

3120605-05

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개()

농생명산업기술개발사업 최종보고서

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002231-01

형가
질축
전유
환래
/
질전
환분
모화
델능

동물
기
세
생
포
산
를
기
술
이
용
개
한
발
고
효
율

최
종
보
고
서

2017

농
림
축
산
식
품
부

농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

가축유래 전분화능
줄기세포를 이용한 고효율
형질전환/질환모델 동물
생산기술 개발

최종보고서

2017. 12. 17.

주관연구기관/서울대학교 산학협력단
협동연구기관/강원대학교 산학협력단
경상대학교 산학협력단
충남대학교 산학협력단
(주)옵티팜

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

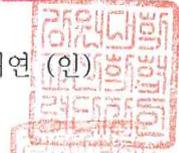
본 보고서를 “가축유래 전분화능 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환모델 동물 생산기술 개발”(개발기간 : 2012.12.18 ~ 2017.12.17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01 . 30 .

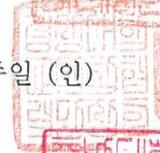
주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 김철환 (인)



협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 정재연 (인)



경상대학교 산학협력단 (대표자) 정종일 (인)



충남대학교 산학협력단 (대표자) 김영국 (인)



(주)옵티팜 (대표자) 박철세 (인)



주관연구책임자 : 임정목

협동연구책임자 : 박태섭, 박춘근, 노규진, 진동일
최기명

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

국문 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>본 연구는 경제동물 줄기세포 활용 산업화기술 개발을 위하여 기획되었음. 산업적 가치가 큰 닭과 돼지 (전능성) 줄기세포를 활용하여 질병 및 분화모델 (닭) 과 생체반응기 및 바이오 장기생산 (돼지) 에 활용될 수 있는 선도기술 개발이 연구목표임. 동물줄기세포 활용기술 개발을 위한 본 과제는 직접적 치료기술 개발을 모색하는 인간 줄기세포 연구와는 차별화된 줄기세포 산업화기술 개발과제이며, 보다 효과적인 기술개발과 산업화를 촉진하기 위하여 세포생리적 특성이 검증된 순수 줄기세포 확보 및 세포은행을 포함한 연구 인프라 구축을 동시에 추구하는 것임.</p> <p>본 연구는 동물 줄기세포 중 산업적 가치가 가장 높은 닭과 돼지 줄기세포를 생명자원으로 활용하여 동물산업 선도기술을 개발하는 것이 목표임. 연구의 최종 업적물로 줄기세포를 활용한 선도적 동물모델 발굴 및 생체반응기 및 바이오장기 생산에 활용할 수 있는 줄기세포 유래 (형질전환) 동물 생산을 도출할 것임. 연구 결과물로 1> 전능성/기능성 줄기세포 확보, 2> 연구개발 인프라 구축, 3> 특수 분화/질병모델 개발 및 4> 줄기세포 유래 동물생산 실용화 기술 등이 도출 될 것임. 본 연구는 총 2개의 세부과제와 4개의 협동과제로 구성하였으며, 줄기세포 유래 돼지의 효율적 생산을 위하여 동물산업기업인 옵티팜이 위탁과제에 참여하고 있음. 과제수행을 통하여 사람과는 다른 동물만의 차별화된 줄기세포 활용기술 개발을 모색함과 동시에 첨단 지식산업 발달에 필요한 기반-핵심기술을 개발함.</p> <p>연구의 성공적 진행을 위하여 본 사업은 사전 기획 및 자료조사를 토대로 경제동물 중 산업적 가치가 가장 높은 닭과 돼지를 연구대상으로 선정하였으며, 동물 생명공학 및 줄기세포 연구전망을 토대로 동물분야 고유의 선도기술 개발을 효과적으로 모색할 수 있는 연구개발 모듈을 축종 특성에 맞게 설정하였음. <u>가금의 경우 1> 체조직 유래 전능성/다능성 줄기세포 발굴과 2> 생체반응기용 줄기세포 유래 형질전환 가금 생산, 돼지의 경우는 3> 줄기세포를 활용한 체세포핵이식 기술개발 및 4> 성체유래 전능성/다능성 줄기세포 발굴, 그리고 5> 줄기세포 유전자 적중을 통한 카메라/형질전환 돼지 생산을 중점적으로 모색 하였음.</u></p>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구개발사업의 결과물로 확보되는 유용 경제동물 유래 줄기세포를 대상으로 산업동물 기반 줄기세포은행 설립 ▪ 가금 골수세포의 유효분비물질을 활용한 생명신소재 발굴 및 산업재산권 확보 ▪ 유용 단백질 생산을 위한 형질전환 닭 생산기술의 안정화 ▪ 높은 효율의 핵이식 기술 및 형질전환 수정란 생산 방법의 안정화 ▪ 효과적인 유전자 적중 기술을 이용한 형질전환 카메라/복제 돼지 생산 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>본 연구는 미래사회의 시장성, 미래시장전망 분석 및 현재까지의 연구개발 현황을 분석하여 동물 줄기세포 만의 차별화된 경쟁력을 확보하기 위한 파일럿 과제 임. 본 연구의 성공적 수행을 통하여 동물줄기세포 연구의 저변이 확대됨은 물론, 인간 줄기세포 연구와는 차별화된 산업적으로 활용 가능한 생명공학 기술을 개발 할 수 있을 것임. 성과를 토대로 전 세계적으로 빠르게 확장하고 있는 줄기세포 연구에 동물줄기세포 활용분야를 포함시킴으로 국제적 경쟁력 확보 및 동물분야 고유의 차별화 된 연구개발이 가능해질 것임. 연구의 효율적 추진을 통하여 연구자 간 융합형 네트워크와 분야 발전을 위한 효과적인 동물 줄기세포 연구 인프라를 구축할 것이며, 이를 활용하여 우리나라 동물줄기세포 연구를 수행하고 있는 모든 연구자가 공유할 수 있는 연구지원 시스템을 확립할 예정임. 따라서 동물 줄기세포의 체계적인 관리 및 공급을 통한 연구 인프라 구축과 연구 활성화를 기대하고 있음. 한편 줄기세포 특이적 질환모델 및 분화기술 개발을 위하여 미국, 호주 및 국내 의과대학과 상호 보완적이면서도 독립적인 연구네트워크를 운용할 것이며, 국제적 경쟁력을 가진 생명공학기술 개발기반을 구축할 수 있을 것임. 닭, 돼지 배아 및 형질전환 동물을 활용한 질환동물모델 생산을 통하여 고부가 가치 창출은 물론, 경제동물 및 실험동물 시장의 국제적 주도권을 확보할 것임. 과제 특성상 공익적 개념의 줄기세포 연구기반 확보를 위하여 과제를 통해 개발된 줄기세포를 연구자들에게 공유할 것이며, 이를 통해 우리나라 동물 줄기세포 연구 활성화 및 활용도 증진이 향상되기를 기대하고 있음.</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	돼지	닭	줄기세포	질환동물모델	산업화
영문핵심어 (5개 이내)	Pig	Chicken	Stem cells	Disease transgenic model	Industrialization

SUMMARY

Purpose& Contents	<p>This research is designed to strengthen the development of an industry-oriented technology for utilizing animal stem cells, which lead to develop leading technology for disease/differentiation model, bioreactor production and cell/tissue regeneration. We selected chicken and porcine species based on their economic values as target animals of research. We have tried to find out innovative methods for utilizing animal cells, which prominently different from human stem cells. To establish research infrastructure, we have established a bank system of function cells, which is functionally connected to cell manipulation laboratory and animal farm. Based on this infrastructure, our efforts became focused to retrieve stem cell of various functions (in chickens), 2> to renovate technology for stem cell derivation and utilization (in pigs). and 3> to acquire the rights of intellectual property for industrial application.</p>				
Results	<p>Initial purposes of this research became focused to find out the utilization of newly discovered, multipotent-like, progenitor cells in chicken and to stabilize the technology for transgenic chicken and pig production. Number of notable outcome was derived from a series of researches;</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Establishment of the bank system of functional cells for industrial application, which is functionally closed to animal farm and laboratory with clean facility ▪ First discovery of osteogenesis-driven functional cells from neonate chicks, which can be possible by alternative concept on species difference. Based on this research outcome, we begin to apply this unique technology of differentiation for the industry of cell and tissue regeneration and differentiation. A multi-disciplinary approach using smart devices can be utilized for further research and we anticipate to develop new pharmaceutical substances from chicken bone marrow cells ▪ Stabilization of the technologies for transgenic chicken production as a bioreactor and for somatic cell nuclear transfer and transgenic embryo production. Stable production of transgenic chimeric/clone porcine with effective gene targeting methodology became also possible. 				
Expected Contribution	<p>By this research, we expect to expand the infrastructure of animal stem cell research and to activate an industrial application of novel biotechnology for various field of bioscience and engineering. Based on our research outcome, we could obtain competitiveness and specific advantages in an animal stem cell research. Such establishment of research infrastructure make it possible to pursue innovative research. Some research infrastructure can be shared with every stem cell researchers, which can motivates various researches for utilizing animal cells of specific function. Novel findings on the function of chick bone marrow cells expand the utilization of animal cells for develop innovative medical technology and drug development. Research network with medical school of USA and Australia for pursuing our research can also expand both global network and industrial application. The research outcome from our proposal will be shared with other scientists for public interest, which further activate animal stem cell research.</p>				
Keywords	Pig	Chicken	Stem cells	Disease transgenic model	Industrialization

< Contents >

1. Overview of Research and development	1
2. Scope and results of the study	14
3. Target attainment and contribution to related fields	212
4. Plan for utilizing study results, etc	220
Attachment. References	222

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 연구수행내용 및 성과	14
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	212
4. 연구개발성과의 활용 계획 등	220
붙임. 참고 문헌	222

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 목적

세부과제명 및 목표		연구개발의 목적
총괄 1세부	가축유래 전분화능 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환모델 동물 생산기술 개발	- 닭의 체조직 유래 전능성/다능성 줄기세포 확보 및 조작·배양 기술을 개발하며, 확립된 인프라를 기반으로 인간/동물의 유병 및 분화기전 해석에 필요한 <i>ex vivo</i> 모델의 확립 및 닭 및 돼지 줄기세포 연구결과 확보한 줄기세포를 기탁받아 동물 줄기세포 은행을 설립하고, 줄기세포 생산 프로토콜 정립 및 세포품질평가 기준을 제시하여 체계적 관리 및 안정적 공급을 위한 시스템 구축
2세부	고부가 달걀 생산을 위한 가금 생식줄기세포의 유전자 조절 체계 확립	- 고부가 달걀 생산을 위한 유용물질 유전자 확보와 가금 생식줄기세포 확립 및 장기보관 시스템 확립 및 형질 전환 가금 생산 및 유용물질 발현 양상 확인
1협동	돼지 체내 수정란 유래배아줄기세포 생산 인프라 구축	- 돼지의 체내/외 수정란과 체세포 핵이식 수정란 유래 배아 줄기세포 생산 기술을 개발하고 대량·장기 배양 시스템 및 효율적인 동결 시스템을 확립하여 고품질 배아줄기세포 생산 인프라를 구축
2협동	체세포 유래 줄기세포 활용 질병 특이적 돼지 생산기술 개발	- 다양한 기원의 중간엽 줄기세포와 유도만능줄기세포를 확보하고, 최적의 핵이식 공여세포를 선별기술을 개발 하고 타 세부과제와 연계하여 고효율 형질전환 공여세포를 제작하여 핵이식을 통한 형질전환 돼지 생산기술을 개발
3협동	돼지 줄기세포를 이용한 유전자 조작 기술의 확립	- 돼지줄기세포를 이용하여 유전자변이 기술을 개발하고, 이를 이용하여 돼지 줄기세포에서 muscle dystrophy를 유발하는 Dystrophin 유전자가 조작된 줄기세포주의 구축 및 사람의 DMD(Duchenne muscular dystrophy, 듀센근육위축증) 질환모델돼지의 개발
4협동	줄기세포 유래 형질전환 복제 돼지 생산	- 돼지의 전분화능 형질전환 줄기세포를 공여세포로 이용하여 특정 형질이 변환된 형질전환복제돼지를 생산
종합		- 산업적 가치가 큰 가금과 돼지의 줄기세포를 활용하여 의료물질과 생체 반응기, 바이오 장기생산에 활용 가능한 동물생산을 위한 생명공학 기술 개발

1-2. 연구개발의 필요성

- 줄기세포는 세포 자신을 무한 생산할 수 있는 자가증식능 (self-renewal) 및 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 다분화능 (multipotency)/전분화능 (pluripotency)을 보유하고 있어, 세포치료술 및 조직공학기술 개발에 필수적으로 인식되고 있음. 따라서 줄기세포를 이용한 치료기술의 개발 및 관련 제품시장은 전 세계적으로 증대하고 있음.
- 동물줄기세포 연구는 인간을 대상으로 하는 세포치료제 개발 연구와 차별성을 가져야 함. 현재 동물 줄기세포 관련 기초 자료 및 각종 시료가 부족하며, R&D 연구 인프라가 미비하여 동물줄기세포 연구가 정체되어 있는 실정임.
- 전능성을 지닌 줄기세포는 일반적으로 체세포에 비해 유전자 조작이 훨씬 유리한데, 이는 시험배지에서 세포군을 형성하면서 자라기 때문에 세포수가 많고, 전능성을 유지하면서 세포분열이 빠르기 때문에 적당한 유전자 벡터를 삽입시킨 후 homologous recombination/non-homologous end joining과 같은 현상을 효율적으로 유발시킬 수 있고, 내생 유전자가 정확하게 적중된 세포군을 선별할 수 있는 장점이 있음.
- 닭은 경제 산업적으로 매우 높은 부가가치를 가지고 있는 동물이며 실험동물로서도 특정 질환 목적의 모델동물로서 이용되고 있음. 또한 달걀은 저비용 대량생산이 가능한 생체반응기로 줄기세포 분화추적 연구 및 세포-미세환경간 연구에 많은 실험적 성과가 기대되고 있음.
- 돼지는 해부생리학적으로 인간과 매우 유사한 특성을 가지고 있으며, 각종 질환 모델 개발이 쉬워 인간에게 적 용할 수 있는 전 임상 실험동물로 이용가치가 높을 뿐 아니라, 난치병 치료를 위한 이종장기 생산, 이종세포치료기술 개발 및 치료용 생물신소재 (therapeutic biomaterials) 개발에 유용한 산업경제동물임.
- 이러한 이유로, 재생 의학적 차원에서 닭과 돼지로부터 유래한 줄기세포의 연구가 활발히 진행되고 있음. 특히, 돼지골수에서 중간엽 줄기세포를 분리한 후 심근경색모델 동물의 심근 부위로 이식하여 혈액의 흐름과 심장기능이 개선되었다는 보고가 있으며 (Fuchs et al., 2001), 이는 돼지 중간엽 줄기세포의 세포/조직 수준의 정밀한 평가기반이 구축되어 수행된다면 손상된 각종 중간엽 조직 및 골격조직에 있어서 가치가 큰 재생의학 모델 시스템이 될 것이라 여겨짐. 또한 닭의 배아를 이용하여 줄기세포의 기작 및 분화를 실시간으로 관찰할 수 있는 기반연구도 수행되고 있으며 (Haque et al., 2011) 이는 닭 배아의 줄기세포 연구모델로서의 큰 가능성을 보여 주었음.
- 닭 줄기세포의 연구는 현재 배아 및 골수 등의 한정적인 기원에서 유래된 줄기세포주의 연구가 주를 이루고 있으며 이를 이용한 형질전환 연구도 이루어지고는 있으나 기초적 연구단계에 머무르고 있음. 이에 보다 다양한 기원의 줄기세포주의 확립은 관련 연구 지지기반의 확충으로 이어질 것임.
- 높은 활용가치에도 불구하고 현재 전 세계 가금, 돼지줄기세포 연구는 초기단계에 머물고 있으며, 줄기세포 확립에 있어 필수적인 세포 बैं킹 시스템의 구축도 매우 미흡한 상황임. 또한 SOP/준 GLP 품질경영을 통하여 생물자원의 안정적인 확보와 경쟁력 확보가 필요함. 현 상황에서 가금, 돼지 줄기세포 बैं킹 시스템의 구축 및 품질경영을 통한 동물줄기세포 연구는 국제사회에서 관련 연구 분야를 선도하는 데에 밑바탕이 되어줄 것으로 기대됨.

- 경제동물로부터의 보다 효과적인 줄기 세포 구축법 확립 및 질환 동물시스템을 개발하는 것은 줄기세포 연구에 기반 요소를 강화시킴과 동시에 차세대 의학과 생명공학 발전에 있어서 국가전략 핵심기술이 될 수 있음.
- 가축에서 전분화능 줄기세포주를 활용하여 유전자 조작을 통한 질환모델동물의 효율적 생산이 가능해 짐으로써 의생명공학 분야 연구에 기여할 것임.
- 돼지 또는 가금 (닭)을 이용한 연구는 경제동물 활용성을 극대화 시키는 방향으로 집중되어 있으며, 전임상 실험 모델 동물로의 활용 가능성에 대한 연구는 걸음마 단계에 머물러 있는 실정임.
- 현재 국내에서는 카이스트나 서울대를 중심으로 연구가 진행되고 있으나 닭과 돼지는 실험적인 측면에서 주로 독성 테스트나 면역관련 실험 목적으로 사용되고 있음. 닭의 배아의 특징을 고려하였을 때 줄기세포를 이용한 분화 추적 모델 및 질병 기작 연구에 효용성이 클 것으로 기대됨. 현재 외국에서는 이와 관련된 연구가 진행되고 있는 반면 (Pettite et al., 2004, Park et al., 2009) 국내 연구는 아직 기초 단계에 머물러 있는 실정임.
- 현재 줄기세포 관련 전임상 연구는 쥐를 활용한 연구가 대부분이며 인간과 보다 생리/해부학적으로 유사한 돼지를 이용한 전임상 연구는 답보 수준임. 돼지를 이용한 연구는 체세포 핵이식 관련 연구에 편향적이며 새로운 방향으로 연구할 필요성이 대두됨. 체세포 복제 기술 개발을 활용하여 Inbred line 또는 질환모델동물 구축 시스템의 확보는 경제동물로서의 활용뿐만 아니라 대량의 실험 축군을 확보할 수 있게 해줌으로서 관련 실험 지지기반구축이 가능함.
- 사람에서 근육위축증 (DMD, Duchenne muscular dystrophy)은 열성 X-염색체연관 근육위축증으로 Dystrophin 유전자의 돌연변이에 의해 발생하며, 돌연변이 Dystrophin 유전자를 가지는 여성이 남아를 낳을 경우 50% 근육 위축증 질환을 가지게 됨 (Hoffan et al., 1987, Cell; Emery, 1991, Neuromuscul Disord). 현재 쥐를 이용한 질환모델은 불완전 Dystrophin이 발현되어 mild한 근육위축증을 나타내고 있는 것으로 DMD 증상의 연구에 이용되고 있으나 (Chamberain et al., 2007, FASEB J), 치료제 개발이나 세포치료와 같은 연구를 위해서는 사람에서와 거의 비슷한 DMD 동물모델이 필요한 실정임 (Bouchentouf, et al., 2006, Neuromuscul Disord). 따라서 인간과 생리학, 해부학적으로 유사한 돼지를 활용한 질환모델동물의 개발이 필요한 실정임.
- 뒤센근육위축증(DMD)은 유발 후 전개가 빠르며, 일반적으로 20세 이전에 사망하는 유전적 질병으로. UN이 정한 ‘5 대 중증 진행성, 희귀난치성 질환’ 중 하나임. 환자 유병율이 1,000명당 5.2 명에 달하고 있지만 현재까지 근본적인 치료 방법이 알려지지 않았음. 따라서 확실한 치료제 개발을 위해서 인간과 생리학적 특성이 유사한 돼지에서 DMD 동물 모델 생산이 필요함.
- 돼지 핵이식 기술은 국제적으로 높은 기술수준을 유지하고 있으나 현재 체세포 핵이식을 통해 개체를 생산할 때에 태반이상, 거대태아의 생산 및 태어난 개체의 건강이상 등의 문제점이 나타나며 이러한 이유로는 핵 치환된 수정란의 apoptosis인자의 비정상적 발현, 공여핵의 품질저하 등 착상 전 배아의 품질이 떨어지기 때문에 고품질의 배반포를 생산해 내는 기술이 절실히 요구됨. 이런 문제점을 해결하는 방법으로 다양한 공여세포를 이용하는 연구와 공여세포의 factor를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있는 실정임.

- 동물의 수정란에서 2세포시기에 인위적인 전기충격을 주어 세포를 융합하면 핵의 염색체의 수가 2배로 증가하는 것을 tetraploid 현상 이라하며, 배반포 시기까지 발달한 tetraploid 수정란은 주로 trophoblast로 분화되어 태반을 형성하게 하게 됨. 특히 8세포시기와 상질배시기의 수정란에 배아줄기세포를 공배양하게 되면 배아줄기세포는 수정란안으로 들어가는 현상이 발생함.
- 따라서 이러한 특성을 갖는 수정란과 배아줄기세포간의 특이적인 성격을 이용하여 tetraploid로 형성된 수정란에 적절한 시기에 줄기세포와 공동배양 시스템을 적용하면 원래 4n을 보유한 수정란 세포는 태반으로 이용분화가 되며 배아줄기세포 유래의 세포는 내세포괴 (Inner cell mass; ICM)로 모두 분화되는 원리를 이용하여 고품질의 배반포를 생산할 수 있음. 이러한 기술은 체세포 핵이식을 이용한 방법의 장점과 마찬가지로 단시간 내에 원하는 개체를 생산해 낼 수 있는 장점이 있음.
- 이러한 기술을 이용하여 줄기세포의 형질전환 기술을 접목시켜 형질전환/질환모델 돼지를 생산해 낼 수 있게 되며, 일반 체세포가 갖는 한계점을 배아줄기세포로 극복할 수 있기 때문에 고품질의 배아를 생산해 낼 수 있다는 장점이 있음. 이렇게 배아줄기세포를 공여세포로 이용하기 위해서는 고품질의 배아줄기세포를 생산해야 함.
- 가금 (닭)은 학문적 저변이 부족하고 중간 호환성 문제, 줄기세포 및 형질전환동물 연구 인프라 부족, 네트워크 및 연구 장비의 미흡 등의 약점을 가지고 있는 반면, 다른 동물줄기세포와는 다른 차별성 및 선도성을 가질 수 있으며, 저비용으로 많은 배아를 확보 할 수 있고 배아 발달이 비교적 빠른 편에 속하여 실험모델동물로 많은 장점을 가지고 있음. 또한 배아에 줄기세포를 이식이 포유동물에 비해 용이한 편이며, 배아 발달 중간 중간 실시시간으로 이식한 세포의 변화를 관찰할 수 있음. 이러한 장점을 이용한다면 가금 (닭)은 새로운 실험모델 동물로써 각광받을 수 있음.
- 가금류 (닭)은 다른 동물과는 다른 발생학적 및 생물학적 특징에 기인한 형질전환동물로써의 장점을 가짐. 세대 주기가 5개월로 다른 동물에 비해 형질전환 개체 확보에 시간이 짧게 걸리고, 한 마리 수컷을 이용하여 다수의 암컷을 수정시키는 것이 가능함. 또한 1년에 300여개 정도의 알을 생산이 가능하므로 많은 배아를 단기간에 확보가 가능하며, 달걀 구성성분 또한 단순하여 유용 단백질을 고효율로 생산하여 정제하는데 유리한 장점을 가지고 있음.
- 2004년 International Chicken Genome Sequencing Consortium에 의하여 닭의 게놈 염기서열이 밝혀진 이후, 인간과 유사한 유전자의 발현 억제, 과 발현 및 변이를 통한 유전자의 기능연구에서부터, 특정 유전자의 변이와 관련되어 있는 인간 질병 연구에 활용되면서 실험 모델 동물로써의 활용성이 점점 더 넓어지고 있는 실정임.
- 가금류 배아 이용 ex vivo 모델 시스템을 구축함으로써 저비용/고효율 실험 결과를 대량으로 단시간에 확보하는 것이 가능해 질 것임. 이는 닭의 경제동물로서의 가치뿐만이 아닌 실험동물로서의 가치를 인정받을 수 있음.
- 확립된 전분화능 줄기세포주와 이를 이용한 질환모델동물 시스템의 확립은 의생명분야 관련 전임상 연구에 가장 중요한 부분이며, 미국, 유럽, 일본과 같은 바이오 연구 산업 강국에 비교하여 국내 연구는 원천기술 확보에 뒤쳐져 있는 실정임.
- 일부 미래학자들은 2020년을 전후로 하여 정보경제가 종말을 맺고 생명공학 기술을 바탕으로 한 바이오 경제 시대가 도래 할 것이라고 전망하고 있음 (저서 '변화의 충격').

이러한 가운데 줄기세포를 이용한 세포치료제 개발은 국내 의료시장에만 국한되어 있을 수 없으며, 국제 의료시장을 대상으로 기술 개발이 이루어져야 함. 최근 자료에 의하면 (Science/2008) 세포치료기술의 부가가치는 연간 3,000억 달러에 이를 것으로 추정되며, 치료에 따른 부가가치 이외에도 관련 산업 발전유도 효과는 막대할 것으로 예상되어 짐.

- 세포치료제 개발에 있어서 형질전환동물/질환모델동물을 활용한 전임상 연구는 임상연구를 진행하기 위한 반드시 필요한 단계로 현재까지는 다양한 질환모델 쥐가 개발되어져 왔음. 하지만 가금 (닭)을 활용하여 저비용으로 많은 배아 확보와 연구 결과를 실시간으로 관찰할 수 있는 장점을 활용한 실험모델로써의 개발은 높은 부가가치를 창출 할 수 있을 것임.
- 경제동물이 아닌 실험모델동물로서의 가금(닭)과 돼지를 이용한 연구는 유용생리물질/형질전환동물의 고효율/대량 시스템의 확립은 학문적/산업적 관점에서 높은 부가가치를 지니고 있음. 하지만 많은 연구가 연구소 수준에서 진행되며 초기 산업화의 많은 어려움이 있음.
- 따라서 본 연구는 실험모델동물로써의 돼지와 닭에 대한 인프라 구축과 연구소-기업 간 공동연구를 통하여 지적재산권을 확보하고 실험모델동물 활용에 관한 조기 산업화와 대량화 기반을 마련하고자 함.

1-3. 연구개발 범위

구분 (연도)	세부 및 연구목표	세부연구내용	연구범위
1차 년도 (2013)	[총괄 및 1세부] 가축유래 전분화능 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환모델 동물 생산기술 개발	- 다양한 기원유래 닭 줄기세포 분리	- 닭 골수 유래의 줄기세포 분리 및 배양 (10종 이상)
		- 줄기세포 특이마커 동정	- 확보된 줄기세포의 세포표현형 분석 및 닭 특이적 마커 동정
		- 확보된 줄기세포의 세포·분자유전학적 특성 분석	- 확보된 줄기세포의 세포학적 특성 검증 및 줄기세포 관련 유전자 분석
		- 경제동물 줄기세포 은행 구축을 위한 기반 확보	- 줄기세포 은행 설립을 위한 기초 인프라 구축
	[2세부] 고부가 달걀 생산을 위한 가금 생식줄기세포의 유전자 조절 체계 확립	- 유용물질 유전자 확보를 위한 유전자 클로닝 및 합성	- 고부가가치 시스타틴 유전자 클로닝 및 합성완료
		- 기본 발현 벡터 제작	- 기본 발현 벡터의 제작 완료
		- 가금 생식줄기세포 장기 배양을 통한 세포 주 확보	- 가금 생식줄기세포 장기 배양을 통한 세포 주 확보
		- 확립된 가금생식줄기세포 주 특성 분석	- 가금생식줄기세포 주 특성 분석
	[1협동] 돼지 체내 수정란 유래 배아줄기세포 생산 인프라 구축	- 인공수정기법을 통한 체내 수정란 생산 및 체내 수정란 회수 기법 개발	- 품종별 정액을 이용한 인공수정실시
			- 활력정자 분리를 통한 고품질 인공수정용 정자 생산
			- 효과적인 체내 수정란 회수

		기법 개발
	-. 착상 전 배아로부터 ICM분리 기법 개발	-. 면역학적 기법을 이용한 분리 -. 화학적 기법을 이용한 분리 -. 물리적 기법을 이용한 분리 -. 면역, 화학 및 기계적 기법 조합을 이용한 분리
	-. ICM유래 콜로니 초대배양 기법 개발	-. ICM유래 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발 -. ICM유래 콜로니 증식 촉진 배양 시스템 개발
	-. 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발	-. 미분화 유지 및 자가증식을 위한 최적의 세포배양 시스템 개발 -. 효과적인 계대배양기법의 개발
	-. 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명	-. Morphology -. Self-renewal-specific gene 및 protein 확인 -. Telomerase Activity 확인 -. Methylation Pattern 확인 -. 자발적 체외분화를 통한 3배엽 세포 분화능 확인 -. Teratoma 형성 및 3배엽 조직 형성능 확인 -. 생식세포의 분화능 확인
<p align="center">[2협동] 돼지 줄기세포 구축 및 특성화</p>	-. 다양한 조직으로부터 확보된 MSCs 구축	-. 다양한 유래 MSCs의 특성화를 통한 차이 탐구 -. MSCs 별 분화 유도 및 조직특이 마커 발현능력의 차이 규명 -. 다양한 조직 유래 돼지줄기세포 구축 및 총괄 기탁
	-. Normalization을 위한 돼지 MSCs 특이적 reference gene의 발굴	-. 돼지 줄기세포 특이적인 계대 및 분화 전/후에도 안정한 Ct 값의 reference gene의 확정 여부
	-. 성별, 나이, 세포기원에 따른 MSCs의 노화에 대한 연구	-. 지방유래 및 피부유래 MSCs 사용 -. AP activity, CD90 발현 -. 분화능 비교 및 노화관련 분석 -. 텔로미어 및 세포주기 분석 -. 노화관련 단백질 분석
	-. 돼지 골수유래 MSC 및 섬유아세포를 이용한 iPSCs 구축	-. Colony 형성능 -. 내인성/외인성 도입 유전자의 발현 확인 -. Embryoid body 형성능 확인
	-. 돼지 Dystrophin cDNA 확인 -. 돼지 genomic DNA로 부터 Dystrophin sequence 및 locus 규명	-. 돼지 genomic DMD locus screening -. 돼지 DMD 유전자 구조 및 단백질코딩 부위 규명
<p align="center">[3협동] 돼지 줄기세포를 이용한 유전자조작 기술의 확립</p>	-. DMD locus 유전자적중 벡터 구축	-. 돼지 Dystrophin 유전자내 타겟부위 선정 -. TALEN system을 위한 벡터 구축 -. Reporter system 확인
	-. 미니돼지 성체줄기세포 분리 배양	-. Yucatan 미니돼지의 골수줄기세포 분리 배양
<p align="center">[4협동] 줄기세포유래</p>		

형질전환복제돼지 생산	- 미니돼지 성체줄기세포의 특성 분석	- 분리된 골수줄기세포를 이용하여 세포의 surface marker, 줄기세포 관련 유전자의 발현 확인 및 분화 유도를 통한 줄기세포의 특성 분석
	- 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환 유도 기술 확립	- 인간 면역조절 유전자를 발현하는 벡터를 이용한 형질전환 유도

구분 (연도)	세부 및 연구목표	세부연구내용	연구범위
2차 년도 (2014)	[총괄 및 1 세부] 가금줄기세포 획득법 연구 및 동물줄기세포 은행 구축을 위한 기반 조사	- 체조직 유래 가금 줄기세포 배양기법 최적화	- 세포 타입 별 개체 특성 및 신체 부위별 상관관계 분석 - 골수유래 줄기세포 장기/대량배양기법 최적화 - 확보한 줄기세포의 세포·분자유전학적 특성분석
		- 장기보존 프로토콜 점검 및 관리 시스템 구축	- 동물줄기세포은행 구축을 위한 기탁세포 장기보존 프로토콜 점검 및 관리 기반 확보
	[2 세부] 고부가 달걀 생산을 위한 가금 생식줄기세포의 유전자 조절 체계 확립	- 과 발현을 위한 난관 특이 발현 synthetic promoter system 개발	- 난관 특이 프로모터 개발 및 특이 발현 synthetic vector 제작
		- 가금 생식줄기세포 체외 배양 및 유전자 전이에 의한 안정적 줄기세포 주 확립	- 유용물질 생산을 위한 발현 벡터의 가금 생식줄기세포 전이 및 선별
		- 생식선 카이메라 생산을 위한 기초 실험 축 조성	- 선별된 가금 생식줄기세포의 수용체내 주입 - 생식선 카이메라 생산을 위한 실험 축 조성
	[1 협동] 돼지 줄기세포 은행 및 개발 인프라 구축	- 체외수정 기법을 통한 체외수정란 생산	- 난포유래 고품질 성숙 난자 선별기법 개발 - 활력정자 분리를 통한 고품질 체외수정용 정자 생산 - Polyspermy 형성을 저하를 위한 체외수정기법 개발
		- 체외수정란 유래 고품질 배반포 생산기술 개발	- 항산화제, 기본 배양액, 성장인자, CO ₂ 농도, O ₂ 농도 등의 최적화 - 난관 및 자궁조직의 3차원배양기술에 의한 고품질 체외수정란의 생산
		- 착상 전 배아로부터 ICM분리 기법 개발	- 화학적 기법을 이용한 분리 - 기계적 기법을 이용한 분리
		- ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발	- ICM유래 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발 - ICM유래 콜로니 증식 촉진 배양 시스템 개발
		- 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포	- 미분화 유지 및 자가증식을

		주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 위한 최적의 세포배양 시스템 개발 - 효과적인 계대배양기법의 개발
		- 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - Morphology - Self-renewal-specific gene 및 protein 발현 확인 - 자발적 체외분화를 통한 3배엽 세포 분화능 확인
	<p>[2 협동] 체세포 유래 줄기세포 활용 질병 특이적 돼지 생산기술 개발</p>	- 각종MSCs/섬유아세포를 돼지iPSCs의 유도 및 유도율 수치화	- 각종 MSCs와 fibroblast를 도너로 하여 각각의 iPSCs 유도율을 비교 조사
		- 돼지 iPSCs를 유도 시 virus 및 chemical reagent로 효율비교	- 기존의 virus 이외에 peptide, chemical reagent를 이용하여 돼지 iPSCs 최적 유도율 조사
		- 구축된 iPSCs의 검정	- 연구계대능, 미분화능, Alkaline phosphate activity 검정, teratoma 형성능, embryoid body 형성능의 검정을 통한 iPSCs 성공 여부 평가
		- 동물질환모델에 적용	- 구축된 iPSCs를 동물질환 모델을 선정하여 적용
	<p>[3 협동] 돼지 줄기세포를 이용한 유전자조작 기술의 확립</p>	- 줄기세포용 유전자적중 벡터 분석	- 유전자적중 효율 증진을 위한 선별마커 탐색
		- 세포 주 선별 유전자적중 마커조건 탐색	- 돼지 줄기세포에 유전자적중 벡터를 transfection 및 drug 스크리닝 - PCR에 의한 유전자적중 분석
	<p>[4 협동] 줄기세포유래 형질전환복제돼지 생산</p>	- 확립된 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환세포 주 제작	- 확립된 미니돼지의 성체줄기세포에 인간 면역조절유전자인 hDAF 유전자를 이용한 형질전환세포 주 확립
		- 핵이식란의 체외 발달을 향상을 위한 배양시스템 개발	- 확립된 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 핵 이식란 제조 및 체외 발달을 확인 - 핵 이식란 제조 및 대리모돈 이식

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 년도 (2015)	<p>[총괄 및 1 세부] 동물줄기세포 은행 구축 및 가금 이용 세포변이·종양·분화 모델 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 체조직 유래 가금 줄기세포 특이적 배양법 개발 - 닭 배아 ex vivo 시스템을 활용한 세포변이종양분화 모델 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 기본 배양액 차이에 따른 닭 골수 유래 줄기세포의 특이적 특성 분석 및 분화능 비교 - 가금 줄기세포에 특이적인 배양 시스템 구축 - 다른 종 유래 줄기세포의 전능성마커 중 하나인 SSEA-1을 활용하여 닭에서 줄기세포 분리 가능성 탐색 - 4일령 닭의 골수에서 SSEA-1

			양성세포를 분리하여 배아에 <i>ex vivo</i> microinjection 하여 이식 세포의 생체 내 분포 정도와 생식선으로의 이동능 확인
		- 동물줄기세포은행 시스템 구축	- 본 세부 및 타 세부 연구자로부터 확립된 줄기세포 기탁 유도를 통한 동물줄기세포 은행 시범운영 및 은행 운영을 위한 효율적인 시스템 구축
<p>[2세부] 고부가 달걀 생산을 위한 가금 생식줄기세포의 유전자 조절 체계 확립</p>		- 유용물질 검출 시스템 구축	- 유용물질 확인을 위한 검출시스템 구축
		- 유용물질 생산을 위한 형질전환 가금 생산	- 검정교배를 통한 형질전환 개체 생산 및 확인
		- 난백 내 유용물질 발현 양상 검증	- 형질전환 가금의 난백 내 유용물질 발현 양상 확인 - 형질전환 가금의 난백 내 유용물질 발현량 검증
<p>[1협동] 돼지 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 수정란 유래 배아줄기세포 생산인프라 구축</p>		- 체세포 핵이식 기법을 통한 고품질 핵치환 수정란 생산 기술 개발	- 난포유래 고품질 성숙 난자 선별기법 개발 - 효과적인 핵치환 기술 개발 - 재조합 난자 활성화 기술 개발 : 화학적인 방법, 전기자극 방법
		- 핵치환 수정란 유래 고품질 배반포 생산 기술 개발	- 핵치환 수정란 유래 고품질 배반포 생산기법 개발 : 항산화제, 기본 배양액, 성장인자, CO ₂ 농도, O ₂ 농도 등의 최적화
		- 착상 전 배아로부터 ICM 분리 기법 개발	- 기계적 기법을 이용한 분리
		- ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발	- ICM유래 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발 - ICM유래 콜로니 증식 촉진 배양 시스템 개발
		- 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발	- 확립을 위한 효과적인 기법 개발 - 미분화유지 및 자가증식을 위한 최적의 세포배양 시스템 개발
		- 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명	- Morphology - Self-renewal-specific gene 및 protein 발현 확인 - 자발적 체외분화를 통한 3배엽 세포 분화능 확인
		- 두 구간 복제란 발달률 비교 및 DNA methylation, Histone Acetylation 조사	- MSCs와 iPSCs를 각각 NT donor로 이용하여 blastocyst의 발달률 비교
<p>[2협동] 구축된 MSC와 iPSCs를 이용하여 핵이식 효율의</p>			

	비교 및 중요유전자 factor 규명		- 발달한 Blastocyst의 DNA methylation, Histone acetylation 조사.
		- 복제란 유전자 패턴 분석	- qPCR을 이용하여 Oct4, Sox, Nanog 등 pluripotency 관련 유전자 패턴 분석
		- 발달관련 유전자 up/down regulation된 공여세포를 핵이식하여 복제란 조사	- 특정 유전자 선별 및 선별된 유전자를 이용한 transfection. - transfected donor cell을 이용한 blastocyst 생산 및 검증
		- 상기 연구를 근거로 공여세포로 potential이 높은 세포 주 선택	- 각 line 별로 blastocyst의 발달률 조사. - 발달률이 높은 세포 주 선택
	[3협동] 돼지 줄기세포를 이용한 유전자조작 기술의 확립	- 돼지 DMD locus CRISPR/Cas9/DMD 벡터구축 및 세포에 유전자적중 실시	- Cas9 sgRNA 선정 및 제작 - pCRISPR/Cas9/DMD1 구축 - 돼지세포에 유전자변이 유도 벡터를 transfection 및 콜로니 선별
		- 유전자적중 DNA 분석과 염기서열 확인	- PCR에 의한 유전자변이 분석 - 염기서열 분석을 통한 유전자변이 검사
[4협동] 줄기세포유래 형질전환복제돼지 생산	- 효율적인 핵 이식란 이식 시스템 확립	- 핵 이식란의 최적 체외배양 시스템 확립 - 핵 이식란의 효율적인 대리모돈 이식 방법의 확립 - 다양한 형질전환세포주를 이용한 핵이식란의 제조 및 대리모돈 이식	

구분 (연도)	세부 및 연구목표	세부연구내용	연구범위
4차 년도 (2016)	[총괄 및 1세부] 동물줄기세포 은행 시범 운영 및 가금 이용한 유용 물질 탐색	- 동물줄기세포은행 시스템 구축	- 동물줄기세포은행 운영을 위한 세포 확보 - 동물줄기세포은행의 운영을 위한 시스템 구축
		- 가금 골수유래 세포의 특성 검증	- 유추기의 병아리 (4일령)의 골강에서 분리하여 배양한 세포의 기원 분석 및 분자·세포생물학적 특성 검증 - 유추기의 병아리 (4일령)의 골수 유래 줄기세포 대량 확보를 위한 배양 기법 모색 - 닭 성장 단계에 따른 골수 내 부착세포의 특성 비교·분석
		- 가금 골수유래 세포를 이용한 의료물질 개발	- 유추기의 병아리 (4일령)의 골강에서 확보한 세포의 분비물질 분석
	[2세부] 고부가 달걀 생산을 위한 가금	- 상업종 산란계 생식줄기세포 분리 배양 및 동결보존	- 상업종 (Hyline)으로 배자로부터 원식생식세포 분리 및 체외

생식줄기세포의 유전자 조절 체계 확립		배양을 통한 생식줄기세포 확립
	- 효율적 외래단백질 정제를 위한 his-tag 분리 기술	- his-tag을 활용한 순수분리를 위한 1/2차 정제 기술 확립
	- 유용 단백질 생화학적 역가 및 특성 분석	- 유용 단백질의 anti- microbial activity 측정
	- 상업용 산란계를 이용한 유용 단백질 생산 형질전환	- 생식선 카이메라 실험축 조성 및 검정교배를 통한 형질전환 개체 생산
<p>[1협동] 돼지 배아줄기세포 장기 배양 시스템 개발 과 돼지 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 수정란 유래 배아줄기세포 생산인프라 구축</p>	- 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명	- Protein 발현과 자발적 체외분화를 통한 3배엽 세포 분화능 확인
	- ICM 유래 콜로니 초대배양	- 초대배양 시 콜로니의 형성에 영향을 미치는 배양액 성분과 조성 비교
	- 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발	- 체세포 핵이식 기법 유래 수정란의 체외배양 기간에 따른 ICM 부착율과 콜로니 형성을 확인
	- 돼지 배아줄기세포 대량 배양 시스템 개발	- 돼지 배아줄기세포 단일 세포 배양 시스템 개발을 위한 체외성숙 및 배양 과정에서 glycine 과 alanine 및 삼투압의 영향 확인 - 소형 콜로니 증식 촉진 배양 시스템 개발을 위한 체외성숙 과정에서 γ -tocotrienol 효과 확인
	- 돼지 배아줄기세포 장기 배양 시스템 개발	- Feeder cell(2D 환경) 및 agarose(3D 환경)에 의한 줄기세포 마커의 발현 변화 비교 - Early passage의 돼지 배아줄기세포 내 integrin 발현 확인
<p>[2협동] 선택한 최적 공여세포의 형질전환 및 핵이식</p>	- 공여세포의 선택	- piPSCs와 pMSCs의 cell cycle 비교 및 핵 이식 효율 결과를 바탕으로 공여세포로서의 적합성을 평가
	- TERT와 RAS 유전자가 도입된 세포를 이용한 핵이식	- 돼지 BM-MSCs 세포에 TERT와 RAS 유전자를 도입하여 구축한 cell line으로 핵 이식
	- MSCs를 이용한 높은 효율의 핵이식 방법 검증	- pMSCs를 핵이식의 공여 세포로 사용
	- 새로운 공여세포의 발굴	- 돼지 자궁내막 유래 중간엽줄기세포의 체장 베타세포와 심근세포로의 분화를 실시
	- 초기 노화 모델을 위한 형질전환 수정란 생산	- in vitro, 난자, 수정란에서 pTERT-CRISPR CAS9의 작용을 검증
<p>[3협동] 줄기세포유래 형질전환복제돼지 생산</p>	- DMD 유전자변형 돼지세포에서 DMD유전자의 염기서열 분석을 통한 nonsense mutation 여부 탐색	- DMD 부위에서 term codon 형성 분석 - biallelic mutation을 일으키는 효율적인 부위 탐색
	- 돼지 수정란에 CRISPR/Cas9 벡터 주입과 유전자 분석 및 배발달능 탐색	- 돼지 체외수정란에 DMD CRISPR/Cas9 벡터 주입 - 벡터주입 후 배반포배 발달을 분석

	<p>[4협동] 줄기세포유래 형질전환복제돼지 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 키메라/복제돼지 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환줄기세포를 이용한 핵 이식란 생산 및 대리모돈 이식 - 자연분만 유도를 통한 산자의 생존율 제고 방안 확립 - 생산된 형질전환돼지로부터 PCR, Western blot 분석을 통한 형질전환 확인 - 생산된 형질전환돼지의 조직 및 세포를 이용한 형질 전환 단백질 발현 확인
--	--	--	--

구분 (연도)	세부 및 연구목표	세부연구내용	연구범위
5차 년도 (2017)	<p>[총괄 및 1세부] 동물줄기세포은행 시스템 가동 및 가금 골수유래 부착세포 및 세포 유효분비물질을 이용한 의약품 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 동물줄기세포 은행 운영 	<ul style="list-style-type: none"> - 각 세부의 정제동물 유래 줄기세포를 기탁을 통한 세포라인 확보 - 기탁 받은 세포들의 미생물 부정검정(마이코플라즈마 테스트) 및 이종세포간의 오염 여부 확인 검증
		<ul style="list-style-type: none"> - 닭 골강세포 유래 부착세포 및 세포분비물을 이용한 의약품 개발연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 효율적인 가금 골수 유래 부착세포의 세포 분비물 획득 법 개발 - 인간 지방유래 줄기세포를 이용하여 가금세포 유효 분비물질의 효과를 탐색 - 지적 우선권 선점을 위한 국내 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보 - Sox9 발현세포의 분비물질의 단백질 정제를 통한 시제품 개발
	<p>[2세부] 난백내 유용물질의 연구, 형질전환 계통 확립 및 유래 물질 관련 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 난백내 유용물질의 생체내 기능, 역가 분석, 실용화 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 단백질 생화학적 역가 및 특성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 계통 확립 및 유지를 프로그램 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 김정교배를 통한 형질전환 개체 생산 및 확인
		<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 가금의 생식줄기세포 분리 및 banking시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 상업종 산란계 생식줄기세포 분리 배양 및 동결보존
	<p>[1협동] 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 돼지 배아줄기세포주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 동결보호제에 따른 동결시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 동결보호제의 첨가 농도별 동결-융해 후 줄기세포의 능력 확인
		<ul style="list-style-type: none"> - 동결배양액 종류에 따른 동결시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 세포피해를 최소화하는 새로운 동결배양액의 탐색 및 개발
		<ul style="list-style-type: none"> - Antioxidant, 동해방지물질 등의 탐색에 의한 동결시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 배아줄기 세포의 antioxidant를 이용한 동결시스템을 확립
	<p>[2협동] 형질 전환 돼지의 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 줄기세포 구축 및 특성화 	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 조직으로부터 확보된 MSCs 구축 - 성별, 나이, 세포기원에 따른 MSCs의 노화에 대한 연구
		<ul style="list-style-type: none"> - 줄기세포를 이용한 유도만능 줄기세포(iPSCs)의 구축 및 특성화 	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 골수유래 MSC 및 섬유아세포를 이용한 iPSCs 구축 - 구축된 iPSCs의 검증

		<ul style="list-style-type: none"> - 구축된 MSC와 iPSCs를 이용하여 핵이식 효율의 비교 및 중요 유전자 factor 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - MSC와 iPSCs 두 구간 복제란 비교 - MSCs를 이용한 높은 효율의 핵이식 방법 구축
		<ul style="list-style-type: none"> - 최적의 공여세포를 이용한 형질 전환 및 핵이식 	<ul style="list-style-type: none"> - TERT와 유전자 형질전환기술 구축 - 상기 형질전환 기술을 활용한 수정란 생산
		<ul style="list-style-type: none"> - 형질 전환 돼지의 생산 및 초기 노화 돼지 모델의 생산을 위한 데이터 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - TERT 유전자가 KNOCK OUT과 과발현된 수정란 생산 및 검증을 통한 초기 노화 모델 데이터 구축 - TERT 유전자가 과 발현된 세포가 핵이식된 수정란의 이식을 통한 초기 노화 돼지 모델 생산
	<p>[3협동] 돼지 수정란에 gRNA/Cas9 주입 및 DMD유전자의 염기서열 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 수정란에 gRNA/Cas9 주입 및 수정란이식과 배발달능 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 1-cell embryo에 DMD gRNA/CAS9 미세주입 - 미세주입 수정란의 대리모에 이식
		<ul style="list-style-type: none"> - DMD유전자의 염기서열 분석을 통한 mutation 여부 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - DMD 유전자의 염기서열 분석 - 유전자적중 효율 탐색
	<p>[4협동] 줄기세포 유래 형질전환 복제돼지 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 돼지 축군 형성 	<ul style="list-style-type: none"> - 핵이식란 대리모 이식 및 형질 전환복제돼지 생산 - 생산된 형질전환 카메라/복제 돼지의 교배를 통한 축군을 형성
		<ul style="list-style-type: none"> - 생산된 자돈의 형질전환 확인 및 형질전환 단백질 발현 여부 확인 	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환복제돼지의 유전자 및 단백질 발현 분석 - 형질전환복제돼지의 세포 및 조직을 이용한 면역학적 특성 분석

2. 연구수행내용 및 성과

2-1. 연구수행내용

총괄 1세부	가축유래 전분화능 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환모델 동물 생산기술 개발
-------------------	---

[1차년도]

1. 4일령 미성숙 닭의 골수세포 분리 및 배양

가. 4일령 White leghorn (WL) 닭의 Femur 와 Tibia 로부터 골수를 채취하여 단세포를 분리, 배양함.

(1) 닭의 몸무게와 대퇴부의 크기와 상관없이 회수되는 세포 양에 차이가 있음을 확인함.

<표1>

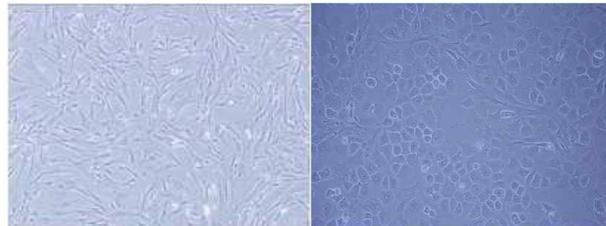
<표1> 닭의 몸무게 및 대퇴부의 크기와 회수되는 세포 양 확인

유추 식별번호 /(Egg #)	출생일	유추 성질 (출생 후)						실험적 처치	회수 cell
		계통	색	무게 (g)	키 (cm)	가슴너비 (cm)	허벅지 둘레(cm)		
130419 /(1)	130415	WL	Yellow	42.34	8.5	6.8	3.4	단두	1X10 ⁸
130419 /(2)	130415	WL	Yellow	40.61	9.5	5.8	3.4	단두	8.45X10 ⁷
130419 /(3)	130415	WL	Yellow	38.7	9.5	5.7	3.4	단두	1.6X10 ⁸
130423 /(1)	130419	WL	Yellow	42.34	8.5	6.8	3.4	단두	1.75X10 ⁸
130514 /(1)	130510	WL	Yellow	33.11	9.6	5.6	3.2	단두	2.75X10 ⁸
130810 /(1)	130806	WL	Yellow	40	10.2	5.6	2.7	단두	2.4X10 ⁸
130810 /(2)	130806	WL	Yellow	38	11	4.9	3.5	단두	3.5X10 ⁸
130810 /(3)	130806	WL	Yellow	45.5	9.6	5.8	3.5	단두	2X10 ⁸
130813 /(1)	130809	WL	Yellow	42.34	9.5	4.7	3.2	단두	2.7X10 ⁸
130813 /(2)	130809	WL	Yellow	40.61	8.5	5.8	2.9	단두	3.4X10 ⁸
130830 /(1)	130826	WL	Yellow	45.5	10	4.0	2.0	단두	2X10 ⁸
130913 /(1)	130909	WL	Yellow	32.8	7.5	6.5	2.8	단두	1.36X10 ⁸
130913 /(2)	130909	WL	Yellow	29.5	9.5	4.7	1.7	단두	1.08X10 ⁸
130913 /(4)	130909	WL	Yellow	36.35	9.2	6.2	3.2	단두	2.7X10 ⁸

130913										
/(5)	130909	WL	Yellow	28.26	9.2	6.1	2.9	단두	9.65X10 ⁷	
130913										
/(6)	130909	WL	Yellow	28.70	9.8	6.4	2.7	단두	1.125X10 ⁸	

(2) 인간의 골수유래줄기세포와 비교하여 형태학적 heterogeneity가 높음을 확인함.

<그림1>



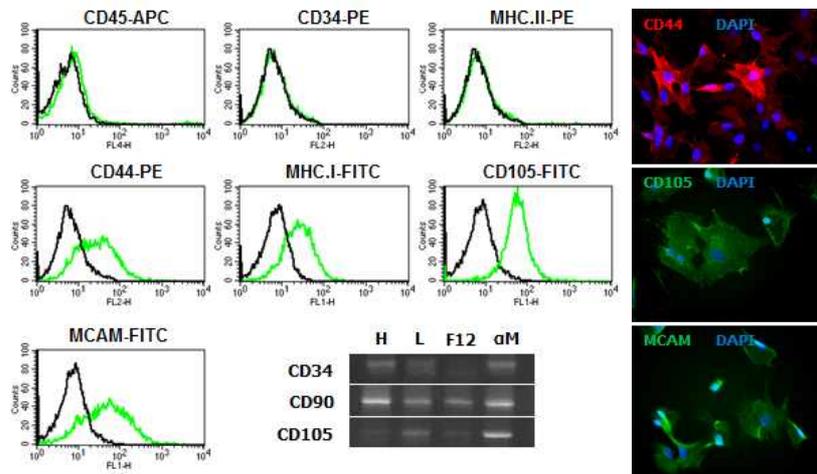
Human BM-MSCs

Chick BM-MSCs

<그림1> 4일령 미성숙 닭의 골수세포와 인간의 골수유래줄기세포의 형태학적 비교

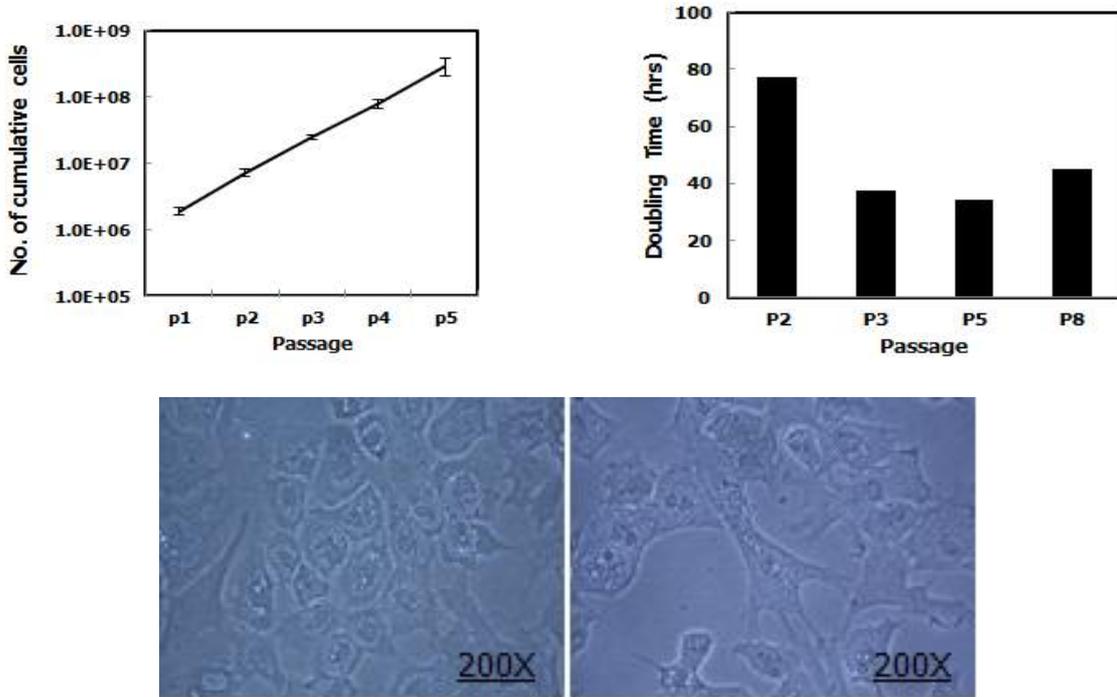
(3) 기존에 보고된 배양액을 사용한 결과 세포표현형을 제외한 성장능 및 분화능이 낮음을 확인함.

- 기존에 중간엽줄기세포의 특이마커가 모두 발현됨을 확인함.<그림2>



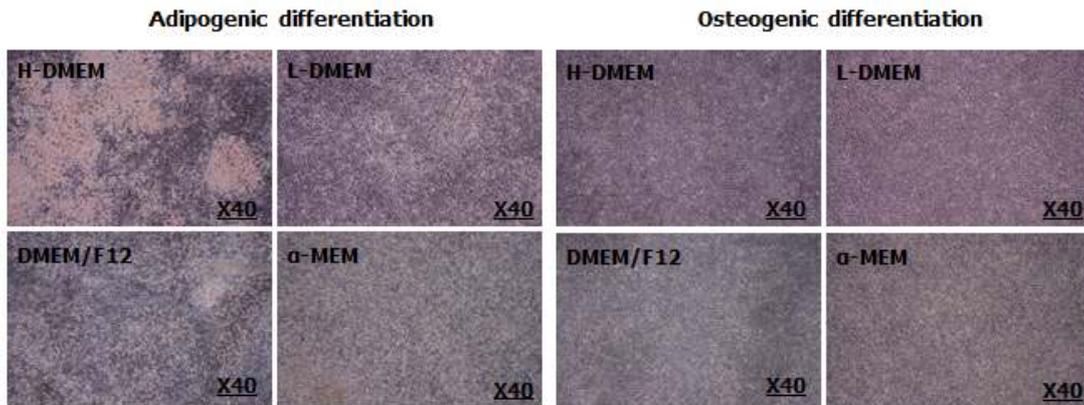
<그림2> 4일령 미성숙 닭의 골수세포의 중간엽줄기세포 특이마커 발현 검증

- 세포 성장이 느리고 계대 배양 시 vacuole이 많이 관찰됨. <그림3>.



<그림3> 4일령 미성숙 닭의 골수세포의 성장능 및 형태학적 검증

- 분화능이 현저히 떨어짐을 확인함 <그림4>.



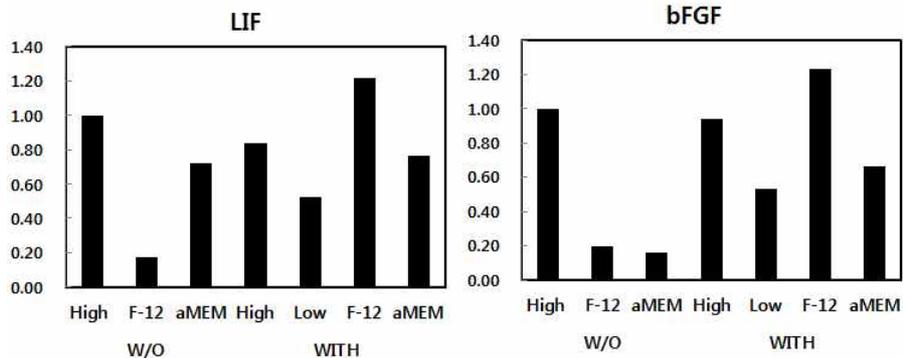
<그림4> 4일령 미성숙 닭의 골수세포의 분화능 검증

2. 닭 골수유래 줄기세포에 적합한 배양환경 탐색

가. 닭 골수유래 줄기세포 유지에 필요한 성장인자 탐색 <그림5>

- 초기 배양된 chick BMSC에서 bFGF receptor 와 LIF receptor가 발현함을 확인함.





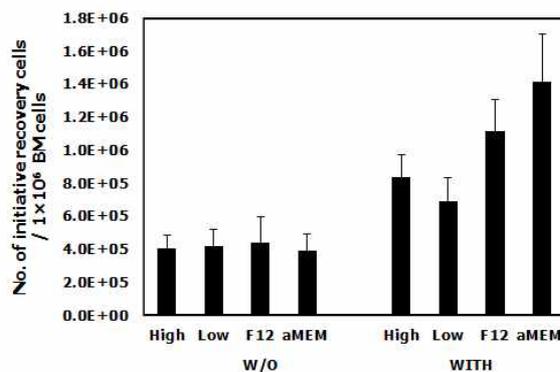
<그림5> 닭 골수유래 줄기세포 유지에 필요한 성장인자 탐색

3. 다양한 배지조성에 따른 세포성장 비교

- 세포 부착배양에 유용한 상용화 배지 4가지를 선택하여 세포성상을 비교함.
- 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포성상을 비교함.

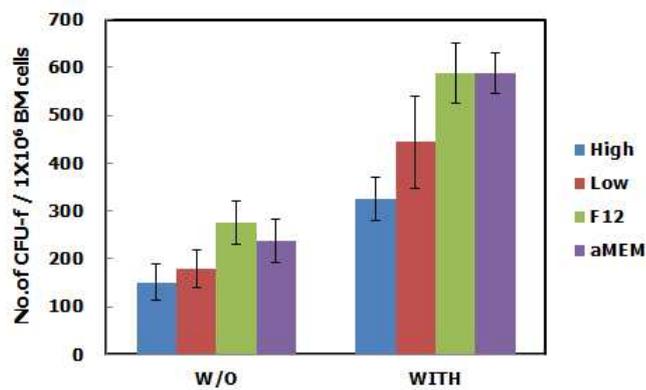
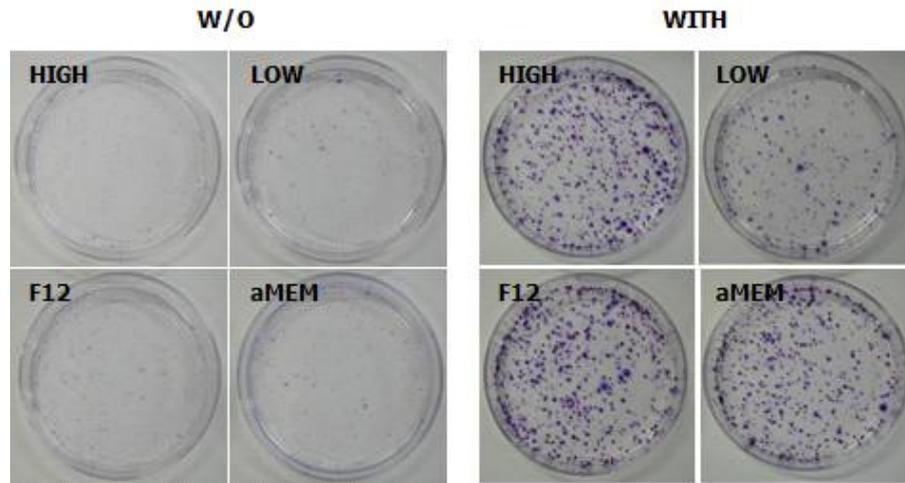
(1) 배지조성에 따라 초기 plating efficiency 및 콜로니 형성능에 차이가 있음을 확인함.

- 동일한 개체의 골수세포를 10% FBS가 첨가된 High-glucose DMEM, Low-glucose DMEM, DMEM-F/12, aMEM 배지에 동일한 수를 배양하였을 때 초기 부착세포 회수율에 유의적 차이가 없음을 확인함.
- 각 배지별 성장인자 (5ng/ml LIF, 500unit bFGF) 첨가 그룹에서 무첨가 그룹에 비하여 초기 부착세포 회수율이 높음을 확인함.
- 성장인자가 포함된 aMEM 배지 그룹에서 초기 회수율이 가장 높은 것을 확인함 <그림6>.



<그림6> 배지조성에 따른 초기 plating efficiency 확인

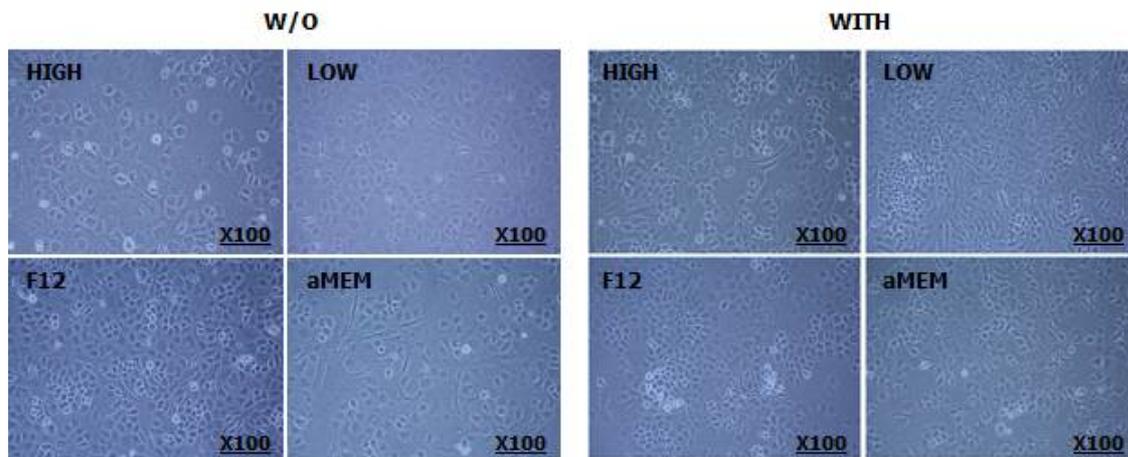
- 성장인자 첨가그룹에서 콜로니 형성능이 높음을 확인함.<그림7>



<그림7> 배지조성에 따른 콜로니 형성능 확인

(2) 배지조성에 따라 세포형태가 차이가 있음을 확인함.

- 모든 그룹에서 cuboidal 형태의 세포가 많음을 관찰함. (Passage 1) <그림8>

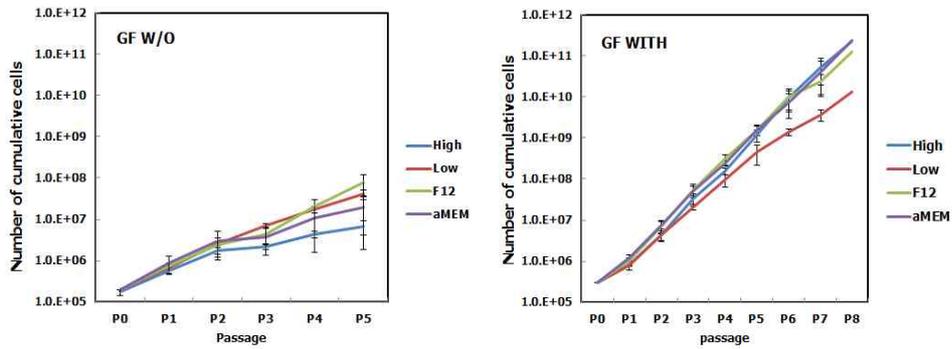


<그림8> 배지조성에 따른 세포형태가 차이 확인

(3) 배지조성에 따라 성장능에 차이가 있음을 확인함 <그림9>.

- 성장인자 첨가 그룹에서 성장 속도가 빠름을 확인함.

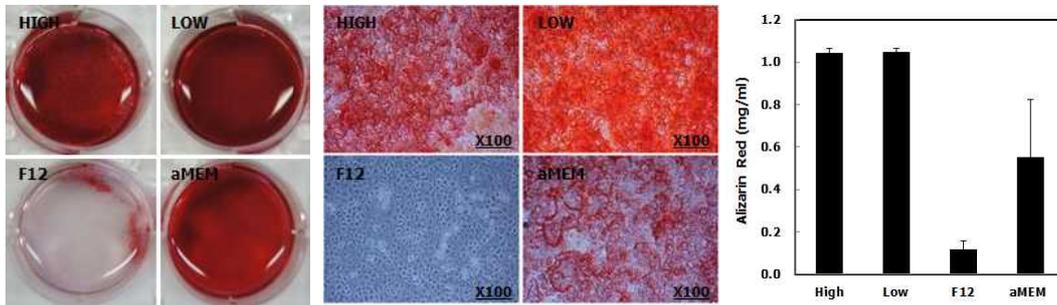
- 성장인자가 첨가된 Low glucose DMEM 그룹에서 성장 속도가 유의적으로 떨어짐을 확인함.



<그림9> 배지조성에 따른 성장능 차이 검증

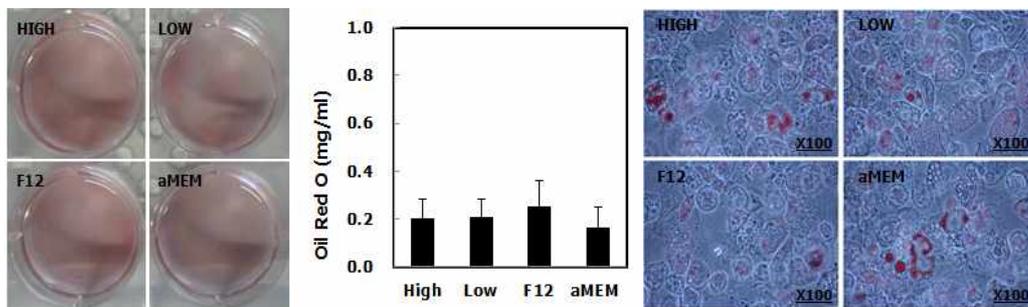
(4) 배지조성에 따라 분화능에 차이가 있음을 확인함.

- 성장인자 첨가그룹의 각 배지별 Osteogenic 분화능이 차이가 있음을 확인함 <그림10>.



<그림10> 배지조성에 따른 골분화능 차이 검증

- 모든 그룹에서 Adipogenic 분화능이 낮음을 확인함 <그림11>.



<그림11> 배지조성에 따른 지방분화능 차이 검증

4. 동물줄기세포주 은행 설립을 위한 기반 구축

가. 세포배양실 멸균작업 및 미생물 모니터링을 실시하여 준GLP 시설 유지를 위한 모니터링 시스템 구축

(1) 세포배양실 멸균작업 및 미생물 모니터링 실시 <그림12>.

- 전문 소독업체인 (주) 태왕사이언스에 의뢰하여 소독 및 멸균을 실시 (2013.5.24.)
- Ionized Hydrogen Peroxide를 이용한 세포배양실 및 인큐베이터 완전 멸균함.

- 소독 모니터링 결과 세포배양실 전 구역이 멸균됨을 확인함.
- 미생물 모니터링 결과 실험실, 클린벤치, 인큐베이터 내부가 완전 멸균됨을 확인함.



표 4-8									
Control	3:1	3:2	2:1	2:2	2:3	2:4	A/S	FA	
배양 전	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후	배양 후
표 4-9									
No	표 위치	Code No	결과						
1	전실 (Room 2)	3-1							
2	전실 (Room 1)	3-2							
3	주 실험실 안쪽 문	3-1							
4	주 실험실 문쪽의 벽	3-2							
5	주 실험실 A/S 외부	2-1							
6	동물 CO2 incubator	2-2							
7	Air shower 창	A/S							
8	Fox Box 창	FA							
9	Control	Control							

<그림12> 세포배양실 멸균작업 및 미생물 모니터링 실시

[2차년도]

1. 서울대학교 동물실험윤리위원회 승인인가

- 서울대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 승인 신청서를 제출하여 동물실험 과정에 따른 절차 및 실험동물 윤리와 안락사에 관련된 사항을 인가 받음 <그림13>.



<그림13> 서울대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)에 승인 인가

2. 4일령 유추에서 회수된 골수 유래 세포의 회수 및 각 신체 부위별 특성 분석

가. 4일령 White leghorn (WL) 닭의 Femur와 Tibia로부터 골수를 채취하여 단세포를 분리, 배양함.

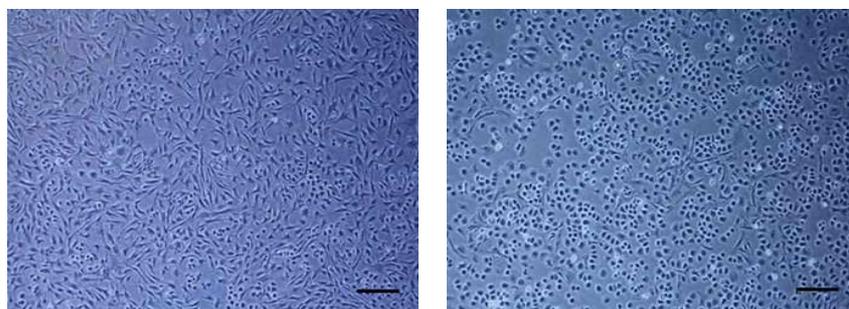
(1) 회수된 세포의 성장에 따라 각 세포 수 및 신체 부위 사이에 유의적 차이 없음을 확인. <표2>

<표2> 4일령 White leghorn (WL) 닭의 Femur와 Tibia로부터 회수된 세포의 성장에 따라 각 세포 수 및 신체 부위 특성

Chicks	Physical characterization			Mean no. of cells retrieved (x100,000,000 cells)	Morphology of dominant cells
	Body weight(g)	Height(cm)	Length of leg(cm)		
130415-1	42.34	8.5	3.4	1.0	Stromal cell
130415-2	40.61	9.5	3.4	0.84	Stromal cell
130415-3	38.70	9.5	3.4	1.6	Stromal cell
130419-1	42.34	8.5	3.4	1.8	Stromal cell
130510-1	33.11	9.6	3.2	2.8	Stromal cell
Mean±SE	39.42±1.9	9.12±0.3	3.36	1.61±0.4	-
130806-1	40.00	10.2	2.7	2.4	Cuboidal cell
130806-2	38.00	11.0	3.5	3.5	Cuboidal cell
138006-3	45.50	9.6	3.5	2.0	Cuboidal cell
130809-1	42.34	9.5	3.2	2.7	Cuboidal cell
130809-2	40.61	8.5	2.9	3.4	Cuboidal cell
130826-1	45.50	10.0	2.0	2.0	Cuboidal cell
130909-1	32.80	7.5	2.8	1.4	Cuboidal cell
130909-2	29.50	9.5	1.7	1.1	Cuboidal cell
130909-3	36.40	9.2	3.2	2.7	Cuboidal cell
140124-1	31.10	8.7	2.3	1.5	Cuboidal cell
140201-1	32.10	7.9	2.3	1.0	Cuboidal cell
140617-1	36.40	9.2	3.8	1.0	Cuboidal cell
140617-2	34.59	9.8	3.5	1.7	Cuboidal cell
140617-3	34.40	9.8	3.5	2.0	Cuboidal cell
Mean±SE	34.61±1.2	9.27±0.2	3.09±0.1	2.03±0.2	-
Model effect	0.1738	0.7807	0.1812	0.3353	-

(2) Stromal-dominant cell과 Cuboidal-dominant cell 사이의 세포 morphology 비교 확인.

<그림14>



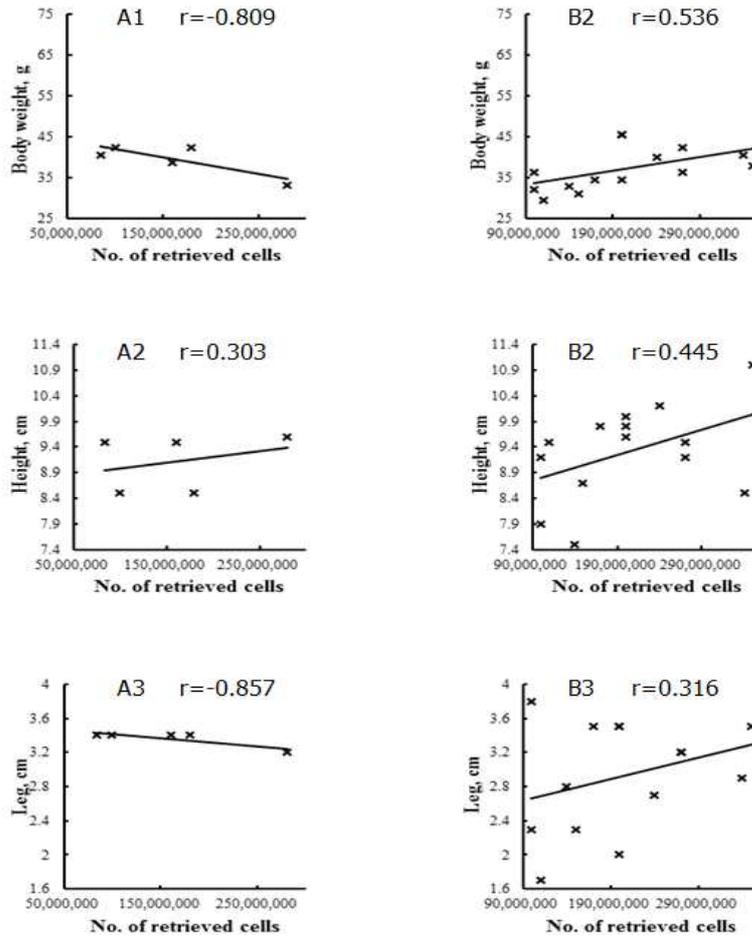
Stromal-dominant cell

Cuboidal-dominant cell

<그림14> 회수되어진 Stromal-dominant cell과 Cuboidal-dominant cell의 세포 morphology

(3) 각 세포 타입 별 회수된 세포의 양과 각 신체 부위별 상관관계를 분석함.

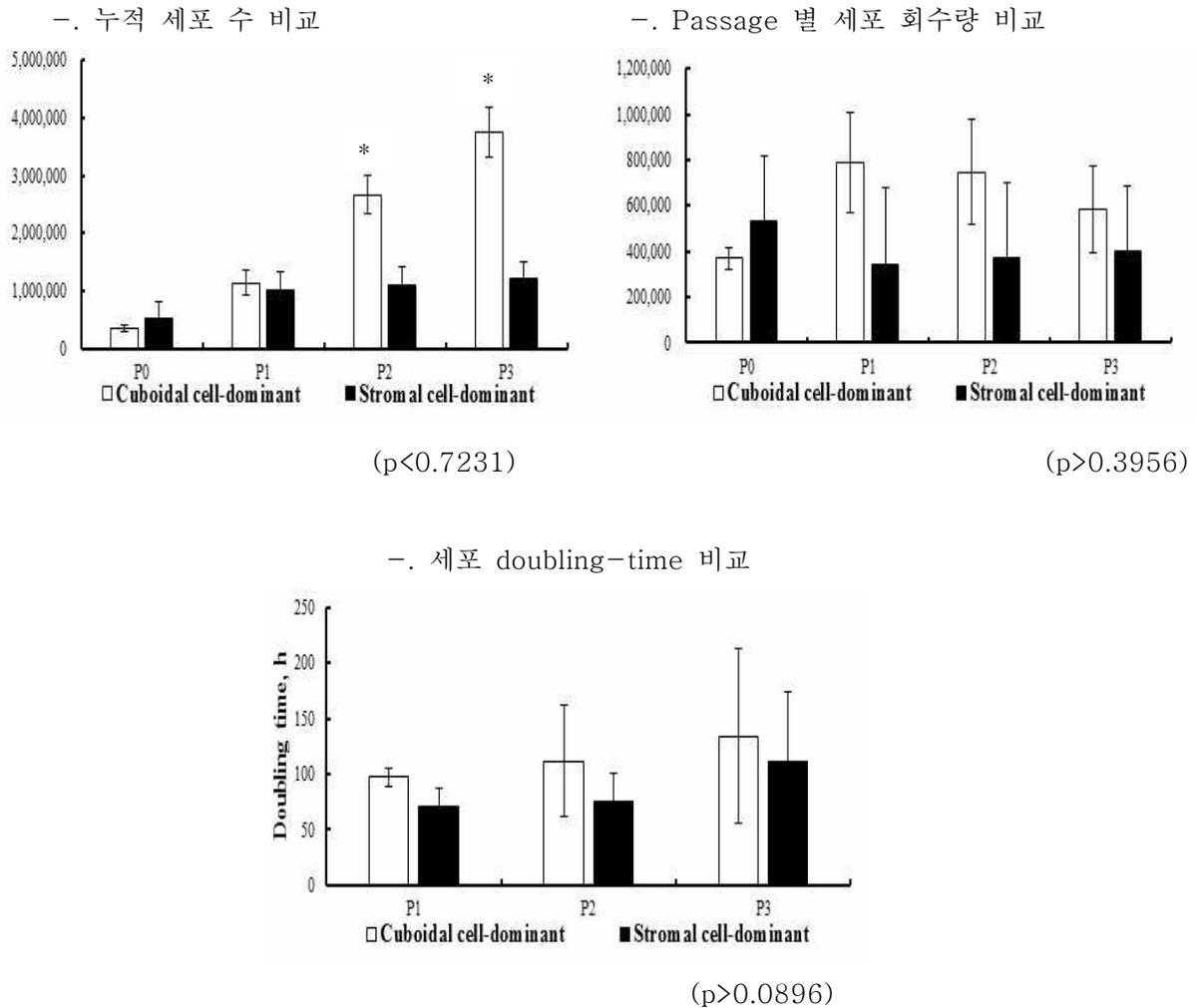
- Stromal-dominant cell (A1-A3)과 Cuboidal-dominant cell (B1-B3) 모두에서 회수 세포의 양과 유추의 키와 정 의 상관관계를 지님을 밝힘. <그림15>



<그림15> 세포 타입 별 회수된 세포의 양과 각 신체 부위별 상관관계 분석

(4) 회수된 세포별 성장능 비교 분석함 <그림16>.

- Stromal-dominant cell에 비해 Cuboidal-dominant cell의 성장능이 높음을 확인함.
- 누적세포수, passage 별 세포 회수 양, 세포 doubling time을 회수된 세포 타입별로 비교해 봤을 때 Cuboidal-dominant cell의 성장능이 높음을 확인함.



<그림16> 회수된 세포별 성장능 비교 분석

3. 닭 골수유래 줄기세포에 적합한 배양환경 탐색

가. 배지 구성에 따른 세포성장 비교

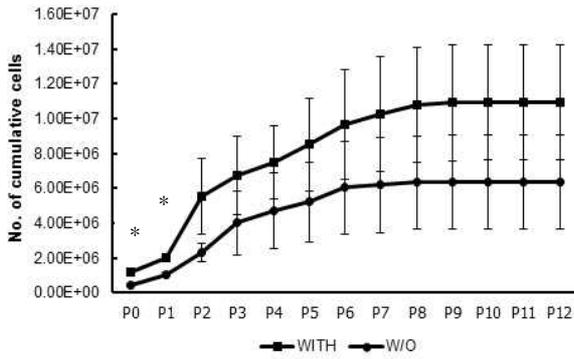
- 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포성상을 비교함.

(1) 성장인자의 첨가 유무에 따라 성장능 및 초기 plating efficiency에 차이가 있음을 확인.<그림17>

- 동일한 개체의 골수세포를 10% FBS가 첨가된 High-glucose DMEM 배지에 동일한 수를 배양하였을 때 성장능(누적세포 수, Passage별 세포 회수량, 세포 Doubling-time)에 유의적 차이가 있음을 확인함.
- 성장인자 첨가 그룹에서 성장 속도가 빠름을 확인함.

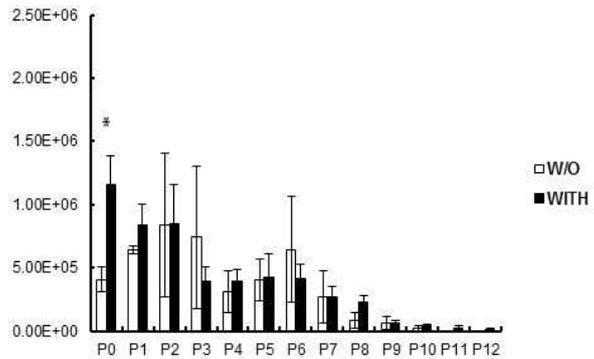
- 각 배지별 성장인자 (5ng/ml LIF, 500unit bFGF) 첨가 그룹에서 무첨가 그룹에 비하여 초기 부착세포 회수율이 높음을 확인함.

- 누적 세포 수 비교



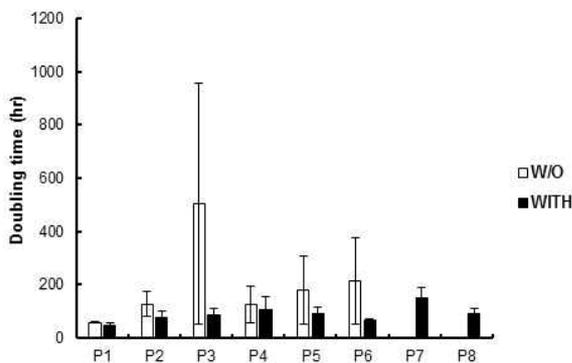
(p>0.0023)

- Passage 별 세포 회수량 비교



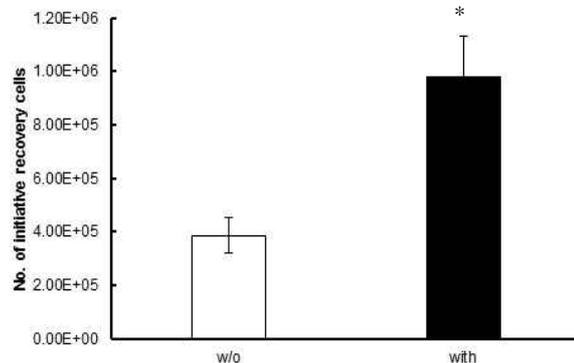
(p>0.0118)

- 세포 doubling-time 비교



(P>0.1751)

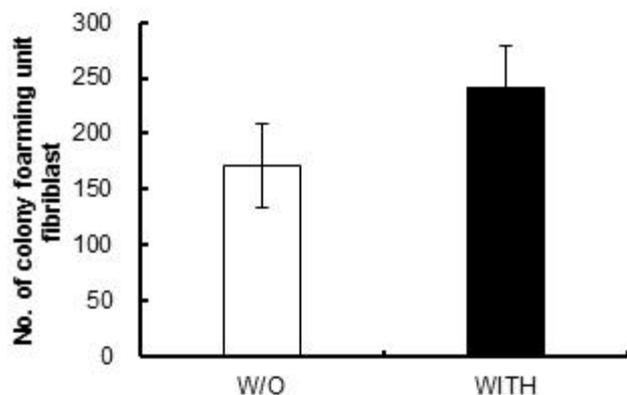
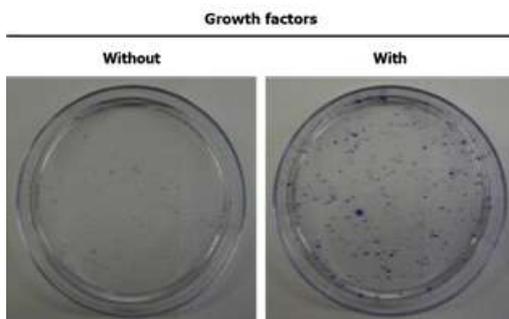
- 초기 부착세포 회수율



(P=0.0336)

<그림17> 성장인자의 첨가 유무에 따라 성장능 비교

- 성장인자 첨가그룹에서 콜로니 형성능이 높음을 확인함. <그림18>

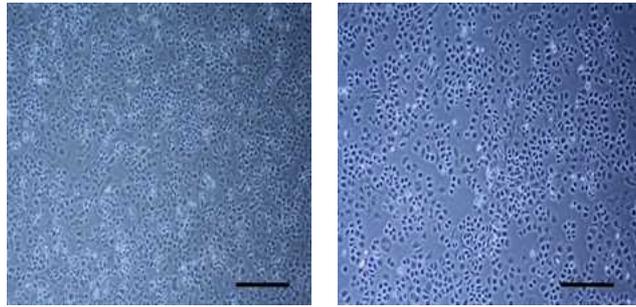


(p=0.1581)

<그림18> 성장인자 첨가 유무에 따른 콜로니 형성능 비교

(2) 성장인자의 첨가 유무에 따라 세포형태가 차이가 없음을 확인함.

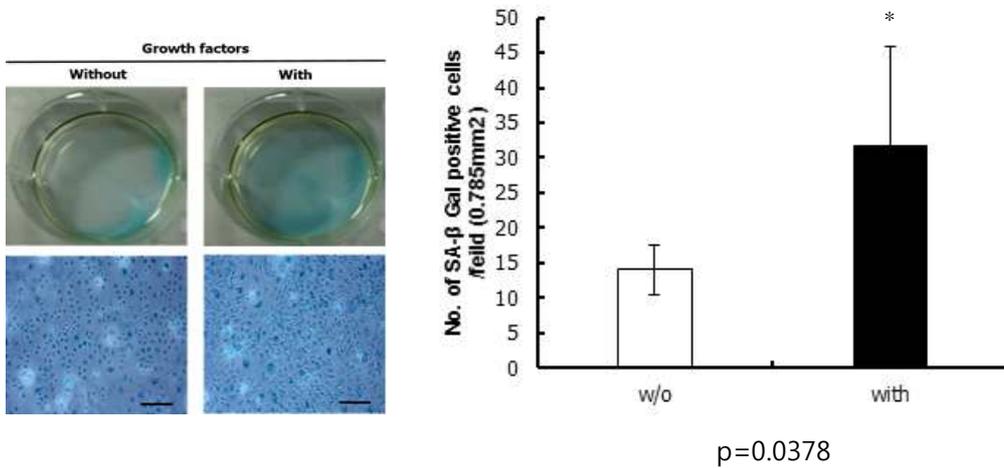
- 모든 그룹에서 cuboidal 형태의 세포가 우점적으로 관찰됨. (Passage 5) <그림19>



Growth factor with Growth factor without
<그림19> 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포형태 차이 비교

(3) 성장인자의 첨가가 세포의 노화를 촉진함을 확인함.

- 성장인자의 첨가 그룹에서 세포 노화가 유의적으로 증가함을 확인함. <그림20>

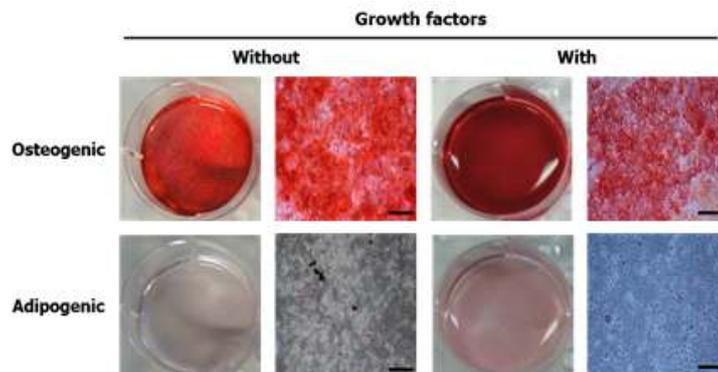


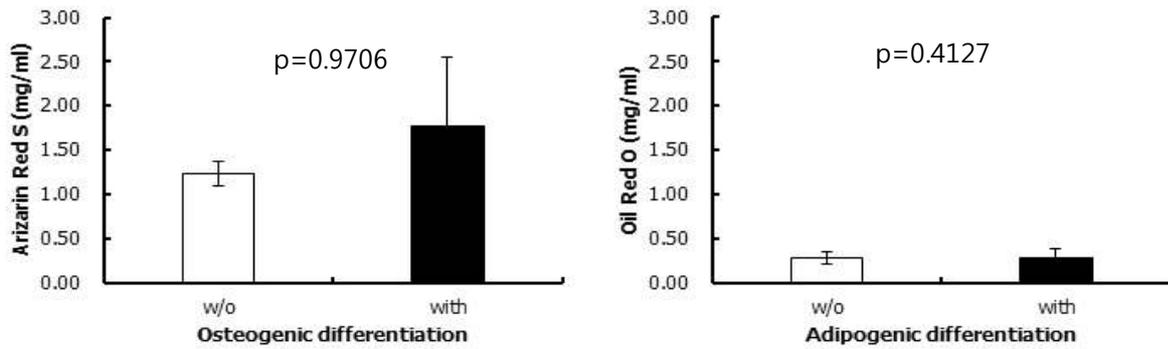
<그림20> 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포노화 차이 비교

(4) 성장인자의 첨가에 따른 세포의 분화능이 다름을 확인함. <그림 21>

- 성장인자 첨가그룹에서 골 분화능이 증가됨을 확인함.

- 모든 그룹에서 지방 분화능이 낮음을 확인함.

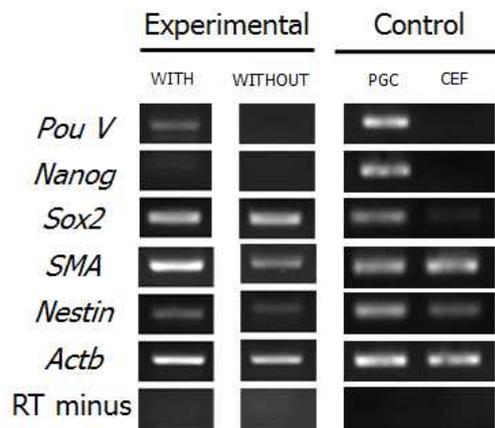




<그림 21> 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포분화능 비교

(5) 성장인자의 첨가에 따른 전능성 및 분화능 관련 유전자 발현을 비교함.

-. 성장인자의 첨가로 인해 전능성 관련 유전자인 *Pou V*이 발현됨을 확인함.<그림22>



<그림22> 성장인자의 첨가 유무에 따른 전능성 및 분화능 관련 유전자 발현 비교

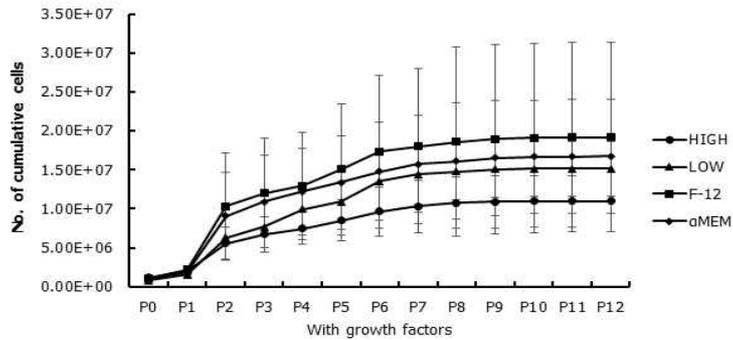
나. 다양한 배지조성에 따른 세포 성장 비교

-. 세포 부착배양에 유용한 상용화 배지 4가지를 선택하여 세포성상을 비교함.

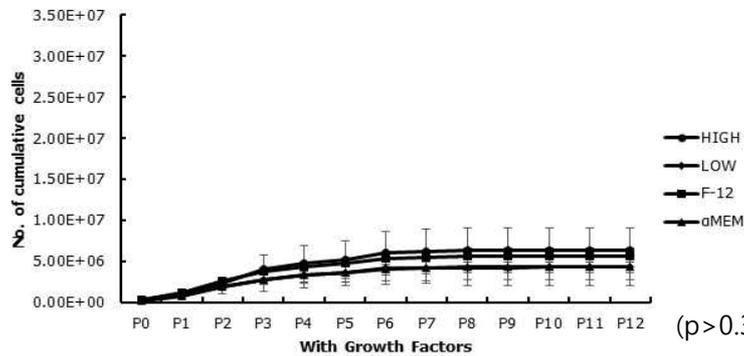
-. 성장인자의 첨가 유무에 따른 세포성상을 비교함.

(1) 배지조성에 따라 성장능에 차이가 있음을 확인함.

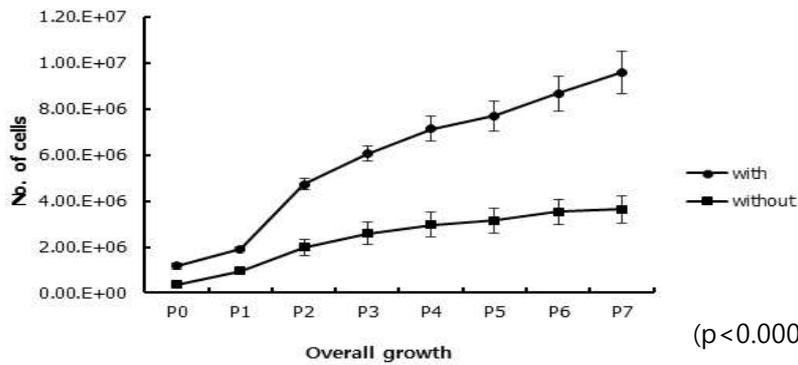
- 성장인자 첨가 그룹에서 성장 속도가 빠름을 확인함. <그림 23>



(p>0.6692)



(p>0.3567)



(p<0.0001)

<그림23> 배지조성에 따른 성장능 차이 비교

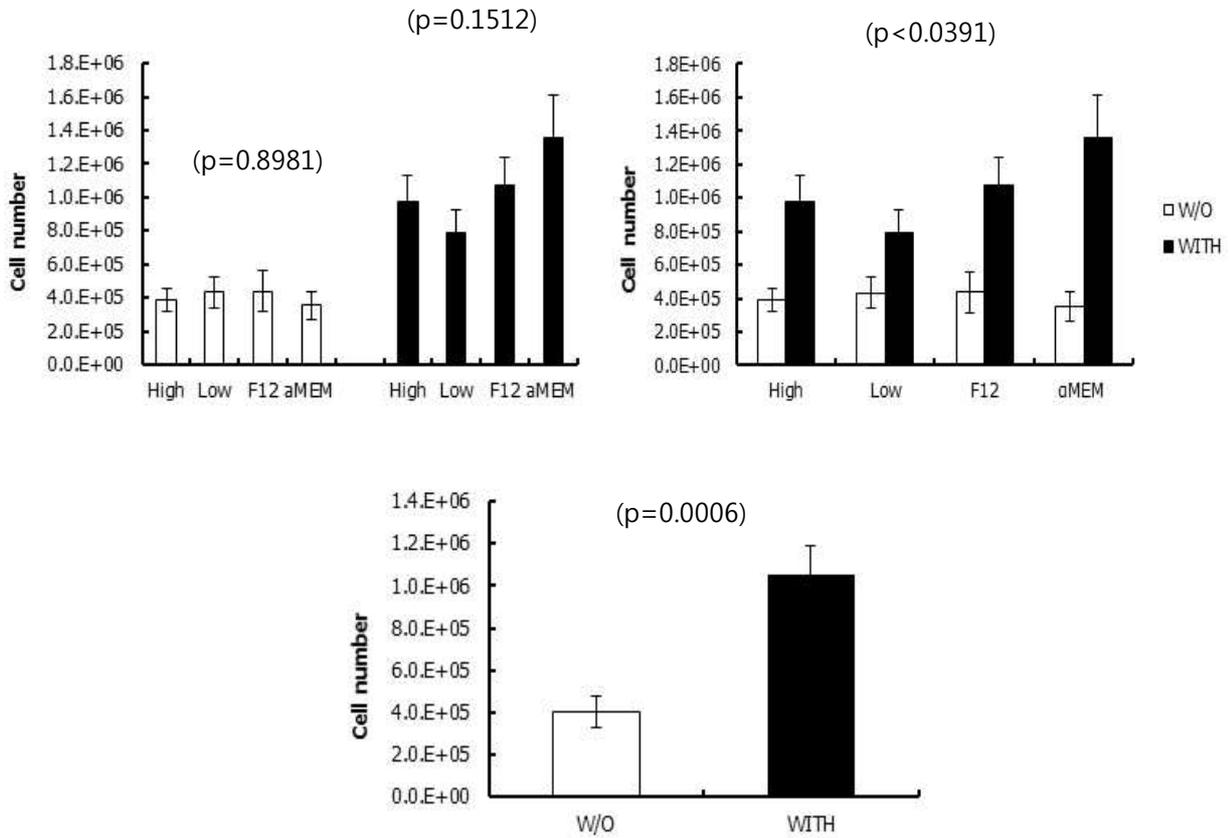
(2) 배지조성에 따라 초기 plating efficiency 및 콜로니 형성능에 차이가 있음을 확인함

- 동일한 개체의 골수세포를 10% FBS가 첨가된 High-glucose DMEM,

Low-glucose DMEM, DMEM-F/12, aMEM 배지에 동일한 수를 배양하였을 때 초기 부착세포 회수율에 유의적 차이가 없음을 확인함. <그림24>

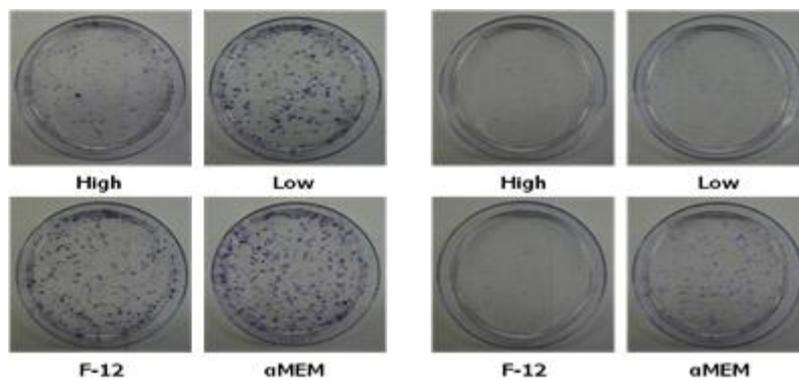
- 각 배지별 성장인자 (5ng/ml LIF, 500unit bFGF) 첨가 그룹에서 무첨가 그룹에 비하여 초기 부착세포 회수율이 높음을 확인함.

- 성장인자가 포함된 aMEM 배지 그룹에서 초기 회수율이 가장 높은 것을 확인함.

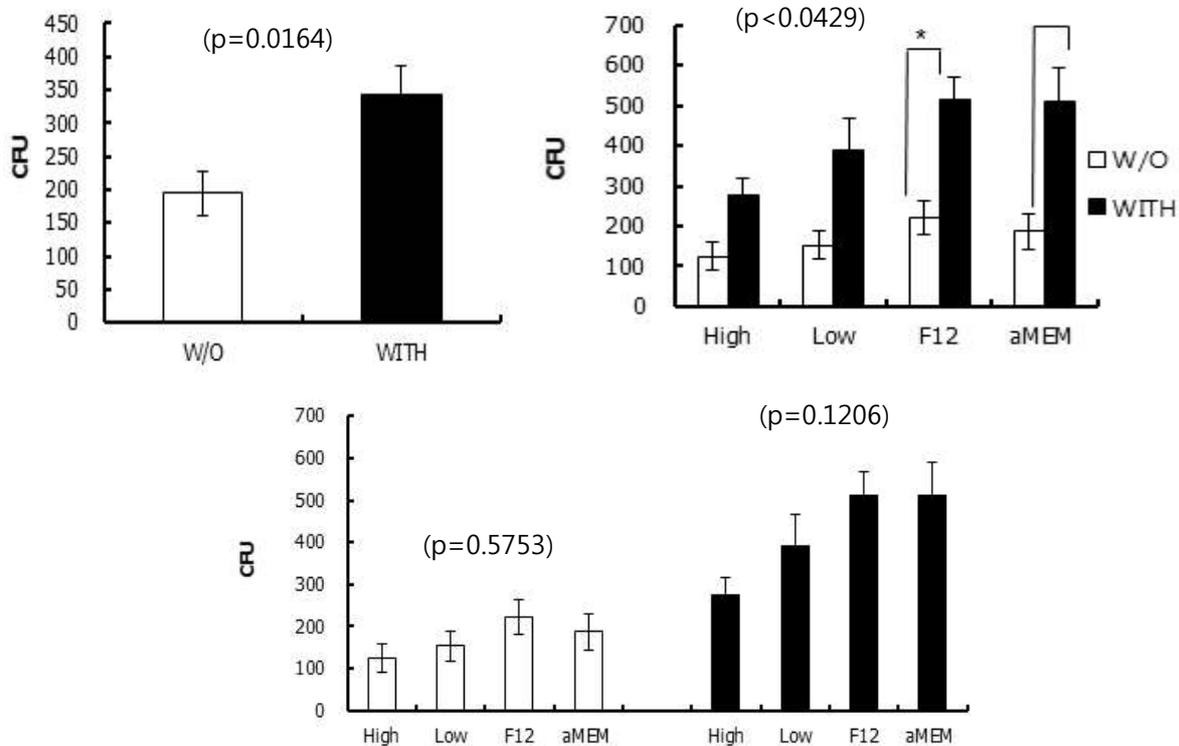


<그림24> 배지조성에 따른 초기 plating efficiency 비교 확인

- 성장인자 첨가그룹에서 콜로니 형성능이 높음을 확인함. <그림25>



*

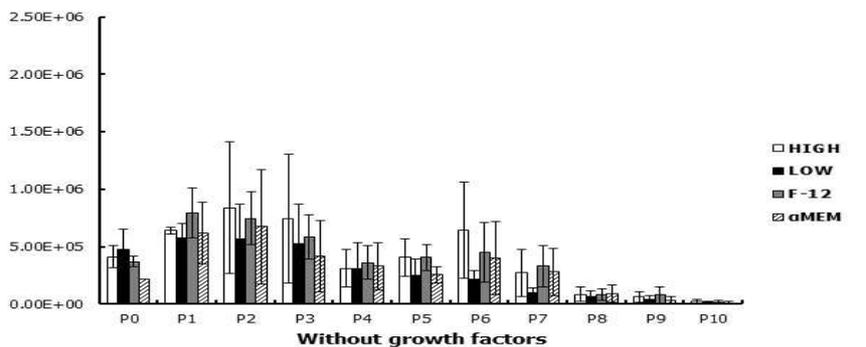
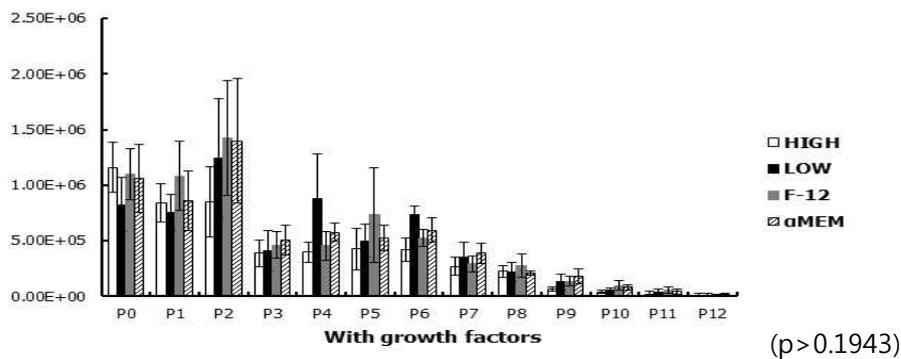


<그림25> 배지조성에 따른 콜로니 형성능 비교

(3) 배지조성에 따라 Passage 별 세포 회수량과 doubling time에 차이가 있음을 확인 함.

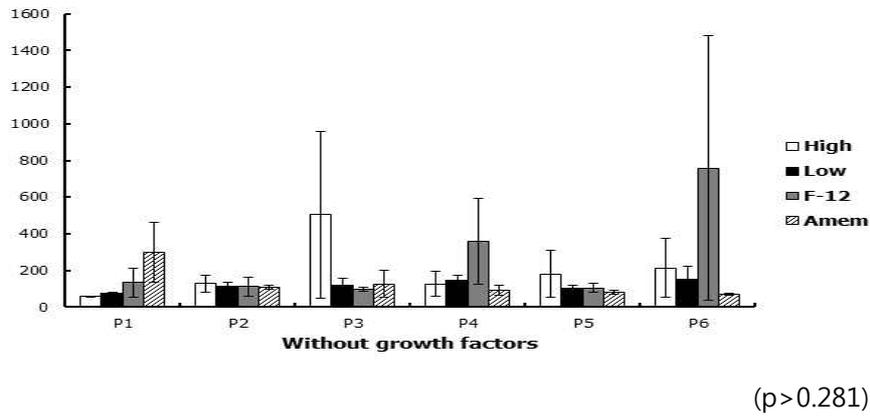
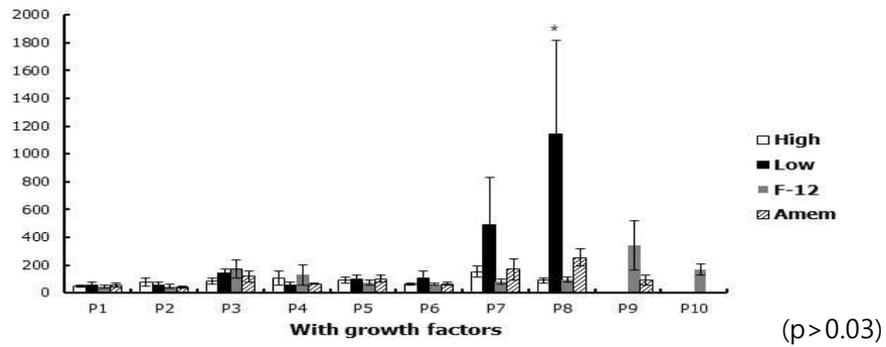
<그림26>

- Passage 별 세포 회수량



(p>0.254)

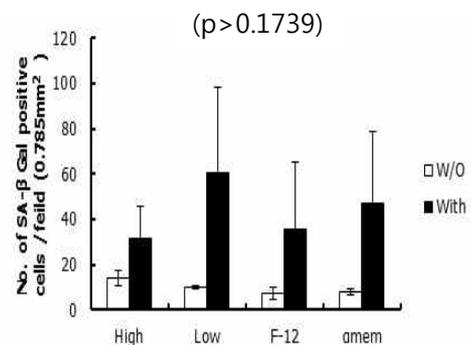
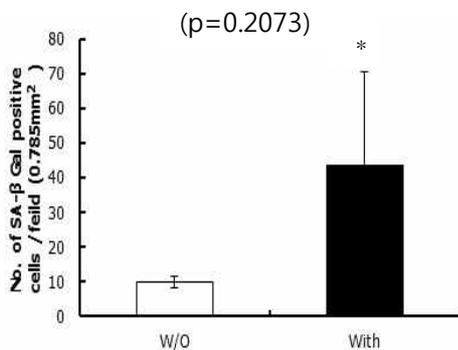
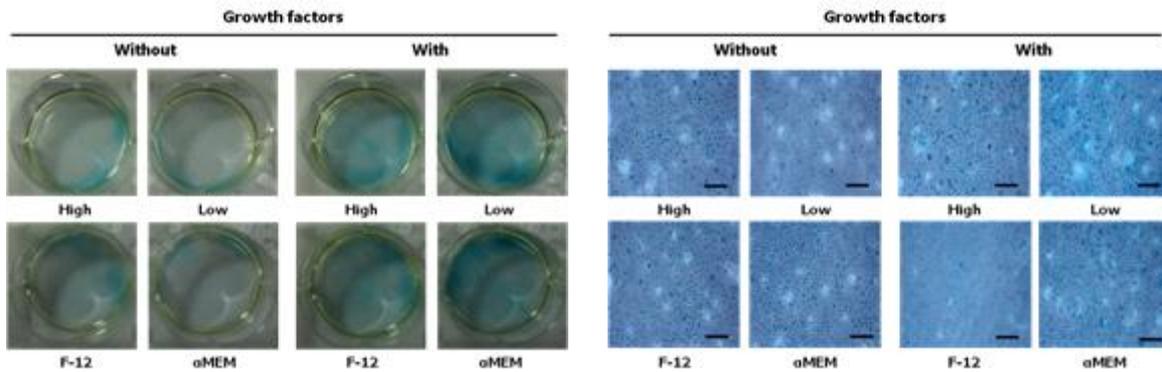
- Cell doubling time

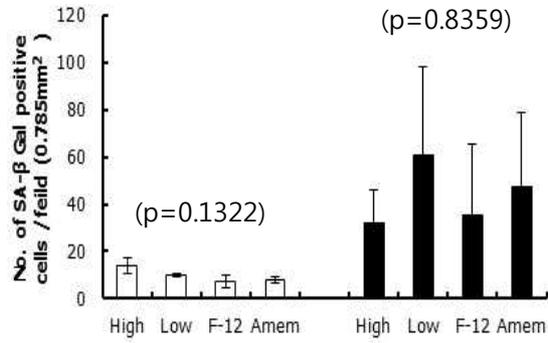


<그림26> 배지조성에 따른 Passage 별 세포 회수량과 doubling time에 차이 비교

(4) 다양한 배지 조성에 성장인자의 첨가가 세포의 노화 정도에 차이가 있음을 확인함.

- 성장인자 첨가그룹에서 세포의 노화가 유의적으로 촉진됨 확인함. <그림27>

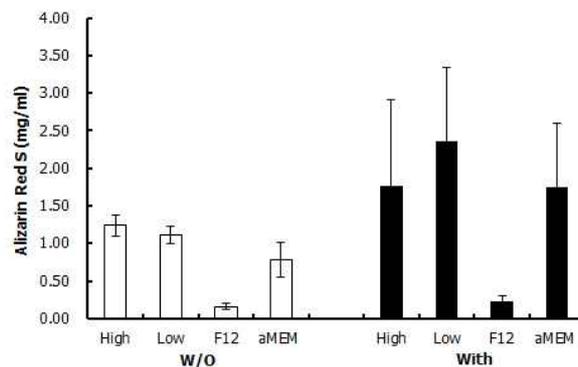
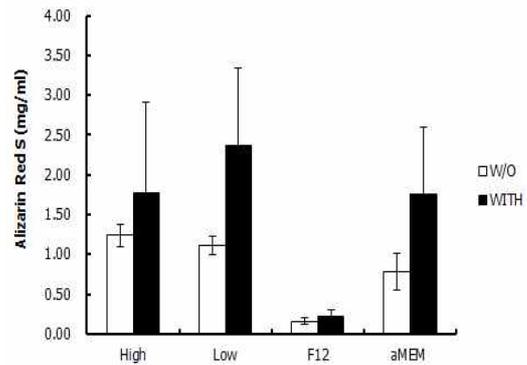
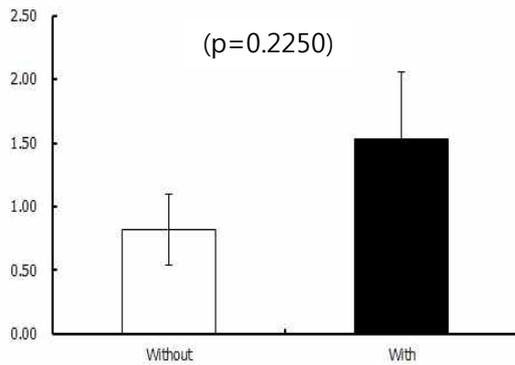
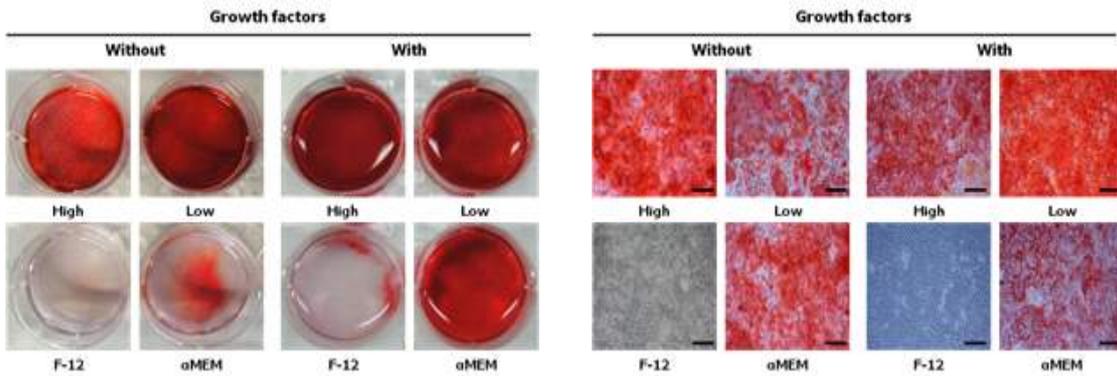




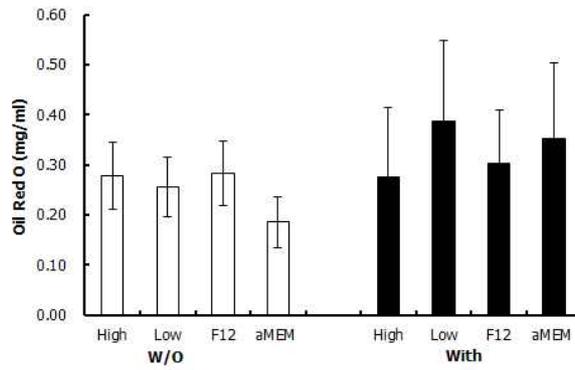
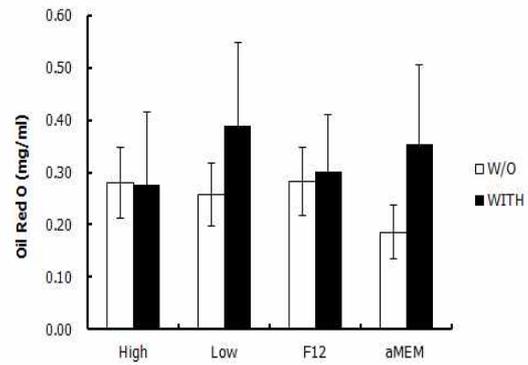
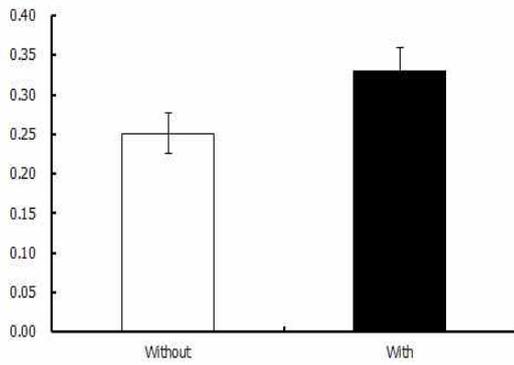
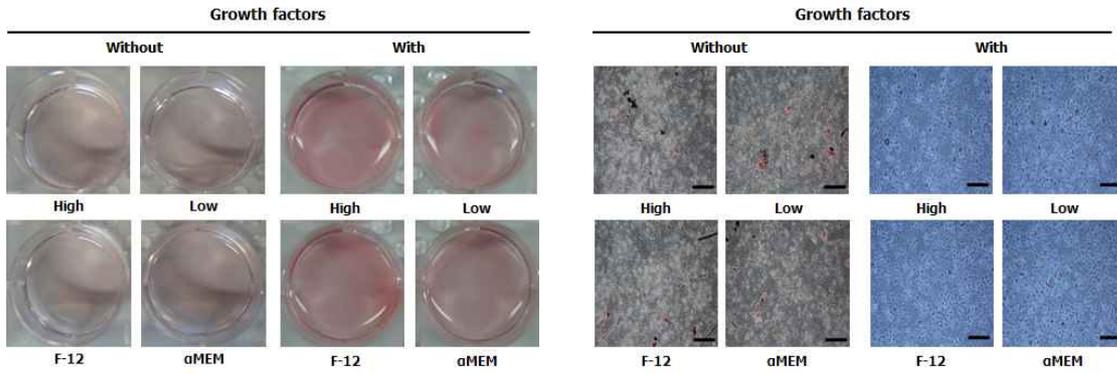
<그림27> 다양한 배지 조성파 성장인자의 첨가로 인한 세포의 노화 정도 차이 비교

(5) 배지조성에 따라 분화능에 차이를 있음을 확인함. <그림28>

- 성장인자 첨가그룹의 각 배지별 골 분화능이 차이가 있음을 확인함.
- F-12의 경우 성장인자의 첨가 유무에 관계없이 골 분화능이 없음을 확인함.

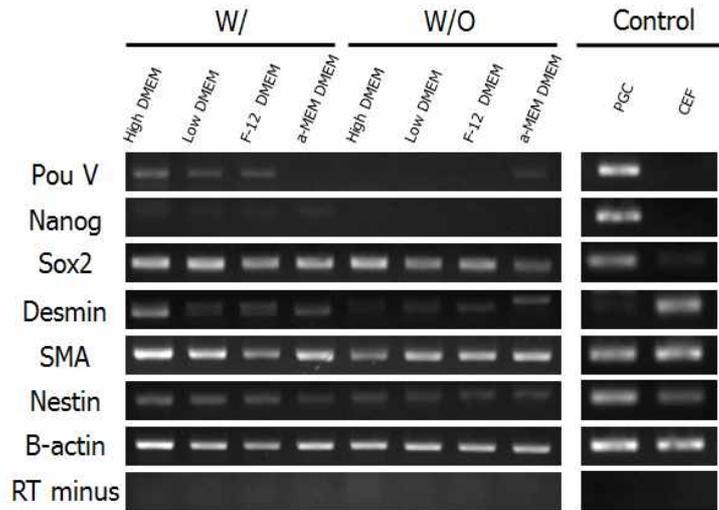


- 모든 그룹에서 Adipogenic 분화능이 낮음을 확인함.



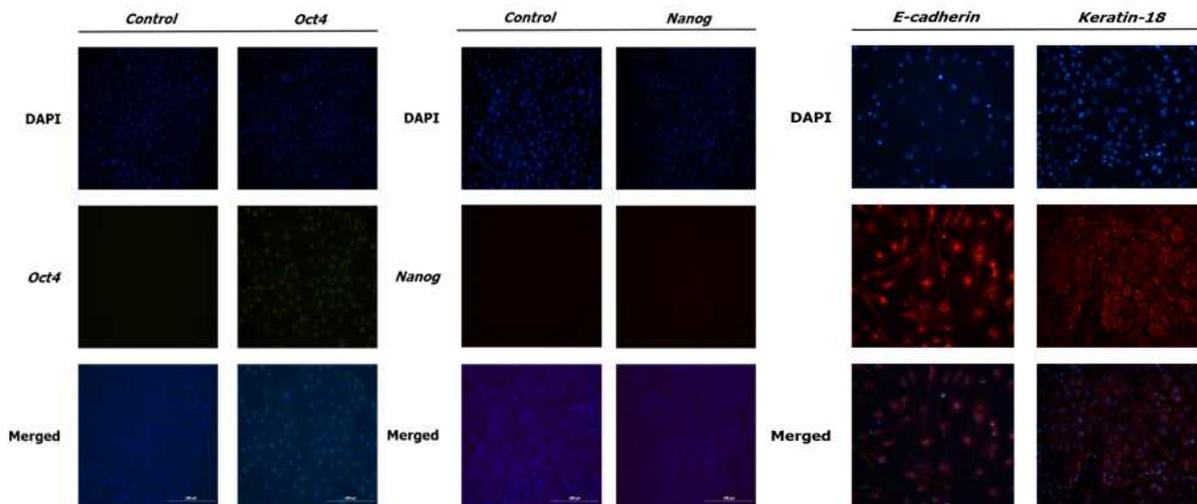
<그림28> 배지조성에 따른 분화능 차이 비교

- (6) 성장인자의 첨가에 따른 전능성 및 분화능 관련 유전자 발현을 비교함. <그림29>
 - 성장인자의 첨가가 전능성 및 분화능 관련 유전자 발현을 향상/유지시킴을 확인함.



<그림29> 다양한 배지별 성장인자의 첨가에 따른 전능성 및 분화능 관련 유전자 발현 비교

- (7) 전능성 관련 마커 및 Mesenchymal/Epithelial cell 관련 마커 발현을 확인함.
 <그림30>



<그림30> 전능성 관련 마커 및 Mesenchymal/Epithelial cell 관련 마커 발현 확인

4. 장기보존 프로토콜 점검 및 관리 시스템 구축

가. 세포 동결방법 SOP 구축

- (1) 세포의 동결 방법 및 해동, 그에 따른 세포 생존율에 관한 프로토콜을 적립하여 표준 작업지침서(SOP)를 구축. 이에 따른 세포의 장기보존 관리 시스템 및 बैं킹 시스템을 구축함.
- (2) 표준작업프로토콜 목차 및 세포 동결방법과 해동과정에 관한 SOP를 구축함.

표준작업지침서
Standard Operating Procedure

발생공학연구소
Lab. of Stem Cell and Bioevaluation
Seoul National University

목차

A. 실험실 관리 총칙 (SCB-A)

1. 실험실 및 실험기기 관리 규정	1
1. 실험실 청소	1
2. 액질포스(LN ₂) 관리	1
3. 실험실용 주변 및 관리	2
4. CO ₂ 가스 관리	2
5. Water bath 관리	3
6. Incubator 관리	3
7. Clean bench 관리	4
8. Dewo freezer 관리	5
9. 세포배양실 내 공조기 관리 및 리모컨 관리	5
10. 폐기물 관리	5
11. 1차, 3차 중류수 기기관리 및 물관리	6
12. 실험기구 washing 방법	7
13. 배기팬 관리	9
14. 연쿠드트 관리	10
15. 세포배양 포팅규격	11
16. 정액 시 대처요령	13
17. BOP 작성 지휘서	15
18. 환부본서	20
III. 세포배양실 사용규정	21
1. 목적	21
2. 세포배양실 이용 시 주의사항	21
3. 세포배양실 내 세포배양 수칙	22
4. 세포배양실 기기사용 수칙	23
5. 환부본서	24

III. 세포배양실 사용규정	25
1. 목적	25
2. 세포배양실 이용시 주의사항	25
3. 세포배양실 내 세포배양 수칙	26
4. 세포배양실 기기사용 수칙	27
5. 환부본서	29
IV. 공돌 배지 및 시약 분주용 취락 표준 프로토콜	30
1. 목적	30
2. 세포 배양 배지	30
3. 세포 배양 supplements	31
4. 배아 배양 배지	38
5. 배아 배양 supplements	39
6. 기타	44
7. 환부본서	45
V. 실험동물 사육시설 관리	47
1. 목적	47
2. 준비	47
3. 동물사육실 출입관리	47
4. 동물사육실 시설 청소 소독 절차	48
5. 동물사육실 기타관리사항	49
6. 동물사육실 동물관리	50
7. 동물사육실 케이지 사용 관리	50
8. 동물사육실 비둘기	50
9. Mouse의 관리사 및 사양관리	51
10. Mouse Breeding 관리	51
11. 18대, 99대 실험동물 자결리검 취약사육 이용방법	52
12. 참고문헌	52

B. 실험방법 (SCB-B)

1. 세포 배양 실험	53
1. 세포수 측정 (Cell Counting)	53
1) 목적	53
2) Hemocytometer를 이용한 세포 수 측정	53
2. 세포의 생존도 측정방법	55
1) 목적	55
2) CCK (Cell Counting Kit, Dojindo) 이용 측정방법	55
3) Trypan Blue 이용 측정방법	56
4) 참고문헌	56
3. 세포의 증식방법	57
1) 목적	57
2) Cytovial Labeling 방법	57
3) 동물세포 보문시 세포관리대상 이용 방법	57
4) MEF cell(대 EB cell의 증식 및 배양 방법	57
5) Slow Freezing 실험(난소의 slow freezing 방법)	58
6) Vitrification 실험방법 (난소의 vitrification 방법)	59
7) 참고문헌	60
4. Mycoplasma 검사	61
1) 목적	61
2) Mycoplasma 테스트	61
5. Mycoplasma 진단용 plasmocin 처리	62
1) 목적	62
2) Plasmocin 처리	62
6. 마우스 난포의 재외배양	64
1) 목적	64
2) 마우스 난포의 재외배양	64
(1) Primary follicle culture	64
(2) Early secondary follicle culture	66
(3) Late secondary follicle culture	66
(4) 재외배양 후 미성숙난포 유리 장치의 설숙	70
(5) 난생생식 (oogenesis) 유도	71

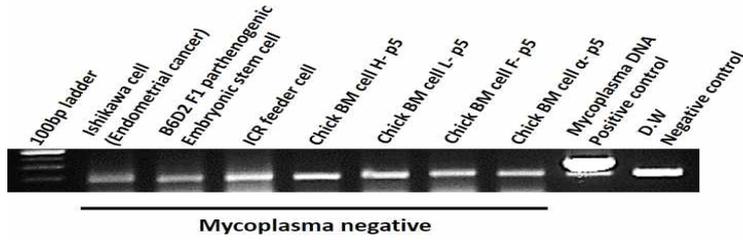
(6) In vitro fertilization (IVF)	73
7. 마우스 배아(embryo)의 배양	75
1) 1-cell flushing	75
2) 2-cell flushing	76
3) 3-cell flushing	78
4) 4-cell (blastocyst) flushing	80
8. 마우스 배아의 형질	82
1) FISH 측정	82
2) TUNEL assay	83
9. 마우스생유아세포 배양	85
1) 목적	85
2) 마우스생유아세포 배양	85
3) 마우스생유아세포의 동결, 해동	87
4) 마우스생유아세포의 MNC 처리	89
5) 환부본서	90
10. 마우스 배아줄기세포의 확립	91
1) 목적	91
2) 마우스 배아줄기 (E1)로부터 배아줄기세포의 확립	91
11. 마우스 배아줄기세포의 feeder 만들기	93
1) 목적	93
2) 마우스 배아줄기세포의 feeder 만들기	93
12. 마우스 배아줄기세포의 계대	95
1) 목적	95
2) 마우스 배아줄기세포의 계대 (subculture)	95
13. 마우스 배아줄기세포의 보관	97
1) 목적	97
2) 마우스 배아줄기세포의 동결 (freezing) 및 해동 (thawing)	97
14. 마우스 배아줄기세포 분화	99
1) 목적	99
2) 신경분화 (NEB27 induction)	99
15. 마우스 배아줄기세포의 확립	101
1) 목적	101
2) 마우스 결시생식세포 (PGC)로부터 배아줄기세포의 확립	101
16. 마우스 배아줄기세포의 특성분석	103

1) 목적	103
2) 마우스 배아줄기세포의 특성분석	103
(1) 핵형분석	103
(2) FACS 이용 DNA content 분석 (Immunostaining)	106
3) 마우스 배아줄기세포의 면역형색	106
(1) DAPI 및 FITC 이용의 면역형색	106
(2) Immunostaining (직접형색)	108
(3) Immunostaining (FACS 이용법)	108
(4) AP staining (Alkaline Phosphatase staining)	110
4) 마우스 배아줄기세포의 분화방법 (Spontaneous differentiation)	111
(1) 재외 배양법	111
(2) 체내 배양법	113
5) 카이메라 (Chimera)	114
(1) Diploid aggregation 방법	114
(2) Tetraploid aggregation 방법	116
(3) Chimera의 관리	118
(4) Embryo Transfer (ET)	119
(5) Germinal transmission	121
17. 돼지 난소로부터 돼지 미성숙 난포 분리	123
1) 목적	123
2) 돼지 미성숙 난포 분리	123
3) 돼지 미성숙 난포의 재외배양	126
4) 돼지 미성숙 난소 (COC)의 재외배양	128
18. 돼지 줄기세포의 확립	133
1) 목적	133
2) 미성숙 난포의 배양을 위한 배양액의 제조	133
3) 미성숙 난포의 배양을 위한 배양액의 제조	136
4) 미성숙 난포 배양을 위한 배양액의 제조	136
19. 쥐 실험동물 BOP	141
1) 목적	141
2) 닭알 부화 (Chicken egg hatching)	141
3) Chicken embryonic fibroblast cell culture	141
4) Periodic acid-Schiff (PAS) staining	142
20. 인간 치면 유래 기저세포 분리 및 유도분화	144

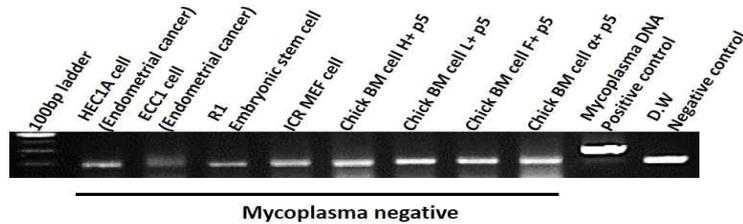
(3) 세포 및 배아, 난소의 다양한 동결 기법을 구축하여 세포은행으로서의 기초 프로토콜을 정립함.

(4) 세포 은행으로서의 기탁 및 공여 기관으로서의 기반을 구축함.

(5) 기탁 및 공여 시 신청서를 작성하여 신청 기관 및 관련 세포 정보를 구체적으로 기입할 수 있게 관련 문서를 작성, 보관함.



<2015년 상반기 Mycoplasma test 결과>

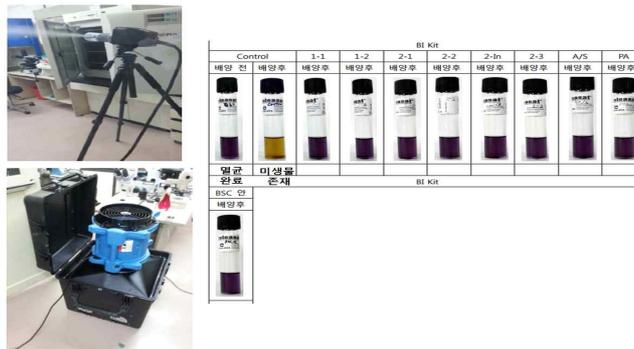


<2015년 하반기 Mycoplasma test 결과>

<그림31> 실험실 보유 세포의 마이코플라즈마 테스트 결과

나. 지속적인 세포 배양실 청정 관리 <그림32>

- (1) 2015년 8월 10일부터 8월 17일 세포배양실 향온향습기 교체를 통한 쾌적한 세포 조 작 환경 제공
- (2) 교체한 향온향습기 특징
 - 기존의 벨트 방식에서 시로코 Fan을 이용한 방식으로 저진동, 저소음
 - 전처리 필터와 주필터의 2중 구조로 집진 효율 AFI 85%로 완벽한 먼지 제거 능력
 - 제품의 소형화
 - 정전 발생 시 정전 종료 후 자동 복귀하여 정전 전의 설정 값으로 자동 운전 가능
- (3) 1년 1회 실시하는 세포 배양실 소독 (과산화수소 소독)을 8월 25일에 실시함.



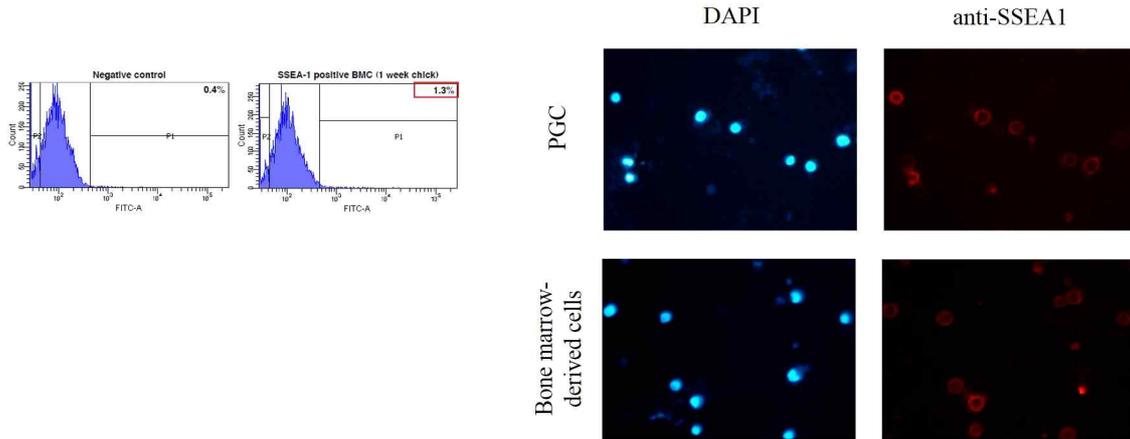
<그림32> 지속적인 세포 배양조작과정의 청정 관리 시스템

2. 닭 배아 *ex vivo* 시스템을 활용한 세포분화모델 개발

가. 고순도 줄기세포를 분리를 위하여 전능성마커인 SSEA-1을 활용하여 줄기세포 분리 가능성 탐색

(1) 4일령 닭 골수에서 SSEA-1 양성세포의 존재를 확인함. <그림33>

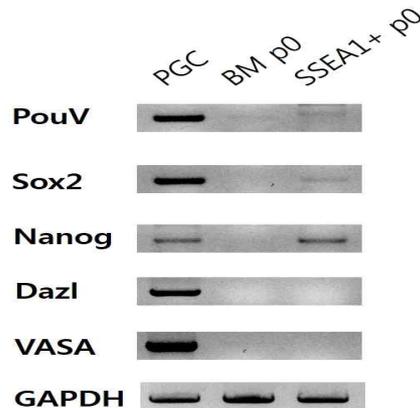
- 전체 골수세포 내에 약 1%의 SSEA-1 양성세포가 존재하며, 형광염색법을 통해 발현 강도를 확인함.



<그림33> 4 일령 닭 골수에서 SSEA-1 양성세포의 존재를 확인

(2) FACS ARIA III 와 MACS를 이용하여 SSEA-1 양성 세포를 분리하여 줄기세포 특이 마커를 확인함. <그림34>

- 전능성 마커인 Nanog, PouV, Sox2 유전자가 발현됨을 확인함.
- PGC와 Germ Cell 마커인 VASA와 DAZL은 발현되지 않음을 확인함.

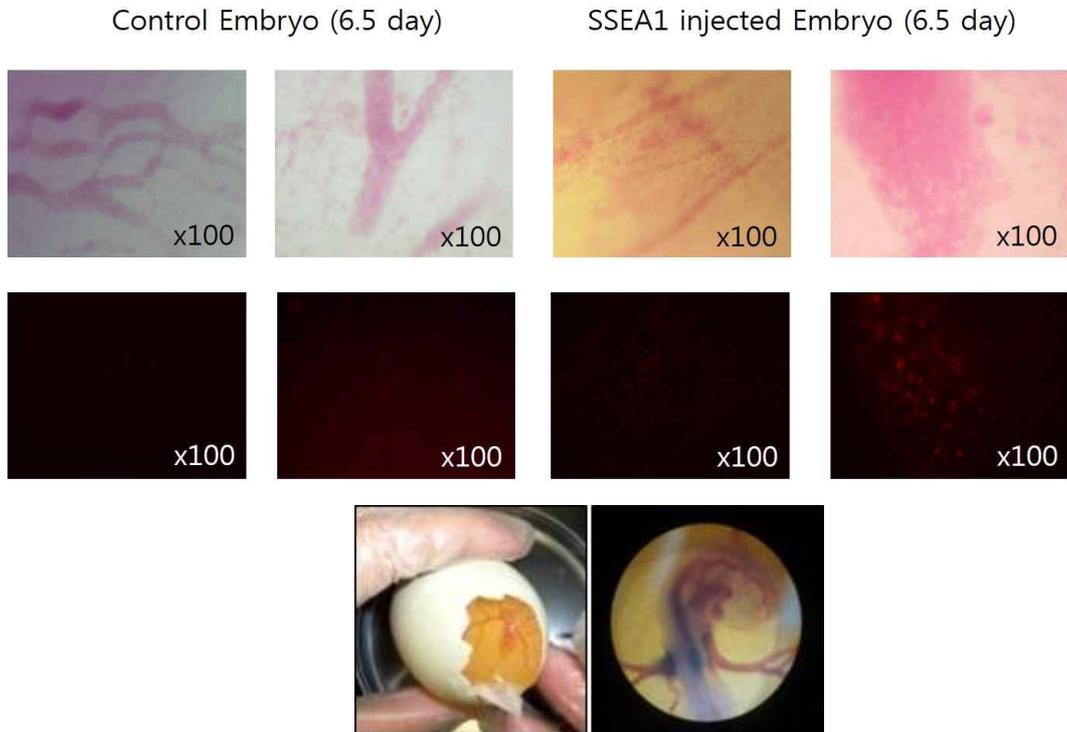


<그림34> SSEA-1 양성 세포를 분리하여 줄기세포 특이 마커 확인

(나) 골수 내 SSEA-1 양성세포 분리 후 *ex vivo* 시스템을 이용한 세포분화모델 개발.

(1) 4일령 닭 골수에서 SSEA-1 양성 세포를 분리하여 닭 배아에 microinjection 후 이식 세포의 분포 및 이동능 확인.

- 단세포 분리한 SSEA-1 양성 세포를 PKH로 염색한 후 Stage X embryo에 microinjection 한 후 6.5일에 배아 표면을 관찰함. SSEA-1 양성 세포가 혈관 주변부에서 관찰되었으나 다른 기관이나 피부에서는 관찰되지 않았음. <그림35>



<그림35> 4일령 닭 골수에서 SSEA-1 양성 세포를 분리 후 닭 배아에 microinjection 후 이식 세포의 분포 확인.

- 단세포 분리한 SSEA-1 양성 세포를 PKH로 염색한 후 2.5일령 embryo에 microinjection 하여 Gonad로의 이동능을 분석함. Gonad에서 PKH labeled SSEA-1 양성세포가 관찰됨. <그림36>



<그림36> 4일령 닭 골수에서 SSEA-1 양성 세포를 분리 후 닭 배아에 microinjection 후 이식 세포의 이동능 확인.

3. 체조직 유래 가금 줄기세포 특이적 배양법 개발

가. 배지 조성에 따른 골세포 분화능 비교.

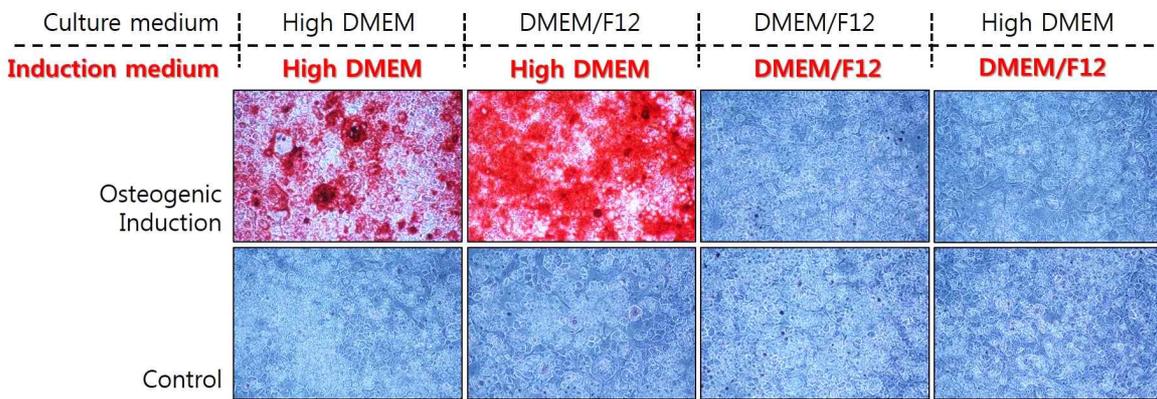
- 분화 배지의 기본배지에 따라서 닭 골수유래 세포의 골세포 분화능을 비교.

(1) 2차년도 결과에서 배양배지와 분화배지의 기본배지 종류에 따라서 골세포 분화능에 차이가 있음을 확인함.<그림37>

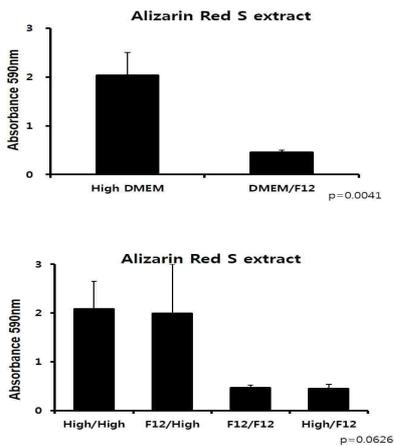
- DMEM/F12 배지를 기본배지로 하여 닭 골수유래 세포를 배양 및 분화배지로 이용한

그룹에서 골세포 분화능이 현저히 떨어짐을 확인함.

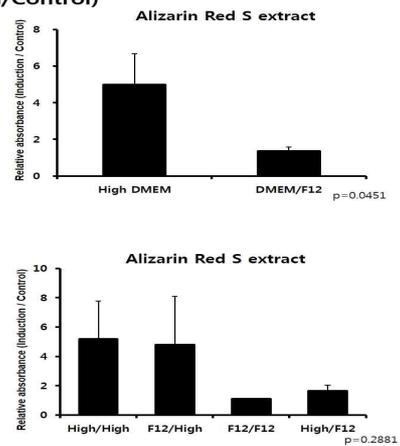
- 골세포 분화능에 차이를 보이는 원인이 1> 세포 분리 시 사용하는 기본 배양액의 차이에 의해 능력이 다른 세포가 분리된 것인지, 2> 분리된 세포의 능력은 같으나 분화배지의 조성 차이에 의해 분화가 유도되지 않는 것인지 확인하기 위하여 골 분화를 잘 유발하는 조건의 배양액으로 상호 교환하여 세포의 특성 및 분화능을 확인함.
- DMEM/F12 배양액에서 분리된 세포를 분화가 잘 유도되는 High glucose DMEM 기반의 분화배지로 교체하였을 때 골분화가 유도됨을 확인함. 반대로 골분화가 잘 유도되던 High glucose DMEM 배양액에서 분리된 세포를 DMEM/F12 기반의 분화배지로 교체하였을 때 골분화가 유도되지 않음을 확인함.
- 결론적으로 닭 골수유래 줄기세포의 골세포 분화능은 배양배지 종류가 아닌 분화배지의 종류에 따라서 조절되는 것을 확인함.



Induction absorbance



Relation absorbance (Induction/Control)

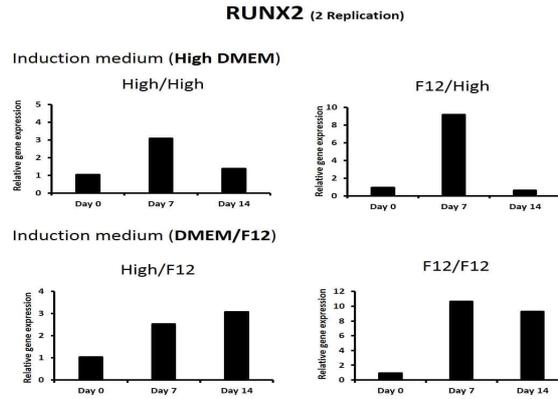


<그림37> 배양배지와 분화배지의 기본배지 종류에 따른 골세포 분화능에 차이 비교

(2) 닭 골수 유래 세포의 배양배지와 분화배지 종류에 따른 골세포 유도분화 중에 골세포 관련 유전자 발현 비교.

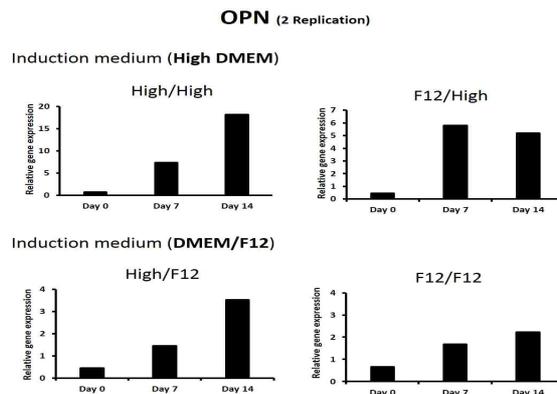
- 골세포 및 골세포 분화에 관련된 유전자 *RUNX2*, *OPN (Osteopontin)*, *ALP* 의 발현을 분화과정 중에 확인함.

- *RUNX2* 유전자는 골세포 분화 및 골격 형성에 필수적인 역할을 하는 유전자로 알려져 있음. 골세포 분화 시 *RUNX2* 유전자 발현은 증가했다 감소하는 것으로 보고되어 있음. High Glucose DMEM를 분화배지로 이용했을 때 *RUNX2*의 발현이 7일째 증가했다 14일째 감소하는 경향이 보이는 반면, DMEM/F12를 분화배지로 이용했을 때 *RUNX2*의 발현이 14일 째 감소하지 않는 경향이 관찰됨.<그림38>



<그림38> 닭 골수 유래 세포의 배양배지와 분화배지 종류에 따른 골세포 유도분화 중에 골세포 관련 유전자 *Runx2* 발현 비교

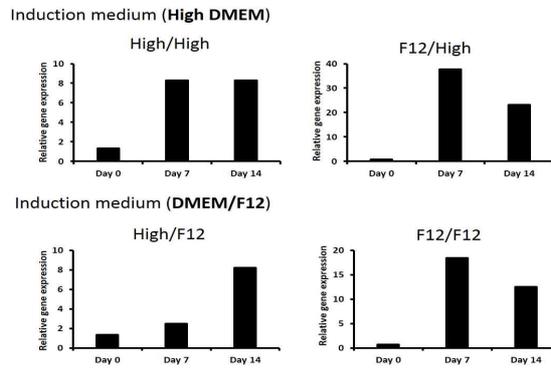
- OPN은 뼈에 발현하는 Extracellular structural glycoprotein으로 생광물화 (biomineralization), 뼈 remodeling에 관여하는 것으로 알려져 있음. 또한 골세포 분화 시 분화가 진행되면서 *OPN* 유전자 발현이 증가하는 것으로 알려져 있음. High glucose DMEM을 이용하여 분화할 때 *OPN* 유전자 발현량이 높게 증가하는 것으로 관찰되었으나 DMEM/F12를 이용하여 골세포 분화를 유도할 때에는 *OPN* 유전자 발현 증가정도가 낮음을 확인할 수 있었음. <그림39>



<그림39> 닭 골수 유래 세포의 배양배지와 분화배지 종류에 따른 골세포 유도분화 중에 골세포 관련 유전자 *OPN* 발현 비교

- *ALP* 유전자는 골세포 분화 과정에서 Phosphate metabolism과 matrix elaboration에 관련되어 있음. 골세포의 calcification initiating에 연관되어 있는 것으로 알려져 있음. *ALP* 유전자 발현의 경우 모든 조건에서 증가하는 것이 관찰됨. <그림40>

ALP (2 Replication)



<그림40> 닭 골수 유래 세포의 배양배지와 분화배지 종류에 따른 골세포 유도분화 중에 골세포 관련 유전자 ALP 발현 비교

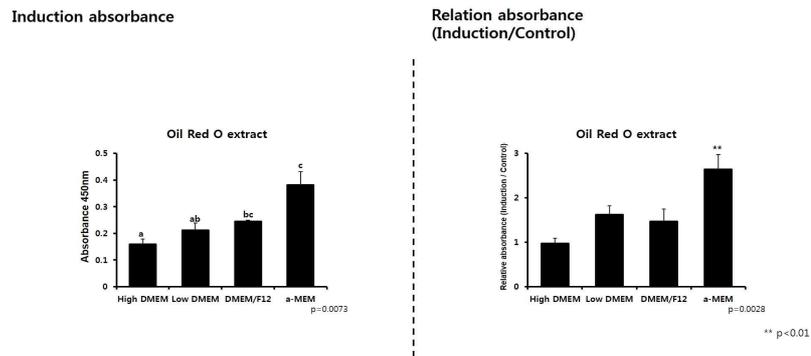
4. 배지 구성에 따른 닭 골수유래 세포의 지방세포 분화능

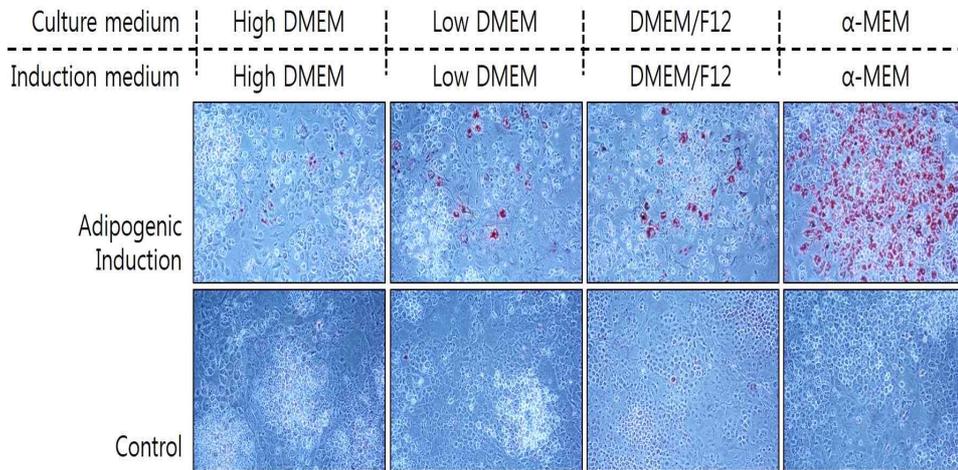
가. 배지 구성에 따른 지방세포 분화능 비교.

- 분화 배지의 기본배지에 따라서 닭 골수유래 세포의 지방세포 분화능을 비교.

(1) 배지 종류에 따라서 지방세포 분화능 차이를 비교함. <그림41>

- 기존에는 지방세포 유도 분화 시 human recombinant Insulin을 이용하였으며 배지 구성에 관계없이 지방세포 분화능이 낮은 것을 확인함.
- 지방세포 유도 분화 시 bovine insulin을 이용하였으며 α -MEM를 이용한 그룹에서 지방세포 분화능이 다른 조건에 비해 높은 것을 확인함.





<그림41> 배지 종류에 따라서 지방세포 분화능 차이 비교

5. 4일령 유추에서 회수된 골수 유래 세포의 추가 회수 및 골세포 분화 특성 분석

가. 추가적으로 4일령 White leghorn (WL) 닭의 Femur와 Tibia로부터 골수를 채취하여 단세포를 분리, 배양을 수행함.

(1) 회수된 세포의 성장에 따라 각 세포 수 및 신체 부위 사이에 유의적 차이가 없음을 확인함. <표3>

<표3> 4일령 병아리의 Femur와 Tibia로부터 골수 회수된 세포의 성장에 따라 각 세포 수 및 신체 부위 사이에 유의적 차이 비교

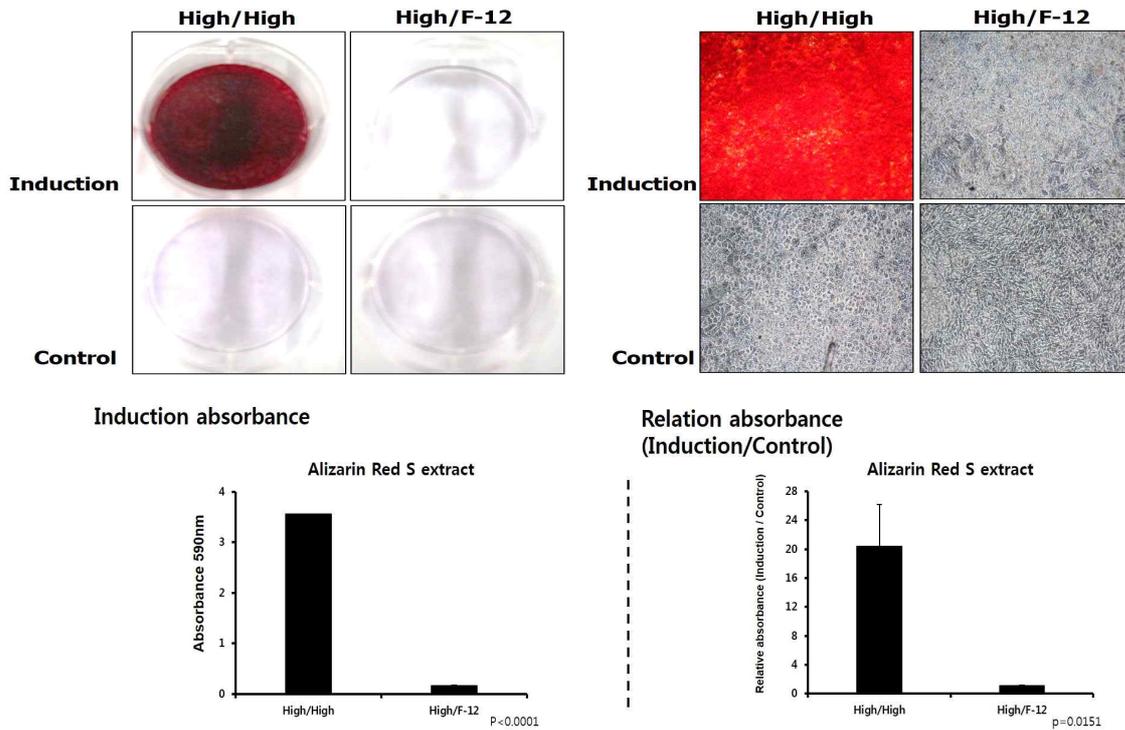
Physical characterization				
Heads	Body weight (g)	Height (cm)	Length of leg (cm)	Mean no. of cells retrieved
#101	26.50	7.1	5.7	5.85X10 ⁸
#102	29.80	9.4	5.9	8.55X10 ⁸
#103	27.70	8.9	4.7	5.94X10 ⁸
#104	28.20	9.3	4.7	5.52X10 ⁸

(2) 추가적으로 회수, 배양한 닭 골수유래 세포의 배양배지 별 세포 성장 변화 비교
 - 배양 배지 종류에 따라서 골수 유래 세포의 모양이 다름을 확인함.
 - DMEM/F12 배양배지에서 배양한 골수 유래 세포의 경우 다른 조건과 달리 Cuboidal 형태의 세포가 우점적으로 성장하는 것을 확인함.

(3) 추가로 확립된 골수유래 세포를 대상으로 골세포 유도 분화능을 분석함. <그림42>
 - *RUNX2* 유전자 발현 결과 DMEM/F12를 이용한 분화배지로 골세포 유도분화를 진행할 때 다른 조건에 비해 천천히 진행될 수 있을 가능성이 제시됨. 따라서 유도 분화

기간을 2주에서 4주로 늘려서 실험을 진행함.

- 분화기간을 4주로 늘렸음에도 불구하고 DMEM/F12를 분화배지로 이용한 그룹에서는 골세포로 분화하지 않음을 확인함.



<그림42> 추가로 확립된 골수유래 세포를 대상으로 골세포 유도 분화능 분석

[4차년도]

1. 동물줄기세포은행 시스템 구축을 위한 관리 시스템

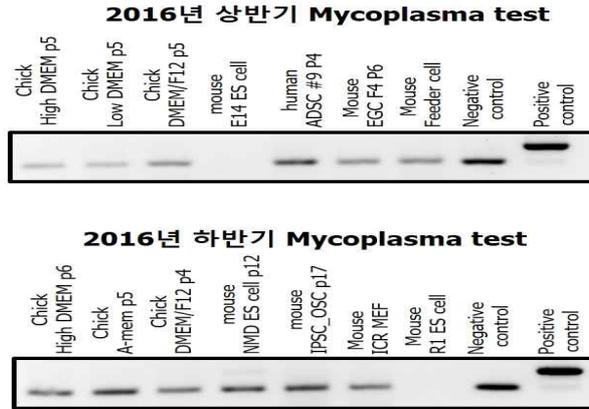
- 본 연구진으로부터 유추기 가금 골수 유래 부착세포 78주 (4일령 병아리 가금 골수유래 부착세포 62주, 11주령 가금 골수유래 부착세포 16주)를 확립하였음.

가. 타 세부로부터 확립된 경제동물 줄기세포 기탁

- (1) 2세부과제 연구진으로부터 오골계 원시생식세포 2주 (5 vial), 화이트 레그혼 원시생식세포 1주 (5 vial), 하이라인 (산업종 산란계)의 원시생식세포주 1주 (5 vial), 총 4주의 가금 원시생식세포를 기탁 받음.
- (2) 1협동과제 연구진으로부터 체내수정 (*in vivo* fertilization) 수정란 유래 돼지 배아줄기세포 4주 (5 vial), 체외수정 (*in vitro* fertilization) 수정란 유래 돼지 배아줄기세포 1주 (5 vial), 총 5주의 돼지 배아줄기세포를 기탁 받음.
- (3) 기탁 받은 가금 및 돼지 세포주를 포함하여 본 연구진의 동물줄기세포은행은 가금 원시생식세포 4주, 유추기 가금 골수 유래 부착세포 62주, 중추기 가금 골수 유래 부착세포 16주, 체내수정 수정란 유래 돼지 배아줄기세포 4주, 체외수정 수정란 유래 돼지 배아줄기세포 1주, 단성생식 수정란 유래 돼지 배아줄기세포 2주, 돼지 골수유래 기질세포 1주, 생쥐 줄기세포 (iPSC 포함) 35주를 확보함.

나. 지속적인 미생물 오염 모니터링

- 실험실에서 보여하고 있는 세포를 대상으로 무작위로 선택하여 1년에 2회 미생물 감염 여부를 확인하였고, 2016년 2회 마이코플라즈마 감염 여부를 검사한 결과 모두 음성임. <그림43>



<그림43> 지속적인 미생물 오염 모니터링 확인

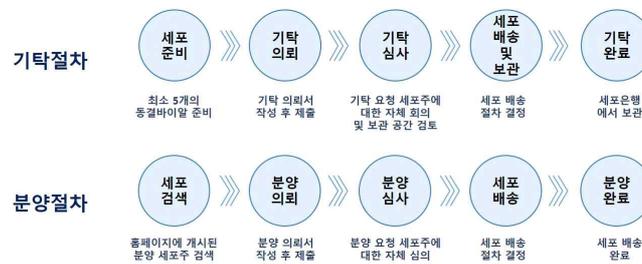
다. 동물줄기세포 은행 운영 프로토콜 정립

- (1) 동물줄기세포 절차 편의성 향상을 위한 홈페이지 개설과 절차 안내서, 서식을 정립함.
- 동물줄기세포 시범 운영을 끝내고 정상 운영을 위한 홈페이지 개설. <그림44>



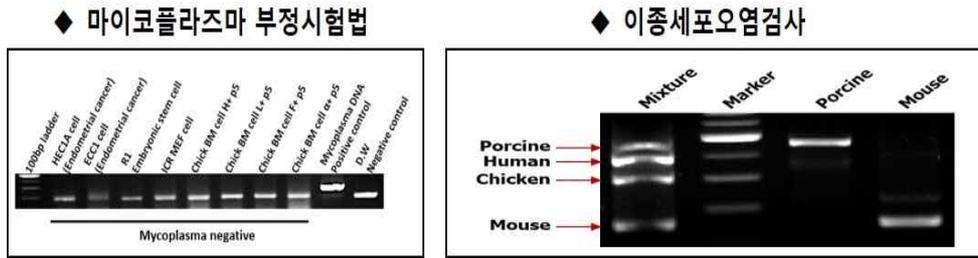
<그림44> 동물줄기세포은행 홈페이지 개설

- 동물줄기세포 기탁 및 분양 절차 확립함. <그림45>



<그림45> 동물줄기세포 기탁 및 분양 절차 확립

- 세포 기탁 시 모든 세포를 대상으로 세포품질보증 시험을 위한 마이코플라즈마 부정시험과 이중세포오염검사 무료 검증을 해주는 서비스를 시범운영함. <그림46>



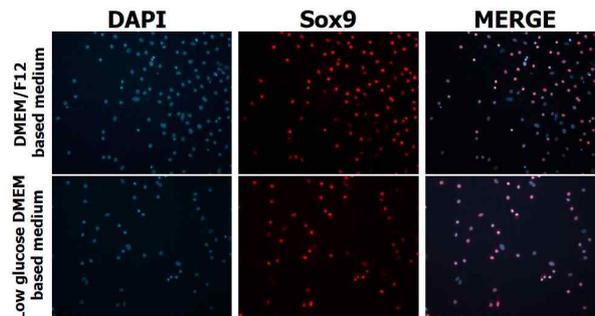
<그림46> 기탁 받는 세포를 대상으로 세포품질보증 시험 무료 검증 서비스 시범운영

2. 가끔 골수유래 부착세포의 특성 분석

가. 4일령 (유추기) 병아리 골강 내 존재하는 부착세포의 특성 검증

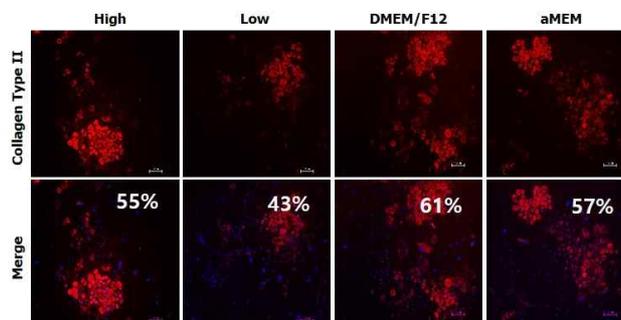
- (1) 4일령 병아리 대퇴부 골수에서 분리한 세포의 특성 검증을 위해 세포 형태학적 유사성을 가지는 osteochondroblast 마커를 이용하여 검증

- 4일령 병아리 대퇴부 골수에서 분리한 부착세포의 Sox9 발현을 세포면역형광 분석을 통해 확인한 결과 90% 이상 발현되는 것이 관찰되었음. 따라서 4일령 병아리 골수유래 부착세포는 Condensed mesenchyme임을 입증함. <그림47>



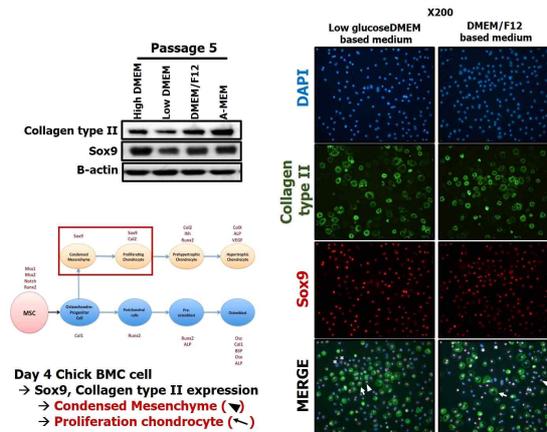
<그림47> 4일령 병아리 대퇴부 골수에서 분리한 부착세포의 Sox9 발현 확인

- Collagen type II 단백질의 4일령 병아리 골수유래 부착세포내 발현을 세포면역형광 분석을 통해 확인한 결과, 배양 기본 배지에 따라 43~61%의 발현 세포가 관찰되었으며, 배양 기본배지간의 유의적인 차이는 없었음. <그림48>



<그림48> 4일령 병아리 대퇴부 골수에서 분리한 부착세포의 배양배지에 따른 Collagen type II 발현 비교

- 따라서 본 연구진은 확립한 골수유래 부착세포가 Sox9+ Condensed mesenchyme, Sox9+/Collagen type II+ Proliferating chondrocyte임을 확인하였음. <그림49>

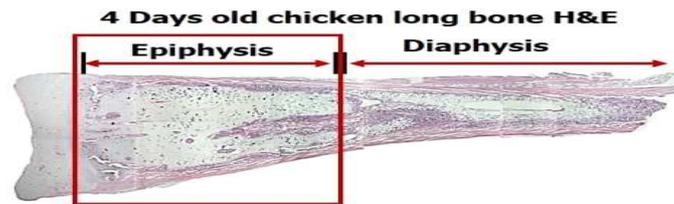


<그림49> 4일령 병아리 대퇴부 골수에서 분리한 부착세포의 특성 검증

나. Collagen type II positive 세포의 기원 추적

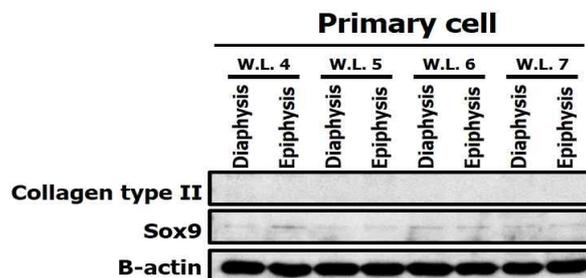
(1) 골수유래 중간엽 줄기세포와 형태학적으로 차이가 있는 Osteochondroblast가 대퇴부골의 어느 부위에서 유래했는지 확인함

- Osteochondroblast가 대퇴부골의 어느 부분에서 많이 존재하는지 확인하기 위하여 4일령 대퇴부골을 Epiphysis 와 Diaphysis 부분으로 나눠서 골강 내 부착세포를 분리/확립함. <그림50>



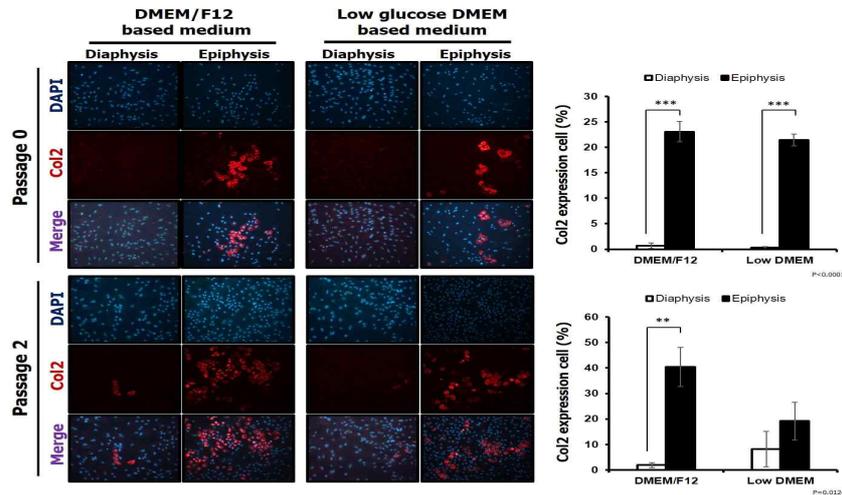
<그림50> Epiphysis 와 Diaphysis 부분으로 나눈 뒤 골강 내 부착세포를 분리/확립

- Epiphysis와 Diaphysis 부분에서 분리한 세포를 Western blot을 통하여 Osteochondroblast 마커인 Sox9와 Collagen type II 단백질 발현을 확인한 결과 Collagen type II 은 확인되지 않았으며, Sox9는 아주 약하게 관찰되었음. <그림51>



<그림51> Epiphysis와 Diaphysis 부분에서 분리한 세포의 Sox9와 Collagen type II 단백질 발현 검증

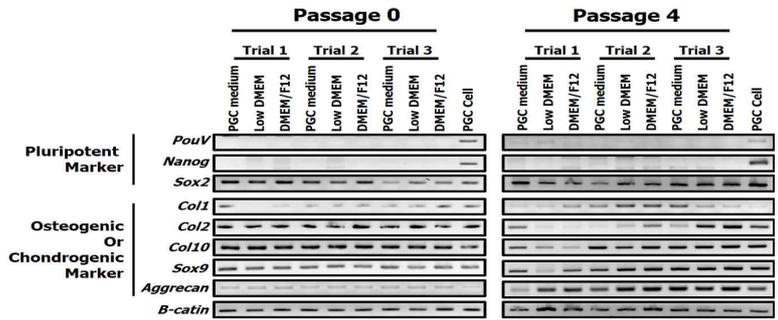
- 각 부위에서 분리한 세포를 12 well 배양디쉬에 1×10^5 씩 10일간 배양 후 Immunofluorescence로 분석한 결과 Epiphysis 부위에서 유래한 세포에서 osteochondroblast 형태의 세포가 관찰되었으며 21~23%가 Collagen type II를 발현하는 세포였음. 반면 Diaphysis에서는 기질세포 모양의 세포가 관찰되었으며 0.3~0.6% 세포가 collagen type II 단백질을 발현하고 있었음. <그림52>
- Epiphysis와 Diaphysis에서 각각 분리한 세포를 두 번의 계대배양 후 Collagen type II 발현을 확인한 결과, Epiphysis에서 20~40%의 세포가 Collagen type II를 발현하고 있었으며, Diaphysis에서는 2~8%가 확인되었음. 이러한 결과를 토대로 Collagen type II를 발현하는 세포는 Epiphysis 부분에 많이 존재하고 있음을 확인함. <그림52>



<그림52> Epiphysis와 Diaphysis 부분에서 분리한 세포의 Collagen type II 발현 검증

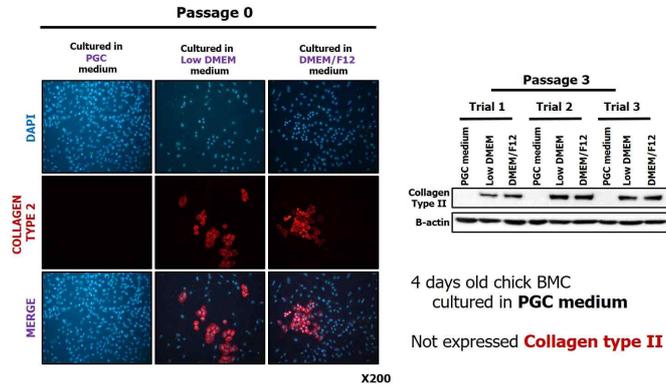
다. 가금 전능성 세포 (원시생식세포;PGC) 배양 배지를 이용한 골강 내 부착세포 특성 분석

- (1) 4일령 병아리의 대퇴부골에서 전능성 세포를 분리 배양하기 위하여 가금 전능성 세포를 배양하는데 이용되는 PGC 배양 배지를 이용하여 4일령 병아리 골수유래 부착세포 배양 후 특성을 분석
 - 4일령 병아리 골수에서 전능성 세포를 확립하기 위하여 가금 전능성세포인 원시생식세포 PGC 배양 배지를 이용하여 골수유래 부착세포를 배양한 결과 세포 형태학적으로 기질세포 모양이 관찰되었음.
 - PGC 배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포와 본 연구진에서 사용한 배양 배지에서 배양한 세포를 Passage 0 와 Passage 4에서 전능성 마커와 Osteo-chondrogenic 마커 발현을 유전자 레벨에서 RT-PCR로 확인한 결과 전능성 마커인 *PouV* 와 *Nanog* 유전자의 발현이 관찰되지 않았음. 그러나 유전자 레벨에서 osteo-chondrogenic 마커는 모두 발현되는 것이 관찰됨.<그림53>



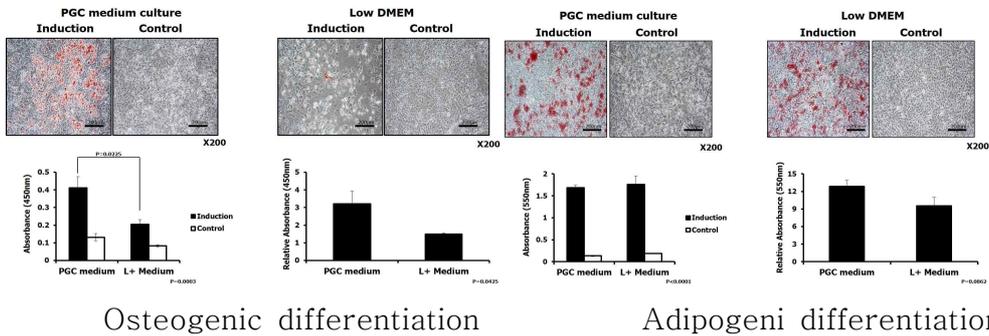
<그림53> PGC 배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 단백질 발현 검증

- PGC 배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포와 본 연구진에서 사용한 배양 배지에서 배양한 세포의 Collagen type II 단백질 발현을 Western blot을 통해 확인해 본 결과 PGC 배양배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포에서 발현이 확인되지 않았음. 이를 통해 PGC 배양배지에서 배양한 부착세포는 Osteochondroblast가 아님을 확인함. <그림54>



<그림54> PGC 배양배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포에서의 Collagen type II 단백질 미발현 검증

- PGC 배양배지와 본 연구진에서 사용한 배양배지에서 각각 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 분화능을 검증한 결과 골세포 분화에는 차이가 없지만 지방세포 분화에서 PGC 배양배지에서 배양한 세포에서 높은 분화능이 관찰됨. 이런 결과를 토대로 PGC 배양배지에서 배양한 부착세포가 중간엽 줄기세포에 보다 가깝다고 예상함. <그림55>



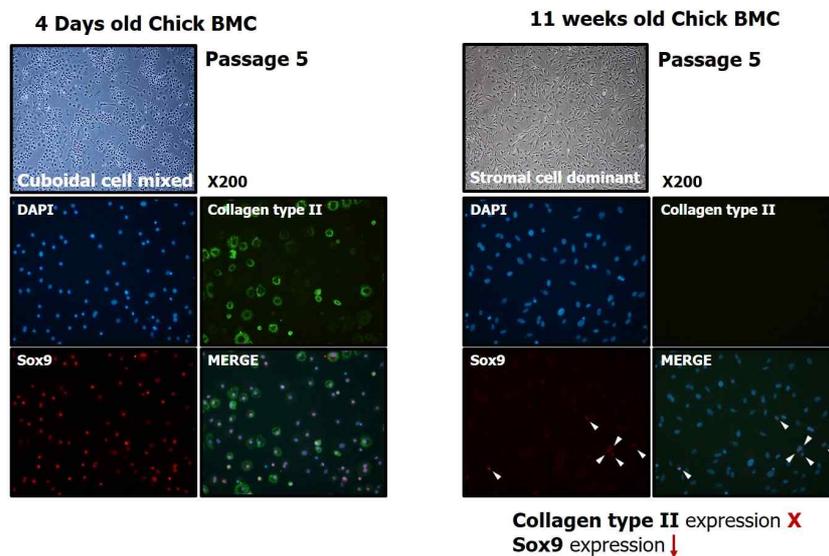
<그림55> PGC 배양배지에서 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포에서의 분화능 검증

- 따라서 본 연구진은 PGC 배양배지로 배양한 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 세포

막 표지인자를 분석하는 연구를 진행 중에 있음.

라. 가금 발달 단계에 따른 골수유래 부착세포의 특성 변화 추적

- (1) 가금의 경우 다른 종과 달리 유추기에 대퇴부골은 활발한 골 형성기에 있으며 이 때 분리되는 부착세포와 중추기의 대퇴부골의 부착세포 간에 차이가 있을 것이라는 가설을 세우고 가금의 발달 단계인 유추와 중추의 대퇴부 골수 내 부착세포를 비교하는 연구를 수행함.
 - 중추기인 11주령 가금의 대퇴부골의 세포 회수 후 부착배양을 시도함.
 - 11주령 가금의 골수유래 부착세포는 4일령 병아리 골수유래 부착세포와 달리 형태학적으로 기질세포 모양이 관찰되었음. Osteochondroblast 마커인 Sox9 단백질의 발현이 약하게 관찰되었으며 Collagen type II 단백질은 발현하지 않는 것을 확인함. <그림 56>



<그림 56> 11주령 가금의 골수유래 부착세포와 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 세포 특성 및 정상 비교

3. 가금 골수유래 부착세포의 유효분비물질 분석

가. 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 세포 유효분비물 분석

- (1) 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 배양액을 대조군으로 하여 골수유래 부착세포 배양 후 회수되는 Supernatant 내 세포에서 분비되는 분비물을 Mass spectrum 분석을 수행함.
- (2) Supernatant에서 확인된 Chicken Protein은 대부분 Extracellular matrix (ECM)를 조성하는 물질임을 확인하였음. Supernatant에서 확인된 chicken protein의 양을 토대로 리스트 해본 결과 Collagen I의 Alpha 2 chain이 가장 많이 관찰되었으며, 그 다음으로 Collagen XII의 Alpha 1 chain 이었음. <표4>
- (3) 기존에 발표된 연구 중 인간의 연골을 구성하는 ECM에서 Collagen type I, Fibronectin이 많이 존재하는 것을 확인하였음. 본 연구진에서 확립한 부착세포의 세포 분비물을 인간 지방유래 기질세포의 연골세포로 분화에 적용시켜 연골세포 분화능을 비교하는 연구를 진행중에 있음. 이 연구에서 유의미한 결과가 나올 경우 본 연구진에서

확립한 세포의 세포 분비물을 임상에 적용시키는 방향으로 5차년도 연구를 진행하였음.

<표4> 4일령 병아리 골수유래 부착세포의 배양액에서 분비되는 분비물 분석결과

Mass spectrum analysis

Control vs 4 Days chick BMC supernatant
(4 Day chick BMC supernatant detected protein top 10)

	Gene name	Protein name
1	<i>COL1A2</i>	Collagen alpha-2(I) chain
2	<i>COL12A1</i>	Collagen alpha-1(XII) chain
3	<i>COL1A1</i>	Collagen alpha-1(I) chain
4	<i>FN1</i>	Fibronectin
5	<i>COMP</i>	Uncharacterized protein
6	<i>TNC</i>	Tenascin
7	<i>THBS1</i>	Uncharacterized protein
8	<i>SPARC</i>	SPARC
9	<i>COL6A1</i>	Collagen alpha-1(VI) chain
10	<i>TGFBI</i>	Uncharacterized protein

[5차년도]

1. 동물세포은행 운영

가. 일반 연구자들의 연구 접근이 어려운 닭과 돼지와 같은 경제동물의 배아 또는 조직으로부터 유래된 줄기세포 및 프라이머리 세포를 총 143주 확보하여 보관하고 있음.<표5>

<표5> 확보되어진 경제동물의 배아 또는 조직으로부터 유래된 줄기세포 및 프라이머리 세포

세포 종류	개수
가금원시생식세포	8주
유추기 가금 골수 유래 부착세포	62주
중추기 가금 골수 유래 부착세포	20주
성추기 가금 골수 유래 부착세포	4주
체내수정 수정란 유래 돼지 배아줄기세포	4주
체외수정 수정란 유래 돼지 배아줄기세포	1주
단성생식 수정란 유래 돼지 배아줄기세포	2주
돼지 골수유래 기질세포	1주
돼지 섬유아세포(TERT 과발현)	1주
돼지 골수유래 중간엽줄기세포	2주
돼지 태아섬유아세포	1주
돼지 근육유래 줄기세포	2주
생쥐 줄기세포 (iPSC 포함)	35주
총	143주

나, 기탁 및 분양과 관련된 모든 절차에 대한 검토를 완료하였으며, 기탁과 분양시 진행되는 모든 과정을 온라인화 하여 세포의 정보와 이동을 직접 확인 할 수 있는 홈페이지 구축을 완료하였음. <그림57>

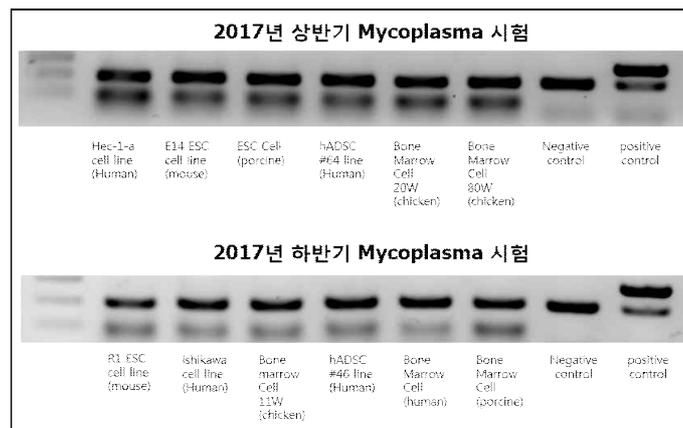
번호	계 종	유래	년월
10	동물세포기탁 신청서입니다. (미시)	최고원리	10-10-2017
13	porcine fetal fibroblast	박주미	17-09-18
14	porcine muscle derived stem cell (PMS 2)	박주미	17-09-12
15	porcine muscle derived stem cell (PMS 1)	박주미	17-09-18
12	porcine Bone marrow mesenchymal stem cell (PBM 2)	박주미	17-09-18
11	porcine Bone marrow mesenchymal stem cell (PBM 1)	박주미	17-09-18
10	porcine TERT overexpression fibroblast	박주미	17-09-14
9	Porcine ESC (PivO-KNU-S) 기탁	한나리	17-05-11

<그림57> 동물줄기세포 은행 기탁신청 및 분양 홈페이지 운영

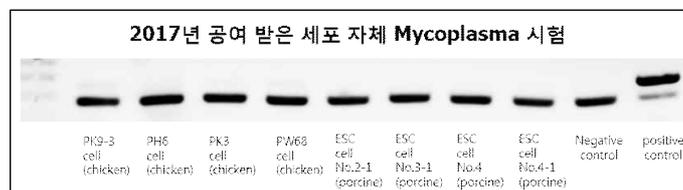
다. 지속적인 미생물 오염 모니터링 및 이중세포간의 오염 테스트 진행

(1) 기탁 받은 모든 세포를 대상으로 미생물 부정검정(마이코플라즈마 테스트)와 이중세포간의 오염여부 검사(인간, 쥐, 돼지, 닭 4종의 미토콘드리아 구별 검사)를 시행하여 세포은행 운영의 안전성을 확보하였음. 향후 분양 시 분양 직전 모든 검사를 재실시 하여 신뢰할 수 있는 세포를 공급할 예정임.

- 년 2회 기탁 받은 세포와 무작위로 선택되어진 실험실 보유세포를 대상으로 세포내 미생물오염 균 감염여부를 확인한 결과 모두 음성임을 확인함. <그림 58 및 59>

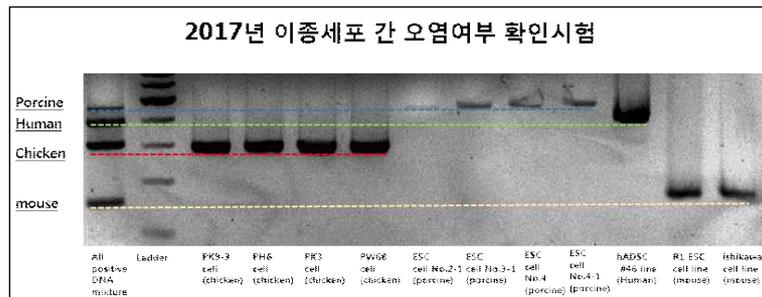


<그림58> 2017년 실험실 보유세포 mycoplasma 시험 결과



<그림59> 2017년 공여받은 세포 (무작위로 8종류 세포) 자체 mycoplasma 시험 결과

- 기탁 받은 세포와 무작위로 선택되어진 실험실 보유세포를 대상으로 이중간 세포 오염 여부를 확인한 결과 모두 음성임을 확인함. <그림60>



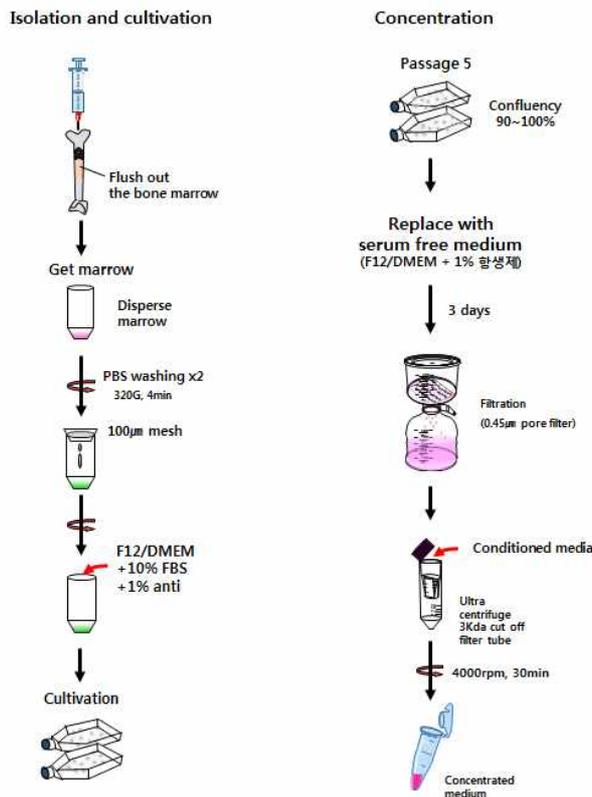
<그림60> 2017년 공여받은 세포 (무작위로 8종류 세포) 이중세포간 오염여부 확인 시험 결과

2. 닭 골강 유래 부착세포 및 세포분비물을 이용한 의약품질 개발연구

가. 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액이 인간의 중간엽줄기세포의 성장과 분화에 미치는 영향 분석

(1) 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 의약품질생산방법 확립

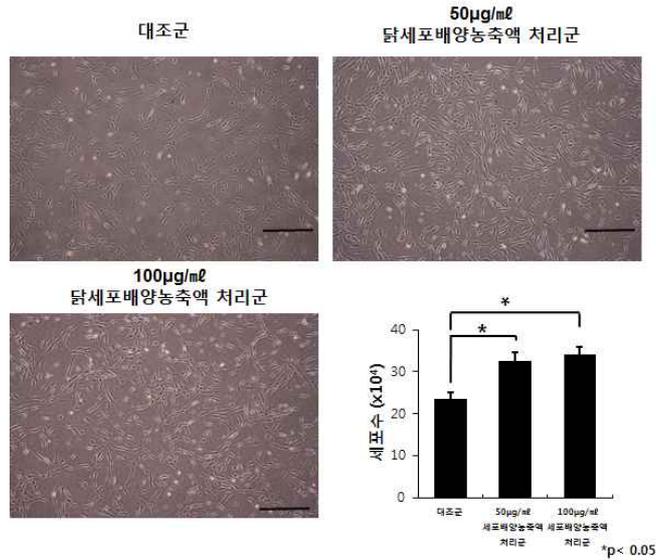
- 4일령 유추기 병아리 장골 내 초자연골과 골수에서 세포를 분리 배양 및 세포배양농축액을 제조함.<그림61>



<그림61> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액 제조 과정

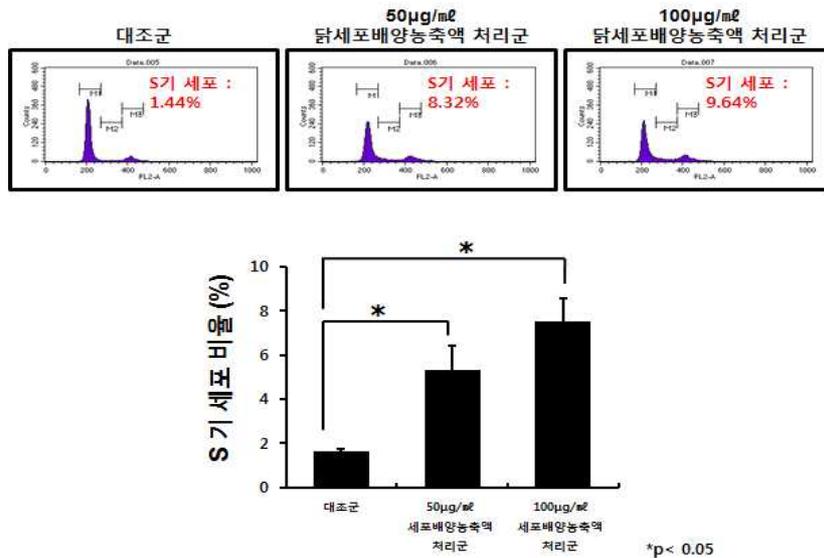
(2) 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액의 인간 중간엽 줄기세포의 성장촉진효과 검증

- 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 인간 중간엽 줄기세포에 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 첨가하였을 때 농축액을 처리한 세포가 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 세포수가 증가됨을 확인 함.<그림62>



<그림62> 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 증식 확인

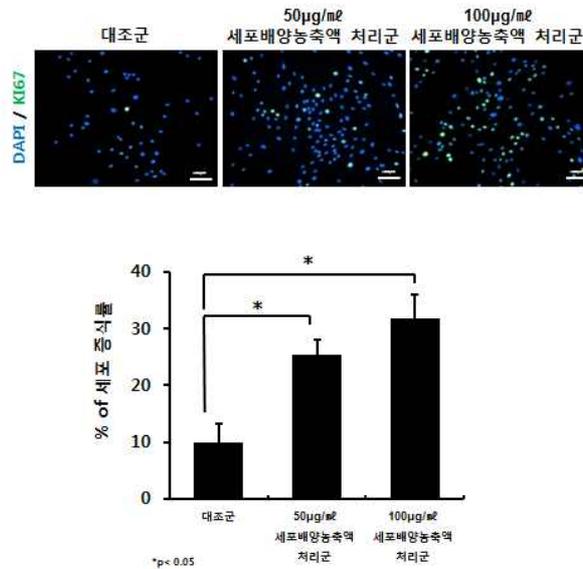
- 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 배양배지에 50 μ g/ml, 100 μ g/ml 첨가하여 인간 중간엽 줄기세포에 처리한 결과 세포의 분열시기를 나타내는 S phase 세포가 대조군에 비해 더 많은 것을 유세포 분석을 통해 확인함.<그림63>



<그림63> 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 증식 유세포 분석

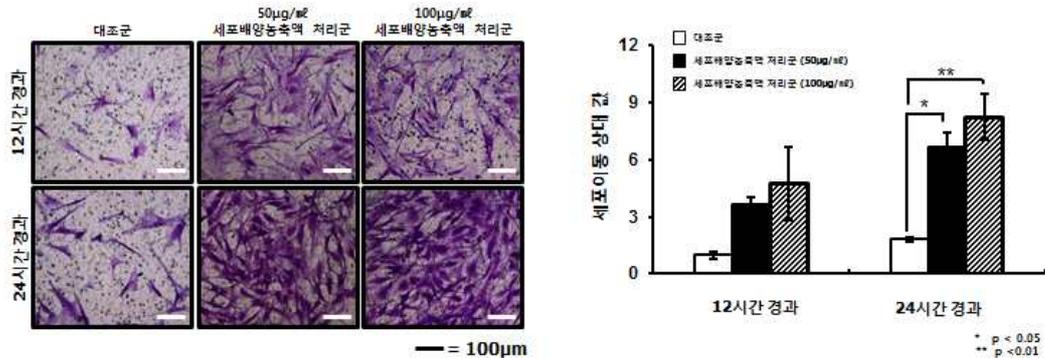
- 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 배양배지에 50 or 100 μ g/ml 첨가하여 인간 중간엽 줄기세포에 처리한 후 세포증식 시 발현하는 단백질 중 하나인 Ki67 단백질을 확인한 결과 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 배양배지를 처리한 그룹에서 대조군에

비해 세포의 증식이 더 많이 일어나는 것을 면역세포형광분석을 통해 확인함.<그림64>



<그림64> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 인간 중간엽 줄기세포에 처리 하였을 때 KI67 단백질 발현 확인

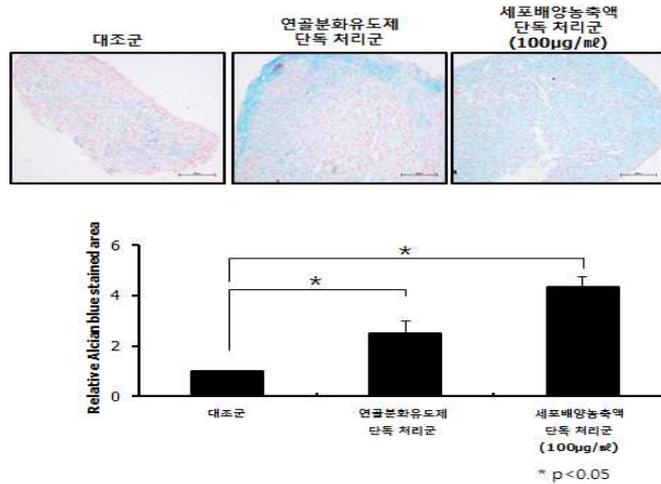
-. 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 처리한 인간 중간엽 줄기세포군에서 12시간 24 시간 동안의 세포 증식 이동 능력이 대조군에 비해 증가한 것을 검증함.<그림65>



<그림65> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 인간 중간엽 줄기세포에 처리 하였을 때의 이동능 확인

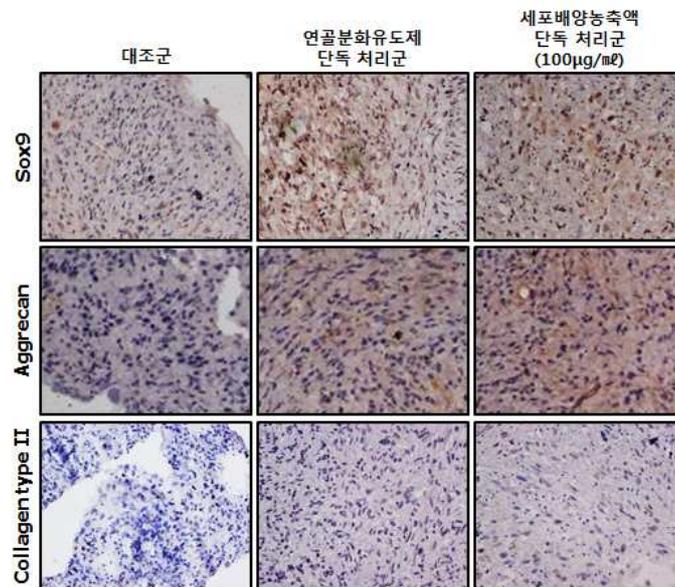
(3) 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 연골세포 분화 효과 검증

-. 연골세포의 존재 유무를 확인할 수 있는 alcian blue 염색법을 통해 인간 중간엽 줄기세포를 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액과 함께 3차원 배양을 하면 연골 세포로 분화 하는데 있어서 필요한 화학물질이 없어도 연골분화가 되는 것을 확인함. <그림66>



<그림66> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 연골분화능 확인

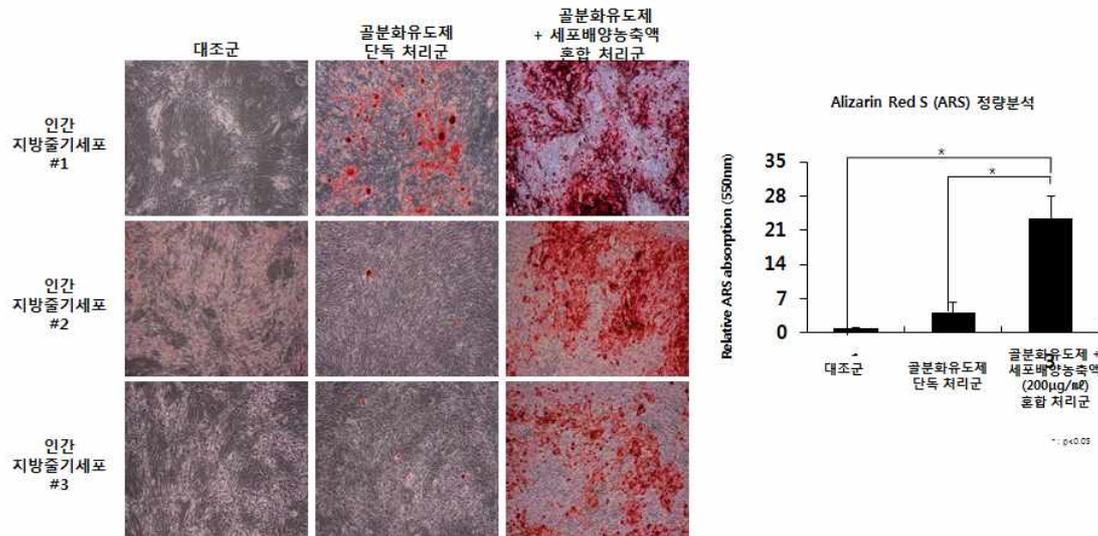
- 또한 연골세포의 분화 표지마커인 Sox9, Aggrecan, Collagen type II의 발현 양상을 세포면역염색법을 통해 연골분화가 되는 것을 검증함.<그림67>



<그림67> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 연골분화 유도 후 분화 표지마커 확인

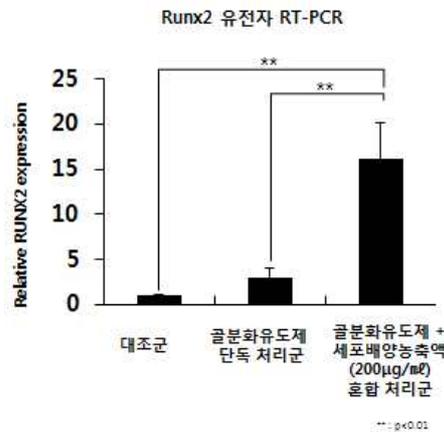
(4) 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액의 골세포 분화 촉진효과 검증

- 골세포의 분화 정도를 확인할 수 있는 alizarin red 염색을 통해 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 인간 중간엽 줄기세포에 골세포분화 유도 배지와 함께 배양하면 골세포 분화유도 배양배지 단독으로 처리군 보다 빠르고 높은 골세포 분화 율을 가지는 것을 확인함.<그림68>



<그림68> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 골 분화능 확인

- 또한 골세포 특정 유전자인 *Runx2*의 확인을 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 골 세포로의 분화가 되는 것을 검증함. <그림69>



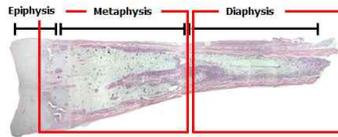
<그림69> 닭 골·연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 인간 중간엽 줄기세포의 골 분화능력을 RT-PCR기법을 통해 확인

3. 골강세포유래 osteochondroblast의 고순도·고효율 배양방법

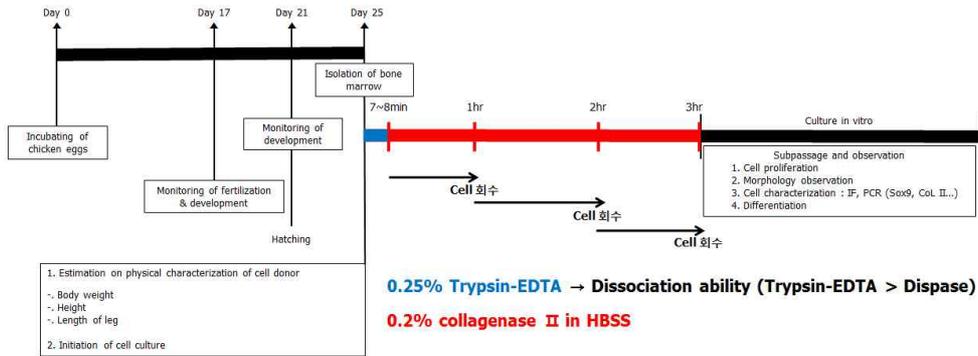
가. 4일령 (유추기) 병아리 골강세포유래 osteochondroblast의 고순도·고효율 회수를 위해 기계적 또는 효소적 처리에 따른 비교 탐색

- 기계적(Flushing) 또는 시간 별 효소적(Collagenase type II)처리에 따른 세포 회수율 및 세포성상을 비교함. <그림70>

1) Flushing method



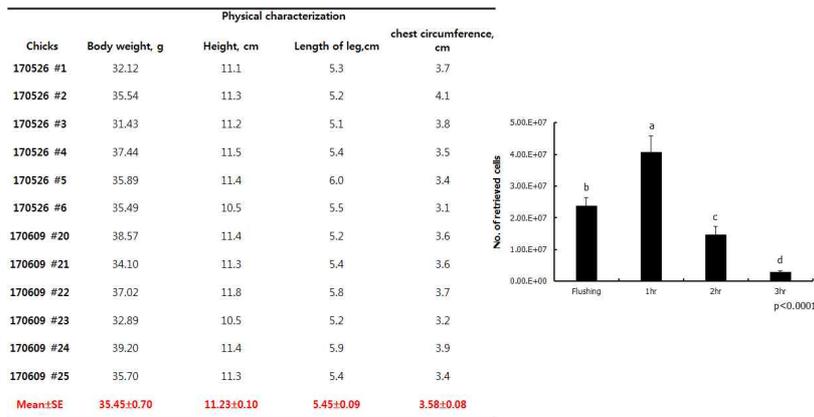
2) Enzyme treatment method



<그림70> 골강세포유래 osteochondroblast의 고순도·고효율 배양방법을 위한 실험모식도

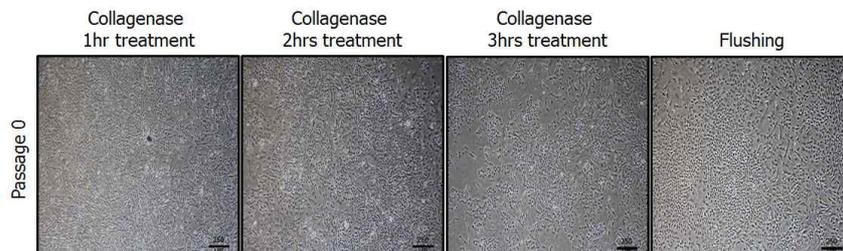
(1) 기계적, 효소적 처리방법에 따른 회수 된 세포의 수가 유의적인 차이가 있음을 밝힘.

- 4일령 (유추기) 병아리의 동일한 개체에서 얻은 골수세포를 기계적(Flushing) 방법 또는 시간별 효소적(Collagenase type II) 처리방법으로 세포를 회수 하였을 때, 회수된 세포의 수가 1시간 효소적 처리를 하였을 때 가장 많음을 확인함.<그림71>



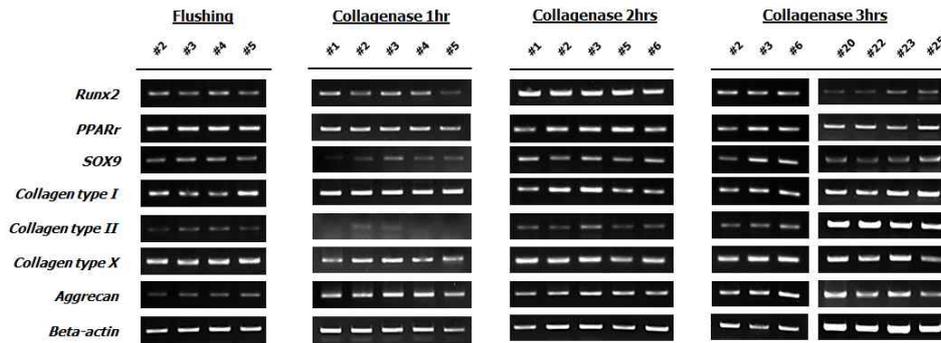
<그림71> 기계적 및 효소적 처리에 따른 세포 회수량 차이 확인

- 기계적 및 시간별 효소적 처리에 따른 Passage 0에서 광학현미경을 통해 세포형태를 비교함. <그림72>



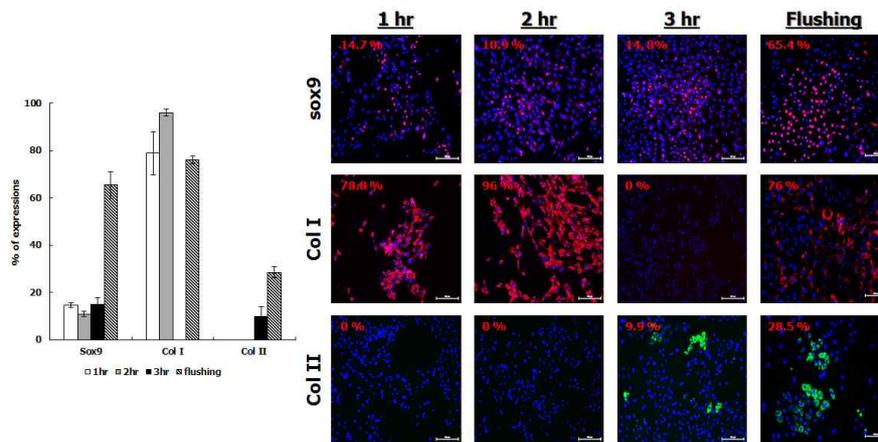
<그림72> 기계적 및 효소적 처리에 따른 세포형태 확인

- 기계적 및 시간별 효소적 처리에 따른 세포의 특성을 알아보기 위해 중합효소연쇄반응을 통해 Passage 0에서 확인한 결과 osteochondroblast 마커가 발현하는 것을 확인함. <그림73>



<그림73> 기계적 및 효소적 처리에 따른 골 연골 유전자 발현확인

- 면역세포형광염색방법을 통해 기계적 및 시간별 효소적 처리에 따른 세포의 특성을 passage 1에서 확인함. 그 결과 flushing 방법을 통한 유추기 골강세포의 회수가 osteochondroblast 마커인 Sox9과 Collagen type II가 효소적 처리방법에 비해 많이 발현하는 것을 확인함에 따라 flushing 방법이 고순도 osteochondroblast 세포의 회수 방법임을 확인함. <그림74>

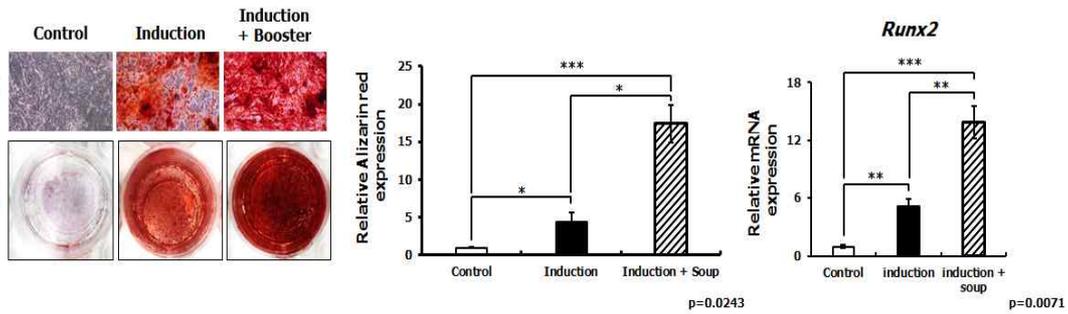


<그림74> 기계적 및 효소적 처리에 따른 osteochondroblast 관련 단백질 확인

4. 닭 골강세포 유래 부착세포분비물을 이용한 시제품개발

- 가. 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액인 생물소재를 활용한 인간 중간엽줄기세포의 골세포 분화 유도 키트 시제품 제작 완료

- 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 이용하여 제작한 시제품의 인간중간엽 줄기세포에서의 골분화 촉진능 효능확인.<그림75>



<그림75> 닭 골연골전구세포 세포배양 농축액을 이용한 시제품개발의 효능평가 분석시험.

- 시제품의 사용설명서<그림76>



<그림76> 골분화 촉진용 키트 시제품의 사용설명서

- 골분화 촉진용 키트 시제품의 실제 사진 <그림77>



<그림77> 골분화 촉진용 키트 시제품 실제 사진.

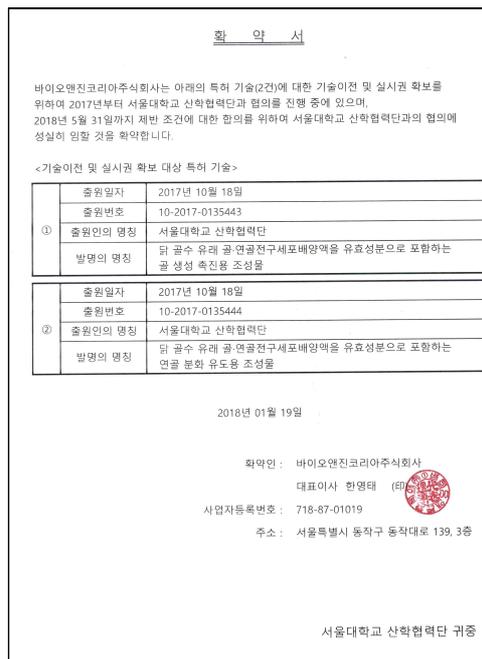
- 본 연구과제의 결과물을 활용하여 인간 지방조직 유래 중간엽줄기세포를 효과적으로 골 세포로 분화할 수 있는 분화 유도 키트를 제작하였음. 이를 기반으로 기술의 산업화를 추진하고자 함.

5. 2건의 지적 재산권 확보 및 기술이전

- 본 과제를 통하여 닭 골수 유래 골·연골전구세포를 배양한 세포배양농축액이 인간 중간엽 줄기세포의 골 분화능을 촉진함을 확인하였음.
- 또한, 닭 골수 유래 골·연골전구세포를 배양한 세포배양농축액이 인간 중간엽 줄기세포의 연골 분화를 유도함을 확인하였음.
- 이와 관련한 2건의 연구내용을 국내에 특허 출원을 하였으며 <그림78>, 기술이전 성과목 표 1건은 종료 1차년도에 2건 달성예정임. 현재 서울대학교 산학협력단과 기업 간 협상이 진행 중이며, 기업으로부터 금년 내에 기술이전을 완료 하겠다는 약속서를 받았음. <그림 79>.



<그림78> 특허 출원 통지서



<그림79> 관련 특허 기술이전 협약서

- 또한, 효율적인 발현을 위하여 2개의 stop codon (taa tga)을 첨가함으로써 protein translation을 신속하게 진행시켜 과량의 chicken cystatin의 발현을 유도할 수 있도록 제작하였음.
- chicken cystatin뿐만 아니라 고부가가치 단백질 생산을 위하여 human cystatin에 유전자도 함께 합성하였음. 기본적인 유전자 합성은 chicken cystatin과 동일하게 구성하였음. 발현 벡터 제작을 위하여 5 '과 3' 에 각각 MCS (multiple cloning site)를 첨가하였으며, 과량의 발현을 위하여 두 개의 human cystatin이 발현될 수 있도록 concatemer 형태의 유전자를 합성하였음. 두 개의 human cystatin 유전자의 concatemer는 2A peptide sequences로 연결이 되도록 구성되었으며, human cystatin protein translation 이후 두 개의 시스타인이 분리되도록 하였음. 또한 chicken cystatin과 동일하게 furin cleavage site를 첨가함으로써 추후에 불필요한 2A peptide를 제거할 수 있도록 제작하였음. 마지막으로, 효율적인 발현을 위하여 2개의 stop codon (tag tga)을 첨가함으로써 protein translation을 신속하게 진행시켜 과량의 human cystatin의 발현을 유도할 수 있도록 제작하였음 <그림2>.

Human Cystatin C (985bp)

```

MCS      start codon
aagccttgcatcgATGGCCGGACCCCTGAGAGCCCCCTGCTGCTGCTGGCCATCCTGGCCGTG
GCCCTGGCCGTGAGCCCCGCCGCCGAGCAGCCCCGGCAAGCCCCCAGACTGGTGGGCGGCC
CATGGATGCCAGCGTGGAGGAGGAGGGCGTGAGAAGAGCCCTGGATTTTCGCCGTGGGCGAGTACA
ACAAGGCCAGCAACGATATGTACCACAGCAGAGCCCTGCAGGTGGTGGAGCCAGAAAGCAGATC
GTGGCCGGCGTGAACACTTCTGGATGTGGAGCTGGGCAGAACCACCTGCACCAAGACCCAGCC
CAACCTGGATAACTGCCCTTCCACGATCAGCCCCACCTGAAGAGAAAGGCCTTCTGCAGCTTCC
A Furin Cleavage site CCCTGGCAGGGCACCATGACCC 2A peptide seq. ACCTGCCAGGATGCCAA
GTGAGAAGAAAGAGATACGCCGGCTACTTCGCCGATCTGCTGATCCACGATATCGAGACCAACCC
CGGCCCATGGCCGACCCCTGAGAGCCCCCTGCTGCTGCTGGCCATCCTGGCCGTGGCCCTGG
CCGTGAGCCCCGCCGCCGAGCAGCCCCGGCAAGCCCCCAGACTGGTGGGCGGCCCATGGAT
GCCAGCGTGGAGGAGGAGGGCGTGAGAAGAGCCCTGGATTTTCGCCGTGGGCGAGTACAACAAGGC
CAGCAACGATATGTACCACAGCAGAGCCCTGCAGGTGGTGGAGCCAGAAAGCAGATCGTGGCCG
GCGTGAACACTTCTGGATGTGGAGCTGGGCAGAACCACCTGCACCAAGACCCAGCCCAACCTG
GATAACTGCCCTTCCACGATCAGCCCCACCTGAAGAGAAAGGCCTTCTGCAGCTTCCAGATCTA
CGCCGTGCCCTGGCAGGGCACCATGACCCTGAGCAAGAGCACCTGCCAGGATGCCTAGTGAggcc
ggcctctaga
MCS

```

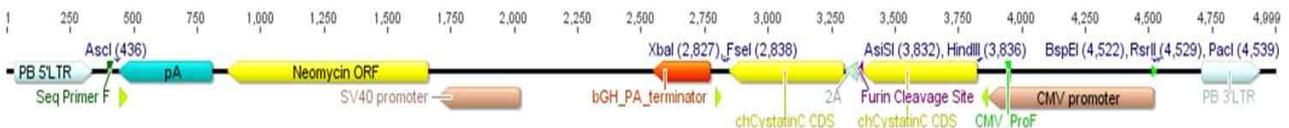
<그림2> 효율적으로 대량의 human cystatin 발현을 위한 유전자 합성 염기서열. MCS: mutiple cloning site, Red: chicken cystatin, green: furin cleavage site, Blue:2A peptide sequences, Bold Red: start or stop codon.

2. 유용물질 유전자 발현을 위한 효율적 벡터 제작

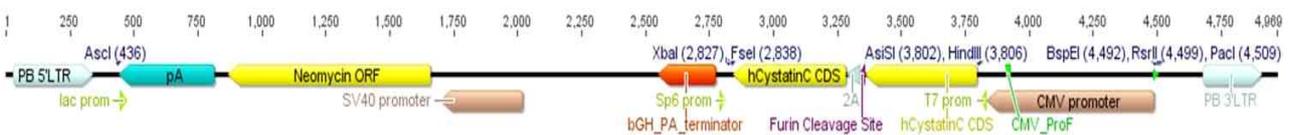
가. 시스타틴 발현을 위해 다양한 발현 벡터를 제작.

- 우선 chicken/human cystatin에 대한 constant expression을 위해 기본 벡터로 CMV promoter를 이용하여 발현 벡터를 제작하였음. 본 발현벡터는 현재까지 chicken에서 강하게 발현되는 것으로 예비실험에서 검증된 CMV를 사용하여 ubiquitous expression을 유도하였음. Selection marker로는 본 연구실에서 chicken cell 및 생식세포 (primordial germ cell, PGC) 조건이 확립된 Neomycin-resistant gene (Neo^R)을 클로닝하였음. 최종적으로 stable chicken genome integration을 위해서는 본 연구실에서 확립한 piggyBac transposon 및 transposase 시스템 활용을 위해 5 ‘과 3’ 에 각각 PB transposon element를 삽입하였음 <그림3>.

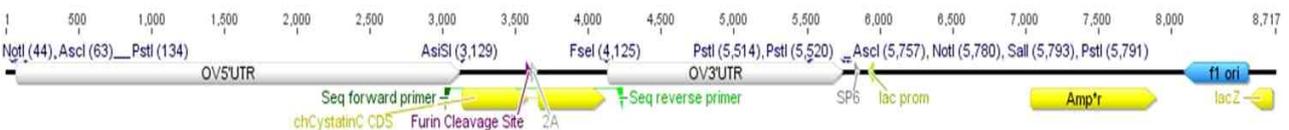
- piggyBac+CMV P::_chicken cystatin



- piggyBac+CMV P::_human cystatin



- piggyBac+OV P::_chicken cystatin / human cystatin



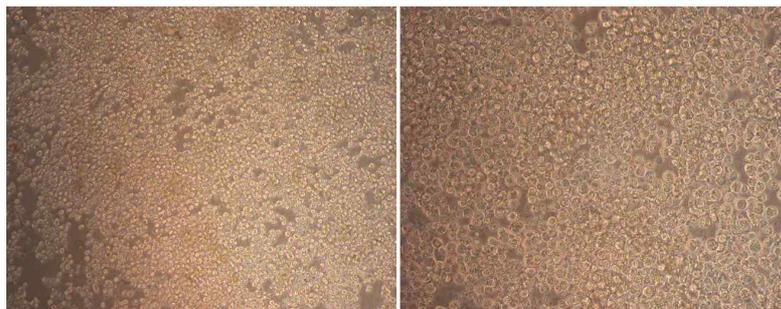
<그림3> 효율적 발현을 위한 발현 벡터 제작. Ubiquitous expression을 위한 CMV promoter 및 oviduct-specific expression을 위한 ovalbumin promoter를 이용한 발현 벡터. PB5' LTR: piggyBac 5' transposon element, PB3' LTR: piggyBac 3' transposon element, SV40 promoter_Neomycin-resistant gene, bGH PA: bovine growth hormone polyA termination, OV5' UTR: ovalbumin 5' promoter_untranslation region, OV3' UTR: ovalbumin 3' promoter_untranslation region, Amp^R: ampicillin-resistant gene.

- 유용 단백질의 난백내 대량 생산을 위해서는 난백내 축적을 위해 난관세포 (oviduct) 특이적 발현을 유도해야 함. 따라서 본 연구에서는 난관특이적으로 대량 발현하는 ovalbumin gene의 promoter를 클로닝하였음. 본 연구에서 제작한 벡터의 가장 큰 특징은 ovalbumin promoter 중에서 transcription initiation site인 5 ‘-element를 포함한 UTR (untranslation region)까지 포함하였음. 이는 ovalbumin promoter에서 5' UTR이 mRNA의 stability에 어느 정도 영향을 미치기 때문에 시스타인 유전자의 transcription후 mRNA의 안정성을 증가시키기 위하여 도입하였음. 또한 ovalbumin gene structure 중에서 3 'UTR도 포함하였음. 3' UTR이 역시 mRNA의 stability에

중요한 역할하기 때문에 transcription 뿐만 아니라 mRNA의 안정성도 증가시켜 과발현을 유도하고자 하였음. Selection marker로는 CMV promoter 발현 벡터와 동일하게 Neomycin-resistant gene (Neo^R)을 클로닝하였으며, ~6kb (5' OV_C/H cystatin_3' OV)의 발현 벡터는 piggyBac transposon 및 transposase 시스템 활용을 위해 5 '과 3' 에 각각 PB transposon element를 삽입하였음 <그림3>. OV promoter 발현 벡터는 chicken cystatin 및 human cystatin 모두 제작 완료하였음. 제작된 모든 벡터는 DNA sequencing을 통해 transcription initiation site 및 정확한 발현 벡터를 최종적으로 확인하였음.

3. 안정적인 가금 생식줄기세포주 확보

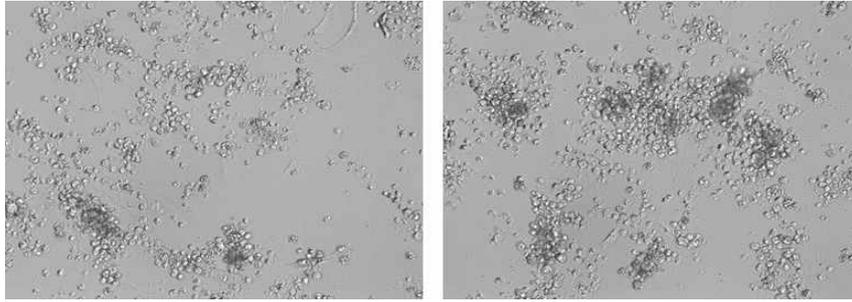
- 현재까지 본 연구를 통해 수종의 닭 원시생식세포주를 확립하였음. 장기배양 및 계대배양을 통해 수종의 개체별 원시생식세포주 (individual primrodial germ cell line)를 확립하였음. 수컷과 더불어 암컷으로부터도 원시생식세포주를 확립하여 유지 중에 있음. 또한 원시생식세포 분리도 원시생식기 (embryonic gonads) 및 혈관내 원시생식세포 (circulating PGCs)를 이용하여 다양한 배발달 단계에 따라 체외 배양을 시도 하였음 <그림4>. 또한, 본 연구에서는 보다 효율적이고 안정적인 원시생식세포 배양을 위한 cell signaling 관련 growth factor의 검증을 진행하고 있음. 기본적으로 bFGF가 chicken PGCs의 체외 증식에 가장 중요한 요소임. 그러나 그 외 Wnt signal 관련 beta-catenin 조절인자도 안정적인 생식줄기세포주 확립에 중요한 요소로 인지되며, bFGF가 beta-catenin pathway를 함께 사용하는지에 대한 검증을 진행 중에 있음.



<그림4> 수컷 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포 분리 및 계대 배양을 통한 닭 원시생식세포주 확립. 원시생식세포의 특징인 larger and eccentric nucleus, cytoplasmic granule 등은 계대배양을 통해서도 유지.

4. 확립된 가금생식줄기세포주 특성 분석

- CMV promoter_chicken cystatin을 이용하여 우선 DF1 (chickien fibroblast)에 transfection을 하여 cellular toxicity를 검증하였음. transfection후에도 DF1에 대한 특별한 viability의 감소는 관찰되지 않았음. 따라서 CMV promoter_chicken/human cystatin를 이용한 chicken PGC line에 대한 transfection 및 G418-selection을 진행 중에 있음. G418의 기본 조건은 본 연구실에서 확립한 농도인 300ug/ml을 기준으로 안정적으로 유전자 전이된 chicken PGC line을 선별 중에 있음 <그림5>.



<그림5> chicken/human cystatin 발현 벡터 전이 후
G418 (300ug/ml) 진행 중인 chicken PGC lines (Left:
chicken cystatin, Right: human cystatin).

- chicken PGC에 대한 유전자 전이는 lipofectamine-mediated transfection을 사용하고 있으며 target vector와 transposase와의 비율은 molar ratio에 상관없이 1:1로 사용하였음. 보다 고효율의 유전자 전이 효율을 위하여 nucleofection 방법을 사용하였으나 PGC에 대한 높은 cell damage에 의해 생식세포의 특성을 어느 정도 상실하는 경향이 있어 모든 유전자 전이는 lipofection 방법에 의해 진행하였음.

5. 가금 생식줄기세포주 장기 보관 시스템 구축

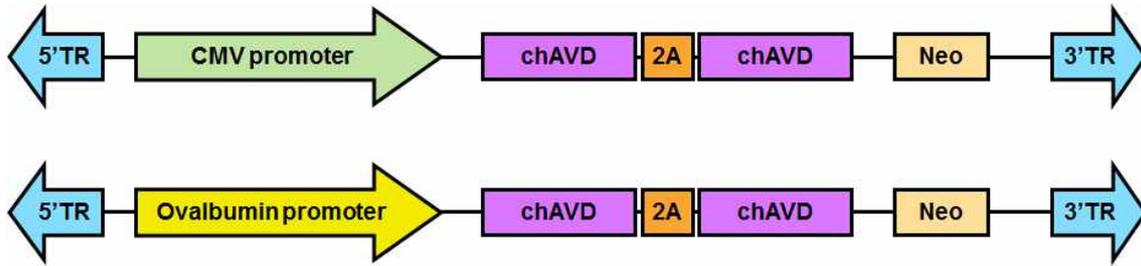
- 본 연구를 통해 확립된 모든 chicken PGC line은 암수 및 gonadal/blood PGC line에 상관없이 동결보존에 의해 보관 중에 있음.
- 장기보관 시스템은 본 연구를 통해 확립된 FBS:DMSO 방법을 이용하여 동결보존 후 액화질소에 보관 중에 있음.
- 또한 유전자 전이 및 선별 중인 일부 chicken PGCs에 대해서도 추후 실험 진행에 따라 동결보존을 통해 장기 보관 중에 있음.

[2차년도]

1. 난관 특이 프로모터를 이용한 아비딘 발현 synthetic vector 제작

가. 아비딘의 발현을 위해 다양한 발현 벡터를 제작

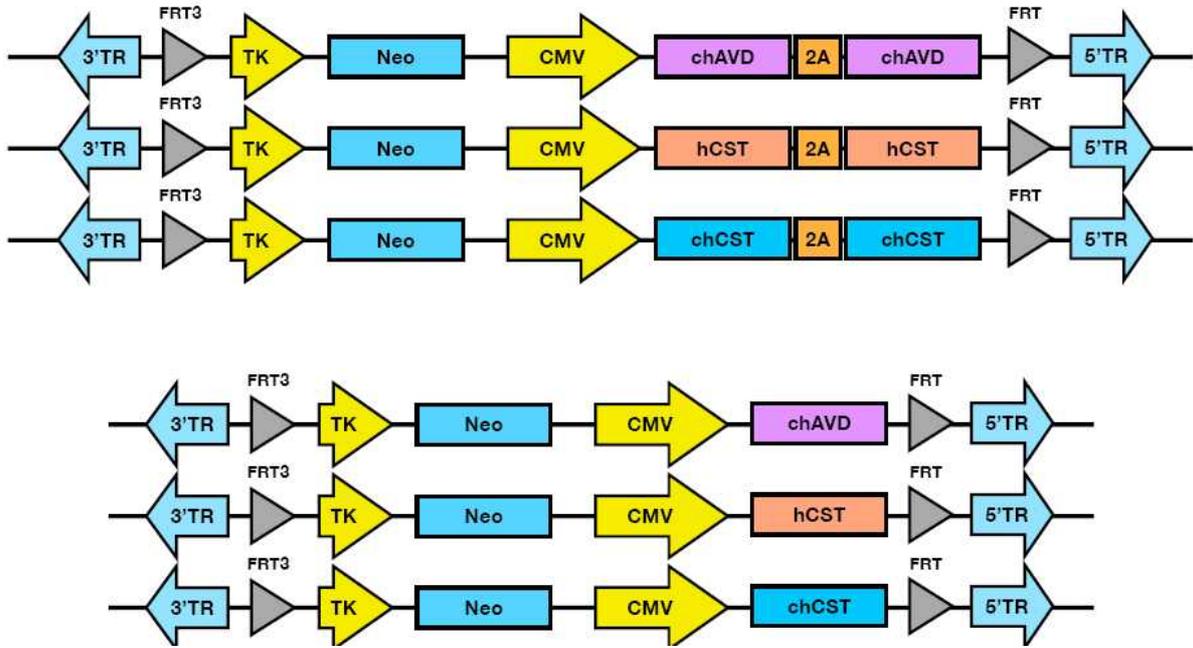
- 아비딘 발현 검증 및 형질전환 조류 내에서 비조직 특이적 대량 발현을 유도하기 위해 cytomegalovirus (CMV) promoter를 이용하여 발현 벡터를 제작하였음. 벡터의 selection marker로는 본 연구실에서 chicken cell 및 원시생식세포 (primordial germ cell, PGC) 에서 조건이 확립된 Neomycin-resistant gene (Neo^R)을 클로닝하여 삽입하였으며, 최종적으로 stable chicken genome integration을 위해서 본 연구실에서 확립한 piggyBac transposon 및 transposase 시스템을 활용할 수 있는 PB transposon element를 cystatin, avidin 발현 cassette 5 '과 3' 에 삽입하였음. 뿐만 아니라 유용 단백질의 난백내 대량 생산을 위해서는 난백내 축적을 위해 난관세포 (oviduct) 특이적 발현을 유도하기 위하여 synthetic ovalbumin gene promoter에 아비딘 발현 벡터를 제작하였음. <그림6>



<그림6> CMV promoter를 활용한 아비딘 발현 벡터. 5' TR: piggyBac 5' transposon element, 3' TR: piggyBac 3' transposon element, CMV promoter: cytomegalovirus promoter, Neo: Neomycin-resistant gene, chAVD: chicken avidin, 2A: 2A peptide sequence.

나. 추가적으로 본 연구에서는 벡터의 chicken genome integration 이후 벡터 내 외래 유전자의 발현이 가장 높게 나타나는 locus를 활용하고자 FLP/FRT system을 활용할 수 있는 flipase recognition target (FRT) sequence를 추가적으로 가지는 발현 벡터를 제작 <그림7>

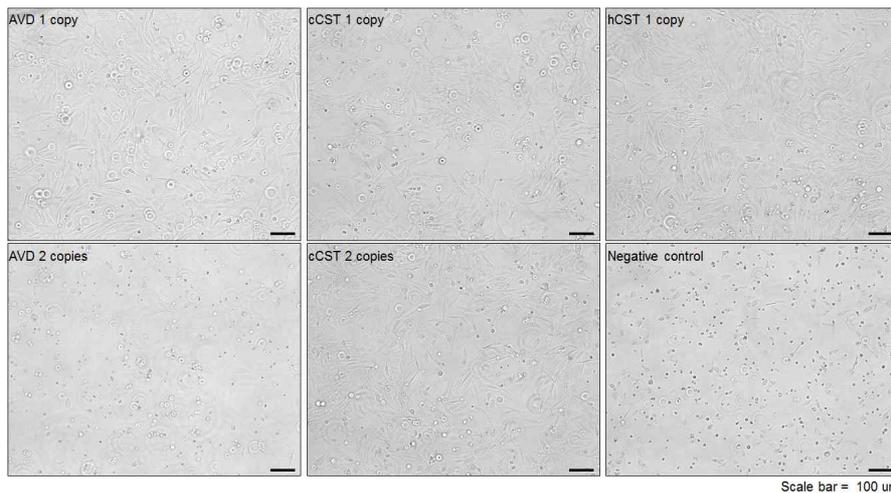
- 형질전환 조류의 생산이 이루어지고 난 뒤 가장 높은 발현을 보이는 계축의 라인을 선별하여, 그 라인이 가지고 있는 벡터 integration 사이트를 활용 가능할 것으로 기대되며, 특히 이 벡터는 cystatin, avidin 의 coding sequence가 1 copy, 2 copies로 각 두 종류씩 제작되어 copy number와 외래 유전자의 상대적 발현차이를 비교 분석 연구할 수 있어 추후에 이어질 동물생체반응기 생산에 있어 기초가 되는 연구 재료가 될 수 있을 것으로 판단됨.
- 벡터 디자인은 하나의 형질전환 개체 생산으로 결과를 도출하는 것이 아니라 향후 필요한 다양한 유용유전자를 대체함으로써 형질전환 계통의 활용을 최대화 할 수 있을 것으로 기대됨.



<그림7> FLP/FRT system를 활용한 cystatin, avidin 발현 벡터. 5' TR: piggyBac 5' transposon element, 3' TR: piggyBac 3' transposon element, Neo: Neomycin-resistant gene, hCST: human cystatin, chCST: chicken cystatin, chAVD: chicken avidin, 2A: 2A peptide sequence, FRT: flipase recognition target, TK: tyrosine kinase promoter.

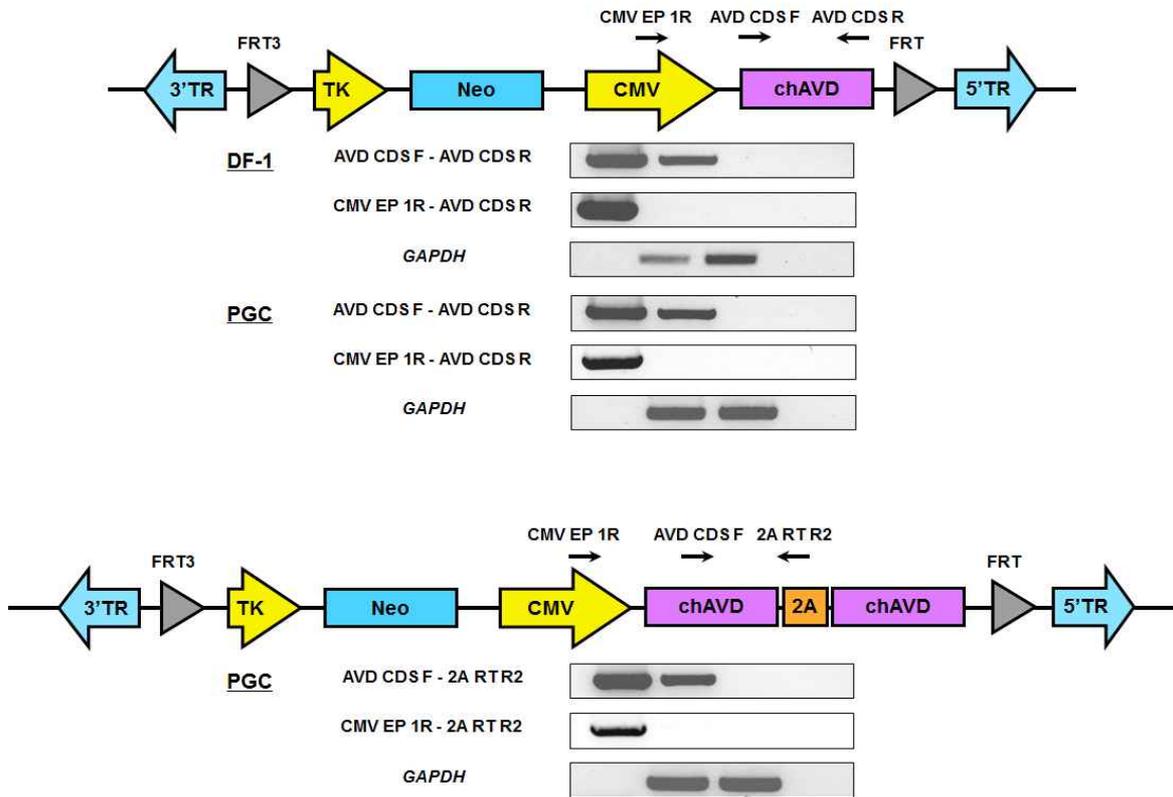
2. Chicken DF1 cell에서의 유용유전자 발현 검증

- 가. 제작된 시스타틴 및 아비딘 FRT 벡터의 조류 세포내 발현을 검증하기 위하여 우선적으로 DF1 chicken fibroblast cell에서의 발현 벡터 전이를 진행
 - 제작된 모든 유용유전자 발현 벡터는 일차적으로 DF1 세포주에서 전이 후 G418을 이용하여 안정적인 subline을 구축하였음 <그림8>

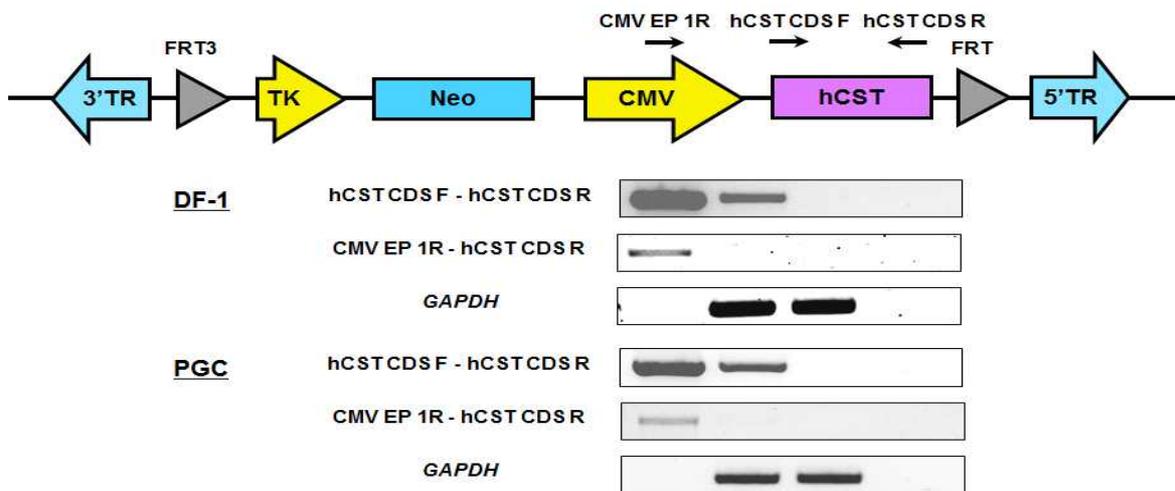


<그림8> 유용유전자 발현 벡터의 전이 후 G418에 의해 선발된 DF1 cell sublines.

- 또한 DF1 세포주에서 전이 및 선발 후 RT-PCR을 통해 유용유전자 발현을 확인하였음. <그림 9-10>



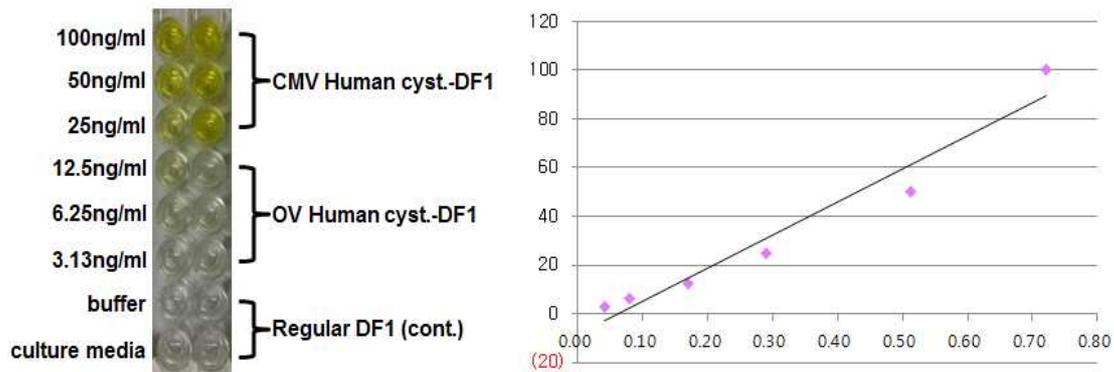
<그림9> 아비딘 발현 벡터의 DF1 cell line 및 chicken PGCs 전이와 선발 후 RT-PCR에 의해 발현 확인 검증.



<그림10> 시스타틴 발현 벡터의 DF1 cell line 및 chicken PGCs 전이와 선발 후 RT-PCR에 의해 발현 확인 검증.

- DF1 cell line과 PGCs 모두에서 CMV 프로모터의 경우에는 강한 발현을 확인할 수 있어 벡터 제작과 안정적 유전자 전이 조건을 확립함과 동시에 실험축 조성을 위한 닭 생식줄기세포 확립을 완료하였음.
- 더불어 단순히 RT-PCR에 의한 유용유전자 발현뿐만 아니라 정상적인 단백질 생산을 검증하기 위해 ELISA를 이용한 검출을 진행하였음. ELISA는 현재 상업적으로 판매하

고 있는 ELISA kit 중에 가장 안정적으로 검출이 가능한 human cystatin ELISA kit (R&D Systems, Quantikine Human Cystatin C ELISA kit)을 이용하여 최종 검증하였음. CMV human cystatin과 OV human cystatin 발현백터가 전이되어 G418에 의해 선별된 DF1 cell line에 대해 ELISA 검출을 진행하였음. ELISA 결과 CMV 프로모터의 경우에는 human cystatin이 검출되었으나 OV 프로모터의 경우에는 ELISA 검출이 되지 않음을 확인함. <그림11>



<그림11> Human cystatin의 프로모터에 따른 DF1 cell 발현 검증을 위한 ELISA 분석 결과.

- ELISA 결과는 본 연구에서 제작된 발현백터 중에 CMV 프로모터는 예상대로 안정적인 ubiquitous expression을 하고 있음을 알 수 있었으며, OV 프로모터의 경우 fibroblast cell인 DF1에서는 발현이 되지 않음을 알 수 있었음. 또한 ELISA 검증에서는 culture media soup을 이용한 검출을 진행하여 발현된 human cystatin이 정상적으로 세포 밖으로 분비되고 있음을 검증할 수 있었음. DF1 cell line에서 CMV 프로모터에 의한 발현량은 평균 99.5ng/ml 검출되었음 <그림11>. 본 실험을 통해서 유용유전자 발현 시스템 및 cell secretion까지는 검증이 되었으나 발현량이 높지 않은 것으로 분석되었음. 이는 기본적으로 chicken/human cystatin의 분자량이 크지 않아 상대적 발현량은 높으나 절대적 단백질량이 높지 않은 것으로 판단됨.
- 따라서 본 과제의 성공적 결과 도출을 위해 보다 높은 단백질을 생산을 위해 분자량이 상대적으로 큰 인간화 항체 (humanized antibody)를 진행하였음. 이는 본 과제의 최종 목표에 부합하기 위하여 유용단백질 효율적 생산 시스템 개발 및 검증을 위하여 추가 진행을 하였음.
- 우선 발현 검증을 위하여 시스타틴과 동일하게 CMV 프로모터에 humanized antibody gene을 삽입하여 ubiquitous expression vector를 제작함.
- 또한 난관 특이적 발현을 위한 오브알부민 프로모터에 humanized antibody gene을 삽입하여 발현백터를 제작하였음.
- 제작된 백터는 DF1 cell line에 안정적 삽입 및 선발 후 최종적으로 Human IgG ELISA kit을 사용하여 발현 및 cell secretion 여부를 검증하였음. <그림12>
- 따라서 1-2년차 연구 계획에서 발현 백터 제작 및 검증은 추가 백터를 포함하여 완료하였음.

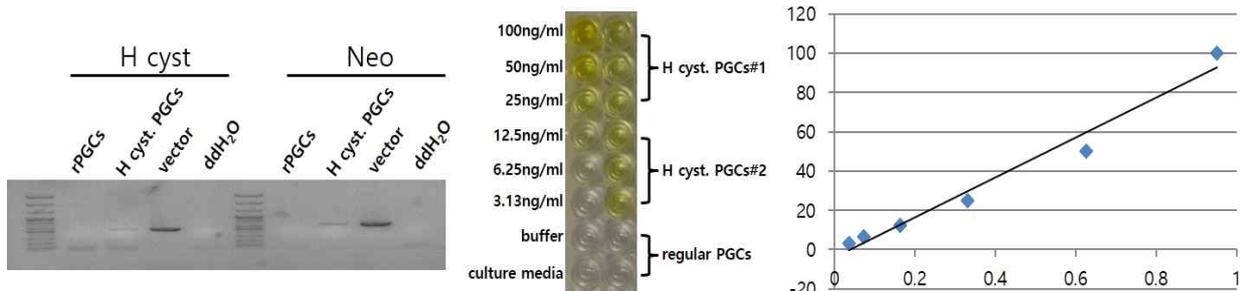


<그림12> Human antibody의 DF1 cell에서의 발현 검증을 위한 ELISA 분석 결과

3. Chicken primordial germ cells에서의 유용유전자 발현 벡터 제작 및 발현 검증

가. 제작된 human cystatin 발현 벡터의 검증 및 검출 방법 구축을 위해 CMV promoter-human cystatin (1 copy) 발현 벡터를 닭 생식줄기세포에 전이 및 G418을 이용하여 생식줄기세포에서의 안정적인 genome integration이 된 subline을 구축.

- 구축된 subline에따른 ELISA 정량적 방법을 통해 발현 유무를 판별하였음 <그림13>. 일차적으로 발현 벡터 전이 및 G418 선별된 닭 생식줄기세포에 대한 genomic PCR analysis를 통해 유전자 전이 여부를 확인함. <그림13>
- 이는 앞서 chicken somatic cell line (DF1)에서만 발현 검증한 것을 닭 생식줄기세포에서도 안정적인 유전자 전이 및 발현을 확인한 결과라 할 수 있음.



<그림13> Detection of human cystatin transgene in chicken primordial germ cells (PGCs) and expression of human cystatin in chicken PGC sublines.

4. 선별된 가금 생식줄기세포의 수용체내 주입

가. 유용유전자 전이 및 선별 후 RT-PCR 및 ELISA로 검증된 시스타틴, 아미딘 발현 벡터 전이 닭 생식줄기세포를 이용한 형질전환 닭 생산을 위해 수용체 배자에 미세주입함으로써 기초 실험 축소성을 진행

- 일부 실험축의 경우 성숙에 도달하였으며 일부 수컷 개체의 sperm에 대한 WL-specific primer set을 이용한 PCR 결과 WL donor PGCs 유래 sperm을 확인할 수 있었음.
- Donor PGCs로는 WL 유래 SNUhp26 line을 사용하였으며, 수용체 배자로는 오계 (KO)를 사용하였음. 따라서 검정교배에서 실험축을 일반 오계와 교배시 생식선카이메라 생산 및 donor PGC

유래 자손에 대해 깃털 색으로 일차적인 구분이 가능하도록 설계하였음.

- 또한 donor PGC로 사용한 SNUhp26의 경우 수컷유래 생식줄기세포이기 때문에 암컷 수용체 개체는 검정교배에서 배제하고 수컷 개체만 사용하였음. 그러나 2차년도에 구축한 실험축의 검정교배에서는 최종적으로 형질전환 닭이 생산되지 않았음. 이는 발현 벡터의 문제, 사용한 생식세포주의 문제 등 다양한 요인에 기인한 것으로 사료됨.<표 1>

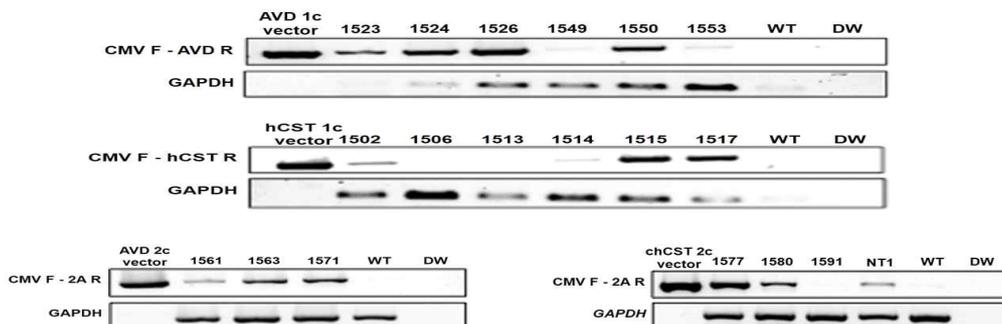
<표1> 시스타틴, 아비딘, 인간화 항체 벡터가 전이된 닭 생식줄기세포의 수용체 배자 내 주입에 의한 기초 실험축 조성 현황

Cell	Vector	Recipient	No. of injected embryos
SNUhp26	AVD 1c	Stage 14-17 KO	46
SNUhp26	cCST 1c	Stage 14-17 KO	30
SNUhp26	hCST 1c	Stage 14-17 KO	43
SNUhp26	hAbs	Stage 14-17 KO	46

[3차년도]

1. 검정교배를 통한 형질전환 개체 생산 및 확인

- 앞서 언급한 바와 같이, 시스타틴과 아비딘 발현을 위해 제작된 다양한 발현 벡터를 이용한 닭 원시생식세포 전이 및 선발을 거쳐 수용체 배자에 주입함으로써 2차년도에 구축한 실험축에 대해 정액 검증 및 검정교배를 진행하였으나 최종적으로 형질전환 개체는 생산되지 않았음.
- 일차적으로 조성된 실험축에 대해서는 성성숙 후 정액으로부터 외래 유전자 검출을 수행하였음. (유전자 전이 및 수용체 배자 주입에 수컷 유래 생식줄기세포이기 때문에 암컷 수용체 개체는 검정교배에서 배제하고 수컷 개체만 사용). 조성된 수컷 실험축의 정액에 대해서 genomic PCR을 통해 전이한 유전자는 다양한 실험축에서 검출되었음. <그림 14>.

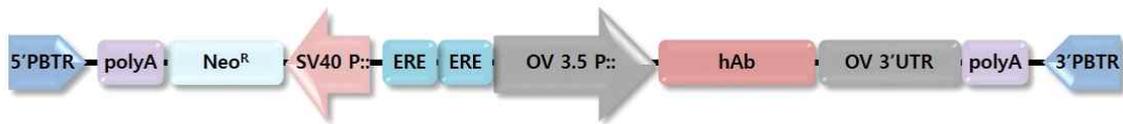


<그림14> Detection of transgene expression vectors in the semens of putative germline chimeras by genomic DNA PCR.

- 각각의 유전자 전이 실험축 (avidin 1 copy / 2 copy, human cystatin 1 copy, chicken cystatin 2 copy)은 대부분 genomic PCR에 의해 외래 유전자가 검출되었음. 따라서 genomic

DNA PCR 결과를 바탕으로 강하게 검출된 실험축에 대해 우선적으로 검정교배를 진행하였음.

- 그러나 germline chimera 및 donor germ cell-derived chick의 생산 결과는 없으며, 이에 형질전환 개체 역시 확인되지 않았음. Putative germline chimeras의 정액에서는 안정적으로 KOC-specific primer set과 transgene detection primer set으로는 검출되지만 발생 개체는 확인되지 않았음. 일반적으로 PCR 기법으로는 소량의 유전자라도 증폭이 되면 확인이 가능함. 따라서 실질적으로 정액안에는 매우 적은 비율의 donor germ cell-derived sperm이 존재하여 검정교배를 통해서는 자손 발생이 되지 않는 것으로 판단됨. 또한, cystatin의 과발현에 의한 배발달 영향으로 germline chimeras로부터 donor germ cell-derived chick 생산이 되지 않을 수도 있을 것으로 사료됨.
- Human cystatin의 경우 low molecular weight에 의해 형질전환 닭 생산과 과발현을 유도한다 하더라도 검출 및 분리/정제 후 활성 검증이 어려울 것으로 예측됨. 이에 다른 유용 유전자 발현을 위해 humanized antibody 발현 벡터의 추가 제작 및 실험축 조성을 진행하였음.
- Humanized antibody 발현 벡터의 경우, ubiquitous expression CMV promoter대신 난관 특이 발현을 위한 estrogen response element (ERE)을 이용한 synthetic promoter를 이용하여 제작하였으며, 효율적인 유전체 삽입을 위해 piggyBac transposon을 사용하였음. <그림15>



<그림15>. Humanized antibody expression vector controlled by synthetic chicken ovalbumin promoter with 2xERE.

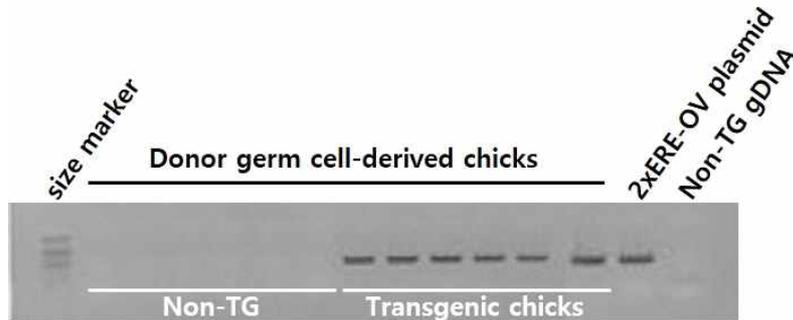
- 2xERE-Ov hAb 벡터도 cystatin/avidin 발현 벡터와 동일하게 닭 생식줄기세포에 전이 후 G418 선별을 통해 안정적인 subline을 확립하였음.
- 확립된 2xERE-Ov hAb 벡터 전이 닭 생식줄기세포는 수용체 배자에 주입함으로써 검정교배 실험축을 조성하였음.
- xERE-Ov hAb 벡터 전이 생식줄기세포는 104마리의 수용체 배자에 혈관에 주입하였으며, 이 중 46마리가 발생하여 44.2%의 발생효율을 나타내었음. 성성숙 후 숫컷에 대해서 검정교배를 수행하였음. (유전자 전이 및 수용체 배자 주입에 숫컷 유래 생식줄기세포이기 때문에 암컷 수용체 개체는 검정교배에서 배제하고 숫컷 개체만 사용). 2xERE-Ov hAb 벡터의 경우 cystatin 실험축과 달리 안정적으로 germline chimeras로부터 donor germ cell-derived chicks이 생산되었음. 3개체 숫컷 오계 실험축 (A1990 / A2126 / A2153)에 대해 화이트 레그혼과의 인공수정을 통해 검정교배를 수행하였음. 3개체에 대한 전체 부화율 평균은 45.7% (59/129)이었으며, 개체별로 A1990 (26/51, 51.0%), A2126 (9/39, 23.1%), A2153 (24/39, 61.5%)로 A2126 개체가 상대적으로 낮은 부화율을 보였음. 검정교배 결과 3개체 모두 생식선카이메라로 확인되었으며, Donor germ cell-derived chicks은 각각 A1990 88.5% (23/26), A2126 55.6% (5/9), A2153 50.0% (12/24)의 결과를 보였음. 생식선카이메라 효율은 50.0%~88.5%까지 매우 다양한 범위를 보였으나 전체 평균 67.8% (40/59)로 비교적

높은 효율을 보였음.<표2>

<표2> Production efficiencies of the donor germ cell-derived chicks and transgenic chicks through testcross analysis.

ID # of germline chimeras	No. of incubated eggs	No. of hatched chicks	No. of donor germ cell-derived chicks	No. of transgenic chicks
A1990	51	26 (51.0%)	23 (88.5%)	16 (69.6%)
A2126	39	9 (23.1%)	5 (55.6%)	4 (80.0%)
A2153	39	24 (61.5%)	12 (50.0%)	11 (91.7%)
Total	129	59 (45.7%)	40 (67.8%)	31 (77.5%)

-. 최종적으로 donor germ cell-derived chicks에 대한 genomic DNA PCR analysis를 통해 형질전환 여부를 확인하였음. <그림16>



<그림16> Genomic PCR analysis of donor germ cell-derived chicks through testcross analysis

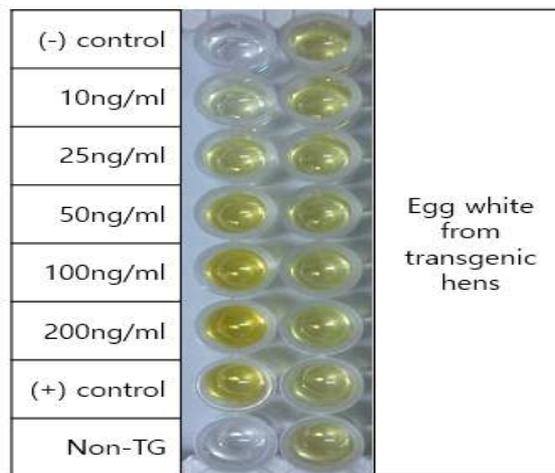
-. 발생 개체의 feather pulp로부터 genomic DNA 추출 후 hAb transgene-specific primer set을 통해 형질전환 여부를 확인하였음. 전체 donor germ cell-derived chicks 40수에 대한 분석 결과 77.5% (31/40)가 형질전환 개체로 확인되어 매우 높은 효율을 나타내었음.

-. 각 개체별로는 A1990 69.6% (16/23), A2126 80.0% (4/5), A2153 91.7% (11/12)의 결과를 보였음. A2153의 경우 생식선카이메라 효율 (50.0%)은 가장 낮았으나 한 마리를 제외한 모든 개체가 형질전환으로 확인되어 매우 높은 효율 (91.7%)을 나타내었고 A2126 경우에도 발생 개체가 상대적으로 적어 비교는 어렵지만 생식선카이메라 효율 (55.6%)에 비해 높은 형질전환 개체 생산 효율 (80.0%)을 보였음. 정확한 발현벡터의 유전체내 삽입 위치를 확인하기 위하여 발생 개체 중에서 6개체 (숫컷 4개체, 암컷 2개체)에 대해 DNA walking을 통해 2xERE-Ov hAb transgene에 대한 genomic integration site를 확인하였음. <표3>

<표3>. Genomic integration sites of transgene in transgenic chickens

		Integration site
Male	9107	chr1 : 41420208
	9187	chr4 : 52205745
	9615	chr4 : 76531283
	9643	chr1 : 36233131
Female	9191	chrUn_JH376196:6147
	9184	chr8 : 26481939

- Genomic integration site는 개체별로 다양하게 확인되었으며, 모든 개체가 다른 염색체상에 존재하였으나, 주로 macro chromosome에 위치하는 것으로 확인되었음.
- 따라서 현재까지 본 과제 수행을 위한 성공적인 형질전환 개체를 생산하였으며, 향후 유용 유전자 발현 단백질에 대한 발현 양상 및 특성 분석에 활용할 수 있을 것으로 사료됨.
- 최종적으로 검정교배에 의해 생산된 형질전환 개체에 대한 유용 유전자 발현 단백질의 발현 여부를 확인하였음. 생산된 형질전환 개체에 대해 성성숙 도달 후 예비 발현 분석을 진행하였고, 조성된 형질전환 개체 중 성성숙에 도달하여 산란을 시작한 형질전환 암컷에 대한 난백내 humanized Ab의 발현 여부를 ELISA를 통해 검증하였음. <그림17>.
- 검증 결과, 성공적으로 모든 개체의 난백에서 humanized Ab의 검출을 확인할 수 있었음. 형질전환 개체에서의 조직별 발현 검증에서는 난관이외의 조직에서는 transgene leakage에 의한 humanized Ab 발현은 확인되지 않았음.



<그림17> Detection of humanized Ab in egg white of transgenic hens.

[4차년도]

1. 상업종 산란계 생식줄기세포 분리 배양 및 동결보존

가. 본 과제의 가축유래 전분화능 줄기세포 확립을 위하여 제1세부과제와 협업을 통해 화이트레그혼 (White Leghorn), 오계 (Korean Oge), 상업종 산란계 하이라인 (Hyline)으로부터 생식줄기세포를 확립함.

- 화이트레그혼과 오계의 경우, 축산과학원으로부터 분양받은 수정란을 사용하여 세포주 확립을 진행함. 하이라인의 경우 서울대학교 평창캠퍼스 실험목장에서 사육중인 일반 상업종 계통에 대한 인공수정을 통하여 수정란을 확보하여 사용하였음. 원시생식세포 (primordial germ cells, PGCs) 분리를 위해서 각각의 수정란을 배양하여 6일령 배자의 원시생식기 (embryonic gonads)를 추출하였으며, 각각의 배자의 원시생식기를 추출 후 배자 조직 또는 혈액으로부터 genomic DNA를 추출하여 각각의 배자의 성감별을 진행하였음. <그림18> 성감별을 위한 primer sets은 기존 보고된 조류 특이 성감별 primer sets (Ogawa *et al.*, *Chromosome Res*, 1997; Itoh *et al.*, *J Hered*, 2001)을 사용하였음. <그림18>



<그림18> Chick embryo sexing determination for isolation of primordial germ cells (PGCs) and establishment of PGC lines by *in vitro* culture. A lower band (252bp) and a upper band (374bp) indicate the amplification of internal control site and W-chromosome specific site, respectively. One band denotes male embryos and two bands denotes female embryos.

- 분리된 원시생식기는 HBSS/0.05% trypsin-EDTA을 이용하여 5분씩 2회에 걸쳐 조직 dissociation을 진행하였으며, 최종적으로 dissociation후 DMEM/10% FBS을 첨가하여 inactivation 유도 후 spin-down을 통해 cell pellet을 수거하였음. 수거된 cell pellet은 각각 배자별로 culture plate에 seeding후 primary culture를 진행하였음. PGC culture media로는 Knockout-DMEM을 기본배지로 하여 basic FGF (fibroblast growth factor)를 첨가하여 사용하였으며, Primary culture이후에는 mouse embryonic fibroblasts (MEFs)를 feeder layer로 사용하여 공배양 조건으로 진행하였음. 사용된 MEF feeder layer는 mitomycin-C inactivation을 통해 분열 억제하여 사용하였으며 PGC 공배양을 위한 Feeder layer 최적화를 위한 다양한 MEF feeder를 검증하였음. 판매회사별, 마우스 계통에 따른 3가지 MEF에 대한 공배양 조건을 검증하였다 (MEF from Cell Biolabs, Inc., DR4 MEF from Applied StemCell, Inc., BALB/c mouse). 그러나 공배양을 위한 MEF feeder 검증 결과 마우스 계통에 따른 PGC proliferation에는 큰 영향을 나타내지 않았음. 마우스 계통에 따른 feeder 사용이 PGC culture 진행에 따른 cell aggregation 양상에는 다소간 차이를 보이기는 했지만 PGC line 확립 및 배양에는 큰 영향을 나타내지는 않았음.

- 최종적으로 확립된 생식줄기세포는 동결보존을 통해 유지하였음. 동결보존 배지로는 FBS:DMSO=90:10을 사용하여 동결보존을 진행하였으며, 동결 보존된 생식줄기세포는 제1세부과제의 “IPET 지원 서울대학교 농업생명과학대학 줄기세포 및 품질평가 연구실 운영 동물세포은행”에 기탁하였음. <그림19>

2. 세포주 명칭							
1) 세포주 명칭	닭 원시생식세포 (Pw68)	1) 세포주 명칭	닭 원시생식세포 (Pk9-3)	1) 세포주 명칭	닭 원시생식세포 (Pk3)	1) 세포주 명칭	닭 원시생식세포 (Ph6)
2) 기탁 형태	cryotube (1 vial)						
3. 세포주 기원		3. 세포주 기원		3. 세포주 기원		3. 세포주 기원	
동물 종 : 닭 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)		동물 종 : 닭 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)		동물 종 : 닭 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)		동물 종 : 닭 (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	
(1) strain	White Leghorn	(2) 나이 (age)	6 days of	(1) strain	Korean Oge	(2) 나이 (age)	6 days of
(3) 성별	♂ 암(+) □ 수(+)						
(4) 동물 상태	<input type="checkbox"/> 성인 (adult) <input type="checkbox"/> 태아 (embryo) <input type="checkbox"/> 정상 (normal) <input type="checkbox"/> 악성 (malignant)	(4) 동물 상태	<input type="checkbox"/> 성인 (adult) <input type="checkbox"/> 태아 (embryo) <input type="checkbox"/> 정상 (normal) <input type="checkbox"/> 악성 (malignant)	(4) 동물 상태	<input type="checkbox"/> 성인 (adult) <input type="checkbox"/> 태아 (embryo) <input type="checkbox"/> 정상 (normal) <input type="checkbox"/> 악성 (malignant)	(4) 동물 상태	<input type="checkbox"/> 성인 (adult) <input type="checkbox"/> 태아 (embryo) <input type="checkbox"/> 정상 (normal) <input type="checkbox"/> 악성 (malignant)
(5) 배양 장기 (organ) 및 유래	embryonic gonads	(5) 배양 장기 (organ) 및 유래	embryonic gonads	(5) 배양 장기 (organ) 및 유래	embryonic gonads	(5) 배양 장기 (organ) 및 유래	embryonic gonads
(6) 기타 참고사항		(6) 기타 참고사항		(6) 기타 참고사항		(6) 기타 참고사항	
4. 세포주 특성 및 용도		4. 세포주 특성 및 용도		4. 세포주 특성 및 용도		4. 세포주 특성 및 용도	
중요한 특성	생식세포 전구세포 (precursor cells of germ)	중요한 특성	생식세포 전구세포 (precursor cells of germ)	중요한 특성	생식세포 전구세포 (precursor cells of germ)	중요한 특성	생식세포 전구세포 (precursor cells of germ)
용도	생식선 카이메라 (germline chimera) 생산 및 유전체 편집 (genomic editing)	용도	생식선 카이메라 (germline chimera) 생산 및 유전체 편집 (genomic editing)	용도	생식선 카이메라 (germline chimera) 생산 및 유전체 편집 (genomic editing)	용도	생식선 카이메라 (germline chimera) 생산 및 유전체 편집 (genomic editing)
5. 세포의 형태		5. 세포의 형태		5. 세포의 형태		5. 세포의 형태	
<input type="checkbox"/> 상피 세포 (epithelial-like)	<input type="checkbox"/> 섬유아세포 (fibroblast-li)	<input type="checkbox"/> 상피 세포 (epithelial-like)	<input type="checkbox"/> 섬유아세포 (fibroblast-li)	<input type="checkbox"/> 상피 세포 (epithelial-like)	<input type="checkbox"/> 섬유아세포 (fibroblast-li)	<input type="checkbox"/> 상피 세포 (epithelial-like)	<input type="checkbox"/> 섬유아세포 (fibroblast-li)
<input type="checkbox"/> 림프구양세포 (lymphoblast-like)	또 기타 (생식세포, germ ce	<input type="checkbox"/> 림프구양세포 (lymphoblast-like)	또 기타 (생식세포, germ ce	<input type="checkbox"/> 림프구양세포 (lymphoblast-like)	또 기타 (생식세포, germ ce	<input type="checkbox"/> 림프구양세포 (lymphoblast-like)	또 기타 (생식세포, germ ce

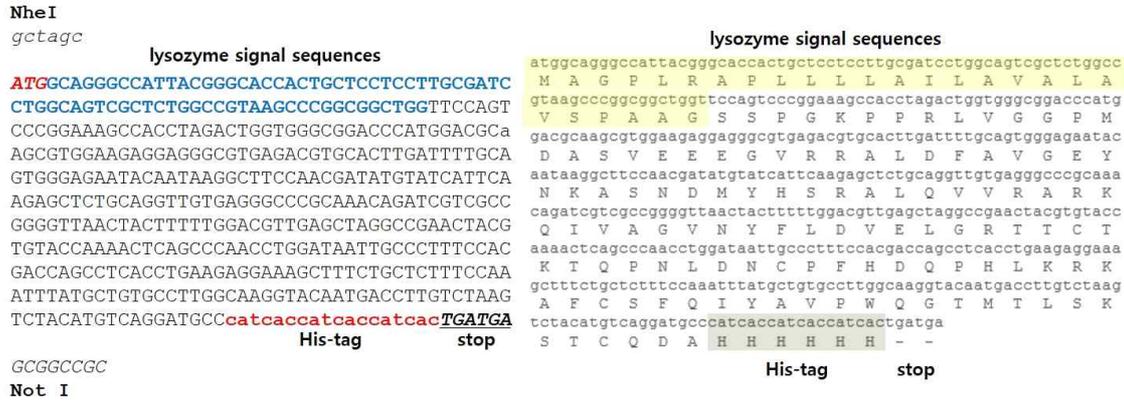
<그림19> Deposit of chick primordial germ cell lines at animal cell banking center.

- 현재까지 확보된 닭 생식줄기세포주는 화이트레그혼 유래 Pw68 (♀), 한국 재래계인 오계 유래 Pk9-3 (♂), Pk3 (♀), 상업종 하이라인 유래 Ph6 (♀) 등 4종에 대한 기탁을 진행하였음. 특히 상업종 하이라인은 현재 가장 많이 사육되어지고 있는 산란계로써 향후 이에 대한 동물생체반응기 이용은 형질전환 계통 구성에 있어 훨씬 수월할 뿐만 아니라 외래 유용 단백질 생산이 타종에 비하여 높은 산란율에 의해 짧은 시간 내 대량 생산이 가능할 것으로 예상됨.

2. 효율적 외래단백질 정제를 위한 his-tag 분리 기술

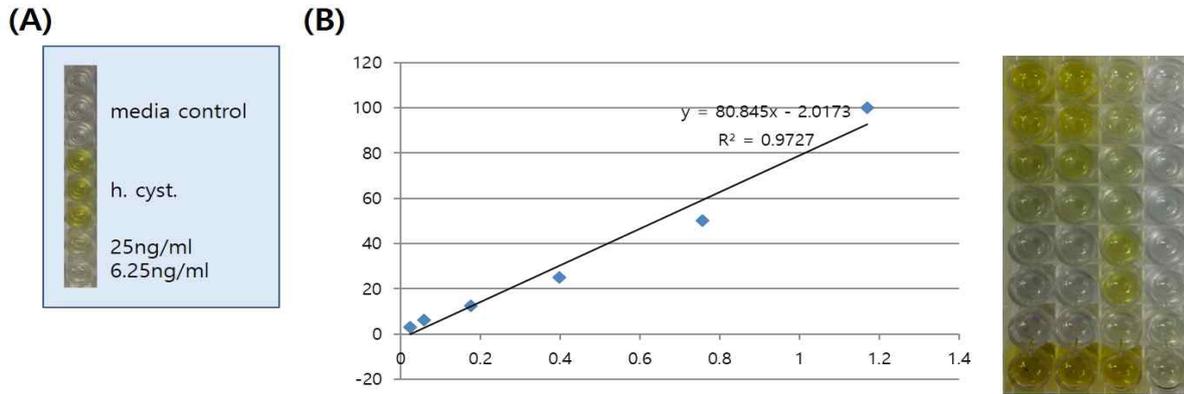
가. 효율적인 분리, 정제를 위하여 his-tag을 이용한 새로운 human cystatin 발현 벡터 및 정제 시스템 확립

- 1-3년차 제작된 human cystatin에 대한 효율적인 발현은 확인되었으나 최종 생산물에 대한 효율적인 분리, 정제는 어려우며 또한 많은 부대비용이 필요로 함. 또한 제작된 벡터 및 생식세포주에 대한 문제로 인하여 최종적으로 human cystatin 발현 형질전환 개체 생산이 되지 않았음. 이에 효율적인 분리, 정제를 위하여 his-tag을 이용한 새로운 human cystatin 발현 벡터 및 정제 시스템을 확립하였음.
- 우선 기본 프로모터로는 CMV (Cytomegalovirus) 유래 프로모터를 사용하였으며, human cystatin의 cell secretion을 위해서는 기존의 lysozyme signal sequences를 변형하여 사용하였음. <그림20>



<그림20> DNA sequence information of human cystatin-his and translated amino acid sequences. Lysozyme signal sequences were used for cell secretion and 6x histatin tag were inserted into the C-terminal part of human cystatin. Additionally, two stop codons were inserted for translational termination.

- 또한 보다 높은 발현을 위해서 human cystatin 유전자에 대한 기존 codon usage와 달리 새로운 codon usage를 활용하여 새롭게 디자인 및 유전자 합성을 진행하였음. (유전자 서열정보 참조, 그림20).
- 또한 앞서 언급 바와 같이 human cystatin의 C-terminal part에 6x histatin tag (cat cac cat cac cat cac)을 첨부하였으며, 최종적으로 2x stop codons을 첨가하여 신속한 translational termination을 유도할 수 있도록 디자인하였음 .<그림20>
- 최종적으로 합성된 human cystatin-his 유전자는 효율적인 외래유전자 전이 및 유전체 도입을 위한 최적화된 *piggyBac* transposon vector에 클로닝하였음. *piggyBac* transposon vector는 System Biosciences, Inc.로부터 구입하여 *Nhe I-Not I* digestion 및 ligation을 통해 제작하였음. <그림20>.
- 제작된 벡터는 효율적인 선발을 위하여 puromycin-resistance 유전자가 포함되도록 디자인이 되었음.
- 제작된 발현 벡터는 chicken fibroblast cell (DF1)과 앞서 확립된 생식줄기세포주에 각각 lipofection 방법에 의해 *iggyBac* transposase와 co-transfection을 수행하였음. DF1 경우에는 발현 벡터 전이 후 1일에 puromycin (10ug/ml)을 culture media에 첨가하여 유전자 전이 세포에 대한 선발을 진행하였음, Puromycin 특성상 1-2주내에 선발이 완료되지만 지속적인 puromycin 첨가에 의한 안정적인 human cystatin-his 발현 세포주를 확립하였음. 확립된 human cystatin-his 발현 DF1에 대한 검증을 위해 ELISA를 진행하였음. 유전자 발현 디자인상에 cell secretion이 되도록 하였기 때문에 DF1 cell lysis가 아닌 cell culture media에 대한 ELISA 검증을 진행하였음.
- ELISA 결과 <그림21A>와 같이 안정적인 human cystatin의 발현 및 세포외 분비를 확인할 수 있었음. 확립된 human cystatin-his 발현 DF1 세포주는 동결 보존하여 보관 중이며 추가적인 실험에 사용 계획에 있음.



<그림21>. Expression analysis of human cystatin-his after transfection and puromycin selection. (A) Expression of human cystatin in the culture media of human cystatin-his expressing DF1 cells. (B) Quantification of human cystatin expressions in the different batches and after purification.

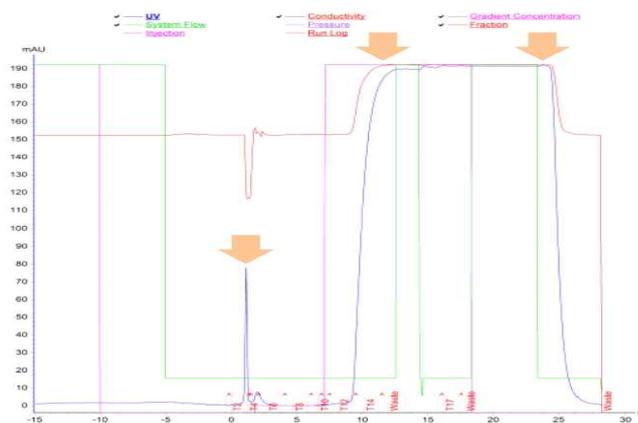
- 제작된 발현 벡터는 본 연구에서 확립된 닭 생식줄기세포에도 전이 후 puromycin 선발을 진행하였음. 특히, 사용된 생식줄기세포는 화이트 레그혼 및 상업종 산란계인 하이라인으로부터 확립된 생식줄기세포를 이용하여 실험을 수행하였음. 생식줄기세포는 MEF와 공배양을 통해 체외 배양이 가능하기 때문에 일차적으로 puromycin-resistance MEF에 대한 feeder layer test를 진행하였음. Puromycin-resistance MEF은 Applied StemCell, Inc.로부터 구입하여 검증하였으며, puromycin-resistance MEF feeder layer에서는 5~10ug/ml 농도에서 안정적인 배양이 가능하였음.
- 따라서 생식줄기세포에 발현 벡터에 대한 lipofection에 의한 유전자 전이후 5~10ug/ml puromycin 처리에 의한 2주 이상의 선발을 진행하였음. 선발이 종료된 이후에도 안정적인 human cystatin-his 유전자 전이 생식세포주의 유지를 위한 지속적으로 puromycin 처리는 진행하였음. 확립된 human cystatin-his 발현 생식세포주는 향후 실험 진행과 더불어 동결 보존하여 유지하였음.

2. 유용 단백질 생화학적 역가 및 특성 분석

가. 유용 단백질인 human cystatin의 역가 및 특성 분석

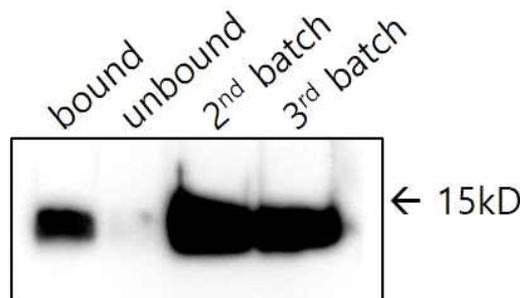
- 유용 단백질인 human cystatin의 역가 및 특성 분석을 위해 우선 DF1 cell에서 과발현 유도 및 반복 실험/배치를 통한 human cystatin을 확보하였음.
- 대량 생산을 위해 확보된 DF1에 mitomycin-C에 의한 분열 억제 처리 후 culture media를 확보하였음.
- Human cystatin 회수를 위한 culture media로는 기본 DMEM 배지에 2% FBS 및 10% FBS 조건으로 실험을 진행함. 낮은 FBS 조건이 추후 human cystatin의 분리, 정제가 용이하기 때문에 세포 유지에 영향하지 않은 FBS 조건에 대한 검증을 수행하였음.
- 결과적으로 2% FBS 조건에서도 안정적인 세포의 유지에는 큰 영향을 하지 않아 human cystatin 생산은 mitomycin-C 처리 및 2% FBS 배지에서 회수하는 조건으로 6회의 다른 배치에 대해 확보함. 확보한 human cystatin 함유 배지는 일차적인 ELISA에 의해 발현 확인 후 분리, 정제를 진행하였음. <그림21B>

- 분리, 정제를 위해서는 두 단계에 걸쳐 진행하는데, 일차적으로 crude purification을 위하여 Ni-NTA magnetic silica beads (바이오니아)를 이용하여 culture media내 his tag-labeled human cystatin-his를 분리하였음. 이후 높은 순도의 정제를 위하여 AKTA starter (GE Healthcare Life Sciences)를 이용한 순수 정제 기술을 확립함.
- 그림 17에서 나타내는 바와 같이, 일차적으로는 Ni-NTA magnetic silica beads만으로도 분리 효율은 매우 높은 것으로 나타남. 즉, 첫 번째 피크 (첫번째 화살표)인 non-specific protein의 양이 상대적으로 낮게 나타났으며, elution시 target protein (human cystatin-his tag)의 양이 높게 나오면서, 고순도의 정제가 가능하였음 (두번째 - 세번째 화살표, 그림 22).



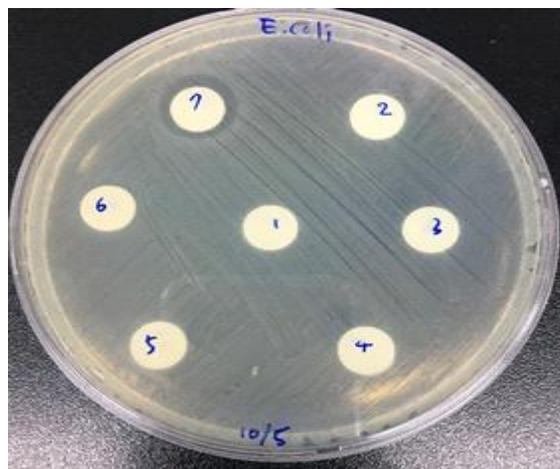
<그림22>. Purification of human cystatin-his tag with AKTA starter

- 효율적인 분리 정제를 위한 검증으로 최종 정제 후 Western blotting을 이용하여 human cystatin을 검출하였음. Western blotting 결과 분리, 정제에 따른 bound fraction에서는 human cystatin이 강하게 검출된 반면, washing 후 unbound fraction에서는 전혀 검출이 되지 않아 매우 높은 효율로 분리, 정제되었음을 알 수 있었음. <그림23> 또한 다른 배치에서도 매우 높은 정제 효율 및 human cystatin 생산량을 확인할 수 있었음. <그림23>



<그림23> Western blotting analysis of human cystatin-his tag after purification.

- 최종 분리, 정제된 human cystatin은 생화학적 활성 및 역가 (bioactive activity) 측정을 위해 anti-microbial activity를 검증하였음. 정제된 human cystatin에 대해 다양한 농도별로 disc를 이용한 agar diffusion assay을 진행하였음.
- 다양한 균주에 대한 일차 검증결과는 anti-microbial activity에 대한 유의적 차이가 나타나지 않았음. 이에 농도 조절에 따른 추가 실험 진행을 하였을 때는 그림 19과 같이 정제된 human cystatin-his tag (100ng/disc)에 대한 *E. coli*에서 growth inhibition을 나타내었음 <그림 24>.
- 따라서 이러한 결과는 chicken cell에서 생산된 human cystatin에 대한 분리, 정제 기술의 확립 및 최종적으로 biofunctional activity도 가지고 있음을 제시하고 있으며, 이에 생산되는 형질전환 개체에 대해서 human cystatin의 분리, 정제 및 역가 검증을 위한 기술은 모두 확립하였음.



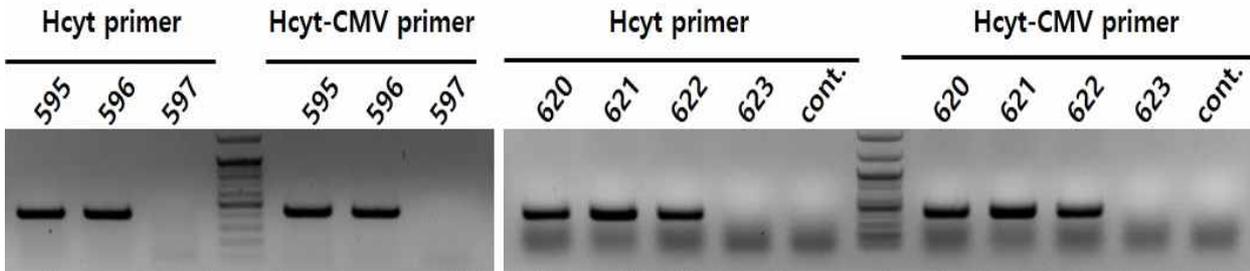
<그림24> Anti-microbial assay of purified human cystatin by agar diffusion assay. (1) Control (ddH₂O), (2) elution buffer, (3) Hcyst (10ng/disc), (4) Hcyst (25ng/disc), (5) Hcyst (50ng/disc), (6) Hcyst (75ng/disc), (7) Hcyst (100ng/disc)

[5차년도]

1. 상업종 산란계를 이용한 유용 단백질 생산 형질전환

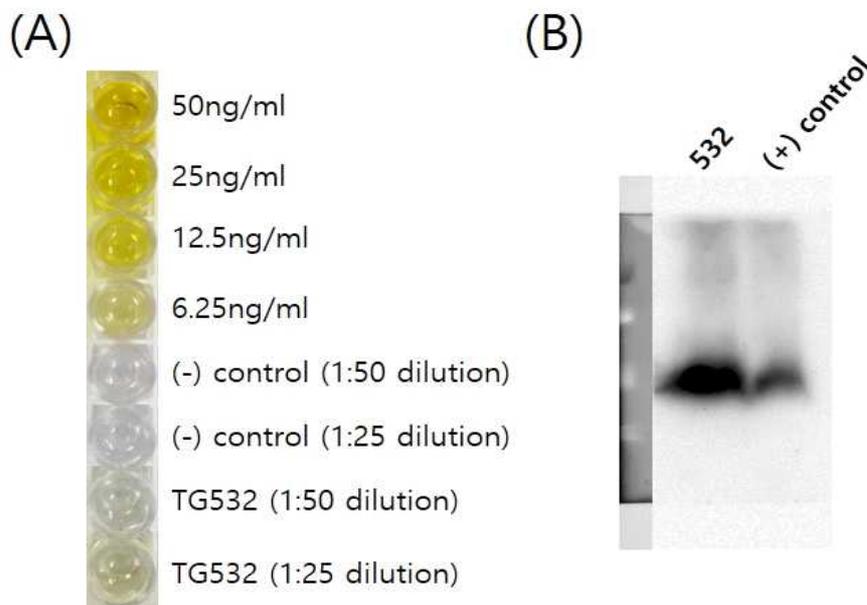
- 가. 최종적으로 발현 및 생산된 활성이 검증된 유용 유전자 발현 벡터를 활용한 형질전환 개체 생산을 위한 실험축 조성 완료 및 검정교배 진행
- 형질전환 개체 생산을 위한 닭 생식줄기세포주에 재제작된 human cystatin-his tag 발현 벡터 주입 및 선발을 완료함.
 - 확립된 human cystatin-his tag 발현 생식줄기세포주는 하이라인 수용체 배자에 주입을 통해 실험축 조성을 완료하였음. 생식줄기세포주를 주입한 수용체 실험축은 102수였으며, 11마리가 발생하여 10.8%의 발생율을 나타냄. 낮은 발생율은 하이라인이 일반 상업종이기 때문에 개체간 변이가 다소 큰 것때문인 것으로 판단됨. 구축된 실험축 중 암컷은 제외하고 수컷 개체에 대한 검정교배를 진행하였음.
 - 검정교배를 통해 최종적으로 97개의 수정란을 부화하여 75수의 병아리 (78.9%)를 생산하였으며, 이 중에서 주입한 생식세포 유래 개체는 21수로 생식선 카이메라 전이 효율

은 28%를 나타냈었음. 최종적으로 21수에 대한 genomic PCR 분석을 통해 최종적으로 13수 (61.9%)의 human cystatin-his tag 발현 벡터를 보유한 형질전환 개체를 생산 하였음. <그림25>



<그림25> Detection of transgenic chickens by genomic PCR analysis. Two primer sets (Hcyt and Hcyt-CMV primers) were used to detect the human cystatin-his tag transgene.

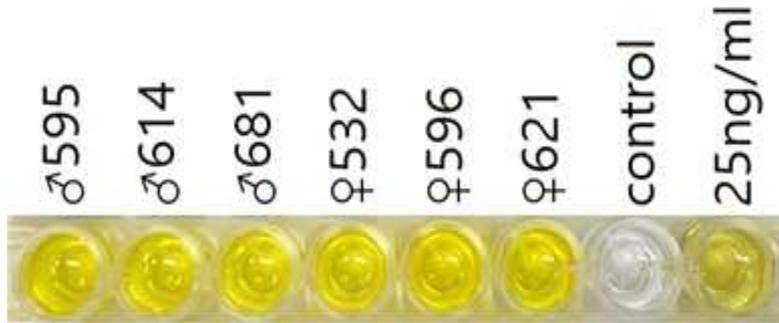
- 최종적으로는 안정적으로 발현하는 계통 조성 및 이에 대한 검증을 진행 예정이지만 생산된 형질전환 개체에 대해서 우선 human cystatin 발현을 검증하였음. CMV 프로모터를 사용하였기 때문에 기본적으로는 모든 조직에서 발현을 예측할 수 있었음. 이에 우선 human cystatin 발현을 feather pulp에서 ELISA와 Western blotting을 통해 확인하였음.
- ELISA 결과, 일반 대조군에서는 예상과 같이 저농도에서도 human cystatin은 검출되지 않았으나 형질전환 개체 (TG532)에서는 human cystatin이 검출되었음. (그림 21A). 또한 Western blotting에서도 (+)control과 동일하게 안정적으로 human cystatin의 발현을 확인할 수 있었음 (그림 21B). 이러한 결과는 genomic PCR에 의해 확인된 형질전환 개체에서 안정적으로 외래유전자인 human cystatin이 발현되고 있음을 알 수 있었음.



<그림26> Detection of human cystatin in feather pulp of transgenic chicken (TG532) through ELISA (A) and Western blotting (B),

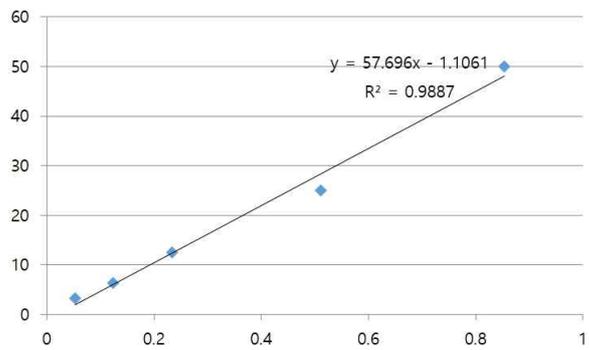
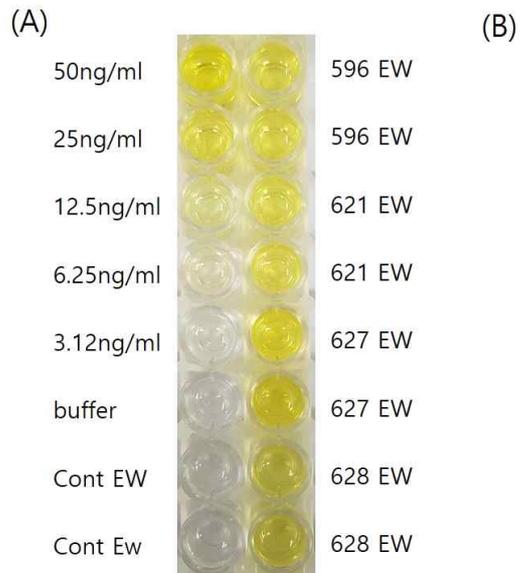
나. 성성숙 후 형질전환 개체의 계란에서의 human cystatin의 축적 여부를 검증

- 그에 앞서 우선적으로 혈액내에서의 human cystatin 발현을 검증하였음. 이에 앞서 우선 형질전환 개체의 혈액에서의 human cystatin 발현 여부를 ELISA를 통해 검증하였음.
- 형질전환 개체 중에서 암수 각각 3마리씩 무작위로 선발을 하여 혈액 채취 및 검증을 진행함.
- 검증 결과, 모든 형질전환 개체에서 안정적으로 human cystatin 발현을 확인할 수 있었음 <그림27>.



<그림27> Detection of human cystatin in blood of transgenic chickens by ELISA analysis.

- 이러한 결과는 형질전환 개체 생산을 위하여 CMV 프로모터를 사용하였기 때문에 형질전환 개체의 모든 조직에서 원하는 외래 단백질의 합성과 분비가 되어 특정 조직에서가 아니라 형질전환 개체의 모든 조직을 바이오리액터로 사용할 수 있음을 제시하고 있음.
- 앞서 언급한 바와 같이 최종적으로는 성성숙 후 암컷의 계란내에서의 human cystatin 축적 여부를 검증하였음.
- 성성숙 후 산란을 개시한 4마리의 암컷의 계란에 대한 각각 개체별 5개씩 채란하여 난백만을 수집하였고, 각각의 형질전환 개체 계란에 대한 2반복을 진행하여 최종 정량 검증을 진행하였음. 일차적으로는 혈액의 결과와 동일하게 형질전환 개체에 따른 변이는 있었으나 기본적으로 모든 형질전환 개체의 난백에서 human cystatin이 검출되었으며, 대조군에 대해서는 human cystatin이 전혀 검출되지 않았음 <그림28>.
- 정량 결과, 난백에서 263.28ng/ml-390.79ng/ml human cystatin을 나타내었으며, 평균적으로는 300.57ng/ml이 검출되었음. 이를 계란 한 개당 총량으로 산출하면, 6.58ug-9.777ug이며 평균 7.51ug의 생산량을 보여주고 있음.



<그림28> Detection and quantification of human cystatin in egg white of transgenic chickens by ELISA analysis.

- 이상의 결과로, 본 과제에서는 연구 목표인 유용 단백질인 human cystatin 유전자가 전이된 형질전환 개체를 성공적으로 생산하였으며, 계란을 포함한 여러 조직에서의 안정적인 발현 및 축적이 되고 있음을 제시하고 있음. 이러한 구축된 형질전환 개체의 경우에는 현재 개체별 발현 양상 분석 및 계대 유지를 통해 안정적인 형질전환 계통을 확립하고자 하고 있음.

[1차년도]

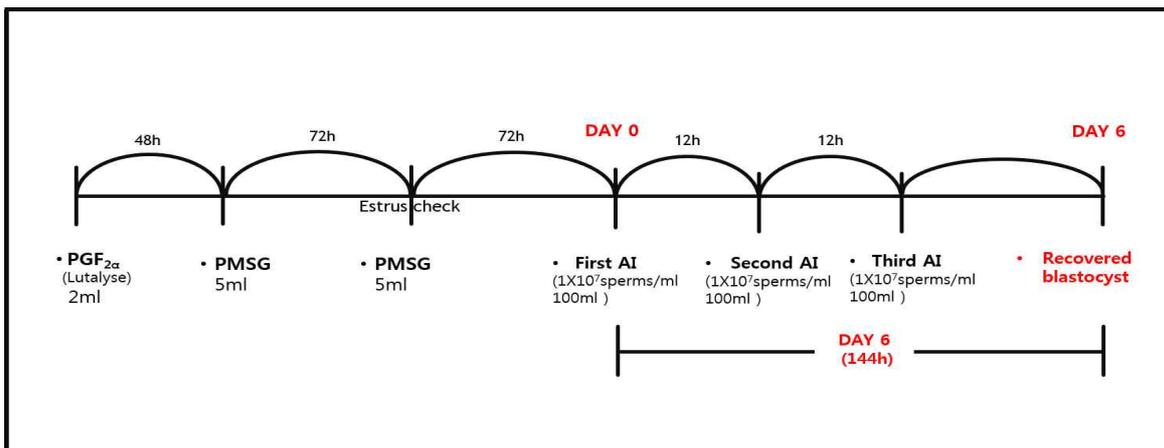
1. 인공수정 기법을 통한 체내 수정란 생산 및 체내 수정란 회수기법 개발

- 본 연구에서는 인공수정 기법을 이용하여 고품질의 체내 수정란을 얻기 위해 임신경험이 한번도 없는 (Yorkshire×Landrace)×Duroc 3원교잡종의 미경산돈 <그림1>을 강원대학교 부속 목장에서 사육하였음.



<그림1> (Yorkshire×Landrace)×Duroc gilt

- 동물의 체내에서 높은 수태율을 얻기 위해서는 건전한 번식 조건에 있는 암돼지에게 발정 기간 중 적절한 시기를 선택하여 인공수정을 하여야 하지만, 임신경험이 없는 미경산돈이기 때문에 정확한 발정시기를 알 수가 없어 다음의 <그림2>과 같이 인위적으로 발정을 동기화 시켰음.



<그림2> Estrus synchronization methods and fixed AI time on gilt

- PGF2 α (Prostaglandin)를 주입하여 체내에 생성되어있는 황체를 인위적으로 퇴행시켜 새로운 주기를 시작하게 하였음. 48시간 후, 인공수정의 적절한 발정시기를 맞추기 위해 PMSG로 발정을 유도하고, 수시로 다음과 같은 발정의 징후를 확인하였음.

(1) 외음부가 붉게 충혈되고 팽대해짐.

- (2) 음부에 유백색의 점액물질이 고이거나 흐름
- (3) 행동이 불안하며 활동성이 증가됨.
- (4) 식욕이 감퇴됨.
- (5) 사람이 등아래 부분을 손으로 눌러 체중을 실어도 움직이지 않음.
- (6) 숫태지의 승가를 허용함.

이러한 발정징후를 발견하고 활력이 있는 정자만을 선별하여 인공수정에 사용하기 위해 시중에서 판매하는 duroc정액으로 swim-up방법을 실시하였음.

- 그 결과, 높은 viability을 보이는 정자는 90%이상이었으며 motility 또한 매우 활력이 좋았음. 이러한 정자를 회수하여 <그림3> 과 같은 방법으로 1×10^6 개/ml 농도의 정액을 100ml씩 3회 주입하였음.



<그림3> Artificial insemination

- 미경산돈을 인공수정에 이용한 결과, 임신경험이 한번도 없어 정확한 발정징후와 발정시기를 발견하기 어려운 단점이 나타나 미경산돈의 이러한 문제를 보완하기 위해 5산차의 (Yorkshire×Landrace) 2원 교잡종의 경산돈<그림4>을 사육함. 미경산돈과 같은 방법으로 인공수정을 실시하였음. 경산돈은 이유시기 이후 예정된 발정기간에 앞서 정의한 발정징후들이 뚜렷하게 나타나 확실한 인공수정 적기를 판단할 수 있었지만, 미경산돈과 마찬가지로 배란의 유무와 확실한 수정의 유무를 판단할 수 없어 체내 수정란을 얻는데 많은 어려움이 있었음.



<그림4> Yorkshire×Landrace sow

- 배란된 난자는 난관팽대부에서 정자와 수정되어 수정란이 되는데 수정란은 자궁으로 이

동하면서 난할을 반복하며 배란 후 4~5일 쯤이 되는 시기에 영양막세포(Trophoblast)와 내세포괴(Inner cell mass)가 형성된 배반포로 분화하게 됨. 그래서 첫 번째 인공수정일로부터 6일째가 되는 시기를 수정란 회수일로 정하였음. 그러나 돼지의 경우, 수정란을 회수하기 위해서는 소와는 달리 해부학적인 자궁의 구조가 비외과적인 방법으로는 얻을 수 없는 단점이 있어 반드시 외과적인 수술과정을 거쳐야 함. 그래서 인근 도축장에 의뢰하여 도축된 돼지의 자궁을 무균적으로 회수하였음. 그리고 자궁 내에 존재하는 수정란을 회수하기 위해 <표1> 조성의 관류액을 자궁 내에 관류시켜 채란하였음 <그림 5>.

<표1> Condition of flushing medium

Component	Company	Cat. NO.	ml
Medium 199 (w/o NaHCO ₃)	GIBCO	12350-039	500
5% FBS			
2% Antibiotics Antimycotic			



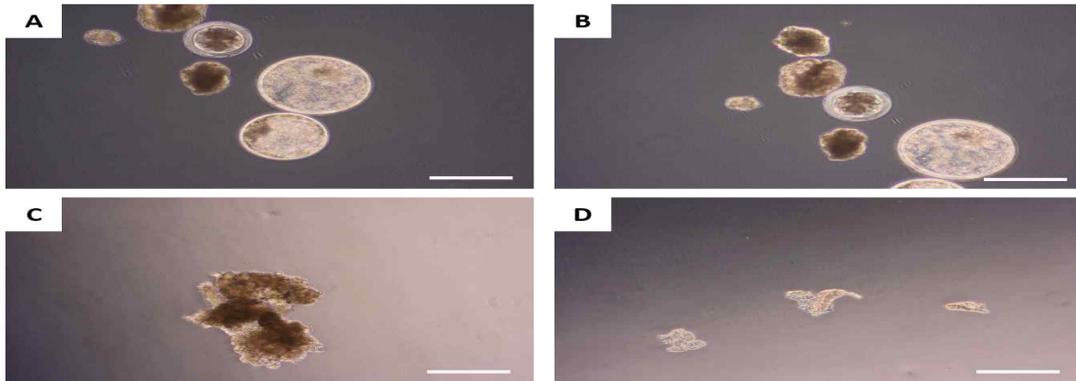
<그림5> Flushing embryos from luteal uterus

- 직접 회수한 수정란의 수와 난소에서 배란된 난포의 수를 비교해보았을 때, 수정란 회수율이 80%이상의 높은 비율을 나타내었음. 그러나 <표2>의 결과와 같이 배반포의 발달 정도에 따라 투명대가 보존되어있는 배반포와 투명대가 제거된 해칭 배반포로 분류되었고 배반포 뿐만 아니라 아직 난할단계가 완료되지 않은 8cell, 16cell 등의 수정란도 얻을 수 있었음. 이는 난자의 배란시기와 수정시기 간의 차이로 인해 다양한 수정란이 회수된 것으로 생각됨.<그림6>

<표2> Number of recovered blastocysts

No. of blastocysts	No. of ZP* blastocysts	No. of ZP-free blastocysts
27	12	15

*ZP: Zona pellucida

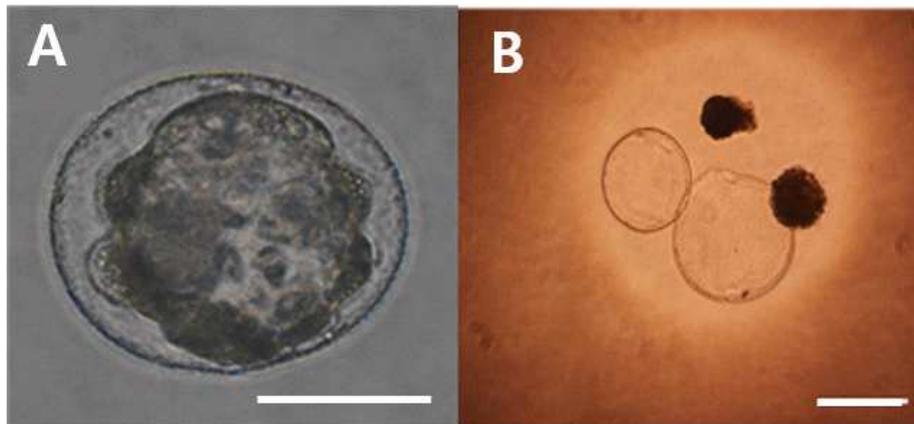


<그림6> Recovered blastocysts (Scale bar=200µm)

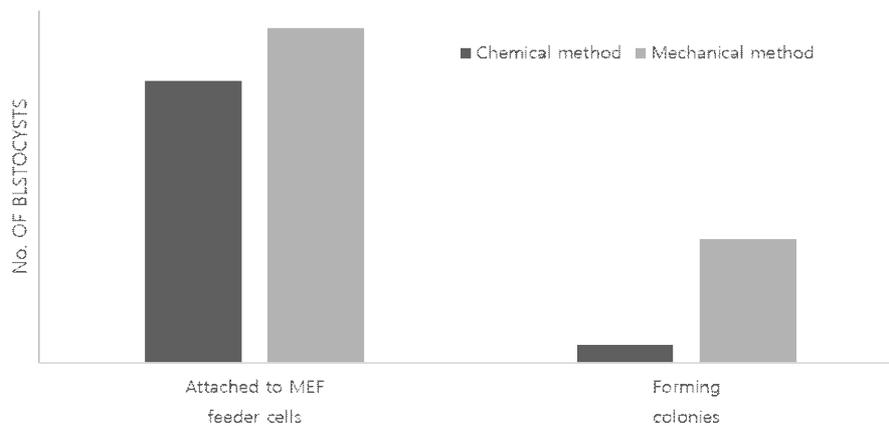
2. 착상 전 배아로부터 ICM분리 기법 개발

- 체내 수정란을 이용하여 가장 효율적인 ICM분리 기법을 개발하는 것이지만 한번에 많은 양의 수정란을 얻기 힘들고, 빠른 시간 내에 최적의 조건을 찾는 것이 쉽지 않음. 따라서 이런 문제를 해결하고자 빠른 시간 내에 많은 수의 수정란을 얻을 수 있는 체외수정란으로 대체하여 실험을 진행하였음.
- 돼지 배반포의 경우에 수정란에서 배반포로 분화할 때, 두가지 세포로 분리가 되는데 이때 투명대만 제거하여도 ICM부분만 지지세포에 부착되어 자라기 때문에 trophoblast와 ICM을 굳이 분리하지 않아도 줄기세포로 배양이 가능함. 따라서 본 연구는 수정란의 투명대를 제거하는 방향에 치중하여 실험을 수행하였음.
- 투명대를 제거하기 위한 방법으로 화학적인 기법과 기계적인 기법을 각각 사용하여 배반포 부착과 콜로니 형성유무를 비교하였음. 그 외의 면역학적인 기법은 Ming(*Improved isolation and culture of embryonic stem cell from chinese miniature pig, 2004*)이 연구한 논문에 의하면 ICM부분만을 정확하게 분리할 수 있지만 그 방법이 번거롭고, 효소적 처리에 비해 비효율적인 면이 있다는 결과를 바탕으로 본 연구에서는 이 기법은 제외하고 실질적으로 쉽게 이용할 수 있는 기법들로 실험을 실시하였음.
- 화학적인 기법으로는 tyrode's solution을 이용하였음. Solution으로 배반포에 1분 정도 처리하면 <그림7A>와 같이 투명대가 얇게 변화되고 결국에는 투명대가 녹아 없어져 투명대 안에 자리잡고 있던 세포를 손쉽게 얻을 수 있었음. 이 방법은 빠르게 투명대를 제거할 수 있다는 장점이 있었지만 그만큼 세포에게 damage를 크게 주어 결과적으로 콜로니 형성에 문제가 생길 수 있다는 단점이 있었음.

- 기계적인 방법으로는 mouse pipette과 insulin syringe를 이용하여 직접 투명대를 제거하였음. 크게 확장된 배반포만을 선별하여 mouse pipette으로 배반포를 고정시킨 뒤 30 gauge 정도의 insulin syringe로 투명대를 찢어 mouse pipette으로 수차례 흡입과 배출을 반복하면 <그림7B>와 같이 세포의 큰 damage 없이 온전한 배반포를 얻을 수 있었음. <그림8>의 그래프에서처럼 화학적 기법과 기계적인 기법간의 배반포 부착 수치는 차이가 없었지만 콜로니 형성 면에서는 확연하게 기계적인 기법에서 더 많은 수의 콜로니를 얻어 현재까지 기계적인 기법을 이용하여 세포의 damage없이 초대 배양하였음.



<그림7> Removed zona pellucida blastocysts by chemical (A) and mechanical (B) method (Scale bar = 200µm)



<그림8> Attachment of removed zona pellucida blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from *in vivo*-derived blastocysts by chemical and mechanical method

3. ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발

- 돼지 배아줄기세포를 확립하기 위해 가장 중요시 생각해야 할 것은 초대배양시의 콜로니 형성 유무임. 콜로니는 만능성의 특성을 가진 줄기세포집단으로 배양을 계속 진행하

게 되면 지지세포 바닥면 위에서 넓게 퍼지면서 증식하게 된다는 것임.

- 만약, 초대배양시의 배반포가 지지세포에 부착되었다가도 콜로니가 형성되지 않으면 줄기세포로서의 특성과 모습을 갖지 못하고 분화하여 사멸하게 됨. 그렇기 때문에 배양 초기에 콜로니를 형성하고 유지시켜 증식할 수 있는 조건을 개발해야 함.
- 이전의 많은 연구자들에 의해 규명되어진 여러 조건들 중에서도 체외에서 줄기세포를 배양하기 위한 대표적인 기본 배양액으로 DMEM/Ham's F-10과 α -MEM을 이용하는 연구들이 많이 있었음.
- 이를 바탕으로 본 연구에서도 초대배양시의 첫 번째 실험 비교군으로 DMEM/Ham's F-10과 α -MEM으로 설정하고 그 안에 세포의 생존을 유지하기 위해 첨가되는 FBS와 완벽하게 밝혀지지 않은 구성성분으로 인한 FBS의 단점을 대체할 KSR과의 배반포 부착효율과 콜로니 형성율을 비교하였으며 DMEM/Ham's F-10과 α -MEM 기본 배양액에 첨가된 조성은 다음의 <표3>과 같음.

<표3> Conditions of porcine embryonic stem cell mediums

Based medium	Components	
	Serum	Factors
DMEM/Ham's -F10 (Low glucose)	15% ES FBS	20ng/ml bFGF
α -MEM	10% KSR	40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF 20ng/ml bFGF

<표4> Attachment of *in vivo*-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from *in vivo*-derived blastocysts in different culture medium.

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^c of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
α -MEM-based medium ^a	26	23 (88)	18 ^d (69)
DMEM / Ham's F-10-based medium ^b	3	2 (67)	0 ^e (0)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.3171 and 0.0185 in the number of blastocysts attached to feeder cells and forming colonies, respectively. Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM-based medium and DMEM / Ham's F-10-based medium.

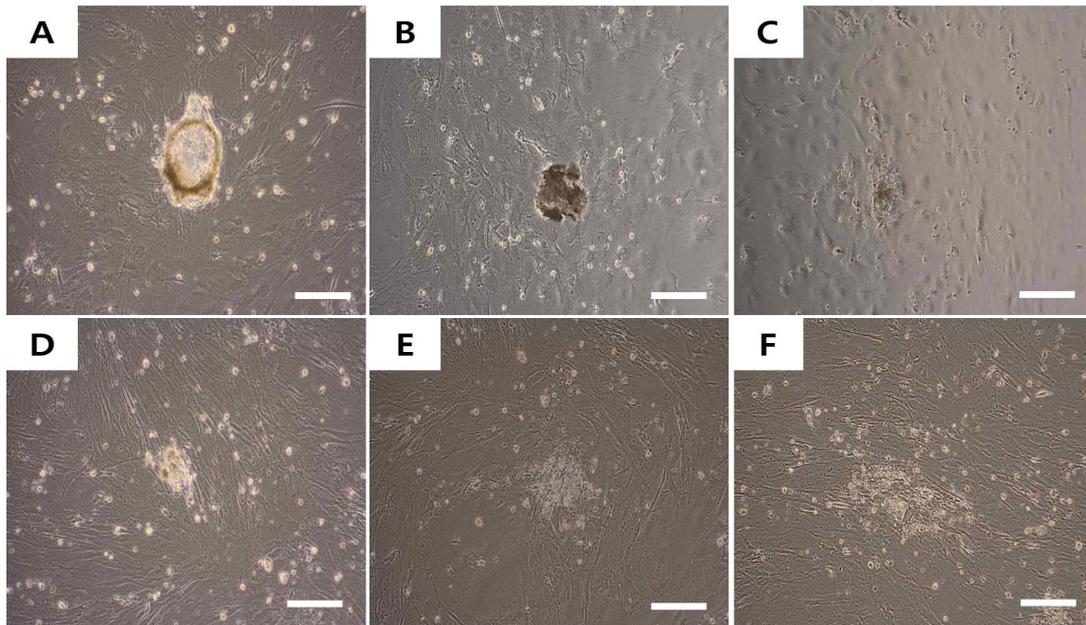
^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 40ng/ml EGF, 100l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham' s F-10-based medium consist of DMEM / Ham' s F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS and 20ng/ml bFGF.

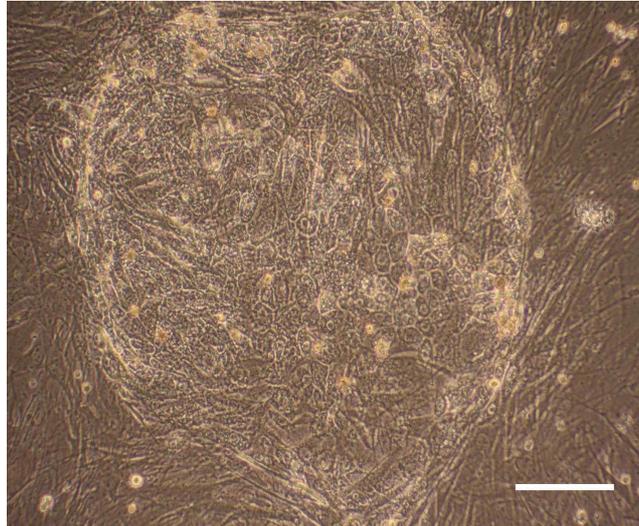
^cPercentage of the number of seeded blastocysts

^{de}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.05$

-. 각 배양액을 이용하여 배반포를 배양한 결과를 <표4>에 나타내었음. 각각의 처리군에 투명대를 제거한 배반포를 배양하였을 때 바닥면의 지지세포에 부착한 세포는 α -MEM배양액에서 높은 부착 효율을 보였으며, 초기 콜로니 형성을 또한 DMEM/Ham' s F-10에 비해 높은 비율을 나타내었음. 앞서 언급하였듯이 초대배양에서의 초기 콜로니 형성은 매우 중요한 단계로 이와 같은 결과로 초대배양 시에는 α -MEM 기본 배양액에서 배양되는 세포가 초반에 높은 증식능력을 가질 수 있을 것으로 예상되어짐. <표4>의 결과를 사진으로 비교하였을 때, α -MEM 배양액에서 배반포가 더 강하게 부착되어 있는 것을 확인하였으나, DMEM/Ham' s F-10 배양액에서는 배반포를 지지세포에 배양한 후 2일차에는 부착되어있었지만 3일차에는 부착되어 있던 세포가 떨어지고 흔적만 남은 것을 관찰하였음.<그림9> 초반의 콜로니 형성 또한 DMEM/Ham' s F-10 배양액보다 α -MEM 배양액에서 좋은 형성효과를 보여 <그림 10>과 같이 α -MEM medium에서 형성된 콜로니의 형태는 경계가 뚜렷하고 바닥면에 납작하게 붙어 자라는 모습을 띄어 인간배아줄기세포와 유사한 형태를 가진 것으로 예상하였음.<그림10>



<그림9> Blastocysts were cultured in α -MEM-based medium (A~C) and DMEM/Ham' s F-10-based medium (D~F) at day 3. (Scale bar=200 μ m)



<그림10> Morphology of colonies derived from inner cell mass (ICM) of porcine blastocysts in α -MEM-based medium at day 7 (Scale bar=200 μ m)

- 두 번째 비교 실험은 지지세포의 적정 수를 확인하였음. 이전연구에 따르면 지지세포는 배아줄기세포의 증식을 막지 않도록 세포분열 상태가 정지된 세포로 배아줄기세포가 미분화 상태를 유지하고 성장하는데 매우 중요한 역할을 한다고 밝혀졌음. 이러한 세포는 배아줄기세포와 공동배양을 하기 때문에 배아줄기세포가 증식하기 위한 적합한 조건의 지지세포를 만들어 주어야 하는데, 그 중에서도 dish 전체 바닥면에 깔려 있는 지지세포의 수(밀도)는 배아줄기세포가 성장하는데 매우 중요한 조건이기 때문에 적정 세포수를 찾는 것이 초대배양시의 콜로니 형성에 밀접한 관계가 있음. 만약 지지세포의 수가 적으면 배아줄기세포가 성장하기 위한 영양을 받지 못하며, 세포의 수가 많게 되면 그만큼 배아줄기세포가 증식해나갈 공간이 부족하게 되므로 결국엔 분화되어 사멸하게 됨. 따라서 첫 번째 실험에서 나타난 결과를 바탕으로 α -MEM 배양액에서 지지세포의 수를 2.5×10^5 개와 5.0×10^5 개 2가지로 나누어 초대배양시의 배반포 부착율과 콜로니 형성율을 비교하여 다음의 <표5>의 결과를 얻었음.

<표5> Effects of different feeder cell number on attachment of *in vivo*-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from *in vivo*-derived blastocysts in α -MEM based medium^a.

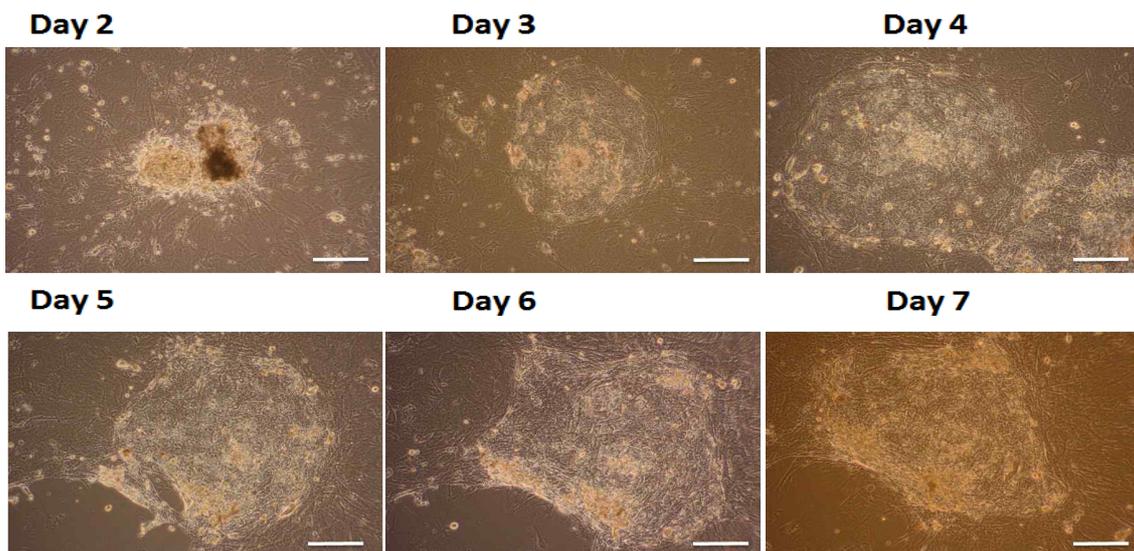
No. of feeder cells	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^b of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
2.5×10^5	13	10 (77)	9 (69)
5.0×10^5	13	13 (100)	9 (69)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.0699 and 1.0000 in the number of blastocysts attached to feeder cells and forming colonies, respectively. Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells.

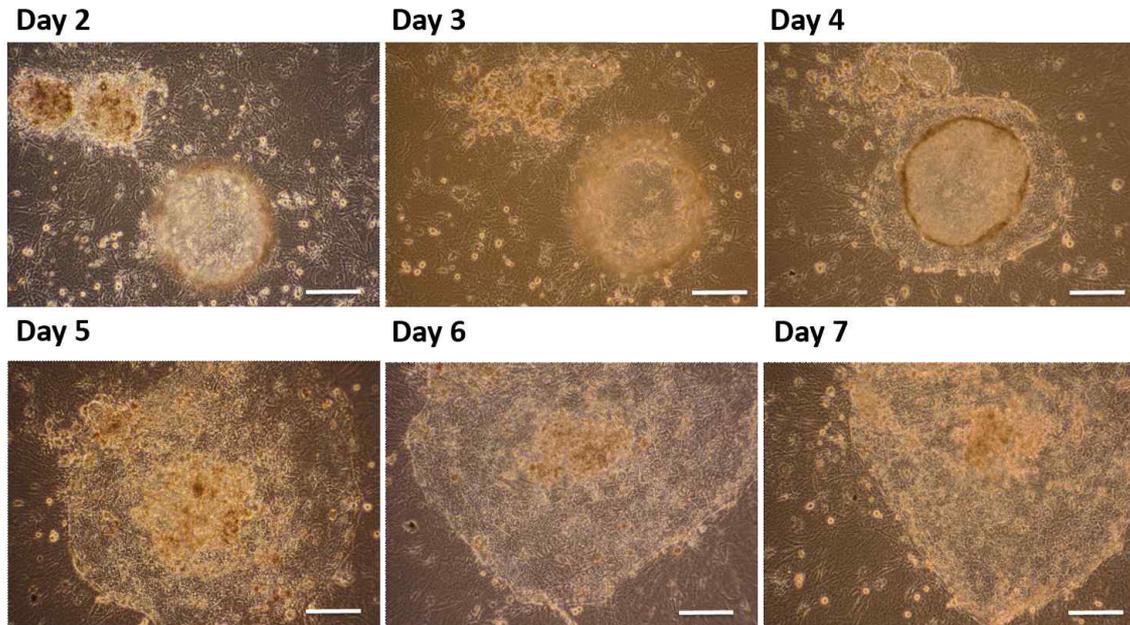
^aα-MEM-based medium consist of α-MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 40ng/ml EGF, 100I/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bPercentage of the number of seeded blastocysts.

- 초대배양 시 지지세포의 수를 2.5×10^5 개와 5.0×10^5 개로하여 같은 수의 배반포를 올려 배양하였을 때 지지세포에 붙은 배반포의 수와 비율은 통계적인 면에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 수치적인 면이나 직접 눈으로 배반포가 부착된 상태를 확인해 보았을 때에는 5.0×10^5 개의 지지세포에서 2.5×10^5 개에 비해 배양 초기에 더 강한 부착을 보였음. 그러나 콜로니 형성에서도 두 비교군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았음.
- 배양 일차 별 지지세포의 수에 따른 콜로니 형성을 <그림11>과 <그림12>의 사진으로 비교하였을 때, day 2에는 5.0×10^5 개에서보다 2.5×10^5 개에서 먼저 배반포가 부착되었지만 부착 정도는 5.0×10^5 개의 지지세포와 더 강하게 보였으며 day 4부터 형성되기 시작한 콜로니의 질은 2.5×10^5 보다 좋았고, 콜로니 안의 세포간의 밀집도 매우 조밀한 형태를 띄는 것을 확인하였음. 또한 이렇게 형성된 콜로니의 증식 속도와 증식 면적은 2.5×10^5 개보다 확연하게 빠른 증식속도와 넓은 면적으로 퍼져나가 지지세포와의 경계가 뚜렷한 세포의 모습을 나타내었음.
- 결론적으로, 초대배양 시 ICM 유래 콜로니를 형성하기 위한 기법으로는 α-MEM을 기본으로 하는 배양액과 5.0×10^5 개의 지지세포 수에서 배양하는 것이 가장 적합한 기법임을 확인하였음.



<그림11> Morphologies of colony on ICR-MEF feeder 2.5×10^5 at passage 0
(Scale bar = 200 μ m)



<그림12> Morphologies of colony on ICR-MEF feeder 5.0×10^5 at passage 0
(Scale bar = $200 \mu\text{m}$)

4. 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발

- 초대배양 시 형성되어진 콜로니는 반복적인 계대과정으로 오랜 기간 동안 분화되지 않고 계속해서 증식할 수 있음. 이때에 개발된 배아줄기세포의 계대 방법은 미세피펫을 이용한 물리적인 방법임. 이는 최대한의 세포 손상을 줄이고, 빠르게 새로운 지지세포에서 배양 될 수 있도록 미세피펫으로 콜로니 크기에 따라 여러 등분으로 분할해 새로운 지지세포로 옮겨 주었기 때문에 배아줄기세포가 증식함에 있어 긍정적인 효과를 보였음.
- 배아줄기세포는 오랜 시간동안 증식을 이어가기위해 여러 번의 계대과정을 통해 콜로니 내의 세포 수를 증가시키고, 안정화 단계에 점차 도달하여 미분화 상태를 유지하면서 자가증식을 진행함. 따라서 초대배양 때와는 또 다른 조건의 배양 기법으로 배아줄기세포의 세포 주화를 이어갈 수도 있어 지지세포의 수와 배양액을 비교하여 계대 시의 차이를 확인해보았음. 또한 본 연구에서 문제가 되고 있는 부분인 콜로니 내에 생성된 알 수 없는 버블을 여러 번의 계대과정으로 제거하여 줄기세포의 질을 향상시킬 방법을 찾아보았음.
- 첫 번째로 앞서 확인한 초대배양시의 비교하였던 적합한 지지세포의 수를 계대 시에는 어떠한 변화와 차이가 있는 가를 부착율과 콜로니 형성율로 비교 확인하여 <표6>의 결과를 얻었음.

<표6> Effects of different feeder cell number on attachment of clumps to feeder cells and clump-derived colony formation in α -MEM-based medium^a post-subpassage.

No. of feeder cells	No. of seeded clumps	No. (%) ^b of clumps	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
2.5 x 10 ⁵	4	4 (100)	4 (100)
5.0 x 10 ⁵	14	13 (93)	8 (57)

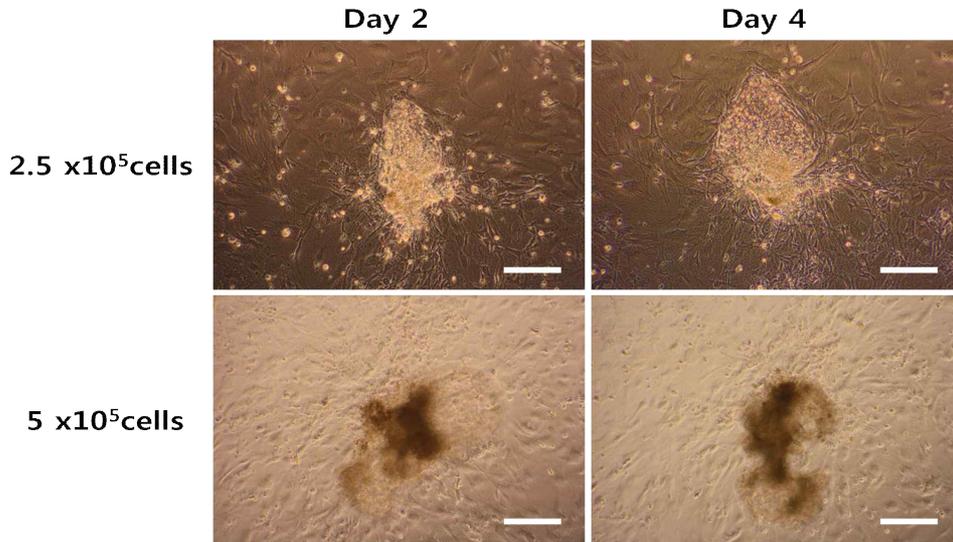
Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.6082 and 0.1220 in the number of clumps attached to feeder cells and forming colonies, respectively.

Clumps were derived from mechanically dissociated colonies 7 days post-seeding blastocysts and cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 40ng/ml EGF, 100l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bPercentage of the number of seeded clumps

- 초대배양 때와는 달리 2.5 x 10⁵개의 지지세포 수에서 부착된 clump의 수와 부착비율이 수치적으로 높게 나타났으며, 콜로니 형성 또한 2.5 x 10⁵에서 더 높은 효율을 나타내었음. 이는 콜로니에 형성되어 있는 세포의 수가 계대를 거칠 수 록 증가하므로 그만큼 초대배양 때와는 다르게 콜로니가 증식해야할 공간이 많아져야 함. 따라서 5.0 x 10⁵개의 지지세포 수에서는 콜로니가 쉽게 증식해나갈 공간의 여유가 없기 때문에 계대시의 콜로니 형성이 적게 나타나는 것으로 예상됨. <그림13>에서와 같이 고농도의 지지세포 수에서는 부착되지 못하고 떠다니는 콜로니를 발견할 수 있었으며 반면에 저농도의 지지세포 수에서는 강하게 지지세포에 부착되어진 것을 확인할 수 있었음. 그리고 콜로니가 형성된 모습으로도 저농도의 지지세포에서 뚜렷한 배아줄기세포 콜로니의 형태를 형성하고 있음을 확인하였음. 따라서 계대 시에는 초대배양과는 다르게 2.5 x 10⁵개의 저농도 세포 수를 이용하는 것이 더 효율적으로 결론을 지을 수 있었음.



<그림13> Morphologies of colony on ICR-MEF feeder 2.5×10^5 and 5×10^5 at passage 1 (Scale bar = $200 \mu\text{m}$)

- 두 번째는 앞서 문제점으로 제기하였던 콜로니 내의 버블형성을 제거하기 위해 초대배양때와는 다른 배양액과 비교를 하여 버블의 형성 유무와 지지세포에 부착된 비율, 콜로니 형성율을 확인하였음. 버블의 형성 원인은 현재까지 밝혀내지 못하였지만 초기의 배반포에서부터 유래가 되어진 것으로 예상이 되며 또한 초대배양 시에 사용된 α -MEM의 배양액에 첨가된 KSR의 문제로 예상을 하고 있음. 그러나 현재까지는 이 버블의 형성으로 배아줄기세포의 증식에 큰 영향은 끼치지 않고 있음. 이러한 문제를 해결하기 위해 대체 배양액조성으로 기존에 효과를 보였던 α -MEM 기본 배양액에 FBS가 첨가된 DMEM/Ham' s F-10 기본 배양액을 50:50으로 섞어 α -MEM 배양액과 비교하였음. 이는 초대배양 시에 사용되었던 α -MEM에 적응되어 있는 콜로니를 처음부터 새로운 배지로 옮겨 배양하는 것은 오히려 좋지 못한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어 위와 같이 수행하였음.

<표7> Attachment of clumps to feeder cells and formation of colonies derived from clumps post-subpassage in different culture medium.

Type of medium	No. of seeded clumps	No. (%) ^c of clumps	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
α -MEM-based medium ^a	4	4 (100)	4 (100)
Mixture medium ^b	8	8 (100)	8 (100)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the p value, were 1.00 and 1.00 in the number of clumps attached to feeder cells and forming colonies, respectively.

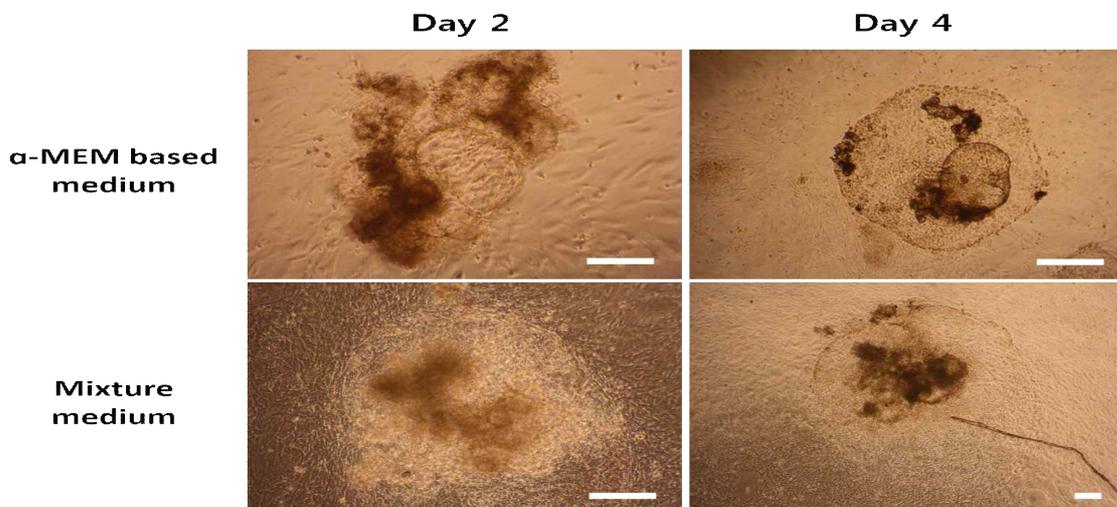
Clumps were derived from mechanically dissociated colonies 7 days post-seeding blastocysts and cultured for 7 days on 2.5×10^5 mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 40ng/ml EGF, 100IU/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bMixture medium consist of 50:50 mixture of α -MEM-based medium and DMEM / Ham' s F-10-based medium.

^aPercentage of the number of seeded clumps

- <표7>의 결과와 같이 계대 시의 지지세포에 부착되어지는 clump의 수와 비율은 두 배양액 간의 유의적인 차이나 부착력의 차이는 없었으나 콜로니 형성에서도 유의적인 차이는 나타나지 않았음. 하지만 mixture 배양액에서 지지세포와의 경계도 뚜렷하고 세포의 수도 많은 질 좋은 콜로니가 생성이 되었으며, 여러 번의 계대를 거처도 증식하는 속도는 매우 빨라지는 현상이 관찰되었음<그림14>. 또한 버블을 제거하기 위한 비교 실험이었으나 두 배양액에서 모두 버블이 사라지지 않아 오히려 계대 시에는 KSR이 포함된 α -MEM 배양액보다는 FBS가 첨가된 DMEM/Ham' s F-10 배양액에서 콜로니의 증식에 더 좋은 효과를 볼 수 있는 결과를 얻을 수 있었음. 따라서 현재는 FBS가 첨가된 DMEM/Ham' s F-10으로만 배아줄기세포의 배양을 계속해서 진행하고 있음.

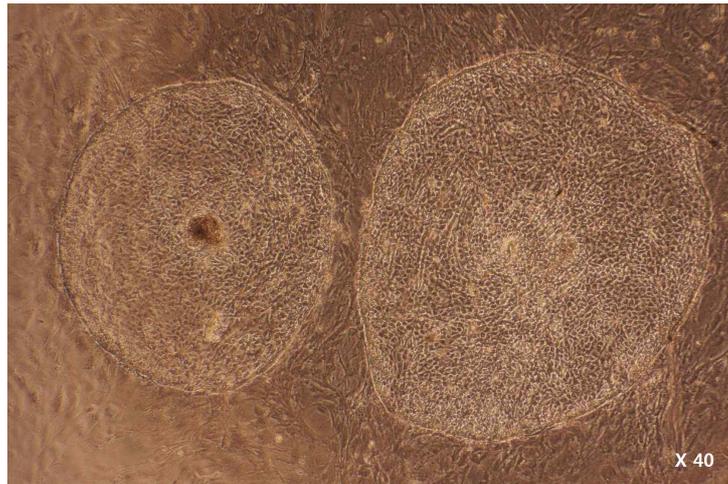


<그림14> Morphologies of colony on ICR-MEF feeder 2.5×10^5 in α -MEM-based medium and mixture medium at passage 1 (Scale bar = $200 \mu\text{m}$)

5. 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명

- 이전의 돼지 배아줄기세포의 특성을 갖는 세포를 확립한 연구들에 의하면 지지세포에 부착되어 형성되어지는 콜로니는 주변이 둥그런 모양을 띄고 경계가 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있다고 보고됨. 또한 바닥면에 강하게 부착하여 지지세포를 밀어내면서 자신의 영역을 넓히면서 증식한다고 밝혔음. 본 연구에서 생산되어진 콜로니가 배아줄기세포의 특성을 가지고 있는가를 확인하기 위해 기본적으로 형태학적인 면을 확인하였음. 이전의 연구와 비슷한 양상의 콜로니가 형성되었으며, 세포간의 밀집도 또한 매우 조밀하고, 지지세포와의 경계선이 뚜렷하게 나타내는 것을 확인함. 현재까지는 passage 4단계의 줄기세포로 <그림15>와 같이 고품질의 배아줄기세포를 배양하고 있으나, 배아줄기세

포의 여러 가지 특성을 규명하기 위해서는 콜로니가 안정화 되어지는 기간이 필요함. 이 기간은 보통 passage 10단계이상부터 진행되는데 현재로서는 줄기세포의 다양한 특성을 규명하기에는 안정화 단계로 도달하지 못하였으므로 passage 10으로 진행되었을 시기에 수행할 계획임.



<그림15> Morphology of colonies on ICR-MEF feeder at day 4 of passage 4

[2차년도]

1. 체외수정 기법을 통한 고품질 체외수정란 생산 기술 개발

가 Drop culture oil 세척을 이용한 고품질 체외 수정란 생산

- 배양 과정에서 paraffin oil, mineral oil 및 각각을 세척한 oil을 배양액에 덮어 169시간 동안 배양 후 세포의 분할을 확인하였음. 본 실험의 결과는 세척 oil의 능력을 확인하고자 실시한 실험으로 분할율에서는 모든 처리군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 <표8>, 배반포 생성율에서 세척하지 않은 group보다 세척한 oil을 사용한 group에서 유의적으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었음 ($p < 0.05$).

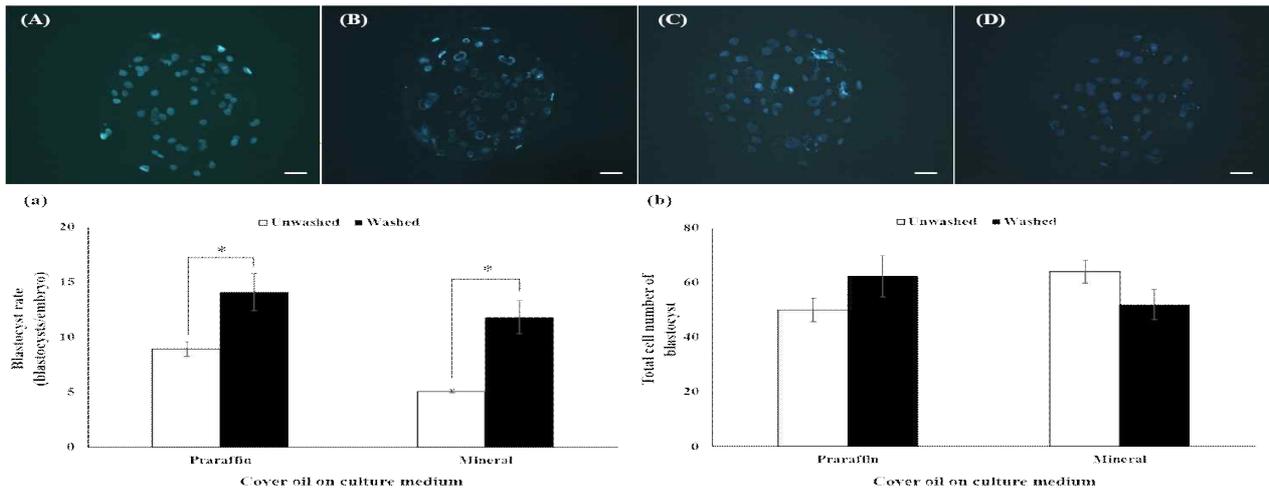
<표8> *In vitro* development of porcine embryos in culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils

Oil treatment	Washing treatment	No. of oocytes	Cleavage (%)	No. of embryo development to (%)			Deg. (%) [*]
				2~8 cell [*]	≥ 16 cells [*]	Blastocyst [*]	
Paraffin	-	124	100 (79.8 ± 5.4)	34 (26.7 ± 4.0)	55 (44.2 ± 2.9) ^{ab}	11 (8.9 ± 0.7) ^{bc}	24 (20.2 ± 5.4)
	+	145	119 (81.9 ± 3.7)	47 (29.9 ± 8.5)	52 (37.9 ± 6.3) ^{ab}	20 (14.1 ± 1.7) ^a	26 (18.1 ± 3.7)
Mineral	-	174	135 (77.7 ± 0.2)	47 (24.7 ± 4.3)	79 (47.9 ± 4.4) ^a	9 (5.1 ± 0.1) ^c	39 (22.3 ± 0.2)
	+	155	115 (75.4 ± 4.5)	59 (37.6 ± 4.9)	37 (26.1 ± 9.3) ^b	19 (11.8 ± 1.5) ^{ab}	40 (24.6 ± 4.5)

^{a-c} Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

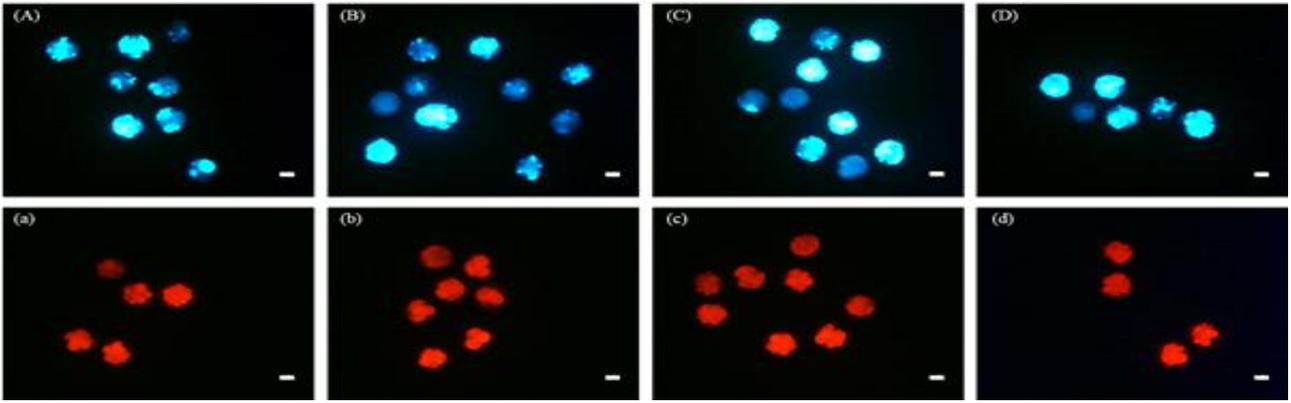
^{*}Percentage of total number of oocytes used for IVF. n=3.

-. 배양 과정에서 paraffin oil과 mineral oil 및 각각을 세척한 oil을 배양액에 덮어 169 시간 동안 배양 후, 생성된 배반포의 염색으로 total cell 확인하였음. <그림16>의 (A)~(D)는 각각 paraffin, washing paraffin, mineral 및 washing mineral oil에서 생성된 배반포의 염색 사진을 나타낸 것임. 이에 대한 배반포율과 total cell을 그래프화 하여 (a), (b) 그래프로 나타낸 것으로 세척한 oil을 사용하였을 때 더 높은 배반포 수치가 나타난 것을 확인할 수 있었음 (a). 그러나 paraffin의 경우 세척한 oil에서 total cell이 증가하였지만 mineral oil에서는 감소하는 결과가 나타난 것을 볼 수 있음. (b).

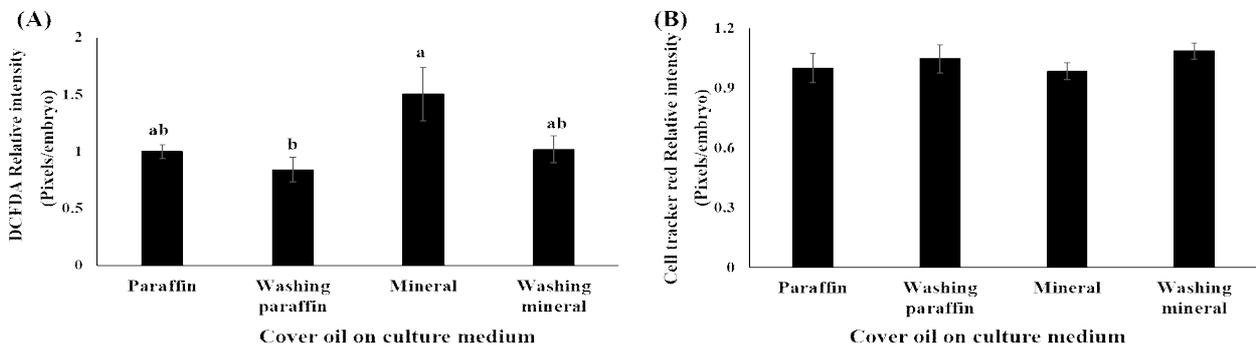


<그림16> Fluorescence microscopic images in blastocyst, blastocyst rate to comparison with or without washing oil (a) and total cell of blastocyst (b) produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils, (A: paraffin, B: washing paraffin, C: mineral, D: washing mineral oil), Scale bar: 50 μ m. * Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

-. 배양 과정에서 paraffin oil과 mineral oil 및 각각을 세척한 oil을 배양액에 덮어 169시간 동안 배양 후, 수정란을 DCFDA와 celltracker RED로 염색하여 H₂O₂와 GSH를 염색하였음. <그림17>의 (A)~(D)는 각각 paraffin, washing paraffin, mineral 및 washing mineral oil에서 생성된 배아의 H₂O₂를 염색한 사진을 나타낸 것이고, (a)~(d)는 각각 paraffin, washing paraffin, mineral 및 washing mineral oil에서 생성된 수정란의 Glutathione(GSH)를 염색한 사진임. <그림18>은 각 처리군별 H₂O₂와 GSH를 수치화한 그래프로 (A)에서 나타난 H₂O₂의 농도는 세척하지 않은 oil을 사용하였을 때 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였음 ($p < 0.05$). 반대로 GSH의 경우 모든 처리군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 세척한 oil을 처리하였을 때, 높게 나타난 것을 확인할 수 있음(B).



<그림17> Fluorescence microscopic of H₂O₂(blue) and GSH(red) in embryo produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils, (A, a: paraffin oil; B, b: washing paraffin oil; C, c: mineral oil; D, d: washing mineral oil), Scale bar: 50 μm



<그림18> H₂O₂(A) and GSH(B) expression level in embryo produced by culture medium overlaid with paraffin, washing paraffin, mineral and washing mineral oils, ^{a,b}Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

-. Washing culture oil은 배양에 사용되는 oil을 배양액과 함께 교반하여 oil 내의 불순물을 제거하는 것으로 washing culture oil을 이용하여 체외 배양에 이용하였음. 그 결과, 배아의 기능이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 배아의 발달율과 배반포 생성율이 증가하였으며, 배아 내의 활성산소가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였음. 또한, 항산화 능력에서는 유의적인 차이는 없었지만 washing culture oil을 이용하여 배양하였을 때, 증가하는 것을 확인하였음.

나. Tetraploid 방법을 이용한 고품질 체외 수정란 생산

-. PZM-3에 GSH를 각 농도별로 처리하여 분할률을 확인한 결과, 배양 48시간에서는 control에서 분할률이 높았지만 유의적 차이가 없었으며, 72시간에서는 300μM에서 분할률이 높았지만 역시 유의적인 차이는 인정되지 않았음 <표9>. <표10>에서 배양 96시간에서 배반포 형성률은 GSH 100uM 군에서 유의적으로 낮게 나타남을 확인하였음 ($p < 0.05$). 또한 120시간에서 분할률을 확인한 결과, GSH 500uM 처리군의 배반포 형성률에서 유의적으로 높게 나타남을 확인하였음 ($p < 0.05$).

<표9> Effect of GSH on tetraploid embryos development at 48 and 72 hours after electrofusion

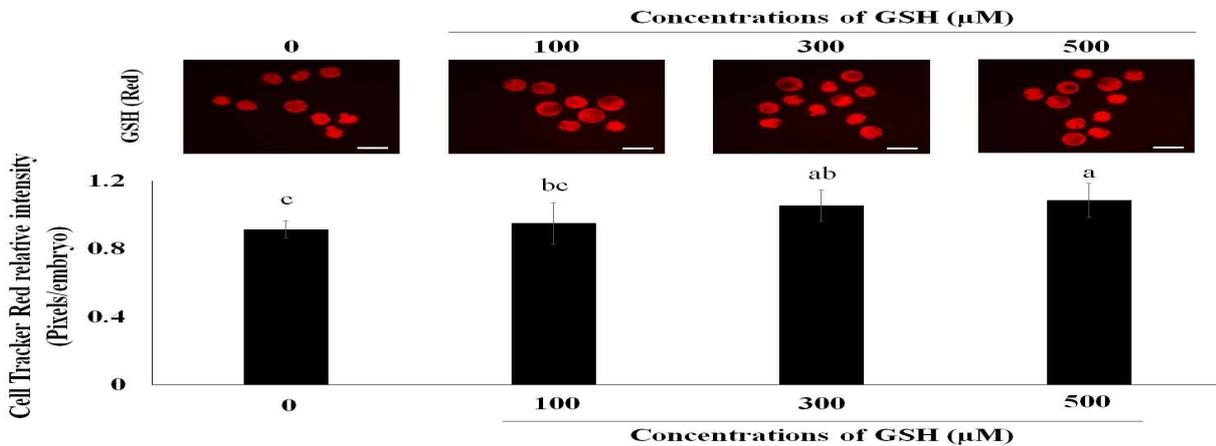
Treatment		No. of oocytes	Cleavage (%)	No. of development to (%)		
Time after electrofusion (h)	GSH con. (μM)			≥2cell	Blastocyst	Degeneration
48	0	19	15 (81.9 ± 10.8)	15 (20.5 ± 5.7)	0 (0.0 ± 0.0)	4 (18.1 ± 10.8)
	100	20	15 (76.4 ± 6.9)	15 (19.1 ± 7.0)	0 (0.0 ± 0.0)	5 (23.6 ± 6.9)
	300	27	22 (80.6 ± 7.3)	22 (20.1 ± 2.7)	0 (0.0 ± 0.0)	5 (19.4 ± 7.3)
	500	28	21 (73.8 ± 3.6)	21 (18.4 ± 6.2)	0 (0.0 ± 0.0)	7 (26.2 ± 3.6)
72	0	19	15 (80.6 ± 10.0)	14 (19.1 ± 6.5)	1 (4.2 ± 4.2)	4 (19.4 ± 10.0)
	100	20	14 (72.2 ± 11.1)	13 (17.0 ± 3.8)	1 (4.2 ± 4.2)	6 (27.8 ± 11.1)
	300	27	22 (81.5 ± 1.9)	15 (15.5 ± 7.2)	7 (19.4 ± 19.4)	5 (18.5 ± 1.9)
	500	28	21 (73.8 ± 3.6)	17 (15.9 ± 5.6)	4 (10.3 ± 10.3)	7 (26.2 ± 3.6)

<표10> Effect of GSH on tetraploid embryo development and cell number at 96 and 120 hours after electrofusion

Treatment		No. of oocytes	Cleavage (%)	No. of development to (%)			Cell number per blastocyst
Time after electro-fusion (h)	GSH con. (μM)			≥2cell	Blastocyst	Degeneration	
96	0	19	14 (78.1 ± 8.6)	3 (3.8 ± 3.2)	11 (62.9 ± 5.3) ^a	5 (21.9 ± 8.6)	-
	100	20	13 (71.9 ± 6.7)	9 (10.7 ± 5.3)	4 (29.2 ± 9.9) ^b	7 (28.1 ± 6.7)	-
	300	27	22 (77.8 ± 3.9)	2 (5.6 ± 4.2)	20 (55.6 ± 19.6) ^a	5 (22.2 ± 3.9)	-
	500	28	17 (64.7 ± 3.8)	1 (4.6 ± 3.5)	16 (46.2 ± 11.2) ^a	11 (35.3 ± 3.8)	-
120	0	19	6 (41.0 ± 11.3)	1 (1.3 ± 1.3)	5 (36.0 ± 9.5) ^b	13 (59.0 ± 11.3)	16.4 ± 0.7
	100	20	12 (37.5 ± 8.0)	0 (1.0 ± 1.0)	12 (33.3 ± 11.8) ^{ab}	14 (62.5 ± 8.0)	18.2 ± 2.5
	300	27	15 (49.3 ± 5.6)	1 (1.0 ± 1.0)	14 (45.1 ± 6.8) ^{ab}	12 (50.7 ± 5.6)	17.7 ± 3.8
	500	28	17 (50.4 ± 12.4)	0 (0.0 ± 0.0)	17 (50.4 ± 12.4) ^a	11 (49.6 ± 12.4)	17.0 ± 2.1

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

- Cell tracker red를 이용하여 GSH 염색을 실시하였고 세포 내 GSH의 발현을 측정한 결과 GSH 500uM을 처리한 처리군에서 가장 높은 발현을 보였고 control에서 제일 낮음을 확인하였음.<그림19>

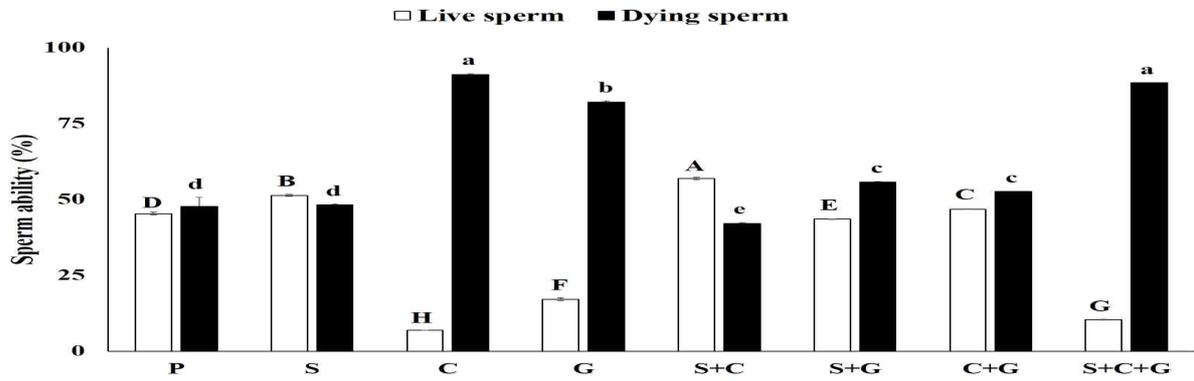


<그림19> Measurement of relative intracellular GSH intensity using CellTracker Red in tetraploid embryos ^{a-c}Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Scale bar, 50 μm

- Glutathione은 자연계의 동물이나 효모 등 거의 모든 생체 세포 속에 들어있으며 생체 내의 산화환원 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 이를 이용하여 단일 생식배아를 이용하여 생산한 tetraploid embryo의 발달에 효과가 있는지 확인해 보고자 electrofusion 후 PZM-3에 GSH를 처리하여 fusion후 24, 48, 72, 96과 120시간에 분할률을 확인하였고 120시간에 배반포를 염색하여 cell number를 측정하였음. 그 결과, electrofusion 후 48과 72시간에서 tetraploid의 분할률에서는 유의적인 차이가 없었음. 그러나 96시간에서는 GSH 100uM을 처리한 group에서 배반포 형성률이 가장 낮게 나타남을 확인하였고 120시간에서는 GSH 500uM을 처리한 group에서 배반포 형성률이 가장 높음을 확인하였음. 하지만 배반포 염색을 진행하여 세포수를 측정한 결과 유의적인 차이는 확인하지 못하였음. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 GSH 500uM을 PZM-3에 첨가하여 배양한 결과 tetraploid embryo의 배반포 형성률에 기여하는 것을 확인하였음.

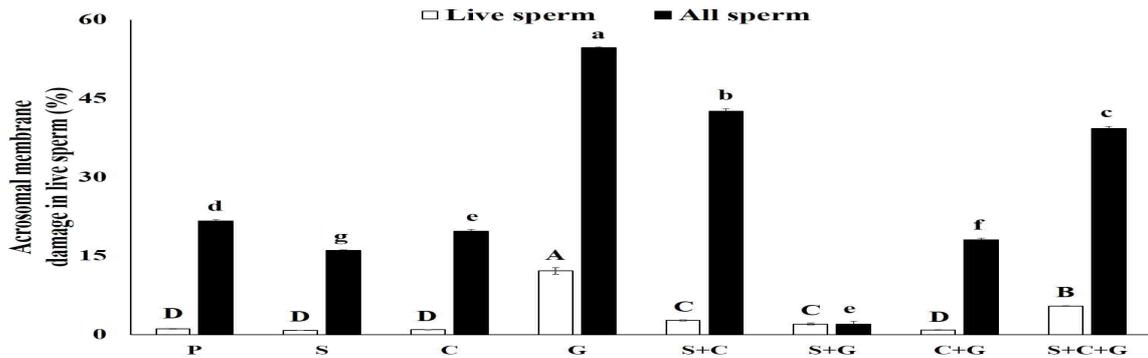
2. 활력 정자 분리를 통한 고품질 체외 수정용 정자 생산

- 활력 정자 분리를 통한 고품질 체외 수정용 정자를 생산하기 위하여 돼지 정액 동결과정에서 복합항산화제가 처리된 percoll을 이용한 활력 정자의 분리를 위한 실험을 진행하였음. [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군별로 나눠, Flow cytometry analysis을 사용하여 Viability를 분석하였고, 그 중에 live sperm과 dying sperm으로 분류하여 표현하였음. <그림20>은 각 처리군별 Viability를 live sperm과 dying sperm으로 분류하여 수치화하였음. live sperm에서는 [S]+[C] 그룹에서 유의적으로 높게 나타났으며 dying sperm에서도 [S]+[C] 그룹에서 유의적으로 낮게 나타남을 확인함. ($p < 0.05$).



<그림20> Viability after frozen-thawing of boar sperm separated by percoll with multi-complex antioxidant enzymes. Boar sperm was cryopreserved after separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G) ($p < 0.05$).

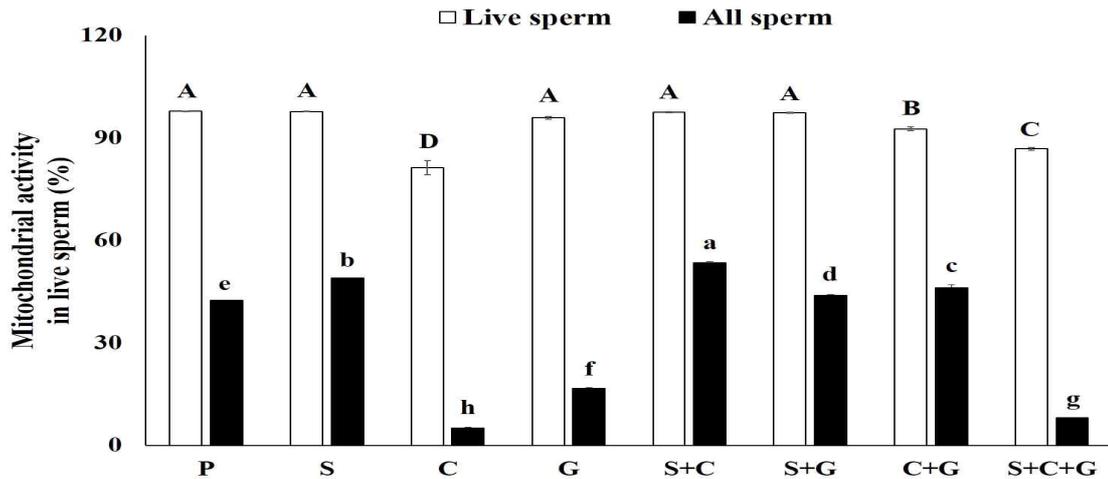
- 다음, 각각 [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군별로 나눠, Flow cytometry analysis을 사용하여 acrosomal membrane damage를 분석하였고, live sperm과 all sperm으로 분류하여 표현하였음. <그림21>은 acrosomal membrane damage을 live sperm과 all sperm으로 분류하여 수치화하였음. live sperm에서는 [P], [S], [C], [S]+[G] 및 [C]+[G]그룹에서 유의적으로 낮게 나타났으며 ($p < 0.05$) all sperm에서는 [S]+[G]그룹에서 유의적으로 낮게 나타남을 확인함. ($p < 0.05$). 결론적으로 [S]+[G]그룹에서 live sperm과 all sperm에서 유의적인 차이가 나타난 것을 확인 할 수 있었음.



<그림21> Acrosomal membrane damage after frozen-thawing of boar sperm separated by percoll with multi-complex antioxidant enzymes. Boar sperm was cryopreserved after separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G) ($p < 0.05$).

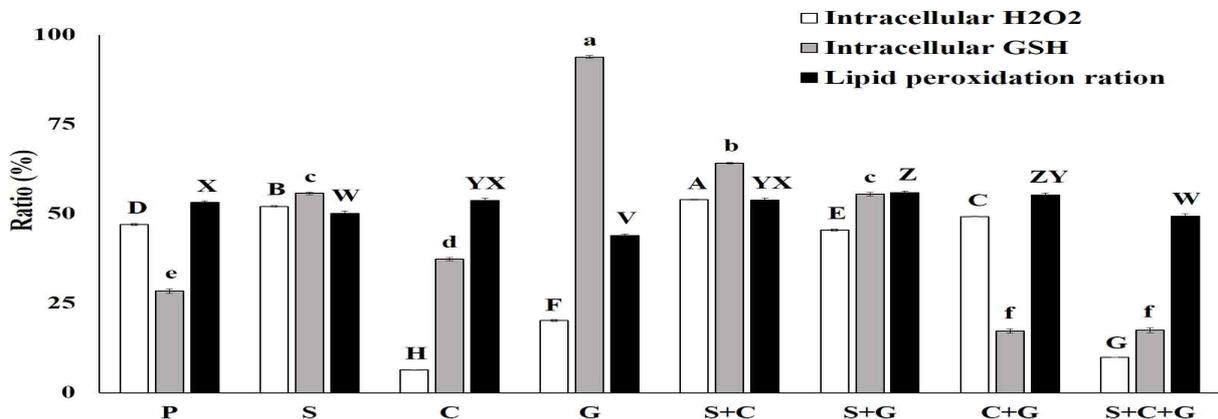
- 다음, [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군별로 Flow cytometry analyses을 사용하여 Mitochondrial activity를 분석하였고, 그중에 live sperm과 all sperm으로 분류하여 표현하였음. <그림22>는 mitochondrial activity in live sperm을 live sperm과 all sperm으로 분류하여 수치화하였음. live

sperm에서는 [P], [S], [G], [S]+[C] 및 [S]+[G] 그룹에서 유의적으로 높게 나타났으며 all sperm에서는 [S]+[C] 그룹에서 유의적으로 높게 나타난 것을 확인함. ($p < 0.05$). 결론적으로 [S]+[C] 그룹에서 live sperm과 all sperm에서 유의적인 차이가 나타난 것을 확인 할 수 있었음.



<그림22>. Mitochondrial activity after frozen-thawing of boar sperm separated by percoll with multi-complex antioxidant enzymes. Boar sperm was cryopreserved after separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G) ($p < 0.05$).

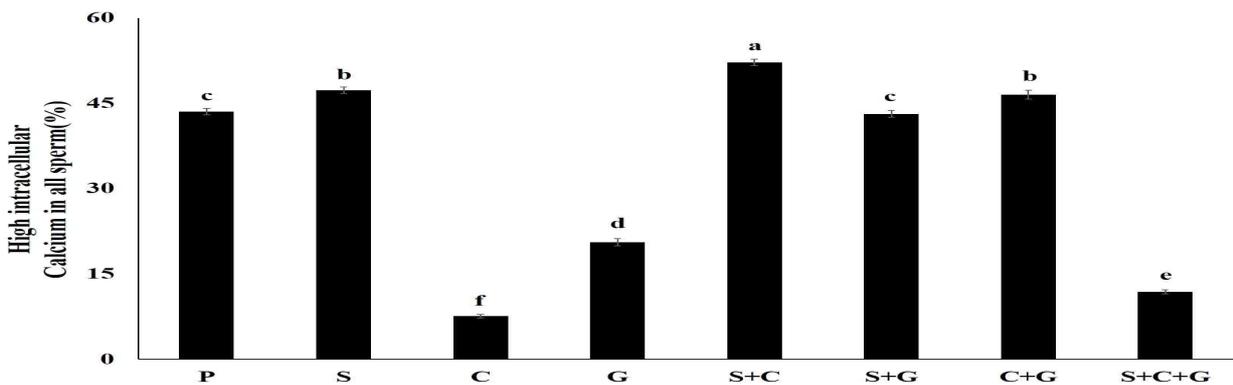
- 다음, [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군 별로 나눠, flow cytometry analyses을 사용하여 Ratio를 분석하였고, 그 중에 Intracellular H_2O_2 , intracellular GSH 및 lipid peroxidation 비율을 표현하였음. <그림 23>은 Intracellular H_2O_2 , intracellular GSH 및 lipid peroxidation ratio으로 분류하여 수치화하였음. Intracellular H_2O_2 에서는 [C]그룹에서 유의적으로 낮게 나타났으며 Intracellular GSH에서는 [G]그룹에서 유의적으로 높은 것을 확인함. ($p < 0.05$). 그리고 lipid peroxidation ration에서도 [G]그룹에서 유의적으로 낮게 나타냄 ($p < 0.05$).



<그림23> Intracellular H_2O_2 , GSH and Lipid peroxidation ratio after frozen-thawing of boar sperm

separated by percoll with multi-complex antioxidant enzymes. Boar sperm was cryopreserved after separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G) ($p<0.05$).

- 다음 [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군 별로 flow cytometry analyses을 사용하여 high intracellular calcium in all sperm를 분석하였음. <그림24>에서 나타낸 바와 같이 high intracellular calcium in all sperm을 수치화하였으며, intracellular calcium에서는 [C]그룹에서 유의적으로 낮게 나타남 ($p<0.05$).



<그림24> High intracellular calcium after frozen-thawing of boar sperm separated by percoll with multi-complex antioxidant enzymes. Boar sperm was cryopreserved after unseparated by separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G). Similarly shaded bars with different letters are significantly different within histograms ($p<0.05$).

- 다음, [P], [S], [C], [G], [S]+[C], [S]+[G], [C]+[G] 및 [S]+[C]+[G]를 처리군 별로 나눠, flow cytometry analysis을 사용하여 acrosome reaction 및 abnormality를 분석하였음. <표11>에서 나타낸 바와 같이 acrosome reaction과 abnormality를 수치화하였음. 그 결과, acrosome reaction에서는 [C]+[G]그룹에서 가장 낮게 나타났으며, abnormality는 [C], [S]+[C]+[G]를 제외한 모든 그룹에서 유의적으로 낮게 나타난 것을 확인함. ($p<0.05$).

<표11> Characteristics of pig spermatozoa in cryopreserved after unseparated by separated by percoll without antioxidant enzymes (P), with 300 IU superoxide dismutase (S) and/or 400 IU catalase (C) and/or 1mM glutathione (G).

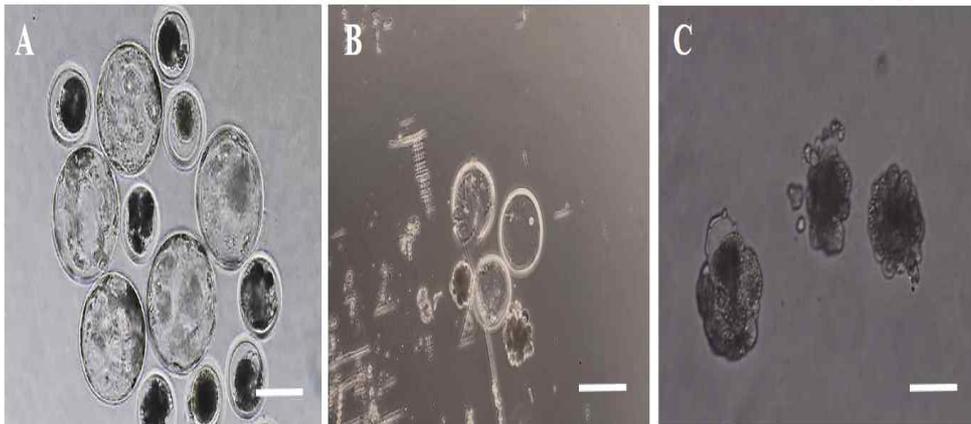
Treatments	Analysis of spermatozoa frozen-thawed (%)	
	Acrosome reaction	Abnormality
[P]	9.67±0.88 ^c	0.00±0.00 ^b
[S]	5.67±0.33 ^{cd}	0.00±0.00 ^b
[C]	45.00±2.89 ^a	0.67±0.33 ^a
[G]	3.33±0.33 ^d	0.00±0.00 ^b
[S]+[C]	5.67±0.33 ^{cd}	0.00±0.00 ^b
[C]+[G]	6.00±0.58 ^{cd}	0.00±0.00 ^b
[S]+[G]	2.67±0.33 ^d	0.00±0.00 ^b
[S]+[C]+[G]	14.67±1.67 ^b	0.33±0.33 ^{ab}

^{a-d}Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

- 본 실험에서는 돼지 정액 동결과정에서 Superoxide dismutase, Catalase 및 Glutathione 이 복합처리된 Percoll을 이용하였음. 그 결과, 항산화제를 첨가하지 않은 percoll 처리군 보다 항산화제를 첨가한 percoll 처리군에서 보다 많은 고품질 정자를 생산할 수 있었음. 생존율에서는 $[S]+[C] > [S] > [C]+[G]$ 순으로 유의적으로 높게 나왔으며, 살아있는 정자의 mitochondrial activity에서는 $[P] > [S] > [C]+[G]$ 순으로 유의적으로 높게 나타남을 확인함. 또 lipid peroxidation ratio에서는 $[G] > [S]+[C]+[G], [S] > [C]$ 순으로 유의적으로 낮게 나타났으며, acrosome integrity에서는 $[S] > [C]+[G] > [C]$ 순으로 유의적으로 높게 나타냄. ($p<0.05$).

3. 착상 전 배아로부터 ICM 분리 기법 개발

- 체외 수정란의 투명대를 제거하기 위한 방법으로 tyrode' s solution을 이용한 화학적인 기법과 insulin syringe를 이용한 물리적인 기법을 각각 사용하여 배반포 부착과 콜로니 형성유무를 비교하였음 <그림25>. 그 결과, <표12>에서 나타낸 바와 같이 배반포가 지지세포에 부착되는 값은 두 처리군에서 차이가 없었지만 colony 형성율에서는 유의적으로 물리적인 방법을 이용한 처리군에서 더 높은 값이 나타남을 확인함 ($p<0.05$).



<그림25>. Morphology of expansion blastocyst on day 7 after *in vitro* fertilization. (A) : Zona-pellucida (ZP) blastocyst, (b):Make an incision to remove a zona pellucida by insulin syringe, (C):Thinned zona-pellucida blastocyst by tyrode solution. Scale bar, 200 μ m

<표12> Effects of zona-pellucida removal different methods on attachment of *in vitro* fertilization-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from *in vitro* fertilization-derived blastocysts in DMEM-based medium^a.

Type of methods	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
Chemical method ^b	56	16 (28.6)	0 (0.0)
Mechanical method ^c	64	19 (29.7)	7 (10.9) ^e

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.8944 and 0.0105 in the number of blastocysts attached to feeder cells and forming colonies, respectively. Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in DMEM/Ham's F-12-based medium.

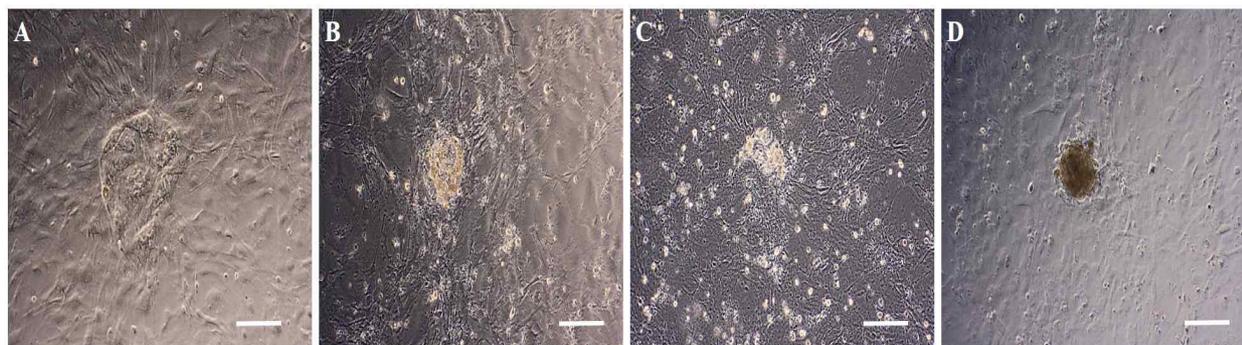
DMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml basic FGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

^eDifferent superscripts within the same column are significantly different, *p*<0.05.

4. ICM 유래 콜로니 초대배양

- . 체외 수정 유래 배반포를 이용하여 ICM 유래 콜로니의 초대배양을 위해 4가지의 배양액을 사용하여 배반포 부착과 콜로니 형성유무를 비교하였음. 배양액을 달리하여 MEF 지지세포에 배양 후 4일 쯤의 모습으로 α -MEM-based medium-1 처리군에서만 colony 형태를 띄었으며, 유의적으로 높은 colony 형성율을 보였음<그림26 과 표13>.



<그림26> Morphology of culture medium supporting formation of colonies from mechanically zona pellucida (ZP)-free blastocyst at day 4. (A): α -MEM-based medium -1, (B) : α -MEM-based medium -2, (C) : DMEM / Ham's F-10-based medium, (D) : DMEM / Ham's F-12-based medium. Scale bar, 200 μ m

<표13> Attachment of *in vitro* fertilization-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from *in vitro* fertilization-derived blastocysts in different culture medium.

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^e of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
α-MEM- based medium -1 ^a	65	53 (82) ^f	32 (49) ⁱ
α-MEM- based medium -2 ^b	50	25 (50) ^g	2 (4) ^j
DMEM / Ham's F-10-based medium ^c	49	17 (35) ^h	2 (4) ^j
DMEM / Ham's F-12-based medium ^d	47	12 (26) ^h	1 (2) ^j

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α-MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aα-MEM-based medium-1 consist of α-MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β-mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 20ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bα-MEM-based medium consist-2 of α-MEM medium supplemented with 20% (v/v) FBS, 0.05mM β-mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 20ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^cDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β-mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

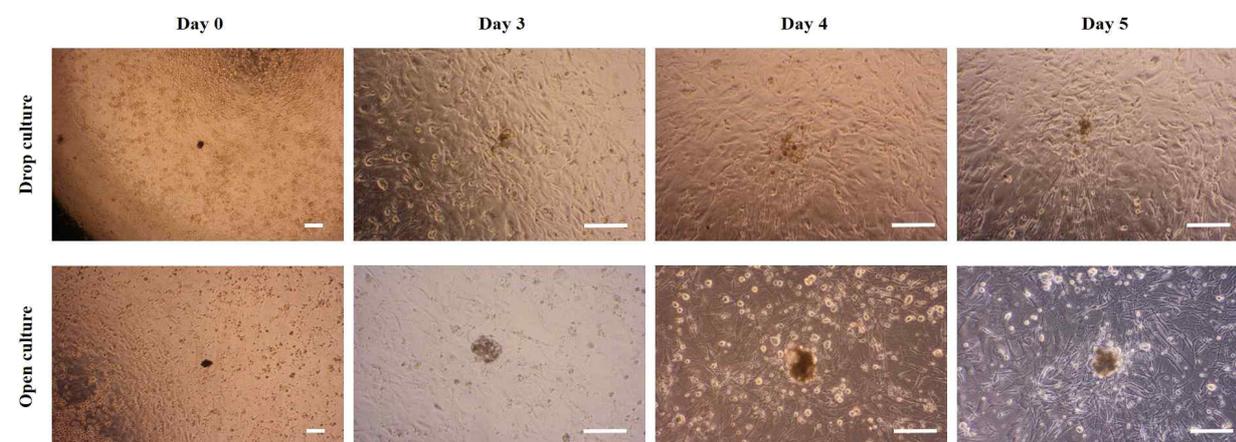
^dDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.1mM β-mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^ePercentage of the number of seeded blastocysts

^{f-j}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.001$.

5. 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발

- 체외 수정란으로부터 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포 주화를 위해 배양방법을 달리하여 배반포 부착과 콜로니 형성유무를 비교하였음. Drop culture는 체외수정 시에 사용하는 방법을 응용하였으며, open culture는 일반적인 줄기세포 배양법으로 비교하였음. Drop culture와 open culture에서 모두 3일째까지는 지지세포에 부착하였으나 open culture에서만 colony 형태를 유지하여 배양되었음 <그림27>. <표14>에서 와 같이 두 그룹간의 부착율은 유의적인 차이가 없었지만 colony 형성율에서는 유의적으로 open culture에서 더 높은 결과를 보였음 ($p < 0.05$).



<그림27> Morphology of culture method supporting formation of colonies from mechanically zona pellucida (ZP)-free blastocyst. Scale bar, 200 μ m

<표14> Optimization of culture method supporting formation of colonies from mechanically zona pellucida (ZP)-free *in vitro*-derived blastocyst.

Type of culture method	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^a of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
Drop culture	41	23 (56)	8 (19) ^b
Open culture	46	30 (65)	19 (41) ^c

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.39 and 0.0284 in the number of blastocysts attached to feeder cells and forming colonies, respectively.

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM-based medium.

^aPercentage of the number of seeded blastocysts

^{b,c}Different superscripts within the same column are significantly different, *p*<0.05.

- 저농도 basic FGF (2ng/ml)를 처리하여 체내 수정란 유래 돼지배아줄기-유사 세포를 확립하기 위한 초대 배양 기법으로 배양액의 종류와 지지세포의 수를 달리하여 colony 형성율과 성장률을 확인하였음 <표15>.

<표15> Optimization of culture condition supporting formation and outgrowth of colonies derived from *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration of bFGF

Culture conditions at Passage 0		No. of blastocysts seeded	No. (%) ^c of formed colonies	No. (%) ^d of outgrowing colonies
Type of medium	No. of feeder cells			
α -MEM-based medium ^a	2.5×10^5	4	3 (75)	1 (33) ^e
α -MEM-based medium	5.0×10^5	40	21 (53)	19 (90) ^f
DMEM/Ham's F10-based medium ^b	1.2×10^5	3	0 (0)	0 (0)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.1356 and 0.0114 in the number of formed and outgrowing colonies, respectively.

Blastocysts were cultured for 4 days under a variety of culture conditions derived from combination of different numbers of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts and different type of culture media.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution, 4 ng/mL EGF, 10 μ /mL ITS, 1,000 U/mL mLIF and 2 ng/mL bFGF.

^bDMEM/Ham' s F-10-based medium consist of DMEM / Ham' s F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic and 2 ng/mL bFGF.

^cPercentage of the number of blastocysts seeded

^dPercentage of the number of formed colonies

^{e,f}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.05$.

- . 초대배양 시의 배양액의 종류와 지지세포의 수를 달리한 결과 colony 형성은 세 처리군에서 유의적인 차이가 없었지만, colony 성장에서는 α -MEM-based medium에 5.0×10^5 지지세포 수에서 유의적으로 높은 값을 보였음 ($p < 0.05$).

6. 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발

- . 저농도 basic FGF를 처리하여 돼지배아줄기-유사 세포를 유지하기 위한 세포 주화 배양기법으로 배양액의 종류와 지지세포의 수를 달리하여 coloy 형성율과 성장률을 확인하였음 <표16,17>.

<표16> Determination of culture condition supporting formation and outgrowth of colonies after primary culture of *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration of bFGF

Culture conditions at				No. of blastocysts maintained by Passage 0 and subpassaged to Passage 1	No. (%) ^c of blastocysts forming colonies	No. (%) ^d of blastocysts showing outgrowth of colonies
Passage 0		Passage 1				
Type of medium	No. of feeder cells	Type of medium	No. of feeder cells			
α -MEM-based medium ^a	5.0×10^5	α -MEM-based medium	5.0×10^5	5	4 (80)	2 (50)
α -MEM-based medium	5.0×10^5	Mixture medium ^b	2.5×10^5	14	14 (100)	12 (85)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the p value, were 0.0947 and 0.1457 in the number of blastocysts forming colonies and showing outgrowth of colonies, respectively.

In-vivo porcine blastocysts-derived inner cell mass cultured for 4 days on 5.0×10^5 mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts in the α -MEM-based medium were mechanically dissociated into several pieces. Subsequently, these clumps were cultured for 4 days under a variety of culture conditions derived from combination of different numbers of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts and different type of culture media.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution, 4 ng/mL EGF, 10 μ /mL ITS, 1,000 U/mL mLIF and 2 ng/mL bFGF.

^bMixture medium consist of 50:50 mixture of α -MEM-based medium and DMEM/Ham' s F-10-based medium consisting of DMEM / Ham' s F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic and 2 ng/mL bFGF.

^cPercentage of the number of blastocysts maintained by Passage 0 and subpassaged to Passage 1.

^dPercentage of the number of blastocysts forming colonies.

- . 초대 배양 후 계대 과정을 거쳐 passage 1에서는 각각의 처리군 간의 수치적인 유의차는 없었지만, Mixture medium에 2.5×10^5 지지세포 수에서 형성된 colony의 형태가

가장 좋았으며, 유지된 배양 일수 또한 오랜 기간 지속 되었음.

<표 17> Optimization of culture condition supporting formation and outgrowth of colonies and establishment of porcine embryonic stem (ES) - like cell lines post-2nd subpassage in the reduced concentration of bFGF

Culture conditions at						No. of blastocysts maintained by Passage 1 and subpassaged to Passage 2	No. (%) ^d of blastocysts forming colonies	No. (%) ^e of blastocysts showing outgrowth of colonies	No. (%) ^f of lines over Passage 10
Passage 0		Passage 1		Passage 2					
Type of medium	No. of feeder cells	Type of medium	No. of feeder cells	Type of medium	No. of feeder cells				
α -MEM-based medium ^a	5.0×10^5	α -MEM-based medium	5.0×10^5	α -MEM-based medium	5.0×10^5	2	2 (100)	2 (100)	0 (0)
α -MEM-based medium	5.0×10^5	Mixture medium ^c	2.5×10^5	DMEM/Ham's F10-based medium ^b	2.5×10^5	12	10 (83)	10 (100)	4 (40)

Model effects of treatments in each parameter, which is indicated as the *p* value, were 0.5690, 1.0000 and 0.3166 in the number of blastocysts forming colonies and showing outgrowth of colonies, and lines over Passage 10, respectively.

In-vivo porcine blastocysts-derived inner cell mass cultured by Passage 1 in the each culture condition were mechanically dissociated into several pieces. Subsequently, these clumps were cultured for 4 days under a variety of culture conditions derived from combination of different numbers of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts and different type of culture media.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution, 4 ng/mL EGF, 10 μ /mL ITS, 1,000 U/mL mLIF and 2 ng/mL bFGF.

^b DMEM/Ham' s F-10-based medium consist of DMEM / Ham' s F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2 mM β -mercaptoethanol, 1% (v/v) NEAA, 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution and 2 ng/mL bFGF.

^c Mixture medium consist of 50:50 mixture of α -MEM-based medium and DMEM/Ham' s F-10-based medium.

^d Percentage of the number of blastocysts maintained by Passage 1 and subpassaged to Passage 2.

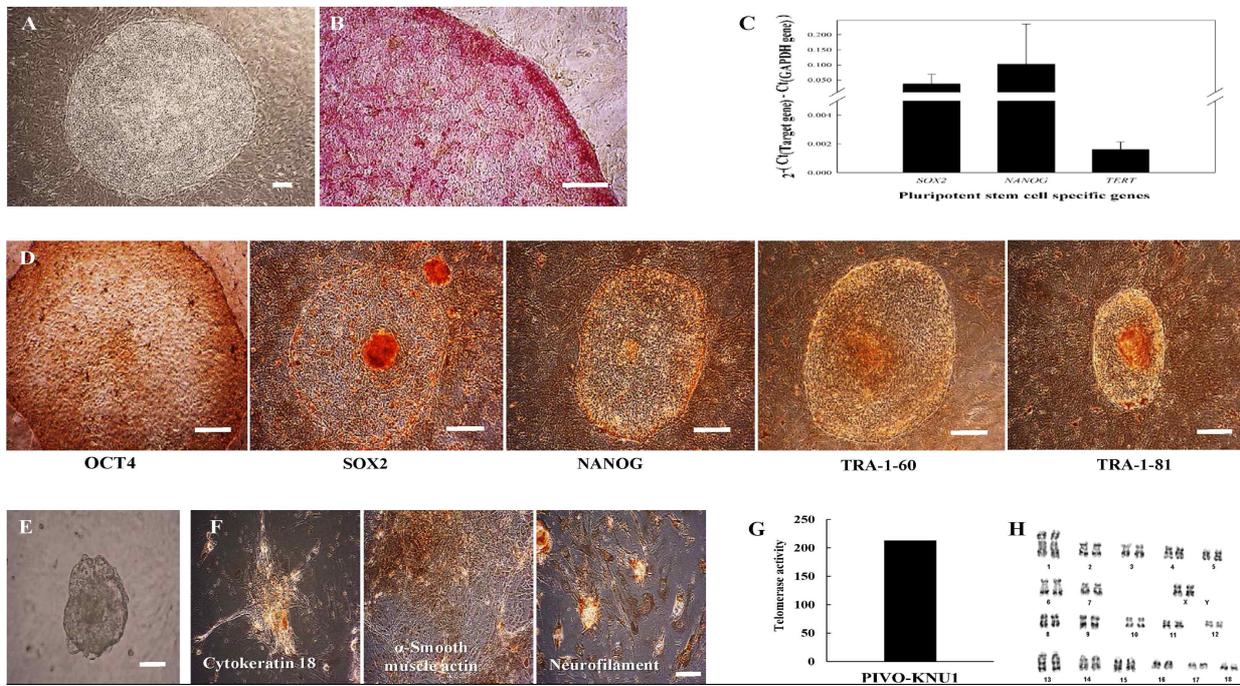
^e Percentage of the number of blastocysts forming colonies.

^f Percentage of the number of blastocysts showing outgrowth of colonies.

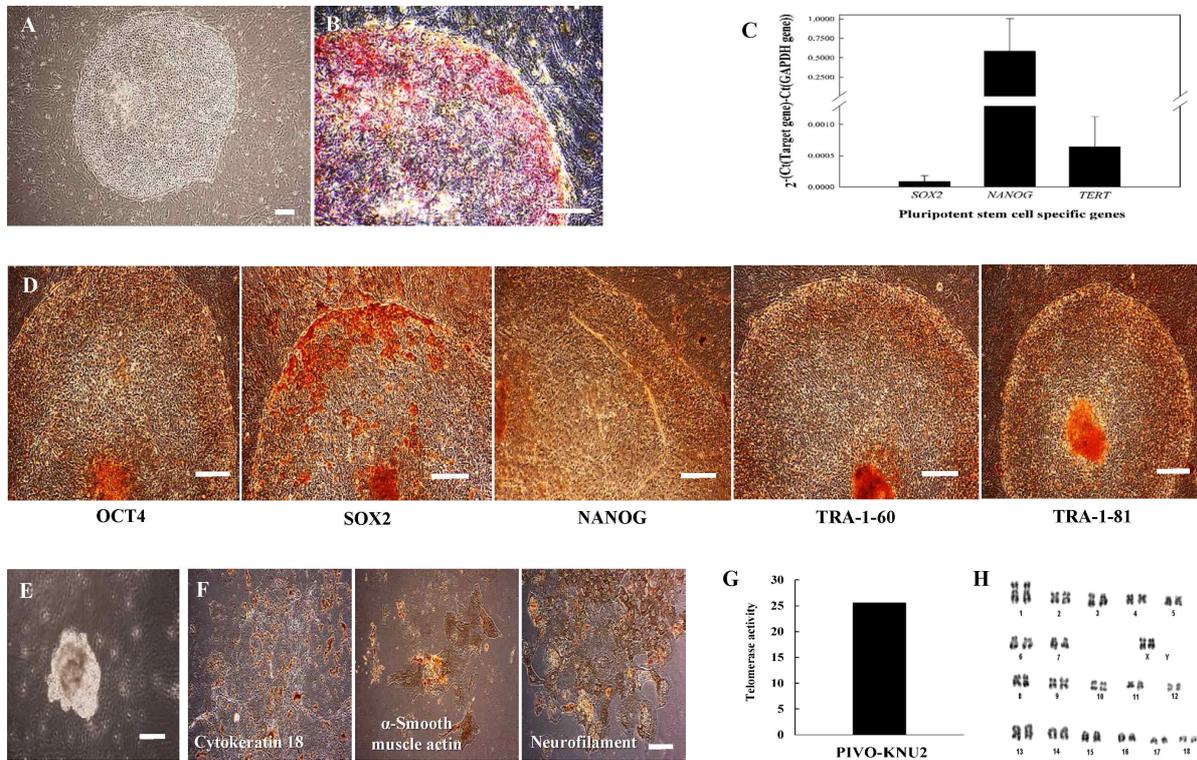
- 생산된 돼지 배아줄기-유사 세포를 여러 번의 계대과정을 통해 장기간 배양한 결과, DMEM/Ham' s F-10-based medium에 2.5×10^5 지지세포 수에서 4개의 돼지 배아 줄기-유사 세포주를 확립하였음.

7. 생산된 돼지 배아줄기세포의 특성 규명

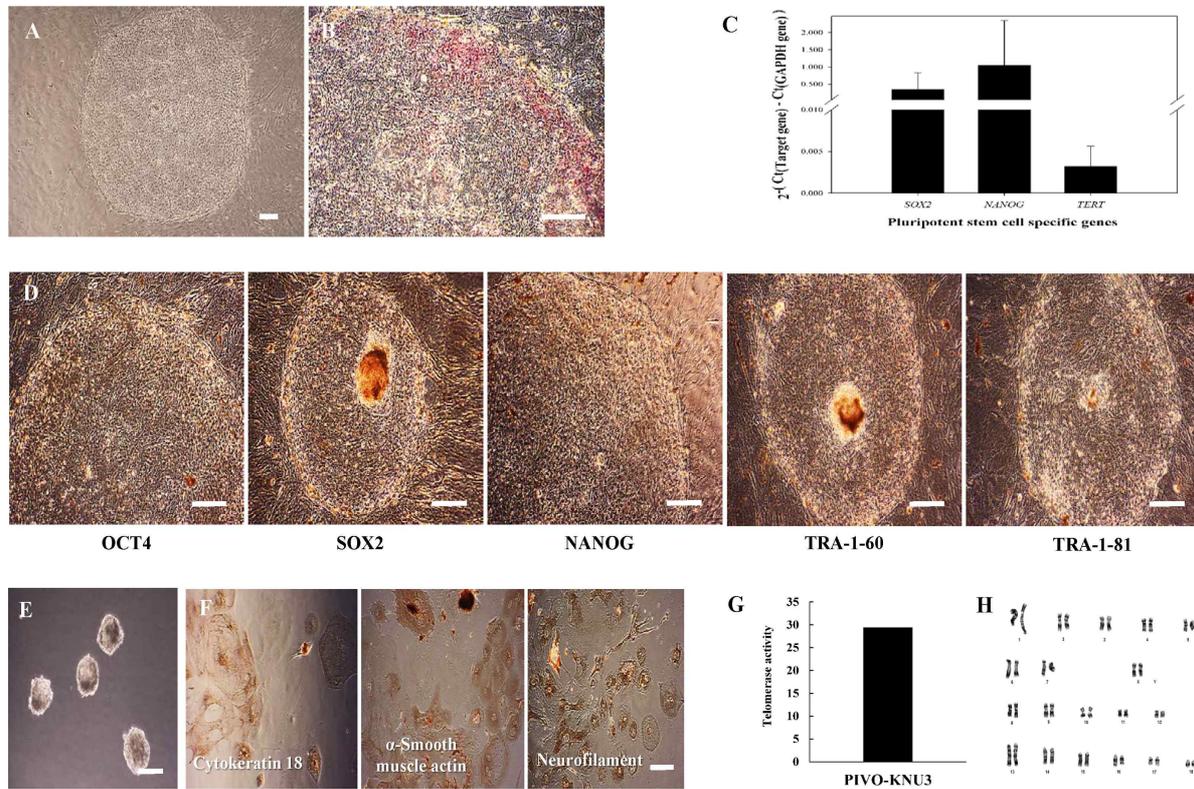
- 저농도 basic FGF를 이용하여 확립된 돼지 배아줄기-유사 세포 주의 특성을 규명하였 음. 확립된 돼지 배아줄기세포는 4개 라인으로 각각 PIVO-KNU1, PIVO-KNU2, PIVO-KNU3 및 PIVO-KNU4로 명시하였음 <그림 28~31, 표 18>.



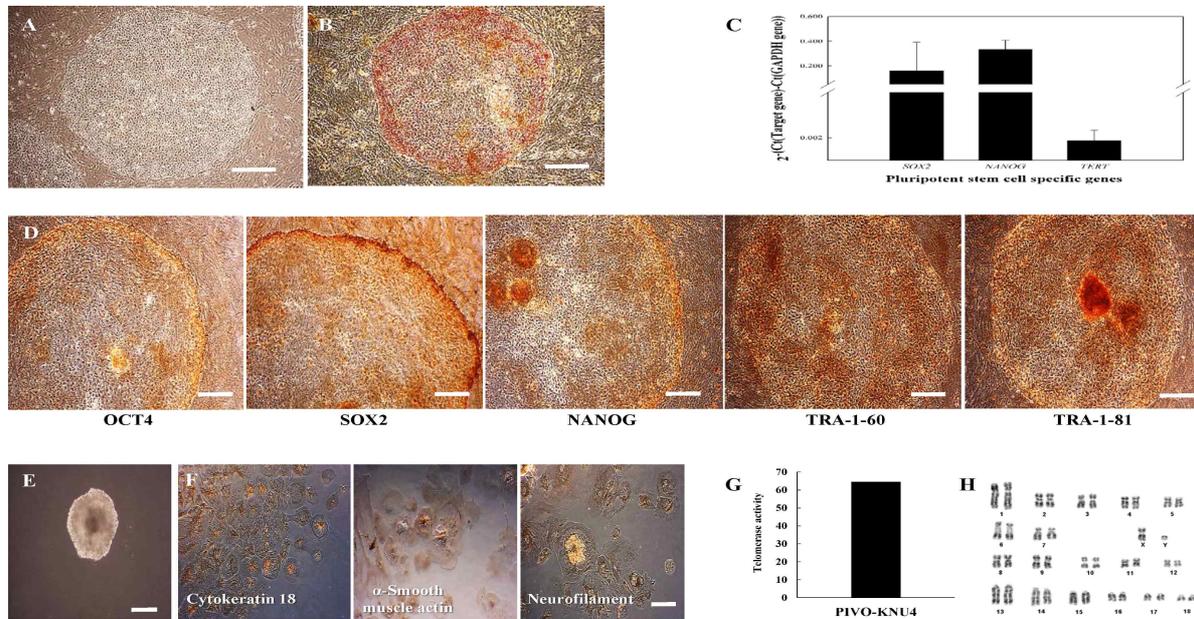
<그림28> Characterization of embryonic stem (ES)-like cells established from *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration (2ng/ml) of bFGF. From Passage 2 on, the porcine ES-like cells (PIVO-KNU-1) were cultured on 2.5×10^5 mitotically inactivated MEFs in the DMEM/Ham's F-10-based medium and subpassaged every 4 day. Moreover, characterization of the established porcine ES-like cells was conducted at Passage between 11 and 19. **(A)** Colony morphology. Well-defined boundary and flattened colonies. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(B)** Alkaline phosphatase (AP) activity. The established porcine ES-like cells were stained positively by AP staining. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(C)** Transcriptional expression of pluripotent markers. Transcripts of pluripotent marker genes, *SOX2*, *NANOG* and *TERT*, were detected in the established porcine ES-like cells. **(D)** Translational expression of pluripotent stem cell markers. Immunocytochemistry of the established porcine ES-like cells was conducted using pluripotent stem cell-specific markers: OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 and TRA-1-81, and cells were positively stained with one of these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(E)** Embryonic body (EB) formation. The porcine ES-like cells were cultured for 4 days in bFGF and mLIF-free medium allowing differentiation into EBs, and EBs with spherical morphology were observed. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(F)** *In-vitro* differentiation into three germ lineages. Spontaneous differentiation of EBs was conducted by culturing for 14 days in bFGF and mLIF-free medium, and the differentiated cells were investigated through immunocytochemical staining with antibodies specific for three germ lineages: Cytokeratin 18 (endoderm), α -Smooth muscle actin (mesoderm) and Neurofilament (ectoderm). Cells comprising the EBs were positive for these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(G)** Telomerase activity. The established porcine ES-like cells showed normally telomerase activity. **(H)** Karyotyping. The established porcine ES-like cells had a normal diploid female karyotype of 38, XX.



<그림29> Characterization of embryonic stem (ES) -like cells established from *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration (2ng/ml) of bFGF. From Passage 2 on, the porcine ES-like cells (PIVO-KNU-2) were cultured on 2.5×10^5 mitotically inactivated MEFs in the DMEM/Ham's F-10-based medium and subpassaged every 4 day. Moreover, characterization of the established porcine ES-like cells was conducted at Passage between 11 and 19. (A) Colony morphology. Well-defined boundary and flattened colonies. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. (B) Alkaline phosphatase (AP) activity. The established porcine ES-like cells were stained positively by AP staining. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. (C) Transcriptional expression of pluripotent markers. Transcripts of pluripotent marker genes, *SOX2*, *NANOG* and *TERT*, were detected in the established porcine ES-like cells. (D) Translational expression of pluripotent stem cell markers. Immunocytochemistry of the established porcine ES-like cells was conducted using pluripotent stem cell-specific markers: OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 and TRA-1-81, and cells were positively stained with one of these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. (E) Embryonic body (EB) formation. The porcine ES-like cells were cultured for 4 days in bFGF and mLIF-free medium allowing differentiation into EBs, and EBs with spherical morphology were observed. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. (F) *In-vitro* differentiation into three germ lineages. Spontaneous differentiation of EBs was conducted by culturing for 14 days in bFGF and mLIF-free medium, and the differentiated cells were investigated through immunocytochemical staining with antibodies specific for three germ lineages: Cytokeratin 18 (endoderm), α -Smooth muscle actin (mesoderm) and Neurofilament (ectoderm). Cells comprising the EBs were positive for these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. (G) Telomerase activity. The established porcine ES-like cells showed normally telomerase activity. (H) Karyotyping. The established porcine ES-like cells had a normal diploid female karyotype of 38, XX.



<그림30> Characterization of embryonic stem (ES)-like cells established from *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration (2ng/ml) of bFGF. From Passage 2 on, the porcine ES-like cells (PIVO-KNU-3) were cultured on 2.5×10^5 mitotically inactivated MEFs in the DMEM/Ham's F-10-based medium and subpassaged every 4 day. Moreover, characterization of the established porcine ES-like cells was conducted at Passage between 11 and 19. **(A)** Colony morphology. Well-defined boundary and flattened colonies. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(B)** Alkaline phosphatase (AP) activity. The established porcine ES-like cells were stained positively by AP staining. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(C)** Transcriptional expression of pluripotent markers. Transcripts of pluripotent marker genes, *SOX2*, *NANOG* and *TERT*, were detected in the established porcine ES-like cells. **(D)** Translational expression of pluripotent stem cell markers. Immunocytochemistry of the established porcine ES-like cells was conducted using pluripotent stem cell-specific markers: OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 and TRA-1-81, and cells were positively stained with one of these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(E)** Embryonic body (EB) formation. The porcine ES-like cells were cultured for 4 days in bFGF and mLIF-free medium allowing differentiation into EBs, and EBs with spherical morphology were observed. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(F)** *In-vitro* differentiation into three germ lineages. Spontaneous differentiation of EBs was conducted by culturing for 14 days in bFGF and mLIF-free medium, and the differentiated cells were investigated through immunocytochemical staining with antibodies specific for three germ lineages: Cytokeratin 18 (endoderm), α -Smooth muscle actin (mesoderm) and Neurofilament (ectoderm). Cells comprising the EBs were positive for these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(G)** Telomerase activity. The established porcine ES-like cells showed normally telomerase activity. **(H)** Karyotyping. The established porcine ES-like cells had a normal diploid female karyotype of 38, XX.



<그림31> Characterization of embryonic stem (ES)-like cells established from *in-vivo* porcine blastocysts in the reduced concentration (2ng/ml) of bFGF. From Passage 2 on, the porcine ES-like cells (PIVO-KNU-4) were cultured on 2.5×10^5 mitotically inactivated MEFs in the DMEM/Ham's F-10-based medium and subpassaged every 4 day. Moreover, characterization of the established porcine ES-like cells was conducted at Passage between 11 and 19. **(A)** Colony morphology. Well-defined boundary and flattened colonies. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(B)** Alkaline phosphatase (AP) activity. The established porcine ES-like cells were stained positively by AP staining. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(C)** Transcriptional expression of pluripotent markers. Transcripts of pluripotent marker genes, *SOX2*, *NANOG* and *TERT*, were detected in the established porcine ES-like cells. **(D)** Translational expression of pluripotent stem cell markers. Immunocytochemistry of the established porcine ES-like cells was conducted using pluripotent stem cell-specific markers: OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 and TRA-1-81, and cells were positively stained with one of these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(E)** Embryonic body (EB) formation. The porcine ES-like cells were cultured for 4 days in bFGF and mLIF-free medium allowing differentiation into EBs, and EBs with spherical morphology were observed. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(F)** *In-vitro* differentiation into three germ lineages. Spontaneous differentiation of EBs was conducted by culturing for 14 days in bFGF and mLIF-free medium, and the differentiated cells were investigated through immunocytochemical staining with antibodies specific for three germ lineages: Cytokeratin 18 (endoderm), α -Smooth muscle actin (mesoderm) and Neurofilament (ectoderm). Cells comprising the EBs were positive for these markers. Scale bar, $200 \mu\text{m}$. **(G)** Telomerase activity. The established porcine ES-like cells showed normally telomerase activity. **(H)** Karyotyping. The established porcine ES-like cells had a normal diploid male karyotype of 38, XY.

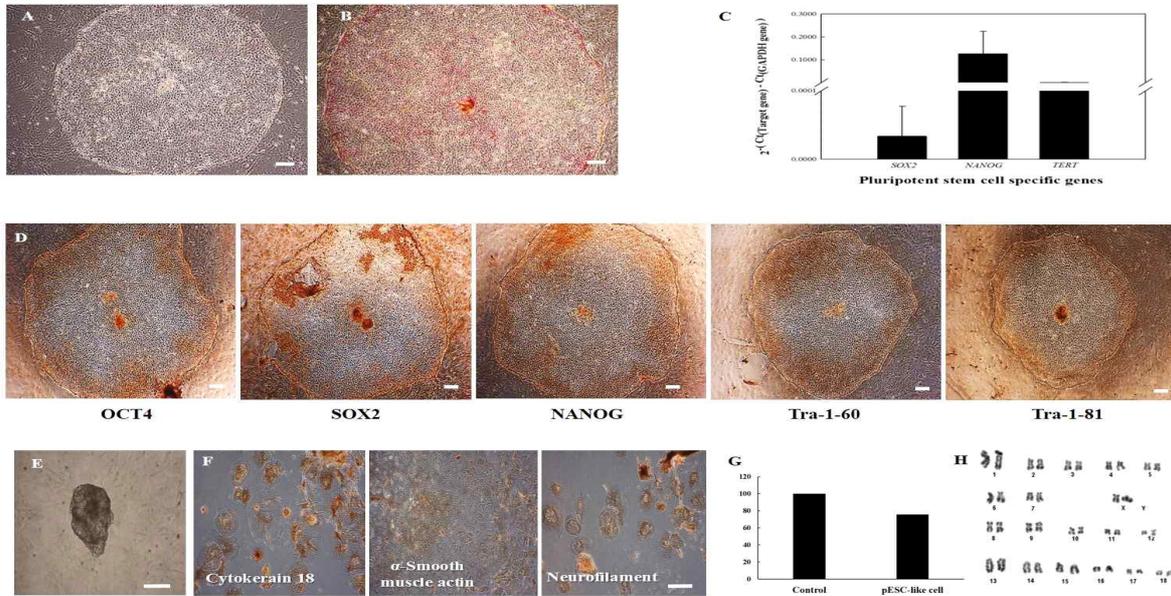
<표 18> Characterization of porcine embryonic stem (ES) – like cell lines established in the reduced concentration of bFGF.

The established ES-like cell lines	AP activity	Pluripotent stem cell-specific genes expression			Pluripotent stem cell-specific proteins expression					Telomerase activity	Embryoid body formation	Differentiation into three germ lineages			Karyotype	Passages number*	Remarks
		SOX2	NANOG	TERT	OCT4	SOX2	NANOG	TRA-1-60	TRA-1-81			Endoderm	Mesoderm	Ectoderm			
PIVO-KNU-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	38, XX	>20	Fig. 12.
PIVO-KNU-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	38, XX	>20	Fig. 13.
PIVO-KNU-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	38, XX	>20	Fig. 14.
PIVO-KNU-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	38, XY	>20	Fig. 15.

AP = Alkaline phosphatase; + = Positive response indicated, - = Negative response indicated; *Derived cell lines could be maintained over the passage.

-. Basic fibroblast growth factor (bFGF)는 돼지의 배아 줄기-유사 세포의 자가 재생 및 다능성의 유지를 지원하는 필수적인 요소이지만 체내 배반포를 낮은 농도의 bFGF (2ng/ml)를 사용하여 서로 다른 배양 배지와 피더 세포의 수를 다양하게 배양 하였음. 설립된 돼지 배아줄기-유사 세포는 이후 passage 10이상에서 특징을 확인하였음. 결과를 바탕으로, 체내 유래 돼지 배반포를 5.0×10^5 MEF 지지세포 위에서 α -MEM -based 배지를 이용하여 초대배양 하였으며, passage 1에서는 2.5×10^5 MEF지지세포와 DMEM-Ham' s F-10 based 배지와 α -MEM -based 배지를 50:50으로 만든 mixture 배지에서 돼지 배아줄기-유사 세포가 유지되는 것을 확인함. 그리고 passage 2 이후부터는 DMEM-Ham' s F-10 based 배지와 2.5×10^5 MEF지지세포에서 돼지 배아 줄기-유사 세포의 구축 및 유지를 지지할 수 있었음. 확립된 돼지 배아줄기-유사 세포는 alkaline phosphatase 활성, 다능성 줄기 세포와 분화 마커, telomerase 활성, 배아체 형성, *in vitro* 분화 및 염색체 정상 발현을 보았음. 이러한 결과를 기초로 하여, 본 연구는 생체 내 돼지 유래의 배반포를 이용하여 bFGF의 낮은 농도에서도 돼지 배아 줄기-유사 세포가 생성 될 수 있음을 확인 하였음.

-. 앞선 연구에서 확립된 배양 방법을 이용하고, 처리된 basic FGF는 20ng/ml의 농도를 처리하여 돼지 배아줄기세포 주 1개 라인을 확립하여 특성을 규명하였음 <그림 32>



<그림32> Characterization of long-term cultured porcine embryonic stem cells (ESCs) in the normal concentration (20ng/ml) of bFGF. Moreover, characterization of the established porcine ES-like cells was conducted at Passage between 11 and 19. Colony morphology. Well-defined boundary and flattened colonies (A). Alkaline phosphatase (AP) activity (B). Transcriptional expression of pluripotent markers (C). Translational expression of pluripotent stem cell markers (D). Embryonic body (EB) formation (E). *In-vitro* differentiation into three germ lineages (F). Telomerase activity (G). Karyotyping had a normal diploid female karyotype of 38 XX (H). Scale bar, 200 μ m.

[3차년도]

1. 고품질의 돼지 체세포 핵이식 유래 배반포 배아의 생산

- 61.6mM NaCl을 함유하는 PZM-3에서 돼지 미성숙 난자가 성숙되는 동안 glucose (5.56mM) 와 pyruvate (0.91mM)를 단일 및 병용 처리하였을 경우 체외성숙 유도 후 변성난자, 성숙난자의 비율, 그리고 단위발생 유도를 통하여 활성화된 배아의 체외 발육능을 평가하였음 <표19>.
- 본 실험의 결과 돼지 미성숙 난자가 체외성숙 되는 동안 glucose 또는 pyruvate를 단일 첨가시 무처리군에 비해 체외성숙 동안 변성이 되는 난자의 비율을 유의적으로 감소시켰으며 또한 성숙난자 및 체외 발육 능력이 증가됨을 확인할 수 있었음. 한편 glucose 와 pyruvate를 병용하여 첨가 하였을 경우, 단일 처리 및 무처리 군들에 비해 유의적으로 높은 핵 성숙률을 보였으며 배반포 형성률 또한 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음 ($p < 0.05$).

<표19> Effect of glucose and/or pyruvate in a chemically defined maturation medium containing 61.6 mM NaCl on embryonic development after parthenogenetic activation (PA)

IVM medium ^a with		No. of oocytes cultured	% of oocytes degenerated after IVM	% of oocytes reached MII	No. of PA oocytes cultured	% of oocytes developed to		No. of cells in blastocyst
Glucose	Pyruvate					≥ 2-cell	Blastocyst	
No	No	218	73.9 ± 9.5 ^b	40.8 ± 6.5 ^c	23	78.5 ± 8.0 ^a	2.1 ± 2.1 ^a	21.0 ± 0.0
Yes	No	123	9.8 ± 1.6 ^a	59.7 ± 3.7 ^b	61	86.6 ± 3.8 ^{ab}	24.3 ± 3.8 ^b	30.4 ± 1.2
No	Yes	125	7.2 ± 4.3 ^a	62.2 ± 5.2 ^b	69	82.3 ± 2.9 ^a	31.9 ± 2.3 ^b	31.7 ± 2.0
Yes	Yes	124	4.8 ± 2.9 ^a	77.2 ± 1.8 ^a	82	96.1 ± 2.5 ^b	47.8 ± 2.5 ^c	32.5 ± 1.6

^a Bovine serum albumin-free porcine zygote medium-3 containing 61.6 mM NaCl and 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol was used as the base medium for oocyte maturation.

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

*Three replicates.

- 108 mM 과 61.6 mM NaCl을 함유한 PZM-3 배양액에서 돼지 미성숙 난자가 체외성숙 되는 동안 glucose 첨가가 체외성숙 유도 후 난자의 성숙과 성숙 난자내의 GSH 함량에 미치는 영향을 평가하였음 <표20>.
- 체외성숙이 유도된 각 실험군에서 제 1극체를 방출한 난자를 무작위로 선별하여 10 uM Celltracker Blue 염색약으로 난자 내 GSH 함량을 평가하였음. 염색 후, 동일한 2ul의 미소적으로 옮겨져 형광 현미경 하에 370 nm UV filter를 이용하여 난자 내의 GSH 함량을 관찰하였음. 난자의 영상을 디지털카메라를 이용하여 촬영 한 후 난자의 형광 강도를 ImageJ software 를 이용하여 분석하였음. 체외성숙 동안 Glucose가 첨가되지 않고 108 mM NaCl을 함유한 PZM-3에서 배양된 난자군을 1로 환산하여 다른 군의 상대적인 GSH 농도를 산정하였음.
- 본 실험의 결과 Glucose가 첨가되지 않았을 경우, 61.6mM NaCl을 함유하는 PZM-3 배양액에서 미성숙 난자가 체외성숙 되었을 경우 108mM NaCl을 함유하는 PZM-3 배양액에서 성숙된 난자보다 유의적으로 낮은 핵 성숙률을 나타내었음. 그러나 glucose를 첨가 해줌으로써 소금 농도에 관계없이 체외성숙 유도 후 핵 성숙률은 유의적으로 증가되어 나타났음 ($p < 0.05$). 체외성숙 동안 glucose의 첨가는 난자 내 GSH 함량에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였음.

<표20> Effect of glucose in a chemically defined maturation medium containing polyvinyl alcohol on nuclear maturation, intraoocyte glutathione contents after in vitro maturation (IVM)

IVM medium ^a with		No. of oocytes cultured	% of oocytes reached MII	Relative contents (pixels/oocyte) of	
NaCl (mM)	Glucose			N ^b	Glutathione
108.0	No	218	78.5 ± 4.7 ^c	47	1.00 ± 0.03
108.0	Yes	224	91.2 ± 1.7 ^d	48	0.92 ± 0.04
61.6	No	194	57.7 ± 5.3 ^c	48	1.03 ± 0.03
61.6	Yes	219	84.3 ± 3.9 ^{cd}	48	0.95 ± 0.04

^aBovine serum albumin-free porcine zygote medium-3 containing 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol was

used as the base medium for oocyte maturation.

^bNumber of metaphase II oocytes examined for glutathione contents.

^{c-e}Values with different superscript letters in the same column are different ($p < 0.05$).

- 108 mM 과 61.6 mM NaCl을 함유한 PZM-3 배양액에서 돼지 미성숙 난자가 성숙되는 동안 glucose를 첨가하여 체외성숙 유도 후 체세포 핵이식을 통하여 체외 발육능력을 평가하였음 <표21>.
- Porcine fetal fibroblast (passage 3~8)는 체세포 핵이식을 하기 위한 donor cell로 이용되었음. 난구세포가 제거된 난자의 핵과 제 1극체는 Hoechst 33342를 이용해 염색이 이루어졌으며 UV에 노출시켜 제거되었음.
- 본 실험의 결과 108 mM NaCl을 함유한 PZM-3 배양액에서 성숙된 난자의 경우, 체세포 핵이식 이후 배아의 배 발육능은 glucose 첨가에 유무에 관계없이 유사한 체외 발육능력을 나타냄을 확인함. 그러나 61.6 mM NaCl을 함유한 PZM-3배양액에서 성숙된 난자의 경우, 체외성숙 동안 glucose를 첨가 해줌으로 써 세포융합 비율뿐만 아니라 배반포 형성률 또한 증가되어 나타남을 확인 할 수 있었음 ($p < 0.05$).

<표21>. Effect of glucose in a maturation medium containing polyvinyl alcohol on embryonic development after somatic cell nuclear transfer (SCNT)

IVM medium ^a with		% of SCNT oocytes fused	No. of SCNT oocytes cultured	% of oocytes developed to		No. of cells in blastocyst
NaCl (mM)	Glucose			≥ 2-cell	Blastocyst	
108.0	No	53.4 ± 8.8 ^{bc}	68	69.9 ± 3.5	16.2 ± 2.0 ^b	32.9 ± 3.6
108.0	Yes	63.7 ± 4.1 ^c	80	77.0 ± 4.2	14.7 ± 1.8 ^{bc}	39.7 ± 3.3
61.6	No	38.0 ± 7.7 ^b	37	52.8 ± 18.4	7.7 ± 4.5 ^c	26.3 ± 2.8
61.6	Yes	60.3 ± 5.3 ^c	78	80.0 ± 3.9	15.2 ± 2.7 ^b	38.3 ± 3.9

^aBovine serum albumin-free porcine zygote medium-3 containing 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol was used as the base medium for oocyte maturation.

^{b-d}Values with different superscript letters in the same column are different ($p < 0.05$).

- 체세포 핵이식 기법을 통하여 생산된 배아의 체외배양 동안 다양한 배양액 조성에 따른 체외발육 능력을 평가하였음. 실험은 돼지 배아의 체외배양을 위해 일반적으로 많이 이용되는 PZM-3 배양액에서 체외 배양된 군을 대조군으로 설정하였고, PZM-5 배양액에서 체외배양된 군, 그리고 체외배양 0~4일 동안은 PZM-5에서 체외배양된 후, 5일째 부터는 각각 10% FBS (PZM-5F)와 5% KSR (PZM-5K) 추가적으로 공급해준 배양액에서 체외배양된 군을 실험 군으로 설정하여 진행하였음. 체외배양은 총 7일동안 이루어졌으며 배반포 형성률과 hatching 비율은 168시간째에 확인하였음 <표22>.

<표22> Developmental competence of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived embryos in different in vitro culture (IVC) medium

Culture medium	No. of embryos cultured*	% of embryos developed to	
		Blastocyst formation (n) [‡]	Hatching ^A (n)
PZM-3	132	27.1 ± 8.2 (37)	39.0 ± 13.3 ^a (19)
PZM-5	129	29.4 ± 3.8 (38)	42.9 ± 5.1 ^{ab} (17)
PZM-5F	132	37.9 ± 6.7 (51)	72.9 ± 3.7 ^b (36)
PZM-5K	160	31.1 ± 4.8 (49)	30.8 ± 12.6 ^a (14)

*Four replicates. [‡]Number

^APercentage of the number of blastocyst formation

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

- 본 실험의 결과 체외배양 5일째부터 FBS와 KSR의 공급은 체세포 핵이식 배아의 배반포 형성에 영향을 미치지 않았음. 하지만 PZM-5에서 4일동안 배양 후, 5일째부터 10% FBS를 첨가해 주었을 경우 체세포 핵이식 배반포의 hatching 과정에 효과적이라는 것을 확인 할 수 있었음 ($p < 0.05$).

2. ICM 유래 콜로니 초대배양

- 핵이식 기법으로 얻은 수정란 (PZM-3, PZM-5, PZM-5F, PZM-5K)의 초기의 콜로니 형성에 적합한 배양액의 조건을 확립하기 위해 3가지 배양액을 사용해 ICM 부착효율과 콜로니 형성율을 비교하였음<표23~26>.
- 그 결과, PZM-3 그룹의 경우 α -MEM-based medium을 사용했을 때 부착율에서 유의적인 차이가 없었지만 가장 높게 나타났으며 다른 배양액을 사용했을 때와 비교했을 때 유의적으로 높은 콜로니 형성을 보여주었음 ($p < 0.05$). PZM-5, PZM-5F 그룹에서는 부착율과 콜로니 형성면에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 역시 α -MEM-based medium을 사용했을 때 높은 콜로니 형성을 나타냈음. PZM-5K의 경우는 DMEM/Ham's F-12-based medium과 α -MEM-based medium에서 유의적으로 높은 부착율을 보였지만 ($p < 0.05$) 콜로니 형성에는 유의적인 차가 나타나지 않았음.
- 종합적으로 초대배양 시 α -MEM-based medium을 이용했을 때 콜로니 형성이 좋은 것으로 나타났음. 이 결과는 핵이식 유래의 수정란으로부터 배아줄기세포를 생산하는데 효율적으로 사용될 수 있음.

<323> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-3)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	28	21 (75)	6 (21) ^{e,f}
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	29	19 (65.52)	1 (3.45) ^e
α -MEM- based medium -1 ^c	30	26 (86.67)	9 (30) ^f

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

^{e,f}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.05$.

<324> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	30	25 (83.33)	2 (6.67)
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	30	19 (63.33)	7 (23.33)
α -MEM- based medium -1 ^c	33	27 (81.82)	10 (30.3)

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

<325> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5F)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	30	18 (60)	2 (6.66)
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	30	25 (83.33)	7 (23.33)
α -MEM- based medium -1 ^c	29	23 (79.31)	9 (31.03)

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

<326> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5K)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	30	16 (53.33) ^e	4 (13.33)
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	29	24 (82.76) ^f	6 (20.69)
α -MEM- based medium -1 ^c	31	26 (83.87) ^f	6 (19.35)

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

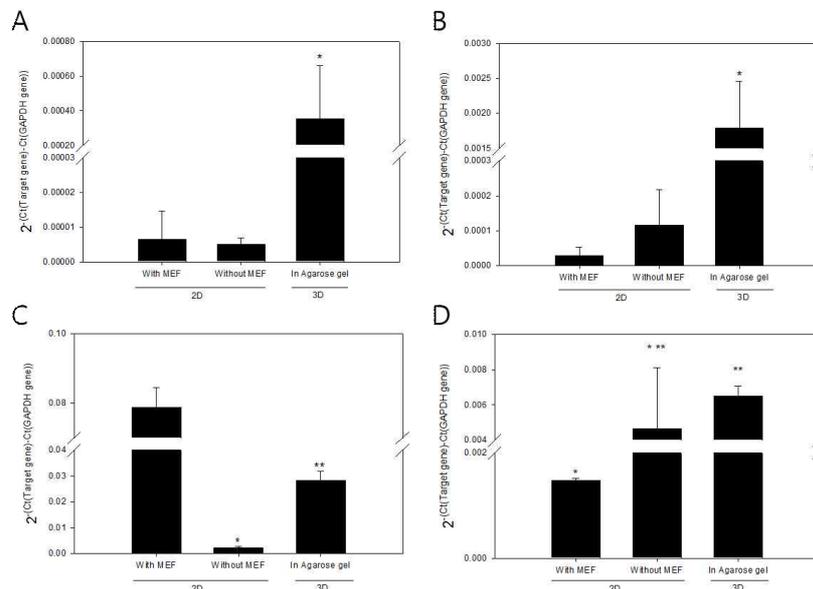
^{e,f}Different superscripts within the same column are significantly different, p<0.05.

3. 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발

- 체내에서 유래된 수정란으로부터 세포주화 된 배아줄기세포를 feeder가 있는 2D환경과 feeder가 없는 2D 환경 (with or without feeder), agarose gel을 이용한 3D 환경에서 7일간 배양 후, 배아줄기세포의 미분화 유지 효율을 확인하기 위하여 alkaline phosphatase (AP) activity와 배아줄기세포 특이적 마커를 mRNA 발현 수준을 비교하였음 <그림 33 및 34>.
- 3D 환경과 feeder를 사용한 2D 환경에서 배양된 배아줄기세포는 feeder가 없는 2D환경에 비해 높은 AP activity를 보여주었음. 이 결과는 3D 환경과 feeder를 사용한 2D 환경이 배아줄기세포의 미분화 유지에 적합하다는 것을 보여줌.



<그림33> Colony morphology and alkaline phosphatase (AP) activity of porcine embryonic stem cells cultured on 2D with or without mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and in 3D agarose gel. Porcine embryonic stem cells (pESCs) were cultured on 2D culture dish with (A) or without (B) MEFs and in 1.5% (wt/v) 3D gel agarose gel (C) for 7 days. Subsequently, AP staining were conducted. As the results, pESC cultured on MEF-free 2D cultured didn't show any positivity in AP activity (B). However, pESC cultured on 2D culture dish with MEFs and in 1.5% (wt/v) 3D agarose gel showed strong positivity in AP activity (A,C). Scale bars are 200 μ m.



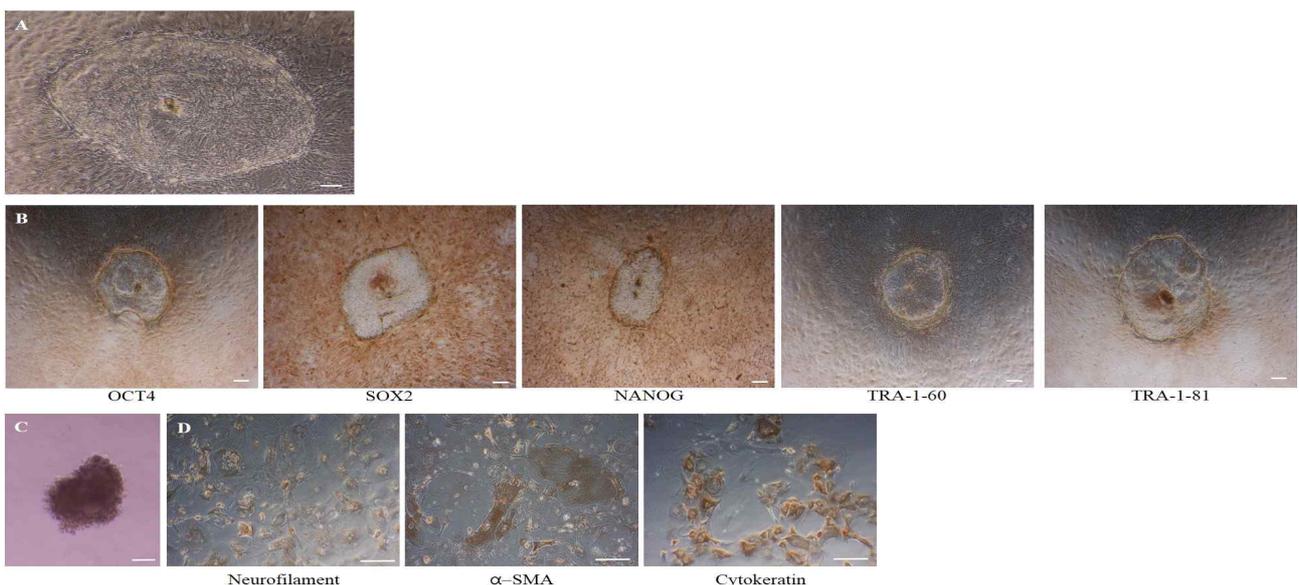
<그림34> Effects of culture dimensional differences on transcriptional expression of self-renewal-specific genes in porcine embryonic stem cells (pESCs). pESCs were cultured for 7 days on 2D culture dish with or without and in 1.5 % (wt/v) 3D agarose gel. Subsequently, transcriptional levels of self-renewal-related genes were analyzed by real-time PCR. As the results, pESCs in 3D agarose gel showed significantly higher transcriptional level in *OCT4* (A), *SOX2* (B) and *TERT* (D) than those on 2D culture dish with and without MEFs. However, in case of *NANOG* (C) transcriptional expression, significantly the highest or lowest transcriptional level was detected in pESCs cultured on 2D culture dish with or without MEFs. Error bars represent S.D. n=3. *** $p < 0.05$.

- 배아줄기세포 특이적 마커의 mRNA 발현을 확인하였을 때, 3D agarose gel에서 배양된 배아줄기세포가 2D 환경에서 배양된 배아줄기세포에 비해서 유의적으로 높은 Oct4, Sox2, TERT의 발현을 보여주었음. 그러나 Nanog는 feeder가 있는 2D 환경에서 유의적으로 가장 높았으며, feeder가 없는 2D 환경에서 유의적으로 가장 낮았음.
- 이러한 결과를 미루어 보아 agarose gel을 이용한 3D 환경에서 배양된 배아줄기세포는 2D 환경보다 더 효율적으로 미분화 상태를 유지하고 자가 증식 능력을 보유하는 것으로 나타났음. 따라서, agarose gel을 이용하면 배아줄기세포의 특성을 효율적으로 유지 할 수 있음.

[4차년도]

1. 생산된 체외 수정란 유래 배아줄기세포의 특성 규명

- 체외 수정란 유래 배반포로부터 생산된 돼지 배아줄기세포는 전형적인 morphology를 보이며, pluripotent stem cells marker를 발현하고 정상적인 *in vitro* differentiation capacity를 보였음 <그림35>.



<그림35> Morphology (A) and expression of pluripotent stem cells marker (B~D) in porcine embryonic stem cell derived from *in vitro* fertilization.

2. 돼지 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 핵이식 수정란 ICM 유래 콜로니 초대배양

- 다른 IVC 배지에서 생산된 핵이식 유래 수정란의 초대배양 콜로니 형성에 영향을 미치는 배양액의 효과를 확인함
- PZM-3 배지에서 생산된 ICM의 초대 배양 시 ICM 부착율은 모든 배양액 처리군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 α -MEM-based medium에서 가장 높게 나타났고 다른 배양액에 비해 유의적으로 높은 콜로니 형성을 보였음 <표27>.

<표27> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-3)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	28	21 (75)	6 (21) ^{e,f}
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	29	19 (65.52)	1 (3.45) ^e
α -MEM- based medium -1 ^c	30	26 (86.67)	9 (30) ^f

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

^{e,f}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.05$.

- PZM-5 배지에서 생산된 ICM 역시 초대 배양 시 ICM 부착율은 모든 배양액 처리군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 α -MEM-based medium에서 가장 높게 나타났고, α -MEM-based medium과 DMEM/Ham's F-12-based medium을 사용했을 때 유의적으로 높은 콜로니 형성을 보였음 <표28>.

<표28> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	37	29 (78.38)	2 (5.41) ^e
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	38	25 (65.79)	9 (23.68) ^f
α -MEM- based medium -1 ^c	40	33 (82.5)	13 (32.5) ^f

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells

in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.
^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts, $p < 0.05$.

- . PZM-5F 배지에서 생산된 ICM은 PZM-3와 마찬가지로 초대 배양 시 ICM 부착율은 모든 배양액 처리군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 α -MEM-based medium에서 가장 높게 나타났고 다른 배양액에 비해 유의적으로 높은 콜로니 형성을 보였음 <표29>.

<표29> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5F)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	44	28 (63.63)	7 (15.91) ^e
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	44	34 (77.27)	14 (31.82) ^e
α -MEM- based medium -1 ^c	42	36 (85.71)	19 (45.24) ^f

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts, $p < 0.01$.

- . PZM-5K 배지에서 생산된 ICM은 초대 배양 시 콜로니 형성률은 모든 배양액 처리군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, α -MEM-based medium과 DMEM/Ham's F-12-based medium을 사용했을 때 유의적으로 높은 ICM 부착률을 보였음 <표30>.

<표30> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocyst to feeder cells and colony formation of inner cells mass derived from SCNT-derived blastocyst in different culture medium. (PZM-5K)

Type of medium	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^d of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
DMEM / Ham's F-10-based medium ^a	46	26 (56.52) ^e	7 (15.21)
DMEM / Ham's F-12-based medium ^b	46	38 (82.61) ^f	13 (28.26)
α -MEM- based medium -1 ^c	49	39 (79.59) ^f	14 (28.57)

Blastocysts were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium, DMEM/Ham's F-10-based medium and DMEM/Ham's F-12-based medium.

^aDMEM / Ham's F-10-based medium consist of DMEM / Ham's F-10 medium supplemented with 15% (v/v) FBS, 0.2mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^bDMEM / Ham's F-12-based medium consist of DMEM / Ham's F-12 medium supplemented with 20% (v/v) KSR, 0.1mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S and 20ng/ml bFGF.

^c α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^dPercentage of the number of seeded blastocysts

^{e,f}Different superscripts within the same column are significantly different, p<0.01.

3. 생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발

- 체세포 핵이식 기법 유래 수정란의 *in vitro* culture (IVC) 기간에 따른 ICM 부착율과 콜로니 형성률에 대한 실험을 진행한 결과, ICM 부착률은 배양 기간 간의 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 8일 동안 배양된 배반포 그룹에서 유의적으로 높은 콜로니 형성률을 확인할 수 있었음 <표31>.

<표31> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from SCNT-derived blastocysts in different IVC culture day. (PZM-5F)

Culture day	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^b of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
Day 7	62	46 (74.19)	23 (37.10) ^c
Day 8	56	40 (71.43)	31 (55.36) ^d

Blastocysts generated for 7 or 8 days in PZM-5F medium were cultured for 7 days on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium^a.

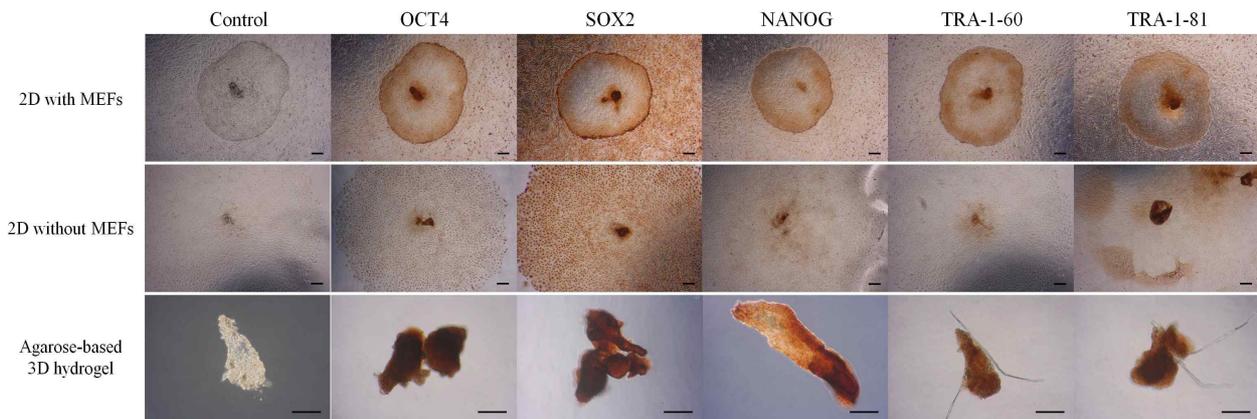
^a α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 μ l/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bPercentage of the number of seeded blastocysts

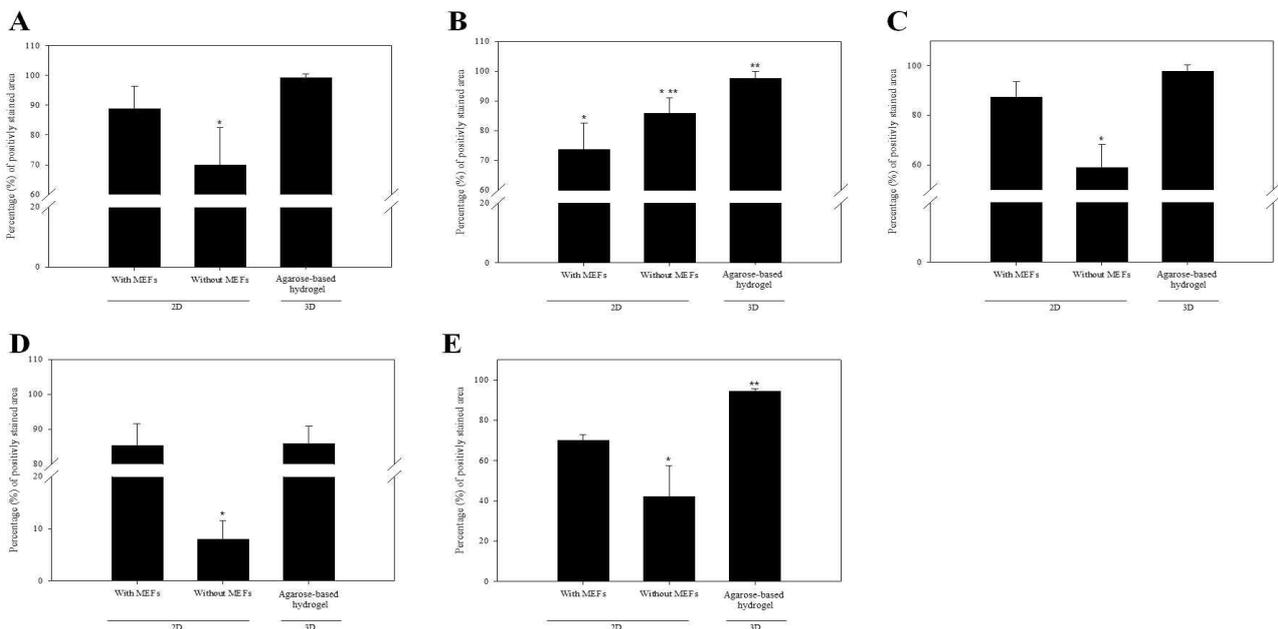
^{c,d}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.05$.

4. 돼지 배아줄기세포 대량 배양 시스템 개발

- 배반포 내세포외 주변 환경을 모방한 비세포성 디쉬 활용을 통한 3차원 세포배양 시스템 개발을 위해 2D와 3D 환경에서 배양된 줄기세포에서 줄기세포 마커를 확인한 결과, OCT4, SOX2, NANOG, TRA-1-60 및 TRA-1-81이 정상적으로 발현하는 것을 확인하였음<그림 36 및 37>.



<그림36> Expression of self-renewal-related proteins in porcine ESCs on 2D culture plates coated with or without MEFs and in agarose-based 3D hydrogels. Porcine ESCs were cultured for 7 days on 2D culture plates coated with or without MEFs or in 1.5% (w/v) agarose-based 3D hydrogels and then immunostained for self-renewal-related proteins expressed in undifferentiated ESCs. ESCs cultured in 2D with MEFs or in 3D hydrogels showed strong protein expression of *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *TRA-1-60*, and *TRA-1-81*, whereas those cultured in 2D without MEFs showed much weaker expression of these genes. Scale bars are 200 μ m.



<그림37>. The percentage of porcine ESCs expressing self-renewal-related proteins in 2D and 3D cultures. ESCs were cultured for 7 days on 2D plates with or without MEFs or in 1.5% agarose 3D hydrogels and then immunostained for self-renewal-related proteins expressed in undifferentiated porcine ESCs. The percentage of ESCs expressing self-renewal-related proteins within a colony was calculated by dividing the positively stained area of each colony by the total area of that colony. Porcine ESCs cultured in MEF-free 2D cultures showed significantly lower percentages of cells positive for all self-renewal-related proteins evaluated except SOX2 (B). There were no significant differences in the percentages of ESCs expressing OCT4 (A), NANOG (C) and TRA-1-60 (D) between 2D cultures with MEFs and 3D hydrogels; significantly more ESCs cultured in 3D hydrogels were positive for SOX2 (B) and TRA-1-81 (E) than in 2D cultures with MEFs. Error bars represent S.D. n=3. *** $p < 0.05$.

- 줄기세포 마커의 발현을 정량적으로 분석한 결과, 모든 마커는 3D 환경에 의해 증가하는 것을 확인하였고, feeder cell의 유무에 따라 발현의 차이를 보였음.

5. 돼지 배아줄기세포 장기배양 시스템 개발을 위한 체외배양과정에서의 glycine 과 alanine의 첨가 및 삼투압 변화의 효과 검토

- 285 mOsm의 체외성숙 배지에 다른 농도의 glycine을 첨가하였을 때, 농도가 증가할 수록 control에 비하여 난자의 핵 성숙률이 증가하였으며, 20 mM 처리군에서 가장 높은 분할률을 확인하였지만 배반포 형성에는 영향을 미치지 않았음 <표32>.

<표 32> Effect of glycine treatment various concentration during in vitro maturation on embryonic development after parthenogenetic activation

IVM treatment	% of oocytes that reached MII	No. of oocytes cultured*	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
			≥ 2-cell	blastocyst	
glycine 0mM	69.3 ±4.2 ^b	147	71.3 ±8.1	25.4 ±6.5	36.3 ±2.4
glycine 1mM	69.6 ±5.3 ^{ab}	138	66.8 ±6.6	18.4 ±6.0	37.8 ±2.8
glycine 5mM	73.6 ±2.5 ^{ab}	145	70.0 ±5.1	25.5 ±7.0	34.0 ±2.5
glycine 10mM	78.8 ±3.9 ^a	151	70.5 ±5.1	28.2 ±8.7	37.0 ±2.3
glycine 20mM	79.3 ±1.2 ^a	150	80.4 ±7.3	25.0 ±8.2	36.8 ±1.9

* Five replicates.

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

IVM media: PZM-3(NEAA removed)+ 0.1% PVA with 5.56 mM glucose

- 기존 연구를 통해 검증된 저농도 NaCl (삼투압: 225 mOsm) 체외성숙 배지에서 glycine의 효과를 비교한 결과, 저 삼투압의 체외성숙 배지에서는 glycine에 의한 영향이 나타나지 않았음 <표33>.

<표 33> Effect of glycine treatment various concentration during in vitro maturation on embryonic development after parthenogenetic activation

IVM treatment	% of oocytes that reached MII	No. of oocytes cultured*	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
			≥ 2-cell	blastocyst	
glycine 0mM	47.7 ± 4.9	85	86.2 ± 3.3	20.7 ± 3.6	39.8 ± 3.5
glycine 1mM	47.6 ± 2.1	84	84.8 ± 3.9	21.1 ± 3.6	37.9 ± 3.3
glycine 5mM	44.9 ± 5.0	81	84.7 ± 3.6	20.9 ± 4.9	33.3 ± 3.2
glycine 10mM	47.9 ± 4.3	87	91.6 ± 3.4	22.6 ± 3.6	40.5 ± 2.8
glycine 20mM	45.0 ± 1.9	80	92.2 ± 3.5	18.8 ± 3.9	29.8 ± 2.1

* Four replicates.

IVM media: Low- PZM-3(NEAA removed)+ 0.1% PVA with 5.56 mM glucose

- 체외 배양과정에서 glycine과 alanine의 첨가 및 삼투압 변화의 효과 확인한 결과, 단위 발생 수정란의 초기발달 동안 고 삼투압(320 mOsm)과 glycine의 처리는 배반포 형성을 증가시켰으나 alanine은 영향을 미치지 못하였음 <표34>.

<표 34> Effect of glycine treatment in vitro culture medium (IVC) having different osmolality on embryo culture after parthenogenetic activation (PA)

IVC treatment			No. of PA embryos cultured*	% of embryos developing to		No. of cells in blastocyst
0~2 day	3~7 day	organic osmolyres		≥ 2-cells	Blastocyst	
280 mOsm	280 mOsm	-	122	89.0 ± 3.2	25.9 ± 1.7 _c	31.4 ± 1.5
280 mOsm	280 mOsm	4.1 mM glycine	122	86.3 ± 2.2	27.9 ± 0.7 _c	31.4 ± 1.4
320 mOsm	280 mOsm	-	122	89.0 ± 2.5	36.5 ± 1.6 _b	30.9 ± 1.6
320 mOsm	280 mOsm	4.1 mM glycine	122	90.0 ± 3.6	50.4 ± 3.4 _a	30.5 ± 1.0
320 mOsm	280 mOsm	1.2 mM alanine 4.1 mM glycine	121	92.0 ± 1.9	45.7 ± 1.6 _a	31.7 ± 1.2

* Four replicates.

^{a,b,c} Values in the same column with different superscript letters are different (P < 0.01).

- 단위발생을 통한 배반포 발육능의 결과를 토대로 체세포 핵이식을 진행한 결과, 단위발생 수정란과 다르게 7일간의 체외배양의 삼투압 변화보다, glycine을 첨가가 배반포 형성의 증가에 더 크게 영향을 미치는 것을 확인하였음 <표35>.

<표 35> Effect of glycine treatment in vitro culture (IVC) medium having different osmolality on embryo culture after somatic cell nuclear transfer (SCNT)

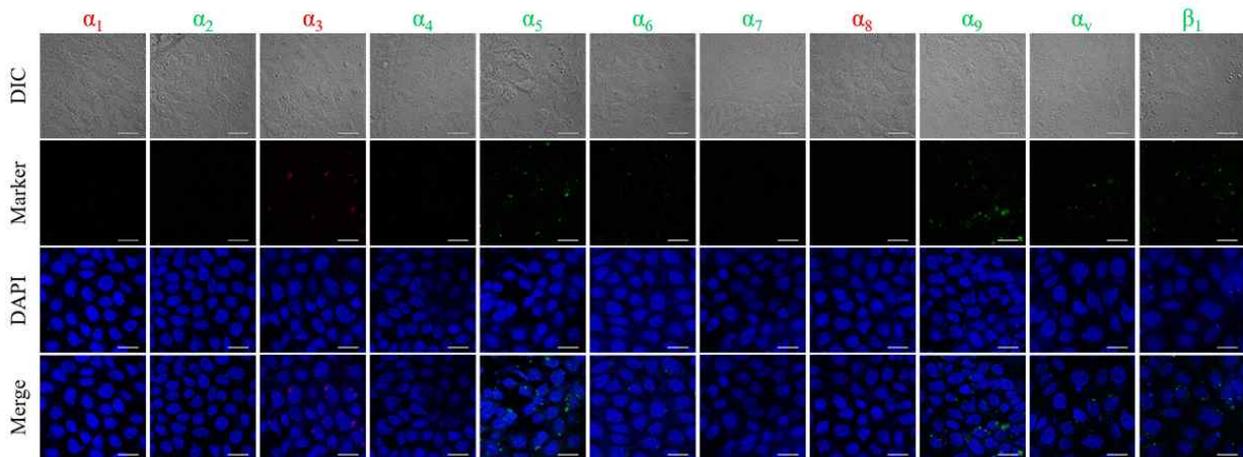
IVC treatment			No. of PA embryos Cultured*	% of embryos developing to		No. of cells in blastocyst
0~2 day	3~7 day	organic osmolytes		≥ 2-cells	Blastocyst	
280 mOsm	280 mOsm	-	161	85.6 ± 2.8 _b	27.6 ± 1.6 _{bc}	31.9 ± 1.5
280 mOsm	280 mOsm	4.1 mM glycine	159	93.7 ± 1.6 _{ab}	38.0 ± 1.6 _a	35.5 ± 1.7
320 mOsm	280 mOsm	-	159	88.8 ± 3.0 _{ab}	23.7 ± 4.1 _c	34.7 ± 1.7
320 mOsm	280 mOsm	4.1 mM glycine	158	94.2 ± 3.4 _a	35.3 ± 3.8 _{ab}	33.7 ± 1.5

* Four replicates.

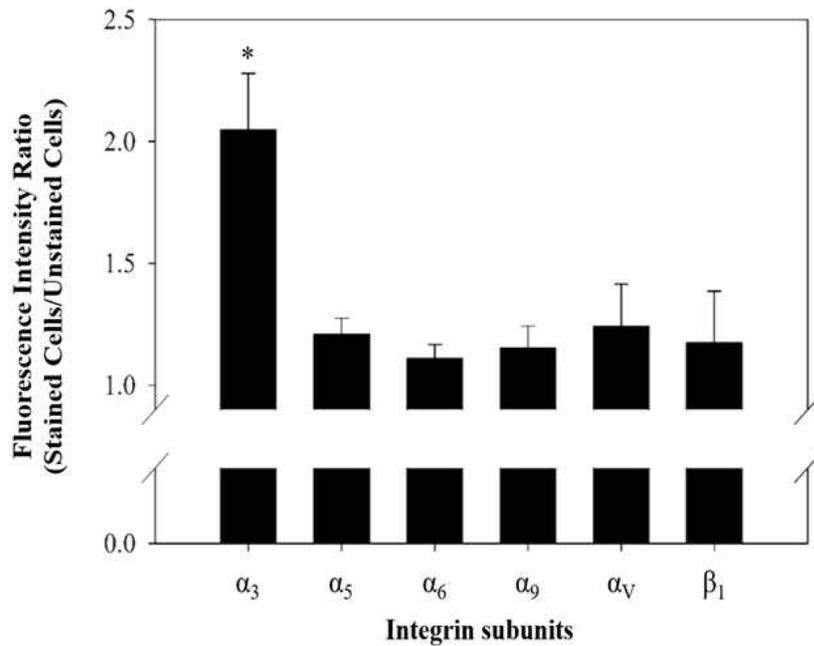
^{a,b,c}Values in the same column with different superscript letters are different (P < 0.05).

6. 대량 및 장기 배양된 돼지 배아줄기세포의 계대별 특성 규명

- 배아줄기세포의 계대에 따른 줄기세포 내 특이 인자 발현 확인을 위하여 porcine ES-like cell내에 존재하는 integrin heterodimer를 확인하는 실험을 진행하였음. Passage 25에서 30까지 배양된 세포를 사용하여 immuocytochemistry와 fluorescence immuoassay를 진행한 결과, integrin α_3 , α_5 , α_6 , α_9 , α_V , 그리고 β_1 subunits이 세포내에 존재하는 것을 확인하였으며 <그림38> 그중 integrin α_3 subunits의 발현수준이 가장 높은 것을 확인하였음 <그림39>.

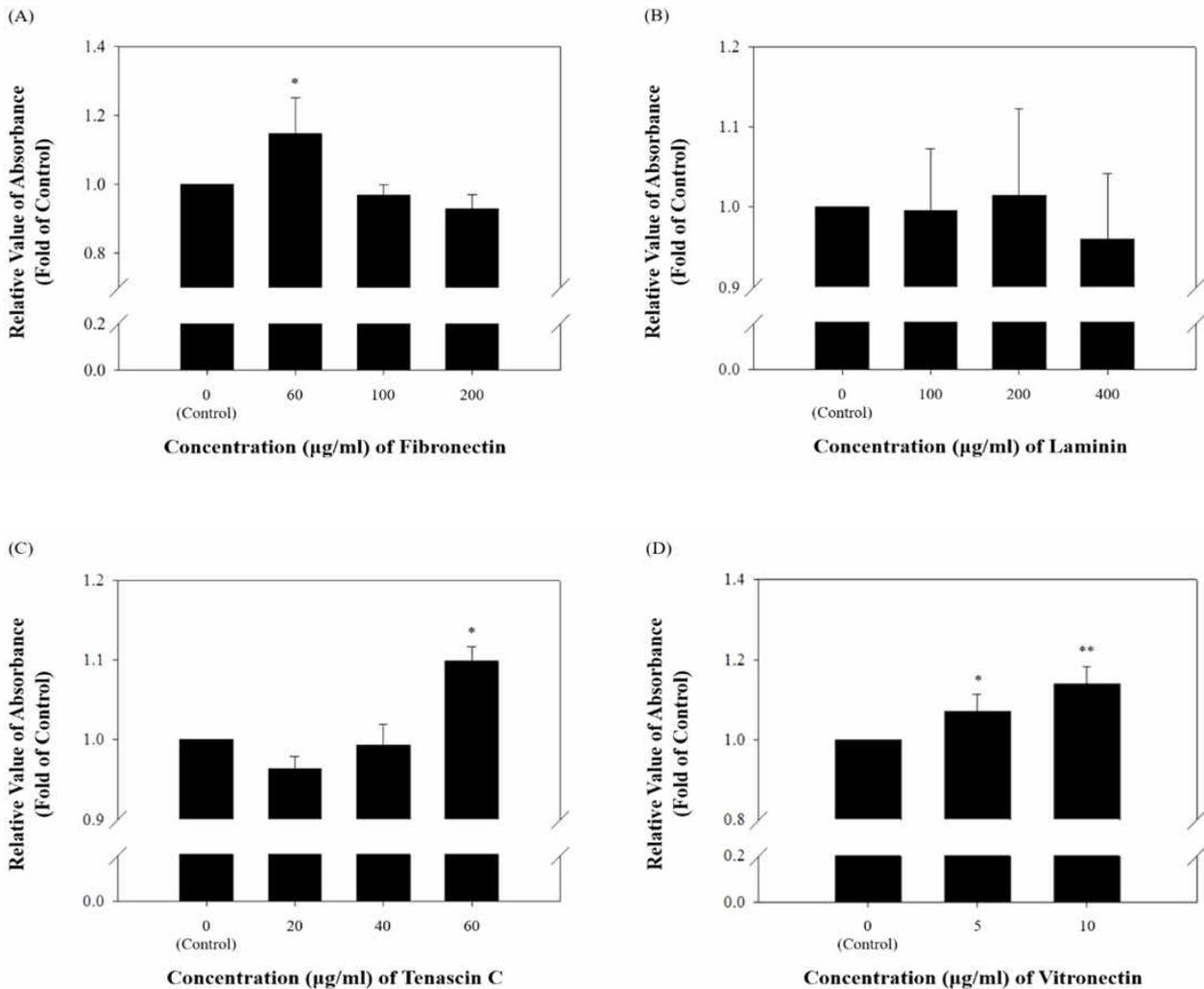


<그림38> The expression of the α and β integrin subunits expressed in undifferentiated porcine ES-like cells. The expression of integrin α and β subunit proteins on the surface of porcine ES-like cells was identified by immunocytochemistry. As the results, the localization of integrin α_3 , α_5 , α_6 , α_9 , α_V and β_1 subunit proteins were identified on the surface of porcine ES-like cells, whereas any expression of integrin α_1 , α_2 , α_4 , α_7 and α_8 subunit proteins were not detected on their plasma membrane. Nuclear counter-staining was conducted using DAPI. n=4. Scale bar = 20 μ m.

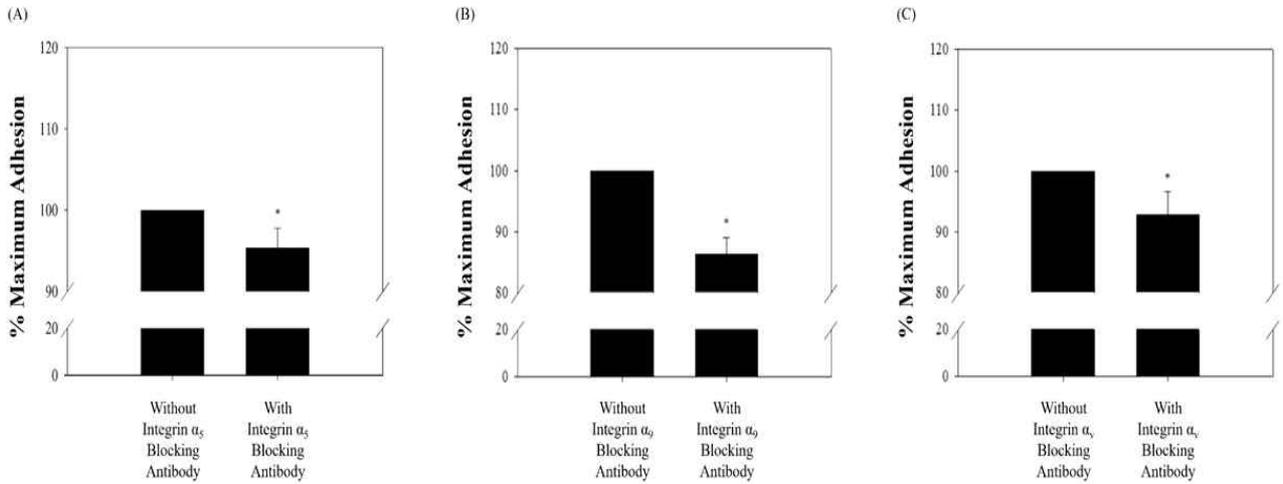


<그림39> Quantitative analysis of the α and β integrin subunits expressed in undifferentiated porcine ES-like cells. The undifferentiation of porcine ES-like cells were maintained on mitotically inactivated MEFs in the DMEM/Ham's F-10-based medium. Subsequently, the expression of integrin α and β subunit proteins on the surface of porcine ES-like cells was measured using fluorescence immunoassay, and then the expression level of each integrin subunit protein was calculated as the ratio of fluorescence intensity of stained cells to fluorescence intensity of secondary antibody-stained (integrin α_3 subunit) or unstained cells (integrin α_5 , α_6 , α_9 , α_V and β_1 subunits). The integrin α_3 subunit showed the highest significant expression and relatively weak expression was observed in integrin α_3 , α_5 , α_6 , α_9 , α_V , and β_1 subunits. All data shown are means \pm SD from four independent experiments. * $p < 0.05$.

- 이후 porcine ES-like cell내에 존재하는 integrin heterodimer type을 확인하기 위하여 cell attachment assay를 진행하였으며, 확인된 integrin heterodimer가 porcine ES-like cell에서 정상적으로 기능하는지를 확인하기 위하여 antibody inhibition assay를 진행하였음. 그 결과, integrin $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, 및 $\alpha_V\beta_1$ heterodimer가 존재하는 것을 확인하였으며 <그림40>, integrin의 기능을 억제한 결과 blocking antibody를 처리하지 않은 그룹에 비하여 adhesion rate가 감소하는 것을 확인할 수 있었음 <그림41>.



<그림40> Identification of the presence of integrin heterodimers interacting with fibronectin, laminin, tenascin C and vitronectin on the surface of porcine ES-like cells. 96-well cell culture plates were coated with 0, 60, 100, and 200 µg/ml fibronectin, 0, 100, 200, and 400 µg/ml laminin, 0, 20, 40, and 60 µg/ml tenascin C and 0, 5, and 10 µg/ml vitronectin, respectively. Subsequently, 3×10^3 porcine ES-like cells were resuspended in DMEM/Ham's F-10-based medium and plated to each well. After incubation for 2 h in 37° C, adherent cells were stained with crystal violet and adherent level was quantified using a microplate reader. The percentage of maximum adhesion represents the optical density of cells plated on extracellular matrix proteins-free plates. Porcine ES-like cells cultured on 60 µg/ml fibronectin- (A), 60 µg/ml tenascin C- (C), and 5 and 10 µg/ml vitronectin-coated culture plates (D) had significantly higher levels of adhesion than those on extracellular matrix protein-free culture plates. However, no significant difference in the adhesion level was observed in porcine ES-like cells cultured on laminin-coated culture plates (B). All data shown are means \pm SD from four independent experiments. *** $p < 0.05$.



<그림 41> **Functional blocking of integrin heterodimers interacting with fibronectin, tenascin C or vitronectin in undifferentiated porcine ES-like cells.** Undifferentiated porcine ES-like cells were incubated in the absence or presence of anti-integrin α_5 , anti-integrin α_6 and anti-integrin α_v blocking antibodies and then plated on $60 \mu\text{g/ml}$ fibronectin-, $60 \mu\text{g/ml}$ tenascin C- and $10 \mu\text{g/ml}$ vitronectin-coated wells for 8 hours in 37°C . Adherent cells were stained with crystal violet, and adherent level was quantified using a microplate reader. As the parameter of functional blocking by antibodies, the percentage of maximum adhesion, which represents as the optical density of cells plated on each extracellular matrix protein-coated wells in the absence of any blocking antibodies, was determined. Porcine ES-like cells treated with integrin α_5 (A), α_6 (B) and α_v blocking antibodies (C) showed significantly lower rates of attachment to each extracellular matrix component than those without blocking antibody. All data shown are means \pm SD from four independent experiments. * $p < 0.05$.

[5차년도]

1. 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 수정란 유래 돼지 배아줄기세포주 확립을 위한 효과적인 배양 기법 개발

- 체세포 핵이식 기법을 통해 생산된 배반포 유래 ICM의 지지세포 부착율과 콜로니 형성율을 향상시키기 위해 다양한 마우스 종류로부터 얻은 embryonic fibroblasts를 지지세포로 사용하였음.
- 그 결과, 지지세포의 종류에 따른 부착율과 콜로니 형성율은 유의적인 차이는 보이지 않았지만, ICR 마우스 유래의 embryonic fibroblasts를 지지세포로 사용했을 때 수치적으로 부착율과 콜로니 형성율이 높았음 <표 36>.

<표36> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from SCNT-derived blastocysts in different feeder cell.

Type of feeder cells	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^b of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
ICR	90	57 (63.33)	26 (28.89)
C57BL/6	72	44 (61.11)	18 (25.00)
B6CBAF1	71	43 (60.56)	20 (28.17)

Blastocysts generated for 8 days in PZM-5F medium were cultured for 8 days on mitotically inactivated different mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium.

^a α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 ul/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

^bPercentage of the number of seeded blastocysts

- Donor cell의 차이에 따른 배아줄기세포의 생산 효율을 비교하고자 Porcine fetal fibroblast(PFFs)와 Porcine spermatogonial stem cells(SSCs)을 donor cell로서 사용하였음.
- 그 결과, donor cell로서 SSCs를 사용했을 때, 유의적으로 높은 콜로니 형성율을 확인할 수 있었으며 1개의 배아줄기세포주를 생산 할 수 있었음 <표37>.

<표37> Attachment of somatic cell nuclear transfer-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from somatic cell nuclear transfer-derived blastocysts in different donor cells.

Type of donor cells	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^b of blastocysts		No. (%) of generated ES cells
		Attached to feeder cells	Forming colonies	
PFFs	90	57 (63.33)	26 (28.89) ^c	0 (0.00) ^e
SSCs	107	74 (69.16)	57 (53.27) ^d	1 (0.93) ^f

Blastocysts generated for 8 days in PZM-5F medium were cultured for 7 days on mitotically inactivated ICR-derived mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM- based medium^a.

^a α -MEM-based medium-1 consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 ul/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF.

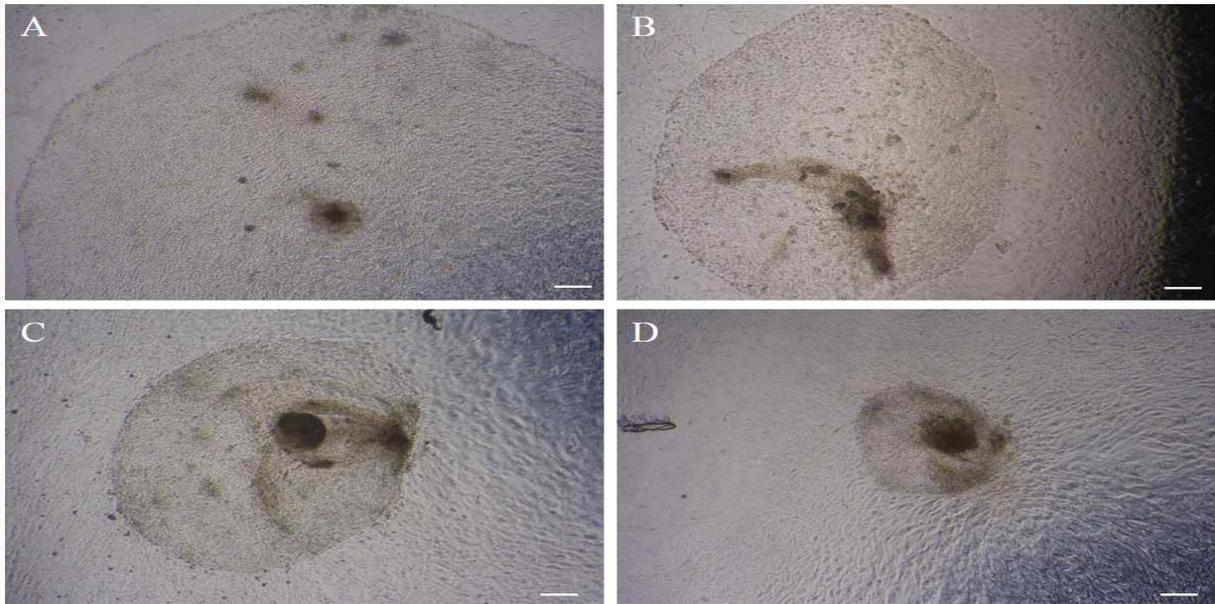
^bPercentage of the number of seeded blastocysts

^{c-f}Different superscripts within the same column are significantly different, $p < 0.01$.

- 생산된 세포를 세포주화 시키고자 지속적으로 배양을 시도함. 하지만, 동결과 세포 특성 규명을 할 수 있을 정도의 콜로니 수를 얻지 못하였음.
- 생산된 줄기세포 증식의 문제점은 초대 배양 이후에 효율적인 배양 시스템이 확립되지 않은 상황과 생산된 세포내에 OCT4 단백질이 부족해서 생기는 것으로 보여짐. 따라서

이러한 문제를 개선하기 위해 생산된 줄기세포를 다양한 배지로 배양했으며 induced pluripotent stem cells(iPSCs)을 생산 할 때 흔히 사용되는 인간 OCT4 단백질을 배지 내에 첨가해 주었음. 이 단백질에는 11개의 arginine이 붙어 있어 쉽게 세포내로 들어갈 수 있는 특징이 있음.

- 이를 통해 생산된 배아줄기세포의 상태가 개선되어 지는 듯 했지만, 배아줄기세포는 결국 passage 35에서 분화되었음 <그림42>. 비록, 배아줄기세포 세포주 확립에는 실패했지만 donor cell로서 SSCs 사용한 체세포 핵이식 수정란으로부터 배아줄기세포를 생산했고 passage 35까지 배양 했다는 데에 의의가 있음.



<그림42> Morphologies of embryonic stem cells generated from SCNT-derived blastocysts made using SSCs as donor cells. (A) Embryonic stem cells at passage 6 were cultured in α -MEM-based medium^a supplemented without human OCT4 protein. (B) Embryonic stem cells at passage 14 were cultured in α -MEM-based medium^a supplemented with human OCT4 protein. (C) Embryonic stem cells at passage 21 were cultured in mixture medium^b supplemented with human OCT4 protein. (D) Embryonic stem cells at passage 33 were cultured in mixture medium^b supplemented without human OCT4 protein. (Scale bar = 200 μ m)

- 배아줄기세포 확립 효율을 높이기 위해, PFFs와 SSCs를 각각 donor cell로서 사용해 생산된 배반포 유래 ICM을 지지세포위에서 배양하는 첫 날에 배양 배지에 인간 OCT4 단백질을 처리한 후, 부착율과 콜로니 형성율을 조사하였음.
- 그 결과, 부착율과 콜로니 형성율에서 유의적인 차이가 보이지 않았지만, 수치적으로 부착율은 SSCs를 donor cell로서 사용했을 때 높았고 콜로니 형성율은 PFFs를 donor cell로 사용했을 때 높음을 확인함<표38>.

<표38> Attachment of somatic cell nuclear transfer (SCNT)-derived blastocysts to feeder cells and colony formation of inner cell mass derived from SCNT-derived blastocysts in culture medium supplemented with human OCT4 protein

Type of donor cells	No. of seeded blastocysts	No. (%) ^b of blastocysts	
		Attached to feeder cells	Forming colonies
PFs	85	59 (69.41)	43 (50.59)
SSCs	51	42 (82.35)	24 (47.06)

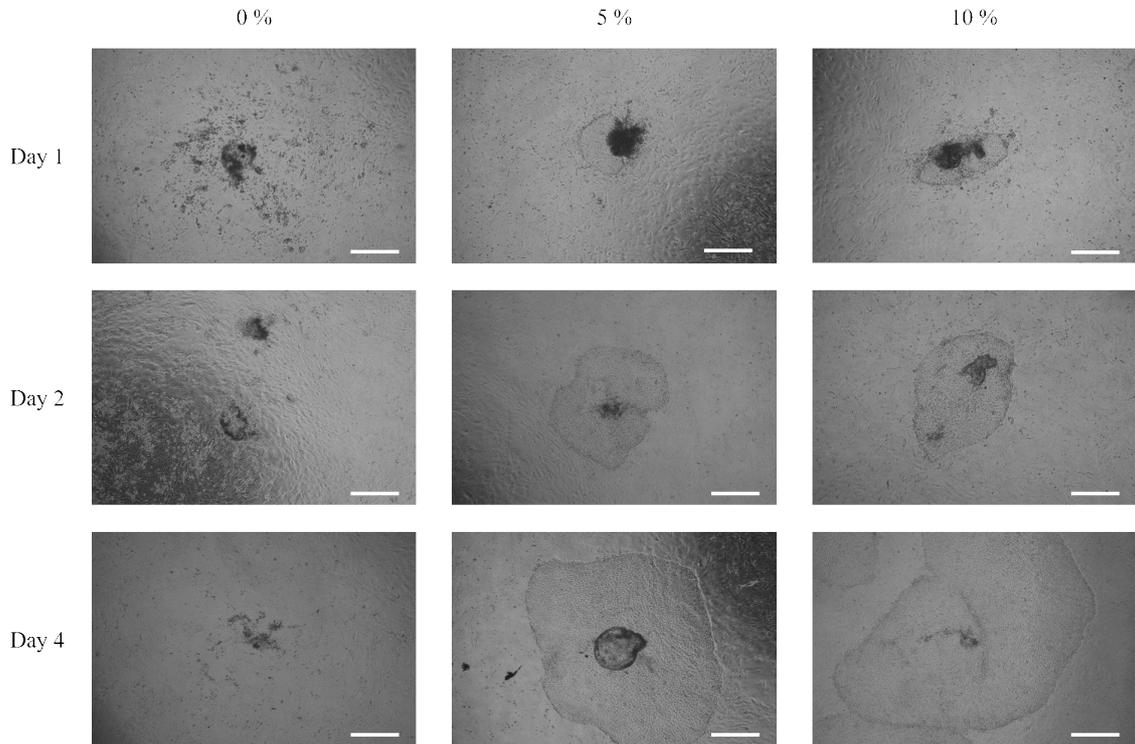
Blastocysts were cultured for 8 days on mitotically inactivated ICR-derived mouse embryonic fibroblast feeder cells in α -MEM-based medium^a.

^a α -MEM-based medium consist of α -MEM medium supplemented with 10% (v/v) KSR, 0.05mM β -mercaptoetanol, 1% NEAA, 1% P/S, 40ng/ml EGF, 10 ul/ml ITS, 1,000 unit/ml mLIF and 20ng/ml bFGF. At day 0, 1 ug/ml human OCT4 protein was added to α -MEM-based medium.

^bPercentage of the number of seeded blastocysts

2. 동결보호제에 따른 동결시스템 확립

- 동결보호제에 따른 동결시스템을 확립하기 위하여 현재 porcine ES-like cell의 동결에 사용하던 DMSO의 농도를 0%, 5%, 그리고 10%로 나누어 동결-용해 후 morphology와 survival rate를 확인하였음. 그 결과, 0%의 DMSO를 첨가하여 동결한 porcine ES-like cell은 동결보호제가 들어가 있지 않았기 때문에 모두 분화되는 모습을 관찰하였으며, 5%와 10%의 DMSO를 첨가하여 동결한 porcine ES-like cell의 morphology는 분화되지 않고 일반적으로 자라는 모습을 확인할 수 있었음 <그림 43>.
- 또한, 동결-용해 후 porcine ES-like cell의 survival rate를 확인한 결과, 10% DMSO를 첨가하여 동결-용해를 한 porcine ES-like cell에서 유의적으로 높은 survival rate를 확인하였음 <표39> ($p < 0.05$). 이를 통해 porcine ES-like cell의 동결을 위한 DMSO의 농도는 기존의 5% DMSO의 첨가보다 10% DMSO를 첨가하였을 때 동결 효과가 더 좋다고 사료됨.



<그림43>. Morphology of porcine embryonic stem-like cells after freezing - thawing using various DMSO concentration at day 1, day 2, and day 4. Scale bar = 200 μ m

<표39> Survival rate of porcine embryonic stem cells after freezing - thawing using various DMSO* concentration

DMSO concentration (%)	No. of seeded colony	No. of colony attached to feeder cell (day 2)	No. of colony formed to feeder cell (day 4)	Survival rate (%)
0	34	8	0	0.00
5	30	27	21	70.00
10	31	31	25	80.65*

*DMSO, Dimethylsulfoxide

* $p < 0.05$.

3. 동결배양액 종류에 따른 동결시스템 확립

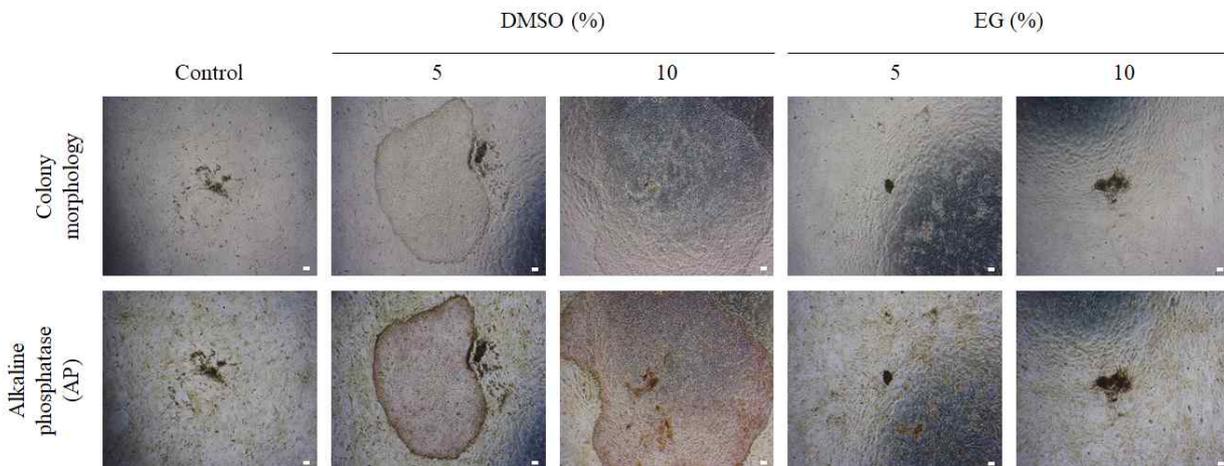
- 동결배양액 종류에 따른 동결시스템을 확립하기 위하여 DMSO이외에 Ethylene glycol (EG)을 0%, 5%, 그리고 10%로 나누어 동결-융해 후 survival rate를 확인하였음. 그 결과, 모든 처리군에서 survival rate가 10%미만으로 나타났고 그중 5%의 EG를 첨가하여 동결-융해한 처리군에서 survival rate가 가장 높은 것을 확인할 수 있었음 <표 40>.
- 또한 DMSO와 EG를 첨가하여 동결-융해한 porcine ES-like cell의 미분화 상태를 확인하기 위하여 alkaline phosphatase activity를 확인함 <그림44>. EG를 사용하여 동결

-용해한 porcine ES-like cell에서는 alkaline phosphatase activity를 나타내지 않았지만, DMSO를 사용하여 동결-용해한 porcine ES-like cell에서는 alkaline phosphatase activity를 나타내는 것을 확인하였음. 이를 통해, EG는 porcine ES-like cell를 동결함에 있어 적절하지 않은 동결배양액으로 생각됨.

<표40> Survival rate of porcine embryonic stem cells after freezing - thawing using various EG* concentration

EG concentration (%)	No. of seeded colony	No. of colony attached to feeder cell (day 2)	No. of colony formed to feeder cell (day 4)	Survival rate (%)
0	31	3	0	0.00
5	33	4	2	6.06
10	36	21	0	0.00

* EG, Ethylene glycol



<그림44> Alkaline phosphatase activity of cryopreserved porcine ES-like cell after freezing - thawing using various DMSO and EG concentration. Scale bar = 50 μ m

4. Antioxidant 탐색에 의한 동결시스템 확립

-. 돼지 배아줄기 세포의 antioxidant를 이용한 동결시스템을 확립을 위하여 돼지난자의 체외성숙과 배양과정에서의 γ -tocotrienol (GTT))과 L-ascorbic acid (V_C) 를 산화스트레스 조건 (H_2O_2 ; 200 μ M) 아래에서 복합 첨가하여 효과를 검토하였음. 200 μ M H_2O_2 에 50 μ M의 GTT와 100 μ M V_C 를 복합 처리하여 성숙률을 확인한 결과 산화스트레스에 노출된 난자에서 GTT만을 단독 처리하였을 때 성숙률이 유의적으로 높았음 <표41> ($p < 0.05$).

<표41> Effect of γ -tocotrienol and L-ascorbic acid treatment under the oxidative stress on nuclear maturation of porcine oocytes

Treatment	No. of oocytes	Stage of nuclear maturation (%)					
		GV	GVBD	MI	AI	TI	MII
H ₂ O ₂	175	16.0 ± 1.4 ^a	8.0 ± 2.3	40.0 ± 3.2 ^a	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^a	36.0 ± 1.4 ^a
H ₂ O ₂ + V _C	175	10.4 ± 1.7 ^b	5.6 ± 1.7	36.0 ± 4.4 ^{ab}	0.8 ± 0.8	0.84 ± 1.3 ^b	38.8 ± 3.8 ^a
H ₂ O ₂ + GTT	175	6.0 ± 1.8 ^b	4.4 ± 1.8	29.6 ± 2.3 ^b	0.8 ± 0.8	0.28 ± 1.5 ^a	56.4 ± 2.9 ^b
H ₂ O ₂ + V _C + GTT	175	10.4 ± 1.7 ^b	4.0 ± 1.3	28.8 ± 2.0 ^b	0.4 ± 0.4	13.6 ± 2.7 ^c	42.8 ± 1.7 ^a

V_C, L-ascorbic acid; GTT, γ -tocotrienol; GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; MI, metaphase of the first meiotic division; AI, anaphase of the first meiotic division; TI, telophase of the first meiotic division; MII, metaphase of the second meiotic division ($P < 0.05$)

- 이후 산화스트레스에 노출된 돼지난자에서 GTT와 V_C의 효과를 확인하기 위하여 GSH와 ROS 수준을 확인하였음 <표42>. 그 결과, GSH수준은 GTT 혹은 V_C를 단독 첨가한 처리군에서는 GTT만을 처리한 그룹에서 유의적으로 높았으나 ($p < 0.05$) GTT와 V_C를 복합처리한 그룹에서는 유의적인 차이를 보이지 않았음. 하지만 ROS 수준에서 GTT만을 단독 처리한 그룹이 모든 처리군에 비하여 유의적으로 감소한 것을 확인하였음 ($p < 0.05$).

<표42> Effect of γ -tocotrienol and L-ascorbic acid treatment on intracellular GSH and ROS levels under the oxidative stress during *in vitro* maturation

Treatment	No. of oocytes	Relative level (pixels per oocyte)	
		GSH	ROS
H ₂ O ₂	45	1.00 ± 0.02 ^a	1.00 ± 0.01 ^a
H ₂ O ₂ + V _C	45	1.04 ± 0.01 ^b	0.96 ± 0.01 ^a
H ₂ O ₂ + GTT	45	1.09 ± 0.01 ^c	0.90 ± 0.01 ^b
H ₂ O ₂ + V _C + GTT	45	1.07 ± 0.01 ^{bc}	0.98 ± 0.01 ^a

V_C, L-ascorbic acid; GTT, γ -tocotrienol

^{a-c} Values in the same column marked with different letters mean significant difference ($p < 0.05$)

- 이후, 산화스트레스 조건아래 GTT, V_C 혹은 GTT와 V_C를 복합 처리한 돼지난자의 발달능력을 확인하였음 <표43>. 그 결과, cleavage rate에서는 control과 비교하였을 때 GTT만을 처리한 그룹에서 2일차, 7일차 cleavage rate가 유의적으로 높았으나 ($p < 0.05$), GTT 혹은 V_C만을 처리한 그룹과 비교하였을 때 유의적 차이를 보이지 않았음. 그러나 blastocyst rate에서는 산화스트레스 조건 아래 GTT만을 처리한 그룹에서

유의적으로 높은 것을 확인하였음 ($p < 0.05$). 이를 통해, 산화스트레스 조건 아래에서 GTT와 V_C를 복합 처리하는 것 보다는 GTT만을 단독 처리하여 배양하는 것이 돼지난자의 성숙과 발달에서 더욱더 효과적인 것으로 생각됨.

<표43> Effect of γ -tocotrienol and L-ascorbic acid treatment under the oxidative stress on development of porcine embryos during *in vitro* culture

Treatment	No. of embryos	No. of cleavage (%)		No. of blastocyst (%)
		Day 2	Day 7	
H ₂ O ₂	160	78 (49.17 ± 2.75) ^a	82 (51.62 ± 2.50) ^a	4 (4.75 ± 1.04) ^a
H ₂ O ₂ + V _C	147	78 (53.08 ± 2.64) ^{ab}	84 (57.20 ± 2.65) ^{ab}	6 (7.20 ± 0.56) ^b
H ₂ O ₂ + GTT	158	93 (59.07 ± 2.39) ^b	105 (66.64 ± 2.95) ^c	12 (11.35 ± 0.67) ^c
H ₂ O ₂ + V _C + GTT	155	89 (55.76 ± 2.38) ^{ab}	95 (60.89 ± 2.46) ^{bc}	8 (8.42 ± 0.35) ^b

V_C, L-ascorbic acid; GTT, γ -tocotrienol

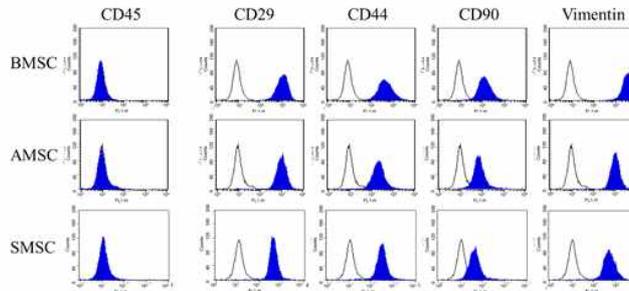
^{a-c} Values in the same column marked with different letters mean significant difference ($p < 0.05$)

- 따라서 본 연구의 결과 항산화제인 GTT의 처리는 세포 내 산화스트레스 수준을 감소시킴으로써 세포의 기능을 정상화 시킬 수 있으며, 이러한 GTT의 특징은 줄기세포의 동결 시 발생하는 산화스트레스로부터 세포를 보호하여 동결-융해 후 미분화 유지 및 세포증식에 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각됨.

[1차년도]

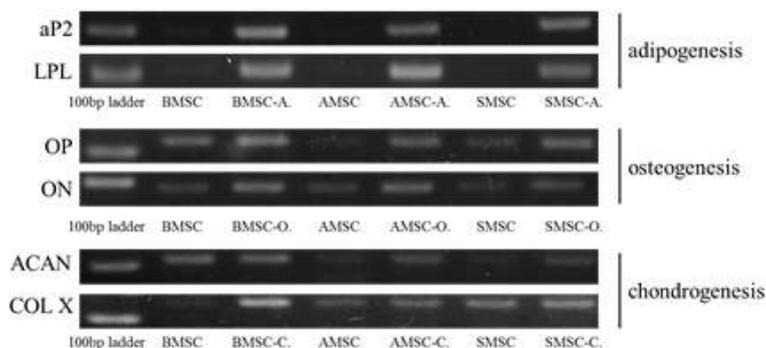
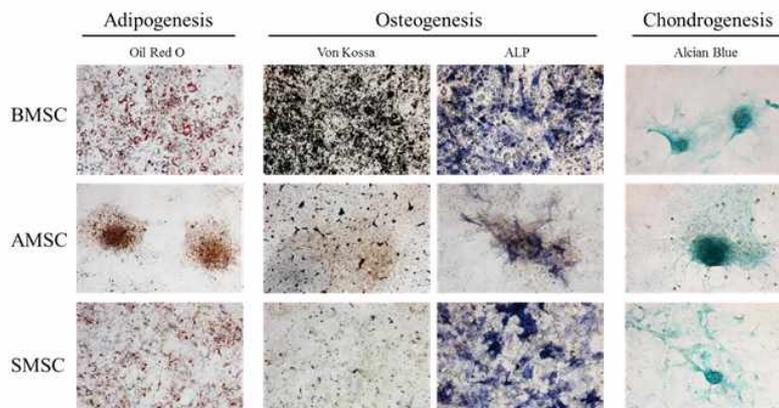
1. 다양한 조직으로부터 MSCs 분리 및 검증

- Bone marrow derived MSCs (BMSCs), Adipose derived MSCs (AMSCs), Skin derived MSCs (SMSCs)를 분리, 구축하여 MSCs의 특이적 표면항원을 분석하였음. 세 군 모두에서 positive marker인 CD29, CD44, CD90, Vimentin의 발현되고 negative marker인 CD45의 발현되지 않음을 확인하였음.<그림1>



<그림1> BMSCs, AMSCs, SMSCs에서의 표면항원 분석 결과

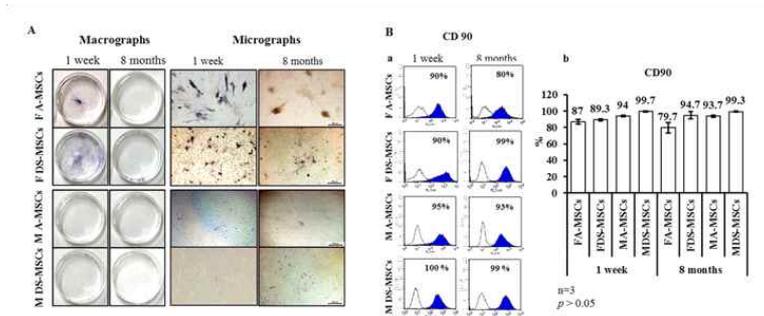
- BMSCs, AMSCs, SMSCs의 지방세포, 뼈세포, 연골세포로의 분화를 유도하여 Oil Red O, Von Kossa, ALP, Alcian Blue 염색 및 관련 특이마커의 발현을 PCR을 이용하여 검증하였음. 세 군 모두 관련 특이마커의 발현이 분화 유도 전에 비해 유도 후에서 증가함을 확인하였음. <그림2>



<그림2> BMSCs, AMSCs, SMSCs에서 지방세포, 뼈세포, 연골세포로의 분화유도 결과

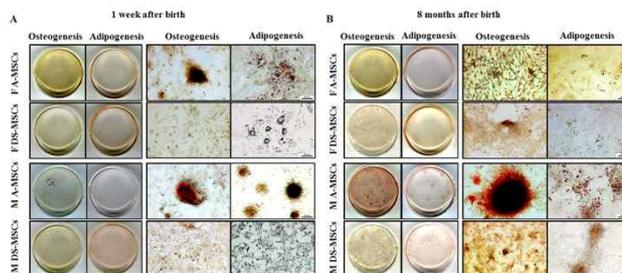
2. 성별, 나이, 세포기원에 따른 MSCs의 노화에 관한 연구

- 1주령, 8개월령 미니피그를 암컷, 수컷으로 분리하여 각각 지방 및 피부조직에서 MSCs를 분리, 구축하여 8개의 MSCs line을 확보하였음. 각각의 MSCs 군에서 Alkaline Phosphatase(AP) 염색 및 Flow cytometry를 이용하여 CD90 분석을 수행하였음. AP 염색에서 1주령의 암컷 지방, 피부 유래 MSCs에서 AP가 높게 나타남을 확인하였음. CD90 분석에서 line 간 차이는 있었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았음.<그림3>



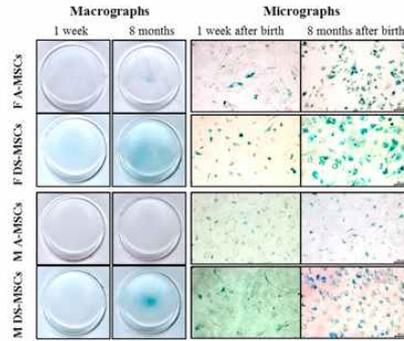
<그림3> 각 8개의 MSCs line에서의 AP 염색 및 CD90 분석 결과

- 구축된 8개의 MSCs line을 각각 지방세포, 뼈세포, 연골세포로 분화 유도하였음. 지방세포로 분화 시 각 line에서 분화능력의 차이는 나타나지 않았으나 뼈세포 분화 시 8개월령의 수컷 지방유래 MSCs에서 분화유도가 잘 되는 것을 확인하였음.<그림4>



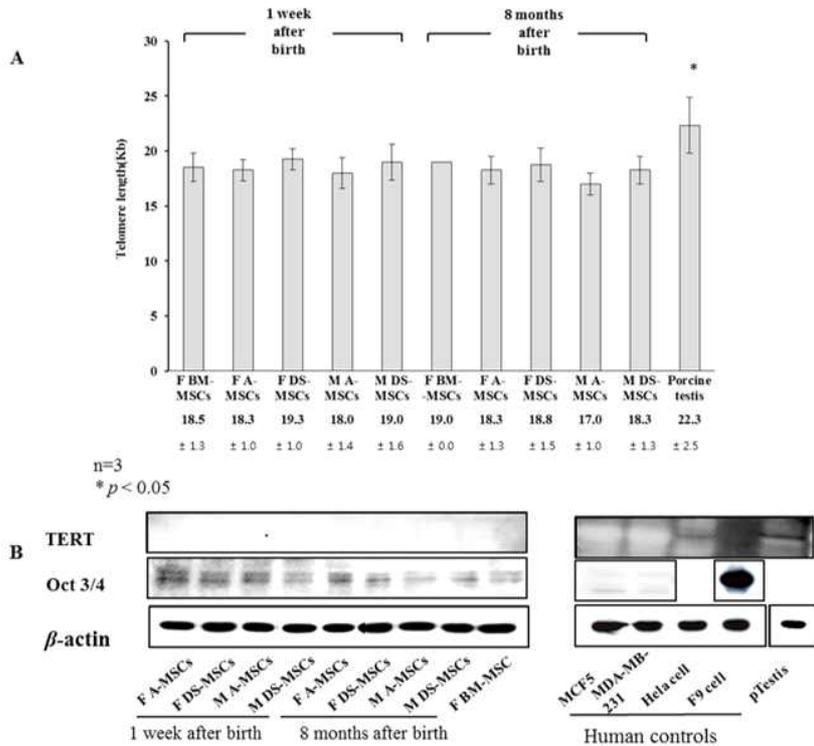
<그림4> 각 8개의 MSCs line에서의 지방세포, 뼈세포 분화 유도 후 염색 결과

- 구축된 8개의 MSCs line을 senescence를 분석하기 위해 Senescence associated (SA)- β -galactosidase를 염색하였음. 분석 결과, 전반적으로 8개월령 미니돼지 유래 MSCs에서 1주령 미니돼지 유래 MSCs에 비해 노화가 많이 일어난 것을 확인할 수 있었으며 특히, 피부유래 MSCs에서 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였음.<그림5>



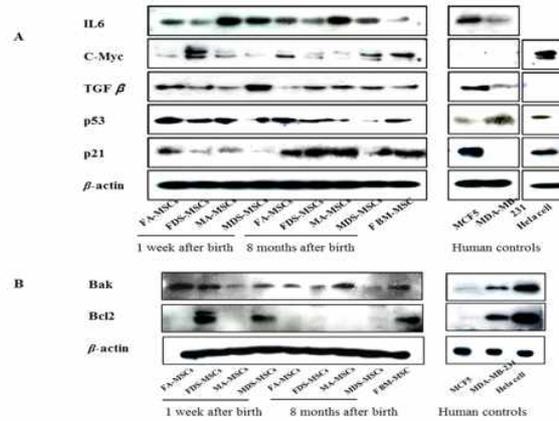
<그림5> 각 8개의 MSCs line에서의 SA-β-galactosidase 염색 결과

- 구축된 8개의 MSCs line에서 Telomere 길이 및 TERT, Oct 3/4 발현을 분석하였음. 각 line간 telomere의 길이는 유의적인 차이가 나타나지 않았음. TERT 또한 western blot을 통해 분석하였을 때 각 군간의 차이는 나타나지 않았으나 Oct 3/4의 경우 비교적 1주령의 미니피그 유래 MSCs에서 발현이 증가함을 확인하였음.<그림6>



<그림6> 각 8개의 MSCs line에서의 Telomere 길이 및 TERT, Oct 3/4 발현 분석 결과

- 구축된 8개의 MSCs line에 노화관련 단백질의 발현을 western blot을 통하여 분석하였음.<그림7>



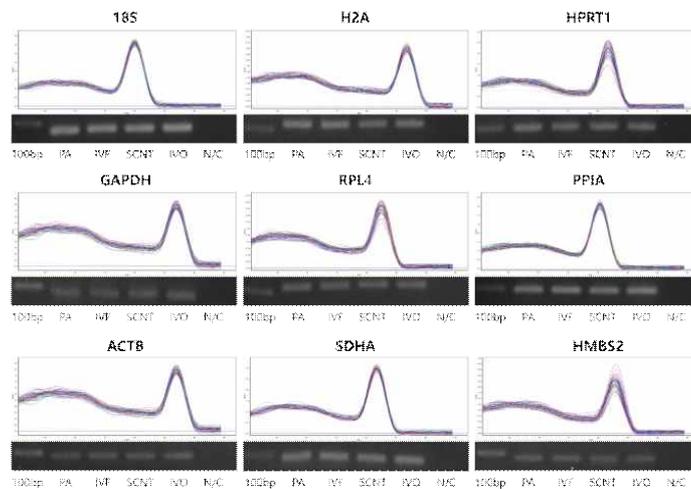
<그림7> 각 8개의 MSCs line에서의 노화 관련 단백질 발현 분석 결과

[2차년도]

1. 유전자 정량분석(Real time PCR)을 위한 돼지 수정란 특이적 Reference gene 선정

가. 프라이머 specificity 및 예상되는 PCR product size 분석

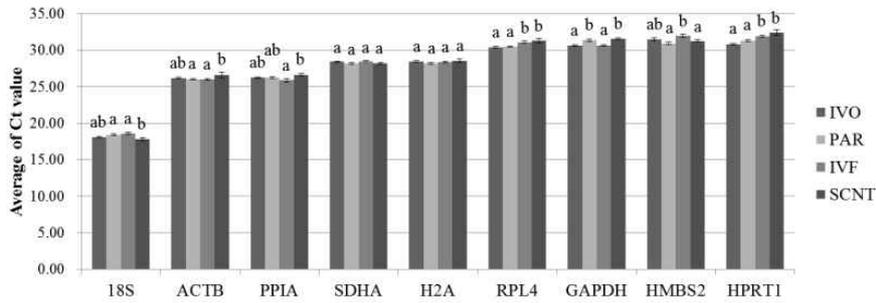
- 선택된 9개 reference gene(18S, H2A, HPRT1, GAPDH, RPL4, PPIA, ACTB, SDHA, HMBS2)의 RT-PCR 수행을 통해 얻어진 melting curve 및 전기영동을 통한 검사에서 선택된 9개 reference gene에 대한 primer가 dimer가 형성되지 않고 단일 product가 증폭되지 않음을 확인하였음.<그림8>



<그림8> 9개 reference gene의 RT-PCR에서의 melting curve 및 전기영동 gel 사진

나. in vivo 및 in vitro에서 생산된 수정란의 평균 Ct value 분석

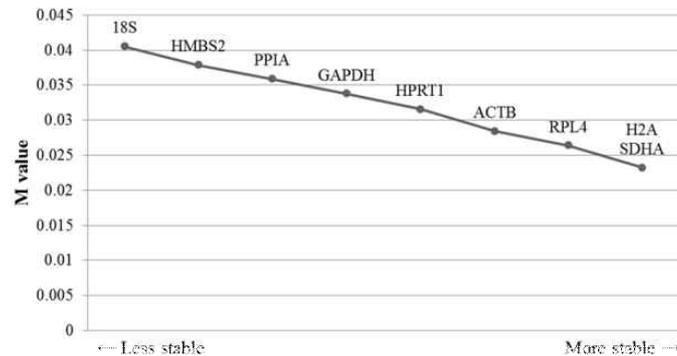
- in vivo blastocyst(IVO), parthenogenetic activation (PA), in vitro fertilization (IVF), somatic cell nuclear transfer (SCNT) 수정란을 이용하여 선택된 9개 reference gene의 RT-PCR 수행, 얻어진 Ct value에 대한 통계분석을 실시하였음.<그림9>



<그림9> 9개 reference gene의 RT-PCR에서의 Ct value

다. geNorm을 이용한 Reference genes ranking of stability (M values) 분석

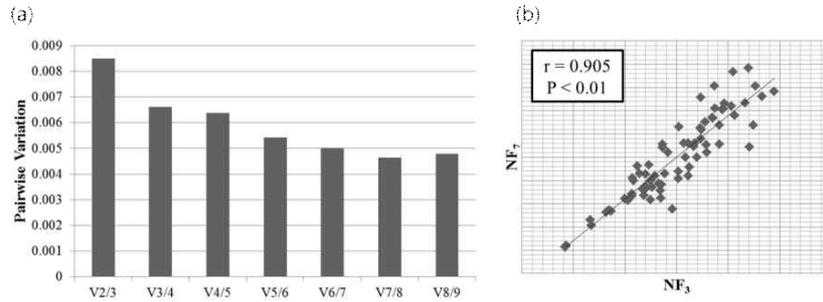
- M value는 전체 유전자에서 표준편차가 큰 유전자를 하나씩 지워감으로써 계산되어지며, 낮을수록 안정된 reference gene임을 의미함. 이 때, 가장 안정한 3개의 gene을 NF3라고 함. 분석 결과 가장 안정한 gene인 NF3는 RPL4, H2A, SDHA로 나타남.<그림10>



<그림10> 9개 reference gene의 M value

라. Pearson's correlation을 이용하여 최적의 Reference gene의 수 및 NFopt and NF3의 상관관계 분석

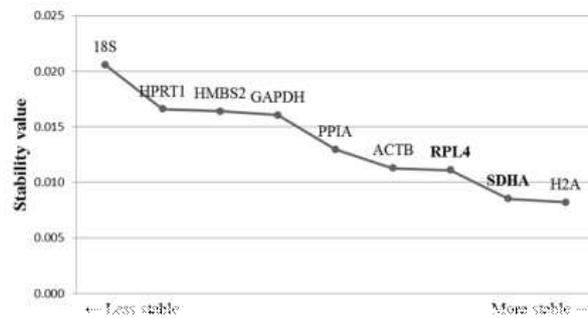
- P value는 전체 유전자에서 표준편차가 큰 유전자를 하나씩 지워갈 때 가장 표준편차가 낮은 순간을 나타내며, 각 실험군에서 분석에 필요한 reference gene의 숫자를 NFopt이라 함. 제시된 NFopt을 실제 실험에 사용하는 것을 불가능하다고 판단하여 제시된 NF3와 NFopt의 reference gene의 상관관계를 Pearson's correlation을 통하여 분석하였음. 그 결과 90%이상의 높은 상관관계를 나타내는 것으로 보이며 이를 통하여 NFopt를 사용하지 않고 NF3만으로 안정한 reference gene으로 판단될 수 있음을 보였음.<그림11>



<그림11> 9개 reference gene의 P value 및 NF3와 NFopt의 상관관계 분석

마. Normfinder를 이용한 Reference gene의 stability 분석

- Normfinder를 이용하여 선택된 9개의 reference gene의 안정도를 분석하였음. 결과 SDHA, H2A가 가장 안정정인 gene임을 나타내었음.<그림12>



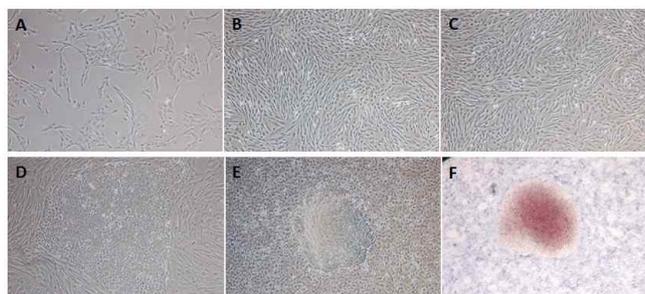
<그림12> Normfinder을 통한 9개 reference gene의 안정도 분석

- 위와 같은 분석을 통하여 돼지 수정란의 정확한 유전자 발현패턴 분석을 위하여 가장 안정한 reference gene은 SDHA와 H2A로 보임. 본 연구의 결과는 돼지 수정란 관련 연구시 안정한 reference gene을 제공함으로써 신빙성 있는 유전자의 발현 패턴 분석에 도움이 될 것이라고 예상됨.

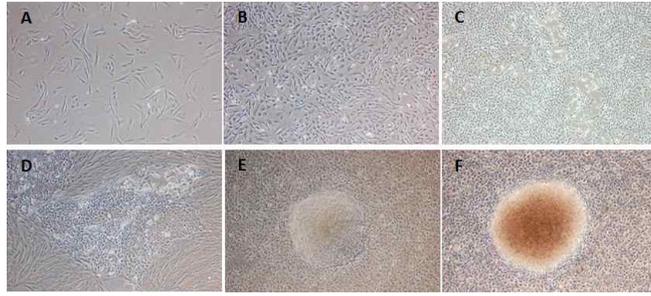
[3차년도]

1. 돼지 MSC 및 섬유아세포를 이용한 iPSCs 구축

- 가. 돼지 골수 유래 중간엽줄기세포(pBMSCs)와 피부유래 섬유아세포(pSFs)를 이용하여 iPSCs를 유도하였음. <그림13,14>



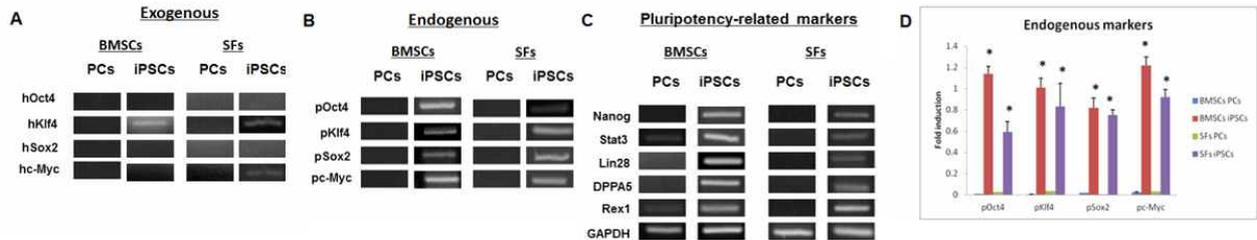
<그림13> pBMSCs의 morphology, iPSCs 유도 후 colony 형성 모습 및 ALP staining



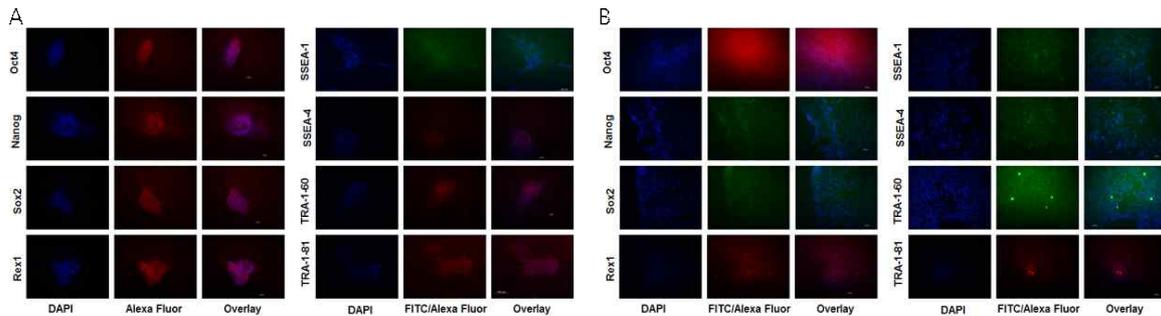
<그림14> pSFs의 morphology, iPSCs 유도 후 colony 형성 모습 및 ALP staining

나. 구축된 iPSCs의 검정

- 구축된 iPSCs에서 exogenous/endogenous gene 발현 및 pluripotency 관련 마커의 발현 확인하였음. pBMSCs-iPSCs에서는 hKlf4의 발현만이 확인되었으나 pSFs-iPSCs에서는 hKlf4와 hc-Myc의 발현이 확인되었음. pluripotency 관련 마커의 발현은 유도된 iPSCs에서 유의적으로 크게 발현이 증가하는 것을 확인하였음.<그림15,16>

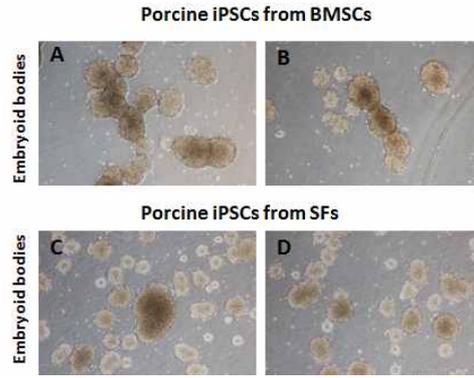


<그림15>Endpoint PCR 및 RT-PCR을 통한 각각의 iPSCs의 exogenous/endogenous gene 및 pluripotency marker 발현 분석

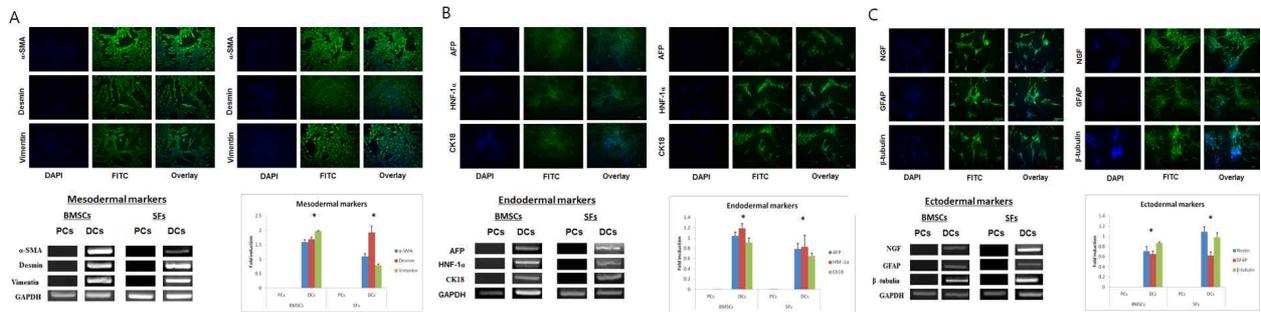


<그림16> 세포면역형광염색을 통한 각각의 iPSCs에서 pluripotency marker 발현 분석(A. pBMSCs-iPSCs, B. pSFs-iPSCs)

- Embryoid body (EB) 형성을 통한 3배엽 (mesoderm, endoderm, ectoderm)으로의 분화능력을 검증하였음.<그림17,18>

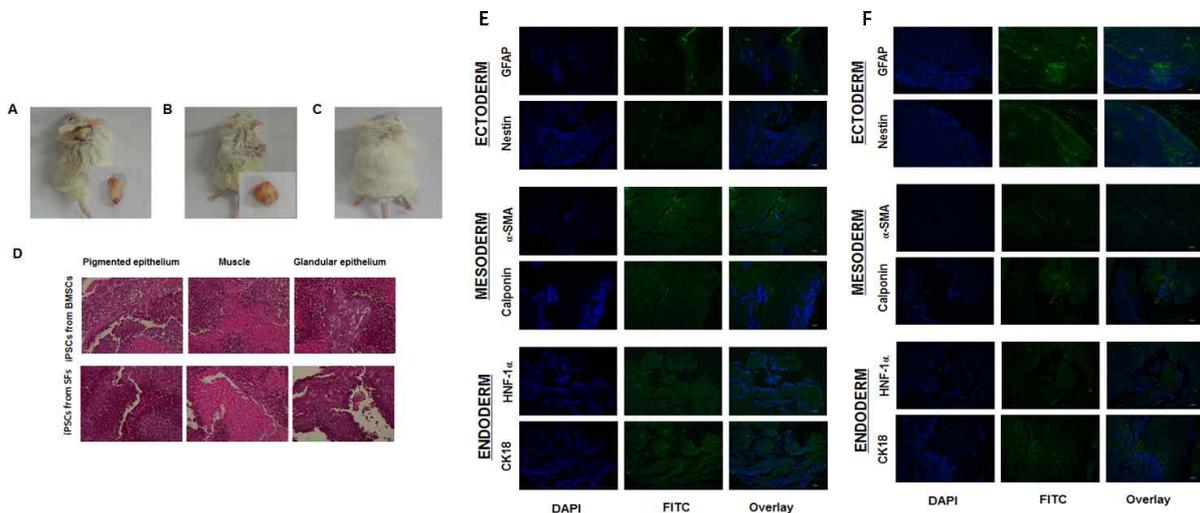


<그림17> 각각의 iPSCs에서 EB 형성



<그림18>. 각각의 iPSCs에서 trilineage로의 분화 후 면역형광염색 및 RT-PCR을 통한 관련 마커 분석(A. Mesoderm, B. Endoderm, C. Ectoderm)

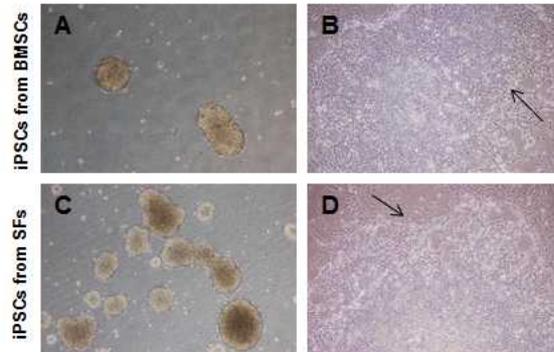
- SCID 마우스를 이용하여 구축된 iPSCs의 teratoma 형성능력을 검증하였음. 세포 주입 8주 후, pBMSCs-iPSCs와 pSFs-iPSCs를 주입한 군에서 teratoma가 형성된 것을 확인하였으며, 대조군으로 PBS를 주입한 군에서는 teratoma가 형성되지 않았음. 형성된 teratoma를 H&E 및 조직형광 염색을 통하여 mesoderm, endoderm, ectoderm을 확인하였음.<그림19>



<그림19> 각각의 iPSCs를 SCID 마우스에 주입 후 teratoma 형성 및 H&E와 조직면역 염색을 통한 분석

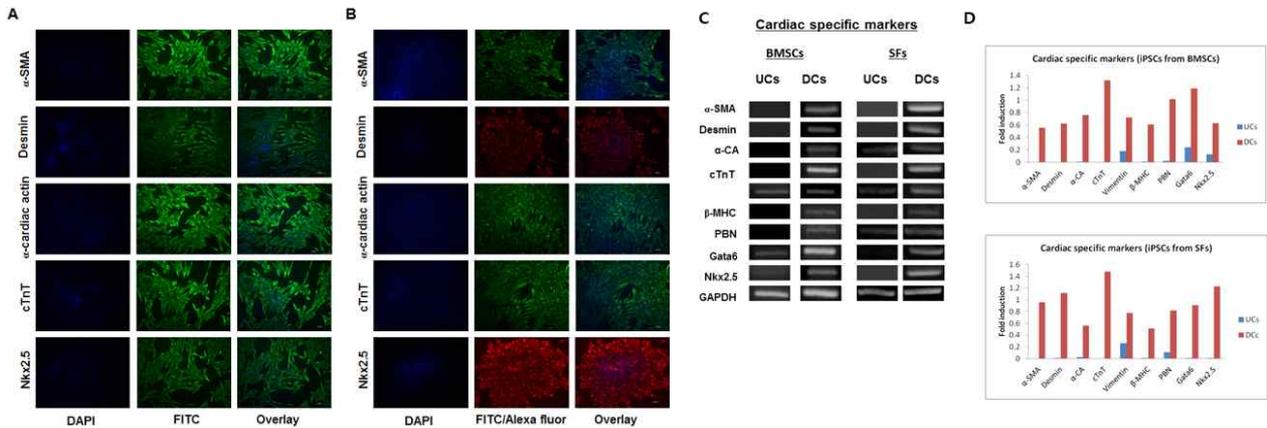
다. 구축된 iPSCs의 심근세포로의 분화

- 구축된 pBMSCs-iPSCs와 pSFs-iPSCs를 이용하여 EB형성 후 5-asacytidine을 함유한 배지에서 심근세포로 분화 유도하였음.<그림20>



<그림20> 각각의 iPSCs에서 EB 형성(좌)하여 심근세포로 분화 후 morphology(우)

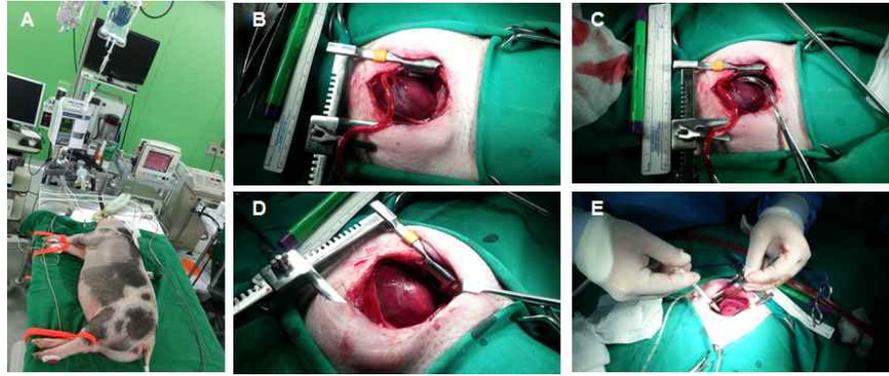
- 심근세포로 분화유도된 iPSCs를 심근세포 특이적 마커인 α -SMA, Desmin, α -cardiac actin (α -CA), Cardiac troponin T (cTnT), Vimentin, β -MHC, Phospholamban (PBN), Gata6 및 Nkx2.5를 면역형광염색 및 PCR을 통해 분석하였음.<그림21>



<그림21> 심근세포로 분화유도된 각각의 iPSCs에서 심근세포 특이적 마커 발현 분석

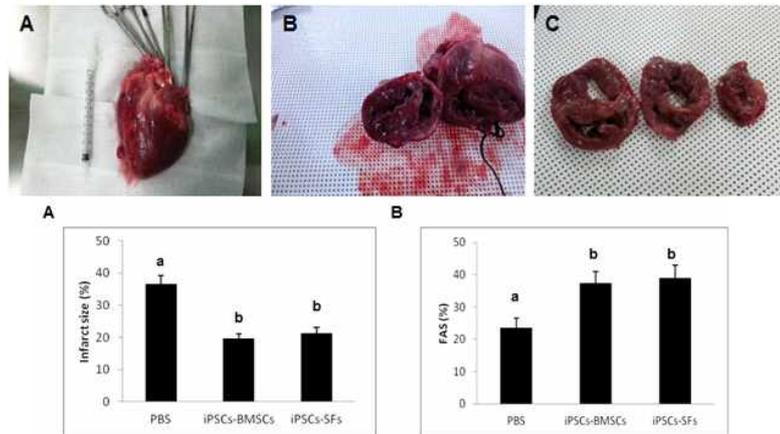
라. 구축된 iPSCs의 심근경색 미니돼지 동물모델에 적용

- 미니돼지에 심근경색을 유도하여 동물모델을 생산한 후 iPSCs를 이식하여 구축된 iPSCs의 치료적 적용가능성을 평가하였음. 심근경색 미니돼지 동물모델은 미니돼지를 마취한 후 흉골절개술을 통하여 심장을 노출시키고 심막을 절제하고 LAD를 결찰하여 유도하였음. 경색이 일어난 부위를 확인한 후 1 ml iPSCs (5×10^7 cells/animal)를 PKH26으로 labeling하여 경색부위 및 경색 주변부위에 나누어 주입하였음.<그림22>



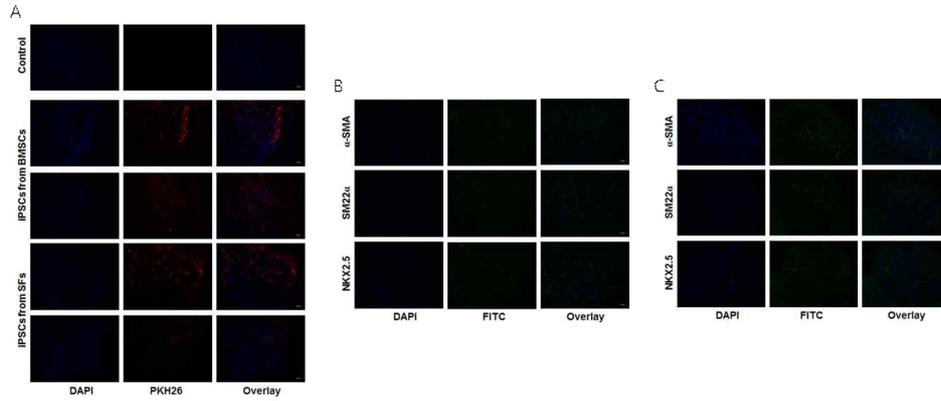
<그림22> 심근경색 미니돼지 동물모델 생산 및 iPSCs 주입

- iPSCs를 주입 4주 후 미니돼지의 심장을 적출하여 횡단면으로 절개, 허혈부위를 조직학적으로 분석하였음. iPSCs를 주입한 군에서 경색부위가 현저히 감소된 것을 확인하였으며 Fractional Area Shortening(FAS) 측정 결과 iPSCs를 주입한 군에서 증가하는 경향을 보였음. <그림23>



<그림23> 심근경색 미니돼지 동물모델에서 적출한 심장 및 심장의 기능적 평가(Infraction size 및 FAS)

- 적출한 미니돼지 심장에서 PKH26을 labeling한 iPSCs의 생존여부를 확인하였음. 심근 조직에서 PKH26의 발현을 확인을 통하여 iPSCs 주입 4주 후에도 주입된 세포가 생존하고 있음을 검증하였음. 또한 iPSCs 주입에 대한 부작용으로 염증세포의 침윤 및 염증 반응이 나타나지 않음을 확인하였음.
- 각 iPSCs가 주입된 심근에서 심근세포 특이적 마커인 α -SMA, smooth muscle 22 α (SM22 α) 및 Nkx2.5의 발현을 조직면역염색을 통해 확인하였음. <그림24>



<그림24> 심근조직 내 PKH26 발현 확인(A) 및 각 iPSCs 주입된 심근조직에서의 심근세포 특이적 마커 발현 분석(B, C)

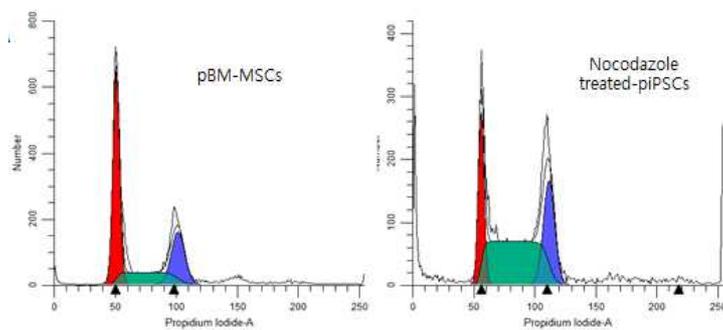
[4차년도]

1. 공여세포의 선택

가. 공여세포는 G0/G1기로 동기화 한 후 핵이식을 진행함. MSCs의 경우 serum starvation 또는 full confluent 상태에서 높은 비율로 동기화가 됨. 구축된 piPSCs와 pMSCs의 cell cycle을 측정하여 G0/G1기의 비율을 측정하고 핵이식 후 cleavage율, blastocyst율을 평가하여 공여세포로서의 적합성을 판단하였음.

나. piPSCs와 pMSCs의 cell cycle 비교를 통한 공여세포 적합성 평가

- pMSCs의 경우 bonmarrow derived MSCs(pBM-MSCs)를 사용하였고 full confluent된 상태로 cell cycle을 측정하였음.
- piPSCs의 경우, 세포 주기를 멈추기 위해 Nocodazole을 처리하여 cell cycle을 측정하였음.
- 그 결과 pBM-MSCs의 경우 G0-G1기가 75.6%, piPSCs는 Nocodazole 약물을 처리했음에도 22.09%가 나왔음. <그림25>



	G0-G1(%)	S(%)	G2-M(%)
pBM-MSCs	75.6	13.4	11
piPSCs	22.09	51.53	26.38

<그림25> pBM-MSCs와 Nocodazole treated-piPSCs의 cell cycle 비교

다. pMSCs와 piPSCs를 공여세포로 한 핵이식 효율 비교

- pMSCs와 piPSCs를 사용하여 핵 이식을 한 결과가 다음과 같았음.<표1>

<표1> pMSCs와 piPSCs를 사용한 핵 이식 발달률

Groups	No. of embryos	No. of Cleaved embryos (Mean%±SEM)	No. of Blastocyst (Mean%±SEM)
pBMSCs NT	284	195(68.8±1.7) ^a	43(15.2±6.2) ^a
iPSCs NT	260	155(59.7±6) ^b	19(7.3±3.7) ^b

- piPSCs가 높은 증식력과 분화능을 보이지만 핵 이식시 cleavage률, blastocyst률이 MSCs에 비해 낮아 공여세포로서 MSCs가 더 유리한 것으로 여겨짐.

2. MSCs를 이용한 높은 효율의 핵이식 방법 검증

- 본 연구진은 수정란 발달 단계에서의 후성유전학(Epigenetics)적 접근을 통해 기존의 낮은 돼지 체세포 핵이식 효율을 높이기 위한 연구를 진행하였음. 체세포 핵이식의 낮은 효율은 공여세포가 가진 기존의 후성 유전적 특성을 삭제하고 배아상태의 유전자를 새롭게 재발현시키는 리프로그래밍 과정의 빈번한 결함 발생이 그 원인중 하나로 밝혀진 바 있음. 이러한 리프로그래밍 과정에서 DNA methylation, Histone methylation 또는 acetylation등의 변화가 중심적인 역할을 하며 본 연구에 사용된 Trichostatin A(TSA)는 Histone deacetylase inhibitor로서 리프로그래밍 과정 중 Histone acetylation을 조절하는 작용을 함. TSA의 작용으로 유도된 histone acetylation은 각종 리프로그래밍 관련 유전자와 전사인자 등의 물리·화학적 결함 및 작용에 유리한 환경을 조성하여 체세포 핵이식의 리프로그래밍은 물론 수정란의 발달의 효율을 증진시킬 것으로 기대됨.

가. TSA처리에 따른 수정란 발달률 변화

- TSA처리는 공여세포와 난자의 post-activation이후 40nM, 24hr처리 하여 각각의 군에서 발달률을 비교분석 함. <표2>

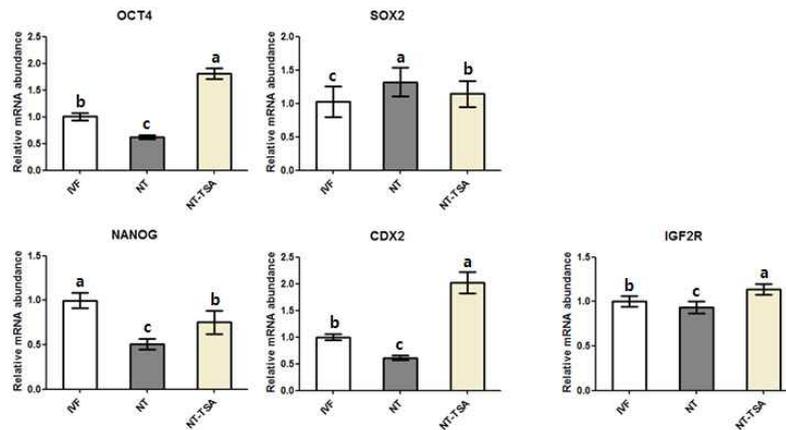
<표2> IVF, pBMSCs-NT, TSA treated pBMSCs-NT의 수정란 발달률

Groups	No. of embryos	No. of Cleaved embryos (Mean%±SEM)	No. of Blastocyst (Mean%±SEM)
IVF	440	267(59.2±10.5)	66(14.2±2.3) ^b
pBMSCs NT	347	249(71.3±4.6)	48(13.7±1.9) ^b
pBMSCs NT-TSA	325	227(69.0±2.4)	105(32.5±1.1) ^a

- 2-, 4-세포기 발달률은 IVF, pBMSCs NT, pBMSCs NT-TSA군이 각각 59.2±10.5%, 71.3±4.6%, 69.0±2.4%를 나타내어 TSA 처리에 따른 유의적 차이가 없었으나 배반포 발달률은 IVF, pBMSCs NT, pBMSCs NT-TSA군이 각각 14.2±2.3%, 13.7±1.9%, 32.5±1.1%를 나타내어 TSA 처리에 따라 핵이식 수정란의 유의적으로 높은 배반포 발달률을 확인함.

나. TSA 처리에 따른 리프로그래밍 관련 유전자 발현 패턴 분석

- TSA 처리에 따른 전분화능(pluripotency) 및 계통 분화(lineage differentiation)관련된 유전자인 OCT4, SOX2, NANOG, CDX2와 배아발달과 관련된 대표적 각인유전자(imprinted gene)인 IGF2R의 발현량을 비교 분석.<그림26>



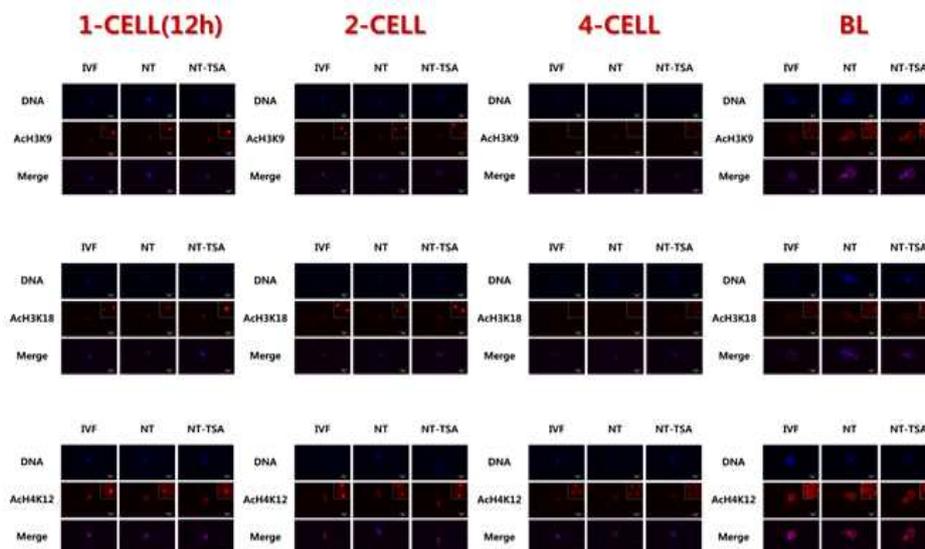
<그림26> 계통 분화와 증식력 관련 유전자 및 각인 유전자의 상대적 mRNA 발현량 분석

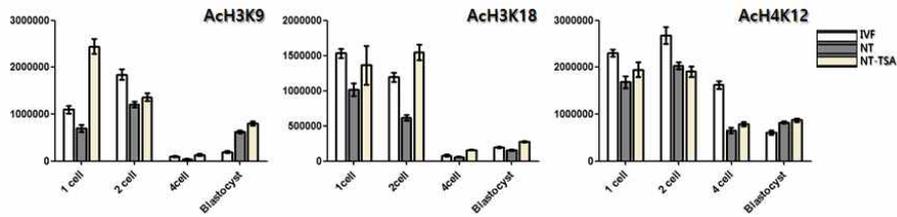
- OCT4, CDX2 유전자의 경우 IVF군에 비해 pBMSCs NT군에서의 발현량이 낮은 것을 확인 할 수 있으며 TSA를 처리한 pBMSCs NT-TSA군의 경우 그 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인함.

- NANOG, ICF2R 유전자의 경우에도 IVF군에 비해 pBMSCs NT군에서의 발현량이 낮은 것을 확인 할 수 있으며 TSA를 처리한 pBMSCs NT-TSA군의 경우 그 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었으나 NANOG의 경우 발현량이 IVF군보다는 적은 것을 확인함.

다. TSA 처리에 따른 수정란 발달 단계에서의 histone acetylation패턴 분석.

- TSA 처리로 유도된 histone acetylation패턴을 1-세포기, 2-세포기, 4-세포기, 배반포기의 각 수정란 발달단계에서 비교분석함.<그림27>





<그림27> 1 세포기, 2 세포기, 4 세포기, 배반포에서의 H3K9ac, H3K18ac, H4K12ac 시그널

- pBMSCs NT군의 H3K9, H4K12의 acetylation level이 1-세포기, 2-세포기, 4-세포에서 IVF군에 비해 모두 낮은 것을 확인할 수 있으며 TSA를 처리한 pBMSCs NT-TSA군의 경우 그 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인함.
- pBMSCs NT군의 H3K18 acetylation level은 분석한 배아 발달 전 단계에서 IVF군에 비해 모두 낮은 것을 확인할 수 있으며 TSA를 처리한 pBMSCs NT-TSA군에서 그 발현량이 유의적으로 증가하는 것을 확인함.

3. 새로운 공여세포의 발굴

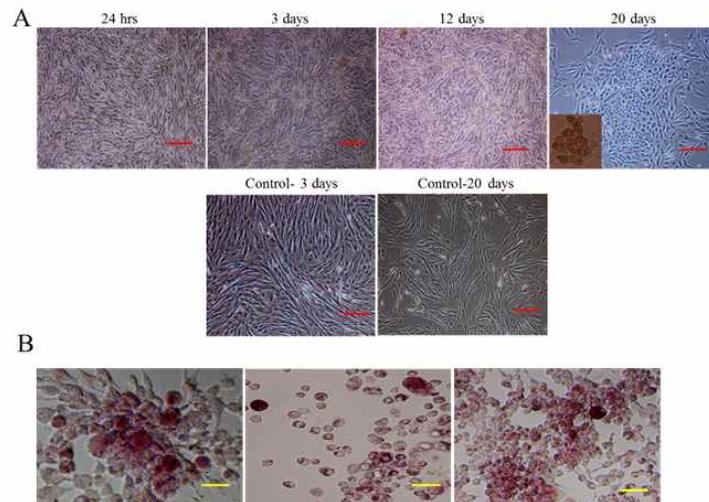
- 본 연구진은 과거 일반적으로 핵이식 시 사용되었던 돼지 섬유아세포(porcine fibroblast)에 비해 pMSCs가 높은 핵이식 효율을 보인다는 점, piPSCs가 높은 증식력과 분화능을 보이지만 cell cycle 측면에서 적합하지 않고 오히려 핵이식 효율이 낮기 때문에 공여세포로서의 적합성이 부족하다는 점을 선행연구에서 밝혀내었음. MSCs의 뛰어난 공여세포로서의 유용성에 대한 연구를 바탕으로 보다 높은 효율의 핵이식을 위해 새로운 pMSCs의 발굴 및 검증이 필요하다고 생각되었음. 돼지 자궁내막 유래 중간엽 줄기세포 (Porcine endometrial stromal-derived mesenchymal stem cells, pEMSCs)의 채장 베타 세포와 심근세포로의 분화를 통해 보다 더 뛰어난 공여세포로서의 가능성을 시사 할 것으로 기대함.

가. pEMSCs를 사용한 채장 베타 세포로의 분화

- 7개월령 암컷 돼지의 자궁 채취하여 pEMSCs를 분리하였으며 ADMEM 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 100U/ml 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)을 첨가하여 38.5°C의 5% CO2 조건에서 배양하였음.
- pEMSCs가 플라스크에 70%가량 배양 되었을 때 4 Step 과정을 통하여 분화유도하였음.

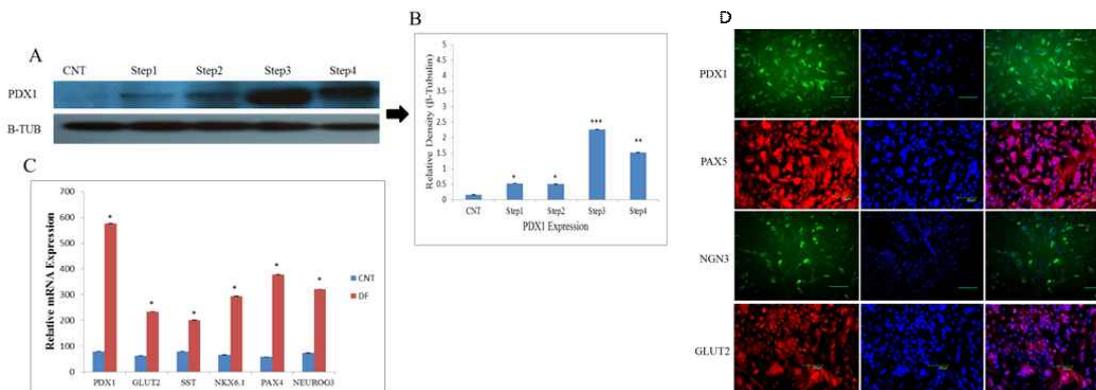
- 1 Step : 10% FBS, 1uM 레티오닉 산(retionic acid)을 첨가한 25mM DMEM에서 24시간 배양
- 2 Step : 유도된 세포를 10% FBS 25mM DMEM에서 이틀간 배양 후 0.25% 트립신으로 떼어냄.
- 3 Step : 떼어낸 세포는 Geltrex LDEV-free membrane matrix로 코팅한 6-well 플레이트에서 10% FBS, 10mM 니코티나마이드(nicotinamide), 10ng/ml 상피성장인자(epidermal growth factor), 300 nmol/l 인도락탐 V(indolactam V)에서 9일간 배양. 배지는 3일마다 교환.
- 4 Step : 10% FBS, 10mM Exendin-4, 50ng/ml Activin A를 첨가한 5.6mM DMEM에서 7일간 배양.

- 분화된 세포는 step 1에서는 세포 형태가 변하지 않았으나 step 2에서는 응집되어 무리 (cluster)를 형성하였으며 step 3 마지막 시기에는 세포가 구형의 몸체를 갖추었으며 step 4에서는 전형적인 췌장세포의 형태를 보여주었음. DTZ 염색으로 이를 확인하였음. <그림28>



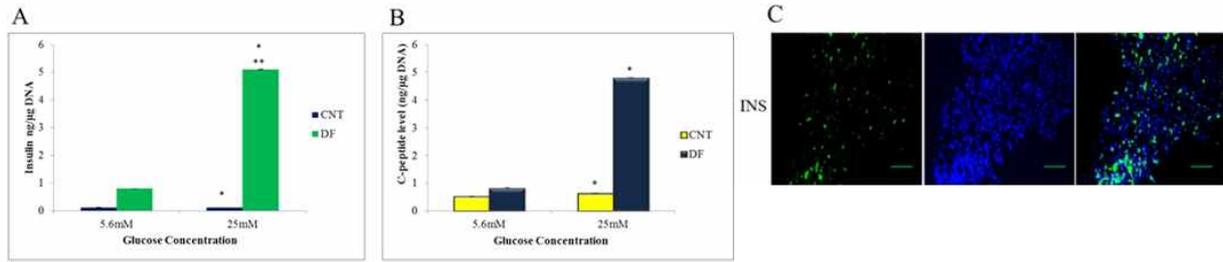
<그림28> (A) 췌장 분화 세포와 대조군 세포의 현미경 사진 (B) 분화된 세포의 dithizone 염색사진

- 인슐린 전구인자 1로 알려진 PDX1의 발현은 다른 단계에 비하여 step 3에서 유기적으로 높게 발현이 되었으며, 대조군인 줄기세포에서 가장 낮게 발현되었음. 췌장 B-cell의 특징적인 PDX1, GLUT2, SST, NKX6.1, PAX4, NEUROG3 또한 분화 후 높게 발현 되었음. 면역형광염색 시 PDX1, INS, PAX5, NEUROG3, GLUT2이 분화된 세포에서는 발현 되었으며, 대조군에서는 발현하지 않았음. <그림29>



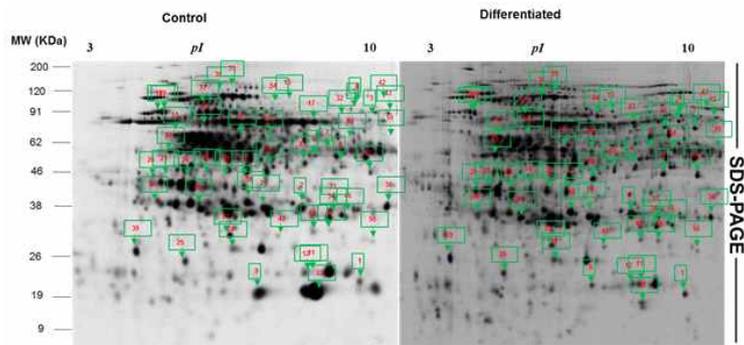
<그림29> 분화과정의 pEMSCs에서 PDX1의 발현 비교(A, B)와 췌장 B 세포 특이적 유전자의 RT-qPCR(C) 및 면역형광염색(D)

- 글루코스 변화에 따른 인슐린 및 C-peptide의 분비 측정시 분화된 세포에서 발현되었으며 ($p < 0.05$) 대조군에서는 변화가 없었음.<그림30>



<그림30> 췌장분화세포와 대조군 세포의 (A) 인슐린 (B) C-peptide level 비교 (C) 인슐린 단백질 발현의 면역형광염색

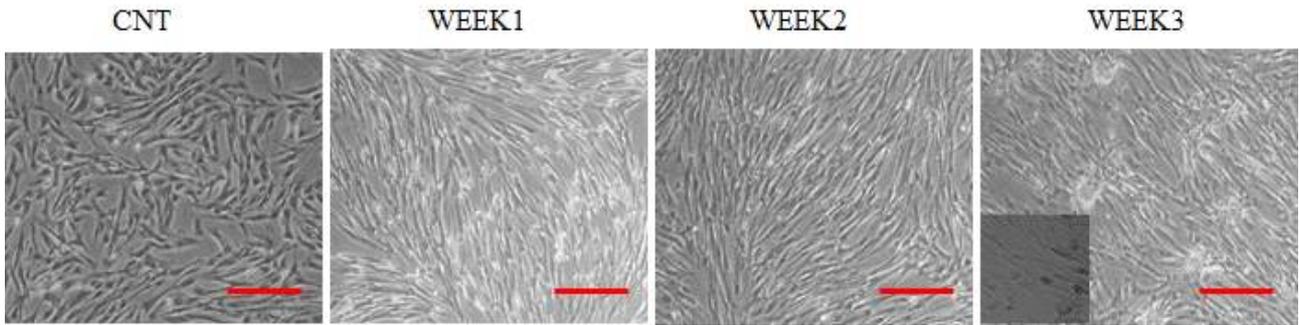
- 대조군 세포와 분화된 췌장 세포 단백질 분석시 PD-Quest 분석 결과 대조군에서는 365.3 ± 18.32 spot이 분화된 세포군에서는 382.7 ± 24.71 이 관찰되었음. 대부분 spot은 PH 4~9에서 관찰 되었으며, 말디토프 분석결과 48개의 spot이 분화된 세포에서 다르게 관찰되었음.<그림31>



<그림31> 대조군과 췌장분화 세포군의 2D

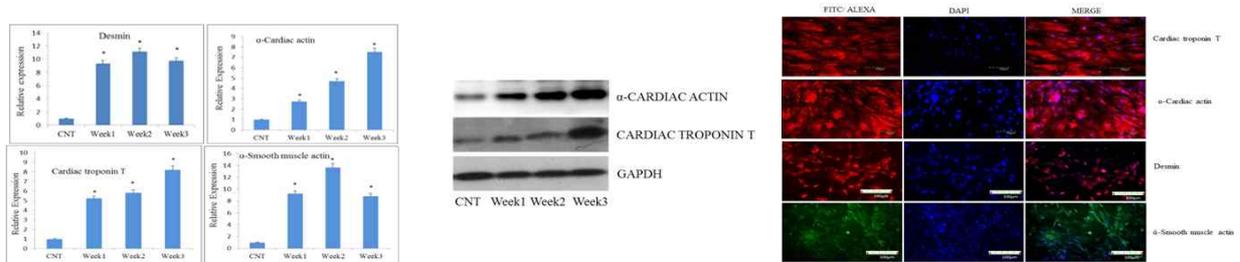
나. pEMSCs를 이용한 심근세포로의 분화 능력에 관한 연구

- 본 연구는 pEMSCs의 다양한 세포로의 분화 능력을 검증하는 연구로써, 앞서 수행한 신경세포, 췌장 β 세포로의 분화와 함께 심근세포로의 분화능력을 검증하였음. 심근세포로 유도하기 위하여 5-azacytidine($10 \mu\text{mol/L}$)과 angiotensin-II ($0.1 \mu\text{mol/L}$)을 24시간 처리 한 후 TGF- β 1(10ng/ml)가 포함된 배양액에서 20일 동안 배양하여하여 심근세포로 분화를 유도하였음.
- 분화 유도 1주일 후 긴 막대모양(fibroblast-like morphology \rightarrow elongated-stick like morphology)의 세포형태 변화를 관찰하였으며 분화 유도 말기에는 근관세포(myotube)와 유사하게 인접 세포와 연결되어 cluster를 형성함. <그림32>



<그림32> 심근세포로 분화 유도한 pEMSCs의 형태학적 변화

-. pEMSCs의 심근세포 분화능력을 확인하기 위해 심근세포의 특이적인 단백질인 Desmin(DES), Cardiac muscle alpha actin(ACTC1), Cardiac troponin T(cTnT) 및 alpha smooth muscle actin(ACTA2)를 RT-PCR, western blot 및 면역세포화학염색을 통해 검증하였음. RT-PCR을 통해 모든 심근세포 특이 단백질이 분화 유도 전의 돼지 자궁내막 유래 중간엽 줄기세포에 비해 분화 유도 후 유의적으로 높은 수준의 유전자 발현이 나타남을 검증하였음. DES 및 ACTA2의 경우 분화 2주차에서 가장 높게 발현되었으며 ACTC1 및 cTnT는 점차적으로 높게 발현됨을 확인하였음. western blot을 통해 RT-PCR의 결과와 동일하게 ACTC1 및 cTnT의 발현이 순차적으로 증가하는 것을 단백질 레벨에서 검증하였음. 분화 3주차의 세포를 면역세포화학염색을 통해 심근세포 특이 단백질 발현 여부를 확인하였음. <그림33>

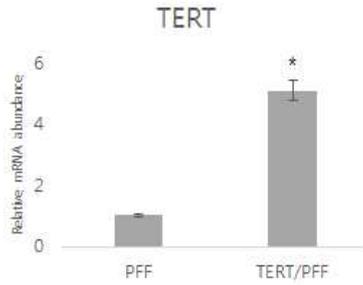


<그림33> pEMSCs의 심근세포 특이 단백질의 발현 분석

4. TERT 유전자가 도입

-. TERT(Telomerase reverse transcriptase) 유전자는 telomere 길이를 유지시키고 길어지게 하는 telomerase의 구성요소로서 노화가 진행될수록 발현량이 감소하고 줄기세포의 증식력 및 분화능과도 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있음.

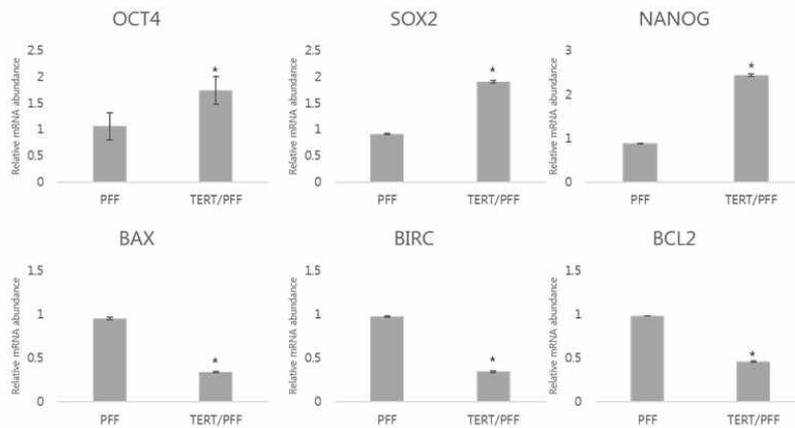
-. Porcine Fetal Fibroblasts(PFFs)에 TERT 유전자를 도입한 후 이를 확인하였음. <그림34>



<그림34> TERT 유전자 도입후 RT-PCR을 통한 검증

가. 구축된 TERT 과발현 세포(TERT/PFF)에 관한 분석

- TERT 처리에 따른 전분화능에 관련된 유전자인 OCT4, SOX2, NANOG 및 세포사멸 (apoptosis)에 관련된 BAX, BIRC, BCL2의 발현량을 비교분석하였음. OCT4, SOX2, NANOG 유전자의 경우 PFF군에 비하여 TERT/PFF군에서의 발현이 증가함을 보였으나 pro-apoptosis 유전자인 BAX와 anti-apoptosis 유전자인 BIRC, BCL2 또한, PFF군에 비해 TERT/PFF 군에서의 발현량이 감소하는 것을 확인하였음.<그림35>



<그림35> TERT 유전자 도입 후 RT-PCR을 통한 pluripotency 및 apoptosis 관련 유전자의 상대적 mRNA 발현량 분석

5. TERT 유전자가 도입된 세포를 이용한 핵이식

- Porcine Fetal Fibroblasts (PFFs)에 TERT유전자를 도입하여 구축한 cell line으로 핵 이식을 하였으며 핵 이식 발달률은 다음과 같음. <표3>

<표3> PFFs NT, TERT/PFFs NT의 핵 이식 발달률

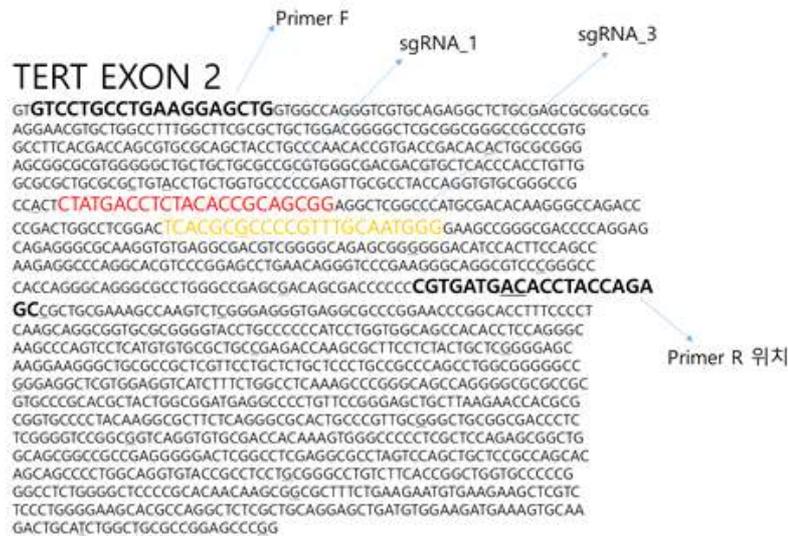
Groups	No. of embryos	No. of Cleaved embryos (Mean%±SEM)	No. of Blastocyst (Mean%±SEM)
PFFs NT	289	195(67.5±8.3) ^a	48(16.5±1.4) ^a
TERT/PFFs NT	188	98(52.9±2.8) ^b	13(6.9±0.7) ^b

- 발달된 blastocyst는 이식을 통해 암에 취약한 동물 모델의 생산을 기대할 수 있을 것으로 보임.

6. Porcine TERT targeting crispr cas9 제작

- 최근 노화에 관한 연구가 많이 진행되고 있지만 나이가 많은 여성에 있어 염색체 이상인 태아가 태어날 확률이 높고 수정률이 낮은 이유가 명확하게 밝혀져 있지 않음. 현재까지 나이가 많은 마우스의 난자의 telomere 길이가 짧으며(Yamada-Fukunaga et al. 2013) 염색체 이상(an euploidy)을 가진 수정란과 telomere DNA 의 결손이 연관되어 있다는 보고(Nathan R. Treff et al. 2011), 돼지가 사람과 다른 실험동물에 비해 유사하다는 점으로 미루어 본 연구진은 돼지를 이용한 노화 모델을 생산하고자 하였음.

가. Porcine TERT 유전자 exon2 부위를 목표로 하는 sgRNA1, sgRNA3을 제작하였음. <그림36>



<그림36> Porcine TERT exon2 부위의 염기서열과sgRNA가 목표하는 위치

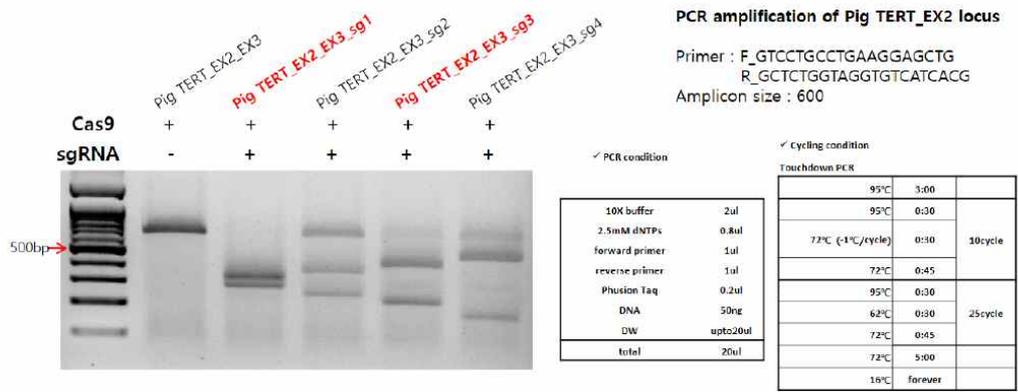
- 검증을 위해sgRNA_1, sgRNA_2을 CAS9 protein과 함께porcine 세포DNA에 처리하여 600bp 보다 더 작은 부위에서 확인이 되었음 (잘리기 전 PCR product size가 600bp로 PCR gel사진에서 확인되었음. 목표하는 부위가 잘려서 PCR product size가 더 작은 위치에서 확인됨). <그림37>

<그림37> 제작한sgRNA 및 CAS9 protein의 PCR을 통한 검증

나. 난자 및 수정란에서의 CRISPR CAS9의 작동 검증

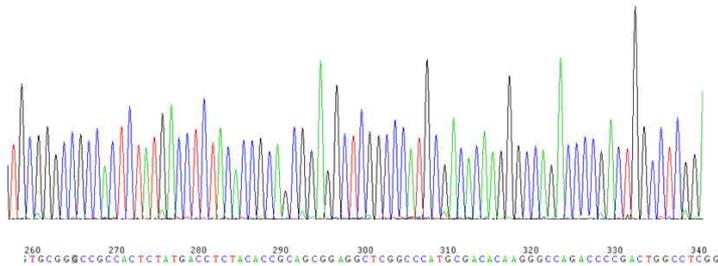
- 난자에 sgRNA 1 과 CAS protein을 함께 주입 (sgRNA: 62.5 ng/ul, CAS9: 62.5 ul) 한 후 electrical pulses (1.2 KV/cm, 30 ms, two times, 1 sec interval) 를 처리하여 activated oocytes (parthenogenetic embryos)를 PZM media에 배양하여 blastocyst 를 10개 모아 DNA 분리함. sgRNA가 목표하는 부위를 포함하여 PCR로 증폭시켜 sanger sequencing 함. 아래 그림과 같이 CAS9 protein만 주입한 control 의 경우one peak 를 보이는데 sgRNA + CAS9 protein을 주입한 군의 경우 목표 부위가 잘려 잡다 한 peak를 형성하는 것을 알 수 있음. <그림38>

- ① Pig TERT_EX2_sgRNA_1 (50ug, lyophilized): 5' CTATGACCTCTACACCGAGCGG 3'
- ② Pig TERT_EX2_sgRNA_3 (50ug, lyophilized): 5' TCACGCGCCCCGTTTGAATGGG 3'



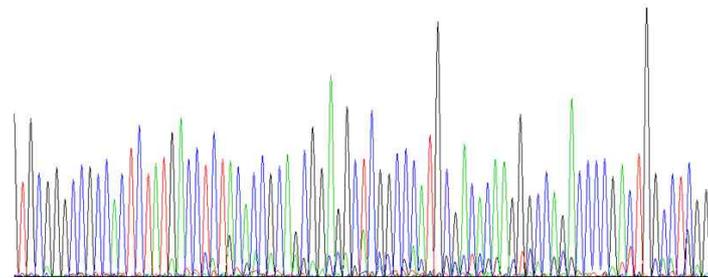
268 270 280 290 300 310 320 330 340
TGC GGC CGC CAC TCT ATG ACC TCT ACACCGC AGCGG AGGCTCGGCCCATGCGACACAGGGCCAGACCCCGACTGGCCCTCGG

Control group : CAS9 protein



260 270 280 290 300 310 320 330 340
TGC GGC CGC CAC TCT ATG ACC TCT ACACCGC AGCGG AGGCTCGGCCCATGCGACACAGGGCCAGACCCCGACTGGCCCTCGG

Experimetal group : sgRNA1 + CAS9 protein



<그림38> Sanger sequencing을 통한 난자에서의 Crispr-cas9 system의 검증

[5차년도]

1. sgRNA와CAS9 protein의 농도 확립

가. CAS9 protein (62.5 ng/ul)과 sgRNA_1 (50-62.5 ng/ul)를 함께 주입하여 단위생식 (Parthenogenesis)를 통해 발달을 유도하였고 시퀀싱을 통해 원하는 부위가 잘린 것을 확인하였음. 단위생식 과정에서의 발달율에 TERT knockout은 영향을 미치지 않았음. <표4>

<표4> Crispr-cas9 system 확립

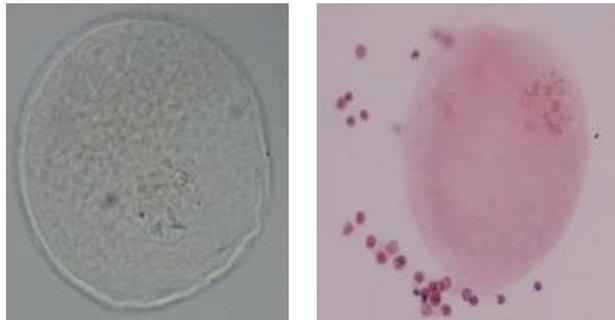
CAS9 protein con.	RNA-1 con.	method	oocyte number	cleavage	Cleavage %	blastocyst	Blastocyst %
62.5	50	parthenote after injection	323	243	75	66	27
62.5	62.5	parthenote after injection	224	145	65	35	24
62.5	0	parthenote after injection	181	117	64	20	31

나. 난자에 주입 시기에 따른 발달율의 차이

- Crispr-cas9 system의 문제점은 목표하는 부위가 아닌 다른 부위가 영향을 받을 수 있다는 점 (off-target effect)과 배아 중 일부만 작용을 할 수도 있다는 점 (mosaicism effect)이 있음. Crispr-cas9 system을 이용한 수정란의 Knock-out 및 Knock-in 실험은 대부분 zygote 시기에 이루어지고 있음. 하지만 이 시기의 injection 방법은 Crispr-cas9의 뒤늦은 작동으로 인한 mosaicism의 가능성이 높으며 난자의 발달 시기별에 따른 Crispr-cas9 system의 적용에 대한 연구는 보고되지 않았음. 따라서 난자의 GV stage와 MII 시기 전stage에 주입하여 성숙 및 발달율을 알아보았음.

(1) GV stage injected oocyte

- 이 경우, 난자의 MII 성숙에는 영향이 없었음. 하지만 blastocyst로의 발달은 잘 되지 않았음. Cas9 protein만 주입한 control군이 더 발달률이 낮은 것으로 보아 GV 상태에서 cas9 protein의 주입이 난자의 발달률에 영향을 미치는 것을 알 수 있었음. 이로써 GV stage에서 cas9 protein를 이용한 Knock-out 실험은 피해야 할 것으로 보임.<그림39 및 표5>



<그림39> GV단계 확인을 위한 Orcein 염색

<표5> GV stage oocyte에 injection 후, 단위생식하여 성숙 및 발달율 검증

CAS9 protein con.	RNA-1 con.	method	oocyte number	cleavage	Cleavage %	blastocyst	Blastocyst %
62.5	50	GV injection before parthenogenesis	552	202	37	6	16
62.5	0	GV injection before parthenogenesis	328	124	38	0	0

(2) 14 hr after In vitro maturation stage (before MII maturation) injected oocyte.

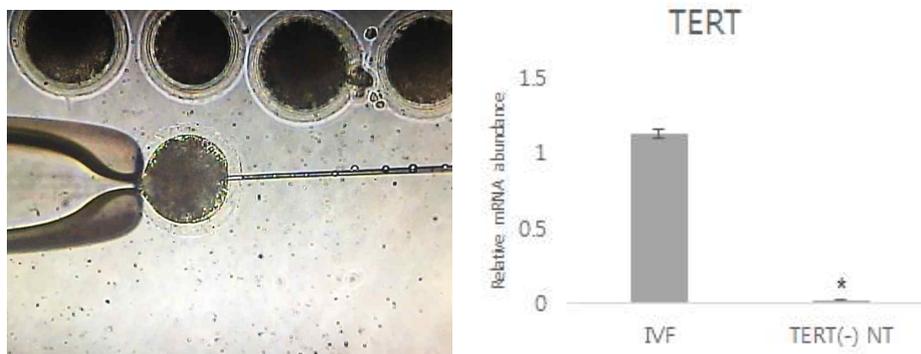
이 시기의 경우, CAS9만 injection한 control 그룹은 blastocyst로의 발달율이 15% 정도 나왔으나 Crispr-cas9 을 injection한 그룹의 경우 발달을 하지 않았음. 이 시기에

injection하는 것은 아무것도 injection하지 않은 그룹 (30-40%)에 비해서는 발달율이 낮지만 난자의 성숙 및 발달에 자극을 줄인다면 mosaicism을 줄일 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 보임. 하지만 Crispr-cas9을 모두 injection한 그룹에서 blastocyst로의 발달이 되지 않은 것이 작동에 의한 영향인지 injection 자극에 의한 것인지는 차후 연구를 통해 진행 되어야 할 것으로 보임. <표6>

<표6> MII maturation 시기 전에 injection 후, 단위생식하여 성숙 및 발달을 검증

CAS9 protein con.	RNA-1 con.	method	oocyte number	cleavage	Cleavage %	blastocyst	Blastocyst %
62.5	50	14 hr after IVM injection befor parthenogenesis	304	109	36	0	0
62.5	0	14 hr after IVM injection befor parthenogenesis	101	48	48	7	15

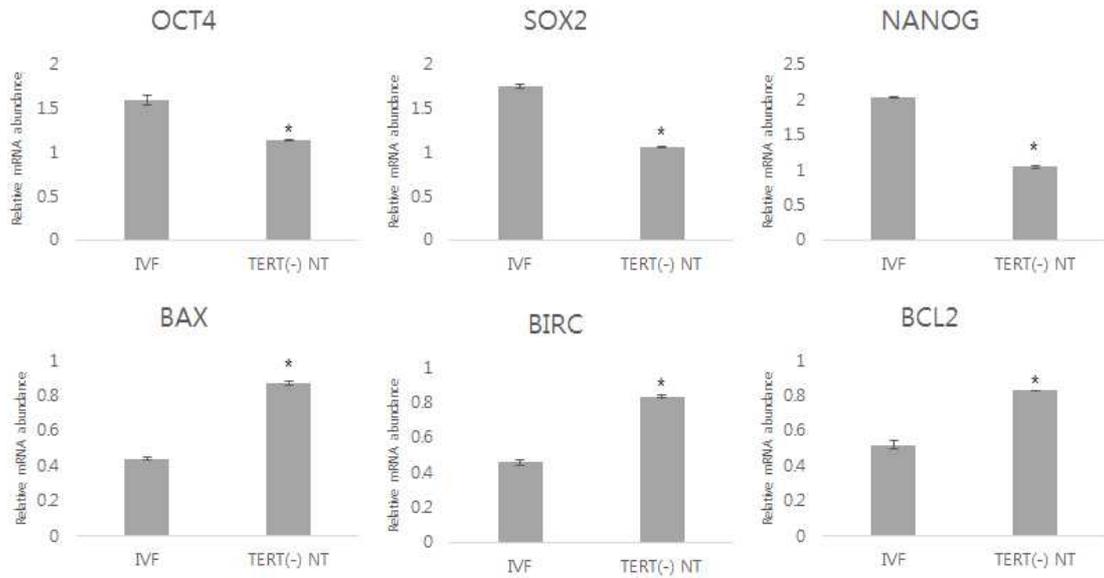
다. CRISPR CAS9 system을 통해 TERT Knock-out 수정란을 생산 후 이를 확인하였음.<그림40>



<그림40> TERT(-) 수정란 생산후 RT-PCR을 통하여 확인

라. 구축된 TERT(-) 수정란에 관한 분석

- 앞서 검증한 방법으로 sgRNA와 CAS9 protein을 함께 수정란에 주입하여 단위생식을 통해 발달을 유도하였음. 대조군으로는 IVF(In vitro fertilisation)을 사용하였음. 양쪽 군 모두 blastocyst 단계에서 전분화능에 관련된 유전자인 OCT4, SOX2, NANOG 와 및 세포사멸(apoptosis)에 관련된 BAX, BIRC, BCL2의 발현량을 비교분석 하였음. OCT4, SOX2, NANOG 유전자의 경우 IVF군에 비하여 TERT(-)군에서의 발현이 낮았으나 BAX, BIRC, BCL2의 경우 TERT(-)군에서의 발현이 증가하는 것을 확인하였음.<그림41>



<그림41> CRISPR CAS9 system을 사용하여 TERT knock-out 후 RT-PCR을 통해 pluripotency 및 apoptosis 관련 유전자의 상대적 mRNA 발현량 분석

2. TERT 과발현된 세포를 이용한 형질전환 돼지 생산

- TERT 과발현된 세포를 핵이식에 이용하여 100-150개 가량의 1-2cell 단계 수정란을 생산하였음. 이후 오퍼큘럼으로 수정란을 수정하여 다음과 같은 일정으로 수정란을 대리모에 이식하였음. 현재 대리모가 임신 중에 있으며 산자가 태어난 후 검증할 예정임. <표7>

<표7> 연구기간 내 ET 수행 일정

ET 날짜	9/1	9/15	9/25	10/12	10/23	12/7(예정)
Embryo 개수	100	100	150	150	150	150

[1차년도]

1. 돼지 체세포에서 Dystrophin cDNA 확인

- 돼지 섬유아세포주에서 사람 근육위축증(DMD, Duchenne muscular dystrophy)을 나타내는 Dystrophin 유전자의 발현 유무를 확인하기 위해 EMBL Nucleotide Sequence Database (AJ865385)로부터 primer를 작성하여 약 14,000bp 길이의 Dystrophin mRNA transcript가 나타나는지를 확인하였음. (Ronald 등, 1992; Lee 등, 2012). 섬유아세포주로부터 Total RNA를 Trizol reagent로 추출하였고, 약 1 ug을 random hexamers와 SuperScript II(Invitrogen-Life Technologies)를 이용하여 reverse transcription 반응을 시켰고, 다시 25 pmol의 primers를 이용하여 PCR을 수행하였음. 이용된 primer set는 다음과 같음.

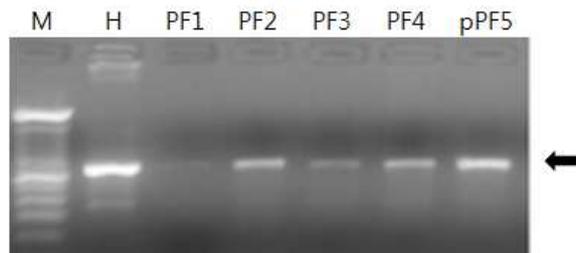
Dp427F: CGGCAACCGGAGTGGAAGAAACAG

Dp427R: ATTG TTCAGGGCATGAACTCTTGT

DYST14-F: CCCCGAATGGGCTACCTGCC

DYST14-R: GGCAGGTAGCCCATTCGGGG

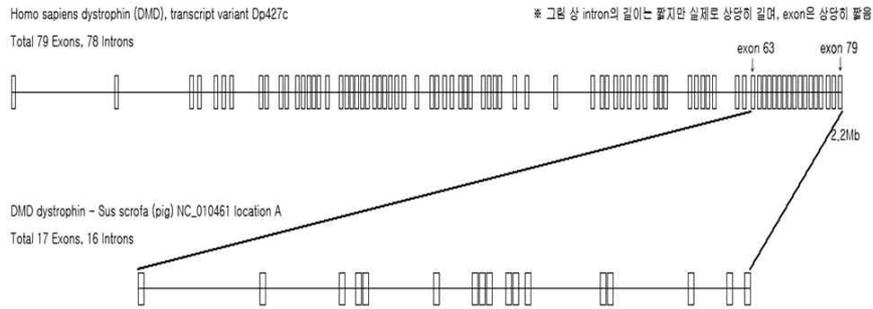
- 이 primer set들은 약 500 bp 크기의 Dystrophin cDNA PCR 산물을 생산하게 되는데 그림1 에서와 같이 사람 cDNA와 같은 크기로 돼지 섬유아세포들에서도 Dystrophin mRNA가 증폭되는 것을 확인할 수 있었음. <그림1>



<그림1> RT-PCR products of porcine Dystrophin mRNA in porcine fetal fibroblast cells. M; molecular maker, H: human muscle RNA, PF1-5: porcine fetal fibroblast cel lines, arrow: about 500 bp cDNA PCR product.

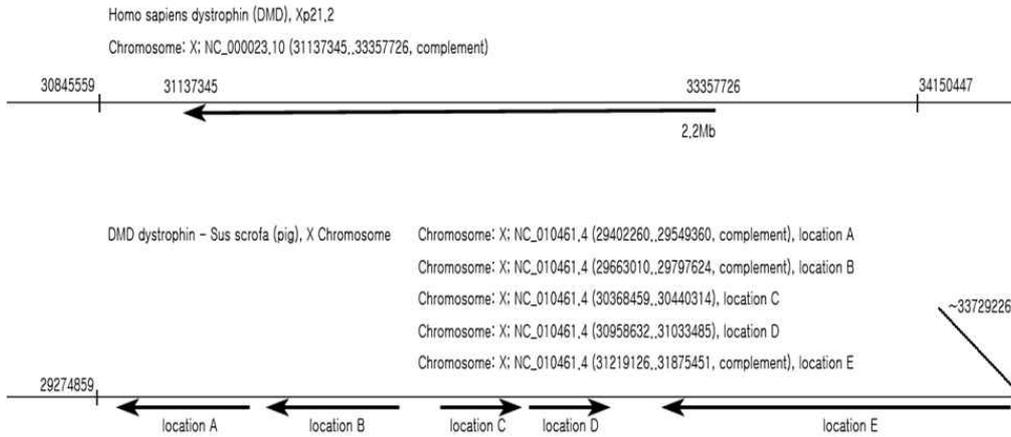
2. 돼지 genomic DMD 유전자 확인

- NCBI database에서 X-chromosome에서의 사람 DMD locus의 Dystrophin 유전자와 돼지 Dystrophin 유전자의 DNA sequence 비교에서는 약간의 exon 순서는 다르지만 전체적으로 잘 일치하는 것으로 나타났음 <그림2>.



<그림2> Partial matching area of porcine DMD locus with humana DMD locus consisting of 78 exons and 79 introns.

- . 사람에서 DMD locus의 총 길이는 2.2 Mb인데 반해 돼지에서는 약 4.4 Mb를 차지하여 single gene으로 가장 큰 부위를 차지하는 것으로 나타남. <그림3>. 사람과 돼지에서 Dystrophin 유전자의 intron 78개와 exon은 79개로 공히 같은 수를 가지고 있고 mRNA 크기도 비슷하게 약 14 kb를 가진 것으로 드러났음. <그림3>



<그림3> Comparison of human and porcine DMD loci (about 2.2 Mb and 4.4 Mb, respectively) in X-chromosome

3. 돼지 genomic DMD에서의 TALEN 부위 선정

- . Dystrophin 유전자의 protein coding sequence 11,025 bp(ATG-Stop codon) 크기 중 ATG에서 약 480 bp(exon 6) 정도의 위치에서 TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nucleases)을 이용한 돌연변이 도입(Hockemeyer 등, 2011; Tesson 등 2011) 부위에서 2쌍의 TALEN의 effector pair를 선정하였음.<그림 4>

GTCAAAAATGTAATGAAGAATATCATGGCTGGATTGCAACAACTAACAGTGAAAAGATACTC
 CTGAGCTGGGTCCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTAATGTCATTAACTTCACCACC
AGCTGGTCTGATGGTCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCAC AGTCATAG

L1-DAS	Spacer	R1-RR
5' TGTCATTAACTTCACCACCA	13	5' TGAGAGCATTCAAAGCCAGA

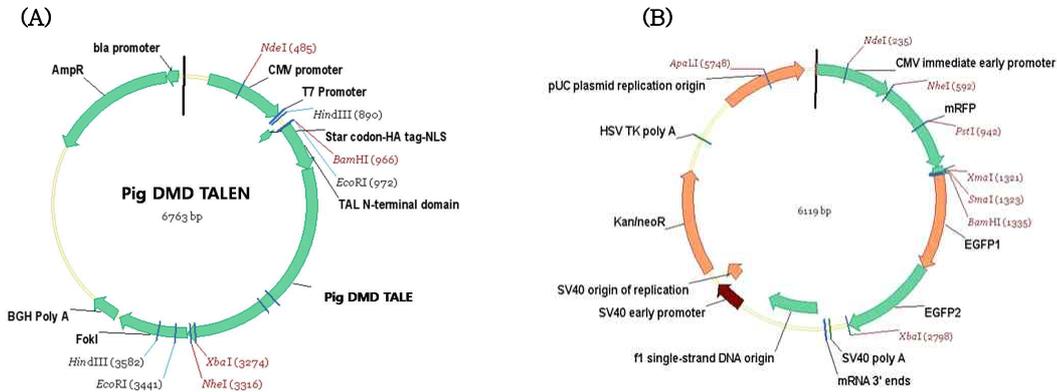
L2-DAS	Spacer	R2-RR
5' TTAACCTTCACCACCAGCTGG	12	5' TGGATGAGAGCATTCAAAGC

<그림 4> 돼지 DMD 유전자의 Exon 6부위에서 TALEN pair1과 TALEN pair2 부위 및 TALEN pair set

4. 돼지 DMD locus 유전자적중 TALEN 벡터와 reporter system 구축

- 앞에서 선정된 TALEN pair를 기반으로 하여 아래와 같은 TALEN 벡터와 reporter 벡터를 구축하였음 <그림 5>.

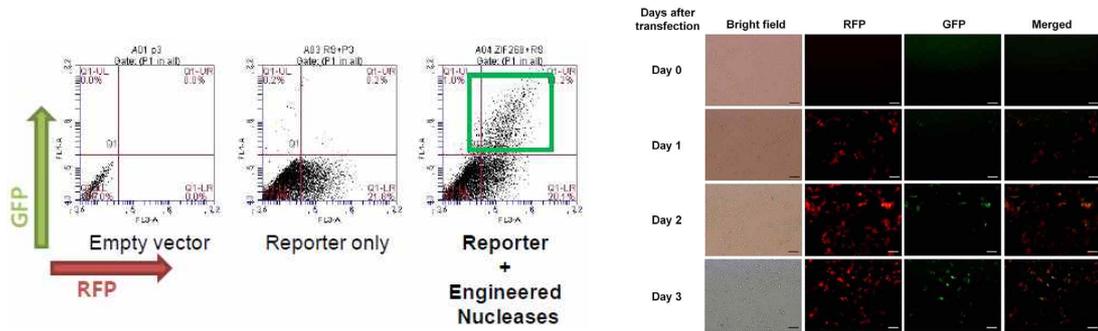
- 1) Pig-DMD_TALEN L1: Expression vector(CMV promoter) with DMD TALEN pair 1 Left
- 2) Pig-DMD_TALEN R1: Expression vector(CMV promoter) with DMD TALEN pair 1 Right
- 3) Pig-DMD_TALEN L2: Expression vector(CMV promoter) with DMD TALEN pair 2 Left
- 4) Pig-DMD_TALEN R2: Expression vector(CMV promoter) with DMD TALEN pair 2 Right
- 5) Pig-DMD_RG2S 1: Surrogate reporter vector(CMV promoter) for DMD TALEN pair 1
- 6) Pig-DMD_RG2S 2: Surrogate reporter vector(CMV promoter) for DMD TALEN pair 2



<그림 5> 돼지 DMD 유전자의 TALEN 벡터 map과 TALEN reporter map

5. 돼지 DMD locus 유전자적중을 위한 reporter system 확인

- 구축된 돼지 DMD TALEN reporter system이 작동하는 지 확인하기 위해 Flow cytometry와 Fluorescence Microscope를 이용하여 예비실험을 실시하였는데, 돼지 배아섬유아세포에 벡터 DNA가 200 ng이 되도록 하고 TALEN 벡터와의 비율은 TALEN_Left : TALEN_Right : Reporter = 1:1:2으로 하여 Lipofectamine 2000을 이용하여 transfection을 실시하였음. 48시간 후에 FACS analysis와 Confocal microscope로 분석한 결과 정상적으로 GFP와 RFP의 발현이 유도되고 있는 것으로 분석되어 reporter system이 작동하는 것을 확인하였음 <그림 6>.



<그림6> 돼지 DMD TALEN 벡터와 reporter 벡터를 이용한 FACS analysis와 Fluorescence microscopy 분석

- 1차년도에 구축한 DMD TALEN 벡터는 non-homologous recombination(NHR)에 의한 유전자적중방법으로, 2차년도에는 homologous recombination(HR)에 의한 positive-negative selection을 위한 유전자벡터를 구축하였음. 이를 위해 돼지 genomic DNA를 screening하여 DMD 유전자들의 Exon 6부위 전후를 PCR로 cloning 하고 neomycin phosphotransferase(*neo^r*) gene과 thymidine kinase(HSV-*tk*) gene을 이용하여 HR 유전자적중T Vector를 구축하고자 함. 이 유전자적중벡터를 돼지 세포에 transfection시켜 G418과 gancyclovir로 double selection을 하고 살아남는 colony를 확인하여 증 유전자의 적중 여부를 확인하였음.

[2차년도]

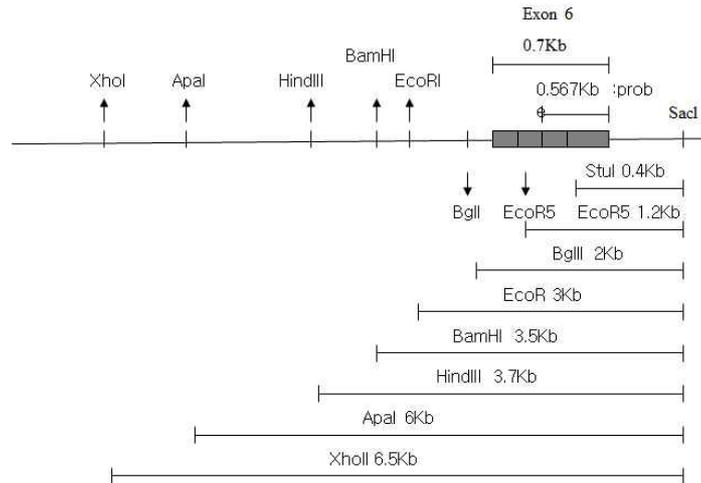
1. 돼지 DMD locus 유전자적중을 위한 reporter system 확인

- 1차년도에 구축된 돼지 DMD TALEN reporter system이 작동하는지 확인하기 위해 Flow cytometry와 Fluorescence Microscope를 이용하여 실험을 실시하였는데, 돼지 배아섬유아세포에 TALEN 벡터 DNA가 200 ng이 되도록 하고, TALEN 벡터와의 비율은 TALEN_Left : TALEN_Right : Reporter = 1:1:2으로 하여 Lipofectamine을 이용하여 transfection을 실시하였음. 48시간 후에 FACS와 Conforcal microscope로 분석하였는데, 세포주에서 GFP와 RFP가 발현되고 있는 것으로 분석되어 reporter system이 정상적으로 작동하는 것을 재차 확인하였음.

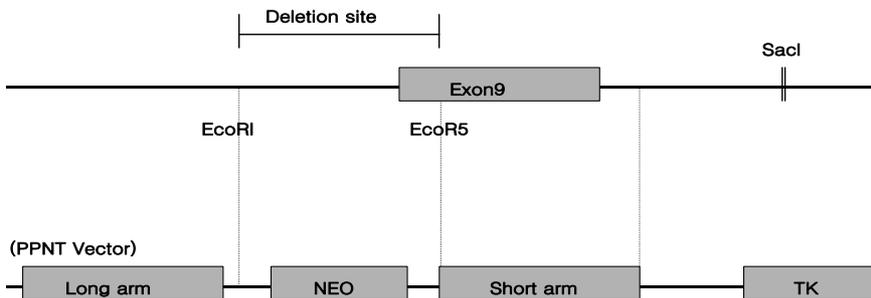
2. 돼지 DMD locus에 대한 homologous recombination에 의한 유전자적중 벡터 구축

- 돼지의 DMD locus의 정보를 바탕으로 DMD 유전자좌위의 exon 6 부위를 PCR로 cloning하고 <그림 7>과 같이 restriction map을 구축한 것을 기초로 하여 돼지 DMD locus의 homologous recombination 유전자적중을 위한 knockout vector의 구축하였음. 먼저 DMD genomic gene의 exon 6의 전후의 일부를 deletion 시킨 부위에 neomycin-resistance gene(*neo^r* gene)이 존재하고 gene 외부에 Herpes simples virus의 thymidine kinase gene(HSV-*tk* gene)을 포함한 knockout 돼지 생산에 필요한 vector를 제작하였음<그림8>. targeting vector는 4.0kb의 long arm genomic DNA(exon 5 및 intron 5)와 1.9 kb neomycin-resistance gene, 0.8kb short

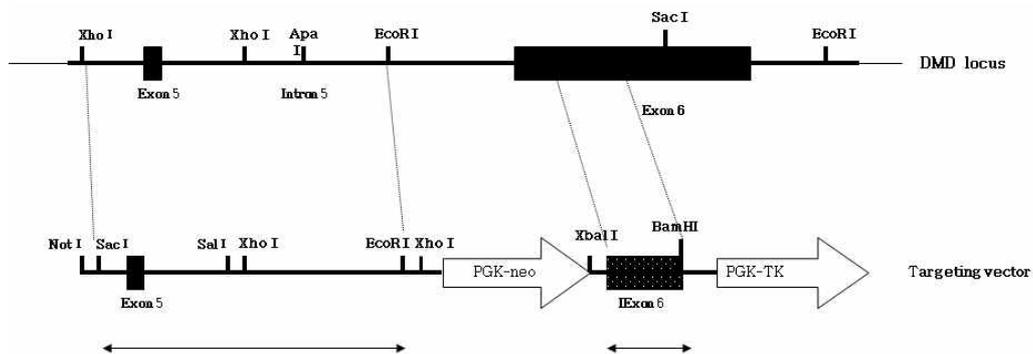
genomic DNA(exon 6)과 3.4 kb thymidine kinase gene을 함유하도록 구축하였음. knockout vector 구축 시 arm 부분들은 위에서 genomic DNA를 template로 한 PCR을 수행하여 얻은 단편들을 T-vector에 cloning 한 후 pPNT vector의 lon arm은 NotI/XhoI에, short arm은 BamHI/XbaI 부위에 클로닝을 하였음.<그림 9 및 10>



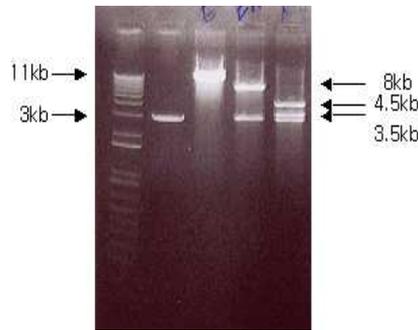
<그림7> Restriction enzyme mapping around exon 6 of pig DMD locus.



<그림8> Strategy of pig DMD gene targeting.



<그림9> Construction of DMD gene targeting vector.



<그림 10> Confirmation of DMD targeting vector. Lane1: marker, lane2, vector(3kb), lane 3: 11kb band, lane 4: Identification of EcoRI fragment, lane 5: Identification of XhoI fragments.

3. 유전자적중 Efficiency 확인

- 유전자 적중 시 neomycin phosphotransferase(*neo^r*) gene을 이용한 G418 selection(single selection)과 또 thymidine kinase(HSV-*tk*) gene을 함께 이용한 G418+gancyclovir selection(double selection)하여 유전자적중 효율을 비교하여 보았음. PFF 약 2,000,000개에 targeting vector로 electroporation 실시한 후 10-14일 동안 selection을 실시한 결과 G418 selection만으로는 약 300 여개의 colony가 생존하였고 G418+gancyclovir selection에서는 약 30개의 colony가 자라는 것을 확인함. 그 중에서 G418+gancyclovir selection 방법에서 약 2개가 유전자 적중된 것으로 확인되었고 G419 colony에서는 확인되지 않아 G418+gancyclovir double selection 방법이 효율이 높은 것으로 나타났음 <표1>.

<표1> Targeting efficiency in pig fibroblast cells following single selection and double selection

Selection marker	No. cells treated	No. Colonies		Targeted colonies
		G418 ^r	G418 ^r + Gang ^r	
Neo	2,000,000	356	-	0
Neo + TK	2,000,000	309	32	2

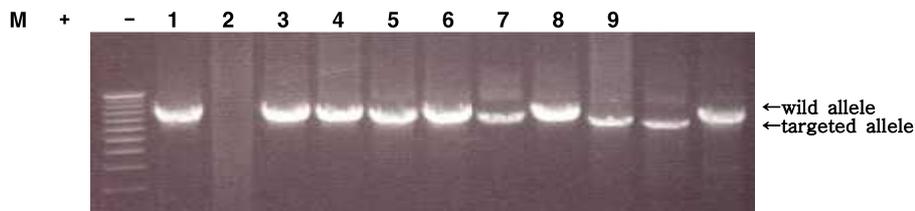
- 또한 Liposome-mediated transfection 방법과 electroporation 방법과의 유전자 적중 효율을 비교하는 실험을 실시하였음. 먼저 PFF의 수가 4×10^6 되도록 한 후 targeting vector를 Liposome과 electroporation 방법에 의해 transfection을 실시한 후 G418과 gancyclovir에서 10-14일 동안 selection을 하고 DNA 검사를 실시하였음. 전체 효율은 electroporation 방법이 0.36% (2/550)를 나타내었고, Liposome 방법은 transfection 후에 콜로니 수는 상대적으로 많았지만 실제 targeting된 콜로니는 없는 것으로 나타나 homologous recombination 유전자적중에는 electroporation 방법이 좋은 것으로 나타남 <표2>.

<표2> Targeting efficiency of pig fetal fibroblasts transfected with targeting vector by electroporation or liposome-mediated method

Transfection Method	No. G418 ^r -colonies	No. G418 ^r + Gang ^r - colonies (%)	LR-PCR positive colonies (%)
Electroporation	550	30 (5.5)	2(0.36)
Liposome	964	75(7.8)	0

4. 유전자적중 확인

- 유전자적중 여부의 확인을 위해 G418과 gancyclovir의 positive/negative selection에서 살아남은 colony들을 먼저 PCR에 의해 targeting 여부의 실험을 실시하였음. pig fetal fibroblast cell에 transfection 시킨 후 약 14일 정도 G418과 gancyclovir selection을 실시하여 살아나는 colonies을 확인하여 DNA를 추출하였음. PCR screening 결과 예상되는 positive control과 같은 size인 약 1.1 kb의 knock-out positive colonies를 확인할 수 있었음. DNA locus가 정확하게 targeting된 것을 확인하기 위하여 targeting 부위를 포함하여 exon 5, intron 5과 exon 5부위를 증폭하는 LR-PCR을 실시하였음. wild type allele에서는 5.3 kb genomic DNA sequence가 증폭되고 targeing된 allele은 4.3 kb가 증폭되는 것을 확인할 수 있었음 <그림11>.



<그림11> LR-PCR analysis of pig fetal fibroblast cells following transfection with targeting vector and drug selection. M: marker, +: positive targeting vector, -: negative DNA, 1-9: colony DNA, underlined figures: targeted cells.

[3차년도]

- 최근에 효율적인 non-homologous recombination(NHR) 유전자적중 시스템인 CRSPR/Cas9을 돼지 DMD locus에 적용하기 위해 guide RNA(gRNA) 부위를 선별하여 DMD-CRSPR/Cas9KO vector를 구축하였고 유전자변이 유도 벡터를 돼지 세포에 transfection시켜 GFP가 발현되는 colony를 선별하여 이들의 genomic DNA에서 gRNA 부위에서 sequencing을 실시하여 유전자의 변이 여부를 확인하였음

1. 돼지 DMD locus CRSPR/Cas9 유전자변이 유도를 위한 벡터 구축

- 돼지 DMD 유전자의 CRSPR/Cas9을 활용한 유전자변이 시스템을 구축하기 위해 돼지 DMD locus에 적용하기 위해 guide RNA(gRNA) 부위를 선별하기 위해 79개의 exon 중 앞부위인 exon 11과 exon 15 부위에서 gRNA 부위를 선정하는 작업을 수행하였음 <그림12>. 특히 Cas9에 필수적인 PAM(protospacer adjacent motif) motif를 위한 target sequence의 downstream 부위에 NGG sequence를 바탕으로 3부위를 선

발하였음. 각 부위는 PAM motif를 함유하고 있고 각각 DMD#1, DMD#2, DMD#3로 명명하였고, DMD#1은 exon 11 부위에서, DMD#2는 exon 15 부위 그리고 DMD#3의 경우는 exon 11에서 reverse 부위를 선정하였음 <표3>. 각각 GGG, AGG, TGG의 PAM motif sequence를 3 '에 함유하고 있음.

Pig exon 11: GGATACATGATGGACTTGACATCCCATCAGGGACAAATTGGCAGTGTTCTCCAATTGGGCAGTC
 AACTGATTGGAAAGGGAAATTATCAGAAGATGAAGAACTGAAGTCAAGAACAATGAATC
 TCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCAAGTGTGGAAAAACAAAGCAA

Pig exon 15: TGCCTTTTGTAGTACGTGGCTTTCTGAAAAAGAAGATGCATTGAACAAGATTCACACAAGTGGCTT
 TAAGGACCAAGGTGAAATGTTATCAAGTCTTCAAAAAGTGGCT

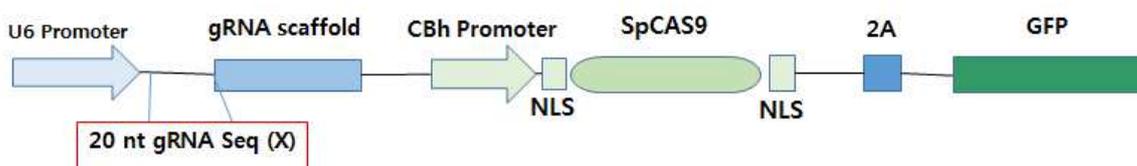
<그림12> Cas9 target site in exon 11 and 15 of porcine *DMD* gene. Yellow and purple are sites for forward sequences and blue is reverse sequences for gRNA site.

<표3> Sequence information for porcine *DMD* Cas9-target sites

Target gene	Ensembl ID	gRNA ID	Target sequence (PAM)
Porcine DMD	NM_001012408	DMD#1 (Exon 11)	GAATCTCCTAAATTCAAGAT (GGG)
		DMD#2 (Exon 15)	GATTCACACAAGTGGCTTTA (AGG)
		DMD#3 (Exon 11 Reverse)	CAATCAGTTGACTGCCCAAT (TGG)

2. 돼지 DMD locus에 대한 homologous recombination에 의한 유전자변이 벡터 구축

- 이 DMD유전자의 gRNA 부위를 바탕으로 CRSPR/Cas9 vector를 디자인 하였는데 Santa Cruz의 CRSPR/Cas9KO plasmid를 이용하였음 <그림13>. 이 벡터에는 U6 promoter에 의해 gRNA가 합성되도록 디자인되어 있으며, chicken beta-catin promoter에 의해 Cas9이 발현되며 이와 함께 GFP가 발현되도록 설계되어 있음. 이 CRSPR/Cas9KO plasmid에 각각 gRNA부위를 합성한 DNA를 삽입하여 Cas9이 인식할 수 있도록 gRNA scaffold sequence의 앞쪽에 삽입하였음. 이 DMD CRSPR/Cas9KO 벡터는 세포에 transfection시킨 후 GFP의 발현여부를 확인하여 colony 선발하도록 되어있음.



Loci: X Sequences

1. DMD#1 - GAATCTCCTAAATTCAAGAT GGG (1453-1472) - exon 11

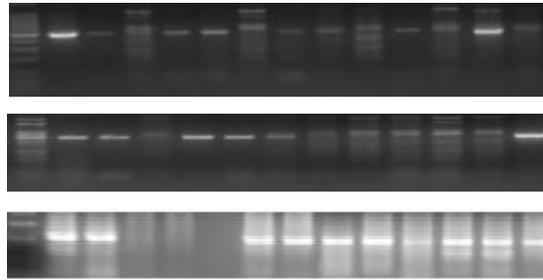
2. DMD#2 - GATTCACACAACACTGGCTTTA AGG (1933-1952) - exon 15

3. DMD#3 - CAATCAGTTGACTGCCCAAT TGG (1403-1384) - exon 11(Reverse)

<그림13> Cas9-induced DMD disruption system

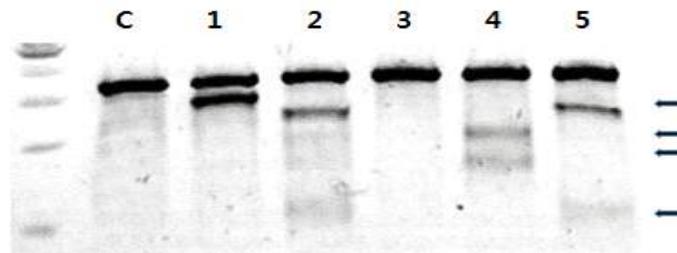
3. 돼지 DMD locus CRSPR/Cas9 유전자변이 확인

- DMD CRSPR/Cas9KO 벡터를 돼지 세포에 Liposome 방법과 Electroporation 방법으로 transfection시킨 후 배양하여 각 세포콜로니에서 GFP가 발현되는 콜로니를 분리한 후 이들의 genomic DNA를 추출한 후 DMD DNA의 gRNA 부위에서 변이가 일어났는지를 확인하였음. 유전자 변이(뉴클레오타이드 deletion 또는 addition)가 일어나 heteroduplex를 이루는 DNA region은 T7 endonuclease I에 의해 잘리기 때문에 DMD target site에 대해 specific primer set를 이용하여 PCR을 수행하였음(그림14).



<그림14> PCR results of clonal porcine cells with DMD-specific primers

- 그리고 이들 PCR product를 90°C에서 denaturation을 시킨 후 다시 annealing을 실시하고 T7 endonuclease I를 이용하여 1시간 정도 처리한 후 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하였음 <그림15>. gRNA 부위를 약 300 bp PCR product가 여러 가지 크기로 잘리고 잘린 크기의 합이 300 bp에 일치하는 것을 확인할 수 있어 DMD target site에 mutation이 일어나고 있음을 확인할 수 있었음.



<그림15> T7 endonuclease I assay for DMD-Cas9 activity

4. CRSPR/Cas9에 의한 DMD 유전자의 변이 확인

- DMD target site에 유전자 mutation 상태를 확인하기 위해 gRNA 부위를 PCR로 증

폭시키고 TA vector에 클로닝하여 sequencing에 의해 유전자가 변이된 상태를 확인하였음. 다양하게 유전자가 변이된 것을 확인할 수 있었는데, 대부분 1 bp에서 6 bp까지의 뉴클레오타이드에서 deletion이 일어났고, 극히 일부에서 1-2 bp addition이 된 것도 확인할 수 있었음<표4>. 특히 DMD#1 locus에서 많은 세포클로니에서 유전자 변이가 나타났고, 또한 좀더 다양한 유전자변이가 일어난 것을 확인할 수 있었음. 또한 일부 클로니에서는 biallelic mutation이 생성된 것도 확인할 수 있었는데, 이들의 경우 각각의 대립유전자가 다른 형태의 DNA 변형이 일어난 것을 확인할 수 있었음. 극한 biallelic mutation의 경우 한쪽 allele에서는 뉴클레오타이드의 addition이 다른 한쪽에는 deletion이 나타난 것도 확인되었음.

<표4> Sequencing analysis of pocine clonal cell DNA following transfection of DMD CRSPR/Cas9KO vector

Locus	clone#	DNA Sequences
DMD1	#1	5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCTCCT-AATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
	#2	5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCT-----AATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
	#3	5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAAT-----GATGGGAATGCCTCAG ---3'
	#4	5'--- GAACAAATGAATC--CTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCTCC-----AAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
	#5	5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAATTCAACGATGGGAATGCCTCAG ---3'
	#6	5'--- GAACAAATGAATC---TAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
		5'--- GAACAAATGAATCTCCTAAGATTCAAGATGGGAATGCCTCAG ---3'
DMD2	#1	5'--- ATTGAACAAGATTCACAACCTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
		5'--- ATTGAACAAGATTCACA---GGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
	#2	5'--- ATTGAACAAGATTCACAACCTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
		5'--- ATTGAACAA-----ACTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
	#3	5'--- ATTGAACAAGATTCACAACCTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
		5'--- ATTGAACAA-----CACAACCTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
	#4	5'--- ATTGAACAAGATTC-CAACTGGCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
		5'--- ATTGAACAAGATTCACAAC--GCTTTAAGGACCAAGGT ---3'
DMD3	#1	5'--- CCTTTCCAATCAGTTGACTGCCCAATTGGAGAACACT ---3'
		5'--- CCTTTTCCAA-----CCCAATTGGAGAACACT ---3'
	#2	5'--- CCTTTCCAATCAGTTGACTGCCCAATTGGAGAACACT ---3'
		5'--- CCTTTCCAATCAGTTGATCTGCCCAATTGGAGAACACT ---3'

- DMD#1 target site의 genomic DNA sequencing에서 DNA mutation이 일어난 상태를 보면 1 bp deletion에서 6 bp deletion까지 gRNA부위에서 뉴클레오타이드가 제거된 것과 1 bp와 2 bp의 뉴클레오타이드가 삽입된 것 등을 확인할 수 있었음<표5>.

<표5> Induction of mutation in porcine DMD#1 locus by transfection of CRSPR/Cas9 vector

Loci	Mutation	DNA Sequences
WT	-	5'--- GAATCTCCTAAATTCAAGAT GGG --- 3'
D1-1	-1 bp	5'--- GAATCTCCTAAA- TCAAGAT GGG --- 3'
D1-2	-2 bp	5'--- GAATCTCCTAA-- TCAAGAT GGG --- 3'
D1-3	-3 bp	5'--- GAATCTCCTAA--- CAAGAT GGG --- 3'
D1-4	-4 bp	5'--- GAATCTCCT---- TCAAGAT GGG --- 3'
D1-6	-6 bp	5'--- GAATCTCC ----- CAAGAT GGG --- 3'
D1+1	M1	5'---GAATCTCCTAAAT A TCAAGAT GGG --- 3'
D1+2	M2	5'---GAATCTCCTAAAT AA TCAAGAT GGG --- 3'

[4차년도]

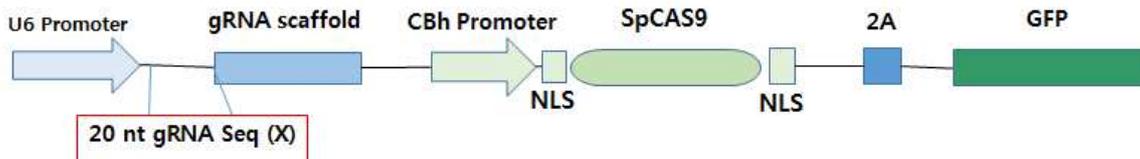
- 3차년도에 개발한 유전자적중 시스템인 DMD-CRSPR/Cas9 벡터 이용하여 돼지 체세포와 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)에 transfection시키고 선별하여 Cas9KO벡터를 함유하고 있는 체세포와 MCS세포의 DNA에서 염기서열분석에 의해 guide RNA (gRNA) 부위의 DMD 유전자의 변이 여부를 확인하였음.
- 또한 최근에 효율적인 유전자적중 시스템으로 개발된 gRNAs와 함께 Cas9 mRNA와 CAS9 protein을 직접 수정란에 미세주입하는 방법을 돼지 체외외수정란을 이용하여 실시하여 보았음(Wang 등 2013). 특히 주입 RNA 물질들의 copy수에 따른 배반포 발달달을을 측정하였음.

1. 돼지 DMD 유전자에 CRSPR/Cas9에 의한 nonsense 유전자변이 분석

- 3차년도에서 돼지 DMD 유전자의 CRSPR/Cas9을 활용한 유전자변이 시스템을 구축하기 위해 guide RNA(gRNA) 부위는 exon 11과 exon 15 부위에서 gRNA 부위를 선정하였고, gRNA 마지막부위에 Cas9에 필수적인 PAM(protospacer adjacent motif) motif를 위한 NGG sequence를 바탕으로 3부위를 고려하였음 <표6>. 이를 이용하여 <그림16>과 같은 발현 벡터를 구축하였고, 이 DMD CRSPR/Cas9KO 벡터를 돼지 체세포와 중간엽줄기세포(MCS)에 Liposome 방법과 Electroporation 방법으로 transfection시킨 후 배양하여 세포콜로니에서 GFP가 발현되는 콜로니를 분리한 후 이들의 genomic DNA를 추출한 후 DMD DNA의 gRNA 부위에서 변이가 일어났는지를 확인하였음.

<표6> Three gRNA regions in porcine DMD locus for DMD knock-out

Target gene	Ensembl ID	gRNA ID	gRNA 합성 sequence (PAM)
Porcine DMD	NM_001012408	DMD 1 (Exon 11)	GAATCTCCTAAATTCAAGAT (GGG)
		DMD 2 (Exon 15)	GATTCACACAACACTGGCTTTA (AGG)
		DMD 3 (Exon 11 Reverse)	CAATCAGTTGACTGCCCAAT (TGG)



<그림16> CRISPR/Cas9 vector for porcine DMD knock-out

- 이들 gRNA 부위의 DMD target site에 유전자 mutation 상태를 확인하기 위해 gRNA 부위를 PCR로 증폭시키고 TA vector에 클로닝하여 sequencing에 의해 유전자가 변이된 상태를 확인하였는데, gRNA 부위 3곳의 3' 아랫부위에 stop codon이 형성될 수 있는 잠재적인 nonsense mutation 형성부위가 있음 <그림17>.
- 유전자 변이가 일어난 곳에서 이곳에 nonsense mutation이 형성되는 지에 대한 연구를 실시하였음. 먼저, 돼지 체세포와 중간엽 MSC세포에서 다양하게 유전자가 변이된 것을 확인할 수 있었는데, 대부분 1 bp에서 7 bp의 염기 deletion이 일어났고, 극히 일부에서는 10bp 이상 deletion이 일어나고 있는 것을 확인하였음. 또한 1-2 bp addition이 된 것도 확인할 수 있었음 <그림18>.
- gRNA 3곳의 염기서열을 분석한 결과 염기에서 변이가 일어난 곳 중에서 약 50%에서 종결코돈이 형성되는 nonsense mutation이 나타나는 것으로 확인되었음. gRNA 부위 중에는 특히 nonsense mutation이 잘 일어나는 곳으로 DMD 1과 DMD 3 locus로 나타났고, 일부 콜로니에서는 biallelic mutation이 생성된 것도 확인할 수 있었음. 이들의 경우 각각의 대립유전자가 다른 형태의 DNA 변형이 일어난 것도 확인할 수 있었음. 3개 및 6개의 염기가 deletion 되는 경우는 원래의 DMD 단백질과 같은 아미노산을 가진 synonymous mutation이 나타나는 것으로 확인되었고, 기타 nonsense mutation을 일으키지 않는 유전자변형 부위에서는 아미노산 배열이 완전히 특이한 단백질을 생성할 수도 있는 mutation도 있을 것으로 추정되었음.

DMD 1- G AAT CTC CTA AAT TCA AGA TGG GAA TGC CTC AGG GTA GCA AGT
M N(425) L L N S R W E C L R V A S

DMD 2- G ATT CAC ACA ACT GGC TTT AAG GAC CAA GGT GAA ATG TTA TCA A
K I(585) H T T G F K D Q G E M L S

DMD 3- c CAA TTG GGA AGT AAG CTG ATT GGA AAA GGG AAA TTA TCA GAA GAT GAA
Q(401) L G S K L I G K G K L S E D E

<그림17> Codon usage of porcine DMD knock-out region (red: potential nonsense region).

DMD 1- G AAT CTC CTA AAT TCA AGA TGG GAA TGC CTC AGG GTAGCAAGTGTGGAA
M N(425) L L N S R W E

5'--- GAACAAATG AAT CTC CTAA A-T CAA GAT GGG AAT GCC TCA GGG TAG ---3 (1bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTAA ACA AGA TGG GAA TGC CTC AGG GTAG ---3 (2bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTA AAT----GAT GGG AAT GCC TCA GGG TAG ---3 (4bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTA AAT-----ATG GGA ATG CCT CAG GGT AG ---3' (5bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTA-----AGA TGG GAA TGC CTC AGG GTAG ---3 (6bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC C-----AA GAT GGG AAT GCC TCA GGG TAG ---3' (7bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTA AAT TCA ACG ATG GGA ATG CCT CAG GGTAG ---3' (1bp)
5'--- GAACAAATG AAT CTC CTA AGT ATT CAA GAT GGG AAT GCC TCA GGG TAG ---3' (2bp)

DMD 2- G ATT CAC ACA ACT GGC TTT AAG GAC CAA GGT GAA ATG
K I(585) H T T G F K D

5'--- ATTGAACAAG ATT CAC ACA AC--G CTT TAA GGA CCA AGG TGA ---3' (2bp)
5'--- ATTGAACAAG ATT--CAC AAC T GG CTT TAA GGA CCA AGG TGA ---3' (2bp)
5'--- ATTGAACAAG ATT CAC ACA ACT---TTT AAG GAC CAA GGT GA ---3' (3bp)
5'--- ATTGAACAAG ATT CAC A----TG GCT TTA AGG ACC AAG GTG A ---3' (4bp)
5'--- ATTGAACAAG ATT CAC ACA---GCT TTA AGG ACC AAG GTG A ---3' (4bp)
5'--- ATTGAACAAG ATT CAC A-----GG CTT TAA GGA CCA AGG TGA ---3' (5bp)
5'--- ATTGAACAAG-----CAA CTG GCT TTA AGG ACC AAG GTG A ---3' (7bp)
5'--- ATTGAACAA-----A CTG GCT TTA AGG ACC AAG GTG A ---3' (10bp)

DMD 3- C CAA TTG GGC AGT CAA CTG ATT GGA AAA GGG AAA TTA TCA GAA GATGA
Q(401) L G S Q L I G

5'---TC CAA TTG G-CA GTC AAC TGA TTG GAA AAG GGA AAT TAT CAG AAG ATG A ---3'(1bp)
5'--TC CAA TTG GGC A--CA ACT GAT TGG AAA AGG GAA ATT ATC AGA AGA TGA ---3' (2bp)
5'---TTC CAA TTG GGC---CAA CTG ATT GGA AAA GGG AAA TTA TCA GAA GAT GA ---3' (3bp)
5'---TTC CAA TTG GGC---AAC TGA TTG GAA AAG GGA AAT TAT CAG AAG ATG A ---3' (4bp)
5'---TTC CAA TTG G-----CA ACT GAT TGG AAA AGG GAA ATT ATC AGA AGA TGA ---3'(5bp)
5'---TTC CAA -----ACT GAT TGG AAA AGG GAA ATT ATC AGA AGA TGA ---3' (11bp)
5'--TTC CAA TTG GGC AGT TCA ACT GAT TGG AAA AGG GAA ATT ATC AGA AGA TGA---3'(1bp)

<그림18> Anaysis of condon usage and nonsense mutation in pocine mesenchymal stem cells
(orange: gRNA 부위, red: 잠재 nonsense 부위, pink: nonsense 변이부위).

2. 돼지 수정란에 DMD gRNA/Cas9 미세주입 후 배발달을 분석

- . 최근에 효율적인 유전자적중 시스템으로 개발된 gRNAs와 함께 Cas9 mRNA와 CAS9 protein을 직접 수정란에 미세주입하는 방법을 돼지 체외외수정란을 이용하여 실시하였

음.(Wang 등, 2013; Sakurai 등 2014; Tanihara 등 2016). 이를 위해 guide RNA 3 부위에서 thymine 연기대신 uracil로 대체하여 <그림19>와 같이 gRNA를 합성 준비하였음. 또한 (주)톨젠으로부터 Cas9 mRNA와 protein을 구입하여 미세주입을 준비하였음.

<그림19> DMD gRNA sequences for DMD gene knock-out.

DMD 1- GAAUCUCCUAAAUUCAAGAU GGG (1453-1472) - exon 11
 DMD 2- GAUUCACACAACUGGCUUUA AGG (1933-1952) - exon 15
 DMD 3- CAAUCAGUUGACUGCCCAAU UGG (1403-1384) - exon 11
 exon 11 reverse 부위 (CCA ATTGGGCAGTCAACTGATTG)

- 본 실험에 사용한 돼지 난자는 도축장에서 암돼지의 난소를 30-35 °C의 0.9% NaCl에 보존하여 실험실에 운반한 후, 18-guage 주사기를 이용하여 직경 약 2-6mm 난포에서 적출하여 채취하였음. 난포란의 채취성숙은 TCM-199 배양액을 사용하였음. 선별된 난자는 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA), 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM L-cysteine, 0.5µg/ml LH (L-5269, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), 0.5µg/ml FSH (F-2292, Sigma), 10 ng/ml epidermal growth factor (E-4127, Sigma), 75 µg/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin, 0.05% (v/v) MEM vitamins (Sigma, M-6895)를 첨가된 배양액에서 38.5 °C, 5% CO₂ 배양기로 22시간동안 먼저 배양하였고 이후 호르몬이 첨가되지 않은 배양액으로 20-22시간 배양시켜 체외 성숙을 유도하였음. 성숙시킨 난포란은 0.1% hyaluronidase하에서 피펫을 사용하여 난구세포를 제거하여 -70°C에 보관하였음. 성숙이 완료된 난자는 mTBM배양액을 이용하였음. 정자는 최종농도가 약 5×10⁵sperm/mL가 되도록 준비하였고 성숙된 난자와 10시간동안 배양을 하여 체외수정을 실시하였음 <그림20>.

- 미세주입은 RNA/protein을 각각 6000 copy/pL로 산출하여 gRNA는 약 0.15 mg/L로, Cas9 mRNA는 30 mg/L로 Cas9 protein은 1.5 mg/L 농도로 T₁₀E_{0.1}(Tris-EDTA)용액으로 희석하여 준비하였음. 미세주입은 Micromanupulator로 그림 5와 같이 전핵부위의 세포질로 gRNA와 Cas9 혼합용액을 주입하였고, 미세주입 후 PZM-3 배양액으로 38.5 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 실시하였음.



<그림20> Microinjection of Cas9 mRNA/DMD gRNA into porcine zygote

- gRNA와 Cas9 mRNA의 농도에 따른 배발달율을 측정하여 보았음 <표7>. 체외수정란에 gRNA와 Cas9 mRNA가 각각 6000 copy씩 존재하는 조건인 gRNA 약 0.15 mg/L 및 Cas9 mRNA 30 mg/L로 미세주입하였을 때 배발포배 발달율은 25%로 체외수정란의 발달율

인 27.5%와 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 이보다 5배 높은 조건인 gRNA 약 0.7 mg/L 및 Cas9 mRNA 15mg/L에서는 배발달율이 20%로 낮아지는 경향을 나타내었음. 적어도 gRNA와 Cas9 mRNA의 농도를 10,000 copies/pL까지 희석한 한 후 미세주입을 실시하여도 돼지 수정란의 배발달율에는 영향을 미치지 않을 것으로 추정됨.

<표7> Development of porcine zygote injected with different concentration of Cas9 mRNA/DMD gRNA

Group	No. zygotes	No. embryos cleaved (%)	No. blastocysts (%)
Control	40	28 (70.0)	11(27.5)
0.05mg/L gRNA 10mg/L Cas9mRNA	40	25 (62.5)	10 (25.0)
0.15mg/L gRNA 30mg/L Cas9mRNA*	40	26 (65.0)	10 (25.0)
0.75mg/L gRNA 150mg/L Cas9mRNA	40	25 (62.5)	8 (20.0)

*0.15mg/L gRNA, 30mg/L Cas9 mRNA: 6,000 copies of gRNA and Cas9 mRNA/pL

- 또한 Cas9 mRNA와 Cas9 protein을 gRNA와 함께 6000 copy/pL의 농도로 돼지 수정란에 미세주입하였을 때 배발달율을 측정하여 보았는데, gRNA/Cas9 mRNA 미세주입이 경우 23.1%로 gRNA/Cas9 protein 미세주입은 25.5%로 나타나 체외수정란의 배발달율보다 약간 낮아지는 경향을 나타냈지만 유의적인 차이는 없었음 <표8>. 이로서 Cas9 단백질을 미세주입하였을 경우 유전자변이가 효율적으로 나타날 수 있는 것을 감안한다면 전체적인 유전자적중 효율은 gRNA와 Cas9 단백질을 함께 주입하였을 때 훨씬 좋아질 것이라고 추정됨

<표8> Development of porcine zygote injected with Cas9 mRNA/DMD gRNA

Experiments	No. zygotes injected	No. embryos cleaved (%)	No. blastocysts (%)
Control	58	49 (84.5)	17 (29.3)
gRNA/Cas9mRNA*	65	51 (78.5)	15 (23.1)
gRNA/CAS9**	55	45 (81.8)	14 (25.5)

*0.15mg/L gRNA, 30mg/L Cas9 mRNA: 6,000 copies of gRNA and Cas9 mRNA/pL

** .15mg/L gRNA, 1.5mg/L Cas9 protein: 6,000 copies of gRNA and Cas9 protein/pL

- 돼지 체외수정란에 먼저 DMD1의 gRNA와 Cas9 mRNA가 각각 6000 copy씩 존재하는 조건인 gRNA 약 0.15 mg/L 및 Cas9 mRNA 30 mg/L로 미세주입한 후 7일간 배양한 후 발달한 배반포배에서 DNA를 추출하여 염기서열을 분석하여 보았음. 약 50%의 배반포에서 DMD 1부위가 유전자 변형을 일으킨 것으로 나타났는데 <표9> 에서와 같이 1 bp - 7 bp deletion과 1 bp addition을 확인하였는데 이는 앞에서 돼지 체세포와 중간엽줄기세포에서 나타

난 유전자변형과 비슷한 것으로 나타난 수정란에 직접 미세주입하였을때도 gRNA/Cas9가 효과적으로 작동한다는 것을 보여주고 있음. 전체적인 유전자변이 효율과 다른 gRNA 부위별 유전자 변이 등에 대해서는 계속 분석 중에 있음.

<표9> Base analysis of DMD 1 region in porcine blastocysts injecte with Cas9 mRNA/DMD1 gRNA

Loci	Mutation	DNA Sequences
WT(gRNA)	-	5'---CAAATGAATCTCCTAAATTCAAGAT GGG --- 3'
DMD 1-1	-1 bp	5'--- CAAATGAATCTCCTAAA-TCAAGAT GGG --- 3'
DMD 1-2	-2 bp	5'--- CAAATGAATCTCCTAAAT--AAGAT GGG --- 3'
DMD1-3	-2 bp	5'--- CAAATGAATC--CTAA--- CAAGAT GGG --- 3'
DMD1-4	-4 bp	5'---CAAATGAATCTCCT----TCAAGAT GGG --- 3'
DMD1-6	-7 bp	5'--- CAAATGA-----AAATTCAAGAT GGG --- 3'
DMD1-7	+ 1	5'---CAAATGAATCTCCTAAATATCAAGAT GGG --- 3'

[5차년도]

1. 돼지 수정란에 gRNA/Cas9 전기영동 효율비교

- 체외수정 후 시간별 Cas9/gRNA를 전기기영동후 배발달 효율을 확인하기 위하여, 돼지 체외수정란에 DMD1, 2 및 3의 100ug/mL gRNA와 200ug/mL의 Cas9 mRNA를 Opti-MEM-1(Gibco) 용액에 혼합한 다음 전기영동규벳(Bio-Rad Gene Pulser)에 넣어 Gene pulser Xcell electroporator(Bio-Rad)에 연결하여 5 msec, 30V의 6 pulse의 조건으로 전기영동을 실시하였음. 전기영동 후 수정란을 PZM-3 배양액으로 38.5 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양을 실시하여 배발달율을 확인하였음. 체외수정 후 10시간이내에서의 전기영동조건에서는 약 10%대의 배반포 발달율을 보였고, 체외수정 후 12시간에서는 15%의 배반포율을 나타내어 체외수정 후 12시간이 가장 적합한 조건으로 확인되었음 <표 10>

<표10> Development of porcine zygote electroporated with Cas9/ DMD gRNA by electroporation condition

Electroporation hour after IVF	No. zygotes	No. cleaved (%)	No. blastocysts (%)
Control	36	28 (77.8)	7 (19.4)
4 hr	38	15 (39.4)	4 (10.5)
8 hr	40	14 (35.0)	4 (10.0)
12 hr	40	19 (47.5)	6 (15.0)
18 hr	38	14 (36.8)	5 (13.2)

2. 돼지 수정란에 gRNA/Cas9 전기영동한 후 대리모에 이식 후 임신율 확인

- 돼지 체외수정란에 DMD1, 2 및 3의 100ug/mL gRNA와 200ug/mL의 Cas9 mRNA를 전기영동 규벳(Bio-Rad Gene Pulser)dp 혼합하여 Gene pulser Xcell electroporator(Bio-Rad)에서 5 msec, 30V의 6 pulse의 조건으로 전기영동을 실시한 수정란을 대리모에 이식하였음. 대리모 돼지는 (주) 옵티팜의 농장 암돼지를 Regumate로 발정동기화를 유발시켜 발정개시 후 24시간에 난관에 이식하였음. 이식 수정란 수는 100개이상에서 200개 정도를 이식하였음 <표11>. 총 8마리의 대리모에 Cas9/gRNA를 전기영동한 수정란을 이식하였음. 2두가 임신된 것으로 확인되었으나 L17-2의 경우 임신 10주령에 유산되었고, LY3-03이 초음파 감정을 통하여 임신된 것을 확인하였음. 나머지는 모두 비 임신으로 판명되었음.

<표11> Embryo transfer of porcine zygote electroporated with Cas9/ DMD into synchronized recipient sows

Recipient #	Date	No. transferred	Pregenant	No. litters	Detection
L10-1	2017-08-25	120	Non preg	-	Ultrasound detection
L10-2	2017-09-01	115	Non preg	-	Return Est
L17-1	2017-09-08	105	Non preg	-	Return Est
L17-2	2017-09-15	150	Pregenant		Aborted (10wk)
LY3-01	2017-09-22	170	Non preg		Return Est
LY3-02	2017-09-29	180	Non preg		Ultrasound detection
LY3-03	2017-10-13	200	Pregnant		Ultrasound detection
LY3-04	2017-10-20	180	Non preg		Return Est

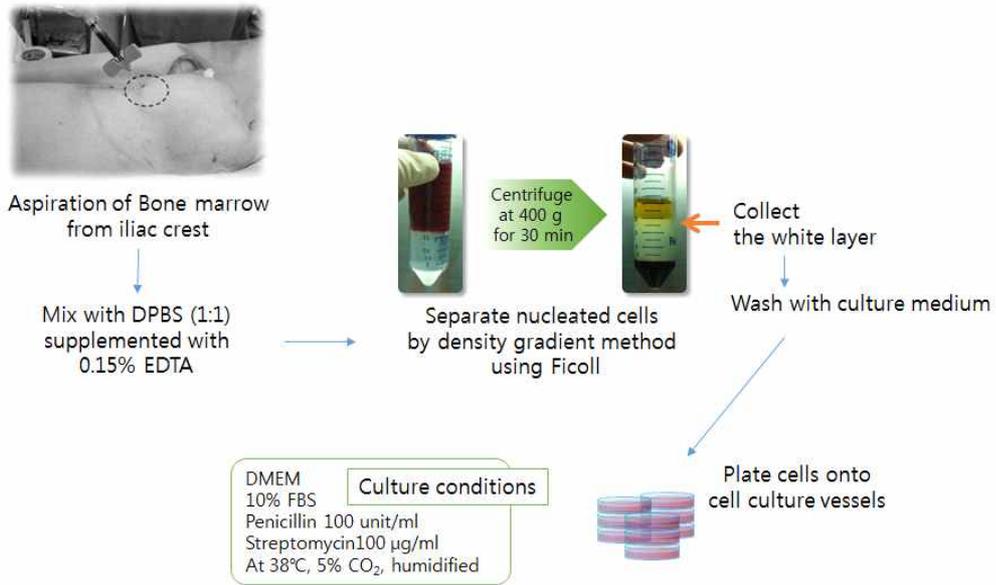
[1차년도]

1. 줄기세포 배양시스템 확립

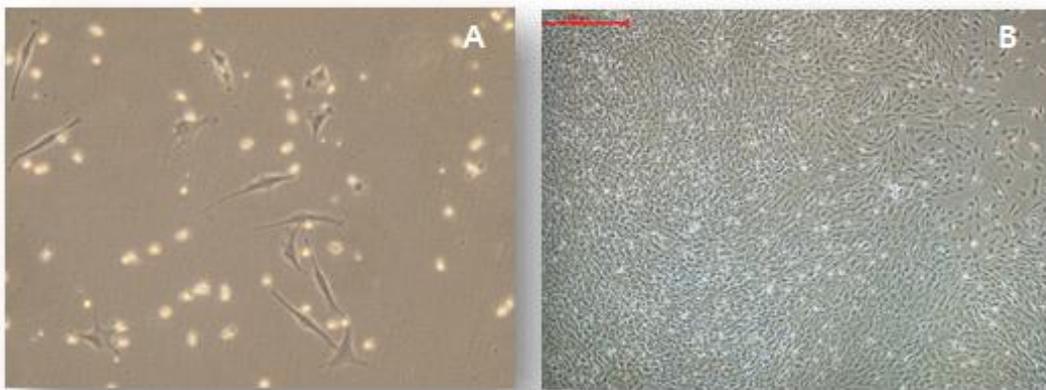
가. 미니돼지의 성체줄기세포 분리 배양

(1) 연구 방법 및 결과

- 18개월령의 Yucatan 미니돼지의 장골능(ilic crest)을 천자하여 골수(bone marrow)를 채취하고 Ficoll density gradient 방법으로 유핵세포층을 분리하여 10% FBS가 포함된 DMEM에 배양하고 colony 형성을 확인하였음. 이와 같은 방법으로 3종의 미니돼지 MSC를 확립하였음.<그림1 및 2>



<그림1> 미니돼지의 골수 채취 및 MSC 분리 과정 모식도



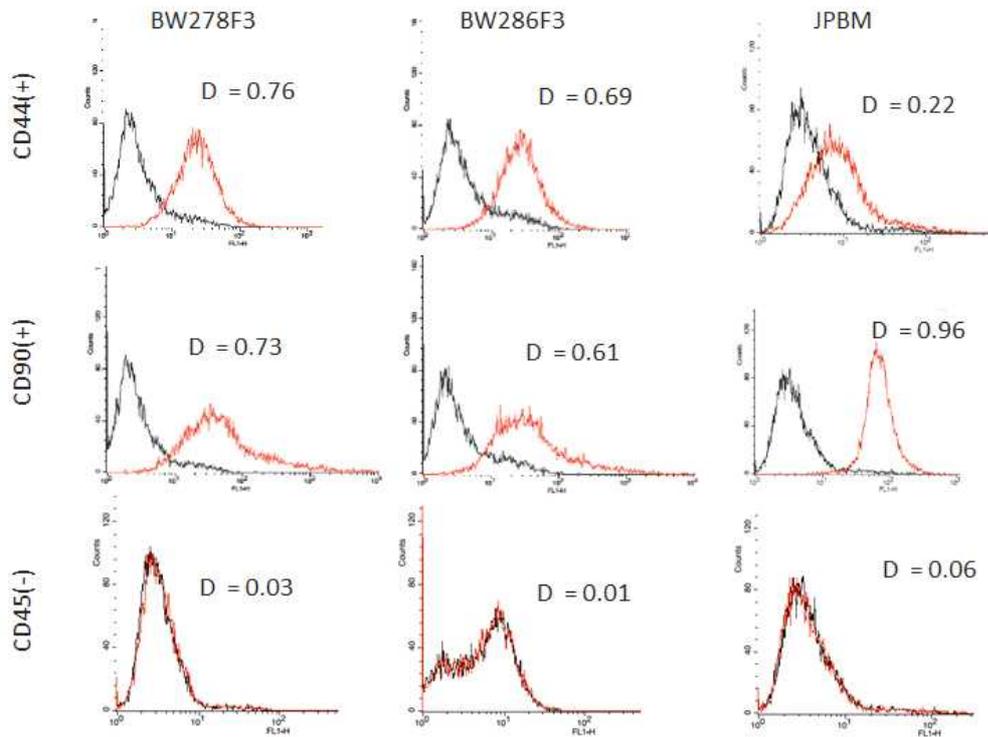
<그림2> 확립된 미니돼지 mesenchymal stem cells. A; 유핵세포층 배양 후 3일, B; 성체줄기세포 colony 형성

나. 미니돼지 성체 줄기세포의 특성 분석

(1) 연구 방법 및 결과

(가) 세포표면항원 발현 확인을 통한 줄기세포 확인

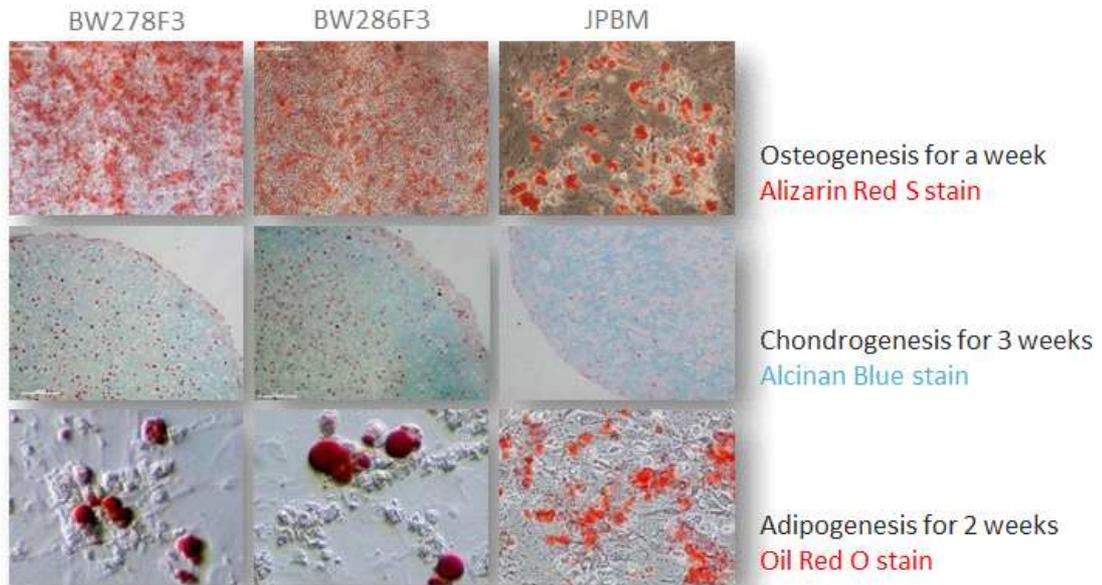
- 채취된 미니돼지의 골수로부터 확립된 세포주가 줄기세포임을 확인하기 위해 세포표면의 positive (CD90, CD105) marker와 negative (CD45) marker에 대한 antibody를 이용하여 FACS 분석을 실시하였음. 그 결과 골수유래 줄기세포에서 positive, negative 반응이 명확하게 확인되어 골수유래 성체줄기세포임을 확인되었음 <그림3>.



<그림3>. 세포표면항원인 CD90, CD44, 그리고 CD45 antibody를 이용한 FACS 결과 (D value, Kolmogorov-Smirnov(K-S) statistics)

(나) 성체줄기세포의 분화능 확인

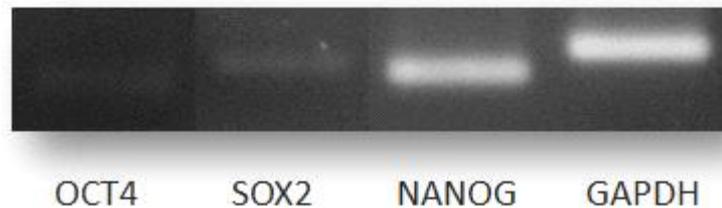
- 미니돼지 MSC의 분화능 확인을 위해 분화배지를 이용하여 osteogenesis, adipogenesis, 및 chondrogenesis를 유도하였고, 각각 Alizarin Red S, Alcian Blue 및 Oil Red O 등 분화특이염색을 통해 분화능을 확인하였음 <그림4>.



<그림4>. 확립된 MSC에 대한 Osteogenesis, Chondrogenesis 및 Adipogenesis를 분화특이염색

(다) 성체줄기세포에서 pluripotency marker 유전자 발현 확인

- 줄기세포의 pluripotency marker 인 OCT4, SOX2, NANOG 등의 유전자 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 모든 유전자가 발현함을 확인하였음 <그림5>.



<그림5> RT-PCR을 통한 OCT4, SOX2, NANOG 등의 유전자 발현 확인

[2차년도]

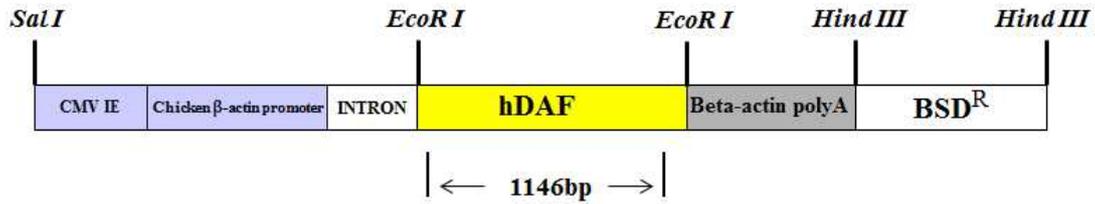
1. 확립된 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환세포주 제작

가. 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환유도 기술 확립

(1) 연구방법

(가) 발현벡터 제작

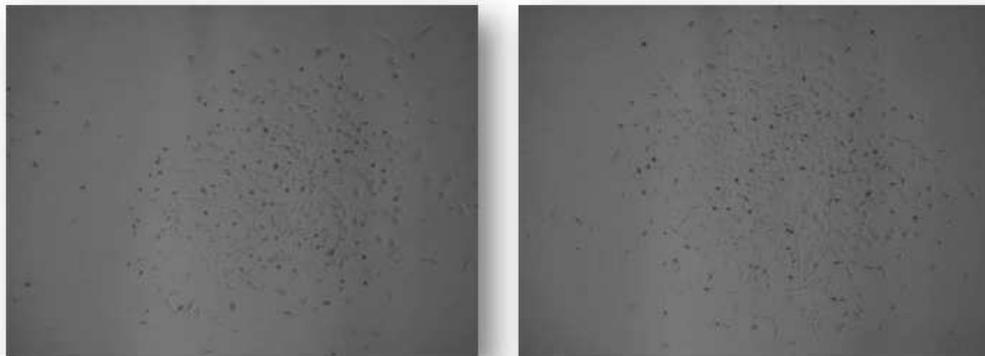
- 형질전환복제돼지 생산 및 형질전환세포주 제작 효율 향상을 위해 확립된 MSC를 이용하여 형질전환세포주 제작을 실시하였음. 성체줄기세포의 형질전환을 위해 인간의 면역조절 유전자인 hDAF를 클로닝하였음. hDAF 발현시키기 위해 chicken β -actin promoter에 의해 발현이 조절되고 항생제 선별을 위해 blasticidin resistant gene을 갖는 pCAGGS 벡터에 클로닝하고 확립된 성체줄기세포에 electrophoration 방법으로 transfection을 진행하였음. <그림6>.



<그림6> hDAF 유전자를 발현하는 형질전환벡터 시스템

(나) 세포의 형질전환유도 및 항생제 선별

- 완성된 형질전환 벡터를 이용하여 미니돼지 MSC에 electrophoration 방법을 이용하여 세포내 벡터 도입을 유도하였고 Blasticidin (BSD) 4 ug/ml을 이용하여 약 12일간 항생제 선별을 통해 약 116개의 콜로니를 선별하였음. 선별된 콜로니의 분석을 위해 다양한 분자생물학적 방법을 이용하여 형질전환세포주 확립을 위해 분석을 진행하였음. <그림7>



<그림7> BSD 항생제 선별을 통해 선별된 콜로니(배양 후 7일차).

(다) 형질전환 성체줄기세포 분석

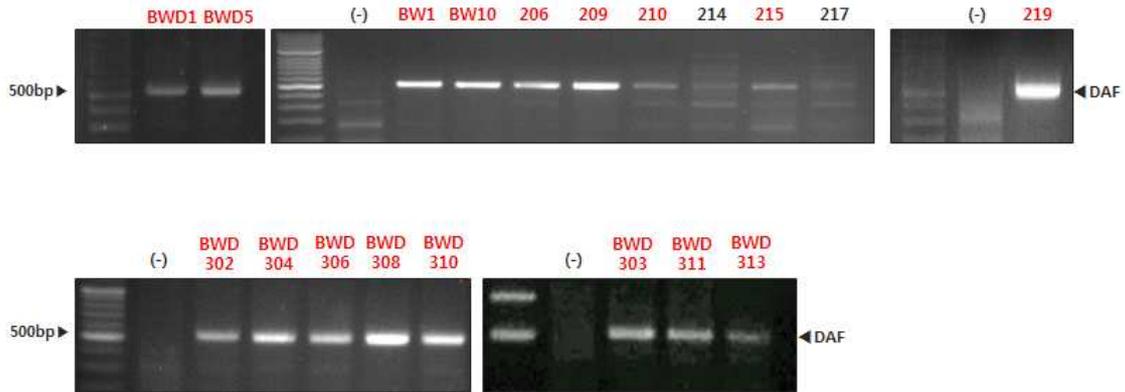
- ① 항생제 선별을 통해 구별된 콜로니의 genomic DNA를 이용하여 유전자 삽입을 확인하기 위해 PCR을 실시하였으며 Genomic DNA PCR을 통해 유전자가 삽입된 콜로니 중 비교적 상태가 양호하고 세포분열이 활발한 콜로니 중 일부를 선별하여 fluorescent in situ hybridization (FISH) 분석을 진행하였음. FISH 분석을 위해 형질전환에 사용된 발현 벡터를 FITC-labeling하여 probe로 사용하였음.
- ② 선별된 콜로니에서 단백질 발현 확인을 위해 유세포 분석 (FACS) 및 Western blot을 통해 단백질 발현을 확인하였음
- ③ 도입된 유전자 및 단백질 발현이 확인된 콜로니에 대한 human serum complement를 이용하여 세포독성 (Cytotoxicity) 테스트를 실시하였음.

(2) 연구결과

(가) 선별된 콜로니의 PCR 및 FISH 분석을 통한 발현벡터 삽입 확인

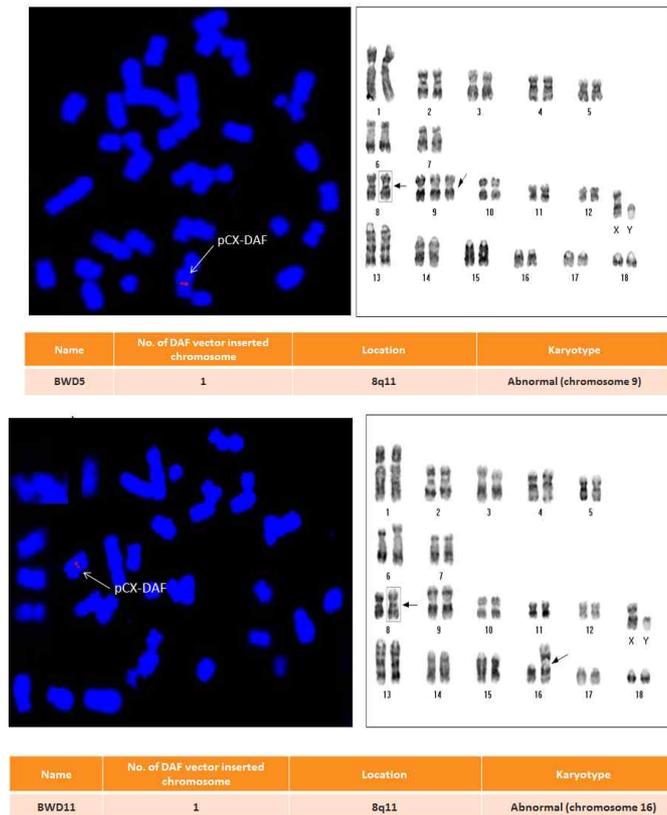
- PCR을 통해 유전자가 삽입된 것으로 확인된 콜로니는 총 58개이며 이중 세포의 상태가 양호한 콜로니를 중심으로 FISH 분석을 진행하였음. 1차 2개의 콜로니를 FISH 분석

한 결과 각각 염색체에 발현벡터가 정확하게 삽입된 것으로 확인되었으나 염색체 수와 다른 염색체의 삽입 등의 비정상 핵형으로 확인되었음. 따라서 추가 콜로니에 대한 FISH를 진행하였음.<그림8>

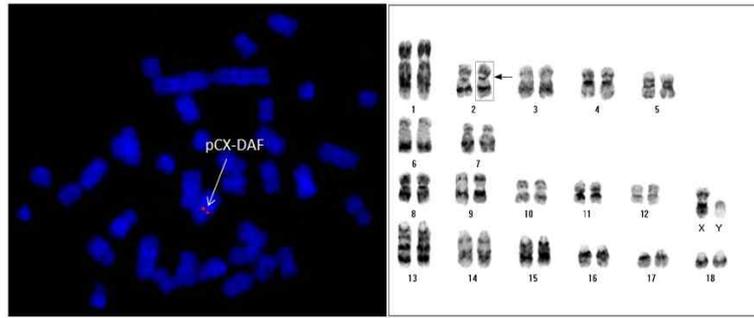


<그림8>PCR을 통한 세포내 발현벡터의 삽입을 확인

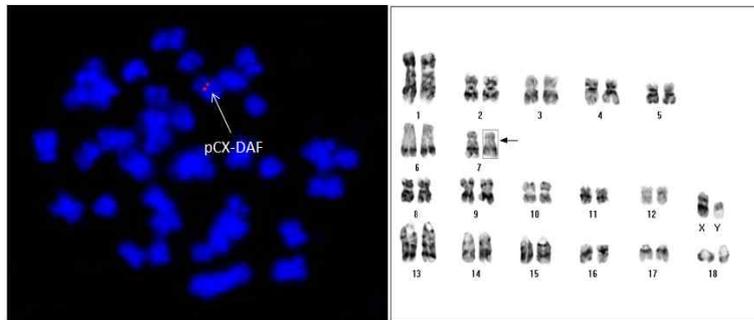
- BWD303, BWD306 두 개의 콜로니에 대해 추가로 FISH 분석을 실시한 결과 염색체 2q12와 7q11의 위치에 발현벡터가 삽입된 것을 확인 하였고 핵형이 정상으로 확인되었음. 이후 유전자 발현 및 단백질 발현 등의 확인 실험을 위하여 두 개의 콜로니를 분석 하였음.<그림9 및 10>



<그림9> FISH 분석을 통한 핵형 분석 결과 (비정상 핵형으로 확인된 콜로니)



Name	No. of DAF vector inserted chromosome	Location	Karyotype
BWD303	1	2q12	Normal

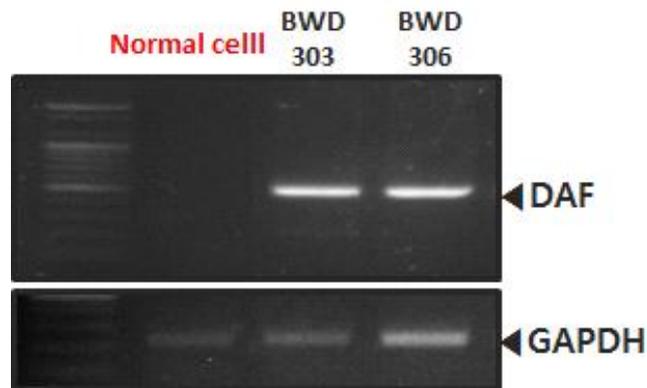


Name	No. of DAF vector inserted chromosome	Location	Karyotype
BWD306	1	7q11	Normal

<그림10> FISH 분석을 통한 핵형 분석 결과 (정상 핵형으로 확인된 콜로니)

(나) 삽입된 발현벡터의 유전자 및 단백질 발현 확인

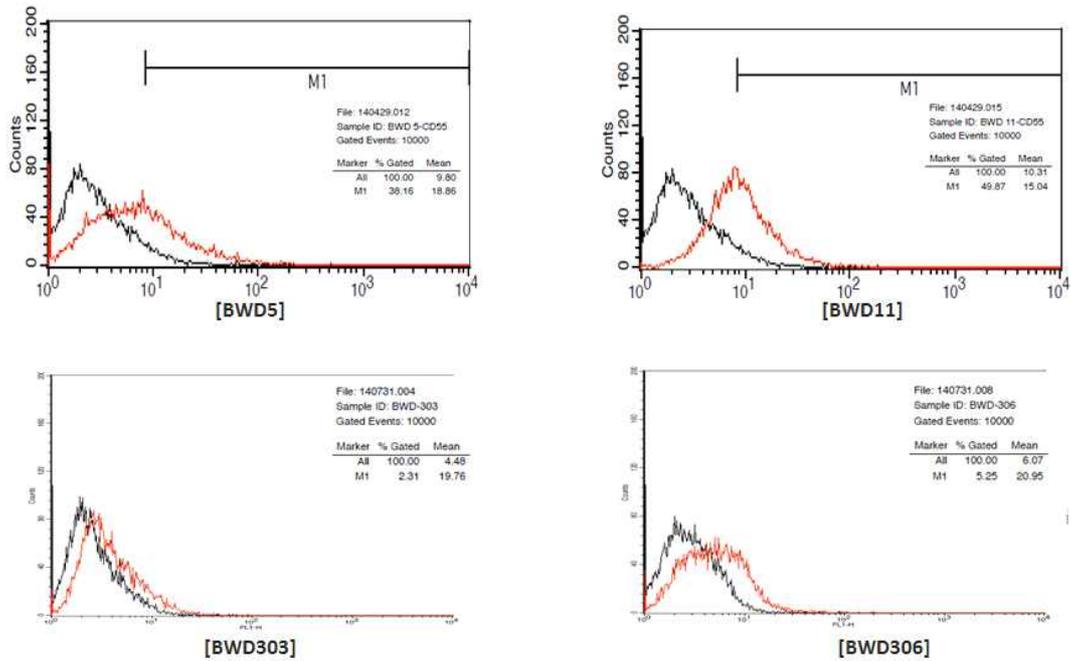
- FISH 분석을 통해 유전자 삽입이 확인된 콜로니의 RNA를 이용한 RT-PCR결과 발현 벡터의 유전자가 발현하는 것을 확인하였음.<그림11>



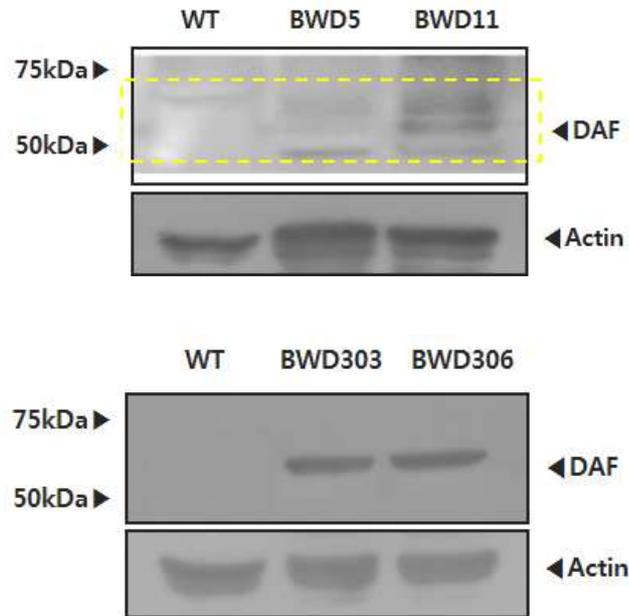
<그림11> RT-PCR결과 발현벡터의 유전자가 발현함을 확인

- 선별된 콜로니에서 유세포 분석(FACS) 및 Western blot을 통해 도입된 유전자의 단

백질 발현을 확인하였음. <그림12 및 13>



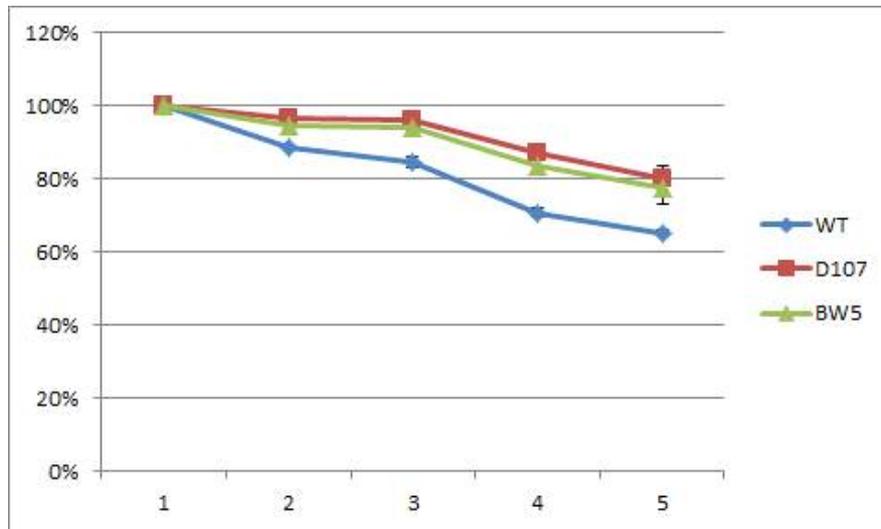
<그림12> FACS 분석을 통한 세포표면 단백질 발현 확인



<그림13> Western blot을 통한 형질전환세포주에서 hDAF 단백질 발현 확인

(다) 유전자 및 단백질 발현이 확인된 콜로니를 이용한 세포독성 분석

- 도입된 유전자 및 단백질 발현이 확인된 콜로니에 대한 human serum complement를 이용하여 세포독성(Cytotoxicity) 테스트를 실시한 결과 형질전환세포주에서 세포독성이 현저하게 감소하는 경향을 확인하였음 <그림14>.



<그림14> Human serum complement를 이용한 hDAF 콜로니 세포독성 결과

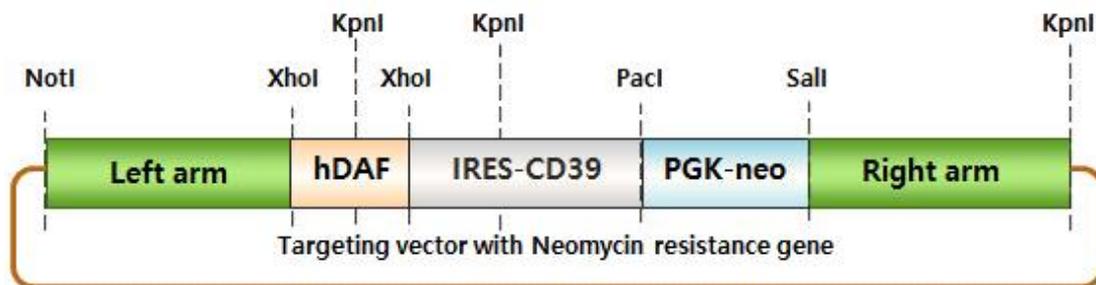
나. 미니돼지 귀세포 유래 섬유아세포를 이용한 형질전환유도 기술 확립

- 미니돼지 줄기세포 유래 형질전환세포주 확립과 더불어 귀세포 유래 섬유아세포를 이용하여 형질전환 유도를 실시하였음.

(1) 연구방법

(가) 발현벡터 제작

- 형질전환 복제돼지 생산 및 형질전환세포주 제작을 위해 타겟팅 벡터를 제작 하였음. 타겟팅 벡터는 인간의 면역조절을 위하여 hDAF와 hCD39 유전자를 클로닝 하여 homologous recombination 원리를 이용하여 GalT 유전자위에 벡터가 타겟팅 되도록 하기 위하여 Left arm, Right arm이 클로닝 된 타겟팅 벡터에 클로닝 하여 형질전환 벡터를 제작하였음. 항생제 선별을 위하여 neomycin resistant gene을 타겟팅 벡터 내에 도입하여 이용하였음. 미니돼지 섬유아세포에 제작된 타겟팅 벡터를 electrophoration 방법으로 transfection을 진행 하였음. <그림15>



<그림15> GalT유전자위에 hDAF 및 hCD39를 발현하는 벡터 모식도

(나) 세포의 형질전환유도 및 항생제 선별

- 완성된 형질전환 벡터를 이용하여 미니돼지 섬유아 세포에 electrophoration 방법으로 도입 한 후 neomycin을 400 μ g/ml의 농도로 처리하여 약 2주간 배양 하였고 67개의 콜로니를 선별하였음. 선별된 콜로니의 분석을 위해 유전자 분석 및 단백질 분석방법을 이

용하여 형질전환세포주를 선별 및 확립하였음.

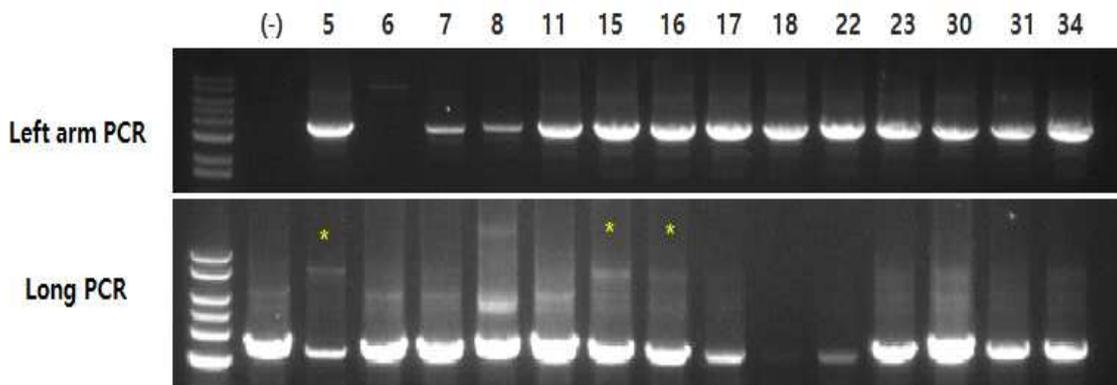
(다) 형질전환 섬유아세포 분석

- 항생제 선별 후 확보된 콜로니의 genomic DNA를 이용하여 GalT 유전자위의 타겟팅 여부를 확인하는 PCR을 실시하였으며 그 중 타겟팅이 된 것으로 확인된 콜로니를 선별하였음. 선별된 콜로니에서 단백질 발현 분석을 위해 FACS 및 Western blot 분석 방법을 이용하여 단백질 발현을 확인하였음.

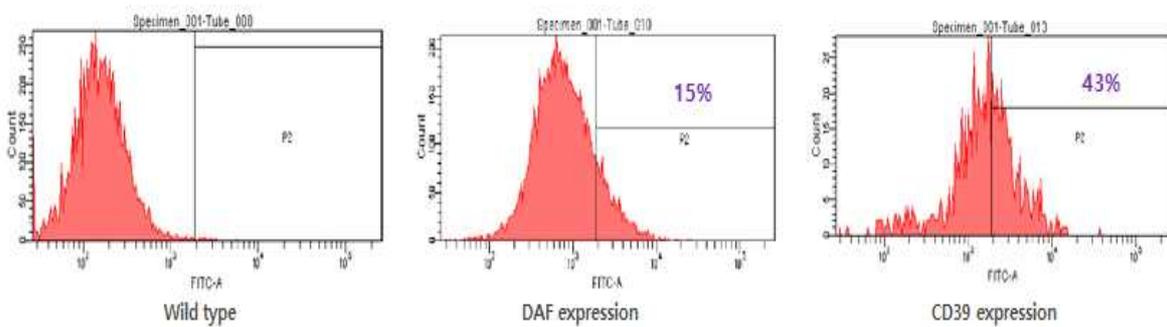
(2) 연구결과

(가) 선별된 콜로니의 형질전환 여부 분석

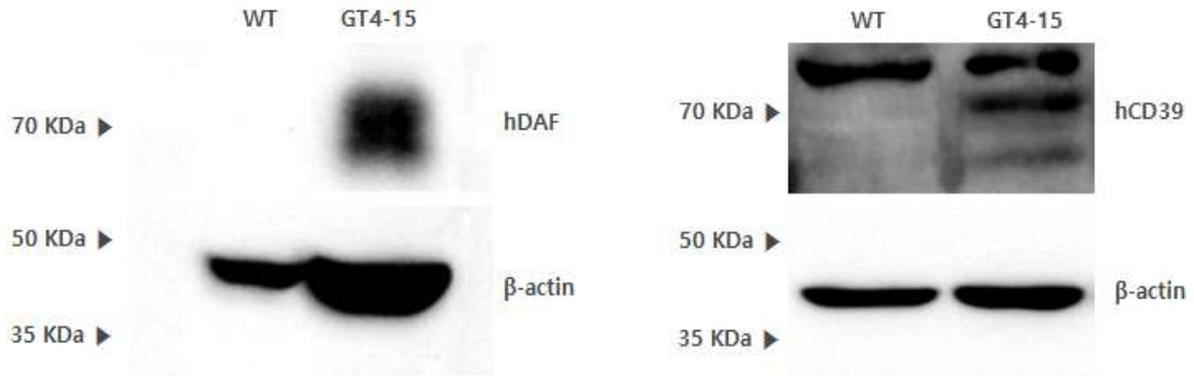
- PCR 분석 <그림16>을 통해 hDAF, hCD39 유전자가 GalT 유전자위에 타겟팅된 콜로니는 3개이며 3개의 콜로니 중 세포 형태 및 증식 속도가 양호한 1개의 콜로니 (GT4-15)를 중심으로 추가 분석을 진행하였음. 선별된 콜로니에서 단백질 발현 확인을 위하여 FACS 분석 <그림17>과 western blotting <그림18>을 진행하였으며 CD55 및 CD39 단백질이 세포에서 현저하게 발현하는 것을 확인하였음.



<그림16> PCR 분석을 통한 hDAF, hCD39 유전자가 타겟팅된 콜로니 선별



<그림 17> FACS 분석을 통한 hDAF 및 hCD39 단백질 발현 확인



<그림 18> Western blot 분석을 통한 hDAF 및 hCD39 단백질 발현 확인

[3,4,5차년도]

1. 효율적인 핵이식란 이식 시스템 확립

가. 핵이식란의 최적 배양 시스템 확립

(1) 연구방법

(가) 미성숙난자의 체외성숙시스템 확립

- 핵이식란 생산에 이용되는 돼지 난자는 도축장의 난소에서 채취한 미성숙난자 (immature oocyte)의 체외성숙 (IVM, *In vitro* maturation)으로부터 시작됨. 돼지의 경우 미성숙난자를 44시간 체외배양을 통해 성숙난자 (MII stage oocyte)를 확보하여야 함. 미성숙난자의 성숙율(maturation rate) 뿐만 아니라, 난자의 품질 또한 실험 중 중요한 요인임. 미성숙 난자를 이용하여 체외에서 성숙을 유도한 후 우수한 성숙난자를 다량으로 생산, 확보하는 것은 효율적으로 복제돼지를 생산하기 위한 첫 번째 과정임에 동시에 가장 중요한 단계임.

- 본 연구팀에서는 고품질의 체외성숙난자 생산을 위하여 다양한 체외성숙시스템 조건을 설정하여, 성숙난자 내 글루타치온(GSH)과 활성산소(ROS) 발현을 조사하여 최적의 체외성숙시스템을 확립하고자 하였음. 또한, 다양한 조건에서 생산된 성숙난자를 이용하여 단위발생 및 핵이식란을 생산하고 배반포까지의 체외발달율 및 총 세포수를 측정함으로써 체외에서 생산된 수정란의 품질을 평가하였음.

㉠ 체외성숙시스템 조건 (I); 기본 성숙 배지 선정

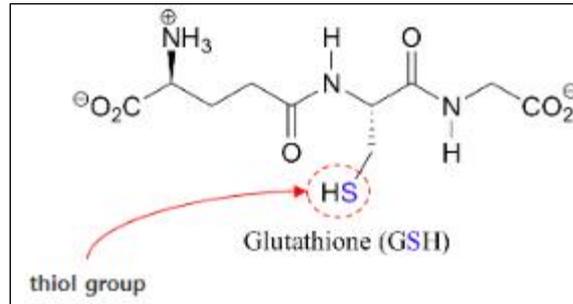
- 1step IVM system (PFF 미첨가)
- 1step IVM system (PFF 첨가)
- 2step IVM system (PFF 첨가)
- * 2 step의 경우, 최초 배양 22시간 후 배양액 교체
- * PFF : Porcine follicular fluid (돼지 난포액 원심분리 후, 상층액 이용)

㉡ 체외성숙시스템 조건 (II)

- 선정된 기본 성숙 배지 + 글라이신
- 선정된 기본 성숙 배지 + 알라닌
- 선정된 기본 성숙 배지 + 글라이신 + 알라닌

㉢ GSH 분석 메커니즘

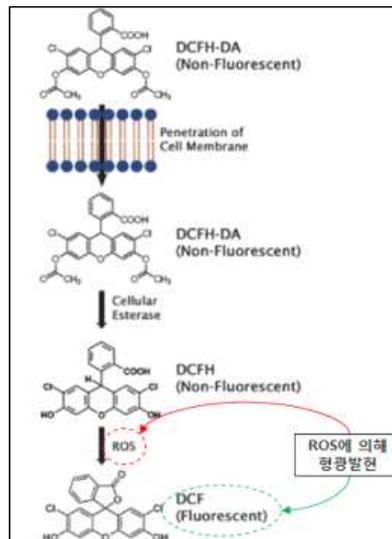
- 난자 내 존재하는 글루타티온은 산화환원반응에 중요한 역할을 하는 폴리펩타이드로, 난자가 체외성숙과정에서 받는 외부 스트레스가 많을수록 활성이 많이 되어 난자의 품질이 저하되게 됨.
- 난자 내 GSH를 측정하기 위해서는 Cell tracker™시약을 이용하며, 이 형광발현 시약성분의 chloromethyl group과 Fluorescent marker가 난자 내 세포로 침투하여 GSH의 thiol group의 황(S)에 특이적으로 결합하여 GSH 농도에 따라 형광발현을 하게 됨.<그림19>



<그림19> Structure of glutathione

㉔ ROS 분석 메커니즘

- 난자의 체외성숙과정에서 받는 외부 스트레스에 의해 세포질 내 발생하는 활성산소는 난자의 성숙율과 품질에 중요한 요인으로 작용함.
- 활성산소를 측정은 Image-iT™ Live green ROS species detection kit 내에 존재하는 형광시약이 DCFH-DA (Dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 이용하며, 활성기전의 아래와 그림과 같이 DCFH-DA가 세포막을 투과하여 세포질 내 에스테라아제 (esterase)라는 효소에 의해 DCFH로 구조가 변경이 되고 이는 다시 활성산소(ROS)와 접촉하였을 때 형광발현을 특이적으로 일으키게 됨. <그림20>



<그림20> 활성산소의 발현과정

㉕ 형광발현 이미지 분석 및 통계분석

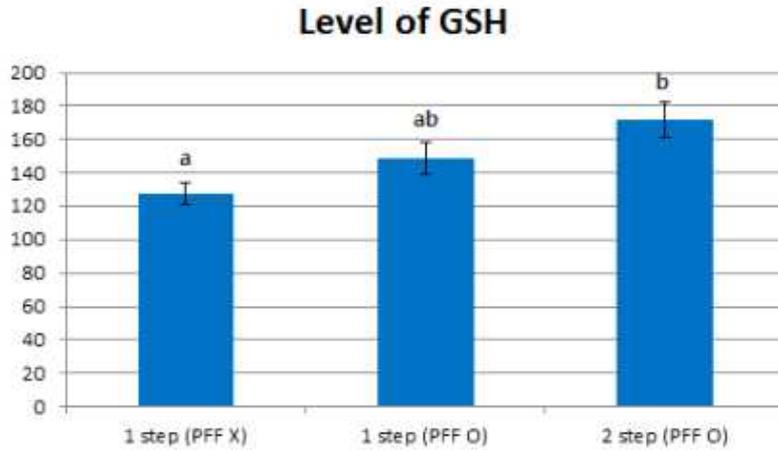
- Image J 프로그램을 이용하여 체외성숙난자의 형광촬영한 사진을 분석하여 발현하는 정도

를 측정하여 3가지 실험그룹 간 비교를 진행하였음.

- 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA)을 통해 3가지 체외성숙조건 그룹 간의 유의차 분석을 실시하였음. ($P < 0.05$)

(2) 연구결과

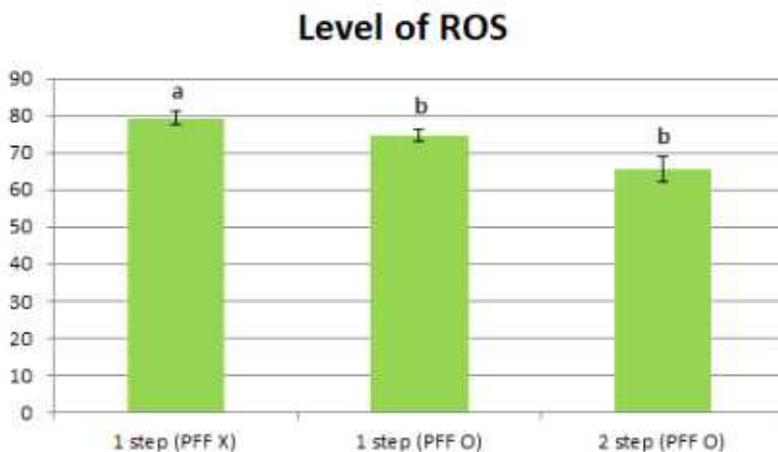
(가) 기본배지 선정을 위한 다양한 체외성숙시스템 조건에 따른 GSH 발현 변화<그림21>



<그림21> 체외성숙시스템 종류에 따른 GSH 발현 측정 결과

- 2 step IVM (PFF 첨가) 시스템에서 체외성숙난자의 품질이 가장 좋았으며, GSH 발현이 다른 두 그룹과 비교했을 때, 유의적으로 높은 수치를 기록하였음.
- GSH의 발현이 높은 것으로 2 step IVM (PFF 첨가) 조건에서 난자가 받는 외부 스트레스가 상대적으로 적어 산화환원반응을 일으키는 빈도를 줄일 수 있었기에 난자의 품질이 상대적으로 좋은 것을 확인할 수 있는 결과임.

(나) 기본배지 선정을 위한 다양한 체외성숙시스템 조건에 따른 ROS 발현변화 <그림23>

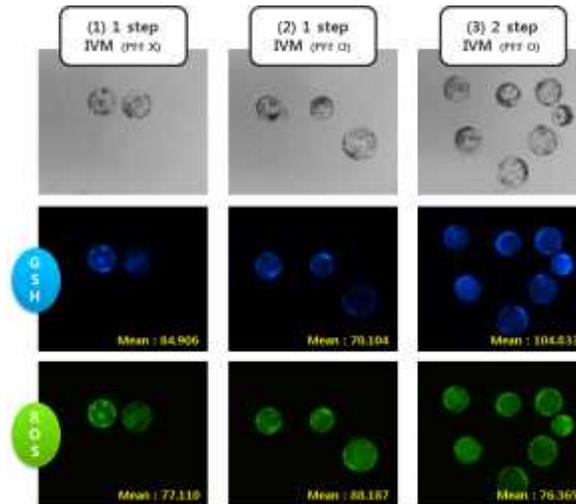


<그림22> 체외성숙시스템 종류에 따른 ROS 발현 측정 결과

- 1 step IVM(PFF 첨가)과 2 step IVM(PFF 첨가) 조건이 1 step IVM(PFF 미첨가) 조건보다 유의적으로 ROS 발현이 적음을 확인하였음.
- 활성산소의 농도는 난자의 스트레스 지표가 되며, 향후 난자의 성숙율 및 핵이식란의

생산효율에도 중요한 요인으로 작용할 수 있음.

- 위 결과를 종합하여 보았을 때, 2 step IVM (PFF 첨가) 조건이 돼지 난자의 체외성숙 시스템에 최적의 환경으로 판단되며, 향후 핵이식란 생산 효율에도 긍정적인 효과를 일으킬 것으로 예상됨. <그림23>



<그림23> 단위발생란 배반포에서 ROS 및 GSH 측정

(다) 알라닌 첨가를 통한 미성숙 난자의 체외성숙 및 성숙난자의 품질 검정

- 본 연구팀은 2 step IVM (PFF 첨가) 조건을 미성숙 난자의 기본 체외 성숙 배지로 선정하고 추가적으로 알라닌과 같은 화학적 처리를 통하여 고품질의 성숙난자를 생산하고자 하였음. 여러 크기의 난포액에 존재하는 성분들의 함량을 조사하여 이를 미성숙 난자의 성숙을 유도하는 배양액에 함유시켰을 때 보여지는 결과를 통하여 최적의 함량을 찾고 체외성숙 유도 후 제작된 핵이식 배아를 체외에서 배양시킨 결과 초기 배아의 할구 형성 및 배반포 형성능력이 향상되는 것을 확인하였음. <표1, 표2, 그림25>

<표 1> 알라닌 첨가에 의한 체외성숙 돼지 난자의 핵성숙 및 글루타치온 함량¹

IVM treatment ²	No. of oocytes cultured for IVM	% of oocytes that reached MII	Relative level (pixels per oocyte) of GSH (N=57 ³)
TCM	247	91.3 ± 1.7	1.192 ± 0.010 ^c
NCSU-23	251	88.7 ± 1.3	1.000 ± 0.014 ^a
NCSU-G	247	85.3 ± 5.2	1.116 ± 0.025 ^b
NCSU-A	249	88.8 ± 1.7	1.193 ± 0.015 ^c
NCSU-GA	260	90.7 ± 1.6	1.170 ± 0.018 ^c

^{a,b,c}Different superscript letters indicate a significant difference within a column (P < 0.05).

¹Five replicates were carried out.

²TCM: TCM + 10% (v/v) porcine follicular fluid, 0.91 mM pyruvate, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml EGF, 75 ug/ml gentamycin; NCSU-23: NCSU-23 + 0.1% (w/v) PVA, 10 ng/ml EGF, 75 ug/ml gentamycin; NCSU-G: NCSU-23 + 0.562 mM glycine; NCSU-A: NCSU-23 + 0.363 mM alanine; NCSU-GA: NCSU-23 + 0.562 mM glycine + 0.363 mM alanine.

³Number of oocytes examined. Three replicates.

<표2> 핵이식 배아 발달에 있어서 체외성숙 동안 알라닌 첨가 효과¹

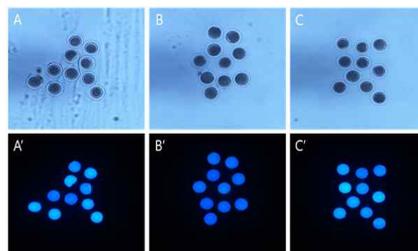
Groups ²	No. of oocytes cultured	% of embryos developed to		No. of cells in blastocyst
		≥ 2-cell	blastocyst	
TCM	111	94.0 ± 2.2 ^c	20.8 ± 2.4 ^c	33.7 ± 2.0
NCSU-23	112	82.2 ± 1.3 ^a	9.3 ± 1.9 ^a	30.7 ± 2.5
NCSU-G	131	83.7 ± 2.1 ^a	12.2 ± 1.0 ^{ab}	31.8 ± 1.7
NCSU-A	108	91.2 ± 1.8 ^b	20.2 ± 2.9 ^c	32.0 ± 1.8
NCSU-GA	122	92.0 ± 2.7 ^b	17.8 ± 2.3 ^{bc}	33.1 ± 2.0

^{a,b,c}Different superscript letters indicate a significant difference within a column (P < 0.05).

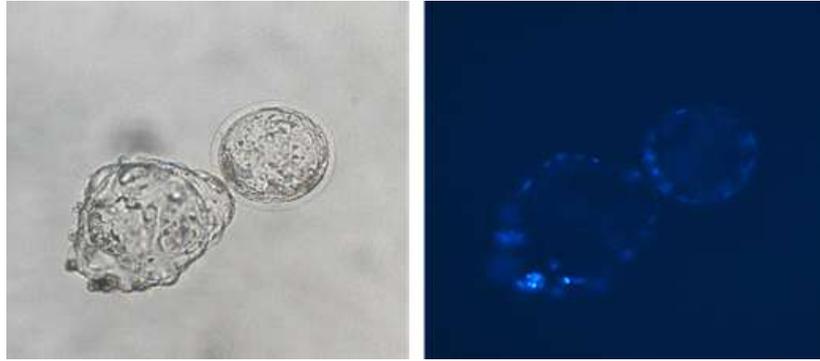
¹Four replicates were carried out.

²TCM: TCM + 10% (v/v) porcine follicular fluid, 0.91 mM pyruvate, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml EGF, 75 ug/ml gentamycin; NCSU-23: NCSU-23 + 0.1% (w/v) PVA, 10 ng/ml EGF, 75 ug/ml gentamycin; NCSU-G: NCSU-23 + 0.562 mM glycine; NCSU-A: NCSU-23 + 0.363 mM alanine; NCSU-GA: NCSU-23 + 0.562 mM glycine + 0.363 mM alanine.

-. 알라닌이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자의 글루타치온 함량을 측정한 결과 알라닌이 첨가된 고정 배양액에서 글루타치온 함량이 높은 것으로 확인되었음. <그림24>



<그림24> 다양한 성숙 배양액 조건에 따른 글루타치온 발현 분석(A, A' ; 기본성숙배양액, B, B' ; 화학적 고정 배양액, C, C' ; 알라닌이 첨가된 고정 배양액)



<그림25> 알라닌이 함유된 고정 배양액에서 배양된 핵이식 배아의 배반포

나. 다양한 형질전환세포주를 이용한 핵이식란 제작 및 체외발달을 검토

(1) 연구방법

- 분자생물학적인 방법에 의해 형질전환된 것으로 확인된 세포주를 이용하여 핵이식란을 제작하고 배반포까지의 체외 발달을 확인하고 총 세포 수를 측정함으로써 핵이식란의 품질을 검토하였음.

(2) 연구결과

- 확립된 MSC유래의 hDAF 형질전환세포주를 이용하여 핵이식란을 생산하였음. 다른 정상 세포주 및 형질전환세포주를 이용하여 각각 핵이식란을 생산하고 체외 발달을 비교하였음. 그 결과, 모든 세포주 유래의 핵이식란 배반포 형성율은 17%~20%의 비슷한 수준으로 나타났으며, 총 세포 수 역시 평균 33.4~37.9개로 세포주에 따른 차이는 크지 않았음 <표 3>.

<표3> 다양한 세포를 이용한 핵이식란의 체외발달을 확인

공여세포 주*	No. of fused / reconstructed oocyte (%)	No. of NT embryo develop to		Total cell number (±SEM)
		≥ 2 cells (%)	Blastocysts (%)	
일반 미니돼지	95 / 119 (80)	77 (84.1)	16 (17.8)	37.9±3.68
GTKO	115 / 130 (89)	98 (89.4)	22 (20.0)	33.4±1.76
MSC-DAF	119 / 132 (90)	95 (83.5)	20 (17.3)	35.9±3.12

* : GTKO; α-1,3 galactosyltransferase knock out, MSC-DAF; 중간엽줄기세포유래 DAF유전자 삽입

다. 효율적인 임신 및 분만 시스템 구축

(1) 연구방법

(가) 핵이식란 이식 방법의 차이 검토

- 효율적인 핵이식란의 대리모돈 이식 방법의 확립을 위하여 기존의 개복을 통한 핵이식란의 난관이식 방법 (외과적 수술방법)과 심부주입기를 이용한 비침습적 핵이식란 이식 방법의 차이를 검토해 보았음.



<그림26> 심부주입기를 이용한 핵이식란의 대리모돈 이식

(나) 자연분만 유도를 통한 산자의 생존율 제고 방안 확립

- 핵이식을 통한 형질전환돼지 생산 시 제왕절개 등의 방법에 의해 나타나는 폐사를 줄이고자 자연분만을 유도하고 생산된 자돈을 SPF 수준의 시설에서 관리함으로써 자돈의 생존율 향상을 위한 기본 시스템을 구축하고자 하였음.

(2) 연구결과

(가) 핵이식란 이식 방법의 차이 검토

- 기존의 핵이식란 대리모돈 이식 방법은 대리모돈의 개복을 통한 난관 및 자궁을 체외로 들어내어 핵이식란을 자궁 내로 주입해 주는 방식임. 이 방법은 대리모돈의 마취 약제 선정, 마취 방식, 외과적 수술 진행, 수술 후 회복 시간 등 다양한 요소에 대한 고려 및 주의가 필요하고 임신 및 분만 효율도 20% 수준에 그치는 실정임. 효율적인 핵이식란의 대리모돈 이식 방법의 확립을 위하여 인공수정 시 사용하는 심부주입기를 이용하여 생산된 핵이식란을 발정이 유기된 대리모돈의 외음부를 통하여 비침습적 방법으로 이식하여 두 방법의 차이를 검토해 보고자 하였음. 그러나 심부주입기를 이용한 핵이식란의 대리모돈 이식은 총 2회 실시하여 2회 모두 임신에 실패하는 결과가 나타났는데, 이는 주입기를 이용하여 핵이식란을 돼지 자궁 내로 주입해 주는 정교하고 숙련된 기술이 요구되며 추가적으로 충분한 반복 수행을 진행하여야 할 것으로 사료됨.

(나) 자연분만 유도를 통한 산자의 생존율 제고 방안 확립

- 핵이식을 통한 형질전환복제돼지를 생산하는 데 제왕절개 등의 방법을 사용하는데 이는 자돈의 사산 및 조기 폐사 발생율을 매우 높이는 원인이 되었음. 따라서 생산되는 복제 돼지의 생존율을 높이기 위하여 대리모돈의 자연분만을 유도하였음. 분만징후를 보이는 대리모돈을 관찰하면서 최소한의 간호를 통한 분만을 유도하였으며 이를 통해 사산율을 낮출 수 있었음. 또한, 준SPF 수준의 시설 관리와 주기적인 헬스모니터링을 통하여 형질전환돼지의 생존율을 높이는데 주력하고 있음.

4. 미니돼지 줄기세포유래 형질전환복제돼지 생산

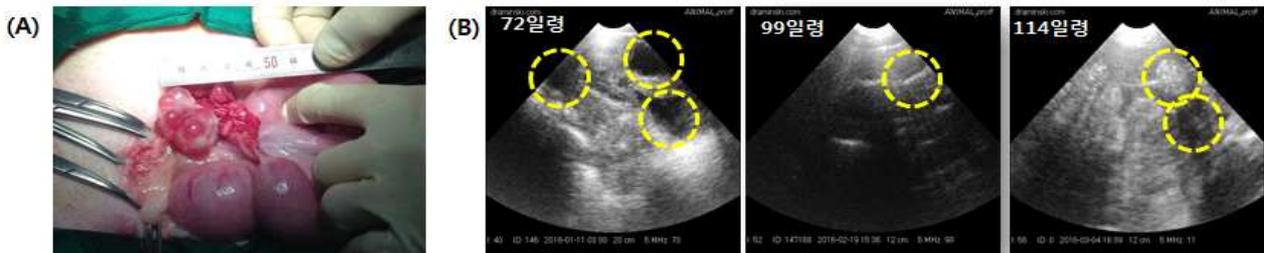
가. 미니돼지 줄기세포유래의 형질전환세포주를 이용하여 생산된 핵이식란의 대리모돈 이식

(1) 연구방법 및 결과

(가) 체외배양을 통해 줄기세포유래 형질전환세포주를 이용하여 생산된 핵이식란의 배반포 발달능력 및 총 세포 수를 확인한 후 제작된 핵이식란을 대리모돈에 이식하여 임신 유도하였음 <표4>. 대리모돈은 프로스타그란딘 제제인 레규메이트를 18일간 사료와 함께 첨가하여 발정을 유도함. 총 1,687개의 핵이식란을 발정이 유지된 8마리의 대리모돈의 한쪽 난관에 이식하였고 이식 후 35일령에 초음파를 통해 대리모돈 2두에서 임신이 확인되었음. 임신모돈 1두는 63일째 유산되었으나 나머지 1두는 분만까지 성공하여 총 3두의 자돈을 생산하였음 <그림27, 28>. 생산된 자돈 3두 중 2두는 사산이었으며 나머지 1두만 생존자돈이었음. 생존자돈의 경우 전지 기형으로 기립에 어려움이 있어 인공포유를 진행하였으나 생후 28일째 폐사하였음. 형질전환복제돼지의 확보를 위하여 폐사한 형질전환복제돼지의 귀조직에서 분리한 섬유아세포를 이용하여 핵이식란 제작 후 대리모돈 이식을 통해 재복제를 실시함과 동시에 새롭게 제작한 형질전환세포주 (GTKO/hCD55/hCD39)를 이용하여 핵이식란을 제작하고 대리모돈에 이식하여 임신을 유도하였음.

<표4>. 줄기세포유래 형질전환세포주를 이용한 핵이식란 제작 및 대리모돈 이식 현황

공여 세포	총 이식란 수 (평균 이식란 수)	대리모돈 수	임신돈 (%)	분만돈 (%)	생산 자돈 (사산)	생존 자돈
MSC유래DAF	1,687 (211)	8	2 (25)	1 (50)	1 (2)	0



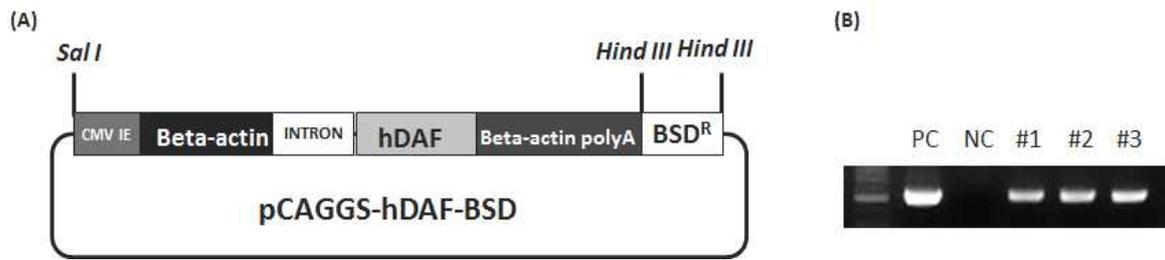
<그림27> 분만 대리모의 핵이식란 이식 시 자궁 (A) 및 임신 초음파 사진 (B)



<그림28> MSC유래hDAF 형질전환복제돼지, 총 3두 중 2두 사산

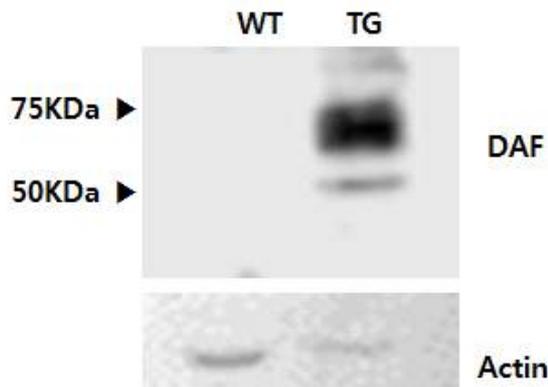
(나) 생산된 MSC유래hDAF 형질전환복제돼지의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 통해

hCD55 유전자의 삽입을 확인하였고, 사산되었던 자돈들에서도 역시 삽입된 유전자가 확인되었음 <그림29>.



<그림29> 벡터모식도 (A)와 생산자돈 유전자 확인 결과 PCR (B)

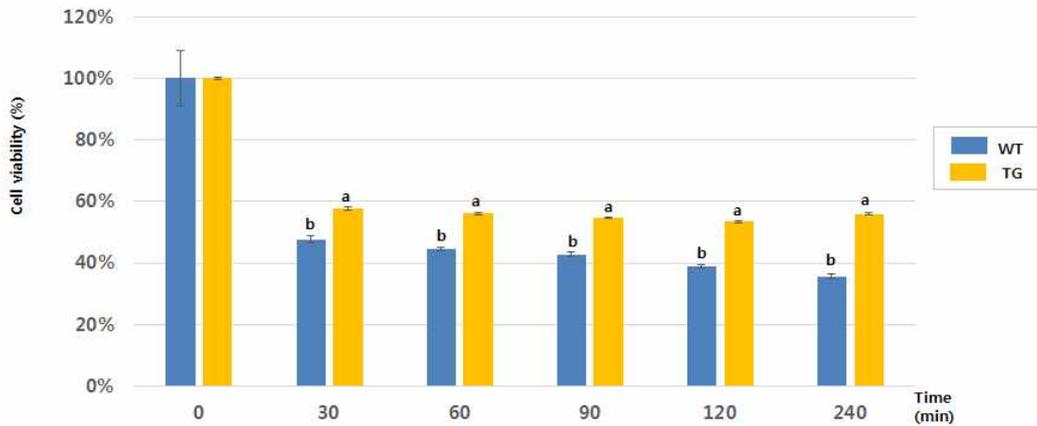
(다) 생산된 형질전환돼지에서 삽입된 hDAF 단백질 발현을 확인하기 위해 western blot 을 실시하였음 <그림30>. 그 결과 형질전환복제돼지 (TG)에서 일반미니돼지 (WT)와 달리 강한 human DAF 단백질 발현이 확인되었음.



<그림 30> human DAF 단백질 발현 확인

(라) 생산된 형질전환돼지 세포를 이용한 세포독성 분석

- 형질전환돼지의 귀조직으로부터 섬유아세포를 분리하고 인간 보체세포(human complement)를 이용한 세포독성분석(Cell cytotoxicity analysis)을 하였음. 그림5와 같이 일반 미니돼지 섬유아세포 (WT)의 생존율은 보체세포에 노출되고 30분 후 48%로 감소하였으며 240분 후 최대 38%까지 감소하였음. 그러나 형질전환돼지 (TG)의 생존율은 노출시간이 지나더라도 꾸준히 50% 이상의 생존율을 나타내었음 <그림31>.



<그림31> 인간 보체 혈청을 이용한 세포독성 검사

나. 미니돼지 귀세포유래의 형질전환세포주를 이용하여 생산된 핵이식란의 대리모돈 이식

(1) 연구방법 및 결과

(가) 미니돼지의 귀세포 유래 섬유아세포를 이용하여 GalT 유전자를 타겟팅함과 동시에 GalT 유전자위에 hDAF 및 hCD39 유전자를 Knock-in 함으로서 제작된 형질전환세포주를 이용하여 핵이식란을 제작하고 대리모돈에 이식하여 임신을 유도하였음. 총 2,644개의 핵이식란을 19두의 대리모돈에 이식하였고 이 중 8두가 임신이 확인되었음 <표 5>. 이는 기존의 임신을 25%에서 42%로 약 1.6배 향상된 수준으로 고품질의 핵이식란 제작을 위하여 확립한 최적의 체외배양시스템과 대리모돈 발정유기시스템 확립을 통해 이끌어낸 결과로 보임. 또한, 자연분만을 유도함으로써 사산되는 자돈의 발생율을 차츰 줄여 나가고 있음. 그러나 태어난 복제돼지가 이유 시점까지 폐사되는 비율이 높아 이 문제를 해결하기 위하여 준SPF 시설에서 사양관리를 진행 중이며 세균, 바이러스 및 기생충에 대한 주기적인 헬스모니터링을 통하여 복제돼지를 케어하고 있음. 현재 GTKO/hDAF/hCD39 형질전환복제돼지는 1두가 생존하여 건강하게 관리되고 있으며 <그림33, (E)> 추가적인 생산을 통한 개체 확보를 위하여 지속적으로 대리모돈 이식 수술을 진행 중이며 현재 1두의 대리모돈이 초음파 진단을 통해 임신이 확인되었음 <그림32>. 이 대리모돈은 18년 2월 26일 분만 예정임.

<표5> 다양한 형질전환세포주를 이용한 핵이식란 제작 및 대리모돈 이식 현황

공여 세포	총 이식란 수 (평균 이식란 수)	대리모돈 수	임신돈 (%)	분만돈 (%)	생산 자돈 (사산)	생존 자돈
MSC유래DAF 재복제	382 (95)	4	0 (0)	0 (0)	0	0
GTKO/hDAF/ hCD39	2,644 (123)	21 ^a	8 ^b (42)	4 (57) ^c	5 (5)	1

^a 총 21두 중 2두는 시기적으로 임신 진단이 불가능, 추후 임신 여부 판정 예정

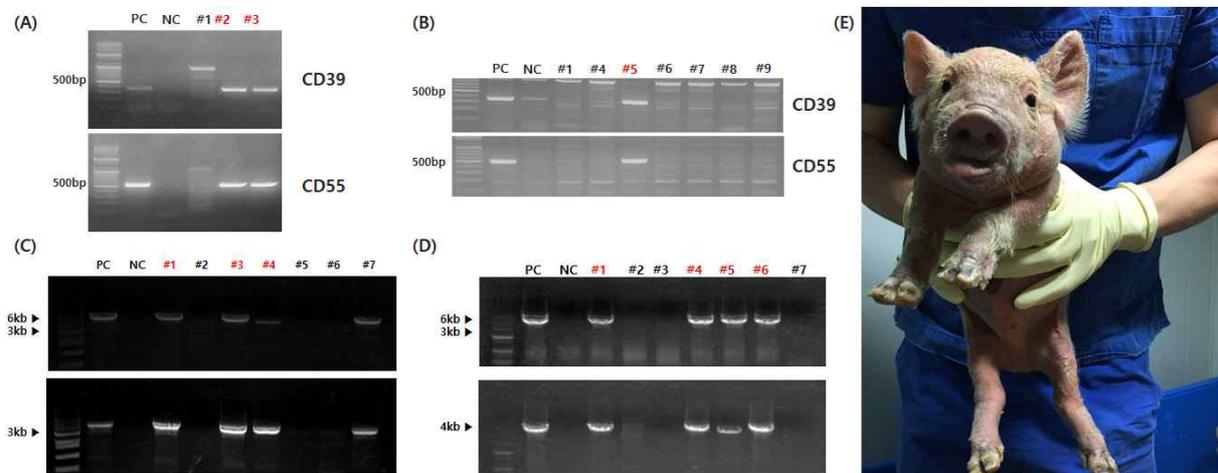
^b 1두의 대리모돈은 현재 임신 유지 중이며 18년 2월 26일 분만 예정임, (임신율= 8/19*100)

^c 현재 임신 유지 중인 대리모돈 1두를 제외한 7두 중 4두 분만



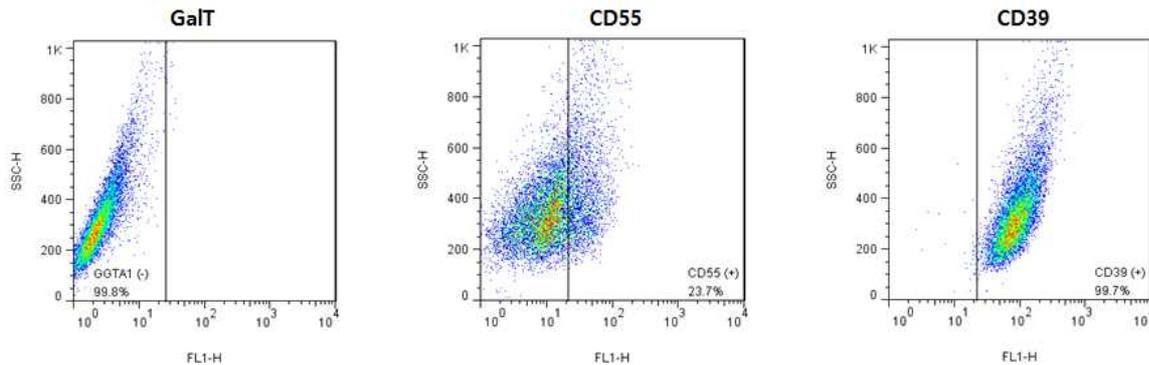
<그림32> 초음파 진단을 통한 대리모돈의 추가 임신 확인 (18.2.26 분만예정)

(나) 총 8두의 임신 대리모돈 중에서 4두가 무사히 분만을 완료하였음. 태어난 자돈들의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통한 유전자 분석을 진행한 결과, 10두가 GTKO/hDAF/hCD39 유전자타입의 형질전환복제돼지임이 확인되었음 <그림 33>.



<그림33> PCR을 통한 생산자돈의 유전자타입 분석 (A) 17.5.2 생산; (B) 17.5.7 생산; (C) 17.8.28 생산; (D) 17.9.12 생산; (E) 성장 중인 GTKO/hDAF/hCD39 형질전환복제돼지

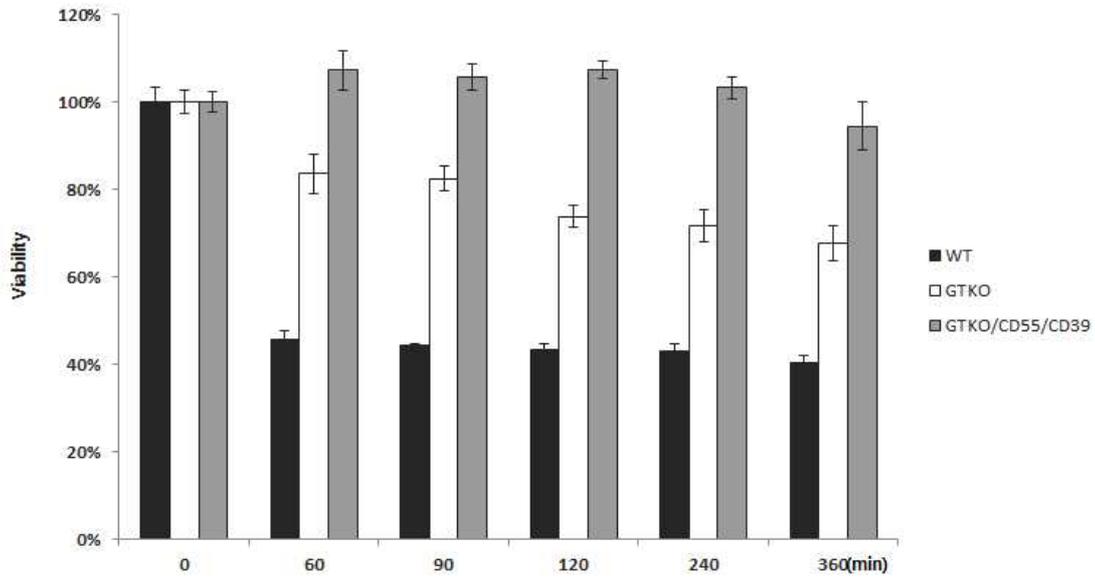
(다) 생산된 형질전환복제돼지의 귀조직으로부터 섬유아세포를 구축하고 구축된 세포를 이용하여 FACS 분석을 통한 단백질 발현을 분석하였음. GalT 단백질의 경우 거의 발현하지 않는 것에 비하여 hDAF와 hCD39 단백질의 발현이 뚜렷한 것을 확인할 수 있었음 <그림34>.



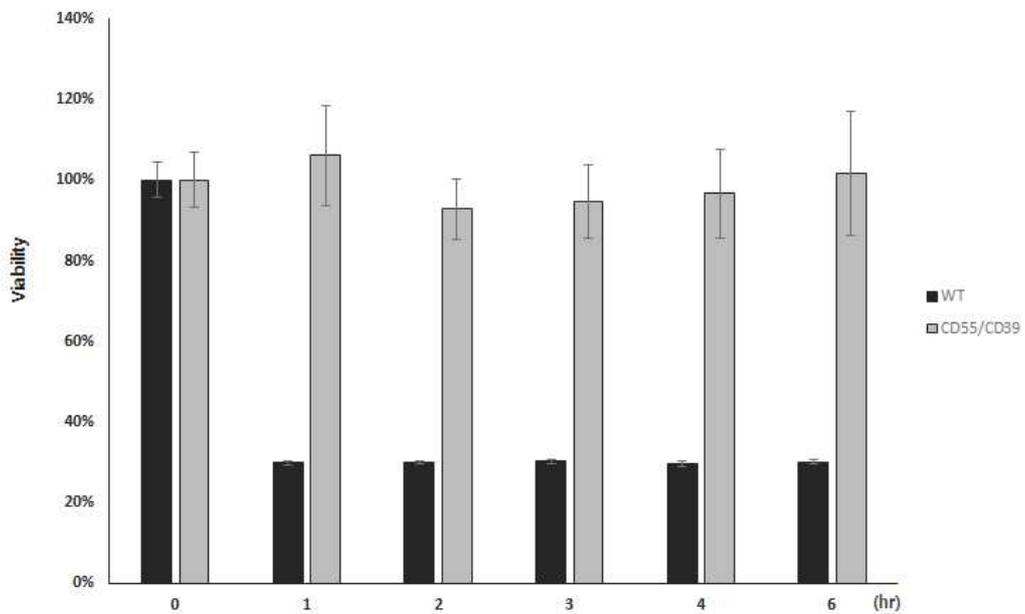
<그림34> FACS 분석을 통한 GalT, hDAF, 그리고 hCD39 단백질 발현 확인

(라) 생산된 형질전환복제돼지의 다양한 세포를 이용한 세포독성 분석

1. 형질전환복제돼지의 귀조직으로부터 섬유아세포 및 혈관내피세포를 분리하고 인간 보체세포 (human complement)를 이용한 세포독성분석(Cell cytotoxicity analysis)을 진행하였음. 일반 미니돼지 (WT)의 섬유아세포는 human serum 처리 1시간째부터 세포독성으로 인하여 생존율이 40% 수준을 나타내었으며 GalT 유전자만 제거된 형질전환 돼지의 섬유아세포는 생존율이 꾸준히 감소되어 6시간째에 70% 정도의 수준을 나타낸 반면 GTKO/hDAF/hCD39 섬유아세포는 human serum을 처리하고 6시간째까지도 세포독성이 거의 나타나지 않았음 <그림35>. 이러한 결과는 혈관내피세포에서 더욱 현저하게 나타났는데 <그림36>과 같이 일반 미니돼지 섬유아세포 (WT)의 생존율은 보체세포에 노출되고 1시간째부터 20%의 수준을 나타내었으나 이와는 다르게 GTKO/hDAF/hCD39 형질전환돼지 혈관내피세포의 생존율은 노출시간이 지나더라도 꾸준히 90% 이상의 생존율을 나타내었음.



<그림35> 귀조직유래 섬유아세포에서의 human serum에 대한 독성 분석



<그림36> 혈관내피세포에서의 human serum에 대한 독성 분석

(마) 또한 본 기관은 연구과제의 협동 기관인 충남대학교와 경상대학교에서 제작한 체외수정란의 대리모돈 이식 수술을 대행하여 진행 중에 있음. 현재까지 총 8두의 대리모돈에 체외수정란을 이식하는 수술을 진행하였으며 총 3두가 임신이 확인되었으나 모두 full-term까지 진행되지 못하고 유산되었음 <표6, 그림37>.

<표 6>. 충남대학교와 경상대학교의 체외수정란 대리모돈 이식 현황

	대리모돈 수	임신돈 (%)	유산돈 (%)
충남대학교	8	3 (38)	3 (100)
경상대학교	5	2 (40)	2 (100)



<그림37> 충남대학교와 경상대학교 체외수정란이 이식되어 임신이 확인된 대리모돈 초음파

2-2 연구수행성과

가. 연구 성과물 및 사업화 가능성(기술이전) 정량 지표

성과목표	지식재산권		기술실시(이전)		학술성과		
	출원	등록	건수	기술료	SCI	비SCI	학회발표
단위	건	건	건	백만원	건	건	건
최종목표	5	6	1		37	25	34
연구기간 내 달성실적	5	4	0		45	14	34
최종목표 대비 달성률(%)	100	67	0		122	64	100
연구종료 후 성과창출 계획	1	2	2	50			
최종목표 대비 달성률(%)	120	100	200		122	64	100

나. 특허 등록 및 출원 성과

등록·출원	연도	특허명	출원인 및 발명인	출원국	등록·출원번호
출원	2014	자기 활성수를 이용한 돼지의 번식능력 개선방법	강원대학교 산학협력단, 박춘근, 이상희, 황보용, 이진우	한국	10-2014-0180628
출원	2015	동물세포 동결 보존 전처리 장치	강원대학교 산학협력단, 박춘근, 이상희, 이진우, 양진우	한국	10-2015-0059897
출원	2015	이종장기이식을 위한 형질전환 복제돼지 및 이의 제조방법	유태팜, 김현일, 최기명, 심주현, 고나영, 엄희중, 김지호, 이정웅	한국	10-2015-0092205
출원	2017	닭 골수 유래 골·연골전구세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 연골 분화 유도용 조성물	서울대학교 산학협력단 임정목, 안지연	한국	10-2017-0135444
출원	2017	닭 골수 유래 골·연골전구세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 골 생성 촉진용 조성물	서울대학교 산학협력단 임정목, 안지연, 안종일, 고동우, 양우섭, 김근천	한국	10-2017-0135443
등록	2014	Use of $\alpha 1G$ subunit of T-type calcium channel as diagnostic marker for pregnancy in cattle	진동일,한영훈,김홍래	미국	US 8,691,955 B2
등록	2015	이종장기이식을 위한 형질전환 복제돼지 및 이의 제조방법	유태팜, 김현일, 최기명, 심주현, 고나영, 엄희중, 김지호, 이정웅	한국	10-1763196-0000
등록	2017	포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진용 배지 조성물 및 이를 이용한 포유동물의 난모세포 성숙화 및 배아 발달 촉진 방법	충남대학교산학협력단 진동일, 장진욱	한국	10-1733818
등록	2017	자기 활성수를 이용한 돼지의 번식능력 개선방법	강원대학교 산학협력단, 박춘근, 이상희, 황보용, 이진우	한국	10-1740375

다. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Chromosomes in the porcine first polar body possess competence of second meiotic division within enucleated MII stage oocytes	타오 린	진동일	조운비 강정원 이재은 김동교	Plos One	8(12)	국외	SCI (3.730)
2014	General transcription factors and embryonic genome activation	레자	진동일	강정원 림도 이재은	Reproductive & Developmental Biology	38:41-52	국내	비SCI (KCI)
2014	Somatic cell transformation into stem cell-like cells induced by different microenvironments.	임정목	공승표		Organogenesis	9(4)	국외	SCI (2.596)
2014	Development of a Serum-free, Defined System Employing Growth Factor for Preantral Follicle Culture	박영현	임정목	공승표 김화영 김길아 최준희 안지연	Molecular Reproduction and Development	80(9)	국외	SCI (2.532)
2013	돼지의 배란 전 자궁내막 상피세포 내 Plasminogen Activators의 발현	황보용	박춘근	이상희 차혜진 송은지 이승태 이은송 정희태 양부근	Journal of embryo transfer	28(3)	국내	비SCI (KCI)
2013	Treatment of fetal fibroblasts with DNA methylation inhibitors and/or histone deacetylase inhibitors improves the development of porcine nuclear transfer-derived embryos	디아오윤페이	진동일	겐지 한룡순 이효하 레자 림도	Animal reproduction Science	141(3)	국외	SCI (1.511)
2013	Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model.	이성학	진동일	강정원 림도 이재은	BioMed research international	epub	국외	SCI (2.88)
2013	Effects of Trichostatin A on In Vitro Development of Porcine Parthenogenetic and Nuclear Transfer Embryos	조운비	진동일	겐지 한룡순 타오린 레자 강정원	Reproductive & developmental biology	37(2)	국내	비SCI (KCI)
2013	Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on the development of porcine parthenogenetic and nuclear transfer embryos	조운비	진동일	나루세 겐지 한영훈 레자 림도	Natural Science	5(7)	국외	SCI (1.02)
2014	The CCAAT element in the CIWI promoter regulates transcriptional initiation in chicken primordial germ cells	손윤아	박태섭, 한재용	이상인 최희정 김현정 김기현	Molecular reproduction and development	81(9)	국외	SCI (2.812)
2014	Effect of Washing Culture Oil on In Vitro Development in Porcine Embryos	이연주	박춘근	김유진 이상희 정희태 양부근	Reproductive & Developmental Biology	38(3)	국내	비SCI (KCI)
2014	Distinct roles of ROCK1 and ROCK2 during development of porcine preimplantation embryos	장지유	진동일	동환승 레자 림도 강정원	Reproduction : the official journal of the Society for the Study of Fertility	148(1)	국외	SCI (3.555)
2014	Changes in Histone H3 Lysine 36 Methylation in Porcine Oocytes and Preimplantation Embryos	조운비	진동일	강정원 이효하 레자 림도	PloS one	9(6)	국외	SCI (3.73)

2014	Effects of sorbitol on porcine oocyte maturation and embryo development <i>in vitro</i>	림도	진동일	장진옥, 조운비, 강정원	Zygote	Epub ahead of print	국외	SCIE (1.323)
2013	Stem cell maintenance in a different niche	임정목	이승태	안지연	Clinical and experimental reproductive medicine	40(2)	국내	비SCI (KCI)
2013	Development of three dimensional culture and expression of integrin heterodimers in human embryonic stem cells	이승태	임정목	장미 이진	Organogenesis	9(3)	국외	SCI (2.596)
2015	Characterization and evaluation of neuronal trans-differentiation with electrophysiological properties of mesenchymal stem cells isolated from porcine endometrium.	섭바라오	노규진	임란 김은진 장지정 이재원 전령훈 강다원 이승림 박봉옥	International journal of molecular sciences	16(5)	국외	SCI (2.862)
2015	Tauroursodeoxycholic acid improves the implantation and live-birth rates of mouse embryos	림도	진동일	조운비 강정원 이재은 김동규	Reproductive biology	15(2)	국외	SCI (1.048)
2015	Proteomic Analysis of Bovine Pregnancy-specific Serum Proteins by 2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis	이재은	진동일	이재영, 김홍례 신현영 림도	Asian-Australasian journal of animal sciences	28(6)	국내	SCI (0.563)
2015	Lysophosphatidic acid improves porcine oocyte maturation and embryo development in vitro	장진옥	진동일	지아영 림도 강정원 이재은	Molecular reproduction and development	82(1)	국외	SCI (2.675)
2014	Procedure used for denuding pig oocytes influences oocyte damage, and development of in vitro and nuclear transfer embryos	림도	진동일	조운비 최화식 레자 강정원 이재은	Animal reproduction science	152	국외	SCI (1.582)
2015	Selection of Reference Genes for Quantitative Gene Expression in Porcine Mesenchymal Stem Cells Derived from Various Sources along with Differentiation into Multilineages.	이원재	노규진	전령훈 장시정 박지성 이승찬 섭바라오 이승림 박봉옥 알관경	Stem cells international	2015	국외	SCI (2.813)
2015	Cell source-dependent in vivo immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and synovial fluid of minipigs	이원재	노규진 이성립	한영술 옥선아 이재훈 전령훈 박지성 이상일 노나영	Experimental cell research	333(2)	국외	SCI (3.246)
2015	Effect of Nicotinic acid on sperm characteristic and oocyte development after invitro fertilization using cryopreserved boar semen	김유진	박춘근	이상희 이연주 오혜인 정희태 양부근 이승형	Journal of Embryo Transfer	30(1)	국내	비SCI (KCI)

2015	Role of Golgi complex on regulation of Sec 61 β , COG2 and Epidermal growth factor during oocyte maturation	오해인	박춘근	이상희 이승형 이승태 이은송	The Korean Society of Animal Reproduction	39(3)	국내	비SCI (KCI)
2015	Antioxidative effects of magnetized extender containing bovine serum albumin on sperm oxidative stress during long-term liquid preservation of boar semen	이상희	박춘근		BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	464(2)	국외	SCI (2.297)
2015	Laboratory control and basic culture protocols for stem cell self-renewal	임정목		안지연 조윤미	Methods in molecular biology	1212	국외	SCI (1.29)
2015	Deposition of bioactive human epidermal growth factor in the egg white of transgenic hens using an oviduct-specific minisynthetic promoter	박태섭	한재용 한범구	이효근 문정국 이홍조 윤종원 윤빛나래 강상철 김지호 김현일	The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology	29(6)	국외	SCI (5.043)
2015	Establishment of embryo culture system using co-incubated collagen matrix gel with porcine endometrial cell	이상희	박춘근	한혜인 황보용 이승형 정희태 양부근	The Korean Society of Animal Reproduction	39(3)	국내	비SCI (KCI)
2015	Comparison of Immunomodulation Properties of Porcine Mesenchymal Stromal/Stem Cells Derived from the Bone Marrow, Adipose Tissue, and Dermal Skin Tissue	옥선아	노규진	섭바라오 이연미 이정현 전령훈 이성림 박지권 황선철	Stem cells international	2016	국외	SCI (3.687)
2015	Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation	이용승	박춘근	이승형 이상희 양부근	Animal reproduction science	159	국외	SCI (1.511)
2015	DAZL Expression Explains Origin and Central Formation of Primordial Germ Cells in Chickens	이형철	한재용	임정목 최희정 이효근 타마오	Stem Cells and Development	25(1)	국외	SCI (3.727)
2016	Overexpression of Oct4 in porcine ovarian stem/stromal cells enhances differentiation of oocyte-like cells in vitro and ovarian follicular formation in vivo	이연미	노규진	김태호 이정현 이원재 전령훈 장지성 옥선아 이성림 박봉옥	journal of ovarian research	9(0)	국외	SCI (2.502)
2016	Cryo-ability of boar sperm sorted by Percoll containing of antioxidant enzyme	이경진	박춘근	이상희 주선호 김유진 양진우 이연주 황보용 이승형 이승태 이은송	Korean Journal of Embryo Transfer	30(3)	국내	비SCI (KCI)

2016	Effect of progesterone on expression of prostaglandin synthases and plasminogen activator in bovine endometrium during estrous cycle	최수빈	박춘근	황보용 정희태 양부근	Korean Journal of Embryo Transfer	31(1)	국내	비SCI (KCI)
2016	Difference in suitable mechanical properties of three-dimensional, synthetic scaffolds for self-renewing mouse embryonic stem cells of different genetic backgrounds	이명옥	임정목 이승태	안종일 안지연 양우섭 제프리	J Biomed Mater Res B Appl Biomater	105(8)	국외	SCI (2.881)
2016	Effect of glutathione on tetraploid embryo development in pigs	김화영	박춘근	이상희 황보용 이승태 이은송	Korean Journal of Embryo Transfer	31(3)	국내	비SCI (KCI)
2016	In vitro oocyte maturation in a medium containing reduced sodium chloride improves the developmental competence of pig oocytes after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer.	이주형	이은송	이한나 이용진 박보라 파즐 이승태 박춘근 현상환	Reprod Fertil Dev	29(8)	국외	SCI (2.4)
2016	Alpha-linolenic acid treatment during oocyte maturation enhances embryonic development by influencing mitogen-activated protein kinase activity and intraoocyte glutathione content in pigs	이용진	이은송	이한나 박보라 파즐 이주형 이승태 현상환, 박춘근	Journal of Animal Science	94(8)	국외	SCI (2.014)
2016	Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the viability and acrosome damage of sex-sorted sperm in frozen-thawed bovine semen	이승현	박춘근	이용승 이상희 양부근	J Biol Res-Thessalon	23(0)	국외	SCI (0.574)
2016	Effects of L-carnitine and nicotinic acid on sperm characteristics in miniature pigs	이연주	박춘근	이상희 김유진 황보용 이승형 정희태 양부근	Reproductive & developmental biology	40(1)	국내	비SCI (KCI)
2016	Change of uterine histotroph proteins during follicular and luteal phase in pigs	이상희	박춘근	송은지 황보용 이승형	ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE	168(0)	국외	SCI (1.377)
2016	Research Advancements in Porcine Derived Mesenchymal Stem Cells	바티	노규진	쉬바쿠마 섭바라오	Current Stem Cell Research & Therapy	11(1)	국외	SCI (2.645)
2016	Inhibition of P-TEFb disrupts global transcription, oocyte maturation and embryo development in the mouse	레자	진동일	린도 이재은 김소연 사주진 우제석	Genesis	54(9)	국외	SCI (2.165)
2016	P-TEFb kinase activity is essential for global transcription, resumption of meiosis and embryonic genome activation in pig	레자	진동일	린도 이재은 최기명 신현영	Plos One	11(3)	국외	SCI (3.057)
2016	cAMP-Response Element-Binding 3-Like Protein 1 (CREB3L1) Is Required for Decidualization and Its Expression Is Decreased in Women With Endometriosis	안종일 유정윤	임정목 정계숙	김태훈 김영임 Susan D. Asgerally Bruce A Steven L 안지연	CURRENT MOLECULAR MEDICINE	16(3)	국외	SCI (2.345)

2016	돼지 자궁내막세포에서 Plasminogen Activator mRNA와 단백질 발현에 미치는 Heat Stress의 영향	황보용	박춘근	이상희 김화영 이유림 박지은 정희태 양부근	강원대학교 동물자원공동연구소	27(3)	국내	비SCI (KCI)
2016	Isolation, Characterization, and In vitro cultureing of spermatohonial stem cells in Japanese quail (coturnix japonica)	Ravindran 이보람	한재용	김영민 이홍조 박영현 타마오 임정목	STEM CELLS AND DEVELOPMENT	26(1)	국외	SCI (3.562)
2017	G-protein coupled receptor 64 is required for decidualization of endometrial stromal cells.	유정윤 안종일	임정목 정재욱	김태훈 유성렬 안지연	Scientific Reports	7(1)	국외	SCI (4.259)
2017	Development of In Vitro Embryo Production System Using Collagen Matrix Gel Attached with Vascular Endothelial Growth Factor Derived from Interleukin-1 Beta-Treated Porcine Endometrial Tissue	한혜인	박춘근	이상희	Tissue engineering. Part C, Methods.	23(7)	국외	SCI (3.485)
2017	Effects of Culture Dimensions on Maintenance of Porcine Inner Cell Mass-Derived Cell Self-Renewal	백송	이승태	한나래 윤정임 황재연 김민석 박춘근 이은송	Molecules and cells.	40(2)	국내	SCI (3.054)
2016	Production of Heterozygous Alpha 1,3-Galactosyltransferase (GGTA1) Knock-out Transgenic Miniature Pigs Expressing Human CD39	최기명	김현일	심주현 고나영 엄희정 김지호 이정웅 진동일	Transgenic Research	26(2)	국외	SCI (2.054)
2016	Coculture with Good-Quality COCs Enhances the Maturation and Development Rates of Poor-Quality COCs	림도	진동일	레자 이재은 신현영	Theriogenology	85(3)	국외	SCI (1.838)
2014	Culture of preantral follicles in poly(ethylene) glycol-based, three-dimensional hydrogel: a relationship between swelling ratio and follicular developments.	안종일	임정목	김길아 권효숙 안지연 제프리 송용상 이승태	Journal of tissue engineering and regenerative medicine	9(3)	국외	SCI (4.428)
2017	The expression of VEGF, myoglobin and CRP2 proteins regulating endometrial remodeling in the porcine endometrial tissues during follicular and luteal phase	이승형	박춘근	이상희 양부근	Animal science journal	88(9)	국외	SCI (1.325)
2017	Effect of rapamycin treatment during post-activation and/or in vitro culture on embryonic development after parthenogenesis and in vitro fertilization in pigs	파즐	이은송	이한나 이주형 이승태 박춘근 현상환	Reproduction in domestic animals	52(5)	국외	SCI (1.4)

2017	폐지 정자의 동결보존 시 α -Linolenic Acid의 효과	이원희	박춘근	황보용 이상희 양진우 김화영 이유림 박지은 정희태 양부근	Reproductive developmental biology	40(4)	국내	비SCI (KCI)
2014	The co-injection of somatic cells with embryonic stem cells affects teratoma formation and the properties of teratoma-derived stem cell-like cells.	공승표	임정목	김보연 권효숙 양우섭 정재욱 안지연	Plos One	9(9)	국외	SCIE (3.730)
2017	Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes	이명옥	임정목	안종일 이아란 고동우 이진 양우섭 안지연	Molecules and cells	40(8)	국내	SCIE (3.054)
2016	A role of unsaturated fatty acid in animal reproductive cells and biology	황보용	박춘근	김화영 이유림 이승태 이은송 정희태 양부근	Reproductive & developmental biology	40(2)	국내	비SCI (KCI)
2017	Generation of embryonic stem-like cells from in vivo-derived porcine blastocysts at a low concentration of basic fibroblast growth factor.	차혜진	이승태	윤정임 한나래 백송 김화영 이상희 이주영 이은송 박춘근	Reproduction in domestic animals	52(5)	국외	SCI (1.4)
2017	The Importance of Post-thaw Subculture for Standardizing Cellular Activity of Fresh or Cryopreserved Mouse Embryonic Stem Cells.	고동우	임정목 안지연	윤정기 안종일 이명옥 양우섭	Asian-Australasian Journal of Animal Sciences	Epub ahead of print	국내	SCI (0.86)
2015	Effect of Nicotinic Acid on Frozen-Thawed Sperm Characteristics in Bulls	김유진	박춘근	이상희 양진우 이연주 최수빈 이경진 이승형	강원대학교 동물자원공동연구소	26(2)	국내	비SCI (KCI)

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 및 달성여부

[총괄 및 제1세부]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	다양한 기원유래 닭 줄기세포 분리	25	90	- 닭 골수 유래의 줄기세포 분리 및 배양 (10종 이상)
	줄기세포 특이마커 동정	25	80	- 확보된 줄기세포의 세포표현형 분석 및 닭 특이적 마커 동정
	확보된 줄기세포의 세포·분자유전학적 특성 분석	25	80	- 확보된 줄기세포의 세포학적 특성 검증 및 줄기세포 관련 유전자 분석
	경제동물 줄기세포 은행 구축을 위한 기반 확보	25	80	- 줄기세포 은행 설립을 위한 기초 인프라 구축
2차년도	체조직 유래 가금 줄기세포 배양기법 최적화	50	90	- 세포 타입 별 개체 특성 및 신체 부위별 상관관계 분석 - 골수유래 줄기세포 장기/대량배양기법 최적화 - 확보된 줄기세포의 세포·분자유전학적 특성분석
	장기보존 프로토콜 점검 및 관리 시스템 구축	50	90	- 동물줄기세포은행 구축을 위한 기탁세포 장기보존 프로토콜 점검 및 관리 기반 확보
3차년도	체조직 유래 가금 줄기세포 특이적 배양법 개발	40	80	- 기본 배양액 차이에 따른 닭 골수 유래 줄기세포의 특이적 특성 분석 및 분화능 비교 - 가금 줄기세포에 특이적인 배양 시스템 구축
	닭 배아 ex vivo 시스템을 활용한 세포변이종양분화 모델 개발	40	50	- 다른 종 유래 줄기세포의 전능성마커 중 하나인 SSEA-1을 활용하여 닭에서 줄기세포 분리 가능성 탐색 - 4일령 닭의 골수에서 SSEA-1 양성세포를 분리하여 배아에 ex vivo microinjection 하여 이식 세포의 생체 내 분포 정도와 생식선으로의 이동능 확인
	동물줄기세포은행 시스템 구축	20	80	- 본 세부 및 타 세부 연구자로 부터 확립된 줄기세포 기탁 유도를 통한 동물줄기세포 은행 시범은행 및 은행 운영을 위한 효율적인 시스템 구축
4차년도	동물줄기세포은행 시스템 구축	20	100	- 동물줄기세포은행의 운영을 위한 시스템 구축 - 동물줄기세포은행 운영을 위한 세포 확보
	가금 골수유래 세포의 특성 검증	40	100	- 유추기의 병아리 (4일령)의 골강에서 분리하여 배양한 세포의 기원 분석 및 분자·세포생물학적 특성 검증 - 유추기의 병아리 (4일령)의 골수 유래 줄기세포 대량 확보를 위한 배양 기법 모색 - 닭 성장 단계에 따른 골수 내 부착세포의 특성 비교·분석
	가금 골수유래 세포를 이용한 의료물질 개발	40	80	- 유추기의 병아리 (4일령)의 골강에서 확보한 세포의 분비물질 분석
5차년도	동물줄기세포 은행 운영	20	100	- 각 세부 결과물인 동물줄기세포의 기탁을 통한 세포라인 확보 - 기탁받은 세포들의 미생물 부정검정 및 이종세포간의 오염 여부 확인 - 매년 2회씩 연구실의 모든세포 중 무작위로 마이코플라스마 감염여부 확인
	닭 골강세포 유래 부착세포 및 세포분비물질을 이용한 의약품 개발연구	80	90	- 기계적 또는 화학적인 방법을 통한 효율적인 가금 골수 유래 부착세포의 세포 분비물 획득 법 개발 - 인간 지방유래 줄기세포를 이용하여 가금 세포 유효 분비물질의 효과를 탐색 - 지적 우선권 선점을 위한 국내 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보 - Sox9 발현세포의 분비물질의 단백질 정제를 통한 시제품 개발

[2세부]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	유용물질 유전자 확보를 위한 유전자 클로닝 및 합성	20	100	- 고부가가치 시스타틴 유전자 클로닝 및 합성완료
	기본 발현 벡터 제작	20	100	- 기본 발현 벡터의 제작 완료
	가금 생식줄기세포 장기 배양을 통한 세포주 확보	20	100	- 가금 생식줄기세포 장기 배양을 통한 세포주 확보
	확립된 가금생식줄기세포주 특성 분석	20	90	- 가금생식줄기세포주 특성 분석
2차년도	가금 생식줄기세포주 장기 보관 시스템 구축	20	100	- 가금생식줄기세포주 장기 보관 시스템 구축 완료
	고발현을 위한 난관 특이 발현 synthetic promoter system 개발	40	100	- 난관 특이 프로모터 개발 및 특이 발현 synthetic vector 제작
	가금 생식줄기세포 체외 배양 및 유전자 전이에 의한 안정적 줄기세포주 확립	30	100	- 유용물질 생산을 위한 발현 벡터의 가금 생식줄기세포 전이 및 선별
3차년도	생식선 카이메라 생산을 위한 기초 실험측 조성	30	100	- 선별된 가금 생식줄기세포의 수용체내 주입 - 생식선 카이메라 생산을 위한 실험측 조성
	유용물질 검출 시스템 구축	40	100	- 유용물질 확인을 위한 검출시스템 구축
	유용물질 생산을 위한 형질전환 가금 생산	30	100	- 검정교배를 통한 형질전환 개체 생산 및 확인
4차년도	난백내 유용물질 발현 양상 검증	30	100	- 형질전환 가금의 난백내 유용물질 발현 양상 확인 - 형질전환 가금의 난백내 유용물질 발현량 검증
	상업종 산란계 생식줄기세포 분리 배양 및 동결보존	20	100	- 상업종 (Hyline)으로 배자로부터 원식생세포 분리 및 체외 배양을 통한 생식줄기세포 확립
	효율적 외래단백질 정제를 위한 his-tag 분리 기술	20	100	- his-tag을 활용한 순수분리를 위한 1/2차 정제 기술 확립
	유용 단백질 생화학적 역가 및 특성 분석	30	100	- 유용 단백질의 anti- microbial activity 측정
5차년도	상업종 산란계를 이용한 유용 단백질 생산 형질전환	30	100	- 생식선 카이메라 실험측 조성 및 검정교배를 통한 형질전환 개체 생산
	유용물질 유전자 확보와 가금 생식줄기세포 확립 및 장기보관 시스템 확립	20	100	- 세 개의 다른 품종의 닭 생식줄기세포 확립 및 장기 보관
	형질 전환 가금 생산 및 유용물질 발현, 특성 분석	40	100	- Human cystatin 발현 형질전환 닭 생산 및 발현 검증 완료
	형질 전환 가금에서 생산된 유용물질검증	40	100	- 계란 및 조직별 human cystatin 발현 확인 및 기능성 검증

[1협동]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	인공수정 기법을 통한 체내 수정란 생산 및 체내 수정란 회수기법 개발	10	100	- 품종별 정액을 이용한 인공수정 - 활력정자 분리를 통한 고품질 인공수정용 정자 생산 - 효과적인 체내 수정란 회수 기법 개발
	착상전 배아로부터 ICM 분리기법 개발	15	100	- 번역학적, 화학적, 기계적 기법을 이용한 분리
	ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발	20	100	- 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발
	생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발	25	100	- 최적의 세포 배양 시스템 개발 - 효과적인 계대배양기법 개발
	생산된 돼지배아줄기세포의 특성 규명	30	100	- 형태적 특징 확인 - 줄기세포 특이적 인자 발현 확인 - 3배엽 분화능 확인
2차년도	체외수정 기법을 통한 고품질 체외수정란 생산 기술 개발	10	100	- 품종별 정액을 이용한 인공수정 - 활력정자 분리를 통한 고품질 인공수정용 정자 생산 - 효과적인 체내 수정란 회수 기법 개발
	체외수정란 유래 고품질 배반포 생산 기술 개발	15	100	- 체외수정 유래의 고품질 배반포 생산체계 확립
	착상전 배아로부터 ICM 분리기법 개발	10	100	- 번역학적, 화학적, 기계적 기법을 이용한 분리
	ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발	20	100	- 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발
	생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한 효과적인 배양 기법 개발	20	100	- 최적의 세포 배양 시스템 개발
	생산된 돼지배아줄기세포의 특성 규명	25	100	- 형태적 특징 확인 - 줄기세포 특이적 인자 발현 확인 - 3배엽 분화능 확인
3차년도	체세포 핵이식 기법을 통한 고품질 핵치환 수정란 생산 기술 개발	10	100	- 품종별 정액을 이용한 인공수정 - 활력정자 분리를 통한 고품질 인공수정용 정자 생산 - 효과적인 체내 수정란 회수 기법 개발
	핵치환 수정란 유래 고품질 배반포 생산 기술 개발	15	100	- 체외수정 유래의 고품질 배반포 생산체계 확립
	착상전 배아로부터 ICM 분리기법 개발	10	100	- 번역학적, 화학적, 기계적 기법을 이용한 분리
	ICM 유래 콜로니 초대배양 기법 개발	20	100	- 콜로니 형성 촉진 배양 시스템 개발
	생산된 돼지 배아줄기세포의 세포주화를 위한	20	100	- 최적의 세포 배양 시스템 개발 - 효과적인 계대배양기법 개발

	효과적인 배양 기법 개발			
	생산된 돼지배아줄기세포의 특성 규명	25	100	- 형태적 특징 확인 - 줄기세포 특이적 인자 발현 확인 - 3배엽 분화능 확인
4차년도	돼지 배아줄기세포의 대량배양 시스템 개발	30	100	- 대량 생산을 위한 고품질 수정란 생산 조건 확립 - 배양조건 확립을 위한 줄기세포의 특성 규명 - 배양 환경에 따른 줄기세포의 미분화 유지 확인
	돼지 배아줄기세포 장기배양 시스템 개발	35	100	- 미분화 및 자가증식 능력 유지를 위한 최적의 배양 조건 확립
	대량 및 장기 배양된 돼지 배아줄기세포 계대별 특성 규명	35	100	- 형태적 특징 확인 - 줄기세포 특이적 인자 발현 확인 - 3배엽 분화능 확인
5차년도	동결보호제에 따른 동결 시스템 확립	20	100	- 동결보호제의 첨가 농도에 따른 동결-융해 후 줄기세포의 능력 확인
	동결배양액 종류에 따른 동결시스템 확립	30	100	- 세포피해를 최소화 할 수 있는 동결배양액의 탐색 및 개발
	Antioxidant, 동해방지물질 등의 탐색에 의한 동결시스템 확립	25	100	- 동결-융해 시 발생하는 산화스트레스를 감소 시킬수 있는 물질 탐색
	동결용기 및 냉각조건 등의 탐색에 의한 동결시스템 확립	25	50	- 최적의 동결 시스템 확립을 위한 동결용기 및 냉각조건 확립

[2협동]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	다양한 조직으로부터 확보된 MSCs 구축	30	100	- 다양한 유래 MSCs 의 특성화를 통한 차이 탐구 (5종↑) - MSCs별 분화 유도 및 조직특이 마커 발현 능력의 차이성 규명 (5종↑) - 다양한 조직 유래 돼지줄기세포 7종 이상 구축 및 총괄 기탁
	Normalization을 위한 돼지 MSCs 특이적 reference gene의 발굴	30	100	- 돼지 줄기세포 특이적인 계대 및 분화 전/후에도 안정한 Ct 값의 reference gene의 확정
	성별, 나이, 세포기원에 따른 MSCs의 노화에 대한 연구	30	100	- AP activity, CD90 발현 분석 - 분화능 비교 및 노화관련 분석 - 텔로미어 및 세포주기 분석 - 노화관련 단백질 분석
	관련 결과 학술 발표	10	100	
2차년도	돼지 골수유래 MSC 및 섬유아세포를 이용한 iPSCs 구축	40	100	- 돼지 골수유래 MSC 및 섬유아세포를 이용한 iPSCs 구축
	구축된 iPSCs의 검증	40	100	- 미분화능, Alkaline phosphate activity 검증, teratoma 형성능, embryoid body 형성능의 검정을 통한 iPSCs 성공과 심근세포로 분화능 검증

	동물질환모델에 적용	10	100	-. 구축된 iPSCs를 동물질환 모델을 선정하여 적용
	관련 결과 학술 발표	10	100	
3차년도	MSC와 iPSCs 두 군간 복제란 비교	45	100	-. MSCs와 iPSCs의 cell cycle 비교 -. MSCs와 iPSCs를 각각 NT donor로 이용하여 blastocyst의 발달률 비교
	상기 연구를 근거로 공여세포로 potential이 높은 세포주 선택	45	100	-. 핵이식시 발달률이 높은 세포주 선정
	관련 결과 학술 발표	10	100	
4차년도	MSCs를 이용한 높은 효율의 핵이식 방법 구축	30	100	-. TSA처리에 따른 발달을 비교 -. TSA처리에 따른 수정란 발달 단계에서의 histone acetylation패턴 분석
	TERT와 유전자 형질전환기술 구축	30	100	-. 세포 단계의 TERT 유전자 OVER EXPRESSION 기술 구축 -. 난자 및 수정란의 의 KNOCK OUT 기술 구축
	상기 형질전환 기술을 활용한 수정란 생산	30	100	-. TERT 유전자 OVER EXPRESSION된 세포를 이용한 핵이식과 형질전환 수정란 생산 -. 난자 및 수정란의 KNOCK OUT과 형질전환 수정란 생산 -. TSA처리에 따른 발달을 비교 -. TSA처리에 따른 수정란 발달 단계에서의 histone acetylation패턴 분석
	관련 결과 학술 발표	10	100	
5차년도	TERT 유전자가 KNOCK OUT된 수정란 생산 및 검증을 통한 초기 노화 모델 데이터 구축	30	100	-. TERT가 Knock out된 난자의 성숙 및 수정률 비교 -. TERT가 Knock out된 수정란의 발달률 및 노화관련 유전자 분석
	TERT 유전자가 OVER EXPRESSION된 세포를 이용한 핵이식과 수정란 생산 및 검증을 통한 초기 노화 모델 데이터 구축	30	100	-. TERT가 Overexpression된 세포의 분석 -. TERT가 Overexpression된 세포 를 이용한 핵이식으로 생산된 수정란 분석
	TERT 유전자가 OVER EXPRESSION된 세포가 핵이식된 수정란의 이식을 통한 초기 노화 돼지 모델 생산	30	80	-. TERT가 Overexpression된 세포 를 이용한 핵이식으로 생산된 수정란의 이식 -. 형질전환 돼지 모델 생산
	관련 결과 학술 발표	10	100	

[3협동]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	돼지 Dystrophin cDNA 확인 및 돼지 genomic DNA로 부터 Dystrophin sequence 및 locus 규명	50	100	- 돼지 genomic DMD locus screening - 돼지 DMD 유전자 구조 및 단백질코딩 부위 규명
	DMD locus 유전자적중 벡터 구축	50	100	- 돼지 Dystrophin 유전자내 타겟부위 선정 - TALEN system을 위한 벡터 구축 - Reporter system 확인
2차년도	줄기세포용 유전자적중 벡터 분석	50	100	- 유전자적중 효율 증진을 위한 선별마커 탐색
	세포주 선별 유전자적중 마커조건 탐색	50	100	- 돼지 줄기세포에 유전자적중 벡터를 transfection 및 drug 스크리닝 - PCR에 의한 유전자적중 분석
3차년도	돼지 DMD locus CRISPR/ Cas9/DMD 벡터구축 및 세포에 유전자적중 실시	50	100	- Cas9 sgRNA 선정 및 제작 - pCRISPR/Cas9/DMD1 구축 - 돼지세포에 유전자변이 유도 벡터를 transfection 및 콜로니 선별
	유전자적중 DNA 분석과 염기서열 확인	50	100	- PCR에 의한 유전자변이 분석 - 염기서열 분석을 통한 유전자변이 검사
4차년도	DMD 유전자변형 돼지세포에서 DMD유전자의 염기서열 분석을 통한 nonsense mutation 여부 탐색	50	100	- DMD 부위에서 term codon 형성 분석 - biallelic mutation을 일으키는 효율적인 부위 탐색
	돼지 수정란에 CRSPR/ Cas9 벡터 주입과 유전자 분석 및 배발달능 탐색	50	100	- 돼지 체외수정란에 DMD CRSPR/Cas9 벡터 주입 - 벡터주입후 배반포배 발달을 분석
5차년도	돼지 DMD gene에서 다양한 유전자적중을 실시하여 그 효율을 검증하고, 유전자 변형여부 분석 및 유전자변형 효율 검증	50	100	- 돼지 DMD locus에 CRSPR/Cas9 시스템을 돼지에 적용하여 유전자변형 여부를 검증하고 대리모 이식하는 등 효율적인 연구를 수행

[4협동]

년차	목 표	가중치(%)	달성도(%)	내 용
1차년도	미니돼지 성체줄기세포 분리 배양	30	100	- Yucatan 미니돼지의 골수줄기세포 분리 배양
	미니돼지 성체줄기세포의 특성 분석	30	100	- 분리된 골수줄기세포를 이용하여 세포의 surface marker, 줄기세포 관련 유전자의 발현 확인 및 분화 유도를 통한 줄기세포의 특성 분석
	미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환 유도 기술 확립	40	80	- 인간 면역조절 유전자를 발현하는 벡터를 이용한 형질전환 유도
2차년도	확립된 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 형질전환세포주 제작	50	100	- 확립된 미니돼지의 성체줄기세포에 인간 면역조절유전자인 hDAF 유전자를 이용한 형질전환세포주 확립
	핵이식란의 체외 발달을 향상을 위한 배양시스템 개발	50	80	- 확립된 미니돼지 성체줄기세포를 이용한 핵이식란 제조 및 체외 발달을 확인 - 핵이식란 제조 및 대리모돈 이식
3차년도	효율적인 핵이식란 이식 시스템 확립	100	100	- 핵이식란의 최적 체외배양 시스템 확립 - 핵이식란의 효율적인 대리모돈 이식 방법의 확립 - 다양한 형질전환세포주를 이용한 핵이식란의 제조 및 대리모돈 이식
4차년도	형질전환 카메라/복제돼지 생산	100	90	- 형질전환줄기세포를 이용한 핵이식란 생산 및 대리모돈 이식 자연분만유도 및 SPF 시설 입식을 위한 제왕절개에 의한 산자 생존율 제고 방안 확립 - 생산된 형질전환 카메라/복제 돼지로부터 PCR, FISH 등을 통한 형질전환 여부 확인 - 생산된 형질전환 돼지의 조직 및 세포를 이용하여 형질전환 단백질 발현 여부 확인
5차년도	형질전환 카메라/복제돼지 축군 형성	100	90	- 형질전환 돼지 축군 형성 - 생산된 형질전환 카메라/복제 돼지의 교배를 통한 축군을 형성 - 생산된 자돈의 형질전환 확인 및 형질전환 단백질 발현 여부 확인

3-2. 목표미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

가. 형질전환복제돼지 생산의 실패사례와 성공사례의 분석

- 형질전환복제돼지 생산은 아직도 1~2% 정도의 낮은 분만율을 기록하고 있음. 사용되는 세포주의 종류, 유전자 조작 방법 및 핵이식란 배양 시스템 그리고 분만 시 관리 등에 의해서도 상당한 영향을 받을 수 있음.
- 본 연구에서는 다양한 형질전환 세포주 및 유전자 조작 방법-핵이식란 배양 시스템을 이용하여 체세포복제를 시도하였으며, 성공적 사례와 실패 사례를 확인할 수 있었음. 하지만 체세포 복제방법에 의한 형질전환 동물생산은 빈번한 발생배아 자궁 내 흡수, 유사산, 기형 발생 등이 높게 발생하고 있어, 조금 더 개선된 복제시스템 개발이 필요할 것으로 사료됨.

○ 형질전환 복제 돼지 생산의 실패사례와 성공사례를 아래 표로 정리하였음.

주요 내용	성공사례	실패사례
세포주 제작 방법	상동재조합(Homologous recombination) 방법을 이용한 정확한 유전자 삽입 위치 예측가능으로 유전자 삽입 위치에 따른 기형 및 폐사 등 사전 확인 가능	무작위 삽입(Random insertion) 방법에 의한 유전자 삽입 위치의 정확한 이해 및 예측 불가능
유전자 삽입 방법	전기자극법(Electroporation)	Lipofectamine
핵이식란 배양 시스템	Defined media에 alanine 첨가	Defined media 배양 시스템
간호 분만 여부	혈중 progesterone 측정을 통한 분만 시간 추정 및 간호 분만을 통해 비교적 빠른 분만 관리 가능	간호 분만을 실시하였으나 정확한 분만시간 예측 불가로 분만 직후 대응이 지연됨
자돈 관리	특수 isolator 사용에 따른 향온향습 유지를 통해 자돈의 건강 상태 유지	분만 모돈의 포유 불량으로 사람에 의한 인공포유로 자돈 관리의 문제점 발생

4. 연구개발성과의 활용 계획

- 일반 연구자의 접근이 어려운 가금, 돼지 등과 같은 가축유래 줄기세포은행 구축을 통해 경제 동물을 활용한 공익적 목적의 연구인프라 제공과 이를 연계한 농축산업 고나련 연구의 확장을 기대함.
- 닭 장골의 매트릭스 유래 골/연골 전구세포의 세포분비물을 활용하여 인간의 질병치료가 가능한 유용물질 개발 가능성을 확인하였으며 이를 활용하여 식의약품 개발 예정임.
- 구축된 Human Cystatin-C 생산 형질전환 계통 유지 및 산업적 활용을 위한 기능성 연구와 실용화 검증.
- 구축된 비바이러스 이용 형질전환 닭 생산 시스템 활용한 다양한 형질전환 계통 조성 및 산업화를 위한 실용화 검증이 필요함.
- 가금 생식세포 기초 연구를 위한 가금 줄기세포 활용 기술 개발이 필요함.
- 본 연구를 통하여 돼지 체내 수정란 유래 배아 줄기세포의 세포주를 확립하였으며, 배양 조건의 최적화 및 3D 배양을 통하여 생산된 돼지 배아줄기세포의 미분화능을 유지할 수 있는 효과적인 배양 기법을 개발하였음. 이러한 결과는 돼지 배아줄기세포를 이용한 세포 치료나 조직 재생 연구에 이용될 수 있으며, 돼지 배아줄기세포의 주변 미세환경(microenvironment)에 대한 연구에도 이용될 수 있음.
- 배반포 유래 ICM 분리 및 최적화된 ICM 유래 콜로니 초대배양 기법을 개발하였음. ICM 유래 콜로니에서 배아줄기세포를 얻기 위해서는 추가 연구를 통한 체외수정 과정에서의 polyspermy를 차단할 수 있는 기법의 개발이 필요함.
- 돼지 체세포 핵이식 수정란 유래 배아줄기세포의 세포주 배양은 성공하지 못하였지만, 최적화된 ICM 유래 콜로니 초대배양 기법을 확립하였으며, 세포핵 기증 세포 (donor cell)에 따른 콜로니 형성율의 변화를 확인함. 이러한 결과는 형질전환 동물 생산을 위한 돼지 체세포 핵이식 유래 수정란 생산 연구에 이용될 수 있음.
- 돼지 배아줄기세포의 미분화성을 유지하기 위한 아가로스 (agarose) 기반 3D 배양 결과, 돼지 배아줄기세포의 증식 및 생존을 효과적으로 유지하지 못함. 따라서 추가 연구를 통하여 보다 돼지 배아줄기세포에 친화적이며 효과적으로 세포 증식을 지지하고 줄기세포의 미분화성을 유지할 수 있는 최적의 3D 배양 기법을 개발할 필요가 있음.
- 돼지배아줄기세포의 장기·대량 배양 시스템을 개발하기 위하여 돼지배아줄기세포 내에 존재하는 integrin heterodimer를 확인함. 이를 이용하여 돼지 배아줄기세포에만 특별하게 작용하는 3D scaffold와 세포 외 신호에 대한 연구에 도움이 될 수 있음.
- 돼지배아줄기세포의 동결 보존을 위하여 DMSO와 EG를 사용하여 동결효율을 비교하였음. 그 결과, EG보다 DMSO에서 보다 더 나은 동결 효율성을 보임. 하지만 항산화제에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것으로 생각되어짐. 따라서 추가 연구를 통하여 보다 나은 동결시스템을 확립한다면 효율적으로 돼지배아줄기세포를 동결보존 할 수 있을 것으로 생각 됨.
- 돼지 줄기세포의 기원에 따른 줄기세포능 평가에 활용하고자 함.
- 돼지 줄기세포의 유전자적 패턴에 대한 심층적인 연구 데이터베이스 구축하고자 함.
- 선택적 분화 유도 기술 개발로 세포치료 기작 분석에 활용하고자 함.
- 돼지 줄기세포주 확립으로 다른 동물의 줄기세포 구축에 활용하고자 함.
- 줄기세포에 특이적인 효율적인 형질전환 기술개발에 활용될 수 있음.

- 줄기세포의 형질전환 기술을 확립하여 유용유전자 발굴에 활용될 수 있음.
- 형질전환 세포를 이용하여 노화와 관련된 다양한 유전자의 기능 연구에 활용하고자 함.
- 기존 복제방법의 문제점 파악 및 공여세포를 이용한 해결방안 모색에 활용하고자 함.
- 돼지 핵이식 수정란의 생물학적 특성에 대한 정보를 축적함으로써 핵이식기술을 이용한 응용분야에 기초 자료로써 활용될 수 있음.
- 복제돼지 생산효율 향상으로 인한 생명공학 기술의 실용화될 수 있음.
- 줄기세포를 이용하여 형질전환 돼지의 생산효율 증진에 대한 기초자료로 활용될 수 있음.
- 돼지를 이용한 질환모델을 구축하여 바이오신약평가 시스템구축에 활용될 수 있음.
- 돼지 DMD 증후군 모델을 확립하여 근육위축증에 대한 신약개발이나 유전자치료 등에 활용될 수 있음.
- 본 연구에서 확립한 Cas9/CRSPR 시스템을 이용하여 돼지에서 다른 유전자변이 유도에 활용될 수 있음.
- 연구 수행을 통하여 축적된 핵이식 기법, 핵이식란 체외생산 기술 및 대리모 이식 기술 등은 바이오신약 및 바이오장기용 형질전환돼지 생산에 적극 활용할 수 있고, 유전자 발현 조절 연구결과는 면역관련 유전자의 기능 규명과 발생 및 분화연구 등에 활용하고자 함.
- GTKO/CD55/CD39KI 형질전환돼지 유래의 세포주에 다양한 면역거부반응 제어 유전자 도입 후 다중형질전환돼지의 생산에 활용하고자 함.
- 장기이식용 형질전환돼지의 생산과 특성 규명을 통해 돼지를 이용한 이식용 장기의 생산연구에 적극적으로 활용하고자 함.
- 이종장기이식 시 발생할 수 있는 면역거부반응 관련 유전자를 조절하여, 이종장기이식 거부반응을 줄일 수 있다고 알려져 있음. 본 연구에서 개발된 다중 유전자 발현 벡터를 활용하여 다양하고 복잡한 형질전환 유전자들을 발현하는 다중형질전환돼지를 생산할 예정임.
- 이종장기 이식시 거부반응과 관련된 형질전환돼지를 생산함으로써 실질적인 안정성 검증단계인 전임상, 임상 실험에 활용하고자 함.
- 본 연구팀은 무균돼지 시설에서 무균돼지를 사육하고 있으므로, 본 연구결과들을 활용하여 다중유전자가 적중된 수정란 이식을 실시하여, 다중유전자 형질전환복제무균돼지를 생산하는 연구에 활용하고자 함.
- 본 과제의 결과물인 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환 동물 모델의 생산기술이 개발 완료되면, 아래 표와 같이 산업화를 추진할 예정임. 또한, 본 과제의 결과물인 줄기세포를 이용한 고효율 형질전환/질환 동물 모델의 생산기술은 국내외 학회 및 저널 등에 적극 활용하여 우수성을 홍보할 계획임.

년도	추진내용	
18~19	지적재산권 출원, 완료 및 기술이전 전담조직(TLO)를 통한 기술이전 대가 결정(기술평가)	기술동향, 경쟁 환경 및 시장 매력도, 기술의 장점 및 권리성 평가 사업성 및 수익성 평가, 운영자 기술 및 조직성 평가, 법적인 규제 평가
20	기술 마케팅 계획서 작성 및 기술 수요자 발굴	사업화 투자비, 수익 추정치 제시, 중견·중소기업 중심 기술이전 설명회 활용, 1:1 매칭 작업 및 전문 상담회 실시, 기술융자 금융정보 제공
21	기술이전 조건협상 계약체결 및 약정사항 이행, 계약관리	기술료 이전방식(기술양도, 라이선싱), 기간협의 및 실시권 설정 기술료 지급, 기술관련 자료 제공, 기술권리이전 서류 교부, 기타 조건 이행

붙임. 참고문헌

- Jan O, Ahmet C, Gianluca M, Kaveh M, Tong L, Suchitra M, Troels T, Dong L, Shengting L, Stoyan P, Susanna C. (2017). The selection of genes was based on previous publications of pluripotency networks in the mouse embryonic stem cells. *Mol.Reprod.Dev.* 84:229–245. DOI: 10.1002/mrd.22771
- Charles A, Williams C, Nathanael S, Gray M. (2017). Embryonic stem cells can self-renew or differentiate into all cell types. *J Vis Exp.* 2017 May 12;(123). DOI: 10.3791/55515
- Valerie B, Vanneaux V, Alain B, Hany N, Solene EB, pierre J, Marie P, Estelle R, Chantal M, Albert H, Patrick B, Jerome L, Onnik A, Philippe M. (2015). A fibrin scaffold loaded with ESC-derived cardiac progenitors resulted in sustained improvement in contractility. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2015; 34: 1198–1207 DOI: 10.1016/j.healun.2014.10.008
- Menasche P, Vanneaux V, Fabreguettes JR, Tosca AB, Garcia S. (2014). Cardiac progenitor cells derived from pluripotent stem cells look equally appealing candidates. *European Heart Journal*(2015) 36, 743–750 DOI: 10.1093/eurheartj/ehu192
- Hall VJ and Hyttel P. (2014). Genes expressed and pathways involved in regulating embryonic pluripotency could help improve culture conditions of porcine pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014 Sep 1;23(17):2030–45. DOI: 10.1089/scd.2013.0502
- Zhang Y, Wei C, Zhang P, Li X, Liu T. (2014). Playing an important role in maintaining the stemness of ESCs and reprogramming of induced pluripotent stem cells.. *PLOS ONE* 9(1): e85089. DOI: 10.1371/journal.pone.0085089
- Vassiliev I, Tsui A, Kang WX, McIlpatrick S, Mark B. (2014). Putative parthenogenetic embryonic stem cell lines could be directly differentiated to cell types representative of all three germ layers. *Stem Cell Biol Res.* 2014; 1:2. DOI: 10.7243/2054-717X-1-2
- Yang JR, Liao CH, Pang CY, Huang LH, Chen YL, Shiue YL, Chen LR. (2013). Transplantation of porcine embryonic stem cell has treatment potential for spinal cord injury. *Cytherapy*, 2013; 15: 201–208 DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.09.001
- Jing Z, Kai Z, Yuan S, Xuan G, Yingchao L, Zijiang C. (2013). Human Embryonic Stem Cell derived Limbal stem cells might be a potential therapy option for ocular surface regeneration in LSCD cases. *Tissue Engineering* 2013; 19(21–22): 2412–2425. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0097
- Yang Y, Hsu C, Liao S, Lin Y, Chen L, Yuan K. (2013). Embryonic stem cells can generate teratoma in immunocompromised animals. *Journal of Clinical*

Periodontology 2013; 40: 364–371 DOI: 10.1111/jcpe.12069

- Differential Gene Expression Patterns in Porcine Nuclear Transfer Embryos Reconstructed With Fetal Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells. Kumar et al. *Developmental Dynamics*, 2007
- Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. Jin et al. *Int. J Dev Biol*, 2007
- Developmental ability of miniature pig embryo cloned with mesenchymal stem cells. Lee 등. *Journal of Reproduction and Development*, 2010
- Comparative characterization of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow extract and skin tissues. Ock et al. *Tissue Engineering*, 2010
- α -1,3-Galactosyltransferase Knock out MCP. 농촌 진흥청, 전남대, 2010
- Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. Oh 등. *Theriogenology*, 2011
- Histone deacetylase inhibitor trichostatin A affects porcine oocyte maturation in vitro Yong-Xun Jin et al. *Reproduction, Fertility and Development*, 2014
- Extended Exposure to Trichostatin A after Activation Alters the Expression of Genes Important for Early Development in Nuclear Transfer Murine Embryos. Hoin KANG et al. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010
- Trichostatin A Improves Preimplantation Development of Bovine Cloned Embryos and Alters Expression of Epigenetic and Pluripotency Genes in Cloned Blastocysts Hyun Ju OH et al. *Journal of Veterinary Medical Science* 2012
- Effects of Trichostatin A on in vitro development of porcine embryos derived from somatic cell nuclear transfer Yeon Ik Jeong et al. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 2013
- Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. Kato et al. *Biology of Reproduction*, 2004
- Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. Colleoni et al. *Cloning and Stem Cells*, 2005
- Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. Faast et al. *Cloning and Stem Cells*, 2006
- Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. Bosch et al. *Biology of Reproduction*, 2006
- Differential developmental ability of embryos cloned from tissue specific stem cells. Inoue et al.. *Stem Cells*, 2007
- Reprogramming of active and repressive histone modifications following nuclear transfer with rabbit mesenchymal stem cells and adult fibroblasts. Brero 등. *Cloning and Stem Cells*, 2009
- Chromosomal instability of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

in long-term culture and development of cloned embryos. Qin et al. Cloning and Stem Cells, 2009

- Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. Yong Wang et al. Scientific reports, 2015.
- A Genetic Porcine Model of Cancer, Lawrence B. Schook et al. Plos one, 2015.
- Direct Injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into Cytoplasm of Parthenogenetically Activated Porcine Oocytes Causes Frequent Mosaicism for Indel Mutations. Masahiro Sato et al. International Journal Of Molecular Sciences, 2015.
- Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. Chih-Chien Tsai et al. Journal Of Biomedical Science, 2010
- Inducible Immortality in hTERT-Human Mesenchymal Stem Cells. Samantha L. Piper et al. Journal Of Orthopaedic Research, 2012
- Cooperation of hTERT, SV40 T Antigen and Oncogenic Ras in Tumorigenesis: A Cell Transplantation Model Using Bovine Adrenocortical Cells. Michael Thomas et al. Neoplasia, 2002
- Genetic induction of tumorigenesis in Swine. SJ Adam et al. 2007, Oncogen
- Cytochalasin B and Trichostatin A Treatment Postactivation Improves In Vitro Development of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Luke F.S. Beebe et al. CLONING AND STEM CELLS 2009
- Trichostatin A Modulates Apoptotic-Related Gene Expression and Improves Embryo Viability in Cloned Bovine Embryos Xiang-Shun Cui et al. CELLULAR REPROGRAMMING, 2011
- Effects of trichostatin A on in vitro development and transgene function in somatic cell nuclear transfer embryos derived from transgenic Clawn miniature pig cells Takehiro HIMAKI et al. Animal science journal, 2010
- Trichostatin A-treated eight-cell bovine embryos had increased histone acetylation and gene expression, with increased cell numbers at the blastocyst stage Shogo Shiratsuki et al. Elsevier, 2011
- TSA and BIX-01294 Induced Normal DNA and Histone Methylation and Increased Protein Expression in Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Zubing Cao et al. PLOS ONE, 2017
- In vitro development and cytological quality of inter-species (porcine/bovine) cloned embryos are affected by trichostatin A-dependent epigenomic modulation of adult mesenchymal stem cells J. Opiela et al. ELSEVIER, 2017
- Effects of Trichostatin A and PXD101 on the In Vitro Development of Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Xiaoyan Qiu et al. CELLULAR REPROGRAMMING, 2017
- Trichostatin A specifically improves the aberrant expression of transcription factor

genes in embryos produced by somatic cell nuclear transfer Kimiko Inoue et al. Scientific Reports, 2015

- Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs Jinxue Ruan et al. SCIENTIFIC REPORTS, 2015
- Proteomic identification of proteins differentially expressed following overexpression of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) in cancer cells Rishi Kumar Jaiswal et al. PLOS ONE, 2017
- Liposome-Adenoviral hTERT-siRNA Knockdown in Fibroblasts from Keloids Reduce Telomere Length and Fibroblast Growth Yong Shang et al. Cell Biochemistry and Biophysics, 2015
- Point mutations in the dystrophin gene. Roland G. R., M. BOBROW, AND D. R. BENTLEY. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89: 2331-2335.
- Genetic Analysis of Dystrophin Gene for Affected Male and Female Carriers with Duchenne/Becker Muscular Dystrophy in Korea. Bo Lyun Lee, Sook Hyun Nam, Jun Hwa Lee, Chang Seok Ki, Munhyang Lee, and Jeehun. 2012. J Korean Med Sci 27: 274-280.
- Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. Laurent Tesson, Claire Usal, S verine M noret, Elo Leung, Brett J Niles, S verine Remy, Yolanda Santiago, Anna I Vincent, Xiangdong Meng, Lei Zhang, Philip D Gregory, Ignacio Anegon1 & Gregory J Cost. 2011. Nature Biotech. 29: 695- 696.
- Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases Nature Biotech. Dirk Hockemeyer, Haoyi Wang, Samira Kiani, Christine S Lai, Qing Gao, John P Cassady, Gregory J Cost, Lei Zhang, Yolanda Santiago, Jeffrey C Miller, Bryan Zeitler, Jennifer M Cherone3 Xiangdong Meng, Sarah J Hinkley, Edward J Rebar, Philip D Gregory, Fyodor D Urnov & Rudolf Jaenisch. 2011. 29: 731-734.
- Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. Fuminori Tanihara, Tatsuya Takemoto, Eri Kitagawa, Shengbin Rao, Lanh Thi Kim Do, Akira Onishi, Yukiko Yamashita, Chisato Kosugi, Hitomi Suzuki, Shoichiro Sembon, Shunichi Suzuki, Michiko Nakai, Masakazu Hashimoto, Akihiro Yasue, Munehide Matsuhisa, Sumihare Noji, Tatsuya Fujimura, Dai-ichiro Fuchimoto, Takeshige Otoi. 2016. Sci. Adv. 2: e1600803.
- One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Haoyi Wang, Hui Yang, Chikdu S. Shivalila, Meelad M. Dawlaty, Albert W. Cheng, Feng Zhang, and Rudolf Jaenisch. 2013. Cell 153, 1-9.
- A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. Takayuki Sakurai, Satoshi Watanabe, Akiko Kamiyoshi, Masahiro Sato and Takayuki Shindo. 2014. BMC Biotechnology 2014, 14:69-80.
- Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion.

McGrath J, Solter D. *Science*. (1983) 17;220(4603):1300–2.

- cDNA cloning and characterization of the protein encoded by RD, a gene located in the class III region of the human major histocompatibility complex. Cheng J, Macon KJ, Volanakis JE. *Biochem J*. (1993) 1;294(Pt 2):589–93.
- Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson–Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2001) 22;98(11):6209–14.
- Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson–Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R. *Nat Biotechnol*. (2002) 20(5):455–9.
- Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) 2;284(5411):143–7.
- Generation of mice from wild–type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet*. Rideout WM 3rd, Wakayama T, Wutz A, Eggan K, Jackson–Grusby L, Dausman J, Yanagimachi R, Jaenisch R. (2000) 24(2):109–10.
- Cloning of male mice from adult tail–tip cells. Wakayama T, Yanagimachi R. *Nat Genet*. (1999) 22(2):127–8.
- Nuclear cloning, embryonic stem cells, and transplantation therapy. Jaenisch R. *Harvey Lect*. (2002–2003) 98:145–71.
- Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of 9nsduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. Kato Y, Imabayashi H, Mori T, Tani T, Taniguchi M, Higashi M, Matsumoto M, Umezawa A, Tsunoda Y. *Cloning Stem Cells*. (2005) 7(3):154–66.
- Efficient adenoviral–mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. Bosch P, Foulletier–Dilling C, Olmsted–Davis EA, Davis AR, Stice SL. *Mol Reprod Dev*. (2006) 73(11):1393–403.
- Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma. Mohan A, Kandalam M, Ramkumar HL, Gopal L, Krishnakumar S. *Br J Ophthalmol*. (2006) 90(7):889–93.
- Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, McIlpatrick SM, Ashman RJ, Nottle MB. *Cloning Stem Cells*. (2006) 8(3):166–73.
- Efficient adenoviral–mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. Bosch P, Foulletier–Dilling C, Olmsted–Davis EA, Davis AR, Stice SL. *Mol Reprod Dev*. (2006) 73(11):1393–403.
- Encouraging results of stem cell transplantation following a melphalan–preceding

intensified preparative regimen for refractory acute leukemia in children. Inoue M, Yasui M, Sawada A, Koyama M, Kondo O, Miyamura T, Higuchi B, Kouroki M, Ishihara T, Kawa K. *Rinsho Ketsueki*. (2007) 48(11):1470–7.

- Genetically Modified Pigs as Organ Donors for Xenotransplantation. Hryhorowicz M, Zeyland J, Słomski R, Lipiński D. *Mol Biotechnol*. (2017) 59(9–10):435–444.
- The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. Niemann H, Petersen B3,4. *Transgenic Res*. (2016) 25(3):361–74.
- Potential value of human thrombomodulin and DAF expression for coagulation control in pig-to-human xenotransplantation. Miwa Y, Yamamoto K, Onishi A, Iwamoto M, Yazaki S, Haneda M, Iwasaki K, Liu D, Ogawa H, Nagasaka T, Uchida K, Nakao A, Kadomatsu K, Kobayashi T. (2010) *xenotransplantation*, 17:26–37.
- Generation of α -1,3-galactosyltransferase knocked-out transgenic cloned pigs with knocked-in five human genes. Kwon DJ, Kim DH, Hwang IS, Kim DE, Kim HJ, Kim JS, Lee K, Im GS, Lee JW, Hwang S. (2017) *Transgenic Res*. 26:153–163.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.