

발간등록번호

11-1543000-001495-01

**돼지 common cytokine receptor gamma(IL-2R γ)
유전자 적중 복제 미니 돼지 개발과
이를 이용한 사람 조혈 줄기세포 생체 대량 배양**

최종보고서

2016.11.16

주관연구기관 / 건국대학교
협동연구기관 / 부산대학교
경남과학기술대학교

농림축산식품자료실



0025119

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 common cytokine receptor gamma(IL-2R γ) 유전자 적중 복제 미니 돼지 개발과 이를 이용한 사람 조혈 줄기세포 생체 대량 배양” (개발기간 : 2011. 9. 23 ~ 2016. 9. 22) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 11 . 16.

주관연구기관명 : 건국대학교	김 진 회
협동연구기관명 : 부산대학교	조 성 근
협동연구기관명 : 경남과학기술대학교	민 계 식
참여기관명 : 건국대학교 산학	서 정 향



주관연구책임자 :	김 진 회
협동연구책임자 :	조 성 근
협동연구책임자 :	민 계 식
참여기관책임자 :	서 정 향

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	111047-5	해당 단계 연구 기간	2011.9-2016.9	단계 구분	5 (해당단계)/ 5 (총 단계)
연구사업명	중사업명	농생명산업기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	돼지 common cytokine receptor gamma(IL-2R γ) 유전자 적중 복제 미니 돼지 개발과 이를 이용한 사람 조혈 줄기세포 생체 대량 배양			
	세부과제명	1세부 : ZFN을 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터 제작과 이를 이용한 knock-out 미니돼지 체세포주 확립 1협동 : 유전자 적중 돼지 면역조직의 조직학적 또는 면역 세포학적 특성 분석을 통한 면역 결핍 특성 분석 2협동 : 유전자 적중 돼지를 이용한 사람 조혈 줄기세포의 이종 이식을 통한 사람 줄기세포 생체 증식 동물 모델 확립			
연구책임자	김진희	해당단계 참여 연구원 수	총: 13 명 내부: 7 명 외부: 6 명	해당단계 연구개발비	정부:280,000천원 민간: 70,000천원 계:350,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 23 명 내부: 8 명 외부: 15 명	총연구개발비	정부:1,400,000천원 민간: 350,000천원 계:1,750,000천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교			참여기업명 : 광개토태우 농업법인 (주)	
위탁연구	연구기관명: 없음			연구책임자: 없음	
▶ 1 연구 성과 (돼지 IL-2Rγ유전자 적중 미니돼지 체세포주 개발 및 복제돼지 생산) 1)돼지 IL-2R γ 유전자 분리 및 염기서열 분석 2)Zinc finger nuclearase(ZFN)을 이용한 IL-2 유전자 적중 vector 제작 3)미니돼지 체세포주를 이용한 유전자 적중 체세포주 선별 4)형질전환 체세포주를 이용한 복제 돼지 생산 및 라인 구축				보고서 면수 : 193	

▶ 제1협동 연구 성과 (복제 돼지 생체 면역세포 특성 분석)

- 1)면역조직의 병리학적 검증 분석을 통한 면역조직 특성 분석
- 2)복제돼지 면역조직에서의 자연면역세포 및 획득면역세포의 분화 및 발달 특성 분석
- 3)면역조절 인자 및 면역활성화 제제 자극에 따른 면역세포의 증식 및 활성화 특성 분석

▶ 제2협동 연구 성과 (복제돼지 생체 사람 조혈줄기세포의 생체 대량 배양 기술 개발)

- 1)사람 조혈줄기세포의 복제돼지 골수조직 이식을 통한 생체 이식 기술 개발
- 2)돼지 이종 조혈조직에서의 이식 사람 줄기세포의 자기복제 특성 분석
- 3)유전학적 또는 세포학적인 검증 방법을 통한 조혈줄기세포의 분화 및 증식 특성 분석

국문 요약문

					D-01
연구의 목적 및 내용	<p>21세기 생명과학 분야는 다양한 유래의 줄기세포를 활용한 맞춤형 세포 및 조직 재생을 통한 치료제 개발이라 할 수 있다. 본 연구과제는 선천성 중증 면역결핍 원인 유전자인 IL-2Rγ가 결핍된 미니돼지 체세포를 개발하고 이를 이용한 복제 미니 돼지를 생산하여 선천성 면역결핍 돼지 동물모델을 구축하고자 한다. 최종적으로 사람 줄기세포 생체 배양 모델로의 활용을 위하여 사람의 조혈줄기세포를 돼지 골수조직에 이식을 실시하여 돼지 생체에서 사람 줄기세포의 대량 배양을 목적으로 한다.</p>				
연구개발성과	<p>(1) 돼지 IL-2Rγ유전자 적중 미니돼지 체세포주 개발 및 복제돼지 생산</p> <ul style="list-style-type: none"> • 돼지 IL-2Rγ 유전자 분리 및 염기서열 분석 • Zinc finger nuclease(ZFN)을 이용한 IL-2 유전자 적중 vector 제작 • 미니돼지 체세포주를 이용한 유전자 적중 체세포주 선별 • 형질전환 체세포주를 이용한 복제 돼지 생산 및 라인 구축 <p>(2) 복제 돼지 생체 면역세포 특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 면역조직의 병리학적 검증 분석을 통한 면역조직 특성 분석 • 복제돼지 면역조직에서의 자연면역세포 및 획득면역세포의 분화 및 발달 특성 분석 • 면역조절 인자 및 면역활성화 제제 자극에 따른 면역세포의 증식 및 활성화 특성 분석 <p>(3) 복제돼지 생체 사람 조혈줄기세포의 생체 대량 배양 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 사람 조혈줄기세포의 복제돼지 골수조직 이식을 통한 생체 이식 기술 개발 • 돼지 이종 조혈조직에서의 이식 사람 줄기세포의 자기복제 특성 분석 • 유전학적 또는 세포학적인 검증 방법을 통한 조혈줄기세포의 분화 및 증식 특성 분석 				
연구개발성과의 활용 계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> 면역거부반응이 제어된 이종 장기 이식용 동물모델로의 활용 <input checked="" type="checkbox"/> 사람 유도만능줄기세포(iPSCs) 생체이식을 통한 환자 맞춤형 조직 재생 모델로의 활용 <input checked="" type="checkbox"/> 사람 성체 줄기세포 생체 이식을 통한 생체 대량 배양용 바이오리액터로의 활용 <input checked="" type="checkbox"/> 생체 암 발병 기전 연구와 치료제 효능 및 안전성 검증용 동물모델로의 활용 <input checked="" type="checkbox"/> 치료용 항체 단백질 제작 및 대량 생산용 생체 모델로의 활용 				
중심어 (5개 이내)	IL-2R γ	중증 복합 면역결핍증	ZFN	복제 미니돼지	사람조혈줄기세포

영문 요약문

		D-02			
Purpose& Contents	In biomedical research fields, such as regenerative medicine, various stem cells promises the humanization of tissue for xenotransplantation, and the evaluation of stem cells for clinical therapy. We report here the generation and preliminary evaluation of a porcine IL-2R γ Knock-out pigs model. These genetically engineered pigs could be a valuable resource as models for human patients with analogous immunodeficiencies and for large scale proliferation of grafts derived from human hematopoietic stem cells.				
Results	<p>(1) Development of porcine IL-2Rγ targeted mini pig fibroblast and generation of IL-2Rγ Knock-out pigs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isolation of porcine IL-2Rγ gene and analysis of nucleotide • Constructions of IL-2Rγ gene targeted vector by using zinc finger nuclearase (ZFN) • Selection of IL-2Rγ gene targeted pig fibroblast • Generation of IL-2Rγ gene targeted pig <p>(2) Characterization of lymphocytes from IL-2Rγ gene targeted pig</p> <ul style="list-style-type: none"> • Characterization of lymphocytes by using immunohistochemistry • Characterization of innate and adaptive immunity differentiation/development • Proliferation of lymphocytes by using immunity related regulation factor or activation factor <p>(3) Development of large scale human hematopoietic stem cells system in IL-2Rγ Knock-out pigs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Technology development of organ transplantation through IL-2Rγ Knock-out pigs who has human hematopoietic stem cells • Characterization of self renewal of transplanted hematopoietic stem cells into IL-2Rγ Knock-out pigs • Characterization of transplanted hematopoietic stem cells by using determination of genetic and cellular biology 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <input checked="" type="checkbox"/> Application of xeno-transplantation pig model which is immunodeficiency <input checked="" type="checkbox"/> Application of patient-specific organ from induced human induced pluripotent stem cells <input checked="" type="checkbox"/> Application of bioreactor for large scale culture system of human hematopoietic cell <input checked="" type="checkbox"/> Application of preliminary evaluation of a porcine SCID model to facilitate human cancer studies and the evaluation of stem cells for clinical therapy <input checked="" type="checkbox"/> Application of large scale culture system of antibody for therapy 				
Keywords	IL2R γ	severe combined immunodeficie ncy	ZFN	cloned pigs	human hematopoietic stem cells

< CONTENTS >

Chaper 1. Overview and performance goals of the research-----	11
Section 1 The need and objective for research and development-----	11
Section 2 The scope of R & D-----	22
Chaper 2. Development status-----	34
Section 1 Domestic status of xenotransplantation-----	34
Section 2 International status of xenotransplantation-----	34
Chaper 3. Content and progress of the project-----	37
Section 1 Results of the 1 st year progress-----	37
Section 2 Results of the 2 nd year progress-----	51
Section 3 Results of the 3 rd year progress-----	69
Section 4 Results of the 4 th year progress-----	94
Section 5 Results of the 5 th year progress-----	137
Chaper 4. Goal achievement and contribution to the relevant scientific field----	165
Section 1 Research and development goal achievement-----	165
Section 2 Contribution related scientific fields-----	171
Chaper 5. R & D results and performance utilization plan-----	172
Chaper 6. International scientific and technological information gathered from the research and development process-----	175
Chaper 7. Security level of R & D results-----	176
Chaper 8. Research facilities and equipment status-----	177
Chaper 9. Performance of Laboratory Safety Management Implementation -----	178
Chaper 10. Five representative works of R & D results-----	184
Chaper 11. Others-----	185
Chaper 12. References-----	186

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의개요	11
제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성	11
1. 연구 개발의 목적	11
2. 연구 개발의 필요성	11
제 2 절 연구개발의 범위	22
1. 연구 개발의 최종 목표 및 주요 내용	22
2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용	25
3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용	29
제 2 장 국내외 기술개발 현황	34
제 1 절 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국내외 연구 개발 현황	34
1. 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국내 연구 개발 현황	34
2. 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국외 연구 개발 현황	34
제 2 절 장기 생산을 위한 기술 개발 현황 비교 분석과 시장 현황	35
1. 장기 생산을 위한 기술 개발 현황 비교 분석	35
2. 국내외 관련분야에 대한 기술개발의 시장현황	36
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	37
제 1 절 1차년도 연구 수행 내용 및 결과	37
1.1,2세부 연구 수행 내용 및 결과	37
2.1협동 연구 수행 내용 및 결과	44
3.2협동 연구 수행 내용 및 결과	48
제 2 절 2차년도 연구 수행 내용 및 결과	51
1.1세부 연구 수행 내용 및 결과	51
2.2세부 연구 수행 내용 및 결과	56
3.1협동 연구 수행 내용 및 결과	59
4.2협동 연구 수행 내용 및 결과	62
제 3 절 3차년도 연구 수행 내용 및 결과	69
1.1,2세부 연구 수행 내용 및 결과	69
2.1협동 연구 수행 내용 및 결과	73
3.2협동 연구 수행 내용 및 결과	79
제 4 절 4차년도 연구 수행 내용 및 결과	94
1.1세부와 1협동 연구 수행 내용 및 결과	94

2.2협동 연구 수행 내용 및 결과	130
제 5 절 5차년도 연구 수행 내용 및 결과	137
1.1세부 연구 수행 내용 및 결과	137
2.1협동 연구 수행 내용 및 결과	143
3.2협동 연구 수행 내용 및 결과	158
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	165
제 1절. 목표달성도	165
제 2절. 관련분야 기여도	171
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	172
제 1절. 연구개발결과의 활용방안	172
제 2절. 기대성과	173
제 3절. 추가연구의 필요성	174
제 4절. 타 연구에의 응용	174
제 5절. 기업화 추진방안	174
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	175
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	176
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	177
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	178
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	184
제 11 장 기타사항	185
제 12 장 참고문헌	186

8. 뒷면지

주 의

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

제 1장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1절 연구 개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

21세기 생명과학 분야는 다양한 유래의 줄기세포를 활용한 맞춤형 세포 및 조직 재생 을 통한 치료제 개발이라 할 수 있다. 본 연구과제는 선천성 중증 면역결핍 원인 유전자인 IL-2R γ 가 결핍된 미니돼지 체세포를 개발하고 이를 이용한 복제 미니 돼지를 생산하여 선 천성 면역결핍 돼지 동물모델을 구축하고 한다. 최종적으로 사람 줄기세포 생체 배양 모델로 의 활용을 위하여 사람의 조혈줄기세포를 돼지 골수조직에 이식을 실시하여 돼지 생체에서 사람 줄기세포의 대량 배양을 목적으로 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 국내 장기 이식 환자 현황

▶ 국립 장기이식 센터(KONOS)에 따르면 2006년 한 해 동안 장기이식 대기자 현황을 살펴보면 총 9,587건으로 집계되었으며 2000년도 장기이식 대기자 3,981건에 비해서 약 2.5배 이상의 장기이식 대기자 가 증가되었음¹.

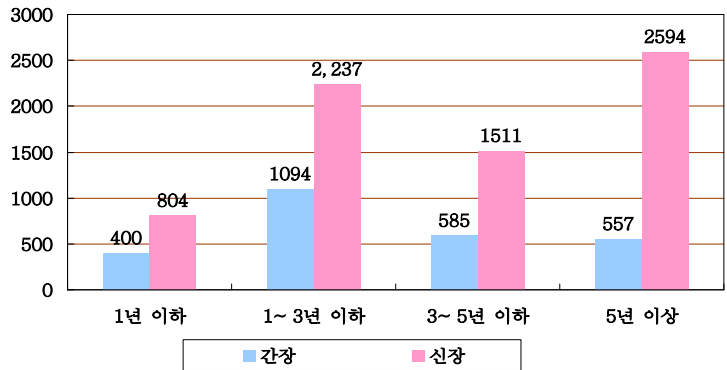
▶ 또한 장기이식 대기자의 장기별에 따른 증가 추세를 살펴보면 신장이식과 간장 이식의 이식 대기자 증가가 가장 두드러지고 췌장과 심장 및 폐등의 장기이식 대기자도 매년 증가 추세에 있음¹.

[국내 장기이식 대기자 현황, KONOS,2007¹]

연도	신장	간장	췌장	심장	폐	총계
2000	3,120	620	75	119	47	3,981
2001	3,262	944	82	134	51	4,473
2002	4,005	893	106	117	35	5,156
2003	4,542	1,163	129	135	45	6,014
2004	5,131	1,460	148	143	47	6,929
2005	5,846	1,905	175	161	50	8,137
2006	6,724	2,413	231	168	51	9,587
'07.5.31	7,146	2,636	254	183	50	10,269

▶ 장기이식을 받기 위한 환자의 대기 시간에 따른 현황을 조사한 결과 1년 이하의 기간에 장기를 공급 받을 수 있는 환자가 전체 환자의 약 10%에 불과하며 3년 이하의 기간에 장기를 공급 받을 수 있는 환 자는 전체에 약 46%에 불과한 것으로 밝혀졌음. 그러나 5년 동안 장기이식을 위해서 대기하고 있는 환

자수도 전체의 약 30%이상을 차지하고 있다는 사실이 밝혀져 장기이식에 수요 불균형에 따른 심각한 사회적 경제적 손실을 초래하고 있다는 사실을 알 수 있음¹.



[국내 장기이식의 대기 기간에 따른 현황, KONOS,2007¹]

- ▶ 국내 장기 수요의 급증: 국내 장기 이식율은 신장 및 심장이 대기자의 약 20%, 간이 약 40%에 불과하여 많은 환자들이 이식 대기 중에 사망하는 실정임².
- ▶ 장기부족에 따른 부작용: 고령화의 사회현상에 따른 국내외의 장기부전 환자들의 급증에 따른 직접 또는 간접 의료비의 부담 증강에 따른 환자 및 국민 의료보험비용 증가에 따른 국가 재정 상태의 악화현상을 초래하고 이에 따른 노동력손실에 따른 국가 경쟁력 약화 현상을 초래함.
- ▶ 국내 수급 불균형의 악화: 국내에서는 성인병의 증가, 사회의 고령화, 유교 문화, 핵가족의 영향으로 국외보다 이식 장기 수요 공급의 불균형 현상이 심각함. 그 결과 불법 장기 매매가 성행하고 있으며, 최근에는 국내보다 낮은 의료기술 수준의 외국에서 장기이식을 받는 사례가 증가되어 외교적, 법률적 문제로 비화되고 있음.

[이종 장기 개발 연구의 필요성]



나. 줄기세포를 포함한 세포 치료제 개발현황 및 가능성

- ▶ 최근의 유도만능줄기세포(IPS)를 비롯한 배아줄기세포에 대한 연구는 약 210가지의 모든 장기를 구성할 수 있는 조직세포로 분화 할 수 있는 다분화능력을 지니고 있는 세포로 임상 적용 가능성은 무한함. 그러나 배아줄기세포로부터 분화되는 세포의 epigenetic 적인 문제 해결과 안정성 확보 등 임상 적용을 위해서 아직 많은 장애가 존재하고 있음³.
- ▶ 그러나 사람의 성체 조직에서 유래된 성체 체세포치료제 및 줄기세포 치료제는 배아줄기세포의 가장 큰 문제점인 안전성이 확보된 세포로서 현재 다음과 같은 다양한 분야에의 세포 치료제로서 활용되어지고 있음.

[줄기세포 종류에 따른 세계 시장 현황 및 전망⁴]

(단위: US\$ 백만)				
	성체줄기세포	배아줄기세포	제대혈줄기세포	총합계
2005년	4,128	1,028	1,772	6,927
2009년	9,867	2,650	4,700	17,217
2012년	18,015	5,067	9,271	32,354
CAGR	23.4	25.6	26.7	24.6

자료: Research Impact Technologies, "Stem Cell Research - A Market Insight Report"(2008.5)

- ▶ 특히 대표적인 성체 줄기세포인 조혈줄기세포를 이용한 백혈병 치료, 자가면역질환 치료 및 암 치료제로서의 활용 가능성은 2012년도 전체 세포치료제 시장의 약 38%를 차지하고 있으며 향후 무한한 발전 가능성을 지니고 있음.

[세포치료제를 이용한 질환별 시장 현황 및 전망⁴]

(단위: US\$ 백만)				
줄기세포 질환별 세계시장 현황과 전망	2005년	2009년	2012년	CAGR
Neurology	1,776	4,998	10,170	28.3
Bone and Cartilage	931	2,481	4,879	26.7
Cancer	912	2,183	4,009	23.6
Hematology	740	1,858	3,546	25.1
Cardiology	783	1,896	3,481	23.8
Dermatology	677	1,760	3,339	25.6
Diabetes	581	1,468	2,786	25.1
Other*	526	573	144	-16.9
총합계	6,927	17,217	32,354	24.6

자료: Research Impact Technologies, "Stem Cell Research - A Market Insight Report"(2008.5)

다. 바이오 장기 개발 산업의 발전 가능성

▶ 이식 장기 수요의 폭발적인 증가와 수급 불균형 심화 되고 있는 와중에 바이오 장기 재생 연구는 21세기 고부가가치 신산업인 생명산업의 제분야가 걸집되는 ‘생명산업의 총체이자 꽃’으로 관련 생명산업의 동반 발전 및 응용 기회 제공할 것으로 기대됨.

▶ 현재 장기 이식에 따른 면역억제제의 시장 규모만 해도 2001년 기준으로 3조 4200억 원 규모에 달하고 매년 6% 증가되어 2010년경에는 5조 5050억 원에 이를 것으로 예상하고 있음⁵.

▶ 의료비 및 정부 예산 절감 효과 창출 : 바이오 이종장기 이식의 대상들 중 신장이식만 평가한다면, 투석 치료에 비해 신장이식은 전체 의료비가 75%로 줄어들어 미국의 경우 신장이식만으로도 매년 20억 달러의 정부 예산 절감 효과 창출.

▶ 최근에 개발된 성체 조직 유래의 세포를 이용한 배아줄기세포와 동일한 분화 자기복제 및 다분화 능력을 지닌 유도만능줄기세포인 iPSCs 세포는 기존의 면역거부반응을 완전히 극복할 수 있는 줄기세포로서 돼지를 비롯한 동물모델에의 생체 이식을 통하여 사람 이식가능 장기재생에 지대한 공헌이 기대됨.

라. 사람 줄기세포 생체 증식용 동물모델 개발 현황 및 특성

▶ 인체 이식용 바이오 장기 재생을 위한 연구 개발은 사람 배아줄기세포 및 성체 줄기세포를 이용해 간편하고 단기간의 연구결과를 창출할 수 있는 시험관에서의 연구가 대부분을 차지하고 있었음. 그러나 시험관에서 얻어지는 바이오 장기는 일차원적인 세포레벨의 재생에 불과하여 삼차원적인 장기재생에는 부적합함.

▶ 이러한 문제점 극복을 위해서 인체 장기재생을 위한 연구는 마우스와 랫트를 비롯한 소동물의 동물모델 개발연구와, 양과 돼지 및 원숭이 등을 이용한 대동물 이종 동물모델 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 현재 활용되고 있는 동물모델의 종류 및 특성에 관한 자료임.

[줄기세포 이식을 위해 개발된 동물모델의 종류 및 특성 비교 분석⁶⁾]

Species	Size	Cost	Current feasibility of genetic manipulation	Suitable for whole animal imaging	Similarity to human	Level of ethical concern ^b
Mouse	Small	Low	Very high	All modalities	Organ-specific, moderate	Moderate
Rat	Small	Low	High	All modalities	Organ-specific, moderate	Moderate
Pig, sheep, goat	Large	High	Moderate	PET, MRI	Organ-specific, high	Moderate
Nonhuman primate	Small to large	Very high	None	PET, MRI (all modalities for marmoset)	Generally high	High
Chicken embryo	Very small	Very low	Low	All modalities	Organ-specific, low to moderate	Low

^aMRI, magnetic resonance imaging; PET, positron emission tomography
^bAs gauged by degree of protection conferred by animal research regulatory agencies and level of use in Western society.

▶ 현재까지 사람 배아유래 줄기세포와 성체 유래 줄기세포를 활용해 이종 동물모델 생체 이식을 통한 사람 줄기세포 및 성숙 세포 배양 기술 개발을 위한 동물모델의 종류 및 활용 분야는 다음과 같음.

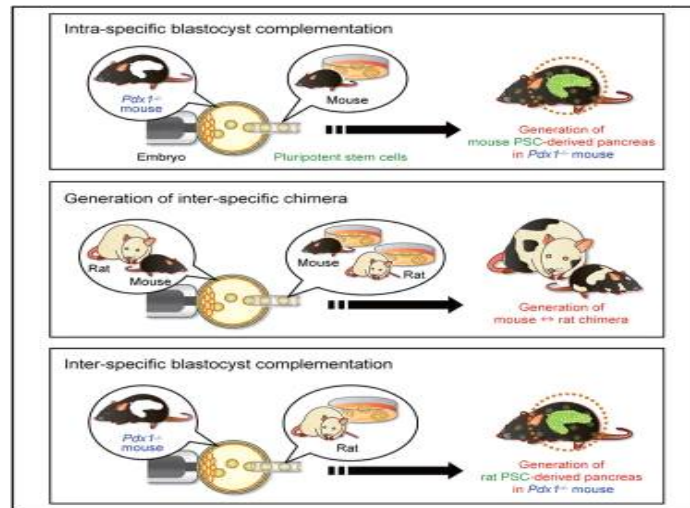
[이종 동물모델의 종류에 따른 사람 줄기세포 생체이식과 활용 분야]

동물 모델	종별 분류	생체이식세포종류	활용 분야	특성
소 동물	마우스	<ul style="list-style-type: none"> 배아줄기세포 및 iPSCs⁷ 성체줄기세포(골수 및 태반 조혈 줄기세포, 양수 줄기세포, 간엽줄기세포, 신경줄기세포, 간줄기세포, 피부줄기세포)⁸ 암 세포 (자궁암, 난소암, 피부암, 백혈병 등) 이식⁹ 바이러스(HIV, EBV, HTLV) 감염 암 세포 이식¹⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> 배아줄기세포의 종양형성 및 다분화 특성 규명 성체줄기세포유래 조직 특이적 성숙 세포 재생 난치성 질환 및 암 발병 모델 구축 및 치료 효능 검증 	면역거부반응 극복을 위한 면역결핍마우스 이용 연구
	랫트	<ul style="list-style-type: none"> 자궁암 세포 이식¹¹ 	<ul style="list-style-type: none"> 자궁암 발병 동물 모델 구축 	면역결핍 모델 이식
대 동물	돼지	<ul style="list-style-type: none"> 조혈줄기세포¹², 신장전구세포¹³ 	<ul style="list-style-type: none"> 성숙 조혈세포로의 분화 유도 성숙 신장세포로의 분화 유도 	태아조직에의 세포이식
	양	<ul style="list-style-type: none"> 골수조혈줄기세포¹⁴, 태반줄기세포¹⁵, 간엽줄기세포¹⁶, 신경줄기세포¹⁷ 	<ul style="list-style-type: none"> 성숙 조혈세포 재생 간장세포 및 피부세포와 신경세포 재생 	태아조직에의 세포이식
	닭	<ul style="list-style-type: none"> 배아줄기세포¹⁸ 치아 유래 줄기세포¹⁹ 	<ul style="list-style-type: none"> 배아줄기세포로부터 신경줄기세포 분화 유도 치아줄기세포의 신경세포로의 분화 유도 	배아조직에의 세포이식

▶ 일본 동경의대 연구팀은 마우스 및 랫트의 iPSCs 세포를 이용해 척장 조직이 결핍된 마우스를 제작을 위하여 Pdx1 유전자 조작 형질전환 마우스를 제작하고 수정란을 채취하여 동종 또는 이종 마우스 또는 랫트 유래의 iPSCs 세포를 이식한 결과 iPSCs 유래의 척장 조직 재생에 성공하였음²⁰.

▶ 또한 동 연구팀은 동일한 방법으로 척장이 결핍된 유전자 조작 형질전환 돼지를 세계 최초로 생산하는데 성공하였으며 이를 이용해 정상 돼지 iPSCs 세포이식을 통하여 이식된 줄기세포 유래의 척장 조직 재생에 성공하였음²¹.

[배아이식 기술을 활용한 이종 장기재생²⁰⁾



마. 유전자 적중 기술을 이용한 면역결핍 동물모델 제작 현황

▶ 이종 세포 및 장기이식에 따른 동물모델에 의해서 유발되는 면역거부반응을 억제하기 위해서 다음과 같은 다양한 방법에 의해서 면역세포를 제거 또는 억제하는 방법이 시도되어지고 있음.

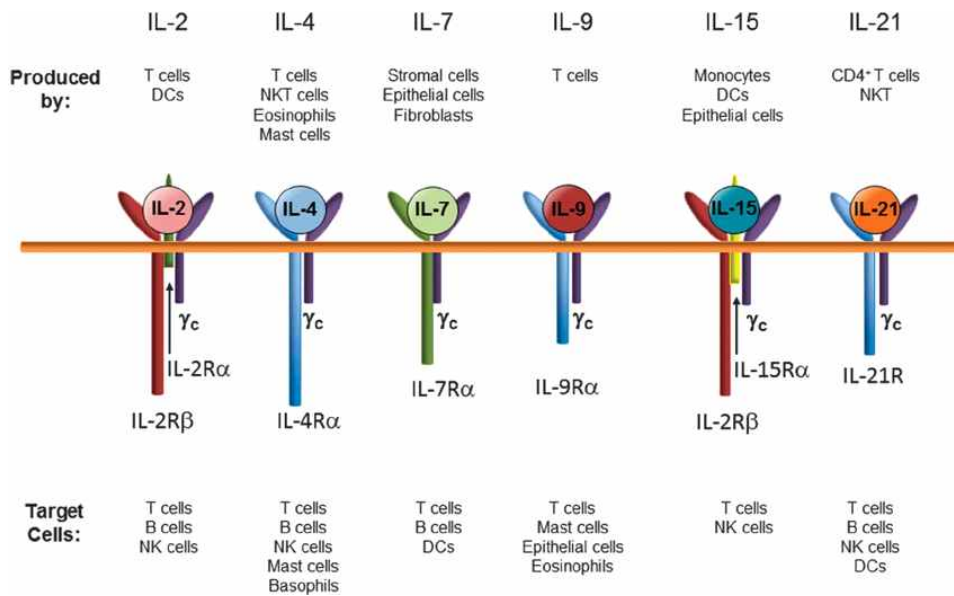
[유전자 조작 및 항암제등을 이용한 면역결핍 동물모델 제작]

동물 종	면역세포 제거 및 억제기술	면역세포 특성	비고
마우스	<ul style="list-style-type: none"> 선천성 prkdc 유전자결손에 따른 면역결핍 마우스 구축²² IL-2Rγ 유전자 적중 기술을 이용한 면역결핍마우스 생산²³ Rag1/Rag2 knock -out 유전자 적중 마우스 제작^{24, 25} 	<ul style="list-style-type: none"> T면역세포, B 면역세포 부재 NK 세포의 부재 수지상면역세포 기능 부재 	유전자 결손 마우스 교배를 통한 다양한 동물모델이 구축되었음
랫 트	<ul style="list-style-type: none"> ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 기술을 이용한 면역 결핍 랫트 생산²⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> 말초임파절, Peyer's patch 임파 조직 결손 면역조직 백혈구세포수 감소 CD4+와 CD8+T면역세포 감소 B면역세포와 NK면역세포 감소 	ZFN 유전자 적중 기술을 이용한 면역결핍 랫트 최초생산

바. IL-2R γ 유전자 결손 선천성 면역결핍 모델

▶ IL-2R γ 유전자는 common cytokine receptor gamma chain으로 명명되고 있는 유전자로서 interleukin-2 (IL-2) receptor의 α chain과 β chain과 γ chain이 결합하여 IL-2의 신호전달 역할을 담당하고 있었으나 다른 면역조절인자 IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21 수용체의 공통 구성 단백질이라는 사실이 밝혀졌음²⁷.

[Common cytokine receptor gamma chain의 구조 특성²⁸⁾



▶ 사람을 포함한 대부분의 생물체에서 common cytokine receptor gamma chain은 X 염색체상에 존재하며 사람의 경우 X 염색체 중증 복합면역결핍증세(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)의 원인유전자로 밝혀졌음. 유전자 변이에 따라 사람의 경우 T 면역세포 및 NK 면역세포의 결핍 증세와 더불어 B 면역세포는 세포수의 증가 현상이 관찰되었으나 B 면역세포의 정상적인 기능 및 활성화에 필요한 T 세포가 존재하지 않기 때문에 실질적인 기능을 발휘하지 못하는 면역결핍특성을 나타내고 있음²⁹⁾.

▶ 또한 마우스의 IL-2R γ 유전자 결손에 따른 면역세포의 특성을 조사한 결과, 사람과 동일하게 T 면역세포와 NK면역세포의 결손과 더불어 B 면역세포의 감소현상이 관찰되어 사람의 면역결핍증상과 동일한 표현형이 관찰되었음³⁰⁾.

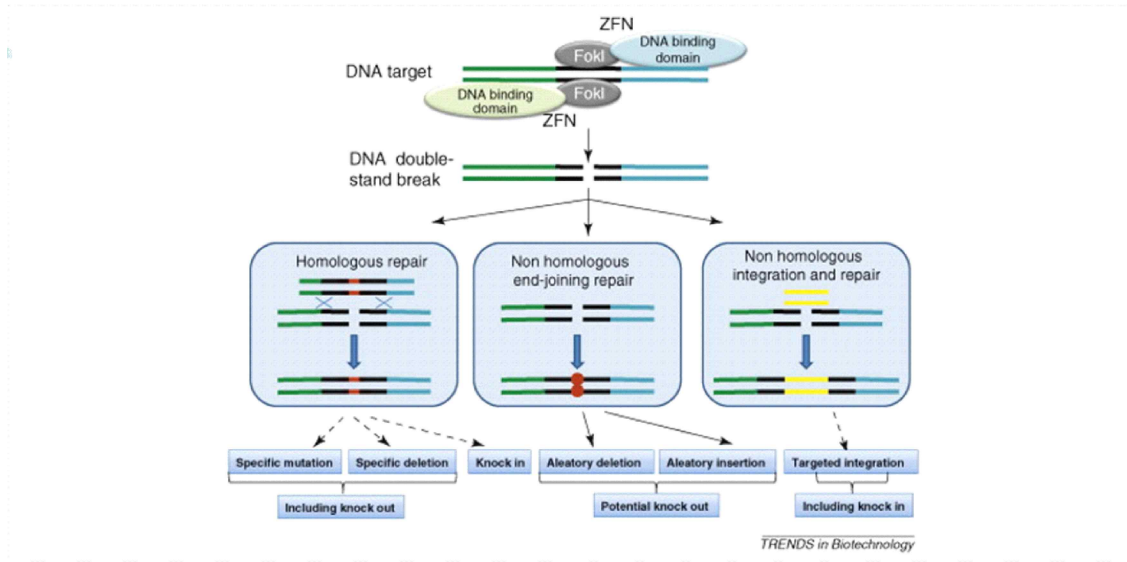
▶ 본 연구는 사람, 마우스 및 랫트에서 검증된 IL-2R γ (common cytokine receptor gamma chain)를 유전자 적중 기술로 형질전환해 사람과 동일한 선천성 중증 면역결핍증을 지닌 면역결핍 형질전환 돼지 생산을 목적으로 하고 있음.

사. ZFN (Zinc Finger Nuclease)를 이용한 유전자 적중 기술 개발 현황

▶ 최근 genetic engineering 기술을 통해 새롭게 개발된 ZFN 기술은 기존의 유전자 적중 기술과 달리 살아있는 세포에 한번의 transfection을 통해 원하는 타겟 genomic DNA 특정 부위에 직접적으로 gene deletion, insertion, edition이 가능한 기술임³¹⁾.

▶ target으로 하는 DNA를 100% knock out이 가능 함. 이러한 특성을 이용하면 기존의 유전자 적중 방법에 비해서 단기간에 고 효율의 유전자 적중이 가능하여 현재 식물을 비롯해 마우스와 랫트 또는 사람 유전자 적중 세포 및 동물체 개발에 활용되어 지고 있음.

[ZFN을 이용한 유전자 적중 방법 모식도³²⁾



[ZFN을 이용한 국내외 유전자 적중 연구 활용 현황]

국가	연구기관	대상유전자	비고	연도
미국	Tufts Medical Center, Boston	Pro23His rhodopsin ³³	human cell	2010
	Sangamo BioSciences, Richmond Tech Center	IPK1 ³⁴	plant	2009
	Medical college of Wisconsin	Ig M, Rab 38 ³⁵	rat	2009
	University of Minnesota	SuRB ³⁶	plant (tobacco)	2009
	Sangamo BioSciences, Inc.	OCT4, AAVS1, PITX3 ³⁷	human cell	2009
	Carnegie Institution for Science	rosy gene ³⁸	Drosophila	2008
	Sangamo BioSciences, Inc.	DHFR ³⁹	mammalian cells	2008
Sangamo BioSciences, Inc.	IL2R γ ⁴⁰	human cell	2005	
일본	Hiroshima University	homologue of HesC ⁴¹	sea urchin embryo	2010
	Kyoto University	IL2R γ ⁴²	Rat	2010
체코	University of South Bohemia	BmBLOS2, Bmwh3 ⁴³	silkworm	2010
한국	Seoul National University	human chemokine receptor 5 ⁴⁴	human cell	2009

아. 돼지 동물모델을 이용한 바이오 장기 개발 필요성 및 전망

- ▶ 돼지는 사람의 장기와 비슷한 크기와 생리학적 특성을 지니고 있기 때문에 환자에의 직접적인 장기이식이 가능한 특성으로 그 활용 가능성은 매우 높음.
- ▶ 유전공학 기법으로 장기 및 특이적 세포가 결손된 형질전환 복제돼지의 대량생산이 가능하

며 이를 이용한 다중 유전자 결손 모델 구축이 가능하며 가장 이상적인 동물모델 구축이 가능함.

▶ 돼지는 마우스와 랫트에서 분비되는 단백질 및 보체를 포함한 분자세포학적으로 사람과 매우 유사하기 때문에 이식에 따른 부작용이 적다는 장점을 지니고 있음.

▶ 인간에게 유해한 특정병원균이 제거된 무균돼지의 사육기술이 확립되어 장기이식 시 발생할 수 있는 병원균의 전이를 극복할 수도 있음

▶ 돼지 생체내에서 사람 면역세포의 증식과 분화 동물모델 구축을 통한 사람 항체 치료제 개발연구에의 활용이 가능하며 다양한 사람 유래 배아줄기세포를 포함한 성체줄기세포의 이식을 통하여 생체 내에서의 분화 능력 검증이나 종양형성에 대한 특성 연구용 동물모델로서의 활용 가능성도 기대됨.

▶ 현재 국내 및 국외에서 사람 배아줄기세포 및 iPSC 세포를 이용한 이종배아이식은 원천적으로 금지되어 있는 실정이기 때문에 동물모델을 이용한 사람 세포 및 장기 재생은 불가능한 상태임.

▶ 환자 조직 유래의 성체 줄기세포 및 조직의 돼지 생체 이식은 안정성이 확보되면 실질적인 적용 및 활용이 가능하기 때문에 본 연구 과제를 통해서 구축되는 면역결핍 돼지는 매우 높은 활용성이 기대됨.

▶ 현재 연구 개발되어지고 있는 다양한 종류의 사람 성체유래 줄기세포와 면역결핍 돼지를 활용한다면 현재 시험관에서 배양 및 증식이 불가능한 다양한 종류의 사람 성체 줄기세포의 생체 대량 배양이 가능하게 되어 줄기세포의 실질적인 적용 범위가 광범위할 것임.

자. 연구기관의 관련 기술 보유 현황

(1) 형질전환 복제 돼지 개발

지금까지의 바이오 장기이식 연구의 대부분은 돼지와 사람간의 이종장기이식에 대한 연구개발이 대부분임. 본 연구팀은 돼지 이용 바이오장기 이식시 유발되는 초급성 면역거부반응 제어를 위하여 돼지 $\alpha(1,3)$ -Gal 합성효소인 GGTA1 유전자가 제거된 형질전환 복제돼지 (Xeno I,II) 생산에 성공하였음⁴⁵.

[GGTA1제거 복제돼지]



Xeno I ('09.4)



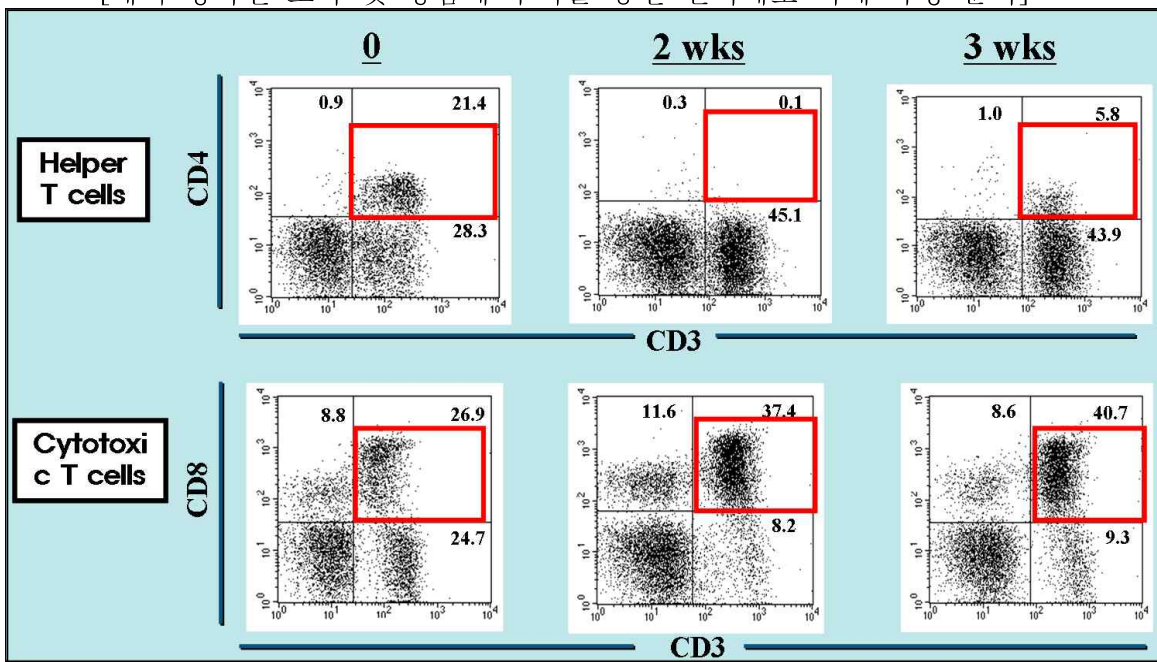
Xeno II ('09.6)

(2) 면역세포 억제 돼지 동물모델 개발

본 연구실에서는 돼지에의 사람 줄기세포 및 장기이식을 위해서 다음과 같이 방사선 조사, 면역억제제 및 항암제 투여를 돼지 면역세포 억제방법을 시도하였음. 연구결과로서 돼지 항암제(AraC)를 투여한 돼지 말초혈액에 존재하는 면역세포의 변화 양상을 유세포분석기를 이용해 분석한 결과임.

돼지 CD4+ T 면역세포는 방사선 조사와 더불어 2주령까지 말초혈액에서 급격한 감소 현상이 관찰되나 3주후에는 면역세포의 재생이 관찰되었음. 그에 비해 CD8+ T 면역세포는 뚜렷한 감소현상이 관찰되지 않은 것으로 판명되어 방사선 조사 및 항암제 투여 방법에 의한 돼지 면역세포 제거 방법은 극히 부분적인 제어 방법임이 증명되었음.

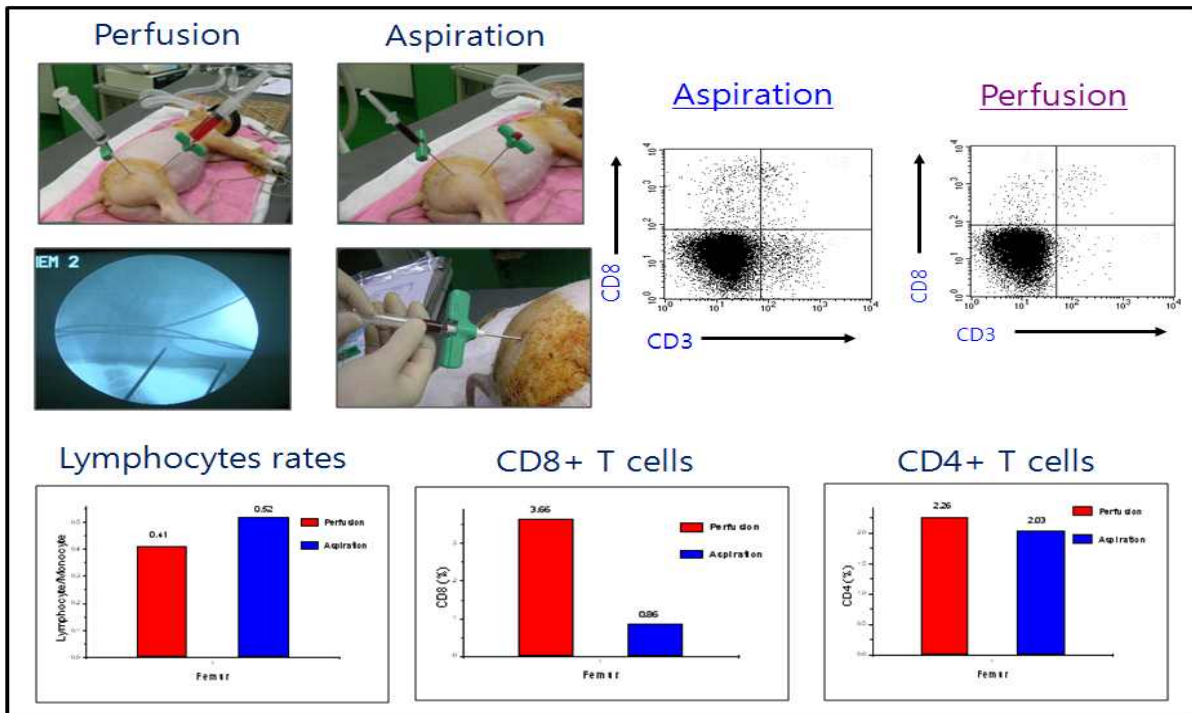
[돼지 방사선 조사 및 항암제 투여를 통한 면역세포 억제 특성 분석]



(3) 돼지 조혈조직에의 인간 줄기세포 생체 이식 기술 확립

일반돼지를 이용해 사람 조혈줄기세포의 생체 이식 기술을 확립하고 고효율의 생체 증식모델 개발을 위해서 돼지 골수조직에의 세포채취 및 이식방법을 비교 검증하였음. Perfusion 방법과 aspiration방법을 이용해 골수조직 존재 조혈줄기세포의 세포 채취를 비교 분석한 결과 aspiration방법이 perfusion방법에 비해서 낮은 CD8+ 면역세포가 채취되었음. 본 결과는 사람 조혈줄기세포의 미니돼지 생체이식을 위해서는 aspiration방법에 의한 돼지 골수세포 제거 기술이 perfusion방법에 비해서 효과적임이 밝혀졌음.

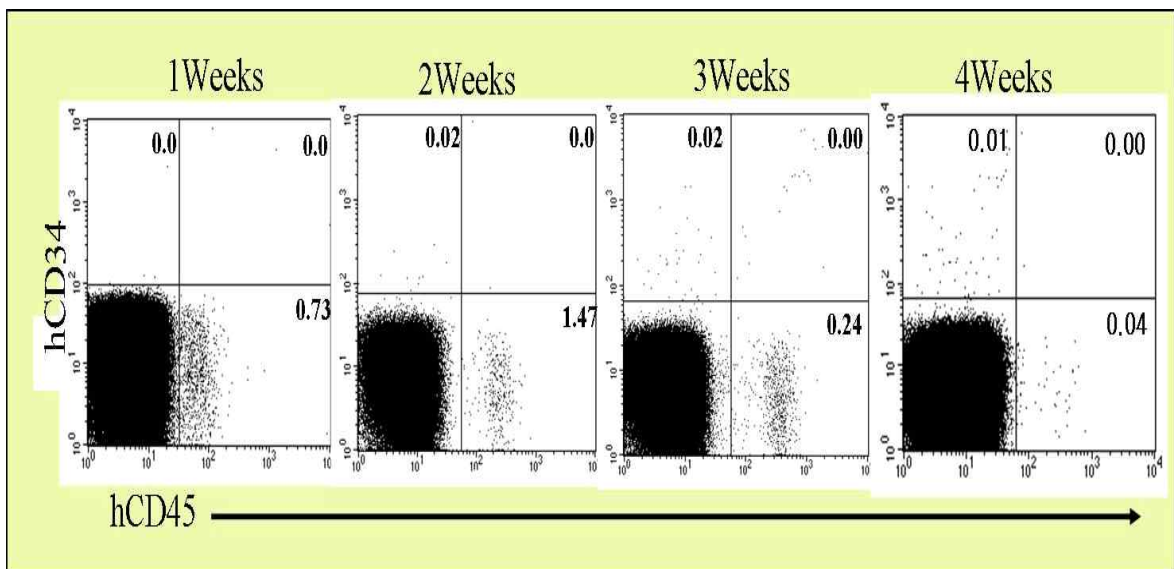
[돼지 골수조직에의 사람 조혈줄기세포 생체 이식 기술과 면역세포 특성 분석]



(4) 면역억제 돼지를 이용한 사람 줄기세포 이식 동물모델 구축 및 특성 분석

면역억제제 및 항암제 투여를 통해 돼지 면역세포가 부분적으로 억제된 돼지 동물모델을 구축하고 이를 이용해 사람 태반 혈액에서 유래된 조혈줄기세포를 생체 이식하였음. 본 동물모델의 말초혈액을 분석한 결과 이식된 사람 조혈세포가 매우 낮은 비율로 생착되고 있음이 관명되었음.

[면역억제 돼지 골수조직에의 사람 조혈줄기세포 이식에 따른 생체 증식 분석]



제 2절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

가. 연구 개발의 최종 목표

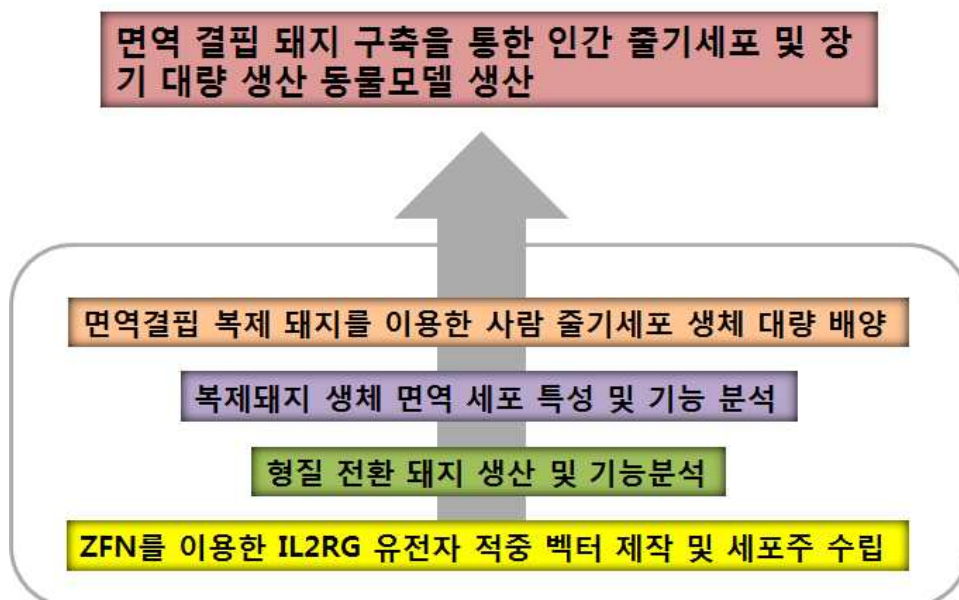
돼지 IL-2R γ (cytokine receptor common γ chain) knock-out 체세포주 확립을 통한 형질전환 복제 돼지를 생산하여 선천성 면역결핍 동물모델을 개발하여 사람 조혈 줄기세포 대량 배양 생체 동물모델을 구축하고자 함.

본 과제의 목표 달성을 위한 세부 및 협동과제별 연구목표는

과 제	연구 목 표
제 1 세부	ZFN(Zinc-Finger Nucleases)를 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터 제작과 이를 이용한 knock-out 미니돼지 체세포주 확립
제 2 세부	IL-2R γ 유전자 적중 미니 복제 돼지 생산 및 라인 구축
제 1 협동	유전자 적중 돼지 면역조직의 조직학적 또는 면역세포학적 특성 분석을 통한 면역결핍 특성 분석
제 2 협동	유전자 적중 돼지를 이용한 사람 조혈줄기세포의 이종 이식을 통한 사람 줄기세포 생체 증식 동물 모델 확립

[연구개발의 최종 목표]

최 종 목 표

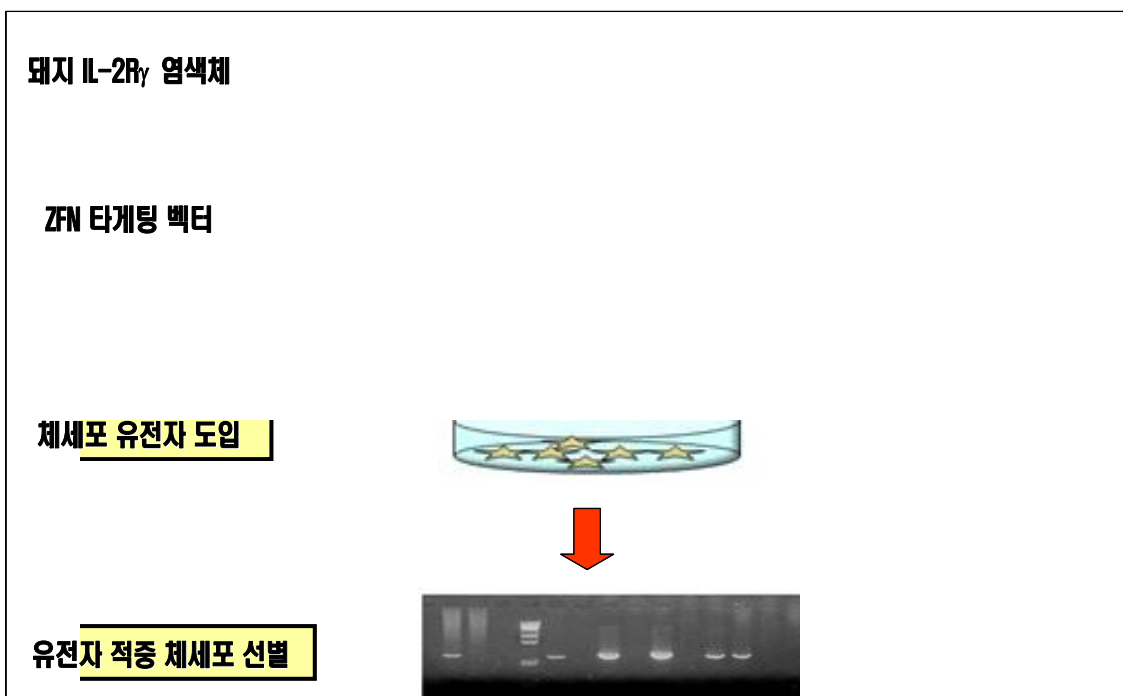


나. 연구 개발의 주요 내용

(1) ZFN(Zinc-Finger Nucleases)를 이용한 유전자 적중 미니돼지 체세포주 개발 :

새롭게 개발되어 효과적이고 단기간에 체세포주 유전자 변형을 유도하여 타겟 유전자 적중을 유도하는 기법인 ZFN 기술을 본 과제에 적용하여 미니돼지 IL-2R γ 유전자 적중 미니돼지 체세포주를 수립하고자 함. 이를 위하여 미니돼지 염색체에 분리한 IL-2R γ 유전자의 염기서열을 분석하고 IL-2R γ exon 1의 부분에 특이적인 ZFN제작를 시행함. ZFN 유전자 탐색은 (주)틀젠에 의뢰하여 제작하였고 이를 이용해 유전자 적중 체세포주 확립용 벡터로 활용할 예정이다.

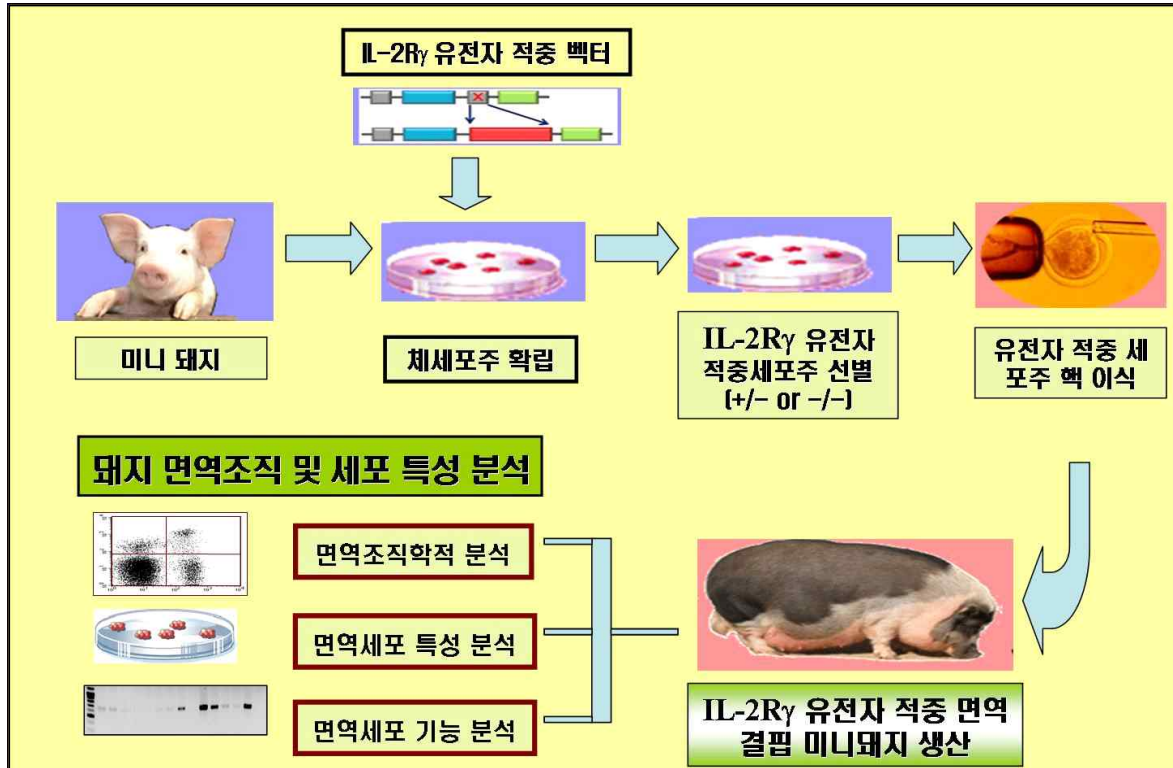
[ZFN를 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터 제작과 체세포주 선별]



(2) 유전자 적중 복제 돼지 생산 및 면역세포 결핍 및 기능 특성 분석 :

ZFN 유전자 적중벡터를 이용한 IL-2R γ 유전자 적중 벡터를 제작하고 이를 이용해 미니돼지체세포에의 유전자 도입을 실시하고 체세포 핵이식기술을 이용한 유전자 적중 형질전환 돼지를 생산하고자 함. 생산된 복제돼지의 면역조직에서의 조직학적 분석과 더불어 면역세포를 이용한 세포학적 또는 면역반응을 조사 분석함으로써 면역결핍 여부를 판별하고자 함.

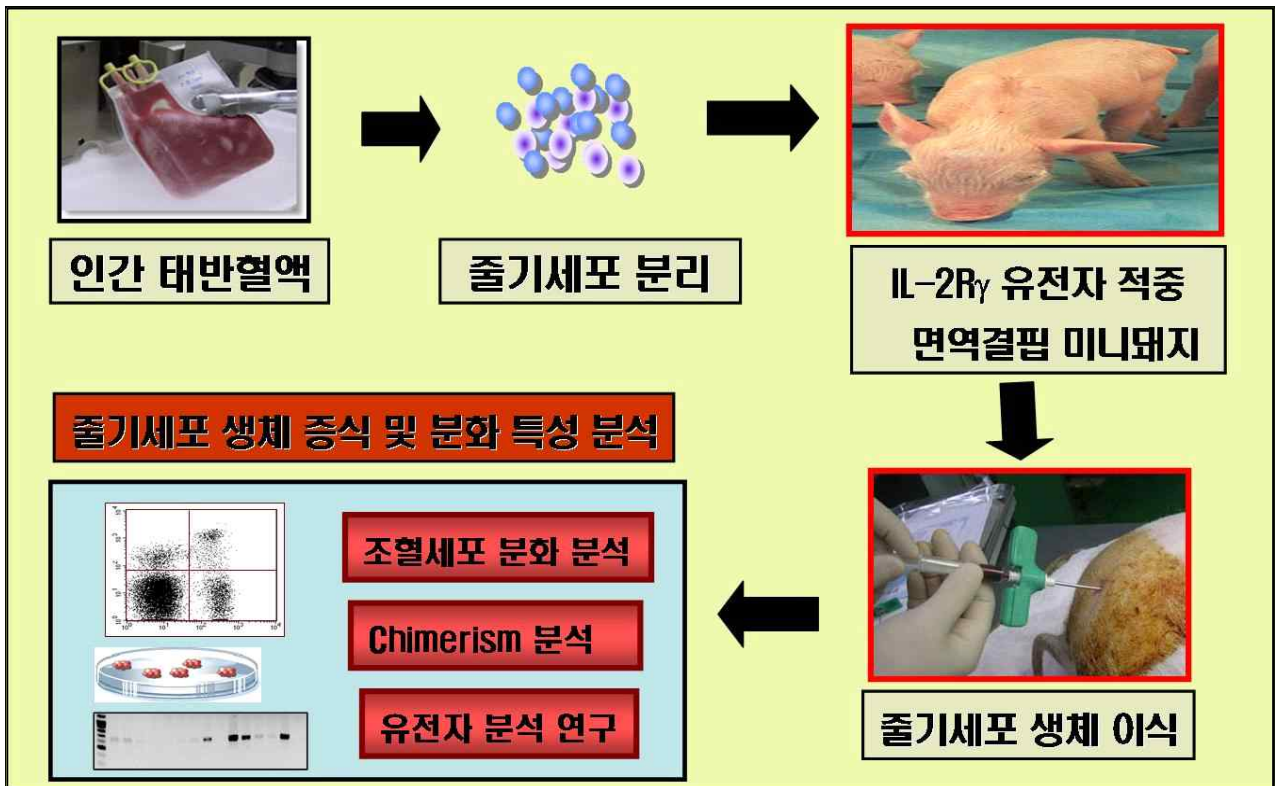
[돼지 IL-2R γ 유전자 적중 복제 돼지 생산 및 면역학적 특성 분석]



(3) 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 복제 돼지를 이용한 사람 줄기세포 생체이식 능력 검증 :

구축된 IL-2R γ 유전자 적중 면역결핍 미니돼지를 이용해 실질적으로 이종 세포인 사람 태반 유래의 조혈줄기세포를 분리하여 유전자 적중 돼지 생체 이식을 실시하고 이식 후 이종 사람 줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 및 증식 여부를 조직 및 세포분석을 통하여 검증 분석하고자 함. 미니돼지 생체 증식 사람 줄기세포를 활용한 생체 이식용 세포로서의 활용 가능성을 검증하기 위해서 분리된 사람 조혈세포의 유전자 분석을 통한 돼지 PERV 감염 여부를 분석할 예정임. 또한 효능 검증을 위하여 미니돼지에서 분리된 조혈세포의 시험관 분화 및 증식 특성을 검증하고 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 자기 복제 및 다분화 능력을 검증할 예정임.

[면역결핍 돼지를 이용한 사람 조혈 줄기세포 생체이식을 통한 생체 대량배양 및 증식 모델 구축]



2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 제 1 세부과제 :

ZFN을 이용한 IL-2R γ knock-out 벡터 제작과 유전자 적중 체세포주 구축

연구 개발 목표	연구 개발 내용
<ul style="list-style-type: none"> 돼지 IL-2Rγ 유전자 클로닝 및 염기서열 분석 	<ul style="list-style-type: none"> Male 또는 female 미니돼지 유래 체세포주 확보 및 최적의 배양조건 검토 미니돼지 체세포를 이용한 IL-2Rγ 유전자 클로닝 미니돼지 IL-2Rγ 유전자 염기서열 분석
<ul style="list-style-type: none"> ZFN을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 벡터제작 및 미니돼지 체세포에의 유전자 도입 	<ul style="list-style-type: none"> ZFN을 이용한 IL-2Rγ 타게팅 벡터 제작 미니돼지 체세포주에의 최적의유전자 도입 조건 검토 ZFN 유전자 도입 체세포주의 배양 조건 검토
<ul style="list-style-type: none"> IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주 선별 및 염색체 이상 유무 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ZFN/ IL-2Rγ 유전자 도입 세포의 단일 세포 클로닝 및 배양 조건 확립 PCR 기법을 이용한 ZFN/ IL-2Rγ 유전자 도입 체세포에서의 유전자 클로닝

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 분리된 유전자의 염기서열 분석을 통한 유전자 mutant 여부 판별 ▪ ZFN/ IL-2Rγ 적중 단일 클론 체세포주의 확립 및 장기 배양 기법 구축 ▪ ZFN 유전자 적중 벡터의 염색체 이상 유무 검증
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 체세포주 및 돼지 생체 유전자 발현 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 RT-PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ mRNA 발현 특성 분석 ▪ 복제 돼지 면역세포에서의 IL-2Rγ 유전자 발현 억제 효과 검증

나. 제 2 세부과제 :

IL-2R γ 유전자 적중 복제돼지 생체 면역세포 특성 분석

연구 개발 목표	연구 개발 내용
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지 조혈조직에서의 면역세포 발달 억제 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 미니돼지 조혈조직인 골수 조직에 존재하는 면역세포 전구세포군의 발달과정 추적 조사, ▪ 흉선, 비장, 임파절 및 비장 조직 적출을 통한 면역세포 분리 기술 확립 ▪ 2차 면역조직을 이용한 면역세포의 분화 발달과정 추적 조사를 통한 분화 ▪ 유세포분석기를 이용한 면역세포 특이 항체를 이용한 T, B, NK, 단핵구, 마크로파지, 호중구계 면역세포 분석 검증 ▪ T 세포와 B 세포의 분화 마커 항체를 이용한 면역세포 발달 억제 단계 추적 조사
<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 돼지 면역조직의 조직학적 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 돼지의 흉선조직의 HE 염색을 통한 T 면역세포의 cortex 및 medullar 조직학적 분석 ▪ 2차 면역조직인 비장, 임파절 조직에서의 T세포 와 B 세포 zone인 follicle 조직 특성 분석 ▪ T 세포와 B 세포 특이적 단클론 항체를 이용한 면역염색을 통한 조직학적 특성 분석
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 돼지의 T, B 면역세포 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 돼지 흉선조직에서 채취한 T 면역세포를 이용해 시험관 mitogen (ConA,PMA, Ionomycin)을 이용한 면역세포 증식 특성 분석 ▪ 면역조절인자 (IL-2, IL-4, IL7)을 이용한 흉선 T 면역세포의 조절인자 반응성 조사 분석 ▪ 비장 조직에서 채취한 B 면역세포를 이용한 IL-4 조절인자 자극에 따른 isotype switch 능력 검증 ▪ B 면역세포를 이용한 mitogen(PHA,LPS) 자극에 따른 세포 증식 특성 검증

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 조절인자 자극에 따른 B세포의 immunoglobulin 생산 능력 검증
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 돼지의 자연면역세포의 기능 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제돼지 비장 조직에 존재하는 NK 세포의 분포 특성을 특이항체 NK1.1을 이용한 세포특성 분석 ▪ 특이 항체인 Gr-1, Mac-1 단클론 항체의 세포 염색을 통한 유세포분석기를 이용한 말초혈액 존재 단핵구, 호중구, 마크로파지 전구세포군의 특성 분석 ▪ ⁵¹Cr 레벨 YAC 세포와의 공배양을 통한 시험관 NK 세포에 의한 killing activity 측정

다. 제 1 협동과제 :

IL-2R γ 유전자 적중 복제돼지 생산 및 기능 분석

연구 개발 목표	연구 개발 내용
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주에서 단백질 발현 분석을 통한 IL-2Rγ 단백질 미 발현 체세포주를 이용한 돼지 수정란에의 세포 핵 이식 실시 ▪ Female 미니돼지 체세포주에서 double IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 수정란 핵이식 ▪ 핵이식 수정란의 이용한 PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 여부 검증 ▪ 유전자 적중 복제 수정란의 시험관에서의 수정란 분열 능력 검증 ▪ Single 또는 double 유전자 적중 체세포주의 핵이식 수정란의 대리모 이식 ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 생산 돼지 교배를 통한 대량 생산 시스템 구축 ▪ 제 1세부과제에서 ZFN를 활용해 유전자가 적중된 체세포주를 활용해 2차년부터 5차년까지 지속적인 복제돼지 생산 연구 수행
<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 유전자 특성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 꼬리, 뇌, 심장 및 간장 조직에서의 genome DNA 적출 ▪ ZFN/IL-2Rγ 특이적 PCR primer를 이용한 ZFN cleavage site DNA 유전자 분리 ▪ 염기서열 분석을 통한 IL-2Rγ 유전자 mutation site 염기서열 검증 ▪ RT-PCR 기법을 이용한 말초혈액 존재 면역세포에서의 IL-2Rγ mRNA 발현 양상 분석

<ul style="list-style-type: none"> IL-2Rγ mutnat 유전자의 복제돼지의 후생생식 전이 효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 유전자 적중 복제 돼지 교배를 통한 ZFN 유전자 적중 IL-2Rγ 유전자 변이의 후대 전이 능력 추적 조사 Heterozygote 돼지 교배를 통한 homozygote mutant 돼지 생산 정소 및 난소 존재 생식세포의 유전자 검증 분석을 통한 ZFN유전자 mutation 후대 전이 효능 검증
--	--

라. 제 2 협동과제 :

면역결핍 복제돼지 생체내 사람 줄기세포 대량 증식 유도

연구 개발 목표	연구 개발 내용
<ul style="list-style-type: none"> 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 복제돼지를 이용한 사람 줄기세포 생체이식 	<ul style="list-style-type: none"> 복제 면역결핍 돼지 생체이식을 위한 이중 세포인 사람 태반 유래 조혈줄기세포의 분리 정제 기술 확립 복제돼지 골수조직에의 줄기세포 이식 기술 확립 줄기세포 생체 이식 후 복제돼지 골수조직에서의 조혈세포 분리 기술 확립
<ul style="list-style-type: none"> 복제 돼지 조혈조직에서의 사람 줄기세포 자기복제 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 유세포 분석기를 이용한 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색과 이를 이용한 사람 조혈 줄기세포 생체 증식 효능 검증 분석 돼지 골수조직세포를 이용한 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력(colony assay) 검증 분화 조절인자를 이용한 시험관 사람 조혈줄기세포 분화 능력 검증 돼지 골수 증식 사람 줄기세포 분리를 통한 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 줄기세포 자기복제 능력 검증 각 조혈조직 유래 조혈세포 유전자를 이용한 human specific Alu primer를 이용한 사람 유전자 PCR 검증
<ul style="list-style-type: none"> 복제 돼지 조혈기관에서의 줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 사람 면역세포 특이적 항체인 CD4, CD8, B220를 이용한 흉선 조직에서의 T세포 분화 발달 정도 조사 2차 면역기관인 복제돼지 비장, 임파절 조직 유래 면역세포를 이용한 사람 줄기세포 유래 성숙 조혈세포의 존재 여부 검증 성숙 조혈세포의 시험관 조혈인자 및 mitogen 자극에 따른 세포 증식 능력 검증 말초혈액 존재 이식 사람 조혈줄기세포 유래 성숙 단핵구, 호중구, 마크로파지 및 NK 세포 존재 여부 판별

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2011	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 클로닝 및 염기서열 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Male 또는 female 미니돼지 유래 체세포주 확보 및 최적의 배양조건 검토 ▪ 미니돼지 체세포를 이용한 IL-2Rγ 유전자 클로닝 ▪ 미니돼지 IL-2Rγ 유전자 염기서열 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 벡터제작 ▪ 미니돼지 체세포에의 유전자적중 벡터 도입 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN을 이용한 IL-2Rγ 타게팅 벡터 제작 ▪ 미니돼지 체세포주에의 최적의유전자 도입 조건 검토 ▪ ZFN 유전자 도입 체세포주의 배양 조건 검토
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주 선별 ▪ 유전자 적중 체세포주의 염색체 이상 유무 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/ IL-2Rγ 유전자 도입 세포의 단일 세포 클로닝 및 배양 조건 확립 ▪ PCR 기법을 이용한 ZFN/ IL-2Rγ유전자 도입 체세포에서의 유전자 클로닝 ▪ 분리된 유전자의 염기서열 분석을 통한 유전자 mutant 여부 판별 ▪ ZFN/ IL-2Rγ 적중 단일 클론 체세포주의 확립 및 장기 배양 기법 구축 ▪ ZFN 유전자 적중 벡터의 염색체 이상 유무 검증
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 체세포주의 유전자 및 단백질 발현 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/ IL-2Rγ유전자 적중 체세포주를 이용한 RT-PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ mRNA발현 특성 분석 ▪ 단백질 분석 방법을 이용한 유전자 적중 체세포주의 IL-2Rγ 발현 제어 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 미니돼지 생체 면역세포 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 말초조직에서 채취한 혈액을 이용한 면역세포 특성 분석 ▪ 면역세포를 이용해 시험관 mitogen (ConA,PMA, Ionomycin)을 이용한 면역세포 증식 특성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인간 줄기세포 분리 및 배양 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색 실시를 통한 줄기세포 분리 기술 확립 ▪ 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력 (colony assay,CFU-C) 검증

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	2012	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주에서 단백질 발현 분석을 통한 IL-2Rγ 단백질 미 발현 체세포주를 이용한 돼지 수정란에의 세포 핵 이식 실시 ▪ Female 미니돼지 체세포주에서 double IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 수정란 핵이식 ▪ 핵이식 수정란의 이용한 PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 여부 검증 ▪ 유전자 적중 복제 수정란의 시험관에서의 수정란 분열 능력 검증 ▪ Single 또는 double 유전자 적중 체세포주의 핵이식 수정란의 대리모 이식 ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 생산 돼지 교배를 통한 대량 생산 시스템 구축
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 유전자 특성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 꼬리, 뇌, 심장 및 간장 조직에서의 genome DNA 적출 ▪ ZFN/IL-2Rγ 특이적 PCR primer를 이용한 ZFN cleavage site DNA 유전자 분리 ▪ 염기서열 분석을 통한 IL-2Rγ 유전자 mutation site 염기 서열 검증 ▪ RT-PCR 기법을 이용한 말초혈액 존재 면역세포에서의 IL-2Rγ mRNA 발현 양상 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ^{-/-} 복제돼지의 T, B 면역세포 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 적중 돼지 흉선조직에서 채취한 T 면역세포를 이용해 시험관 mitogen (ConA,PMA, Ionomycin)을 이용한 면역세포 증식 특성 분석 ▪ 면역조절인자 (IL-2, IL-4, IL7)을 이용한 흉선 T 면역세포의 조절인자 반응성 조사 분석 ▪ 비장 조직에서 채취한 B 면역세포를 이용한 IL-4 조절인자 자극에 따른 isotype switch 능력 검증 ▪ B 면역세포를 이용한 mitogen(PHA,LPS) 자극에 따른 세포 증식 특성 검증 ▪ 조절인자 자극에 따른 B세포의 immunoglobulin 생산 능력 검증

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	2013	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Female 미니돼지 체세포주에서 double IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 수정란 핵이식 ▪ 핵이식 수정란의 이용한 PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 여부 검증 ▪ 유전자 적중 복제 수정란의 시험관에서의 수정란 분열 능력 검증
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 유전자 및 단백질 발현 특성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 꼬리, 뇌, 심장 및 간장 조직에서의 genome DNA 적출 ▪ ZFN/IL-2Rγ 특이적 PCR primer를 이용한 ZFN cleavage site DNA 유전자 분리 ▪ 염기서열 분석을 통한 IL-2Rγ 유전자 mutation site 염기 서열 검증 ▪ RT-PCR 기법을 이용한 말초혈액 존재 면역세포에서의 IL-2Rγ mRNA 발현 양상 분석 ▪ 확보된 복제돼지 면역조직에서의 IL-2Rγ 단백질 발현 여부 검증 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ^{-/-} 유전자 적중 돼지의 T, B 면역세포 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ G0, G1 유전자 적중 미니돼지 생체 혈액조직을 포함한 병리 특성 분석 ▪ 유전자 적중 돼지 흉선조직에서 채취한 T 면역세포를 이용해 시험관 mitogen (ConA,PMA, Ionomycin)을 이용한 면역세포 증식 특성 분석 ▪ 면역조절인자 (IL-2, IL-4, IL7)을 이용한 흉선 T 면역세포의 조절인자 반응성 조사 분석 ▪ 비장 조직에서 채취한 B 면역세포를 이용한 IL-4 조절인자 자극에 따른 isotype switch 능력 검증 ▪ B 면역세포를 이용한 mitogen(PHA,LPS) 자극에 따른 세포 증식 특성 검증 ▪ 조절인자 자극에 따른 B세포의 immunoglobulin 생산 능력 검증

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
4차년도	2014	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-2Rγ knock-out 복제 돼지의 지속적 관리 및 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ZFN에 의한 유전자 변이에 따른 복제 돼지의 지속적 생산 ▪ Heterozygote 미니돼지 교배를 통한 homozygotes 미니돼지 생산 ▪ 면역결핍 미니돼지 라인별 관리 시스템 구축
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제 돼지라인별 면역세포 발달특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutant 라인별 복제돼지에 혈액속에서의 면역세포의 면역결핍 검증 확인 ▪ 유세포분석기를 이용한 말초혈액내 NK, 단핵구, 마크로파지 자연면역세포의 정상 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 복제돼지를 이용한 사람 줄기세포 생체이식 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제 면역결핍 돼지 생체이식을 위한 이중 세포인 사람 태반 유래 조혈줄기세포의 분리 정제 기술 확립 ▪ 복제돼지 골수조직에의 줄기세포 이식 기술 확립 ▪ 줄기세포 생체 이식 후 복제돼지 골수조직에서의 조혈세포 분리 기술 확립
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 사람 줄기세포 생체 이식 돼지 조혈조직에서의 줄기세포 증식 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 골수조직에서 채취한 혈액 세포를 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색 실시를 통한 생체 증식 효능 검증 분석 ▪ 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력 (colony assay, CFU-C) 검증 ▪ 돼지 골수 증식 사람 줄기세포 분리를 통한 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 줄기세포 자기복제 능력 검증 ▪ 각 조혈조직 유래 조혈세포 유전자를 이용한 human specific Alu primer를 이용한 사람 유전자 PCR 검증

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
5차년도	2015	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 면역결핍 복제돼지의 지속적 생산을 통한 유전자원 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Double knock-out 복제돼지 교배를 통한 mutant 라인의 지속적 생산 및 관리 ▪ 면역세포의 지속적 검증을 통한 후생 세포학적 특성 분석 ▪ 복제돼지 정자 및 난자 확보 및 냉동보관을 통한 형질전환 돼지 유전 자원 확보
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제 돼지의 이중 사람 줄기세포 생체 증식 효능 증진 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neonate 복제돼지에의 사람 줄기세포 이식을 통한 증식 효능 검증 분석 ▪ 사람 줄기세포 증식 효율 증진을 위한 간엽줄기세포와의 공이식 기술 개발 ▪ 사람 조혈인자 발현 간엽줄기세포이식을 통한 줄기세포 증식 효율 증진 방법 개발
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제 돼지 조혈조직에서의 사람 줄기세포 자기복제 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유세포 분석기를 이용한 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색과 이를 이용한 사람 조혈줄기세포 생체 증식 효능 검증 분석 ▪ 돼지 골수조직세포를 이용한 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력(colony assay) 검증 ▪ 분화 조절인자를 이용한 시험관 사람 조혈줄기세포 분화 능력 검증 ▪ 돼지 골수 증식 사람 줄기세포 분리를 통한 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 줄기세포 자기복제 능력 검증 ▪ 각 조혈조직 유래 조혈세포 유전자를 이용한 human specific Alu primer를 이용한 사람 유전자 PCR 검증
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 복제 돼지 조혈기관에서의 줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 사람 면역세포 특이적 항체인 CD4, CD8, B220를 이용한 흉선 조직에서의 T세포 분화 발달 정도 조사 ▪ 2차 면역기관인 복제돼지 비장, 임파절 조직 유래 면역세포를 이용한 사람 줄기세포 유래 성숙 조혈세포의 존재 여부 검증 ▪ 성숙 조혈세포의 시험관 조혈인자 및 mitogen 자극에 따른 세포 증식 능력 검증 ▪ 말초혈액 존재 이식 사람 조혈줄기세포 유래 성숙 단핵구, 호중구, 마크로파지 및 NK 세포 존재 여부 판별

제 2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1절 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국내외 연구 개발 현황

1. 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국내 연구 개발 현황

- ▶ 2016년 RAG2 KO 미니 돼지 생산 보고 (엠젠플러스)⁴⁶
- ▶ 2016년 IL2RG KO 미니 돼지 생산 보고 (건국대, 김진희교수팀)⁴⁷
- ▶ 2014년 RAG2 KO 미니 돼지 생산 보고 (건국대, 김진희교수팀)⁴⁸
- ▶ 2013년 CAMH KO 미니 돼지 생산 보고 (건국대, 김진희교수팀)⁴⁹
- ▶ 2009년 5월 Alpha Gal hetero K/O 미니 돼지 생산을 완료 (건국대/단국대/전남대/생공연/축산과학원)⁵⁰
- ▶ 2008년 사람의 면역유전자 2개(HLA-G, DAF)를 제어하는 돼지 생산 (엠젠바이오)⁵¹
- ▶ 2007년 보체 생성을 억제할 수 있는 CD59 형질전환 돼지를 생산 (단국대)⁵²
- ▶ 2003년 국내 최초 복제돼지 생산 (경상대)⁵³

2. 이종 장기 이식용 바이오 돼지 생산을 위한 국외 연구 개발 현황

- ▶ CD59, H-transferase, CD59 + H-transferase 형질전환 돼지, GT 유전자적중 (single KO) + DAF 형질전환 복제돼지 각각 생산 (Alexion, 미국)⁵⁴
- ▶ 인체 장기 이식 때 거부반응을 일으키는 GGTA1 유전자가 제거된 복제돼지 생산 (미주리대학, Immerge Bio Therapeutics)⁵⁵
- ▶ 알파갈 유전자가 제거된 double knock-out 돼지 최초생산 (PPL, 미국)⁵⁶
- ▶ 알파갈 제거 돼지의 심장을 바분원숭이에 이식:179일간 생명 유지 (하버드대)⁵⁷
- ▶ GT 유전자적중(single KO) + DAF + GnT-III 형질전환 복제돼지 (메이지대, 일본)⁵⁸
- ▶ GT 유전자적중(double KO) 복제돼지 (알데라이드대, 호주)⁵⁹
- ▶ GGTA1/CMAH knock out pig 돼지 생산 (Indiana university, 미국)⁶⁰
- ▶ RAG2 knock out pig 돼지 생산 (Tsukuba university, 일본)⁶¹
- ▶ RAG1/2 knock out pig 돼지 생산 (Chinese Academy of Sciences, 중국)⁶²
- ▶ IL2RG knock out pig 돼지 생산 (Tsukuba university, 일본)⁶³

제 2절 장기 생산을 위한 기술 개발 현황 비교 분석과 시장 현황

1. 장기 생산을 위한 기술 개발 현황 비교 분석

- ▶ 장기 부전 환자를 위한 대체 장기 확보방법으로 줄기세포 응용, 생체조직 공학 응용, 이종 복제 장기 및 humanized 동물모델 구축을 통한 장기재생 등이 있음.
- ▶ 줄기세포를 이용하는 방법은 세포 치료에 도움이 될 것으로 기대되나 아직 장기별 분화에 대한 이론적 토대가 마련이 되어 있지 않아 상용화까지는 많은 시간을 기다려야 함.
- ▶ 자가 혹은 타인의 세포를 조직공학적 방법으로 연골, 뼈, 피부 제작에 응용되고 있으나, 이런 방법만으로는 여러 종류의 세포가 구조를 형성하여 기능을 하는 장기를 제작하기는 어려움.
- ▶ 이종장기 복제 방법은 생명에 직접 관여되는 대체가 가능한 장기를 제공 할 수 있으며, 충분한 수의 분화된 면역관용 세포를 공급할 수 있어 줄기세포 및 조직공학 발전에 상승효과를 기대 할 수 있음.

[바이오 장기 재생을 위한 대표적 연구개발 현황 및 특성]

	인간화 장기	이종 장기	조직공학	줄기세포
장점	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 재생된 조직 및 세포는 자가이식 인간 줄기세포 유래 세포로 이루어 짐 ▪ 면역거부반응이 없거나 극히 낮음 ▪ 환자맞춤형 세포 및 조직재생 가능 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 주요 기능성 장기를 확보할 수 있음 ▪ 조직공학과 줄기세포 응용, 개발에 필요한 대량의 세포 공급이 가능 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 구조물을 형성할 수 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포치료에 효과적 ▪ 거부반응이 약함 ▪ 반복 치료가 충분히 가능함
단점	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 면역거부반응 제어 동물모델 구축 필요성 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 면역거부반응이 심함 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 조직공학 재료의 생체적합성 ▪ 기능성 장기 제작이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대량 생산이 어려움 ▪ 분화가 복잡하거나, 복합 기능을 가진 장기 생산이 어려움
개발 대상	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 혈액세포, 신경세포, 간세포 및 신장, 췌장, 심장 신장, 간, 췌도등 활용범위가 다양함. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 심장, 폐, 신장, 간, 췌도 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연골, 뼈, 치아 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신경세포, 피부세포

2. 국내외 관련분야에 대한 기술개발의 시장현황

▶ 우리나라에서 바이오장기 생산용 동물의 연구 부분 중 사람에게 먼저 적용된 연구는 인공간 연구분야(bio artificial liver, BAL) 이다. 현재 임상 1상 진행 중이다. 시험에 사용된 인공간은 미니돼지에게서 추출되고 이 미니돼지는 미국 Sinclair Research Center 유래 White Hairless Yucatan Miniature pig로 (주)옵티팜에서 우리나라에 독점 공급하고 있다. 현재 진행되고 있는 임상1상 시험은 빠르면 2016년, 늦어도 2017년 중에는 완료될 것으로 예측된다⁶⁴.

▶ 중국연구팀이 2015년 돼지 각막 부분층을 사람환자에게 이식 시도한 결과를 발표하였다. 그리고 환자에게 이식할 각막의 재료로 일반 돼지의 각막을 사용했지만 세포가 거의 없는 간질층(stroma)을 초순수와 2M NaCl 등으로 처리하였고, 중국 연구팀이 사용한 간질층은 1.62%로 현저하게 낮은 면역원성을 나타부분을 사용하였다⁶⁵.

▶ 2014년 Mohiuddin 실험 조건과 같이 GalTKO 기반에 사람 CD46 분자가 삽입되고 역시 사람 thrombomodulin (hTBM) 분자가 삽입된 돼지가 Baboon 원숭이에서 2014년과 다른 면역억제 프로토콜로 실험 진행을 했을 때 이식된 심장이 2년 넘게 생존한 결과를 2016년 4월에 Nature communications에 보고되었다⁶⁶.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1절 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 제 1, 2 세부 연구수행 내용 및 결과

▶ 돼지와 마우스 유전자 homology 분석 : 마우스 IL-2R γ 의 기능 도메인인 exon 2에 해당하는 부위는 돼지의 exon 2과 homology를 가지고 있음을 확인하였고, 다음 마우스와 돼지간의 IL-2R γ exon 2의 염기서열을 비교 분석한 결과, 마우스와 돼지간에는 총 85bp이상의 homology를 지니고 있다는 사실을 확인하였다.

▶ 돼지 IL-2R γ KO vector 제작 : 미니돼지 IL-2R γ 유전자의 transcript 활성 domain인 exon 2 부위에 neo 유전자로 치환을 실시 (Knock out vector)하였다. 또한 이종간의 장기 이식시 사람 보체에 의한 면역 거부반응 제어를 위하여, neo 유전자의 앞부위에 보체활성 억제기능을 가진 사람 유래 DAF (Decay-accelerating factor)의 cDNA가 도입된 Knock in vector를 제작하였다.

▶ 돼지 IL-2R γ 유전자 분리 및 염기 서열 분석 : 미니돼지의 귀에서 확립된 체세포주의 genome DNA를 추출하여, 돼지 IL-2R γ vector 제작을 위하여 left arm region 특이적 primer와 right region 특이적인 primer를 제작하였으며, 이를 이용해 PCR 기법으로 KO vector 제작을 위한 유전자로 사용하였고, 이 유전자의 염기서열 분석 및 cloning을 위하여 TA cloning vector에 삽입을 실시하고 염기서열 분석을 실시한 결과, Gene bank에 등록된 유전자 정보와 동일한 염기서열을 확인하였다.

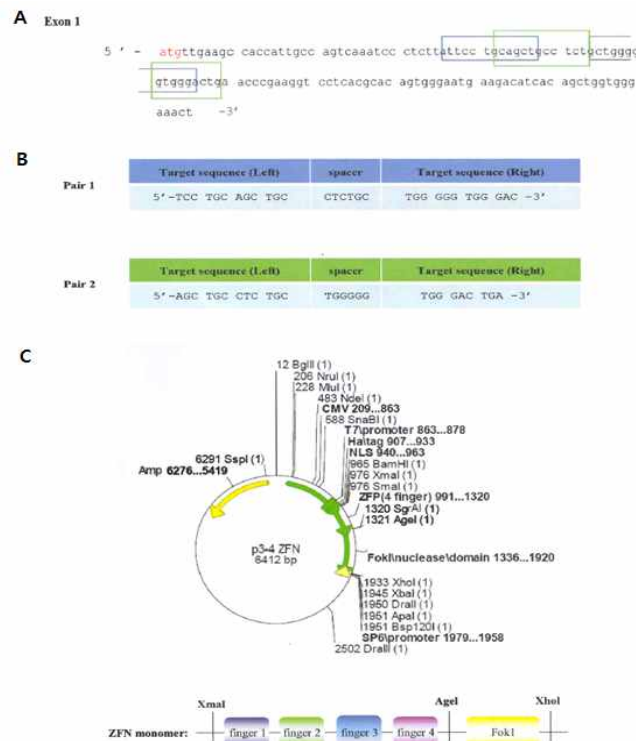
▶ 계놈상의 IL-2R γ 유전자 특이적 primer와 유전자 적중 벡터상의 primer를 각각 제작하고 이를 이용해 클론별로 분리 확보된 체세포의 IL-2R γ 적중여부를 선별하였다.

▶ 돼지 IL-2R γ 특이 항체를 생산하였으며, 이를 이용하여 대조군과 적중 세포 또는 조직에서의 IL-2R γ 단백질 발현 특성을 분석하였다.

▶ Zinc Finger Nuclease (ZFN) 및 IL-2R γ knock-out vector의 구축: 보다 안정적인 IL-2R γ 적중 미니돼지 세포주 개발을 위하여, 미니돼지 IL-2R γ gene exon 2 부위를 타겟팅하는 ZFN vector 및 neo selection maker가 삽입된 IL-2R γ 적중 donor DNA vector를 수립하였다.

▶ ZFN 및 donor DNA의 transfection 및 IL-2R γ 적중 체세포 선발 : electroporation 방법을 이용하여 미니돼지 체세포에 right 및 left ZFN vector와 donor DNA를 도입하였고, 세포수 총 5×10^6 cell을 48well에 528개 배양하였으며, 이중 colony를 형성한 64개를 PCR 분석하였고, 최종적으로 IL-2R γ 가 적중된 19개의 positive colony를 얻었다.

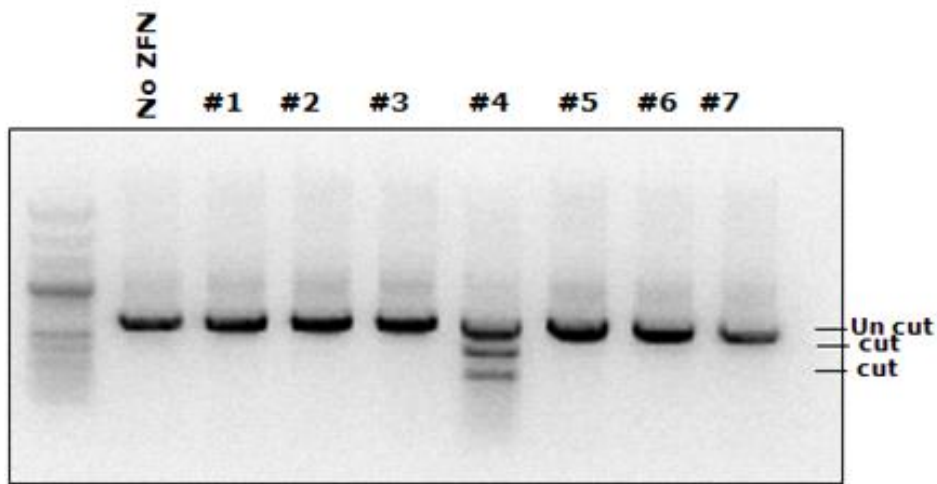
- ▶ 체세포를 이용한 복제수정란 생산체계 구축 : 양질의 성숙난자를 생산하기 위하여 기존의 48 시간 동안 배양하던 방법과 비교하여 배양시간을 42시간으로 줄여 배양하는 방법과 또한 처음 20 시간은 호르몬이 첨가된 배양액에서 배양하고, 이후 20-22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 배양을 실시하여 성숙율을 조사하였다. 난자의 배양에서 호르몬 첨가 후 호르몬 무첨가 배양액에서 배양한 난자의 성숙율이 단일 배양시스템으로 배양한 경우보다 유의적으로 높게 나타났다.
- ▶ 배양액에 따른 체세포 세포주기 조절 : 공여세포를 DMEM + 10% FBS를 첨가한 배양액과 DMEM + 10% FBS + Roscovitin (50mM)을 첨가한 배양액으로 배양을 실시하여 핵이식에 활용한 결과 융합율 및 난할율에 있어서 차이가 나타나지 않았다.
- ▶ 공여세포별 전압에 따른 융합율 조사에서 형질전환 체세포 (TG 1)의 경우는 1.5kV/cm 조건으로 융합을 실시하였을 경우에 약 82% 수준의 융합율을 나타내었다.
- ▶ 공여세포의 종류에 따른 형질전환 복제 배반포 발달율을 조사한 결과 TG 1을 이용하여 복제란을 생산하였을 때에는 난할율이 82.3%, 배반포 발달율이 21.4%로 일반 체세포에 비하여 배반포 발달율이 다소 낮은 것으로 확인되었으나, GV extract 처리군은 IVF 수준으로 회복되었다.
- ▶ 공여세포의 종류가 임신율에 미치는 영향을 분석한 결과 IL-2R γ 공여세포의 경우 7마리 이식한 수란돈에서 2마리가 임신이 확인되었다 (28.6%).



[그림 1] Target sequence of pig IL-2R γ gene and IL-2R γ knock out vector using ZFN

가. 세포내에서 ZFN을 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터의 활성 확인

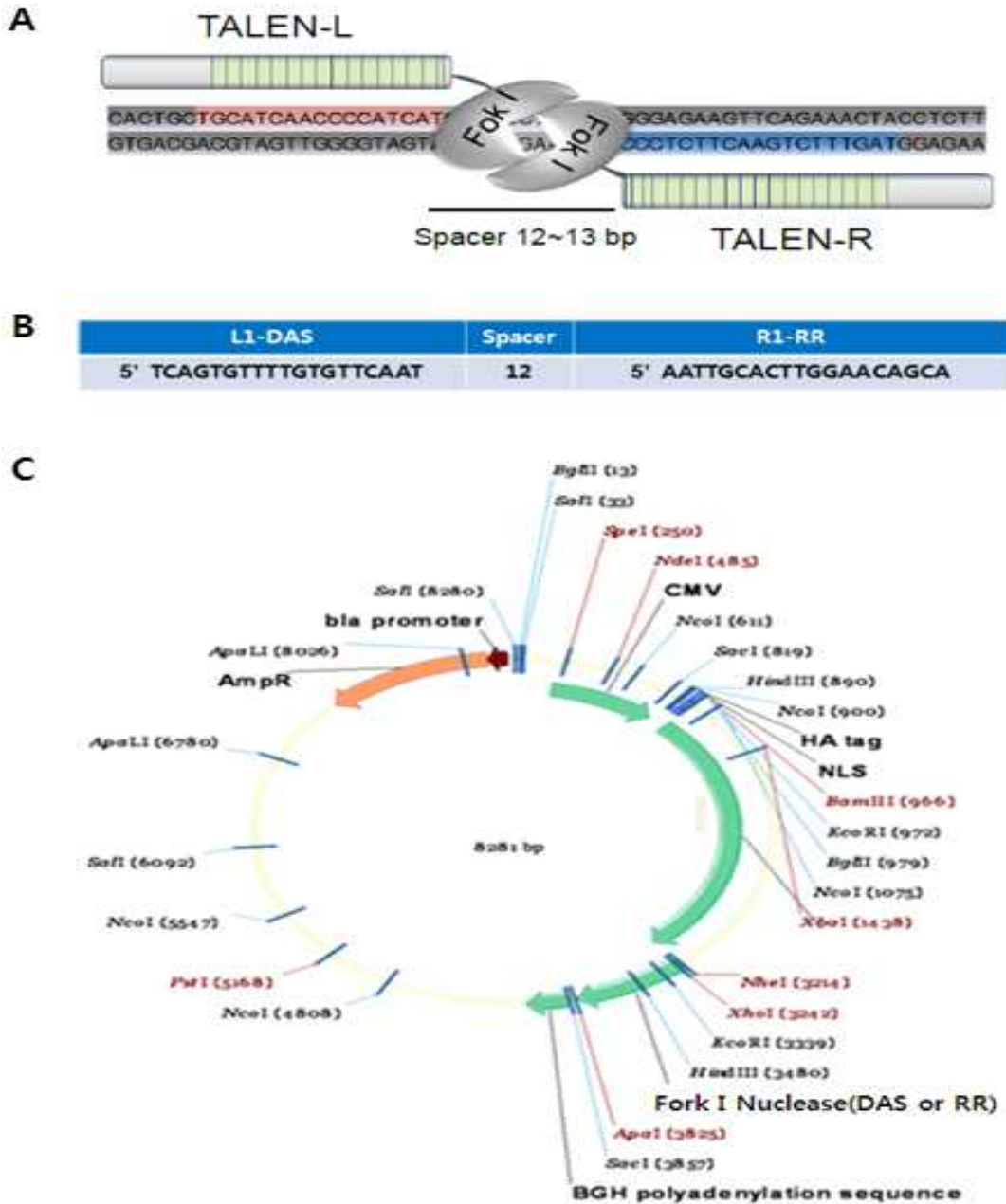
ZFN을 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터의 functional activity를 확인하기 위해 미니돼지 유래의 섬유아세포에 ZFN 적중 벡터를 transfection 한 후 surveyor mutation assay를 통해 그 활성정도를 확인하였다. 그 결과, [그림 2]에서와 같이 제작된 IL-2R γ 유전자 적중 벡터는 lane 4와 같이 활성이 있는 것으로 나타났다.



[그림 2] ZFN functional activity in mini-pig derived fibroblast after transfection by surveyor mutation assay

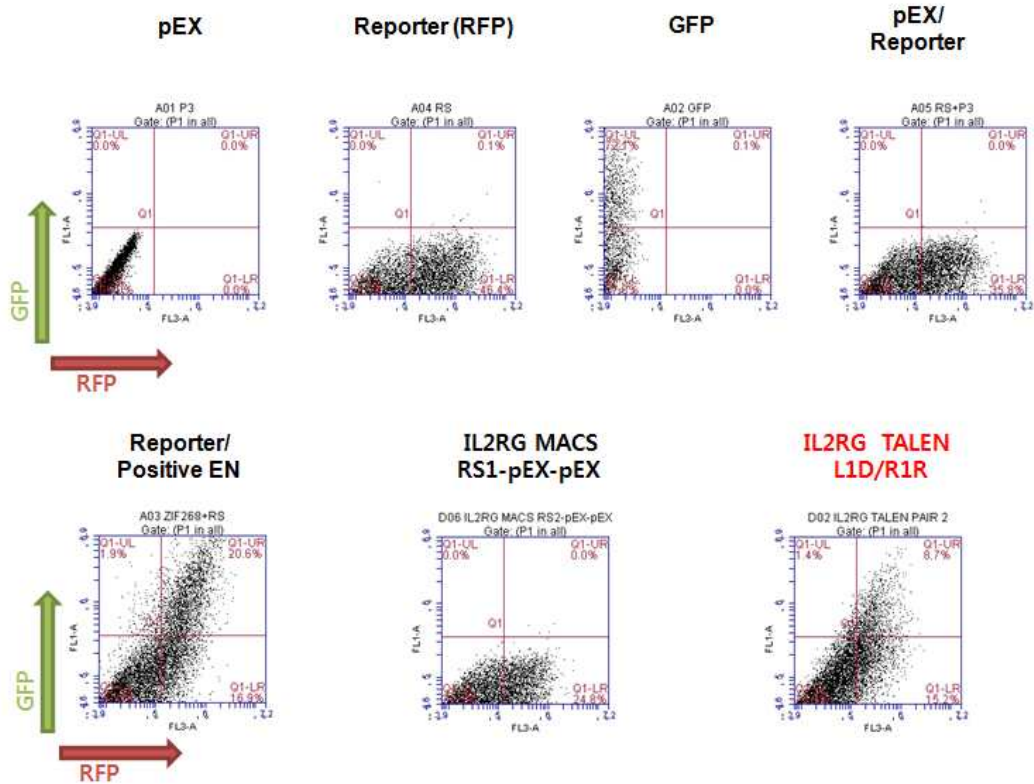
나. TALEN (transcription activator-like)를 이용한 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터 확립과 MACS (magnetic cell sorting system)을 이용한 IL-2R γ 유전자 적중 및 분리

또한, 이와 더불어 ZFN 기법 이후 새롭게 개발된 보다 효과적이고 단기간에 체세포주 유전자 변형을 유도할 수 있는 TALEN 기술을 이용하여 타겟 유전자 적중을 유도하고자 하였으며, (주)тол젠에 의뢰하여 아래 [그림 3]과 같이 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 벡터를 제작하였다.



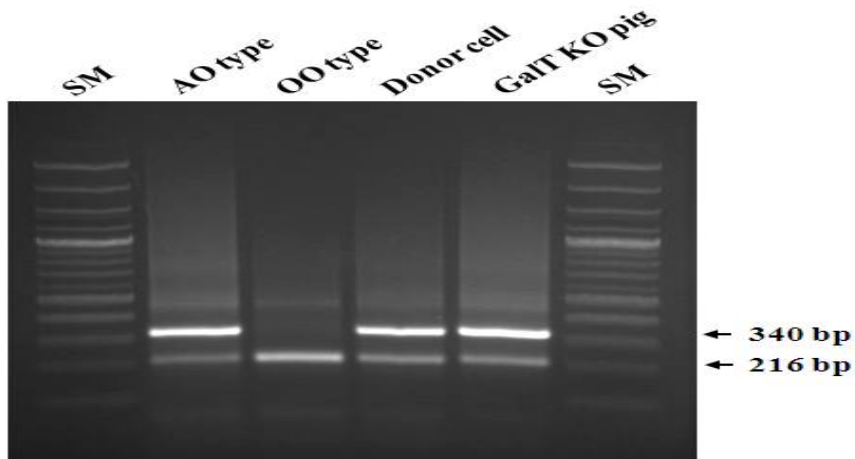
[그림 3] Target sequence of pig IL-2R γ gene and pig IL-2R γ knock-out vector using TALEN

돼지의 IL-2R γ 유전자 적중 세포를 분리하기 위하여 fluorescent marker를 이용하여 변형된 MACS (magnetic cell sorting system)을 활용하였다. 일반 세포에 IL-2R γ 유전자에 대한 TALEN 적중 벡터를 transfection 한 후 cell sorting 후 FACS로 분석한 결과, [그림 4]에서와 같이 8.7%의 IL-2R γ 유전자가 적중된 세포를 분리할 수 있었다.



[그림 4] Cell sorting of target-mutated IL-2Ry gene using Magnetic cell sorting system

다. "O"형 혈액형을 가진 돼지 세포주 수립



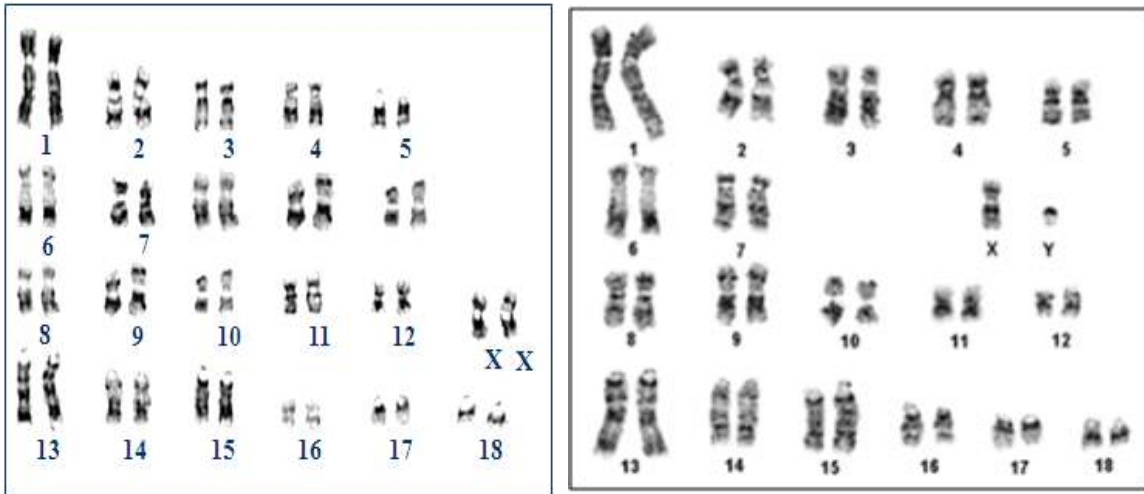
[그림 5] PCR-based A or O blood typing. For genotyping, PCR was performed with two pairs of primers specific to alleles A and O. Lane 1 and 6 are 100 bp ladders of DNA size marker (SM). If both 340 (specific to allele A) and 216 bp (specific to allele O) bands were amplified, the blood genotype was AO blood type (Lane 2), whereas if the single 216 bp (specific for allele O) band was amplified, the genotype was OO (Lane 3). Lane 4 and 5

shows the results amplified from donor cells and heterozygote α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out (GalT KO) pig, respectively, indicating the AO blood type.

[그림 5]에서와 같이 PCR을 이용한 “O”형 혈액형을 가진 개체 식별법이 개발되었다. 이 결과는 “Cell Reprogram”지에 발간되었다⁶⁷.

라. “XX” 염색체 및 XY 염색체를 가진 돼지 세포주 수립

복제 돼지 또는 knock-out 돼지의 생산을 위해서는 염색체 이상 여부가 매우 중요한 결과를 초래한다. 본 연구에 사용한 섬유아세포의 염색체를 분석한 결과는 [그림 6]과 같으며, 이들 세포는 모두 정상적인 염색체를 가지고 있는 것으로 증명되었다.

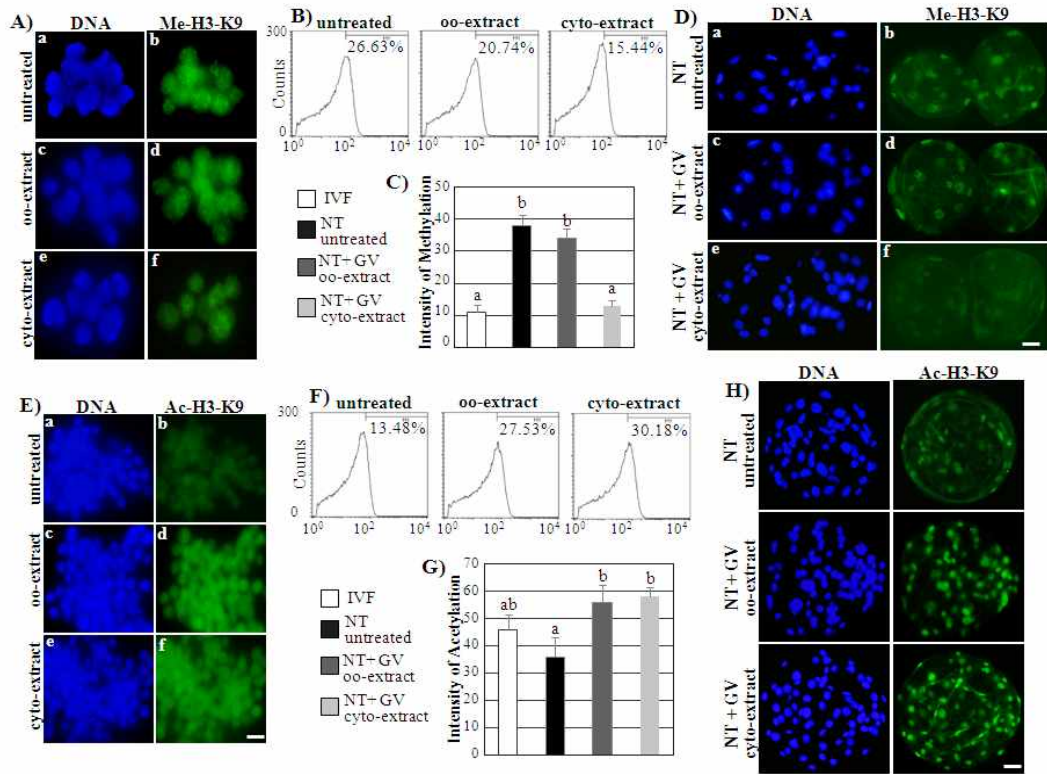


[그림 6] Female and Male chromosome analysis in KO fibroblast cells

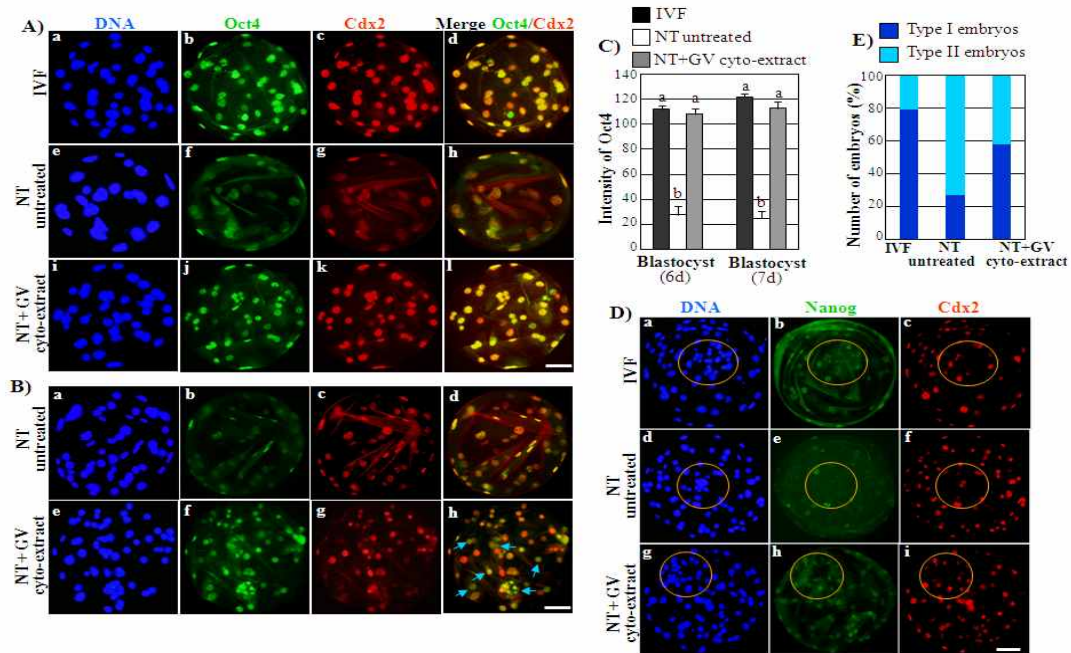
마. 체세포 복제 및 KO 돼지 생산을 위한 최적의 세포주 수립

최근 oocyte extract 특히 GV 단계의 oocyte extract를 체세포주에 처리시 IPES 세포주와 비슷한 콜로니를 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 GV 단계의 oocyte extract 처리가 핵치환을 위한 donor 세포주로서 사용이 가능하며, 또한 효율을 좋게 cell reprogram에 관여하는지를 알아본 결과는 [그림 7, 8]과 같다.

즉 GV oocyte extract을 donor cell에 처리시 methylation을 낮추고, acetylation의 효율은 향상시키며, 그 결과의 세포주를 복제에 사용시 IVF 수준의 등급이 좋은 배반포를 생산하는 것이 가능하다는 것을 보여 주고 있다. 또한, 이들 배반포는 미처리군과는 달리 IVF유래의 배반포와 거의 동일한 수준의 OCT3/4와 Nanog 유전자를 발현하였다. 이상의 결과를 요약하면, GV oocyte extract을 donor 세포에 처리시 복제 산자의 효율이 향상가능하다는 것을 시사한다. 이 결과는 현재 “DEVELOPMENT”지에 2014년 게재되었다⁶⁸.



[그림 7] Expression of histone H3 acetylation (Ac-H3-K9) in fibroblast nuclei with untreated (b, control) or GVocyte-extract treated or GVcyto-extract treated⁶⁸.

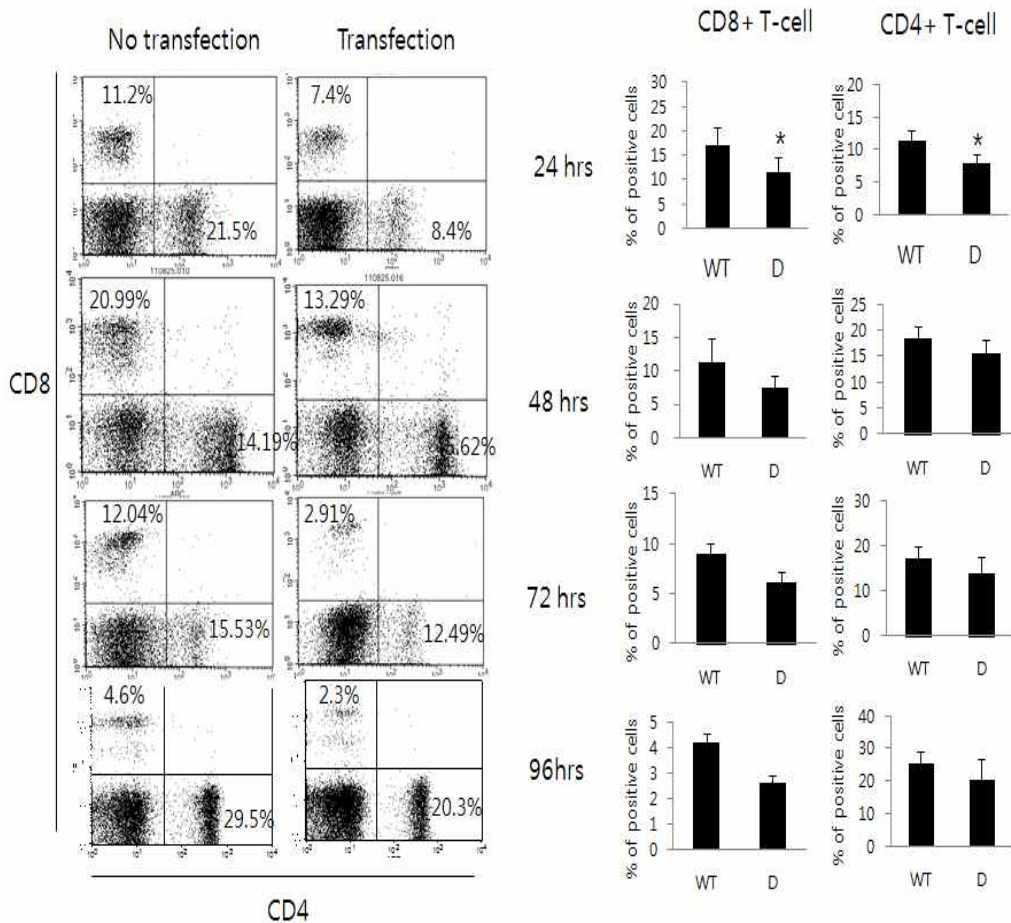


[그림 8] Effect of pig GV oocyte cytoplasmic extract (GVcyto-extract) on Oct4 and Nanog expression⁶⁸.

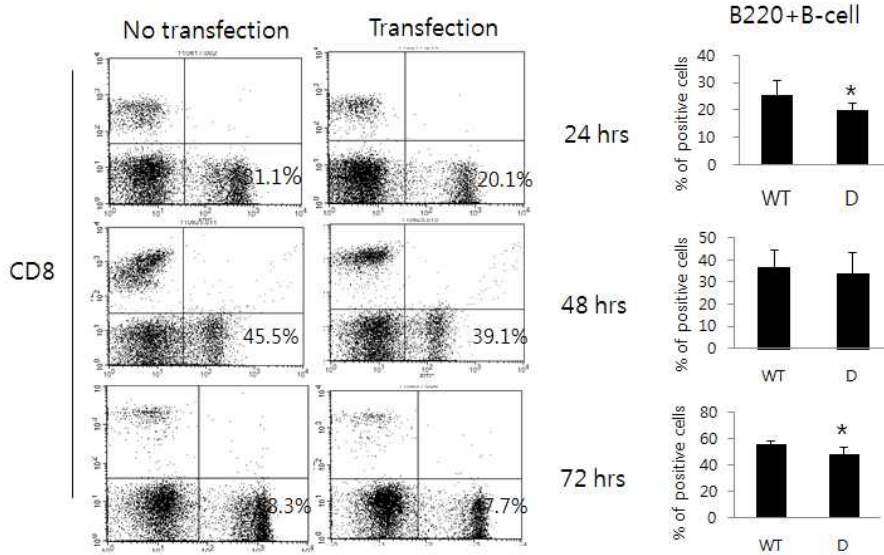
2. 제 1협동 연구수행 내용 및 결과

가. 미니돼지에서 T 면역 세포의 변화 양상

본 연구진은 IL-2R γ 유전자가 적중된 복제돼지를 궁극적으로 사람 줄기세포 이식 및 장기이식을 위해 사용하고자 하여 우선 미니돼지의 생체내 면역세포의 특성을 분석하고자 하였다. 이를 위해 미니돼지의 spleen과 thymus에서 primary cell을 분리한 후 제1세부과제에서 구축한 TALEN 기법으로 IL-2R γ 유전자가 적중된 벡터를 transfection한 후 면역세포의 변화 양상을 유세포 분석기를 이용해 분석하였다. 아래 [그림 9]에서 보는바와 같이 T와 B 면역세포의 변화양상에 있어서 유의적 차이가 크지 않고 극히 부분적인 방법이지만 향후 생산될 IL-2R γ 유전자 KO 돼지를 이용한다면 보다 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것이라 여겨진다.



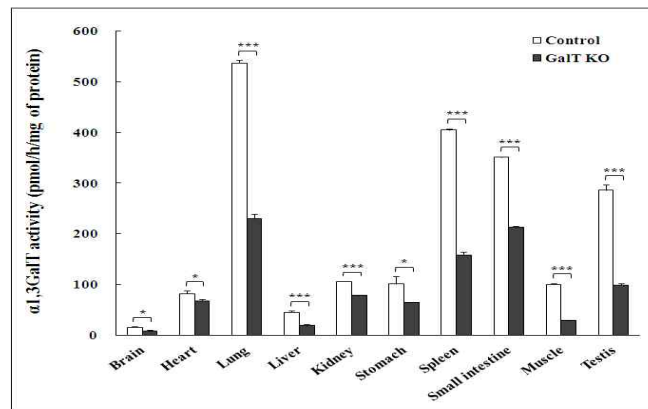
[그림 9] Effect of mini-pig derived T immune cells



[그림 10] Effect of mini-pig derived B immune cells

나. Heterozygote GALT KO pig 에서의 면역 기능 분석

현재 IL-2R γ KO 돼지가 생산되지 않은 관계로, 헤테로 GaLT KO 미니 돼지를 이용한 초급성 반응과 관련된 alpha GalT 활성을 각 장기에서 비교한 결과는 [그림 11]과 같다. 대조군에 비해 alpha GalT 활성이 현저히 떨어진 주요 장기는 lung, liver, kidney, spleen이 있으며, brain과 heart 부분은 약간의 통계적 유의차만 보였다.



[그림 11] Assay of α 1,3-galactosyltransferase activity. Enzyme activity was measured by reverse-phase HPLC using a fluorescence detector with 2-aminobenzamide-labeled lacto-N-neo-tetraose as the substrate. α 1,3-galactosyltransferase activity from each organ lysate (15 μ g of protein, 6 h at 37°C) was examined. Each value is the mean \pm standard deviation (SD) of independent triplicate examinations. Statistical significances were confirmed by t-test. * p<0.05, *** p<0.001. The liver data was obtained from our previous data⁶⁷.

[표 1]은 잠재적 면역 거절반응의 인자로 작용할 수 있는 Sias의 구성물을 non-Gal에 의하여 면역 거절 반응을 야기할 수 있는 H-D antigen의 성질을 가진 것으로 각 장기에서 이들 활성을 비교 분석한 결과이다. MAA는 MAH와 MAL로 구성되어 있으며, 이들은 sialic acid-contained glycoconjugates을 구성한다. 즉 MAL은 N-glycans의 Sia2,3Galβ1,4GlcNAc 구조에 특이적으로 결합하나, 반면에 MAH는 O-glycan의 Sia2,3 Galβ1,3[Sia2,6]GalNAc에 친화적으로 결합하는 성질을 가지고 있다. 이것과 마찬가지로, SNA lectin는 N- or O-glycan의 Sia2,6Gal/GalNAc구조 둘다와 결합하는 성질을 가지고 있다.

이들 성질을 이용하여 분석한 결과는 [그림 12]에서와 같이 GalT KO유래의 장기가 더 많은 H-D antigen을 가진 것으로 밝혀졌다. 이 결과는 매우 흥미로운 결과로서 지금까지의 이론과는 매우 대치되는 중요한 발견이다. 즉 Gal epitope가 제거할 경우 Non-Gal epitope가 상대적으로 증가하여 초급성은 방어할 수 있지만 급성 면역 반응을 조절하는 것이 불가능할 수 있다는 결과를 도출하였다는 점에서 매우 흥미로운 결과이다. 이 결과는 현재 "Cell Reprogram"에 발간되었다⁶⁷.

[표 1] Comparison of the sialic acid contents between control and heterozygote GalT KO organs⁶⁷.

Organs		Neu5Gc	Neu5Ac	Sialic acids (%)
		($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)	($\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein)	Neu5Gc/Neu5Ac
Heart	Control	1.01 \pm 0.11	4.76 \pm 0.49	17.47/82.53
	GalT KO	2.12 \pm 0.36**	7.73 \pm 0.67**	21.47/78.53
Lung	Control	6.62 \pm 0.19	11.25 \pm 1.30	37.15/62.85
	GalT KO	6.52 \pm 0.80	13.98 \pm 1.61**	31.80/68.20
Liver	Control	1.24 \pm 0.25	6.67 \pm 1.26	15.59/84.41
	GalT KO	2.28 \pm 0.15**	9.70 \pm 1.64**	19.25/80.75
Kidney	Control	0.47 \pm 0.05	2.50 \pm 0.32	15.73/84.27
	GalT KO	1.14 \pm 0.12*	5.16 \pm 0.29***	18.21/81.88

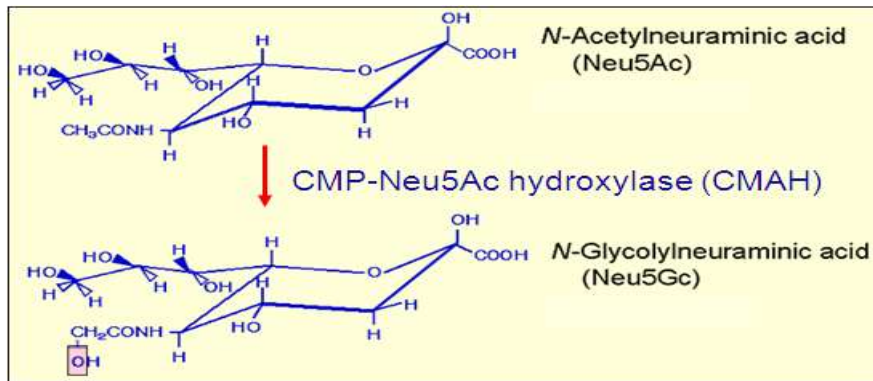
Each value is the mean \pm standard deviation (SD) of triplicate determinations.

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

다. Heterozygote GALT KO pig에서의 Non-Gal antigen 기능 분석

Non-Gal antigen인 Neu5Gc의 생성 메카니즘으로 우리몸에 존재하는 Neu5Ac는 CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH) 효소에 의하여 Neu5Gc로 전환되며, 그 결과의 Neu5Gc는 이종항원으로 활동하게 된다. 즉 사람의 경우는 진화적 단계에서 CMAH 효소를 생성하는 유전자에 돌연변이가 생겨, CMAH 효소를 생산할 수 없는 반면에 돼지를 포함한 동물의 경우에는 이 유전자가 기능적이어서 CMAH 효소를 생성할 수 있다. 따라서 돼지의 경우 초급성인자인 Gal-epitope을 제거하여도 급성 면역 반응이 일어나는 이유는 이 Neu5Gc가 기능적인 CMAH 효소 활성화에 의하여 생성되기 때문이다.

즉 GalT KO 돼지의 심장, 간 신장에서는 Neu5Gc의 양은 대조군에 비하여 유의적으로 증가였으나, 폐의 경우에는 유의적 차이를 보이지 않았다. 이들 결과는 Gal T을 제거한 돼지의 장기를 바분 원숭이에 이식하였을 때 왜 179일 만에 괴사가 일어나고, 최종적으로 급성 면역반을 제어할 수 없는지를 설명하는데 매우 중요한 단서를 제공한다. 결론적으로, 인간에게 돼지의 장기를 이식하기 위해서는 GAL T + CMAH 두 개의 유전자를 제거한 돼지 유래의 장기를 사용하지 않을 경우 초급성 및 급성 면역반응에 의하여 장기이식을 성공 할 수 없음을 처음으로 밝힌 매우 유익한 결과이다.

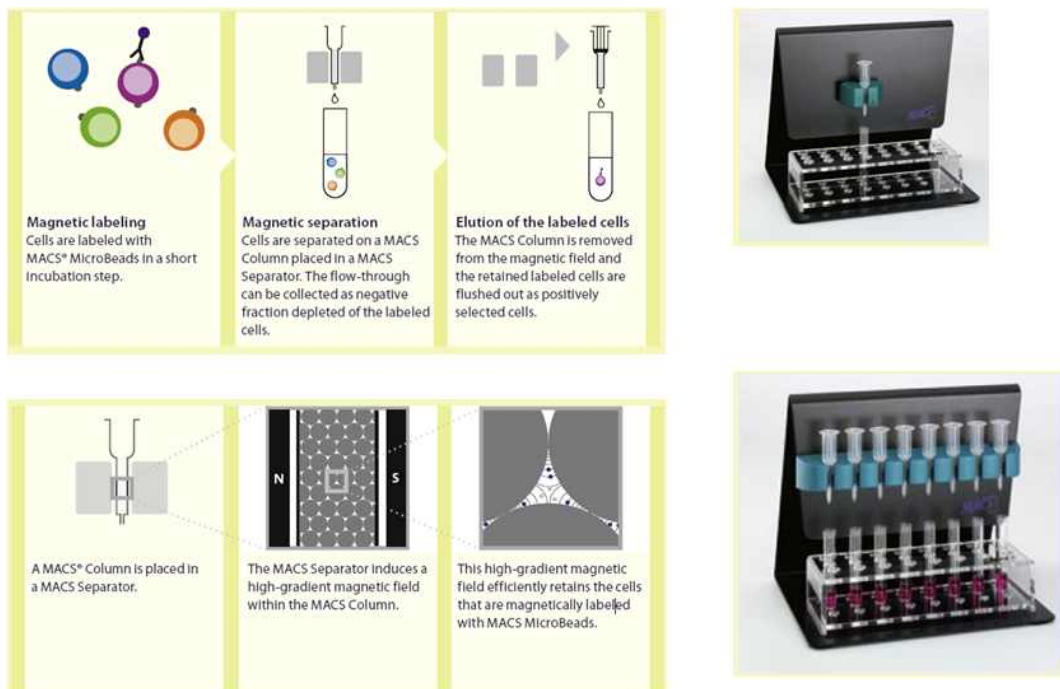


[그림 12] A representative mechanism from N-acetylneuraminic acid to (Neu5Ac) N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) conversion for H-D antigen⁶⁷.

3. 제 2 협동 연구수행 내용 및 결과

가. MACS를 이용한 사람 줄기세포 분리 기술 확립

구축된 IL-2R γ 유전자 적중 면역결핍 미니돼지를 이용해 실질적으로 이종 세포인 사람 태반 유래의 조혈줄기세포를 분리하여 유전자 적중 돼지 생체 이식을 실시하고 이식 후 이종 사람 줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 및 증식 여부를 조직 및 세포분석을 통하여 검증 분석하고자 한다. 따라서 본 연구진은 우선적으로 MACS를 이용한 사람줄기세포 분리 방법을 확립하고자 하였다. 그 결과, 아래 [그림 13]에서와 같이 시중에서 판매하고 있는 단일클론 항체 (CD34, CD38)를 이용하여 조혈줄기세포 분리 방법을 확립하여 실험을 실시한 결과 [표 2]에서와 같이 조혈줄기세포를 얻을 수 있었다.



[그림 13] Establishment of isolation method of human hematopoietic stem cells using MACS

[표 2] Stem cell isolation in blood using monoclonal antibody

	% of Total (mean \pm SD)	
	CD34 ⁺	CD34 ⁺ + CD38 ⁻
Cord blood	0.47 \pm 0.33	0.04 \pm 0.01

나. MSC의 Osteoblast 세포로의 분화유도

분화 유도한 후 이들 세포가 osteoblast cell인지를 확인하기 위하여 AP 염색한 결과는 [그림 14]와 같다.



[그림 14] Osteoblast cell induction from MSC

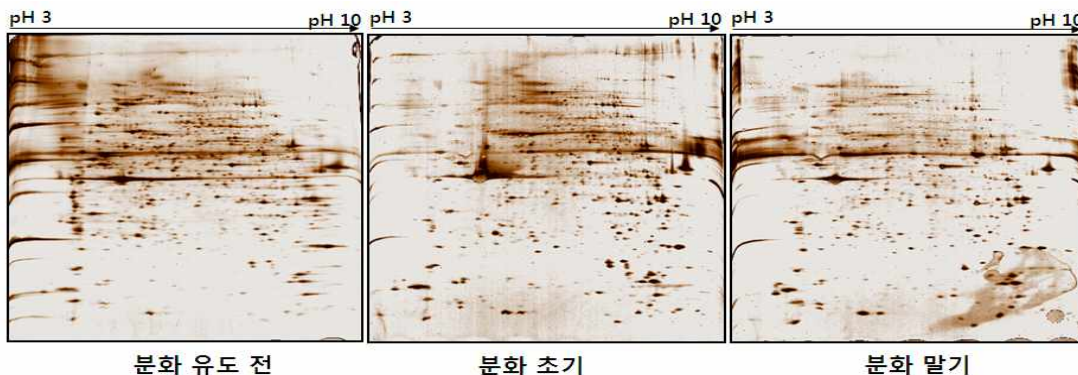
다. MSC의 Chondrocyte 세포로의 분화유도

MSC세포를 분화 유도한 후 이들 세포가 chondrocyte cell 인지를 확인하기 위하여 alcian blue 염색한 결과는 [그림 15]와 같다.



[그림 15] Chondrocyte differentiation induction from mesenchymal stem cell

라. MSC의 osteoblast 세포로의 분화유도에 따른 단백질 변화



[그림 16] Alteration of protein profiles according to differentiation stage

이상의 결과로부터 MSC는 미분화된 세포주임을 확인할 수 있었다.

[표3] MSC 분화에 따른 단백질 발현 변화

Spot Number	Mr (kDa)	pI	Fold change	Protein identification	NCBI Accession No.	MOWSE	Sequence Coverage %
1	35.8	4.9		Annexin A5	P08758	54012	37%
3	14.1	4.7		Peroxiredoxin2	P52552	3274	43.3%
6	11.6	5.0		Thioredoxin(Trx)	P82460	795471	66.3%
8	37.9	5.7		Hydroxyindole-O-methyltransferase	P01950	607	18%
10	27.1	5.4		Proteasome activator complex subunit 2	Q863z0	3.672+6	43.3%
11	70.4	5.5		Plastin-3	P13797	3.672+7	20.6%
12	59.4	5.4		T-complex protein 1 subunit theta	P50990	3.18e+6	21.4%
13	34.2	5.7		60s acidic ribosomal protein PO	P05388	267	10.7%
14	27.5	5.7		Phosphogluconolactonase	Q95336	3237	27.5%
15	41.7	5.3		Actin, cytoplasmic 1 (β-actin)	P60709	384	18.4%
16	11.7	5.9		Protein s100-A4	P26447	1653	36.6%
18	23.5	6.1		Ras-related protein Rab-2A	P61019	2606	15.1%
19	22.9	6.2		Heat-shock protein beta 1	Q5S1U1	9160	24.2%
20	28.1	7.2		Thioredoxin-dependent peroxide reductase	P35705	7460	19.5%
21							
22	24.9	6.0		Peroxiredoxin-6	O77834	3.58e+8	65.5%
23	17.1	5.8		Nucleoside diphosphate kinase A	P15531	394224	44.1%
24	46.2	5.6		Cop9 signalosome complex subunit-4	Q98t78	2.95e+9	42.4%
25	55.6	5.9		Septin-8	Q92599	191292	19.3%
27	59.6	5.5		T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	4.87e+8	33.8%
28	59.6	5.5		T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	1.05e+6	28.5%
29	32.4	5.5		T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	2.880+11	27.7%
31	43.7	6.4		Proliferation-associated protein 2G4	P90Q80	77737	21.3%
32	38.7	6.7		G1/S-specific cyclin-d3	q3mhh5	1280	20.5%
33	38.7	6.4		Annexin A1	P19619	1368	16.2%
34	22.9	6.2		Heat-shock protein beta-1	Q5S1U1	68947	31.9%
35	22.8	6.5		Proteasome subunit beta type 2	P49721	3393	30.3%
37	28.6	6.8		Phosphoglycerate mutase 1	P18669	9.53e+6	42.3%
38	26.5	7.2		Triosephosphate isomerase	Q29371	7.51e+8	59.5%
40	36.4	6.6		Alcohol dehydrogenase	P50578	167762	26.2%
41	27.1	7.2		Ferritin, Mitochondrial precurs	Q9d5h4	953	13.9%
42	20.1	6.8		α-crystallin β chain	Q7m2w6	153804	36.6%
43	22.4	8.9		Transgelin	Q01995	2.62e+7	57.5%
44	14.3	7.0		40s ribosomal protein s12	Q46405	3168	48.1%
45	10.9	6.3		Protein s100-A10	Q0ch63	22.6	28.4%

45	10.9	6.3		Protein s100-A10	Q0ch63	22.6	28.4%
46	11.9	8.2		Marcocophage migration inhibitory factor	Q80928	1063	24.5%
47	11.9	8.2		Marcocophage migration inhibitory factor	Q80928	1071	24.5%
48	17.1	7.8		Nucleoside diphosphatekinase B	Q2en76	831929	61.2%
49	27.0	8.5		3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase	Q02691	6808	35.4%
50	28.6	6.8		Phosphoglycerate mutase 1	P18669	1.68e+9	54.9%
52	34.9	7.6		Guanine nucleotide-binding protein channel protein	P63246	3.20e+8	45.6%
53	30.5	8.6		Voltage-dependent anion-selectine	Q9mz16	2.58e+8	50%
54	30.5	8.6		Voltage-dependent anion-selectine	Q9mz16	2.85e+7	46.8%
55	36.4	8.2		L-lactate dehydrogenase A chain	p00339	4.53e+11	41.4%
56	36.8	8.1		Aldo-keto reductase family 1 member c3	P42330	153574	18.6%
57	47.0	7.0		A-enolase	Q9xsj4	1.43e+6	26.6%

현재 70% 완성되었으며, 금후 정밀한 분석과 정량 분석이 필요하다.

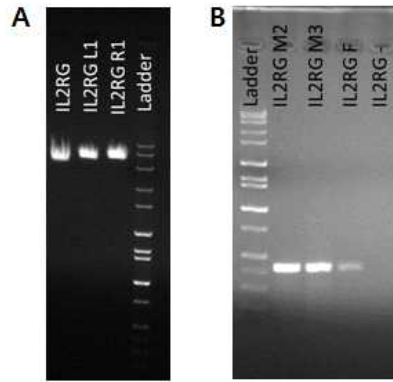
제 2절. 2차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 제 1세부 연구수행 내용 및 결과

가. 돼지 IL-2RG 유전자 적중 벡터의 transfection

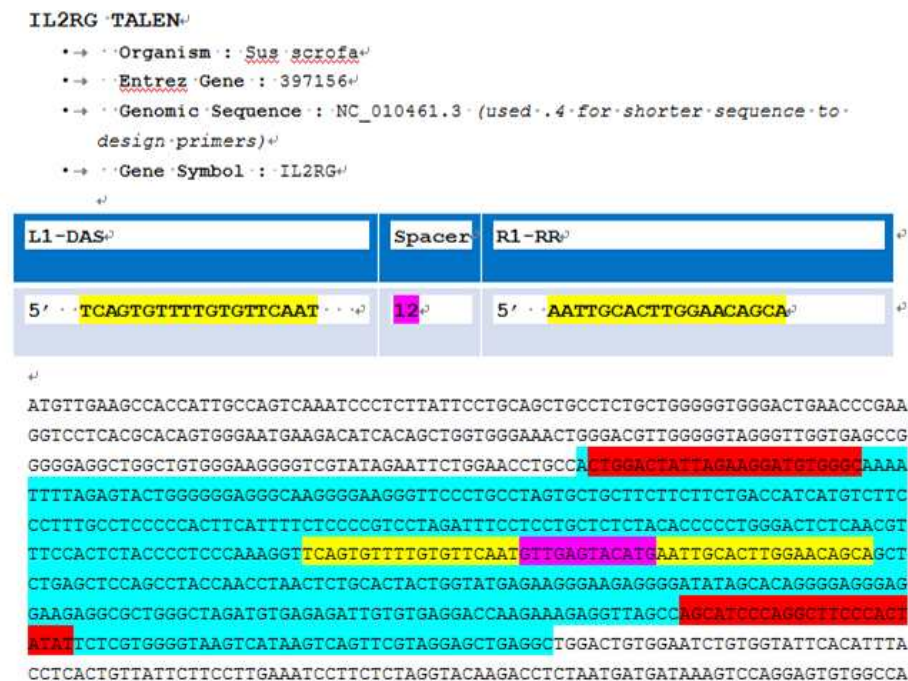
IL2RG 유전자가 적중된 미니돼지를 생산하기 위하여, IL2RG knock-out 미니돼지 체세포주를 확립하고자 하였다. 이를 위해, 1차년도에 확립한 IL2RG exon 2를 target으로한 TALEN 벡터를 이용하여 다음 연구를 수행하였다.

먼저, TALEN 기법을 이용한 IL2RG 유전자 적중 체세포주 구축을 위해 endo-free maxi prep kit으로 DNA를 준비하였고 (IL2RG L1, IL2RG R1, IL2RG [report DNA]; [그림 17 A], male과 female 유래의 minnesota mini fibroblast에 위의 유전자를 transfection한 후 GFP positive 한 colony만을 분리한 후 PCR로 확인하였다. 그 결과, [그림 17 B]에서와 같이 male과 female 유래의 minnesota mini fibroblast에 TALEN binding region을 포함한 IL2RG 유전자가 증폭이 되는 것을 확인 할 수 있었다.



[그림 17] PCR genotyping in male and female-derived Minnesota fibroblast after transfection of TALEN construct for IL2RG gene. A) Plasmid DNA for transfection, B) PCR genotyping.

TALEN (transcription activator-like effector nuclease) 은 특정염기서열을 인식하고 이를 통해 특정부위의 DNA double strand를 잘라주는 역할을 한다. TALEN에 의해서 특정부위가 잘려지면 세포는 repair system을 통하여 repair를 한다. non homologous End-join 방식에 의하여 수정되게 되며 그 결과로 인하여 특정부위가 deletion 된다. 이 TALEN을 세포에 transfection 하기 위해서 endo-free maxi prep kit로 DNA를 준비를 하였고, 이를 1% agarose gel에서 확인을 하였다[그림 17 A]. 이 DNA를 이용하여 Minnesota mini fibroblast에 transfection 후, PCR을 통하여 TALEN을 통하여 deletion된 IL2RG를 확인하였다[그림 17 B].

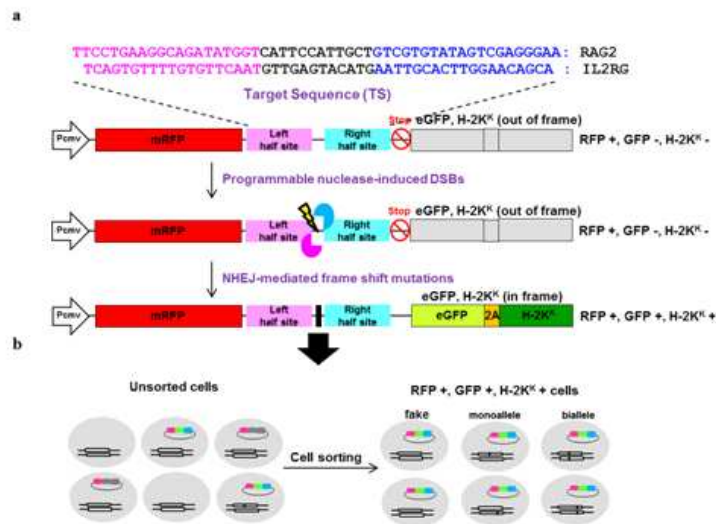


[그림 18] IL2RG target sequence and primer for genotyping

[그림 18]은 IL2RG의 target sequence (left and right: yellow color), space (pink color)와 genotyping에 사용한 primer 위치 및 sequence (red color)를 나타낸 것이다.

나. Report 유전자를 이용한 돼지 IL-2RG 유전자 적중 체세포주 선별 system 확립

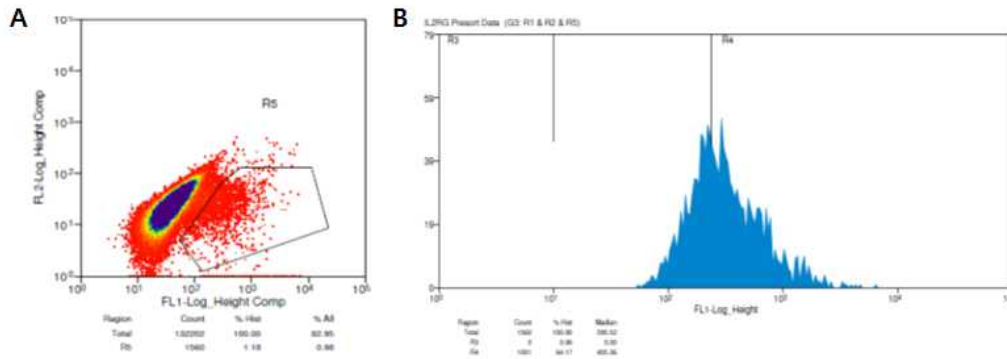
보다 효율적인 selection을 위해 실제적으로 TALEN에 의해 targeting 되어진 돼지 fibroblast cell을 selection하기 위한 다음과 같은 report 유전자를 이용한 체세포주 선별 시스템을 확립하였다. 먼저, target sequence를 포함하고 있는 report vector와 TALEN 벡터를 transfection 하면 되면 report 벡터의 target sequence 내 Programmable nuclease에 의해 DSB가 유도되고 이 break는 NHEJ에 의해 repair되어 frame shift가 일어나며 in-frame일때 다음과 같이 GFP를 expression 하게 된다 [그림 19].



[그림 19] Construction of surrogate reporter vector for enrichment of targeted cells by TALENs. (a) The reporter vector consists of the monomer RFP gene, the programmable nuclease's target sequence (left and right half-sites), the enhancer GFP and the H-2KK gene (upper panel of a). If GFP and H-2KK sequence are out of frame because of the absence of programmable nuclease activity, only the RFP gene is expressed. When a double-strand break is introduced into the target sequence by programmable nucleases, the break is repaired by non-homologous end-joining (NHEJ), which often causes frame shift mutations. Such mutations can render GFP into in frame with RFP, inducing the expression of the mRFP-eGFP-H-2KK fusion protein (low panel of a). (b) Schematic illustrates enrichment of nuclease-induced mutations in mRFP+eGFP+H-2KK+ cells sorted by two systems: magnetic separation by H-2KK antibody and flow cytometry by RFP and GFP expression. Within cells, reporter plasmids and chromosomal target loci are illustrated. Mutations are shown as black spots.

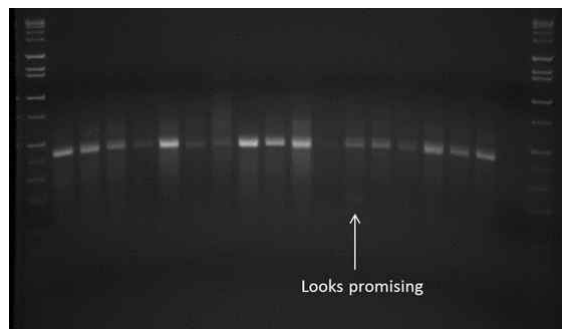
다. 돼지 IL-2RG 유전자 적중 체세포주 선별

앞서 구축되어진 방법을 이용하여 minnesota mini fibroblast에 IL2RG 유전자에 대한 TALEN 적중 벡터를 transfection한 후 cell을 sorting하여 FACS로 분석한 결과, [그림 20]에 서와 같이 0.98%의 IL2RG 유전자가 적중된 세포를 확인할 수 있었다.



[그림 20] FACS analysis and sorting of IL2R transfected cells. A) FACS analysis of IL2R transfected cells. B) Re-analysis of sorted GFP positive cells by FACS.

Sorting 되어진 GFP positive한 체세포를 96 well plate에서 10-14일 정도 배양한 후 colony PCR을 통하여 TALEN binding/cutting sites를 증폭 후 sequencing을 한 결과, 30개의 colony중 9개의 colony가 mutation이 일어남으로서 약 30 %의 효율을 갖는 것을 확인할 수 있었다 [그림 21, 22].



[그림 21] Colony PCR for TALEN binding/cutting sites in sorted cell

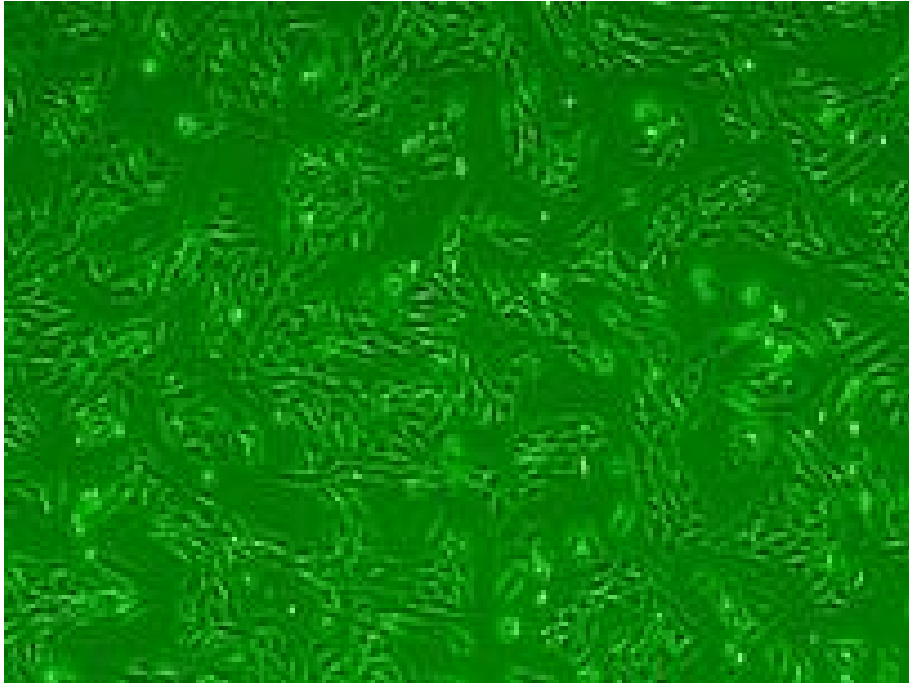
IL2RG

```

WT TCAGTGT TTTGTGTTCAAT GTTGAGTACATG AATTGCACTTGGAACAGCA
#10 TCAGTGT TTTGTGTTCAAT G-----CA--- -----C---TTGGAACAGCA
#13 TCAGTGT TTTGTGTTCAAT GTTGAG-----TG AATTGCACTTGGAACAGCA
#2-8 TCAGTGT TTTGTG----- -----GAACAGCA
#2-10 TCAGTGT TTTGTGTTCAAT GTTGAGTA---TG AATTGCACTTGGAACAGCA
    
```

[그림 22] Sequencing results from 9 positive identified cell

GFP+ cells만 FACS를 통하여 sorting을 하고 96well palte에 배양을 하였다. 그리고 50%이상 세포가 자랐을 때, 일부는 계속 배양을 하고 일부는 PCR을 통하여 정확하게 TALEN이 transfection 된 세포를 확인하였다[그림 21]. transfection의 정도 및 효율은 GFP를 현미경으로 확인할수도 있지만, PCR을 통하여 발현을 확인하고 바로 sequencing을 하여 IL2RG의 deletion을 확인하였다[그림 22]. WT는 정상적인 돼지의 경우 left target sequence, IL2RG, right target sequence를 가지고 있지만, #10, 13, 2-8,2-10은 IL2RG의 mutation과 Left와 Right target sequence에서 일부 mutation을 확인을 할 수가 있었다.



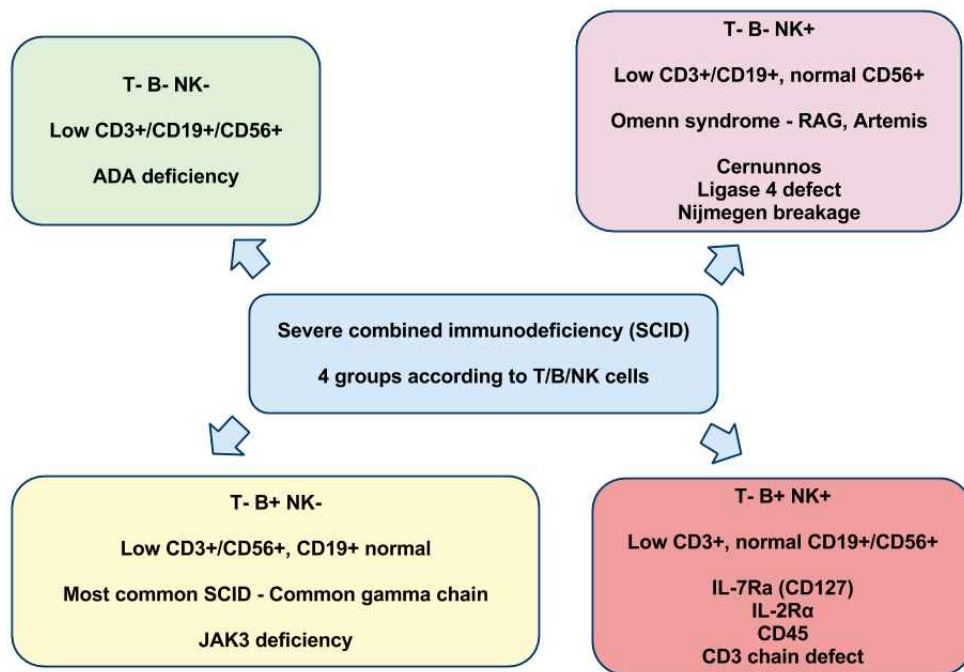
[그림 23] Established IL2RG cell line.

Sequencing 결과, 9개의 colony로부터 위에서 보시는 바와 같이 4 line (#10, #13, #2-8, #2-10)의 IL2RG 유전자가 적중된 체세포주를 구축하였고[그림 23], 이후 반복 실험을 통하여 2 line (#14, #15)의 IL2RG 유전자가 적중된 체세포주를 구축하여, 최종적으로 총 6 line의 체세포주를 확보하였다. 총 9개의 colony를 분석하여 [그림 21]의 결과를 확인하였고, 중복되는 mutation이 있어서 대표적인 4개만 [그림 22]에 나타내었다. 이중 3 line (#10, #13, #15)의 IL2RG 유전자 적중 체세포주를 돼지 생산을 위해 제1 협동과제 책임자에게 전달하였다.

2. 제 2세부 연구수행 내용 및 결과

가. SCID 의 특성 및 종류

제1협동과제에서 생산한 IL2RG 유전자가 제거된 돼지는 중증합병 면역결핍증 (Severe combined immunodeficiency: SCID)을 가진 돼지로 유전적 결함으로 인해 면역체계에 관여하는 세포들의 결핍으로 인하여 면역체계가 기능을 하지 못하는 유전질환을 가졌다. 이러한 면역세포의 결핍에 의한 SCID는 [그림 24]에서 나타난 바와 같이 4 종류로 나눌 수 있으며 본 과제에서 더 이로 인해 T 림프구의 정상적인 발달을 억제하여 체내의 면역체계의 이상을 유발한 돼지이다. 생산한 돼지는 X염색체성 SCID의 원인 유전자는 Interleukin 2 receptor gamma (IL2RG) 유전자로 interleukin receptor 의 구성성분인 gamma chain subunit의 mutation에 의해 생산되어졌다.



AllergyCases.org

[그림 24] Severe combined immunodeficiency (SCID) 4 groups according to T/B/NK cells⁶⁹.

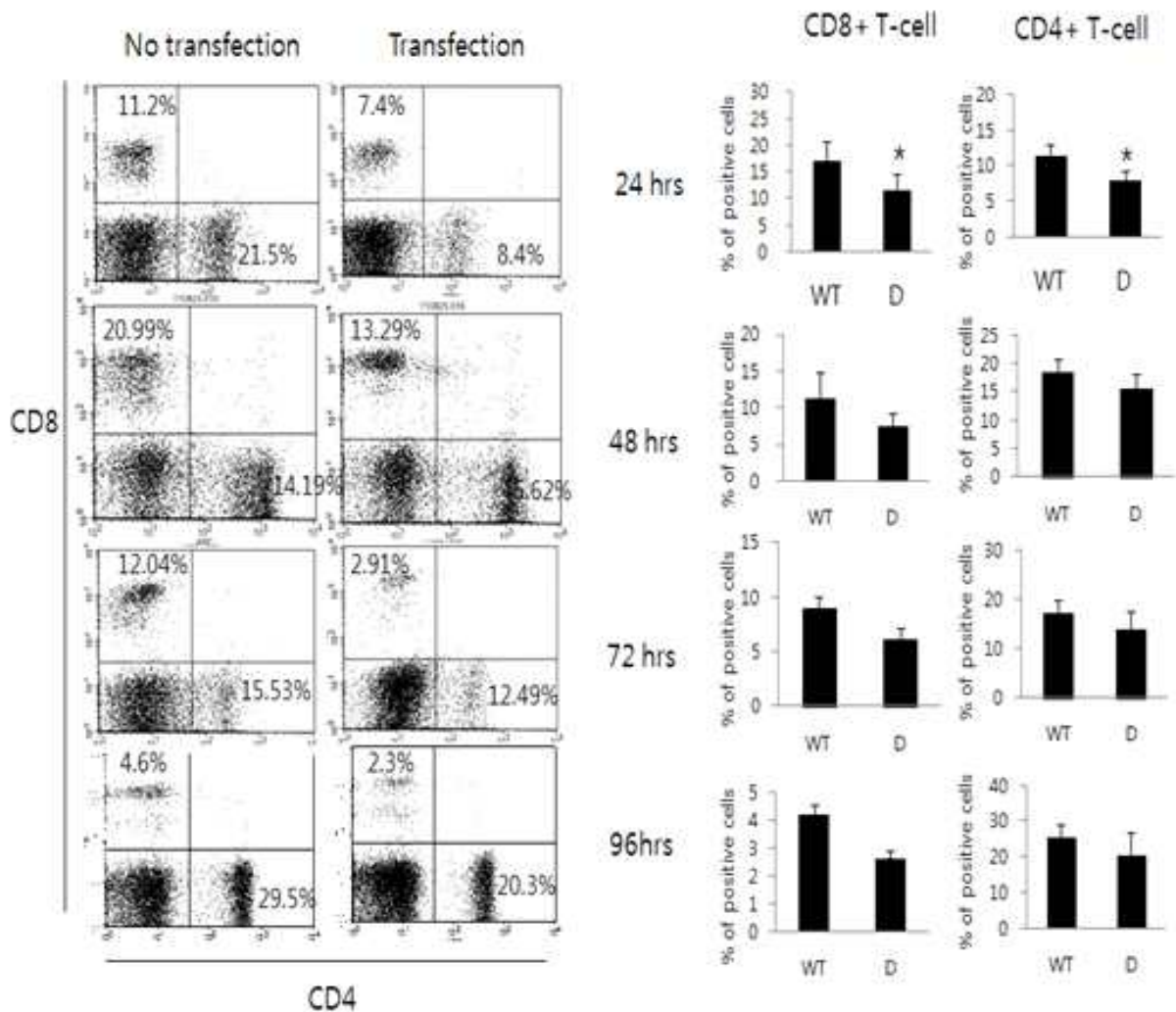
나. 미니돼지에서 T 면역세포의 변화 양상

본 연구진은 IL-2RG 유전자가 적중된 복제돼지를 궁극적으로 사람 줄기세포 이식 및 장기이식을 위해 사용하고자 하여 우선 미니돼지의 생체내 면역세포의 특성을 분석하고자 하였다. 이를 위해 미니돼지의 spleen과 thymus에서 primary cell을 분리한 후 제1세부과제에서 구축한 TALEN 기법으로 IL-2RG 유전자가 적중된 벡터를 transfection한 후 면역세포의 변화 양상을 유세포 분석기를 이용해 분석하였다.

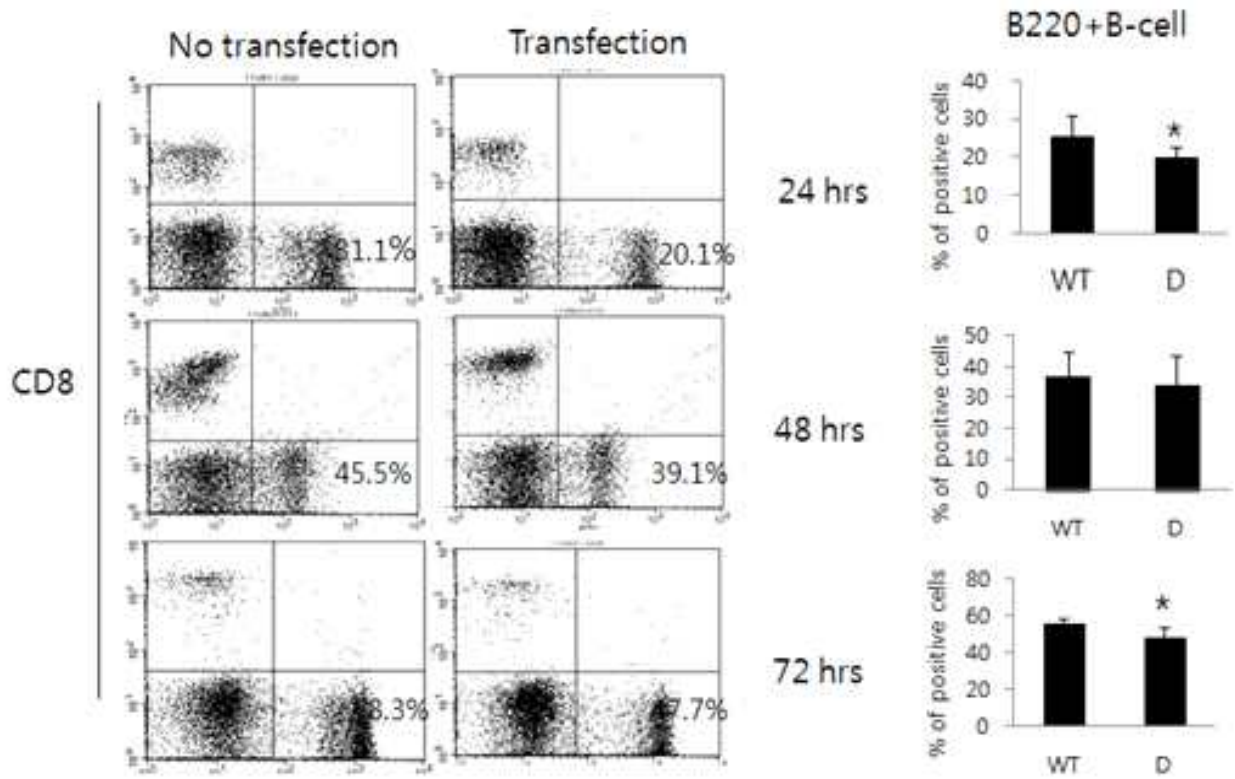
아래의 그림에서 보는바와 같이 T와 B 면역세포의 변화양상에 있어서 유의적 차이가 크지 않고 극히 부분적인 방법이지만 향후 생산될 IL-2RG 유전자 KO 돼지를 이용한다면 보다 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것이라 여겨진다.

면역세포의 변화양상을 시간별로 구별하여 분석을 수행하였다. 그림에서와 같이 24시간 뒤에는 유의적인 차이가 나타났지만, 48시간부터 - 96시간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그래서 유의적 차이가 나타나지 않는다고 분석을 하였다.

[그림 24]는 SCID의 종류를 설명을 한 것이고 [그림 25]와 [그림 26]은 면역세포에 IL2RG를 transfection 시켰을 때 NK cell과 T cell population 경향을 살펴본 것이다. 앞으로 좀 더 다양하게 세부적인 면역세포를 확인할 수 있는 마커를 활용하여 분석을 할 예정이다.

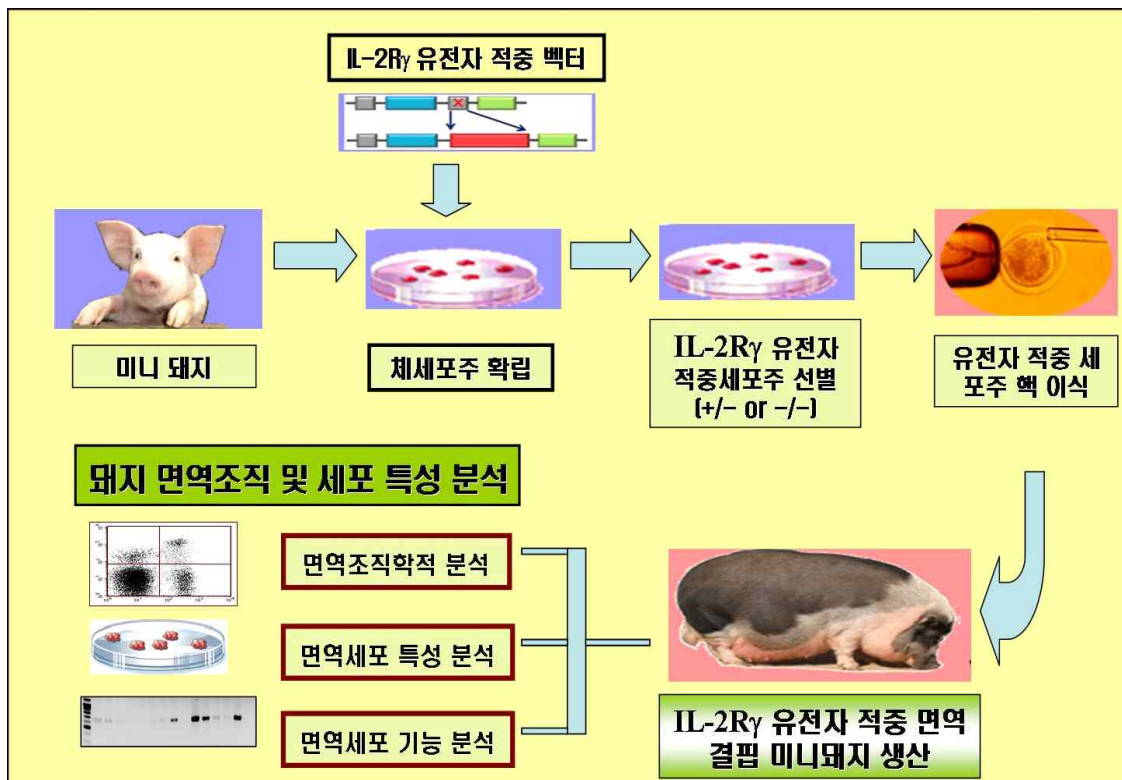


[그림 25] Effect of mini-pig derived T immune cells



[그림 26] Effect of mini-pig derived B immune cells

향후 7월말부터 태어날 IL2RG 유전자 적중 형질전환돼지들을 이용하여 [그림 27]과 같이 면역기관의 조직학적 또는 면역 세포학적 특성 분석 및 면역 결핍 특성을 분석할 예정이다.



[그림 27] Immunological characterization using IL2RG knock-out pigs

3. 제 1협동 연구수행 내용 및 결과

가. 돼지 IL-2RG 유전자가 제거된 형질전환복제돼지 생산

IL2RG 유전자가 적중된 미니복제돼지 생산을 위해 제1 세부과제에서 구축한 3 line (#10, #13, #15)의 IL2RG 유전자 적중 체세포주를 이용하여 SCNT에 의해 산자를 생산하였다. 다음 [표 4]는 embryo 이식 결과를 나타낸 것이다.

[표 4] IL2RG Embryo transfer list

ET Date	Donor cell	Number of embryos transferred	Day of heat	Results
10/12/12	Korean IL2RG #10,13,15	216	1	1 female
2/25/13	Korean IL2RG 53-1	96	4	Cycled
2/25/13	Korean IL2RG 53-1	179	4	Cycled
4/2/13	Korean IL2RG 53-1	35 Blast	6	Cycled
4/9/13	Korean IL2RG 53-1	35 Blast	4	Cycled
4/10/13	Korean IL2RG 53-1	48 Blast	4	-
4/23/13	Korean IL2RG 53-1	51 Blast	5	-
4/25/13	Korean IL2RG 53-1	187	1	-
4/26/13	Korean IL2RG 53-1+RAG2	243	0	-

2012-10-12일 [그림 28]에서와 같이 female 돼지가 태어났으며, IL2RG 53-1 donor cell 을 이용하였으며, 이 세포는 분석된 총 9개의 colony를 확인하였고, 중복되는 mutation이 있어서 대표적인 4개만 [그림 22]에 나타내었다. IL2RG 53-1 donor cell는 #2-8과 동일한 mutation을 나타내어 표기하지 않았다.



[그림 28] Production of IL2RG knock-out pig.

돼지의 귀로부터 genomic DNA를 분리 후 TALEN binding/cutting sites를 포함하는 부분을 PCR로 증폭하여 sequencing한 결과, [그림 29]에서와 같이 heterozygote 미니복제돼지 임 (53-1)을 확인할 수 있었다. 또한, heterozygote IL2RG knock-out 복제돼지(53-1)의 귀로부터 체세포주를 구축하여 이 체세포를 이용하여 이식을 진행하였으며 3 마리의 돼지가 더 임신 을 해 8월말부터 분만할 예정이다. 이후 개체들을 이용하여 교배에 의해 homozygote라인도 구 축할 계획이다.

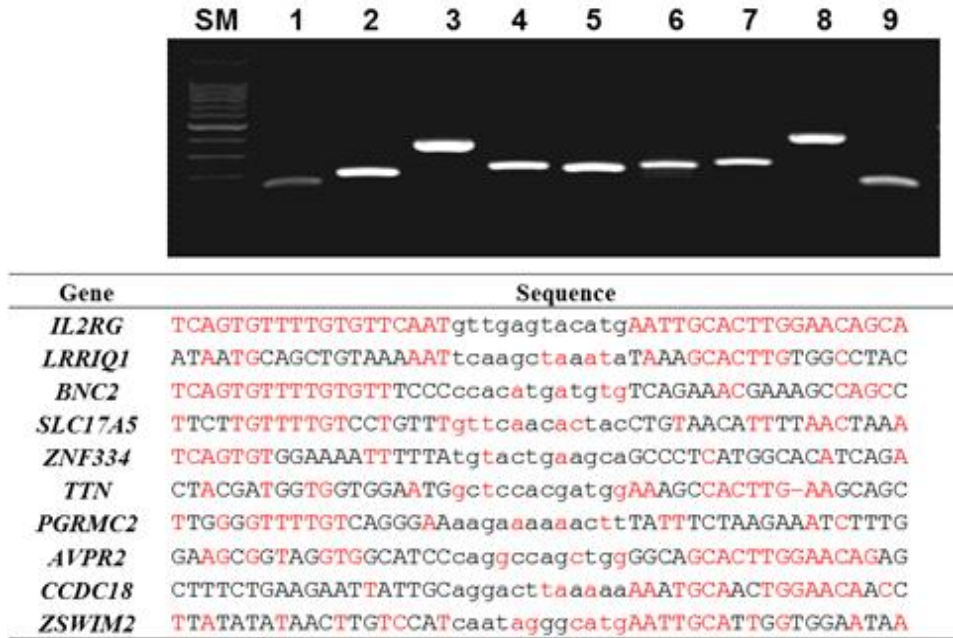
IL2RG monoallelic
 TCAGTGTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCA
 TCAGTGTTTTGTGTTCAATGTTGAG -----TGAATTGCACTTGGAACAGCA

[그림 29] Sequencing result from IL2RG knock-out pig(53-1)

2012-10-12일 복제돼지가 태어났으며, KO을 확인하기 위하여 복제돼지의 귀 조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 TALEN binding/cutting site를 포함하는 부분으로 디자인되었다. PCR후, sequencing을 했는데, 그 결과 2개의 상동염색체중 1개의 염색체에서만 IL2의 mutation이 나타났었고, 그 결과 이 복제돼지는 hetero 임을 알 수가 있었다.

나. 돼지 IL-2RG 유전자가 제거된 형질전환복제돼지 분석

함께 태어난 돼지의 세포를 이용하여 off-target 분석을 실시하였다. [그림 30]은 TALEN vector 구축 시 IL2RG target sequence와 가장 높은 homology를 가지는 9개의 유전 자를 PCR로 증폭 후 Surveyor assay를 통해 분석한 결과 어떠한 off-target mutation이 없음을 확인할 수 있었다.



[그림 30] Off-target analysis of IL2RG gene from IL2RG mutated pig. Upper) Surveyor nuclease digest of heteroduplex DNA revealed no additional off-target mutations at the 9 loci with highest homology to IL2RG gene; SM: size marker, lane 1: LRR1Q1; 2: BNC2; 3: SLC17A5; 4: ZNF334; 5: TTN; 6: PGRMC2; 7: AVPR2. 8: CCDC18; 9: ZSWIM2. Bottom) Genes and sequence homologies of IL2RG related sequence to exclude off-target mutations.

SURVEYOR Mutation Detection Kits 는 DNA의 mutations과 polymorphisms을 확인할 수 있는 간단한 방법으로, deletions, small insertions, SNP(single nucleotide polymorphisms)에 존재하는 mismatches를 확인한다. 그래서 TALEN에 의한 non specific binding으로 IL2RG와 유사한 sequence를 가진 부분에 영향이 있는지 확인하기 위해서 surveyor assay를 수행하였다 [그림 30]. 유사한 sequence를 가진 유전자를 찾고 그 부분을 detection하기 위한 primer를 디자인하여 PCR을 수행한 뒤 sequencing을 진행하였다.

그 결과 IL2RG와 유사한 sequence를 가지는 유전자들이 정상적으로 증폭이 되고 sequencing 결과도 정상으로 나와서 우리가 사용한 IL2RG TALEN이 다른 유전자에는 영향을 미치지 않고, IL2RG만 특이하게 반응을 하여 deletion한 것을 확인 할 수 있었다.

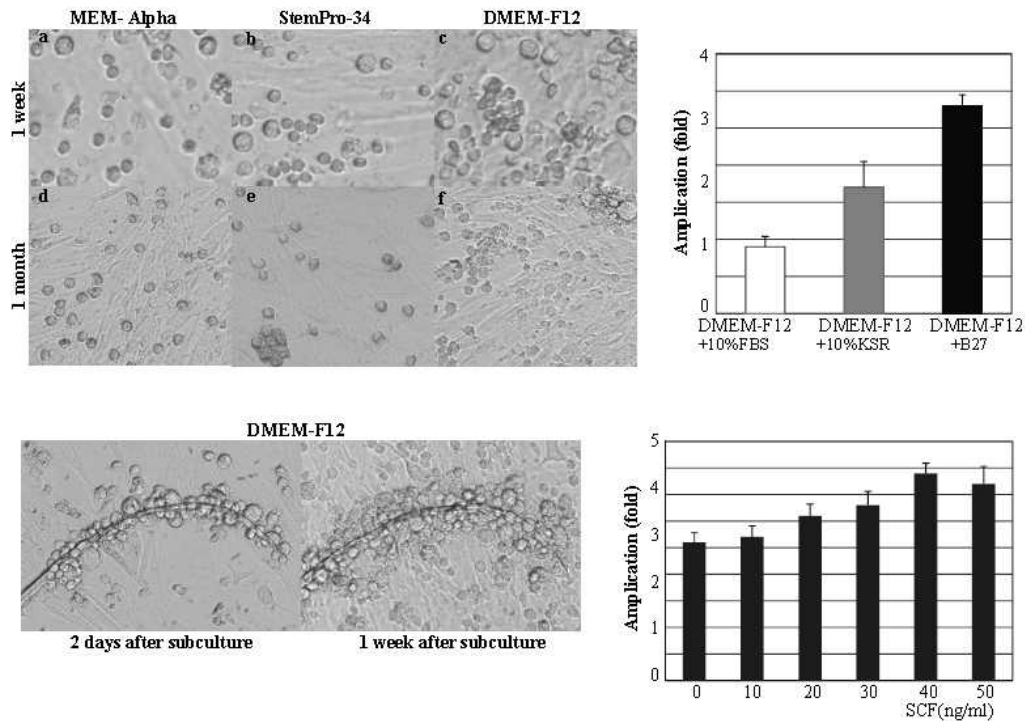
[표 5] Primer sets used to identify off-site targeting of pig IL2RG.

Gene	Abbreviation	Primer	Product
Leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	<i>LRRIQ1</i>	F: CGTTTGTATAAACTGCAGCATA R: TTTTGCTTCCCTTTCCTTCC	150
Basonuclin 2	<i>BNC2</i>	F: AGCCAGAGGAAGGGGTTTTA R: GGTTAACCAGCTCAGGCAAC	199
Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	<i>SLC17A5</i>	F: GTCTGGTTGCAGCTCAAGGT R: GCCACTGTGGACTCTAGAGGAT	369
Zinc finger protein 334	<i>ZNF334</i>	F: ATTCACACAGGGGAGAAACG R: GTGGAAATTTTTCCCCCATT	233
Titin	<i>TTN</i>	F: CTTTGGACCTGCCCACTTT R: GGATGTGTGATCGGTTCCAT	228
Progesterone receptor membrane component 2	<i>PGRMC2</i>	F: TGAGGGAGAGAGGAGACCTG R: CTAGGGGAAGGAAAGGGATG	238
Arginine vasopressin receptor 2	<i>AVPR2</i>	F: GGCGTACATGCCTACCATCT R: CTGTCCACGGTCTTTGTGG	246
Coiled-coil domain containing 18	<i>CCDC18</i>	F: TTCTCCCAACCCATTTACA R: CCTGAGTTGAACCAGCACCT	405
Zinc finger, SWIM-type containing 2	<i>ZSWIM2</i>	F: AAAAGTTCTTCCTGTTTTGACAGA R: TGGTTATTCCACCAATGCAA	150

4. 제 2협동 연구수행 내용 및 결과

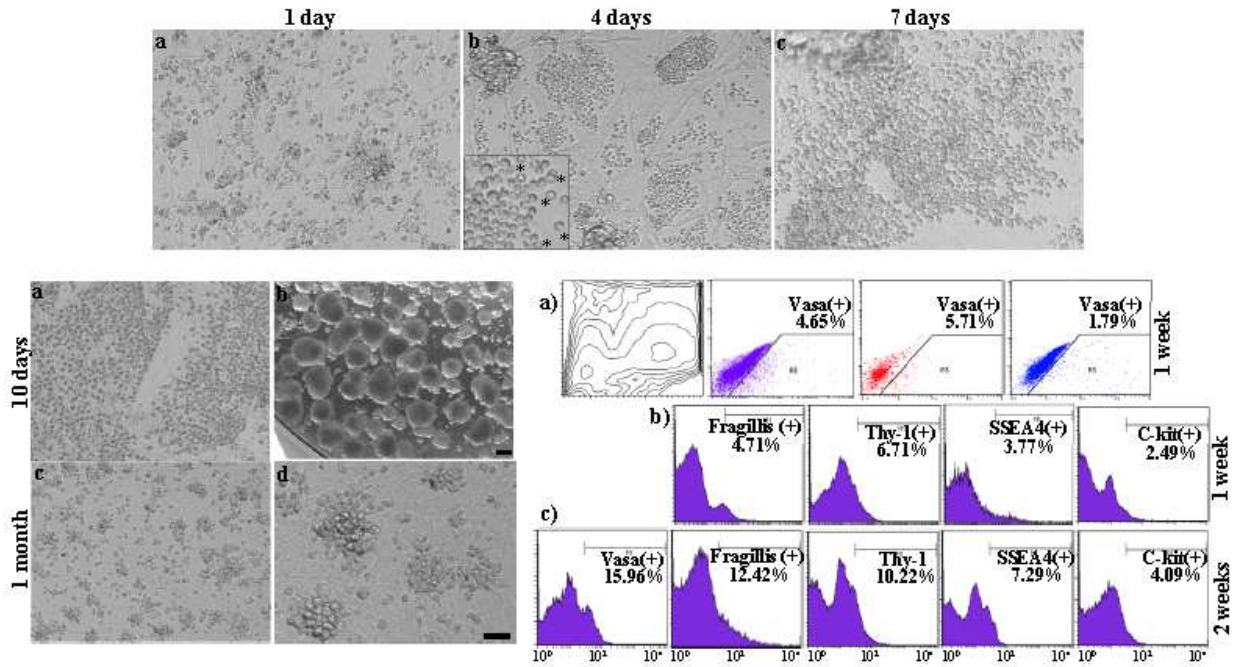
가. Adult mammalian ovary내에 존재하는 very small embryonic-like stem cell의 증명

도축장에서 확보한 돼지 난소에서 putative stem cell을 분리를 하였다. 분리방법은 collagen과 trypsin/EDTA 으로 2 step enzyme digestion 처리를 통하여 single cell을 만든 뒤, large tissue clumps를 제거하기 위해서 70 μ m filter를 사용하고 분리된 난소 세포에 난자가 포함되는 것을 막기 위해서 40 μ m filter를 사용하였다. 그리고 배양조건이 확립되어있지 않은 PSC를 위하여 3가지 배양조건을 이용하여 PSC를 배양하였다 [그림 31]. 배양액에 kit ligand/stem cell factor를 첨가하면 PSC의 proliferation이 잘 자라는 것을 확인 했다. 이 실험을 통하여 PSC의 효과적인 배양조건을 확인 할 수 있었다.



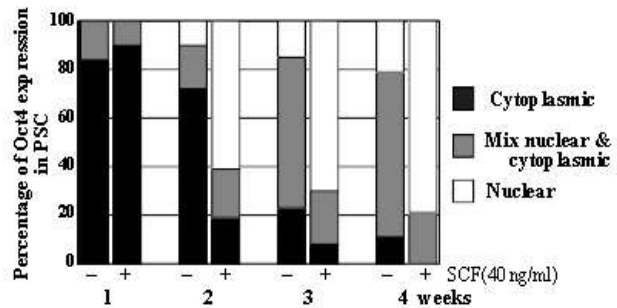
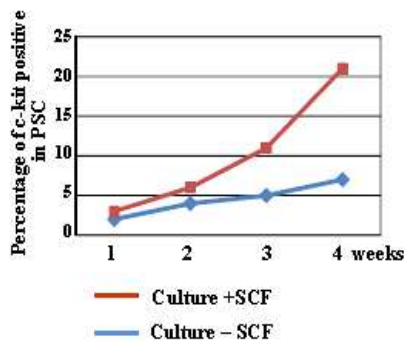
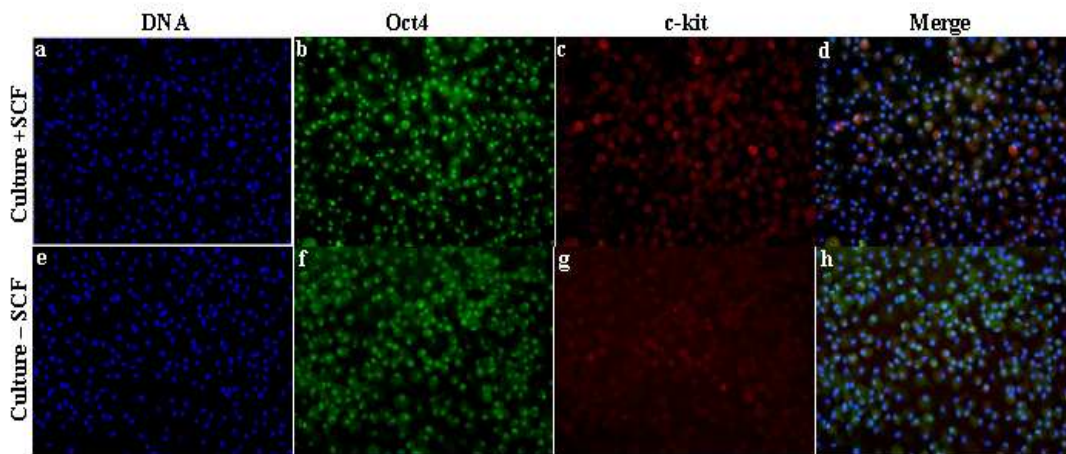
[그림 31] Comparison of basic culture media for putative stem cell (PSCs) and improvement of PSCs proliferation by some supplements. (A) Appearance of PSCs on 3 kinds of media MEM-Alpha, StemPro-34, and DMEM-F12 after 1 week culture (a-c). After 1 month of culture, DMEM-F12 exhibited significant effect on the PSCs proliferation. Both of MEM-alpha and DMEM-F12 were cultured with 10% FBS enhanced differentiated cells (d-f). (B) DMEM-F12 increased large number of PSCs and spontaneously differentiated oocytes during 5 days after subculture. (C) Effect of knockout serum replacement (KSR) and serum-free supplement (B27) on PSCs proliferation (n=6). PSCs were cultured for 7 days on gelatin-coated dishes. Note the improved growth of PSCs with DMEM-F12 + B27 supplement (DMEM-F12/B27). (D) Effect of Kit Ligand/Stem Cell Factor (KL/SCF) on PSCs proliferation (n=6). PSCs were cultured for 7 days on gelatin-coated dishes with DMEM-F12/B27 supplemented with various concentration of SCF (10, 20, 30, 40, 50 ng/ml). Note the PSCs proliferation was improved by 40 ng/ml SCF.

분리한 PSC는 분별가능한 세포모양을 가지고 있어서 RBC과 구분이 가능하였고, 이는 다시 germ cell과 stem cell marker를 가지고 FACS 분석을 하였다. 분리된 세포중 일부는 germ cell과 stem cell marker인 Thy-1, Fragilis, SSEA4, c-kit의 특징을 보여주고 있음을 확인하였다 [그림 32].



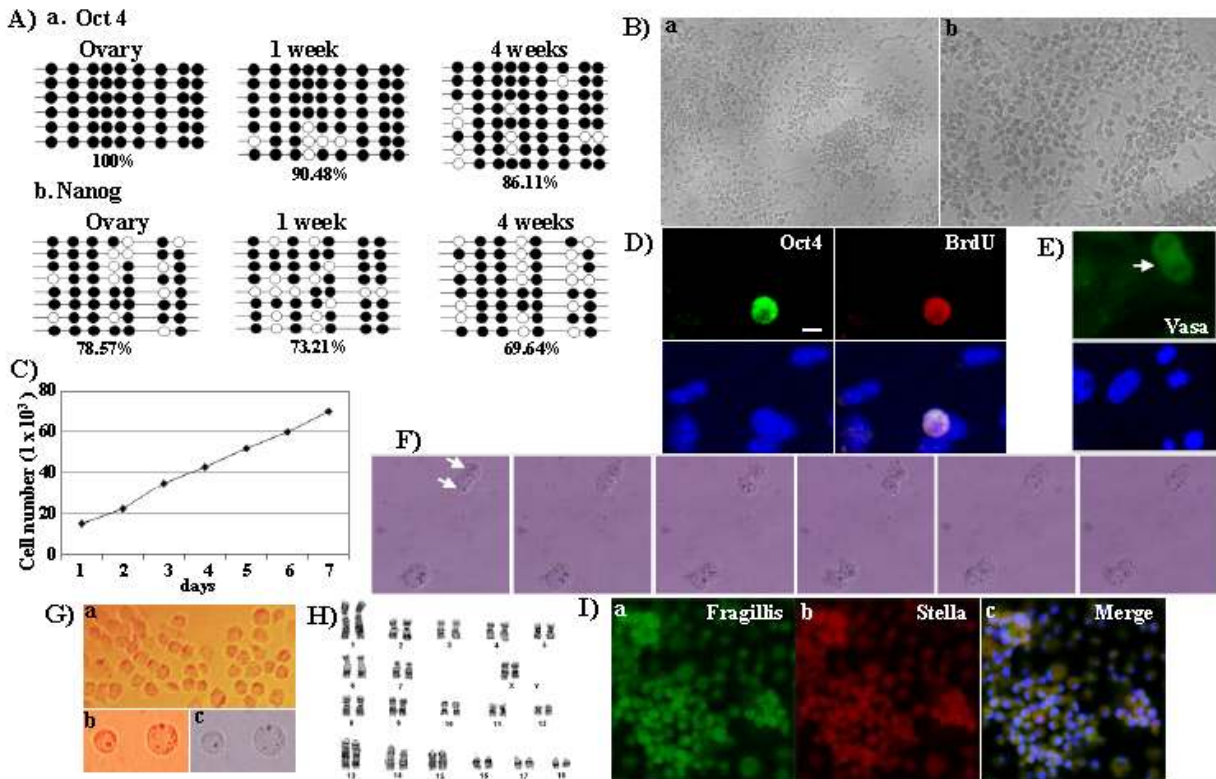
[그림 32] Development of putative stem cells (PSCs). (A) After isolation from the ovary, the PSCs were cultured and appeared dark and shiny and could easily be distinguished from the RBCs, which had a typical biconcave disc shape (b, asterisks). The PSCs gathered in hollows of epithelial cells or were trapped in theca stem cell colonies after 4 days in culture and increased in number and size after 1 week. (B) PSCs grew to a uniform size (10.12 μm), forming groups of cells or clustered around theca stem cell colonies after 10 days of culture (a, b). PSCs maintained during 1 month without MEF feeder (c, d). (C) Flow cytometric characterization of PSCs after 1 week of culture, the cells were of two sizes: 25% were small and 75% were large, and among the small cells, 1.79% were Vasa positive versus 5.71% of the large cells. Some cells were also positive for other germ and stem cell markers such as Fragilis, Thy-1, SSEA4, and c-kit (a). After 2 weeks in culture, the cells became identical in size with increasing positive counts for PSCs (c). Scale bar, 50 μm .

분리한 뒤, 40ng/mlSCF를 각 1, 2, 3, 4주 동안 배양한 뒤 Oct4와 c-kit의 발현을 immunohistochemistry를 통하여 분석을 하였다 [그림 33]. SCF가 포함이 된 배양액이 없는 배양에서 키운 PSC에 c-kit positive cell이 22% 더 많음을 확인할 수가 있었고, Oct4의 발현이 시간이 지날수록 발현위치가 세포질에서 핵으로 이동했다. 이 결과를 통해서 우리가 분리한 PSC가 nuclear reprogramming을 함을 알 수가 있었다.



[그림 33] KL/SCF improved in reprogramming of pig PSCs during establishment. PSCs were isolated and cultured in medium without and with 40 ng/ml SCF for 1, 2, 3, and 4 weeks, and then collected for the detection of Oct4 and c-kit by immunostaining. (A) Representative immunofluorescence expression of Oct4 and c-kit in PSCs after 4 week culture. (B) Quantification of c-kit positive in PSCs after 1, 2, 3, 4 weeks culture. (C) Quantification of nuclear or cytoplasmic localization of Oct4 in PSCs after culture 1, 2, 3, 4 weeks

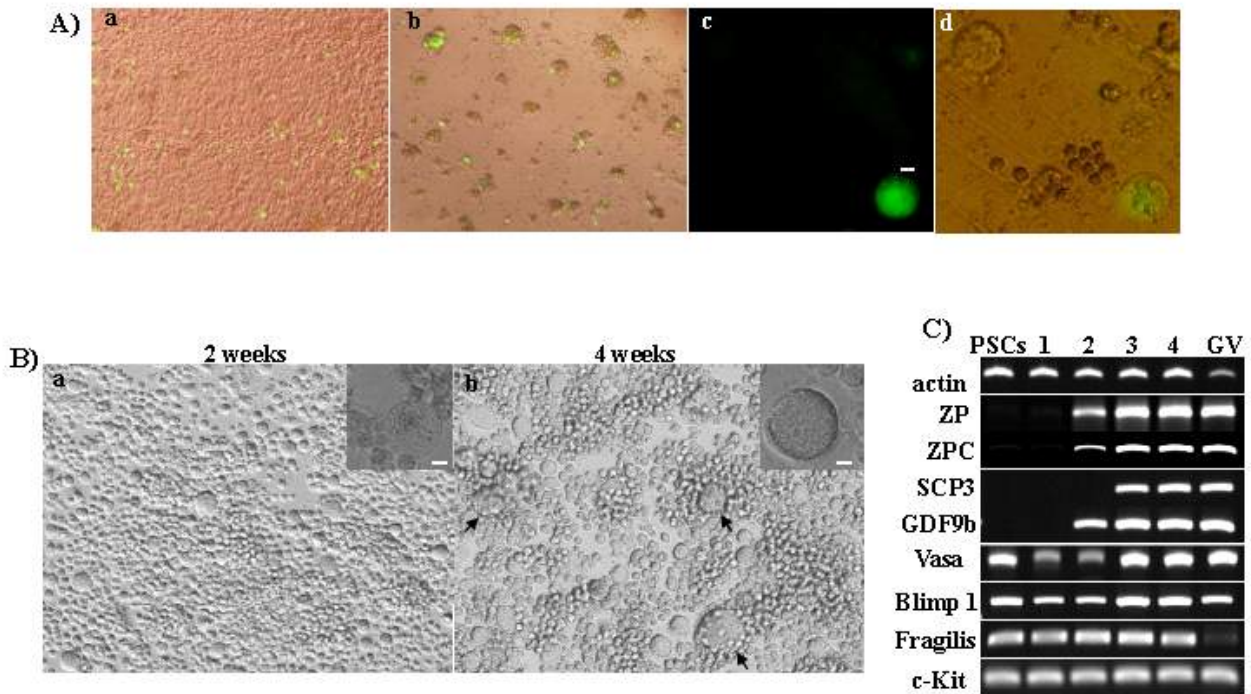
분리한 PSC를 각 1주와 4주동안 배양한뒤, methylation status를 bisulfite sequencing analysis를 통하여 분석을 하였다. 그리고 분리된 PSC가 분화되는 과정을 Oct4와 Brdudouble stain을 통하여 분석을 하여 분리된 PSC가 stem cell의 특징을 가지며 증식을 잘하는 것을 확인하였다. 이와 동시에 분리된 PSC는 alkaline phosphatase에 positive 함을 확인하였고 정상적인 karyotype을 가지고 있는 것 또한 확인을 하였다.



of culture, the small cells showed cytoplasmic localization of Vasa, Stella and Oct-4. The compact theca stem cell colony was bound by small PSCs and somatic ovarian cells (g, arrows). (C) After 2 weeks, the PSCs became larger maintained expression of Fragilis, Stella, Oct4 and Sohlh1. Especially, Oct4 protein was reduced in cytoplasm and localized in the nuclei of PSCs (e). After 4 week culture, most of PSCs become large size (10.12 μm) and maintained expression of germ cell markers, DAZL and Blimp1. The flat cell layer of epithelial and somatic cells did not express any markers (g, k; arrows). (D, E) Expression of oocyte-specific genes (ZP, SCP3), germ cell-specific genes (Fragilis, Blimp1, Vasa, c-kit and DAZL) and stem cell-specific genes (Oct4, Nanog, Sox2, Rex1, cMyc and KLF4) in PSCs. The gene for β -actin was used as a normalization control. Key: Ov, ovarian tissue; RT-, water control; 1, 2, small PSCs samples 1 and 2 after 1 week of culture; 3, PSCs after 4 weeks of culture. (Scale bar, 10 μm).

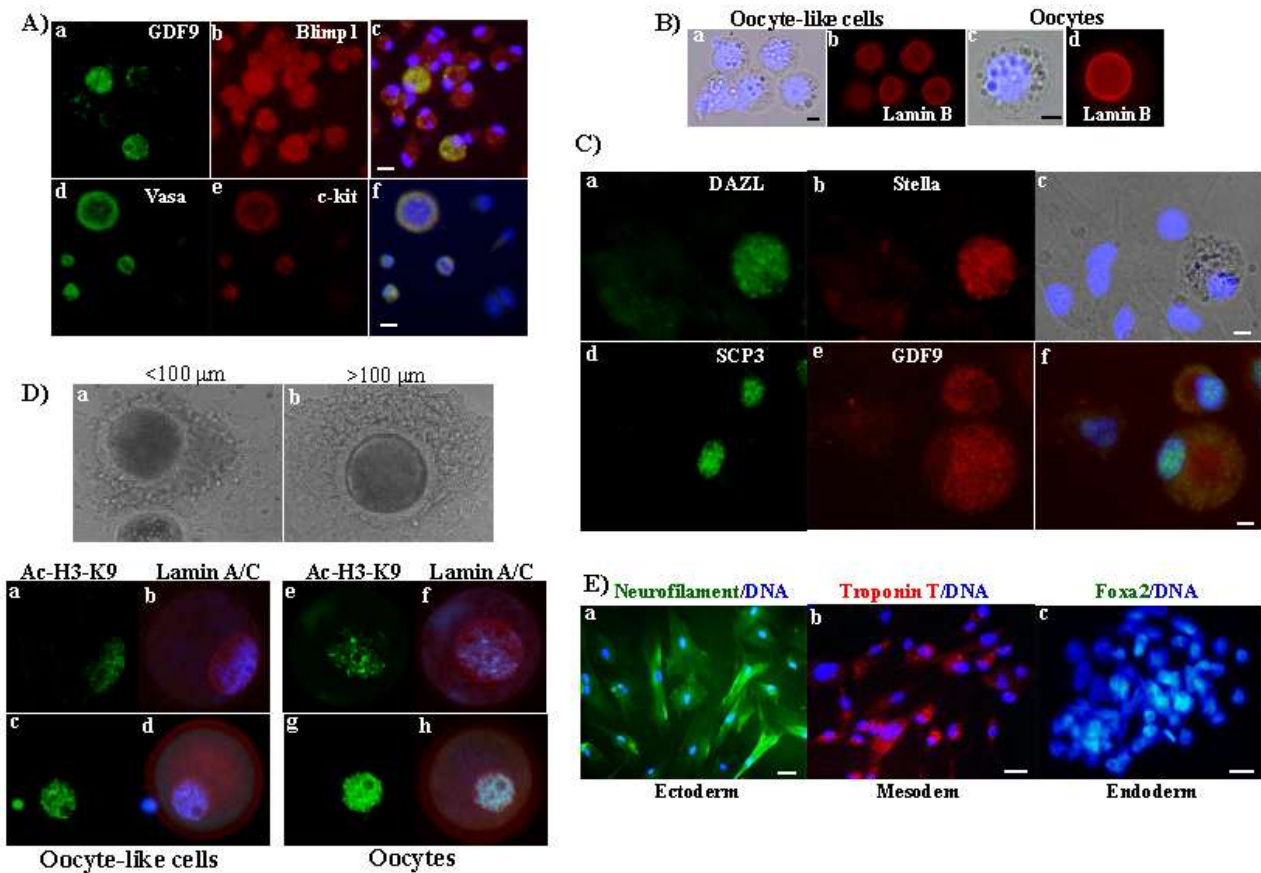
분리된 PSC가 *in vivo*에서 oogenesis를 하는지 확인하기 위해서 먼저 lenti virus를 이용하여 GFP labelling을 하고 이식을 하였다. 이주뒤에 많은 primordial oocyte-like cells이 형성이 되었고 이는 GFP발현을 통하여 확인을 하였다 [그림 35]. 그리고 PCR을 통해서 oocyte specific genes(ZP, ZPC, SCP3, GDF9b)과 germ cell specific genes (Blimp1, c-kit, VASA,

Fragilis, stella)의 발현을 확인하였다.



[그림 35] Induced differentiation of PSCs into oocyte-like cells (OLCs). (A) Expression of GFP-positive 821 cells throughout the PSCs re-aggregated with dispersed adult pig ovarian cortical tissue (OCT) cells (a, b). Primordial GFP-positive oocyte-like cells (OLCs) were formed from GFP.PSC and GFP-negative OLCs arose from OCT cells after 2 weeks of culture (c, d). Scale bar, 10 μ m. (B) After culture for differentiation 2-4 weeks, some of the PSCs formed primordial OLCs (30.35 μ m; a, illustration), and some of them reached to growing OLCs (50 μ m; b, illustration) and formed oocyte cumulus complex (OCC)-like structures (b, arrows). (C) Expression of oocyte-specific genes (ZP, ZPC, SCP3, GDF9b) and germ cell-specific genes (Vasa, Blimp1, Fragilis, c-kit) in differentiated cells. The gene for β -actin was used as a normalization control. Key: PSCs, control PSCs 3 weeks after isolation; 1, 2, 3, 4, PSCs that differentiated into OLCs after 1, 2, 3 and 4 weeks, respectively. GV: oocyte from the pig ovary.

PSC에서 유래된 oocyte like cells의 특징을 ICC와 in vitro differentiation을 통해서 분석을 하였다 [그림 36].



[그림 36] Characteristics oocyte-like cells (OLCs) and three germ layers after differentiation from PSCs.(A, C) The OLCs exhibited positive staining for GDF9, Blimp1, Vasa, c-kit, DAZL, Stella and SCP3 while the adjacent somatic cells were negative, indicating specific localization of these markers. (B) As with normal primordial oocytes, the primordial OLCs contain many cytoplasmic germinal granules as discussed in the text. (D) OLCs grew almost to the same size as normal oocytes (>100 μm) and expressed histone acetylation (Ac-H3-K9). Lamin A/C staining for nucleus of oocyte (G) In vitro differentiation of three germ layers showed expression of specific antibody for neuron marker, Neurofilament; cardiomyocyte marker, Troponin; and pancreatic maker, Foxa2. Scale bar, 10 μm .

oocyte like cell은 GDF9, Blimp-1, vasa, c-kit, DAZL, STella, SCP3에 염색이 되어 green 혹은 red로 발색을 하였고, somatic cell들은 GDF9, Blimp-1, vasa, c-kit, DAZL, STella, SCP3에 반응 하지 않는 것을 확인하였다 [그림 36]. 이는 PSC에서 유래된 oocyte like cells가 oocyte 의 특징을 잘 가지고 있음을 확인하였고, 또한 oocyte like cell은 정상 난자와 동일한 크기로 자라남과 동시에 Ac-H3-K9의 발현 또한 정상 난자와 같음을 확인하였다.

PSC에서 유래된 oocyte like cells는 앞선 결과에서 보여준 것처럼, pluripotency marker 발현을 하였다. 그래서 PSC가 three germ layers로 분화되는 가능성을 확인해보았다. 그 결과 three germ layer로 분화되었고 각각의 markers (neuron marker-neurofilament, cardiomyocyte marker-troponin, pancreatic marker-Foxa2)가 발현되어 PSC에서 유래된 oocyte like cells가 pluripotency 의 특성을 가지고 있음을 확인하였다⁷⁰.

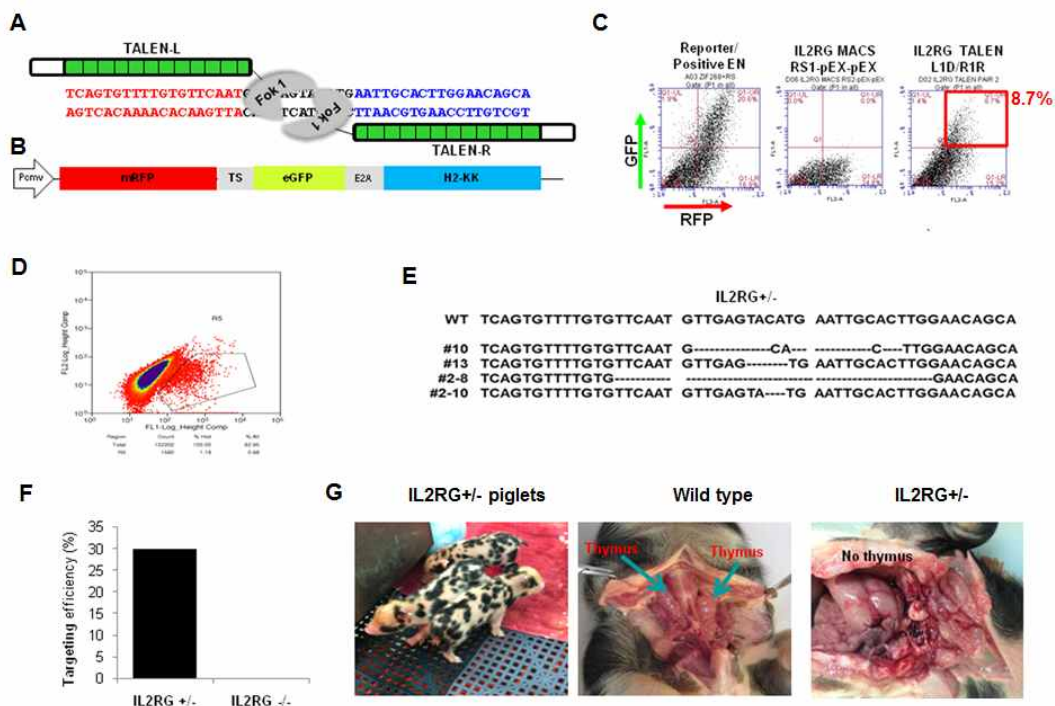
제 3절 3차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 제 1, 2 세부 과제 연구수행 내용 및 결과

가. 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산

IL-2RG 유전자가 적중된 미니돼지를 생산하기 위하여, 1차년도에는 IL-2RG exon 2를 target으로 한 TALEN 벡터를 구축을 하고, 2차년도에는 이 벡터를 이용해 IL-2RG knock-out 미니돼지 체세포주를 확립하였다. 이상의 결과물을 이용하여 3차년도에는 산자생산을 집중적으로 진행을 하였다. 아래의 [표 6]에서 나타난 바와 같이, 총8회의 Embryo transfer를 진행하였고 이중에 약 30%정도가 IL-2RG \pm 이었다 [그림 37 F].

태어난 IL2RG \pm 는 모두 female 이었으며, male의 경우, 하나밖에 없는 x chromosome에 mutation 결과 사산되는 것을 확인할 수가 있었다. 10월 12일 이식한 난자에서 태어난 female IL2RG \pm 가 조기 사망함에 따라 그 이후에는 처음에 태어난 산자에서 분리한 세포를 이용하여 복제 knock-out돼지를 생산한 결과는 [그림 37]과 같다⁷¹.



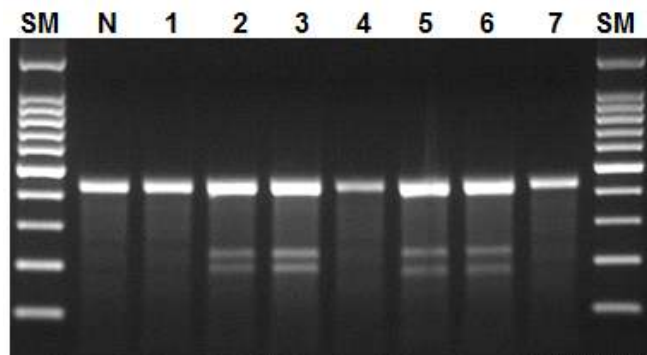
[그림 37] Production of IL-2RG mutant pigs using TALENs. (A) TALENs designed to cause mutations in Exon x of IL-2RG. The target site codes for a beta propeller region, an essential domain for functional IL-2RG. (B) Fluorescent reporter vector. The reporter consists of the mRFP gene, the TALEN target sequence, the eGFP gene, and the H-2Kk gene. mRFP is constitutively expressed by the CMV promoter (PCMV), whereas functional GFP and H-2Kk are not expressed due to a double barrier: the two downstream genes are out of frame and as top codon precedes them. If TALENs induce double strand breaks in the target sequence, the repair of the break through nonhomologous end joining (NHEJ) often induces frame shift mutations, which can make the GFP and H-2Kk genes inframe and expressed. (C) Representative flow cytometry of cells (here 293 cells) 3 days after cotransfection with reporter and TALEN-encoding plasmids. RFP+eGFP+ cells were flow cytometrically sorted. (D) Flow cytometric enrichment of cells containing TALEN-induced IL-2RG mutations. Only IL-2RG mutated cells were flow cytometrically sorted. (E) DNA sequences of mono allelic IL-2RG mutant clones from SCNT-derived piglets. Deleted bases were indicated by dashes. (F) Targeting efficiency of IL-2RG gene in pig fibroblast cells. (G) Genotypes of the genetically engineered pigs. We produced pigs with mono allelic modification of IL-2RG. One of 3 IL-2RG KO pigs have a very small size of thymus, whereas two of three KO pigs lacked thymus completely⁷¹.

[표 6] IL-2RG embryo transfer list

ET DATA	ID of Donor cells	Number of embryos transferred	Day of heat	Results
2012-10-12	Korean IL2RG #10,13,15	216	1	1 female
2013-2-25	Korean IL2RG 53-1	96	4	Cycled
2013-2-25	Korean IL2RG 53-1	179	4	Cycled
2013-4-2	Korean IL2RG 53-1	35 Blast	6	Cycled
2013-4-13	Korean IL2RG 53-1	35 Blast	4	Cycled
2013-4-10	Korean IL2RG 53-1	48 Blast	4	4 females
2013-4-23	Korean IL2RG 53-1	51 Blast	5	mummies
2013-4-25	Korean IL2RG 53-1	187	1	2 females

IL2RG^{-/-} 산자인 호모 knock-out 돼지 즉 IL2-RG(y⁻)의 경우는 면역결핍돼지로서 무균시설에서 사육을 해야 하는데, 무균시설을 사용하지 못함으로 인해 감염 등의 이유로 조기 사망을 하였다. 따라서 본 연구의 성공적인 수행을 위하여, IL2RG(+/-) 헤테로 knock-out 돼지 생산을 시도하였으며, 복제 수정란의 이식 결과는 표 6과 같다. IL2RG+/- knock-out 돼지는 추가로 태어난 4마리 중 1마리만 생존 중이며, 이 헤테로 돼지는 현재 번식을 위하여 육성중에 있다. 조기 사망한 IL2RG+/- (개체번호 59-1)는 해부를 통해 정상적인 thymus를 가지는지를 sampling을 하여 분석한 결과는 [그림 37 G]과 같다.

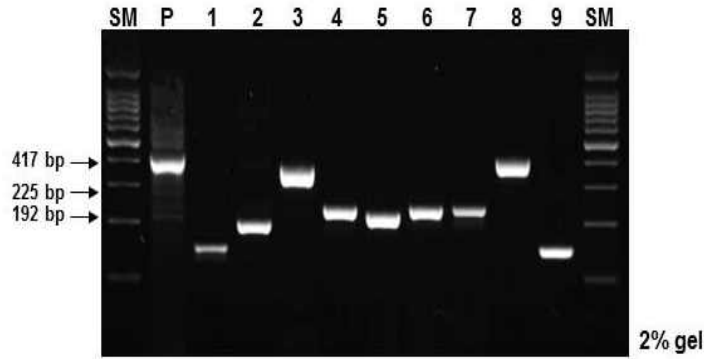
해부학적으로 IL2RG+/- knock-out를 분석해 보았을 때 상단의 [그림 37 G]과 같이 IL2RG+/- knock-out 돼지는 대부분이 thymus가 없었고 있어도 비정상적 (개체번호 59-2)으로 크기가 작았다. Thymus가 결여된 돼지가 IL-2RG 유전자 영역에서 유전자 일부가 소실되었는지를 확인하기 위하여 분석한 결과는 [그림 38]과 같다.



[그림 38] Mono-allelic modification of IL-2RG. PCR products flanking TALEN binding site are shown. The absence of a PCR band of the anticipated wild-type size indicates a monoallelic modification (lane 2, 3, 4 and 6). The PCR products had been loaded on a 2.0% agarose gel.

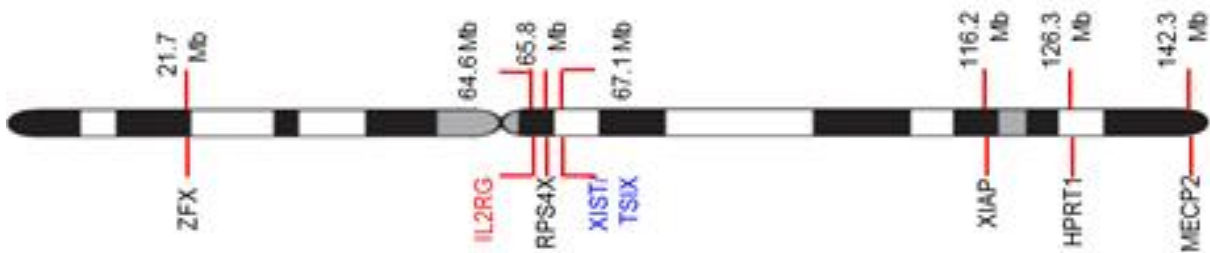
생산된 IL2RG+/- 돼지의 표현형이 target gene의 결실에 의하여 야기되었는지 혹은 off target effect에 의하여 야기되었는지를 확인한 결과는 [그림 39]와 같다. Transcript의 degradation이 아닌 translation inhibition이나 transcription repression에 관여하는 RNA의 경우는 완전한 sequence의 match를 요구하지는 않으나, 유전자 배열의 유사성에 의하여 off side effect를 보일수가 있기 때문에, IL-2RG 유전자와 homology가 있는 다른 유전자가 있는지 확인 후, target-off assay를 실시하였다. [그림 39]는 porcine IL2RG 유전자와 homology가 있는지 확인하여 9가지 유전자 (1; LRR1Q1, 2; BNC2, 3; SLC17A5, 4; ZNF334, 5; TTN, 6; PGRMC2, 7; AVPR2, 8; CCDC18, 9; ZSWIM2)를 확보하였다. 이상의 유전자들을 이용하여 분

석을 진행한 결과 IL2RG TALEN에 의한 mutation은 IL2RG에만 특이성을 가지고 영향을 미친 것을 확인하였다.

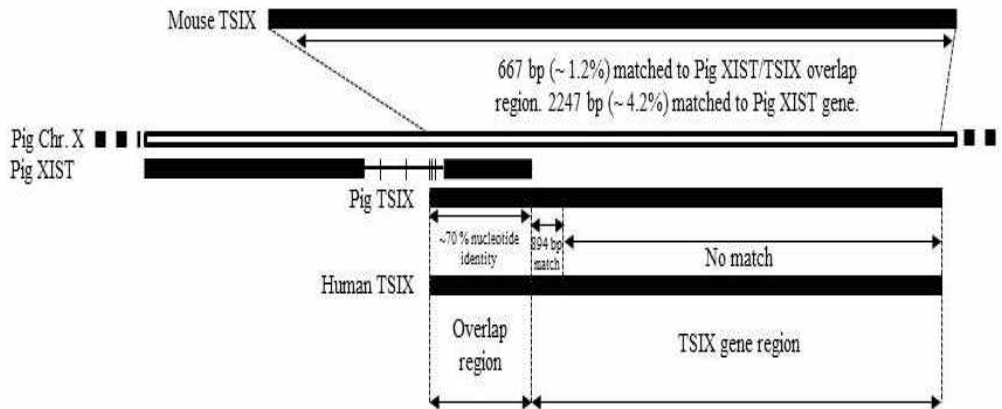


[그림 39] Analysis of off targeting locus. P; IL2RG (positive control, IL2RG^{+/-} piglet derived gDNA, 1;LRRIQ1, 2;BNC2, 3;SLC17A5, 4;ZNF334, 5;TTN, 6;PGRMC2, 7;AVPR2, 8;CCDC18, 9;ZSWIM2

IL-2RG는 X chromosome에 위치한다. [그림 40]에서는 X chromosome에 존재하는 IL-2RG의 위치와 다른 유전자들을 표시하였다. IL-2RG가 다른 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지 검증하기 위하여 porcine specific primer를 준비하여 검증하였다. X-chromosome에 위치하는 대표적인 유전자인 Xist는 돼지에서 밝혀져 있지만, Xist의 anti sense인 Tsix는 밝혀져 있지 않다. 그래서 human, mouse, pig을 비교하여 예상되는 Tsix를 분석하였다 [그림 41].



[그림 40] Location of IL2RG and other genes on X-chromosome.

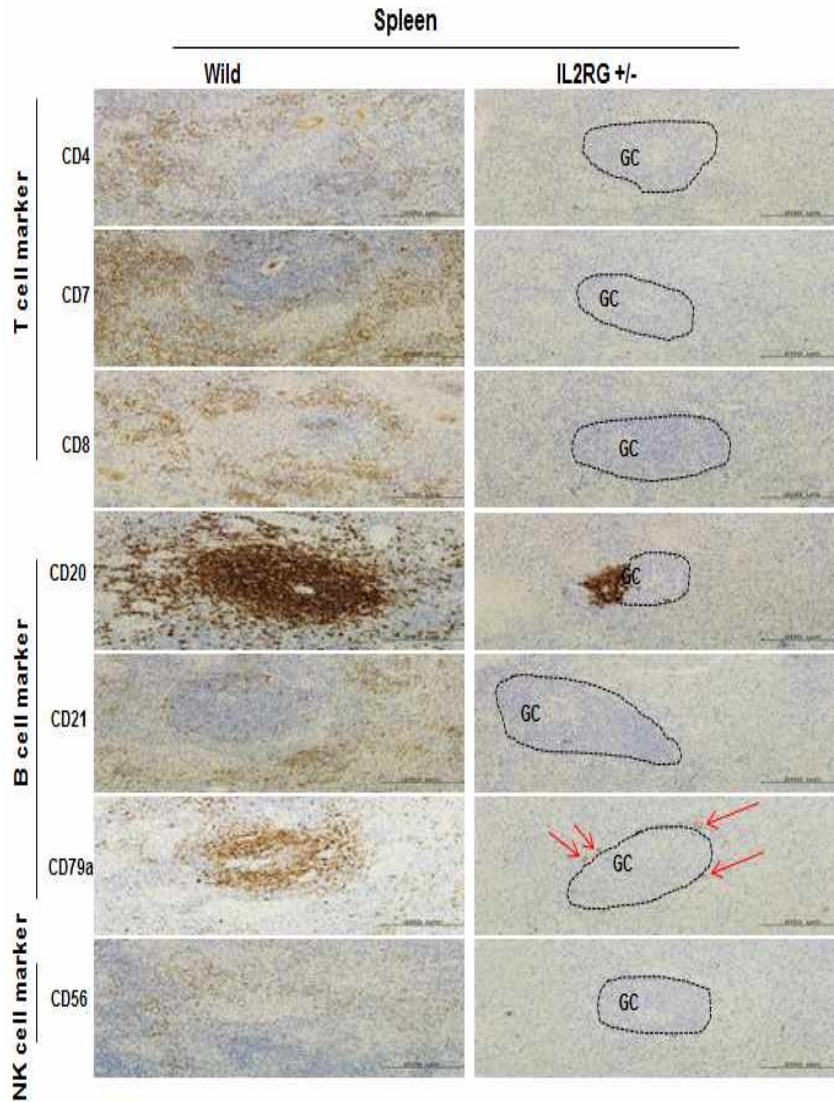


[그림 41] Comparison analysis of Xist and Tsix between Human, Mouse and pig. In this study, we have cloned approximately 150bp DNA sequence for distinguishing between Xist and Tsix. Now, this result is under review. So, we feel sorry because we can not show up these sequence.

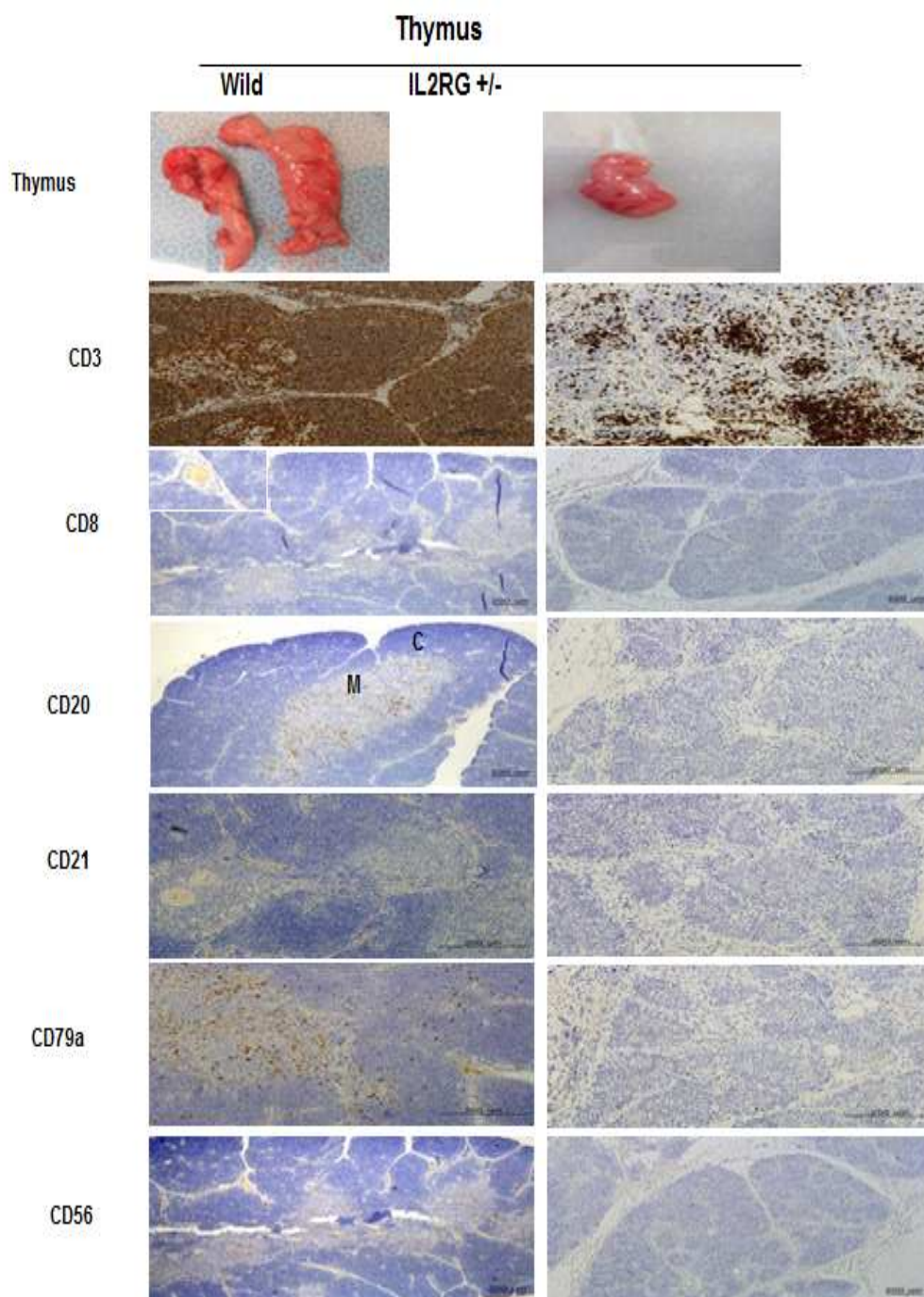
2. 제 1협동 연구수행 내용 및 결과

IL2RG 유전자는 성염색체상인 x chromosome에 위치하며 IL2를 포함하는 다양한 인터루킨에 대한 수용체를 암호화 하는 유전자이다. 이 유전자에 돌연변이가 유발될 경우 x linked combined immunodeficiency (XCID)를 비롯하여 x-linked severe combined immunodeficiency (XSCID)와 같은 면역 결핍성 질환을 초래하게 된다. 개발된 면역 결핍되는 면역 기관인 흉선 및 면역에 관여하는 주요 림프구-T세포, NK세포, B세포가 결실 되었을 것이라 예상을 하고 T, B 면역세포의 기능을 분석하고자 하였다.

Thymus와 spleen에서 각각 T cell, B cell, and NK cell marker를 이용하여 immunohistology한 결과는 [그림 42, 43]과 같다. 정상돼지에서는 T cell, B cell, and NK cell 이 정상적으로 존재하는 것을 확인할 수가 있었으나, IL2RG KO pig에서는 T cell의 전구 세포인 CD3에서, B 세포의 마크인 CD 20과 B세포 receptor마크인 CD79에서만 positive 시그널을 보였다. 본 연구를 위하여 T cell marker로는 CD3, CD4, CD7,CD8을, B cell marker로는 CD20, CD21, CD79a을, 그리고 NK cell marker로는 CD56을 사용하였다⁷¹.



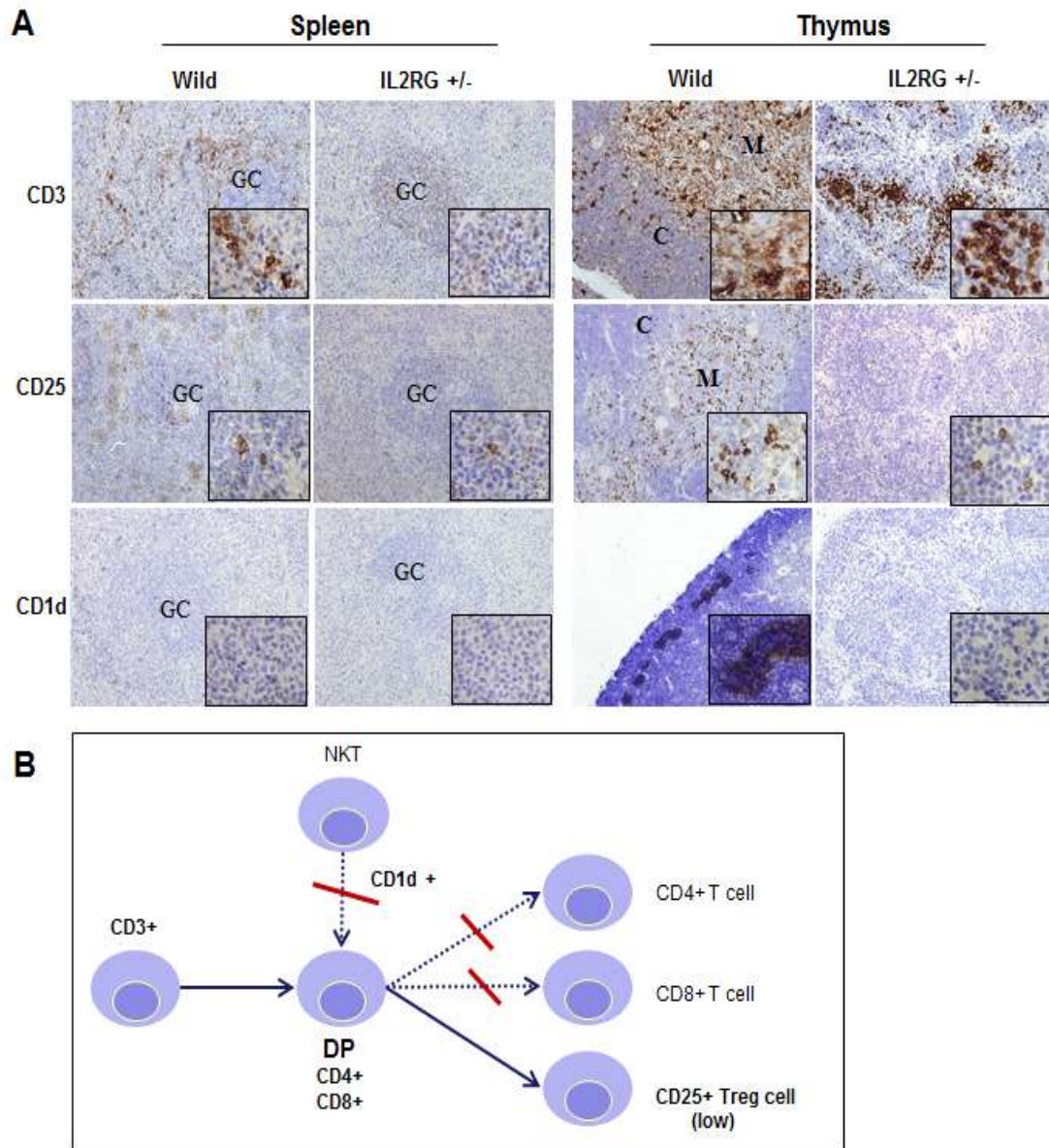
[그림 42] Analysis of T-, B-, and NK-specific biomarker expression patterns in spleen. T cell (CD4, CD7, and CD8), B cell (CD20, CD21, and CD79), NK cell (CD56) positive signal in WT-derived spleen tissues were strongly detected, whereas a few or rarely CD20 and CD79 positive cells, which is a critical factors for B cell development in mono allelic IL-2RG pigs were detected⁷¹.



[그림 43] Analysis of T-, B-, and NK-specific biomarker expression patterns in thymus. In thymus, only CD3 positive signals in mono allelic IL-2RG pigs was detected in comparison with WT⁷¹.

[그림 43]에서 나타난 바와 같이, IL-2RG에서 T세포의 전구 세포인 CD3가 positive로 나타났기 때문에, 이들 T세포가 어떤 종류의 T세포인지를 조사하기 위하여 T세포의 대표적인 3종류의 마크 항체를 사용하여 IHC을 실시한 결과는 [그림 44]와 같다. IL2RG KO pig 유래

spleen과 thymus에서 CD3-와 CD25-positive signal을 나타낸 반면, [그림 42, 43]에서 CD4-와 CD-8은 negative signal을 보였기 때문에 IL2-RG KO pig은 생쥐와는 달리 regulatory T세포를 가질 수 있다는 것을 본 연구를 통하여 처음으로 증명하였다, 그 결과에 대한 모식도는 [그림 55 B]와 같다⁷¹.



[그림 44] T cell subtype analysis. (A) In thymus of Fig. 3, we find only CD3 positive signal mono allelic IL-2RG pigs. To identify T-cell subtype, we compared CD3, CD25, and CD1d expression patterns between WT and mono allelic IL-2RG pigs. Of note, CD3 and CD25 expression in mono allelic IL-2RG pigs were significantly decreased, compared to WT, but mono allelic IL-2RG pigs still showed these positive signals. No CD1d positive signal in mono allelic IL-2RG pigs, however, was detected. (B) Taken Fig. 19 and Fig.

20A together, we proposed an underlying mechanism for T cell development in IL-2RG pigs⁷¹.

이상의 연구들을 진행하면서 사용한 antibodies와 primer에 대한 정보는 아래 [표 7, 8]과 같다.

[표 7] Antibodies list for immunohistochemistry

Primary antibodies	Host	Dilution	Source
IL-2Ra	Mouse	1/100	Santa Cruz Biotechnology, sc-365511
IL2Ry	Rabbit	1/200	Bioss, bs-2545R
CD3	Mouse (LN10)	1/50	Leica Biosystems, PA0553
CD4	Mouse(4B12)	Predilution	Leica Biosystems, PA0368
CD8	Mouse(4B11)	Predilution	Leica Biosystems, PA0183
CD20	Mouse(MJ1)	Predilution	Leica Biosystems, PA0906
CD21	Mouse(2G9)	Predilution	Leica Biosystems, PA0171
CD79a	Mouse(11E3)	Predilution	Leica Biosystems, PA0192
CD56	Mouse(1B6)	1/100	Novocastra, NCL-L-CD56-1B6
CD25	Mouse(4C9)	predilution	Leica Biosystems, PA0305
CD1d	Mouse	1/100	Santa Cruz Biotechnology, sc-19632

[표 8] Primers list for Real-Time RT-PCR

Gene		Primer sequence
IL2Ralpha	Forward	AAA TGC CAC GTT CAA GAT CC
	Reverse	GTT TCC CCT GCA GAT CAT GT
IL2Rbeta	Forward	TCA CCA ACC AGG GYT ACT TC
	Reverse	CAG CAG GYC ATC CCT GGY C
IL2Rgamma	Forward	GAC CAC TGT TTG GAG CAC CT
	Reverse	CCT TTA TCC CCA CTT GCT CA
GATA3	Forward	ACA GAC CCC TGA CCA TGA AG
	Reverse	GGA GAT GTG GCT GAG AGA GG
EOMES	Forward	ACT GGT TCC CAC TGG ATG AG
	Reverse	GCA ATG AAC TGC GTT TCT GA
NKp30	Forward	ATC CTG TGC TCT CTG GGT GT
	Reverse	GTC CCA TTC CTC ACC TCC TT
ETS1	Forward	CCT CCT ACG ACA GCT TCG AC

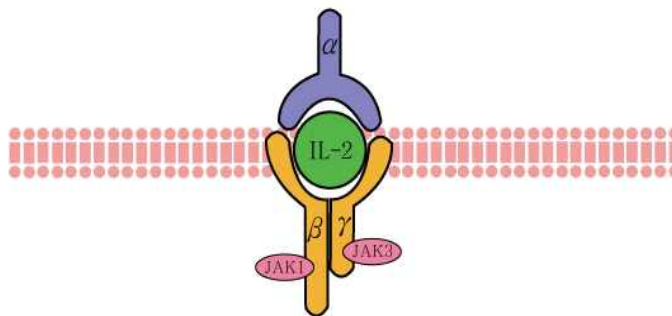
	Reverse	AGA AAC TGC CAC AGC TGG AT
MCM4	Forward	CGA CGA GTT CGA CAA GAT GA
	Reverse	GGC AGC TGG ATG TTT TCA AT
TBX21	Forward	GGA CCC AAC TGT CAA TTG CT
	Reverse	TCA TGC TGA CAG CTC GAA AT
CX3CR1	Forward	TGG ATG AGG CTC AGA CAC AG
	Reverse	CCA TCC CAA AGG AAG TCT GA
PU.1	Forward	GGA TCT CTA CCA ACG CCA AA
	Reverse	ACT CTG CAG CTC CGT GAA GT
E2A	Forward	TTC CTT CCA GGT TGG TTC AG
	Reverse	ACA TGT CTC TAG CGG GGT CA
EBF1	Forward	TTG GGA TTC AGG AAA GCA TC
	Reverse	AGT TGG ATT TCC GCA GAT TG
BCL6	Forward	GCA ATT TCC CAA ACA TGG AG
	Reverse	TCG TTT GTG AAC TCC ACC AG
STAT3	Forward	AGC TGC ACC TGA TCA CCT TT
	Reverse	AGT TCA CGT TCT TGG GGT TG
T-bet	Forward	GGA CCC AAC TGT CAA TTG CT
	Reverse	GCT GAG GGC AGA AAT GTA GG
BLIMP1	Forward	TTC AAT TGT GAG CCA AAC CA
	Reverse	GGT CTC CAC CTT TGT TCC AA
STAT4	Forward	ACC ATT CGC TGA CAT CCT TC
	Reverse	TCC CCT TTC TGT TGG TCT TG
Bmi1	Forward	AGG TGT TCC CTC CAC CTC TT
	Reverse	TAC GGA CGA TTT TCG AGG TC
MBD2	Forward	GAG ACT GCG GAA TGA TCC TC
	Reverse	TGA CGT GGC TGT TCA TTC AT
XBP1	Forward	ACT GCC AGA GAC CGA AAG AA
	Reverse	CCA AGC GCT GTC TTA ACT CC
ABL1	Forward	CAG AAT AGG GGA AAG GCA CA
	Reverse	GCT GCC TCT TTG ATG GAC TC
CD8a	Forward	CAA GCT GTC CCT GGC TCT AC
	Reverse	TGT CAT TGG CCT TGT AAC CA
FLT3LG	Forward	GAT GGG ACA GCT CAA GAC
	Reverse	AAG ACT ATC TCG GTG TTG AC
IL7	Forward	CAA CTG CAC CAG CAA GGT TA
	Reverse	GAA ACA CAA GTC CCC CTG TC
LTB	Forward	CGT TAA TAT CAG TCA CCC CGA T
	Reverse	TCC TCA GCC CAC CAT CAC
CCL2	Forward	TGC TGC TAT ACA CTT ACC
	Reverse	TGC TTC TTT AGG ACA CTT
IFNG	Forward	TAA CCA GGC CAT TCA AAG GA
	Reverse	TTC AGT TTC CCA GAG CTA CCA
STAT1	Forward	AGC AAG CGT AAC CTT CAG GA
	Reverse	GAA TCT CTG GGC ATT TTC CA
JAK3	Forward	CTC TCC CCA GCT GTG ATT TC
	Reverse	AGG AAA ATG AGC GTG TTT GG
CEACAM1	Forward	AAC CCA GAA CCC AGT GAG TG
	Reverse	CTC TGC GAG CAG TAG GCT CT

PTEN	Forward	TAT CAA GAG GAT GGA TTC G
	Reverse	TTG GCG GTA TCA TAA TGT
HIFa1	Forward	TGC TCA TCA GTT GCC ACT TC
	Reverse	TCC TCA CAC GCA AAT AGC TG
IL2	Forward	ACC TCA ACT CCT GCC ACA AT
	Reverse	TGA AGT AGG TGC ACC GTT TG
IL13	Forward	TGG CCC AGT TCG TAA AAG AC
	Reverse	CCC CAG TGA GTT CCT GAC AT
CD4	Forward	TTC CAC TGC TGT CTC TTG
	Reverse	TAC CAG GCA TCT GTG ACT A
GNRH1	Forward	AGC CAA CAC TGG TCC TAT GG
	Reverse	CTT TGG CCA TCT CTT GGA AA
IL4	Forward	GCA TGT ACC AGC AAC TTC
	Reverse	CTG TGA GAA TGT TCA AGG TT
DNM1	Forward	TGC AAG GGG AAG AAA TTC AC
	Reverse	TGG AGA GAT TCC CTT GTT GG
DNM2	Forward	GCT CGG TTT GAC CAC TGT AAG
	Reverse	ACC AGA AGC GTC TTC CCT TTA
CD5	Forward	TCA AGA GCC AGA CCC TCT GT
	Reverse	AGA AGG TCA CAT CCG TGG TC
IL21	Forward	GCC CAT AAA TCA AGC TTC CA
	Reverse	CAG CAA TTC AGG GTC CAA GT

Mixed base code; Y:C,T

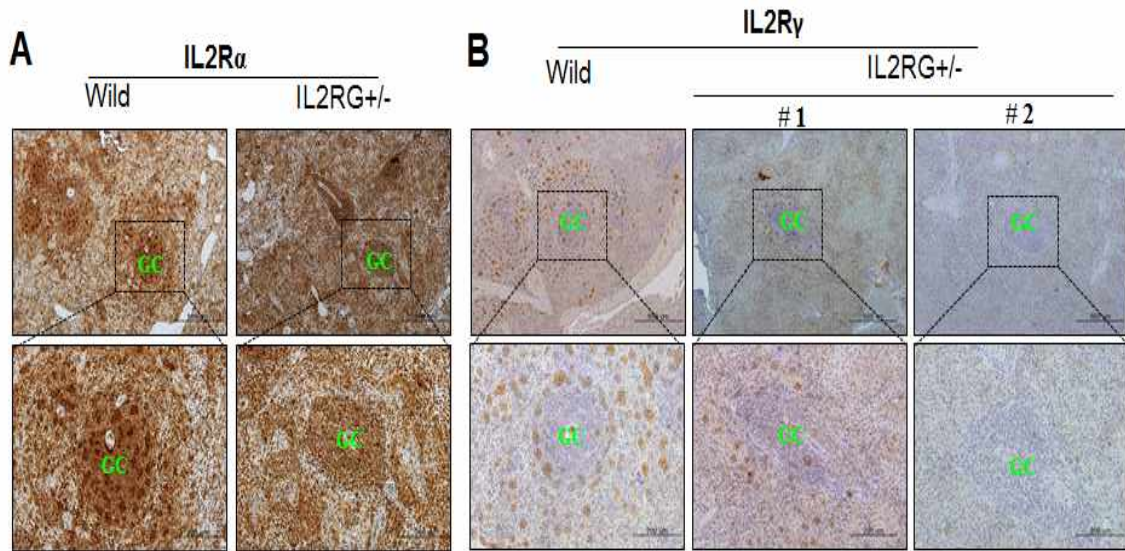
3. 제 2 협동 과제 연구수행 내용 및 결과

IL-2RG는 heterotrimeric protein으로 immune cell의 surface에 존재를 하고 3개의 subunits인 alpha, beta, gamma로 이루어져 있다 [그림 45]⁷¹.

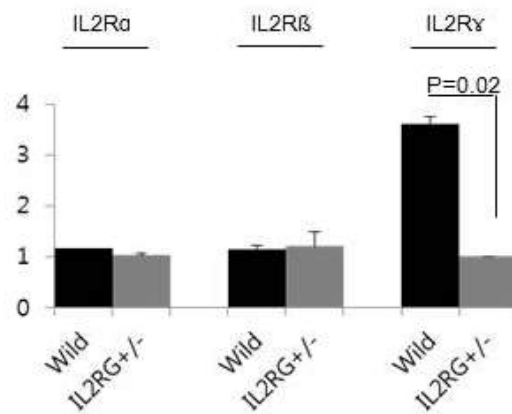


[그림 45] IL2 receptor structure. The interleukin-2 receptor (IL-2R) is a heterotrimeric protein expressed on the surface of certain immune cells, such as lymphocytes, that binds and responds to a cytokine called IL-2. The IL-2R is made up of 3 subunits - alpha (α), beta (β) and gamma (γ)⁷¹.

IL2RG (+/-) heterozygote pig의 특성을 분석하기 위해서 spleen에서 IL2RG의 단백질 발현을 검증하였다. IL2RG+/- 산자의 spleen에서 IL2R alpha와 IL2R gamma의 단백질의 발현을 같이 비교를 하였다 [그림 46]. IL2RG+/- spleen에서 우선 IL2 receptor alpha의 발현을 확인한 결과, wild type pig과 IL2RG+/-의 knock-out pig에서는 정상적으로 IL2Ra를 발현하는 것으로 확인하였다 [그림 46 A]⁷¹.



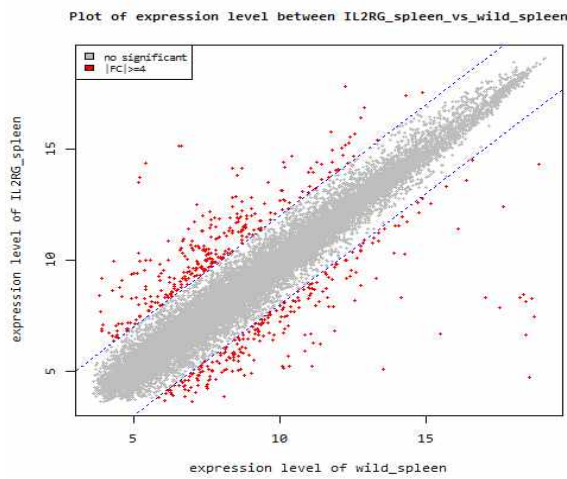
[그림 46] IHC analysis of IL-2RG expression. (A) Localization of IL-2Rα and γ protein expression in spleen of control (WT) and mono allelic IL-2RG pigs. IL-2Rα expression in spleen of control (WT) and mono allelic IL-2RG pigs showed a similar expression patterns, whereas IL-2Rγ protein expression was significantly decreased or undetectable (B)⁷¹.



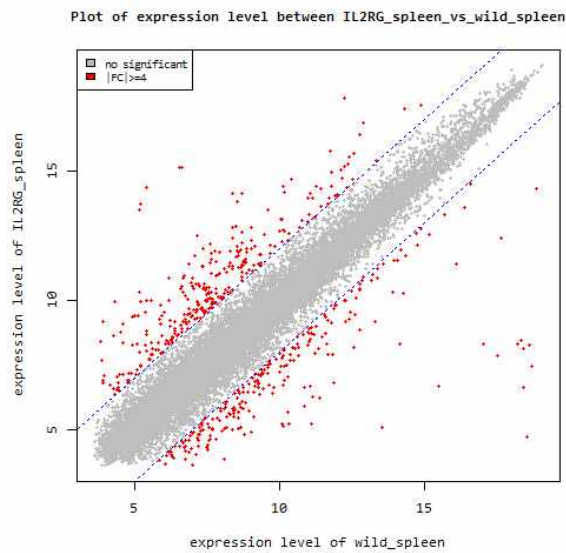
[그림 47] Real-time RT-qPCR analysis. IL-2Rα and β mRNA expression in mono allelic IL-2RG pigs was not changed compared to WT, whereas IL-2Rγ expression was significantly decreased ($p < 0.02$). Gadph was simultaneously assayed as an endogenous invariant control for data normalization. The experiments were performed in triplicate; data shown represent the mean of three independent experiments.

[그림 46]의 결과를 재확인하기 위하여, 이들 유전자의 mRNA 발현을 조사한 결과는 [그림 47]과 같다. 이들 결과는 단백질 발현 경향과 동일하게 나타났는데, 즉 IL-2R alpha와 beta의 발현에서는 거의 차이가 없었고 gamma의 발현에서는 4배 이상 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

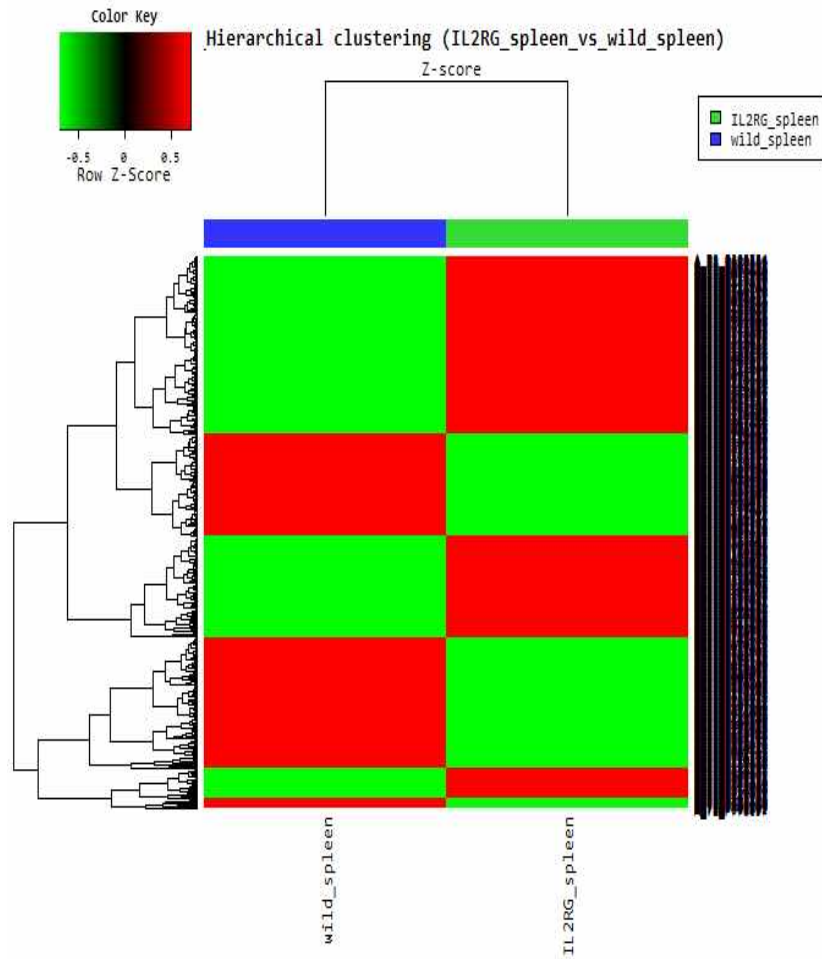
IL2RG knock-out 돼지는 면역 기능에 이상을 초래하기 때문에, 이 유전자의 결핍이 타 면역 기능에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 면역 기능의 주요 장기인 spleen [그림 48, 50]과 thymus [그림 49, 51]을 이용하여 chip assay를 진행하였다.



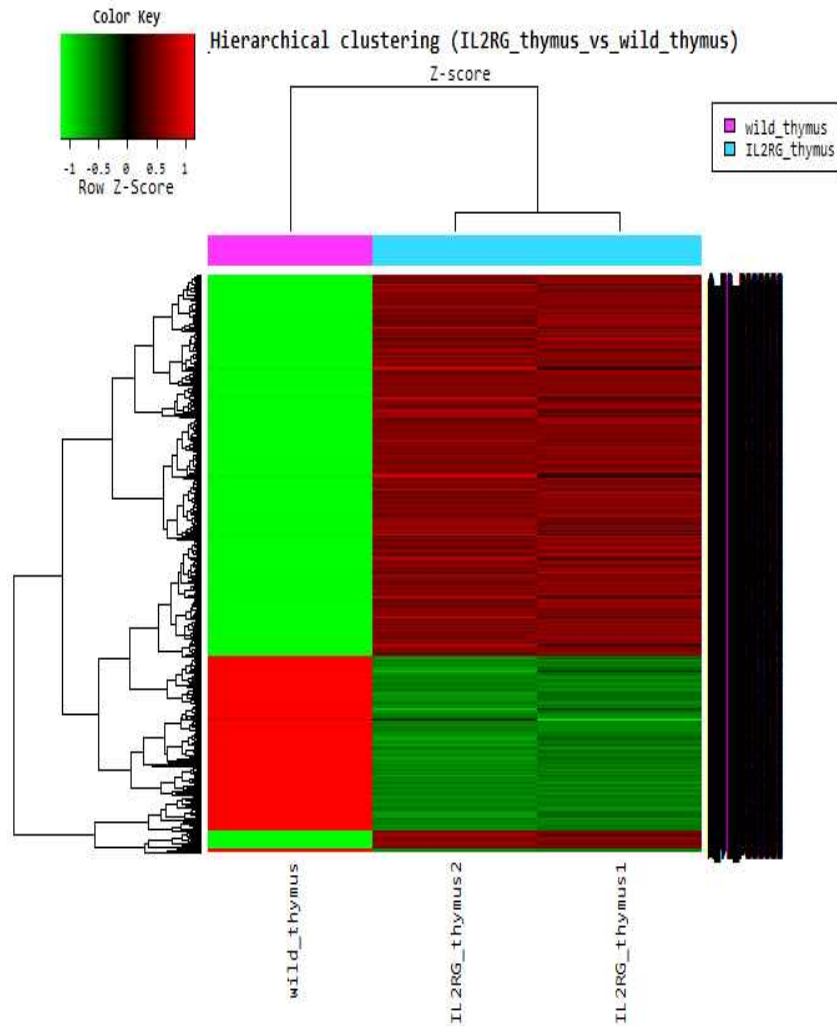
[그림 48] Pairwise scatter plot analysis of the global gene expression profiles of spleen



[그림 49] Pairwise scatter plot analysis of the global gene expression profiles of thymus



[그림 50] Tissue expression patterns of the IL2RG^{+/-} spleen on microarray data. Hierarchical clustering with the average linkage method was performed using Cluster software

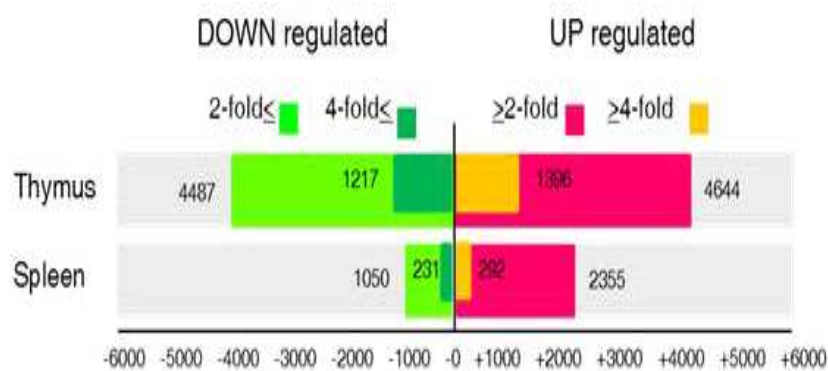


[그림 51] Tissue expression patterns of the IL2RG^{+/-} thymus on microarray data. Hierarchical clustering with the average linkage method was performed using Cluster software.

앞에서 언급한 바와 같이 IL2RG monoallelic knock-out pig은 분석한 3마리에서 오직 한 마리만이 thymus을 가졌으며, 나머지 2마리는 thymus가 존재하지 않았다, 그러나, spleen의 경우는 대조군에 비하여 다소간 size가 적었지만 3마리 모두에 존재하여 DNA array분석은 spleen의 경우는 3마리에서 분석한 반면, thymus의 경우는 오직 1마리에서만 분석 (동일 개체 반복- 실험적 오류를 제거하기 위하여, [그림 51]의 thymus1 과 2는 동일한 시료 사용하였음) 하였다. Spleen과 thymus에서의 DNA chip분석 후, 유전자 발현을 대조군을 사용하여 normalization후 up- or down-regulated된 유전자를 나타낸 결과는 [그림 48, 49]와 같다.

이들 유전자를 활용하여 hierarchical clustering을 분석한 결과는 [그림 50, 51]과 같다. 이들 그림에서 나타난 바와 같이 대조군은 IL2RG knock-out과는 분명한 발현 양상의 차이를 보였다. 한 가지 흥미로운 사실은 spleen에 비하여 thymus에서 더 분명한 발현의 차이를 보였는데, 이는 아마도 IL2RG KO pig유래의 흉선의 발달이 매우 저조한데서 유래된 것으로 보인다. 그러나 IL2RG KO pig상호간의 발현차이는 다소간 적었는데, 이는 앞 [그림 46]에서 언급한 바와 같다.

돼지의 DNA chip분석에서 가장 어려운 부분은 비록 돼지 전체 genomic DNA sequence가 보고 되어있지만, 각 단백질을 만드는 기능 유전자의 sequence부분이 gene bank에 등록이 부족하여 타 종간의 기능 분석이 아직은 불가능하다는데 있다. 따라서, 생쥐 유전자와 비교 분석은 돼지 유전체 분석의 한계를 극복하기 위하여 활용가능하기 때문에, 본 연구에서는 돼지 유전자와 생쥐 유전자가 기능적으로 일치한 유전자만을 sorting하였다. 그 결과 2배 이상 down 되는 유전자는 thymus에서는 4487개, spleen에서는 1050개, 4배 이상 down 되는 유전자는 thymus에서는 1217개, spleen에서는 231개가 분석이 되었다 [그림 52]⁷¹.



[그림 52] DNA chip analysis. In 2 folds comparison of DNA chip, 4644 and 4487 genes in thymus mono allelic IL-2RG pigs are up- or down-regulated, compared to WT. In 4 folds comparison, 1396 and 1217 genes in thymus mono allelic IL-2RG pigs are up- or down-regulated, compared to WT. In spleen, 2355 and 1050 for 2 fold comparison, and 292 and 231 genes for 4 fold comparison in mono allelic IL-2RG pigs are up- or down-regulated, respectively⁷¹.

분석된 유전자들을 이용하여 DAVID 분석을 진행을 하였다. 그 결과 총 4개의 group (Biological process, Cellular component, Molecular function, KEGG pathway)으로 나누어서 분

석 할 수가 있었다. spleen에서 분석한 발현 경향 결과는 붉은 색은 wild에 비해 up, 파랑색은 down으로 나누어 정리를 하였다.

[표 9] Gene list by DAVID in spleen

DAVID	Group	Genes
Biological Process	Inflammatory response	IL-1BETA, IL8, CFB, IL27, IL1B, LOC733603, C2, CD163
	Acute inflammatory response	IL-1BETA, IL8, CFB, IL27, IL1B, LOC733603, C2, CD163
	Defense response	TLR10, IL-1BETA, NPG4, IL8, CFB, IL27, LYZ, IL1B, LOC733603, C2, CD163
	Response to wounding	IL-1BETA, IL8, CFB, IL27, IL1B, LOC733603, C2, CD163
	Acute-phase response	IL-1BETA, IL1B, LOC733603, CD163
	Immuno response	TLR10, IL-1BETA, IL8, CFB, IL27, IL1RN, CXCL9, CD70, IL15, CXCL11, CXCL10, TNFSF13B, CCL21, IL1B, C2, LOC780409
Cellular Component	Extracellular space	IL-1BETA, IL8, CCL21, IL27, IL1B, CD70, LOC733603, IL15, CXCL11, LOC780409
	Extracellular region	IL-1BETA, CXCL9, CD70, LOC733603, HP, SPINK4, IL15, CXCL11, CXCL10, NPG4, CCL21, ITIH1, LTF, IL1B, C2, IL8, CFB, IL27, IL1RN, CD163, RETN, ADM, SLPI, EGFL8, PYY, LOC780409
Molecular Function	Cytokine activity	IL-1BETA, IL8, CCL21, IL27, CXCL9, IL1B, CD70, IL15, CXCL11, LOC780409, CXCL10
	Chemokine activity	IL8, CCL21, CXCL9, CXCL11, LOC780409, CXCL10
	Chemokine receptor binding	IL8, CCL21, CXCL9, CXCL11, LOC780409, CXCL10
	Interleukin-1 receptor binding	IL-1BETA, IL1RN, IL1B
KEGG pathway	Cytokine-cytokine receptor interaction	CCR9, IL-1BETA, CCR5, IL8, TNFSF13B, CXCL9, IL1B, CD70, IL2RG, IL15, CXCL11, CXCL10
	Chemokine signaling pathway	CCR9, CCR5, IL8, CCL21, CXCL9, CXCL11, LOC780409, CXCL10
	Toll-like receptor signaling pathway	IL-1BETA, IL8, CXCL9, IL1B, CXCL11, CD14, CXCL10

[표 10-1] Gene list by DAVID in Thmus

DAVID	Group	Genes
Biological process	Antigen processing and presentation	SLA-DMA, SLA-DRA, CD1.1, SLA-DOA, SLA-DMB, SLA-5, CD74, CD1D, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, PCD1B, PCD1E
	Antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	SLA-DMA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-DRB1, SLA-DOA, SLA-DMB
	Innate immune response	C1QA, DDX58, IL-18RA, IL27, FCN2, TLR2, TLR3, TLR4, C1S, LOC396877
	Protein processing	C1QA, C3, CFB, FCN2, SCG5, C1S, C2, MMP14, LOC396877
	Activation of immune response	C1QA, C3, CFB, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Immune effector process	C1QA, C3, CFB, IRG6, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Inflammatory response	CCL2, C3, CFB, IL27, LOC733603, TLR4, C1S, LOC396877, CCL4, CD163, C1QA, FCN2, ITIH4, C2
	Acute inflammatory response	C1QA, C3, CFB, FCN2, ITIH4, LOC733603, C1S, C2, LOC396877, CD163
	Humoral immune response	C1QA, C3, CFB, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Response to wounding	CCL2, C3, CFB, IL27, LOC733603, TLR4, C1S, LOC396877, CCL4, CD163, C1QA, VWF, THBD, F5, FCN2, ITIH4, C2
	Positive regulation of immune system process	C1QA, C3, CFB, IL18, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Positive regulation of immune response	C1QA, C3, CFB, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Positive regulation of response to stimulus	C1QA, NPY, C3, CFB, FCN2, C1S, C2, LOC396877
	Cell adhesion	SELP, TNC, ICAM-1, ITGB3, COL5A3, CDH5, VCL, VCAM1, CD9, VWF, APP, CD36, F5, CD34, ITGAV, PECAM1, CD2, CD4
	Biological adhesion	SELP, TNC, ICAM-1, ITGB3, COL5A3, CDH5, VCL, VCAM1, CD9, VWF, APP, CD36, F5, CD34, ITGAV, PECAM1, CD2,

		CD4
	Protein amino acid phosphorylation	EGFR, SRPK3, FGFR2, CDK1, PDK4, MET, AXL, PKMYT1, AURKA, PBK, AURKB, PRKG1, MST4, IL10, NTRK3, IGF1R, MAPK12, LCK, PRKAA2, BMPR1B, LRRK2, SYK
	Activation of immune response	C1QA, C3, CFB, FCN2, C1S, C2, LOC396877

[表 10-2] Gene list by DAVID in Thymus

DAVID	Group	Genes
Cellular component	MHC protein complex	SLA-DMA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, PCD1B, SLA-5, CD1D
	MHC class II protein complex	SLA-DMA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-DRB1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB
	Intrinsic to membrane	ATP1B1, OCLN, EFNA1, SLC44A4, TLR2, TLR3, TLR4, GGT1, AQP1, GP91-PHOX, APP, SLC16A1, SLC2A4, B3GALNT1, SLC2A1, S1PR5, MS4A2, FAS, SCD5, SLC4A4, CD3G, CD3D, IL-18RA, CD3E, CD40, CCR9, CCR5, ATP9A, CCR2, FGFR2, CAV2, CAV1, PTH1R, KLRK1, SFXN1, KCNA5, ITGB3, BCL2L1, HCRTR1, SLC11A1, ITGAV, FCER1G, EGF, ENTPD1, TYROBP, TRPC1, MAOA, MET, EPHX1, CYB561, NTRK3, UCP3, SLC7A2, CD59, FAAH, CD274, TGFBR3, CLDN7, SLC15A1, LDLR, CLDN4, CD1.1, DUOX2, GJA1, ANPEP, SLA-5, EDNRA, SLA-1, EDNRB, SLA-3, CXCR4, CXCR6, TPO, FCGR3B, GHR, CCRL1, SLA-DMA, RAMP2, SLA-DMB, MMP14, ST6GALNAC2, CD163, FOLH1, ADRB2, NRM, SR-PSOX, SGCD, PRNP, STEAP1, SGCB, MAL2, FUT8, CCR1, CD247, ITM2C, CDH5, GPR4, VCAM1, CD9, IGF1R, SLA-DQA1, CD2, FUT1, CD4, FUT2, COX7A1, SLA-DOA, PTGFR, SLA-DQB1, SLA-DRB1, PLN, PECAM1
	Integral to membrane	ATP1B1, OCLN, SLC44A4, TLR2, TLR3,

		TLR4, GGT1, AQP1, GP91-PHOX, APP, SLC16A1, SLC2A4, B3GALNT1, SLC2A1, S1PR5, MS4A2, FAS, SCD5, SLC4A4, CD3G, IL-18RA, CD3D, CD3E, CD40, CCR9, CCR5, ATP9A, CCR2, FGFR2, CAV2, CAV1, PTH1R, KLRK1, SFXN1, KCNA5, ITGB3, BCL2L1, HCRTR1, SLC11A1, ITGAV, FCER1G, EGF, ENTPD1, TYROBP, TRPC1, MAOA, MET, EPHX1, CYB561, NTRK3, UCP3, SLC7A2, FAAH, CD274, TGFBR3, CLDN7, SLC15A1, LDLR, CLDN4, CD1.1, DUOX2, GJA1, ANPEP, SLA-5, EDNRA, SLA-1, EDNRB, SLA-3, CXCR4, CXCR6, TPO, FCGR3B, GHR, CCRL1, SLA-DMA, RAMP2, SLA-DMB, MMP14, ST6GALNAC2, CD163, FOLH1, ADRB2, NRM, SR-PSOX, SGCD, STEAP1, SGCB, MAL2, FUT8, CCR1, CD247, ITM2C, CDH5, GPR4, VCAM1, CD9, IGF1R, SLA-DQA1, CD2, FUT1, CD4, FUT2, COX7A1, SLA-DOA, PTGFR, SLA-DQB1, SLA-DRB1, PLN, PECAM1
	Dystroglycan complex	SGCD, SGCE, SGCA, SGCB
	Sarcoglycan complex	SGCD, SGCE, SGCA, SGCB
	Dystrophin-associated glycoprotein complex	SGCD, SGCE, SGCA, SGCB
	MHC protein complex	SLA-DMA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, PCD1B, SLA-5, CD1D

[表 10-3] Gene list by DAVID in Thymus

DAVID	Group	Genes
Molecular function	Chemokine activity	CCL2, CCL21, CCL3L1, CXCL9, CXCL11, CCL5, LOC780409, CCL4, CXCL12, CXCL10
	Chemokine receptor binding	CCL2, CCL21, CCL3L1, CXCL9, CXCL11, CCL5, LOC780409, CCL4, CXCL12, CXCL10
	Protein kinase activity	EGFR, SRPK3, FGFR2, CDK1, PDK4, MET, AXL, PKMYT1, AURKA, PBK, AURKB, PRKG1, MST4, NTRK3, IGF1R, MAPK12, LCK, TGFBR3, PRKAA2, BMPR1B,

		LRRK2, MYLK, SYK
	ATP binding	FGFR2, BLM, MYO7A, PKMYT1, OAS1, AURKA, AURKB, PRKG1, MST4, IGF1R, TOPOIL, PRKAA2, ENTPD1, SYK, SRPK3, EGFR, CDK1, ACTA1, PDK4, MET, AXL, ACACA, PBK, RAD54L, NME4, NTRK3, DDX58, OASL, GLUL, MAPK12, ATP9A, LCK, BMPR1B, LRRK2, MYLK
	Protein tyrosine kinase activity	FGFR2, EGFR, NTRK3, IGF1R, MET, LCK, AXL, SYK
	Protein serine/threonine kinase activity	SRPK3, CDK1, PKMYT1, AURKA, AURKB, PBK, PRKG1, MST4, MAPK12, TGFBR3, PRKAA2, BMPR1B, LRRK2, MYLK
	Adenyl ribonucleotide binding	FGFR2, BLM, MYO7A, PKMYT1, OAS1, AURKA, AURKB, PRKG1, MST4, IGF1R, TOPOIL, PRKAA2, ENTPD1, SYK, SRPK3, EGFR, CDK1, ACTA1, PDK4, MET, AXL, ACACA, PBK, RAD54L, NME4, NTRK3, DDX58, OASL, GLUL, MAPK12, ATP9A, LCK, BMPR1B, LRRK2, MYLK
	Cytokine binding	CCR9, CCR5, CXCR4, IL6ST, CCR1, CXCR6, CCR2, TGFBR3, IL2RG, IL13RA1, GHR, CCRL1
	C-C chemokine receptor activity/ binding	CCR9, CCR5, CXCR4, CCR1, CXCR6, CCR2, CCRL1

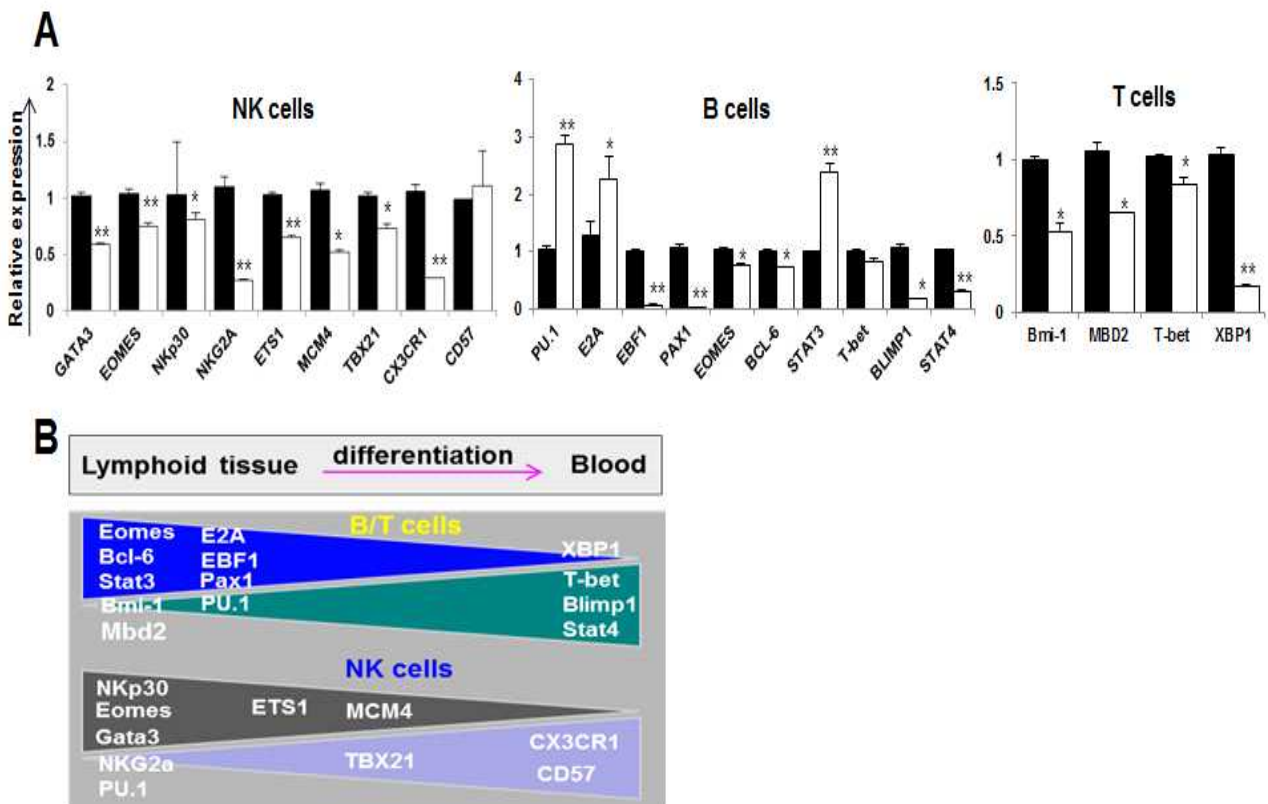
[표 10-4] Gene list by DAVID in Thymus

DAVID	Group	Genes
KEGG pathway	Cell adhesion molecules (CAMs)	CD8A, SLA-DRA, CD8B, ICAM-1, SLA-5, CDH5, VCAM1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, ITGAV, ICOS, CD2, CD4, SLA-DMA, F11R, SELP, SLA-DOA, SLA-DMB, CD40, PDCD1LG2, SLA-DQB1, SLA-DRB1, CD34, CD274, PECAM1
	Intestinal immune network for IgA production	SLA-DMA, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, CD40, APRIL, IL15, CXCL12, IL10, SLA-DQB1, CCR9, SLA-DQA1, TNFSF13B, SLA-DRB1, CXCR4, ICOS, LOC396781
	Asthma	SLA-DMA, SLA-DRA, SLA-DOA,

		SLA-DMB, CD40, IL10, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-DRB1, LOC396781, MS4A2, FCER1G, LOC100152827
	Viral myocarditis	SLA-DMA, PRF1, CAV1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, ICAM-1, CD40, SLA-5, SLA-DQB1, SLA-1, SLA-DQA1, SLA-3, SLA-DRB1, LOC396781, SGCD, SGCA, SGCB
	Allograft rejection	SLA-DMA, PRF1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, CD40, SLA-5, IL10, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, LOC396781, FAS
	Autoimmune thyroid disease	SLA-DMA, PRF1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, CD40, SLA-5, IL10, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, LOC396781, FAS
	Graft-versus-host disease	SLA-DMA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, PRF1, SLA-3, SLA-DRB1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, FAS, SLA-5
	Type I diabetes mellitus	SLA-DMA, PRF1, SLA-DRA, SLA-DOA, SLA-DMB, SLA-5, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, CPE, SLA-DRB1, FAS
	Systemic lupus erythematosus	SLA-DMA, C4, SLA-DRA, C3, SLA-DOA, SLA-DMB, CD40, C1S, LOC100155404, IL10, C1QA, SLA-DQB1, SLA-DQA1, FCGR2B, SLA-DRB1, H2AFZ, LOC396781, C2, FCGR3B, LOC100153329, LOC100154181
	Antigen processing and presentation	SLA-DMA, CD8A, SLA-DRA, CD8B, SLA-DOA, SLA-DMB, SLA-5, CD74, SLA-DQB1, SLA-DQA1, SLA-1, SLA-3, SLA-DRB1, LOC100153090, CD4
	Chemokine signaling pathway	CCL2, CCR1, CXCL9, GNG12, STAT1, CCL5, CXCL11, CXCL12, CCL4, CXCL10, CCR9, CCR5, CXCR4, CCL21, CCL3L1, SR-PSOX, CXCR6, CCR2, LOC780409
	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	CACNA2D1, ITGAV, SGCD, LEF1, ITGB3, TCF7L2, SGCA, SGCB
	Dilated cardiomyopathy	CACNA2D1, PLN, ITGAV, LOC396781, IGF1, SGCD, ITGB3, TPM1, SGCA, SGCB
	Complement and	PLAT, A2M, C4, C3, CFB, SERPING1, C1S,

	coagulation cascades	C1QA, THBD, F5, CD59, SERPINE1, C2, PLAUI
--	----------------------	---

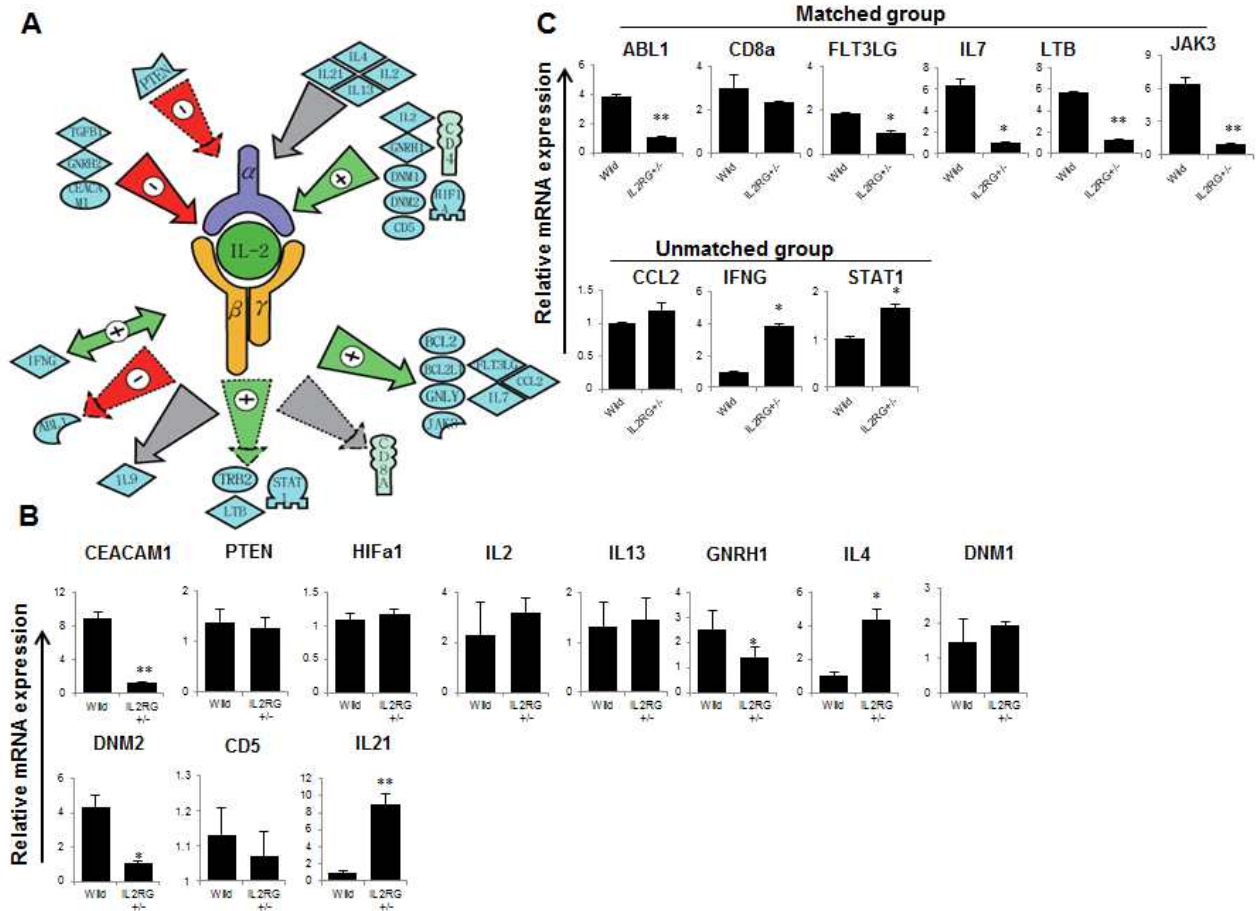
[표 9, 10]에서 나타난 결과는 금후 추가적인 분석이 필요한 상황이다. IL-2RG KO pig은 면역 결핍을 나타내기 때문에 T와 B, NK 관련 유전자들의 발현을 비교를 진행하기 위해 생쥐에서 보고된 기존의 정보를 활용하여 Studio pathway을 분석하여 T/B/NK세포의 발생과 분화에 관여하는 주요 유전자를 스크린 한 후, 이들 유전자의 발현을 조사한 결과는 [그림 53]과 같다⁷¹.



[그림 53] Key gene expression patterns in each NK, T, and B cell stages during transition from lymphoid tissue to circulatory blood⁷¹.

B/T cell과 NK세포의 발생 및 분화에 중요한 역할을 하는 유전자군은 Figure 14B에 나타난 바와 같다. 이들 유전자의 발현을 real-time RT-qPCR로 분석한 결과는 Fig. 14A와 같다. NK/T세포군의 경우는 대조군에 비하여 IL-2RG KO pig의 group에서 모든 유전자에 대하여 발현정도가 현저히 줄어든 것을 보였으나, B세포군의 경우는 PU.1, E2A, Stat 3 유전자군은 대조군에서 IL-2RG KO pig보다는 높은 발현을 보였다. 이들 현상은 생쥐의 군에서 나타난 현상으로 설명가능하다: IL-2RG KO mouse의 경우 성숙 T/NK세포는 결손되어 있지만, B세포

는 존재하였다는 보고가 있는데 이것으로 설명이 가능하다. 그러나 B세포의 경우도 T세포의 구조적 상호 역할을 받지 못하여 이들 B세포군의 경우 또한 기능적인 역할을 수행 할 수 없다는 것을 알 수 있는데, 이는 성숙 B 세포를 지지하는 T-bet, XBP-1, Blimp1, Stat4유전자의 발현이 대조군에 비하여 현저하게 감소한 사실에서도 증명되었다⁷¹.



[그림 54] Schematic representation of biological networks constructed by relation to the pig IL-2RG gene. (A) Functional correlation and interaction among the signaling proteins and IL-2RG gene were reconstituted into a network model using the Pathway Studio software (Ariadne Genomics Inc.; Rockville, MD, USA). All genes are shown by their gene symbols. Direct and indirect regulation is indicated by colored lines and dotted gray lines, respectively. (B and C) Validation of microarray gene expression by real time quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in upstream (B) and downstream (C). Gene expression levels of selected genes were determined by quantitative RT-qPCR from the spleen and thymus tissues, using WT- and mono allelic IL-2RG-derived pigs mRNA samples. Measurements were performed in triplicate, after which the calculated mean expression level was corrected for Gadph expression levels. Error bars indicate standard deviations. In (C), upper panel indicated matched gene expression levels between RT-qPCR data and model data using the Pathway Studio software, whereas down panel indicated unmatched gene expression levels

between RT-qPCR data and model data⁷¹.

[그림 54]에 나타난 바와 같이, IL-2RG 상단의 유전자군의 경우는 CEACAM1, GNRH1, IL-4, DNMT2, IL21 유전자군은 IL-2RG 유전자의 영향을 받아 발현이 up- or down-regulation되었는데, 이들 유전자군이 대조군과 상이하게 나타난 결과는 추후의 연구가 필요하나 현재로서의 해석은 이들 유전자군은 서로 cis- 혹은 trans-signal을 주고받으면서 IL-2RG의 발현에 직. 간접적으로 역할을 수행함을 나타낸다. IL-2RG 하단의 시그날에 관여하는 유전자군중, 다수의 경우는 Pathway Studio Software에 의하여 분석된 결과와 일치하였으나, CCL2, IFNG, STAT1 유전자의 발현은 Pathway Studio Software에 의하여 분석된 결과와는 상이한 결과를 보였다⁷¹.

이런 현상은 1) 분석한 IL-2RG KO pig이 heterozygotic 유래의 장기를 사용하였기 때문에, 2) 돼지의 발현 기전이 생쥐의 그것과는 상이하기 때문에 일어날 수 있다. [그림 55]과 같이 IL-2RG KO pig이 살아 있어, 금후 이들 산자를 이용한 이러한 결과에 대한 연구가 필요하다.



[그림 55] A live IL-2RG heterozygote KO pig

제 4절 4차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 제 1세부와 제 1협동 연구수행 내용 및 결과

▶ 현재까지 IL-2RG knock-out 복제 돼지는 총 10마리가 생산되었으며, 이중 9마리는 생후 성장 과정에서 폐사되었다. 그러나 한 마리는 현재 23개월째 건강하게 생존하고 있으며, 이 개체는 노토바이오트 (gnotobiot) 생산시설인 건국대학교 의생명과학연구동의 바이오장기연구센터에서 잘 성장 중에 있으며, 현재 자연 교미에 의하여 임신 중인 것으로 확인되었다. 임신이 늦은 사유는 정상 대조군에 비하여 성장이 많이 지연되었으며, 체중이 정상적인 것에 비하여 현격이 떨어져 춘기발동기의 도래가 대조군에 비하여 상당히 늦게 유도되었기 때문이다.

▶ 죽은 IL2RG KO pig 9마리를 분석한 결과 대부분이 흉선 (thymus)을 결여하여 (분석된 9 마리 중 7마리가 흉선 결여) 성숙한 T-cells이 결핍된 것으로 확인되었다. 그러나 타 연구 분석 결과에서 나타난 바와 같이, spleen에서 대조군에 비하여는 상당한 수치가 줄어들었지만, 일부의 B-cell positive signal이 확인되었다. Lymph node조직을 분석한 결과는 대조군에 비하여 상당히 위축된 조직 소견을 보였으며, 이들 조직에서 성숙한 T-cell의 존재는 확인되지 않았다. 여러 조직학적 분석 결과를 바탕으로, 한가지 흥미로운 사실은 IL-2RG knock-out 복제 돼지는 생쥐와는 달리 좀 더 분화된 T-cells과 B-cells을 보유하고 있었다. 그러나 성숙한 B-cell을 제외하고는 완전히 성숙한 T-cells과 NK-cells은 존재하지 않았다. 특히 생쥐와의 차이점은 일부의 B-cells을 보유하고 있었으며, Spleen과 Lymph node에서 다량의 CD3 positive cells의 존재한다는 것이다.

좀 더 구체적으로 살펴보면, IL2RG KO pig은 double negative (이하 DN)인 DN3 [CD44(-)CD25(+)]단계로부터 DN4 [CD44(+)-CD25(-)]단계로의 이행에 실패한 것으로 관찰되었다. 이러한 관찰은 DN1 [CD44(-)CD25(+)]에서 DN2 [CD44(+)-CD25(+)]로의 전이에 실패한 IL2rg knock-out 생쥐와는 확연한 발현 차이를 보였다. 또한, 본 연구진이 수행하고 있는 타 연구과제의 면역 결핍돼지인 RAG-2 KO pig (이 돼지의 경우 사람 IPS을 이식하여 teratoma을 형성하였음)과 비교 시 대조군에 비해서는 조금 발현의 수치가 줄어들었지만 이들 돼지에 비해서도 상당한 CD3 positive cells을 보유하고 있다는 사실이다.

이는 본 연구진이 실험 설계 당시 예상하지 못한 결과로서, 일본 그룹이 (Cell Stem Cell 10: 753 - 758, 2012 and PLoS One 8(10): e76478, 2013)보고한 결과와도 매우 상이하였다. 일본 그룹과의 차이는 일본 그룹의 경우 flow cytometry로만 오직 CD3의 발현을 분석하였지만, 본 연구에서는 이 분석 외에 immunohistochemistry을 활용하여 좀 더 정밀하게 분석하였기 때문이다.

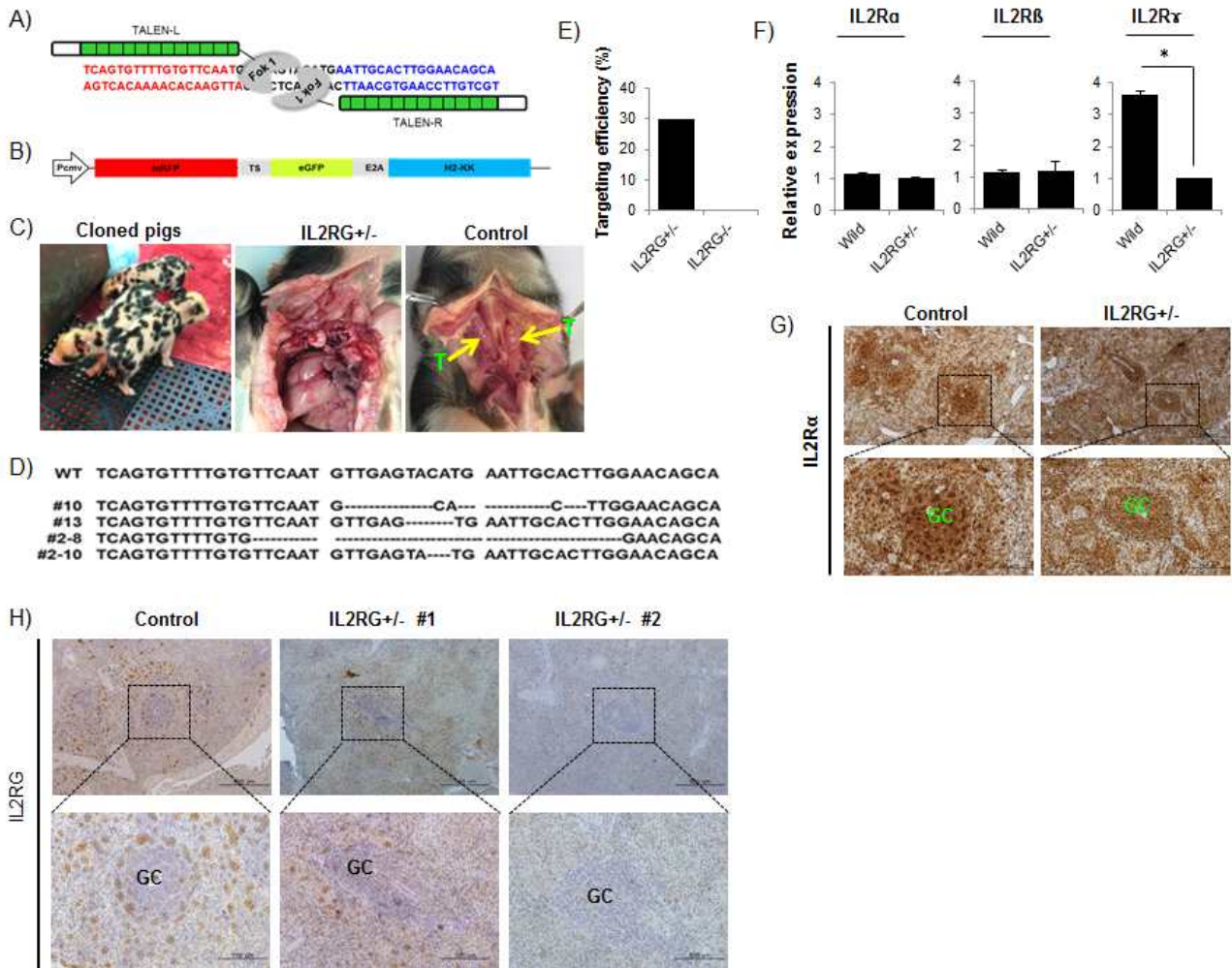
▶ 이러한 CD3의 positive cells의 수 차이와 DN단계에서의 T cells의 성숙도 차이는 왜 일본 그

립이 동종간의 세포 이식은 성공하였지만, 이종간 즉 사람 IPS을 이들 돼지에 이식이 실패 하였는지를 명백히 보여주는 중요한 단서로 사료된다.

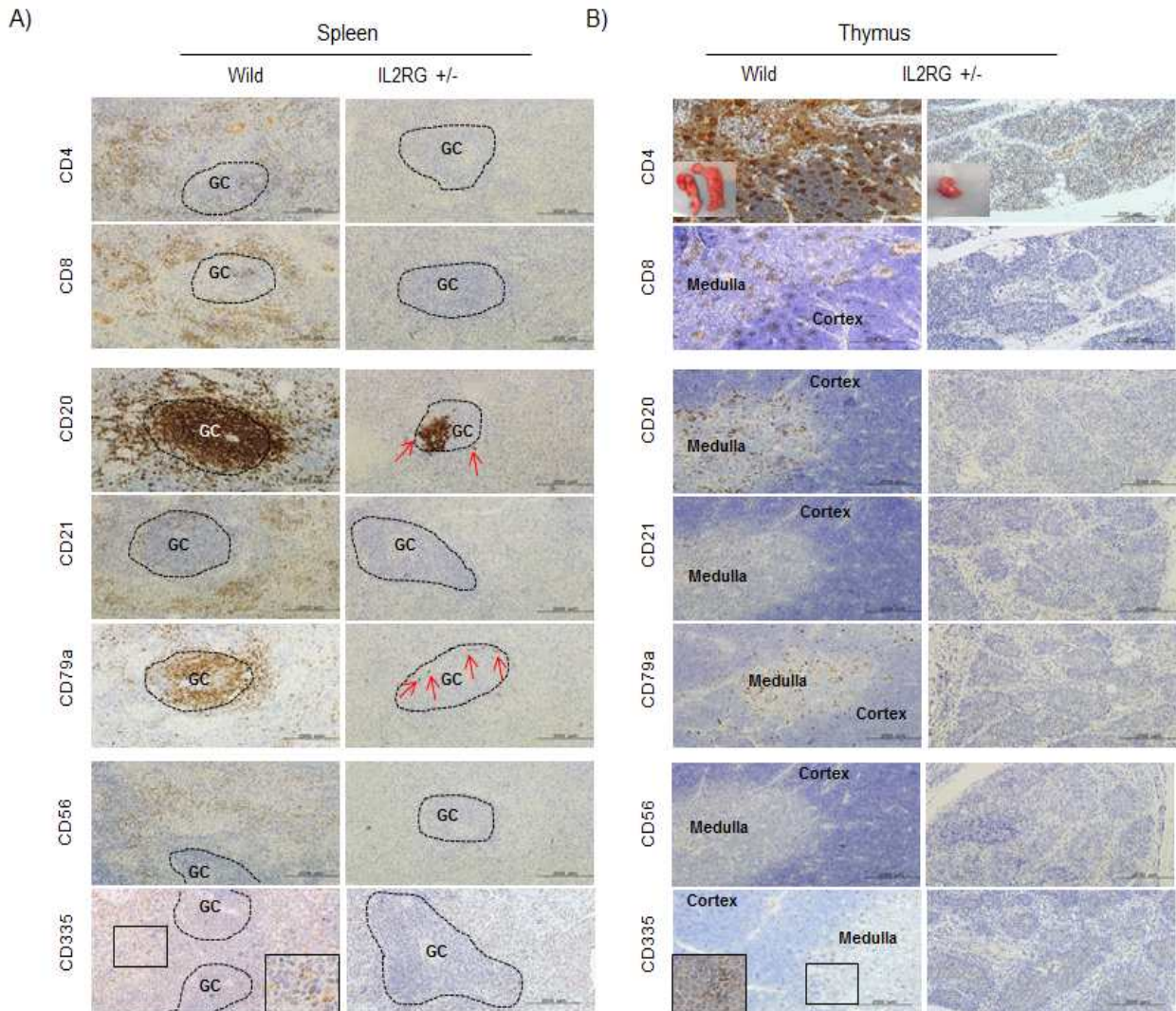
▶ X-chromosome의 경우 상당히 중요한 imprinting 유전자군이 IL2RG유전자 군을 중심으로 존재하고 있다. 이중 XIST와 Tsix의 경우 이들 imprinting유전자의 발현에 매우 중요한 역할을 수행하는데, IL2RG 유전자의 결손이 XIST와 Tsix의 발현에 미치는 영향은 물론 이들 유전자의 발현에 의한 imprinting 유전자군의 발현에 어떠한 영향을 미치는지는 보고되어 있지 않다. 따라서 이들 유전자의 발현을 조사하기 위하여 PUBMED에 등록된 유전자를 활용하였으나, Txis 유전자 sequencing이 잘못 보고 되어있어 본 연구를 통하여 새로운 유전자를 cloning하고 sequencing 하였으며, 이 유전자들을 토대로 하여 imprinting유전자의 발현을 조사한 결과 IL2RG의 소실이 이들 imprinting유전자의 발현을 상당히 저해한다는 사실을 처음으로 도출하였다.

▶ 상염색체에 위치한 유전자 조작에 의한 면역 결핍을 나타내는 타 유전자와는 달리 IL2RG 유전자는 X-염색체에 위치하고 있다. 따라서 호모 IL2RG female KO pig의 경우 사망하기 때문에 타 군에 비하여 호모 돼지를 생산하는 것이 매우 어려워 호모돼지와 유사한 기능을 나타내는 hemizygote [IL2RG(-/y)]을 이용한다. 이는 본 연구 결과를 상당히 지연시키는 효과를 가져왔으며, 분석에 한계로 작용하였다. 또한, IL2RG KO pig의 성장 속도의 지연, 성숙속의 지연과 사이코패스와 같은 행위, 흥선의 결여 등등과 같은 본 연구진이 예상치 못한 결과 도출과 생쥐와의 상당한 생리적 구조적 차이점에 의하여 본 연구진의 연구 결과는 상당 부분 지연될 수밖에 없었다.

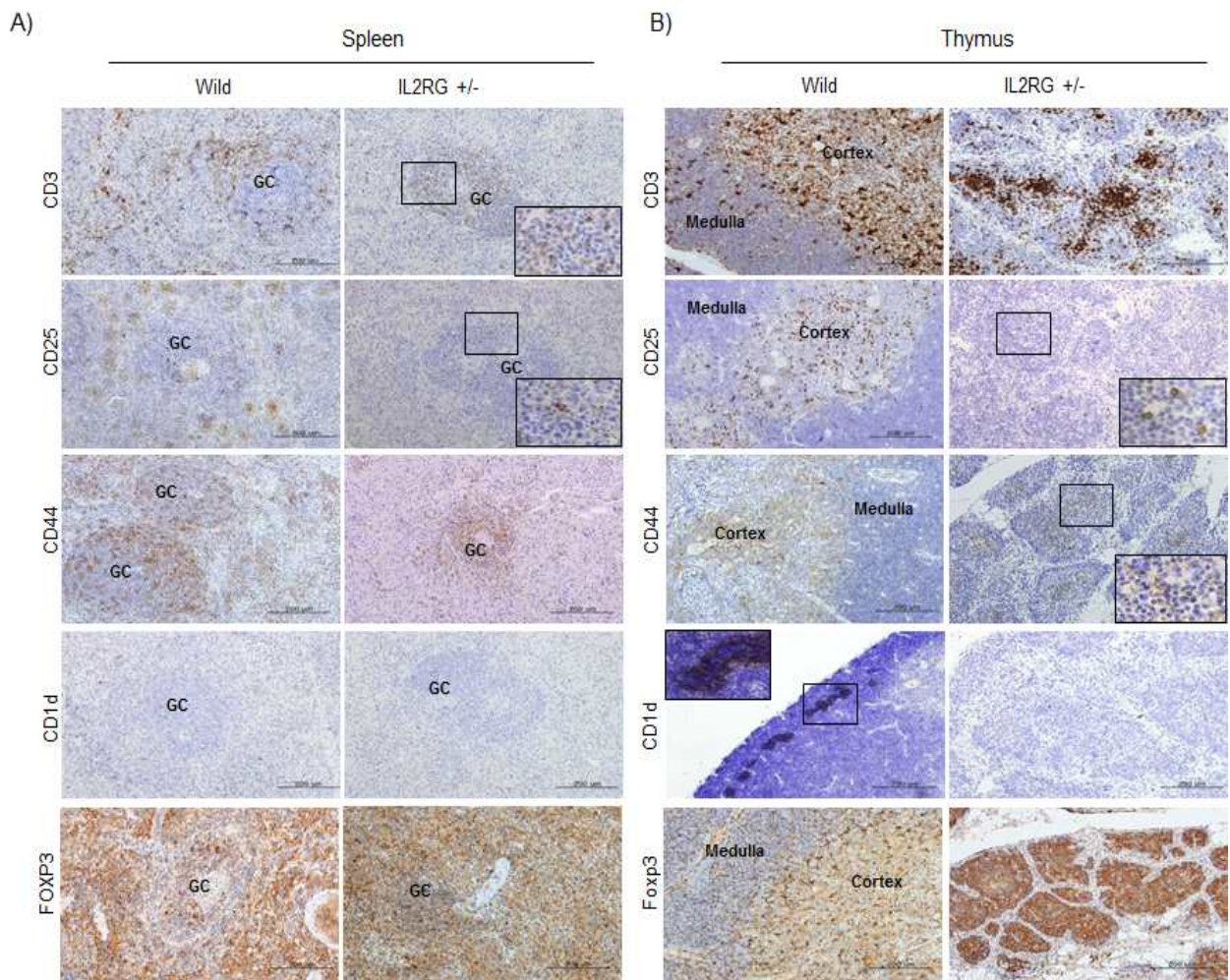
▶ 당해 연도의 연구 결과와 일부 전년도 연구 결과를 취합하여 그 결과는 2015년 2월에 “Cell Report”에 투고되어 있으며, 총괄적인 이해를 위하여 본문에 실린 그림만 요약 [그림 56-62]하여 보고하면 다음과 같다.



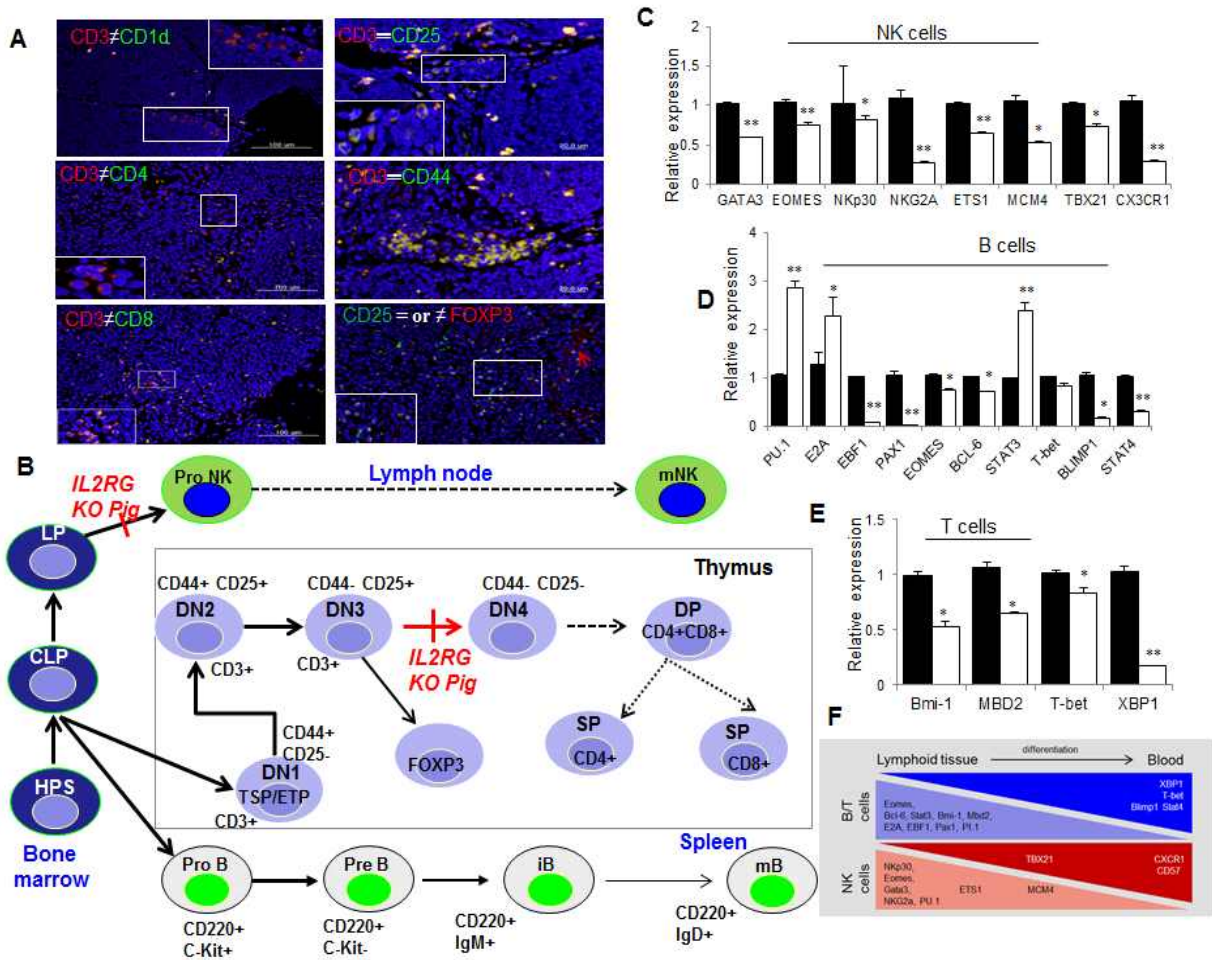
[그림 56] Production of IL2RG mutant pigs using TALENs. (A) TALENs designed to cause mutations in Exon 2 of IL2RG. (B) Donor vector for analysis of targeting efficacy. (C) Underdeveloped thymus in IL2RG KO pig. Thymus was underdeveloped or absent in IL2RG KO pigs. T indicates thymus. (D) Targeted mutation of IL2RG using TALENs. Deleted bases were indicated by dashes. (E) Targeting efficacy. (F) RT-qPCR analysis. (G and H) Localization of IL2R α (G) and γ (H) protein expression in the spleen of control (WT) and IL2RG KO pigs⁷¹.



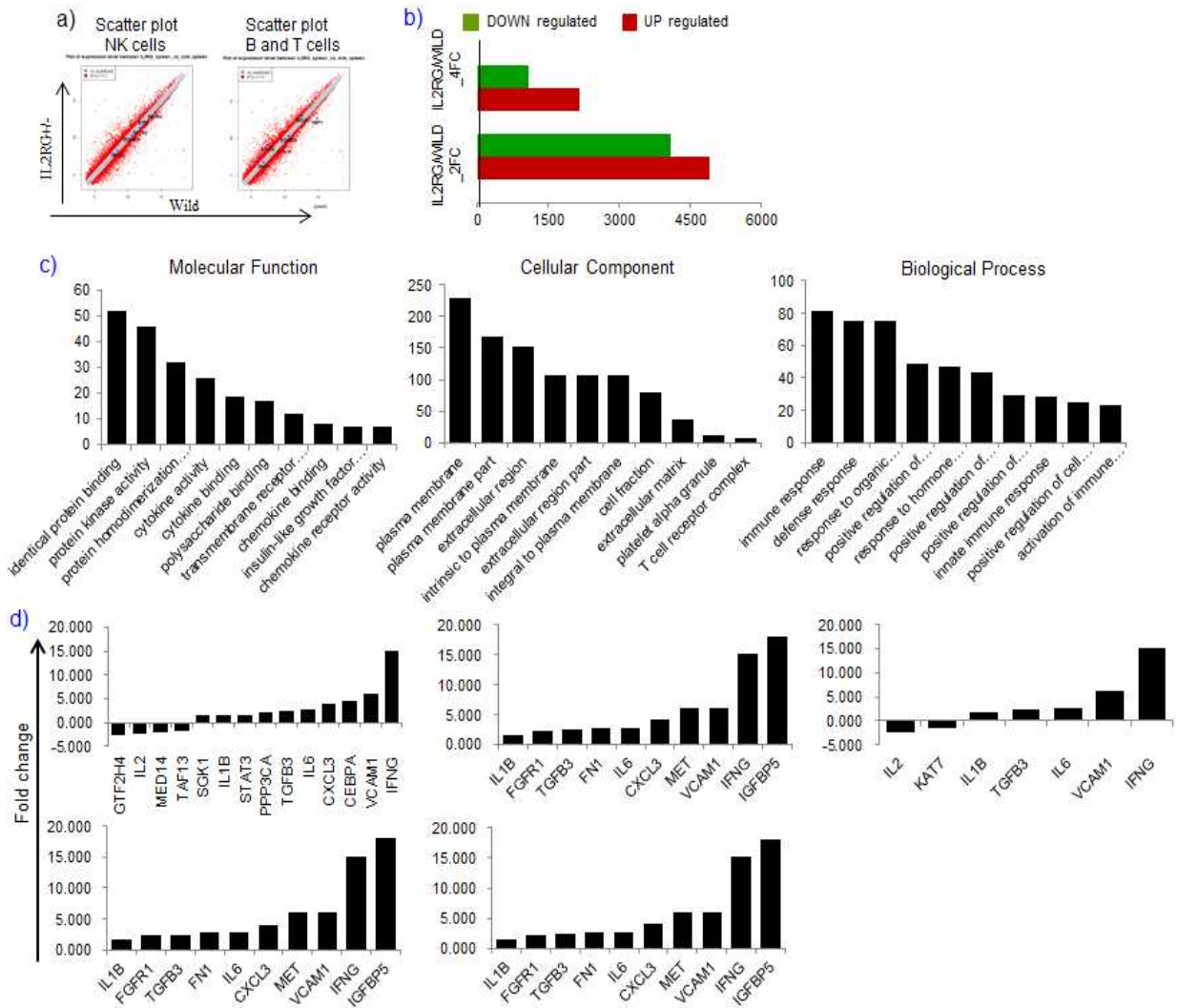
[그림 57] Analysis of T-, B-, and NK-specific biomarker expression patterns in spleen (A) and thymus (B). T cells (CD4, CD7, and CD8) , B cells (CD20, CD21, and CD79), NK cells (CD56, and CD 335) positive signal in control-derived spleen tissues were strongly detected, whereas a few CD20 and CD79 positive cells, which is a critical factors for B cell development in monoallelic IL-2RG pigs, were detected. However, biomarkers expression of T and NK cells in thymus of monoallelic IL-2RG pigs were not detected⁷¹.



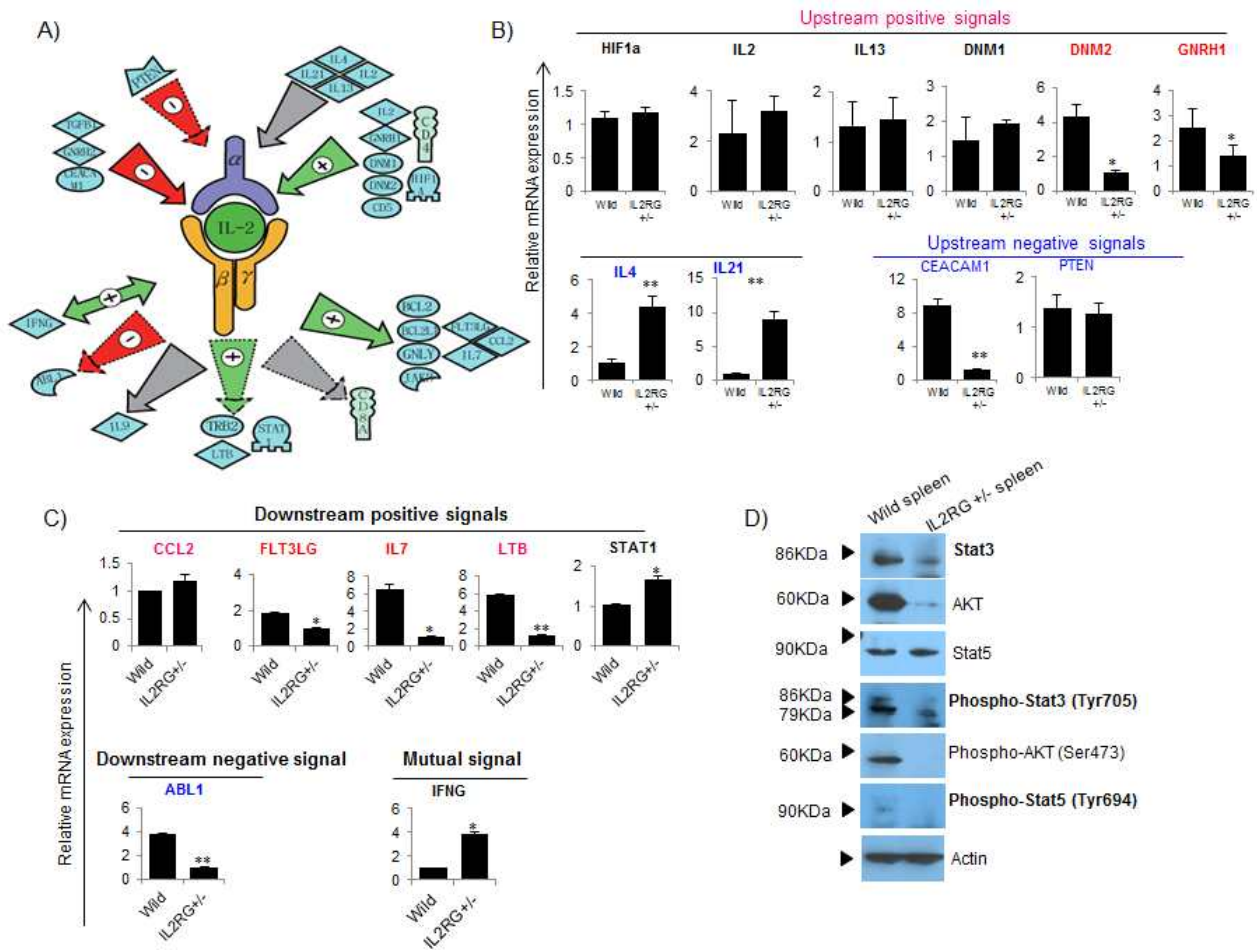
[그림 58] T cell subtype analysis. CD3, CD25, CD1d, and FOXP3 expression pattern analysis between control and monoallelic IL-2RG pig's spleen (A) and thymus tissues (B)⁷¹.



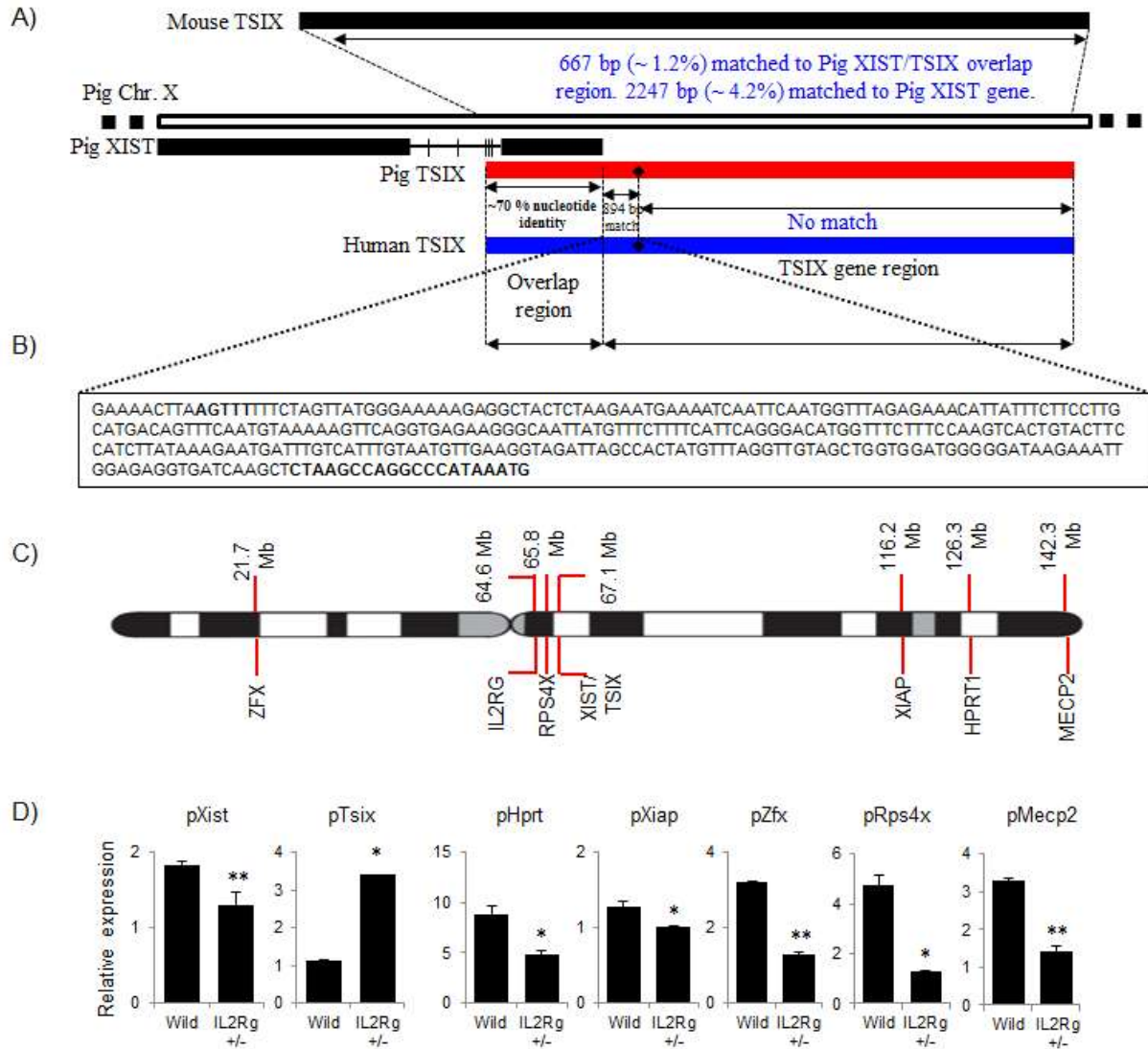
[그림 59] Co-localization of T cell subtypes. (A) CD3 expression is co-localized with CD1d or CD25, CD44, CD4, CD8 and FOXP3. Also CD44 or CD25 expression is co-localized with FOXP3. (B) Blocks in T- and B-cell development associated with IL2RG knock-out in mice and pigs. (C) Expression analysis of transcription factors for terminal T cell developments (D) Expression analysis of transcription factors for B cell development (E) Expression analysis of transcription factors for NK cell development (F) Summary of T, B, NK cell development⁷¹.



[그림 60] DNA chip analysis and validation of real-time RT-qPCR. (A) Scatter plot for NK and B/T transcripts. (B) Summary of Up- and Down-regulated genes in control and heterozygous IL2RG KO pigs. (C) Using DAVID program, up- and down-regulated gene expression were analyzed, and divide into 3 subgroups such as biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF). (D) Real time RT-qPCR analysis for differentiation-related key genes expression of NK-, B-, and T-cells. (E) Key gene expression in T/B/NK cell stages during transition from lymphoid tissue to circulatory blood.



[그림 61] Studio pathway analysis of pig IL-2RG regulation. (A) Functional correlation and interaction of IL2RG signaling using the Pathway Studio software (Ariadne Genomics Inc.; Rockville, MD, USA). All genes are shown by their gene symbols. Direct and indirect regulation is indicated by colored lines and dotted gray lines, respectively. (B and C) Validation of gene expression by real time quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in upstream (B) and downstream (C)⁷¹.



[그림 62] Partial cloning of TSIX gene and analysis of imprinting gene expressions on the X chromosome. (A) Comparison of mouse, pig, and human TSIX gene sequence. (B) Partial sequencing of pig TSIX gene. (C) Molecular Location of imprinting genes on the X chromosome. (D) RT-qPCR analysis of imprinting gene expression on X chromosome.

최종적으로 건국대학교 내 일반사육실에서 현재 IL-2RG^{+/-} (female, 23 months) 유전자 적중 돼지는 사육 중이다 [그림 63]. 현재는 외부환경에 노출이 된 상태이기 때문에 앞으로 태어날 산자들은 전처리를 하여 isolator에서 키운 후 최종 무균화가 될 예정이다. 2015년 6월 3일 AI를 진행했으며, 자연 발정이 왔을 때 정자를 주입하였다. 제 1차 임신확인은 2015년 6월 30일 실시하였으며 현재까지 재발정이 확인되지 않아 임신확인 중이고 임신이 실패하면, 다음에는 발정지연제를 19일 동안 먹인 후 다시 발정이 오면 AI를 통해 발정과 임신을 유도할 예정이다.



[그림 63] A IL-2R γ +/- KO pig in gnotobiotic facility

가. 제 1 세부 와 제 1 협동 과제 연구수행 내용 및 결과

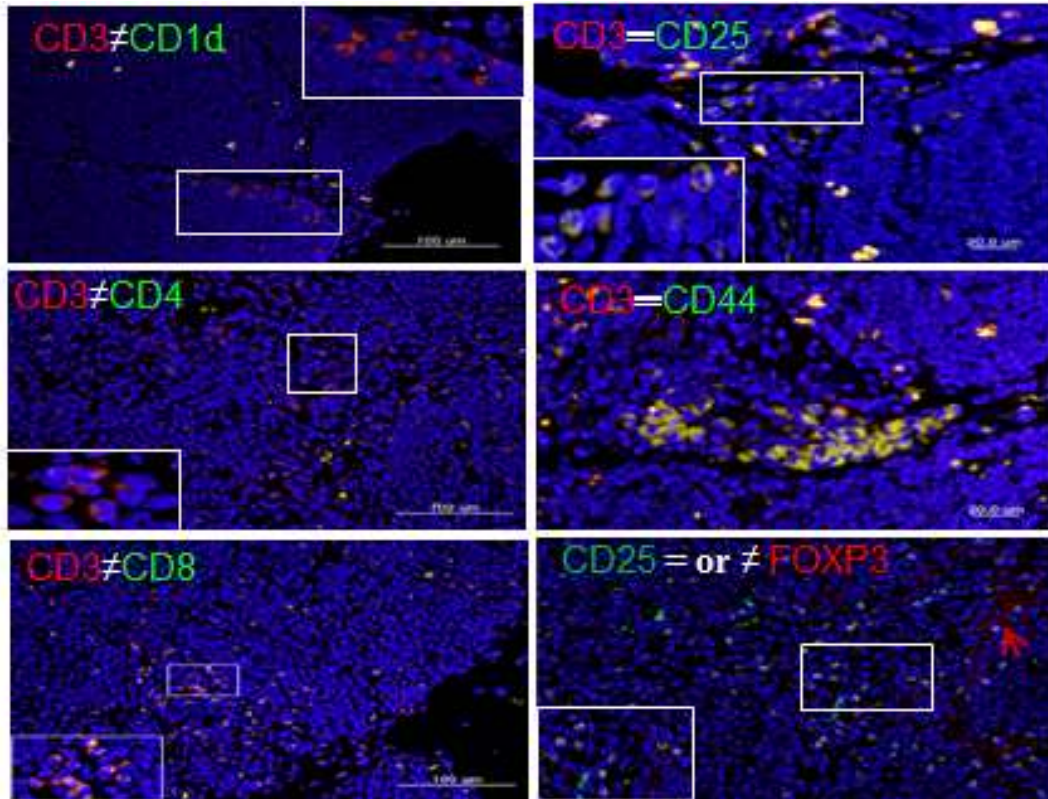
-복제 돼지라인별 T, B 면역세포 발달특성 분석

-자연면역세포의 분화 특성 규명

(1) IL-2R γ +/- 유전자 적중 돼지의 T, B, NK 면역세포 기능 분석

IL2RG 유전자는 성염색체상인 x chromosome에 위치하며 IL2를 포함하는 다양한 인터루킨에 대한 수용체를 암호화 하는 유전자이다. 이 유전자에 돌연변이가 유발될 경우 x linked combined immunodeficiency (XCID)를 비롯하여 x-linked severe combined immunodeficiency (XSCID)와 같은 면역 결핍성 질환을 초래하게 된다.

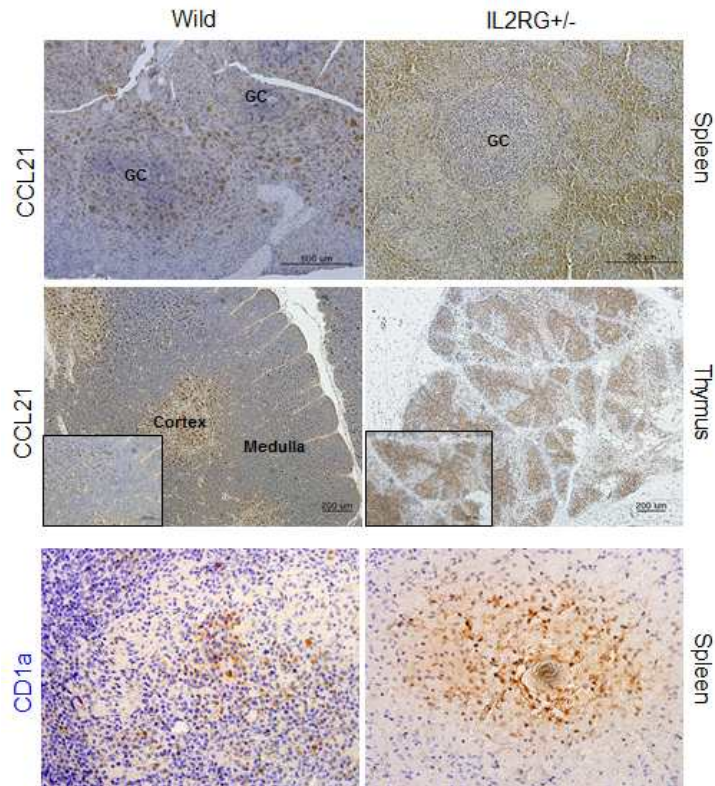
개발된 면역 결핍돼지는 면역 기관인 흉선 및 면역에 관여하는 주요 림프구-T세포, NK세포, B세포가 결실 되었을 것이라 예상을 하고 T, B 면역세포의 기능을 분석하여 일차 보고 하였다. 그 후, 세부적인 IL2RG에 의한 주요 림프구의 발달과정을 확인하기 위해서 double stain을 수행하였고, 그 결과는 다음 [그림 64]와 같다.



[그림 64] IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지에서 각 면역 세포 마커를 이용한 림프구 종류 확인

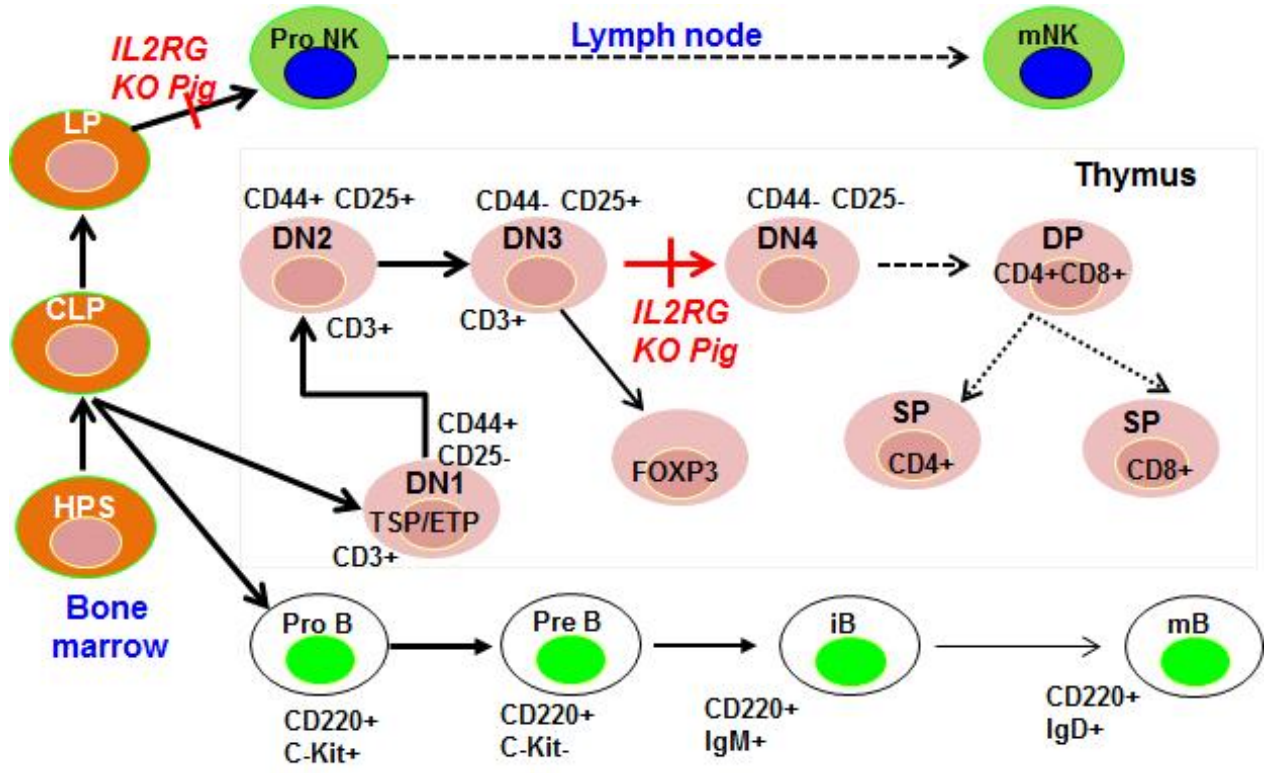
CD3 is initially expressed in the cytoplasm of pro-thymocytes, the stem cells from which T-cells arise in the thymus. This high specificity, combined with the presence of CD3 at all stages of T-cell development, makes it a useful immunohistochemical marker for T-cells in tissue sections. CD4 is a glycoprotein found on the surface of immune cells such as T helper cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells and it is a co-receptor that assists the T cell receptor (TCR) in communicating with an antigen-presenting cell. CD8 is a transmembrane glycoprotein that serves as a co-receptor for the T cell receptor (TCR). And the CD8 co-receptor is predominantly expressed on the surface of cytotoxic T cells, but can also be found on natural killer cells, cortical thymocytes, and dendritic cells. CD25 is a type I transmembrane protein present on activated T cells, activated B cells, some thymocytes, myeloid precursors, and oligodendrocytes that associates with CD122 to form a heterodimer and is expressed in most B-cell neoplasms. CD44 expression is an indicative marker for effector-memory T-cells. CD44, along with CD25, is used to track early T cell development in the thymus. Foxp3 appears to function as a master regulator (transcription factor) in the development and function of regulatory T cells⁷¹.

CCL21은 T세포 구역으로 T cell과 DC cell을 모집하고 조율하는 대표적인 사이토카인이다. 그런데 [그림 65]와 같이 wild와 IL2RG +/-에서 CCL21이 강하게 발현되는 것을 확인하였다. 그래서 CCL21 positive cell은 DC cell 이라고 추측하였고, 다른 DC cell maker인 CD1a를 이용하여 immunohistology를 진행하였을 때, CCL21과 같은 발현경향을 확인하였다. 이로써 IL2RG+/-에서 CCL21 positive cell은 DC cell 임을 이 실험을 통하여 증명하였다.



[그림 65] IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지에서 DC cells 존재 확인. Wild type pig spleen, thymus 와 IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지 spleen, thymus에서 각각 CCL21과 CD1a의 발현을 immunohistochemistry 방법으로 확인하였다.

앞선 연구결과와 이 결과를 바탕으로 최종적으로 [그림 66]과 같은 모식도를 그릴 수 있었다.



[그림 66] IL2RG 유전자 적중 돼지의 B, T, NK의 발달과정⁷¹.

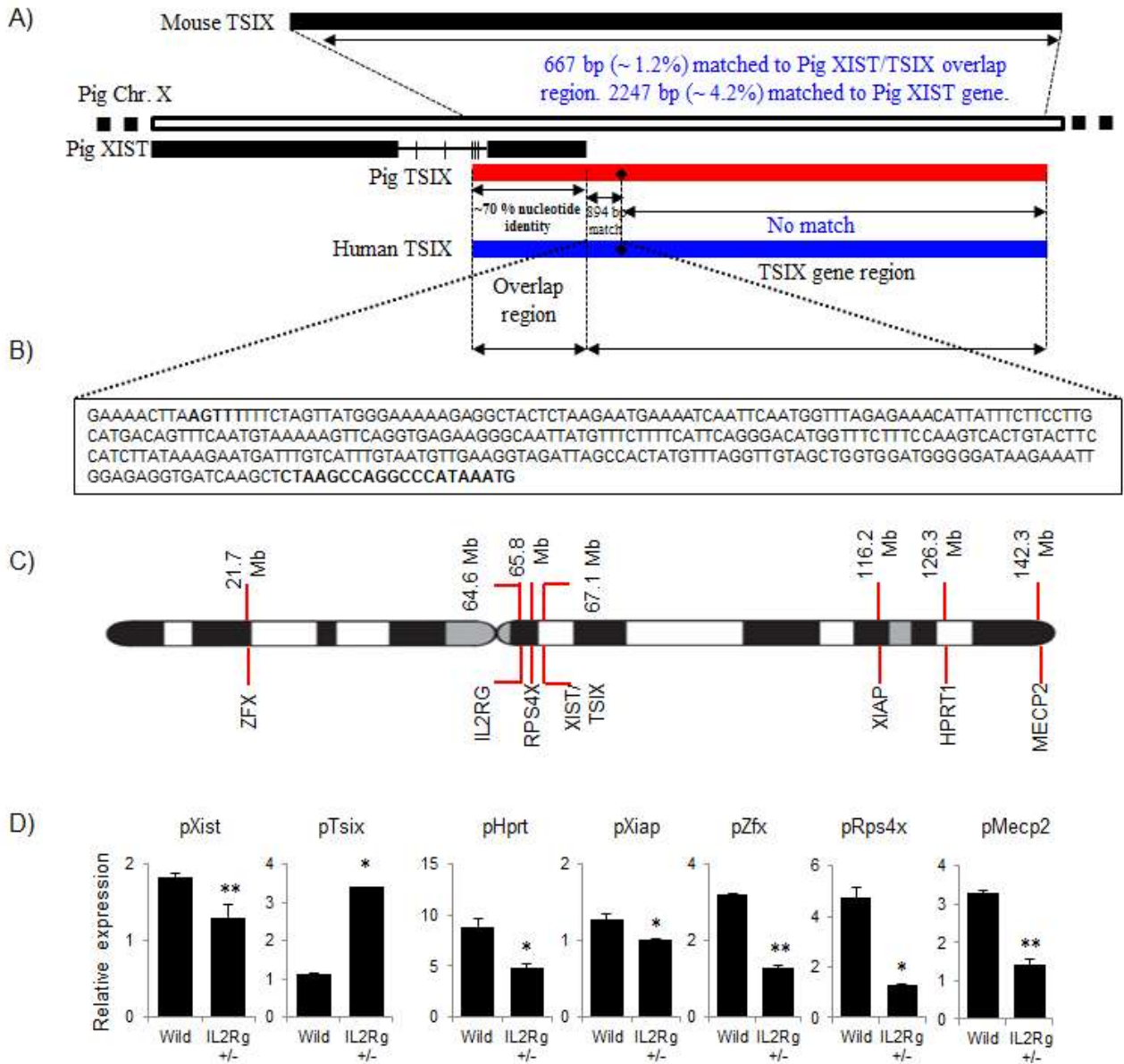
IL2RG 돼지에 있어서 각각의 B, T, NK의 발달 과정 중에 IL2RG 에 의해서 각 세포 발달에 영향을 주는 것을 확인하였는데, 특히 T cell은 Double negative stage3 에서 double negative stage 4로 넘어가는 단계에서 문제가 있음을 확인하였고 마우스의 경우, 돼지와 달리 double negative stage 2와 3사이를 block 한다는 보고 가 있었다.

Bone marrow에 존재하는 hematopoietic stem cell이 각각 B, T, NK로 분화하는 과정을 나타낸 그림이다. 각 분화 단계에 맞는 CD markers도 같이 나타내어 이해를 돕는다. 앞선 보고와 같이, L2RG 유전자는 성염색체상인 x chromosome에 위치하며, 이 유전자에 돌연변이가 유발될 경우 x linked combined immunodeficiency (XCID)를 비롯하여 x-linked severe combined immunodeficiency (XSCID)와 같은 면역 결핍성 질환을 초래하게 된다.

따라서, IL2RG 유전자에 이상이 발생했을 때 x-chromosome에 위치하는 다른 imprinted genes의 발현에 영향을 미치는지를 확인확인하기 위하여 그림 67과 같은 실험을 실시하였다. X-chromosome에 위치하는 대표적인 imprinted genes은 XIST와 TSIX인데, pig TSIX는 아직 NCBI에 미등록상태이다. 따라서 human, mouse, pig chromosome 분석을 통하여 예상되는 pig TSIX를 pcr로 증폭하고, sequencing 하여 유전자 서열을 확인하였다 [그림 67 A, B]. 그리고 논문을 통하여 x-chromosome에 위치하는 imprinted genes을 조사하여 [그림

67 C]에 정리하여 나타내었고, 이와 동시에 PCR을 통하여 유전자의 발현 양상을 확인하였다 [그림 67 D].

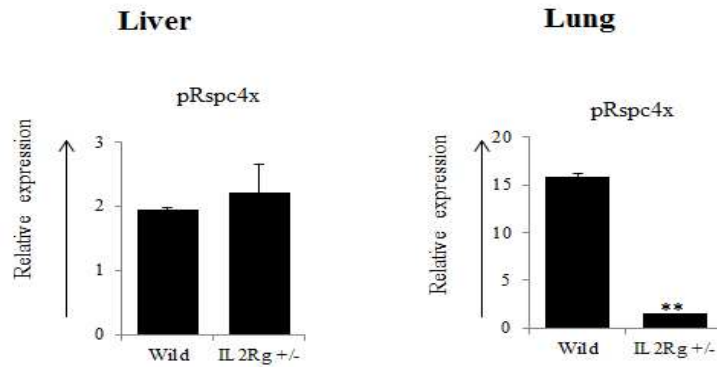
TSIX를 제외한 모든 imprinted genes (Hprt, Xiap, Zfx, Rps4x, Mecp2)은 IL2RG 유전자 적중 돼지에서 발현이 감소함을 확인하였다. 아마도 IL2rg가 없으면, T, B, NK 뿐만 아니라 imprinted genes 역시도 영향을 받음을 확인할 수 있었다.



[그림 67] IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지에 존재하는 imprinted genes

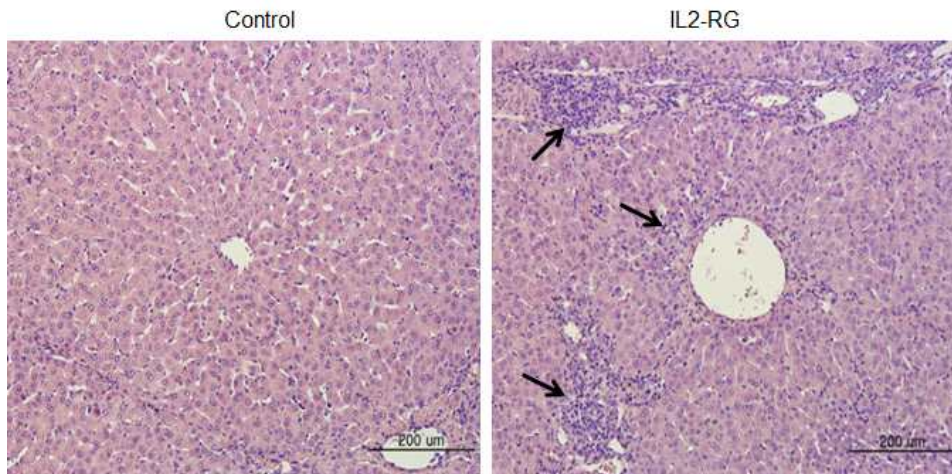
a) x-chromosome의 대표적인 imprinted gene인 TXIS 유전자 mapping b) pig TXIS 유전자 partial sequencing 및 서열 정보 c) x-chromosome에 위치하는 imprinted genes 위치 표시 d) 각 imprinted genes 발현 검정.

IL2RG 적중 돼지의 대표 분석 기관은 spleen, lymph node 과 thymus이다. 이상의 모든 실험은 thymus 와 spleen에서 진행된 결과들을 나타낸 것이다. 특이하게 imprinted gene의 경우, 개체 전체에서 동일한 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 모든 x-chromosome에 위치하는 imprinted genes을 각 장기에서 분석을 진행하였다. 그 결과 대부분의 imprinted genes은 모든 장기에서 동일하게 발현이 되지만, 일부 Rspc4x 유전자의 경우, 각 장기마다 다른 발현현상을 보여주었다 [그림 68].



[그림 68] X-chromosome에 존재하는 Rspc4x의 각 장기에서 다르게 발현

이상과 같이 IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지 는 정상적인 림프구 발달이 이루어지지 않음을 확인할 수 있었고, 따라서 IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지 는 외부 바이러스 등의 침입으로 인한 저항력이 없기 때문에 염증이 더 많이 발생하지 않을까 추측되어 liver를 통하여 분석하였다. 그 결과, [그림 69]에서와 같이 HE stain을 통하여 염증부위로 침투한 neutrophil을 확인할 수가 있었으며, 이는 정상에 비해서 IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지에서 더 많이 나타남을 확인하였다.

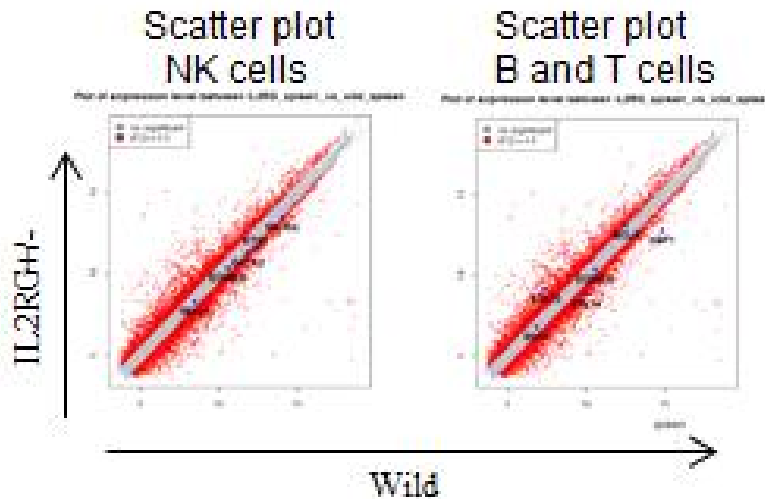


[그림 69] 간에서 HE 염색에 의한 염증 유발 검정. 화살표는 염증 유발에 의하여 발생된 마크로파지 세포를 의미한다.

(2) Ingenuity pathway analysis를 이용한 IL-2R γ -/- 유전자 적중 돼지 유전체 분석

Ingenuity pathway analysis 는 대사체와 전사체를 통합적으로 분석하고 해석해주는 웹 기반의 오믹스 분석 응용 소프트웨어이다. 이 소프트웨어를 이용하여 1) Biomarker discovery (주요 생물학적 특징을 기반으로 바이오마커의 후보군들을 검색하고, 관심있는 질병이나 표현형의 마커가 관련된 메커니즘을 설명) 2) Metabolomics (세포 기능에 영향을 미치는 대사체를 탐색할 수 있으며, miRNA 연구를 통해 유전자 발현 패턴을 조절하는 miRNA를 예측하고, miRBASE, TargetScan, Ingenuity 지식베이스를 이용하여 mRNA 타겟을 검색) 3) NGS/ RNAseq analysis (통합적인 통계 분석과 발견되는 isoform을 빠르게 식별할 수 있는 간소화된 분석 도구를 제공) 4) Proteomics (복잡한 단백질체 데이터와 연관된 메커니즘을 발견하고, 조절인자를 규명 또는 하위경로나 질병에 영향을 미칠 수 있는 요인을 예측) 분야에 활용이 가능하다. 3차년도에 진행한 chip assay와 본 년차를 통하여 분석한 chip assay를 IPA를 통하여 심층 분석을 시도 하였다.

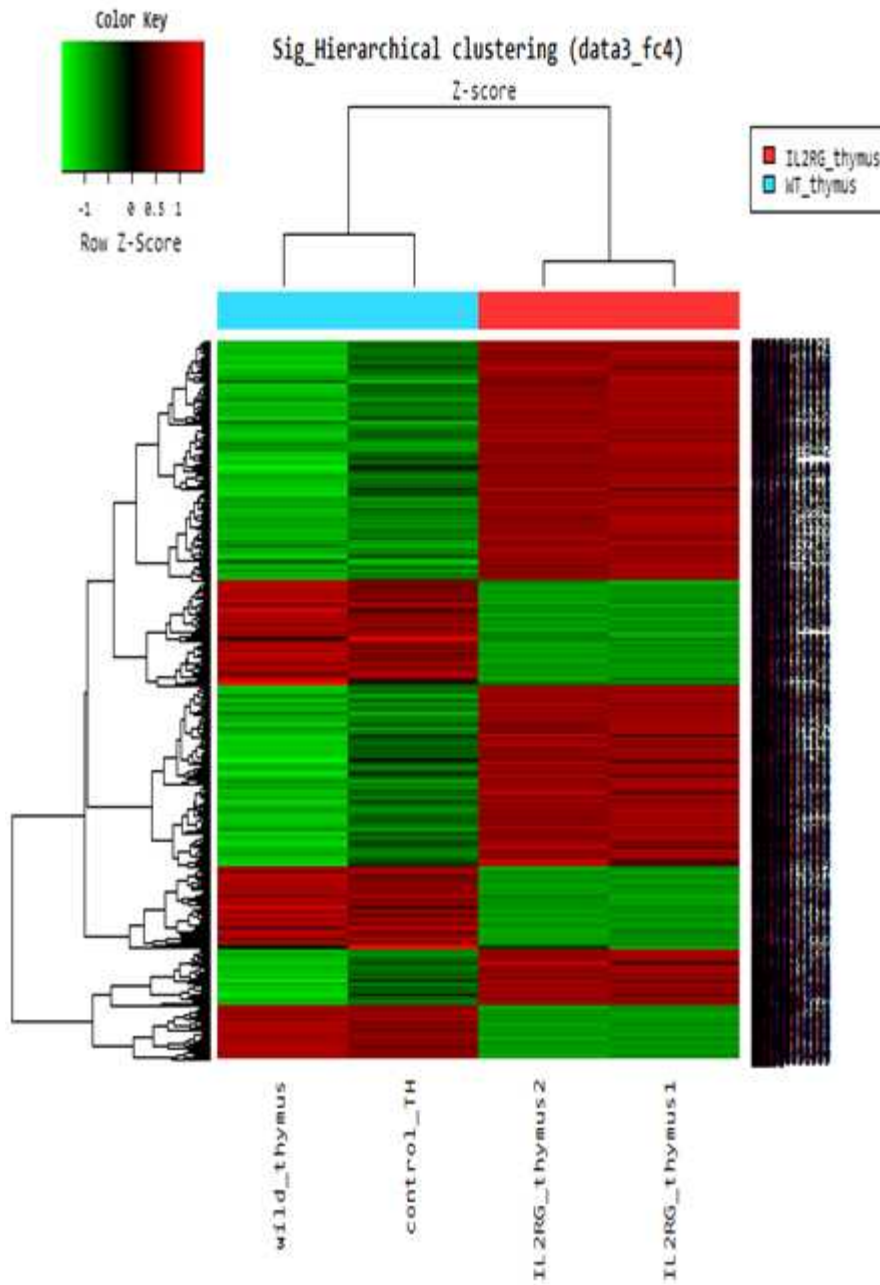
[그림 70]에서는 진행된 chip assay의 scatter plot 분석 결과이다. 1.5배 이상 유전자를 이용하여 scatter plot 분석을 진행하였을 때 대부분의 B, T, NK 발달 관련 유전자들이 위치를 확인할 수가 있었다. 하지만 그림에서 보는 바와 같이 각 B, T, NK 발달 관련 유전자들 분석만으로는 충분한 분석이 되지 않았다.



[그림 70] Scatter plot 분석

3차년도에 진행한 실험에서는 IL-2R γ -/- 유전자 적중 돼지 한 마리만 이용하여 분석을 진행했는데, 4차년도에 추가로 IL-2R γ -/- 유전자 적중 돼지가 생산이 되어 추가적으로 chip 분석을 진행하였고 그 자료를 바탕으로 IPA 분석을 진행하였다. [그림 71]에서는 추가로

진행된 개체와 같이 분석된 Hierarchical clustering을 나타내었다.



[그림 71] IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 돼지의 Hierarchical Clustering.

우선, IPA 분석은 chip에서 2배 이상 발현 차이가 나는 유전자를 이용하여 진행하였을 경우, 분석되는 유전자 정보가 부족하다는 판단 하에 1.5배 이상 발현차이가 나는 유전자를 분석 진행하였다. IPA 분석으로 TOP CANONICAL PATHWAY를 확인하였다, 유의적인 차이가 나는 상위 그룹은 [표 11]과 같다.

[표 11] IPA 분석을 통한 IL-2R γ ^{-/-} 유전자 적중 패지의 TOP CANONICAL PATHWAY.

		p-value range	#Molecules
Diseases and Bio-functions	Cancer	1.13E-03-2.40E-08	95
	Gastrointestinal disease	1.09E-03-2.40E-08	64
	Organismal injury and abnormalities	1.13E-03-2.40E-08	101
	Inflammatory disease	1.13E-03-7.75E-08	34
	Inflammatory response	1.13E-03-1.56E-07	49
Molecular and cellular functions	Cell death and survival	1.03E-03-9.70E-08	74
	Free radical scavenging	7.26E-04-2.26E-07	20
	Cellular growth and proliferation	1.13E-03-5.27E-07	76
	Cellular movement	1.03E-03-9.23E-07	47
	Cell-to-cell signaling and interaction	1.13E-03-1.16E-06	37
Physiological system development and function	Tissue development	1.07E-03-5.27E-07	38
	Hematological system development and function	1.13E-03-9.23E-07	42
	Immune cell trafficking	1.03E-03-9.23E-07	32
	Cell-mediated immune response	1.03E-03-2.00E-06	16
	Hemopoiesis	1.03E-03-2.00E-06	17

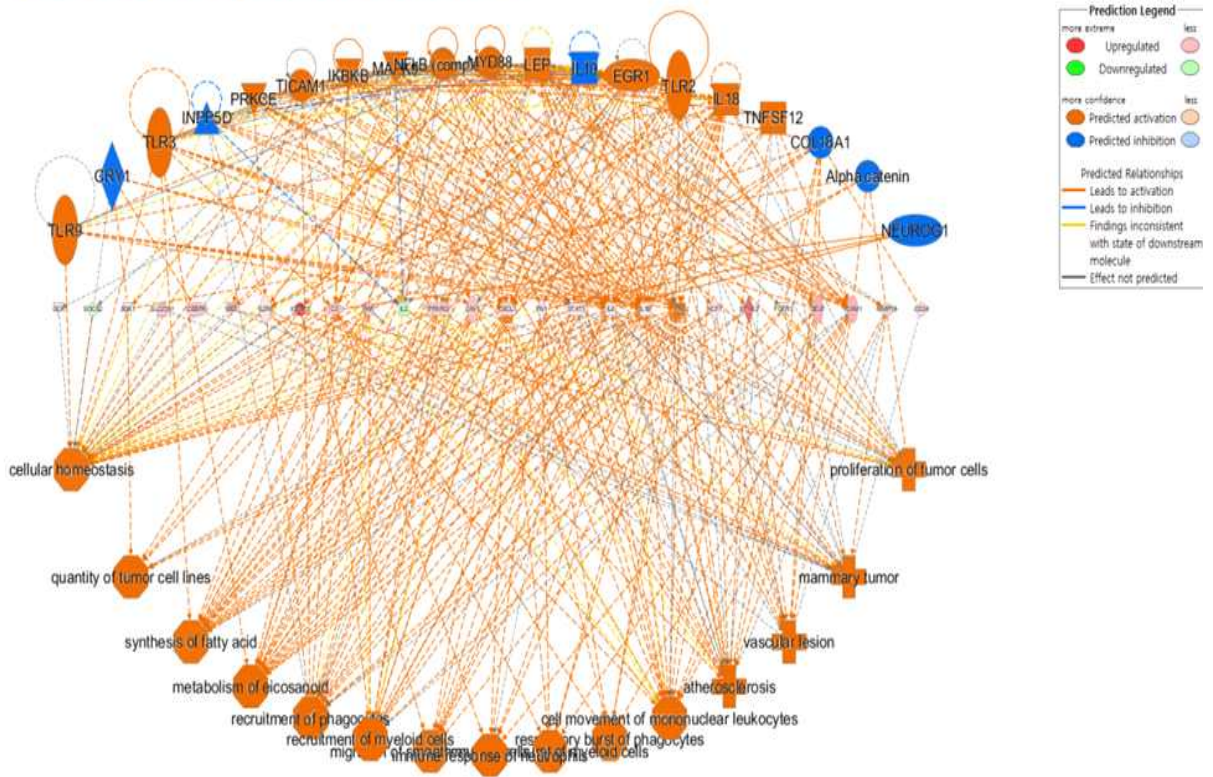
특징적으로 disease and bio-functions pathway에서 inflammatory disease와 inflammatory response, physiological system development and function pathway에서 cell-mediated immune response, immune cell trafficking 와 같은 면역 관련 canonical pathway를 확인할 수가 있었다. 이는 우리가 생산한 IL-2R γ ^{+/-} 유전자 적중 패지가 면역결핍이 발생한 생체임을 다시 확인시켜주었다. 관련된 main molecular에 의해 조절되는 network을 IPA를 통하여 분석을 하였고 그 결과는 [표 12]에 정리를 하였다.

[표 12] Main molecular 에 의해 조절되는 network.

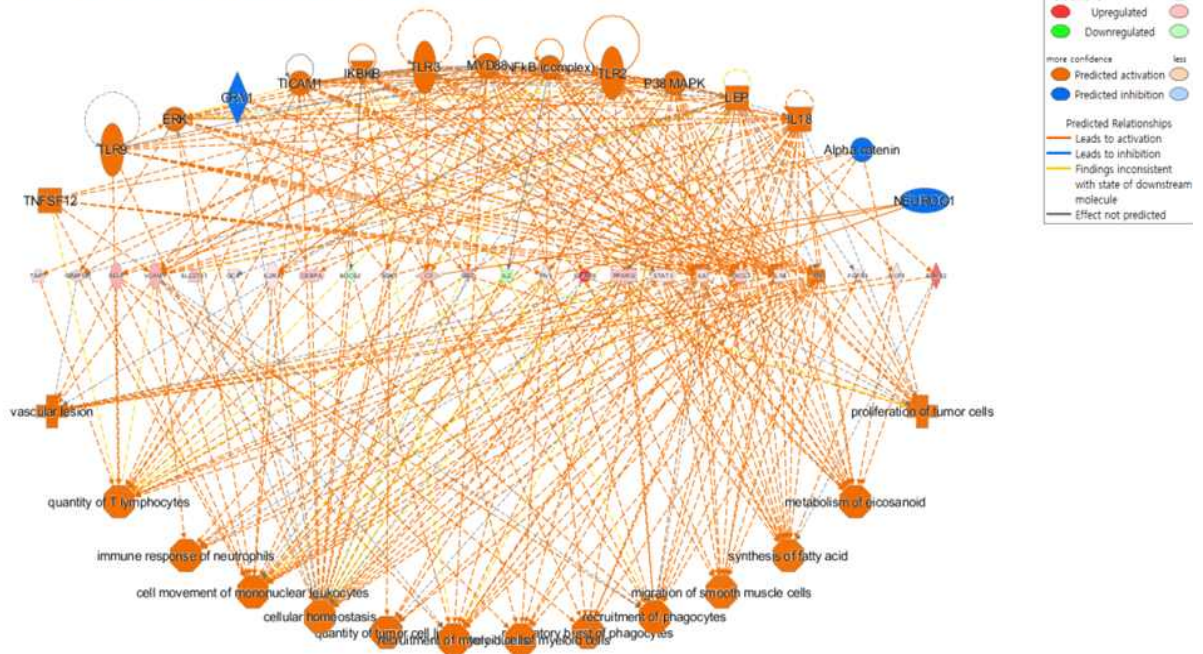
ID regulators	Diseases and Functions	Consistency score
Alpha Catenin, COL18A1, EGR1, IKBKB, IL10, IL18 (+12 more)	atherosclerosis (+14 more)	90.802
Alpha Catenin, CRY1, ERK1, IKBKB, IL18, LEP, MYD88 (+8 more)	cell movement of mononuclear leuckocytes (+13 more)	79.608
COL18A1, IL18, LEP, MYD88, NFkb (complex), TICAM1, TLR2 (+2 more)	atherosclerosis, cancer (+10 more)	60.052
CSF2, EGR1, IFNG, IKBKB, INPP5D, MYD88, NFkb (complex) (+2 more)	adhesion of eosinophils (+9 more)	40.279

그리고 세부적인 분석을 하기 위하여, 관련된 세부 유전자와의 pathway를 다음 [그림 72] 와 같이 모식도로 나타내었다.

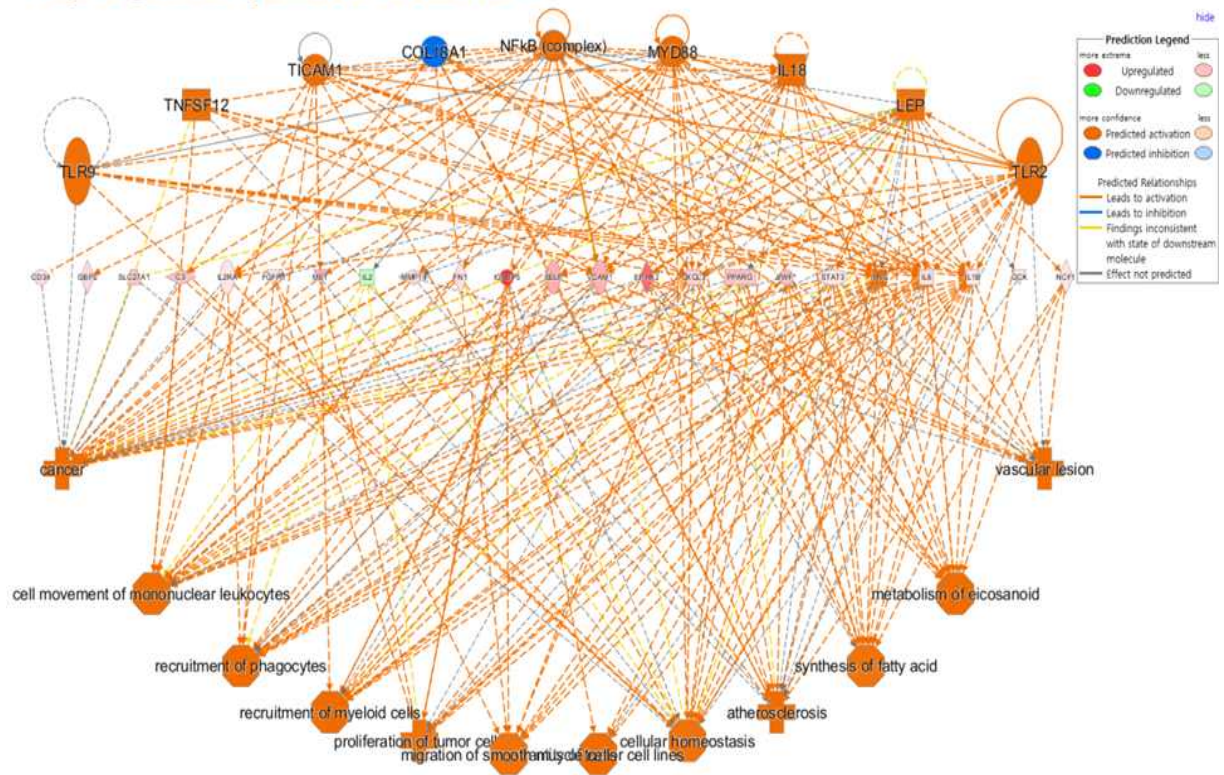
Top regulatory effect network 1



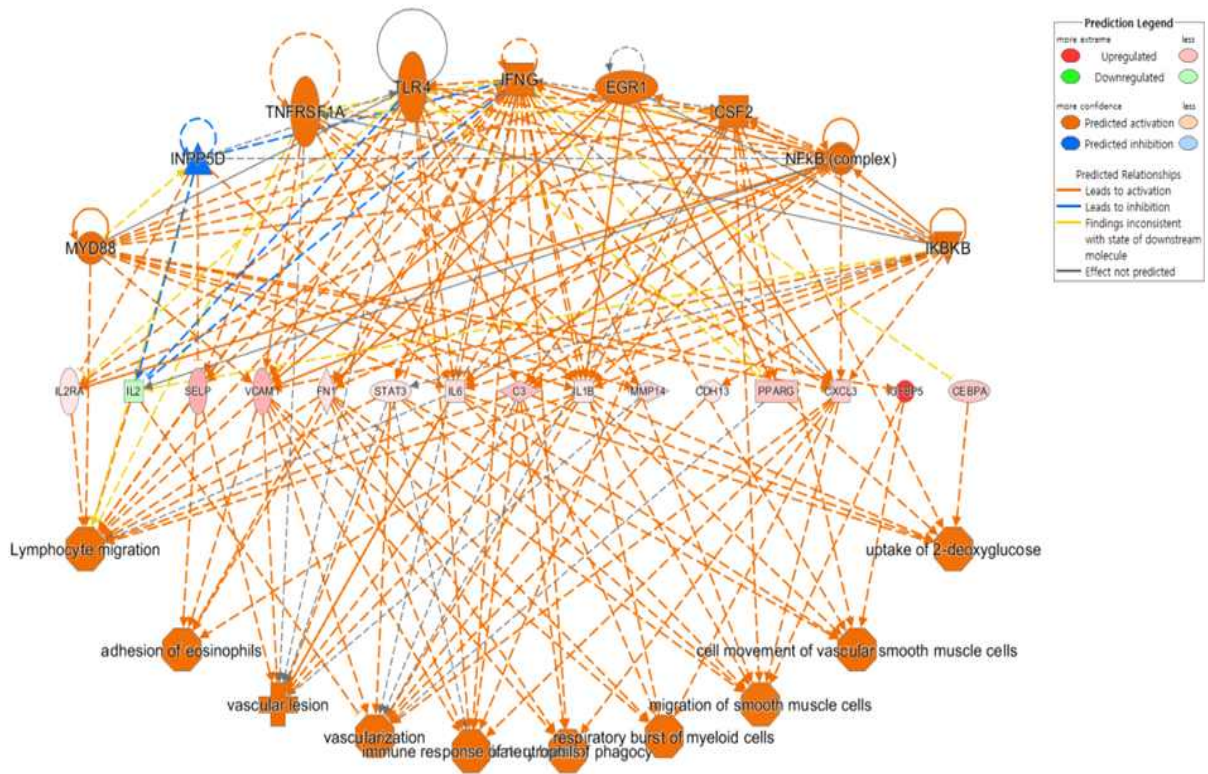
Top regulatory effect network 2



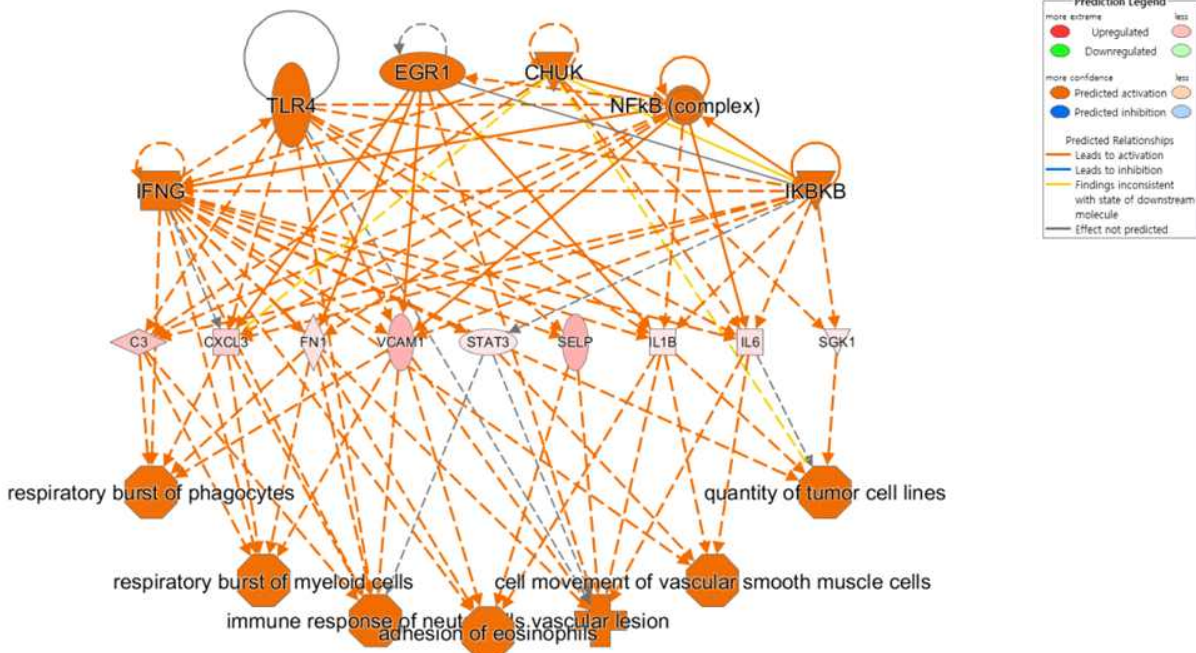
Top regulatory effect network 3



Top regulatory effect network 4



Top regulatory effect network 5

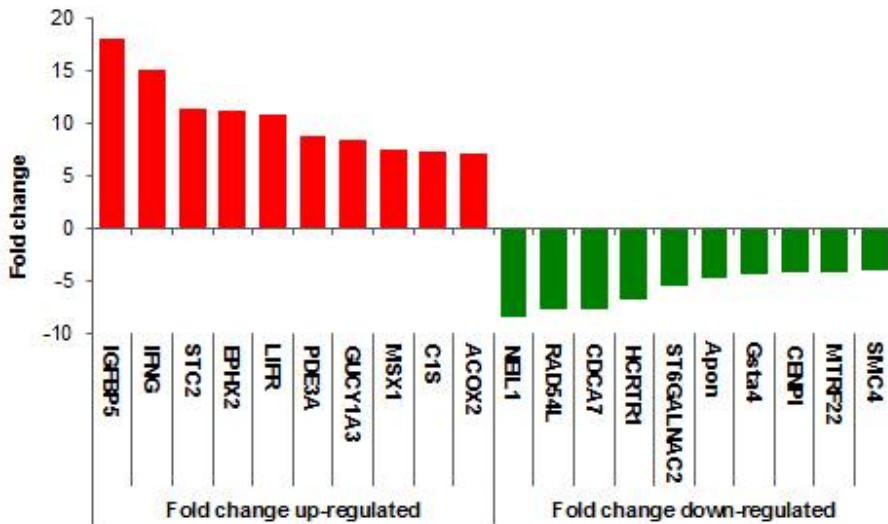


[그림 72] Main molecular 에 의해 조절되는 network pathway. Top regulatory effect network 1-5.

IPA를 통해서 IL-2R γ +/- 유전자 적중 돼지에서 가장 발현이 높은 유전자와 낮은 유전자를 [표 13]에 정리하였고, 각각의 유전자 발현양의 차이는 [그림 73]에 나타내었다.

[표 13] IL-2R γ +/- 유전자 적중 돼지에서 발현된 최상과 최하 유전자 목록

Top molecules		
Fold change up-regulated	IGFBP5	18.011
	IFNG	15.168
	STC2	11.481
	EPHX2	11.244
	LIFR	10.836
	PDE3A	8.877
	GUCY1A3	8.455
	MSX1	7.589
	C1S	7.394
	ACOX2	7.076
Fold change down-regulated	NEIL1	-8.405
	RAD54L	-7.726
	CDCA7	-7.689
	HCRTR1	-6.754
	ST6GALNAC2	-5.473
	Apon	-4.670
	Gsta4	-4.309
	CENPI	-4.268
	MTRFR22	-4.176
	SMC4	-3.987

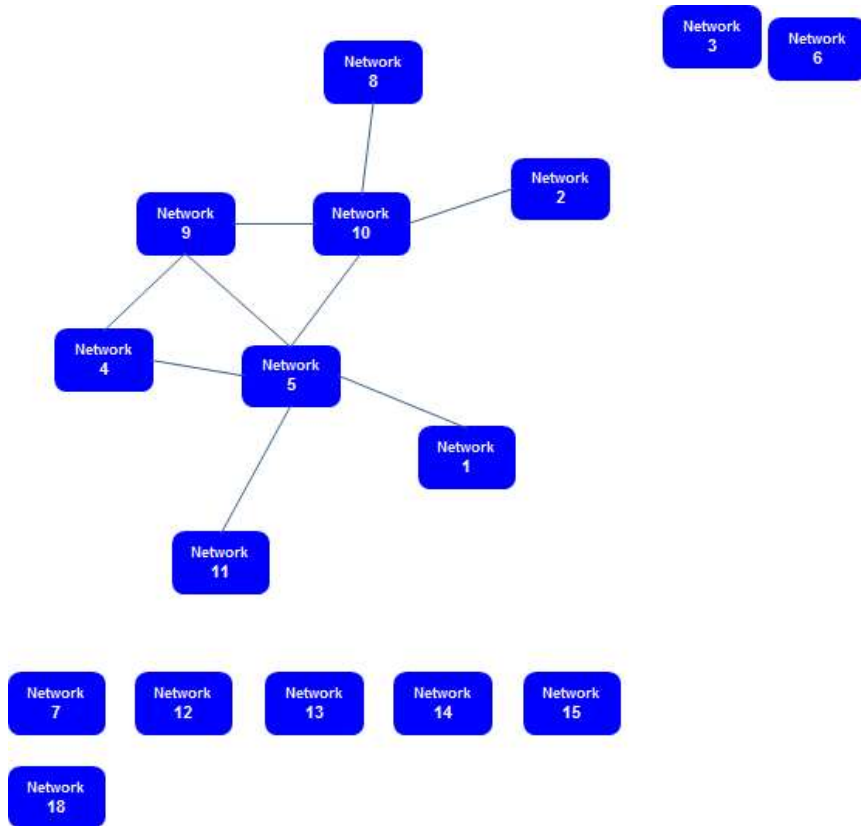


[그림 73] IL-2R γ +/- 유전자 적중 돼지에서 발현된 최상과 최하 유전자 발현양

Molecule Activity Predictor(MAP)는 서브 네트워크와 고전적인 pathway에서 관심있는 분자를 선택하여 가설 검증을 도와주며, 네트워크와 신호경로에서 방향성과 조절양상을 살펴볼 수 있다. 핵심 분석 및 인과적 네트워크 분석, IPA Advanced Analytics은 데이터셋에 직접적인 연관이 없는 조절인자를 찾기 위해 상위경로까지 분석을 확장하여 실험 데이터와 관련된 다양한 원인 관계를 밝힐 수 있다.

IL-2R γ +/- 유전자 적중 돼지에서 나온 결과를 바탕으로 ID network 분석을 진행하였

고 그 결과 다음과 같이 전체 18개의 network이 세부로 나누어지고 이들은 모두 연결되어지는 것이 아니라 특정 network만 관계되는 것을 확인하였다 [그림 74].



[그림 74] ID network 분석 결과

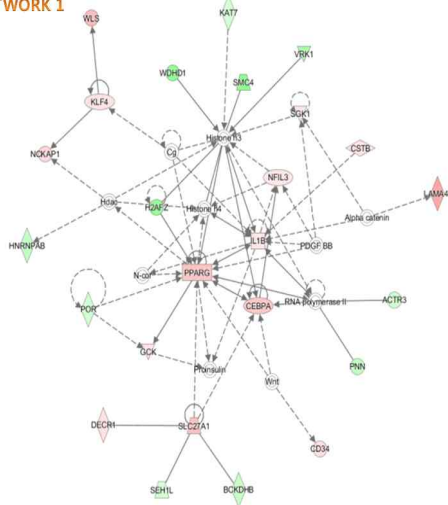
[그림 74]에서 서로 관련이 있는 ID network에 관련된 유전자들을 [표 14]에서 정리하여 나타내었다. 표에서는 각각의 ID network가 나타내는 TOP DISEASE AND FUNCTIONS을 나타내고 실제로 chip 결과에서 속하면서 up-regulated-red color와 down-regulated-green color로 나타내었다. 그리고 각 network에서 chip에서는 확인되지 않았지만 red 혹은 green을 연결시켜주는 유전자 (Molecules in network)에 나타내었다.

[표 14] ID network 에 속하는 유전자 목록

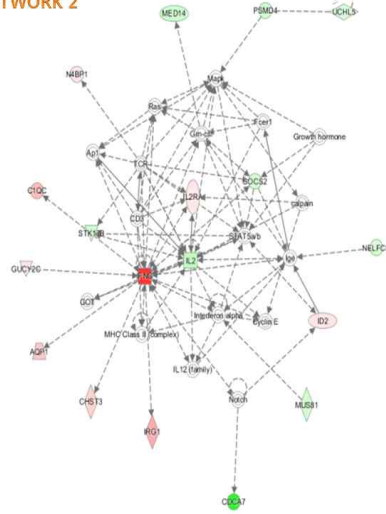
Network	Top disease and functions	Moleules in Network	Moleules in Network (up)	Moleules in Network (down)
Network 1	Carbohydrate metabolism, Molecular transport, Small molecular biochemistry	Alpha catenin, Cg, Hdac, histon h3, Histone h4, N-cor, PDGF BB, Proinsulin, RNA polymerase II, WNT,	CD34, CEBPA, CSTB, DECR1, GSK3, IL1B, KLF4, LAMA4, NCKAP1, NFIL3, PPARG, SGK1, SLC27A1, WLS	ACTR3, BCKDHB, H2AFZ, HNRNPAB, KAT7, PNN, POR, SEH1L, SMC4, VRK1, WDHD1
Network 2	Cell-mediated immune response, Cellular development, Cellular function and maintenance	Ap1, calpain, CD3, Cyclin E, Fcgr1, Gm-csf, GOT, Growth hormone, Ige, IL12 (family), Interferon alpha, Mapk, MHC class II (complex), Notch, Ras, STAT5a/b, TCR	AQP1, C1QC, CHST3, GUCY2C, ID2, IFNG, IL2RA, IRG1, N4BP1,	CDC47, IL2, MED14, MUS81, NELLFCD, PSMD4, SOCS2, STK17B, UCHL5
Network 4	Cancer, Organismal injury and abnormalities, Cell death and survival	Alp, C-Src, Collagen(S), Creb, ERK1/2, Fibrinogen, Focal adhesion kinase, Gsk3, Hsp27, Mek, MTORC1, p38MAPK, PI3K (family), Pkc(s), PP2a, Ras homolog, Rock, SRC (family), Vegf	ANGPTL7, CAV1, FBXO32, FN1, HK2, IGFBP5, MET, MMP14, PDGFRA, SFN	DCT, FTO, LIMS1, SLC5A5, TBC1D4, VTN
Network 5	Cancer, Cell cycle, Organismal injury and Abnormalities	BIK, CD24, CTSD, IGFBP7, LAPTM4A, MCAM, MYO1C, OGG1, PRDX2, PRPF31, TBP, TP53, TP63, TP53AIP1, TPP1, ULBP2, UPX2, VAMP4	GUCY1A3, PGLYRP2, PGM3, PP3CA, SCPEP1, SFN, UPK1B	ERP44, FRYL, JMJD1C, NUP153, PRDX3, PTP4A1, SART3, SMC4, TAF13,
Network 8	Developmental disorder, Hereditary disorder, Immunological disease	C1q, C1R, CAPG, EXTL2, FHL2, GFPT1, GRB2, IGF1R, KIF5B, KRT6B, mir-223, NUPR1, PIK3C2B, PSEN1, RAC1, SAMHD1, SLC1A2, Smad2/3, TGM2, TUBGCP5, YY1	C1S, CYP2R1, DOCK4, Meg3, SLC39A1, ZSWIM6	ATP6V1G2, CENP1, ILF2, LEMD3, MTRFR2, SAR1A, SMU1, TACC3
Network 9	Cellular assembly and organisation, Lipid metabolism, Small molecule biochemistry	AGPS, ARFGAP3, arginase, ATF6, BET1L, CDC6, COG7, Cyp4A14, FADS2, GOLGB1, HSD17B10, LGALS4, LMAN1, MGST1, NFE2L2, PPARA, RE, TNMDL, SORBS1, Sos, TPP1, TXN, XBP1	AGA, FKBP10, FLRT2, GOLGA3, IGFBP5, MGST3, MYO5B, PFKM	AKAP3, COG7, Gsta4, MCM8, PSMA4,
Network 10	Neurological disease, Developmental disorder, Hereditary disorder	AHR, APP, ATP4A, CDK5R1, CDKN1A, CPLX2, CTSD, F8, GNAO1, HEY1, HSPE1, HTT, IgG1, KIF5B, NSF, PP1R1B, SLC1A2, STXBP1, TPH1, TPST1, VAMP3, VIPR2,	ACTN2, AQP1, ITIM2B, PDE2A, VWF	ARF3, CELA1, CLN3, KIF16, ID2, PRPF19, SEPHS1, ZBTB33
Network 11	Cell-to-cell signaling and interaction, Reproductive system development and function, Infectious disease	ARHGEF5, ARL6IP5, CCRL2, CDC42EP4, CH25H, CREM, DAB2, EP300, FNDC3B, PARP12, RASGEF1A, ERBB2, FAM26F, FSH, GBP5, GPRC5H3, SPARCL1, SPATA20, S3, PDLIM2, Sifn1, STAT1, TNFAIP3	STC2, USP13	CPSF6, MAPKAPK5, PTP4A1, RTN2

그리고 [그림 75]에서는 ID network에 관련된 각각의 network에 대한 결과를 나타내었다.

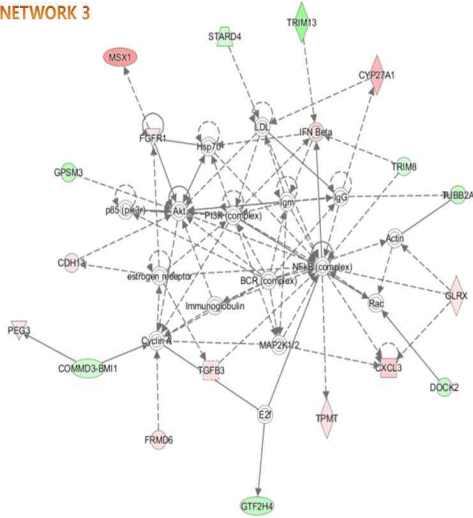
NETWORK 1



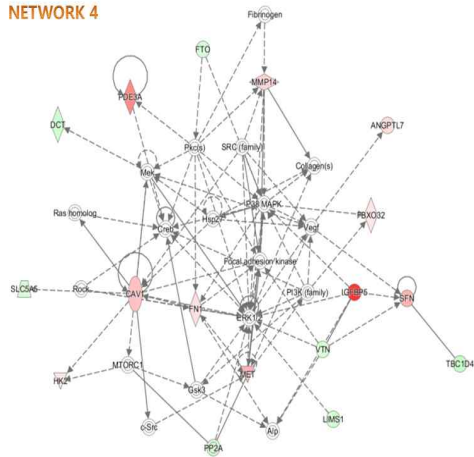
NETWORK 2



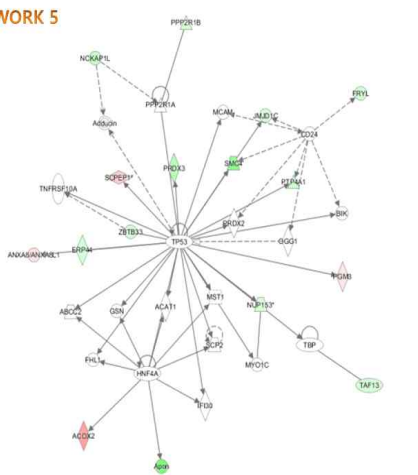
NETWORK 3



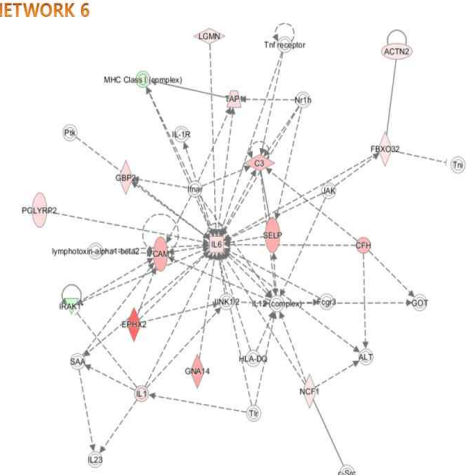
NETWORK 4



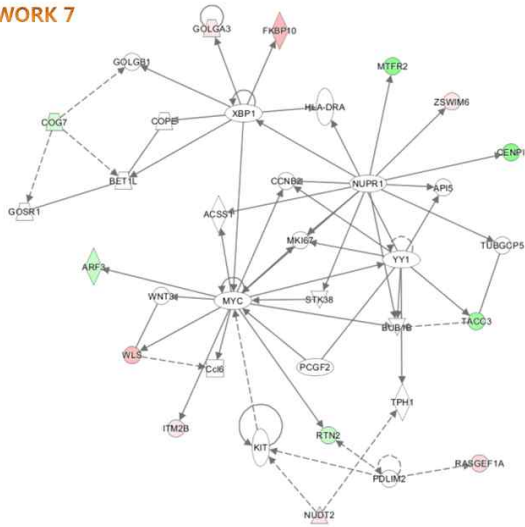
NETWORK 5



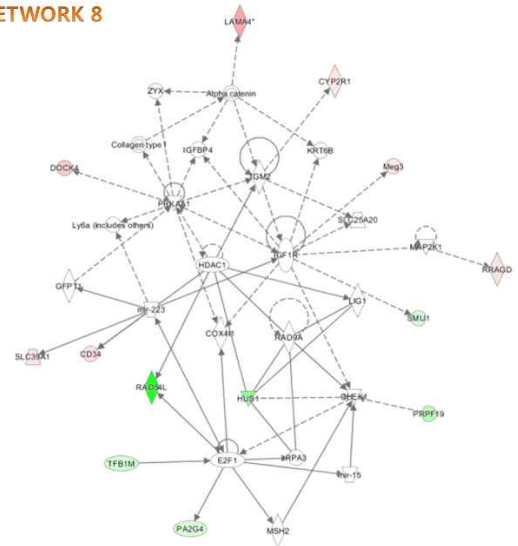
NETWORK 6



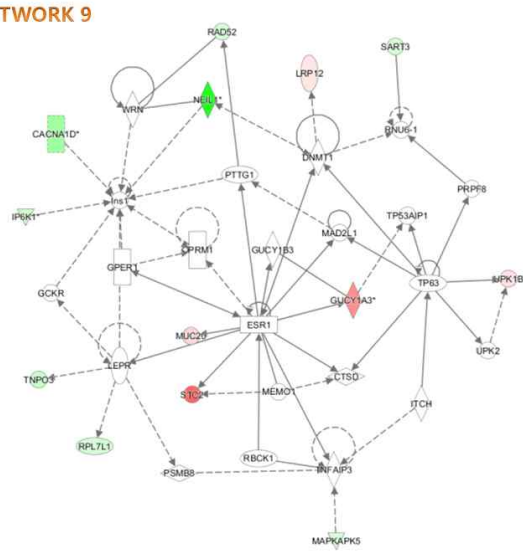
NETWORK 7



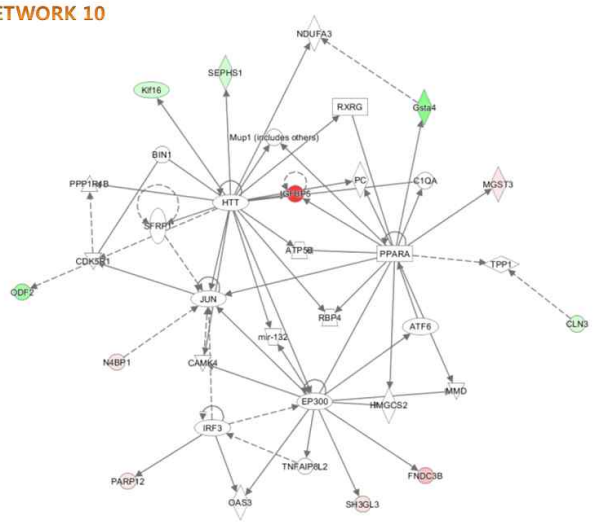
NETWORK 8



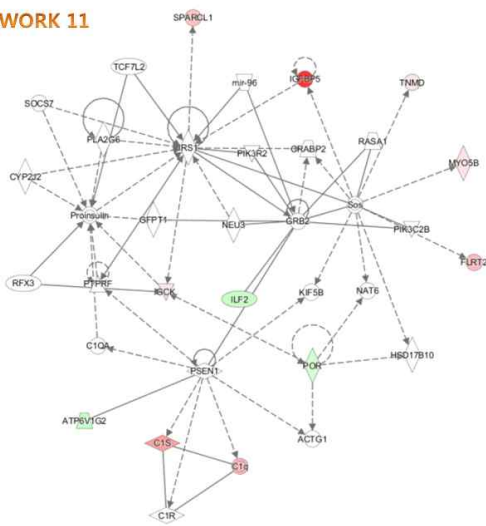
NETWORK 9



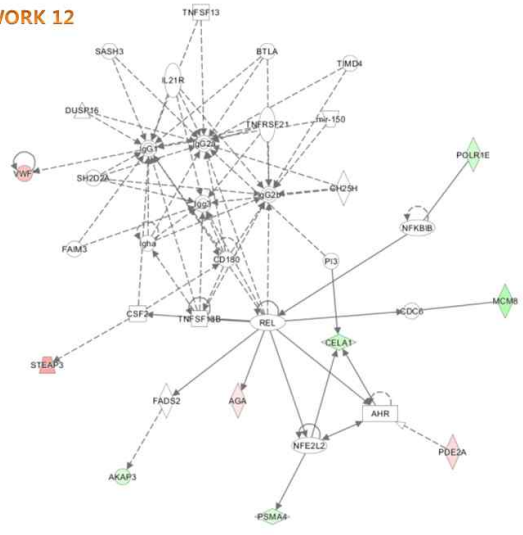
NETWORK 10



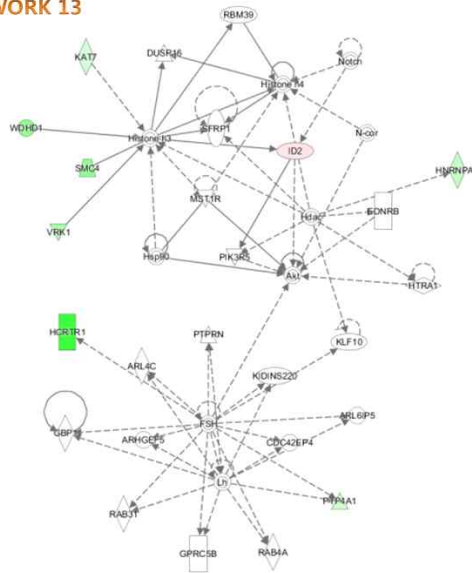
NETWORK 11



NETWORK 12



NETWORK 13



NETWORK 14



NETWORK 15



NETWORK 16



NETWORK 17



NETWORK 18

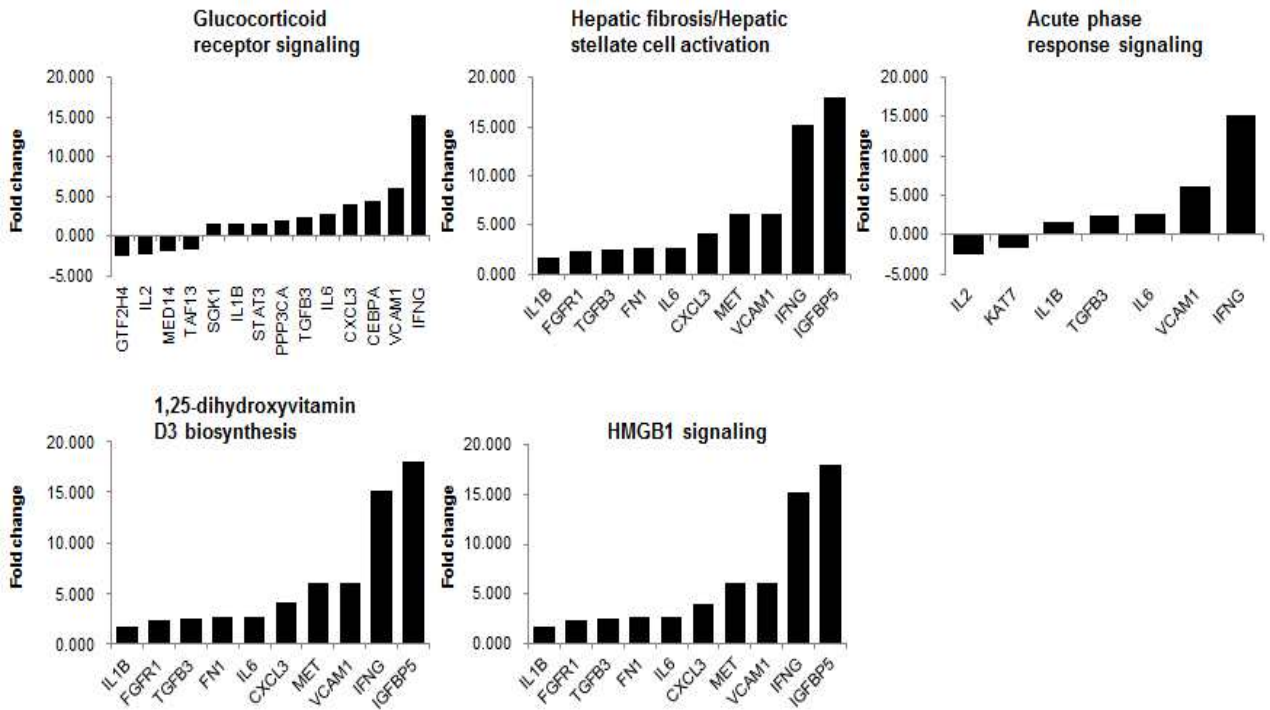


[그림 75] 각각의 network 모식도 (Network1-18)

[표 15] Canonical pathway 분석에 의한 기능 분석

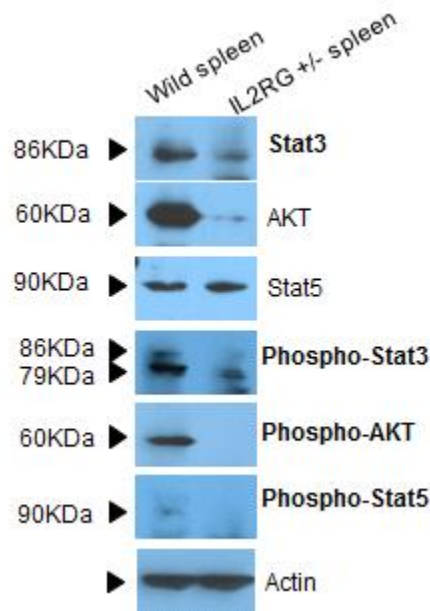
	p-value	#Molecules
Glucocorticoid receptor signaling	7.73E-06	14
Hepatic fibrosis/Hepatic stellate cell activation	1.50E-04	10
Canonical pathways Acute phase response signaling	2.22E-04	7
1,25-dihydroxyvitamin D3 biosynthesis	5.18E-04	2
HMGB1 signaling	6.81E-04	7

Canonical pathway 분석에 의하여 IL2RG KO pig의 경우 [표 15]에서와 같이 5개의 signaldp 관여하는 것으로 밝혀졌다. 이들은 통계적 분석에 의하여 최소 $p < 0.05$ 이하의 통계적 유의치를 보여 IL2RG signal에 중요한 역할을 수행하는 것으로 판단되었다. 이들 signal에 관련된 각각의 유전자 군의 발현 양상을 살펴본 결과는 [그림 76]과 같다.



[그림 76] Canonical pathway 분석에 의한 각 그룹의 signal에 관여하는 각 유전자군의 발현 양상 분석.

최종적으로 IL2RG의 소실에 의한 IL2RG의 downstream에 관여하는 유전자군의 발현 양상을 western에 의하여 분석한 결과는 [그림 77]과 같다. IL2RG의 소실은 결과 Stat-3 혹은 -5의 인산화 반응을 저해함으로써 각종 면역 기능에 관여하는 세포의 발달을 저해하는 것으로 도출되었다.



[그림 77] Western blotting에 의한 IL2RG KO (+/-) pig의 downstream regulation 분석⁷¹.

(3) 제 1과제 부록

[표 16] Summary of Studio pathway

Compare with Wild spleen	Relation	Type	CellType	Effect	Reference
UP	IFNG --+> IL2RG	Expression	Monocytes	positive	Schrader, S. et al., 2007 ⁷²
Up	IL2RG --+> CCL2	Expression	-	positive	Ozawa, A. et al., 2003 ⁷³
Up	IL2RG --+> IFNG	Expression	T-Lymphocytes, Helper-Inducer	positive	Sattler, A. et al., 2009 ⁷⁴
Up	IL2RG --+> JAK3	Direct-Regulation	-	positive	Hofmann, S.R. et al., 2004 ⁷⁵ ; Reichel, M. et al., 1997 ⁷⁶ ; Thomis, D.C. et al., 1997 ⁷⁷
Up	IL2RG --+> STAT1	Regulation	-	positive	Van der Pouw Kraan, T.C. et al., 2003 ⁷⁸
Up	IL2RG ---> IL9	Direct-Regulation	B-Lymphocytes, T-Lymphocytes, PBMCs, Leukocytes	unknown	Uribe, L. and Weinberg, K.I., 1998 ⁷⁹ ; Ettinger, R. et al., 2008 ⁸⁰ ; Behbod, F. et al., 2001 ⁸¹ ; Gu, X.X. et al., 2007 ⁸²
-	IL2RG --+> FLT3LG	MolTransport	T-Lymphocytes	positive	Chklovskaja, E. et al., 2001 ⁸³
ND	IL2RG --+> TRB@	Regulation	Thymocytes	positive	
Down	IL2RG --+> IL7	Direct-Regulation	T-Lymphocytes, B-Lymphocytes, PBMCs, Leukocytes	positive	Uribe, L. et al., 1998 ⁷⁹ ; Ettinger, R. et al., 2008 ⁸⁰ ; Noguchi, M. et al., 1993 ⁸⁴ ; McElroy, C.A. et al., 2009 ⁸⁵ ; Kondo, M. et al., 1997 ⁸⁶
Down	IL2RG --+> LTB	Regulation	B-Lymphocytes	positive	Mebius, R.E. et al., 1997 ⁸⁷
Down	IL2RG --+> BCL2	Expression	T-Lymphocytes	positive	Li, W. et al., 2007 ⁸⁸ ; Plunkett, F.J. et al., 2001 ⁸⁹
-	IL2RG ---> CD8A	Regulation	Thymocytes, T-Lymphocytes	unknown	Borthwick, N.J. et al., 2000 ⁹⁰ ; Pérez-Andres, M. et al., 2006 ⁹¹
Down	IL2RG --- ABL1	Regulation	Stem Cells	negative	Gregory, M.A. et al., 2010 ⁹²

[表 17] Primers list for Real-Time RT-PCR

Gene		Primer sequence
IL2Ralpha	Forward	AAA TGC CAC GTT CAA GAT CC
	Reverse	GTT TCC CCT GCA GAT CAT GT
IL2Rbeta	Forward	TCA CCA ACC AGG GYT ACT TC
	Reverse	CAG CAG GYC ATC CCT GGY C
IL2Rgamma	Forward	GAC CAC TGT TTG GAG CAC CT
	Reverse	CCT TTA TCC CCA CTT GCT CA
GATA3	Forward	ACA GAC CCC TGA CCA TGA AG
	Reverse	GGA GAT GTG GCT GAG AGA GG
EOMES	Forward	ACT GGT TCC CAC TGG ATG AG
	Reverse	GCA ATG AAC TGC GTT TCT GA
NKp30	Forward	ATC CTG TGC TCT CTG GGT GT
	Reverse	GTC CCA TTC CTC ACC TCC TT
ETS1	Forward	CCT CCT ACG ACA GCT TCG AC
	Reverse	AGA AAC TGC CAC AGC TGG AT
MCM4	Forward	CGA CGA GTT CGA CAA GAT GA
	Reverse	GGC AGC TGG ATG TTT TCA AT
TBX21	Forward	GGA CCC AAC TGT CAA TTG CT
	Reverse	TCA TGC TGA CAG CTC GAA AT
CX3CR1	Forward	TGG ATG AGG CTC AGA CAC AG
	Reverse	CCA TCC CAA AGG AAG TCT GA
PU.1	Forward	GGA TCT CTA CCA ACG CCA AA
	Reverse	ACT CTG CAG CTC CGT GAA GT
E2A	Forward	TTC CTT CCA GGT TGG TTC AG
	Reverse	ACA TGT CTC TAG CGG GGT CA
EBF1	Forward	TTG GGA TTC AGG AAA GCA TC
	Reverse	AGT TGG ATT TCC GCA GAT TG
BCL6	Forward	GCA ATT TCC CAA ACA TGG AG
	Reverse	TCG TTT GTG AAC TCC ACC AG
STAT3	Forward	AGC TGC ACC TGA TCA CCT TT
	Reverse	AGT TCA CGT TCT TGG GGT TG
T-bet	Forward	GGA CCC AAC TGT CAA TTG CT
	Reverse	GCT GAG GGC AGA AAT GTA GG
BLIMP1	Forward	TTC AAT TGT GAG CCA AAC CA
	Reverse	GGT CTC CAC CTT TGT TCC AA
STAT4	Forward	ACC ATT CGC TGA CAT CCT TC
	Reverse	TCC CCT TTC TGT TGG TCT TG
Bmi1	Forward	AGG TGT TCC CTC CAC CTC TT
	Reverse	TAC GGA CGA TTT TCG AGG TC
MBD2	Forward	GAG ACT GCG GAA TGA TCC TC
	Reverse	TGA CGT GGC TGT TCA TTC AT
XBP1	Forward	ACT GCC AGA GAC CGA AAG AA
	Reverse	CCA AGC GCT GTC TTA ACT CC
ABL1	Forward	CAG AAT AGG GGA AAG GCA CA
	Reverse	GCT GCC TCT TTG ATG GAC TC
CD8a	Forward	CAA GCT GTC CCT GGC TCT AC
	Reverse	TGT CAT TGG CCT TGT AAC CA
FLT3LG	Forward	GAT GGG ACA GCT CAA GAC

	Reverse	AAG ACT ATC TCG GTG TTG AC
IL7	Forward	CAA CTG CAC CAG CAA GGT TA
	Reverse	GAA ACA CAA GTC CCC CTG TC
LTB	Forward	CGT TAA TAT CAG TCA CCC CGA T
	Reverse	TCC TCA GCC CAC CAT CAC
CCL2	Forward	TGC TGC TAT ACA CTT ACC
	Reverse	TGC TTC TTT AGG ACA CTT
IFNG	Forward	TAA CCA GGC CAT TCA AAG GA
	Reverse	TTC AGT TTC CCA GAG CTA CCA
STAT1	Forward	AGC AAG CGT AAC CTT CAG GA
	Reverse	GAA TCT CTG GGC ATT TTC CA
JAK3	Forward	CTC TCC CCA GCT GTG ATT TC
	Reverse	AGG AAA ATG AGC GTG TTT GG
CEACAM1	Forward	AAC CCA GAA CCC AGT GAG TG
	Reverse	CTC TGC GAG CAG TAG GCT CT
PTEN	Forward	TAT CAA GAG GAT GGA TTC G
	Reverse	TTG GCG GTA TCA TAA TGT
HIFa1	Forward	TGC TCA TCA GTT GCC ACT TC
	Reverse	TCC TCA CAC GCA AAT AGC TG
IL2	Forward	ACC TCA ACT CCT GCC ACA AT
	Reverse	TGA AGT AGG TGC ACC GTT TG
IL13	Forward	TGG CCC AGT TCG TAA AAG AC
	Reverse	CCC CAG TGA GTT CCT GAC AT
CD4	Forward	TTC CAC TGC TGT CTC TTG
	Reverse	TAC CAG GCA TCT GTG ACT A
GNRH1	Forward	AGC CAA CAC TGG TCC TAT GG
	Reverse	CTT TGG CCA TCT CTT GGA AA
IL4	Forward	GCA TGT ACC AGC AAC TTC
	Reverse	CTG TGA GAA TGT TCA AGG TT
DNM1	Forward	TGC AAG GGG AAG AAA TTC AC
	Reverse	TGG AGA GAT TCC CTT GTT GG
DNM2	Forward	GCT CGG TTT GAC CAC TGT AAG
	Reverse	ACC AGA AGC GTC TTC CCT TTA
CD5	Forward	TCA AGA GCC AGA CCC TCT GT
	Reverse	AGA AGG TCA CAT CCG TGG TC
IL21	Forward	GCC CAT AAA TCA AGC TTC CA
	Reverse	CAG CAA TTC AGG GTC CAA GT

[표 18] Antibodies list for immunohistochemistry

Primary antibodies	Host	Dilution	Source
IL-2R α	Mouse	1/100	Santa Cruz Biotechnology,
IL2R γ	Rabbit	1/200	Bioss
CD3	Mouse (LN10)	1/50	Leica Biosystems
CD4	Rabbit	1/100	LSbio

CD8	Goat	1/100	LSbio
CD20	Mouse(MJ1)	Predilution	Leica Biosystems
CD21	Mouse(2G9)	Predilution	Leica Biosystems
CD79a	Mouse(11E3)	Predilution	Leica Biosystems
CD56	Mouse(1B6)	1/100	Novocastra
CD25	Mouse(4C9)	predilution	Leica Biosystems
CD1d	Mouse	1/100	Santa Cruz Biotechnology,
CD44	Mouse	1/100	LSbio
CD335	Rabbit	1/100	Bioss
FOXP3	Rabbit	1/100	Abcam

[表 19] Primer set lists for off-targeting analysis of IL2RG KO pigs

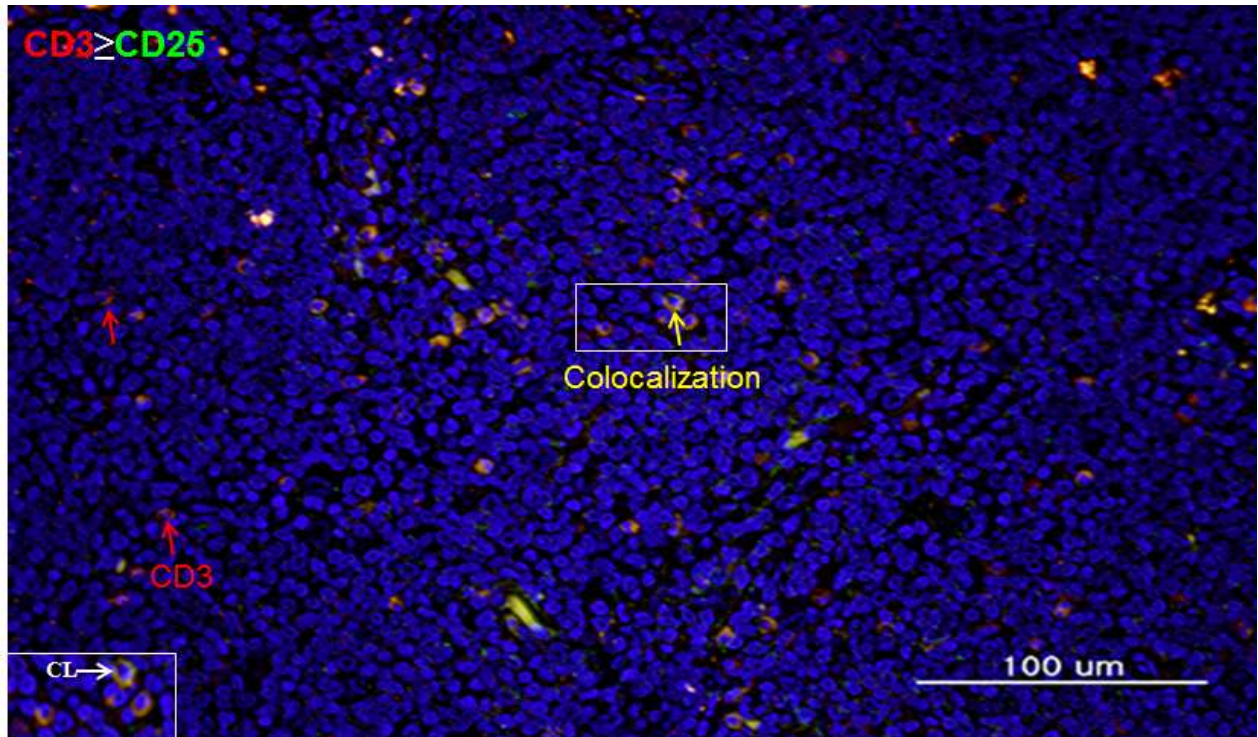
Gene	Primer	sequence
LRRIQ1	Forward	CGTTTGTTAAAACCTGCAGCATA
	Reverse	TTTTGCTTCCCTTTCCTTCC
BNC2	Forward	AGCCAGAGGAAGGGGTTTTA
	Reverse	GTTAACCAGCTCAGGCAAC
SLC17A5	Forward	GTCTGGTTGCAGCTCAAGGT
	Reverse	GCCACTGTGGACTCTAGAGGAT
ZNF334	Forward	ATTCACACAGGGGAGAAACG
	Reverse	GTGGAAATTTTCCCCCATT
TTN	Forward	CTTTGGACCTGCCACTTT
	Reverse	GGATGTGTGATCGGTTCCAT
PGRMC2	Forward	TGAGGGAGAGAGGAGACCTG
	Reverse	CTAGGGGAAGGAAAGGGATG
AVPR2	Forward	GGCGTACATGCCTACCATCT
	Reverse	CTGTCCACGGTCTTTGTGG
CCDC18	Forward	TTCTCCCAACCCATTACA
	Reverse	CCTGAGTTGAACCAGCACCT
ZSWIM2	Forward	AAAAAGTTCTTCCTGTTTTGACAGA
	Reverse	TGGTTATTCCACCAATGCAA

[表 20] Primer set lists for IL2RG KO pig analysis

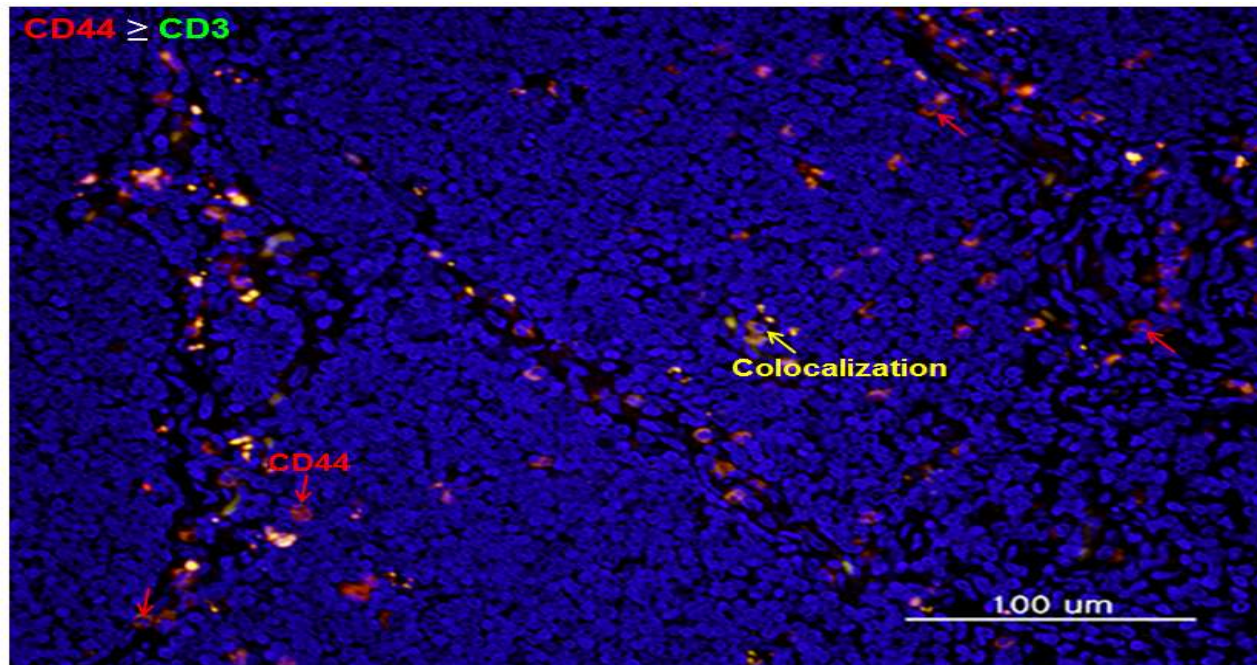
Gene		Primer sequence
IL2RG	Forward	CTGGACTATTAGAAGGATGTGGGC
	Reverse	ATATAGTGGGAAGCCTGGGATGGCT

[表 21] Disorder of psychology

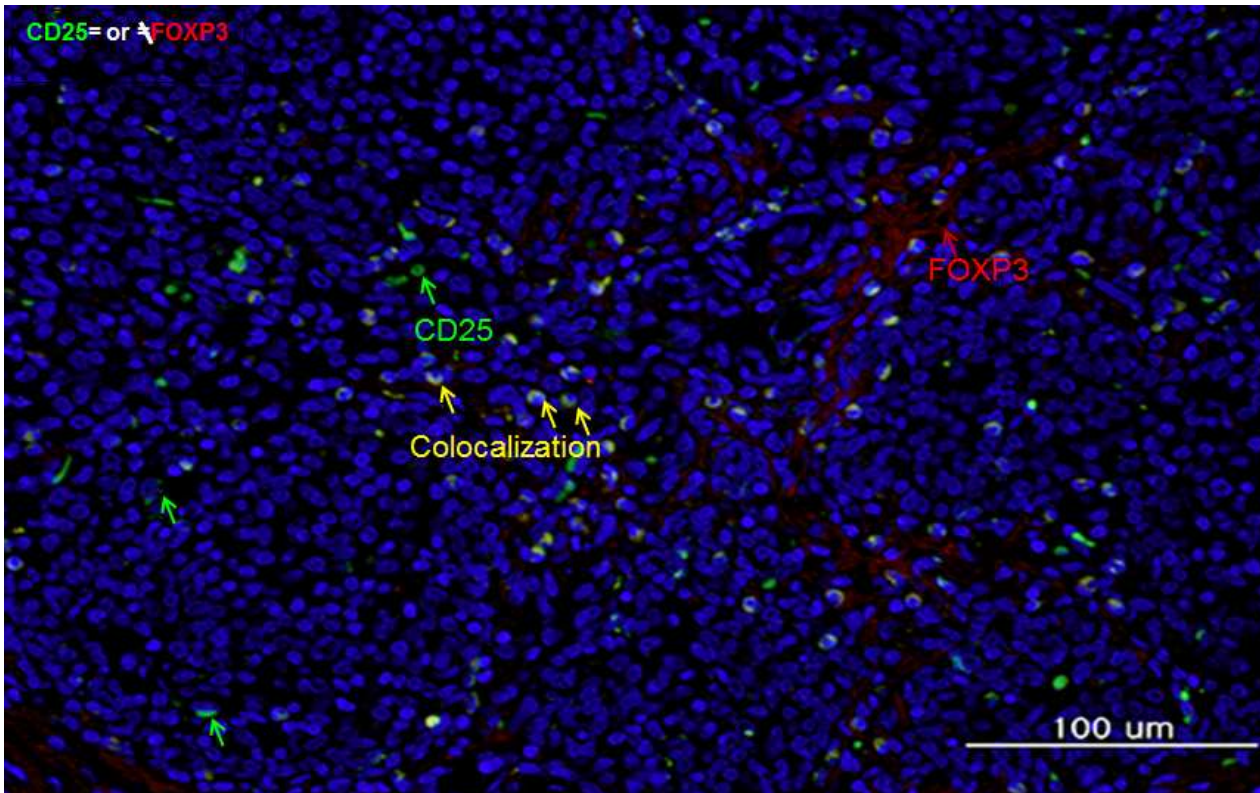
		IL2RG_thymus/wild_thymus. fc	IL2RG_spleen/wild_spleen.fc
1	BCL11B	-12.030076	1.175118
2	TUBA1B	-4.609061	1.031672
3	SLC2A1	-4.045956	1.054225
4	BCL6	-2.847671	1.396605
5	HP	3.476576	4.721939
6	CCL5	5.06117	-1.166256
7	CSRP2	5.270091	2.082456
8	RGS4	5.336996	-1.02966
9	GJA1	5.624224	1.229369
10	CAV1	6.003806	1.262483
11	SNCA	6.407792	1.165487
12	PPARG	6.491323	-1.1796
13	APOD	11.235256	1.041562
14	IGF1	17.83542	-1.383096
15	SLIT2	25.734063	-1.769722



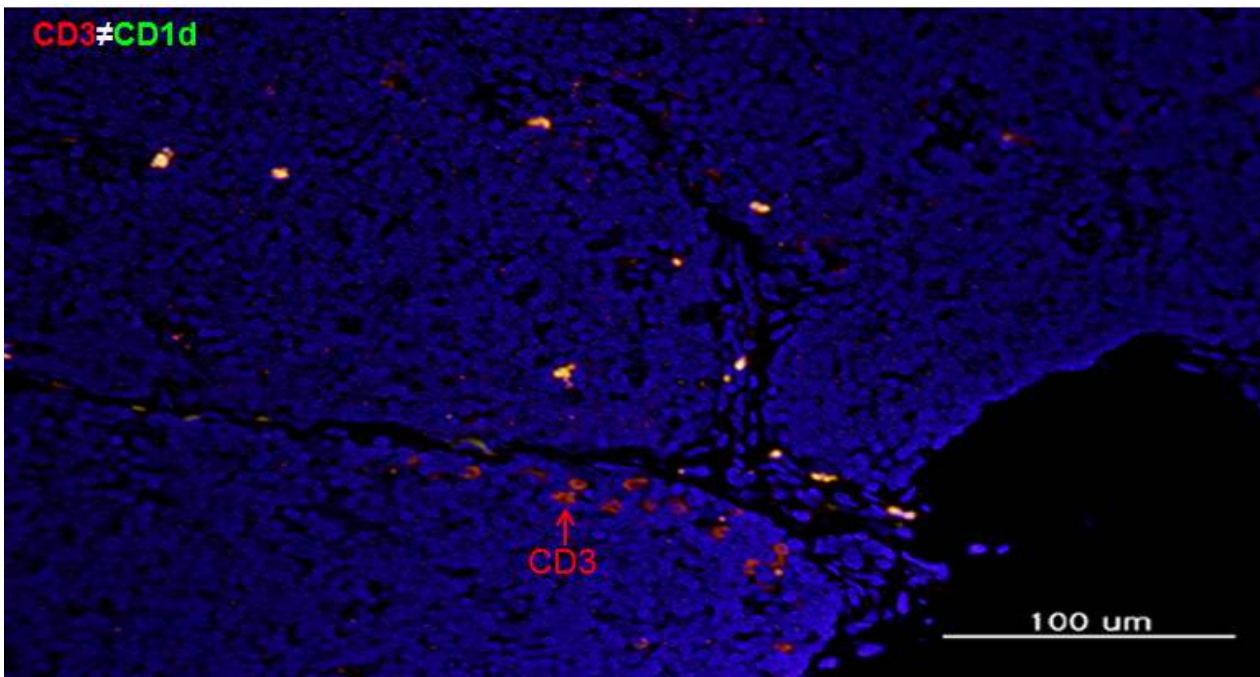
[그림 78] Colocalization of CD3 and CD25 in IL2RG KO pigs



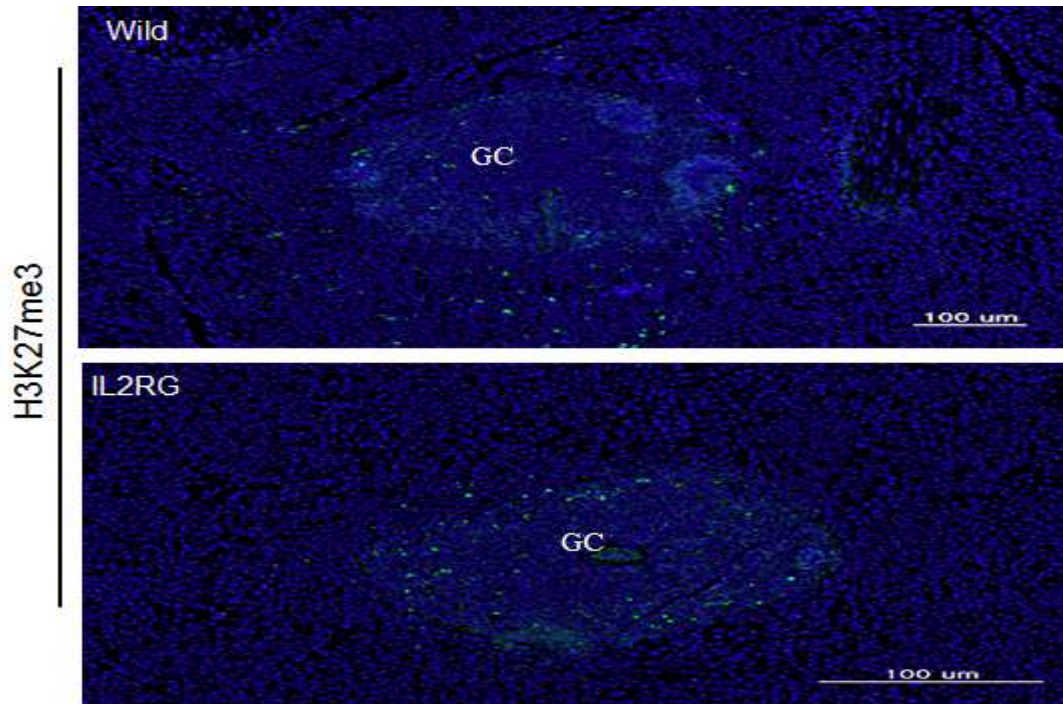
[그림 79] Colocalization of CD44 and CD3 in IL2RG KO pigs



[그림 80] Colocalization of CD25 and FOXP3 in IL2RG KO pigs



[그림 81] Colocalization of CD3 and CD1d in IL2RG KO pigs⁷¹



[그림 82] Comparison of H3K27me3 expression in IL2RG KO and wild pigs. GC indicates germinal cells in spleen. Of note, H3K27me3 expression in IL2RG KO pig is localized in GC, whereas H3K27me3 expression in wildtype pig is localized in several areas including GC.



[그림 83] IL2RG KO pig의 생산 및 성장 도중 사망

총 4마리의 KO pigs이 추가적으로 생산되었으며, 이 중 hemizyote (male)은 약 28일 후 사망했다. 사망한 조직의 외관상 특별한 징후는 없으나, 사망시 체온 측정 온도가 44도를 나타 낼 정도로 고열에 시달렸다 [그림 84].

[2015년 6월 30일 초음파 사진]



[2015년 7월 28일 초음파 사진]



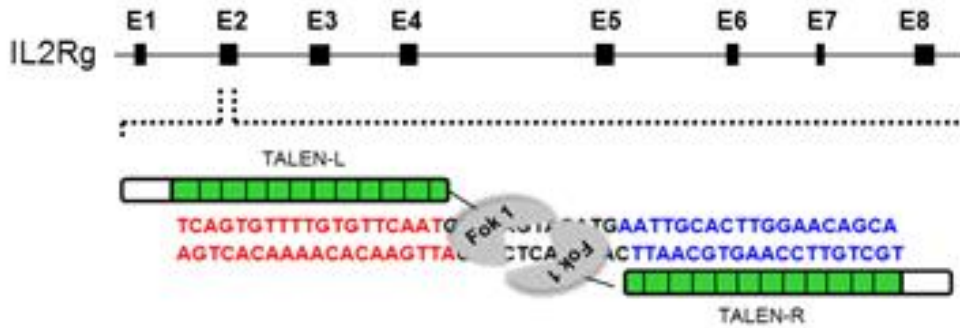
[그림 84] IL2RG KO female pig의 임신 초음파 사진 (현재 임신 약 60일 정도임)

2. 제 2 협동 연구수행 내용 및 결과

- 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 복제돼지를 이용한 사람 줄기세포 생체이식
- 돼지 골수조직에의 사람 줄기세포 생체이식 기술 확립

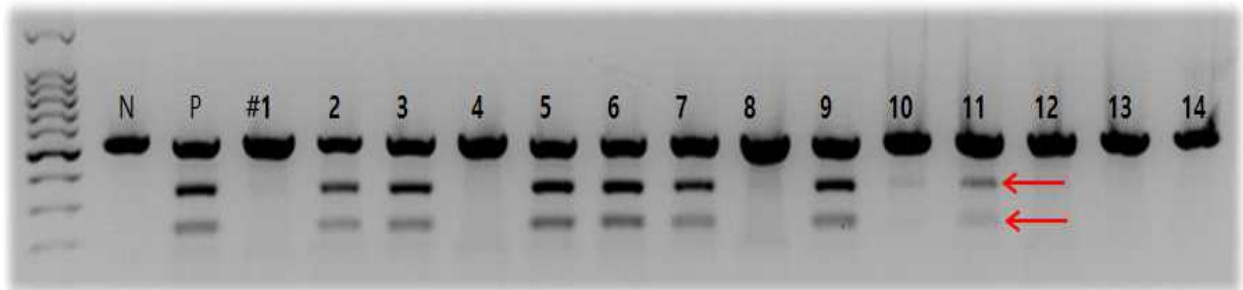
가. IL2RG KO mouse 생산

IL2RG 유전자가 적중된 면역결핍돼지에 이식 전 SCID 실험모델동물인 IL2RG 유전자가 결핍된 마우스에서 사람줄기세포의 생착 여부를 살펴보기 위해 Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)을 이용하여, 생쥐의 전핵에 미세주입후 대리모에 이식함으로써 IL2G KO mouse를 먼저 생산하였다. IL2rg KO mice생산을 위하여 사용된 TALEN vector 모식도는 [그림 85]와 같다.



[그림 85] IL2RG KO 생쥐 생산을 위한 TALEN vector 모식도

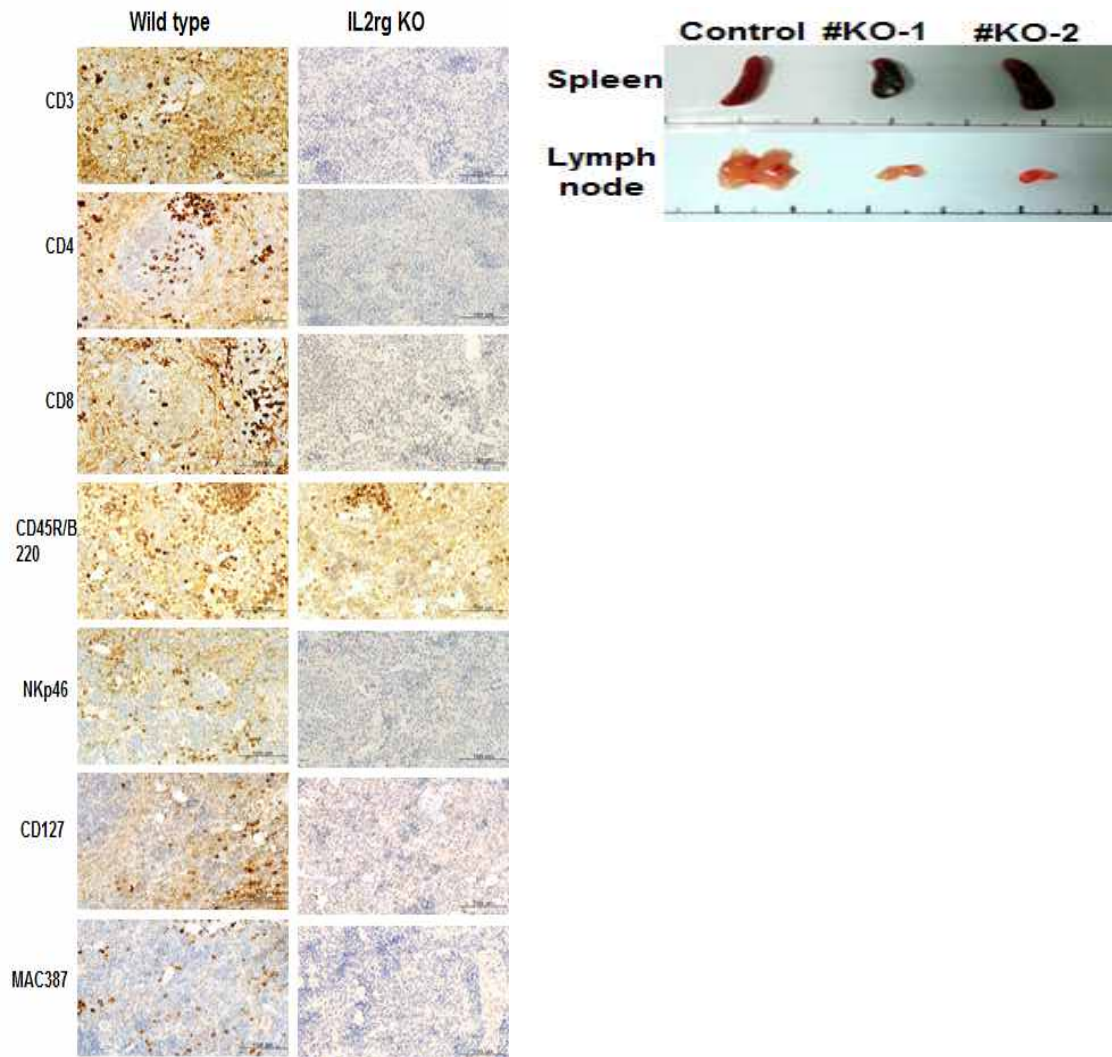
IL2rg KO mice을 증명하기 위하여, 전기영동으로 확인한 결과는 [그림 86]과 같다. 약 30-40%의 비율로 KO비율을 보였으며, 대부분이 heterozygote로 판정되었다. Hemizygote (-/y)는 heterozygote male x heterozygote female을 교배에 의하여 또는 직접적으로 생산되었다. 이들 SCID mouse는 돼지와는 달리 흉선 (thymus)과 spleen(비장)은 정상적으로 가지고 있었지만, 흥미로운 사실은 대조군에 비하여 적은 lymph node를 보였다[그림 87]. 이러한 관찰은 IL2rg KO mice는 적어도 성숙 NK세포는 잘 발달이 될 수 없음을 시사한다.



[그림 86] IL2RG KO 생쥐 검정. 붉은 화살표를 가진 개체는 KO mouse

그림 86에서 나타난 바와 같이, T cell biomarkes (CD3, CD4, CD8), B cell biomarkers (CD45R/B200), NK cell biomarkers (NKp46, CD127), macropgage (MAC 387)의 항체를 이용하여 대조군과 IL2rg mouse의 spleen에서 검정한 결과 약간의 성숙 B 세포군을 보였으나 [그림 87, 왼쪽], T-, B-cells은 존재하지 않았다.

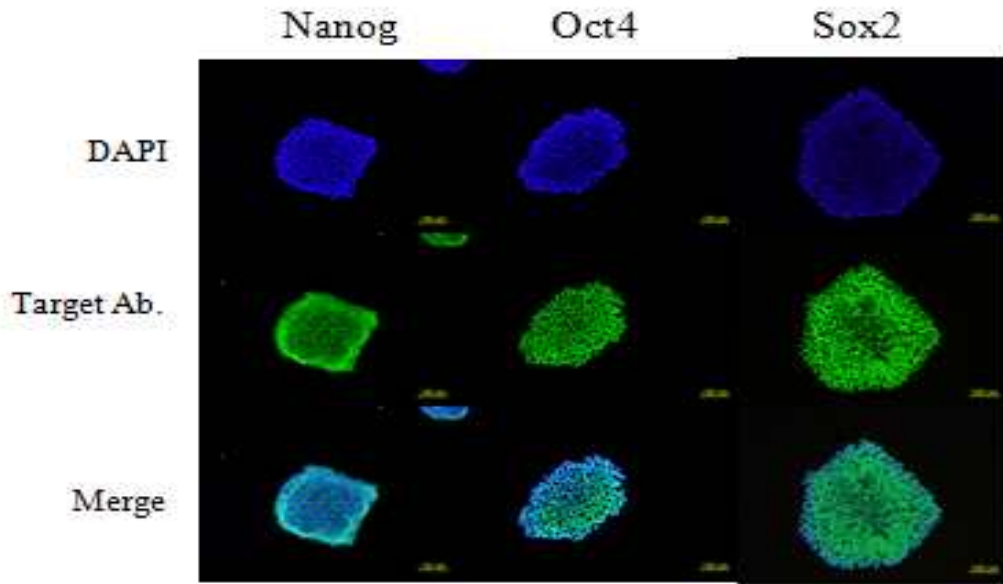
특히 NK세포가 성숙하는데 절대적으로 필요한 lymph node [그림 87, 오른쪽]는 대조군에 비하여 조직학적으로 매우 왜소하여, NK세포의 성숙 환경이 이루어 질수 없음을 시사하였다.



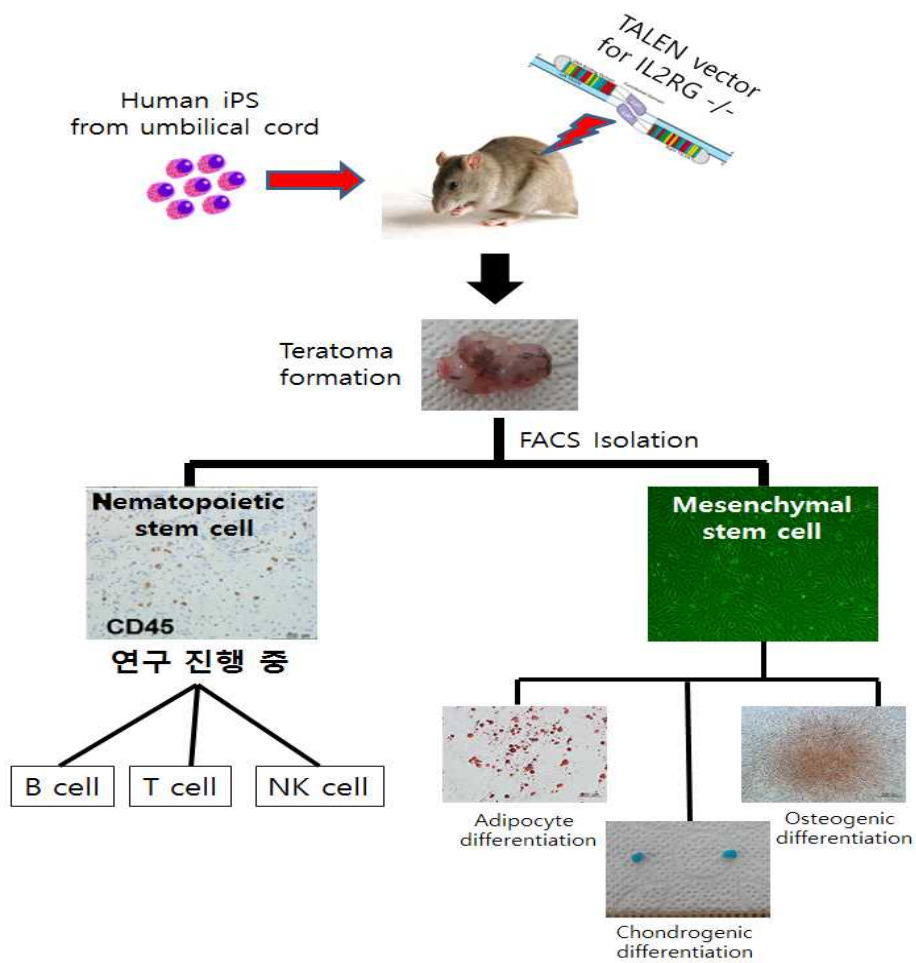
[그림 87] IL2RG KO 생쥐에서의 T, B, NK세포의 검정(왼쪽)과 lymph node(오른쪽)발달

[그림 88]에서 나타난 사람 IPS세포를 [그림 89]에서 나타난 마와 같이 IL2rg KO mouse 주입하여 teratoma를 형성시킨 후, 이들 teratoma로부터 flow cytometry를 사용하여 hematopoietic stem cells과 mechenchymal stem cell을 분리하였다. 이들 분리한 세포를 이용하여 면역 담당세포 (T, B, NK세포)로 분화 또는 adipocyte, chondorcyte, osteocyte로 분화를 유도하였다. 그 결과 면역 세포(T, B, NK)의 분화는 성공적으로 in vitro에서 유도 할 수 없었지만, 보모세포인 mechenchymal stem cell은 adipocyte, chondorcyte, osteocyte로 분화를 성공적으로 유도하였다.

면역 세포(T, B, NK)로의 분화 실패는 현재의 배양 시스템이 개발되어 있지 않아 분화 유도에 실패하였으나, mechenchymal stem cell의 분화 성공은 분화 유도 시스템의 개발이 되어 있어 가능한 것으로 이들 분화능과는 무관 한 것으로 사료된다. 특히 이들 조혈모세포를 in vivo에 세포 이식할 경우 이들이 정상적으로 발달 가능성을 시사하여, 금후 이들 결과를 폐지에 응용 시 매우 높은 효율로 성공 가능성을 시사하였다.



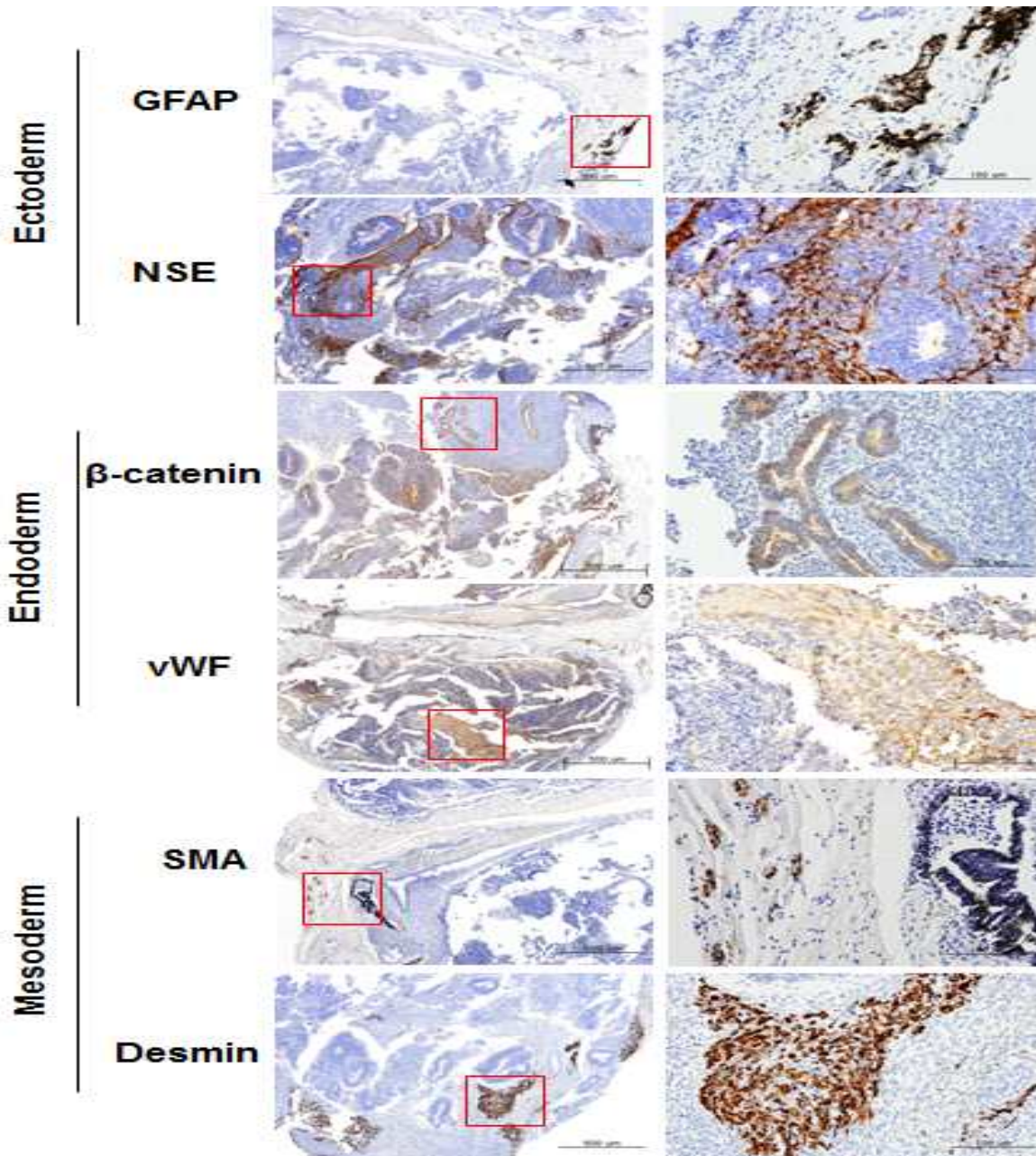
[그림 88] 사람 IPS세포의 다능성 검증. Nanog, Oct3/4, Sox2의 positive signal로 유추하여 이들 세포는 최소한 다능성을 보유함을 시사하였다.



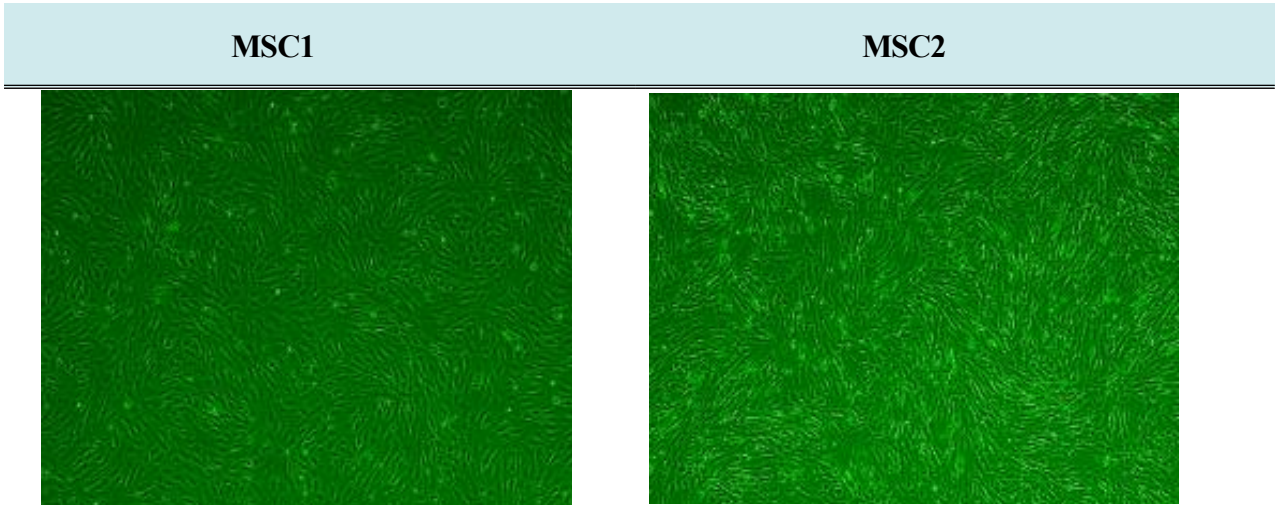
[그림 89] IL2RG KO 생쥐에서의 사람 조혈모세포와 보모세포의 발달 (in vivo)후 in vitro에서

최종 면역세포의 분화 유도

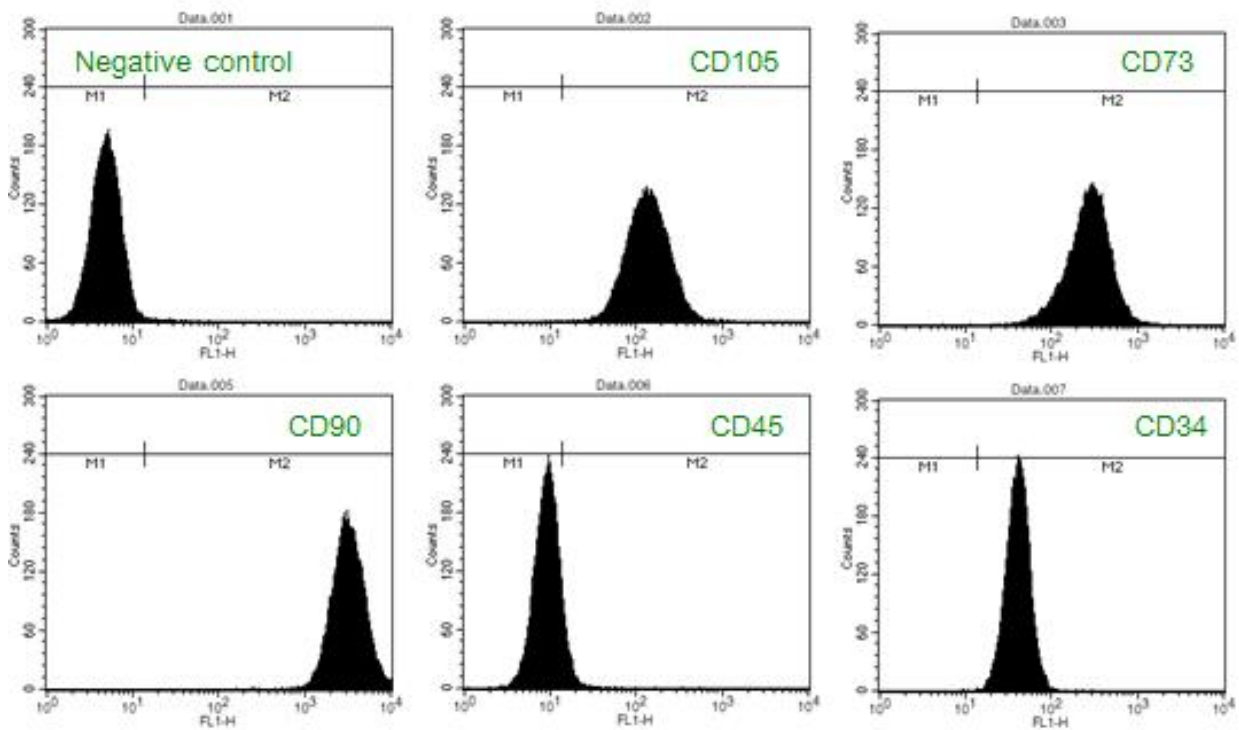
나. 2 협동 과제 연구 부록



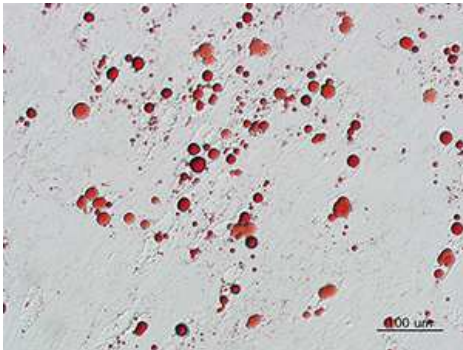
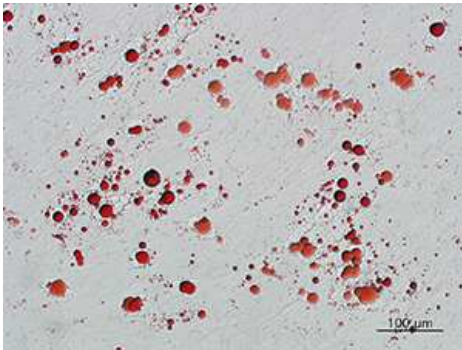
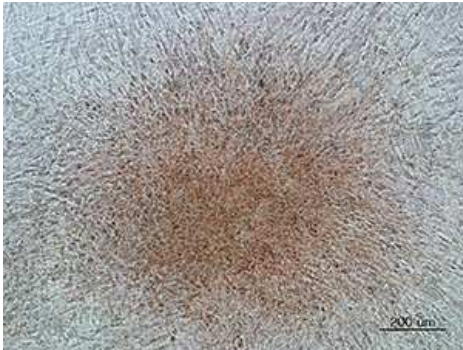


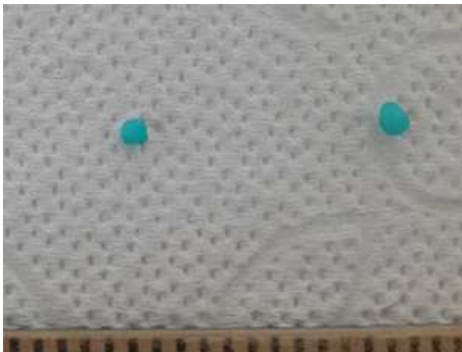
[그림 90] IL2RG ^{-/-} KO 마우스에서 teratoma 형성. a) IL2RG에 형성된 teratoma b) PCR을 이용하여 human specific mitochondrial mitofusin (MFN1)으로 확인, PCR 크기는 236bp. P: genomic DNA from human iPSC. N: genomic DNA from B6 mouse. T1: genomic DNA from the IL2RG KO-derived teratoma 1. T2: genomic DNA from the IL2RG KO-derived teratoma 2



[그림 91] 형성된 teratoma 특징 분석. endoderm markers : GFAP, NSE, Endoderm markers:beta-catenin, vWF, Mesoderm markers:SMA, Desmin



[그림 92] Human MSC positive 와 negative marker를 이용한 분석. 이와 동시에, MSC positive markers로 알려진 CD105, CD73, CD90, CD34 그리고 MSC negative marker인 CD45를 이용하여 분석을 하였다.

	MSC 1	MSC 2
Adipocyte differentiation	 <p>Oil Red O stain</p>	 <p>Oil Red O stain</p>
Osteogenic differentiation	 <p>Alizarin Red S stain</p>	 <p>Alizarin Red S stain</p>
Chondrogenic differentiation	 <p>Alcian Blue stain Chondrogenic differentiation of MSC in 3D spheroid culture</p>	 <p>Alcian Blue stain Chondrogenic differentiation of MSC in 3D spheroid culture</p>

[그림 93] human MSC 분화 결과

정상적인 MSC 특색을 가지고 있는 이 세포로 분화유도를 해보았다. MSC는 adipocyte, osteogenic, chondrogenic으로 분화되는지를 검정한 결과, 각각의 분화유도 배양액에서 2-3주 정도 분화유도를 한 뒤, 각각의 마커를 이용하여 cytology를 진행하였다. adipocyte는 oil red o stain으로 확인을 진행하고, osteogenic cells은 Alizarin red s stain으로, 마지막으로 chondrocyte는 Alcian blue stain으로 검증하였다.

제 5절 5차년도 연구 수행 내용 및 결과

1. 제 1세부 연구수행 내용 및 결과

Interleukin-2 receptor subunit gamma (IL2RG) 유전자는 Cytokine receptor common subunit gamma로써 X chromosome에 존재 하고 있다. IL2RG유전자가 knock out이 되게 되면 X-linked severe combined immunodeficiency을 비롯하여 X-lined severe combined immunodeficiency (XSCID)와 같은 면역 결핍성 질환이 나타나게 된다. 현재 개발하여 보유하고 있는 IL2RG KO miniature pig는 자연교배와 인공수정을 통하여 개체 증식을 하는 과정 중에 있다.

가. IL2RG 증식현황

현재 보유중인 IL2RG KO 돼지외에도 추가적인 생산을 위해서 지속적인 scNT를 진행하고 있다. scNT를 진행하는 전체적인 과정은 다음 [표 21]과 같다.

[표 21] scNT 스케줄

	내용
Donor cells	IL2RG cells (#53-1 cell line)
대리모 준비방법	임신통의 강제 유산 - 금요일 (PGF-2 α 3 ml injection, 루텔라이스) - 일요일 (PMSG 2000 IU + PGF-2 α 1ml injection) - 수요일 (hCG 2000 IU injection) - 금요일 (ET)
수술 시 처치 약품	1 st : stressnil 10 cc IM 2 nd : Zoletil 3 cc + Xylazine 7 cc IV(이정맥) 3 rd : 수술 후 톨피드 10 cc IM

작년 연말부터 현재까지 총 11번의 scNR가 진행이 되었으며 그에 대한 기록은 다음 [표 22]와 같다.

[표 22] scNT 진행 사항 및 결과

Recipient (ET data)	Donor cells	No. Of embryos	Day of heat /pregnant	Results
#1 2015/11/27	IL2RG cells (#53-1 cell line)	218	o/x	임신안됨
#2 2016/1/29		362	o/o	임신, 2016년 4월 4일 태아 유산
#3 2016/4/8		249	o/o	임신, 유산
#4 2016/4/15		272	o/o	임신,

				2016년 5월 20일 태아 유산
#5 2016/4/22		235	o/o	임신, 중간 유산
#6 2016/4/29		282	o/o	임신
#7 2016/5/13		252	o/x	임신안됨
#8 2016/6/11		320	o/o	임신, 유산
#9 2016/8/5		167	o/x	임신안됨
#10 2016/11/4				2016년 10월 7일 AI
#11 2016/11/18				2016년 10월 10일 AI

scNT의 recipient 의 상태는 다음 [그림 94]와 같이 1등급의 대리모 상태를 나타내고 있다.

대리모 번호	오른쪽 난소	왼쪽 난소
#2 (2016년 1 월 29일 대 리모)		
#5 (2016년 4 월 22일 대 리모)		
#5 (2016년 4 월 29일 대 리모)		

[그림 94] 대리모의 좌우 난소의 상태

R: 배란전 (대란포 다수 존재), L;배란중 (3개) 및 배란직전 난포 다수

대리모에 이식을 한 뒤에 27일째에 처음 초음파로 임신 여부를 확인한 결과는 아래 [그림 95]에 정리하였다. 모든 임신 초음파 결과를 정리 할수 없어서 대표적으로 2016년 1월 29일에 진행한 대리모의 결과를 정리하여 나타내었다.

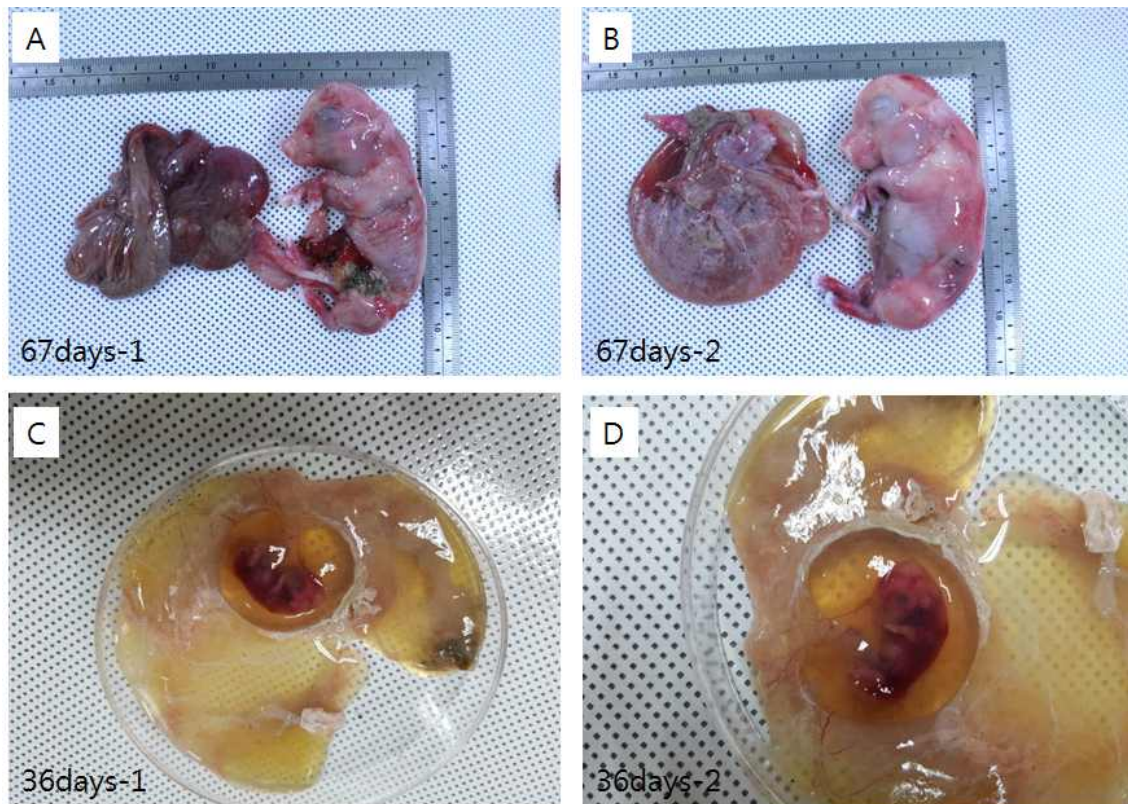
날짜	초음파 사진
2016년 3월 4일 (수요일)	
2016년 4월 4일 (수요일)	
2016년 3월 30일 (수요일)	

#2번째에 진행한 scNT의 대리모는 4월 4일 에 유산을 하였으며, 태아는 67일령이었다.

날짜	초음파 사진
2016년 2월 25일 (27일)	

[그림 95] 임신 날짜별 초음파 사진

그리고 4월 15일에 진행한 scNT의 대리모는 임신 36일령에 유산을 하였다. 사산 및 유산된 태아는 아래 [그림 96]과 같이 회수되었으며, 분석을 위하여 일부 조직은 보관을 하고 있다.



[그림 96] 대리모의 유산

A) 67일째 유산된 태아 B)36일째 유산된 태아

지난 4월 29일에 진행한 scNT에서는 대리모의 임신이 확인이 되었고 정상 출산 [그림 97]이 되었다. 총 4마리의 산자가 생산이 되었으며, 비외과적 무균화 과정중에 3마리의 산자가 사망하였으며, 총 1마리가 무균화에 성공하여 현재 건국대학교 무균화시설에서 사육되고 있다.



[그림 97] 태어난 돼지의 태반 과 돼지

나. IL2RG KO 돼지의 사육

성체 IL2RG KO mono-allelic KO pig는 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 광주기 08:00 ~ 20:00(L)·20:00 ~ 08:00(D)인 실내 사육장에서 사육 및 관리가 되고 있다. 사료는 하루 1번 0.9kg 씩 급이 하고, 식수는 항상 공급 하고 있다.



[그림 98] 실내 돼지 사육실 사육 환경

돼지의 발정 주기는 16일의 황체기와 5일의 난포기로 구성된 21일이다. 또한 계절에 관계없이 연중 계속적으로 발정이 반복적으로 오는 동물로 알려져 있다. 발정의 징후로는 외음

부가 팽대해지며 충혈 되고, 음부에서 유백색의 점액물질을 관찰할 수 있게 되며, 수태지의 승가를 허용하며, 사람이 손으로 등 아래 부분을 눌러도 움직이지 않고 허리를 펴는 행동을 보이게 된다. 발정의 지속시간은 평균 58시간으로 알려져 있다.

현재 시설에서 보유하고 있는 IL2RG KO 돼지의 경우 일반적인 상태에서 발정이 잘 관찰 되지 않고, 발정 중에도 수태지의 접근을 허락하지 않는 행동을 보였으며, 수태지에게 공격성 또한 보였다. 따라서 IL2RG KO 돼지의 증식을 위하여 발정 동기화 및 과배란을 유도한 후 인공수정을 실시함으로써 산자를 얻을 수 있었다.

다. IL2RG KO 돼지의 산자 확인.

인공 수정 진행 30일 후 초음파로 임신여부를 확인 하였으며, 114일 후 출산이 진행되었다. 총 5두의 산자를 얻을 수 있었고, 출산 당시 샘플링한 탯줄에서 genomic DNA를 추출하여 genotyping을 진행 하였다.

[표 23] Primer 정보 및 PCR 조건

Primer	Primer seq		
IL2RG-F	TCAGTGTTTTGTGTTCAAT		
IL2RG-R	AATTGCACTTGGAACAGCA		
IL2RG-Sequencing	CCTCCCCACTTCATTTTCT		
PCR 조건			
1.	95℃	3분	35cycle.
2.	95℃	30초	
3.	60℃	30초	
4.	72℃	30초	
5.	72℃	7분	

genotyping 결과 총 2두의 IL2RG Hetero piglets을 확인 할 수 있었다.

[표 24] 산자 IL2RG genotyping 결과

Ear taq.	IL2RG Seq.
#1	GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCAGCTCT GTTTTGTGTTCAATG-----CACTTGGAACAGCAGCTCT
#2	GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCAGCTCT GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCAGCTCT
#3	GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCAGCTCT GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACTTGGAACAGCAGCTCT
#4	

	<p style="text-align: center;"> GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACCTTGGAACAGCAGCTCTI GTTTTGTGTTCAATG-----CACCTTGGAACAGCAGCTCTI </p>
#5	<p style="text-align: center;"> GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACCTTGGAACAGCAGCTCT GTTTTGTGTTCAATGTTGAGTACATGAATTGCACCTTGGAACAGCAGCTCT </p>

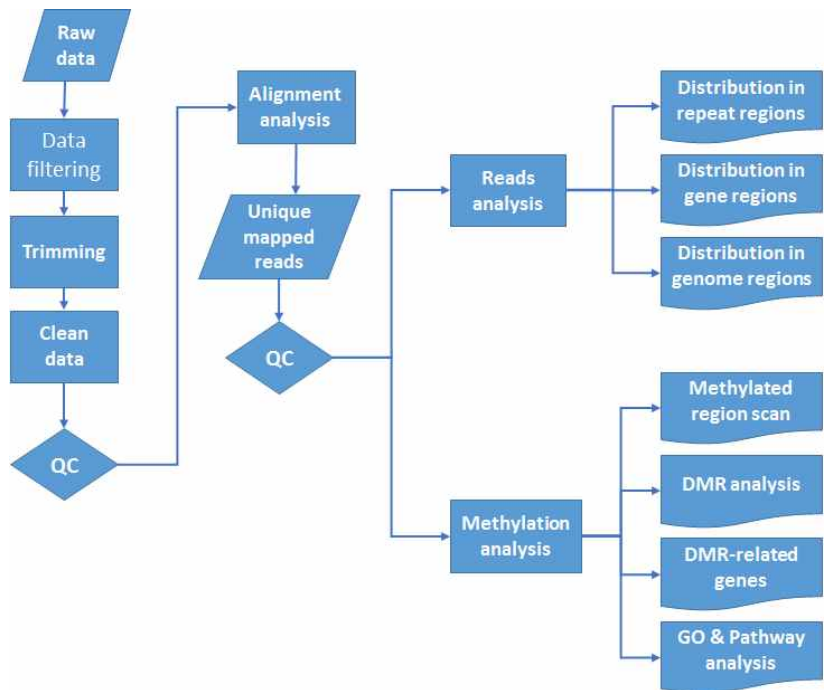
2. 제 1협동 과제 연구수행 내용 및 결과

가. IL2RG 의 methylation profile

IL2Rg 유전자는 x-chromosome에 존재하며 IL2RG KO의 mutation이 x-chromosome의 후생유전학에 미치는 영향을 분석하였다. IL2RG KO 돼지는 hetero 임에도 불구하고 homo와 유사한 phenotype을 보여주고 있으며, 이는 후생학적 영향도 있을 것이라 예상을 하고 methylation profile을 분석하였다. 본 실험에 사용된 샘플은 생후 3달 wild spleen, 생후 25일째 IL2RG KO 돼지 spleen, 생후 3달 IL2RG KO 돼지 spleen을 사용하였다⁹³⁻⁹⁹.

methylation profile을 확인을 하기 위하여, 본 연구팀에서는 MBD 단백질을 이용한 메틸화 DNA의 enrichment를 진행하였다. 그 다음 methylation marker를 PCR로 enrichment 여부를 확인한 후, 시퀀싱 라이브러리를 제작하였다⁹³.

라이브러리는 Agilent BioAnalyzer 2100으로 QC 확인 후, 차세대염기서열해독 장비로 시퀀싱하고, 시퀀싱 리드들의 품질을 평가, 필터링한 후 생명정보학적인 도구들을 이용하여 분석하는 과정(DNA purification -> DNA fragmentation (100-500bp) -> MBD-based methylated DNA enrichment -> QC by PCR of known methylation positive and negative control -> Elution and sequencing library preparation -> QC with BioAnalyzer 2100 -> Sequencing -> Bioinformatic analysis) 을 거쳤으며, 간략하게 모식도로 나타내면 그림 xx와 같다.



[그림 99] MBD 단백질을 이용한 메틸화 DNA의 enrichment의 모식도

데이터 필터링은 차세대염기서열해독 데이터, 즉 시퀀싱 데이터의 각 리드(read, 한 개의 해독된 염기서열)에서 시퀀싱 어댑터 서열 및 기타 artifact 서열, low quality 리드들을 제거할 뿐만 아니라, 각 리드들에서 부분적으로 low quality 서열을 제거하는 과정을 말하며 이 필터링을 통해 얻어진 시퀀싱 데이터의 요약은 아래 [표 25]와 같다.

[표 25] Clean read data production

Sample	Read Length (average) bp	Total Reads (as paired-ends)	Total amount (Gbp)	Quality (average)
input	80-100 (99)	15981625	3.16	> 35
WT	80-100 (99)	15981625	3.16	> 35
IL2RG	80-100 (99)	15981625	3.16	> 35
IL2RG_25	80-100 (99)	15981625	3.16	> 35

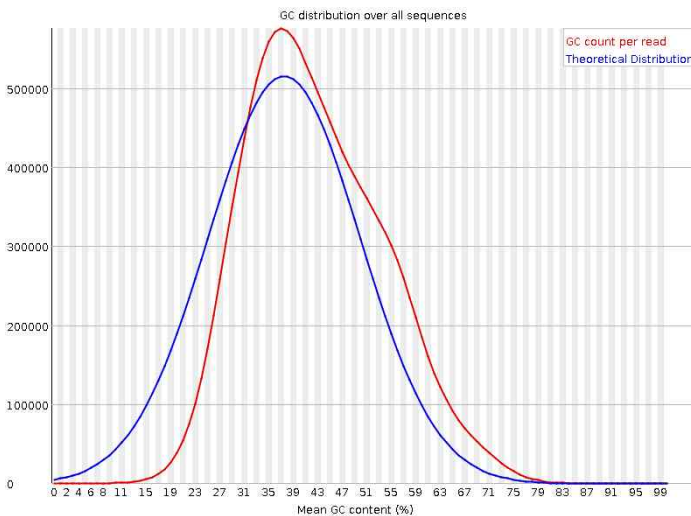
* “clean read data” indicates the data which have deleted adapter reads and removed the reads that the rate of low quality (quality value ≤ 20 is no less than 90% or the rate of “N” in a read is no less than 10%)

* Quality 30 means 99.9% of sequencing accuracy and 40 means 99.99%. For more information, please go : http://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format.

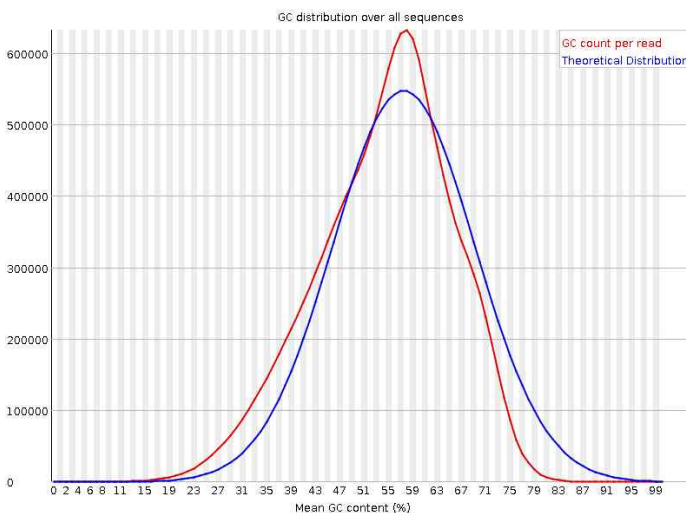
NGS로부터 읽혀진 시퀀싱 리드들에 대한 퀄리티 분석을 통해 얻어지는 GC% 및 GC% 그래프로부터 methylated CpG enrichment에 대한 추정을 할 수 있으며, 아래 표xx와 그림들xx (아래 2개)을 보면 MBD단백질을 이용한 methylated DNA enrichment를 하지 않은 input 샘플과 meDNA enrichment를 한 샘플간의 CG%와 CG 분포에 차이가 있음을 확인할 수 있다. 따라서 최소한 MBD 단백질에 의해 CG 비율이 증가했으며, 이는 CpG 메틸화에 의한 것임을 확인할 수 있다.

[표 26] GC% 비교

	Input	WT_3M	IL2RG_3M	IL2RG_25D
CG%	42	53.5	54	52.5



[그림 100] input DNA GC 분포 그래프



[그림 101] WT GC 분포 그래프.

methyalted DNA로부터 얻어진 시퀀싱 리드들은 BWA 프로그램을 이용하여 인간 reference genome에 매핑되었다. 왜지는 전체 genome이 아직 완전하기 않기 때문에 human reference를 사용하였다. 그리고 그 human reference는 BWA 0.7 ver 2.2.3¹⁰⁰ 와 UCSC human reference genome version HG19⁹⁵ 를 사용하였다.

[표 27] Result of read alignment

Sample	Input	WT_3M	IL2RG-3M	IL2RG_25D
Total Reads	15981625	15981625	15981625	15981625
Aligned	13414220	11781466	11523250	12027156
Failed QC (q<10)	1059010	1016893	1083423	1000654
High Quality aligned reads	12336453	10754678	10430640	10985548
Total repeated	1103910	1950000	1855190	1544375
Final Reads (nonclonal)	11232543	8804678	8575450	9441173
Mean Fragment length	254	264	255	290

Note: “Aligned”: number of reads that can be aligned to reference genome. “Final Reads”: number of reads which align to reference genome uniquely and nonclonal. Final reads will be used for further bioinformatic analysis.

왜지 전체 유전체를 500bp 로 자른 후, 해당 크기 내의 RPKM값을 계산하고, 이 값에 근거하여 샘플간 Correlation을 계산하였고 그 결과는 아래 [표 28]에 나타내었다.

[표 28] Correlation table by CpG Island between 4 groups

	input	WT_3M	IL2RG_3M	IL2RG_25D
input	1	0.8112887	0.88014483	0.84709334
WT_3M	0.8112887	1	0.9504957	0.9669305
IL2RG_3M	0.88014483	0.9504957	1	0.97764575
IL2RG_25D	0.84709334	0.9669305	0.97764575	1

Genome에 mapping 된 read들의 분포는 RPKM (Read per Kilobase per Million Mapped Read)을 이용하여 나타내었다¹⁰¹. RPKM은 특정된 영역에 매핑된 리드수를 특정영역 길이와 전체 매핑된 리드수로 나누어 normalization한 것으로, 다음 식에 의해 계산된다.

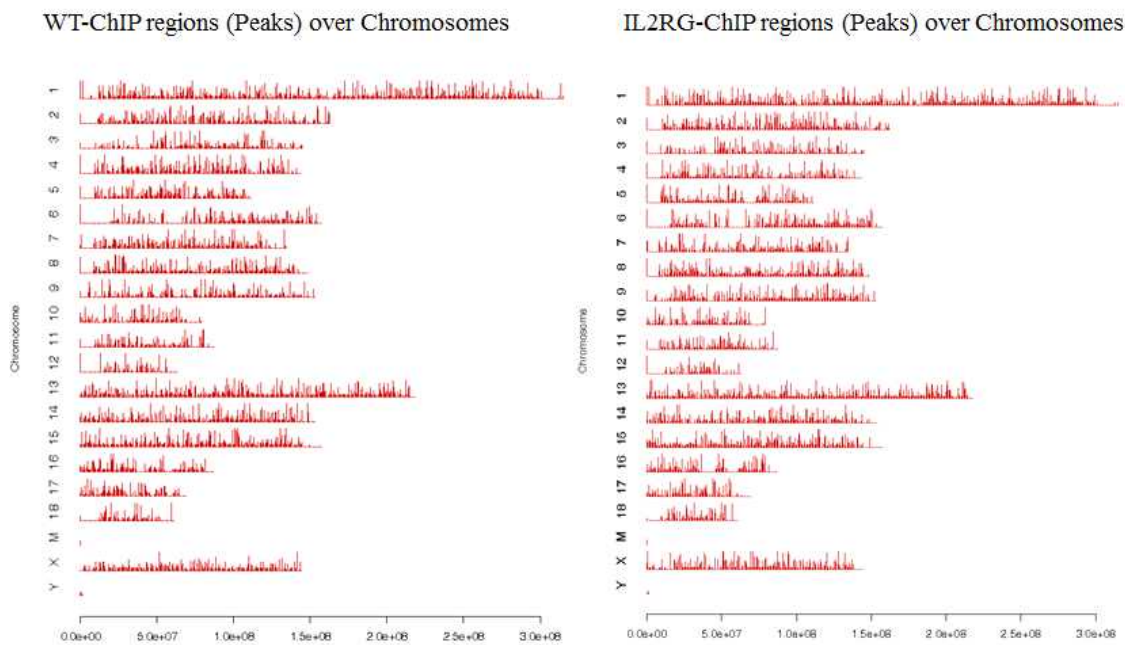
$$RPKM = 10^9 C / LN$$

C: Number of mappable reads on a feature

L: Length of feature (kb)

N: total number of mappable reads (millions)

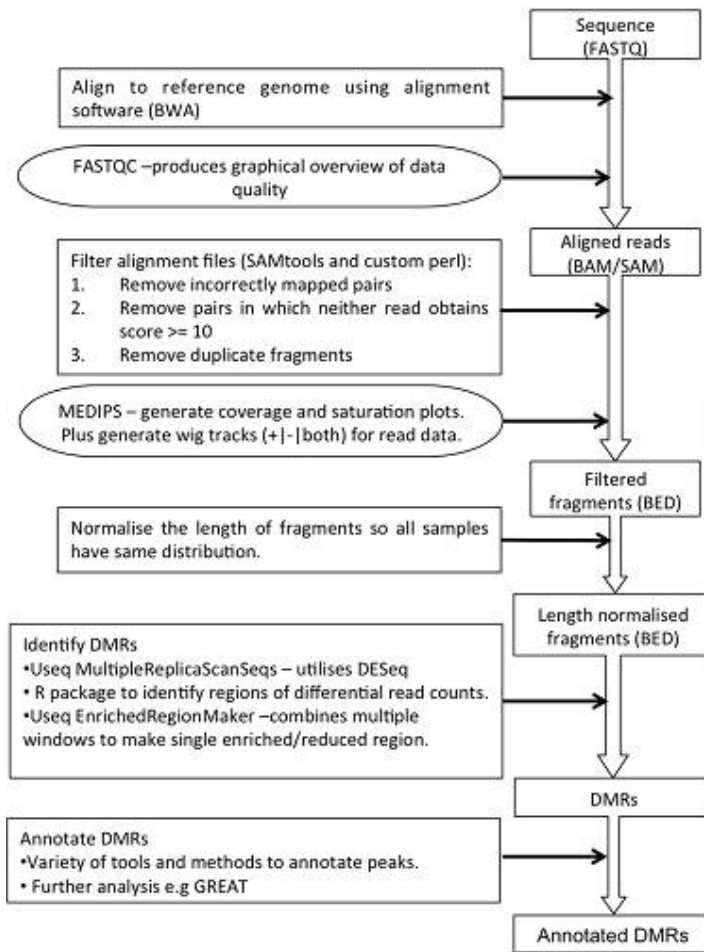
본 실험의 분석에서는 whole genome을 window size 500bp로 자른 뒤, 각 영역에 매핑된 리드수로부터 RPKM 값을 계산하여 further study에 이용하였다. 매핑된 리드의 분포를 genome-wide로 볼 수 있게 visualization 했다. 게놈 전반에 걸쳐 시퀀싱 된 부위에 대한 시각적 정보를 제공했다 [그림 102].



[그림 102] Distribution of the methylated sequences along the chromosome cytogenetic map

RPKM 값을 계산에 의해서 확인된 read들은 MEDIPS, USeq software suite, R Bioconductor package DESeq, SAMtools, 및 BEDTools, Homer 등을 사용하여 DMR (differentially methylated regions) 분석을 진행하였고, workflow는 아래 [그림 103]과 같이 진

행하였다¹⁰²⁻¹⁰⁷.



[그림 103] Flow chart of data analysis

Read의 whole-genome 매핑 데이터로부터, 500bp 내의 메틸화 수준을 실험군과 대조군과 비교하여, methylation이 대조군 대비 2배 이상 (\log_2 값으로 1) 유의하게 ($FDR < 0.1$) 증가하거나 감소하는 DMR 영역의 개수를 발굴하여 아래 [표 29]에 나타내었다.

[표 29] Summary on counts of statistically significant DMRs ($FDR < 0.1$) with 2-fold methylation changes

	WT / input	IL2 / input	IL2_25 / input
HyperDMR	571765	553929	592532
HypoDMR	1324476	1343076	1313073
Total DMR	1,896,241	1,897,005	1,905,605

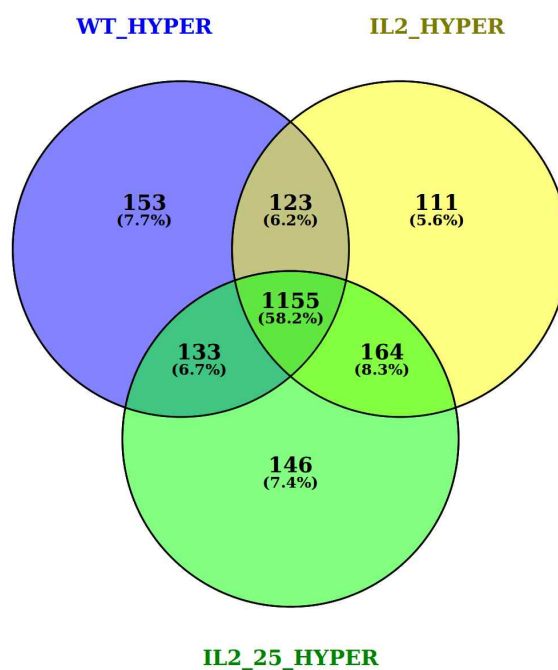
앞서 얻어진 통계적 유의한 DMR 영역에 대한 context를 얻기 위하여, 각각 genome level과 gene level에서 DMR 영역에 대한 annotation을 수행하였다.

[표 30] Summary of significant DMRs on promoter (FDR < 0.1)

-2000 bp to 1000 bp	WT / input	IL2 / input	IL2_25 / input
HyperDMR	4124	4201	4198
HypoDMR	6998	6980	7000

[표 31] Summary of promoters (FDR < 0.1)

-2000 bp to 1000 bp	WT / input	IL2 / input	IL2_25 / input
HyperDMR	1564	1553	1598
HypoDMR	2655	2651	2671



[그림 104] Venn Diagram of hypermethylated or hypomethylated region

venn diagram을 이용하여 hypermethylated 혹은 hypomethylated 된 유전자를 분석

[그림 104] 했을 때, IL2RG-25D 에서만 확인 되는 methylated region은 약 7.4%이 그 외 wild_3M은 7.7%, IL2RG_3M은 5.6%가 확인이 되었다.

DMR annotation 데이터 중, Log fold change ≥ 1 or Log fold change ≤ -1 , -2000bp \geq TSS (transcriptional start site) ≤ 1000 bp 인 DMR들만 선택하여 Gene Ontology 및 KEGG signaling pathway 등을 포함하는 enrichment 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 promoter regions 수는 아래 [표 32]와 같다. Differentially methylated promoter regions들의 Gene Ontology, KEGG, 및 다른 biological functionality term 들에 대해 enrichment analysis를 수행 하였다.

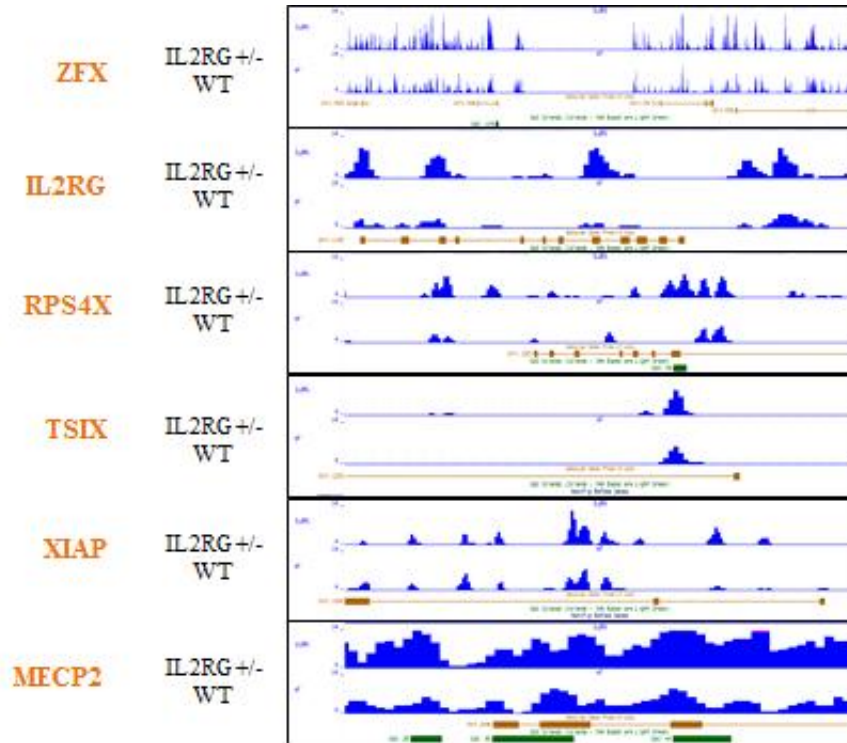
[표 32] Summary of promoters (FDR < 0.1)

-2000 bp to 1000 bp	WT / input	IL2 / input	IL2_25 / input
HyperDMR	1564	1553	1598
HypoDMR	2655	2651	2671

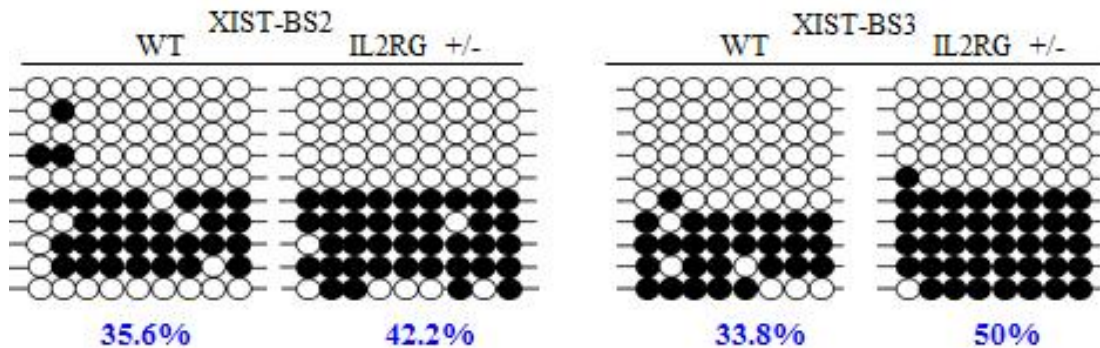
나. IL2RG methylation 결과 분석 자료

X-chromosome에 존재하며 IL2RG KO에 의해서 유전자 발현양이 변화된 유전자의 methylation의 발현 양상을 확인해보았다. [그림 105]와 같이 메틸레이션이 정상군에 비해서 감소 혹은 증가하는 등의 변화가 확인이 되었으며, IL2RG mutation에 의해서 x-chromosome related genes의 메틸레이션이 변화할수있다는 것을 확인 하였다.

그리고 x-chromosome 의 inactivation에 중요한 역할을 하는 xist의 CpG profile도 같이 확인을 하였다. 그 결과는 아래 [그림 106]에 나타내었다. 돼지 xist의 경우, 아직 연구가 많이 진행되지 않은 부분이라서 transcript start site의 부근에서 2개의 후보군을 선정하여 CpG 분석을 진행하였다. xist의 경우, wild에 비해서 methylation이 증가하는 것을 확인할 수가 있었다.



[그림 105] x-chromosome related genes의 methylation mapping 결과



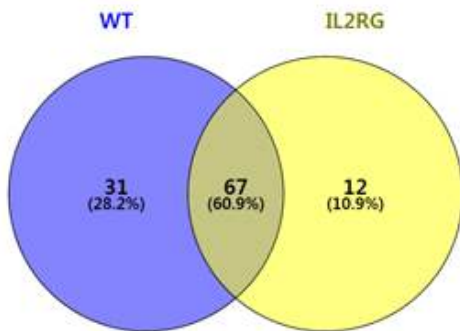
[그림 106] Bisulfite sequencing of BS2 and BS3 sequences of xist

DAVID 분석툴은 연구자들이 관심있는 유전자들 또는 microarray 등의 실험결과에서 얻은 유전자들을 input 데이터로 넣고 기존 수많은 유전자 정보를 갖고 있는 데이터 베이스를 기반으로 유전자들끼리의 상관관계를 통계적으로 분석하여 input 유전자들의 주요 기능들을 예측하는 분석툴이다.

본 연구결과를 DAVID bioinformatics resources 6.8을 통하여 Functional annotation을 진행하였고, KEGG pathway를 확인하였다. [그림 107]과 같이 wildd 에서는 총 98개의 KEGG pathway가 확인이 되었고 IL2RG에서는 79개의 KEGG pathway가 확인이 되었다. 이중에서

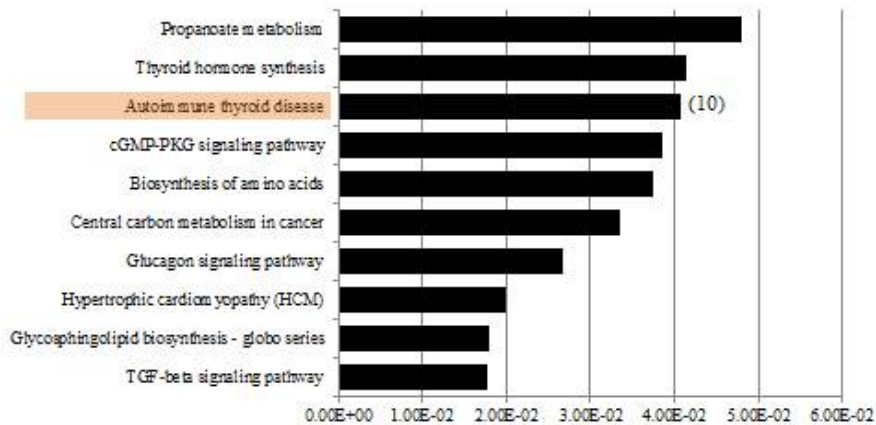
약 67개 (60.9%)는 wild와 IL2RG에 공통적으로 존재하는 KEGG pathway임을 확인하였다 [그림 107 A].

A)

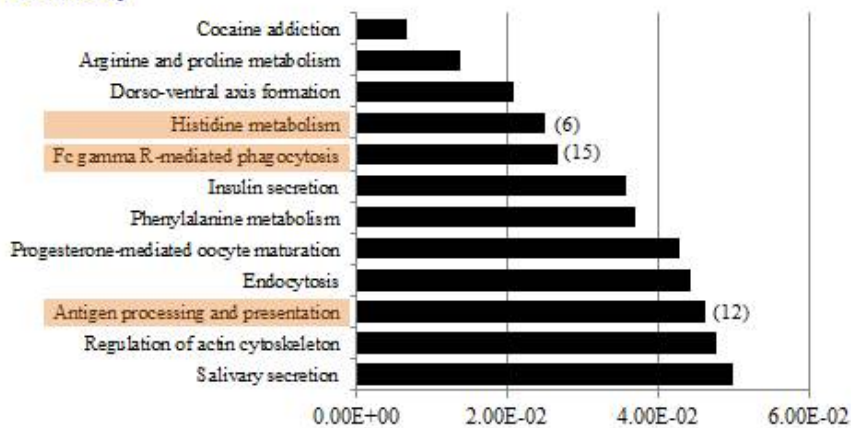


B)

WT only



IL2RG only



[그림 107] A) Venn diagram for KEGG pathway of all chromosomes

B) GO analysis - KEGG

아래의 [표 33]은 위의 그림을 통해서 확인된 내용을 세부적으로 정리한 것이다. WT와 IL2RG 각각에서만 존재하는 KEGG pathway중에서 상위 10개만 정리를 하였고 면역과 관련있는 pathway는 살구색으로 표시를 하였다.

[표 33] KEGG analysis

	Term	P-value	Common Genes
WT only	TGF-beta signaling pathway	1.78E-02	PPP2CA,RHOA,MAPK1,AMHR2,AMH,SMAD3,LEFTY2,TGFB1,SMAD9,PPP2R1A,TNF,TGFB3,ID1,INHBA,GDF5
	Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	1.80E-02	FUT1,FUT2,HEXB,ST3GAL1,NAGA
	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	1.99E-02	TNNT2,ITGB6,PRKAA2,SGCA,ACE,MYL3,TNF,TPM3,TGFB1,CACNG1,TNNI3,TGFB3,PRKAG3,MYL2,TPM2
	Glucagon signaling pathway	2.68E-02	PPP3CA,AKT2,GNAS,PRKAA2,ACACA,PDHB,PGAM2,ACACB,PPARA,LDHC,PRKAG3,CREB1,LOC100153697,CREB3L4,CPT1A,PHKG1,PCK1
	Central carbon metabolism in cancer	3.35E-02	ERBB2,HK1,KIT,MAP2K2,NTRK3,FGFR2,MAPK1,AKT2,PIK3R5,PGAM2,MAP2K1,PDHB
	Biosynthesis of amino acids	3.75E-02	NAGS,ENO3,PC,CTH,OTC,IDH3B,TALDO1,CS,PGAM2,PGK2,TKT,TPH1,ATP2B1,CREB1,NPR2,NOS3,VDAC1,ATP1A1,MAP2K2,ADORA3,EDNRB,ADRA2B,PIK3R5,ADORA1,MEF2A,PPP3CA,RHOA,FXVD2,AKT2,ADRA1D,NFATC1,B2R,ATP1B4,ATP1A3,CREB3L4,MAP2K1,MAPK1,ADRB3
	cGMP-PKG signaling pathway	3.85E-02	R5,ADORA1,MEF2A,PPP3CA,RHOA,FXVD2,AKT2,ADRA1D,NFATC1,B2R,ATP1B4,ATP1A3,CREB3L4,MAP2K1,MAPK1,ADRB3
	Autoimmune thyroid disease	4.09E-02	SLA-DOA,TG,SLA-DOB,TPO,SLA-DRA,CGA,SLA-7,CD86,CD40LG,IL4
	Thyroid hormone synthesis	4.15E-02	GNAS,TG,FXVD2,TPO,HSP90B1,CGA,CREB3L4,ATP1A3,ATP1B4,IYD,ATP1A1,ASGR1,CREB1
	Propanoate metabolism	4.79E-02	ACACB,ACACA,MCEE,LDHC,LOC100153697,ABAT
IL2RG only	Salivary secretion	4.98E-02	ADRB3,ATP1A1,CHRM3,ATP1B4,KCNN4,LYZ,GNAS,ADRA1D,ATP1A3,AQP5,DMBT1,FXVD2,PMAP-36
	Regulation of actin cytoskeleton	4.78E-02	PIP5K1A,MOS,MYL9,ITGB6,PIK3R5,ITGB2,MAP2K1,F2,ARPC3,ARPC4,VAV1,ARAF,ARPC1B,APC2,RHOA,BDKRB2,PPP1CA,ITGAL,B2R,F2R,ARPC1A,CRK,MAPK1,ACTN2,FGFR2,ACTN1,CHRM3,CFL1,FGF21
	Antigen processing and presentation	4.64E-02	CD8B,KIR2DL1,HSP90AA1,CD4,CREB1,SLA-6,SLA-7,HSP90AB1,TNF,IFI30,TAP2,SLA-DOB
	Endocytosis	4.43E-02	ADRBK1,CYTH2,F2R,ARPC1A,SLA-7,GRK7,ADRB3,SH3GLB1,WASH1,CHMP1A,ARPC3,PIP5K1A,SLA-6,WIPF2,SMAD3,RAB5A,AP2M1,ARPC1B,VPS26B,IL2RG,VPS37B,FOLR1,ARFGAP2,TGFB3,LOC100037957,DNAJC6,FGFR2,RAB22A,FOLR2,SNX6,ARF5,ARF3,ARPC4,PRKCZ,TGFB1,RHOA
	Progesterone-mediated oocyte maturation	4.27E-02	CDC23,MOS,AKT2,SPDYA,PIK3R5,MAP2K1,HSP90AA1,MAPK1,CPEB1,HSP90AB1,ARAF,PKMYT1,RPS6KA1,CDK2,FZR1
	Phenylalanine metabolism	3.68E-02	ALDH3B1,DDC,HPD,MAOB,MAOA
	Insulin secretion	3.57E-02	ADCYAP1R1,ATP1A3,GPR119,FXVD2,CREB1,GNAS,ATP1B4,KCNN4,PDX1,ATP1A1,CHRM3,FFAR1,GIP,KCNN3,GLP1R
	Fc gamma R-mediated phagocytosis	2.67E-02	ARPC3,MAP2K1,NCF1,PIK3R5,AKT2,ARPC1A,PIP5K1A,CFL1,ARPC1B,SYK,CRK,ARPC4,MAPK1,PPAP2C,VAV1
	Histidine metabolism	2.49E-02	FTCD,ALDH3B1,DDC,UROC1,MAOB,MAOA
	Dorso-ventral axis formation	2.09E-02	MAP2K1,ETS1,NOTCH4,PIWIL4,PIWIL2,CPEB1,MAPK1
	Arginine and proline metabolism	1.38E-02	SAT2,NOS3,SMOX,MAOB,HOGA1,DAO,MAOA,OAT,ALDH4A1,SAT1
	Cocaine addiction	6.76E-03	CREB1,GNAS,MAOA,DRD2,CDK5R1,RELA,DDC,DRD1,MAOB,NFKB1,CDK5

IL2RG KO은 T-B+NK-의 phenotype을 가진다고 보고가 많이 되어 있다. 그래서 각각의 B,T, NK의 발달에 관련되는 유전자의 methylation 변화에 대해서 확인을 하였고, 그 결과

는 아래 [그림 108-110]에 발달순서대로 정리를 하였다. 발달에 관련되는 전체 유전자를 동정하지는 못하였는데, 그 이유는 돼지의 whole genome이 아직 분석이 완전히 마무리 되지 않았기 때문에 발달에 관련되는 전체를 분석하지는 못하였다.

	Gene Name	Probe	WT	IL2RG	Gene Description
Phase 1 Pre-commitment	GATA2	Chr13:79614001-79614500	2	2	GATA binding protein 2
		Chr13:79613501-79614000	0	-0.1520031	
	MEF2C	Chr2:98886001-98886500	-0.1520031	-0.1520031	myocyte enhancer factor 2C
		Chr2:98885501-98886000	-0.1520031	-0.1520031	
	SPI1	Chr2:16434001-16434500	-0.1520031	1	Spi-1 proto-oncogene
		Chr2:16434501-16435000	2.807355	4	
	BCL11A	Chr3:85284001-85284500	-0.1520031	-0.1520031	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
		Chr3:85284501-85285000	-0.1520031	-0.1520031	
	ERG	Chr13:212157501-212158000	1.5849625	1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
		Chr13:212313501-212314000	2	1	
Chr13:212157001-212157500		3.169925	3.169925		
Chr13:212314001-212314500		1	2.521928		
RUNX1	Chr13:208305001-208305500	-0.1520031	-0.1520031	runt-related transcription factor 1	
	Chr13:208304501-208305000	1	-0.1520031		
GATA3	Chr10:69602001-69602500	-0.1520031	-0.1520031	GATA binding protein 3	
	Chr10:69601501-69602000	1	-0.1520031		
GATA3	Chr10:69602001-69602500	-0.1520031	-0.1520031	GATA binding protein 3	
	Chr10:69601501-69602000	1	-0.1520031		
ETS1	Chr9:61564001-61564500	2.321928	-0.1520031	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	
	Chr9:61508001-61508500	-0.1520031	0		
	Chr9:61564501-61565000	3.5849626	3.4594316		
	Chr9:61508501-61509000	2.321928	2.807355		
HES1	Chr13:140632501-140633000	-0.1520031	-0.1520031	hes family bHLH transcription factor 1	
	Chr13:140633001-140633500	-0.1520031	-0.1520031		
AHR	Chr9:95391501-95392000	0	0	aryl hydrocarbon receptor	
	Chr9:95510501-95511000	-0.1520031	-0.1520031		
	Chr9:95391001-95391500	-0.1520031	0		
BCL11B	Chr7:127855001-127856000	-0.1520031	-0.1520031	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	
	Chr7:127855001-127855500	-0.1520031	-0.1520031		
LEF1	Chr8:122085001-122085500	0	-0.1520031	lymphoid enhancer-binding factor 1	
	Chr8:122085501-122086000	-0.1520031	-0.1520031		

[그림 108] T cell development

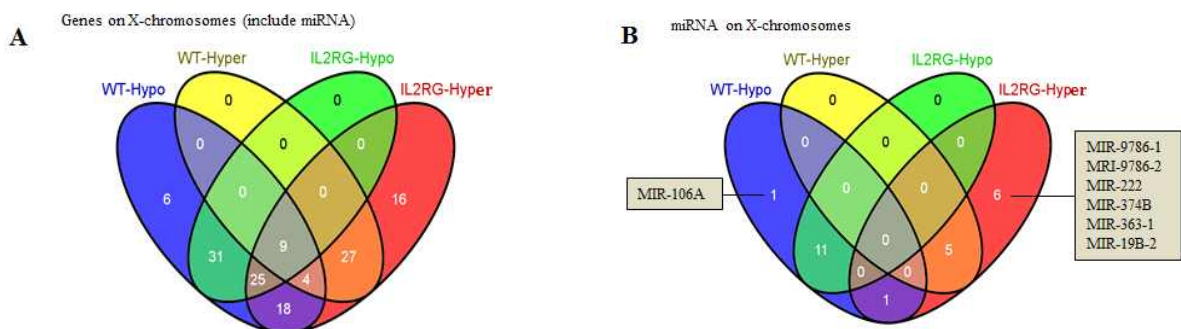
Gene Name	Probe	WT	IL2RG	Gene Description
KIT	Chr8:43549001-43549500	3.4594316	2.321928	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
	Chr8:43549501-43550000	2.807355	1	
	Chr8:43550001-43550500	3.321928	2	
IL7R	Chr16:22281501-22282000	-0.1520031	1	interleukin 7 receptor
	Chr16:22282001-22282500	-0.1520031	0	
CD19	Chr16:22282501-22283000	1	1	CD19 molecule
	Chr3:18778001-18778500	0	2.5849626	
RAG1	Chr3:18778501-18779000	3.4594316	4.169925	recombination activating gene 1
	Chr2:26734001-26734500	3.321928	2.807355	
RAG2	Chr2:26733501-26734000	3.321928	3.7004397	recombination activating gene 2
	Chr2:26715501-26716000	-0.1520031	1	
	Chr2:26716001-26716500	-0.1520031	1	

[그림 109] B cell development

	Gene Name	Probe	WT	IL2RG	Gene Description
Bone marrow pro and pre-NK	CD34	Chr9:148445001-148445500	1	1.5849625	CD34 molecule
		Chr9:148445501-148446000	0	0	
Primary lymphoid organ stage3 and stage4NK	GATA3	Chr10:69602001-69602500	-0.1520031	-0.1520031	GATA binding protein 3
		Chr10:69601501-69602000	1	-0.1520031	
		Chr9:61564001-61564500	2.321928	-0.1520031	
	ETS1	Chr9:61508001-61508500	-0.1520031	0	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
		Chr9:61564501-61565000	3.5849626	3.4594316	
Chr9:61508501-61509000		2.321928	2.807355		
TBX21	Chr12:23866001-23866500	2.807355	2	T-box 21	
	Chr12:23866501-23867000	-0.1520031	-0.1520031		
	Chr12:23867001-23867500	-0.1520031	-0.1520031		
Peripheral blood inhibitory receptors	KIR2DL1	Chr6:53979501-53980000	-0.1520031	-0.1520031	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1
		Chr6:53657001-53657500	-0.1520031	-0.1520031	
		Chr6:53980001-53980500	0	-0.1520031	
		Chr16:36384501-36385000	-0.1520031	-0.1520031	
Peripheral blood granule constituents	GZMA	Chr16:36365001-36365500	-0.1520031	-0.1520031	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
		Chr16:36385001-36385500	-0.1520031	-0.1520031	
		Chr16:36385501-36386000	-0.1520031	-0.1520031	
	GZMB	Chr7:79835001-79835500	1.5849625	1	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
		Chr7:79834501-79835000	3.169925	3.4594316	

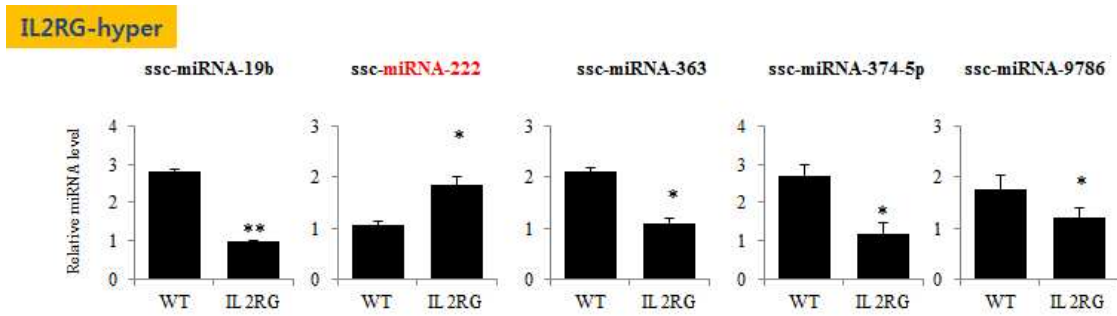
[그림 110] NK cell development

IL2RG는 x-chromosome에 위치하며, IL2RG mutation에 의해서 x-chromosome related genes이 영향을 받는 것을 확인을 하였다. 추가적인 연구를 위하여 x-chromosome에서 만 hypo, hyper - methlated를 분석하였고, 특이적으로 miRNA 도 같이 확인이 되었다. 따라서 본 결과를 세분화해서 분석하기 위해서 venn diagram을 진행하였고, 그 결과는 아래 [그림 111]에 정리되었다.



[그림 111] A. venn diagram of methylated genes from x-chromosome B. venn diagram of miRNA from only x-chromosome

[그림 112]에서 보는 바와 같이 IL2RG -hyper 에서만 확인되는 miRNA는 6개가 확인이 되었으며, 반대로 WT-hypo에서 확인되는 miRNA는 1개가 확인이 되었다. 그리고 각각의 miRNA의 발현을 WT-spleen과 IL2RG-spleen에서 분석을 해봤을 때 아래 [그림 112]와 같이 miRNA-222를 제외한 나머지는 모두 발현이 감소됨을 확인하였다.

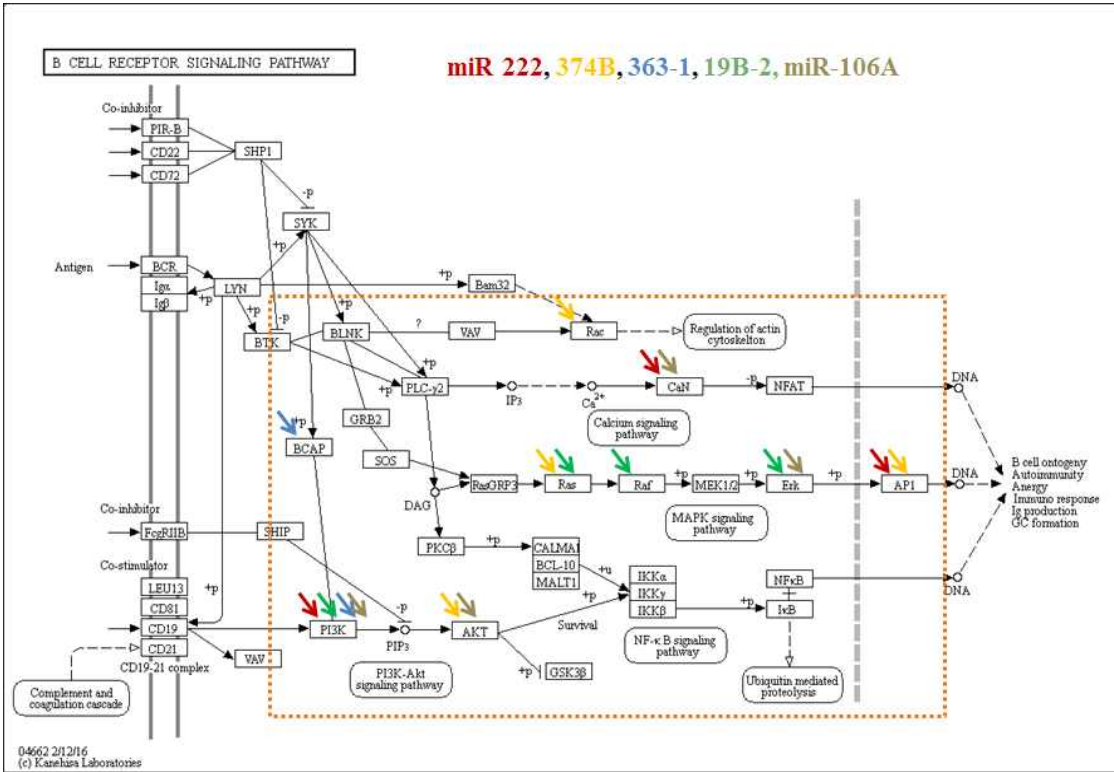


[그림 112] miRNA expression

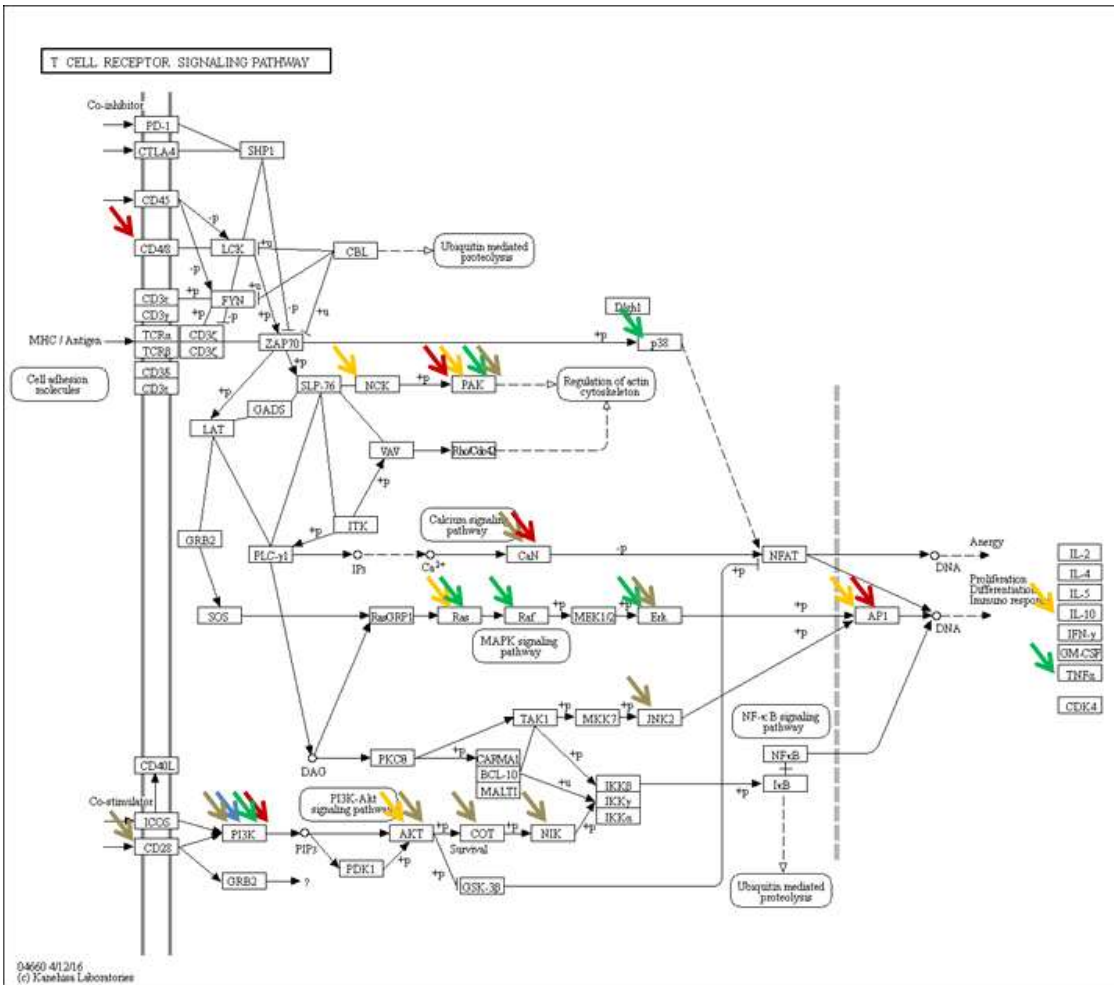
miRNA의 down stream signaling pathway를 확인하기 위하여 다양한 web-based program을 활용하여 분석을 진행하였다. 돼지의 경우, miRNA 연구가 많이 되어있지않아서 human을 기본으로 분석을 진행하였다.

그 결과 IL2RG-hyper에서만 발현이 확인되는 miRNA는 B cell development 와 T cell development 에 관여하는 것을 확인할 수가 있었으며, 그 예상 결과는 아래 [그림 113]과 [그림 114]에 나타내었다.

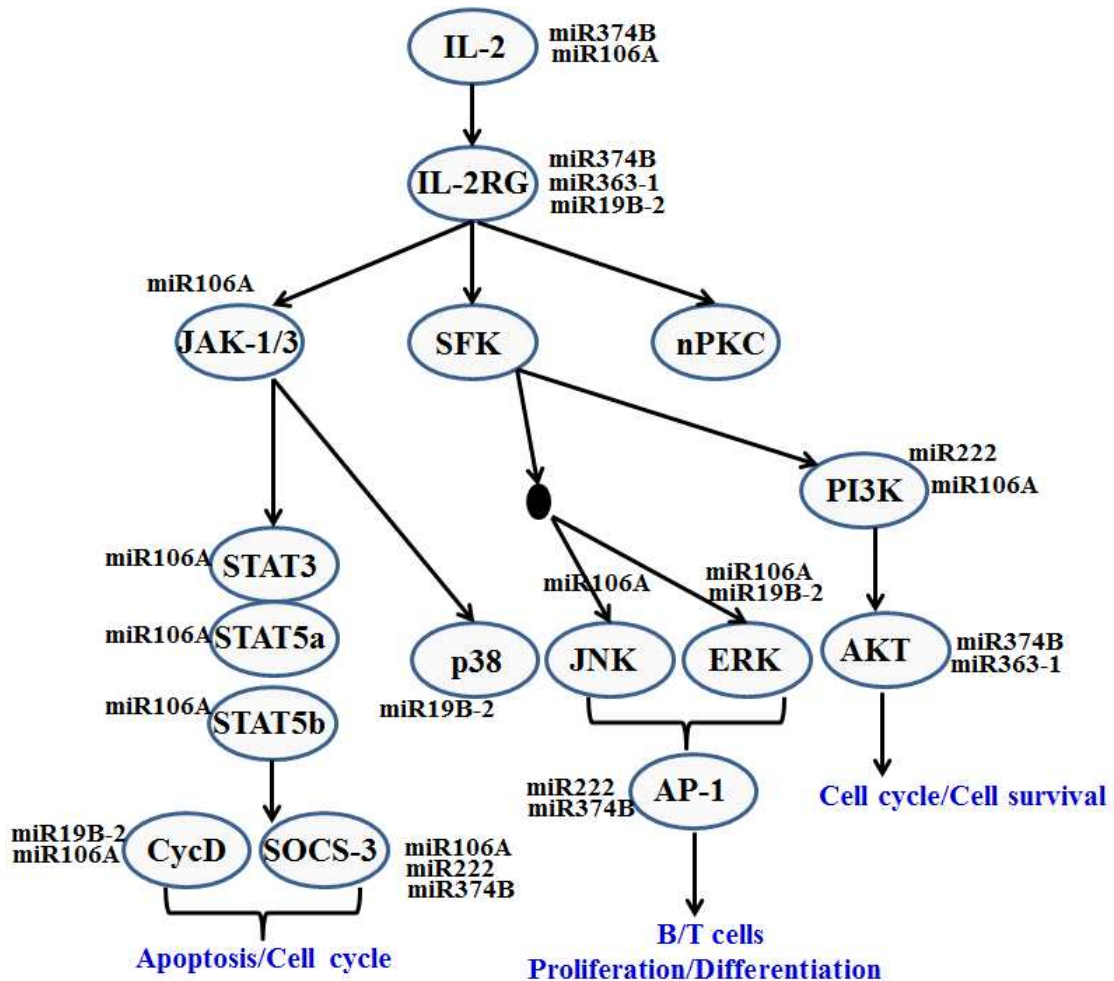
따라서 이상의 결과들을 바탕으로 IL2RG mutation은 후생학적 변화가 발생을 하며 특히 x-chromosome에 영향을 많이 미치는 것을 확인하였다. 그리고 x-chromosome에 존재하는 miRNA에도 영향을 주는 것으로 확인이 되며, 그로인해 x-chromosome inaction 뿐만 아니라 miRNA 도 IL2RG KO 의 immunodeficiency에 영향을 미친다는 결과를 도출 할 수가 있었다.



[그림 113] B cell receptor signaling pathway



[그림 114] T cell receptor signaling pathway



[그림 115] Summary of miRNA in IL2Rg KO pig

3. 제 2협동 연구수행 내용 및 결과

IL2RG 유전자는 성염색체인 X-chromosome에 위치하며 IL2를 포함하는 다양한 Interleukin에 대한 receptor를 암호화하는 유전자이다. 이 유전자에 돌연변이가 유발될 경우, X-linked combined immunodeficiency (XCID)를 비롯하여 X-lined severe combined immunodeficiency (XSCID)와 같은 면역 결핍성 질환을 초래하게 된다. 개발된 면역 결핍 돼지는 면역에 관여하는 주요림프구인 T, B, NK 세포의 결실이 예상되며, 이에 따라 Gnotobiotic 시설에서의 사육이 필요 하게 되었다. 우리는 비외과적인 방법을 이용하여 현재 보유중인 IL2RG KO 돼지를 유지 하면서 piglet들을 Gnotobiotic 시설에 수용하기 위한 작업을 진행 하였다. 그 결과 생산된 돼지들 중에서 1마리를 무균화에 성공하였다.

가. IL2RG KO 돼지의 번식

IL2RG KO 돼지의 번식을 위하여 발정 유도를 실시하였다. 먼저 altrenogest를 18일간 하루 20mg씩 경구 투여 하였으나, 뚜렷한 발정을 관찰 할 수가 없었다. 다음으로는

PMSG, hCG가 혼합된 호르몬 제제인 PG600을 피하에 주사하였다. 주사 후 5일 후 발정을 관찰할 수가 있었다.

수압법으로 수태지로부터 정액을 채취하였다. 정액을 채취하기 전 수태지의 하복부를 닦아 주었다. 의빈대는 플라스틱을 이용하여 암컷의 등처럼 만들었으며, 천으로 한번 덮어 주었다. 수태지의 승가를 유도하기 전 의빈대를 암컷 cage에 넣어 냄새가 배어들게 하였으며, 암컷의 오줌을 발라 주어 수태지의 흥분을 유도하였다. 수태지가 흥분하여 의빈대에 승가를 하면 음경이 발기하여 나오게 된다.

발기된 음경 선단이 포피 밖으로 나올 때 오른손의 엄지, 집게 및 가운데 손가락으로 음경을 잡고 적당히 압력을 가해 사정을 유도하였다. 정액 채취병으로 보온병을 사용하였으며, 입구는 멸균된 거즈로 두 겹으로 막아 정액 이외의 것들이 들어가지 못하게 하였다. 수태지가 사정을 시작하게 되면 유백색의 농후한 정액만 채취병으로 받아 내었다. 받아들인 정액은 정액 희석제에 희석하여 인공수정에 이용하였다. 채정한 정액은 16℃에서 보관 하였다. 인공 수정은 catheter를 사용하여 12시간 간격으로 2회 진행 하였으며, 인공수정 시 암컷의 외음부를 닦아 주고 암태지의 등을 눌러 주어 안정감을 주며 수정할 준비를 시켜 주었다. 또한 catheter를 삽입할 때 부드럽게 삽입하기 위하여 리도카인젤을 이용하였다.

catheter를 정확하게 삽입하기 위해서 손으로 돼지의 외음부를 최대한 벌리고, 처음 약 10cm 깊이까지는 catheter를 30°정도 위로 향하게 삽입하다 주입기를 수평으로 유지 하면서 천천히 시계 반대 방향으로 돌리면서 삽입하였다. 정확하게 catheter를 삽입한 후 정액 주입병과 연결한 뒤 압력을 살짝 가하지만 스스로 정액을 흡수 할 수 있게 유도하였다. 인공수정이 끝난 catheter는 시계방향으로 돌리면서 천천히 빼 주었다.



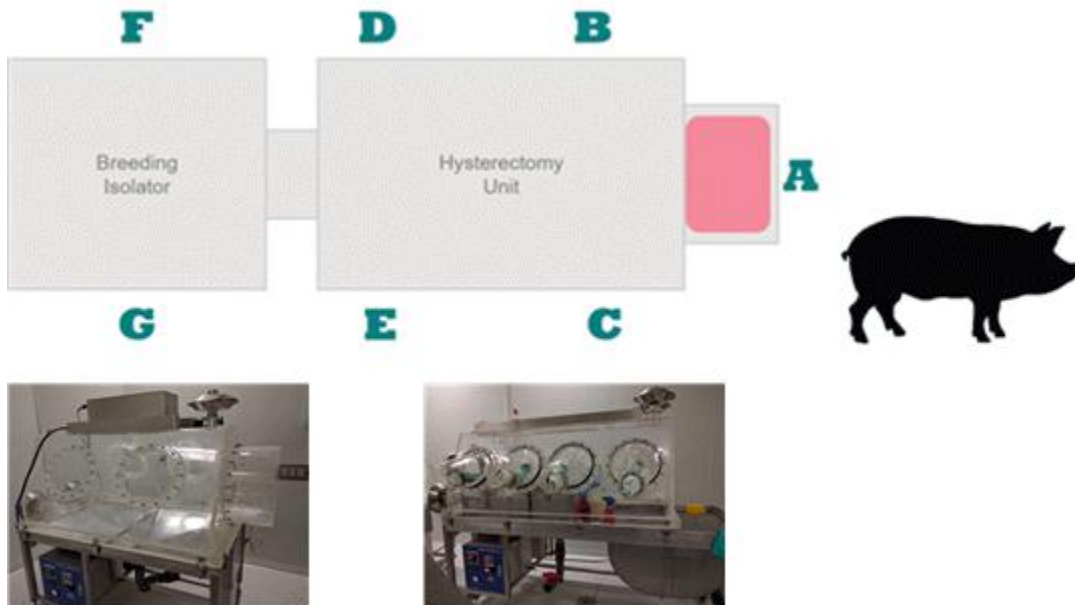
[그림 116] 수태지의 채정 및 채정한 정액을 이용한 인공수정.

나. 분만

Breeding isolator와 Hysterectomy unit은 미리 연결 하여 4% paraformaldehyde로 소독을 하였으며, 소독제인 베크론-s를 1:100으로 희석하여 Germicidal trap을 만들어 외부에서 돼지가 들어갈 수 있게 만들어 주었다. 출산이 임박한 모돈은 질과 외음부를 0.05% Chlorhexidine gluconate solution 으로 소독을 하였다.

돼지가 출산을 하면 A 자리에 위치한 사람이 태반에 쌓여있는 자돈을 태반이 찢어지지 않게 조심스럽게 받은 후, 신속하게 베크론-s 로 차 있는 germicidal trap을 통과 하여 C에 자리한 사람에게 넘긴다. B에 위치한 사람은 C에 위치한 사람으로부터 Germicidal trap을 통과한 태반에 쌓여 있는 자돈을 받아 신속하게 Diaper를 이용하여 구강내의 이물질을 제거하며, 호흡을 유도 한다. 이 후 D에 위치한 사람은 탯줄을 케이블 타이로 고정과 동시에 수술용 가위를 이용하여 탯줄을 잘라 주며, 이때 탯줄을 샘플링 하였다.

남은 태반을 diaper로 제거 한 뒤, E에 위치한 사람이 breeding isolator의 케이지에 있는 F에 위치한 사람에게로 자돈을 넘긴다. E에 위치한 사람은 자돈을 cage에 넣고 멸균한 두유를 급이 하며, 1시간 이내로 스스로 먹지 않을 경우 tube를 사용하여 강제로 급이 한다. 모든 작업이 끝나면 Hysterectomy unit 은 Breeding isolator와 분리 하여 Breeding isolator만 운용하였다. 총 두 대의 Breeding isolator를 이용하여 자돈을 관리하였다.



[그림 117] 비외과적 무균화 돼지 생산을 위한 틀.

다. 자돈 관리.

자돈은 15일령까지 2시간 마다 상태 및 환경을 확인 하였으며, 4시간 마다 75ml의 멸

균된 두유를 급이 하였다. 15일령부터는 150ml을 4시간 마다 급이 하였다. 20일령 이후부터 50일령까지 6시간, 8시간으로 급이 간격을 늘렸으며, 급이량도 최대 225ml까지 늘렸다. 자돈이 스스로 분유를 섭취하지 않을 시 젓병을 이용하여 급이 하였으며, 저혈당 쇼크를 대비하기 위하여 설탕물과 위에 삽관을 위한 튜브 또한 준비 하였다.

[표 34] Breeding isolator 체크포인트 및 사육 환경.

자돈 상태	환경
✓분유 섭취량	✓온도: 31 °C / 습도: 40-60 % 확인
✓활동성 확인	✓점등: 오전 8시 / 소등: 오후 8시
✓배변: 고체인지 설사하였는지 확인	✓Waste basket 버큰-s 상태 확인
✓케이블 타이 유무 확인	✓물 1L, 분유 6포, diaper 1봉 (4개입) 유지



[그림 118] Breeding isolator에서 사육 중인 IL2RG 자돈

자돈이 태어난 후 5일째에 자돈의 오염여부를 확인하기 위하여 균 검사를 실시하였다. 균 검사는 aseptic 한 상태의 아이솔레이터 내에서 멸균한 스왑봉을 개봉한 뒤 자돈의 경부와 후지를 잡은 뒤 스왑봉을 항문으로 삽입하여 직장까지 넣어 직장 벽면을 닦아주었고, 스왑봉은 캐리어에 주변에 닿지 않게 조심히 넣어 밀봉한 뒤 아이솔레이터 외부로 반출하였다.




[그림 119] 호기·혐기배양 겸용 수송용 배지

직장을 스왑한 스왑봉을 클린벤치 내에서 개봉한 뒤 pre-warming 해 둔 배지에 도말한다. 도말한 배지는 37°C 인큐베이터에 혐기와 호기로 나누어 배양한다. 호기 배양은 24시간 후 부터 콜로니를 확인하고, 혐기 배양은 48시간 후 혐기 챔버를 개봉하여 콜로니를 확인한다. 필요시 콜로니 형태와 그람 염색 양상에 따라 균을 분류하여 16s rRNA sequencing으로 동정을 실시한다.

[표 35] 선택배지와 영양배지 사용조합

	혐기	호기	배지 약어
영양배지	BAP BHIP AP	BAP BHIP NAP LB	AP: anaerobic agar plate BAP: sheep blood agar plate BHIP: brain heart infusion agar plate EMB: Eosin methylene blue agar plate LB: lactobacilli broth
선택배지	MRSP MACP	MRSP MACP EMB	MACP: MacConkey agar plate MRSP: Man, Rogosa and Sharpe agar plate NAP: nutrient agar plate

A. 

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences		PCR Primer Name Primer Sequences	
785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'		27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'	
907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'		1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'	

Subject						Genus		Species	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_117062.1	Lactobacillus acidophilus	1531	2	1502	98	2765	0.0	1500/1501	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus acidophilus

B. 

Primer Information

Sequencing Primer Name Primer Sequences		PCR Primer Name Primer Sequences	
785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'		27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'	
907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'		1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'	

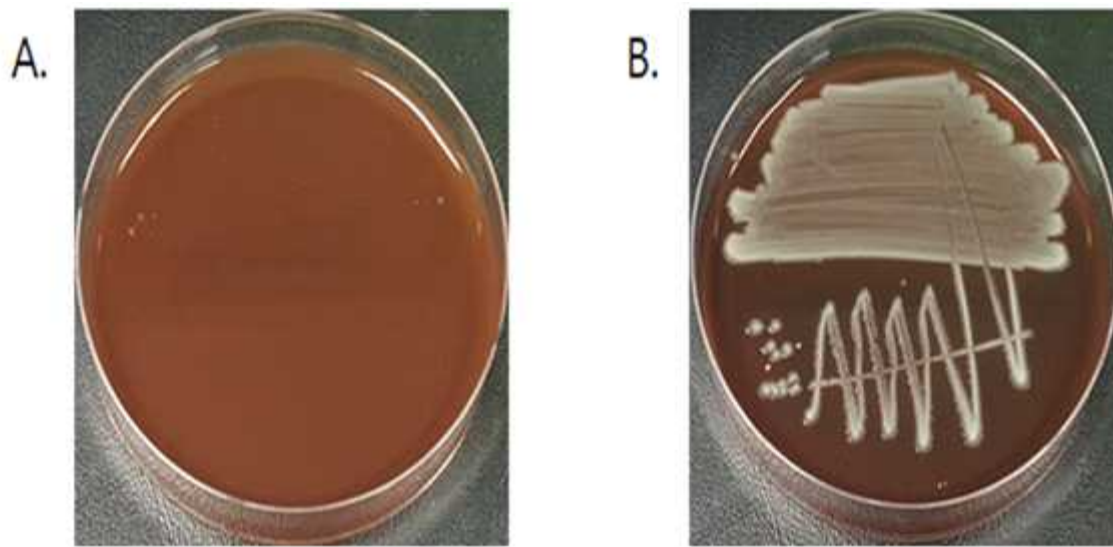
Subject						Genus		Species	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
NR_042778.1	Streptococcus thermophilus	1539	6	1511	97	2776	0.0	1505/1506	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus thermophilus

[그림 120] Inoculation을 위하여 배양한 lactobacillus acidophilus(A)와 streptococcus thermophilus(B) 및 Sequencing 결과.

5일째 IL2RG KO 자돈은 확인한 결과 1번 Breeding isolator에서는 아무런 균이 발견되지 않았지만 2번 Breeding isolator에서는 균 오염이 확인되었고, 16s rRNA sequencing 결과 E.Coli로 확인되었다. 이에 따라 1번 Breeding isolator의 자돈들에게는 21일령에 배양한 lactobacillus acidophilus (johnsoni)와 streptococcus thermophilus를 분유에 희석하여 위에 삽관하여 inoculation 하였다. inoculation 3일 후 자돈의 직장을 스왑하여 inoculation한 두 가지 균주만 발견된 것을 확인 하였으며, 30일령에 1번 Breeding isolator의 자돈들은 Gnotobiotic 시설에 들어 갈 수 있었다.

라. Gnotobiotic 시설에서의 돼지 사육, 관리 및 유지.



C.

Query		Subject				Score			Identities				
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	1505	Escherichia coli strain CQ5W20, complete genome	CP0113253.1	4579074	691342	692846	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus
1	1505	Escherichia coli strain 2012C-4227, complete genome	CP0113029.1	5202850	3627765	3626261	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Minus
1	1505	Escherichia coli K-12 GM4792 Lac-, complete genome	CP011343.2	4621656	223693	225197	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus
1	1505	Escherichia coli K-12 GM4792 Lac+, complete genome	CP011342.2	4622342	223865	225367	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus
1	1505	Escherichia coli strain K-12 substrain MG1655_TMP32XR2, complete genome	CP012870.1	4641689	433501	431997	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Minus
1	1505	Escherichia coli strain K-12 substrain MG1655_TMP32XR1, complete genome	CP012869.1	4641684	433501	431997	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Minus
1	1505	Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome	CP012868.1	4641665	433501	431997	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Minus
1	1505	Escherichia coli strain RR1, complete genome	CP011113.1	4587291	4124729	4126233	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus
1	1505	Escherichia coli strain DH1Ec169, complete genome	CP012127.1	4609522	4141073	4142577	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus
1	1505	Escherichia coli strain DH1Ec104, complete genome	CP012126.1	4612363	4143908	4145412	2758	1493	0.0	1502	1506	99	Plus/Plus

[그림 121] 각 breeding isolator에서 포유중인 돼지의 직장 스왑결과 A : 1번 breeding isolator B : 2번 breeding isolator C: B plate에서 나온 균 동정

Gnotobiotic 시설은 차압 (7±2mmH2O), 습도(50±5%) 및 온도 (22±2 °C)를 유지하고 있으며, 일정하게 되면 가장 먼저 돼지의 상태를 체크한다.

검사가 끝난 IL2RG KO 자돈은 Breeding isolator에 들어있는 상태에서 Gnotobiotic 시설 연결 통로와 연결 하였고, 터널은 4% paraformaldehyde로 30분간 소독하였다. 이 후 Gnotobiotic 시설 쪽 통로를 열어 다시 한번 1:100으로 희석한 Vircon-S로 소독 한 뒤, Breeding isolator와 Gnotobiotic 시설을 연결 하여 자돈을 이동 시켰다.



[그림 122] Gnotobiotic 시설 연결 통로 및 상태 창

[표 36] Gnotobiotic 시설 돼지의 체크 사항

	상 태
정상	<ol style="list-style-type: none"> 1. 케이지 한 곳에 머무르지 않고 활발하게 활동을 함. 2. 급여된 사료를 전부 섭취함. 3. 대소변이 존재하고 대변 상태가 고체형태임.
비정상	<ol style="list-style-type: none"> 1. 스스로 서있지 못함. 2. 자극을 주어도 반응을 못함. 3. 급여된 사료를 섭취하지 않음. 4. 대변이 묽음.

자돈은 80일령까지 고형사료 250g과 분유 200ml를 섞어서 급여 하였으며, 두당 한 개의 급이기를 사용하였다. 80일령 이후부터는 분유의 양을 점차적으로 줄임과 동시에 고형 사료의 양을 늘려 자돈이 고형 사료에 적응 할 수 있도록 관리가 되었다. 최종적으로 1두의 IL2RG hetro 돼지가 Gnotobiotic 시설에서 사육 중에 있으며, Wild type 돼지와 교배를 통하여 Breeding 중에 있다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

제 1절 목표달성도

1차년도 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<input type="checkbox"/> Male 또는 female 미니돼지 유래 체세포주 확보 및 최적의 배양조건 검토	<input checked="" type="checkbox"/> Male 미니돼지 유래 체세포주 확보 여부 <input checked="" type="checkbox"/> Female 미니돼지 유래 체세포주 확보 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 돼지 체세포주의 최적 배양조건 수립 여부	100%
<input type="checkbox"/> 미니돼지 체세포를 이용한 IL-2R γ 유전자 클로닝 및 염기서열 분석	<input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 체세포주에서의 PCR 기법을 이용한 IL-2R γ genome 확보 여부 <input checked="" type="checkbox"/> Cloning vector에의 유전자 클로닝 여부 <input checked="" type="checkbox"/> IL-2 genome을 이용한 염기서열 분석 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 일반돼지와 미니돼지 IL-2R γ 게놈 염기서열 비교 분석 여부 <input checked="" type="checkbox"/> IL-2R γ 유전자 exon 위치 파악 여부	100%
<input type="checkbox"/> ZFN을 이용한 IL-2R γ 유전자 적중 벡터제작 <input type="checkbox"/> 미니돼지 체세포에의 유전자 도입 최적 조건 확립	<input checked="" type="checkbox"/> ZFN을 이용한 IL-2R γ 타게팅 벡터 제작 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 체세포주에의 최적의 유전자 도입 조건 확립 여부 <input checked="" type="checkbox"/> ZFN/IL-2R γ 유전자 적중 벡터의 male 또는 female 체세포주에의 유전자 도입 조건 확립 여부 <input checked="" type="checkbox"/> ZFN/IL-2R γ mRAN 제작을 통한 체세포주 유전자 도입 조건 확립 여부	100%
<input type="checkbox"/> IL-2R γ 유전자 적중 체세포주 선별 <input type="checkbox"/> 유전자 적중 체세포주의 염색체 이상 유무 검증	<input checked="" type="checkbox"/> ZFN/ IL-2R γ 유전자 도입 세포의 단일 세포 클로닝 및 배양 조건 확립 여부 <input checked="" type="checkbox"/> PCR 기법을 이용한 ZFN/ IL-2R γ 유전자 도입 체세포에서의 유전자 클로닝 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 분리된 유전자의 염기서열 분석을 통한 유전자 mutant 여부 선별 여부 <input checked="" type="checkbox"/> ZFN/ IL-2R γ 적중 단일 클론 체세포주의 확립 및 장기 배양 기법 구축 여부 <input checked="" type="checkbox"/> ZFN 유전자 적중 벡터의 염색체 이상 유무 검증 여부	100%
<input type="checkbox"/> 유전자 적중 체세포주의 유전자 검증 분석	<input checked="" type="checkbox"/> ZFN/ IL-2R γ 유전자 적중 체세포주를 이용한 RT-PCR 기법을 이용한 IL-2R γ mRNA 발현 억제 특성 분석 여부	100%
<input type="checkbox"/> 돼지 면역세포의 발달 과정 추적 조사	<input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 면역조직에서의 면역세포의 발달 특성 추적 조사 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 T 면역세포와 B 면역세포의 증식 특성 분석 여부	100%

2차년도 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<ul style="list-style-type: none"> □ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주 선별 및 세포주 확보 □ 유전자 적중 체세포주의 배양 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ PCR 기법을 이용한 ZFN/ IL-2Rγ 유전자 도입 체세포에서의 유전자 적중 체세포주 선별 여부 ☑ 분리된 유전자의 염기서열 분석을 통한 유전자 mutant 여부 선별 여부 ☑ ZFN/ IL-2Rγ 적중 단일 클론 체세포주의 확립 및 장기 배양 기법 구축 여부 ☑ 선별된 IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주의 최적 배양 조건 수립 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 □ 복제 돼지 수정란 특성 분석 및 복제 돼지 생산 및 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 돼지 수정란에의 세포 핵 이식 실시 여부 ☑ 임신돼지에의 핵이식 수정란 이식 여부 ☑ 핵이식 수정란의 이용한 PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 여부 ☑ 유전자 적중 복제 수정란의 시험관에서의 수정란 분열 능력 검증 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 유전자 검증 □ 복제돼지 생체 IL-2Rγ 유전자 발현 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 꼬리, 뇌, 심장 및 간장 조직에서의 genome DNA 적출 여부 ☑ ZFN/IL-2Rγ 특이적 PCR primer를 이용한 ZFN cleavage site DNA 유전자 분리 방법 확립 여부 ☑ PCR 기법을 이용한 생산 복제돼지의 IL-2Rγ 게놈 유전자 분리 여부 ☑ IL-2Rγ 유전자 적중 복제돼지 형질전환 돼지 1개 라인 구축 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 돼지 면역세포의 T 면역세포 생리기능 분석 □ 돼지 혈액내 B 면역세포의 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 미니돼지 말초혈액 유래 T 면역세포를 이용한 시험관 증식 특이성 검증 분석 여부 ☑ Mitogen 자극에 따른 미니돼지 B 면역세포의 증식 특성 분석 여부 ☑ B 면역세포의 immunoglobulin 생산 조건 확립 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 사람 조혈줄기세포 배양 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 사람 태반 유래 줄기세포 분리 기술 확립 여부와 시험관 배양 기술 확립 여부 ☑ 조혈인자 처리를 통한 줄기세포로부터 성숙 조혈세포로의 분화 유도 기술 확립 여부 	100%

3차년도 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<ul style="list-style-type: none"> □ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산 □ Double IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ Double IL-2Rγ 유전자 적중 체세포주를 이용한 수정란 핵이식 여부 ☑ Heterozygote 유전자 적중 복제 돼지 교배를 통한 homozygote 복제 돼지 생산 여부 ☑ 핵이식 수정란의 이용한 PCR 기법을 이용한 IL-2Rγ 유전자 적중 여부 검증 ☑ 유전자 적중 복제 수정란의 시험관에서의 수정란 분열 능력 검증 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 유전자 발현 특성 검증 □ 복제 돼지 면역 장기에서의 IL-2Rγ 유전자 발현 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ ZFN/IL-2Rγ 유전자 적중 복제 돼지의 꼬리, 뇌, 심장 및 간장 조직에서의 genome DNA 적출 여부 ☑ ZFN/IL-2Rγ 특이적 PCR primer를 이용한 ZFN cleavage site DNA 유전자 분리여부 ☑ 염기서열 분석을 통한 IL-2Rγ 유전자 mutation site 염기 서열 검증 여부 ☑ RT-PCR 기법을 이용한 말초혈액 존재 면역세포에서의 IL-2Rγ mRNA 발현 양상 분석 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 유전자 적중 돼지의 흉선 조직 T 면역세포 기능 분석 □ 임파절, 비장등 2차 면역 조직에서의 T 면역세포 기능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 유전자 적중 돼지 흉선조직에서 채취한 T 면역세포를 이용해 시험관 mitogen (ConA,PMA, Ionomycin)을 이용한 면역세포 증식 특성 분석 ☑ 면역조절인자 (IL-2, IL-4, IL7)을 이용한 흉선 T 면역세포의 조절인자 반응성 조사 분석 ☑ 비장조직 유래 T 면역세포를 이용한 mitogen 자극에 따른 증식 특성 분석 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ Mitogen 자극에 따른 유전자 적중 돼지의 B 면역세포 기능 분석 □ 면역조절인자 자극에 따른 B 세포 증식 효능 검증 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 비장 조직에서 채취한 B 면역세포를 이용한 IL-4 조절인자 자극에 따른 isotype switch 능력 검증 ☑ B 면역세포를 이용한 mitogen(PHA,LPS) 자극에 따른 세포 증식 특성 검증 여부 ☑ 조절인자 자극에 따른 B세포의 immunoglobulin 생산 능력 검증 여부 	100%

4차년도 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<ul style="list-style-type: none"> □ IL-2Rγ knock-out 복제 돼지의 지속적 관리 및 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ ZFN에 의한 유전자 변이에 따른 복제 돼지의 지속적 생산 여부 ☑ Homozygotes 미니돼지 생산 여부 ☑ 면역결핍 미니돼지 라인별 관리 시스템 구축 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 복제 돼지라인별 T, B 면역세포 발달특성 분석 □ 자연면역세포의 분화 특성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ Mutant 라인별 복제돼지에 혈액속에서의 면역세포의 면역결핍 검증 확인 여부 ☑ 유세포분석기를 이용한 말초혈액내 NK, 단핵구, 마크로파지 자연면역세포의 정상 분석 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 돼지 IL-2Rγ 유전자 적중 복제돼지를 이용한 사람 줄기세포 생체이식 □ 돼지 골수조직에의 사람 줄기세포 생체이식 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 복제 면역결핍 돼지 생체이식을 위한 이중 세포인 사람 태반 유래 조혈줄기세포의 분리 정제 기술 확립 ☑ 복제돼지 골수조직에의 줄기세포 이식 기술 확립 ☑ 줄기세포 생체 이식 후 복제돼지 골수조직에서의 조혈세포 분리 기술 확립 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 시험관 배양 기법을 이용한 복제 돼지 골수 존재 사람 줄기세포의 분화 능력 검증 □ 사람 줄기세포 생체 이식 돼지 조혈조직에서의 줄기세포 증식 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 돼지 골수조직에서 채취한 혈액 세포를 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색 실시를 통한 생체 증식 효능 검증 분석 ☑ 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력(colony assay,CFU-C) 검증 ☑ 돼지 골수 증식 사람 줄기세포 분리를 통한 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 줄기세포 자기복제 능력 검증 ☑ 각 조혈조직 유래 조혈세포 유전자를 이용한 human specific Alu primer를 이용한 사람 유전자 PCR 검증 	90%

5차년도 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<ul style="list-style-type: none"> □ 면역결핍 복제돼지의 지속적인 생산을 통한 유전자원 확보 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ Double knock-out 복제돼지 교배를 통한 mutant 라인의 지속적 생산 및 관리 여부 ☑ 면역세포의 지속적 검증을 통한 후생 세포학적 특성 분석 여부 ☑ 복제돼지 정자 및 난자 확보 및 냉동보관을 통한 형질전환 돼지 유전 자원 확보 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 복제 돼지의 이종 사람 줄기세포 생체 증식 효능 증진 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ Neonate 복제돼지에의 사람 줄기세포 이식을 통한 증식 효능 검증 분석 여부 ☑ 사람 줄기세포 증식 효율 증진을 위한 간엽줄기세포와의 공이식 기술 개발 여부 ☑ 사람 조혈인자 발현 간엽줄기세포이식을 통한 줄기세포 증식 효율 증진 방법 개발 여부 	80%
<ul style="list-style-type: none"> □ 복제돼지 조혈조직에서 증식되는 사람 조혈세포 특성 분석 □ 복제 돼지 조혈조직에서의 사람 줄기세포 자기복제 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 유세포 분석기를 이용한 사람 조혈줄기세포 특이 항체 CD45, CD34, CD38의 면역염색과 이를 이용한 사람 조혈줄기세포 생체 증식 효능 검증 분석 여부 ☑ 돼지 골수조직세포를 이용한 시험관에서의 human 특이적 조혈형성능력(colony assay) 검증 여부 ☑ 분화 조절인자를 이용한 시험관 사람 조혈줄기세포 분화 능력 검증 여부 ☑ 돼지 골수 증식 사람 줄기세포 분리를 통한 면역결핍 마우스 생체 이식을 통한 줄기세포 자기복제 능력 검증 여부 ☑ 각 조혈조직 유래 조혈세포 유전자를 이용한 human specific Alu primer를 이용한 사람 유전자 PCR 검증 여부 	100%
<ul style="list-style-type: none"> □ 면역결핍 돼지 조혈장기에 존재하는 사람 조혈세포 생체 증식 능력 검증 분석 □ 복제 돼지 조혈기관에서의 줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ☑ 사람 면역세포 특이적 항체인 CD4, CD8, B220를 이용한 흉선 조직에서의 T세포 분화 발달 정도 조사 여부 ☑ 2차 면역기관인 복제돼지 비장, 임파절 조직 유래 면역세포를 이용한 사람 줄기세포 유래 성숙 조혈세포의 존재 여부 검증 여부 ☑ 성숙 조혈세포의 시험관 조혈인자 및 mitogen 자극에 따른 세포 증식 능력 검증 여부 ☑ 말초혈액 존재 이식 사람 조혈줄기세포 유래 성숙 단핵구, 호중구, 마크로파지 및 NK 세포 존재 여부 판별 여부 	80%

최종 연구 개발 내용 및 평가의 착안점과 달성도		
연구 세부 내용	평가방법	달성도
<input type="checkbox"/> 돼지 IL-2R γ 유전자 클로닝 및 염기서열 분석과 ZFN을 통한 유전자 적중 체세포주 개발	<input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 유래 체세포주 구축 및 장기 배양 기술 확립 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 체세포를 이용한 IL-2R γ 유전자 클로닝 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 미니돼지 IL-2R γ 유전자 염기서열 분석여부 <input checked="" type="checkbox"/> ZFN 유전자 적중 벡터의 돼지 체세포주에의 유전자 적중 세포주 확립 여부	100%
<input type="checkbox"/> 돼지 IL-2R γ 유전자 적중 체세포를 이용한 수정란 이식 및 복제 돼지 생산	<input checked="" type="checkbox"/> IL-2R γ +/- 유전자 적중 체세포주를 이용한 수정란 핵이식 및 복제 돼지 생산 여부 <input checked="" type="checkbox"/> IL-2R γ -/- double KO 돼지 생산 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 복제돼지 유전자 검사를 통한 복제돼지 검증 유전자 검사 및 발현 특성 검증 여부	100%
<input type="checkbox"/> 유전자 적중 복제 돼지의 면역결핍 증상 검증	<input checked="" type="checkbox"/> 유전자 적중 돼지 흉선조직에서 채취한 T 면역세포를 이용해 시험관 면역세포 증식 특성 분석 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 면역조절인자 (IL-2, IL-4, IL7)을 이용한 흉선 T 면역세포의 조절인자 반응성 조사 분석여부 <input checked="" type="checkbox"/> B 면역세포를 이용한 mitogen(PHA,LPS) 자극에 따른 세포 증식 특성 검증여부 <input checked="" type="checkbox"/> 조절인자 자극에 따른 B세포의 immunoglobulin 생산 능력 검증 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 돼지 NK 면역세포를 포함한 자연면역세포의 특성 및 기능 분석 여부	100%
<input type="checkbox"/> 면역결핍 돼지 조혈장기에의 사람 조혈줄기세포 생체 이식 및 증식 특성 분석	<input checked="" type="checkbox"/> 유전자 적중 돼지를 이용한 사람 태반 유래 조혈줄기세포의 생체 이식 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 돼지 골수 및 조혈조직에서 증식하는 사람 조혈줄기세포의 자기 복제 능력 검증 분석 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 이종 생착 조혈줄기세포의 성숙 조혈세포로의 분화 특성 분석 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 조혈지지세포를 이용한 조혈줄기세포 증식 방법 개발 여부 <input checked="" type="checkbox"/> 장기간 걸친 조혈재생 능력 검증 평가 여부	80%

제 2절 관련분야 기여도

개발 기술명	관련기술 최고보유국	과제 신청 시 우리나라 기술수준	과제 신청 시 연구 신청팀 기술수준	과제 신청 시 기술개발 목표수준	과제 마감 시 연구 신청팀 기술수준
복제 돼지 생산 기술	미국	90%	100%	100%	100%
돼지 형질전환 기술	미국	80%	100%	100%	100%
면역세포 특성 분석 기술	미국, 일본	50%	80%	100%	100%
조혈줄기 세 포 배양기술	미국, 일본	50%	60%	100%	80%
동물모델 생 체 줄기세포 배양 기술	미국	50%	70%	100%	80%

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

제 5장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

제 1절 연구개발결과의 활용방안

ZFN을 이용한 유전자 적중 기술을 바탕으로 다양한 형질전환 복제돼지의 생산 기반 기술을 확립함과 현재까지 본 연구실에서 구축된 형질전환 기술, 복제 기술, 특수동물 관리 기술, 면역 조절 기술 및 줄기세포 분리 및 증식 기술을 바탕으로 본 연구의 최종 목표인 선천성 면역결핍 형질전환 미니복제 돼지를 생산하고 이를 이용해 사람 이종 줄기세포의 생체이식을 통한 돼지 조혈조직에서의 대량 증식 및 배양 기술을 확립하여 궁극적으로 백혈병을 비롯한 다양한 혈액질환 치료용 치료제로서의 활용을 기대한다.

또한 본 연구과제 수행을 통해서 확립된 면역결핍 미니돼지를 이용한 다양한 조직 유래의 사람 줄기세포의 생체 배양 및 증식 시스템을 구축하고 더불어 사람 장기재생 분야에의 응용을 통한 환자 이식용 장기재생 동물모델에 적용 될 것으로 기대된다.

1. ZFN을 이용한 다양한 형질전환 동물모델 생산을 위한 기반 기술 제공
2. 대동물을 이용한 질환모델동물 생산 구축을 통한 신약 치료 효능 및 안전성 검증 연구용으로 활용을 통한 제약을 포함한 바이오 신약 개발 분야에의 적용
3. 면역결핍 대동물을 이용한 사람 ES 또는 iPSC 배아줄기세포의 생체 다분화 능력 검증 및 생체 종양형성능 검증용 모델로의 활용
4. 환자 유래 성체 줄기세포의 생체 대량 배양 바이옱리액터로서의 활용 기대
5. 면역결핍 동물모델을 이용한 환자 맞춤형 치료용 장기 생산 모델로의 활용이 기대되며 환자 성체 줄기세포의 돼지 태아 세포 이식을 통한 사람 심장, 뼈, 췌도, 피부, 신장, 간장 조직 재생 모델로의 활용
6. 사람 암 발병 대동물모델로의 활용을 통한 사람 암 발병 기전 규명과 병리학적 특성 연구에의 활용이 기대되며 특히 암 치료제 개발 신약 물질의 생체 안전성 및 효능 연구용 모델로서 활용이 기대
7. 사람 면역세포의 동물이식을 통해 사람 암 및 각종 질병 치료용 단백질 신약 생체 대량 생산 모델로의 활용

[동물모델 생체 바이오리액터를 이용한 줄기세포 대량 배양 활용 분야]

사람 줄기세포	임상 활용 분야
조혈줄기세포	급성 백혈병, 만성 백혈병, 면역결핍증, 자가 면역질환 치료제로의 활용
간엽줄기세포	관절염과 동종 장기이식에 따른 면역세포 기능 억제제 및 신경세포 재생 촉진세포로의 활용
신경줄기세포	뇌졸중, 파킨슨, 알츠하이머, 척추 질환 치료제로 활용
간 줄기세포	간경변과 간암등 간 질환 치료용 세포 치료제 활용
췌장 베타세포	당뇨병 치료용 활용
기 타	혈관내피전구세포, 신장줄기세포, 근육줄기세포등 다양한 조직유래 줄기세포를 이용한 바이오 줄기세포 배양 배양 모델로의 활용

제 2절 기대성과

1. 기술적 측면

- ▶ ZFN을 이용한 동물 체세포의 유전자적중기술 및 검증기술 확립
- ▶ 최적 체세포 핵이식 기법 확립 및 동물복제기술 확립
- ▶ 형질전환 동물 생산 및 검증 기술의 최적화 달성
- ▶ 돼지 면역세포의 발달과정 및 특성 분석을 통한 면역세포 기능 제어기술 개발
- ▶ 사람 줄기세포의 대동물 생체 이식과 배양 기술을 통한 바이오리액터 대동물모델 개발
- ▶ 사람 맞춤형 장기 재생용 동물 모델 개발

2. 경제적·산업적 측면

- ▶ 세포 및 장기 생산 모델로의 활용을 통한 의료 치료분야의 확대를 통한 국민 건강 복지 증진 기대
- ▶ 연구 결과물의 특허로 산업재산권 확보에 의한 국가경쟁력 향상
- ▶ 바이오기술 적용에 의한 이중장기용 동물의 고부가가치화 달성
- ▶ 형질전환 동물생산에 의한 바이오제품 대량생산 기반 확보를 통한 국내 축산업의 새로운

발전 방향이 제시

- ▶ 양돈 산업의 활성화를 통한 축산농가의 생산성 향상 및 고부가가치가 창출
- ▶ 환자 맞춤형 세포 및 장기 재생용 무균 돼지로의 활용을 통한 고부가가치 소득 창출
- ▶ 대동물에 이용한 사람 장기 및 세포 재생을 위한 관련 기술의 발달과 산업화 적용을 통한 바이오 관련 산업의 발달 기대됨.
- ▶ 항체를 비롯한 신 바이오 산업에의 직접적 활용을 통한 치료제 대량 생산 구축을 통한 의료비 경감 효과
- ▶ 난치성 또는 불치성 질병 치료를 통한 국민 건강 증진과 의료 비용 절감이 가능하며 국가 노동 생산성 향상으로 인한 국가 경쟁력 강화 효과

제 3절 추가연구의 필요성

- ▶ 본 연구 단독으로는 humanized pig을 완전히 생산하는 것은 불가능하다. 왜냐하면, IL2RG KO pig은 T(-)B(+)NK(-)로 정상적인 기능을 하는 B세포를 함유하기 때문이다. 따라서 이를 극복하기 위해서는 B세포가 결손된 Rag-2 KO pig을 생산하여, 이들 품종과의 교배에 의하여 T(-)B(-)NK(-)인 double Rag2/IL2RG KO pig의 생산이 요구된다. 따라서 산업화를 위해서는 이 분야의 개발이 추가적으로 진행되어야한다.

제 4절 타 연구에의 응용

- ▶ 본 연구는 현재 “Humanized Pig Research Center” SRC에서 일부 사용할 예정이다.

제 5절 기업화 추진방안

- ▶ Double Rag2/IL2RG KO pig이 생산되면 사업화 할 계획이다.

제 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

- ❖ CD59, H-transferase, CD59 + H-transferase 형질전환 돼지, GT 유전자적중 (single KO) + DAF 형질전환 복제돼지 각각 생산 (Alexion, 미국)⁵⁴
- ❖ 인체 장기 이식 때 거부반응을 일으키는 GGTA1 유전자가 제거된 복제돼지 생산 (미주리대학, Immerge Bio Therapeutics)⁵⁵
- ❖ 알파갈 유전자가 제거된 double knock-out 돼지 최초생산 (PPL, 미국)⁵⁶
- ❖ 알파갈 제거 돼지의 심장을 바분원숭이에 이식:179일간 생명 유지 (하버드대)⁵⁷
- ❖ GT 유전자적중(single KO) + DAF + GnT-III 형질전환 복제돼지 생산(메이지대, 일본)⁵⁸
- ❖ GT 유전자적중(double KO) 복제돼지 생산 (알테라이드대, 호주)⁵⁹
- ❖ GGTA1/CMAH knock out pig 돼지 생산 (Indiana university, 미국)⁶⁰
- ❖ RAG2 knock out pig 돼지 생산 (Tsukuba university, 일본)⁶¹
- ❖ RAG1/2 knock out pig 돼지 생산 (Chinese Academy of Sciences, 중국)⁶²
- ❖ IL2RG knock out pig 돼지 생산 (Tsukuba university, 일본)⁶³

제 7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
------	------

▶ 일반과제

8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비 명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장 비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		
-	-	-	-	-	-	-	-	-

▶현금으로 구입한 1개(건)당 3,000만원(부가세 포함) 이상의 연구시설·장비 와 공동활용이 가능한 연구시설·장비라도 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 시설·장비 없음

9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호	D-11
------	------

제 1절 연구실 안전조치 이행계획

1. 기술적 위험 요소 분석과 대처방안

연구내용	실험방법	위험요인	대처방안
섬유세포배양	세포의 분리, 동결 및 해동	첨가시약의 피부접촉 및 흡입으로 인한 화학 및 생리학적 상해	- 후드 내에서 마스크와 장갑을 착용하여 실험함.
		초저온냉동고 및 액체 질소 사용 시 동결물 접촉에 의한 피부저온 화상	- 항상 두꺼운 저온전용 장갑을 착용하여 냉동고 및 질소탱크를 개폐하고 동결물들과 접촉하게끔 함.
		초저온냉동고 및 액체 질소탱크 내에서 동결물 이동 및 해동 시 폭발	- 동결전용튜브를 사용함 - 동결 시 튜브 내 압력이 너무 높지 않게 폐쇄하도록 해야 함. - 항상 안구보호대와 두꺼운 장갑을 착용하여 동결물 이동함 - 급격한 온도변화를 최대한 줄이고자 탱크 내에서 공기 중으로 가급적 천천히 이동함.
돼지 난자 채집 및 체세포핵치환	Glass Capillary Micropipette 제작 및 사용	깨진 Glass Pipette 파편에 의한 물리적 상해	- 정해진 장소에서만 Glass Pipette 을 열로 녹여 커팅하는 조작을 하게끔 함. - 실내에서 항상 양말과 발등까지 덮히는 보호신발을 착용하여 생활함. - 사용이 끝난 Glass Pipette은 즉시 정해진 수거함에 분리 폐기할 수 있게 함.
	돼지 난자 채집(Aspiration)	수술도구(예:주사기바늘)로 오사용으로 인한 물리적 상해	- 보호구 착용 하여 적출수술 진행 - 사전에 수술도구 종류 및 사용법 숙지 - 실내에서 항상 양말과 발등까지 덮히는 보호신발을 착용하여 생활함.
	수정란 이식수술	부정확한 실험동물 보정으로 인한 물리적 상해	- 실험동물 보정법 교육 사전 실시 - 상해 시 즉시 병원에서 적절한 조치를 받을 수 있도록 유도.

			- 보정용 보호장구 착용
유전자형 분석	유전자 증폭	아가로즈겔 제작시 고온노출에 의한 화상	- 두꺼운 보호장갑을 끼고 젤용액을 다룬다
		발암물질(EtBR) 노출	- 분리된 지정공간에서 실험을 진행한다 - 흡입방지를 위해서 후드내에서 작업하고, 화상에 대비해 이중으로 보호장갑을 착용하여 오염방지
단백질 분리 및 Blotting	Buffer제조	분말형태의 독성화학물질에 의한 호흡기 노출	- 항상 마스크와 보호복을 착용 하고 실험한다. - 흘린 용액은 즉시 제거하고 착용한 장갑 등을 통해 다른 장비나 작업환경에 교차오염이 되지 않도록 수시로 교체한다.
병리학적 진단 실험	조직면역염색	고농도 독성용매에 의한 급성호흡기 노출	- 항상 흡후드가 설치된 분리된 공간 내에서 작업을 실시하도록 한다.
		박편 제작 시 블레이드에 의한 자상위험	- 사용수칙에 대한 사전교육을 실시한다. - 두꺼운 소재의 글로브를 착용하여 실험한다.

2. 본 과제를 수행하는 기관 (건국대학교)의 연구실 안전관리 체계

가. 연구실 안전관리 체계 : 연구실안전관리규정에 의거 실험실별로 안전관리책임자(정·부)를 임명하고 연구실 안전사고 발생시 1차적인 경위조사 및 사고 확대방지에 만전을 기하고, 사후 대책 수립 후 7일 이내에 안전관리위원회에 보고한다.

▶ 소속기관장 및 안전관리위원회는 안전점검 및 정밀안전진단의 실시 결과 또는 사고조사의 결과에 따라 연구활동중사자 또는 공중의 안전한 이용을 위하여 긴급한 조치가 필요하다고 판단되는 경우에는 연구실의 사용제한·금지 또는 철거 등 안전상의 조치를 취하게 된다.

▶ 온라인상으로 연구실 안전관리 통합시스템을 구축하여 연구실 현황 및 일상점검, 화학물, 폐기물 관리뿐만 아니라 안전교육 및 야간잔류자안전교육을 실시하고 파악할 수 있다.

연구(실험)실 안전관리 조직도



나. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시

(1) 연구실 위험 등급의 지정 : 안전관리 위원회는 각 실험실 안전관리책임자와 협의하여 연구실에 대한 위험정도에 따라 관리등급을 아래의 표와 같이 지정한다.

구분	구분	구분
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배

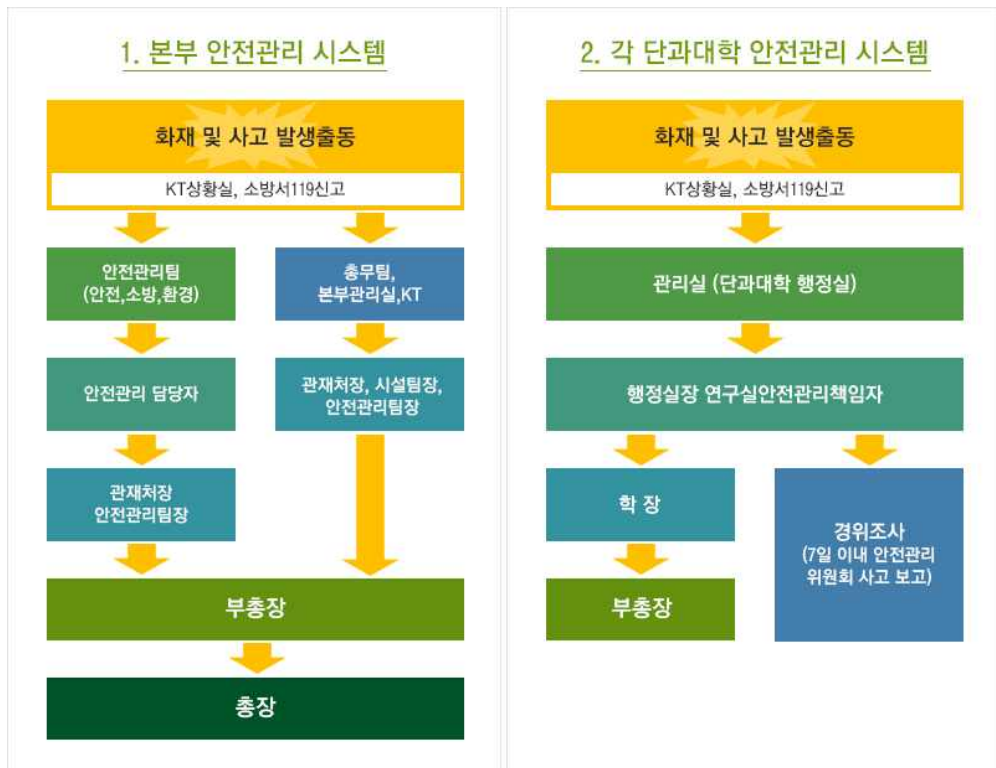
		출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실 등
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실 등
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

(2) 연구실 안전점검 실시 : 연구실의 위험등급에 따라 다음과 같이 정기적으로 안전점검을 실시한 후 안전점검일지를 기록하고 2년간 보관 한다.

- A등급: 매일 1회 일상 순시점검 및 주 1회 기록점검
- B등급: 주 1회 기록점검
- C등급: 월 1회 기록점검

(3) 연구실 정밀안전진단 실시 및 보고: 연구실안전점검을 실시한 결과 연구실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에 전담부서가 정밀안전진단을 직접 실시하거나 일정 요건을 갖춘 전문기관으로 하여금 대행하게 할 수 있고 그 결과를 지체없이 총장에게 보고하고 이를 해당기관에 통보하여야 한다.

(4) 안전사고에 따른 업무 계통도



다. 교육 훈련

(1) 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18 조, 동법 시행령 제 17 조 및 동법 시행규칙 제 9 조 실험실 안전관리 규정 제 16 조(안전교육), 제 17 조(안전교육의 관리)에 관련하여 매년 일정시간 이상의 연구실안전교육을 실시한다.

(2) 연구실안전교육은 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등을 대상으로 실시한다.

(3) 안전교육 훈련시간

구분	대상	시간
정기	연구 활동 종사자	8 시간이상/반기별
신규채용	신규채용 된 연구 활동 종사자 (계약직 포함)	6 시간이상
	대학·연구기관 등에서 채용된 자 외의 자로서 신규로 연구 개발 활동에 참여하는 연구 활동 종사자	2 시간이상
특별안전	중대 연구실사고 발생 및 연구내용 변경 등의 경우 연구주체의 창이 필요하다고 인정하는 연구 활동	6 시간이상

(4) 안전교육절차



(5) 보험 현황

- ▶ 연구실 안전공제증권 회사명 : 교육시설재난공제회
- ▶ 공제가입기간: 2015.05.04 ~ 2016.05.04 (366일간)
- ▶ 공제가입금액
 - 사망/후유장해(1급시): 100,000,000원
 - 상해: 10,000,000원

▶ 총 공제료: 53,391,000원

▶ 보험 행정 절차 시스템

(6) 건강 검진 : 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자의 건강을 보호하고자 산업안전보건법 시행령 제29조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시한다.

(7) 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

제 2절 LMO 연구시설 및 수입신고 현황

시설 번호	▶강의동 101호 : LML09-174 ▶강의동 401-2호 : LML09-175 ▶폐지사육실 : LML08-541	안전 관리 등급	2등급
수입 신고(최근 1년간)			

제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문계 재지/ 특허등 록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문계 재일 /특허등 록일	사사여 부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	특허	인터루킨2수용체 감마 유전자적중벡터,그 벡터가 도입된 면역세포 결핍 형질전환 미니복제 돼지생 산과 그 제조방법 및 활용	건국대 학교 산학협 력단	PCT 출원 (진입국가)- 대한민국, 유럽, 미국, 중국, 일본	-	2015.10. 30	-	출원번호 10-156649 8	
2	논문	Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extract from germinal vesicle stage pig oocytes	건국대 학교	교신 저자	DEVE LOPM ENT	6.596	2012.12. 01	중복	SCI/19
3	논문	Identification and characterization of putative stem cells in the adult pig ovary	건국대 학교	교신 저자	DEVE LOPM ENT	6.671	2014.01. 23	중복	SCI/9
4	논문	Growth and Replication of Infectious Bursal Disease Virus in the DF-1 Cell Line and Chicken Embryo Fibroblasts	건국대 학교	공동 저자	Hinda wi Publis hing Corpor ation	2.88	2014.05. 14	단독	SCI/4
5	논문	Partial loss of interleukin 2 receptor gamma function in pigs provides mechanistic insights for the study of human immunodeficiency syndrome	건국대 학교	교신 저자	Oncot arget	5.008	2016.07. 24	단독	SCI/0

제 11장 기타사항

코드번호	D-13
○ 없음	

제 12장 참고문헌

코드번호	D-14
------	------

1. 2007년 장기이식 통계연보. (KONOS 2007).
2. 2001년 장기이식 통계연보. (KONOS 2001).
3. Zhao XY, Li W, Zhuo L, et al. (2009). "iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation". *Nature*. 461(7260): 86 - 90.
4. "Stem cell research—a market insight report". (2008). Research Impact Technologies.
5. 한국보건산업진흥원. (2007). "2007 보건산업백서".
6. Glover JC, Boulland JL, Halasi G, Kasumacic N. (2010). "Chimeric Animal Models in Human Stem Cell Biology". *ILAR Journal*. 51(1): 62-73.
7. Wobus AM, Boheler KR. (2005) "Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy". *Physiol Rev*. 85(2): 635-678.
8. Passier R, Mummery C. (2003). "Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair". *Cardiovasc Res*. 58(2): 324-335.
9. Cheng L, Ramesh AV, Flesken-Nikitin A, et al, (2010). "Mouse models for cancer stem cell research". *Toxicol Pathol*. 38(1): 62-71.
10. Zimmerman B, Niewiesk S, Lairmore MD. (2010). "Mouse models of human T lymphotropic virus type-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma". *Vet Pathol*. 47(4): 677-689.
11. Kanemura H, Go M, Shikamura M, et al, (2014). "Tumorigenicity Studies of Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Retinal Pigment Epithelium (RPE) for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration". *PLoS One*.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085336>.
12. Fujiki Y, Fukawa K, Kameyama K, et al, (2003). "Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation". *Transplantation*. 75(7): 916-922.
13. Hammerman MR. (2004). "Organogenesis of kidneys following transplantation of renal progenitor cells". *Transpl Immunol*. 12(3-4): 229-39.
14. Troeger C, Surbek D, Schöberlein A, et al, (2006). "In utero haematopoietic stem cell transplantation: experiences in mice, sheep and humans". *Swiss Med Wkly*. 136(31-32):

498-503.

15. Young AJ, Holzgreve W, Dudler L, et al. (2003). "Engraftment of human cord blood-derived stem cells in preimmune ovine fetuses after ultrasound-guided in utero transplantation". *Am J Obstet Gynecol.* 189(3): 698-701.
16. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep". *Nat Med.* 6(11): 1282-1286.
17. Almeida-Porada G, Crapnell K, Porada C, et al. (2005). "In vivo haematopoietic potential of human neural stem cells". *Br J Haematol.* 130(2):276-283.
18. Boulland JL, Halasi G, Kasumacic N, et al. "Xenotransplantation of human stem cells into the chicken embryo". *J Vis Exp.* doi: 10.3791/2071.
19. Arthur A, Shi S, Zannettino AC, et al. (2009). "Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance". *Stem Cells.* 27(9):2229-2237.
20. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al. (2010). "Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells". *Cell.* 142(5): 787-799.
21. "Stem cell scientist to try growing human organs in pigs" (2015). *Nikkei Asian Preview* 2015년 07월 02일자 기사.
<http://asia.nikkei.com/magazine/20150702-ASIA-S-STARTUPS-SWITCHED-ON/Tech-Science/Stem-cell-scientist-to-try-growing-human-organs-in-pigs>.
22. Zhang S, Yajima H, Hyunh H, et al. (2011). "Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair". *The Journal of Cell Biology.* 193(2): 295-305.
23. Ikebe M, Miyakawa K, Takahashi K, et al. (1997). "Lymphohaematopoietic abnormalities and systemic lymphoproliferative disorder in interleukin-2 receptor gamma chain-deficient mice". *Int J Exp Pathol.* 78(3): 133-148.
24. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes". *Cell.* 68(5): 869-877.
25. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement". *Cell.* 68(5). 855-867.
26. Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, et al. (2010). "Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases".

PLoS One 5:e8870.

27. Weidanz WP, LaFleur GL, Kita-Yarbro A, et al. (2011). "Signaling through the IL-2 receptor γ c peptide (CD132) is essential for the expression of immunity to *Plasmodium chabaudi* adami blood-stage malaria". *Parasite Immunol.* 33(9): 512-516.
28. Koboziev I, Jones-Hall Y, Valentine JF, et al. (2015). "Use of Humanized Mice to Study the Pathogenesis of Autoimmune and Inflammatory Diseases". *Inflamm Bowel Dis.* 21(7): 1652-1673.
29. Puck JM, Basile GDS, Schwarz K, et al. (1996). "IL2RGbase: a database of γ c-chain defects causing human X-SCID". *Immunology Today.* 13(11): 507-511.
30. Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. (2002). "Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases" *Genetics.* 161(3): 1169-1175.
31. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, et al. (2008). "Rapid "Open-Source" Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification". *Molecular Cell.* 31(2): 294-301.
32. Le Provost F, Lillico S, Passet B, et al. (2010). "Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis". *Trends Biotechnol.* 28(3): 134-141.
33. Greenwald DL, Cashman SM, Kumar-Singh R. (2010). "Engineered zinc finger nuclease-mediated homologous recombination of the human rhodopsin gene". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(12): 6374-6380.
34. Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, et al. (2009). "Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases". *Nature.* 459(7245): 437-441.
35. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. (2009). "Knockout Rats Produced Using Designed Zinc Finger Nucleases". *Science.* 325(5939): 433.
36. Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, et al. (2009). "High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases". *Nature* 459, 442-445.
37. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. (2009). "Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases". *Nat Biotechnol.* 27(9): 851-857.
38. Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, et al. (2008). "Efficient Gene Targeting in *Drosophila* With Zinc-Finger Nucleases". *Genetics.* 172(4): 2391 - 2403.
39. Santiago Y, Chan E, Liu PQ, et al. (2008). "Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases". *PNAS.* 105(15): 5809 - 5814.

40. Urnov FD, Miller JC, LEE YL, et al. (2005). “Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases”. *Nature*. 435: 646-651.
41. Ochiai H, Fujita K, Suzuki K, et al. (2010). “Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases”. *Genes Cells*. 15(8): 875-885.
42. Mashimo T1, Takizawa A, Voigt B, et al. (2010). “Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases”. *PLoS One*. 25:5(1):e8870.
43. Takasu Y1, Kobayashi I, Beumer K, et al. (2010). “Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection”. *Insect Biochem Mol Biol*. 40(10): 759-765.
44. Lee HJ, Kim EJ, Kim JS. (2009). “Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases”. *Genome Res*. 20(1): 81 - 89.
45. “장기이식용 형질전환 복제돼지 탄생”. (2009). 연합뉴스 2009년 04월 22일자 기사.
<http://news.naver.com/main/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=102&oid=001&aid=0002621649>.
46. “엠젠플러스, 국내 최초로 면역결핍 돼지 생산”. 머니투데이 2016년 02월 25일자 기사.
<http://news.mt.co.kr/mtview.php?no=2016022515549661102>.
47. Choi YJ, Lee KH, Park WJ, et al. (2016). “Partial loss of interleukin 2 receptor gamma function in pigs provides mechanistic insights for the study of human immunodeficiency syndrome”. *Oncotarget*. DOI: 10.18632/oncotarget.10812.
48. Lee KH, Kwon DN, Ezashi T, et al. (2014). Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency“. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(20): 7260-7265.
49. Kwon DN, Lee K, Kang MJ, et al. (2013). “Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs”. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep01981.
50. “장기이식용 돼지 국내 첫 생산”. 한겨레 2009년 04월 22일자 기사.
http://www.hani.co.kr/arti/science/science_general/351178.html.
51. “돼지 체도 당뇨환자 이식 이르면 2010년 가능”. 동아닷컴 뉴스. 2008년 11월 21일자 기사. http://news.donga.com/It_List/3/08/20081121/8660737/1
52. Ahn KS, Won JY, Park JK, et al. (2010). “Production of human CD59-transgenic pigs by embryonic germ cell nuclear transfer”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 400(4): 667-672.

53. “경상대 김진회 교수팀 복제돼지 성공” (2002). 경남신문 2002년 08월 20일자 기사.
<http://www.knnews.co.kr/news/articleView.php?idxno=343173>.
54. Costa C, Zhao L, Burton WV, et al. (2002). “Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection”. *Xenotransplantation*. 9(1):45-57.
55. Lai L1, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. (2002). “Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning”. *Science*. 295(5557): 1089-1092.
56. “PPL Therapeutics PLC: World’s First Cloned Double Knock-Out Pigs Lack Both Copies of Gene Involved in Hyperacute Rejection in Humans”. PPL Therapeutics. 2002년 8월 22일자 기사. <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-1-82>.
57. “인공장기 : 돼지의 심장.신장 이식 원숭이“. (2006). 한경신문. 2006년 05월 08일자 기사.
<http://www.hankyung.com/news/app/newsview.php?aid=2006050700131>.
58. Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, et al. “Production of α 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III”. (2005). *Transgenics*. 10.1002/mrd.20305
59. Harrison S, Boquest A, Grupen C, et al. (2004). “An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs“. *Cloning Stem Cells*. 6(4): 327-331.
60. Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, et al. (2013). “Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose α -1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation”. *Xenotransplantation*. 20(1):27-35.
61. Suzuki S, Iwamoto M, Hashimoto M, et al. (2016). “Generation and characterization of RAG2 knockout pigs as animal model for severe combined immunodeficiency”. *Vet Immunol Immunopathol*. 178: 37-49.
62. Huang J, Guo X, Fan N, et al. (2014). “RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency”. *J Immunol*. 193(3): 1496-1503.
63. Suzuki S, Iwamoto M, Saito Y, et al. (2012). “Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs”. *Cell Stem Cell*. 10(6): 753-758.
64. 김현일. (2016). “바이오장기 생산용 형질전환 동물의 연구 및 산업동향”. Bric View. 2016-T21. <http://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=2586>.
65. Zhang MC, Liu X, Jin Y, Jiang DL, et al. (2015). “Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma“. *Am J Transplant*. 15(4):

1068-1075.

66. Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, et al. (2016). "Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft". *Nat Commun.* 11138. doi: 10.1038/ncomms11138.
67. Park JY, Park MR, Bui HT, et al. (2012). "α1,3-galactosyltransferase deficiency in germ-free miniature pigs increases N-glycolylneuraminic acids as the xenoantigenic determinant in pig-human xenotransplantation". *Cell Reprogram.* 14(4): 353-363.
68. Bui HT, Van Thuan N, Kwon DN, et al. (2014). "Identification and characterization of putative stem cells in the adult pig ovary". *Development.* 2014, 141(11): 2235-2244.
69. V. Dimov. (2010). "T-cell receptor excision circles (TRECs)". *AllergyCases.org.* <http://allergycases.blogspot.kr/2010/05/t-cell-receptor-excision-circles-trecs.html>.
70. Bui HT, Van Thuan N, Kwon DN, et al. (2014). "Identification and characterization of putative stem cells in the adult pig ovary". *Development.* 141(11): 2235-2244.
71. Choi YJ, Lee K, Park WJ, et al. (2014). "Partial loss of interleukin 2 receptor gamma function in pigs provides mechanistic insights for the study of human immunodeficiency syndrome". *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.10812.
72. Schrader S, Klos A, Hess S, et al. (2007). "Expression of inflammatory host genes in Chlamydia trachomatis-infected human monocytes". *Arthritis Res Ther.* 9(3): R54.
73. Ozawa A, Tada H, Tamai R, et al. (2003). "Expression of IL-2 receptor beta and gamma chains by human gingival fibroblasts and up-regulation of adhesion to neutrophils in response to IL-2". *J Leukoc Biol.* 74(3): 352-359.
74. Sattler A, Wagner U, Rossol M, et al. (2009). "Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation". *Blood.* 113(9): 1948-1956.
75. Hofmann SR, Lam AQ, Frank S, et al. (2004) "Jak3-independent trafficking of the common gamma chain receptor subunit: chaperone function of Jaks revisited". *Mol Cell Biol.* 24(11): 5039-5049.
76. Reichel M, Nelson BH, Greenberg PD, et al. (1997). "The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression". *J Immunol.* 158(12): 5860-5867.
77. Thomis DC, Lee W, Berg LJ. (1997). "T cells from Jak3-deficient mice have intact TCR signaling, but increased apoptosis". *J Immunol.* 159(10): 4708-4719.

78. van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, et al. (2003). "Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues". *Arthritis Rheum.* 48(8): 2132-2145.
79. Uribe L, Weinberg KI. (1998). "X-linked SCID and other defects of cytokine pathways". *Semin Hematol.* 35(4): 299-309.
80. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. (2008). "The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease". *Immunol Rev.* doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00631.x.
81. Behbod F, Erwin-Cohen RA, Wang ME, (2001). "Concomitant inhibition of Janus kinase 3 and calcineurin-dependent signaling pathways synergistically prolongs the survival of rat heart allografts".
82. Gu XX, Yue FY, Kovacs CM, (2007). "The role of cytokines which signal through the common gamma chain cytokine receptor in the reversal of HIV specific CD4(+) and CD8(+) T cell anergy". *PLoS One.* 21:2(3):e300.
83. Chklovskaja E, Nissen C, Landmann L, (2001). "Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A". *Blood.*97(4): 1027-1034.
84. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor". *Science.* 262(5141): 1877-1880.
85. McElroy CA, Dohm JA, Walsh ST. (2009). "Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex". *Structure.* 17(1): 54-65.
86. Kondo M, Akashi K, Domen J, et al. (1997). "Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice". *Immunity.* 7(1): 155-162.
87. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. (1997). "Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells". *Immunity.* 7(4): 493-504.
88. Li W, Kashiwamura S, Ueda H, et al. (2007). "Protection of CD8+ T cells from activation-induced cell death by IL-18". *J Leukoc Biol.* 82(1): 142-151.
89. Plunkett FJ, Soares MV, Annels N, et al. "The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8+ T cells during acute Epstein-Barr virus infection". *Blood.* 97(3): 700-707.

90. Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN. (2000). "Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis". *Int Immunol.* 12(7): 1005-1013.
91. Pérez-Andres M1, Almeida J, Martín-Ayuso M, et al. (2006). "Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire". *Cancer.* 106(6): 1296-1305.
92. Gregory MA, Phang TL, Neviani P, (2010). "Wnt/Ca2+/NFAT signaling maintains survival of Ph+ leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl". *Cancer Cell.* 18(1):74-87.
93. Moon YH, Oh TJ, Kin NY, et al. (2009). "Methylated DNA Isolation (Assay-Mediated DNA Methylation Detection and Whole-Genome Methylation Profiling)". *American Biotechnology Laboratory.* 27(10): 23-25.
94. Langmead B, Salzberg SL. (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2". *Nat Methods.* 9(4): 357-359.
95. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. (2002). "The human genome browser at UCSC", *Genome Res* 12(6):996-1006.
96. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq". *Nat Methods.* 5(7): 621-628.
97. Lienhard M, Grimm C, Morkel M, et al. (2014). "MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments". *Bioinformatics.* 2014 30(2): 284-286.
98. Quinlan AR, Hall IM. (2010). "BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features". *Bioinformatics.* 26(6): 841-842.
99. Heinz S, Benner C, Spann N, et al. (2010). "Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities". *Mol Cell.* 38(4): 576-589.
100. Li H, Durbin R. (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform". *Bioinformatics.* 25(14): 1754-1760.
101. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq". *Nat Methods.* 5(7): 621-628.
102. Lienhard M, Grimm C, Morkel M, et al. (2014). "MEDIPS: genome-wide differential

- coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments”. *Bioinformatics*. 30(2): 284-286.
103. Love MI, Huber W, Anders S. (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2”. *Genome Biol*. 15(12): 550.
104. Anders S, Huber W. (2010). “Differential expression analysis for sequence count data”. *Genome Biol*. 11(10): R106.
105. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. (2009). “The Sequence Alignment/Map format and SAMtools”. *Bioinformatics*. 25(16): 2078-2079.
106. Quinlan AR, Hall IM. “BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features”. *Bioinformatics*. 26(6): 841-842.
107. Heinz S, Benner C, Spann N, et al. (2010). “Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities”. *Mol Cell*. 38(4): 576-589.