

116085
-3

농생명산업기술개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002632-01

덴기열 백신개발을 위한 덴기열 감수성 돼지 모델 구축
최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

덴기열 백신개발을 위한 덴기열 감수성 돼지모델 구축 최종보고서

2019 . 02 . 14 .

주관연구기관 / 엠젠플러스(주)
협동연구기관 / 고려대학교 세종산학협력단

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

주 의

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

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “멧기열 백신 개발을 위한 멧기열 감수성 돼지모델 구축”

(개발기간 : 2016 . 09 . 05 ~ 2018 . 12 . 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 14 .

주관연구기관명 : ㈜엠젠플러스 (대표자) 심 영 복
협동연구기관명 : 고려대학교세종산학협력단 (대표자) 백 승 필



주관연구책임자 : 강 정 택
협동연구책임자 : 나 운 성

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

| | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------|----------------------------|------------------------|---|
| 과제고유번호 | 116085-3 | 해 당 단 계 연 구 기 간 | 2016.09.05.~ 2018.12.31 | 단 계 구 분 | (해당단계)/ (총 단 계) |
| 연구사업명 | 단 위 사 업 | 농식품기술개발사업 | | | |
| | 사 업 명 | 농생명산업기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 대 과 제 명 | (해당 없음) | | | |
| | 세부 과제명 | 덴기열 백신개발을 위한 덴기열 감수성 돼지모델 구축 | | | |
| 연구책임자 | 강정택 | 해당단계 참여연구원 수 | 총: 명 내부: 명 외부: 명 | 해당단계 연구개발비 | 정부: 천원 민간: 천원 계: 천원 |
| | | 총 연구기간 참여연구원 수 | 총: 15명 내부: 15명 외부: 명 | 총 연구개발비 | 정부:700,000천원 민간:234,000천원 계:934,000천원 |
| 연구기관명 및 소 속 부 서 명 | 엠젠플러스 생명공학연구소 | | | 참여기업명 고려대학교 세종산학협력단 | |
| 국제공동연구 | 상대국명: | | | 상대국 연구기관명: | |
| 위 탁 연 구 | 연구기관명: | | | 연구책임자: | |
| ※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음 | | | | | |
| 연구개발성과의 보안등급 및 사유 | | | | | |

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구시설 ·장비 | 기술요약 정보 | 소프트 웨어 | 화합물 | 생명자원 | | 신품종 | |
|-------------|----|----|-----------|-------------|------------|-----------|-----|----------|----------|-----|----|
| | | | | | | | | 생명정 보 | 생물자 원 | 정보 | 실물 |
| 등록·기탁 번호 | | | | | | | | | | | |

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

| 구입기관 | 연구시설·장 비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | NTIS 등록번호 |
|------|--------------|-------------|----|-------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수
70

○ 연구목표 : 뎅기열 바이러스를 타겟으로하여 돼지로부터 세계 최초로 뎅기바이러스 질환모델을 확립하고 이를 활용하여 뎅기열 백신 및 신약 개발 등 활용체계를 구축함

○ 내용

- 뎅기 바이러스 감시체계 구축을 통한 신규 분리주 분리
- 신규 뎅기 바이러스 분리 및 분리주에 대한 유전학적 특성 규명
- 유전자 변형기술을 활용한 뎅기열 감수성 돼지 체세포주 확립 및 뎅기열 질환모델 형질전환 돼지 생산
- 뎅기바이러스의 감염세포주 및 모델동물에서의 감염 역가와 병태생리 규명
- 뎅기바이러스 유용 재조합 단백질 발현 및 생산시스템 구축
- 생산된 모델돼지의 유효성 평가 및 뎅기바이러스 접종을 통해 뎅기바이러스 감수성 측정, 뎅기바이러스 감염 동력학 평가

○ 활용계획

- 뎅기 바이러스 수용체를 발현하는 돼지초대세포주 및 질환모델 돼지는 뎅기열 연구자료로 활용가능하며 타 바이러스성 질환의 기초 연구자료로도 활용가능함.
- 바이러스 수용체 발현 및 면역관련 인자 제거된 돼지의 개발은 관련 형질전환 동물 개발에 있어 유용한 정보 및 실험동물로 활용되게 될 것이며, 개발된 뎅기바이러스 pr 단백질은 감염개체로부터 배출되는 바이러스 진단 및 항체 ELISA법에 활용 가능

<요약문>

| | | | | | |
|------------------------------------|--|---------------------|-----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| <p>연구의 목적 및 내용</p> | <p>○ 목표 : 뎅기열 바이러스를 타겟으로하여 돼지로부터 세계 최초의 뎅기바이러스 질환모델을 확립하고 이를 활용하여 백신 및 신약 개발 및 활용체계를 구축</p> <p>○ 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 뎅기 바이러스 감시체계 구축을 통한 신규 분리주 분리 - 신규 뎅기 바이러스 분리 및 분리주에 대한 유전학적 특성 규명 - 유전자 변형기술을 활용한 뎅기열 감수성 돼지 체세포주 확립 및 뎅기열 질환모델 형질전환 돼지 생산 - 뎅기바이러스의 감염세포주 및 모델동물에서의 감염 역가와 병태생리 규명 - 뎅기바이러스 유용 재조합 단백질 발현 및 생산시스템 구축 - 생산된 모델돼지의 유효성 평가 및 뎅기바이러스 접종을 통해 뎅기바이러스 감수성 측정, 뎅기바이러스 감염 동력학 평가 | | | | |
| <p>연구개발성과</p> | <p>○ 뎅기 바이러스 type별 라이브러리 구축 및 유전학적 정보</p> <p>○ 뎅기 바이러스 in-vitro, in vivo 감염모델 바이러스 동력학 정보 규명</p> <p>○ 뎅기바이러스 감수성 확인분석을 위한 유용 재조합 단백질 제작</p> <p>○ 뎅기열 수용체를 발현시키는 형질전환 세포주 및 복제돼지 생산</p> <p>○ 뎅기열바이러스 감수성 유효성 평가를 통해 뎅기열 감수성 모델동물 확립</p> | | | | |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <p>○ 뎅기열 바이러스에 감수성이 있는 형질 전환 돼지는 그동안 적절한 모델을 제공하지 못했던 기존의 설치류 등과 달리, 뎅기열 바이러스의 병리생리학적 연구와 분자 수준에서 뎅기열 바이러스의 기전의 연구, 그리고 치료제 및 백신의 효능 연구에 적절한 in vivo 모델을 제시함으로써 백신개발 연구를 활성화하고 뎅기열 신약 및 새로운 치료법의 개발에 기여</p> <p>○ 뎅기열 감수성 형질전환 돼지는 전임상연구에서 정확한 임상자료를 확보할 수 있도록 하여, 임상단계에서의 실패확률을 줄여주며, 이러한 혁신적 백신 발굴 기술은 국내 기업의 개발역량을 극대화시킬 것으로 기대.</p> <p>○ 뎅기열 돼지 질환 모델을 통한 국내 기업 개발역량 극대화는 세계 시장을 선도할 성장 동력을 제공해줄 것으로 기대.</p> <p>○ 바이러스성 질환 모델 확립에 대한 원천기술 확보로 기업체와 타기관 등에 기술이전 및 정보 확산에 의한 부가가치 창출이 가능하며, 뎅기 바이러스와 유사한 지카 바이러스, 황열, 웨스트나일 바이러스에 대한 원천 기술의 확장은 새로운 가치 창출 및 글로벌 대형 제약사들이 대부분 장악하고 있는 바이러스 감염 백신시장 진입의 기회로 활용가능(개발도상국과 UN구호시장 진입 및 경쟁우위 확보)</p> <p>○ 뎅기바이러스에 대한 원천 기술확보는 현재 바이러스를 예방하는데 사용되는 상당한 국부의 손실을 막을 수 있을 것으로 기대됨.</p> <p>○ 본 연구개발의 예상되는 기술개발로부터 국산화된 뎅기열 대응 연구기반을 안정적인 확보로 수입의존을 벗어나 경제적 측면에서 관련부처/국내기업의 부담을 덜어줄 수 있으며 다국적제약사의 제품가격 폭등 등에 따른 공급차질로 비롯되는 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대됨</p> | | | | |
| <p>국문핵심어 (5개 이내)</p> | <p>뎅기바이러스</p> | <p>감염모델</p> | <p>형질전환 돼지</p> | <p>체세포핵이식</p> | <p>질환모델</p> |
| <p>영문핵심어 (5개 이내)</p> | <p>Dengue fever</p> | <p>Animal model</p> | <p>transgenic pig</p> | <p>somatic cell nuclear transfer</p> | <p>disease model</p> |

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

| | |
|-----------------------------|----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 6 |
| 2. 연구수행 내용 및 결과 | 17 |
| 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 | 68 |
| 4. 연구결과의 활용 계획 등 | 70 |

제1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목적

본 과제는 뎅기열 질환을 타겟으로 세계 최초로 돼지에서 바이러스성 질환모델을 확립하고 이를 활용하여 백신, 신약 개발 및 활용체계를 구축하는데 그 목표를 두고 있으며 해당 연구의 제안 배경과 용도 및 적용 분야, 필요성은 다음과 같다.

1. 제안 배경

가. 뎅기열 바이러스(Dengue fever virus)

(1) 유전학적 특징

(가) Flavivirus과에 속하며, 피막(envelope)이 있는 단일가닥 양성(single stranded positive-sense) RNA 바이러스이며 네 개의 혈청형(DENV-1~4)이 존재함.

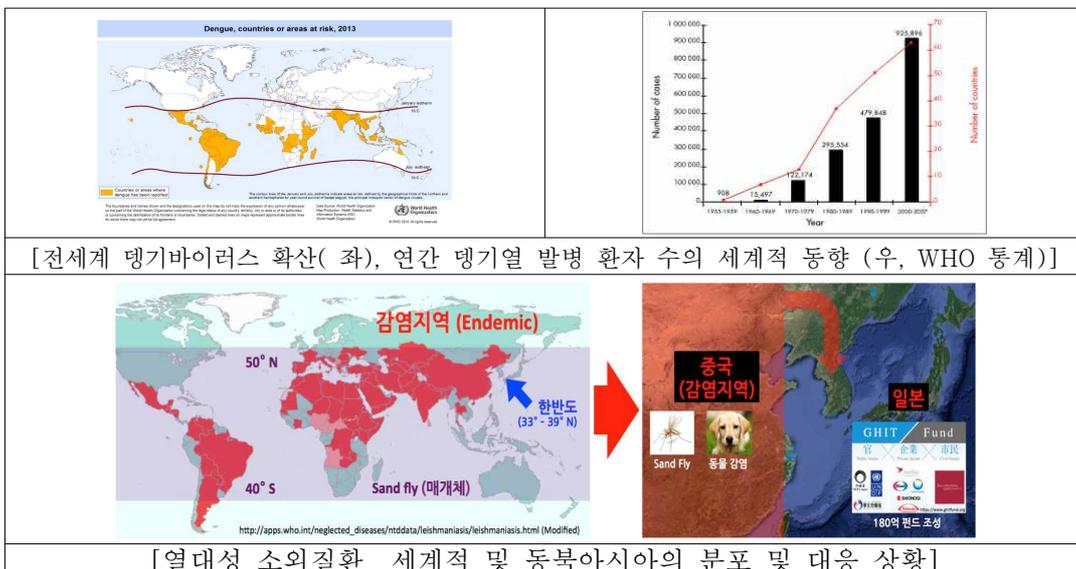
(2) 뎅기열 바이러스의 위험성

(가) 뎅기열 바이러스는 모기를 매개로 하는 바이러스 감염병인 뎅기열을 일으키며, WHO에 따르면 전 세계 약 100여 개 국가에서 연간 5,000만에서 1억 명이 뎅기열에 감염된다고 함

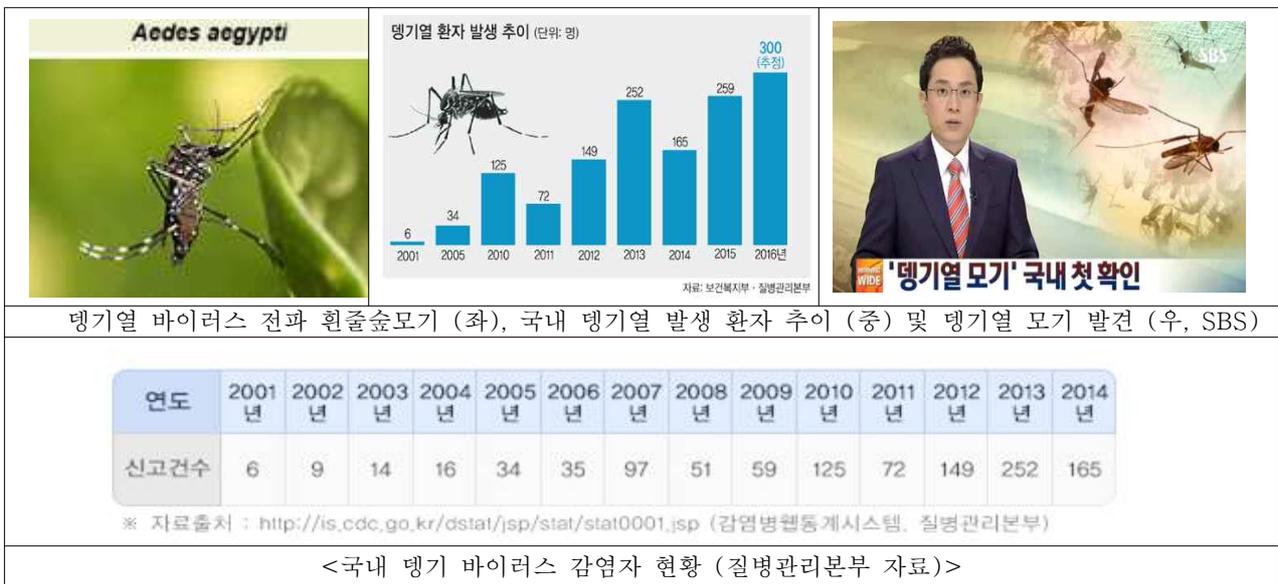
(나) 뎅기열을 전파하는 이집트숲모기 (Aedes aegypti)는 주로 열대와 아열대지역에 분포하여, 뎅기열은 주로 동남아시아를 중심으로 유행하는 질환으로 고열과 출혈성향을 동반하는 열성질환으로 현재 예방접종이나 항바이러스제제는 없음

(다) 2014년 여름에는 도쿄 중심부의 요요기공원을 중심으로 뎅기열 환자가 113명 발생. 유럽에서도 2012-2013년 대서양의 포르투갈령 마테이라섬에서 대규모 뎅기열 유행이 발생하여 총 환자수가 3,000여명 발생

(라) 2010년에는 프랑스와 크로아티아에서 각각 2명, 17명 환자가 발생하였는데 모두 해외 여행경력이 없는 자체 발생 환자로 이는 1928년 이후 유럽에서 발생한 최초의 자생적 발생 사례로 기후변화와 더불어 유럽지역에서 뎅기열 유행 가능성을 시사하고 있음



- (마) 흰줄숲모기는 치쿤군야, 웨스트나일열, 황열 등 다른 열성 바이러스 질환의 주매개체로 작용하는데 이러한 질환은 이미 유럽과 미국에 화물선이나 항공기를 통해 유입되어 이미 정착하거나 유행을 일으킨 사례가 있음. 해외무역이 활발하고 세계적인 허브 공항을 보유하고 있는 국내의 사정을 감안하여 장기적으로 볼 때 이러한 질환 유행이 국내에서 발생할 가능성은 낮지 않으며 이에 대한 적극적인 대비가 필요.
- (바) 2013년 국내 제주에서 아열대 모기 발견. 땡기열을 옮기는 아열대 모기 '흰줄숲모기' 로 유전자 염기서열 분석결과 베트남에서 서식하는 것과 동일한 것으로 확인. 국내 기후가 아열대로 변해감에 따라 아열대 곤충이 더 오래 살아남을 수 있는 환경으로 바뀌고 있으며 땡기 바이러스의 감염자가 발생할 가능성이 있음을 시사함.

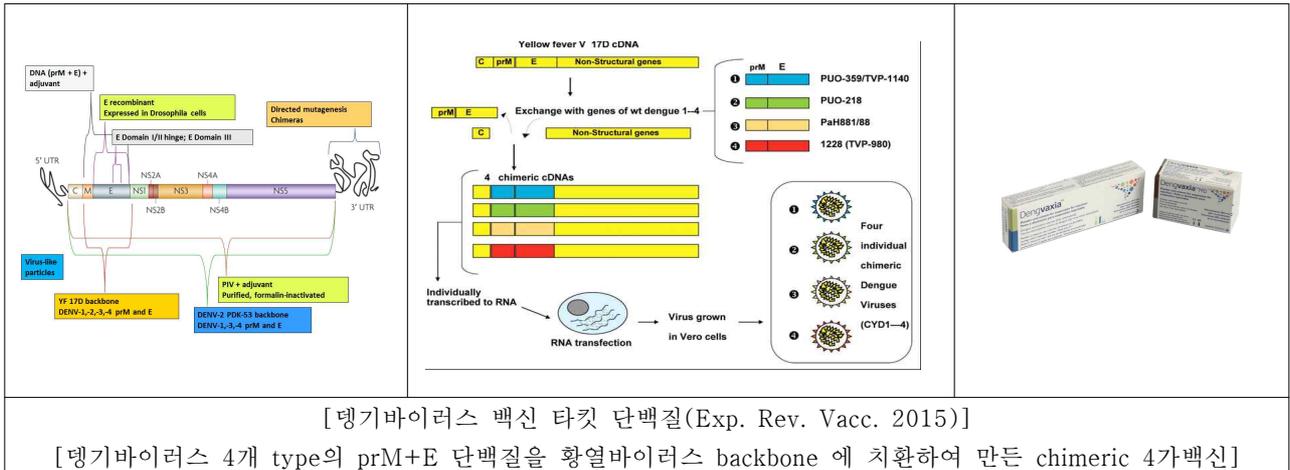


- (사) 땡기열의 주된 발생지역은 아시아-태평양지역, 중부아메리카와 남아메리카, 아프리카 지역으로 땡기출혈열이나 땡기쇼크의 경우 집중적인 치료시에는 치명률이 1-2.5%이나 적절한 치료를 받지 못하면 사망률이 20%가 넘는다고 보고됨. 국내의 땡기열 환자 발생은 모두 땡기열 위험지역을 여행하거나 방문했던 사람으로 아직까지 국내에서 직접 발생 환자는 없음.
- (아) 국내에서 보고되는 땡기열 환자는 현재까지는 모두 해외에서 유입된 환자로 발생한 환자의 95% 이상은 동남아시아와 남아시아에서 감염된 후 귀국한 환자로 판명됨. 그러나 2013년 국내 제주에서도 아열대 모기가 발견되었고 국내 기후가 아열대로 변해감에 따라 아열대 곤충이 더 오래 살아남을 수 있는 환경으로 바뀌고 있으며 감염병 유입 시 자체 유행할 가능성이 있음을 시사함

나. 뎅기열 백신의 개발 과정에서의 한계점과 그 극복방안

(1) 뎅기열 바이러스 백신

(가) 최근 세계 최대 백신업체 사노피가 최초의 뎅기열 4가 백신인 ‘뎅그박시아(Dengvaxia)’ 를 개발하였으며, 2015년 12월 멕시코와 필리핀에서 판매 승인을 받았고 최근에는 브라질에서도 판매가 허용됨. 현재 2016년 6월 기준 5개국에서 시판 중임.

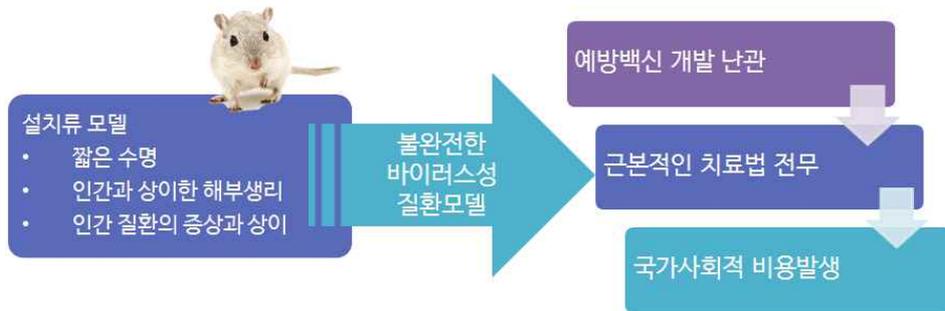


(2) 백신의 한계

(가) 뎅그박시아(Dengvaxia) 4가 백신은 최초의 백신이지만, 예방 효과는 60%로서 95%이상의 효과를 보이는 홍역, 소아마비 등의 다른 백신에 비해 효과가 떨어지며, 임상시험 결과 9세 이하와 45세이상의 연장자에게 사용시 원인 불명의 부작용이 커 뎅기열의 주된 사망자인 9세 이하 어린이와 45세 이상의 노인은 아무런 혜택을 받을 수 없음. 또한 혈청형간의 간섭에 의해 type2에 대한 효능은 부족한 것으로 밝혀지고 있으며 또한 황열 바이러스 기반의 NS 단백질이 T cell 반응을 유도하여 본래의 뎅기 백신 항체 형성보다 황열에 대한 T cell 반응이 나타나는 것으로 밝혀짐.

(3) 한계의 원인

(가) 현재까지 백신개발을 위한 바이러스성 질병의 모델동물은 대부분 설치류 모델을 이용해 이루어졌으나, 설치류 자체의 수명이 짧아 장기간 모니터링이 되지 않고 종간차이, 면역 시스템의 차이, 유전자 불안정성 등의 문제로 질환모델 증상의 진행과정이 사람과 다르다는 문제가 있음. 더군다나 뎅기열의 경우 사람의 뎅기열 임상증상을 구현해내는 설치류 모델조차 현재까지 존재하지 않아 치료제와 백신 개발에 필수적인 바이러스의 복제 기전, 질병 발생의 기전 등의 연구와 전임상시험에서 정확한 백신의 효능과 부작용 측정 등에 난관이 있어왔음. 뎅기열 백신 연구가 시작된 1940년 이래로 적합한 동물 모델의 부재가 뎅기열 백신 개발의 주된 장벽으로 작용해왔으며, 뎅그박시아의 경우도 뎅기열 질환 모델의 부재로 바이러스에 대한 이해가 부족하여 낮은 효과나 원인 불명의 부작용이 보고되는 것으로 보임.



[바이러스성 질병에 대한 모델돼지 생산의 필요성]

2절 연구개발의 필요성

1. 뎅기열에 대한 돼지모델의 필요성

가. 현재 시판중인 뎅기열 백신인 뎅기백시아는 적절한 질환모델의 부재로 인해, 부작용과 효과 측면에서 한계가 있음에도, 2016년 1분기 기준 매출이 250억에 이르며 2020년 예상 매출이 1조 5천억원에 이를 것으로 전망됨. 따라서, 적합한 질병 동물모델을 통해 최적으로 개선된 신약 및 백신이 나온다면 그 경제적 파급효과는 무시하지 못할 것임.

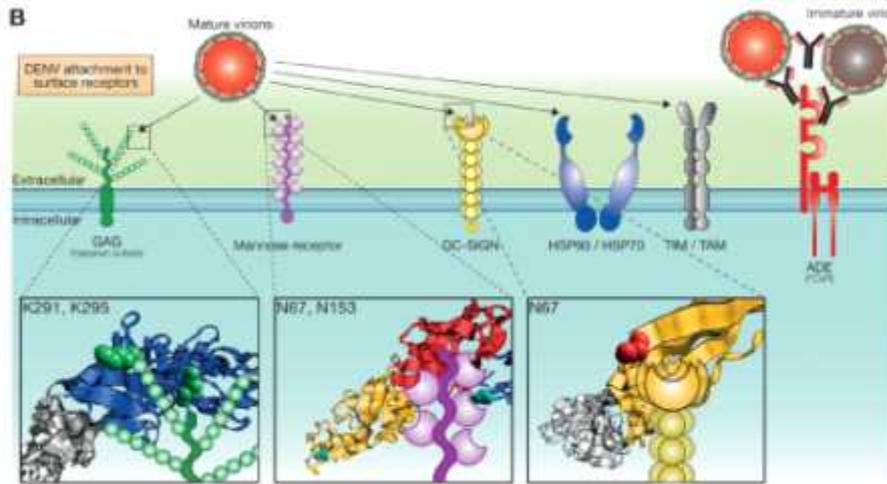
나. 돼지는 질병 모델 동물로서 다른 동물보다 유전자 변형 및 적응 기술이 잘 확립되어 있으며, 번식의 관점에서 성숙 도달 일령이 빠르고 번식기간이 짧고 산자수가 많은 장점을 가지고 있음. 더군다나 설치류나 다른 중대 동물에 비해 해부학적 및 생리학적, 병리학적 측면에서 사람과 가장 유사하여 질환의 연구 및 백신, 치료제의 효능 연구에 가장 최적으로 사용될 수 있음. 따라서 이러한 돼지를 이용하여 뎅기열 질환모델을 구축하게 된다면 기존 설치류 모델 및 개발된 기존 뎅기열 백신이 가진 문제점을 극복한 백신 및 치료제 개발이 가속화될 것임. 더 나아가 뎅기열 백신은 모기에 의해서 전파되는 플라비 바이러스의 대표적인 종류로서 교통의 발달과 온난화의 영향으로 해당 모기의 번식이 증대되어 향후 뎅기 바이러스 뿐 아니라 이와 유사한 지카바이러스, 황열 바이러스 등이 한국에서도 잠재적으로 발생가능성이 있음. 이러한 상황에서 뎅기바이러스 돼지 모델을 확립하는 원천 기술을 만든다면, 향후 발생가능한 잠재적인 위험에 대비할 수 있는 대책이 될 뿐 아니라, 세계 감염병 백신 시장에서의 우위를 점할 수 있게 될 것임.



뎅기열 백신 연구가 시작된 1940년 이래로 적합한 동물모델의 부재가 뎅기열 백신 개발의 주된 장벽

[뎅기열 질병에 대한 모델돼지 생산의 필요성]

다. 본 연구에서는 사람의 세포 표면에 발현되는 주요 수용체를 돼지 체내에서 발현시켜 뎅기열에 감수성을 보이는 뎅기바이러스성 질환모델 돼지를 세계 최초로 확립하고자 하며, 이를 활용하여 백신 및 신약 개발 및 활용체계를 구축하고자 함.



[뎅기열 바이러스의 감염경로가 되는 세포표면 수용체]
(FEMS Microbiology Reviews, 2015, Vol 39, No.2)

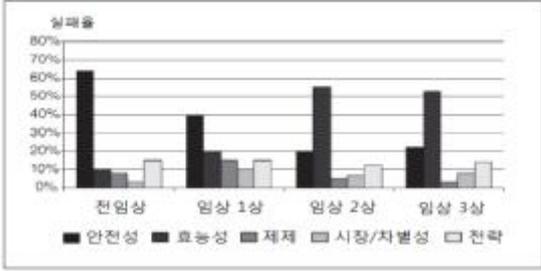
2. 연구 과제의 용도 및 적용 분야

가. 뎅기열에 대한 기초 연구의 가속화

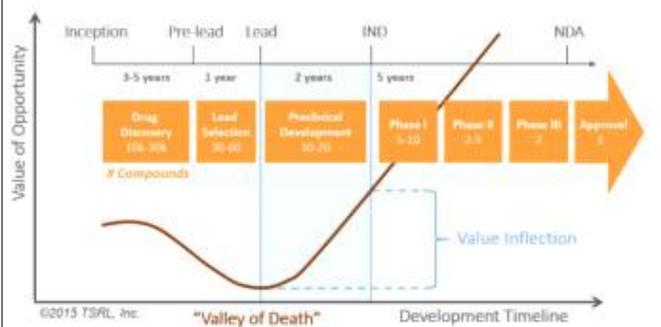
(1) 뎅기열 감수성 모델 돼지가 확립되어 뎅기열에 대한 병리학적, 세포분자학적 메커니즘의 연구에 적용된다면, 그 동안 설치류로부터 얻을 수 없었던 새로운 과학적 지식을 축적할 기회를 제공할 것임. 이는 형질전환을 통한 질병 모델 개발이라는 응용과학을 통해 기초 연구 분야를 지탱하는 창조적인 방향성을 제시하며 그동안 확립되었던 지식을 새로이 규명할 수 있게 해줄 것임. 이러한 기초 연구의 가속화는 백신, 치료제 개발에 방해가 되었던 여러 장애요소를 해결하게 하여 백신 및 신약 개발의 새로운 가능성을 넓혀줄 것으로 기대되며, 바이러스 연구에 방향성을 제시하는 사례가 될 것임

나. 백신 및 신약 개발 활용체계 구축

(1) 신약 및 백신 개발의 주요 실패 원인 및 비용 낭비가 동물실험에서 적절한 효능과 부작용에 관한 프로파일을 얻지 못하여 후보물질 선정에 실패가 있음은 잘 알려진 사실로, 적절한 질환모델 동물을 이용한 백신 및 신약 개발 활용체계의 구축은 중요한 과정임. 뎅기열 돼지 질환 모델은 전임상시험에서 백신 및 치료제 후보약물의 효능과 부작용에 대한 정확한 프로파일을 제공함으로써 향후 진행될 임상시험의 경제적, 시간적 장벽을 낮춰 줄 것이며, 임상과정에서 있을 수 있는 실패를 사전에 방지할 수 있도록 해줄 것임. 본 과제는 이러한 체계 구축의 대표적인 선례가 될 것이며, 개발 실패의 리스크 및 개발 시간, 비용 등의 감소는 다국적 제약사에 비해 영세한 국내 기업의 백신 개발 진입장벽을 낮춰 국내 기업의 개발역량을 극대화 시킬 수 있는 계기가 될것임.



[임상단계별 신약 개발 실패 주요 사유 : 안전성, 효능 검증의 실패, Michael J, Barrett & Donald E Frail, Drug Repositioning, Wiley & Sons, 2012]



[백신 및 신약개발에서 전임상 시험의 중요성, TSRL INC 제공]



[최적화된 동물 모델을 사용한 전임상 시험의 중요성]

다. 바이러스성 질환 모델 개발의 원천 기술 확보 및 확장 적용

- (1) 이러한 원천기술의 확보는 기업체와 타기관 등에 기술이전을 통해 부가가치 창출을 가능하게 할 것이며, 실제로 형질전환 질병모델 폐지의 가치가 마리당 5만~10만 달러에 육박할 것으로 예상됨. 또한 향후 원천 기술을 뎅기바이러스와 유사한 지카바이러스, 웨스트나일 바이러스 등으로 확장 적용하게 된다면, 새로운 가치 창출 및 글로벌 대형 제약사들이 대부분을 장악하고 있는 바이러스 감염병 백신 시장의 국내 기업 진입 확대의 기회로 이어질 수 있음

3. 연구 과제의 필요성

- 가. 뎅기열은 모기가 매개하는 질환으로 전염성이 강하고 현재까지 효과적인 백신이나 치료법이 개발되지 않은 난치성 질환으로 진단 및 치료에 많은 비용이 소요되어 개인이 온전히 해결하기에는 무리가 있기에 치료와 보호 등에 여러 기관의 도움이 필요함. 특히 이러한 바이러스성 질환을 대상으로 하는 백신 개발이나 진단법 개발은 비용이 많이 들고 단기간에 수익을 창출하기 어려운 수익성의 결핍으로 인해 연구와 투자가 상대적으로 미흡할 수가 있음. 따라서 이러한 바이러스성 질환의 관리를 위해서는 국가적 차원에서의 장기적이고도 적극적인 개입이 필요함.

- 나. 바이러스성 질환 동물모델을 활용한 중개의학 연구도 국가적 차원의 접근이 필요하며 특히 설치류를 제외한 중대동물 등의 생물학적 자원은 그 희소성으로 말미암아 더욱 공공성을 지니게 됨. 성공적인 바이러스성 질환의 중개의학 연구를 위해서는 인간과 유사한 생리적, 해부학적 구조를 지닌 돼지를 대상으로 한 질환 모델을 확립하여 이와 같은 질환모델 돼지의 생물자원수집과 바이오마커 개발 등의 연구에 대한 국가적 차원의 지원 필요성이 대두됨. 또한 확립된 뎅기열 감수성 모델 돼지의 표현형, 유전형 등의 분석을 통해 질환 모델로서의 가치에 대한 유용성이 담보되어야 하며, 바이러스성 질환 중개의학 연구를 통한 치료 반응, 증상 발현의 예측지표, 치료제에 대한 반응 지표 등의 지표 발굴은 매우 중요함.
- 다. 현재 질환모델용으로 거래되고 있는 마우스는, 일반적인 누드마우스의 경우 평균 300,000원 ~ 500,000원 선에서 공급되며, 국내 시장규모는 43억 정도됨. 현재 질환모델동물의 세계시장 규모는 11억달러(2013년)에서 새로운 질환모델동물의 개발과 더불어 18억달러(2018년)까지 늘어날 것으로 전망되고 있음. 같은 특성을 지닌 형질전환 돼지의 경우, 그 희소성과 품종적 특징, 기술적 가치 등을 고려해서 고부가가치를 가짐. 뎅기열 질환모델의 경우, 현재 동종 내지는 이종의 동물모델이 없는 점, 뎅기열 질환의 감염력 정도, 뎅기열 치료제 개발 현황 등을 고려했을 때 희소성 및 기술적 가치를 보다 높게 책정해서 최소 1두당 10,000,000원 정도로 책정됨.
- 라. 연구개발 종료후 대량 생산 및 전문 돼지 공급업체로의 기술이전을 상정했을 때 소정의 착수금과 연간 매출액의 5%를 전용실시에 대한 기술료로 책정하거나 일괄적인 기술료로 받을 수 있음. 실제로 국내 농촌진흥청은 에리트로포이에틴을 유즙에서 분비하는 형질전환 돼지 개발 및 제조 특허기술을 민간업체인 (주)피엠지바이오파밍에 매출액 3%기준으로 유상이전한바 있고, 미국의 Ovation Pharmaceuticals 는 형질전환 염소를 통해 항트롬빈 제제의 미국내 개발 및 판매에 대한 기술료로 2억5천7백만 달러 (한화 약 3,000억원)를 지급한 바 있음.
- 마. 또한, 뎅기열 발생현황을 보면 2015년 기준 전세계에서 연간 약 16억명이 감염되는 반해 백신효과를 누린 환자는 겨우 50만명에 불과함. 2015년 기준 뎅기 백신시장은 약 7천만달러 (한화 770억원)으로 산정되었으며, 연평균 성장률을 17.5%로 2027년까지 약 12억달러 시장으로 예견됨. 국외 뎅기바이러스 백신개발 현황을 보면 사노피 회사에서 개발한 뎅그박시아(Dengvaxia) 가 유일한 백신으로 해외 5개국에 시판되어 2016년 1분기 매출이 1900만 유로 (한화 250억)를 달성했으며 2020년 예상매출을 14억 달러로 잡고 있음. 다만, 이 백신의 문제점은 9세이상 45세 이하의 성인만을 유효 대상으로 하고 있으며 뎅기열에 의한 사망자가 집중된 9세 이하의 어린이와 45세 이상의 노인은 아무런 효과 및 백신혜택을 받지 못하고 있음. 더군다나 예방효과가 60% 미만으로 다른 질병의 백신보다 현저히 효과가 떨어진다는 단점이 있음. 이러한 뎅기열 백신의 부재는, 백신개발 과정에서 적합한 동물모델의 부재가 주된 장벽으로 여겨지고 있어, 뎅기열 백신개발을 위한 뎅기열 질환모델 돼지는 백신개발에 필수적인 실험동물모델로서 그 가치 및 수요가 급증할 것으로 예상됨.

3절 연구개발 범위

1. 연구개발 목표 및 내용

| 구분 | 내용 |
|------|--|
| 최종목표 | 덴기열 바이러스에 감수성을 갖는 돼지모델 확립 |
| 세부목표 | <ul style="list-style-type: none"> □ 덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 덴기열 바이러스 수용체 발현백터의 제작 - 덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주 제작 - 유전자 변형 여부 검증 및 덴기열 바이러스 수용체 발현여부 검증 □ 유전자 변형 덴기열 감수성 형질전환 돼지 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 유전자 변형 세포주를 이용한 복제 수정란 생산 및 효율 확인 - 대리모에 대한 복제 수정란 이식 후 형질전환 돼지 생산 - 복제돼지 산자 생산을 확인 및 유전자 변형 여부 검증 □ 덴기열 감수성 돼지모델 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 생산된 돼지에서 덴기열 바이러스 감염시 감염여부 평가 - 덴기열 감수성 돼지 확보 및 맞춤형 교배를 통한 번식체계 구축 - 덴기열 감수성 돼지 품종 확립 유지 및 대량 양산체계 구축 □ 덴기열 바이러스 동력학 규명 및 모델돼지 효용성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 덴기열 바이러스의 TCID50 역가 측정 및 마우스 병원성 최저 역가 설정 - 덴기열 감수성 돼지모델을 이용한 덴기열 바이러스 감염 및 임상증상 발현여부 |
| | <p style="text-align: center;">연구개발과정의 모식도</p> |

2. 연차별 개발목표 및 범위

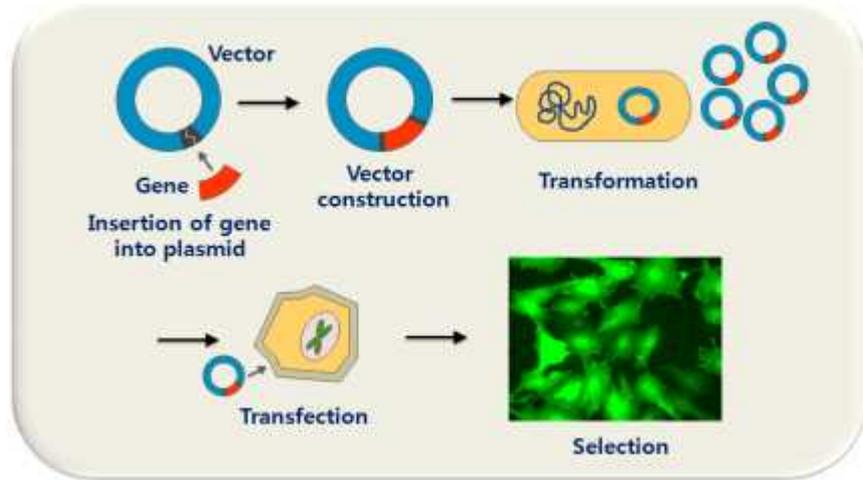
가. 1차년도

(1) 연구개발 목표

- (가) 덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주 확보
- (나) 덴기열 바이러스 라이브러리 및 culture 시스템 구축

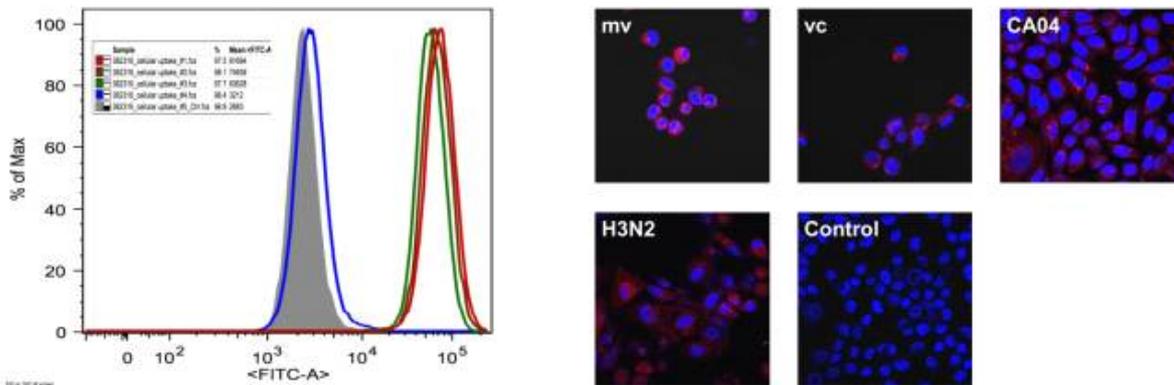
(2) 개발 내용 및 범위

- (가) 질환 모델 생산을 위한 돼지 체세포의 확립
- (나) 덴기열 바이러스 수용체를 발현토록 하는 유전자 백터시스템 개발
- (다) 덴기열 바이러스 수용체 유전자 발현 체세포주 3종 이상 작성
- (라) 외래유전자의 돼지 유전체 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인
- (마) 덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주에서 덴기열 감수성 여부 판정



<형질전환 세포주 확립 과정>

- (바) 최신 뎅기바이러스 분리 및 확보, 유전학적 정보 라이브러리를 구축
- (사) 안정적인 뎅기바이러스 culture 시스템 구축
- (아) 뎅기 바이러스 RNA기반 Realtime PCR 역가 측정 시스템 구축
- (자) 뎅기열 바이러스 수용체 발현 유무확인 시스템 구축



[nile red 염색물질에 담지된 바이러스의 세포 uptake FACS 측정결과와 confocal image]

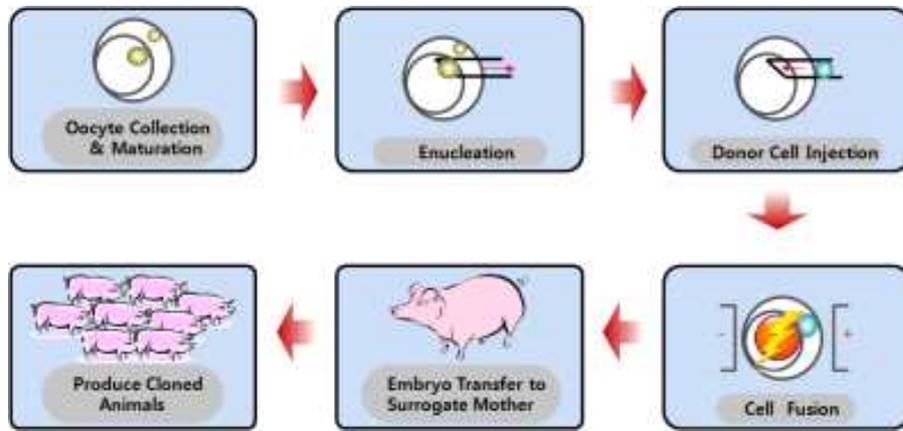
나. 2차년도

(1) 연구개발 목표

- (가) 뎅기바이러스 수용체 발현 복제돼지 생산
- (나) 뎅기 바이러스 in-vitro, in-vivo 감염모델 바이러스 동력학 정보 규명

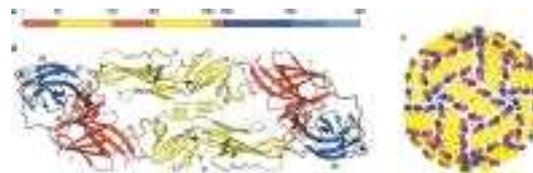
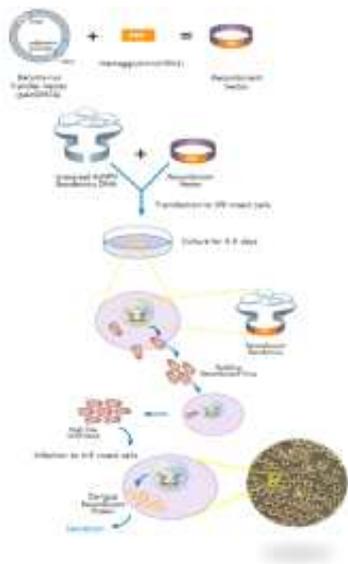
(2) 개발 내용 및 범위

- (가) 뎅기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 공여세포로 이용한 복제 수정란 제작
- (나) 복제수정란에서 외래유전자의 삽입 및 형질전환 여부 검증
- (다) 복제 수정란의 대리모 이식 후 임신 여부 평가
- (라) 임신한 대리모에서 뎅기열 바이러스 수용체 발현 복제돼지 생산
- (마) 태어난 산자에서 외래유전자의 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인
- (바) 복제돼지의 세포수준에서 뎅기열 감수성 여부 판정 (In vitro 분석)



<복제수정란 제작 과정 모식도>

- (사) 댕기바이러스 in-vitro 감염 동력학 규명후 in-vivo 감염을 위한 최적 농도 설정
- (아) 댕기바이러스의 마우스 모델 감염 통한 진단 및 임상증상 판별 여부 확인
- (자) 곤충세포 발현계를 이용한 유용항원 재조합 단백질 발현 및 생산 시스템 구축
- (차) 댕기바이러스 감수성 평가를 위한 감염실험 및 임상증상 유발 최소역가 수 산정



: Env 기반 생물정보학 분석을 통해 현재 진화적으로 높은 Fitness를 갖는 댕기바이러스를 탐색하고 해당 바이러스 strain의 Envelope 유전자를 기반으로 재조합 단백질 제작

[바이러스 유용 재조합 항원 생산 전략]

다. 3차년도

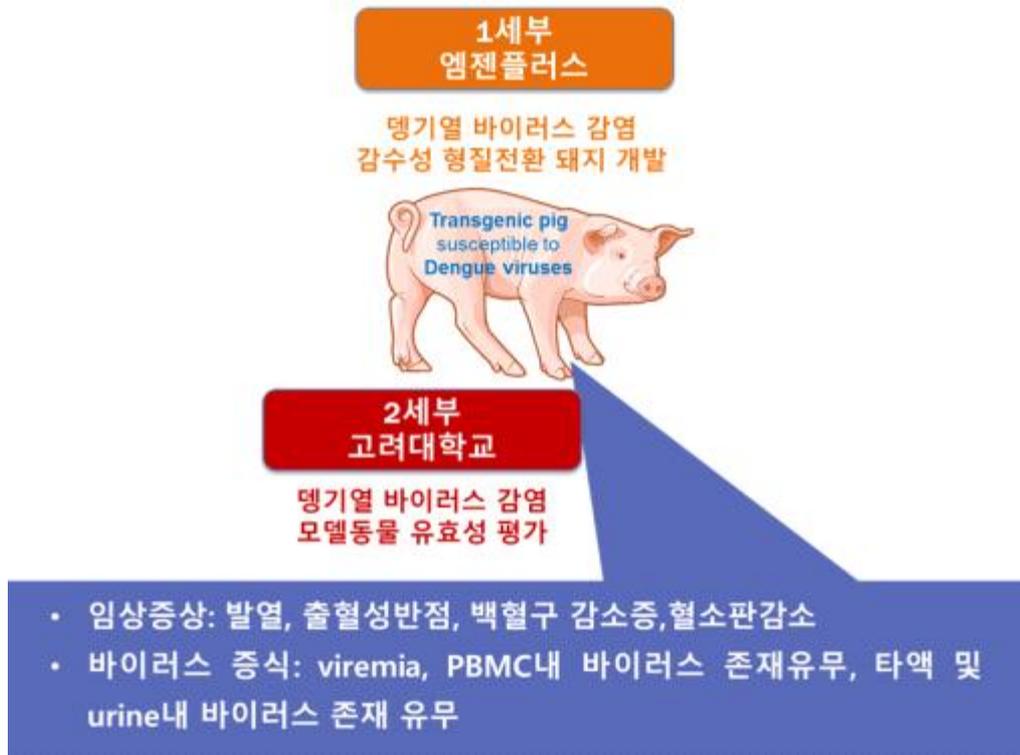
(1) 연구개발 목표

- (가) 댕기열 바이러스 감수성 돼지모델 구축
- (나) 댕기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 변형 돼지 유효성 검증

(2) 개발 내용 및 범위

- (가) 댕기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 공여세포로 이용한 복제 수정란 제작
- (나) 복제수정란에서 외래유전자의 삽입 및 형질전환 여부 검증
- (다) 복제 수정란의 대리모 이식 후 임신 여부 평가

- (라) 임신한 대리모에서 뎅기열 바이러스 수용체 발현 복제돼지 생산
- (마) 뎅기열 감수성 돼지 확보 및 맞춤형 교배를 통한 번식체계 구축
- (바) 뎅기열 감수성 돼지 품종 확립 유지 및 대량 양산체계 구축
- (사) 외래유전자의 돼지 유전체 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인
- (아) 복제돼지의 산자에서 뎅기열 감수성 여부 판정 (In vivo 분석)
- (자) 뎅기 바이러스의 병원성 재현실험 수행
- (차) 병원성 유발 바이러스 역가 규명 및 임상증상 유발여부 판정
- (카) 개발된 동물모델에서 바이러스 배출량 차이 확인



제2장 연구수행 내용 및 결과

1 연차별 연구수행 내용

1. 1차년도

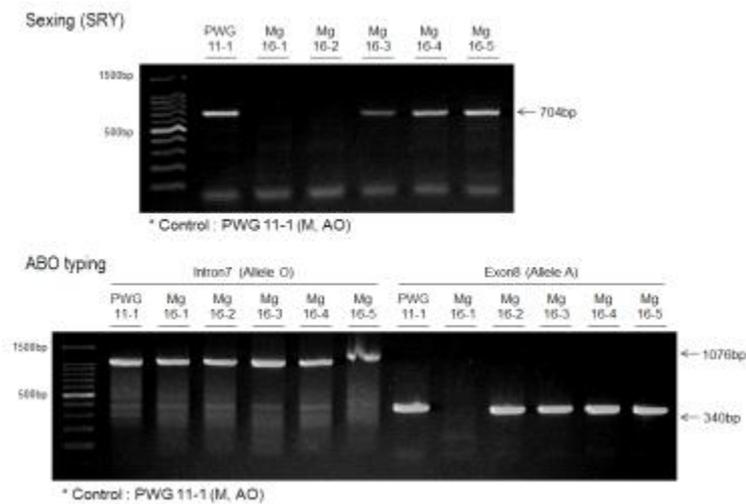
가. 당해년도 연구결과

| 구분 (연도) | 세부과제 명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|--|--|---|
| 1차 년도 (2016) | 덴기열 백신개발 을 위한 덴기열 감수성 돼지모델 구축 | 질환모델생산을 위한 돼지 체세포의 확립 | - 돼지 Primary fetal fibroblast 확보 | - 5두의 wildtype pig fetus로부터 primary fetal fibroblast 확보 |
| | | 덴기열 바이러스 수 용체를 발현토록 하 는 유전자 벡터시스 템 개발 | - 외부유전자 발현 시스템 확보 - 타겟 유전자 선정 및 database를 통한 서열 분석 - DC-SIGN 유전자 확보 및 서열 분석 - hTIM-1 유전자 확보 및 서열 분석 - h M a n n o s e receptor 유전자 확보 및 서열 분석 | - Universal 프로모터인 CAG 프로모터 활용 유전자 발현벡터 시스템 2종 확보 - 타겟 유전자의 서열 비교분석 완료 - 타겟 유전자 확보를 위한 THP-1 cell activation 및 분화 조건 확립 - hDC-SIGN variant 3 유전자 확보 및 서열 확인 완료 - hDC-SIGN variant 1 유전자 확보, 서열 확인 및 발현 검증 완료 - hTIM-1 유전자 확보 및 서열 확인 완료, 발현 검증 진행 - hMannose receptor 유전자 확보 진행 |
| | | 덴기열 바이러스 수 용체 유전자 발현 체 세포주 3종이상 작성 | - hDC-SIGN 발현 세포주 확립 - 추가 발현 벡터 도입 후 세포주 확립 예정 | - Primary fetal fibroblast를 이용하여 hDC-SIGN 발현 세포주 확립 - 추가 유전자 발현 벡터 (hTIM-1, hMannose receptor) 제작이 완료 되는대로 체세포주에 도입할 계획 |
| | | 외래유전자의 돼지유 전체 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인 | - 유전자 시퀀싱을 통해 삽입확인 - 세포주에서 확보한 RNA 와 단백질에서 수용체 발현 검증 | - 덴기열 수용체가 발현되는 체세포주가 확립되는대로 검증 진행 |
| | 덴기열 바이러스 수 용체 발현 세포주에 서 덴기열 감수성 여 부 판정 | - 제작된 세포주에 덴기열 바이러스를 감염시켜 감염여가를 측정하여 감수성 여부 판정 | - 덴기열 수용체가 발현되는 체세포주가 확립되는대로 검증 진행 | |
| | 덴기열 바이러스 모델동물 유효성 검증 | 최신 덴기바이러스 분리 및 확보 | - Dengue virus 국내 분리주 분양승인 | -병원성 바이러스 은행으로부터 Dengue virus 혈청형의 분리주를 분양받아 확보 |
| | 덴기바이러스 culture 시스템 구축 | - 원숭이 비장세포 (Vero) 및 모기세포 C6/36를 이용한 바이러스 배양 시스템 구축 및 유전자서열정보 비교 | -지속배양을 통해 Vero E6 적응도를 높여 확보중인 바이러스의 역가를 최대화 - 덴기바이러스 혈청형에 따른 유전자서열 정보를 Clustal Omega V를 이용하여 alignment 수행. | |
| | 타겟 유전자 대상의 realtime RT-PCR 프 라이머 선정 최적화 | - 4가지 혈청형 대한 서열분석 통해 Realtime -PCR 프라이머 선정 | -프라이머 최적화 선정을 위한 대조군 프라이머를 이용한 realtime RT-PCR평가 - 바이러스 배양액과 세포내 바이러스 realtime RT-PCR역가 확인 | |

나. 세부적인 당해년도 연구결과 내용

(1) 질환모델 돼지생산을 위한 돼지 체세포주의 확립

- (가) 질환모델 돼지 생산을 위하여 28일령의 Farm pig fetus를 외과적 방법을 통하여 총 5두 회수하였고 일차 섬유아세포 배양을 진행하였다. 회수된 fetus는 primary fibroblast 확보를 위하여 primary cell culture를 시도하였다.
- (나) Primary cell culture를 시도한 5두 모두 cell adhesion을 확인하였고 이를 배양하여 primary fibroblast를 확보하였다.
- (다) 확보된 5두의 fetal primary fibroblast는 성별 및 blood type 확인을 위하여 genomic DNA 추출을 진행하였고 이를 template로 하여 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction; PCR)을 통해 확인하였다 (그림 1).



< 1. 확보한 Fetus 의 성별 및 Blood typing>

- (라) 그림 1에서 보는 바와 같이 5두 (MG16-1, MG16-2, MG16-3, MG16-4, MG16-5) 중 3두 (MG16-3, MG16-4, MG16-5)는 수컷, 2두 (MG16-1, MG16-2)는 암컷으로 확인되었고 blood type은 4두 (MG16-2, MG16-3, MG16-4, MG16-5)는 AO type, 1두 (MG16-1)는 OO type으로 확인되었다. 결과는 표 1에 나타냈다.

<표 1> Characterization of harvested fetus

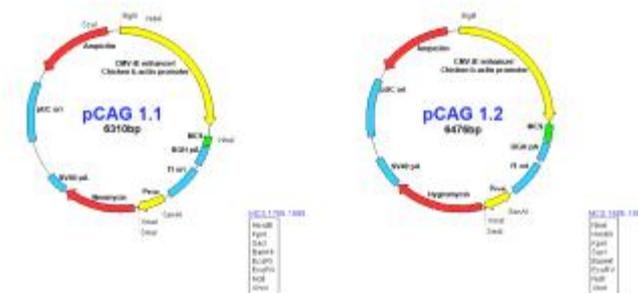
| Fetus | 성별 | Blood type |
|--------|--------|------------|
| MG16-1 | Female | OO |
| MG16-2 | Female | AO |
| MG16-3 | Male | AO |
| MG16-4 | Male | AO |
| MG16-5 | Male | AO |

- (마) 확인된 fetal fibroblast는 체세포 핵이식의 공여세포로 사용하기 위하여 동결을 진행하고 액체 질소에 보관하였다.

(2) 뎅기열 바이러스 수용체를 발현토록 하는 유전자 벡터시스템 개발

(가) 외부 유전자 발현 벡터 시스템 확보

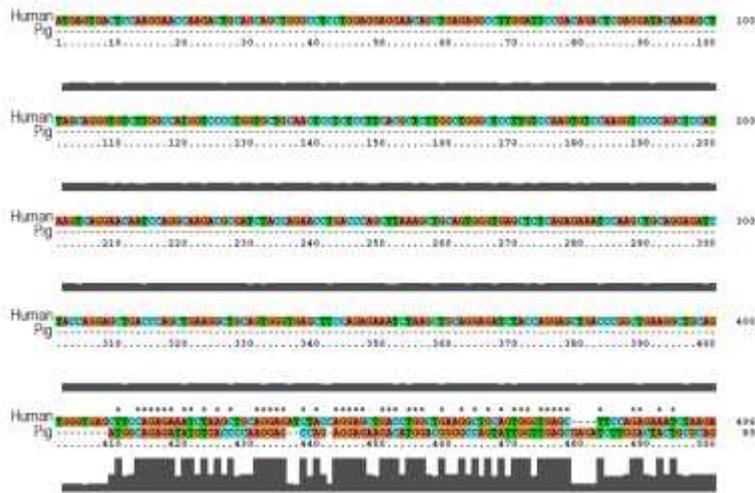
- ① 외부 유전자를 발현하기 위해서는 원하는 외부 유전자를 발현시킬 수 있는 발현 벡터 시스템이 필수적으로, 외부 유전자의 효율적인 발현은 유전자 발현 벡터 시스템의 프로모터 및 여러 조절 서열 (ex; enhancer 또는 repressor)에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다.
- ② 본 연구팀은 외부 유전자의 발현 효율을 높이기 위해서 일반적으로 사용되고 있는 mammalian expression vector인 pcDNA 3.1 vector의 프로모터 부위를 교체하였다.
- ③ pcDNA3.1 series의 발현 벡터는 기본적으로 CMV 프로모터를 가지는데 이는 cytomegalo 바이러스 유래의 프로모터로 많이 사용되고 있는 발현 시스템이다. 그러나 CMV promoter는 형질전환 동물에서 불안정하다는 문헌들이 보고되었고 특히 epigenetic modification의 영향으로 유전자의 발현 감소가 나타날 수 있으며 유전자 발현에 있어서 다양한 발현 정도를 보인다고 알려져 있다.
- ④ 본 연구팀에서는 바이러스 유래 프로모터가 아닌 chicken b-actin 프로모터 유래의 CAG 프로모터를 사용하기 위하여 pcDNA3.1 vector의 프로모터를 교체하여 새로운 유전자 발현 벡터 시스템 2종을 확보하였다 (그림 2).



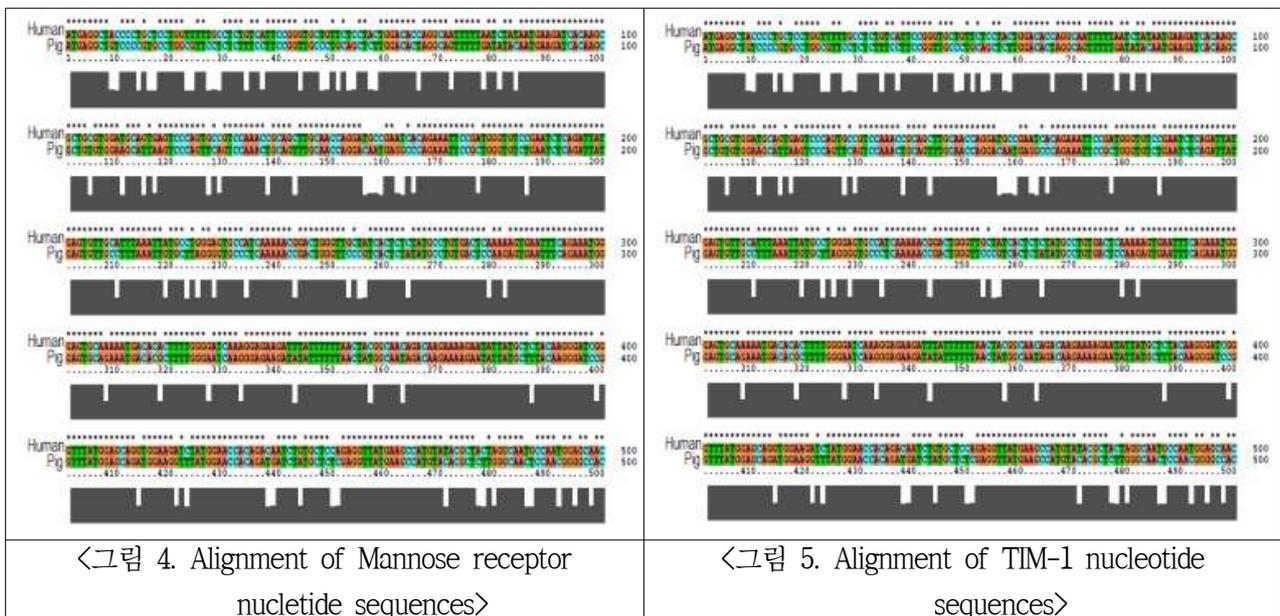
< 2. 유전자 발현 벡터 시스템 2종 >

(나) 타겟 유전자 선정 및 database를 통한 서열 분석

- ① 타겟 유전자를 선정하기 위하여 관련 문헌 (JR Valle et al., 2014; MA Schmid et al., 2014; C Cruz-Oliveira et al., 2015; N Khetarpal and I Khanna, 2016) 을 참고하여 일차적으로 DC-SIGN (CD209), Mannose receptor (CD206), TIM-1을 선정하였다.
- ② NCBI database를 이용하여 선정된 세 유전자를 검색하고 인간과 돼지의 유전자 서열을 모두 확보하였다.
- ③ 확보된 유전자 서열은 Clustal X 프로그램을 사용하여 인간과 돼지 유전자의 alignment를 진행하여 homology 분석을 진행하였다. 그림 3, 4, 5에는 alignment 결과를 나타내었고 결과 중 일부만 표기하였다.



< 3. Alignment of DC-SIGN nucleotide sequences >



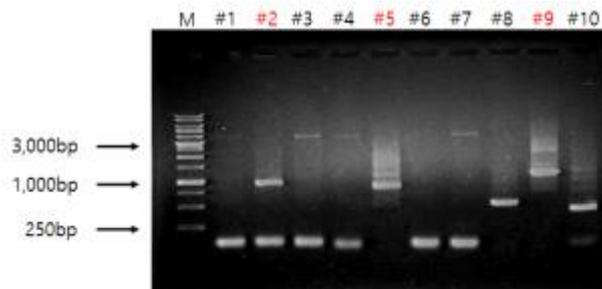
- ④ Homology 분석 결과 DC-SIGN은 61%, Mannose receptor는 87%, TIM-1은 64%의 homology를 보임을 확인하였다.
- ⑤ 위의 결과로 DC-SIGN과 TIM-1은 낮은 homology를 가지므로 Dengue virus에 대하여 서로 다른 반응을 보일 것으로 예상할 수 있다. Mannose receptor의 경우 비교적 높은 homology를 나타내고 있지만 바이러스 감염 효율의 증가를 위하여 추가 선정하였다.

(다) DC-SIGN 유전자 확보 및 서열 분석

① DC-SIGN variant 3 확보

- ㉠ Human DC-SIGN 유전자를 확보를 위하여 human monocytic cellline인 THP-1 세포로부터 Total RNA를 추출하고 reverse transcription을 통해 cDNA를 합성하였다.

- ㉔ 합성된 cDNA를 주형으로하여 hDC-SIGN 유전자를 증합효소 연쇄반응을 통해 증폭하였다. hDC-SIGN PCR product는 TA-Blunt cloning을 진행하고 colony PCR을 통해 삽입 여부를 확인하였다 (그림 6).



< 6. Colony PCR 결과 >

- ㉕ 삽입된 것으로 생각되는 #5, #9번 colony에서 plasmid DNA를 추출하여 Sequencing 분석을 진행하였다. 진행 결과 #9번 colony의 유전자 서열 분석 결과 transmembrane 부분이 결실되어 있는 형태의 DC-SIGN variant 3번으로 확인되었다 (그림 7).

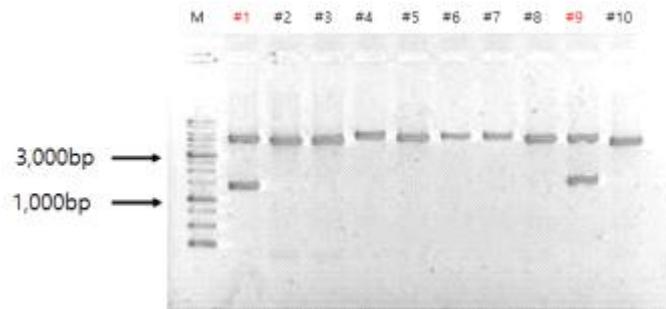


<그림 7. #9번 colony 유전자 서열 분석>

- ㉖ 확보된 DC-SIGN variant 3의 경우 transmembrane domain이 결실되어 있기 때문에 cell surface에 존재하지 못하므로 virus의 entry receptor로의 기능을 못할 것으로 예상되어 hDC-SIGN의 추가 확보를 진행하였다.

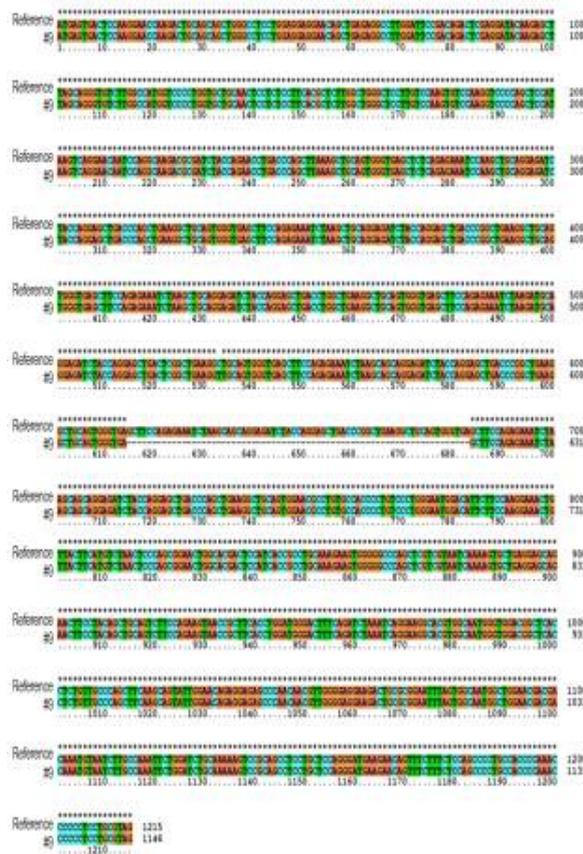
② DC-SIGN variant 1 확보

- ㉠ DC-SIGN variant 1 확보를 위하여 THP-1 세포에 PMA를 처리하여 활성화를 유도하고 활성화된 THP-1 세포로부터 total RNA를 추출하여 cDNA 합성을 진행하였다.
- ㉡ 합성된 cDNA를 주형으로 PCR 진행한 후 PCR product를 TA-Blunt cloning을 진행하였다. 10개의 colony를 선별하여 plasmid DNA를 추출하고 restriction enzyme을 이용하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석을 진행하였다 (그림 8).



< 8. Restriction Fragment Length Polymorphism 분석 >

- ㉢ RFLP 진행 결과 #1번과 #9번 colony에서 삽입이 확인되었고 Sequencing 분석을 추가 진행하였다. 분석 결과 #9번 colony에서 일부 결실이 있는 형태로 확인되었다 (그림 9).



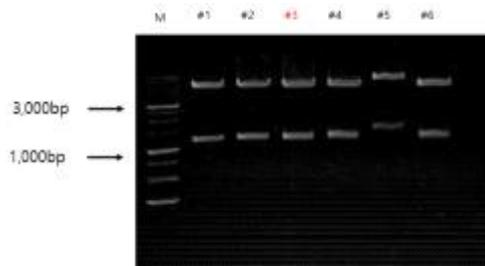
<그림 9. hDC-SIGN 유전자 서열 분석 결과>

㉔ #9번 colony에서 일부 결실이 확인되었으나 결실 부위가 extracellular domain에 위치한 부분이며 virus 결합 부위는 아닌 것으로 확인되어서 세포내 발현 후 기능 검증을 하기로 하였다.

③ 발현 검증

㉕ 확보된 hDC-SIGN 유전자 발현을 위하여 기확보된 유전자 발현 벡터인 pCAG1.1 벡터로 subcloning을 진행하였다.

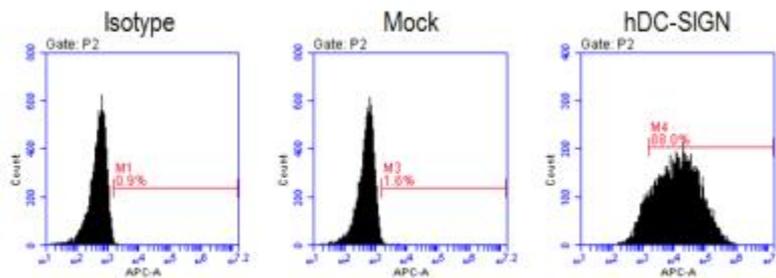
㉖ 총 6개의 colony를 선별하여 plasmid DNA를 추출하고 RFLP 분석을 통하여 벡터 내 삽입 여부를 확인하였다 (그림 10).



< 10. hDC-SIGN/pCAG1.1 벡터 RFLP 분석 결과 >

㉗ #5번을 제외한 모든 colony에서 벡터 내 삽입을 확인하였고 그 중 #3번 colony 유래 DNA를 사용하여 발현 검증을 진행하였다.

㉘ 확보된 hDC-SIGN 발현 벡터를 미니돼지 혈관내피세포주인 MPN3 세포에 transfection 후 유세포 분석을 이용하여 확보된 유전자의 발현 여부를 확인하였다 (그림 11).



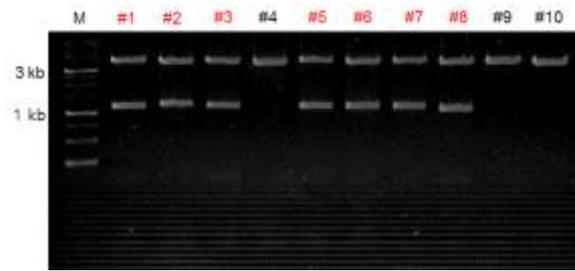
<그림 11. hDC-SIGN 발현 분석 결과 >

㉙ 그림 11에서 보는 바와 같이 확보된 hDC-SIGN/pCAG1.1 발현 벡터를 transfection한 MPN3 세포에서 hDC-SIGN의 발현이 매우 높음을 확인할 수 있었다.

④ hTIM-1 유전자 확보 및 서열 분석

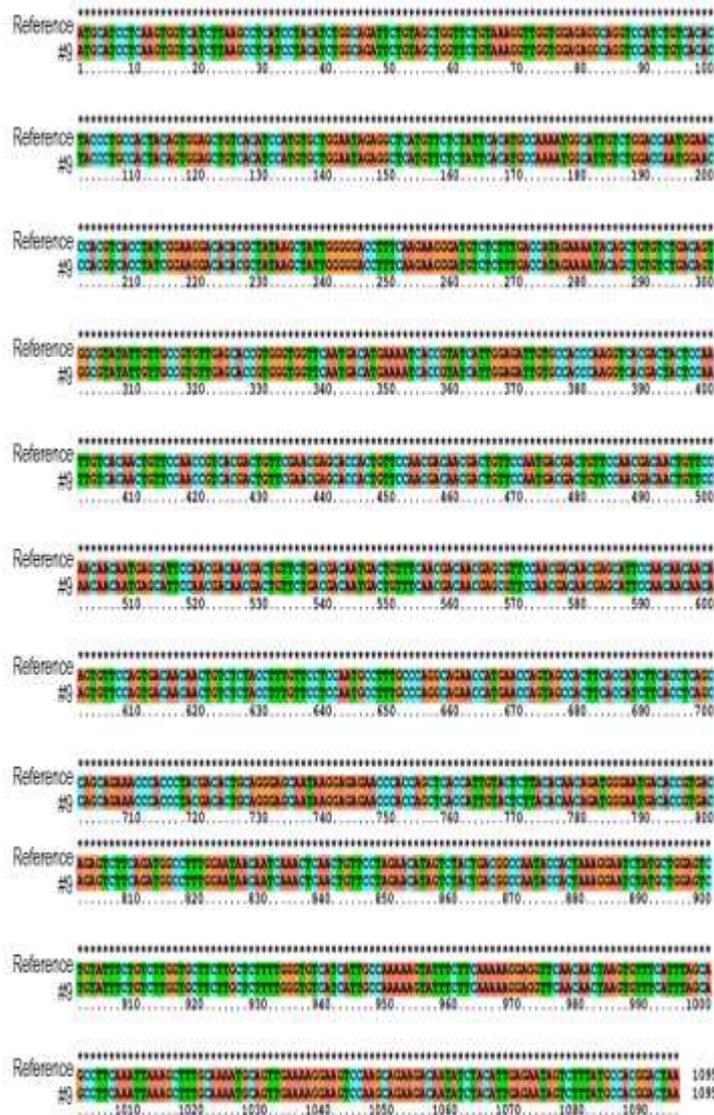
㉚ hTIM-1 유전자를 확보하기 위하여 PMA 처리로 활성화된 THP-1 세포 유래 cDNA를 주형으로하여 PCR을 진행하였다.

㉔ PCR product는 TA-Blunt cloning을 진행하였고 colony 10개를 선별하여 plasmid DNA를 추출하여 RFLP 분석을 통해 삽입 여부를 확인하였다 (그림 12).



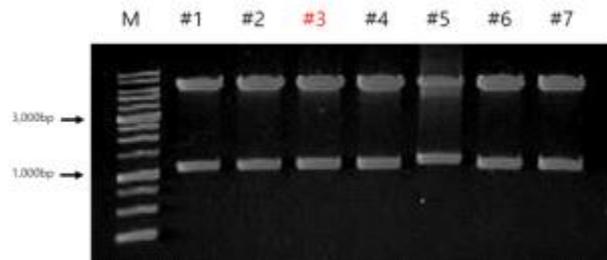
< 12. hTIM-1 RFLP 분석 결과 >

㉕ 선별된 10개 colony 중 #1, #2, #3, #5, #6, #7, #8번 colony는 sequencing 분석을 추가 진행하였다. 분석 결과 #3번 colony가 일치함을 확인하였다 (그림 13).



<그림 13. hTIM-1 유전자 서열 분석 결과>

- ㉔ 유전자 서열이 확인된 #3번 colony로부터 hTIM-1 유전자를 restriction enzyme을 이용하여 확보하고 이를 유전자 발현 벡터인 pCAG1.1 벡터로 subcloning을 진행하였다. 선별된 colony를 RFLP 방법으로 확인한 결과 선별된 모든 colony에서 삽입이 확인되었다. 이 중 #3번 colony (hTIM-1/pCAG1.1)를 hTIM-1 발현 세포주 확립에 사용하기 위하여 Midi-prep을 진행하여 벡터를 확보하였다 (그림 14).

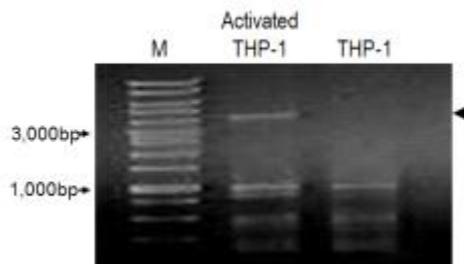


< 14. hTIM-1 RFLP 분석 결과 >

- ㉕ 확보된 벡터를 이용하여 hTIM-1 발현 검증을 진행 중이며 발현이 확인되는대로 hTIM-1 발현 세포주 제작을 진행할 예정이다.

⑤ hMannose receptor 유전자 확보 및 서열 분석

- ㉖ hMannose receptor 유전자는 주로 macrophage에서 발현하는 receptor로 알려져 있으며 이를 확보하기 위하여 PMA 처리로 활성화된 THP-1 세포 유래 cDNA를 주형으로 PCR을 진행하였다 (그림 15).



<그림 15. hMannose receptor PCR 결과 >

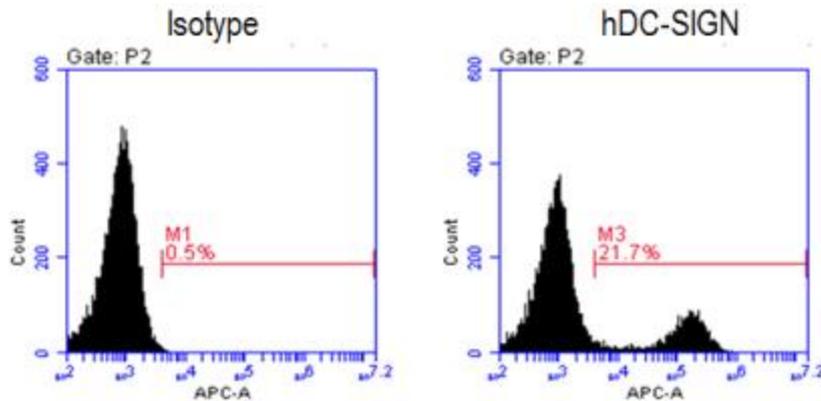
- ㉗ hMannose receptor의 경우 CDS의 크기 (4,371 bp)가 매우 큰 편이기 때문에 cloning 진행이 어렵기 때문에 다양한 접근 방법으로 cloning 진행 중이다.

(3) 헵기열 바이러스 수용체 유전자 발현 체세포주 3종이상 작성

(가) hDC-SIGN 발현 세포주

- ① hDC-SIGN 발현 세포주를 확립하기 위하여 확보된 hDC-SIGN 발현 벡터 (hDC-SIGN/pCAG1.1)를 primary fetal fibroblast에 electroporation 방법으로 도입하였다.

- ② 발현 벡터 도입 후 Antibiotics (G418)를 2주간 처리하여 hDC-SIGN 발현 세포주를 선별하였다. Antibiotics 선별 과정을 거친 세포를 배양하여 동결 보관하고 일부 세포는 유세포 분석을 통하여 hDC-SIGN 발현 여부를 확인하였다 (그림 16).



< 15. hDC-SIGN 발현 세포주의 hDC-SIGN 발현 검증 >

- ③ hDC-SIGN 발현 세포주의 비율을 높이기 위하여 Microbead를 이용한 cell sorting을 진행할 예정이다.
- (4) 외래유전자의 돼지유전체 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인
 (가) 뎅기열 수용체가 발현되는 체세포주가 확립 되는대로 검증
- (5) 뎅기열 바이러스 수용체 발현 세포주에서 뎅기열 감수성 여부 판정
 (가) 뎅기열 수용체가 발현되는 체세포주가 확립되는대로 검증
- (6) 지속배양을 통해 Vero E6 적응도를 높여 확보중인 바이러스의 역가를 최대화
 (가) 5% FBS, Antibiotics, L-Glutamine 포함 DMEM 배지를 사용하여 Vero E6 세포를 배양하고 바이러스 접종 24시간 전에 105cells/ml로 subculture하여 접종 당일 80-90% monolayer가 형성될 수 있도록 함
 (나) Virus stock은 37°C water bath에서 신속히 녹여 준비하고 접종 농도는 실험 목적에 맞게 0.1 ~ 0.001 m.o.i (바이러스 농도/세포 농도) 정도로 FBS가 포함되지 않은 배지로 희석함
 (다) 세포 표면에 충분히 분포할 수 있도록 접종량을 정하고 (T25당 1ml 정도), 37°C 인큐베이터에서 2시간동안 배양 진행함
 (라) 접종이 끝나면 2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하며, 4-5일 경 세포변성효과(CPE)를 관찰함. (4-7일 배양)

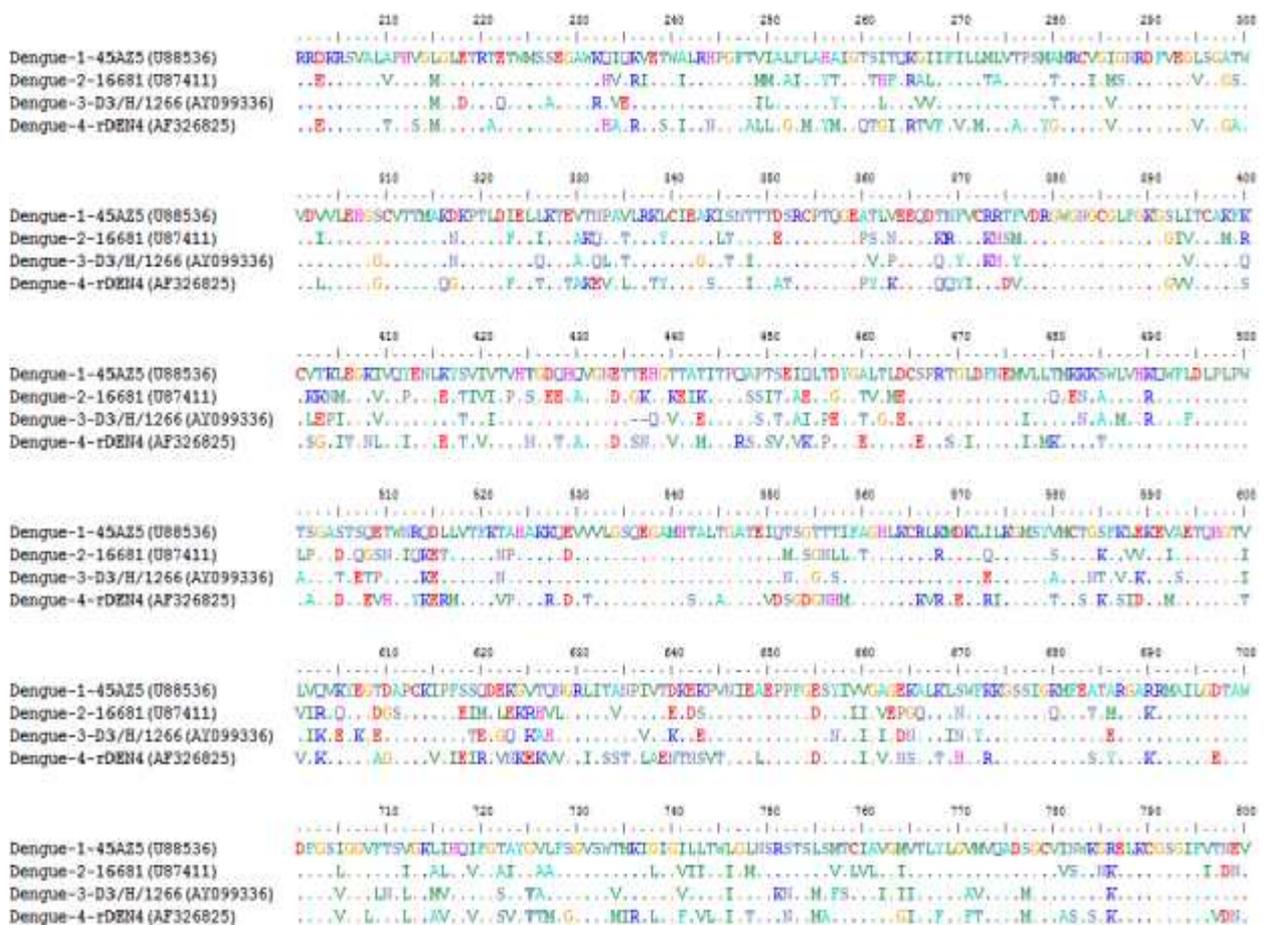
| 혈청형 | Strain | 바이러스 역가 | 비고 |
|----------|---------|----------------------------------|-------|
| Dengue 2 | KUMC-29 | 2 x 10 ^{4.75} TCID50/ml | P1 진행 |
| Dengue 3 | KUMC-30 | 2 x 10 ^{3.75} TCID50/ml | P3 완료 |
| Dengue 4 | KUMC-31 | 2 x 10 ⁵ TCID50/ml | P1 진행 |

(마) 프라이머 최적화 선정을 위한 대조군 프라이머를 이용한 realtime RT-PCR평가

| Name | Sequence (5'-3') | Position | Tm |
|-----------|--------------------------------|-------------|------|
| DENV_F | GCATATTGACGCTGGGARAGAC | 10632-10653 | 59.7 |
| DENV_R1-3 | TTCTGTGCCTGGAATGATGCTG | 10674-10695 | 63.1 |
| DENV_R4 | YTCTGTGCCTGGATWGATGTTG | 10674-10695 | 63.1 |
| DENV_P | 6FAM-CAGAGATCCTGCTGTC-MGB(NFQ) | 10654-10669 | 67.0 |

(바) 뎅기바이러스 혈청형에 따른 유전자서열 정보를 Clustal Omega V를 이용하여 alignment 수행결과 혈청형 1,2,3,4의 Envelope부위는 62.8-69.5% 상동성을 갖으며,

혈청형 1,2,3,4의 Envelope부위 alignment



한국형 혈청형 2의 뎅기 reference 타입과의 상동성 (92%)



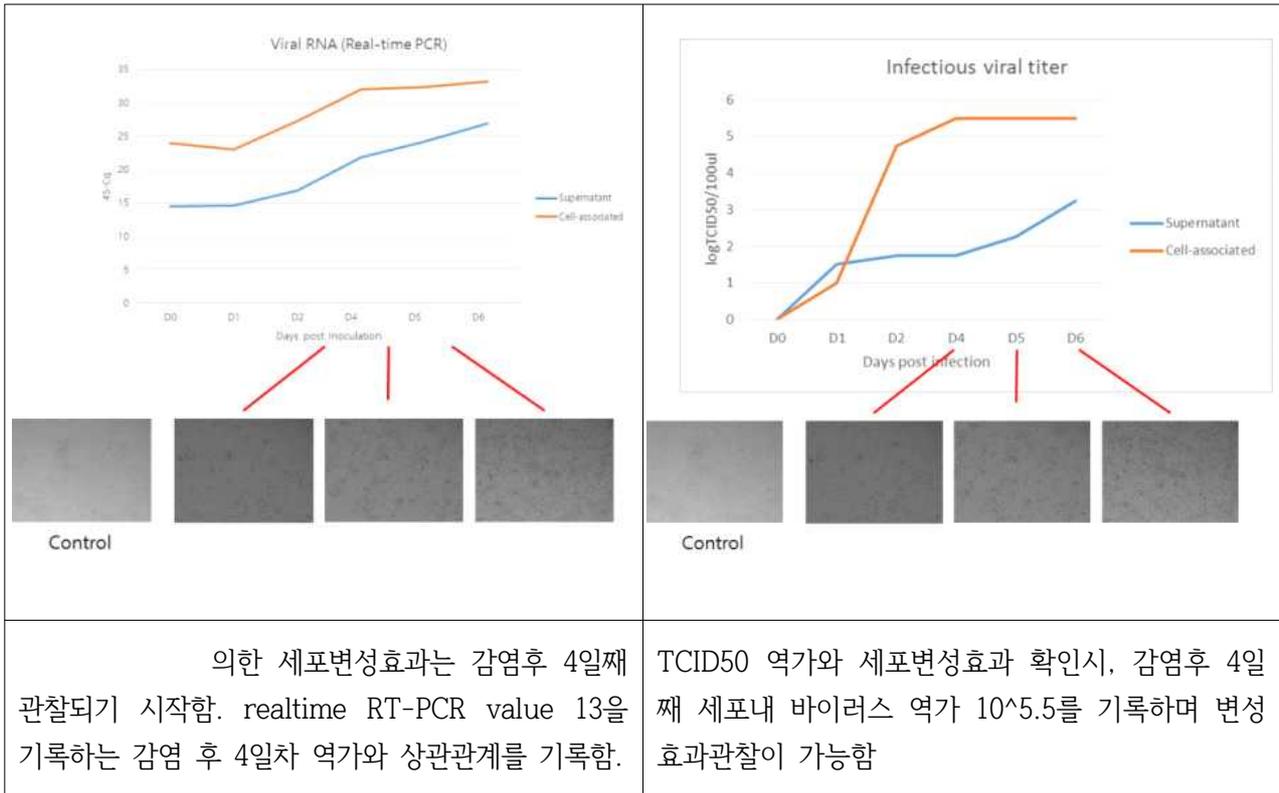
한국형 혈청형 3의 멩기 reference 타입과의 상동성(93.8%)



한국형 혈청형 3의 멩기 reference 타입과의 상동성(94.3%)



(사) 바이러스 배양액과 세포내 바이러스 realtime RT-PCR역가와 TCID50 및 세포변성효과간의 상관관계 규명.



2. 2

가. 당해년도 연구결과

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|--|--|---|--|
| 2차 년도 (2017) | 덴기열 백신개발을 위한 덴기열 감수성 돼지모델 구축 | <p>덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 공여세포로 이용한 복제 수정란 제작</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 덴기열바이러스 수용체 발현 세포주 추가 확보 - 복제수정란 생산 및 체외발달을 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도 기확보된 hDC-SIGN과 hTIM-1 이외에 추가로 hCD300a 유전자 확보 및 발현백터 제작 - hMannose receptor 발현 백터 검증 및 백터확립 진행 - 3종의 공여세포주 확립 (hDC-SIGN, hTIM-1, hCD300a) 및 발현확인 - 3종의 세포주를 각각 공여세포로 사용하여 체세포 핵이식기법으로 복제수정란 제작 - 복제수정란 체외배양시 발달상의 유해한 결과는 나타나지 않고 정상수준의 배반포 발달율을 보임. |
| | | <p>복제수정란에서 외래유전자의 삽입 및 형질전환 여부 검증</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 복제수정란 체외발달을 통해 배반포까지 성장한 배아를 회수하여 유전자 발현여부 평가 - 복제수정란 생산 효율 검증 | <ul style="list-style-type: none"> - 공여세포주에서 발현되는 유전자별로 복제수정란에서도 정상적으로 발현이 되고있음을 확인 - 제작된 공여세포주별로 정상적인 배반포 발달율을 나타내었음. (38.6%, 56.5%, 36.0%) - 복제수정란의 배반포 총세포수도 정상수치를 나타내어 수정란의 질적인 quality 도 이상없음을 나타냄. |
| | | <p>복제 수정란의 대리모 이식 후 임신 여부 평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 복제수정란의 대리모 난관내 이식 - 대리모에서 초기임신여부확인 - 임신기간 모니터링 | <ul style="list-style-type: none"> - 복제수정란을 이식한 4두의 대리모로부터 hDC-SIGN 발현 형질전환 복제 돼지 산자 19두 생산 - 복제수정란을 이식한 2두의 대리모로부터 hTIM-1 발현 형질전환 복제 돼지 산자 6두 생산 - 복제수정란을 이식한 2두의 대리모로부터 hCD300a 발현 형질전환 복제 돼지 산자 10두 생산 |
| | | <p>임신한 대리모의 자궁적출술 등을 이용한 덴기열 바이러스 수용체 발현 복제돼지 생산</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 임신 114일째에 대리모 제왕절개 수술 및 자연분만을 통한 복제돼지 생산 - 복제돼지 산자 초기 생존율 모니터링 | <ul style="list-style-type: none"> - 6두의 대리모가 분만에 성공. - 총 25두의 산자를 생산하였고, 초기폐사율이 높은 생후 3주일(포유기)을 넘긴 14두가 생존에 성공 |

| | | | | |
|-----------------------------|--|--|--|---|
| | | <p>산자에서 외래유전자의 돼지 유전체 삽입 확인 및 mRNA/단백질 발현 확인</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 산자의 귀 또는 꼬리조직을 확보하여 체세포주 확립 - 확립된 체세포주에서 DNA를 확보하여 외래 유전자 삽입 확인 - 확립된 체세포주의 mRNA 또는 단백질을 분리하여 발현 여부 확인 | <ul style="list-style-type: none"> - 초기생존에 성공한 복제돼지 산자로부터 귀 또는 꼬리조직을 채취하여 체세포를 확보함. - hDC-SIGN 발현 형질전환 복제 돼지 산자 14두 중 세포 확보 가능한 8두 분석 결과 모든 개체에서 hDC-SIGN 발현 확인 - hTIM-1 발현 형질전환 복제 돼지 산자 4두 중 세포 확보 가능한 3두 분석 결과 모든 개체에서 hTIM-1 발현 확인 |
| | | <p>복제돼지의 세포수준에서 뎅기열 감수성 여부 판정 (In vitro 분석)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 복제돼지의 체세포주를 확립하여 실험실내에서 뎅기열 바이러스 감염후 감염 역가를 측정하여 감수성 여부 판단 | <ul style="list-style-type: none"> - 감수성 여부 연구진행중 |
| <p>뎅기열 바이러스 모델동물 유효성 검증</p> | | <p>뎅기바이러스 in-vitro 감염 동력학 규명</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 뎅기바이러스 수용체 발현 세포주 (hTIM-1, DC-SIGN) 세포 감염능 평가 및 Vero cell에서의 감염 동력학 규명 | <ul style="list-style-type: none"> - hTIM, DC-SIGN 및 발현 세포주에서 type2 DENV 증식이 가장 높은 수치를 기록함 |
| | | <p>곤충세포 발현계를 이용한 유용 재조합 단백질 발현 및 생산 시스템을 구축</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 곤충세포 발현계를 이용한 뎅기바이러스 pr 재조합 단백질 생산 | <ul style="list-style-type: none"> - 뎅기바이러스 pr amino acid 1-86 부위를 곤충세포 발현계에서 생산 |
| | | <p>뎅기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 변형 돼지 유효성 평가</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 뎅기바이러스 수용체 hTIM-1 및 DC-SIGN 발현 유전자 변형 돼지 감염 평가 | <ul style="list-style-type: none"> - 뎅기바이러스 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml 역가로 경피접종하여 임상증상 및 viremia 관찰중 |

나. 세부적인 당해년도 연구결과 및 내용

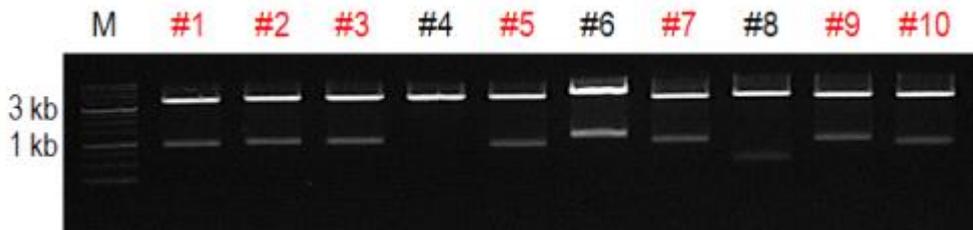
(1) 뎅기열 바이러스 수용체를 발현토록 하는 유전자 벡터 시스템 개발

(가) Human CD300a 유전자 확보 및 서열 분석

① Human CD300a 유전자 확보

㉠ 1차년도 기확보한 human DC-SIGN, TIM-1 이외에 추가로 human CD300a 유전자를 확보하였음.

㉡ Human CD300a 유전자 확보를 위하여 human PBMC 유래 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 진행한 후 PCR product를 TA-Blunt cloning을 진행하였음. TA-Blunt cloning 후 restriction enzyme을 이용하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석을 진행하였음 (그림 1).

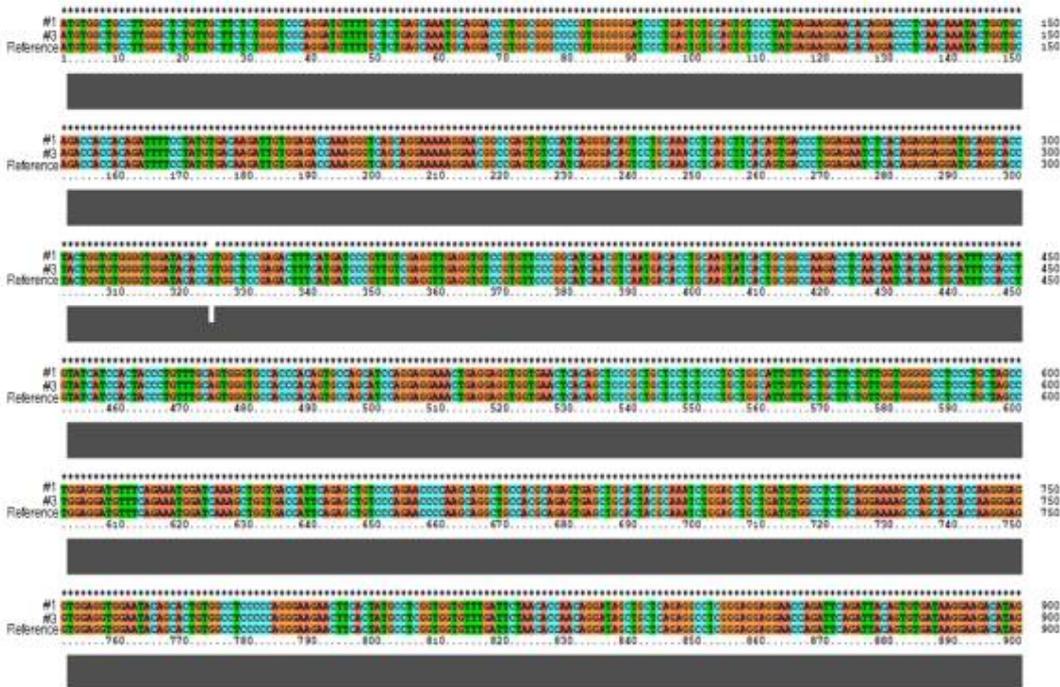


<그림 1. RFLP 확인>

- #1, #2, #3, #5, #7, #9, #10 colony는 nucleotide sequencing 분석을 추가 진행하였음.

② Human CD300a 서열 분석

㉠ Sequencing 분석을 진행한 결과 #1, #3 colony에서 hCD300a 유전자를 확인하였음.

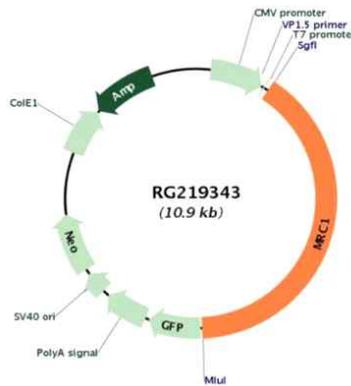


<그림 2. Human CD300a nucleotides 서열 분석 결과>

(나) Human Mannose receptor (hCD206) 유전자 확보 및 발현 벡터 확인

① Human mannose receptor (hCD206) 유전자 확보

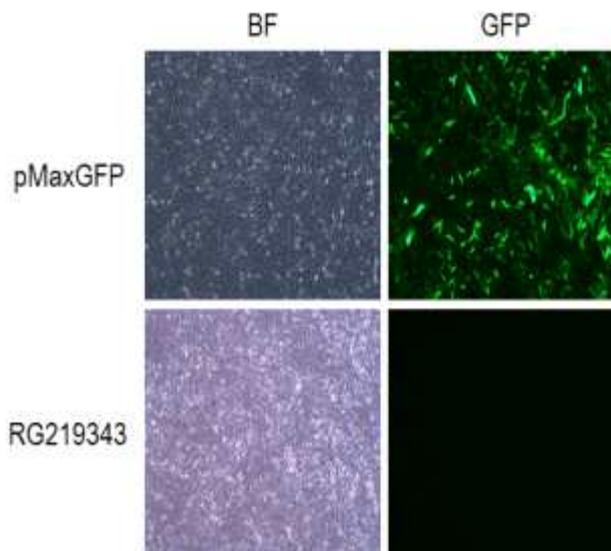
- ㉠ 1차년도에 PMA 처리를 통해 activation된 THP-1 세포 유래 cDNA를 주형으로 PCR을 진행하여 human Mannose receptor의 CDS로 예상되는 size (4.3 kb)의 PCR product 확인하였음.
- ㉡ 예상되는 사이즈의 PCR product를 expression vector (pCAG1.1, 6.3 kb)로 cloning을 시도하였으나 Mannose receptor CDS의 size가 커서 cloning 진행이 어려움.
- ㉢ OriGene사의 Human Mannose receptor, C type 1-GFP tagged plasmid vector (RG219343, 그림 3)를 구입하여 발현 확인을 진행하였음.



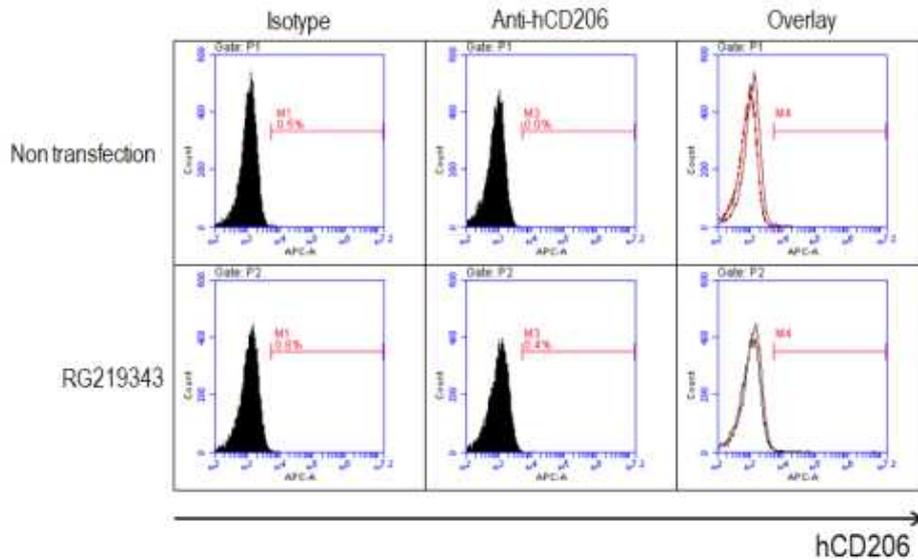
<그림 3. GFP tagged hMannose receptor expression vector map>

② hMannose receptor (hCD206) expression vector (RG219343) 발현 확인

- ㉠ GFP tagged hMannose receptor expression vector (RG219343)를 돼지 일차 섬유아세포에 전기 천공법으로 도입 후 GFP와 hMannose receptor의 발현을 각각 형광현미경 (그림 4)과 유세포 분석 (그림 5)으로 확인하였음.



<그림 4. GFP tagged hMannose receptor 벡터 도입 후 GFP 발현 확인>



<그림 5. GFP tagged hMannose receptor 벡터 도입 후 hMannose receptor 발현 확인>

㉔ 형광 현미경과 유세포 분석 결과 hMannose receptor 발현에 문제가 있는 것으로 파악되어 현재 발현 벡터를 변경하는 Subcloning 진행 중임.

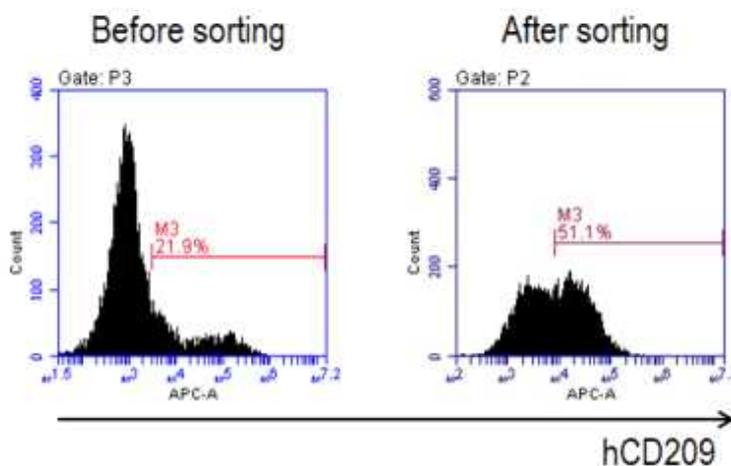
(2) 령기열 바이러스 수용체 유전자 발현 체세포주 작성

(가) Human DC-SIGN (CD209) 발현 세포주

① hDC-SIGN positive cell sorting

㉔ 1차년도 진행하였던 hDC-SIGN 발현 세포주의 hDC-SIGN 발현 비율을 높이기 위하여 추가 세포주 확립을 진행하였음.

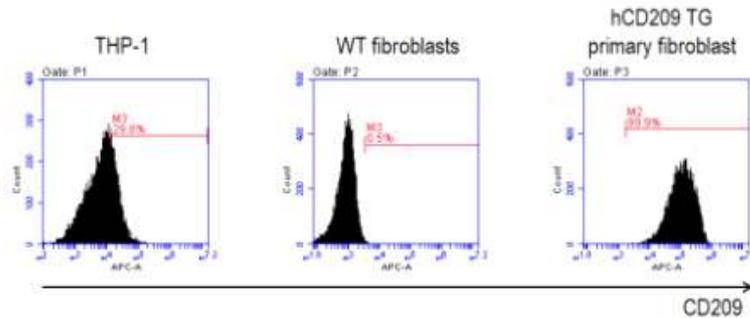
㉔ hDC-SIGN 발현 비율을 높이기 위하여 Microbead를 이용하여 cell sorting을 진행하고 sorting된 세포에서 hDC-SIGN의 발현율을 확인하였음 (그림 6).



<그림 6. Microbeads를 이용한 cell sorting 전후 CD209 발현>

㉔ 그림 6에서 보는 바와 같이 Cell sorting 이후 hDC-SIGN 발현 비율이 2배 이상 증가하였음을 확인하였음.

- ㉔ 발현 비율이 증가된 것을 확인하였지만 더 높은 발현을 확보하기 위하여 이식 후 fetus를 회수하여 일차 섬유아세포 (primary fetal fibroblast)를 확보하기로 함.
- ② hDC-SIGN 발현 일차 태아섬유아세포 확보
 - ㉔ hDC-SIGN positive cell sorting하여 확보된 세포주를 체세포 핵이식 기법 (SCNT)을 이용하여 수정란을 제작 후 대리모에 이식하였음.
 - ㉔ 임신진단 후 Fetus를 회수하여 태아섬유아세포를 확보하여 hDC-SIGN의 발현을 확인함(그림 7).

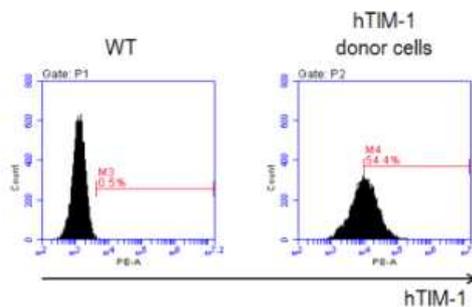


<그림 7. 일차 태아섬유아세포의 hDC-SIGN 발현 확인>

- ㉔ 그림 7에서 보는바와 같이 모든 세포에서 hDC-SIGN이 발현하고 있음을 확인하였고 확보된 일차 태아 섬유아세포를 이후 hDC-SIGN 발현 형질전환 돼지 생산에 사용하였음.

(나) Human TIM-1 발현 세포주

- ① hTIM-1 발현 벡터 세포 내 도입 및 항생제 선별
 - ㉔ hTIM-1 발현 세포주를 확립하기 위하여 1차년도에 확보된 hTIM-1 발현 벡터 (hTIM-1/pCAG1.1)를 일차 섬유아세포에 전기천공법 (electroporation)으로 도입하였음.
 - ㉔ hTIM-1 발현 벡터 도입 후 항생제 (Antibiotics; G418)를 2주간 처리하여 hTIM-1 발현 세포주를 선별하였음. 항생제 선별 과정을 거친 세포를 배양하여 동결 보관하고 일부 세포는 유세포 분석을 이용하여 hTIM-1 발현 여부를 확인하였음 (그림 8).



<그림 8. 확립된 세포주에서의 hTIM-1 발현 확인>

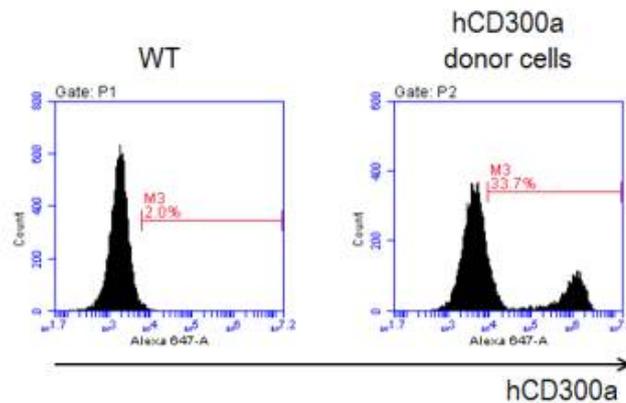
- ㉔ 발현 확인된 세포주를 공여 세포로 사용하여 체세포 핵이식을 진행하였음.

(다) Human CD300a 발현 세포주

① hCD300a 발현 벡터 세포내 도입 및 항생제 선별

㉠ hCD300a 발현 세포주를 확립하기 위하여 새롭게 확보된 hCD300a 발현 벡터 (hCD300a/pCAG1.1)를 일차 섬유아세포에 전기천공법 (electroporation)으로 도입하였음.

㉡ hCD300a 발현 벡터 도입 후 항생제 (Antibiotics; G418)를 2주간 처리하여 hCD300a 발현 세포주를 선별하였음. 항생제 선별 과정을 거친 세포를 배양하여 동결 보관하고 일부 세포는 유세포 분석을 이용하여 hCD300a 발현 여부를 확인하였음 (그림 9).



<그림 9. 확립된 세포주에서의 hCD300a 발현 확인>

㉢ 발현 확인된 세포주를 공여 세포로 사용하여 체세포 핵이식을 진행하였음.

(3) 뎅기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 공여세포로 이용한 복제 수정란 제작

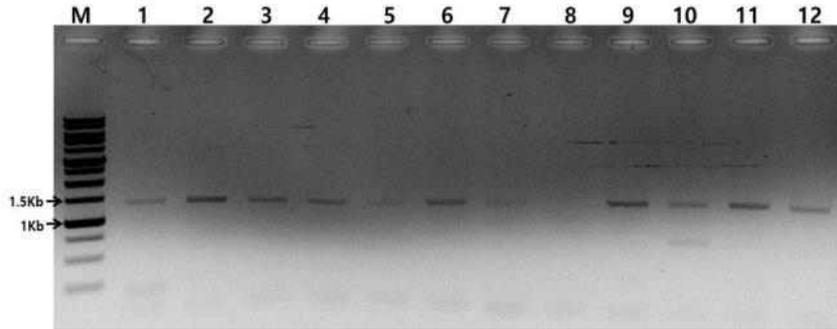
(가) 뎅기열 바이러스 수용체를 발현하는 3종의 세포주를 각각 공여세포로 하여 체세포 핵이식을 진행함. 체세포 핵이식 후 복제수정란 제작현황은 아래 표와 같음.

| 공여세포주 | 배양된 복제수정란 | 초기 난할율 (%) | 배반포형성율 (%) | 배반포 총세포수 (mean) |
|----------|-----------|------------|------------|-----------------|
| hDC-SIGN | 176 | 164 (93.2) | 68 (38.6) | 28.1 |
| hTIM-1 | 69 | 69 (100) | 39 (56.5) | 27.9 |
| hCD300a | 50 | 48 (96.0) | 18 (36.0) | 36.0 |

(나) 위 표에서 확인하듯이 각 공여세포주는 복제수정란 제작시 정상적인 체외발달을 보였고, 초기 난할율 및 배반포 형성율도 정상적인 효율을 보임.

(다) 수정란의 질적인 quality를 평가하는데 유효한 지표인 배반포의 총세포수도 정상적인 수준을 나타내는 것으로 보아 체외발달에 이상이 없는 것으로 판단됨.

(라) 체외발달한 복제수정란의 배반포에서 genomic DNA를 확보하여 외래 유전자의 삽입여부를 확인한 결과 아래 그림과 같이 각각의 단일 배반포에서 DC-SIGN 유전자의 검출이 확인됨.



<체세포 핵이식 유래 단일 배반포에서의 DC-sign 유전자 검출확인>

(4) 텅기열 바이러스 수용체 발현 형질전환 돼지 생산

(가) 기제작된 3종의 공여세포주 (hDC-SIGN, hTIM-1, hCD300a) 를 공여세포주로 하여 체세포 핵이식 실험을 수행하여 복제수정란을 제작하였고, 이를 발정동기화된 대리모의 난관에 외과적 수술법을 활용하여 이식함. 이식현황은 아래 표와 같음.

| 이식세포주 | 이식일 | 대리모 | 이식배아수 | 임신진단 | 분만일 | 분만결과 |
|----------|----------|---------|-------|------|----------|--------------------------|
| hDC-SIGN | 17.03.10 | 122-118 | 235 | O | 17.05.25 | Fetus 회수(1개) |
| | 17.06.08 | 122-4 | 314 | O | 17.09.30 | 6두 분만 (2두 생존, 4두 폐사) |
| | 17.06.16 | 68-135 | 257 | O | 17.10.11 | 8두 분만 (5두 생존, 3두 사산) |
| | 17.04.07 | 124-127 | 353 | X | 재발정 | • |
| | 17.05.25 | 65-144 | 245 | O | 17.09.15 | 5두 분만 (3두 생존, 2두 사산) |
| hTIM-1 | 17.03.24 | 48-118 | 280 | O | 17.07.18 | 4두 분만 (3두 생존, 1두 폐사) |
| | 17.03.24 | 51-56 | 266 | O | 17.07.17 | 2두 분만 (1두 생존, 1두 사산) |
| | 17.03.31 | 126-48 | 264 | X | 재발정 | • |
| hCD300a | 17.09.01 | 142-117 | 291 | O | 유산 | • |
| | 17.09.08 | 36-114 | 261 | O | 18.01.02 | 10두 분만 (9두 생존, 1두 사산) |

<표. 이식현황표>

(나) 이식에 따른 분만현황을 종합하면, 아래 내용과 같음.

| 공여세포주 | 이식 대리모 | 이식 수정란수 | 초기 임신 대리모 (%) | 분만 대리모 (%) | 분만 산자수 |
|----------|--------|---------|---------------|------------|------------|
| hDC-SIGN | 5 | 1,404 | 4 (80) | 4 (80) | 19 (생존 10) |
| hTIM-1 | 3 | 810 | 2 (66.7) | 2 (66.7) | 6 (생존 4) |
| hCD300a | 2 | 552 | 2 (100) | 1 (50%) | 10 (생존 9) |

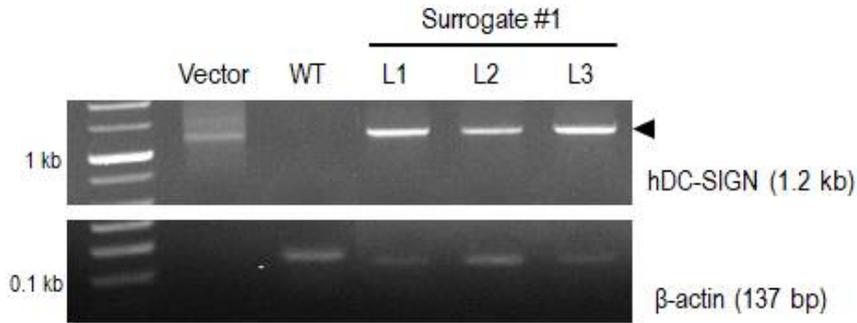
- (다) 각 세포주별로 초기임신율은 60% 이상을 상회하였고, 초기 임신이 확인된 개체는 안정적으로 임신을 유지한뒤 자연분만에 성공함. 종래의 복제동물 생산효율이 10% 미만에, 복제산자의 생산두수도 1~2두에 그치는 것에 비하면, 본 연구의 성과는 생산효율은 총이식두수 10마리중 7마리가 분만에 성공하여 분만을 70%를 기록하였고, 분만산자 총수도 35두로 대리모돈당 평균 5두 이상의 산자를 생산하여 높은 생산효율을 나타냄.
- (라) 임신이 확인되었던 7두의 대리모로부터 총 35두의 복제돼지 (사산 및 초기폐사 12두) 가 생산되었고 그중 23마리가 폐사율이 높은 분만초기를 지나 생존하였음.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>hDC-SIGN 발현 돼지 (2017.09.30. 분만)</p> | <p>hDC-SIGN 발현 돼지 (2017.09.15. 분만)</p> |
|  |  |
| <p>hTIM-1 발현 돼지 (2017.07.18. 분만)</p> | <p>hCD300a 발현 돼지 (2018.01.02. 분만)</p> |

(5) 생산된 덴기열 바이러스 수용체 발현 형질전환 돼지에서의 외래 유전자 발현 확인

(가) Human DC-SIGN (hCD209)

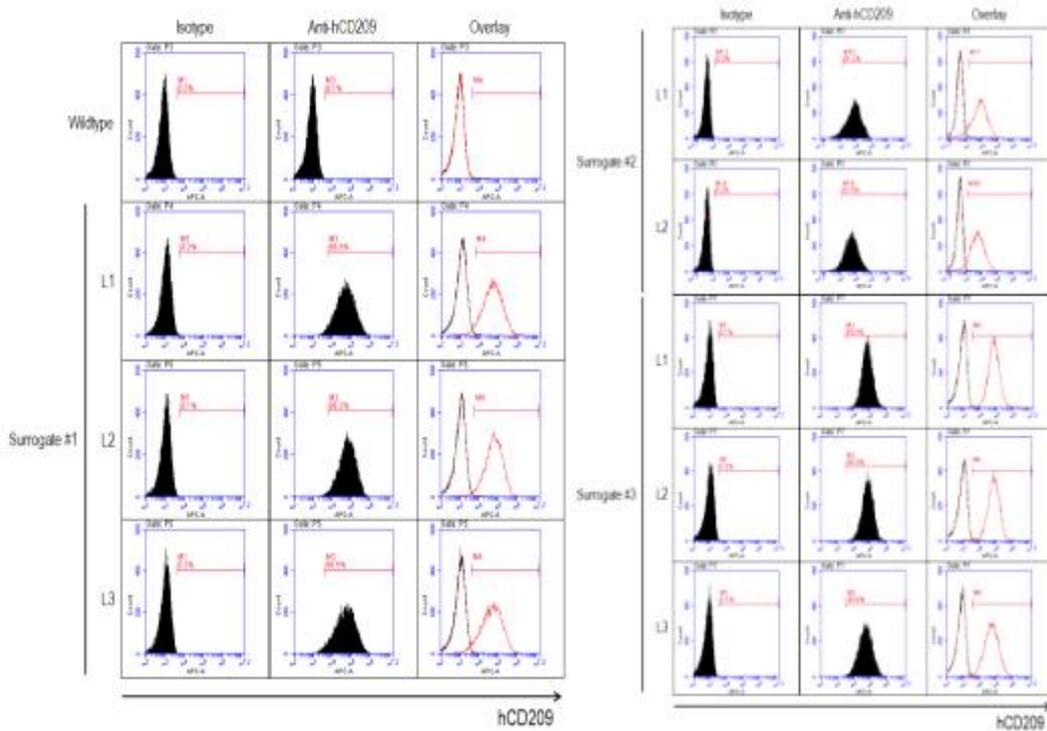
- ① 외래 유전자 (hDC-SIGN)의 돼지 유전체 내 삽입 확인
 - ㉠ Human DC-SIGN 형질전환 돼지는 3두의 대리모 (#1, #2, #3)로부터 14두의 생존 산자가 생산되었음.
 - ㉡ 생산된 14두의 생존 산자 중 #1 대리모 유래 3두에 대해서 genomic DNA를 확보한 후 human DC-SIGN 유전자의 삽입 여부를 PCR을 이용하여 확인하였음 (그림 10).



<그림 10. 생산된 형질전환 돼지에서 human DC-SIGN 유전자 삽입 확인>

② Human DC-SIGN 단백질 발현 확인

- ㉠ 생산된 14두의 생존 산자 중 일차 섬유아세포가 확보된 8두의 형질전환 돼지 일차 섬유아세포를 이용하여 유세포 분석법으로 human DC-SIGN 발현을 확인하였음 (그림 11).

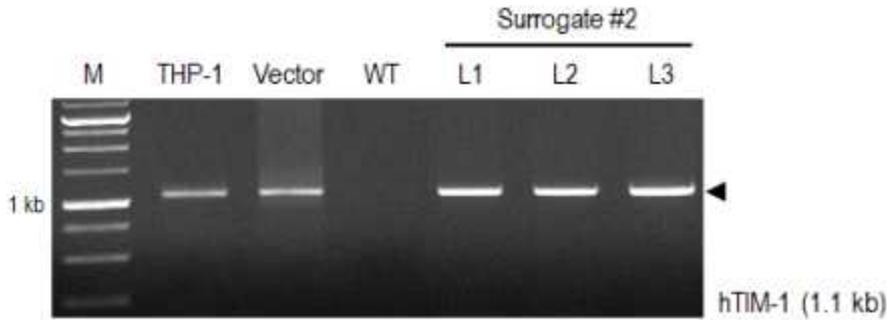


<그림 11. 생산된 형질전환 돼지에서 human DC-SIGN 단백질 발현 확인>

- ㉡ 단백질 발현 확인 진행한 8두 모두 human DC-SIGN의 발현이 확인되었음.

(나) Human TIM-1

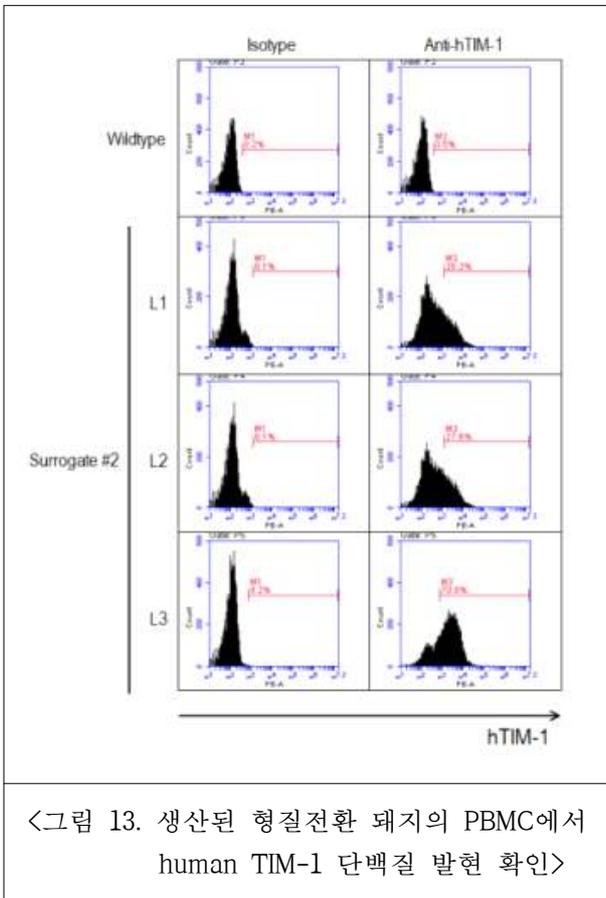
- ① 외래 유전자 (human TIM-1)의 돼지 유전체 내 삽입 확인
 - ㉠ Human TIM-1 형질전환 돼지는 2두의 대리모 (#1, #2)로부터 4두의 생존 산자가 생산되었음.
 - ㉡ 생산된 4두의 생존 산자 중 폐사한 1두 (대리모 #1 유래)를 제외한 3두에 대해서 human TIM-1 유전자의 돼지 유전체 내로의 삽입 여부를 genomic DNA를 주형으로 PCR로 확인하였음 (그림 12).



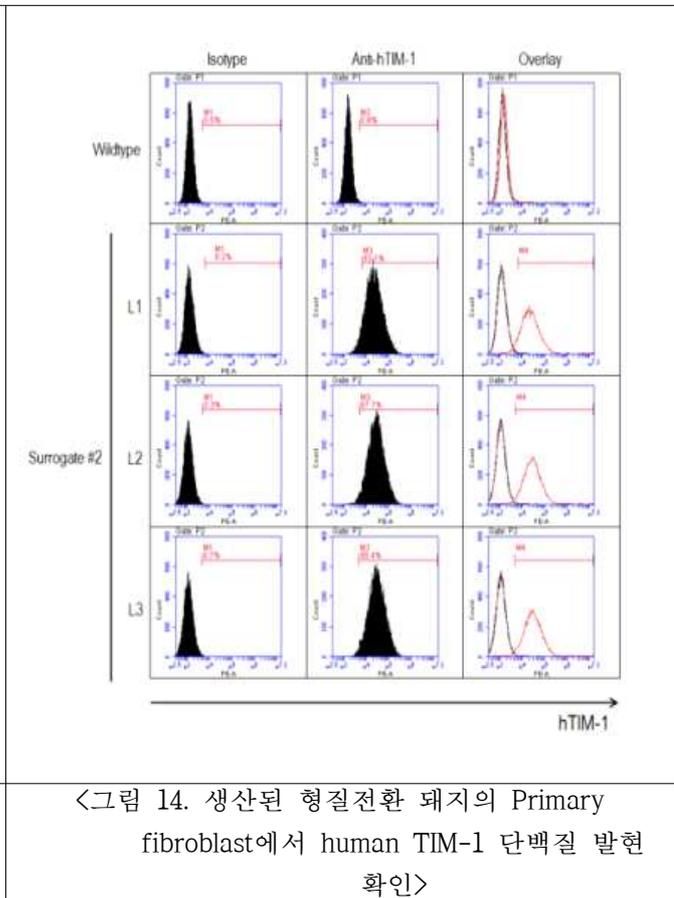
<그림 12. 생산된 형질전환 돼지에서 human TIM-1 유전자 삽입 확인>

② Human TIM-1 단백질 발현 확인

- ㉠ 생산된 4두의 생존 산자 중에서 폐사한 1두 (대리모 #1 유래)를 제외한 3두의 말초혈액 단핵구 (PBMC)와 일차섬유아세포에서 human TIM-1 단백질 발현을 유세포분석법을 이용하여 확인하였음 (그림 13 and 그림 14).



<그림 13. 생산된 형질전환 돼지의 PBMC에서 human TIM-1 단백질 발현 확인>



<그림 14. 생산된 형질전환 돼지의 Primary fibroblast에서 human TIM-1 단백질 발현 확인>

(6) 뎅기바이러스 수용체발현 세포주(hTIM-1, DC-SIGN) 세포 감염능 평가 및 Vero cell에서의 감염 동력학 규명

(가) primary fetal fibroblast에서 hTIM 및 DC-SIGN발현 세포주에서 type2 DENV 증식이 가장 높은 수치를 기록함

(나) wild type fibroblast와 KI fibroblast에서 DNEV type별 감염력 비교

- ① 세포 배양 : Mg16-1, hTIM, hDc-Sign, Vero 세포주를 25T flask에 배양한다.
- ② DENV 접종 : trypsin을 포함하는 infection media와 DENV 분리주(Cq value : 11.27)를 10배, 100배 희석하여 접종한다.
- ③ Realtime PCR : 바이러스 접종 3일 후, 상등액으로부터 바이러스 RNA를 extraction 한 후 Realtime PCR을 진행하여 역가를 통해 감염력을 비교

| Sample Name | Cq | Call | Sample | Cq | Call |
|-------------------------------|-------|----------|------------------------|-------|----------|
| Negative(template=dw) | - | Negative | negative | - | Negative |
| positive | 10.67 | Positive | positive | 11.27 | Positive |
| mg-16 den2 infection1 | 29.97 | Positive | mg16-1 media(negative) | - | Negative |
| mg-16 den2 infection2 | 30.53 | Positive | mg16-1 den 2 1/10 | 30.31 | Positive |
| mg-16 den3 infection1 | 33.53 | Positive | mg16-1 den 3 1/10 | 33.58 | Positive |
| mg-16 den3 infection2 | 34.23 | Positive | mg16-1 den 4 1/10 | - | Negative |
| mg-16 den4 infection | 30.42 | Positive | mg16-1 den2 1/100 | 24.43 | Positive |
| mg-16 infection media only | - | Negative | mg16-1 den3 1/100 | 28.87 | Positive |
| hDC-sign den2 infection1 | 30 | Positive | mg16-1 den4 1/100 | 32.46 | Positive |
| hDC-sign den2 infection2 | 30.98 | Positive | HTIM media(negative) | - | Negative |
| hDC-sign den3 infection1 | 34.75 | Positive | HTIM den2 1/10 | 28.92 | Positive |
| hDC-sign den3 infection2 | 33.4 | Positive | HTIM den3 1/10 | 31.83 | Positive |
| hDC-sign den4 infection | 31.19 | Positive | HTIM den4 1/10 | - | Negative |
| hDC-sign infection media only | - | Negative | HTIM den2 1/100 | 24.92 | Positive |
| Vero adaptive den2 | 16.93 | Positive | HTIM den3 1/100 | 29.09 | Positive |
| Vero adaptive den3 | 20.34 | Positive | HTIM den4 1/100 | - | |
| Vero adaptive den4 | 22.96 | Positive | | | |

- ④ DENV바이러스 type2 경우 Human 수용체인 hTIM, DC-SIGN 발현 세포와 원숭이유래 Vero 세포에서 가장 높은 역가로 증식하고 있음.
- ⑤ 감염에 사용된 DENV type2,3,4 는 Vero세포에서 적응된 바이러스이기 때문에 Vero세포내 증식 역가가 가장 높은 것으로 사료됨. 반면, hTIM, DC-SIGN 발현 세포는 primary cell 기반 이기 때문에 바이러스 적응이 되지 않았으며, 감염에 필요한 trypsin에 취약하여 낮은 역가를 나타내는 것으로 판단됨.
- ⑥ Human 수용체인 hTIM, DC-SIGN 발현 세포간에 비교시 hTIM발현 세포에서의 증식이 더 높은 것으로 관찰됨.

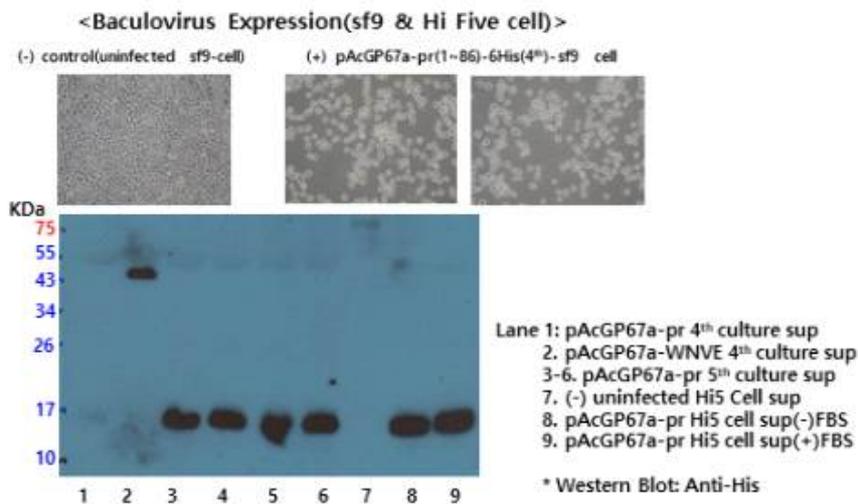
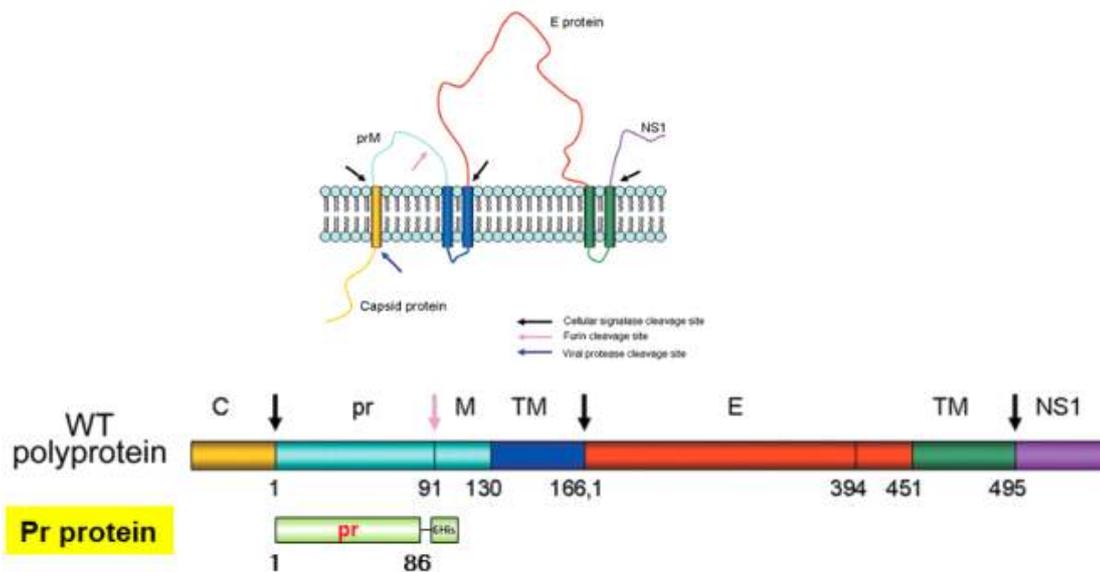
(7) 곤충세포 발현계를 이용한 뎅기바이러스 pr 재조합 단백질 생산

(가) 뎅기 바이러스 (DENV) prM 단백질은 pr과 M 도메인의 두 부분으로 구성되며 DENV E 단백질의 조기 융합 활성을 예방하는 것 외에도 prM은 단백질 - 단백질 상호 작용과 막 - 단백질 상호 작용역할을 하며 DENV 바이러스주기의 필수 구성 요소임.

(나) 감염후 배출되는 바이러스 (미성숙 바이러스)를 타겟하기 위해 prM 단백질중 넓은 부위인 pr 도메인을 타겟하여 진단에 필요한 재조합 항원제작이 필수임.

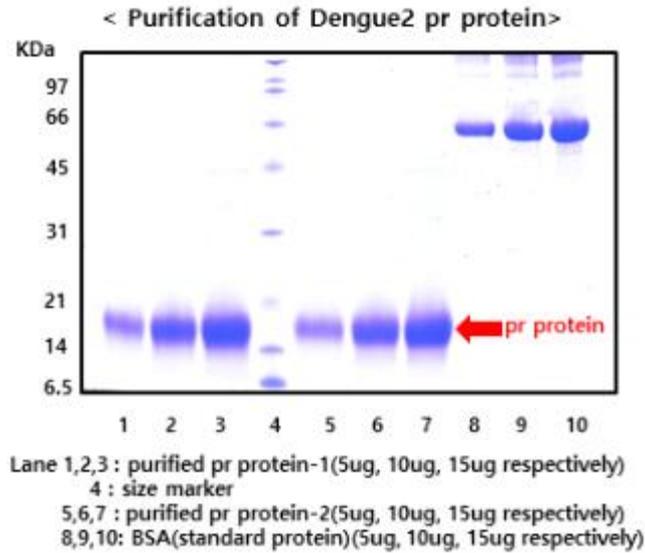
(다) 땡기바이러스 pr amino acid 1~86 부위를 곤충세포 (sf9 세포주)기반 Baculovirus 발현 시스템을 통한 재조합 단백질 발현

- ① 대장균 발현 시스템(pET28a 벡터)을 활용하여 재조합 항원 단백질 발현의 최적화를 바탕으로 고순도 재조합 항원 단백질 정제 최적화 시스템 구축을 수행하였음.
- ② 다양한 범용 백신 타깃 항원을 대장균 발현벡터에 삽입 후 배양함. 세포 배양 후 IPTG를 이용하여 낮은 온도(18도)에서 16~18시간 induction후, 세포를 원심 분리하여 모음. 배양세포 파쇄 후 상층액에 포함된 단백질은 His-tag affinity와 친화크로마토그래피법과 gel filtration chromatography법을 Akta Prime purification system을 이용하여 순도가 높은 단백질 분획을 확보하였음.
- ③ 먼저 His-tag affinity와 친화크로마토그래피(Ni-NTA agarose)법을 이용하여, 순도가 높은 항원을 정제하고, 발현된 단백질은 재조합 단백질 정제법에 가장 많이 사용되고 있는 Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) agarose colume을 사용하였음



[고순도 단백질 백신후보물질 정제 생산 개요]

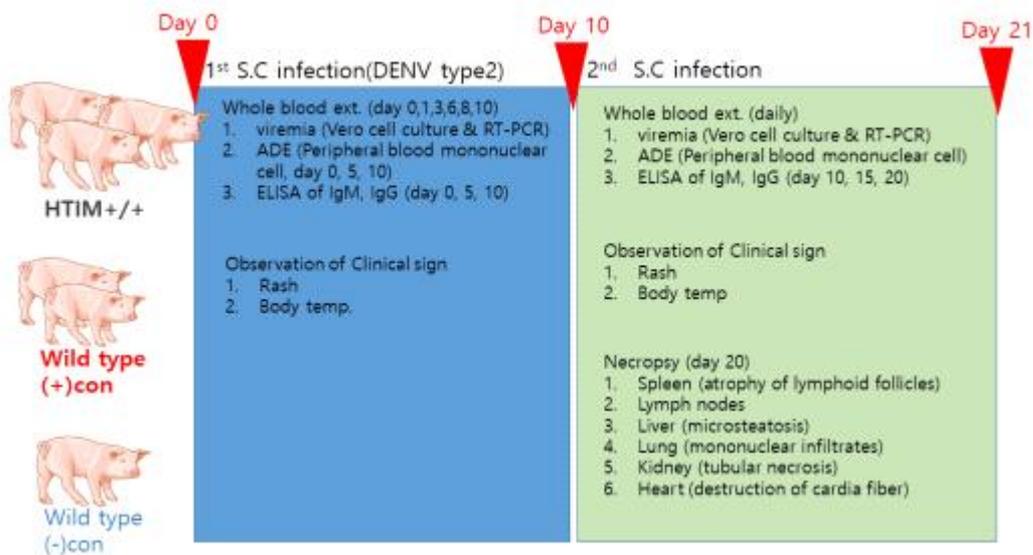
- ④ 정제된 단백질 중 순도가 높은 단백질 분획은 Akta Prime protein purification system (GE Healthcare Life)을 이용하여 고순도 재조합 항원 단백질을 확보함.
- ⑤ 정제된 순도가 높은 재조합 단백질 백신용 항원은 SDS-PAGE와 coomassie blue 염색법을 이용하여 각각의 분획된 정제된 pr 단백질을 육안으로 확인하였음.



[고순도 DENV pr 항원 생산]

- ⑥ 단백질 정량은 bradford assay와 표준 단백질로 알려진 BSA(bovine serum albumin) 단백질을 정제된 단백질을 이용하여 타깃 항원의 정량적인 분석도 수행함
- ⑦ 생산된 pr 단백질은 DENV 감염개체로부터 배출되는 바이러스 진단 및 항체 ELISA법에 활용할 예정임.

(8) 뎅기바이러스 수용체 hTIM 및 DC-SIGN 발현 유전자 변형 돼지 감염 평가
(가) 뎅기바이러스 교차감염 (heterologous infection) $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL 로 피하 or 경피접종하여 임상증상 및 viremia 관찰중



[DENV 수용체 발현 유전자변형 돼지 감염평가 요약]

(나) hTIM 발현 유전자 감염 돼지 관찰

- ① 1차(DENV type 2), 2차(DENV type 3)로 2회 피하접종 수행함
- ② 1차 접종 후 12일차에 2차 접종 수행함
- ③ 접종 전 돼지 건강 상태를 육안으로 확인하였음



[hTIM 발현 유전자 변형 돼지 (1번,2번)]



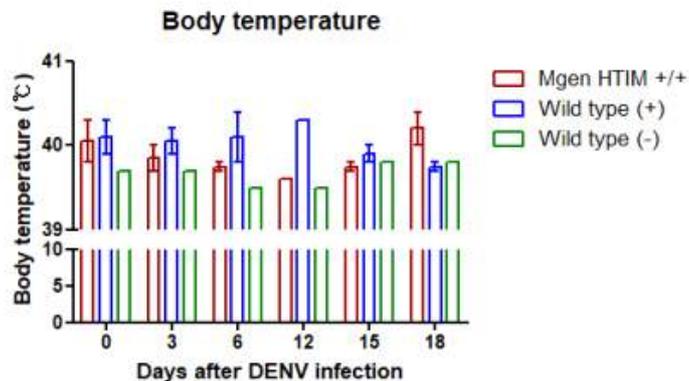
[일반 돼지 : 뎅기바이러스 접종예정 (3번,4번)]

[일반 돼지 (5번)]

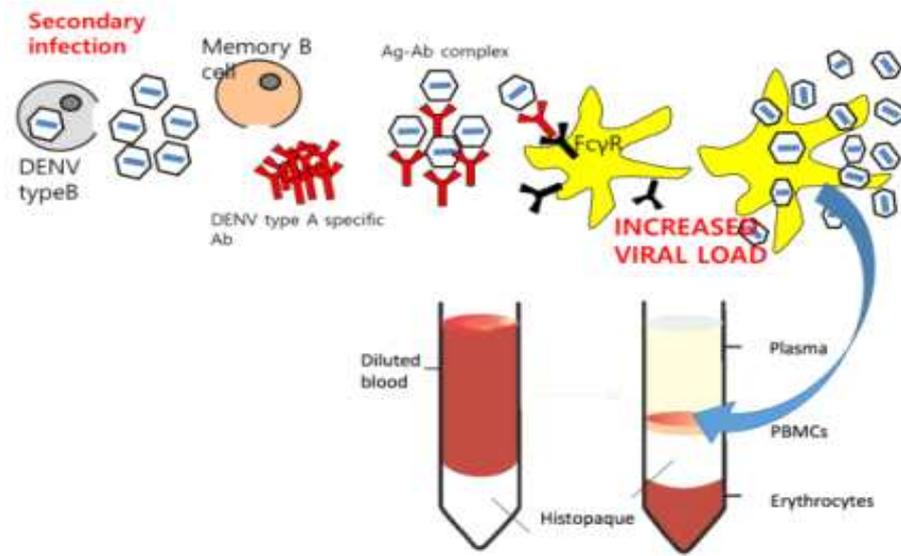
- ④ Day 0, 3, 6, 12, 15, 18에 체온 관찰하였음
- ⑤ 뎅기바이러스 수용체 hTIM 발현 유전자 변형 돼지와 일반 돼지의 체온이 정상범위로 확인됨.

| Group | No. | DPI0 (1차접종) | DPI3 | DPI6 | DPI12 (2차 접종) | DPI15 | DPI18 |
|---------------------|-----|----------------|------|------|------------------|-------|-------|
| hTIM+/+ | 1 | 40.3 | 39.7 | 39.8 | 39.6 | 39.8 | 40.0 |
| | 2 | 39.8 | 40.0 | 39.7 | 39.6 | 39.7 | 40.4 |
| Wild type (+)con | 3 | 40.3 | 40.2 | 40.4 | 40.3 | 40.0 | 39.7 |
| | 4 | 39.9 | 39.9 | 39.8 | 40.3 | 39.8 | 39.8 |
| Wild type (-)con | 5 | 39.7 | 39.7 | 39.5 | 39.5 | 39.8 | 39.8 |

<Body template (°C)>

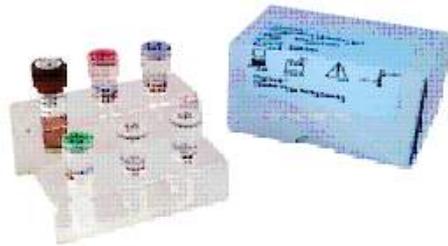


- ⑥ 감염개체로부터 3일 간격으로 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)를 분리하여 DENV가 탐식하는 면역세포에서의 바이러스 증식여부를 확인하고, 혈청을 분리하여 viremia 생성 여부 확인.



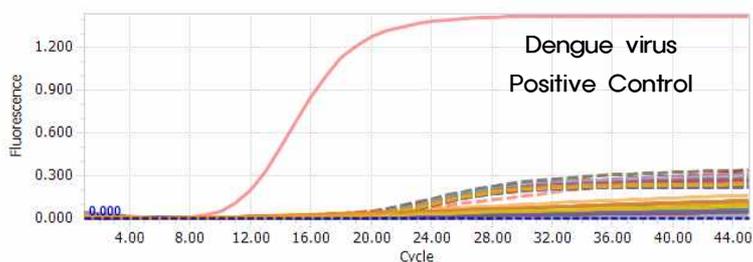
[Peripheral blood mononuclear cell 내에서 증식하는 DENV 분리과정]

- ⑦ 확보된 PBMC와 혈청내 total RNA를 추출하여 Real time PCR을 시행하여 혈청에 뎅기바이러스 존재 여부를 확인.
- ⑧ PerkinElmer chemagic 360 기기의 Viral DNA/RNA 프로토콜을 사용하여 RNA를 추출하였음.
- ⑨ DiaPlexQ™ Dengue Virus Detection Kit (Real-Time OneStep RT-PCR)와 Roche LightCycler96기기를 사용하여 역가를 확인하였음.



[DiaPlexQ™ Dengue Virus Detection Kit]

- ⑩ Real time PCR을 통한 역가 결과 모두 음성으로 확인되었음.
- ⑪ 뎅기바이러스 키트에 함께 포함된 양성 Control은 Cq값 9.95로 신뢰되는 결과임.



<Real time PCR>

<Serum (Cq)>

| Group | No. | DPI0 (1차접종) | DPI3 | DPI6 | DPI12 (2차 접종) | DPI15 | DPI18 | DPI22 |
|---------------------|-----|----------------|------|------|------------------|-------|-------|-------|
| hTIM+/+ | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (+)con | 3 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (-)con | 5 | - | - | - | - | - | - | - |

-: Negative

<PBMC (Cq)>

| Group | No. | DPI0 (1차접종) | DPI6 | DPI12 (2차 접종) | DPI18 | DPI22 |
|---------------------|-----|----------------|------|------------------|-------|-------|
| hTIM+/+ | 1 | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | - |
| Wild type (+)con | 3 | - | - | - | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | - |
| Wild type (-)con | 5 | - | - | - | - | - |

-: Negative

<Organs (Cq)>

| Group | No. | 폐 | 심장 | 신장 | 비장 | 림프절 | 간 |
|---------------------|-----|---|----|----|----|-----|---|
| hTIM+/+ | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (+)con | 3 | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (-)con | 5 | - | - | - | - | - | - |

-: Negative

3. 3차년도

가. 당해년도 연구결과

| 구분 (연도) | 세부 과제명 | 세부연구목표 | 연구개발 수행내용 | 연구결과 |
|--------------------|---|---|--|---|
| 3차 년도 (2018) | 덴기열 백신개발 을 위한 덴기열 감수성 돼지모델 구축 | 덴기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 벡터시스템 또는 선천면역반응 관련 유전자 적중 벡터시스템 개발 | - 타겟으로 하는 외부유전자 발현 벡터 확보 - CRISPR/Cas9 system을 이용한 선천면역반응 관련 유전자 적중 벡터 확보 | - Human PBMC 유래 cDNA로부터 human CLEC5A 유전자 확보 및 서열 확인 완료 - 확보된 CLEC5A 유전자를 CAG 프로모터를 가진 유전자 발현 벡터에 삽입하여 CLEC5A 유전자 발현 벡터 확보 - 선천면역반응 관련 유전자 중 MYD88 과 IFNAR2 유전자의 서열 분석을 통해 target sgRNA 제작 - 제작된 sgRNA를 CRISPR/Cas9 vector에 삽입하여 유전자 적중 벡터 확보 |
| | | 덴기열 바이러스 수용체 발현 세포주 제작 | - 제작된 유전자 발현 벡터를 기확보된 세포주에 도입 후 항생제 선별과정을 통해 수용체가 발현되는 체세포주 확보 | - 제작된 human CLEC5A 유전자 발현 벡터를 기확보된 human DC-SIGN 발현 섬유아세포주에 도입 후 Hygromycin-B selection을 진행하여 세포주를 확보 - 확보된 세포주에서 CLEC5A 발현을 유세포 분석을 통해 확인 |
| | | 선천면역반응 관련 유전자 적중 세포주 제작 | - MYD88 유전자 적중 벡터를 기 확보된 섬유아세포에 도입 후 유전형 분석 - IFNAR2 유전자 적중 벡터를 기 확보된 섬유아세포에 도입 후 유전형 분석 | - MYD88 유전자 적중 벡터를 기확보된 WT 섬유아세포, human DC-SIGN, human TIM-1, human CD300a 발현 세포주에 각각 도입 후 MYD88 유전자 타겟 부위에 대한 유전형 분석 완료 - IFNAR2 유전자 적중 벡터를 기확보된 WT 섬유아세포에 도입 후 IFNAR2 유전자 타겟 부위에 대한 유전형 분석 완료 |
| | | 생산된 형질전환 돼지에서의 덴기열 바이러스 수용체 발현 확인 | - Genomic DNA를 주형으로 PCR을 통한 유전자 삽입 검증 - Real-time PCR을 이용한 mRNA 발현 분석 - 형질전환 돼지 유래 세포를 이용한 단백질 발현 분석 | - Human CD300a 형질전환 돼지 17 두 중 체세포 확보가 가능한 15두에서 human CD300a 유전자 삽입 확인 결과 4두에서 삽입 확인 - 2차년도에서 유전자 삽입이 확인된 human DC-SIG, human TIM-1 형질전환 돼지 유래 세포에서 타겟 유전자의 개체별 발현양 분석 - 3차년도에 생산된 human CD300a 형질전환 돼지 중 단백질 발현이 확인된 3두에서 mRNA 발현양 분석 - 생산된 15두 CD300a 돼지로부터 유래한 세포에서 human CD300a 단백질 발현을 유세포 분석법으로 확인한 결과 유전자 삽입된 4두 중 3두에서 hCD300a 단백질 발현 확인 |
| | | 면역반응 관련 유 | - 선천면역 반응 | - 선천면역 반응에 관련된 MYD88 유전자 |

| | | | | |
|--|----------------------|--|--|--|
| | | 전자 적응 형질 전환 돼지에서의 유전형 및 단백질 발현 분석 | <p>관련 유전자인 MYD88 또는 IFNAR2 유전자 적응 형질전환 돼지에서의 유전형 분석</p> <p>- 선천면역 반응 관련 유전자인 MYD88 유전자 적응 형질전환 돼지에서의 단백질 발현 분석</p> | <p>적응을 시도하여 생산된 15두의 산자 중 세포 확보 가능한 13두에서 유전형 분석 결과 MYD88 유전자의 변형 확인</p> <p>- MYD88 유전자 적응 형질전환 돼지 유래 세포 및 조직에서의 단백질 발현 확인</p> <p>- 선천면역 반응에 관련된 IFNAR2 유전자 적응을 시도하여 생산된 3두의 산자 중 세포 확보 가능한 3두에서 유전형 분석 결과 1두에서 유전자의 변형 확인</p> |
| | | 덴기열 바이러스 수용체를 발현하고 면역반응 관련 유전자가 적응된 형질전환 돼지에서의 유전형 및 단백질 발현 분석 | <p>- Human TIM-1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자가 적응된 형질전환 돼지에서의 유전형 분석</p> <p>- Human TIM-1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자가 적응된 형질전환 돼지에서의 단백질 발현 분석</p> | <p>- Human TIM-1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자를 적응하여 생산된 형질전환 돼지 5두 유래의 세포에서 유전형 분석을 통해 5두 모두 hTIM-1 유전자의 삽입 및 MYD88 유전자의 변형을 확인</p> <p>- 단백질 발현 분석을 통해 MYD88 단백질 발현을 확인</p> |
| | | 생산된 복제돼지의 산자에서 덴기바이러스 감수성 여부 판정 | <p>- 덴기바이러스 수용체 (DC-SIGN, hTIM-1) 발현 유전자 변형돼지 바이러스 감염 평가</p> <p>- 덴기바이러스 수용체 발현 돼지초대세포에서의 감수성 평가</p> | <p>- 덴기바이러스 수용체 (DC-SIGN, hTIM-1) 발현 유전자 변형돼지의 바이러스 접종후 혈액 및 조직을 채취하여 Real time PCR을 통한 역가 결과 모두 음성으로 확인되었음.</p> <p>- 돼지초대세포에서의 감수성 평가결과, hCD300a 수용체 발현 세포주에서의 덴기바이러스 수용체 결합정도가 높음.</p> |
| | 덴기열 바이러스 모델동물 유효성 검증 | 병원성 유발 바이러스의 역가 규명 및 임상 증상 유발여부 판정 | <p>- 병원성 유발 바이러스 역가 규명을 위해 임상 증상을 유발하는 최소역가 수립</p> <p>- 덴기바이러스 접종후 임상증상 발현 여부 판정</p> | <p>- 병원성 유발 바이러스 역가 규명을 위해 다양한 역가에서의 모델동물 임상증상을 유발하는 최소역가 수립</p> <p>- 발열, 출혈성반점, 백혈구 감소증, 혈장유출에 의한 혈소판감소 등 전형적인 덴기열 임상증상을 체크함.</p> |
| | | 덴기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 변형 돼지 유효성 평가 | <p>- 바이러스 배출량의 차이를 확인하기 위해 real time PCR 기법으로 바이러스 배출량 확인</p> | <p>- 바이러스 배출량의 차이를 확인하기 위해 접종 후 3,5,7,9 일에 각 그룹에서 3마리씩 혈액, 타액, urine 등을 샘플링하여 RNA를 추출하여 최적화된 dengue specific primer을 이용한 realtime PCR기법으로 바이러스 배출량 확인</p> |

나. 세부적인 당해년도 연구결과 내용

(1) 령기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 벡터시스템 또는 선천면역반응 관련 유전자 적중 벡터시스템 개발

(가) Human CLEC5A 유전자 발현 벡터 제작 및 Porcine MYD88 유전자 적중 벡터 제작

① Human CLEC5A 유전자 발현 벡터 제작

- ㉠ Human CLEC5A (C-type lectin domain family 5 member A)는 C-type lectin으로 CLEC5A 유전자에 의해 암호화되고 있으며 DENV의 수용체 중 하나로 알려져 있음.
- ㉡ NCBI 및 Ensembl을 통한 서열 분석으로 CLEC5A 유전자 서열을 확인하고 human PBMC 유래 cDNA를 template로 하여 PCR을 통해 CLEC5A 유전자를 확보하였음.
- ㉢ 확보된 유전자는 CAG 프로모터를 가진 유전자 발현 벡터에 삽입하여 CLEC5A 유전자 발현 벡터를 제작하고 Sanger sequencing 분석을 통해 유전자 서열을 확인하였음 (그림 1).

```

Fri Jun 08, 2018 11:04 JST
CLEC5A + smyme.apc from 1 to 589
Alignment to
New DNA-- Matches:589; Mismatches:0; Gaps:0; Unattempted:0
New DNA(1)-- Matches:589; Mismatches:0; Gaps:0; Unattempted:0

          SacI
1>ATGAATGGCCACATGATCTCTGGGCTTATGTGGTAGTGCCTTAAAGTTGTTGGATGACCTTATTTCTACTTATTTCCACAGATTTTA>100
1>GAGCTCATGAACTGGCACATGATCATCTCTGGGCTTATGTGGTAGTGCCTTAAAGTTGTTGGATGACCTTATTTCTACTTATTTCCACAGATTTTA>100
1>GAGCTCATGAACTGGCACATGATCATCTCTGGGCTTATGTGGTAGTGCCTTAAAGTTGTTGGATGACCTTATTTCTACTTATTTCCACAGATTTTA>100

101>ACAAAATACAGATGGTTTCACCCACACAGAGCTATGGACAGTCTCCAGATTTTGGAGCAGTCCCAAGTCCACAGGCTTCATTCACAGAG>200
101>ACAAAATACAGATGGTTTCACCCACACAGAGCTATGGACAGTCTCCAGATTTTGGAGCAGTCCCAAGTCCACAGGCTTCATTCACAGAG>200
101>ACAAAATACAGATGGTTTCACCCACACAGAGCTATGGACAGTCTCCAGATTTTGGAGCAGTCCCAAGTCCACAGGCTTCATTCACAGAG>200

201>GAGCTATGGACAGTCTCCCAAGACTGGGAATTTATCAAGCAGATGTTTTTTCTTATCCACTTCTGATCATCTTGGAAATGAAGCAGGACTTT>300
201>GAGCTATGGACAGTCTCCCAAGACTGGGAATTTATCAAGCAGATGTTTTTTCTTATCCACTTCTGATCATCTTGGAAATGAAGCAGGACTTT>300
201>GAGCTATGGACAGTCTCCCAAGACTGGGAATTTATCAAGCAGATGTTTTTTCTTATCCACTTCTGATCATCTTGGAAATGAAGCAGGACTTT>300

301>TSCAAAAGAAAAGATCCCAATTGGCAATTTCCACACGCCAGAGAACTGAAATTTCTCAGGACATACTGATGCTGGAGATATTTTATGGCTTAA>400
301>TSCAAAAGAAAAGATCCCAATTGGCAATTTCCACACGCCAGAGAACTGAAATTTCTCAGGACATACTGATGCTGGAGATATTTTATGGCTTAA>400
301>TSCAAAAGAAAAGATCCCAATTGGCAATTTCCACACGCCAGAGAACTGAAATTTCTCAGGACATACTGATGCTGGAGATATTTTATGGCTTAA>400

401>TTTACCATCTGTGAGAGAAAAGTGGGTTGGATCAACAATCTGTGTTCAATGGCAATTTTACCAATCAGAAATCAGAAATTCAGCTGTGGACATTGG>500
401>TTTACCATCTGTGAGAGAAAAGTGGGTTGGATCAACAATCTGTGTTCAATGGCAATTTTACCAATCAGAAATCAGAAATTCAGCTGTGGACATTGG>500
401>TTTACCATCTGTGAGAGAAAAGTGGGTTGGATCAACAATCTGTGTTCAATGGCAATTTTACCAATCAGAAATCAGAAATTCAGCTGTGGACATTGG>500

501>CTTACAAAAGCAATTTGATGCTGCATCATGTGACATCAGTTACCGCGGATCTGTGGAGAAATGCAAAATGGAATTTCCAGATATC>589
501>CTTACAAAAGCAATTTGATGCTGCATCATGTGACATCAGTTACCGCGGATCTGTGGAGAAATGCAAAATGGAATTTCCAGATATC>589
501>CTTACAAAAGCAATTTGATGCTGCATCATGTGACATCAGTTACCGCGGATCTGTGGAGAAATGCAAAATGGAATTTCCAGATATC>589
    
```

<그림 1. 제작된 CLEC5A 유전자 발현 벡터에서의 CLEC5A 유전자 서열 확인>

② Porcine MYD88 유전자 적중 벡터 제작

- ㉠ DENV의 감염 효율을 증가시키기 위하여 돼지의 선천면역 관련 유전자 중 바이러스 감염과 관련 있는 MYD88 유전자의 발현을 억제하기로 함.
- ㉡ CRISPR/Cas9 system에 사용할 sgRNA를 제작하기 위하여 서열 분석을 통해 타겟 서열을 확인하고 oligomer 합성으로 sgRNA를 제작하였음.
- ㉢ 제작된 sgRNA는 pCas9-H2Kk vector에 BbsI 제한 효소를 이용하여 삽입 후 Sanger sequencing을 통해 삽입 여부를 확인하고 MYD88 유전자 적중 벡터로 사용하였음 (그림 2).

```

predicted 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
#1 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
#2 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
Colony #3 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
#4 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
#5 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
#6 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>59
pCas9-H2Kk 1>GGAA-GGACGAAACACCGAGGCGACTCGACAGCGCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG>40

```

<그림 2. pCas9-H2Kk vector에서의 MYD88 sgRNA 서열 확인>

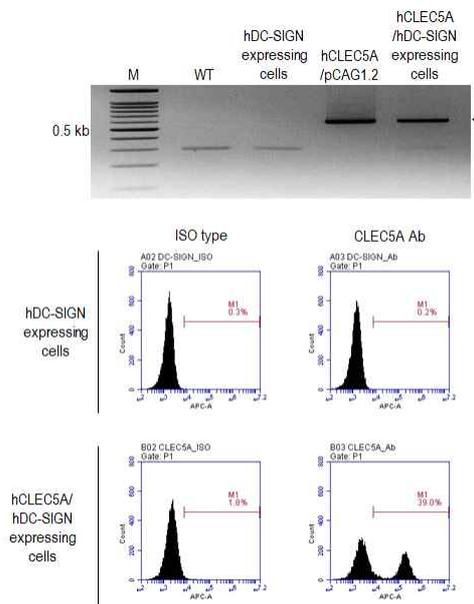
③ Porcine IFNAR2 유전자 적중 벡터 제작

- ㉠ 선천면역반응과 관련된 다른 후보 유전자로 interferon- α/β receptor beta chain을 암호화하는 IFNAR2 유전자를 억제하기로 함.
- ㉡ CRISPR/Cas9 system에 사용할 sgRNA를 제작하기 위하여 서열 분석을 통해 타겟 서열을 확인하고 oligomer 합성으로 sgRNA를 제작하였음.
- ㉢ 제작된 sgRNA는 pCas9-H2Kk vector에 BbsI 제한 효소를 이용하여 삽입 후 Sanger sequencing을 통해 삽입 여부를 확인하고 IFNAR2 유전자 적중 벡터로 사용하였음.

(2) 뎅기열 바이러스 수용체 발현 세포주 제작

(가) Human CLEC5A 발현 세포주 제작

- ① Human CLEC5A 발현 세포주를 확립하기 위하여 확보된 hCLEC5A 발현 벡터 (hCLEC5A/pCAG1.2)를 기확보된 hDC-SIGN 발현 세포주에 electroporation 방법으로 도입하였다.
- ② 발현 벡터 도입 후 Antibiotics (Hygromycin B)를 2주간 처리하여 hCLEC5A 발현 세포주를 선별하였다. Antibiotics 선별 과정을 거친 세포를 배양하여 동결 보관하고 일부 세포는 PCR과 유세포 분석을 통하여 hCLEC5A 유전자 삽입과 발현 여부를 확인하였다 (그림 3).



< 3. hCLEC5A/hDC-SIGN 발현 세포주에서 hCLEC5A 유전자 삽입 및 발현 분석>

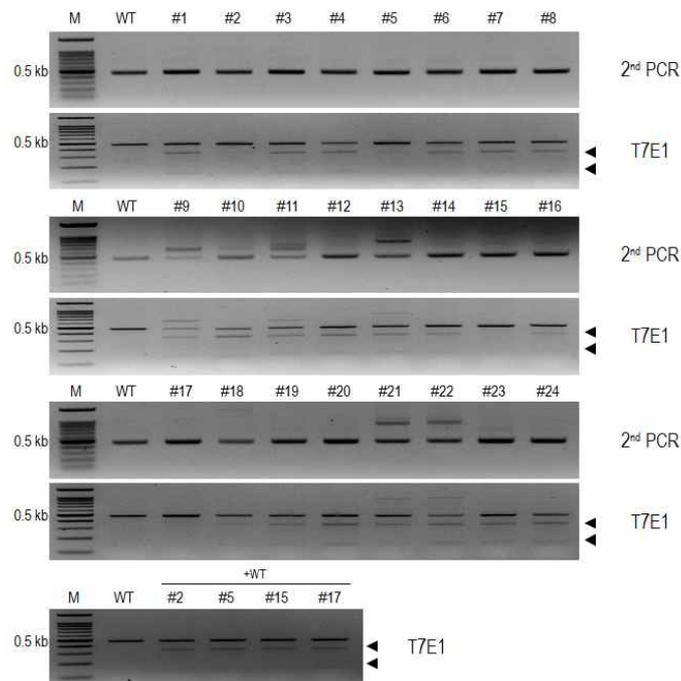
(3) 선천면역반응 관련 유전자 적중 세포주 제작

(가) MYD88 유전자 적중 세포주 제작

① WT 세포 기반 MYD88 유전자 적중 세포주 제작

㉠ 8MYD88 유전자 적중 세포주를 제작하기 위하여 primary fetal fibroblast에 MYD88 유전자 적중 벡터 (pMYD88_sgRNA/Cas9-H2Kk)를 electroporation 방법으로 도입하고 48 시간 후 MACS 방법으로 H2Kk microbead를 이용하여 세포를 선별하였음.

㉡ 선별된 세포에서 single-cell derived colony를 확보하기 위하여 serial dilution 방법으로 배양 후 총 24개의 single-cell derived colony를 확보하여 유전형 분석을 통해 MYD88 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 4).



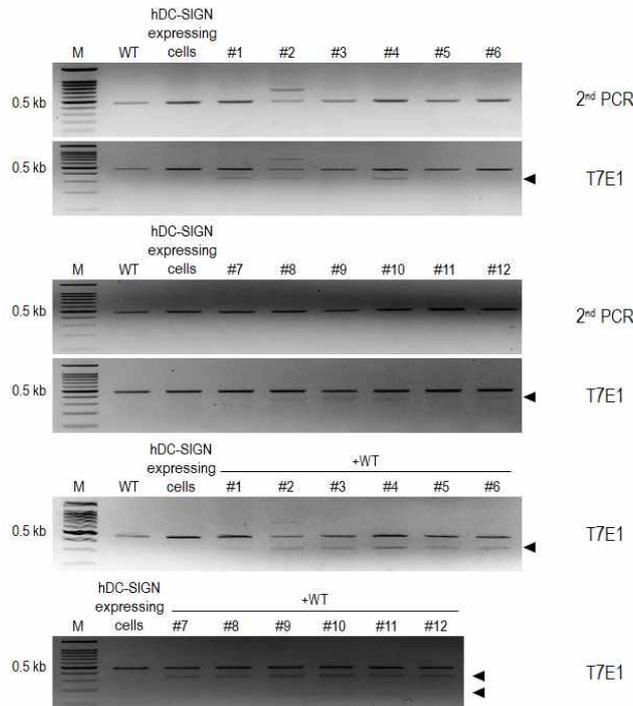
< 4. MYD88 유전자 적중 세포주 유전형분석 >

㉠ 2nd PCR product를 이용하여 Sanger sequencing으로 서열 분석을 진행한 결과 24개 colony 모두 MYD88 유전자의 Bi-allelic mutation이 확인되었으며 세부적으로 Bi-allelic hetero colony 비율이 79.2% (19/24), Bi-allelic homo colony 비율이 12.5% (3/24)로 확인되었음.

② hDC-SIGN 발현 세포주 기반 MYD88 유전자 적중 세포주 제작

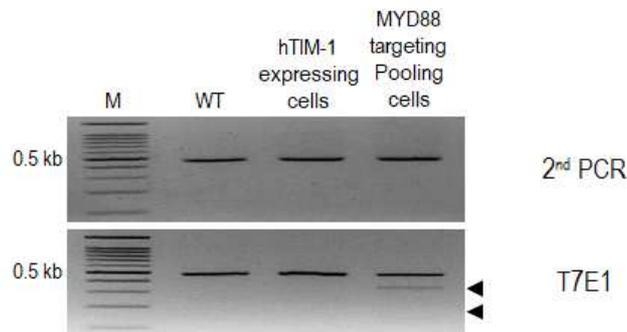
㉠ hDC-SIGN 발현 세포주를 기반으로 MYD88 유전자 적중 세포주를 제작하기 위하여 기확보된 hDC-SIGN 발현 세포주에 MYD88 유전자 적중 벡터 (pMYD88_sgRNA/Cas9-H2Kk)를 electroporation 방법으로 도입하고 48 시간 후 MACS 방법으로 H2Kk microbead를 이용하여 세포를 선별하였음.

㉡ 선별된 세포에서 single-cell derived colony를 확보하기 위하여 serial dilution 방법으로 배양 후 총 12개의 single-cell derived colony를 확보하여 유전형 분석을 통해 MYD88 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 5).



<그림 5. hDC-SIGN 발현 세포주 기반 YD88 유전자 적중 세포주 유전형 분석>

- ㉔ 2nd PCR product를 이용하여 Sanger sequencing으로 서열 분석을 진행한 결과 12개 colony 중 11개 colony에서 MYD88 유전자의 Bi-allelic mutation이 확인되었으며 1개 colony에서는 Mono-allelic mutation이 확인되었음.
 - ㉕ 세부적으로 Bi-allelic hetero colony 비율이 33.3% (4/12), Bi-allelic homo colony 비율이 58.3% (7/12)로 확인되었음.
- ③ hTIM-1 발현 세포주 기반 MYD88 유전자 적중 세포주 제작
- ㉖ hTIM-1 발현 세포주를 기반으로 MYD88 유전자 적중 세포주를 제작하기 위하여 기 확보된 hTIM-1 발현 세포주에 MYD88 유전자 적중 벡터 (pMYD88_sgRNA/Cas9-H2Kk)를 electroporation 방법으로 도입하고 48 시간 후 MACS 방법으로 H2Kk microbead를 이용하여 세포를 선별하였음.
 - ㉗ 선별된 세포는 pooling하여 일부 세포는 동결 보관하고 일부 세포는 유전형 분석을 통해 MYD88 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 6).



< 6. hTIM-1 발현 세포주 기반 YD88 유전자 적중 세포주 유전형 분석 >

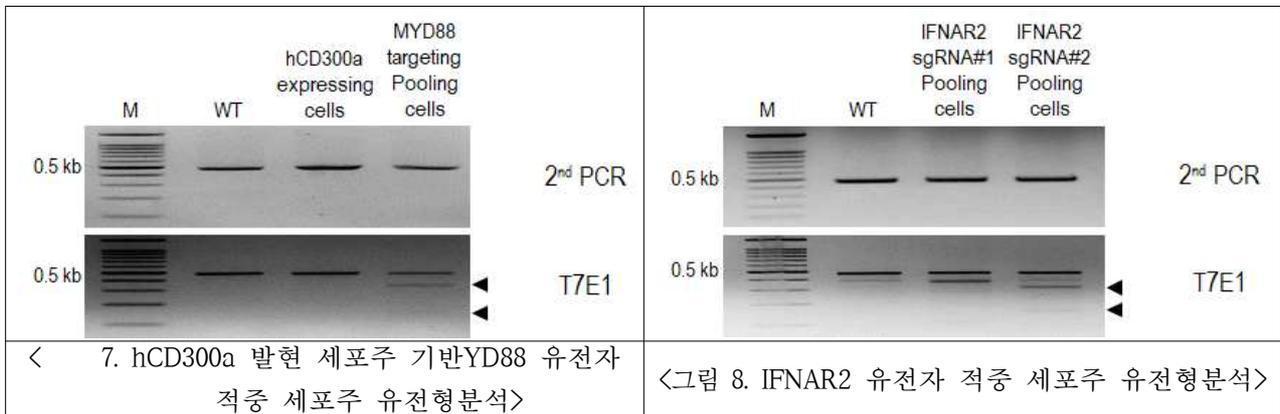
④ hCD300a 발현 세포주 기반 MYD88 유전자 적중 세포주 제작

- ㉞ hCD300a 발현 세포주를 기반으로 MYD88 유전자 적중 세포주를 제작하기 위하여 기확보된 hCD300a 발현 세포주에 MYD88 유전자 적중 벡터 (pMYD88_sgRNA/Cas9-H2Kk)를 electroporation 방법으로 도입하고 48 시간 후 MACS 방법으로 H2Kk microbead를 이용하여 세포를 선별하였음.
- ㉟ 선별된 세포는 pooling하여 일부 세포는 동결 보관하고 일부 세포는 유전형 분석을 통해 MYD88 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 7).

(나) IFNAR2 유전자 적중 세포주 제작

① WT 세포 기반 IFNAR2 유전자 적중 세포주 제작

- ㉞ IFNAR2 유전자 적중 세포주를 제작하기 위하여 primary fetal fibroblast에 IFNAR2 유전자 적중 벡터 (pIFNAR2_sgRNA/Cas9-H2Kk)를 electroporation 방법으로 도입하고 48 시간 후 MACS 방법으로 H2Kk microbead를 이용하여 세포를 선별하였음.
- ㉟ 선별된 세포는 pooling하여 일부 세포는 동결 보관하고 일부 세포는 유전형 분석을 통해 MYD88 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 8).



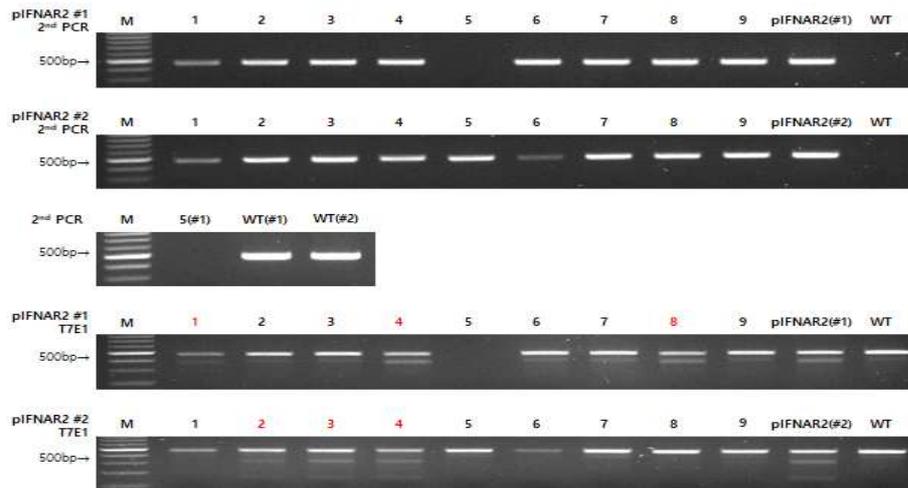
(4) 텡기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 공여세포로 이용한 복제 수정란 제작

(가) 개발된 텡기열 바이러스 수용체 발현 세포주를 각각 공여세포로 하여 체세포 핵이식을 진행함. 체세포 핵이식 후 복제수정란 제작현황은 아래 표와 같음.

| 세포주 | 핵이식 난자수 | 융합란 (%) | 배양란 | 난할란 (%) | 배반포 (%) | 총세포수 |
|------------|---------|-------------|-----|-------------|------------|------|
| hCD300a | 326 | 301 (92.3%) | 20 | 20 (100.0%) | 11 (55.0%) | 36.5 |
| pMYD88 KO | 423 | 398 (94.1%) | 20 | 20 (100.0%) | 12 (60.0%) | 39.6 |
| pIFNAR2 KO | 372 | 346 (93.0%) | 40 | 38 (95.0%) | 18 (45.0%) | - |

(나) 표에서 확인하듯이 각 공여세포주는 복제수정란 제작시 정상적인 체외발달을 보였고, 초기 난할을 및 배반포 형성을도 정상적인 비율을 보임.

- (다) 수정란의 질적인 quality를 평가하는데 유효한 지표인 배반포의 총세포수도 정상적인 수준을 나타내는 것으로 보아 체외발달에 이상이 없는 것으로 판단됨.
- (라) 체외발달한 복제수정란의 배반포에서 genomic DNA를 확보하여 외래 유전자의 삽입여부를 확인한 결과 아래 그림과 같이 각각의 단일 배반포에서 pIFNAR2 유전자의 검출이 확인됨.



(5) 뎅기열 바이러스 질환모델 관련 형질전환 돼지 생산

- (가) 기제작된 공여세포주를 활용하여 체세포 핵이식 실험을 수행하여 복제수정란을 제작하였고, 이를 발정동기화된 대리모의 난관에 외과적 수술법을 활용하여 이식하였음. 이식현황은 아래 표와 같음.

| 이식세포주 | 이식일 | 대리모 | 이식배아 수 | 초기임신 진단 | 분만일 | 분만결과 |
|--|------------|--------|----------|---------|----------|---------------------------------|
| hCD300a (Farm, Female) | 2018.02.09 | 60-16 | 215 | O | 18.06.03 | 7마리 분만 (live 6두, stillbirth 1두) |
| pMYD88 KO #2-2 (Farm, Male) | 2018.04.27 | 73-20 | 319 | O | 18.08.20 | 7마리 분만 (live 6두, stillbirth 1두) |
| pMYD88 KO #2-15 (Farm, Male) | 2018.05.04 | 72-5 | 183 | O | 18.08.30 | 3마리 분만 (live 3두) |
| pMYD88 KO #2-17 (Farm, Female) | 2018.06.29 | 80-142 | 373 | O | 18.10.24 | 5마리 분만 (live 4두, stillbirth 1두) |
| hTIM1/pMYD88 KO pooling (Farm, Female) | 2018.07.20 | 81-76 | 226 | O | 18.11.13 | 5마리 분만 (live 5두) |
| | 2018.07.25 | 60-16 | 8 (B.L) | x | - | |
| DC-sign/pMYD88 KO #2-11 (Farm, Female) | 2018.07.20 | 80-100 | 210 | O | 18.11.13 | 미이라 1두 |
| | 2018.07.25 | 60-16 | 19 (B.L) | x | - | |
| pIFNAR2 #1 (Farm, Male) | 2018.08.31 | 3-32 | 145 | O | 18.12.26 | 3마리 분만 (live 3두) |
| pIFNAR2 #2 (Farm, Male) | | | 159 | | | |

(나) 이식에 따른 분만현황을 종합하면, 아래 내용과 같음.

| 이식세포주 | 이식대리모 수 | 이식 배아수 (대리모 1두당 평균) | 초기임신모돈 수 (%) | 분만모돈 수 (%) | 전체 산자수 | 생존산자 수 | 사산자 수 |
|------------------|---------|---------------------|--------------|------------|--------|--------|-------|
| hCD300a | 1 | 215 | 1 (100.0%) | 1 (100.0%) | 7 | 6 | 1 |
| pMYD88 KO | 3 | 292 | 3 (100.0%) | 3 (100.0%) | 15 | 13 | 2 |
| 수용체 발현/pMYD88 KO | 4 | 270 | 2 (50.0%) | 2 (50.0%) | 6 | 5 | 1 |
| pIFNAR2 KO | 1 | 304 | 1 (100.0%) | 1 (100.0%) | 3 | 3 | - |
| Total | 9 | 270 | 7 (77.8%) | 7 (77.8%) | 31 | 27 | 4 |

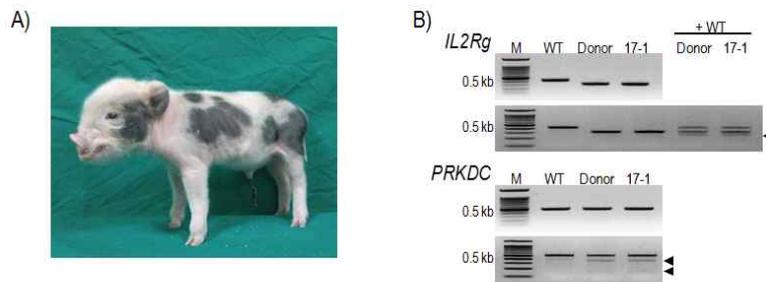
(다) 각 세포주별로 초기임신율은 70% 이상을 상회하였고, 초기 임신이 확인된 개체는 안정적으로 임신을 유지한뒤 자연분만에 성공함. 종래의 복제동물 생산효율이 10% 미만이며 복제산자의 생산두수도 1~2두에 그치는 것에 비하면, 본 연구의 성과는 생산효율은 총이식두수 9마리중 7마리가 분만에 성공하여 분만을 77%를 기록하였고, 분만산자 총수도 31두로 대리모돈당 평균 4두 이상의 산자를 생산하여 높은 생산효율을 나타냄.

(라) 임신이 확인되었던 7두의 대리모로부터 총 31두의 복제돼지 (사산 및 초기폐사 4두) 가 생산되었고 그중 27마리가 폐사율이 높은 분만초기를 지나 생존하였음.

| | |
|---|--|
|  |  |
| hCD300a 발현 돼지 (2018.01.02. 분만) | pMyD88 KO 돼지 (2018.08.20. 분만) |
|  |  |
| hTIM-1 발현 + pMyD88 KO 돼지 (2018.11.15. 분만) | pIFNAR2 KO 돼지 (2018.12.26. 분만) |

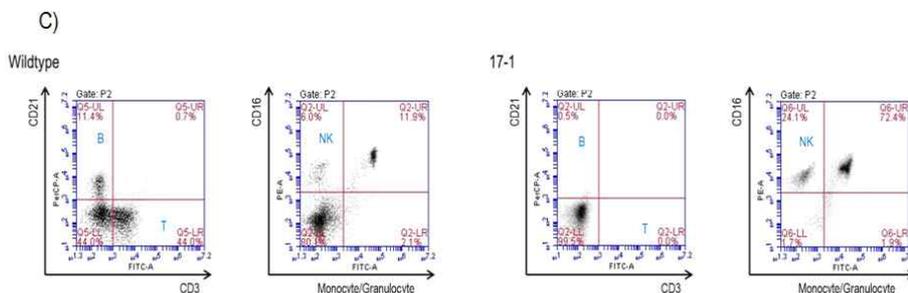
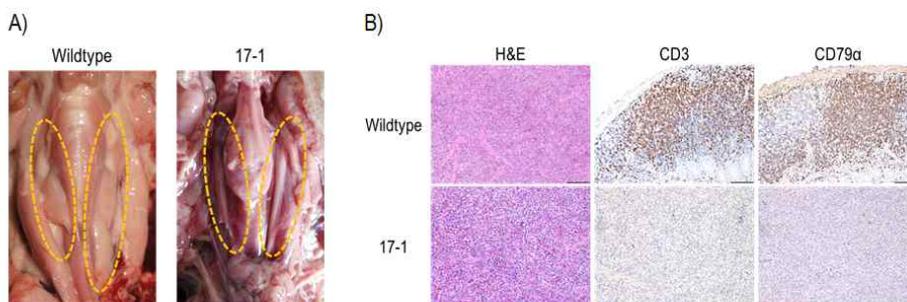
(마) IL2Rg/Prkdc 유전자 결손 복제돼지 생산

- ① IL2rg 유전자는 Interleukin 2 수용체의 감마 사슬을 코딩하는 유전자 부위이며, Prkdc 유전자 (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide) 는 이중쇄 DNA 손상의 복구와 V(D)J 유전자의 재조합에 대한 역할을 하며 이 두 유전자가 결손시 심각한 면역부전을 일으키는 것으로 알려져 있음.
- ② IL2rg/Prkdc 유전자가 동시에 결손된 돼지를 생산하여, 생산된 돼지에서 IL2rg/Prkdc 유전자 서열의 결손과 흉선의 발달 미약 및 체내 비장 및 말초혈액에서 T림프구, B림프구 등 면역관련 세포의 결핍을 확인하였음.
- ③ 생산된 IL2rg/Prkdc knockout 형질전환 돼지는 면역결핍돼지로서 뎅기열 바이러스 감염시 감염질환 모델의 기반동물로서 활용가능하며 더 나아가 인간 면역부전증 연구 및 장기이식, 종양발생 등의 모델 동물로 활용 될 수 있음.



C)

| IL2Rg | Nucleotide sequences in target region (5' -> 3') | |
|-------------|--|--------------------|
| Wildtype | ACTGAACCCGAAGGTCCTCAGCACAGTGGGAATGAAGA | WT/WT |
| Donor cells | ACTGAACCCGAA-----Δ112 bp-----TCTGGAAC | Δ112 bp |
| 17-1 piglet | ACTGAACCCGAA-----Δ112 bp-----TCTGGAAC | Δ112 bp |
| PRKDC | Nucleotide sequences in target region (5' -> 3') | |
| Wildtype | GTGGCCAGTTGTCAGTTGCTGCGTGGTCGGGGCAGGAG | WT |
| Donor cells | GTGGCCAGTTGTCAGTTGCTGCGTGAATCCTGGGGCAGGAG | +1 bp, 1 bp change |
| 17-1 piglet | GTGGCCAGTTGTCAGTTGCTGCGTGAATCCTGGGGCAGGAG | +1 bp, 1 bp change |



<그림. Il2rg/Prkdc 유전자 결손 형질전환 복제돼지의 생산과 검증>

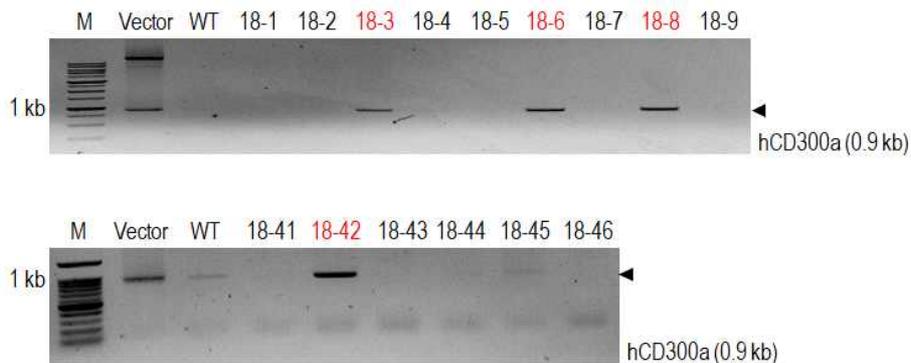
(6) 생산된 형질전환 돼지에서의 덩기열 바이러스 수용체 발현 확인

(가) Human CD300a 발현 형질전환 돼지 유전자 삽입 분석

① 외래 유전자 (hCD300a)의 돼지 유전체내 삽입 확인

㉠ hCD300a를 발현하는 공여세포주를 이용하여 제작된 복제수정란을 대리모에 이식하여 총 17두 (사산 2두 포함)의 산자를 생산하였음.

㉡ 생산된 17두의 산자 중 생존 산자 15두에 대해 꼬리 조직에서 genomic DNA를 확보한 후 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 통하여 human CD300a 유전자의 삽입 여부를 확인하였음 (그림 9).



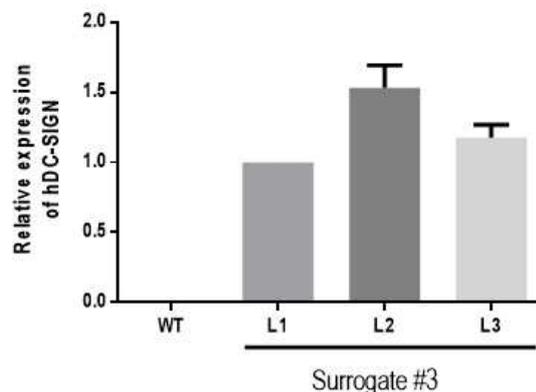
<그림 9. 생산된 형질전환 돼지에서 Human CD300a 유전자 삽입 확인>

㉢ 그림 9에서 보는 바와 같이 총 15두의 형질전환 돼지 중 4두에서만 human CD300a 유전자가 돼지 유전체 내로 삽입되었음을 확인하였음.

(나) 생산된 형질전환 돼지에서의 mRNA 발현량 분석

① hDC-SIGN 발현 형질전환 돼지의 hDC-SIGN mRNA 발현량 분석

㉠ 기생산된 hDC-SIGN 발현 형질전환 돼지 중 #3번 대리모 유래 산자 3두의 세포로부터 Total RNA를 분리하고 reverse transcription을 통해 cDNA를 만들고 이를 주형으로 Real-time PCR 방법으로 각 개체별 hDC-SIGN의 mRNA 발현량을 확인하였음 (그림 10).



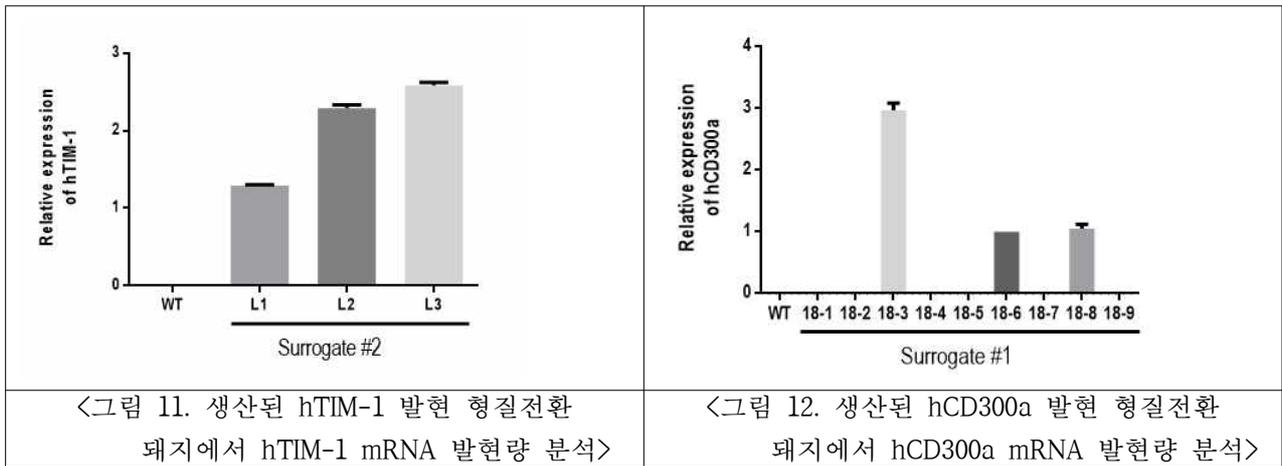
<그림 10. 생산된 hDC-SIGN 발현 형질전환 돼지에서 hDC-SIGN mRNA 발현량 분석>

② hTIM-1 발현 형질전환 돼지의 hDC-SIGN mRNA 발현량 분석

㉠ 기생산된 hTIM-1 발현 형질전환 돼지 중 #2번 대리모 유래 산자 3두의 세포로부터 Total RNA를 분리하고 reverse transcription을 통해 cDNA를 만들고 이를 주형으로 Real-time PCR 방법으로 각 개체별 hTIM-1의 mRNA 발현량을 확인하였음 (그림 11).

③ hCD300a 발현 형질전환 돼지의 hCD300a mRNA 발현량 분석

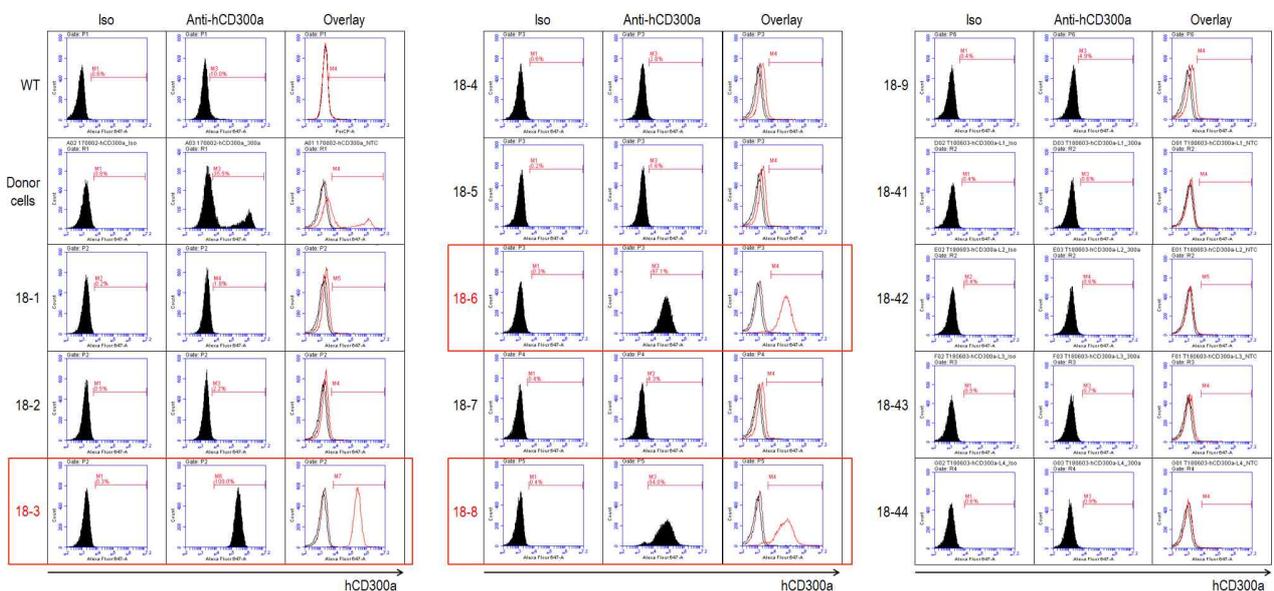
㉠ 생산된 hCD300a 발현 형질전환 돼지 중 #1번 대리모 유래 산자 9두의 세포로부터 Total RNA를 분리하고 reverse transcription을 통해 cDNA를 만들고 이를 주형으로 Real-time PCR 방법으로 각 개체별 hCD300a의 mRNA 발현량을 확인하였음 (그림 12).



(다) Human CD300a 발현 형질전환 돼지에서 단백질 발현 확인

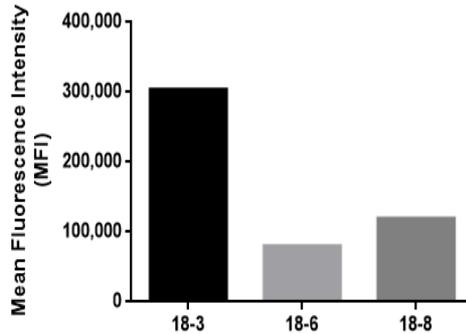
① Human CD300a 단백질 발현 확인

㉠ 생산된 15두의 생존 산자 중 13두의 일차 섬유아세포를 확보하고 이를 이용하여 유세포 분석법으로 human CD300a 의 발현을 확인하였음 (그림 13).



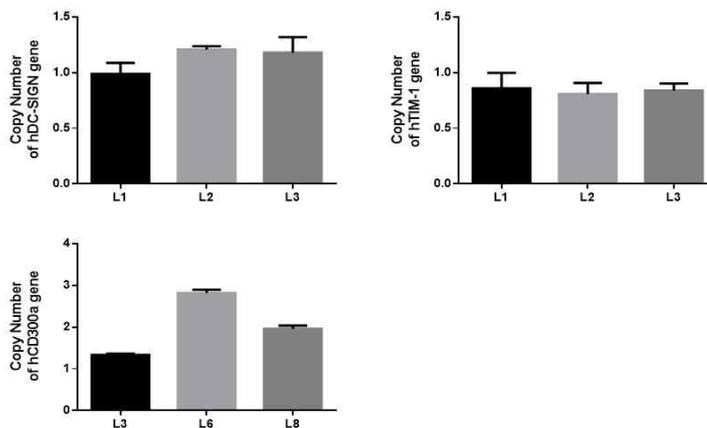
<그림 13. 생산된 형질전환 돼지에서 human CD300a 단백질 발현 확인>

- ㉔ 그림 13에서 보는 바와 같이 분석한 13두의 형질전환 돼지 중 3두에서 human CD300a의 단백질 발현이 확인되었음.
- ㉕ 발현되는 단백질의 발현 강도를 확인하기 위하여 Mean Fluorescence Intensity (MFI)로 분석한 결과 Real-time PCR 결과와 유사하게 나타남을 확인하였음 (그림 14).



< 14. 생산된 형질전환 돼지에서 Human CD300a 단백질 발현 강도 분석 >

- ④ 생산된 형질전환 돼지에서 외래 유전자 copy number 분석
 - ㉗ 생산된 형질전환 돼지의 mRNA 및 단백질 발현 분석 결과 개체별로 발현량의 차이가 존재함을 확인하였음.
 - ㉘ 이러한 차이가 삽입된 외래 유전자의 copy number에 의한 차이인지를 확인하기 위하여 mRNA 및 단백질 발현 분석을 진행한 개체들로부터 genomic DNA를 분리하여 real-time PCR을 통한 copy number 분석을 진행하였음 (그림 15).

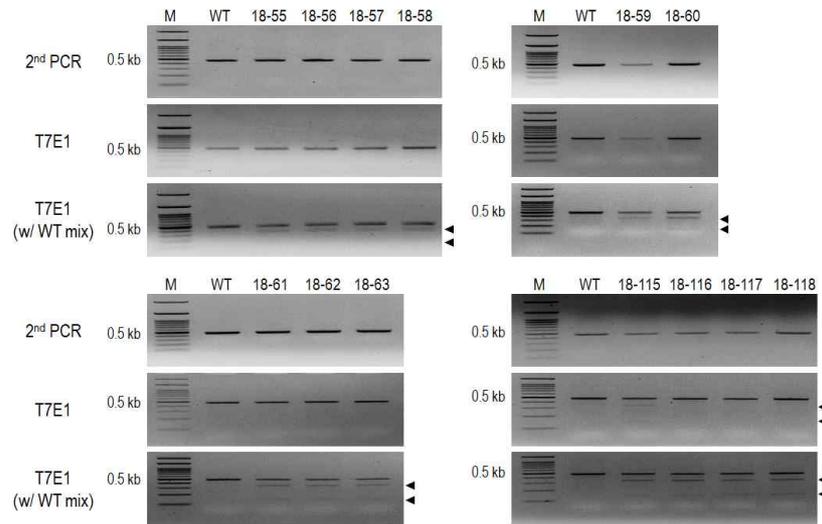


<그림 15. 생산된 형질전환 돼지에서 외래 유전자의 Copy number 분석>

- ㉙ 생산된 형질전환 돼지에서 개체별 외래 유전자의 Copy number를 분석한 결과 개체별로 Copy number의 차이는 크지 않았고 mRNA 및 단백질 발현량과 비교하였을 때 Copy number의 차이에 의해 mRNA 및 단백질의 발현량이 차이가 나지는 않는 것을 확인하였음.
- (7) 선천 면역반응 관련 유전자 적중 형질전환 돼지의 유전형 및 단백질 발현 분석
- (가) MYD88 적중 형질전환 돼지에서 유전형 및 단백질 발현 분석

① MYD88 적중 형질전환 돼지의 유전형 분석

- ㉓ 선천 면역반응 관련 단백질 중 바이러스와 관련된 TLR pathway의 중요 단백질인 MYD88을 제거하기 위하여 MYD88 적중 세포주를 제작하고 형질전환 돼지 생산을 시도하였음.
- ㉔ 생산된 15두의 산자 중 생존 산자 13두의 꼬리 조직으로부터 genomic DNA를 확보하고 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 MYD88 유전자의 타겟 부위를 증폭한 후 T7E1 효소를 이용하여 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 16).



<그림 16. 생산된 형질전환 돼지에서 MYD88 유전자 변형 여부 확인>

- ㉕ 그림 16에서 보는 바와 같이 T7E1 효소 처리 결과, 13두의 생존 산자 중 1두 (18-115)를 제외한 모든 개체에서 Bi-allelic homo mutation 패턴이 확인되었음.
- ㉖ 정확한 염기서열의 변화를 확인하기 위하여 Bi-allelic homo mutation 양상을 보이는 산자의 genomic DNA를 이용하여 MYD88 유전자의 적중 부위에 대한 서열 분석을 진행하였음 (그림 17).

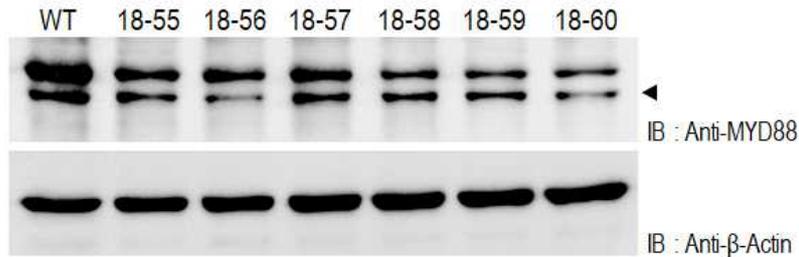
| MYD88 | Sequences (5' -> 3') | Genotype |
|-------------|---------------------------------------|---|
| WT | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | wt/wt |
| | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | |
| Donor cells | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | $\Delta 2$ bp/ $\Delta 2$ bp (Bi-allelic Homo) |
| | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | |
| Piglets | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | $\Delta 2$ bp/ $\Delta 2$ bp (Bi-allelic Homo) |
| | AGGCCACAGGCCGACTCGACAGCGCGAGGCTCCCCGG | |

<그림 17. 생산된 MYD88 유전자 적중 형질전환 돼지 서열 분석>

- ㉗ 그림 17에서 녹색 바탕은 guide RNA의 타겟 위치를 나타내며 붉은색 글씨는 PAM 서열을 나타내고 있음.
- ㉘ MYD88 유전자 적중 부위에 대한 서열 분석 결과 Bi-allelic homo mutation 패턴을 보이는 모든 개체에서는 guide RNA 타겟 부위에서 2 bp deletion이 확인되었음.

② MYD88 적중 형질전환 돼지의 단백질 발현 분석

- ㉑ MYD88 유전자의 타겟 부위에서의 염기서열 변형이 확인된 개체 유래 세포에서 단백질을 분리하고 이를 이용하여 MYD88 단백질의 발현 여부를 Western blot 방법을 이용하여 확인하였음 (그림 18).



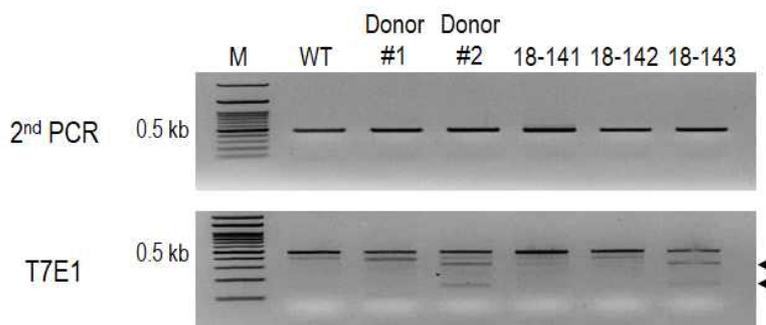
<그림 18. 생산된 MYD88 유전자 적중 형질전환 돼지 단백질 발현 분석>

- ㉒ Western blot 결과 모든 개체에서 MYD88 단백질이 발현되고 있음을 확인하였음. 일부 개체에서 발현양의 감소가 보이지만 완전히 사라지지 않음을 확인하였음.

(나) IFNAR2 유전자 적중 형질전환 돼지의 유전형 분석

① IFNAR2 KO 돼지의 유전형 분석

- ㉑ 선천 면역반응의 주요 인자 중 하나인 Interferon (IFN)의 수용체 중 하나인 IFNAR2를 제거하기 위하여 IFNAR2 녹아웃 공여세포주를 제작하고 이를 이용하여 형질전환 돼지 생산을 시도하였음.
- ㉒ 생산된 생존 산자 3두의 꼬리 조직으로부터 genomic DNA를 확보하고 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 IFNAR2 유전자의 타겟 부위를 증폭한 후 T7E1 효소를 이용하여 유전자의 변형 여부를 확인하였음 (그림 19).



<그림 19. 생산된 형질전환 돼지에서 IFNAR2 유전자 변형 여부 확인>

- ㉓ T7E1 효소 처리 결과, 생존 산자 3두 중 1두 (18-143)에서만 유전자 변형이 확실하게 확인되었음.
- ㉔ 정확한 염기서열의 변화를 확인하기 위하여 생존 산자 3두 중 2두 (18-141, 18-143)의 IFNAR2 유전자 타겟 부위에 대한 염기서열 분석을 진행함. (그림 20).

| IFNAR2 | Sequences (5' -> 3') | Genotype |
|--------|--|----------|
| WT | TTCGGAAATTCCCAAGTCAATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | wt/wt |
| | TTCGGAAATTCCCAAGTCAATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | |
| 18-141 | TTCGGAAATTCCCAAGTCAATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | wt/wt |
| | TTCGGAAATTCCCAAGTCAATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | |
| 18-143 | TTCGGAAATTCCCAAGTCAATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | wt/Δ4 bp |
| | TTCGGAAATTCCCA-----ATCTTATCATGGGAAATAAAAAATCATT GGTCGTGCCAACTCACTACACATTATGGTACACGATCAT | |

<그림 20. 생산된 IFNAR2 유전자 적중 형질전환 돼지 서열 분석>

㉞ 염기서열 분석 결과 T7E1 처리 실험 결과와 마찬가지로 18-141 개체는 Wildtype으로 확인되었고 18-143 개체에서는 염기서열 변화를 확인하였으나 Mono-allelic mutation으로 확인되었음.

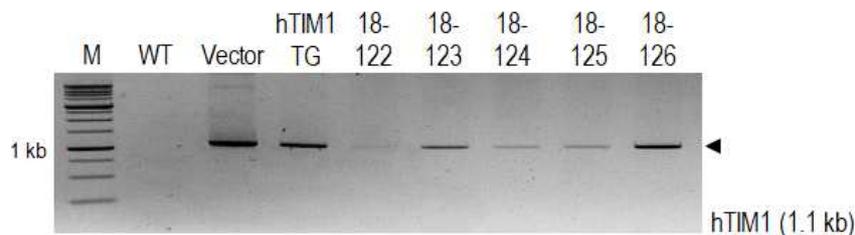
(8) 령기열 바이러스 수용체를 발현하고 선천 면역반응 관련 유전자가 적중된 형질전환 돼지에서의 유전형 및 단백질 발현 분석

(가) Human TIM1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자가 적중된 형질전환 돼지에서의 유전형 및 단백질 발현 분석

① Human TIM1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자가 적중된 형질전환 돼지에서의 유전형 분석

㉠ 2차년도에 생산된 Human TIM1 발현 형질전환 돼지 유래 일차섬유아세포에 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 MYD88 유전자가 적중된 공여세포주를 제작하고 이를 이용하여 형질전환 돼지 생산을 시도하였음.

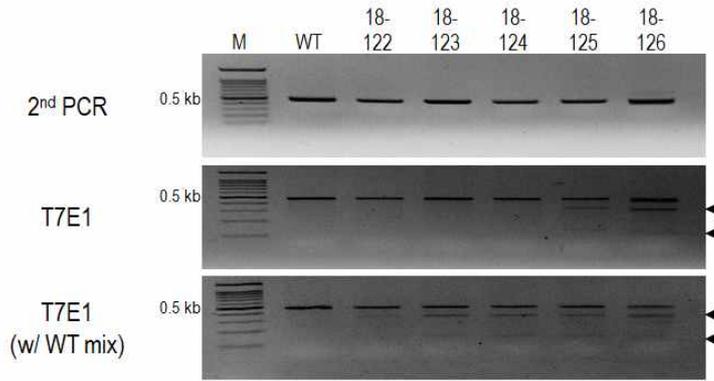
㉡ 생산된 생존 산자 5두의 꼬리 조직으로부터 genomic DNA를 확보하고 중합효소 연쇄반응을 통하여 human TIM1 유전자의 삽입 여부를 확인하였음 (그림 21).



<그림 21. 생산된 human TIM1 TG/MYD88 KO 형질전환 돼지에서의 hTIM1 유전자 삽입 확인>

㉢ 생산된 생존 산자 5두 모두 human TIM1 유전자의 삽입 되어있음을 확인하였음.

㉣ 다음으로 생존 산자 5두에서 MYD88 유전자의 변형 여부를 분석하기 위하여 MYD88 타겟 부위를 중합효소 연쇄반응을 이용하여 증폭하고 T7E1 효소를 처리하여 DNA의 절단 패턴을 확인하였음 (그림 22).



<그림 22. 생산된 human TIM1 TG/MYD88 KO 형질전환 돼지에서의 MYD88 유전자 변형 여부 확인>

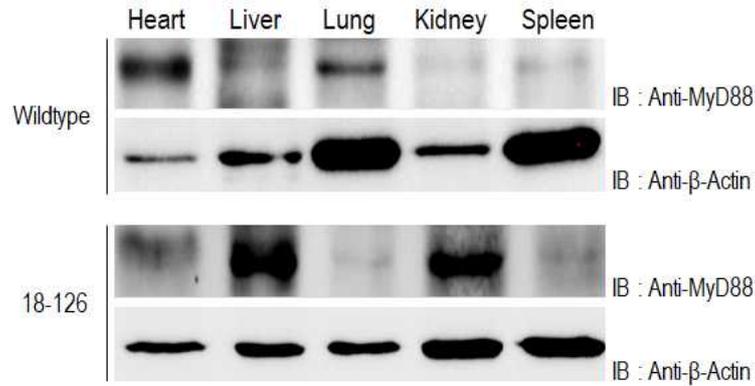
- ㉓ T7E1 효소 처리 결과, 3두 (18-122, 18-123, 18-124)는 Bi-allelic homo mutation 양상을 보였고, 2두 (18-125, 18-126)는 Mono-allelic mutation 또는 Bi-allelic hetero mutaion 양상을 보이고 있음을 확인하였음.
- ㉔ MYD88 유전자 타겟 부위에 대한 정확한 염기서열 변화를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 진Sanger sequencing 방법으로 진행하였음 (그림 23).

| MYD88 | Sequences (5' -> 3') | Genotype |
|----------------------------|--|-------------------------------------|
| WT | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCGCGG AGGCTCCCCGG | wt/wt |
| | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCGCGG AGGCTCCCCGG | |
| 18-122 18-123 18-124 | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCG -GG AGGCTCCCCGG | Δ2 bp/Δ2 bp (Bi-allelic homo) |
| | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCG -GG AGGCTCCCCGG | |
| 18-125 | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCG - -G AGGCTCCCCGG | Δ2 bp/+1 bp (Bi-allelic hetero) |
| | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCA ACGG AGGCTCCCCGG | |
| 18-126 | AGGCCAC AAGGCGACTCGACAGCG - -G AGGCTCCCCGG | Δ2 bp/Δ37 bp (Bi-allelic Hetero) |
| | AGGCCAC -----Δ37 bp-----GCCATGGC | |

<그림 23. 생산된 human TIM1 TG/MYD88 KO 형질전환 돼지에서의 MYD88 염기서열 분석>

- ㉕ 염기서열 분석 결과, Biallelic-homo mutation 양상을 보였던 3두 (18-122, 18-123, 18-124)는 모두 2 bp deletion mutation이 확인되었고, Mono-allelic mutation 또는 Bi-allelic hetero mutation 양상을 보였던 2두 중 1두 (18-125)는 2 bp deletion과 1 bp insertion이 확인되어 Bi-allelic hetero mutation이 확인되었음. 마지막 1두 (18-126)도 2 bp deletion과 37 bp deletion이 확인되어 Bi-allelic hetero mutation으로 확인되었음.
- ② Human TIM1 유전자를 발현하고 MYD88 유전자가 적중된 형질전환 돼지에서의 단백질 발현 분석
 - ㉖ Human TIM1 발현이 확인된 형질전환 돼지 유래 세포에 MYD88 유전자 적중을 시도하였기 때문에 human TIM1에 대한 발현 확인은 진행하지 않고 MYD88에 대한 단백질 발현만 분석을 진행하였음.
 - ㉗ 생산된 생존 산자 5두 중 유전형 분석을 통해 기존 MYD88 적중 돼지와 같은

Bi-allelic homo mutation 양상 3두를 제외하고 남은 2두 중 18-126 개체의 장기 조직에서 MYD88 단백질 발현을 western blot을 이용하여 분석하였음 (그림 24).

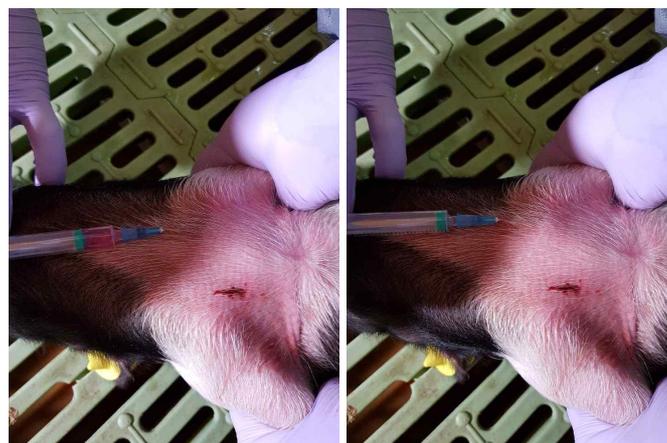


<그림 24. 생산된 human TIM1 TG/MYD88 KO 형질전환 돼지에서의 MYD88 단백질 발현 분석>

- ㉔ Western blot 결과, Wildtype과 비교할 때 Heart와 Lung에서는 발현이 감소한 것으로 보이나 오히려 Liver와 Kidney에서는 증가한 것으로 보이고 있어서 MYD88의 적중에 의한 단백질 발현 변화가 아닌 개체에 따른 발현 변화로 생각됨.

(9) 뎅기바이러스 수용체 DC-SIGN 발현 유전자 변형 돼지 감염 평가

- (가) 뎅기바이러스 교차감염 (heterologous infection) $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL 로 피하 or 경피접종하여 임상증상 및 viremia 관찰
- (나) DC-SIGN 발현 유전자 감염 돼지 관찰
 - ① 1차(뎅기바이러스 타입2), 2차(뎅기바이러스 타입4), 3차(뎅기바이러스 타입3)로 3회 피하접종 수행함



[접종 전]

[접종 후]

- ② 1차 접종 후 14일차에 2차 접종 수행함
- ③ 피부 표면이 부어오르는 것을 통해 경피내 주사가 된 것으로 확인됨.
- ④ 접종 전 돼지 건강 상태를 체온으로 확인하였음
- ⑤ Day 0차 체온이 약 40℃이므로 건강 상태 정상적인 것으로 확인됨.

<Body template (°C)>

| Group | | No. | DPIO (1차접종) |
|----------|------------------|-----|----------------|
| Duroc | DC-SIGN +/+ | 1 | 39.2 |
| | | 2 | 39.8 |
| | Wild type (+)con | 3 | 39.4 |
| | Wild type (-)con | 4 | 39.7 |
| Landrace | DC-SIGN +/+ | 5 | 39.9 |
| | | 6 | 39.7 |
| | Wild type (+)con | 7 | 39.3 |
| | Wild type (-)con | 8 | 39.8 |

- ⑥ 채혈한 혈액은 혈청과 Peripheral blood mononuclear cell(PBMC)를 분리하였음
- ⑦ Serum separate tube를 사용하여 4000rpm에 20분 원심분리 후 혈청 샘플을 얻었음
- ⑧ 1차 접종 후 17일차에 부검하여 폐, 심장, 신장, 비장, 림프절, 간 조직을 채취함
- ⑨ 채취된 장기 조직은 가위로 잘게 갈아서 PBS와 섞은 후 4000rpm에 20분 원심분리하여 상층액의 샘플을 얻었음
- ⑩ RNA 추출 및 Real time PCR을 시행하여 혈청에 뎅기바이러스 존재 여부를 확인하였음.
- ⑪ PerkinElmer chemagic 360 기기의 Viral DNA/RNA 프로토콜을 사용하여 RNA를 추출하였음.
- ⑫ DiaPlexQ™ Dengue Virus Detection Kit (Real-Time OneStep RT-PCR)와 Roche LightCycler96기기를 사용하여 역가를 확인하였음.
- ⑬ Real time PCR을 통한 역가 결과 모두 음성으로 확인되었음.
- ⑭ 뎅기바이러스 키트에 함께 포함된 양성 Control은 Cq값 9.95로 신뢰되는 결과임.

<Serum (Cq)>

| Group | | No. | DPIO (1차접종) | DPI6 | DPI14 (2차접종) | DPI26 | DPI34 (3차접종) | DPI40 |
|----------|------------------|-----|----------------|------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| Duroc | DC-SIGN +/+ | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (+)con | 3 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (-)con | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Landrace | DC-SIGN +/+ | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | | 6 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (+)con | 7 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (-)con | 8 | - | - | - | - | - | - |

-; Negative

<PBMC (Cq)>

| Group | | No. | DPIO (1차접종) | DPI6 | DPI14 (2차접종) | DPI26 | DPI34 (3차접종) | DPI40 |
|----------|------------------|-----|----------------|------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| Duroc | DC-SIGN +/+ | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (+)con | 3 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (-)con | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Landrace | DC-SIGN +/+ | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | | 6 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (+)con | 7 | - | - | - | - | - | - |
| | Wild type (-)con | 8 | - | - | - | - | - | - |

-; Negative

<Organs (Cq)>

| Group | | No. | 폐 | 심장 | 신장 | 비장 | 림프절 | 간 |
|----------|-----------------|-----|---|----|----|----|-----|---|
| Duroc | DC-SIGN +/+ | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | Wildtype (+)con | 3 | - | - | - | - | - | - |
| | Wildtype (-)con | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Landrace | DC-SIGN +/+ | 5 | - | - | - | - | - | - |
| | | 6 | - | - | - | - | - | - |
| | Wildtype (+)con | 7 | - | - | - | - | - | - |
| | Wildtype (-)con | 8 | - | - | - | - | - | - |

-: Negative

(10) 뎅기바이러스 수용체 DC-SIGN 발현 유전자 변형 돼지 감염 평가

(가) 뎅기바이러스 교차감염 (heterologous infection) DENV2(Cq13.98), DENV4(Cq15.58) 로 피하 or 경피접종하여 임상증상 및 viremia 관찰

(나) 발현 유전자 감염 돼지 관찰

- ① 1차(뎅기바이러스 타입2), 2차(뎅기바이러스 타입4) 로 2회 피하접종 수행함
- ② 1차 접종 후 10일차에 2차 접종 수행함
- ③ 채혈한 혈액은 혈청을 분리하였음
- ④ Serum separate tube를 사용하여 4000rpm에 20분 원심분리 후 혈청 샘플을 얻었음 SepMate™-15 (RUO) (Tube for density gradient centrifugation) 튜브의 PBMC 분리 프로토콜을 사용하여 PBMC 샘플을 얻었음
- ⑤ 1차 접종 후 40일차에 부검하여 폐, 심장, 신장, 비장, 림프절, 간 조직을 채취함
- ⑥ 채취된 장기 조직은 가위로 잘게 갈아서 PBS와 섞은 후 4000rpm에 20분 원심분리하여 상층액의 샘플을 얻었음
- ⑦ RNA 추출 및 Real time PCR을 시행하여 혈청에 뎅기바이러스 존재 여부를 확인하였음.
- ⑧ QIAamp Viral RNA Mini Kit 프로토콜을 사용하여 RNA를 추출하였음.
- ⑨ DiaPlexQ™ Dengue Virus Detection Kit (Real-Time OneStep RT-PCR)와 Roche LightCycler96기기를 사용하여 역가를 확인하였음.
- ⑩ Real time PCR을 통한 역가 결과 모두 음성으로 확인되었음.
- ⑪ 뎅기바이러스 키트에 함께 포함된 양성 Control은 Cq값 9.95로 신뢰되는 결과임.

<Serum (Cq)>

| Group | No. | DPI0 (1차접종) | DPI4 | DPI10 (2차접종) | DPI17 |
|------------------|-----|----------------|------|-----------------|-------|
| +/+ | 1 | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - |
| | 3 | - | - | - | - |
| - | 4 | - | - | - | - |
| Wild type (+)con | 5 | - | - | - | - |
| Wild type (-)con | 6 | - | - | - | - |

-: Negative

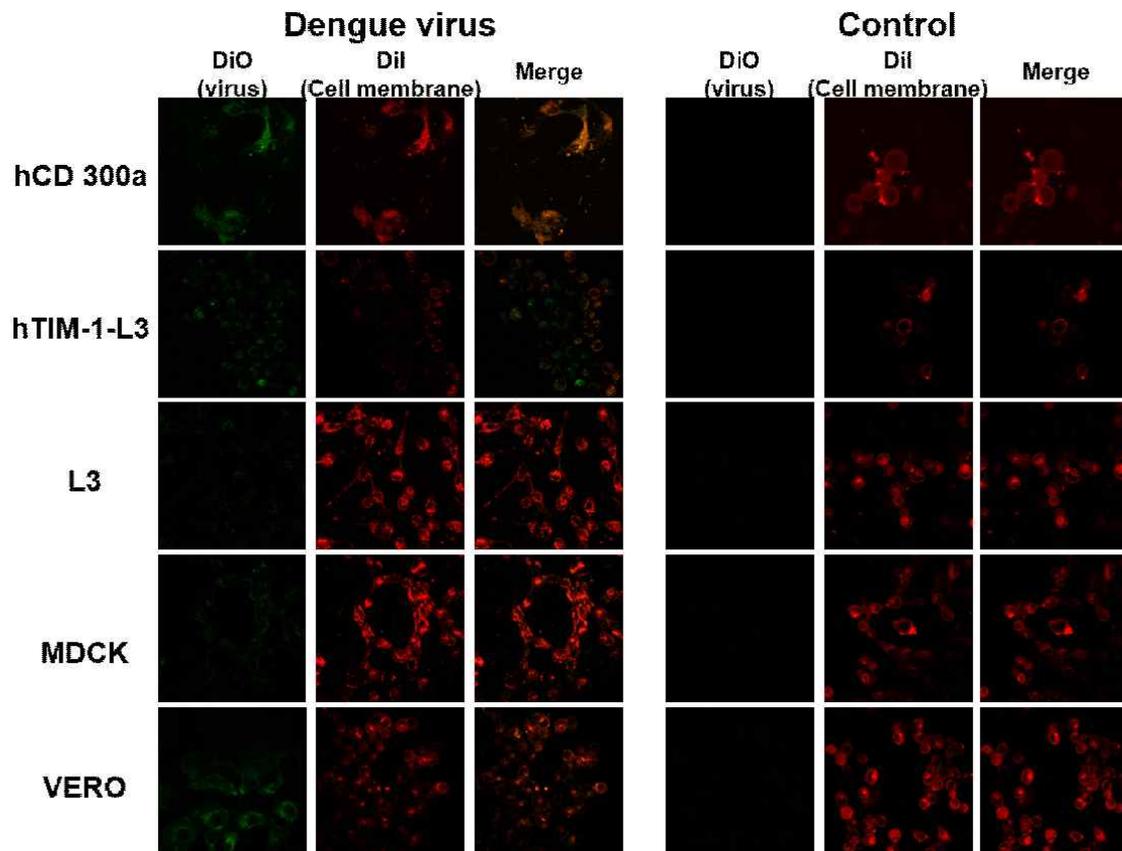
<Organs (Cq)>

| Group | No. | 폐 | 심장 | 신장 | 비장 | 림프절 | 간 |
|------------------|-----|---|----|----|----|-----|---|
| +/+ | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | - | - | - | - | - | - |
| - | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (+)con | 5 | - | - | - | - | - | - |
| Wild type (-)con | 6 | - | - | - | - | - | - |

-; Negative

(11) 땡기바이러스 수용체 발현 돼지초대세포 감수성 평가

(가) 땡기바이러스 DENV2(Cq13.98)에 대한 hCD300a, hTIM-1 발현 돼지초대세포의 바이러스 감수성을 평가



(나) hCD300a 수용체 발현 세포주에서의 땡기바이러스 수용체 결합정도가 높음.

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절 목표

1. 최종목표 : 뎅기열 백신개발을 위한 뎅기열 바이러스에 감수성을 갖는 돼지모델 확립
- 2.
3. 세부목표 :
 - 가. 뎅기바이러스 라이브러리 구축 및 동력학 정보 규명
 - 나. 유전자 변형을 통해 돼지 체세포내 사람 뎅기열 수용체의 발현
 - 다. 체세포 복제를 통한 뎅기열 바이러스 수용체 발현 복제 돼지의 생산
 - 라. 생산된 형질전환 모델돼지의 유효성 분석 및 검증을 통해 뎅기열 감수성 돼지모델 확립
 - 마. 최종적으로 뎅기열 질환의 치료 기술개발, 질환의 규명 및 예방백신 개발의 가능성이 있는 뎅기열 감수성 돼지모델을 구축하여 이를 활용

2절 목표 달성여부

| 성과목표 | 자 체 평 가 | 달성도 |
|--|--|------|
| • 뎅기바이러스 수용체 발현 세포주 확립 | <ul style="list-style-type: none"> • 유전자발현을 활성화하기 위해 CAG 프로모터를 가지는 유전자 발현 벡터시스템 확보 • 뎅기열 수용체로 알려진 DC-SIGN 과 TIM-1, CD300a, hMannose, hCLEC5A 유전자를 발현하는 세포주 확보 • 뎅기열 감염을 증진시킬 MYD88, IFNAR2 유전자 적중 세포주 확보 | 100% |
| • 뎅기바이러스 라이브러리 및 culture 시스템 구축 | <ul style="list-style-type: none"> • 병원성 바이러스 은행으로부터 Dengue virus 1,2,3,4 혈청형의 분리주를 분양받아 확보 후 Vero 세포 적응 완료 및 배양시스템 구축 • 뎅기 바이러스 RNA기반 realtime RT PCR 역가 측정 시스템 구축 | 100% |
| • 유전자 변형 세포주를 이용한 복제 수정란 생산 및 효율 확인 | <ul style="list-style-type: none"> • 유전자 변형세포주를 확보하여 이를 공여세포주로 복제수정란을 생산한 결과 체외배양시 정상적인 발달 및 배반포 형성율을 나타내었고 배반포 총세포주도 정상수준을 유지하여 고순도의 복제수정란 확보 | 100% |
| • 대리모에 대한 복제 수정란 이식 후 임신율 확인 및 산자 생산을 확인 | <ul style="list-style-type: none"> • 뎅기열 수용체 DC-SIGN, TIM-1, CD300a 형질전환 돼지 생산 성공 및 산자확보 • hMannose, hCLEC5A 형질전환 돼지는 생산진행중 • 형질전환 돼지생산을 위한 초기임신율이 70% 이상 상회하고 안정적으로 임신기간이 유지 되었고, 생산율도 50% 이상 고효율을 보임. 생산산자수 평균 4두 이상을 나타내는등 생산효율이 대폭 상승함. | 100% |
| • 복제돼지 산자의 유전자 변형 및 단백질 발현여부 검증 | <ul style="list-style-type: none"> • 태어난 산자에서 외래 유전자의 삽입 여부 및 목적으로 하는 단백질 발현이 정상적으로 확인되어 성공적으로 형질이 전환되었음을 보여줌. | 100% |

| | | |
|--|--|------|
| <ul style="list-style-type: none"> • 댕기바이러스 In-vitro, In-vivo 감염 동력학 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • 댕기바이러스 수용체 발현 세포주 (hTIM, hDC-SIGN, hCD300a) 에서 세포 감염능 평가 및 Vero cell에서의 감염 동력학 규명 • 수용체 발현 돼지에서의 감염능 미확인으로 인해 in-vivo상의 동력학 정보 규명 실패 | 50% |
| <ul style="list-style-type: none"> • 곤충세포 발현계를 이용한 유용 재조합 단백질 발현 및 생산 시스템을 구축 | <ul style="list-style-type: none"> • 곤충세포 발현계를 이용한 댕기바이러스 pr 재조합 단백질 생산 완료 • 대장균 발현 시스템 기반 댕기바이러스 pr 단백질 제작 완료 | 100% |
| <ul style="list-style-type: none"> • 댕기열 바이러스 수용체를 발현하는 유전자 변형 돼지 유효성 평가 | <ul style="list-style-type: none"> • 댕기바이러스 수용체 hTIM 및 DC-SIGN, CD300a 발현 유전자 변형 돼지 감염 평가를 진행함 • 수용체 발현 돼지에서의 댕기바이러스 접종경로별 (피하, 근육, 정맥) 감염력 평가 수행 • 댕기바이러스 타입 교차 감염을 통한 항체의존증대 재현 평가 수행 • 댕기 바이러스 수용체를 발현하는 돼지의 초대세포에서 댕기감수성 확인 및 모델 세포주확립 • 댕기 바이러스 수용체 발현 세포의 흡착 효율 측정을 통한 댕기바이러스 감수성 모델동물 표현형 분석가능 | 50% |

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

1. 댕기열 감염경로로 사용되는 사람체내 수용체 (hDC-Sign, hTIM-1, hCD300a)를 돼지 세포내에서 발현시킬 경우, 댕기바이러스 감염시 감수성을 나타낼 것으로 예상하고 실험을 진행함. 댕기바이러스 발현 돼지의 체내에서 확보한 세포 (돼지 초대세포) 실험에서는 일부 댕기바이러스 감염후 감수성을 나타내었으나 댕기바이러스 수용체를 발현시키는 돼지 자체에서는 댕기바이러스 접종후 바이러스 감염여부가 확인이 되지 않음. 이는 댕기바이러스의 수용체가 세포 표면에 발현되었다 하더라도, 돼지 체내에서 활성화된 내인성 면역체계로 인해 바이러스 감염 및 배출이 이루어지지 않는 것으로 판단됨.
2. 이러한 돼지 면역체계의 차단 면역을 약화시키기 위해, 댕기바이러스 수용체 발현 형질전환 돼지 생산과 별도로, 돼지 자체 면역체계를 약화시키거나 (Il2rg/Prkdc 유전자가 결핍된 면역결핍돼지), 댕기바이러스 감염시 감염력을 떨어뜨리는 면역관련 인자를 제거하는 방법 (MYD88 혹은 IFNAR2 유전자 결손 돼지)을 통해 수용체 발현 돼지가 갖는 바이러스 감수성의 단점을 보완코자 했고, 면역결핍돼지 및 면역관련 인자가 제거된 돼지 생산에 성공함.
3. 본 과제의 최종 목표인 댕기열 감수성 질환모델 돼지 확립을 위해 댕기바이러스 수용체가 발현되는 돼지 생산과 더불어 체내 면역계의 활성화 및 댕기바이러스 감염의 방해요인인 면역인자를 제거하는 유전자 변형 돼지 생산에 각각 성공하였으나, 양 유전자 변형돼지의 융합을 통해 동시에 유전자가 변형되어 효과적으로 감수성을 갖는 형태의 질환모델 돼지를 생산코자 하였으나 연구기간 종료와 더불어 연구기간내에 생산을 종료하지 못하고, 현재는 기관 자체에서 후속연구를 진행중임.

4. 돼기바이러스 감수성 모델동물 유효성 검증에 있어, 수용체 발현 돼지의 초대세포에서의 바이러스 감염은 확인하였으나, 수용체 발현 돼지에서 병원체 감수성분석을 위해 감염경로 별(근육, 피하, 정맥) 반복 실험에 필요한 돼지 생산 두수의 한계가 존재하였음. 추후 지속적인 생산과 감염 실험을 통해 데이터를 확보할 예정임.
5. 충분한 돼지 생산이 가능할 경우, 돼기바이러스 pr 단백질 면역화 돼지에서의 항체의존증대(antibody dependent enhancement)를 재현할 수 있는지 여부를 규명할 수 있으며, 돼지에 대한 바이러스 연속감염계대 (pig to pig)를 통해 돼지숙주에 적응된 바이러스 제작이 가능함. 돼지 생산주기를 1주 간격으로 짧게 하여 연속적인 감염계대를 수행하고, 돼지에 적응력을 높인 바이러스를 표준주로 설정하여 모델동물에 적합한 바이러스 개발이 필요함.
6. 향후 본 연구결과에 대한 객관적인 평가를 위해 정성적 평가지표로서, SCI급 전문 학술잡지에 논문투고 및 학술발표를 통해 본 연구결과 및 질환모델 동물 개발정도의 지속적인 확인을 진행할 예정임.

제4장 연구결과의 활용 계획 등

1. 본 과제에서 생산된 면역결핍돼지 및 감염차단경로를 제거한 돼지의 경우, 돼기바이러스 뿐만 아니라 여타의 전염성 바이러스 (지카바이러스, 황열, 웨스트나일 바이러스성 질병 등)감수성 모델동물로서 개발이 가능하며, 이는 바이러스 감염 동력학 연구 및 백신, 신약 개발등에 모델동물로 활용할 수 있음.
2. 돼기바이러스 수용체 발현 돼지의 체내에서 확보한 초대세포주의 경우, 일부 돼기 바이러스의 감염 감수성이 확인되었고, 지속적인 연구개발을 통해 바이러스 감염 동력학 관련 연구 기반을 안정적으로 확보하게 된다면, 관련 기술력 향상에 기여할 것임.
3. 본 과제에서 확보한 돼기바이러스 수용체 흡착 효율 분석 기술의 경우, 효과적인 기술로서 정량화 될 경우, 돼기 바이러스 수용체 발현 세포의 흡착 효율 측정을 통한 돼기바이러스 감수성 모델동물 표현형 분석 및 질병 진단의 바이오마커로서 활용 가능