

11-1543  
000-001  
468-01

발간등록번호  
11-1543000-001468-01

인체질병 적용 실험동물 모델개발 최종보고서  
2016 농림축산식품부

생명산업기술개발사업 R&D Report

# 인체질병 적용 실험동물 모델개발 최종보고서

2016. 08. 18.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 서울대학교 산학협력단  
(주) 룰젠  
(주) 옵티팜솔루션

농림축산식품부

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “인체적용 질병 실험동물 모델개발”(개발기간 : 2011.8.19 ~ 2016.8.18)  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 8 . 18



주관(세부)연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) (인)  
협동연구기관명 : (주) 톨젠 (대표자) (인)  
협동연구기관명 : (주) 옵티팜솔루션 (대표자) (인)  
위탁기관명 : (주) 알앤에프 (대표자) (인)

주관연구책임자 : 이병천  
1세부연구책임자 : 이병천  
2세부연구책임자 : 백선하  
1협동연구책임자 : 김석중  
2협동연구책임자 : 김현일  
위탁연구책임자: 이우춘

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	311011-5	해 당 단 계 연 구 기 간	5	단 계 구 분	5/5
연구사업명	중 사업명	농식품기술개발사업			
	세부 사업명	생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	해당없음			
	세부 과제명	인체적용 질병 실험동물 모델개발			
연구책임자	이병천	해당단계 (5차년도) 참 여 연구원 수	총: 39명 내부: 명 외부: 명	해당단계 (5차년도) 연 구 개 발 비	정부: 700 천원 민간: 66,667 천원 계: 766,667 천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 193명 내부: 95명 외부: 98명	총 연구개발비	정부: 3,500 천원 민간: 333,335 천원 계: 3,833,335 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	서울대학교 산학협력단 수의과대학/의과대학			참여기업명 (주) 툴젠 (주) 옵티팜솔루션	
위 탁 연 구	연구기관명: (주) 알앤에프			연구책임자: 이우춘	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구를 통해 신경 독성 물질 투여를 통한 PD 모델 미니 돼지 생산 및 모니터링 시스템을 확립하였다.</li> <li>2. 형질전환 복제 기법을 이용한 1) hAPP발현과 2) hAPP와 PS1 다중 발현 AD모델 미니돼지 2종을 각각 생산 하였다.</li> <li>3. 형질전환 및 녹아웃 복제 기법을 이용한 1) hSNCA발현과 2) Parkin KO PD모델 미니돼지 2종을 각각 생산하였다.</li> <li>4. 생산된 1종의 AD 돼지(hAPP발현)와 2종의 PD 돼지(hSNCA발현, Parkin KO)의 번식능을 검증하였으며, 후대의 생산을 통해 생식선전이를 검증하였다.</li> <li>5. 생산된 형질전환 PD 모델돼지간의 교배를 통해 다중 형질전환 PD 모델 미니돼지를 생산하였다.</li> <li>6. AD/PD모델 미니돼지의 행동학적/영상학적 기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템을 구축하였다.</li> <li>7. 비침습적 모니터링 시스템을 이용하여 1종의 AD 돼지(hAPP발현)와 2종의 PD 돼지(hSNCA발현, Parkin KO)의 전임상모델로의 가능성을 검증하였다.</li> <li>8. AD/PD모델 미니돼지의 조직병리학적 평가 및 유전자 프로파일링 시스템 구축을 통해 모델 돼지에서의 변화상을 관찰 하였다.</li> <li>9. AD/PD모델 미니돼지의 활용 기반 구축을 위하여 특허 출원 및 기술이전을 실시하였다.</li> </ol>				311페이지	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	본 연구는 인간의 퇴행성 뇌신경 질환의 대표적 질환인 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)/파킨슨병(Parkinson's disease, PD)의 발생 기전 연구 및 질병 정복을 위하여, 1) 형질전환복제 기법을 이용한 AD 병인 유전자가 발현하는 2종의 AD 모델 미니돼지를 생산하고, 2) PD 병인 유전자를 조절한 3종의 PD 모델 미니돼지 생산하여, 3) 비침습적 분석 기법을 이용 AD/PD 미니돼지를 분석하는 것이다. 이를 통해 인체적용 AD/PD 모델동물을 확립하는 것을 최종 목표로 한다.				
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 본 연구를 통해 신경 독성 물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 생산 및 모니터링 시스템을 확립하였다.</li> <li>2. 형질전환 복제 기법을 이용한 1) hAPP발현과 2) hAPP와 PS1 다중 발현 AD모델 미니돼지 2종을 각각 생산 하였다.</li> <li>3. 형질전환 및 녹아웃 복제 기법을 이용한 1) hSNCA발현과 2) Parkin KO PD모델 미니돼지 2종을 각각 생산하였다.</li> <li>4. 생산된 1종의 AD 돼지(hAPP발현)와 2종의 PD 돼지(hSNCA발현, Parkin KO)의 번식능을 검증하였으며, 후대의 생산을 통해 생식선전이를 검증하였다.</li> <li>5. 생산된 형질전환 PD 모델돼지간의 교배를 통해 다중 형질전환 PD 모델 미니돼지를 생산하였다.</li> <li>6. AD/PD모델 미니돼지의 행동학적/영상학적 기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템을 구축하였다.</li> <li>7. 비침습적 모니터링 시스템을 이용하여 1종의 AD 돼지(hAPP발현)와 2종의 PD 돼지(hSNCA발현, Parkin KO)의 전임상모델로의 가능성을 검증하였다.</li> <li>8. AD/PD모델 미니돼지의 조직병리학적 평가 및 유전자 프로파일링 시스템 구축을 통해 모델 돼지에서의 변화상을 관찰하였다.</li> <li>9. AD/PD모델 미니돼지의 활용 기반 구축을 위하여 특허 출원 및 기술이전을 실시하였다.</li> </ol>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 파킨슨병 유발 돼지 모델 제작 및 이의 행동점수화 분석 방법 국내 특허를 출원하였으며, 본 발명을 기술이전을 실시하여 유전자조절 파킨슨모델돼지의 평가에 활용이 기대된다.</li> <li>2. 알츠하이머 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도로 국내 특허를 출원 및 기술이전을 실시하였으며, 본 성과인 알츠하이머 돼지는 최초의 비침습적 분석 결과를 지닌 모델이며, 생산된 기술에 이용되어진 세포주의 판매 및 AD 모델 돼지의 상품화가 가능할 것이다.</li> <li>3. 파킨슨 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도로 특허 출원 및 기술이전을 실시하였으며, 본 성과는 파킨슨병 유발 병인 유전자가 발현되는 돼지의 활용으로 인체 질병 진단 및 치료제 분야에 활용 가능할 것이다.</li> <li>4. Parkin 녹아웃을 통한 파킨슨모델 돼지의 생산 및 이의 용도로 특허를 출원 하였으며, 본 성과는 체세포핵이식에 의한 최초의 Parkin 녹아웃 복제 돼지의 영상/행동학적 분석결과 인체 적용 모델로의 가치가 검증되고 있어 국내외 관련 기업에 기술 실시 및 파킨슨병 진단 및 치료제 개발에 활용 가능할 것이다.</li> </ol>				
중심어 (5개 이내)	실험동물	기능성 신소재	유효성 평가	질환모델	체세포핵이식

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>The purpose of this research is 1) to produce two kinds of Alzheimer's disease (AD) minipigs using transgenic cells overexpressing AD related genes through somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology, 2) to produce three kinds of Parkinson's disease (PD) minipigs combined with genetic engineering technology and SCNT and 3) to analyze the clinical phenotypes of those minipigs via non-invasive approaches for proceeding the investigation of the most representative neurodegenerative disease. Therefore, subsequently, the final goal is to establish AD/PD animal model for human clinical use.</p>		
Results	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Production of PD model minipig via neurotoxic chemical injection and monitoring system has been established by this research.</li> <li>2. Using transgenic cells and SCNT technology, 1) hAPP overexpression minipigs and 2) hAPP and PS1 multi-genes overexpressing minipigs were produced.</li> <li>3. Using genetically engineered cells with transgenesis or knockout system, 1) hSNCA overexpressing minipigs and 2) Parkin KO minipigs were generated.</li> <li>4. Reproductive ability of one type of AD minipigs (hAPP) and two types of PD minipigs (hSNCA overexpression and Parkin KO, respectively) was proved and germline transmission was confirmed by producing offsprings.</li> <li>5. Multi-genes modified PD minipigs were produced via breeding PD minipigs.</li> <li>6. Non-invasive monitoring system such as behavioral and imaging approaches was established through AD/PD minipigs analysis.</li> <li>7. The possibility of AD/PD minipigs as preclinical animal models was proved by using of non-invasive monitoring system for one type of minipigs (hAPP) and two types of PD minipigs (hSNCA overexpression and Parkin KO, respectively).</li> <li>8. Clinical phenotypes of AD/PD minipigs have been observed via evaluation of histopathological analysis and genetic profiling system.</li> <li>9. To establish AD/PD model minipigs for application basement, patent applications and technology licensings were performed.</li> </ol>		
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Production of PD model pig and analysis of behavioral scoring were applied to internal patent and this invention is performed for technology licensing.</li> <li>2. Production of transgenic minipig for AD model and use of those are applied for domestic patent and technology licensing. The produced AD</li> </ol>		

	<p>minipigs are analyzed for the first time by non-invasive investigation and established cells for producing those minipigs and AD minipigs could be used for commercialization.</p> <p>3. Production of genetically engineered minipigs for PD model and use of those are applied for domestic patent and technology licensing. The produced PD minipigs could be used for diagnosis and therapeutic research.</p> <p>4. PD model pig production via Parkin knockout and use of those are applied for domestic patent. This is the first Parkin KO minipigs produced by SCNT and consequently imaging and behavioral analysis result suggest the value for the human clinical use. Therefore, they could be used for the PD diagnosis and drug development or its related technology could be transferred to international/domestic company.</p>				
Keywords	Laboratory animal	Functional new resources	Validity evaluation	Disease model	Somatic cell nuclear transfer

## 6. 영문목차

### **I. Outline and objective of the research**

- 1) Ultimate objective
- 2) The necessity of research
- 3) The contents of research

### **II. Domestic and foreign research current state**

- 1) The research status of establishment for neurodegenerative disease model via neurotoxic chemical injection
- 2) The research status of AD/PD mechanism and pathological genetic study
- 3) The production of neurodegenerative disease model animal in non-rodents
- 4) Gene targeting research using genetic correction
- 5) The market status of neurodegenerative disease model pigs

### **III. Results**

- 1) Strategy, method, flow chart and plan for research development
- 2) Research development methods and results
- 3) Summary of research development results
- 3) Achievement of research development

### **IV. Achievement and level of contribution into interest fields**

### **V. Attainment of research and plan for utilization of outcome**

### **VI. Collected foreign science technology informations during research development**

### **VII. Security level for research development outcome**

### **VIII. The current status of research facility and equipment enrolled in national science and technology information system**

### **IX. The implement result of laboratory safety management**

### **X. The representative outcomes of research development**

### **XI. Further informations**

### **XII. References**

## 7. 본문목차

# < 목 차 >

### 제 1 장 연구개발과제의 개요

- 1) 연구개발 목적
- 2) 연구개발의 필요성
- 3) 연구개발의 범위

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1) 신경독성물질 투여를 통한 퇴행성 뇌질환 모델 확립 연구 동향
- 2) 퇴행성 뇌신경 질환 (AD/PD)의 메카니즘 및 병인 유전자 연구
- 3) 비설치류에서 퇴행성 뇌신경 질환 모델 동물 생산
- 4) 유전자교정을 이용한 유전자 적중 연구
- 5) 퇴행성 뇌질환 모델 돼지의 시장 현황

### 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

- 1) 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계, 추진일정
- 2) 연구개발 방법 및 연구결과
  - 가) 1세부: 체세포 핵이식 기법에 의한 퇴행성 뇌신경 질환 미니돼지 생산
    - 뇌신경세포 특이발현 프로모터 개발
    - PD 병인유전자 발현 세포주 확립
    - 형질전환 복제수정란 생산 효율 향상
    - AD 모델 생산 위한 hAPP 유전자 조절 형질전환 미니돼지 생산
    - PD 병인유전자 발현 형질전환 복제수정란 생산 및 검증
    - AD 돼지 세포주 이용 AD 병인 유전자 복합발현 세포주 생산
    - hSNCA 발현 PD 모델 미니돼지 생산
    - PD 병인유전자 KO 복제수정란 생산
    - AD 병인 유전자 복합발현 미니돼지 생산
    - Parkin KO 복제 미니돼지 생산
    - 사업화를 위한 기초 수요조사 실시 및 모델돼지로서의 정량적 기준의 마커 제시
    - 형질전환 미니돼지의 교배를 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산
    - 체세포핵이식을 이용한 AD/PD 모델들의 재복제 생산
  - 나) 2세부: 질환 모델 미니돼지의 영상학적 분석 및 행동학적 분석
    - 일반 미니돼지이용 영상/행동분석기법 확립
    - 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 분석 시스템 확립



- hAPP 유전자 조절 미니돼지의 행동/영상학적 분석
  - PD 유전자 KO 미니돼지의 행동/영상학 분석 통한 PD 모델로의 평가
- 다) 1협동: 질환 모델 미니돼지 생산을 위한 ZFN 합성 및 유전자 프로파일링
- AD 모델 생산 위한 hAPP 유전자 조절벡터 생산 및 PD 병인유전자 합성
  - PD 병인유전자 KO 위한 고효율 ZFN 합성 및 세포주 생산
  - 신경독성물질투여를 통한 미니돼지의 유전학적 검증
  - hAPP 유전자 조절 미니돼지의 유전자조절 유무 검증
  - ZFN 이용 PD-KO 세포주 생산
  - hSNCA 발현 미니돼지의 유전학적 검증
  - 다중 PD 유전자 적중 돼지 생산을 위한 DJ-1 KO 세포 생산
- 라) 2협동: 질환 모델 돼지의 사육 및 관리기법 확립
- 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 개발 및 미니돼지 유래 원료세포 확보 및 공급
  - 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 조직병리 분석
  - hAPP 유전자 조절 미니돼지의 번식능 평가 및 사육기법 확립
  - hSNCA 발현 미니돼지의 번식능 평가 및 사육기법 확립
  - PARK2 KO PD 모델 미니돼지 번식능 평가
- 3) 연구과제 결과 총정리
- 3) 연구과제의 성과

- 제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도**
- 제 5 장    연구개발의 활용계획**
- 제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보**
- 제 7 장    연구개발 성과의 보안등급**
- 제 8 장    국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황**
- 제 9 장    연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적**
- 제 10 장   연구개발과제의 대표적 연구실적**
- 제 11 장   기타사항**
- 제 12 장   참고문헌**

<별첨> 자체평가의견서

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 제 1 절. 연구개발 목적

1. 인간의 대표적 퇴행성 뇌신경 질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)/파킨슨병(Parkinson's disease, PD)의 발생 기전 연구 및 질병 정복을 위한, 알츠하이머병(AD)/파킨슨병(PD)모델 복제 미니돼지를 확립하는 것이다.

- 가. 형질전환복제 기법을 이용한 2종의 AD 모델 미니돼지 생산
- 나. 형질전환복제 기법을 이용한 3종의 PD 모델 미니돼지 생산

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

### 1. 퇴행성 뇌신경 질환의 개요

현대의학의 발전으로 고령화 사회로 진행됨에 따라 퇴행성 뇌신경 질환의 발병은 점차 증가하고 있다. 대표적 퇴행성 뇌신경 질환인 파킨슨병과 알츠하이머병은 60세 이상의 인구에서 주로 발생하며, 연령의 증가와 함께 발병률이 증가하는 경향을 보인다. 하지만 아직까지 뚜렷한 발병원인에 대한 지식과 치료법은 없으며, 일단 발병하면 환자의 기대수명과 삶의 질이 크게 저하된다.

파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 존재하는 도파민 신경세포가 소실되어 발생하게 되며 경직, 느린운동, 안정떨림 및 자세 불안정성이 나타나는 만성 진행성 퇴행성 뇌신경 질환이다. 노인 인구 증가에 따라 환자수가 증가하고 있으며, 50세 이전에 발병하는 조기발현 파킨슨병 환자도 증가하고 있다. 하지만 파킨슨병에서 나타나는 선택적 세포 파괴의 발병기전 및 원인도 밝혀져 있지 않으며, 현재까지 조기 진단 및 예방, 완치 가능한 명확한 치료약이나 치료법도 없는 실정이다. 대부분의 파킨슨병 환자들은 가족력 없이 발병하지만 약 10% 정도에서는 가족성 파킨슨병이 나타나고 있다. 이러한 가족성 파킨슨병 환자를 이용한 연구를 통해 파킨슨병과 연관성 있는 유전자 돌연변이가 밝혀지고 있다. 이들 유전자 결함에 의한 가족성 파킨슨병의 경우 증상 발현은 10대에서 20대부터 발현되나, 아직까지 파킨슨병 연관된 것으로 알려진 유전자들 간에 의한 상호작용 및 질병발생에 대한 정확한 기전에 대해 알려진 바가 없다.

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 흔한 퇴행성신경질환(neurodegenerative disease)의 하나로 비정상적으로 뭉쳐있는 단백질 덩어리인 아밀로이드와 같은 신경독성물질이 양측 측두엽에 축적되면서 수반되는 기능 저하로 시작하게 되며, 점차 뇌의 피질부의 신경 세포 내부와 외부에 아밀로이드의 축적량이 늘어나면서 병이 진행된다. 주요증상은 기억장애로 시작되어 언어장애등이 야기되며 생각하거나 추론할 수 있는 능력이 소실된다. 결국 환자는 움직일 수 없게 되어 매우 쇠약해지며, 폐렴, 요로감염, 욕창 등의 합병증이 발생하여 사망에 이르게 된다. 이 질병 역시 현재까지 완치시킬 수 있는 명확한 치료약이나 치료법은 없는 실정이다.

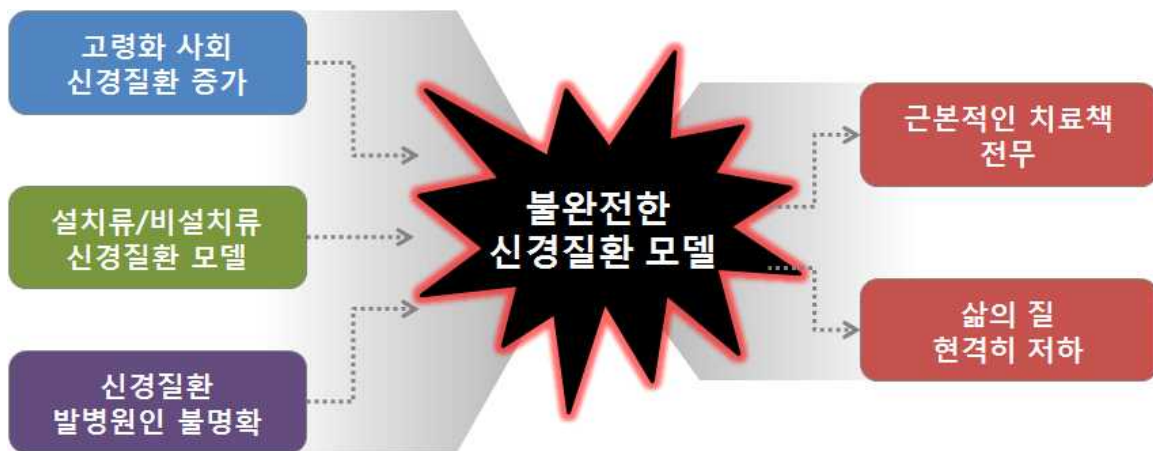


그림 1. 퇴행성 뇌신경 질환 연구의 문제점

퇴행성 뇌신경 질환의 약물치료나 기전연구를 위한 질병모델로는 대부분 설치류를 이용해 왔으나, 동물 질환모델의 병리양상과 증상이 사람에서 관찰되는 것과 많은 차이를 보이고 있어 설치류질환모델에서 나온 결과를 토대로 임상시험을 시행할 경우 많은 문제점을 안고 있어왔다. 적절한 뇌신경질환 모델 동물을 개발하는 것이 발병 기전의 연구 및 치료제의 개발에 가장 먼저 선행되어야 할 중요한 과제이나 국내외적으로 이러한 환자과 유사한 적절한 질환모델동물의 개발은 미진한 상태에 있어 이에 대한 활발한 연구가 반드시 필요하다.

## 2. 퇴행성 뇌신경 질환의 연구의 문제점

기존의 퇴행성 뇌질환 연구를 위한 모델동물은 신경독성 물질을 투여하거나 형질전환 기법을 적용한 설치류 모델로 분류할 수 있으며 다른 동물종은 한계점이 많다. 각 방법으로 확립된 동물모델의 문제점에 대해서 아래에 작성하였다.

### 가. 신경독성물질 투여를 통한 퇴행성 뇌질환모델 확립 연구에서의 문제점

- (1) 설치류를 이용한 AD와 PD모델 확립 연구에서 PD와 AD의 일부증상 유발에는 성공하였으나 질환모델로 사용 가능할 만큼 사람의 PD와 AD의 증상을 모두 발현하는 모델 동물은 아직까지 확립하지 못하였다.
- (2) 수년간의 연구에도 불구하고 설치류를 이용한 연구가 답보상태인 점을 감안한다면 돼지와 같은 다른 종으로 모델동물 연구를 옮겨가는 게 현명한 판단으로 보인다.

### 나. 형질전환 기법 이용한 AD/PD모델 동물 확립 연구에서의 문제점

- (1) 간헐적으로 몇 가지 유전자가 AD/PD의 발병에 관여한다는 점은 인지되었으나 발병하는 모든 AD/PD의 병인을 설명할 수는 없는 실정이다.
- (2) 병인유전자로 가능성 있는 여러 유전자를 형질전환한 설치류를 생산하였으나 PD/AD의 증상을 모두 발현하는 모델은 아직까지 생산하지 못하였다.
- (3) 형질전환을 3가지 유전자에 대해서 한 경우 AD모델에 더 비슷해지는 것으로 보아 형질전환 기법이 잘 활용된다면 유용한 AD/PD모델의 생산으로 가능할 것으로 보인다.

- (4) 노령의 칩팬지는 대량생산이 불가능해서 여러 가지 제한점으로 질환동물 모델로 부적합하기 때문에 돼지와 같은 번식능력이 탁월한 중/대 동물이 대안이 될 수 있다.
- (5) 이미 체세포핵이식기법과 ZFN을 이용해서 특정유전자가 제거된 복제돼지가 생산된바 있으므로 체세포핵이식과 ZFN 기법 이 최근 개발된 유전자 편집 기술을 이용한 AD/PD모델의 생산은 가능할 것이다.

### 3. 퇴행성 뇌신경질환 연구에 적합한 모델동물 생산의 필요성 및 전망

노인인구의 증가에 따라 퇴행성 뇌신경질환은 그 발생빈도가 증가하고 있으나, 대표적 퇴행성 뇌신경질환인 알츠하이머와 파킨슨병은 아직까지 질병의 발생이나 진행을 억제하거나 근치적인 치료 방법이 없는 상태로 이에 대한 연구가 필요함에는 이견이 없는 실정이다. 국내 알츠하이머병에 의해 기인되는 노인성 치매의 경우 2005년 6만5천명, 2008년 13만 7천명으로 연평균 25%의 증가율을 보이고 있으며, 특히 80대 이상 연령층의 실진료 환자 수는 연평균 34%씩 증가하고 있어 국가적 의료 재정에도 부담으로 작용하고 사회적으로는 가정과 개인의 삶에도 큰 영향을 끼치고 있다. 치매로 인한 건강보험 진료비도 해마다 증가하여, 2005년 872억 원에서 2008년에는 3천817억 원으로 집계되어, 치매 진료환자 1인당 연간 건강보험 진료비가 최근 7년 동안 2.4배나 증가하였다. 또한 치매 등 노인성 질환으로 인한 건강보험 급여비가 30%에 육박하는 등 노인의료비와 함께 커다란 경제 사회적 문제로 야기되고 있다. 하지만 여러 연구자들의 노력에도 불구하고 현재까지 환자와 유사한 적절한 퇴행성 뇌신경질환 모델동물은 개발되지 않아 이러한 문제점을 해결하기 위한 타개책이 필요하다.

지금까지 여러 가지 질환의 약물치료나 기전연구를 위해 주로 이용해오던 설치류 모델을 이용한 연구가 많이 시도 되었고, 퇴행성 뇌신경질환의 병인유전자로 가능성 있는 여러 유전자를 형질 전환한 모델 생산에는 성공하여 일부증상 유발을 확인하였으나, 질환 모델로 사용 가능할 만큼 사람의 PD와 AD의 증상을 모두 발현하는 모델동물은 아직까지 확립하지 못하였다. 인간과의 디멘존, 번식, 수명 및 행동양상의 확연한 차이로 인해 보다 인간과 가까운 종을 이용한 질환동물 모델에 대한 필요성이 제기 되었고, 영장류의 경우 그 희소성 및 사육관리의 비용 및 어려움으로 인해 극히 제한적인 분야에서만 질환연구에 활용 가능한 제약이 있으므로, 이에 따라 비교적 저렴한 비용과 시설에서 보다 정확한 난치 질환 연구를 할 수 있는 돼지를 새로운 모델 동물로서 바이오 메디컬 분야에 활용하고자 하는 요구가 증가되고 있다. 모델 동물로서의 돼지는 기존의 설치류 모델에 비해 생존 기간이 길며, 인간과 유사한 생체 메카니즘을 지니고 있다고 알려져 있어 기존의 한계성을 극복 가능할 차세대 질환모델 동물 종으로서 각광받고 있다. 돼지는 해부생리학적으로 인간과 유사성이 인정되어 이미 각종 질환의 병리학적 기전과 치료를 위한 연구에 이용되고 있으며, 특히 오랫동안 경제 동물로 가치가 인정되어 다른 중/대 동물을 질환모델로 사용할 때 보다 윤리적인 문제점을 피해갈 수 있으며, 안정적인 사육 시스템이 구축되어 있어 실험동물 모델 개발 시 유지 및 관리가 용이한 장점이 있다. 또한 이종장기 이식 및 유용물질의 생산을 위해 형질전환 기술과 체세포 핵이식 기술을 이용한 형질전환 복제돼지 생산연구가 활발하게 이루어지고 있어 돼지를 이용한 유전자 조절 복제 모델 돼지의

생산이 가능할 것이다.

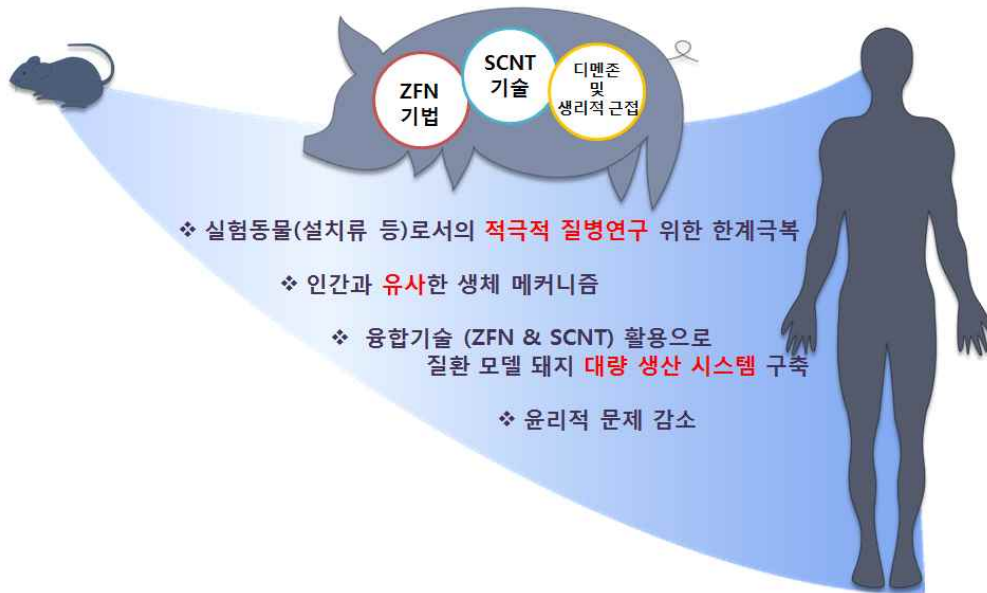


그림 2. 퇴행성 뇌신경 질환 연구의 필요성

기존에는 설치류 이외의 종에서 유전자가 완전히 제거된 동물의 생산에 큰 제약이 있었으나, 최근 Zinc Finger Nuclease (ZFN)의 개발로 인해 유전자 Knock Out 효율이 기존의 homologous recombination 방식에 비해 비약적으로 상승되었다. 이는 Zinc finger 단백질과 유전자를 자르는 부분을 결합하여 세포 안에 존재하는 유전자를 대상으로 특정 위치만을 인식·절단함으로써 유전자를 교정 및 개량이 가능한 ‘유전자 가위’ 기술로서, 이를 바탕으로 다양한 유전자의 제거, 돌연변이 유발, 타 유용유전자의 정해진 위치에 삽입 등 다양한 형태의 유전자 편집이 가능하다. 세포 및 유전자치료(선천성 유전질환, AIDS 등), 고부가가치의 형질전환 동식물 생산, 바이오 에너지 고효율 생산 시스템 및 바이오시밀러 등의 바이오 의약품의 고효율 생산 시스템 개발 등 무한한 산업적 활용이 가능하므로 이를 통하여 창출되는 효용가치는 실로 막대할 것이다. 때문에 ZFN 기법과 체세포핵이식(somatic cell nuclear transfer, SCNT) 기법이 융합되면 특정유전자가 제거된 질환모델 동물을 만들 수 있으며, 유전자 조절 모델동물 연구 분야의 획기적인 발전이 가능하게 되었다.

따라서 본 연구를 통해 대동물을 이용한 퇴행성 뇌질환모델 (알츠하이머병/파킨슨병) 기술이 세계 최초로 확보된다면, 이를 기반으로 질환의 극복이 가능할 뿐만 아니라 설치류 모델에서 벗어나, 수많은 인간의 난치질환모델이 개발 될 수 있는 무한한 학문적, 경제적 가치를 생산해 낼 수 있을 것이다. 또한, 세계에서 처음으로 퇴행성 뇌질환 모델 동물이 개발한다면 질병기전의 규명, 치료물질의 탐색, 진단법의 개발 및 진단장비까지 우리나라가 주도적으로 개발할 수 있을 뿐만 아니라 국내외 생명과학 지식 및 관련기술의 비약적 발전을 유도할 수 있을 것으로 국가적으로도 이 분야 기술을 지닌 핵심연구팀을 구성하여 장기간 집중적 지원을 해야 하는 당위성이 있다.

## 제 3 절. 연구개발 범위

### 1. 신경 독성 물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 생산

- 가. 신경 독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 개발 및 검증
- 나. 뇌신경질환 모델 미니돼지의 생산 및 관리 시스템 확립
- 다. 뇌신경질환 모델 미니돼지의 행동학적/영상학적 모니터링 시스템 확립
- 라. 뇌신경질환 모델 미니돼지의 조직 병리학적 평가 및 유전자 프로파일링

### 2. 체세포복제 기법과 유전자조절 기법을 융합한 AD 모델 미니돼지 생산

뇌신경 특이적 유전자 발현 유도를 위해, 미니돼지세포를 이용하여 3개의 프로모터 (synapsin1, Thy1, PrP1) 평가 및 선정

- 가. hAPP 유전자 조절 위한 벡터 제작 및 세포주 확립
- 나. 체세포 핵이식(SCNT) 기법을 이용한 hAPP 유전자 조절 미니돼지 생산 및 hAPP 유전자 조절 미니돼지 유래 세포주 확립
- 다. 생산된 형질전환 미니돼지에서 hAPP 유전자 조절 검증 및 생식선 전이 검증
- 라. hAPP 유전자 조절 미니돼지의 행동학적/영상학적기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템 확립
- 마. hAPP 유전자 조절 미니돼지의 조직 병리학적 평가
- 바. hAPP 유전자 조절 미니돼지의 유전자 프로파일링 및 비교분석을 통한 질병의 발병 기전 연구
- 사. hAPP 유전자 조절 미니돼지 확립을 통한 실험동물 자원 인프라 구축
- 아. hAPP 유전자 조절 미니돼지의 활용 기반 구축

### 3. 형질전환복제 기법을 이용한 복합 유전자 발현 AD 모델 미니돼지 생산

- 가. 인간의 AD 병인 유전자 hAPP 와 PS1 복합 발현 벡터 제작
- 나. 뇌신경세포 특이적 AD 병인 유전자 복합 발현 세포주 확립 및 형질전환 복제수정란 생산
- 다. 형질전환 체세포복제 기법을 통해 AD 병인 유전자 복합 발현 AD 모델 생산
- 라. 형질전환 복제미니돼지에서 AD 병인 유전자 복합 발현 검증 및 생식선 전이 여부 검증
- 마. AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지의 행동학적/영상학적 기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템 확립
- 바. AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지의 조직 병리학적 평가
- 사. 질환 모니터링 시스템 이용하여 형질전환 복제동물 평가
- 아. AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지의 유전자 프로파일링 및 비교 분석을 통한 질병의 발병 기전 연구
- 자. AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지 확립을 통한 실험동물 자원 인프라 구축
- 차. AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지의 활용 기반 구축

#### 4. 형질전환복제 기법과 유전자과발현 기법을 융합한 PD 모델 미니돼지 생산

- 가. PD 유발에 가장 적절한 프로모터 선정을 위해, 미니돼지 세포를 이용하여 뇌신경 특이적 유전자 발현 유도를 위한 프로모터 (synapsin1, Thy1, PrP1) 평가 및 선정
- 나. 인간의 PD 병인 유전자 human mutant alpha-Synuclein (hSNCA) 유전자 스크리닝 및 벡터 제작
- 다. 뇌신경세포 특이적 hSNCA 과발현 세포주 확립 및 형질전환 복제수정란 생산 및 최적화
- 라. SCNT 기법과 형질전환 기술의 융합을 통해 hSNCA 발현 복제미니돼지 생산
- 마. 형질전환 복제미니돼지에서 hSNCA 유전자 발현 검증 및 생식선 전이 여부 검증
- 바. PD 모델 미니돼지의 행동학적/영상학적기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템 확립
- 사. PD 모델 미니돼지의 조직 병리학적 평가
- 아. 확립된 질환 모니터링 시스템 이용하여 형질전환 복제동물 평가
- 자. PD 모델 미니돼지의 유전자 프로파일링 및 비교분석을 통한 질병의 발병 기전 연구
- 차. PD 모델 미니돼지 확립을 통한 실험동물 자원 인프라 구축
- 카. PD 모델 미니돼지의 활용 기반 구축

#### 5. 체세포복제 기법과 ZFN 기법을 융합한 KO PD 모델 복제 미니돼지 생산

- 가. Parkin, PINK1, DJ1 및 ATP13A2 유전자 스크리닝 및 유전자 적중 위한 모듈 개발
- 나. 최고효율의 KO 유전자 선택 및 형질전환 세포주 생산
- 다. SCNT 기법과 유전자가위 기술의 융합을 통해 PD 모델 복제 미니돼지 생산
- 라. PD 병인 유전자 KO 복제미니돼지에서 KO 검증 및 생식선 전이 검증
- 마. PD 모델 미니돼지의 행동학적/영상학적기법을 이용한 비침습적 모니터링 시스템 확립
- 바. PD 모델 미니돼지의 조직 병리학적 평가
- 사. 질환 모니터링 시스템 이용하여 형질전환 복제동물 평가
- 아. PD 모델 미니돼지의 유전자 프로파일링 및 비교분석을 통한 질병의 발병 기전 연구
- 자. PD 모델 미니돼지 확립을 통한 실험동물 자원 인프라 구축
- 차. PD 모델 미니돼지의 활용 기반 구축

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1 절. 신경독성물질 투여를 통한 퇴행성 뇌질환 모델 확립 연구 동향

퇴행성 뇌신경 질환의 연구를 위해 초기 증상을 보이는 사람의 뇌와 유사한 해부학적 부위에 신경독성물질 투여에 의해 손상이 유발된 뇌신경 질환 모델을 주로 사용하였다. 현재까지의 신경독성물질의 투여를 통한 퇴행성 뇌신경 질환 모델 확립 연구는 그 보고가 다양하며, 연구 현황은 아래에 작성하였다.

1. lipopolysaccharide를 뇌실질 조직과 뇌실에 주입하여 알츠하이머 질병모델 쥐를 생산했으나, 이 모델은 전체적으로 표준화 작업이 어렵고, 유발 방법과 관련한 모든 것이 구체화되어 있지 않아 모델 동물의 병변의 양상이 완전히 통일되어있지 않다는 단점이 있다 (Haus-Wegrzyniak 등, Brain Res., 1998).
2. 알츠하이머의 발병에 있어 베타아밀로이드와 신경섬유성 병변 유발의 관련성에 대해 연구하기 위해 hAPP형질전환 쥐의 뇌에서 추출한 베타아밀로이드 침전물을 B6/P301L tau 형질전환 개체의 뇌에 주사하여, 주입한 베타 아밀로이드가 tau 신경섬유성 병변을 유발함을 보고하였다. 그러나, 주입한 베타아밀로이드 침전물의 농도 및 양과 실험에 사용되는 쥐의 품종에 따라 병변의 유발이 일정치 않아 이 부분에서의 연구가 더 필요한 상태이다 (Bolmont 등, Am J Pathol., 2007).
3. 6-hydroxydopamine(6-OHDA) 또는 MPTP(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)의 주입으로 PD모델 쥐를 생산하였다. MPTP를 주입한 모델과 달리 6-OHDA를 주입한 모델동물에서의 병변은 비가역적인 신경 손상을 유발하였고 일측성 또는 양측성으로 유발된 것을 확인할 수 있었다. MPTP 주입 모델의 경우에는 자발적인 병변 치유가 일어났고, 성별, 나이, 품종 등에 영향을 받는 것으로 확인되어 PD 모델 생산에는 적절치 않은 것으로 확인되었다 (Conceicao 등, J Vis Exp., 2010).
4. PD모델을 생산하는데에 가장 널리 쓰이는 독성 약물인 MPTP의 결점을 보완할 대체약물로 6-OHDA를 이용하여 wild type과  $\alpha$ -synuclein-/- 마우스에서 PD를 유발하였다. PD 유발된 mouse에서는 dopamine의 분비 억제가 오랫동안 유지되었으나, 행동 이상은 2개월 후에 회복되었다. 그리고  $\alpha$ -synuclein-/- mouse가 6-OHDA에 대해 저항성이 강한 것으로 보아 6-OHDA의 독성은  $\alpha$ -synuclein에 의해서 영향을 받는 것으로 관찰되었다. 이 연구에서는 행동학적인 지표가 2개월 정도 후에 회복되었다는 점에서 PD 모델 생산이 완전하게 이루어졌다고 보기는 어렵다 (Alvarez-Fischer 등, Exp Neurol., 2007).
5. 콜레스테롤이 풍부한 식이를 공급받은 토끼를 동물 모델로 사용하여 베타아밀로이드의 침전이 완만하게 나타나는 것을 확인하였다. 그러나 콜레스테롤 식이 방법이 표준화되지 않았고 베타아밀로이드의 침전 양상은 개체에 따라 조금씩 변이가 있어 알츠하이머 모델 동물로 활용되기에는 무리가 있다 (Sparks 등, J Alzheimers Dis., 2008).
6. MPTP를 다양한 연령대의 수컷 C57BL/6 mice와 BALB/c mice에 주입하여, 나이에 따른



MPTP의 dopamine 분비 억제 효과에 대해 알아보았다. C57BL/6는 1개월령에 MPTP의 영향이 최소였던 반면, 18개월령에서 가장 큰 영향을 보였고, 이와 유사하게 BALB/c는 1개월, 3개월령의 어린 개체에서 MPTP의 어떠한 영향도 관찰되지 않은 반면, 10개월령, 18개월령에서는 dopamine 분비의 현저한 감소가 관찰되었다. 기존의 실험에서는 2-4개월령의 수컷 C57BL/6와 BALB/c에 MPTP를 주입하였을 때에 C57BL/6는 매우 효율적으로 PD 모델을 생산할 수 있었지만, BALB/c는 MPTP에 대한 저항성이 강해 PD가 유발되지 않았다고 보고되었는데, 이번 실험에서 MPTP에 저항성이 강한 strain도 나이가 들면서 저항성을 잃는다고 보고하였다. C57BL/6의 어린 연령에서 MPTP의 영향에 대한 보고 내용이 일관되지 않아 약물에 의한 PD 모델의 생산에 일관성이 부족하다 (Filipov 등, Neuroreport, 2009)

7. Reserpine을 사용하여 뇌 카테콜라민(catecholamine)의 결핍을 유도하여 도파민 결핍, 무동증(akinesia) 등과 같은 파킨슨 병 소견을 보였으며, L-Dopa 치료에 의해 증상이 호전되는 소견을 보였으나, 신경전달물질의 결핍이 일시적이며, 흑질 도파민 세포의 사멸이 발생하지 않는 단점이 있다(Carlsson A 등, 1958).
8. 도파민 신경 독소인 6-OHDA를 흑질에 투여하여 파킨슨 병 쥐 모델을 유도하였으나, 흑질-선조체(nigrostriatal) 시스템의 도파민 신경세포를 손상시켜 운동 증상 뿐만 아니라 심히 및 인지 장애와 같은 비운동 증상도 발현 시킨다 (Ungerstedt U.등, 1968, Branchi I 등, 2008).
9. MPTP는 카테콜라민 신경세포에서만 미토콘드리아 효소 복합체 I를 억제하지만, rotenone은 전반적으로 복합체 I를 억제한다 (Cannon JR 등, 2010).
10. Paraquat은 환경 독소로 MPP+과 화학적 구조가 유사하여 신경독성이 있고, 반복적으로 쥐에 투여 시 흑질에 도파민 신경세포가 소실되어 파킨슨 병 증상을 유발할 수 있기 때문에 파킨슨 병의 기전에서 환경적인 요인이 중요하다는 것을 알 수 있다 (McCormack AL 등, 2002)

## 제 2 절. 퇴행성 뇌신경 질환 (AD/PD)의 메카니즘 및 병인 유전자 연구

대표적인 퇴행성 뇌신경 질환인 AD/PD는 많은 방법으로 연구되고 있다. 하지만 아직까지 질병의 발생기전이 불명확하여 그 메카니즘 및 병변 유전자를 동정하는 연구가 계속적으로 진행 중에 있으며, 그 연구 현황은 아래에 작성해 두었다.

### 1. 알츠하이머병 메카니즘 및 병인 유전자 동정

가. 사람과 마우스에서 presenilin1(PS1), presenilin2(PS2)이 AD 유발 유전자임을 보고 하였다. 그러나 PS1의 단백질 분해능이라는 기능적인 중요성에 대해 밝히지 못하였으며, 면역 염색을 통해 PS1이 대량 발견되어야 할 신경그물 내의 glial cell body에서 PS1-IR(immunoreactive)을 감지해내지 못하였다. (Lee 등, J Neurosci., 1996).

나. AD 환자의 경우 amyloid precursor protein(APP)이  $\beta$ -secretase에 의해 분해가

되고 PS1과 PS2를 subunit으로 지니고 있는  $\gamma$ -secretase에 의해 분해되어, 분해 산물이 세포외에 축적되어 발병된다고 보고하였다. (Hardy, 2002, Science.; Wilson등, Nat Neurosci., 2002).

다. APP, PS1, PS2를 암호화하고 있는 유전자 내에서의 돌연변이에 의해서 AD가 유발된다고 보고되었다. 그러나 정확하게 세포 내 어느 곳에서 베타아밀로이드가 생성되고 얼마나 많이 분비되는지에 대한 연구가 필요하다. (Selkoe, Nat Cell Biol., 2004).

## 2. 파킨슨병 메카니즘 및 병인 유전자 동정

가. PD 발병과 관련된 LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2) 돌연변이는 우성 유전으로 후대에 전달되는 것을 밝혔다. 그러나 아직까지 전체 LRRK2 유전자 중 일부 변이만이 PD와 관련하여 연구되었으며, LRRK2의 기능 규명, 생화학적 회로에 대한 연구가 더 진행되어야 PD 발병과 LRRK2의 변이의 관련성에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다. (West et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2005).

나. PD 환자의 가계도 및 유전자 분석을 이용하여 Parkin 유전자의 돌연변이가 유년 시기에 발병하는 PD와 관련이 있음을 밝혔다. 그러나 유년시기에 발병하는 PD의 일부 환자에서 PD의 병변 중 하나인 Lewy body가 관찰되지 않아, Parkin 유전자의 정확한 생리학적 기능과 Parkin 유전자의 돌연변이가 Lewy body의 형성없이 어떻게 선택적으로 nigral neuron의 퇴행성 변화를 유도할 수 있는지에 대한 연구가 더 진행되어야 한다. (Kitada 등, Nature, 1998).

다. PD는 도파민성 신경의 퇴행과 Lewy body라고 알려진 단백질 축적물이 형성되는데, ubiquitin proteasome system(UPS)과 chaperone이 PD와 관련이 있음을 Drosophila을 이용한 실험을 통해 제시하였다. (Auluck 등, Science, 2002).

라. PD 환자의 염색체상에서 PARK6라고 알려진 chromosome 1p36의 좌위를 분석한 결과 PINK1(PTEN-induced kinase 1)에서의 돌연변이가 PARK6와 관련이 있다고 확인하였으며, 이것은 missense mutation과 nonsense mutation으로 나타난다고 보고하였다. 또한 PINK1은 미토콘드리아에 위치하고 있으며 이 유전자에 돌연변이가 생기면 cellular stress에 대한 민감도가 증가함을 밝혀 미토콘드리아와 PD의 관련성에 대해 보고하였다. 그러나 PTEN에 의해 발현이 증가한다고 알려진 PINK1이 PTEN과 관련된 세포의 모양에는 어떠한 영향을 끼치지 않아 PTEN 회로에서의 PINK1의 역할에 대한 연구가 더 필요하다. (Valente등, Science, 2004).

## 제 3 절. 비설치류에서 퇴행성 뇌신경 질환 모델 동물 생산

설치류에서 AD/PD모델을 생산하여 질환연구를 진행하고 있으나, 인간의 질환과 유사한 병적 증상과 병리병변을 보여주지 못하고 있다. 따라서 이러한 한계를 극복하

기 위하여 비설치류에서도 AD/PD모델 동물을 생산하고 있으며, 초파리에서 그 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 돼지등의 대동물에서도 보고가 있으며 관련한 국내외의 연구 현황은 아래의 목록과 같다.

1. 인간의 APP 유전자를 과발현시켜 초파리를 이용한 AD모델을 생산하였다. 그 결과, 초파리의 날개에서 비정상적인 변화와 뇌의 Kenyon cell에서 퇴행성 변화, 아밀로이드 plaque와 유사한 산재된 축적물이 형성되었다. 그러나 3일령의 초파리에서도 이러한 축적물이 소량 발견되어 축적물과 행동학적 이상이 연관이 있는지는 결론지을 수 없었다. (Iijima 등, PNAS, 2004).
2. 독성이 있는 베타아밀로이드 펩타이드를 발현시켜 AD모델 초파리를 생산하였고, 형질전환 초파리의 신경이 퇴행성 변화를 보였으며, 생후 몇 일이 지나지 않아 운동 기능이 저하되고, 후각 기억력이 손상되었으며 수명이 짧아지는 등의 AD의 분명한 표현형을 보였다. 그러나 초파리에서의 hAPP는 베타아밀로이드 부분에서 척추동물의 hAPP와 서열이 불일치함을 보였다. (Crowther 등, Curr Opin Pharmacol., 2004).
3. 초파리를 이용하여 정상적인 사람의  $\alpha$ -synuclein과 두 개의 돌연변이 형(A30P, A53T)으로 PD질환모델 동물을 생산하였다. 뇌 조직에서 육안적인 형태학적 변화를 유발하지는 않았으나 성체 시기가 되었을 때 tyrosine hydroxylase의 손상이 일어났으며, 사람과 유사하게 lewy body와 같은 축적이 일어났고, 운동 기능 손상도 유발되었다.  $\alpha$ -synuclein의 발현량에 있어 세 가지 다른 모델에서 거의 유사하게 관찰되어  $\alpha$ -synuclein과 PD 유발의 관련성에 큰 의미를 부여하지는 못하였다. (Feany 등, Nature, 2000).
4. 초파리에서 Parkin 유전자의 기능 손상을 유발하여 PD 질병모델을 생산하였다. 결과 초파리의 산화적 손상에 대한 민감도의 증가와 날개의 표현형이 달라졌다. 시간의 경과에 따라 운동 기능에서도 퇴행성 변화가 나타났고, 그 구조적인 변화에는 미토콘드리아의 기능 결핍 및 조직학적 비정상이 관찰되었다. 그러나 Parkin 돌연변이 동물에서 dopamine 분비감소는 관찰하지 못하였다. (Greene 등, PNAS, 2003; Pesah 등, Development, 2004).
5. 초파리를 이용하여 Pink1 유전자가 Parkin과 유전적으로 상호작용하여 mitochondria의 function과 관련있다는 것을 밝혀냈다. 초파리의 PINK1의 유사체를 제거한 결과, 수컷의 불임, 근육조직의 괴사성 퇴화, 미토콘드리아 형태의 이상을 유발하고 산화적 스트레스를 포함한 여러 스트레스에 대해 민감도가 증가하였다. 미토콘드리아의 기능을 조절하는데 있어서 pink1-parkin의 역할은 PD의 병인의 중추적인 메카니즘이라고 보고하였다. 그러나 Parkin 돌연변이에서 dopamine 분비 신경세포의 손실이 약하게 일어났지만, PINK1 돌연변이에서는 dopamine 분비 신경세포의 손실을 전혀 관찰하지 못했다. (Clark 등, Nature, 2006).
6. 자연발생학적 동물 모델로 알츠하이머와 유사한 증상을 나타내는 노령의 침팬지를 이용한 연구도 진행되고 있다. 신경학적 plaque의 형성과 NFT 및 Filament의 형성이 알츠하이머 질병 양상과 동일하였으나 실험동물 모델로 사용하기 위해서는 대량 생산이 필요하며 자연발생학적인 무작위적으로 발생하기 때문에 노령의 침팬지는 실험동물 모델로는 적합하지 않다. (Rosen 등, J Comp Neurol., 2008).
7. 대동물의 뇌를 이용한 연구는 경제성, 윤리성, 실용성 등의 문제에도 불구하고, 인간 뇌 기

능에 대한 연구를 하기에 최적의 조건을 갖고 있다. 소동물의 뇌를 이용한 연구의 문제점을 극복하여 소동물의 CNS 연구부터 인간의 CNS 연구까지 다리를 놓아 줄 수 있는 동물로서 미니돼지는 매우 적합하다. MPTP 주사하여 PD 질병모델을 개발하여 뇌 영상법, 보행분석, 신경계분석, 사후 조직학 분석등을 진행한 사례가 있다. (Bjarkam 등, Br J Neurosurg., 2008).

8. 돼지에서 DJ-1 유전자의 기능 손상을 유발하여 PD 모델을 생산하였다. 2마리의 bi-allelic 녹아웃 미니돼지 및 1마리의 mono-allelic 녹아웃 미니돼지를 생산하여, 웨스턴블랏 결과, DJ-1 단백질이 생산되지 않는 것을 관찰하였다. 그러나 수일내에 폐사하여 DJ-1 녹아웃 돼지에서 표현형은 관찰하지 못하였다. (Yao J 등, Sci Rep., 2014).
9. 인간의 APP 유전자를 과발현시킨 돼지 AD 모델을 생산하였다. 그 결과, 7마리를 생산하였으며, PDGFbeta 프로모터에 따라, 심장 또는 간이 아닌 뇌에서만 APP 단백질의 생산이 관찰되었다. 그러나, 물체 인식 테스트 결과, AAP 과발현 AD 모델 돼지에서 유의적인 결과는 없었으며, 아직 1-2년령의 나이로 인하여 증상이 발현되지 않았다고 추측하고 있다. (Kragh 등, Transgenic Res., 2009).
10. 2009년 Denmark의 연구자들이 handmade cloning기법을 이용하여 swedish form의 돌연변이 APP형 유전자를 지닌 APP 모델 돼지를 발표 (Kragh et al., Transgenic Res, 2009) 하였고 2012년에 이 돼지가 1-2살이 되었을 때, 익숙한 물질 또는 새로운 물질에 대한 행동학적 반응을 spontaneous object recognition test를 이용하여 평가하였다 (Sondergaard et al., Transgenic Res, 2012). 평가 결과, 유의적인 기억력 감퇴 등이 나타나지 않았음을 보고하였다. 최근 이 복제돼지를 활용하여 지속적으로 뇌척수액의 면역학적 증상 등을 분석하고는 있으나 병리학적인 변화는 나타나지 않는다고 하였다 (Holm et al., Journal of Pathology, 2016). 이 연구에서 개발된 돼지의 돌연변이형 APP 유전자는 GLIS3 유전자의 인트론에 삽입된 것으로 알려졌는데, 2006년 프랑스 연구팀의 보고에 의하면 GLIS3 유전자의 돌연변이는 선천성 상염색체 열성 질환과 관련이 있다고 하였다 (Senee et al., Nat Genet, 2006). 따라서 해외 연구팀에 의해 개발된 돼지의 증상은 완전히 알츠하이머 환자의 그것과 연관시켜 연구하기엔 불완전하다. 하지만 본 연구 과제 수행을 통해 생산된 APP 과발현 복제돼지는 행동학적 측면에서 알츠하이머 환자에서 나타나는 행동 양상과 유사한 인지기능 이상 등의 측면이 관찰되며 생존 수명이 길어서 질병의 메카니즘 분석이 용이하다는 장점을 지닌다. 또한 행동학적인 표현형 외에도 뇌 영상 분석시 사람 알츠하이머 환자와 유사한 뇌의 대사 활성 정도를 나타남을 확인하였다. 그러므로 본 연구 과제의 수행을 통해 개발된 돼지는 사람의 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머 모델로서의 가치가 충분하고 이는 국내에서 개발된 이 형질전환 복제돼지 생산 및 표현형 분석 기술의 우수성을 알 수 있다.
11. Parkinson disease를 동물모델에서 재현하기 위해 주로 마우스 및 설치류 모델에서 hSNCA를 과발현하여 생산하였다. 사람에서는 사후 조직에서 SNCA의 전사체가 뇌의 cortex, substantia nigra와 소뇌에서 부위-특이적으로 발현이 됨을 확인하였고 마우스 모델에서도 파킨슨 모델과 유사성을 발표하고 있다 (McLean et al., Molecular and Cellular Neuroscience, 2012). 복제 기술 및 최근 개발된 유전자 재조합 기술을 이용하여 Parkinson disease를 재현하는 미니 돼지를 생산하고자 하는 시도 또한 해외 연구진에

의해 보고되고 있다. 2014년 중국에서는 TALEN으로 DJ-1유전자를 녹아웃 시킨 복제돼지를 생산 보고 하였으나 생산된 직후에 모두 사망하여 이들의 임상 증상 등에 대해서는 보고된 바 없다 (Yao et al., Sci Rep, 2014). 또한 2015년 중국에서는 CRISPR/Cas9을 이용하여 PARK2, PARK1을 동시에 녹아웃시킨 복제 돼지를 생산 보고 하였으나 7개월령에서 분석한 복제돼지에서 유사증상이 나타나지 않았다 (Zhou et al., Cell Mol Life Sci, 2015). 하지만 본 연구과제에서는 녹아웃 기술 외에도 과발현 기술을 통한 파킨슨 모델 돼지를 생산 시도 하였다. 체세포 복제 기술을 통해 생산된 hSNCA 과발현 복제 미니돼지는 2년령에 정상 미니돼지와 비교하여 <sup>18</sup>F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견에서 양측 putamen 섭취감소가 관찰되고 행동 및 운동양상이 파킨슨 질환의 증상과 유사한 소견을 보였다. 이를 통해 hSNCA 과발현 복제 미니돼지의 퇴행성 질환모델로서의 가치를 추정할 수 있다.

12. 알츠하이머 질환의 또다른 원인 유전자에 해당되는 PS1을 과발현하는 미니돼지 또한 덴마크의 연구진에 의해 2013년 개발되어 보고되었다. Gottingen 미니돼지의 세포에 돌연변이형 PS1유전자를 과발현 시켜서 복제 미니돼지를 생산하였다 (Jakobsen et al., 2013, Transgenic Res). 이 미니돼지에 대해서도 3년 이상의 기간에 걸쳐 뇌에서 면역염색 등을 통해 지속적으로 분석을 실시하고 있으나 알츠하이머 환자와 유사한 증상은 나타나지 않는다고 한다 (Holm et al., Journal of Pathology, 2016). 따라서 덴마크 연구진은 현재 뇌에서 아밀로이드의 축적과 침착을 가속화시킬 수 있도록 APP와 PSEN을 동시에 발현하는 미니돼지를 생산하였고 이 돼지의 표현형을 현재 분석하고 있다. 본 연구과제에서는 돌연변이형 APP 유전자를 과발현 시킨 복제돼지를 안정적으로 생산하였고 이 복제돼지의 번식 및 1-2세령에서의 영상 분석을 통해 알츠하이머 모델로의 적정성을 확인하였다. 또한 APP-PS1를 동시에 과발현하는 복제돼지를 생산하였으며 APP 과발현 복제돼지의 행동 양상을 토대로 APP유전자와 PS1 유전자를 동시에 과발현하는 복제돼지 또한 알츠하이머 질환과 같은 임상증상 및 표현형을 나타낼 것이며 한 개 유전자를 지닌 개체보다 더 중증의 증상을 나타낼 것으로 기대할 수 있다. 이러한 연구결과는 국내외에서 보고된 바 없으며 APP유전자와 PS1 유전자를 동시에 과발현하는 복제돼지의 지속적인 다양한 측면의 분석을 통해 알츠하이머 모델 돼지 생산 및 분석기술의 과학적 기술력을 독보적으로 인정받을 수 있을 것이다.

## 제 4 절. 유전자교정을 이용한 유전자 적중 연구

지금까지 비설치류 형질전환 모델은 비효율성과 기술적 한계로 인해 응용에 큰 제약이 있었다. 하지만 근래 유전자의 부위를 인식하여 자를 수 있는 유전자가위 기술의 개발에 의해 형질전환 모델 연구에 새로운 장이 개척되었다. 특히 지난 10여년에 걸쳐 Zinc finger nucleases (ZFN), TAL effector nucleases (TALEN) 및 CRISPR/Cas9 등의 유전자가위 플랫폼이 지속적으로 진화하면서 연구자들은 원하는 유전자의 특정 서열을 정확하고 효율적으로 자르는 도구를 가지게 되었다. 이러한 새로운 기술을 이용하여 다양한 종에서 세포 수준의 연구뿐만 아니라, 한 단계 나아가 제브라피쉬와 rat

에의 적용되고 있으며 다양한 대동물 및 야생 동물에도 적용되고 있다.

1. ZFN 기술을 이용하여 사람의 세포에서 원하는 부위에 외부 유전자를 삽입시키는 것을 비교적 높은 효율로 성공하여, 세포 공학 기술로의 적용 가능성뿐만 아니라 사람의 유전적 질병 치료를 위해 ZFN을 이용한 유전자 치료제의 개발 가능성을 확인하였다 (Moehle 등, PNAS, 2007).
2. ZFN을 이용하여 HIV의 감염 시 인식되는 CCR5를 제거함으로써 HIV의 감염에 저항할 수 있는 사람의 CD4+ T 세포를 확립하여 보고하였다. 또한 이러한 CD4+ T 세포를 HIV에 감염되어 있는 mice에 이식하였을 경우 면역체계가 회복되는 것을 확인하여, ZFN을 이용하여 환자유래의 CCR5가 형질 전환 된 T세포를 확립하여 환자에 적용하는 새로운 치료 기술로서 이용할 수 있음을 확인하였다 (Perez 등, Nat biotech., 2008).
3. ZFN을 이용하여 제브라피쉬에서 체세포뿐만 아니라 생식세포 유전자의 형질전환을 유도할 수 있음을 확인하였다. 수정 후 1cell 단계의 배아에 제브리피쉬 유전자를 인식하도록 합성된 ZFN mRNA를 도입하여 20%의 효율로 형질전환 된 개체를 생산하였으며, ZFN mRNA의 수정란 도입을 통해 다양한 제브라피쉬의 유전자를 조절 가능함을 확인하였다 (Doyon Y 등, Nat biotech, 2008).
4. mice에 비해 rat은 형질전환을 통한 다양한 모델동물 확립 및 연구에 제약이 컸으나 rat의 유전자를 인식하여 잘라내는 ZFN을 확립한 후 전핵내 미세주입법 또는 intracytoplasmic injection을 통해 배아에 주입하여 원하는 유전자가 제거된 rat을 성공적으로 생산하여 보고하였다 이 연구를 통해 빠른 시간 내에 원하는 유전자가 제거되고 후대까지 전달되는 rat model을 확립가능하며 새로운 사람의 질병 모델동물로서 이용 가능함을 확인하였다 (Geurts 등, Science, 2009).
5. 원하는 유전자 부위를 효율적으로 인식 및 제거하기 위해 ZFN을 합성하는 새로운 방법을 확립하여 보고하였다. 확립된 ZFN은 높은 효율로 원하는 부위의 유전자 부위의 재조합이 일어나도록 하였으며, 이를 이용하여 식물뿐 아니라 사람의 유전자를 조절함으로써 유전자 치료 및 의생명공학 분야에 응용 가능함을 확인하였다 (Lee 등, Genome res., 2010).
6. 녹색 형광을 발현하는 돼지 체세포에서 ZFN을 이용하여 녹색 형광을 발현하도록 하는 유전자를 제거하고, 이 세포를 이용하여 체세포 핵이식을 실시하여 복제 돼지 생산에 성공하여 보고하였다. 이는 ZFN을 가축에 적용하여 성공적으로 산자를 생산한 최초의 보고이며 이를 통해 ZFN을 이용하여 대동물에서 체내에 가지고 있는 유전자를 조절한 동물을 생산할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 이는 농축산업 뿐만 아니라 의생명공학 분야에 이용 가치가 크다 (Whyte JJ 등, Mol Rerod Dev., 2011).
7. ZFN에 비해 높은 특이성과 절단 효율을 갖는 TALEN이 개발되었으며 이를 통해 좀더 정교하고 손쉬운 유전자교정기술이 사용되기 시작함. 이후 세균의 면역체계인 CRISPR/Cas 시스템을 바탕으로한 CRISPR/Cas9 유전자가위가 발명되었으며 높은 효율과 함께 매우 쉽게 만들 수 있는 장점을 바탕으로 유전자교정의 보편화가 이루어짐 (Kim 등, Nature Reviews in Genetics, 2014)
8. 전통적인 녹아웃 기법인 gene targeting을 이용하여 생산되어온 뇌질환 모델 동물은 대부분 mouse로 화학물질을 이용하여 만들어지는 모델에 비해 형질의 안정성이 기대되었으나

실제로는 예상하였던 퇴행성뇌질환의 병리적 특성을 잘 재현하여 오지 못하였다 (Dawson 등, Neuron, 2012). 대부분의 경우 경미한 증상만을 보이거나 일부의 증상만 보였으며 전혀 관련 증상이 나타나지 않는 경우도 있었다.

9. 나 유전자교정기술을 이용하여 유전자 녹아웃을 통한 유전성 질병모델 동물을 만드는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 기존 연구에 널리 사용되고 있는 쥐 모델이 퇴행성 뇌질환에 대해 정확한 병리 형태를 보이지 못하여 다른 설치류 및 대동물에서의 모델 개발에 대한 관심이 높다. 특히 기존 쥐 모델과 달리 Rat 모델의 경우 PD 관련 유전자 녹아웃 시 PD에 관련한 주요 병리현상 중 일부를 기존 쥐 모델에 비해 잘 보여줘 PD 모델로의 가능성을 보였다 (Dave 등, Neurobiol. Dis., 2014). 유전자 녹아웃 Rat의 퇴행성 뇌질환 모델로의 유용성은 비침습적 영상연구 및 행동연구를 통해 추가적인 검증이 필요하다.
10. 나. 또한 대동물에서의 유전자교정 기술 적용이 확대됨에 따라 퇴행성 뇌질환 연구를 위한 유전자교정 대동물을 개발하는 연구가 세계적으로 다수의 연구진에서 진행되고 있는 것으로 보인다. 특히 2014년부터 시작하여 중국의 연구진들이 활발히 관련 연구를 진행하고 있으며 TALEN 및 CRISPR 기술을 바탕으로 파킨슨질병과 유전적 관련성이 잘 밝혀져 있는 PARK2, PINK2, DJ-1 유전자에 대한 녹아웃 돼지 개발이 발표되어 오고 있다 (Zhou 등, Cell. Mol. Life Sci., 2015/Wang 등, Scientific Reports, 2016/Yao 등, Scientific Reports, 2014). 하지만 대부분의 연구가 유전자 녹아웃 돼지 생산 자체에 대한 연구로 질병모델로의 가치를 보여주고 있지 못하다.

## 제 5 절. 퇴행성 뇌질환 모델 돼지의 시장 현황

1. 세계적으로 인구 고령화가 빠르게 진행되면서 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌종양 등의 퇴행성 신경질환 환자가 급속히 증가하고 있다. 국내의 경우 2013년 65세 이상 인구가 전체의 12.2%를 차지해 이미 고령화 국가에 진행하였으며, 2030년에는 초고령 국가가 될 것으로 예상하고 있다. 2005년부터 2010년까지 건강보험 진료비 지급자료를 분석한 결과, 치매로 인한 진료 이용은 312.4% 파킨슨병은 189.2% 증가하였으며 진료비 또한 상승하였다.
2. 퇴행성 신경질환 치료제의 세계 시장 규모는 2012년 88억 달러에서 2018년 110억 달러 이상(연평균 5.9%의 성장)의 성장이 예상되며 근본적인 치료제가 없는 상황으로 우수한 효능에 대한 치료제 수요가 많아 잠재시장은 매우 클 것으로 전망하고 있다. 알츠하이머병 치료제 세계 시장은 2011년 약 52억 달러의 규모이며 국내 시장의 치료제 매출 및 진료 전 반 비용은 2011년 1,800억원의 시장을 형성하고 있다. 파킨슨병 치료제 세계 시장은 2011년 약 24억 달러의 규모이며 국내 시장은 2011년 1,533억의 시장을 형성하고 있다. (2020 세계 의약품 및 의료기기 시장 전망, 우리투자증권, 2014년)
3. 비임상, 임상 연구개발의 확대와 함께 기초, 원천 연구의 확대를 통해 약물개발을 위한 작용기전 연구에 많은 투자가 필요하며, 근본적인 치료제가 없는 상황에서 작용기전 연구와 바이오마커를 활용한 진단 기법의 개발에 퇴행성 질환 모델 돼지의 활용이 기대 된다. (퇴행성 뇌질환 치료제의 개발동향, KISTI, 2013년)

# 제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계, 추진일정

### 1. 추진 전략 · 방법

#### 가. 퇴행성 뇌신경 질환 모델 개발을 위한 컨소시엄 구성

특정 유전자를 제거 혹은 과발현시킨 형질전환 세포주를 이용한 SCNT 기법은 질환 모델 복제동물을 생산하는 보편적인 방식으로 인정받고 있다. 이를 위해서는 1) 신경질환 관련 병인 유전자가 형질전환 된 세포주 확립기술, 2) SCNT 기법을 통한 복제동물 생산기술, 3) 복제동물의 검증기술, 4) 기 생산/검증된 질환모델동물의 활용을 위한 연구용 실험동물 자원 인프라 구축 기술 등이 필요하다.

이 모든 기술을 동일 연구팀에서 보유하기는 현실적으로 어렵기 때문에 이를 보유하고 있는 다양한 연구팀의 참여 및 컨소시엄의 구성이 퇴행성 신경질환 모델 개발 연구의 성공을 위해 필요하다.

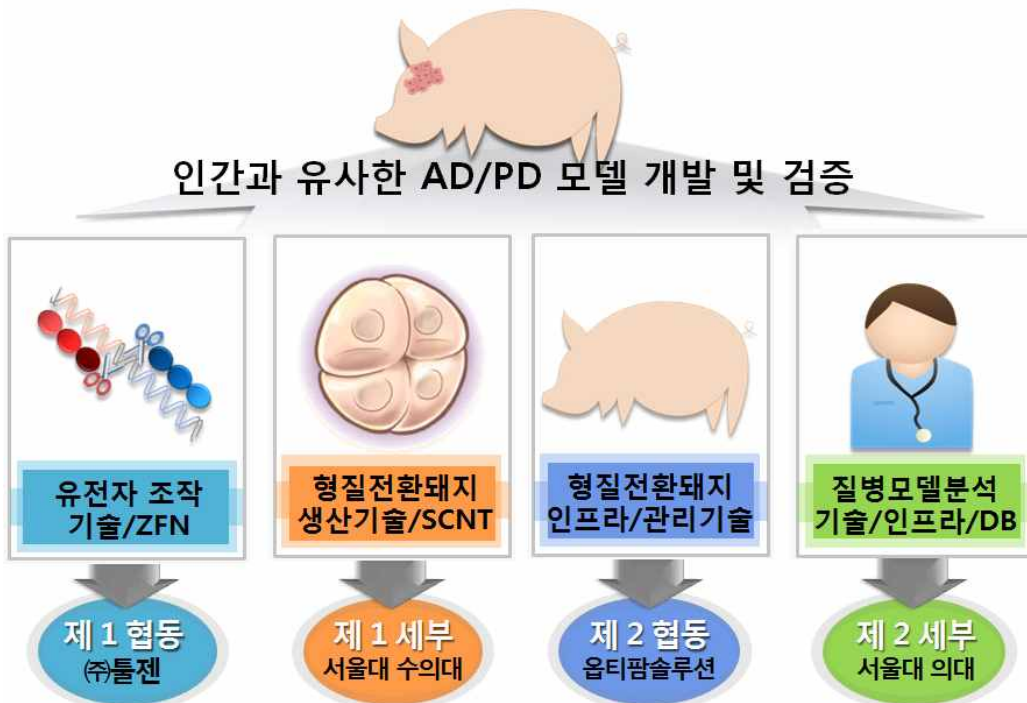


그림 3 연구과제 관계도

#### 나. AD/PD 병인론

(1) AD 병인론



(가) AD는 진행성 퇴행성 뇌신경계 질환으로 주요한 병리학적 특징으로는, 해마와 대뇌 피질 신경세포의 외부에는 아밀로이드 베타 단백질 (amyloid  $\beta$  protein, A $\beta$ )로 구성된 노인성 반점 (senile plaque, SP)이, 내부에는 과인산화된 타우 단백질 (hyperphosphorylated Tau protein)로 구성된 신경섬유 덩어리 (neurofibrillary tangle, NFT)의 두 가지 불용성 단백질이 축적되며, neuron의 loss를 보인다.

(나) 아밀로이드 전구 단백질 (amyloid precursor protein, APP)은  $\alpha$ -secretase에 의해 A $\beta$ 의 중앙부분이 절단되어 non-amyloidogenic fragment를 형성하는 것이 정상적인 분해 과정이지만,  $\beta$ -secretase에 의해 가수분해 되고, 뒤이어  $\gamma$ -secretase가 A $\beta$ 의 C-말단을 절단하게 되면 불용성 A $\beta$ 가 생성되고, plaque를 형성한다. 따라서 돌연변이형의 APP와  $\gamma$ -secretase와 비슷한 기능을 수행하는 돌연변이형의 PS1과 PS2는 많은 양의 A $\beta$  생성을 유도하게 되고 결과적으로 신경세포 외부에 노인성 반점을 생성하여 AD의 주된 신경 병리학적 특징을 나타낸다.

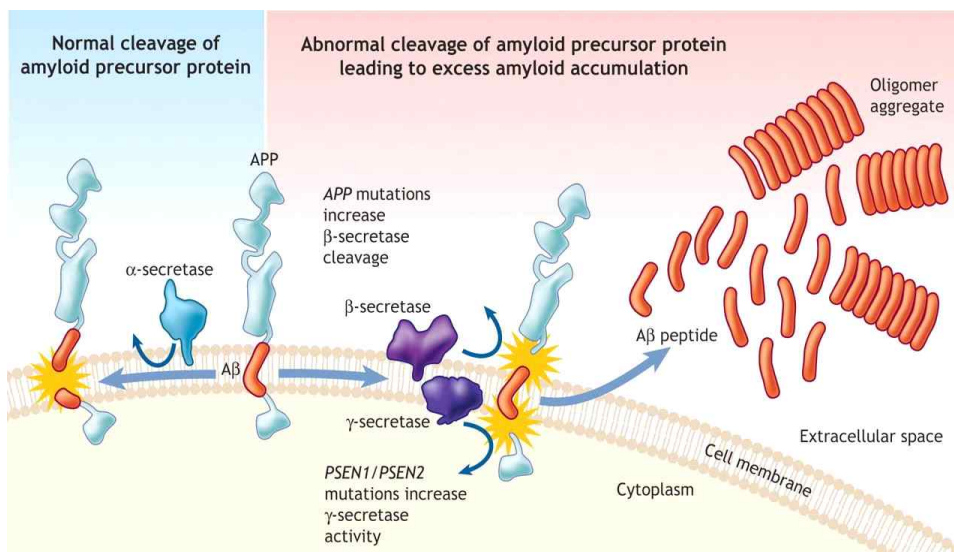


그림 4 AD의 병인론인 A $\beta$ 설을 설명해주는 모식도

(다) NFT의 주요 구성성분인 tau 단백질은 미세관 결합 단백질 (microtubule associated protein) 중 하나로 그 기능이 정확하게 알려져 있지는 않지만 axonal transport에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 과거에는 NFT가 이차적으로 발생하는 것으로 추정하였으나 Tau 유전자 돌연변이가 전두측두엽 치매를 유발시키는 것이 확인되면서 tauopathy라는 관점에서 새롭게 연구되고 있다.

(라) 인산화과정이 Tau 단백질의 분해와 중합과정을 조절하는 기전으로 알려져 있으나, Tau 단백질이 과인산화 되면, 과인산화 된 Tau 단백질과 미세관의 결합에 변화가 초래되고 미세관의 안정성이 떨어지며 세포골격의 붕괴로 신경세포가 타격을 입게 되고 결과적으로 AD 질환을 나타내게 된다.

(마) Age-related myelin breakdown이 AD 원인의 하나로 주목받고 있다.

Demyelination은 axon에서 신호전달을 중단시키고, 이러한 자극이 없어진 신경세포의 손실을 일으키게 된다. 또한 myelin이 붕괴되면서 방출되는 iron이 또 다른 손상의 원인으로 작용하게 되며 손상된 myelin을 복구하기 위한 과정 중에서 A $\beta$ 나 Tau 같은 단백질들이 더욱 축적되게 된다.

(바) 전체 AD 환자 중 가족력을 동반한 조기 발병 AD 환자는 약 5 %에 불과지만, 이들의 연구를 통해 AD의 병인을 밝혀내는데 중요한 정보를 얻고 있다. APP 유전자 및 PS1, PS2의 돌연변이가 AD 발병과의 연관성이 높음이 보고되어, 이들을 이용하여 AD의 정확한 병인 기전을 밝혀내기 위한 연구들이 진행되고 있다.

## (2) PD 병인론

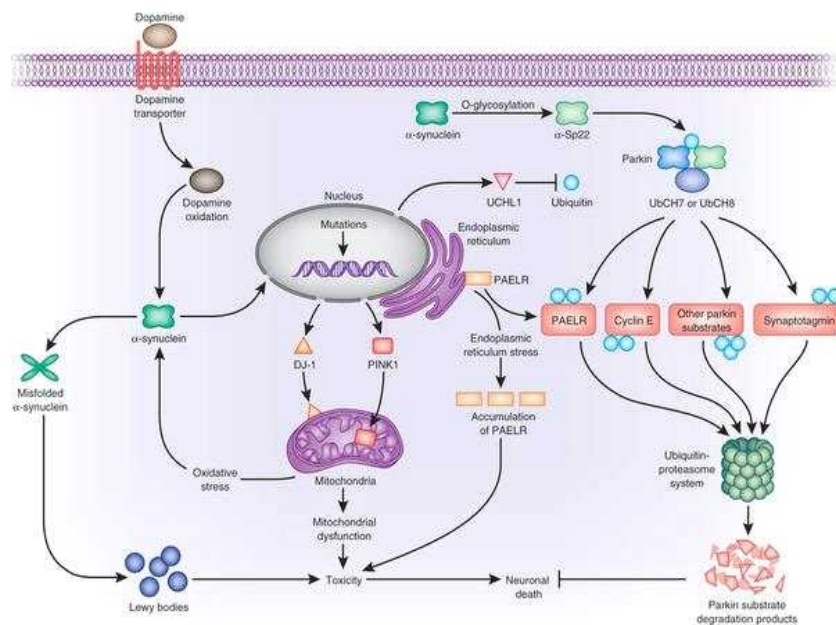


그림 5 PD 병인론의 모식도

(가) PD는 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민 신경세포가 선택적으로 파괴되어 발생하는 질환이며, 떨림, 경직, 서동 (운동느림) 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타난다.

(나) alpha-synuclein (SNCA), ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1), Parkin (PRKN), leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2 or dardarin), PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), DJ1 and ATP13A2 등의 유전자에 돌연변이가 생긴 대부분의 경우에서 PD 증상이 발견된다고 알려졌으나, PD에서 나타나는 선택적 세포 파괴의 발병기전 및 원인은 아직 밝혀져 있지 않으며, 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용을 일으킨다는 ‘다인성 가설’이 가장 보편적으로 받아들여지고 있다.

(다) 대부분의 PD 환자들은 가족력 없이 발병하지만, 약 10% 정도에서는 가족성 PD가 나타나고 있다. 가장 먼저 확인된 유전성 파킨슨 질환은 상염색체 alpha-synuclein (SNCA) 유전자 결손에 의하여 일어나며 우성으로 발생된다. hSNCA는 PD환자 중 뇌

흑질의 도파민 뉴런의 세포질 내에 침착되는 Lewy body의 주된 구성성분이다.

(라) Young onset juvenile PD를 일으키는 familial genetic PD로 잘 알려진 대표적인 gene들은 PARK2 (Parkin), PARK6 (PTEN-induced kinase 1; PINK1), 및 PARK7 (DJ1)이다. 이들 유전자 결함에 의한 familial PD의 경우 증상 발현은 10대에서 20대 부터 발현되며 모두 상염색체 열성유전에 의하여 발생하는 early onset juvenile PD 질환들이나 아직까지 이러한 유전자에 의한 PD 발생의 정확한 기전 및 상호 작용에 대해 알려진 바가 없다.

(마) PINK1과 Parkin 및 DJ1은 mitochondria의 기능과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 이들 유전자 돌연변이로 인해 cellular dysfunction을 일으키고 신경세포의 파괴가 일어나 PD가 발병하는 것으로 알려져 있다. Parkin은 특정 neural protein의 분해를 촉진시키고, Lewy body를 구성하고 있는 alpha-synuclein을 선택적으로 nitration 시키는 것이 관찰되어 PD의 주요 원인 유전자로 알려져 있다.

(바) PD 원인 유전자의 기능 및 상호 연관성에 대한 연구를 바탕으로 PD 발병 기전을 밝힐 수 있을 것이다. 이를 바탕으로 PD의 예방·진단·치료법을 개발 할 수 있을 것이며, 이를 위해 다양한 연구가 진행되고 있으나, 현재까지 적절한 모델 시스템이 확립 되어 있지 않다.

#### 다. 본 과제 수행을 위한 연구팀의 전략 및 방법

※ 연구과제 신청시 유전자 조절은 ZFN을 활용할 예정이었으나 이후 효율이 높은 ZTALE effector nucleases (TALEN) 및 CRISPR/Cas9 등 유전자 편집 기술이 개발되어 최선의 방법을 활용하여 연구를 수행하였음.

##### (1) 퇴행성 뇌신경질환 복제 미니돼지 생산을 위한 SCNT 연구팀의 전략

(가) SCNT 기법의 최적화; SCNT 기법은 형질전환 미니돼지 생산을 위한 최적의 기술이나 사업화 및 광범위한 활용을 위해서는 생산효율의 증진이 필요하다. 따라서 본 연구팀은 양질의 체외성숙 난자 생산 기법 및 체외수정 또는 단위발생란 등을 이용한 미니돼지 수정란에서 얻은 다양한 기초 데이터를 기반으로 SCNT 기법의 주요 요소들을 최적화하여 효율성을 향상시킬 것이다.

(나) SCNT 기법과 형질전환 기술의 융합을 통한 AD/PD 모델 미니돼지 생산; 연구팀의 복제동물 및 형질전환 생산 기술을 토대로, AD/PD 병인 유전자들이 각각 발현 또는 제거된 형질전환 복제 미니돼지를 생산할 것이다. 특히 제 3세부 연구팀에서 선정/개발된 ZFN 및 최근 유전자편집 기법에 타겟 유전자의 변이를 유발시킨 공여세포와 제 1세부 연구팀에서 바이러스를 매개로 병인 유전자를 과발현시킨 공여세포를 이용하여 형질전환 복제 미니돼지를 생산하고, 이에 대한 결과를 다시 공동 연구팀을 통해 분석하는 상호 연계 연구를 통해 최적의 유전자 시스템을 찾아갈 예정이다.

##### (2) 형질전환 복제 미니돼지의 분석 및 검증 시스템 확립을 위한 연구팀의 전략

(가) 퇴행성 뇌신경질환 모델 복제 미니돼지에 적합한 비침습적 모니터링 시스템 확립; 제 4

세부의 신경 독성물질 투여를 통한 PD모델 미니돼지를 이용하여 향후 생산될 형질전환 미니돼지의 행동학적/영상학적 모니터링을 위한 시스템을 확립할 것이다. 또한 미니돼지에서 병변 유발부위를 미리 확인하여 독성물질로 유발된 질환모델과 유전적 변이에 의해 생산된 형질전환 미니돼지 간의 차이점 분석을 통해, 퇴행성 뇌신경 질환 모델 생산에 가장 적합한 유전자 또는 방법에 관한 결과를 공동 연구팀과의 상호 연계 연구를 통해 찾아갈 예정이다.

(나) AD/PD 형질전환 미니돼지의 확립 및 검증; AD/PD는 퇴행성 뇌신경질환으로 뇌질환의 유발까지는 일정 기간이 소요될 것으로 생각된다. 유전자 조절된 미니돼지의 질병발현까지의 기간을 정확히 예측하기는 어려우나 2-3년차에 생산된 미니돼지의 경우 5년차에서는 유발이 가능할 것으로 생각되며, 미니돼지에서 유래한 만능줄기세포 및 지방유래 줄기세포로 신경분화를 실시하고 체외에서 검증할 수 있는 시스템을 확립하여 모델로서의 적합성 여부를 평가하고자 하며 이를 바탕으로 산업화 가능성을 검증한다. 또한 유전자 조절에 의해 모델 가능성이 확인된 미니돼지의 경우 외적 환경적 요소의 조절 (AD/PD 모델의 조기 유발은 vitamin B6/B9(folate)/B12 등이 결핍된 nutrition depleted food를 급여하거나, 사육장을 chamber로 만들어 chronic hypoxic condition을 유발시키는 방법 등 활용)에 의해 뇌질환이 조기에 유발되는 방안을 모색하여 인간에서의 환경적/유전적 요인에 의한 AD/PD의 발병 기전을 밝히고자 한다.

(3) 질병 모델 제작용 세포주 생산을 위한 ZFN 합성 및 형질전환 복제돼지의 검증을 위한 연구팀의 전략

(가) AD/PD 병인 유전자 조절위한 벡터 제작; AD 모델 미니돼지 생산위해 hAPP 유전자 조절 벡터를, 그리고 PD 모델 미니돼지 생산을 위해 Parkin, PINK1, DJ1, ATP13A2 유전자 적중 벡터를 제작한다. PD 모델 미니돼지 생산의 경우 만들어진 PD 유전자 적중 ZFN중 가장 효율이 좋은 ZFN을 선택하여 PD 모델 미니돼지 생산을 위한 공여 체세포 제작에 이용한다. ZFN 기술은 현재까지 다양한 배양 세포와 모델동물 (C.elegans, D.melanogaster, Zebrafish, Mouse and Rat)들에서 효율적인 유전자 KO을 위해 성공적으로 사용되었다. 하지만 미니돼지와 같은 큰 동물에서의 활용은 아직 발표되어 있지 않다. 제 3 세부 연구팀은 지난 수년간 독자적으로 ZFN기술을 개발하고 이를 다양한 배양세포 system에서 효율적으로 사용하는 기술을 개발하여 왔다. 이를 제 1 세부 연구팀의 SCNT 기술과 접목하면 빠르고 효율적으로 유전자 KO 동물을 생산할 수 있는 기술을 확립하여 PD 모델을 생산할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

(나) 형질전환 복제 미니돼지의 유전자 프로파일링 및 비교 분석; 신경 독성물질의 투여에 의해서 또는 유전자 조절 기법에 의해서 확립된 모델 동물과 대조군 동물과의 비교를 통해 표현형의 변화에 영향을 미친 요인들을 찾아낼 수 있다. 따라서 두 그룹간의 유전자 발현 양상의 비교를 통해 질환을 일으킨 원인 유전자 및 질환의 진행과정에 연관된 유전자를 밝혀낼 수 있을 것이다. 이러한 기법을 바탕으로 본 연구 과제를 통해 확립할 모델 미니돼지를 이용하여 유전자 프로파일링을 수행하여 확립된 모델

미니돼지의 인간 질병과의 유사성 여부를 검증하고, 또한 질병 발병 원인 메커니즘을 밝히고자 한다.

(4) 신경독성 모델 미니돼지 생산과 사육 및 관리기법 확립을 위한 연구팀의 전략

(가) 신경독성 모델 미니돼지 생산을 통한 조직 병리학적 평가 기준 마련; 신경독성 모델 미니돼지 생산을 위하여, 우선 PD와 유사한 병변을 일으킨다고 알려진 신경독성물질을 이용하여 PD 모델 미니돼지 개발의 기반을 마련할 것이다. 신경독성물질 투여를 통해 만든 PD 모델 미니돼지를 이용하여 조직병리학적인 검사 및 유전자 변화를 프로파일링 하여 인간의 PD와의 유사성 여부 판단 및 질병의 발병기전을 연구를 위한 시스템을 확립할 것이다.

(나) 퇴행성 뇌신경질환모델 복제 미니돼지 확립을 통한 실험동물 자원 인프라 구축; 뇌신경질환모델 복제 미니돼지의 생산 및 관리 시스템 확립을 위하여 양돈 및 미니돼지의 사양관리에 풍부한 지식이 있는 기업, 수의사, 실험동물 시설 및 일선 양돈농장 등 (TS무지개사료, 특수생물자원연구센터, 옵티팜솔루션 메디피그 등) 다양한 인력 풀과의 꾸준한 교류를 해오고 있으며, 연구 협력 및 기술 자문을 통한 실험동물 자원인프라를 구축할 계획이다.

(5) 축산 농가와 연계를 통한 질환 모델 돼지 생산 관련 기술의 사업화

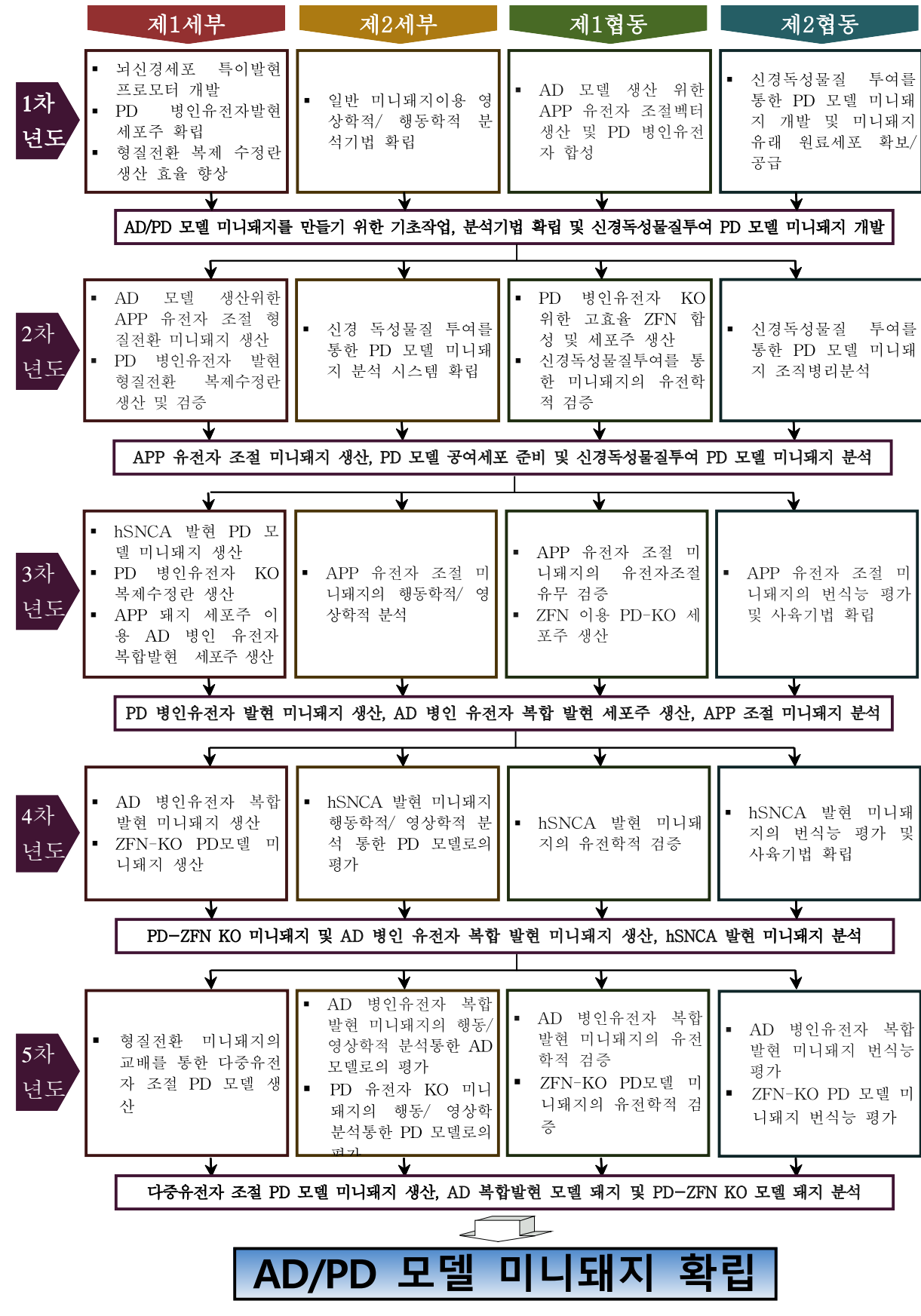
(가) 연구수행 중: 복제 돼지 모델 생산을 위한 대리모 공급 및 대리모의 사육을 위한 축산 농가의 참여는 우선 알앤에프영농법인을 대상으로 시작하여 일반축산 농가로 확대할 계획이다.

(나) 연구종료 시: 의학 및 생물학 실험 위한 원료 돼지 공급은 참여기업이 주축이 되어 일반축산 농가를 포함한 생산 시스템을 구축할 예정이다.

(다) 뇌질환 모델 돼지의 사양을 위한 사양 시설의 기준 확립 및 기존 축산 농가에의 적용을 통하여, 질환 모델 돼지의 일반축산농가와 연계된 대량 생산을 구축하여 기존의 축산업 식품 소재로서만의 제한된 이미지를 벗어나 새로운 바이오 리소스로서의 인식 개선 및 소득향상을 도모할 예정이다.

(6) 자문회의; 과제 수행시 외부전문가, 농식품부 및 IPET 담당자가 참여하는 연구협의회(발표회)를 구성하여 추진할 계획이다.

다. 추진 체계



## 제 2 절 연구개발 방법 및 연구결과

### <1세부: 체세포 핵이식 기법에 의한 퇴행성 뇌신경 질환 미니돼지 생산>

#### 1. 뇌신경세포 특이발현 프로모터 개발

##### 가. AD 모델 돼지 생산을 위한 뇌신경세포 특이발현 프로모터 개발

###### (1) 연구방법

(가) 돼지의 뇌에서 신경특이적 유전자 발현을 위한 synapsin 프로모터 - GFP 벡터 제작 및 평가

① 알츠하이머병의 정확한 발병 기전과 원인에 대해서는 정확히 알려져 있지는 않으나, 베타 아밀로이드(beta-amyloid)라는 작은 단백질이 과도하게 만들어져 뇌에 침착되면서 뇌 신경세포에 유해한 영향을 주는 것이 발병의 핵심 기전으로 알려졌다. 그 외에도 뇌 세포의 골격 유지에 중요한 역할을 하는 타우 단백질(tau protein)의 과인산화, 염증반응, 산화적 손상 등도 뇌 세포 손상에 기여하여 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서 알츠하이머병 모델 돼지 생산을 위해서는 뇌신경세포 특이적으로 병인유전자가 발현되도록 조절하는 것이 필수적이다. 이를 위해 뇌신경 특이적으로 유전자 발현을 조절할 수 있다고 알려진 synapsin(SYN) promoter 프로모터를 이용하고자 한다. 먼저 SYN 프로모터의 조절 하에 RFP 유전자가 뇌신경세포에서만 발현되도록 작성한다.



그림 6 뇌신경세포 특이적 synapsin promoter-reporter 벡터

① SYN 프로모터 하에서 유전자 발현이 조절되는 체계는 Lentivirus를 사용하고, 또한 WPRE (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) 서열을 도입하여 mRNA 합성의 효율성을 증가시키고 이에 따라 단백질합성의 향상을 유도한다. 따라서 돼지의 뇌신경특이적으로 발현하는 프로모터의 검증을 위한 벡터는 synapsin 프로모터, eGFP 정보 제공 유전자, PGK (phosphoglycerate kinase) 촉진자를 Lentiviral plasmid에 결합시킨 것이다. 생산된 virus를 미니돼지 지방줄기세포에 감염시킨 후 신경세포 특이적 발현 양상을 검증한다.

###### (2) 연구결과

(가) 돼지의 뇌에서 신경특이적 유전자 발현을 위한 synapsin 프로모터 - RFP 벡터 제작 및 평가

① human synapsin promoter를 이용하여 돼지의 뇌신경세포 특이적으로 유전자가 발현하는 벡터를 렌티바이러스 벡터를 구축하였다. 미니돼지의 지방줄기세포를 구축된 바이러스 벡터를 이용하여 감염시켜, puromycin 1.5 µg/ml가 첨가된 배지를 이용하여 4일 동안 선별하였다. 선별을 마친 세포의 일부는 신경원성세포로 분화를 유도하기 위하여 신경세포분화배지에서 배양하였고 나머지는 동결보관하였다. 선별된 세포를 자외선 하에서 관찰하였을 때 여전히 RFP가 관찰되지 않았으나, 신경세포로 분화된 세포에서는 RFP가 관찰되기 시작하였다. 신경분화 14일째 세포에서 아래 그림과 같이 RFP발현되는 것을 통해, 본 연구에서 AD 모델 생산을 위해 선정된 synapsin 프로모터는 돼지에서 뇌신경세포 특이적으로 유전자의 발현을 조절할 수 있는 능력이 있음이 검증되었다. 따라서 앞으로 AD 모델 생산을 위한 형질전환 세포주를 생산 시 synapsin 프로모터를 이용하여 벡터를 제작하고자 한다.

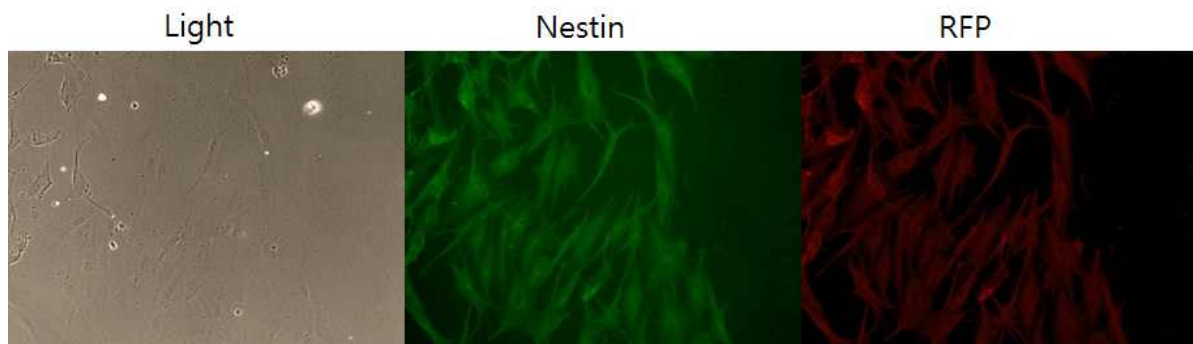


그림 7 형질전환 된 돼지 지방줄기세포를 14일 동안 신경원성으로 분화시킨 후, Nestin 항체로 신경원성으로 분화된 사진 (GFP발현)과 자외선 하에서 동일하게 신경원성 분화세포에서 RFP가 발현되는 사진.

## 나. 공여세포 준비를 위한 미니돼지 세포주 확립

### (1) 연구방법

(가) 성체섬유아세포, 태아섬유아세포 및 지방줄기세포주의 확립

① 미니돼지의 성체섬유아세포 확립을 위하여 6년령 암컷 미니돼지의 복부 조직을 채취한 후, PBS에 3번 washing 하였다. 그 후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 0.25 %(w/v) 트립신 및 1 mM EDTA가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 1시간 배양했다. 배양 후, 10 %(v/v) FBS 가 첨가된 DMEM으로 트립신을 중화후, 원심분리 후 상층액은 제거하고 조직과 세포 펠렛을 회수하



여 배양접시에 넣은 후, 10 %(v/v) FBS 가 첨가된 DMEM에서 6일 내지 8일 간 배양한다. 배양 후, 부착되지 아니한 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시까지 계속하여 배양하여 성체 섬유아세포주를 확립하였다. 확립한 세포주는 실험에 사용하기 전까지 10%DMSO 가 첨가된 FBS를 이용하여 동결하여 액체질소에 보관한다.

② 미니돼지의 지방줄기세포를 분리하기 위해 미니돼지의 서혜부에서 지방조직을 회수하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 washing하였다. 그 후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 1 mg/ml collagenase I을 처리하여 60분 간 37 °C에서 교반시켜 조직을 분해했다. 100 $\mu$ m cell strainer를 이용하여 분해된 조직을 걸러내고 원심 분리하여 세포 분획을 얻은 후, 상층액을 제거하고 세포를 회수하여 지방줄기세포 배양배지(RKCM)에 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양한다. 다음날 배양 접시에 부착되지 아니한 세포 또는 조직 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시까지 계속하여 배양하였다. 부착된 세포는 줄기세포임을 검증하기 위하여 줄기세포 특이적 발현 cell surface marker를 이용하여 flow cytometry로 세포의 특성을 분석하였다. 또한 체외분화 실험을 통하여 3배엽으로 분화되는 만능성 검증을 통하여 배양된 세포가 지방줄기세포주임을 검증하였다. 이렇게 확립한 세포주는 실험에 사용하기 전까지 10% DMSO 가 첨가된 FBS를 이용하여 동결하여 액체질소에 보관한다.

## (2) 연구결과

### (가) 미니돼지 성체조직유래의 섬유아세포주 확립

- 형질전환 복제돼지의 생산을 위하여 미니돼지유래의 다양한 세포주를 확립하였다. 현재까지 형질전환 복제돼지 생산에 가장 효율적이라고 보고되어진 태아섬유아세포를 비롯하여, 피부유래의 성체섬유아세포와 태아섬유아세포의 이용 시 발생하는 문제점 (제한적인 세포 수, 윤리적인문제)을 극복하기 위한 대안으로 돼지의 지방줄기세포주도 확립하였다. 결과는 아래 기술하였다.

① 성체섬유아세포의 확립은 6년 령의 미니돼지 암컷의 피부조직과 근육조직으로부터 각각 확립되었다. 확립된 세포는 피부유래세포는 0계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 7개로 각각 동결되었고, 근육유래세포는 0계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 3개로 각각 동결되어 세포의 이용 전까지 액체질소에서 보관하였다.

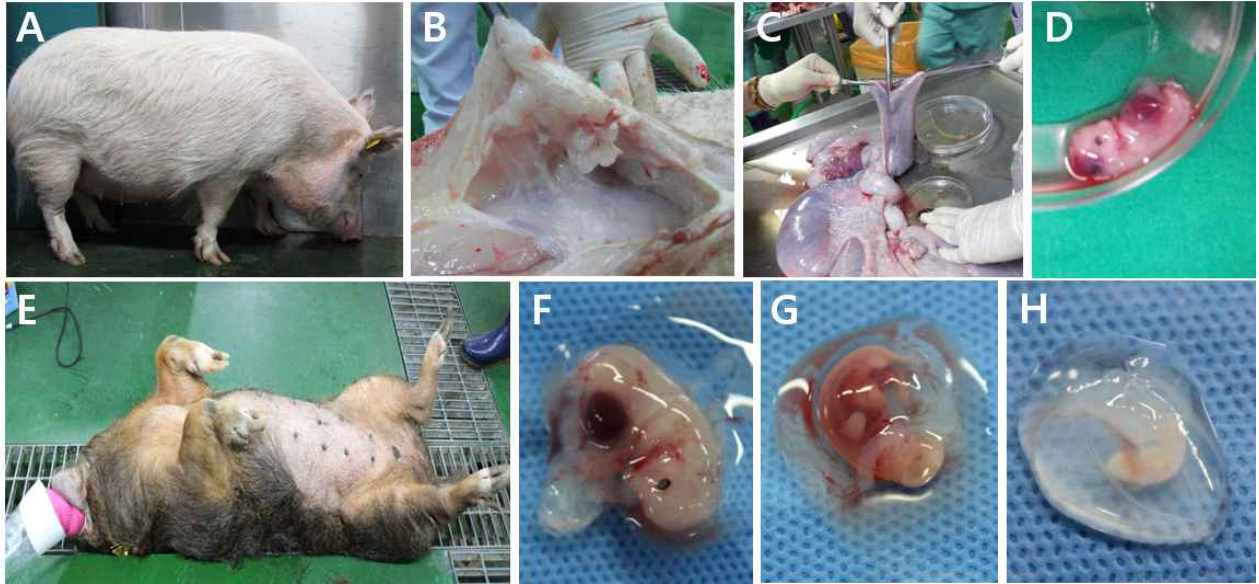


그림 8 형질전환 복제돼지 생산을 위한 공여세포주 확립을 위해 2회(A-D, E-H)에 걸쳐 암컷 미니돼지로부터 근육, 피부, 지방 및 태아유래 세포주를 확립하였다. 첫 번째 세포주 확립 시 7개의 태아유래 섬유아세포주를 확립하였으며 두 번째 세포주 확립시 9개의 태낭이 확인되었으나, 2개의 태아유래 섬유아세포주만 확립하였다.



그림 9 미니돼지유래의 태아섬유아세포(A), 성체섬유아세포 (B), 지방줄기세포 (C).

표 2 미니돼지로부터 확립하고 동결 보관한 태아, 성체조직유래 섬유아세포주

Cell Strain	Passage	Number	concentration	Note
IPET-Fetus1	0	11	1 x10 <sup>6</sup>	Male, fetal fibroblast
	1	2	1 x10 <sup>6</sup>	
	2	1	1.5 x10 <sup>6</sup>	
IPET-Fetus2	0	11	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
IPET-Fetus3	0	11	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
IPET-Fetus4	0	11	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
IPET-Fetus5	0	7	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
IPET-Fetus6	0	24	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
IPET-Fetus7	0	8	1 x10 <sup>6</sup>	Male, fetal fibroblast
	0	7	2 x10 <sup>6</sup>	
	1	3	1 x10 <sup>6</sup>	
	1	3	2 x10 <sup>6</sup>	
	1	2	1 x10 <sup>6</sup>	
IPET-Fetus8	0	8	1 x10 <sup>6</sup>	Female, fetal fibroblast
	0	5	2 x10 <sup>6</sup>	
	1	4	1 x10 <sup>6</sup>	
	1	3	2 x10 <sup>6</sup>	
Female 미니돼그	0	7	1 x10 <sup>6</sup>	Adult skin fibroblast
	1	3	2 x10 <sup>6</sup>	
	1	5	1 x10 <sup>6</sup>	
	1	10	1 x10 <sup>5</sup>	
Female 미니돼그	0	3	9 x10 <sup>5</sup>	Adult muscle fibroblast
Male 미니돼그	0	2	1 x10 <sup>6</sup>	Adult skin fibroblast
	1	2	1 x10 <sup>6</sup>	

(나) 미니돼지 지방조직유래 지방줄기세포주 확립

① 미니돼지 암컷의 서혜부와 복부의 지방으로부터 중간엽줄기세포주를 분리 배양하였다. 분리되어진 세포가 줄기세포주임을 증명하기 위하여 줄기세포의 면역표현형분석을 실시하였다. 돼지의 지방줄기세포를 2x10<sup>5</sup> cells/100  $\mu$ l 농도로 5% 우태아혈청 (Bovine Serum Albumin, BSA)이 포함된 PBS에 부유시켜 간엽줄기세포 특이적인 CD29 (1:100, BD Biosciences, San Jose, CA), CD44 (1: 100, Serotec, Oxford, UK), CD90 (1:100, Serotec) 항체로 면역염색하였다. 위의 항체는 Fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 것이었다. 또한, CD45 (1:100, BD Biosciences), CD34 (1:100, Serotec) 항체는 phycoerythrin (PE)이 결합된 것을 사용하였다. 각 항체를 부착시킨 세포를 FACS Calibur (BD Biosciences)로 분석하였다. 간엽줄기세포 특이 marker의 발현을 flow cytometry로 분석한 결과, 실험된 지방줄기세포는 CD29, CD44, CD90에 대해 양성을 보인 반면, CD45, CD34는 음성을 보였다.

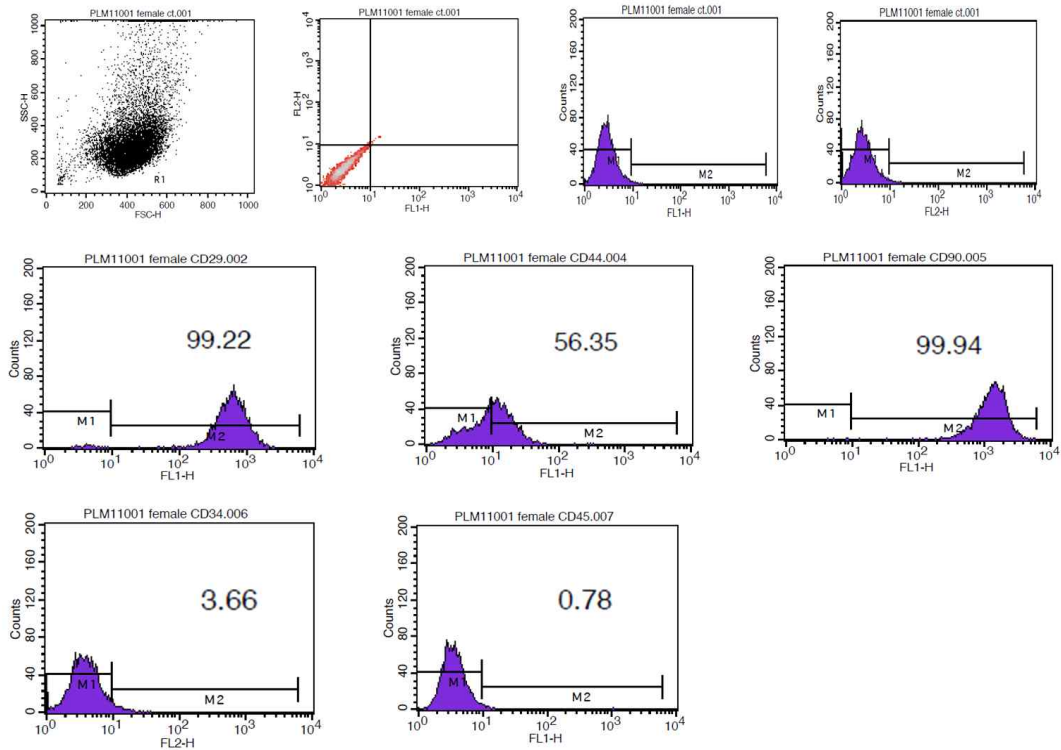


그림 10 미니돼지 지방조직으로부터 유래된 돼지지방줄기세포의 CD29, CD44, CD90, CD34와 CD45 antigen 발현 유무를 조사하기 위한 FACS 분석.

(다) 미니돼지 지방조직유래 지방줄기세포주 확립

- 지방줄기세포의 중간엽줄기세포로서의 검증을 위하여 전능성을 평가하기 위한 체외 분화 실험을 실시하였다. 모든 분화 실험은 2계대 세포에서 진행되었다.

- ① 골원성 유도(Osteogenic induction); 동결보존되어 있는 0계대의 지방줄기세포를 배양하여 2계대에 도달하였을 때에 50% confluency에서 세포배양 배지를 각자 골아세포 분화유도 배지(NH Osteodiff medium), 로 교환해주었다. 3일마다 배지의 90%를 교환해주면서 14일간 배양하였다. 분화된 세포를 70% 에탄올로 고정, Alizarin red S 로 염색한 후 washing하여 현미경하에서 관찰하였다.
- ② 지방원성 유도(Adipogenic induction); 2계대의 지방줄기세포 50% confluency에서 세포배양 배지를 지방세포 분화유도 배지(NH Adipodiff medium)로 교환해주었다. 3일마다 배지의 90%를 교환해주면서 21일간 배양하였다. 분화된 세포를 10% formalin으로 고정, Oil red O solution으로 염색한 후 washing하여 현미경하에서 관찰하였다.
- ③ 신경원성 유도; 2계대의 지방줄기세포 50% confluency에서 세포배양 배지를 신경세포 분화유도 배지로 교환해주었다. 8-10일간 배양하여 분화를 유도하였다. 분화된 세포를 4% paraformaldehyde으로 고정, human MAP2 항체와 NSC 항체, TUJ1 항체, GFAP 항체로 면역염색한 후 역상 형광 현미경하에서 관찰하였다.
- ④ 분화 유도 결과; 돼지의 지방줄기세포를 각각 지방세포, 골아세포, 신경세포로 분화

시켜 관찰한 결과는 아래 그림과 같다. 먼저 골세포로의 분화는 100%에 가깝게 이루어졌고, 지방세포로의 분화는 Oil red O로 염색된 세포질 내에 형성된 공포로 확인되었는데, 이것은 대조군에서는 염색되지 않은 것과 대조를 보였다. 신경세포로의 분화는 신경세포 marker (MAP-2, Nestin, TUJ1 항체 ; 녹색), 성상세포 (astrocyte) marker (GFAP; 빨강색)로 확인할 수 있었다.

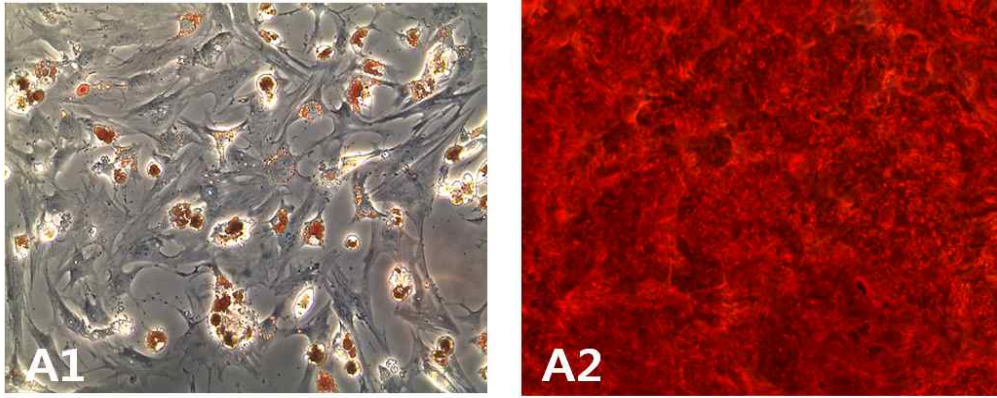


그림 11 미니돼지에서 유래한 지방줄기세포를 체외에서 지방원성, 골원성 세포로 분화 유도. (A1) 지방원성 분화 모양, 세포질 내 지방방울 축적과 세포 모양 변화, Oil red O 염색에 반응한 지방원성 분화 결과 (이상 x100), (A2) 골원성 분화 모양, 골원성 분화배지로 배양한 세포의 경우 13일 후에 모양 변화와 Alizarin red S에 반응하는 광물질 침착을 보임 (이상 x100).

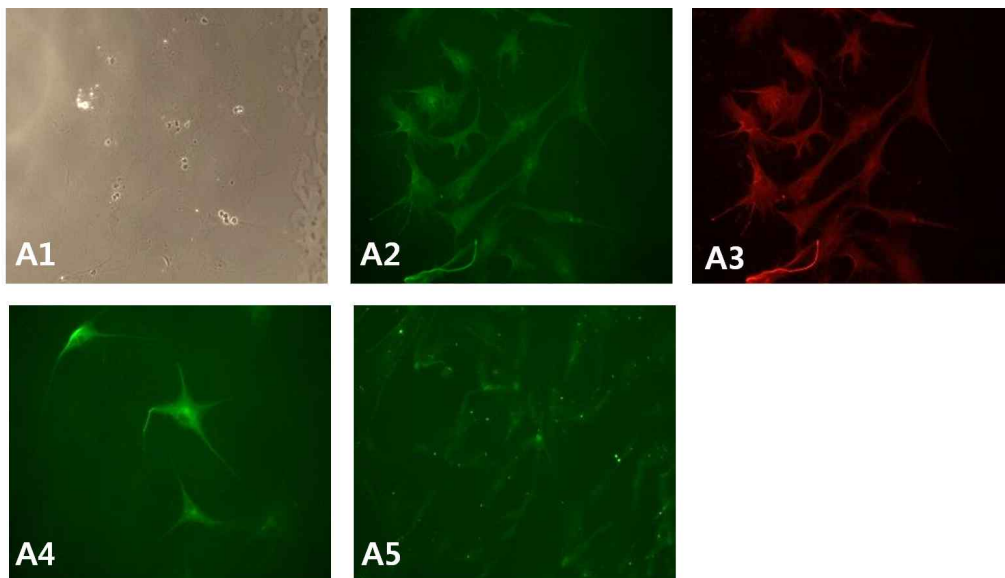


그림 12 미니돼지에서 유래한 지방줄기세포를 체외에서 신경원성 세포로 분화 유도. (A1) 신경원성 분화를 유도하지 않은 음성대조군, (A2) Nestin 면역염색, (A3) GFAP 면역염색, (A4) TUJ1 면역염색, (A5) MAP2 면역염색에 양성 결과를 보였다(이상 x400).

## 2. PD 병인유전자 발현 세포주 확립

### 가. PD 모델 돼지 생산을 위한 뇌신경세포 특이발현 프로모터 개발

#### (1) 연구방법

- ① PD 모델 동물 생산을 위해서는 뇌신경세포 특이적으로 병인 유전자가 발현되도록 조절하는 것이 필수적이며 이를 위해 기존의 설치류 PD 모델에서 신경 조직 특이적으로 유전자 발현을 조절할 수 있다고 알려진 TH, Thy1, PrP 및 PDGF $\beta$  등의 프로모터 중에서 설치류 모델에서 나타난 PD 관련 임상증상을 고려하여 가장 적합한 프로모터를 선정하였다.
- ② 파킨슨 유전자 발현 세포주 확립을 위하여, 인간의 PD 병인 유전자로 알려져 있는 human mutant alpha-Synuclein (hSNCA) 유전자를 스크리닝하고 과발현을 위한 벡터를 제작하여 제1협동으로부터 제공받는다. hSNCA는 파킨슨 병 환자에서 신경독성을 일으키는 직접적인 원인으로 보고되고 있으며 PD 환자에서 관찰되는 Lewy body의 구성 물질로 알려져 있어 이를 신경 특이적으로 과발현 시키는 세포주를 확립한다. 이를 위해 앞선 실험에서 미니돼지 신경 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터에 hSNCA를 과발현 시키는 벡터를 구축하고 렌티바이러스 감염에 의해 neuron specific promoter-hSNCA 발현 미니돼지 세포주를 확립하여, 세포주 수준에서 유전자 삽입 여부를 검증하였다.

#### HIV based Lentivirus Vector



그림 13. 뇌신경세포 특이적 PD 병인유전자 발현 벡터

- ③ 구축한 neuron specific promoter - hSNCA 벡터의 신경세포에서의 작동 여부를 검증하기 위하여 neuron cell line인 RGC 세포를 배양하고 작성한 벡터를 도입하여 hSNCA가 단백질 수준까지 발현되는 여부를 hSNCA 특이적 항체를 이용하여 확인하였다.

#### (2) 연구결과

##### (가) 신경세포 특이발현 프로모터 선정을 위한 문헌조사

- hSNCA(human  $\alpha$ -synuclein) 과발현 모델 확립을 위해 설치류에서 연구된 SNCA 과발현 모델 중 가장 사람에서의 PD와 유사한 증상을 나타내며, 증상의 정도가 심하

다고 알려진 프로모터를 사용하고자 하였다. 또한 미니피그 형질전환 공여세포의 제작을 위해 viral mediated gene transfer 방법을 사용하므로, 효과적인 외부유전자의 전달을 위해 전체 target 유전자의 크기를 최소화 할 수 있는 promoter를 선정하였다. 그리고 본래의 SNCA가 발현되는 위치와 가장 유사한 부위에서 발현시킬 수 있는 Promoter의 선정을 위해, 알려진 SNCA의 발현 위치를 고려하여 선정하였다.

- ① TH promoter; PD는 대뇌 흑질 (Substantia nigra)에 존재하는 도파민 신경세포의 소실, 봉입체 (inclusion) 형성, 신경교증(gliosis)이 나타나 발생하게 되는 질병이다. 이러한 임상증상은 다양한 기전에 의해 나타나는 것으로 제시되고 있으나, 여전히 병인은 정확하게 알려져 있지 않다. 이중 SNCA의 aggregation이 이러한 신경 소실의 원인으로 알려져 있으며, 도파민 신경 특이적인 SNCA의 과발현을 유도하기 위하여 TH (tyrosine hydroxylase) promoter를 이용한 mouse 모델이 보고된 바 있다. 하지만 이러한 마우스모델은 nitrostriatal system의 신경세포체, 축색돌기, 신경말단에서 SNCA를 과발현하고, 약간의 운동실조를 보였으며, 미약한 도파민의 분비량의 변화를 나타내었으나, 도파민 신경의 소실 및 PD의 증상은 나타내지 않아 PD 연구를 위한 모델동물로 활용하기에는 무리가 있다. 또한 설치류 모델 연구에서 사용된 TH promoter는 대부분 9 Kb로 size가 매우 큰 편이며, size가 크다는 단점을 극복하기 위하여 functional domain들만의 조합을 통해 4.5 또는 4.8 Kb로 size를 줄여서 사용한 예도 있으나, 이러한 promoter를 이용하여 다른 종의 세포에서 발현시키는 경우 homology가 떨어져 promoter의 발현 강도가 약해지거나, tissue specificity가 나타나지 않는다는 보고가 있다.
- ② Thy1 promoter; 시냅스 앞에서 발현되는 SNCA는 PD 및 DLB(dementia with lewy bodies)등의 질병과 관련 있다고 생각되며, 이의 병인론을 알아보기 위해, 중추신경계 신경 특이적 promoter인 Thy1 promoter를 이용한 형질전환 모델이 보고되었다. 이들 모델은 뇌와 척수부위 신경세포체에 SNCA 집합체 형성을 특징으로 하며, neuromuscular junction 부위의 퇴행과 더불어 운동능의 감소가 관찰되었다. 이들 모델은 SNCA 축적에 따른 행동학적 변화와의 관련성 이해에는 도움이 되나, 대뇌흑질 부위의 도파민 신경의 소실이 나타나는 PD의 표현형은 관찰되지 않았다.
- ③ PrP promoter; PrP promoter를 이용하여 뇌간부위와 척수의 신경에서 SNCA의 fibrillization에 의한 신경독성을 보임을 밝혔다. 이 모델은 심한 운동불능 증상과 함께 마비 및 죽음에 이르는 강한 임상증상을 보였지만, 대뇌 흑질부위의 도파민 신경은 손상되지 않아 PD 모델로 이용하기에는 한계가 있었다.
- ④ PDGF- $\beta$  promoter; 모든 신경에서 발현되는 것으로 알려진 PDGF- $\beta$  promoter를 이용하여 SNCA를 과발현시킨 모델이 확립되었으며, 이 모델은 신경세포와 신경돌기에서 SNCA 집합체가 관찰되었다. 또한 나이가 든 형질전환 모델에서는 운동능의 소실과 함께 TH를 발현하는 신경의 수가 줄어들음을 확인하여, PD의 행동학적, 신경화학적, 생화학적 특징을 다양하게 나타내는 모델로서의 활용가능성이 제시되었다. 또한 본 연구에서 사용한 promoter는 size가 약 1.4Kb로 형질전환 vector 제작 시 유전자 도입이 쉬울 것으로 기대되었다. 이상의 문헌조사 연구를 통하여, 다양한 부위

의 중추신경계에서 SNCA를 발현시킬 수 있으며 가장 size가 작고 다양한 PD 관련 임상증상을 나타낸 바 있는 PDGF- $\beta$  promoter를 두 차례의 자문회의를 거쳐 선정하였으며, 이후 hSNCA 과발현 미니피그 모델 생산연구를 진행하였다.

(나) RGC 세포의 배양 및 PDGF- $\beta$  promoter하에서 hSNCA의 발현 확인

① PDGF- $\beta$  promoter하에서 hSNCA가 신경세포에서 과발현 됨을 확인하기 위하여 RGC 세포를 이용하여 확인하였다. RGC 세포의 신경세포 특이적 특성의 확인 및 SNCA 항체의 specificity 확인을 위하여 SNCA/HR, SNCA/H, 및 MAP2 항체를 이용하여 면역염색을 실시하였다.

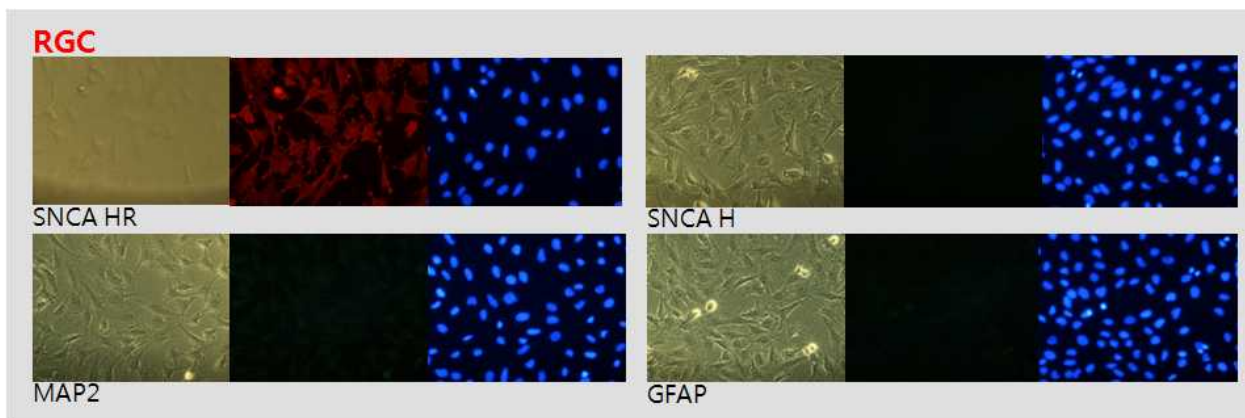


그림 14 RGC 세포에서 SNCA/HR, SNCA/H, MAP2, GFAP 항체를 이용하여 면역염색 (이상 x200).

② RGC 세포는 SNCA/HR은 강하게 발현하였으나 SNCA/H는 발현하지 않아 hSNCA에 대한 항체의 특이성을 확인할 수 있었다. 또한 RGC 세포는 신경특이적 단백질인 MAP2는 약하게 발현하였고, GFAP는 거의 발현하지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 RGC 세포에서 PDGF- $\beta$  promoter-hSNCA 벡터를 도입한 후 면역염색을 실시하였다.

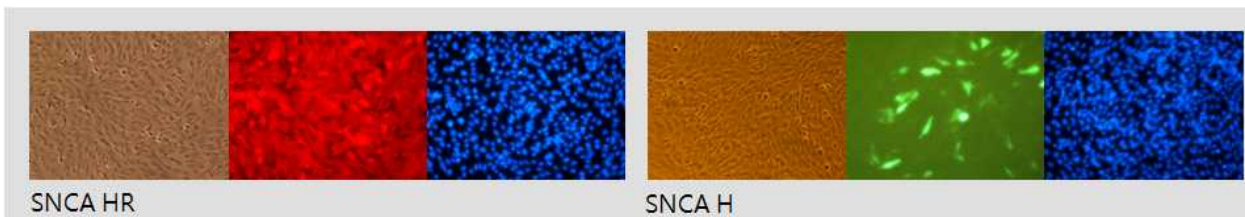


그림 15 RGC 세포에 PDGF- $\beta$  promoter-hSNCA 벡터를 도입한 후 SNCA/HR(빨강색) 및 SNCA/H(녹색)에 대한 항체를 이용한 면역염색 결과 (이상 x100).

③ SNCA/H에 의해 전혀 염색되지 않았던 도입 전 세포와는 달리, RGC 세포에 PDGF- $\beta$  promoter - hSNCA 벡터를 도입한 세포에서는 SNCA/H항체에 의해 녹색으로 강하게 염색되는 것을 확인하였다. 이를 통해 PDGF- $\beta$  promoter-hSNCA 벡터



가 도입된 세포만 hSNCA 단백질이 발현됨을 확인할 수 있었고, 또한 세포 내부적으로 발현되는 SNCA와 구별 가능성을 확인할 수 있었다.

### 3. 형질전환 복제수정란 생산 효율 향상

#### 가. 돼지 난자의 체외성숙 조건 최적화

##### (1) 연구방법

- ① 지역의 도축장에서 도축되는 돼지의 난소를 채취하여 25~30 oC 생리식염수에 넣은 채로 2시간 내에 실험실로 가지고 온다. 배달된 난소는 실험실에서 생리식염수로 2~3번 세척 과정을 거친다. 난소에서 3~6 mm 정도 크기를 가진 여포를 선택하여 18 게이지 바늘이 달린 주사기를 이용하여 여포 속 내용물을 여포액과 함께 뽑아낸다.
- ② 뽑아낸 여포액을 50 ml conical tube로 옮기고 39 oC에서 잠시 보관한다. 5분여의 정지 후 상층액을 제거하고 가라앉은 물질을 100mm dish에 옮기고 oocyte washing media로 희석과 세척을 2~3 회 반복한다. 현미경하에서 난구세포-난자복합체 중 난구세포가 확장되지 않고 단단하게 붙어있으면서 세포질이 균일하게 검은 상태의 복합체를 선발하여 oocyte washing media에서 3 차례 반복하여 세척한다. 그리고 선별된 난구세포-난자복합체는 in vitro maturation (IVM) 배지로 옮긴다.
- ③ 각 30~60개의 난구세포-난자복합체를 450 ul의 IVM 배지 (Tissue culture medium (TCM) 199, 1 ug/ml gonadotrophin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 0.57 mM cystein, 0.91mM sodium pyruvate, 5 ug/ml insulin, 5 nM 9-cis retinoic acid)가 담긴 4-well의 한 well에서 배양한다. 39°C, 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 세포 배양기에 4-well을 넣고 22시간 배양한다. 처음 22시간 배양 후 난구세포-난자복합체는 세척한 후 호르몬이 제거된 IVM 배지에서 나머지 22시간을 배양한다.
- ④ 체외성숙 배양배지의 최적화를 위하여 배양배지는 1) 10% PFF: TCM 199 + 10% PFF, 2) 1% PFF: TCM 199 + 1% PFF, 3) 0.1% PVA: TCM 199 + 0.1% PVA의 3 가지 조건으로 나누어 실시하였다.

##### (2) 연구결과

#### (가) 체외배양배지 내 돼지 난포액의 농도에 따른 난자의 성숙률 및 체외발달률 비교

- ① 돼지 난포액(porcine follicular fluid, PFF)은 미성숙 돼지 난자의 성숙 시 배양배지에 첨가되며, 정확한 성분은 알려져 있지 않지만, 난자의 성숙에 필수적인 다양한 영양 성분 및 호르몬, 미세 물질이 들어있다고 알려져 있다. 하지만 PFF를 채취한 난포의 종류 (난포의 크기 및 발달 단계) 및 그 시기에 따라 그 구성 성분의 차이가 많으며, 이에 따라 난자의 성숙에 긍정적 또는 부정적 영향을 미친다고 알려져 있다. 이에 따라 최적의 PFF 첨가 조건을 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

표 3 난자 체외성숙 배지 내 PFF 농도에 따른 성숙률 비교

Maturation medium	Total no. of COCs	Matured	Maturation rate (%)
10% PFF	638	553	86.7
1% PFF	418	364	87.1
0.1% PVA	693	608	87.7

② 10% PFF, 1% PFF, 그리고 PFF를 넣지 않은 0.1% PVA 3개의 조건하에서 난자를 성숙시키고, 성숙률의 비교를 위해 제1극체가 나온 비율을 확인하였다. 위의 표에서 나타나는 것과 같이 3개 그룹에서 난자의 성숙률은 각각 86.7%, 87.1%, 87.7%로서 통계적 유의성에는 차이가 없는 것으로 밝혀졌다.

표 4 난자의 성숙배지 구성에 따른 단위생식 배아의 체외 발달률.

Maturation medium	Total no. of embryos	>2 cells (%)	No. of BLs (%)	No. of cells in BL mean±SEM)
10% PFF	151	131 (86.8)	59 (45) <sup>a</sup>	52±1.3
1% PFF	105	90 (85.7)	28 (31.1) <sup>b</sup>	54±3.1
0.1% PVA	120	102 (85.0)	37 (36.3) <sup>ab</sup>	54±2.5

③ 3가지의 돼지난자 성숙배지 구성에 따른 단위생식 배아의 체외 발달률을 확인하였다. 위의 표는 8회 이상 반복된 실험을 통해 얻은 결과이며, 난할률은 각 86.8%, 85.7%, 그리고 85%로 차이가 없었으나, 배반포 형성률에서는 10% PFF 그룹이 1% PFF 그룹보다 유의적으로 우수한 것으로 나타났다. 배반포를 이루는 세포수를 확인한 결과에서는 3개의 그룹에서 통계적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

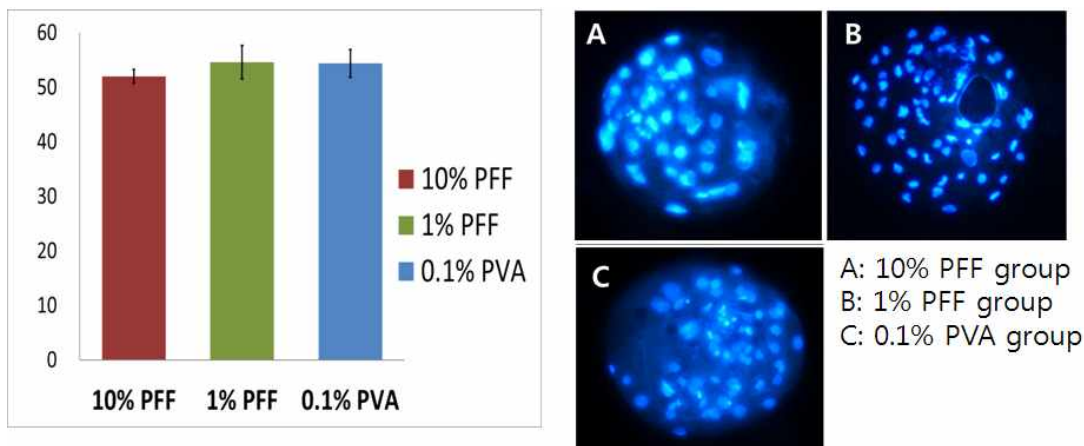


그림 16 난자의 성숙배지 구성에 따른 단위생식 배반포의 세포수 (왼쪽) 및 배반포의 핵 염색 사진 (오른쪽).

(나) 체외배양배지 내 돼지 난포액의 농도에 따른 난구 세포 및 배반포에서의 유전자 발현 패턴 비교

① 난자의 체외 성숙배지 구성에 따른 영향을 조금 더 자세히 알아보기 위하여 난자를 44시간 성숙시킨 후 COC로부터 분리한 난구세포에서의 유전자 발현 양상 및 단위생식 배반포에서의 유전자 발현 양상을 비교 분석하였다. 난구세포에서는 matrix molecule과 관련 있다고 알려진 유전자인 HAS2 (hyaluronan synthase 2), PTGS2 (prostaglandin G/H synthase 2), GREM1 (gremlin1)의 유전자를, 그리고 steridogenesis와 관련 있는 HSD3B (hydroxy-delta-5 steroid dehydrogenase), EFG signaling과 관련 있다고 알려져 있는 AREG (amphiregulin), BTC (betacellulin)의 2 가지 유전자와 connexin과 관련 있는 GJA4 (gap junction protein alpha4), 마지막으로 cell cycle regulator인 CCND2 (cyclin D2)의 8가지 유전자의 발현 패턴을 알아보았다.

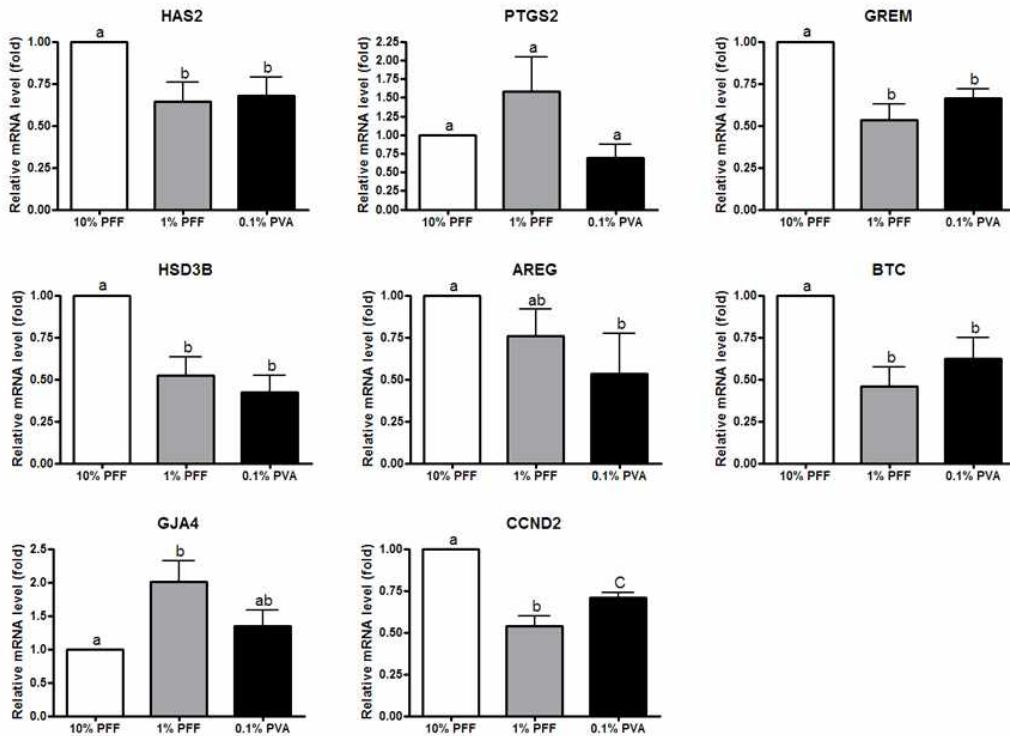


그림 17 난자의 체외성숙 배양배지 구성에 따른 cumulus cell의 유전자 발현 패턴 비교

② 3가지 그룹 내에서 유의적인 차이가 없는 PTGS2 및 1% PFF 그룹에 비해 발현율이 낮은 것으로 나타난 GJA4 유전자를 제외하고, 10% PFF 그룹의 난구세포에서 HAS2, GREM, AREG, BTC 그리고 CCND2 유전자의 발현율이 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 체외성숙 배지 내의 PFF 농도의 차이에 따른 난자의 성숙률에는 차이가 없었지만, 난자 성숙에 중요한 영향을 미치는 난구세포의 유전자 발현율에는 차이를 나타내게 됨을 확인하였으며, 이러한 영향에 의해 이후 단위생식

한 배아의 체외 배양물에서 10% PFF 그룹에서 배반포가 가장 높은 효율로 얻어진 것으로 생각된다.

- ③ 다음으로 단위생식을 통해 얻어진 배반포에서 Metabolism과 관련된 GLUT1 (glucose transporter1), LDHA (lactate dehydrogenase A)의 2개 유전자와 Apoptosis와 관련된 BclxL (B-cell lymphoma-extra large)과 bax (BCL2 associated X protein)의 발현을 및 bax에 대한 bclxL의 발현 비율을 비교하였다.

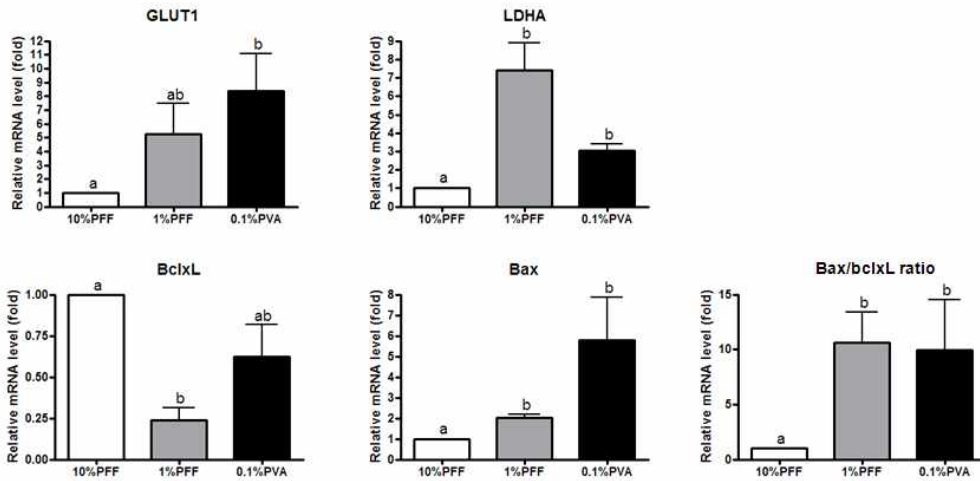


그림 18 난자의 체외성숙 배양배지 조성에 따른 단위생식 배반포에서의 유전자 발현 패턴 비교.

- ④ 1% PFF 그룹 및 0.1% PVA 그룹에서는 10% PFF를 넣어주는 대신 3mM의 D-glucose를 첨가해주었는데, GLUT1 및 LDHA의 발현율이 1% PFF 및 0.1% PVA 그룹에서 높게 나타난 것은 이러한 배지 조성의 차이에 의한 것으로 생각된다. apoptosis 관련 유전자 발현율은 10% PFF 그룹에서 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서 실험에 이용한 3가지 난자 성숙을 위한 체외배양배지 조성에 따른 성숙률에는 차이가 없었지만, 배반포 발달률 및 유전자 발현패턴의 차이를 바탕으로, 본 과제에서는 10% PFF를 이용하여 성숙시킨 난자를 이용하여 이후 실험을 진행하였다.

(다) 난구세포 및 배반포에서의 유전자 발현 분석

- ① 40-44시간동안 완전히 체외 성숙된 난구세포-난자복합체는 IVM 배지에 0.1% (w/v)의 hyaluronidase를 첨가한 배지로 옮긴 후 주변에 붙어있는 난구 세포의 제거를 위해 100ul 피펫으로 여러 번 pipetting해준다. 제거된 난구세포를 원심분리를 통해 모은 후 상층액을 제거하고 이후 유전자 분석 시까지 -80°C에 동결 보관 한다. 화학적 방법을 이용하여 활성화 시키고 PZM-5 배지에서 7일간 배양하여 얻은 단위생식 배반포는 PBS에서 3회 washing한 후 이후 유전자 분석 시까지 -80 °C에 동결 보관 한다. 유전자 분석을 위하여 난구세포와 배반포에서 mRNA를 추출한다. mRNA의 추출을 위해 easy-spin Total RNA Extraction Kit (iNtRON)를 사용하였으며, 이후 cDNA로 합성하기 위해 amfiRivertII cDNA synthesis kit(GenDEPOT)를

이용하여 reverse transcription을 진행하였다. 각 유전자의 발현률 비교를 위해 Applied biosystem 7300 Real-time PCR system을 이용하여 real-time PCR을 진행하였으며, 이에 사용한 primer의 정보는 아래의 표와 같다.

표 5 난구세포에서 발현되는 유전자 패턴 연구에 사용한 primer

Gene	Sequenece	Size (bp)	Genbank no.
HAS2	F:CTGGCTGGGGCACATCTGGA R:CCTTCTTCCGCCGGCCACAT	246	AB050389.1
PTGS2	F:TCCCCTTCTGCCTGACGCCT R:CCACCAGCAACCCTGCCAGC	147	AY028583.1
GREM1	F:GCCTGTACTIONCGGGACGCAGC R:CGGCAAGAGGCAGCTGGTGG	109	XM_001925261.2
HSD3B	F:GCCAGCGTGCCGGTCTTCAT R:AGCCCAGCCGTTAGCCTCCA	177	AB529538.1
AREG	F:GTTGCCCCAGAGACCGCGAC R:GAGTGACAGCACACGGGCG	85	NM_214376.1
BTC	F:ACCACCACACCACCGAAGCG R:CGGCCACCACGAAGCGACAT	97	XM_003356977.1
GJA4	F:GCTGGAGCTGGCGTACCTGC R:GCCCGTTGTAGGTGGGGCAC	176	NM_001244224
CCND2	F:AGCTGCTGTGCTGCGAGGTG R:CAACACGCGGTCTCGTGGA	77	NM_214088.1
$\beta$ -actin	F:GTGGACATCAGGAAGGACCTCTA R:ATGATCTTGATCTTCATGGTGCT	137	U07786

표 6 배반포에서 발현되는 유전자 패턴 연구에 사용한 primer

Gene	Sequenece	Size (bp)	Genbank no.
GLUT1	F:GCTTCCAGTATGTGGAGCAACT R:AAGCAATCTCATCGAAGGTCC	132	X17058.1
LDHA	F:ATCTTGACCTATGTGGCTTGGA R:TCTTCAGGGAGACACCAGCAA	214	NM_001172363.1
BclxL	F:TGGTGGTTGACTTTCTCTCC R:ATTGATGGCACTAGGGGTTT	139	AF216205
Bax	F:GCCGAAATGTTTGCTGACGG R:CGAAGGAAGTCCAGCGTCCA	152	AJ606301
$\beta$ -actin	F:GTGGACATCAGGAAGGACCTCTA R:ATGATCTTGATCTTCATGGTGCT	137	U07786

## 나. 성체섬유아세포, 태아섬유아세포와 지방줄기세포를 이용한 체세포 핵이식 효율 비교 평가

### (1) 연구방법

(가) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

- ① 체세포 핵 이식 (SCNT)를 위하여 3종의 세포 미니돼지유래의 성체섬유아세포, 태아섬유아세포, 그리고 지방줄기세포를 각각 사용한다.
- ② 체세포 핵이식을 하기에 앞서, 세포들을 해동하고, 첫 번째 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후의 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여세포로 이용한다.

(나) 체세포 핵이식을 위한 공여 핵세포의 준비

- ① 도축장으로부터 돼지 난소를 30~35°C의 생리식염수에 담아 3~4시간 이내에 운반하여, 난소 중 난포의 사이즈가 3~6mm가 되는 크기의 난포로부터 18-gauge 바늘의 10ml 주사기를 이용하여 난구세포-난자복합체(cumulus-oocyte complex)만을 회수한다.
- ② 난구세포로 난자의 투명대 외벽이 여러 겹으로 쌓여있고, 난자의 세포질이 균일한 상태의 난구세포-난자복합체들을 선택하여 체외성숙배양액에서 5% 이산화탄소의 39°C 배양기에서 체외성숙을 유도한다. HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리파이펫을 이용, 반복 파이펫팅 (pipetting)하여, 생체 내에서 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다.
- ③ 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫 (내경 150  $\mu$ m)으로 고정하고, 10% (v/v) FBS 및 5  $\mu$ g/mL 비즈벤자마이드 (bisbenzimidazole) (Hoechst 33342)와 5  $\mu$ g/mL 사이토칼라신 B가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)로 탈핵한다. 비즈벤자마이드로 염색된 제1극체 및 중기-II 염색체를 흡입 피펫 (aspiration pipette)을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 SCNT에 사용한다.

(다) 미세주입, 융합, 활성화 및 수정란 배양후 체외발달률 조사

- ① 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline) 공간으로 단일의 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM HEPES를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 전극을 사용하여 융합시킨다.
- ② 단일 세포-난자 결합체를 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)에 부착되어 있는 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 1.2 Kv/cm의 직류전압으로 한번의 30  $\mu$ s 지속시간으로 가하며, 전기자극 30 분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실체현미경 하에서 관찰한다.
- ③ 융합된 수정란만을 선별하여 화학적 방법으로 활성화시킨다. 복제수정란의 활성화 후, 3가지의 공여세포를 이용하여 각각 생산된 수정란의 발달효율을 비교 평가하기 위하여 8일 동안 미네랄 오일 (mineral oil)로 도포된 25  $\mu$ L의 PZM-5 미세소적

(microdrops)내에서 각각 배양한다. 8일 동안 배양 시, 현미경하에서 3가지 세포를 이용한 복제수정란의 배발달률을 조사한다. 또한 8일째 형성된 배반포 발달률과 비즈벤자마이드로 염색된 배반포를 이루고 있는 총세포수를 확인하여 배반포의 질적 차이를 비교한다.

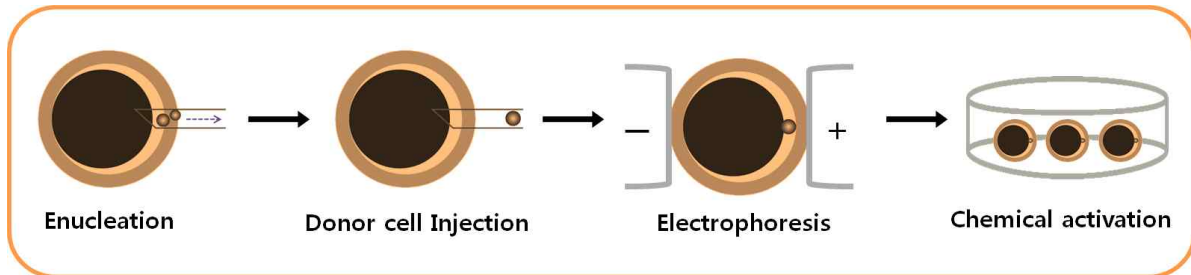


그림 19 돼지 체세포핵 이식을 이용한 복제수정란 생산 과정

(2) 연구결과

(가) 돼지지방줄기세포를 이용한 복제수정란 생산 효율 및 체외 발달률 조사

① 실험을 위하여 돼지지방줄기세포(MSC)와 형질전환돼지연구에 많이 이용되어지는 태아섬유아세포(FF)와 성체섬유아세포(ASF)를 가지고 체세포 핵이식한 후의 결과를 비교하였다. 체세포와 세포질간의 융합률을 MSC 그룹이 87.88%로 ASF 85.89%와 FF 그룹 90.22% 로 차이를 보이지 않았다.

표 7 돼지의 체세포 핵이식에 적합한 공여세포주의 선발을 위한 3가지 세포주 유래의 복제수정란의 체외 발달률 비교 조사

Cell	Fused oocytes (%)	2 cells	16 cells	BLs
MSC	134 (87.88)	113	79	14
ASF	88 (85.89)	40	40	6
FF	104 (90.22)	72	57	18

② 융합 된 수정란들의 체외배양 후에 그들의 발달률을 비교하였다. 그 결과로 세 개의 그룹간의 수정란 발달율은 유의한 차이를 보이지 않았다 (MSC 84.33% vs. ASF 45.45% vs. FF 69.23%). 배양 후 8일째 형성되는 배반포율의 경우 MSC 그룹 10.45%, ASF 그룹 6.82%, FF 그룹 17.31%로 통계적인 유의한 차이를 보여주지 못했다.

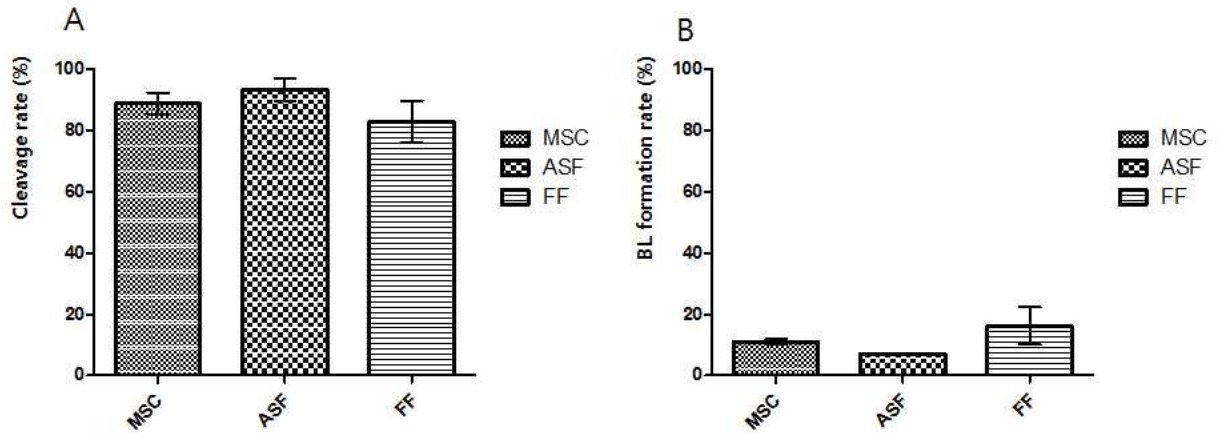


그림 20 Comparison among MSC, ASF and FF on *in vitro* developmental ability of porcine SCNT embryos. a, b means significantly different among groups ( $P < 0.05$ ).

③ 마지막으로 각 그룹에서 생산된 배반포를 이루고 있는 세포수의 차이를 조사하였다. 아래 그림에서 보여주듯이 배반포의 총 세포수에서는 통계적인 유의한 차이를 보여주었다. MSC 그룹의 경우 총 세포수 평균 89개, ASF 그룹 평균 57.5개 그리고 FF 그룹의 경우는 평균 105개의 결과를 나타냈으며, MSC 와 FF 그룹은 통계적인 유의한 차이가 없는 반면, ASF는 다른 두 그룹에 비해 유의하게 낮은 결과를 보여주었다. 따라서 지방줄기세포를 공여세포로 사용할 경우 그 발달 효율이 태아섬유아 세포와 유의한 차이가 나지 않으므로, 돼지 체세포 핵이식을 위한 연구의 공여세포로서 사용이 가능함을 보여주는 결과를 도출하였다. 따라서 본 과제에서는 먼저 돼지 지방줄기세포를 형질전환을 위한 공여세포로 시도하고자 한다.

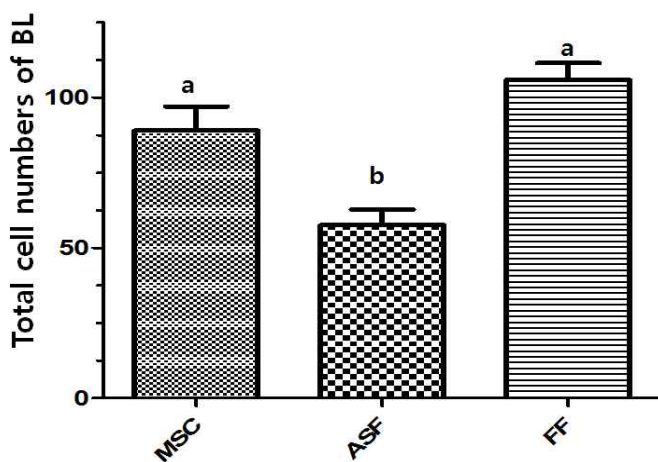


그림 21 Comparison among MSC, ASF and FF on *in vitro* developmental ability of porcine SCNT embryos. a, b means significantly different among groups ( $P < 0.05$ )



## 다. 복제수정란의 체외 발달률 향상을 위한 활성화 조건 비교

### (1) 연구방법

#### (가) 체외성숙 난자의 활성화를 통한 단위생식 배아의 생산 및 발달률 비교

- ① SCNT를 이용하여 제작한 복제수정란을 효과적으로 활성화시키기 위하여 널리 쓰이고 있는 두 가지 활성화 방법의 배반포 발달 유도 효율을 비교하였다. SCNT 유래 배아를 이용하기에 앞서서 단위생식 유래 배아를 이용하여 실험하였다.
- ② 40시간 동안 순차적으로 두 종류의 배지에서 돼지 난자를 배양 및 성숙시킨다. 성숙된 난자를 0.1% 히알루로니다아제 (hyaluronidase)가 포함된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 반복적으로 피펫팅 (pipetting)하여 난자로부터 난구세포를 제거하고, 성숙된 난자를 선택한 후 무작위로 두 그룹으로 나눈다.
- ③ 한 그룹은 전기적 활성화 방법을 이용하여 0.5mM HEPES, 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>가 보충된 0.26 M mannitol 용액에 넣어 평형을 맞추고 위의 용액이 담긴 전극 chamber에 옮겨 1.5kV/cm의 직류 전류를 60 μsec 동안 한 번 흘려주어 전기적으로 활성화 시킨다. 그 후에 2 mM 6-DMAP, 0.4 μg/ml demecolcine에 40분간 노출시켜 추가적으로 난자 세포질 내 Ca의 농도를 증가시킨다. 다른 그룹은 화학적으로 활성화시키는 방법으로, 0.2 mM Thimerosal, 2 mM 6-DMAP, 0.4 μg/ml demecolcine에 10분간 노출시킨 후 washing하고 8mM DTT, 2 mM 6-DMAP, 0.4 μg/ml demecolcine에서 30분간 처리한 후 washing한다.
- ④ 각 그룹에서 활성화된 난자를 PZM-5 배지에서 일주일간 배양하면서 배아 발달률을 확인한다.

### (2) 연구결과

- ① SCNT를 통한 복제수정란 생산은 IVM, 탈핵, 세포 주입, 퓨전, 활성화 등 많은 과정을 거쳐 이루어진다. 그러므로 복제수정란 생산 효율에 영향을 미치는 요인은 매우 다양한데, 이 중 활성화 방법에 의한 복제수정란의 발달 효율을 알아보고 효율이 더 높은 방법을 채택하기 위하여 본 실험을 실행하였다. SCNT를 이용하여 제작한 복제수정란을 효과적으로 활성화시키기 위하여 널리 쓰이고 있는 두 가지 활성화 방법-전기적 활성화와 화학적 활성화-을 통해 단위생식 된 난자의 배반포 발달률을 비교하였다. 두 가지 방법으로부터 얻은 배반포 발달율은 전기적 활성화 그룹과 화학적 활성화 그룹에서 각각 19.06±1.727, 18.38±1.357%로 유의적인 차이가 없었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 두 가지 활성화 방법을 접목하여 SCNT 복제수정란 및 단위생식 유도 난자의 배반포 발달률을 높이는 방법에 대해 연구할 예정이다.

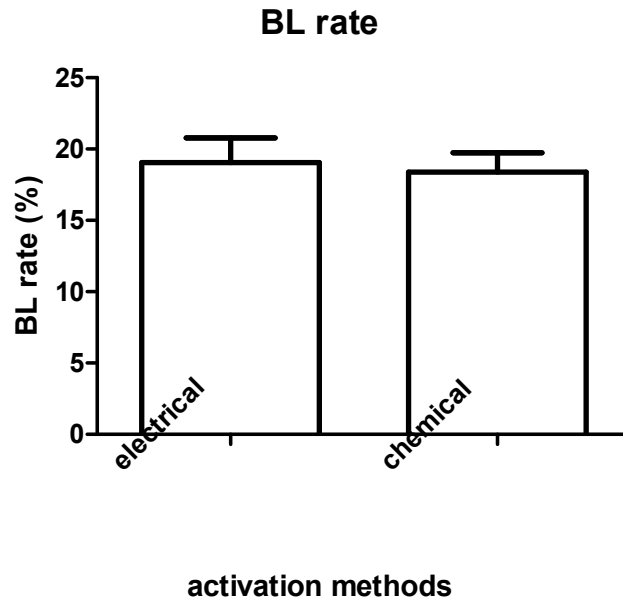


그림 22 전기적 활성화와 화학적 활성화 방법에 의한 단위생식 유도 난자의 배반포 형성률 비교.

표 8 전기적 활성화와 화학적 활성화 방법에 의한 단위생식 유도 난자의 배반포 형성률

	electrical method (%)	chemical method (%)
BL rate	19.06 ± 1.727	18.38 ± 1.357

## 라. 미니돼지 배아의 체외배양 시 seminal fluid가 미치는 영향 연구

### (1) 연구방법

#### (가) 단위생식 배아의 생산을 위한 난자의 활성화 방법

- ① 0-44시간 동안 체외 성숙시킨 돼지 난자를 이용하여 실험을 진행하였다.
- ② Electrical activation: BTX Electro-Cell Manipulator 2001 (BTX, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 난자의 활성화를 진행한다. 3.2 mm의 간격을 가진 BTX 챔버에 융합단계를 마친 난자를 activation 배지에 넣은 채로 옮겨준다. 1.5 kV/cm, 60 usec 단일 pulse의 직류 전기를 챔버에 흘려주어 난자가 활성화되어 난할이 일어나도록 유도한다. 활성화가 끝난 난자는 다시 PZM-5로 옮겨서 배양하도록 한다.
- ③ Chemical activation: 융합이 끝난 배아를 oxamflatin, 2 mM 6-DMAP, 0.4 ug/ml demecolcine, 그리고 0.2 mM thimerosal이 포함된 PZM-5 배지로 옮겨서 10분 간 39 oC, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>가 포함된 incubator에 둔다. 10분이 지난 배아는 꺼내어서 TALP 배지로 세척을 한번 한 다음, 다시 oxamflatin, 2 mM 6-DMAP, 0.4 ug/ml demecolcine, 그리고 8 mM DTT가 포함된 PZM-5 배지로 옮

겨서 30분 간 incubator에 둔다. 배아를 다시 꺼내어 TALP로 세척한 후 oxamflatin, 2 mM 6-DMAP, 그리고 0.4 ug/ml demecolcine이 포함된 PZM-5 배지에서 추가로 8시간 20분 간 incubation한다. 이렇게 모든 과정을 마친 배아는 mineral oil로 도포된 PZM-5 배지로 옮겨져 추가적인 배양을 한다.

(나) 체세포 핵이식 수정란의 준비

- ① 난자에서 hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거한다. 제거된 난구세포를 체세포 핵이식에 공여세포로 사용한다. 난구세포가 제거된 난자를 10분 간 5 ug/ml bisbenzamide (Hoechst 33342)를 이용하여 염색한다.
- ② 염색이 완료된 난자는 미세세포조작기로 옮긴다. 미세세포조작기의 자외선 파장 하에서 세포질의 핵과 극체를 injection 피펫을 이용하여 제거한다. 탈핵된 난자에 위에서 준비한 난구세포를 각 난자 하나에 하나씩 미세조작을 통해 주입한다. 세포가 주입된 난자는 fusion 배지에 옮겨서 전기적인 활성을 주어서 공여세포의 세포막과 탈핵된 난자의 세포질막이 융합되도록 유도한다. 융합된 난자는 화학적인 방법으로 활성화하여 난할이 진행되도록 한다.
- ③ 이렇게 제작된 난자는 7일 간 미네랄 오일로 도포한 Porcine zygote media-5에서 배양하여 각 발달과정을 관찰한다. 배아는 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>가 포함된 세포배양기에서 배양한다. 배양 후 2일 째 난할률을 관찰하고, 7일 째는 배반포 형성률을 기록한다.

(다) 정상 돼지의 정액의 채취 및 정액의 준비

- ① Seminal plasma 공급; 일반 돼지 사육 농장에서 정상적으로 교배에 사용되는 수컷을 선발한다. 발정이 유도된 암컷을 수컷이 있는 우리에 넣어준 뒤 코걸이를 한 후 보정을 한다. 수컷이 승가를 하고 암컷과 교미를 하기 위해 발기하는 순간 손으로 수컷의 성기를 잡아서 옆으로 빼다. 미리 준비해간 멸균 유리병의 입구를 멸균 거즈로 감싼 뒤, 수컷의 정액을 받는다. 이 때 수컷의 정액 중 제 1분획과 3분획은 받지 않고 버리고, 제 2분획만을 선택적으로 받는다. 0 oC로 유지되는 아이스박스에 정액을 넣어 실험실로 운반한다. 운반된 정액을 4 oC 냉장고에 하루 정치한 뒤 상층액만을 따로 담아내고 침전물은 버린다. 상층액은 1.2 um syringe filter를 이용하여 필터링하고 순차적으로 0.45 um와 0.2 um syringe filter를 이용하여 필터링하여 -30 oC에서 냉동 보관한다.
- ② 실험군에 seminal plasma의 첨가; 단위생식이나 체세포 핵이식을 통하여 발달 중인 배아를 2일 째 0, 0.1, 0.5 그리고 1%의 seminal plasma가 포함된 TALP (Table 3) 배지로 옮긴 후 39 oC, 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 세포배양기에서 3 시간 동안 배양한다. 배양이 끝난 배아는 다시 PZM-5 배지로 옮겨서 배반포가 될 때까지 키운다.

(라) 발달 중인 배아의 분석 및 검증

- ① 난할률 계산; 단위생식 또는 체세포핵이식으로 만들어진 배아를 2일째 역상현미경으로 난할의 유무를 관찰한다. 난할율 (%) = 난할이 일어난 배아의 수/전체 배아의 수
- ② 배반포의 세포수 계산; 발달한 배반포 중 일부를 Hoechst 33342를 이용해 염색한 다음 TALP로 세척한다. 염색이 끝난 배반포를 slide glass에 올리고 cover glass를 살짝 떨어뜨리면서 덮어준다. 올려둔 배반포의 세포가 모두 일차원적으로 퍼지면서 세포의 숫자를 세기 용이한 상태가 된다. 형광현미경하에서 계수기를 이용하여 각각의 배반포마다 세포의 개수를 센다.
- ③ 유전자 발현을 계산; 각 군의 배반포 중 일부를 모아서 DEPC로 옮긴다. 2~3 차례 세척 후 DEPC와 함께 배반포를 E-tube로 옮겨준다. 이렇게 옮긴 E-tube를 -80 oC 냉동고를 이용하여 얼렸다 녹였다를 반복하면서 배반포의 투명대를 파괴하고 세포가 외부로 잘 노출될 수 있도록 하여 준다. 이렇게 준비된 각 군의 시료는 easy-spin Total RNA Extraction Kit (iNtRON)를 사용하여 시료에 들어있는 모든 RNA를 추출해 낸다. 추출한 total RNA는 Maxime RT Premix (iNtRON)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성한다. 각 군의 cDNA를 template로 quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 진행한다.

## (2) 연구결과

### (가) Parthenogenic activation

- ① 단위생식을 유도할 수 있는 방법 중의 하나인 전기적인 활성화 방법을 통해서 난자의 난할을 유도하였다. 난할을 유도하고 48시간 후 현미경하에서 배아의 발달 정도를 관찰하였다.
- ② 아래의 그림에서 볼 수 있듯이 배아의 난할 정도는 모든 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이렇게 난할률을 관찰한 배아는 돼지의 배아를 운반할 때 많이 사용하게 되는 TALP 배지를 기본으로 각각 0, 0.1, 0.5 그리고 1%의 seminal plasma를 혼합한 용액으로 이동하여 주었다.
- ③ 이동한 배아는 3시간 동안 38.5 oC 그리고 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 incubator에서 배양하였다. 3시간의 incubation 후에 각 군의 배아들은 다시 원래의 배양 배지인 PZM-5로 옮겨서 추가적으로 120시간 더 배양하였다.
- ④ 일주일이 지난 배아 중 배반포로 발달 중인 배아의 숫자를 통해서 배반포 생성률을 조사하였고, 배반포를 5 ug/mL bisbenzamide (Hoechst 33342)에 10분 간 노출시킨 후 배반포를 구성하고 있는 세포의 수를 관찰하였다. 관찰 결과 배반포 생성율과 세포의 개수 모두에서 대조군과 유의적인 차이를 보이는 실험군은 존재하지 않았다.

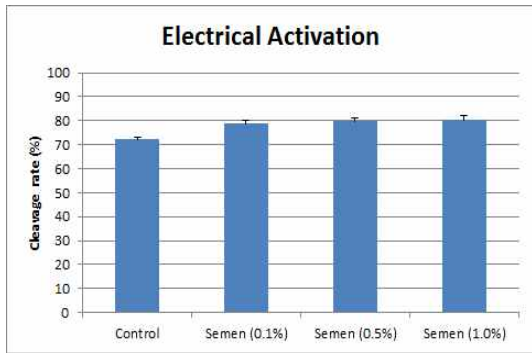


그림 23 Electrical activation 48시간 후 활성화된 난자의 난할률 비교

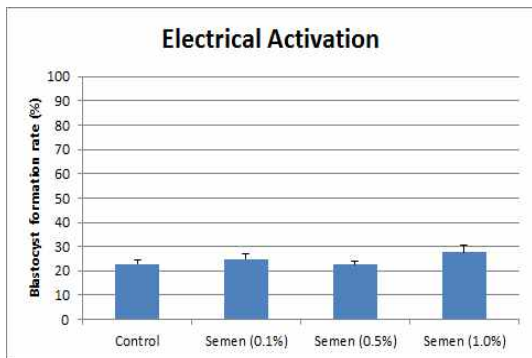


그림 24 Electrical activation 168시간 후 활성화된 난자 중 배반포까지 발달한 배아의 비율

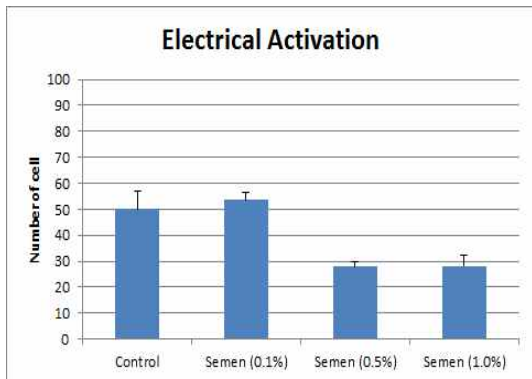


그림 25 발달한 배반포를 염색하여 세포의 수 측정

#### (나) Parthenogenic activation

- ① 단위생식을 유도할 수 있는 또 다른 방법 중 하나인 화학적 활성화 방법에 의해서 난자의 난할을 유도해보았다. 전기적 활성화 방법을 사용했을 때와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 48시간 만에 관찰한 난할률에서는 유의적인 차이가 보이지 않았으며, 배반포의 세포 개수에서도 유의적인 차이는 없었다. 하지만 배지에 0.1%의 seminal plasma를 처리한 군이 대조군에 비해서 유의적으로 증가하였다.

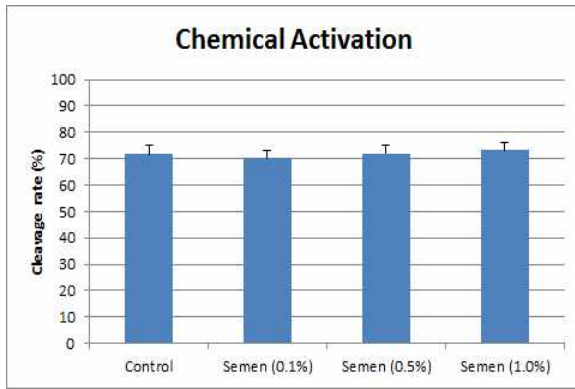


그림 26 Chemical activation 48시간 후 활성화된 난자의 난할률 비교

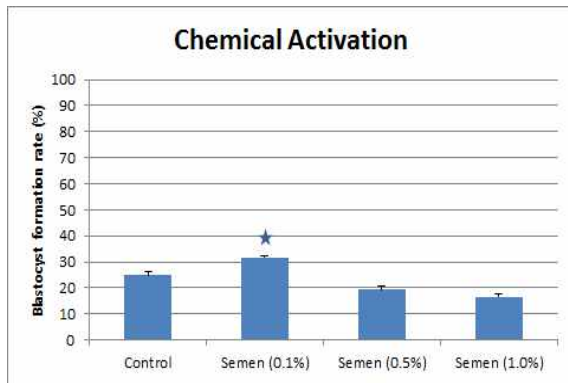


그림 27 Chemical activation 168시간 후 활성화된 난자 중 배반포까지 발달한 배아의 비율

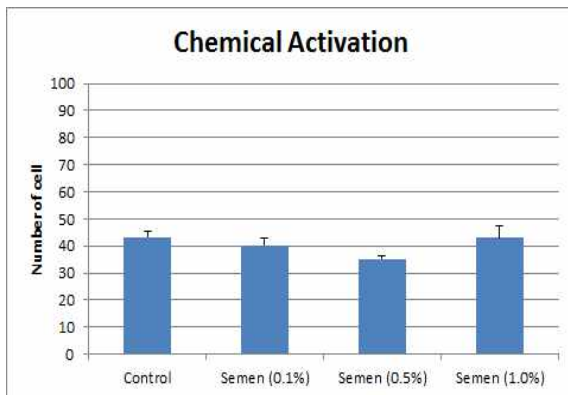


그림 28 발달한 배반포를 염색하여 세포의 수 측정

#### (다) Parthenogenic activation

- ① Chemical activation; 앞으로 형질전환 복제돼지를 만드는 방법으로 사용하게 될 체세포 핵이식에서 seminal plasma의 역할에 대해서 알아보기 위해서 본 실험을 진행하였다. 본 체세포 핵이식 실험에 사용된 공여세포는 cumulus cell이다. 각각 체세포 핵이식 후 48시간과 168시간 후 난할률과 배반포 생성률을 비교하였다. 아래의 표에서 보듯이 두 group간 유의적인 차이는 발견할 수 없었다.

표 9 0.1%의 seminal plasma가 체세포 핵이식을 통해 제작된 배아에 미치는 효과

	Total	Cleavage rate (%)	Blastocyst formation rate (%)	Number of cells
Control	119	71(59.7±1.86) <sup>a</sup>	9(7.6±1.63) <sup>a</sup>	38.7 <sup>a</sup>
0.1%	120	71(59.2±2.65) <sup>a</sup>	8(6.7±1.64) <sup>a</sup>	37.5 <sup>a</sup>

② Real-time PCR results; 대조군과 0.1%의 정액을 처치한 군에서 나온 배반포를 모아서 Bcl-2, Bax 그리고 p53 등 세포사멸 관련 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다. 각 군 간에 조사한 3 가지 유전자 모두에서 유의적인 차이는 발견할 수 없었다.

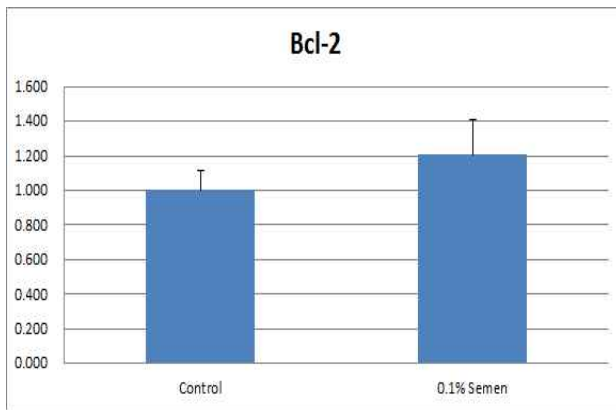


그림 29 Expression level of Bcl-2 in both groups.

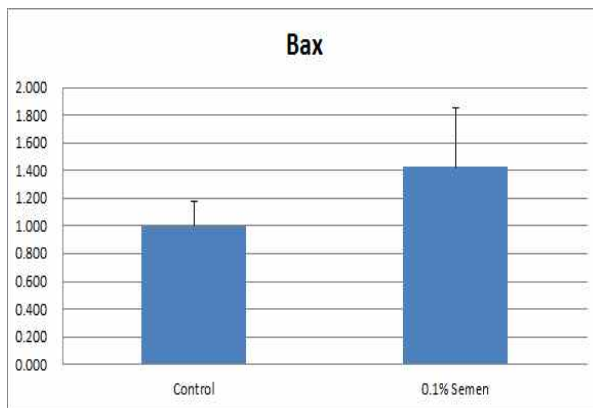


그림 30 Expression level of Bax in both groups.

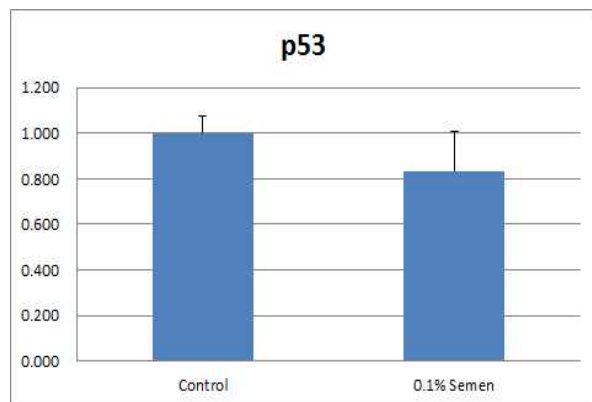


그림 31 Expression level of p53 in both groups.

- ③ 실험결과에서 알 수 있듯이, seminal fluid의 첨가는 electrical activation에 의해 유도된 모든 실험군 배아의 경우 난할률이나 배반포 생성률 그리고 배반포의 세포수에서 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. Chemical activation에 의해 유도된 실험군에서는 0.1% seminal fluid를 처리해준 실험군에서 대조군에 비해 유의적으로 배반포 생성률이 증가한 것을 관찰할 수 있었지만 난할률이나 세포의 수에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이 두 단위생식 실험의 결과를 바탕으로 체세포 핵이식 방법으로 제작된 배아의 경우는 0.1%의 seminal fluid가 처리된 군만을 실험군으로 지정하게 되었고, 이 역시 난할률, 배반포 생성률, 그리고 배반포의 세포수에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 또한 제작된 배반포에서 세포자연사와 관계된 유전자인 Bcl-2, Bax, 그리고 p53 유전자의 발현 정도를 quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 통해서 검증하였다. 그 결과에서도 각 유전자의 유의적인 발현정도 차이는 관찰되지 않았다.
- ④ 이러한 모든 결과를 종합하여 볼 때, 대리모에 이식될 복제수정란을 옮길 때 사용하는 배지에 seminal fluid를 최대 3 시간 추가하여도 복제수정란의 상태에 특별히 나쁜 영향을 주지 않고, 화학적으로 활성화된 경우 오히려 배반포 생성률이 증가하는 좋은 효과도 있다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 마. 배아 이식용 배지 조성 및 복제수정란의 체외 발달률 비교

##### (1) 연구방법

##### (가) 난자의 활성화 방법 및 이식배지의 조성

- ① 난자의 활성화 방법 중 화학적 활성화 방법으로 단위생식을 유도한 난자를 2일간 38°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양한 다음, 분할이 이루어진 난자를 두 그룹으로 나눈다. 그리고 기존에 본 연구실에서 이식용 배지로 이용하고 있는 TALP와 새로운 이식용 배지로 이용하고자 하는 HEPES-buffered PZM-5를 이용하여 배아를 straw에 loading한다.
- ② 멸균된 0.25ml straw에 두 그룹의 배지를 이용하여 각각 배아를 loading한 후에 이동식 인큐베이터에 넣어 2시간-2시간 30분 동안 보관한다. 이 시간은 실제 본 연구실에서 SCNT 배아를 농장으로 옮겨 이식하는 데에 걸리는 시간을 바탕으로 결정한 것이다. 그 후 loading된 난자를 다시 회수하여 38°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 인큐베이터에서 5일간 배양하면서 두 그룹간의 배아 발달률을 비교한다.
- ③ 각 그룹에서 얻은 배반포를 일부는 동결하였다가 mRNA를 추출하여 세포사멸과 관련된 유전자의 발현 정도를 비교 분석하고 나머지 배반포는 10 µg/ml의 Bisbenzimidazole (Hoechst 33342)로 염색하여 배반포를 이루고 있는 총 세포수를 비교한다.

##### (2) 연구결과



(가) 이식용 배양액의 분석

- ① 본 연구실에서 생산한 복제 배아를 농장에서 사육하는 대리모에 이식하기 위해서는 2시간 30분 정도의 이동시간이 필요하다. CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 영양성분이 담긴 배지에 넣어 배양하던 복제 배아를 대리모의 자궁에 이식하기 전까지 이동시간 동안 최소한의 영양성분이 든 배지보다는 영양성분이 좀 더 풍부한 배양배지와 같은 성분의 배지를 이용하여 운반할 경우 배아의 발달률 증가 및 세포사멸 감소 등의 긍정적인 효과가 있을 것이라고 생각하여 본 실험을 진행하게 되었다.
- ② 배양배지인 PZM-5는 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서만 pH 조절이 가능한 buffer가 들어 있어서 공기 중에서도 pH 조절이 가능한 buffer를 추가로 넣어주어야 했다. 이를 위해서 기존에 사용하는 이식용 배지인 TALP에 들어있는 것과 같은 농도의 HEPES 10 mM을 PZM-5에 첨가하고 공기 중에서 2시간 30분 정치시킨 후 pH를 측정해보니 TALP와 유사하였다. 이 결과로 배아 이식용 배지 테스트에 TALP와 10 mM HEPES가 첨가된 PZM-5 (HEPES-buffered PZM-5)를 이용하였다.

표 10 TALP와 PZM-5, 10mM HEPES가 첨가된 PZM-5 (HEPES-buffered PZM-5)의 공기 중에서의 pH

	TALP	PZM-5	HEPES-buffered PZM-5
pH	7.0	7.8	7.2

- ③ TALP와 HEPES-buffered PZM-5로 각각 단위생식 난자를 loading하고 2시간 보관 후 배양한 결과, 배반포 발달율은 TALP와 HEPES-buffered PZM-5에서 각각  $22.46 \pm 1.47$ ,  $23.17 \pm 2.13$ (%), 배반포의 총 세포수는 각각  $32.9 \pm 2.22$ ,  $37.09 \pm 2.18$ (개)로 유의적인 차이가 없었다. 이로써 HEPES-buffered PZM-5가 TALP에 비해 더 유용하다는 결론을 얻지는 못하였지만, PZM-5 역시 배아 이식용 배지로 사용가능함을 확인하였다.
- ④ 본 연구에서 사용한 PZM-5는 다양한 amino acid가 포함되어 있는 배지로, 소에서 착상 전 배아의 필수 아미노산 흡수율이 증가한다는 연구 (Reproduction 141: 685-695, 2011) 및 마우스에서 착상 전 배아가 공기 중의 높은 산소에 노출되었을 때 아미노산 이용율이 높아진다는 연구 (Biol Reprod, 87:1-8, 2012) 결과와 같은 맥락에서 PZM-5가 TALP에 비해 돼지의 착상 전 발달 중인 배아에 긍정적인 효과를 보일 것이라고 예상되지만, 실험결과를 통해 배양이 아닌 이식을 위한 운반과정(2시간 30분)은 긍정적인 효과를 보이기에 다소 시간이 짧다고 생각된다. 추가로 배반포 발달율 및 총 세포수에 세포사멸과 관련된 유전자 분석을 수행하여 두 가지 이식용 배지가 배아에 미치는 영향에 대해 더 깊게 연구할 예정이다. 배아 이식용 배지에 대한 연구 자체는 활발하지는 않지만 주로 사람과 마우스에서 이루어졌는데, 특히 hyaluronic acid라는 물질의 이식용 배지 내 첨가에 대한 내용이 대부분이며, 이 물질이 임신율 및 산자 생산율을 개선시킨다는 결론이 내려졌다. 이를 토대로 이식용 배지 및 체외배양 시 배지에 hyaluronic acid를 첨가하여 체외 발달율 개선에 대한

연구를 진행할 예정이다.

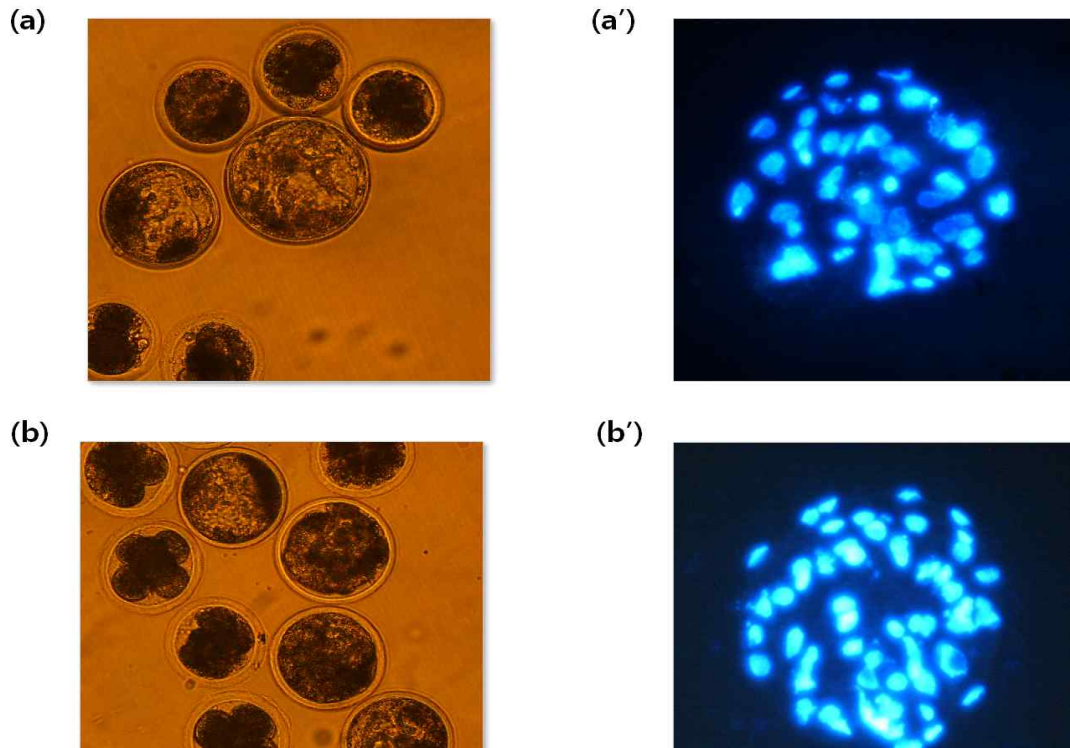


그림 32 TALP와 HEPES-buffered PZM-5 (PZM+H)로 loading한 그룹에서의 배반포 형성 모습. (a, a') TALP, (b, b') PZM+H로 loading된 그룹에서의 배반포 형성 및 bisbenzimidazole로 염색된 배반포.

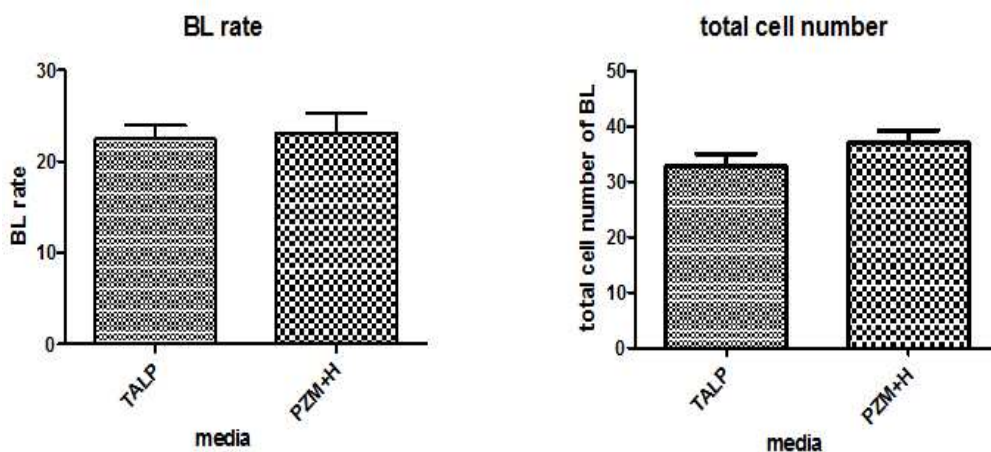


그림 33 TALP와 HEPES-buffered PZM-5(PZM+H)로 loading한 그룹에서의 배반포 발달률 (BL rate) 및 배반포 내 총 세포수의 비교 (total cell number).

표 11 두 그룹에서의 배반포 발달률 (BL rate) 및 배반포 내 총 세포수 (total cell number).

	TALP	PZM+H
BL rate (%)	22.46 ± 1.47	23.17 ± 2.13
Total cell number	32.9 ± 2.22	37.09 ± 2.18

## 바. 체세포 핵이식 복제 돼지 생산 효율 향상을 위한 대리모 선발조건 및 이식 시스템 확립

### (1) 연구방법

#### (가) 전신마취를 통한 대리모의 수술 방법

- ① 발정이 동기화된 대리모를 농장에서부터 공급받는다. 대리모에 1 mg/kg의 케타민과 0.5 mg/kg의 자일라진 합제를 돼지의 이경맥으로 투여하여 전마취를 유도한다. 합제를 투여하고 잠시 기다린 후 쓰러져 의식이 없는 돼지를 수술대로 옮긴다. 수술대에 옮긴 후 아이소플루란을 이용하여 전신마취를 유지하도록 한다.
- ② 수술부위를 비누를 이용하여 깨끗하게 씻어준 다음, 면도기를 이용하여 수술부위의 털을 깔끔하게 제거해준다. 포비돈, 알코올, 포비돈, 알코올, 포비돈 순으로 수술부위를 소독해준 다음, 완전한 멸균상태를 유지한 채 수술을 진행한다.
- ③ 하복부의 중간 부위를 정중 절개한 후 자궁을 견인한다. 난관과 난소의 상태를 눈으로 확인하고 형질전환 복제수정란을 난관 내로 이식한다. 이때 straw loading 법 또는 tomcat catheter를 이용하는 방법 등 2 가지 방법 중 하나의 방법으로 이식을 진행한다. Straw loading 법은 난관의 난소 쪽 opening을 통해서 형질전환 복제수정란이 미리 loading되어 있는 straw를 깊이 넣은 후 난자를 대리모에 이식하는 방법이다. 이 방법은 학교에서 출발하기 전 모든 준비를 완료할 수 있기 때문에 농장에 형질전환 복제수정란을 따로 loading 하기 위한 장비가 필요 없다는 장점이 있는 반면, 시술에 사용되는 straw가 너무 단단하고 단면이 날카롭고 또한 straw를 깊이 넣어주어야하기 때문에 대리모의 난관 벽을 많이 손상시킨다는 단점이 있다. Tomcat catheter를 이용하는 방법은 난관에 직접 날카로운 바늘로 구멍을 낸 후 형질전환 복제수정란이 loading되어 있는 catheter를 넣은 후 난자를 대리모에 이식하는 방법이다. 이 방법은 catheter가 부드러운 대신 이 catheter에는 수정란이 미리 loading되어 운반될 수 없기 때문에 농장에 형질전환 복제 수정란을 따로 loading 하기 위한 장비가 필요하다는 단점이 있다. 하지만, catheter가 난관에 깊이 삽입되지 않고, 난관에 작은 구멍 하나 정도의 손상이 주어지는 것이기 때문에 난관의 손상을 최소화할 수 있다는 장점이 있다.
- ④ 이렇게 형질전환 복제수정란의 이식이 끝난 돼지는 자궁을 환납하고 열상을 봉합한다. 봉합이 완료된 대리모는 환부를 베타딘으로 소독해준 다음, 수술 후 대기실로 옮

긴 후 술 후 케어를 한다. 또한 수술 후 발생할 수 있는 여러 가지 감염에 대비하여 광범위 항생제를 투여한다. 마취가 완전히 깨고, 기력을 회복하면 본래 거주하던 임신사로 옮겨져 개별 관리에 들어간다.

(2) 연구결과

(가) 대리모의 발정시간과 체세포 핵이식을 통한 복제수정란 생산 시간의 간격이 초기 착상률에 미치는 영향

① 이식에 사용될 대리모는 농장에서 자연적으로 발정이 오는 대리모 중 화요일 오후에 발정이 온 대리모와 수요일 오전에 발정이 온 대리모를 사용하여 이식을 진행하였다. 특별한 경우가 없을 경우 화요일 발정이 온 대리모에 수요일 제작한 배아를 이식하였고, 수요일 발정이 온 대리모에는 목요일 제작한 배아를 이식하였다. 총 이식 두수 중 초기임신이 확인이 된 개체의 비율을 살펴보면 아래의 표와 같다.

표 12 대리모 총 19두에서 체세포 핵이식 난자 제작의 시간적 차이에 따른 초기임신을 연구

	수 오전 SCNT	목 오전 SCNT
화 오후 발정 대리모	7 (36.8) <sup>1</sup>	0
수 오전 발정 대리모	1 (5.3) <sup>2</sup>	11 (57.9) <sup>3</sup>

<sup>1</sup> 임신한 대리모수(7마리)/총대리모수(19마리)의 백분율  
<sup>2</sup> 임신한 대리모수(1마리)/총대리모수(19마리)의 백분율  
<sup>3</sup> 임신한 대리모수(11마리)/총대리모수(19마리)의 백분율

② 결과적으로 화요일 오후에 발정이 온 대리모에 이식했던 모든 경우에는 분만을 통해 산자를 얻을 수 없었다. 하지만 목요일 오전 작성된 배아를 이식한 수요일 오전 발정 대리모에서는 2마리의 대리모가 분만까지 이를 수 있었다. 수요일 오전에 작성된 배아를 수요일 오전 발정 대리모에 이식한 1 경우는 예외적인 경우로 딱 한번 진행이 된 사항이었는데 임신이 이루어졌고, 분만까지 진행이 되었다. 예외적인 경우를 제외하면, 대리모의 발정 발견 시간과 체세포 핵이식 복제수정란의 제작 시간이 24시간 차이가 있을 경우 초기 착상률이 높고, 임신도 유지가 됨을 발견할 수 있었다.

(나) Progesterone 농도와 임신과 출산과의 상관관계

① 농장에서 발정의 발견은 수많은 암퇘지 중에서 발정 징후를 보이는 암컷을 농장 관리자가 육안적으로 확인하는 상태를 일컫는다. 하지만 이에 대한 정확한 판단 기준이 필요하였고, 그러한 판단의 기준이 될 수 있는 지표로 progesterone의 혈 중 농도를 선택하였다. 따라서 이식 실험이 진행되는 당시 전신마취가 이루어진 돼지를 상대로 jugular vein을 통해서 전혈을 채혈하였다. 임신 실패, 착상 성공, 그리고 분만까지 이루어진 모든 돼지를 상대로 progesterone의 농도를 비교하여 평균을 얻었다.

그 결과는 아래의 그림 또는 표와 같다. 농장에서 발정의 발견은 수많은 암퇘지 중에서 발정 징후를 보이는 암컷을 농장 관리자가 육안적으로 확인하는 상태를 일컫는다. 하지만 이에 대한 정확한 판단 기준이 필요하였고, 그러한 판단의 기준이 될 수 있는 지표로 progesterone의 혈 중 농도를 선택하였다. 따라서 이식 실험이 진행되는 당시 전신마취가 이루어진 돼지를 상대로 jugular vein을 통해서 전혈을 채혈하였다. 임신 실패, 착상 성공, 그리고 분만까지 이루어진 모든 돼지를 상대로 progesterone의 농도를 비교하여 평균을 얻었다. 그 결과는 아래의 그림 또는 표와 같다.

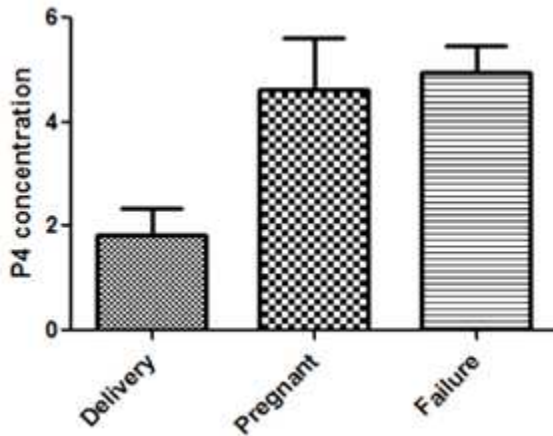


그림 34 분만/초기임신(유산)/임신 실패를 기준으로 한 progesterone 농도

표 13 Progesterone 농도를 기준으로 한 분만/유산/임신 실패의 상관관계

P4 conc.	분만	유산	임신 실패	총 이식두수
≤ 0.5	0	0	4 (100)	4
0.5 ~ 3	5 (14.7)	8 (23.5)	21 (61.8)	34
3 ~ 6	1 (4.0)	5 (20.0)	19 (76.0)	25
≥ 6	0	4 (18.2)	18 (81.8)	22

② 결과적으로 분만까지 진행된 이식 시 대리모의 평균 progesterone의 농도는  $1.835 \pm 0.457$ 였다. 또한 progesterone의 농도를 기준으로 보았을 때, 농도가 0.5~3 ng/ml 일 때 초기임신과 분만 효율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

#### 사. AD 형질전환 세포를 이용한 복제수정란 생산과 검증 및 수정란이식

##### (1) 연구방법

(가) 체세포 핵이식기법을 이용한 AD 복제수정란 생산

- ① 1협동으로부터 hAPP 유전자가 삽입된 세포를 이용하여, 형질전환복제수정란을 생산하는 과정은 다음과 같다. 리포터 유전자인 GFP가 발현되어지는 세포가 hAPP가 발현되는 세포임이 기 검증된 결과를 바탕으로, 복제수정란을 작성한다.
- ② 앞서 기술한 바와 같이 체외성숙과정을 통해 성숙된 돼지난자를 획득한다. 성숙된 돼지 난자는 앞서 기술한 바와 같이 탈핵과정을 통해 핵을 제거한다. 이후 GFP 가 발현되어지는 세포를 선택적으로 골라 탈핵된 난자의 위란강으로 세포를 주입하고, 전기융합, 화학적 활성화 과정을 통해 복제수정란을 성공적으로 구축한다.
- ③ 재구축된 복제수정란은 GFP의 지속적인 발현과 배반포의 형성 그리고 복제수정란에서 GFP, hAPP, porcine APP 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 8일 동안 미네랄 오일 (mineral oil)로 도포된 25 uL의 PZM-5 미세소적 (microdrops)내에서 각각 배양한다.

(나) AD 복제수정란 생산 및 유전자 발현 검증 및 대리모 내 복제수정란 이식

- ① 8일 동안 배양과정에서 생산되어진 복제수정란의 분할률, 배반포 형성률을 현미경 하에서 관찰한다. 이와 동시에 발달시 GFP 의 지속적인 발현 유무를 통해 형질전환 복제수정란의 완벽한 구축을 검증한다.
- ② 수정란 검증을 위하여, GFP 발현 (hAPP 도입) 복제수정란, 일반지방줄기세포이용 복제수정란으로부터 genomic DNA를 추출한다. 추출한 gDNA는 PCR reaction을 통해 GFP, hAPP, porcine endogenous APP의 발현 여부를 분석한다.
- ③ 체외검증이 완료된 AD 형질전환체세포를 이용한 형질전환복제수정란의 대리모 난관 내 이식을 실시한다. 대리모는 자연발정이 온 대리모로 이식할 수정란과의 발정 주기를 동기화하여 수술적인 방법으로 이식하고, 임신여부를 재발정 관찰법과 초음파진단기로 모니터링 한다.

(2) 연구결과

(가) 체세포 핵이식기법을 이용한 AD 복제수정란 생산 및 검증

- ① 자외선 아래에서 초록형광단백질(GFP)을 발현하는 세포만 사용하여 체세포 핵이식을 실시하였다. 체외 발달을 관찰하기 위해 형질전환된 복제수정란 (TG), 형질전환되지 않은 복제수정란 (Non-TG)를 각각 PZM-5 미세소적에 넣고 38 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>의 조건하에서 8일간 배양하였다. 체외에서의 배아 발달률은 아래표와 같다.

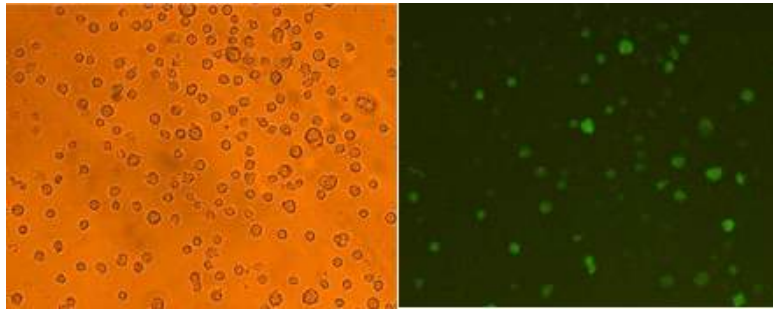


그림 35 자외선 아래에서 초록형광단백질(GFP)을 발현하는 hAPP가 발현되는 공여세포들

표 14 AD 형질전환 세포로 생산된 복제수정란의 체외발달 효율

MSC	Total IVC	2 cells	%	16 cells	%	BL	%
Non-TG	244	209	85.66	131	53.69	19	7.79
TG	254	236	92.91	120	47.24	18	7.09

② 복제수정란 두 그룹의 발달률은 유의한 차이가 없었다. 형질전환 된 복제수정란과 형질전환 되지 않은 복제수정란의 발달률은 2세포기(92.91 vs. 85.66%), 16세포기(47.24 vs. 53.69%), 배반포 (7.09 vs. 7.79%)에서 유사하였다. 형질전환 된 세포에서 유래한 GFP는 형질전환 되지 않은 복제수정란에서는 관찰되지 않은 반면, 형질전환 된 복제수정란에서는 아래 그림과 같이 GFP가 관찰 되었다.

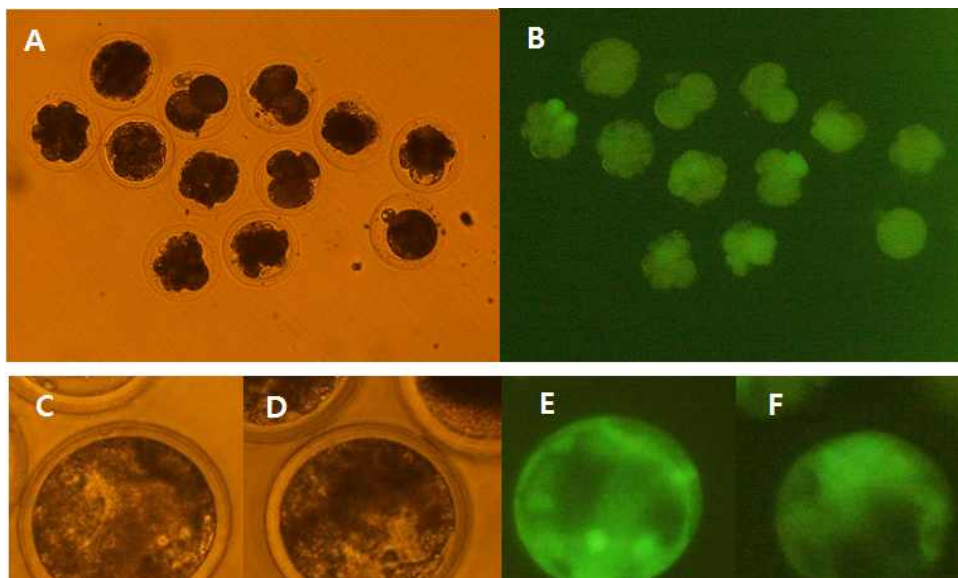


그림 36 형질전환 된 복제수정란의 사진. (A) 일반현미경하에서 관찰한 형질전환복제수정란 사진. (B) 자외선 하에서 GFP가 발현하는 형질전환복제수정란 사진. (C, D) 8일째 형성된 형질전환복제 배반포의 일반광하에서의 사진. (E, F) 8일째 형성된 형질전환복제 배반포의 자외선 하에서 GFP가 발현하는 사진.

(나) AD 복제수정란 생산 및 유전자 발현 검증 및 대리모 내 복제수정란 이식

- ① 형질전환 된 복제수정란 (TG), 형질전환되지 않은 복제수정란 (Non-TG)의 genomic DNA를 추출하여 외래유전자가 삽입되었는지를 조사하였다. 결과 marker 유전자인 GFP 유전자는 Non-TG에서는 검출이 되지 않았으나 TG에서는 유전자가 검출된 결과를 보여주었다. 또한 돼지에서 발견되는 porcine APP(pAPP) 유전자과 유전자조작을 통해 삽입된 mutant human APP(hAPP)의 발현유무를 조사하였다.
- ② 결과 pAPP 유전자는 Non-TG 수정란과 TG 수정란에서 모두 발현되어지는 반면, hAPP 유전자는 TG 수정란에서만 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 현재 연구에서 생산되어진 GFP 가 발현되는 형질전환세포를 이용한 복제수정란은 hAPP 가 발현되고 있음을 확인하였으며, 이렇게 생산되어진 수정란의 이식은 AD 모델 돼지의 생산 가능성을 보여주는 결과이다.

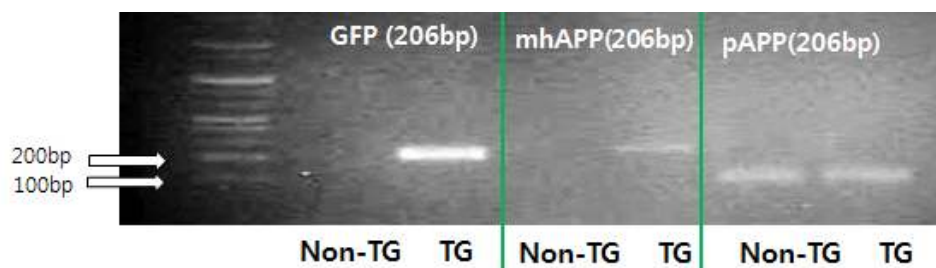


그림 37 GFP 발현 공여세포를 이용하여 생산된 형질전환 복제수정란의 hAPP 발현 검증.

- ③ 따라서 본 연구팀은 2차년도 AD 모델 돼지 생산 연구를 1차 년도에 앞서 진행하였다. 암컷 형질전환 지방줄기세포주를 이용해 생산된 복제수정란을 7마리의 대리모에 이식하였고, 수컷 형질전환 지방줄기세포주를 이용하여 생산된 복제수정란을 5마리의 대리모에 이식하였다. 또한 대조군으로 형질전환 되지 않은 지방줄기세포주를 이용한 복제수정란을 7마리의 대리모에 이식하였다. 결과 대조군에서는 임신이 확인되지 않았으나, 현재 암컷 형질전환 지방줄기세포주를 이용하여 생산된 복제수정란이 이식된 대리모 중 한 마리에서 임신이 확인되었다. 분만시 유전자 검사를 통해 hAPP 유전자가 삽입되었는지 여부를 확인하여 AD 모델 돼지 생산을 검증 하고자 한다.



표 15 체세포 핵이식을 이용하여 생산된 복제수정란의 대리모의 난관 내 이식

Recipient			SCNT		Pregnancy
ID	Estrus	No. CL	donor cell	No. embryos	
A	수 오전	5	female 미니피그/MSC	103	No
B	수 오전	6	female 미니피그/MSC	168	No
C	수 오전	4	female 미니피그/MSC	178	No
D	수 오전	10	female 미니피그/MSC	92	No
E	수 오전	11	female 미니피그/MSC	166	No
F	화 오후	0	female 미니피그/MSC	150	No
G	수 오전	5, 7	male 미니피그/MSC	158	No
H	수 오후	9, 3	female Syn-mAPP-GFP	120	No
I	수 오전	5, 6	female Syn-mAPP-GFP	150	No
J	수 오전	5	female Syn-mAPP-GFP	203	No
K	수	미배란	female Syn-mAPP-GFP	162	No
L	수 오전	6	female Syn-mAPP-GFP	198	No
M	월 저녁	10 (미배란)	female Syn-mAPP-GFP	229	No
N	화 오후	6	female Syn-mAPP-GFP	155	YES
O	수 오전	6	male Syn-mAPP-GFP	213	No
P	화 오후	8	male Syn-mAPP-GFP	212	No
Q	화 오후	6	male Syn-mAPP-GFP	230	No
R	수 오전	5	male Syn-mAPP-GFP	154	YES
S	화 오후	9	male Syn-mAPP-GFP	230	No

#### 4. AD 모델 생산 위한 hAPP 유전자 조절 형질전환 미니돼지 생산

##### 가. hAPP 뇌신경세포 특이적 과발현 복제수정란 생산

###### (1) 연구방법

###### (가) 체세포핵이식기법을 이용한 AD 복제수정란 생산

- ① 도축장으로부터 돼지 난소를 28-31°C의 생리식염수에 담아 실험실로 운반하여, 직경이 3-6mm가 되는 난포로부터 18-gauge 바늘이 장착된 10ml 주사기를 이용하여 난구세포-난자복합체 (cumulus-oocyte complex, COC)를 회수한다. 난구세포로 난자

의 투명대 외벽이 여러 겹으로 쌓여있고, 난자의 세포질이 균일한 상태의 COC를 선택하여 체외성숙배양액에서 5% 이산화탄소의 39°C 배양기에서 40시간동안 체외성숙을 유도한다. Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제 (hyaluronidase)에 침지한 후, 미세 유리피펫을 이용, 반복 피펫팅 (pipetting)하여, 체외 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫으로 고정하고, 5 ug/mL 비즈벤지마이드 (bisbenzimidazole) (Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 보충된 TALP 배지 내에서 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)로 탈핵한다. 비즈벤지마이드로 염색된 제1극체 및 중기-II 염색체를 흡입 피펫 (aspiration pipette)을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 Porcine zygote media (PZM)-5에 두고 계속하여 체세포핵이식에 사용한다.

② 1차년도에 확립된 돼지의 뇌신경에서만 특이적으로 human mutation amyloid precursor protein (hAPP) 유전자가 발현되는 세포를 이용하여, 형질전환복제수정란을 생산하는 과정은 다음과 같다. 체세포 핵 이식을 위하여 hAPP 세포들을 해동하고, 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양한 후 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵 공여세포로 이용한다. 기년도의 검증된 결과를 바탕으로 리포터 유전자인 GFP가 발현되는 세포가 hAPP가 발현되는 세포임을 이용하여 복제수정란을 작성한다.

③ 앞서 준비되어진 탈핵 난자의 위란강 (perivitelline) 공간으로 단일의 GFP가 발현되는 공여세포를 주입한다. 상기 결합체 (couplets)를 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM HEPES를 포함하는 융합 배지에 침전시키고, 바늘 형의 전극을 사용하여 융합시킨다. 단일 세포-난자 결합체를 미세조작기 (Nikon-Narishige, Tokyo, Japan)에 부착되어 있는 2개의 마주보는 전극 사이에 놓는다. 난자 세포질체 및 핵 공여세포 사이의 접촉면을 전극과 평행하게 놓고, Electro-Cell Fusion apparatus (NEPA GENE Co., Chiba, Japan)로 전기 자극을 준다. 1.2 Kv/cm의 직류전압으로 한번의 30 μs 지속시간으로 가하며, 전기자극 30분 후에 핵 공여세포와 난자세포질체의 융합을 실험현미경 하에서 관찰한다. 융합된 수정란만을 선별하여 0.26 M 만니톨, 0.5 mM HEPES, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>가 첨가된 활성배지가 담긴 chamber에 넣고 전극을 연결한 후, BTX electro-cell Manipulator 2001기계를 이용하여 1.5 kv/cm의 직류전압으로 한번의 60 μs의 지속시간으로 전류를 가하여 활성화시킨다. 미네랄 오일 (mineral oil)로 도포된 20 uL의 PZM-5 미세소적 (microdrops) 내에서 수정란을 5-6개씩 배양한다.

④ 발정이 동기화된 대리모를 농장으로부터 공급받는다. 대리모에 1 mg/kg의 케타민과 0.5 mg/kg의 자일라진 합제를 돼지의 이경맥으로 투여하여 전마취를 유도한다. 합제를 투여하고 잠시 기다린 후 쓰러져 의식이 없는 돼지를 수술대로 옮긴다. 수술대에 옮긴 후 아이소플루란을 이용하여 전신마취를 유지하도록 한다. 수술부위를 비누를 이용하여 깨끗하게 씻어준 다음, 면도기를 이용하여 수술부위의 털을 깔끔하게 제거해준다. 포비돈, 알코올, 포비돈, 알코올, 포비돈 순으로 수술부위를 소독해준 다음, 완전한 멸균상태를 유지한 채 수술을 진행한다. 먼저 하복부의 중간 부위를 정중절개한 후 자궁을 견인한다. 난관과 난소의 상태를 눈으로 확인하고 형질전환 복제

수정란을 난관 내로 이식한다. 이때 straw loading 법 또는 tomcat catheter를 이용하는 방법 등 2 가지 방법 중 하나의 방법으로 이식을 진행한다. Straw loading 법은 난관의 난소 쪽 opening을 통해서 형질전환 복제수정란이 미리 loading되어 있는 straw를 깊이 넣은 후 난자를 대리모에 이식하는 방법이다. 이 방법은 학교에서 출발하기 전 모든 준비를 완료할 수 있기 때문에 농장에 형질전환 복제수정란을 따로 loading 하기 위한 장비가 필요 없다는 장점이 있는 반면, 시술에 사용되는 straw가 너무 단단하고 단면이 날카롭고 또한 straw를 깊이 넣어주어야 하기 때문에 대리모의 난관 벽을 많이 손상시킨다는 단점이 있다. Tomcat catheter를 이용하는 방법은 난관에 직접 날카로운 바늘로 구멍을 낸 후 형질전환 복제수정란이 loading되어 있는 catheter를 넣은 후 난자를 대리모에 이식하는 방법이다. 이 방법은 catheter가 부드러운 대신 이 catheter에는 수정란이 미리 loading되어 운반될 수 없기 때문에 농장에 형질전환 복제 수정란을 따로 loading 하기 위한 장비가 필요하다는 단점이 있다. 하지만, catheter가 난관에 깊이 삽입되지 않고, 난관에도 작은 구멍 하나 정도의 손상이 주어지는 것이기 때문에 난관의 손상을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 이렇게 형질전환 복제수정란의 이식이 끝난 돼지는 자궁을 환납하고 열상을 봉합한다. 봉합이 완료된 대리모는 환부를 베타딘으로 소독해준 다음, 수술 후 대기실로 옮긴 후 술후 케어를 한다. 또한 수술 후 발생할 수 있는 여러 가지 감염에 대비하여 광범위 항생제를 투여한다. 마취가 완전히 깨고, 기력을 회복하면 본래 거주하던 임신사로 옮겨져 개별 관리에 들어간다. 분만예정일에 제왕절개를 통해서 복제돼지를 분만한다.

## (2) 연구결과

### (가) hAPP 뇌신경세포 특이적 과발현 복제수정란 생산

- ① 체외성숙 난자의 핵을 제거하고, 형질전환된 hAPP 과발현 세포를 주입하여 복제수정란을 생산하였다. hAPP 과발현 세포는 GFP 마커도 함께 도입되어, 생산된 복제수정란 역시 그림과 같이 GFP 를 발현하였다. 또한 수정란에서 GFP와 hAPP가 genomic DNA 내로 도입된 것을 PCR을 통해 확인하였다.

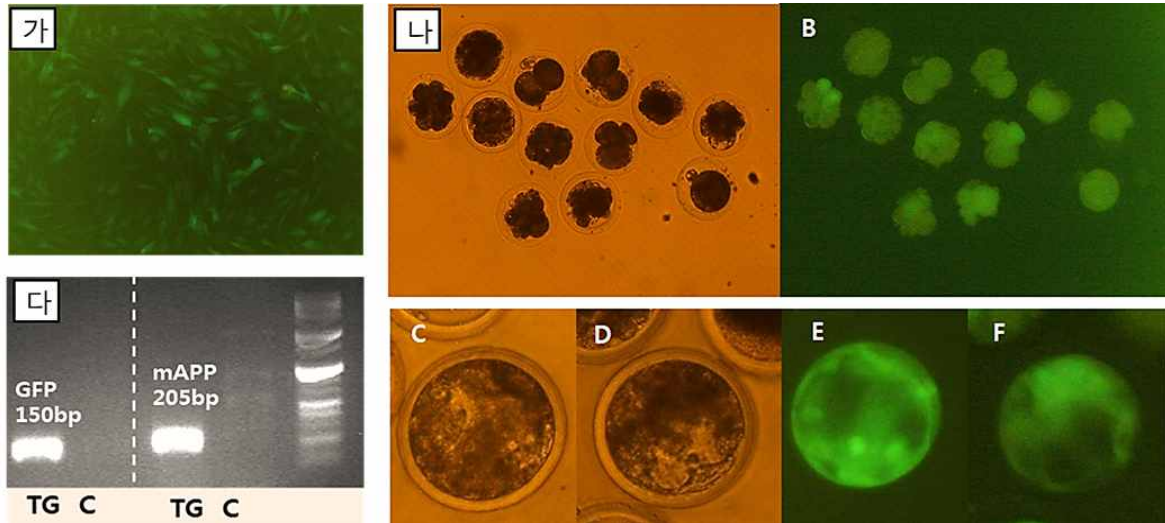


그림 38 hAPP 뇌신경세포 특이적 과발현 복제수정란생산에 관한 그림. (가) 렌티바이러스 벡터를 이용해 hAPP와 GFP 유전자를 도입시켜 GFP 발현이 확인된 미니돼지 지방유래줄기세포. (나) hAPP 세포의 체세포핵이식을 통해 생산된 복제수정란의 GFP 유전자 발현. (다) PCR을 통한 복제 수정란에서 hAPP와 GFP 유전자의 존재 검증 (TG; hAPP 세포를 이용해 제작한 복제 수정란, C; 정상 미니돼지 지방유래줄기세포를 이용해 제작한 복제 수정란).

## 나. APP 뇌신경세포 특이적 과발현 미니돼지 생산

### (1) 연구방법

- ① 형질전환 돼지의 DNA 추출 및 PCR 분석; 생산된 복제 돼지의 hAPP 유전자의 genome에 삽입 여부를 검증하기 위하여, hAPP가 삽입전인 공여세포 (negative control), 복제된 돼지 및 plasmid vector(positive control)를 이용하여 유전자 검사를 수행한다. 태어난 개체의 혈액이나 꼬리로부터 조직 단편과 체세포 공여세포로부터 Genomic DNA를 분리한다. 추출된 DNA에서 hmtDNA 삽입여부를 분석하기 위하여 벡터내 마커인 GFP와 hAPP를 증폭하기 위한 프라이머를 각각 제작한다. 제작된 프라이머들을 이용해 분리된 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 분석을 실시한다. 증폭된 PCR 산물을 전기영동 하여 분리한 후 이에 대한 염기서열 분석을 자동화 DNA 서열 분석기를 이용하여 실시한다. 태어난 복제돼지의 genomic DNA 내에 외래에서 도입시킨 hAPP가 도입되었는지 여부를 판정한다.
- ② 형질전환 돼지의 목적유전자 삽입 검증을 위한 southern blot 분석; 목적유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 Southern blot의 방법을 이용하여 수행하였다. GFP, hAPP 유전자의 합성에 대한 프라이머는 목적 유전자를 구성하고 있는 벡터의 서열을 근거로 하여 실험을 수행하였다. 713개의 염기서열을 지닌 프루브를 PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 합성하고 전기영동 장치에 의해 정제하였다. 양전하를 띠는 나일론 필터에 DNA 절편을 옮겨서 DNA 탐침과 혼성화되는지의 여부를 DIG luminescent detection kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 확인한다.

(2) 연구결과

(가) APP 뇌신경세포 특이적 과발현 복제 수정란 이식 및 복제 돼지 생산

① AD 복제수정란을 발정 동기화된 대리모에 이식하여 수정란 이식 후 114일째 제왕 절개를 통하여 3마리의 복제돼지를 생산하였다. 162개의 복제수정란 중 3개가 분만 까지 유지되어 3마리의 복제돼지가 분만되었다. 3마리의 돼지 중 1마리는 생후 1일째 사망하였으며, 다른 한 마리는 생후 10일경 폐사하였다. 나머지 한 마리는 건강하게 생존 중이며 보고서 작성일자 기준 현재 9개월령이다.

표 16 체세포핵이식을 통해 생산된 3마리의 복제돼지 현황

Recipient	Donor cell	No. Pregnancy	Clone ID	Transgene	Status	
A	female Syn-mAPP-GFP	162	YES	ADF1	GFP,hAPP	Live
				ADF2	GFP,hAPP	Dead at 1 day
				ADF3	GFP,hAPP	Dead at 10 days

(나) PCR을 통한 APP 형질전환 복제돼지 유전자 검증

① 형질전환 복제돼지의 꼬리조직에서 유전자를 채취하여 목적유전자의 삽입 여부를 PCR을 통해 검증하였다. 아래 그림에서 보듯이 본 과제에서 생산된 APP 형질전환 돼지 3마리 (ADF 1, 2, 3) 모두의 genomic DNA에 hAPP 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다. 또한 마커 유전자인 GFP의 유전자 역시 삽입된 것이 함께 검증되었다.



그림 39 형질전환돼지 ADF 1, 2, 3의 PCR을 통한 hAPP 및 GFP 유전자의 삽입 검증. P; positive control로 형질전환에 사용한 플라스미드 벡터 DNA, N; negative control로 형질전환유도를 위해 이용된 미니돼지지방줄기세포. 1, 2, 3; 형질전환돼지 ADF 1, 2, 3의 genomic DNA.

(다) Southern blot 기법을 이용한 형질전환체의 분석

- ① 형질전환 복제체 3마리의 genome에 외래에서 인위적으로 도입시킨 벡터가 안정적으로 삽입되었는지 여부를 southern blot 기법을 이용하여 재검증하였다.

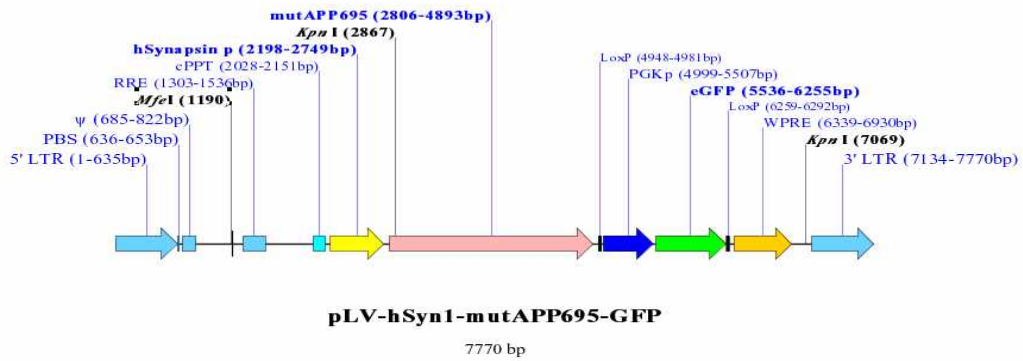


그림 40 hAPP 과발현 형질전환 복제체 생산에 이용된 렌티바이러스 벡터.

- ② 위의 벡터로 형질전환이 유도된 미니돼지 지방줄기세포를 이용하여 생산된 복제체 3마리의 southern blot 분석은 마커 유전자로 도입된 EGFP를 증명하기 위한 EGFP probe와 AD 질환 유도를 위해 삽입된 hAPP probe를 각각 이용하여 이루어졌다.

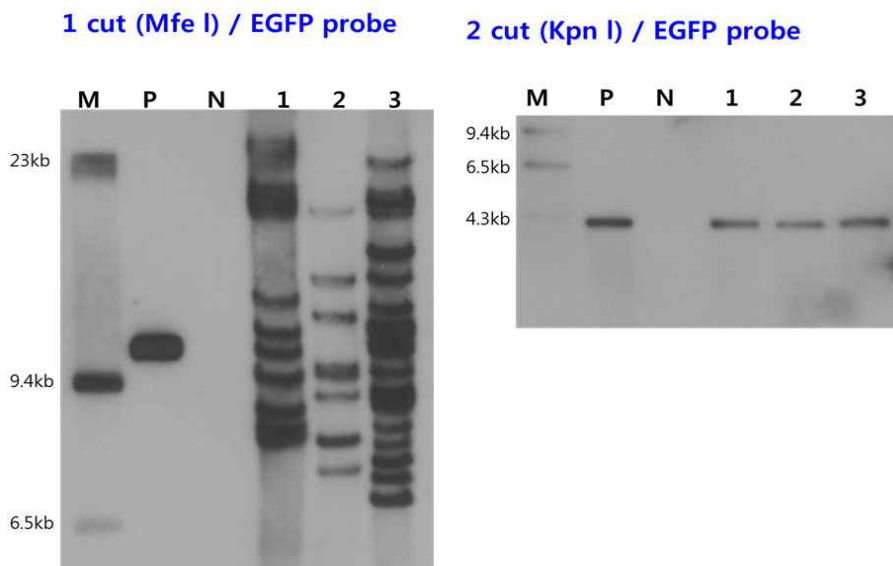


그림 41 southern blot 기법을 이용한 hAPP 형질전환 복제체의 EGFP 삽입 유무 검증. (좌) 형질전환 돼지 3마리의 genome 내에 최소 7copy 이상이 integration된 결과. (우) 형질전환 돼지의 genome 내에 EGFP가 insertion된 결과.

- ③ 다음으로 3마리의 형질전환복제체의 genome 내에 목적 유전자인 hAPP가 안정적으로 삽입되었는지를 검증하였다. 마커 유전자인 EGFP와 동일하게 최소 7copy 이

상이 integration된 결과를 보여주었다.

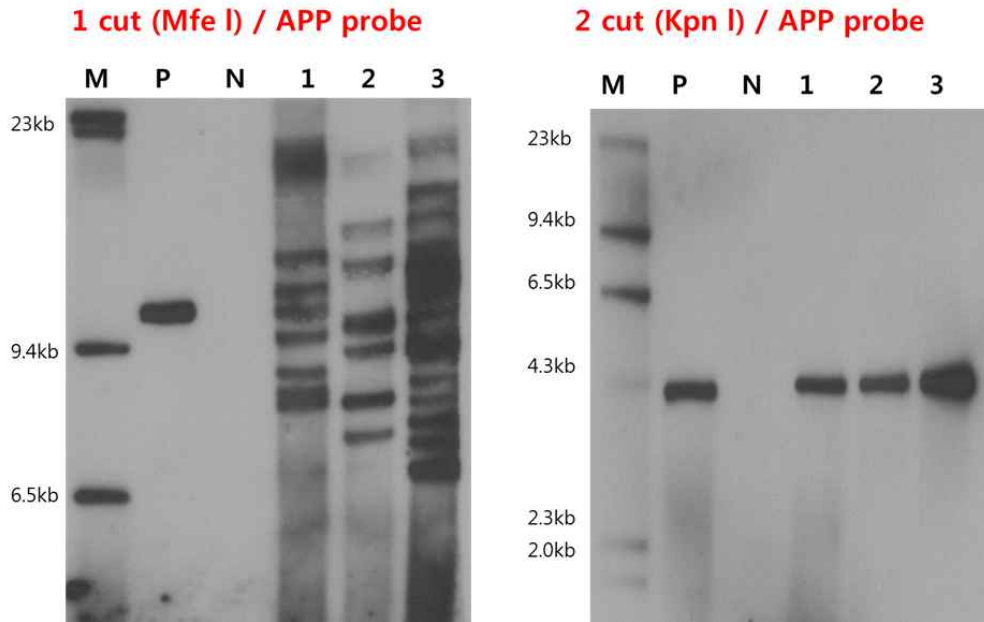
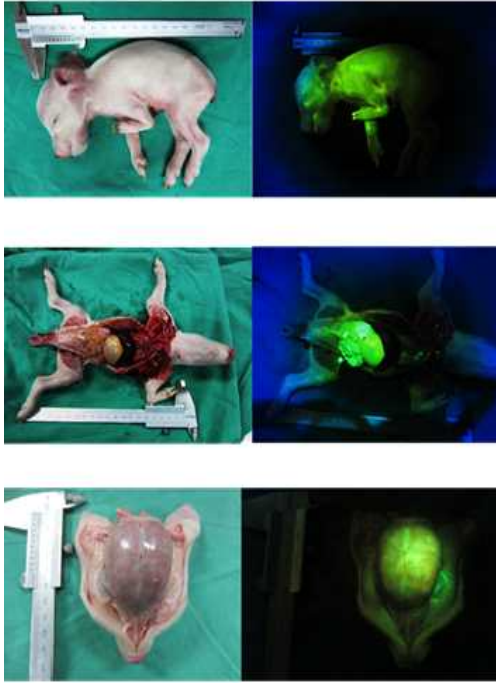


그림 42 southern blot 기법을 이용한 hAPP 형질전환 복제돼지의 hAPP 삽입 유무 검증. (좌) 형질전환 돼지 3마리의 genome 내에 최소 7copy 이상이 integration된 결과. (우) 형질전환돼지의 genome 내에 hAPP가 insertion된 결과.

(다) 생후 폐사한 형질전환 복제돼지의 GFP 발현 검증

- ① 생산된 3마리의 돼지 중 생후 1일째 폐사한 ADF 2와 생후 10일경 폐사한 ADF 3의 부검과정에서 전신 장기에서 GFP가 발현하는 지를 UV를 조사하여 검증하였다. 아래 그림과 같이, 2마리 돼지의 전신 장기에서 GFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- ② PCR 및 southern blot 분석 결과와 더불어 마커인 GFP가 안정적으로 발현되는 것으로 미루어 볼 때, 본 연구에서 생산된 돼지는 목적유전자인 hAPP 유전자 역시 안정적으로 발현될 것이다. 현재 생존중인 ADF 1의 지속적인 모니터링을 통해 향후 행동적인 부분이나 병태학적인 부분에서의 이상징후를 지속적으로 관찰할 계획이다.

## ADF 2



## ADF 3



그림 43 APP 형질전환 복제 미니돼지의 전신 장기에서의 GFP 발현 유무 검증.

### 다. APP 뇌신경세포 특이적 과발현 복제돼지유래 세포주 이용 재복제돼지 생산

#### (1) 연구방법

- ① APP 발현 재복제돼지 수정란 생산 및 이식; hAPP 형질전환 미니돼지로부터 확립한 섬유아세포를 공여세포로 하여 체세포 핵이식을 수행한다. 1-2 일간 체외배양된 배아 중 양호한 것을 선별하여 TALP 배지 1ml과 함께 1.5 ml tube에 넣은 후, 포터블 인큐베이터에 옮겨 대리모가 준비된 농장으로 이동한다. 대리모의 자궁에 배아를 이식하는 방법은 위와 동일하다.
- ② APP 발현 재복제돼지의 생산 및 유전자 검증; 대리모에 배아를 이식하고 114일이 되는 날 즉, 분만예정일에 제왕절개를 통해서 살아있는 재복제돼지를 얻는다. 이렇게 생산된 돼지의 꼬리 끝부분 0.5cm 정도를 지혈검자로 잡고 도려낸 후, 그 부위를 소독하고 봉합해준다. 도려낸 조직은 유전자 검증을 위해 DNA추출에 이용한다. 추출한 DNA를 이용한 PCR과 Southern blot 방법을 통해 genomic DNA 상의 유전자 존재를 입증한다.

#### (2) 연구결과

##### (가) hAPP 발현 재복제돼지 수정란 생산 및 이식



① 확립된 ADF 3 섬유아세포주를 이용하여 hAPP 재복제돼지 생산을 위한 체세포 핵이식을 수행하고, 이렇게 제작된 복제 수정란을 대리모에 이식하였다. 12번의 대리모 이식을 통해 3마리의 대리모에서 초기 임신을 확인하였다.

표 17 hAPP 형질전환 재복제돼지 이식 및 임신 현황

ID	Donor cell	Pregnancy
A	ADF3	fail
B	ADF3	fail
C	ADF3	fail
D	ADF3	fail
E	ADF3	fail
F	ADF3	success
G	ADF3	fail
H	ADF3	fail
I	ADF3	fail
J	ADF3	success
K	ADF3	fail
L	ADF3	success
M	ADF1	abortion

(나) hAPP 발현 재복제돼지의 생산 및 유전자 검증

① 초기 임신이 확인된 3마리의 대리모 중, 2마리는 유산되었고 나머지 1마리에서만 살아있는 상태의 hAPP 발현 재복제돼지 2마리를 제왕절개를 통해 얻을 수 있었다. 이 2마리를 출생 순서대로 ADF 4, ADF 5로 명명하였으나 (아래그림), ADF 5는 생후 4일 쯤에, ADF 4는 생후 7일 쯤에 폐사하였다. 폐사한 2마리의 재복제돼지 및 생후 3일 쯤에 폐사한 일반 미니돼지로부터 전신 장기 및 피부조직을 회수하여, 그 중 폐 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다. ADF 1, 2, 3에서의 유전자 삽입 검증 방법과 마찬가지로 PCR을 실행하여 마커 유전자인 GFP와 목적 유전자인 hAPP의 존재를 확인할 수 있었다.



그림 44 hAPP 미니돼지 재복제돼지 2마리의 출생 직후 모습. (좌) ADF 4, (우) ADF 5.

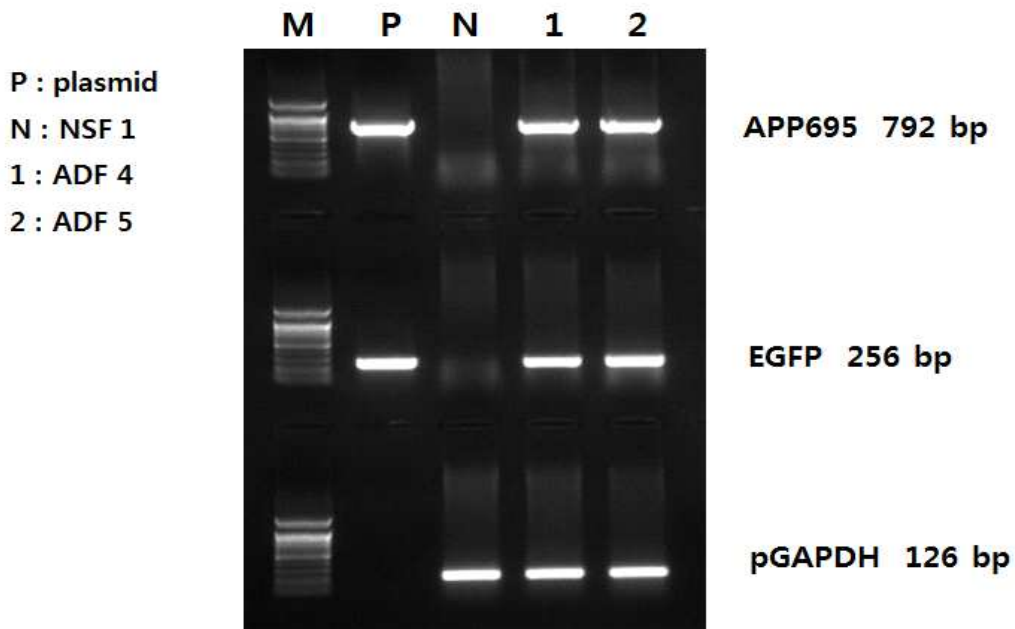


그림 45 형질전환 재복제돼지 ADF 4, 5의 PCR을 통한 hAPP 및 GFP 유전자의 삽입 검증. P; positive control 로 형질전환에 사용한 플라스미드 벡터 DNA. N; negative control로 생후 3일 짜에 폐사한 일반 미니돼지의 genomic DNA. 1, 2; 각각 ADF 4, 5의 genomic DNA.

(다) 생후 폐사한 형질전환 재복제돼지의 GFP 발현 검증

① 생산된 2마리의 돼지 ADF 4와 ADF 5의 부검과정에서 전신 장기에서 GFP가 발현하는 지를 UV를 조사하여 검증하였다. 이 중 ADF 4의 몇몇 장기에서 GFP가 발현되는 모습을 일반 미니돼지와 비교한 사진을 아래에 나열하였다. 정상 미니돼지의 대장에서 위양성 반응으로 약한 녹색 신호가 보이는 것을 제외하고, ADF 4의 피부, 발굽, 장기에서만 뚜렷하게 GFP가 발현되는 것을 확인할 수 있다.

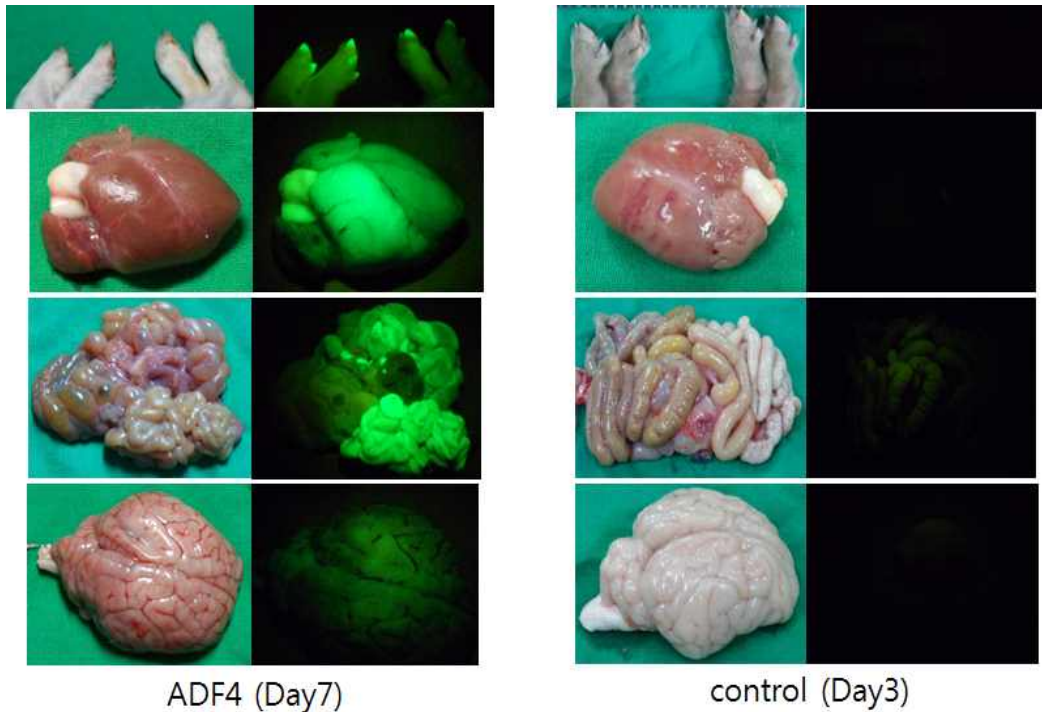


그림 46 ADF 4와 정상 미니돼지의 GFP 발현을 일부장기에서 확인한 결과.

## 라. hAPP 유전자조절 미니돼지 유래 태아세포주 수립

### (1) 연구방법

#### (가) 성체섬유아세포주 확립

- ① hAPP 형질전환 미니돼지의 성체섬유아세포 확립을 위하여 복부 피부 조직을 무균적으로 채취한 후, phosphate buffered saline (PBS)에 3번 washing 한다. 그 후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게 자르고 0.25 %(w/v) 트립신 및 1 mM EDTA가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 1시간 배양한다. 배양 후, 10 %(v/v) FBS 가 첨가된 DMEM으로 트립신을 중화 후, 원심분리 후 상층액은 제거하고 조직과 세포 펠렛을 회수하여 배양접시에 넣은 후, 10 %(v/v) FBS 가 첨가된 DMEM에서 6일 내지 8일 간 배양한다.
- ② 배양 후, 부착되지 아니한 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시까지 계속하여 배양하여 성체 섬유아세포주를 확립하였다. 확립한 세포주

는 실험에 사용하기 전까지 10%DMSO 가 첨가된 FBS를 이용하여 동결하여 액체질소에 보관한다.

(2) 연구결과

(가) 형질전환 미니돼지 성체조직유래의 섬유아세포주 확립

- ① 형질전환 미니돼지 성체 조직 유래의 성체섬유아세포의 확립은 생후 폐사한 ADF 2와 ADF 3의 귀조직과 생존하고 있는 ADF 1의 서혜부 피부 조직으로부터 각각 확립되었다.
- ② ADF 2 유래 확립된 세포는 2계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 9개로 동결되었고, ADF 3 유래는 0계대에서 2 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 20개, 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 4개, 1계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 1개로 각각 동결되었다.
- ③ ADF 1 유래 세포는 0계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 7개, 1계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 3개, 2계대에서 1 x10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 1.5 ml 동결튜브 5개로 각각 동결되었다. 이 모든 세포는 체세포 핵이식에 이용 전까지 액체질소에서 보관되었다. 또한 형질전환 돼지의 마커유전자인 GFP의 발현이 확립된 세포주에서도 동일하게 발현되었음을 증명하였다.

표 18 hAPP 형질전환 미니돼지로부터 확립하고 동결 보관한 성체조직유래 섬유아세포주

Cell Strain	Date	Passage	Number	concentration
ADF1	2013-05-12	0	3	1 x10 <sup>6</sup>
	2013-05-13	0	4	1 x10 <sup>6</sup>
	2013-05-12	1	3	1 x10 <sup>6</sup>
	2013-06-10	2	5	1 x10 <sup>6</sup>
ADF2	2012-09-17	2	9	1 x10 <sup>6</sup>
ADF3	2012-09-21	0	14	2 x10 <sup>6</sup>
	2012-09-21	0	4	1 x10 <sup>6</sup>
	2012-09-26	0	6	2 x10 <sup>6</sup>
	2012-09-26	1	1	1 x10 <sup>6</sup>

마. APP 유전자조절 미니돼지 유래 줄기세포주 수립

(1) 연구방법

- ① hAPP 형질전환 미니돼지의 지방줄기세포를 분리하기 위해 복부의 피하지방조직을 무균적으로 채취하여 PBS로 washing한다. 그 후, 미세가위를 이용하여 조직을 잘게

자르고 1 mg/ml collagenase I을 처리하여 60분 간 37 °C에서 교반시켜 조직을 분해한다. 100 $\mu$ m cell strainer를 이용하여 분해된 조직을 걸러내고 원심 분리하여 세포 분획을 얻은 후, 상층액을 제거하고 세포를 회수하여 지방줄기세포 배양배지(RKCM)에 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양한다.

② 다음날 배양 접시에 부착되지 아니한 세포 또는 조직 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들을 컨플루언시까지 계속하여 배양한다.

(2) 연구결과

(가) 형질전환 미니돼지 지방조직유래 지방줄기세포주 확립

① ADF 1로부터 지방조직을 채취하기에 충분한 시기가 되기까지 기다렸다가 생후 8개월령에 서혜부로부터 지방조직을 채취하여 지방줄기세포를 분리하였다. 또한 형질전환 돼지의 마커유전자인 GFP의 발현이 확립된 세포주에서도 동일하게 발현되었음을 증명하였다.

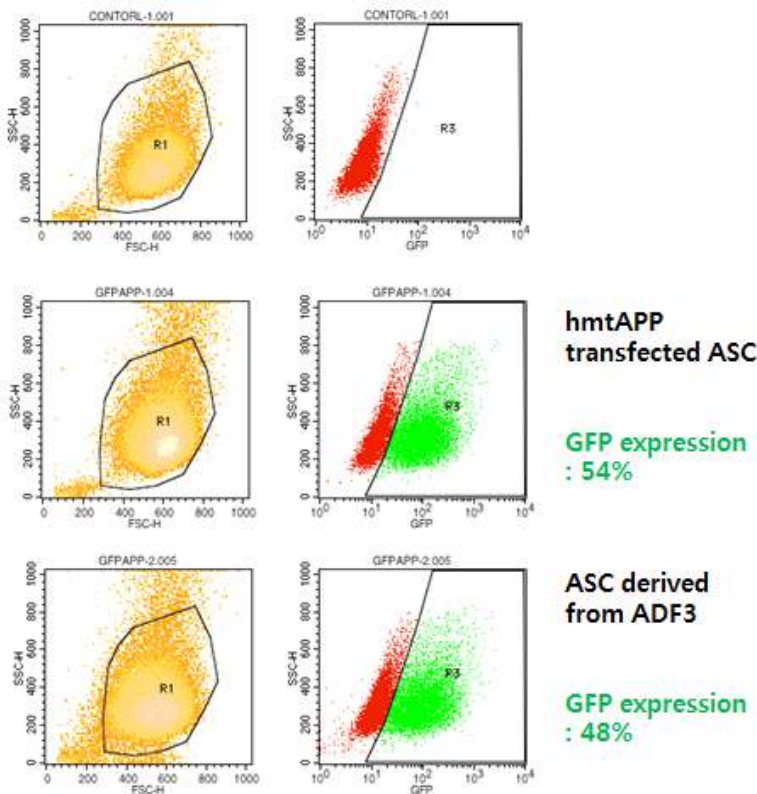


그림 47 Flow cytometry를 이용한 ADF3 유래의 성체 세포주에서 GFP 발현.

바. 난자의 생화학적 특성을 이용한 돼지 난자 선별법 적용 및 복제 수정란의 체외 발달률 비교

(1) 연구방법

- ① 난소로부터 회수한 COC 중 난구세포로 난자의 투명대 외벽이 여러 겹으로 쌓여있고, 난자의 세포질이 균일한 상태의 난구세포-난자복합체를 선택한다. 이 중 절반(1st control 그룹)은 체외성숙배양액에서 5% 이산화탄소의 39℃ 배양기에서 40시간 동안 체외성숙을 유도 하고, 나머지 절반(1st B+ 그룹)은 체외성숙 유도 전, TALP 배지에 26 μM 로 BCB를 희석한 용액에 넣어 90분간 염색한다. 90분 후, COC를 PBS에 washing하고, 세포질이 푸른 색을 띄는 것만을 선택하여 위와 같은 방법으로 체외성숙을 유도한다.
- ② 앞서 난구세포 및 난자의 세포질에 의한 COC 선별 기준에 들지 못한 나머지 난자를 1st 그룹과 같이 control 및 B+ 그룹으로 나누어 각각 체외성숙을 유도한다. 체외성숙 유도 후 체세포 핵이식을 수행하는 내용은 상기와 동일하며, 단위생식을 수행하는 방법은 체세포 핵이식 과정 중 활성화 단계부터 시작되어 그 이후는 체세포 핵이식 과정과 동일하다.
- ③ 배아의 발달율은 체외 배양 2일째에 분할을 관찰, 7일째에 배반포 형성을 관찰을 통해 계산되며, 배반포를 5 ug/mL 비즈벤자마이드 (bisbenzimidazole) (Hoechst 33342) 에 10분간 염색한 후, 슬라이드 글라스와 커버 글라스 사이에 놓고 압착하여 형광현미경 하에서 전체 세포수를 측정하여 배반포의 질을 평가한다.

## (2) 연구결과

### (가) 난자의 생화학적 특성을 이용한 돼지 난자 선별법 적용 및 복제 수정란의 체외 발달률 비교

- ① 체외성숙에 들어가기 전, 성숙될 가능성이 높은 난자를 주로 외형적인 모양을 보고 선별한다. 그러나 여기에 난자의 생화학적 특성에 근거를 두고, 난자가 성숙될 가능성이 높다는 것을 조금 더 객관적으로 파악할 수 있는 방법을 적용해 난자를 선별하는 실험을 실행하였다. 여기에서 말하는 난자의 생화학적인 특성이란, 작은 난포 내에 존재하는, 아직 다 자라지 못한 난자의 경우에는 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)라는 효소를 그 세포질에 매우 풍부한 양으로 함유하고 있는 반면, 난포가 발달함에 따라 완전히 다 성장한 난자의 경우에는 G6PD를 거의 가지고 있지 않은 것이다. 이 때, G6PD에 의해 분해되는 물질을 이용하면 난자의 세포질 내 이 효소의 활성을 파악할 수 있는데, 그 물질 중 하나인 Brilliant Cresyl Blue (BCB)를 난자에 처리하면 덜 자란 난자는 풍부한 G6PD 때문에 BCB가 분해되어 난자의 세포질 색이 변하지 않는 반면, 다 자란 난자는 BCB를 분해하지 못해 세포질의 색이 짙은 보라색으로 관찰된다. 이러한 내용을 토대로 실험을 수행하였다.
- ② 외형적인 모양으로 먼저 선별한 1st 그룹과 선택되지 못한 나머지 난자들로 이루어진 2nd 그룹을 다시 각각 두 개의 그룹으로 나누어, BCB 처리하지 않은 control 그룹(1st control/ 2nd control)과 90분간 BCB 처리 후 세포질이 짙은 보라색으로 보이는 난자들의 B+ 그룹(1st B+/ 2nd B+)을 설정하였다. 각 그룹의 난자들을 그룹별로

체외성숙 시킨 후, 단위생식 (Parthenogenesis) 또는 체세포 핵이식을 통한 배아를 제작하였다. 각 그룹 및 실험 방법에 따른 배아의 발달률을 아래 그림에 나타내었다.

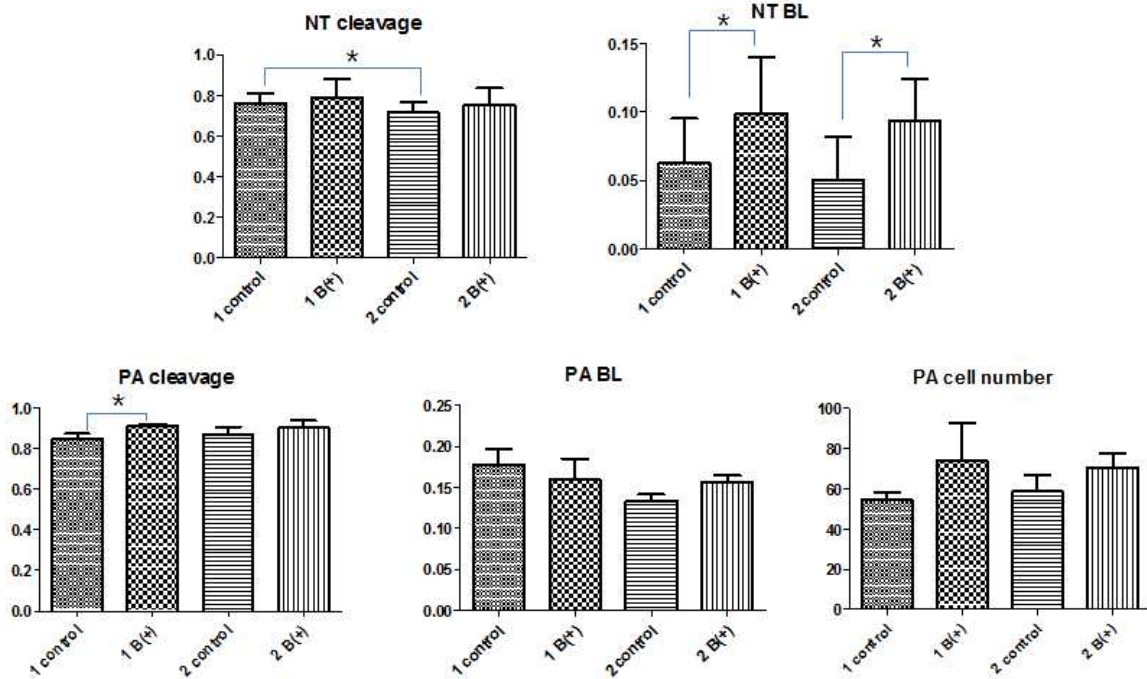


그림 48 일반적인 방법으로 선별된 난자와 BCB 처리를 통해 선별된 난자의 체외 발달을 비교. NT; 체세포 핵이식, PA; 단위생식, cleavage; 배아 분할률, BL; 배반포 발달률.

③ 단위생식 배아의 경우, 난할율은 1st control과 1st B+ 사이에서만 유의차를 보였고 배반포 형성율 및 배반포 전체 세포수는 모든 그룹에서 유의차를 보이지 않았다. 반면, 체세포 핵이식을 통해 제작된 배아의 경우에는 난할율은 1st control과 2nd control 사이에만 차이가 있었고, 배반포 형성율은 각각 1st control과 1st B+ 사이, 2nd control과 2nd B+ 사이에서 유의차가 존재했다. 이로써 체세포 핵이식에 사용될 난자를 선택할 때에 BCB를 이용하는 것이 체외 발달율을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

## 5. PD 병인유전자 발현 형질전환 복제수정란 생산 및 검증

### 가. hSNCA 발현 복제수정란 생산

#### (1) 연구방법

(가) Full length hSNCA 과발현 cell line 제작과 복제수정란 제작

① Early-onset familial PD 및 Sporadic PD에 유전적으로 연관되어 있는 SNCA 유전

자는 PD의 발생 및 병리학적 특징에 관련하는 alpha-synuclein을 발현한다. 따라서 full-length의 human SNCA 유전자를 과발현하는 세포를 lentivirus를 이용하여 구축하였다. 또한 이렇게 구축된 세포 중 GFP를 발현하는 세포를 이용하여 체세포 핵이식을 진행하였고, 이를 통해서 hSNCA를 과발현하는 복제수정란을 생산하였다.



그림 49 Full-length hSNCA 과발현 벡터.

(나) Truncated hSNCA 과발현 cell line 제작과 복제수정란

- ① 4Early-onset familial PD 및 Sporadic PD에 유전적으로 연관되어 있는 SNCA 단백질은 PD 환자 세포에서 aggregation을 일으켜 축적되게 되는데 유전적 돌연변이 및 C-terminally truncated 형태는 aggregation을 촉진 시키는 것으로 알려져 다양한 PD 동물 모델 개발에 사용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 truncated 형태인 SNCA (d121)을 발현하는 돼지 세포를 만들고자 한다.
- ② Truncated form의 hSNCA의 과발현 벡터는 2A peptide system을 이용하여 bicystronic하도록 제작하였다. 이를 통해서 체세포 핵이식을 진행하는 동안 RFP의 발현을 확인하면서 공여세포를 선정함으로써 hSNCA가 과발현하는 세포만을 공여세포로서 사용할 수 있게 제작하였다.

>Human SNCA (d121), 363 bases

```

ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAG
AAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGT
AGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCA
AAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCCAG
AAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACC
AGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGGAAGATATGCCTGTG
GATCCTTGA
    
```

그림 50 인간 SNCA (d121)의 유전자 염기 서열.



그림 51 Truncated hSNCA 과발현 벡터.

(2) 연구결과

(가) Full length hSNCA 과발현 cell line 제작과 복제수정란 제작



① Full-length hSNCA 과발현 세포 제작; Full-length hSNCA 과발현 세포는 다음과 같이 2가지 종류의 세포에서 제작되었다. 이전에 행해서 몇 차례 실험에서 lentiviral infection이 fibroblast 유래의 세포에서 잘 작동이 되지 않는 것을 알았다. 따라서 이번 실험을 위한 세포로 fibroblast 유래 세포가 아닌 mesenchymal stem cell과 kidney cell을 이용하였다. Viral infection 후 항생제를 이용하여 일주일 간 selection을 한 뒤 형광현미경 하에서 GFP를 발현하는 세포만을 이용하여 체세포 핵이식을 진행하였다.

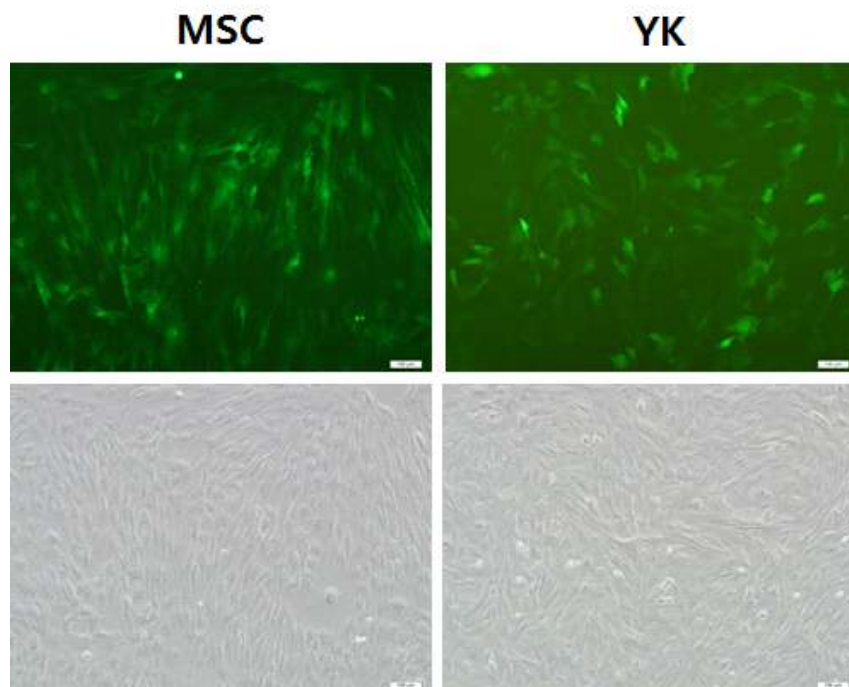


그림 52 Full-length hSNCA를 과발현하는 2가지 종류의 세포. Mesenchymal stem cell (MSC)와 Yucatan kidney (YK) cell line.

② 이렇게 만들어진 세포에서 genomic DNA에 hSNCA 유전자가 정확하게 삽입되었는지 여부와 유전자의 발현여부를 확인하기 위해서 PCR과 RT-PCR을 진행하였다. PCR에 사용된 SNCA를 primer sequences는 각각 forward: CTGAGAAAACCAAACAGGGTGT, reverse: CTCCACTGTCTTCTGGGCTACT이고, expected band size는 194bp이다. PCR 결과 MSC와 kidney 세포 모두에서 hSNCA가 genomic DNA에 제대로 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다. 그리고 RT-PCR 결과에서도 GFP가 정상적으로 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

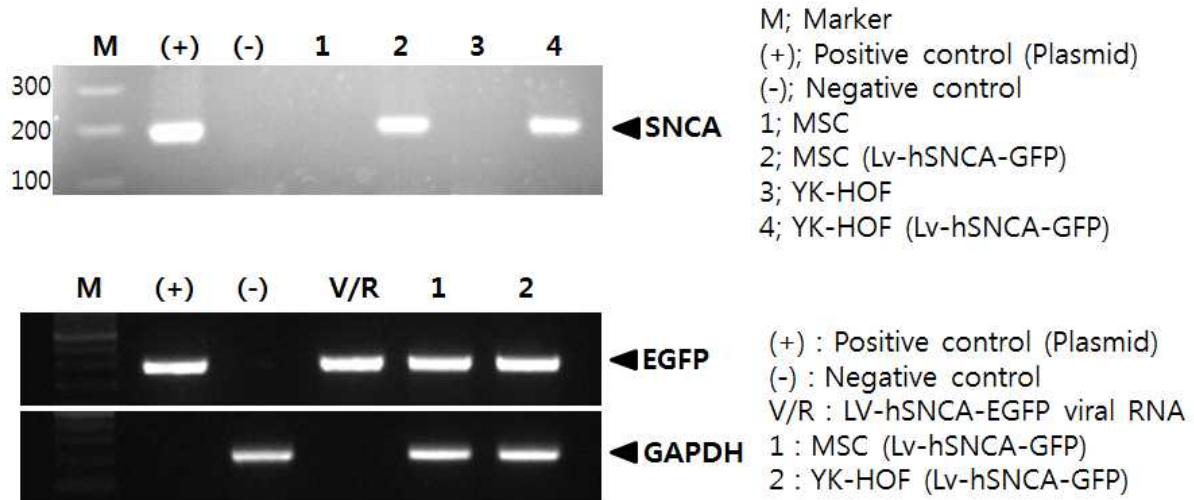


그림 53 세포 수준에서 유전자의 삽입여부와 발현여부의 확인. Genomic DNA에 삽입된 hSNCA 유전자를 확인하는 PCR 사진 (위)와 GFP의 발현여부를 확인하는 RT-PCR 사진 (아래).

③ Full-length hSNCA 과발현 복제수정란 제작; MSC를 공여세포로 이용한 경우 수정란의 난할율에는 특이적인 차이를 발견할 수 없었지만 복제수정란의 배반포까지의 체외발달 효율이 7.8%였던 것에 비해 kidney 세포를 이용한 경우 배반포 발달율이 29.9%로 현저히 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 추후 진행된 체세포 핵이식의 공여세포는 kidney 세포에서 hSNCA가 과발현하는 세포를 중점적으로 이용하여 진행하였다. 이렇게 만들어진 대부분의 배반포는 대리모의 자궁에 이식하였다.

표 19 세포 종류가 복제수정란의 체외발달 효율에 미치는 영향

Cell type	Total IVC	2 cells	%	BL	%
MSC	244	209	85.66	19	7.8
YK	157	126	80.3	47	29.9

④ 현재 full-length hSNCA는 총 5마리의 대리모에 이식이 진행되었고, 이 중 4마리에서 임신이 확인 되었다.

표 20 체세포 핵이식을 이용하여 생산된 복제수정란의 대리모의 난관 내 이식

ID	Donor cell	No. embryos
A	Lv-hSNCA-GFP	113
B	Lv-hSNCA-GFP	187
C	Lv-hSNCA-GFP	160
D	Lv-hSNCA-GFP	260
E	Lv-hSNCA-GFP	264

(나) Truncated hSNCA over expression cell line 제작과 복제수정란 제작

- ① Full-length hSNCA는 viral infection을 통해서 세포주를 제작하였기 때문에 fibroblast 유래 세포를 만들기 어려웠지만, truncated hSNCA 과발현 벡터는 플라스미드 벡터이기 때문에 electroporation 방법을 통해서 fibroblast 유래의 세포에도 손쉽게 형질전환이 가능하였다. Kidney 세포의 경우는 배반포 형성율이 많이 증가하는 장점이 있기는 하지만, 다양한 세포가 같이 존재하고 있는 heterogenous하기 때문에 electroporation으로 형질전환을 일으키기 까다롭다는 단점이 있었다. 이에, 형질전환이 보다 간편하게 이루어질 수 있는 fibroblast를 본 실험에 사용하기로 하였다.
- ② Fibroblast에 electroporation (1400V, 20msec, 1 pulse)을 진행한 다음, 2일 후부터 neomycin (1000ng/ml) 을 이용하여 일주일 간 selection을 진행한 다음 형광현미경 하에서 체세포 핵이식을 진행하는데 큰 어려움이 없다고 판단이 될 정도의 발현율을 가진 세포를 만든 다음 이 세포를 공여세포로 사용하였다.

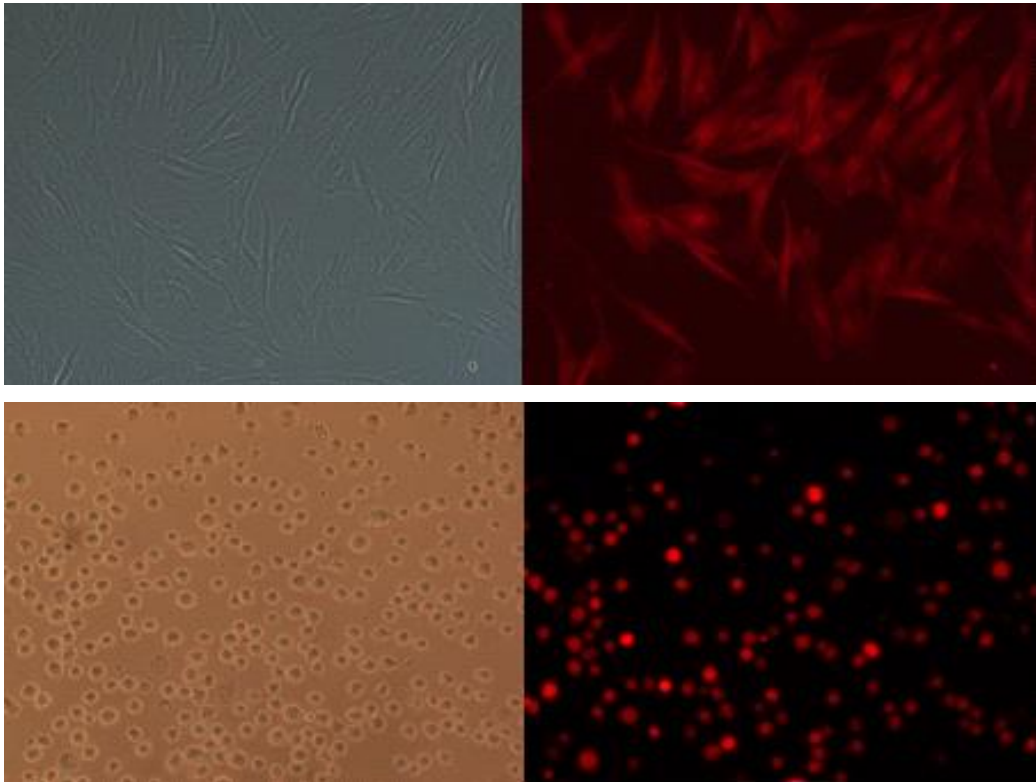


그림 54 Truncated hSNCA 과발현 세포의 사진. 배양 중인 세포의 일반 사진과 형광현미경 사진 (위), 체세포 핵이식에 공여세포로 사용하기 위해 single cell로 각각의 세포를 분리한 후 찍은 일반 사진과 형광현미경 사진 (아래).

- ③ 이렇게 만들어진 세포에서 단백질의 발현을 확인하기 위해서 western blot을 진행하였다. 대조군의 단백질과 truncated hSNCA를 과발현하는 세포에서 추출한 단백질을 이용하였다. 본 western blot에 사용된 gel의 농도는 15%였고, 100V의 전압으로 1시간 40분 동안 gel running을 한 다음 PVDF membrane에 25V로 6분 간 transfer하였다. 이 membrane을 5% skim milk를 이용해서 blocking 한 다음, 1차 항체는

Abcam사의 ab3309를 1:250으로 희석하여 사용하였고, 2차 항체는 goat anti-mouse IgG (HRP)를 1:20,000으로 희석하여 사용하였다. 이렇게 준비된 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL)을 처리하여 X-ray 필름에서 인화하였다.

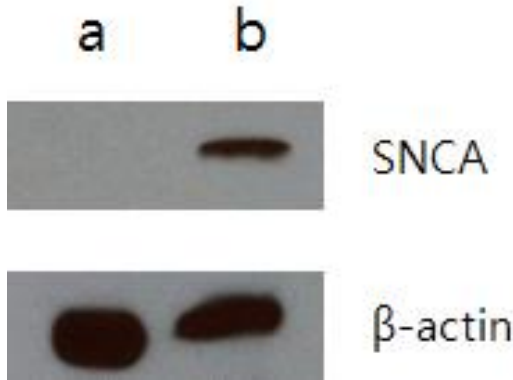


그림 55 Truncated hSNCA 과발현 세포에서 추출한 단백질을 이용하여 western blot을 진행한 결과. a: 대조군 세포에서 추출한 단백질, b: hSNCA 과발현 세포에서 추출한 단백질.

④ Kidney cell이 배반포 형성률을 획기적으로 올려주는 하지만, electroporation으로 형질전환하기 어려운 단점이 있었다. 이에 fibroblast 세포를 이용하여 형질전환 세포를 제작하였고, 이 세포를 공여세포로 이용하였을 경우 형질전환 복제수정란의 배반포 생성률에 많은 영향을 끼치는지 먼저 확인할 필요가 있었다. 따라서 형질전환된 복제수정란의 배반포 생성률을 확인하였고, 큰 무리가 없을 것으로 판단되어 추후의 실험을 진행하였다. 또한 이렇게 만들어진 복제수정란의 배반포를 대상으로 RT-PCR을 진행하기 위하여 추가적으로 total RNA를 추출하였다.

표 21 Truncated hSNCA를 이용한 복제수정란 제작과 효율

	Total	Cleaved embryos (%)	Blastocyst (%)
PA	50	38 (76.0)	17 (34.0)
SCNT	38	33 (86.8)	8 (21.1)

⑤ Truncated hSNCA 공여세포를 이용하여 작성된 복제수정란은 대부분 자연적으로 발정시기를 맞춘 대리모에 이식을 하는 방식으로 실험을 진행하였다. 최근에는 주로 난관에 피해가 적은 것으로 생각되는 tomcat catheter를 이용하는 방식으로 복제수정란을 대리모의 난관에 직접 이식하였다. 이렇게 이식이 된 대리모는 따로 관리를 하면서 21일 후 자연발정이 오는지 여부를 관찰하여 초기에 임신 여부를 확인한다. 재발이 오지 않은 대리모의 경우에는 추가적으로 초음파 검사를 진행하여 자궁 안의 태아낭을 확인하는 방법으로 임신을 확인한다. 현재 truncated hSNCA는 아래 표와 같이 총 5마리의 대리모에 이식을 하였으나, 모두 임신이 되지는 않았다.

표 22 체세포 핵이식을 이용하여 생산된 복제수정란의 대리모의 난관 내 이식

ID	Donor cell	No. embryos
A	pCAG-RFP-2A-hSNCA	117
B	pCAG-RFP-2A-hSNCA	161
C	pCAG-RFP-2A-hSNCA	149
D	pCAG-RFP-2A-hSNCA	92
E	pCAG-RFP-2A-hSNCA	163

## 나. hSNCA 발현 복제수정란 유전자 발현 분석

### (1) 연구방법

#### (가) Full length hSNCA 발현 복제수정란

- ① Full-length의 hSNCA를 발현하는 세포를 viral infection을 통해서 제작한 뒤 세포 수준에서 PCR과 RT-PCR을 진행하여 hSNCA 유전자의 genomic DNA 삽입 여부와 발현 여부를 각각 확인한다. 또한 세포 수준에서 형광현미경을 이용하여 GFP의 발현 여부를 눈으로 확인한다. 이렇게 확인된 세포를 공여세포로 사용하여 체세포 핵이식을 진행하고, 핵이식수정란의 체외배양을 통해 생산된 배반포에서의 GFP 발현 여부는 형광현미경을 통하여 확인한다.
- ② 체세포 핵이식을 진행한 후 일부의 수정란은 유전자의 발현 유무를 판별하기 위해 사용하였고, 대부분의 수정란은 대리모에 이식을 통해서 hSNCA 과발현 돼지를 생산하기 위한 실험에 사용하였다.

#### (나) Full length hSNCA 발현 복제수정란

- ① Truncated hSNCA를 발현하는 세포를 electroporation을 통해서 제작한 뒤 세포 수준에서 발현 여부를 형광현미경을 이용하여 RFP의 발현 여부를 눈으로 확인하고, western blot을 이용하여 세포 수준에서 hSNCA 단백질의 발현을 확인한다. 또한 이렇게 확인된 세포를 공여세포로 사용하여 체세포 핵이식을 진행하고 이를 통해 작성된 배반포에서의 RFP 발현 여부는 형광현미경을 통하여 확인한다.
- ② 작성된 배반포의 일부를 이용하여 RT-PCR을 진행함으로써 RT-PCR에서 RFP의 발현 및 hSNCA의 발현을 확인한다. Truncated hSNCA를 과발현하는 세포를 공여세포로 이용하여 제작된 배반포의 대부분은 대리모에 이식을 진행하여 hSNCA 과발현 돼지를 생산하기 위한 실험에 사용하였다.

### (2) 연구결과

(가) Full-length hSNCA 발현 복제수정란의 유전자 발현 분석

- ① Full-length hSNCA 유전자의 경우 뒤쪽에 marker로 GFP가 존재하기 때문에 형광현미경 하에서 GFP를 발현하는 세포만을 선별하여 공여세포로 사용하였다. 결과적으로 이렇게 만들어진 복제수정란에서는 배반포도 역시 GFP를 발현하기 때문에 형광현미경 하에서 GFP의 발현을 확인할 수 있었다.

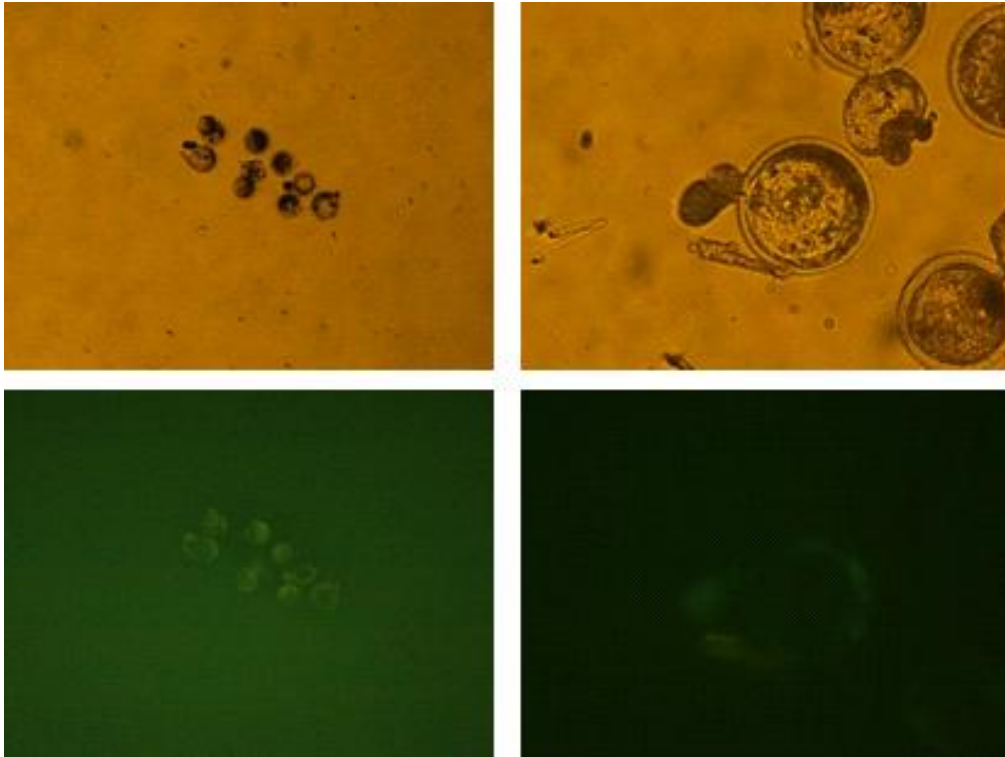


그림 56 Kidney세포를 이용하여 체세포 핵이식을 진행한 결과 발달한 배반포와 형광현미경하에서 GFP 발현을 확인한 사진.

(나) Truncated hSNCA 발현 복제수정란의 유전자 발현 분석

- ① Truncated hSNCA를 발현하는 복제수정란의 경우 형광현미경 하에서 RFP를 발현하는 세포만을 공여세포로 사용하여 체세포 핵이식을 진행하였다. 따라서 배반포에서도 RFP의 발현을 형광현미경 하에서 육안으로 관찰할 수 있었다.
- ② 또한 이렇게 발현이 확인된 배반포 8개 중 각각 4개씩으로 나누어서 2개 군으로 RFP와 hSNCA의 발현여부를 RT-PCR을 통해서 확인하였다. 확인 결과 parthenoactivation 결과로 만들어진 배반포에서는 RFP와 hSNCA가 모두 확인되지 않았지만, 형질전환된 세포를 공여세포로 사용하여 제작된 복제수정란 유래 배반포에서는 RFP와 hSNCA가 모두 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

## RT-PCR

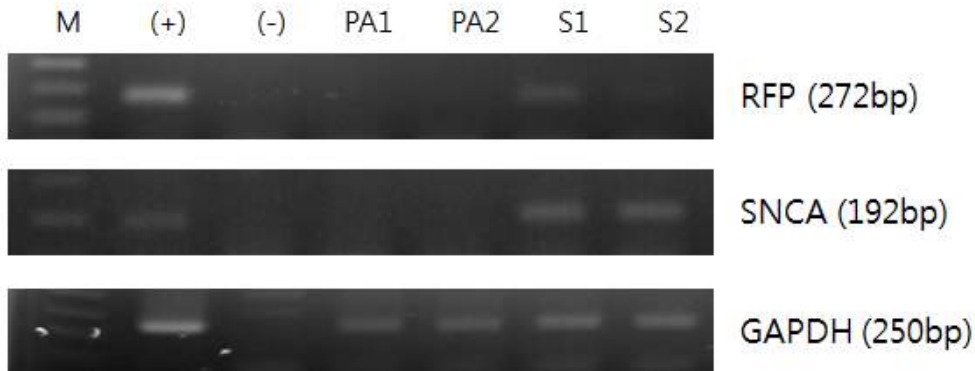


그림 57 Truncated hSNCA를 공여세포로 이용해 제작한 복제수정란과 대조군 수정란의 RFP 발현과 hSNCA 발현을 RT-PCR을 이용해서 비교.

### 다. hSNCA 발현 복제수정란 리프로그래밍 효율화 방안 연구

#### (1) 연구방법

- ① 리포터 유전자인 RFP가 발현되어지는 세포가 hSNCA가 발현되는 세포임이 검증된 결과를 바탕으로, 앞서 기술한 바와 같이 복제수정란을 작성한다. 즉, 상기 체외성숙과정을 통해 성숙된 돼지난자를 탈핵과정을 통해 핵을 제거한 후 RFP가 발현되어지는 세포를 선택적으로 골라 탈핵된 난자의 위란강으로 세포를 주입하고, 전기융합, 전기적 활성화 과정을 통해 복제수정란을 성공적으로 구축한다.
- ② 재구축된 복제수정란은 효율적인 리프로그래밍을 유도하기 위하여, demecolcine, sodium butyrate, SAHA가 각각 함유된 30 uL의 PZM-5 미세소적 (microdrops) 내에서 4~9시간 정치한 후 신선한 PZM-5로 수회 세정한다. 이후 7일 동안 PZM-5 미세소적 (30 uL) 내에서 배양하여 체외발달을 확인한다.

#### (2) 연구결과

##### (가) hDAC 억제제의 처리 농도 및 시간 확인

- ① 히스톤 탈아세틸화 억제제 (histone deacetylation inhibitors; HDACi)를 복제수정란에 처리함으로써 복제수정란의 리프로그래밍 효율이 향상된다는 연구결과가 보고되고 있는데 HDACi의 종류나 적용 동물 종에 따라 그 효과가 다르게 나타나고 있다. 이에 본 연구에서는 sodium butyrate (NaBu) 및 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)를 복제수정란의 활성화 후 처리하여 형질전환 복제수정란의 체외발달에 미치는 효과를 확인하였다.
- ② 먼저, 단위생식 수정란을 이용하여 각 hDACi의 적정 처리농도 및 처리시간을 확인하였는데, NaBu의 경우 전체 군 사이에 통계적인 차이는 나타나지 않았지만 1.0

mM의 농도로 9시간 처리한 군에서의 배반포 형성과 배반포 세포수가 대조군 및 다른 처치군에서 보다 높게 나타나는 경향을 나타냈다.

표 23 NaBu의 처리 조건에 따른 단위생식 수정란의 체외발달률

Treatment of NaBu	Total no. of embryos	>2 cells (%±SEM)	BLs (%±SEM)	No. of cells in BL (mean±SEM)
Control	82	84.4±3.93	14.9±4.89	42.8±4.34
0.5 mM - 9 hr	79	75.8±9.53	13.9±4.42	50.3±7.51
1.0 mM - 9 hr	80	79.6±7.23	23.6±4.72	53.8±5.16
0.5 mM - 18 hr	82	77.3±5.15	21.3±5.42	46.0±4.36
1.0 mM - 18 hr	81	74.6±7.03	18.1±4.93	44.9±4.87

③ 한편, 단위생식 수정란에 SAHA를 처리한 후 체외배양을 실시한 결과, 분할률 및 배반포 세포수는 전체 군 사이에서 차이가 없었지만, 배반포 형성율에서는 0.5 uM SAHA를 9시간 처리한 군이 대조군 및 다른 처치군에 비해 유의적으로 우수한 것으로 나타났다.

표 24 SAHA의 처리 조건에 따른 단위생식 수정란의 체외발달률

Treatment of SAHA	Total no. of embryos	>2 cells (%±SEM)	BLs (%±SEM)	No. of cells in BL (mean±SEM)
Control	65	75.2±5.34	28.5±4.82 <sup>bc</sup>	57.1±6.05
0.5 uM - 9 hr	66	79.2±6.49	49.0±4.59 <sup>a</sup>	54.0±4.47
1.0 uM - 9 hr	65	77.1±3.68	28.6±5.16 <sup>bc</sup>	56.0±6.25
0.5 uM - 18 hr	66	72.9±4.45	28.8±3.12 <sup>bc</sup>	57.8±6.22
1.0 uM - 18 hr	64	73.8±5.61	22.6±3.96 <sup>c</sup>	59.1±5.26

(나) 복제수정란의 hDAC 억제제 처리에 따른 체외발달 확인

① 단위생식 수정란에서의 결과를 바탕으로 하여, 복제수정란의 후활성화 처리가 리프로그래밍 및 체외발달에 미치는 효과를 확인하였다. 미니돼지 신장 유래 섬유아세포를 공여세포로 하여 제작된 복제수정란에 demecolcine (4 ug/ml, 4시간 처리), NaBu (1.0 mM, 9시간 처리), SAHA (0.5 uM, 9시간 처리)를 세포질 활성화 과정 후 처리하고 체외배양한 결과, SAHA 처치군은 대조군과 차이가 없었고, demecolcine 처치군과 NaBu 처치군에서는 배반포 형성율이 대조군보다 높게 나타나는 경향을 보였지만 통계적인 차이는 나타나지 않았다. 단위생식 수정란과 복제수정란에서의 hDACi 처리에 의한 효과가 정확하게 일치하지 않는 원인은 확실하지 않지만, 복제수정란의 경우 공여세포의 종류가 체외발달에 영향을 줄 수 있는 것도 원인 중 하나일 것으로 추측하며, 추가적으로 관련 유전자 및 다양한 유전자의 발현 정도 분석을 진행 중이



다.

표 25 복제수정란의 후활성화 처치에 따른 체외발달률

Treatment of NaBu	Total no. of embryos	>2 cells (%±SEM)	BLs (%±SEM)	No. of cells in BL
Control	116	80.3±2.43	20.8±2.55	41.7
Demecolcine	118	85.9±1.87	26.7±5.86	44.6
NaBu	115	80.0±2.70	23.4±4.22	41.9
SAHA	116	80.4±3.84	20.3±2.12	41.2

② 마지막으로, hSNCA 발현 복제수정란을 이용하여 demecolcine, NaBu 및 SAHA의 처치 효과를 확인하였다. 일반세포를 사용한 복제수정란에서의 결과와 마찬가지로, demecolcine 처치군과 NaBu 처치군에서 통계적 차이는 없었지만 대조군에 비해 배반포 형성율이 높게 나타나는 경향을 보였다. 최종적으로, NaBu 또는 demecolcine 처치가 형질전환 돼지 복제수정란의 리프로그래밍 및 체외발육 효율 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

표 26 hSNCA 발현 복제수정란의 후활성화 처치에 따른 체외발달률

Treatment of NaBu	Total no. of embryos	No. of >2 cells (%)	No. of BLs (%)	No. of cells in BL
Control	56	50 (89.8)	12 (24.1)	42.7
Demecolcine	58	52 (89.2)	16 (27.4)	47.6
NaBu	51	45 (86.9)	15 (28.9)	42.7
SAHA	57	50 (88.4)	13 (23.4)	44.2

## 6. AD 돼지 세포주 이용 AD 병인 유전자 복합발현 세포주 생산

### 가. AD 병인 복합 유전자 mutant PS1 (mPS1)의 선정 및 합성

#### (1) 연구방법

##### (가) mutant PS1 유전자의 선정

① 이미 2차년도에 축적되기 쉬운 형태의 돌연변이 아밀로이드 전구 단백질(mutant amyloid precursor protein, mAPP)이 뇌 신경세포 특이적으로 과발현되도록 디자인된 복제 미니돼지를 생산하여 체세포를 확보해 두었으며, 여기에 추가로 다른 종류의 돌연변이 유전자를 도입시키기 위해 문헌을 검색을 통해 PS1 (Presenilin 1)이라는 유전자를 AD 병인 복합 유전자로 선정하였다. PS1은 아밀로이드 전구 단백질을

프로세싱하여 베타 아밀로이드를 생성하는  $\gamma$ -secretase의 구성 요소 중 하나로, 이 유전자에 돌연변이가 있을 경우, 축적되기 쉬운 형태의 베타 아밀로이드가 생성되는 것으로 알려져 있다.

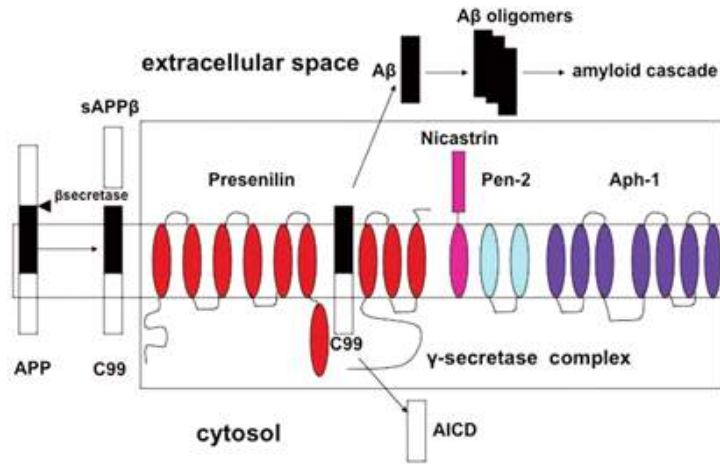


그림 58  $\gamma$ -secretase의 구성 요소인 PS1과 베타 아밀로이드 생성 모식도 (Wu et al. 2012).

#### (나) mutant PS1 유전자의 합성

- ① PubMed의 GenBank를 통해 PS1 전체 유전자 염기서열을 파악한 후 아미노산 변환되는 염기서열로 유전자 합성을 진행하였다.

#### (2) 연구결과

##### (가) mutant PS1 유전자의 선정

- ① PS1 (Presenilin 1)은 아밀로이드 전구 단백질을 프로세싱하여 베타 아밀로이드를 생성하는  $\gamma$ -secretase의 구성 요소 중 하나로, 이 유전자에 돌연변이가 있을 경우, 축적되기 쉬운 형태의 베타 아밀로이드가 생성되는 것으로 알려져 있다. PS1의 돌연변이는 AD 가족력이 있는 집단에서 75-80%의 매우 높은 빈도로 나타나고, 185 종류의 돌연변이 위치를 보이고 있다 (Wu et al. 2012). 이처럼 많은 돌연변이 중, 다중 복합 돌연변이 유전자의 발현으로 다수의 AD 관련 표현형을 보인 마우스 생산에 이용된 PS1M146V 돌연변이를 선정하게 되었다 (Guo et al. 1999, Oddo et al. 2003, Ryazantseva et al. 2013).

표 27 유전적인 AD와 관련된 주요 유전자의 돌연변이 (Wu et al. 2012)

Table: Clinical spectrum among different genotypes of EOFAD

	<i>PS1</i> mutations	<i>PS2</i> mutations	<i>APP</i> mutations or duplication
<b>Frequency Mutations reported</b>	75 - 80 % 185	< 5% 13	20-15% 32 mutations or complete gene duplication
<b>Chromosome Pathophysiology</b>	14 increased Aβ42 production and high Aβ42/Aβ40 ratio	1 increased Aβ42 production and high Aβ42/Aβ40 ratio no CWP	21 increased production of Aβ42 alone, or both Aβ42 and Aβ40
<b>Pathology</b>	CWP in some, mild CAA in most	mean AAO in fifties, range from 39 to 75 years	severe CAA in most forties (Flemish mutation) to fifties or sixties (Iowa mutation)
<b>Age at onset</b>	mean AAO at early forties, ranged from 24 to 65 years	seizures, behavioural and psychiatric symptoms in some	haemorrhage, stroke-like episodes and leukoencephalopathy associated with severe CAA; seizures common
<b>Canonical Phenotype</b>	spastic paraparesis in some special type; myoclonus, seizures, extrapyramidal signs, behavioural and psychiatric symptoms in some cases		
<b>Amyloid imaging</b>	increased PiB retention in striatum and cortex	no literature available	increased PiB retention in the striatum and cortex
<b>FDG-PET</b>	early hypometabolism in the posterior cingulate cortices, hippocampus and entorhinal cortices in presymptomatic stage	no literature available	no literature available
<b>Structural MRI</b>	early medial temporal lobe atrophy in the presymptomatic stage	no literature available	no literature available
<b>CSF</b>	profoundly decreased Aβ42 and increased t-tau and p-tau in presymptomatic stage	no literature available	profoundly decreased Aβ42 and increased t-tau and p-tau

(나) mutant PS1 유전자의 합성

① PS1M146V를 시중에서 구입할 수 없어 유전자 합성을 시도하였다. 즉, PubMed의 GenBank를 통해 PS1 전체 유전자 염기서열을 파악하였고, 정확히 146번째 아미노산이 Methionine임을 확인하여 이 아미노산이 Valine으로 변환될 수 있도록 염기서열 하나를 변화시켜 유전자 합성을 진행하였다.

**PS1M146V (GenBank No. NM\_000021.3)**

GTG    ATG (M) → GTG (V)

```

ATGACAGAGTTACCTGCACCGTTGTCCTACTCCAGAAATGCACAGATGCTGAGGACAAC
CACCTGAGCAATACTGTACGTAGCCAGAATGACAATAGAGAACGGCAGGACACAACGAC
AGACGGAGCCTTGGCCACCCTGAGCCATTATCTAATGGACGACCCCAGGGTAACCTCCCGG
CAGGTGGTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGATGAGGAGCTGACATTGAAATATGGCGCCAAG
CATGTGATCATGCTCTTTGTCCCTGTGACTCTCTGCAIGGTGGTGGTCTGGTACCATT
AAGTCAGTCAGCTTTTATACCCGGAAGGATGGGCAGCTAATCTATACCCCATTCACAGAA
GATACCGAGACTGTGGCCAGAGAGCCCTGCACTCAATTCTGAATGCTGCCATCATGATC
AGTGCATTGTTGCTATGACTATCCCTCCTGGTGGTTCGTATAAATACAGGTGCTATAAG
GTCATCCATGCCTGGCTTATTATATCATCTCTATTGTTGCTGTTCTTTTTTCATTTCATT
TACTTGGGGGAAGTGTITAAAACCTATAACGTTGCTGTGGACTACATTACTGTTGCCTC
CTGATCTGGAATTTTGGTGTGGTGGGAATGATTTCCATTCACTGGAAAGGTCCACTTCGA
CTCCAGCAGGCATACTCATTATGATTAGTGCCCTCAIGGCCCTGGTGTITATCAAGTAC
CTCCCTGAATGGACTGCGTGGCTCAICTTGGCTGTGATTTAGTATATGATTTAGTGGCT
GTTTTGTGTCCGAAAGGTCCACTTCGATGCTGGTTGAAACAGCTCAGGAGAGAAATGAA
ACGCTTTTTCCAGCTCTCATTACTCCTCAACAATGGTGTGGTGGTGAATATGGCAGAA
GGAGACCCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATCCAAAATTCCAAGTATAATGCAGAAAGCACA
GAAAGGGAGTCACAAGACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAGTGAGGAATGG
GAAGCCAGAGGGACAGTCTAGGGCCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCACGAGCTGCT
GTCCAGGAACCTTCCAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGGGGAGTAAAA
CTTGGATTGGGAGATTTCAATTTCTACAGTGTCTGGTGGTAAAGCCTCAGCAACAGCC
AGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGTTTCGTAGCCATATTAATTGGTITGTGCCTT
ACATTAATACTCCTTGCCATTTTCAAGAAAAGCATTGCCAGCTCTTCCAACTCCATCACC
TTTGGCTTGTITTTCTACTTTGCCACAGATTATCTTGTACAGCCTTTTTATGGACCAATTA
GCATTCCATCAATTTTATATCTAG
    
```

그림 59 human PS1M146V mutation 염기서열.

## 나. mPS1 과발현 벡터 디자인 및 제작

### (1) 연구방법

#### (가) APP 뇌신경세포 특이적 mPS1 과발현 벡터 제작

- ① AD 병인 유전자 복합 발현 모델 미니돼지 생산을 위해서 관련 유전자의 돌연변이를 mAPP 돼지 세포에 도입하여 뇌 신경세포 특이적으로 발현시키는 것이 이번 과제 전략이므로, 뇌신경세포 특이적으로 유전자 발현을 조절하는 synapsin (Syn) promoter를 이용하였다.

### (2) 연구결과

#### (가) APP 뇌신경세포 특이적 mPS1 과발현 벡터 제작

- ① Syn promoter의 조절 하에 PS1M146V 유전자가 뇌신경세포에서만 발현되도록 하고, 체세포 핵이식 시에 벡터의 도입이 이루어진 세포를 선택하기 위하여 전신 발현 promoter인 PGK (phosphoglycerate kinase) promoter에 의해 GFP 및 Puromycin 저항성 유전자 (PuroR)를 발현되도록 하는 벡터를 디자인하고 제작하였다.



그림 60 뇌 신경세포 특이적 AD 병인유전자 발현 벡터 구조.

## 다. mAPP와 mPS1 복합발현 세포주 제작

### (1) 연구방법

#### (가) 세포주 확립 및 분석

- ① PiggyBac system을 이용하여 위에서 제작된 벡터를 mAPP 세포에 도입시킨 후, puromycin selection을 통해 뇌 신경세포 특이적 promoter-PS1M146V와 mAPP 복합 발현 미니돼지 세포주를 확립하여, 세포주 수준에서 유전자 삽입 여부를 검증하고 있다.

### (2) 연구결과

(가) AD 병인 유전자 복합발현 미니돼지 세포주 생산 및 분석

① human synapsin promoter를 이용하여 돼지의 뇌 신경세포 특이적으로 mutant PS1 유전자가 발현되는 벡터를 구축하였다. mutant APP이 뇌 신경세포 특이적으로 과발현되는 미니돼지 (2차년도 생산)의 피부 섬유아세포에 제작된 벡터를 도입시켜, puromycin 1.5 µg/ml가 첨가된 배지에서 4일 동안 세포를 배양하고 벡터가 도입된 세포만을 선별하였다. 선별을 마친 세포는 대부분 동결보관하고 일부는 자외선 하에서 관찰 및 복제 수정란 생산 및 검증에 이용하였다. 선별된 세포를 자외선 하에서 관찰하였을 때 GFP가 관찰되었으며, 그 세포를 이용하여 체세포 핵이식을 통해 생산된 복제 배반포 역시 강한 GFP를 발현하였다.

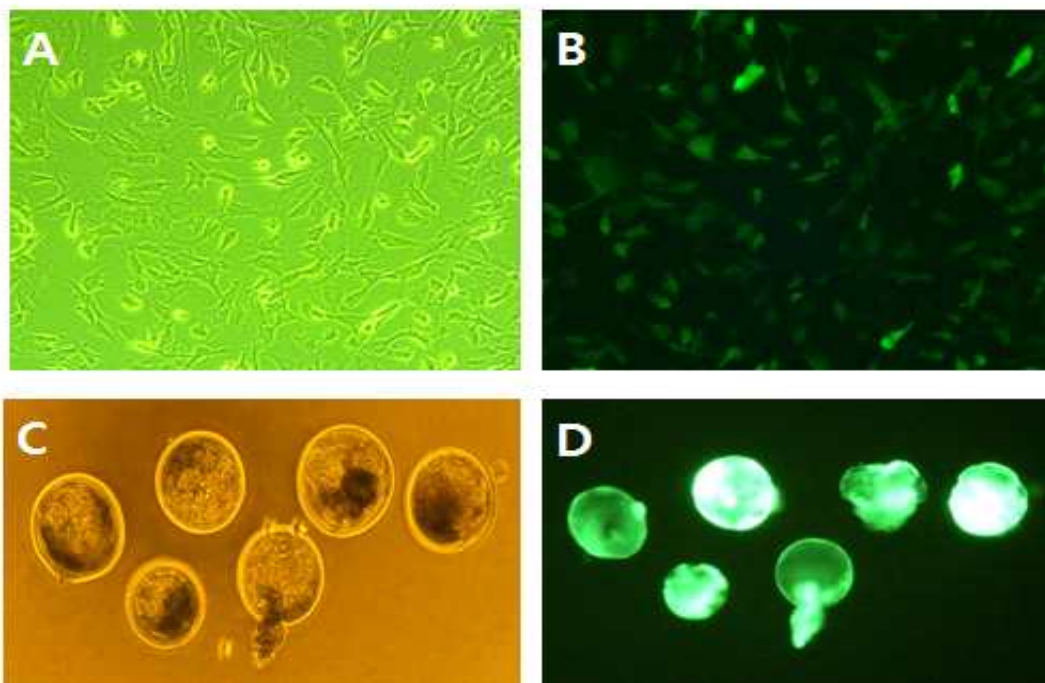
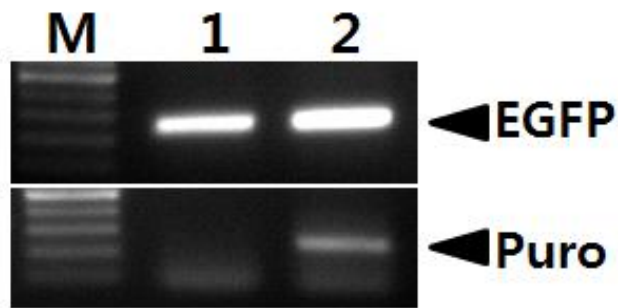


그림 61 GFP를 발현하는 AD 병인 유전자 (mAPP, mPS1) 복합 발현 세포주(A, B)와 복제 배반포 (C, D).

② AD 병인 유전자를 복합 발현하는 미니돼지 세포주를 생산하여, EGFP (녹색 형광 단백질)와 puromycin 저항성 유전자(항생제 저항성 유전자)의 mRNA 발현을 확인하였다. AD 병인 유전자의 경우, 뇌세포 특이적으로 작동하는 프로모터 조절하에 발현되도록 벡터를 디자인하였으므로, 제작된 체세포에서는 그 발현을 확인할 수 없기 때문에 그 대신 체세포에서 항상 발현되는 EGFP와 puromycin 저항성 유전자의 발현을 확인하였다. Lane 1은 기존에 생산된 mAPP 과발현 돼지의 세포, Lane 2는 새로 생산된 복합 유전자 발현 세포로, EGFP는 두 세포 모두에서 발현되는 반면, puromycin 저항성 유전자는 새로 생산된 세포에서만 발현됨을 확인할 수 있다.



**M : 100 bp ladder DNA**

**1 : SYN-mAPP-EGFP**

**2 : SYN-mAPP-EGFP-PB + Syn-PS1(M146V)-Green-Puro**

그림 62 AD 병인 유전자 (mAPP+ mPS1) 복합 발현 미니돼지 세포주의 마커 유전자 발현 분석

## 7. hSNCA 발현 PD 모델 미니돼지 생산

### 가. hSNCA 발현 미니돼지 생산

#### (1) 연구방법

##### (가) 체세포핵이식기법을 이용한 복제 돼지 생산

① 제왕절개 수술을 통해 임신 114일 쯤에 복제돼지를 생산하였다. 미니돼지는 태어난 순서에 따라 PDF 1~23으로 명명하였다. 이 중에서 선천적으로 구개열을 가지고 태어나서 sacrifice한 개체를 포함하여 총 19마리가 출생 후 폐사하였다. 폐사한 모든 개체에 대해서는 부검이 진행되었고, 부검 결과에서 특이적인 소견은 발견되지 않았다. 현재까지 살아있는 4마리의 개체는 각각 PDF 4, 16, 18, 그리고 20이다.

#### (2) 연구결과

##### (가) 체세포핵이식기법을 이용한 복제 돼지 생산

① 총 4마리의 대리모에서 23마리의 hSNCA가 발현되는 산자를 생산하였다. 각 산자의 이식 날짜, 출생 날짜, 삽입된 유전자 등의 정보는 아래의 표 2와 같다.

표 28 hSNCA 발현 형질전환 복제돼지 생산

Target gene	Type of cell	No. recipients	No. of piglets
CMV-hSNCA-PGKp-GFP	kidney cell	6	23
CAG-RFP-2A-htSNCA	kidney cell	8	0
Syn-htSNCA-PGKp-RFP	kidney cell	4	0

② 총 23마리의 산자를 각각 태어난 순서에 따라서 Parkinson's Disease Female (PDF) 1~23 으로 명명하였다. 그 중 현재까지 살아있는 개체는 PDF 4, 16, 18, 그리고 20으로 총 4마리이다. 19마리의 산자가 사망하였고 모든 태어난 뒤 사망한 산자에 대해서는 부검을 진행했지만 구개열로 인해 sacrifice한 개체 (PDF7) 이외에는 특이적인 소견은 발견할 수 없었다.

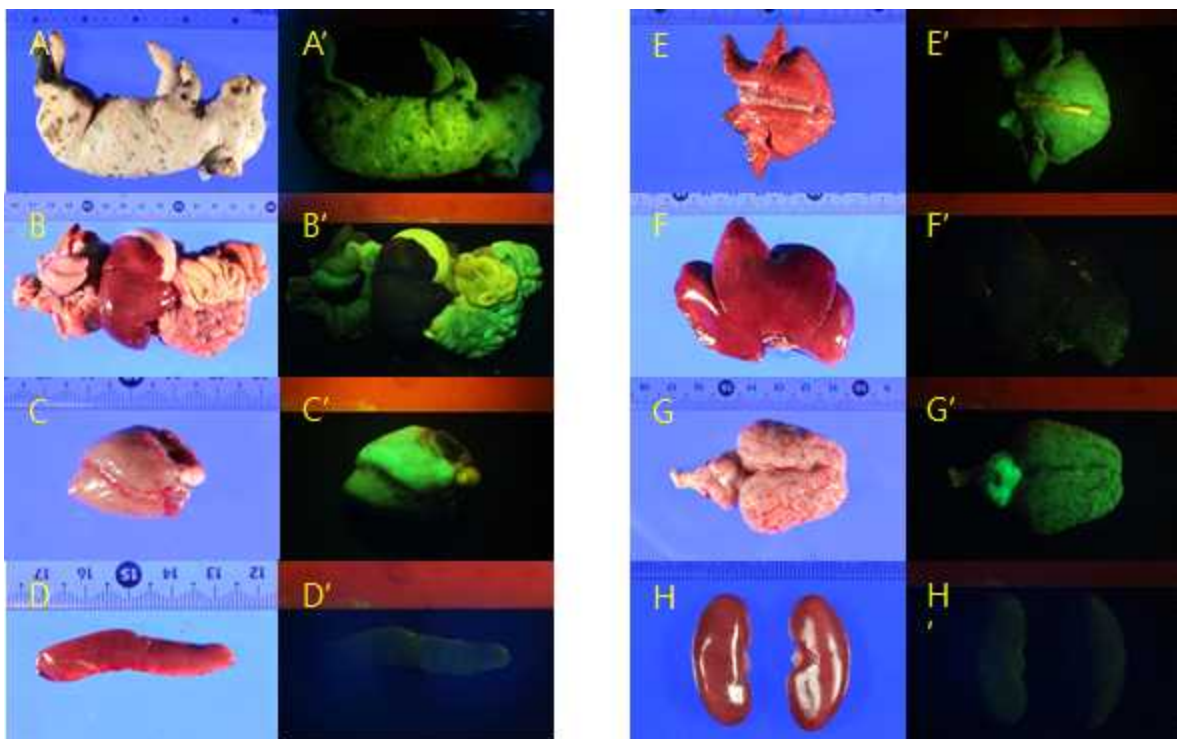


그림 63 생산된 산자 중 폐사한 개체 1두 (PDF2)에 대한 eGFP 유전자 발현 여부 확인.

③ 그림 61은 부검을 진행한 19마리의 산자 중에서 대표적으로 PDF 2에 대한 eGFP 유전자 발현 여부를 모든 장기별로 자외선을 이용해서 확인한 결과이다. hSNCA 발현 형질전환 복제돼지를 생산하기 위한 세포에 reporter 유전자로 eGFP를 삽입하였기 때문에 이를 통한 형질전환 여부의 확인이 가능하였다. 보는 바와 같이 전신 피부 (A 와 A'), 내부 소화 장기 (B 와 B'), 심장 (C 와 C'), 폐 (E 와 E'), 그리고 뇌 (G 와 G')에서 eGFP가 발현하는 것을 확인할 수

있었다. 하지만 비장 (D 와 D'), 간 (F 와 F'), 그리고 신장 (H 와 H')에서 eGFP의 발현은 명확하게 확인하기 어려웠다.

#### 나. hSNCA 발현 미니돼지 유전자 발현 분석

##### (1) 연구방법

###### (가) 다양한 방법을 이용한 유전자 삽입 확인

- ① 23마리 모든 개체에 대해서 PCR과 RT-PCR이 진행되었다. PCR결과 PDF 11을 제외한 22마리 개체에서 genomic DNA 내에 hSNCA 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다. 또한 이중 PDF1, PDF2, PDF4, PDF6, PDF7, PDF16, PDF17, PDF18, PDF20, PDF21, 그리고 PDF22의 11마리 개체에서만 삽입된 유전자가 mRNA로 transcription되는 것을 확인할 수 있었다. 다행스럽게도 현재 살아있는 PDF 4, 16, 18 그리고 20의 4마리는 모두 genomic DNA 내에 해당 유전자가 삽입되어 있고 또한 그 유전자가 transcription된다는 것이었다.
- ② 단백질 발현 여부는 ELISA를 이용해서 판단하였고, 살아있는 4마리 개체에 대해서 생후 4개월령에 진행되었다. 결과적으로 대조군에 비하여 PDF 4와 PDF 18에서 hSNCA 단백질 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었고, 나머지 2마리는 대조군과 발현양상에 차이를 보이지 않았다.

##### (2) 연구결과

###### (가) 다양한 방법을 이용한 유전자 삽입 확인

- ① 총 23마리의 hSNCA 발현 미니돼지 중 PDF 11은 hSNCA 유전자가 genomic DNA에조차 삽입되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이를 제외한 나머지 22마리에서는 hSNCA 유전자가 genomic DNA에 삽입된 것을 확인할 수 있었다. 그렇지만 hSNCA 유전자의 삽입을 확인한 개체 중에서도 단지 11마리의 개체 (PDF1, PDF2, PDF4, PDF6, PDF7, PDF16, PDF17, PDF18, PDF20, PDF21, 그리고 PDF22)에서만 삽입된 유전자가 transcription이 되는 것을 확인할 수 있었다. 다행스럽게도 현재까지 살아있는 4마리 개체인 PDF 4, 16, 18, 그리고 20은 모두 hSNCA 유전자가 삽입되어 있고 transcription도 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.



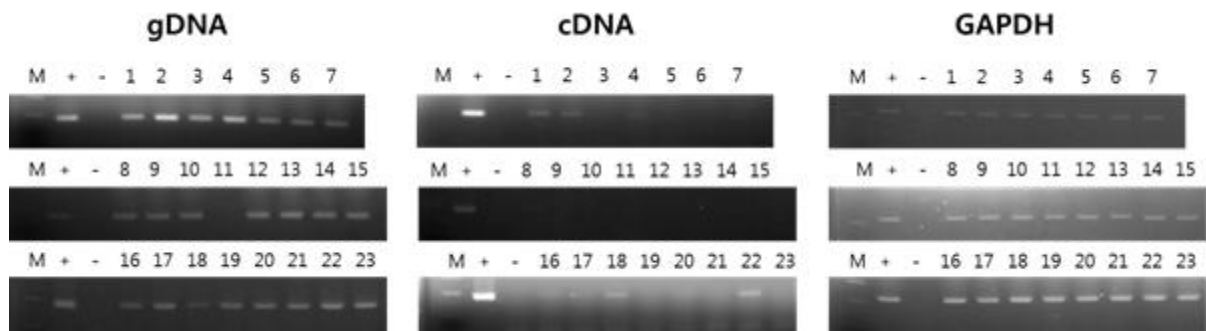


그림 64 23마리의 hSNCA 발현 미니돼지에서 hSNCA 유전자의 삽입과 발현 확인.

② Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 통해서 hSNCA가 PDF 4, 16, 18, 그리고 20에서 발현하는지 여부를 복제돼지가 4개월령이 되었을 당시의 혈액을 이용하여 분석을 진행하였다. 이를 통해서 hSNCA 발현을 정량적으로 평가할 수 있었고, 평가 결과 대조군과 비교하였을 때, PDF 4와 PDF 18에서 유의적인 차이를 가지고 증가하였음을 확인할 수 있었다. 하지만 PDF 16과 PDF 20에서는 대조군과 차이를 보이지 않았다. 이는 단백질 발현이 되지 않고 있음을 의미할 수도 있지만 아직 실험을 진행한 미니돼지의 일령이 120일 정도로 낮았기 때문에 개체 차이에 따라서 발현 양상이 다른 것으로 생각될 수도 있다. 따라서 일령이 증가하는 것에 따른 단백질 발현 양상의 차이를 추후 확인해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

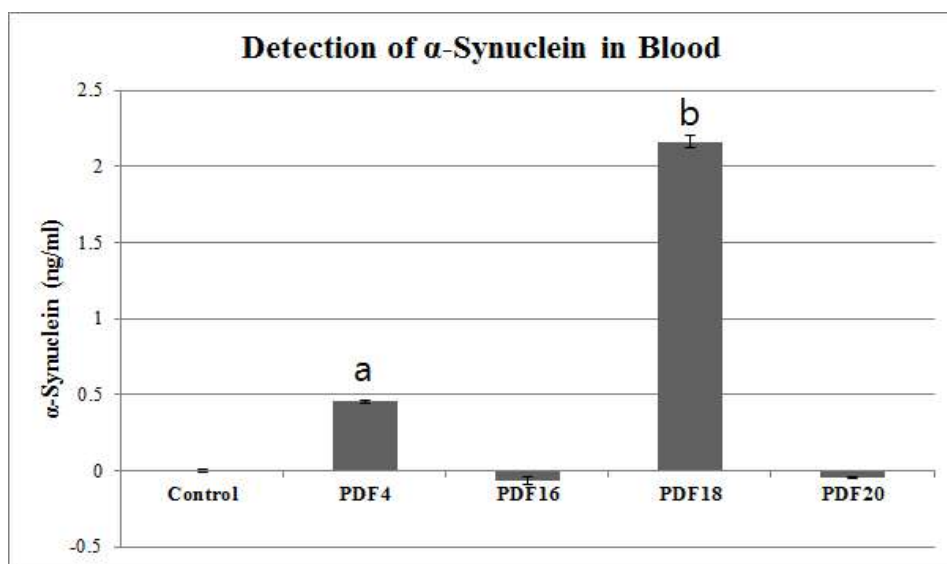


그림 65 생존한 4마리 hSNCA 발현 미니돼지에서 해당 유전자의 단백질 발현 여부 확인.

다. hSNCA 발현 미니돼지유래 세포주 확립

(1) 연구방법

(가) 제왕절개 및 세포주 확립

① 제왕절개를 통해서 태어난 PDF 1~15는 모든 개체에 대한 세포주 확립을 완료하였다. 하지만 자연분만을 통해서 태어난 PDF 16~23의 경우 살아남은 개체인 PDF 16, 18, 그리고 20에 대해서는 세포주 확립을 완료하였지만 나머지 개체에 대해서는 세포주를 확립하기 이전에 폐사하는 바람에 세포주 확립에는 실패하였다. 따라서 총 23마리의 산자 중 18마리의 산자에 대한 세포주 확립을 완료하여 현재 액체 질소 속에서 냉동 보관 중이다.

(2) 연구결과

(가) 제왕절개 및 세포주 확립

① 제왕절개를 통해서 태어난 PDF 1~15는 모든 개체에 대한 세포주 확립을 완료하였다. 하지만 자연분만을 통해서 태어난 PDF 16~23의 경우 살아남은 개체인 PDF 16, 18, 그리고 20에 대해서는 세포주 확립을 완료하였지만 나머지 개체에 대해서는 세포주를 확립하기 이전에 폐사하였기 때문에 세포주 확립에는 실패하였다. 따라서 총 23마리의 산자 중 18마리의 산자에 대한 세포주 확립을 완료하여 현재 액체 질소 속에서 냉동 보관 중이다.

8. PD 병인유전자 KO 복제수정란 생산

가. TALEN-KO 복제수정란 생산

(1) 연구방법

(가) 체세포핵이식기법을 이용한 복제수정란 생산

① TALEN을 이용하여 PARK2 유전자를 knock-out한 세포를 만들 수 있는 형질전환 조건을 확립하였다.

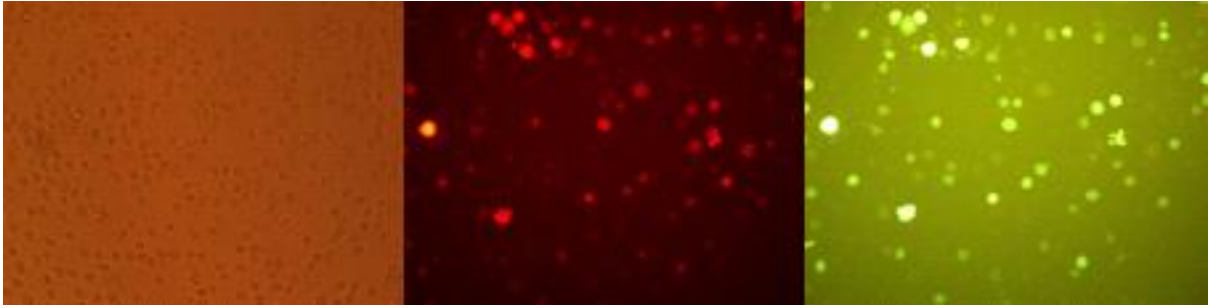


그림 66 TALEN을 이용한 PARK2 KO 세포주 확립.

- ② 미니돼지 세포에 TALEN과 reporter plasmid를 transfection하게 되면 TALEN과 reporter가 세포 속으로 들어간 것을 알려주는 RFP 발현이 먼저 확인된다. 추후 TALEN이 정상적으로 작동을 하면 GFP까지 발현하는 것을 확인할 수 있고 이렇게 만들어진 GFP를 발현하는 세포를 이용하여 복제수정란을 생산하였다.

## (2) 연구결과

### (가) 체세포핵이식기법을 이용한 복제수정란 생산

- ① TALEN을 이용하여 형질전환을 시도하여 RFP와 GFP를 동시에 발현하게 만든 세포는 치명적인 단점이 존재한다. GFP의 발현이 최대 일주일 정도라는 점이다. 따라서 형질전환 복제돼지를 만들기 위해서는 매주 세포에 TALEN과 reporter plasmid를 transfection하여야 한다. 또한 이렇게 GFP를 발현하는 세포라 할지라도 100%의 확률로 knock-out이 되지 않는다는 것 또한 단점으로 지적될 수 있다. 이러한 문제는 TALEN을 transfection한 다음, magnetic activated cell sorting (MACS)이나 fluorescence assisted cell sorting (FACS)등의 방법을 적용하면 해결할 수 있다. 하지만 MACS나 FACS를 진행하고 난 뒤에 세포가 체세포핵이식의 cell donor로 사용하기에는 어렵다는 점이 매주 세포에 TALEN을 transfection하는 방법을 선택한 이유이다.



그림 67 PARK2 KO 세포주를 이용하여 복제수정란 생산.

## 나. TALEN-KO 복제수정란 유전자 발현 분석

(1) 연구방법

(가) T7E1 assay를 통한 유전자 KO 확인

① 제작된 TALEN을 이용하여 PARK2 유전자를 knock-out하였고 GFP를 발현하는 세포를 이용하여 복제수정란을 생산하였다. 이렇게 생산된 복제수정란 중 26개를 random으로 선택하여 각각의 복제수정란 하나에 대해서 T7E1 assay를 통해서 해당 유전자의 knock-out 여부를 판단하였다. 총 26개의 복제수정란에 대해서 해당 검사를 진행하였고, 그 중 11개의 복제수정란에서 해당 유전자의 knock-out이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 42.3%의 높은 확률로 복제수정란에서 knock-out이 발생한다는 것을 확인할 수 있었다.

(2) 연구결과

(가) T7E1 assay를 통한 유전자 KO 확인

① 제작된 TALEN을 이용하여 PARK2 유전자를 knock-out하였고 GFP를 발현하는 세포를 이용하여 복제수정란을 생산하였다. 이렇게 생산된 복제수정란 중 26개를 random으로 선택하여 각각의 복제수정란 하나에 대해서 T7E1 assay를 통해서 해당 유전자의 knock-out 여부를 판단하였다. 총 26개의 복제수정란에 대해서 해당 검사를 진행하였고, 그 중 11개의 복제수정란에서 해당 유전자의 knock-out이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 42.3%의 높은 확률로 복제수정란에서 knock-out이 발생한다는 것을 확인할 수 있었다.

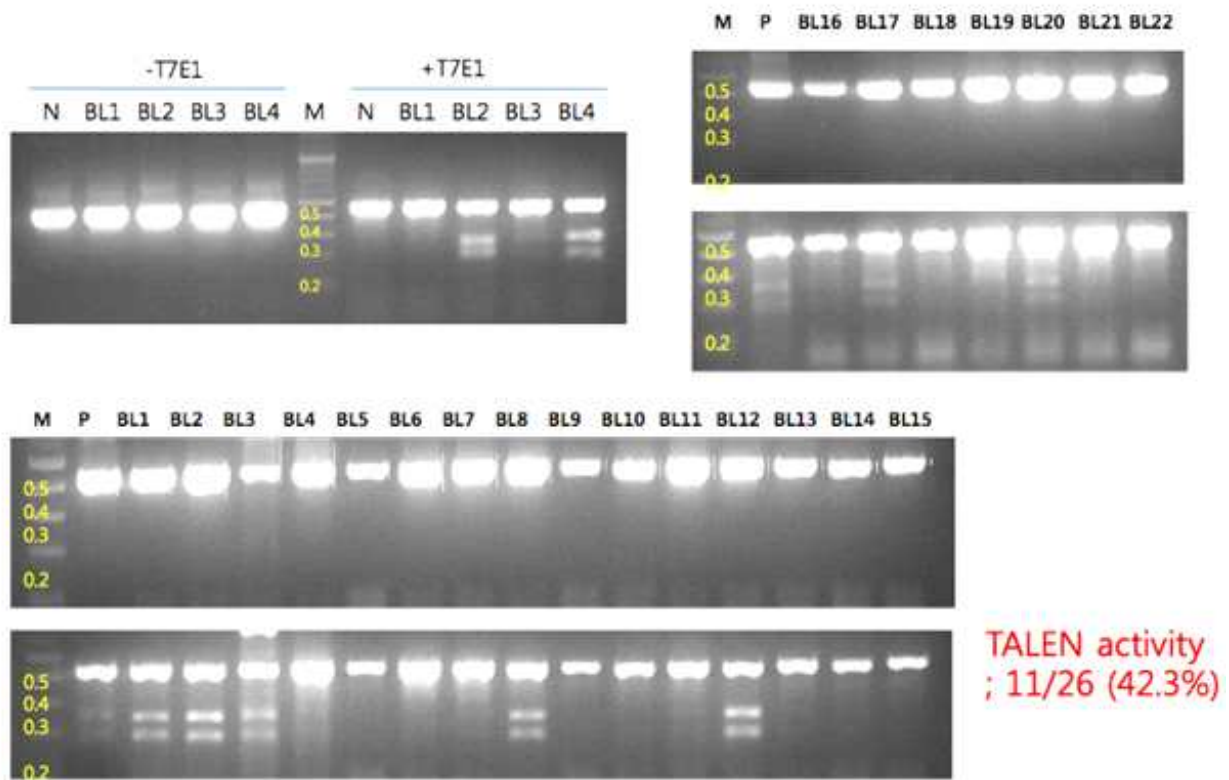


그림 68 TALEN을 이용한 PARK2 KO 복제수정란의 T7E1 assay를 통한 KO 여부 확인.

#### 다. TALEN-KO 복제수정란 생산효율 최적화

##### (1) 연구방법

##### (가) Resveratrol을 이용한 복제수정란 생산효율 최적화

① 먼저 체외성숙 기간 동안 antioxidant인 resveratrol의 처리를 통한 생산 효율 향상을 시도하였다. 이를 위해 Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 50 mM의 1차 stock solution으로 만들어 놓고, 사용할 때마다 TCM-199 베이스의 체외성숙 배지로 희석하여 신선한 50  $\mu$ M 2차 stock solution을 만들어 사용하였다. 이전의 논문을 참고하여 (Kwak et al., 2013) control, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M 총 4개의 군으로 44시간의 체외성숙 기간 동안 처리하였다. 생산 효율 향상을 측정하기 위한 방법으로는 parthenogenetic activation을 사용하였다.

##### (나) Trolox을 이용한 복제수정란 생산효율 최적화

① 다음으로 체외배양 기간 동안 antioxidant인 trolox의 처리를 통한 생산 효율 향상

실험을 진행하였다. Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 100 mM의 1차 stock solution으로 만들어 놓고, 사용할 때마다 porcine zygote media 5 (PZM-5)에 희석하여 control, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M 총 4개의 군으로 7일간의 체외배양 기간 동안 처리하였다. 생산 효율 향상을 측정하기 위한 방법으로는 parthenogenetic activation을 사용하였다.

② 위 두가지 실험을 진행하기 위해 진행한 parthenogenetic activation 방법은 다음과 같다. 체외성숙 후 난구세포-난자-복합체는 0.1% hyaluronidase를 사용하여 난구세포를 벗겨내고, 성숙된 난자를 0.26 M mannitol, 0.5 mM HEPES, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>가 첨가된 활성배지가 담긴 chamber에 넣고 전극을 연결한 후, BTX electro-cell Manipulator 2001기계를 이용하여 1.5 kv/cm의 직류전압으로 한번의 60  $\mu$ s의 지속시간으로 전류를 가하여 활성화시켰다. 미네랄 오일 (mineral oil)로 도포된 20  $\mu$ L의 PZM-5 미세소적 (microdrops) 내에서 수정란을 5-6개씩 배양하였다. 활성화 2일 후에 분할률을 측정하고, 활성화 7일 후에 배반포 형성률을 측정하여 생산 효율 향상의 지표로 사용하였다.

## (2) 연구결과

### (가) 체외성숙 기간 동안 antioxidant인 resveratrol의 처리를 통한 생산 효율 향상

- ① 체외성숙 기간 동안 체외성숙 배지에 antioxidant인 resveratrol의 처리가 돼지 수정란의 발달률을 향상시킨다는 연구결과가 보고되었고, 이에 본 연구에서는 resveratrol을 체외성숙 기간 동안 처리한 난자를 사용하여 단위생식 활성화 후 단위생식 수정란의 체외발달에 미치는 효과를 확인하였다.
- ② 단위생식 활성화 기법을 이용하여 resveratrol의 적정 처리농도를 확인하였는데, 1  $\mu$ M과 2  $\mu$ M의 농도로 처리한 군에서의 분할률이 대조군 및 4  $\mu$ M 처리군에서 보다 유의적으로 높게 나타났다. 또한 2  $\mu$ M의 처리군에서의 배반포 형성율이 대조군 및 다른 처리군에 보다 유의적으로 높게 나타났다. 배반포 세포수에서는 군 별간 유의적 차이가 없었다.

표 29 체외성숙 기간 동안 Resveratrol의 처리 조건에 따른 단위생식 수정란의 체외발달률

Resveratrol concentration (μM)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%)		Total cell no. in blastocyst (N)†
		≥ 2-cells	Blastocyst*	
0 (control)	131	92(64.9 ± 0.5) <sup>a</sup>	22(16.9 ± 1.2) <sup>a</sup>	36.2 ± 2.6 (5)
1	131	99(73.6 ± 2.7) <sup>b</sup>	26(20.2 ± 3.0) <sup>a</sup>	35.6 ± 1.9 (7)
2	124	93(73.4 ± 2.8) <sup>b</sup>	40(32.9 ± 4.2) <sup>b</sup>	42.2 ± 3.8 (13)
4	137	83(59.3 ± 2.9) <sup>a</sup>	17(12.5 ± 1.0) <sup>a</sup>	43.2 ± 4.6 (6)

Values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Experiment was replicated five times.

\* Percentage of total cultured oocytes. The data represent means ± SEM.

† Number of examined blastocysts.

(나) 체외배양 기간 동안 antioxidant인 trolox의 처리를 통한 생산 효율 향상

① 체외배양 기간 동안 체외배양 배지에 antioxidant인 trolox의 처리가 소 및 양의 수정란의 발달률을 향상시킨다는 연구결과가 보고되었고, 이에 본 연구에서는 trolox를 돼지난자의 단위생식 활성화 후 체외배양 기간 동안 처리하여 단위생식 수정란의 체외발달에 미치는 효과를 확인하였다.

표 30 체외배양 기간 동안 Trolox의 처리 조건에 따른 단위생식 수정란의 체외발달률

Trolox concentration (μM)	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to (%)		Total cell no. in blastocyst (N)†
		≥ 2-cells	Blastocyst*	
0 (control)	240	165(69.1 ± 2.9) <sup>a,b</sup>	56(23.8 ± 2.6) <sup>a</sup>	40.0 ± 4.4 <sup>a,b</sup> (11)
100	239	180(75.6 ± 1.8) <sup>c</sup>	56(23.7 ± 2.1) <sup>a</sup>	45.3 ± 3.9 <sup>a,b</sup> (12)
200	239	178(74.6 ± 2.1) <sup>b,c</sup>	79(33.7 ± 3.1) <sup>b</sup>	51.9 ± 4.3 <sup>b</sup> (11)
400	239	162(67.8 ± 1.0) <sup>a</sup>	47(20.7 ± 4.1) <sup>a</sup>	36.8 ± 3.3 <sup>a</sup> (10)

Values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Experiment was replicated three times.

The data represent means ± SEM.

\* Percentage of total cultured oocytes.

† Number of examined blastocysts.

② 단위생식 활성화 기법을 이용하여 trolox의 적정 처리농도를 확인하였는데, 100 μM 농도로 처리한 군에서의 분할률이 대조군 및 다른 처리군에서 보다 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 200 μM 농도로 처리한 군에서의 배반포형성율과 배반포 세포수가 대조군 및 다른 처리군에서 보다 유의적으로 높게 나타났다.

## 9. AD 병인 유전자 복합발현 미니배지 생산

### 가. mAPP와 mPS1 복합발현 복제수정란의 생산

#### (1) 연구방법

##### (가) APP 발현 복제배지 세포에 PS1 추가적 복합발현 복제수정란의 생산

- ① AD 병인 유전자 복합발현 미니배지 생산을 위해 기존에 보유하고 있던 뇌신경세포 특이적 mutant APP(mAPP) 과발현 미니배지 지방줄기세포에 뇌신경세포 특이적으로 mutant PS1(mPS1)를 발현하도록 하는 벡터를 도입시켰다 (그림 1). mAPP와 mPS1의 뇌신경세포 특이적 발현을 유도하는 promoter로는 Synapsin (Syn) promoter가 이용되었다. 전신 발현 promoter인 EF1 promoter에 의해 copGFP 및 puromycin 저항성 유전자 (puroR)이 발현되도록 하여 벡터의 도입이 이루어진 세포를 선택하였다. 선택된 세포를 이용하여 생산한 복제수정란이 정상적으로 배반포단계까지 발달하고, GFP를 발현하는 것을 확인하였다.

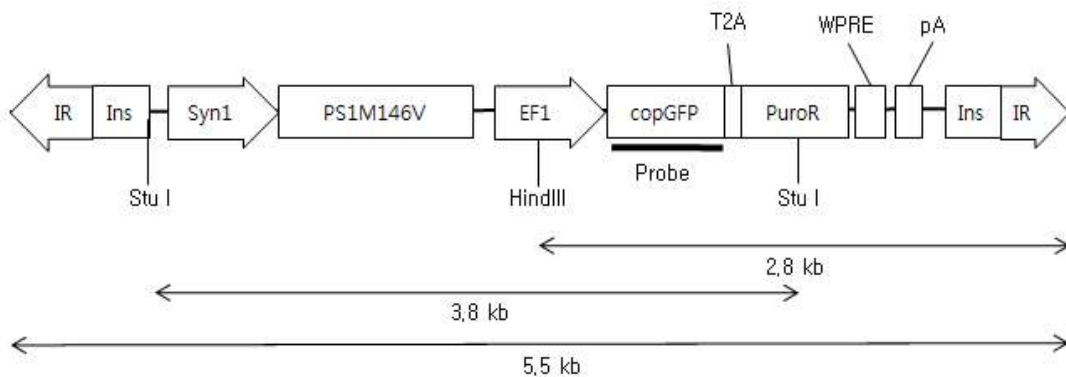


그림 69 뇌신경세포 특이적 mutant PS1 발현 벡터 구조

#### (2) 연구결과

##### (가) mAPP와 mPS1 복합발현 복제수정란의 생산

- ① 전년도에 제작된 뇌신경세포 특이적 mAPP, mPS1 복합발현 체세포를 공여세포로 이용하여 체세포 핵이식을 수행, 뇌신경세포 특이적 mAPP, mPS1 복합발현 복제수정란을 생산하였다.



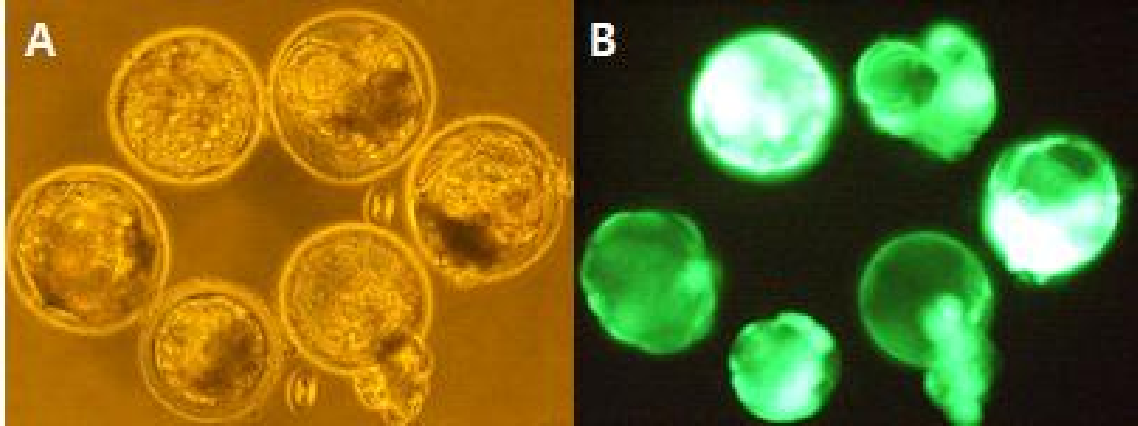


그림 70 GFP를 발현하는 AD 병원 유전자 (mAPP, mPS1) 복합발현 배반포. A, bright field; B, fluorescence

- ② 생산된 복제수정란은 체외배양 시 정상적으로 배반포단계까지 발달하였으며, 삽입된 유전자의 검증은 marker 단백질인 GFP를 통해 실시되었다 (그림 1. 전년도 결과보고서와 같음). 또한, 이로부터 생산된 복제돼지의 유전자 삽입을 확인하고, 그 체세포를 분리하여 유전적으로 같은 개체를 복제하기 위하여 지속적으로 복제수정란을 생산하고 있다.

#### 나. APP와 PS1 복합발현 모델 복제돼지의 생산

##### (1) 연구방법

##### (가) mAPP와 mPS1 복합발현 모델 복제돼지의 생산

- ① 생산된 mAPP와 mPS1 복합발현 복제수정란을 4-8 cell 단계에서 선택하여 이동식 인큐베이터로 농장까지 운반한 후, 발정 시기 등을 고려해 선택된 대리모의 자궁에 이식하였다. 이식 후 21일 경 대리모의 발정 회귀여부를 판단하고, 발정이 회귀되지 않은 개체에 대하여 초음파 검사를 지속적으로 실시하였다.
- ② 분만예정일까지 지속적으로 임신을 모니터링하였고, 총 3마리의 대리모에서 6마리의 mAPP와 mPS1을 복합발현하는 복제 미니돼지를 생산하였다. 미니돼지는 기존의 mAPP 과발현 미니돼지(ADF1-5)에 이어 ADF6-11로 명명하였다. 전지 기형을 가지고 태어난 ADF8는 생후 2일 째, 특별한 이상이 관찰되지 않은 ADF6과 ADF7은 생후 16일 째에 설사와 호흡곤란을 보이며 폐사하였다. mAPP, mPS1 복합발현 미니돼지를 추가 생산하기 위하여 유전자 삽입이 검증된 ADF6의 세포를 이용하여 지속적으로 체세포 핵이식 수행 및 대리모에 이식 중이며, 6월 현재 임신 확인 및 유지되고 있는 대리모 1두의 분만을 대비하고 있다.

##### (2) 연구결과

(가) mAPP와 mPS1 복합발현 모델 복제돼지의 생산

① 3두의 대리모에서 mAPP와 mPS1을 복합발현하는 복제 미니돼지 6두를 생산하였다.

표 31 4차년도에 생산된 mAPP, mPS1 복합발현 복제 미니돼지에 관한 정보

개체번호	출생일	생시 체중	유전자 삽입 여부	현재 상태
ADF6	2014. 11. 21	1.20 kg	O	폐사 (16일령)
ADF7	2014. 11. 21	1.06 kg	O	폐사 (16일령)
ADF8	2015. 1. 26	580 g	O	폐사 (2일령)
ADF9	2015. 5. 29	1.05 kg	O	생존
ADF10	2015. 5. 29	0.83 kg	O	생존
ADF11	2015. 5. 29	0.41 kg	O	생존

② AD 관련 유전자 복합발현 미니돼지는 기존의 mAPP 과발현 미니돼지(ADF1-5)에 이어 ADF6-11로 명명하였다. ADF6, 7은 각각 1.20kg, 1.06kg으로 건강하게 태어났으나, 생후 16일 쯤 호흡곤란과 설사 증상으로 폐사하였다. ADF6, 7은 체표면 뿐 아니라 내부 장기, 뇌에서도 GFP를 발현하는 것이 확인되었다.

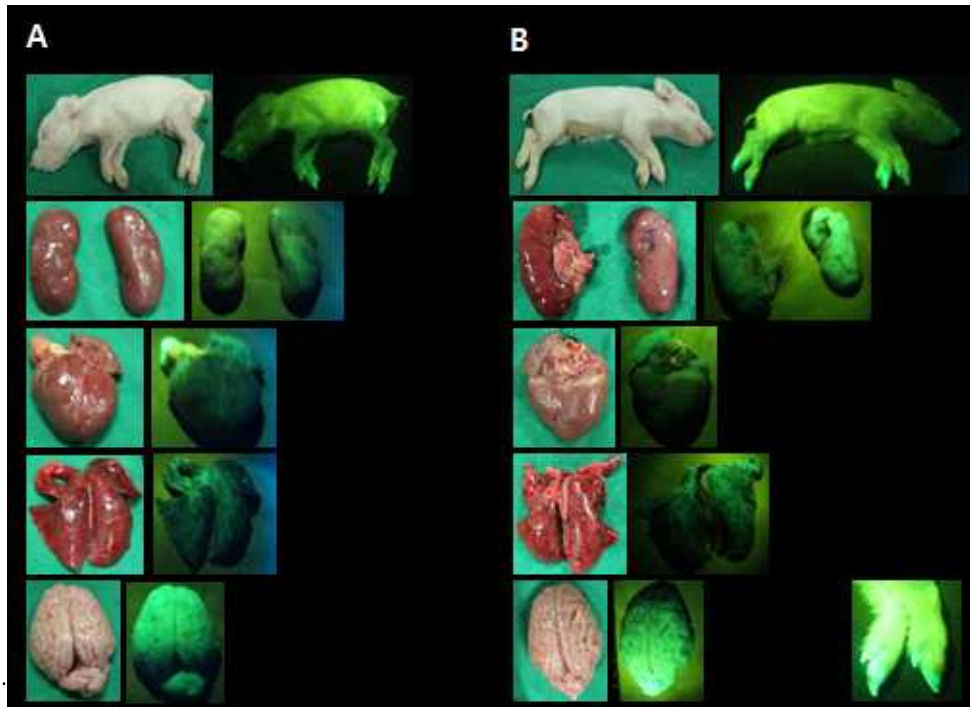


그림 71 ADF6, 7의 폐사 후 GFP 발현 확인. A, ADF6 전신, 신장, 심장, 폐, 뇌; B, ADF7 전신, 신장, 심장, 폐, 뇌 및 발굽에서의 GFP 발현

③ ADF8은 580g으로 출생하였으나 초유 섭취 의지가 없고, 전지 기형으로 운동 불가능하여 2일 쯤 폐사하였다. ADF6, 7의 AD 유전자 삽입 검증을 위해 genomic DNA (gDNA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. mAPP의 경우, WT을 제외하고 positive control (ADF1) 및 ADF6과 ADF7 에서 gDNA 상에 삽입되어 있음을 확인하였다.



그림 72 전지기형을 보이는 ADF8. A, 전신 상태; B, 다지증을 나타내는 전지



그림 73 ADF6, 7의 gDNA에 삽입된 mAPP. WT, wild type; P, positive control (ADF1 fibroblast)

④ mPS1의 경우, 돼지의 PS1과 유사한 염기서열 정보를 가지고 있어, mPS1과 같은 벡터 내에 존재하는 다른 유전자들(copGFP, PuroR, WPRE)의 삽입 여부로 대신하였다. copGFP, PuroR, WPRE 역시 WT을 제외하고 positive control (벡터) 및 ADF6 과 ADF7에서 gDNA 상에 삽입되어 있음을 확인하였다.

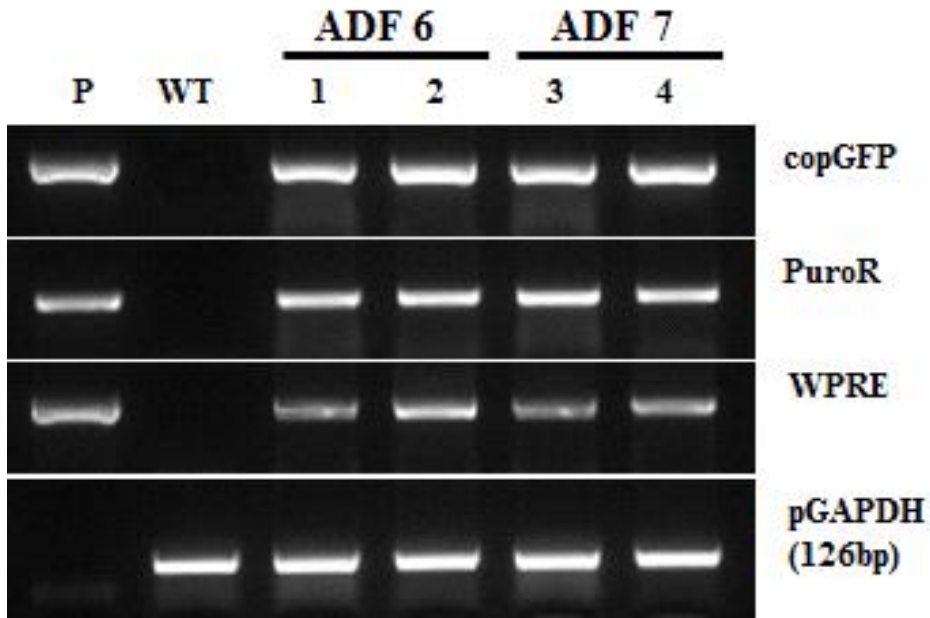


그림 74 ADF6, 7의 gDNA에 삽입된 piggyBac (pB) 벡터에 포함된 여러 유전자. copGFP (446bp), PuroR (612bp), WPRE (315bp); P, positive control (pB 벡터); WT, wild type; 1, ADF6 skin fibroblast; 2, ADF6 skin tissue; 3, ADF7 skin fibroblast; 4, ADF7 skin tissue

⑤ 또한, 각 개체의 mPS1 copy number를 파악하고자 실시한 souther blot에서 ADF6은 최소 4개, ADF7은 최소 2개의 copy number가 확인되었다.

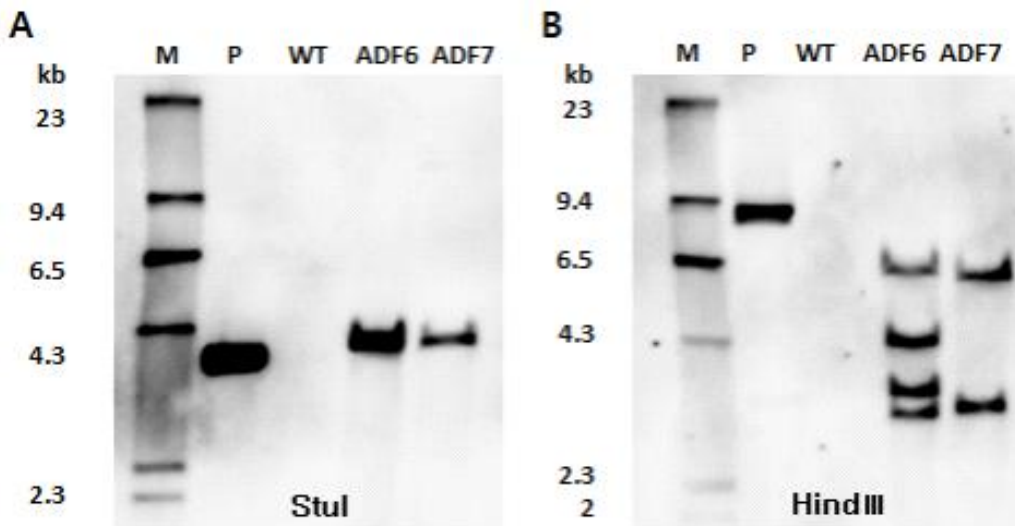


그림 75 mAPP, mPS1 복합발현 미니배지의 Southern blot 결과. 피부조직으로부터 gDNA를 분리하고, copGFP에 대한 probe를 사용하였음. Stul (A), HindIII (B) 제한 효소를 이용하여 gDNA를 특정 염기서열에서 자르고, 전기영동 실시. M, molecular weight; P, positive control (pB 벡터); WT, wild type

⑥ mAPP, mPS1 복합발현 미니배지를 추가 생산하기 위하여 유전자 삽입이 검증된

ADF6의 세포를 이용하여 지속적으로 체세포 핵이식 수행 및 대리모에 이식하였으며, 총 4두를 생산하였다. 모두 ADF6 개체의 체세포를 이용한 리클론이며, 아래 그림과 같이 모두 벡터내에 있는 유전자가 발현하는 것을 PCR을 통하여 검증하였다.

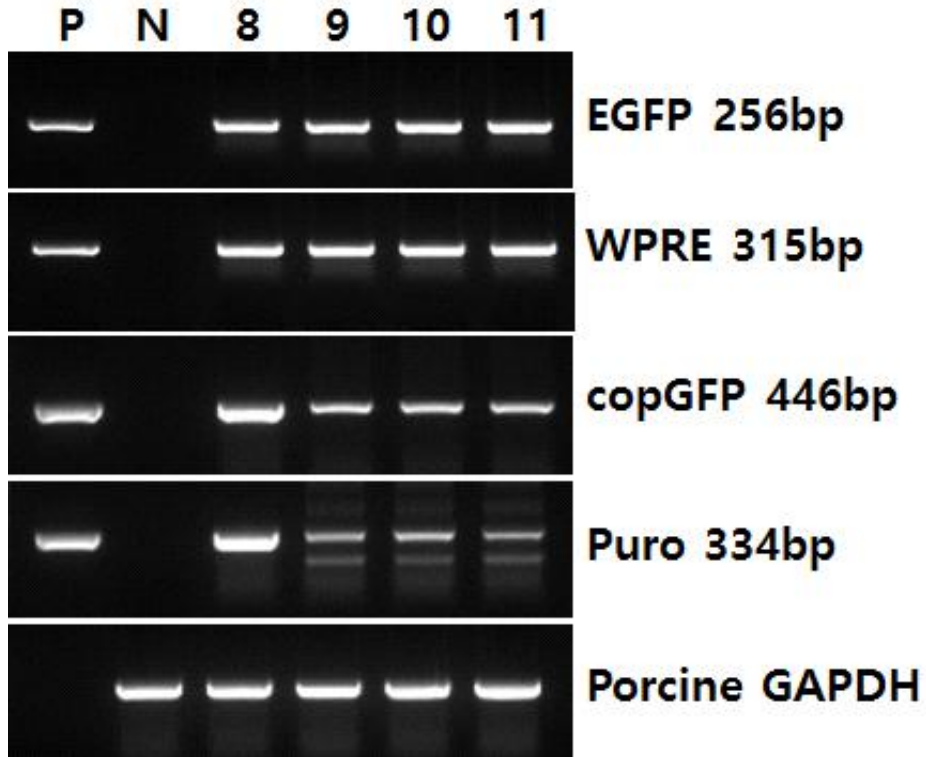


그림 76 ADF 6 리클론을 통해 생산된 ADF 8, 9, 10, 11개체의 gDNA에 삽입된 piggyBac (pB) 벡터에 포함된 여러 유전자. copGFP (446bp), PuroR (612bp), WPRE (315bp); P, positive control (pB 벡터); WT, wild type; 8, ADF8 skin fibroblast; 9, ADF9 skin tissue; 10, ADF10 skin fibroblast; 11, ADF11 skin tissue



그림 77 2015년 5월 29일 태어난 ADF6의 리클론을 통해 생산되어진 ADF 9, 10, 11 mAPP+PS1 복합발현 형질전환 돼지

#### 다. mAPP 과발현 미니돼지의 자손 유전자 분석

##### (1) 연구방법

##### (가) mAPP 과발현 미니돼지의 번식 및 자손 유전자 분석

- ① 기년도에 생산되어진 mAPP 과발현 미니돼지(ADF1)가 standing heat sign을 보이는 등 발정 반응을 보일 때 wild type 수돼지와 자연 교배하였다. 114일의 임신기간이 지나고 최종적으로 8두의 자손을 분만하였다.

##### (2) 연구결과

##### (가) mAPP 과발현 미니돼지의 번식 및 자손 유전자 분석

- ① 얻은 8마리의 자손 중, 암컷은 2마리, 수컷은 6마리였다. 모든 개체에서 mAPP가 삽입되었음을 확인하였고, 이로써 ADF1의 mAPP 생식선 전이가 검증되었다. 자손 중 암컷 개체인 ADF1-2가 생존하여 ADF1과 같이 AD 발병에 대해 분석중이다.

#### 10. Parkin KO 복제 미니돼지 생산

##### 가. Parkin KO 복제 미니돼지 생산

(1) 연구방법

(가) Parkin KO 복제 미니돼지 생산

① TALEN을 이용하여 parkin 유전자를 KO한 돼지는 크게 2가지 과정으로 생산하였다. 먼저, TALEN을 직접적으로 세포에 transfection하여서 KO되었을 것으로 예상되는 세포 (GFP를 발현하는 세포)를 선별하였고, 그 세포를 체세포핵이식에 공여세포로 사용하여 산자를 생산하였다. 이런 방법을 통해서 총 8마리의 산자를 생산하였고, 각각 PDM1~8이라고 명명하였다. 하지만 이렇게 생산하는 방법의 단점은 100% KO된 산자를 생산할 수 없다는 점이고, 출생 후 sequencing을 이용한 분석을 통해 확인해본 결과, 8마리 중에서 parkin KO이 확인된 산자는 총 3마리였다 (Hetero KO; PDM3, homo KO; PDM5 and PDM6). 나머지 5마리는 wild type인 것으로 확인되었다. 이를 통해 확인된 KO 효율은 37.5%였다. 하지만 이렇게 생산된 KO 산자들이 PDM3는 불명확한 이유, PDM5는 구개열 그리고 PDM6는 사산 등의 이유로 모두 사망하였다.

② 다음으로, KO이 확인된 개체의 세포를 이용하여 재복제를 통해서 KO 개체를 복제하였다. 이를 통하면 100% KO된 개체를 생산할 수 있다는 장점이 있다. 먼저 homo KO으로 확인된 PDM5 세포를 이용해서 체세포 핵이식을 진행하였고, PDM9을 생산하였다. 하지만 PDM5와 마찬가지로 PDM9도 구개열을 가지고 있었고, 이로 인해 sacrifice를 결정하였다. 다음으로 hetero KO으로 확인된 PDM3 세포를 이용해서 체세포 핵이식을 진행하였고, PDM10과 PDM11을 생산하였다. PDM10의 경우 허가 비정상적으로 큰 것을 확인하였고, 얼마 후 폐사하였다. PDM11은 현재까지도 건강하게 자라고 있다.

(2) 연구결과

(가) Parkin KO 복제 미니돼지 생산

① 현재까지 PD 녹아웃 개체는 체세포핵이식을 통해서 총 11마리의 산자를 생산하였다 (표 1). PDM1부터 PDM8까지의 8마리는 TALEN을 세포에 transfection하여서 KO을 유도한 세포를 공여세포로 사용하여 체세포핵이식을 진행하여서 태어난 산자들이고, PDM9부터 PDM11까지의 3마리는 태어난 산자의 체세포를 이용하여 재복제를 진행하여 태어난 산자들이다. PDM1부터 PDM8까지의 산자들 중 parkin이 KO된 산자는 PDM3 (hetero KO), PDM5 (homo KO) 그리고 PDM6 (homo KO)의 총 3마리였다. 이를 토대로 KO의 효율을 추정해보면, 37.5%인 것을 확인할 수 있었다. 나머지 5마리는 wild type으로 확인되었다. 현재는 PDM1을 제외한 나머지 7마리는 표 1에서 확인할 수 있는 것처럼 모두 폐사하였다.

표 32 생산된 parkin KO 복제 미니돼지의 정보

No.	ID	Modified genes	Sex	Fate	Cause of death
1	PDM1	None*	M**	Alive	-
2	PDM2	None*	M**	Dead	Cleft
3	PDM3	Hetero PRKN KO	M**	Dead	Unclear reason
4	PDM4	None*	M**	Dead	Unclear reason
5	PDM5	Homo PRKN KO	M**	Dead	Cleft
6	PDM6	Homo PRKN KO	M**	Dead	Stillbirth
7	PDM7	None*	M**	Dead	Unclear reason
8	PDM8	None*	M**	Dead	Unclear reason
9	PDM9	PDM5 reclone (Homo PRKN KO)	M**	Dead	Cleft
10	PDM10	PDM3 reclone (Hetero PRKN KO)	M**	Dead	Mega tongue
11	PDM11	PDM3 reclone (Hetero PRKN KO)	M**	Alive	-

② KO이 확인된 개체들이 존재했기 때문에 추가적으로 진행되는 체세포핵이식은 KO이 확인된 개체에서 유래한 체세포를 이용하여 진행하였다. 먼저 homo KO이 확인된 개체인 PDM5와 PDM6가 후보로 선정되었고, PDM6는 사산태아였기 때문에 체세포 이용에서 제외하였다. PDM5를 이용한 산자생산에서 PDM9가 태어났다. 염기서열 확인결과 PDM5와 정확하게 일치하는 homo KO인 것을 확인하였으나, PDM5와 마찬가지로 구개열을 가지고 있었다. 다음으로 재복제 후보는 hetero KO인 PDM3였고, 이 세포를 이용해서 PDM10과 PDM11의 두 마리 산자가 태어났다. PDM10의 경우 혀가 기형이 발견되었고, 생후 12일령에 폐사하였다. PDM11의 경우 현재까지 건강하게 살아있다. 아래 그림은 구개열을 가지고 태어난 PDM5가 폐사하고 난 뒤, 진행한 부검사진이다. 부검상에서 구개열 이외에 특별한 이상을 발견하지 못하였다.

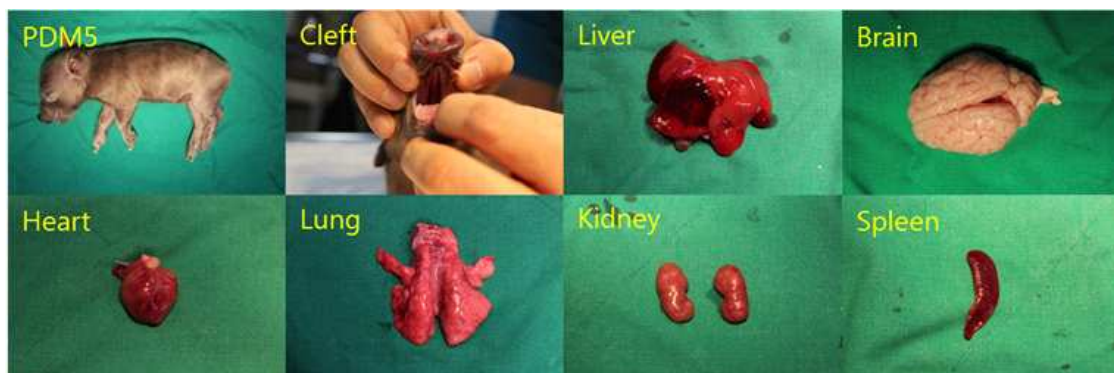


그림 78 PDM5 부검 사진



③ 아래그림은 hetero KO 복제 미니돼지인 PDM3를 재복제한 PDM10과 PDM11의 사진이다. 두 마리 모두 900g 이상으로 건강하게 태어났으나, PDM10의 경우 그림에서 볼 수 있듯이, 혀가 커서 입이 잘 다물어지지 않는 것을 확인할 수 있다. PDM10은 지속적인 관리에도 출생 후 12일 만에 폐사하였다.



그림 79 PDM10과 PDM11 사진

#### 나. Parkin KO 복제 미니돼지 유전자 발현 분석

##### (1) 연구방법

##### (가) Parkin KO 복제 미니돼지 유전자 발현 분석

① 먼저 TALEN transfection을 직접적으로 한 세포를 이용해서 태어난 산자의 sequencing 결과에서 PDM3는 7bp deletion, PDM5는 4bp deletion/7bp insertion 그리고 PDM6는 78bp deletion/14bp deletion이 일어난 것을 확인하였다. 그리고 PDM5를 재복제한 PDM9의 경우 PDM5와 정확하게 동일한 양상의 KO sequence를 확인할 수 있었고, PDM3를 재복제한 PDM10과 PDM11의 경우 PDM3와 정확하게 일치하는 KO sequence를 확인할 수 있었다. PDM3의 경우 KO이 일어나지 않은 반대쪽 allele에 A가 G로 바뀐 point mutation이 발생했는데, 재복제한된 PDM10과 PDM11도 동일한 point mutation이 존재하는 것도 확인하였다.

##### (2) 연구결과

(가) Parkin KO 복제 미니배지 유전자 발현 분석

① 태어난 모든 개체에 대해서 sequencing을 진행하였다. KO을 유발하기 전 target site의 wild type sequence는 그림 66의 가장 위에 제시된 sequence이다. PDM1, PDM2, PDM4, PMD7 그리고 PDM8의 경우 이 wild type과 sequence가 완벽하게 일치하는 것을 확인하였다. 반면에 PDM3의 경우 한 쪽 allele에 7bp가 deletion이 일어난 hetero KO (KO이 일어난 반대쪽 allele에는 A가 G로 변한 point mutation이 있음)이었고, PDM5의 경우 4bp deletion/7bp insertion이 일어난 homo KO, PDM6의 경우 78bp deletion/14bp deletion이 일어난 homo KO 복제 미니배지인 것을 확인하였다. 이렇게 KO이 확인된 체세포 중 일부를 이용하여 재복제를 진행하였고, PDM5를 재복제하여 생산한 PDM9의 경우 PDM5와 sequencing 결과가 정확하게 일치하는 것을 확인하였고, PDM3를 재복제하여 생산한 PDM10과 PDM11의 경우 PDM3와 sequencing 결과가 정확하게 일치하는 것을 확인하였다. 그 sequencing 결과는 아래 그림에서 확인할 수 있다.

**WT**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM1 (WT/WT)**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM2 (WT/WT)**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM3 (WT;A→G/-7); Hetero KO**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACGGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGC-----CCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM4 (WT/WT)**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM5 (-4/+7); Homo KO**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCC-----GCCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCC  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGGGGGGACCACGGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCC

**PDM6 (-78/-14); Homo KO**  
CTCACAGGGTCTTCTT------(78bp DEL)-----GTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**A-----ACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM7 (WT/WT)**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM8 (WT/WT)**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM9 (-4/+7); Homo KO**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCC-----GCCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCC  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGGGGGGACCACGGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCC

**PDM10 (WT;A→G/-7); Hetero KO**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACGGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGC-----CCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

**PDM11 (WT;A→G/-7); Hetero KO**  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGCCCTGGGACCACGGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT  
ACCGGATGAGTGGT**GAGTGCCAGTCTCAA**ACTGC-----CCACAGCAGTAAGTACTGGTCAAATCCGTCCTTCCATT

그림 80 Parkin KO 복제 미니돼지 총 11마리의 sequencing 결과

#### 다. Parkin KO 복제 미니돼지 유래 세포주 확립

##### (1) 연구방법

##### (가) Parkin KO 복제 미니돼지 유래 세포주 확립

- ① 출생 당시 미이라 상태였던 PDM6와 초기배양에 실패한 PDM9을 제외한 9마리에 대한 세포를 확립하였다. 현재 액체질소 속에서 냉동 보관 중이다.

##### (2) 연구결과

##### (가) Parkin KO 복제 미니돼지 유래 세포주 확립

① 현재 미이라 상태로 죽어서 태어난 PDM6와 초기배양에 실패한 PDM8과 PDM9를 제외한 8마리에 대한 체세포를 확보하여 액체질소 속에서 냉동보관 중이다.

표 33 Parkin KO 복제 미니돼지 유래 세포 보관 현황

세포명	유전자	계대	수	세포수
PDM 1	-	0	5	1×106
	-	1	2	1×106
PDM 2	-	0	8	1×106
	-	1	3	1×106
PDM 3	PARK2 KO (Hetero)	1	2	1×106
	PARK2 KO (Hetero)	2	7	1×106
	PARK2 KO (Hetero)	2	5	1×105
PDM 4	-	0	1	1×106
	-	1	1	1×106
PDM 5	PARK2 KO (Homo)	0	2	1×106
	PARK2 KO (Homo)	1	3	1×106
	PARK2 KO (Homo)	1	8	1×105
	PARK2 KO (Homo)	2	4	1×106
	PARK2 KO (Homo)	5	1	1×106
PDM 7	-	0	9	1×106
PDM 10	PARK2 KO (Hetero)	0	1	1×106
	PARK2 KO (Hetero)	1	3	1×106
PDM 11	PARK2 KO (Hetero)	0	1	1×106
	PARK2 KO (Hetero)	1	2	1×106

## 11. 사업화를 위한 기초 수요조사 실시 및 모델돼지로서의 정량적 기준의 마커 제시

### 가. 기초 수요조사 실시

#### (1) 연구방법

##### (가) 시장의 전망성 및 사업화 가능성 타진

- ① 알츠하이머 질환관련 글로벌 시장동향 및 질환관련 시장의 전망과 알츠하이머 질환 모델 동물의 중요성을 조사하였다.
- ② 알츠하이머 질환 모델 동물로 마우스 모델의 한계점 및 현재까지 개발된 대동물 모델, 돼지모델 개발의 필요성에 대해서 문헌 조사를 실시를 통해 시장성 및 기초 수

요를 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 알츠하이머 질환관련 글로벌 시장동향

- ① 전 세계적으로 인구 고령화가 진행되면서 퇴행성 뇌질환, 그 중에서도 알츠하이머 질환의 환자가 급속도로 증가하면서 알츠하이머 질환과 관련된 시장 규모가 크게 증가하고 있다.
- ② 알츠하이머 질환의 높은 발병률과 더불어 시장 규모는 2017년에는 90억 달러로 증가될 것으로 예상된다. 국내 시장은 현재 700억 정도이나 98%가 수입 의약품에 의존하고 있으며, 주로 다국적 제약회사 (노바티스, 얀센)가 시장을 점유하고 있다. 또한 세계 치료제 시장 규모는 2005년 276억 달러에서 연평균 13.3% 성장률을 나타내며, 2015년에는 963억 달러의 시장을 형성할 것으로 예상하고 있다. 21세기 고령화 사회를 앞두고, Datamonitor사의 발표에 따르면, 7개 거대시장(미국, 일본, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국)의 알츠하이머 질환 치료제 시장은 2019년까지 \$11.9 billion 으로 전망되며, 2020년까지 10.7%의 성장률을 예상하고 있다.

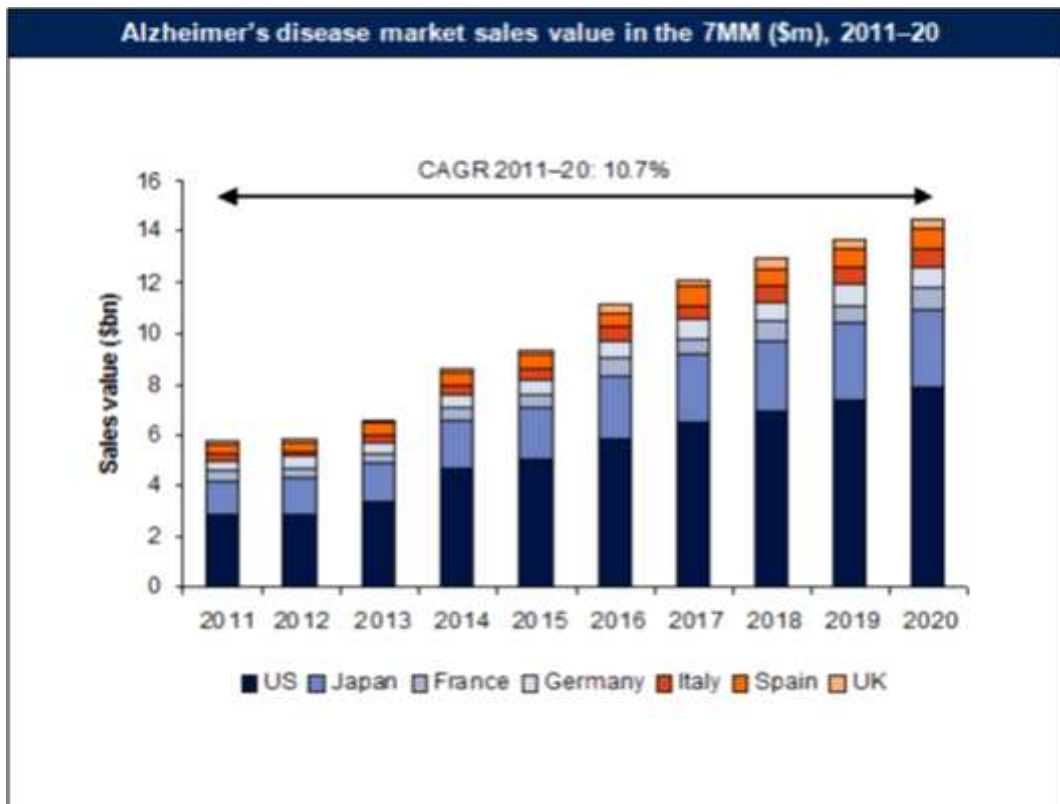


그림 81 알츠하이머 질환 치료제 글로벌 시장

(나) 알츠하이머 질환관련 국내 시장 동향

① 한국의 실버 산업은 아직 초기 단계로 저출산 고령사회 위원회에 따르면 요양 시설을 포함해 전체시장규모가 2002년 기준 12조 8,334억원으로 파악된다. 그러나 관련업계는 실버 산업의 성장 가능성에 주목하고 있으며, 국내 시장은 2002년 12조원대에서 한국시장규모가 2010년에는 43조 9,612억원에서 2020년에는 148조 5,969억에 도달할 것으로 예상하고 있다.



그림 82 실버산업 시장규모

② 이 중 뇌 신경질환 관련 전망에 따르면 국내 시장은 연평균 12.8%의 성장률로 성장하여 2005년 6,463억 원에서 2015년 21,554억 원의 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다.

표 34 뇌 신경 질환 관련 국내 시장 전망

(단위: 백만 달러, 억원, %)

	2005년	2010년	2015년
해외시장	92,355	168,658	308,001
국내시장	6,463	11,803	21,554

(다) 알츠하이머 질환 관련 시장의 전망

① 전체적으로 미국, 일본을 중심으로 알츠하이머 질환에 대한 치료제의 개발이 이루어지고 있으며, 최근 다국적 제약사의 특허권이 만료되면서 개발이 더욱 치열해질 것으로 예상된다. 특히, 선진국의 경우에는 향후 고령화 시대를 대비하여 대대적인 정부 투자의 주도 아래 기술 연구 개발이 이루어지고 있는 것을 확인할 수 있다. 국내외 전체적으로 고령화 시대에 접어듬에 따라 그 마켓 규모는 점차 증대할 것으로 예상되는데, 선제적인 연구 개발이 이루어지지 못하는 경우에는 국부의 유출이 예견된다 하겠다.

(라) 알츠하이머 질환 연구 동물 모델의 중요성

- ① 현재 알츠하이머 질환 치료제로는 FDA의 승인을 받은 의약품은 5개로, 4개의 AChEI와 1개의 NMDA 길항제가 있다. 그러나 해외 시장에서 개발되는 이들 약품은 근본적으로 알츠하이머를 완치시키는 것보다는 주로 증상을 완화시키고 진행을 지연시키는 약물들이다. 현재까지 질병을 근본적으로 치료하기 위한 약물은 개발되지 못하고 있는 것이 실정이다. 1998년부터 2011년까지 101개의 알츠하이머 질환 치료제 개발이 실패로 돌아갔으며 같은 기간 단 3개의 약물만이 승인을 받았다. 또한 최근에 관심을 모았던 amyloid- $\beta$  peptides를 인식하는 항체인 Bapineuzumab(Pfizer)와 Solanezumab(Lilly) 및 면역글로블린 기반(immunoglobulin-based) 약물인 Gammagard(Baxter)에 대한 3상 임상 시험이 모두 실패 또는 부분 실패로 돌아감으로써 알츠하이머병 치료제 개발의 험난함을 더욱 실감하고 있다.
- ② 알츠하이머 질환의 근본적 치료제 개발에 매달리고 있지만, 원하는 수준의 신약 개발은 사실상 요원한 상태이다. 다양한 원인이 있지만 그 중에서도 가장 큰 원인의 하나는 알츠하이머 질환의 특성 상 임상 시험 디자인이 곤란한 점을 들 수 있다. 이것은 임상 시험을 위해 적합한 실험동물이 개발되지 못하고 있다는 것이 큰 원인으로 꼽히고 있다.

(마) 알츠하이머 질환 모델 동물

- ① 일반적으로 질병 동물 모델로는 사람과 유전적으로 유사하고 유전적 분석이 유용하며 짧은 생명 주기를 가지고 크기가 작아 다루기 쉬운 쥐 또는 생쥐를 이용하고 있다. 알츠하이머 질환 동물 모델의 경우에는 2000년대 초반까지 쥐를 이용하여 많은 모델들이 생산되었다. 대부분 알츠하이머 질환의 주요 발생원인인 아밀로이드 단백질이 변형된 형질전환 쥐 모델이며 이외에 타우 단백질 변형 쥐 모델, GRK5가 녹아웃(knock-out, KO) 모델이 있다.
- ② 그러나, 알츠하이머 질환 쥐 모델은 사람과 생리학적, 해부학적으로 차이가 있기 때문에 정확한 질병의 발병원인과 기전을 연구하기에 있어 한계가 있다. 쥐를 이용한 질환모델이 사람의 질환을 재현하지 못하는 경우가 있는데, 알츠하이머 질환의 경우 생쥐를 이용한 다양한 유전적 돌연변이를 통한 알츠하이머 질환 모델이 만들어졌으나, 어떤 알츠하이머 질환 생쥐 모델도 사람의 알츠하이머 질환 모델 표현형을 보여 주지 못하는 한계점을 가지고 있었다.

(바) 알츠하이머 질환 돼지 모델

- ① 상술한 쥐 모델을 통한 알츠하이머 질환 연구의 한계점에 부딪혀 이를 대체하기 위한 다양한 동물군이 제시된 바 있다. 특히, 최근에는 사람과 해부학적으로 그리고 생리적으로 더 유사한 돼 동물 가족에서도 생쥐에서만 가능했던 유전자가 변형 또는

조작 기술이 발달함에 따라 모델 동물로서 가축이 각광을 받고 있다.

- ② 가축과 같은 대 동물의 가장 큰 단점은 유지 및 관리 비용이 많이 필요하고, 대부분은 분만 간격 및 단산성이라는 것인데, 이러한 점에서 돼지는 다산성이며 번식 간격이 짧기 때문에 소나 염소, 양과 같은 가축 보다 선호되고 있으며, 그 대안으로 돼지 모델이 대두되고 있다.
- ③ 모델 동물로서 돼지는 다른 종의 가축보다 유리한 점이 많다. 심장 혈관계, 소화 시스템, 중추 신경계, 골격, 음식 섭취 습관 등 해부학적 및 생리적인 관점에서 돼지는 다른 가축보다 더 사람에게 더 유사하며, 또한 번식의 관점에 있어서도 성 성숙 도달 일령이 빠르고, 번식 기간이 짧고, 산자수가 많은 장점을 가지고 있다. 또한 생쥐와 같은 실험동물처럼, 유전자 변형 기술, 유전자 적중 기술이 잘 확립되어 있고, 많은 연구자들에 의해 유도줄기세포, 다양한 조직의 성체줄기세포도 확립되어 있어 다른 가축보다 더 다양한 분야의 생체의학 모델동물로서 각광받고, 실제로 활용되고 있다.
- ④ 2012년에는 국립축산과학원 등 세계 각국 연구소의 공동 연구로 돼지의 게놈(genome) 프로젝트가 완성되어 유전정보에 접근하기가 더욱 쉬워졌고, 최근 전 세계적으로 사람의 특정 질환에 대한 생체 의학 모델로서 돼지의 사용이 급증하는 추세이다.
- ⑤ 즉, 여러 실험동물 중에서, 돼지는 해부학적으로 장기의 크기가 인간과 비슷하여 이 종 장기모델로서 적합할 뿐만 아니라 생리, 유전학적으로도 인간과 유사한 점이 많다. 또한 높은 번식 능력을 가지고 있으므로 생산 및 치료용 생물 신소재 개발에 있어서도 적합할 뿐만 아니라 독성 및 안정성평가에 좋은 동물 모델이라 할 수 있다.

#### (사) 돼지 모델 개발의 필요성

- ① 2008년 미국 NIH에서는 특정 질환을 유발하는 후성유전학적 변화나 기작에 대한 연구를 통해 후성유전체와 관련하여 발생하는 질병에 대한 연구를 진행하고 있다(Katsnelson, 2010). 질환동물 모델의 개발은 인간의 유전적 질병의 이해 및 치료법 개발에 따른 바이오 산업발전에 핵심적인 역할을 수행하고 있으며 바이오산업발전에 따른 유효성과 안전성을 평가하기 위한 인간질병 모델의 중·대동물의 중요성도 점차 대두되고 있다. 따라서 돼지를 이용한 인간 질환모델 개발은 마우스의 유전적 차이로 인한 많은 한계점을 타파할 수 있는 차세대 질병모델로 각광받고 있다(Pohanka, 2011). 질환모델 동물로써 돼지 유전체 연구의 당위성에 비하여, 유전체와 후성유전체에 대한 연구가 전무 하며, 돼지 유전자의 전사체 동정을 통한 정확한 유전자 맵 구축 및 후성학적 분석 결과를 통해 차후 개발되어지는 다양한 질환모델 돼지 유전체에 대한 reference가 요구되어진다.

#### (아) 돼지 모델의 시장성

- ① 상술한 바와 같이 알츠하이머 질환의 동물 모델로는 기존의 쥐 모델에 비하여 돼지



모델에 장점이 많은 것을 알 수 있다. 이하에서는 이러한 돼지 모델이 가지는 시장성에 관하여 검토하기로 한다. 특히, 알츠하이머 질환에 관한 돼지 모델은 현재 기술적 도입기에 해당하는 단계로서 구체적인 시장이 형성되지 않은 관계로 대학교나 국가 연구소 또는 기업에서 이루어지는 연구 현황과 더불어 알츠하이머 질환에 관한 선진국들의 특허 동향을 분석함으로써 향후 시장성을 전망하기로 한다.

- ② 심장혈관계 연구 분야에서 돼지는 의료용 장비의 개발을 위해, 그리고 외과적 방법에 의한 심장혈관계 질환을 유도하는 용도로 사용되고 있으며 유전자가 변형된 형질 전환 돼지도 생산되며, 대사성 질환 연구 분야에도 돼지가 모델 동물로서 사용되고 있다. 다양한 형질전환 돼지 모델에 관한 정보는 미국의 National Swine Resource and Research Centre at the University of Missouri-Columbia (<http://www.nsrcc.missouri.edu>), 일본의 Meiji University International Institute for Bio-Resource Research (MUIBR; <http://www.muibr.com>)에서 확인할 수 있다. 특히, 알츠하이머 질환 동물 모델의 경우, 종래의 쥐 모델의 한계점에 봉착한 것을 알 수 있다. 따라서, 그 대안으로 돼지 모델이 강력하게 대두되고 있는 상황으로 파악되며, 최근 국내외에서 돼지를 이용한 질환 모델을 성립시키기 위한 연구가 진행 중이다. 따라서, 해당 기술 분야에서 원천 기술을 확보하는 것이 관건이라 하겠다.
- ③ 생명공학 기술을 발전에 따라 유전자 조작 돼지 생상이 가능해지면서 알츠하이머 질환 분석에 적합한 돼지 모델의 연구 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 특히, 녹아웃 AD 돼지 모델에서는 사람과 유사한 증상의 관찰이 가능한 것이 확인되고 있어 향후 알츠하이머 질환 동물 모델로서의 돼지 모델의 이용이 점차 증가할 것으로 예상된다.
- ④ 물론, 생쥐와 같은 작은 동물들은 여전히 중요한 실험동물로 사용되고 있으나, 그렇지만 기니피그 같은 동물은 점점 실험동물로서 이용이 감소되는 반면에 돼지와 같은 대 동물의 이용은 점점 증가하는 추세이다.
- ⑤ 또한 유전자 변형 기술의 돼지에서 가능해짐에 따라 연구 모델 동물로서 돼지의 중요성이 점점 확대되고 있다. 생체의학 연구 분야에서 사용되는 유전자가 변형된 형질전환 돼지를 살펴보면 복잡한 질환의 병리 생리학적 연구를 위한 in vivo 모델, 세포 수준에서 생물학적 기능을 분석하기 위한 자원으로 제공, 치료용 세포나 장기를 제공 또는 재생 의학의 기전이나 치료제의 효능을 검증하기 위한 모델, 특정 세포나 장기로부터 고속대량 스크리닝 방법으로 표적 물질 탐색 등에 매우 유용하다.
- ⑥ 사람 질환을 모방하기 위하여 유전자를 변형 시켜 생산한 형질전환 돼지는 분자 수준에서 그 질환의 발생 기전을 연구하는 데 사용되며, 이의 결과로서 새로운 치료 방법의 개발이 기대된다.

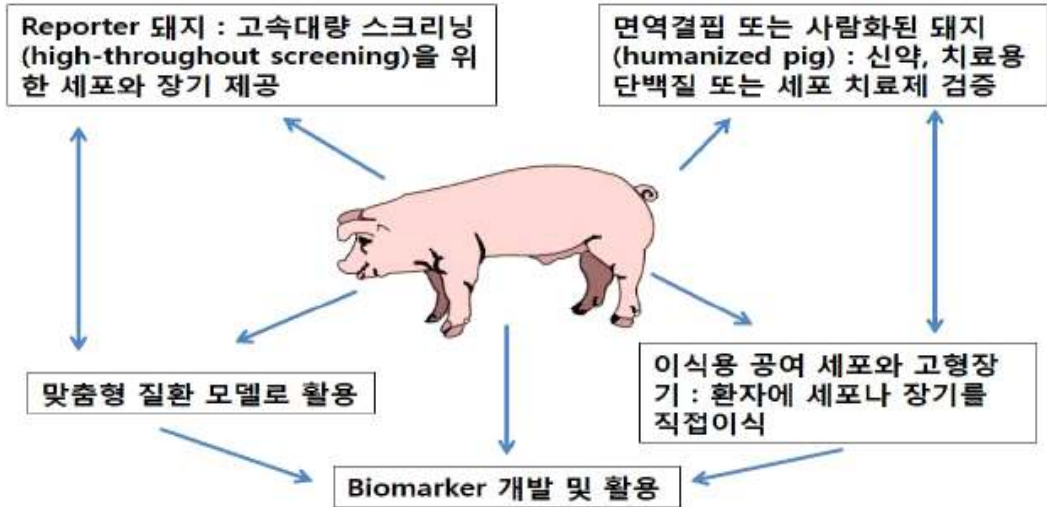


그림 83 생체의학 연구용 유전자 변형 형질전환 돼지의 응용

- ⑦ 알츠하이머 질환 동물 모델 생산 관련 특허는 2000년도 이전에서부터 2000년대 초반에 등록이 많이 이루어졌으며, 2011년까지도 어느 정도 유지되는 특허 등록의 양상을 보였다. 총 93편의 특허 등록이 있었으며, 그 중에는 PCT와 미국 특허가 대부분을 차지하였다. 각국의 특허 동향을 살펴보면, PCT는 2000년도 초반에 많았으며, 미국과 일본 특허는 매년 고른 분포를 보였고, 유럽 특허는 2010년도 후반에 많이 이루어졌다. 대부분 바이러스나 플라스미드 벡터를 이용한 알츠하이머 질환 관련 유전자 조작을 통한 transgenic animal 모델이 많았다. 동물 종은 주로 마우스였으며 덴마크 연구진에서 유일하게 알츠하이머 질환 돼지 모델을 개발하였다. 유전자에 있어서는 presenilin이나 amyloid같은 대사 관련 유전자의 이상으로 발생하는 알츠하이머 질환 동물 모델이나 ABAD, APP, RAGE등의 과발현으로 인해 발생하는 알츠하이머 질환 동물 모델을 만들었고 이를 항원항체반응, qPCR등으로 검증하였다.
- ⑧ 알츠하이머 질환 동물 모델의 생산에 대한 측면에서는 주 대상종이 마우스였다. 다양한 알츠하이머 질환 동물 모델 확보 및 인간과 더 유사한 동물 모델을 만들기 위해서 마우스 같은 소동물 질병 모델뿐만 아니라 돼지 등의 대동물 질병 모델을 만들 필요가 있다. 또한 최근 최신 기술인 ZFN이나 TALEN 시스템을 통한 형질전환동물 모델에 관한 특허가 필요하다.
- ⑨ 기존의 알츠하이머 질환 동물 모델은 마우스 종류로 국한되어 왔다. 마우스의 경우 사람과의 유전적 유사성과 다산, 손쉬운 핸들링 등의 이유로 알츠하이머 질환 동물 모델로서 많이 이용되어 왔지만 사람과의 생리, 해부학적인 차이점이 많은 한계가 있다. 이에 사람과 유사한 생리, 해부학적 구조를 가진 돼지를 실험 동물 모델로 많이 이용하고 있다. 돼지의 경우 세포치료 및 이종간 장기이식 모델로 많이 사용되고 있으며 사람의 전임상 연구 모델로 적합하다고 할 수 있다.

(자) 본 연구의 알츠하이머 돼지의 사업화 가능성

- ① 퇴행성 뇌 질환 관련해서는 미국과 영국이 특허를 주도하고 있는 상황이며, 중국에

서도 그 출원 수가 증가하고 있는 것을 파악할 수 있다. 우리나라의 경우에는 다소 특허를 통한 지식재산권 확보가 미진한 상황이며, 아직 연구 개발이 활발한 상태이므로 빠른 권리화를 통해 특허권을 확보하는 것이 중요할 것이다.

② 한편, 동물 모델의 경우 기존의 쥐 모델에 관한 특허가 주류를 이루고 있으며, 최근 돼지 모델에 관한 특허 출원이 시작되고 있는 것이 특이할 만한 점이라 하겠다. 돼지 모델은 기존의 쥐 모델에 비하여 기술적 난이도가 높아 아직 주요한 특허 출원은 없는 것으로 예측되며, 해당 기술의 개발과 더불어 지재산 확보의 적기로 보인다. 특히, 시기적으로 점차 쥐 모델 대비 돼지 모델의 특허 출원 건수 비율이 증가하고 있는 것을 살펴볼 수 있는데, 이는 향후 시장의 중심이 돼지 모델 방향으로 나아갈 것임을 시사하고 있다.

③ 이러한 대동물 시장의 확대 추세와 함께, 미국 보건부는 지난 5월 14~15일 국립보건원 주최 ‘2012년 알츠하이머 질환 연구 서밋에서 오는 2025년까지 알츠하이머 질환 치료제를 정부 차원에서 개발하겠다고 발표하였다. 미국 정부는 치매의 일종인 알츠하이머 질환 및 이와 관련된 질환을 근본적으로 해결하는 치료제를 2025년까지 개발할 계획을 발표하기도 하였다.

④ 따라서 이번 년차의 본 과제에서는 현재 뇌영상 촬영에서 인간 알츠하이머 환자와 유사한 증상을 보여주고 있는 돼지의 생산과 본 결과의 특허화로 인해 이러한 세계적인 추세에 뒤처지지 않는 결과를 보유하고 있음을 확인하였다. 치매성 알츠하이머 질환이 노인성질환인 만큼 본 과제에서 도출되어진 의미 있는 결과들은 예상한 것보다 빠른 phenotype 을 나타내고 있으며, 무엇보다 교배를 통해 생산되어진 F1은 founder 돼지보다 phenotype 이 1년 빠르게 관찰되는 결과를 가져왔다. 따라서 현지 점에서 알츠하이머 모델로서의 돼지는 알츠하이머 치료제 개발 및 기전 연구를 위한 마우스를 대신한 임상 모델이 될 수 있음을 기대해보게 된다. 특히 APP 유전자가 발현하는 돼지가 2연령에 의미있는 결과들을 보인만큼, 앞으로 지속적인 모니터링을 통해 인간 알츠하이머 연구를 위한 모델동물로써의 검증을 이루어 내야만 본 과제에서 개발되어진 돼지의 시장성을 완전히 확보 할수 있을 것이다.

## 나. 모델돼지로서의 정량적 기준의 마커 제시

### (1) 연구방법

#### (가) AD/PD 인증을 위한 정량적 기준의 마커 제시

① 현재까지의 연구 과제 결과를 토대로 AD/PD의 정량적 기준이 될 수 있는 마커를 도출하였다.

### (2) 연구결과

#### (가) AD/PD 인증을 위한 정량적 기준의 마커 제시

- ① 현재 AD 연구를 위해 이용되어지는 동물들에 대해 2004년 Molecular Psychiatry에서 리뷰 되어진 바 있다(Gotz et al. Molecular Psychiatry, 2004). 각 동물모델에 대한 장점과 단점 그리고 알츠하이머 모델로서의 가치 평가를 위한 다양한 양상들을 분석하였다. 이에 따르면 초파리와 같은 하등동물 및 마우스의 경우 오랜시간 동안 다수의 다양한 유전자의 변이를 유도하여 모델을 생산하고 있으나, 인간 질병 모델로서의 한계를 여전히 보여준다고 지적하였다.
- ② 본 연구과제는 현재 4차년의 결과를 도출하였다. 기 생산되어진 human mAPP 유전자가 과발현되는 ADF1 돼지의 경우 2살 때 촬영한 뇌의 영상에서 사람의 알츠하이머 환자와 유사한 뇌의 대사 영상이 관찰이 되었다. 뿐만 아니라 ADF1의 F1의 경우에는 1살임에도 불구하고 뇌의 대사 영상이 2살령의 ADF1의 결과와 매우 유사한 양상을 보여주었다.
- ③ 다른 동물에서 알츠하이머 모델의 연구를 위해서는 항상 침습적인 방법을 통한 병리 부검을 통해서 최종적으로 알츠하이머 진단을 하기에 더 이상의 추적관찰은 불가능한 형태의 연구가 진행이 되어왔다. 하지만 이번 본 연구에서 제시하듯이 돼지를 이용할 경우 비침습적인 방법을 통해 질환의 정도를 평가할 수 있을 뿐만 아니라 그 진행상황을 추적관찰이 가능하여 조기 진단에 대한 큰 기여 및 질병의 진행을 완화시키거나 근치를 위한 연구도 가능할 것으로 사료된다.





Species	Selective advantages	Selective limitations	Modeled aspects of AD
 <b>M. musculus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brain anatomy similar to humans</li> <li>• NFT and plaque staging, regional vulnerability can be addressed</li> <li>• sophisticated behavioral tests possible</li> <li>• therapeutic treatments possible; monitored by histopathology and behavioral tests</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• production and breeding of transgenic mice: time-consuming, laborious, inefficient, expensive</li> <li>• ethical considerations limit animal numbers and prohibit certain experiments</li> <li>• high throughput drug screening (HTS) not possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proof of role of FAD genes in AD pathology</li> <li>• role of lipid metabolism and inflammation in AD confirmed</li> <li>• histopathology: plaques, NFT, synapse loss, glial pathology, astrogliosis; but <u>no</u> massive neuronal losses</li> <li>• behavioral impairment associated with region-specific pathology</li> </ul>
 <b>P. marinus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• well characterized ABC giant neurons which can be microinjected</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brain anatomy different from humans</li> <li>• behavioral abnormalities of AD difficult to address</li> <li>• NFT and plaque staging, regional vulnerability difficult to address</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stereotyped sequence of tau degenerative changes</li> </ul>
 <b>C. elegans</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• easy and fast to breed, cheap, no ethical limitations</li> <li>• powerful genetics</li> <li>• suppressor and enhancer (modifier) screens possible, drug screening possible</li> <li>• RNA interference allows inactivation of thousands of genes in parallel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brain anatomy different from humans</li> <li>• behavioral abnormalities of AD difficult to address</li> <li>• NFT and plaque staging, regional vulnerability impossible to address</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• isolation of AD-related genes</li> <li>• behavioral and synaptic abnormalities</li> </ul>
 <b>D. melanogaster</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• easy and fast to breed, cheap, no ethical limitations</li> <li>• modifier screens and drug screenings possible</li> <li>• powerful genetics</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• brain anatomy different from humans</li> <li>• behavioral abnormalities of AD difficult to address</li> <li>• NFT and plaque staging, regional vulnerability impossible to address</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• analysis of physiological role of APP with implications for pathological role such as impaired axonal transport</li> <li>• neurodegeneration in the absence of NFT formation</li> </ul>

그림 84 인간의 알츠하이머 질환 모델로서의 동물별 특징. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. Gotz et al. Molecular Psychiatry (2004) 9, 664 - 683

④ 따라서 본과에서 알츠하이머 모델 폐지의 정량적 기준의 마커는 현재수준에서 비침습적인 방법의 뇌영상 촬영 기법이며, 그 결과는 현재 사람 알츠하이머 환자와 매우 유사한 영상결과를 보여 지속적인 관찰 및 연구가 필요할 것으로 판단이 된다.

표 35 인간의 알츠하이머 질환 모델로서의 돼지

장점	단점	현 과제에서 생산된 돼지의 AD모델로서의 측면
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 비침습적인 영상분석 결과 도출 가능</li> <li>■ 생존수명이 길어 질병의 메커니즘 분석 용이</li> <li>■ 디멘존이 인간과 유사함</li> <li>■ 인간활동 스케일에서 행동관찰 가능</li> <li>■ 윤리적인 문제에 제한이 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 사육비용이 많이 소요</li> <li>■ 대동물 시설 및 사육관리 전문 인력 필요</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ APP발현돼지에서 뇌의 영상분석시 인간환자와 유사한 뇌의 대사를 보임</li> </ul>

## 12. 형질전환 미니돼지의 교배를 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산

### 가. hSNCA 발현 복제 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산

#### (1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산

① 현재 hSNCA 발현 복제 미니돼지는 2013년 7월에 태어난 PDF4 (암컷)와 2013년 8월에 태어난 PDF16 (암컷), PDF18 (암컷) 그리고 PDF20 (암컷)가 있다. 또한 이들, hSNCA 발현돼지들을 정상 수컷돼지와 교배하여 다수의 암컷과 수컷이 섞인 hSNCA 발현돼지 산자들도 확보가 된 상태이다. 이와 교배를 해야할 PDM11 (수컷)은 2015년 3월 출생하였고, 대략 6개월~8개월이면 수태지는 성성숙에 도달하므로, 5차년도가 시작하는 것과 거의 비슷한 시기에 교배를 진행할 수 있었다. 자연교배를 이용하여 다중유전자 조절 PD 모델 돼지를 생산하였다.

#### (2) 연구결과

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산

① PDM11(PARK2 KO) 수컷 개체의 성성숙 후 11개월령에 승가훈련을 통해 암컷과의 번식 가능성 여부를 확인하였다. 다중유전자 조절 모델 생산을 위하여 기생산된

PDF-20-3(hSNCA)와 PDF-20-2(hSNCA)개체의 발정이 확인되어, PDM11과 각각 자연 교배를 진행하였으며 임신을 확인하였다. 자연교배후 hSNCA 발현 미니돼지인 PDF-20-2, PDF-20-3 개체와 PARK2 KO 돼지인 PDM-11 개체간의 교배로부터 자돈 12두를 생산하였다.

## 나. 다중유전자 조절 PD 모델 유전자 분석

### (1) 연구방법

#### (가) 다중유전자 조절 PD 모델 유전자 분석

- ① 교배를 통해서 얻어지는 모든 다중유전자 조절 PD 모델에 대해서 PCR을 통해서 hSNCA 유전자의 genome 내 삽입여부를 확인한다. Marker 유전자인 GFP 단백질의 전신 발현을 통해 SNCA의 발현을 간접적으로 확인한다. Parkin KO은 T7E1 assay를 통해서 KO 여부를 확인하고, sequencing을 통해서 협동기관인 툴젠에서 최종적으로 확인한다.

### (2) 연구결과

#### (가) 다중유전자 조절 PD 모델 유전자 분석

- ① 총 12두의 산자로의 귀조직으로부터 추출한 DNA를 이용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 아래 그림에서와 같은 결과를 얻을수 있었다. hSNCA가 genome 상으로 삽입된 개체는 총 9두로 확인이 되었다. 본 결과로부터 hSNCA가 과발현된 founder 복제돼지의 교배를 통해 생산된 2세대 20-3과 20-2의 생식전전이를 검증하였다. 또한 3세대에서도 유전자의 발현이 검증된 결과 9두가 hSNCA 과발현 founder 돼지가 확립된 것을 검증할수 있었다. 제1협동에 의해 9두중 1두 20-2-6 개체가 Parkin KO임을 검증하였다. 따라서 PDF 20-2와 PDM11 개체의 교배를 통해 1두의 다중유전자 조절 PD 모델 미니피그를 생산하였다.

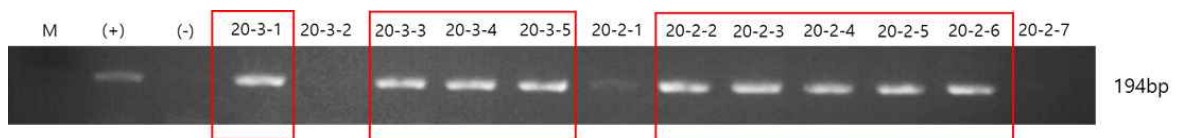


그림 85 PDF-20-2, PDF-20-3 개체와 PARK2 KO 개체의 교배로 생산된 자손의 hSNCA 발현 유무 검사

- ② 또한 DNA 가 삽입된 것을 확인한후, 전신에서 아래 그림과 같이 GFP(marker

gene)이 발현되는 것을 보아 삽입된 vector의 활성화가 일어남을 확인할 수 있었다.



그림 86 hSNCA유전자가 삽입된 산자에서 GFP 형광이 발현되는 사진

#### 다. 다중유전자 조절 PD 모델 유래 세포주 확립

##### (1) 연구방법

##### (가) 다중유전자 조절 PD 모델 유래 세포주 확립

- ① 태어나는 모든 다중유전자 조절 PD 모델에 대해서 태어남과 동시에 꼬리 조직 일부를 회수하여 PBS로 세척한 뒤 15 ml tube에 넣어서 ice-box에 넣은 채로 실험실로 옮긴다. 옮긴 조직을 세절하여, 다중유전자 조절 PD 모델 유래 세포주를 확립한다. 확립된 세포는 액체질소에 냉동 보관하고, 추후 실험에 사용한다.

##### (2) 연구결과

##### (가) 다중유전자 조절 PD 모델 유래 세포주 확립

- ① 생산되어진 산자중 hSNCA 와 PARK2 녹아웃 개체의 세포주 확립을 시도하였다. 현재 산자가 어린 관계로 1차세포배양을 위해 채취할수 있는 조직의 양이 한정적이여 많은 수의 세포를 확립하지는 못하였다. 확립된 세포의 리스트는 아래와 같다.



표 36 다중유전자 조절 돼지로부터 확립한 세포주 리스트

Cell Strain	Date	Passage	Number	concentration
20-2-1	2016-08-30	2	3	5 x10 <sup>5</sup>
20-2-2	2016-08-30	2	4	1 x10 <sup>6</sup>
20-2-3	2016-08-30	2	3	1 x10 <sup>6</sup>
20-2-4	2016-08-30	2	2	5 x10 <sup>5</sup>
20-2-5	2016-08-30	2	1	1 x10 <sup>6</sup>
20-2-6	2016-08-30	2	3	5 x10 <sup>5</sup>
20-2-7	2016-08-30	2	4	1 x10 <sup>6</sup>
20-3-1	2016-08-30	2	3	5 x10 <sup>5</sup>
20-3-2	2016-08-30	2	2	1 x10 <sup>6</sup>
20-3-3	2016-08-30	2	3	5 x10 <sup>5</sup>
20-3-4	2016-08-30	2	2	1 x10 <sup>6</sup>

### 13. 체세포핵이식을 이용한 AD/PD 모델들의 복제체 생산

#### 가. Phenotype 을 나타내는 개체의 세포주를 이용하여 founder 돼지의 생산

##### (1) 연구방법

(가) 기년도 결과로 AD phenotype 을 나타낸 ADF1 돼지의 세포를 이용한 복제체 돼지 생산

- ① 알츠하이머 모델로서의 가치를 보이고 있는 ADF1 돼지를 추가로 생산하여 founder 로 이용하고자 한다. 따라서 기 확보되어진 ADF1의 세포주를 이용하여 복제수정란을 생산한다.
- ② 생산된 복제수정란은 대리모에 이식한 후, 초음파 검사를 실시하여 임신 모니터링을 한다. 분만예정일에 제왕절개를 통해 복제돼지를 얻어 유전자 발현 및 추후 다양한 AD 모델 생산을 위한 founder로 이용한다.

(나) mAPP, mPS1 복합발현 모델 복제돼지의 생산

- ① mAPP와 mPS1 복합발현 복제돼지를 다수 확보하기 위하여 지속적으로 AD 모델 돼지 라인을 확립한다. 복제수정란을 생산하여 인큐베이터에서 1-2일간 체외배양한 후, 4-8 cell 단계에서 대리모의 자궁에 이식한다. 이식 후 21일 경 대리모의 발정 회귀여부를 판단하고, 발정이 회귀되지 않은 개체에 대하여 지속적으로 초음파 검사를 실시하여 임신 모니터링을 한다. 분만예정일에 제왕절개를 통해 복제돼지를 얻어 유전자 발현 및 추후 다양한 AD 모델 생산을 위한 founder로 이용한다.

(2) 연구결과

(가) 기년도 결과로 AD phenotype 을 나타낸 ADF1 돼지의 세포를 이용한 재복제 돼지 생산

표 37 ADF1 돼지의 세포를 이용한 재복제 돼지 생산

이식일	개체번호	세포	총난자수	임신	분만예정일	결과
16-2-5	5-7	ADF7	264	임신	16-5-29	유산
16-2-18	7-11	ADF7	156	실패		
16-2-26	7-12	ADF7	247	임신	16-6-19	유산
16-3-4	5-9	ADF7	97	임신	16-6-24	자연분만 1두
16-3-18	7-15	ADF7	234	임신	16-7-10	유산
16-3-25	7-17	ADF7	186	실패		

- ① 초기 임신이 확인된 4마리의 대리모 중, 3마리는 유산되었고 나머지 1마리에서만 살아있는 상태의 hAPP 발현 재복제돼지 1마리를 자연분만을 통해 얻을 수 있었다. 그러나 생산된 돼지는 생후 1일 째에 폐사하였다. 폐사한 1마리의 재복제돼지 전신 장기 및 피부조직을 회수하여, 그 중 폐 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 유전자 삽입 검증 방법과 마찬가지로 PCR을 실행하여 마커 유전자인 GFP와 목적 유전자인 hAPP의 존재를 확인할 수 있었다.
- ② 생후 1일째 폐사한 돼지에서 GFP가 발현하는 지를 UV를 조사하여 검증하였다. 아래 그림과 같이, 돼지의 전신에서 GFP가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.



그림 87 GFP가 발현되는 돼지의 전신 모습

(나) mAPP, mPS1 복합발현 모델 복제돼지의 생산

① 4마리의 대리모에 총 832개의 복제수정란을 이식하였으며, 그 결과 2마리의 대리모가 임신한 것을 확인하였다. 그러나 후기에 2마리가 모두 유산이 되어 산자를 생산할 수는 없었다.

표 38 AD 병인 유전자 복합 발현 복제수정란 이식 결과

이식일	개체번호	세포	총난자수	임신
16-4-8	6111	mAPP, mPS1	235	유산
16-4-15	6129	mAPP, mPS1	210	실패
16-4-22	3-67	mAPP, mPS1	199	실패
16-4-29	6107	mAPP, mPS1	188	유산

## <2세부: 질환 모델 미니돼지의 영상학적 분석 및 행동학적 분석>

### 1. 일반 미니돼지이용 영상/행동분석기법 확립

#### 가. 일반 미니돼지이용 행동학적 분석위한 프로토콜 확립

##### (1) 연구방법

##### (가) 문헌조사

① 일반 미니돼지의 행동분석을 하기에 앞서 미니돼지의 신체 능력에 관한 문헌을 고찰하였다. 시력 (Visual accuracy)은 미니돼지는 영장류보다 시력이 좋으며 색 인지 능력에 대해서 연구된바있으며, 파랑색이 유일하게 구별할 수 있는 색이며 나머지는 회색으로 보인다고 알려져 있다 (Neitz and Jacobs, 1989, Tanaka et al., 1998 and Tanida et al., 1991). 또한 청력 (auditory sensitivity)의 경우 미니돼지의 청력은 영장류의 청력과 비슷하며 소리와 툰과 박자를 구별할 수 있다는 것이 대표적인 특징이다 (Heffner and Heffner, 1990, and Arnfred et al. 2003). 또한 후각 (olfactory discrimination and sensitivity)은 미니돼지의 후각이 영장류의 후각보다 훨씬 뛰어나다는 것이 선행된 연구이다 (Kristensen et al., 2001 and Meese et al., 1975). 마지막으로 시각 자극을 사용한 경우보다 후각 자극을 사용한 경우가 훨씬 더 확실하게 행동이 변했다 (Croney et al., 2003).

② 이러한 참조 내용들을 토대로 하여 알츠하이머병과 파킨슨병 모델 돼지를 생산하였을 때 비교할 수 있는 행동평가에 대해 문헌 조사를 하고 각 질환에 대한 평가 기준들을 작성하였다. 우선 알츠하이머병의 경우 인지 기능의 이상 여부 판단이 중요하다. 인지 기능을 알아보기 위한 여러 가지 행동 실험은 T-maze test, Y-maze test,

Complex maze test 등의 테스트가 가능하다.

(2) 연구결과

(가) Maze test

- ① 기 실험된 참조 논문을 토대로 하여 돼지 및 대동물에서 Maze test를 위한 평면도를 작성하였다 (Gielling, E.T. et al, Animal Cognition, 2011; Mendl, M. et al, Current Biology, 2011; Kornum, B.R. et al, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2011; Nielsen, T.R. et al, Behavioural Brain Research, 2009; Bolhuis, J.E. et al, Behavioural Brain Research, 2004).

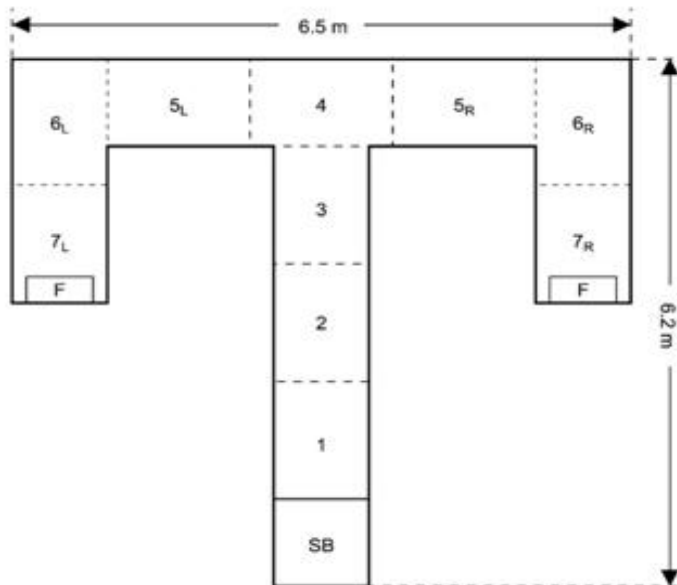


그림 88 미니돼지에서의 T-maze test를 위한 평면도

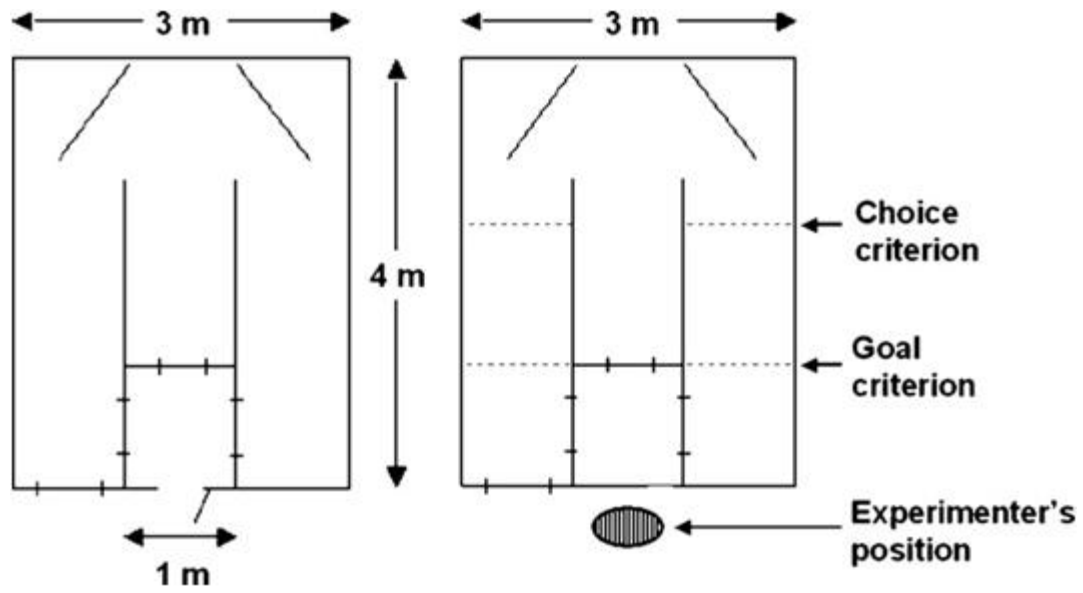


그림 89 미니돼지에서의 Complex maze test를 위한 평면도

(라) 행동분석 Scaling 기준 확립

- ① 충청남도 천안에 위치한 움티팜 솔루션 돼지 농장에서 사육중인 일반 미니돼지의 일상 행동을 비디오 촬영하여 정상적인 행동 양식을 분석하고 MPTP 피하투여 한 미니 돼지의 일상 행동을 비디오 촬영하여, 이상적인 행동 양식을 분석하여 돼지의 파킨슨 모델이 개발되었을 때 이를 평가할 수 있는 행동 분석 scaling을 완성하였다.

표 39 질환모델 미니패지의 행동분석 scaling을 위한 표

No.	Question	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>&lt; Tremor &gt;</b>					
1	Tremor at rest	None	Mild	Moderate	Severe
2	Tremor in moving	None	Mild	Moderate	Severe
<b>&lt; Loss of automatic movements &gt;</b>					
3	Drooling	None	Intermittent	Usually	Always
4	Food intake amount	Invariable	Over 70% to	40-70% to	Below 40% to
5			normal	normal	normal
5	Drinking water	Invariable	Over 70% to	40-70% to	Below 40% to
6			normal	normal	normal
6	Eyeblink	Normal	Little slowed	Slowed	Very slowed
7	Movement	Normal	Slightly	Moderately	Severely
8			decreased	decreased	decreased
8	Acrid odor	Move	Move with	Aversive but	No response
		immediately	hesitate	not moving	
<b>&lt; Slowed motion (Bradykinesia) &gt;</b>					
9	Response to touch (rubbing)	React			No reaction
10	Walking test - Time	Similar to normal	100-150% to normal	150-200% to normal	Over 200% to normal
<b>&lt; Impaired posture and balance &gt;</b>					
11	Walking test - Balance	Normal	Lost occasionally	Lost intermittent	Lost continuously
12	Changing posture by alert	Fast	Slow	Very slow	No movement
13	Balance in ordinary life time	Normal	Lost occasionally	Lost intermittent	Lost continuously
<b>&lt; Dementia &gt;</b>					
14	Curiosity for new object	Curious and play	Interested	Recognize	Unconcern
15	Escaping	None	1 time per week	2-6 times per week	Everyday

② 현재 파킨슨 질환 환자를 진단하는데 있어서 사용되는 UPDRS는 파킨슨병의 주증상인 떨림 (진전, tremor), 움직임의 둔화 (서동, bradykinesia), 근육의 경직 (강직, rigidity), 자세의 불균형 (impaired posture and balance), 불수의 운동의 상실 (loss of autonomous movement) 등의 운동기능 이상을 반영할 수 있도록 하고 있다. 따라서 패지에서는 이러한 항목들에 비추어 평가 가능한 항목들 및 기준을 마련하였다.

③ 떨림 및 진전에 대해서는 쉬는 동안 및 움직이는 동안의 진전에 대해서 구분하여 기술하였고 구분하여 평가하고자 한다. 그리고 불수의 운동의 상실에 대해서는 침 흘림, 사료섭취량, 음수량, 눈 깜박임, 움직이는 양, 자극적인 냄새에 대한 반응으로 구분하여 평가한다. 특히 눈 깜박임의 경우 속도 및 회수에 대해서 구체적으로 평가하고자 한다. 서동에 대해서는 피부접촉에 대한 반응과 걷는 시간에 대해서 구분하여 테스트하고자 한다. 자세의 불균형 문제와 관련해서는 돼지 모델에서 일정한 거리를 걷는 동안의 균형 감각을 평가하고자 하며 깜짝 놀라게 했을 때의 자세 변화 속도 및 일상적 움직임에서의 균형으로 나눠서 평가할 것이다. 치매 증상과 유사한 부분으로 새로운 물질에 대한 호기심을 평가하거나 탈출현상 등 기 평가 항목으로 제시된 2개의 항목 외에도 쉬면서 내는 소리 등의 변화 등 돼지의 정상적 생리학적 특징들을 반영하여 행동평가 기준 항목으로 제시하였다.

(다) 일반 미니돼지의 오픈필드 테스트

① 행동학적 측면의 영상학적 분석을 위한 영상 분석 장비들로 SMART video-tracking system (Harvard apparatus), Vigie primate (View point analyzing system for primate), Kinect (Xbox) 등의 장비들을 검토하고 실제로 일반 미니돼지 적용하여 시행하여 보았지만 비용 대 효용 가치가 매우 적고, 실제 적용이 어려워 행동 분석은 일반 비디오 영상 촬영을 시행하여 분석하기로 하였다.

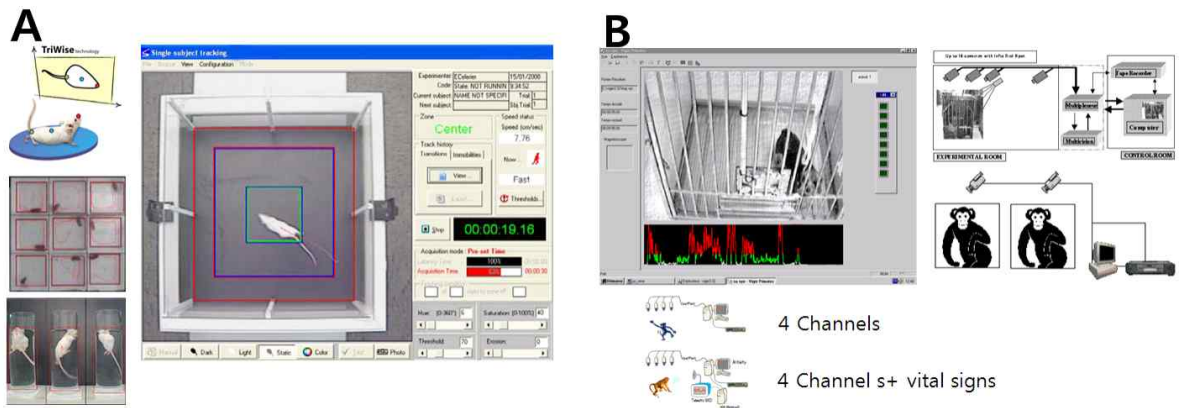


그림 90 (A) SMART video tracking system 장비와 (B) Vigie Primate (View point) 장비

② 서울 연건동에 위치한 서울대학교병원의생명 연구원(전임상 실험부), 서울대학교의과대학특생동, 수원에 위치한 서울대학교 수의과대학 농장, 강화도의 사설 미니 돼지 농장 등에서 일반 미니 돼지의 행동양식의 분석을 위한 영상 촬영을 시도하였고, 이러한 사전 시도를 바탕으로 일반 비디오 영상 촬영을 통해 일반 미니돼지와 질병모델 미니돼지의 영상을 분석할 것이다.

나. 일반 미니돼지 뇌의 영상학적 분석위한 프로토콜 확립

(1) 연구방법

(가) 일반 미니돼지의 영상학적 분석 (brain CT, 1.5T-brain MRI)

① 서울대학교 수의과대학의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 일반 미니 돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 정상적인 일반 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 이를 기준으로 MPTP등의 독성 물질에 의한 혹은 transgenic porcine PD model의 뇌영상 촬영 시 비교 할 예정이다.

(2) 연구결과

(가) 일반 미니돼지의 영상학적 분석 (brain CT, 1.5T-brain MRI)

① 일반 미니 돼지에서 아래 그림과 같은 precontrast와 postcontrast의 MRI 및 CT 영상을 획득하였다.

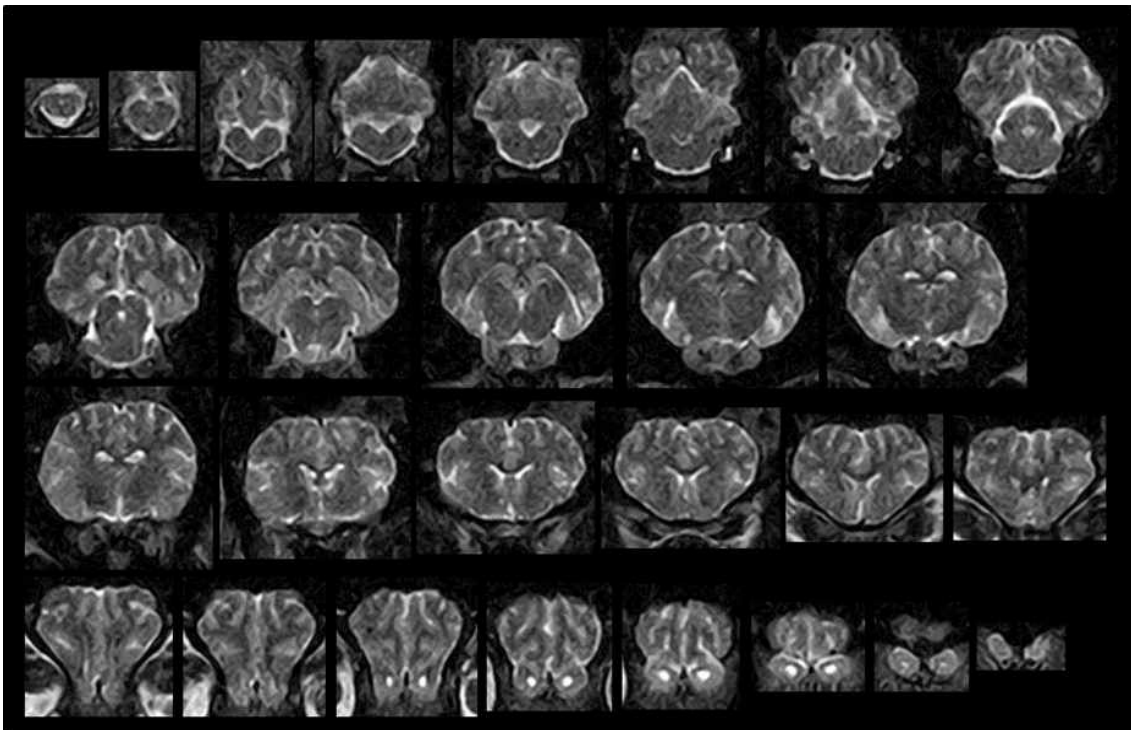


그림 91 정상 미니돼지의 뇌 MRI 이미지



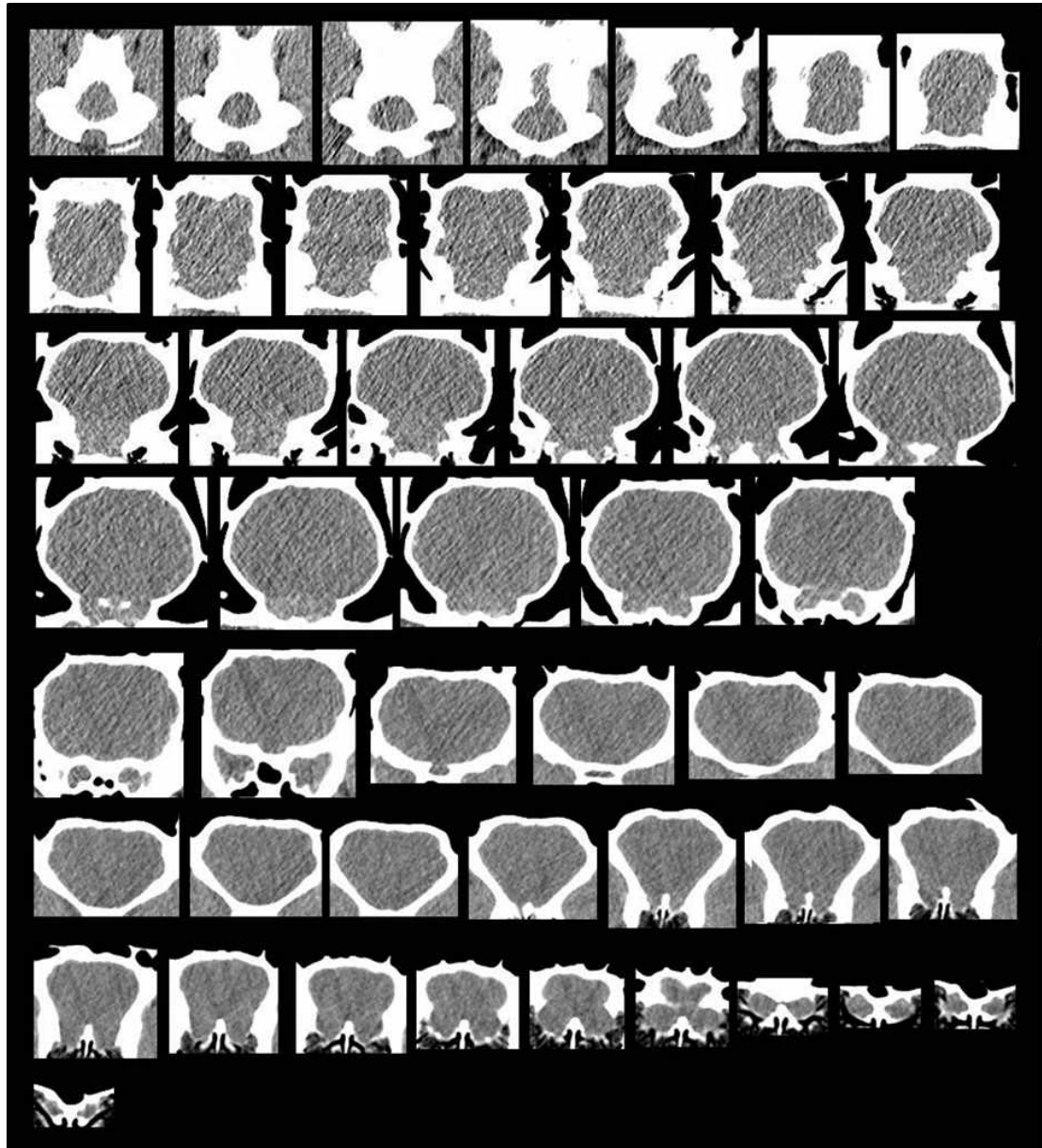


그림 92 정상 미니돼지의 뇌 CT이미지.

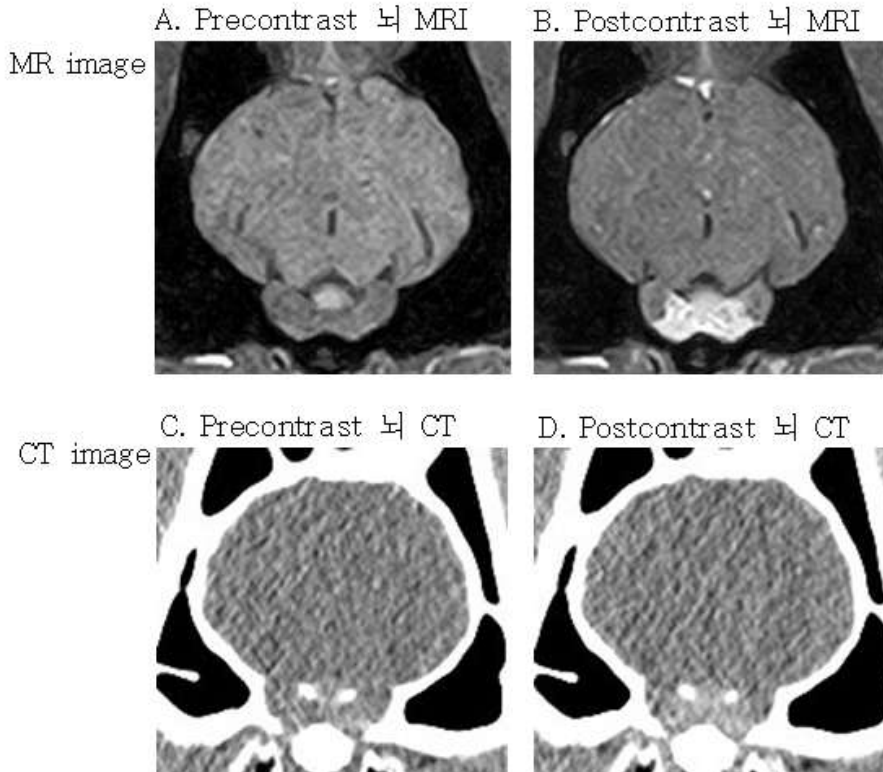


그림 93 일반 미니 돼지의 precontrast 뇌 MRI (A)와 postcontrast 뇌 MRI (B) 사진 및 precontrast 뇌 CT (C)와 postcontrast 뇌 CT (D).

**다. 생산된 복제미니돼지의 질환모델로서의 검증을 위한 질환모델 복제미니돼지와 인간 환자간의 유사성 및 차이점 비교 분석**

(1) 연구방법

(가) 뇌심부자극술(deep brain stimulation) 환자의 임상 치료 성적 분석

- ① 서울대학교병원에서 뇌심부자극술(deep brain stimulation)을 시행 받은 41명의 환자들을 대상으로 수술 후 3년까지의 임상 치료 성적의 결과 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 뇌심부자극술(deep brain stimulation) 환자의 임상 치료 성적 분석

- ① 향후 porcine PD model을 이용한 치료를 시행 받은 치료군에서의 행동 분석의 비교 자료로 이용하고자한다 (이 자료는 publication을 위해서 stereotactic and functional neurosurgery 잡지에 2011년 11월 submission하여 현재 review중에 있다).

라. 파킨슨환자에서 유래된 불멸화된 지방유래 간엽줄기세포의 미토콘드리아 기능장애 연구

(1) 연구방법

(가) 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자 (정상대조군)로부터 얻은 지방조직에서 간엽줄기세포를 분리 배양 실시

- ① 추가적으로 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자 (정상대조군)로부터 얻은 지방조직에서 간엽줄기세포를 분리 배양 실시하고 불멸화시킨 세포주를 확립하여 미토콘드리아 기능 비교 연구를 실시하였다. 이를 바탕으로 추후 확립될 모델 동물 분석 연구의 기초 자료로 이용하고자 하였다.
- ② 파킨슨 환자에서 유래된 지방유래 간엽줄기세포를 이용한 연구를 시행하기 위해 뇌하수체 선종환자(pituitary adenoma) 지방유래 간엽줄기세포 (정상대조군, non-PD), Idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포 (idiopathic 파킨슨병, PD), Parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포 (familial parkin deficient 파킨슨병, Parkin)를 배양하였으며, Deep Brain Stimulation (DBS)를 시행 받은 파킨슨환자의 피하 지방조직에서 얻은 간엽줄기세포를 single cell로 분리하여 일차세포배양을 시행하였다.

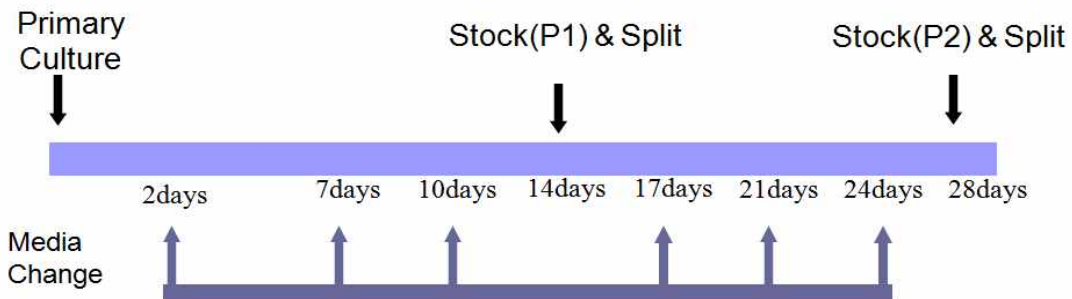


그림 94 파킨슨 환자 및 대조군으로부터 얻은 지방유래 간엽줄기세포의 배양을 위한 culture scheme

(나) 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid를 이용한 세포불멸화

- ① DBS를 시행 받은 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종 환자(대조군)로부터 얻은 지방조직에서 간엽줄기세포를 single cell로 분리 후에 일차세포배양 하였고, 세포 불멸화를 위하여 배양된 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid transfection한 후에 hygromycin을 이용한 selection을 실시하였다.
- ② Selection된 immortalized cell을 long-term cultivation (2년 동안 진행함)을 실시하였다. 배양된 세포를 이용하여 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종 환자 (대조군)로부터

얻은 지방조직에서 간엽줄기세포간의 미토콘드리아 손상정도의 활성도와 형태를 비교 분석하였다.

(2) 연구결과

(가) 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자 (정상대조군)로부터 얻은 지방조직에서 간엽줄기세포를 분리 배양 실시

① 파킨슨 환자 및 대조군 유래 간엽줄기세포 확립 결과, 아래와 같은 stock을 banking하는데 성공하였다.

A.			B.		
Patient No.	Labeling	Culture Date	Patient No.	Labeling	Culture Date
1	FSC-#1	2006-11-22	1	FSC-PD#2	2007-03-09
2	FSC-#2	2006-11-23	2	FSC-PD#3	2007-04-02
3	FSC-#3	2006-12-18	3	FSC-PD#5	2007-08-13
4	FSC-#4	2006-12-18	4	FSC-PD#6	2007-10-22
5	FSC-#7	2007-01-08	5	FSC-PD#7	2007-10-29
6	FSC-#8	2007-01-22	6	FSC-PD#8	2007-11-19
7	FSC-#9	2007-01-31	7	FSC-PD#9	2008-03-24
8	FSC-#11	2007-02-15	8	FSC-PD#10	2008-07-07
9	FSC-#12	2007-02-26	9	FSC-PD#11	2008-08-29
10	FSC-#14	2007-03-15	10	FSC0714	2008-07-14
11	FSC-#15	2007-04-20	11	FSC0721	2008-07-21
12	FSC-#17	2007-10-02	12	FSC0829	2008-08-29
13	FSC-#18	2007-10-04	13	FSC1006	2008-10-06
14	FSC-#19	2008-03-25	14	FSC0119	2009-01-19
15	FSC1013	2008-10-13	15	FSC0209	2009-02-09
16	FSC1014	2008-10-14	16	FSC0420	2009-04-20
17	FSC1103	2008-11-03	17	FSC0427	2009-04-27
18	FSC1104	2008-11-04	18	FSC0601	2009-06-01
19	FSC0629	2009-06-29	19	FSC0622	2009-06-22
20	FSC0630	2009-06-30	20	FSC0918	2009-09-18
21	FSC0706	2009-07-06	21	FSC1123	2009-11-23
22	FSC1019	2009-10-19			
23	FSC1102	2009-11-02			
24	FSC1109	2009-11-09			
25	FSC1201	2009-12-01			

C.		
Patient	Labeling	Culture Date
1	FSC-parkin	2007-05-17
2	gFSC	2008-06-02

그림 95 보유중인 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종환자 (정상대조군) 지방유래 간엽줄기세포 stocks. (A) 뇌하수체 선종환자 유래 세포 (정상 대조군-PA), (B) Idiopathic Parkinson Group (파킨슨병 환자-PD), (C) Genetic Parkin Deficient Group (파킨슨병 환자-parkin)

② 파킨슨 환자 및 대조군의 지방유래 간엽줄기세포 배양 결과 아래 사진과 같은 세포 형태학적인 특징을 관찰할 수 있었다.

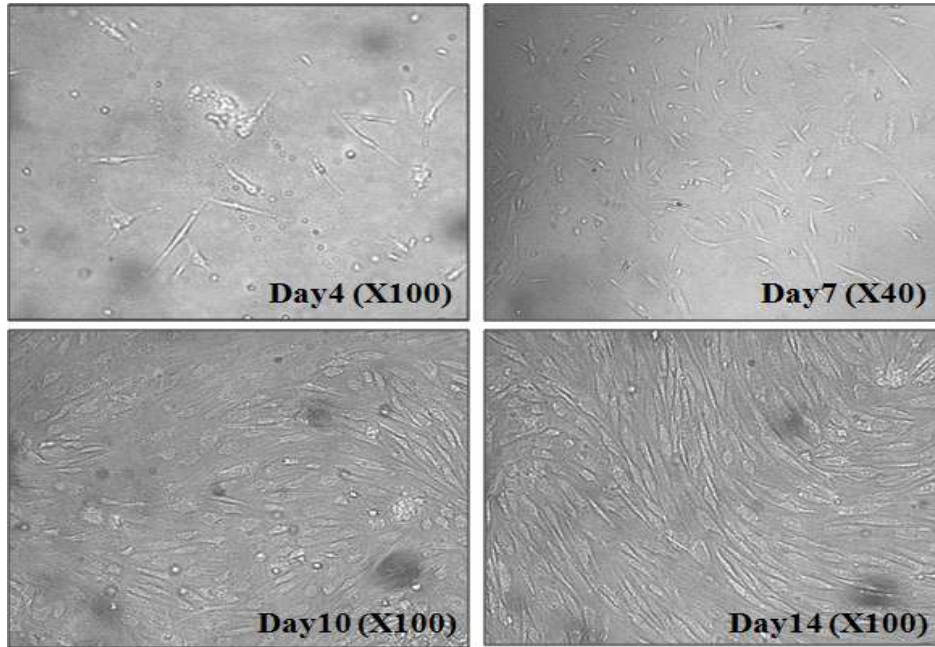


그림 96 파킨슨 환자 및 대조군으로부터 얻은 지방유래 간엽줄기세포의 cell morphology

(나) 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid를 이용한 세포불멸화

① 세포불멸화를 진행하면서 촬영한 세포 사진은 아래와 같다.

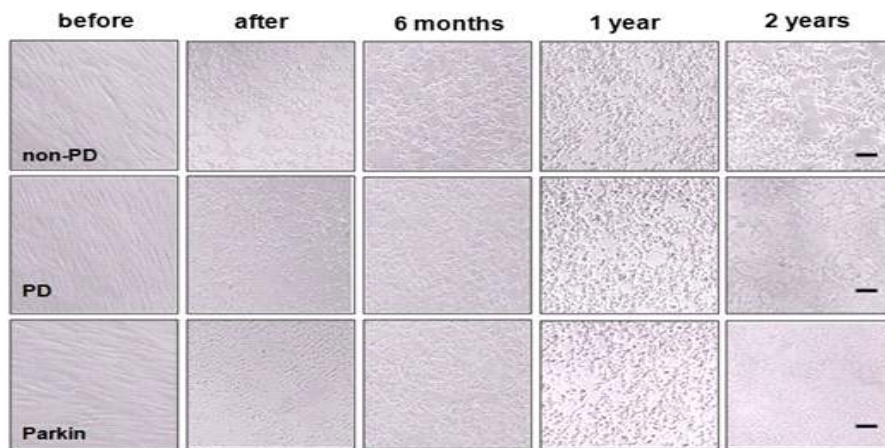


그림 97 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid를 이용한 세포불멸화 (before, after, 6months, 1 year, 2 years). non-PD, PD, Parkin의 hTERT plasmid (pGRN145, Geron corporation, Menlo Park, CA, USA)로 transfection 후에 hygromycin (30  $\mu$ g/ml)로 selection함. 그 후에 2년 동안 long term cultivation을 실시함

② 불멸화된 세포의 염색체 karyotyping 분석 결과 및 TRAP 결과는 아래와 같다.

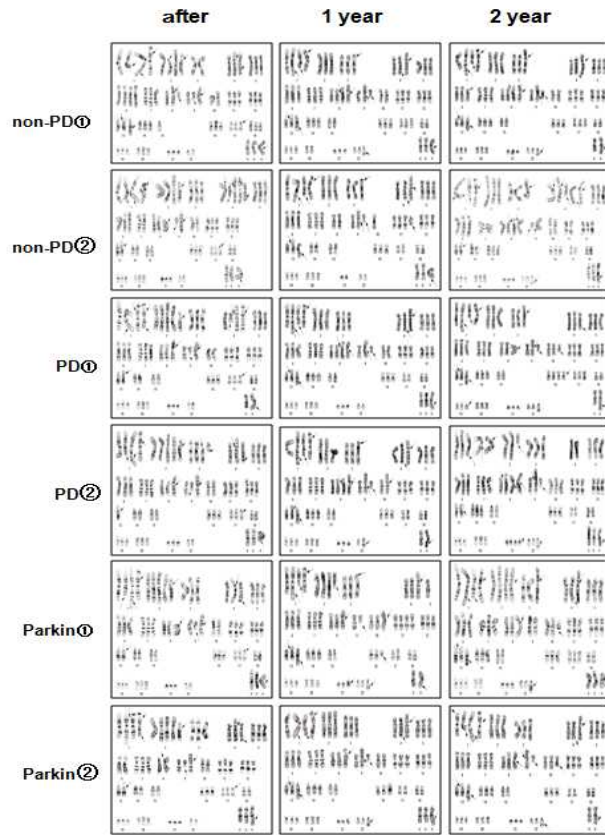


그림 98 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 염색체 Karyotyping 분석. hTERT 불멸화된 *non-PD*, *PD*, *Parkin*의 비정상적인 염색체 karyotyping 분석결과로 euploidy에서 aneuploidy로 모양이 변형됨, (after, 1 year, 2 year cultures) : non-PD①, non-PD②, PD①, PD②, Parkin①, Parkin②

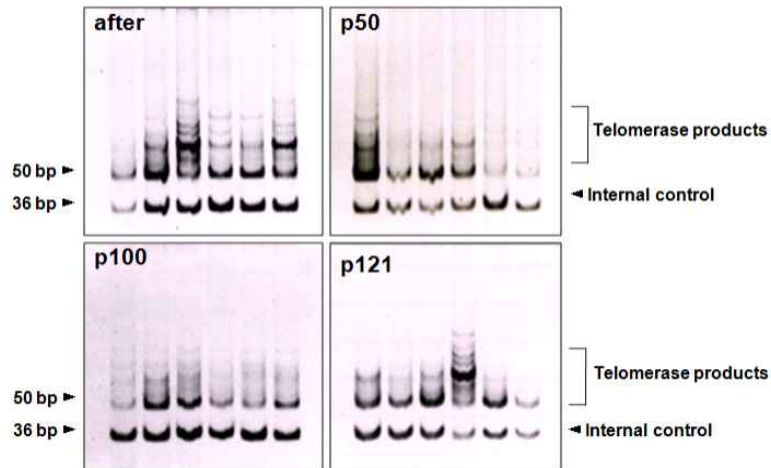


그림 99 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 TRAP assay. hTERT 불멸화된 *non-PD*, *PD*, *Parkin*의 after, passage50, passage100, passage121의 TRAP activity 측정을 위한 TRAP assay

③ 불멸화된 세포에서 미토콘드리아의 발현, 활성화도 및 전자현미경을 이용한 형태학적 비교 결과는 아래와 같다.

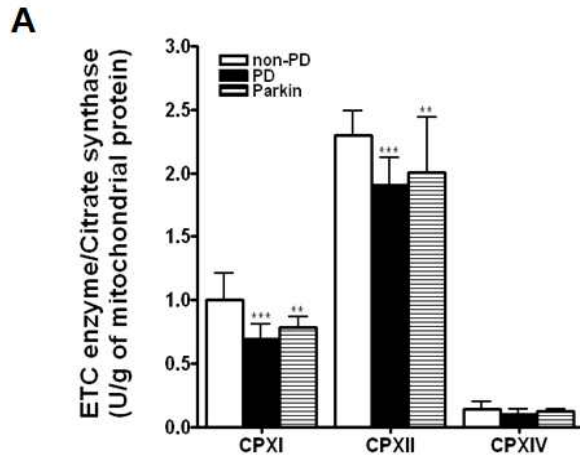


그림 100 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자의 지방유래 간엽줄기세포의 불멸화된 세포의 미토콘드리아 활성도의 측정. (A) Complex I (NADH dehydrogenase), Complex II (Succinate dehydrogenase), Complex IV (Cytochrome c oxidase). hTERT 불멸화된 *non-PD*, *PD*, *Parkin*의 Biochemical enzyme assay로 미토콘드리아 활성도를 측정하여 비교하였으며 비파킨슨 환자에 비하여 idiopathic과 parkin deficient 파킨슨환자의 미토콘드리아 활성도가 감소가 확인되었다. (B) 불멸화된 *non-PD*, *PD*, *Parkin*간의 mitochondrial marker인 prohibitin의 발현과 cytoplasmic marker인 actin의 발현 확인한 western blot analysis.

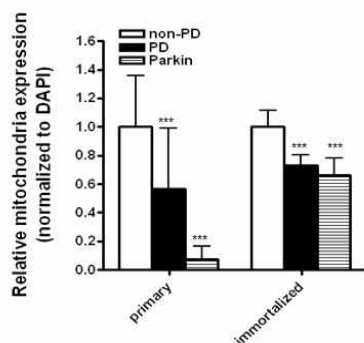
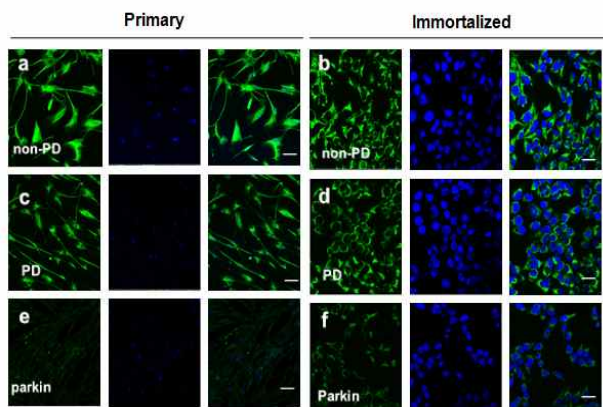


그림 101 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자의 지방유래 간엽줄기세포의 mitochondria expression 발현비교. Primary와 불멸화된 *PA*, *PD*, *Parkin*의 미토콘드리아 발현을 순차적으로 (*non-PD*==> *PD* ==> *Parkin*) 순서대로 미토콘드리아의 발현이 감소함을 확인하였다. (a) Primary 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(*non-PD*), (b) Immortalized 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(*non-PD*), (c) Primary idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*PD*), (d) Immortalized idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*PD*), (e) Primary parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*Parkin*), (f) Immortalized parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*Parkin*).

## Primary

## Immortalized

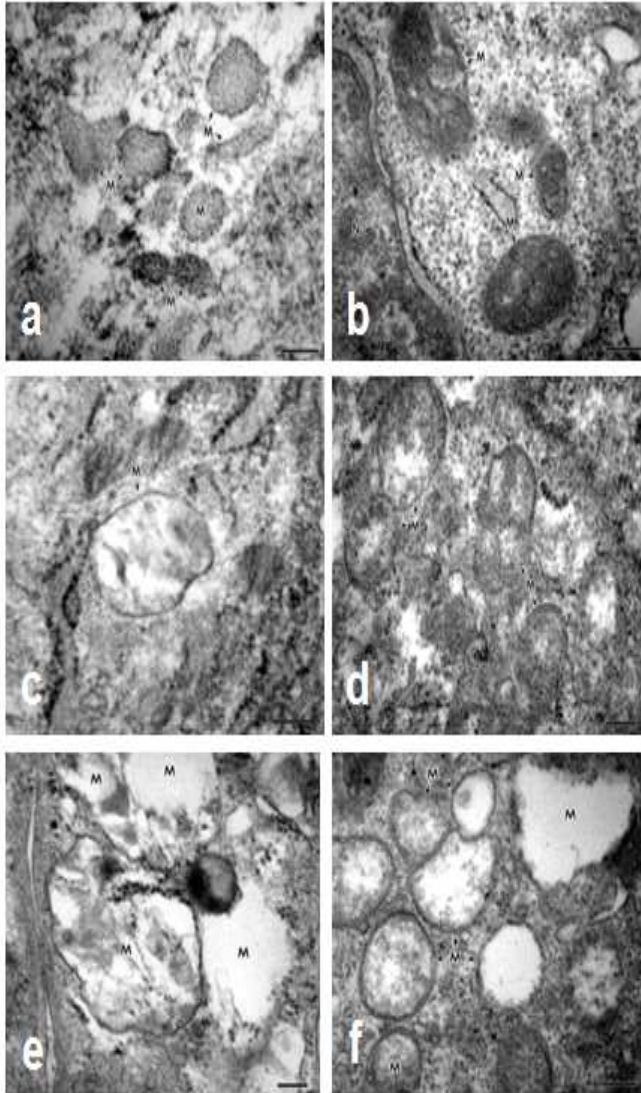


그림 102 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 Primary와 Immortalized 세포의 미토콘드리아 형태의 Electron micrograph. : Primary와 불멸화된 *PA*, *PD*, *Parkin*의 미토콘드리아 형태의 Electron micrograph로 순차적으로 (*non-PD*==>*PD*==>*Parkin*) 순서대로 미토콘드리아의 형태가 손상됨을 확인하였다. M, Mitochondria, Nu, nucleus, Bar = 200 nm, (a) Primary 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(*non-PD*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph, (b) Immortalized 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(*non-PD*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph, (c) Primary idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*PD*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph, (d) Immortalized idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*PD*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph, (e) Primary parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*Parkin*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph, (f) Immortalized parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(*Parkin*)의 미토콘드리아의 Electron micrograph.

## 2. 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 분석 시스템 확립

### 가. 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 행동학적 평가

#### (1) 연구방법

(가) 관찰된 여러 가지 증상을 기준으로 정상미니돼지와 비교하여 PD 유발된 미니돼지의 행동에 대한 표준을 정하기 위해 PD 유발돼지에 대한 점수화를 아래의 표와 같이 확립하였다.

#### (2) 연구방법



(가) PD 유발 돼지의 행동 점수화

① 확립된 점수화(scoring)를 기준으로 신경독성물질 투여 돼지에 대한 scoring을 실시하였으며, 다음과 같은 점수를 확인하였다.

표 40 MPTP를 이용한 PD 유발돼지의 행동에 대한 점수화(scoring)

관찰항목	DPI 0				DPI 7				DPI 14				DPI 21				
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
쉬는동안의 떨림				●	●								●				●
움직이는 동안의 떨림				●	●								●				●
침흘림			●		●								●				●
사료섭취량			●			●							●				●
음수량		●					●						●				●
자극적인 냄새에 대한 반응				●			●					●				●	
피부 접촉시의 반응			●		●							●					●
일정한 거리를 걷는데 걸리는 시간			●			●							●				●
일정한 거리를 걷는 동안의 균형 유지				●		●							●				●
깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도			●		●							●				●	
일상적인 움직임 동안의 균형				●	●								●				●
새로운 사물에 대한 호기심			●			●							●				●
탈출	●				●				●					●			
쉬면서 내는 소리의 변화				●			●					●			●		
강한 빛에 대한 반응		●				●						●					●
큰 소리에 대한 놀람 반응		●					●					●				●	
식사 시간 전의 울음 소리			●					●					●				●
(원통에서)발을 빼는 실험			●										●				●
피부에 빨래집게				●									●				●
<b>score</b>	<b>40</b>				<b>16</b>				<b>48</b>				<b>49</b>				

② PD 유발 돼지의 행동 관찰을 투여 당일부터 21일까지 7일 간격으로 진행한 결과 PD의 병변이 40점 이상 높게 유지되는 것이 관찰되었으며, MPTP 투여를 통한 PD 병변 유발이 효율적으로 유도될 수 있다는 것을 확인하였다.

나. 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 영상학적 평가

(1) 연구방법

(가) 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 PET 및 CT 영상 촬영

- ① 인체용 MRI 영상기기를 이용하여 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하고 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) dopamine transporter인 Fluoro-CIT radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후에 약 2시간 후에 촬영하였고, 2) glucose metabolism인 FDG radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후에 약 30분 후에 촬영하였다.



그림 103 정상 미니돼지의 뇌 PET 촬영 모습.

(나) 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 MRI 및 CT 촬영

- ① 서울대학교 수의과대학의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 이를 기준으로 1차년도에 확보한 정상적인 일반 미니돼지의 뇌영상 자료와 비교를 시도하였다.



그림 104 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌 MRI 촬영전후의 모습.

## (2) 연구결과

### (가) 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 PET 및 CT 영상 촬영

- ① Basal ganglia에 F-CIT의 uptake가 상승했고 brain cortex와 basal ganglia에 FDG의 uptake가 상승했음이 확인되었으며, 이는 PD 모델 미니돼지의 뇌가 PD 병변을 나타내고 있다고 할 수 있다. 하지만 미니돼지의 brain PET 촬영은 현재까지 시도된 바가 없이 본 연구에서 최초로 수행되었기 때문에 연구결과를 비교할 수 있는 기준이 없는 실정이며, 추후 PD 병인유전자 조절 형질전환 미니돼지가 생산되면 brain PET 영상을 확보하여 이 자료와 비교 분석할 계획이다.
- ② 현재 사용한 신경독성물질인 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 이외에 또 다른 신경독성물질인 6-OHDA (6-hydroxydopamine)의 뇌안의 intraparenchymal MFB injection 모델 제작을 위하여 돼지 frame을 제작중이다 (Mayo Clinic 제작주관).

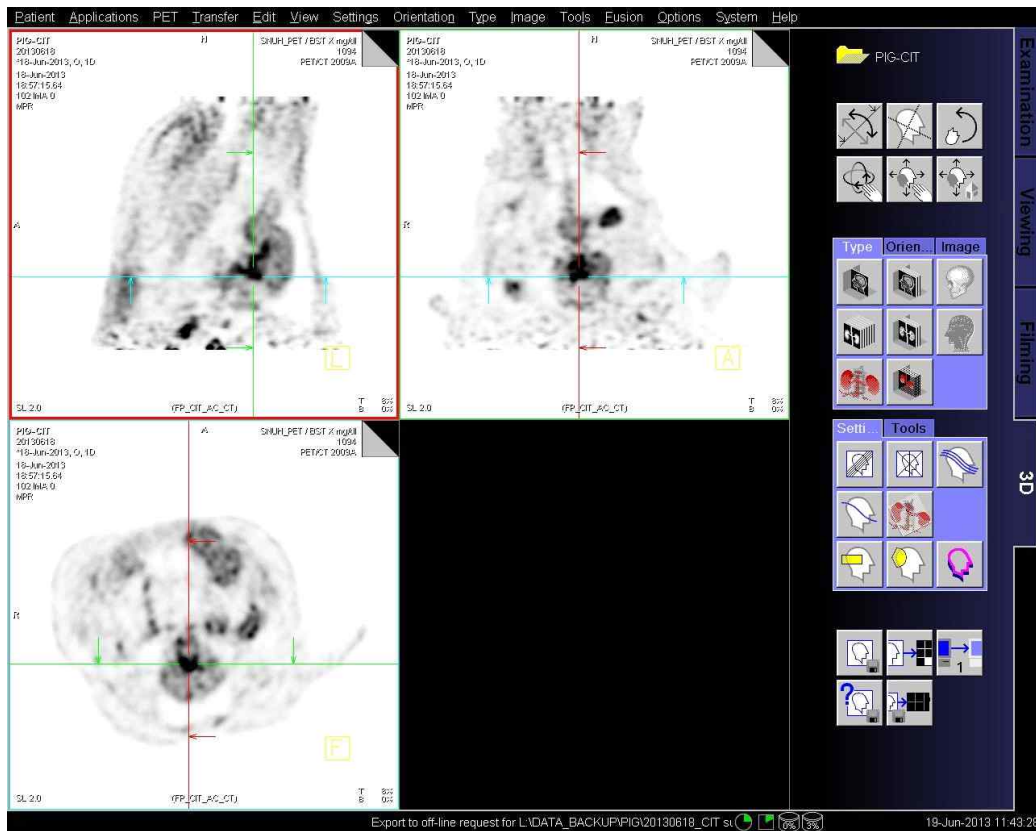


그림 105 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 F-CIT 주입후의 뇌 PET 이미지.



그림 106 정상 미니패지의 F-CIT 주입 후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.

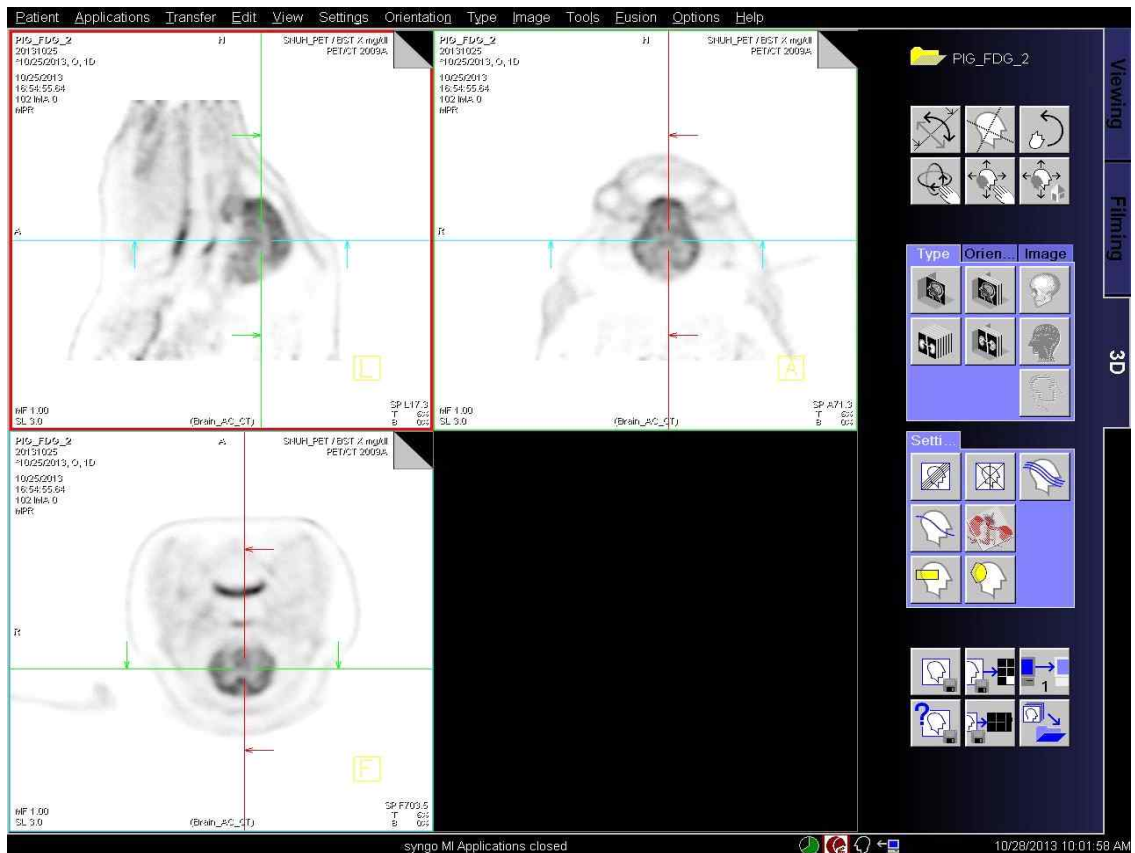


그림 107 정상 미니패지의 FDG 주입 후의 뇌 PET 이미지.



그림 108 정상 미니돼지의 FDG 주입 후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.

(나) 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 MRI 및 CT 촬영

- ① MRI의 해상도가 높지 않아 명확한 소견을 확인할 수 없었다. 따라서, 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 분석은 MRI 자료 보다는 조직병리학적 결과를 기반으로 실시하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

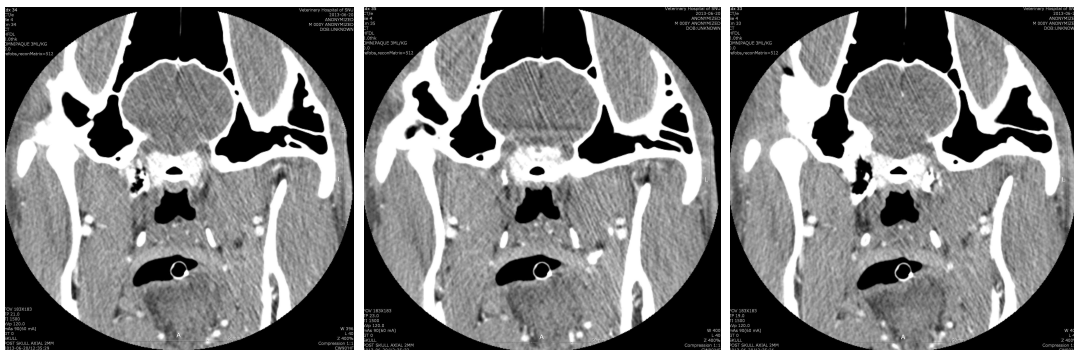


그림 109 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌 CT 이미지.



그림 110 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌 PET-CT 이미지.



그림 111 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌 MRI coronal 이미지.



그림 112 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 뇌 MRI sagittal 이미지.

## 다. 신경독성물질 투여 PD 모델 미니돼지의 인간 PD환자와의 비교분석

### (1) 연구방법

(가) 뇌심부자극술(deep brain stimulation)의 임상 치료 성적 결과 분석

- ① 서울대학교병원에서 뇌심부자극술(deep brain stimulation)을 시행 받은 41명의 환자들을 대상으로 수술 후 3년까지의 임상 치료 성적의 결과 분석하여 향후 porcine PD model을 이용한 치료를 시행 받은 치료군에서의 행동 분석의 비교 자료로 이용하고자 한다.

(2) 연구결과

(가) 뇌심부자극술(deep brain stimulation)의 임상 치료 성적 결과 분석

- ① 임상 치료 성적 결과 분석 자료는 Journal of Neurological Sciences 잡지에 2013년 4월 publication되었다. 또한 파킨슨병환자에서 DBS 수술 후 monitoring unit에서 입원하여 관찰한 Long-term behavior outcome에 대한 임상 분석을 한 내용은 논문 작성중이다.

**라. 파킨슨병환자에서 유래된 불멸화된 지방유래 간엽줄기세포의 미토콘드리아 기능장애 연구**

(1) 연구방법

(가) 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid를 이용한 세포불멸화

- ① 1차년도에서 추가적으로 진행한 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종 환자 (정상대조군)로부터 얻은 지방조직에서 간엽줄기세포를 분리 배양 실시하고 불멸화시킨 세포주를 확립하여 미토콘드리아 기능장애에 관한 연구를 계속하여 실시하였다. 이를 바탕으로 추후 확립될 모델 동물 분석 연구의 기초 자료로 이용하고자 하였다.
- ② 배양된 파킨슨 환자 (PD, Parkin) 및 뇌하수체 선종 환자 (대조군, non-PD) 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid transfection한 후에 hygromycin을 이용하여 selection하여 선별된 immortalized cell을 long term cultivation을 하였다 (2년 동안 진행됨). 이후 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종 환자 (대조군)로부터 얻은 지방유래 간엽줄기세포들 간의 미토콘드리아 손상의 활성도와 형태를 비교 분석하였다.

(나) 파킨슨병 환자 및 수두증 환자의 피부유래 섬유아세포주의 확립 및 분석

- ① 파킨슨병 환자 및 수두증 환자 (정상대조군)로부터 얻은 피부에서 섬유아세포 (skin fibroblast cell)를 분리하여 일차배양을 실시한다. 비파킨슨병인 수두증 환자(Normal pressure hydrocephalus, NPH) 피부유래 섬유아세포(정상대조군), Idiopathic 파킨슨

환자 피부유래 섬유아세포 (idiopathic 파킨슨병), Parkin defect 파킨슨환자 피부유래 섬유아세포 (familial parkin defect 파킨슨병), Deep Brain Stimulation (DBS)를 시행 받은 파킨슨환자의 피부조직에서 얻은 섬유아세포를 single cell로 분리하여 일차세포 배양을 진행 하였다.

② NPH 피부유래 섬유아세포 3종, idiopathic 파킨슨병 피부유래 섬유아세포 3종, familial parkin defect 파킨슨병 피부유래 섬유아세포 3종 (총 9종)에서 미토콘드리아 형태의 Electron micrograph 소견의 비교 분석 및 미토콘드리아 효소 활성도의 비교 측정 하였다.

(2) 연구결과

(가) 파킨슨 환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 hTERT plasmid를 이용한 세포불멸화

① 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 간엽줄기세포에서 TRAP assay 결과는 아래와 같다.

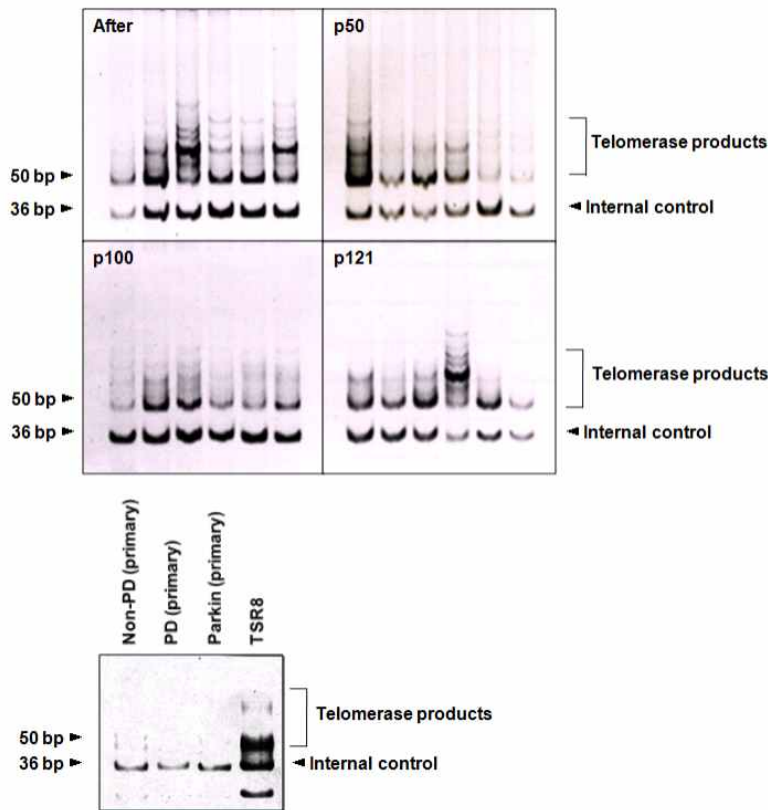


그림 113 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 TRAP assay. hTERT 불멸화된 *non-PD*, *PD*, *Parkin*의 after, passage50, passage100, passage121의 telomerase activity 측정을 위한 TRAP assay. 일차배양 *non-PD*, *PD*, *Parkin*은 negative control로, TSR8은 positive control로 사용됨.

② 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 간엽줄기세포에서 미토콘드리아 손상 및 활성도 측정 결과는 아래와 같다.



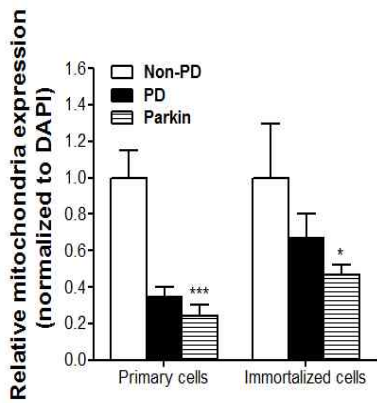
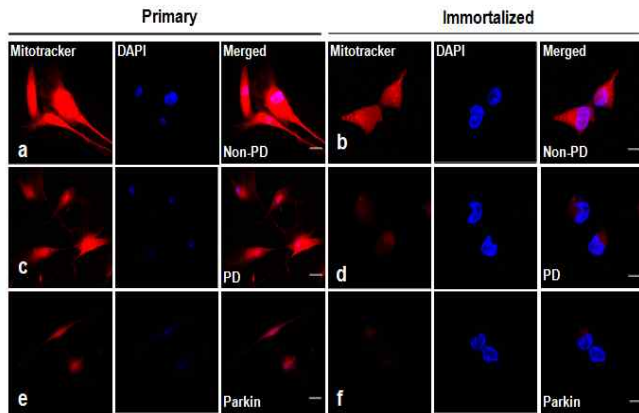


그림 114 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 일차배양과 불멸화된 세포의 미토콘드리아 손상을 재확인한 mitotracker staining. 일차배양과 불멸화된 non-PD, PD, Parkin의 미토콘드리아 형태와 기능이 (non-PD=> PD => Parkin) 순서대로 망가짐을 재확인하였음. (a) 일차배양 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(non-PD), (b)불멸화된 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포(non-PD), (c) 일차배양 idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(PD), (d) 불멸화된 idiopathic 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(PD), (e) 일차배양 parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(Parkin), (f) 불멸화된 parkin deficient 파킨슨환자 지방유래 간엽줄기세포(Parkin). Scale bar = 10 μm.

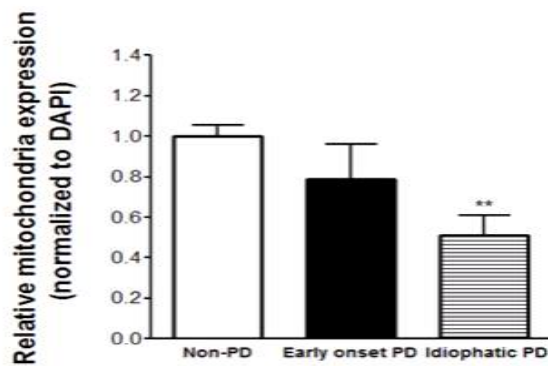
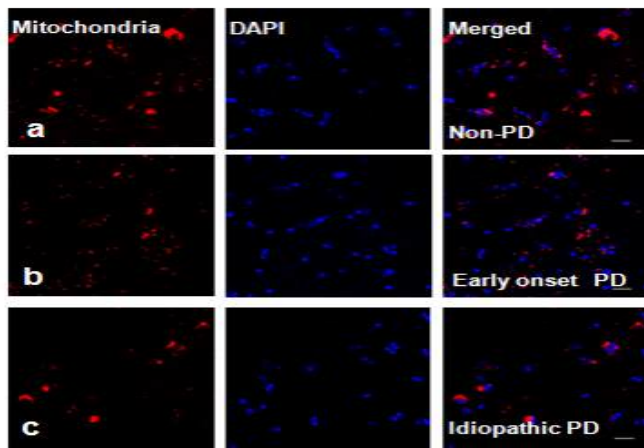


그림 115 비파킨슨환자 및 파킨슨환자의 brain cortex tissue에서의 미토콘드리아 손상을 확인. Non-PD, early onset PD, idiopathic PD환자의 brain cortex tissue에서의 미토콘드리아 immunostaining을 DAPI로 정량함.

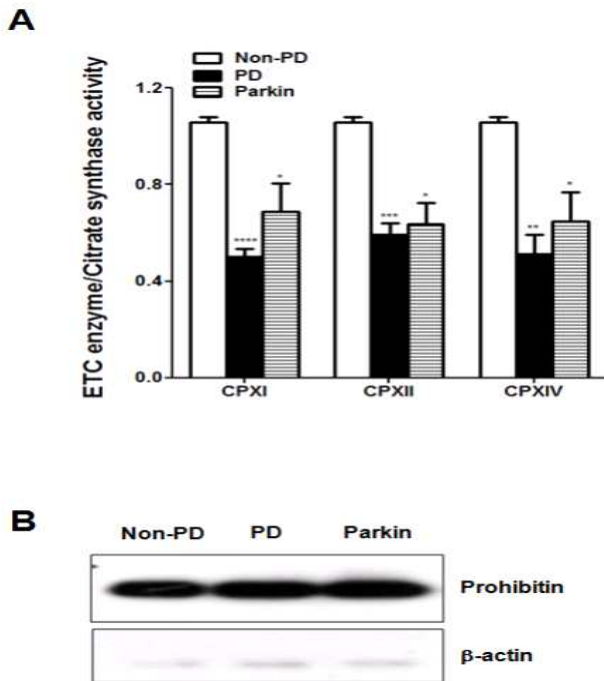


그림 116 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽줄기세포의 불멸화된 세포의 미토콘드리아 활성도의 측정. (a) Complex I (NADH dehydrogenase), Complex II (Succinate dehydrogenase), Complex IV (Cytochrome c oxidase) : hTERT 불멸화된 non-PD, PD, Parkin의 Biochemical enzyme assay로 미토콘드리아 활성도를 측정; 비파킨슨환자에 비하여 idiopathic과 parkin deficient 파킨슨환자의 미토콘드리아 활성도가 감소됨. (b) 불멸화된 non-PD, PD, Parkin간의 mitochondrial marker인 prohibitin

③ 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 간엽줄기세포에서 파킨슨병 특이 마커의 발현을 비교한 결과는 아래와 같다.

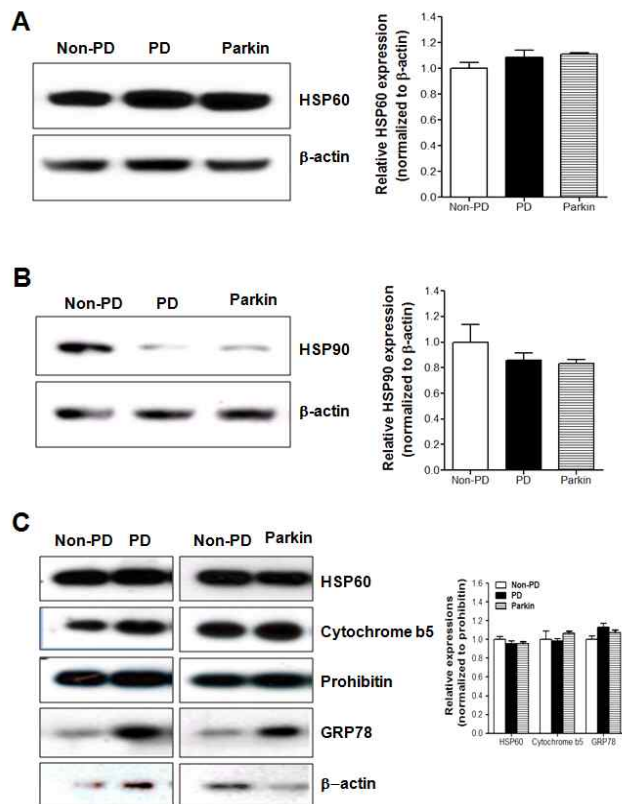


그림 117 불멸화된 파킨슨환자 및 뇌하수체 선종환자의 지방유래 간엽 줄기세포에서 파킨슨병 specific marker의 발현을 비교함. (a) 불멸화된 non-PD, PD, Parkin 환자 지방유래 간엽줄기세포주에서 Hsp60 발현 확인한 western blot analysis, (b) 불멸화된 non-PD, PD, Parkin 환자 지방유래 간엽줄기세포주에서 Hsp90 발현 확인한 western blot analysis, (c) 불멸화된 non-PD, PD, Parkin 환자 지방유래 간엽줄기세포의 미토콘드리아에서 Hsp60, cytochrome b5, GRP78 발현 확인한 western blot analysis.

(나) 파킨슨병 환자 및 수두증 환자의 피부유래 섬유아세포주의 확립 및 분석

① 파킨슨병 환자의 일차배양한 피부유래섬유아세포주의 형태는 아래 사진과 같다.

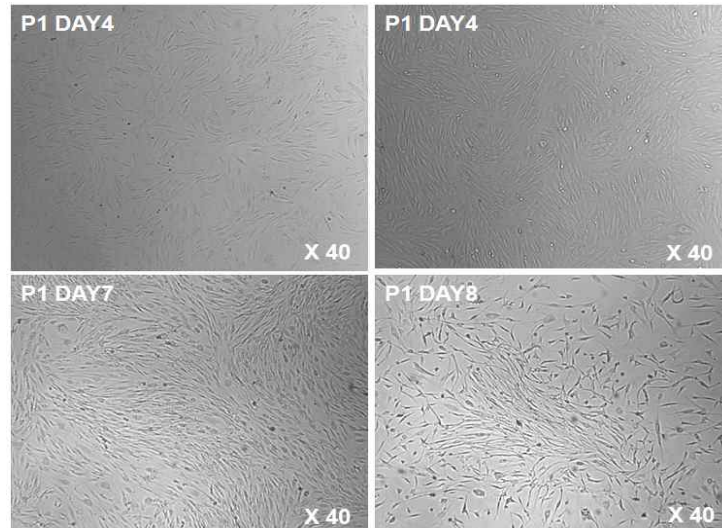


그림 118 파킨슨병 환자의 일차배양한 피부유래섬유아세포주의 형태.

### 3. hAPP 유전자 조절 미니돼지의 행동/영상학적 분석

가. 생후 1년째 정상 미니돼지를 대조군으로 사용하여 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 생후 1년째 행동학적 분석 실시

(1) 연구방법

(가) hAPP 유전자 조절 미니돼지의 행동학적 변화의 점수화

- ① 14개의 항목을 기준으로 행동을 관찰하였으며, 항목별 점수를 부여하여 hAPP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지와의 차이를 확인하였다.
- ② 행동관찰 중 특이한 부분이 있는 경우 관련 행동의 영상자료를 확보하였으며, 정상인 미니돼지와 비교하였다.
- ③ 일령에 따라 행동의 변화가 있는지 확인을 위해 주기적인 관찰을 통해 행동의 변화를 확인하였다.

표 41 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 행동 점수화 (scoring)

No	Question	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Sleep and Wake-up pattern					
1	일정한 거리를 걷는데 걸리는 시간	Normal	Mild Increase	Moderate Increase	Severe Increase
Loss of Self Care & Hygiene					
2	사료 섭취량	Normal	Mild Increase	Moderate Increase	Severe Increase
3	개체 위생	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
4	사료 배급에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
Loss of Objective Recognition					
5	자극적인 냄새에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
6	피부 접촉시의 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
7	큰 소리(Loud sound)에 대한 놀람 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
8	강한 빛(Spot light)에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
9	새로운 object에 대한 호기심	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
Loss of social recognition					
10	한우리에 다른 개체에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
11	한우리에 여러 개체에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
12	사람에 대한 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
Loss of Memory and Learning					
13	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease
14	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	Normal	Mild Decrease	Moderate Decrease	Severe Decrease

④ ADF-1 개체의 경우는 T-test를 통한 인지능력 확인을 진행하여 정상인 미니돼지와  
와의 차이를 확인하였다.

(2) 연구결과

(가) 행동관찰 점수화

① 2012년 8월 31일 태어난 hAPP 유전자 개체로 2013년 9월을 시작으로 총 14회 행

동관찰을 진행하였으며, 관찰 시 점수는 다음 표와 같다.

표 42 hAPP 유전자 조절 미니돼지 행동점수 (ADF-1)

Question	2013년		2014년			2015년					2016년			
	9/1	10/3	1/13	4/25	7/25	1/11	4/8	4/15	4/23	7/10	10/23	1/28	4/22	7/19
일정한 거리를 걷는데 걸리는 시간	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
사료 섭취량	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
개체 위생	2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
사료 배급에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
자극적인 냄새에 대한 반응	3	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
피부 접촉시의 반응	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
큰 소리에 대한 놀람 반응	3	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
강한 빛에 대한 반응	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
새로운 object에 대한 호기심	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
한우리에 다른 개체에 대한 반응	3	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
한우리에 여러 개체에 대한 반응	3	0	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
사람에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	0	2
원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	0	0
SCORE	17	15	8	19	7	6	7	8	7	5	6	6	1	3

② 2014년 6월 9일 태어난 hAPP 유전자 개체로 2015년 4월을 시작으로 총 8회 행동 관찰을 진행하였으며, 관찰 시 점수는 다음 표와 같다.

표 43 ADF1의 산자 ADF-1-2 미니돼지 행동점수 (ADF-1-2)

Question	2015년					2016년		
	4/8	4/15	4/23	7/10	10/23	1/28	4/22	7/19
일정한 거리를 걷는데 걸리는 시간	0	0	0	0	0	0	0	0
사료 섭취량	2	0	0	0	0	0	0	0
개체 위생	1	1	1	1	0	0	0	0
사료 배급에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
피부 접촉시의 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	0	1	0	0	0
강한 빛에 대한 반응	3	0	3	0	0	0	0	0
새로운 object에 대한 호기심	1	0	0	0	0	0	0	0
한우리에 다른 개체에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
한우리에 여러 개체에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
사람에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	0	3	0	1	1	3	3
원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	0	0	0	0	0	3	0
<b>SCORE</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>

③ 행동관찰 시 정상인 개체와 다른 항목은 별도의 동영상 촬영 및 영상자료를 확보하였다.



그림 119 hAPP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 일정한 거리를 걷는데 걸리는 시간 비교 (hAPP유전자 조절 미니돼지는 보행속도 및 주위 관심이 많아 수 분이 경과하여도 제자리로 돌아오지 않음, 정상미니돼지는 1분 16초 소요된 것으로 관찰 됨).



그림 120 APP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 개체위생 비교 (APP유전자 조절 미니돼지는 바닥을 핥거나 분변 섭취행동이 관찰 됨).



그림 121 hAPP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 자극적인 냄새에 대한 반응 비교 (hAPP유전자 조절 미니돼지는 자극적인 냄새에 대한 거부행동이 없으나, 정상 미니돼지는 피하는 행동이 관찰 됨).



**ADF-1**



**대조군**

그림 122 hAPP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 피부 접촉시의 반응 비교 (hAPP유전자 조절 미니돼지는 피부 접촉 시 아무런 반응이 없었으나, 정상 미니돼지는 몸을 밀착하거나 흔드는 행동이 관찰 됨).



**ADF-1**



**대조군**

그림 123 hAPP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 큰 소리에 대한 놀람 반응 비교 (APP 유전자 조절 미니돼지는 큰 소리 발생 시 아무런 반응이 없었으나, 정상 미니돼지는 깜짝 놀라 움찔하는 행동이 관찰 됨).



**ADF-1**



**대조군**

그림 124 hAPP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 강한 빛에 대한 반응 비교 (APP유전자 조절 미니돼지는 손전등을 눈에 비추었을 때 아무런 반응이 없었으나, 정상 미니돼지는 고개를 떨구거나 피하는 행동이 관찰 됨).





그림 125 APP유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 피부 접촉시의 반응 비교 (APP유전자 조절 미니돼지는 다른 개체가 접근을 해도 관심이 없으나, 정상미니돼지는 회피함).

(나) T-tset

- ① hAPP 유전자 조절 미니돼지의 기억력 확인을 위해 T-maze test를 진행하였으며, 진행은 사육실 내부 복도 밑 앞쪽을 이용하여 test 공간을 확보하였다.
- ② 앞쪽 공간에 사료를 좌측, 우측, 제거한 후 APP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지를 복도 끝에서 출발시킨 후 어느 방향으로 진행하는지 확인을 하였으며, 결과는 표 11에 나타내었다.

표 44 APP 유전자 조절 미니돼지의 T-test 결과(ADF-1)

사료 위치	APP유전자 조절 미니돼지	정상 미니돼지
1. 좌측에 있을 시 진행 방향	좌측 이동(총 3회 연속)	좌측 이동(총 3회 연속)
2. 우측에 있을 시 진행 방향	좌측 확인(3회) 이동 후 우측	좌측 확인(1회) 이동 후 우측
3. 좌측에 있을 시 진행 방향	좌측	좌측
4. 사료 없을 시 진행 방향	좌측	좌측

- ③ 좌측에 사료가 있을 후 우측으로 변경을 하면 APP 유전자 조절 미니돼지는 총 3회에 걸쳐 좌측 확인 후 우측으로 이동을 하였으나, 정상 미니돼지는 1회만 좌측을 확인 후 그 다음에는 바로 우측으로 이동한 것이 관찰 되었다.

나. 생후 1년째 정상 미니돼지를 대조군으로 사용하여 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 생후 1년째 뇌의 MRI, CT, PET 촬영 후 영상학적 평가 실시

(1) 연구방법/결과

(가) CT와 PET 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET과 CT 영상기기를 이용하여 APP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 APP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.
- ② 뇌 PET 영상은 1) dopamine transporter인 Fluoro-CIT radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 2시간 후에 촬영하였고, 2) glucose uptake metabolism인 FDG radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였다.



그림 126 1년령 정상 미니돼지의 뇌 PET 촬영 모습.



그림 127 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 뇌 PET 촬영 모습.

(나) MRI와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 일산 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 APP 유전자 조절 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 APP 유전자 조절 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 정상미니돼지의 뇌영상 자료도 함께 확보하였다.



그림 128 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 뇌 MRI 촬영전후의 모습.

## (2) 연구방법/결과

### (가) CT와 PET 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 2013년 6월에 촬영한 미니돼지 MPTP PD 모델에서 Basal ganglia의 F-CIT의 uptake가 정상 미니돼지와 비교하여 떨어져 있다. 또한 APP overexpression 미니돼지 APP model에서 brain FDG의 uptake는 정상 미니돼지와 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없다.

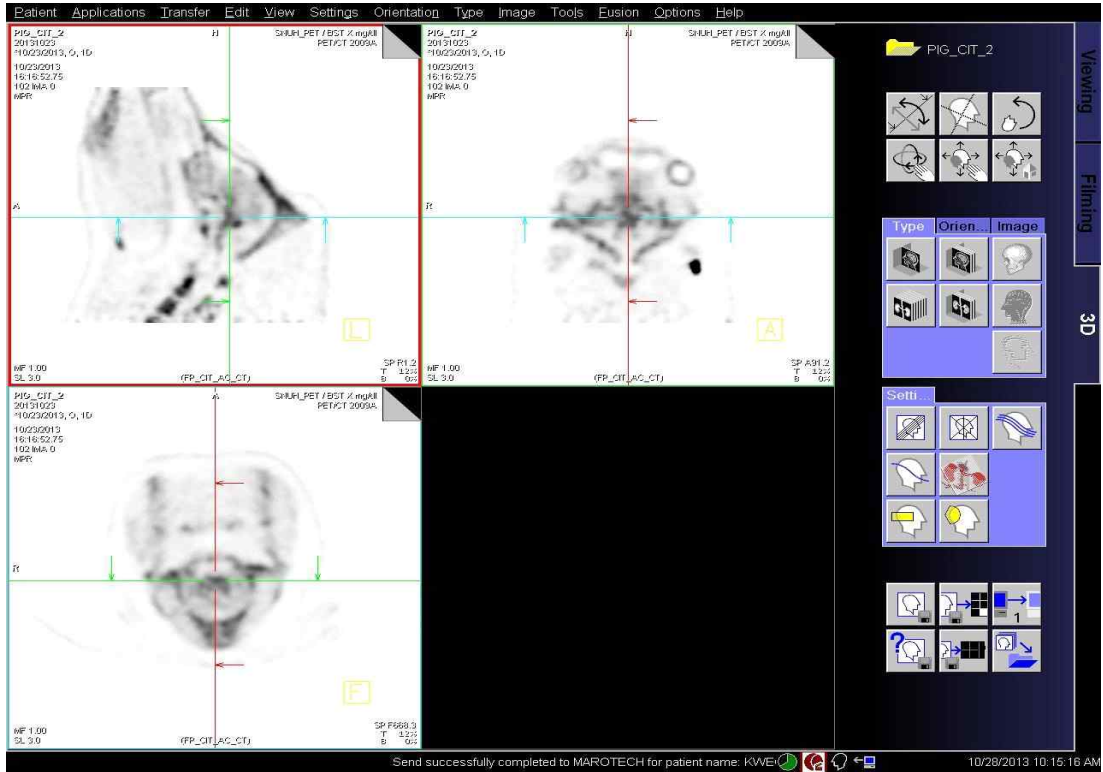


그림 129 1년령 정상 미니돼지의 F-CIT 주입 후의 뇌 PET 이미지.



그림 130 1년령 정상 미니돼지의 F-CIT 주입 후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.

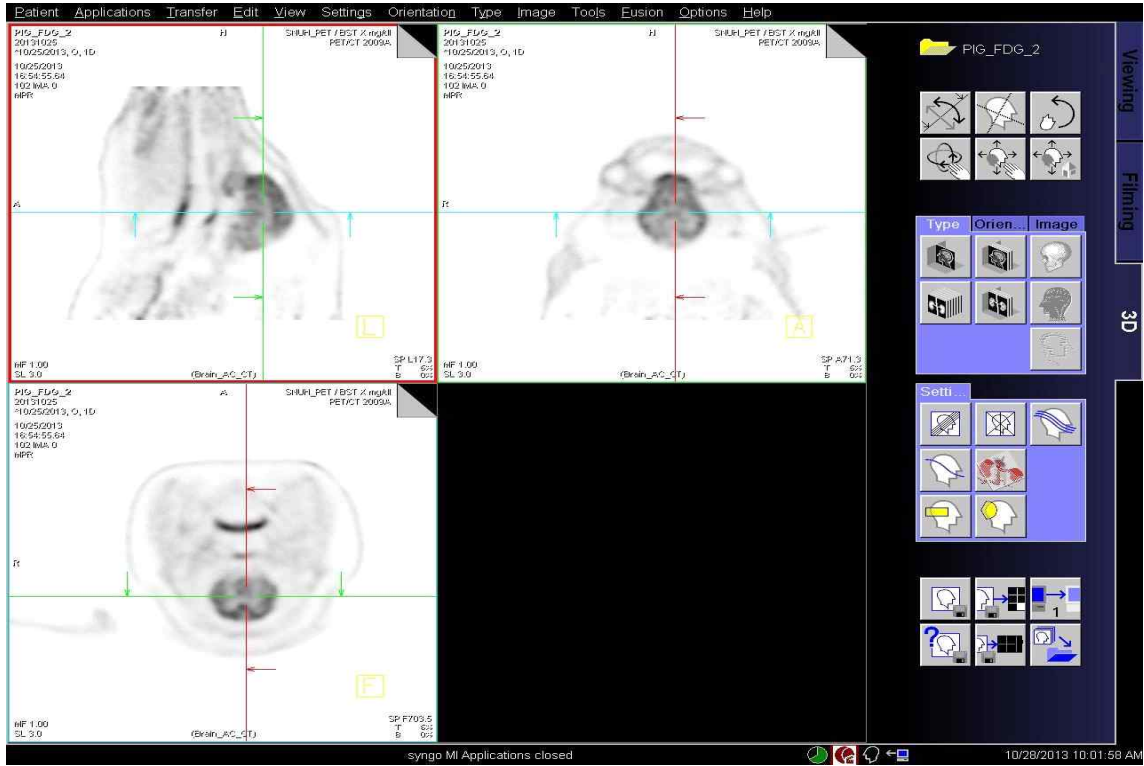


그림 131 1년령 정상 미니돼지의 FDG 주입 후의 뇌 PET 이미지.



그림 132 1년령 정상 미니돼지의 FDG 주입 후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.

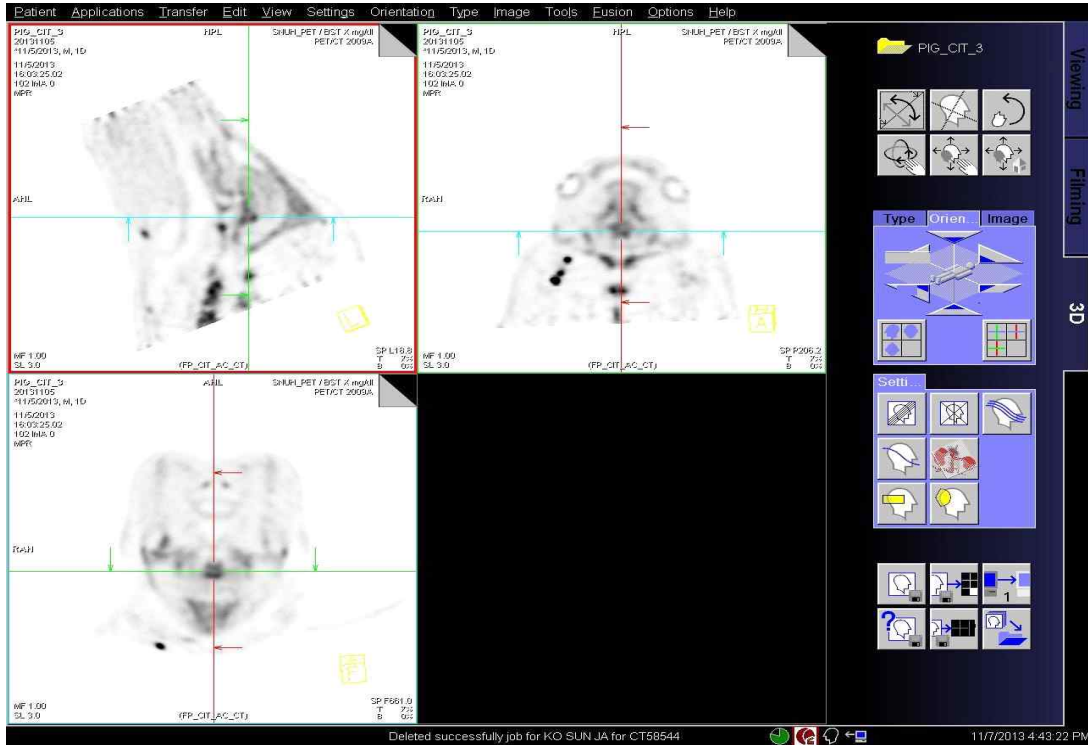


그림 133 1년령 hAPP 유전자 조절 미니페지의 F-CIT 주입후의 뇌 PET 이미지.

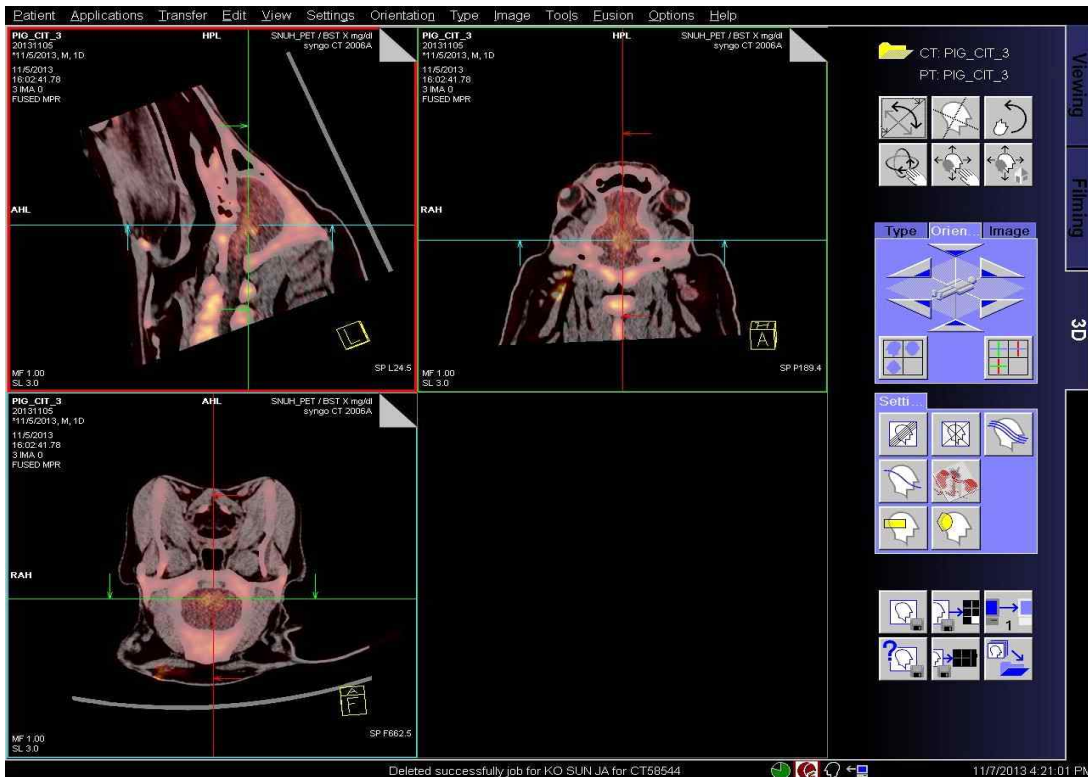


그림 134 1년령 hAPP 유전자 조절 미니페지의 F-CIT 주입후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.

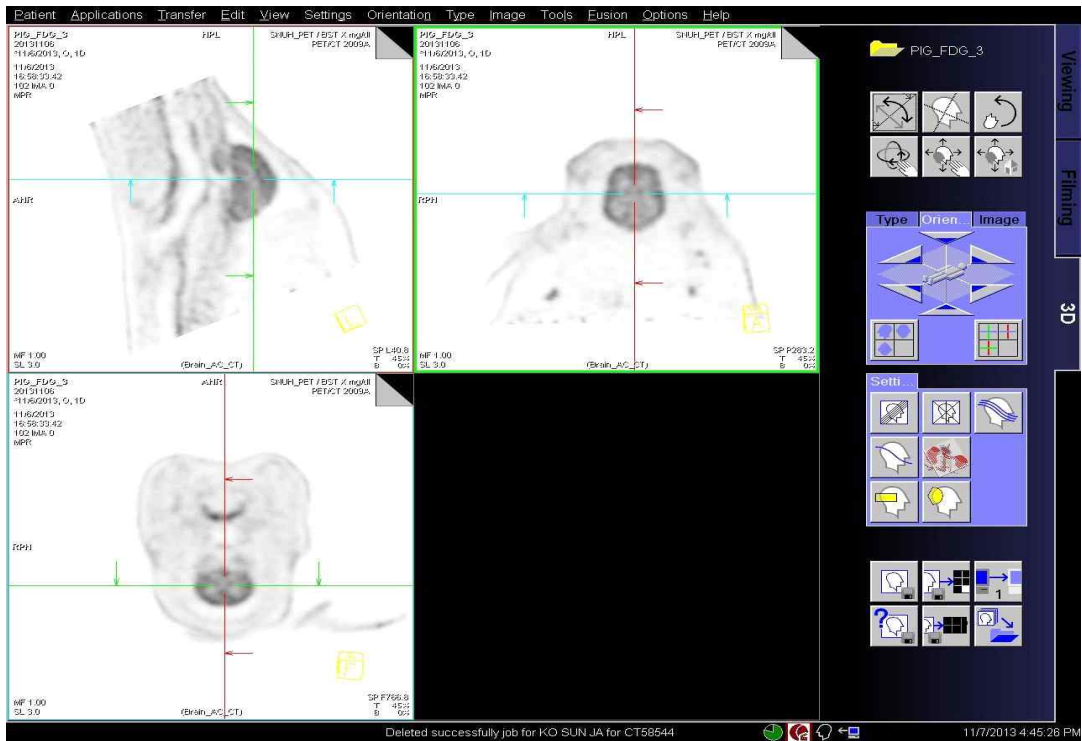
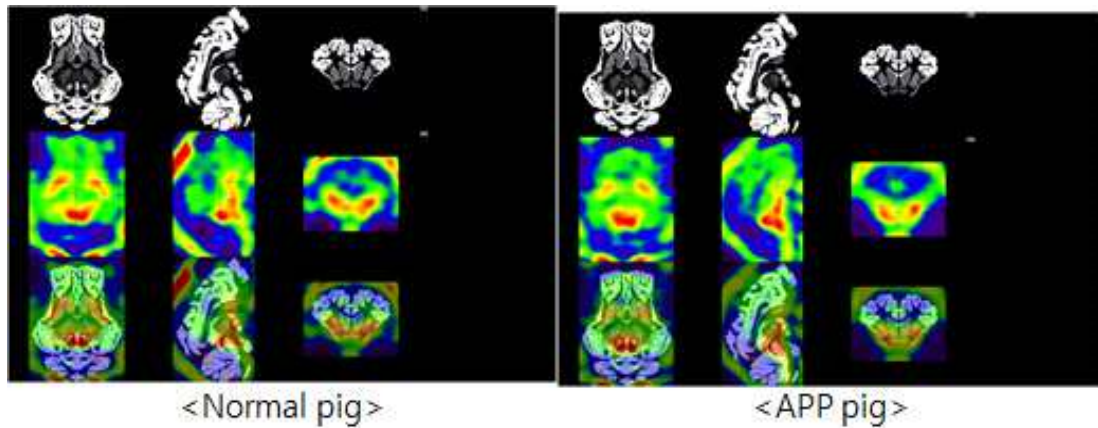


그림 135 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 FDG 주입후의 뇌 PET 이미지.



그림 136 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 FDG 주입후의 뇌 PET-CT fusion 이미지.



	Binding potential	
	Normal pig	APP pig
Nucleus_caudatus_R	0.693546	0.473399
Nucleus_caudatus_L	0.424178	0.489571
Putamen_R	1.254003	1.012133
Putamen_L	1.10095	1.11204

그림 137 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지와 정상미니돼지의 F-CIT 주입후의 뇌 PET 이미지의 비교 및 binding potential의 정량.

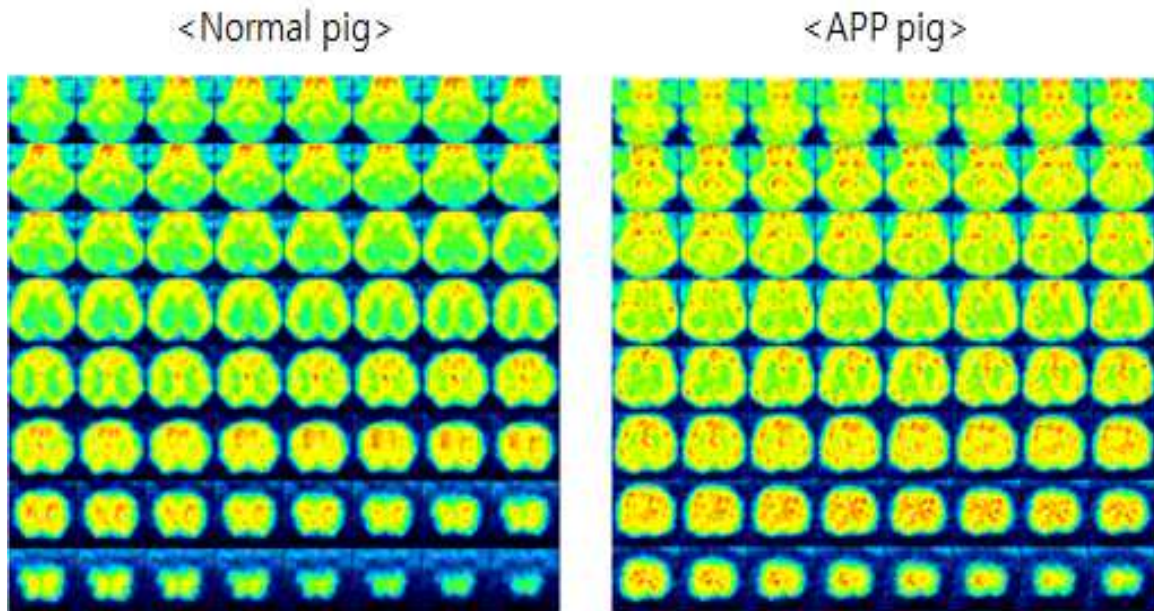


그림 138 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지와 정상미니돼지의 FDG 주입후의 뇌 PET-CT fusion 이미지의 비교.



(나) MRI와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① APP 유전자 조절 미니돼지의 뇌 MRI 및 CT 촬영 결과 아래와 같은 영상을 획득하였다.

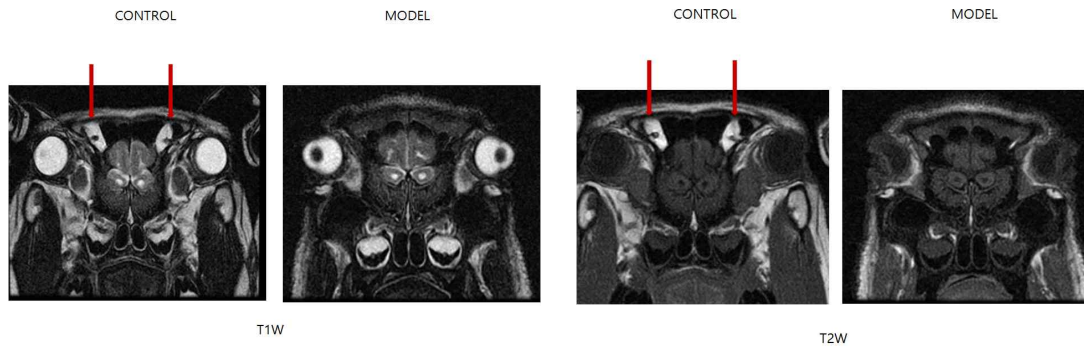


그림 139 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 뇌 MRI 이미지.

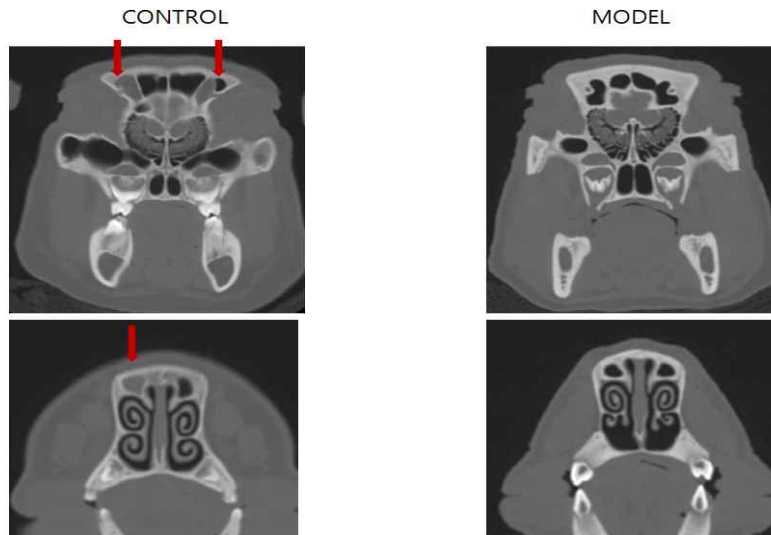


그림 140. 1년령 hAPP 유전자 조절 미니돼지의 뇌 CT 이미지.

다. APP 유전자 조절 미니돼지 생후 2년째 뇌 및 F1 APP 발현 돼지의 생후 1년째 뇌의 MRI, CT, PET 촬영 후 영상학적 평가 실시

(1) 연구방법/결과

(가) APP 미니돼지에서 생후 2년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET과 CT 영상기기를 이용하여 APP 유전자 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 APP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) glucose uptake metabolism을 평가하는 glucose analog인 FDG (Fluorodeoxyglucose (18F), [18F]FDG, 18F-FDG) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였고, 2) amyloid plaque level를 타겟으로 하는 PIB (Pittsburgh B) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 70분 후에 촬영하였다.

표 45 CT와 PET 촬영에 사용된 대조군과 APP 미니돼지의 정보

<b>FDG</b> APP mini pig (Hanford, ♀ / 114 주령)	<b>PIB</b> APP mini pig (Hanford, ♀ / 114 주령)
<b>FDG</b> Control mini pig 2 (Hanford, ♀ / 127 주령)	<b>PIB</b> Control mini pig 2 (Hanford, ♀ / 125 주령)

(나) APP 미니돼지에서 생후 2년째 CT와 MRI 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① 일산 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 APP 유전자 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 APP 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 46 CT와 MRI 촬영에 사용된 APP 미니돼지의 정보

<b>APP mini pig</b> (Hanford, ♀ / 114 주령)	<b>Control mini pig 2</b> (Hanford, ♀ / 127 주령)
--	--

(다) F1 APP 발현 돼지(ADF1-2)에서 생후 1년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET과 CT 영상기기를 이용하여 F1 APP 유전자 과발현 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 47 CT와 PET 촬영에 사용된 F1 APP 돼지의 정보

<b>FDG</b> APP mini pig (Hanford, ♀ / 49 주령)	<b>PIB</b> APP mini pig (Hanford, ♀ / 49 주령)
---	---

(2) 연구결과

(가) APP 미니돼지에서 생후 2년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① APP 발현 복제돼지의  $^{18}\text{F}$ -FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 APP 발현 복제 미니돼지에서 primary somatosensory cortex를 제외한 전반적인 부위에서 brain metabolism의 감소됨이 관찰되었다. 이 결과는 severe AD 환자에서 보이는 전형적인 FDG 영상 소견과 유사하다. 따라서 APP 발현 미니 돼지의 경우 AD 환자에서 보이는 뇌에서의 glucose metabolism의 감소패턴이 유사함을 관찰할 수 있으므로, AD 모델로서의 본과제의 APP 과발현 돼지의 가치를 보여주는 결과이다.

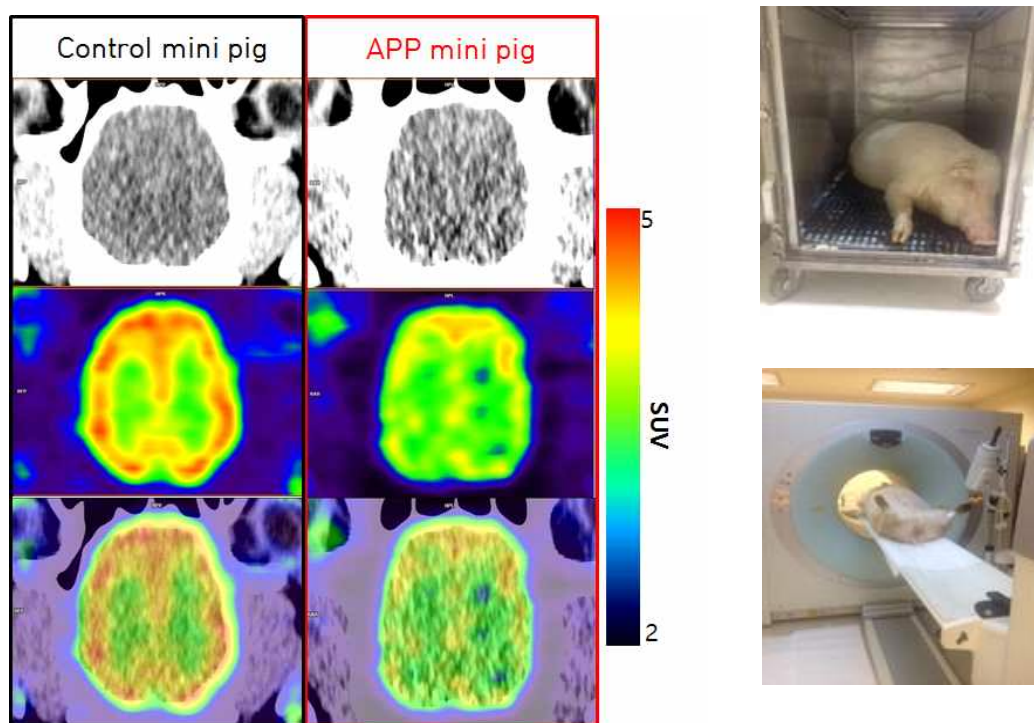


그림 141 2년령 hAPP 유전자 발현 미니돼지의  $^{18}\text{F}$ -FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

② APP 발현 복제 돼지의  $^{11}\text{C}$ -PIB의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 APP 발현 복제 미니돼지의 모두 white matter에 주로 PIB uptake가 관찰되었다. 그러나 APP 발현 복제 미니돼지에서 AD 환자에서 보이는 명확한 cortical PIB uptake는 관찰되지 않았다. 향후 cortical uptake의 차이가 있는지 우선 기존 영상으로 정량 분석을 진행하고, 또한 추적검사를 실시하여, 뇌에서의 beta amyloid oligomer assemblies를 관찰할 예정이다.

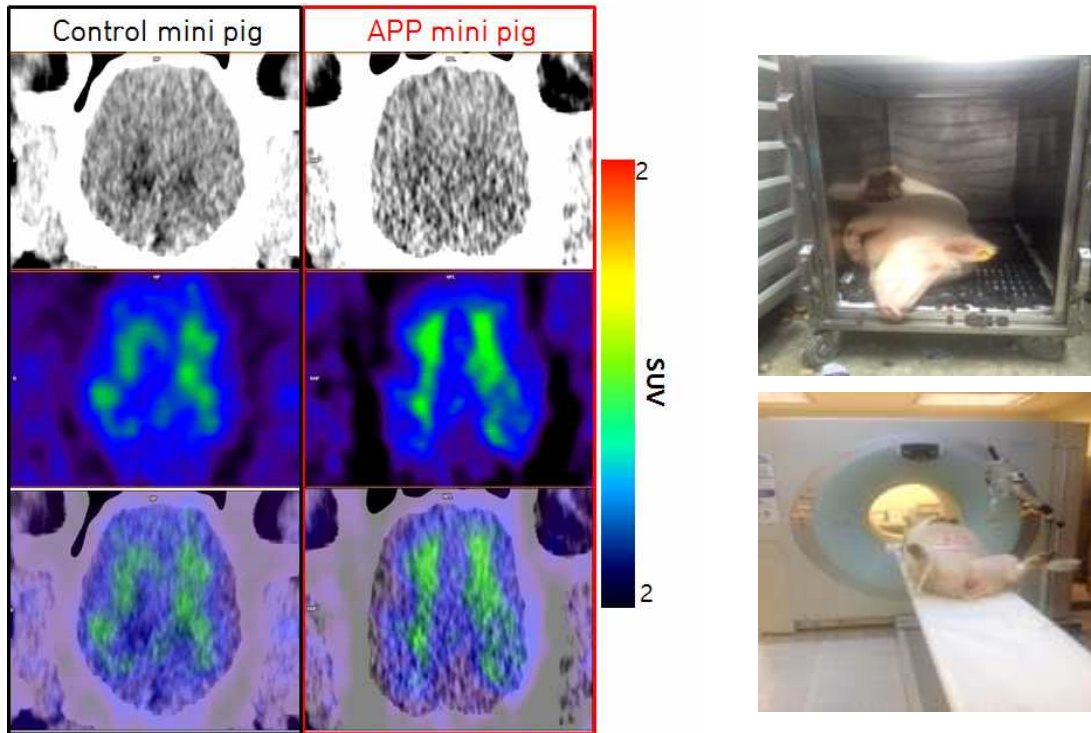


그림 142 2년령 hAPP 유전자 발현 미니돼지의  $^{11}\text{C}$ -PIB의 PET과 CT에 관한 영상 결과

(나) APP 미니돼지에서 생후 2년째 CT와 MRI 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① 생후 2년령의 정상 미니돼지와 APP 발현 복제 미니돼지의 비교분석결과에서, APP 발현 복제 미니돼지에서 CT로는 유의한 구조적 변화를 찾을 수 없었다.

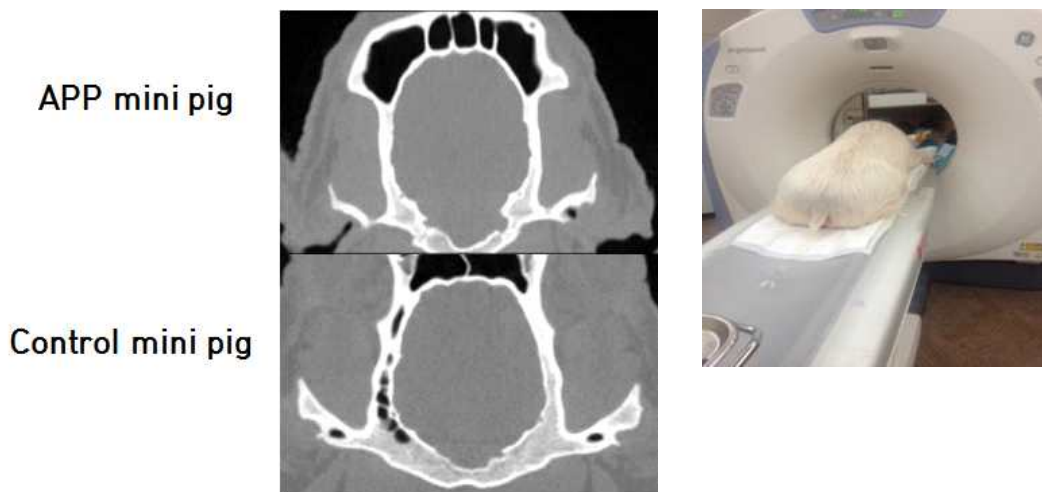
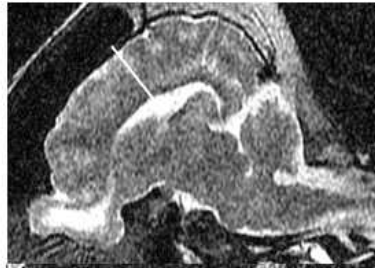


그림 143 2년령 hAPP 유전자 발현 미니돼지의 CT에 관한 영상 결과

- ② 정상 미니돼지와 비교하여 MRI 영상에서 APP 발현 복제 미니돼지에서 뇌실 확장 및 뇌 피질의 위축이 관찰되었다.

APP mini pig



Control mini pig



그림 144 2년령 hAPP 유전자 발현 미니돼지의 MRI에 관한 영상 결과

(다) F1 APP 발현 돼지(ADF1-2)에서 생후 1년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① F1 APP 발현 돼지(1년령)의  $^{18}\text{F}$ -FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니 돼지에 비교하여 2년령 APP 발현 복제 돼지와 그 산자인 1년령 APP 발현돼지의 cortical metabolism이 비슷한 양상으로 감소됨이 관찰되었다. 이는 founder 가 되는 APP 과발현 돼지에 비하여 F1에서 phenotype 이 1년 일찍 나타남을 보여 주는 결과이다.

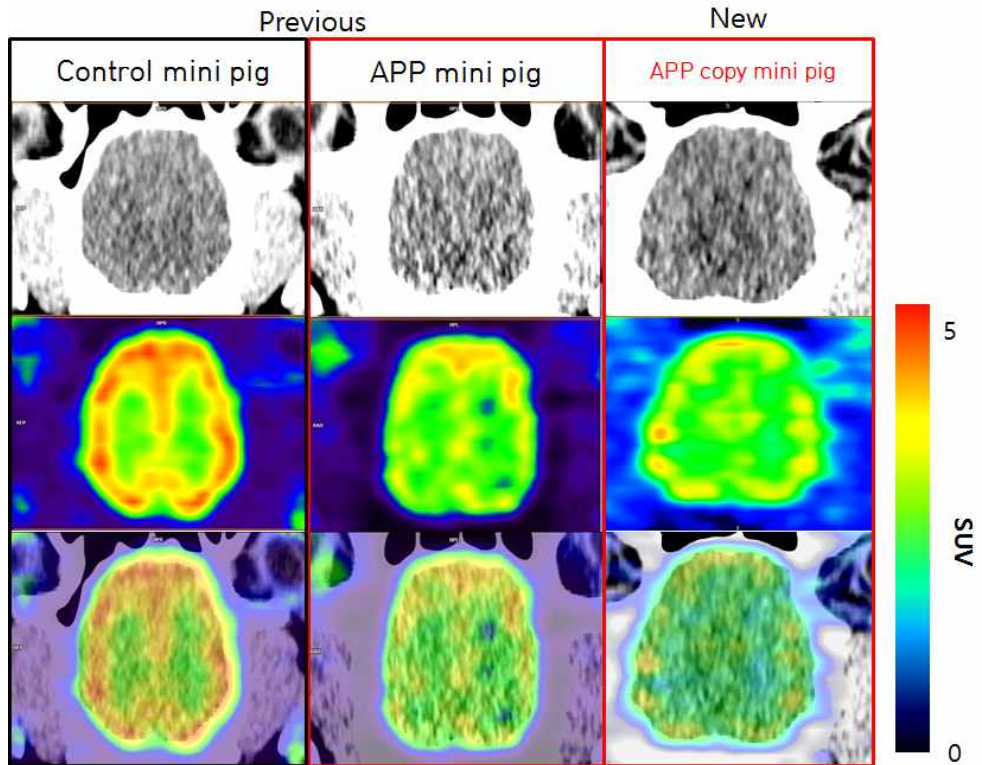


그림 145 F1 APP 발현 돼지(1년령)의  $^{18}\text{F}$ -FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

- ② F1 APP 발현 돼지(1년령)의  $^{11}\text{C}$ -PIB의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니 돼지에 비교하여 2년령 APP 발현 복제 돼지와 그 산자인 1년령 APP 발현 돼지는 비슷한 양상을 보였으며 특이 소견이 보이지 않았다.

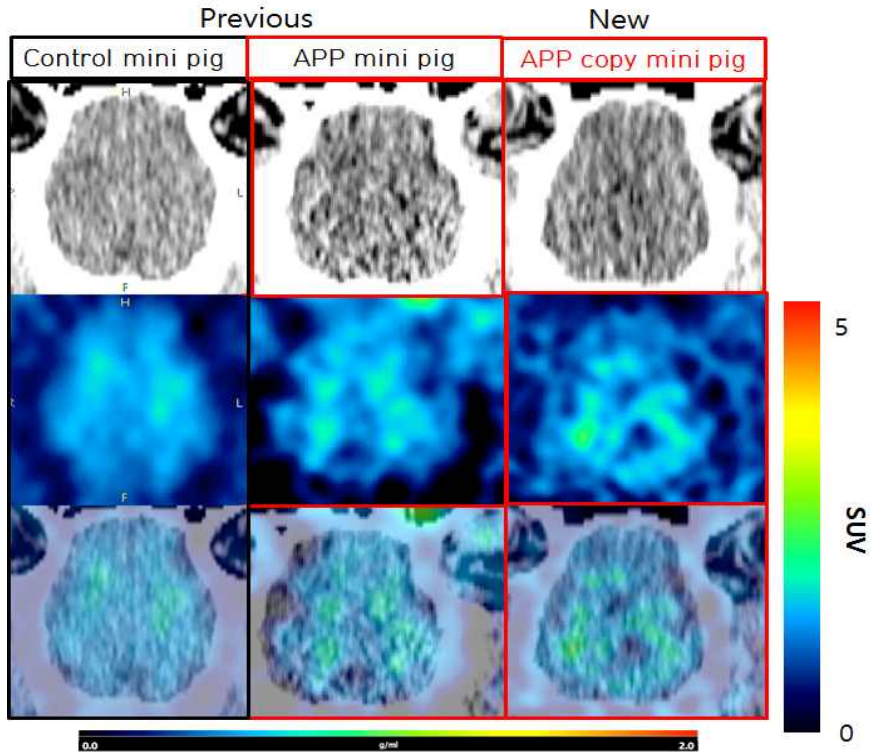


그림 146 F1 APP 발현 돼지(1년령)의  $^{11}\text{C}$ -PIB의 PET과 CT에 관한 영상 결과

라. hAPP 유전자 조절 미니돼지(ADF-1) 생후 3년째 뇌 및 F1 APP 발현 돼지 (ADF1-2)의 생후 2년째 뇌의 MRI, CT, PET 촬영 후 영상학적 평가 실시

(1) 연구방법/결과

(가) APP 미니돼지(ADF-1) 에서 생후 3년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① 서울대학교병원 암병원 핵의학과의 PET과 CT 영상기기를 이용하여 APP 유전자 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 APP 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) glucose uptake metabolism을 평가하는 glucose analog인 FDG (Fluorodeoxyglucose (18F), [18F]FDG, 18F-FDG) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였고, 2) amyloid plaque level를 타겟으로 하는 PIB (Pittsburgh B) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 70분 후에 촬영하였다.

표 48 CT와 PET 촬영에 사용된 APP 돼지에서 FDG 및 PIB 투여 주령

1차 촬영	FDG (ADF-1): Hanford, ♀/159 주령	FDG (정상돼지): Hanford, ♀/172 주령
2차 촬영	FDG (ADF-1) : Hanford, ♀/193 주령	PIB (ADF-1) : Hanford, ♀/193 주령

(나) APP 미니돼지에서 생후 3년째 CT와 MRI 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 APP 유전자 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 APP 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 49 CT와 PET 촬영에 사용된 정상돼지와 APP 돼지에서 CT 및 MRI 촬영 주령

1차 촬영	ADF-1 Hanford, ♀/159 주령	정상돼지 Hanford, ♀/172 주령
2차 촬영	ADF-1 Hanford, ♀/193 주령	ADF1-2 Hanford, ♀/100 주령

(다) F1 APP 발현 돼지에서 생후 2년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET과 CT 영상기기를 이용하여 F1 APP 유전자 과발현 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 50 CT와 PET 촬영에 사용된 F1 APP 돼지에서 FDG 및 PIB 투여 주령

FDG (ADF1-2) : Hanford, ♀/100 주령	PIB (ADF1-2) : Hanford, ♀/100 주령
----------------------------------	----------------------------------

(2) 연구결과

(가) APP 미니돼지에서 생후 3년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① APP 발현 복제돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 APP 발현 복제 미니돼지에서 1차 촬영시 큰 차이가 없어, 2차 촬영을 진행하였다. 그 결과 FDG PET에서 parietal cortex에 약간 metabolism이 감소함을 확인하였다. 하지만 그 차이가 subtle하여 실제 변화가 있는 것인지는 확실하지 않다.



[1차 촬영]

[2차 촬영]

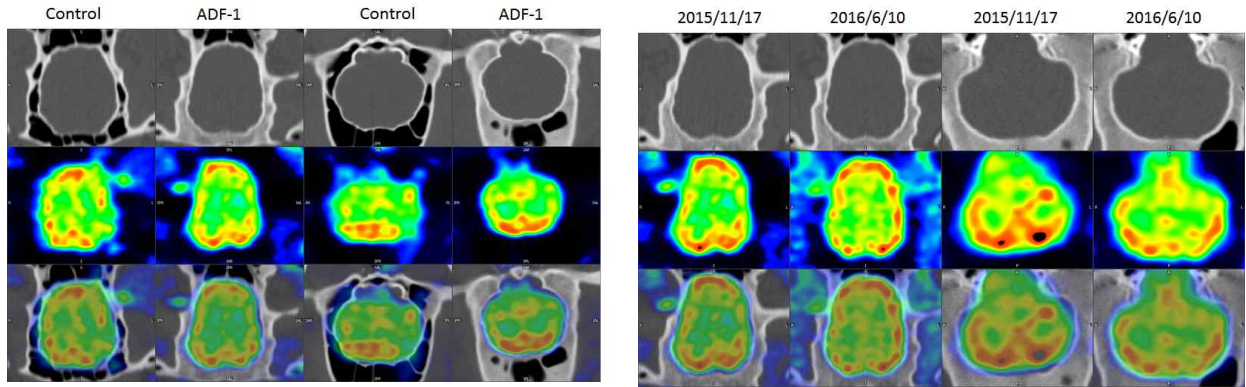


그림 147 3년령 hAPP 발현 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

② APP 발현 복제 돼지의 11C-PIB의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 APP 발현 복제 미니돼지에서 양쪽 temporal cortex에 PIB uptake가 관찰되었다.

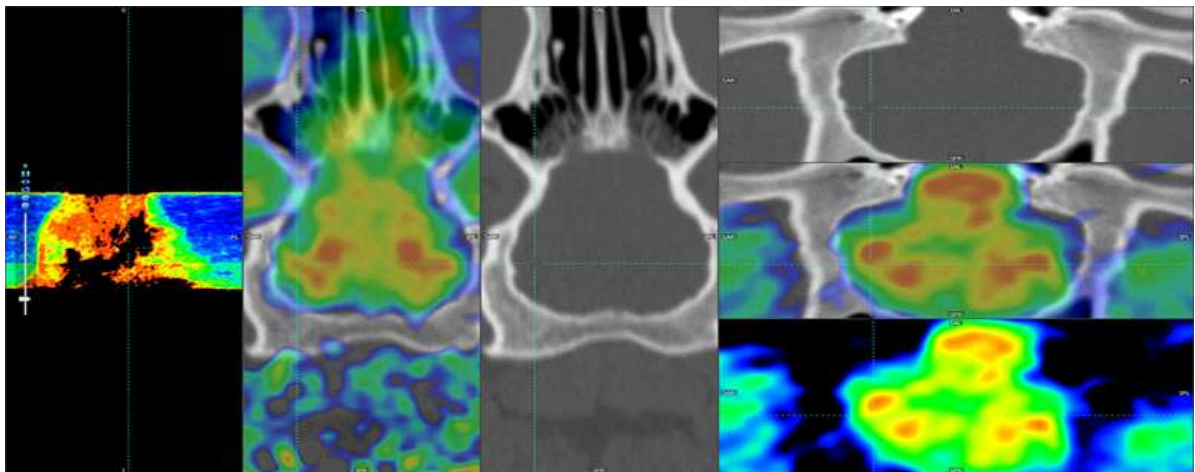


그림 148 3년령 hAPP 발현 미니돼지의 11C-PIB의 PET과 CT에 관한 영상 결과

(나) hAPP 미니돼지에서 생후 3년째 CT와 MRI 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

① APP 발현 복제 미니돼지(3년령 ADF1)의 CT에 관한 영상 소견; 생후 3년령의 정상 미니돼지와 APP 발현 복제 미니돼지의 비교분석결과에서, APP 발현 복제 미니돼지에서 CT로는 유의한 구조적 변화를 찾을 수 없었다.

Normal 1



ADF-1

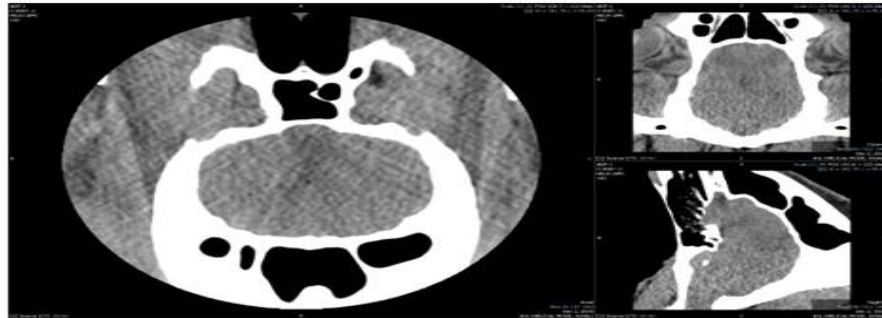


그림 149 3년령 hAPP 발현 미니돼지의 CT에 관한 영상 결과

② hAPP 발현 복제 미니돼지(3년령 ADF1)의 MRI에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 MR 영상에서 APP 발현 복제 미니돼지에서 ventricle size가 약간 증가한 듯도 하였다. 하지만 그 차이가 subtle하여 실제변화가 있는지는 확실하지 않다.

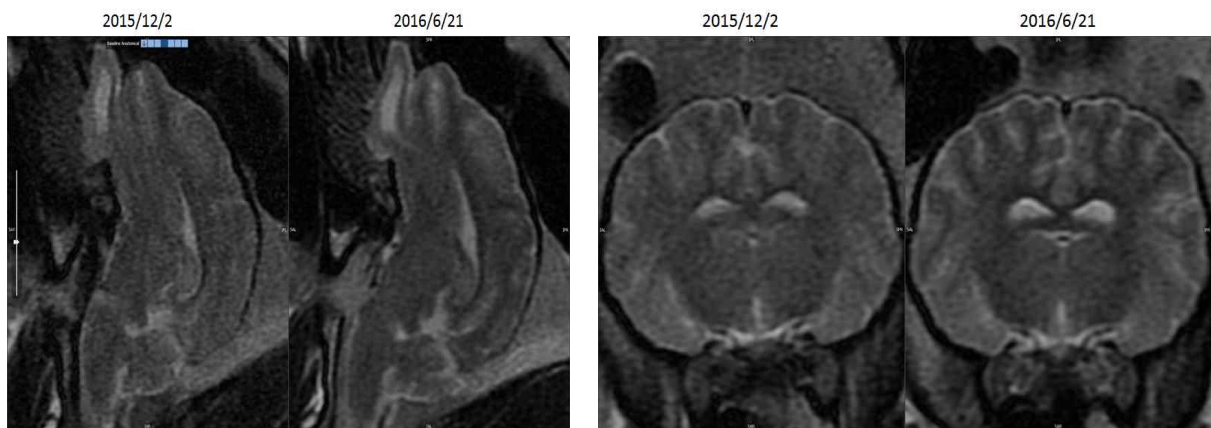
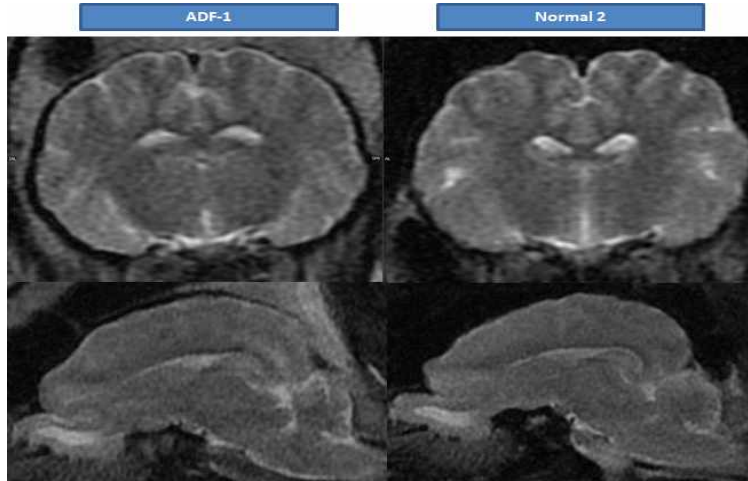


그림 150 3년령 hAPP 발현 미니돼지의 MR에 관한 영상 결과

(다) F1 hAPP 발현 미니돼지(ADF1-2)에서 생후 2년째 CT와 PET 촬영의 뇌 영상학적 평가 및 분석

- ① F1 hAPP 발현 돼지(3년령)의  $^{18}\text{F}$ -FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니 돼지에 비교하여 3년령 APP 발현 복제 돼지의 산자인 2년령 APP 발현돼지는 유의한 변화를 찾을 수 없었다 (2015년 5월 22일은 1년령 촬영결과임).



그림 151 2년령 F1 hAPP 발현 미니돼지(ADF1-2)의 MR에 관한 영상 결과

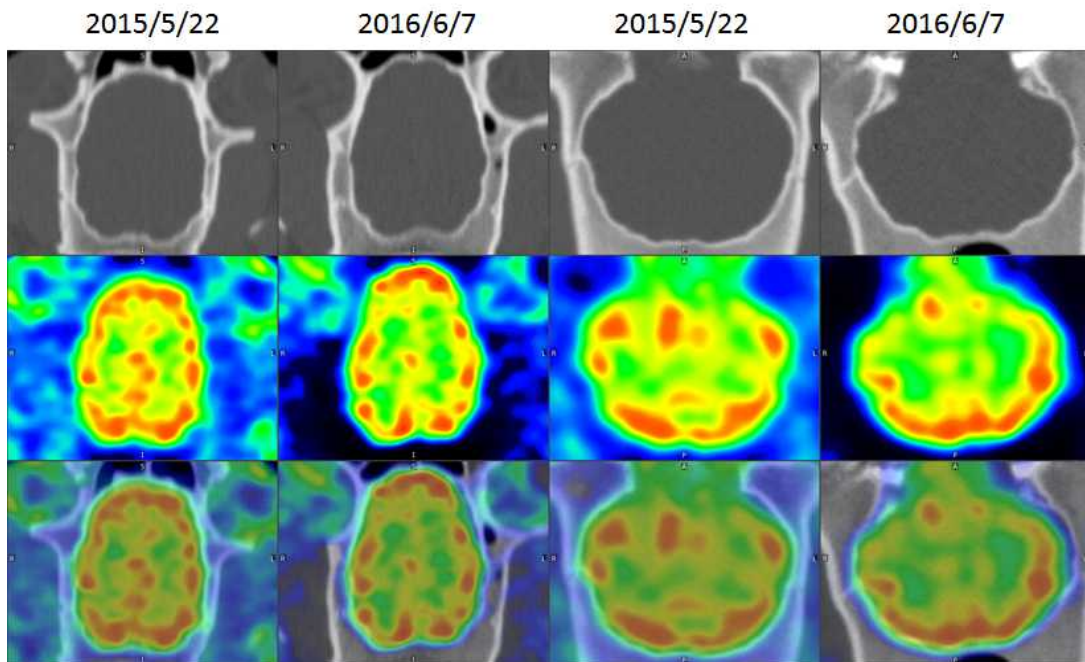


그림 152 2년령 F1 hAPP 발현 미니돼지(ADF1-2)의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

② F1 APP 발현 미니돼지(2년령)의  $^{11}\text{C}$ -PIB의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지에 비교하여 3년령 APP 발현 복제 돼지의 산자인 2년령 APP 발현 돼지는 cortex에 PIB uptake가 관찰되지 않았다.

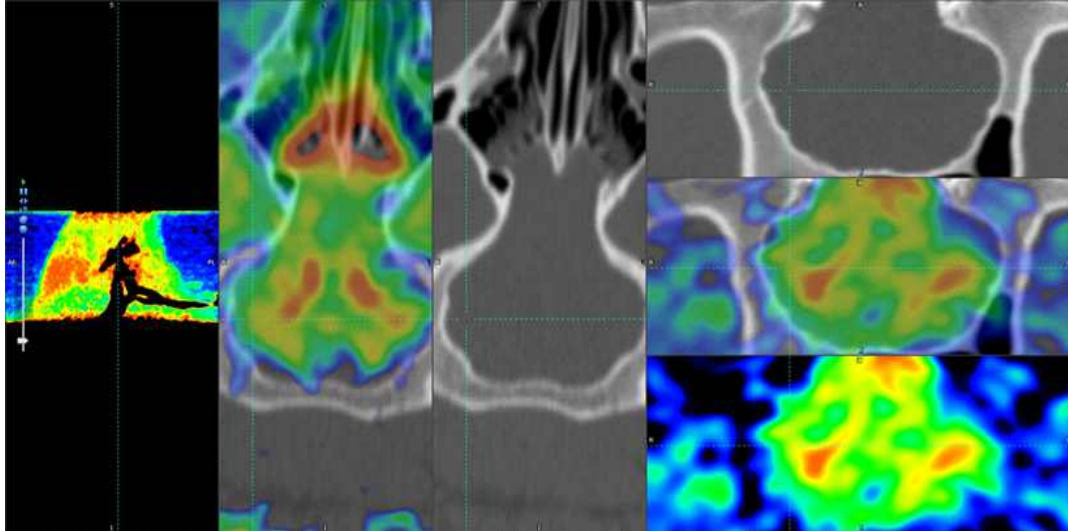


그림 153 2년령 F1 hAPP 발현 미니돼지(ADF1-2)의 11C-PIB의 PET과 CT에 관한 영상 결과

#### 4. PD 유전자 SNCA 발현 미니돼지의 행동/영상학 분석 통한 PD 모델로의 평가

##### 가. hSNCA 발현 미니돼지의 투여 후 증상 관찰 및 점수화 방안 확립

###### (1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 미니돼지의 일반적인 증상인 떨림, 경직, 서동(운동느림) 및 자세 불안정 등에 대한 증상이 관찰되었으며, 이러한 증상을 대조군의 행동과 비교하기 위하여 영상자료를 확보하였다.

표 51 PD pig model의 관찰행동 점수화(scoring) 표준

	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>Tremor</b>				
쉬는 동안의 떨림 (신체부위 무관)	None			Severe
움직이는 동안의 떨림 (신체부위 무관)	None			Severe
<b>Loss of automatic movements</b>				
침 흘림	None			Always
사료 섭취량	Invariable	Over 70% to normal	40-70% to normal	Below 40% to normal
음수량	Invariable	Over 70% to normal	40-70% to normal	Below 40% to normal
자극적인 냄새에 대한 반응	Move immediately			No response
<b>Slowed motion (Bradykinesia)</b>				
피부 접촉시의 반응	React			No reaction
일정한 거리를 걷는 데 걸리는 시간	Similar to normal	100-150% to normal	150-200% to normal	Over 200% to normal
<b>Impaired posture and balance</b>				
일정한 거리를 걷는 동안의 균형 유지	Normal			Lost continuously
깜짝 놀래 췌을 때의 반응 속도	Fast			No movement
일상적 움직임 동안의 균형	Normal			Lost continuously
<b>Dementia</b>				
새로운 사물에 대한 호기심	Curious and play			Unconcern
탈출(Escaping)	None	1 time per week	2-6 times per week	Everyday
쉬면서 내는 소리(grunting sound)의 변화	Normal			Severely decreased
강한 빛(spot light)에 대한 반응	Move immediately			No response
큰 소리(loud sound)에 대한 놀람 반응	Fast			No movement
식사 시간 전의 울음 소리	Normal			Severely decreased
원통에서 발을 밖으로 빼는 실험				
피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	React			No reaction

(나) hSNCA 발현 미니돼지의 행동관찰

- ① 신경독성물질 투여를 통해 PD를 유발한 미니돼지에게 적용하였던 행동관찰 항목 중 17개 항목을 선정하여 정기적으로 hSNCA 발현 미니돼지의 행동관찰을 진행하였

으며, 각각의 항목에 대하여 점수를 부여하여 변화를 관찰하였다.

표 52 hSNCA 발현 미니돼지의 행동관찰 항목 및 방법

No.	Question	관찰 방법
1	쉬는 동안의 떨림	누운 상태에서 3분간 관찰하여 떨림 횟수 측정
2	움직이는 동안의 떨림	보행 시 3분간 관찰하여 떨림 횟수 측정
3	침흘림	일반상황에서의 침흘림 여부 및 정도 관찰
4	사료 섭취량	일정량의 사료 급여 후 섭취 완료 시 까지의 시간 측정
5	음수량	사료급여 후 20분간 음수 섭취횟수 횟수 관찰
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	1분간 깜빡이는 횟수 측정
7	움직이는 양	1분간 움직이는 상태 관찰
8	자극적인 냄새에 대한 반응	알코올을 분무하여 확인되는 행동 관찰
9	피부 접촉시의 반응	손으로 몸을 비비거나 접촉을 하였을 시 행동 관찰
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	갑자기 큰 소음을 제공하거나 놀래켰을 때의 반응 속도 확인
11	새로운 사물에 대한 호기심	새로운 물건을 제공하여 반응하는 행동 측정
12	쉬면서 내는 소리의 변화	누운 상태에서 내는 소리의 관찰
13	강한 빛에 대한 반응	랜턴을 이용하여 눈에 자극을 준 후 행동 관찰
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	큰 소음을 발생시켰을 때의 행동 관찰
15	식사 시간 전의 울음소리	사료급여 전 행동양상 관찰
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	발에 로프 또는 고리를 부착 후의 행동 관찰
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	귀에 빨래집게를 부착 후의 행동 관찰

② 정상 미니돼지의 행동을 0점으로 기준하여, 각각의 관찰 항목 별로 hSNCA 발현 미니돼지의 행동을 점수화 하였다.

(2) 연구결과

(가) 행동관찰 점수화

① PDF-4 개체는 총 4회에 걸쳐 행동관찰을 진행하였으며, 관찰 결과는 다음 표와 같다.

표 53 hSNCA 발현 복제 미니돼지의 행동 점수화(PDF-4)

No.	Question	PDF-4				
		1차	2차	3차	4차	관찰내용
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0	0	떨림증상 없음
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0	0	떨림증상 없음
3	침흘림	0	0	0	0	일반상황 뿐 아니라 사료급여 전, 후에도 큰 반응이 없음
4	사료 섭취량	0	3	3	3	30~35분 소요
5	음수량	3	3	3	3	4회 모두 5회 미만으로 음수를 섭취하여, 정상인 개체 16회 이상에 비해 섭취횟수가 적음
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0	0	1분에 18~22회 깜빡임
7	움직이는 양	0	0	0	1	돈방 내에서의 움직임은 많지 않으며, 운동성이 조금 떨어져 있음, 복도에서의 보행은 활발한 편
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0	0	냄새, 맛을 바로 확인함
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0	0	접촉에 대한 민감성이 높아 빠르게 반응
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0	0	반응이 강하여 주저 앉아 신음소리
11	새로운 사물에 대한 호기심	3	0	0	0	1차 관찰시만 제외하고 나머지는 정상인 개체와 유사한 반응
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0	0	거의 소리가 없음
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0	0	빛이 비추는 곳을 보거나 눈을 피하는 반응
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	0	엎드리거나 도망가는 행동이 관찰
15	식사 시간 전의 울음소리	0	2	2	2	움직임은 있지만 적극성은 떨어짐
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	0	0	0	1차 관찰 시는 반응을 보이지 않았지만, 나머지 관찰 시에는 떼어내려는 모습을 바로 보임
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	1	2	2	2	부착물 인지 후 제거하려 하지만 한 동안은 그냥 방치
Total Score		10	10	10	11	

- ② PDF-4 개체는 접촉에 대한 민감도가 높아 흡사된 다른 개체의 영향으로 그 반응이 크기 때문에 그 과정에서 돈방 웬스에 충돌하여 우측후지에 외상을 당하였다.
- ③ 발열증상을 동반한 건강상태 악화로 사료섭취가 매우 불량하여 행동관찰 시 영향을 받아 사료섭취량의 점수가 3점으로 측정되었다.
- ④ 그 후에도 사료섭취, 운동성 등이 불규칙적인 모습이 자주 관찰되어 행동관찰 항목 중에서 사료섭취량, 음수량, 사물에 대한 호기심, 식사시간전의 울음소리, 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험, 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응 등이 정상인 개체와 차



이를 보였다.

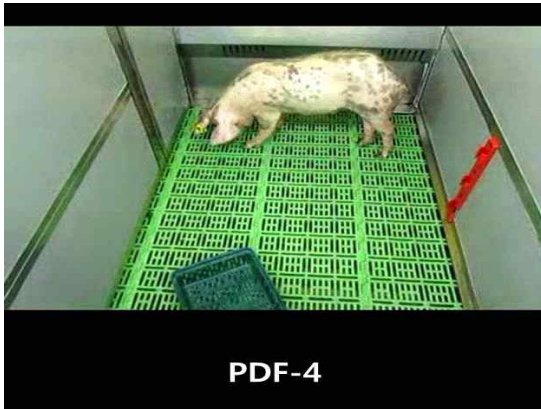


그림 154 새로운 물건에 대한 호기심

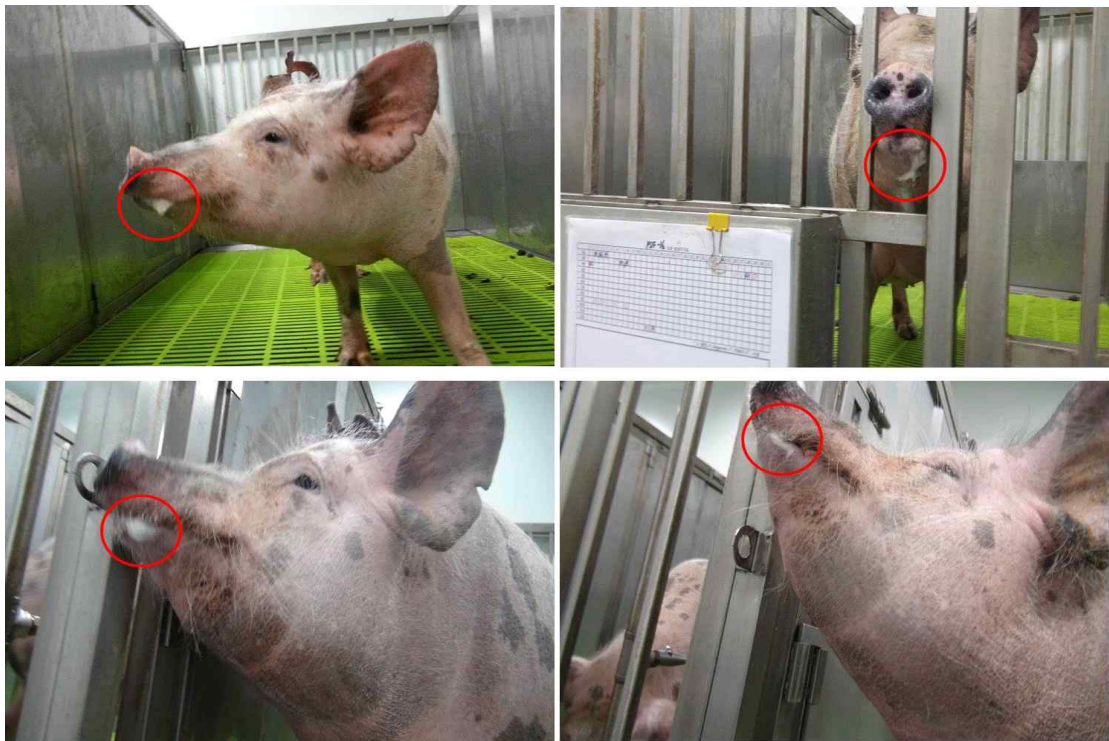


그림 155 PDF-16 개체의 칩 흘림 관찰

(나) PDF-16

- ① PDF-16 개체는 총 5회에 걸쳐 행동관찰을 진행하였으며, 관찰 결과는 다음 표와 같다.

표 54 hSNCA 발현 복제 미니돼지의 행동 점수화(PDF-16)

No.	Question	PDF-16					관찰내용
		1차	2차	3차			
				1	2	3	
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	떨림증상 없음
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	떨림증상 없음
3	침흘림	2	0	2	2	2	일반적인 상황에서도 침 흘림이 관찰 됨
4	사료 섭취량	3	3	0	0	0	1, 2차는 20분 소요, 3차는 모두 10분 미만
5	음수량	3	3	3	3	3	사료섭취 및 섭취 후에도 음수 섭취가 거의 없으며, 4차 1회 관찰시에만 20분간 4회 섭취
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	1	0	1	0	1	1분간 깜박거린 횟수는 최소 13회(1차)에서 최대 22회(2차)로 관찰 됨
7	움직이는 양	0	0	0	0	0	움직임이 활발함
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0	0	0	냄새, 맛 확인
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0	0	0	몸을 밀착하는 행동이 관찰
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0	0	0	즉각적인 반응을 나타냄
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0	0	0	코로 밀거나 물면서 지속적인 관심
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0	0	0	소리 없음
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0	0	0	눈에 비쳤을 때 바로 반응을 나타냄
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	0	0	소리가 나는 곳에 집중하며 행동을 멈춤
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0	0	0	큰 소리로 반응을 보이며 돈방에 매달림
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	0	0	0	0	0	발을 흔드는 등 제거하려는 행동을 바로 보임
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	0	0	0	0	0	머리를 흔들어서 제거함
Total Score		9	6	6	5	6	

② 사료급여 전 및 후가 아닌 일반적인 상황에서도 입 주위에 침이 많이 보였으며, 사료의 섭취 속도는 1, 2차 관찰 시에는 약 20분 소요 되었으나, 이 행동은 정상인 개체와 유사하여 10분 미만으로 단축되었다.

③ 음수량의 경우는 사료급여 후부터 20분간 전혀 섭취를 하지 않았다.

(다) PDF-18

① PDF-16 개체는 총 5회에 걸쳐 행동관찰을 진행하였으며, 관찰 결과는 다음 표와 같다.

표 55 hSNCA 발현 복제 미니돼지의 행동 점수화(PDF-18)

No.	Question	PDF-18					관찰내용
		1차	2차	3차			
				1	2	3	
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	쉬는 동안의 떨림 관찰 안됨
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	보행 중 떨림 관찰 안됨
3	침흘림	0	0	0	2	2	4차 2회차 관찰 시 일반적인 상황에서 침이 분비되는 모습이 관찰
4	사료 섭취량	0	0	0	0	0	급여 사료 전량 섭취 시간이 모두 10분 미만
5	음수량	2	2	0	3	2	1, 2차 관찰 시 6~8회 관찰되었으며, 4차 1회 관찰 시에만 17회, 나머지 관찰 시에는 4회, 7회로 확인됨
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	1	0	0	1	0	1분간 눈 깜박임 횟수는 최소 13회(1차)에서 최대 19회(4차)로 관찰됨
7	움직이는 양	0	0	0	0	0	움직임이 활발함
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0	0	0	즉각적으로 반응을 나타냄
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0	0	0	접촉 시 바로 반응을 보임
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0	0	0	움짤 하는 행동이 관찰
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0	0	0	관심을 보이며 냄새 맡음
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0	0	0	소리의 변화가 없음
13	강한 빛에 대한 반응	1	1	0	0	0	1, 2차 관찰 시에는 피하거나 빛에 관심을 행동 등 반응을 즉시 보이지 않았지만, 4차 관찰 시에는 빛에 관심을 보이며 바로 반응을 보임
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	0	0	소리가 나는 곳에 집중
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0	0	0	큰 소리로 반응하며 돈방에 매달림
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	0	2	0	0	0	2차 관찰시에는 5~6초 후 반응을 보인 후 20초 정도 소요하여 제거하였으나, 나머지 관찰 시는 즉시 반응을 보이며 제거 함
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	0	0	0	0	0	머리를 흔들어서 제거
Total Score		8	7	0	6	4	

② PDF-18 개체는 초반에 관찰되지 않았던 침 흘리는 모습이 관찰되었으며, 음수량의 경우도 정상인 미니돼지에 비해 섭취 횟수가 떨어지는 경향을 보였다.



그림 156 PDF-18개체의 침 흘림 관찰

(라) PDF-20

① PDF-20 개체는 8회에 걸쳐 행동관찰을 진행하였으며, 관찰 결과는 다음 표와 같다.

표 56 hSNCA 발현 복제 미니돼지의 행동 점수화(PDF-20)

No.	Question	PDF-20							
		1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0	0	0	0	0	0
3	침흘림	0	0	0	0	0	0	0	0
4	사료 섭취량	0	0	1	0	0	0	0	1
5	음수량	1	2	0	0	1	1	0	0
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	3	3	0	0	3	3	0
7	움직이는 양	0	0	0	0	0	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	2	2	2	0	0	1	0	0
10	깜짝 놀래 켜을 때의 반응 속도	0	0	0	0	0	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0	0	0	0	0	0
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0	0	0	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	1	0	3	1	2	3	3	3
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	0	0	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0	0	0	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	0	0	0	2	0	0	0	0
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	2	0	0	0	3	0	0	0
Total Score		6	7	9	3	6	8	6	4

- ② 음수량의 경우 다른 hSNCA 발현 미니돼지에 비해 섭취 횟수가 높았다.
- ③ 강한 빛을 눈에 비쳤을 때는 빛을 따라 시선을 움직이거나 시선을 회피하는 등의 반응이 관찰되지 않았고, 빛을 주시한 채 눈을 깜박거리는 행동만 관찰되어 반응이 없는 것이 관찰 되었다.
- ④ 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험 진행 시 다른 개체들은 바로 반응을 보이며 다리에 묶인 로프 등을 제거하려 했으나, 4차 관찰 시에는 반응 속도가 매우 느리게 확인 되었으며, 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응 실험 시에는 5차 관찰 시 아무런 반응을 보이지 않았다.



그림 157 PDF-20 개체의 강한 빛에 대한 반응



그림 158 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응

## 나. hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET, CT, MRI 촬영의 영상학적 평가 및 분석

### (1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지(PDF-20)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET 와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET과 CT 영상기기를 이용하여 hSNCA 과발

현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 hSNCA 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) dopamine transporter인 Fluoro-CIT ([18F] FP-CIT) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 2시간 후에 촬영하였고, 2) glucose uptake metabolism을 평가하는 glucose analog인 FDG (Fluorodeoxyglucose (18F), [18F]FDG, 18F-FDG) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였다.

표 57 FP-CIT, FDG를 이용한 영상 분석에 사용된 hSNCA 복제돼지에서 주령

FP-CIT (PDF-20): Yucatan, ♀/62 주령	FDG (PDF-20): Yucatan, ♀/63 주령
FP-CIT (정상돼지): Yucatan, ♀/60 주령	FDG (정상돼지): Yucatan, ♀/60 주령

(나) hSNCA 발현 복제 미니돼지(PDF-20)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 MRI와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 일산 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 58 CT, MRI 촬영에 사용된 hSNCA 복제돼지의 주령

PDF-20 : Yucatan, ♀/62 주령	정상돼지 : Yucatan, ♀/ 60 주령
---------------------------	--------------------------

(2) 연구결과

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① hSNCA 발현 복제 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 FDG PET 영상에서도 유의한 국소적인 뇌 대사 감소 혹은 증가 소견 없는 정상 소견이었다. 계속해서 2년령에도 분석을 진행할 계획이다.

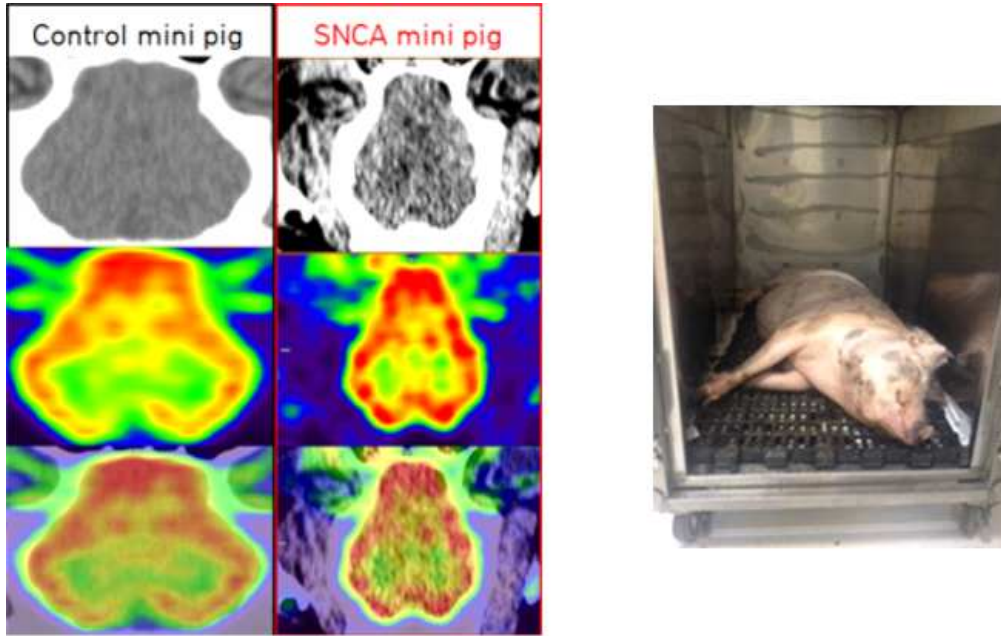


그림 159 1년령 hSNCA 발현 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

② hSNCA 발현 복제 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니 돼지와 비교하여 FP-CIT PET 영상 에서 양쪽 선조체에 uptake가 대칭적으로 보여 정상 소견이었다. 계속해서 2년령에도 분석을 진행할 계획이다.

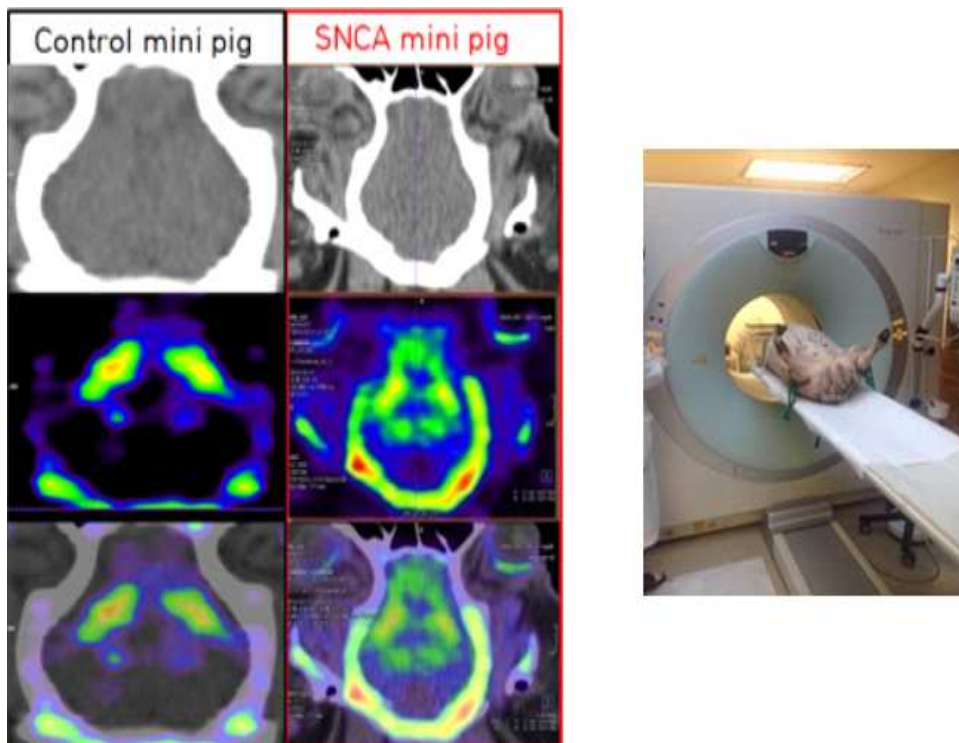


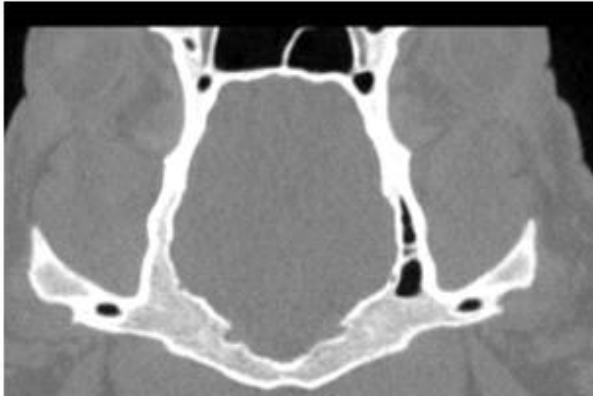
그림 160 1년령 hSNCA 발현 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 결과



(나) hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 MRI와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① 정상 미니돼지와 비교하여 hSNCA 발현 복제 미니돼지에서 유의한 이상 소견이 없었다.

CT



MRI

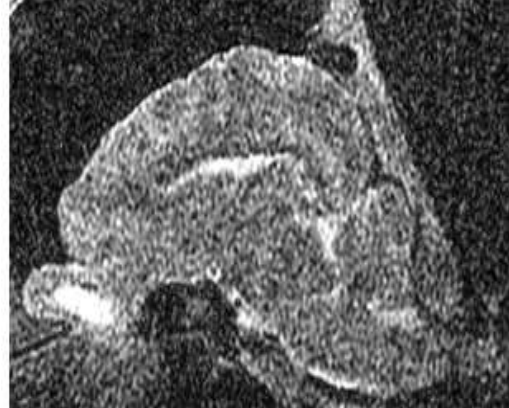


그림 161 1년령 hSNCA 발현 미니돼지의 MRI와 CT에 관한 영상 결과

다. hSNCA 발현 복제 미니돼지(PDF-20)와 정상 미니돼지의 생후 2년째의 뇌의 PET, CT, MRI 촬영의 영상학적 평가 및 분석

(1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 2년째의 뇌의 PET와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① 서울대학교병원 암병원 핵의학과 PET와 CT 영상기기를 이용하여 hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 hSNCA 유전자 조절 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) dopamine transporter인 Fluoro-CIT ([18F] FP-CIT) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 2시간 후에 촬영하였고, 2) glucose uptake metabolism을 평가하는 glucose analog인 FDG (Fluorodeoxyglucose (18F), [18F]FDG, 18F-FDG) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였다.

표 59 CT, PET 분석에 사용된 정상돼지와 hSNCA 돼지의 종류

FP-CIT (PDF-20): Yucatan, ♀/98 주령	FDG (PDF-20): Yucatan, ♀/98 주령
FP-CIT (정상돼지): Yucatan, ♀/90 주령	FDG (정상돼지): Yucatan, ♀/90 주령

(나) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 2년째의 뇌의 CT와 MRI 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 일산 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 hSNCA 과발현 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 60 MRI와 CT 영상촬영에 사용한 hSNCA 발현 복제 미니돼지의 종류

PDF-20 : Yucatan, ♀/98 주령	정상돼지 : Yucatan, ♀/ 90 주령
---------------------------	--------------------------

(1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 2년째의 뇌의 PET와 CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① hSNCA 발현 복제 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 FDG PET 영상에서 유의한 국소적인 뇌 대사 감소 혹은 증가 소견이 없는 정상 소견이었다.

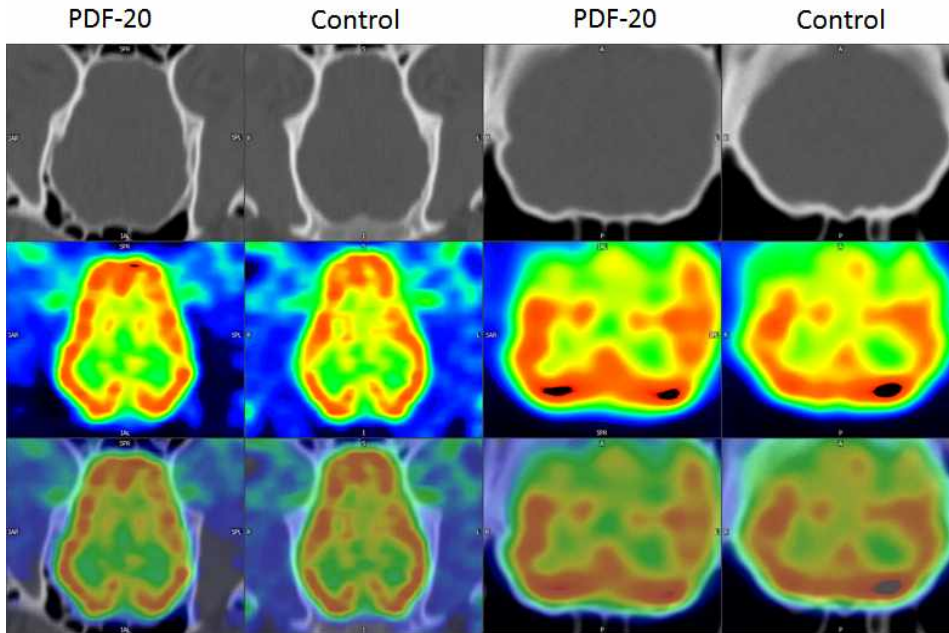


그림 162 2년령 hSNCA 발현 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

② hSNCA 발현 복제 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 감소되었음을 관찰하였다.

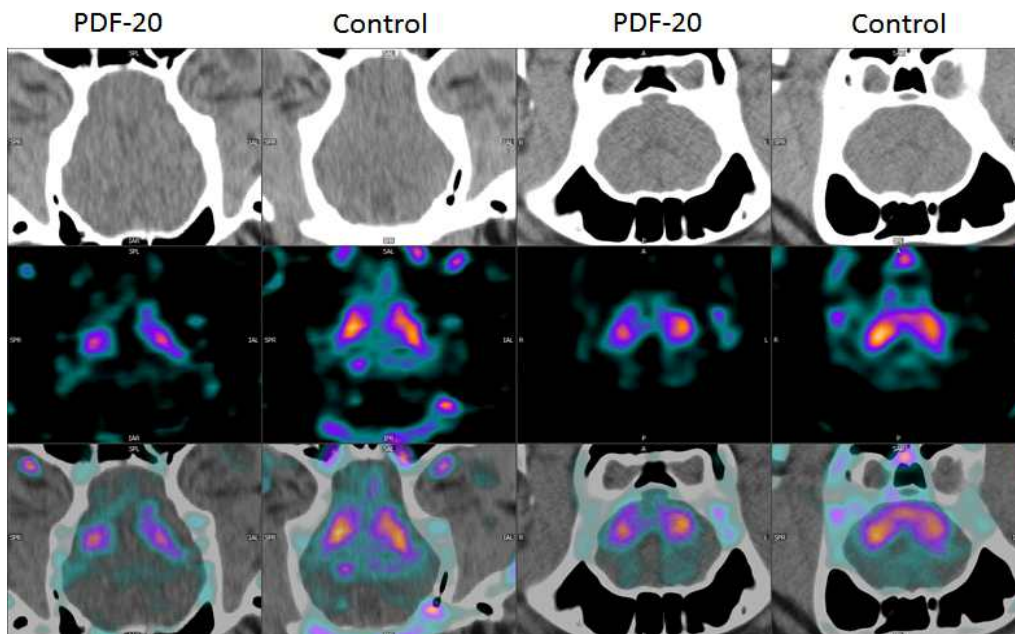


그림 163 2년령 hSNCA 발현 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 결과

(나) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 정상 미니돼지의 생후 2년째의 뇌의 CT와 MRI 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① hSNCA 발현 복제 미니돼지의 MRI와 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 hSNCA 발현 복제 미니돼지에서 유의한 이상 소견이 없었다.

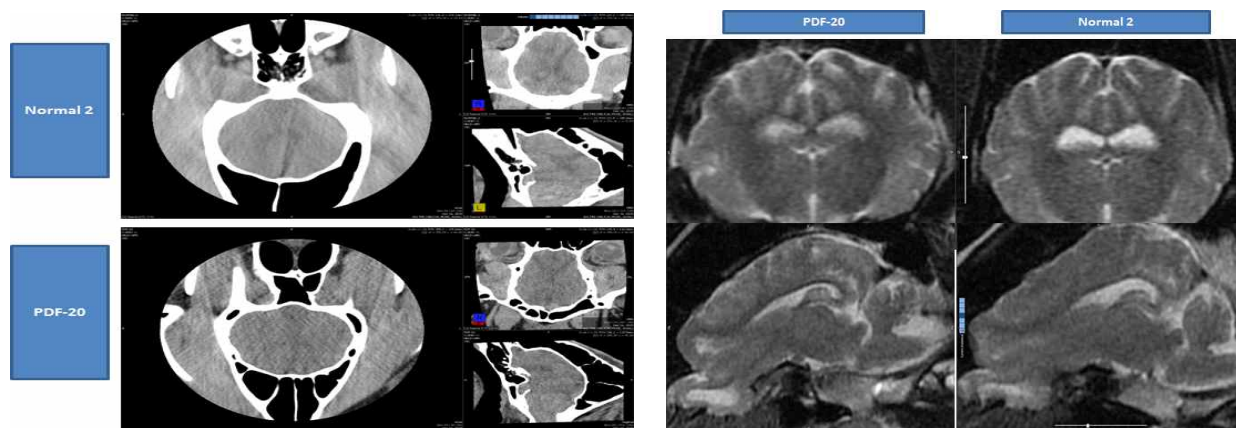


그림 164 2년령 hSNCA 발현 미니돼지의 MRI와 CT에 관한 영상 결과

#### 라. Parkin KO 미니돼지(PDM-11)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET, CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

##### (1) 연구방법

(가) Parkin KO 미니돼지(PDM-11)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET, CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

① 서울대학교병원 암병원 핵의학과를 이용하여 Parkin KO 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain PET과 brain CT를 행하여 Parkin KO 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다. 뇌 PET 영상은 1) dopamine transporter인 Fluoro-CIT ([18F] FP-CIT) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 2시간 후에 촬영하였고, 2) glucose uptake metabolism을 평가하는 glucose analog인 FDG (Fluorodeoxyglucose (18F), [18F]FDG, 18F-FDG) radioisotope 정맥주사제의 정맥주입 후 약 30분 후에 촬영하였다.

표 61 PET과 CT 영상촬영에 사용한 Parkin KO 복제 미니돼지의 종류

FP-CIT (PDM-11): Yucatan, ♂/ 28주령	FDG (PDM-11): Yucatan, ♂/ 28주령
FP-CIT (정상돼지): Yucatan, ♂/ 30 주령	FDG (정상돼지): Yucatan, ♂/ 30주령

(나) Parkin KO 미니돼지(PDM-11)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 MRI, CT 촬영

영의 영상학적 평가 및 분석

- ① 일산 헬릭스동물병원의 CT와 1.5T MRI 영상 기기를 이용하여 Parkin KO 미니돼지와 정상 미니돼지의 brain CT와 brain MRI를 시행하여 Parkin KO 미니돼지와 정상 미니돼지의 뇌영상 자료를 확보하였다.

표 62 MRI와 CT 영상촬영에 사용한 Parkin KO 미니돼지의 종류

PDM-11 : Yucatan, ♂/ 28주령	정상돼지 : Yucatan, ♂/ 30주령
---------------------------	-------------------------

(2) 연구결과

(가) Parkin KO 미니돼지(PDM-11)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 PET, CT, MRI 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① Parkin KO 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 FDG PET 영상에서 양 측 occipital cortex 대사가 감소함이 관찰되었다.

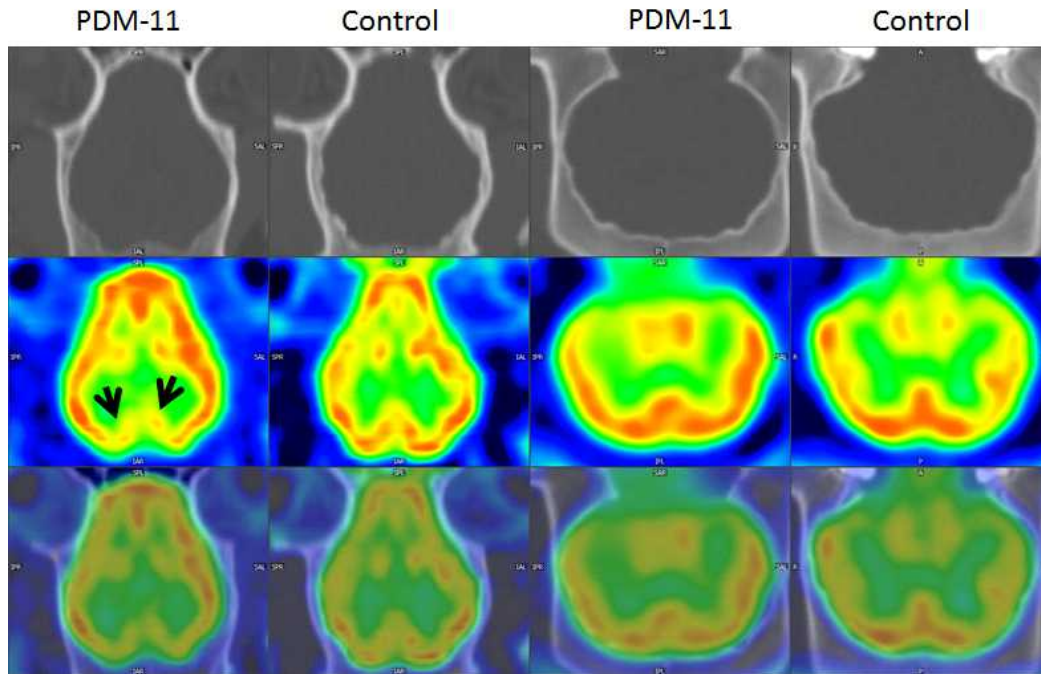


그림 165 1년령 Parkin KO 미니돼지의 18F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 결과

- ② Parkin KO 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 현저하게 감소되었음을 관찰하였다.

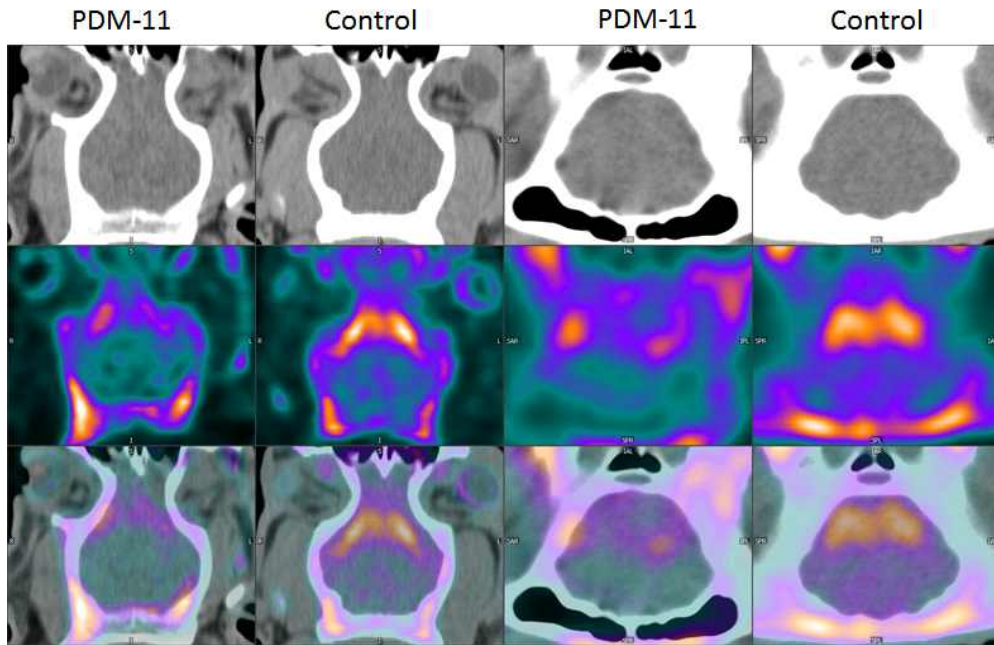


그림 166 1년령 Parkin KO 미니돼지의 FP-CIT의 PET과 CT에 관한 영상 결과

(나) Parkin KO 미니돼지(PDM-11)와 정상 미니돼지의 생후 1년째의 뇌의 MRI, CT 촬영의 영상학적 평가 및 분석

- ① Parkin KO 미니돼지의 CT에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 Parkin KO 미니돼지에서 유의한 이상 소견이 없었다.

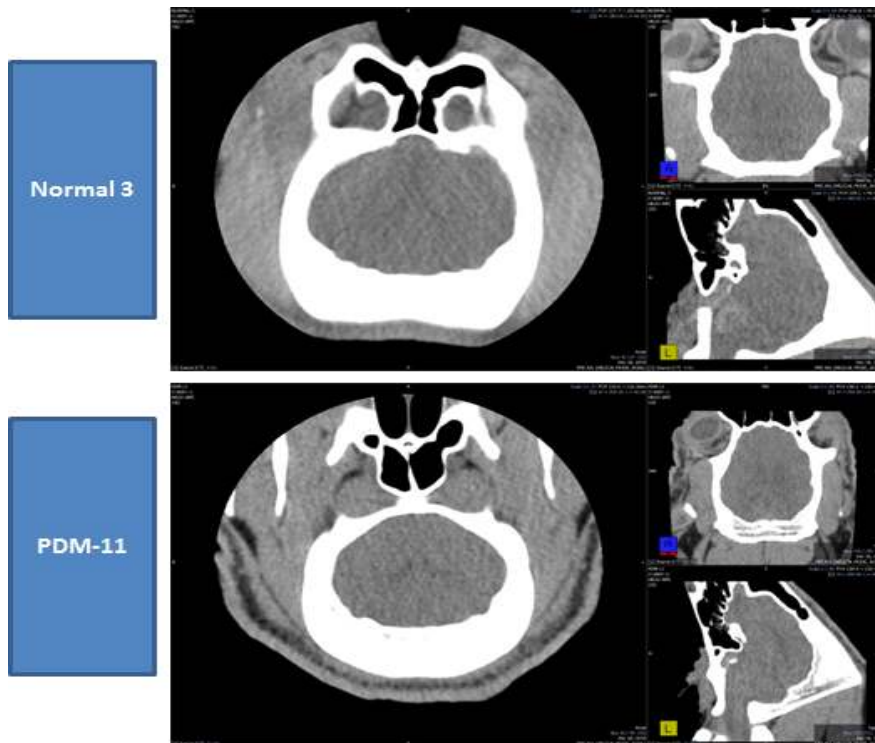


그림 167 1년령 Parkin KO 미니돼지의 CT에 관한 영상 결과

② parkin KO 미니돼지의 MRI에 관한 영상 소견; 정상 미니돼지와 비교하여 Parkin KO 미니돼지에서 Cortical atrophy와 ventricle size가 증가됨이 관찰되었다.

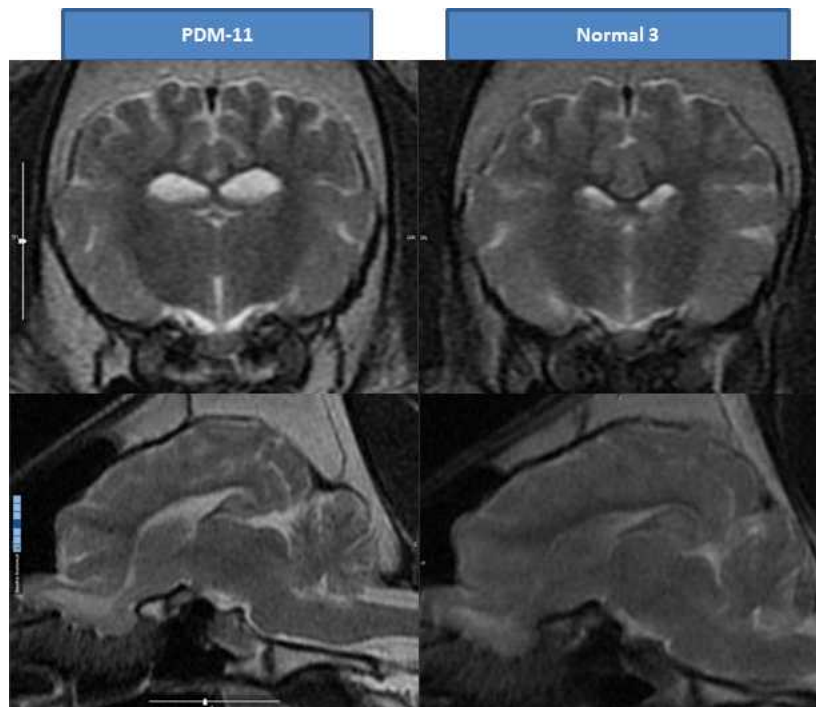


그림 168 1년령 Parkin KO 미니돼지의 MRI에 관한 영상 결과

## <1협동: 질환 모델 미니돼지 생산을 위한 ZFN 합성 및 유전자 프로파일링>

### 1. AD 모델 생산 위한 APP 유전자 조절벡터 생산 및 PD 병인유전자 합성

#### 가. AD 유전자 발현 세포주 생산

##### (1) 연구방법

##### (가) mutant human APP 유전자 신경특이적 발현 세포주 생산

- ① human APP 발현 벡터 제작; AD 유전자 발현 세포주 확립을 위하여, pLV plasmid는 synasin promoter, mAPP 유전자와 PGK promoter, eGFP gene 그리고 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)를 포함하는 DNA 절편을 도입하여 제작하였다.
- ② 바이러스 생산 및 세포 제작; 293T 세포에 lentiviral packaging plasmids (pPAX2, pVpack-VSV-G)과 함께 전달하여 바이러스를 생산하였다. 생산된 바이러스의 infection 검증을 위해 293T 세포에 8 ug/ml polybrene과 함께 24시간 간 infection을 진행하였으며 fresh media에서의 24시간 배양 후 1 ng/ml puromycin을 이용하여 selection을 진행하였다. 바이러스를 생산 세포주를 37 oC, 5% CO2조건의 인큐베이터 하에서 배양한 후, 0.45 um pore size filter를 통해 세포를 걸러내고 바이러스를 포함하는 배지를 수득 하였다. 바이러스 배지를 이용하여 돼지의 지방줄기세포를 감염시키는데 적용하였다.
- ③ 형질전환세포 검증; 연구과정중에 생산된 바이러스 세포와 결과물로 도출된 형질전환 지방줄기세포는 PCR 분석을 통해서 바이러스 세포에 pLV 벡터와 Lv-synp-mhAPP-GFP viral RNA가 삽입된 것을 확인함. 또한 형질전환 된 세포의 형질전환 효율을 검증하기 위하여 형질전환세포와 형질전환 되지 않은 돼지의 지방줄기세포를 flow cytometry를 이용하여 분석을 하였다. 분석하기 위한 세포는 trypsinazation 을 하여 단일세포화 하였고, PBS를 넣어 원심분리를 하여 세포 펠렛만 회수하였다. 회수된 세포를 4% paraformaldehyde로 고정시킨 후, flow cytometry로 분석을 하여 GFP가 발현되는 정도를 분석하였다.

##### (2) 연구결과

##### (가) mutant human APP 유전자 신경특이적 발현 세포주 생산

- ① APP 유전자 발현 바이러스 벡터 확보; mutant human APP(mhAPP)는 인간의 알



츠하이머질환 중 Swedish mutation form 으로서 early-onset familial Alzheimer's disease를 유발하는 유전자이다. 그리고 eGFP는 Bioluminescent jellyfish (해파리) *Aequorea victoria*에서 분리한 형질전환 연구에서 가장 널리 쓰이고 있는 리포터 유전자이다.

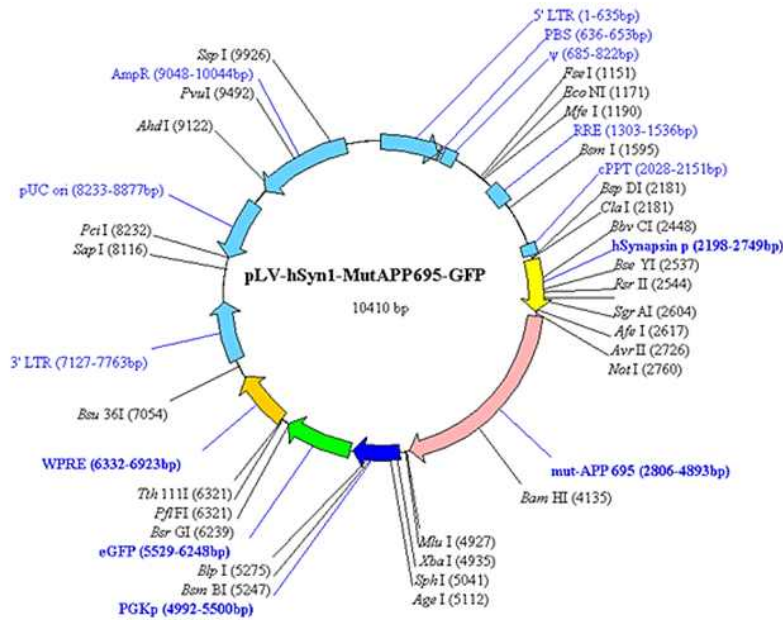


그림 169 SYN-mhAPP-GFP 벡터 구조.

- ② AD 유전자 발현 세포주 확립; 형질전환 세포의 유전체에서 PCR를 통해 pLV 벡터와 Lv-synp-mhAPP-GFP infeced cell이 검출된 것을 확인하였다. 또한 형광현미경 관찰을 통해 GFP 발현이 확인됨.

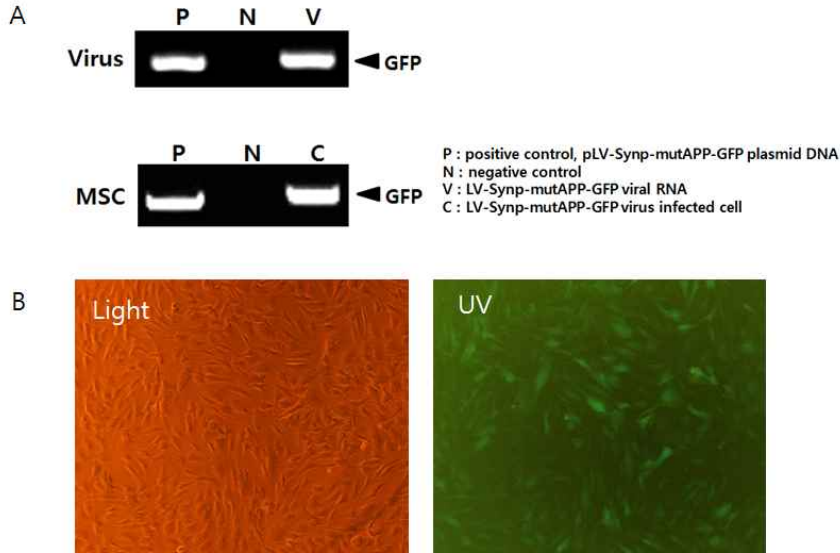


그림 170 (A) 바이러스세포내로 도입된 플라스미드 벡터와 바이러스 RNA의 사진과 돼지지방줄기세포주 내로 도입된 플라스미드와 바이러스세포의 결과 (B) SYN-mhAPP-GFP 형질전환 지방줄기세포주에서 GFP의 발현.

③ Flow cytometer 분석을 통해 형질전환되지 않은 세포는 FL2 채널에서 양성반응을 보인 세포가 검출되지 않은 반면, 형질전환 돼어진 세포에서는 FL2 채널에서 54.49%의 세포가 양성반응을 보였다. 따라서 돼지지방줄기세포주에서 Lentiviral system 의 형질전환효율은 50%의 높은 결과를 보여주었으며, 이러한 결과는 이전의 Lipofectamine™ reagents 의 결과보다도 높은 효율을 보여주는 것이다.

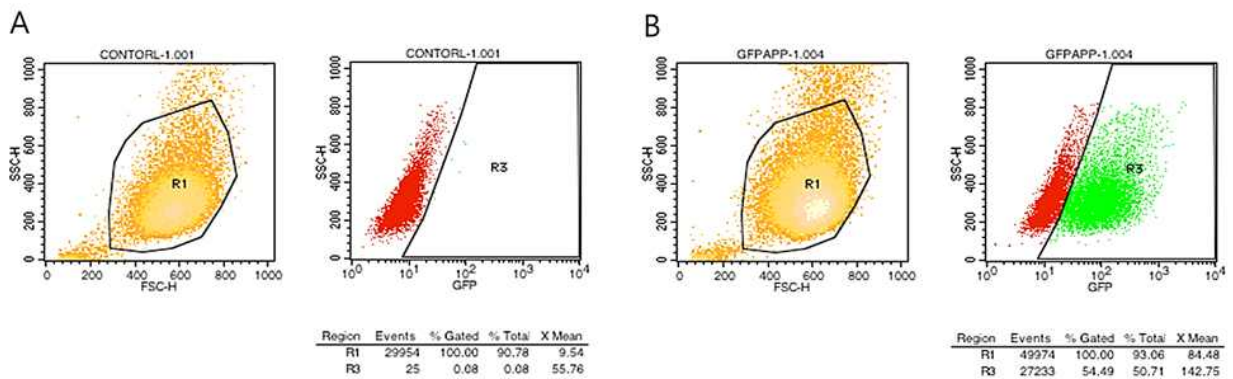


그림 171 형질전환 된 돼지의 지방줄기세포의 Flow cytometry 이용한 GFP 발현 효율 분석

#### 나. PD model 생산을 위한 hSNCA 유전자 합성 및 발현 vector 구축

##### (1) 연구방법

(가) 실험 계획 및 주요 연구재료 조사

① Promoter 선정; Mouse 기반 PD 연구 모델의 구축에 사용된 promoter를 조사하고 그 중 인간 PD 병리적 특성에 관련이 있는 형질을 보였던 모델을 조사한 결과 Prion, Thy-1, PDGFβ 등의 다양한 promoter가 후보로 도출되었다. 이중 비교적 크기가 작아 다양한 DNA 전달방법에 적합한 PDGFβ를 선정하고 PDGFβ promoter를 확보하였다 (Science. 2000 Feb 18;287(5456):1265-9).

Affected Systems	Genotypes:	tg1
<b>behavior/neurological</b>		✓
abnormal spatial learning		✓
abnormal motor coordination/ balance		✓
impaired coordination		✓
<b>nervous system</b>		✓
loss of dopaminergic neurons		✓
neuronal intranuclear inclusions		✓
<b>Disease Models</b>		✓
Dementia, Lewy Body; DLB		✓
Parkinson Disease 1, Autosomal Dominant; PARK1		✓

그림 172 PDGFβ를 이용한 SNCA 발현 형질전환 mouse의 PD phenotype.

(<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&id=MGI:3528873>)

② SNCA 합성 및 발현 형태 결정; SNCA는 presynaptic 단백질인 alpha-synuclein을 발현하는 유전자로 유전학적으로 또한 신경 병리학적으로 PD에 깊이 관련 하고 있는 것으로 알려져 있다. PD에서의 SNCA의 기능은 다양한 역할로 알려져 있으나 특히 단백질 aggregation을 통해 신경독성을 일으켜 PD를 비롯한 다양한 신경질환의 발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 특히 PD에서 발견되는 SNCA aggregate에서는 SNCA의 truncated form이 자주 관찰되는데 실제로 truncated SNCA의 뇌특이적 과발현은 PD 관련 형질을 유도할 수 있는 것으로 보였다.

③ DNA 세포전달 벡터 결정 및 SNCA발현 벡터 제작; 제1세부의 다양한 외부 유전자 발현 형질전환 복제동물 제작 경험을 바탕으로 DNA의 임의적 유전체상 위치 도입, Retrovirus, Lentivirus등의 다양한 DNA 전달 벡터를 고려하였다. 높은 효율을 위해 virus를 이용한 DNA 전달을 선정하였으며 그 중 세대 간 유전자 silencing의 문제가 상대적으로 덜한 것으로 알려진 Lentivirus를 이용하여 SNCA 발현 벡터를 제작하기로 결정하였다. human SNCA 유전자와 human PDGFβ promoter의 확보를 위해 두

가지 요소를 이용하여 mouse PD model을 개발하였던 연구 (Science. 2000 Feb 18;287(5456):1265-9)에서 사용되었던 DNA construct를 확보하였다.

(2) 연구결과

(가) Lentiviral SNCA 발현 벡터 제작 및 검증

① pLVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121)-PGK/puro 제작 및 검증; pLVX-puro (puromycin resistance gene을 selection marker로 갖는 HIV-based lentiviral vector)에 hPDGFβ promoter-SNCA gene 구조를 PCR을 통해 subcloning 하였다. 이때 증폭을 위해 사용된 primer 중 3' primer는 SNCA의 전체 cDNA 부분 중 뒷 10 aa 발현 부분을 뺀 120aa의 SNCA 단백질만을 발현하는 truncated form을 발현할 수 있도록 제작 되었다. 제작된 viral 벡터의 sequence 검증 후 293T 세포에 lentiviral packaging plasmids (pPAX2, pVpack-VSV-G)과 함께 전달하여 바이러스를 생산하였다. 바이러스 생산에 있어서의 효율을 비교하기 위해 lipofectamine과 lipofectamine 2000 두 가지 세포 DNA 전달 reagent를 이용하였다. 생산된 바이러스의 infection 검증을 위해 293T 세포에 8 ug/ml polybrene과 함께 24 시간 간 infection을 진행하였으며 fresh media에서의 24시간 배양 후 1 ng/ml puromycin을 이용하여 1 주일 간 selection을 진행하였다. 이후 살아남은 세포의 crystal violet을 이용한 염색을 통해 lipofectamine 2000을 이용하여 만들어진 virus에 의해 293T 세포의 infection이 이루어 졌음을 확인하였다.

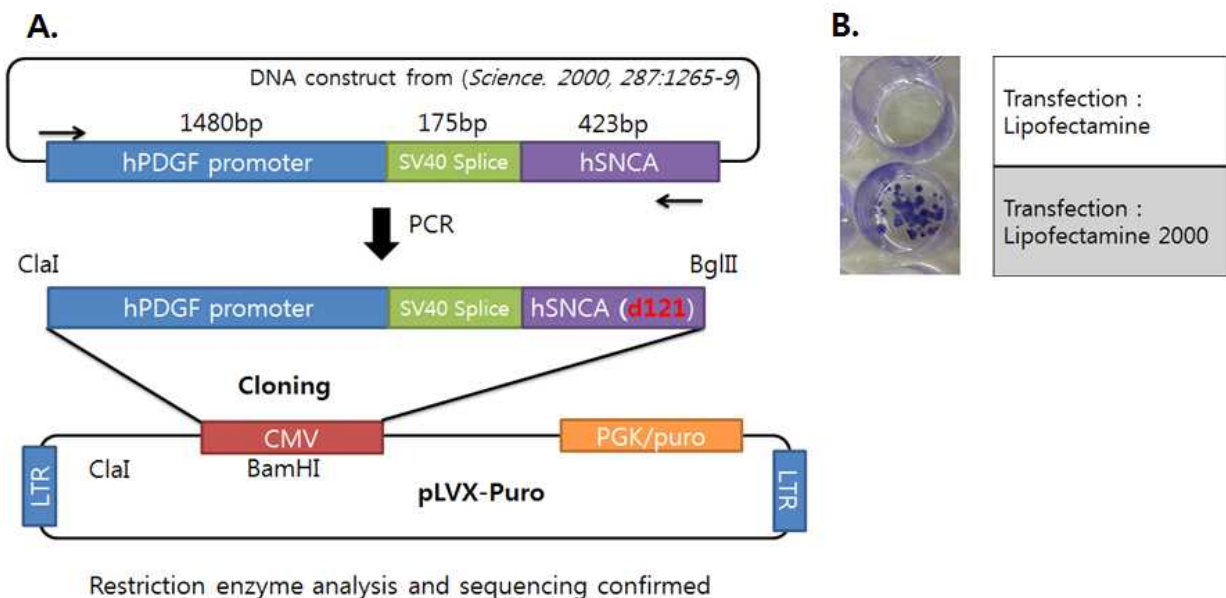


그림 173 pLVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121)-PGK/puro 제작 및 검증 (A) Lentiviral construct cloning 과정 (B) 바이러스 생산 및 infection 검증.

② pLVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121)-CMV/RFP-puro 제작 및 검증; pLVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121)-PGK/puro의 infection 된 세포를 puromycin을 이용한 세포 selection을 통해 골라낼 수 있으나 antibiotic-selection을 통한 세포 사멸과정이 infection을 통해 만들어지는 세포주의 핵외공여세포로서의 기능성에 영향을 줄 수 있기 때문에 좀 더 세포에 영향을 주지 않는 방식의 infection 세포 선별을 위해 형광 단백질을 선별 리포터로 사용할 수 있는 lentiviral vector를 제작하였다. 이를 위해 CMV-mRFP 구조를 PCR 증폭한 후 LVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121)-PGK/puro에서 PGK promoter를 제거한 자리에 집어넣어 CMV promoter하에 RFP와 puromycin selection marker gene이 fusion 형태로 발현되는 dual selection lentiviral vector를 제작하였다. Sequencing을 통한 제작검증 후 293T 세포로 transfection을 통해 RFP가 세포에서 높은 수준으로 발현되는 것을 검증하였다.

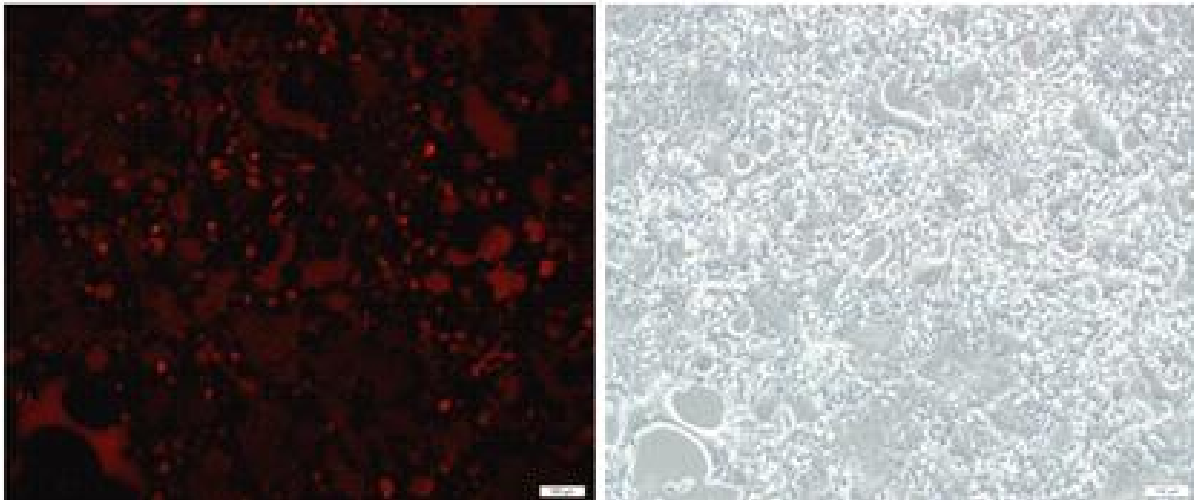


그림 174 pLVX-hPDGFβ Prom/hSNCA(d121) -CMV/RFP-puro에 의한 RFP 발현. RFP 형광 (좌).

#### 다. PD 병인유전자 녹아웃을 위한 ZFN 개발

##### (1) 연구방법

##### (가) PARK2 유전자가위 개발

① 서열 분석 및 ZFN 생산; 돼지 Park2 유전자의 경우 현재 database상 mRNA sequence는 잘 나와 있지만 실제 genomic loci에 대한 annotation은 정확하지 않은 관계로 NCBI reference mRNA sequence를 UCSC genome database의 pig genome (Nov. 2009 (SGSC Sscroga9.2/susScr2))에 대한 homology search (BLAT)을 통해 exon 구조를 추출하였다. 이렇게 얻어진 돼지 Park2 유전자 exon 서열에 대한 ZFN은 자체 개발 프로그램 (<http://www.toolgen.co.kr/ZFNfinder/>)을 통해 고안되었으며

가능한 ZFN 중 31쌍이 선정되어 합성 시스템에 semi-assembled zinc finger library로부터 제작되었다.

② ZFN 활성 검증; ZFN 활성 검증은 리포터시스템을 이용하여 이루어 졌다. 툴젠의 리포터 시스템은 유전자가위의 활성화에 따라 정량적으로 세포에서 형광단백질을 발현하여 유전자가위의 활성을 조사하는 중요한 도구로 특히 리포터에서 관찰되는 활성은 세포내의 원하는 유전자 부위를 자르는 실제의 활성화와 높은 상관관계를 보여 유전자가위의 대량생산을 위해 유용하게 사용되고 있다. 먼저 합성된 각 ZFN의 목적 서열을 포함하는 활성 리포터를 제작하고 293T 세포 내로 도입하여 형광 단백질의 발현을 측정하여 활성이 관찰되는 ZFN을 찾아내었다. 이후 ZFN의 FokI 부분을 활성 및 특이성이 개선된 형태의 nuclease variant (DAS/RR, RR/DAS)로 교체하여 다시 한번 활성 조사를 진행하여 ZFN에 따라 더 높은 활성을 갖는 ZFN 구조를 확인하였다.

③ Park2 TALEN 제작; 2009년 새롭게 발견된 맞춤형 염기결합 도메인 구조인 TAL effector 염기결합 도메인의 모듈을 이용한 유전자가위인 TAL effector nucleases (TALEN)이 최근 크게 각광을 받고 있다. 툴젠은 독립적 연구를 통해 자체의 TALEN 구조 및 생산 시스템을 구축하였으며 이를 이용한 Park2 TALEN 개발을 진행하였다. ZFN과 같은 과정으로 고안 및 합성을 진행한 후 유전자가위 활성 리포터를 이용하여 활성을 조사하였다.

## (2) 연구결과

### (가) 돼지 PARK2 ZFN 확보

① 돼지 PARK2 ZFN 활성 분석; 3 pair의 Park2 ZFN을 확보하였으며 그중 pair 2번은 매우 높은 활성을 보였다.

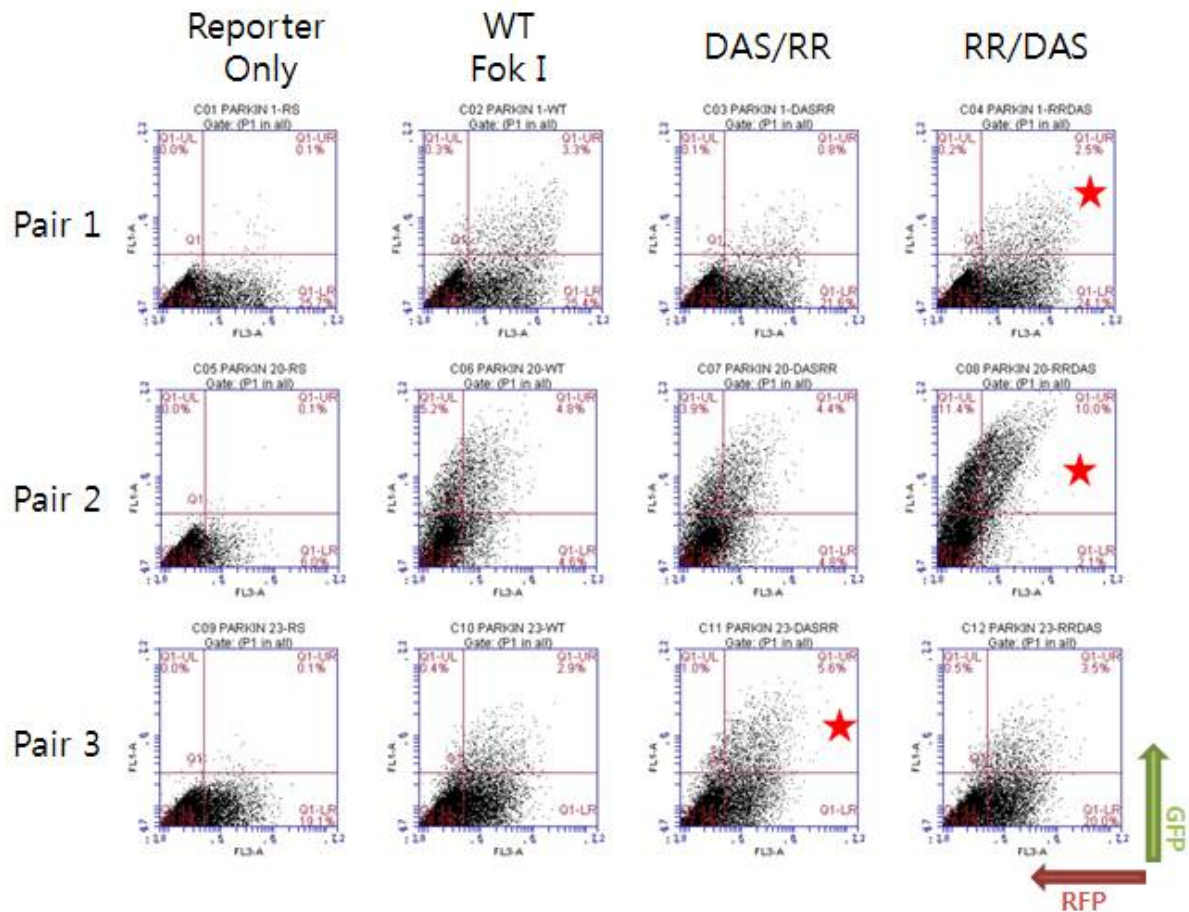


그림 175 페이지 Park2 ZFN 활성화조사.

(나) 돼지 PARK2 TALEN 확보

① 돼지 PARK2 TALEN 활성화 분석; 두 pair의 고효율성 TALEN을 확보하였다.

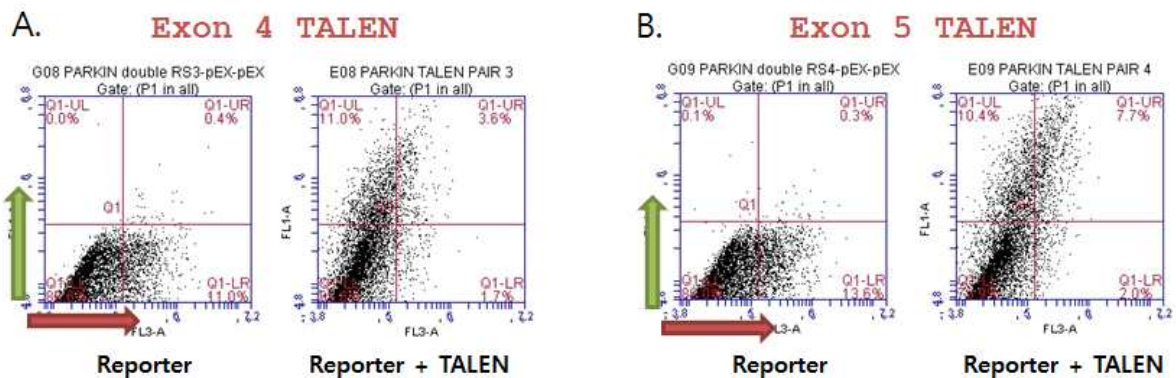


그림 176 페이지 Park2 TALEN 활성화조사.

② 확보된 돼지 Park2 ZFN과 TALEN의 목적 위치를 Park2 유전자 상에서 조사하여 보면 인간 Park2의 Exon 3 (ZFN), Exon 5 (TALEN1) 그리고 Exon 6 (TALEN2)에

위치한다. 실제 Early-onset PD를 일으키는 돌연변이형 중 ZFN이나 TALEN에 의한 돌연변이 형태인 frameshift에 의한 gene truncation/knockout과 비슷한 형태의 돌연변이들을 찾아보면 전체 Park2 유전자의 위치상 다양하게 위치하면 많은 수의 돌연변이는 ZFN/TALEN 목적 위치 중 가장 뒤인 Exon 6 보다 더 C-term 방향에 위치하는 경우도 많은 것으로 관찰되었다. 따라서 확보된 ZFN/TALEN에 의한 돌연변이는 인간 Early-onset PD환자에서 나타난 Park2 기능이상/유실을 잘 재현할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

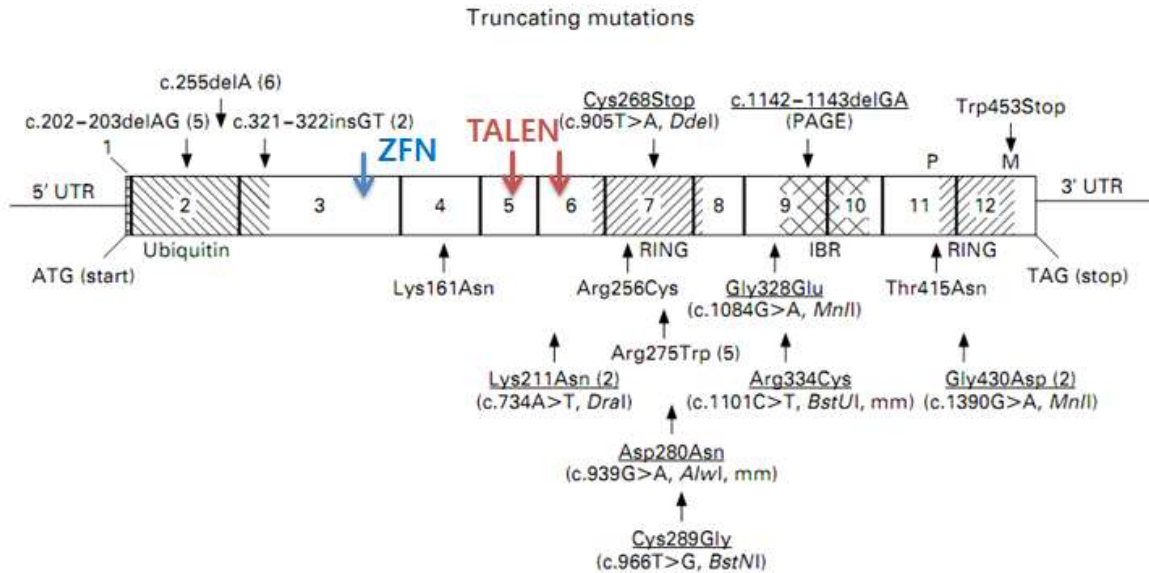


그림 177 확보된 돼지 Park2 ZFN 및 TALEN의 인간 Park2상 위치 및 PD 관련 Park2 돌연변이 spectrum.

## 2. PD 병인유전자 KO 위한 고효율 ZFN 합성 및 세포주 생산

### 가. PD 병인전자에 대한 유전자가위 개발 및 검증

#### (1) 연구방법

##### (가) PD 관련 유전자 유전자가위의 개발

- ① 돼지 Park2 ZFN의 고안 및 합성; Park2 (Parkin), PINK1, DJ1 및 ATP13A2는 인간 유전성 PD의 recessive 관련 유전자로 알려져 있다. 각 유전자의 유전체상 서열 분석을 통해 exon 구조를 확보하였다. 각 exon에서 적합한 TALEN 목적 위치(그림 5)의 검색을 위해 본 연구진에서 개발한 TALEN\_designer program ([http://toolgen.co.kr/talen\\_designer/](http://toolgen.co.kr/talen_designer/))을 사용하였다. 고안된 TALEN은 one-step TALEN assembly system을 이용하여 유전자가위 형태로 만들어지고 sequencing을 통해 확인되었다.



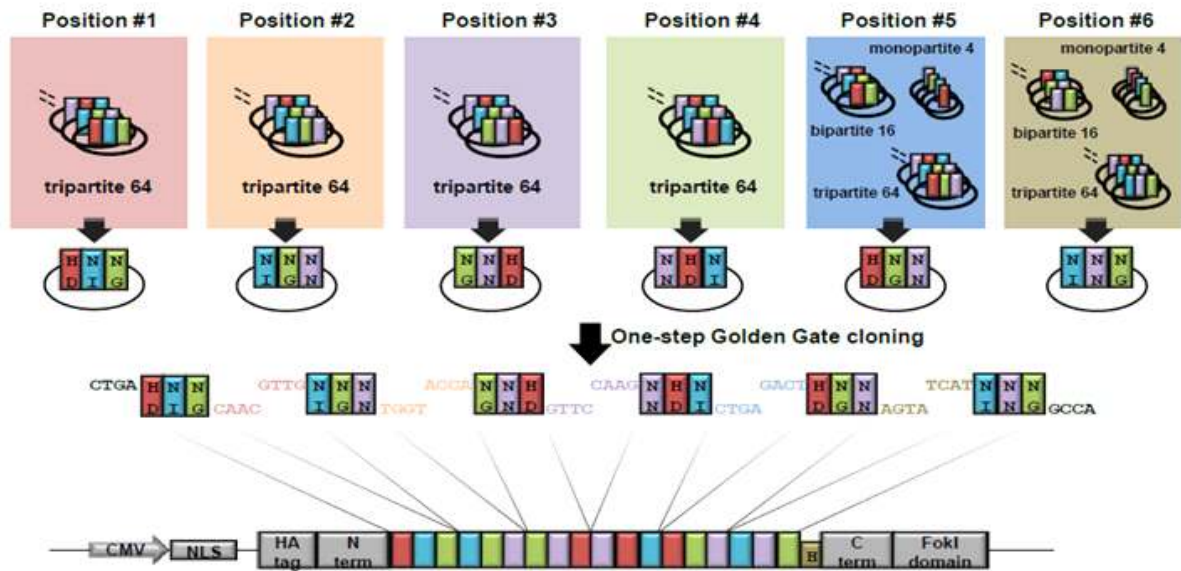


그림 178 Golden Gate TALEN assembly 방법.

② 돼지 Park2 ZFN의 활성 검증; 합성된 ZFN/TALEN의 활성 검증 및 비교를 위해 유전자가위 surrogate reporter를 이용하였다. Surrogate reporter 상 RFP와 GFP 사이에 조사하고자 하는 ZFN/TALEN의 target sequence를 oligo DNA형태로 합성하여 cloning 하였다. 이때 도입되는 target site는 RFP로부터 발현되고 있는 frame에 shift를 일으켜 GFP는 발현되지 못하도록 고안되었다. 이렇게 만들어지는 surrogate reporter를 각각에 맞는 ZFN/TALEN 발현 벡터와 함께 인간 293T 세포에 Lipofectamine 2000을 이용하여 transfection 하였다. Transfection 이틀 후 Accuri C6 flow cytometer를 이용하여 세포중 RFP/GFP의 발현을 조사하여 ZFN/TALEN의 활성을 결정하였다.

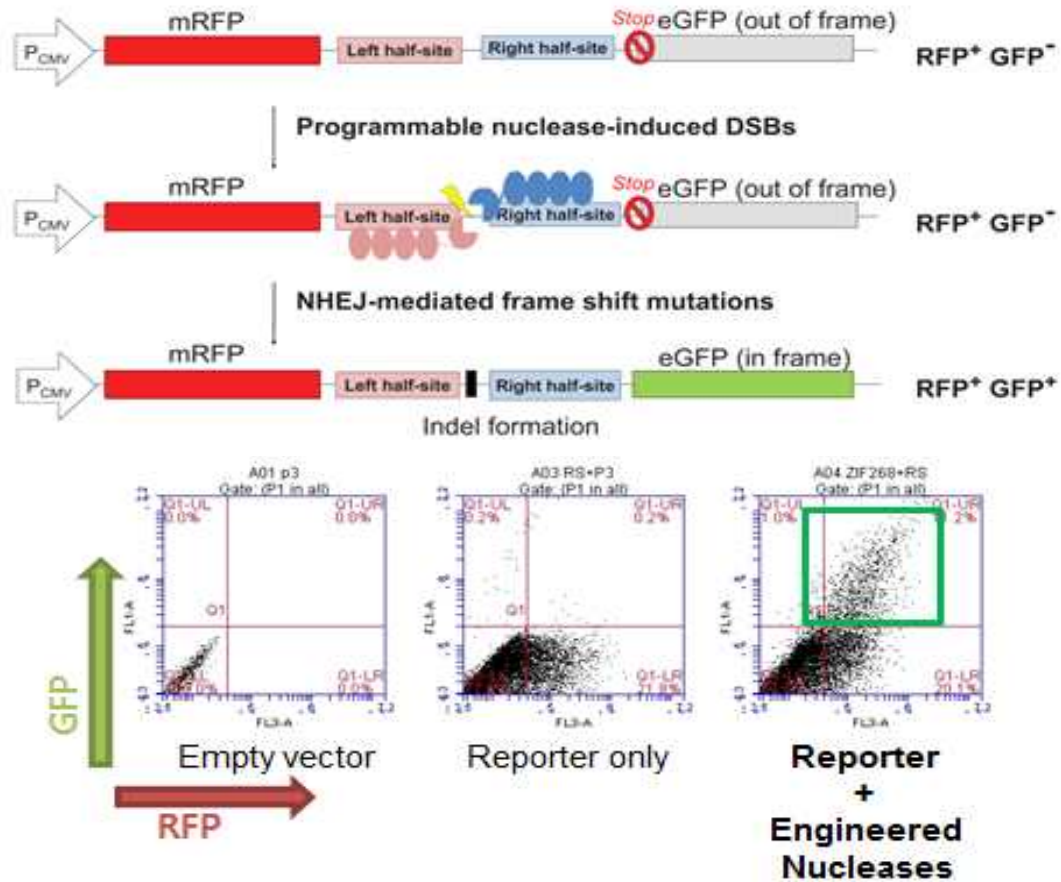


그림 179 TALEN 활성 리포터 시스템. (A) Surrogate reporter의 구조 모식도. (B) Flow cytometry를 이용한 형광단백질 발현조사 결과.

③ 유전자가위 활성의 돼지 세포내 작동 검증; 유전자가위 발현 벡터를 돼지 fibroblast에 transfection 또는 electroporation으로 전달한 후 2~3일 후 mismatch-sensitive nuclease assay를 통해 목적위치에 돌연변이 도입여부를 조사하였다.

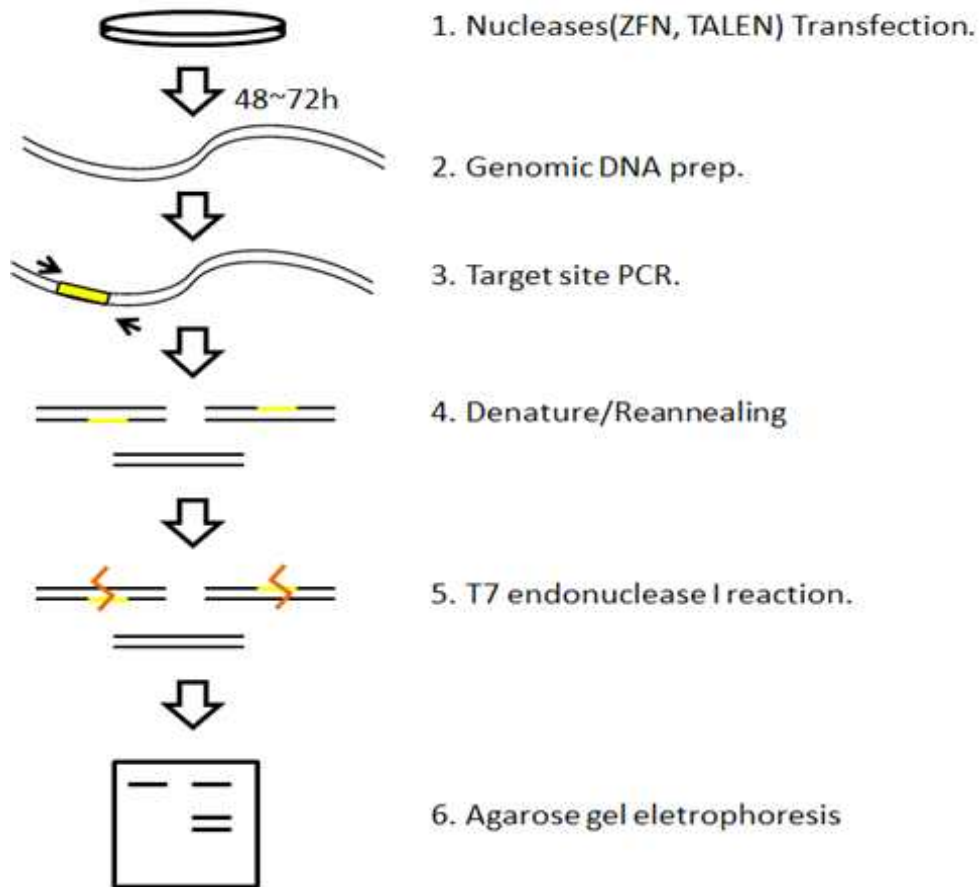


그림 180 Mismatch-sensitive nuclease assay의 절차.

④ ZFN 이용 PD 유전자 KO 세포의 enrich 위한 실험 조건 확립; 유전자가위를 세포에 도입하였을 때 유전자 변형이 일어나는 세포는 DNA 전달 효율 및 유전자가위 활성에 따라 1~20%정도로 관찰된다. 유전자 변형이 일어난 세포의 농축을 위해 유전자가위의 활성에 의해 추적 가능한 리포터 유전자가 켜지는 구조의 리포터를 활용할 수 있다. 이를 위해 활성이 검증된 유전자가위에 대해 그 유전자가위의 활성에 의해 색깔 유전자와 세포 표면 단백질이 켜질 수 있는 형태의 리포터를 제작하였다.

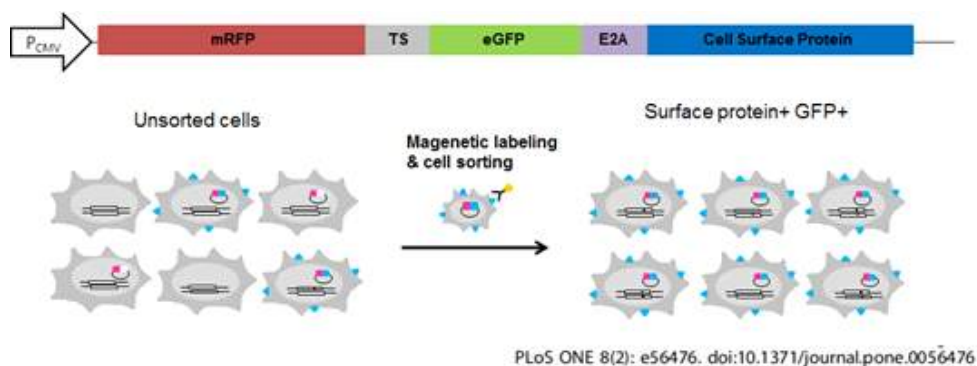


그림 181 ZFN 이용 PD 유전자 KO 세포의 enrich.

- ⑤ 다양한 PD 유전자 PINK1, DJ1 및 ATP13A2 등의 유전자가위 생산; Park2 유전자가위를 이용한 돼지 세포에서의 유전자 녹아웃 유도 과정이 확립되고 제1세부를 통한 녹아웃세포 배반포 제작이 관찰됨에 따라 확립된 실험의 확장을 위하여 다른 주요 PD관련 recessive 유전자인 Pink1, DJ1, ATP13A2에 대한 유전자가위를 고안하고 리포터활성조사를 통해 활성 검증을 수행하였다.

## (2) 연구결과

### (가) PD 병인전자에 대한 유전자가위 개발 및 검증

- ① PARK2 TALEN 확보; Loss-of-function 돌연변이에 의해 early onset PD를 일으키는 recessive PD 유전자로는 Park2 (Parkin), PINK1, DJ1 및 ATP13A2 등의 유전자가 있다. 이러한 유전자의 기능을 제거한 유전자 녹아웃 동물을 개발하면 인간 PD의 좋은 모델이 될 것으로 기대할 수 있다. 이 후보군 중 2차년도에는 Early-onset PD에서 가장 빈번하게 mutation이 일어나고 sporadic case의 PD에서도 돌연변이가 관찰되며 다른 유전자에 비해 상대적으로 많이 연구되고 있는 Park2 유전자를 우선적으로 진행하였다. 유전자 녹아웃을 위한 몇 가지 가능한 접근법 중 최근 가장 주요한 방법으로 떠오르고 있는 유전자가위를 이용한 녹아웃을 수행하기 위해 Park2 유전자에 대한 유전자 가위를 개발하였다. 돼지 Park2 유전자의 경우 현재 database 상 mRNA sequence는 잘 나와 있지만 실제 genomic loci에 대한 annotation은 정확하지 않은 관계로 NCBI reference mRNA sequence를 UCSC genome database의 pig genome (Nov. 2009 (SGSC Sscroga9.2/susScr2))에 대한 homology search (BLAT)을 통해 exon 구조를 추출하였다. 이렇게 얻어진 돼지 Park2 유전자 exon 서열에 대한 TALEN자체 개발 프로그램 ([http://toolgen.co.kr/TALEN\\_designer](http://toolgen.co.kr/TALEN_designer)) 을 통해 고안되었으며, 가능한 TALEN 쌍중 8개를 선정하여 제작하였다.

**Your Sequence ( length : 190 )**

TTTCTTGGTCAGTGTGGTTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT  
GGTTGCTAAGCGACAGGGGGTTCCAGCTGACCAGTTGCGTGTGATTTTCGAGGGAAGGAGCTTAGGAATGACTTGACAGTGCAGGTGA  
GTCTCCCTGG

No	Start at	Sequence Length	Pattern	TALEN1 Length	Spacer Length	TALEN2 Length
1	1	52	T TTCTTGGTCAGTGTGGTTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
2	6	53	T GGTTCAGTGTGGTTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	13	20
3	13	52	T GTTTGTCCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
4	15	52	T TTGTCCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
5	17	53	T GTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	13	20
6	49	52	T GGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
7	55	52	T CGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
8	73	52	T CTTCCAGCTCAAGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	12	20
9	91	53	T GGTTCAGTGTGGTTCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGAGGT	20	13	20
10	95	53	T GCTAAGCGACAGGGGGTTCCAGCTGACCAGTTGCGTGTGATTTTCGAGGGAAGGAGCTTAGGAATGACTTGACAGTGCAGGTGA	20	13	20
11	112	52	T TCCAGCTGACCAGTTGCGTGTGATTTTCGAGGGAAGGAGCTTAGGAATGACTTGACAGTGCAGGTGA	20	12	20
12	119	52	T GACCAGTTGCGTGTGATTTTCGAGGGAAGGAGCTTAGGAATGACTTGACAGTGCAGGTGA	20	12	20

그림 182 Park2 Exon1 TALEN design의 예. Park2 Exon 1에 대한 TALEN design 결과.

**Exon 1**

Pair 1 TCAGGTTCAACTCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCA  
 Pair 2 TGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCAGCTCAAGGA  
 Pair 3 TCCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCATCTTCCA  
 Pair 4 TCTTCCAGCTCAAGGAGGTCGATTCTGACACCAGCCATGGTTTCCCAGTGGAGGTCGATTCTGACACCAGCA

**Exon 3**

Pair 5 TAGACCAACCAACAAGAGCTTTTATGTCTATTGCAAAGGCCCTGTCAAAGA  
 Pair 6 TCAAAGAGTGCAGCCAGGAAAGCTCCGCGTGCAGCACCTGCCAACA

**Exon 5**

Pair 7 TTGATCCCAAACCGGATGAGTGGTGAGTGCCAGTCTCCAAACTGCCCTGGGA  
 Pair 8 TGAGTGCCAGTCTCCAAACTGCCCTGGGACCACAGCAGTAACTACTGGTCAA  
 Pair 9 TGGGACGATGTCTTGATCCCAAACCGGATGAGTGGTGAGTGCCAGTCTCCAA

그림 183 제작된 Park2 유전자가위 target sequence list.

② 확보된 유전자가위의 발현 벡터를 돼지 세포에 electroporation으로 각각 전달하고 3일 후 genomic DNA를 준비하여 각 exon에 맞는 primer를 이용하여 증폭하고 T7E1 mismatch-sensitive nuclease assay를 진행하였다. 이를 통해 Exon5에 해당하는 8번 pair에서 좋은 활성을 관찰할 수 있었다.

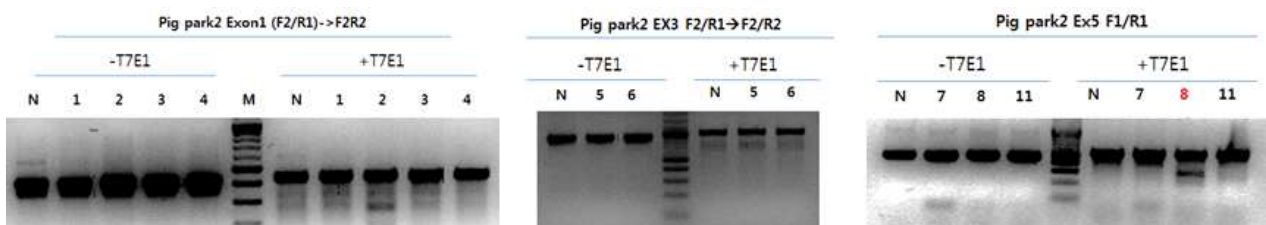


그림 184 Park2 돼지 세포내 유전자가위 활성의 검증.

③ PARK2 KO 세포 농축 시스템 확보; 유전자가위 활성 리포터를 이용한 유전자변형 세포의 농축과정을 활용하기 위해 확보된 유전자가위의 목적 서열을 reporter에 직접 삽입하고 제작된 유전자가위 리포터의 활성성을 세포에서 관찰하였다. 인간 293T 세포에 유전자가위 리포터에서 Park2 유전자가위에 의존적으로 GFP-positive 세포가 효율적으로 생성되는 것이 관찰되어 유전자가위 리포터의 활성성이 검증되었다.

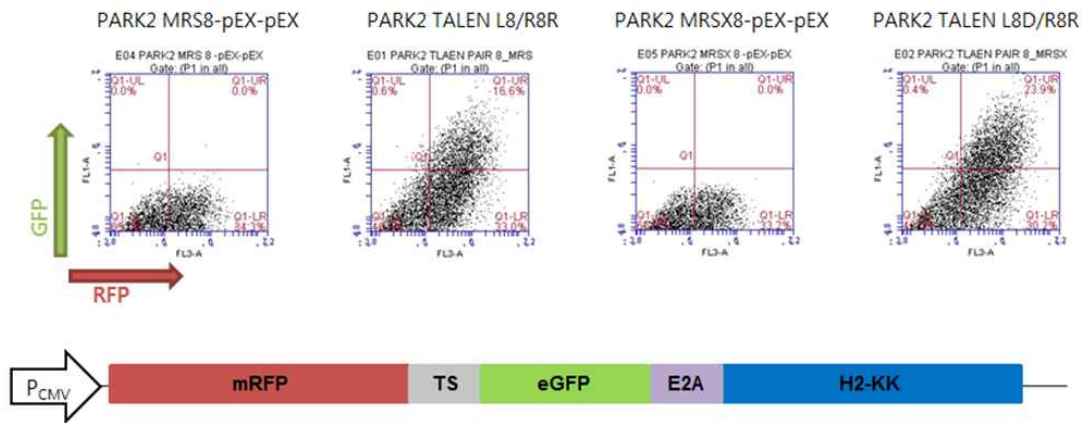


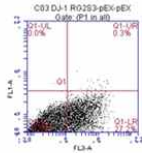
그림 185 유전자가위 리포터의 제작 및 작동성 검증. 유전자가위 리포터의 개략적 구조 상 TS위치에 목적 유전자가위의 인식 서열이 인공적으로 합성되고 도입됨.

④ PPINK1, DJ1 및 ATP13A2 등의 유전자가위 생산; Park2 유전자가위를 이용한 돼지 세포에서의 유전자 녹아웃 유도 과정이 확립되고 제1세부를 통한 녹아웃세포 배반포 제작이 관찰됨에 따라 확립된 실험의 확장을 위하여 다른 주요 PD관련 recessive 유전자인 Pink1, DJ1, ATP13A2에 대한 유전자가위를 고안하고 리포터활성조사를 통해 활성 검증을 수행하였다. 이를 통해 각 유전자에 대해 효율적인 활성을 보이는 TALEN을 확보할 수 있었다.

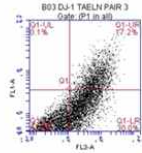
## Pig DJ-1 (Gene ID: 780404)

Exon1  
**ATGGCTTCTAAAAGGGCTCTGGTCATCCTGGCTAAAGGAGCAGAGGA**  
**GATGGAGACGGTTATTCCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGA**

DJ-1 RG253-pEX-pEX



DJ-1 TALEN L3D/R3R

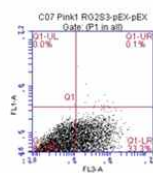


Exon 1 TALEN

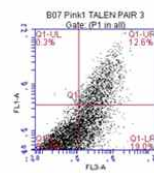
## Pig Pink1

Exon1  
 .....TCGGGCAGTCCATCGGCCAGGGCTGCAGCGCTGCTGTATAGGCCAC  
**CATGCCTGTGTGGCCCCAGAACCTGGA**GGCGGCGAAGAGCACC.....

Pink1 RG253-pEX-pEX



Pink1 TALEN L3D/R3R

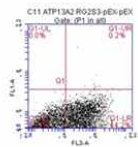


Exon 1 TALEN

## Pig ATP13A2

Exon3  
 .....AGGGATCCCTTTGCTGCTCTCCGATGGAAGCCCGTTTGGGGGTC  
**GGCTCGGGCTCCAGCCATGCAACCTGGCCCGCGCAACACTCGT.....**

ATP13A2 RG253-pEX-pEX



ATP13A2 TALEN L3D/R3R



Exon 3 TALEN

그림 186 Pig Pink1, DJ-1, ATP13A2 TALEN 개발 결과.

### 3. 신경독성물질투여를 통한 미니돼지의 유전학적 검증

#### 가. 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지의 유전학적 검증

##### (1) 연구방법

##### (가) 신경독성물질투여 PD 모델 미니돼지의 유전자 profiling

- ① 신경독성물질투여 PD 모델 미니돼지의 PD 관련 뇌조직을 채취하여 RNA를 분리 후 GeneChip Porcine Genome Array (affymetrix)를 이용하여 (Genocheck, Seoul, Korea) 유전자 발현 분석을 진행하였다.

##### (2) 연구결과

##### (가) 신경독성물질투여 PD 모델 미니돼지의 유전자 profiling

- ① RNA 품질 분석: 대조군과 신경독성물질 투여 PD 모델 돼지 중뇌의 RNA를 분리 후 QC를 진행하였으며 microarray를 진행하기에 적합한 range가 확보됨.
- ② Microarray 분석 결과 신경독성 처리 PD 모델 돼지에서 대조군에 비해 1.5배 이상 발현이 높아진 유전자는 1404개, 낮아진 유전자는 831개가 확인됨.

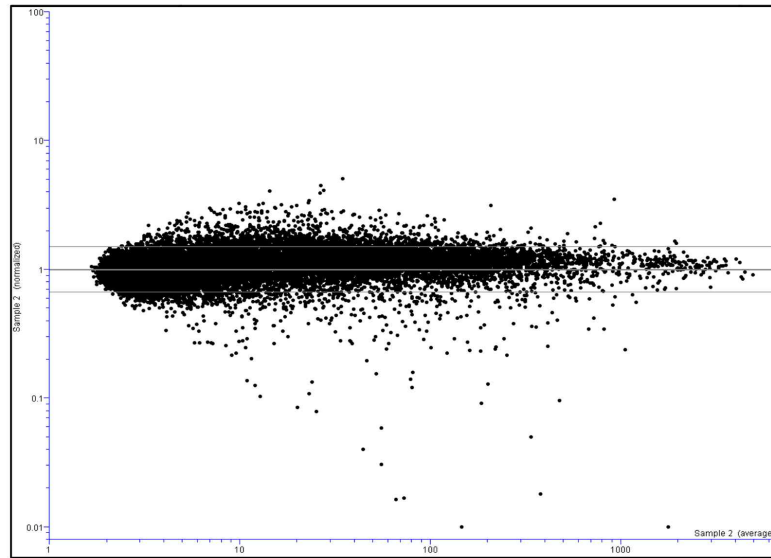


그림 187 PD 모델 미니돼지의 유전자 profiling

#### 4. APP 유전자 조절 미니돼지의 유전자조절 유무 검증

##### 가. APP 유전자 조절 미니돼지의 유전자 발현 변화 연구

###### (1) 연구방법

###### (가) APP 유전자 조절 미니돼지의 유전자 profiling

① GeneChip Porcine Genome Array 분석; APP 유전자 조절 미니돼지의 중뇌에서 RNA 분리 후 GeneChip Porcine Genome Array (affymetrix)를 이용하여 (마크로젠, Seoul, Korea) 유전자 발현 분석을 시행하였고 이를 통해 PD모델 돼지에서 발현의 차이를 보이는 유전자의 목록 및 영향을 받은 세포기관 또는 기능을 발굴하였다.



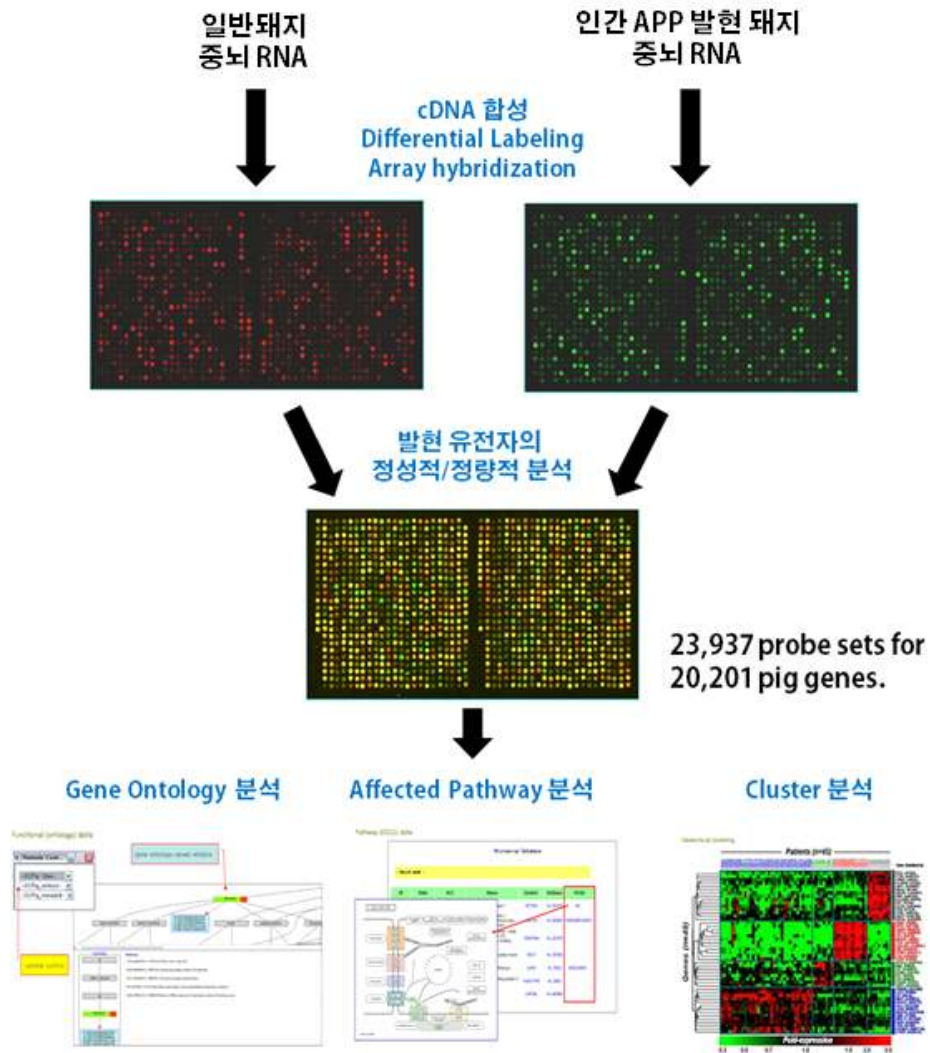


그림 188 APP 발현 미니돼지의 유전자 profiling 결과.

## (2) 연구결과

### (가) APP 유전자 조절 미니돼지의 유전자 발현 변화 연구

- ① 기초 분석; 총 23935 probe를 이용해서 돼지의 20,201 유전자의 발현 (23,256 transcript)을 비교 분석. 두 sample에서 각 유전자의 발현을 비교한 결과 한 APP 발현 돼지 중뇌에서 control에 비해 발현이 1.5배 이상 증가한 probe signal은 2692개, 줄어든 probe는 2785개 관찰되었다. 증감의 배수를 2배로 조정하면 1111개의 probe에서 발현 증가, 1201 probe에서 발현 저하가 관찰되었다.

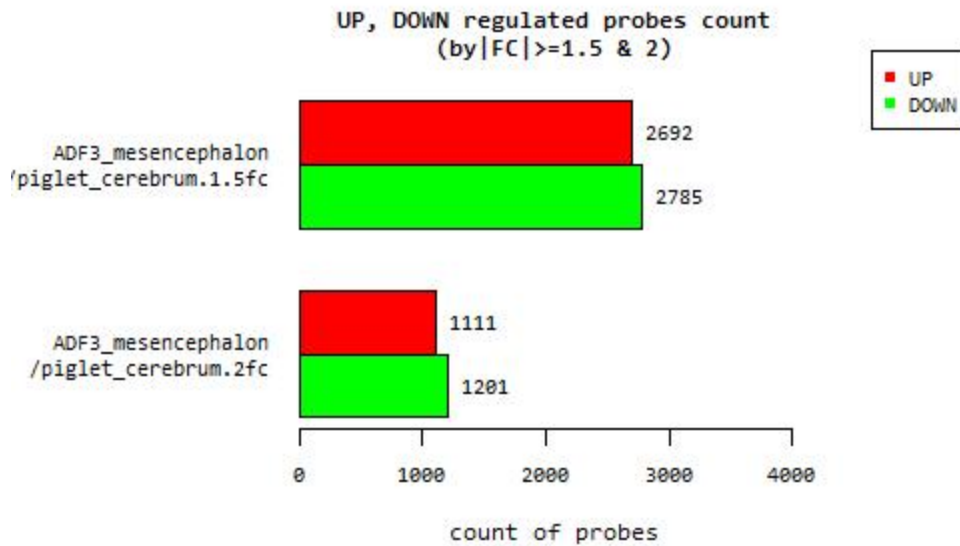


그림 189 유전자 발현 비교 결과.

② GO Analysis; APP에 의해 발현이 영향을 받은 중뇌 유전자들의 기능, 관련된 생명 현상에 대한 통계학적 분석 (GO analysis)을 통해 APP의 발현에 의해 영향을 받은 세포기능을 알아본 결과 면역관련 pathway가 가장 높은 빈도로 관찰되었으며 전체적으로는 외부 signal에 대한 반응에 관련되는 기능이 영향을 받은 것으로 보인다. 알츠하이머의 발생 과정에서 염증 반응이 주요 하게 관찰되며 또한 병리적 기작에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 중뇌 위치에 대한 유전자 발현 연구였지만 균질한 세포 종류가 아니라 중뇌 기관에 대한 연구로 실제로는 다양한 세포의 복합적인 transcript가 분석되었을 수 있다. 따라서 면역 관련 유전자의 발현이 실제 뇌 세포에서 발현이 바뀐 것인지 또는 면역 세포 등이 직접 중뇌 위치로 많이 이동하면서 발생한 결과인지는 추후 연구를 통해 분석하여야 한다.

표 63 GO 분석 결과

Term	Description	PValue
GO:0042592	homeostatic process	0.0031
GO:0002684	positive regulation of immune system process	0.0043
GO:0006954	inflammatory response	0.0105
GO:0009611	response to wounding	0.0113
GO:0044271	nitrogen compound biosynthetic process	0.0132
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus	0.0145
GO:0022610	biological adhesion	0.0153
GO:0007155	cell adhesion	0.0153
GO:0005509	calcium ion binding	0.0198
GO:0007610	behavior	0.0213
GO:0044421	extracellular region part	0.0320
GO:0002252	immune effector process	0.0413
GO:0002520	immune system development	0.0445
GO:0048534	hemopoietic or lymphoid organ development	0.0445

③ APP 발현에 의해 발현에 가장 영향을 많이 받은 유전자 list; APP 발현 돼지 중뇌와 일반 돼지 중뇌에서 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자 20개 (발현이 올라간 10개 유전자와 발현이 내려간 10개 유전자의 list는 표 7 같다. 분석 과정에서 실제 영향을 많이 받은 것으로 예상되지만 NCBI 등 주요 database에서 정확히 annotation된 유전자가 없는 경우는 제외하였다. 또한 data의 신뢰성을 확보하기 위해 두 sample 중 하나에서라도 발현이 거의 관찰되지 않은 경우는 발현 차이가 강조되어 나타날 수 있기 때문에 제외하였다. 이때 어떤 sample에서 한 probe의 발현 수준은 Volume이라는 지표로 나타나며 0 ~ 12 사이의 값으로 관찰되며 두가지 sample 중 하나에서라도 volume 값이 2이하인 sample에 대해서는 제외하였다. 제외된 유전자의 경우 개별적 분석을 통해 실제 큰 영향을 받은 유전자와 실험과정에서의 다양한 이유로 위양성 결과로 보이는 경우를 비교할 필요 있다.

표 64 APP 발현 돼지 중뇌와 일반 돼지 중뇌에서 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자들

ProbeID	Gene Symbol	Description	Entrez Gene ID	Fold Change (APP over control)
Ssc.2358.1.A1_at	LOC100511614	rho GTPase-activating protein 36-like	100511614	38.7
Ssc.101.1.S1_at	SPP1	secreted phosphoprotein 1	397087	33.3
Ssc.31160.1.A1_s_at	ATP6V1C2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	100512277	26.2
Ssc.10453.1.S1_at	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	406870	23.7
Ssc.7621.1.A1_at	LOC100523340	anillin, actin binding protein	100523340	21.1
Ssc.27980.1.A1_at	LOC100152537	transmembrane protein 255A	100152537	18.4
Ssc.1520.1.A1_at	RET	ret proto-oncogene	100155053	17.5
Ssc.5145.1.S1_a_at	HSP70.2	heat shock protein 70.2	396648	17.5
Ssc.21300.1.S1_at	LOC100523870	uncharacterized LOC10052387	100523870	17.4
Ssc.8159.1.S1_at	CALB2	calbindin 2	100127479	16.3
Ssc.24085.1.A1_at	VIT	vitrin	100524557	-12.4
Ssc.11953.1.A1_at	CPNE4	copine IV	100157532	-12.6
Ssc.30236.1.A1_at	LOC100525333	crystallin, mu	100525333	-18.0
Ssc.717.1.S1_at	CCK	cholecystokinin	397468	-23.2
Ssc.1733.1.A1_at	ITPKA	inositol-trisphosphate 3-kinase A	100516235	-30.7
Ssc.6766.1.A1_at	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	733590	-31.8
Ssc.15822.1.S1_at	F5	coagulation factor V	397217	-33.1
Ssc.10168.1.A1_at	ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB domain)	100517459	-38.4
Ssc.8345.1.A1_at	ARPP21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	100512986	-44.3
Ssc.27304.1.S1_at	TMSB4X	thymosin beta 4	733606	-60.6

## 5. ZFN 이용 PD-KO 세포주 생산

### 가. PD 유전자 KO 돼지 세포주 확립 및 복제수정란에서 KO 검증

#### (1) 연구방법

##### (가) PD 유전자 KO 세포주 확립 및 복제수정란에서 KO 검증

- ① 유전자교정 효율 최적화 및 분석법 개발; Pig primary cell에 유전자가위 도입을 최적화하기 위한 조건 test를 mismatch-sensitive nuclease assay를 이용하여 검증하였다. 확립된 조건을 이용하여 PD 관련 유전자 중 pig PARK2에 대해 활성이 검증된 TALEN과 reporter system을 이용하여 여러 종류의 pig primary cell line에서 KO 공여세포를 생산하였다. 생산된 공여세포의 효율 검증을 위해 genomic DNA 및 in vitro condition에서 생산된 핵이식 배반포를 전달 받아서 mismatch-sensitive nuclease assay를 이용하여 분석하였다.
- ② 최신 유전자가위 활용 PD 유전자 KO 효율 비교 및 개선; 최근 개발된 유전자가위인 CRISPR-CAS9 system (RGEN)을 도입하기 위해 Park2, DJ1, Pink1에 대한 RGEN design하여 공여세포 제작에 사용 및 RGEN 도입에 대한 조건 수립하였다.

#### (2) 연구결과

##### (가) Pig primary cell에 유전자가위도입을 최적화하기 위한 조건 test

- ① 세포 양과 DNA 양, 세포 종류, electroporation 기계에 따른 KO 효율 변화; Amaxa(Lonza)와 Neon(Invitrogen) 기기를 이용하여 기계에 따른 돌연변이 효율을 분석을 시행 한 결과, 유전자 가위와 reporter 전달 후 세포 상태는 Amaxa가 더 좋았지만, 돌연변이 도입 효율은 Neon과 비슷하다고 했을 때 세포 양과 DNA양을 줄여서 실험 가능한 Neon으로 조건을 확립했다.
- ② Pig primary cell line중 Sinclair Male Kidney(SMK), Sinclair Male Fibroblast(SMF), Yukatan Kidney (YK), O type minipig 7 (OMP7)에서 세포 양과 DNA양을 조절하여 돌연변이 도입여부를 관찰 했을때 DNA dose가 높을수록 mutation이 잘 들어가지만 일정 양 이상을 넘어가면 오히려 효율이 낮아짐을 알 수 있었다. 또한 DNA dose에 따라 세포에 damage가 많은 현상을 관찰 하여 이를 통해 공여세포에 적합한 DNA 전달 조건 범위를 확정할 수 있었다.

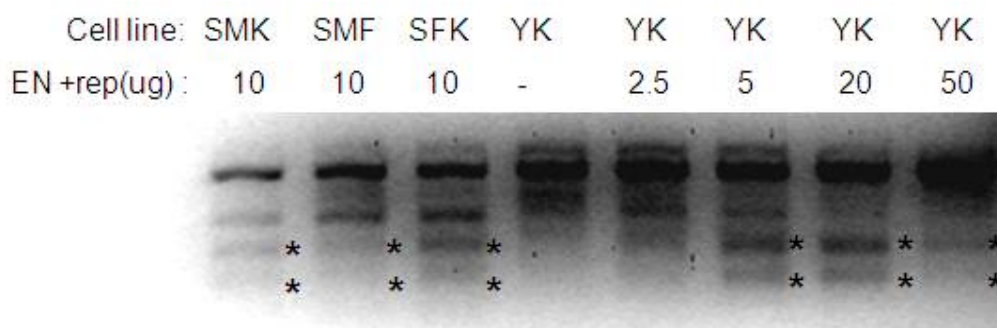


그림 190 세포 종류에 따른 KO 효율 확인 결과.

#### (나) Park2 KO 공여세포 생산

- ① pig park2 TALEN과 reporter를 도입하여 pig primary cell line으로 KO 공여세포 생산; SMK와 YK cell을 이용하여 park2 TALEN과 reporter를 도입하여 매주 공여세포 생산 후 48 h이후에 제1세부 연구팀 (서울대 수의대)에 전달하여 형광 검증하고, 전달된 세포 중 GFP positive한 세포를 이용하여 매주 2번의 체세포 핵이식을 제1세부 연구팀에서 진행했다. 본 연구팀에서는 남겨둔 공여세포의 일부를 이용하여 T7E1으로 돌연변이 효율을 검증하고 제1세부 연구팀에서 체세포 핵이식에 사용하고 남은 세포를 in vitro culture하여 만든 배반포를 전달받아 돌연변이 효율을 간접적으로 측정하여 분석했다.

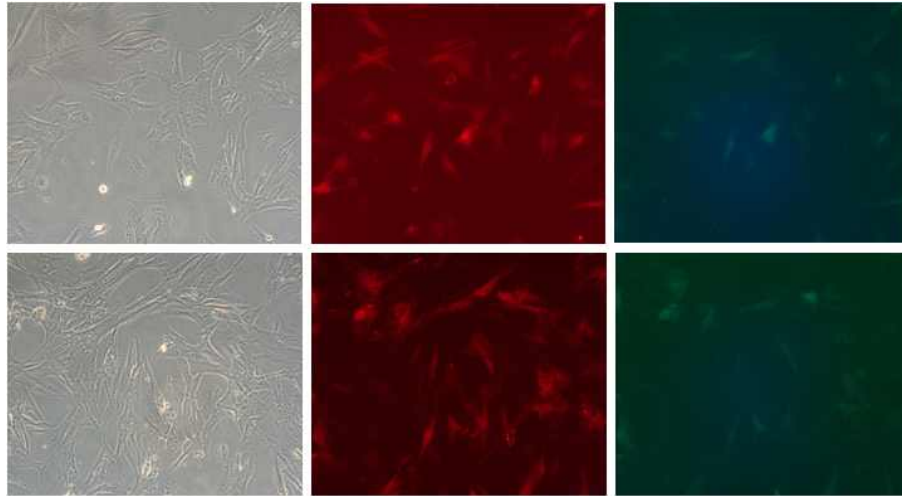


그림 191 PARK2 TALEN 도입한 돼지 세포에서의 형광 발현.

- ② 생산된 공여 세포의 효율 검증을 위해 제1세부 연구팀에 전달한 genomic DNA 및 in vitro condition에서 생산된 배반포를 전달 받아서 mismatch-sensitive nuclease assay를 이용하여 분석, 총 44개의 배반포를 분석하여 8개의 positive를 확인하여 20%의 효율로 돌연변이가 관찰됨을 알 수 있었다.

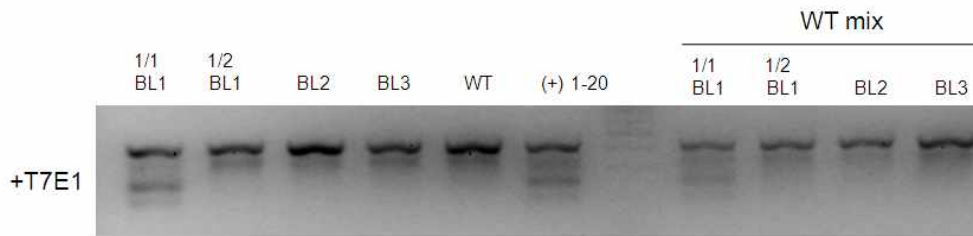


그림 192 배반포에서 PARK2 TALEN 효율 검증.

(다) CRISPR 유전자가위 개발

- ① PARK2, DJ1, Pink1 CRISPR 개발; 최근 개발된 유전자가위인 CRISPR-CAS9 system (RGEN)을 도입하기 위해 Park2, DJ1, Pink1 에 대한 RGEN design하여 공여세포 제작에 사용 및 RGEN 도입했을 때 서로 다른 pig cell line에서 TALEN보다 효율이 높은 dRGEN이 확인되었다.

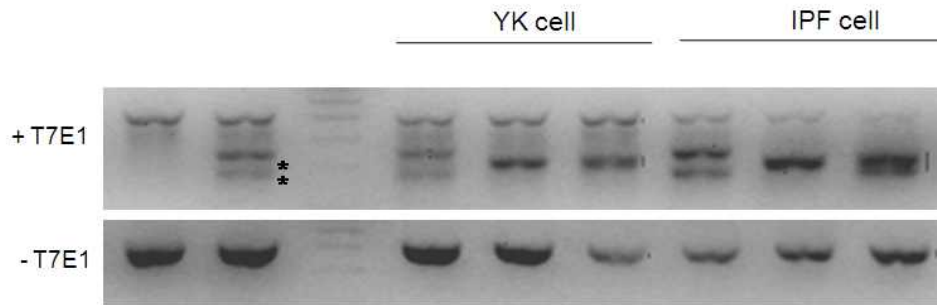


그림 193 돼지 PARK2 RGEN 효율 확인.

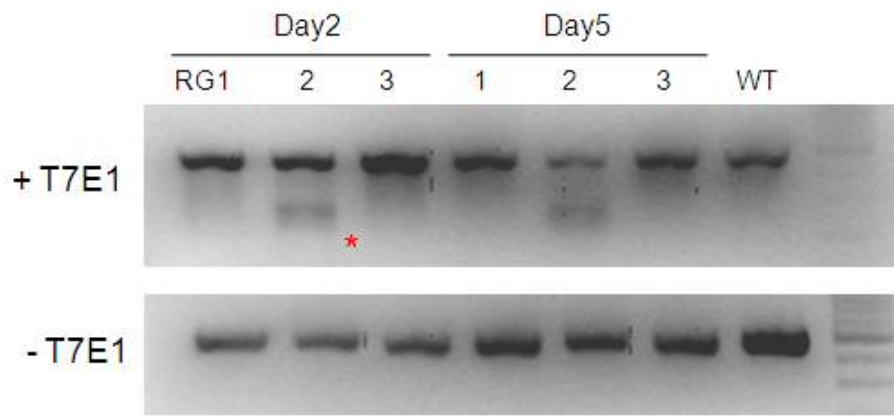


그림 194 개발된 DJ1 RGEN 확인.

표 65 돼지 PARK2 RGEN 염기서열

	seq	direction	seq for RGEN
Pig-park2-RG1	CCTTCTTGCTGGGACGATGTCTT	CCN	AAGACATCGTCCCAGCAAGAAGG
Pig-park2-RG3	TTGATCCCAAACCGGATGAGTGG	NGG	TTGATCCCAAACCGGATGAGTGG
Pig-park2-RG4	CCCAAACCGGATGAGTGGTGAGT	CCN	ACTCACCCTCATCCGGTTTGGG

## 6. hSNCA 발현 미니돼지의 유전학적 검증

### 가. hSNCA 발현 미니돼지의 유전학적 검증

#### (1) 연구방법

#### (가) hSNCA 발현 복제 미니돼지의 유전학적 검증

- ① hSNCA 발현 복제 미니돼지의 유전자 발현 profile 비교 분석; SNCA 유전자 조절

미니돼지의 증뇌에서 RNA 분리 후 GeneChip Porcine Genome Array (affymetrix) 를 이용하여 (마크로젠, Seoul, Korea) 유전자 발현 분석을 시행하였고 이를 통해 PD모델 돼지에서 발현의 차이를 보이는 유전자의 목록 및 영향을 받은 세포기관 또는 기능을 발굴하였다.

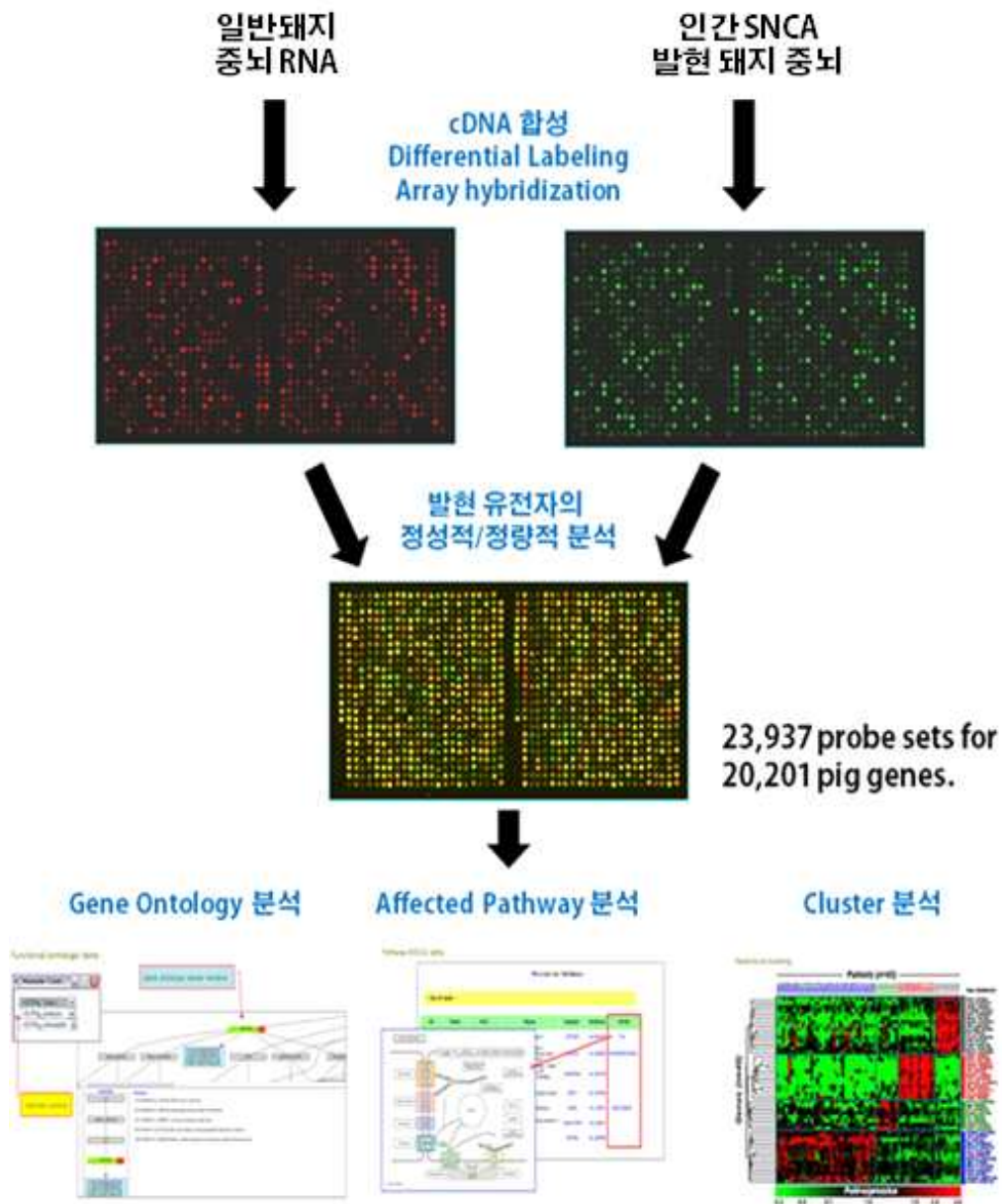


그림 195 SNCA 발현 미니돼지 유전자발현 profiling

(2) 연구결과

(가) hSNCA 발현 복제 미니돼지의 유전학적 검증

① 기초분석; 인간 SNCA발현 transgenic pig 제작 과정에서 사용된 parental 세포



(PDF11)와 transgene의 insertion이 확인되었으나 transcript의 발현이 관찰되지 않았던 PDF5, 그리고 transgene의 insertion 및 transcript 발현이 모두 확인되었던 PDF1의 중뇌 조직 transcriptome을 microarray를 이용하여 유전자 발현 profiling 진행하였다. 전체 transcriptome의 유사성을 분석하였을 때 인간의 SNCA 발현이 확인되는 PDF1가 SNCA의 발현이 관찰되지 않는 대조군 PDF11 또는 PDF5와 분리되는 경향을 보여 SNCA가 중뇌에서 유전자 발현의 profile에 영향을 준 것으로 예상된다.

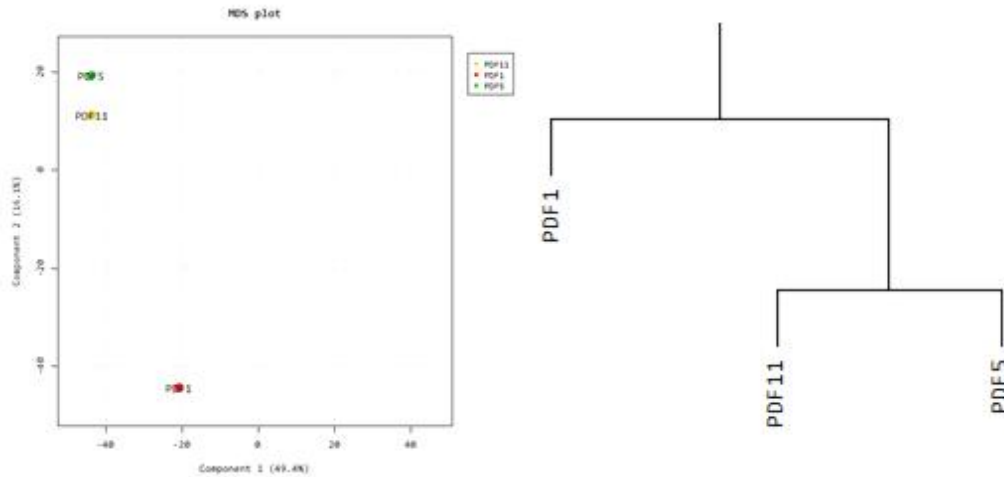


그림 196 각 sample Transcriptome 간의 유사성 조사. A. MDS plot(multidimensional scaling plot). B. Hierarchical clustering

② GO Analysis; SNCA에 의해 발현이 영향을 받은 중뇌 유전자들의 기능, 관련된 생명현상에 대한 통계학적 분석 (GO analysis)을 통해 SNCA의 발현에 의해 영향을 받은 세포기능을 알아본 결과 면역관련 pathway가 가장 높은 빈도로 관찰되었으며 전체적으로는 외부 signal에 대한 반응에 관련되는 기능이 영향을 받은 것으로 보인다. 분석한 sample의 경우 어린 돼지의 중뇌로 전진적인 질병인 파킨슨씨 병의 증상을 아직 보이지 않았던 sample이므로 현재 밝혀진 유전자 list가 실제 파킨슨씨 병에 관련될 런지를 알기 위해서는 지속적인 관찰이 필요할 것으로 보인다.

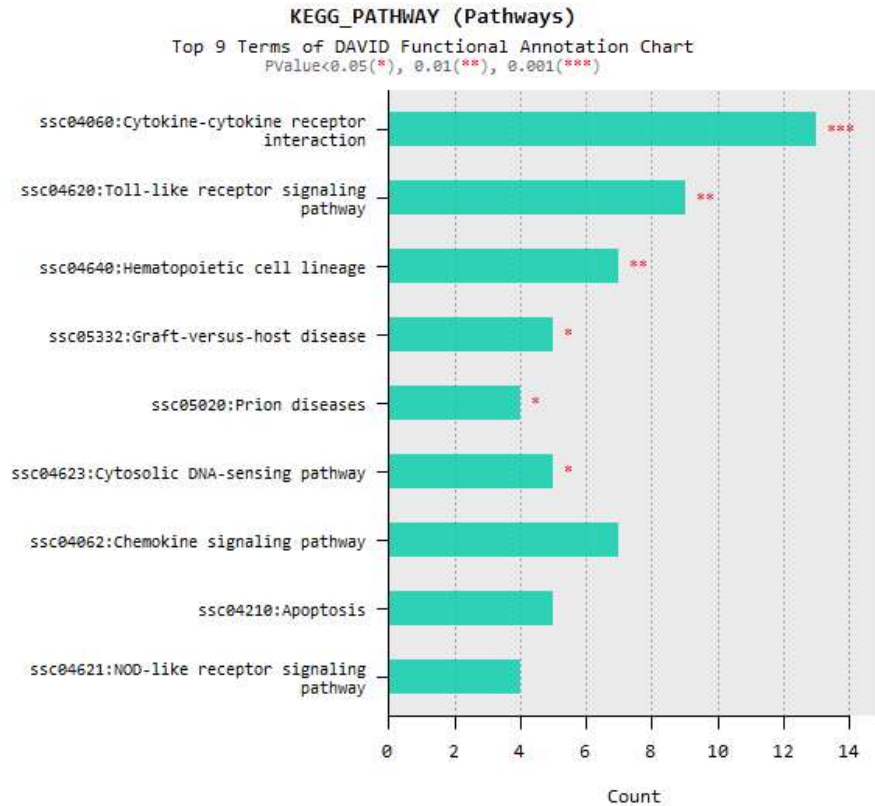


그림 197 Gene Ontology Analysis (KEGG-Pathway)

③ SNCA 발현에 의해 발현에 가장 영향을 많이 받은 유전자 list; SNCA 발현 돼지 중뇌와 일반 돼지 중뇌에서 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자 20개 (발현이 올라간 10개 유전자와 발현이 내려간 10개 유전자의 list는 같다. 분석 과정에서 실제 영향을 많이 받은 것으로 예상되지만 NCBI 등 주요 database에서 정확히 annotation된 유전자가 없는 경우는 제외하였다. 또한 data의 신뢰성을 확보하기 위해 두 sample 중 하나에서라도 발현이 거의 관찰되지 않은 경우는 발현 차이가 강조되어 나타날 수 있기 때문에 제외하였다. 이때 어떤 sample에서 한 probe의 발현 수준은 Volume이라는 지표로 나타나며 0~12 사이의 값으로 관찰되며 두가지 sample 중 하나에서라도 volume 값이 2이하인 sample에 대해서는 제외하였다. 제외된 유전자의 경우 개별적 분석을 통해 실제 큰 영향을 받은 유전자와 실험과정에서의 다양한 이유로 위양성 결과로 보이는 경우를 비교할 필요 있다.

ProbeID	mRNA Accession	Gene Symbol	Gene Description	Fold Change (SNCA over control)
15323380	NM_001008691	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	51.8
15336153	NM_001012408	DMD	dystrophin	33.7
15325924	NM_001244253	DRD2	dopamine receptor D2	22.4
15295198	XM_003481758	NTS	neurotensin	14.7
15223090	NM_214286	LPL	lipoprotein lipase	12.1
15286641	XM_003355282	LOC100623311	probable G-protein coupled receptor 88-like	10.5
15327224	XM_003130164	LOC100525179	protachykinin-1-like	8.4
15331399	XM_003130164	LOC100525179	protachykinin-1-like	8.4
15217144	ENSSSCT00000012833	MME	membrane metallo-endopeptidase	7.4
15265951	XM_003123755	LOC100513200	ankyrin repeat domain-containing protein 34B-like	7.2
15312975	ENSSSCT00000002650	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-5.3
15218535	NM_001144843	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	-5.5
15189844	NM_214247	NOR-1	neuron-derived orphan receptor-1 alfa	-5.5
15248880	XM_003134366	TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	-5.5
15205461	NM_001025227	DCT	dopachrome tautomerase	-5.7
15229543	ENSSSCT00000010570	STC1	stanniocalcin 1	-5.8
15220087	ENSSSCT00000012485	HYAL2	hyaluronoglucosaminidase 2	-6.0
15253897	XM_003122496	NPAS4	neuronal PAS domain protein 4	-7.1
15278576	Z80109	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	-7.4
15332643	ENSSSCT00000035485	LOC100738612	cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3-like	-9.6

그림 198 APP 발현 돼지 중뇌와 일반 돼지 중뇌에서 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자들

## 7. 다중 PD 유전자 적중 돼지 생산을 위한 DJ-1 KO 세포 생산

### 가. 3세대 유전자가위 활용 DJ-1 유전자 KO 돼지 세포 생산

#### (1) 연구방법

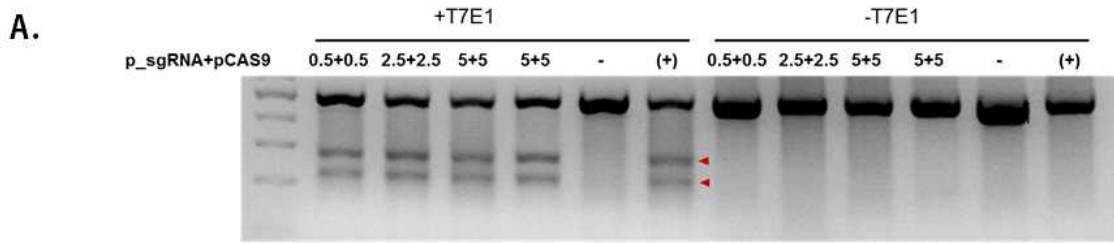
##### (가) 돼지 세포 유전자가위 적용 확립

① 유전체 돌연변이 도입 유도 및 분석; Pig primary cell에 유전자가위 도입을 최적화하기 위한 조건 test를 mismatch-sensitive nuclease assay를 이용하여 검증하였다. 확립된 조건을 이용하여 PD 관련 유전자 중 pig PARK2에 대해 활성이 하검증된 TALEN과 reporter system을 이용하여 여러 종류의 pig primary cell line에서 KO 공여세포를 생산하였다. 생산된 공여세포의 효율 검증을 위해 genomic DNA 및 in vitro condition에서 생산된 핵이식 배반포를 전달 받아서 mismatch-sensitive nuclease assay를 이용하여 분석하였다.

#### (2) 연구결과

##### (가) 3세대 유전자가위 활용 DJ-1 유전자 KO 조건 확립

① CRISPR유전자가위 적용 최적화; Neon electroporator를 이용하여 SMK/YK 두가지 종류의 공여세포에 대해 RGEN 발현 벡터 및 리포터의 양과 비율을 적용하고 돌연변이 도입 효율을 분석하여 최적화 조건을 확립하였다.



5x10<sup>5</sup> pig YK cells, Neon, 72h analysis

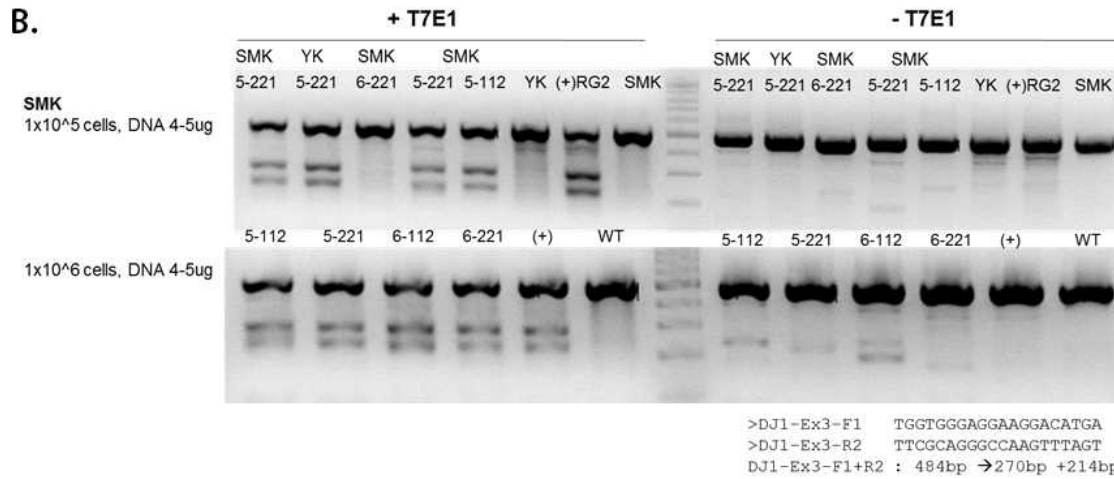


그림 199 DJ-1 RGEN 적용 최적화. A. SMK세포에서 RGEN 발현 벡터 전달 양 최적화. B. SMK/YK 세포에 대해 세포 양 및 전달 벡터/리포터 비율 최적화

② 3세대 유전자가위 활용 DJ-1 유전자 KO 조건 확립; DJ-1 RGEN과 리포터를 전달한 공여세포를 이용하여 복제된 복제 배아를 배반포까지 배양 후 유전체 DNA를 준비하여 DJ-1 target site 돌연변이를 분석한 결과 4개 복제배아 중 3개에서 돌연변이가 관찰되었다.

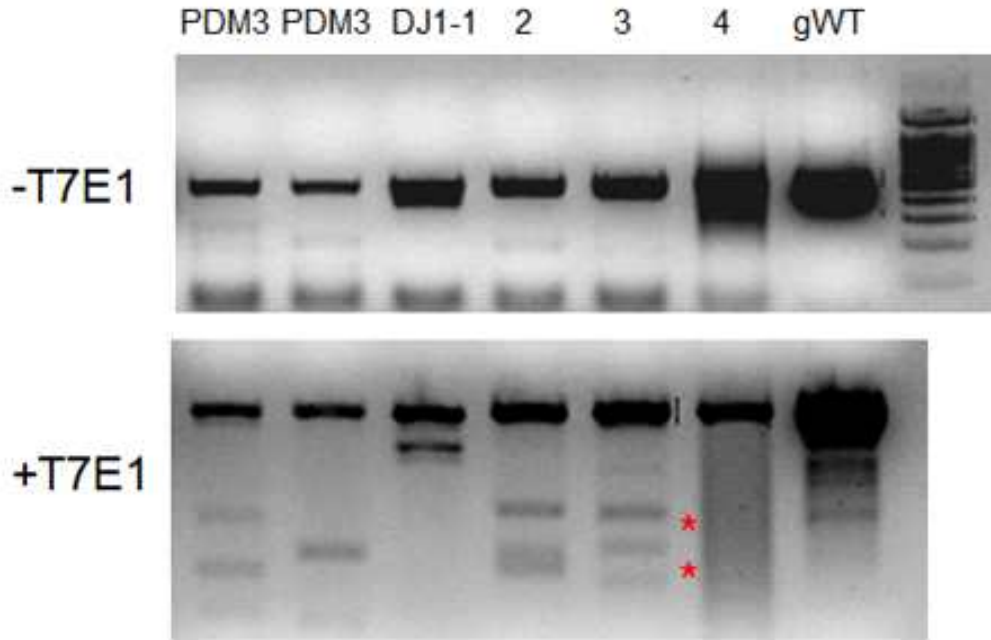


그림 200 DJ-1 knockout 복제 배반포 생산 검증

③ DJ-1 녹아웃 복제돼지 분석; DJ-1 RGEN 전달된 공여세포에서 만들어진 복제 수정란을 대리모에 이식하여 임신이 확인되었으나 유산된 태아를 분리하여 DJ-1 target site 돌연변이 여부를 분석하였을 때 7개 태아 중 2개에서 돌연변이가 관찰되었다.

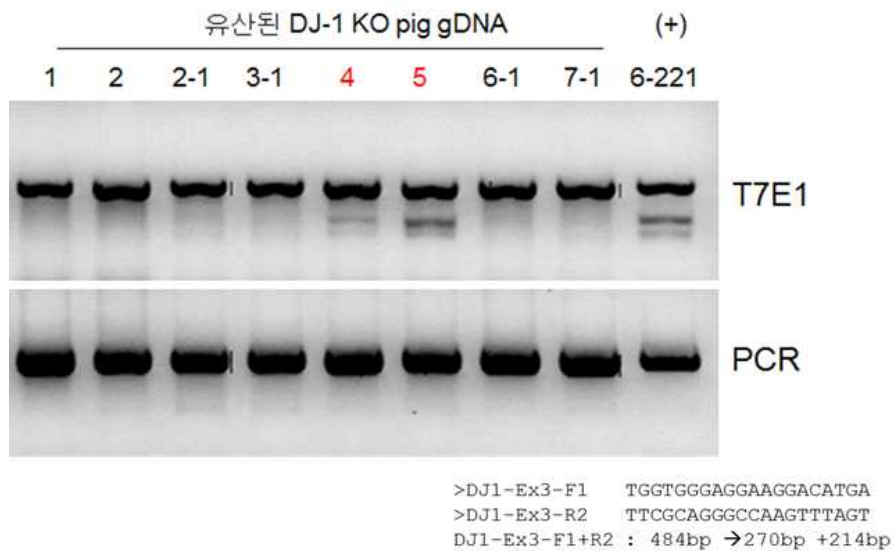


그림 201 유산된 복제 돼지에서 DJ-1 돌연변이 분석

④ PARK2/DJ-1 다중 녹아웃 복제 돼지 생산; 다중 유전자 녹아웃 파킨슨 모델 돼지 생산을 위하여 PARK2 유전자 중 1 allele이 녹아웃 되어있는 PDM3 세포주에 DJ-1

RGEN을 처리하여 돌연변이 도입여부를 관찰하였을 때 일반 공여 세포주와 비슷한 수준으로 돌연변이가 도입됨을 확인하였다.

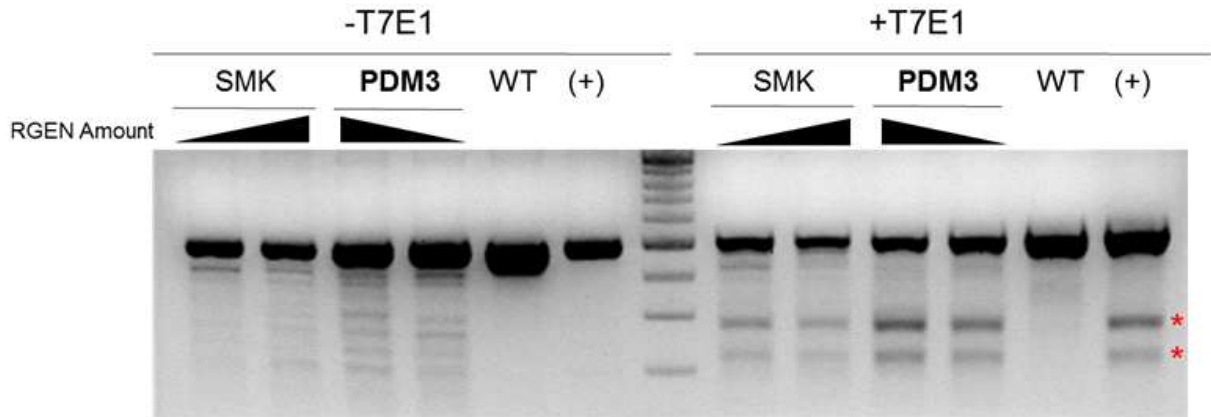


그림 202 PARK2 hetero KO 세포 (PDM3)에서 DJ-1 RGEN 작동 확인

⑤ DJ-1 RGEN이 처리된 PDM3 세포에서 유래된 복제 수정란을 대리모에 이식 후 태어난 개체인 PDMD-1의 genomic DNA를 분석하였을 때 기존 보유하고 있는 PARK2위치의 돌연변이 이외에도 DJ-1 유전자상 RGEN target site에 1bp insertion이 확인되어 DJ-1 녹아웃이 성공적으로 수행되었다. 1bp insertion에 의해 돌연변이에서 5bp 떨어진 위치에 stop codon이 형성 되므로 기능성이 없는 truncated protein의 발현이 예상된다.

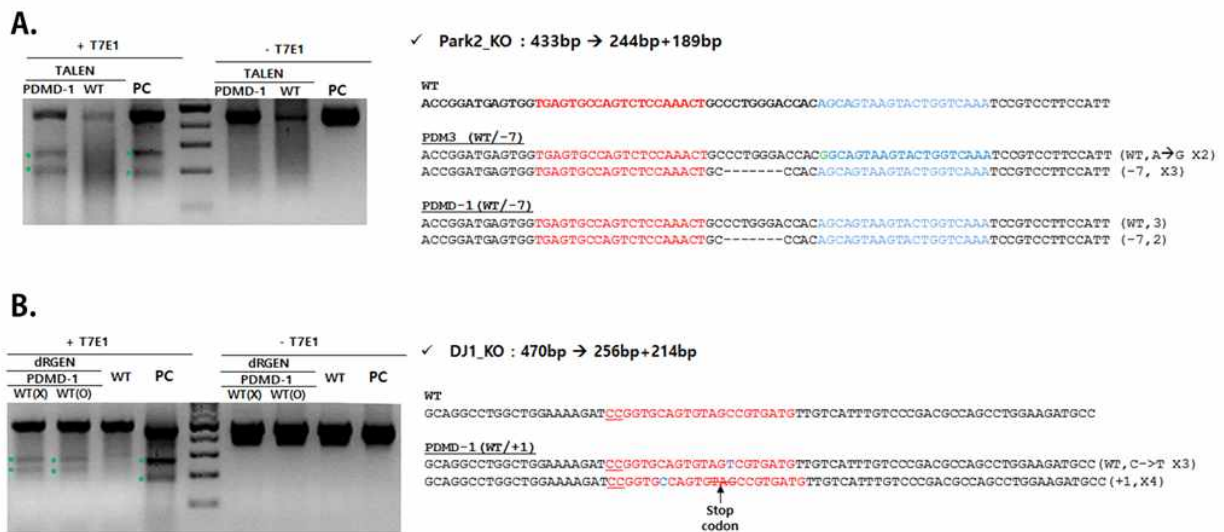


그림 203 PDMD-1 태지의 genomic DNA 분석. A. PDM3세포가 보유한 PARK2 유전자 돌연변이 보유 여부 분석. B. DJ-1 RGEN에 의해 절단되는 위치에 돌연변이 도입 여부 분석.

## 8. AD 병인유전자 복합 발현 미니태지의 유전학적 검증

가. AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지의 유전학적 검증

(1) 연구방법

(가) AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지의 유전학적 검증

① AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지의 유전자 발현 profile 비교 분석; AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지의 중뇌에서 RNA 분리 후 GeneChip Porcine Genome Array (affymetrix)를 이용하여 (마크로젠, Seoul, Korea) 유전자 발현 분석을 시행하였고 이를 통해 PD모델 돼지에서 발현의 차이를 보이는 유전자의 목록 및 영향을 받은 세포기관 또는 기능을 발굴하였다.

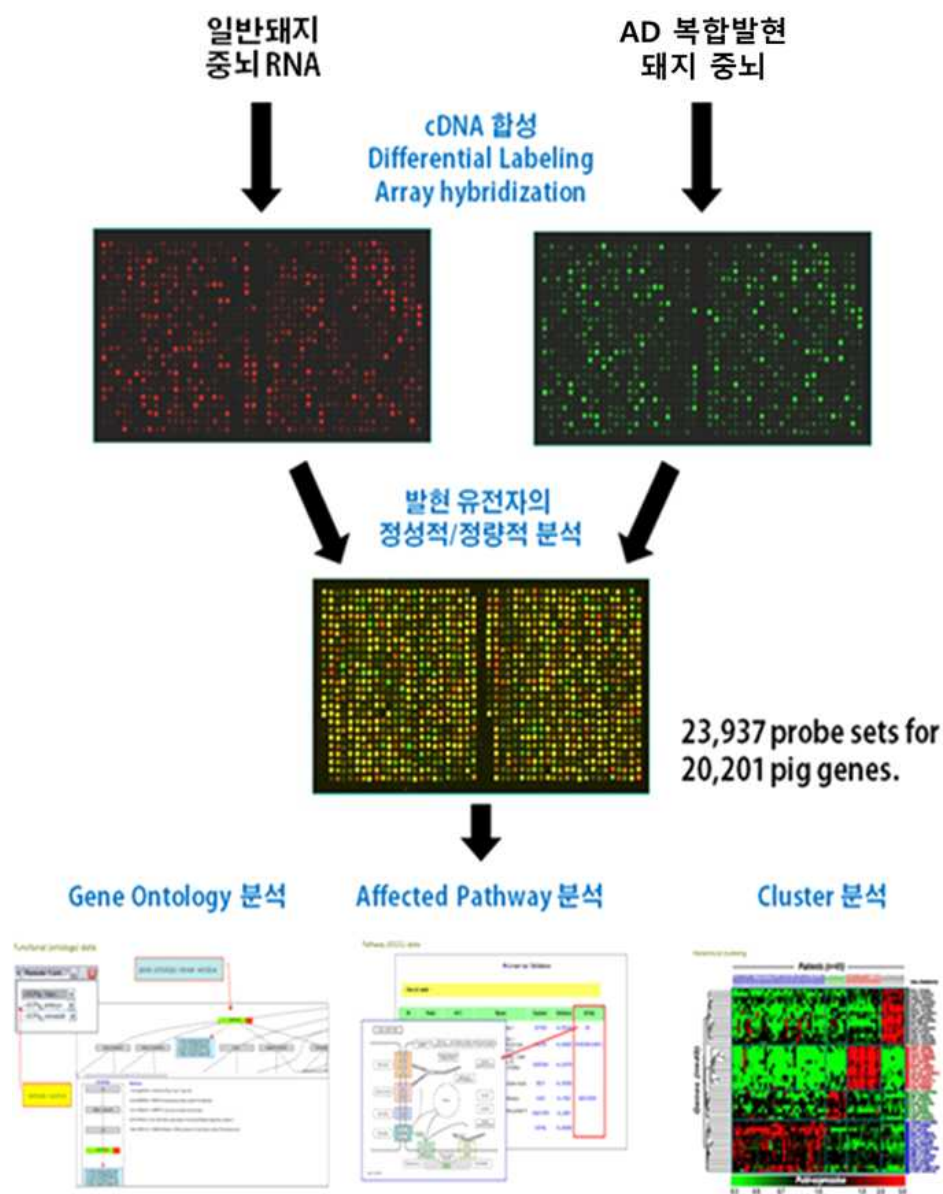


그림 204 AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지 유전자발현 profiling

(2) 연구결과

(가) AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지의 유전학적 검증

① 기초분석; 총 23935 probe를 이용해서 돼지의 20,201 유전자의 발현 (23,256 transcript)을 비교 분석. APP/PS1 복합발현 돼지에서 control에 비해 발현이 1.5배 이상 증가한 probe signal은 666개, 줄어든 probe는 578개 관찰되었다. 증감의 배수를 2배로 조정하면 146개의 probe에서 발현 증가, 128probe에서 발현 저하가 관찰되었다.

② GO Analysis: APP/PS1 복합의해 발현이 영향을 받은 대뇌 유전자들의 기능, 관련된 생명현상에 대한 통계학적 분석 (GO analysis)을 수행하였다. 다양한 생명현상 관련 유전자 군이 APP/PS1 발현에 의해 대뇌에서 영향을 받은 것으로 관찰되었다. 분석한 sample의 경우 어린 돼지의 대뇌로 전진적인 질병인 알츠하이머병의 증상을 아직 보이지 않았던 sample이므로 현재 밝혀진 유전자 list의 병리학적 중요성은 지속적인 관찰이 필요할 것으로 보인다.

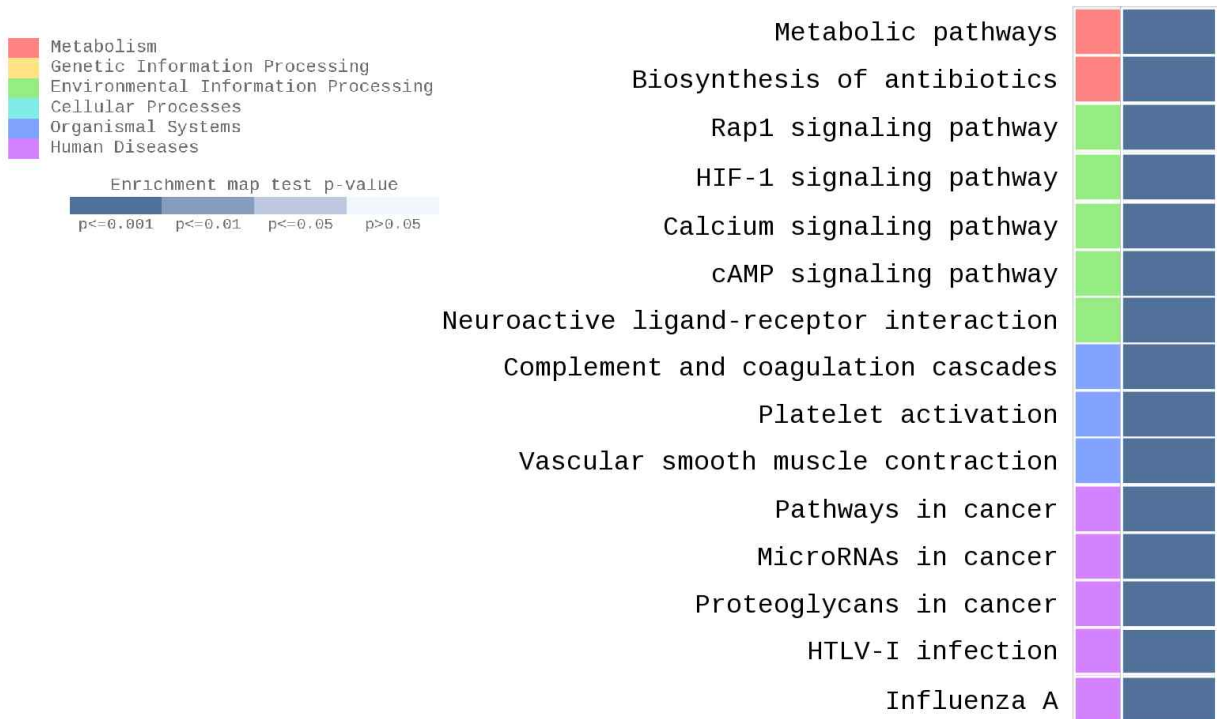


그림 205 Gene Ontology Analysis (KEGG-Pathway)

② AD 병인유전자 복합 발현에 의해 발현에 가장 영향을 많이 받은 유전자 list: APP/PS1 복합 발현 돼지 대뇌와 일반 돼지 대뇌에서 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자 20개 (발현이 올라간 10개 유전자와 발현이 내려간 10개) 유전자의 list는 같다.



분석 과정에서 실제 영향을 많이 받은 것으로 예상되지만 NCBI 등 주요 databale에서 정확히 annotation된 유전자가 없는 경우는 제외하였다. 또한 data의 신뢰성을 확보하기 위해 두 sample 중 하나에서라도 발현이 거의 관찰되지 않은 경우는 발현 차이가 강조되어 나타날 수 있기 때문에 제외하였다. 이때 어떤 sample에서 한 probe의 발현 수준은 Volume이라는 지표로 나타나며 0~12 사이의 값으로 관찰되며 두가지 sample 중 하나에서라도 volume 값이 2이하인 sample에 대해서는 제외하였다.

Gene_Symbol	Gene Accession	Gene Description	Fold Change (APP+PS1/WT)
ALB	NM_001005208	albumin	-9.60
LOC102163738	XR_001298140	uncharacterized LOC102163738	-6.42
AHSG	XM_005652369	alpha-2-HS-glycoprotein	-6.21
LOC102163397	XR_304704	uncharacterized LOC102163397	-5.91
ECHDC1	XM_003121214	ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	-5.22
LOC102163738	XR_001298141	uncharacterized LOC102163738	-5.15
GNAS	NM_001130215	GNAS complex locus	-4.53
LOC102163738	XR_001298139	uncharacterized LOC102163738	-4.14
ASPA	NM_001123077	aspartoacylase	-3.85
LOC100514666	XM_003129130	fibrinogen alpha chain	-3.75
PVALB	NM_001190157	parvalbumin	4.43
EVA1A	XM_013992169	eva-1 homolog A (C. elegans)	4.47
VEGFA	AF041084	vascular endothelial growth factor A	4.55
ENO1	ENSSSCT00000026917	enolase 1, (alpha)	4.61
RPE65	XM_003127931	retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa	5.40
OSGIN2	XM_001925927	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2	5.73
CARTPT	NM_001099925	CART prepropeptide	5.88
GEM	XM_001926976	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	9.47
LOC100518088	ENSSSCT00000020537	uncharacterized LOC100518088	9.64
EMP1	NM_001099940	epithelial membrane protein 1	10.72

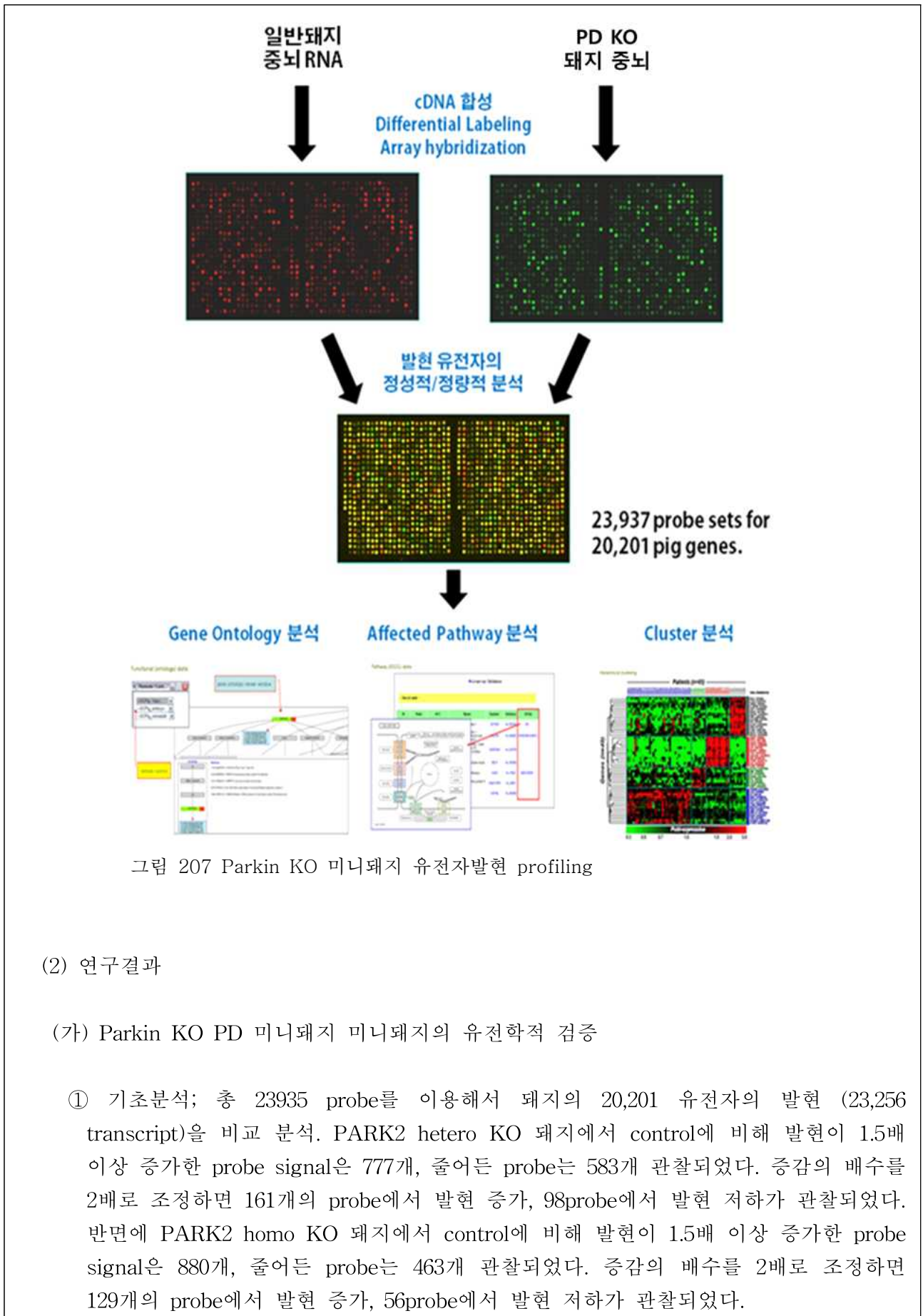
그림 206 다중 유전자 발현 APP 돼지 대뇌와 일반 돼지와 가장 큰 발현 차이를 보인 유전자들

## 9. Parkin KO PD모델 미니돼지의 유전학적 검증

### (1) 연구방법

#### (가) Parkin KO PD 미니돼지의 유전학적 검증

- ① Parkin KO PD 미니돼지의 유전자 발현 profile 비교 분석; Parkin KO PD 미니돼지의 중뇌에서 RNA 분리 후 GeneChip Porcine Genome Array (affymetrix)를 이용하여 (마크로젠, Seoul, Korea) 유전자 발현 분석을 시행하였고 이를 통해 PD모델 돼지에서 발현의 차이를 보이는 유전자의 목록 및 영향을 받은 세포기관 또는 기능을 발굴하였다.



② Parkin KO에 의해 발현에 가장 영향을 많이 받은 유전자 list: Control에 비해 PARK2 유전자의 hetero 녹아웃과 homo 녹아웃에서 동시에 발현의 영향을 받은 유전자 리스트 Top 10 (UP and DOWN)은 아래와 같다. 모든 유전자에서 PARK2 hetero KO와 Homo KO에서 Control에 비해 발현이 변화된 경향이 같다는 점에서 결과의 신뢰성이 높다고 볼 수 있다.

mRNA Accession	Gene Symbol	Gene name	Fold Change (Hetero KO/WT)	Fold Change (Homo KO/WT)
NM_001243181	UBE3A	ubiquitin protein ligase E3A	3.91	4.21
NM_001267694	CP	ceruloplasmin	2.18	3.72
ENSSSCT00000011495	OPALIN	oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein	2.86	3.63
NM_001123139	MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	2.38	3.50
AK234800	TMEM144	transmembrane protein 144	2.26	3.48
AY691688	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	2.27	3.32
NM_214006	CD9	CD9 molecule	2.04	3.23
ENSSSCT00000018136	ANLN	anillin actin binding protein	2.81	3.22
XM_001925962	PLEKHH1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	2.87	3.04
AK391432	EVI2A	ecotropic viral integration site 2A	2.23	3.00
ENSSSCT00000007089	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	-2.80	-2.35
ENSSSCT00000013647	TNMD	tenomodulin	-3.50	-2.38
XM_003129581	LOC100517176	olfactory receptor 52K1-like	-3.00	-2.44
XM_001924336	LIP1	lipase I	-2.17	-2.45
XM_003356711	LOC100625105	Ig kappa chain V-III region NG9-like	-2.54	-2.55
NM_001206347	POSTN	periostin	-3.16	-2.66
ENSSSCT00000018791	SLC16A6	solute carrier family 16 member 6	-2.14	-2.71
ENSSSCT00000001763	unannotated	Uncharacterized protein	-3.05	-2.86
ENSSSCT000000020802	U6.127-201	U6 spliceosomal RNA	-3.36	-3.28
ENSSSCT00000019655	unannotated	Novel Mt tRNA	-4.15	-5.51

그림 208 PARK2 유전자 (Hetero or Homo) KO에 의해 조절된 유전자 리스트

③ 실제 PARK2가 전혀 없는 상태인 homo 녹아웃 돼지의 중뇌에서만 Control 또는 PARK2 hetero 녹아웃 돼지의 중뇌에 비해 발현이 크게 변화된 유전자의 리스트는 아래와 같다.

mRNA Accession	Gene Symbol	Gene name	Fold Change (Hetero KO/WT)	Fold Change (Homo KO/WT)
AK346379	ORM1	orosomucoid 1	-1.18	4.86
NM_001244653	TF	transferrin	1.99	3.42
ENSSSCT00000021278	unannotated	novel transcript	1.39	3.38
AK234926	APOD	apolipoprotein D	1.84	3.35
XM_003357155	LOC100624993	olfactory receptor 52D1-like	1.16	3.26
AK392438	MAG	myelin associated glycoprotein	1.92	3.09
AK389545	CERS2	ceramide synthase 2	1.68	3.08
ENSSSCT00000012858	CLDN11	claudin 11	1.65	3.08
ENSSSCT00000027288	ERBB3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3	1.45	2.94
AK393905	ANXA13	annexin A13	1.83	2.90
GU117604	MAGEL2	melanoma antigen, family L, 2	-1.86	-2.42
ENSSSCT00000020252	unannotated	novel transcript	-1.59	-2.48
XM_003132330	CNTN6	contactin 6	-1.61	-2.49
NM_001144843	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1	1.17	-2.50
AK344332	LOC100522901	unannotated	-1.87	-2.52
AK399531	DB791163	unannotated	-1.41	-2.54
ENSSSCT00000020185	U6.62-201	U6 spliceosomal RNA	-1.05	-2.54
ENSSSCT00000020292	U6.69-201	U6 spliceosomal RNA	-1.98	-2.75
ENSSSCT00000023887	U6	U6 spliceosomal RNA	-1.08	-2.84
ENSSSCT00000021182	SNORD18	Small nucleolar RNA SNORD18	-1.27	-3.04

그림 209 PARK2 유전자 Homo KO에 의해 조절된 유전자 리스트

#### 나. hSNCA 발현 복제 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 다중유전자 조절 PD모델 생산

##### (1) 연구방법

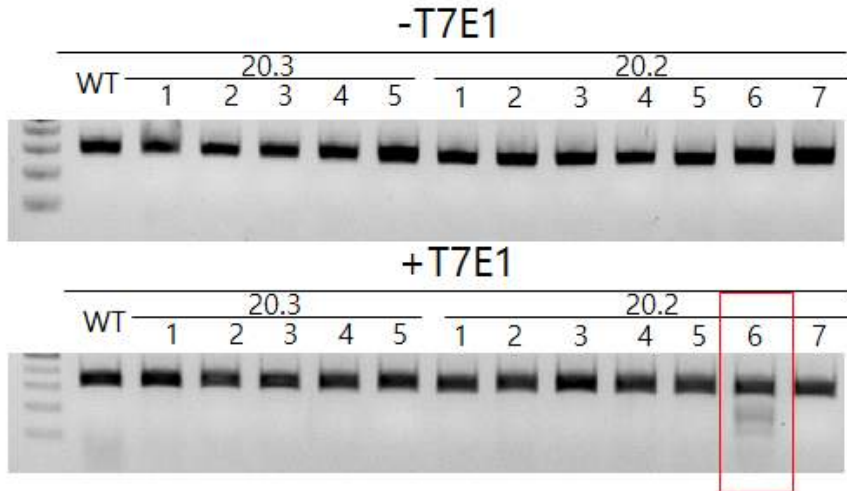
##### (가) 다중유전자 조절 PD 모델에서 PARK2 유전자 녹아웃 검증

- ① 교배를 통해 생산된 다중유전자 조절 PD 모델 돼지의 유전체 DNA를 분리하고 PARK2 돌연변이 위치를 증폭 후 T7E1 실험을 통해 돌연변이 도입 여부를 확인하였다.

##### (2) 연구결과

##### (가) hSNCA 발현 복제 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 산자의 유전학적 검증

- ① 교배를 통해 생산된 다중유전자 조절 PD 모델 후보 돼지의 PARK2 유전자 돌연변이 여부를 분석한 결과 12 마리중 1마리에서 돌연변이가 관찰되었다.



pig-park2_deep sequencing_F1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTgttttccttccttctcacag
pig-park2_deep sequencing_R1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTgaacggtttcgaatgaacac

그림 210 hSNCA 발현 미니돼지와 KO 미니돼지의 교배 통한 산자의에서 Park2 변이 확인

## <2협동: 질환 모델 돼지의 사육 및 관리기법 확립>

### 1. 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 개발 및 미니돼지 유래 원료세포 확보 및 공급

#### 가. PD 유발 신경 독성물질 screening

##### (1) 연구방법

(가) PD 유발 신경독성물질 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 선별

- ① PD 연구자들은 질병의 다양한 측면에서 신뢰할 만한 모델 시스템을 확립하기 위해 노력해 왔고, 지난 수년간 도파민 신경 파괴로 인한 PD를 유발하는 것으로 믿어지는 다양한 독성물질들을 이용한 연구가 진행되어 오고 있다.
- ② 신경독성 물질들이 전체가 아닌 일부분의 PD의 특징들을 나타내지만 PD와 상동하는 검증된 신경독성물질을 이용한 모델은 확립되지 않았다.
- ③ 본 연구에서는 이러한 제한에도 불구하고 다음 3가지 이유로 MPTP PD 모델 확립을 위한 신경독성물질로 논문 및 문헌(Nature Protocols 2(1):141-151, 2007) 조사를 통하여 선별하였다.

(2) 연구결과

(가) PD 모델 미니돼지의 개발을 위하여 신경독성 물질인 MPTP를 선정하였으며, 그 이유는 다음과 같다.

- ① MPTP는 인간과 원숭이에서 PD의 특징을 야기할 수 있는 dopaminergic neurotoxin으로 알려져 있다.
- ② 비록 MPTP를 사용하기 위한 여러 가지 주의사항이 필요하지만 stereotaxic frame과 같은 장비 등이 요구되지 않고 또한 6-hydroxydopamine이나 rotenone과 같이 살아있는 동물의 수술이 필요하지 않다.
- ③ MPTP는 투약 후 뇌 흑질에서 dopamine 경로에 의한 병변을 반복적으로 신뢰할 만 한 수준으로 나타내기 때문이다.

나. 신경독성물질의 투여방법 확립

(1) 연구방법

(가) 신경독성물질의 투여방법에 따른 효과를 확인하기 위하여 피하 및 경동맥 투여 방법을 중심으로 연구를 진행하였다. 피하 및 경동맥 투여를 위하여 MPTP 투여 농도는 체중 1 kg 당 MPTP 1 mg을 0.9% 생리식염수에 희석하여 각각 투여하였다. 신경독성물질의 투여 방법, 일정 및 투여량은 아래의 표와 같이 진행하였다.

표 66 신경독성물질 투여 실험

그룹	개체번호	일령	체중(kg)	투여량
A(피하투여)	H10-028	301	62	(60 mg * 1.17 * 4 days) + (120 mg * 1.17 * 3 days) = 702 mg / 두
	H10-029	301	58	
B(경동맥투여)	W10-047	500	56	12 mg * 1.17 * 7 days = 98 mg / 두
	W10-056	457	66	
C(대조군)	B10-004	530	48	-
	B10-005	530	65	
	W10-022	580	88	

(나) 300일령 이상의 미니피그를 선발하여 각 그룹별로 투여경로 및 투여량을 달리하여 진행하였다.

(다) 사육조건은 습도 45~55%, 온도 23~25℃, 12시간 간격의 명암을 유지할 수 있는 차폐시설에서 사육하였다.

(라) 각 개체 별 사료섭취량, 섭취 모습, 배변활동, 걸음걸이(다리움직임), 서 있는 자세 및 누워있는 자세 등의 모든 행동을 관찰 후 수기로 작성하였다.

## (2) 연구결과

### (가) 피하접종

① 접종종료 1일차에 가만히 서 있는 모습이 관찰되었으며, 2일차에 앞다리의 무릎은 굽히고 있는 것이 관찰되었다. 또한, 5일차에는 누워있는 모습이 자주 관찰되었으며, 대조군에 비해 사료섭취량이 20% 수준으로 관찰되었다.

② 피하접종 개체 중 1두는 접종종료 7일차에 폐사하였다.



그림 211 가만히 서 있는 모습(1일차, 좌측 위), 무릎을 굽히고 있는 모습(2일차, 우측 위), 그림 3. 누워있는 모습(5일차, 좌측 아래)

③ 접종 종료 14일이 경과된 시점에도 사료섭취에 대한 의욕이 없었으며, 급수대를 통해 직접 물을 섭취하지도 못하였다. 보행은 느리고 한 자리에 가만히 서 있는 모습이 관찰되었다.

- ④ 접종 종료 24일차에는 사료는 적극적으로 섭취를 하지만 음수대를 통한 물 섭취는 불가능한 상태로 유지되었다.
- ⑤ 접종 종료 26일차에는 돈방 밖으로 탈출을 하는 모습이 관찰되었다. 접촉 및 사물에 대한 반응이 없고, 능동적인 수분 섭취는 불가능하였다.



그림 212 피하접종 개체의 돈방 탈출 모습(26일차)

- ⑥ 접종 종료 29일차에는 보행 및 서 있는 자세 등은 대조군과 동일하게 정상적인 모습을 보였고, 사료 섭취도 정상상태로 회복된 것을 확인하였다. 물의 섭취는 아직 회복되지 않은 상태로 관찰 되었다.
- ⑦ 접종 종료 50일차에 물체에 대한 반응을 보이기 시작하였으며 급수대에 대한 기억이 회복되어 음수 섭취도 회복되는 모습이 관찰되었고, 56일차에는 모든 행동이 정상으로 회복된 것이 관찰되었다.

(나) 경동맥 접종

- ① 접종 종료 3일차에 일어나지 못하고, 다리로 몸을 지탱하지 못하는 모습이 관찰되었다.



그림 213 일어나지 못함 (3일차)

- ② 접종 종료 5일차 오전에는 두 개체 모두 기립한 모습을 보이기도 하였지만 오후에



는 일어나지 못하는 행동이 관찰되었다. 또한 급여한 사료는 대조군에 비해 약 30~40 % 정도의 수준으로만 섭취하는 것이 확인되었다.



그림 214 기립 불능(5일차)

③ 접종 종료 7일차에는 정상적으로 기립이 가능했으며, 자연스러운 보행이 가능했고 정상상태로 회복되는 모습을 보였다.

④ 접종 종료 14일차에는 보행 및 서 있는 자세 모두 정상적인 행동이 관찰되었으며, 사료섭취와 음수의 섭취도 모두 정상으로 회복된 것이 확인되었다. 대조군과 마찬가지로 사료섭취에 대한 의욕이 강했고 움직임도 활발한 것이 관찰되었다.



그림 215 경동맥 투여 개체(14일차)

⑤ 신경독성물질인 MPTP를 피하투여와 경동맥투여의 투여경로를 달리하여 투여한 결과 피하투여의 경우 PD 병변의 증상이 약 56일간 지속되었다. 반면에 경동맥 투여의 경우는 약 15일 정도로 피하투여에 비해 그 기간이 짧게 관찰되었으며, 추후 신경독성물질 투여의 경로를 피하투여 방법으로 채택하였다.

#### 다. 미니돼지 유래 원료세포 확보 및 공급

(1) 연구방법

(가) 개체 선별

- ① 성성숙 이후의 미니돼지 중에서 체중 및 질병 모니터링 결과를 확인하여 형질전환 복제돼지 생산에 적합한 모돈을 선발한다.
- ② 선발된 모돈은 동일한 종의 수컷을 이용하여 교배를 진행하고, 교배는 발정확인 후 총 3회에 걸쳐 실시한다.
- ③ 교배 21일 경과 후 초음파 임신진단기를 이용하여 임신여부를 확인한 후 임신이 확인되면 제 1 세부과제의 형질전환 복제돼지 생산을 위해 공급한다.

(2) 연구결과

(가) 개체 공급

- ① 1차 공급 개체는 Hanford strain으로 공급 당시 1,628일령의 모돈으로 2011년 7월 23일 교배 후 임신 31일령인 2011년 8월 23일에 공급을 하였다.
- ② 2차 공급 개체는 Sinclair strain으로 공급 당시 947일령의 모돈으로 2012년 4월 12일 교배 후 임신 28일령인 2012년 5월 10일에 공급을 하였다.

2. 신경독성물질 투여를 통한 PD 모델 미니돼지 조직병리 분석

가. 논문과 문헌 검색을 통한 항체 조사 및 예비 실험

(1) 연구방법

(가) 기 보고된 논문(Kish SJ 등, 2001; Zhu 등, 2000; Zhu 등, 1999) 및 문헌을 참고하여 흑색질 신경세포 면역염색용 항체를 선정하여 정상 동물에 적용 실험을 통해 프로토콜의 재현성 및 적정성을 평가하였다. 항체의 선정은 4가지 항목을 고려하여 선정하였다.

- ① 원하는 부위에만 반응할 수 있도록 특이성이 좋은 항체
- ② 포르말린 고정 조직에 면역염색이 가능한 항체
- ③ 가급적 돼지와 설치류 등 실험동물 모두에게 반응이 가능한 항체
- ④ 국내 수입이 어렵지 않아 구입이 용이한 항체

(나) 정상 마우스를 이용한 예비실험을 통해 뇌 조직의 삭정부위 방법 및 면역조직화학 염색 실험방법을 수립하였으며, 이를 기반으로 정상돼지의 병리조직학적 평가를 진행

하였다.

(다) 마우스의 뇌를 이용한 병리조직학적 평가를 실시하여 정상돼지 및 PD모델 미니돼지에서의 적용을 위해 선정된 항체의 결과를 비교, 평가하였다.

(2) 연구결과

(가) 동물실험에 이용된 적정 1차 항체는 총 5개로 요약되어 그 중 두 종류의 항체를 우선 선정하여 면역염색 조건 설정에 보다 용이한 항체를 최종 선택하였다.

표 67 병리조직 분석을 위한 항체 조사

항체	제조사	희석비율	장단점
Mouse anti-tyrosine hydroxylase	Boehringer Mannheim	1 : 500	장: 국내 논문이므로 항체 구입에도 어렵지 않을 것으로 판됨 단: 파립핀 절편에 대한 결과 없음
Rabbit anti-tyrosine hydroxylase	Pel Freez	1 : 600	장: 돼지에 적용가능(결과사진 있음) 단: 다른 동물종 적용 확인 안됨 국내 정식 수입 업체 확인 중
Rabbit anti-tyrosine hydroxylase	Abcam	1 : 400	장: 돼지적용 가능(결과사진 있음) 단: Pel Freez 제품과 세부 비교 필요
Rabbit anti-tyrosine hydroxylase	Invitrogen	1 : 1000	장: 수입 가능 업체 단: 동물 적용 사례 확인 못했음
Mouse anti-human tyrosinase	DAKO	1 : 100	장: 수입 가능 업체 단: 동물 적용 사례 확인 못했음

(나) 우선 선정된 두 종류의 항체를 비교, 평가하기 위하여 면역조직화학염색을 진행하였다.

① 면역조직화학 염색 결과 특정 뉴런의 세포질에만 갈색의 양성 반응을 확인할 수 있었다.

표 68 면역조직화학 염색 실험법

단계	적용기법 및 시약
대상조직	10% 중성완충포르말린 고정 뇌 조직, 파라핀 블록
슬라이드 글라스	Silane coating slide (MUTO PURE CHEMICALS, Japan)
내인성 과산화효소 억제제	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBS
항원성 부활	가열법(citrate buffer solution, pH 6.0)
1차 항체	Rabbit anti-tyrosine hydroxylase (Abcam, 1 : 500) 37°C, 1시간
2차 항체	Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse 37°C, 40분
발색	DAB (diaminobenzidine)

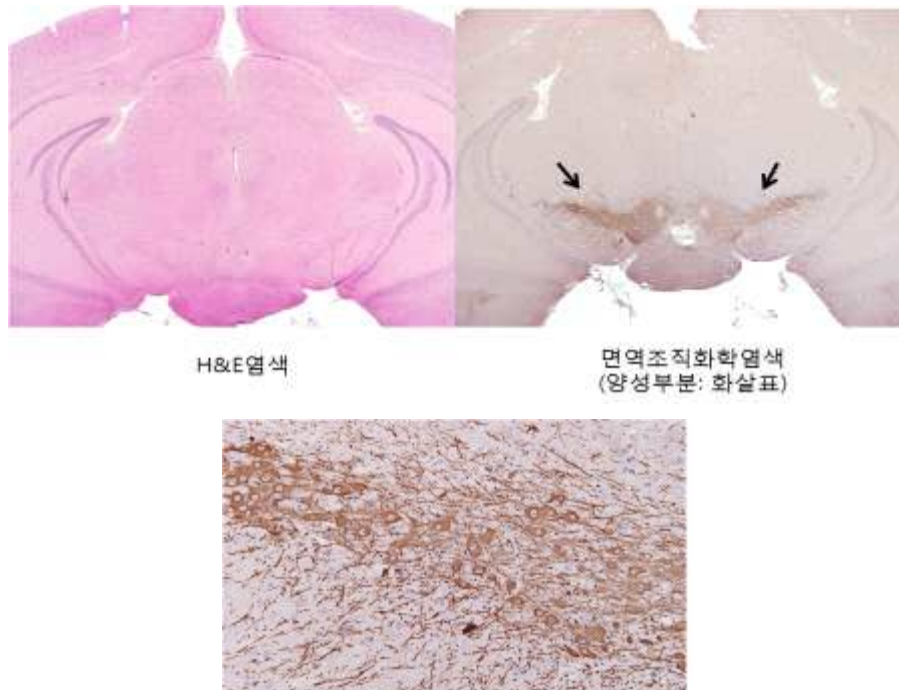


그림 216 면역조직화학염색 결과(갈색의 양성반응 확인)

② 동일한 조직 및 면역조직화학 염색 방법을 이용하여 선정된 두 종류의 항체를 비교, 평가하여 실험한 결과 두 종류의 항체에서는 큰 차이가 없었다.

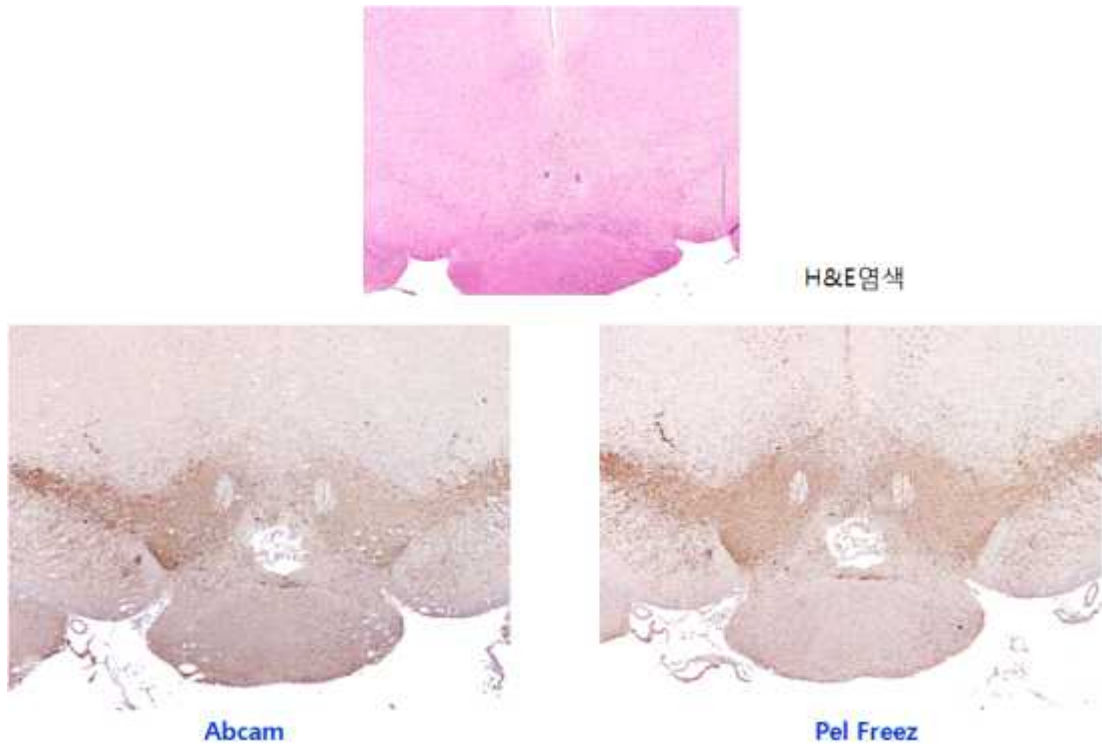


그림 217 항체 별 면역조직화학 염색 결과 비교 - 저배율

(다) 정상돼지의 뇌 조직을 이용한 병리조직학적 평가

- ① 예비실험에서 도출된 실험방법을 토대로 정상돼지의 뇌 조직을 이용한 병리조직학적 평가를 실시하였다.
- ② 검체는 정상돼지를 이용하였으며, 일반적인 10% 중성완충포르말린용액에 고장한 뇌 조직을 사용하였다.
- ③ 뇌 부위 삭정은 중뇌 직전을 시작으로 하여 일정간격으로 연속 삭정하여 5~6개의 부위를 준비하였다.



그림 218 정상돼지의 뇌 부위 삭정

④ 면역조직화학 염색 실험은 마우스실험과 동일한 방법으로 진행하였다.

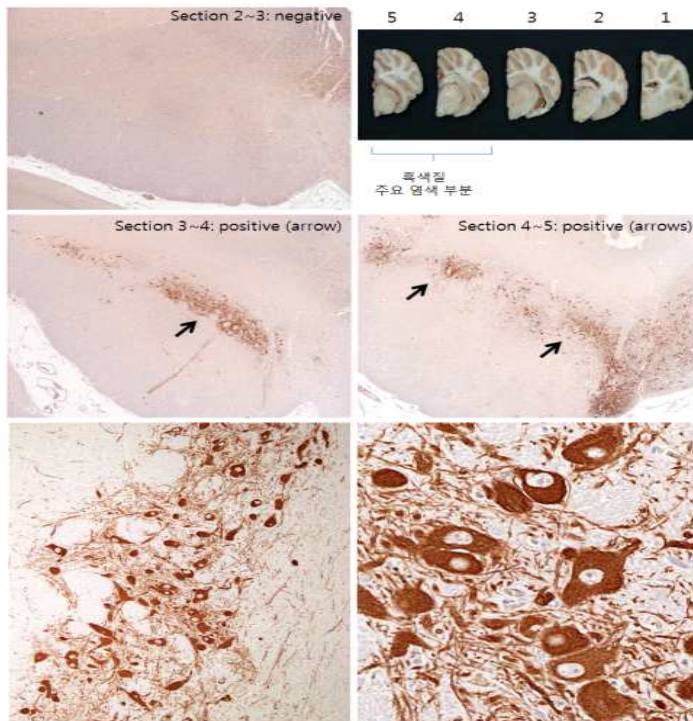


그림 219 면역조직화학 염색 결과. 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 신경세포들로 구성되어 있는 흑색질 구역 확인.

⑤ 선정된 두 종류의 항체를 이용하여 염색을 실시하였으며, 희석배율은 1:500에서 1:1,000으로 변경하여 평가하였다. 희석배율은 달리 하여도 차이는 나타나지 않았으며, 양성 세포의 DAB 발색 시간에서는 'abcam'사의 제품이 보다 신속하게 반응하는 것이 관찰되었다. 따라서 PD모델 미니돼지의 평가를 위한 1차 항체는 'abcam'사의 항체를 우선 적용하는 것을 결정하였다.(Ettrup KS 등, 2010)

표 69 적용항체 경과 비교

제조사	희석비율	반응시간
<b>Pel Freez</b>	1 : 1,000	1분 내외
<b>abcam</b>	1 : 1,000	50초 이내

(라) PD 모델 미니돼지의 병리 조직 검사

(라) PD 모델 미니돼지의 병리 조직 검사

- ① 연속 절편 중 흑색질 부위가 제대로 관찰되는 두 부위 (부위 1, 부위 2)를 선정하여 PD 모델 미니돼지 및 일반 미니돼지를 비교하여 관찰한 결과 흑색질 면역조직화학 염색 양성 신경세포는 MPTP를 이용하여 PD를 유발한 미니돼지와 정상 미니돼지에 게서 차이를 확인 할 수 있었다.
- ② MPTP에 의한 흑색질 신경세포의 수적 감소 경향을 확인할 수 있었으며, 이는 생 존 당시의 신경증상과의 상관성이 있다는 것을 유추할 수 있다.

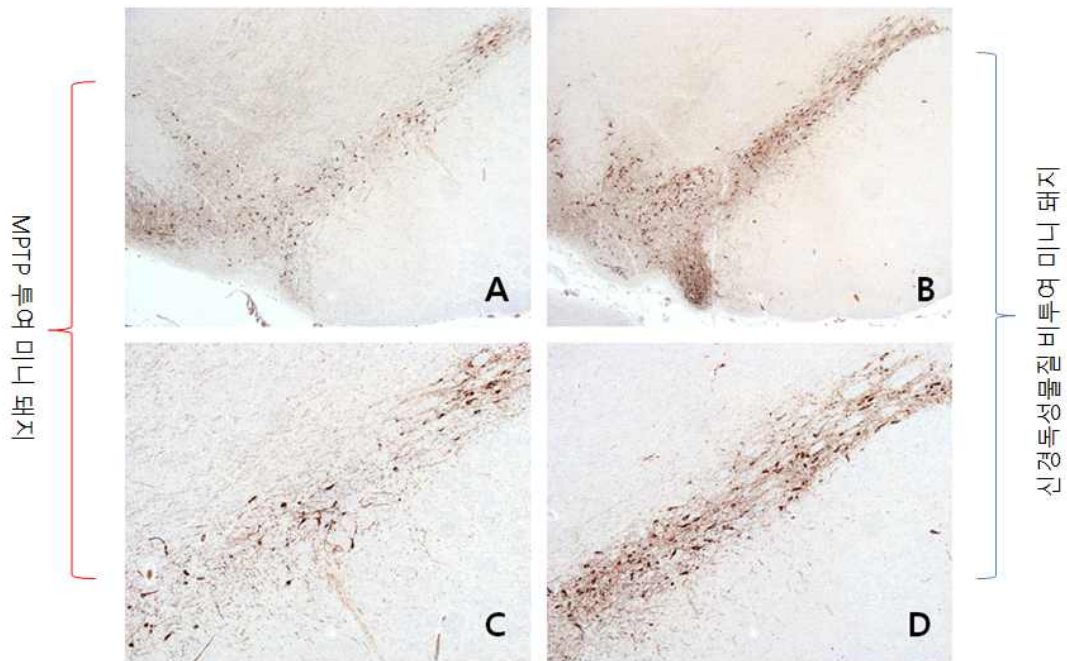


그림 220 MPTP 투여 미니돼지 및 정상 미니돼지의 면역조직화학염색(부위 1)

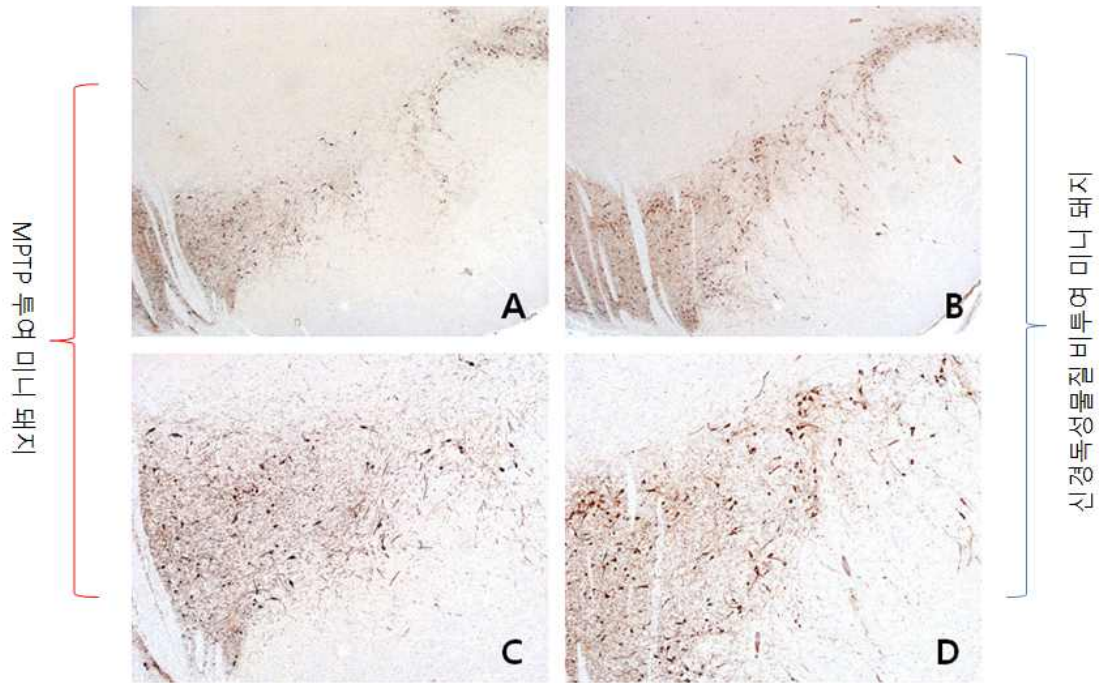


그림 221 MPTP 투여 미니돼지 및 정상 미니돼지의 면역조직화학염색(부위 2)

### 3. APP 유전자 조절 미니돼지의 번식능 평가 및 사육기법 확립

#### 가. APP 유전자 조절 미니돼지 관리

##### (1) 연구방법

##### (가) APP 유전자 조절 미니돼지의 입식

- ① 2012년 8월 31일 APP 유전자 조절 미니돼지 3두가 입식하였다. 1두(AD-2)는 입식 당일 폐사하였으며, 당시 체중은 332 g으로 저체중이었으며, 좌측 전지가 굵은 비정상적인 상태의 APP 유전자 조절 미니돼지로 확인되었다.
- ② 958 g으로 입식된 AD-3 개체는 12일령인 2012년 9월 12일 폐사하였으며, 폐사 체중은 960 g이었다.
- ③ AD-1 개체는 정상 미니돼지와 체중의 차이가 확인되어 32주령부터 정상 급여량보다 증량하여 사료를 급여하였다.





그림 222 APP 유전자 조절 미니돼지(AD-1)

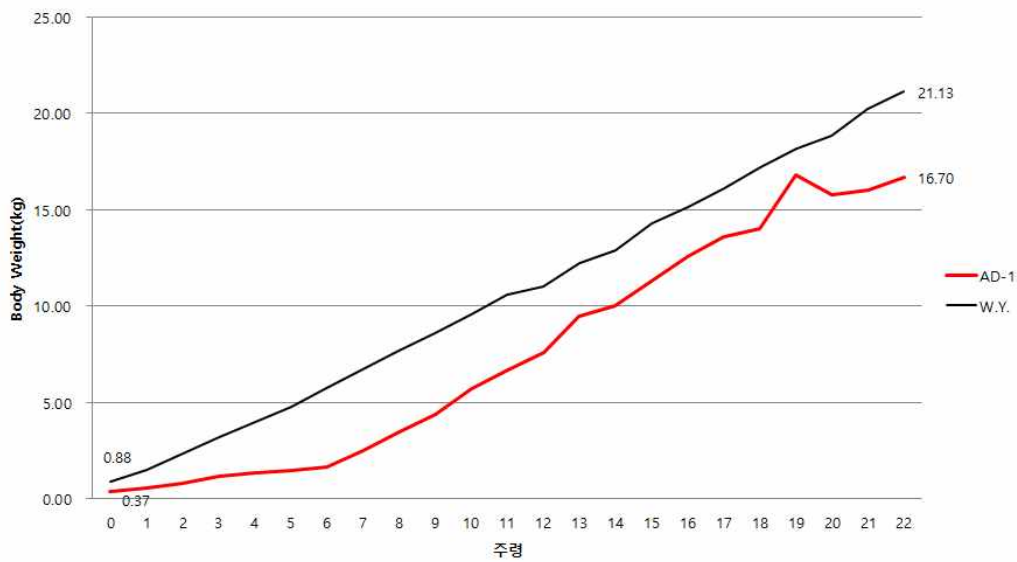


그림 223 APP 유전자 조절 미니돼지(AD-1)과 정상 미니돼지의 체중 비교

## 나. APP 유전자 조절 미니돼지의 번식능력 확인

### (1) 연구방법

(가) 발정 확인

- ① 성성숙 일령(분만 6개월령 이상)에 도달한 APP 유전자 조절 미니돼지의 발정 확인을 진행하여 발정 적기를 확인한다.

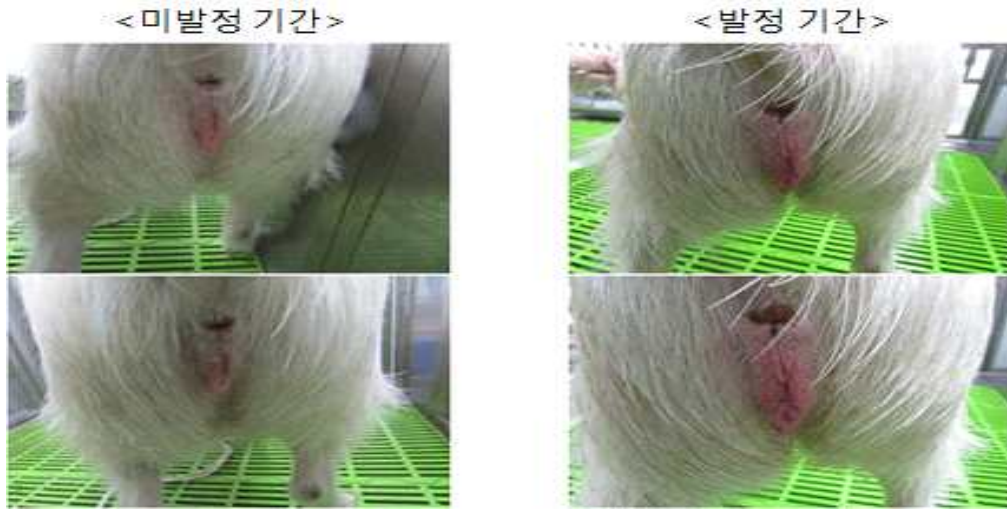


그림 224 APP 유전자 조절 미니돼지의 발정 및 미발정 기간의 외음부 차이(ADF-1)

- ② 발정 확인은 2회/일 진행하며, 발정이 확인되면 wild type의 미니돼지와 교배를 진행한다.

(나) 교배

- ① APP 유전자 조절 미니돼지의 생산에 사용된 유전자와 동일한 개체의 종(Hanford strain)의 Wild type 미니돼지 수컷을 이용하여 자연교배를 실시하였다.



그림 225 Wild type 미니돼지와 APP유전자 조절 미니돼지의 교배

② 1차 번식을 종료한 ADF-1 개체는 2014년 9월 18일 재귀발정이 확인되어 교배를 진행하였으나 임신이 되지 않았으며, 그 이후의 교배 내역은 다음 표와 같이 진행되었다.

표 70 APP 유전자 조절 미니돼지(ADF-1)의 번식을 위한 교배

일정	내용
2014년 9월	18일 발정이 확인되어 1차 분만 시 사용한 웅돈과 교배 →미임신
2014년 10월	13일 발정이 확인되어 교배 진행 →미임신
2014년 10월 31일	너 영상 촬영을 위해 반출 후 2015년 11월 26일 입식
2014년 12월	12일 발정이 확인되었으나, 교배 웅돈의 승가 의욕 상실로 교배 실패
2015년 1월	미약 발정
2015년 2월	미약 발정
2015년 3월	3개월 간 미약발정으로 교배의 어려움이 있어 호르몬제 처치 결정 3월 26일부터 Regumate 투여 개시
2015년 4월	4월 16일 Regumate 투여 종료 4월 17일 PG 600 주사 4월 21일~24일 새로운 웅돈을 이용하여 교배 진행

③ 지속적인 미약발정으로 인해 호르몬 처치를 진행하여 번식을 유도하기로 하였으며, 이 때 사용된 호르몬제는 Regumate와 PG600이다.

④ Regumate는 사료에 첨가하는 progesterone 성분이 함유된 호르몬제로 투여 중단 후 5일 이내 발정이 오는 호르몬제이다. 해당 호르몬제를 2015년 3월 26일부터 2015년 4월 16일까지 21일간 투여하였으며, 성선자극호르몬제인 PG 600을 2015년 4월 17일 주사하여 발정을 유도하였다.

## (2) 연구결과

### (가) ADF-1 1차 임신

① APP 유전자 조절 미니돼지는 발정확인을 개시한 시점부터 총 3회에 걸쳐 확인이 되었고, 첫 발정은 교배적기가 아니라 2번째 발정 시부터 교배를 실시하였다.

- ② 1차 교배는 2014년 1월 3일부터 2014년 1월 3일간 진행하였으나 임신이 되지 않았고, 2차 교배는 2014년 2월 15일 진행하여 임신이 확인되었다.
- ③ APP 유전자 조절 미니페지의 임신진단을 교배 26일령부터 매 주 확인하여 임신 유지와 태아의 크기를 확인하였다.



그림 226 APP 유전자 조절 미니페지의 임신진단 영상.(1차 임신)

(나) ADF-1 2차 임신

- ① 2015년 4월 21일 교배를 진행한 결과 임신이 확인되었으며, 주기적인 임신진단으로 임신 유지를 확인하였다.

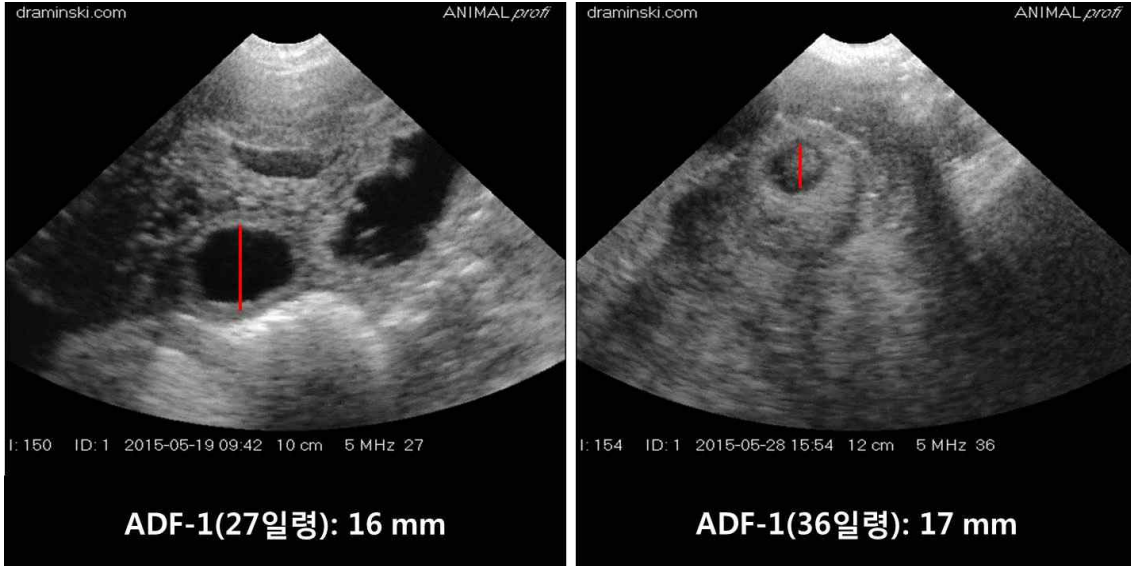


그림 233 APP 유전자 조절 미니돼지의 임신진단 영상.(2차 임신)

(다) 1차 분만

- ① APP 유전자 조절 미니 돼지의 임신기간 일반 돼지의 평균 임신기간과 동일한 기간인 114일령으로, 2014년 6월 9일 분만을 하였다.  
 ② 분만한 자돈은 총 8두로 정상 미니돼지의 평균 분만자돈 수 보다 많은 산자수를 기록하였다.

표 71 APP 유전자 조절 미니돼지 및 정상 미니돼지의 번식능력 비교

	APP유전자 조절 미니돼지	정상 미니돼지
임신 기간	114일	113.8일
총 분만 자돈 수	8두	6.4두
1산차 분만 자돈 수	8두	5두
자돈 평균 체중(kg)	0.614	0.80
암/수	2 / 6	3 / 3.4

- ③ 총 8두의 분만자돈 중 3두(ADF-1-6, ADF-1-7, ADF-1-8)는 분만 직후 폐사하였으며, 3두(ADF-1-1, ADF-1-3, ADF-1-5)는 splayed leg 증상이 심하여 상태가 매우 불량하였다.

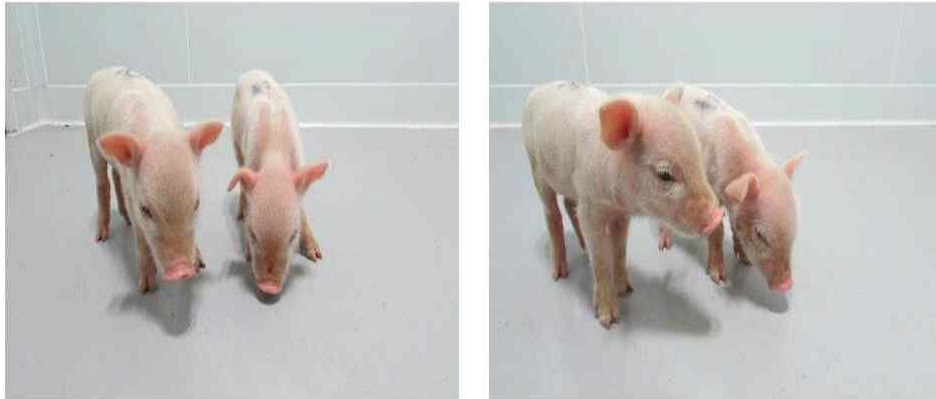


그림 234 APP 유전자 조절 미니돼지 자돈(분만 1일령)

표 72 APP 유전자 조절 미니돼지 자돈의 상태

Date		2014/6/9	2014/6/10	2014/6/11	2014/6/12
Age(Days)		0	1	2	3
개체번호	성별	체중(kg) 및 특이사항			
ADF-1-1	Male	0.510	Splayed leg 증상으로 sacrifice		
ADF-1-2	Female	0.701	0.786	0.910	1.024
ADF-1-3	Male	0.611	Splayed leg 증상으로 sacrifice		
ADF-1-4	Male	0.636	0.753	0.846	0.851
ADF-1-5	Male	0.547	Splayed leg 증상으로 sacrifice		
ADF-1-6	Female	0.703	분만 후 폐사(상태 불량 및 압사)		
ADF-1-7	Male	0.548			
ADF-1-8	Male	0.659			
Average		0.614	0.770	0.878	0.938

④ 생존한 ADF-1-2 개체는 모든의 포유능력 부재로 인해 정상 이유일령인 35일령이 아닌 9일령에 이유를 실시하였다. 고품사료의 섭취가 불가능 하기에 젓병을 이용하여 분유를 공급하는 인공포유를 진행하였다.

⑤ 분만 29일령에는 고품사료 섭취가 가능해져 펠렛사료를 급여하여 관리를 시작하였다.

(라) 2차 분만

① 2015년 4월 21일 교배를 진행한 ADF-1 개체의 분만예정일은 2015년 8월 13일이지만, 2015년 8월 18일에 분만을 하였다.

② 총 5두의 산자를 분만하였으나, 2두는 분만 당일 폐사(2, 3 번), 1두는 1일령에 폐사

(4번)하였다.



그림 235 ADF-1 분만 자돈(2차 분만)

③ 생존 개체 2두(정상 및 후지기형)는 제 1세부 기관에 전달하였다.

(마) APP 유전자 조절 미니돼지의 분만 자돈 관리 방법

- ① 정상적인 미니돼지보다 포유능력이 떨어지는 것이 확인되어 일반 미니돼지의 초유를 채취하였으며, 이와 함께 대용유를 이용한 인공 포유 방법도 병행하였다.
- ② 정상 미니돼지에게서 같은 증상이 발생되면 실시하였던 관리 방법을 개선하여 아래 표와 같이 자돈의 관리를 실시하였다.

표 73 관리 방법의 개선

구분	기존방법	개선방법
사료(대용유) 급여 / 음수량	20g + 100ml/회 (아침, 저녁 2배 급여)	섭취량에 따른 탄력적 급여
철분주사	1차: 분만 3일령 2차: 분만 21일령	개체 상태에 따른 주사
관리 Isolator 온도(℃)	27~31	30~34
관리 횟수	3~4회/일(6~8시간 간격)	6~7회/일(3.5~4시간 간격)
기타	돈방 바닥에 멸균 패드 설치 땀줄 및 꼬리 부위 수시 소독	

#### 다. APP 유전자 조절 미니돼지의 혈청학적 분석

(1) 연구방법

(가) APP 유전자 조절 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 돼지와 비교하였다.

① 혈액의 채취는 경정맥에서 채취하였으며, 19G\*38 mm의 10 ml syringe를 이용하여 혈액 샘플을 채취하였으며, 채취한 혈액은 SST tube에 담아 생화학 분석을 실시하였다.

(2) 연구결과

(가) 총 23개 항목에 대한 검사를 진행하였으며, 검사 결과서는 다음 표와 같다.

표 74 APP 유전자 조절 미니돼지의 혈액 생화학 분석 결과

항목	Unit	ADF-1	정상 미니돼지 (n=8)	편차
ALT	U/L	37.9	37.18	0.51
AST	U/L	38.3	38.48	0.13
ALP	U/L	57.3	41.55	11.14
GGT	U/L	13	54.83	29.58
CPK	IU/L	1044	564.17	339.29
LDH	U/L	390	380.46	6.75
T.BIL	mg/dL	0.28	0.16	0.09
TG	mg/dL	54	36.83	12.14
T.CHO	mg/dL	80	58.67	15.08
LDL	mg/dL	36	33.21	1.97
HDL	mg/dL	39	23.63	10.87
TP	mg/dL	7.82	7.96	0.1
ALB	g/dL	4.51	3.87	0.45
A/G	Ratio	1.36	0.95	0.29
GLU	mg/dl	66.1	59	5.02
AMY	U/L	1620	1406.88	150.7
BUN	mg/dL	10.4	20.16	6.9
CREA	mg/dL	1.25	1.25	0
CA	mg/dL	10.61	9.92	0.49
IP	mg/dL	7.23	5.85	0.98
Na	mmol/L	142.04	143.16	0.79
K	mmol/L	4.38	4.49	0.08
Cl	mmol/L	97.88	101.54	2.59



#### 4. hSNCA 발현 미니돼지의 번식능 평가 및 사육기법 확립

##### 가. hSNCA 발현 미니돼지 입식

- ① 2013년 7월 5일 입식된 PDF-4 개체는 7월 18일까지 연변증상이 관찰되고 주저앉아서 엉덩이를 끌고 이동하는 행동이 관찰되기도 하였다 (2013년 7월 10일).



그림 236 hSNCA 발현 미니돼지

- ② 2013년 10월 31일 입식된 3두(PDF-16, PDF-18, PDF-20)은 입식 당시 평균 체중이 3.67 kg 양호한 상태로 입식되었다.
- ③ PDF-16 개체는 평상시에도 침 흘리는 모습이 자주 관찰되었고 2013년 11월에는 활동성이 저하되어 사료섭취가 불량했으며, 구토 증상 및 콧물도 관찰되어 대사촉진제인 카토살 3 ml 이근부에 주사 하여 회복되었다.



그림 237 PDF-16 침 흘리는 모습

④ 이후 2013년 12월 정상으로 회복되어 다른 개체들과의 체중 편차를 줄이기 위하여 사료 급여량을 증가시켰으며, 2014년 1월부터는 정상량으로 동일하게 급여하였다.

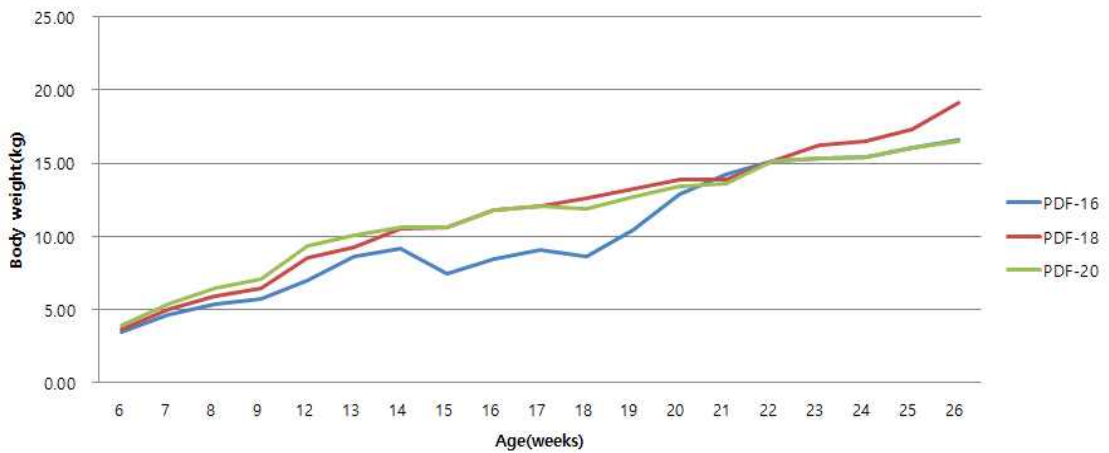


그림 238 hSNCA 발현 미니돼지 주령 별 체중

⑤ hSNCA 발현 미니돼지는 다음 표의 일정으로 백신을 접종하여 관리를 진행 하였다.

표 75 hSNCA 발현 미니돼지 백신 이력

개체번호	백신 이력
PDF-4	PCV2 1 <sup>st</sup> (14/10/24) PCV2 2 <sup>nd</sup> (15/1/27)
PDF-16	HE(13/11/16)
PDF-18	FMD 1 <sup>st</sup> (14/12/29)
PDF-20	FMD 2 <sup>nd</sup> (15/1/26) FMD 3 <sup>rd</sup> (15/6/1_PDF-16, 15/6/19_PDF-18)

## 나. 혈청학적 특성

### (1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 미니돼지와 비교

- ① hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 돼지와 비교하였다.
- ② 혈액의 채취는 경정맥에서 채취하였으며, 19G 의 10 ml syringe를 이용하여 혈액 샘플을 채취하였으며, 채취한 혈액은 SST tube에 담아 생화학 분석을 실시하였다.

표 76 hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석 결과(PDF-4)

Parameter	Unit	1차	2차	3차	4차	5차
ALT	U/L	33.2	17.7	9.7	13.3	42.1
AST	U/L	27.8	52.1	41.8	56.9	91.4
ALP	U/L	39.8	68.5	29.9	-	62.9
CPK	IU/L	346	393	347	1568	781
LDH	U/L	4.93	6.81	7.58	9.29	14.33
TG	mg/dL	107	68	43	38	46
T.CHO	mg/dL	113	129	99	118	116
TP	g/dL	8.25	7.83	8.19	-	8.93
ALB	g/dL	3.15	2.38	1.77	-	1.93
A/G	Ratio	0.62	0.44	0.28	-	0.28
GLU	mg/dL	68.1	68.8	17.6	68.1	42.8
CREA	mg/dL	0.26	3.21	0.81	0.04	0.82
CA	mg/dL	9.85	10.59	8.94	-	8.52
IP	mg/dL	7.48	8.6	8	7.7	8.07

표 77 hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석 결과(PDF-16)

Parameter	Unit	1차	2차	3차	4차
ALT	U/L	39.9	28.7	25.9	16.5
AST	U/L	100.1	41.3	35.4	23.8
ALP	U/L	72.1	53.4	55.2	-
CPK	IU/L	7184	2232	569	1214
LDH	U/L	18.95	8.75	4.93	6.33
TG	mg/dL	70	47	55	95
T.CHO	mg/dL	136	145	117	81
TP	g/dL	7.01	8.67	8.72	-
ALB	g/dL	4.08	4.56	3.83	-
A/G	Ratio	1.39	1.11	0.78	-
GLU	mg/dL	61.5	56.5	58.7	62.2
CREA	mg/dL	0.04	4.86	1.17	0.44
CA	mg/dL	10.56	11.02	10.64	-
IP	mg/dL	7.19	7.1	6.39	5.56

표 78 hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석 결과(PDF-18)

Parameter	Unit	1차	2차	3차	4차
ALT	U/L	27.1	31.9	25	23.7
AST	U/L	28.1	46.5	31.2	21.7
ALP	U/L	68.1	56.5	59.8	-
CPK	IU/L	221	925	219	418
LDH	U/L	4.31	5.79	5.03	5.16
TG	mg/dL	70	52	69	50
T.CHO	mg/dL	127	100	152	79
TP	g/dL	7.89	8.26	9.48	-
ALB	g/dL	4.07	4.45	4.1	-
A/G	Ratio	1.07	1.17	0.76	-
GLU	mg/dL	64.8	68.8	61.8	72.9
CREA	mg/dL	0.17	4.31	1.08	0.06
CA	mg/dL	11.07	11.01	11.32	-
IP	mg/dL	7.29	6.89	7.66	5.79

표 79 hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석 결과(PDF-20)

Parameter	Unit	1차	2차	3차	4차	5차	6차
ALT	U/L	31.4	35.7	37.6	34.5	43.6	45.4
AST	U/L	29.9	35.8	32.5	32.9	78.1	43.1
ALP	U/L	64.9	74.3	64.9	-	31	51.9
CPK	IU/L	276	239	435	237	1800	379
LDH	U/L	4.29	4.49	5.14	5.59	7.82	7.38
TG	mg/dL	120	101	81	31	42	112
T.CHO	mg/dL	123	109	96	85	111	89
TP	g/dL	8.5	8.36	9.27	-	8.9	8.11
ALB	g/dL	3.84	3.96	3.68	-	4.02	3.19
A/G	Ratio	0.82	0.9	0.66	-	0.82	0.65
GLU	mg/dL	69.5	51	63.1	75	66.4	69.4
CREA	mg/dL	0.45	2.85	1.29	0.05	1.42	1.05
CA	mg/dL	11.13	10.55	10.77	-	9.77	10.21
IP	mg/dL	7.39	6.54	6.42	7	6.05	4.58

#### 다. hSNCA 발현 미니돼지 번식능력 확인

##### (1) 연구방법

##### (가) Wild type 과의 교배

- ① hSNCA 발현 미니돼지의 번식을 통한 대량생산을 위해 매일 발정 확인을 진행하여 발정이 확인된 개체들을 대상으로 wild type과의 교배를 진행하였다.
- ② 대상 개체들의 발정확인 및 교배에 관한 사항은 다음 표에 나타나 있다.

표 80 hSNCA 발현 미니돼지 번식능 확인

	PDF-4	PDF-16	PDF-18	PDF-20
2014년 9월	- 9월 25일 발정 확인 후 교배 시도 하였으나, 웅돈의 승가 거부로 교배 실패	- 9월 24일~28일 발정이 확인되었으나, 웅돈의 승가로 교배는 이뤄지지 않음	- 9월 24~28일 발정 확인되었으나 승가 거부로 교배 못함	- 9월 28일 발정 확인
2014년 10월	- 건강상의 문제로 교배 진행하지 않음	- 10월 14일 발정 확인되었으나, 11월 뇌 영상 촬영 예정으로 교배 진행하지 않음	- 10월 14~16일 교배 진행	- 10월 16일 발정 확인
2014년 11월	- 개체의 상태는 많이 호전되었으나, 교배는 어려운 상태	- 뇌 영상 반출	- 임신 유지 확인	- 11월 6~8일 발정 확인 후 교배 하였으나, 11월 28일 재발정 확인
2014년 12월	- 12월 13일~14일 교배	- 12월 12~13일 교배	- 임신 유지 확인	
2015년 1월		- 1월 2일 재교배 하였으나 임신진단 결과 미임신	- 임신 유지 확인	- 1월 6일 교배 후 교배 21일령 및 25일령에 임신확인
2015년 2월		- 2월 7일 교배 후 임신실패, 2월 27일 교배	- 2월 8일 분만	- 임신 유지 확인
2015년 3월		- 3월 25일 임신확인	- 3월 9일 이유 후 3월 15일~3월 18일 교배	- 임신 유지 확인
2015년 4월		- 임신 유지 확인	- 임신 유지 확인	- 임신 유지 확인
2015년 5월		- 분만 예정일: 2015년 6월 21일	- 분만 예정일: 2015년 7월 7일	- 분만 예정일: 2015년 4월 30일

(2) 연구결과

(가) PDF-16 번식

- ① PDF-16 개체는 2015년 2월 27일 교배 후 2015년 6월 24일 분만을 하였다. 총 분만 두수는 6두(PDF-16-1~6)이며, 그 중 female 5두, male 1두이다.
- ② 분만 35일령인 2015년 7월 28일 이유를 진행하였으며, 생후 5주간의 체중변화는 다음과 같다.

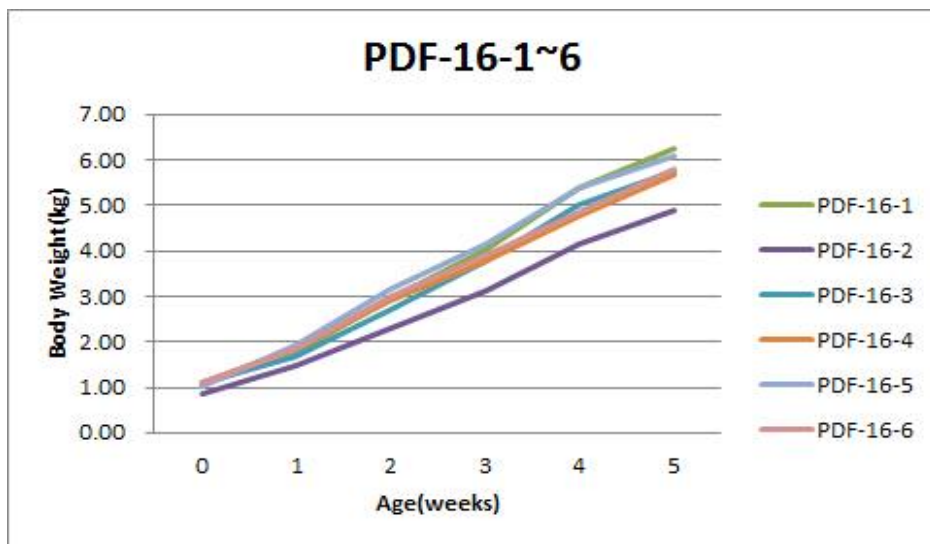


그림 239 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-16) 자돈의 평균 체중

- ③ 분만 자돈들에 대한 백신 이력은 다음 일정에 따라 진행하였다.

표 81 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-16-1~8) 백신 이력

접종 일자	접종 백신
2015년 7월 1일	MH
2015년 7월 18일	PCV2
2015년 8월 6일	HE
2015년 8월 12일	FMD

(나) PDF-18 번식

- ① PDF-18 개체의 1차 번식은 2014년 10월 14일 교배 후 2015년 2월 8일 분만을 하였다. 총 분만 두수는 7두(PDF-18-1~7)이며, 그 중 female 6두, male 1두이다. Female 1두(PDF-18-2)는 발육상태가 불량하여 분만 7일령에 귀 조직 샘플링 후 도태처리하였으며, 분만 9일령에는 설사 및 빈혈예방을 위하여 철분제를 각각 1 ml/두 주사하였다.



그림 240 hSNCA 발현 복제 미니돼지 분만자돈(PDF-18, 1차)

② 분만 29일령인 2015년 3월 9일 이유를 진행하였으며, 생후 5주간의 체중변화는 다음과 같다.

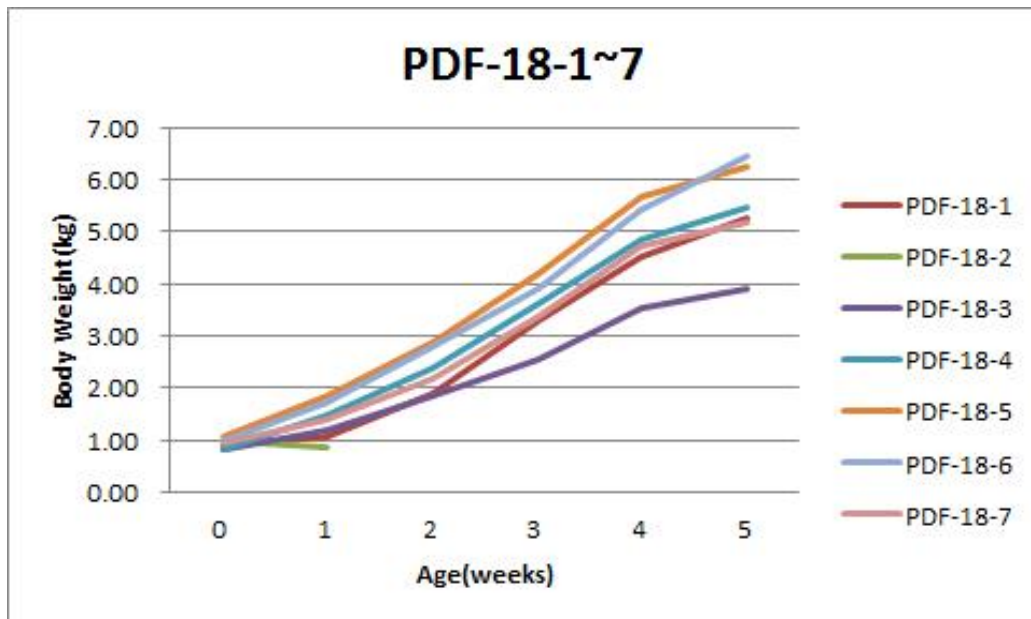


그림 241 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-18, 1차) 자돈의 평균 체중

③ 분만 자돈들에 대한 백신 이력은 다음 일정에 따라 진행하였다.



표 82 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-18-1~7) 백신 이력

접종 일자	접종 백신
2015년 3월 18일	PCV2
2015년 3월 23일	HE
2015년 3월 27일	FMD
2015년 4월 1일	MH
2015년 4월 9일	APP
2015년 4월 15일	HE
2015년 4월 24일	FMD
2014년 8월 6일	PCV2

- ④ PDF-18 개체의 2차 번식은 2015년 3월 15일 교배 후 2015년 7월 11일 분만을 하였다. 총 분만 두수는 6두(PDF-18-8~13)이며, 그 중 female 1두, male 5두이다. 분만 2일령에 6두에 대한 귀 조직을 채취하여 제 1세부기관에 전달하였으며, 항생제인 바이트릴을 구강투여 하였다. 분만 3일령에는 철분제(근육 주사) 및 콕시들펀제(구강 투여)를 진행하였으며, 21일령에는 2차 철분주사를 실시하였다.
- ⑤ 분만 33일령인 2015년 8월 13일 이유를 진행하였으며, 생후 5주간의 체중변화는 다음과 같다.

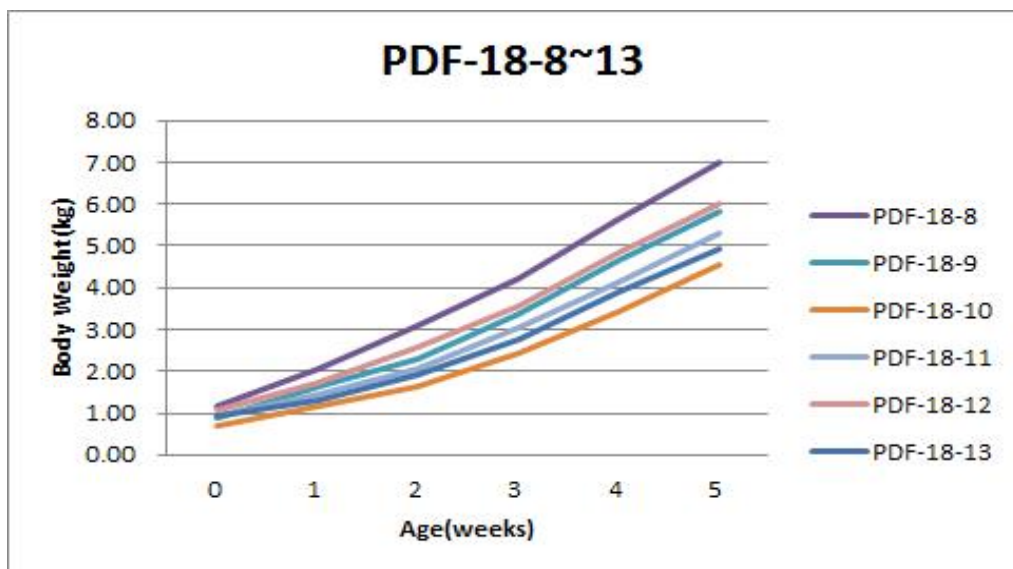


그림 242 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-18, 2차) 자돈의 평균 체중

- ⑥ 분만 자돈들에 대한 백신 이력은 다음 일정에 따라 진행하였다.

표 83 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-18-8~13) 백신 이력

접종 일자	접종 백신
2015년 7월 18일	MH
2015년 8월 6일	PCV2
2015년 8월 15일	APP
2015년 8월 20일	HE
2015년 8월 28일	FMD

(다) PDF-20 번식

① PDF-20 개체의 번식은 2015년 1월 6일 교배 후 2015년 5월 1일 분만을 하였다. 총 분만 두수는 7두(PDF-20-1~7)이며, 그 중 female 5두, male 2두이다. 분만 당일 바이트릴 1 ml 투여하였으며, 2015년 5월 3일에는 철분제와 콕시듐제를 각각 1 ml 투여하였다. 2015년 5월 6일에는 개체구분을 위한 이표를 부착하였으며, 꼬리조직을 샘플링하여 전달하였다.

② 분만 27일령인 2015년 5월 28일 이유를 진행하였으며, 생후 5주간의 체중변화는 다음과 같다.

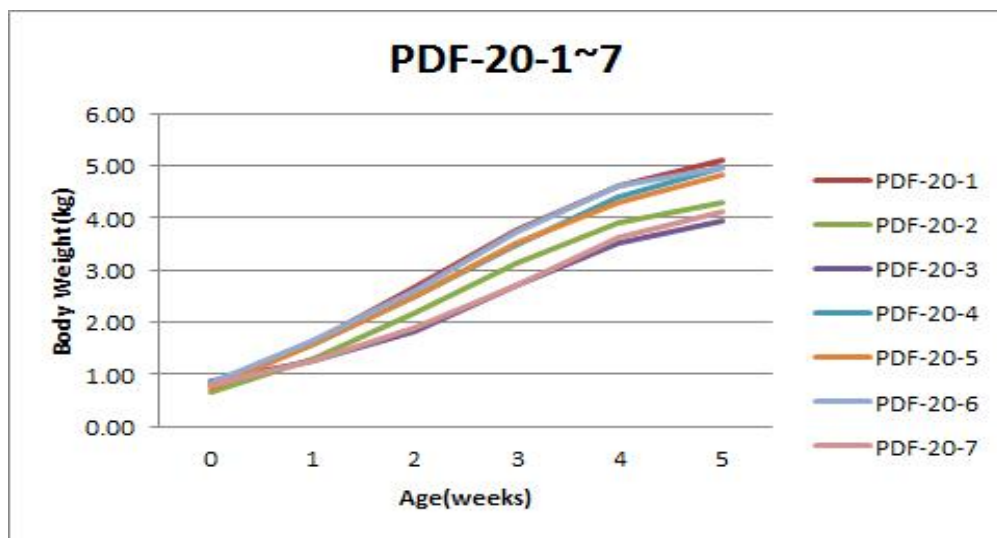


그림 243 hSNCA 발현 미니돼지(PDF-20) 자돈의 평균 체중

(라) 번식능력 비교

① hSNCA 발현 미니돼지 및 정상 미니돼지의 번식능력을 비교하여 다음 표와 같은 차이를 확인 할 수 있었다.

표 84 hSNCA 발현 미니돼지 및 정상 미니돼지의 번식능력 비교

	hSNCA 발현 미니돼지				정상 미니돼지 (White Yucatan)
	PDF-16	PDF-18		PDF-20	
		1차	2차		
임신기간	117일	117일	118일	115일	114.3일 <sup>1)</sup>
총 분만 자돈 수	6두	7두	6두	7두	5.36 <sup>1)</sup>
1산차 분만 자돈 수	6두	7두	-	7두	4.04두 <sup>2)</sup>
자돈 평균 분만 체중(kg)	1.05	0.98	0.95	0.72	0.86 <sup>1)</sup>
암/수	5/1	6/1	1/5	5/2	2.54/2.84 <sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>n=148, (<sup>2)</sup>n=24)

- ② hSNCA 발현 미니돼지의 평균 임신기간은 약 116일인 반면, 정상 미니돼지의 임신기간은 일반 돼지와 유사한 114일인 것으로 확인 되었다.
- ③ 분만 자돈 수의 경우는 정상 미니돼지의 5.36두 보다 약 1.2두가 많은 6.5두의 평균 산자수를 기록하였으며, 평균 분만 체중의 경우도 정상 미니돼지의 0.86 kg 보다 높은 0.92 kg으로 측정되었다.
- ④ 총 분만 자돈수의 암/수 비율은 정상인 미니돼지에게서는 1 : 1 의 유사한 비율로 번식을 하는 결과이지만, hSNCA 발현 미니돼지는 약 2 : 1 의 비율로 암컷의 출현율이 2배정도 높게 확인 되었다.
- ⑤ PDF-16, PDF-18, PDF-20 개체들의 총 산자는 26두로 샘플링된 유전자검사 결과 PDF-20 자돈인 PDF-20-1~7의 7두만 모계와 동일한 hSNCA 발현 미니돼지로 확인 되었다.

**라. hSNCA 발현 미니돼지 자돈(PDF-20-1~7)의 혈청학적 특성**

(1) 연구방법

(가) hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상의 미니돼지와 비교

- ① hSNCA 발현 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 돼지와 차이점을 비교하였다.
- ② 혈액의 채취는 경정맥에서 채취하였으며, 23G 의 3 ml syringe를 이용하여 혈액 샘플을 채취하였으며, 채취한 혈액은 SST tube에 담아 생화학 분석을 실시하였다.

(2) 연구결과

(가) hSNCA 발현 미니돼지로 확인된 PDF-20-1~7 개체의 혈액생화학 분석 결과는 다음과 같다.

표 85 hSNCA 발현 미니돼지 자돈의 (PDF-20-1~7) 혈액 생화학1차 분석

Parameter	Unit	1 차							Normal Range		Reference
		PDF-20-1	PDF-20-2	PDF-20-3	PDF-20-4	PDF-20-5	PDF-20-6	PDF-20-7	Mean±SD	Range	
ALT(alanine aminotransferase)	U/L	62.3	81.2	60	43.5	58.3	52.6	50.5	45.43±15.65	16.0~97.0	*
AST(aspartate aminotransferase)	U/L	74.2	260.5	47.1	43.4	62.2	64.3	78.3	40.51±22.73	19.0~225.0	*
ALP(alkaline phosphatase)	U/L	122.2	184.9	138.9	130.7	148.1	105.5	105.7	637±558	175~4246	*
CPK(creatinine phosphokinase)	IU/L	1182	834	457	447	1959	712	918	744.3±1085.1	134~8446	*
LDH(lactate dehydrogenase)	μkat/L	18.52	14.75	9.3	9.27	13.46	10.17	14.45	12.89±2.99	7.7~28.5	**
TG(triglyceride)	mg/dL	65	148	82	59	88	40	30	44.74±26.15	17~236	*
T.CHO(total cholesterol)	mg/dL	117	121	125	107	120	87	114	86.3±47.2	43~533	*
LDL(low density lipoprotein)	mg/dL	60	63	62	56	64	44	56	6.16±3.47	0.77~19.69	**
TP(total protein)	g/dL	8.49	8.46	8.06	7.97	8.18	7.18	8.63	7.68±0.97	4.90~10.40	*
ALB(albumin)	g/dL	4.9	4.84	4.48	4.32	4.62	4.48	5.55	4.38±0.50	2.4~5.50	*
A/G(albumin-globulin ratio))	ratio	1.36	1.34	1.25	1.18	1.3	1.66	1.8	1.46±0.50	0.51~3.46	*
Glu(glucose)	mg/dL	88.2	76.3	60.1	59.7	71.7	114.5	50.2	90.49±20.81	66~224	*
CREA(creatinine)	mg/dL	1.29	1.2	1.2	1.06	1.12	1.17	1.3	0.91±0.3	0.31~1.94	*
CA(calcium)	mg/dL	11.9	11.36	10.72	10.84	10.81	9.16	10.29	10.67±0.56	9.3~12.3	*
IP(inorganic-phosphorus)	mg/dL	12.09	11.15	10.44	10.64	11.11	7.26	9.23	6.82±1.48	3.85~13.21	*
Na(sodium)	mEq/L	138.64	140.51	136.73	136.4	137.98	111.36	130.34	144.8±3.6	119~153	*
K(potassium)	mEq/L	16.88	14	12.77	12.01	12.84	11.43	16.77	5.74±0.72	4~7.5	*
Cl(chloride)	mEq/L	100.93	104.28	103.05	100.81	102.57	77.45	97.95	103.4±3.8	76~111	*

\* Kawaguchi, H. et al.(2012) Reference Values of Hematological and Biochemical Parameters for the World Smallest Microminipigs. J Vet Med Sci.

\*\* Rispat, G. et al.(1993) Haematological and plasma biochemical values for healthy Yucatan micropigs. Laboratory Animals 27. 368-73

표 86 hSNCA 발현 미니돼지 자돈의 (PDF-20-1~7) 혈액 생화학2차 분석

Parameter	Unit	2 차							Normal Range		Reference
		PDF-20-1	PDF-20-2	PDF-20-3	PDF-20-4	PDF-20-5	PDF-20-6	PDF-20-7	Mean±SD	Range	
ALT(alanine aminotransferase)	U/L	51.3	49.4	63.1	42.5	46.9	46.4	34.9	45.43±15.65	16.0~97.0	*
AST(aspartate aminotransferase)	U/L	63.8	29	57.3	54.3	101.1	72.3	43.9	40.51±22.73	19.0~225.0	*
ALP(alkaline phosphatase)	U/L	132.5	121.5	125.8	115.2	118.2	110.3	94.4	637±558	175~4246	*
CPK(creatinine phosphokinase)	IU/L	1754	377	1679	1165	6672	635	521	744.3±1085.1	134~8446	*
LDH(lactate dehydrogenase)	μkat/L	12.21	7.05	9.25	9.15	19.44	8.03	6.53	12.89±2.99	7.7~28.5	**
TG(triglyceride)	mg/dL	69	73	85	62	76	59	75	44.74±26.15	17~236	*
T.CHO(total cholesterol)	mg/dL	112	111	130	113	137	124	67	86.3±47.2	43~533	*
LDL(low density lipoprotein)	mg/dL	57	60	64	59	75	78	37	6.16±3.47	0.77~19.69	**
TP(total protein)	g/dL	8.07	7.88	8.7	8.23	8.65	7.45	8.58	7.68±0.97	4.90~10.40	*
ALB(albumin)	g/dL	4.51	4.59	4.57	4.43	4.55	3.78	5.1	4.38±0.50	2.4~5.50	*
A/G(albumin-globlin ratio))	ratio	1.27	1.4	1.11	1.17	1.11	1.03	1.47	1.46±0.50	0.51~3.46	*
Glu(glucose)	mg/dL	42.4	37.3	40	61.4	56.1	72.5	56.8	90.49±20.81	66~224	*
CREA(creatinine)	mg/dL	1.17	1.31	1.33	1.2	1.1	1.2	1.16	0.91±0.3	0.31~1.94	*
CA(calcium)	mg/dL	10.88	11.11	11.35	11.1	10.61	10.69	11.35	10.67±0.56	9.3~12.3	*
IP(inorganic-phosphorus)	mg/dL	5.14	9.87	9.14	9.59	9.81	8.66	9.27	6.82±1.48	3.85~13.21	*
Na(sodium)	mEq/L	138.97	142.74	139.54	138.47	141.64	141.57	146.17	144.8±3.6	119~153	*
K(potassium)	mEq/L	12.03	10.57	9.41	11.52	11.09	10.11	11.84	5.74±0.72	4~7.5	*
Cl(chloride)	mEq/L	101.94	102.69	100.78	101.07	103.19	103.91	106.83	103.4±3.8	76~111	*

\* Kawaguchi, H. et al.(2012) Reference Values of Hematological and Biochemical Parameters for the World Smallest Microminipigs. J Vet Med Sci.

\*\* Rispat, G. et al.(1993) Haematological and plasma biochemical values for healthy Yucatan micropigs. Laboratory Animals 27. 368-73

마. hSNCA 발현 미니돼지 자돈(PDF-20-1~7)의 행동학적 특성

(1) 연구방법

(가) 행동관찰

- ① PDF-20-1~7 개체와 성별이 동일한 개체 및 일령이 유사한 정상인 미니돼지를 선정하여, 정상 미니돼지의 행동을 0점으로 부여한 후 비교하여 PDF-20-1~7 개체의 행동을 관찰하였다.
- ② 분만 후 8개월령이 되는 2016년 2월부터 총 3회에 걸쳐 17개 항목에 대하여 행동관찰을 진행하였다.

(2) 연구결과

(가) PDF-20-1의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 87 PDF-20-1 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	1	1
5	음수량	1	0	0
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	2	2	2
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	1	1	1
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		11	10	10

- ① PDF-20-1의 사료섭취 속도는 정상인 개체에 비하여 느린 것으로 확인되었으며, 새로운 사물에 대한 호기심도 금방 흥미를 잃는 것으로 관찰되었다.
- ② 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험과 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 모두 반응을 하지 않았다.

(나) PDF-20-2의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 88 PDF-20-2 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	0	0
5	음수량	1	1	1
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	2	0	0
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		10	7	7

- ① PDF-20-2의 음수량은 정상 개체에 비하여 사료급여 후 20분간 관찰한 결과 음수 섭취 횟수가 적은 것으로 관찰되었다.

(다) PDF-20-3의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 89 PDF-20-3 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침 흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	1	1
5	음수량	0	0	0
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	3	3
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	1	1	1
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		8	11	11

- ① PDF-20-3의 사료섭취 속도는 정상인 개체에 비하여 느리게 관찰되었으며, 2, 3차 관찰 시에는 피부에 접촉을 하여도 아무런 반응을 보이지 않았다.
- ② 강한 빛을 이용하여 눈에 자극을 주어도 바로 피하거나 눈길을 돌리지 않고 2초 가량의 시간이 경과된 후에 반응을 보이며 피하였다.
- ③ 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험이나 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 관찰되지 않았다.



(라) PDF-20-4의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 90 PDF-20-4 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침 흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	1	1
5	음수량	0	0	0
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	2	0	0
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	1	0	0
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	2	2
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		10	6	6

- ① PDF-20-4의 사료섭취 속도는 정상인 개체에 비하여 느리게 관찰 되었다.
- ② 1차 관찰 시에는 사물에 대한 호기심과 강한 빛에 대한 반응이 정상인 개체에 비하여 정도가 약했지만, 2, 3차 관찰 시에는 차이를 확인할 수 없었다.
- ③ 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험이나 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 관찰되지 않았다.

(마) PDF-20-5의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 91 PDF-20-5 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	1	0
5	음수량	0	0	0
6	눈 깜박임 속도 및 횟수	1	1	1
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켄을 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	2	3	3
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		10	11	10

- ① PDF-20-5의 눈 깜박임 횟수가 정상 및 다른 hSNCA 개체에 비하여 1분 당 약 5회 정도 낮게 관찰되었으며, 사물에 대한 호기심도 약하게 관찰되었다.
- ② 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험이나 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 관찰되지 않았다.

(바) PDF-20-6의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 92 PDF-20-6 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	0	0	0
5	음수량	3	3	1
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	2	2	2
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		11	11	9

- ① PDF-20-6의 음수량은 사료급여 후 20분간 총 2~4회 섭취 하는 것으로 관찰 되었 으며, 새로운 사물에 대해서도 금방 흥미를 잃는 것으로 관찰되었다.
- ② 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험이나 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 관찰되 지 않았다.

(사) PDF-20-7의 행동관찰에 관한 점수화는 다음과 같다.

표 93 PDF-20-7 행동관찰 점수

No.	Question	1차	2차	3차
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0
3	침흘림	0	0	0
4	사료 섭취량	1	0	0
5	음수량	3	0	0
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0
7	움직이는 양	0	0	0
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	0	0
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0
13	강한 빛에 대한 반응	1	0	0
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	3	3
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3
Total Score		11	6	6

- ① PDF-20-7의 음수량은 사료급여 후 20분간 총 2~4회 섭취 하는 것으로 관찰 되었 으지만, PDF-20-6 및 정상인 개체에 비하여 오랜 시간동안 섭취를 하는 모습이 관 찰되었다.
- ② 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험이나 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 관찰되 지 않았다.

## 5. PARK2 KO PD 모델 미니돼지 번식능 평가

### 가. 행동학적 특성

#### (1) 연구방법

(가) PARK2 KO 미니돼지(PDM-11) 입식

- ① 2015년 3월 6일 분만한 PARK2 KO 미니돼지(male) 1두가 2015년 11월 5일 차폐시설로 입식되었다. 입식당시 체중은 약 35 kg이었다.
- ② 입식 및 뇌 영상 촬영 후 2016년 1월부터 총 3회에 걸쳐 행동관찰을 실시하였으며, 행동관찰의 방법은 신경독성물질 투여를 통한 PD 유발 미니돼지와 hSNCA 발현 미니돼지의 행동관찰 방법과 동일하게 진행하였다.

(2) 연구결과

(가) 행동관찰

- ① PDM-11 개체와 성별이 동일한 개체 및 일령이 유사한 정상인 미니돼지를 선정하여, 정상 미니돼지의 행동을 0점으로 부여한 후 비교하여 PDM-11 개체의 행동을 관찰하였으며, 관찰 후 각 항목에 대한 점수는 다음 표와 같다.

표 94 PARK2 KO 미니돼지의 행동 점수화

No.	Question	1차	2차	3차	관찰 내용
1	쉬는 동안의 떨림	0	0	0	정상인 개체와 마찬가지로 떨림 없음
2	움직이는 동안의 떨림	0	0	0	정상인 개체와 마찬가지로 떨림 없음
3	침흘림	0	0	0	사료 섭취 전, 후에 약간의 침 흘림 현상을 보이며, 이는 정상인 개체들과 동일한 증상
4	사료 섭취량	1	0	0	1차 관찰 시에만 섭취 속도가 10분을 넘었을 뿐, 이후에는 정상 개체들과의 속도와 유사함
5	음수량	0	0	0	정상인 개체들에 비해 음수 섭취가 더 많은 편임
6	눈 깜빡임 속도 및 횟수	0	0	0	18~19회/분 관찰 됨
7	움직이는 양	0	0	0	정상인 개체에 비해 활동량이 많음
8	자극적인 냄새에 대한 반응	0	1	1	알코올 분무 시 약 4초후 반응음 보임
9	피부 접촉시의 반응	0	0	0	접촉 즉시 반응을 보이며 피함
10	깜짝 놀래 켜올 때의 반응 속도	0	0	0	즉각 반응을 보임
11	새로운 사물에 대한 호기심	0	0	0	냄새를 맡고 코를 이용하여 사물을 움직임
12	쉬면서 내는 소리의 변화	0	0	0	소리의 변화 없음
13	강한 빛에 대한 반응	0	0	0	즉시 빛을 피하는 행동을 보임
14	큰 소리에 대한 놀람 반응	0	0	0	즉각 반응을 보이며 소리 발생 장소를 응시 함
15	식사 시간 전의 울음소리	0	0	0	큰 소리는 없지만 빠른 속도로 급이기 주변을 배회
16	원통에서 발을 밖으로 빼는 실험	3	2	2	1차 관찰 시에는 전/후지 모두 반응이 없었으며, 2, 3차 관찰 시에는 앞다리는 제거하려고 함
17	피부에 스티커를 붙였을 때의 반응	3	3	3	반응 관찰 안됨
Total Score		7	6	6	

② PDM-11 개체의 경우는 다른 항목에 있어서는 정상인 개체와 큰 차이가 없었지만, 원통에서 발을 밖으로 빼는 실험과 피부에 스티커를 붙였을 때의 반응은 크게 차이를 보여 반응을 거의 보이지 않았다. 이는 발을 밖으로 빼 내려고 노력하고 몸을 흔들어 스티커를 제거하려는 정상 개체들과는 큰 차이를 보이는 항목이다.

- ③ 또한, 행동관찰 항목 이외에 정상인 개체와 차이가 확인되는 모습은 다른 미니돼지들의 분변을 섭취하고, 평상시에도 혀가 밖으로 노출된 모습이 관찰 되었다.



그림 244 분변 섭취하는 모습



그림 245 혀를 노출한 모습

#### 나. PARK2 KO 미니돼지의 혈청학적 특성

##### (1) 연구방법

(가) PARK2 KO 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 미니돼지와 비교

- ① PARK2 KO 미니돼지의 혈액 생화학 분석을 통해 정상 돼지와 비교하였다.
- ② 혈액의 채취는 경정맥에서 채취하였으며, 21G 의 5 ml syringe를 이용하여 혈액 샘플을 채취하였으며, 채취한 혈액은 SST tube에 담아 생화학 분석을 실시하였다.

##### (2) 연구결과

(가) PARK2 KO 미니돼지의 혈액생화학 분석 결과는 다음과 같다.

표 95 PARK2 KO 미니돼지의 혈액 생화학 분석

Parameter	Unit	Result	Normal Range		Reference
			Mean±SD	Range	
ALT(alanine aminotransferase)	U/L	48.4	45.43±15.65	16.0~97.0	*
AST(aspartate aminotransferase)	U/L	54.2	40.51±22.73	19.0~225.0	*
ALP(alkaline phosphatase)	U/L	71.4	637±558	175~4246	*
CPK(creatinine phosphokinase)	IU/L	1726	744.3±1085.1	134~8446	*
LDH(lactate dehydrogenase)	μkat/L	7.77	12.89±2.99	7.7~28.5	**
TG(triglyceride)	mg/dL	79	44.74±26.15	17~236	*
T.CHO(total cholesterol)	mg/dL	57	86.3±47.2	43~533	*
LDL(low density lipoprotein)	mg/dL	24	6.16±3.47	0.77~19.69	**
TP(total protein)	g/dL	7.72	7.68±0.97	4.90~10.40	*
ALB(albumin)	g/dL	4.23	4.38±0.50	2.4~5.50	*
A/G(albumin-globlin ratio))	ratio	1.21	1.46±0.50	0.51~3.46	*
Glu(glucose)	mg/dL	39.6	90.49±20.81	66~224	*
CREA(creatinine)	mg/dL	1.52	0.91±0.3	0.31~1.94	*
CA(calcium)	mg/dL	9.97	10.67±0.56	9.3~12.3	*
IP(inorganic-phosphorus)	mg/dL	7.98	6.82±1.48	3.85~13.21	*
Na(sodium)	mEq/L	137.26	144.8±3.6	119~153	*
K(potassium)	mEq/L	9.1	5.74±0.72	4~7.5	*
Cl(chloride)	mEq/L	99.59	103.4±3.8	76~111	*

#### 다. PARK2 KO 미니돼지의 번식능 평가

##### (1) 연구방법

##### (가) PARK2 KO 미니돼지의 교배

- ① PARK2 KO 미니돼지의 번식능력을 평가하기 위하여 hSNCA 발현 미니돼지들과의 교배를 실시 목적으로, 자연교배 전 승가연습을 위하여 의빈대 사용 훈련을 실시하였다.
- ② 의빈대를 통한 승가 훈련은 오전, 오후 각각 1회 씩 진행하였으며, 승가에는 문제가 없는 것으로 확인되어 승가훈련과 동시에 hSNCA 발현 미니돼지의 자돈(PDF-20-1~5)의 발정을 확인하기 시작하였다.





그림 246 PARK2 KO 미니돼지 의빈대 승가 훈련

(2) 연구결과

(가) hSNCA 발현 미니돼지 자돈 발정 확인 및 교배

- ① hSNCA 발현 미니돼지인 PDF-20 개체와 wild type 미니돼지의 교배를 통해 분만 한 PDF-20-1~7 의 7두는 hSNCA 발현 미니돼지로 확인되어, 이 중 female 개체들을 대상으로 약 8개월인 2016년 2월부터 발정확인을 진행하였다.
- ② PDF-20-3 개체는 2016년 2월 4일 발정이 확인되어 PDM-11 개체와 총 3회에 걸쳐 교배를 진행하였으며, 2016년 2월 29일 임신이 확인되었다.



그림 247 PARK2 KO 미니돼지(PDM-11) 교배 및 임신진단(PDF-20-2, 25일령)

- ③ PDF-20-5 개체는 2016년 3월 15일 발정이 확인되어 PDM-11 개체와 총 3회에 걸쳐 교배를 진행하였지만 임신이 되지 않았다.
- ④ PDF-20-2 개체는 2016년 4월 6일 발정이 확인되어 PDM-11 개체와 총 3회에 걸쳐 교배를 진행하였으며, 2016년 4월 29일 임신이 확인되었다



그림 248 PARK2 KO 미니돼지(PDM-11) 교배 및 임신진단(PDF-20-2, 23일령)

- ⑤ 임신이 확인된 PDF-20-2 및 PDF-20-3 개체는 매 주 임신진단을 실시하여 임신 유지 여부를 확인하였다.
- ⑥ 분만 예정일이 2016년 5월 28일이었던 PDF-20-3 개체는 예정일보다 1일 늦은 2016년 5월 29일 분만을 하였으며, 총 분만두수는 5두(female 3, male 2)이며, 평균 분만 체중은 0.90 kg이었다.
- ⑦ 분만 3일령에 1차 철분주사를 1 ml/두 근육주사 하였으며, 견치를 실시하였고, 분만 21일령에 2차 철분주사 2.0 ml/두를 근육주사하였다. 이유는 35일령 7월 3일 진행하였으며, 분만 후 5주령의 체중 변화는 다음과 같다.

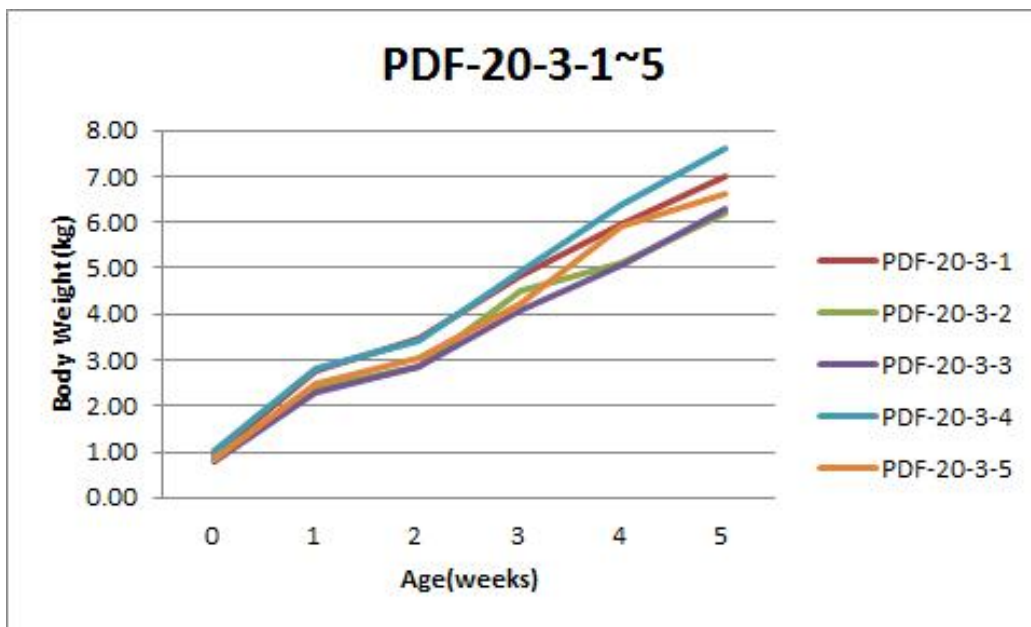


그림 249 PDF-20-3-1~5 자돈의 평균 체중

- ⑧ 분만 예정일이 2016년 7월 29일이었던 PDF-20-2 개체는 예정일보다 1일 빠른 2016년 7월 28일 분만을 하였으며, 총 분만두수는 7두(female 4, male 3)이며, 평균 분만 체중은 0.92 kg이었다.



그림 250 PDF-20-2 자돈(PDF-20-2-1~7)

- ⑨ 분만 3일령에 1차 철분주사를 1 ml/두 근육주사 하였으며, 견치를 실시하였고, 분만 21일령에 2차 철분주사 2.0 ml/두를 근육 주사하였다. 분만 후 2주령의 체중 변화는 다음과 같다.

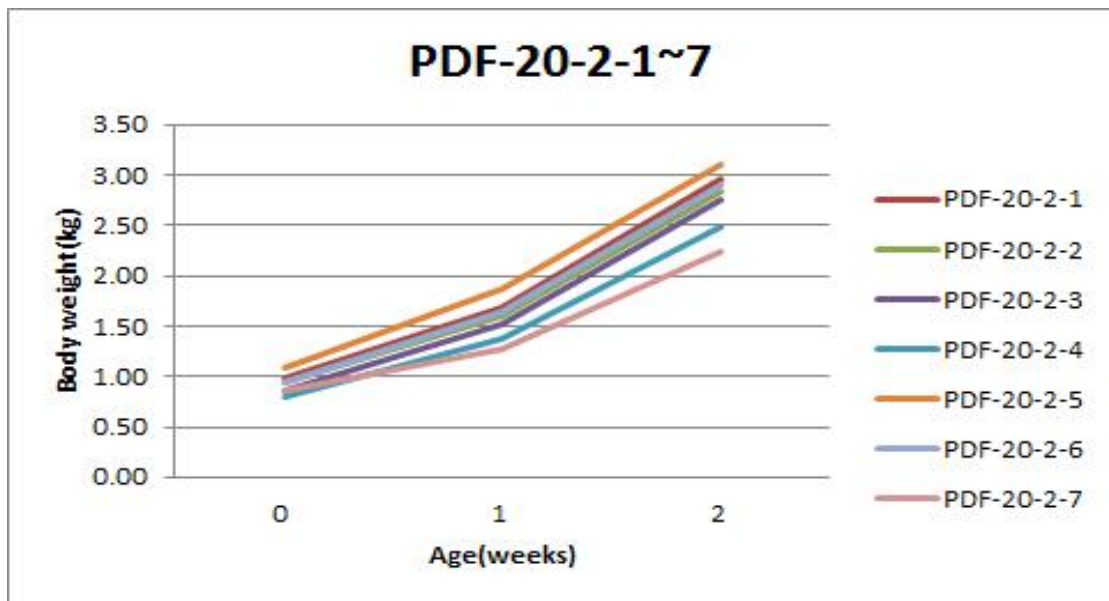


그림 251 PDF-20-2-1~7 자돈의 평균 체중

- ⑩ hSNCA 발현 미니돼지와 wild type과의 교배, hSNCA 발현 미니돼지와 PARK2 KO 미니돼지의 교배를 통해 확인된 번식 능력은 다음 표와 같다.

표 96 hSNCA 발현 미니돼지, PARK2 KO 정상 미니돼지의 번식능력 비교

교배 모돈	PDF-20	PDF-20-2	PDF-20-3	정상 미니돼지 (White Yucatan)
교배 옹돈	wild type	PARK2 KO	PARK2 KO	
임신기간	115일	113일	115일	114.3일 <sup>1)</sup>
총 분만 자돈 수	7두	7두	5두	5.36 <sup>1)</sup>
1산차 분만 자돈 수	7두	7두	5두	4.04두 <sup>2)</sup>
자돈 평균 분만 체중(kg)	0.72	0.92	0.90	0.86 <sup>1)</sup>
암/수	5/2	4/3	3/2	2.54/2.84 <sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>n=148, <sup>2)</sup>n=24)

① hSNCA 발현 미니돼지인 PDF-20-2, PDF-20-3 개체와 PARK2 KO 돼지인 PDM-11 개체의 교배 결과 생산된 자돈 12두 중 TG(hSNCA 발현) model로 확인된 개체는 총 9두로 확인되었다.

### 제 3 절 연구과제 결과 총정리

본 과제의 최종 연구결과는 다음과 같다. 총 5년 동안 AD/PD 모델 미니돼지를 생산하기 위하여 체세포핵이식 기법에 의해 45마리의 형질전환복제돼지를 생산하였으며, 최종적으로 25마리가 생존하였다. 이중 6두에서 생식전 전이와 교배능을 검증하였다. 번식능력을 지닌 6두를 이용하여 총 33두의 자손을 생산 할 수 있었다. **이를 통해 인체질병 모델로서 AD 2종 PD 3종의 형질전환 돼지를 확립**하였다.

1. 신경독성물질 MPTP 투여를 통한 PD 모델을 생산 검증 하였다. 사람의 PD 병변 증상 및 행동과 유사한 19개 항목을 선정하여 관찰한 결과 이들 돼지에서 **40점 이상의 높은 점수로 확인되어 MPTP의 투여로 PD의 병변이 유도된다는 것을 확인** 검증하였다. MPTP 투여 돼지 뇌의 면역조직화학염색의 결과 **흑색질 신경세포의 수적 감소 경향을 확인**할 수 있었다. 본 연구를 통하여 MPTP의 투여로 PD 모델 미니돼지를 생산할 수 있는 방법을 확립하였다.
2. AD 모델 미니돼지를 생산하였다. AD 모델 미니돼지는 **AD 병인 유전자중 swedish형을 유발하는 human mutant APP(hAPP)를 발현시켰고, 복합유전자 발현 미니돼지는 PS1의 추가 발현을 유도**하였다. 본 연구에서 hAPP 발현 복제 미니돼지 ADF-1 개체에서 5차년도까지 시행한 **행동분석 결과 치매 환자에 준하는 증상들을 확인**하였으며, **FDG PET 영상 분석의 결과 전반적인 뇌 대사 감소가 관찰되며, MRI 분석에서는 뇌 실확장 및 뇌 피질 위축이 관찰되어 AD 환자에서 나타나는 소견과 유사함**을 보였다.

그러나 PIB PET 영상에서는 hAPP 발현 복제 미니돼지에서 유의한 뇌피질 uptake 유의적 증가는 보이지 않았다.

3. **본 연구팀은 PD 모델 미니돼지 개발을 위해 hSNCA 발현 미니돼지와 PARK2 KO 미니돼지를 생산하였고, 2가지의 PD 모델돼지의 자연 교배를 통해 다중 유전자 조절 PD 모델 미니돼지도 생산하였다.** 본 연구에서는 hSNCA 발현 미니돼지와 PARK2 KO 미니돼지의 행동학적 영상학적 분석을 실시하였으며, **행동관찰을 진행한 결과 사람에서와 유사하게 행동 및 운동양상의 점수가 지속적인 감소소견을** 보여주었다. 영상학적 분석 결과에서도 PD 환자에서 보이는 소견과 유사하게 **hSNCA 발현 미니돼지 2년령 PDF-20 개체의 경우** 정상 미니돼지와 비교하여 **FP-CIT PET 영상에서 양측 putamen 섭취가 감소되었음을** 관찰하였다. 또한 **Parkin KO 미니돼지 1년령 PDM-11의 경우** 정상 미니돼지와 비교하여 **FDG PET 영상에서 양측 occipital cortex 대사가 감소함이 관찰되었고 FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 현저하게 감소되었음을** 관찰하였고 Cortical atrophy와 ventricle size가 증가됨이 관찰되었다.
4. 따라서 **최종적으로 본 과제에서 생산 및 분석되어진 AD와 PD 모델 미니돼지들은 인체 알츠하이머병/파킨슨병 동물 모델로서의 이용이 가능할 것으로 판단**된다. 하지만 전임상 모델로의 활용을 위해서는 조직 검사와 현재까지 검사가 진행되어진 이후의 연령에서도 지속적으로 행동 및 영상학적 변화의 추가적인 관찰이 필요할 것이라고 판단되어진다. 결론적으로 인체와 유사한 임상증상 패턴을 보여주었기에 모델로의 가치는 충분하다고 판단된다.

표 97 최종 결과 총 정리; 생산된 AD/PD 모델 미니돼지의 검증

이름 (나이)	유전자	행동분석 증상	영상분석 증상	의학적 소견
ADF-1 (3년령)	Synapsin-1, n-hAPP	2012년 8월 31일 태어난 hAPP 유전자 개체로 2013년 9월을 시작으로 2016년 7월까지, 총 14회 행동관찰을 진행한 결과 인지기능 및 행동양상의 지속적인 감소 소견이 관찰되었음. (평가 개별 점수: 17, 15, 8, 19, 7, 6, 7, 8, 7, 5, 6, 6, 1, 3)	hAPP 발현 복제 미니돼지에서 5차년도까지 시행한 영상 분석중 5년째 시행한 FDG PET에서 parietal cortex에 약간 metabolism이 감소함을 확인하였고 <sup>12</sup> C-PIB의 PET과 CT에 관한 영상 소견상 정상 미니돼지와 비교하여 APP 발현 복제 미니돼지에서 양측 temporal cortex에 PIB uptake가 관찰되었으며, 정상 미니돼지와 비교하여 MR 영상에서 APP 발현 복제 미니돼지에서 ventricle size가 약간 증가 하여 이후에 향후 추적 관찰 및 조직 검사 소견과 비교해 보아야 할 것으로 판	hAPP 발현 복제 미니돼지에서 5차년도까지 시행한 행동분석과 영상 분석 결과 치매 환자에 준하는 치매 증상과 유사한 임상 증상과 영상학적 변화소견이 관찰되고 있으나 조직 검사 소견과의 비교 분석이 필요함. 본 동물 모델은 인체 치매 동물모델로서의 이용이 가능할 것으로 판단되나 연령 4년 이후의 행동 및 영상학적 변화의 추가적인 관찰이 요망됨

			단됨	
ADF-1-2 (2년령)	Synapsin-hAPP	2014년 6월 9일 태어난 hAPP 유전자 개체로 2015년 4월을 시작으로 2016년 7월까지, 총 8회 행동관찰을 진행한 결과 인지기능 및 행동양상의 지속적인 감소소견이 관찰되어 있음. (평가개별 점수; 13, 1, 7, 1, 2, 1, 6, 3)	hAPP 발현 복제 미니 돼지 산자 ADF1-2에서 2차년도까지 시행한 영상 분석중 ADF-1의 경우 FDG PET에서 parietal cortex에 약간 metabolism이 감소하고 양쪽 temporal cortex에 PIB uptake가 관찰되었고 MR에서 ventricle size가 약간 증가되어 보이나 그 차이가 subtle 하여 실제 변화가 있는 것인지는 확실하지 않아 향후 추적 관찰 및 조직 병리학적인 검사가 필요하다고 판단됨	hAPP 발현 복제 미니돼지에서 나온 산자 2차년도까지 시행한 행동분석과 영상 분석 결과 치매 환자에 준하는 치매 증상과 유사한 임상 증상과 영상학적 변화소견이 관찰되고 있으나 조직 검사 소견과의 비교 분석이 필요함. 본 동물 모델은 인체 치매 동물모델로서의 이용이 가능할 것으로 판단되나 연령 2년 이후의 행동 및 영상학적 변화의 추가적인 추적 관찰이 요망됨
PDF-20 (2년령)	CMV-hSNCA	2013년 태어난 hSNCA 유전자 개체로 2013년 9월을 시작으로 2016년 7월까지, 총 8회 행동관찰을 진행한 결과 행동 및 운동양상의 지속적인 감소소견이 관찰되어 있음. (평가 개별점수 6, 7, 9, 3, 6, 8, 6, 4)	hSNCA 발현 복제 미니돼지의 <sup>18</sup> F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상 소견에서 정상 미니돼지와 비교하여 이상소견을 관찰되지 않았으나 hSNCA 과발현 4 미니돼지 2년령 PDF-20의 경우 정상 미니돼지와 비교하여 FP-CIT PET 영상에서 양측 putamen 섭취가 감소가 관찰되어 향후 추적 관찰 및 조직 병리학적인 검사가 필요하다고 판단됨	hSNCA 발현 복제 미니돼지 5차년도까지 행동관찰을 진행한 결과 행동 및 운동양상의 지속적인 감소소견이 관찰되고 <sup>18</sup> F-FDG의 PET과 CT에 관한 영상소견에서 정상 미니돼지와 비교하여FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 감소가 관찰되어 있으나 조직 검사 소견과의 비교 분석이 필요함. 본 동물 모델은 인체 파킨슨 동물 모델로서의 이용이 가능할 것으로 판단되나 연령 3년 이후의 행동 및 영상학적 변화의 추가적인 관찰이 요망됨
PDM-11 (1년령)	PARK2 KO	2015년 3월 태어난 PARK2 KO 유전자 개체로 2013년 9월을 시작으로 2016년 7월까지, 총 3회 행동관찰을 진행한 결과 행동 및 운동양상의 지속적인 감소소견이 관찰되어 있음. (평가 개별 점수; 7, 6, 6)	Parkin KO 미니돼지 1년령 PDM-11의 경우 정상 미니돼지와 비교하여 FDG PET 영상에서 양 측 occipital cortex 대사가 감소함이 관찰되었고 FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 현저하게 감소되었음을 관찰하였고 Cortical atrophy와 ventricle size가 증가가 관찰되어 향후 추적 관찰 및 조직 병리학적인 검사가 필요하다고 판단됨	Parkin KO 미니돼지 1년령 PDM-11의 경우 정상 미니돼지와 비교하여 행동관찰을 진행한 결과 행동 및 운동양상의 지속적인 감소소견이 관찰되고 FDG PET 영상에서 양 측 occipital cortex 대사가 감소함이 관찰되었고 FP-CIT PET 영상에서 양 측 putamen 섭취가 현저하게 감소되었음을 관찰하였고 Cortical atrophy와 ventricle size가 증가가 관찰되어 향후 추적 관찰 및 조직 병리학적인 검사가 필요하다고 판단됨. 본 동물 모델은 인체

파킨슨 동물 모델로서 의 이용  
이 가능할 것으로 판단되나 연  
령 1년 이후의 행동 및 영상학  
적 변화의 추가적인 추적관찰  
이 요망됨

## 제 4 절 연구과제의 성과

### 가. 지식재산권

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	파킨슨병 유발 돼지 모델 제작 및 이의 행동점수화 분석방법	한국	이병천 오현주 문준호 박은정 박선하 김현일 김지호 강상철	2014-06- 18	10-2014- 0074390				
발명특허	알츠하이머 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	한국	이병천 오현주 박정은 문준호 박은정 송길영	2015-06- 17	10-2015- 0085879				
발명특허	파킨슨 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	한국	이병천 오현주 김건아	2016-09- 29	10-2016- 0125806				
발명특허	Parkin 유전자 녹아웃된 파킨슨 질환 모델용 돼지 및 이의 용도	한국	이병천 오현주 김석중 박선하 문효은 김지호 김현일	2016-10- 04	10-2016- 0127412				
발명특허	타가 세포 이식용 스캐폴드 제조방법	한국	서울대학 교 산학협력 단/포항 공과대학 교산학협	2014-04- 30	10-2014- 0052782	서울대 학교 산학협 력단/포 항공과 대학교	2016-0 6-28	10-163596 4	

			력단			산학협 력단			
상표출원	ADPIG	한국	서울대 학교산 학협력 단	2016-08- 03	40-2016- 0059080				
상표출원	PDPIG	한국	서울대 학교산 학협력 단	2016-08- 03	40-2016- 0059082				
상표출원	에디피그	한국	서울대 학교산 학협력 단	2016-08- 03	40-2016- 0059079				
상표출원	피디피그	한국	서울대 학교산 학협력 단	2016-08- 03	40-2016- 0059081				

#### 나. 논문게재

번호	논문명	학술지명	주저 자명	학술지게재일	SCI여부
1	Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes	Theriogenology	Kim MJ	2012-01-19	SCI
2	Post-mortem re-cloning of a transgenic red fluorescent protein dog	Journal of veterinary science	Hong SG	2011-12-01	SCI
3	Minipig as laboratory animals: Facility management and husbandry	Reproductive and Developmental Biology	Koo OJ	2012-03-01	비SCI
4	Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture	Reproduction, Fertility and Development	Saadeldin IM	2011-11-28	SCI
5	Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	Cell Proliferation	Oh HJ; Park EJ	2012-08-27	SCI
6	Trichostatin A Improves Preimplantation Development of Bovine Cloned Embryos and Alters Expression of Epigenetic and Pluripotency Genes in Cloned Blastocysts	The Journal of veterinary medical science	Oh, H.J.	2012-06-18	SCI



7	Relationship between pregnancy rate and serum progesterone concentration in porcine embryo transfer	Journal of Veterinary Science	Moon JH	2013-12-27	SCI
8	The clinical impact of precise electrode positioning in STN DBS on three-year outcomes	Journal of the neurological sciences	Paek, S.H.	2013-03-07	SCI
9	A library of TAL effector nucleases spanning the human genome	Nature biotechnology	Kim, Yongsub	2013-02-17	SCI
10	Mitochondrial dysfunction of immortalized human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from patients with Parkinson's disease	Experimental Neurobiology	Moon H.E.	2013-12-31	SCI
11	Effect of 7,8-Dihydroxyflavone as an Antioxidant on In Vitro Maturation of Oocytes and Development of Parthenogenetic Embryos in Pigs	The Journal of reproduction and development	Choi, J.-Y.	2013-06-08	SCI
12	Post-maturation zona perforation improves porcine parthenogenetic trophoblast culture	Placenta	Saadeldin IM	2014-04-01	SCI
13	Hybrid scaffold composed of hydrogel/3D-framework and its application as a dopamine delivery system	Journal of Controlled Release	Kang KS1	2014-02-01	SCI
14	The influence of propofol and fentanyl on deep brain stimulation of the subthalamic nucleus	Journal of Korean Medical Science	Kim W1	2014-09-01	SCI
15	A spatial model showing differences between juxtacrine and paracrine mutual oocyte-granulosa cells interactions.	Indian journal of experimental biology	Saadeldin IM	2015-02-02	SCI
16	Sequential treatment with resveratrol-trolox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer	Theriogenology	Lee S	2015-07-01	SCI
17	Production of Mutated Porcine Embryos Using Zinc Finger Nucleases and a Reporter-based Cell Enrichment System	Asian-Australasia n Journal of Animal Sciences	Koo OJ	2014-03-01	SCI
18	Fully Implantable Deep Brain Stimulation System with Wireless Power Transmission for Long-term Use in Rodent Models of Parkinson's Disease.	Journal of Korean Neurosurgical Society	Heo MS	2015-03-01	SCI
19	Improvement of cloned embryos	Cell Reprogram.	Saadeldin	2014-06-01	SCI

	development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication.		IM		
20	Analysis of cell growth and gene expression of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as nuclear donor cell	Development, growth & differentiation	Oh HJ	2014-12-17	SCI
21	Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells	Nature methods	Kim D	2015-02-09	SCI
22	Optimizing electrical activation of porcine oocytes by adjusting pre- and post-activation mannitol exposure times	Reproduction in Domestic Animals	Kwon D	2014-12-01	SCI
23	A case report of preoperative and postoperative 7.0T brain MRI in a patient with a small cell glioblastoma.	Journal of Korean medical science	Paek SH	2014-07-11	SCI
24	Proposed Motor Scoring System in a Porcine Model of Parkinson's Disease induced by Chronic Subcutaneous Injection of MPTP.	Experimental Neurobiology	Moon JH	2014-09-01	SCI
25	Intrapancreatic ectopic splenic tissue found in a cloned miniature pig	Journal of veterinary science	Koo OJ	2015-06-30	SCI
26	Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels	Journal of veterinary science	Kang JT	2013-01-14	SCI
27	Oct4 overexpression facilitates proliferation of porcine fibroblasts and development of cloned embryos.	Zygote	Kim SJ	2015-10-01	SCI
28	The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells.	Experimental Neurobiology	Jo HY	2015-09-01	SCI
29	Supplementation with spermine during in vitro maturation of porcine oocytes improves early embryonic development after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer.	Journal Of Animal Science	Jin JX	2016-05-01	SCI
30	Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of cloned embryos	Theriogenology	Lee S	2016-03-01	SCI
31	Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve functional recovery through	Journal of Neuroscience Research	Park HW	2015-12-01	SCI

	thrombospondin1, pantraxin3, and vascular endothelial growth factor in the ischemic rat brain				
32	Long-Term Clinical Outcome of Internal Globus Pallidus Deep Brain Stimulation for Dystonia	PLoS One	Park HR	2016-01-01	SCI
33	A Short Review on the Current Understanding of Autism Spectrum Disorders.	Experimental Neurobiology	Park HR	2016-02-01	비SCI
34	Bilateral Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus under Sedation with Propofol and Fentanyl.	PLoS One	Lee WW	2016-03-01	SCI
35	Fractionated Stereotactic Gamma Knife Radiosurgery for Medial Temporal Lobe Epilepsy: A Case Report.	Experimental Neurobiology	Park HR	2016-04-01	비SCI

다. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명
1	Moon JH	Effects of porcine seminal plasma in in vitro culture of embryos	2012-06-22	대전
2	Oh HJ	Minipig adipose tissue-derived mesenchymal stem cell in pig cloning	2012-06-22	대전
3	Park EJ	Effects of embryo transfer media on porcine parthenogenetic embryos	2012-06-22	대전
4	Kim SJ	Targeted genome engineering using Programmable Nucleases	2012-07-20	서울
5	Park JE	Effect of follicular fluid concentration on in vitro maturation of porcine oocytes	2012-06-22	대전
6	Saadeldin IM	Using porcine granulosa cells as feeders for porcine and bovine trophectoderm cell culture	2012-01-09	Phoenix/USA
7	Moon HE	Mitochondrial dysfunction of immortalized human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells from patients with Parkinson's disease	2013-04-18	서울
8	Moon JH	Relationship between pregnancy rate and serum progesterone concentration in porcine embryo transfer	2013-04-25	대전
9	Hwang JH	The influence of propofol on the microelectrode recording of STN DBS	2013-05-28	Tokyo/Japan
10	Hwang JH	The clinical impact of precise electrode positioning in STN DBS on three-year outcomes	2013-05-28	Tokyo/Japan
11	Paek SH	Proposal of international multi-center clinical trial with DBS electrode localization analysis system (DELAS)	2013-05-28	Tokyo/Japan
12	Park JE	Effect of follicular fluid concentration on in vitro development of porcine oocytes and the expression of genes related to cumulus expansion and embryo	2013-01-20	Hannover/Germany
13	Kim GA	Effect of medium type for culture of adipose-derived mesenchymal stem cells on pre-implantation	2013-01-20	Hannover/Germany

development of cloned embryos				
14	Park EJ	Effects of amino acids in embryo transport media on porcine embryos	2013-01-20	Hannover/ Germany
15	Moon JH	Effects of boar seminal plasma in in vitro culture of porcine embryos	2013-01-20	Hannover/ Germany
16	Kim MJ	Pig cloning and gene expression patterns in minipig adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	2013-01-20	Hannover/ Germany
17	Oh HJ	Cloned transgenic piglets derived from adipose mesenchymal stem cells of transgenic pig using adipose stem cells	2013-02-26	Guangzhou/ China
18	문호은	Genetic Profiling in Immortalized Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells from the Idiopathic and Familial Parkin-Deficient Patients of Parkinson's Disease in Comparison with Non-PD patients	2013-10-26	한국
19	오현주	1) Production of cloned pigs expressing mutant human amyloid precursor protein	2014-03-26	스위스 제네바
20	최유빈	Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on maturation of porcine oocytes in vitro maturation and development of parthenogenetic embryos	2014-01-12	Reno, Nevada
21	김건아	Production of TALEN-mediated gene-modified pigs via somatic cell nuclear transfer	2015-11-15	호주
22	오현주	Adipose-derived mesenchymal stem cell co-culture enhances the in vitro developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos	2015-09-17	헝가리
23	오현주	Generation of transgenic pig carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin1 transgenes	2015-06-18	미국
24	김군학	Effects of Spermine on Porcine Oocytes In vitro Maturation and Early Embryonic Development after Parthenogenetic Activation	2015-05-16	한국
25	이상훈	Effects of lanosterol on Porcine Oocytes in vitro maturation and Subsequent Embryonic Development after Parthenogenetic Activation	2015-04-29	한국
26	이상훈	Serial treatment of resveratrol-trox improved embryonic development of porcine parthenotes	2015-01-10	파리, 프랑스
27	박은정	Porcine Oocytes Selection using Brilliant Cresyl Blue (BCB) and Embryo Development after Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)	2014-01-11	Reno, Nevada
28	오아라	Expression of Perilipin in Porcine Oocytes and Cumulus Cells at Different Stages of in vitro Maturation	2016-01-25	USA
29	김건아	Adipose-derived mesenchymal stem cell co-culture enhances the in vitro developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos	2015-09-18	Hungary

30	오현주	PET Imaging of glucose metabolism and amyloid- $\beta$ peptide in an APP pig model of Alzheimer's Disease	2016-07-24	캐나다 벤쿠버 컨벤션 센터
----	-----	---	------------	----------------------

라. 기술거래 및 기술료

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	특허출원	알츠하이머 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	(주) 옵티팜	2016-09-01	5,000,000
2	특허출원	파킨슨병 유발 돼지 모델 제작 및 이의 행동점수화 분석 방법	(주) 옵티팜	2016-09-07	3,000,000
3	노하우	체세포복제기법을 이용한 파킨슨 질환 모델용 돼지생산 기술	(주)틀젠	2016-09-07	5,000,000
4	노하우	유전자 녹아웃 돼지 세포 생산 노하우 및 PARK1 녹아웃 돼지 세포	(주) 옵티팜	2016-09-01	무상

마. 사업화

번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	PD KO 세포주	PD KO 세포주	(주) 틀젠	사업화예정	0	0	0	0
2	ADF1	AD 모델 미니피그	(주) 옵티팜	사업화예정	0	0	0	0
3	ADF1-2	AD 모델 미니피그	(주) 옵티팜	사업화예정	0	0	0	0
4	PDF-20	PD 모델 미니피그	(주) 옵티팜	사업화예정	0	0	0	0
5	PDM-11	PD 모델 미니피그	(주) 옵티팜	사업화예정	0	0	0	0

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
<p><b>1. 최종 성과 목표 및 달성도</b></p> <p>본 연구의 최종 목표는 인간의 대표적 퇴행성 뇌신경 질환인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)/파킨슨병(Parkinson's disease, PD)의 발생 기전 연구 및 질병 정복을 위한, <b>알츠하이머병(AD)/파킨슨병(PD)모델 복제 미니돼지를 생산</b>하는 것이다. 이를 위하여 첫 번째는 형질전환복제 기법을 이용한 2종의 AD 모델 미니돼지를 생산하였으며, 두 번째로 형질전환복제 기법과 유전자녹아웃 기법을 이용한 총 3종의 PD 모델 미니돼지를 생산하였다.</p> <p>생산된 5종의 복제미니돼지의 genome 상에서 병인유전자들의 도입 및 제거를 검증하였으며, 비 침습적 방법으로 <b>인간환자의 모델로서의 가능성을 검증하여 본 과제에서는 최종 목표를 100% 달성</b> 하였다.</p>				
<p><b>2. 연차별 주요 성과 목표 및 달성도</b></p>				
구분	세부 연구의 목표	가중치 (%)	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차 년도 (2011)	신경 독성물질 투여를 통한 모델 개발 및 검증	20	- 1종 이상 신경 독성물질 이용한 돼지생산 - 생산된 신경 독성물질 투여 돼지 사양관리 시스템 구축	100
	비침습적 분석위한 기법확립	20	- 일반 미니돼지 이용 행동학적 분석 프로토콜 확립 - 일반 미니돼지 이용 영상학적 분석 프로토콜 확립	100
	AD 및 PD 유발 유전자 스크리닝 및 벡터 제작	35	- 뇌신경세포 특이발현 프로모터 선정 및 대동물에서 프로모터 작동 효율 검증 - 형질 전환 체세포 작성 위한 원료세포인 미니돼지 세포주 확립 - 1종 이상 PD 병인 유전자 screening 및 확보 - 1종 이상 AD 병인유전자 조절 위한 벡터 및 세포주 구축	100
	복제수정란 생산 효율 향상을 위한 연구	25	- 복제수정란 생산을 위한 양질의 난자 확보 - 형질전환 복제 수정란 생산 효율 최적화	100
<p><b>※ 1차 년도 달성도</b></p> <p>1차 년도 주요 목표인 <b>독성물질 MPTP를 이용한 PD 미니 모델돼지의 1종의 생산을 완전하게 수행 완료</b>하였다. MPTP 투여 조건 및 생산된 돼지의 사양관리를 확립하였으며, 이를 2~5차 년도동안 생산되어진 모델돼지의 사양에 적용하였다. 또한 미니돼지를 비침습적으로 분석하기 위한 행동학적 영상학적 분석 프로토콜을 확립하여 본 연구에서 생산되어진 모델돼지들의 분석에 적용하였으며, 특히 MPTP모델 돼지를 활용하여 개발된 <b>PD 모델돼지의 행동학적 분석 프로토콜은 국내에 특허를 출원</b>하여 현재 등록을 위한 심사 중에 있다. 마지막으로 차 년도 AD와 PD 모델돼지 생산을 위한 유전자의 선정과 벡터 구축 등을 완료하였으며, 복제돼지 생산효율</p>				

증진을 위하여 돼지난자와 공여세포의 질적 향상을 위한 연구를 수행하여 <b>평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b> 하였다.				
2차 년도 (2012)	신경 독성물질 투여를 통한 모델 분석 시스템 확립	20	- PD 유발 신경독성 물질 투여한 돼지 모델 이용 행동학적/영상학적 평가 시스템 확립 - PD 유발 신경독성 물질 모델을 이용하여 유전자 profiling 비교 분석	100
	PD 병인 유전자 스크리닝 및 ZFN 백터 제작	30	- Parkin, PINK1, DJ1 및 ATP13A2 중 고효율의 ZFN 1종 선별하여 PD 병인유전자 targeting 및 검증 - ZFN 이용 KO 세포의 enrich 실험 조건 확립	100
	AD 병인 유전자 조절 미니돼지 생산	50	- APP 유전자 조절 복제수정란 생산 - 1종 이상 APP 유전자 조절 복제미니 돼지 생산 및 검증	100
	<b>※ 2차 년도 달성도</b> 2차 년도 주요목표인 <b>AD 병인 유전자 hAPP 발현 미니돼지를 1종을 생산</b> 하였으며, 1차 년도에 개발한 모델돼지 사양 조건을 적용하여 돼지 케어를 실시하였다. AD 모델 돼지 생산을 위해서 신경특이적 유전자 발현 유도를 위한 human synapsin promoter를 이용하였으며, <b>hAPP가 발현되는 형질전환돼지 생산하여 유전자 검증을 완료하였고 생산기술을 국내 특허로 출원</b> 하였다. 또한 1차 년도에 생산된 PD 유발 신경독성 물질 모델을 이용하여 유전자 profiling을 완료 하였다. 차 년도 PD 모델 돼지 생산을 위한 PD 병인 유전자 스크리닝 및 SCNA 과발현 세포주 준비 및 효율적 유전자 녹아웃을 위한 실험 조건을 확립하여 <b>2차년도 평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b> 하였다.			
3차 년도 (2013)	AD 병인 유전자 조절 미니돼지 검증 및 AD 병인 유전자 복합발현 세포주 확립	35	- APP 유전자 조절 AD 미니돼지의 wild type과 질병 모델돼지와 교배를 통한 생신전이 검증 - APP 유전자 조절 AD 미니돼지의 행동학적 /영상학적 모니터링을 통한 비교 분석 및 검증 - 1종 이상 AD 병인 유전자 복합 발현 미니돼지 세포주 생산	100
	PD 병인 유전자 조절 미니돼지 생산	50	- hSNCA 발현 복제수정란 생산 - 1종 이상 hSNCA 발현 복제 미니돼지 생산 - PD 병인 유전자 KO 세포주 확립 및 검증	100
	AD 모델 복제 미니돼지의 번식능 평가 및 제품화	15	- APP 유전자 조절 미니돼지의 유전자 profiling 비교 분석을 통한 검증 - 모델 미니돼지의 사육기법 확립 - 1종 이상 모델 미니돼지 유래 세포제제 제품화	100
	<b>※ 3차 년도 달성도</b> 3차 년는 주요 목표인 <b>PD 병인유전자인 hSNCA가 발현되는 미니돼지를 1종이상 생산하여 주요성과를 달성</b> 하였으며, 개체로부터 조직을 회수하여 1차 배양을 통해 hSNCA 세포주를 확립하였다. 2차 년도에 생산되어진 hAPP 발현돼지의 행동학적			

	<p>영상학적 평가를 실시하여 모델로서의 가치를 평가하였으며, hAPP 돼지의 번식능을 평가하여 wild 수컷돼지와 자연교배를 통해 산자를 생산하였다. 따라서 3차 년도에서는 1종의 PD 모델돼지 생산뿐만 아니라, <b>기년도 결과인 AD 돼지 (hAPP발현)의 생식선 전이를 검증하여 founder 로의 가치도 검증하여 평가의 착안점 및 기준을 100% 달성</b>하였다.</p>			
4차 년도 (2014)	AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지 생산	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AD 병인유전자 복합발현 모델 복제수정란의 생산</li> <li>- AD 병인유전자 복합발현 모델 복제돼지의 생산</li> </ul>	100
	PD 병인 유전자발현 미니돼지 검증 및 PD 유전자 KO 복제 미니 돼지 생산	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- hSNCA 발현 PD 미니돼지의 행동학적/영상학적 모니터링을 통한 비교 분석 및 검증</li> <li>- hSNCA 발현 PD 미니돼지의 유전자 profiling 비교 분석을 통한 검증</li> <li>- PD 유전자 KO 질병모델 복제돼지 1종 이상 생산</li> </ul>	100
	PD 모델 복제 미니돼지의 번식능 평가 및 제품화	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- wild type과 hSNCA 발현 PD 미니돼지와 교배를 통한 생식선 전이 검증</li> <li>- 모델 미니돼지의 사육기법 확립</li> <li>- 1종 이상 모델 미니돼지 유래 세포주체 제품화</li> </ul>	100
	<p><b>※ 4차 년도 달성도</b></p> <p>4차년도는 기년도의 결과를 바탕으로 <b>AD 병인유전자 복합 발현 미니돼지와 PD 유전자 KO 복제 미니돼지를 생산 완료</b>하였다. hAPP와 또 다른 AD 병인 유전자 PS1이 복합발현되는 미니돼지를 성공적으로 체세포핵이식을 통해 생산하였으며, PD 모델돼지 생산을 위해 TALEN을 이용하여 PD 병인 유전자 Parkin이 녹아웃된 세포를 생산, 체세포핵이식을 통해 Parkin 녹아웃 돼지를 성공적으로 생산하였다. 또한 3차년도 생산된 <b>PD 모델돼지(hSNCA발현돼지)의 교배를 통해 유전자의 생식선 전이 여부를 검증하여 4차년도의 목표도 100% 달성</b>하였다. 또한 2015년 국가연구개발 분야별 우수성과 추천을 받아 <b>“우수성과 100선 후보”로 추천</b>을 받아 결과의 우수성을 평가 받았다.</p>			
5차 년도 (2015)	체세포핵이식을 이용한 AD/PD 모델들의 재복제 생산	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phenotype 을 나타내는 개체의 세포주를 이용하여 founder 돼지의 생산</li> </ul>	100
	병인유전자 복합 발현 PD모델 돼지의 생산 및 검증	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1종 이상 PD 병인유전자 복합 조절된 모델 미니돼지 생산</li> <li>- PD 유전자 KO 복제 미니돼지의 행동학적/영상학적 모니터링을 통한 비교 분석 및 검증</li> <li>- PD 유전자 KO 복제 미니돼지의 유전자 profiling 비교 분석을 통한 검증</li> </ul>	100
	확립된 질환 모니터링 시스템 이용하여 형질 전환 복제돼지 평가	20%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 질환유전자 과발현-SCNT를 이용한 형질전환 복제돼지 생산 시스템의 확립 및 검증</li> <li>- TALEN-SCNT를 이용한 유전자 적중 질환모델 복제돼지 생산 시스템의 확립 및 검증</li> <li>- 인간과 유사한 AD/PD모델 확립 평가</li> </ul>	100



### ※ 5차년도 달성도

5차 년는 본 과제를 통해 기 생산되어진 복제된 개체들을 이용하여 복합발현 모델의 생산 및 임상증상을 나타내는 AD 모델 돼지를 선정하여 재복제를 시도하였다. 결과 도출을 위하여 이전결과에서 도출된 hSNCA 발현 PD 돼지와 Parkin 녹아웃 돼지의 자연교배를 통해 다중유전자 조절 PD 돼지를 성공적으로 생산하였다. 또한 뇌 영상 촬영 분석의 결과가 인간 AD환자와 유사한 증상을 보인 2년령 hAPP 발현 AD 돼지를 재복제 생산하여 목표를 성공적으로 달성하였다. 또한 산업화를 실시하기 위하여 본 과제를 통해 출원된 특허2건과 개발된 기술2건의 기술 실시를 완료 하였다.

최종적으로 본 과제는 5년 동안 총 2종의 AD모델 돼지와 3종의 PD 모델 돼지를 성공적으로 생산하였으며, 모델 돼지들의 행동·유전·영상의 분석을 통해 AD/PD 모델돼지로의 가능성을 검증하였다. Founder의 확립을 통해 3세대까지 성공적으로 모델돼지를 생산하였으며, 노령성 질병임에도 불구하고 2년령부터 임상 증상이 나타남을 확인하였다. 따라서 노령성 질환인 AD/PD의 phenotype을 모델돼지의 어린 나이에서 확인할 수 있었으며, 이를 통해 본 과제의 목표를 100% 성공적으로 달성하였다.

### 3. 기술발전의 기여도

본 연구의 학술적 측면의 기여는 다음과 같다. 돼지의 체세포핵이식 기법의 향상 연구를 통해 보다 효율적으로 복제동물을 생산하는데 기여 할 수 있다. 본 연구 수행을 통해 screening 된 유전자가 AD/PD 모델 복제 미니돼지에서 어떤 역할을 하는지, 어떠한 작용 기전을 통하여 임상증상이 나타나게 되는지에 대한 보다 정밀한 기전연구가 가능하다. 암수 AD/PD 미니돼지의 복제 및 교배를 통한 생산으로 질병유전자가 안정적으로 발현되는 가계도를 형성하고, 동일한 유전형질을 지닌 질환모델 복제동물을 생산함으로써, 산발적으로 나타나는 다양한 AD/PD의 유형들을 반복적으로 생산하여, 병인의 정확한 기전연구에 활용 가능하다.

기술적 측면의 기여는 다음과 같다. 소동물 모델(쥐)을 넘어 대동물 모델(돼지)을 활용함으로써 국내외 생명과학 지식 및 관련기술의 비약적 발전을 유도하는 촉매제 역할을 할 수 있다. 또한 타 질환 모델 대동물 연구의 분야에 기여할수 있을 것이다.

신경보호 물질 효능을 평가하는 기술 개발 및 치료제 개발 연구에 있어서 인간과 근접한 중/대동물 모델을 이용하는 큰 진보가 기대된다. 또한 AD/PD모델 복제미니돼지의 생산으로 진단 연구 및 방법에 있어 제한성이 줄어들고 특수 시설이 아닌 기존의 시설을 갖춘 연구 기관 및 대학교에서도 활발히 연구를 진행하여 AD/PD 질환의 바이오마커 및 뇌 영상 기법 개발의 발달에 큰 향상을 가져올 수 있을 것이다. 관련 기술인력 확보를 통해 다양한

형태의 유전자 조절 유용동물 확립 기술 및 사육 기술의 개발에도 기여할 것이다.

마지막으로 경제적 측면에서의 기여이다. 돼지의 단순 식량자원으로서의 이용에서 벗어나 질병의 조기 진단, 질병예방 및 이를 위한 고부가가치 바이오 소재 등의 생산 및 산업화가 가능할 것이다. 신경질환모델 미니돼지는 치매 등 치료제 개발 연구에 활용될 것이며 그로 인해, AD/PD 질병진행을 막을 수 있는 약제 등 개발 시 그 유효성과 안전성 평가율을 증진시킬 것이다. 인구 노령화로 인해 그 규모가 기하급수적으로 증가하고 있는 AD/PD 치료제 시장에 기여할 수 있을 것이다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 AD/PD 모델돼지를 활용한다면 치료제 개발 연구에 도움을 줄 것으로 기대된다. 이를 통해 건강한 사회를 구현, 노인 복지와 일상생활의 삶에 큰 기여가 가능할 것이며, 모델돼지의 개발을 통해 확보된 대한민국의 지적재산권은 관련 연구 및 타 질병모델 대동물의 개발에 기여할 것이다.

## 제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 1. 추가연구의 필요성

본 연구를 통하여 돼지를 이용한 퇴행성 뇌질환 모델의 생산 가능성을 검증하였다. 그러나 과제가 5차년임에도 불구하고 돼지의 모니터링이 최장 3년밖에 되지 않은 문제점이 발생하였으나, 영상분석과 행동분석 결과에서 인간의 환자와 유사한 임상증상을 확인 할 수 있었다.

본 과제의 연구결과에서 알 수 있듯이 생산된 5종 모델돼지의 상업적 활용을 위해서는 장기간의 추가 분석 연구를 해야 할 필요가 있다. 실제로 파킨슨병에 있어서는 tremor, bradykinesia, rigidity, postural instability의 주요 4가지 증상이 있으며, 이 증상 중 postural instability는 발병 10년에서 12년 이상의 후기단계에 gait difficulty(PIGD)와 동반되어 나타나기 때문에 행동의 지속적인 관찰이 필요하다. 그러므로 본 연구의 5년이라는 짧은 기간으로는 모든 현상을 관찰을 할 수 없었을 것으로 본다. 또한 본 과제에서 생산된 AD 모델도 현재 founder 돼지의 연령이 3살이며, 2살에 이미 일부 증상을 나타내고는 있으나 아밀로이드 단백질의 과축적을 관찰하기에는 현재의 시기가 이른 것이 사실이다. 따라서 향후 영상학적 분석을 통해 나타나는 결과를 추가 분석하여 결과를 도출해야할 필요성이 있다.

본 연구진 이외에 돼지를 이용하여 알츠하이머를 연구하는 덴마크 연구진은 2009년 swedish form의 돌연변이 APP형 유전자를 지닌 모델 돼지를 본 연구진 보다 먼저 발표 (Kragh et al., Transgenic Res, 2009)하였으나, 2016년 현재 8살인 돼지에서 아직도 행동학적 반응이나 병리학적인 변화를 관찰하지 못하고 있다고 보고하고 있다 (Holm et al., Journal of Pathology, 2016). 그럼에도 불구하고 돼지의 phenotype 을 분석하기 위하여 8년째 연구를 진행 중인 것을 고려했을 때, 본 연구진에 의해 개발되어진 AD 돼지는 2살 때부터 변화가 관찰되었으며, 지속적인 관찰을 통해 humanized model pig으로의 완전한 검증을 완료할 수 있을 것으로 기대되며, 모델돼지로 확립될 경우 과학적인 기술의 파급력뿐만 아니라 경제적 효과도 클 것으로 기대된다.

그리고 본 과제 4, 5 차년도에 생산되어진 PD 녹아웃 돼지와 다중유전자 조절 돼지들의 경우 그 관찰기간이 너무 짧아 모델로의 가치를 평가하기에 한계가 있으며, 과제 종료로 더 이상의 검증이 불가한 상황이다. 이유는 돼지의 생산뿐만 아니라 돼지의 사양과 지속적인 분석은 단일 기관에서 수행하는 것은 불가능하며, 본 과제와 같이 여러 전문기관이 공동 연구를 통해 분석해야 가능하기 때문이다.

본 연구에서는 유전자가위를 표적유전자 녹아웃을 위해 사용하는 방식에 대해 최적화 하고 성공적으로 수행하였다. 지난 몇 년간 유전자교정의 빠른 발전을 통해 유전자 녹아웃만이

아니라 유전자 녹인 (knockin) 방식을 통해 정교하고 정확한 유전정보 활용이 가능성이 보여졌다. 유전자 녹인 복제돼지 생산 기술은 인간 질병과 관련되는 유전형질을 정확히 돼지에 적용하여 더욱 정교한 질병 모델을 생산하게 해줄 수 있다. 따라서 본 과제에서 확립된 유전자 녹아웃 돼지생산기술을 바탕으로 유전자 녹인을 수행하는 기술을 확립할 수 있다면 그 효용이 매우 높을 것이다.

따라서 본 과제는 최초의 퇴행성 뇌질환 모델돼지를 정립하기 위하여 추가적인 연구가 필요하다.

## 2. 타 연구에의 응용

본 과제에서 개발된 돼지의 행동학적 분석 프로토콜과 영상학적 분석 프로토콜은 인간환자의 조기진단법을 개발하는데 응용이 가능할 것이다. 그리고 PD 질병 모델 돼지 생산을 위해 개발한 유전자 녹아웃 복제 돼지 생산 기술은 다양한 질병 및 산업 유용 표현형을 갖는 돼지 생산을 위해 사용될 수 있다. 유전자 녹아웃을 통해 생산할 수 있는 질병 모델로는 비만, 대사성질환, 암과 같은 다양한 주요 인간 질병이 있음. 또한 면역제거 돼지는 인간 치료제 개발 과정에서 유용하게 사용될 수 있음. 산업적 유용성으로는 질병저항동물의 개발 및 환경친화적 돼지의 개발 등에 응용 가능하다.

## 제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

## 제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○		

## 제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

# 제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

## <1세부: 체세포 핵이식 기법에 의한 퇴행성 뇌신경 질환 미니돼지 생산>

- (1) 연구활동종사자 환경안전교육 실시
  - (가) 정기 교육 - 이공계 및 미술대 대학원 신입생을 대상으로 년2회 집체교육
  - (나) 온라인 교육 - 연구활동종사자를 대상으로 온라인 안전교육 실시
  - (다) 수시 교육 - 실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 기관의 요청에 의해 실시
  
- (2) 실험실 안전점검 실시
  - 연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 의거 이공계 대학, 연구소 실험실 및 미술대학 작업장을 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀 안전진단을 실시
  - (가) 일상점검 - 연구개발활동 전 연구개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검
  - (나) 정기점검 - 실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시하고, 그 결과 「서울대학교실험실안전 白書」를 배포하여 부적합 사항에 대하여 개선요구
  - (다) 특별안전점검 - 폭발사고, 화재사고 등 연구활동종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 총장의 지시에 의해 실시
  - (라) 정밀안전진단 - 정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해 요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

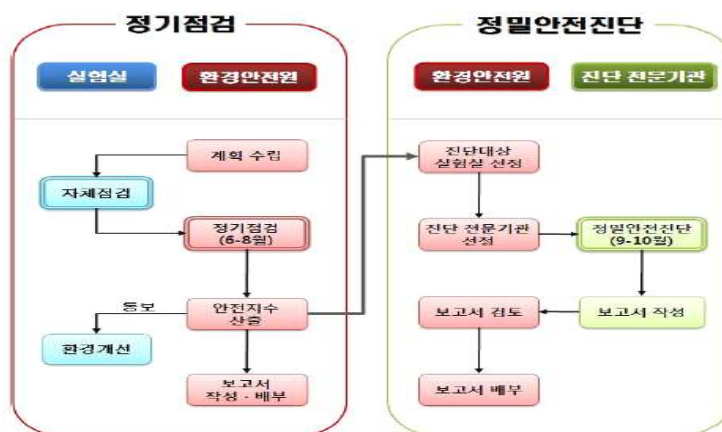


그림 252. 실험실 안전점검 체계

- (3) 실험실 안전사고 대응 및 예방

- 완전밀폐형시약장 설치, 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시, 실험실 사고사례 전파, 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포 등이 대응 조직에 의해 진행

(4) 유전자 변형 생물(LMO) 실험실 안전관리

- 「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률」(2008.1)과 보건복지부 「실험실 생물 안전지침」(2006.12)에 따라 실험실내 생물안전 확보를 위하여 생물실험에 대한 신고·허가/안전교육/안전점검을 「서울대학교 생물안전관리」 체계로 운영
- (가) 병원체 및 LMO 실험실 안전교육
- (나) LMO 실험실 안전점검 - 2등급 이상 생물안전연구시설(LMO)에 대하여 미래창조과학부와 공동으로 점검실시 및 점검 후 개선여부 확인

(5) 연구활동종사자 특수건강검진 실시

- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시

(6) 연구활동종사자 보험가입

- (가) 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함
- (나) 연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적 가입
- (다) 가입회사: 교육시설재난공제회
- (라) 가입대상: 학부생, 대학원생, 연구원 (보조연구원 포함)

## <2세부: 질환 모델 미니돼지의 영상학적 분석 및 행동학적 분석>

(1) 안전관리 대책

- (가) 서울대 의생명연구원 실험안전실의 기관 안전 조치에 의거하여 연구를 수행함.
- (나) 연구기관의 안전 조치 및 관리 책임자를 본원에서 임명하여 생물안전 책임자, 관리자, 생물안전위원회 등 안전관련 위원회를 운영하고 연구소장 직속의 실험안전실이 안전관리를 하고 있음.
- (다) 생물실험에 필요한 1, 2, 3등급의 시설은 LMO 시설 신고 또는 허가를 받아 전문인력에 의해 운영 되고 있음.
- (라) 실험안전실(02-2072-4432): 의생명 연구원 실험실 안전관리 총괄 강지영 실장(생물안전 전문가), 김성훈(소방 안전 방재 전공산업안전기사, 위험물안전 기사 자격증 보유)
- (마) 연구 시설 : LMO 2등급 실험실 사용 LML15-548, 생물안전 3등급 KCDC 09-3-06
- (바) 동물실 (ABSL1: LML 14-442, ABSL2 LML12-46 )

- (2) 연구안전관리지침 작성 및 비치
  - (가) 연구안전관리지침 MSDS, 비상연락망, 연구실 안전관리지침 제작
  - (나) 제작 후 각 층 별, 실별로 비치 및 부착
- (3) 안전점검 실시 : 매일 점검, 정기 점검 등 / 분기별 1회 합동 점검
- (4) 정밀안전진단 실시 및 결과 보고 : 3년에 1회 / 건축과
- (5) 연구활동종사자 보험 가입 :
  - (가) 보험명: AIG 손해보험주식회사/의생명연구원 재실 연구활동 종사자 책임보험
  - (나) 가입대상 :의생명연구원 연구활동종사자, 연구원내방하는 제3자
  - (다) 보장내역 :보험담보지역내 발생한 사고로 인한 부상, 질병, 신체장애, 사망,
  - (라) 보상금액 :대인 1인당 1억 1사고당 10억원 대물 1사고당 3천만원
  - (마) 특약 :치료비 1인당 5백만원, 1사고당 1천만원
- (6) 연구활동종사자(연구원) 건강검진 실시:
  - 실험 실시 전 건강검진, 매년 전원 건강검진 실시 및 인플루엔자 접종 실시, 연구 관련 백신 접종, 3등급 이상 혈청 보관
- (7) 연구실 안전교육 실시(필수 집체 교육 외 산안법에 따른 24시간 교육을 이수 하도록 지원, LMO 생물안전 교육 매년 2회 실시, 소방안전 교육 실시, 유해 위험물질 안전교육 등의 교육 포함 24시간 교육)
- (8) 생물안전위원회 운영 11명의 위원 (2007년부터 운영), 연간 50건 이상 심의
- (9) 기타 연구안전 시설 개선 사항
  - (가) 안전보호구함 제작 및 설치 (층별), 안전포스터, MSDS(물질안전보건자료) 비치(층별)
  - (나) 응급샤워기, 아이워셔 설치 및 운영
  - (다) 유해화학물 보관 캐비닛, 방폭 캐비닛 전 층 배치
  - (라) 유기용매 폐기 관리시스템 운영
  - (마) 생물안전사고, 감염관리, 보건관리 응급조치 지침 운영
  - (바) 생물 보안 : 출입문 지문등록 시스템 운영, 실험 안전실 모니터링 시스템 구축

## **<1협동: 질환 모델 미나되지 생산을 위한 ZFN 합성 및 유전자 프로파일링>**

- (1) 연구실 안전조치 이행계획
  - (가) 연구자 교육 훈련 사항
    - 실험실의 안전을 확보하고 연구 활동 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구 활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경 안전교육이 의무화됨에 따라 관련 종사자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
    - 내용 : 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항, 연구실내 유해,위험요인 및 물질안전자료에 관한 사항, 안전한 연구개발 활동에 관한 사항, 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항, 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항, 안전표지



에 관한 사항

(나) 추가 이행 계획

- 신규 연구활동 종사자 채용 시 관련 법규에 의거 환경안전교육을 실시할 예정임

## <2협동: 질환 모델 돼지의 사육 및 관리기법 확립>

(1) 안전위원회

(가) 안전위원회 구성 - 대표이사, 사업부장, 간사 등으로 구성



(나) 정기 회의 - 월 1회(매 월 첫째 주 화요일)

(다) 역할 - 안전 점검, 안전개선 요청서 심의, 안전보건 교육(매 월 첫째 주 월요일)

(2) 안전점검 실시

(가) 일상점검 - 실험실 안점점검표 작성(일일, 주간), 「산업안전보건법」 제 41조 제1항 및 동법 시행규칙 제92조에 의한 ‘물질안전보건자료’ 비치

(가) 정기점검 - 월 1회 안전위원회 정기회의 후 사업장 안전 점검

(3) 안전사고 대응 및 예방

(가) 보호장구 지급 - 보안경, 보호장화, 방독면 등의 보호장구 지급

(나) SOP - ‘비상상황 발생 시 행동규정’에 따른 대응 및 비상연락망 구축

(4) 근로자 건강검진 및 산업재해보험 가입

(가) 「산업안전보건법」 제43조에 따라 건강검진을 1회/년 진행하며, 「산업재해보상보호법」에 따른 임직원상해보험 가입

(나) 가입회사: 흥국화재, 동부화재, 한화생명

## 제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells	서울대학교	교신	Cell Proliferation	3.084	2012-10-27	중복사사	SCI
2	논문	Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells	(주)톨젠	공동	Nature methods	25.328	2016-10-04	중복사사	SCI
3	특허	파킨슨 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	출원기관 및 발명인	대한민국		2016-09-29		출원
4	특허	파킨슨 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	출원기관 및 발명인	대한민국		2015-02-09		출원
5	특허	알츠하이머 질환 모델용 형질전환 돼지 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	출원기관 및 발명인	대한민국		2015-06-17		출원

## 제 11 장. 기타사항-해당없음

코드번호		D-13
○		

## 제 12 장. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. <i>Science</i> . 2002 295(5556):865-8.		
2. Berti V, Pupi A, Mosconi L. PET/CT in diagnosis of movement disorders. <i>Ann N Y Acad Sci</i> 2011 1228:93-108.		
3. Bjarkam CR1, Nielsen MS, Glud AN, Rosendal F, Mogensen P, Bender D, Doudet D, Møller A, Sørensen JC. Neuromodulation in a minipig MPTP model of Parkinson disease. <i>Br J Neurosurg</i> . 2008 22 Suppl 1:S9-12.		
4. Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. <i>FEBS J</i> . 2012 279:1156-66.		
5. Calderwood L, Holm IA, Teot LA, Anselm I. Adrenal Insufficiency in Mitochondrial Disease: A Rare Case of GFER-Related Mitochondrial Encephalomyopathy and Review of the Literature. <i>J Child Neurol</i> . 2016 31(2):190-4.		
6. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. <i>Nature</i> . 2006 441(7097):1162-6.		
7. Crowther DC, Kinghorn KJ, Page R, Lomas DA. Therapeutic targets from a Drosophila model of Alzheimer's disease. <i>Curr Opin Pharmacol</i> . 2004 4(5):513-6.		
8. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, Switzer RC 3rd, Ahmad SO, Sunkin SM, Walker D, Cui X, Fisher DA, McCoy AM, Gamber K, Ding X, Goldberg MS, Benkovic SA, Haupt M, Baptista MA, Fiske BK, Sherer TB, Frasier MA. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. <i>Neurobiol Dis</i> . 2014 70:190-203.		
9. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. Genetic animal models of Parkinson's disease. <i>Neuron</i> . 2010 66(5):646-61.		
10. Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Amacher SL. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. <i>Nat Biotechnol</i> . 2008 26(6):702-8.		
11. Dustin D, Hall BM, Annapragada A, Pautler RG. Neuroimaging in Alzheimer's disease: preclinical challenges toward clinical efficacy. <i>Transl Res</i> . 2016 175:37-53.		
12. Feany MB, Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease. <i>Nature</i> . 2000 404(6776):394-8.		
13. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of		

zinc-finger nucleases. *Science*. 2009 325(5939):433.

14. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 100(7):4078-83.
15. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 297(5580):353-6.
16. Holm IE, Alstrup AK, Luo Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *J Pathol*. 2016 238(2):267-87.
17. Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 101(17):6623-8.
18. Jakobsen JE, Johansen MG, Schmidt M, Dagnæs-Hansen F, Dam K, Gunnarsson A, Liu Y, Kragh PM, Li R, Holm IE, Callesen H, Mikkelsen JG, Nielsen AL, Jørgensen AL. Generation of minipigs with targeted transgene insertion by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Transgenic Res*. 2013 22(4):709-23.
19. Jenner P. From the MPTP-treated primate to the treatment of motor complications in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009 15 Suppl 4:S18-23.
20. Kazumata K, Dhawan V, Chaly T, Antonini A, Margouleff C, Belakhlef A, Neumeier J, Eidelberg D. Dopamine transporter imaging with fluorine-18-FPCIT and PET. *J Nucl Med*. 1998 39:1521-30.
21. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*. 2014 15(5):321-34.
22. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998 392(6676):605-8.
23. Klohs J, Rudin M, Shimshek DR, Beckmann N. Imaging of cerebrovascular pathology in animal models of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2014 13;6:32.
24. Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Holm IE, Jakobsen JE, Johansen MG, Purup S, Bolund L, Vajta G, Jørgensen AL. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res*. 2009 18(4):545-58.
25. Kuntner C, Kesner AL, Bauer M, Kremslehner R, Wanek T, Mandler M, Karch R, Stanek J, Wolf T, Müller M, Langer O. Limitations of small animal PET imaging with [18F]FDDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol*. 2009 11(4):236-40.
26. Lee HJ, Kim E, Kim JS. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res*. 2010 20(1):81-9.
27. Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E,

- Price DL, Sisodia SS. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci*. 1996 16(23):7513-25.
28. McLean JR, Hallett PJ, Cooper O, Stanley M, Isacson O. Transcript expression levels of full-length alpha-synuclein and its three alternatively spliced variants in Parkinson's disease brain regions and in a transgenic mouse model of alpha-synuclein overexpression. *Mol Cell Neurosci*. 2012 49(2):230-9.
29. Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Jouvenot Y, DeKever RC, Gregory PD, Urnov FD, Holmes MC. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 104(9):3055-60.
30. Molinet-Dronda F, Gago B, Quiroga-Varela A, Juri C, Collantes M, Delgado M, Prieto E, Ecay M, Iglesias E, Marín C, Peñuelas I, Obeso JA. Monoaminergic PET imaging and histopathological correlation in unilateral and bilateral 6-hydroxydopamine lesioned rat models of Parkinson's disease: a longitudinal in-vivo study. *Neurobiol Dis*. 2015 77:165-72.
31. Nikolaus S, Antke C, Kley K, Beu M, Wirrwar A, Muller HW. Pretreatment with haloperidol reduces (123)I-FP-CIT binding to the dopamine transporter in the rat striatum: an in vivo imaging study with a dedicated small-animal SPECT camera. *J Nucl Med* 2009 50:1147-52.
32. Niñerola-Baizán A, Rojas S, Roé-Vellvé N, Lomeña F, Ros D, Pavía J. Dopamine transporter imaging in the aged rat: a [<sup>123</sup>I]FP-CIT SPECT study. *Nucl Med Biol*. 2015 42(4):395-8.
33. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, Liu O, Wang N, Lee G, Bartsevich VV, Lee YL, Guschin DY, Rupniewski I, Waite AJ, Carpenito C, Carroll RG, Orange JS, Urnov FD, Rebar EJ, Ando D, Gregory PD, Riley JL, Holmes MC, June CH. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2008 26(7):808-16.
34. Pesah Y, Pham T, Burgess H, Middlebrooks B, Verstreken P, Zhou Y, Harding M, Bellen H, Mardon G. *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development*. 2004 131(9):2183-94.
35. Rosen RF, Farberg AS, Gearing M, Dooyema J, Long PM, Anderson DC, Davis-Turak J, Coppola G, Geschwind DH, Paré JF, Duong TQ, Hopkins WD, Preuss TM, Walker LC. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J Comp Neurol*. 2008 509(3):259-70.
36. Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*. 2004 6(11):1054-61.
37. Senée V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, Charon C, Nicolino M, Boileau P, Cavener DR, Bougnères P, Taha D, Julier C. Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital

hypothyroidism. *Nat Genet.* 2006 38(6):682-7.

38. Søndergaard LV, Ladewig J, Dagnæs-Hansen F, Herskin MS, Holm IE. Object recognition as a measure of memory in 1-2 years old transgenic minipigs carrying the APPsw mutation for Alzheimer's disease. *Transgenic Res.* 2012 21(6):1341-8.
39. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004 304(5674):1158-60.
40. Wang X, Cao C, Huang J, Yao J, Hai T, Zheng Q, Wang X, Zhang H, Qin G, Cheng J, Wang Y, Yuan Z, Zhou Q, Wang H, Zhao J. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2016 9:6:20620.
41. West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 102(46):16842-7.
42. Whyte JJ, Zhao J, Wells KD, Samuel MS, Whitworth KM, Walters EM, Laughlin MH, Prather RS. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev.* 2011 78(1):2.
43. Wilson CA, Doms RW, Zheng H, Lee VM. Presenilins are not required for A beta 42 production in the early secretory pathway. *Nat Neurosci.* 2002 5(9):849-55.
44. Yao J, Huang J, Hai T, Wang X, Qin G, Zhang H, Wu R, Cao C, Xi JJ, Yuan Z, Zhao J. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs. *Sci Rep.* 2014 5:4:6926.
45. Zheng MQ, Yin DZ, Zhang L, Lei B, Cheng DF, Cai HC, Han YJ, Wu MX, Zhang H, Wang J. Biological characters of [18F]O-FET-PIB in a rat model of Alzheimer's disease using micro-PET imaging. *Acta Pharmacol Sin.* 2008 29(5):548-54.
46. Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao B, Liu Z, Lai S, Yi X, Guo L, Esteban MA, Zeng Y, Yang H, Lai L. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci.* 2015 72(6):1175-84.

## 8. 뒷면지

### 주 의

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