

(옆면)

(앞면)

117042-3

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간 등록번호

11-1543000-003139-01

정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산

최종보고서

2019

농림수산식품기술기획평가원
농림축산식품부

정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산 최종보고서

2020. 07. 09.

주관연구기관 / 강원대학교
협동연구기관 / (주)옵티팜

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

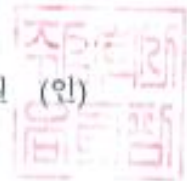
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산”(개발기간 : 2017. 04. 21.~ 2019. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 02. 13.

주관연구기관명 : 강원대학교
협동연구기관명 : ㈜유평티팜

(대표자) 윤경구 (인)
(대표자) 한성준, 김현일 (인)



주관연구책임자 : 이승태
제1세부과제책임자 : 이승태
제2세부과제책임자 : 이은송
협동연구책임자 : 최기명

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117042-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21.~ 2019.12.31. (3년)	단 계 구 분	없음
연구사업명	단 위 사 업	농림축산식품부연구개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산			
	세 부 과 제 명	제1세부:돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술 개발 제2세부:형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자 생산 기술 개발 협동: 돼지 형질전환 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 및 형질 전환 돼지 생산 기술 개발			
연구책임자	이승태	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 54명 내부: 33명 외부: 21명	총 연구개발비	정부:825,000천원 민간:275,000천원 계:1,100,000천원
연구기관명 및 소속부서명	강원대학교 동물응용과학과			참여기업명 (주)옵티팜	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당사항 없음
-------------------------	---------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

본 연구개발의 최종 목표는 정소내 정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지를 생산하고, 이러한 이식용 돼지 정소내에 Human BMP2 유전자가 삽입된 돼지 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 형질전환 성숙정자를 생산하고 이를 활용해 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하는 것임. 3년간의 연구개발을 통해, 비록 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하지는 못했지만, 돼지 정원줄기세포내로 특정 형질전환 유전자를 기존보다 유의적으로 높은 효율로 전달하여 형질전환을 유도할 수 있는 기술을 확립하였음. 또한, 돼지 정소내 정자형성 미세환경을 유지하면서 정원줄기세포만 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 성공적으로 생산하였으며, 이러한 돼지 정소에 돼지 형질전환 정원줄기세포를 이식함으로써 돼지 정소내 정자형성 미세환경을 이용한 돼지 형질전환 성숙정자를 성공적으로 생산하였음. 따라서, 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산을 위해 요구되는 기반 기술들을 성공적으로 개발하였으며, 개발된 일부 기술들의 문제점인 저효율이라는 난제를 해결하기 위한 연구가 연구 종료 후에도 지속적으로 진행되어질 예정임. 또한, 도출된 결과들을 통해 1건의 특허 출원, 10건의 논문 발표, 14건의 학술대회 발표, 2건의 인력양성, 1건의 홍보, 1건의 수상실적, 1건의 고용창출, 1건의 기술이전이 성공적으로 이루어졌음.

보고서 면수

109

<요약문>

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 연구목적 정소내 정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지를 생산하고, 이러한 돼지에 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 형질전환 성숙정자를 생산하는 것임. 또한, 생산된 형질전환 정자를 활용하여 형질전환 돼지를 생산하는 것임. ● 연구내용 제1세부과제: 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선을 위한 기반 기술 개발, 형질전환 돼지 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발, 그리고 생산된 형질전환 돼지의 Human BMP2 생산성 및 안전성 검증 제2세부과제: 돼지 정원줄기세포의 돼지 정소내 이식 기술 개발, 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지 생산, 그리고 생산된 형질전환 돼지의 정상성 및 번식능 검증 협동과제: 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 개발, 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산, 그리고 형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자를 이용한 형질전환 돼지 생산
<p align="center">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 제1세부과제: 적외선 조사를 이용하여 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율을 향상 시킬 수 있는 기술을 개발하였음. 또한, 돼지 정원줄기세포를 체외에서 효과적으로 배양할 수 있는 3차원 비세포성니쉬를 성공적으로 제작할 수 있었음. 그리고, 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 향상 기술 및 돼지정원줄기세포 체외배양용 3차원 비세포성니쉬를 접목하여 돼지 형질전환 정원줄기세포를 대량 생산 할 수 있는 기반 기술들을 성공적으로 개발하였음. 하지만, 일부 기술에 있어 낮은 효율 극복이 필요하며, 효율 향상을 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있음. ● 제2세부과제: 살아있는 돼지 정소내로 돼지 정원줄기세포를 이식하는 기법은 성공적으로 개발되어졌음. 또한, 이렇게 확립된 이식 기법을 통해 돼지 정원줄기세포를 정원줄기세포 이식용 돼지 정소에 이식하였을 때 이식된 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 성공적으로 생산할 수 있었음. 그리고, 동일한 이식 기법을 통해 돼지 형질전환 정원줄기세포를 이식하였을 때에도 돼지 형질전환 성숙정자를 성공적으로 생산할 수 있었음. ● 협동과제: 살아있는 수컷 돼지 정소내 정자형성 지지세포 유지 및 정원줄기세포 제거에 효과적인 Busulfan 농도를 최적화함으로써 살아있는 수컷 돼지 정소내 정원줄기세포 제거 기술을 확립하였음. 그리고, Busulfan 처리 및 NANOS 유전자 제거를 통해 정자형성을 지지하는 미세환경을 보유 하면서 정원줄기세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 성공적으로 생산함으로써 정원줄기세포 이식용 돼지 생산 기술을 확립하였음. 그러나, 형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 형질전환 돼지 생산에는 실패하였음. ● 본 연구의 최종 목표인 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하지는 못했지만, 돼지 정원줄기세포의 형질전환 유도 효율 및 형질전환된 돼지 정원줄기세포 생산을 향상시키는 기술 및 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지를 이용한 형질전환 성숙정자를 생산함에 있어 요구되는 기반 기술들을 성공적으로 개발하였음. 또한, 개발된 일부 기술들의 문

	<p>제점인 저효율이라는 난제를 해결하기 위한 연구는 연구 종료 후에서도 지속적으로 진행될 예정임.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 형질전환동물의 효율적 생산을 통한 산업화에 활용 • 고능력 가축의 유전능력 보존에 활용 • 멸종위기동물의 보존에 활용 • 임상에서의 난임환자 치료에 활용 • 형질전환기술 및 형질전환동물 생산과 관련된 모든 기술들을 산업화함으로써 경제적 및 산업적 측면에서 새로운 분야로 거듭날 것으로 기대됨. • 형질전환 생식세포의 원활한 공급으로 농가에서도 쉽게 형질전환동물들의 생산이 가능하며, 이는 농가의 새로운 고소득원으로 정착될 것으로 기대됨. • 인간질병을 가진 다양한 축종의 형질전환동물들을 원활하게 공급할 수 있기 때문에, 의약품 개발 및 안전성 검증에 큰 기여를 할 것으로 기대됨. • 국내 및 국외 불임관련 산업에 큰 변화 및 시너지효과를 줄 것으로 기대됨. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>돼지</p>	<p>정원줄기세포</p>	<p>형질전환정자</p>	<p>정소</p>	<p>이식</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Pig</p>	<p>Spermatogonia l stem cells</p>	<p>Transgenic sperm</p>	<p>Testis</p>	<p>Transplantation</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	13
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	102
4. 연구결과의 활용 계획 등	106
붙임. 참고 문헌	109

[별첨1] 연구개발보고서 초록

[별첨2] 자체평가의견서

[별첨3] 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산

1-2. 연구개발의 필요성

▶ 형질전환 정자 생산을 통한 형질전환동물 생산 기술 개발의 필요성

- 현재 Bioreactor로서의 형질전환가축 생산, 질병저항성 가축 생산, 의약품 효능 검증을 위한 질병 저항성 가축 생산, 그리고 장기이식용 가축 생산의 산업화는 우리나라의 미래성장 동력의 하나로 각광 받아 오고 있으며, 외국 역시 효과적인 형질전환동물 생산 기술을 개발하기 위해 많은 투자와 노력을 하고 있다.
- 형질전환동물이란 인위적으로 외래 유전자를 주입하거나 제거함으로써 본래의 유전형질이 변화되어진 동물을 일컬으며, 형질전환동물 생산을 위해서는 DNA 미세주입법과 체세포복제기술이 사용되어져오고 있다. DNA 미세주입법은 외래유전자의 게놈내 삽입 빈도가 1% 미만으로 매우 낮으며, 이렇게 생산된 형질전환동물의 대부분이 mosaic이 때문에, 외래유전자의 자손 전달 비율이 매우 낮다는 문제점이 있다. 또한, 체세포복제 기술은 외래유전자가 미리 도입된 세포만을 핵치환을 위해 사용하기 때문에, mosaic이 없는 완벽한 형질전환동물을 생산할 수 있지만, 체세포에 유전자도입 및 체세포복제 재조합 수정란의 제작 및 배양 그리고 이식 후 산자 생산율이 좋지 않다는 문제점 때문에, 실질적으로 형질전환가축의 산업화를 위한 대량생산은 생각보다 어려운 실정이다.
- 체세포복제로 생산된 형질전환동물에 있어 외래유전자의 생식세포 내 도입도 그 빈도가 매우 낮은 실정이다. 체세포복제기술은 매우 고도의 기술 및 배경지식 그리고 고가의 설비를 요구하기 때문에 실제 농가에서 사용되어지기에는 적절하지 못한 부분이 매우 많다. 따라서, 농가에서 인공수정 및 체외수정은 일반적으로 널리 수행되어지고 있는 기술이기 때문에, 형질전환된 성숙 정자의 공급은 형질전환동물의 원활한 생산에 더욱더 효과적일 것이다.
- 그러나, 정자벡터 즉 형질전환정자 생산 기술의 필요에도 불구하고, 정자 수준에서의 형질전환 기술은 국내외적으로 전무후무하다. 또한, 동물에서 정자수준의 형질전환은 정자의 구조적 특성상 거의 불가능하며, 정원줄기세포 수준에서의 형질전환이 보다 효과적인 것으로 알려져 있다.
- 정원줄기세포는 자가재생능력과 정자세포로의 분화능이 있는 세포로, 정원줄기세포 (spermatogonial stem cell)의 체외 증식은 불가능한 것으로 알려져, 생식줄기세포 (germ-line stem cell)의 분화에 초점을 맞추어 연구되어져 왔으나, 최근 몇 년 사이 배양액과 혈청의 농도, 배양 온도의 조절 등을 통하여 생식세포의 증식을 유지시켰다는

보고가 있었다. Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF)와 epidermal growth factor, fibroblast growth factor, leukemia inhibitory factor 등과 mouse embryonic fibroblast 세포를 공배양 하여 5개월 이상 증식 배양에 성공⁴⁾을 시작으로 체외배양에 관한 연구가 여러 연구자에 의해 재연되고, 여러 실험동물 뿐만 아니라 대동물에서도 시도되고 있다.

- 국외 한 연구그룹은 실험동물 수준에서 생식세포로의 분화를 유도하는 stem cell factor (SCF)를 처리하여 체외에서 정원줄기세포로부터 원형정모세포로의 분화 성공하였으며, 분화된 원형 정모세포로 수정을 성공시켰으나 수정 성공률은 1%로 낮았다고 보고하였다. 이러한 낮은 수정 성공률을 극복하기 위한 방안으로, 국외 한 연구그룹은 생식 세포가 존재하지 않는 생쥐의 정소에 정원줄기세포를 이식하여 생식세포의 재생을 유도하였고, 이 후 개체 생산을 보고하였다.
- 이러한 보고들로부터 돼지 수준에서도 정원줄기세포의 정소 세정관유래 미세환경내 이식을 통해 성숙정자를 생산 할 수 있다는 가능성을 엿 볼 수 있다. 만일 돼지 정소 세정관내 미세환경을 온전히 보존함과 동시에 돼지 정원줄기세포가 전혀 존재하지 않는 수컷 돼지를 생산할 수 있다면, 정원줄기세포 수준에서 형질전환을 한 후, 형질전환 정원줄기세포를 정원줄기세포를 전혀 가지고 있지 않은 돼지 정소 세정관에 이식함으로써, 최종적으로 형질전환 돼지 정자를 효과적으로 만들 수 있을 것이다. 이러한 형질전환 정자의 효율적 생산은 형질전환동물의 산업화에 크게 이바지 할 수 있다.
- 다시말해, 정소 세정관내 정자 형성을 유도할 수 있는 미세환경과 정원줄기세포가 없는 정소를 가지고 있는 수컷 돼지를 활용한 형질전환 돼지 정자 생산 및 이를 이용한 형질전환 돼지 생산관련 기반 기술들은 다양한 축종에서의 형질전환동물 생산 기술 개발, 다양한 종류의 형질전환 돼지 생산, 형질전환동물 생산의 산업화 및 관련 분야의 발전, 멸종동물 및 유전적 보존가치가 있는 동물 보존에 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

▶ **형질전환동물기반 Human BMP2 치료제 생산 기술의 필요성**

- 최근의 의학과 경제발전으로 고령화 인구의 증가가 초래되었으며, 이로 인하여 발생하는 의학적 요구가 확대되고 있다. 고령화에 따른 의학적 요구 중 골다공증의 치료, 골절치료, 임플란트 시술 등이 그 대표적인 예이며 조골세포의 뼈 형성과 파골세포의 뼈 흡수 능력이 저하되어 나타나는 질병인 골다공증의 경우 골밀도가 감소되기 시작하는 평균연령이 50세로 간주되었을 때, 2010년 27%, 2020년 35%로의 국민이 골다공증 위험군으로 분류될 수 있다고 한다. 점점 더 많은 골질환 환자들이 증가될 것으로 전망되며 최근 골다공증학회와 골대사학회에서 발표된 연구결과들에 의하면 이로 인하여 발생하는 골절 치료의 사회경제적 부담금이 연간 1조 50여억원에 이르는 것으로 분석되었다. 이러한 치료비용의 증가는 개인의 삶뿐만 아니라 심각한 사회적 문제로 나타날 것이다. 세계적으로 이러한 골치료를 위하여 조골세포와 파골 세포의 생성 조절에 관여하는 호르몬, 외부 영양물질, 유전적 측면 등 많은 연구들이 진행되고 있으며, 현재 치료 방법의 대부분은 뼈세포의 흡수능을 억제하여 뼈세포의 균형을 맞추는 시술이 시도되고 있지만 그 효과는 크지 않으므로 치료효과가 극대화된 저비용으로 공급되어질 수 있는 약물의 개발이 요구되고 있으며, 많은 연구자들이 직접적인 뼈 형성을 촉진 시킬 수 있

는 약물의 개발을 시도하고 있다.

- 그 중, Bone Morphogenic Factor(BMP)는 세포 증식, 분화 및 발생에 중요한 역할을 담당하는 30여개의 단백질로 구성된 TGF β superfamily의 한 부분을 이루는 중요 단백질이다. 이 단백질은 동물의 피하로 주입되었을때, 주입부위에서 생성된 연골이나 뼈들에서 발견되어졌으며, 생쥐 발생시 사지 중간엽 특이적인 BMP2/4의 제거함으로써 뼈 형성에 심각한 손상이 관찰되었고, 또한 BMP2가 제거된 생쥐에서 정상적으로 뼈는 생성되지만 출생 후 장골에서 골밀도의 결핍이 관찰되며, 잦은 골절과 골절된 뼈의 재생에 문제가 있음을 보이는 증상이 보고되는바 발생과정에서 다양한 역할을 담당하는 것으로 확인되었다.
- 지금까지의 Human BMP2 치료제의 경우, 미생물이나 세포단계에서의 생산을 바탕으로 하기 때문에 그 반응효과가 크지 못하고, 또한 고가의 가격으로 인하여 대중적인 공급에 부족한 점이 있었다. 따라서, Human BMP2의 생산과 반응효율을 극대화 시키고, 가격적 부담을 줄일 수 있는 생산기로서의 가축 생산은 필수적이다.

1-3. 연구개발 범위

▶ 제 1 세부과제: 돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술 개발

○ 연구개발 목표

돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선을 위한 기반 기술을 개발하고, 이를 기반으로 형질전환 돼지 정원줄기세포 대량생산 기술을 개발하고자 한다. 또한, 생산된 형질전환 돼지의 Human BMP2 생산성 및 안전성을 검증하고자 한다.

○ 연구개발 내용 및 범위

- Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작

과거 본 연구팀에 의해 제작된 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터에서 보여준 EGFP 리포터 단백질의 낮은 발현에 대한 문제점을 해결하고자 한다. 돼지 정원줄기세포내로 유전자 도입을 확인하기 위해 삽입된 EGFP 단백질을 강하게 발현시키는 프로모터에 대한 탐색 및 삽입을 통해 방광상피세포에서 특이적으로 Human BMP2를 강하게 발현시키는 Uroplakin II 프로모터가 삽입된 형질전환 벡터를 개선하고자 한다.

- 돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발

과거 본 연구팀에 의해 확립된 전기천공법에 의한 정원줄기세포내 유전자 전달 기술에서 보여준 낮은 유전자전달 효율의 한계점을 극복할 수 있는 고효율 유전자 전달 기술을 개발하고자 한다. 이를 위해 기존에 확립된 전기천공법 조건의 물리적(빛, 온도) 또는 화학적(전해질 종류, 농도) 변형이 시도될 것이며, Nano needle 또는 Microfluidic device를 활용한 새로운 유전자전달 기법들에 대한 다양한 시도가 이루어질 것이다. 이러한 시도들을 통해 정원줄기세포내로 유전자 전달을 효과적으로 유

도할 수 있는 기법 확립이 이루어질 것이다.

- . 형질전환 돼지 정원줄기세포 체외 배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발
비형질전환 돼지 정원줄기세포 미분화유지 및 증식에 최적화된 3차원 스캐폴드의 물리적 조건을 PEG-based hydrogel을 이용하여 구현하고, 이러한 스캐폴드에 비형질전환 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하는 인테그린을 활성화 시킬 수 있는 ECM 모티프를 제작 및 결합시켜 비형질전환 돼지 정원줄기세포 미분화유지 및 증식에 최적화된 3차원 비세포성니쉬를 개발하고자 한다. 이러한 3차원 비세포성니쉬에서 형질전환 돼지 정원줄기세포를 체외 배양함으로써 이식시 요구되어지는 다량의 형질전환 돼지 정원줄기세포를 생산하고자 한다.
- . 3차원 비세포성니쉬에서 체외 배양된 형질전환 돼지 정원줄기세포의 특성 분석을 통한 정상성 검증
3차원 비세포성니쉬에서 체외 배양된 형질전환 돼지 정원줄기세포에서 돼지 정원줄기세포 특이적 마커 유전자 및 단백질 발현을 검증하고, 마우스 정소내 이식하여 정자 분화능을 확인하고자 한다. 또한, RNA Seq 기법을 이용하여 삽입된 유전자 및 3차원 배양 환경이 전체적인 정원줄기세포 유전자 발현에 미치는 영향을 비교 분석함으로써 개발된 형질전환 및 체외배양기술의 안정성 검증이 이루어질 것이다.
- . 형질전환 돼지 소변으로부터 Human BMP2 단백질 생산
형질전환 돼지 소변내 Human BMP2 단백질 존재 여부 및 농도 확인을 통해 생산 효율을 분석하고, 이후 분자량의 차이를 이용한 HPLC 또는 GFP tagging을 이용한 Affinity Chromatography를 이용하여 소변으로부터 Human BMP2 단백질을 25% 이상의 수율로 분리 정제하고자 한다. 또한, 분리 정제된 Human BMP2 단백질의 장기 보관 조건에 대한 탐색도 이루어질 것이다.
- . 정제된 Human BMP2 단백질의 반응효과 및 안정성 검증
골세포를 이용하여 세포 수준에서의 Human BMP2 단백질의 반응효과 및 독성 검증이 이루어질 것이며, 마우스 골에 인위적인 골절을 유발하여 직접 주입함으로써 골 치료제로서의 Human BMP2 단백질 반응효과 및 독성 검증이 이루어질 것이다. 또한, 생산된 Human BMP2 단백질내에 바이러스, 세균, 곰팡이 또는 마이코플라스마 존재 여부 및 생산된 Human BMP2 단백질이 골관련세포주의 생리적 변화에 미치는 영향을 분석함으로써 미생물 및 세포 수준에서의 안전성 검증이 이루어질 것이다.

▶ 제 2 세부과제: 형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자 생산 기술 개발

○ 연구개발 목표

돼지 정원줄기세포의 돼지 정소내 이식 기술을 개발하고, 이를 기반으로 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 생산하고자 한다. 또한, 생산된 형질전환 돼지의 정상성 및 번식능을 검증하고자 한다.

○ 연구개발 내용 및 범위

- In Vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발
초기 실험은 수컷 돼지의 정소에 정원줄기세포를 효과적으로 주입, 이식할 수 있는 방법을 수립하고자 한다. 도축 또는 거세된 돼지로부터 회수된 정소를 이용하여 해부학적 구조를 파악하고 정소의 해부학적 특징에 따른 정원줄기세포의 주입 위치 및 주입량에 대하여 검토하고자 한다. 또한, 정원줄기세포 주입을 위한 needle 또는 catheter 의 직경 및 크기 여부를 검토하고, 형광표지인자를 부착시킨 세포 또는 색소를 이용하여 주입한 세포 또는 색소가 정소 내에 어떻게 분포하는지를 확인할 것이다.
- In Vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발
In Vitro 상태에서 검토된 정원줄기세포 주입 방법을 통해 살아 있는 돼지의 정소에 정원줄기세포를 이식하는 방법을 검토하고자 한다. 이를 위해 기존에 확립된 기법들을 검토하는 한편 효율을 높일 수 있는 새로운 기법들을 시도할 예정이다. 또한 정원줄기세포 주입 후 recipient의 체중변화 및 후유증을 진단하고, In vivo에서 이식한 돼지 정소를 회수하여 정원줄기세포의 이식 후 경과(고환의 크기 변화 및 이식 세포 과다증식 또는 정상적 정원줄기세포 확립)여부를 확인할 것이다.
- 형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립
정원줄기세포가 제거된 recipient에 1차년도에서 확립된 정소 내 정원줄기세포 이식 방법을 적용하여 형질전환된 정자를 생산할 수 있는 돼지를 생산하고자 한다. 성 성숙이 진행된 수컷 돼지로부터 정액을 채취하여 정자 유무 및 정액량 등을 검사하고 형질전환 유전자의 발현여부를 검토하는 한편, 정자 정상성과 번식능에 대한 검증이 수행되어질 것이며, 형질전환돼지의 정액 보존기술 개발을 통해 유전능 보존이 이루어질 것이다.
- 형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지로부터 정액의 성상 검사
돼지 정원줄기세포의 돼지 정소 내 이식을 통해 정상적인 성숙정자를 만든 후 정액을 수압법으로 채취하여 정자의 성상 (정자수, 활력, 정자 직진운동성, 기형정자비율, Protamine Deficiency 등)을 검토 하고자 한다.
- 생산된 형질전환 돼지의 발생학적 정상성 검증
생산된 형질전환 돼지의 해부학적 정상성, 주요장기의 성상 및 조직학적 검사를 통해 발생학적 정상성이 검증되어질 것이다.
- 생산된 형질전환 돼지유래 형질전환 정자 번식능 검증
정자의 외형, 핵형, 운동성 분석을 통해 Human BMP2 생산용 형질전환 돼지로부터 유래된 성숙정자의 정상성을 검증할 것이다. 또한, 생산된 형질전환 정자의 계놈내에 Human BMP2 유전자가 삽입되어 있는지 여부를 확인할 것이며, 난세포질 내 정자 주입법(ICSI; Intracytoplasmic sperm injection) 및 체외수정(IVF; in vitro fertilization)과 같은 최신인공번식 기술을 이용하여 수정란 생산 효율이 검증되어질 것이다.

▶ 협동연구과제: 형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자를 이용한 형질전환 돼지 생산

○ 연구개발 목표

돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 개발을 통해 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지를 생산하고자 한다. 또한, 생산된 형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자를 이용하여 형질전환 돼지를 생산하고자 한다.

○ 연구개발 내용 및 범위

- 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립

실험동물 수준에서의 Busulfan을 이용한 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기법을 기반으로 임신한 암컷 돼지로부터 유래한 수컷 돼지 새끼의 정소내 정원줄기세포 형성을 최대한 억제시킬 수 있는 Busulfan의 주사 방법, 빈도 및 농도 조건을 탐색하고자 한다. Busulfan 처리된 임신 돼지로부터 태어난 수컷 돼지 새끼의 정소내 정원줄기세포 및 정자형성을 지지하는 세포들의 존재 여부를 세포학 및 조직학적으로 분석하고, Busulfan이 수컷 돼지 새끼 발생과정에 미치는 영향을 해부학적으로 분석하고자 한다. 마지막으로, Busulfan 처리를 통한 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거에 있어 표준화 프로토콜을 제작이 이루어질 것이다.

- 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립

제 1차년도에 확립된 표준화 프로토콜을 이용하여 정원줄기세포세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 원활하게 생산할 수 있는 기반 기술들을 확립하고, 이렇게 생산된 수컷 돼지 새끼들을 성성숙이 이루어지는 시기까지 유지할 수 있는 기술을 개발하고자 한다. 또한, 성성숙 발생 시기 이후, 생산된 돼지 정소내에서 정원줄기세포가 다시 성장하여 정자를 생산할 수 있는지 여부를 확인함으로써, 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식에 적절한 정소를 가진 수컷 돼지임이 최종 확인되어질 것이다.

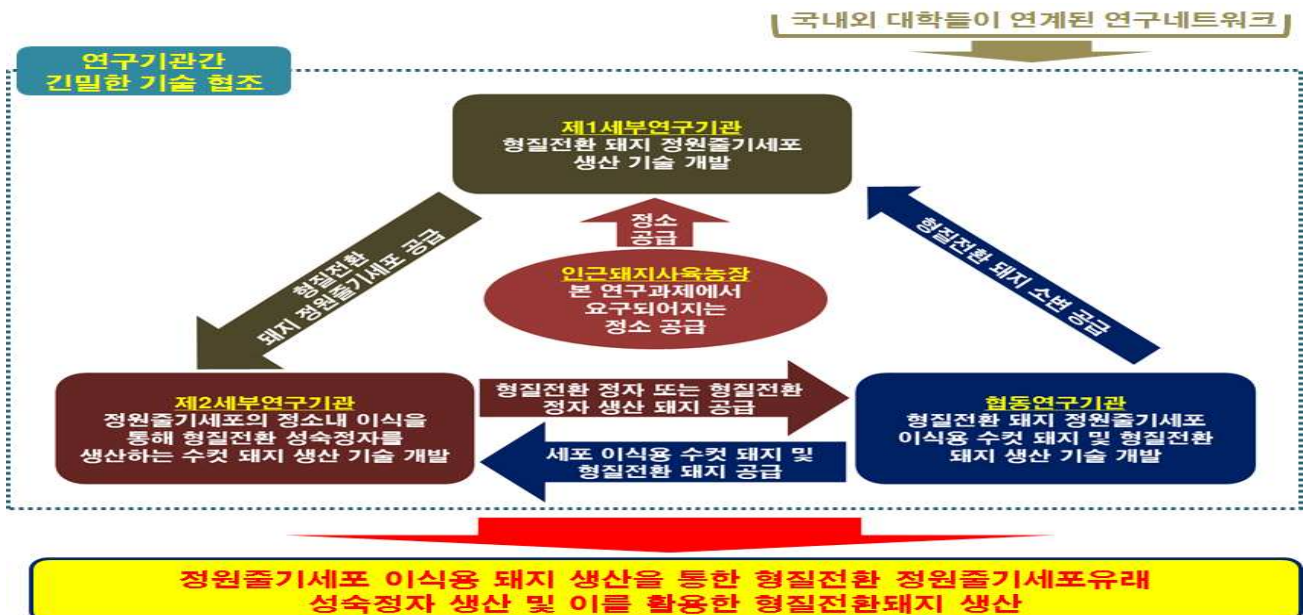
- 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 Human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산

제 2차년도에 생산된 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지와 자연교배 또는 이들로부터 회수된 형질전환 성숙정자를 이용한 인공수정등과 같은 보조생식술을 적용하여 Human BMP2를 돼지 소변에서 생산하는 형질전환 돼지를 생산하고자 한다. 또한, 생산된 형질전환 돼지들을 안정적으로 유지할 수 있는 기반 기술을 확립하고자 한다.

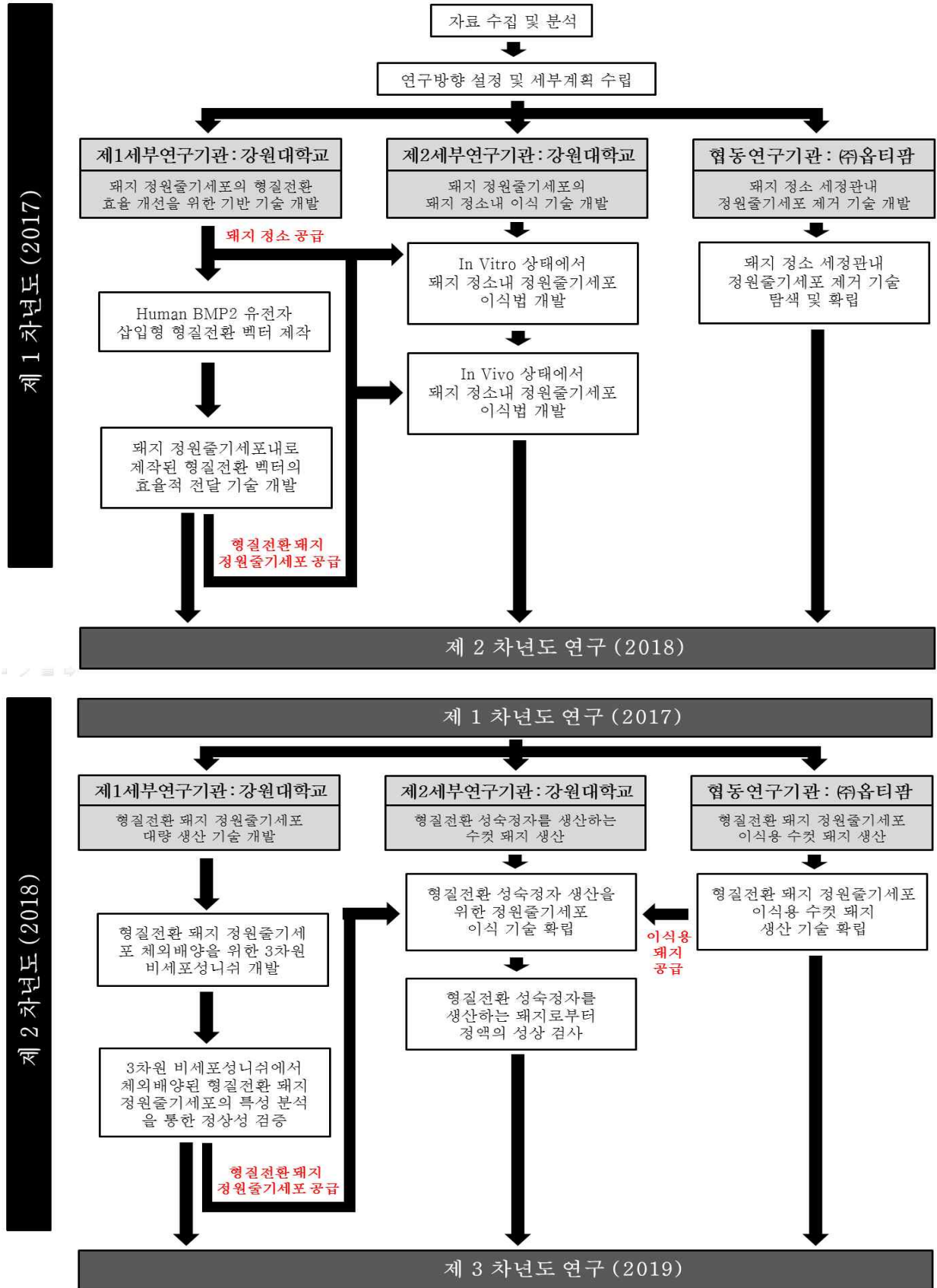
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진전략 및 방법

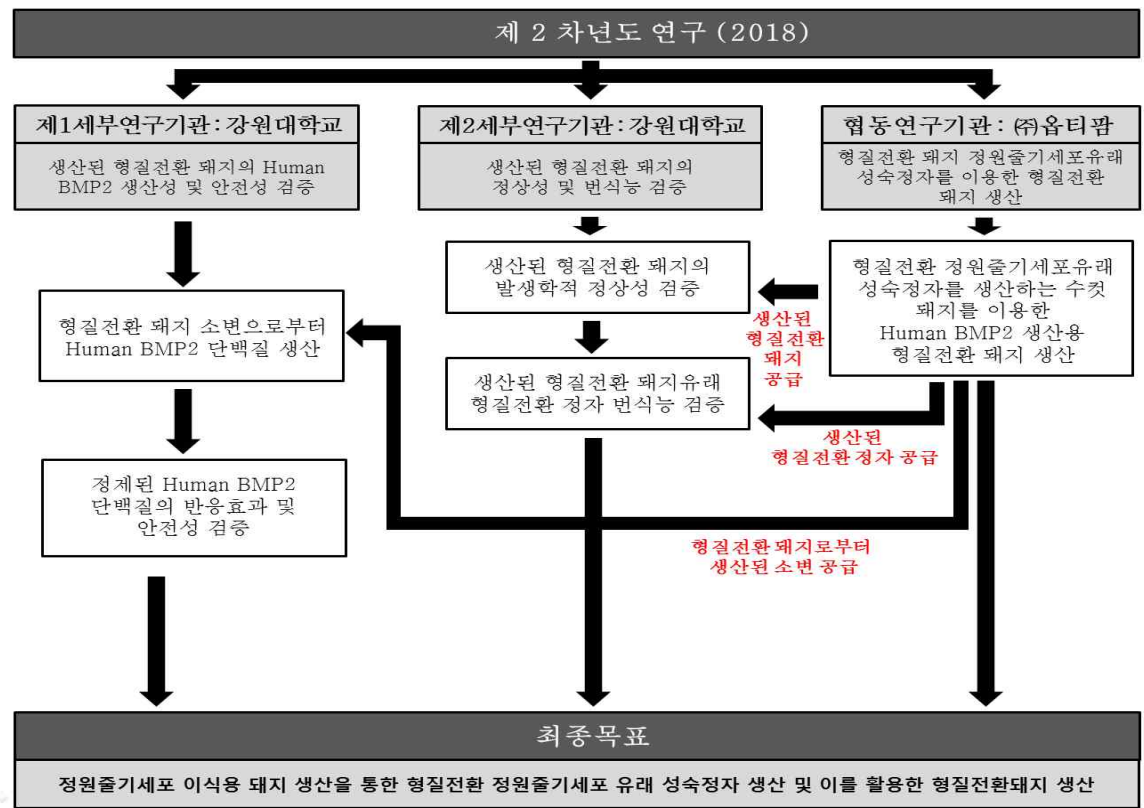
본 연구는 총 3년에 걸쳐 수행되어질 예정이며, 형질전환 돼지 정원줄기세포 생산과 관련된 연구는 생식세포 및 줄기세포 관련 연구에 있어 많은 경험과 노하우를 가지고 있는 제1세부(주관)연구책임자에 의해 수행되어질 것이며, 형질전환 정원줄기세포의 수컷 돼지 정소내 도입 기술은 수의산과학 및 체내 생식세포 도입 경험과 노하우를 많이 가지고 있는 제2세부과제책임자에 의해 수행되어질 것이다. 또한, 정소내 정원줄기세포가 제거된 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 및 형질전환 정자를 활용한 형질전환 돼지 생산과 관련된 부분은 형질전환 돼지 생산에 있어 많은 업적과 경험 그리고 생산 시설을 보유하고 있는 협동연구책임자에 의해 수행되어질 것이다. 특히, 주관연구책임자가 이끌고 있는 연구팀에는 유전자 재조합, 유전자 삽입 및 형질전환 세포 생산에 있어 많은 경험이 있는 박사급 인프라가 구성되어 있어 형질전환 정원줄기세포 생산에 큰 기여를 할 것이다. 주관연구책임자는 2010년부터 경제동물에서의 정원줄기세포 확립 및 생식세포 분화에 대한 연구를 꾸준히 진행해오고 있으며, 본 연구계획에서 수행되어질 모든 연구 방법 및 기술들에 대한 충분한 노하우를 현재 보유하고 있다. 또한, 각 연구책임자들은 오랜기간동안 체세포복제를 활용한 형질전환동물 생산과 관련해서 협력 연구를 해오고 있기 때문에, 본 연구에서 요구되어지는 모든 연구 방법, 기술 그리고 시설들에 대한 충분한 노하우를 보유하고 있으며, 이들은 유기적으로 긴밀한 기술 협조를 통해 최종 목표 달성에 최선을 다할 것이다. 연구를 수행을 하는 과정 중 발생하는 문제점들을 극복하기 위해 본 연구팀이 현재 소속되어있는 줄기세포 및 생식세포 전문가들이 연계된 국내 및 국외 연구네트워크를 통해 자문을 받을 계획이다. 또한 그 이외의 부족한 부분은 이미 발표된 논문을 통해 해결할 것이며, 돼지 정소는 인근 돼지 사육 농장에서 직접 공급을 받을 것이며, 연구시 요구되어지는 돼지 생산 및 관리를 위한 사육설비들은 협력연구책임자가 소속되어 있는 (주)윙티팜으로부터 직접 제공되어질 것이다.



2-2. 연구개발 추진체계



제 3 차년도 (2019)



2-3. 연구개발 추진일정

일련번호	연구내용	1차년도												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		월별 추진 일정													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작				■	■								40,000	이승태 (강원대학교)
2	돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발						■	■	■	■	■	■	■	40,000	이승태 (강원대학교)
3	In Vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발				■	■	■	■	■					40,000	이은송 (강원대학교)
4	In Vivo 상태에서의 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발								■	■	■	■	■	52,500	이은송 (강원대학교)
5	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립				■	■	■	■	■	■	■	■	■	127,500	최기명 ((주)옵티팜)
2차년도															
6	형질전환 돼지 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	60,000	이승태 (강원대학교)
7	3차원 비세포성니쉬에서 체외배양된									■	■	■	■	40,000	이승태 (강원대학교)

	형질전환 돼지 정원줄기세포의 특성 분석을 통한 정상성 검증																		
8	형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립																60,000	이은송 (강원대학교)	
9	형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지로부터 정액의 상상 검사																40,000	이은송 (강원대학교)	
10	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립																200,000	최기명 ((주)옵티팜)	
3차년도																			
11	형질전환 돼지 소변으로부터 Human BMP2 단백질 생산																50,000	이승태 (강원대학교)	
12	정제된 Human BMP2 단백질의 반응효과 및 안정성 검증																50,000	이승태 (강원대학교)	
13	생산된 형질전환 돼지의 발생학적 정상성 검증																50,000	이은송 (강원대학교)	
14	생산된 형질전환 돼지유래 형질전환 정자 번식능 검증																50,000	이은송 (강원대학교)	
15	형질전환 정원줄기세포유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 Human BMP2 생산용 형질전환돼지 생산																200,000	최기명 ((주)옵티팜)	

2-4. 연구개발결과

● 제1세부과제: 돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술 개발

1. 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선을 위한 기반 기술 개발

가. Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작

♣ 연구수행기간: 1차년도 (2017년)

♣ 연구수행내용

: 형질전환이 성공적으로 유도된 정원줄기세포만을 효과적으로 분리하기 위해 reporter gene을 벡터에 삽입했고, 이러한 reporter gene들이 정원줄기세포에서 강하게 발현될 수 있도록 다양한 종류의 프로모터를 reporter gene 앞에 삽입하여 정원줄기세포에서의 발현 강도를 측정하였다. 그리고나서, reporter gene 프로모터 앞쪽에 Human BMP2가 돼지 방광상피세포에서만 특이적으로 생산되어질 수 있도록 돼지 방광상피세포에서만 작동되는 Uroplakin II 프로모터를 삽입하였고, Uroplakin II 프로모터 바로 뒤에 Human BMP2 유전자를 삽입함으로써, Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터를 성공적으로 제작완료 하였다.

(1) 돼지 정원줄기세포에서 강하게 작동하는 프로모터 탐색

◆ 연구수행기간: 1차년도 (2017년)

◆ 연구수행내용

: 돼지 정원줄기세포를 형질전환 유도하였을 경우, 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 및 세포 내 reporter gene의 발현강도가 매우 낮아 형질전환이 유도된 돼지 정원줄기세포만을 분리해 낼 수 없는 한계점을 극복하기 위해, 본 연구팀은 우선적으로 돼지 정원줄기세포 내에서 reporter gene을 보다 더 강하게 발현시킬 수 있는 프로모터가 삽입된 human BMP2 유전자 삽입형 벡터를 제작하려 하였다. 이를 위해 200V 500 μ F의 동일한 조건에서 각 프로모터 (CMV, SV40, chicken β -actin)가 삽입된 벡터 (그림 1)를 돼지 정원줄기세포 내로 도입을 한 후, FACS 분석을 통해 프로모터간 돼지 정원줄기세포의 형광단백질 (EGFP) 발현효율 및 발현강도를 비교 분석하고자 하였다.

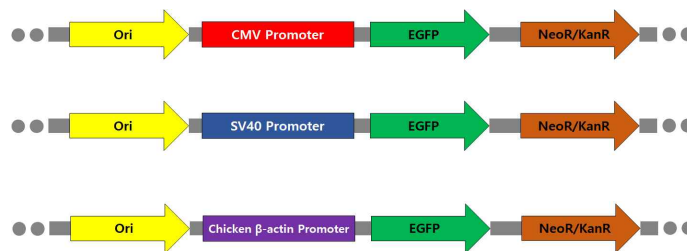


그림 1. 벡터 모식도

: 그 결과, CMV 프로모터가 삽입된 벡터로 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 15.52%, SV40 프로모터가 삽입된 벡터로 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 7.19%, chicken β -actin 프로모터가 삽입된 벡터로 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 12.7%의 형광단백질 발현율을 확인하였다 (그림 2). 또한 CMV 프로모터가 삽입된 벡터가 도입된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 95.53의 형광단백질 발현강도를 보여주었으며 (그림 3), 다른 프로모터가 삽입된 벡터로 형질전환 유도된 그룹의 형광단백질 발현강도보다 유의적으로 강하게 발현됨을 확인하였다 (SV40 프로모터: 28.96, chicken β -actin 프로모터: 62.11). 따라서, CMV 프로모터가 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 및 형광단백질 발현강도를 극대화 시켜 줄 수 있는 프로모터라는 것을 확인할 수 있었다.

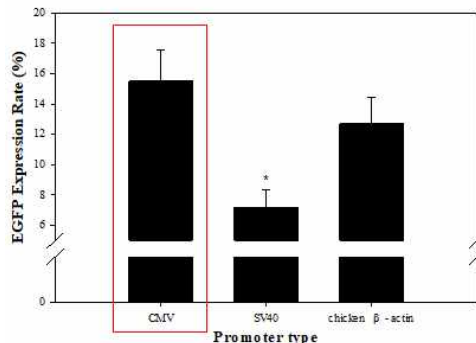


그림 2. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 각각의 프로모터에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현을 확인

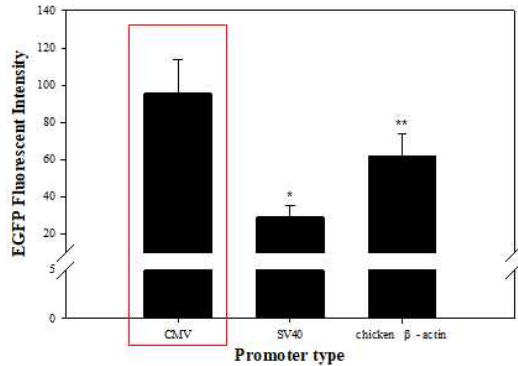


그림 3. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 각각의 프로모터에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현강도 확인

(2) 확인된 프로모터를 탑재한 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작

◆ 연구수행기간: 1차년도 (2017년)

◆ 연구수행내용

: 방광 특이적으로 인간 bone morphogenetic protein 2 (hBMP2) 단백질을 발현 할 수 있는 형질전환동물을 생산하기 위하여, 핵이식에 사용되어질 형질전환된 세포만을 용이하게 선택하기 위한 발현 비특이적 프로모터 (CMV)을 사용하여 기존에 제작된 pd2/pUPK2/ hBMP2/SV40보다 더 강한 세기의 reporter 단백질 (EGFP)을 발현시킬 수 있는 벡터를 제작하고자 하였다 (그림 4).

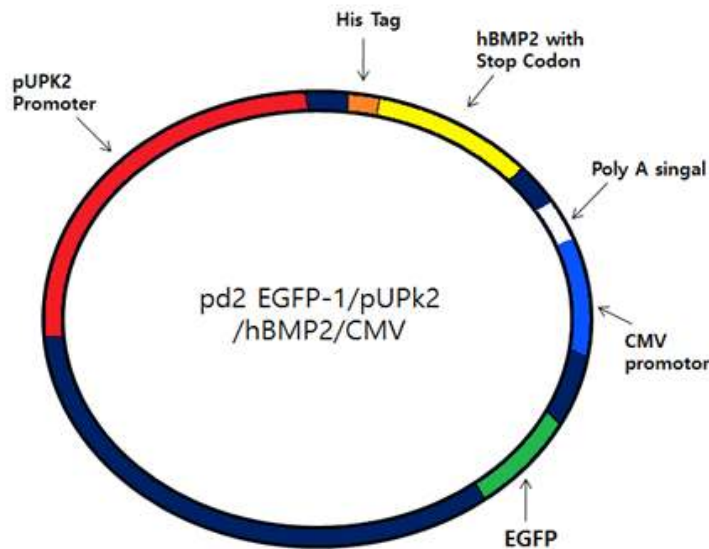


그림 4. CMV 프로모터를 이용한 방광 특이적 사람 BMP2 유전자 발현 동시에 방광 비특이적 EGFP 유전자 발현벡터의 제작 모식도

: 기존에 제작된 pd2/pUPKII/hBMP2/SV40 발현벡터보다 EGFP의 발현 강도가 더욱 강하게 발현되도록 CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자를 분리하였다. 538 bp 크기의 CMV 프로모터와 약 149 bp의 Poly A signal 유전자를 PCR 기법을 이용하여 탐지해 내었으며, PCR 기법을 이용하여 생산된 CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자는 전

기영동을 수행하였다 (표 1 및 그림 5).

표 1. CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자 프라이머

Oligo 명		Sequence	Annealing Tm.
CMV	forward	GAATTCGTTCCGCGTTACATAACTTACGG	60 °C
	reverse	GAATTCACCGGTTAAACCAGCTCTGCTTATATAGACCTC	
Poly A signal	forward	AAGCTTACCGGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTT	60 °C
	reverse	GAATTCCGCCTTAAGATACATTGATGAGTTT	

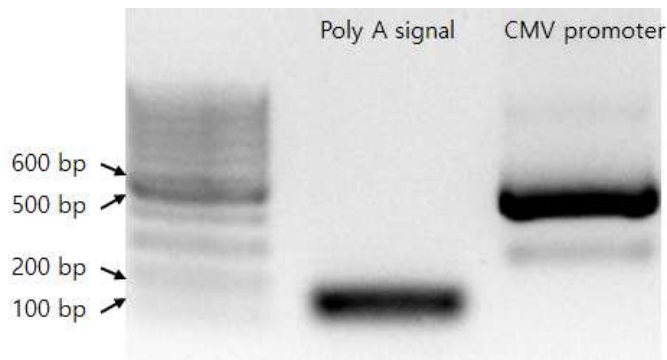


그림 5. Poly A signal 유전자와 CMV 프로모터 PCR 생성물

: CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자를 제작하려는 벡터에 정확하게 삽입하기 위하여, 본 벡터에 삽입하기 전 TA vector와 ligation을 시도, E.coli (DH5 α strain)의 형질 전환을 통하여 다량의 표적 유전자를 확보하였고, 표적 유전자인 Poly A signal과 CMV 프로모터의 TA 벡터로의 삽입 여부를 제한효소 처리하여 전기영동으로 확인하였다 (그림 6).

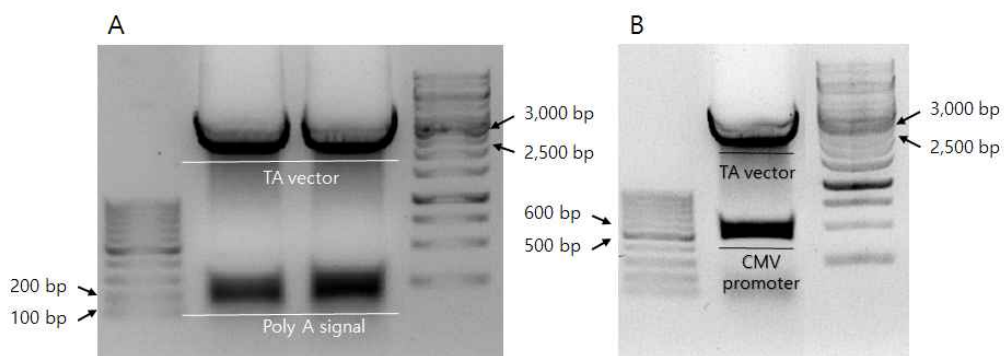


그림 6. 제한 효소 처리된 TA 클로닝 된 Poly A Signal (A)와 CMV 프로모터 (B)

: 이후, pUPKII 프로모터가 삽입된 pd2EGFP-1 벡터(pd2/pUPKII) 내 multiple cloning site 에 CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자를 삽입하기 위하여, 우선 CMV 프로모터와 Poly A signal 유전자 모두 pd2/pUPKII 벡터와 ligation을 시도하였고, E.coli (DH5 α

strain)의 형질전환을 통하여 다량의 표적 유전자를 확보한 후, 제한효소 EcoRI을 이용한 효소처리를 통하여 Poly A signal 유전자와 CMV 프로모터가 pd2/pUPKII 벡터 내에 정확히 순서대로 삽입되었는지 여부를 전기영동으로 확인하였다. 그 결과, 1,500-2500bp 사이에서 제한효소 EcoRI이 처리된 각 벡터의 유전자 크기 양상이 다른 것을 확인 할 수 있었으며, 제한효소 EcoR I을 처리 하였을 때 올바른 방향으로 Poly A signal 유전자와 CMV 프로모터가 삽입된 벡터는 1,892 bp 크기로 절단되며, 반대 방향으로 삽입된 경우 2417 bp 크기로 절단된 것을 확인하였다 (그림 7).

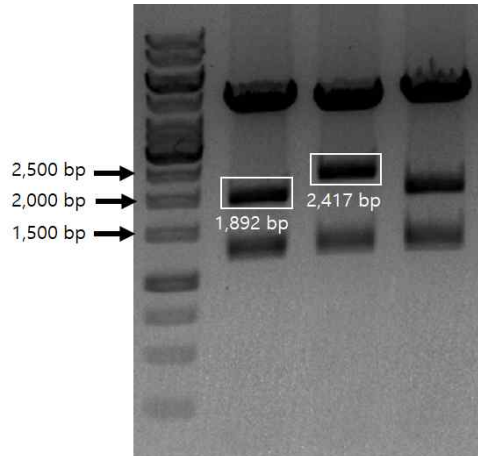


그림 7. 제한효소 EcoR I 처리를 통하여 pd2/pUPKII 내 Poly A signal 유전자와 CMV 프로모터의 삽입이 정방향인 벡터를 선별

: Poly A signal 유전자와 CMV 프로모터가 삽입된 pd2/pUPKII 벡터 (pd2/pUPKII/CMV)에 human BMP2 유전자를 삽입하기 위하여 ligation을 실행하였고 E.coli (DH5 α strain)의 형질 전환을 통하여 여러 클론을 생산하였다. 또한 pd2EGFP-1/pUPK2에 올바른 방향으로 삽입된 hBMP2를 찾기 위하여 sma I 제한효소를 처리 하였으며 전기영동으로 확인하였다. 확인된 벡터를 pd2/pUPKII/hBMP2/CMV라 명명함. 제한효소 Sma I을 처리 하였을 때 올바른 방향으로 human BMP2 유전자가 삽입된 벡터는 252 bp, 1,951 bp, 12,694 bp 크기로 절단되며, 반대 방향으로 삽입된 경우 252 bp, 1030 bp, 11,664 bp 크기로 절단되었다 (그림 8).

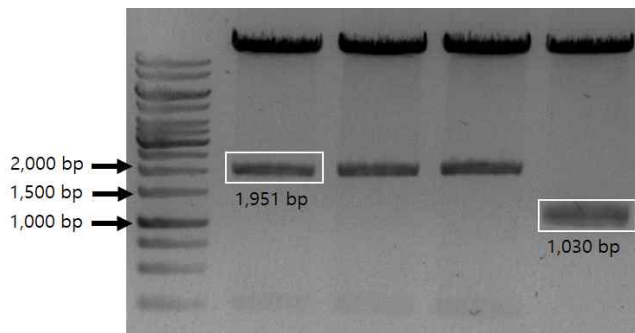


그림 8. 제한효소 Sma I 처리를 통하여 pd2/pUPKII/CMV 내 human BMP2 유전자의 삽입이 정방향인 벡터를 선별

♣ 연구수행결과

: 본 과정들을 통하여 UPKII 프로모터에 의해 형질전환돼지의 방광에서 특이적으로 human BMP를 발현함과 동시에 CMV 프로모터에 의해 발현될 EGFP를 통해 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포를 선별할 수 있는 벡터를 성공적으로 제작하였다.

나. 돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발

♣ 연구수행기간: 1차년도 (2017년)

♣ 논문게제완료: Successful genetic modification of porcine spermatogonial stem cells via an electrically response Au nanowire injector, Biomaterials, SCI, IF=10.273

: Establishment of an electroporation-mediated gene delivery system in porcine spermatogonial stem cells, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, SCI, IF=1.645

♣ 연구수행내용

: 과거 본 연구팀에 의해 확립된 Electroporation 기법에 의한 정원줄기세포 내 유전자 전달 기술에서 보여준 낮은 유전자전달 효율의 한계점을 극복하기 위하여 원적외선을 이용하여 기존에 확립된 Electroporation 기법 조건의 물리적 변형을 시도함으로써, 돼지 정원줄기세포에 고효율로 유전자를 전달할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 원적외선의 조사는 세포막의 강도를 높여준다는 기존 보고에 착안하여 시도를 해 보았으며, 이렇게 원적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포내 형질전환 벡터의 효과적인 전달을 유도할 수 있는 Electroporation 조건을 최적화하기 위해 사용되어지는 전압, Buffer, 정전용량, DNA 양, Pulse number, 적외선 조사 시간등을 다양하게 적용하여 유전자 도입 효율 및 생존율을 비교 분석 하였다.

(1) 적외선 조사 여부가 Electroporation 기법을 통한 돼지 정원줄기세포내 형질전환 벡터 도입 효율에 미치는 영향

◆ 연구수행연차: 1차년도 (2017년)

◆ 연구수행내용

: 과거 본 연구팀에 의해 확립된 정원줄기세포내 형질전환 유전자 전달기술을 회수된 돼지 정원줄기세포에 적용하기 전에 정원줄기세포를 원적외선에 10분간 노출시켰으며, 이후 Electroporation 기법을 이용하여 세포질내로 CMV 프로모터 기반 벡터 (pEGFP-N1)를 도입하였고, 이후 세포 내 EGFP 발현을 및 발현 강도, 세포 생존율 조사를 통해 효과적인 발현 벡터 전달 조건을 최적화하려 하였다.

: 우선, 돼지 정원줄기세포에 적외선 조사 프로토콜 확립하고자 하였다. 이를 위해, 우선적으로 5×10^5 개의 돼지 정원줄기세포를 PBS에 세척 후, 200ul 부피의 Electroporation buffer에 희석하였다. 이후, Electroporation buffer에 희석된 돼지 정원줄기세포를 원적외선 전구와 30cm 간격의 거리를 두고 10분간 노출시켰다. 이후, 원적외선에 노출된 돼지 정원줄기세포를 1ug 상당의 pEGFP-N1 벡터와 함께 Electroporation 기법을 이용하여 형질전환 유도를 시도하였다. 형질전환 유도 직후, Electroporation buffer에

희석된 세포들은 다시 돼지 정원줄기세포 전용 배양액에 24시간 배양하였다 (그림 9).

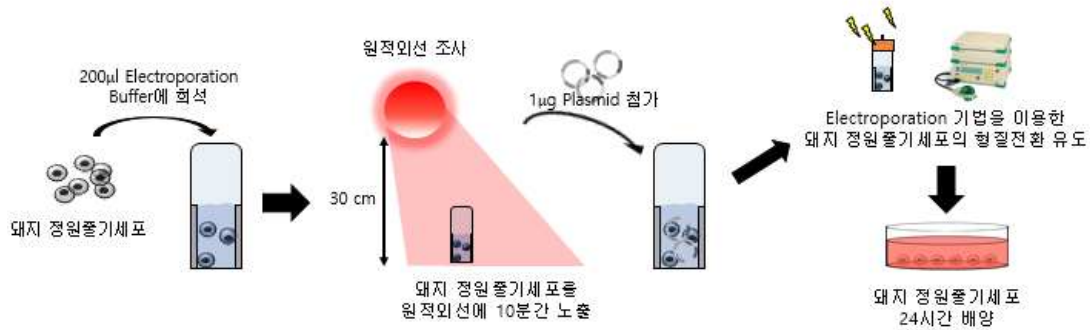


그림 9. 돼지 정원줄기세포를 위한 원적외선 조사 프로토콜 모식도

: 이 후, 원적외선 조사 여부가 Electroporation 기법을 통한 돼지 정원줄기세포내 형질 전환 벡터 도입 효율을 향상시킬 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다. 이를 위해 원적외선에 10분간 노출된 돼지 정원줄기세포와 원적외선에 노출되지 않은 돼지 정원 줄기세포를 Electroporation 기법을 이용하여 200V 전압과 500 μ F의 정전용량으로 전기충격을 가하여 pEGFP-N1 벡터에 도입한 후, 각 그룹 간의 형질전환 유도 효율 및 형질 전환 유전자의 발현강도를 FACS 분석을 통하여 확인하려 하였다.

: 그 결과, 원적외선에 10분간 노출 후 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 16.47, 원적외선 노출 없이 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 10.09의 형광 단백질 발현율을 확인하였으며, 원적외선에 10분간 노출 후 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 85.47, 원적외선 노출 없이 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포 그룹에서 41.88의 EGFP 발현강도를 확인하였다 (그림 10).

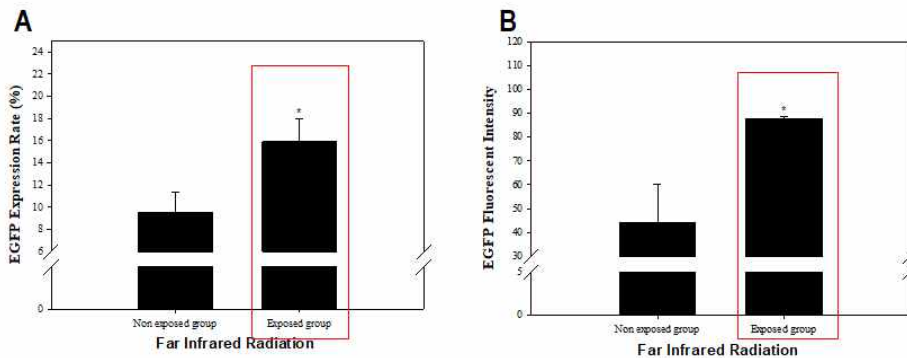


그림 10. Electroporation 기법을 이용하여 원적외선에 노출된 돼지 정원줄기세포 그룹과 원적외선에 노출되지 않은 돼지 정원줄기세포 그룹을 각 전기적 펄스 조건에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현효율 (A)과 발현강도 (B) 확인

: 이러한 결과를 통하여 돼지 정원줄기세포에 원적외선 조사는 Electroporation 기법을 통한 돼지 정원줄기세포내 형질전환 벡터 도입 효율을 향상시키는데 효과적임을 확인하였다. 이후, 원적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포내 형질전환 벡터의 효과적인 전달을 유도할 수 있는 Electroporation 조건을 최적화하고자 하였다.

(2) 원적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포내 형질전환 벡터의 효과적인 전달을 유도할 수 있는 Electroporation 조건 최적화

◆ 연구수행연차: 1, 2차년도 (2017-2018년)

◆ 특허출원: 형질전환 정원줄기세포의 생산방법, 출원번호: 10-2019-0113509

◆ 연구수행내용

: 발현 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 효과적으로 전달 할 수 전압 (V) 조건의 최적화 하고자 하였다. 세포 내 EGFP 발현율 및 발현 강도, 세포 생존율 조사를 통해 효과적인 발현 벡터 전달 조건을 최적화하기 위하여 우선 원적외선에 10분간 노출된 돼지 정원줄기세포를 Electroporation 기법을 통하여, 각 Voltage (V)의 조건을 달리하여 형질전환을 유도하였다.

: 그 결과, 동일한 500 μ F 조건의 100V 전압에서 5.64%, 150V 전압에서 10.22%, 200V 전압에서 15.68%, 250V 전압에서 5.65%의 형광 단백질 발현율을 확인하였으며, 200V의 형광 단백질 발현율이 다른 전압에서의 형광 단백질 발현율보다 유의적으로 증가한 것을 Duncan 검정을 통하여 확인하였다 (그림 11). 또한 100V 전압에서 21.61, 150V 전압에서 46.62, 200V 전압에서 118.01, 250V 전압에서 119.79의 EGFP 발현강도를 확인하였으며, 200V 및 250V 전압의 EGFP 발현이 100V 및 150V 전압에서보다 유의적으로 강하게 발현되는 것을 확인하였다 (그림 12). 하지만 200V 이상의 전압에서 형질전환 유도된 세포들의 생존율이 다른 그룹들에 비해 유의적으로 감소되는 문제점을 확인하였다 (그림 13).

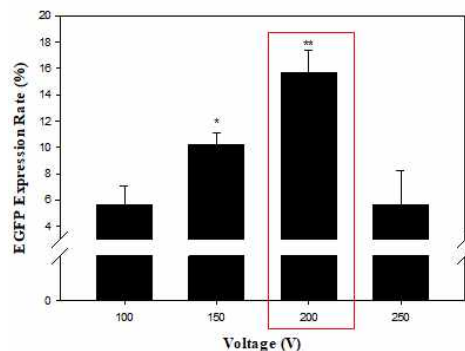


그림 11. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 각각의 전압에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현율 확인

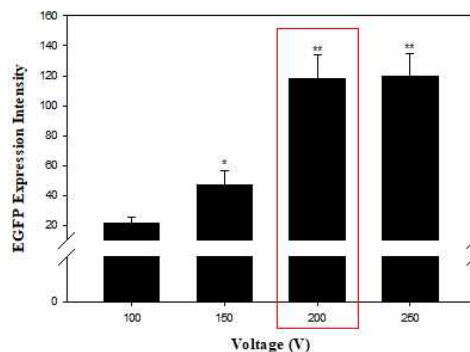


그림 12. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 각각의 전압에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현강도 확인

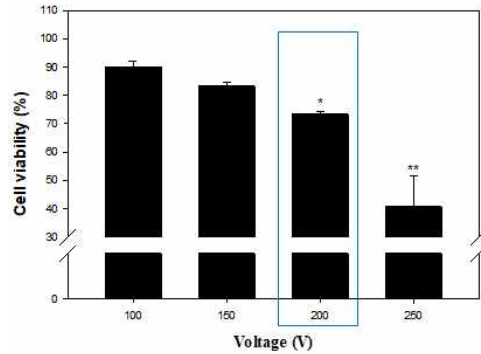


그림 13. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 각각의 전압에서 형질전환 유도 후, 세포생존을 확인

- : 이러한 결과를 통해 Electroporation 기법을 이용한 적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포내 유전자 전달 과정에서 200V의 전압은 유의적으로 가장 좋은 형질전환 효율 및 형광단백질 발현강도를 보여주었지만, 유의적으로 낮은 세포의 생존율을 보여주었다. 따라서, 돼지 정원정원줄기세포내 유전자 도입에 효과적인 Electroporation 조건들 가운데 전압 조건(200V)을 최종 확인할 수 있었다. 이후, 200V에 의해 발생하는 낮은 세포 생존율을 개선하기 위한 연구를 진행하였다.
- : 세포 생존율 향상을 위해 기존에 Electroporation buffer로 사용했던 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS) 대신 돼지 정원줄기세포에 보다 친화적인 돼지 정원줄기세포 기본배지 (StemPro)를 Electroporation buffer로 이용하여 200V의 조건하에서 돼지 정원줄기세포의 형질전환을 유도하였다.
- : 그 결과, 돼지 정원줄기세포 기본배지를 Electroporation buffer로 이용하여 형질전환 유도된 세포들의 생존율이 HBSS를 Electroporation buffer로 이용하여 형질전환 유도된 세포들의 생존율보다 EGFP 발현효율 및 발현강도의 큰 변화 없이 유의적으로 크게 향상된 것을 확인하였다 (그림 14).

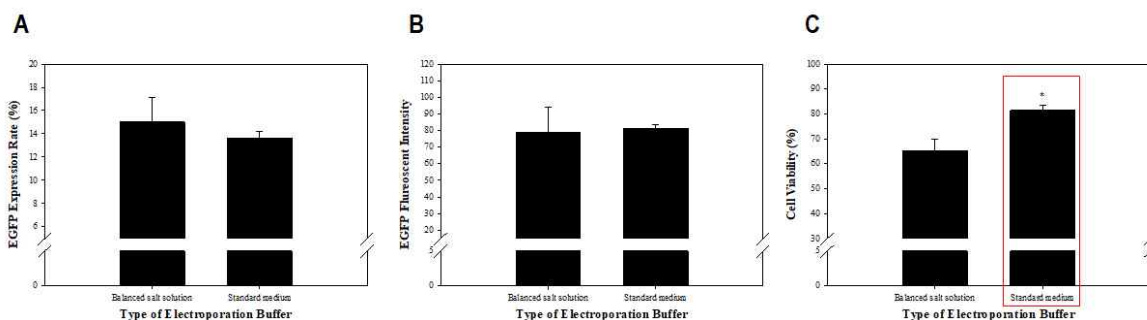


그림 14. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 200V 500 μ F 조건에서 각각의 Electroporation buffer를 이용하여 형질전환 유도 후, EGFP 발현효율 (A), 발현강도 (B), 세포생존율 (C) 확인

- : 이러한 결과를 통해 돼지 정원줄기세포 기본 배지(StemPro)는 적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포에 Electroporation 기법을 이용하여 유전자 전달을 시도할 경우 돼지 정원줄기세포의 생존율을 유의적으로 향상시킬 수 있으며, 동시에 유전자 전달 효율 및

형광단백질 발현강도에는 유의적인 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인하였다. 따라서, Electroporation 기법을 통해 돼지 정원줄기세포내로 유전자를 전달할 경우 돼지 정원줄기세포 기본 배지를 Electroporation buffer로 사용하기로 최종 결정하였다.

: 발현 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 효과적으로 전달 할 수 정전용량 (μF) 조건의 최적화하고자 하였다. 원적외선에 10분간 노출된 돼지 정원줄기세포를 pEGFP-N1 벡터에 도입, 형질전환 유도 효율을 최적화시키기 위하여 Electroporation 기법을 이용하였으며, 200V 전압 조건하에서 각 정전용량 (μF)의 조건을 달리하여 형질전환을 유도하였다.

: 그 결과, 250 μF 에서 9.27%, 500 μF 에서 14.52%, 750 μF 에서 18.21%의 형광단백질 발현율을 확인하였으며, 250 μF 에서 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포의 EGFP 발현강도보다 500 μF , 750 μF 에서 형질전환 유도된 돼지 정원줄기세포의 EGFP 발현강도가 각각 1.62배, 2.62배 높음을 확인할 수 있었다. 하지만 750 μF 조건에서 돼지 정원줄기세포를 형질전환 유도 후, 세포의 생존율이 다른 조건과 비교하여 유의적으로 크게 감소된 것을 확인하였다 (그림 15).

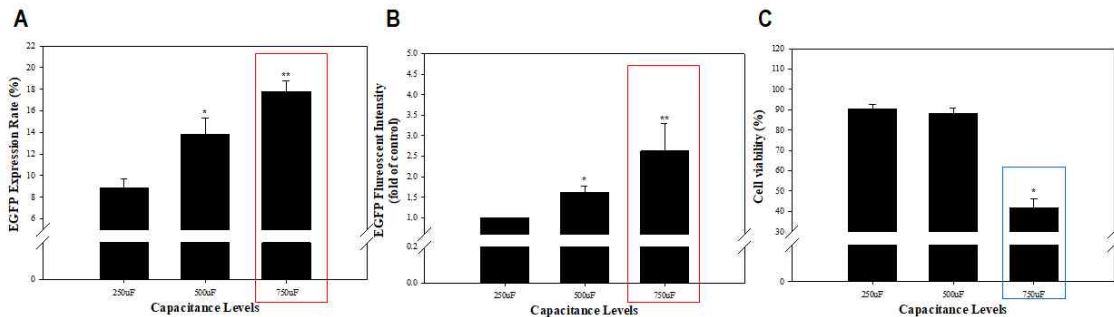


그림 15. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 200V 전압 및 StemPro 배지를 기본 조건으로 각각의 정전용량에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현효율 (A), 발현강도 (B), 세포생존율 (C) 확인

: Electroporation 기법을 이용한 적외선이 조사된 돼지 정원줄기세포내 유전자 전달 과정에서 200V의 전압과 750 μF 의 정전용량은 유의적으로 가장 좋은 형질전환 효율 및 형광단백질 발현강도를 보여주었지만, 형질전환 이후 세포의 형태학적 변화가 동반된 낮은 세포의 생존율을 보여주었다. 따라서 돼지 정원줄기세포를 형질전환 시, 세포의 형태학적 변화 혹은 세포사멸을 최소화시킬 수 있음과 동시에 형질전환 효율 및 reporter 단백질의 발현강도를 효과적으로 촉진시킬 수 있는 Electroporation 조건은 200V의 전압과 500 μF 의 정전용량이라는 것을 최종적으로 확인할 수 있었다.

: 이후, 발현 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 효과적으로 전달 할 수 있는 DNA 양 조건을 최적화 하고자 하였다. 원적외선에 10분간 노출된 돼지 정원줄기세포를 다양한 농도(1 μg , 2.5 μg , 5 μg)의 pEGFP-N1 벡터를 이용하여 200V의 전압과 500 μF 의 정전량, 1 pulse 조건으로 Electroporation을 실시하였다. 그 결과, DNA 양은 유전자 발현 수준 및 유전자 도입 효율에 어떠한 유의적인 차이를 유발하지 못했지만, 1 μg pEGFP-N1 벡터의 사용은 유의적으로 가장 높은 세포의 생존율을 보여줌을 확인할 수 있었다 (그림 16).

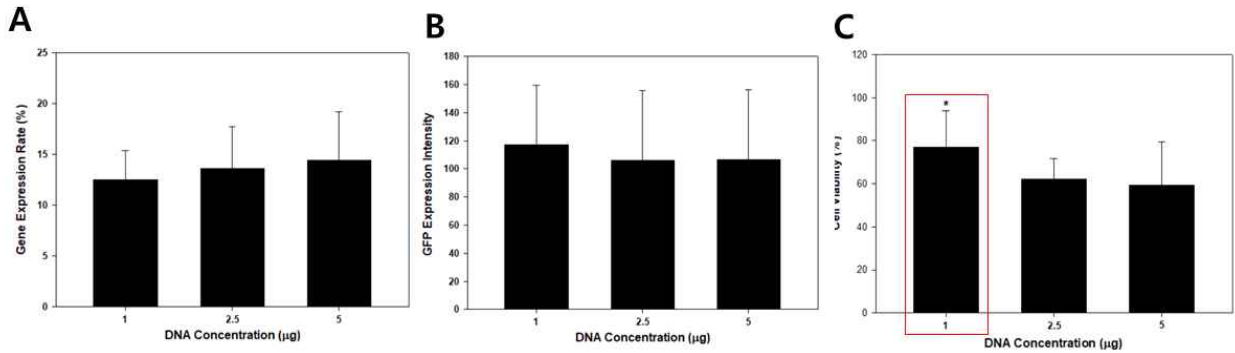


그림 16. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 200V, 500 μ F, Stempro 배지 기본 조건에서 각각의 DNA 양에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현효율 (A), 발현강도 (B), 세포생존율 (C) 확인

: 추가적으로, 발현 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 효과적으로 전달 할 수 있는 Pulse number 조건을 최적화 하고자 하였다. 원적외선에 10분간 노출된 돼지 정원줄기세포를 다양한 Pulse number (1, 2, 3) 조건에서 1 μ g pEGFP-N1 벡터를 이용하여 200V의 전압과 500 μ F의 정전량 조건으로 Electroporation을 실시하였다. 그 결과, 1 Pulse number는 유전자 발현 수준 및 유전자 도입 효율에 어떠한 유의적인 차이를 유발하지 못했지만, 1 pulse number의 사용은 유의적으로 가장 높은 세포의 생존율을 보여줌을 확인할 수 있었다 (그림 17).

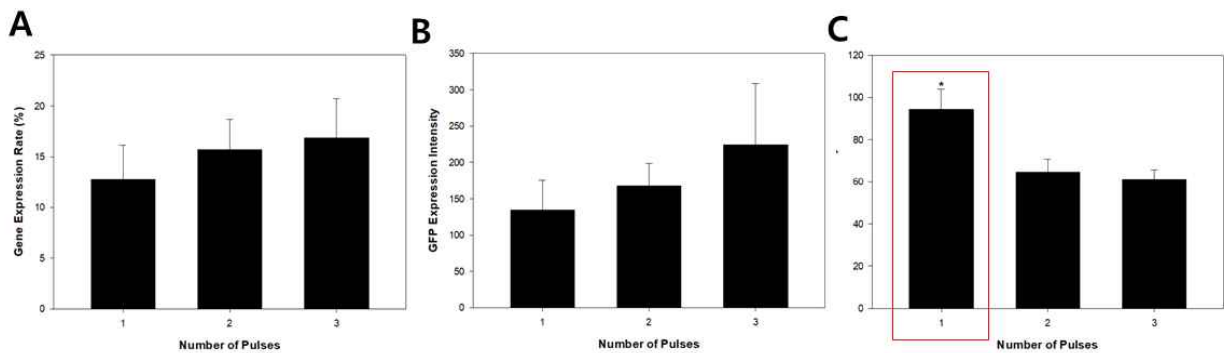


그림 17. Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포를 200V, 500 μ F, 1 μ g DNA, Stempro 배지 기본 조건에서 각각의 Pulse number에서 형질전환 유도 후, EGFP 발현효율 (A), 발현강도 (B), 세포생존율 (C) 확인

♣ 연구수행결과

: 따라서, 일단 10분 정도 적외선을 돼지 정원줄기세포에 조사를 시키고, 이후 200V의 전압과 750 μ F의 정전용량, 1 μ g DNA 양, 1 Pulse number와 같은 조건들에서 Electroporation을 Stempro 배지에서 수행함으로써 돼지 정원줄기세포의 유전자 전달 효율을 유의적으로 향상시킬 수 있는 방법을 개발할 수 있었다.

♣ 향후 연구추진계획

: 돼지 정원줄기세포 내 유전자 전달 효율을 향상시키기 위해 돼지 정원줄기세포에 대한 적외선 노출 시간에 대한 효과를 검증하고 있는 중이다.

2. 형질전환 돼지 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발

가. 형질전환 돼지 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발

♣ 연구수행기간: 2, 3차년도 (2018년-2019년)

♣ 논문게재완료: Porcine spermatogonial stem cells self-renewal effectively in a three dimensional culture microenvironment, Cell Biology International, SCIE, IF=2.127

: Development of a three-dimensional hydrogel system for the maintenance of porcine spermatogonial stem cell self-renewal, Journal of Embryo Transfer, KCI등재지

: Integrin heterodimers expressed on the surface of porcine spermatogonial stem cells, DNA and Cell Biology, SCI, IF=2.918

: Integrin heterodimer $\alpha 9 \beta 1$ is localized on the surface of porcine spermatogonial stem cells in the undifferentiated state, Reproduction in Domestic Animals, SCI, IF=1.638

♣ 연구수행내용

: 형질전환 돼지 정원줄기세포 체외배양을 위해 우선 비형질전환 돼지 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬를 개발하고자 하였다. 이를 위해 3차원 스캐폴드로 사용되어지는 PEG-based hydrogel의 물성을 돼지 정원줄기세포에 최적화 시켰다. 그리고, 미분화 돼지 정원줄기세포 표면에 활성화되어 있는 Integrin heterodimer의 종류를 탐색하여 이들을 활성화시킬 수 있는 adhesion peptide를 제작했고, 이렇게 제작된 adhesion peptide들을 PEG-based hydrogel 스캐폴드에 삽입하였다. 이 때, 다양한 조합의 adhesion peptide들을 스캐폴드에 삽입하여 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하는 integrin heterodimer들을 다양하게 활성화시켰고, 가장 돼지 정원줄기세포의 미분화 유지에 효과적인 integrin heterodimer들의 활성 조합을 탐색하였다.

(1) 돼지 정원줄기세포 미분화 유지 및 증식을 자극하는 3차원 비세포성니쉬의 물리적 성질 최적화

◆ 연구수행기간: 2차년도 (2018년)

◆ 연구수행내용

: 3차원 비세포성니쉬의 스캐폴드는 multi-armed PEG-VS에 MMP에 의해 특이적으로 절단되는 peptide 서열을 가진 crosslinker peptide를 결합시켜 제작되어졌다. 이러한 방법에 의해 제작된 PEG-based hydrogel은 PEG-VS의 arm 수 및 PEG-VS의 농도 차에 의해 다양한 물리적 성질을 가질 수 있다. 따라서 돼지 정원줄기세포의 미분화 유지 및 증식에 친화적인 PEG-based hydrogel의 물리적 성질을 탐색하고자 하였다.

: 4-arm PEG-VS과 8-arm PEG-VS을 가지고 각각 3D PEG-based hydrogel을 제작하였으며, 이러한 각각의 3D PEG-based hydrogel내에서 돼지 정원줄기세포를 체외배양하였다. 돼지 정원줄기세포를 포함한 각각의 3D PEG-based hydrogel들은 StemPro-34에 기반한 돼지 정원줄기세포 배양 배지 내에서 31°C, 5% CO₂ 조건하에서 7일 동안 체외 배양되었다.

: 그 결과, 4-arm PEG-based hydrogel과 8-arm PEG-based hydrogel은 모두 성공적인 구형 콜로니 형성을 유도할 수 있었다 (그림 18). 또한 형성된 콜로니의 수와 크기를 비교했을 때, 4-arm PEG-based hydrogel보다 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포 유래의 콜로니 수와 크기가 유의적으로 더 증가되었음을 확인할 수 있었다 (그림 19).

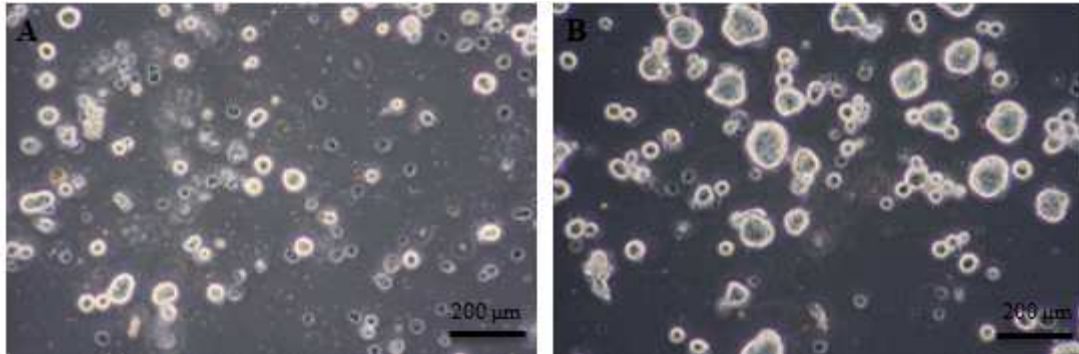


그림 18. 3D 4-arm (A)과 8-arm (B) PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 형성과 형태 비교

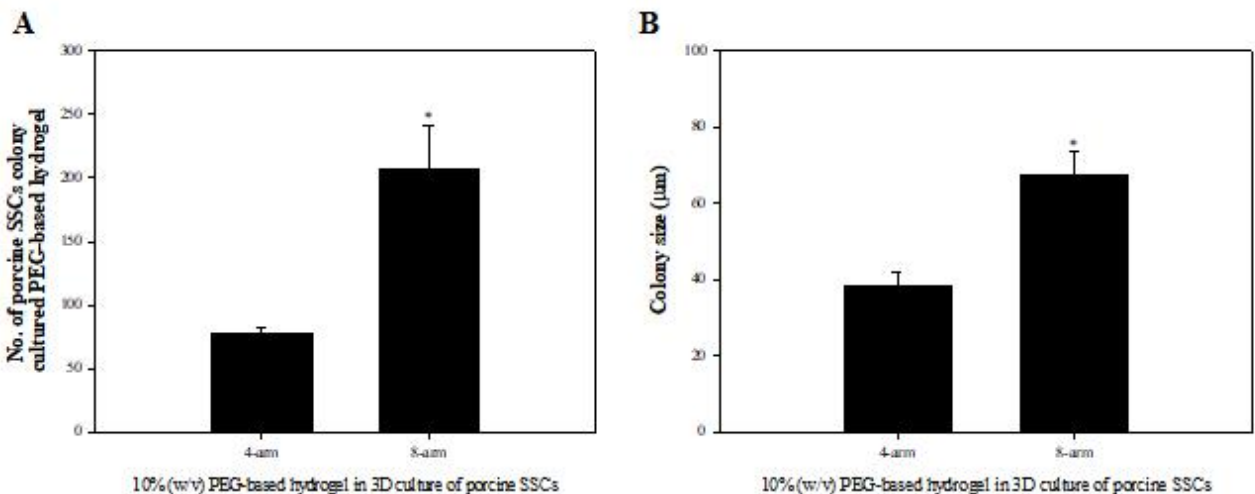


그림 19. 3D 4-arm과 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 개수와 크기 비교. * $p < 0.05$.

: 4-arm PEG-based hydrogel과 8-arm PEG-based hydrogel의 돼지 정원줄기세포 미분화유지능을 확인하기 위해, 각각의 hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포 유래 콜로니들은 AP staining 되어졌으며, arm 수에 관계없이 모든 콜로니들이 강하게 AP staining 되었다 (그림 20). 동시에, 정원줄기세포 특이적 유전자들의 real-time PCR 분석 결과, 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포들은 *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1* 발현에 있어 유의적인 증가를 보여주었다 (그림 21). 이러한 결과들로부터 8-arm PEG-based hydrogel로부터 유래된 물리적 성질은 돼지 정원줄기세포 증식 및 미분화 유지에 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

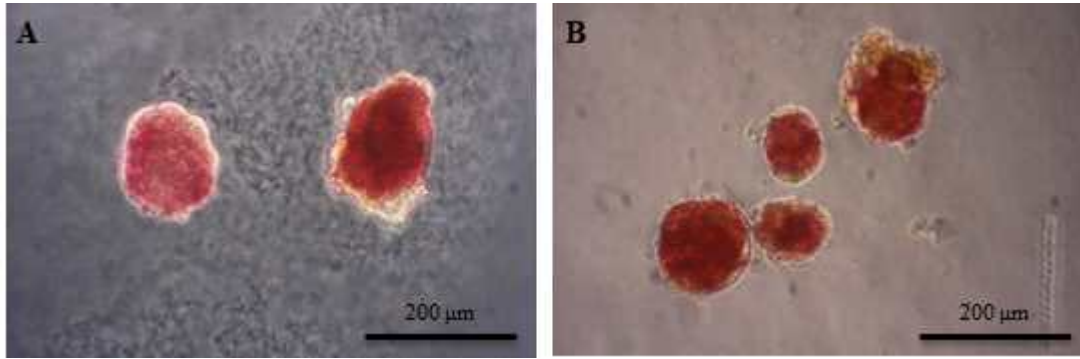


그림 20. 3D 4-arm (A)과 8-arm (B) PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니에서 AP staining을 통해 AP activity 확인

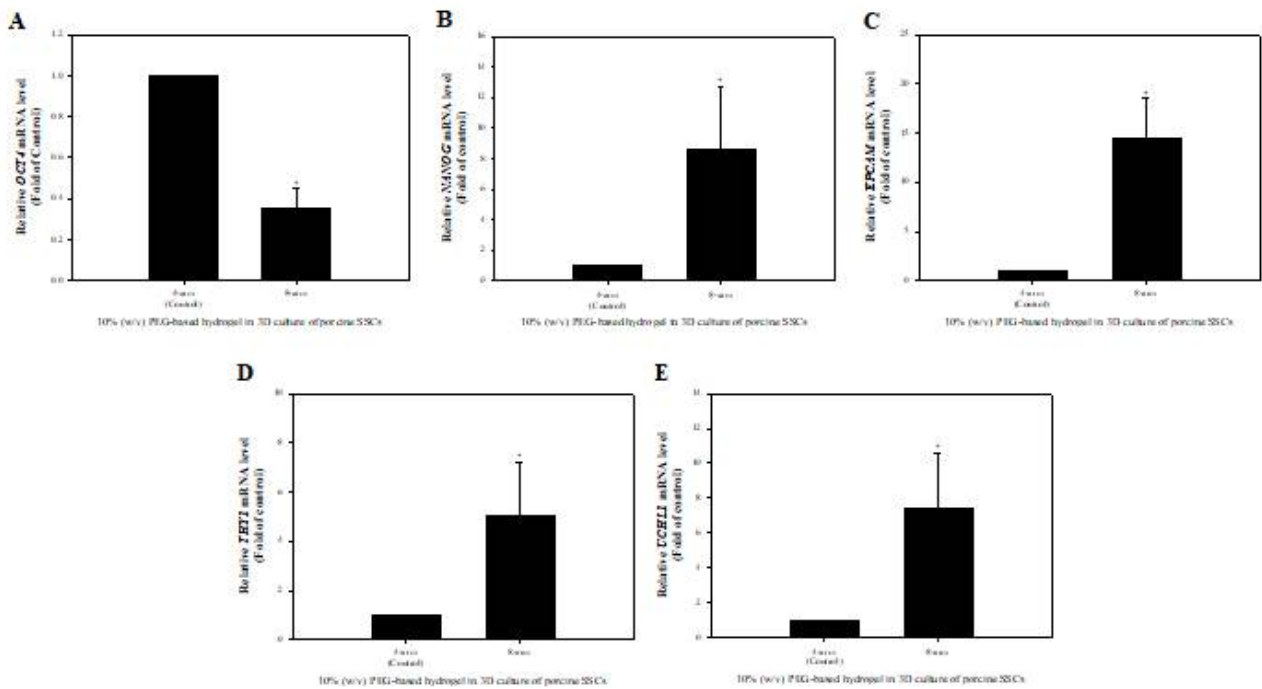


그림 21. 3D 4-arm과 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 정원줄기세포 특이적 유전자 *OCT4* (A), *NANOG* (B), *EPCAM* (C), *THY1* (D), *UCHL1* (E) 발현 분석. * $p < 0.05$.

: 돼지 정원줄기세포 미분화 유지 및 증식 자극에 효과적인 8-arm PEG-VS 농도 결정하기 위해 8-arm PEG-VS를 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% (w/v) 농도로 각각 3D PEG-based hydrogel을 제작하였으며, 이러한 각각의 3D PEG-based hydrogel내에서 돼지 정원줄기세포를 체외배양 하였다. 돼지 정원줄기세포를 포함한 각각의 3D 8-arm PEG-based hydrogel들은 StemPro-34에 기반한 돼지 정원줄기세포 배양 배지 내에서 31°C, 5% CO₂ 조건하에서 7일 동안 체외배양 되었다. 이후, 돼지 정원줄기세포 유래 콜로니의 모양 분석 및 증식 정도를 확인하기 위해 형성된 콜로니의 크기 분석이 이루어졌으며, 미분화 유지능을 확인하기 위해 AP staining 및 정원줄기세포 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1* 발현 수준이 측정되었다.

: 그 결과, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 모두 성공적인 구형 콜로니 형성을 유도할 수 있었다 (그림 22). 또한 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 8-arm PEG-VS의 농도 차이는 돼지 정원줄기세포 유래의 콜로니 크기 변화에 아무런 유의적 차이를 유발하지 못하였다 (그림 23).

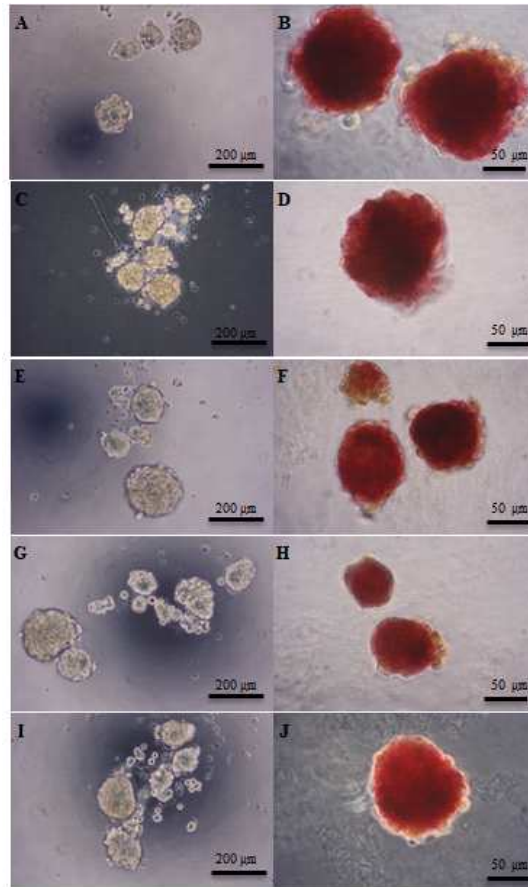


그림 22. 3D 8-arm 5% (A, B), 7.5% (C, D), 10% (E, F), 12.5% (G, H), 15% (I, J) PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 형성과 AP staining을 통해 AP activity 확인

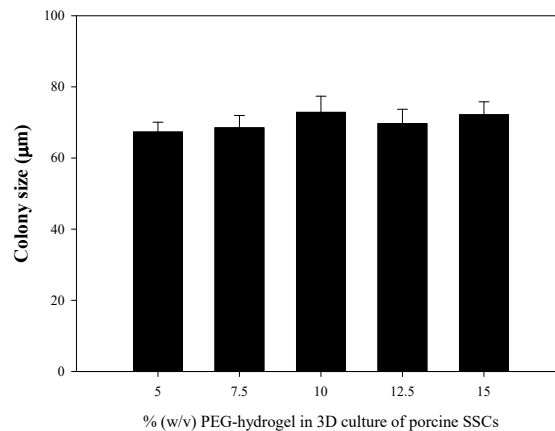


그림 23. 3D 8-arm 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% (w/v) PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교

: 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel의 돼지 정원줄기세포 미분화유지능을 확인하기 위해, 각각의 hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포유래 콜로니들은 AP staining 되어졌으며, arm 수에 관계없이 모든 콜로니들은 강하게 AP staining 되었다 (그림 22). 동시에, 정원줄기세포 특이적 유전자들의 real-time PCR 분석 결과, 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포들은 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*에서 가장 강한 유전자 발현을 보여주었다 (그림 24).

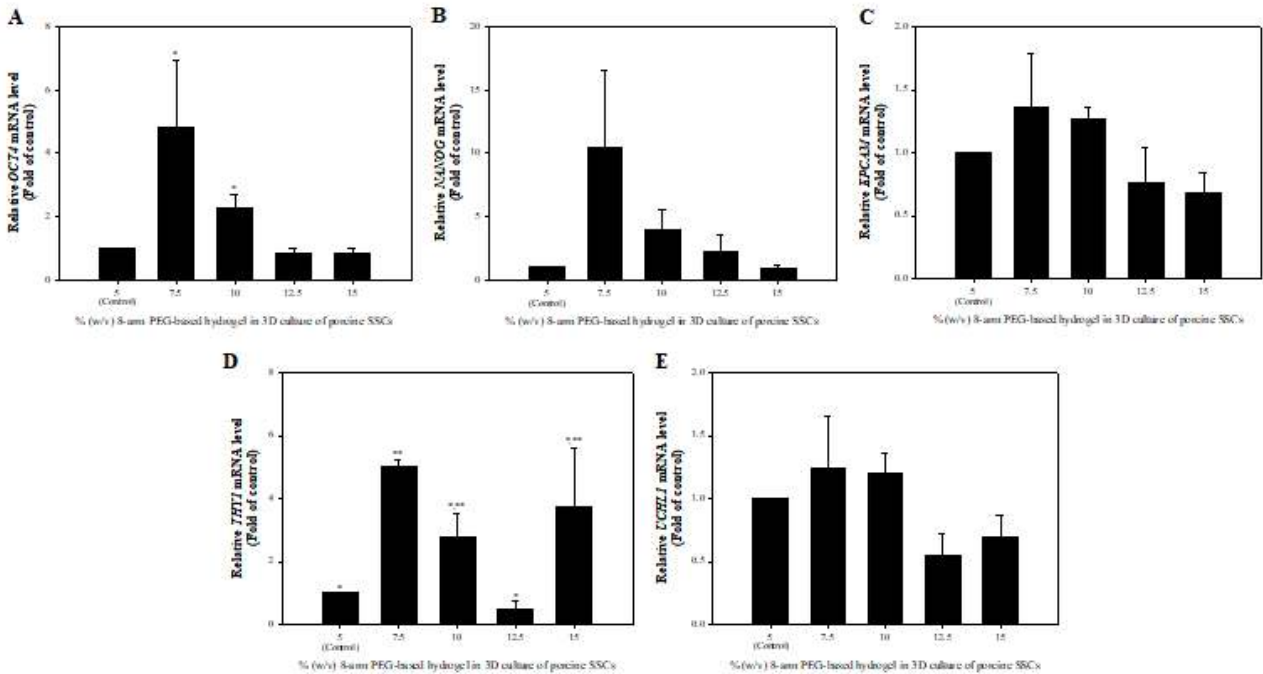


그림 24. 3D 8-arm 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15% PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (A), *NANOG* (B), *EPCAM* (C), *THY1* (D), *UCHL1* (E) 발현 분석. ** $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 최적화된 물리적 성질을 가지고 있는 3차원 비세포성니쉬의 스케폴드는 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel임을 확인할 수 있었다.

(2) 미분화 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하는 integrin heterodimer 탐색

◆ 연구수행기간: 2차년도 (2018년)

◆ 연구수행내용

: 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 존재하는 돼지 정원줄기세포들에게 돼지 정원줄기세포 증식 및 미분화 유지를 자극할 수 있는 세포외 신호를 추가적으로 제공함으로써 좀 더 정밀화된 3차원 비세포성니쉬를 개발하고자 하였다. 이를 위해 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하면서 외부자극을 세포내로 전달하는 기능을 하는 integrin heterodimer 단백질에 대한 탐색을 실시하였다.

: 과거 본 연구팀은 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포 표면에서 발현되는 integrin

heterodimer 종류를 탐색하여 integrin $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$ 이 활성화 되어 있는 형태로 존재하고 있음과 동시에, integrin α_3 , α_5 , α_8 , α_9 subunit은 비활성 형태로 존재하고 있음을 확인하였다. 하지만, 추가적인 연구를 통하여 integrin α_5 , α_6 , α_9 , α_V , β_1 , α_3 , α_4 , α_8 subunit들이 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하고 있음을 immunocytochemistry를 통하여 확실하게 존재 여부를 확인하였다 (그림 25).

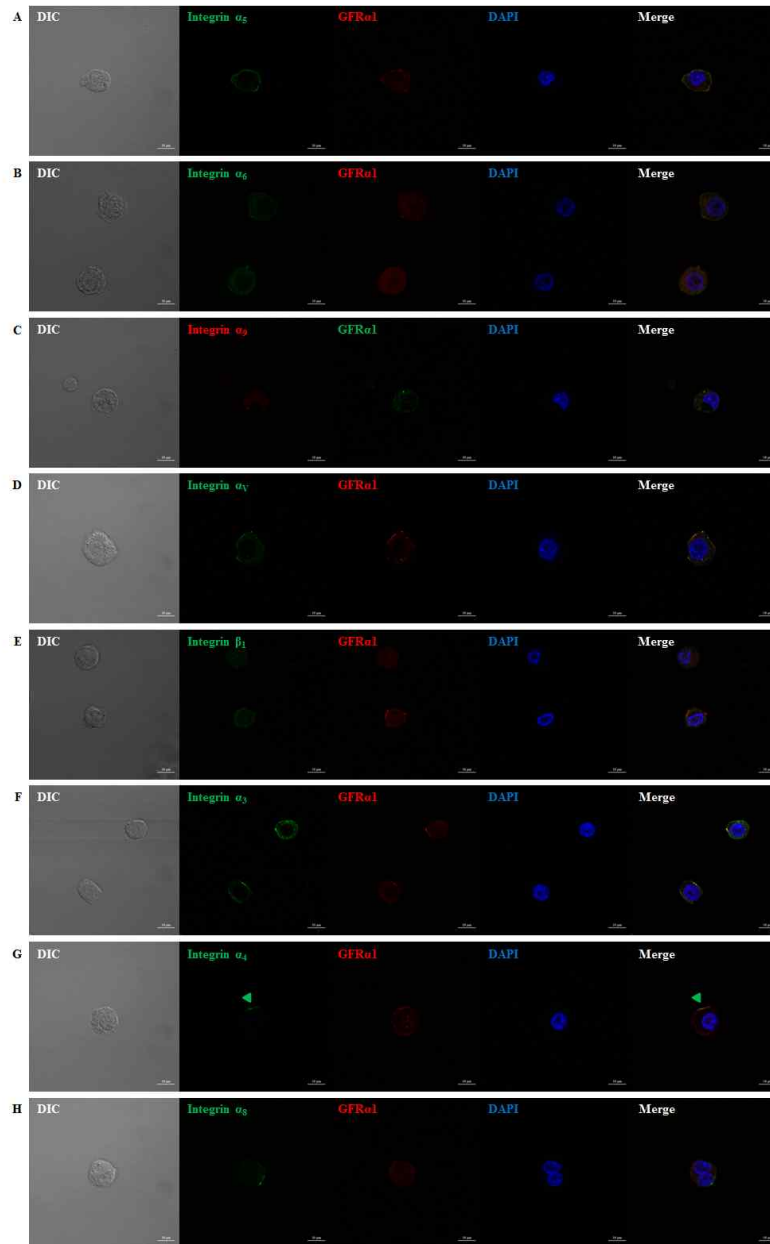


그림 25. Immunocytochemistry를 통해서 돼지 정원줄기세포 표면에 존재하고 있는 α_5 (A), α_6 (B), α_9 (C), α_V (D), β_1 (E), α_3 (F), α_4 (G), α_9 (H) integrin subunit 종류 확인

: 또한, 돼지 정원줄기세포에서의 발현이 확인된 integrin α_9 subunit의 기능 확인을 추가적으로 확인하고자 하였다. 이를 위해, 1×10^5 개의 돼지 정원줄기세포들은 0, 20, 40, 60 $\mu\text{g/ml}$ Tenascin C로 coating된 96-well plate에 seeding되어졌고, 이후 37°C, 5% CO_2 하에서 2시간동안 체외배양 되어졌다. 이후 부착된 정원줄기세포들은 crystal

violet staining이 이뤄졌으며 microplate reader를 통해 정원줄기세포의 부착 정도가 측정되었다. 그 결과, Tenascin C가 coating된 plate에서 Tenascin C 단백질이 coating되지 않은 plate보다 정원줄기세포의 부착 정도가 유의적으로 증가하였음을 확인하였다 (그림 26). 따라서 돼지 정원줄기세포의 표면에 Tenascin C와 결합하는 기능적인 integrin heterodimers (integrin $\alpha_9\beta_1$)의 존재를 추정할 수 있었다.

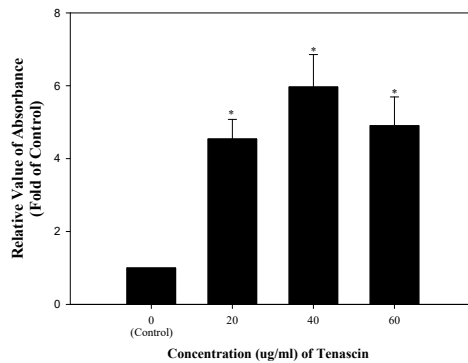


그림 26. 대표적인 세포외기질 단백질인 Tenascin C가 코팅된 plate에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 부착 비율 확인. * $p < 0.05$.

: 돼지 정원줄기세포의 표면에 발현되는 integrin $\alpha_9\beta_1$ 의 기능을 확인하기 위해서, antibody inhibition assay를 수행하였다. 돼지 정원줄기세포는 20 μ g/ml Tenascin C가 각각 coating된 96-well plate에서 anti-integrin α_9 (Y9A2, blocking antibody) 항체의 부재 또는 존재 하에서 각각 배양되었다. 어떤 항체도 존재하지 않은 1 mg/ml poly-L-lysine이 코팅된 well에서 돼지 정원줄기세포의 최적의 부착 밀도를 기준으로, 각각의 단백질이 코팅된 well에 각각의 blocking antibody의 존재 하에서 돼지 정원줄기세포의 부착율을 분석하였을 때, integrin $\alpha_9\beta_1$ 의 blocking antibody로 처리된 well에서의 돼지 정원줄기세포는 유의적으로 낮은 부착율을 보였다 (그림 27).

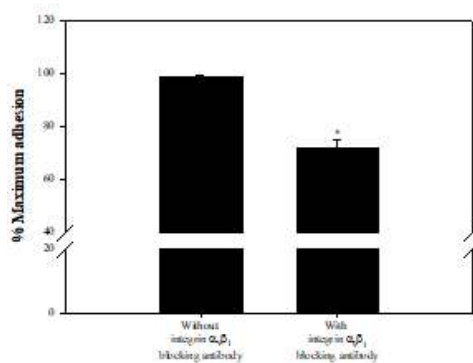


그림 27. 돼지 정원줄기세포의 표면에 발현되는 integrin $\alpha_9\beta_1$ 의 기능 확인. * $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터, 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포의 세포막 표면에는 integrin $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ 이 활성화되어 있는 형태로 존재하고 있음과 동시에, integrin α_3 , α_5 , α_8 subunit은 비활성 형태로 존재하고 있음을 최종적으로 확인할 수 있었다.

(3) 돼지 정원줄기세포 미분화 유지 및 증식을 지지할 수 있는 세포외신호를 돼지 정원줄기세포내로 전달해 줄 수 있는 3D 비세포성니쉬 개발

◆ 연구수행기간: 2, 3차년도 (2018-2019년)

◆ 연구수행내용

: 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포 표면에서 활성화 상태로 존재하고 있는 integrin heterodimer들을 통해 돼지 정원줄기세포 미분화 유지 및 증식을 자극할 수 있는 신호전달을 할 수 있는 extracellular matrix (ECM) motif를 제작하고자 하였으며, 이들을 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에 삽입하여 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화 유지에 더욱더 효과적이면서 정밀한 3D 비세포성니쉬를 제작하고자 하였다.

: 돼지 정원줄기세포 표면에서 발현되는 integrin $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ 을 활성화시킬 수 있는 adhesion peptide 제작하고자 하였고, 제작된 adhesion peptide sequence 들은 아래와 같음

⇒ Integrin $\alpha_v\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide 서열 ⇒ GCGWGRGDSPG

⇒ Integrin $\alpha_6\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide 서열 ⇒ GCRDTTSWSQ

⇒ Integrin $\alpha_4\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide 서열 ⇒ GCRRDPEILDVPSTVRRD

⇒ Integrin $\alpha_9\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide 서열 ⇒ GCRRRRDRDAEIDGIELG

: 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포는 5 μ g/ml Vitronectin, 200 μ g/ml Laminin, 40 μ g/ml Fibronectin, 20 μ g/ml Tenascin C가 각각 coating된 well에서 제작된 adhesion peptide 서열의 부재 또는 존재 하에서 각각 배양되었다. 제작된 adhesion peptide 서열이 첨가되지 않은 그룹의 돼지 정원줄기세포의 최적의 부착 밀도를 기준으로, 제작된 adhesion peptide 서열의 존재 하에서 돼지 정원줄기세포의 부착율을 분석하였을 때, adhesion peptide 서열 RGDSP, TTSWSQ, PEILDVPSTV, AEIDGIEL로 처리된 돼지 정원줄기세포는 낮은 부착율을 보였다 (그림 28).

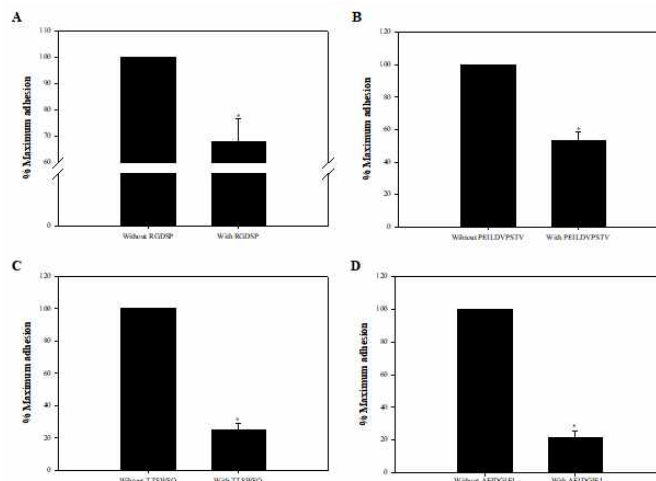


그림 28. Integrin 활성화를 위한 제작된 adhesion peptide 서열의 검증. * $p < 0.05$.

: 돼지 정원줄기세포 세포막 표면에 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide인 GCGWGRGDSPG의 농도 최적화하기 위해 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 0, 400, 800, 1200, 1600 μ M RGDSP peptide의 농도에 따라, 서로 다른 양의 단백질 signaling에서 돼지 정원줄기세포가 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었고, 그 후 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 800 μ M과 1600 μ M RGDSP peptide가 첨가된 조건에서 형성된 돼지 정원줄기세포 콜로니의 크기가 유의적으로 큰 것이 확인되었다 (그림 29).

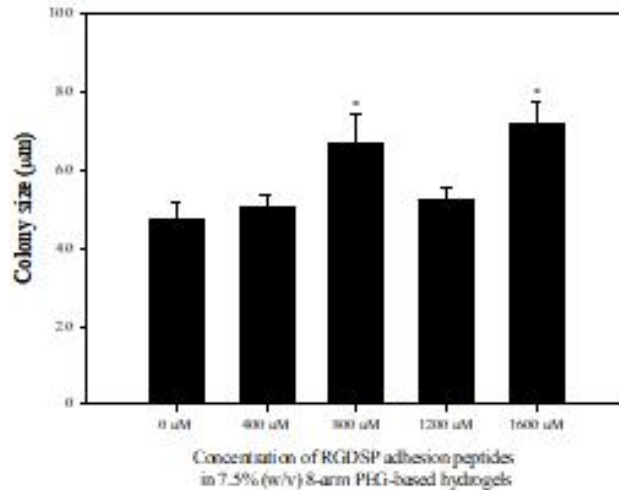


그림 29. RGDSP peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μ M가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. * p <0.05.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*의 경우 800 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 높게 발현되었다. *NANOG*의 경우, 다른 그룹과 달리 400 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 많이 발현되었으나, 유의적인 차이는 없었다. *EPCAM*의 경우에는 RGDSP peptide를 첨가하지 않은 그룹에서 유의적으로 가장 많이 발현되었다. *THY1*의 경우, 1200 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현되었고, *UCHL1*의 경우 800 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현됨을 보였다. 추가적으로 확인한 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *LIN28*의 경우, 400 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 적게 발현되었다. 또한, *CDHI*은 다른 그룹과 달리 1600 μ M RGDSP peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 많이 발현되었다 (그림 30).

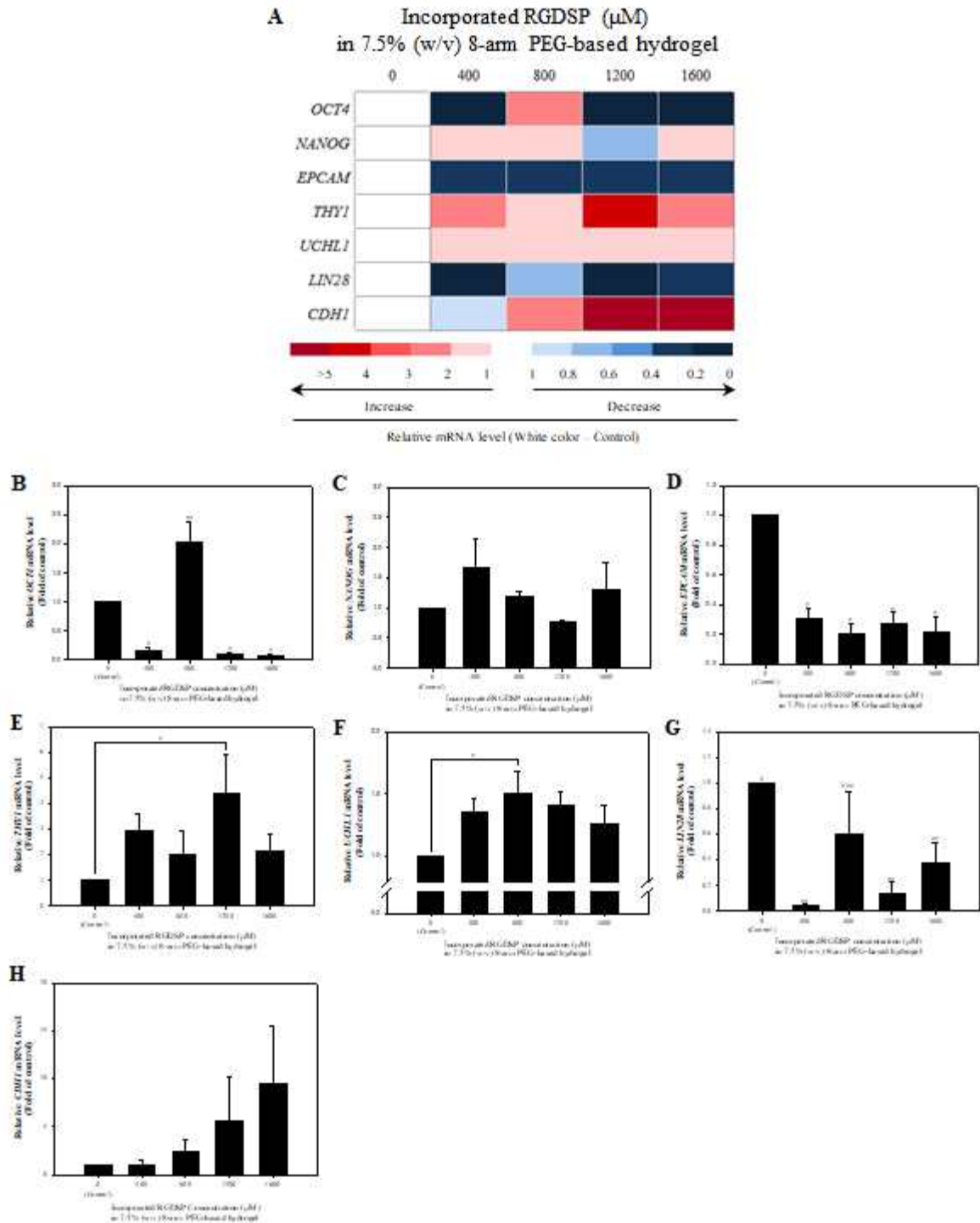


그림 30. RGDSP peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM이 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCLH1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석.

*** $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 800 μM GCGWGRGDSP peptide를 이용한 integrin $\alpha_v\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

: 돼지 정원줄기세포 세포막 표면에 존재하는 integrin $\alpha_4\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide인 GRRDPEILDVPSTVRRD의 농도 최적화하기 위해 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 0, 400, 800, 1200, 1600 μM PEILDVPSTV peptide의 농도에 따라, 서로 다른 양의 단백질 signaling에서 돼지 정원줄기세포가 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었고, 그 후 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 800 μM 과 1200 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 조건에서 형성된 돼지 정원줄기세포 콜로니의 크기가 유의적으로 큰 것이 확인되었다 (그림 31).

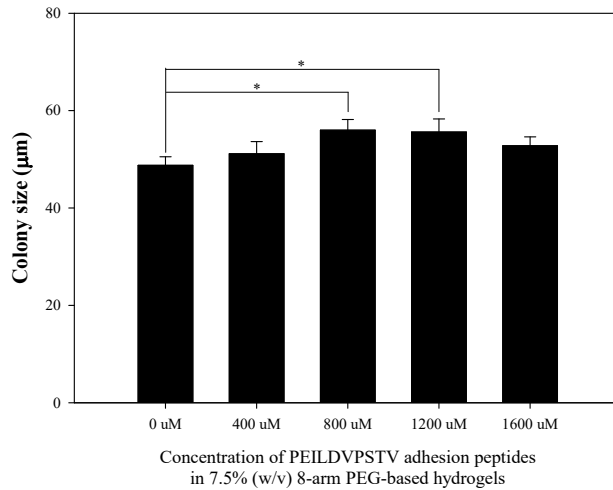


그림 31. PEILDVPSTV peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM 가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. * $p < 0.05$.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*의 경우 800 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 높게 발현되었음. *NANOG*의 경우, 800 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 많이 발현되었음. *EPCAM*의 경우에는 1200 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 그룹에서 유의적으로 가장 많이 발현되었음. *THY1*의 경우, 400 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 많이 발현되었고, *UCHL1*의 경우 모든 그룹에서 비슷하게 발현되었으나, 800 μM 과 1600 μM PEILDVPSTV peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현됨을 보였음. 추가적으로 확인한 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *LIN28*의 경우, 다른 그룹과 달리 PEILDVPSTV peptide가 첨가되지 않은 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 많이 발현되었음. 또한, *CDHI*은 모든 그룹에서 비슷하게 발현되었으나, PEILDVPSTV peptide가 첨가되지 않은 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 많이 발현되었다 (그림 32).

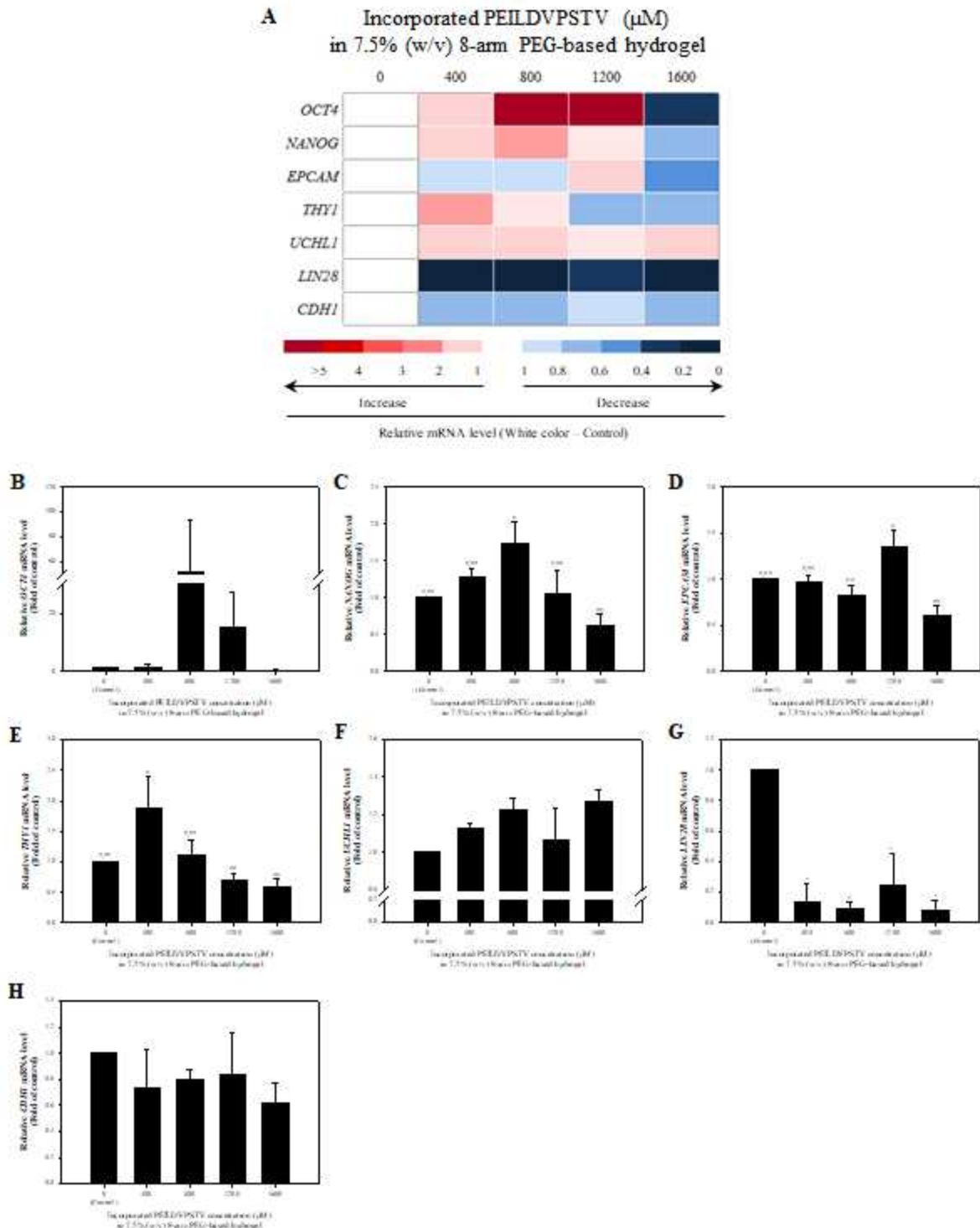


그림 32. PEILDVPSTV peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM 이 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCHL1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석. *** $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 1200 μM GRRDPEILDVPSTVRRD peptide를 이용한 integrin $\alpha_4\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

: 돼지 정원줄기세포 세포막 표면에 존재하는 integrin $\alpha_6\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는

adhesion peptide인 GCRD TTWSQ의 농도 최적화하기 위해 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 0, 400, 800, 1200, 1600 μM TTWSQ peptide의 농도에 따라, 서로 다른 양의 단백질 signaling에서 돼지 정원줄기세포가 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었고, 그 후 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 800 μM 과 1600 μM TTWSQ peptide가 첨가된 조건에서 형성된 돼지 정원줄기세포 콜로니의 크기가 유의적으로 큰 것이 확인되었다 (그림 33).

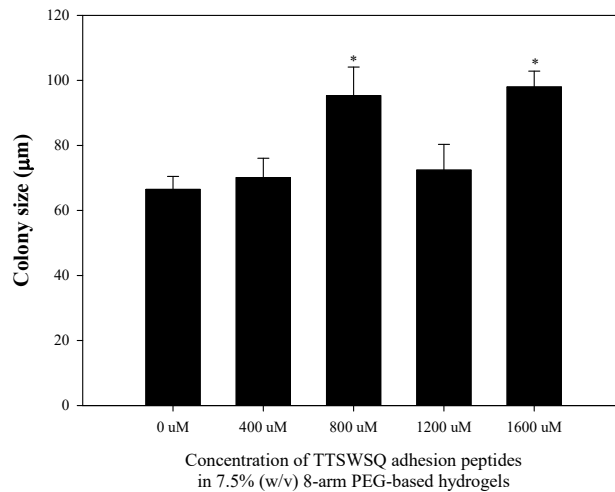


그림 33. TTWSQ peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM 가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. * $p < 0.05$.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*의 경우 800 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 높게 발현되었다. *NANOG*의 경우, 800 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 많이 발현되었음. *EPCAM*의 경우에는 400 μM TTWSQ peptide가 첨가된 그룹에서 유의적으로 가장 많이 발현되었으며, *THY1*의 경우, 800 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 많이 발현되었고, *UCHL1*의 경우 1200 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현됨을 보였다. 추가적으로 확인한 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *LIN28*의 경우, 400 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 적게 발현되었으나, 유의적인 차이는 없었다. 또한, *CDHI*은 800 μM TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 많이 발현되었다 (그림 34).

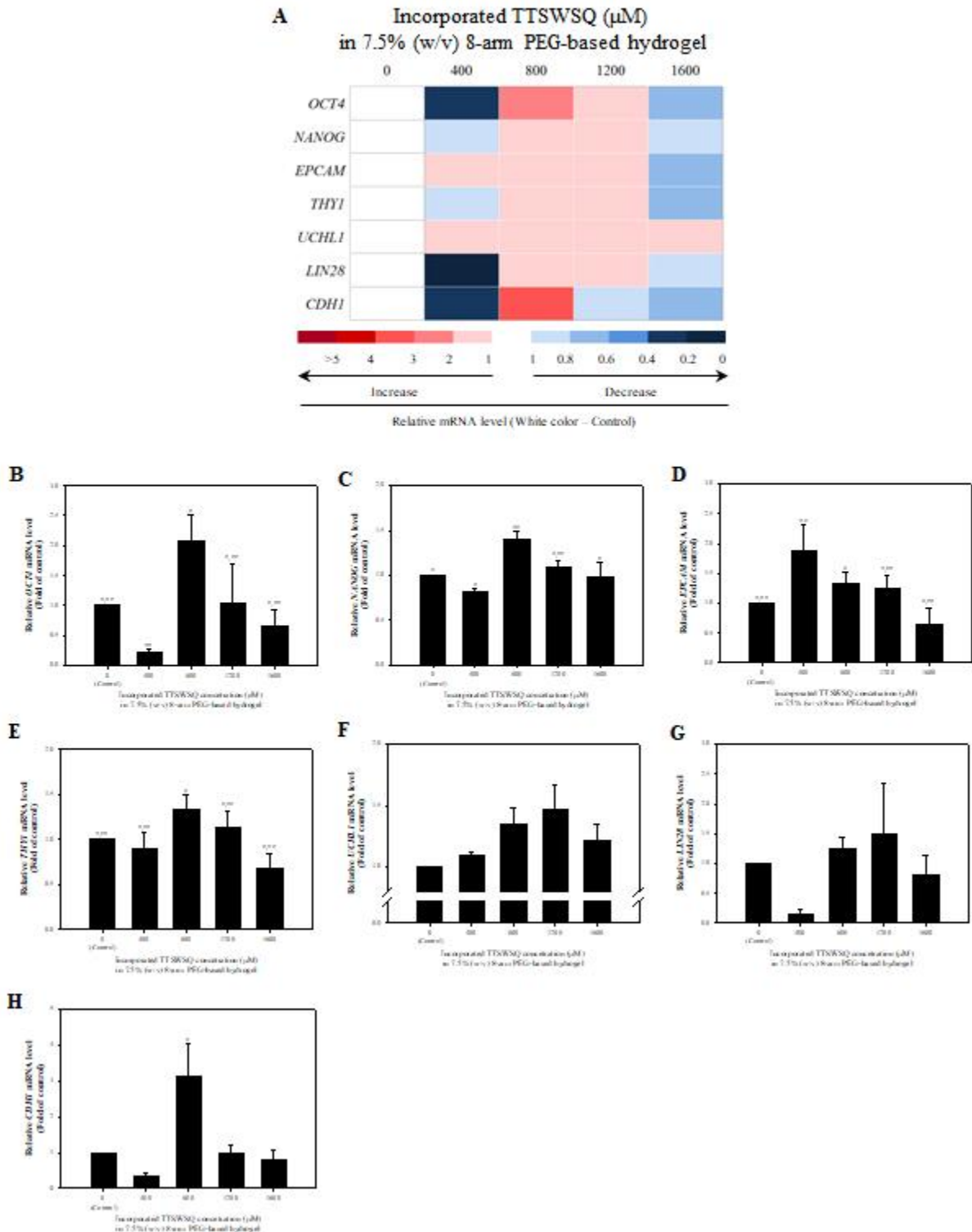


그림 34. TTSWSQ peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM 이 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCLH1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석. $^{***}p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 800 μM GCRDTTWSWSQ peptide를 이용한 integrin $\alpha_6\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

: 돼지 정원줄기세포 세포막 표면에 존재하는 integrin $\alpha_9\beta_1$ 활성화를 유도할 수 있는 adhesion peptide인 GCRRRRDRDAEIDGIELG의 농도 최적화를 위해 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 0, 400, 800, 1200, 1600 μ M AEIDGIEL peptide의 농도에 따라, 서로 다른 양의 단백질 signaling에서 돼지 정원줄기세포가 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었고, 그 후 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 1600 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 조건에서 형성된 돼지 정원줄기세포 콜로니의 크기가 유의적으로 큰 것이 확인되었다 (그림 35).

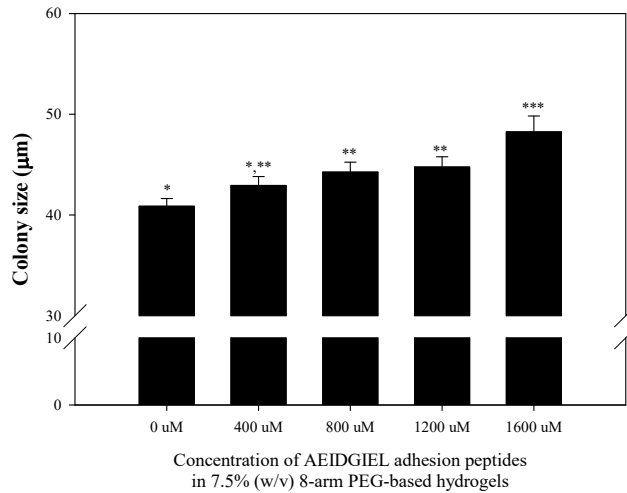


그림 35. AEIDGIEL peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μ M가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. ***,*** $p < 0.05$.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*의 경우 AEIDGIEL peptide가 첨가되지 않은 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 높게 발현되었다. *NANOG*의 경우, 400 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 많이 발현되었다. *EPCAM*의 경우에는 800 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 그룹에서 수치상으로 많이 발현되었으나, 모든 그룹에서 비슷한 수준을 보였다. *THY1*의 경우, 800 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현되었고, *UCHL1*의 경우 1200 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치적으로 가장 적게 발현됨을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 추가적으로 확인한 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *LIN28*의 경우, 1200 μ M과 1600 μ M AEIDGIEL peptide가 각각 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 많이 발현하였다. 또한, *CDHI*은 1600 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 많이 발현되었으나, 유의적인 차이는 없었다 (그림 36).

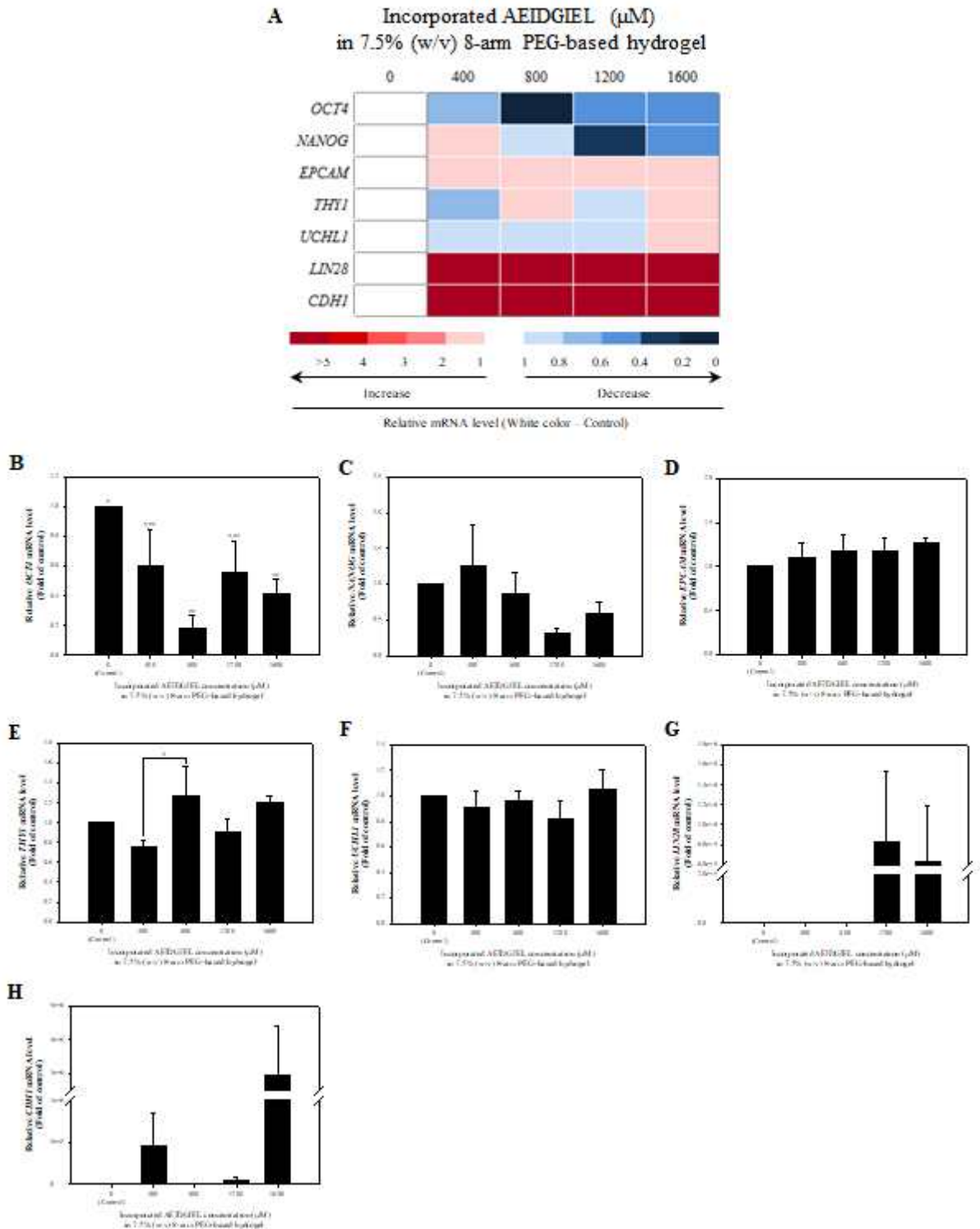


그림 36. AEIDGIEL peptide 0, 400, 800, 1200, 1600 μM 이 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCHL1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석. *** $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 1600 μM GCRRRRDRDAEIDGIELG peptide를 이용한 integrin $\alpha_9\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

: 이후, 돼지 정원줄기세포 미분화 유지 및 증식을 자극할 수 있는 adhesion peptide 조합 탐색하고자 하였다. 미분화 상태의 돼지 정원줄기세포 표면에 활성화 형태로 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ 을 다양한 조합에 의해 활성화시키기 위해, 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 내부에 800 μ M RGDSP, 1200 μ M PEILDVPSTV, 800 μ M TTSWSQ peptide들이 표 2와 같이 결합되어졌으며, 이러한 각각의 비세포성 니쉬에서 돼지 정원줄기세포들은 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었다.

표 2. Adhesion peptide 조합

활성화 타겟 Integrin heterodimer	Adhesion peptide 서열
None	-
Integrin $\alpha_v\beta_1$	GCGWGRGDS \underline{P} G
Integrin $\alpha_4\beta_1$	GCRRDPEILDVPSTVRRD
Integrin $\alpha_6\beta_1$	GCRD <u>TT</u> SWSQ
Integrin $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$	GCGWGRGDS \underline{P} G and GCRRDPEILDVPSTVRRD
Integrin $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$	GCGWGRGDS \underline{P} G and GCRD <u>TT</u> SWSQ
Integrin $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$	GCRRDPEILDVPSTVRRD and GCRD <u>TT</u> SWSQ
Integrin $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$	GCGWGRGDS \underline{P} G, GCRRDPEILDVPSTVRRD, and GCRD <u>TT</u> SWSQ

: 모든 조건들에서 구형 콜로니 형성이 확인되었으며 (그림 37), 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, integrin $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ 모두가 활성화되어졌을 때 유의적으로 가장 크기가 큰 돼지 정원줄기세포 콜로니가 확인되었다 (그림 38).

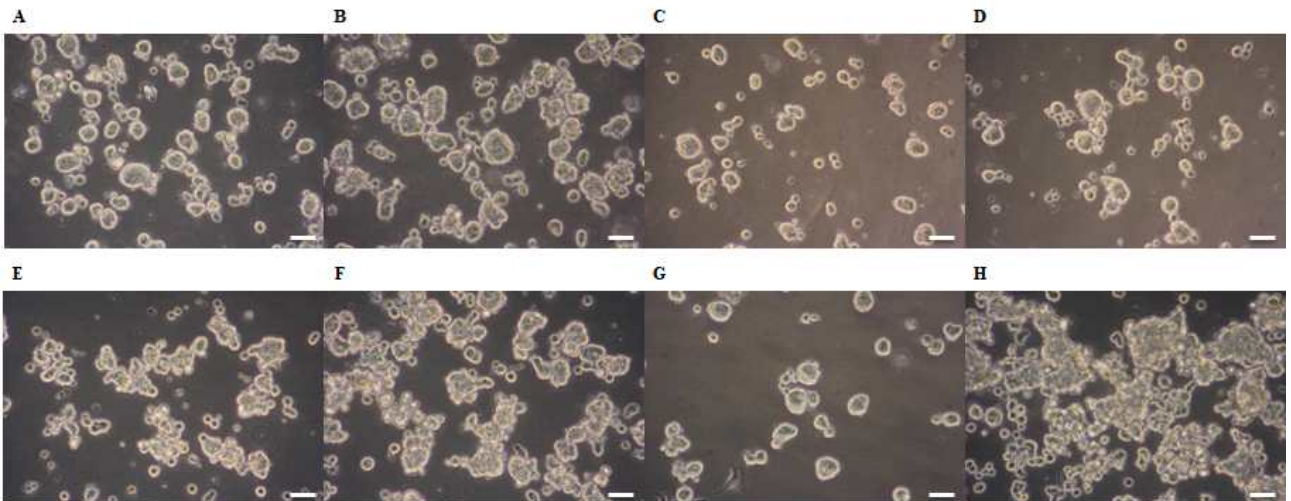


그림 37. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV 그리고/또는 TTSWSQ peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 형성과 형태 비교. None (A), 800 μ M RGDSP (B), 1200 μ M PEILDVPSTV (C), 800 μ M TTSWSQ (D), 800 μ M RGDSP와 1200 μ M PEILDVPSTV (E), 800 μ M RGDSP와 800 μ M TTSWSQ (F), 1200 μ M PEILDVPSTV와 800 μ M TTSWS (G), 800 μ M RGDSP, 1200 μ M PEILDVPSTV와 800 μ M TTSWSQ (H) peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel. Scale bar = 50 μ m.

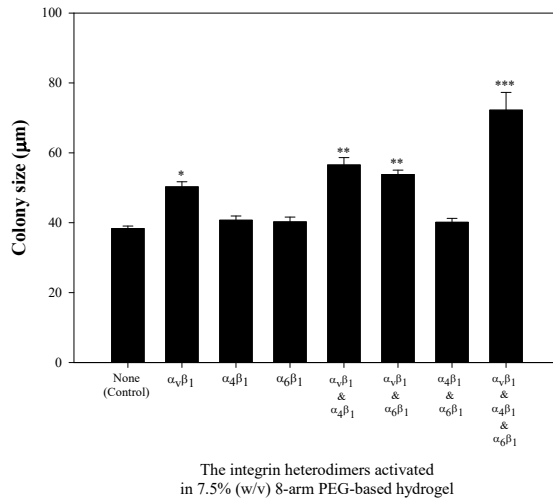


그림 38. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV 그리고/또는 TTSWSQ peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. *,**,*** $p < 0.05$.

- : 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 또한, 각각 조건들이 돼지 정원줄기세포의 미분화유지에 미치는 영향을 확인하기 위해, 정원줄기세포에서 특이적으로 발현되는 세포 표면 단백질인 GFR α 1의 발현을 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정하였다.
- : 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*의 경우 adhesion peptide가 첨가된 모든 그룹에서 adhesion peptide가 첨가되지 않은 그룹보다 높게 발현하는 것이 확인되었다. 또한, 800 μ M TTSWSQ peptide만 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 높은 *OCT4* 발현율을 보여주었다. *NANOG*의 경우, 800 μ M RGDSP peptide와 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현되었다. *EPCAM*의 경우에는 adhesion peptide가 첨가되지 않은 그룹, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide만 첨가된 그룹, 800 μ M TTSWSQ peptide만 첨가된 그룹, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide와 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 그룹에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 높게 발현되었다. *THY1*의 경우, 800 μ M RGDSP peptide와 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 가장 많이 발현되었고, *UCHL1*의 경우 모든 그룹에서 비슷하게 발현되었으나, 800 μ M RGDSP peptide와 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 수치상으로 가장 많이 발현되었다. 추가적으로 확인한 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *LIN28*의 경우, 다른 그룹과 달리 adhesion peptide가 첨가되지 않은 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 많이 발현되었다. 또한, *CDHI*은 adhesion peptide가 첨가된 모든 그룹에서 adhesion peptide가 첨가되지 않은 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based

hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포보다 많이 발현되었다. 또한, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide만 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 가장 높은 *CDHI* 발현율을 보여주었다 (그림 39).

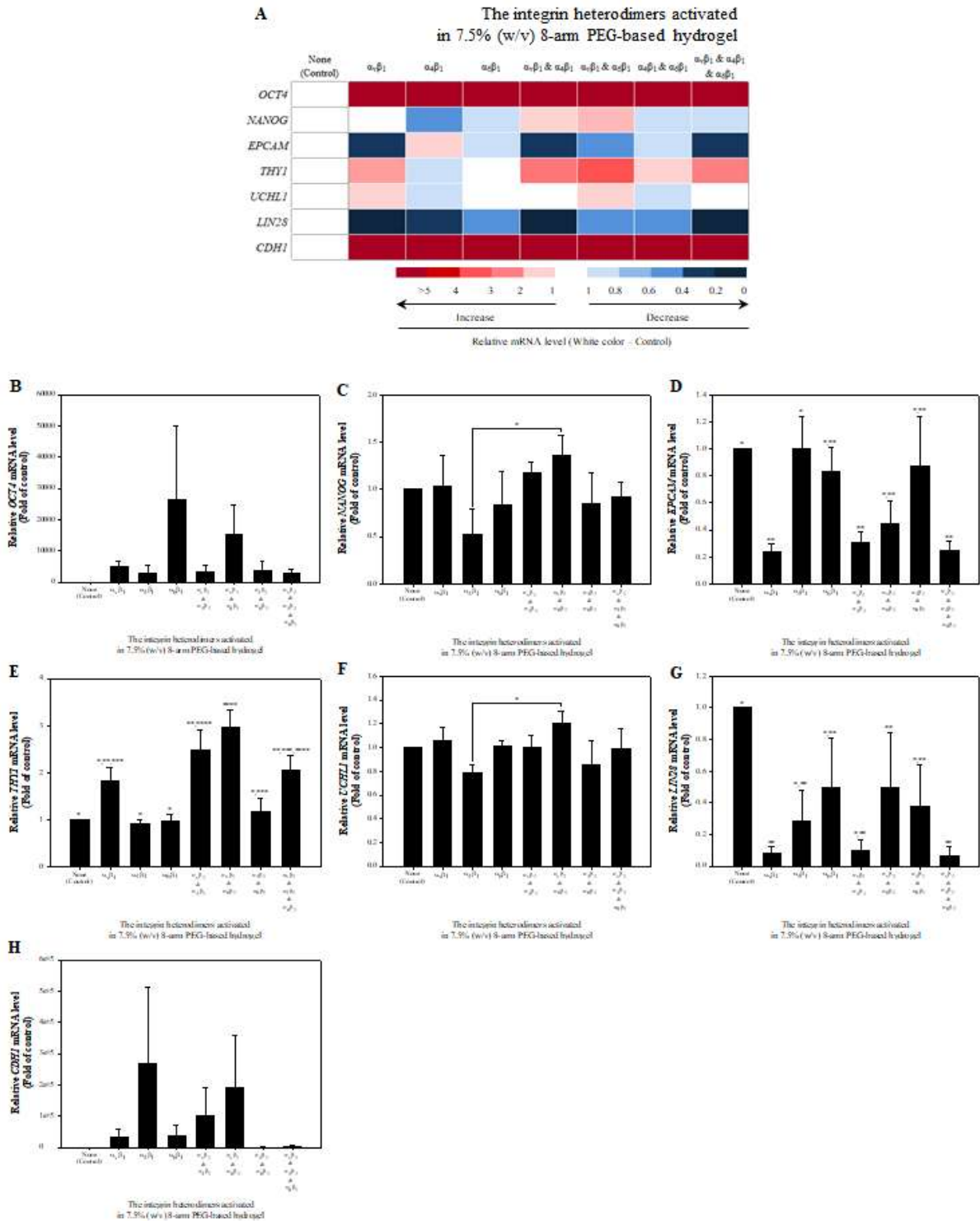


그림 39. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV 또는 TTSWSQ peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCHL1* (F), *LIN28* (G), *CDHI* (H) 발현 분석. **, ***, **** $p < 0.05$.

: 정원줄기세포 특이적 발현 단백질인 GFR $\alpha 1$ 을 가지고 있는 돼지 정원줄기세포의 비율을 각각 조건들에서 체외배양 후 조사했을 때, 모든 그룹에서 유사한 비율을 보여 주었지만, 이러한 비율들은 체외배양 없이 돼지 정소에서 직접 회수된 정원줄기세포 그룹보다 유의적으로 높은 비율을 보여주었다 (그림 40).

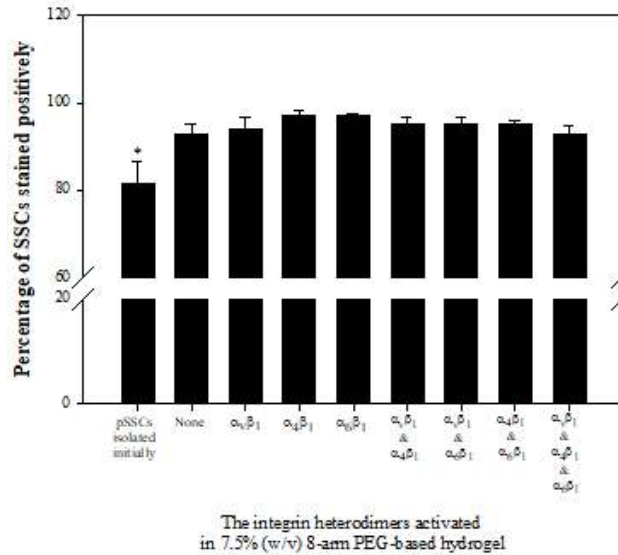


그림 40. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV 또는 TTWSQ peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 단백질 GFR $\alpha 1$ 의 발현 분석. * $p < 0.05$.

: 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 800 μ M GCGWGRGDSPG과 800 μ M GCRDTTWSWQ peptide를 이용한 integrin $\alpha_v\beta_1$ 과 Integrin $\alpha_6\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

: 추가로 integrin $\alpha_9\beta_1$ 을 활성화시킬 수 있는 AEIDGIEL adhesion peptide를 포함하였다. 미분화상태의 돼지 정원줄기세포 표면에 활성화 형태로 존재하는 integrin $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ 및 $\alpha_9\beta_1$ 을 다양한 조합에 의해 활성화시키기 위해, 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 내부에 800 μ M RGDSP, 1200 μ M PEILDVPSTV, 800 μ M TTWSQ, 1600 μ M AEIDGIEL peptide들이 표 2 또는 표 3과 같이 결합되었으며, 이러한 각각의 비세포성니쉬에서 돼지 정원줄기세포들은 31°C, 5% CO₂ 조건에서 7일 동안 배양되었다.

: 표 3에서 제시된 조합은 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDH1*의 발현 수준을 비교하여 가장 효과적인 800 μ M RGDSP와 800 μ M TTWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel (그림 39)에 추가적으로 integrin $\alpha_9\beta_1$ 을 활성화시킬 수 있는 AEIDGIEL adhesion peptide를 포함하였다.

: 표 4에서 제시된 조합은 체외배양 후 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 유의적으로 가장 크기가 큰 돼지 정원줄기세포 콜로니가 확인된 그룹인 800 μ M RGDSP,

1200 μ M PEILDVPSTV, 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel (그림 38)에 추가적으로 integrin $\alpha_9\beta_1$ 을 활성화시킬 수 있는 AEIDGIEL adhesion peptide를 포함하였다.

표 3. Adhesion peptide 조합

활성화 타겟 Integrin heterodimer	Adhesion peptide 서열
Integrin $\alpha_V\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$	GCGWGRGDS <u>SPG</u> and GCRDTT <u>SW</u> SQ <u>G</u>
Integrin $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, and $\alpha_9\beta_1$	GCGWGRGDS <u>SPG</u> , GCRDTT <u>SW</u> SQ <u>G</u> , and GCRRRRDRDAEIDGIEL <u>G</u>

표 4. Adhesion peptide 조합

활성화 타겟 Integrin heterodimer	Adhesion peptide 서열
Integrin $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, and $\alpha_6\beta_1$	GCGWGRGDS <u>SPG</u> , GCRRDPEILDVPSTVRRD, and GCRDTT <u>SW</u> SQ <u>G</u>
Integrin $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, and $\alpha_6\beta_1$	GCGWGRGDS <u>SPG</u> , GCRRDPEILDVPSTVRRD, GCRDTT <u>SW</u> SQ <u>G</u> , and GCRRRRDRDAEIDGIEL <u>G</u>

: 표 2에 제시된 모든 조건들에서 구형 콜로니 형성이 확인되었으며 (그림 41), 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, integrin $\alpha_V\beta_1$ 과 $\alpha_6\beta_1$ 가 활성화되었을 때 유의적으로 큰 돼지 정원줄기세포 콜로니가 확인되었다 (그림 42).

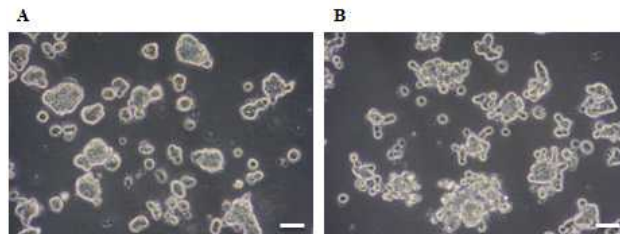


그림 41. Adhesion peptide 서열 RGDSP, TTSWSQ 그리고/또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 형성과 형태 비교. 800 μ M RGDSP와 800 μ M TTSWSQ (A), 800 μ M RGDSP, 800 μ M TTSWSQ와 1600 μ M AEIDGIEL (B) peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel. Scale bar = 50 μ m.

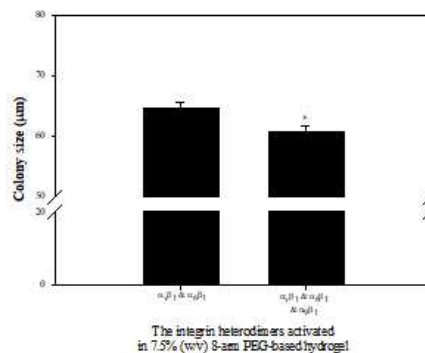
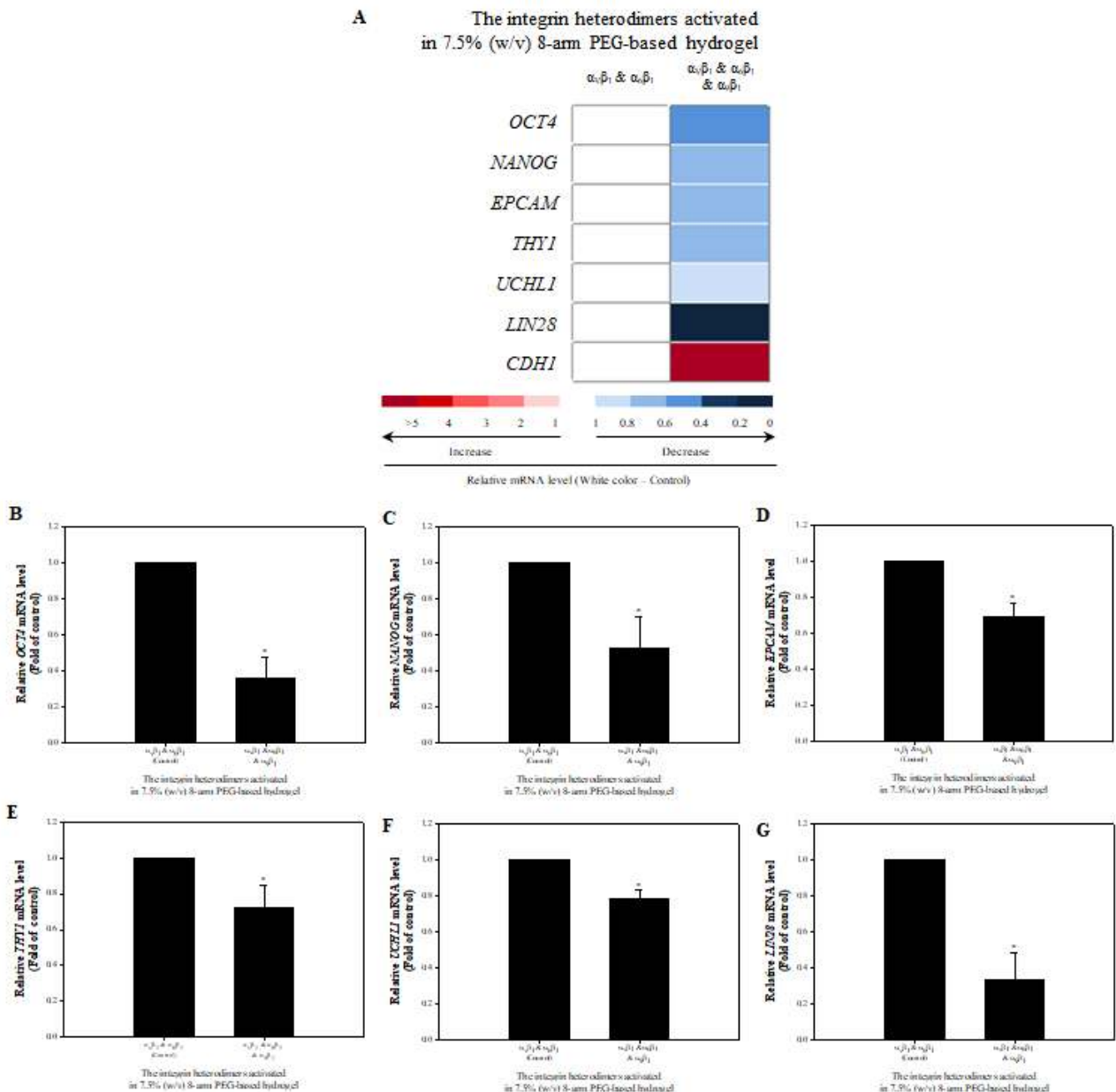


그림 42. Adhesion peptide 서열 RGDSP, TTSWSQ 그리고/또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교. * $p < 0.05$.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 또한, 각각 조건들이 돼지 정원줄기세포의 미분화유지에 미치는 영향을 확인하기 위해, 정원줄기세포에서 특이적으로 발현되는 세포 표면 단백질인 $GFR\ \alpha\ 1$ 의 발현을 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정하였다.

: 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*의 경우 800 μM RGDSP peptide와 800 μM TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 많이 발현되었다. 반면에, *CDHI*의 경우 800 μM RGDSP peptide, 800 μM TTSWSQ peptide와 1600 μM AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 많이 발현되었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다 (그림 43).



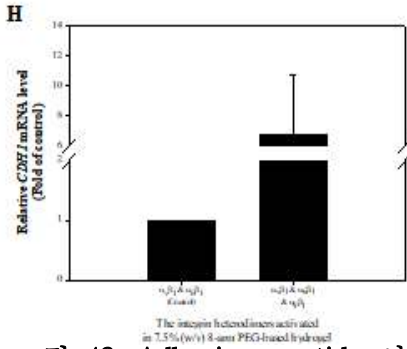


그림 43. Adhesion peptide 서열 RGDSP, TTSWSQ 또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCHL1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석. * $p < 0.05$.

: 정원줄기세포 특이적 발현 단백질인 $GFR\alpha 1$ 을 가지고 있는 돼지 정원줄기세포의 비율을 각각 조건들에서 체외배양 후 조사했을 때, 두 그룹에서 유사한 비율을 보여주었지만, 이러한 비율들은 체외배양 없이 돼지 정소에서 직접 회수된 정원줄기세포 그룹보다 유의적으로 높은 비율을 보여주었다 (그림 44).

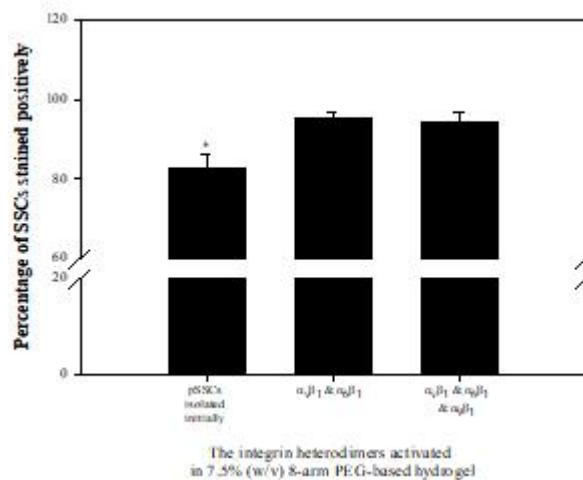


그림 44. Adhesion peptide 서열 RGDSP, TTSWSQ 또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 단백질 $GFR\alpha 1$ 의 발현 분석. * $p < 0.05$.

: 표 3에 제시된 모든 조건들에서 구형 콜로니 형성이 확인되었으며(그림 45), 형성된 콜로니의 크기를 비교했을 때, 비슷한 크기의 돼지 정원줄기세포 콜로니가 확인되었다 (그림 46).

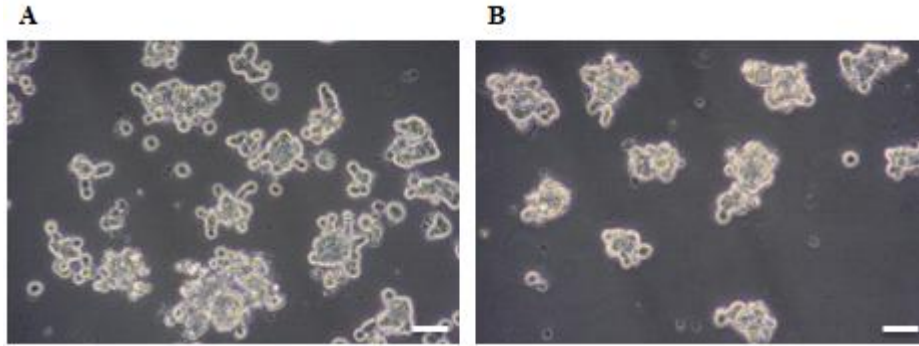


그림 45. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV, TTSWSQ 그리고/또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 형성과 형태 비교. 800 μ M RGDSP, 1200 μ M PEILDVPSTV와 800 μ M TTSWSQ (A), 8800 μ M RGDSP, 1200 μ M PEILDVPSTV, 800 μ M TTSWSQ와 1600 μ M AEIDGIEL (B) peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel. Scale bar = 50 μ m.

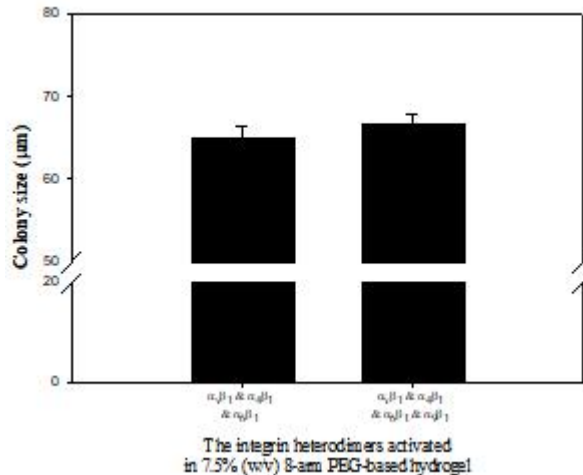


그림 46. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV, TTSWSQ 그리고/또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 조건에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 콜로니 크기 비교.

: 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자인 *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *UCHL1*, *LIN28*, *CDHI*의 발현을 real-time PCR을 통해 측정하였다. 또한, 각각 조건들이 돼지 정원줄기세포의 미분화유지에 미치는 영향을 확인하기 위해, 정원줄기세포에서 특이적으로 발현되는 세포 표면 단백질인 GFR α 1의 발현을 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정하였다.

: 그 결과, 정원줄기세포의 특이적 발현 유전자를 살펴보면, *OCT4*, *NANOG*, *EPCAM*, *THY1*, *LIN28*의 경우 800 μ M RGDSP peptide, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide와 800 μ M TTSWSQ peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 많이 발현되었다. 반면에, *UCHL1*의 경우 800 μ M RGDSP peptide, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide, 800 μ M TTSWSQ peptide와 1600 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된

돼지 정원줄기세포에서 유의적으로 많이 발현되었다. 또한, *CDH1*의 경우 800 μ M RGDSP peptide, 1200 μ M PEILDVPSTV peptide, 800 μ M TTWSQ peptide와 1600 μ M AEIDGIEL peptide가 첨가된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 배양된 돼지 정원줄기세포에서 많이 발현되었지만 유의적인 차이는 보이지 않았다 (그림 47).

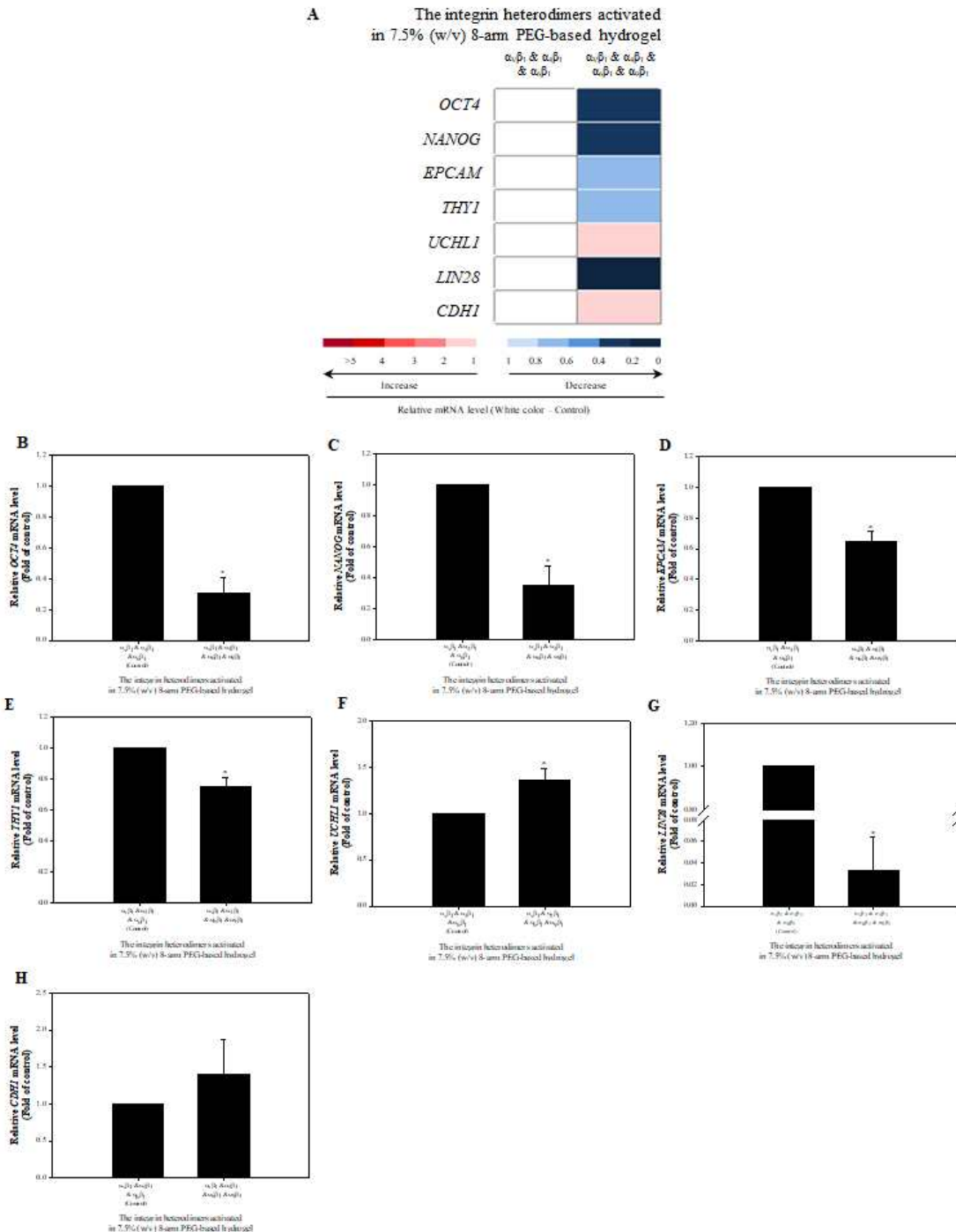


그림 47. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV, TTWSQ 또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 유전자 *OCT4* (B), *NANOG* (C), *EPCAM* (D), *THY1* (E), *UCHL1* (F), *LIN28* (G), *CDH1* (H) 발현 분석. * $p < 0.05$.

: 정원줄기세포 특이적 발현 단백질인 GFR $\alpha 1$ 을 가지고 있는 돼지 정원줄기세포의 비율을 각각 조건들에서 체외배양 후 조사했을 때, 두 그룹에서 유사한 비율을 보여주었지만, 이러한 비율들은 체외배양 없이 돼지 정소에서 직접 회수된 정원줄기세포 그룹보다 수치상으로 높은 비율을 보여주었다 (그림 48).

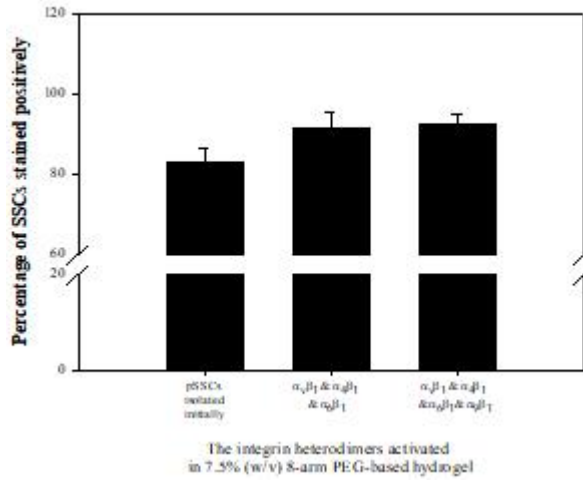


그림 48. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV, TTWSQ 또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 단백질 GFR $\alpha 1$ 의 발현 분석.

: 표 3와 표 4에서 제시된 다양한 조합 그룹을 비교 분석한 결과 (그림 49), 이러한 결과들로부터 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel내에서 800 μ M GCGWGRGDSPPG과 800 μ M GCRDTTWSQ peptide를 이용한 integrin $\alpha_v\beta_1$ 과 integrin $\alpha_6\beta_1$ 의 활성화는 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

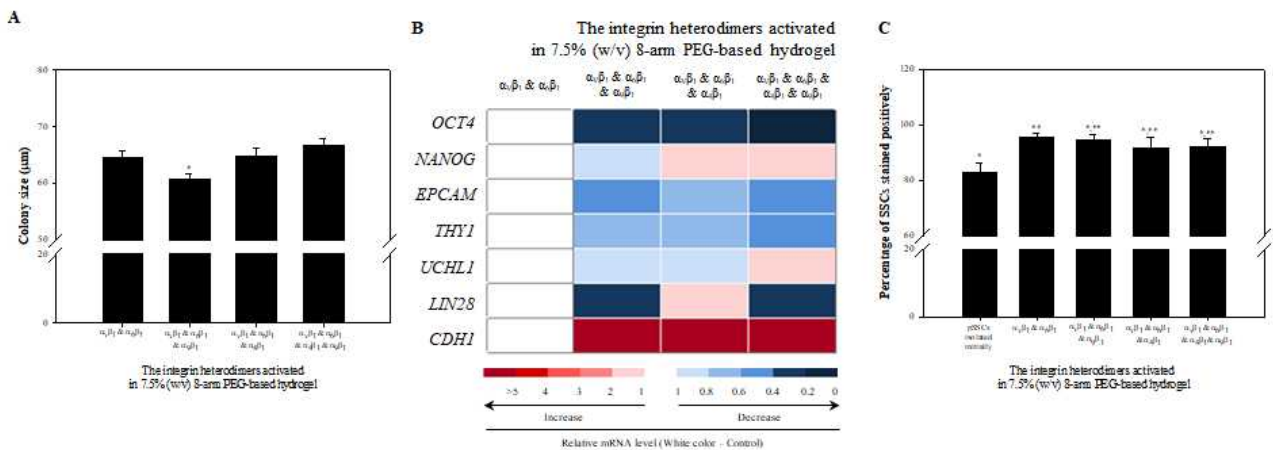


그림 49. Adhesion peptide 서열 RGDSP, PEILDVPSTV, TTWSQ 그리고/또는 AEIDGIEL peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특성 분석 비교. 콜로니 크기 (A), 정원줄기세포 특이적 유전자의 발현 분석 (B), 정원줄기세포 특이적 단백질 GFR $\alpha 1$ 의 발현 분석 (C). $^{**}p < 0.05$.

- : 최종적으로 결정된 조건인 integrin $\alpha_v\beta_1$ 과 integrin $\alpha_6\beta_1$ 을 활성화시키는 800 μ M GCGWGRGDSPG과 800 μ M GCRDTTWSQ peptide가 결합된 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel에서 체외배양한 후, 배양된 돼지 정원줄기세포의 미분화유지를 알아보기 위해, 정원줄기세포에서 특이적으로 발현되는 단백질인 OCT4, NANOG, SOX2, PLZF, GFR α 1, UCHL1의 발현을 유세포 분석기(flow cytometry)를 통해 측정하였다.
- : 정원줄기세포 특이적 발현 단백질들을 가지고 있는 돼지 정원줄기세포의 비율을 최종 조건에서 체외배양 후 조사했을 때, PLZF 단백질이 유의적으로 가장 낮은 비율 (89.23 ± 1.24)을 보여주었지만, 이외에 다른 단백질 OCT4, NANOG, SOX2, GFR α 1, UCHL1은 95% 이상의 높은 비율을 보여주었다 (그림 50).

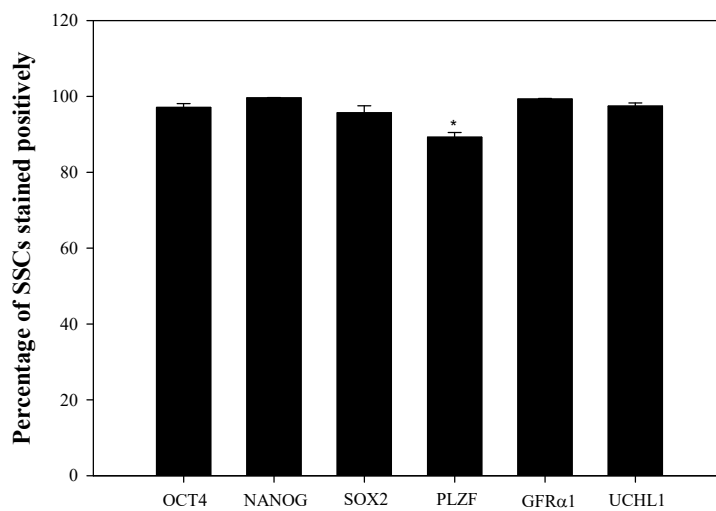


그림 50. Adhesion peptide 서열 RGDSP과 TTWSQ peptide가 첨가된 3D 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 배양시스템에서 배양된 돼지 정원줄기세포의 특이적 단백질 OCT4, NANOG, SOX2, PLZF, GFR α 1, UCHL1의 발현 분석. * $p < 0.05$.

♣ 연구수행결과

- : 7.5% (w/v) 8-arm PEG-based hydrogel 내에서 integrin $\alpha_v\beta_1$ 과 integrin $\alpha_6\beta_1$ 을 활성화시키는 각각의 800 μ M GCGWGRGDSPG과 800 μ M GCRDTTWSQ adhesion peptide가 결합된 3D 체외배양 시스템은 돼지 정원줄기세포의 증식 및 미분화유지에 매우 효과적임을 최종적으로 확인할 수 있었다.

♣ 향후 연구추진계획

- : 최종 개발된 돼지 정원줄기세포의 맞춤형 3D 비세포성 니쉬에서 체외 배양된 돼지 정원줄기세포의 정상성 검증이 수행되고 있다. 이를 위해, 최적화된 3D 배양 환경에서 체외 배양된 돼지 정원줄기세포는 누드마우스를 이용한 xenotransplantation이 수행되고 있는 중이다.

● 제2세부과제: 형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자 생산 기술 개발

1. 돼지 정원줄기세포의 돼지 정소내 이식 기술 개발

가. In vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발

♣ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

♣ 연구수행내용

: 초기 실험은 수컷 돼지의 정소에 정원줄기세포를 효과적으로 주입, 이식할 수 있는 방법을 수립하고자 하였다. 도축 또는 거세된 돼지로부터 회수된 정소를 이용하여 해부학적 구조를 파악하고 정소의 해부학적 특징에 따른 정원줄기세포의 주입 위치 및 주입량에 대하여 검토하였다. 또한 정원줄기세포 주입을 위한 needle 또는 catheter의 직경 및 크기 여부를 검토하였고, 형광표지인자를 부착시킨 세포 또는 색소를 이용하여 주입한 세포 또는 색소가 정소 내에 어떻게 분포하는지를 확인함으로써 in vivo 상에서의 정원줄기세포 이식을 준비하였다 (표 6).

(1) In vitro 상태에서 정소내 세포 주입 위치 및 주입량 검토

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 정소내 정원줄기세포 주입위치를 정소망(rete testis) 및 고환소엽(lobules of testis)에 Trypan Blue 색소를 주입 후 분포를 관찰하였다. 그 결과, 주입 위치가 정소망일 때, 원활히 주입이 이루어지는 것을 확인하였고, 정소 내 용액 주입량을 측정한 결과 정소의 크기에 따라 차이가 있지만 대략 3~10 ml 의 주입량이 적정수준으로 조사되었다 (표 5).

표 5. 돼지 정소 크기에 따른 세포부유액의 적정 주입량

정소 크기 (장축)	DPBS+0.05% PVA 적정 주입량 (ml)			
	총 주입량	세포 주입 전	세포부유액 주입	세포 주입 후
직경 약 7 cm ~	10	2	6	2
직경 약 4~7 cm	5	1	3	1
직경 약 ~ 4 cm	3~4	1	1~2	1

표 6. In vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식

개체번호	품종	개체특성	투여량	주입세포	실험내역
OF1	white yucatan miniature pig	GTKO hetero	5 ml	-	0.5% trypan blue를 이용한 주입액 분포확인
OF2	white yucatan miniature pig	GTKO/CD39 hetero (F0, 복제)	5 ml	PFF	kimsa & 0.5% trypan blue를 이용한 주입액 분포확인
OF4	white yucatan miniature pig	GTKO/CD39 hetero / 정상 성체 (F1 세대)	3 ml	PFF	4% paraformaldehyde over night and 0.5% trypan blue를 이용한 주입액 분포확인
Gumbol	랜드레이스* 요크셔	거세	200 ul	GFP MSC	파라핀 처치 및 조직 검사를 통한 형광발현여부 확인

Gumbo2	렌드레이스* 요크셔	거세	200 ul	GFP MSC	
Gumbo3	렌드레이스* 요크셔	거세	-	-	실린지펌프 test, 0.5% trypan blue를 이용한 주입액 분포확인
Gumbo4	렌드레이스* 요크셔	거세	-	-	
Gumbo5	렌드레이스* 요크셔	거세	1 ml	PFF	
LPC1	3원교잡	도축개체	-	-	
LPC2	3원교잡	도축개체	20 ml	-	실린지펌프 test: 적정주입량 산정, 0.5% trypan blue 주입
Gumbo6	렌드레이스* 요크셔	거세	-	-	실린지 test, 0.5% trypan blue, 주입속도 측정
Gumbo7	렌드레이스* 요크셔	거세	-	-	실린지 test, 0.5% trypan blue, 정소상체 차단 실험
Gumbo8	렌드레이스* 요크셔	거세	-	-	실린지 test, 0.5% trypan blue, UV-PMS, 나비핀 테스트
HR1	3원교잡	거세	1 ml	0.5% trypan blue	실린지펌프 test, 0.5% trypan blue를 이용한 주입액 분포확인
HR2	3원교잡	거세	1 ml	-	실린지 test, 0.6% trypan blue, 일반실린지 테스트
HR3	3원교잡	거세	3 ml	UV-PMS	실린지 test, 0.5% trypan blue, UV-PMS, 나비핀 테스트
HR4	3원교잡	거세	3 ml	-	실린지 test, 0.6% trypan blue, UV-PMS, 18G 천자침
HR5	3원교잡	3일령 자돈 거세정소	1 ml	-	세포주입방식 test, 0.1% PVA vs 0.05% 테스트
HR6	3원교잡	3일령 자돈 거세정소	3 ml	-	
HR7	3원교잡	3일령 자돈 거세정소	5 ml	-	
HR8	3원교잡	30일령 자돈 거세정소	10 ml	UV-PMS	세포주입방식 (PBS 주입중 주사기로 세포주입)
HR9	3원교잡	30일령 자돈 거세정소	12 ml	UV-PMS	
HR10	3원교잡	30일령 자돈 거세정소	14 ml	UV-PMS	
HR11	3원교잡	30일령 자돈 거세정소	16 ml	UV-PMS	
HR12	3원교잡	30일령 자돈 거세정소	18 ml	UV-PMS	

(2) 정원줄기세포 주입을 위한 needle 및 catheter 적정성 조사

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 정원줄기세포 주입을 위한 적절한 사이즈의 needle을 찾기 위해 각각 18~25 gauge를 사용하여 색소를 주입 후 색소 분포를 조사하였다. 또한 needle 길이를 각각 16, 32, 60mm를 사용하여 색소를 주입 후 정소 내 주입액 분포를 확인하였다. 그 결과, 여러 가지의 needle 사이즈 및 gauge를 검토하여 최적의 조건을 확립하였으며 (표 7) 초음파 관찰을 통해 needle의 위치를 확인함 (그림 51).

표 7. 돼지 정소 크기에 따른 catheter 타입 및 needle gauge 크기 및 특징

정소 크기 (장축)	권장 Catheter 타입 및 needle gauge 크기	
직경 7 cm ~	천자침(TUOHY type)	18G, 3 X 1/4 or 60mm
직경 4~7 cm	IV Catheter	18G, 1.3 X 32mm
직경 ~ 4 cm	SafeIne CATH	20G, 1.1 X 32mm



그림 51. 초음파 관찰을 통한 정소망의 위치 확인 및 catheter의 위치 확인. 정소망에 주입된 23 gauge 60m/m needle을 이용한 정원줄기세포 이식하여 정소망에 정확히 catheter를 일치시켜 세포를 주입할 수 있음을 확인. (삼성메디슨 PA60A, 30 HZ, 7cm probe)

(3) 정소내 염색액을 주입을 통한 주입액 분포 확인

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 앞선 실험에서 검토된 needle 사이즈(23 gauge / 60 m/m) 및 주입위치(정소망), 주입량(5ml)을 토대로 Trypan Blue 용액을 주입하여 정소 내 주입액의 분포 위치를 파악하였다 (그림 52). 정소 내에 균일하게 염색액이 분포하는 것을 확인할 수 있었고, 실체현미경을 통해 정세관 내로의 염색액 유입여부를 확인한 결과 염색액의 발색여부가 미약한 것을 확인하였다. 그 이유로 정원줄기세포가 제거되지 않은 정세관에 주입한 결과로 보이며, 추가적으로 Busulfan처치법 또는 정원줄기세포 제거 형질전환돼지의 정소에서의 염색액 및 세포주입 결과를 확인할 필요가 있었다.

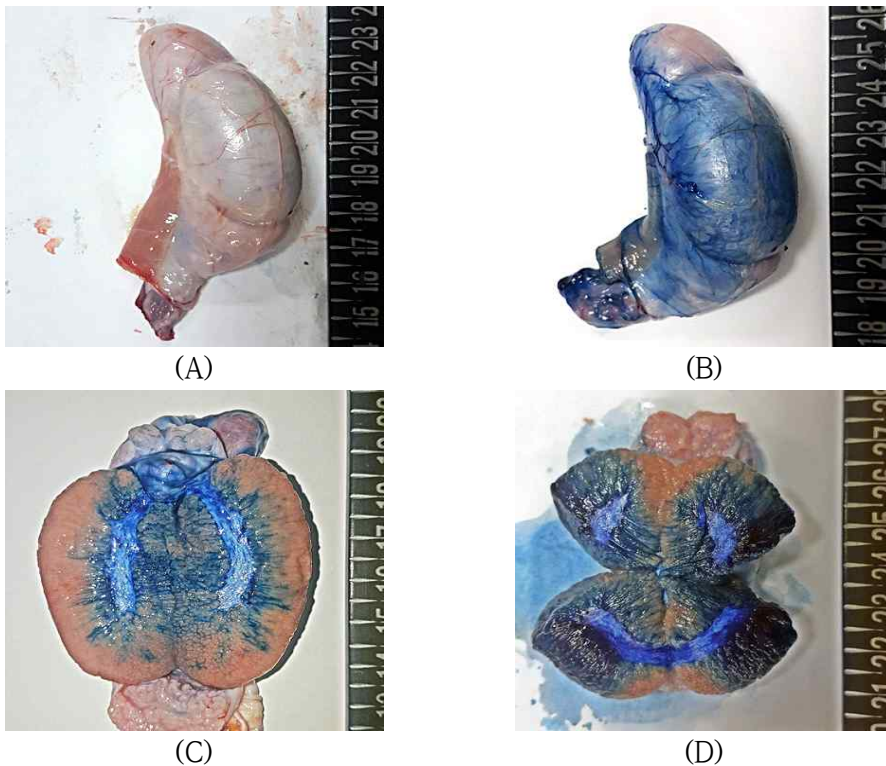


그림 52. In vitro 상태에서 정소내 염색액 주입 후 해부학적 조사. 도축된 돼지로부터 정소 채취(A), Trypan Blue 주입 후 정소 변화(B), 단면 절개를 통한 염색액 분포 확인(C), 4등분 절개를 통한 염색액 분포 확인(D).

(4) 정소상체 부위 결찰(clamping)을 통한 세포 부유액 유실방지

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 일반 체세포 또는 적색형광을 발현하는 세포유사 크기의 polyethylene microspheres (UV-PMS)를 주입하여 조직검사를 통해 정소 내 주입물질 분포를 확인하는 방법을 고안하였고, In vitro 에서 정소 내 주입 후 정소 내 주입세포의 분포 및 주입된 농도를 확인하였다. 거세된 동일한 돼지 개체로부터 정소를 회수, 캘리포셉으로 clamping 한 정소와 결찰을 하지 않은 정소에 각각 trypan blue 용액을 주입하여 용액 분포를 확인하였다.

: 그 결과, 캘리포셉으로 clamping 한 정소에서 trypan blue 용액이 넓게 분포하는 것을 확인하였고, 정소 내 세포 주입시 정소상체 부위를 clamping 하는 것이 정소 외부로의 세포 유실을 방지하고 세포주입 효율을 증가시킬 수 있었다 (그림 53). 이후, In vivo 상태에서 세포 주입시 clamping 하는 것을 추가적으로 검토할 필요성이 있었다.

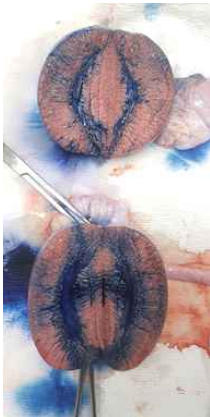


그림 53. 정소상체 부위 결찰(clamping)을 통한 세포 부유액 분포. 캘리포셉으로 clamping 한 정소(아래 정소)에서 trypan blue 용액이 넓게 분포하는 것을 확인. In vitro 상태에서 정소 내 세포 주입시 정소상체 부위를 clamping 하는 것이 정소 외부로의 세포 유실을 방지하고 세포주입 효율을 증가시킬 수 있음.

(5) 세포 부유액 주입속도에 따른 주입효율 검토

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 기존 보고된 문헌정보에 따르면 세포 부유액의 주입 속도에 따른 주입효율을 분석한 결과가 없었기 때문에, Syringe pump [New Era Pump System, Inc.]를 이용한 세포 주입 속도 조절을 통한 주입 효율을 검토하였다 (그림 54). 거세된 동일한 돼지 개체로부터 정소 한 쌍을 회수하여 캘리포셉으로 정소상체 및 혈관을 clamping 하였고, $5.5 \times 10^6/\text{ml}$ 농도의 일반체세포와 trypan blue 용액을 혼합하였다. 이후, 각각 저속 (1 ml/min) 및 고속 (10 ml/min) 으로 정소 내 세포 주입하였고, 주입된 정소를 각각 고정 후 조직검사를 통해 주입 세포 분포를 확인하였다.

: 그 결과, 저속주입된 정소에서 주입세포가 높은 농도로 관찰되었고, 고속주입된 정소에서는 주입세포가 정소 전체에 산재된 형태로 관찰되었다. 또한, 고속주입된 세포는 상대적으로 세포밀도가 낮은 정세관 이외의 기관으로 확산이 이루어지는 것으로 보아, 저속 주입된 정소에서 정세관 내 주입세포가 위치하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 55).



그림 54. Syringe pump [New Era Pump System, Inc.]를 이용한 세포 주입. 한 쌍의 정소에 각각 저속 (1 ml/min) 및 고속 (10 ml/min) 으로 정소 내 세포 주입.

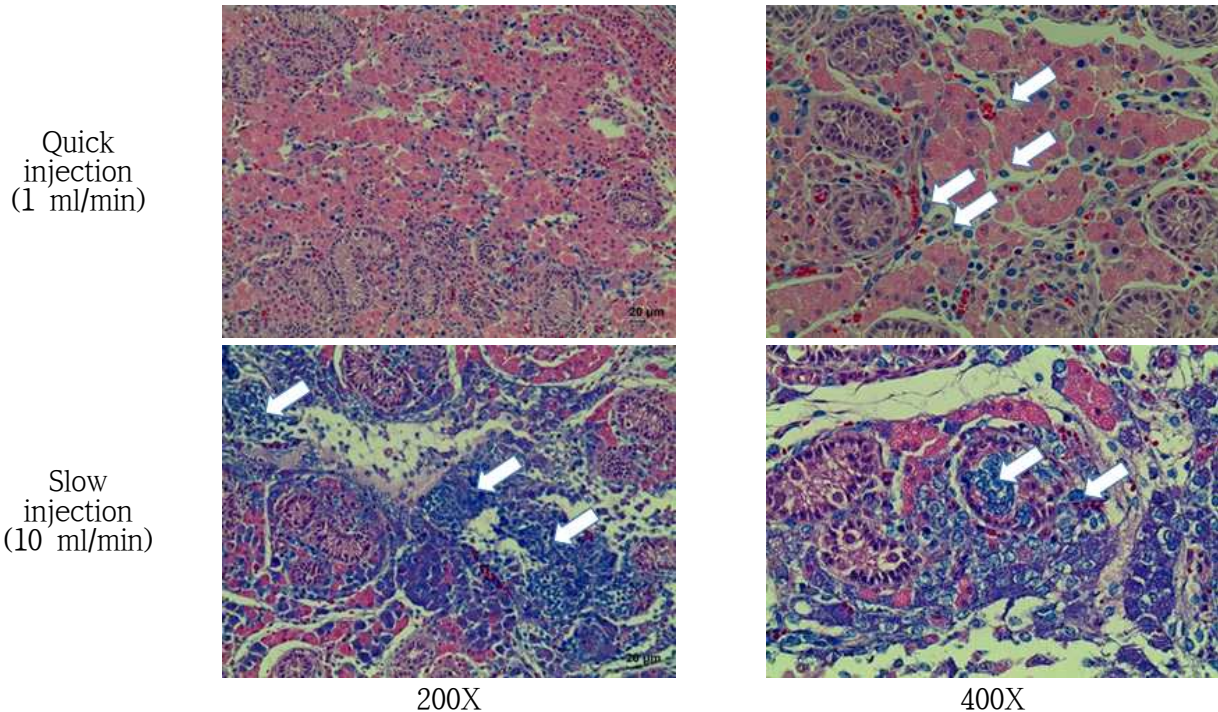


그림 55. 세포 부유액 주입속도에 따른 세포 분포(화살표) 및 주입효율 검토. 고속으로 주입 (10 ml/min)된 세포는 상대적으로 세포밀도가 낮은 정세관 이외의 기관으로 유출이 이루어지는 것으로 보이며 저속 주입(1 ml/min)된 정소에서 정세관 내 주입세포가 다수로 위치하는 것이 확인됨.

(6) RFP 발현 polyethylene microspheres (UV-PMS) 주입을 통한 주입물질의 정소내 분포 관찰

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 적색형광을 발현하는 세포크기의 UV-PMS를 주입하여 조직검사를 통해 확인하는 방법을 고안하였고, In vitro 에서 정소 내 주입 후 정소 내 주입세포의 분포 및 주입된 농도를 확인하였다. 거세된 동일한 돼지 개체로부터 정소를 회수, 정소에 $1 \times 10^7/ml$ 농도의 UV-PMS를 정소에 1.5 ml를 주입하였고, 조직 검사를 통한 UV-PMS 분포 및 형광발현 여부를 확인하였다.

: UV-PMS를 주입한 정소를 조직검사를 통해 확인한 결과 정세관 내 UV-PMS 가 존재하는 것을 확인하였고, UV-PMS를 주입한 정소의 조직샘플을 UV현미경 하에서 관찰

하였을 때 정세관내에서 RFP가 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 56). 세포 크기의 UV-PMS를 정소에 주입 후 정세관에서 분포되는 것을 확인함으로써 정원줄기세포 주입시 정세관에 위치할 수 있음을 간접적으로 증명하였다.

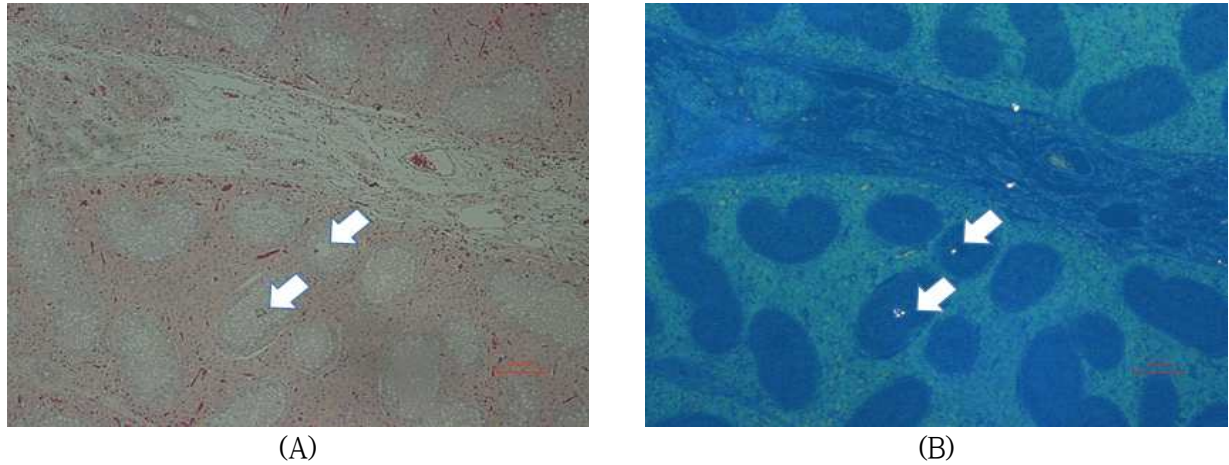


그림 56. Polyethylene microspheres (UV-PMS) 주입을 통한 주입물질의 정소내 분포. 광학현미경(A) 및 형광현미경(B)하에서 관찰한 결과 정세관내에서 UV-PMS가 관찰됨.

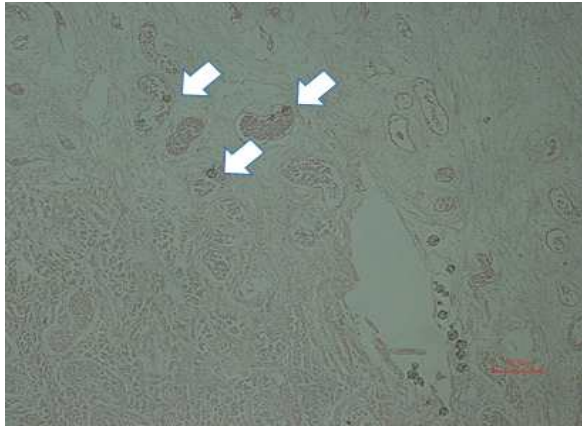
(7) Decellularized Scaffolds 정소에 UV-PMS 주입을 통한 주입물질의 정소내 분포 관찰

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

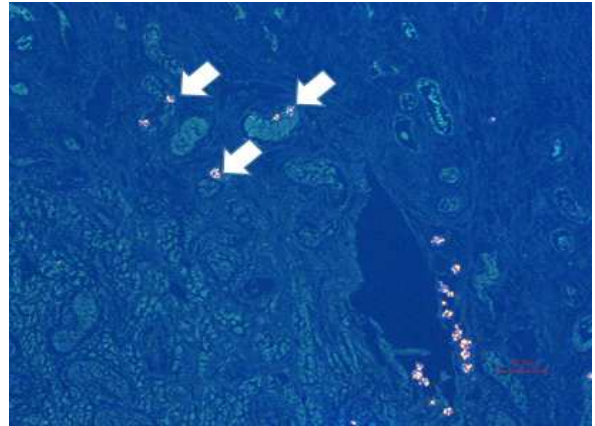
◆ 연구수행내용

: 정원줄기세포가 제거된 정소를 모방하기 위하여 decellularized scaffolds 정소를 제작하여 적색형광을 발현하는 세포크기의 UV-PMS를 in vitro 상에서 주입하여 조직검사를 통해 확인하였다. 거세된 동일한 돼지 개체로부터 정소를 회수하였고, 3차 증류수에서 30분간 세척한 정소를 1% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS)에 넣고 3일 동안 decellularization을 진행하였다. 또한, 24시간마다 1% SDS를 교환해주면서 decellularized scaffolds 정소를 제작하였다. 정소에 1×10^7 /ml 농도의 UV-PMS를 정소에 1.5ml 주입한 후, 조직 검사를 통한 UV-PMS 분포 여부 확인 및 형광발현 여부를 확인하였다.

: 세포가 제거된 정소에서 UV-PMS를 주입하여 조직검사를 통해 확인한 결과 정세관내 UV-PMS가 존재하는 것을 확인하였고, UV-PMS를 주입한 정소의 조직샘플을 UV 현미경 하에서 관찰한 결과 정세관 내에서 RFP가 발현하는 것을 확인하였다. 또한, Decellularized scaffolds 정소에서도 UV-PMS를 주입 후 정세관 내에 분포하는 것을 확인함으로써 정원줄기세포가 제거된 정소에 정원줄기세포 주입시 정세관에 위치할 수 있음을 간접적으로 증명하였다 (그림 57).



(A)



(B)

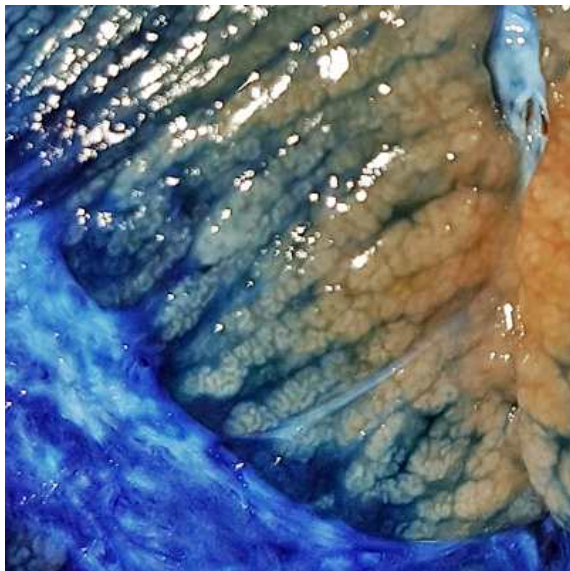
그림 57. Decellularized scaffolds에 UV-PMS 주입을 통한 주입물질의 정소내 분포. 광학현미경(A) 및 형광현미경(B)하에서 관찰한 결과 정세관 내에서 UV-PMS(화살표)가 관찰됨.

(8) 염색액(Trypan Blue)이 첨가된 세포 부유액을 통한 정소내 주입세포 분포 조사

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: In vitro 상태에서 초음파 관찰을 통해 일반 체세포를 주입하여 정소내 주입세포의 분포를 조직검사를 통해 관찰하였음. 그 결과, 염색된 세포가 정소망 주변부에서 육안으로 관찰되었으며 (그림 58), 조직학 검사를 통해 사이질 세포에서 주입된 세포의 형태로 보이는 세포들이 관찰되었다 (그림 59).



(A)



(B)

그림 58. 정소 내 Trypan Blue 용액의 분포 A; 사이질 및 정소망에 염색액 분포, B; 실체 현미경 100배로 관찰된 정세관.

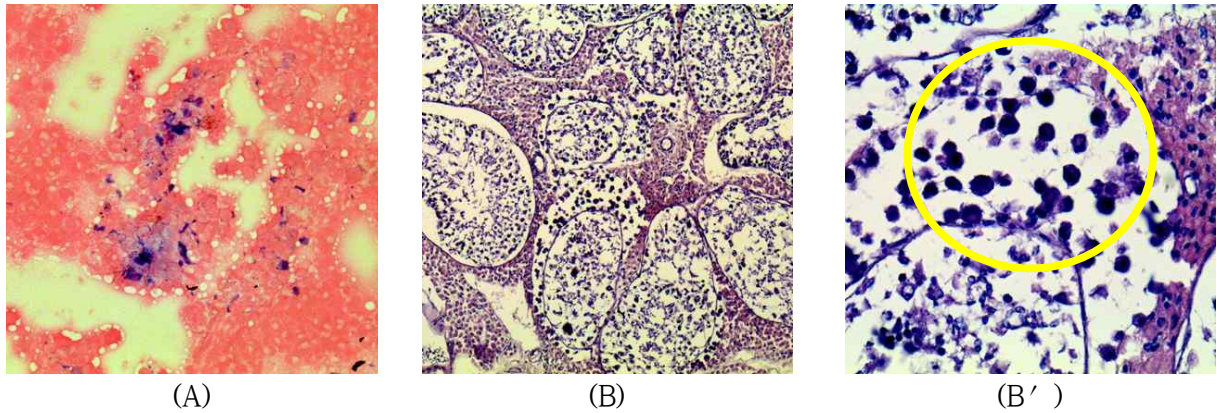


그림 59. 조직검사를 통한 정소내 염색세포의 분포 조사. A; 정소 조직 내 염색 세포의 분포 확인, B; 염색된 세포의 사이질 세포내 분포 확인. B; 100배율, B' ; 200배율.

(9) 고정 후 염색된 세포를 이용한 정소 내 세포 이식

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 조직검사를 통해 확인이 어려웠던 주입세포의 확인을 용이하게 하기 위하여 주입세포를 4% 파라포오름알데하이드에서 고정하여 염색 후 정소에 주입하였고, 조직검사를 통해 고정 및 염색된 세포의 분포 및 세포수를 확인하였다.

: 이식 후 정소를 회수하여 정원줄기세포의 위치를 조직검사를 통해 조사한 결과 사이질 세포 및 정소망 주변부에서 주입된 정원줄기세포로 추정되는 세포형태가 관찰되었다 (그림 60).

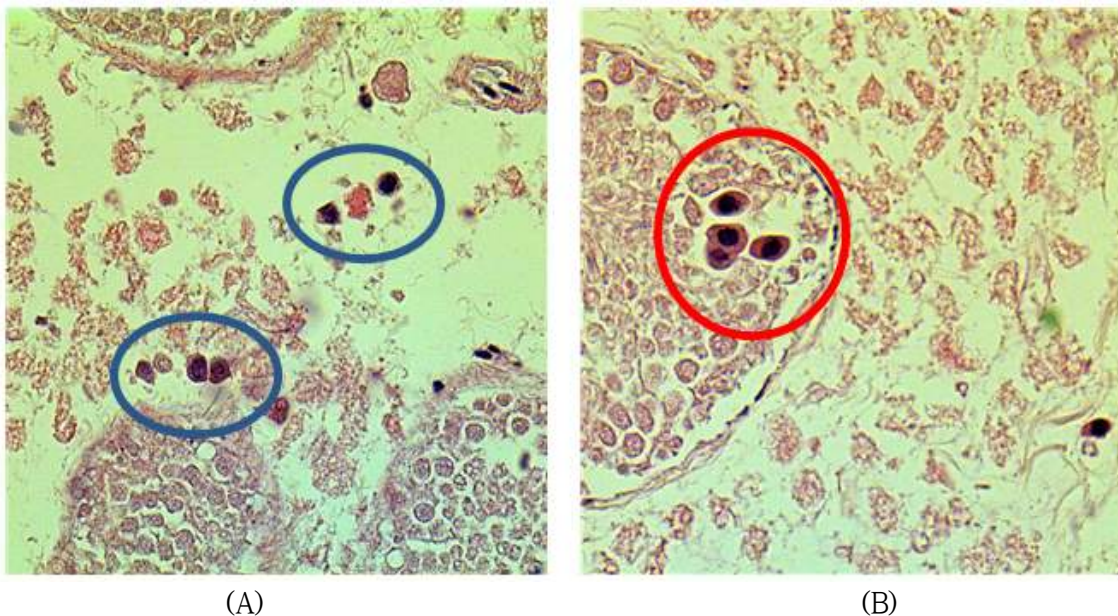


그림 60. 조직검사를 통한 주입세포의 정소 내 분포 확인. A; 사이질 세포 주변으로 주입된 세포 확인(청색 원) B; 정세관 내 주입된 세포 확인(적색 원)

♣ 연구수행결과

: 돼지 정원줄기세포의 돼지 정소내 이식 기술을 개발하기 위하여 In vitro 상태에서 돼지의 정소 내 이식 방법을 다양한 방법으로 접근하여 정소크기에 따른 세포부유액의 적정 주입량, needle 및 catheter의 크기를 도출하였다. Trypan Blue 염색액 및 RFP 발현 polyethylene microspheres (UV-PMS) 주입을 통해 주입액이 정세관 내 분포할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 세포부유액의 주입속도 조절 및 정소상체 부위 결찰을 통해 정소내 주입 효율을 향상시킬 수 있었다.

나. In vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발

♣ 연구수행기간: 2차년도 (2018년-2019년)

♣ 연구수행내용

: In vitro 상태에서 검토된 정원줄기세포 주입 방법을 통해 살아 있는 돼지의 정소에 정원줄기세포를 이식하는 방법을 검토하고자 하였다. 이를 위해 기존에 확립된 기법들을 검토하는 한편, 효율을 높일 수 있는 새로운 기법들을 시도해 보고자 했다. 또한 정원줄기세포 주입 후 recipient의 체중변화 및 후유증을 진단하고, in vivo에서 이식한 돼지 정소를 회수하여 정원줄기세포의 이식 후 경과(고환의 크기 변화 및 이식 세포 과다증식 또는 정상적 정원줄기세포 확립)여부를 확인하였다.

(1) In vivo 상태에서 정원줄기세포 이식방법 모색

◆ 연구수행기간: 2차년도 (2018년-2019년)

◆ 연구수행내용

: In vivo 상태에서 정원줄기세포를 다음과 같은 과정에 의해 이식하였다. DPBS+0.05% polyvinyl alcohol (PVA) 배양액을 가득 채운 20cc 실린지를 실린지 펌프에 결합시켰다. 수액세트에 18G needle을 결합하고 DPBS+0.05% PVA 용액이 들어있는 50ml tube에 위생적으로 needle을 충분히 담그고 10cc 실린지를 천천히 당겨 수액세트 관에 배양액을 가득 채웠다(되도록이면 공기가 관에 들어가지 않게 천천히 빨아들였다). 마취된 돼지의 수술 부위를 베타딘과 알코올 거즈를 이용하여 수 회 소독했다. 초음파를 통해서 rete testis의 위치를 파악하고 위 사진과 같이 catheter를 삽입했다. 이 때 초음파를 통해서 needle의 끝이 rete testis 위치와 정확하게 일치하도록 미세하게 조정했다. 배양액 주입시 관을 수술개체보다 높은 곳에 걸고 catheter가 움직이지 않게 했다. 수액이 정소로 흘러 들어가는지 육안으로 확인하고 수액세트의 노란 고무 부위에 미리 준비한 세포부유액 1cc를 1cc/1min 속도로 천천히 주입했다 (그림 61). 주입이 종료되고 일정시간 DPBS+0.05% PVA 용액을 추가로 주입했다(이 때 주입량은 정소 크기에 따라 유동적으로 주입했다). 주입이 끝나면 catheter를 정소로부터 제거하고 상황에 따라 소염진통제를 주사했다.



(A)



(B)



(C)

그림 61. 정소 내 정원줄기세포 주입 장면. A; 초음파를 통한 해부학적 구조 파악 및 주입위치 확인, B; 초음파를 통한 주입위치(정소망) 위치확인 및 needle 삽입형태 파악, C; 정원줄기세포를 정소 내 주입

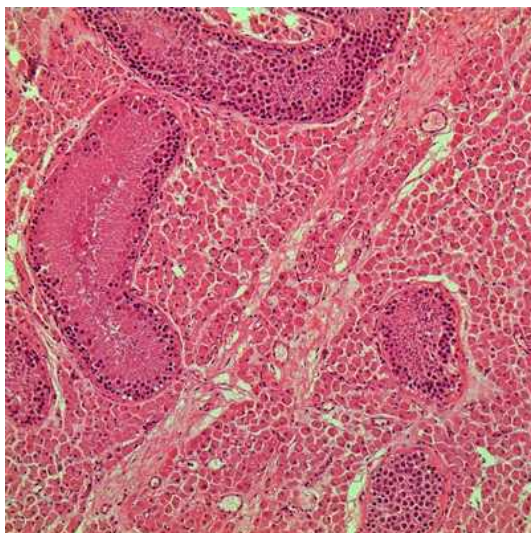
: 그 결과, In vitro에서 검증된 정원줄기세포 주입술을 in vivo 에 적용하여 유사한 결과를 얻을 수 있었고 초음파진단을 통해 정소망의 위치를 정확히 확인하여 세포부유액을 주입할 수 있었다.

(2) In vivo 상태에서 정원줄기세포가 주입된 정소를 회수 및 세포 분포 검사

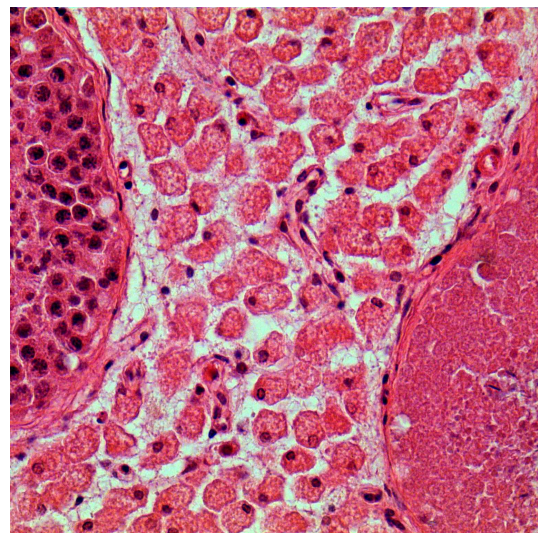
◆ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018년-2019년)

◆ 연구수행내용

: 주입술 후 폐사된 개체로부터 외과적으로 정소를 적출하였고, 적출된 정소는 멸균된 생리식염수에 담겨 조직검사에 이용하였다. 정립된 in vivo 세포 이식법을 이용, 정원줄기세포를 이식 후 정소를 회수하여 정원줄기세포의 위치를 조직검사를 통해 조사한 결과 사이질 세포 및 정소망 주변부에서 주입된 정원줄기세포로 추정되는 세포형태가 관찰되었다 (그림 62).



(A)



(A')

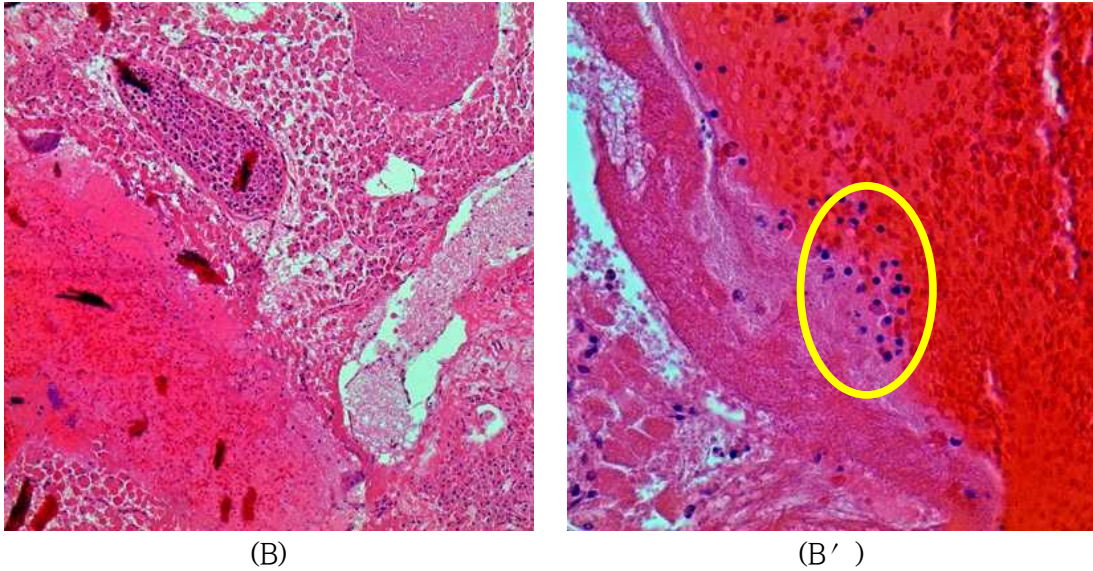


그림 62. In vivo 상태에서 세포부유액 주입 후 정소를 회수하여 조직학적 분석을 통해 관찰. 정소 내 정원줄기세포 미주입 정소 (A), 정원줄기세포 주입 정소; (B). A; 100배 A' ; 200배, B; 100배 B' ; 200배-주입 세포 형태로 보이는 세포분포 (황색 원)

♣ 연구수행결과

: 돼지 정원줄기세포의 돼지 정소 내 이식 기술을 개발하기 위하여 In vivo 상태에서 돼지의 정소 내 이식 방법을 In vitro로 검증된 방법(정소크기에 따른 주입량, catheter의 크기, 주입속도 등)을 활용하여 정소 내 주입을 시도함. In vivo에서 초음파 진단을 통해 정소망의 위치를 정확히 확인 후 세포액을 주입하는 방법을 고안하였으며 세포부유액을 주입한 개체로부터 정소 회수 후 조직학 검사를 통해 주입세포의 정소 내 분포를 확인함.

2. 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지 생산

가. 형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립

♣ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018년-2019년)

♣ 연구수행내용

: 정원줄기세포가 제거된 recipient에 1차년도에서 확립된 정소 내 정원줄기세포 이식 방법을 적용하여 형질전환된 정자를 생산할 수 있는 돼지를 생산하고자 하였다. 성 성숙이 진행된 수컷 돼지로부터 정액을 채취하여 정자 유무 및 정액량 등을 검사하고 형질전환 유전자의 발현여부를 검토하는 한편, 정자 정상성과 번식능에 대한 검증이 수행되어졌고, 형질전환돼지의 정액 보존기술 개발을 통해 유전능 보존이 이루고자 하였다.

(1) In vitro 에서 GFP 발현 Mesenchymal Stem Cell (MSC) 주입 후 정소 내 주입여부 관찰

◆ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018년-2019년)

◆ 연구수행내용

: 조직검사를 통해 관찰시 주입세포의 식별이 어려웠기 때문에, 현재까지 조직검사시 주입세포의 형태적 특징으로 주입세포를 식별하였다. 그러나 관찰되는 세포가 주입된 정원줄기세포인지 확인, 단정하기에는 한계가 있었다. 색소를 이용하여 염색된 세포를 주입하는 방법을 시도하였으나 조직의 고정 및 염색과정에서 뚜렷한 구별이 여전히 어려움이 있었다. 따라서, GFP 부착된 MSC 주입 후 UV하에서 식별하는 방법을 시도하였고, 거세된 동일한 돼지 개체로부터 정소를 회수한 후 정소의 정소망에 1×10^7 /ml 농도의 GFP-MSC를 정소에 주입하였다. 그리고나서, 파라핀 처치 및 조직검사를 통한 형광발현여부를 확인하였다.

: 그 결과, UV하에서 조직을 검사하여 GFP 발현을 검사하였지만 명확히 GFP가 발현되는 세포를 확인하지는 못했다 (그림 63).

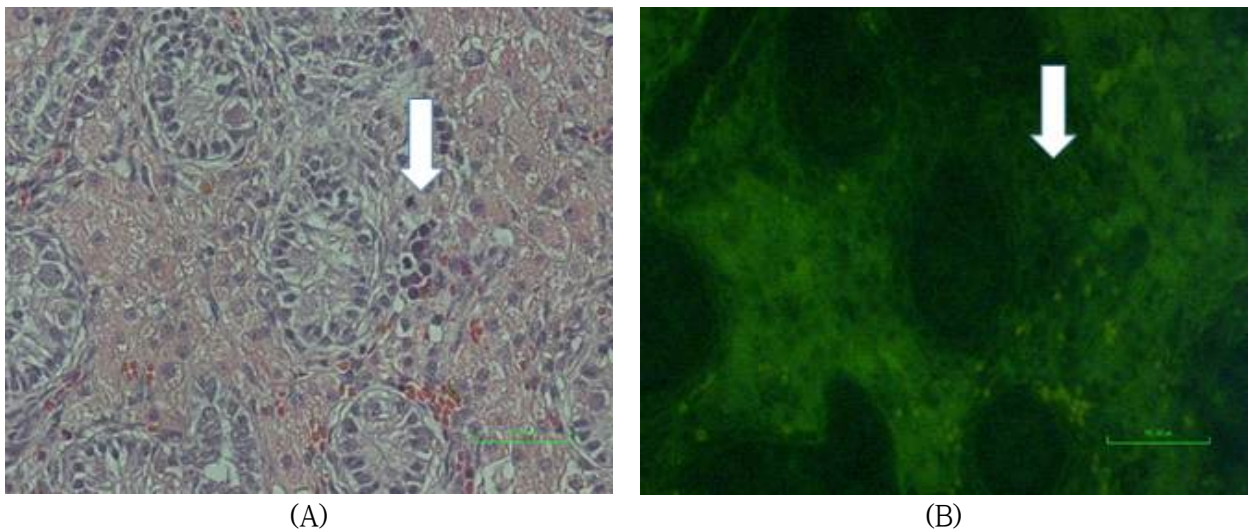


그림 63. 정소내 GFP 발현 MSC 주입 후 조직학적 검사 및 UV 형광현미경 관찰을 통한 주입세포 유무 확인. 조직표본의 현미경상(A)에서 주입된 세포 형태(화살표)로 판단되는 부위를 UV하(B)에서 관찰하였으나 GFP의 발현이 관찰되지 않음.

(2) In Vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발

◆ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018년-2019년)

◆ 연구수행내용

: 총 8두의 수컷 돼지에 정원줄기세포를 이식하였다 (표 8). 수컷돼지의 일령에 따라 주입량을 선정하여 주입하였고, 알팍산(Alfaxan)과 도미톨(Domitor)을 5:1로 혼합하여 이 정맥으로 2 ml 주사 후, 1% 아이프란액(이소플루란) 수준으로 산소와 혼합하여 호흡마취를 유도하였다. 이후 초음파 탐촉자로 정소망을 확인하면서 정소 크기에 적합한 사이즈의 needle을 삽입한 후 실린지 펌프를 이용하여 세포부유액을 마취된 돼지의 정소내로 주입하였다. 정원줄기세포 부유액은 저속(1ml/min)으로 약 3-10분에 걸쳐 주입하였다.

: In vitro 에서 검토된 방법을 In vivo 상황에 적용하여 적정성 여부를 검토한 결과 차

질 없이 이식을 수행할 수 있었다 (표 8). 정원줄기세포를 이식한 총 8두의 돼지 가운데 2두는 주입술 후 폐사하여 정소를 채취하여 주입세포의 분포를 검사하였고, 6두의 개체는 이식술 후 정상적인 발육양상을 보였다. 모든 개체는 채정하여 정자의 생산여부 및 운동성, 유전자 발현여부를 검사하였으며, 이 중 1두의 개체(OF7)에서 주입된 세포의 유전자가 발현되는 것을 확인하였다. 2두의 개체는 이식술 후 성성숙을 유도 중에 있으며 추후 정자의 생산여부 및 운동성, 유전자 발현 여부를 검사할 예정이다.

표 8. In Vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식

실험번호	1	2	3	4	5	6	7	8
출생	2015.10.30	2016.12.06	2016.12.31	2018-04-20	2018.04.21	2018.11.03	2019.03.25	2019.07.27
개체번호	OF3	OF5	OF6	OF7	OF8	OF9	OF10	OF11
품종	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig	white yucatan miniature pig
개체특성	GTKO/CD39 hetero / 정자수 극히 적음 (F1 세대)	.	.	.	무정자증 개체	.	잠복고환 개체	Nanos2
이식시 일령	644	553	552	133	175	104	131	130
정소채취시 체중(kg)	64.5	65	63	16	21	15.9	16	16
정소 장축 길이(cm)	약 9cm	약 10cm	약 9cm	약 3cm	약 4cm	약 3cm	약 4cm	약 4cm
세포주입정 소위치	L	L	R	L	R	L	L	L
주입량	5ml	9ml	10ml	10ml	10ml	4ml	3ml	3ml
주입세포	SSC	transfer SSC	transfer SSC	transfer SSC	transfer SSC	transfer SSC	Pd2/pUPK2-hBMP2/CM V-EGFP vector로 형질전환 유도된 SSC	Pd2/pUPK2-hBMP2/CM V-EGFP vector로 형질전환 유도된 SSC
세포농도	1*10 ⁷ /5ml	3.3*10 ⁵ /주입량	1.8*10 ⁶ /주입량	2.5x10 ⁶ /주입량	3.0x10 ⁶ /주입량	4.5x10 ⁶ /주입량	3.0x10 ⁶ /주입량	6.8x10 ⁶ /주입량
주입액 종류	SSC 세포배양액	SSC 세포배양액	SSC 세포배양액	0.05% PVA DPBS	0.05% PVA DPBS	0.05% PVA DPBS	0.05% PVA DPBS	0.05% PVA DPBS
주입방법	주사기 직접주입	실린지펌프	실린지펌프	실린지펌프	실린지펌프,	실린지펌프	실린지펌프	실린지펌프
주입속도	5ml/min	0.3ml/min	0.5ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min
니들종류	18G 3 1/4" (TUOHY type)	18G, 천자침	18G, 천자침	18G 3 1/4" (TUOHY type)	18G 1.25 in 1.3x32mm	20G, 1.1 X 32mm	20G, 1.1 X 32mm	20G, 1.1 X 32mm
주입 후 결과	폐사	폐사	정상발육	정상발육	정상발육	정상발육	정상발육	정상발육
검토	조직검사	조직검사	정액검사	정액검사	정액검사	정액검사	미검토	미검토
검토결과	주입세포를 조직학적 관찰을	주입세포를 조직학적 관찰을	미검출	주입된 세포의 유전자가 발현	정자수 극히 적음	미검출	미검토	미검토

	통해 확인함	통해 확인함						
--	-----------	-----------	--	--	--	--	--	--

♣ 연구수행결과

: 형질전환 성숙정자를 생산하기 위해 총 8두의 수컷돼지 정소에 세포주입술을 시도하였으며 6두의 개체가 정상적인 발육양상을 보인다. 수술 후 모든 개체는 성성숙 과정을 거쳐 채정하여 정자의 생산여부 및 운동성, 유전자 발현여부를 검사하였으며, 이 중 1두의 개체에서 주입된 세포의 유전자가 발현되는 것을 확인되었다. 따라서 In vitro 및 In vivo 상태에서의 확립된 주입법을 통해 형질전환 수컷 돼지 생산이 가능성을 확인하였다.

♣ 향후 연구추진계획

: 형질전환 정원줄기세포를 이식한 2두의 개체는 이식술 후 성성숙을 유도 중에 있으며 추후 정자의 생산여부 및 운동성, 유전자 발현 여부를 검사할 예정이다.

나. 형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지로부터 정액의 성상 검사

♣ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

♣ 연구수행내용

: 정원줄기세포를 이식한 돼지로부터 정액을 채취하여 정액의 성상을 검사하여 정상성 여부를 조사하는 한편 정원줄기세포 유래 세포의 유전자 발현여부를 검토함으로써 이식의 성공여부를 판단하기 위해 연구를 수행함.

(1) 정원줄기세포 이식 돼지로부터 정액 성상 검사

◆ 연구수행기간: 3차년도 (2019년)

◆ 연구수행내용

: 돼지 정원줄기세포의 돼지 정소 내 이식을 통해 정상적인 성숙정자를 만든 후 정액을 수압법으로 채취하여 정자의 성상(정자수, 활력, 정자 직진운동성 등)을 검사하였다. 돼지에 정원줄기세포를 이식하여 세포이식으로부터 90~314일령에 걸쳐 수압법을 통해 정액을 채취하였다. 채취된 정액 내의 정자 농도 및 생존률을 정자운동성을 협동연구 기관인 옵티팜의 정자분석기를 이용하여 검사하였다.

: OF6 개체의 정액성상 분석 결과 채정량은 85 ml, 정자수는 3×10^8 sperm/ml, 생존률은 약 78%, 직진운동성은 약 60%로 조사되었다 (그림 64). OF7과 OF9 개체의 경우 정자의 운동성과 직진운동성이 높게 나타났다. OF8 개체는 무정자증 증세를 보이는 개체로 정원 줄기세포 이식 이후에도 정자의 수 및 운동성이 현저히 낮은 경향을 보였다 (그림 65). 추후 형질전환 정원줄기세포가 이식된 돼지(OF10, OF11)를 대상으로 주기적으로 채정 후 성상검사를 진행할 예정이다.

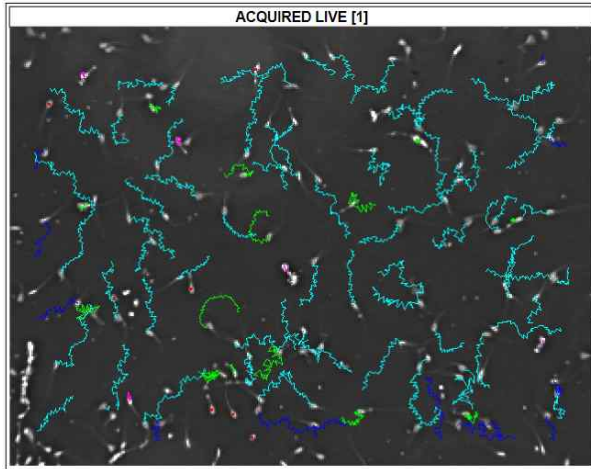
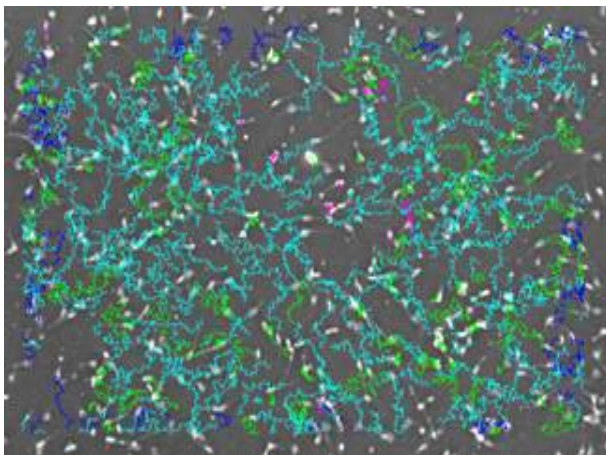
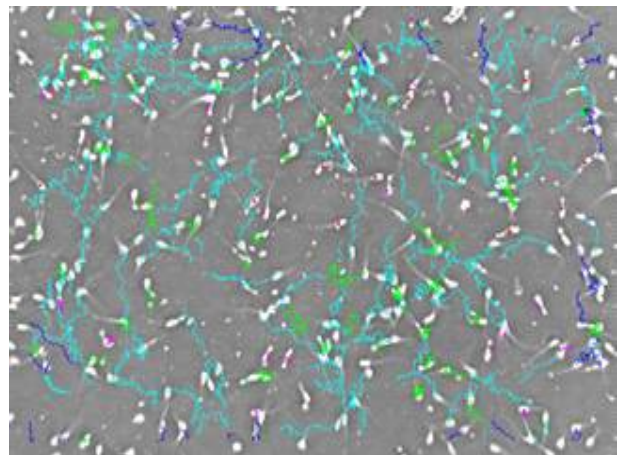


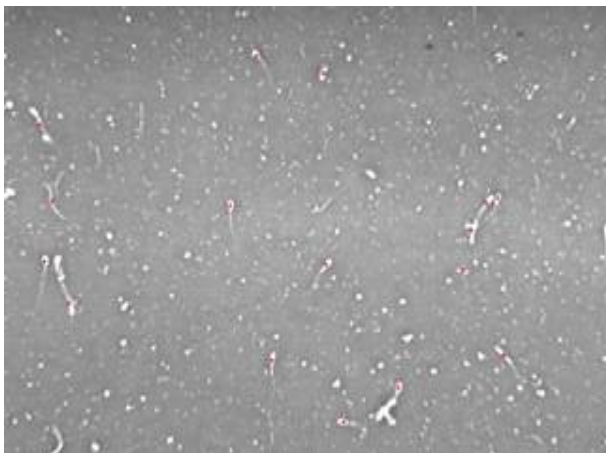
그림 64. 정자의 운동성 분석. 하늘색 정자는 살아 있으면서 직진 운동을 하는 정자(하늘색), 운동성이 없는 정자(빨간색) 원형으로 운동하는 정자(초록색).



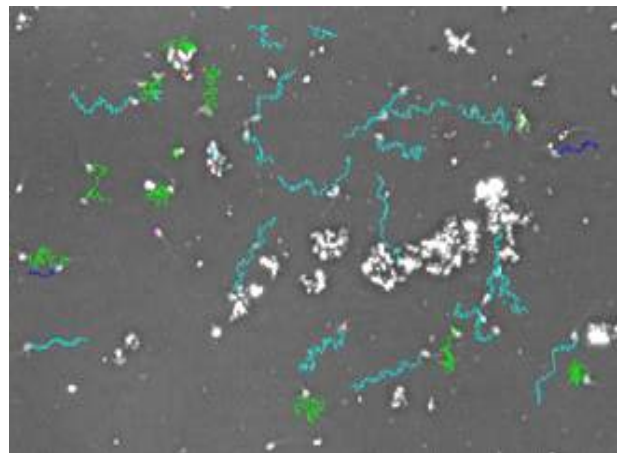
개체정보: OF6 (2018-07-05 이식)
채정시 일령: 865일령(이식 후 314일령)



개체정보: OF7 (2018-08-30 이식)
채정시 일령: 294일령(이식 후 162일령)



개체정보: OF8 (2019-02-14 이식)
채정시 일령: 215일령(이식 후 90일령)



개체정보: OF9 (2019-02-14 이식)
채정시 일령: 247일령(이식 후 114일령)

그림 65. 정원줄기세포 주입 후 채취된 정액의 운동성 분석

♣ 연구수행결과

: 돼지 정소내 세포 주입술을 통해 이식된 돼지로부터 정액을 채취하여 운동성을 분석

하였을 때 정상개체와 동일하게 정상적으로 정자를 생산하였으며, 운동성을 보이는 것으로 확인하였다.

♣ 향후 연구추진계획

: 정소내 세포 주입술을 통해 정상적인 정자를 생산하는데 유해성 여부는 관찰되지 않았음을 확인하였으나 주입된 세포 유래 정자의 생성 여부 및 운동성 등을 포함한 수정능력을 확인하기 위해 이식된 개체로부터 추가적으로 채정하여 정자의 성상 검사를 진행할 예정이다. 더불어 체외수정을 통해 형질전환 발현여부를 배아단계에서 확인하는 한편 발현여부에 따라 수란돈에 이식하여 형질전환 돼지를 생산할 계획이다.

다. 체외수정을 통한 형질전환 성숙정자 유래 산자 생산기초연구

♣ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018-2019년)

♣ 연구수행내용

: 정원줄기세포 이식 이후 수컷 돼지로부터 채취된 정액을 이용하여 체외수정 후 산자를 생산함에 있어 기초연구를 수행하였다. 돼지의 체외수정에 있어 가장 큰 문제점으로 거론되는 다정자 수정의 억제를 위해 고품질의 돼지 체외성숙 난자를 생산하는 연구를 진행하는 한편 적정 농도의 정액 농도를 찾기 위한 연구를 진행하였다.

(1) 돼지 난자의 체외 수정에 있어서 적절한 돼지 정자의 농도 조사

◆ 연구수행기간: 2-3차년도 (2018-2019년)

◆ 연구수행내용

: 정원줄기세포 유래 정자를 이용한 체외수정에 대비하여 정자농도 및 수정시간 등 체외수정 조건을 구축하였다. 돼지 난자는 다른 동물에 비해 체외 수정 과정에서 높은 비율로 다정자 수정이 발생한다. 이러한 문제점을 최소화하기 위해 적절한 정자 농도를 조사함으로써 높은 정자 침투율 및 정상 수정률을 높이기 위한 조건을 검토하기 위해 일련의 실험을 수행하였다. 체외성숙에 사용된 기본 배지는 10 % (v/v) 돼지 난포액 (standard), 0.6 mM cyteine, 0.91 mM pyruvate, 75 μ g/ml kanamycin 및 1 μ g/ml insulin을 첨가한 medium-199이었고, 미성숙 돼지 난자가 44 시간 동안 성숙한 다음 중기 II 단계에 도달 한 난자만 체외 수정을 진행하였다. 체외 수정에 사용된 돼지 정자는 동결 되지 않은 원정액을 사용하였으며, 실험 설계에 따라 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 x 10⁶ sperm/ml의 정자를 caffeine이 첨가된 mTBM으로 부유시키고 6시간 동안 체외수정 시켰다. 배아 발달을 위한 시험 관내 배양 배지는 0.3 % (w/v)의 지방산이 없는 BSA를 함유한 porcine zygote medium-3를 사용하였다.

: 그 결과, 0.2 x 10⁶ sperm/ml 정자 농도가 다른 농도에 비해 분할률, 배반포 형성률, 단일정자 수정률, 정상 수정률 등이 수치적으로 높았으나 유의적인 차이가 나지 않았다 (표 9).

표 9. 다양한 농도의 돼지 정자 농도가 체외수정 후 배반포 발달에 미치는 영향 조사

Sperm concentration (sperm/ml)	No. of oocytes cultured*	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
		≥ 2-cell	blastocyst	
0.2 x 10 ⁶	41	61.5 ± 3.2	25.1 ± 4.3	33.6 ± 4.1
0.4 x 10 ⁶	40	37.1 ± 19.4	8.7 ± 8.7	46.3 ± 13.5
0.6 x 10 ⁶	40	32.0 ± 20.2	13.0 ± 13.0	33.0 ± 3.6
0.8 x 10 ⁶	39	32.3 ± 19.8	15.2 ± 15.2	31.6 ± 4.6

*Two replicates.

Values in the same column with different superscript letters are different ($P < 0.05$)

(2) In Vitro Growth 내에서 insulin이 SAF유래 난자의 체외성숙과 배아 발달을 유도

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 정원줄기세포 유래 정자의 체외수정을 대비하여 고품질의 난자 생산 연구를 진행하였다. In vitro growth (IVG) 배양액 내에서 발육된 SAF유래 난자의 체외성숙과 배아 발달을 유도하기 위해서 기존 in vitro maturation 배양액에 사용하는 growth factor인 insulin, epidermal growth factor (EGF)를 처리하여 새로운 배양방법을 시도하였다. 이후, 단위발생을 유도하여 배아 발달능과 난자 직경크기가 증가하는 것에 유의적 효과가 있는지 검토하였다.

: IVG 이틀 동안 insulin, epidermal growth factor를 단독 또는 병용 처리하여 control과 난자의 성숙, 난자의 크기를 비교 분석하였다. IVG 이후 체외성숙을 유도하여 난자성숙의 지표인 glutathione (GSH) 함량을 측정함하였으며, 체외성숙 이후 단위발생의 배아 발생능을 검토하였다.

: 그 결과, IVG배양액에 insulin을 첨가하여 배양했을 때 난자의 성숙률이 개선되고 난자의 크기도 커지는 것을 확인하였으며 (표 10), Insulin과 EGF가 배아 발생능을 효율적으로 증가시키는 것을 확인하였다 (표 11).

표 10. 돼지 난자의 체외발육(IVG) 과정에서 인슐린 및 EGF의 첨가가 작은난포(SAFCOCS)에서 유래된 난자의 체외성숙 및 체외발육 후 난자의 직경, 위란강의 크기, 및 난자 내 글루타치온(GSH) 농도에 미치는 영향 조사

Origin COCs	IVG culture (d)	IVG treatment*	Oocyte diameter (μm) after IVG (n = 53)	Oocyte PVS of diameter (μm) after IVG (n = 53)	Relative level (pixels/oocyte) of GSH (n = 45)
SAFCOCS	2	Control	116.2 ± 0.5 ^a	7.3 ± 0.3	1.00 ± 0.09 ^{ab}
SAFCOCS	2	I	116.3 ± 0.6 ^a	7.9 ± 0.5	1.07 ± 0.09 ^a
SAFCOCS	2	E	114.9 ± 0.6 ^{ab}	7.3 ± 0.3	0.84 ± 0.09 ^{ab}
SAFCOCS	2	I+E	114.0 ± 0.5 ^b	7.9 ± 0.4	0.78 ± 0.07 ^b

*I; insulin with 1 μg/mL, E; epidermal growth factor (EGF) with 15 ng/mL.

^{a,b}Values in the same column with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

표 11. 돼지 난자의 체외발육(IVG) 과정에서 인슐린 및 EGF의 첨가가 단위발생 후 난자의 체외발달에 미치는 영향 조사

Origin COCs*	IVG treatment**	% of degraded oocytes	No. of oocytes cultured	% of oocytes reached MII	No. of embryos cultured	% of embryos developed to		No. cells in blastocyst
						≥ 2-cell	Blastocyst	
SAFCOCS	Control	15.0 ± 1.4	101	69.3 ± 2.0 ^{ab}	90	89.0 ± 3.9	22.9 ± 1.5 ^b	36.1 ± 3.8
SAFCOCS	I	19.8 ± 4.6	99	73.8 ± 3.8 ^a	79	79.8 ± 2.8	32.4 ± 3.0 ^a	35.8 ± 2.3
SAFCOCS	E	17.1 ± 1.7	105	67.4 ± 3.0 ^{ab}	93	88.7 ± 4.2	35.2 ± 2.4 ^a	40.8 ± 2.8
SAFCOCS	I+E	20.8 ± 6.8	90	59.8 ± 3.2 ^b	78	86.3 ± 2.4	34.8 ± 3.2 ^a	40.5 ± 3.2

[&]Three replicates.

*Oocytes were collected from small antral follicles (<3 mm in diameter).

**I; insulin with 1 µg/mL, E; epidermal growth factor (EGF) with 15 ng/mL.

^{a,b}Values in the same column with different superscript letters are significantly different (P < 0.05).

(3) 돼지 난자의 발달능을 향상시키는 체외성숙시스템 개발

◆ 연구수행기간: 1-2차년도 (2017년-2018년)

◆ 연구수행내용

: 돼지 난자의 체외성숙능 및 발달능을 향상시키는 체외성숙시스템을 개발하고자 하였다. 이를 위해 생체 난소 조직의 단단함을 모방하고자 아가로스를 이용한 부드러운 배양 기질을 제작하였다. 또한, 아가로스로 설립된 배양 기질 위에서 체외성숙시킨 돼지 난자의 난구세포확장, 난자 발달능에 관련된 유전자의 발현 수준, 그리고 배반포의 발생률을 분석하여 돼지 난자의 발달능에 효과적인 아가로스 기질을 선택할 것이다.

: 1% (w/v)와 2% (w/v) 농도의 아가로스를 4-well dish에 코팅하였고, 돼지 난구세포-난자 복합체를 난소로부터 얻어내 44시간 동안 체외성숙시켰다. 체외성숙된 난구세포-난자 복합체로부터 난구세포확장, 난자 발달능에 관련된 BMP15, PFKP, BAX 유전자의 발현, 그리고 처녀생식을 통한 배반포의 발생률을 분석하였다.

: 그 결과, 1% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체의 배반포 발생률이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고 (표 12), 1% (w/v)와 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체의 난구세포 확장이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 (표 13).

: 1% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 BMP15의 발현이 확인됨. 그리고, 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 BAX 유전자의 발현이 확인됨 (그림 66).

: 1% (w/v)와 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 유의적으로 높은 PFKP의 발현과, 유의적으로 낮은 BAX 유전자의 발현이 확인됨 (그림 67).

표 12. 체외성숙된 난구세포-난자 복합체로부터 처녀생식을 통한 배반포의 발생률 분석

Agarose matrices	% of oocytes reached MII	No. of PA embryos cultured	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
			≥ 2-cell	Blastocyst	
Non-coated	90.9 ± 2.9	285	90.0 ± 1.6	56.2 ± 3.1 ^a	46.2 ± 1.4
1%	92.9 ± 1.4	284	93.8 ± 1.5	66.6 ± 2.3 ^b	46.6 ± 1.3
2%	94.2 ± 0.9	294	91.0 ± 2.5	62.8 ± 4.3 ^{ab}	44.5 ± 1.2

*Concentration of Agarose on culture dish.

^{a,b}Values in the same column with different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

표 13. 체외성숙된 난구세포-난자 복합체로부터 난구세포 확장의 분석

Agarose matrices	No. of oocytes examined for cumulus expansion	Cumulus expansion score after IVM
Non-coated	102	1.95 ± 0.06 ^a
1%	104	2.22 ± 0.05 ^b
2%	102	2.17 ± 0.05 ^b

*Concentration of Agarose on culture dish.

^{a,b}Values in the same column with different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

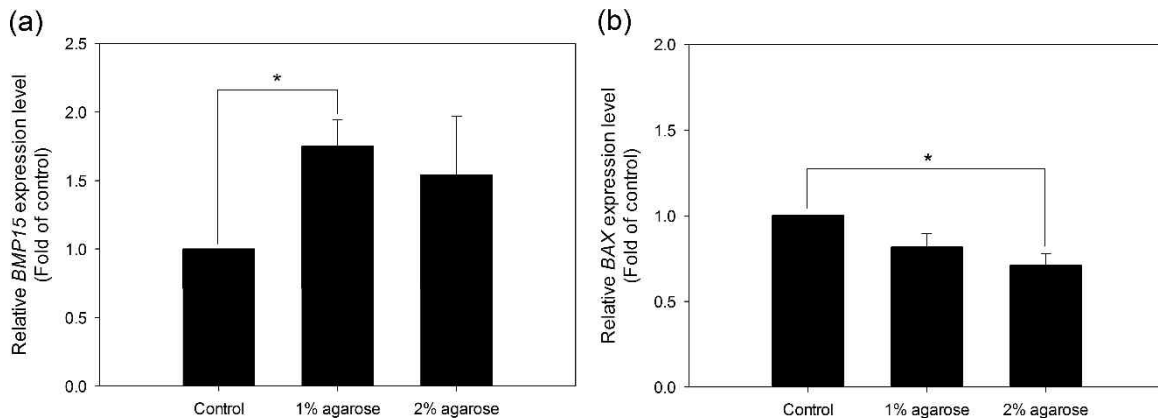


그림 66. 체외성숙된 난구세포-난자 복합체로부터 MII난자만 선별하여 BMP15와 BAX 유전자의 발현 분석. 1% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 대조군에 비해 유의적으로 높은 BMP15의 발현이 확인됨. 그리고 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 BAX 유전자의 발현이 확인됨. * $p < 0.05$.

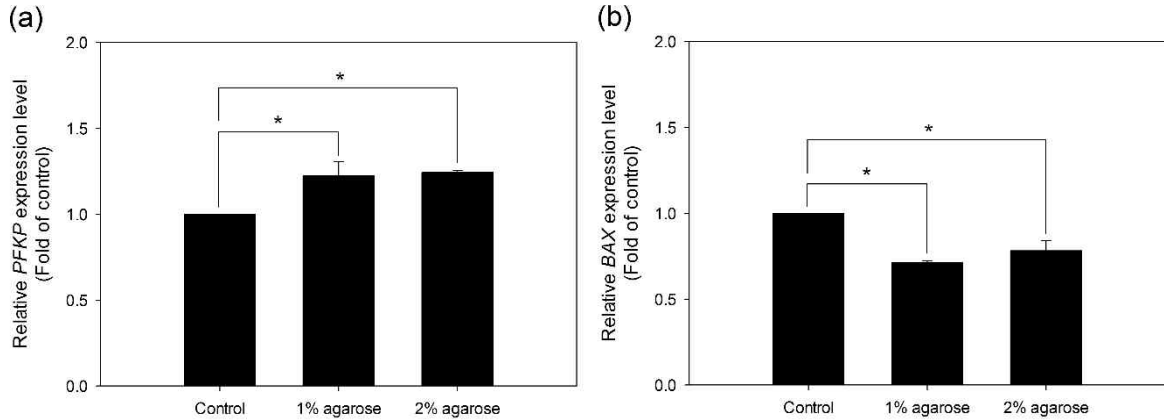


그림 67. 체외성숙된 난구세포-난자 복합체로부터 난구세포만 분리하여 PFKP와 BAX 유전자의 발현 분석. 1% (w/v)와 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체에서 유의적으로 높은 PFKP의 발현과, 유의적으로 낮은 BAX 유전자의 발현이 확인됨. 따라서, 배반포 발생률과, 난모세포의 확장, 그리고 유전자 발현을 비교했을 때, 1% (w/v) 아가로스가 난구세포-난자 복합체의 발달능을 향상시키는 것을 확인함. * $p < 0.05$

♣ 연구수행결과

: 0.2×10^6 sperm/ml 정자 농도가 다른 농도에 비해 분할률, 배반포 형성률, 단일정자 수정률, 정상 수정률 등이 수치적으로 높았으나 유의적인 차이가 나지 않았다. 돼지 난자의 체외발육배양액에 insulin을 첨가하여 배양했을 때 난자의 성숙률이 개선되고 난자의 크기도 커지는 것을 확인하였으며, Insulin과 EGF가 배아 발생능을 효율적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 그 밖에 1% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체의 배반포 발생률이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 1% (w/v)와 2% (w/v) 아가로스가 코팅된 환경에서 체외성숙된 난구세포-난자 복합체의 난구세포 확장이 대조군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이와 같은 방법은 고품질의 난자생산을 위해 필요한 기술을 확보하는 한편 다정자수정을 억제하여 체외수정 유래 산자 생산에 기초지식을 제공할 것으로 판단된다.

♣ 향후 연구추진계획

: 정원줄기세포 이식 돼지로부터 정상적인 정자수의 생산이 어려울 경우 난세포질내 정자 주입법(ICSI) 등의 기술을 활용하여 산자생산 연구를 추후 진행할 계획이다.

● 협동연구과제: 돼지 형질전환 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 및 형질전환 돼지 생산 기술 개발

1. 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 개발

가. 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립

♣ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017년-2019년)

♣ 연구수행내용

: 본 연구팀은 정소 세정관 내 정원줄기세포를 특이적으로 제거하는 부설판을 이용하여 유카탄 미니돼지 기반 형질전환 정원줄기세포 이식용 수컷 미니돼지 생산하고 효과적인 정원줄기세포 제거기술을 확립하고자 하였다. 부설판은 임신 98, 108일령 모돈 피하에 7.5 mg/kg와 3.75mg/kg 농도로 2차례 처치되었다. 부설판 처치에 의해 생산된 수컷 미니돼지는 약 4, 6, 8, 12개월 령에 도달 되었을 때, 정소를 채취하여 형태학적 (크기 및 무게) 및 해부학적 (구조 및 발달상 특징) 특성을 비교 분석하였고 유카탄 미니돼지 최적의 부설판 처치 농도를 평가하였다.

(1) 부설판(Busulfan)을 이용한 정원줄기세포 제거 수컷 돼지 생산

◆ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017년-2019년)

◆ 연구수행내용

: 정소 세정관 내 정원줄기세포가 제거된 수컷을 개발하기 위한 연구는 햄스터, 토끼, 개, 돼지, 소 등 다양한 종에서 이루어져 왔으며, 일반적으로 부설판이 사용되고 있으나 이 약물의 최적 용량은 동물 종마다 다르며 정확한 용법과 용량은 정해지지 않았다.

: 본 연구팀은 돼지 중에서도 유카탄 미니돼지의 정소 세정관 내 정원줄기세포를 제거하기 위하여 자료 및 문헌 검토를 통해 다양한 부설판 처치 용법을 확인하였으며 (표 14), Wenxian Zeng (2013)과 Honaramooz (2005) 등의 연구논문을 참고하여 부설판 처치 방법, 시기, 용량 등의 시험 설계를 완성하였다 (그림 68).

표 14. 돼지 정소 세정관 내 정원줄기세포 제거를 위한 다양한 부설판 처치 용법

처치 방법	처치 시기	용량 및 처치 방법
피하 내 주사	출생 전	임신 98, 108일령 7.5 mg/kg 주사
자궁 내 주사	출생 전	임신 102, 105일령 7.5 mg/kg 주사
정소 내 직접 주사	출생 후	생후 5, 9, 13, 17주 5-15 mg/kg 주사

: 선행 연구들은 상업적으로 사육되고 있는 일반돼지 (3원교잡종; 요크셔x랜드레이스x듀록)를 이용하여 부설판 처치의 적정 농도를 7.5 mg/kg로 확립한 바 있어 본 연구에서도 제 1 실험군으로 선정하였다.

: 그러나 본 연구팀이 개발하고자 하는 유카탄 미니돼지의 경우 일반돼지 체중의 약 1/4 (40-60 kg) 정도 수준으로 종간의 특성 및 약물에 대한 반응, 그리고 감수성에 차이를 고려하여 기존 연구에서 이용된 용량 보다 절반 수준의 부설판 농도를 (3.75 mg/kg) 추가 실험군 (제 2 실험군)으로 선정하였다.

: 본 연구팀은 유카탄 미니돼지의 최적 사양관리 및 헬스모니터링 프로토콜을 보유하고 있으며 표준운영절차 (SOP)에 따라 임신 모돈과 생산된 자돈의 사양관리를 진행하였다.

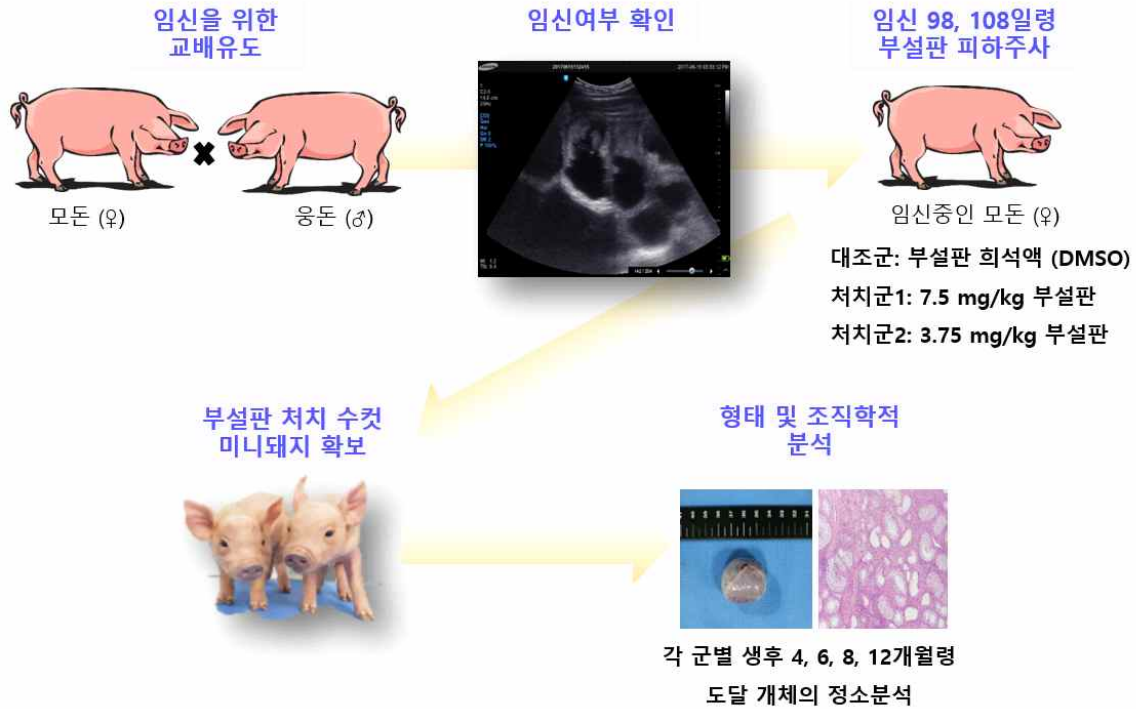


그림 68. 부설판을 이용한 정원줄기세포 제거 수컷 미니돼지 개발 모식도

- : 그림1과 같이 실험 디자인에 맞추어 각 그룹 당 2두씩, 총 6두의 암컷 미니돼지와 동일한 수컷 돼지 1두를 이용해 자연교배를 진행하여 임신을 유도하였다. 6두 모두 임신이 확인되어 2두는 7.5 mg/kg 부설판 처치군, 2두는 3.75 mg/kg 부설판 처치군, 그리고 2두는 대조군으로 설정하였다.
- : 부설판은 40 mg/ml 농도로 처치 30분 전, DMSO에 희석하여 신선한 상태로 준비하고, 주사 전 임신이 유지 중인 모돈의 체중에 맞춰 임신 98일과 108일에 피하 내 주사하였다. 대조군은 두 실험군과 동일 용법으로 용매제인 DMSO만을 주사하였다. 실험군과 대조군의 모든 모돈은 DMSO 및 부설판 처치와 관계없이 임신 115일령 내외로 안전하게 자연분만 하였고 산자 수 및 암/수 비율 등에는 큰 차이를 나타내지 않았다 (표 15).

표 15. 부설판 처치 그룹 별 생산 자돈 수 및 평균 체중

그룹	모돈 두 수	평균 임신기간	총 분만 산자 수	수컷 생산 두 수	평균 체중
대조군	2	114.5일	10두	6두	935 g
7.5 mg/kg 부설판 처치군	2	115.5일	8두	4두	955 g
3.75 mg/kg 부설판 처치군	2	115일	9두	4두	933 g

- : 생산된 수컷 자돈은 대조군에서 6두, 각각의 실험군에서는 4두씩 확보되었는데 (표

15), 특이적으로 부설판이 처치된 실험군 자돈들의 피부색이 대조군에 비해 비교적 어두운 색을 띠었으나, 평균적인 생시체중이나 성장하는 동안의 활력 및 건강상의 차이는 나타나지 않았다 (표 15 및 그림 69).



그림 69. 대조군 (1), 실험군 (2)에서 생산된 수컷 미니돼지

(2) 부설판 처치로 생산된 수컷 미니돼지 정소의 형태 및 조직학적 분석

◆ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017년-2019년)

◆ 연구수행내용

: 부설판 처치에 따른 유카탄 미니돼지에서 세정관 내 정원줄기세포 제거효율을 확인하기 위하여 생산된 대조군 및 실험군 (처치군1: 7.5mg/kg, 처치군2: 3.75mg/kg) 수컷 미니돼지 자돈들은 생후 4, 6, 8 그리고 12개월령에 도달하였을 때 순차적으로 희생되었으며 그룹 간 정소의 형태 (크기 및 무게) 및 조직학적 비교 분석을 실시하였다.

: 생후 4개월령 대조군 정소의 크기 및 무게는 가로 평균 1.8 cm, 세로 평균 2.7 cm, 평균 무게 3.4 g을 나타내었고 처치군1의 정소 크기 및 무게는 가로 평균 1.5 cm, 세로 평균 2.1 cm, 평균 무게 1.6 g으로 대조군에 비해 작은 크기와 무게를 나타내었다. 처치군2의 정소 크기 및 무게는 가로 평균 1.9 cm, 세로 평균, 2.6 cm, 평균 무게 5.31 g으로 측정되었으며 처치군1 대비 평균 무게가 약 3배 수준 증가된 것으로 나타났다 (그림 70 및 표 16).

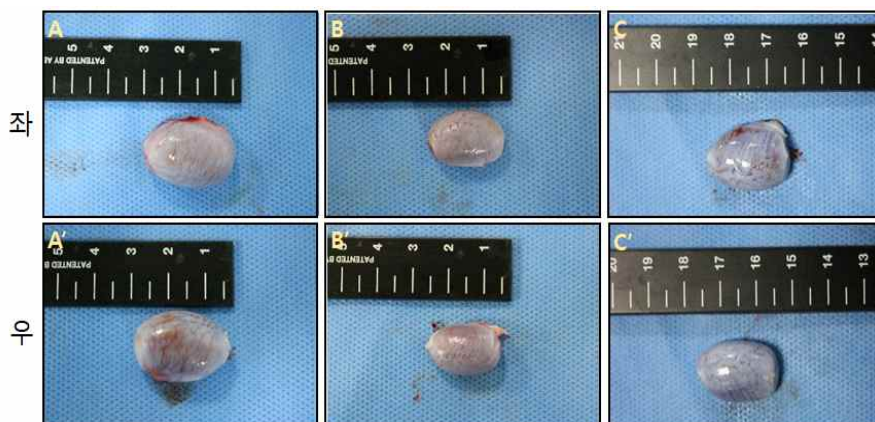


그림 70. 생후 4개월령 미니돼지 정소. (A, A': 대조군; B, B': 처치군1; C, C': 처치군2)

표 16. 생후 4개월령 미니돼지 대조군 및 부설판 처치군의 형태학적 정소 분석표

시험군	채취 시 일령	개체 무게 (kg)	부위	가로 크기 (cm)	가로 평균 (cm)	세로 크기 (cm)	세로 평균 (cm)	무게 (g)	평균 무게 (g)
대조군 (A,A')	117	12.5	좌측	2.5	2.7	1.5	1.8	3.2	3.4
			우측	3.0		2.2		3.6	
처치군1 (B,B')	114	12.7	좌측	2.2	2.1	1.6	1.5	1.7	1.6
			우측	2.0		1.5		1.5	
처치군2 (C,C')	104	12.0	좌측	2.0	1.9	2.8	2.6	5.62	5.31
			우측	1.8		2.5		5.0	

: 부설판 처치 유무에 따른 고환 내 세정관 수를 비롯하여 세정관 내 정자세포의 분포 등의 해부학적 비교 분석을 위해 고환 조직을 삭정하여 조직슬라이드를 제작하고 H&E 염색이 실시되었다. 세정관 수는 40배 시야에서 개체별로 서로 다른 5개의 부위 (#1 부터 #5)를 무작위로 선정하여 1 mm² 당 관찰되는 수를 측정하였고 평균치를 계산하였으며 세정관 내 세포구성 및 특징은 400배 시야에서 비교 관찰하였다. 그 결과 두 처치군 모두 대조군 (57.3개)에 비해 약 3~3.5배 적은 세정관 수 (처치군1: 12.5개, 처치군2: 19.6개)가 확인되었다 (그림 71 및 표 17).

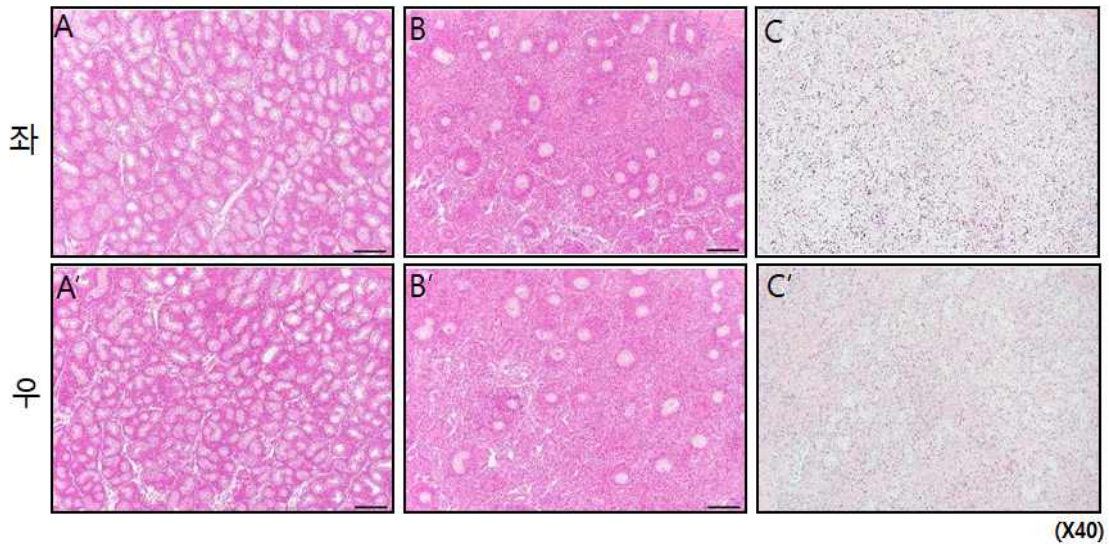


그림 71. 생후 4개월령 미니돼지 세정관 분포. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 17. 생후 4개월령 미니돼지의 고환 1 mm² 당 세정관 수

시험군	부위	측정치					평균
		#1	#2	#3	#4	#5	
대조군 (A,A')	좌	62	61	49	46	50	57.3

	우	73	65	53	72	42	
처치군1 (B,B')	좌	13	16	10	14	13	12.5
	우	14	12	12	8	13	
처치군2 (C,C')	좌	14	26	24	18	19	19.6
	우	17	13	23	20	22	

: 대조군의 고환조직 내에서는 지지세포와 다양한 단계로 분열중인 정모세포 무리가 관찰되고 세정관 중심부인 관강 내 일부에서 정자 (그림 72A', 화살표)가 관찰되기도 하였다. 하지만, 부설관 처치군 모두의 경우 중심부로 세정관 가장자리 기저부에 세포가 배열되어 있으나 정상적인 세정관에서 보이는 여러 개의 세포층은 관찰되지 않고 중심이 온전한 관강의 형태는 이루어지지 못하였다 (그림 72).

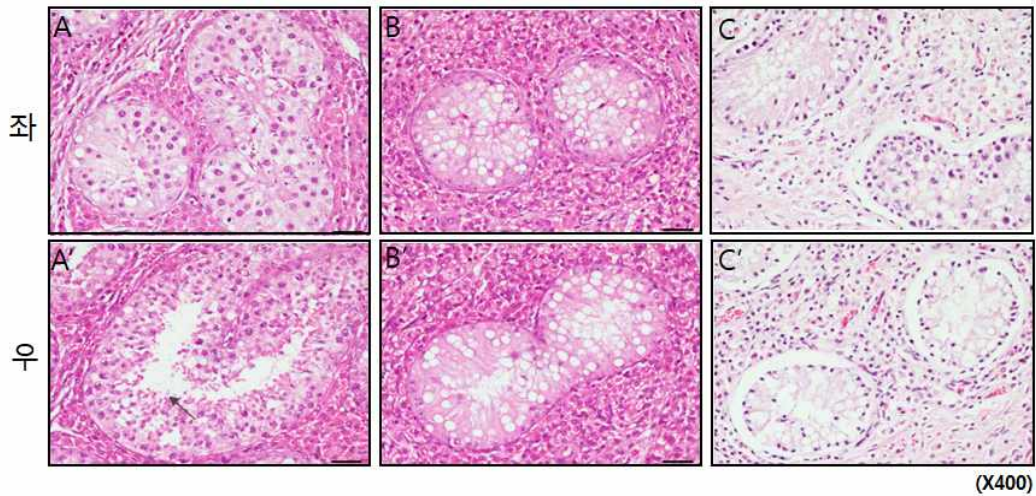


그림 72. 생후 4개월령 미니돼지 세정관 관찰. (A, A': 대조군; B, B': 처치군1; C, C': 처치군2)

: 6개월령 대조군 정소의 크기 및 무게는 가로 평균 2.2 cm, 세로 평균 3.0 cm, 평균 무게 8.0 g을 나타내었고 처치군1의 정소 크기 및 무게는 가로 평균 1.5 cm, 세로 평균 2.7 cm, 평균 무게 4.7 g으로 대조군 대비 무게 및 크기가 4개월령 때와 동일하게 감소하였다. 그러나 처치군2의 경우 가로 평균 2.2 cm, 세로 평균 3.9 cm, 평균 무게 10.5 g으로 4개월령과 유사하게 처치군1에 비해 상대적으로 무게가 증가되었고 대조군과 유사한 크기와 평균 무게를 나타내었다 (그림 73 및 표 18).

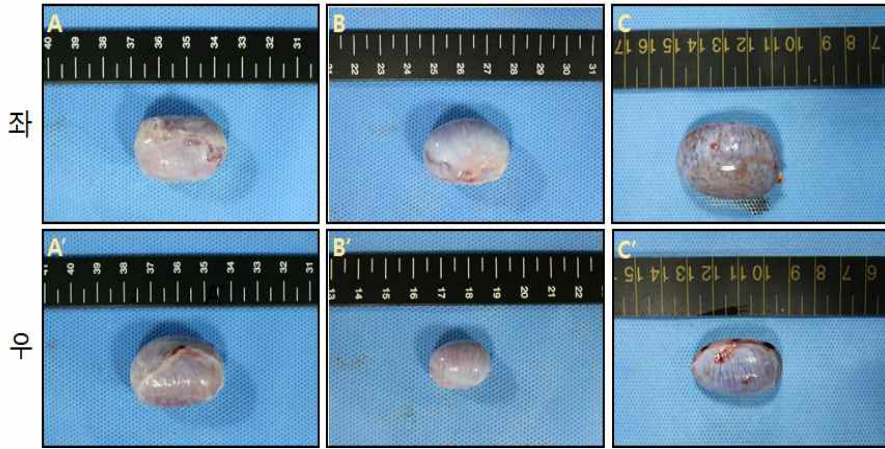


그림 73. 생후 6개월령 미니돼지 정소. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 18. 생후 6개월령 미니돼지 대조군 및 부설판 처치군의 형태학적 정소 분석표

시험군	체취 시 일령	개체 무게 (kg)	부위	가로 크기 (cm)	가로 평균 (cm)	세로 크기 (cm)	세로 평균 (cm)	무게 (g)	평균 무게 (g)
대조군 (A,A')	177	15.5	좌측	2	2.2	3.0	3.0	7.5	8.0
			우측	2.5		3.0		8.5	
처치군1 (B,B')	174	19.0	좌측	2.0	1.5	3.5	2.7	6.9	4.7
			우측	1.0		2.0		2.6	
처치군2 (C,C')	182	25.0	좌측	2.5	2.2	4.3	3.9	14.2	10.5
			우측	1.8		3.5		6.9	

: 생후 4개월령 정소의 조직학적 분석과 동일한 방식으로 생후 6개월령의 정소 세정관 조직을 분석한 결과, 각각 처치군에서 4개월령 보다 상대적으로 적은 세정관 수를 나타내었다. 대조군과 비교 하였을 때는 4개월령과 동일하게 대조군 대비 (대조군: 51개, 처치군1: 3.9개, 처치군2: 12.7개) 상대적으로 낮은 세정관 수가 나타났다 (그림 74 및 표 19).

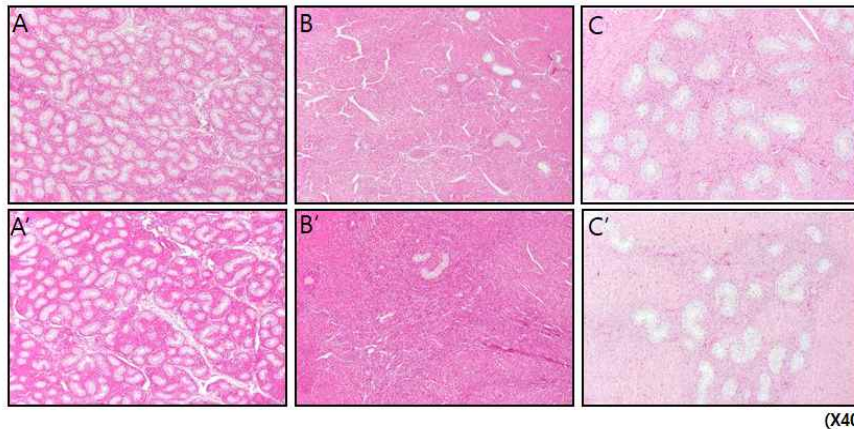


그림 74. 생후 6개월령 미니돼지 세정관 분포. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 19. 생후 6개월령 미니돼지의 고환 1 mm² 당 세정관 수

시험군	부위	측정치					평균
		#1	#2	#3	#4	#5	
대조군 (A,A')	좌	46	53	53	44	62	51
	우	56	55	45	45	51	
처치군 (B,B')	좌	9	2	1	7	7	3.9
	우	4	0	6	0	3	
처치군2 (C,C')	좌	19	17	18	11	11	12.7
	우	13	11	8	11	8	

: 대조군인 일반 미니돼지 6개월령의 경우, 세정관 중심에 관강이 형성되고 세정관 내에서 지지세포와 분열중인 정모세포 및 관강 내 정자 (그림 75A, 화살표) 명확히 관찰되었다. 그러나 처치군1의 경우 세정관의 형태 및 세정관을 구성하는 세포층의 높이가 불규칙하고 관강이 형성된 세정관과 제대로 형성되지 않은 세정관이 혼재된 특징 보였다. 처치군2의 좌측 정소에서는 중심에 내강을 형성하고 성숙정자가 보이는 세정관 (S)이 대부분 이었지만 우측 정소에서는 정상적으로 정자를 형성하는 세정관 (S)과 세정관 구성세포가 변성되고 내강의 형성이 불분명한 비정상적 세정관 (D)가 일부 혼재되어 있는 모습이 관찰되었다 (그림 75).

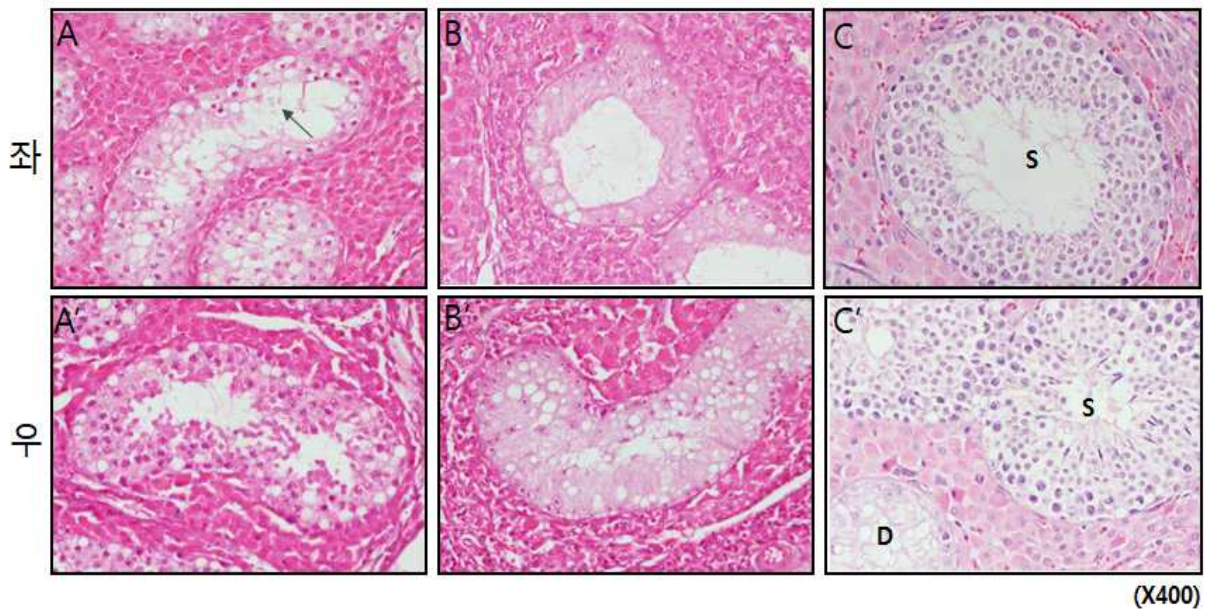


그림 75. 생후 6개월령 미니돼지 세정관 관찰. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

: 생후 8개월령 대조군 정소의 크기 및 무게는 가로 평균 3.5 cm, 세로 평균 6.0 cm, 평균 무게 44.6 g을 나타내었고 처치군1의 정소 크기 및 무게는 가로 평균 1.4 cm,

세로 평균 1.7 cm, 평균 무게 1.2 g으로 생후 8개월령 역시 대조군 보다 현저하게 작은 정소 수치를 나타내었다 (그림 76 및 표 20).

: 주목할 부분은 대조군의 경우 6개월령에 비해 정소의 크기 및 무게가 급격하게 증가되었으나, 처치군1의 경우 정소의 발달은 이루어지지 않았다. 처치군2는 대조군 대비 낮은 무게와 크기를 보였으나, 일령이 증가 될수록 지속적으로 무게가 증가하는 경향을 보였다 (그림 76 및 표 20).

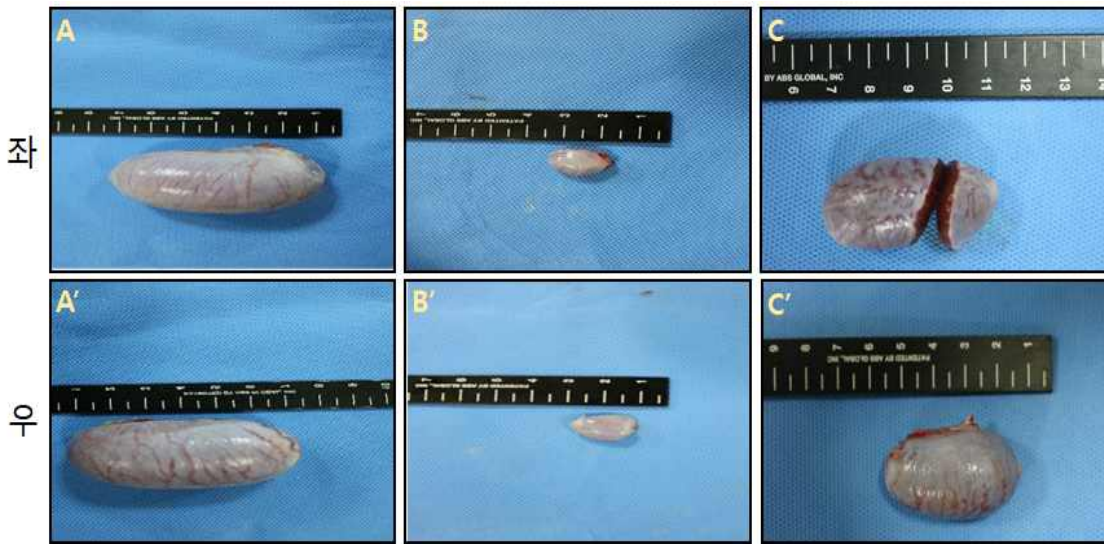


그림 76. 생후 8개월령 미니돼지 정소. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 20. 생후 8개월령 미니돼지 대조군 및 부설판 처치군의 형태학적 정소 분석표

시험군	채취 시 일령	개체 무게 (kg)	부위	가로 크기 (cm)	가로 평균 (cm)	세로 크기 (cm)	세로 평균 (cm)	무게 (g)	평균 무게 (g)
대조군 (A,A')	238	30.0	좌측	3.5	3.5	6.0	6.0	44.8	44.6
			우측	3.5		6.1		44.5	
처치군1 (B,B')	235	24.5	좌측	1.5	1.4	1.7	1.7	1.3	1.2
			우측	1.3		1.7		1.2	
처치군2 (C,C')	245	22.0	좌측	2.2	2.8	3.5	3.7	11.2	12.0
			우측	3.5		4.0		12.9	

: 생후 8개월령 정소의 1 mm² 당 세정관 수는 대조군 평균 37.1개, 부설판 처치군1 평균 19.6개, 처치군2는 평균 11.2개로 확인되었다. 부설판 처치군 모두 대조군 대비 2-3배 수준의 적은 세정관 수가 관찰되었다 (그림 77 및 표 21).

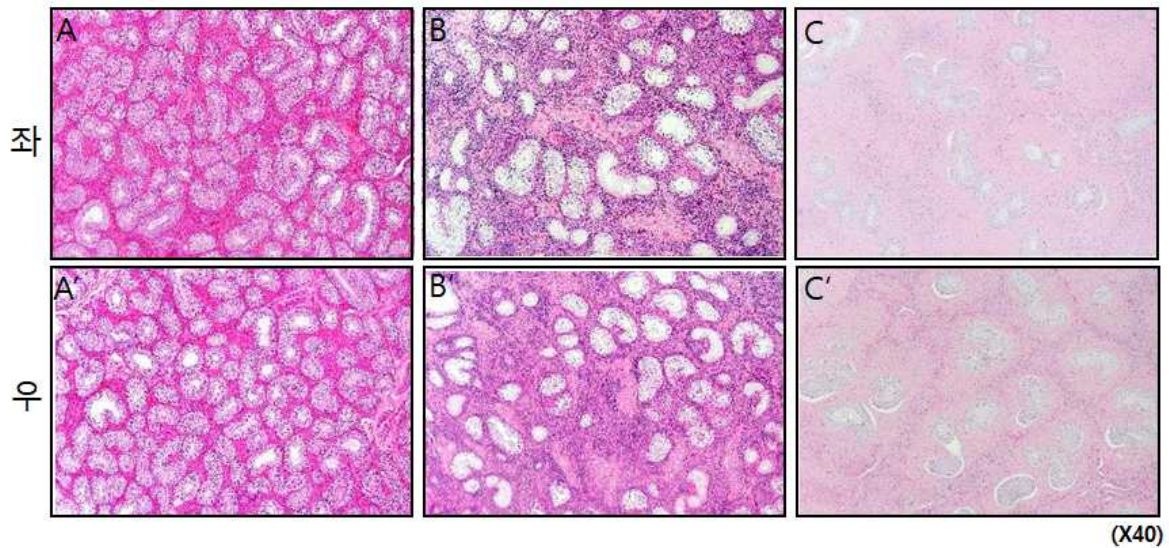


그림 77. 생후 8개월령 미니돼지 세정관 분포. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 21. 생후 8개월령 미니돼지의 고환 1 mm² 당 세정관 수

시험군	부위	측정치					평균
		#1	#2	#3	#4	#5	
대조군 (A,A')	좌	37	33	34	37	35	37.1
	우	38	30	41	43	43	
처치군 (B,B')	좌	19	14	21	15	22	19.6
	우	16	20	26	20	23	
처치군2 (C,C')	좌	11	8	10	7	15	11.2
	우	13	14	12	13	9	

: 생후 8개월령 대조군 정소의 세정관 에서는 지지세포와 다양한 단계로 분열중인 정모 세포가 6개월령 대비 많이 발견되고 관강 내 정자 (그림 78A' , 화살표)가 치밀하게 배열되는 반면, 부설관 처치군1 정소의 일부 세정관은 공포형성 및 세포의 형태가 위축되는 변화를 보였으나, 6개월령의 처치군 정소보다는 세포의 균일성이 증가되고 일부 소수의 정자도 관찰되었다. 처치군2의 세정관 에서는 처치군1 정소 세정관 대비 보다 명확하고 많은 수의 성숙된 정자를 포함하는 세정관이 관찰되는 특징을 보였다 (그림 78).

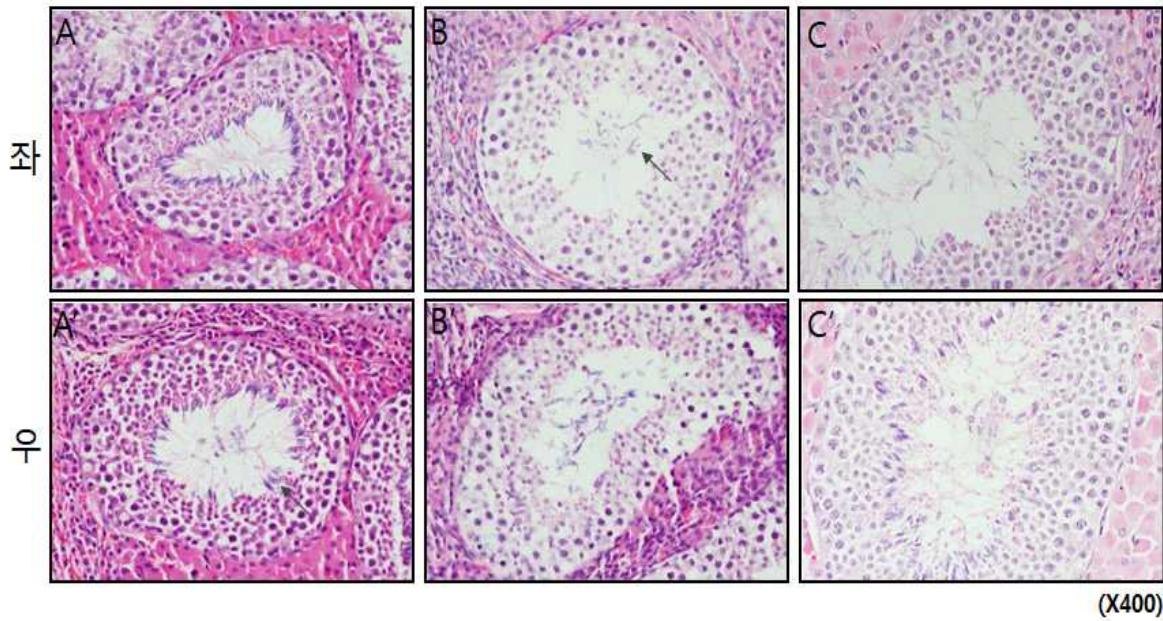


그림 78. 생후 8개월령 미니돼지 세정관 관찰. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

: 성성숙이 충분히 완료된 생후 12개월령 대조군 정소의 크기 및 무게는 가로 평균 4.4 cm, 세로 평균 6.9 cm, 평균 무게 55.3 g을 보여 지속적으로 증가하는 반면 처치군1의 정소 크기 및 무게는 가로 평균 1.7 cm, 세로 평균 2.3 cm, 평균 무게 2.6 g으로 증가의 현상은 보이지 않았다. 그러나 처치군1과 상반되게 처치군2에서는 8개월령 대비 급격한 무게의 증가가 나타났고 크기 또한 증가 되었는데 이러한 수치는 처치군1 정소 대비 약 2배 수준의 평균 크기, 무게는 약 12배 증가된 수치다 (그림 79 및 표 22).

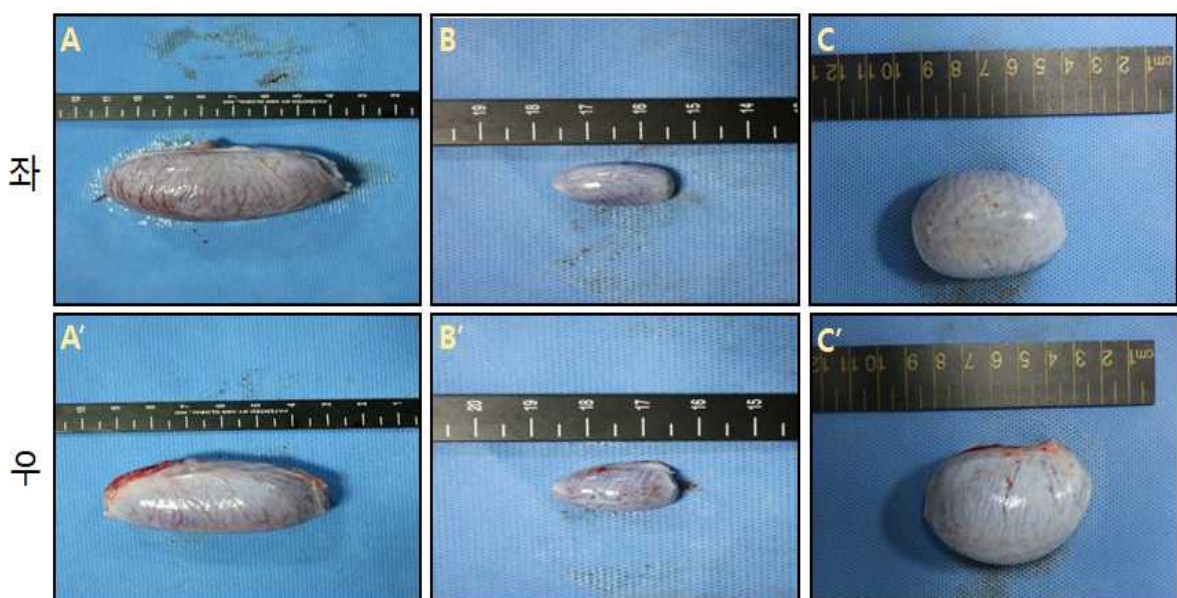


그림 79. 생후 12개월령 미니돼지 정소. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 22. 12개월령 미니돼지 대조군 및 부설판 처치군의 형태학적 정소 분석표

시험군	채취 시 일령	개체 무게 (kg)	부위	가로 크기 (cm)	가로 평균 (cm)	세로 크기 (cm)	세로 평균 (cm)	무게 (g)	평균 무게 (g)
대조군 (A,A')	344	45	좌측	4.5	4.4	7.5	6.9	65.1	55.3
			우측	4.3		6.4		45.5	
처치군1 (B,B')	355	30	좌측	1.7	1.7	2.4	2.3	2.7	2.6
			우측	1.7		2.2		2.6	
처치군2 (C,C')	406	35	좌측	3.7	3.5	5.6	5.3	36.8	32.7
			우측	3.3		5.0		28.7	

: 생후 12개월령 정소의 1 mm² 당 세정관 수는 대조군 평균 32.9개, 부설판 처치군1 평균 7.5개, 처치군2 10.2개로 나타났다. 충분한 성숙이 이루어짐에도 불구하고 두 부설판 처치군 모두 대조군 수준의 세정관 수는 확인되지 않았다 (그림 80 및 표 23).

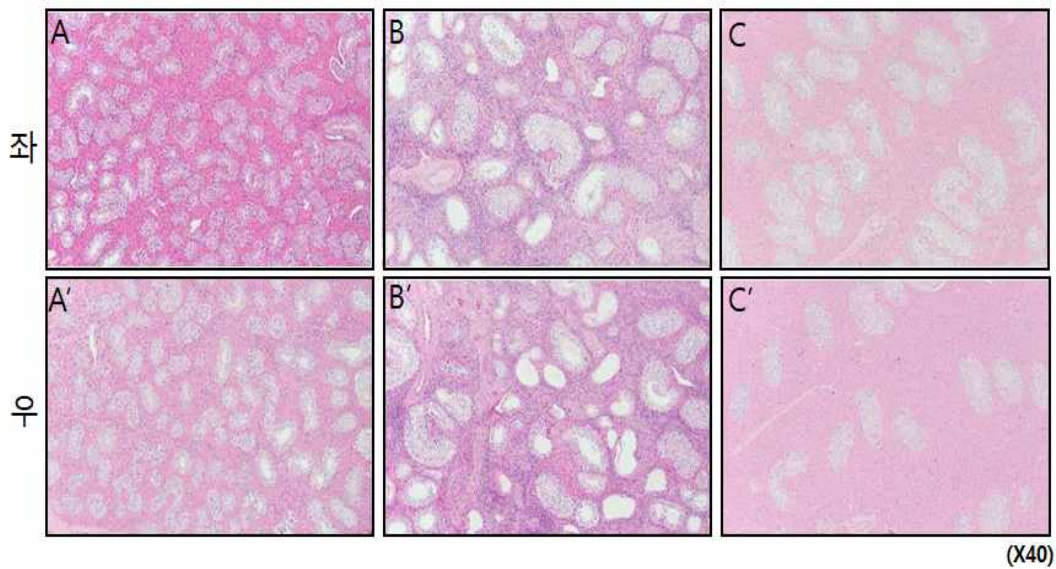


그림 80. 생후 12개월령 미니돼지 세정관 분포. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

표 23. 생후 12개월령 미니돼지의 고환 1 mm² 당 세정관 수

시험군	부위	측정치					평균
		#1	#2	#3	#4	#5	
대조군 (A,A')	좌	34	34	33	37	29	32.9
	우	32	36	32	29	33	
처치군	좌	21	20	12	22	17	17.5

(B,B')	우	13	23	16	18	13	
처치군2 (C,C')	좌	12	11	17	11	10	10.2
	우	7	6	13	6	9	

: 조직학적 검사를 통해 정소 세정관을 최종적으로 관찰한 결과 대조군의 경우 계속적으로 중심부 관강이 형성된 정세관에서 지지세포와 정자로 분열중인 정모세포가 다수 발견되었으며 정세관 내 정자 형성이 보다 명확했다. 그러나 처치군1의 경우 생후 6개월령, 8개월령과 동일하게 세포층이 붕괴되고 온전한 생식세포 형태를 갖춘 정자는 관찰되지 않았다. 처치군2는 일부 정상적인 세정관과 일부 비정상적인 세정관이 혼재된 형태를 보이는 동시에 8개월령과 동일하게 지속적으로 중심에 형성된 내강에서 성숙정자가 발견되었다 (그림 81). 처치군2의 경우 무게 및 크기가 급격히 증가된 현상을 보임에 따라 추가적으로 부정소에서 정자의 존재 여부를 평가하였고 그 결과 좌/우 부정소에서 다수의 정자가 존재함이 발견되었다 (그림 82).

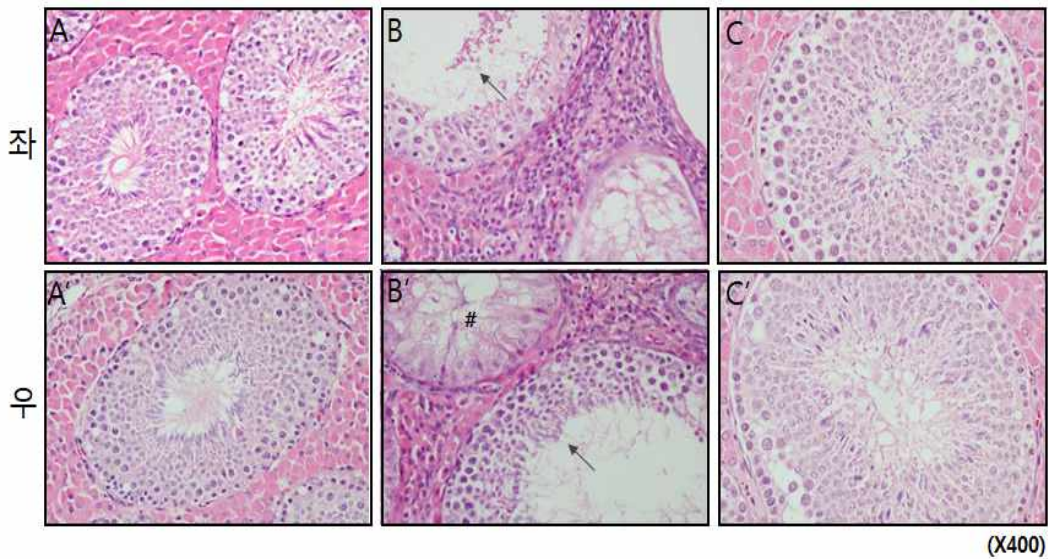


그림 81. 12개월령 미니돼지 세정관 관찰. (A, A' : 대조군; B, B' : 처치군1; C, C' : 처치군2)

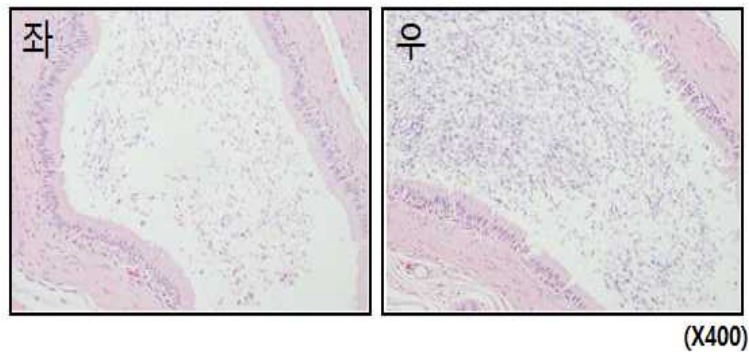


그림 82. 12개월령 3.75 mg/kg 부설판 처치(처치군2) 미니돼지 부정소 조직분석

: 대조군인 유카탄 미니돼지의 경우 성성숙이 이루어지는 생후 6개월령부터 정소의 크기와 무게가 급격하게 증가되었으며 조직학적 분석을 통해 생후 8개월령부터 세정관 내 다수의 정자가 관찰되어 번식능 획득을 확인할 수 있었다 (표 24).

표 24. 월령에 따른 평균 정소 크기 및 평균 세정관 수 종합

월 령	그룹 및 항목	평균 가로 길이 (cm)	평균 세로 길이 (cm)	평균 무게 (g)	평균 세정관 수 (개)
4개월	대조군	2.7	1.8	3.4	57.3
	처치군1	2.1	1.5	1.6	12.5
	처치군2	1.9	2.6	5.3	19.6
6개월	대조군	2.2	3	8	51
	처치군1	1.5	2.7	4.7	3.9
	처치군2	2.2	3.9	10.5	12.7
8개월	대조군	3.5	6	44.6	37.1
	처치군1	1.4	1.7	1.2	19.6
	처치군2	2.8	3.7	12	11.2
12개월	대조군	4.4	6.9	53.3	32.9
	처치군1	1.7	2.3	2.6	17.5
	처치군2	3.5	5.3	32.7	10.2

: 7.5 mg/kg 부설판이 처치된 미니돼지의 경우 생후 1년령에 도달 되었음에도 불구하고 정소의 크기 및 무게의 증가가 나타나지 않았을 뿐만 아니라 비정상적인 형태를 나타내는 세정관이 지속적으로 관찰되었으며 정원줄기세포의 분화능력이나 번식능 획득, 그리고 세정관 수가 대조군에 비해 현저하게 저하됨이 나타났다.

: 3.75 mg/kg 부설판 처치 미니돼지의 경우, 7.5 mg/kg 부설판이 처치된 미니돼지와 유사한 세정관 수준을 보였으나, 대조군과 유사한 경향성으로 성성숙 시점 (생후 6~8개월) 부터 번식능력의 회복이 나타났고 이는 이후 지속적으로 관찰되었으며 대조군과 동일하게 급격한 형태적 증가를 나타냈다.

: 이전 연구결과에서 일반돼지 (3원교잡종, 요크셔x랜드레이스x듀록)에 7.5 mg/kg의 농도로 부설판 처치를 통해 효과적으로 세정관내 정원줄기세포 형성을 억제시킬 수 있었으나, 성성숙 이후 억제된 번식능은 상당히 회복되었다는 보고가 있는데 3.75 mg/kg 처치군의 결과는 이전 문헌과 유사한 결과를 나타낸다. 그러나 월령 별로 검토할 수 있는 개체가 1두에 한정되어 있어 추가적인 샘플 확보를 통한 분석이 필요할 것으로 보인다.

: 본 연구의 결과를 종합하였을 때, 부설판을 이용한 미니돼지 세정관 내 정원줄기세포

제거를 위하여 기존에 보고된 처치용량 보다 감소된 처치가 더 적합할 것으로 사료된다.

: 또한 정소 세정관 수 및 형태는 슬라이드 제작 시 삭정 방향이나 부위에 따라서 달라질 가능성이 있으므로 월령에 따른 세정관 수 변화 검증에 대해서는 보다 세밀한 분석이 요구된다.

: 추가적으로 부설관 처치에 의한 세정관 수의 감소 원인, 그리고 부설관 처치로 세정관 내 정원줄기세포 형성이 억제되었다가 다시 회복되는 양상을 나타내었던 개체들의 번식능을 확인할 필요가 있다.

♣ 연구수행결과

: 7.5 mg/kg 부설관이 처치된 미니돼지의 경우 생후 1년 령에 도달 되었음에도 불구하고 정소의 크기 및 무게의 증가가 나타나지 않았을 뿐만 아니라 비정상적인 형태를 나타내는 세정관이 지속적으로 관찰되었으며 정원줄기세포의 분화능력이나 번식능 획득, 그리고 세정관 수가 대조군에 비해 현저하게 저하됨이 나타났다.

: 3.75 mg/kg 부설관이 처치된 미니돼지의 경우, 생후 4개월까지 7.5 mg/kg 처치 미니돼지와 유사한 세정관 수를 나타내었으나, 성성숙 시점 (생후 6~8개월) 부터 대조군과 유사하게 정소의 크기와 무게가 급격하게 증가되면서 번식능력의 회복이 나타났다.

: 일반돼지 (3원교잡종, 요크셔 x 랜드레이스 x 듀록)의 경우 임신 모돈에 7.5 mg/kg 농도의 부설관 처치를 통해 효과적으로 세정관내 정원줄기세포 형성을 억제시킬 수 있었으나, 성성숙 이후 억제된 번식능은 상당히 회복되었다는 선행 연구 보고가 있다. 본 연구에서는 일반돼지 보다 작은 체구의 유카탄 미니돼지를 이용하였는데, 7.5 mg/kg 부설관 농도는 미니돼지에 있어 과도한 용량으로 보인다. 그에 반해 절반 용량인 3.75 mg/kg 처치군에서 이전 문헌과 유사한 결과를 나타내는 것으로 보아 부설관을 이용한 미니돼지 세정관 내 정원줄기세포 제거를 위해서는 기존에 보고된 처치용량 보다 감소된 처치가 더 적합할 것으로 사료된다.

♣ 향후 연구추진계획

: 본 연구에서 월령 별로 검토할 수 있는 개체가 1두에 한정되어 있어 추가적인 샘플 확보를 통한 분석이 필요할 것으로 보인다. 또한 정소 세정관 수 및 형태는 슬라이드 제작 시 삭정 방향이나 부위에 따라서 달라질 가능성이 있으므로 월령에 따른 세정관 수 변화 검증에 대해서는 보다 세밀한 분석이 요구된다. 추가적으로 부설관 처치에 의한 세정관 수의 감소 원인, 그리고 부설관 처치로 세정관 내 정원줄기세포 형성이 억제되었다가 다시 회복되는 양상을 나타내었던 개체들의 번식능을 확인할 필요가 있다.

2. 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산

가. 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립

♣ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017년-2019년)

♣ 연구수행내용

: 본 연구팀은 부설관 처치에 의한 정원줄기세포 이식용 돼지를 생산하는 기술뿐만 아니

라 유전자 편집기술과 체세포 복제기술을 이용한 정원줄기세포 이식용 돼지를 개발하고자 하였다. NANOS2 유전자는 세정관 내에 존재하는 정원줄기세포의 발생과 연관된 중요 유전자로 NANOS2 유전자 결손은 정소 내 기관형성에 영향을 미치지 않으며 정원줄기세포의 형성을 효과적으로 억제 할 수 있다. 따라서 본 연구팀은 CRISPR/Cas9 유전자 편집기술을 이용하여 NANOS2 유전자 결손 형질전환 세포주를 확립하고 구축된 세포주를 이용하여 체세포 복제 기술을 통해 NANOS2 결손 형질전환복제돼지를 생산하였다.

(1) NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지 생산을 통한 정원줄기세포 이식용 돼지 개발

◆ 연구수행기간: 2, 3차년도 (2018-2019)

◆ 연구수행내용

: 본 연구팀은 부설관 처치를 통한 정원줄기세포 이식용 돼지를 생산하고자 다양한 조건을 검토해 보았으나 부설관 처치의 최적 농도를 선정하기에 시간과 비용이 많이 들어감에 따라 보다 빠른 결과 도출을 위해 추가적으로 형질전환 기술을 통한 형질전환 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 모색하였다.

: NANOS2 유전자는 정원줄기세포의 유지에 중요한 Cytoplasmic mRNP의 응축을 촉진하여 정원줄기세포 형성 및 유지를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Zhou, 2015). 또한 Ki-Eun Park (2017) 등은 NANOS2 유전자가 결손된 돼지는 정소 세정관의 형성에는 영향을 미치지 않으나 효과적으로 정원줄기세포의 제거가 가능하다는 것을 밝혔다.

: 따라서 본 연구팀은 정원줄기세포 이식용 수컷 미니돼지를 개발하기 위하여 유카탄 미니돼지의 NANOS2 유전자가 결손된 형질전환 복제돼지를 생산 계획을 수립하고 수행하였다.

○ NANOS2 유전자 결손 형질전환 세포주 구축

: NANOS2 유전자가 결손된 형질전환 세포주를 확립하고자 Ki-Eun Park (2017)의 연구를 바탕으로 NANOS2 유전자 exon1 위치에서 4개의 타겟 부위를 선정하고 guide RNA (gRNA) 합성을 통해 벡터 클로닝을 진행했다. gRNA 1: CTGATCCAGAATCGTCGACA, gRNA 2: TGATCCAGAATCGTCGACAA, gRNA 3: TCCCCGGTGTCCCGGGCCTC, gRNA4 : GAATCGTCGACAAGGGCCAG 선정된 타겟 부위는 CRISPR/Cas9 시스템의 off-target 부위가 없는지 CRISPR RGen Tools을 이용하여 확인하고 합성된 gRNA를 CRISPR/Cas9 벡터에 클로닝을 하였다 (그림 83).

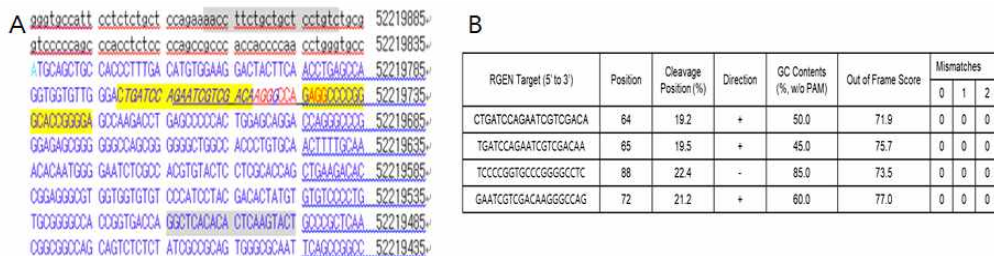


그림 83. NANOS2 유전자 exon1 타겟 위치(A) 및 CRISPR/Cas9 시스템의 off-target 확인(B)

: 4종의 타겟 부위 CRISPR/Cas9 벡터 콜로니를 확보하고 gRNA에 제한효소 처리 후 전기영동을 통하여 삽입 여부를 확인하였다. gRNA가 삽입이 되었다면 두 개의 band, gRNA가 삽입이 되지 않았으면 세개의 band가 나타나게 되는 데, 그림2A와 같이 4개의 타겟 벡터 모두 gRNA가 삽입된 것으로 확인되었으며 염기서열 분석을 통해 이상 유무를 평가하였다 (그림 84).

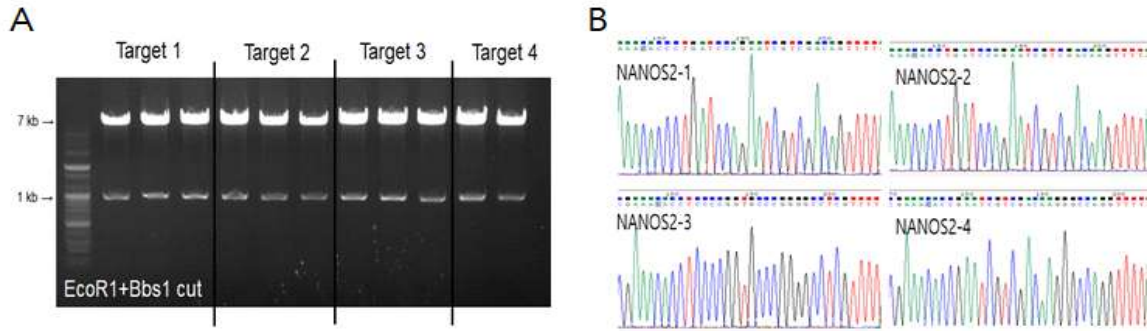


그림 84. 제한효소 처리된 NANOS2 타겟 CRISPR/Cas9 벡터(A)와 클로닝 벡터 염기서열 분석(B)

: 4개의 NANOS2 CRISPR/Cas9 벡터 중 높은 효율의 벡터를 선정하기 위해 CRISPR/Cas9 벡터 cleavage 효율을 평가하기 위하여 T7 endonuclease 1 assay가 실시되었다. 4개의 NANOS2 타겟 CRISPR/Cas9 벡터를 미니돼지 귀세포에 Lipofectamin 3000을 이용하여 transfection을 한 뒤 transfection된 세포에서 genomic DNA를 추출하였고 primer F: AACCTTCTGCTGCTCCTGTC, primer R: AGTACTTGAGTGTGTGAGCC를 사용하여 PCR을 진행하였다. T7 endonuclease 1 효소 처리 후 전기영동 한 결과 NANOS2 타겟 2번 벡터에서 효과적인 결손을 확인하였다 (그림 85).

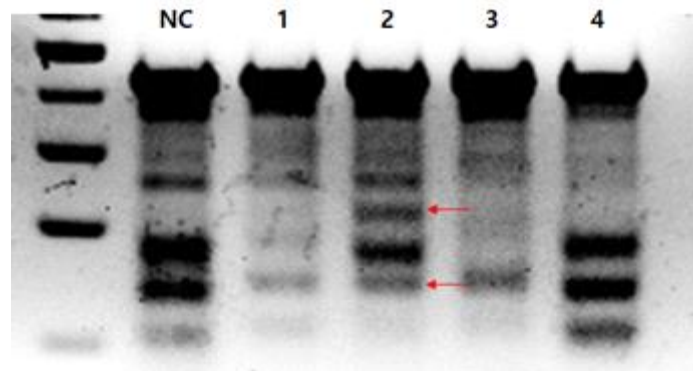


그림 85. T7 endonuclease 1 assay를 통한 클로닝된 CRISPR/Cas9 벡터 전기영동 결과

: 위 방법을 통하여 선정된 NANOS2 유전자 결손 CRISPR/Cas9 벡터를 미니돼지 귀세포에 transfection하여 벡터 내에 있는 GFP signal을 확인하고, Fluorescence-activated cell sorting (FACS)를 통해 EGFP positive cell을 분리하였다. 분리된 세포는 100 mm dish당 1,000개씩 배양하여 single colony를 hand pick up 방법으로 분리하여 공여세포로 사용하기 위하여 대량 배양을 유도하였다 (그림 86).

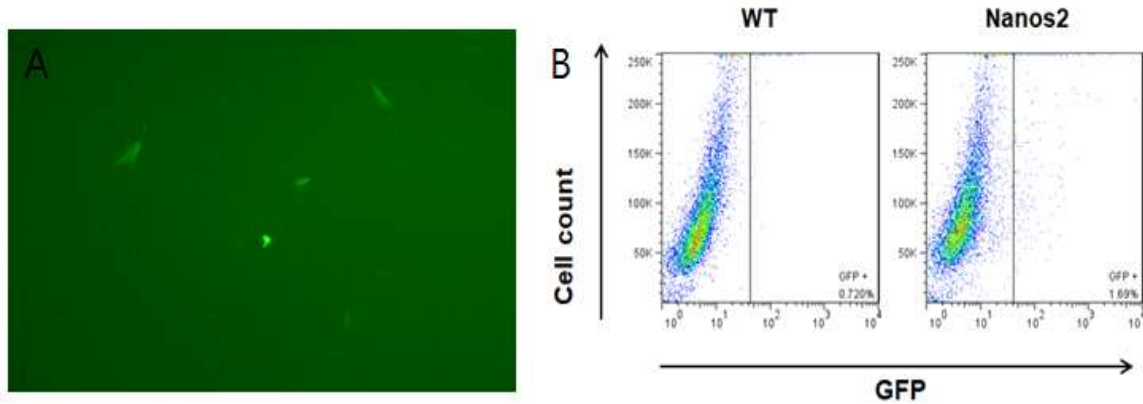


그림 86. Transfection 후 Cas9 벡터의 GFP 신호 (A) 및 FACS sorting 결과 (B)

: 배양된 일부 single colony는 genomic DNA를 추출 후 타겟 부위 확인용 Primer를 이용하여 PCR 하고 PCR product를 이용하여 형질전환된 세포의 유전자 염기서열을 분석한 결과 #4번은 2 bp deletion, #9번은 19 bp deletion 또는 1 bp insertion 됨을 확인하였다 (그림 87).

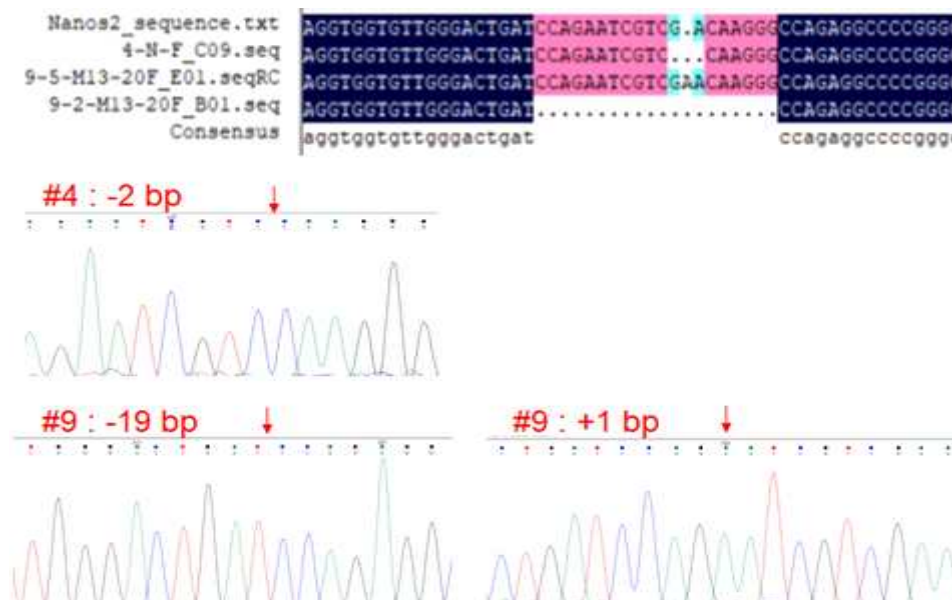


그림 87. 구축된 NANOS2 유전자 결손 세포주 염기서열 분석 결과

○ NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지 생산

: 최종적으로 구축된 2개의 NANOS2 유전자 결손 세포주를 이용하여 복제돼지를 생산하기 이전에 세포주 유래 체세포 복제배아의 체외발달 능력을 평가하였다. 총 3회의 걸쳐 핵이식 배아가 제작되었고 통계적으로 분석을 진행한 결과 대조군 대비 초기 분할 및 배반포 형성능력 뿐만 아니라 전체 세포수에는 유의적 차이를 보이지 않았다 (표 25).

표 25. NANOS2 유전자 결손 형질전환 세포주 유래 핵이식란 체외발달 능력 평가

Donor cell type	No. of oocytes cultured*	% of embryos developed to		No. of cells in Blastocyst
		≥2-cell	Blastocyst	
Wild type	104	90.3 ± 2.9	17.4 ± 3.9	32.5 ± 2.1
NANOS2 #9	108	88.0 ± 3.4	17.1 ± 2.6	33.3 ± 2.6
NANOS2 #4	106	88.8 ± 2.7	14.8 ± 3.6	34.9 ± 3.0

*Three replicates were carried out.

: 핵이식란의 체외발달 능력 뿐만 아니라 형질전환 세포가 체외에서 배양되는 동안 증식 속도 및 형태에 따라 선별된 세포주 (#9)를 이용하여 총 1,094개의 핵이식란을 제작하고 발정이 동기화된 대리모돈 10두의 난관 및 자궁에 외과적 방법으로 이식하였다.

: 10두의 대리모돈 중 1두의 임신이 확인되었고 (그림 88, 좌), 안전하게 분만까지 유도되어 총 3두의 복제자돈이 생산 되었다 (표 26).

: 복제자돈 3두 중 1두는 생후 3일차에 폐사하였으나 남은 2두의 복제자돈은 현재까지 건강하게 성장하고 있다 (그림 88, 우).

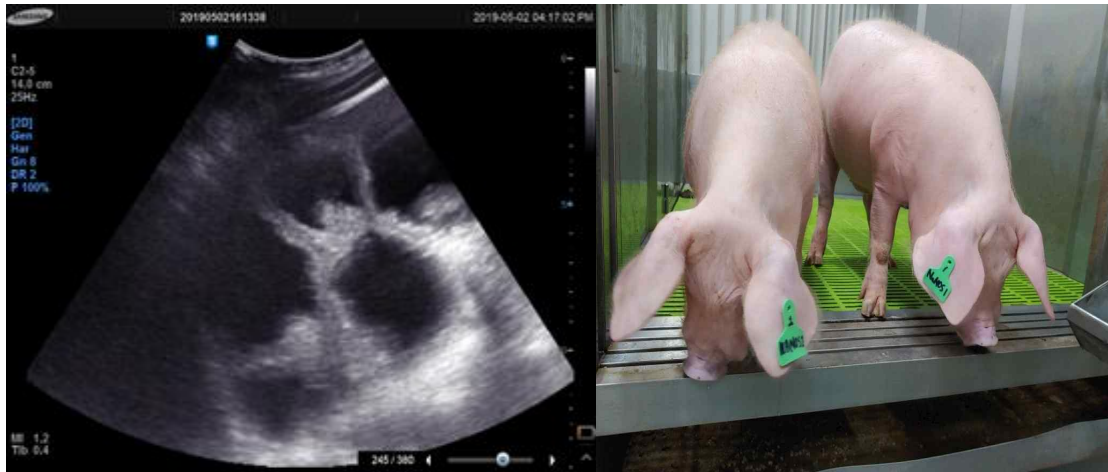


그림 88. NANOS2 유전자 결손 핵이식란 이식 대리모돈 초음파 (좌, 임신 29일령)와 NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지 (우)

표 26. NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지 생산을 위한 이식 현황표

Donor cells	No. of embryos transferred (embryos per transfer)	No. of recipients	Pregnancy* (%)	Delivery (%)	No. of piglets (stillborn)
NANOS2 #9	1,094	10	1 (10%)	1 (100%)	3 (1)

: 생산된 복제돼지의 유전자 분석을 실시 한 결과 공여세포로 이용된 #9번 세포주 (19 bp deletion 또는 1 bp insertion)와 동일하게 유전자가 결손이 확인되었다 (그림 89).

```

Wild type  TGATCCAGAAATCGTCTGA .CAAGGGCCAGAGGCCCCGGGCACCGGG
폐사      TGATCCAGAAATCGTCTGAACAAGGGCCAGAGGCCCCGGGCACCGGG (+1)
          TGATCCAGAA.....GGCCCCGGGCACCGGG (-19)
NANOS2 #1 TGATCCAGAAATCGTCTGAACAAGGGCCAGAGGCCCCGGGCACCGGG (+1)
          TGATCCAGAA.....GGCCCCGGGCACCGGG (-19)
NANOS2 #2 TGATCCAGAAATCGTCTGAACAAGGGCCAGAGGCCCCGGGCACCGGG (+1)
          TGATCCAGAA.....GGCCCCGGGCACCGGG (-19)
  
```

그림 89. 생산된 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지 유전자 분석

: 생후 3일령의 NANOS2 유전자 결손 개체가 폐사됨에 따라 비슷한 일령의 일반 미니 돼지 (생후 5일령) 정소조직을 확보하여 H&E 염색을 이용해 조직학적 평가를 실시하였다. 부설판 처치에 의해 생산된 수컷 미니돼지의 경우, 세정관 수가 줄어드는 경향을 보였으나, NANOS2 유전자 결손 개체의 정소는 정상 개체가 가지는 세정관 수와 유사한 수치를 보였다 (그림 90 및 표 27).

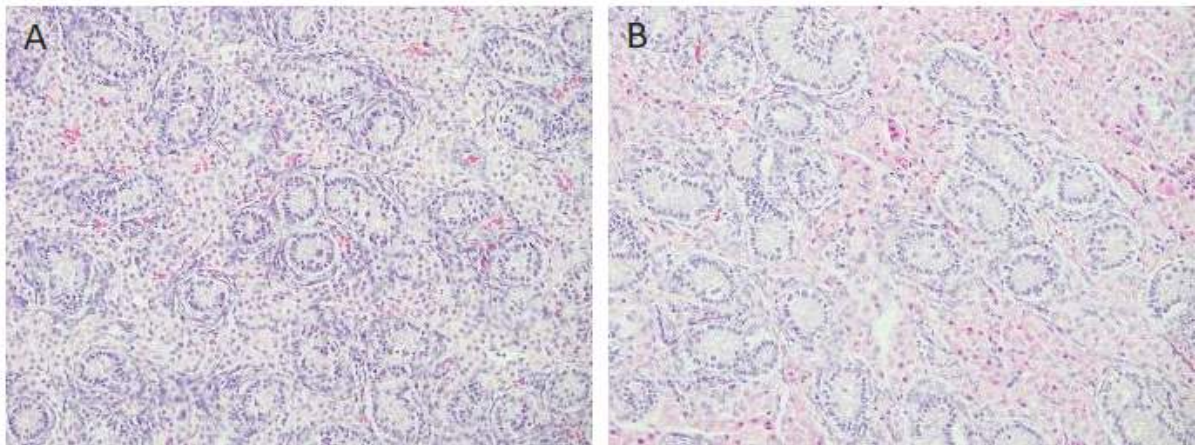


그림 90. NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지 (A)와 일반 미니돼지 (B)의 세정관

표 27. NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지 정소내 세정관 수 비교

시험군	측정치				합계	평균
	#1	#2	#3	#4		
NANOS2	37	44	45	43	169	42.3
Normal	42	34	34	41	151	37.8

♣ 연구수행결과

: 본 연구팀은 유전자 편집기술을 이용하여 NANOS2 유전자 결손 형질전환 세포를 구축하였고 체세포 복제를 통해 2두의 형질전환복제돼지를 생산하였다. NANOS2 유전

자 결손 형질전환 세포주는 배아발달 및 개체 생산, 성장 등에 영향을 미치지 않았다. 또한 NANOS2 유전자 결손 형질전환 돼지는 부설관 처치 시 발생하는 정소내 세정관 수 감소 및 정소조직의 비정상적 구조 형성 등의 문제는 발견되지 않았다. 따라서 NANOS2 유전자 결손 형질전환 돼지는 부설관 처치보다 효과적인 정원줄기세포 이식용 돼지로 이용 될 수 있을 것이다.

♣ 향후 연구추진계획

: 본 연구에서 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지가 생산되었고 생산된 개체의 유전자 분석 결과 공여세포와 동일하게 유전자가 결손됨이 확인되었지만 이에 따른 번식능력 제거 유무는 평가되지 못하였다. 따라서 충분한 성숙 이후 채정된 정액에서 정자형성 유무 및 교배를 통한 번식능력 평가가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

3. 형질전환 돼지 정원줄기세포 유래 성숙정자를 이용한 형질전환 돼지 생산

가. 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산

♣ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017년-2019년)

♣ 연구수행내용

: 본 연구팀은 human BMP2를 발현하는 형질전환 정원줄기세포를 세정관내에 이식하고 생착 및 정상적으로 발생된 정자를 이용하여 최종적으로 human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하고자 하였다. 세정관 내 정원줄기세포 이식시기 및 이식기술 확립과 이식된 정원줄기세포 유래 정자를 생산하기 위해 다양한 일령의 수컷 미니돼지에 이식이 실시되었다. 정원줄기세포가 이식된 개체들은 충분한 정자형성 기간을 거쳐 수압법으로 채정을 실시하였고, 이식된 형질전환 정원줄기세포의 정자형성 여부를 평가하였으며 정자형성이 확인된 개체는 자연교배를 통해 형질전환 정원줄기세포 유래의 형질전환 돼지 생산을 유도하였다. 또한 체세포 복제로 생산된 정원줄기세포 이식용 NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지에도 human BMP2 발현 형질전환 정원줄기세포 이식을 실시하였다.

(1) 형질전환 정원줄기세포 이식

◆ 연구수행기간: 1, 2, 3차년도 (2017-2019년)

◆ 연구수행내용

: 정원줄기세포 이식기술 확립을 위하여 표 28과 같이 다양한 일령의 수컷 유카탄 미니 돼지 7두를 공급하였고 정원줄기세포의 주입 위치, 주입량, 주입 기구 등의 조건을 검토하였다.

: 또한 확립된 정원줄기세포 이식 조건을 이용해 NANOS2 유전자가 결손된 형질전환 복제돼지 정소에 이식하였고 성숙이 이루어지는 대로 정원줄기세포 이식 효과를 확인할 예정이다.

표 28. 형질전환 정원줄기세포 이식을 위한 수컷 미니돼지 공급현황

개체번호	생산 일	이식 일	이식 시 일령	이식 시 체중 (kg)	비고
OF3	15/10/30	17/08/03	644	64.5	이식 후 1일차 폐사
OF5	16/12/06	18/06/21	563	64	이식 후 1일차 폐사
OF6	16/12/31	18/07/05	552	63	이식세포 발현 확인
OF7	18/04/20	18/08/30	133	16	이식세포 미발현
OF8	18/04/21	18/10/12	175	21	이식세포 미발현
OF9	18/11/03	19/02/14	104	15.9	이식세포 미발현
OF10	19/03/25	19/08/02	131	16	미검토
OF11 (NANOS2)	19/07/27	19/12/06	133	16	미검토

: 최초 이식된 2두는 이식 1일 후 폐사하였고, 추가로 이식된 6두 중, 4두의 경우 이식된 정원줄기세포 유래 정자발생 여부를 검토하기 위하여 수압법에 의해 채정이 이루어졌다 (그림 91).



그림 91. 이식된 정원줄기세포 유래 정자형성 유/무 검토를 위한 정액 채취

: 이식된 형질전환 정원줄기세포는 EGFP와 human BMP2를 모두 발현하거나 이식기술 확립을 위해 마커로 부착된 EGFP만을 발현하는 세포로, 공통적으로 EGFP 발현 검증을 통해 이식된 정원줄기세포 유래의 정자를 검토 할 수 있었다.

: 채정된 정액 내 정자가 충분히 분해 될 수 있도록 15개의 튜브로 나누어 소분한 후 Dneasy blood & tissue kit (Qiagen)을 이용해 genomic DNA를 추출했다. 추출된 DNA를 주형으로 forward: 5' -ATCGATACCATGGTGAGCAAGGGCGA-3' , reverse :

5' -ATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3' primer를 이용해 PCR을 수행 했고, 처음 denaturation 95 °C 5분을 시작으로, 95 °C 40초 60 °C 40초 72 °C 1분씩 35 cycle, 마지막 extenstion 7분 조건으로 ABI veriti 96 well thermal cycler (Thermo) 장비를 이용해 진행했다. 생성된 산물은 1% agarose TAE gel에 전기영동하여 EGFP 발현 유무를 확인하였다. 채정을 통해 EGFP 발현여부를 검토 할 수 있었던 4두 중, 1두 (OF7)개체에서 EGFP 발현 양상을 확인할 수 있었다 (그림 92).

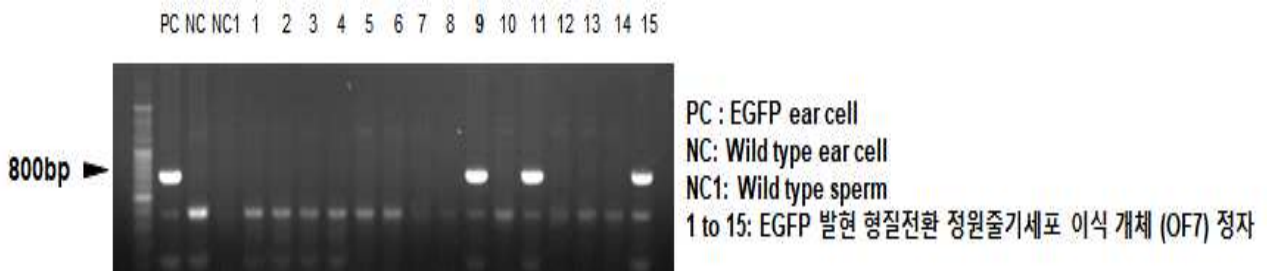


그림 92. EGPF 발현 정원줄기세포 이식 개체 유래 정자 분석

: EGFP 발현 정자가 확인된 개체 (OF7)의 후대에서도 이식된 형질전환 정원줄기세포 유래 자돈 생산이 가능한지 확인하기 위하여 미니돼지 모돈과 자연교배를 통해 임신 을 유도하였다. 그 결과, 사산되거나 폐사된 개체 없이 총 5두 (암컷 3마리, 수컷 2마 리)의 자돈이 생산 되었다 (그림 93).



그림 93. EGFP 발현 형질전환 정원줄기세포 이식 개체 (OF7)의 자돈

: 생산된 자돈 5두 모두 외형상으로 EGFP 발현이 나타나지 않는 것으로 보였으나, EGFP 유전자 존재 여부를 파악하기 위해 생후 3일령 후대들의 귀조직을 채취하여 genomic DNA를 추출한 후 정자분석과 동일한 실험법으로 PCR 및 전기영동을 수행 하였다. 그 결과, 유전자 분석에서도 이식된 형질전환 정원줄기세포 유래 개체는 확 인되지 않았다 (그림 94).

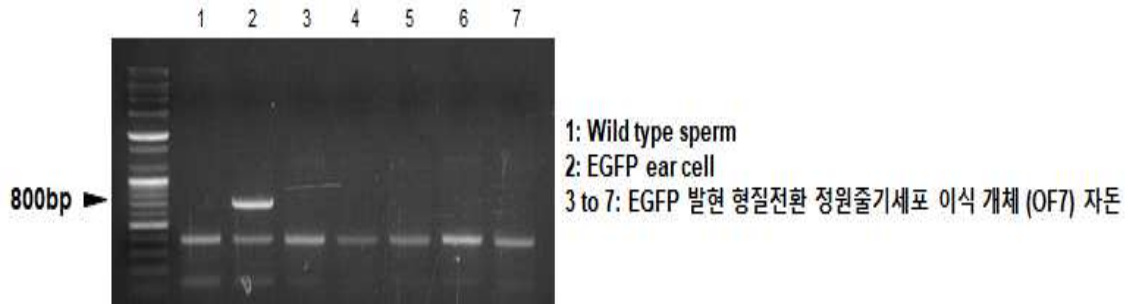


그림 94. EGFP 발현 형질전환 정원줄기세포 이식 개체 (OF7) 유래 후대 유전자 분석

- : 정자 내 EGFP 발현이 확인되었던 OF7 개체는 이식된 정원줄기세포가 온전하게 생착이 이루어졌다고 하더라도 그 비율은 현저하게 낮았을 것이라 판단된다. 또한 이식된 정원줄기세포가 지속적으로 증식하여 정자를 형성할 수 있는지에 대한 검토가 추가적으로 필요할 것이다.
- : 본 연구팀은 부설판을 이용한 정원줄기세포 이식용 수컷돼지를 개발함과 동시에 형질전환 기술을 이용하여 NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지를 생산한 바 있으며 이식된 형질전환 정원줄기세포의 생착, 증식 및 분화가 보다 개선될 것으로 기대하고 있다.
- : 따라서 본 연구과제의 최종 목표인 human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산을 위해 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지의 정소에 human BMP2를 발현하는 형질전환 정원줄기세포를 이식하였다.

(2) Human BMP2를 발현하는 형질전환 정원줄기세포 이식

◆ 연구수행기간: 3차년도 (2019년)

◆ 연구수행내용

- : 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산뿐만 아니라 human BMP2를 발현하는 형질전환 돼지를 생산하는 궁극적 목표로 본 연구팀은 유전자편집기술과 체세포 복제기술을 통해 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지를 2두 확보하였다.
- : 생후 133일령 (19.12.06)의 NANOS2 녹아웃 형질전환복제돼지 1두의 정소에 human BMP2를 발현하는 정원줄기세포를 이식 하였는데 (그림 95), 초음파를 통해 세정관 다발 중심부를 파악하고 오른쪽 정소에 약 6.8×10^6 개의 세포가 이식되었다.



그림 95. NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지에 이식되는 human BMP2 발현 형질전환 정원줄기세포

- : 이식된 human BMP2 발현 형질전환 정원줄기세포가 생착되어 온전한 정자로 발생되는지에 대한 여부는 연구기간 내에 확인 할 수 없었으나, 이식된 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지가 성성숙이 완료되는 시기에 도달하였을 때 (20년 2월), 이식된 형질전환 정원줄기세포 유래의 정자 존재 여부를 검토할 수 있을 것으로 보이며, 이 개체를 활용한 교배 및 인공수정을 통해 human BMP2를 발현하는 자돈을 생산할 수 있는지의 여부도 확인할 수 있을 것이다.
- : 본 연구팀은 화학적 (부설판) 처치를 통한 정원줄기세포 이식용 미니돼지를 생산했을 뿐 아니라 화학적 처치의 단점을 극복 할 수 있는 정원줄기세포 이식용 돼지인 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지를 개발하였다. 또한 NANOS2 유전자 결손 돼지에 human BMP를 발현하는 형질전환 정원줄기세포를 이식하였고 현재까지도 건강상의 문제없이 양호하게 사양 관리되고 있다.
- : NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지에 이식된 human BMP2 발현 정원줄기세포의 생착과 증식, 정자로의 발생, 그리고 발생된 정자유래 형질전환 돼지 생산 여부 등 추가적으로 진행되어야 할 연구들이 남아있지만, 본 연구팀에서 확립하고 개발한 정원줄기세포가 제거된 돼지 생산 기술은 유용단백질을 대량으로 생산할 수 있고 번식효율 증대시킬 수 있으며 동물생명공학 연구 분야에 폭 넓게 기여할 수 있을 것으로 예상 한다 (그림 96).

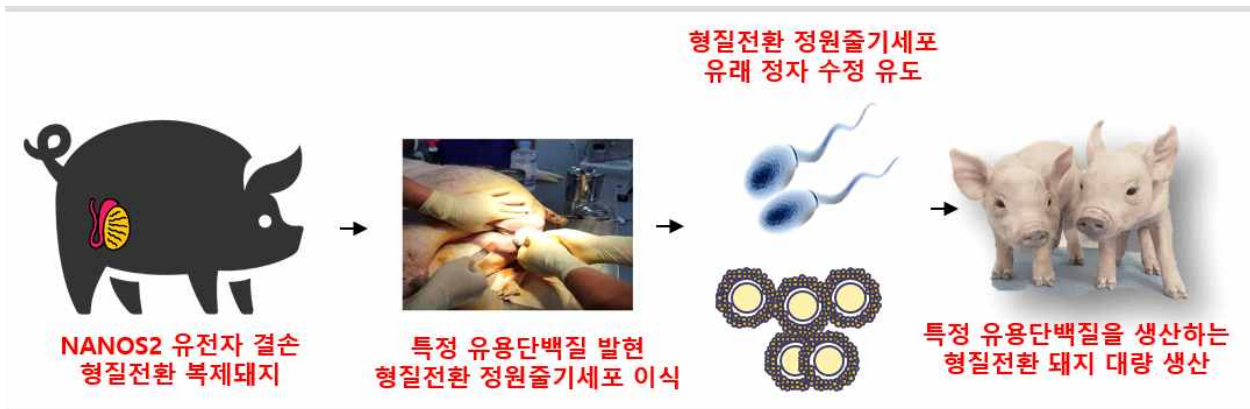


그림 96. NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지의 활용 방안

♣ 연구수행결과

- : 본 연구팀은 화학적 (부설판) 처치를 통한 정원줄기세포 이식용 미니돼지를 생산했을 뿐 아니라 화학적 처치의 단점을 극복 할 수 있는 정원줄기세포 이식용 돼지인 NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지를 개발하였다.
- : 또한 NANOS2 유전자 결손 돼지에 human BMP를 발현하는 형질전환 정원줄기세포를 이식하였고 현재까지도 건강상의 문제없이 양호하게 사양 관리되고 있다. 이식된 human BMP2 발현 형질전환 정원줄기세포가 생착되어 온전한 정자로 발생되는지에 대한 여부는 연구기간 내에 확인 할 수 없었으나, 이식된 NANOS2 유전자 결손 형질전환 복제돼지가 성성숙이 완료되는 시기에 도달하였을 때 (20년 2월), 이식된 형질전환 정원줄기세포 유래의 정자 존재 여부를 검토할 수 있을 것으로 보이며, 이 개체를 활

용한 교배 및 인공수정을 통해 human BMP2를 발현하는 자돈을 생산할 수 있는지의 여부도 확인할 수 있을 것이다.

: 본 연구팀에서 확립하고 개발한 정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지 생산 기술은 유용단백질을 대량으로 생산할 수 있고 번식효율 증대시킬 수 있으며 동물생명공학 연구 분야에 폭 넓게 기여할 수 있을 것으로 예상 된다 (그림2).

♣ 향후 연구추진계획

: 본 연구에서 NANOS2 유전자 결손 형질전환복제돼지에 human BMP2 발현 형질전환 정원줄기세포의 이식은 유도하였지만, 이식 이후에 대한 다양한 평가는 수행되지 못하였다. 따라서 이식된 human BMP2 발현 정원줄기세포의 생장과 증식, 정자로의 발생, 그리고 발생된 정자유래 형질전환 돼지 생산 여부 등 추가적인 연구를 수행할 계획이다.

: 또한 NANOS2 유전자 결손 형질전환돼지를 이용하여 human BMP2 뿐만 아니라 고부가 가치가 있는 다양한 유용단백질의 대량 생산 가능성을 검토해 볼 필요가 있다.

※ 총괄 분석 및 고찰

과거 본 연구팀은 정원줄기세포가 주입된 정소를 체외에서 기관 배양을 통해 성숙정자를 생산하려는 시도를 하였다. 하지만, 정소 기관 배양을 통해서도 성숙정자를 생산하는 것이 매우 쉽지 않음을 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서는 정자형성을 지지하는 세포와 구조들은 보유하고 있으면서, 정원줄기세포만이 제거된 정소를 가지고 있는 수컷 돼지를 생산하고, 이렇게 생산된 수컷 돼지 정소에 형질전환 정원줄기세포를 이식하여 형질전환 성숙정자를 생산하고자 시도하였다. 이러한 연구 수행을 통해 돼지 정원줄기세포를 형질전환 시키기 위한 형질전환 벡터 제작 및 정원줄기세포내로 형질전환 유전자 전달 기술들이 더욱더 진보되었다. 특히 정원줄기세포 형질전환 유전자 전달 기술의 경우, 기존에 사용되어졌던 Electroporation 조건을 개선하여 정원줄기세포내로 형질전환 유전자 전달 효율을 유의적으로 높일 수 있었고, Nano needle이라는 첨단 기술을 이용해서 형질전환 유전자를 정원줄기세포로 전달할 수 있음을 세계 최초로 제시할 수 있었다. 하지만, 본 연구에서 시도된 유전자 전달 기술들을 이용해서는 형질전환 정원줄기세포를 대량으로 생산하는 것이 어려웠다. 이러한 한계를 극복하기 위해 형질전환 정원줄기세포를 체외에서 효과적으로 배양할 수 있는 기술을 개발하고자 노력하였다. 이러한 노력으로서 미분화 정원줄기세포 표면에서 활성화 상태에 있는 integrin heterodimer들을 탐색하였고, 이러한 integrin heterodimer들을 활성화 시킬 수 있는 adhesion peptide들을 제작하여 정원줄기세포 증식 및 미분화 유지에 효과적인 물리적 성질을 가지고 있는 3차원 스캐폴드에 삽입함으로써, 정원줄기세포 체외 배양에 이용되어질 수 있는 3차원 비세포성니쉬를 제작 할 수 있었다. 이러한 3차원 비세포성니쉬 기반 정원줄기세포 체외 배양 시스템을 소량으로 생산되어지는 형질전환 정원줄기세포에 적용함으로써 형질전환 정원줄기세포의 대량 생산이 가능해질 것이다.

기존의 연구들에서 부설관 처리는 돼지 정소내 정원줄기세포 제거에 효과가 있음을 보고했다. 따라서, 연구 초반에 돼지 정소내 정원줄기세포를 효과적으로 제거할 수 있는 부설관 처리 방법을 최적화하여 효율적인 정원줄기세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 생산하고자 하

였다. 하지만, 본 연구를 통해 부설판 처리는 정원줄기세포는 제거되었지만 정자형성을 지지하는 세포와 구조들이 동시에 파괴되어진다는 사실을 알게 되었다. 정원줄기세포를 부설판이 처리된 수컷 돼지 정소에 이식을 하였을 경우에도 성숙정자 형성이 매우 극미하게 관찰되어졌으며, 이러한 결과들은 부설판이 처리된 정소내 정자형성을 지지하는 세포와 구조들의 파괴로부터 기인했을 것으로 본 연구팀은 추정했다. 하지만, 성숙정자 효율은 매우 낮을지라도, 형질전환 정원줄기세포를 정원줄기세포가 제거된 정소에 이식하였을 때, 성공적으로 형질전환 정자가 생산되어짐을 확인할 수 있었고, 이러한 기술은 효율 극대화를 통해 형질전환 성숙 정자를 생산할 수 있는 가장 합리적인 기술임을 다시 한 번 확신할 수 있었다. 본 연구에서는 부설판이 정소내 정자형성을 지지하는 세포 및 구조를 파괴한다는 부정적 영향을 극복하기 위해 발생과정시 생식세포형성에 매우 중요한 역할을 하는 NANOS 유전자가 제거된 형질전환 돼지를 성공적으로 생산하였다. NANOS 유전자가 제거된 돼지는 정자형성을 지지하는 세포와 구조는 어떠한 파괴없이 유지되어졌고, 동시에 정원줄기세포만이 제거된 정소를 가지고 있음을 확인했다. 이후, 본 연구팀은 형질전환 정원줄기세포를 이러한 NANOS 돼지 정소에 이식을 한 상태이며, 연구기간이 종료되었을지라도, 이식된 돼지가 성숙이 이루어질 때까지 기다린 후 정액 검사를 통해 형질전환 성숙정자 생산을 추가적으로 최종 확인하고자 한다. 또한, 형질전환 성숙정자의 확인이 이루어진다면, 이를 활용한 형질전환 돼지 생산도 추가적으로 시도할 예정이다. 결론적으로 본 연구 개발을 통해 형질전환 돼지를 연구기간내에 생산하지 못한 점을 제외하고는 형질전환 성숙정자를 생산하기 위한 새로운 접근 방식이 매우 효과적이라는 결론을 성공적으로 내릴 수 있었으며, 이러한 새롭게 개발된 형질전환 성숙정자 생산 관련 기반 기술들의 효율 향상 기술에 대한 추가적인 연구 개발을 통해 형질전환돼지의 산업화가 빨라질 수 있음을 확신할 수 있었다.

2-5. 연구개발성과

● 논문게재 성과

게제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI/SCIE 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2017	Porcine spermatogonial stem cells self-renewal effectively in a three dimensional culture microenvironment	박지은	이승태	박민희, 김민성, 박여름, 윤정임, 정희태, 김민석, 최정훈, 이은송	Cell Biology International	41 (12)	국외	SCIE (IF:2.127)
2018	Development of a Three-dimensional Hydrogel System for the Maintenance of Porcine Spermatogonial	박지은	이승태	박민희, 김민성, 윤정임, 최정훈, 이은송	Journal of Embryo Transfer	32 (4)	국내	비SCI

	Stem Cell Self-renewal							
2018	Integrin heterodimers expressed on the surface of porcine spermatogonial stem cells	박민희	이승태	김민성, 윤정임, 최정훈, 이은송	DNA and Cell Biology	37 (3)	국외	SCI (IF:2.918)
2018	Successful genetic modification of porcine spermatogonial stem cells via an electrically response Au nanowire injector	박꽃초롱	이승태, 강태준, 김봉수	김민성, 강미정	Biomaterials	193	국외	SCI (IF:10.273)
2018	Identification of a technique optimized for the isolation of spermatogonial stem cells from mouse testes	한나래	이승태	박혜진, 이현, 윤정임, 최기명, 이은송	Journal of Embryo Transfer	33 (4)	국내	비SCI
2019	Establishment of an electroporation-mediated gene delivery system in porcine spermatogonial stem cells	김민성	이승태	박민희, 박지은, 윤정임, 최정훈, 이은송	In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	55 (3)	국외	SCI (IF:1.645)
2019	Establishment of In-Vitro Culture System for Enhancing Production of Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) Blastocysts with High Performance in the Colony Formation and Formation of Colonies Derived from SCNT Blastocysts in Pigs	한나래	이승태	백송, 이용진, 이주형, 윤정임, 이은송	Journal of Animal Reproduction and Biotechnology	34 (2)	국내	비SCI
2019	Comparative study of the developmental competence of cloned pig embryos derived from spermatogonial stem cells and fetal fibroblasts	이주형	이은송	이용진, 이근식, 이승태	Reproduction in Domestic Animals	54 (9)	국외	SCI (IF:1.638)

2019	Integrin heterodimer $\alpha 9 \beta 1$ is localized on the surface of porcine spermatogonial stem cells in the undifferentiated state	박민희	이승태	윤정임, 이은송	Reproduction in Domestic Animals	54 (11)	국외	SCI (IF:1.638)
2019	Determination of medium condition effective to cryopreservation of primary spermatofonial stem cells derived from porcine neonatal testes	박민희	이승태	박지은, 김민성, 윤정임, 최기명, 이은송	CryoLetters	40 (6)	국외	SCI (IF:0.694)

● 특허 성과

구 분	지식재산권 등 명칭	국 명	출 원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	형질전환 정원줄기세포의 생산방법	대한민국	강원대학교산학협력단	2019.09.16	10-2019-0113509				

● 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	기술완성도
2017	돼지 정원줄기세포내로 외래 유전자 도입 기술	Electroporation 기법을 이용하여 돼지 정원줄기세포내로 외래 유전자를 효과적으로 전달할 수 있는 기술	기술개발완료
2017	돼지 정소내 정원줄기세포 이식 기술	살아있는 수컷 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적인 이식할 수 있는 기술	기술개발완료
2017	돼지 정소내 정원줄기세포 제거 기술	Busulfan 처치를 통한 돼지 정소내 정원줄기세포 제거 기술	기술개발진행중
2018	돼지 정원줄기세포 3차원 체외 배양 기술	돼지 정원줄기세포 미분화유지 및 증식에 최적화된 3차원 비세포성니쉬 제작 기술	기술개발완료
2018	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술	임신한 돼지에게 Busulfan 처리를 함으로써 정원줄기세포가 없는 수컷 돼지 생산 기술	기술개발진행중
2019	정원줄기세포가 없는 수컷 돼지 생산 기술	NANOS 유전자가 제거된 형질전환 돼지 생산 기술	기술개발완료

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 총괄목표 달성여부

최종목표	세부 및 협동 과제	연구개발목표	연구개발 수행내용	평가기준	가중치 (%)	성과실적	달성도 (%)
정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환 돼지 생산	1	돼지 형질전환 정원 줄기 세포 배양 기술 개발	돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선 및 돼지 정원줄기세포 체외 배양 기술을 접목하여 형질전환 돼지 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발	돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 향상 기술 개발 여부	10	적외선 조사를 이용하여 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 향상 기술 개발	100
				돼지 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발 여부	10	돼지 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발	100
				돼지 형질전환 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발 여부	10	돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 향상 기술 및 돼지 정원줄기세포 체외배양용 3차원 비세포성니쉬를 접목하여 돼지 형질전환 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발	75
	2	형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자 생산 기술 개발	돼지 정소내 돼지 정원 줄기세포 이식 효율 향상을 통해 형질전환 성숙정자 생산	돼지 정소내 돼지 정원줄기세포 이식 방법 개발 여부	10	살아있는 돼지 정소내로 돼지 정원줄기세포를 이식하는 기법 개발	100
				이식된 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지 생산 여부	10	이식된 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 성공적으로 생산	100
				돼지 형질전환 생식세포 생산 여부	15	돼지 형질전환 생식세포를 성공적으로 생산	100
	협동	돼지 형질전환 정원 줄기 세포 이식용 수컷 돼지 및 형질전환 돼지 생산 기술 개발	돼지 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 성숙정자를 생산할 수 있는 정원줄기세포 제거 정소를 가진 수컷 돼지 생산 및 형질전환 성숙정자를 활용한 형질전환 돼지 생산	살아있는 수컷 돼지 정소내 정원줄기세포 제거 기술 개발 여부	10	살아있는 수컷 돼지 정소내 정자형성지지세포 유지 및 정원줄기세포 제거에 효과적인 Busulfan 농도 확인	100
				정소내 정원줄기세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지 생산 여부	15	Busulfan 처리 및 NANOS 유전자 제거를 통해 정원줄기세포 제거 정소를 가진 수컷 돼지를 성공적으로 생산	100
				형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 형질전환 돼지 생산에는 실패	10	형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 형질전환 돼지 생산에는 실패	50

3-2. 세부목표 달성여부

연구 수행 연차	세부 및 협동 과제	연구개발목표	연구개발 수행내용	평가기준	가중치 (%)	성과실적	달성도 (%)
1	1	돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선을 위한 기반 기술 개발	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작	EGFP를 정원줄기세포에서 강하게 발현시키는 프로모터 및 Human BMP2를 방광상피세포에서 강하게 발현시키는 Uroplakin II 프로모터가 삽입된 벡터 제작 여부	15	EGFP를 정원줄기세포에서 강하게 발현시키는 프로모터 및 Human BMP2를 방광상피세포에서 강하게 발현시키는 Uroplakin II 프로모터가 삽입된 벡터 성공적으로 제작	100
			돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 전달할 수 있는 효율 향상 여부	20	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 전달할 수 있는 효율을 기존보다 6% 향상시키는 기술 개발	100
	2	돼지 정원줄기세포의 돼지 정소내 이식 기술 개발	In Vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발	돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜 확립 여부	15	돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜 확립	100
			In Vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발	살아있는 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜 확립 여부	20	살아있는 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜 확립	100
	협동	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 개발	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포를 제거하기 위한 화학적 기법 확립 여부	30	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포를 제거할 수 있는 Busulfan 처리 조건 확립	100
	2	1	형질전환 돼지 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발	돼지 형질전환 정원줄기세포 체외 배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발	돼지 형질전환 정원줄기세포 체외배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 제작 여부	30	형질전환 정원줄기세포 3차원 체외배양을 위한 비세포성니쉬를 성공적으로 제작. 3차원 배양된 형질전환 정원줄기세포의 GFP 발현 및 정원줄기세포 특이적 마커 유전자 발현 확인.
3차원 비세포성니쉬에서 체외 배양된 돼지 형질전환 정원줄기세포의 특성 분석을 통한 정상성 검증							
	2	형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지 생산	형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립	형질전환 정원줄기세포를 이식한 수컷 돼지로부터 형질전환 성숙정자 생산 여부	30	형질전환 정원줄기세포를 이식한 수컷 돼지로부터 형질전환 정자를 성공적으로	100

			형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지로부터 정액의 정상 검사		생산.		
협동	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립	정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지 생산 여부	40	정원줄기세포가 제거된 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지를 성공적으로 생산	100	
3	1	생산된 형질전환 돼지의 Human BMP2 생산성 및 안전성 검증	형질전환 돼지 소변으로부터 Human BMP2 단백질 생산 정제된 Human BMP2 단백질의 반응효과 및 안전성 검증	형질전환돼지 소변으로부터 Human BMP2 분리 정제 성공 여부	30	형질전환 돼지 생산 실패로 Human BMP2 생산성 및 안전성 검증 수행이 불가하였음.	0
	2	생산된 형질전환 돼지의 정상성 및 번식능 검증	생산된 형질전환 돼지의 발생학적 정상성 검증 생산된 형질전환 돼지유래 형질전환 정자 번식능 검증	형질전환돼지의 장기별 조직 정상성 판독 및 정자번식능 검증 수행 여부	30	형질전환동물 생산 실패로 돼지의 발생학적 정상성 검증 및 형질전환 돼지유래 정자의 번식능 검증은 수행 불가하였음.	0
	협동	형질전환 돼지 정원줄기세포유래 성숙정자를 이용한 형질전환 돼지 생산	형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 Human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산	형질전환돼지 생산 여부	40	형질전환 돼지 생산 실패하였음. 형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 비형질전환 돼지 5마리 생산.	50

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

본 연구과제에서 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하고자 하는 목표는 달성을 하지 못했다. 연구 수행 과정에서 형질전환 정원줄기세포를 Busulfan 처치에 의해 정원줄기세포를 인위적으로 제거한 정소를 가진 살아있는 수컷 정소에 이식하였다. 이 후 이식된 수컷 정소에서 채정된 정액에서 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자의 존재를 간접적으로 확인할 수 있었고, 이러한 정자를 이용하여 산자를 생산했지만 형성된 형질전환 정자의 수가 극히 적었던 관계로 태어난 산자 모두가 비형질전환 돼지였다. Busulfan이 처치된 정소의 해부학적 조사 결과 Busulfan 처치에 의해 정자형성을 지지하는 구조가 파괴되어 있음을 확인할 수 있었고, 이러한 정자형성을 지지하는 구조의 파괴로 인해 이식된 형질전환 정원줄기세포의 정자 분화가 원활하게 유도되지 않았다고 사료되어진다. 본 연구팀은 이러한 문제점을 확인하기 위해 3차년도에 정원줄기세포 형성을 원천적으로 억제함과 동시에 정자형성을 지지하는 구조를 온전하게 유지하고 있는 정소를 가진 수컷 돼지를 생산하고자 NANOS 유전자가 제거된 형질전환 돼지를 생산하는데 성공하였다. NANOS 유전자가 제거된 형질전환 돼지가 3차년도 5월에 태어났고, 돼지의 성숙 기간을 고려했을 때 형질전환 정원줄기세포를 3차년도 12월에 정소에 이식할 수 있었다. 따라서, 연구 수행 기간 안에 이러한 새로운 접근법을 이용한 형질전환 정자 생산 결과를 최종 확인하는 것은 어려웠다. 아마도 연구 기간이 완료되고 그

이후에 형질전환 정자 생산 및 이를 이용한 형질전환 돼지 생산에 대한 결과를 도출할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 이러한 새로운 접근 방법을 통한 성공적인 형질전환 정자 및 형질전환 돼지 생산은 이러한 관련 기술들을 더욱더 표준화하고 사업화 할 수 있는 추가적인 지원이 반드시 요구되어진다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 예상되는 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

● 형질전환동물의 효율적 생산을 통한 산업화에 활용

현재 형질전환동물을 생산하는 가장 효율적인 방법은 체세포핵이식방법으로 알려져 있다. 하지만 이는 고도의 기술 및 높은 비용과 생산 효율이 매우 낮기 때문에 형질전환동물의 산업화는 사실상 불가능하다. 또 하나의 대안으로는 정자 자체를 형질전환시켜 이용하는 방법이다. 하지만, 현재 정자의 구조적 특성상 정자 자체를 형질전환 하는 것은 거의 불가능한 것으로 생각되어지고 있는 실정이다. 만약 정자세포의 형질전환이 가능하다면, 형질전환된 정자를 이용하여 체외수정 및 인공수정 기법을 통해 인간이 원하는 유전자가 들어가거나 제거된 형질전환 동물을 쉽게 생산 할 수 있을 것이다. 이러한 형질전환정자를 활용한 형질전환동물의 효율적인 생산은 다양한 생리활성물질과 바이오신약 생산 및 기술의 산업화, 신약 생산이외에 다양한 종류의 형질전환동물 생산, 고부가가치 축산으로의 활용 및 발전 도모, 다양한 종류의 경제동물에서의 형질전환기술의 산업화, 경제동물에서 형질전환동물 생산을 위한 정자공급에 관한 산업화, 그리고 형질전환동물과 관련된 많은 부가산업들을 동시에 발전시킬 수 있을 것이다.

● 고능력 가축의 유전능력 보존에 활용

종축이 가지고 있는 유전능력은 현재 전 세계의 축산을 발전시키는데 매우 큰 기여를 하고 있다. 하지만, 이러한 종축을 생산 및 보유하기 위해서는 매우 많은 시간과 비용이 요구되어진다. 더구나, 종축이 죽게 되면 종축이 가지고 있는 유전능력은 영원히 사라지게 된다. 따라서, 종축이 죽기전 종축으로부터 정원줄기세포를 회수 및 보관하고, 필요시 정원줄기세포를 본 연구과제에서 개발된 기술에 적용하여 성숙정자를 생산함으로써, 유전능력은 사라지지 않고 계속해서 후대에 남게 될 것이다.

● 멸종위기동물의 보존에 활용

멸종위기동물을 보존하는데 있어 가장 중요한 것은 암컷과 수컷과의 자연교배이다. 하지만, 필드에서 멸종위기동물의 자연교배 성공률은 극히 낮은 상황이다. 물론, 체세포복제기술을 통해 극복 할 수는 있지만, 같은 동물로부터 양질의 난자를 공급받는 것은 매우 어려우며, 그 성공률도 매우 낮기 때문에, 그 한계성을 보여주고 있는 실정이다. 하지만, 멸종위기동물 수컷으로부터 정원줄기세포를 회수한 후 본 연구과제를 통해 개발된 기술을 활용한다면, 멸종위기동물 수컷의 정자를 효율적으로 얻게 될 것이며, 인공수정 기법을 통해 많은 동물의 멸종을 막을 수 있을 것이다. 더불어, 멸종위기동물의 정원줄기세포 및 정자은행을 설립하여, 멸종위기동물의 보존에 크게 기여할 것으로 생각된다. 이를 위해서는 다양한 종의 정원줄기세포를 회수하고 배양 할 수 있는 기술 개발 및 종 특이적 인공 정소의 개발이 추가적으로 이루어질 필요가 있다.

● 임상에서의 난임환자 치료에 활용

2011년도 국내 난임환자의 비율은 7명중 1명이다. 이는 과거에 비해 난임환자의 비율이 계속해서 크게 증가되어지고 있는 실정이다. 난임의 원인은 개인에 따라 매우 다양하지만, 감수분열을 거치지 않은 이배체 정조 또는 정모세포만을 가진 환자는 현재 기술 수준으로는 이러한 난임을 해결 할 방법이 존재하지 않는다. 하지만, 정원줄기세포는 남성 누구나 가지고 있으며, 이를 회수하여 본 연구결과를 통해 개발될 기술에 적용한다면, 이러한 종류의 환자들에게도 난임을 치료 할 수 있는 좋은 방법으로서 제시되어질 수 있을 것이다.

4-2. 추가 연구의 필요성

본 연구에서 최종 목표인 형질전환 돼지 생산에는 도달하지 못했지만, 효율적인 형질전환 돼지를 생산을 위해 필수적으로 요구되어졌던 형질전환 성숙정자 생산은 정원줄기세포 이식용 돼지 정소에 형질전환된 돼지 정원줄기세포를 이식함으로써 달성되어진 상태이다. 하지만, 본 연구에서 제시된 형질전환 성숙정자 생산은 성공은 했지만, 전체적인 고효율 시스템 개발은 여전히 숙제로 남아있는 상태이다. 다시말해, 관련 기반 기술들 가운데 일부는 고효율화를 통해 기술 개발이 완료되었지만, 일부 기술들은 단지 성공만 했을뿐 낮은 효율이라는 문제점들을 여전히 가지고 있다. 그리고, 이러한 저효율 기술들은 돼지 형질전환 성숙정자 생산 효율 향상에 있어 병목현상을 보여주고 있는 실정이기 때문에, 이러한 저효율 기술들에 대한 효율 향상 연구가 반드시 추가적으로 이루어질 필요가 있다. 각 관련 기술들에 대한 고효율화는 돼지 형질전환 돼지를 효과적으로 생산하는데 큰 도움이 될 것이며, 돼지를 이용한 형질전환 돼지 산업화에 큰 도움이 될 것이다.

본 연구에서 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 위해 사용되어진 Busulfan은 Busulfan이 가지고 있는 화학적 부작용으로 인한 정자형성 지지세포들의 파괴로 유발했고, 성숙정자 생산이 가능한 정소 구조를 가진 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 어렵게 만들었다. 또한, 이러한 점들은 높은 효율의 정원줄기세포유래 형질전환 성숙정자 생산 시스템 구축에 있어 큰 걸림돌이 되었다. 이를 극복하기 위한 대안으로 정자형성 지지세포 및 구조들은 남아 있으면서, 정원줄기세포만 제거된 NANOS 유전자 Knock-out 돼지를 성공적으로 본 연구를 통해 생산하였지만, 연구 기간의 만료로 인해 이를 이용한 본격적인 연구 수행은 이루어지지 않았다. 따라서, 이러한 연구들에 대한 추가적인 지원은 본 연구의 큰 장애물이었던 정원줄기세포 이식용 돼지 생산의 어려움을 극복할 수 있는 근본적인 방법이 될 수 있고, 이러한 한계 극복을 통해 형질전환 동물의 산업화는 가능해질 것이다.

4-3. 타 연구에의 응용

본 연구를 통해 개발된 정원줄기세포 체외배양용 3차원 비세포성니쉬 개발 기술들은 다양한 축종 및 인간에 대한 인공 정소를 제작하는데 적극 응용되어질 수 있다. 또한, 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 기술들은 인간에게 유용한 다양한 유전자가 삽입되거나 질병을 유발하는 특정 유전자가 제거된 형질전환 돼지 생산 연구에 적극 활용되어질 수 있다. 그리고, 다른 축종들에서의 형질전환동물 생산 연구에도 이러한 기술들은 적

극 이용되어질 수 있다.

4-4. 기업화 추진 방안

본 연구를 통해 개발된 세부과제별 기초 기술들은 지속적인 연구를 통해 업그레이드 되어질 예정이다. 현재, 형질전환된 돼지 정원줄기세포를 돼지 정소에 이식하기 위해서는 많은 수의 형질전환 돼지 정원줄기세포가 요구되어지며, 이러한 형질전환 돼지 정원줄기세포를 고순도로 대량 생산 할 수 있는 기술은 BRIDGE+ 사업을 통해 사업화를 위한 기술로 업그레이드 되어지고 있는 중이다. 또한, 이렇게 개발된 생산 기술을 기반으로 형질전환 돼지 정원줄기세포를 생산하고 판매하기 위해 본 연구 총괄책임자는 (주)커스토젠을 설립하였고, 이 회사를 통해 형질전환 돼지 정원줄기세포 생산 및 판매에 대한 비즈니스 모델이 진행되어지고 있는 중이다. 또한, 협동연구기관인 (주)옵티팜도 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 비즈니스 모델로 진행할 예정이며, (주)커스토젠과의 지속적인 협력 연구 개발을 통해 형질전환 돼지 정자 생산을 통한 형질전환 돼지 생산에 대한 사업화 노력이 이루어질 예정이다.

4-5. 기술 이전

본 연구과제의 총괄연구책임자가 설립한 (주)커스토젠으로 강원대학교 산학협력단이 출원한 형질전환 돼지 정원줄기세포 생산과 관련된 특허권들에 대한 기술이전이 이루어질 예정이다. 또한, (주)옵티팜에게는 형질전환 돼지 성숙정자 생산에 필수적으로 요구되어지는 형질전환 돼지 정원줄기세포 생산 관련 노하우 이전에 대한 계약을 통해 관련 기술이전이 이루어졌다.

붙임. 참고문헌

-Petersen B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod Domest Anim* 2017;52 Suppl 3:4-13.

-Park KE et al., Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci Rep* 2017;7:40176.

-Suzuki A and Saga Y. Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* 2008;22:430-435.

-Suzuki A et al., Interaction of NANOS2 and NANOS3 with different components of the CNOT complex may contribute to the functional differences in mouse male germ cells. *Biol Open* 2014;3:1207-1216.

-Honaramooz A et al., Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl* 2005;26:698-705.

-Zeng W et al., Viral transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod* 2013;88:27.

-Liu FJ et al., Effect of molybdenum on reproductive function of male mice treated with busulfan. *Theriogenology* 2019;126:49-54.

-Brinster RL and Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22;91:11298-11302.

-Brinster CJ et al., Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod* 2003;69:412-420.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산 (영문) Production of transgenic animals and mature sperms derived from transgenic spermatogonial stem cells using spermatogonial stem cell-free male pig					
주 관 연구 기관	강원대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 강원대학교 동물응용과학과		
참 여 기 업	(주)옵티팜		총 연 구 기 간	(성명) 이승태		
총 연구개발비 (1,100,000 천원)	계	1,100,000	총 연 구 원 수	2017.04.21.~2019.12.31.(2년9월)		
	정부출연 연구개발비	825,000		총 인 원	54명	
	기업부담금	275,000		내부인원	33명	
	연구기관부담금	0		외부인원	21명	

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구개발의 최종 목표는 정소내 정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지를 생산하고, 이러한 이식용 돼지 정소내에 Human BMP2 유전자가 삽입된 돼지 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 형질전환 성숙정자를 생산하고 이를 활용해 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하는 것임. 3년간의 연구개발을 통해, 비록 Human BMP2를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하지는 못했지만, 돼지 정원줄기세포내로 특정 형질전환 유전자를 기존보다 유의적으로 높은 효율로 전달하여 형질전환을 유도할 수 있는 기술을 확립하였음. 또한, 돼지 정소내 정자형성 미세환경을 유지하면서 정원줄기세포만 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 성공적으로 생산하였으며, 이러한 돼지 정소에 돼지 형질전환 정원줄기세포를 이식함으로써 돼지 정소내 정자형성 미세환경을 이용한 돼지 형질전환 성숙정자를 성공적으로 생산하였음. 따라서, 정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산을 위해 요구되는 기반 기술들을 성공적으로 개발하였으며, 개발된 일부 기술들의 문제점인 저효율이라는 난제를 해결하기 위한 연구가 연구 종료 후에도 지속적으로 진행되어질 예정임. 또한, 도출된 결과들을 통해 1건의 특허 출원, 10건의 논문 발표, 14건의 학술대회 발표, 2건의 인력양성, 1건의 홍보, 1건의 수상실적, 1건의 고용창출, 1건의 기술이전이 성공적으로 이루어졌음.

○ 연구내용 및 결과

① 제1세부과제

◆ 연구내용: 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 개선 및 돼지 정원줄기세포 체외 배양 기술을 접목하여 형질전환 돼지 정원줄기세포 대량 생산 기술 개발

◆ 연구결과: 적외선 조사를 이용하여 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율을 향상 시킬 수 있는 기술을 개발하였음. 또한, 돼지 정원줄기세포를 체외에서 효과적으로 배양할 수 있는 3차원 비세포성니쉬를 성공적으로 제작할 수 있었음. 그리고, 돼지 정원줄기세포의 형질전환 효율 향상 기술 및 돼지 정원줄기세포 체외배양용 3차원 비세포성니쉬를 접목하여 돼지 형질전환 정원줄기세포를 대량 생산

할 수 있는 기반 기술들을 성공적으로 개발하였음. 하지만, 일부 기술에 있어 낮은 효율 극복이 필요하며, 효율 향상을 위한 연구가 지속적으로 이루어질 예정임.

② 제2세부과제

◆ 연구내용: 돼지 정소내 돼지 정원줄기세포 이식 효율 향상을 통해 형질전환 성숙정자 생산

◆ 연구결과: 살아있는 돼지 정소내로 돼지 정원줄기세포를 이식하는 기법은 성공적으로 개발되어졌음. 또한, 이렇게 확립된 이식 기법을 통해 돼지 정원줄기세포를 정원줄기세포 이식용 돼지 정소에 이식하였을 때 이식된 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 성공적으로 생산할 수 있었음. 그리고, 동일한 이식 기법을 통해 돼지 형질전환 정원줄기세포를 이식하였을 때에도 돼지 형질전환 성숙정자를 성공적으로 생산할 수 있었음.

③ 협동과제

◆ 연구내용: 돼지 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 성숙정자를 생산할 수 있는 정원줄기세포 제거 정소를 가진 수컷 돼지 생산 및 형질전환 성숙정자를 활용한 형질전환 돼지 생산

◆ 연구결과: 살아있는 수컷 돼지 정소내 정자형성 지지세포 유지 및 정원줄기세포 제거에 효과적인 Busulfan 농도를 최적화함으로써 살아있는 수컷 돼지 정소내 정원줄기세포 제거 기술을 확립하였음. 그리고, Busulfan 처리 및 NANOS 유전자 제거를 통해 정자형성을 지지하는 미세환경을 보유 하면서 정원줄기세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지를 성공적으로 생산함으로써 정원줄기세포 이식용 돼지 생산 기술을 확립하였음. 그러나, 형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 형질전환 돼지 생산에는 실패하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

① 연구성과 활용

: 실용화지원사업을 통해 본 연구에서 개발된 연구성과들이 돼지 형질전환 정자 생산에 이용되어 질 고순도 돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술 개발에 적극 활용되어졌으며, 이러한 기술을 기반으로 사업화 기반 구축이 이루어졌음.

② 연구성과 활용 계획

- : 형질전환동물의 효율적 생산을 통한 산업화에 활용
- : 고능력 가축의 유전능력 보존에 활용
- : 멸종위기동물의 보존에 활용
- : 임사에서 난임환자 치료에 활용

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	117042-3		
사업구분	농림축산식품연구개발사업				
연구분야	기재하지 않음			과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	강원대학교			연구책임자	이승태
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.04.21.~ 2017.12.31.	225,000	75,000	300,000
	2차연도	2018.01.01.~ 2018.12.31.	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2019.01.01.~ 2019.12.31.	300,000	100,000	400,000
	계	2012.04.21.~ 2019.12.31.	825,000	275,000	1,100,000
참여기업	(주)옵티팜				
상대국	상대국연구기관				

2. 평가일 : 2019.01.02.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
강원대학교	부교수	이승태

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	이승태
----	-----

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

형질전환 정원줄기세포를 정원줄기세포가 제거된 정소를 가진 수컷 돼지에 이식하여 형질전환 성숙 정자를 성공적으로 생산했다는 점은 지금의 한계를 극복한 최고의 연구결과이며, 동시에 앞으로 효율 향상만 이루어지기만 한다면 형질전환동물의 산업화를 견인할 수 있는 원천 기술이 될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

본 연구 과제를 통해 개발된 원천 기술들은 다양한 생리활성물질과 바이오신약을 생산할 수 있는 형질전환 돼지 생산 효율 향상, 다양한 축종에 적용이 가능하기 때문에 타 축종에서의 형질전환동물 생산 기술 개발, 난임 극복을 위한 기술 개발에도 큰 도움이 될 것이다. 특히, 형질전환동물 생산의 산업화를 통해 고부가가치 축산으로의 활용 및 발전 도모를 가능하게 할 것이며, 경제동물에서 형질전환동물 생산을 위한 생식세포 공급의 산업화를 가능하게 할 것이다. 이러한 형질전환 생식세포의 원활한 공급은 농가에서도 쉽게 형질전환동물의 생산을 가능하게 할 것이며, 이는 농가의 새로운 고소득원으로 정착될 것이다. 동시에, 인간질병을 가진 다양한 축종의 형질전환동물을 원활하게 공급함으로써, 의약품 개발 및 안정성 검증에 큰 기여와 함께 국내 및 해외 불임관련 산업에 큰 변화 및 시너지효과를 줄 것이다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

본 연구 과제를 통해 개발된 원천 기술들을 통해 신약 이외에 다양한 종류의 형질전환동물 생산 및 임상에서 불임환자 치료기술 개발에 활용되어질 수 있다. 또한, 다양한 종들에서 정원줄기세포 체외배양 및 정자 분화를 유도할 수 있는 인공 정소를 제작하는 활용되어질 수 있으며, 다양한 종들에서 형질전환 생식세포 생산 및 이를 이용한 형질전환동물 생산에 적극 활용되어질 수 있다. 이러한 활용을 통해, 형질전환산업을 부흥시키는데 있어 선구자적인 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

연구 계획에 따라 세부과제별 모든 연구 세부 항목들에 대한 연구 수행이 성실하게 이루어졌다고 판단되어진다. 단지 형질전환동물 생산에 성공하지 못하여 3차년도 연구 수행에 일부 차질이 있었지만, 형질전환동물 생산을 위한 기반기술의 효율을 향상시키기 위한 연구를 성실하게 수행함으로써 보완하였다. 특히, 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산에 있어, 초기 계획의 문제점을 극복하기 위해 추가적으로 NANOS 유전자 결손 돼지를 생산했다는 점은 본 연구 최종 목표를 달성하기 위해 최선을 다해 연구를 수행 했음을 보여주고 있다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

본 연구를 통해 총 10건의 논문을 발표하였으며, 공개발표된 논문들 가운데 70%이상이 SCI/E급 논문(7건)들이다. 또한, 이들 논문들은 분야별로 분류시 관련분야 상위 3%이내 저널은 1건이며, 상위 25%이내 저널은 3건, 상위 40%이내 저널은 4건이다. 특히, 1건의 논문은 조직공학분야 1위 저널(Biomaterials, IF=10.273)에 게재되었다. 따라서, 발표된 논문의 질적 수준은 우수한 것으로 판단된다, 또한, 총 1건의 지적 소유권이 출원된 상태이며, 이들 지적 소유권들은 현재 심사중에 있는 상태이다. 학회 발표의 경우, 총 14건의 학회 발표가 이루어졌으며, 1건의 고용창출, 1건의 연구업적홍보, 1건의 과학기술우수논문상 수상, 2건의 박사인력양성, 1건의 기술이전을 달성할 정도로 연구개발성과의 질적 수준은 매우 우수한 것으로 판단된다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작	5	100	EGFP를 정원줄기세포에서 강하게 발현시키는 프로모터 및 Human BMP2를 방광상피세포에서 강하게 발현시키는 Uroplakin II 프로모터가 삽입된 벡터를 성공적으로 제작하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발	10	100	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 전달할 수 있는 효율을 기존보다 6% 이상 유의적으로 향상시키는 기술을 개발하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
In Vitro 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발	5	100	적출된 돼지 정소를 이용하여 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜을 성공적으로 확립하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
In Vivo 상태에서 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발	10	100	살아있는 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜을 성공적으로 확립하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립	10	100	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포를 효율적으로 제거할 수 있는 Busulfan 처리 조건을 확립하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
형질전환 돼지 정원줄기세포 체외 배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발	10	100	형질전환 정원줄기세포를 체외 배양할 수 있는 3차원 비세포성니쉬를 성공적으로 제작하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
3차원 비세포성니쉬에서 체외 배양된	5	100	3차원 비세포성니쉬에서 배양된 형

형질전환 돼지 정원줄기세포의 특성 분석을 통한 정상성 검증			질전환 정원줄기세포의 GFP 발현 및 정원줄기세포 특이적 마커 유전자 발현을 성공적으로 확인하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립	5	100	살아있는 돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜을 이용하여 형질전환 정원줄기세포를 이식하는 프로토콜을 성공적으로 확립하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지로부터 정액의 정상 검사	5	100	형질전환 정원줄기세포를 이식한 수컷 돼지로부터 형질전환 정자가 성공적으로 생산되어지고 있음을 확인하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립	10	100	Busulfan 처치를 이용한 화학적 방법과 NANOS 유전자 결손을 통해 정원줄기세포 형성을 억제시키는 방법을 통해 정원줄기세포가 제거된 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지를 성공적으로 생산하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하였음.
형질전환 돼지 소변으로부터 Human BMP2 단백질 생산	5	0	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
정제된 Human BMP2 단백질의 반응효과 및 안전성 검증	5	0	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
생산된 형질전환 돼지의 발생학적 정상성 검증	5	0	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
생산된 형질전환 돼지유래 형질전환 정자 번식능 검증	5	0	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 Human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산	5	50	형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 비형질전환 돼지 5마리를 생산하였고, 형질전환 돼지 생산에는 실패하였음. 따라서, 연구 목표를 성공적으로 달성하지 못하였음.
합계	100	75	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구 개발 사업을 통해 도출된 결과들은 외래 정원줄기세포 이식을 위해 기존 정원줄기세포를 제거하고 정자형성을 지지하는 미세환경을 보유하고 있는 정소를 가진 수컷 돼지를 생산하고, 이를 기반으로 형질전환 정원줄기세포를 이용하여 형질전환 성숙정자를 생산함으로써 형질전환 돼지 생산 효율을 극대화 하려는 시도를 하였다는 점에서 매우 큰 가치가 있는 것으로 사료된다. 비록 최종 산물인 형질

전환 돼지 생산에는 성공하지 못했을지라도, 돼지 정원줄기세포 체외 조작 기술, 체외 배양 기술, 형질 전환 정원줄기세포 생산 기술, 형질전환 정원줄기세포의 정소내 이식 기술, 형질전환 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술과 같은 기반 기술 개발에 대한 완료가 이루어졌기 때문에, 이러한 연구개발 결과들은 효율 향상을 위한 지속적 연구를 통해 형질전환 돼지 산업화 및 다양한 축종에서의 형질전환 동물 생산 및 산업화를 주도하는 데 있어 큰 역할을 수행할 수 있을 것이다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구 개발 과제의 최종 목표는 정소내 정원줄기세포가 제거된 수컷 돼지 생산, 이러한 돼지에 형질 전환 정원줄기세포 이식을 통한 형질전환 성숙정자 생산, 그리고 형질전환 돼지의 생산이다. 하지만, 연구 기간동안 두 가지 최종목표는 성공적으로 달성하였지만, 형질전환 돼지를 성공적으로 생산하지는 못했다. 형질전환 정원줄기세포 이식을 통해 형질전환 성숙정자를 생산하는 돼지는 성공적으로 생산하였지만, 이들 돼지의 자연교배를 통해서도 형질전환 돼지를 생산하지 못했다. 이는 전국적인 돼지 범정 전염병 발병으로 인해 돼지 이동이 어려워 이식할 돼지 및 교배할 돼지를 구하기가 매우 어려운 상황이었음을 주지할 필요가 있다. 따라서, 형질전환 돼지 생산에 있어 이러한 어려운 상황에 대한 충분한 고려가 필요함하다. 또한, 형질전환 성숙정자 생산에 필요한 모든 원천 기술들에 대한 개발이 세계 최초로 성공적으로 수행되어졌다는 점은 매우 중요한 평가 요소로서 고려되어질 필요가 있음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

총 3년간의 연구개발을 통해 도출된 결과들은 다양한 생리활성물질과 바이오신약 생산 및 기술의 산업화를 크게 앞당기는데 활용되어질 수 있으며, 신약 생산이외에 다양한 종류의 형질전환동물 생산에도 활용되어질 수 있다. 이러한 형질전환동물 생산의 산업화는 고부가가치 축산으로의 활용 및 발전 도모 및 돼지를 비롯해 각 종 경제동물의 형질전환기술의 산업화를 발전시키는데 적극 활용되어질 수 있다. 또한, 유전자 조작이 된 생식세포 생산을 통해 새로운 유전자원의 보존 및 이용에 크게 앞장 설 수 있다. 특히, 앞으로 본 연구를 통해 개발된 기술의 성공적인 효율 향상은 형질전환 동물 산업을 발전시켜 축산 및 의료 분야에 있어 새로운 부가가치를 창출하는데 있어 매우 중요한 역할을 할 수 있기에, 이에 대한 추가적인 지원이 필요할 것으로 판단된다.

IV. 보안성 검토

○ 본 연구과제는 보안이 필요 없는 과제로 판단됨.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농생명산업기술개발	
연구과제명	정원줄기세포 이식용 돼지 생산을 통한 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자 생산 및 이를 활용한 형질전환돼지 생산			
주관연구기관	강원대학교		주관연구책임자	이승태
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	825,000,000	275,000,000	0	1,100,000
연구개발기간	2017. 04. 21. ~ 2019. 12. 31.			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input 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 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터 제작	EGFP를 정원줄기세포에서 강하게 발현시키는 프로모터 및 Human BMP2를 방광상피세포에서 강하게 발현시키는 Uroplakin II 프로모터가 삽입된 벡터 제작을 완료하였음.
② 돼지 정원줄기세포내로 Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터의 효율적 전달 기술 개발	Human BMP2 유전자 삽입형 형질전환 벡터를 돼지 정원줄기세포내로 전달할 수 있는 효율을 기존보다 6% 향상시키는 Electroporation 기법을 확립하였음.
③ 돼지 정소내 정원줄기세포 이식법 개발	돼지 정소내로 정원줄기세포를 효율적으로 이식할 수 있는 프로토콜을 확립하였음.
④ 돼지 정소 세정관내 정원줄기세포 제거 기술 탐색 및 확립	돼지 정소 세정관내 정원줄기세포를 제거할 수 있는 Busulfan 처리 조건을 확립하고 정원줄기세포 생성에 관여하는 NANOS 유전자 결손 돼지 생산 기술을 확립하였음.
⑤ 형질전환 돼지 정원줄기세포 체외 배양을 위한 3차원 비세포성니쉬 개발 및 배양된 돼지 정원줄기세포의 정상성 검증	형질전환 정원줄기세포의 미분화유지 및 증식을 지지할 수 있는 3차원 체외배양을 위한 비세포성니쉬를 성공적으로 제작하였음.
⑥ 형질전환 성숙정자 생산을 위한 정원줄기세포 이식 기술 확립 및 이식된 돼지로부터 생산된 정액의 성상 검증	형질전환 정원줄기세포를 이식한 수컷 돼지로부터 형질전환 정자를 성공적으로 생산하였음.
⑦ 형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술 확립	정원줄기세포가 제거된 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지를 성공적으로 생산하였음.
⑧ 형질전환 돼지 소변으로부터 Human BMP2 단백질 생산 및 생산된 Human BMP2 단백질의 반	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.

응효과 및 안전성 검증	
⑨ 생산된 형질전환 돼지의 발생학적 정상성 검증	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
⑩ 생산된 형질전환 돼지유래 형질전환 정자 번식능 검증	형질전환 돼지 생산 실패로 인해 연구 수행이 불가능하였음.
⑪ 형질전환 정원줄기세포 유래 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 이용한 Human BMP2 생산용 형질전환 돼지 생산	형질전환 정원줄기세포 유래 형질전환 성숙정자를 생산하는 수컷 돼지를 자연교배시킨 결과 비형질전환 돼지 5마리는 생산하였지만, 형질전환 돼지 생산에는 실패하였음.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30			10	10				10				10	10		10		10	
최종목표	1	1		1	5				1			6	0	3	6		2		1
연구기간내 달성실적	1	0		1	3				1			7	3	3	14		2		1
달성율(%)	100	0		100	60				100			120	300	100	230		100		100

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술
②	돼지 형질전환 정원줄기세포 3차원 체외배양기술
③	돼지 정소내 형질전환 정원줄기세포 이식 기술
④	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술
⑤	형질전환 성숙정자 생산 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

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

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	다양한 종류의 유용유전자를 보유하고 있는 돼지 형질전환 정원줄기세포 생산에 활용함으로써 다양한 유전자원을 가진 돼지 정원줄기세포 은행 구축에 활용
②의 기술	3차원 인공 생식소 개발에 활용. 생식소 기반 tissue-on-a-chip 개발에 활용. 다양한 체내 조직의 3차원 미세환경 제작에 활용. 유해 물질의 번식계통에 미치는 영향 분석을 위한 독성 테스트 프로토콜 개발에 활용. 소수의 정원줄기세포만을 가지고 있는 난임환자 치료 기술 개발에 활용
③의 기술	다른 축종에서의 형질전환 정원줄기세포유래 형질전환 성숙정자 생산에 활용
④의 기술	다른 축종에서의 형질전환 정원줄기세포 이식용 수컷 개체 생산에 활용
⑤의 기술	다른 축종에서의 형질전환 성숙정자 생산 및 다양한 축종에서의 형질전환 동물 생산에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과				교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문 SC I	비 SC I	논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명					
가중치	30			10	10				10				10	10		10		10		
최종목표	1	1		1	5				1			6	0	3	6		2	1		
연구기간내 달성실적	1	0		1	3				1			7	3	3	14		2	1		
연구종료후 성과창출 계획	0	1		0	0				0			0	0	0	0		0	0		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	돼지 형질전환 정원줄기세포 생산 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	3년	실용화예상시기 ³⁾	2023년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술 구현을 위한 설비 및 장비 구축 완료		

핵심기술명 ¹⁾	돼지 형질전환 정원줄기세포 3차원 체외배양기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	3년	실용화예상시기 ³⁾	2023년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술 구현을 위한 설비 및 장비 구축 완료		

핵심기술명 ¹⁾	돼지 정소내 형질전환 정원줄기세포 이식 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2년	실용화예상시기 ³⁾	2022년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술 구현을 위한 설비 및 장비 구축 완료		

핵심기술명 ¹⁾	형질전환 돼지 정원줄기세포 이식용 수컷 돼지 생산 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2년	실용화예상시기 ³⁾	2022년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술 구현을 위한 설비 및 장비 구축 완료		

주 의

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