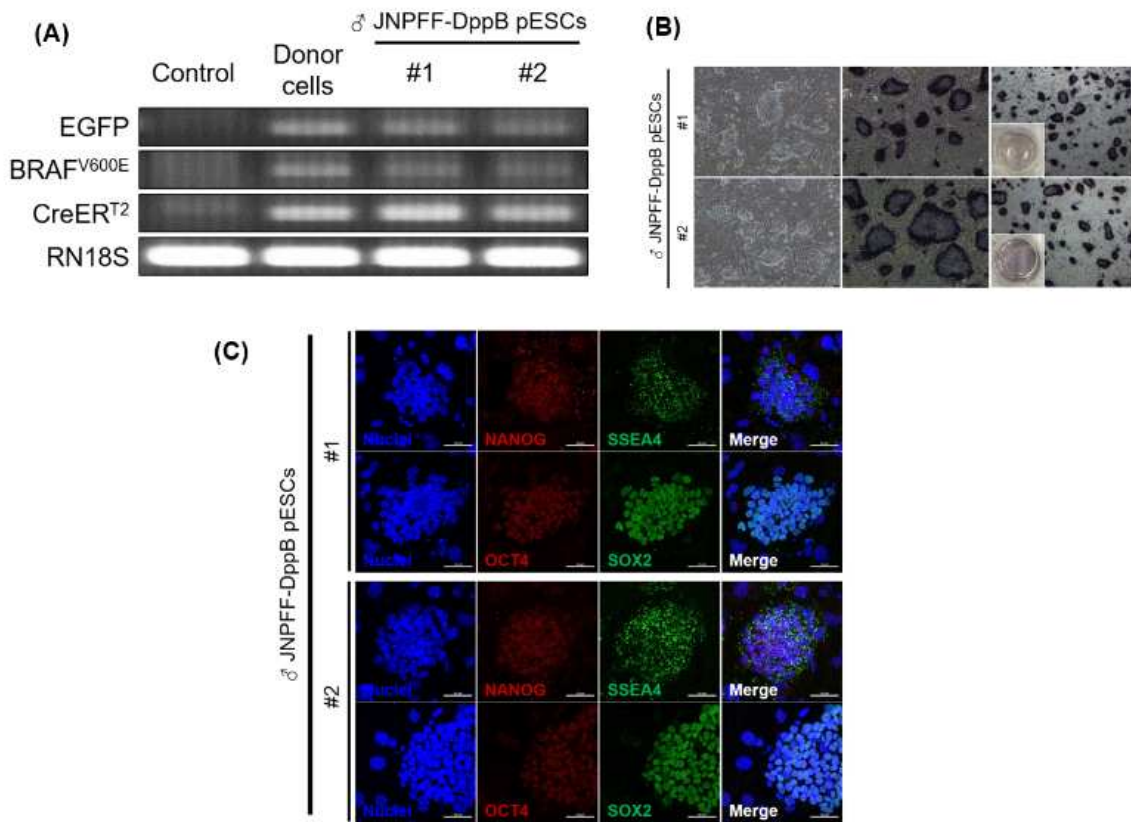


그림. JNPFF-DppB pES cells #1, #2의 특성분석. (A) gDNA PCR 유전자 삽입 여부 확인, (B) AP 염색, (C) SSEA4, NANOG, SOX2, OCT4 면역염색.

c. JNPFF-DppB 개체 생산 및 분석

- BRAF 기반 흑색종 모델 돼지를 생산하기 위해, JNPFF-DppB 세포를 이용하여 SCNT 후 대리모돈에 총 2회 embryo transfer를 실시하였음

표. BRAF 기반 세포주(JNPFF-DppB)의 SCNT 후 대리모돈 배아 이식

이식일자	개체번호	생년월일	시술자	보조자	배란상태	난포크기 (mm)	이식된배아 갯수	ETC	공여핵원	계대	비고	제발정진단			(조음파)임신진단		진단 키트	분만예정일 (+114)	특이사항
												1차(+21)	2차(+28)	결과	진단일자	결과			
2022-01-12	F11-58	2020-11-26	크로넥스	DJ	배란 직후	8-10	172	0	#3 JNFCs-DppB	P9	크로넥스	2022-02-02	2022-02-09		2022-02-09	태낭 확인		2022-05-06	초산돈
2022-01-27	GY-18	2020-10-17	크로넥스	DJ	배란 직전	8-10	184	0	#3 JNFCs-DppB	P11	크로넥스	2022-02-17	2022-02-24		2022-02-23	태낭 확인	양성	2022-05-21	초산돈

### Embryo Transfer (31차)

제발확인일: 22.02.02  
분만예정일: 22.05.06

일자: 2022.01.12      술자:                      보조: DJ  
수란돈 번호: F11-58      체중: 110~120kg      생년: 20/11/26  
배란상태: 배란직후      난포 크기: 8-10 mm      난포갯수:  
자궁상태: 경도양호      비고:

세포주: #3 JNFCs-DppB P9                      이식된 배아 개수: 172개  
01.12 #3 JNFCs-DppB fused embryos: 172

특이사항: 초산돈

ST Date	Egg Num.	Cell	Emulated	Fused (%)				No. of cleavage (%)				
				2	4	8	Total	2	4	8	Total	
220112	120	#3 JNFCs-DppB	187	172	91.98							

### Embryo Transfer (32차)

제발확인일: 22.02.17  
분만예정일: 22.05.21

일자: 2022.01.27      술자:                      보조: DJ  
수란돈 번호: GY-18      체중: 70~80 kg      생년: 20/10/17  
배란상태: 배란직전      난포 크기: 8-10 mm      난포갯수:  
자궁상태: 경도양호      비고:

세포주: #3 ♂ JNFCs-DppB P11                      이식된 배아 개수: 184개  
01.26 #3 JNFCs-DppB cleaved embryos: 63  
01.27 #3 JNFCs-DppB fused embryos: 121

특이사항: 초산돈

ST Date	Egg Num.	Cell	Emulated	Fused (%)				No. of cleavage (%)				
				2	4	8	Total	2	4	8	Total	
220126	180	#3 JNFCs-DppB	180	128	90.78	63						
220127	180	#3 JNFCs-DppB	180	121	90.31							

그림. BRAF 기반 세포주(JNPFF-DppB)의 embryo transfer

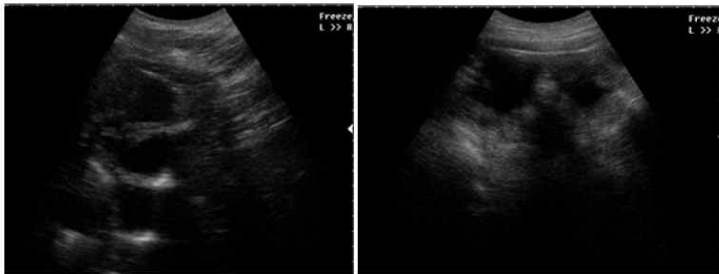


- 22.01.12 이식 일자에서 이식 후 28일차 초음파 검사를 통해 태낭을 관찰하였음. 또한, 22.01.27 이식 일자에서도 28일차에 초음파 검사를 통해 태낭이 관찰되었고, 임신진단키트 사용시 양성으로 확인됨



그림. 22.01.12 이식 대리모돈의 초음파 검사를 이용한 태낭확인

(A)



(B)

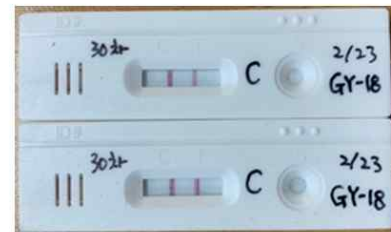


그림. 22.01.27 이식 대리모돈의 임신 진단. (A) 이식 후 28일차 태낭관찰, (B) 이식 후 28일차 임신진단 키트 양성

- 22.01.12 이식 일자에서 이식 후 특이사항 없이 분만예정일 22.05.06보다 1일 뒤인 22.05.07에 총 4두 산자(JNPFF-DppB piglet #1, #2, #3, #4)를 생산하였음
- 각 산자들의 탯줄 샘플을 활용하여, gDNA PCR를 통해 종양 유발 유전자 BRAF<sup>V600E</sup> 뿐만 아니라, EGFP, CreER<sup>T2</sup>가 삽입이 되었는지 확인하였음. 결과로서, 모든 돼지에서 정상적으로 유전자가 모두 삽입이 되어있는 것을 확인하였음

(A)



(B)

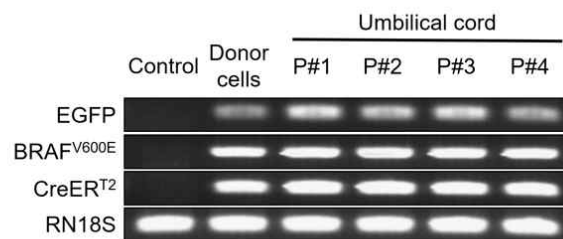


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지 생산 및 분석. (A) JNPFF-DppB 모델 돼지, (B) gDNA PCR 분석

- 각 산자별로 형광 램프를 통해 EGFP가 발현되는 것을 확인하였고, 샘플된 탯줄을 초대배양을 통해 세포주를 구축하였음. 구축된 탯줄 세포에서도 정상적으로 EGFP가 발현되는 것을 확인함

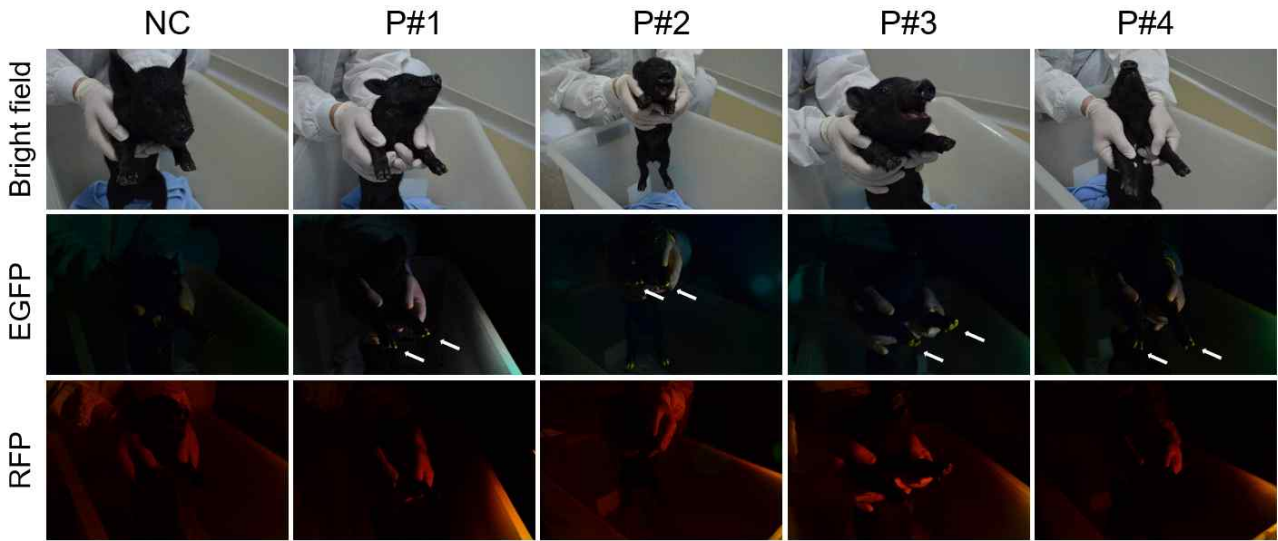


그림. BRAF 기반 JNPF-DppB 흑색종 모델 돼지의 EGFP 발현 확인

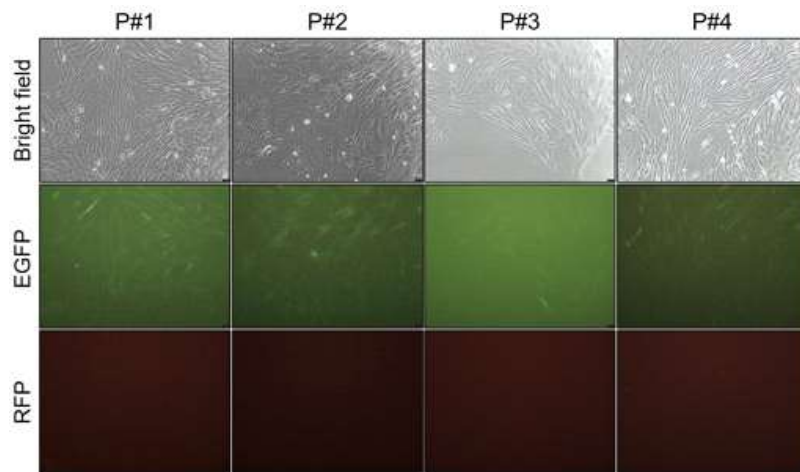


그림. BRAF 기반 JNPF-DppB 흑색종 모델 돼지의 탯줄 세포주에서 EGFP 발현 확인

표. BRAF 기반 JNPF-DppB 흑색종 모델 돼지의 탯줄 세포주 초대배양 정보

Cell type	Cell line	Passage	No. of vial	Freezing date
Umbilical cord	JNFC-SBone-DppB ♂pig #No.1	0	2	2022.05.20
Umbilical cord	JNFC-SBone-DppB ♂pig #No.2	0	2	2022.05.20
Umbilical cord	JNFC-SBone-DppB ♂pig #No.3	0	2	2022.05.20
Umbilical cord	JNFC-SBone-DppB ♂pig #No.4	0	2	2022.05.20

- 22.01.27 이식 일자에서 이식 후 분만예정일 22.05.21보다 4일 뒤인 22.05.25에 총 3두 산자 (JNPF-DppB piglet #5, #6, #7)를 생산하였음. 태어난 산자 중 #6개체는 분만 당일 사산하였음
- 이 개체들도 마찬가지로, 탯줄 샘플을 활용하여, gDNA PCR를 통해 각 유전자의 삽입 유무를 확인하였음. 결과로서, 모든 돼지에서 정상적으로 유전자가 모두 삽입이 되어있는 것을 확인하였음
- 샘플된 탯줄은 초대배양을 통해 세포주를 구축하였음. 해당 탯줄 세포주에서도 형광 발현이 되는 것을 확인함

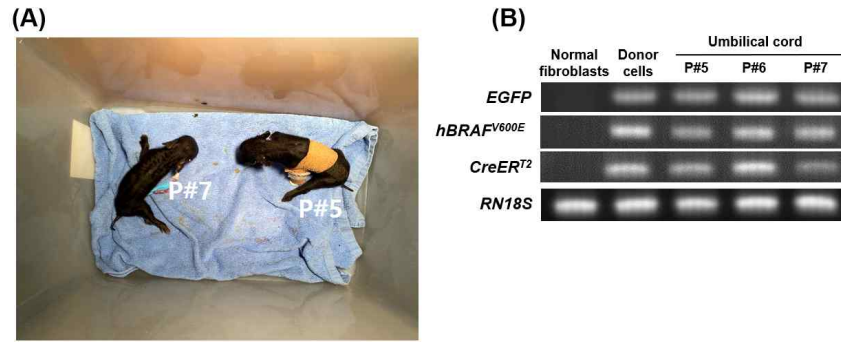


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지 생산 및 분석. (A) JNPFF-DppB 모델 돼지, (B) gDNA PCR 분석

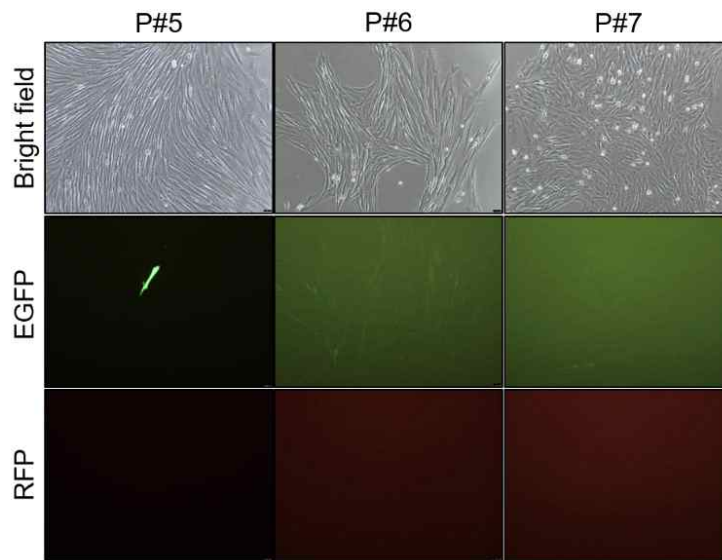


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지의 태줄 세포주에서 EGFP 발현 확인

- 사산된 JNPFF-DppB piglet #6 개체의 부검 결과, 정상 개체와 비교해 외형상 수두증 병변을 관찰하여 부검을 시행하였으며, 발생학적으로 뇌 형성부전 결과를 확인하였음

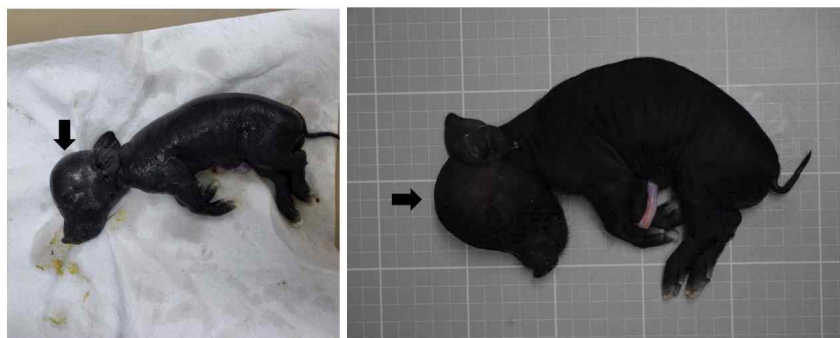


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #6의 비정상적인 발달

- JNPFF-DppB piglet #5, #6, #7 개체에서 EGFP 형광 발현을 확인했을 때, 발굽에서 발현되는 것으로 확인됨

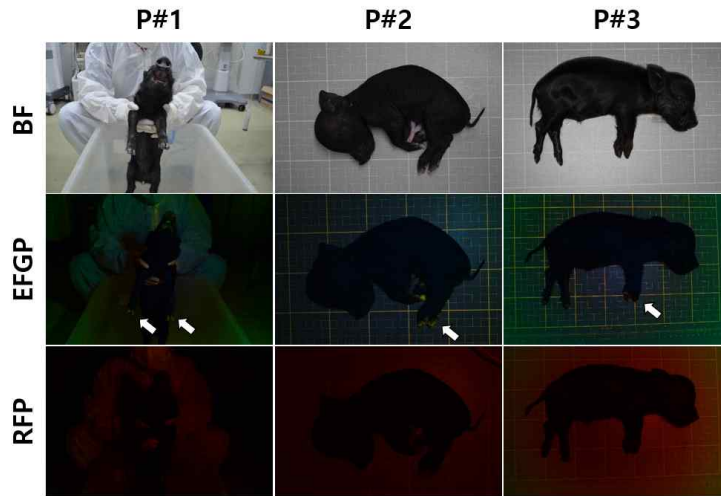


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지의 EGFP 발현 확인

d. JNPFF-DppB 개체의 유효성 검증

가. JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지의 *in vitro* 유효성 평가

- JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지를 성공적으로 생산하였으므로, 모델 돼지가 가지고 있는 벡터의 정상적인 작동을 하는지 판단이 중요함. 우선, 각 개체 유래의 체세포를 활용하여 *in vitro* 상에서 벡터가 작동하는지 확인하였음
- 각 개체의 귀조직 샘플링을 통해서, 초대배양을 통해 각 개체 유래 섬유아세포주를 구축하였음. 모든 섬유아세포에서 EGFP 형광이 정상적으로 발현하는 것을 확인함

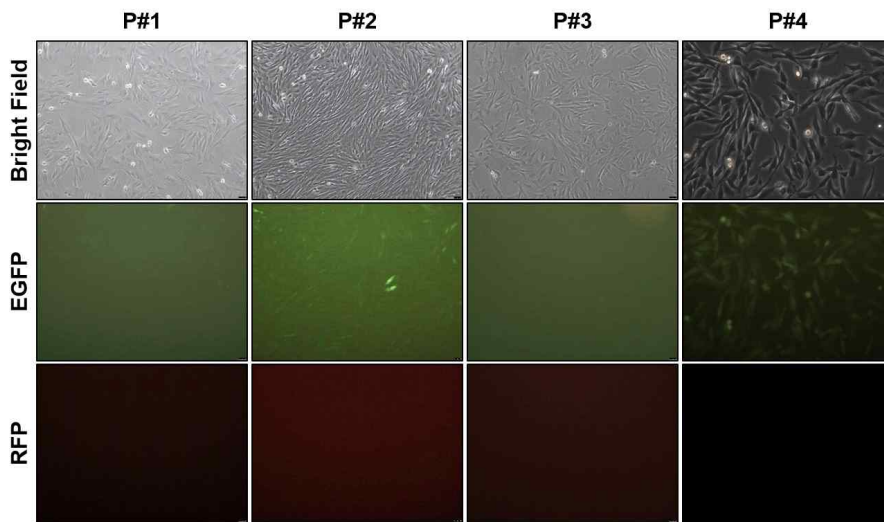


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지의 섬유아세포주에서 EGFP 발현 확인

- 해당 세포주는 1협동(위탁) 고려대학교에서 수령하여, *in vitro* 상에서 유효성을 평가함
- 특히, JNPFF-DppB piglet #3의 섬유아세포는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)으로 기탁 완료하였음 (기탁번호 : BP1914836)

표. 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원) 기탁 목록

기탁번호	생물자원명 / 분리번호	연구과제명	과제책임자	비고
BP1914836	JNPFF-DppB piglet fibroblast	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포주

나. JNPFF-DppB piglet #2 개체의 자발적인 흑색종 병변 유발

- 22.05.07 태어난 JNPFF-DppB 산자 중 #2 개체는 태어날 당시에 머리부위에 mass 형성의 병변이 관찰되었으며, 이외 부위에서는 관찰되지 않았음



그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #2에서 종양 발생



그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #2에서 종양 발생

- 이에, 타 장기로의 전이성 여부를 분석하기 위해 JNPFF-DppB piglet #2 개체를 부검을 진행하였으며 머리 부분에 3개, 등쪽 1개의 추가적인 mass 조직을 발견하였음. 각 조직을 조직병리학적 분석 결과, 응기된 돌출성 종괴 및 dermis 부분까지 멜라닌 흑색 과립이 다량 존재하여 대표적인 흑색종 병변을 보였음



그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #2의 종양 발생

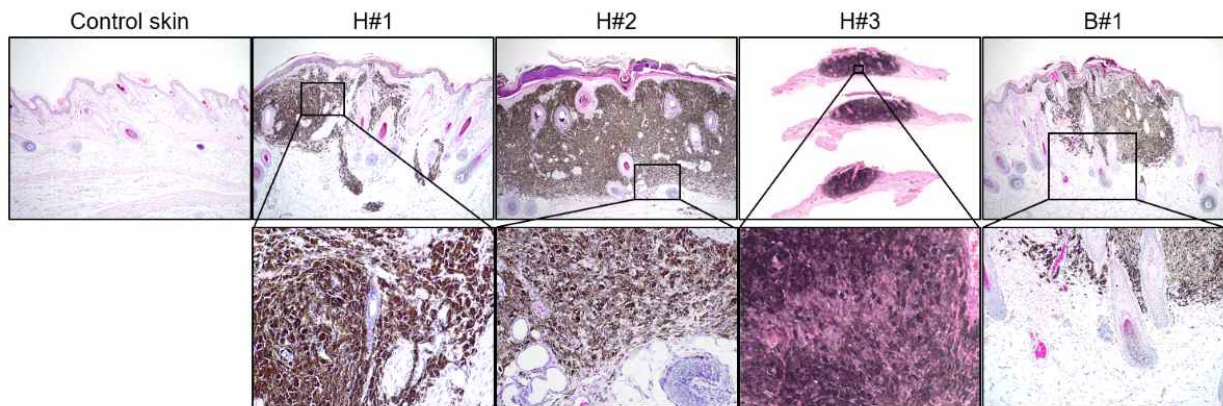


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #2의 피부에서 유래된 종양의 조직학적 검사

- JNPFF-DppB piglet #2 개체의 내부 장기의 육안소견 부검 결과, 폐와 간에서도 색소 침착이 된 부분을 확인할 수 있었음. 색소 침착된 각 조직을 샘플링하여 조직병리학 검사를 실시하였음. 결과로서, 폐에서는 검은 색소 또는 검은 색소 함유세포들이 폐포벽 및 세기관지 상피세포 등에 존재하였음. 따라서, 실질 장기에 멜라닌 색소가 분포하는 전이성 흑색종 폐암으로 진단됨

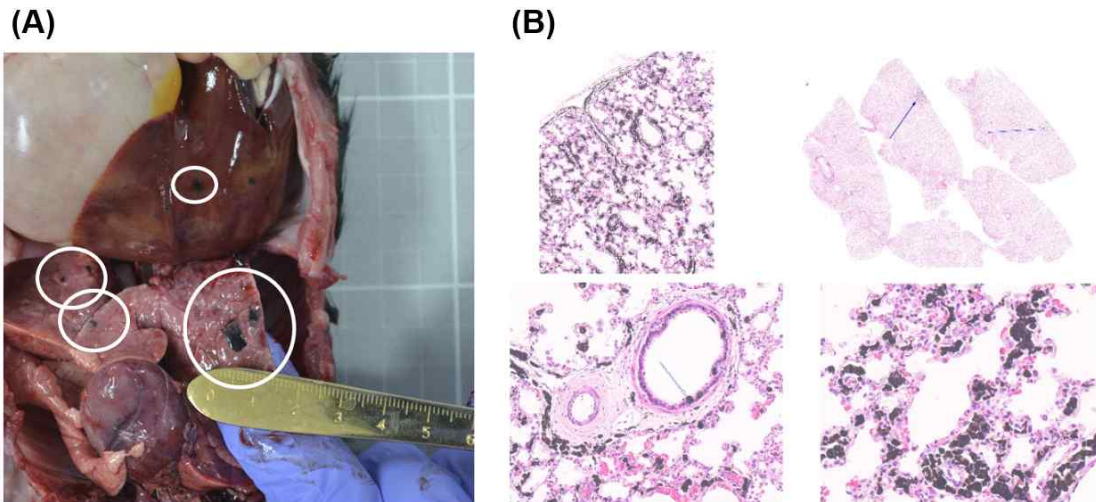


그림. BRAF 기반 JNPFf-DppB piglet #2의 폐에서 유래된 종양의 조직학적 검사

- 간의 조직검사 결과, 마찬가지로 비정상적인 부분이 간장에 다발적으로 분포함을 확인함. 이 부위는 간장의 장막에서 실질로 국소적으로 분포하고, 검은 색소 및 검은 색소 함유 세포들로 구성되어 피막하 실질(동모양혈관, 쿠퍼세포 등)에 존재하고 있음. 따라서, 실질 장기에 멜라닌 색소가 분포하는 흑색종인 전이성 간암으로 진단됨

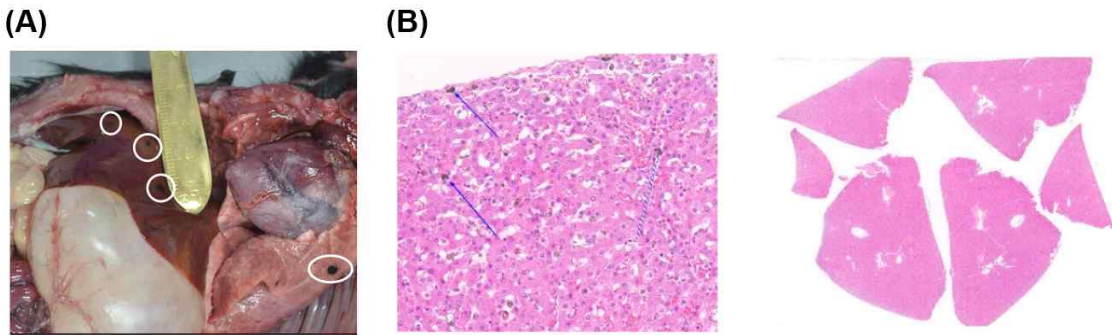


그림. BRAF 기반 JNPFf-DppB piglet #2의 간에서 유래된 종양의 조직학적 검사

- JNPFf-DppB piglet #2 개체 유래된 비정상적인 부분의 조직병리학적 검사 결과 모두 멜라닌 침착으로 인한 종양으로 진단되었음. 추가로, 다음과 같은 비정상적인 종양의 발생이 자연적으로 발병된 것인지. 연구팀이 삽입한 벡터에 의해 유도되어 발생한 것인지 판단하기 위해, 장기별로 일반 조직들과 종양 조직 사이의 유전자 발현 수준을 qPCR를 통해 정량적으로 확인함
- 유전자 발현 수준을 확인하였을 때, 삽입해 준 벡터 관련 유전자(*BRAF<sup>V600E</sup>*, *CreER<sup>T2</sup>*)는 폐와 간에서 비해, 피부 흑색종(skin melanoma) 조직에서 상당히 증가 발현하는 것으로 확인됨
- 색소침착 관련 신호전달 유전자(*TYR*, *TYRP1*, *PAX3*, *SOX10*, *MITF*)를 확인했을 때, 피부 흑색종에서는 모든 유전자가 높아지는 것으로 확인되며, 폐, 간 흑색종 조직에서는 일반 조직과 비교해 몇몇 유전자들이 증가하거나, 흑색종 조직에서만 특이적으로 유전자 발현(*TYR*, *PAX3*)이 되는 것을 확인할 수 있었음
- 본 연구팀에서 삽입해준 *BRAF<sup>V600E</sup>*의 하위 신호전달 체계에는 *BRAF* → *MEK1/2* → *ERK1/2* MAPK 신호전달이 있고, PI3K/Akt 신호전달의 과활성화는 흑색종 발암 및 발달에 중요함. MAPK 신호전달 유전자(*MAP2K2*, *ERK1*, *ERK2*)의 경우 피부 흑색종에서는 *ERK1*, *ERK2*가 유의적으로 높아지는 것으로 확인되며, 폐 흑색종에서는 *MAP2K2*, *ERK1* 유전자가 유의적으로 높아지는 것으로 확인됨. 반면, 간 흑색종에서는 *MAP2K2*, *ERK1*이 유의적으로 감소하는 것으로 확인됨
- 마지막으로 Cell-cycle 조절 관련 유전자(*CDKN2A*, *CCND1*, *CDK4*)는 피부 흑색종에서 모든 유전자가 유의적으로 증가하며, 폐 흑색종에서는 *CCND1* 유전자가 증가하고, 간 흑색종에서는 *CCND1*이 유의적으로 감소하였음

- 종합적으로, 다른 조직(폐, 간)에 비해 피부 흑색종 조직에서 벡터 관련 유전자( $BRAF^{V600E}$ ,  $CreER^{T2}$ )가 과발현되는 것을 확인했으며, 흑색종과 관련된 유전자 발현도 대부분 유의적으로 증가하는 것으로 확인됨. 연구팀이 삽입해 준 벡터에는 피부 특이적인 프로모터인 TYR가 존재하여 피부에서 과발현된 것으로 판단됨
- 폐와 간의 흑색종에서 유전자를 조사하였을 때, 피부 흑색종과 마찬가지로 여러 가지 흑색종과 관련된 신호전달 유전자들이 증가하는 것으로 보아, 피부 흑색종으로부터 전이된 것으로 판단됨

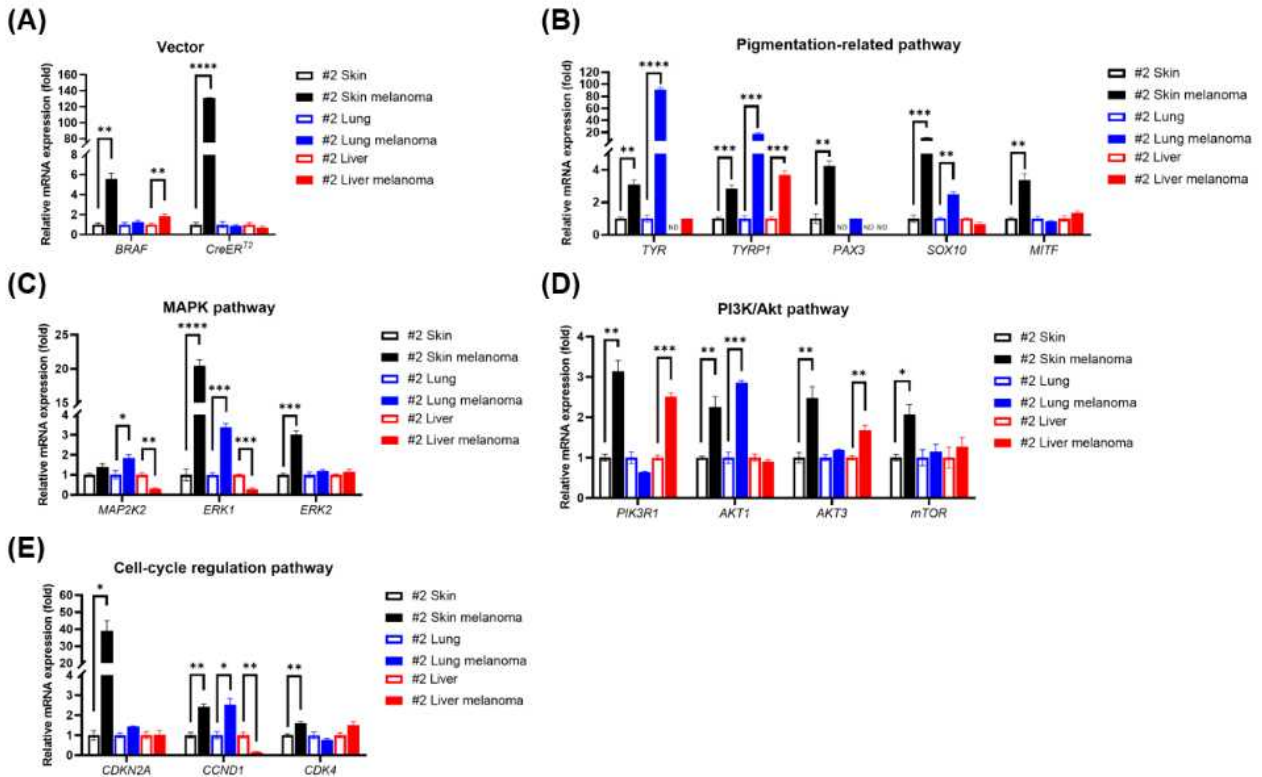


그림.  $BRAF$  기반 JNPFF-DppB piglet #2의 각 종양에서의 유전자 발현 수준 확인. (A) 삽입한 벡터 관련 유전자 ( $BRAF^{V600E}$ ,  $CreER^{T2}$ ), (B) 색소침착 관련 신호전달 유전자 ( $TYR$ ,  $TYRP1$ ,  $PAX3$ ,  $SOX10$ ,  $MITF$ ), (C) MAPK 신호전달 유전자 ( $MAP2K2$ ,  $ERK1$ ,  $ERK2$ ), (D) PI3K/Akt 신호전달 유전자 ( $PIK3R1$ ,  $AKT1$ ,  $AKT3$ ,  $mTOR$ ), (E) Cell-cycle 신호전달 유전자 ( $CDKN2A$ ,  $CCND1$ ,  $CDK4$ )의 정량적 발현 확인

- 종합적으로 외부적인 육안소견 및 조직병리학적 검사를 통한 표현형과 장기별 유전자 발현 수준 결과, 연구팀이 삽입한 벡터로 인해 피부 흑색종이 유도되었으며, 추후 간 및 폐로 전이 되어 해당 장기에 흑색종이 발병된 것으로 분석됨: 위 내용을 정리하여 특허출원 및 논문투고를 준비하고 있음
- JNPFF-DppB piglet #2 개체의 추가적인 분석은 1협동(위탁) 고려대학교에서 진행하였음

#### 다. JNPFF-DppB 흑색종 모델 돼지의 *in vivo* 유효성 평가

- JNPFF-DppB piglet의 *in vivo*에서의 유효성을 평가하기 위해, 삽입해 준 벡터내  $CreER^{T2}$ 와 반응하여 Oncogene를 유도시킬 수 있는 타목시펜을 JNPFF-DppB piglet에 처리하였음
- 우선, 계획으로서 이전 돼지모델 관련 선행논문(Seon-Ung Hwang 등., 2018; Morten M. Callesen 등., 2017)을 참고하여, 5일 동안 kg당 타목시펜 20 mg을 구강으로 사료와 섞어 급이를 실시하였음

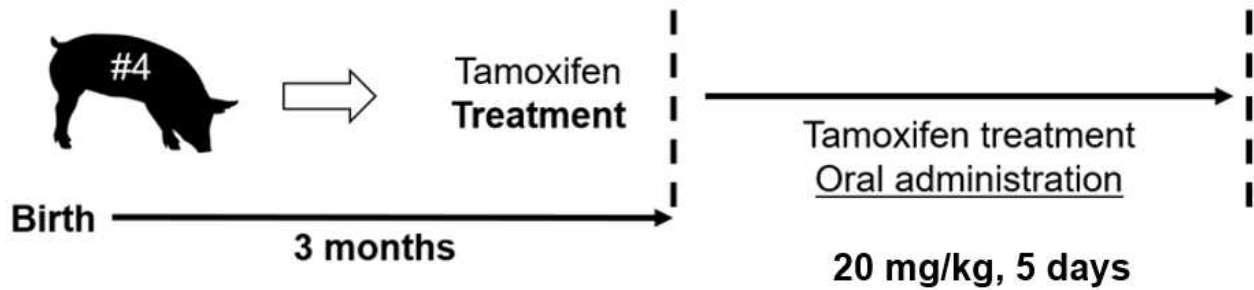


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #4의 1차 타목시펜 유도

- 급이 후 30일 경과, 외관상으로 특이적인 종양을 확인하지 못함. 따라서, 타목시펜의 농도 및 처리 기간의 문제로 판단하여, 농도 및 처리 기간을 두 배로 늘려 처리 진행하였음

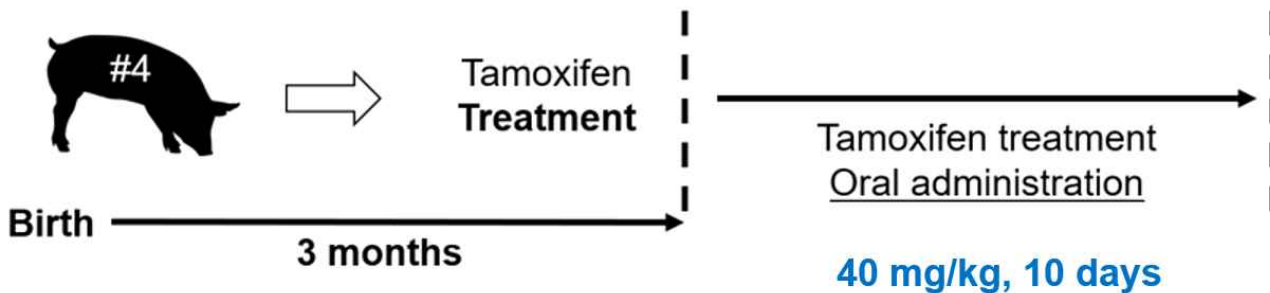


그림. BRAF 기반 JNPFF-DppB piglet #4의 2차 타목시펜 유도

- 투여 7일차에 설사 증세 및 사료 기피 현상이 확인되어 처리 중단하였으며, 현재까지는 외관상 종양의 발달은 확인하지 못함
- 구강으로 타목시펜의 처리는 고통이 없고 손쉽게 처리를 할 수 있다는 장점이 있으나, 사료에 같이 첨가하므로 섭취 과정 중 손실이 발생할 수 있어 최종 타목시펜의 농도를 정확히 처리하는 것이 불가능함
- 또한, 소화기관 내의 타목시펜 침투시, 효소 작용으로 인해 약물이 변경이 될 수 있으므로, 약물 안정성이 보장되지 않음. 연구진이 삽입한 벡터는 피부 특이적이기 때문에, 피부에 도달하기에는 시간이 오래 걸릴 가능성이 있음
- 이에 아직까지 타목시펜을 돼지 피부에 적용한 사례가 없는 관계로, 관련 선행 연구와 함께 추가적인 프로토콜 수립 기술을 개발할 필요가 있으며, 이에 추가 생산되고 있는 개체 대상으로 피부에 직접적으로 타목시펜을 도포하거나, dermis 부분에 타목시펜을 주입해줌으로써 유효성 기술을 고도화 해 나갈 예정임





# 제1 세부과제

## 충북대학교 산학협력단

### Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 *in vitro* 질환모델 구축

#### 연구내용1

#### 효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 프로토콜 수립

##### ▣ 효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 프로토콜 확립

- 2-3차년도에서 Optogenetic-FGFr-iPS를 활용하여 SCNT를 수행하여, 배아 발달률이 낮은 것을 확인하였고, 배아 이식을 진행했지만, 산자로써 생산하지 못하였음
- 해당 iPS를 이용하여 SCNT 수행 시, 세포가 끈적거리고 짧은 시간에 다시 뭉쳐지는 현상이 발생하여 공여 세포주로 사용하는데 어려움이 발생함
- 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위해 Optogenetic-FGFr-iPS를 일반 섬유아세포 관련 배지로 교환시켜 줌으로써 계대 배양 없이 CM 및 non-CM 조건으로 섬유아세포로 자발적 분화를 시행하였음 (4차년도 내용)

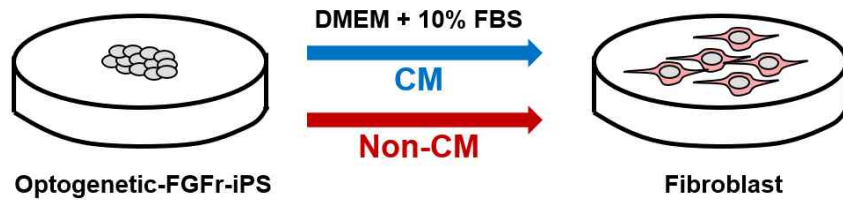


그림. Optogenetic-FGFr-iPS의 섬유아세포로의 자발적인 분화 프로토콜

- 자발적으로 분화된 섬유아세포를 공여 세포주로서 SCNT를 진행하였지만, 여전히 배아 발달 효율성은 낮은 것으로 확인됨
- 본 연구팀은 이러한 문제점이 자발적으로 분화시킨 배양 배지를 이용하였을 때, 일부 불완전한 분화가 발생하였을 것으로 추측하여 이전에 보고된 선행연구를 기반으로 프로토콜을 재수립하였음 (Minglei Zhi 등., 2021)

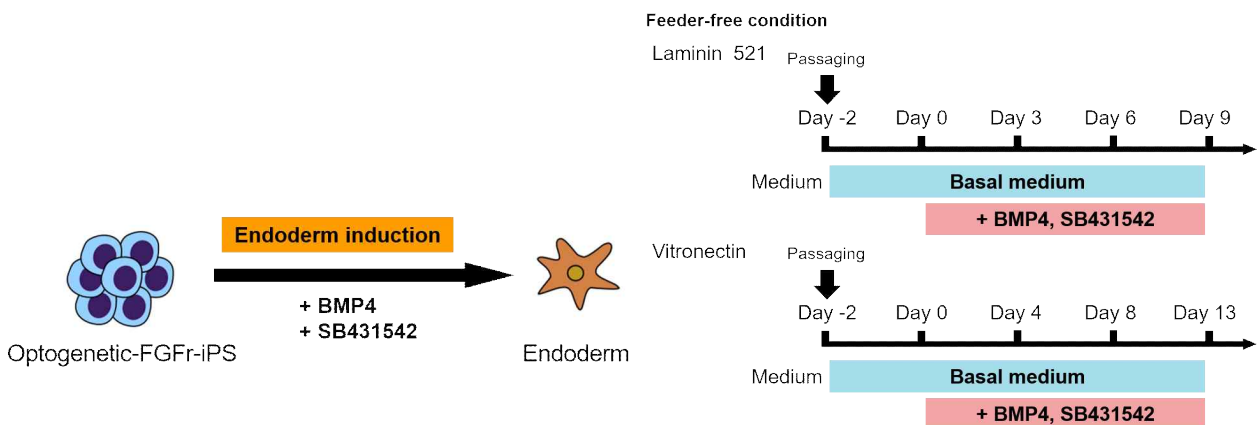


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 Endoderm으로 분화시키기 위한 배양배지 조성 및 배양기간

- Optogenetic-FGFr-iPS를 Endoderm lineage로 효율적으로 분화시키기 위해 feeder-free 조건으로 두 가지 matrix (Laminin 521, Vitronectin)를 사용함
- Optogenetic-FGFr-iPS를 thawing 후 feeder-free 조건에서 안정화시키기 위해 2일 동안 배양함
- Optogenetic-FGFr-iPS를 2일 동안 Basal medium으로 배양 후 Endoderm으로의 분화를 유도하기 위해 각각 Laminin 521 조건에서는 9일 동안, Vitronectin 조건에서는 13일 동안 Basal medium에 BMP4와 SB431542를 추가적으로 넣은 후 배양함 (Minglei Zhi 등., 2021)

**▣ 효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 basement membrane matrix, 계대 배양 및 동결 조건 확립**

**a. Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 basement membrane matrix 조건 확립**

- Optogenetic-FGFr-iPS을 Endoderm으로 의 분화를 유도할 때, Feeder-free 조건으로 Laminin 521과 Vitronectin dl 두가지 matrix를 사용함
- Optogenetic-FGFr-iPS을 배양할 dish에 2.5 µg/mL Laminin 521을 37°C에서 2시간 동안 코팅하여 사용함
- Optogenetic-FGFr-iPS을 배양할 dish에 Vitronectin을 상온에서 1시간 동안 코팅하여 사용함
- 그 결과, 형태학적으로는 두 Feeder-free 조건 사이 큰 차이는 없었음

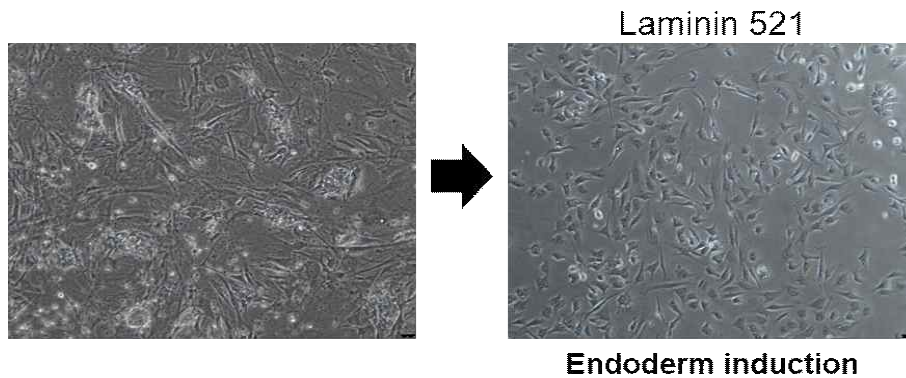


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 Laminin 521 feeder-free 조건에서 Endoderm으로의 분화배지 처리 후 9일차의 형태학적 차이

- Optogenetic-FGFr-iPS를 Endoderm으로의 분화를 유도하기 위한 배양 배지 처리 9일차에 분화 유도전과 비교하여 확실한 형태학적 차이를 확인할 수 있었음

**b. Optogenetic-FGFr-iPS의 분화시 계대 배양 및 동결 조건 확립**

- Optogenetic-FGFr-iPS는 DMEM/F12, 20% knockout serum replacement, 1 mM L-glutamine, 100 µM MEM-non essential amino acids, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 10 ng/mL FGF2를 포함하는 Basal medium 을 이용하여 배양되었고, Endoderm으로의 분화를 위해서는 여기에 추가적으로 Small molecule인 10 ng/mL BMP4와 5 µM SB431542를 넣어서 분화를 유도함 (M. Zhi 등, 2022)
- 하지만, 분화시 세포의 농도가 높아지면 계대 배양이 필요하여, 계대 배양 방법(Single cells 또는 Clump 방식) 및 계대 배양시 이용하는 효소(TrypLE 또는 Trypsin)도 추가로 테스트하였음
- Optogenetic-FGFr-iPS의 계대 배양을 위해 각각 두 가지 효소(TrypLE; Single cell 형태로 탈락됨, ReLeSR; Clump 형태로 탈락됨)를 처리하여 dish로부터 탈락시켜 두 가지 Feeder-free 조건(Laminin 521, Vitronectin)에서 Endoderm 유도 배지와 함께 배양함
- Optogenetic-FGFr-iPS의 계대 배양 시 방법적으로 Single cells 및 Clump 방식의 효율성 차이를 알아보 고자 하였으나, 결과적으로 차이가 없었음

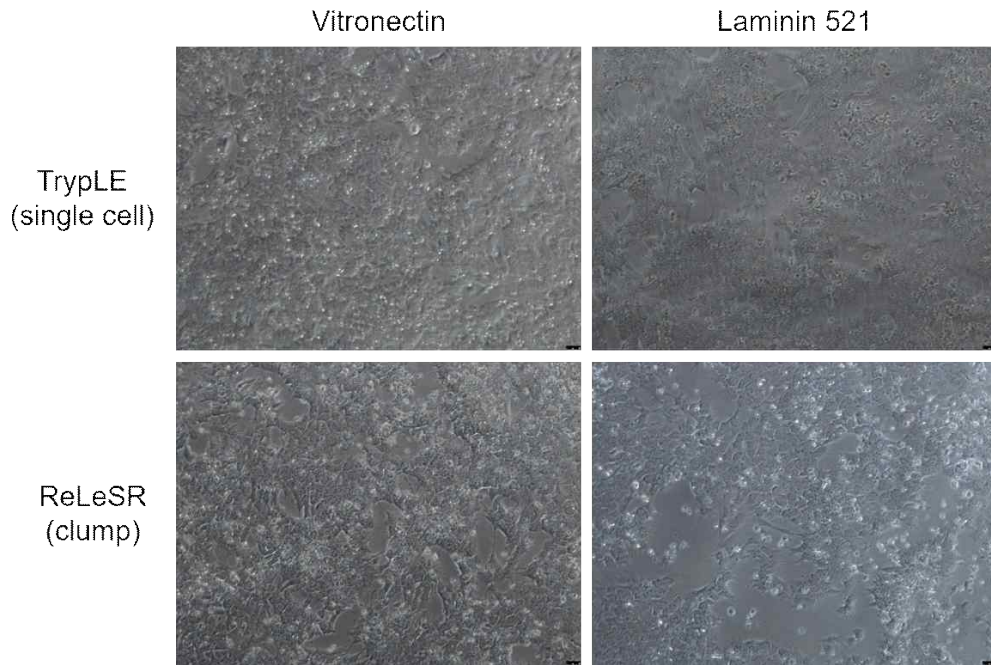


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 두 종류의 효소(TrypLE, ReLeSR)를 이용한 계대 배양 후 2일차 (Endoderm 유도 배지처리 2일차)

- Optogenetic-FGFr-iPS의 계대 배양 시 TrypLE과 ReLeSR 사이에 차이가 없어, 추가적으로 TrypLE과 같이 single cell 형태로 cell을 탈락시키며 일반적인 cell의 계대 배양 시 대중적으로 사용되는 효소인 Trypsin과 TrypLE사이의 차이를 알아보려고 함
- 그 결과, Optogenetic-FGFr-iPS의 계대 배양 시 Trypsin과 TrypLE을 각각 사용하여 Vitronectin 조건에서 배양해준 것을 모두 cell이 뭉쳐있는 형태를 관찰할 수 있었고, 반면에 Laminin 521 조건에서는 single cell 형태를 관찰할 수 있었음 두 효소 사용 사이에는 큰 차이가 없고 두 가지 조건의 Feeder-free 사이에서 attach된 cell 형태에서 차이가 나타남

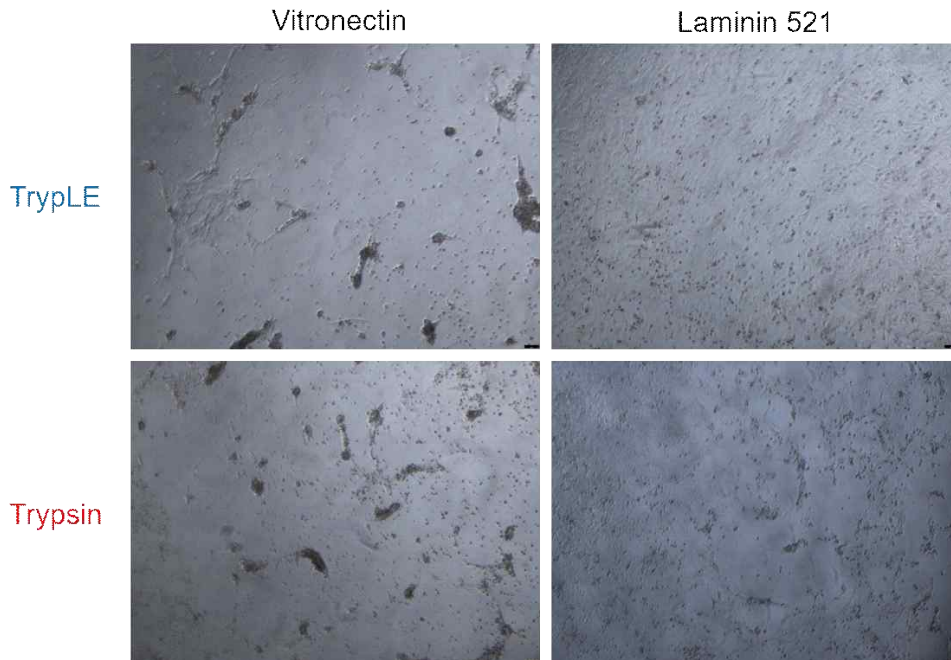


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 두 종류의 효소(TrypLE, Trpsin)를 이용한 계대 배양 후 3일차 (Endoderm 유도 배지처리 5일차)

- Optogenetic-FGFr-iPS의 동결 조건으로는 일반 세포의 동결 배지, 고함량 FBS 동결 배지 이렇게 두 가지로 나누어서 확립하였는데, 일반 세포의 동결 배지의 비율은 70% DMEM/F12, 20% FBS, 10% DMSO로 구성되어있고, 고함량 FBS 동결 배지의 비율은 10% DMEM/F12, 80% FBS, 10% DMSO로 구성되어있음. 두가지

동결조건을 사용하여, 분화된 세포주를 동결 시도 하였으며, 세포 융해시 세포의 생존을 및 형태에서는 큰 변화는 없었음

■ 분화된 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 상태 검증

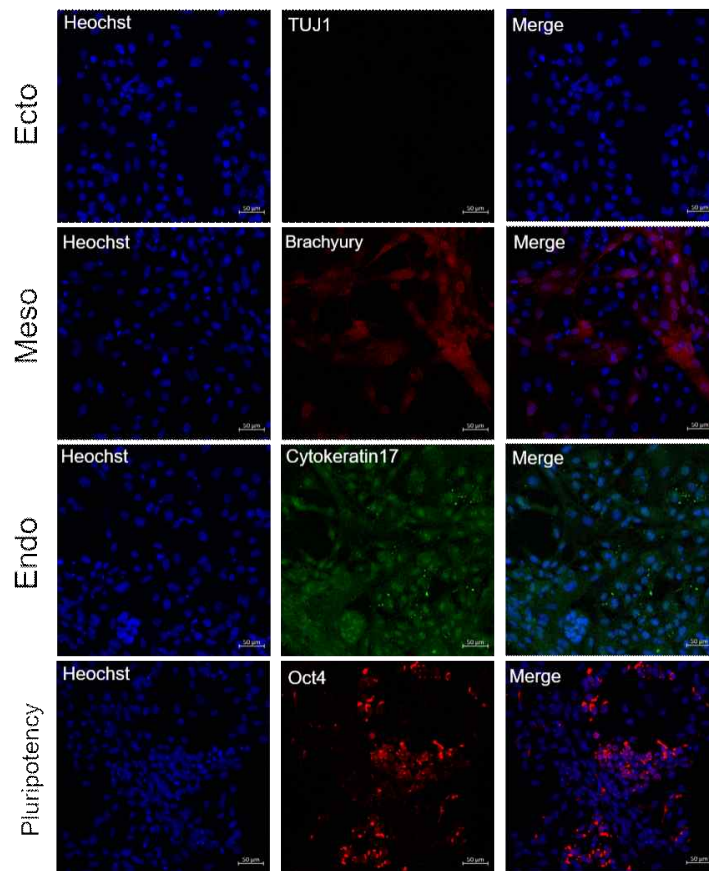


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 Laminin 521 조건에서 Endoderm 유도 배양배지 처리 9일차, 3배엽 Marker에 대한 면역염색

- Optogenetic-FGFr-iPS를 Laminin 521 feeder-free 조건에서 Endoderm 유도 배양배지를 처리한지 9일차에 Sampling 하여 각 3배엽 특정 Marker (Ectoderm: TUJ1, Mesoderm: Brachyury, Endoderm: Cytokeratin17)와 Pluripotency marker (Oct4)로 면역염색을 진행함
- 면역염색 결과, TUJ1는 염색되지 않았고, Brachyury는 일부분 염색되었고, Cytokeratin17은 전체적으로 염색됨. Oct4도 부분적으로 염색되어 나타남

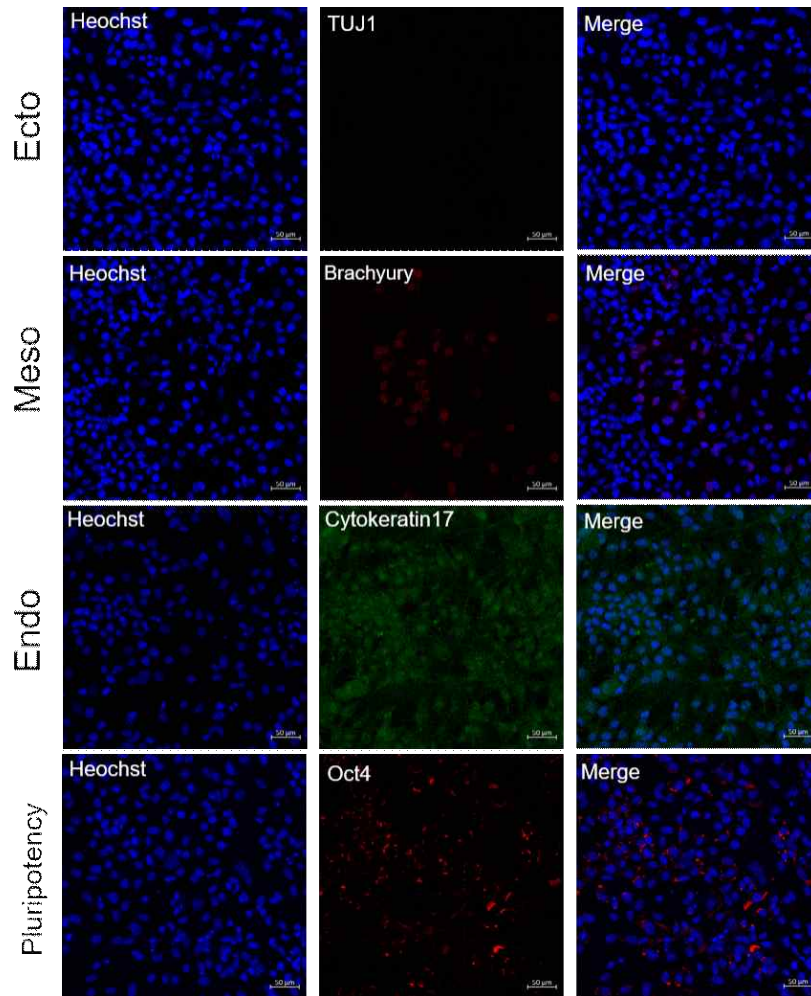


그림. Optogenetic-FGFr-iPS를 Vitronectin 조건에서 Endoderm 유도 배양배지 처리 13일차, 3배엽 Marker에 대한 면역염색

- Optogenetic-FGFr-iPS를 Vitronectin feeder-free 조건에서 Endoderm 유도 배양배지를 처리한지 13일 차에 위와 같이 Sampling 하여 각 3배엽 특정 Marker와 Pluripotency marker로 면역염색을 진행함
- 면역염색 결과, TUJ1는 염색되지 않았고, Brachyury는 일부분 약하게 염색되었고, Cytokeratin17은 전체적으로 염색됨. Oct4도 부분적으로 염색되어 나타남. Laminin 521 feeder-free 조건 결과와 비교해 봤을 때, Brachyury와 Oct4의 염색이 약하게 나타남
- Optogenetic-FGFr-iPS는 feeder-free 조건의 두 종류의 matrix에서 배양과 분화 유도가 가능하며, Endoderm으로의 분화 유도 시에는 형태학적인 면으로는 큰 차이가 없었으나 3배엽의 대표적인 marker들로 각각 면역염색을 진행해보았을 때 Laminin 521 feeder-free 조건과 비교하여 Vitronectin feeder-free 조건에서 Mesoderm marker인 Brachyury와 Pluripotency marker인 Oct4의 염색이 약하게 나타남
- 이 결과는 Optogenetic-FGFr-iPS는 Vitronectin feeder-free 조건에서 Endoderm으로의 분화가 좀 더 효율적으로 진행된 것을 나타냄. 다만 완전한 분화를 위해서는 13일보다 더 긴 기간 동안 BMP4와 SB431542를 포함하는 Basal medium과 함께 배양해야 함

## 연구내용2      분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 활용한 *in vitro* 검증

### ▣ 인터루킨 (Interleukin, IL)-7을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용(*in vitro* culture, IVC) 배지 조성 개발

- 돼지는 생명공학, 형질전환 및 의학과 같은 여러 연구 분야에서 유용한 모델 역할을 하고 있음. 또한, 돼지 배반포 유래한 배아줄기세포는 인간 질병에 관해 예비 연구를 위한 강력한 도구가 될 수 있음
- 따라서, 체외에서 배양된 배반포에서 배아줄기세포를 얻기 위해서는 배반포의 품질도 중요한 요소임

- 본 연구팀은, 돼지 배아의 체외배양(*in vitro* culture, IVC) 과정 중 여러 가지 농도의 인터루킨-7(Interleukin-7, IL-7)를 처리함으로써 돼지 배반포 품질 향상에 도움을 주고자 하였음
- 우선, 돼지 착상 전 배아에 IL-7과 그것의 receptor인 IL-7R가 존재하는지 면역염색을 통해서, MII기, 2-세포기, 4-세포기, 8세포기, 배반포 단계에 각각 확인함

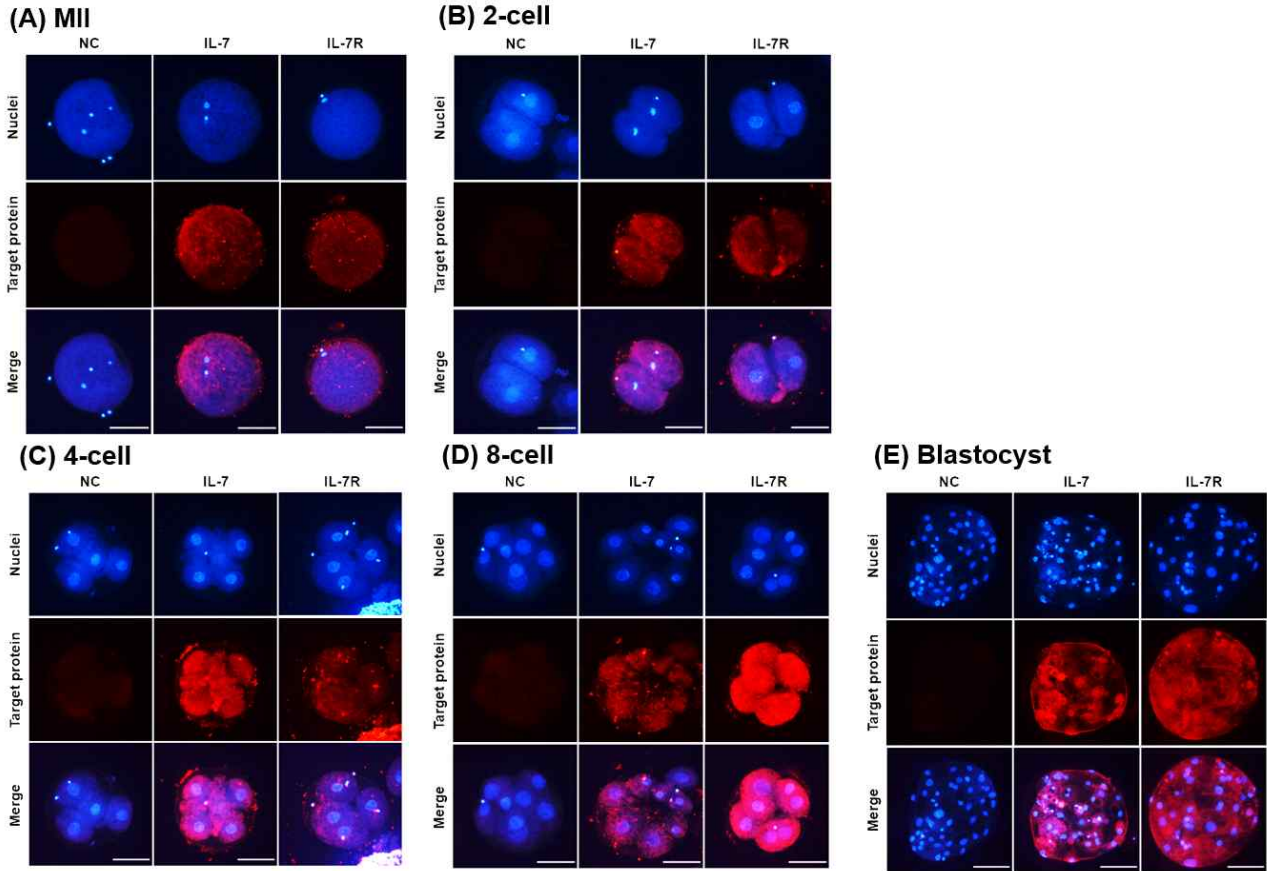


그림. 착상 전 돼지 배아에서 IL-7 및 IL-7R의 위치 확인. 중기 II-단계(MII)(A)의 돼지 난모세포 및 0, 24, 48에서 수집된 2-세포기(B), 4-세포기(C), 8-세포기(D) 및 배반포(E) 단계의 배아

- 다음으로, 단위발생 후 돼지 배아 발달을 위한 최적의 농도를 결정하기 위해 IVC 동안 다양한 농도로 IL-7을 처리함. 분할율은 대조군에 비해 10 및 100 ng/mL IL-7 처리군에서 유의하게 함( $p < 0.05$ ). 또한 배반포 형성률은 10 ng/mL IL-7 처리군이 대조군보다 유의하게 높았음( $p < 0.05$ ). 2일째의 분할 패턴은 fragment된 배아의 비율이 대조군보다 1 및 10 ng/mL IL-7 처리군에서 유의하게 낮았음( $p < 0.05$ )는 것을 보였음

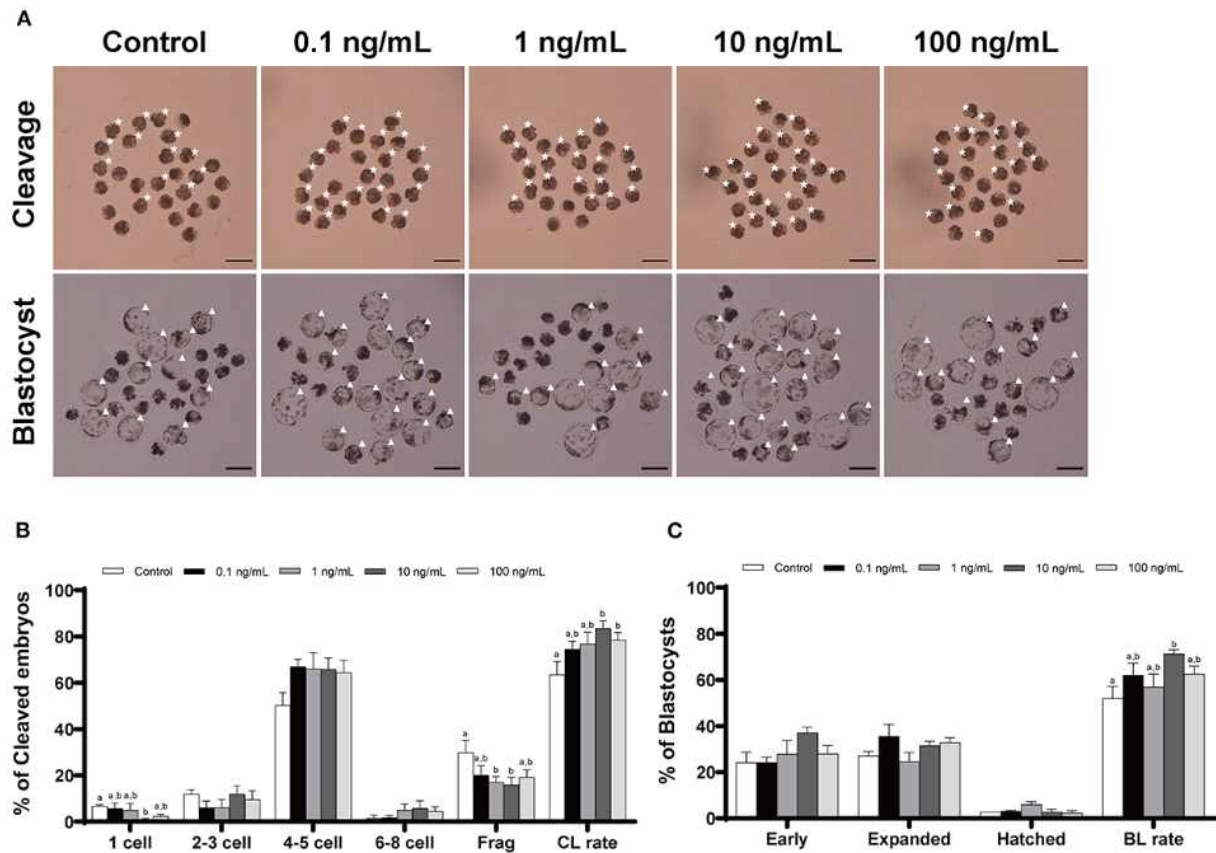


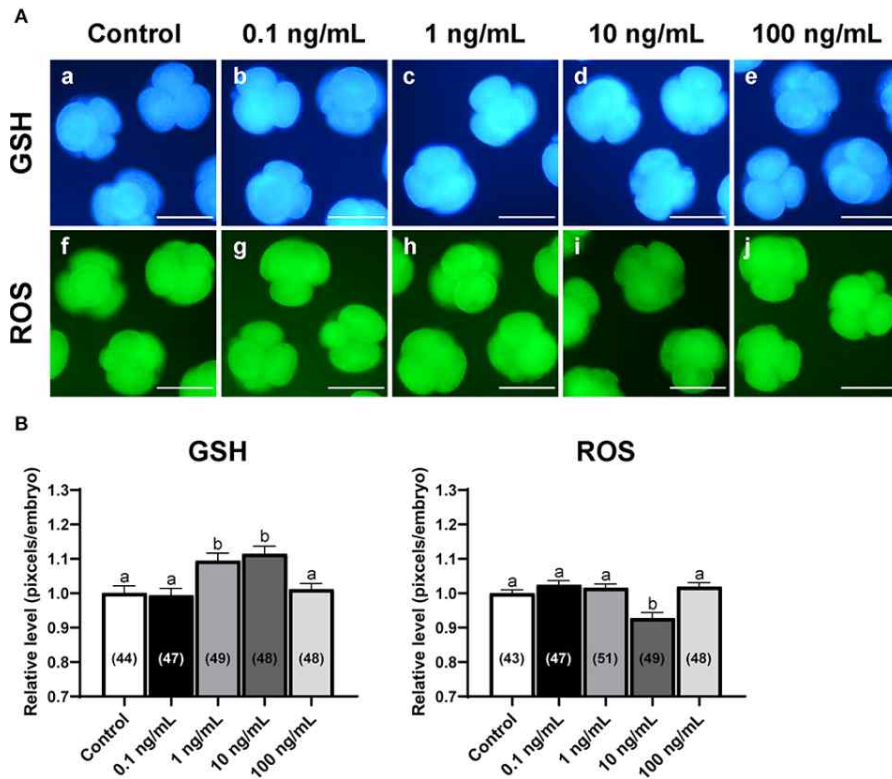
그림. IVC 동안 IL-7 보충이 단위발생 배아의 분할 및 배반포 형성 패턴에 미치는 영향. (A) 단위발생 후 각 그룹에서 분할 배아와 배반포의 형태적 대표 이미지. 별표, 분할된 배아; 삼각형, 배반포. PA 배아의 분할 패턴(B) 및 배반포 형성(C) 비율

표. 단위발생 후 배아 발달에 대한 IVC 동안의 IL-7 보충 효과

IL-7 concentration (ng/mL)	No. of embryos cultured, N*	No. (%) of embryos developed to			
		≥2-Cell		Blastocyst	
0	135	87	(63.4 ± 5.6) <sup>a</sup>	71	(51.9 ± 5.2) <sup>a</sup>
0.1	134	99	(74.4 ± 3.5) <sup>ab</sup>	82	(62.0 ± 5.4) <sup>ab</sup>
1	133	102	(76.7 ± 5.1) <sup>ab</sup>	77	(56.8 ± 5.6) <sup>ab</sup>
10	135	112	(83.4 ± 3.3) <sup>b</sup>	96	(71.3 ± 1.8) <sup>b</sup>
100	133	105	(78.4 ± 3.2) <sup>b</sup>	84	(62.5 ± 3.6) <sup>ab</sup>

N\*: Four times replicated. <sup>ab</sup>Values with different superscripts within a column differ significantly (p < 0.05).

- IL-7 처리가 돼지 배아의 산화 스트레스에 미치는 영향을 조사하기 위해 단위발생 후 2일째에 4세포 배아에서 세포내 GSH 및 ROS 수준을 분석함. 1 및 10 ng/mL IL-7 처리군은 대조군보다 세포내 GSH 수준이 유의하게 더 높았음(p < 0.05). 또한, 10 ng/mL IL-7 처리 그룹의 배아는 대조군의 세포 내 ROS 수준보다 유의하게 낮았음(p < 0.05)



**그림. 2일 동안 IVC 동안 다양한 농도의 IL-7 처리가 단위발생 유래 4세포 배아의 GSH 및 ROS 형광 현미경 사진.** (A) Cell Tracker Blue(a-e) 및 H2DCFDA(f-j)로 배아를 염색하여 세포 내 수준의 글루타티온(GSH) 및 활성 산소종(ROS)을 각각 검출함. (B) IVC 동안 IL-7로 처리된 체외 배양된 돼지 배아 내의 세포내 GSH 및 ROS 수준의 상대적 수준.

- IL-7로 처리된 돼지 배반포의 품질을 조사하기 위해 총 세포 수와 세포 사멸된 핵을 조사했음. IL-7로 IVC 과정에 처리하는 것은 대조군과 비교하여 총 세포 수에 영향을 미치지 않았음. 그럼에도 불구하고, 대조군에 비해 1 및 10 ng/mL IL-7로 처리된 배반포에서 세포 사멸된 핵의 수 및 세포 사멸 지수가 유의하게 감소하였음( $p < 0.05$ )



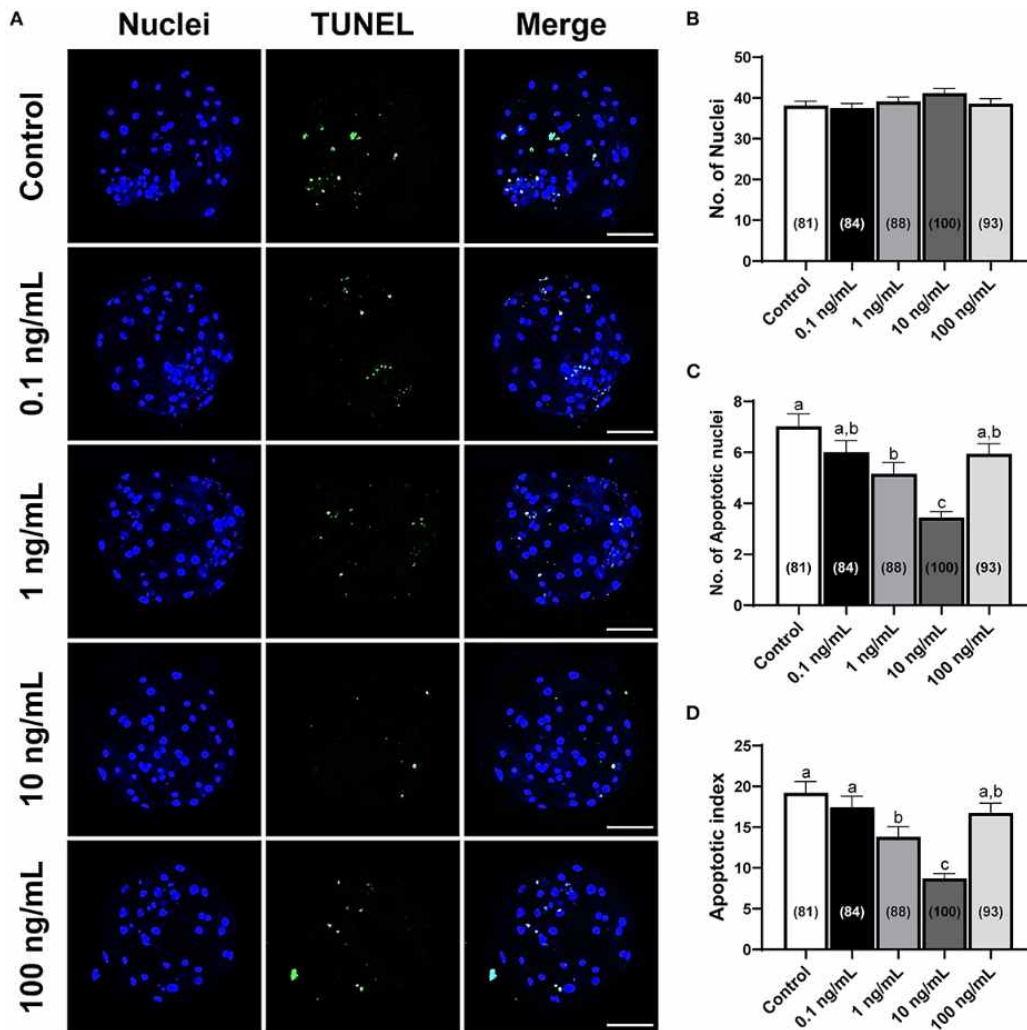
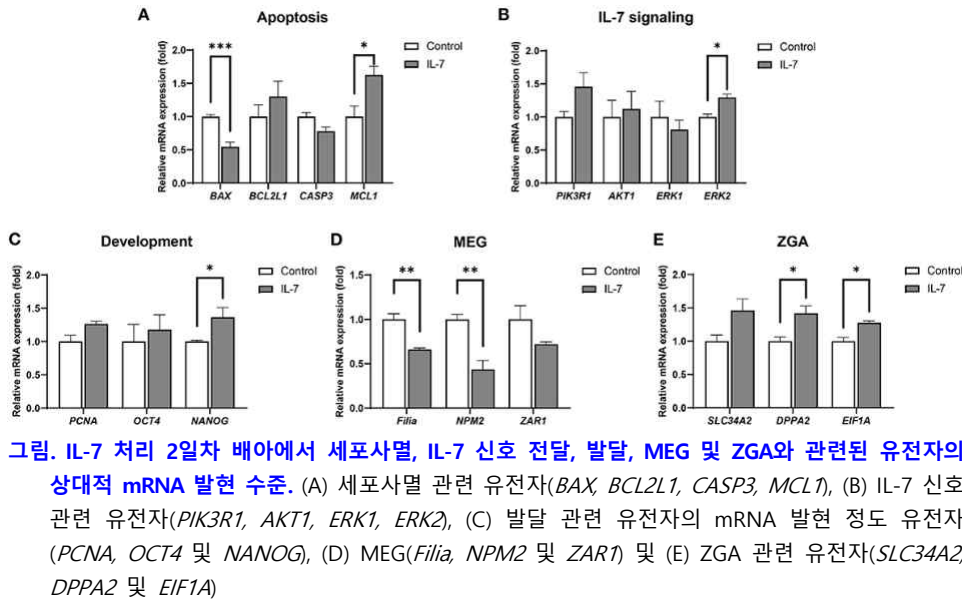


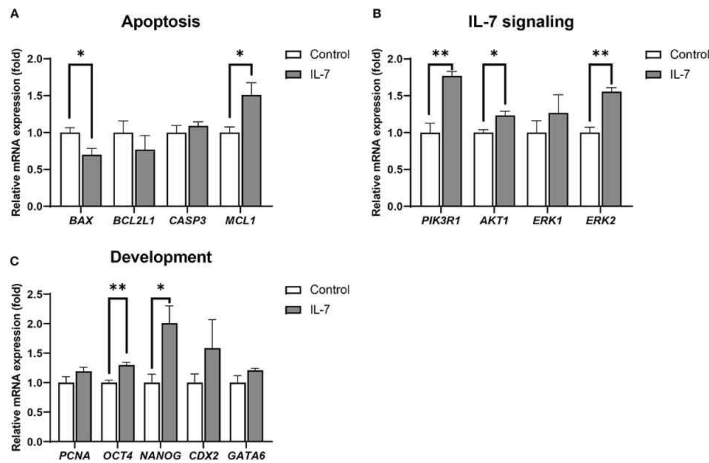
그림. 7일 동안 IVC 동안 다양한 농도의 IL-7 보충에 따른 단위발생 유래 배반포의 총 세포 및 세포 사멸 핵의 수. (A) IVC 후 Hoechst 33342(총 핵, 파란색) 및 TUNEL(세포 사멸 핵, 녹색)로 표시된 돼지 단위발생 배반포의 대표적인 레이저 스캐닝 공초점 현미경 이미지(200x). (B-D) 표시된 그룹의 총 및 세포 사멸 세포 수 및 세포 사멸 지수의 정량화

- 위 실험의 결과를 바탕으로, IVC 기간 동안 최적의 IL-7 처리 농도는 10ng/mL로 결정되었음. IL-7 처리 시 관찰된 배아 발달 효율의 증가 메커니즘을 밝히기 위해 2일차 배아 및 7일차 배반포의 유전자 발현 수준을 qRT-PCR을 통해 분석함
- 2일차 배아에서, 대조군에 비해 IL-7 처리군에서 pro-apoptotic 유전자인 *BAX*의 mRNA 수준이 유의하게 감소한 반면( $p < 0.001$ ), anti-apoptotic 유전자인 *MCL1*의 mRNA 수준은 크게 증가함( $p < 0.05$ ). *PIK3R1*, *AKT1* 및 *ERK1*을 포함하여 IL-7 신호와 관련된 유전자의 발현 수준은 IL-7 보충군과 대조군 간에 유의한 차이가 없었습니다. 하지만, *ERK2* 수준은 대조군에 비해 IL-7 보충군에서 유의하게 높았음( $p < 0.05$ ). 또한, IL-7 처리 배아는 대조군 배아보다 *NANOG* 전사 수준이 유의하게 높았음( $p < 0.05$ )
- Maternal effect genes (*Filia*, *NPM2*, *ZAR1*)와 Zygotic genome activation 관련 유전자(*SLC34A2*, *DPPA2*, *EIF1A*)의 mRNA 수준을 검출하여 IL-7이 Maternal mRNA 제거 및 ZGA에 관여하는지 조사함. 대조군과 비교하여 *Filia* 및 *NPM2* 전사 수준은 IL-7 처리 후 유의하게 낮았음( $p < 0.01$ ). 반대로, 배아를 IL-7로 처리한 후 2일째에 *DPPA2* 및 *EIF1A*의 mRNA 발현 수준이 유의하게 증가함( $p < 0.05$ )



**그림. IL-7 처리 2일차 배아에서 세포사멸, IL-7 신호 전달, 발달, MEG 및 ZGA와 관련된 유전자의 상대적 mRNA 발현 수준.** (A) 세포사멸 관련 유전자(*BAX*, *BCL2L1*, *CASP3*, *MCL1*), (B) IL-7 신호 관련 유전자(*PIK3R1*, *AKT1*, *ERK1*, *ERK2*), (C) 발달 관련 유전자의 mRNA 발현 정도 유전자 (*PCNA*, *OCT4* 및 *NANOG*), (D) MEG(*Filia*, *NPM2* 및 *ZAR1*) 및 (E) ZGA 관련 유전자(*SLC34A2*, *DPPA2* 및 *EIF1A*)

- 7일차 배반포에서는, IL-7로 처리된 배반포는 대조군 배아보다 *MCL1*이 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 더 높고 *BAX* 수준이 더 낮았음. 또한, IL-7 신호전달 관련 유전자 중 *PI3KR1*, *AKT1*, *ERK2*의 발현 수준은 대조군에 비해 IL-7을 처리한 배반포에서 유의하게 증가함. 또한 배아 발달 관련 유전자인 *OCT4*와 *NANOG*의 발현 수준이 IL-7 처리군에서 유의하게 증가한 반면(각각  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), *CDX2*, *GATA6*, *PCNA*의 발현 수준은 두 그룹 사이에 유의한 차이를 보이지 않았음



**그림. 세포 사멸, IL-7 신호 전달 및 IL-7 처리 배반포의 발달과 관련된 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준.** (A) 세포사멸 관련 유전자(*BAX*, *BCL2L1*, *CASP3*, *MCL1*), (B) IL-7 신호 관련 유전자(*PIK3R1*, *AKT1*, *ERK1*, *ERK2*), (C) 발달 관련 유전자 (*PCNA*, *OCT4*, *NANOG*, *CDX2* 및 *GATA6*)

- IL-7은 JAK/STAT 경로를 활성화하며 자극을 받으면 흥선 세포와 과립막 세포에서 STAT5 인산화를 유도함(Luo Y 등., 2021; Johnson SE 등., 2008). 따라서 IVC 중 IL-7 처리가 돼지 배반포 단계에서 JAK/STAT 경로를 자극하는지 여부를 확인하기 위해 면역염색을 통해 pSTAT5 단백질의 발현을 조사함. pSTAT5 단백질 수준은 대조군에 비해 IL-7로 처리된 배반포에서 유의하게( $p < 0.01$ ) 증가하였음

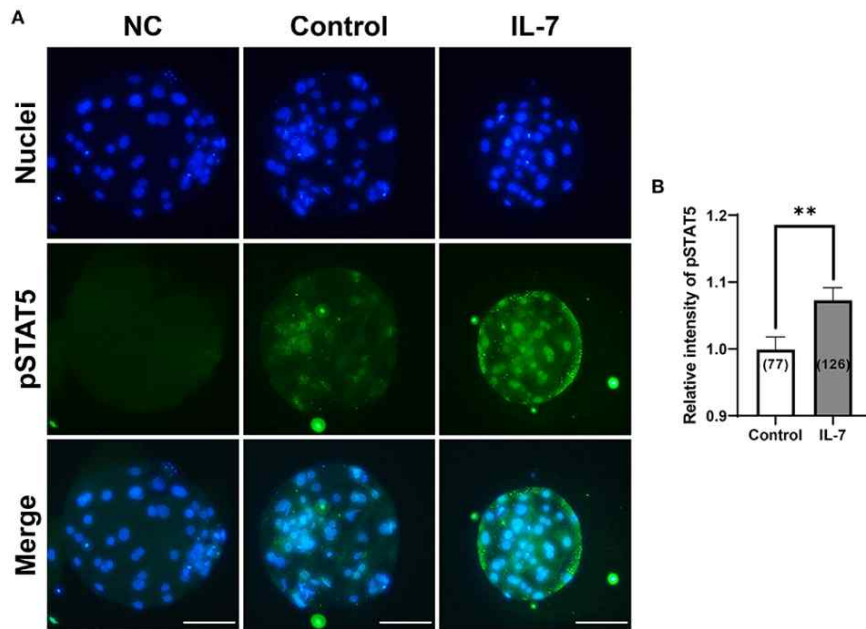


그림. 단위발생 후 배반포의 인산화된 STAT5(pSTAT5) 발현에 대한 IVC 동안의 IL-7 보충 효과. (A) IVC 후 Hoechst 33342(총 핵, 파란색) 및 pSTAT5(녹색)로 표지된 돼지 단세포 배반포의 대표적인 면역형광 이미지(200x). (B) 표시된 그룹에서 pSTAT5의 상대적 강도의 정량화

- qRT-PCR에 기초하여, IL-7 처리된 배반포는 epiblast 마커인 *NANOG*에 대해 상당히 증가된 수준을 나타내었지만 영양외배엽 마커인 *CDX2*는 그렇지 않았음. 따라서, IL-7 보충이 돼지 배반포에서 혈통 분리 동안 내부세포괴(Inner cell mass, ICM) 발달에 영향을 미친다는 가설을 세웠음.
- 배반포의 ICM 세포 수에 대한 IL-7의 효과를 확인하기 위해 총실한 ICM 마커인 SOX2에 대해 면역염색하였음. IVC 기간 동안 IL-7을 보충해도 총 세포 수에는 영향을 미치지 않았음. 그러나, IL-7로 처리된 배아는 대조군에 비해 SOX2+ 세포의 수가 상당히 증가된 ( $p < 0.001$ ) 배반포로 발달하였음. ICM 비율은 또한 IL-7로 처리된 돼지 배반포에서 ~1.7배까지 상당히 향상되었음 ( $p < 0.001$ ) (IL-7에서 10.3% vs. 대조군에서 5.9%)

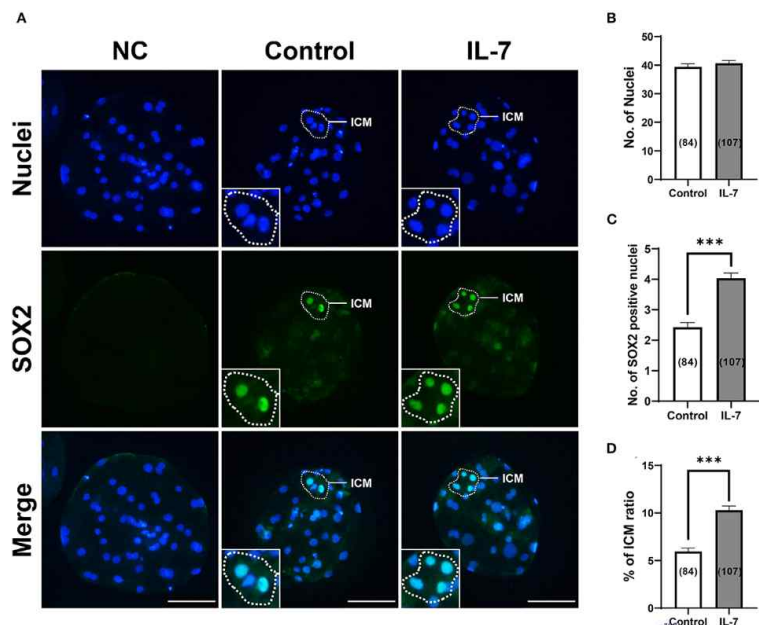


그림. PA 후 배반포의 내부 세포괴(ICM)에 대한 IVC 동안 IL-7 보충의 효과. (A) IVC 후 Hoechst 33342(총 핵, 파란색) 및 SOX2(ICM 마커, 녹색)로 표지된 돼지 배반포의 대표적인 면역형광 이미지(200x). (B-D) 표시된 그룹의 총 SOX2 양성 세포 수 및 ICM 비율의 정량화

- 이 연구에서 본 연구팀은 착상 전 돼지 배아에서 IL-7과 IL-7R의 단백질 발현을 처음으로 보였음. 연구의 결과를 종합하여, IL-7과 그 수용체가 돼지 배아 발달에 관여하고 돼지 IVC에서 IL-7 처리가 항-세포사멸 효과, maternal mRNA 제거 및 ZGA의 조절을 통해 돼지 단위발생 배아의 발달을 향상시킨다는 것을 보여주었음
- 또한, IL-7 보충이 발달 및 IL-7 신호 관련 유전자의 전사를 조절하고 체외에서 돼지 단위발생 배아 발달 동안 SOX2+ 세포의 수와 ICM 비율을 증가시킴으로써 배반포 품질을 향상시키는 것을 관찰하였음
- 본 연구 결과는 주로 IL-7이 배아 발달에 미치는 영향에 대한 새로운 통찰력을 제공하고 돼지 IVC 시스템 및 관련 기술의 개선에 이바지할 수 있을 것으로 시사됨
- 해당 연구내용은 수의학 분야 JCR 상위 10%이내인 *Frontiers in Veterinary Science*에 22.12.08에 출판되었음
- 또한, 본 연구는 특허 제 10-2469369호로서 22.11.16에 ‘인터루킨 (Interleukin, IL)-7을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용 배지 조성물’이라는 발명의 명칭으로 특허 등록되었음

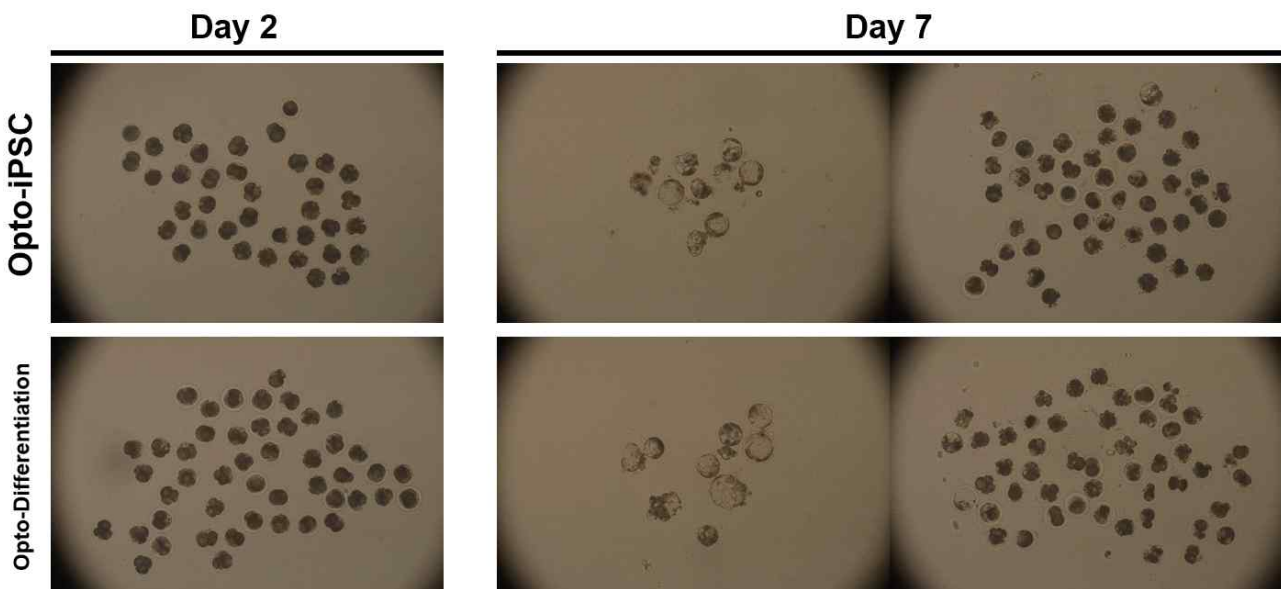
**▣ 분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 세포를 이용하여 SCNT 후 *in vitro* 평가**

- 앞서, 효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS세포의 분화프로토콜을 수립하였음. 분화된 세포를 활용하여 SCNT의 효율이 증진될 수 있는지 확인하기 위해, 분화 전 세포와 분화 후 세포를 각각 비교하여 실험을 진행하였음

**표. Optogenetic-FGFr-iPS 및 Opto-iPS 유래 분화된 세포를 활용한 SCNT**

Egg Num.	Enucleated (M)	Fused (%)	No. of Cleavage (%)				Early (%)	Expanded (%)	Hatched (%)	BL form. (%)	Cell line
			2	4	8	Total (%)					
150	64 (50)	55 (85.94)	22	12	3	37 (67.27)	3 (5.5)	4 (7.3)		7 (12.7)	Opto-iPSC
	65	54 (83.08)	25	17	5	47 (87.04)	4 (7.4)	3 (5.6)		7 (13.)	Opto-Differentiation

- Opto iPS 유래 분화된 세포를 이용하여 SCNT 진행시, Opto-iPS보다 끈적이는 현상이 적어, SCNT 진행시 수월하게 진행할 수 있었음
- SCNT 후 각 그룹의 분할률을 평가했을 때, Opto iPS 유래 분화된 세포에서 좀 더 높은 경향성을 확인할 수 있었음 (67.2% vs. 87%)
- 하지만, 7일간 배양 후 배반포까지의 발달률을 평가하였을 시, 높은 분할률임에도 불구하고 Opto-iPS를 사용한 그룹과 비슷한 배반포 형성률을 보였음



**그림. Optogenetic-FGFr-iPS 및 Opto-iPS 유래 분화된 세포를 활용한 SCNT 후 분할 및 배반포 사진**

- 7일차에 배반포 형성을 관찰시에, 대부분 분할되었던 배아가 이후 배아발달 과정을 진행하지 못하고 정지된 모습을 보였음
- 이에 따른 원인으로, 분화프로토콜을 사용하여 Opto-iPS를 분화시켰음에도 불구하고, 몇몇 OCT4 같은 만능성 유전자가 positive한 것을 면역염색을 통해 관찰하였음. 이러한 만능성 유전자들이 발현되어 배아 발달에 영향을 주었을 것으로 예상됨
- 따라서, 만능성 유전자를 제어하고 더 안정적인 공여세포주로 이용하기 위해서는 15일 내지 한달 이상 동안 분화를 진행시킬 필요가 있음. 해당 프로토콜을 이용하여 최종 목표인 흑색종 질환모델 중대동물을 생산하기에는 비효율적인 생산기법으로 제시됨



## 제2 협동과제

(주)크로넥스

전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축

**세부목표** : 전임상 흑색종 질환모델 중대동물 유효성 검증

### 연구내용1

### 흑색종 모델 중대동물 생산 라인 구축

#### ▣ 흑색종 모델 중대동물의 대량 생산을 위한 라인 구축

- 생산된 암유발 형질전환 동물의 유효성 검증 및 후대 검증을 통하여 흑색종 모델 중대동물의 대량 생산을 위한 계통 라인을 구축 중에 있음
- 기생산된 종양유발 모델(수컷)과 크로넥스의 미니피그를 교배하여 heterogeneous type의 자손을 얻고 형매교배 및 근친교배를 통하여 후대 검증을 위한 종양모델라인 계통을 구축하고 대량생산을 위해 육종 중에 있음
- 결과로서 F1 세대(Yucatan × 제주 재래 흑돼지의 산자)는 총 21마리의 자손으로, 암컷 9마리와 수컷 12마리가 생산되었음
- F1 세대 간 형매 교배를 통하여 총 59두의 자손으로 암컷 20마리와 수컷 39마리의 F2 세대를 생산하였음
- F2 세대 간 형매 교배를 통하여 총 11두의 자손으로 암컷 4마리와 수컷 7마리를 F3세대를 생산하였음
- 현재 총 14회 총 91두의 자돈이 생산(male 48두, female 43두)이 완료되었으며, 종양모델 동물의 비임상 상용화 위하여 육종 중에 있으며 유효성 검증 및 후대 검증을 수행하고 있음

번호	모돈	웅돈	출산일	출산 두수	성별	세대
1	E7-32	CY-5	2020-02-21	4	Male:3, Female:1	F1
2	E7-32		2020-08-07	8	Male:4, Female:4	
3	F6-27		2020-10-17	6	Male:4, Female:2	
4	IY-1	GY-2	2022-03-10	3	Male:1, Female:2	
1	GY-1	GY-2	2020-12-26	5	Male:3, Female:2	F2
2	GY-9	GY-5	2021-05-18	6	Male:3, Female:3	
3	GY-1	G5-34	2021-08-20	10	Male:4, Female:6	
4	GY-12	G5-34	2022-06-01	8	Male:5, Female:3	
5	GY-9	G5-34	2022-06-10	10	Male:5, Female:5	
6	GY-12	H12-41	2022-12-14	10	Male:5, Female:5	
7	GY-9	HY2-3	2023-01-24	10	Male:4, Female:6	
1	GY2-1	GY2-4	2021-11-29	5	Male:2, Female:3	F3
2	H7-21	GY2-4	2022-08-25	2	Male:2, Female:0	
3	HY2-3	HY2-8	2022-09-28	4	Male:3, Female:1	
	합		계	91	Male:48, Female:43	



그림. 흑색종 질환모델 생산용 종돈 축군 조성 및 육성 자돈 생산

**연구내용2**      **흑색종 모델 중대동물 생산 표준화 프로토콜 확립 및 상용화 기반 구축**

**▣ 흑색종 모델 중대동물 상용화 생산 표준화 프로토콜 확립**

- 흑색종 모델 중대동물의 대량 생산 및 품질 표준화를 위한 생산 관리 표준작업지침서 구축 완료
- 동물 사육관련 표준작업지침서 8종, 동물 사육 시설 유지 관리 표준작업지침서 5종, 질환모델동물의 수의학적 관리 표준작업지침서 20종, 모델동물의 병성검사 표준작업지침서 13종, 시험장비 사용 및 운용 표준작업지침서 15종 포함 총 62종의 흑색종 모델 중대동물 생산 및 관리를 위한 표준작업지침서 구축 완료

표. 크로넥스(주) 흑색종 모델 중대동물 생산 표준작업지침서 목록

번호	구분	제목	비고
1	동물 사육관리 관련 SOPs	SOP-PM-EX01. 동물사육시설 사료, 음수에 관한사항	구축 완료
2		SOP-PM-EX02. 동물실험시설 출입절차	
3		SOP-PM-EX03. 개체식별 및 계통유지관리 표준작업지침서	
4		SOP-PM-EX04. 동물사육시설 위생관리 표준작업지침서	
5		SOP-PM-EX05. 동물사육시설 소독 표준작업지침서	
6		SOP-PM-EX06. 동물사육시설 위생관리 표준작업지침서	
7		SOP-PM-EX07. 질환모델 동물 운송 표준작업지침서	
8		SOP-PM-EX08. 긴급상황 시 대처 표준작업지침서	
9	시설 유지 보수 관련 SOPs	SOP-PM-AT01. 차량제독기 유지관리	구비 완료
10		SOP-PM-AT02. 보일러 유지관리	
11		SOP-PM-AT03. 음수 정화 시스템 관리 방법	
12		SOP-PM-AT04. 공기조화장치(AHU) 관리 방법(R01)_LSC	
13		SOP-PM-AT05. 폐수처리 시설 (분리 여과막 세척 방법)	
14	수의학적 관리 관련 SOPs	SOP-01. 동물 보호법 관련 방침	구비 완료
15		SOP-02. 동물복지 관련 방침	
16		SOP-03. 격리 안정화와 분리	
17		SOP-04. 질환모델 동물의 고통과 스트레스 최소화 가이드라인	

18		SOP-05. 질환모델 동물의 진정과 마취 표준작업지침서	
19		SOP-06. 질환모델동물 일반 외과적 수술 표준작업지침서	
20		SOP-07. 질환모델동물 임신돈의 난소/자궁절제술 표준작업지침서	
21		SOP-08. 질환모델동물의 Germ-Free상태 유도과 Gnotobiotic상태 유도	
22		SOP-09. 질환모델동물의 SPF 유도 표준작업지침서	
23		SOP-10. SPF 미니피그의 사육 및 관리	
24		SOP-11. 미니피그 건강상태 모니터링	
25		SOP-12. 약물관리 및 혈액조직 샘플링	
26		SOP-13. 혈액 조직 샘플 운송 및 사용	
27		SOP-14. 안락사	
28		SOP-15. 부검 및 사후변화 평가	
29		SOP-16. 사육시설의 미생물학적 청결 및 위생관리	
30		SOP-17. 폐기물 관리 및 처리	
31		SOP-18. SPF 질환모델동물의 번식 및 재유도	
32		SOP-19. 진단 치료 및 질병 관리	
33		SOP-20. SPF 미니피그의 피부 조직 샘플링	
34	병성검사 관련 SOPs	SOP-PM-APP_01, 돼지흉막폐렴 병성검사 표준작업지침서	구비완료
35		SOP-PM-FMDV_NS_01, 구제역 NS type 병성검사 표준작업지침서	
36		SOP-PM-FMDV_0_01, 미구제역 0 type 병성검사 표준작업지침서	
37		SOP-PM-HPS_01, 글래서씨병 병성검사 표준작업지침서	
38		SOP-PM-INFLU_01, 인플루엔자 H1N1 병성검사 표준작업지침서	
39		SOP-PM-PEDV_01, 돼지유행성설사 병성검사 표준작업지침서	
40		SOP-PM-TGEV-PRCV_01, _돼지전염성위장염, 호흡기코로나바이러스 병성검사 표준작업지침서	
41		SOP-PM-PCV2_01, 돼지췌코바이러스 2형 병성검사 표준작업지침서	
42		SOP-PM-PRRSV_01, 돼지생식기호흡기증후군바이러스 병성검사 표준작업지침서	
43		SOP-PM-PRV_01, 오제스키병 병성검사 표준작업지침서	
44		SOP-PM-CSFV_02, CSFV_항원검사법(PCR) 병성검사 표준작업지침서	
45		SOP-PM-PRRSV_02, PRRSV_항원검사법(PCR) 병성검사 표준작업지침서	
46		SOP-PM-TGEV_02, TGEV_항원검사법(PCR)병성검사 표준작업지침서	
47	시험장비 사용 및 유지 관련 SOPs	SOP-PM- MR01, 마이크로플레이트리더(MR01) 사용 및 유지관리 방법	구비 완료
48		SOP-PM-AC01, 고압증기멸균기(AC01) 사용 및 유지관리 방법	
49		SOP-PM-CA01, 혈액생화학분석기(CA01) 사용 및 유지관리 방법	
50		SOP-PM-CT01, 원심분리기(CT01) 사용 및 유지관리 방법	
51		SOP-PM-D001, 건조기(D001) 사용 및 유지관리 방법	
52		SOP-PM-EP01, 전기영동기(EP01) 사용 및 유지관리 방법	
53		SOP-PM-GD01, 젤닥(GD01) 사용 및 유지관리 방법	
54		SOP-PM-MB01, 미량저울(MB01) 사용 및 유지관리 방법	
55		SOP-PM-MCT01, 마이크로원심분리기(MCT01) 사용 및 유지관리 방법	
56		SOP-PM-PS01, 플라즈마멸균기(PS01) 사용 및 유지관리 방법	
57		SOP-PM-TC01, 유전자증폭기(TC01) 사용 및 유지관리 방법	
58		SOP-PM-UP01, 초순수제조장치(UP01) 사용 및 유지관리 방법	
59		SOP-PM-WB01, 항온수조(WB01) 사용 및 유지관리 방법	
60		SOP-PM-CBC01, 혈구분석기 사용 및 유지관리 방법	
61		SOP-PM-IN01, 인큐베이터 사용 및 유지관리 방법	
62	교육관련 SOPs	SOP-PM-EE_01. 종사자 교육에 관한 표준작업지침서	구비완료

▣ **흑색종 모델 중대동물의 생산 표준작업지침서 (SOP-18. SPF 질환모델동물의 번식 및 재유도 표준작업지침서)**



### 1. 목적:

해당 표준 운영 절차는 자연번식과 출생을 통해 흑색종 모델 중대동물을 생산하기 위해 Minipig Institute (CRONEX) 시설에 생산/수용된 질환모델동물의 번식 육종 또는 재탄생에 대한 지침과 정보를 제공한다

### 2. 적용 범위:

해당 절차는 CRONEX 동물 사육 시설 내의 모든 동물 사육관리 직원, 수의사에게 적용된다. 그들은 모두 질환모델동물의 정상적인 번식 지표에 대해 잘 알고 있어야 한다. 또한, 모든 육종 정보의 업데이트 및 기록 유지해야한다: SOP17에 언급된 양식을 사용하며, SOP18을 참고한다.

### 3. 흑색종 모델 중대동물의 생산 과정:

#### A. 안전 요건 및 출입 절차.

동물과의 접촉 시 동물의 교차 감염을 방지하고 CRONEX SPF 시설의 적절한 관리와 동물복지 및 직원의 안전을 보장하는 절차들을 잘 따르는 것이 중요하다.

1. CRONEX 시설에 입장하기 위한 표준 운영 절차를 읽고 준수한다 (SOP. Entry Procedures and Flow).
2. 모든 직원들은 시설 내에 입실 하기 전에 옷을 갈아입고 샤워를 하고 옷을 입어야 한다. (SOP. SPF Minipig Housing, Care and Husbandry 을 잘 따른다).
3. 동물을 직접 사육하거나 관리하는 사람은 가운, 모자, 장갑 등을 착용하며 무균실에 들어가기 전에 손을 씻고 소독한 뒤 멸균된 PPE 보호복을 착용해야 한다.
4. 사육실에서 나오기 전에 해당 사육실에서 묻은 오염이나 감염성 물질들을 제거하기 위해, 손을 철저히 씻고 모든 방호복도 세척 및 제거한다.

#### B. 사육 전 관리.

1. CRONEX Genetics and Breeding Program에 의해 개발된 기준에 따라 6개월에서 1년 사이의 후보 동물을 선택한다.
2. 웅돈과 암돼지들은 일반적으로 개별적인 케이지에서 사육하지만, “Boar effect” (발정 유도)를 시작하기 위해서는 같은 케이지에 둘 수 있다.
  - a. 모돈과 미경상돈을 한 케이지 내 최대 4개체 집단으로 유지한다.
  - b. 수컷 돼지는 해당 케이지와는 개별적인 케이지에 유지한다.
3. 예방 접종 및 예방 약물 치료 절차에 따라 육종가 선정 기간 (수의사가 요구하는 후보 종축의 백신 접종, 발정 유도, 항기생충 등)동안 모든 예방 접종, 예방적 절차를 수행한다.
4. 암돼지들이 8개월에서 1세 사이의 나이에 도달하면 처음 교미 및 번식을 허용한다.
5. 발정을 자극하고 배란율을 높이기 위해 기대하는 발정기 1-2주 전에 암돼지의 수유량을 증가시킨다.
  - a. 공급되는 먹이의 양을 증가시켜, 수유량을 증가시킨다. 일반적인 먹이량의 약 2배.

#### C. 번식 유도 (핸드메이팅[Hand-Mating]).

1. 핸드메이팅이라고 알려진 자연 번식 절차를 적용한다.
  - a. 관리 감독 하에 자연 짝짓기.
  - b. 수돼지와 암돼지는 예정된 날짜와 계획 하에 한 케이지에 합사시킨다.
  - c. 암돼지는 1번의 발정기 동안 2-3번 짝을 지을 수 있다.
2. 사육을 허용하는 암돼지에서 발정의 흔적을 관찰한다. 열이나 발정의 징후는 다음과 같다:
  - a. 다른 암돼지를 빈번하게 올라탄다.
  - b. 부주의한 움직임.

- c. 외음부의 팽창.
  - d. 외음부에서의 끈적한 점액 배출.
  - e. 빈번한 배뇨.
  - f. 가끔씩 으르렁댐.
  - g. 서거나 다른 돼지를 올라탔을 때 귀가 서있거나, 귀를 직접 눌러서 내려도 다시 벌떡벌떡 섬.
  - h. 수태지를 허용함 (가장 신뢰성이 높은 지표).
  - i. 모돈들은 보통 새끼를 낳은 후 7일 이내에 재발정이 온다.
3. CRONEX 육종 프로그램에서 정한 기준에 따라 육종돈(웅돈)을 선택한다.
  4. 암돼지와 수태지를 짝짓기가 가능한 적절한 구역이나 케이지에 모은다. 짝짓기를 하는 동안 수태지의 구역에 암돼지를 가져오는 것이 가장 좋다.
  5. 1번의 발정마다 2번의 교미를 하는 것이 좋다.
    - a. 첫째, 발정 발견시 12시간 이내.
    - b. 둘째, 발정기의 마지막 2/3 또는 2일에 배란 시간 근처에서 24시간 후에 반복한다..
  6. 수태지가 암돼지의 젤라틴 성분의 자궁경부 마개를 푼 순간부터 5분에서 15분간 지속되는 교미의 과정을 철저히 모니터링한다. 교미에 문제가 발생할 경우 수의사를 소환한다.
  7. SOP들에 언급된 양식들을 사용하여, 전체적인 번식 과정 기록을 항상 보관한다.
  8. 암돼지에게는 교미를 한 후 사료공급을 적당량 줄여서 공급 유지한다. 줄인 사료공급량은 임신한 암돼지의 상태에 따라 임신기의 마지막 즈음에 다시 증가시킨다.
- D. 임신 관리.
1. 교미 후, 임신여부가 확정이 될 때까지 케이지에 넣고 정밀하게 관찰한다.
  2. 임신 진단을 수행한다.
    - a. 교미 후 20일 이내에 휴대용 초음파 장치 (Ultrascan®)을 사용한다.
    - b. 21일 내의 재발정 여부 관찰.
  3. 임신한 것이 확정된 임신돈은 임신돈 전용 사육 케이지로 옮긴다. 돼지의 평균 임신기간은 약 114일 (3개월, 3주, 3일)이다.
  4. 암돼지의 상태를 참고하여, 태아의 급속한 발육을 맞춰 따라가기 위해 임신 마지막 기간에는 사료공급량을 늘려서 임신돈의 에너지 수준을 높인다. 모돈이 변비 또는 기타 위장관 문제를 가지게 되면 사료에 식이섬유 함량도 증가시킨다.
  5. 수의사의 조언에 따라 백신 접종 및 항생제 접종 계획을 세운다.
  6. 예상 분만일 며칠 전에 임신돈을 미리 씻기고 소독, 멸균한 분만용 케이지로 옮긴다.
  7. 번식에 관한 SOP에 따라 신생아 새끼 돼지에게 적절한 환경적 요구사항들을 수용할 수 있도록 깨끗한 고무 매트, 전용 침구 및 열 램프 등이 있는 분만용 케이지를 준비한다.
- E. 분만기.
1. 성공적인 교미 후 약 114일(3개월, 3주, 3일), 임신돈이 분만기에 가까워지는 것을 확인할 수 있는 지표들을 관찰한다:
    - a. 젖꼭지가 확대되고 때로는 우유가 분비된다.
    - b. 안절부절 못하며, 발길질한다.

- c. 동지를 만드는 것 같은 행동을 한다.
- 2. 일반적으로 돼지는 사람의 도움 없이도 자연적으로 분만 과정을 수행할 수 있지만, 가능하면 언제든지 지 관찰자가 참석해야 하며 만에 하나 합병증 같은 것이 발생한다면 수의사에게 보고한다.
- 3. 새끼 돼지를 태어난 뒤 며칠 동안에 가능한 한 빨리 초유를 빨게 해주어야 한다.
- 4. 관찰자는 암돼지와 새끼 돼지에게 다음과 같은 일들을 수행하여야 한다:
  - a. 새끼 돼지를 건조하게 유지할 수 있도록, 입이나 콧구멍 등의 점액을 제거하고 건조하게 닦아내며, 기도를 확보해준다.
  - b. 갈비뼈를 마사지하여 호흡과 심혈관 기능을 자극한다.
  - c. Umbilical (navel) cord를 2-3cm정도 잘라서 포비돈 용액에 담궈놓는다.
  - d. 처음 3일 이내에 철-덱스트란을 주사한다.
  - e. 다른 선택적인 절차 : 식별, 거세 및 예방 약물 치료를 위한 표시로 Needle teeth ( "milk" teeth)를 절단한다.
- 5. 육성이 필요한 경우 (즉, 암돼지가 죽은 경우), 출생 후 24시간 이내에 가능한 한 빨리 실시되어야 하며 다음과 같은 것들을 고려해야 한다.
  - a. 비슷한 크기의 새끼 돼지들을 합친다.
  - b. 비유기 자돈이 육종 전에 초유를 2-3회 정도 성공적으로 섭취했는 지의 여부를 확인한다 (초유를 섭취하는 데에 4-6시간 소요).
  - c. 가능한 한 똑 같은 출생의 자돈들을 늘릴 계획을 세운다.
  - d. 육성된 새끼 돼지에 대한 명확한 식별 또는 표시를 사용한다.
  - e. 병든 자돈은 육성을 그만 두고 분만용 구역이나 케이지로 옮긴 뒤 치료한다, sow-less SPF care를 적용한다.
- 6. CRONEX 프로그램 및 지침에 따라 예방 약물 치료 프로그램을 관리한다.
- 7. 2-3주령에 크립 피드(Creep Feed)를 도입하고 새끼돼지에게 물 접근을 분리시킨다.

#### F. 이유기.

- 1. 이유식은 일반적으로 대부분의 돼지에서 3-6주 사이에 발생하지만, 미니피그는 4-6주령의 노년기 모돈에서 가장 많이 이유된다. 벧짚 깔개는 이유기가 시작하기 전부터 이미 익숙해져 있어야 한다.
- 2. 암돼지를 이동시키며 벧짚 깔개들은 이동한 케이지에 암돼지와 함께 5-7일 정도 더 보관한다.사료 전환과 절식은 절대로 하지 않는다.
- 3. SOP17. SPF Micropig Housing, Care and Husbandry에 나와있는 내용을 참고하여 성별, 크기 및 공간 요건에 따라 멸균시킨 이유용 케이지에 씻긴 이유기 새끼 돼지들을 이유식을 옮긴다. 해당 SOP에 따라 점진적으로 사료공급량을 개체 상태에 적절하게 조절한다.
- 4. 이 단계에서 개체 식별을 위한 이표를 부착한다.
- 5. 새끼 돼지가 스스로 니플 급수기를 사용할 수 있는지 확인하고, 그렇지 않다면 프라이팬이나 적절한 용기를 이용하여 청결하고 깨끗한 식수를 제공한다.
- 6. 새로 옮겨진 새끼 돼지들에게서 설사나 스트레스의 징후가 있는지 관찰하고 수의사에게 보고한다.
- 7. 새로 분만한 모돈의 상태를 관찰하여 사료공급량을 느리고 (Flushing), 이유공급 7일후 따뜻하게 가열한 비타민 ADE 주사를 할 수 있다.

G. 번식용 웅돈.

1. 수컷은 성숙하려면 4-6개월 정도 걸리지만, 약 8개월 이상된 웅돈을 주로 번식을 위해 사용한다.
2. 암퇘지들이 성적으로 성숙하는 과정에서 “Boar effect” 를 얻기 위해 개별적으로 사육하던 수퇘지를 암퇘지들이 사육되는 케이지 근처에 데리고 간다. 케이지와의 간격이 어느정도 있어야 하고, 일반적인 운동이나 움직임은 허용해야 한다.
3. 수퇘지의 육종 사료 배급.
  - a. 최소한 한 달에 2번 비타민 ADE 주사를 투여한다.
  - b. 정기적인 예방 약물 / 예방 접종을 시행한다 (CRONEX 사내 수의사의 지침에 따른다).
  - c. 송곳니와 발톱을 규칙적으로 잘라낸다.
4. 번식과 발정 유도를 위한 수퇘지의 사용을 주당 4-6회 정도 허용한다.
5. 수퇘지를 사용하고 있지 않을 때 케이지 밖으로 꺼내어 관리자 감독 하에 운동을 시키며 자유시간을 줘서 관리자의 관리 감독에 익숙해지게 한다. (부드럽게 등허리를 두드리며 말을 걸고 감독한다. 하지만 대개 매우 공격적인 태도를 보이므로 주의한다).



그림. 흑색종 질환동물모델 생산 및 육종 모습

▣ 흑색종 모델 중대동물의 상용화 기반 구축

- 흑색종 중대모델동물 및 실험동물의 사양관리를 위해 구축된 생산시설(청주생산시설)에서 현재 흑색종 중대모델동물 및 크로넥스 미니피그를 생산 중에 있음
- 기 개발된 표준작업지침서를 동물생산 및 관리 업무에 엄격히 적용하여 사람으로 인한 오염의 위험성도 최소화 하여 생산된 실험동물의 품질 관리 및 유지 중에 있음
- 최대 500마리의 실험용 돼지의 사육이 가능하며, 65.886m<sup>2</sup>의 동물 생산실 2개실에서 85마리의 흑색종 질환모델 동물 육종 관리하고 있음

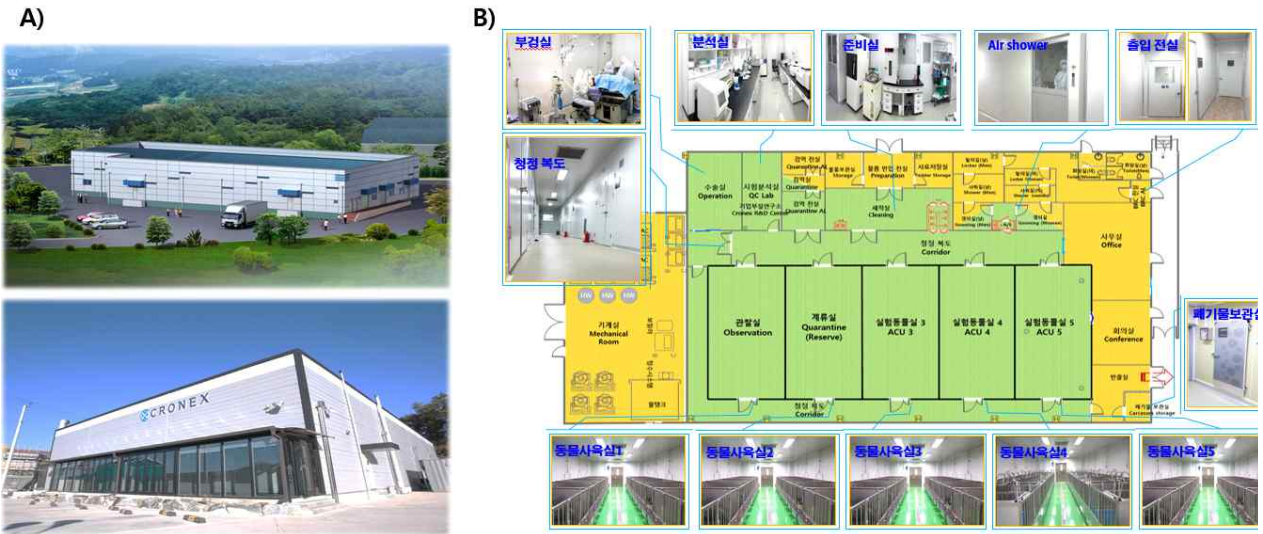
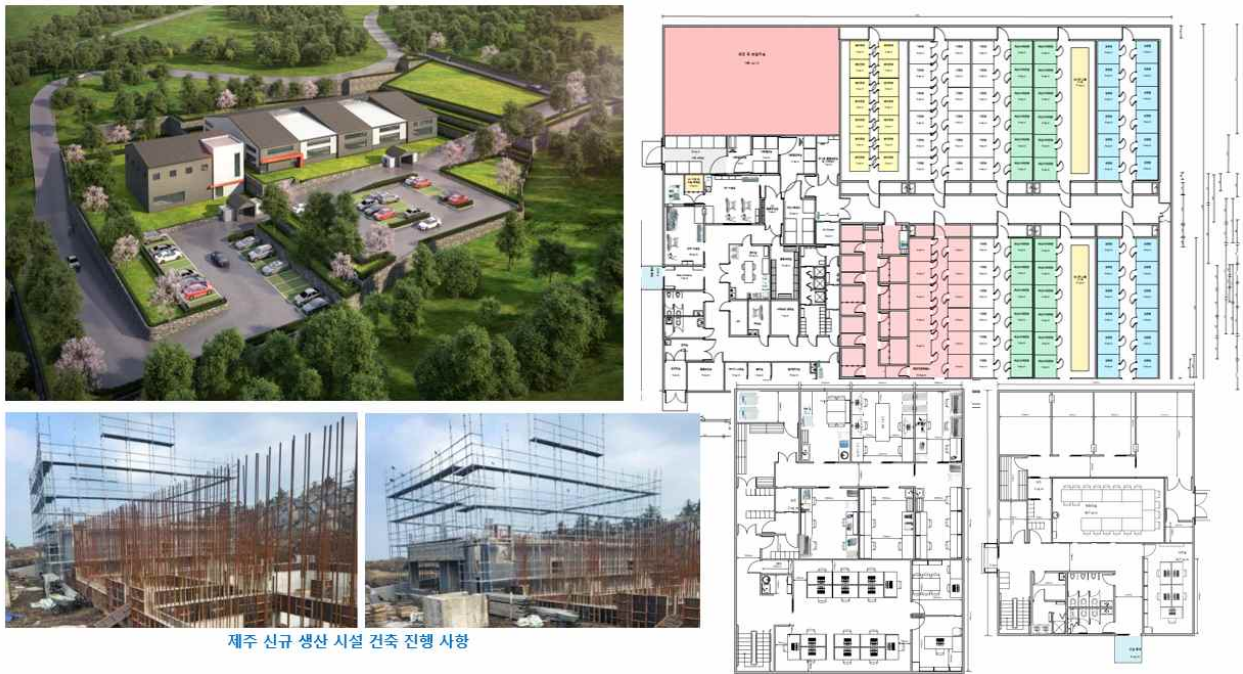


그림. 크로넥스 실험동물 SPF 사육 및 생산 시설. A) 크로넥스 Bio Resource Center 조감도 및 전경, (B) 크로넥스 SPF 사육 및 생산 시설 내부 구조 및 내부 설비

- 흑색종 중대모델동물 대량 생산 및 상용화를 위해 제주 축산진흥원 내 연면적 약 2000m<sup>2</sup> 공간에 동물 사육시설 및 연구시설을 신축 중에 있음.



제주 신규 생산 시설 건축 진행 사항

그림. 신규 동물 생산 시설 조감도 및 개념설개도.

- 신축 동물 생산 시설 규모 및 내용

구분	동물 생산 및 사육동	평수	연구동	평수	
1	사육공간	255	1F	콜라겐 분리/정제실	36
2	공조 및 보일러실	44		사무실 및 회의실	19
3	돈사 및 내부보조공간	106		부대공간	21
4	내부 수술실	6		계	79
5	외부 수술실	5.5	2F	사무실2	24
6	회복실	2.5		형질전환연구실	47
7	사육 및 켄넬실	7.8		부대공간	8
8	사료 멸균 및 보관실	16		계	79
9	합계	440	합계	158	

- 현재 건축 진행률 30%이며 2023년 연내 동물 사육실, 수술실, 부검실, 기계실, 연구실 등 용도별로 분리 구획된 시설을 구축 할 예정임
- 청정도의 유지를 위하여 각 공간별 소독 및 공조가 가능하게 설계되어져 있으며, UV살균 및 역삼투압방식으로 정수된 물, 방사선조사된 사료가 공급되어 동물 내부 오염을 최소화 함으로써 실험동물의 품질 관리 및 유지에 최적화 시스템 적용 예정
- 기 개발된 표준작업지침서를 동물생산 및 관리 업무에 엄격히 적용하여 사람으로 인한 오염의 위험성도 최소화 함
- 최대 1000마리의 실험용 돼지의 사육이 가능하며, 65.886m<sup>2</sup>의 동물 생산실이 10개 있으며 각 동물실 당 최대 100마리의 동물 수용이 가능하도록 구축할 예정임



## 제1 협동과제

## 아부다비 생명공학연구원

### 유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발

**세부목표** : RAS 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가

#### 연구내용1

RAS 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

#### ■ 생산된 RAS 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도

- 효과적으로 흑색종 모델건을 생산하기 위해서 새로운 흑색종 유발유전자 카세트인 SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA를 도입한 세포주로 체세포 핵이식을 수행하여 모델건을 생산함
- 태어난 2마리의 복제건 모두 UV 조명에서 표지 인자인 GFP의 발현이 확인됨

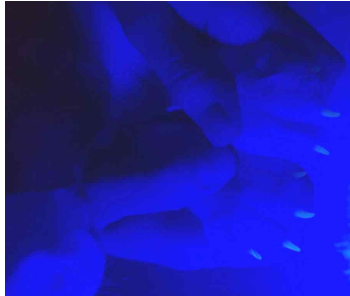


그림. 흑색종 모델 생산용 형질전환 복제건의 GFP 발현 확인

- GFP가 확인된 2두 모두 약 2~3주일령에서 종양으로 병변을 확인하였음. 종양병변은 육안상으로 확인할 수 있을 만큼 크게 나타났으며, 전이 및 증식이 매우 빠르게 관찰됨



그림. 흑색종 모델 생산용 형질전환 복제건 종양 병변 사진

- 종양병변이 관찰된 후, 타 장기로의 전이성 여부를 분석하기 위해 부검을 시행하였음
- 생산된 종양 유발 동물의 조직병리학적 분석을 위해 미세바늘흡입검체 채취법 및 피부 조직에서 punch biopsy를 수행하여 병리조직학적 검사를 수행하였음

#### ■ RAS 유전자 기반 모델건의 병리 조직학적 검증

- 미세바늘흡입검체를 통한 흡인물의 세포학적 검사 결과 피부에 있는 단핵구인 histiocyte가 주종으로 관찰되었음 (그림)
- 채취된 종양 조직에 대한 병리조직학적 검사 결과, necrosis와 phagocytic cell을 보이는 골수 유래 종양이 관찰되었으며, 핵의 다형성 및 유사분열은 존재하지만, 거대세포는 관찰되지 않았음. 또한, 속한 증식속도 및 일부에서 관찰되는 침습적인 성장 양상 등을 고려하였을 때, 악성 종양으로 판별됨 (그림)

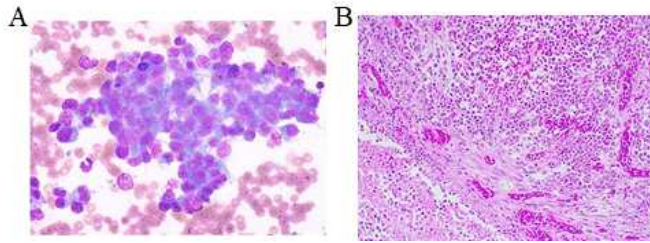


그림. 생산된 형질전환 모델건의 중앙 세포학적 검사 (A) 및 조직 병리학적 분석 (B)

- 면역조직화학염색 (immunohistochemistry) 결과 melanoma marker인 Melan A에는 음성 반응을 보였으나, melanocyte의 핵 내에 발현되는 SOX10에는 양성 반응을 보였음. 또한, 조직 병리학적 분석결과 멜라닌의 침착은 확인되지 않았음 (그림)

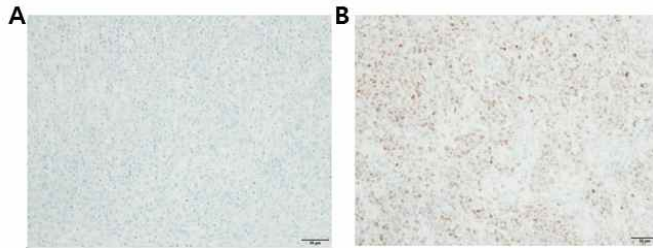


그림. 생산된 형질전환 모델건의 Melan A (A) 및 SOX10 (B) 면역조직화학검사

- 또한, 본 형질전환 복제건에서는, 부검 결과 다른 내부장기로의 전이는 발견되지 않았음. 이에, 멜라닌 결핍 흑색종 (amelanotic melanoma)으로 진단하였음

## 세부목표 : BRAF 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가

### 연구내용1

### BRAF 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

- 효과적으로 흑색종 모델건을 생산하기 위해서 새로운 흑색종 유발유전자 카세트인 SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA를 도입한 세포주로 체세포 핵이식을 수행하여 모델건을 생산함
- 흑색종 모델의 전임상 실험은 일반적으로 연구에서 사용된 멜라닌 세포 특이적 CreER<sup>T2</sup> 발현 시스템을 사용하여, 마우스 등의 설치류에서 시행되고 있음
- 형질전환 마우스에서 흑색종을 유도하기 위하여, 사용되는 Tamoxifen은 일반적으로 피부도포법 및 복강 내 주사가 많이 사용됨. 그러나, 이를 형질전환건에 적용하기에는 체중, 피부면적 및 관리와 같은 부분에서 피부도포법은 적합하지 않으며, 복강 내 주사 또한 개에서는 접근성이 떨어지는 방법임
- 이에 본 연구에서는, BRAF 유전자 기반 형질전환 모델건의 흑색종을 유도하기 위하여 경구투여 방법을 선정하였으며, 기존의 문헌을 참조로 이에 대한 프로토콜을 구축하였음. 또한, 참고문헌 및 서적을 참조로, 개에서의 경구투여에 따른 권장투여용량 및 허용최대투여용량 범위 안에서 프로토콜을 구축하여 수행하였음
- 생산한 형질전환 건의 연령, 체중 및 건강상태를 고려하여 약 60일령 건에 Tamoxifen 경구투여를 통하여 흑색종 유도 전략 구축하였음



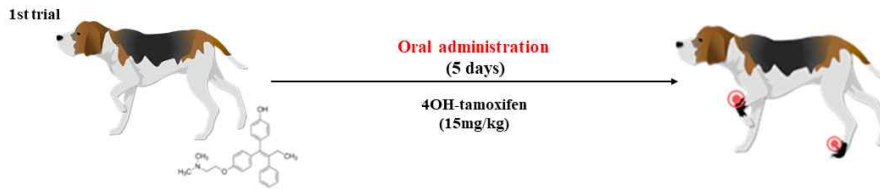


그림. BRAF 기반 흑색종 모델견의 1차 타목시펜 처리 모식도

- 일차적으로, 생산된 BRAF 흑색종 모델견 개체에 Tamoxifen을 5일 동안 15mg/kg을 경구 투여하여 약 3달 간 경과를 관찰한 결과 종양 형성을 육안으로 관찰하지 않았으며, Tamoxifen을 경구투여 하는 과정에서, 해당 BRAF 흑색종 모델견은 섭취거부, 구토, 설사 등의 특이적인 증세는 관찰되지 않았음. 이에 원인을 분석하기 위하여 기존의 문헌 검토 및 협동연구기관인 고려대학교 연구팀과 논의한 결과, In vitro 상에서 CreER<sup>T2</sup> 도입과 함께 Tamoxifen을 처리한 세포들에서만 재조합이 일어나는 것을 확인하였음 (위탁연구기관 4년차 결과 참조)
- 이에 In vivo 상에서, 생산된 흑색종 모델견의 유도방법에 문제가 있다고 판단하였으며, 흑색종 유도를 위한 Tamoxifen 투여 방법에 대하여 문헌을 재검토한 후 추가적으로 약물 경구투여를 통한 흑색종 유도를 결정하였음
- 이차적으로, 동일 BRAF 흑색종 모델견 개체에 대하여 Tamoxifen을 10일 동안 30mg/kg을 투여하여 병변 발현을 관찰하고 있음. 경구투여 과정에서 해당 모델견은 섭취거부, 구토, 설사 등의 특이적인 증세는 관찰되지 않았음. 현재 약 1달간 경과를 관찰 중에 있으며, 참고문헌에 따르면 Tamoxifen 투여 이후 수개월 및 일년까지 BRAF 흑색종 모델동물에서의 흑색종 병변의 발현양상의 관찰 된다고 보고되어 있기에 장기적으로 흑색종 발현 양상을 관찰할 계획임

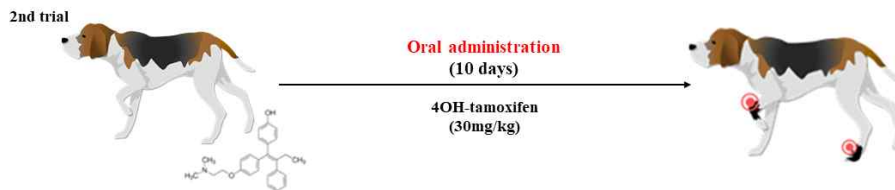


그림. BRAF 기반 흑색종 모델견의 2차 타목시펜 처리 모식도

**세부목표 : RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델견 모델의 전임상 동물 모델로의 생산라인 구축 및 상용화**

**연구내용1 RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델견 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보**

#### ▣ RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델견의 체세포 구축

- 성체줄기세포는 윤리적인 제약이 없고 테라토마와 같은 종양이 발생할 가능성이 없으며 늦은 나이까지 다능성의 미분화 세포를 다량 얻을 수 있다는 점에서 유전자 보존을 위한 세포은행의 강력한 원천 (source)이 될 수 있음
- 피부조직은 생물에서 가장 넓게 분포하는 조직이며, 조직 채취가 골수 및 내부 장기의 조직 채취보다 용이하며, 소량의 조직 채취로는 특별한 합병증이 나타나지 않는 장점이 있음
- 또한 성체줄기세포는 동물의 유전자원의 보존 및 추후, 흑색종 모델견의 생산에 있어서 효율성 높은 공여핵원으로 사용이 가능함
- 이에 본 연구진은 생산된 4차년도에 협동 연구팀인 고려대로부터 전달 받은 SB transposon 시스템을 적용한 RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델견 제작용 핵공여세포를 사용하여 흑색종 모델견을 생산하였으며, 생산된 모델견의 피부 진피(dermis)조직으로부터 중간엽줄기세포를 구축하였음
- 구축된 세포주는 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원)로 기

탁 완료하였음 ( 표, 기탁번호 : BP1914136, BP1914137)

**표. 한국생명공학연구원 바이오의약품프라사업부 생물자원센터 연구성과(생물자원) 기탁 목록**

기탁번호	생물자원명 / 분리번호	연구과제명	과제책임자	비고
BP1914136	SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA (HRAS)	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포 주
BP1914137	SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE-pA;PB-dog TYR-CreERT2-puro (BRAF)	인체 질환모델 중대동물 개발	현상환	동물세포 주

**연구내용2**

**흑색종 모델견 생산 라인 구축**

**▣ 형질전환견 생산을 위한 분만 전/후 대리모 관리 및 산자관리 매뉴얼 확립**

- 분만 전/후 대리모 관리
  - 분만 전 7일 전부터 프로그스테론 농도를 측정함
  - 외음부의 분비물을 확인. 행동변화, 체온의 저하, 구토, 잦은 배변활동 등의 상태를 확인
  - 분만징후가 있을 경우 프로그스테론 레벨이 2ng/ml 이하인 경우 분만에 대한 준비

**표. 대리모의 분만 징후**

증상	설명
체온의 저하	혈중 프로그스테론의 농도가 낮아지면 체온이 37.3℃ 이하로 떨어진다.
식욕부진	진통이 있으면 식욕이 저하된다.
구토	분만전 속을 비우기 위해 구토증세를 나타낸다.
공공거림	공공대거나 늑대울음 같은 소리를 낸다.
헐떡거림	숨이 거칠고 헐떡인다.
몸을 뒹	몸을 부들부들 뒹는다.
바닥 긁음	이불을 한곳에 모으거나 이빨로 물어뜯는 행동, 바닥을 긁는 행동을 보인다.
외음부유연	외음부의 조직이 말랑말랑해진다.
질분비물	외음부를 손으로 꾀보았을 때 분비물이 나온다. (점액성, 양수, 초록색 분비물 등)
힘을 줌	꼬리를 치켜들고 힘을주거나 배변,배뇨하는 자세를 취한다. (분만 임박)
잦은 배변,배뇨	평소와는 다르게 배변,배뇨를 자주 한다.
낮은 p4레벨	p4레벨이 0점대나 1점대인 경우, 종종 2점대인 경우에도 24시간 이내에 분만을 한다.

- 분만 지연 시 조치사항
  - 심박수가 160회 이하로 떨어질 시, 제왕절개를 통하여 산자 확보
  - 첫 번째 분만 후 2시간 이상 지연시 옥시토신 1ml를 30분 간격으로 3회 허벅지에 근육주사함
  - 옥시토신 투여 후 20~30분 경과 시에도 분만이 지연되면, 손 소독 후 윤활제를 발라 외음부에 넣어 태아를 무리하게 당기지 말고 견인진행
- 분만 과정
  - 태막 제거: 등 부분부터 태막을 찢어 탯줄 부분을 향해 벗겨냄
  - 입과 코의 이물질 제거: 머리를 아래 방향으로 한 상태에서 김타울이나 수건을 사용해 이물질을 제거
  - 탯줄 임시 고정: 배로부터 5cm되는 부분에 U Cord Clamp(모스키토)로 집어주고 뒷부분은 제거
  - 털 말림: 울음소리가 나면 김타울이나 수건으로 등을 문질러주며 털을 말려주며, 울음소리가 나지 않으면 양수를 털어준 후 털을 말려줌 (호흡곤란시 산소 공급)
  - 탯줄 묶기: 털이 마르면 탯줄을 배로부터 1cm되는 부분에 나일론실로 묶어준 후 뒷부분은 잘라 줌
  - 배변, 배뇨 유도: 생식기와 항문을 자극하며 유도
  - 인큐베이터 입실: 깨끗한 패드와 수건 등을 충분히 깔아주고 산자를 입실
- 분만 후 대리모와 산자의 관리

- 분만 완료 후 대리모에게 물과 사료를 급여하며, 2시간 이내에 산자에게 젖을 물리도록 함
  - 산자의 출생 이후 18시간 동안 초유를 급여
  - 젖이 잘 나오는 대리모의 모유를 확보하여 냉동 보관. 추후 모유 부족시 사용
  - 분만 후 약 한달 간 대리모의 외음부 위생 상태 확인
- 백신 접종
    - 생후 5주령에 접종을 시작하며, 2주 간격으로 접종을 실시함

표. 백신접종 프로그램

회차	접종약의 종류
1차~3차	DHPPL + KC, 1차 접종 때 KC는 제외
4차	DHPPL + RABIES
5차	DHPPL + RABIES
6차	DHPPL + CORONA
7차	CORONA + CIV
8차	CORONA + CIV

- 구충
  - 6차 까지는 내부기생충약(드론탈정)을 투약하며, 7차부터는 광범위구충약(에드보킷)을 도포함
  - 내부기생충약은 체중 10kg당 1정을 투여하며, 광범위구충약은 체중 1kg당 0.1ml를 한달 간격으로 뒷목 부분에 도포함

표. 구충 프로그램

	1차(7일령)	2차(14일령)	3차(21일령)	4차(23일령)	5차(25일령)	6차(32일령)	7차(42일령)
드론탈정	√	√	√	√	√	√	
에드보킷							√

▣ 신생 복제산자의 생존율을 높이기 위한 가이드라인 구축

- 아프가(APGAR) 지표를 활용한 신생 복제산자의 활성 판단 및 예후의 상관관계를 분석하였음
- 신생 산자는 생리학적 특성과 그에 따른 요구가 성체와 매우 다르기 때문에 이들의 응급관리는 매우 어려워 많은 경우 폐사에 이르며, 특히 신생 산자는 약물을 해독하고 배설하는 주요 장기의 기능이 미성숙 상태이기 때문에 치료를 위한 약물 투여도 한계가 있음
- 개에서 적용된 아프가 채점법(M.C. Veronesi, 2009)을 기반으로 복제 자견의 활성에 대한 평가 방법을 제시하고 그 점수에 따른 이유기 전 복제 산자의 발육을 분석하였음
- 전체 출생한 복제 자견을 대상으로 아프가 점수를 채점한 다음 낮은 점수(0-3), 중간 점수(4-7), 높은 점수(7-10)로 분류함
- 자연분만으로 출산된 44두의 신생 산자 중 아프가 점수가 낮은 점수에 해당하는 자견은 5두이고, 그 중 4두(80.0%)가 출생 후 2시간 이내에 폐사하였으며, 1두(20.0%)가 24시간 이내에 폐사하였음. 중간 점수에 해당하는 신생 산자는 9두이고, 1두(11.1%)가 24시간 이내에 폐사하였음
- 제왕절개로 분만된 67두의 신생 산자 중 아프가 점수가 낮은 점수에 해당하는 자견은 13두이고, 그 중 11두(84.6%)가 출생 후 2시간 이내에 폐사하였으며, 2두(15.4%)가 24시간 이내에 폐사하였음

표. 분만 형태와 아프가 점수에 따른 시간별 복제 산자의 폐사율

아프가 점수	산자 수	자연 분만				산자 수	제왕절개			
		2시간이내 폐사 (%)	24시간이내 폐사 (%)	총 폐사 수 (%)	이유까지 생존 (%)		2시간이내 폐사 (%)	24시간이내 폐사 (%)	총 폐사 수 (%)	이유까지 생존 (%)
낮은 점수	5	4 (80.0)a	1 (20.0)a	5 (100.0)a	0 (0.0)	13	11 (84.6)a	2 (15.4)a	13 (100.0)a	0 (0.0)
중간 점수	9	0 (0.0)b	1 (11.1)b	1 (11.1)b	7 (77.8)	17	0 (0.0)b	3 (17.6)b	3 (17.6)b	7 (41.2)
높은 점수	30	0 (0.0)b	0 (0.0)b	0 (0.0)b	30 (100.0)	37	0 (0.0)b	2 (5.4)b	2 (5.4)b	30 (81.1)
계	44	4 (9.1)	2 (4.5)	6 (13.6)	37 (84.1)	67	11 (16.4)	7 (10.4)	8 (11.9)	37 (55.2)

- 출산 후 아프가 점수에 따른 복제 산자의 증체를 측정
- 자연분만으로 출산한 중간 점수군과 높은 점수군을 비교해본 결과 출생 시 체중에는 유의적인 차이가 없었으나 9일부터 27일까지의 체중이 아프가 점수가 유의적으로 낮은 체중을 보임

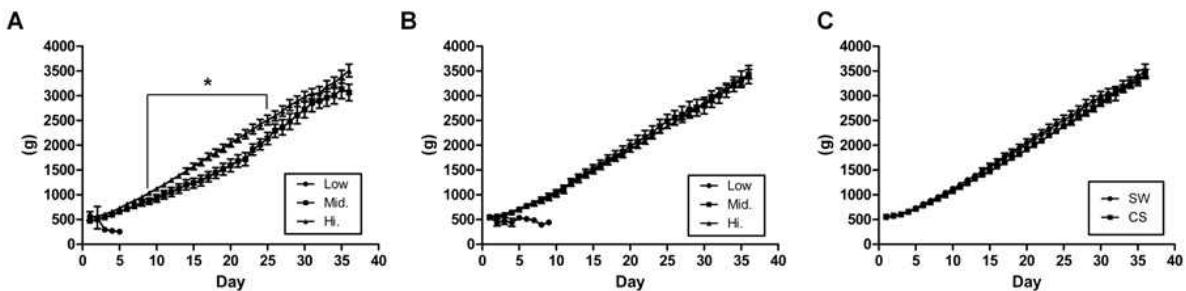


그림. 분만 형태에 따른 복제 산자의 이유기 전 성장

- 추후, 흑색종 모델건의 생산과정에서 아프가 점수를 토대로, 개체 맞춤형 관리 프로그램을 운영할 계획임

▣ 형질전환 복제견 생산 효율 증진을 위한 수정란 이식 방법 구축

a. 배아 이식

- 개의 난모세포는 확보가 어려우며, 시험관 내 성숙 (In vitro maturation) 및 시험관 배양 (In vitro culture)에 대한 연구는 제한적이며 효율성이 부족함. 이에 복제견의 생산을 위하여 일반적인 배반포가 아닌 융합된 배아 (fused embryo)를 외과적으로 이식하고 있음
- 배아 이식 이후 착상 전 단계의 나팔관에서 배아를 회수하여, 발달을 (in vivo culture)을 분석하는 것은 기술적으로 어렵기에 이에 관련된 연구는 매우 제한적임
- 복제 배아의 발달과 임신효율은 공여핵원으로 사용된 세포주의 특성에 따라 영향을 받는다고 보고되어 있으며, 다른 포유류에 비하여 복제견 생산의 효율은 매우 낮음
- 최근 연구결과에 따르면 돼지 및 마우스에서 높은 발달 능력을 가진 단위생식체와 수정된 배아의 동시 이식은 생체 내 착상률 및 임신율을 향상시킨다고 보고가 되었으며, 복제효율이 다른 수정란을 함께 이식하는 경우에도 복제 효율이 낮은 배아의 발달능을 향상시킨다고 보고됨
- 이에, 본 연구진은 흑색종 모델건의 생산 효율을 높이기 위하여, 서로 다른 공여핵원을 사용한 복제 효율이 낮은 배아와 높은 배아를 공동 이식 및 단일 이식을 통하여 생체 내 발달능을 분석하였음

b. 복제배아 공동 이식 및 단일 이식 효율 분석

- 서로 다른 개체로부터 세포를 구축, 이를 공여핵원으로 사용하여 SCNT를 수행하였으며 이를 대리모에 이식하였음 (표)

표. 상이한 공여핵원을 사용한 복제배아의 융합률 및 배아이식

Transfer method	Donor cell	No. of dogs from which oocytes were retrieved	Nuclear transfer		
			No. of oocytes		
			Retrieved	Reconstructed	Fused and transferred (%) <sup>1)</sup>
Single transfer	TM	45	520	460	215 (46.74±11.08) <sup>a</sup>
	TP	9	130	110	69 (62.73±8.46) <sup>b</sup>
Co-transfer	TM	5	48	36	17 (47.22±3.52) <sup>a</sup>
	TP	5	50	42	30 (71.43±5.27) <sup>b</sup>

- 복제 효율이 높은 배아이식군 (TP)은 단일 이식 및 공동이식 간의 분만을 및 이유기까지의 생존율이 차이가 나타나지 않았지만, 복제 효율이 낮은 배아이식군 (TM)은 공동이식을 하였을 때 단일이식에 비하여 유의적으로 높은 임신율, 분만을 및 이유기까지의 생존율을 나타내었음 (표)

표. 서로 다른 복제효율 배아의 단일 이식 및 공동 이식 이후 분만을, 이유기까지의 생존율

Transfer method	Donor cell	No. of transferred embryos	No. of surrogates	Average number of transferred embryos per surrogate	Embryo transfer		Parturition			
					No. of pregnancies (%) <sup>1)</sup>		No. of live births (%) <sup>2)</sup>			
					At mid-term	At term	At mid-term	At term	Abnormal	Alive until weaning
Single transfer	TM	215	16	13.43±1.59	5 (31.30)	3 (18.75) <sup>a</sup>	5 (2.33) <sup>a</sup>	3 (1.40) <sup>a</sup>	2 (0.93)	2 (0.93) <sup>a</sup>
	TP	69	5	13.80±0.84	4 (80.00)	4 (80.00) <sup>b</sup>	6 (8.70) <sup>b</sup>	6 (8.70) <sup>b</sup>	1 (1.45)	6 (8.70) <sup>b</sup>
Co-transfer	TM/TP	47	4	11.75±0.50	2 (50.00)	2 (50.00) <sup>b</sup>	4 (8.51) <sup>ab</sup>	4 (8.51) <sup>b</sup>	0 (0.00)	4 (8.51) <sup>b</sup>

- 복제 효율이 낮은 TM군 및 복제 효율이 높은 TP군의 단일 이식 및 공동 이식 군에서 출산 이후 이유기까지 유사한 체중 변화 곡선을 나타내었음 (그림)

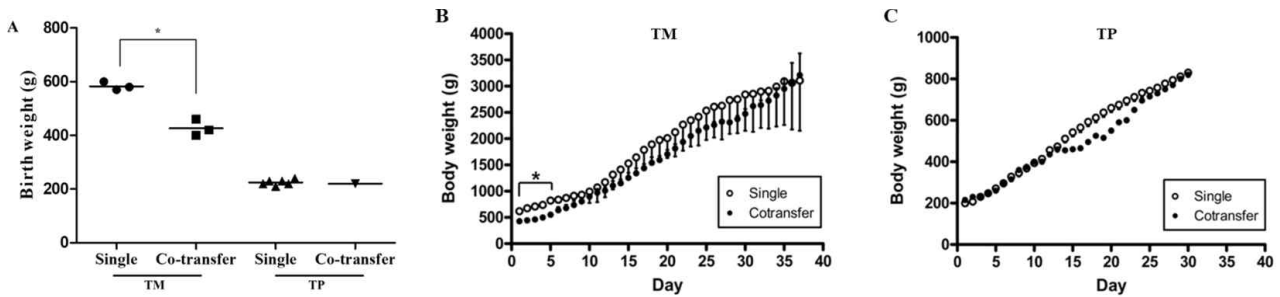


그림. 서로 다른 복제효율 배아의 단일 이식 및 공동 이식 이후 체중 변화

- 앞선 결과들로 보아, 복제 효율이 낮은 배아는 복제 효율이 높은 배아와 공동 이식을 하였을 때 임신률 및 분만을이 높다고 판단됨
- 추후 흑색종 모델견의 대량 생산 과정에서는, 공여핵원에 따른 복제 배아의 효율을 평가한 이후, 공동 이식을 통하여 연구를 수행할 계획임



## 제2 위탁과제

## 고려대학교 산학협력단

### 흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발

**세부목표** : Ras 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가

**연구내용1** Ras 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

- Ras 기반 흑색종 모델건의 경우 아부다비 생명공학연구원에서 흑색종의 발병을 확인하였음
- Ras 기반 흑색종 모델돼지의 경우 충북대학교 현상환 교수 연구팀의 결과를 바탕으로 공여 세포주의 배아 발달을 감소 및 자발적인 유전자 재조합 발생 등의 이유로 해당 Ras 기반 세포주는 흑색종 특이적인 질환모델을 생산하기에 부적합하다고 판단함

**세부목표** : Braf 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가

**연구내용1** Braf 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증

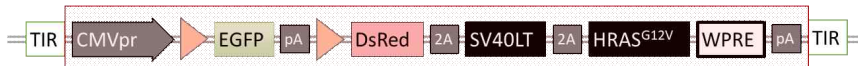
- Braf 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지 생산 및 흑색종 유도 중에 있으며 흑색종 발병 시 조직학적 검증을 공동연구팀과 협업하여 제시하였음(제1세부 및 제1협동 연구결과 참조)

**세부목표** : 전임상 흑색종 질환 모델건으로써의 활용도 검증

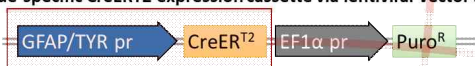
**연구내용1** 전임상 연구를 위한 흑색종 질환 대체 동물모델로써의 유효성 평가

#### Previous GBM/melanoma inducing system

1. Inducible oncogene expression cassette via SB transposon system



2. Tissue-specific CreERT2 expression cassette via lentiviral vector system



#### Current GBM/melanoma inducing system

\* Inducible oncogene expression & Tissue-specific CreERT2 expression cassette via 1 vector SB transposon system



Ras 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



Braf 기반 흑색종 돼지 모델 시스템



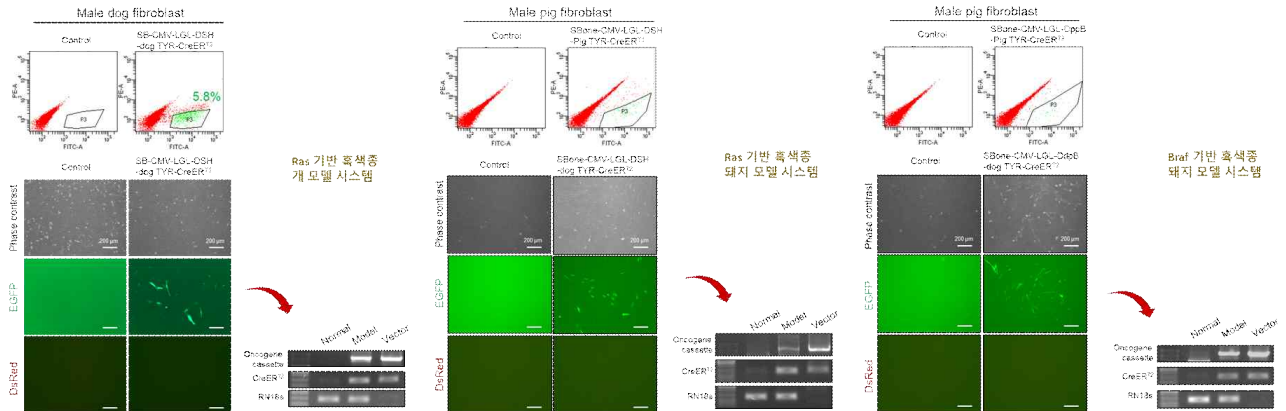
Ras 기반 흑색종 개 모델 시스템



Braf 기반 흑색종 개 모델 시스템



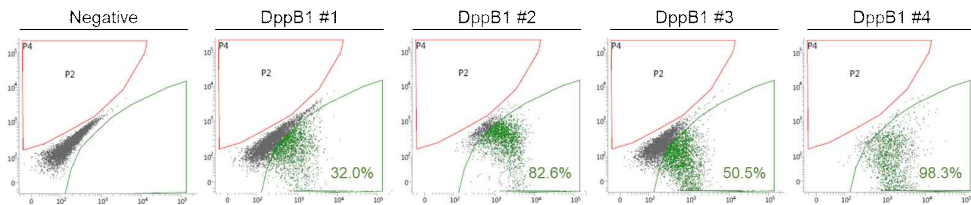
- 본 연구팀은 형질전환 세포의 장기 배양에 따른 암세포화 문제를 보완하기 위하여 SCNT를 위한 형질전환 핵공여세포 제작 기간을 줄이는 전략을 선택하였음. 따라서 이전까지 두 개의 벡터 시스템으로 도입하는 방식에서 하나의 벡터로 만든 transposon 시스템을 개발하였음 (4차년도 결과)



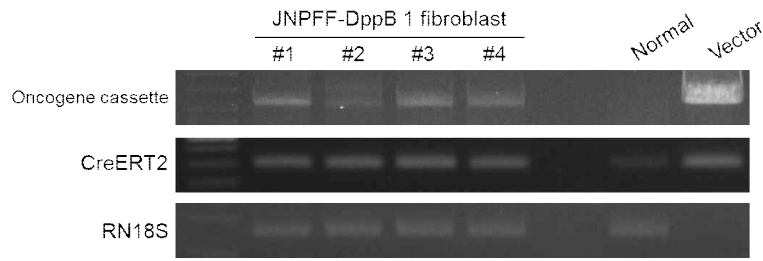
- 개발한 Ras 및 Braf 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 활용하여 형질전환 핵공여세포에 대한 제작 및 검증을 진행하였으며, Ras 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 도입한 개 섬유아세포주 및 Ras 혹은 Braf 기반 통합 흑색종 모델 시스템을 도입한 돼지 섬유아세포주를 각각 (재)아부다비생명공학원 손영범 박사 연구팀과 충북대학교 현상환 교수 연구팀에 전달하였음 (4차년도 결과)

**■ BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 분석**

- 충북대학교 현상환 교수 연구팀에서 SCNT를 수행하여 총 4마리의 형질전환 돼지(JNPFF-DppB 1 pig #1, #2, #3, #4)를 확보함. 이 4마리의 돼지의 피부조직에서 확보된 섬유아세포를 전달받아 분석에 활용함

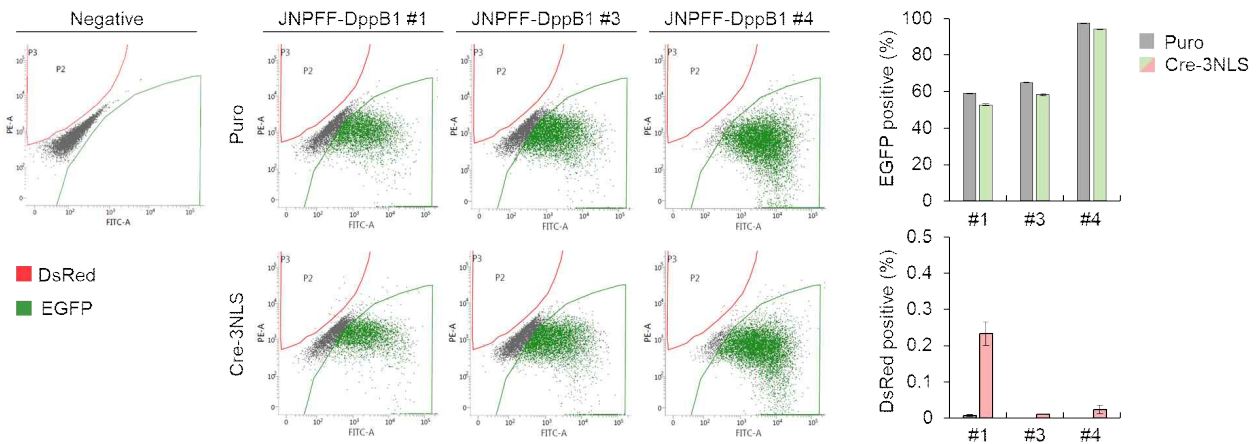


- 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 개체에서 EGFP가 발현되는지 확인하기 위하여 형질전환 돼지의 섬유아세포에 대한 FACS 분석을 진행함. 그 결과 각 개체에서 유래한 섬유아세포 간 EGFP 발현 세포의 비율은 차이가 있으나 EGFP 발현 세포가 존재하며 벡터 시스템이 개체 수준에서 유지되고 있음을 알 수 있음

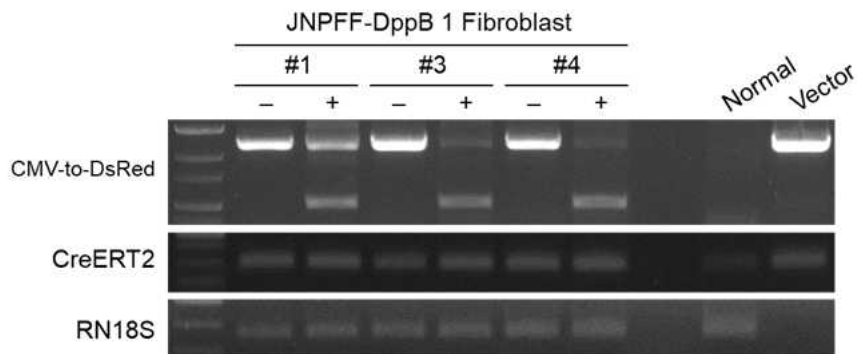


- 형질전환 돼지의 섬유아세포에서 genomic DNA를 추출하고 유전자 발현 벡터 시스템이 온전하게 도입되어 있는지 확인하기 위하여 PCR 분석을 진행함. 그 결과 4마리 개체 모두 oncogene 발현 유도 cassette 및 조직 특이적 CreERT<sup>2</sup> 발현 시스템이 도입되어 있는 것을 확인함

**▣ BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 유래 섬유아세포를 활용한 유전자 발현 벡터 시스템의 유효성 평가**



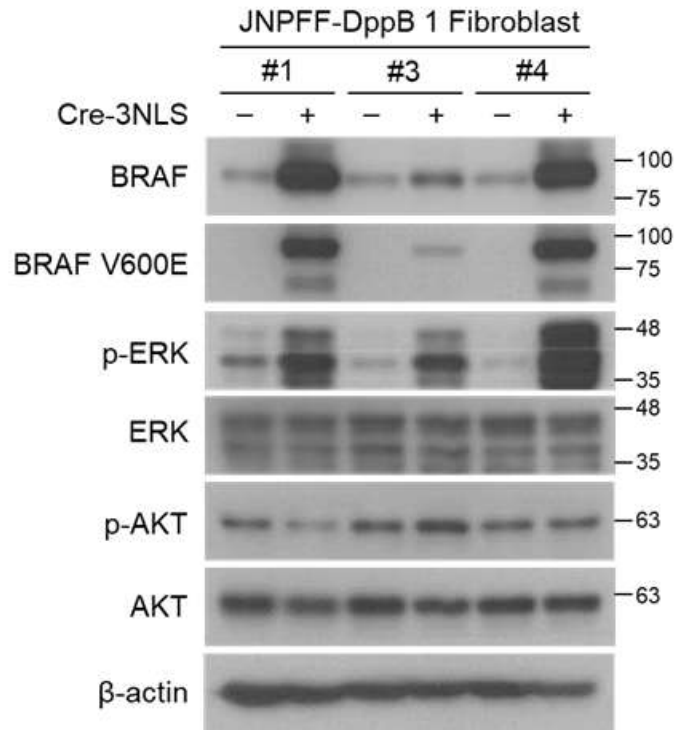
- 도입한 시스템이 Cre에 의해 재조합이 일어나고 그 결과 mutant BRAF와 p53의 발현이 유도되는지 *in vitro*에서 검증하기 위하여 형질전환 돼지의 섬유아세포에 Cre-3NLS를 추가로 도입함. #2 개체 유래 섬유아세포의 경우 세포를 전달받은 후 노화가 빠르게 진행되어 제외하고 나머지 #1, 3, 4 개체 유래 섬유아세포를 활용하였음
- Cre-3NLS 도입 48시간 후 FACS를 통하여 EGFP 및 DsRed 발현 세포의 분포를 확인함. Cre-3NLS 도입 후 EGFP 발현 세포는 감소하며 DsRed 발현 세포는 증가하나 그 정도가 미미함. DsRed 형광의 세기가 약하게 관찰되어 FACS-IF를 진행하여 형광 세기를 증폭시키는 방법으로 추가 확인이 필요함



- 보다 정확하게 Cre-3NLS 도입 후 재조합 여부를 확인하기 위하여 형질전환 돼지의 섬유아세포에 Cre-3NLS를 도입하고 48시간 뒤 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 진행함. 그 결과 Cre-3NLS의 도입에 의해 유전자 재조합이 일어난 것을 확인하였음



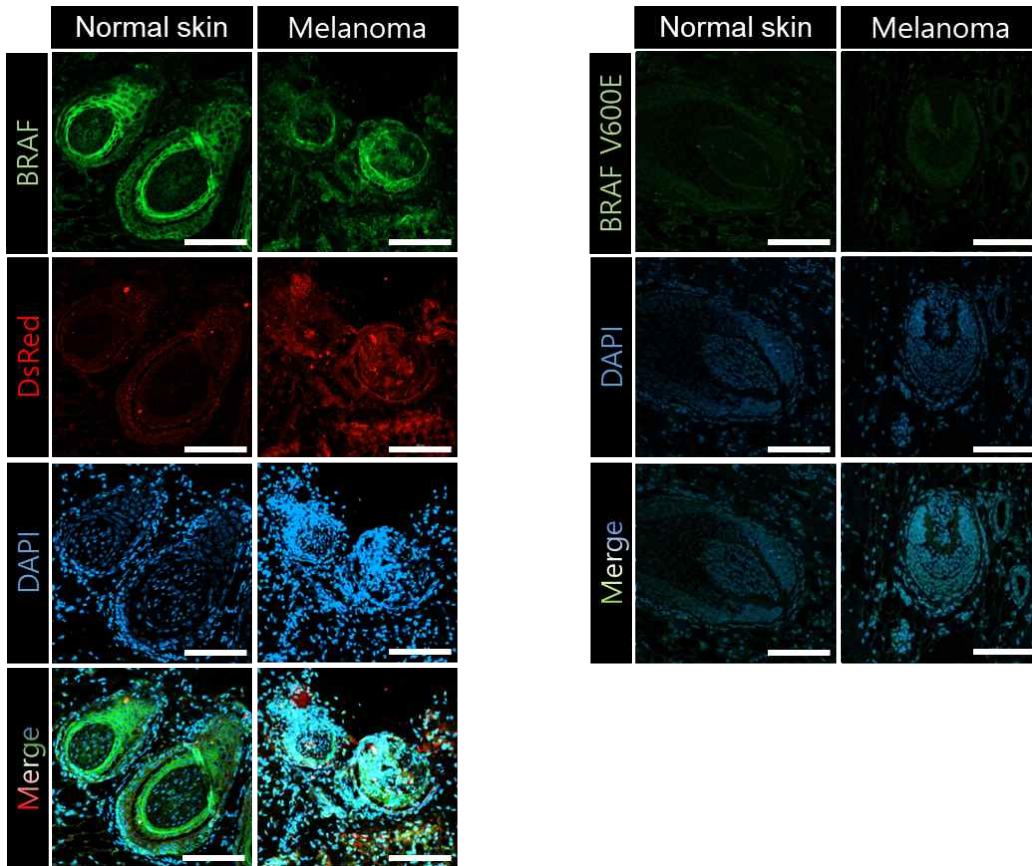
**▣ BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 모델의 유효성 평가(*in vitro*)**



- Cre-3NLS에 의한 재조합 후 종양 유발 유전자 발현 시스템 발현을 단백질 수준에서 확인하기 위하여 형질전환 돼지의 섬유아세포에 Cre-3NLS 도입하고 72시간 뒤 단백질을 추출하여 western blot을 진행함. 그 결과 모든 개체에서 재조합에 의해 mutant BRAF가 발현되는 것을 확인하였음. Mutant p53의 경우 추가 확인이 필요함
- Mutant BRAF는 비정상적인 활성을 가지고 있음. 활성화된 BRAF는 MEK의 인산화 및 활성화를 유도하며 그 결과 ERK의 인산화 및 활성화를 유도한다고 알려짐. 이는 여러 인산화효소 및 전사인자를 인산화하여 세포 성장 유도 및 세포 사멸 억제를 유도함. 이러한 현상은 mutant BRAF를 발현하는 여러 종양에서 나타남(Nat Rev Drug Discov. 2014; 13(12): 928-42.)
- BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지에서도 이러한 현상이 나타나는지 검증하기 위하여 형질전환 돼지의 섬유아세포에서 Cre-3NLS로 유전자 재조합을 유도하고 mutant BRAF의 증가에 따른 ERK의 인산화를 western blot으로 확인함. 그 결과 mutant BRAF의 발현이 증가함에 따라 인산화된 ERK가 증가함을 확인하였음. 따라서 해당 형질전환 돼지에서 유전자 재조합을 유도할 경우 BRAF-ERK 신호 기전이 활성화될 수 있음을 검증함
- Melanoma에서 RAS의 활성화는 RAF-MEK-ERK 및 PI3K-AKT 신호 기전을 활성화하며 각 신호 기전의 활성화는 종양을 촉진한다고 알려짐. RAF의 활성화는 AKT의 인산화는 유도하지 않으며 특정 melanoma subtype에서는 오히려 이를 억제함이 밝혀졌음(PLoS One. 2012; 7(8). e42598.)
- BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지에서 Cre-3NLS 도입으로 mutant BRAF의 발현이 유도되었을 때 AKT의 인산화는 차이가 없는 것을 확인함
- 따라서 해당 형질전환 돼지에서 재조합을 유도하였을 때 개체 수준에서 mutant BRAF의 발현 및 ERK의 인산화 여부를 추가 검증하고자 함

**▣ BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현 벡터 시스템이 도입된 형질전환 돼지 모델의 유효성 평가(*in vivo*)**

- JNPFF-DppB1 모델에 대한 개체 수준에서 Tamoxifen을 처리하여 BRAF 기반 흑색종 유발 유전자 발현을 유도 중이며 병변이 발생한 후 추가 분석을 진행하고자 함



- 부검한 JNPFf-DppB 1 #2 개체의 조직 파라핀 블락을 충북대학교 현상환 교수 연구팀으로부터 제공받아 해당 개체에서 발생한 흑색종으로 예상되는 병변이 도입한 종양 유발 유전자 기반 시스템의 의도하지 않은 발현으로 인한 현상인지 검증하기 위하여 면역형광법을 통해 분석을 진행함
- 정상 피부조직과 흑색종으로 추정되는 병변을 비교하였을 때 병변에서 DsRed의 발현이 확인됨
- 도입한 mutant BRAF의 발현이 증가하는지 검증하기 위해 특이적인 항체를 사용하여 분석을 진행했을 때 정상 피부 및 병변에서 일부 세포들이 염색되는 것을 확인함
- 추가적인 조직 분석이 필요하며 종양 유발 유전자 발현 시스템이 형질전환 돼지의 genomic DNA상의 어느 locus에 삽입되어 있는지 검증이 필요함

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명		연도	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계	가중치 (%)
			(2018~2019)	(2019~2020)	(2020~2021)	(2021~2022)	(2022~2023)		
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문 [SCIE]	목표 (연차별)	-	2	2	2	2	8	
		실적 (누적)	1	5	5	7	6	24	
	논문 [평균 IF]	목표 (연차별)	-	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
		실적 (누적)	2.3	2.5	3.5	3.3	4.7	3.5	
	학술 발표	목표 (연차별)	-	4	4	4	4	16	20
		실적 (누적)	-	7	4	8	8	27	
	특허 출원	목표 (연차별)	-	1	1	1	1	4	20
		실적 (누적)	-	1	1	2	2	6	
	특허 등록	목표 (연차별)	-	-	1	-	1	2	20
		실적 (누적)	-	-	1	-	1	2	
	품종 등록	목표 (연차별)			1		1	2	
		실적 (누적)			-		-	-	
	생명 자원 (생물 자원)	목표 (연차별)				-	-	-	
		실적 (누적)				3	4	7	
연구개발과제 특성 반 영 지표 <sup>2)</sup>	기술 실시 (이전)	목표 (연차별)	-	-	1	1	1	3	20
		실적 (누적)	2	3	3	3	2	13	
	기술료	목표 (연차별)	-	-	5,000	5,000	5,000	15,000	
		실적 (누적)	11,000	24,200	24,200	53,900	46,200	159,500	
	사업화 (제품화)	목표 (연차별)			1	1	1	3	
		실적 (누적)			1	-	2	3	
	사업화 (매출액)	목표 (연차별)				50,000	100,000	150,000	
		실적 (누적)				-	200,000	200,000	
	사업화 (고용 창출)	목표 (연차별)		1	1		1	3	10
		실적 (누적)		8	3	2	3	16	
	인력 양성	목표 (연차별)	1	-	2	2	1	6	10
		실적 (누적)	1	1	3	2	4	11	
	홍보 전시	목표 (연차별)			-			-	
		실적 (누적)			1			1	
포상 및 수상	목표 (연차별)		-	-	-	-	-		
	실적 (누적)		3	1	6	3	13		
계									

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등

을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

- \* 2」 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Embryotropic effects of vascular endothelial growth factor on porcine embryos produced by in vitro fertilization	Theriogenology	Dibyendu Biswas	120	USA	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2018.10.15	0093-691X	5%
2	Establishment of TP53-knockout canine cells using optimized CRIPSR/Cas9 vector system for canine cancer research.	BMC Biotechnology	Kiyoung Eun	19(1)	ENGLAND	BMC	SCIE	2019.01.03	1472-6750	40%
3	GDF8 enhances SOX2 expression and blastocyst total cell number in porcine IVF embryo development	Theriogenology	Junchul David Yoon	129	USA	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2019.04.15	0093-691X	45%
4	Effect of porcine uterus as ex vivo model of fertilizing ability and gene	Theriogenology	Yongquan Han	129	USA	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2019.04.15	0093-691X	60%
5	Growth differentiation factor 8 regulates SMAD2/3 signaling and improves oocyte quality during porcine oocyte maturation in vitro	Biology of Reproduction	Junchul David Yoon	101(1)	USA	OXFORD	SCIE	2019.04.20	0006-3363	55%
6	Sphingosine-1-Phosphate (S1P) analogue Phyto-sphingosine-1-Phosphate (P1P) improves the in vitro maturation efficiency of porcine oocytes via regulation of oxidative stress and apoptosis	Molecular Reproduction and Development	Kyu-Mi Park	86 (11)	USA	WILEY	SCIE	2019.08.03	1040-452X	100%
7	Effects of human recombinant granulocyte-colony stimulating factor treatment during in vitro culture on porcine pre-implantation	PLoS ONE	Lian Cai	15(3)	USA	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE	2020.03.17	1932-6203	90%

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
8	Dog cloning from post-mortem tissue frozen without cryoprotectant	Cryobiology	Yeonik Jeong, Yeon Woo Jeong	97	USA	ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE	SCIE	2020.04.05	0011-2240	100%
9	Transcriptional activities of human elongation factor-1 $\alpha$ and cytomegalovirus promoter in transgenic dogs generated by somatic cell nuclear transfer	PLoS ONE	Kiyong Eun	15(6)	USA	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE	2020.06.03	1932-6203	50%
10	Characterization and comparison of genomic profiles between primary cancer cell lines and parent atypical meningioma tumors	Cancer Cell International	Eunhye Kim	20	ENGLAND	BMC	SCIE	2020.07.28	1475-2867	30%
11	Optimized Approaches for the Induction of Putative Canine Induced Pluripotent Stem Cells from Old Fibroblasts Using Synthetic RNAs	Animals	Mirae Kim	10(10)	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2020.10.11	2076-2615	30%
12	Establishment of neuro-organoids derived from pig embryonic stem cells	International Journal of Molecular Sciences	Seon-Ung Hwang	22	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2021.03.05	1422-0067	20%
13	R-Spondin 2 and WNT/CTNNB1 signaling pathways are required for porcine	Animals	Seon-Ung Hwang	11	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2021.03.05	2076-2615	20%
14	Effect of Interleukin-7 on In Vitro Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes and Subsequent Developmental Potential after Parthenogenic Activation	Animals	Dongjin Oh	11	SWITZERLAND	MDPI	SCIE	2021.03.08	2076-2615	30%

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
15	The Effect of Copper Supplementat ion on in vitro Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes and Subsequent Development al Competence after Parthenogene tic Activation	Theriogen ology	Hyerin Choi	164	USA	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2021.04.01	0093-691X	30%
16	Mitochondrial metabolism assessment of Iycaon-dog fetuses in interspecies somatic cell nuclear transfer	Theriogen ology	Young-Bu m Son	165(7051)	USA	ELSEVIER SCIENCE INC	SCIE	2021.04.15	0093-691X	100%
17	Vitrification of Dog Skin Tissue as a Source of Mesenchymal Stem Cells	BioMed Research Internation al	Young-Bu m Son	2021(1340281)	USA	HINDAWI LTD	SCIE	2021.07.10	2314-6133	100%
18	Comparative evaluation of three different formulas for predicting the parturition date of German Shepherds following somatic cell nuclear transfer	The Journal Of Veterinary Medical Science	Young-Bu m Son	83(9)	JAPAN	JAPAN SOC VET SCI	SCIE	2021.09.15	0916-7250	100%
19	Generation of reproductive transgenic pigs of a CRISPR-Cas9 - b a s e d oncogene-inducible system by somatic cell nuclear transfer	Biotechnol ogy Journal	Kiyoung Eun, Seon-Ung Hwang	17(7)	GERMAN Y	WILEY	SCIE	2022.03.01	1860-6768	50%
20	Exploring the mechanism of trehalose: dual functions of PI3K/Akt a n d VPS34/mTOR pathways in porcine oocytes and cumulus cells	Biology of Reproduct ion	Lian Cai	107(2)	USA	OXFORD	SCIE	2022.03.25	0006-3363	40%
21	Physiological and Functional Roles of Neurotrophin-4 During In Vitro Maturation of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes	Frontiers in Cell and Developm ental Biology	Mirae Kim	10	SWITZER LAND	FRONTIERS	SCIE	2022.07.08	2296-634X	55%

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
22	Neutrotrophic factors in the porcine ovary: Their effects on follicular growth, oocyte maturation, and developmental competence	Frontiers in Veterinary Science	Mirae Kim	9	SWITZERLAND	FRONTIERS	SCIE	2022.08.10	2297-1769	55%
23	Impact of co-transfer of embryos produced by somatic cell nuclear transfer using two types of donor cells on pregnancy outcomes in dogs	Animal Bioscience	Young-Bum Son	35(9)	Korea	Asian-Australasian Association of Animal Production Societies	SCIE	2022.09.01	2765-0189	100%
24	Copper deficiency affects the developmental competence of porcine oocytes matured in vitro	Frontiers in Cell and Developmental Biology	Hyerin Choi	10	SWITZERLAND	FRONTIERS	SCIE	2022.09.07	2296-634X	50%

#### □ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2019 대한수의학회 추계 국제 학술대회	Ga-Hye Kim	2019.04.25	건국대학교 새천년관	대한민국
2	2019 대한수의학회 추계 국제 학술대회	Hyerin Choi	2019.04.25	건국대학교 새천년관	대한민국
3	SSR 52nd Annual Meeting Special Events	Seon-Ung Hwang, Mirae Kim	2019.07.18	San jose McEnergy convention center	미국
4	SSR 52nd Annual Meeting Special Events	Junchul David Yoon	2019.07.18	San jose McEnergy convention center	미국
5	SSR 52nd Annual Meeting Special Events	Hyerin Choi	2019.07.18	San jose McEnergy convention center	미국
6	2019 발생생물학회	Hyerin Choi	2019.08.30	성신여자대학교	대한민국
7	2019 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular biology	Kiyong Eun	2019.10.01	서울 코엑스	대한민국
8	ISSCR 2020 VIRTUAL	Seon-Ung Hwang	2020.06.23	Virtual	Virtual
9	ISSCR 2020 VIRTUAL	Hyerin Choi	2020.06.23	Virtual	Virtual
10	2020년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	Hyerin Choi	2020.08.20	KT대전인재개발원 제2연수관 증강당	대한민국
11	2020년 한국동물생명공학회 정기 학술대회	Dongjin Oh	2020.08.20	KT대전인재개발원 제2연수관 증강당	대한민국
12	2021 대한수의학회 추계 학술대회	Hyerin Choi	2021.05.27	Virtual	대한민국
13	2021 대한수의학회 추계 학술대회	Lian Cai	2021.05.27	Virtual	대한민국
14	2021 한국동물생명공학회	Hyerin Choi	2021.06.18	Virtual	대한민국
15	한국술기세포학회 2021 연례 학술대회	Young-Bum Son	2021.08.12	부산 Bexco	대한민국
16	2021 한국동물생명공학회 (발생공학 심포지움)	Mirae Kim	2021.10.15	Virtual	대한민국
17	2021 한국동물생명공학회 (발생공학 심포지움)	Dongjin Oh	2021.10.15	Virtual	대한민국
18	2021 대한수의학회 추계 학술대회	Hyerin Choi	2021.10.28	군산	대한민국



19	2021 대한수의학회 춘계 학술대회	Dongjin Oh	2021.10.28	군산	대한민국
20	2022 대한수의학회 춘계 학술대회	Dongjin Oh	2022.04.28	오송	대한민국
21	2022 대한수의학회 춘계 학술대회	Ali Jawad	2022.04.28	오송	대한민국
22	2022 ISSCR	Ali Jawad	2022.06.14	샌프란시스코	미국
23	2022 한국동물생명공학회	Ali Jawad	2022.06.24	연세대학교	대한민국
24	2022 한국실험동물학회	Dongjin Oh	2022.07.20	제주도	대한민국
25	제 41회 한국발생생물학회	Lian Cai	2022.08.19	중앙대학교	대한민국
26	제 41회 한국발생생물학회	Mirae Kim	2022.08.19	중앙대학교	대한민국
27	제 41회 한국발생생물학회	Sohee Kim	2022.08.19	중앙대학교	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	melanomaTG+Cre F1#4	BP1912242	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2021
2	melanomaTG-Cre F1#2	BP1912243	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2021
3	NOMduroc	BP1912244	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2021
4	SBone-CMV-LGL-DSH-WPRE-pA-dog TYR-CreERT2-pA (BRAF)	BP1914136	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2022
5	SB-CMV-LGL-DdpB-WPRE-pA;PB-dog TYR-CreERT2-puro (HRAS)	BP1914137	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2022
6	JNPFf-DppB piglet fibroblast	BP1914836	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2022
7	CMV-EGFP-DSH F2 piglet fibroblast	BP1915993	한국생명공학연구원 바이오효인프라사업 부 생물자원센터	2022

\* 품종등록 지표를 생명자원 등록으로 대체하였음

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	개의 TP53 유전자 표적 CRISPR/Cas9 벡터 시스템 및 이를 이용한 TP53 녹아웃 세포	대한민국	고려대학교 산학협력단	2019.05.14	10-2019-0056396		고려대학교 산학협력단	2020.09.17	10-2159317	50%	
2	돈육의 콜라겐 함량 예측용 마커 및 이의용도	대한민국	크로넥스(주) 외 1	2020.06.18	10-2020-0074533					100%	
3	돼지 신경 오가노이드 제조방법	대한민국	충북대학교 산학협력단	2021.04.06	10-2021-0044422					100%	
4	CRISPR/Cas9 매개 폴리시트론성 종양유전자 발현 벡터 및 이를 이용한 동물 종양 모델	대한민국	충북대학교 산학협력단 고려대학교 산학협력단	2021.09.06	10-2021-0118084					100%	
5	인터루킨 (Interleukin, IL)-7을 포함하는 포유동물 수정란의 체외배양용 배지 조성물	대한민국	충북대학교 산학협력단	2022.03.17	10-2022-0033351		충북대학교 산학협력단	2022.11.16	10-2469369	50%	
6	흑색종 형질전환 돼지 모델 및 이의 용도	대한민국	충북대학교 산학협력단	2022.06.23	10-2022-0076520					100%	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자
----	-----------------------	-----	---------------------	-------	-------------	--------------	--------------------------	-----	-----------	------

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

## [경제적 성과]

### □ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
----	------	--------	--------	-------	-------	--------------	----------------	---------------

### □ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	신생자돈의 관리방법	송백농장	2018.05.01	5,500,000원	5,500,000원
2	노하우	대리모돈의 선발 및 사양관리	크로넥스	2018.05.01	5,500,000원	5,500,000원
3	노하우	이유자돈의 사양관리	송백농장	2019.03.28	6,600,000원	6,600,000원
4	노하우	효율적인 동결정액 제조방법	크로넥스	2019.03.28	8,800,000원	8,800,000원
5	노하우	외과수술을 통한 복제배아 이식 프로토콜	크로넥스	2019.03.28	8,800,000원	8,800,000원
6	노하우	정액심부주입기 개발을 위한 미경산돈 생식기관 해부학적 측량 기술 노하우	송백농장	2020.04.27	6,600,000	6,600,000원
7	노하우	형질전환 웅돈 생식세포 정상성, 체외수정을 및 형질전환배아 체외발달을 평가기법	크로넥스	2020.04.28	8,800,000	8,800,000원
8	노하우	형질전환 돼지배아 로딩 및 운반 프로토콜	크로넥스	2020.04.28	8,800,000	8,800,000원
9	노하우	자연발생 흑색종 개체 세포주 확립 및 리프로그래밍	크로넥스	2021.02.25	17,600,000원	17,600,000원
10	노하우	수액세트 개발을 위한 중대동물 전임상 시험기법	크로넥스	2021.04.05	11,000,000원	11,000,000원
11	노하우	흑색종 돼지모델 개발 관련 번식/생산 동물의료기기 개발	성원메디칼	2021.04.14	25,300,000원	25,300,000원
12	노하우	인체질환 돼지모델 관련 동물의료기기 개발	성원메디칼(주)	2022.03.02	29,700,000원	29,700,000원
13	노하우	형질전환 개체 후대생산 및 검증기법	크로넥스(주)	2022.09.01	16,500,000원	16,500,000원

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

### □ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
----	------------	-------	-------	----	-----------

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	위탁판매	국외	연구용 세포주 판매	개 TP53 녹아웃주 판매	Applied Biological Materials . Inc.	-	-	판매 준비중	10년
2	기술이전	신제품 개발	국내	형질전환 동물 제작 및 생산 서비스	유전자 조작 기술을 활용한 형질전환 동물 제작 및 생산	크로넥스	200,000	-	2022	
3	기술이전	신제품 개발	국내	CN-FCT-s kin	약물 투과성 시험	크로넥스	-	-		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- \* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
형질전환 동물 제작 및 생산 서비스	2022	200,000		200,000	세금계산서
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		단위(%)	현재까지	3년 후
	시장 점유율	국내		
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)				합계
			2019년	2020년	2021년	2022년	
1	인체 질환모델 중대동물 개발	크로넥스	6	2	2	2	12
2	인체 질환모델 중대동물 개발	충북대학교 산학협력단	2	1	0	1	4
합계			8	3	2	3	16

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	-
		생산인력	-
	개발 후	연구인력	4
		생산인력	12

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사 취득	2018		1				1			1		
2	박사 취득	2019	1				1			1			
3	석사 취득	2020		2				2		2			
4	박사 취득	2020	1				1		1				
5	석사 취득	2021		1			1			1			
6	박사 취득	2021	1					1		1			
7	석사 취득	2022		1				1		1			
8	박사 취득	2022	1					1		1			
9	취업	2022				2		2	1	1			

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙전문지	랩인터내셔널	"글로벌 동물의료 시장 급성장에 주목...K-축산바이오·오가노이드 개발 분야 유망"	2020.05.04

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수포스터상	우수포스터상	김미래	2019.04.27	대한수의학회
2	수상	우수포스터상	우수포스터상	황선웅	2019.08.31	한국발생생물학회
3	수상	우수포스터상	우수포스터상	윤준철	2019.08.31	한국발생생물학회
4	수상	2019 농식품 R&D 우수성과 60선 선정	2019 농식품 R&D 우수성과 60선 선정	현상환	2020.08.03	농림축산식품부
5	수상	충북대 총장 최우수상	충북대 산업체 공동연구 연구비부문	현상환	2021.01.28	충북대 제9152호
6	표창장	농림축산식품 과학기술대상	농림축산식품부 장관 표창장	현상환	2021.09.08	농림축산식품부 제118964호
7	수상	Travel Award	우수포스터상	김미래	2021.06.26	ISSCR
8	수상	우수포스터상	우수포스터상	김미래	2021.10.15	발생공학 국제 심포지움
9	수상	우수포스터상	우수포스터상	오동진	2021.10.29	대한수의학회
10	수상	젊은 과학자상	젊은 과학자상	최혜린	2021.11.04	충북대학교 수의학과
11	수상	우수포스터상	우수포스터상	오동진	2022.04.28	대한수의학회
12	수상	우수 박사학위 논문상	우수 박사학위 논문상	김미래	2022.08.18	충북대학교
13	수상	우수포스터상	우수포스터상	최혜린	2022.08.20	한국발생생물학회

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/연구장비명	규격(모델명)	개발여부(○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자(YY.MM.DD)	구축비용(천원)	비고(설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

1. 생물자원 등록

가. 성과내용

- 돼지의 경우 국내에서 품종등록의 기준은 생산성과 경제성을 향상시켜 우수한 새끼돼지를 생산하는 고품질의 돼지고기(식육)을 만들어내는 것을 목표로 하고 있음
- **형질전환 돼지 또는 유전자변형 돼지는 품종등록의 대상에서 배제됨**
- 따라서 품종등록이라는 성과지표를 대신한 새로운 성과지표가 필요함
- 본 연구에서는 품종등록이라는 정량적 성과지표를 대신하여 생물자원 기탁으로 성과로 대체함
- MelanomaTG+Cre F1#4 외 6건의 유전자 도입세포 또는 형질전환 개체의 체세포를 한국생명공학연구원 바이오의약인프라사업부 생물자원센터에 기탁하여 생물자원의 확보 및 자원으로써의 활용도를 높임

나. 성과의 기여사항

- 생물자원 기탁은 바이오산업의 핵심요소인 생물자원의 중요성을 인식되고 있음
- 생물자원을 국가의 중요한 전략산업으로 육성하고 있으며, 생물자원의 국가 자산화를 통한 자원 주권 강화에 기여할 수 있음
- 연구자들에 의해 발굴되는 신규 생물자원은 생물자원 다양성 연구에 있어 유용함

#### (4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

##### 1. 국내 재래돼지의 질환모델 개발

###### 가. 성과내용

- 국내 재래종의 제주재래돼지를 유래 태아섬유아세포주를 확립함
- 국내 재래종인 제주재래돼지를 이용한 질환모델 돼지를 생산함
- 기존 사용된 유카탄 미니돼지와 비교 분석하여 번식효율의 차이점을 분석함
- 체세포 핵이식 유래 질환모델 생산에 있어 제주재래돼지의 효율성을 확인함

표. 흑색종 질환모델 돼지 생산에 따른 종의 차이

	유카탄	제주재래돼지
복당산자수	14/3두 (4.7두)	7/3두 (3두)
사산율	3/14두 (21.4%)	0/7두 (0.0%)
기형율	Cleft lip and palate 4/14두(28.6%)	수축뇌 1/7두 (14.3%)
산자평균생시	689g	710g

- 유카탄 종으로 흑색종 모델 돼지를 생산 시 사산율 및 기형률을 확인했을 때 제주재래돼지에 비해 높은 것을 확인할 수 있었음. 이에 제주재래돼지를 활용하여 형질전환 개체 생산시 좀 더 효율적일 것으로 판단됨

###### 나. 성과의 기여사항

- 질환모델 미니돼지 개발에 따른 글로벌 경쟁력 강화 및 국가 기술력 확보
- 국내 미니돼지 산업체 기술 확보를 통한 질환모델 대량생산
- 최신 바이오의료 및 중개의학 연구를 위한 국내외 미니돼지 활용 연구기반시설 구축 가능
- 국가 원천기술 개발과 관련한 정부 차원의 R&D 지원 확대 및 미니돼지 생산과 관련된 글로벌 산업체의 투자 유치 가능



## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 악성 흑색종 질환 모델돼지 및 모델견 생산 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cre/LoxP inducible system 또는 Optogenetics-FGF receptor를 활용한 흑색종 질환모델 형질 전환 세포주 2종 이상 수립 완료</li> <li>○ 체세포핵이식 기법을 통해 흑색종 질환모델 배아생산 및 질환모델 2종 이상의 모델돼지 및 모델견 생산 완료</li> <li>○ 기생산된 종양모델 활용 후대검증, 육종기법을 통한 인체질환 모델동물의 대량생산 프로토콜 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> </ul>
○ 악성 흑색종 질환돼지 및 모델견의 표현형 분석 및 관리체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 흑색종 질환모델 동물 표현형 분석 : 신경, 생리, 운동, 행동, 질병패턴</li> <li>○ 흑색종 질환모델 종대동물의 유전자 분석, 조직병리 및 분자병리학적 표현형 분석체계 구축</li> <li>○ 비침습적 영상진단 분석(PET-CT, MRI)을 통한 표현형 분석 실용화 가능성 제시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> </ul>
○ 악성 흑색종 질환 모델돼지 및 모델견 기반 비임상 평가를 통한 실용화 전략수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Founder가 될 수 있는 흑색종 모델 돼지 및 견 생산 완료</li> <li>○ 치료기술 효능 및 안전성 평가 기준 수립</li> <li>○ 인체 질환 치료기술 비임상 평가를 위한 자원 관리체계 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> </ul>

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

지난 3년간 COVID-19 팬데믹 여파로 연구 수행하는데 많은 애로가 있었으나, 정량지표 및 정성지표 모두 100% 이상 달성하였음

---

##### 2) 자체 보완활동

---

연구수행 종료 후 생산되는 모델개체에 대하여 추가적인 후대검증, 종양유전형 및 표현형별 모델동물 라인구축을 통한 수출품목 전략사업으로 사업화 전략을 구축하였고, 이에 미국 존스홉킨스의대 연구진과 함께 질환모델 미니돼지 수요가 많은 북미시장 진출을 기획하였으며, 이에 정부부처 연구개발 사업 및 충북지역혁신연구개발사업에 지원할 예정

---

##### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

지난 3년간 COVID-19 팬데믹 여파로 연구 수행하는데 많은 애로가 있었으나, 최종연구목표 달성을 위하여 공동연구진과의 정기적 회의, 수정란이식수술과 같은 현장연구, 세포주 탁송 등의 연구수행방법 등을 비대면 시스템으로 수행하였음

이에 연구기간 3년 이상의 팬데믹 기간 중에도 긴밀한 공동연구 수행이 가능하였고, 2종 이상의 흑색종 모델돼지, 모델견 생산과 이의 기반 핵심기술을 수립하였고, 특허출원 150%(목표 4건 vs 성과 6건), 특허등록 100%(목표 2건 vs 성과 2건), 기술이전 건수 433%(목표 3건 vs 성과 13건), 기술료 1063%(목표 1천5백만원 vs 성과 1억5천9백5십만원), SCI 논문 300%(목표 8편 vs. 성과 24편) 등의 정량목표를 초과 달성하였음

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

### 1) 학문적 측면

- 전이성 암과 관련된 기초, 응용, 중개의학 분야의 융합 및 전반적인 학문적 창출 효과를 낼 수 있음
- Cre/LoxP 시스템을 활용하여, 흑색종을 유발할 수 있는 유전자를 표적화, 시간적 및 조직 특이적 제어기술을 통해 중대동물에서 유도기술의 발전을 제공함
- 인간과 생리학적 및 조직학적으로 유사한 중대 동물을 이용함으로써 난치성 질환의 발생 기전 연구에 유용함
- 질환 모델을 이용하여 흑색종 종양유발 관련 기전 분석에 용이할 것임

### 2) 기술적 측면

- 인간과 장기가 약 2,000-2,500배 정도 차이가 나는 형질전환 마우스(GEM)의 한계를 극복한 흑색종 중대동물 질환 모델을 개발함
- 형질전환 중대동물 생산효율을 개선하기 위한 체외 성숙 및 배양 시스템 확립과 형질전환 동물을 생산하기 위한 대리모돈 선발 및 자돈 초기관리 프로토콜 수립함
- 형질전환 중대동물을 생산하기 위한 배아 이식 효율을 개선 시키기 위한 영향인자를 확인함
- 질환 모델을 대량 생산 및 사양 프로토콜 수립과 질환 모델 특이적 유전자의 계대간 전달 체계를 확인함

### 3) 산업화 측면

- 형질전환 생산효율 향상으로 인한 생명공학 기술의 실용화를 가속하며, 인간 질환 모델 중대동물 산업 분야가 생명공학 분야의 한 축을 이룰 것으로 예상됨
- 인간 질환 모델 중대동물의 고부가가치 상품화로 거대 국제 시장 부분 점유 가능성
- 최신의 유전자 발현조절 기술, 중대동물 질환 모델 및 생산기술의 특허 창출
- 흑색종에 대한 신약 개발 및 발병기전 연구에 이바지함으로써 전임상 신약 개발 단계에서 적용 가능성 제시

### 4) 사회적 측면

- 생명공학 분야에서 국제 기술 및 경쟁력을 확보함으로써, 국내 질환 모델 생산 및 관련 기술의 첨단 벤처산업 활성화
- 안정적 질환 모델 산업기반 구축과 부가가치를 높임
- 국가적 생명과학 기술의 비약적 발전을 유도하며, 과학 인프라 구축과 경제구조의 첨단화를 가능하게 함
- 융합 분야 기술의 축적으로 산업의 다변화 및 전문화됨으로써, 전문직의 고용기회 확대될 수 있음

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구 개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
인체 질환 모델 중대동물 개발	최신의 유전자제어 기법 활용을 통한 흑색종 종양모델 돼지 개발 Opto-FGFr 공여세포주 및 iPS 세포주 수립을 통한 흑색종 <i>in vitro</i> 질환모델 구축	충북대학교 산학협력단	대학 (비영리)	810	810	1.000	신규 기술 개발	해 당 없 음	-
	전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 SPF생산라인 및 상용화 기반 구축	(주)크로넥스	중소기업 (영리)	956	330	34.2	기존 공정 개선	[1]- ①	34. 2
	유전자 재조합 기법을 활용한 형질전환 흑색종 질환 모델건 개발	아부다비 생명공학연구원	출연연 (비영리)	760	760	1.000	신규 기술 개발	해 당 없 음	-
	흑색종 유도 시스템을 도입한 중대동물 형질전환 세포주 개발	고려대학교 산학협력단 (위탁)	대학 (비영리)	210.1	210.1	1.000	신규 기술 개발	해 당 없 음	-
	<b>계</b>				<b>1,900</b>	-	-	-	-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내	1				
	국외					
특허등록	국내					1
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전		1		1	
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	30,000	30,000	40,000	40,000	50,000
	기술료(단위 : 천원)		5,000		5,000	
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

### < 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서
2.	1) 2)

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	318016-05		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	인체 질환모델 중대동물 개발			과제유형	기초
연구개발기관	충북대학교 산학협력단			연구책임자	현상환
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.04.26.~2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2019.01.01.~2019.12.31	400,000	140,000	540,000
	3차년도	2020.01.01.~2020.12.31	400,000	140,000	540,000
	4차년도	2021.01.01.~2021.12.31	400,000	140,000	540,000
	5차년도	2022.01.01.~2022.12.31	400,000	106,000	506,000
	계		1,900,000	626,000	2,526,000
참여기업	(주) 크로넥스				
상대국	-	상대국연구개발기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2023.02.06

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
충북대학교 수의과대학	교수	현상환

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	현상환
----	-----

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구는 최신의 생명공학기술인 유전자 제어기법 및 복제동물 생산을 활용하여 인간의 난치 질병의 치료를 위한 질환모델 개발을 시도하였음. 소형 실험동물이 아닌 중대동물을 대상으로 연구하여 온전한 타겟 유전자가 삽입된 질환모델 동물의 생산에 성공하였으며 또한 질환동물을 생산하고, 유지, 사업적 이용을 위한 프로토콜을 수립함으로써 안정적 실험동물 시자의 산업기반 구축하고 부가가치를 증가시킬 수 있는 기반을 마련하였음

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구팀은 최신의 생명공학기술 유전자 제어기법을 활용을 통해 신약개발단계에서 시간과 비용을 줄일 수 있고, 인체 질환의 유전형 및 표현형을 나타내는 악성 흑색종 중대동물(돼지, 개) 질환모델을 개발하여 농생명 바이오 자원의 활용도를 증진시키며, 축산 분야 및 반려동물 중계의학 분야의 신성장 산업모델을 제시하고 기초 지식을 제공하여 발전을 도모하는데 기여할 수 있을 것으로 판단됨

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구는 형질전환 동물의 생산 효율을 향상시킬 수 있는 방법을 제시하고 있으며, 기본에 많이 보고되지 않았던 중대동물 질환모델의 생산, 특성분석, 발병유도, 개체관리 등 다양한 부분에서 기초지식 및 프로토콜을 제공할 수 있음. 또한 질환모델 종류의 다양화에 기여할 수 있으며, 신약개발 및 발병기전 연구, 실험동물 시장의 다변화와 시장 성장에도 기여할 수 있음. 이러한 기술이 더욱 안정화될 경우 *in vitro* 모델 개발을 통한 환자맞춤형 치료 시스템이 현실화될 수 있음

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

지난 3여년간의 COVID-19 팬데믹여파 임에도 불구하고, 비대면 공동연구수행 시스템을 구축하였으며, 주관 기관과 공동연구개발기관의 유기적 연계를 통해 흑색종 질환모델 생산을 위한 세포주 구축, 배아 및 질환모델 생산, 질환모델 생산 관리 시스템을 구축하였음. 연구계획서에 설명된 연구목표와 연구내용대로 연구를 충실히 수행하였으며, 본 기술의 한계와 문제점을 적극적으로 개선하였음

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

■ 등급 : (우수) 보통, 미흡, 극히불량)

본 연구를 통하여 총 24편의 SCIE 학술논문 및 27건의 각종 국내외 학술대회 발표, 6건의 특허출원 및 2건의 특허등록, 13건의 우수학술 수상 성과를 도출함

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
형질전환 돼지 생산을 위한 영향인자 분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>효율적인 흑색종 모델 생산을 위한 최적의 공여핵원 세포주 수립 및 배아생산프로토콜 수립함</li> </ul>
Optogenetic-FGFr 도입 돼지세포주 개발 조건 분석을 위한 시험관내 돼지세포주에서의 광유전학 응용기반 기술 개발 및 구축	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종유발 삽입체개발 및 시스템도입 공여세포주 확립함</li> </ul>
흑색종 모델돼지 개발을 위한 품종선발 및 생산기반 구축	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종모델 돼지 생산을 위한 대리모의 체계적 공급 프로토콜 확립, 질환돼지모델 돼지 생산을 위한 대리모 선발 프로토콜 확립 및 사양기법 개선, 배아식 프로토콜 최적화 및 배아식 기반 시설 구축함</li> </ul>
흑색종 모델건 생산을 위한 체세포 형질전환 기법 및 체세포 핵이식 기법의 최적화 조건 확립	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>유전자가 도입된 세포주를 공여핵원 사용시 체세포 복제 효율 저하 분석함. 모델건 복제에 공여핵원 다양화 및 다변화, 모델건 복제에 외과적 난자 획득과 이식 방법 개선함</li> </ul>
Ras 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>모델건에서의 Ras 유전자 기반 흑색종 유도 시스템의 유효성 평가함.</li> <li>흑색종 모델건에 적용 가능한 흑색종 유도 벡터 시스템 제작하여 선택적 유도가 가능한 개 멜라닌 세포 특이적 유전자 재조합 시스템 제작함</li> </ul>
Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 <i>in vitro</i> 평가시스템 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 돼지 생산을 위한 SCNT 전능세포 생산효율 개선 및 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발함</li> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발함</li> </ul>
Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>멜라닌 세포 특이적 프로모터의 돼지 섬유아세포내 도입 및 검증함</li> <li>흑색종 Cre/LoxP inducible 배아줄기세포주를 수립을 통한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발함</li> </ul>
Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 돼지세포주 개발 조건 분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 유발 시스템 도입 세포주 검증함</li> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 모델 유도만능줄기세포주 수립을 통한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발함</li> </ul>
형질전환 돼지 생산을 위한 대리모돈 영향인자 분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>효율적인 흑색종모델 동물의 임신 및 분만을 위한 프로토콜 확립 및 사양기법 구축함</li> <li>흑색종질환 돼지생산 및 자돈의 관리 시스템 구축 및 확립함</li> <li>대량생산 기반 구축을 위한 모델 자돈 사양기법 개선함</li> </ul>
흑색종 질환모델건 생산 및 자견의 관리 시스템 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>모델건 유도만능 줄기세포 와 배반포의 유전자 발현 양태를 분석함</li> <li>흑색종 모델 자견의 안정적인 성장을 위한 자견 관리 시스템 구축함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건 생산	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>8마리의 대리모를 사용하여 2개 Ras 및 Braf 유전자 기반태아 세포주를 확보함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 공여핵원으로써의 유효성 검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축함</li> <li>흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델건 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축함</li> </ul>
Safe harbor locus 유전자 타게팅 기법을 적용한 Braf 유전자 기반 흑색종 발병 시스템 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 생산을 위한 유전공학 기반 기술 개발 및 유효성 평가함</li> <li>안정적 형질전환 개체 생산을 위한 Safe harbor locus 유전자 타게팅 기술 개발과 Ras 및 Braf 유전자 기반 시스템에 적용함</li> </ul>



Optogenetic-FGFr 유도 흑색종 질환모델 돼지 생산을 위한 영향인자 분석 및 <i>in vitro</i> 평가시스템 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optogenetic-FGFr 유도 흑색종모델 SCNT 전능세포(배아)유래의 배아줄기세포주를 이용한 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발</li> <li>분자생물학적 기법을 통한 흑색종 모델 배아줄기세포주 내 Optogenetic-FGFr-Oncogene 시스템의 유효성검증</li> </ul>
흑색종 모델 Optogenetic-FGFr-Oncogene 도입 형질전환 돼지 생산 및 특성분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>In vivo에서 효율적인 Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 위한 암실조건 및 광학 조건 도출 분석함</li> <li>Optogenetic-FGFr-Oncogene 유도를 통한 흑색종 발병 확인함</li> <li>Reclone system을 적용을 통한 흑색종 모델 SCNT배아의 생산효율 개선함</li> <li>흑색종 특성 비교 분석을 위한 자연발생 돼지 유래 흑색종 개체 생물자원 확보함</li> </ul>
Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>비침습적 영상진단을 통한 질환표현형 분석함</li> <li>형질전환 모델 생식능력 검증방법 확립함</li> </ul>
유도만능줄기세포주 활용 Optogenetic-FGFr-Oncogene을 통해 유도된 흑색종의 특성분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종모델 iPS세포주에서 발생한 종양 세포주 선별함</li> <li>흑색종모델 iPS세포주에서 발생한 종양 세포주 유전적 특징 비교분석함</li> <li>흑색종에서 활성화 되는 관련 신호 활성화 및 특징적 유전자 발현 패턴 분석함</li> </ul>
흑색종 질환모델 중대동물의 특성 분석 및 관리 체계 구축	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>모델 중대동물의 통합적 표현형 분석: 신경, 생리, 혈액, 운동, 행동, 질병 패턴 등</li> <li>모델 중대동물의 흑색종 조직병리 및 분자병리학적 검증함</li> <li>전임상 연구를 위한 흑색종 질환 대체 동물모델로서의 유효성 검증함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건 생산	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>개량된 Ras 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석함</li> <li>생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 유전자 기반 모델건의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증함</li> </ul>
형질전환 모델건의 생산을 위한 기반 기술 확립	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>형질전환 모델건 대량생산을 위한 체세포, 생식세포 확보 및 보관의 최적화 조건 확립함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델 핵공여 세포주 제작	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 개, 미니돼지 세포주 구축함</li> <li>흑색종 유도 벡터 시스템 도입 모델건 유래 세포를 이용해 멜라닌 세포 특이적 재조합 유도 시스템 도입 세포주 구축함</li> <li>Sleeping beauty transposon 시스템을 적용한 흑색종 유발 유전자 전달 시스템 및 핵공여 세포주 개발함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석</li> <li>Ras 유전자 기반 모델건의 흑색종 변형으로 병리 조직학적 검증함</li> </ul>
흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>유전자원 보존을 위한 정액동결 프로토콜 수립</li> <li>질환모델돼지의 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능평가함</li> <li>암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립</li> <li>흑색종 질환모델 내 종양유발 분석 및 종양의 안정적인 분리를 위한 수술기법 개발함</li> <li>비침습적 영상진단을 통한 질환 표현형 분석함</li> </ul>
Cre/LoxP inducible system을 활용한 흑색종 종양모델 돼지 개발	3	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 기반 흑색종 Cre/LoxP inducible 질환모델돼지 생산을 시도함</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델 <i>in vitro</i> 평가 시스템 개발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 자연발생 돼지 유래 세포주를 활용한 흑색종 질환모델돼지 생산 시도함</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>SB-3PA #4 개체의 세포주를 활용하여 SCNT 진행 후 <i>in vitro</i> 발달률 평가 및 대리모돈 이식을 통해 재복제 시도하였음.</li> </ul>

제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>초대 배양을 통한 제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 수립함</li> </ul>
Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 태아세포주 염색체 및 특성분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs) 염색체 및 특성분석함</li> </ul>
Oncogene 도입 제주 재래돼지 형질전환 세포주 수립을 위한 암수 종양모델 세포주 개발 및 활용	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>제주 재래돼지 태아 세포주 (Jeju Native-pig Fetal Cells, JNFCs)를 활용한 oncogene 도입 형질전환 세포주 수립함</li> </ul>
전임상 흑색종 질환모델 중대동물(돼지, 개) 유효성 검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>인간질환 모델 중대동물 기반 비임상 평가를 위한 실용화 전략 수립 및 구축함</li> <li>질환모델동물의 후대 검증을 통한 생산 라인 구축함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건 생산	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>개 흑색종 모델 생산을 위해 RAS 유전자 기반 흑색종 유발 유전자 발현 세포주를 사용한 모델건 생산 및 분석함</li> <li>생산된 RAS 유전자 기반 형질전환 모델 건에서 흑색종 발병 유도함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증함</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델건 생산	3	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>개량된 Braf 기반 흑색종 모델 형질전환 세포주를 이용한 체세포 핵이식 기법 적용으로 모델건 생산 및 분석함</li> <li>생산된 흑색종 질환모델건의 흑색종 발병 유도기법 수립</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 건에서 흑색종 병변으로 병리 및 조직학적 검증함</li> <li>4OH-tamoxifen 경구투여에 따른 흑색종 유도기법 수립</li> </ul>
체세포 핵이식 기법을 활용한 형질전환 모델건 재복제 기술 최적화	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 및 Braf 유전자 기반 흑색종 모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보</li> <li>흑색종 모델 유래 세포의 체세포 핵이식 기법 재적용을 통한 모델건 재복제 기술 확립</li> </ul>
BRAF 기반 흑색종 유도 시스템을 도입한 형질전환 세포주 구축 및 핵공여원으로서의 유효성 검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>BRAF 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주 구축함</li> <li>BRAF 기반 흑색종 유도 벡터 시스템 도입 형질전환 세포주의 핵공여원으로서의 유효성 평가함</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델건 생산 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 건에서 흑색종 병변으로 병리 및 조직학적 검증함</li> <li>4OH-tamoxifen 경구투여에 따른 흑색종 유도기법 수립</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 Ras 유전자 기반 흑색종 모델 분석</li> <li>Ras 유전자 기반 모델에서 유도한 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증</li> </ul>
흑색종 모델돼지의 유효성 및 생식선전달을 통한 후대검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 기반 흑색종 Cre/LoxP inducible 질환모델돼지 특성분석</li> <li>질환모델돼지의 정액동결 및 <i>in vitro</i> 수정능 평가</li> <li>암수 Founder 생산 및 상호 자연교배를 통한 흑색종 유발 유전자의 계대 전달 시스템 확립</li> <li>비침습적 영상진단을 통한 질환 표현형 분석</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Braf 기반 흑색종 모델돼지 생산 및 유효성 검증기법 수립</li> </ul>
Optogenetic-FGFr-Oncogene 흑색종 <i>in vitro</i> 모델 활용 플랫폼 구축	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>효율적인 SCNT를 위한 Optogenetic-FGFr-iPS의 분화 프로토콜 수립</li> <li>분화된 Optogenetic-FGFr-iPS 활용한 <i>in vitro</i> 검증</li> </ul>
전임상 연구를 위한 흑색종 모델 중대동물 생산라인 및 상용화 기반 구축	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색종 모델 중대동물의 대량 생산을 위한 라인 구축함</li> <li>흑색종 모델 중대동물 상용화 생산 표준 프로토콜 확립</li> <li>흑색종 모델 중대동물의 상용화 기반 구축</li> </ul>
RAS 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증함</li> </ul>
BRAF 기반 흑색종 모델건의 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>BRAF 유전자 기반 모델건의 흑색종 병변으로 병리 조직학적 검증함</li> </ul>

RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건 모델의 전임상 동물 모델로의 생산라인 구축 및 상용화	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAS 및 BRAF 유전자 기반 흑색종 모델건 대량 생산을 위한 체세포 및 생식세포 확보</li> <li>흑색종 모델건 생산 라인 구축함</li> </ul>
Ras 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ras 유전자 기반 모델건 및 모델 돼지의 흑색종 발병확인 및 병리 조직학적으로 검증함</li> </ul>
Braf 기반 흑색종 모델건 및 모델 돼지 생산 및 유효성 평가	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>생산된 모델 건에서 흑색종 병변으로 병리 및 조직학적 검증함</li> <li>4OH-tamoxifen 경구투여에 따른 흑색종 유도기법 수립</li> </ul>
전임상 흑색종 질환 모델건으로써의 활용도 검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>전임상 연구를 위한 흑색종 질환 대체 동물모델로서의 유효성 평가함</li> <li>Tamoxifen을 처리하여 종양 발생 유도기법 수립</li> </ul>
합계	100	100	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 창의적인 연구 주제를 바탕으로 성실한 연구수행과 공동연구기관과의 협동연구를 통하여 유의미한 연구 결과를 도출하였으며, 이러한 결과는 관련 학계 및 산업분야에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단됨

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

지난 3여년간 COVID-19 팬데믹 여파임에도 체계적이고 조직적으로 수행되어 계획 대비 정량치 목표지표를 초과 달성하였음. 과제 종료후 생산되는 모델개체에 대하여 추가적인 후대검증, 종양유형별, 표현형별 모델 동물 라인 구축 연구를 진행하고 있으며, 지속적인 분석데이터를 확보해 나갈 계획임

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구의 결과는 악성 흑색종이라는 인간의 질환을 가진 중대동물 모델을 새로운 형질전환 기법을 통해 정상적인 산자의 생산에 성공함으로써 이러한 플랫폼은 이후 다양한 종류의 인간질환모델 동물 생산에 활용되어 질 수 있을 것으로 기대함
- 특히 소형 실험동물에만 국한되어 있는 연구를 중대동물에 적용하여 인간과 더욱 생리, 해부학적으로 유사한 동물종으로 확장함으로써 과학계에 관련 기초 지식을 제공할 수 있을 것으로 기대함
- 소형 실험동물에 비해 중대동물은 특성상 사육 및 처치가 어려워 그 개발에 시간 및 노력이 많이 요구됨. 따라서 좀 더 효율적으로 중개의학에 필수적인 인간질환 중대동물모델을 개발하기 위해서는, 우선 타겟유전자의 시기적 조절장치를 통한 발생단계에서의 유해한 유전자 간섭을 줄이고, 다양한 공여핵원 세포주인 체세포, ES 및 iPS 등의 세포주를 이용한 타겟 유전자의 효율적 전달시스템 기술 개발이 시급하며, 형질전환체 생산용 생식세포 확보 및 착상 전 전능세포 발달의 제어기술 확립이 필요함. 따라서 본 연구의 결과는 Inducible system을 이용하여 발생학적 시기에 정상 발달을 유도하며, 질환모델로서 한 시기에 종양유발 유전자를 활성화 시킨다면 인간 악성종양 중대동물모델도 개발할 수 있을 것으로 기대됨
- 또한, 흑색종 질환모델 생산을 통한 *in vitro* 및 *in vivo* 평가 시스템은 향후 관련 chemotherapy drugs, gene therapy 및 cancer vaccines 등 새로운 흑색종 치료제 개발을 위한 기반분야에 적용될 수 있는 새로운 패러다임을 제시하고 있음
- 따라서, 본 연구결과는 효율적 흑색종 질환모델 중대동물생산 플랫폼은 다른 주요 인간 질환모델 개발에도 활용될 수 있을 것으로 판단됨
- 향후, 종양 유도 시스템의 프로토콜 최적화를 통해, 사업화 및 실용화 단계에 들어가기 위한 후속 과제로서 정부부처 연구개발 사업 혹은 충북지역혁신연구개발사업에 지원할 예정임

[별첨 1]

#### IV. 보안성 검토

해당사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

해당사항 없음

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	인체 질환모델 중대동물 개발			
주관연구개발기관	충북대학교 산학협력단	주관연구책임자	현상환	
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,900,000천원	626,000천원		2,526,000천원
연구개발기간	2018. 04. 26 - 2022. 12. 31 (4년 9개월)			
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 악성 흑색종 질환 모델돼지 및 모델견 생산 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cre/LoxP inducible system 또는 Optogenetics-FGF receptor를 활용한 흑색종 질환모델 형질전환 세포주 2종 이상 수립 완료</li> <li>• 체세포핵이식 기법을 통해 흑색종 질환모델 배아생산 및 질환모델 중대동물 생산 완료</li> <li>• 생산된 흑색종 중대동물모델의 유전적 정착, 유지관리, 표현형모델 동물의 대량생산 프로토콜 확립</li> </ul>
② 악성 흑색종 질환돼지 및 모델견의 표현형 분석 및 관리체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 흑색종 질환모델 동물 표현형 분석 : 신경, 생리, 운동, 행동, 질병패턴</li> <li>• 흑색종 질환모델 중대동물의 유전자 분석, 조직병리 및 분자병리학적 표현형 분석체계 구축</li> <li>• 비침습적 영상진단 분석(PET-CT, MRI)을 통한 표현형 분석 실용화 가능성 제시</li> </ul>
③ 악성 흑색종 질환 모델돼지 및 모델견 기반 비임상 평가를 통한 실용화 전략수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Founder가 될 수 있는 흑색종 모델 돼지 및 견 생산 완료</li> <li>• 흑색종 유도 기법을 개발하였으며, 추가생산되는 개체에 대한 분석데이터를 추가 확보하고 있음</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타연구 활용비)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20			20					10				20		10				
최종 목표	4	2	2		3	15	3	150		3		8		1.5	16		6			
당해 년도	목표	1	1		1	5	1	100		1		2		1.5	4		1			
	실적	2	1		2	46. 2	2	200		3		6		4.7	8		4			
달성률 (%)	150	100			433	1063	100	133		533		300		233	168		183			

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	악성 흑색종 질환 모델대지 및 모델건 생산 기술 확보
②	악성 흑색종 질환대지 및 모델건의 표현형 분석 및 관리 시스템
③	악성 흑색종 질환 모델대지 및 모델건 기반 비임상 평가를 통한 실용화 기술

### 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	✓					✓		✓		
·										
·										

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	악성 흑색종 질환 모델대지 및 모델건 생산 기술에 관한 특허출원
②의 기술	악성 흑색종 개체의 표현형 분석 및 관리 시스템 구축
③의 기술	악성 흑색종 질환 모델대지 및 모델건을 이용한 전임상 평가 및 약물스크리닝

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용비)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T P A T E N T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
											SCI		비 SCI	논 문 평 균 I F						
단위	건	건	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20			20									20		10				
최종목표	4	2	2		3	15	3	150		3				8		1.5	16		6	-
연구기간내 달성실적	6	2	-		13	159.5	3	200		16				24		3.5	27		11	1
연구종료후 성과창출 계획	1	1			2	10		190												

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	악성 흑색종 질환 모델돼지 및 모델건 기반 비임상 평가를 통한 실용화 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타( 노하우 )		
이전소요기간	2023년 하반기	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	해당사항 없음
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	해당사항 없음		

- 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) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.