

발간등록번호

11-1543000-001251-01

비배아성 만능줄기세포 생산 및 분석을 통한 가축  
유전자원의 보존 및 활용

(Conservation and utilization of genome resources by the  
generation and analysis of non-embryonic pluripotent stem  
cells in livestock )

서울대학교 산학협력단

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “비배아성 만능줄기세포 생산 및 분석을 통한 가축 유전자원의 보존 및 활용” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016년 2월 14일

주관연구기관명 : 서울대학교산학협력단

주관연구책임자 : 노 상 호

세부연구책임자 : 노 상 호

협동연구기관명 : 수암생명공학연구원

협동연구책임자 : 황 규 찬

# 요 약 문

## I. 제 목

비배아성 만능줄기세포 생산 및 분석을 통한 가축 유전자원의 보존 및 활용

## II. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
목표	1	1	7	7	15	1	1	-	-	4	-	1	-
실적	1	1	8	9	16	1	1	-	-	5	-	-	1
달성율(%)	100	100	114	129	107	100	100	-	-	125	-	-	우수 논문상 수상

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 소의 각종 조직에서 유래한 체세포 및 다분화능을 지닌 성체줄기세포를 세포원으로 확보하고 이를 후성적 변화 및 분화경로 차단을 통해 유도만능줄기세포를 생산하거나 동일한 기법에 의해 교차분화를 유도하여 특정계통으로의 분화를 유도하고 생산된 각종 줄기세포 및 분화유도체는 분자세포생물학 및 핵이식 등 발생공학기법을 활용한 기능적 분석을 통해 특성규명 및 활용범위를 확인하고자 함.

## IV. 연구개발 내용 및 범위

- ① 소의 다양한 조직에서 체세포 및 성체줄기세포성 전구세포 분리유도.
- ② 다양한 소분자물질을 이용한 전능성 줄기세포 배양환경 조성 및 최적화
- ③ 다양한 활성 및 억제인자를 이용한 체세포 및 성체줄기세포의 역분화 및 교차분화유도
- ④ 다양한 소 배아유래 전능성 줄기세포의 분자세포생물학 및 유전체학적인 특성 비교분석.
- ⑤ 수립한 만능줄기세포에의 표지유전자도입 후 배아와의 응집을 통한 키메라 배아 생산유도 및 효율성 비교.
- ⑥ 만능줄기세포를 공여핵으로 이용한 핵이식 배아 생산 및 체세포핵이식 배아와의 생산효율 및 특성 비교분석.

## V. 연구개발결과

- ① 소의 다양한 조직에서 체세포 및 성체줄기세포성 전구세포 분리유도.
  - 소의 피부세포를 포함한 치아 및 신경조직 등에서 다양한 성체줄기세포 및 전구세포를 분리하고 체외 배양함.
- ② 다수의 화학물질 (소분자물질)을 단계적으로 이용하여 후성적 변화를 유도한 후 최적의 후성적 변화유도 효율이 높은 물질을 선별.
  - 후성적 변화와 관련있는 다양한 소분자 물질을 통해 소 유래 전능성 줄기세포 체외 배양 조건을 확립하고 최적화 시도 (특허 출원).
  - 다양한 분자생물학적 검증법을 통해 소분자 물질을 통해 확립된 줄기세포의 성상을 분석함.
- ③ 후성적 재프로그래밍 유도, 신호경로의 차단 및 활성화를 복합적으로 이용하여 체세포 및 성체줄기세포의 역분화 및 교차분화유도.
  - 바이러스성 및 비 바이러스성 방법을 통해 재프로그래밍을 유도하고 배양조건 확립 시도.
  - 후성적 재프로그래밍을 통해 성체줄기세포의 전능성 향상 및 후성적 재프로그래밍 유도 시도.
  - 침샘 유래 세포의 배양액을 통해 지방줄기세포의 교차분화 유도하고 다양한 분자생물학적 방법으로 검증 시도.
- ④ 다양한 소 배아유래 전능성 줄기세포와의 분자세포생물학 및 유전체학적인 특성 비교분석.
  - 기존에 확립된 각종 배아줄기세포의 분자세포생물학적 분석 및 마이크로 어레이를 통한 전체적인 유전자 변화 검증 시도.
- ⑤ 수립한 만능줄기세포에의 표지유전자도입 후 배아와의 응집을 통한 키메라 배아 생산유도 및 효율성 비교.
  - 다양한 방법으로 생산된 배아줄기세포의 표지 후 발생 초기 배아와의 응집을 유도하고 키메라 배아의 분석 시도.
- ⑥ 만능줄기세포를 공여핵으로 이용한 핵이식 배아 생산 및 체세포핵이식 배아와의 생산효율 및 특성 비교분석.
  - 다양하게 생산된 만능줄기세포를 공여핵으로 이용한 핵이식 배아 생산하고 그 생산 효율을 체세포핵이식 배아와 비교했으며 inner cell mass (ICM)과 trophectoderm (TE)의 비율을 통해 특성을 비교.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### ① 연구논문게재 성과

작성시점 현재 SCI급 국외학술지 8편, KCI급 국내학술지 8편 및 일반 국내학술지 1편 게재

### ② 특허출원 및 등록 성과

보고서 작성시점 현재 국내 특허 등록 1건 (등록번호 101490229)

### ③ 인력지원성과

보고서 작성시점 현재 석사5인 배출

### ④ 실용화, 산업화 및 교육지도 홍보 등 기술 확산 계획

- ㄱ. 한우에서 배아줄기세포를 이용한 유전자원 보존기법개발로 새로운 한우유전자 관리시스템 구축 (embryo and stem cell banking)
- ㄴ. 한우유전자 관리시스템을 통해 보존된 우량 유전자 줄기세포를 통해 손쉬운 품종개량 시도
- ㄷ. 한우유전자 관리시스템을 통해 우량 유전자 연구를 통해 질병연구 및 특정질병에 강한 한우개량 시도
- ㄹ. 산업체, 학계 및 지방자치단체의 협업에 의한 농축산 기술 증진 및 고급연구인력을 생산을 통한 국내 및 국제 경쟁력 강화
- ㅁ. 연구를 통한 기술 및 특허를 기업과 공유해 농·축산업에 접목해 실용화 구현

### ⑤ 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- ㄱ. 기 확보된 특허의 개량특허 개발계획 및 1편의 SCI 투고하였음 (현재 review 중).

### ⑥ 추가연구, 타연구에 활용 계획

현재 ‘첨단 배양 및 보존기법을 활용한 소 수정란 이식 효율 개선’ 이라는 제목으로 2016년도부터 본 연구과제의 참여기업과 함께 개발한 특허를 기반으로 소 수정란을 실온에서 보관할 수 있는 보존액 개발에 참여하고 있으며 이러한 추가적인 연구를 통해 본 연구에서 개발한 기술을 실용화 및 산업화에 활용할 계획임.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Title

Conservation and utilization of genome resources by the generation and analysis of non-embryonic pluripotent stem cells in livestock

#### II. Quantitative outcome

Total 8 peer-reviewed papers were published in SCI journals and 1 patent was registered. Based on this patent, 1 licence agreement was completed.

#### III. Purposes and Necessities

- In the purpose of this project is to isolate somatic cells and multipotent stem cells (adult stem cell) from diverse organization in bovine and generate induced pluripotent stem cells or induce direct differentiated cells from the isolated cells by epigenetic modification or regulation of signaling pathways. Finally, we analyzed generated stem cells or direct differentiated cells by molecular cell biological and development engineering tools.

#### IV. Contents and Scope

- ① Isolation of somatic cells and multipotent stem cells.
- ② Inducing epigenetic modification by candidate small molecules and selection the most effective combinations.
- ③ The generation of Induced pluripotent stem cells and direct differentiated cells by epigenetic modification and regulation of signaling pathways.
- ④ The analysis of pluripotent stem cells by molecular biological and functional genomic level.
- ⑤ The production and analysis of chimeric embryos after introducing marker genes into generated pluripotent stem cells.
- ⑥ The production of nuclear transfer embryos using pluripotent stem cells as a donor and the analysis of characteristics comparing with that of somatic cell nuclear transfer embryos.

## V. Results

① Isolation of somatic cells and multipotent stem cells.

- The isolation and culture of multipotent stem cells and precursor cells from skin, tooth and nervous tissue.

② Inducing epigenetic modification by candidate small molecules and selection the most effective combinations.

- The optimization of in vitro culture system for bovine pluripotent stem cells by small molecules.
- The analysis of bovine pluripotent stem cells by small molecules by molecular cell biological tools.

③ The generation of Induced pluripotent stem cells and direct differentiated cells by epigenetic modification and regulation of signaling pathways.

- The inducing cell reprogramming by viral and non-viral tools and the optimization of culture system.
- The inducing cell reprogramming by epigenetic modification.
- The inducing direct differentiation into salivary gland and the analysis of them by various molecular cell biological tools.

④ The analysis of pluripotent stem cells by molecular biological and functional genomic level.

- The molecular cell biological analysis and microarray analysis of bovine pluripotent stem cells.

⑤ The production and analysis of chimeric embryos after introducing marker genes into generated pluripotent stem cells.

- The production of bovine chimeric embryos and the developmental analysis of them during early development stages.

⑥ The production of nuclear transfer embryos using pluripotent stem cells as a donor and the analysis of characteristics comparing with that of somatic cell nuclear transfer embryos.

- The production of nuclear transfer embryos using bovine pluripotent stem cells as a donor and the comparison analysis of blastocyst and ICM/TE rate of them with that of somatic cell nuclear transfer embryos.

## VI. Outcomes and future application plans

### Outcomes

#### ① Peer-reviewed research articles

Published 8 peer-reviewed articles in SCI-indexed journals.

#### ② Patent Application and Registration Accomplishments

One Korean patent was registered (number 101490229).

#### ③ Human resource development

Total 5 graduate students obtained master's degrees with financial supports from this research project.

### Future application plans

#### ① Security plans for intellectual property rights such as international and local patents, strain register, and research articles, etc.

- The establishment of embryo and stem cell banking system
- The establishment of easy production technique to develop a better breed of bovine
- The study of disease research and attempt to generate specific disease-resistant bovine through stem cell banking system
- The consolidation of competitive power for agriculture and stockbreeding by collaborations between academia and business
- The commercialization of the products by collaborations between academia and business

#### ② Security plans for intellectual property rights such as international and local patents, strain register, and research articles, etc.

- Publication plans of 2 additional research articles

#### ③ Further researches and applications to other related researches

We are currently conducting the project entitled “ The efficiency improvement of bovine embryos using cutting-edge culture systems and preserved techniques “.



**CONTENTS**  
**(영 문 목 차)**

Chapter 1	Introduction and research goals -----	10
Verse 1	Introduction -----	10
Verse 2	Outcome and goals -----	13
Chapter 2	Global and national position of technical development -----	14
Verse 1	Current status of technical development -----	14
Verse 2	The status of our results -----	15
Chapter 3	Contents and results -----	16
Verse 1	Materials and methods -----	16
Verse 2	Contents and results -----	17
Chapter 4	Achievement and contribution -----	100
Verse 1	Achievements -----	100
Verse 2	Contribution to the related fields -----	101
Chapter 5	Outcomes and application plans -----	102
Verse 1	Outcomes -----	102
Verse 2	Application plans -----	104
Chapter 6	Acquisition of the information from oversea colleagues -----	105
Chapter 7	Facilities and equipments -----	106
Chapter 8	Safety control report -----	107
Chapter 9	References -----	111

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과 목표 -----	10
제 1 절	연구개발과제의 개요 -----	10
제 2 절	연구개발과제의 성과목표 -----	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	14
제 1 절	기술개발현황 -----	14
제 2 절	기술개발현황에서 차지하는 위치 -----	15
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	16
제 1 절	연구수행 방법 -----	16
제 2 절	연구내용 및 결과 -----	17
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	100
제 1 절	연구개발 목표의 달성도 -----	100
제 2 절	관련분야의 기술발전에의 기여도 -----	101
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	102
제 1 절	연구개발 성과 -----	102
제 2 절	성과활용계획-----	104
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	105
제 7 장	연구시설·장비 현황 -----	106
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 -----	107
제 9 장	참고문헌-----	111

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제1절 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 목적

- 소를 비롯한 경제동물의 각종 조직에서 유래한 체세포 및 다분화능을 지닌 성체줄기세포를 세포원으로 확보하고 이를 후성적 변화 및 분화경로 차단을 통해 유도만능줄기세포를 생산하거나 동일한 기법에 의해 교차분화를 유도하여 특정계통으로의 분화를 유도하고 생산된 각종 줄기세포 및 분화유도체는 분자세포생물학 및 핵이식 등 발생공학기법을 활용한 기능적 분석을 통해 특성규명 및 활용범위를 확인.

### 2. 연구개발의 필요성 및 범위

#### 가. 유도만능줄기세포 분야

- 미래의 재생의학에 있어 획기적인 발견이라 할 수 있는 유도만능줄기세포는 이미 분화가 완료된 체세포에 바이러스를 이용하여 줄기세포에 관여하는 유전자를 삽입, 역분화를 유도하여 줄기세포와 유사한 세포를 생성하는 것이나 바이러스를 사용한 유전자 삽입이 문제점으로 지적되고 있고 암종의 발생, 낮은 효율 등 단점이 발견되어 세포의 후성적 변화와 분화 신호경로의 차단에 의해 유도만능줄기세포를 생산할 필요성이 부각되고 있으며 이러한 단점을 보완하려는 연구가 세계 여러 연구진에 의해 시도되고 있음.
- 최초 일본 연구진에 의해 개발될 당시 Oct4, Sox2, c-Myc 및 Klf4의 4가지 유전자를 레트로바이러스를 이용하여 체세포 안으로 삽입시켜 이 유전자들의 발현에 의해 체세포의 역분화를 유도했으나 이는 매우 낮은 유전자 삽입율과 낮은 생존율 및 암형성 유전자 사용에 의한 이식 후 암종형성이 문제로 지적되었으며 레트로바이러스를 이용하였기 때문에 치료를 목적으로 사용할 경우 외래 바이러스의 잔존 등이 문제점으로 지적되고 있음. 이후 미국과 일본의 여러 연구진들은 종양형성을 유발하는 c-Myc, Klf4 등을 다른 유전자로 대체하거나 사용하지 않는 방법으로 암형성 유발을 억제하고 레트로바이러스 대신 더 안정적인 렌티바이러스를 사용하는 연구성과를 지속적으로 발표하고 있음.
- 세포의 DNA는 후성적 변화에 의해서 DNA들의 발현과 억제가 조절됨. 이것은 DNA 염기서열에 변화가 전혀 발생하지 않으면서 유전자 기능의 변화를 주는 것으로 이러한 현상의 주된 과정은 DNA 메틸화와 히스톤 변형이 관여하는 것으로 알려져 있음. 줄기세포에서는 Oct4, Nanog, Sox2 등의 DNA는 메틸화 비율이 낮고 히스톤이 아세틸화되어 느슨한 크로마틴 구조를 만들고 이것들이 발현하고 기능을 유지하고 있으나 분화가 완료된 체세포에서는 줄기세포 유지에 관련된 DNA들은 메틸화가 일어나고 히스톤이 탈아세틸화가 일어나서 조밀한 크로마틴 구조를 만들고 발현이 억제되어 기능을 하지 못하게 됨. 그러므로 체세포에 메틸화되어 있는 DNA를 탈메틸화 하고 탈아세틸화되어 있는 히스톤을 아세틸화 시키면 체세포는 다시 줄기세포와 유사한 성향의

세포로 바뀔 수 있음. 또한 마우스 줄기세포의 경우 STAT3/LIF 신호와 BMP 신호에 의해 줄기세포의 특성이 유지되는데 최근 이러한 신호를 자극하지 않고 분화와 관련된 신호를 억제하여도 줄기세포의 성상이 유지가 된다는 결과가 보고됨. 그러므로 후성적 변화와 동시에 줄기세포 유지신호 및 분화관련 신호억제기술을 통해 유도만능줄기세포로의 변화를 유도하는 기술이 부각되고 있음.

- 배아줄기세포의 경우 사용되는 세포자원의 문제로 지속적으로 윤리적인 문제가 대두되고 그에 따라 사회적인 큰 쟁점으로 논의되고 있음. 가장 큰 문제점으로 논의되고 있는 것은 배아줄기세포 확립 시 사용되는 배반포가 하나의 생명체로서 인정할 것인가 하는 것과 핵이식 복제배아줄기세포의 경우 배반포 단계에서 착상유도에 의한 개체발생으로 인한 복제인간의 탄생을 불러 올 수 있다는 위험성으로 이로 인해 전분화능 줄기세포 연구 전반에 대한 우려의 목소리가 사회일각에서 나오고 있는 것이 현실임. 그러나 새로운 개념의 유도만능줄기세포의 개발로 이와 같은 문제점을 상당부분 극복할 수 있을 것으로 전망됨.
- 윤리적 관점에서의 문제를 회피할 수 있는 방안으로 각광을 받았던 유도만능줄기세포는 그러나 최근 이 세포의 면역적합성이 실제 체세포를 제공한 공여자와 반드시 일치하지 않는다는 연구보고로 인해 배아줄기세포에 대한 연구가 다시금 부각되고 있으며 특히 체세포핵이식유래 자가 배아줄기세포 등과의 특성에 관한 비교분석이 반드시 필요한 것으로 주장되고 있음.

#### 나. 중대형 실험동물 및 경제동물에서의 줄기세포 분야

- 현재까지 경제동물 특히 소에서는 마우스나 인간과는 달리 엄격한 의미에서의 배아줄기세포의 생산이 이뤄진 바 없으나 중·대동물에서의 줄기세포 유사세포의 경우 인간배아줄기세포 또는 마우스에서의 배아위관줄기세포 (epiblast stem cell)과 매우 유사한 성질을 가지고 있어 이를 확보할 경우 유전자원의 보존 및 증식에 이바지할 뿐만 아니라 인간배아줄기세포의 전임상모델로서 마우스보다 활용가치가 높을 것으로 생각됨.
- 중·대형 실험동물의 비배아성 줄기세포 수립에 본 연구 결과와 기술을 적용할 경우 약물독성 테스트 등에 중·대동물을 이용한 동물실험의 대체실험용으로 활용이 가능함.
- 역분화 시키고자 하는 세포에서 역분화 유도인자 중 일부가 이미 발현되고 있다면 그 유전자를 제외한 나머지 유전자를 도입함으로써 역분화세포를 제작할 수 있을 것으로 여겨짐.
- 현재 역분화 방법의 한 축으로 인식되고 있는 역분화 만능 줄기세포 유도 유전자 삽입 방법은 유전자 자체가 암 발생과 연관된 유전인자가 포함되어 있으며, 벡터로 이용 되는 바이러스 또한 암 발생을 유발할 가능성이 매우 높으므로, 현실적으로 임상 적용과는 거리가 멀다고 할 수 있음. 그러므로 상용화 측면에서 직접적인 게놈 내 유전자조작에 의한 역분화 보다는 역분화를 유도할 수 있는 소분자 물질이나 단백질 또는 shRNA 등을 발굴하여 후성적 인자 (epigenetic factor) 조절 또는 유전자제어기술을 적용함으로써 역분화를 유도하는 기술을 개발하여 이를 적용한다면 바이러스 삽입 또 종양발생유전자 삽입에 따른 우려를 불식할 수 있을 것으로 보임.
- 이 분야는 아직까지는 미개척 분야이기 때문에 원천기술을 확보할 가능성이 매우 높다고

할 수 있지만, 현재 급속도로 발전하고 있는 분야이기도 하기 때문에 때를 놓칠 경우 일본이나 미국 등의 선진국에 중요 기술을 선점 당하게 되면, 우리나라의 입지가 좁아지게 되는 것은 물론, 경제적 및 산업적 손실을 입는 것이 명백함.

- 경제동물, 특히 부가가치가 높은 고유유전자원인 한우에서 이러한 연구를 수행하기 위해서는 한우에서 배아줄기세포 특히 핵이식유래 자가배아줄기세포의 확보 및 연구경험이 매우 중요한데 본 연구진은 지난 3년간 농림수산식품부에서 관련과제를 수행하여 해당 세포주를 기 확보하고 있어 후속연구 성격인 본 연구의 수행에 적합한 연구팀이며 본 연구과제를 성공적으로 수행할 수 있을 것으로 생각됨.

#### 다. 교차분화에 의한 특정계통 분화연구 분야

- 유도만능줄기세포가 개발된 이후 유전자삽입 및 화학물질, 단백질 및 micro RNA를 이용하여 유도만능줄기세포의 효율증진 및 암형성 차단 등을 위한 수많은 연구가 진행되었으나 아직 그 단점이 완벽히 극복되지 못한 실정임. 이러한 연구를 바탕으로 2009년 미국 연구진에 의해 분화가 완료된 체세포를 유도만능줄기세포 만든 후 다시 분화를 유도하여 원하는 세포로 분화하는 복잡한 단계 대신 *Ascl1*, *Brn2* 및 *Myt1l*의 삽입을 통해 분화가 완료된 피부세포를 직접 신경세포로 분화하는데 성공함.
- 일반적으로 성체줄기세포는 증식배양에 어려움이 있는 것으로 알려져 있으나 신경줄기세포의 하나로 알려진 피부전구세포 등 특정세포군의 경우 비침습적 방법에 의한 회수 및 안정적 증식배양이 가능함. 특히 본 연구진은 최근 수년간의 연구로 피부전구세포의 안정적 증식배양 기법을 확보함. 따라서 유도만능줄기세포와 성체줄기세포의 단점을 동시에 극복할 수 있는 피부전구세포의 교차분화의 연구가 이루어진다면 얻기 쉬운 세포자원으로 인해 더 안정적 생산이 가능하고 교차분화를 통해 치료에 목적에 더 부합한 세포를 생산할 수 있기 때문에 향후 세포치료 산업분야에서의 경제적 산업적 이용가치가 매우 높다고 할 수 있음.

## 제2절 연구개발과제의 성과목표

### 1. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	1	1	7	7	15	1	1	-	-	4	-	1	-
1차년도	목표	-	-	1	2	3	-	-	-	-	1	-	-
	실적	1	-	-	4	4	-	-	-	-	1	-	-
2차년도	목표	1	-	2	2	4	-	-	-	-	1	-	-
	실적	-	-	2	1	4	-	-	-	-	1	-	-
3차년도	목표	-	-	2	2	4	-	-	-	-	1	-	-
	실적	-	-	2	4	4	-	-	-	-	2	-	1
4차년도	목표	-	1	2	1	4	1	1	-	-	1	-	1
	실적			4	-	4	1	1			1		
5차년도	목표												
	실적												
소 계	목표	1	1	7	7	15	1	1	-	-	4	-	1
	실적	1	-	8	9	16	1	1	-	-	5	-	1
종료 1차년도			1									1	
종료 2차년도			1										
종료 3차년도													
종료 4차년도													
종료 5차년도													
소 계	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
합 계	1	1	10	9	16	1	1	-	-	5	-	1	1

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내·외 기술개발현황

#### 1. 국내 기술개발 현황

- 한국 서울대학교 김효수 교수 연구진: 마우스 배아줄기세포의 추출물을 이용하여 인간 섬유모세포의 역분화 재프로그래밍을 유도, 외래유전자삽입이 배제된 유도만능줄기세포를 생산, 이를 이용하여 조혈모세포 분화에 성공
- 한국 카이스트 한용만 교수 연구진: 후성적 변화에 의한 세포 재프로그래밍 및 소에서 핵이식배아의 후성성에 관한 다수의 연구보고.
- 한국 서울대학교 노상호 교수 연구진: 한우에서 체외수정란, 단위발생 및 체세포핵이식 유래 배아줄기세포주 수립에 성공.

#### 2. 국외 기술개발 현황

- 일본 Kyoto 대학 Yamanaka 교수 연구진: 세계최초로 4개의 유전자(Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4)를 바이러스를 이용하여 체세포에 삽입함으로써 유도만능줄기세포 개발. 최근에는 바이러스를 사용하지 않고 외부에서 소분자물질 등을 처리하여 후성적 변화유도를 통한 기법을 통하여 유도만능줄기세포를 확립하는 방법을 보고.
- 미국 Whitehead Institute Jaenisch 교수 연구진: 일본의 연구결과 재현 및 유사기술 개발.
- 미국 Harvard 대학 Melton 교수 연구진: Oct4, Sox2 두 가지 유전자만을 삽입시키고 valproic acid와 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 억제물을 넣어 유도만능줄기세포 유도.
- 독일 Max Planck 연구소 Hans R. Scholer 연구진: 신경줄기세포에 Oct4, Klf 2개의 유전자를 삽입하여 유도만능줄기세포를 확립하여 발표한 후 현재는 Oct4단일 유전자 삽입으로 유도만능줄기세포를 유도함.
- 미국 Stanford 대학 Wernig 교수 연구진: 분화가 완료된 피부세포를 이용하여 Ascl1, Brn2, Myt1l을 삽입하여 신경세포로 직접 교차분화.
- 미국 Scripps 연구소 Ding 박사 연구진: 피부의 섬유모세포에 유도만능줄기세포의 4개의 유전자를 삽입하고 화학물질을 이용하여 유도만능줄기세포를 유도하지 않고 11일만에 심근세포로 직접 분화.
- 영국 캠브리지대학 Simth 교수 연구진: 전능성 줄기세포를 Ground state (배아줄기세포: ESC)와 Primed state (배아위관줄기세포:EpiSC)로 구분하여 이를 상호전환할 수 있는 인자를 발굴하여 제시 및 상업적으로 생산판매. 또한 동 연구진은 신경줄기세포에서 fgf 신호경로 억제를 통해 유도만능줄기세포를 생산하였음.
- 미국 Brook and Gardner 교수 연구진: 마우스를 이용하여 배아줄기세포를 효율적으로 확립하는 방법을 개발하였으며 현재 다양한 배반포가 제작되어 이 방법을 기초로 배아줄기세포의 확립에 이용. 마우스 이외에도 소, 돼지, 양 등의 경제동물 등에서도 여러

실험그룹에서 유사배아줄기세포를 확립하여 유전자원 보존 및 응용 연구에 이용하고 있음.

- 오스트레일리아 Monash 대학의 Verma 박사 연구진: 소 및 양의 체세포에서 야마나카 팩터라 불리는 Oct4, Sox2, c-Myc 및 Klf4의 4가지 유전자에 Nanog를 추가로 형질도입하여 유도만능줄기세포 생산에 성공하였으며 외래삽입 유전자는 이후 세포 내에서 발현되지 않는 것을 확인.
- 오스트레일리아 Monash 대학의 Verma 박사 연구진: 소 체외수정 및 단위발생 배반포 유래의 배아줄기세포 주 수립 보고.
- 미국 Georgia 대학의 Stice 교수 연구진: 돼지 유도만능줄기세포를 이용한 키메라 돼지 생산보고.

## 제2절 기술개발현황에서 차지하는 위치

### 1. 국내 기술개발 위치

- 현재 국내의 대부분의 연구는 마우스와 인간 중심의 연구에 치중되어 있으며 이에 대한 기술은 세계정상급 수준이고 이를 통한 다양한 연구가 지금까지도 지속되고 있음. 그러나 마우스와 인간 이외 다른 종에 대한 연구는 극히 적으며 대부분이 돼지에서 진행되고 있어 사실상 고 부가가치가 있는 소 연구가 매우 뒤쳐져 있는 것으로 판단됨. 최근에 전 세계적으로 생활환경이 나아지며 육류 소비 특히 소고기의 소비가 급증하고 있는 것을 고려하면 소에 대한 연구 및 투자가 절실함. 특히 마우스나 인간에서는 줄기세포 접목 연구 및 산업이 많이 진행되는 반면 소와 같은 대동물에서는 거의 없어 줄기세포 생산 및 활용을 통해 종 개량, 우량종 유전정보 보존 및 질병강화 소 생산을 한다면 축산 분야에 선두 그룹을 차지할 수 있을 것으로 생각됨.

### 2. 국외 기술개발 위치

- 세계적으로 가축의 줄기세포 연구는 마우스나 사람에 비해 상대적으로 낮은 수준을 차지하고 있으나 형질전환 동물 생산 및 그 활용에 대한 연구는 꾸준함. 소 분야에서는 현재까지 완전 줄기세포 생산을 확립하지 못했으며 줄기세포 확립 및 배양조건에 대한 연구가 진행 중임. 최근 일부 연구 팀에서 소 유래 유도만능줄기세포에 대한 연구를 보고 하였으나 완전한 배양조건을 확립해 배아줄기세포와 배양조건을 함께 할수 있는 보고는 없음. 또한 재현성이 없는 연구들이 대부분으로 현재까지 완전한 소유래 전능성 줄기세포 생산 및 유지가 확립되지는 못함. 그러나 대부분의 그룹에서 전능성 줄기세포생산에 초점을 두고 있으나 확립이 되지 않는 이유나 전능성 메커니즘을 연구하는 보고는 없어 이러한 분야의 연구가 매우 중요할 것으로 생각됨.



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구수행 방법

1. 소의 다양한 조직에서 체세포 및 성체줄기세포성 전구세포 분리유도.
  - 성체 및 태아의 다양한 조직을 확보해 물리적으로 작은 조직 덩어리로 만든 후 단백질분해 효소를 포함하고 있는 solution (dispase, Trypsin)을 처리해 단일세포로 만들고 세포에 적합한 배양액을 통해 체외 배양을 시도함.
2. 다양한 소분자물질을 이용한 전능성 줄기세포 배양환경 조성 및 최적화
  - 소 전능성 환경을 확립하기 위해 먼저 소 배아 유래 전능성 세포를 통해 체외 배양을 시도함. 소 배반포를 얻어 지지세포 위에 부착시킨 후 기존에 알려져 있는 배양조건 (DMEM,  $\alpha$ -MEM 및 KnockOut™-DMEM 기본 배양액) 및 소분자물질을 이용한 배양조건을 (PD18435, SU5402 및 CHIR99021 조합 배양액) 이용해 장기배양을 시도하고 부착율, 증식 및 세포에 적합한 계대법을 확립하고 최적화 시도.
  - 장기배양에 성공한 세포가 전능성 줄기세포임을 증명하기 위해 배양된 세포의 증식력 (BrdU 분석), 전능성 마커 (mRNA 및 protein 수준 분석), 체외 분화능 (embryonic body 분석) 및 체내 분화능 검증 (teratoma 분석).
3. 다양한 활성 및 억제인자를 이용한 체세포 및 성체줄기세포의 역분화 및 교차분화유도
  - 바이러스 (레트로바이러스) 및 비바이러스성 (Episomal vector, 전기천공법) 방법을 통해 전능성 유전자를 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 및 Nanog) 앞서 확립된 체세포 및 성체줄기세포에 삽입해 역분화를 유도하고 최적의 배양조건을 확립.
  - 특정 분화된 세포의 배양액 또는 co-culture를 통해 다른 계통의 성체줄기세포의 성상 변화를 통해 교차분화를 유도하고 다양한 분자생물학적인 방법으로 검증 시도.
4. 다양한 소 배아유래 줄기세포의 분자세포생물학 및 유전체학적인 특성 비교분석.
  - 마이크로 어레이 방법을 통해 장기배양에 성공한 소 유래 전능성 줄기세포를 분석하고 변화된 유전자를 분석해 기존에 알려진 전능성 줄기세포와의 공통점과 차이점을 확인하고 소 종 특이적인 전능성 유지관련 신호전달 체계 검증 시도.
5. 수립한 만능줄기세포에의 표지유전자도입 후 배아와의 응집을 통한 키메라 배아 생산유도 및 효율성 비교.
  - 생산된 전능성 줄기세포에 dored와 같은 표지 유전자를 삽입하고 4- 또는 8-세포기 배아에 삽입해 키메라 배아를 유도하고 삽입된 세포가 배반포 단계에서 어떠한 세포 운명을 갖는지 확인 검증.

## 제 2절 연구내용 및 결과

### 1. 소의 다양한 조직에서 체세포 및 성체줄기세포성 전구세포 분리

가. 체세포 및 성체줄기세포를 이용한 역분화 유도만능줄기세포 생산 및 특성분석

(1) 소 유래 다양한 체세포 및 성체 줄기세포 확립

(가) 소 귀 조직 유래 체세포 분리 및 체외 배양 최적화

- 우량 소 귀에서 조직을 확보해 dispase/trypsin 처리를 통해 단일 세포로 분리 후 부착 배양을 통해 DMEM을 기본으로 10% serum, 1% NEAA, 50 Units/ml penicillin 그리고 50 ug/ml streptomycin,를 첨가해 배양함 (그림 1)



그림 1. 체외 배양된 우량 소 귀조직 유래 체세포의 형태.

(나) 소 치수 유래 성체 줄기세포 분리 및 배양조건 최적화

- 소 치수 조직을 통해 성체줄기세포를 확립. 치수 유래 성체 줄기세포는 골수 유래 성체줄기세포와 같이 중간엽성 세포로 다분화능을 갖고 있는 것으로 보고됨. 또한 다른 조직의 세포보다 전능성이 좋아 재프로그래밍에 유리한 것으로 보고되어 다른 성체줄기세포 보다 유용하게 적용할 수 있을 것으로 기대됨. 본 연구에서는 소의 머리에서 턱을 분리해 소의 이빨을 발치 후 치아 절개를 통해 치수 조직을 확보하고 dispase/trypsin 처리를 통해 단일 세포로 분리 후 부착 배양을 통해 alpha-MEM을 기본으로 10% serum, 50 Units/ml penicillin 그리고 50 ug/ml streptomycin를 첨가해 배양함 (그림 2)

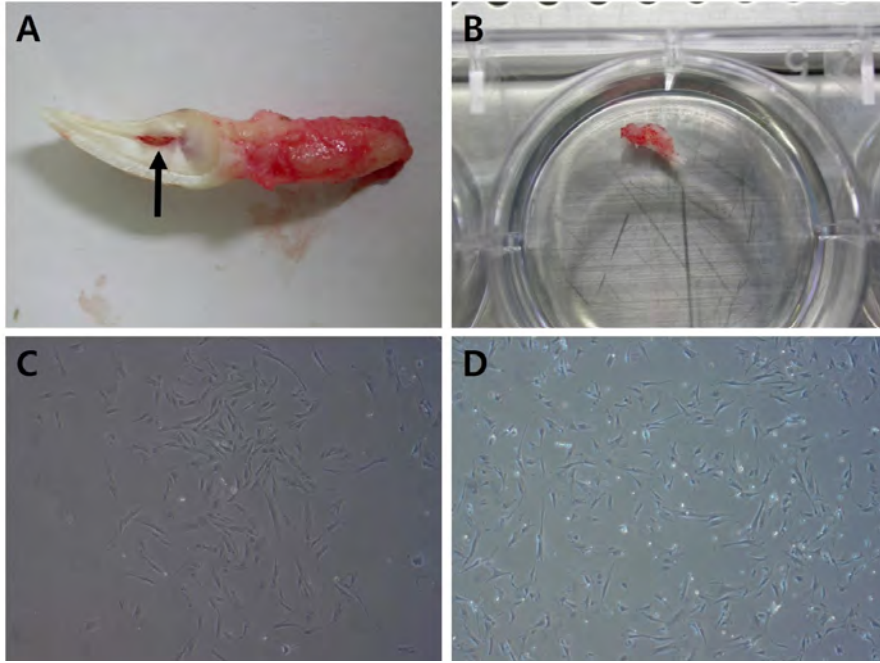


그림 2. 소 치수 조직 유래 성체 줄기세포 확립 및 체외 배양. (A) 소 앞니 절단 후 모습. 화살표는 치수 조직을 표시함. (B) 소 유래 치수조직. (C) 소 치수 조직 유래 초기 성체줄기세포. (D) 2계대 후 소 치수 조직 유래 성체줄기세포.

(다) 소 유래 치주인대 줄기세포 분리 및 배양조건 최적화

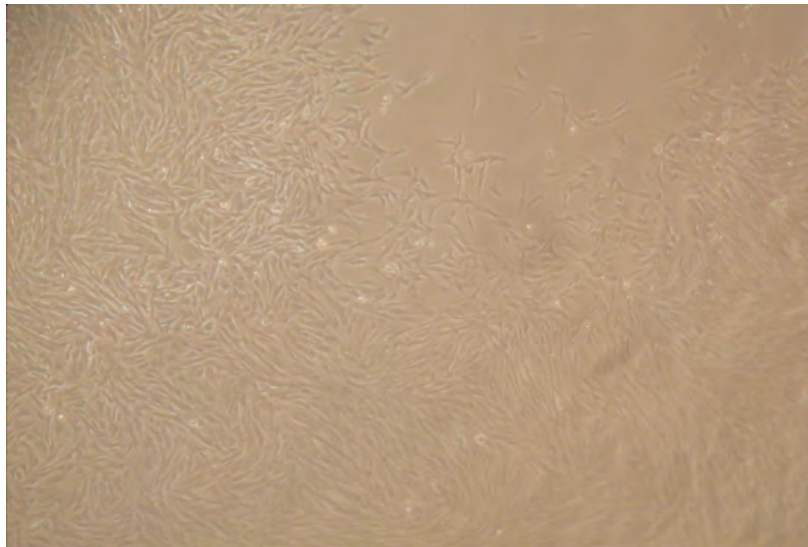


그림 3. 초기 배양된 소 치주인대 줄기세포의 외형적 모습

- 소 치아 주변에 분포하고 있는 치주인대에서 줄기세포를 분리하였음. 치주인대줄기세포는 치수줄기세포와 마찬가지로 분화능이 우수하고 유도만능줄기세포의 자원으로써 최적임. dispase/trypsin 처리를 통해 단일세포로 분리 후 부착 배양을 통해 alpha-MEM을 기본으로 15% serum, 50 Units/ml penicillin 그리고 50 ug/ml streptomycin를 첨가해 배양함 (그림 3)

(라) 소 유래 신경 줄기세포 분리 및 체외 배양 최적화

- 소의 뇌로부터 얻은 조직을 dispase/trypsin 처리를 통해 단일 세포로 분리 후 부착 배양을 통해 DMEM/F12(1:1)을 기본으로 FGF2, EGF, N2B27, ITS, dexamethasone, 50 Units/ml penicillin 그리고 50 ug/ml streptomycin를 첨가해 배양함 (그림 4)

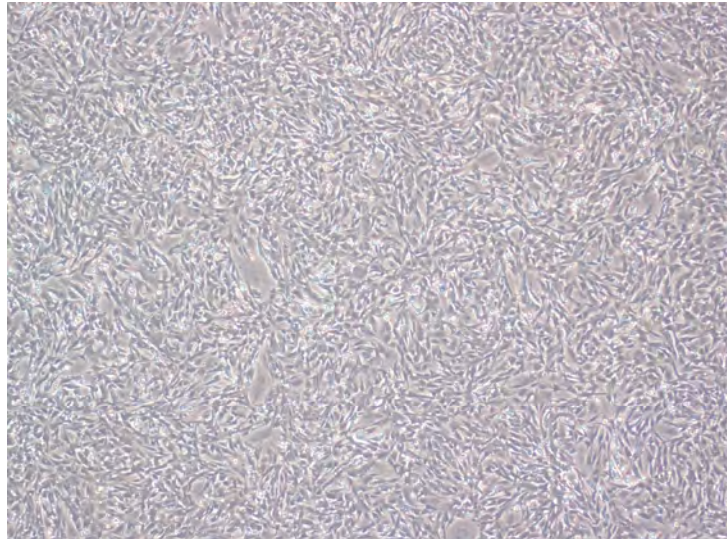


그림 4. 체외 배양된 소 뇌 조직 유래 신경줄기세포의 형태

(2) 소 태아 유래 체세포 분리 및 체외 배양 최적화

(가) 소 태아 대퇴 주변 조직 유래 체세포 분리 및 체외 배양 최적화

- 도축이 진행 중인 소의 자궁에서 확보한 태아를 생리식염수에 보존하여 가져온 후 3X penicillin이 첨가된 PBS로 3회 세정하고 다리 부위의 조직을 확보하여 dispase/trypsin 처리를 통해 단일 세포로 분리하고 이후 부착배양을 통해 DMEM을 기본으로 10% serum, 1% NEAA, 50 Units/ml penicillin 그리고 50 ug/ml streptomycin을 첨가해 배양함 (그림 5)



그림 5. 소 태아 유래 섬유아세포의 형태. (A) 전체 소 태아의 모습. (B) 초기 소 태아 유래 섬유아세포. (C) 7 계대 후 소 태아 섬유아세포.

(나) 소 태아 심장 조직 유래 세포 분리 및 체외 배양 최적화

- 소 태아의 심장 조직을 확보해 dispase/trypsin 처리를 통해 단일 세포로 분리 후 부착 배양을 통해 DMEM을 기본으로 10% serum, 1% NEAA, 0.1% Fugizone, 50 Units/ml penicillin 그리고 50ug/ml streptomycin을 첨가해 배양함 (그림 6).

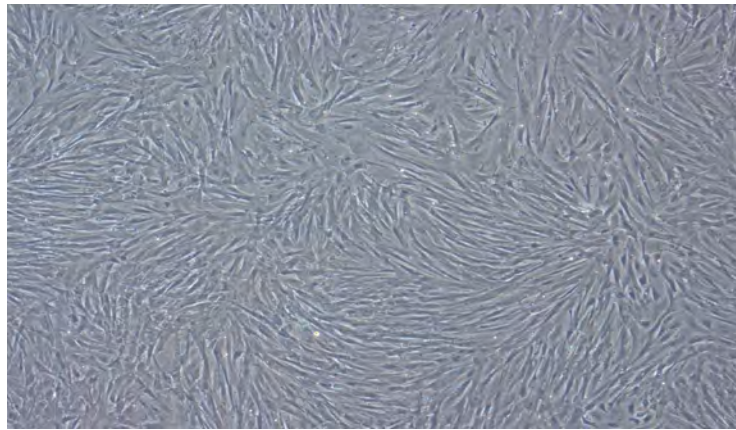


그림 6. 체외 배양된 소 태아 심장 조직 유래 세포의 형태

### (3) 각종 성체줄기세포의 분리 및 배양 기법 확립

- 본 연구에서는 소의 전능성 줄기세포 생산에 앞서 기존에 확립된 마우스와 사람 유래 전능성 줄기세포를 대조군으로 사용하고자함. 역분화 유도만능줄기세포를 효과적으로 생산하기 위해서는 분화가 완료된 체세포 보다는 성체가 가지고 있는 줄기세포를 이용하는 것이 좋다는 보고에 의거하여 성체에서 쉽게 얻을 수 있는 다양한 줄기 세포주를 분리 및 배양하는 기법을 확립하였음. 이는 역분화 줄기세포 확립의 자원으로서의 활용 뿐 아니라 성체줄기세포를 분리 배양하는 기술을 확립하는 그 자체적으로도 의미를 가짐.

#### (가) 마우스 피부전구세포에서의 신경능 줄기세포의 분리 배양

- 피부전구세포는 피부의 분포하고 있는 줄기세포로서 마우스의 등쪽 피부로부터 분리 배양을 시도하였음. 또한 유도만능줄기세포를 만들기 위한 자원으로서 효과적으로 역분화 관련 유전자의 발현을 향상시키기 위해 LIF에 의한 효과를 검증하였음.

##### ① 마우스 피부로부터 전구세포의 분리 및 배양

##### ㉓ 마우스 등쪽 피부로부터 전구세포의 분리 배양

- 지방조직이 적고 분리가 용이한 마우스의 등 쪽 피부를 털을 제거한 후 분리하여 단일 세포로 분리 후 부유배양을 통해 2-3주후 구형의 전구세포 배양하였음 (그림 7)

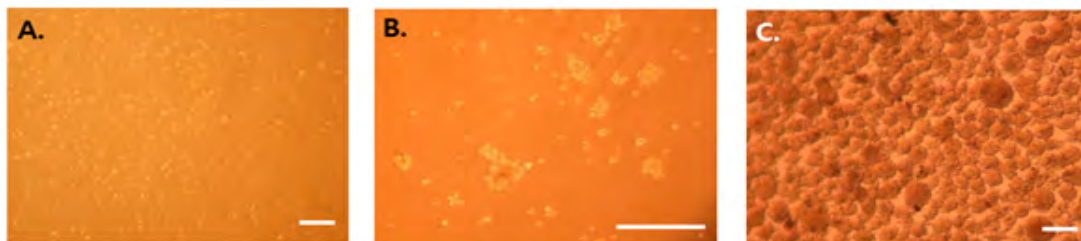


그림 7. 마우스 피부전구세포의 배양. (A) 마우스 등쪽 피부로부터 단일세포 분리 (passage 0). (B) 배양 1주일 후 초기 구형 세포 (passage 1). (C) 배양 3주후 큰 구형전구세포 (passage 3). Bar, 40  $\mu$ m

## ② 전구세포의 분화능 검증

- 분리 배양된 전구세포가 줄기세포로서 기능을 하는지 신경세포와 지방세포로의 분화의 유도를 통해 다분화능을 검증하였음. laminin 코팅된 배양접시에 부착하여 신경세포 분화 배양액을 첨가하여 신경세포로의 분화를 유도하였고 지방세포 분화역시 지방세포 분화 배양액을 통해 유도하였음. 그 결과 신경세포 형태의 세포로 분화되는 것을 확인하였고 지방세포는 oil-Red O 염색을 통해 확인하였음 (그림 8)

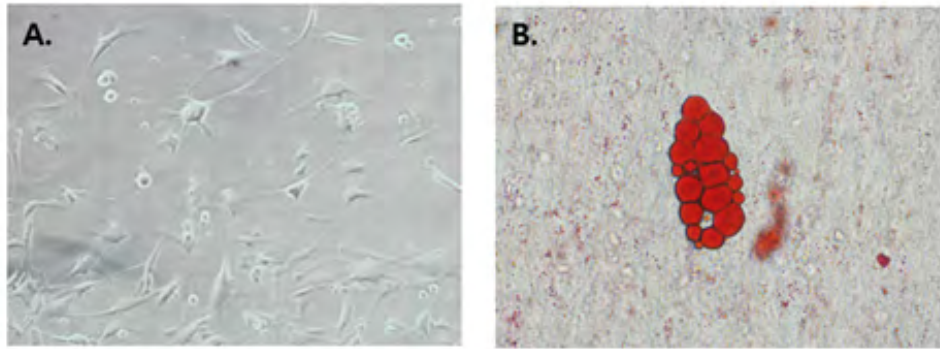


그림 8. 시험관내 피부전구세포의 분화 유도. (A) 피부전구세포로부터 분화된 여러 다른 종류들로 이뤄진 신경유사 세포 (B) Oil Red O 염색된 지방세포(빨간색).

## ③ 분리된 전구세포에 LIF의 효과

- LIF는 배아줄기세포에서 전능성 유지에 가장 중요한 인자로 알려져 있음. 분리 배양된 구형의 전구세포에 LIF를 72시간 처리하여 전능성 및 신경능세포 관련 유전자를 확인하여 LIF에 의해 전능성 관련 유전자의 향상이 유도되었는지 Oct4, Nanog, Klf4, c-Myc, Sani2, Ngfr의 유전자를 확인하였음. 그 결과 Oct4의 발현은 약 1.4배 증가하였으며 Nanog와 Ngfr은 각각 0.4배, 0.4배로 감소되었음. 이와 같은 결과로 비추어 볼 때 피부전구세포에서 LIF는 역분화의 중요한 유전자인 Oct4를 증가시켜 추후 역분화 줄기세포를 생산하는데 도움이 될 것으로 판단됨 (그림 9).

## (나) 치수 유래 중간엽성 줄기세포 분리 및 증식 배양

- 외과적으로 제거된 과잉치로부터 사람 치수 유래 줄기세포 분리 및 배양함 (그림 10)

발치된 치아의 크라운을 제거 후 파일을 이용하여 치수를 분리하여 효소에 의해 단일 세포로 분리 후 부착배양을 통해 90% alpha-MEM, 10% serum, 50 Units/ml penicillin and 50ug/ml streptomycin, 에서 배양함 (그림 10)

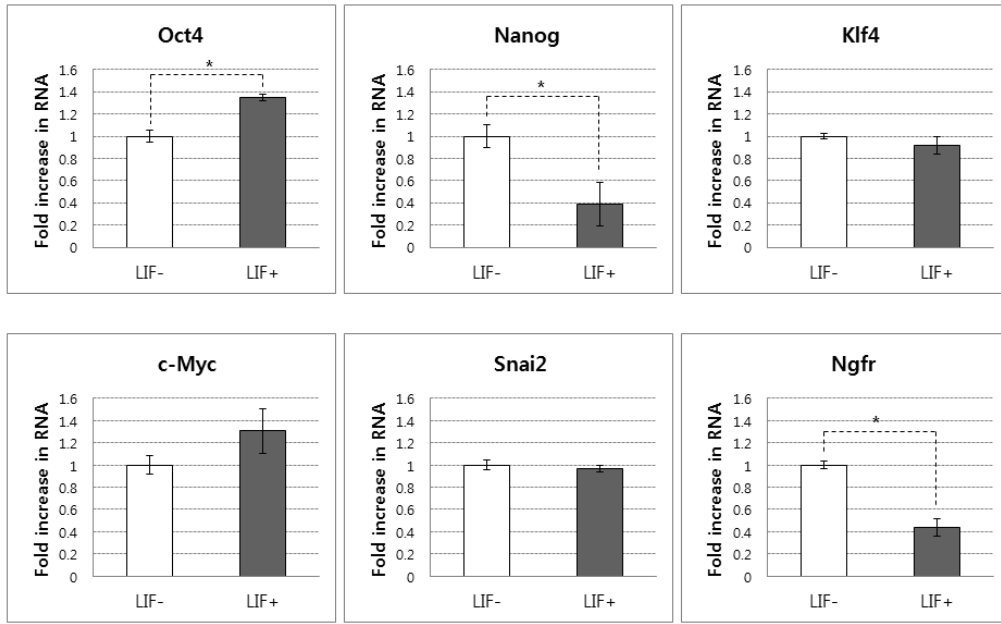


그림 9. 마우스 피부전구세포에 LIF(1000IU) 처리후 유전자 발현분석. 정량 real-time PCR을 이용하여 전능성관련 유전자 (*Oct4*, *Nanog*, *Klf4*, *c-Myc*)와 신경능세포관련 유전자 (*Snai2*, *Ngfr*)를 분석. 모든 값은 control 그룹(-LIF)의 값을 1기준으로 비교하여 분석하였음. (n = 4). \*P < 0.05.

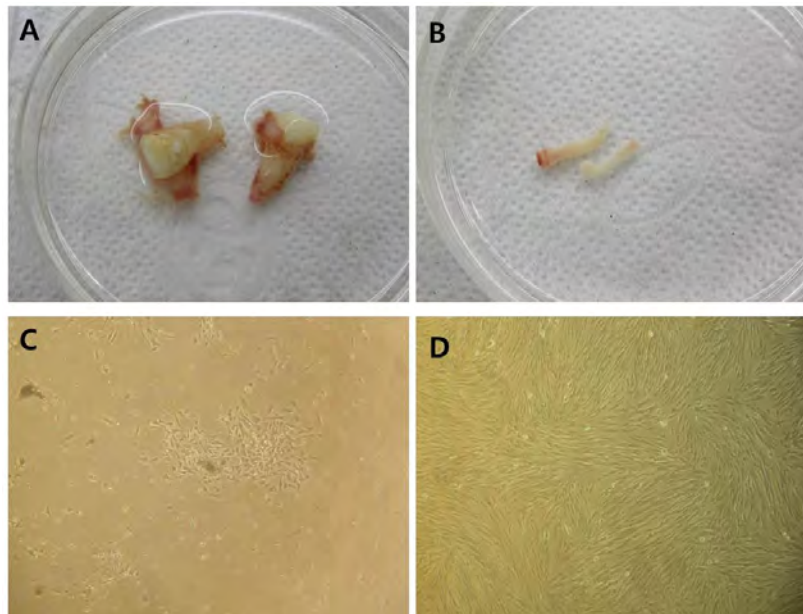


그림 10. 파이치를 이용한 사람치아 치수유래 줄기세포 분리 및 배양 (A) 발치된 사람의 과잉치. (B) 과잉치로부터 분리된 과잉치 유래 치수. (C) 치수조직을 이용한 1차배양 초기 치수유래 줄기세포. (D) 3계대 후 치수유래 줄기세포.

## 2. 다양한 소분자물질을 이용한 전능성 줄기세포 배양 환경 조성 및 최적화

### 가. 소 유래 배아줄기세포 분리 및 체외배양조건 최적화

- 유도만능줄기세포의 확립을 위해 배아줄기세포에서 배양액 조건 확립 및 정상확인 필수적이라고 할 수 있음. 소 유래 전능성 줄기세포의 보고가 없어 먼저 배아 유래의 전능성 세포를 분리해 체외 배양 환경을 확인하고 배양 조건을 최적화 하고자함. 배아줄기세포의 확립 기법 및 증식 배양을 통해 추후 유도만능줄기세포 확립에 적용할 것임.

#### (1) 소 배아 유래 각종 배아줄기세포의 생산

##### (가) 소 배아 유래 배아줄기세포를 위한 배양 조건 확립

- 다양한 소 배아로부터 배아줄기세포를 확립하기위해 먼저 기존의 보고된 마우스나 사람 유래 배아줄기세포를 배양하기 위한 조건을 변형해 적용하였고 초기 부착률, 콜로니 형성률 및 계대 성공률을 확인하였음. 먼저 대표적인 세 가지 배양조건 DMEM,  $\alpha$ -MEM 및 KnockOut™-DMEM을 이용하였고 초기 부착률은 KnockOut™-DMEM을 제외하고 DMEM과  $\alpha$ -MEM은 유사하게 50% 이상이였으며 초기 콜로니 형성 효율도 유사하였음 (표 1). 그러나 초기 계대에서는 DMEM이 높은 효율로 유지 되었으나 높은 계대로 갈수록  $\alpha$ -MEM 이 안정적으로 유지되었음 (표 2). 비록  $\alpha$ -MEM이 안정적으로 유지 되었지만 최종적으로 15 계대 이상을 넘기지 못해 기존에 알려진 마우스나 사람 유래 배아줄기세포 조건은 소 유래 배아 줄기세포에 적합하지 못함을 확인함.

표 1. Comparison of the attachment on feeder layer and primary colony formation of bovine embryonic cells cultured in three different culture systems.

	DMEM	$\alpha$ -MEM	KO
Total blastocysts	30	30	30
Number (%) of attachments	17 (56.7)	19 (63.3)	8 (26.7)
Number (%) of primary colonies	14 (46.6)	16 (53.3)	4 (13.3)
Primary colonies / Attachments	82.3%	84.2%	50%

표 2. Long-term maintenance capability of presumptive bovine ESCs cultured in three different culture systems

	No. of surviving presumptive ESC lines at				
	Primary colony (Passage 0)*	Passage 3	Passage 5	Passage 11	Passage 15
DMEM	14	14	13	1	0
$\alpha$ -MEM	16	6	6	4	1
KO	4	2	1	0	0

\*Each primary colony was derived from different embryos.



(나) 소분자 물질을 이용한 전능성 줄기세포 장기 배양 및 최적화

- 전능성 줄기세포의 장기 배양을 위해 분화와 관련된 경로를 차단하기 위해 억제제를 이용함. 기존에 줄기세포 분화와 관련된 FGF, ERK, GSK 경로를 억제제 처리를 통해 막고자 함. 먼저 이러한 경로 억제제가 줄기세포 확립에 있어 어떠한 영향이 있는지 확인하기 위해 세 가지 대표적 억제제인 PD18435, SU5402 그리고 CHIR99021를 이용하여 여러 조합을 배양액에 처리해 줄기세포를 확립하고자함. 결론 적으로 세 가지 억제제를 함께 이용한 그룹에서만 전능성 줄기세포 장기배양이 가능함 (표 3)

표 3. Comparison of various bovine embryonic stem cell culture media

	<i>No. of stem cell colonies at*</i>					
	<i>Passage 0</i>	<i>Passage 3</i>	<i>Passage 5</i>	<i>Passage 11</i>	<i>Passage 15</i>	
PD184352	5	1	0	0	0	
CHIR99021	5	1	1	0	0	
SU5402 + CHIR99021	5	3	1	0	0	
PD184352 + CHIR99021	5	3	2	2	0	
3i*	22	22	21	20	20	

\*When passaging, only one piece of four slices of the colony, which had been selected randomly, was passaged and maintained for this experiment.

\*\*PD184352 + CHIR99021 + SU5402

(다) 배반포 유래 다양한 세포집단을 통한 전능성 줄기세포 확립 시도

- 전능성 배아 유래 줄기세포는 일반적으로 배반포단계의 세포내 괴 (inner cell mass) 또는 배반포를 이용해 확립함. 본 연구에서는 소 배아 유래에서 전능성 줄기세포를 확립하기 위해 세포내 괴, 영양외배엽 (trophectoderm) 그리고 전체 배반포를 이용함. 결과적으로 세 가지 억제제가 첨가된 배양액에서 전체 배반포를 이용한 그룹만이 장기배양에 성공함 (표 4).

표 4. Comparison of cell source for outgrowth of embryonic cells\*

	<i>Inner cell mass</i>	<i>Trophectoderm</i>	<i>Whole embryo</i>
Maximum survival passage	4	4	15 and over

\*Three replicates; all the cases were conducted with 3i system.

(2) 소 핵이식 배아줄기세포 확립

(가) 핵이식 배반포 seeding 수에 따른 확립 효율

- 단일 개체의 seeding에 앞서 2, 3개의 배아를 한 well에 동시에 넣어 outgrowth 및 세포주 형성 효율을 검증하였음. 2개의 배아보다는 3개의 배아를 넣었을 경우 부착 및 세포주 확립 효율이 높은 것을 확인할 수 있었음 (표 5).

표 5. Generation of bovine somatic cell nuclear transfer-derived embryonic stem cell lines in Multi-seeded group

	Group 1*	Group 2**	Total
No. of repeats	6	3	9
No. of used embryos	12	9	21
No. of attachment of blastocyst (%)	7 (58.3)	7 (77.7)	14 (66.6)
No. of primary colony (%)	7 (58.3)	7 (77.7)	14 (66.6)
No. of primary colony wells (%)	4 (66.6)	3 (100)	7 (77.7)
No. of cell lines (%)	4 (66.6)	3 (100)	7 (77.7)

\* Seeding with two blastocysts each well

\*\* Seeding with three blastocysts each well

(나) 한 개의 핵이식 배아를 활용한 줄기세포주 확립 효율 검증

- 2-3개를 동시에 한 well에 seeding하여 확립한 결과를 바탕으로 well당 한 개씩 seeding하여 약 73% 세포주 확립 효율을 보임 (표 6)

표 6. Generation of bovine somatic cell nuclear transfer-derived embryonic stem cell lines in single-seeded group

Series	No. of used embryos	No. of attachment of blastocysts (%)	No. of primary colonies (%)	No. of cell lines (%)
1	6	4 (66.6)	4 (66.6)	4 (66.6)
2	5	4 (80.0)	4 (80.0)	4 (80.0)
Total	11	8 (72.7)	8 (72.7)	8 (72.7)

(다) 전능성 줄기세포 특성 분석

- 본 연구진은 1차년도 연구를 통해 다양한 방법으로 생산한 배아를 이용해 전능성 줄기세포를 체외에서 장기 배양에 성공함. 2차 년도에는 이러한 소유래 전능성 줄기세포의 특성을

분석하고자 하였음. 지금까지 소와 관련된 전능성 줄기세포의 보고는 대부분이 생산에만 초점을 두고 있지만 그 외 사람이나 마우스에서는 생산된 줄기세포의 성상을 다양하게 분석 보고 되고 있어 확립된 소 유래 전능성 줄기세포의 성상분석은 소뿐만 아니라 대동물 및 전능성 줄기세포 연구에 매우 중요한 자료로 생각됨. 특히 핵이식 배아 유래 전능성 줄기세포는 난자의 자연적인 재프로그래밍 인자를 통해 확립된 전능성 줄기세포로 인위적 유전자를 삽입해 확립한 유도만능줄기세포 분석 시 중요한 비교 배경자료로 사용될 수 있어 초기에 성상 분석 연구가 매우 중요함.

(라) 핵이식 배아 유래 전능성 줄기세포 성상 분석

- 본 연구과제의 최종 목표 중 하나인 유도만능줄기세포는 분화된 세포가 외부인자를 통해 재프로그래밍 과정을 거쳐 전능성을 갖는 줄기세포가 되는 것으로 이와 유사한 핵이식 배아 유래 전능성 줄기세포를 먼저 검증함. 이러한 핵이식 배아는 분화된 세포가 난자 내부의 인자를 통해 자연적 재프로그래밍 과정을 거치는 것으로 인위적인 외부인자를 통해 확립된 유도만능줄기세포 분석 시 컨트롤 그룹이 될 수 있어 매우 의미 있는 자료로 생각됨.

① 확립된 전능성 줄기세포의 형태적 구분 및 분석

- 확립된 전능성 줄기세포는 기존에 알려진 줄기세포와 유사하게 명확한 boundary를 형성해 배양보조세포 (feeder cell) 와 구분됨을 확인 (그림 11A). 여러 계대를 넘기며 전능성 줄기세포는 안정한 콜로니 형태를 보이고 이러한 콜로니는 형태적으로 central multilayer (CMt)와 peripheral monolayer (PMn)로 나누어짐 (그림 11B). CMt 부분은 세포들이 작고 응집된 형태로 콜로니의 중앙에 모여 있는 특징을 보이는 반면 PMn 부분은 세포들이 다소 크고 평평한 형태로 콜로니의 바깥쪽에 존재함.

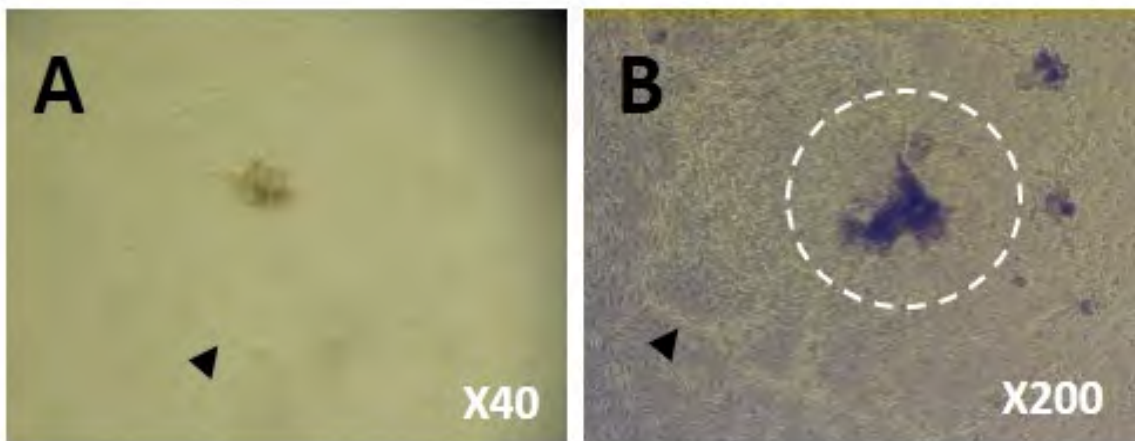


그림 11. The morphology of bovine somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cells (bSCNT-PSCs). (A) Primary colony of bSCNT-PSCs. (B) The colony at passage 20. The dotted circle displays central multilayer (CMt) part and the arrow head points to the boundary between the peripheral monolayer (PMn) part of the PSC colony and the feeder cell layer.

- 이러한 형태적인 차이로 본 연구진은 CMt부분이 PMn 보다 전능성에 차이가 있을 것으로 생각해 세가지 억제제가 들어간 배양액에서 계대 후 콜로니 재형성을 비교함. 그 결과 CMt 부분은 계대 후 80% 가 다시 콜로니 형태로 나타났으나 PMn 부분은 25% 만이 콜로니를 재형성함 (표 7). 또한 계대 후 CMt 부분은 CMt와 PMn 부분으로 추정되는 형태의 세포 집단을 모두 보였으나 PMn은 오직 PMn 형태의 집단만 보임 (그림 12A). 계대 후 다시 형성된 콜로니의 성상을 분석하기 위해 Alkaline phosphatase (AP) staining을 진행한 결과 CMt 유래 콜로니들은 100% 염색이 되었으나 PMn 유래 콜로니들은 10% 만이 약하게 AP staining을 보임 (표 7, 그림 12B, C). 이러한 결과는 CMt 부분은 PMn 부분과 서로 다른 성상의 세포로 이루어져있고 PMn과 비교해 CMt 은 좀 더 강한 전능성을 갖는 세포로 이루어져있을 것으로 판단됨. 이러한 결과를 통해 본 연구는 계대 동안 생성된 콜로니의 CMt 부분만을 이용해 계대를 넘겨 유지함.

표 7. Comparison of outgrowth rate and alkaline phosphatase activity between central multilayer cells and peripheral monolayer cells

	<i>No. of passaged colonies</i>			
	<i>Total</i>	<i>AP positive</i>		<i>Outgrowth (%)</i>
		<i>Strong (%)</i>	<i>Weak (%)</i>	
Central multilayer cells	20	15 (75)	1 (25)	16 (80)
Peripheral monolayer cells	20	0	2 (10)	5 (25)

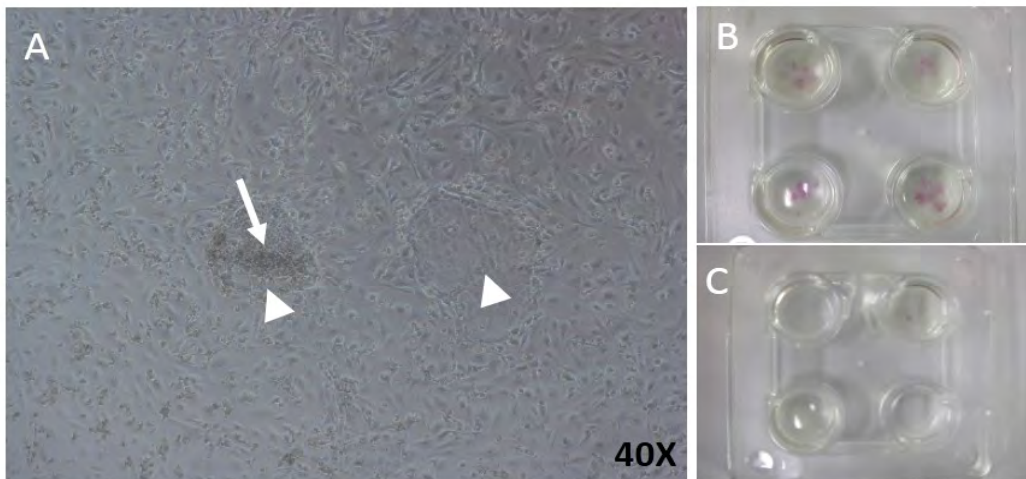


그림 12. The comparison of central multilayer (CMt)-derived colonies and peripheral monolayer (PMn)-derived colonies after passaging. (A) The morphology of CMt-derived (Left) and PMn-derived passaged colony (Right). The arrow indicates small and condensed cells which are generally shown in CMt. The arrowhead indicates large and flat cells generally shown in PMn. (B and C) Alkaline phosphatase (AP) activity assay demonstrate that most CMt-derived passaged colonies show strong AP activity (B) while the PMn-derived passaged colonies showed no AP activity (C).

- 세가지 억제제가 첨가된 배양액에서 계대를 넘기는 동안 CMt와 PMn 유래의 콜로니의 생존을 확인하기 위해 CMt와 PMn 유래의 clump를 추가적으로 계대 해본 결과 CMt는 계대 후 계대 전과 유사한 형태의 콜로니를 다시 형성하는 반면 PMn은 상대적으로 작은 콜로니를 생성하고 2계대 후 콜로니를 형성하지 못함이 관찰되어 두 subpopulation의 성상이 다른 것으로 생각됨 (표 8). 이러한 것은 세 가지 억제제가 첨가된 배양액이 PMn 부분의 증식 및 유지에 적합하지 않지만 CMt 부분에는 적합한 것으로 검증됨. 또한 이러한 결과는 확립된 전능성 줄기세포가 세 가지 억제제가 첨가된 배양액에서 실질적으로 자가 증식력을 보이며 증식하고 있음을 보임.

표 8. The survival rate of cmt- and pmn-derived colonies<sup>a)</sup>

<i>Group</i> <sup>b)</sup>	<i>No. of survival colonies at</i> <sup>c)</sup>			
	<i>Passage 22</i>	<i>Passage 23</i>	<i>Passage 24</i>	
CMt	C1	1	4	13
	C2	1	3	8
	C3	1	2	5
	C4	1	2	11
	C5	1	3	4
Total (%)		5 (100)	14 (70)	41 (73.2)
PMn	P1	1	0	0
	P2	1	0	0
	P3	1	1	0
	P4	1	0	0
	P5	1	1	0
Total (%)		5 (100)	2 (20)	0 (0)

<sup>a)</sup>CMt: central multilayer; PMn: peripheral monolayer.

<sup>b)</sup>Only one colony slice were used for the next passage. The CMt colony was sliced to 4 pieces while the PMn colony was sliced to 2 pieces due to the inability of attachment and proliferation of the cells in PMn colony in 3i culture condition.

<sup>c)</sup>Until passage 21, the stem cell colony was maintained only with CMt-derived cells. Up to passage 21, PMn part of the colony was discarded.

## ② 확립된 줄기세포의 분자생물학적 전능성 성장 검증

- 전능성 줄기세포의 특징 중 하나인 자가증식능력을 확인하기 위해 Brdu 분석을 실시함. 그림 1B에서 보이는 것처럼 Brdu 형광 양성을 보이는 세포들이 관찰되고 이러한 결과는 확립된 전능성 줄기세포가 계대 후 증식함을 보여줌 (그림 13). 이러한 증식력은 CMt 부분뿐만 아니라 CMn 부분에서도 확인됨 (그림 13B, D)

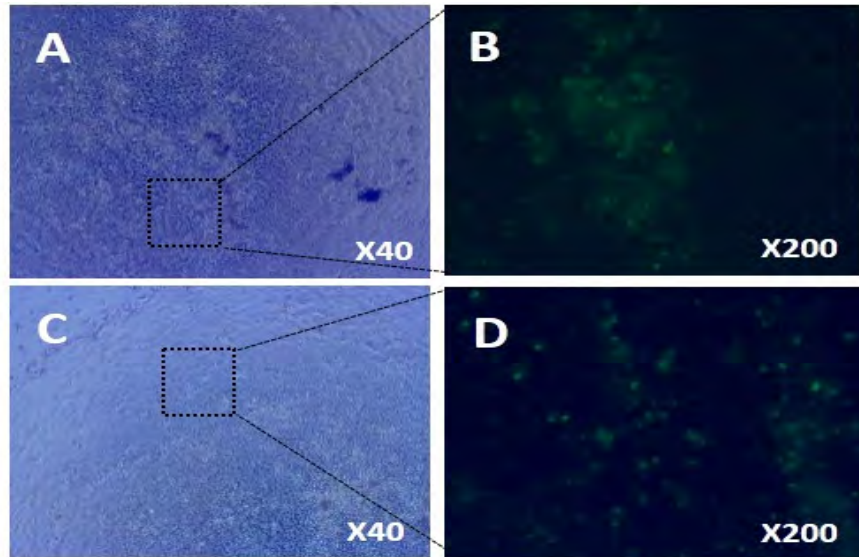


그림 13. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labeling of bovine somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cell colony. (A and C) BrdU-positive cells are revealed in both central multilayer and peripheral monolayer regions. (B and D) Each enlarged picture were from the dotted quadrangles respectively.

- 먼저 전능성 줄기세포에서 일반적으로 확인되는 AP activity를 확인함. 앞서 언급한 것과 유사하게 AP activity는 콜로니 내부 CMt 부분에 더 강하게 염색됨 (그림 14)

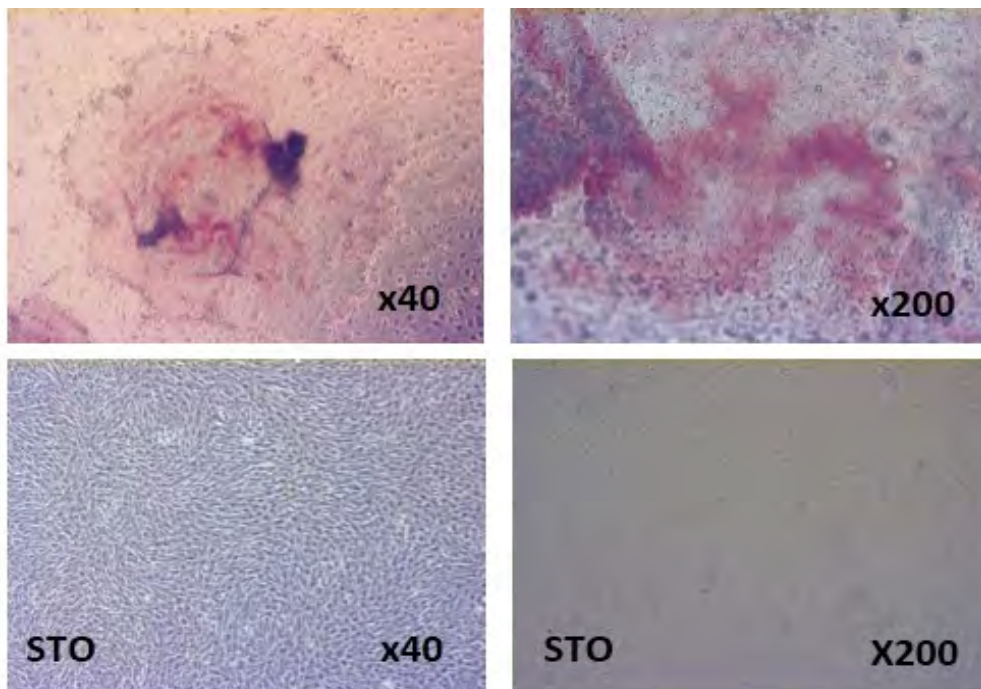


그림 14. Alkaline phosphatase (AP) activity assay at P30. The bSCNT-PSC colonies were positive for AP activity across the whole colony regardless of their morphological differences. The central multilayer portion displayed much stronger AP activity. STO cells were negative control.

- 최근 마우스 유래 전능성 줄기세포의 성상을 naive와 primed 상태로 구분하고 각 상태의 분자생물학적 성상의 차이가 보고 됨. 소에서 역시 이러한 전능성 줄기세포 성상이 나누어질 수 있는지 확인하기 위해 세분화된 전능성관련 유전자 마커 (naive, core 그리고 primed 상태) 를 RT-PCR을 통해 확인 했고 primed 보다 naive한 성상을 보임을 확인함 (그림 15). 또한 본 연구에서 전능성 줄기세포를 확립 시 배반포 전체를 사용하여 확립된 콜로니의 형태 중 일부가 과거 영양막줄기세포와 유사해 이와 관련된 영양외배엽 관련 유전자 마커 (Cdx2, Tead4 그리고 Ifn-tau) 역시 함께 분석한 결과 기존에 알려진 마우스 종과 다르게 영양외배엽성 유전자 마커가 확인되어 영양막줄기세포와 동일한 세포인가 분석하였으나 다양한 전능성 관련 유전자 마커발현을 보여 기존의 영양막줄기세포가 아닌 전능성 줄기세포의 하나로 확인되었으며 이렇게 확립된 핵이식 배아줄기세포는 primed 성상보다는 naive에 가까운 성상을 보이며 높은 전분화능을 가지고 있는 것으로 확인됨.

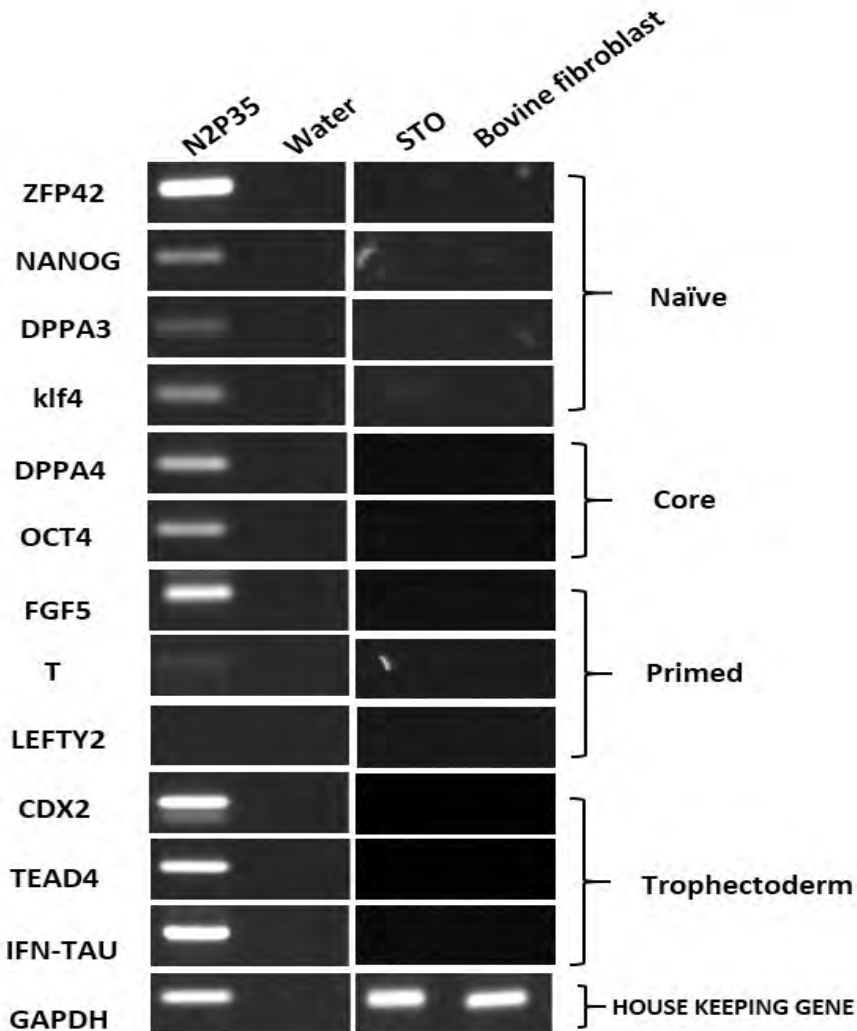


그림 15. Expression of the pluripotency and trophectoderm marker genes by RT-PCR analysis in bSCNT-PSCs at P35. STO (feeder) and bovine fibroblast (nuclear donor). The pluripotency markers were also classified naive, core and primed in accordance with murine embryonic stem cells.

- 본 연구진은 추가적으로 hypoblast contamination을 확인하기 위해 관련 유전자 마커를 RT-PCR을 통해 검증한 결과 Alpha-Fetoprotein와 GATA4는 발현되지 않지만 GATA6는 발현하는 것으로 확인되어 마우스에서 ERK와 FGF 경로를 억제하면 hypoblast cell의 증식이 억제된다는 보고와 다르게 소에서는 완전하게 hypoblast 증식을 억제하지는 못하는 것으로 생각됨 (그림 16). 그러나 Gata6가 확립된 줄기세포 콜로니에서 발현하는 것은 최근 타 연구에서도 보고된 내용으로 소의 배아유래 전능성 줄기세포의 특징인 것으로 판단됨.

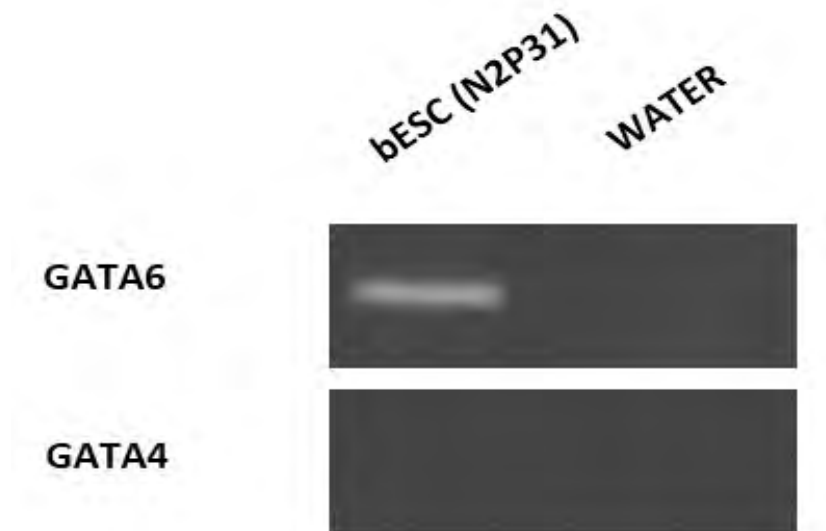


그림 16. Expression of hypoblast marker *GATA6* and *GATA4* in bovine somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cells (bSCNT-PSCs). Among the hypoblast markers, only *GATA6* is expressed in bSCNT-PSCs while *GATA4* and *Alpha-Fetoprotein* (see Fig. 4B) are not.

- 형광 염색 기법을 통해 전능성 관련 유전자를 단백질 단계에서 확인 검증함. 이러한 결과는 확립된 핵치환 배아 유래 전능성 줄기세포가 RNA 수준뿐만 아니라 Protein 수준에서 역시 전능성을 보임을 확인함 (그림 17)

### ③ 확립된 핵치환 배아 유래 전능성 줄기세포의 분화 성상 검증

- 확립된 전능성 줄기세포의 체외 분화능력을 확인하기 위해 먼저 배양액에서 세가지 억제제를 제거해 분화를 유도해 embryoid body (EB)를 생산함. 이렇게 생산된 EB는 형태적으로 두가지, solid와 cystic, 타입으로 나누어 볼 수 있으며 이중 분석은 다른 종에서 볼 수 있는 solid 타입으로 진행함 (그림 18A). 분화 검증을 위해 내 배엽, 외 배엽 그리고 중배엽과 관련된 유전자 마커를 RT-PCR로 확인한 결과 밴드를 확인할 수 있었으며 전능성과 관련된 주요 유전자 마커는 밴드가 사라진 것을 확인함 (그림 18B)



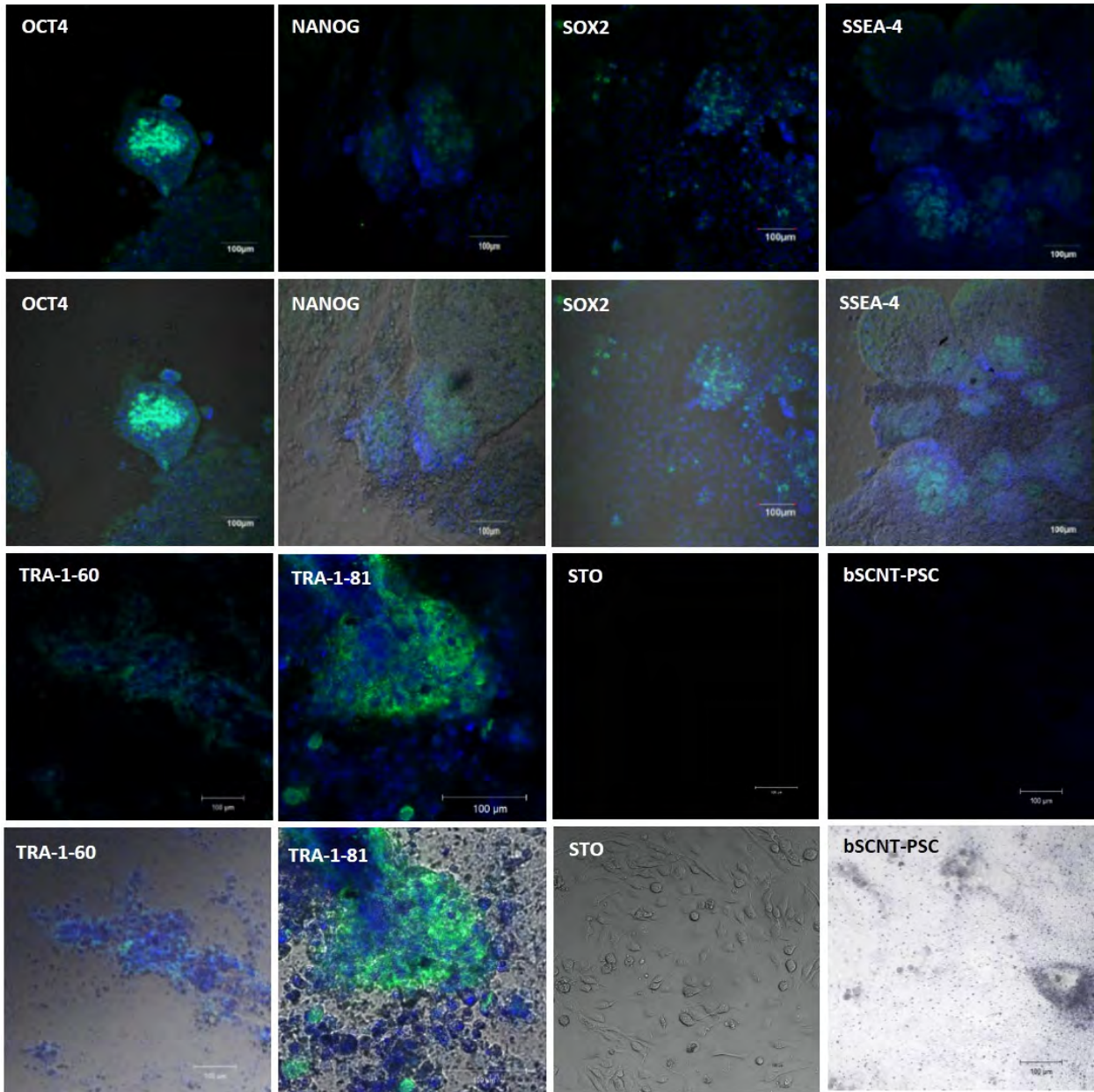
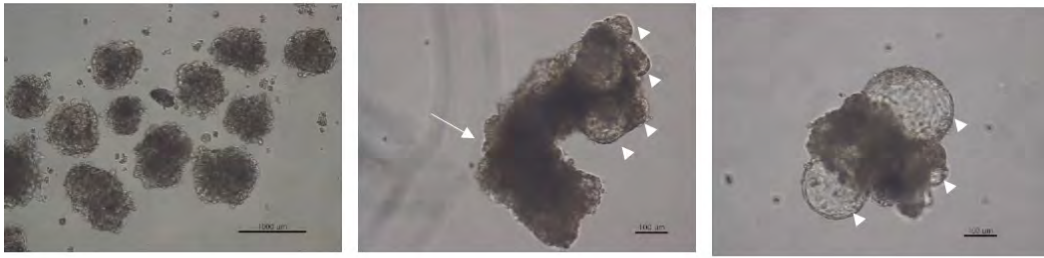


그림 17. The immunofluorescence assay. Somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cells (bSCNT-PSCs) are positive for the pluripotency markers OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81. Fluorescence is generally highlighted in and around the central multilayer area. STO and bSCNT-PSCs were stained without primary antibodies as negative controls. Scale bar = 100  $\mu$ m

**A**



**B**

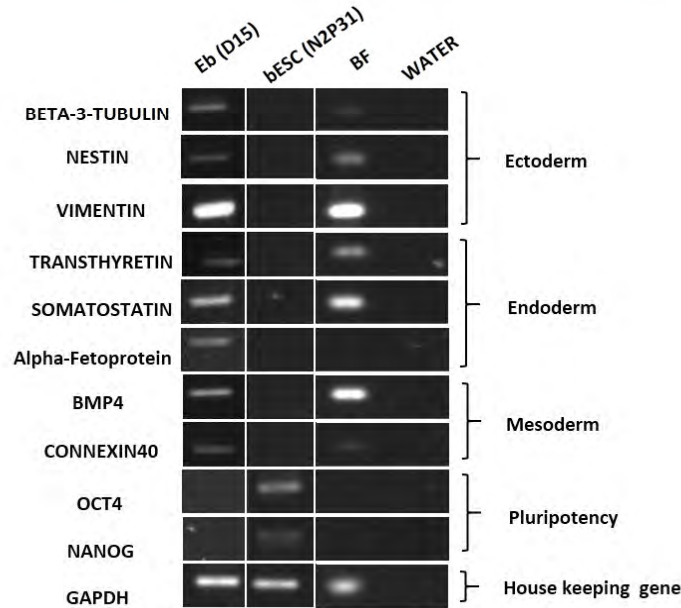


그림 18. In vitro differentiation of somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cells (bSCNT-PSC) at P31. (A) Formed embryoid bodies (EBs) after 9 day of floating culture. The arrow and arrowheads indicate solid part and cystic part of EBs respectively. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Gene expression analyses of EBs by RT-PCR. The three germ layer specific markers of ectodermal ( $\beta$ -3-TUBULIN, NESTIN and VIMENTIN), endodermal (SOMATOSTATIN, TRANSTHYRETIN and ALPHA-FETOPROTEIN) and mesodermal (CONNEXIN40 and BMP4) genes are expressed while pluripotent marker genes of OCT4 and NANOG are not.

- 체내 분화능을 검증하기 위해 누드마우스의 정소에 전능성 줄기세포를 삽입하여 체내에서 teratoma가 형성되는지 확인함. 총 10회에 걸쳐 teratoma 생산을 유도했으나 1번 teratoma-like tumor 형태를 확인함. 소 유래 전능성 줄기세포의 경우 배양보조세포위에 배양하게 되는데 생산된 teratoma-like tumor가 배양보조세포인 STO cell 유래가 아님을 보이기 위해 STO cell 만 따로 주입해 teratoma를 유도한 결과 teratoma 생성은 발견되지 않음 (표 9). 이렇게 줄기세포를 통해 생산된 teratoma-like tumor 조직은 병리학적 분석을 실시한 결과 embryonic carcinoma로 최종 분석됨 (그림 19). 비록 완전한 teratoma는 아니지만 생산된 teratoma-like tissue는 소 유래 세포임을 확인하였고(표 10) 소에서는 최초로 체외에서 배양된 전능성 줄기세포가 체내에서 분화능을 갖는다는 보고를 하였음.

㉞ 9. Teratoma-like tumor formation after transplantation of bSCNT-PSCs\*

	<i>No. of</i>	
	<i>Injection into testis</i>	<i>Teratoma-like tumor formation</i>
bSCNT-PSCs	10	1 (embryonic carcinoma)
STO (feeder cells)	6	0

\*Bovine somatic cell nuclear transfer-derived pluripotent stem cells

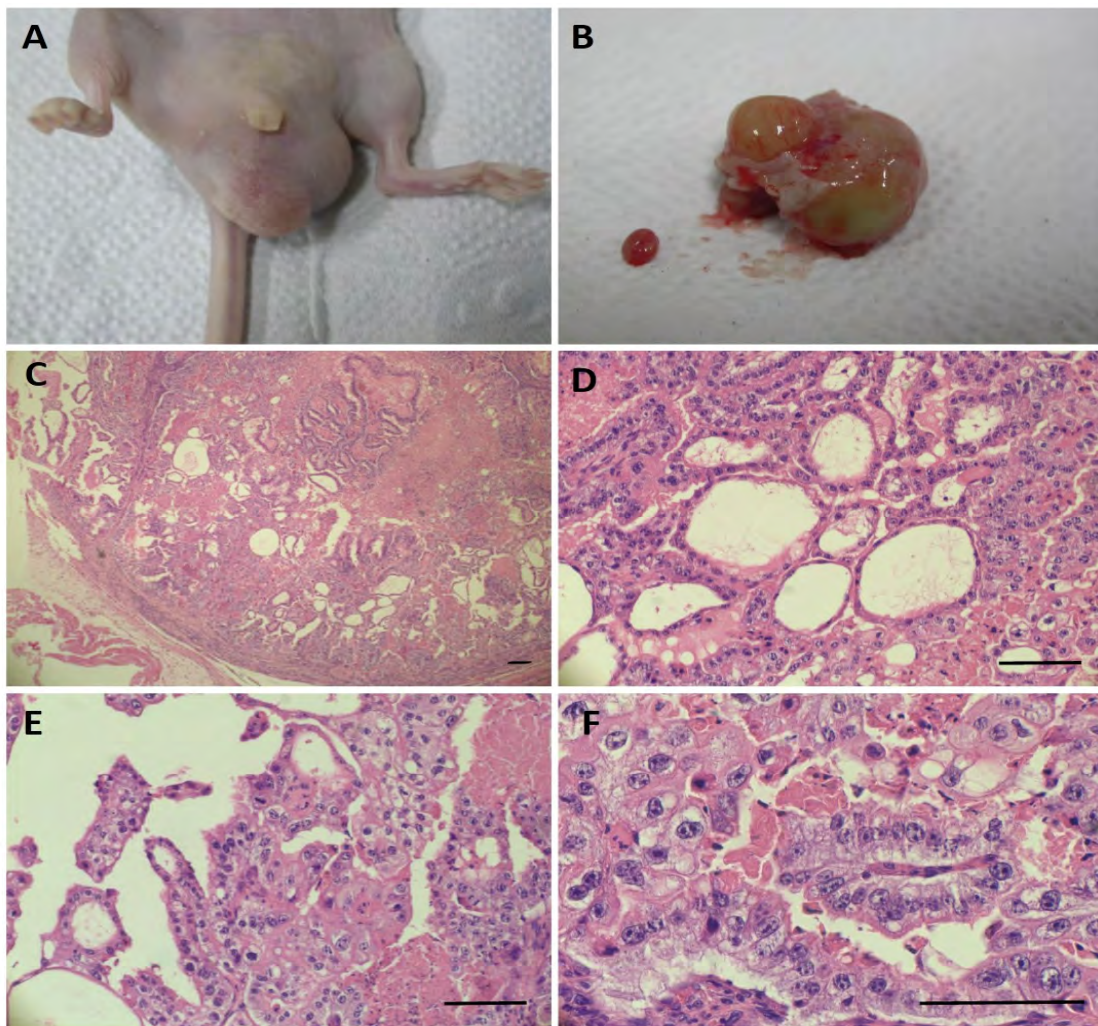


그림 19. In vivo differentiation of somatic cell nuclear transfer embryo-derived pluripotent stem cells (bSCNT-PSC) at P31. (A and B) The teratoma-like tumor formed under the testis capsule of a nude mouse. (C-F) Representative histologic feature of the bSCNT-PSC-derived embryonic carcinoma. The tumor consists of large primitive cells with areas of glandular (D) and papillary (E) formations featuring signs of early differentiation toward embryonic structures. (F) The nuclei were large and overlapping, and prominent multiple nucleoli were present. Hematoxylin and eosin staining; scale bar = 100  $\mu$ m.

표 10. DNA profile for bovine derived teratoma-like cells.

<i>Locus</i> <sup>a</sup>	<i>Allele 1</i> <sup>b</sup>	<i>Allele 2</i> <sup>b</sup>
TGLA227	85.52	85.52
BM2113	140.51	140.51
TGLA53	171.45	180.00
ETH10	212.53	220.19
SPS115	247.16	249.08
TGLA126	121.82	121.82
TGLA112	148.80	148.80
IRA23	204.55	227.95
ETH3	117.67	127.09
ETH225	143.61	147.92
BM1824	187.10	195.16

<sup>a</sup> Bovine specific loci

<sup>b</sup> Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction product size

#### ④ 핵이식 배아 유래 전능성 줄기세포 콜로니의 세부적 성장 분석

- 앞서 형태적 그리고 AP staining을 통해 전능성 줄기세포 콜로니의 CMt와 PMn 부분이 서로 다른 성장을 보임을 간접적으로 검증함. 세부적으로 콜로니의 CMt와 PMn 부분의 성장을 명확히 분석하고 subpopulation 간의 차이를 확인하기 위해 먼저 각각 RNA를 추출해 양적 분석을 진행함. Real-time PCR을 통해 전능성과 관련된 유전자와 영양외배엽성 유전자 마커를 양적 비교한 결과 PMn과 비교해 CMt에서 전능성관련 유전자 마커가 많이 발현하고 영양외배엽성 유전자 마커는 적게 발현하는 현상을 확인함 (그림 20). 이러한 결과는 형태적 뿐만 아니라 RNA 발현도 역시 CMt와 PMn이 다르고 CMt에서 전분화능 성장을 보임을 검증함.

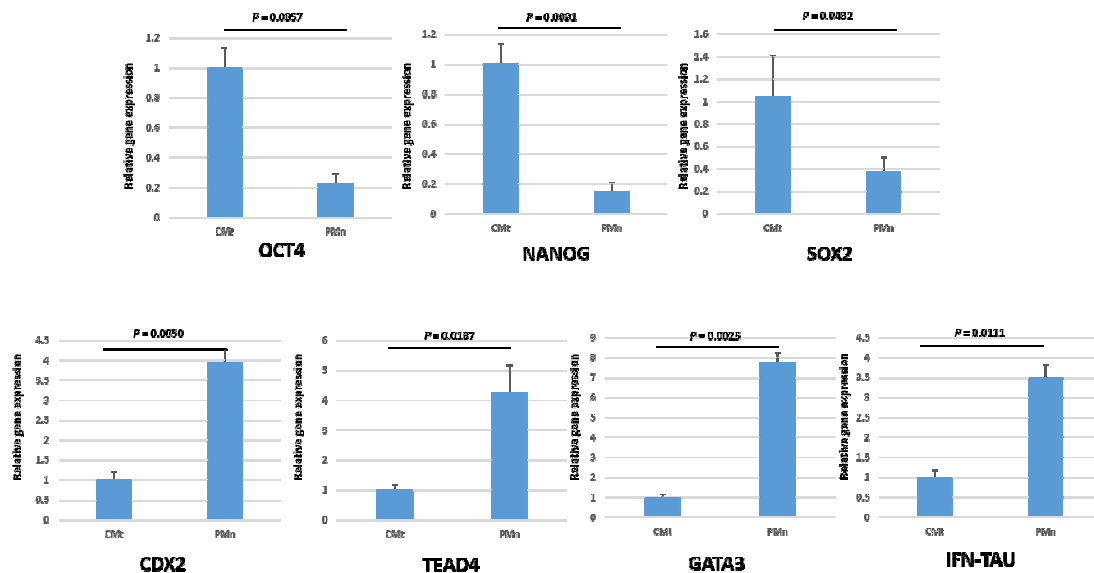


그림 20. Quantitative gene expression analyses of central multilayer (CMt) and peripheral monolayer (PMn) parts of the colony. The expression of pluripotency (OCT4, NANOG and SOX2) and trophectoderm (CDX2, TEAD4, GATA3 and IFN-TAU) markers were analyzed by real-time PCR. The cells in CMt part present higher expression of pluripotency specific marker genes than those in PMn part while TE specific marker expression shows the opposite results. The p-value in each group is lower than 0.05. N = 3.

- Oct4와 Cdx2는 첫 번째 세포 운명이 결정되는데 주된 영향을 주는 것으로 알려짐. 일반적으로 마우스 배반포 단계에서 Oct4는 세포내 괴에서만 발현하고 Cdx2는 영양외배엽성 세포에서만 발현하지만 소에서는 Oct4가 전체적으로 발현하고 Cdx2가 영양외배엽성 세포에서만 발현함. 이러한 lineage specific 한 마커를 통해 확립된 소의 전능성 줄기세포의 성상을 분석한 결과 CMt 일부에서 Cdx2 유전자 발현이 없이 Oct4만 발현하는 subpopulation이 확인됨. 그러나 일부 보고에서 영양외배엽성 유래 세포역시 Oct4를 발현한다는 보고가 있어 영양막 줄기세포에서 발현하지 않는 Nanog 유전자를 이용해 확립된 전능성 줄기세포의 성상을 분석한 결과 CMt 내 일부에서 Cdx2 발현 없이 Nanog 유전자만 발현하는 subpopulation이 확인됨 (그림 21). 이러한 결과는 확립된 전능성 줄기세포 콜로니 내 CMt부분에서 Oct4 또는 Nanog만 발현하는 전능성 줄기세포 subpopulation이 존재함을 보여주고 특히 Nanog는 마우스에서 naive 성상을 대표하는 마커로 앞서 보고한 naive 성상에 가깝다는 결과를 뒷받침함.

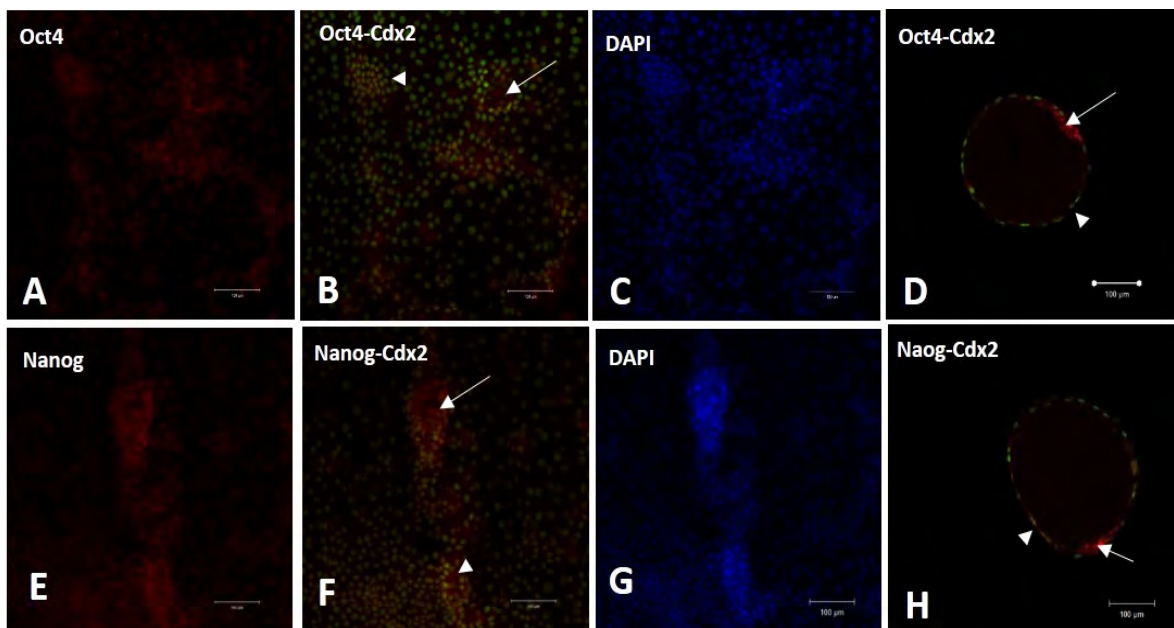


그림 21. Immunofluorescence image of lineage specific marker expression in the central multilayer (CMT) part cells of the colony (A-C) Images from OCT4 (red) and CDX2 (green) stained cells. Nucleus was stained with DAPI (blue) (D) Distribution of OCT4 and CDX2 expressing cells in normal bovine blastocyst as positive control. (E-G) Images from NANOG (red) and CDX2 (green) stained cells. Nucleus was stained with DAPI (blue) (H) Distribution of NANOG and CDX2 expressing cells in normal bovine blastocyst as positive control. The arrowhead indicates the OCT4- or NANOG-positive cells with CDX2 expression. The arrow indicates OCT4- or NANOG-positive cells without CDX2 expression. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### (3) 소분자 물질을 활용한 전능성 줄기세포의 성상 강화

- 소분자 물질을 통해 확립한 소 유래 전능성 줄기세포가 완전한 전능성 줄기세포로 확립되지 않아 추가 소분자 물질인 thiazovivin을 첨가하 체외배양시 전능성 강화 및 유지를 용이하도록 유도함. Thiazovivin은 Rho-Kinase (ROCK) 억제자 마우스 및 사람 줄기세포에서 전능성 성상 및 생산 효율을 증대할 수 있는 것으로 보고됨.

(가) IVF로 생산된 배아의 지지세포 위에서의 Tzv의 처리에 따른 부착효율 비교

- 배아줄기세포의 확립을 위해 소배아의 투명대를 제거 후 전체, 내부세포괴 부분, 영양막세포 부분을 마우스 지지세포위에 올려 Tzv에 의한 부착효율을 확인하고 최적의 배아의 부착 조건을 수립하였음. Tzv 처리 그룹이 전체 배아, 내부세포괴 부분, 영양막세포 부분 모두 부착효율이 증가하였음. 내부세포괴 부분의 Tzv 처리그룹이 가장 좋음 (90%). 그러나 초기 콜로니 형성률은 전체 배아의 Tzv 처리그룹이 가장 높게 나타났음 (77%). (그림 22, 표 11). 그러므로 전체 배아를 지지세포위에 올려 Tzv을 처리하는 것이 초기 배아의 부착 및 초기 콜로니 형성에 적합한 것으로 알 수 있음.

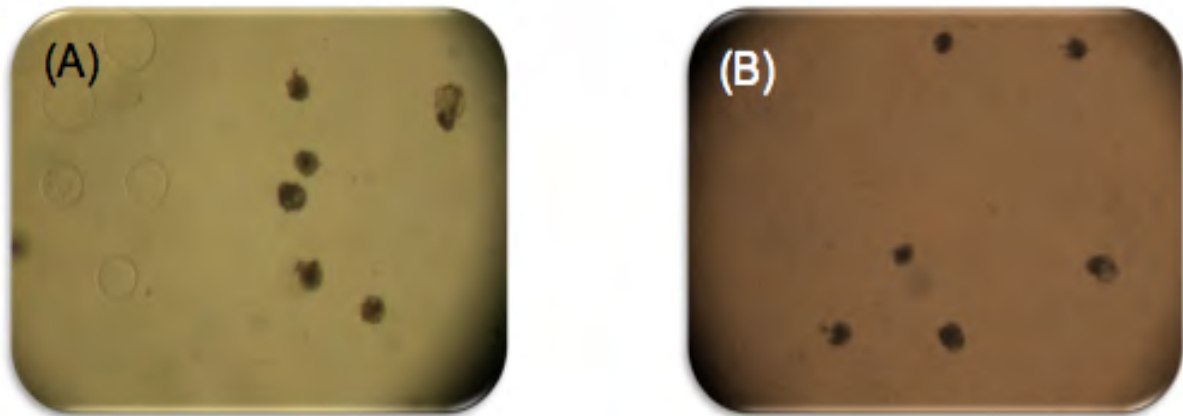


그림 22. (A) 체외수정란와 투명대의 분리와 (B) 분리된 배아의 seeding

표 11. Effect of TZV on attachment of blastocyst and primary colony formation

Group	Part of embryo	No. of total blastocysts	No. (%) of attached blastocysts	No. (%) of primary colonies
3i medium	Whole	26	12 (46.15)	10 (38.46)
	ICM	20	10 (50.00)	5 (25.00)
	TE	20	8 (40.00)	5 (25.00)
3i+TZV medium	Whole	26	21 (80.77)	20 (76.92)
	ICM	20	18 (90.00)	10 (50.00)
	TE	20	14 (70.00)	7 (35.00)

(나) 초기 콜로니 계대 배양시 Tzv의 효과 관찰

- 초기 콜로니를 32g 주사바늘을 이용하여 5조각으로 나눈 후 계대 배양하여 콜로니 조각이 다시 콜로니를 형성할 때 Tzv 처리에 따른 효과를 관찰하였음. 관찰결과 Tzv 처리그룹은 처리하지 않은 그룹에 비해 30% 높은 부착효율을 보였음 (88.6%, 표 12).

표 12. Effect of TZV on bovine ES cell growth during in vitro culture

Group	No. of colony clumps	No. (%) of outgrown colonies
3i medium	35	20 (57.14)
3i + TZV medium	35	31 (88.57)

(다) Tzv에 의한 특징 변화 분석

- 각각 control(3i) 배양액과 Tzv가 포함된 배양액에서 각각 25 passage 배양후 전능성 관련 유전자인 Oct4, Nanog를 RT-PCR과 qRT-PCR을 활용하여 분석 하였음. Oct4는 Tzv처리 그룹에서 약 3배 증가하였고 유의적인 차이를 보였음. Nanog 역시 Tzv처리 그룹에서 1.5배 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았음 (그림 23). 형광염색법 시행결과 두 그룹 모두다 배아줄기세포 마커인 Oct4, Nanog, SSEA-1, TRA-1-60 등이 양성적인 발현을 보였음. 또한 ALP 염색도 두 그룹 모두 발현하였음 (그림 24)

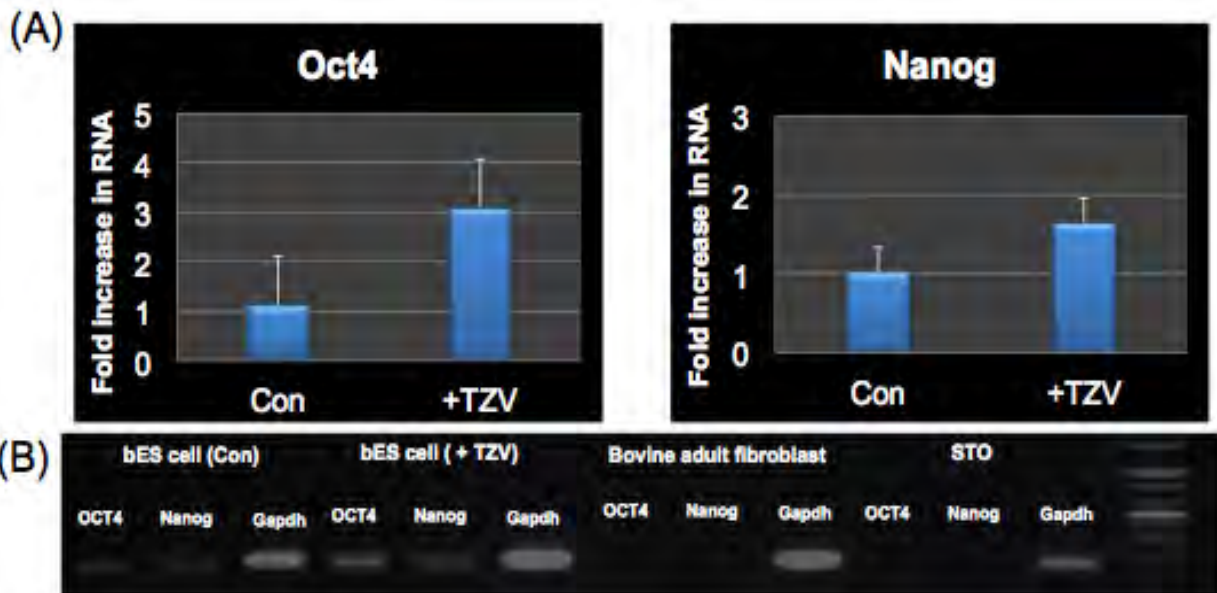


그림 23. Tzv 처리 후 전능성관련 유전자의 발현의 차이 분석. (A) 정량 PCR 분석, (B) RT-PCR 결과

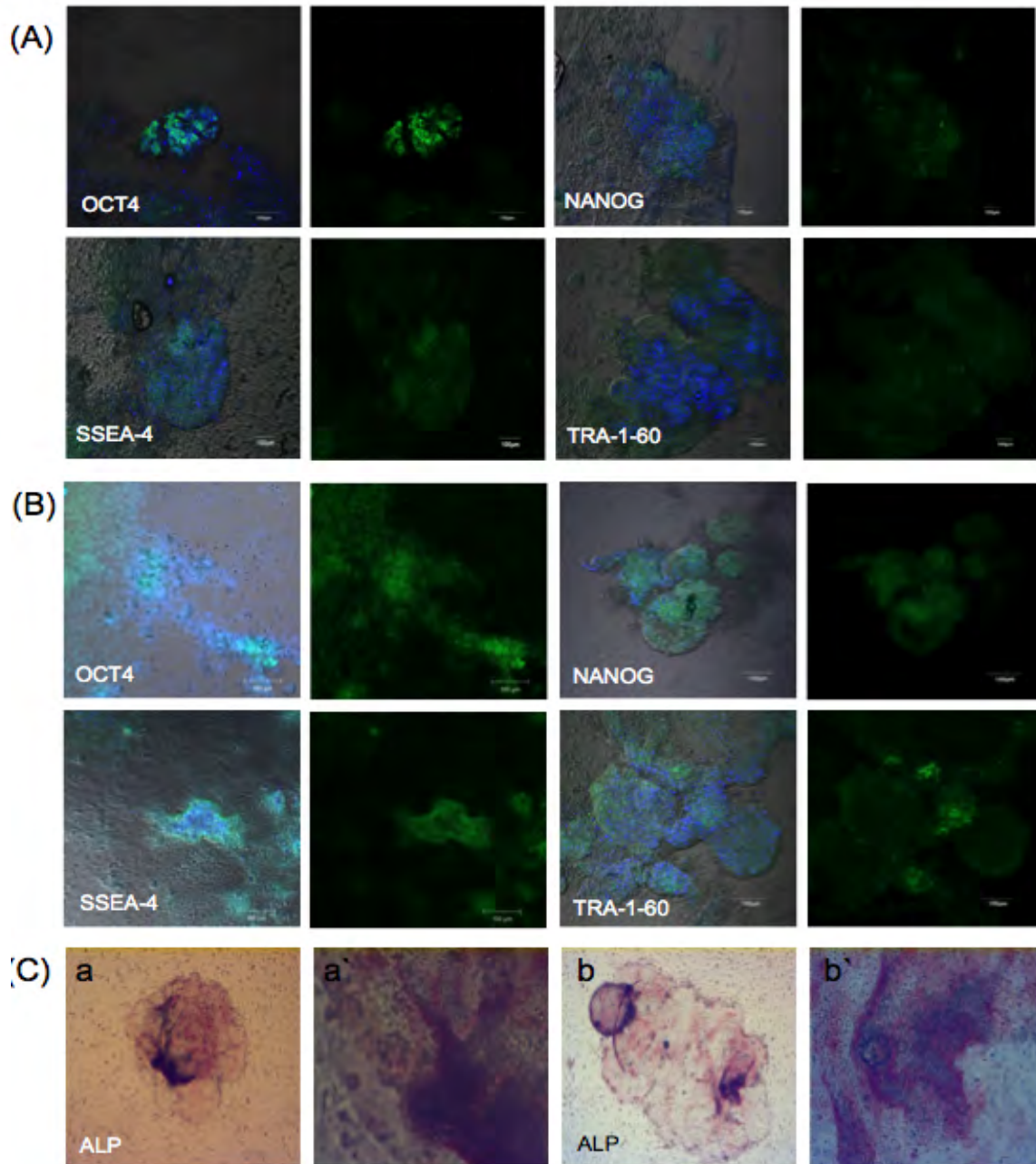


그림 24. Tzv처리 그룹과 처리하지 않은 그룹의 특징 (A) Control 그룹 (B) Tzv 처리 그룹 (C) ALP 염색 a. control 그룹, b. Tzv 처리그룹

(라) 세포 부착관련 단백질인 E-cadherin 발현 분석

- ROCKi에 의한 부착단백질의 발현차이를 확인하기 위해 부착 물질 중 E-cadherin을 선택하여 Tzv에 의한 발현의 차이를 확인하였음. 전체적으로 E-cadherin은 Tzv 처리를 하지 않은 control 그룹에서도 발현하지만 Tzv처리 그룹에서 더 강하게 발현하였음 (그림 25). 이와 같은 결과를 볼 때 Tzv의 ROCK 억제 작용을 통해 E-cad의 발현을 강화시키는 것으로 볼 수 있음.



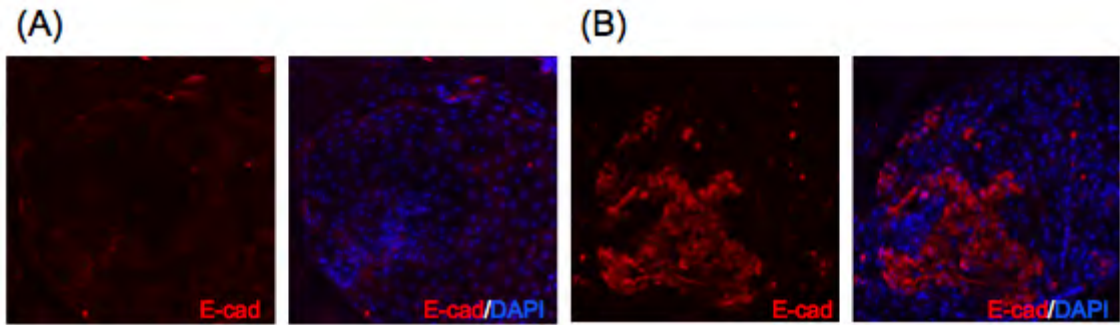


그림 25. 소 전능성 줄기세포의 E-cadherin 염색 (A) cotrol 그룹 (B) Tzv 처리 그룹

(마) 배아체 (Embryonic body) 형성을 통한 배아줄기세포의 분화 유도

- EB 형성 배양액에 15일동안 미부착 배양접시에서 배아줄기세포를 배아체로 유도하였음. 삼배엽 분화 관련 마커를 분석하였음. Tzv 처리그룹과 처리하지 않은 그룹 모두 삼배엽으로 분화가 유도되었고 Tzv 처리 그룹은 중배엽 분화가 더 많이 된 것이 RT-PCR 결과로 확인됨 (그림 26).

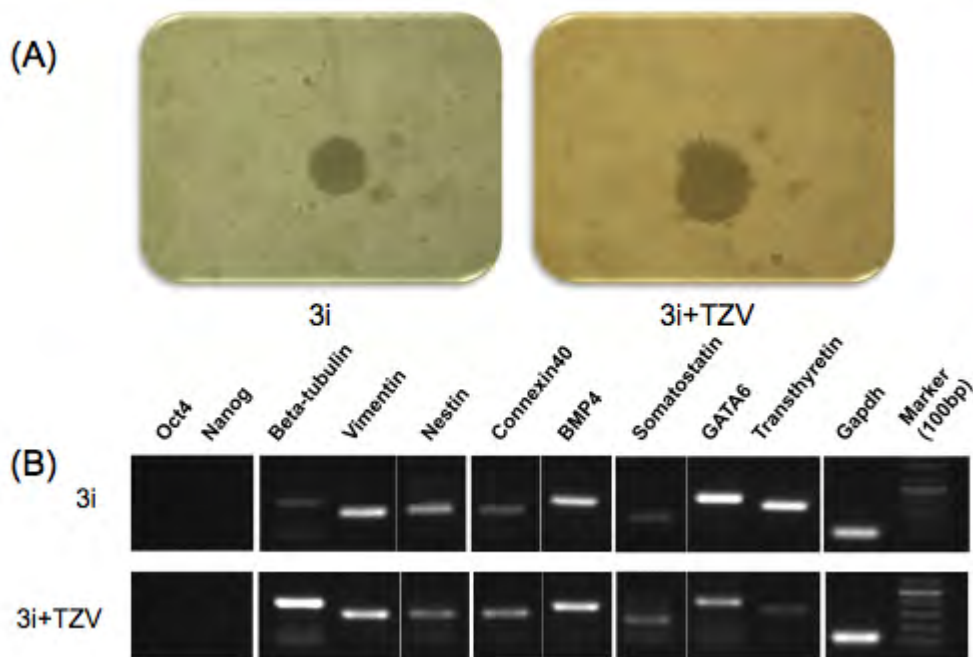


그림 26. Tzv 처리에 따른 소 전능성 줄기세포의 분화능 검증 (A) 배아체의 형성 (B) 분화관련 마커의 발현 확인

(바) Thiazovivin이 전능성 유전자 발현에 미치는 영향

- 확립된 소 배아줄기세포에서 Tzv의 효과를 알아보기 위해서 Naïve, Core, Primed, TE의 유전자 마커들을 RT-PCR로 확인하였음 (그림 27). 보는 것과 같이 Naïve 관련 마커들은 발현이 되는 것을 확인하였고 반대로 primed의 마커는 일부 발현하고 T, LEFTY2와 같은 마커들은 발현하지 않는 것을 확인하였음. 하지만 Tzv를 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹간 발현의 차이는 유의적 차이를 보이지 않았음.

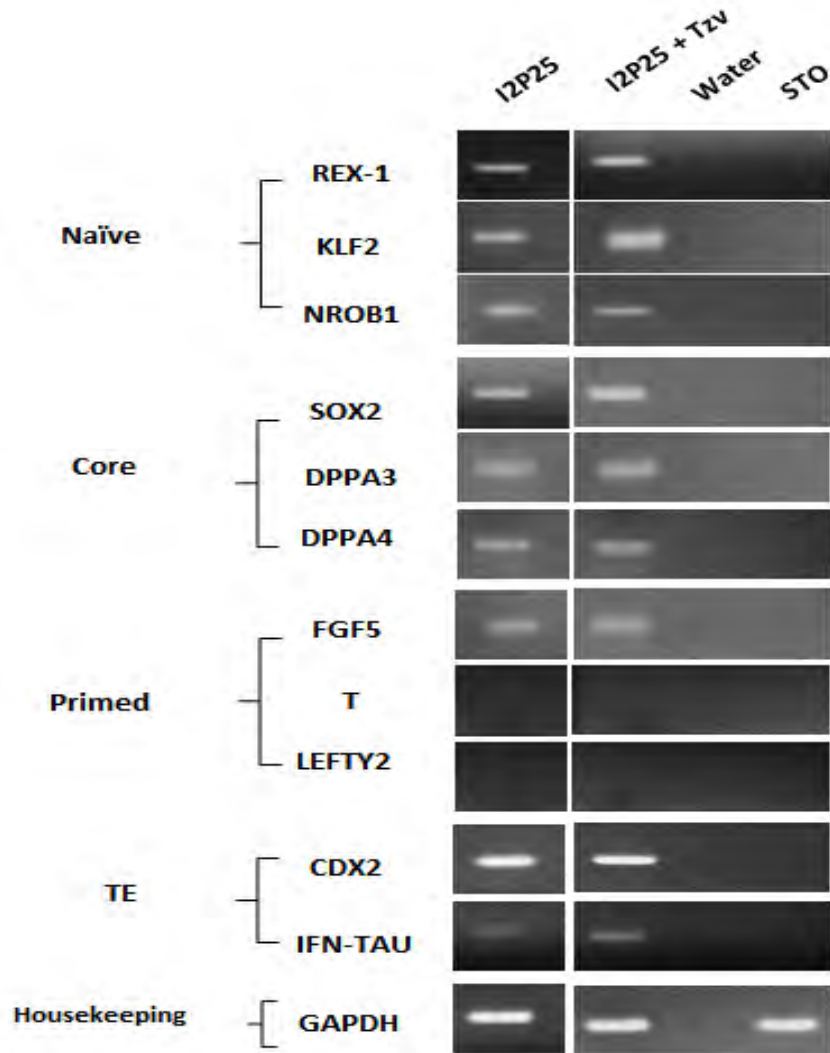


그림 27. Thiazovivin이 줄기세포 유전자발현에 미치는 영향

(사) 확립된 배아줄기세포의 실질적인 증식능력 확인

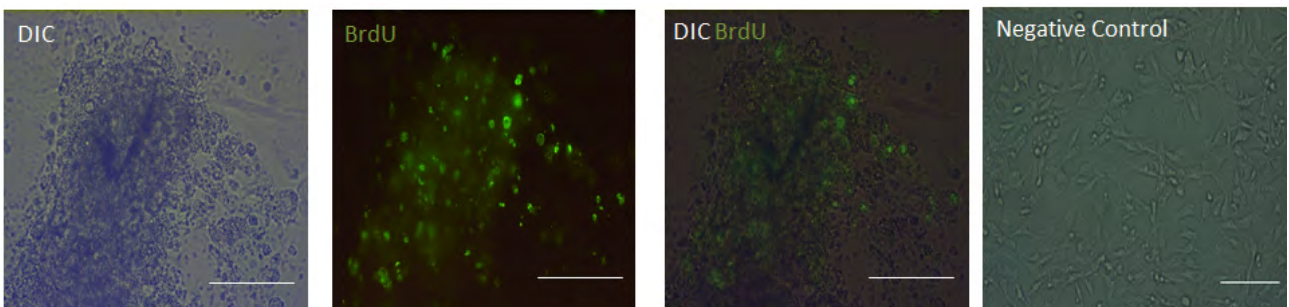


그림 28. 확립된 줄기세포의 증식력 확인 (BrdU test).

- 줄기세포의 중앙부위의 증식력을 확인하기 위해서 BrdU staining을 시행하였음. 중앙부 세포의 대부분이 BrdU 양성을 보였기 때문에 결과적으로 중앙부위에 돔 형태의 구조는 증식이 잘 되는 것으로 판단할 수 있음 (그림 28)

(아) Thiazovivin이 초기 전능성 콜로니 생성에 미치는 영향

표 13. Effect of TZV on attachment of blastocyst and primary colony formation

Group	Part of embryo	No. of total blastocysts	No. (%) of attached blastocysts	No. (%) of primary colonies
3i	Whole	26	12 (46.2) <sup>a</sup>	10 (38.5) <sup>a</sup>
	ICM	20	10 (50.0) <sup>a</sup>	5 (25.0) <sup>a</sup>
	TE	20	8 (40.0) <sup>a</sup>	5 (25.0) <sup>a</sup>
3iT	Whole	26	21 (80.8) <sup>b</sup>	20 (76.9) <sup>b</sup>
	ICM	20	18 (90.0) <sup>b</sup>	10 (50.0) <sup>c</sup>
	TE	20	14 (70.0) <sup>b</sup>	7 (35.0) <sup>a</sup>

Within a column, means without a common letter (a,b,c) differed (P < 0.05)

- 기존의 데이터를 통계분석을 시행하여 그룹간 유의적 차이를 보이는 결과를 도출하였음. Tzv는 배반포의 부착효율을 증가시키고 whole과 ICM그룹에서 처리하지 않은 그룹에 비해 초기 콜로니 형성율이 높은 것을 확인하였음 (표 13). 또한 지속적인 계대에서 나뉜 콜로니 조각이 콜로니를 다시 형성하는 효율도 Tzv 을 처리한 그룹에서 높게 나왔음 (표 14).

표 14. Effect of TZV on bovine ES cell growth during in vitro culture

Group	No. of colony clumps	No. (%) of outgrown colonies
3i	35	20 (57.1)a
3iT	35	31 (88.6)b

(4) 소분자 물질을 활용한 마우스 배아줄기세포에서의 확립 효율 증대

(가) Pluripotin (SC-1) 처리를 통한 단위발생 마우스 배아줄기세포 생산효율 향상

- 1.1 FGF2 신호경로를 제어하는 물질인 SC-1은 배아초기 발달시기에 처리할 때 epiblast로의 분화가 촉진된다는 보고가 있었음. 난할기 배아에 처리한 후 발달된 배아로부터 배아줄기세포를 확립하였을 때 효과는 없는 것으로 알려져 있었지만 FGF2 신호경로 및 ERK1 신호경로와 연관성이 있기 때문에 줄기세포 확립시 효율 증가에 영향이 있을 것으로 판단하여 단위발생 배아줄기세포이 확립시 passage 1- 10까지 처리하였을 때 colony 수가 2배 이상 증가하는 것을 확인하였음 (표 15, 16; 그림 29)

표 15. Comparison of the number of colonies between SC-1-treated and control (non-treated) groups

	Number of blastocysts plated per well	Passage 3	Passage 8	Passage 10
SC-1	2	63.6	149.7	161.6
Control	2	18.7	64.6	63.4
-----				
SC-1/ Control	1	3.40	2.31	2.55

표 16. Comparison of the number of colonies between SC-1-treated and control groups after passage 4

	Passage 4*	Passage 10
SC-1	59.3	190.4
Control	57.6	189.3
-----		
SC-1/ Control	1.02	1.01

\* When passaging presumptive embryonic stem cells at passage 3, the concentration of cells to be distributed was adjusted equally from both groups.

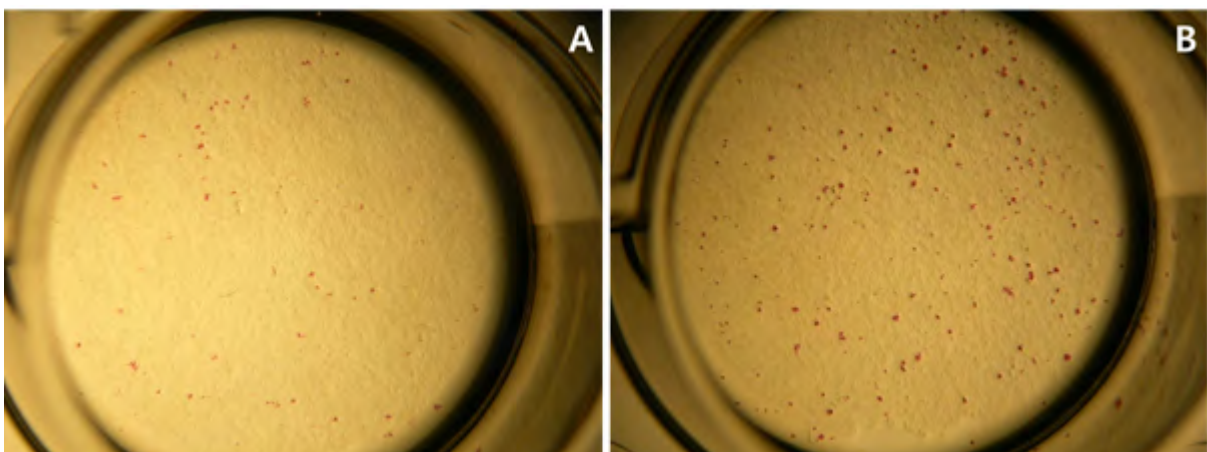


그림 29. Parthenogenetic murine embryonic stem cell (ESC) colonies at passage 10 after alkaline phosphatase staining. Red dots indicate ESC colonies. (A) Control (no treatment) group, (B) SC-1 treated group. Size of the well: 1.5 cm inner diameter.

### 3. 신호경로 억제 및 활성인자를 이용한 체세포 및 성체줄기세포의 역분화 및 교차분화유도

#### 가. 여러 종과 다양한 세포주를 활용한 유도만능줄기세포의 생산

- 소 유래 유도만능줄기세포 생산에 앞서 기존에 보고된 마우스와 인간 유래 유도만능줄기를 생산해 본 연구실에서 보유한 유전자 및 바이러스 시스템을 검증함. 기존에 보고된 리프로그래밍 인자인 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf와 추가적으로 중요하다고 보고된 Nanog를 활용하여 인간 치수세포 및 마우스 피부전구세포에서 역분화 줄기세포를 유도하였음

#### (1) 유도만능줄기세포의 확립을 위한 바이러스의 생산

##### (가) viral vector의 선정 및 정제

- 야마나카 팩터로 알려진 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc을 활용하였음. 또한 추가적으로 리프로그래밍 효율을 높이기 위해 Nanog도 동시에 생산하였음. dsRed가 tagging 되어 있는 벡터 추가적으로 삽입하여 바이러스가 제대로 생산되고 삽입이 되는지 확인하였음. 위와 같은 유전자가 접종이 되어 있는 박테리아를 16시간 배양후 maxiprep을 통해 플라스미드 DNA를 추출하였음

##### (나) virus의 생산

- 293GPG 세포에 extreme HP 또는 extreme 9을 사용하여 플라스미드 DNA를 삽입 후 약 48 h, 72 h, 96 h 및 120 h에 바이러스를 추출하였음. 냉장보관 또는 추출된 바이러스를 바로 사용하였음.

#### (2) 마우스 피부전구세포로부터 유도만능줄기세포의 생산

##### (가) 바이러스를 통한 유전자의 삽입

- 생산된 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc을 부착시킨 마우스 피부전구세포에 24시간 처리하여 삽입하고 dsRed를 동시에 처리하여 삽입 효율을 확인하였음. 약 80% 이상 삽입 되었으며 삽입 4일후 feeder layer와 젤라틴 코팅된 배양접시에 계대한 후 LIF가 첨가된 배아줄기세포 배양으로 교체하였음 (그림 30)

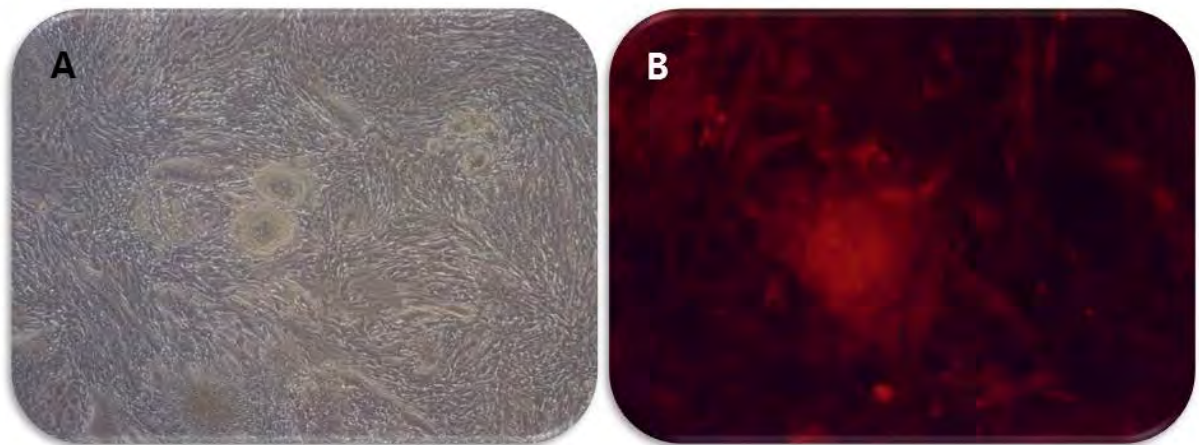


그림 30. 마우스피부 유래 전구세포에 유전자 삽입. (A) 바이러스를 이용한 유전자 삽입후 초기 콜로니. (B) 표지유전자인 dsRed의 발현 모습

(나) 역분화 유도만능세포의 생산 및 검증

- 약 5일후부터 콜로니의 변화가 시작되고 10-14일 사이에 콜로니가 커지면 trypsin을 이용하여 패스하여 5일주기로 패스를 하였음 (그림 31). 현재 약 11 passage 까지 계대하고 있으며 외형적 콜로니 모양은 배아줄기세포와 유사하며 ALP 염색 결과 강하게 발현하는 것을 확인하였음 (그림 32). 현재 전능성 관련 마커의 발현을 검증하고 있으며 분화를 유도하여 전능성 검증을 할 계획임.

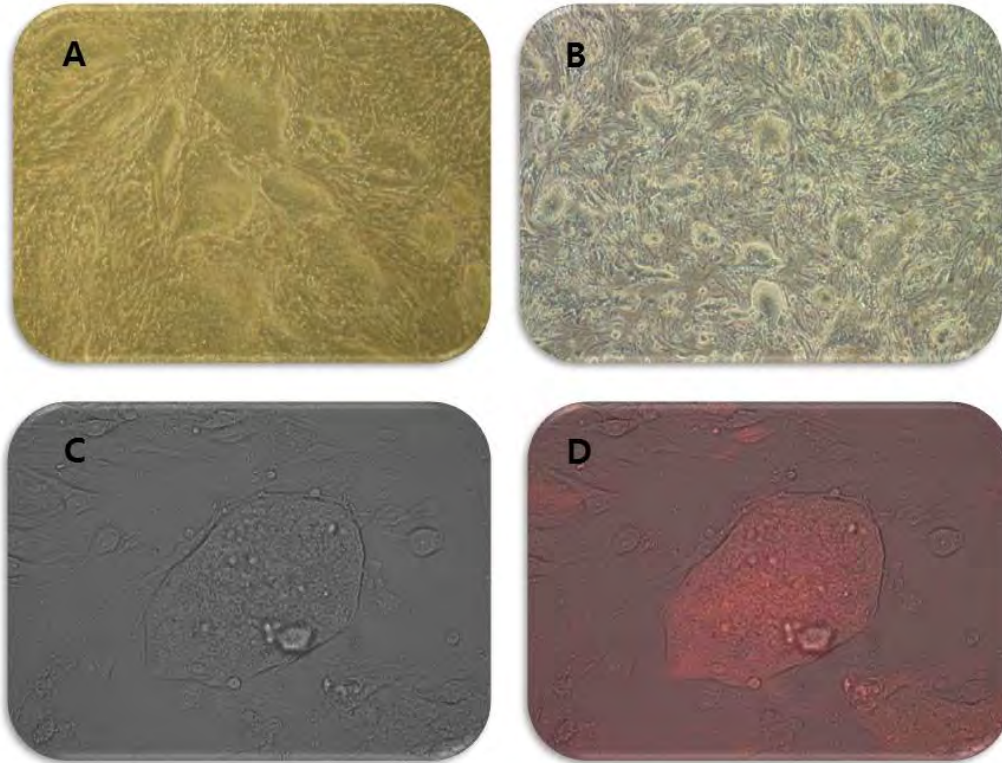


그림 31. 마우스 피부전구세포 유래 유도만능줄기세포의 확립. (A) passage 2의 마우스 유도만능줄기세포 모습. (B) passage 10의 마우스 유도만능줄기세포 모습. (C) 200배로 확대한 마우스 유도만능줄기세포의 모습. (D) 표지유전자인 dsRed의 발현 모습

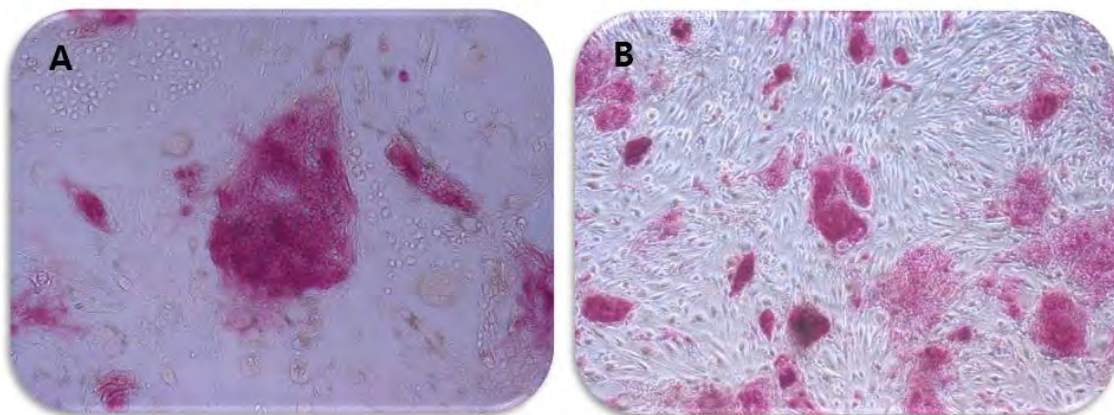


그림 32. 마우스 유도만능줄기세포의 ALP 염색 확인

### (3) 인간 치수세포 유래 유도만능줄기세포의 생산

#### (가) 바이러스를 통한 유전자의 삽입

- 인간 치수세포에 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog를 바이러스를 통해 삽입하였고 dsRed를 활용하여 바이러스 삽입효율을 확인하였음 (그림 33). 24시간 간격으로 2회 유전자의 삽입을 유도하였음. 삽입 4일후 feeder layer와 젤라틴 코팅된 배양접시에 옮겨 serum replacement 20%, bFGF, ITS, valproic acid가 첨가된 F12 DMEM 배양액으로 교체하였음 (그림 34)

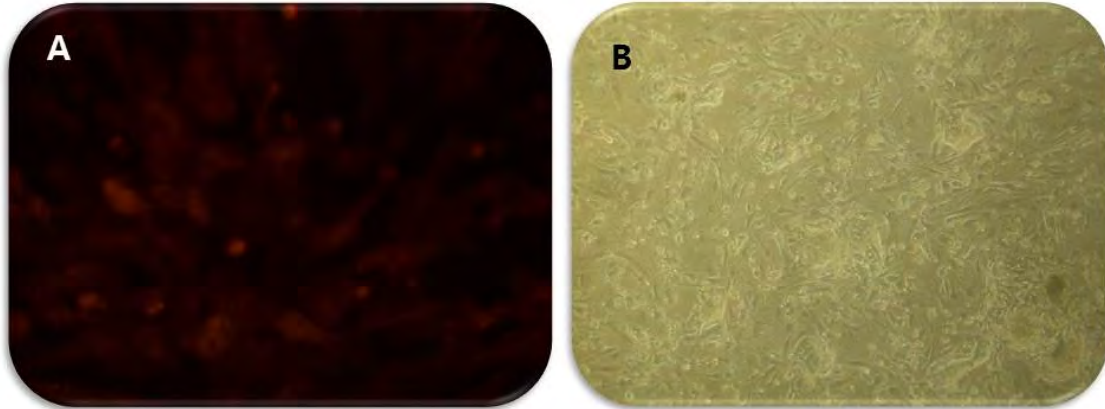


그림 33. 인간 치수유래 세포에 유전자 삽입. (A) 표지유전자인 dsRed가 삽입되어 발현하는 모습. (B) 배아줄기세포 배양액에서 세포의 외형적 변화 모습

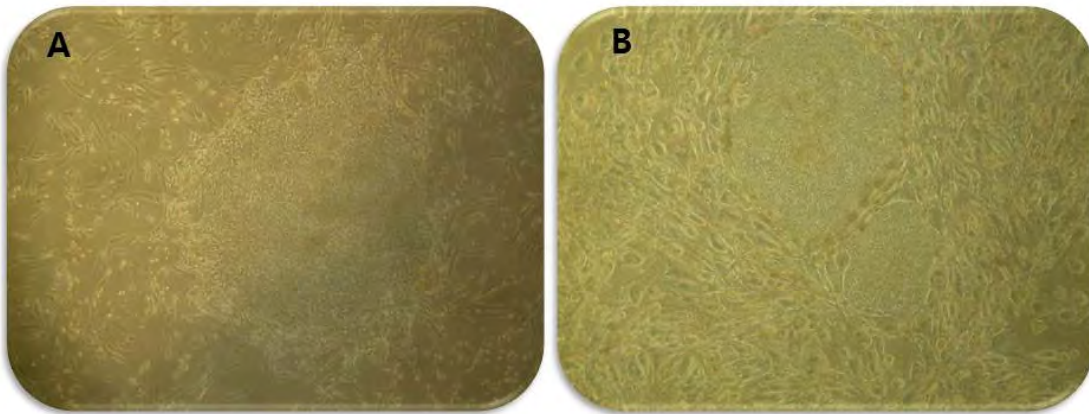


그림 34. 인간 치수 유래 유도만능줄기세포 생산. (A) passage 2의 초기 유도만능줄기세포 콜로니 모습. (B) passage 5의 유도만능줄기세포 콜로니 모습.

#### 라. 사람 유래 유도만능줄기세포 생산

- 인간 치수세포에 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog를 바이러스를 통해 삽입하였고 dsRed를 활용하여 바이러스 삽입효율을 확인하였음. 24시간 간격으로 2회 유전자의 삽입을 유도하고 삽입 4일후 feeder layer와 젤라틴 코팅된 배양접시에 옮겨 serum replacement 20%, bFGF, ITS, valproic acid가 첨가된 F12 DMEM 배양액으로 교체함 (그림 35)

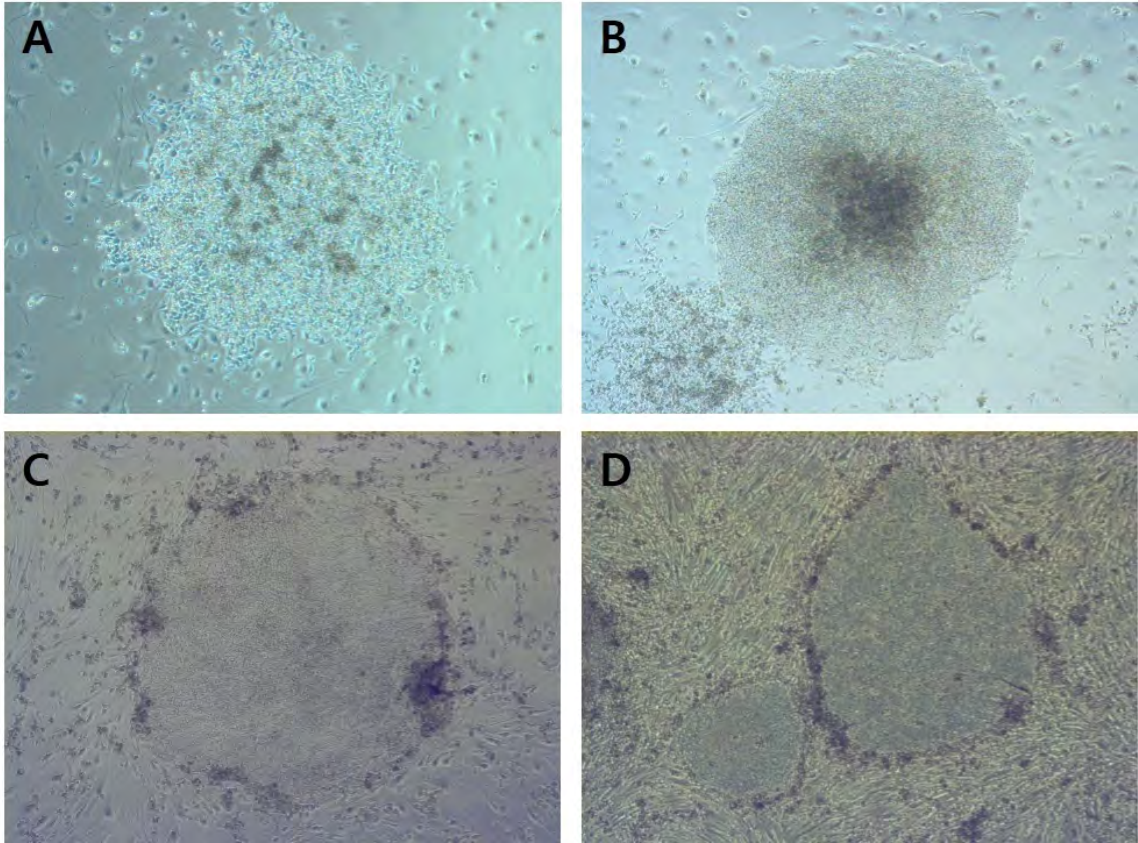


그림 35. 사람 치수 성체줄기세포 유래 유도만능줄기세포. (A) 바이러스 처리 후 7일차 유사 콜로니. 콜로니 형태로 뭉치기 시작함. (B) 바이러스 처리 후 14일차 콜로니. Boundary가 명확해지고 평평한 사람 유도만능줄기세포 형태 보임. (C) 5계대 후 사람 유도만능줄기세포. 계대 후 형태 유지. (D) 10계대 후 사람 유도만능줄기세포.

- 생산된 치수 유도만능줄기세포는 계대를 넘겨도 Dsred를 발현하고 있어 유전자 삽입에 의한 콜로니 임을 확인했으며 유도만능줄기세포 활용 시 세포의 이동추적이 가능함 (그림 36)

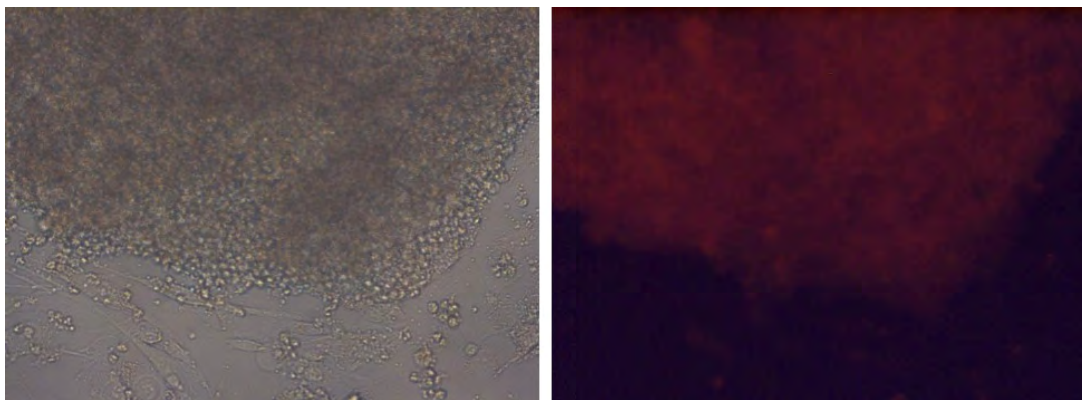


그림 36. 확립된 유도만능줄기세포의 Dsred 발광 모습.

- Alkaline phosphatase 분석한 결과 생산된 유도만능줄기세포는 강하게 양성을 보이는 것을 확인함. 이러한 AP 염색에 대한 양성은 계대를 넘겨도 안정적으로 유지됨을 확인 (그림 37).



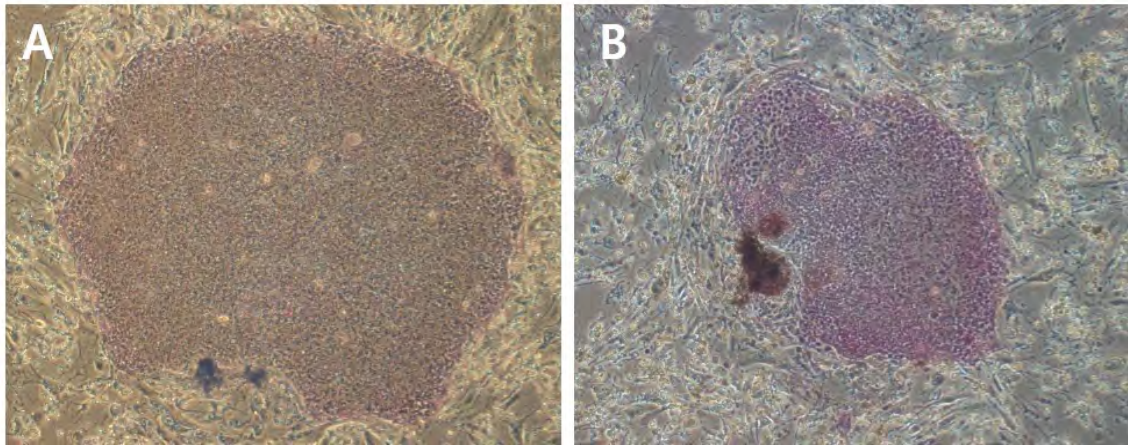


그림 37. 치수 유래 유도만능줄기세포의 Alkaline phosphatase 활성 검증. (A) 5 계대에서 실시한 AP 염색 결과. (B) 10 계대에서 실시한 AP 염색 결과.

#### 나. 소 유래 유도만능줄기세포 생산

##### (1) 소 자궁내막세포 유래 유도만능줄기세포의 생산

- 성체에서 분리한 소 자궁내막세포는 완전히 분화된 체세포에 비해 리프로그래밍 효율이 좋은 것으로 보고되어 유도만능줄기세포의 donor 세포로 사용함. 먼저 바이러스를 통한 유전자의 삽입을 위해 homologous가 존재하는 인간 유전자 유래 바이러스를 생산해 처리함.

##### (2) 유도만능줄기세포의 생산시도

- 배양액의 교체후 14일후 초기 콜로니가 형성되었으며 크기가 커지면 주사바늘을 이용하여 분리후 계대배양을 실시하였음. 하지만 passage 3 이후에 분화되는 양상을 보이며 콜로니가 유지되지 않았음 (그림 38). 이와 같은 문제를 해결하기 위해 사용하는 자원세포의 교체 및 소분자 물질의 처리를 통해 새로운 세포주의 확립을 진행.

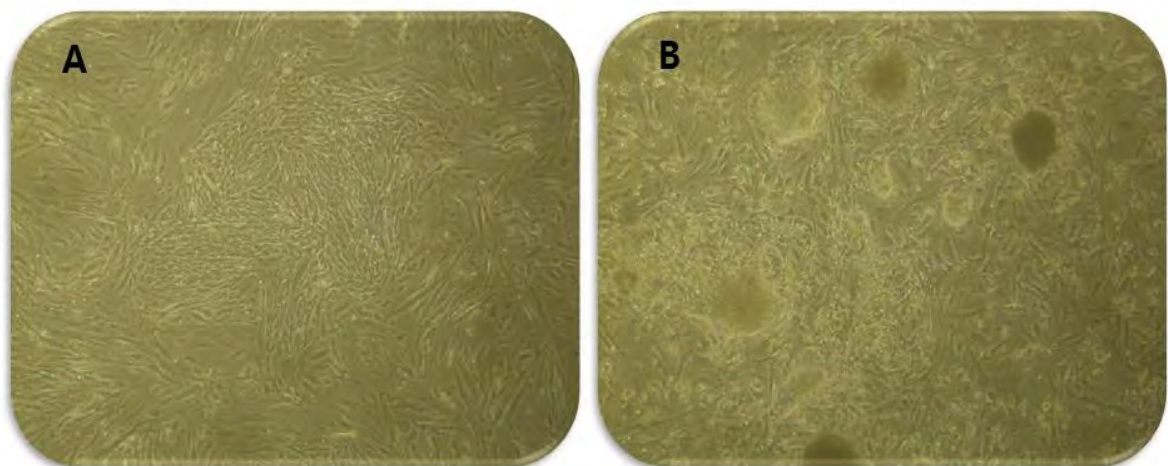


그림 38. 소 자궁내막세포 유래 유도만능줄기세포 유도. (A). passage 1의 초기 소 유도만능줄기유사세포의 모습. (B) passage 3의 소 유도만능줄기유사세포의 모습.

(3) 소 유래 유도만능줄기세포 확립을 위한 배양조건 최적화 시도

표 17. Comparison of various pluripotent stem cells culture media

Component	hPSC*	mPSC**	bPSC-M1***	bPSC-M2***
KnockOut™ DMEM		○		○
F12 + Neural Basal (1:1)	○		○	
KnockOut Serum Replacement,	○	○	○	○
Glutamax,	○	○	○	○
NEAA	○	○	○	○
Penicillin/streptomycin	○	○	○	○
N2B27			○	○
mLif		○		
4ng/ml bFGF	○			
3μM CHIR99021,			○	○
0.8μM PD184352.			○	○
2μM Thiazovivin				○

\* hPSC : human pluripotent stem cell culture medium

\*\*mPSC : mouse pluripotent stem cell culture medium

\*\*\* bPSC-M : bovine pluripotent stem cell culture medium

- 소 유래 섬유아세포에서 만능줄기세포를 확립하기 위해 사람, 마우스 및 과거 소 전능성 줄기세포를 확립시킨 보고를 통해 배양액을 선택하고 최적화를 시도함. 먼저 기존에 알려진 배양 조건을 통해 소 유래 유도만능줄기세포를 확립을 시도함 (표 17). 그 결과 각기 다른 수준의 유사 유도만능줄기세포 콜로니를 확인했고 그 수는 표 18에 정리함. 과거 소에서 보고된 배양액이 실질적으로 초기 유사 유도만능줄기세포 콜로니를 많이 보임 (bPSC-M1).
- 유전자 삽입 후 생존율의 향상시킨다는 Rock 억제제는 유도만능줄기세포의 확립 효율을 증대와 긴밀한 연관성이 있다는 결과가 사람과 마우스에서 보고되어 소에서 적용을 한 결과 오히려 더 적은 콜로니를 보여 사람이나 마우스에 비해 Rock 억제제는 소 유래 유도만능줄기세포 생산에 영향이 적은 것으로 보임 (표 18)

표 18. The number of generated pluripotent stem-like cell colonies with various culture media

Culture medium	Number of generated pluripotent stem-like cell colonies
hPSC	5
mPSC	2
bPSC-M1*	28
bPSC-M2*	7

\* hPSC : human pluripotent stem cell culture medium

\*\*mPSC : mouse pluripotent stem cell culture medium

\*\*\* bPSC-M : bovine pluripotent stem cell culture medium

(4) 다양한 소분자 물질이 첨가된 배양액을 통한 유도만능줄기세포 생산 효율 증대 시도

- 사람과 마우스에서 알려진 전능성 줄기세포 배양액에 기존에 알려진 epigenetic formation에 영향을 줄 수 있는 소분자 물질을 통해 유도만능줄기세포 생산 효율의 증감을 확인함. 본 연구에서 사용된 소분자 물질은 histone deacetylase inhibitor인 vaproic acid (VPA), 강한 항산화물질로 알려진 nicotinamide (NMA)과 kintein 으로 세포가 재프로그래밍 과정에서 생산되는 활성산소를 낮추거나 메틸레에션을 풀어 전능성과 관련된 유전자의 재발현을 유도하는데 도움을 주는 것으로 보고됨. 본 연구결과에서 이 소분자물질을 추가로 장기 배양하는 것은 첨가하지 않은 배양액보다 유사 유도만능줄기세포의 수를 증가시키지 않아 사람이나 마우스와는 달리 소에서는 유의적 영향이 없는 것으로 생각되며 소의 전능성 줄기세포는 기존에 알려진 사람이나 마우스 배양환경과 다른 종특이적인 배양액이 필요한 것으로 생각됨 (표 19).

표 19. Comparison of modified human and mouse embryonic stem cell media

Component	human PSC <sup>*</sup>			mouse PSC <sup>**</sup>		
	hPSC <sup>*</sup> -V	hPSC <sup>*</sup> -N	hPSC <sup>*</sup> -K	mPSC <sup>**</sup> -V	mPSC <sup>**</sup> -N	mPSC <sup>**</sup> -K
KnockOut™ DMEM,				○	○	○
F12 + Neural Basal	○	○	○			
KSR	○	○	○			
FBS				○	○	○
Glutamax,	○	○	○	○	○	○
NEAA	○	○	○	○	○	○
Penicillin/streptomycin	○	○	○	○	○	○
1000 U mLif				○	○	○
4ng/ml bFGF	○	○	○			
Valporic acid	○			○		
Nicotinamide		○			○	
Kinetin			○			○
Number of generated pluripotent stem-like cell colonies	3	4	2	2	0	0

\* hPSC : human pluripotent stem cell culture medium

\*\*mPSC : mouse pluripotent stem cell culture medium

(5) 다양한 소분자 전처리를 통한 유도만능줄기세포 확립 시도

- DNA methylation을 풀고 histone deacetylase inhibitor의 역할을 수행하는 소분자 물질인 vaproic acid (VPA), sodium butyrate (NaB) 및 nicotinamide (NMA)을 처리하여 효율적인 소 유도 만능줄기세포를 확립하기 위하여 전처리를 진행함.

- 앞서 human dermal fibroblast 및 human peripheral blood cell에서 성공적으로 유도만능줄기세포를 확립했다고 보고된 바 있는 Y4 (L-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4) + EBNA-1 combination (표 20)과 소 유도 만능 줄기세포를 확립하는 데 있어서 중요하다고 알려진 Nanog가 들어있는 Y2 (Nanog/c-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4) + EBNA-1 combination (표 21)을 세포에 삽입해 소 유래 유도만능줄기세포 확립 유무 및 그 효율을 확인함.

표 20. Analyzing the efficiency of deriving induced pluripotent stem cells from bovine fetal fibroblast using Y4 + EBNA-1 combination.

Small molecule (Pretreatment time)	Culture medium	Number of generated primary colonies	Efficiency
VPA (3일)	bPSC-M1*	3	0.005%
NaB (3일)	bPSC-M1*	3	0.005%
NMA (3일)	bPSC-M1*	8	0.013%

\* bPSC-M : bovine pluripotent stem cell culture medium.

표 21. Analyzing the efficiency of deriving induced pluripotent stem cells from bovine fetal fibroblast using Y2 + EBNA-1 combination.

Small molecule (Pretreatment time)	Culture medium	Number of generated primary colonies	Efficiency
VPA(3일)	bPSC-M1*	8	0.016%
NaB(3일)	bPSC-M1*	2	0.003%
NMA(3일)	bPSC-M1*	4	0.006%

\* bPSC-M : bovine pluripotent stem cell culture medium.

**다. 소 태아 섬유아세포를 이용한 유도 만능 줄기세포 확립**

- 성체의 세포들과 비교해 보다 전구세포와 같이 전능성을 어느정도 유지하고 있는 것으로 알려져 있는 태아의 세포를 이용해 유도만능줄기세포 확립을 시도함. 소 유래 유도만능 줄기세포를 생산하기위해 Episomal vector를 이용해 N-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4 및 EGFP를 전기천공기를 이용해 106의 소 태아 섬유아세포에 vector를 삽입함. 5일차까지 EGFP가 발현이 됨을 확인하였고 (그림 39B) 14일차에 첫 번째 초기 콜로니가 나타난 것을 확인함 (그림 39C). 18일차에 그림처럼 colony가 커진 것을 확인하였고 총 3개의 100파이 dish에 7개의 colony가 나타났음. passage 5 까지 유지함.

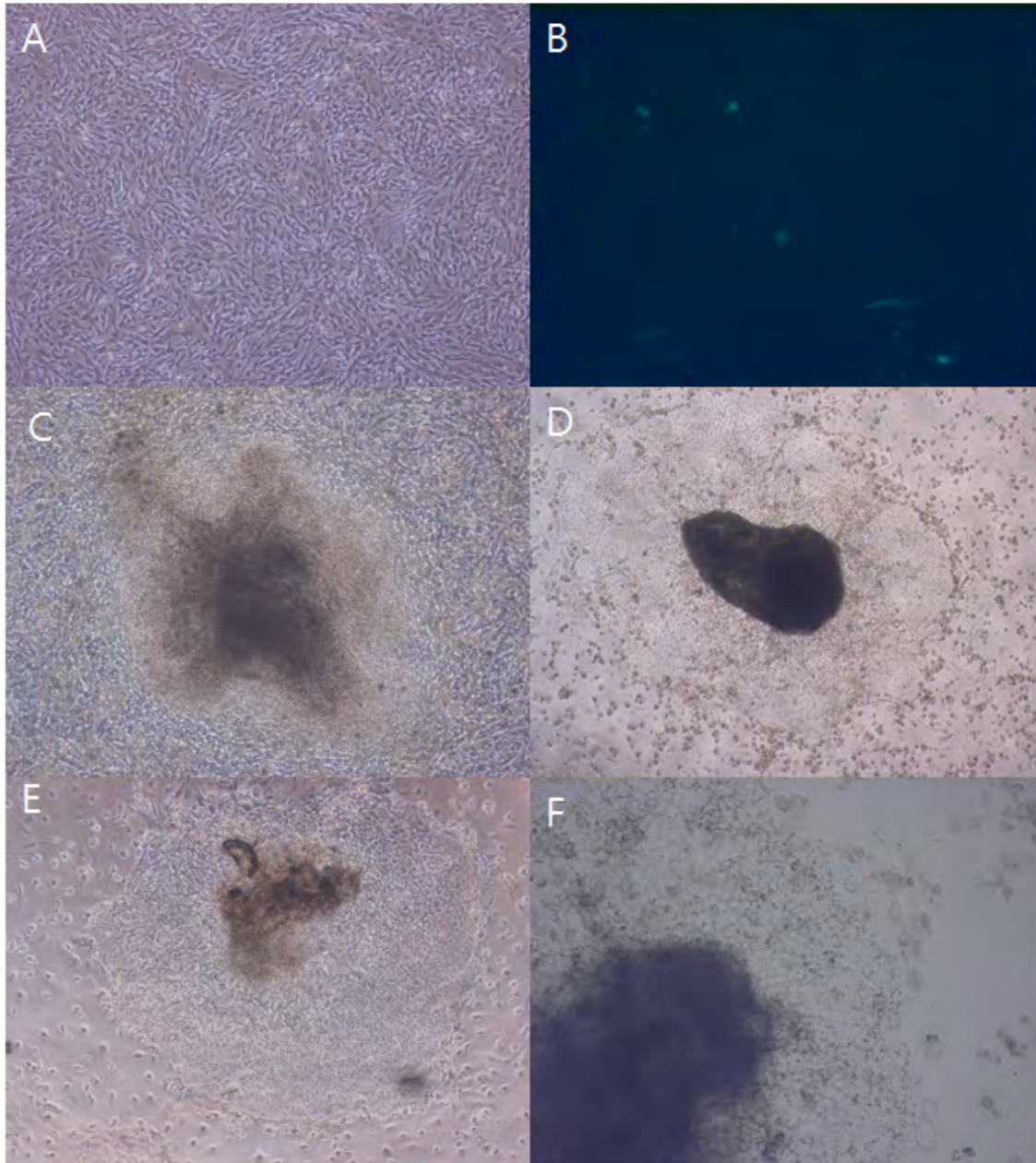


그림 39. 소 태아 유래 섬유 아세포를 이용한 유도만능줄기세포 생산. (A) Transfection 전 소 태아 섬유아세포. (B) Transfection 5일 후 EGFP 관찰 모습. (C) Transfection 후 18일 차 iPS cell-like cell colony. (D) Passage 2 4일 차 증식한 모습. (E) Passage 2 4일 차 증식한 모습. (F) passage 4 3일차 모습.

(1) 소분자물질 전처리 및 EBNA-1 vector의 추가를 통한 유도만능줄기세포 확립

- Methylation을 줄이고 유도만능줄기세포를 효율적으로 확립할 수 있다고 보고 된 valproic acid (VPA), sodium Butyrate (NaB), nicotinic amide (NMA)를 3일 동안 전 처리 실시.
- 다른 vector보다 증식력을 향상시켜 유도만능줄기세포에 탁월하다고 알려진 EBNA-1 vector를 N-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4 및 Nanog/C-myc/Lin28에 추가 하여 transfection 실시 하고 bPSC-M1 배양액 (표 20 참고) 을 통해 유도만능줄기세포 생산 (그림 40)

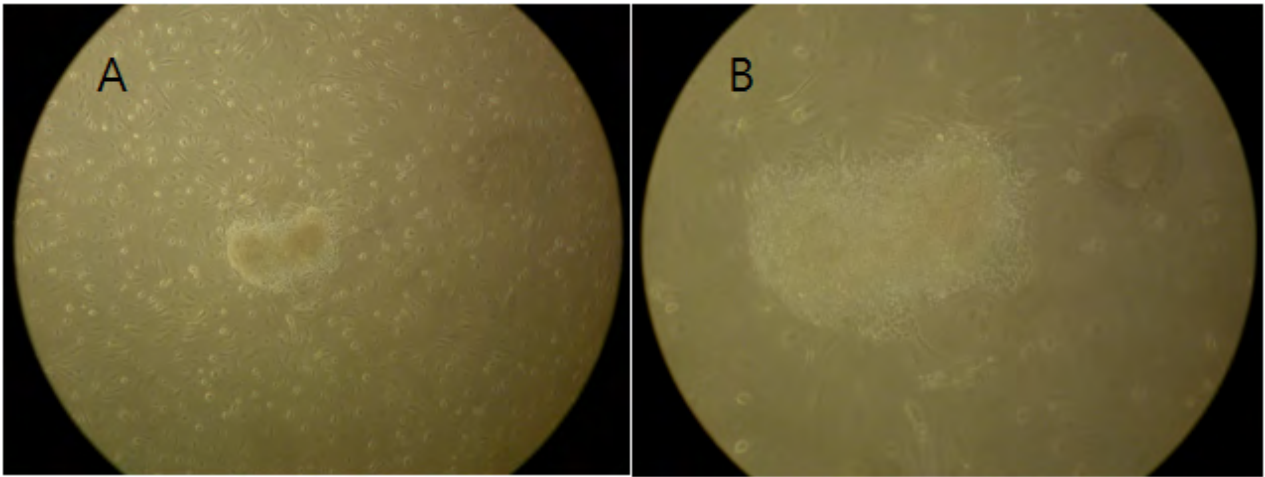


그림 40. 소분자물질을 이용한 소 유래 유도만능줄기세포 생산 시도. (A) passage 1 iPS cell-like cell. 40배 (B) passage 1 iPS cell-like cell. 100배

## (2) 소 유도 만능줄기세포의 Alkaline phosphatase (AP) staining

- Transfection 후 콜로니가 충분히 커진 것을 관찰하고 AP staining을 진행함. 마우스 혹은 사람의 유도만능 줄기세포와 유사하게 생산된 초기 소 유래 유도만능줄기세포 역시 AP 염색에 강하게 양성을 보임. 그러나 다른 종과 다르게 전체적으로 염색이 되지 않은 현상을 보임 (그림 41). 이러한 것은 본 연구진이 확립한 배아유래 전능성 줄기세포와 유사한 현상으로 소 유래 전능성 줄기세포만의 고유 성장인 것으로 생각됨.

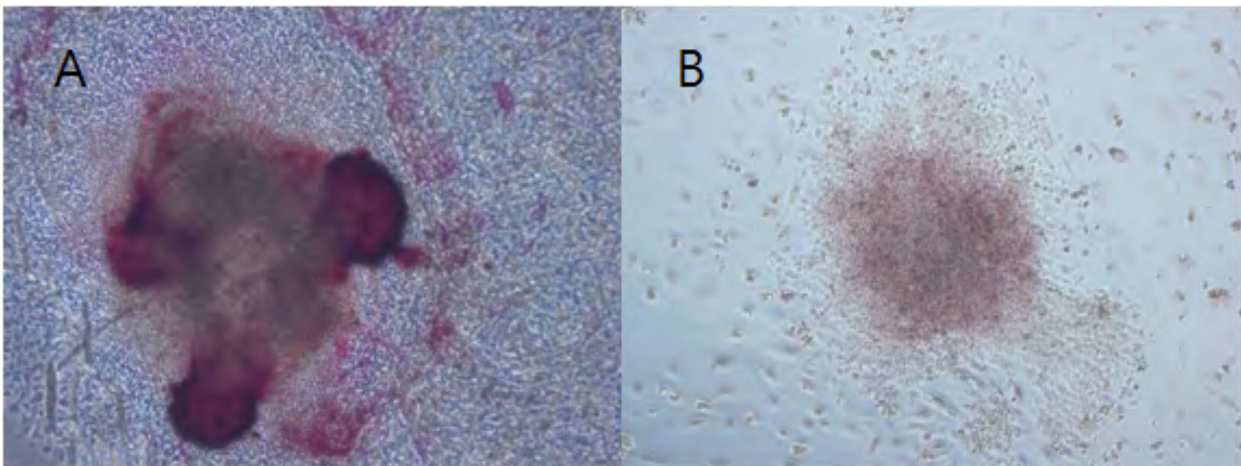


그림 41. 소 유도 만능줄기세포의 Alkaline phosphatase (AP) 염색. (A) small molecule 전처리 하지 않고 M1 medium에서의 culture 18일차 iPSC AP staining. (B) VPA 3일 동안 처리하고 M2에서의 culture 24일차 iPSC AP staining.

## 라. 소유래 유전자를 이용한 소 유도만능줄기세포 생산 시도

### (1) 소 유래 유전자를 통한 바이러스 플라스미드 제작

- 지난 2차년도에는 사람이나 마우스의 전능성관련 유전자가 소에서도 homologous가 있어 시중에서 판매되고 reference가 있는 제품을 사용했으나 이 경우 줄기세포 유사세포 콜로니가 생성되는 시간이나 생성 효율이 낮은 문제가 확인됨. 때문에 bovine 유래의 유전자 지도를

이용해 plasmid DNA를 제작하고 소 유도만능줄기세포 생산에 새로이 적용함. 또한 추가적으로 고효율 소 유도만능줄기세포를 생산하기 위해 새롭게 생산된 플라스미드는 cassette type으로 구성해 기존에 6-7개의 플라스미드를 삽입함으로써 인해 transfection 확률이 낮았던 것을 2-3개만 처리해 실험과정 및 그 효율성을 향상시켰음. 최종적으로 b\_OSK 벡터는 bovine OCT4, SOX2 그리고 KLF4 유전자를 하나의 벡터에 삽입하고 b\_NCL 벡터는 bovine NANOG, c-Myc 그리고 Lin28 유전자를 하나의 벡터에 넣어 사용하였음.

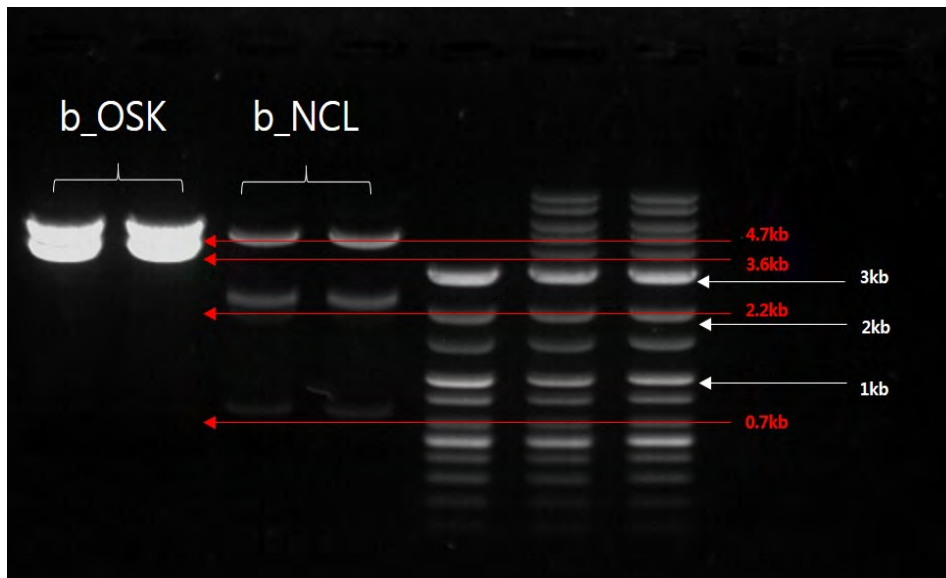


그림 42. 제한효소 (EcoRI)을 이용한 새로운 벡터 size 확인. b\_OSK: bovine OCT4, SOX2, KLF4. b\_NCL: bovine NANOG, c-Myc, Lin28.

- 새롭게 제작된 벡터가 계획한 데로 만들어 졌는지 확인하기 위해 제한효소를 이용해 잘라 예상되는 size를 확인한 결과 두 벡터 모두 일치하는 것을 확인함 (그림 42). 새로운 벡터를 사용한 결과 기존의 벡터에 비해 높은 효율로 AP positive인 콜로니가 확인되었고 세포가 응축되어 재프로그래밍 되는 모습이 기존의 13-15일에서 5-8일 사이로 빨라지고 이에 따라 지난 실험에서보다 빠르고 수월하게 콜로니를 생성하는 것이 확인되어 소 유도만능줄기세포에 기존 벡터보다 적합한 것으로 판단됨. 또한 기존 사람이나 마우스유래의 벡터에서는 초기 콜로니 생성 시 함께 처리한 형광 단백질 dsred가 발현하지 않는 모습을 많이 나타내었으나(그림 43), 새로 제작한 벡터를 통해 transfection을 진행한 세포그룹에서는 일부 dsred를 발현하지 않는 콜로니가 보이기도 하였으나(그림 44A) 전반적으로 약 50% 이상 dsred를 발현하는 초기형태의 콜로니가 많아지고 재프로그래밍 동안 관찰이 용이해져 계대 시 지표로 이용이 가능해짐 (KSR-M6B 미디엄 사용, 그림 44B). 새로 제작한 벡터에서 transfection 효율이 높아진 이유 중 하나는 기존 벡터는 각 유전자를 따로 있어 여러 가지 6-7가지 벡터를 한꺼번에 처리해야했으나 새롭게 제작한 벡터는 cassette type으로 하나 벡터에 3개의 유전자를 이용해 보다 사용이 용이하고 높은 효율로 transfection 유도될 수 있도록 함. 이렇게 형광 단백질이 발현하는 소 유도만능줄기세포는 추후에 키메라 배아생산 및 세포 분포를 확인하는데 도움을 줄 것으로 생각됨.

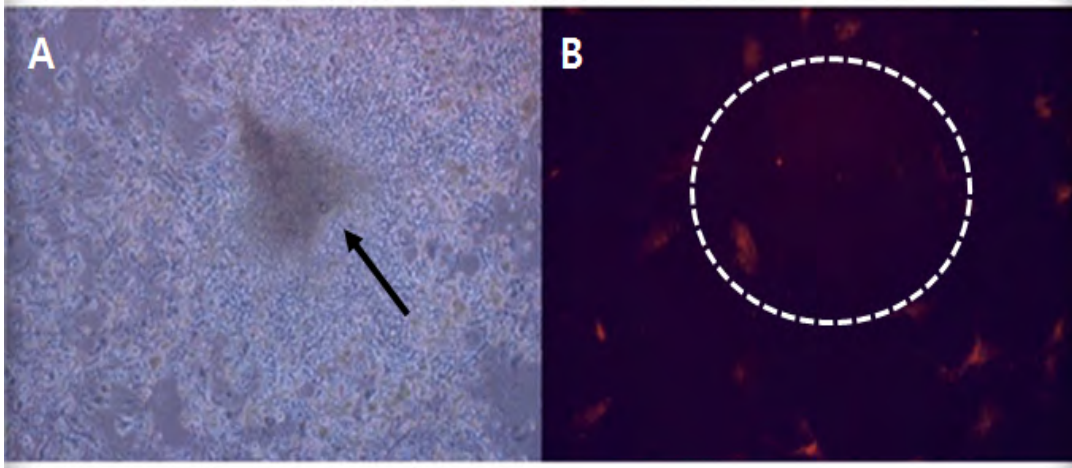


그림 43. 기존 박터 (사람 및 마우스)를 이용한 소 유래 초기 유도만능줄기세포 콜로니 생산. 생성된 다수의 콜로니가 dsred를 발현하 못하는 모습을 보임. 화살표는 초기 콜로니 (A)를 점선 원은 화살표 부위에서 dsred가 발현하지 않는 모습을 보임 (B).

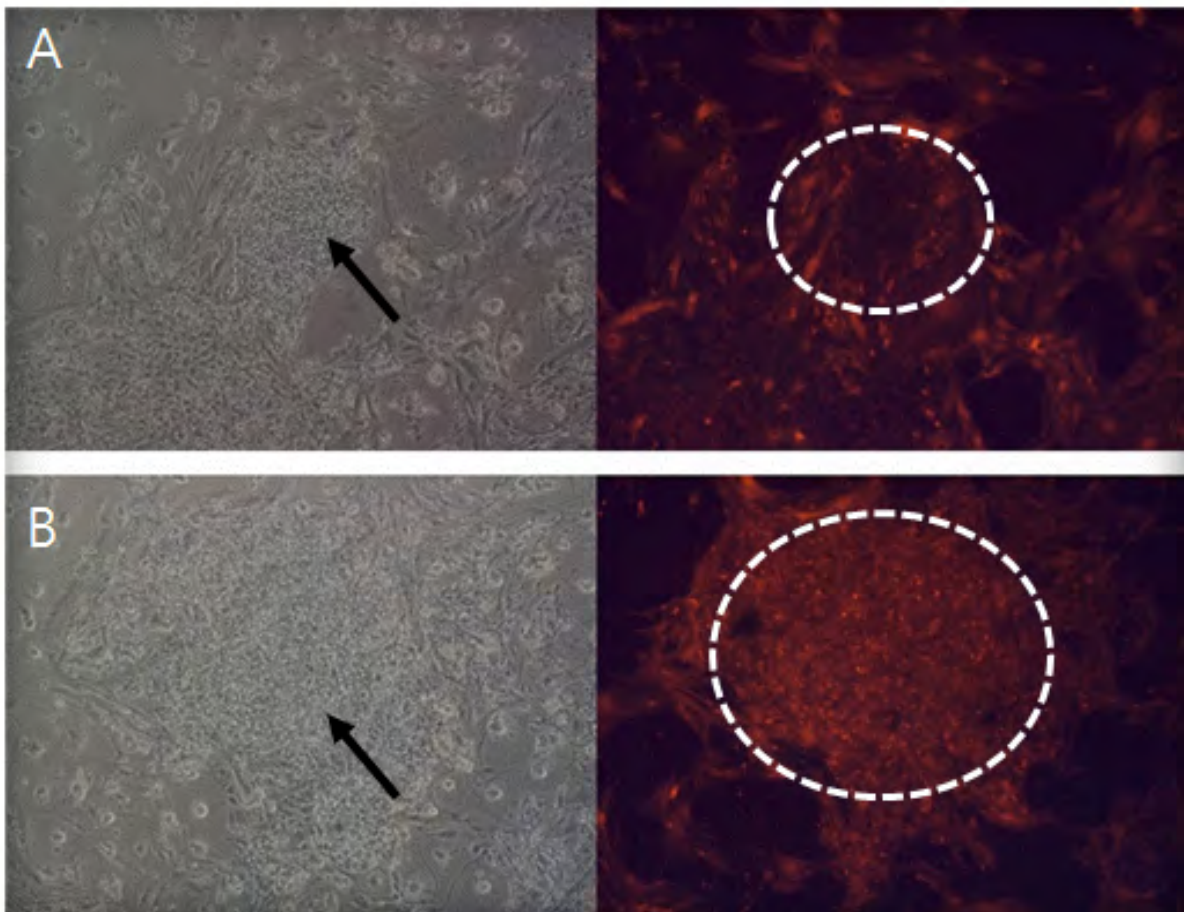


그림 44. 새로운 박터를 이용한 초기 소 유래 유도 만능 줄기세포. (A)기존에 사람 유래 박터를 이용한 것처럼 일부 초기 콜로니에서 dsred가 함께 보이지 않는 것이 확인됨. 그러나 높은 효율로 초기 콜로니가 dsred와 함께 발현하는 것이 확인됨 (B). 화살표는 초기 콜로니를 점선 원은 dsred를 발현하는 초기콜로니를 형광으로 보임.



(2) 다양한 미디엄을 이용한 소 유도만능줄기세포 장기 배양 시도

(가) 사람과 마우스 전능성 줄기세포 유도 배양 조건을 변형해 소 유도만능줄기세포 확립 시도

표 22. 소 유래 재프로그램 동안 사람과 마우스를 기본으로 하는 다양한 배양액 시도.

Component	basic M	basic ML	ML1	ML2
F12 DMEM with glutamax 15% KSR 2-Mercaptoethanol NEAA Penicillin/streptomycin Y-27632 Nab			공통 요소.	
hLif		0	0	0
4ng/ml bFGF			0	
BMP4				0

- 기존에 알려진 사람과 마우스 유도만능줄기세포 배양액을 기본으로 소 유도만능줄기세포 배양에 적용 (표 22). 사람과 마우스에서 중요하게 알려진 LIF, bFGF, BMP4를 처리해 배양 시도. 먼저 LIF 유무에 따른 실험에서 LIF 가 중요한 것을 확인하고 LIF 역시 기본으로 bFGF와 BMP4를 추가로 첨가해 배양을 시도함 (ML1과 ML2). 9일차에 보면 세포가 뭉치고 길쭉한 fibroblast 모양이 상피세포의 모양으로 바뀌는 것을 확인하였음 (그림 45). 18일차가 되면 유사 콜로니의 크기가 커지나 지지세포와 경계가 뚜렷하지는 않고 AP 염색 시 주변주의 경계다 확실하게 구분되지 않음. 또한 이러한 두 그룹에서 초기 계대에서만 유지가 될 뿐 계대 2-3을 넘기기 어려움을 확인하고 추가적으로 세포의 전능성 유지에 도움을 줄 수 있는 인자를 조사함.

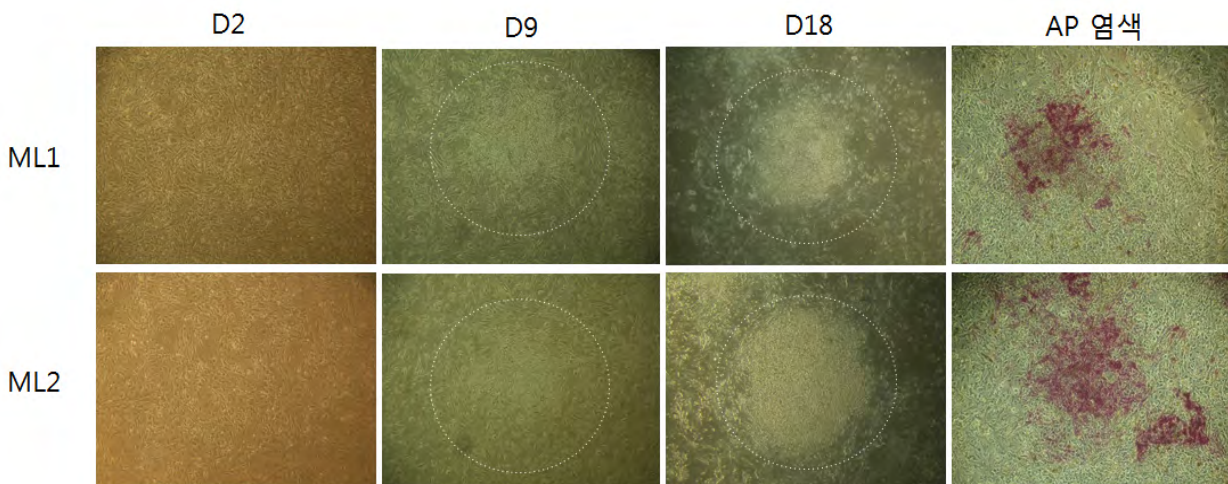


그림 45. 서로 다른 두 가지 미디엄을 통한 초기 소 유도만능줄기세포의 생산 및 AP 염색. 점선원으로 표기된 부분은 초기 유도만능줄기세포를 보여줌.

(나) 소 유도만능줄기세포 생산 시 Hypoxia 환경의 영향

- 소 유도만능줄기세포의 생산을 위해 기존에 다른 종의 유도만능줄기세포의 생산에서 효과적인 방법으로 알려진 Hypoxia 환경에서 콜로니의 형성이 효과적인지 관찰하였음. 그림 5와 같이 ML1 배양조건에서 Hypoxia 환경이 콜로니의 형성을 억제하는 것을 확인함 (그림 46). 이러한 결과는 소 유도만능줄기세포 생산 시 Hypoxia 조건보다 normoxia조건에서 더 좋은 콜로니 효율을 보일 것으로 생각됨.

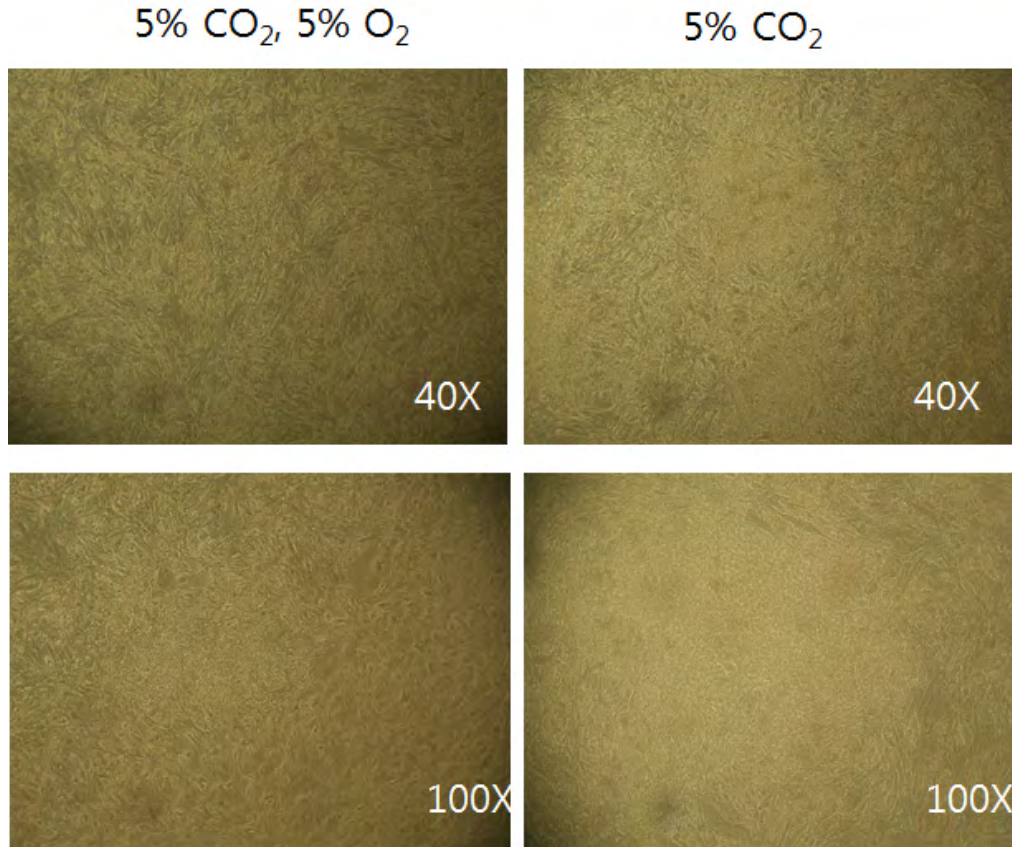


그림 46. 소 유도만능줄기세포 생산 동안 hypoxia와 cytokine에 영향. (A) ML1 기본미디엄에서 hypoxia와 normoxia가 초기 유도만능줄기세포에 형태적으로 미치는 영향. normoxia에서 세포 응축이 더 많이 되는 것을 확인함.

(다) 억제제를 이용한 후성적 재프로그래밍 유도

① N2B27 기본 미디엄을 이용한 후성적 재프로그래밍 유도

- 억제제를 이용해 후성적 재프로그래밍을 유도하기 위해 기존에 가장 많이 알려진 N2B27 기본 미디엄을 이용해 초기 재프로그래밍을 유도함 (표 23) N2B27 기본 미디엄은 재프로그래밍 초기에 세포의 크기가 감소되어 작아지는 효과를 빠르게 가져다 주지만 증식을 많이 유도하지 못함. 기존에 FBS를 사용했던 medium 에서는 4-6일 사이에 well을 가득 채워 세포가 응축되는 모습을 보였으나 N2B27 medium은 세포가 먼저 작아지는 모습을 보이며 초기 증식은 많이 이루어지지 않음. 다음으로 N2B27 기본 미디엄에 growth factor와 small molecules을 통해 세포의 증식력 및 분화를 억제하는 과정을 추가한 결과 대부분에서 유사 콜로니가 확인되지 못함 (그림 47). 오직 seeding 16일 후 AP positive 콜로니는 NB-M6에서만 확인됨 (그림 48)

표 23. Comparison of various pluripotent stem cells culture media with N2B27

Component	NB-M1	NB-M2	NB-M3	NB-M4	NB-M5	NB-M6
F12 DMEM with glutamax						
N2B27						
2-Mercaptoethanol						
NEAA						
Penicillin/streptomycin						
Y-27632						
hLif						
4ng/ml bFGF		○	○	○	○	○
3 $\mu$ M CHIR99021,			○	○	○	○
0.8 $\mu$ M PD184352.				○	○	
2 $\mu$ M SU5402					○	
1 $\mu$ M PD0325901						○

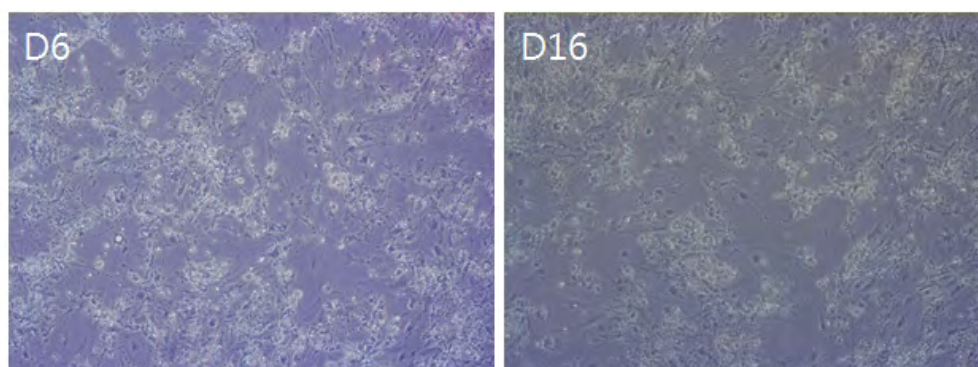


그림 47. N2B27 기본미디엄으로 배양한 소 유도만능줄기세포 (NB-M1). D6에서부터 세포가 응축되는 것처럼 보이나 D16이 되어도 세포는 배양 접시를 가득 채우지 못하고 유사콜로니도 나타나지 않음.

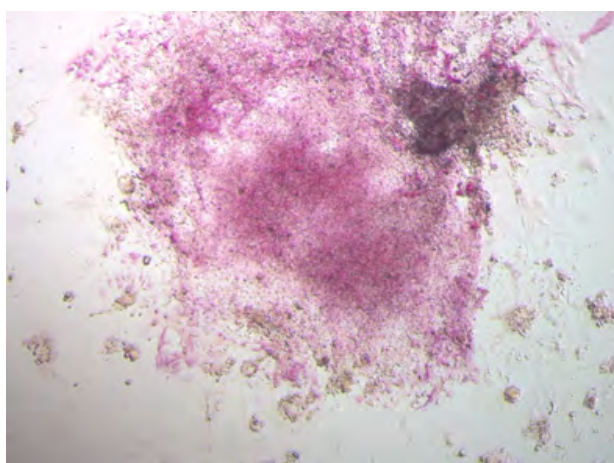


그림 48. N2B27 기본미디엄을 이용한 초기 소 유도 만능줄기세포의 AP 염색. N2B27 기본미디엄에서는 NB-M6에서만 계대 1에서 AP positive 콜로니가 확인 됨.

② KnockOut Serum Replacement (KSR) 기본 미디어를 이용한 후성적 재프로그래밍 유도

- N2B27은 마우스 세포의 재프로그래밍 시 초기 유도에 약하고 세포 죽음을 유도한다는 보고가 있어 대체물인 KSR 기본미디어와 억제제를 이용해 소 재프로그래밍 유도를 시도함 (표 24). 결과적으로 KSR 기본 미디어는 seeding 4-5일 후 well에 세포가 가득 차 N2B27보다 초기 증식에 좋은 모습을 보이고 세포들이 응축되면서 죽어 부유하는 모습이 적음. 이러한 결과는 재프로그래밍 동안 장기 배양해야하는 과정에 있어 N2B27 보다 KSR 기본 미디어가 적합한 것으로 생각됨. 다음으로 N2B27 기본 미디어에 growth factor와 small molecules을 통해 세포의 증식력 및 분화를 억제하는 과정을 추가한 결과 FGF를 넣은 대부분의 그룹에서 유사 콜로니가 확인됨. 그러나 콜로니의 형태를 계속해서 유지하는 그룹은 KSR-M2, -M6 뿐임. 또한 seeding 16일 후 AP positive 콜로니는 KSR-M2와 -M6에서 확인됨. 계대를 넘기는 동안 KSR-M6에서만 AP positive 콜로니를 유지하는 것으로 확인 되었으나 계대 4를 넘기면 증식이 매우 나빠져 유지하기 힘들 (그림 49). 그러나 계대를 넘기는 동안 AP positive 콜로니는 콜로니의 형태를 유지하고 dsred 역시 발현함이 확인됨.

표 24. Comparison of various pluripotent stem cells culture media with KnockOut Serum Replacement (KSR)

Component	KSR-M1	KSR-M2	KSR-M3	KSR-M4	KSR-M5	KSR-M6
F12 DMEM with glutamax KSR 2-Mercaptoethanol NEAA Penicillin/streptomycin Y-27632 hLif		KSR을 포함하는 기본 미디어.				
4ng/ml bFGF		○	○	○	○	○
3μM CHIR99021, 0.8μM PD184352.			○	○	○	○
2μM SU5402				○	○	
1μM PD0325901						○

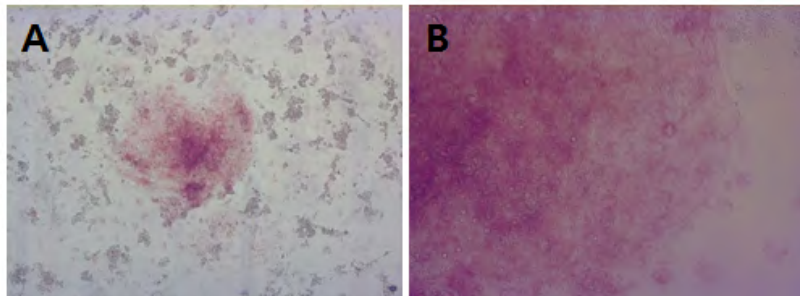


그림 49. 계대 4 동안 KSR 기본미디어를 이용한 초기 소 유도 만능줄기세포의 AP 염색. (A) 비록 세포가 많은 증식을 보이지 않았지만 KSR-M6 미디어에서 계대 4에서 AP positive 콜로니가 유지됨. (B) 고배율로 확대 시 소 유도 만능줄기세포의 경계가 유지되고 있음을 확인할 수 있음.

(라) 사람 naive 상태를 유지시키는 추가적인 억제제를 통한 소 유도만능줄기세포 생산 시도

- 최근 nature에 보고된 내용 중 사람 배아줄기세포의 naive 상태를 위해 TGF-b 신호를 억제하는 A-80 그리고 c-fos를 통해 분화를 유도하는 pathway를 억제하기 위해 P38i와 JNKi를 보고함. 앞서 비교적 좋은 효과를 보인 KSR 기본 미디어를 통해 세가지 추가 억제제를 이용해 소 유도만능줄기세포 생산을 시도했으나 기존의 미디어와 큰 차이가 없음을 확인했고 이는 사람 전능성 줄기세포와 소는 다른 pathway를 이용하는 것으로 생각됨 (표 25)

표 25. Comparison of various pluripotent stem cells culture media with additional inhibitors

Component	KSR-M2	KSR-M6	KSR-M6J	KSR-M6JP	KSR-M6JPA
F12 DMEM with glutamax KSR 2-Mercaptoethanol NEAA Penicillin/streptomycin Y-27632 hLif					
	KSR 을 포함하는 기본 미디어.				
4ng/ml bFGF	○	○	○	○	○
3μM CHIR99021,		○	○	○	○
1μM PD0325901		○	○	○	○
JNKi			○	○	○
P38i				○	○
A-80					○

(마) 추가적인 사이토카인을 이용한 소 유도만능줄기세포 생산 시도

- 전능성에 중요하게 알려져 있는 Activin-A 및 BMP4 signaling을 강화해 분화를 억제하고자 함. 특히 BMP4의 경우 소의 전능성유지에 중요하다는 보고가 있어 연구를 진행함 (표 26)
- 기존에 reference가 있는 BMP4와 사람 전능성 유지에 중요한 Activin-A를 추가한 결과 KSR-M6B와 -AB에서 유사 콜로니가 확인됨. 이러한 콜로니는 계대를 넘기며 증식력이 약해지는 모습을 보이나 AP positive한 성상을 보이고 콜로니의 형태를 유지함 (그림 49A). 초기에는 다양 그룹에서 AP positive 콜로니를 확인 할 수 있었고 특히 KSR-M6과 -M6B에서 강하고 많은 AP positive 콜로니를 확인했으나 계대 5에서는 KSR-M6B에서만 AP positive 콜로니가 확인되어 FGF과 BMP4 연관 signal이 소 유도만능줄기세포에 중요한 역할을 할 것으로 보이고 Activin-A는 영향이 적은 것으로 생각됨 (그림 49B). 또한 KSR-M6B에서 배양된 콜로니는 계대 5에서 AP positive 콜로니는 대부분 dsred 발광을 보여 외부적으로 넣어준 유전자가 삽입된 소 유도만능줄기세포임을 확인함 (그림 50A, B)

표 26. Comparison of various pluripotent stem cells culture media with additional cytokines

Component	KSR-M6	KSR-M6A	KSR-M6B	KSR-M6AB
F12 DMEM with glutamax				
KSR				
2-Mercaptoethanol				
NEAA				
Penicillin/streptomycin				
Y-27632				
hLif				
4ng/ml bFGF	○	○	○	○
3 $\mu$ M CHIR99021,	○	○	○	○
1 $\mu$ M PD0325901	○	○	○	○
Activin-A		○		○
BMP4			○	○

KSR 을 포함하는 기본 미디어.

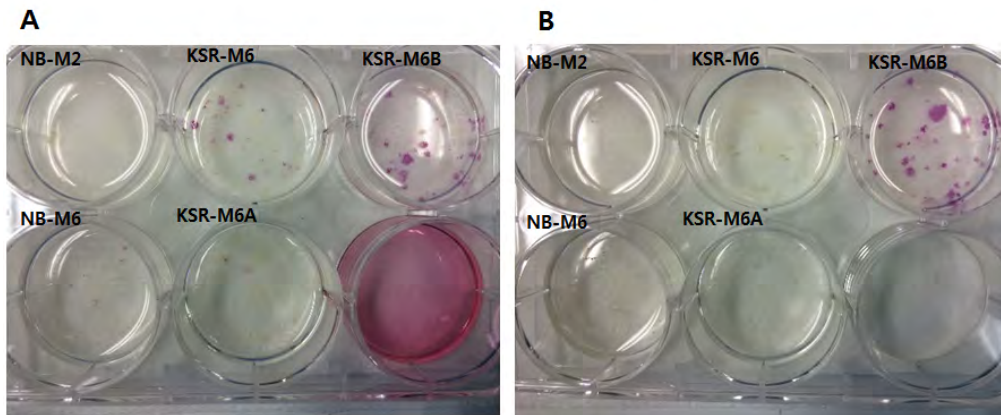


그림 49. 소 유도 배양줄기세포의 AP 염색 비교. (A) 계대 2에서 AP 염색 시 NB-M2를 제외한 그룹에서 AP positive colony를 확인함. (B) KSR-M6과 -M6B에서 강하고 많은 AP positive 콜로니를 확인했으나 계대 5에서는 KSR-M6B에서만 AP positive 콜로니가 확인됨.

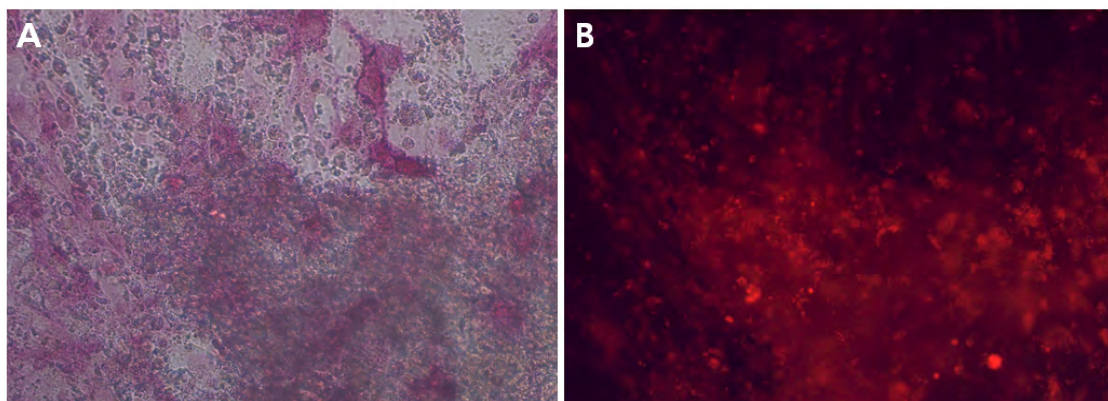


그림 50. KSR-M6B 미디어에서 배양된 소 유도만능줄기세포 콜로니. (A와 B) 생산된 콜로니를 계대 5에서 AP positive인 콜로니는 dsred를 발광하고 있음을 확인함.

마. 비바이러스를 통한 소 유도만능줄기세포 생산 및 장기배양 시도

(1) 비바이러스성 소 유도만능줄기세포 생산 시도 (외래유전자 배제 유도만능줄기세포 생산)

- 앞서 human dermal fibroblast 및 human peripheral blood cell에서 성공적으로 유도만능줄기세포를 확립했다고 보고된 바 있는 Y4 (L-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4) + EBNA-1 combination을 이용해 비바이러스성 소 유도만능줄기세포 생산 시도. 위 백터들은 플라스미드 백터로 100 copy 정도 세포내에서 만들어 계대 초기에 사라지는 백터로 외래 유전자의 integration을 문제를 피할 수 있음. 실험에 앞서 먼저 원하는 백터가 맞는지 확인하기 위해 먼저 제한효소를 이용해 백터의 크기를 확인한 결과 적용하고자하는 백터 크기와 일치하는 것으로 확인됨 (그림 51).

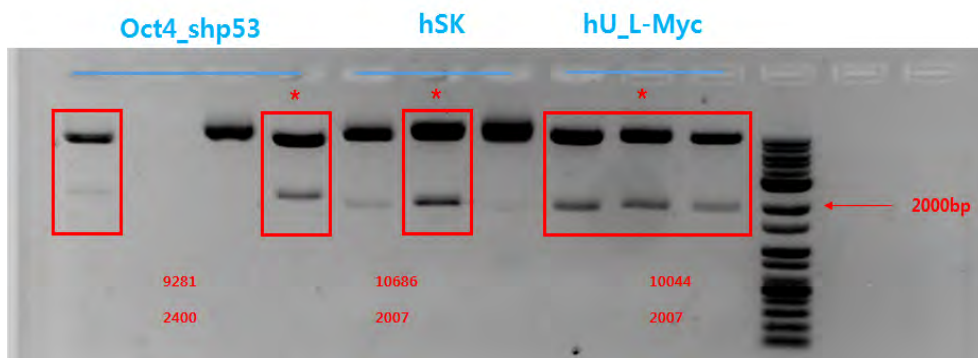


그림 51. 제한효소를 이용해 Y4 (L-myc/Lin28, Oct4/shp53, Sox2/Klf4) 플라스미드 백터의 크기를 확인. 각각 3개의 샘플을 처리해 가장 진하게 잘나온 샘플(\*표시)을 이용해 원하는 플라스미드 DNA를 추출함.

(2) 전기 청공법을 통해 유전자를 삽입

- Primary cell을 대상으로 진행하는 고효율 setting test 통해 가장 적합한 pulse voltage, width, 자극 횟수를 최적화함. EGFP 플라스미드 갖고 실험한 결과 1150 pulse voltage, 20 width, 2회 자극 한결과 약 80% 이상의 세포가 EGFP 발현을 보이는 것으로 확인됨 (그림 52)

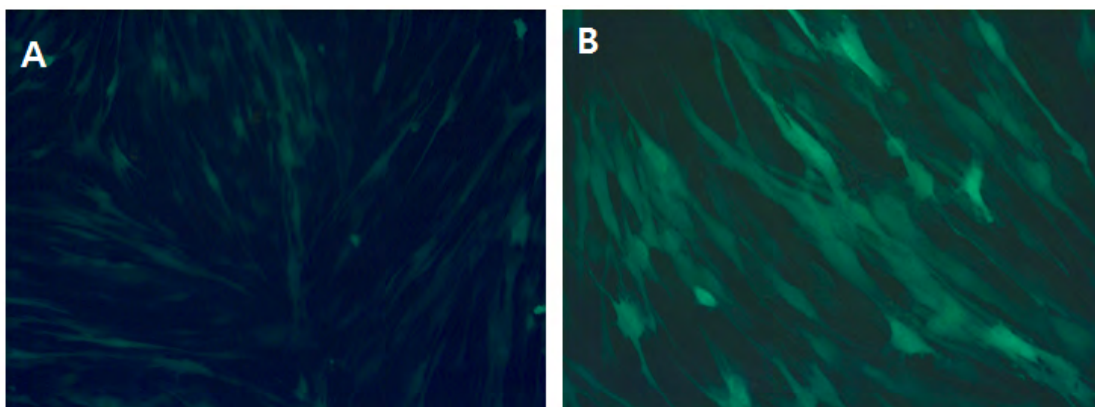


그림 52. EGFP 발현하는 소 primary fetal fibroblast cell (pBFF). (A) transfection 48시간 후 pBFF 모습. (B) EGFP를 발현하는 pBFF의 고배율의 모습 (200배).

(가) 전기 청공법을 통한 유전자 삽입 최적화

- 사람과 마우스 세포를 대상으로 현재까지 다양한 방법으로 외부 유전자를 세포 내로 삽입 시켜 왔으나 소 유래 세포에서는 많은 실험이 진행되지 않은 실정임. 또한 유도만능줄기세포 확립에 있어 일반적으로 그 효율이 낮아 유전자 삽입 효율을 높이는 것은 매우 중요하게 생각됨. 최근 다양한 유전자 삽입 방법이 개발 되어 본 연구에서는 다양한 방법을 통해 소 섬유유아세포에 유전자 삽입 효율 및 생존율을 확인해 최적의 방법을 찾고자함. 또한 3차년도 과정에 있는 비바이러스성 유도만능줄기세포 생산의 예비실험 및 그 가능성을 확인하고자 본 연구를 실시함.
- 먼저 기존에 사람과 마우스에서 잘 알려져 있는 Fugene HD과 X-tremeGENE 9 제품을 통한 효율을 기준으로 사용하고자함. 예비 실험 및 최적화된 조건을 잡기위해 사람의 치수 유래 세포를 통해 Fugene HD과 X-tremeGENE 9 조건을 확립 하고 그림 53에서 보이는 것처럼 DNA와 transfection reagent 비율이 2:6 조건에서 X-tremeGENE 9이 최적화된 transfection과 viability 효율을 보임을 확인함.

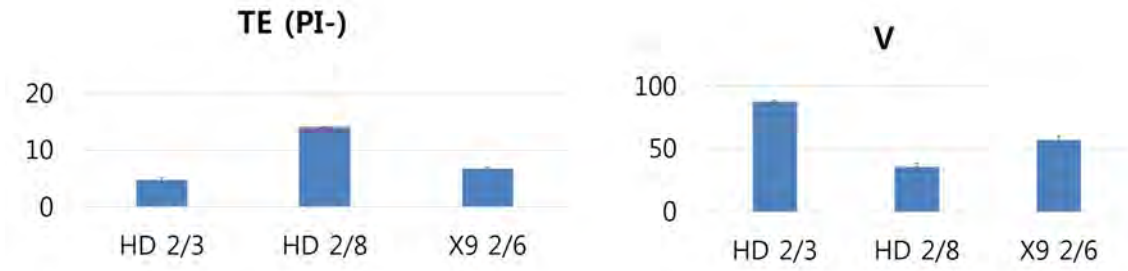


그림 53. The optimization of transfection condition by Fugene HD and X-treamGENE in human dental pulp cells. The ratio of DNA and transfection reagent is indicated. TE : Transfection efficiency, V : viability, PI : propidium iodide.

- 먼저 NEPA사에서 출시된 electroporator를 이용해 Transfection과 viability 효율을 확인함. 본 연구에서 사용된 NEPA사의 electroporator는 유도만능줄기세포를 처음 고안한 Yamanaka 그룹에서 사용하는 제품으로 많은 연구자들이 사용하고 있는 제품으로 먼저 사람 치수 유래 세포를 통해 시험함. 결과적으로 컨트롤 조건인 X-tremeGENE 9 조건에 비해 transfection 효율이 좋은 것은 5번 조건이었으나 transfection과 viability 효율을 고려했을 때 9번 조건이 가장 이상적인 것으로 판단됨 (그림 54)

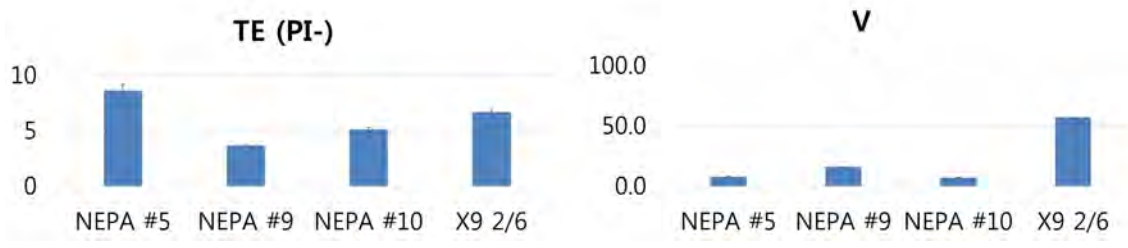


그림 54. The comparison of various NEPA electroporator condition in human dental pulp cells. TE : Transfection efficiency, V : viability, PI : propidium iodide.



- NEPA사의 electroporator를 통해 소 유래 섬유아세포에서 역시 transfection과 viability 효율 확인 했고 그 결과 8번 조건에서 transfection 효율이 높게 나왔으나 transfection과 viability 효율을 고려했을 때 11번 조건이 가장 이상적인 것으로 판단됨(그림 55)

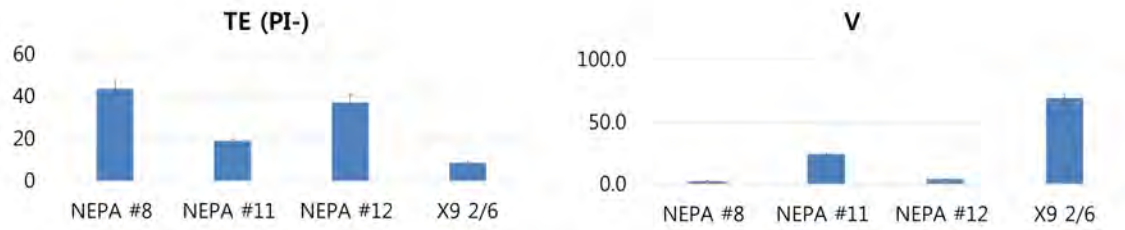


그림 55. The comparison of various NEPA electroporator condition in bovine fetal fibroblast. TE : Transfection efficiency, V : viability, PI : propidium iodide.

- 다음으로 Neon사에서 개발한 electroporator를 통해 같은 실험을 반복함. 실험은 사람의 치수 조직 세포와 소 태아 섬유아세포에서 진행됨. 앞서 실험한 NEPA사의 electroporator 제품과 다르게 높은 transfection과 viability 효율을 보이는 조건 확립함. 이러한 조건은 사람 유래 치수 세포뿐만 아니라 소 태아 섬유아세포에서도 가능성을 확인했고 이러한 것은 소 유래 비바이러스성 유도만능줄기세포 생산에 커다란 도움을 줄 것으로 판단됨 (그림 56)

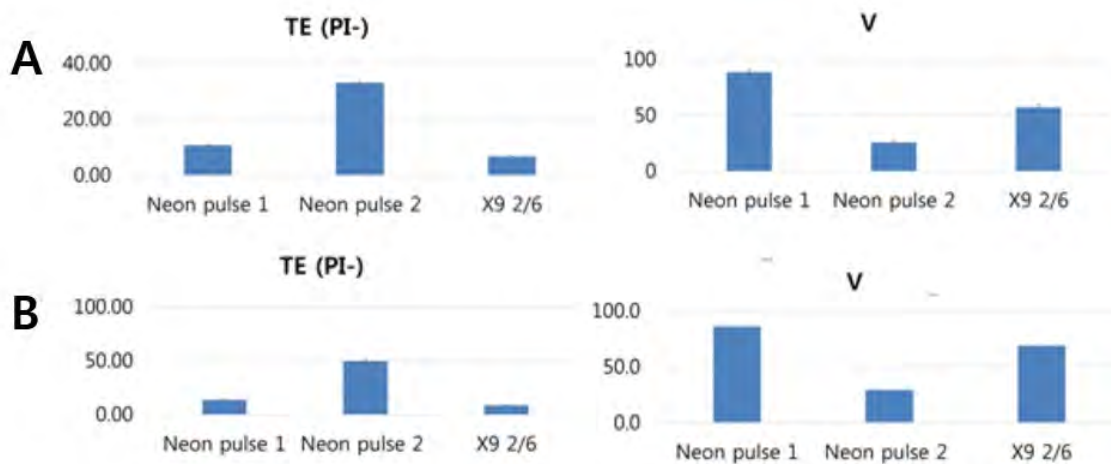


그림 56. The comparison of various Neon electroporator condition in human dental pulp cells (A) and bovine fetal fibroblast (B). TE : Transfection efficiency, V : viability, PI : propidium iodide.

- 다양한 방법으로 유전자 삽입을 실험 한 결과 transfection과 viability 효율에 많은 차이가 확인 되었고 그러한 차이는 아래 표 27에 정리함. 이러한 결과는 Neon사의 electroporator 제품이 소 태아 유래 섬유아세포에 유전자를 삽입 시 가장 최적화된 방법인 것으로 생각되며 나아가 비바이러스성 유도만능줄기세포 생산 시에 중요하게 사용될 것으로 판단됨.

표 27. Transfection efficiency and viability of four different transfection methods.

	Fugene HD	X-tremeGENE 9	NEPATM	NeonTM
Transfection efficiency (%)	4.2	8.5	19.0	49.5
Viability (%)	67.3	68.9	24.2	29.4

(나) 비바이러스성 기법을 통한 세포 리프로그래밍 유도 및 장기 배양 시도

표 28. 전기천공법으로 유전자를 삽입 후 세포 리프로그래밍 동안 다양한 배양액의 비교

		P1	P2	P3	P4	P5
N2B27 을 포함하는 기본 배양액	NB-M1					
	NB-M2					
	NB-M3					
	NB-M4					
	NB-M5					
	NB-M6					
KSR 을 포함하는 기본 배양액	KSR-M1					
	KSR-M2					
	KSR-M3					
	KSR-M4					
	KSR-M5					
	KSR-M6					
	KSR-M6J					
	KSR-M6JP					
	KSR-M6JPA					
	KSR-M6A					
	KSR-M6B					
	KSR-M6AB					

- 앞서 바이러스를 통해서 고안된 다양한 미디어를 통해 비바이러스성 소 유도만능줄기세포 생산 시도함. 대부분의 경향이 앞선 실험과 일치함 (표 28). 그러나 전체적으로 계대 5를 넘지 못했으며 특히 N2B27 기본미디어에서 자란 세포들은 대부분 증식하지 못하고 죽는 현상을 보임. 이러한 내용은 전기 천공법을 이용해 세포에 강한 자극을 준 것이 세포에 나쁜 영향을 주었으며 N2B27 기본 미디어가 이러한 데미지를 회복시켜주지 못하는 것으로 생각됨. KSR 기본 미디어의 경우 앞선 결과와 유사하게 KSR-M6B와 -M6AB에서 유사 콜로니가 오래 유지 되는 것을 확인함 (그림 57)

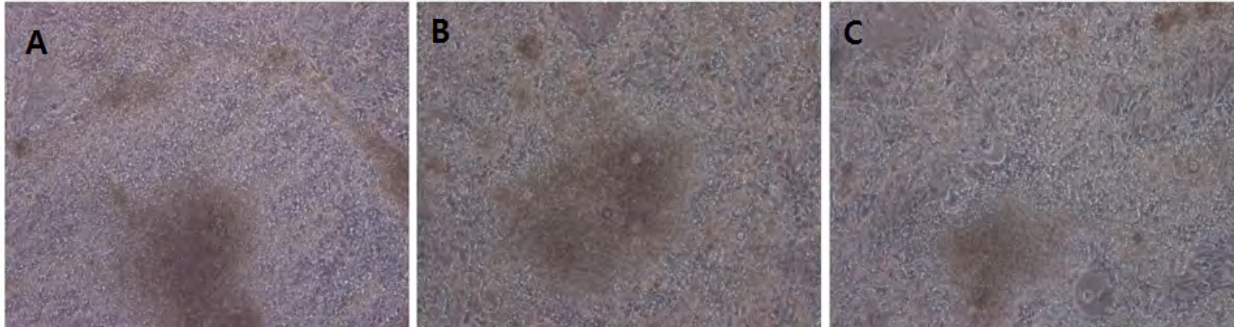


그림 57. 비바이러스성 소 유도만능줄기세포 생산. 계대 2의 콜로니 모습. (A) KSR-M6B, (B) KSR-M6AB, (C) KSR-M6.

#### 바. 전능성 유전자의 변화

- 생산된 초기 유도만능줄기세포가 다양한 배양조건에도 불고하고 장기배양이 어려운 문제가 있음. 이러한 문제의 원인을 밝히기 위해 먼저 대표적인 전능성 유전자인 OCT4와 NANOG의 변화를 확인함. 다양한 배양액 중 비교적 초기 계대가 잘 유지된 KSR-M6과 KSR-M6B를 비교함 (그림 58, 59). 두 가지 미디어를 통해 Oct4를 분석한 결과 exogenous Oct4의 발현이 P2부터 빠르게 감소하는 것을 확인함. Endogenous Oct의 경우 P1부터 조금씩 증가하는 것으로 보이나 유지되지 않고 서서히 감소하는 것으로 확인됨. Nanog 유전자의 경우 exogenous Nanog의 경우 계대를 넘기면 P0에 비해 유전자의 발현이 빠르게 감소하는 것이 확인됨. Endogenous Nanog의 경우 Oct4에 비해 발현 정도가 많지 않은 것으로 보이며 계대를 넘기며 감소하는 것으로 확인됨. 이러한 결과는 생산된 초기 유도만능줄기세포가 외부에서 유입된 전능성 유전자의 발현을 통해 유도만능줄기세포가 유도 되었으나 계대를 넘기며 전능성을 유지 하지 못하고 관련 유전자가 감소하는 것으로 생각됨.

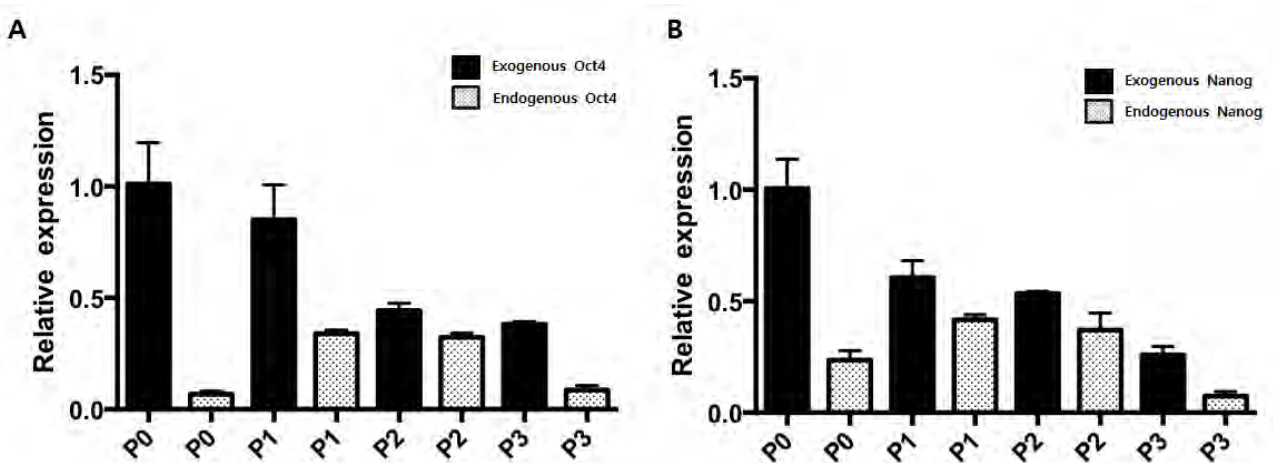


그림 58. KSR-M6 에서 exogeneous 와 endogenous한 전능성 유전자의 변화. (A) Oct4 유전자의 변화. (B) Nanog 유전자의 변화.

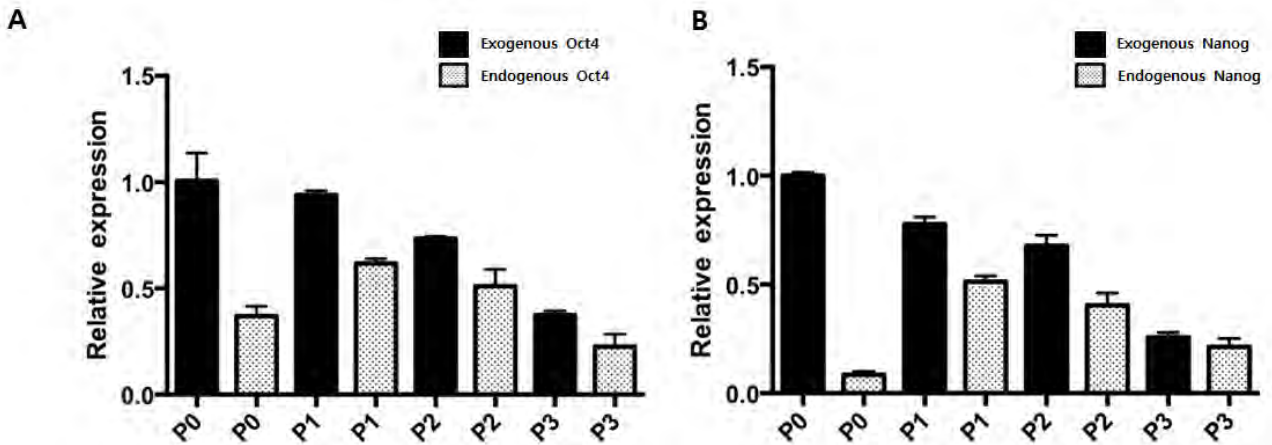


그림 59. KSR-M6B 에서 exogeneous 와 endogenous한 전능성 유전자의 변화. (A) Oct4 유전자의 변화. (B) Nanog 유전자의 변화.

- 앞선 결과에서 보면 KSR-M6B 미디어이 KSR-M6 미디어 보다 콜로니 형성에 조금 더 유리한 결과를 보였는데 유전자 변화 측면에서 보면 exogenous 와 endogenous 한 전능성 유전자들이 상대적으로 적게 감소하기 때문인 것으로 생각됨 (그림 58, 59). 또한 소 전능성 유지에 Nanog 유전자가 중요하게 알려져 있는데 본 연구 결과에서 Oct4에 비해 Nanog (특히 endogenous Nanog)의 증가량이 KSR-M6B 높아 소 유도만능줄기세포 생산에 조금 더 유리할 것으로 생각됨.

#### 사. 특정계통으로의 분화관련 경로 파악을 통한 체세포 및 성체줄기세포의 교차분화 시도

##### (1) 지방유래의 줄기세포를 이용한 타액선세포로 교차분화

- 지방유래의 줄기세포는 수컷 마우스의 복부지방으로부터 분리 배양하였음. 과거에 신경, 지방, 골, 연골 등으로 분화 검증된 자원으로서 타액선 기능 이상의 문제를 해결하기 위한 목적으로 지방유래의 줄기세포의 이용가능성을 제시함.

##### (2) 마우스 지방에서 줄기세포 분리 및 배양

- 수컷 마우스 복부지방으로부터 줄기세포의 분리 배양 실시. 수컷 마우스 정소 위쪽에 존재하는 지방을 분리하고 collagenase I을 이용하여 단일세포로 분리하여 배양. (그림 66)

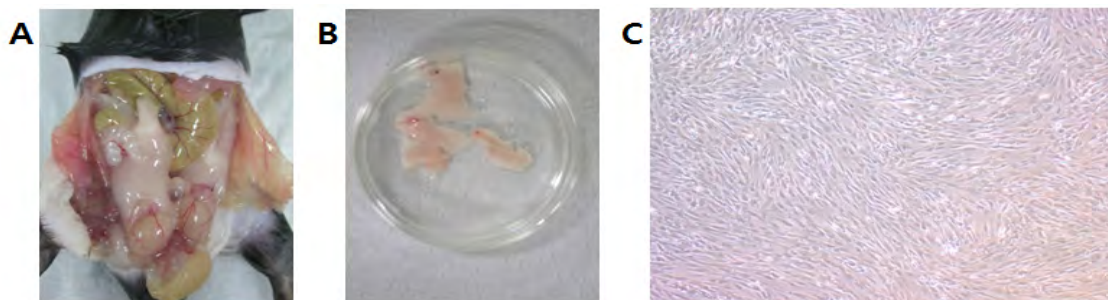


그림 66. 지방유래의 줄기세포를 분리 및 배양. (A, B) 복부지방을 분리. (C) 지방줄기세포 배양액에서 계대를 진행(C; passage 2).

(3) 지방유래 줄기세포의 정상 및 분화능 검증.

- 분리 배양된 지방유래 세포가 중배엽성 줄기세포의 마커를 발현하는지 mRNA 수준에서 확인을 진행하였음. 줄기세포로서 기능을 하는지 지방세포, 골세포와 신경세포로의 분화의 유도를 통해 다분화능을 검증하였음. 각각의 분화 유도 배양액을 이용하여 분화를 실시하고 지방세포는 Oil Red-O, 골세포는 Alizarin Red, 신경세포는 신경세포 마커인 Nestin의 면역염색을 통한 분화를 검증. (그림 67)

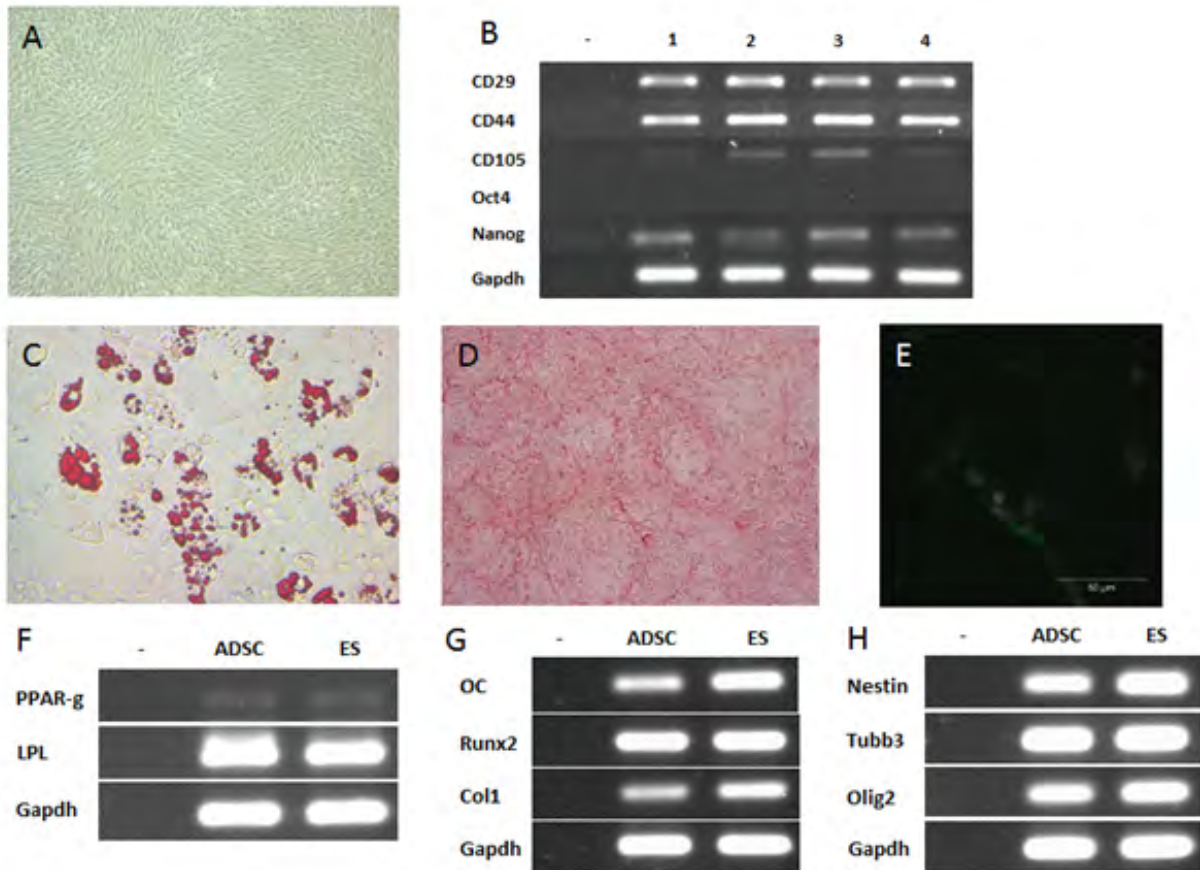


그림 67. 지방유래의 줄기세포의 정상분석. (A) Passage 2의 지방유래 줄기세포 (B) 각각 다른 4마리의 마우스로부터 얻은 지방유래의 줄기세포의 마커확인 (CD29, CD44, CD105) 및 전능성 마커확인 (Oct4, Nanog). (C) 지방유래 줄기세포에서 분화된 지방세포의 Oil Red-O 염색. (D) 지방유래 줄기세포에서 분화된 골세포의 Arizarin Red 염색. (E) 지방유래 줄기세포에서 분화된 신경세포의 마커인 Nestin의 면역염색. (F) 분화된 지방세포의 마커 확인 (PPAR-g, LPL). (G) 분화된 골세포의 마커 확인 (OC, Runx2, Col1). (H) 분화된 신경세포의 마커 확인 (Nestin, Tubb3, Olig2).

(4) 교차분화가 될 타액선세포의 정상분석

- 지방유래의 줄기세포를 이용하여 타액선으로 교차분화를 진행하기 전에 타액선 세포를 마우스에서 분리 배양을 실시하여 타액선세포의 성상을 확인. 마우스의 타액선 중에 턱밑샘을 분리하여 배양을 진행하였음. 배양되는 조직이 배양디쉬에 붙어 퍼져 나가는 현상이 관찰됨. 계대이후에 epithelium같이 둥근모양의 세포가 배양되는 것을 확인하였음. 타액선의 구성 세포중 대표적인 ductal과 acinar cell의 mRNA와 단백질 수준에서 확인 (그림 68).

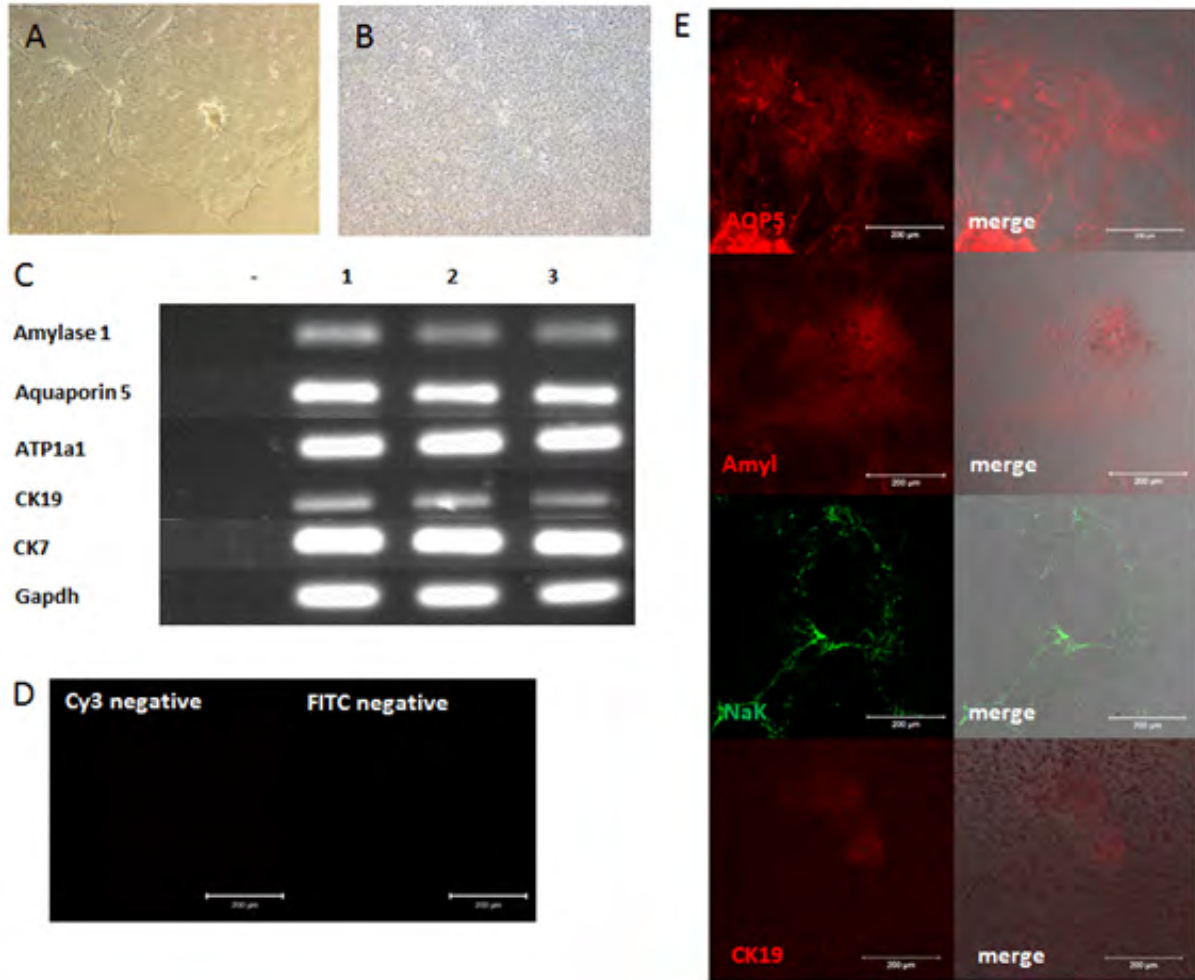


그림 68. 타액선 세포의 정상분석. (A) primary culture된 타액선 세포. (B) 계대 후 배양된 타액선 세포의 형태학적 모양. (C) 타액선 세포의 mRNA 발현 확인 (acinar cell marker : Amylase1, Aquaporin5, ductal cell marker : ATP1a1, CK19, CK7). (D) 면역염색의 negative control. (E) 단백질 수준에서 acinar cell marker (Amylase1, Aquaporin5)와 ductal cell marker (NaK; ATP1a1, CK19)를 면역염색을 통해서 확인.

(5) 지방유래 줄기세포와 타액선 세포의 co-culture를 통한 교차분화.

- 지방유래의 줄기세포를 이용하여 타액선으로 교차분화를 진행하기 위해서 co-culture를 진행하였음. 현재까지 타액선세포로 분화를 직접적으로 실시한 자료가 없으므로, 두가지 세포를 co-culture를 통해 분화 가능성을 확인하였음 (그림 69). 지방유래의 줄기세포를 3주 동안 분화를 실시하여 3주 후, 타액선세포에서 확인되는 acinar cell과 ductal cell의 마커를 mRNA와 단백질 수준에서 확인을 진행하였음. 그 결과 mRNA 수준에서는 3, 4번 그룹에서 각각의 마커(Aquaporin5는 제외)들이 증가되는 현상이 확인되고 단백질 수준에서는 mRNA와 달리 Aquaporin5와 Amylase 발현이 면역염색으로 확인하고 ductal cell marker인 CK19는 4번 그룹, NaK는 전 그룹에서 발현이 확인됨 (그림 70)

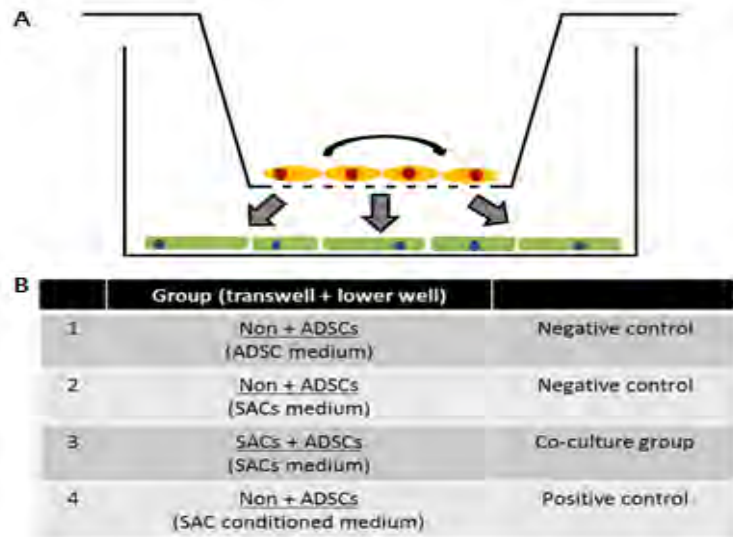


그림 69. 교차분화 모식도. (A) Transwell을 이용하여 위쪽은  $8 \times 10^4$  cell의 타액선 세포를 키우고, 아래쪽은  $2 \times 10^4$  cell의 지방유래의 줄기세포를 배양을 진행. (B) 각각의 실험군 표기.

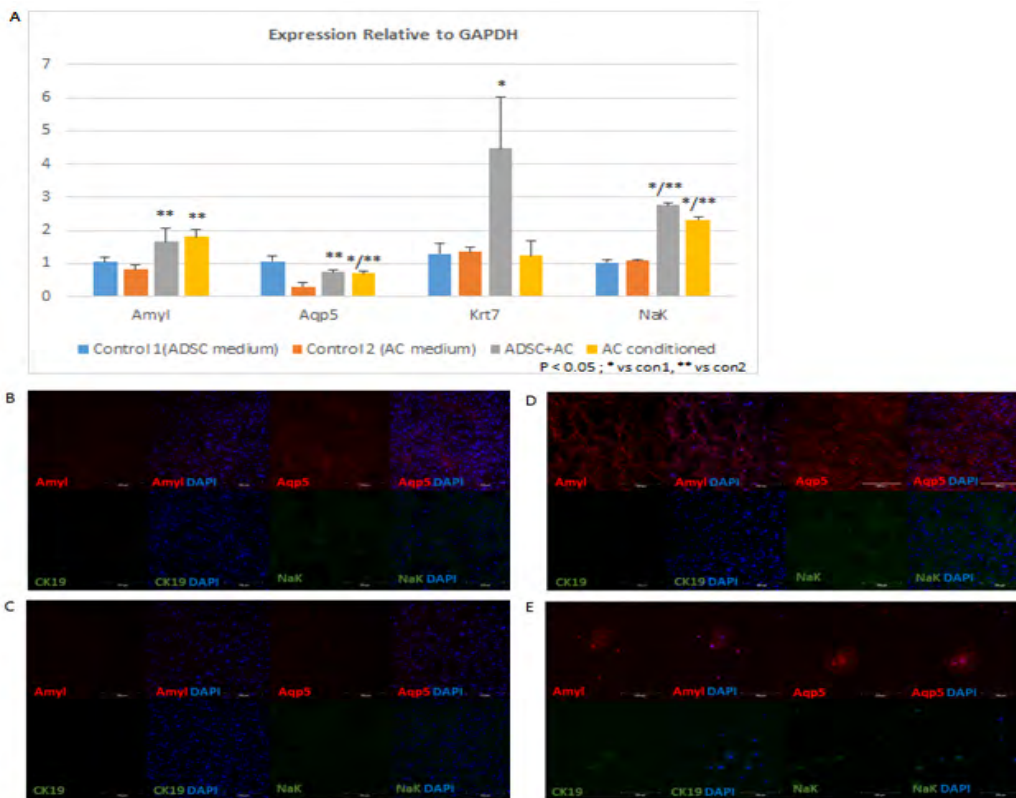


그림 70. 지방유래 줄기세포를 3주 동안 Co-culture하여 교차분화후 확인. (A) acinar cell(Amyl, Aqp5)과 ductal cell(NaK, Krt7)의 marker를 Realtime-PCR로 mRNA 수준을 확인. (B) Negative control로써, 지방유래 줄기세포 배양액에서 분화된 세포 그룹의 단백질발현 확인. (C) Negative control로써, 타액선 세포 배양액에서 분화된 세포 그룹의 단백질발현 확인. (D) co-culture된 그룹으로써, 타액선 세포와 3주 동안 배양한 뒤 얻은 분화된 지방유래 줄기세포의 단백질 발현 확인. (E) Positive control로써, 타액선 세포를 3일 동안 배양한 뒤 얻은 배양액과 타액선 세포 배양액을 1:1로 섞은 conditioned 배양액에서 분화된 세포 그룹의 단백질발현 확인.

아. 물리적인 인자를 통한 분화 유도

- 줄기세포 연구 중 다양한 인자가 주기세포 운명에 영향을 준다는 알게 되었고 소분자물질과 같은 인자 외에 물리적인 인자를 통한 줄기세포 운명을 조절할 수 있는 연구를 추가적으로 진행함. 특히 분화를 유도하는 화학인자 없이 세포가 부착되어 얻는 물리적인 변화를 통한 연구는 줄기세포 치료 분야에 있어 안전성관련 기술증진에 큰 영향을 줄 것으로 생각됨.

(1) 250-nm nanoscale pattern이 사람 치수 유래 줄기세포 형태에 미치는 영향

(가) 사람 치수 유래 줄기세포 분리 및 분화능 검증

- 검증된 치수 유래 줄기세포의 분화능을 확인하기 위해 체외배양 후 지방세포와 뼈세포로 21일간 분화유도 후 각각 Oil red O와 alizarin red 염색을 통해 분화된 세포 확인 (그림 71).

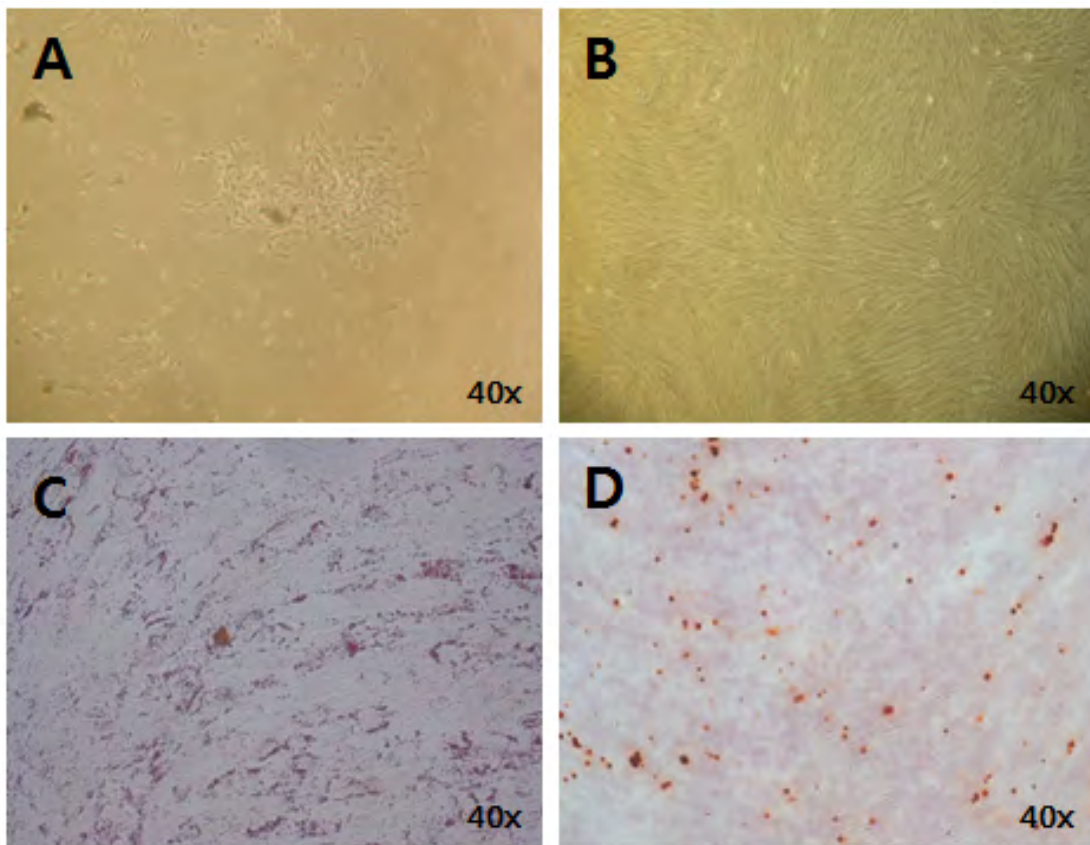


그림 71. 검증된 치수 유래 줄기세포의 분화능 확인. (A) 초기 치수 유래 줄기세포. (B) Passage 3 치수 유래 줄기세포. (C) 치수 유래 줄기세포로부터 지방세포로 분화 후 Oil red O 염색한 결과. (D) 치수 유래 줄기세포로부터 뼈세포로 분화 후 Alizarin red 염색한 결과.

- 생산된 250-nm 패턴을 24 well 배양 접시에 부착시키고 4-5계대를 넘긴 사람 치수 유래 줄기세포를 부착시킴. 부착 24 시간 후 패턴이 있는 그룹과 패턴이 없는 그룹을 비교했을 때 패턴이 있는 그룹의 세포는 패턴이 없는 그룹에 비해 세포가 직선으로 배열되었고 좀 더 길쭉한 형태를 보임. 이는 패턴이 세포의 형태에 영향을 줄 수 있음을 보여줌 (그림 72)



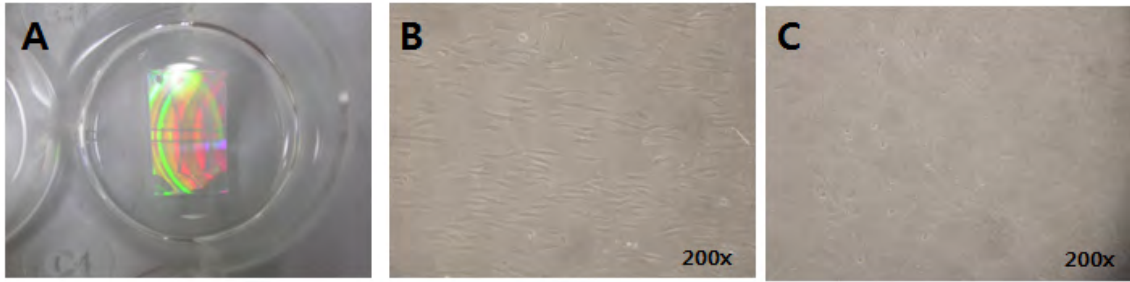


그림 72. 250-nm nanoscale pattern이 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 형태적 변화. (A) 24 well 위에 부착된 nanoscale pattern. (B) Nanoscale pattern 위의 치수 유래 줄기세포.(C) 일반 배양 접시위의 치수 유래 줄기세포.

(나) 사람 치수 유래 줄기세포가 지방세포로 분화하는 동안 250-nm 패턴의 영향

- 사람 치수 유래 줄기세포를 패턴 혹은 패턴이 없는 배양 접시에서 배양 후 지방세포로 분화를 유도해 패턴이 지방세포 분화에 미치는 영향을 확인함. 14일 동안 분화 후 Oil red O 염색 결과 패턴이 없는 conventional group에 비해 pattern group에서 염색된 세포가 조금 더 많은 것으로 확인됨 (그림 73). 이러한 것은 250-nm nanoscale pattern이 지방세포 분화를 강화 하는 것으로 생각됨.

Adipogenic differentiation media

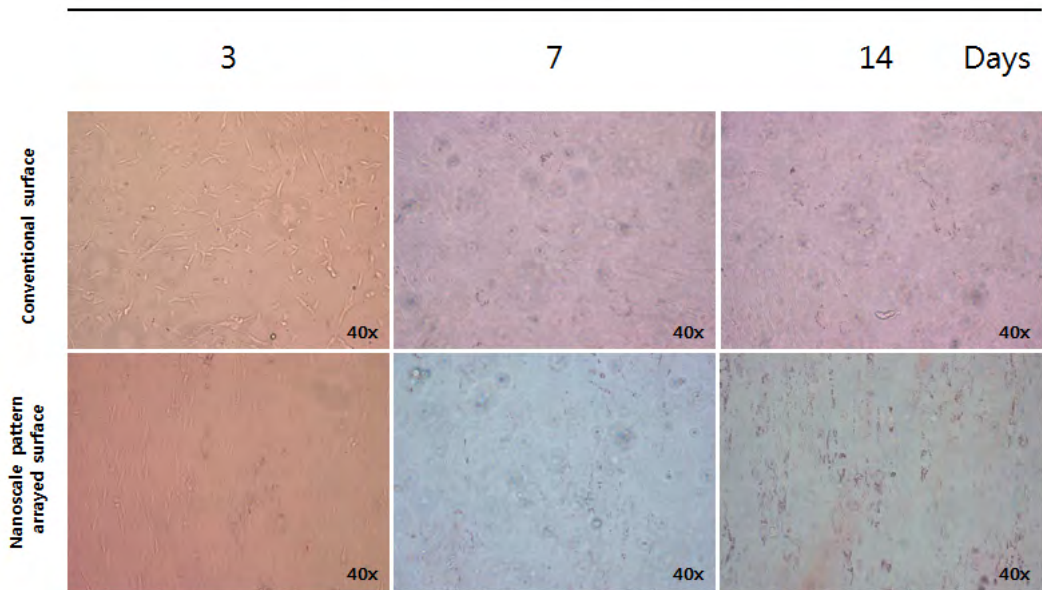


그림 73. 250-nm nanoscale pattern 이 지방세포 분화 동안 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 영향. 치수 유래 줄기세포를 pattern 또는 conventional 표면에 부착 시킨 후 지방세포로 분화를 유도함. 3, 7, 14일에 Oil red O 염색을 통해 지방 분화 정도를 확인함.

① 지방세포 분화 관련 유전자 분석 결과

- RT-PCR을 이용한 지방세포 분화관련 유전자 PPAR-r 분석결과 14일 동안 conventional group과 pattern group 간의 유전자 차이는 크지 않는 것으로 확인됨 (그림 74)

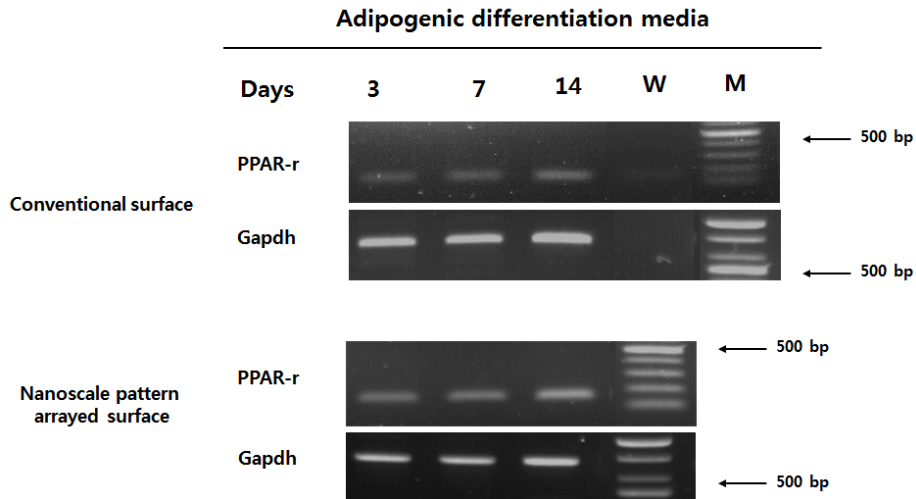


그림 74. 지방세포 분화동안 Nanoscale pattern이 치수 줄기세포의 지방세포 분화관련 유전자에 미치는 영향. 화학적 지방세포 분화 유도 동안 pattern 과 conventional group에서 지방세포 분화관련 유전자인 PPAR-r의 변화를 3, 7, 14일에 확인함. W: water, negative control. M: 1kb size 마커.

(다) 사람 치수 유래 줄기세포가 뼈세포로 분화하는 동안 250-nm 패턴의 영향

- 사람 치수 유래 줄기세포를 패턴 혹은 패턴이 없는 배양 접시에서 배양 후 뼈세포로 분화를 유도해 패턴이 뼈세포 분화에 미치는 영향을 확인함. 14일 동안 분화 후 Alizarin red 염색 결과 pattern group과 conventional group간의 염색된 세포 수의 차이가 거의 없음이 확인됨 (그림 75). 이러한 것은 250-nm nanoscale pattern이 뼈세포 분화동안 영향이 거의 없는 것으로 생각됨.

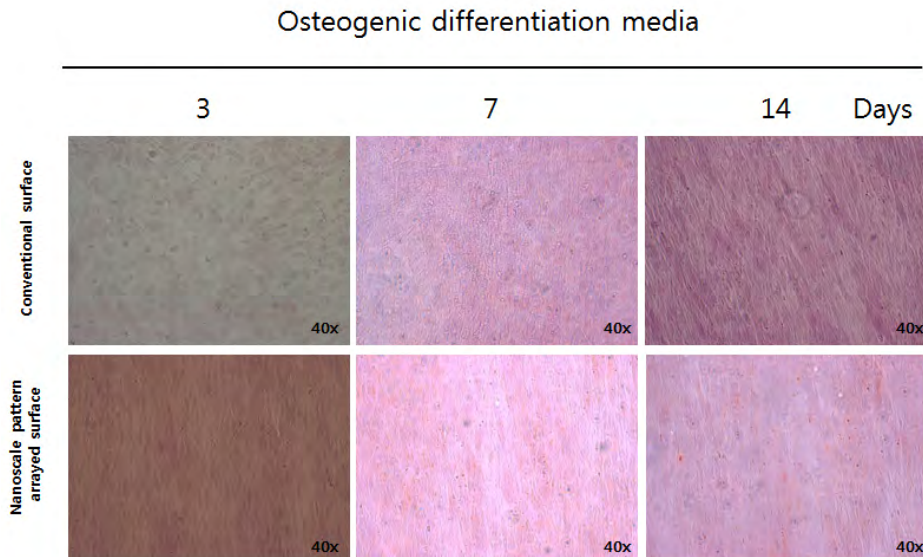


그림 75. 250-nm nanoscale pattern 이 뼈세포 분화 동안 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 영향. 치수 유래 줄기세포를 pattern 또는 conventional 표면에 부착 시킨 후 뼈세포로 분화를 유도함. 3, 7, 14일에 세포를 Alizarin red 염색을 통해 뼈세포 분화 정도를 확인함.

① 뼈세포 분화 관련 유전자 분석 결과

- 지방세포 분화 관련 유전자 Runx-2와 osteocalcin 분석결과 14일 동안 conventional group에 비해 pattern group에서 유전자 발현이 더 늦게 발현함을 확인함 (그림 76). 이러한 것은 250-nm nanoscale pattern이 뼈분화 동안 분화를 억제 또는 분화속도를 느리게 하는 영향 주는 것으로 생각됨.

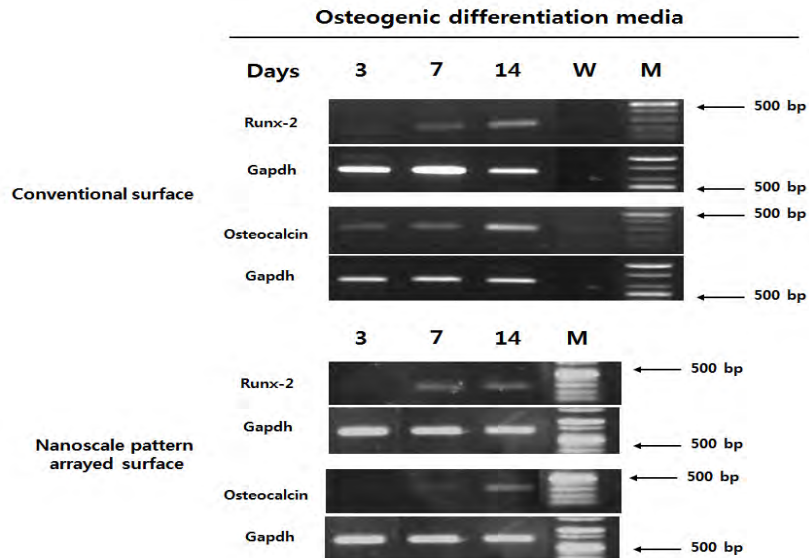


그림 76. 뼈세포 분화동안 Nanoscale pattern이 치수 줄기세포의 지방세포 분화관련 유전자에 미치는 영향. 화학적 뼈세포 분화유도 동안 pattern 과 conventional group에서 뼈세포 관련 유전자인 Runx-2와 Osteocalcin의 변화를 3, 7, 14일에 확인함. W: water, negative control. M: 1kb size 마커.

(2) 350-nm nanoscale pattern 이 지방 및 뼈세포 분화에 미치는 영향

(가) 350-nm nanoscale pattern 이 사람 치수 유래 줄기세포 형태에 미치는 영향

- 검증된 치수 유래 줄기세포를 350-nm nanoscale pattern 에 올려 배양하고 형태적인 변화를 확인함 (그림 77). 치수 유래 줄기세포 부착 24시간 후 pattern group의 세포가 conventional group의 세포보다 형태적으로 선형 형태로 나열되고 길쭉한 형태를 보임. 이러한 것은 250-nm nanoscale pattern과 유사하고 350-nm nanoscale pattern 역시 세포의 형태 및 배열에 영향을 주는 것이 확인됨.

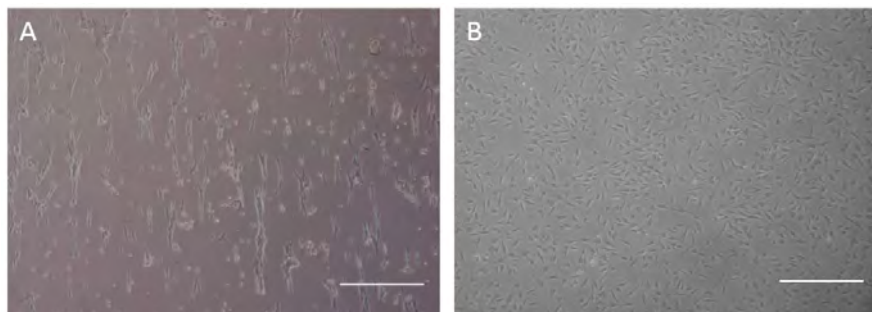


그림 77. 350-nm nanoscale pattern이 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 형태적 변화. (A) Nanoscale pattern 위의 치수 유래 줄기세포. (B) 배양접시 위의 치수줄기세포. Scale bar = 500 μm

(나) 사람 치수 유래 줄기세포가 지방세포로 분화하는 동안 350-nm 패턴의 영향

- 사람 치수 유래 줄기세포를 패턴 혹은 패턴이 없는 배양 접시에서 배양 후 지방세포로 분화를 유도해 패턴이 지방세포 분화에 미치는 영향을 확인함. 9일 동안 분화 후 Oil red O 염색 결과 패턴이 없는 conventional group에 비해 pattern group에서 염색된 세포가 더 많은 것으로 확인됨 (그림 78). 게다가 이러한 차이는 3일차부터 크게 나타남이 확인됨. 이러한 결과는 350-nm nanoscale pattern이 지방 세포 분화를 초기부터 강화 하는 것으로 생각됨.

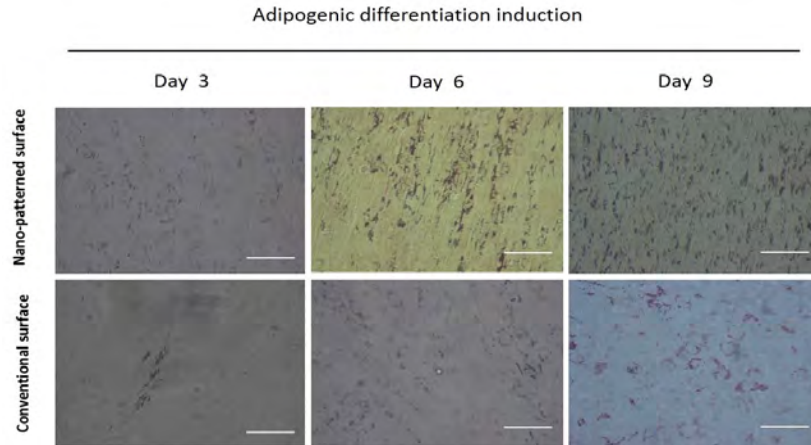


그림 78. 350-nm nanoscale pattern 이 지방세포 분화동안 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 영향. 치수 유래 줄기세포를 pattern 또는 conventional 표면에 부착 시킨 후 지방세포로 분화를 유도함. 3, 6, 9일에 세포를 Oil red O 염색을 통해 지방세포 분화 정도를 확인함. Scale bar = 500  $\mu$ m

(다) 사람 치수 유래 줄기세포가 뼈세포로 분화하는 동안 350-nm 패턴의 영향

- 사람 치수 유래 줄기세포를 패턴 혹은 패턴이 없는 배양접시에서 배양 후 뼈세포로 분화를 유도해 패턴이 뼈세포 분화에 미치는 영향을 확인함. 분화 14일 후 Alizarin red 염색결과 pattern group과 conventional group간의 염색된 세포 수의 차이가 거의 없음이 확인됨 (그림 79). 이는 350-nm nanoscale pattern이 뼈세포 분화동안 영향이 거의 없는 것으로 생각됨.

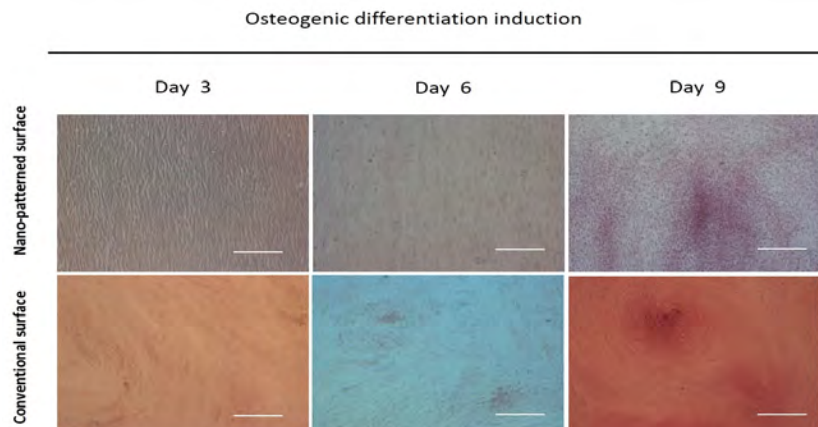


그림 79. 350-nm nanoscale pattern 이 뼈세포 분화 동안 사람 치수 유래 줄기세포에 미치는 영향. 치수 유래 줄기세포를 pattern 또는 conventional 표면에 부착 시킨 후 뼈세포로 분화를 유도함. 3, 6, 9일에 세포를 Alizarin red 염색을 통해 뼈 세포 분화 정도를 확인함. Scale bar = 500  $\mu$ m

(라) Real-time PCR을 통한 분화관련 유전자 분석

- 먼저 화학적 분화유도 동안 350-nm nanoscale pattern이 치수 유래 줄기세포의 유전자 변화에 미치는 영향을 확인하고 최종적으로 화학적 분화유도 없이 단순 치수 유래 줄기세포 증식 배양 동안 pattern이 치수유래 줄기세포의 유전자변화에 미치는 영향을 확인함으로써 pattern의 순수한 영향을 확인하고자 함.
  
- 화학적 분화 유도 동안 pattern이 지방세포 분화에 미치는 영향 (그림 80A)  
화학물질을 이용해 지방세포로 분화하는 동안 pattern group의 세포는 conventional group에 비해 지방세포 관련 유전자인 Lipoprotein lipase (LPL)가 전 구간에 걸쳐 많이 발현하는 것을 확인함. 이러한 것은 350-nm nanoscale pattern이 지방세포 분화유도를 강화한 것으로 보임.
  
- 화학적 분화 유도 동안 pattern이 뼈세포 분화에 미치는 영향 (그림 80B)  
화학 물질을 이용해 지방세포로 분화하는 동안 pattern group의 세포는 conventional group에 비해 뼈세포 관련 유전자인 Runx-2가 전 구간에 걸쳐 적게 발현하는 것을 확인함 특히 분화 3일차에는 분화 전 Runx-2 발현양 보다 적은 것을 확인함. 이러한 결과는 350-nm nanoscale pattern이 화학 물질의 뼈세포 분화를 억제 또는 지연시키는 것으로 보임.
  
- 화학적 분화 유도 없이 pattern이 지방세포 분화에 미치는 영향 (그림 80C)  
화학적 분화 없이 지방세포로 분화하는 동안 pattern group의 세포는 conventional group에 비해 LPL 유전자가 전 구간에 걸쳐 많이 발현하는 것을 확인함. 이러한 결과는 화학적 분화 유도 시 LPL 유전자 변화와 유사함. 이러한 것은 350-nm nanoscale pattern이 화학적 지방 세포 분화 유도 없이도 강하고 빠르게 지방세포를 유도할 수 있음을 확인함.
  
- 화학적 분화 유도 없이 pattern이 뼈세포 분화에 미치는 영향 (그림 80D)  
화학적 분화 없이 뼈세포로 분화하는 동안 pattern group의 세포는 conventional group에 비해 Runx-2 유전자가 전 구간에 걸쳐 적게 발현하는 것을 확인함. 게다가 3일차에 0일차 보다 Runx-2 발현도가 낮은 것을 확인함. 이러한 결과는 화학적 분화 유도 시 Runx-2 유전자 변화와 유사함. 이러한 것은 350-nm nanoscale pattern이 화학적 분화 유도와 관계없이 뼈 세포 분화를 억제하거나 지연시키는 것으로 확인됨.

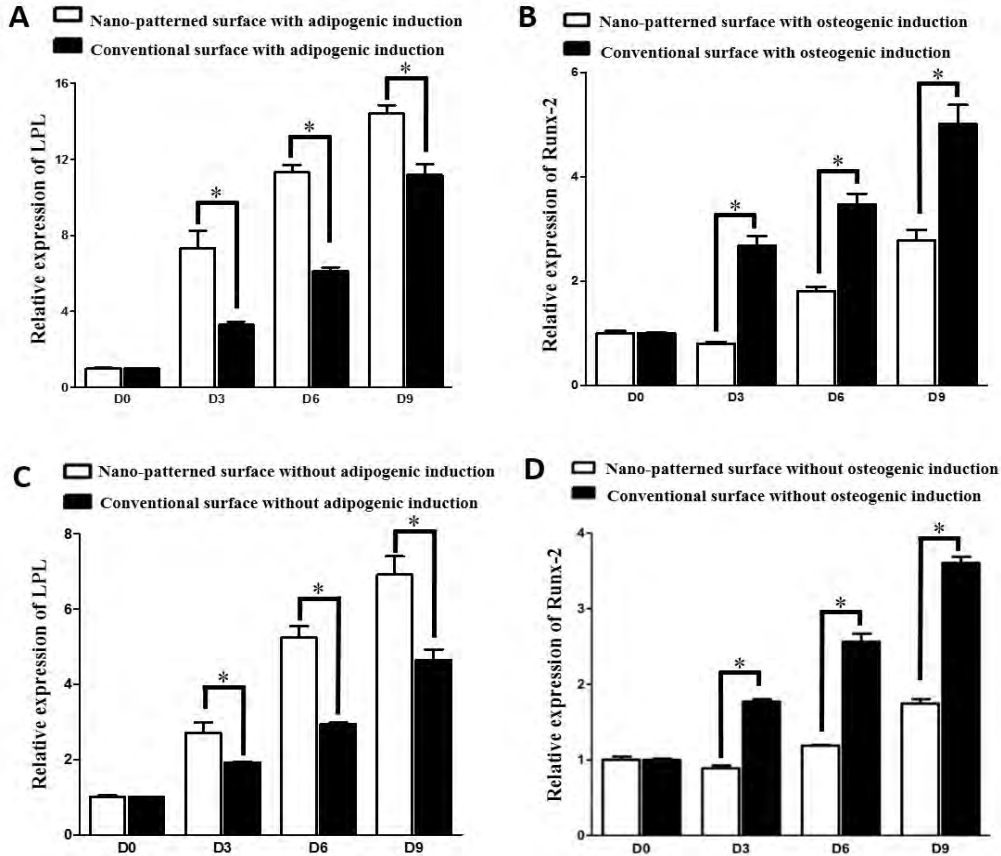


그림 80. 350-nm nanoscale pattern이 치수 유래 줄기세포의 지방 및 뼈세포 분화 유전자 변화에 미치는 영향. (A) 분화 유도 9일 동안 지방세포 관련 유전자 LPL이 전체적으로 pattern group이 conventional group 보다 높게 발현됨. (B) 분화 유도 9일 동안 뼈세포 관련 유전자 Runx-2가 전체적으로 pattern group이 conventional group 보다 낮게 발현됨. (C) 분화 유도 9일 동안 지방세포 관련 유전자 LPL이 전체적으로 pattern group이 conventional group 보다 높게 발현됨. (D) 분화 유도 9일 동안 뼈세포 관련 유전자 Runx-2가 전체적으로 pattern group이 conventional group 보다 낮게 발현됨.

#### 4. 각종 배아줄기세포와의 분자세포생물학 및 유전체학적인 특성 비교분석.

##### 가. 마이크로 어레이 방법을 이용한 전능성 줄기세포 성장 분석

- 마이크로 어레이 방법을 통해 생산된 소 배아 유래 전분화능 줄기세포의 성상을 분석해 소 유도만능줄기세포의 분석 시 대조군으로 활용할 수 있는 자료로 활용할 계획임. 또한 배아 유래 전분화능 줄기세포 성장분석으로 통해 소 고유의 전능성 유지 pathway를 예상할 수 있어 유도만능줄기세포의 배양조건 확립에도 도움을 줄 것으로 생각됨.

##### (1) 소 유래 배아줄기세포의 전체적인 유전자 발현 패턴

- 소 유래 배아줄기세포의 전체적인 유전자 발현 패턴을 확인하기 위해 각 그룹별로 2개의 샘플을 통해 분석을 실시함. 그 결과 그림 78a 와 같이 줄기세포 간에는 유전자 변화가 크게 없지만 체세포와 비교 시 많은 유전자의 차이가 나는 것을 확인함. 또한 scatter plot 분석 결과 역시 각각의 줄기세포가 체세포와 매우 다름을 보여줌 (그림 81b)

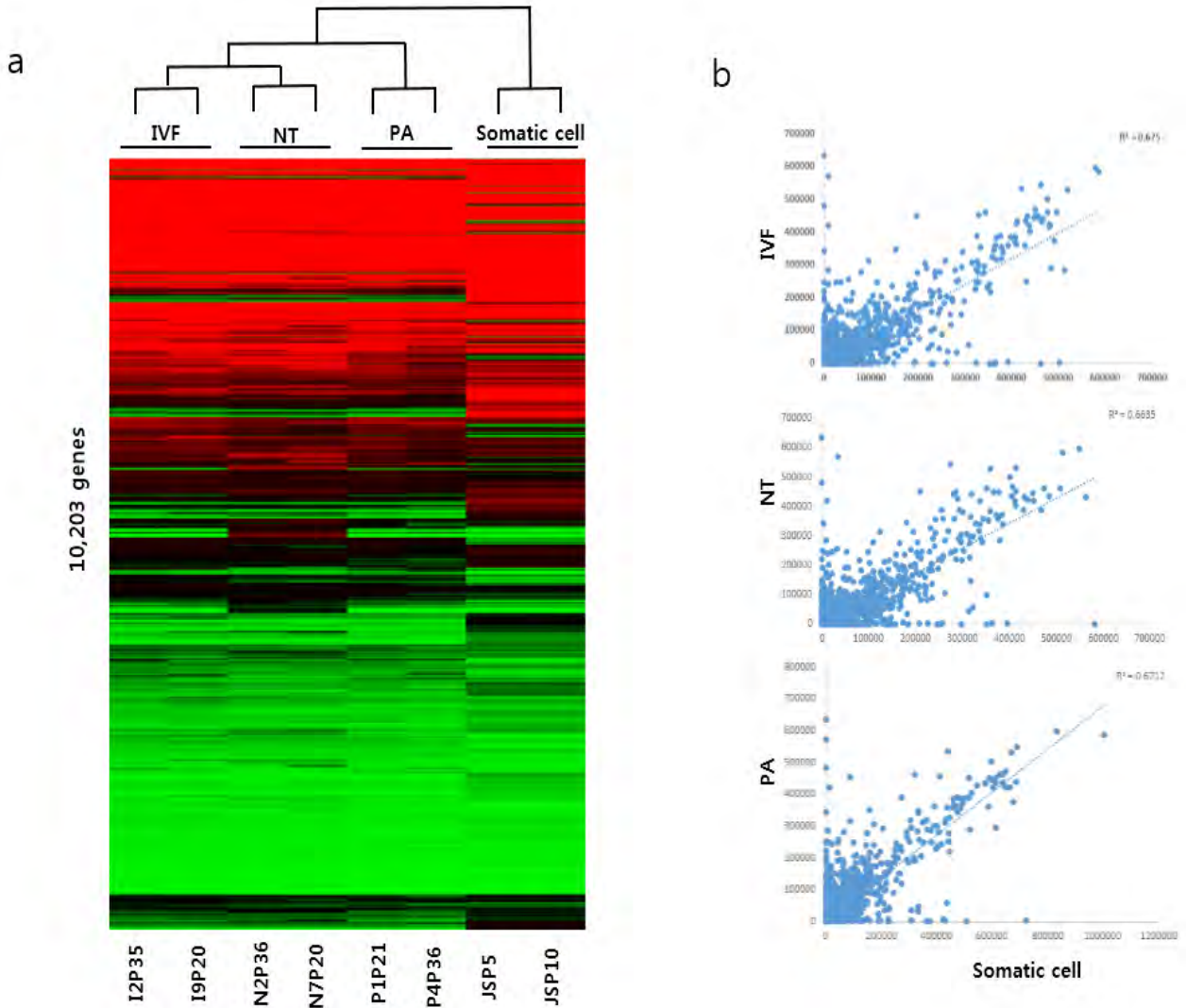


그림 81. 소 유래 배아줄기세포의 전체적인 유전자 발현 패턴. (a) 전체 유전자의 hierarchical clustering pattern. (b) 다양한 배아 줄기세포와 체세포간의 scatter plot 분석 결과.

#### (가) 전능성 관련 유전자 변화

- 확립된 배아줄기세포와 분화된 체세포간의 차이를 명확히 하기 위해 체내란과 유사한 체외 수정란을 통해 확립한 배아줄기세포를 체세포와 비교함. 전체적으로 3,414개의 유전자가 유의적으로 변화했고 이중 1,552 개는 배아줄기세포에서 증가하고 1,862개는 체세포에서 증가함을 확인함 (그림 82a). 배아줄기세포에서 특이적으로 증가한 유전자들을 DAVID data base 를 통해 분석한 결과 대부분 세포의 신진대사 및 cell cycle에 관련된 것으로 확인되었고 이러한 것은 생산된 배아줄기세포의 성상이 앞서 보고된 사람이나 마우스의 줄기세포와 매우 유사함을 보여줌 (그림 82b)

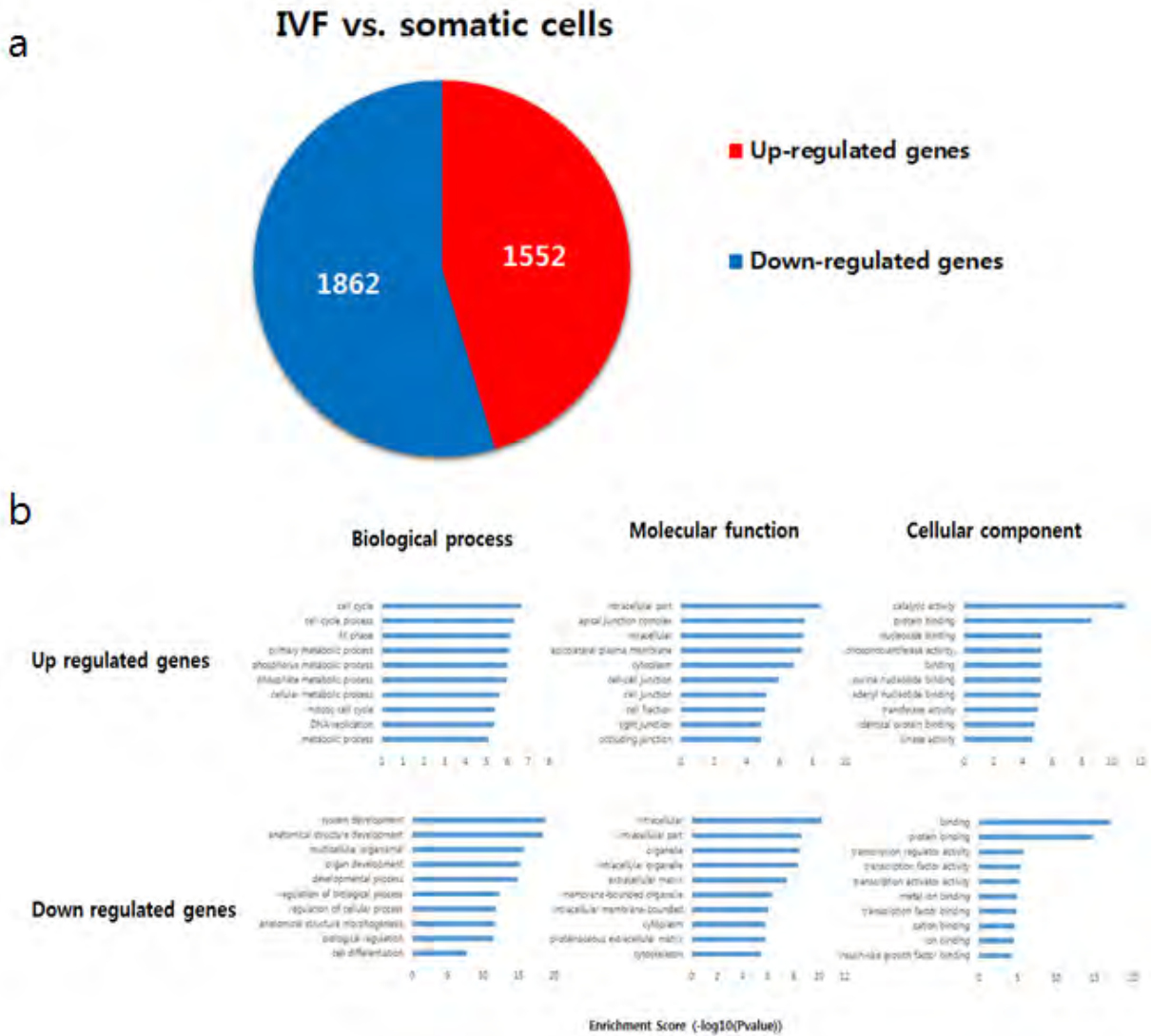


그림 82. (a) 체세포와 IVF 유래 배아줄기세포 간에 유전자 발현 변화. (b) 체세포와 IVF 유래 배아줄기세포 간에 변화된 유전자 간의 biological process, molecular function 그리고 cellular component.

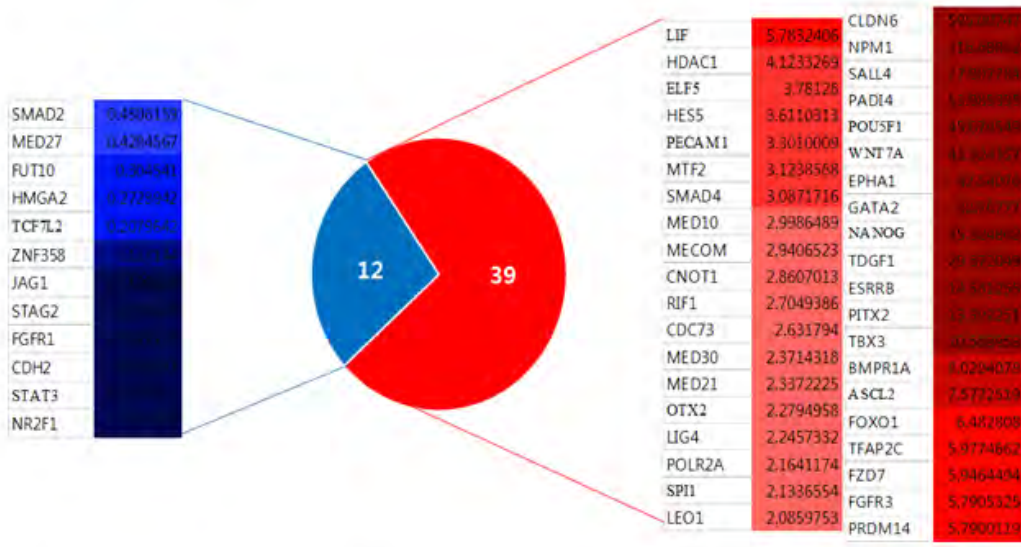
- 추가적으로 전능성 유전자의 변화를 확인한 결과 일부 유전자가 감소하는 것을 보이나 대부분의 유전자가 증가하고 있음을 확인함 (그림 83). 사람이나 마우스와 다르게 소에서는 전능성 유전자가 많이 밝혀지지 않아 본 연구의 자료는 소 전능성 줄기세포를 검증, 분석 및 분리하는데 좋은 자료가 될 것으로 생각됨.
- 이렇게 증가한 유전자 중에는 전능성 유전자로 유명한 oct4와 nanog가 포함 되어 있을 뿐만 아니라 소에서는 잘 알려지지 않은 유전자 역시 포함되어 있음을 확인함 (그림 83a). 특히 PECAM1, CNOT1 OTX2, PRDM14 그리고 CLDN6 등은 소 유래 전능성줄기세포에서 보고되지 않은 것으로 학술적으로 의미가 높으며 소 전능성 마커로 사용할 수 있을 것으로 생각됨. 이러한 유전자는 Real-time PCR 분석을 통해 재 검증을 진행했으며 positive control로 ICM을 함께 확인해 확립된 줄기세포의 성상이 높은 전능성을 갖고 있는 ICM과 유사함을 검증함 (그림 83b)



a

Down regulated DE genes

Up regulated DE genes



b

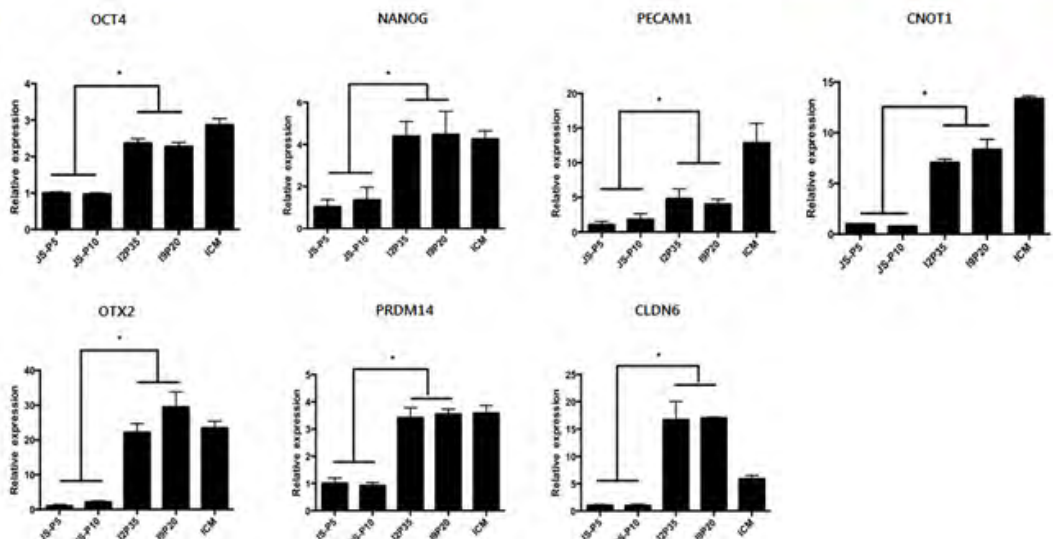


그림 83. 체세포와 IVF 유래 배아줄기세포 간에 전능성 유전자 발현 변화. (a) 전능성 유전자 중 유의적으로 차이가 나는 유전자. 붉은색은 체세포에 비해 IVF 유래 배아줄기세포에서 증가한 유전자 표기. 파란색은 체세포에 비해 IVF 유래 배아줄기세포에서 감소한 유전자 표기. (b) 각 유전자를 Real-time PCR로 검증한 결과.

(2) Chromatin remodeling 관련 유전자의 변화

- 소에서 핵이식 기법은 육종 사업 및 우량종 유지를 위해 매우 중요한 기법으로 알려져 있으나 체외 수정방법과 비교 시 생산된 배아의 발달 효율이 매우 낮음. 지금까지 이러한 효율을 개선하기위해 많은 chemical이 이용되었으나 높이지 못함. 이러한 핵이식 배아의 발달이 낮은 이유 중 하나는 비정상적인 chromatin remodeling 과정으로 핵이식 배아의 발달을 높이기 위해서는 chromatin remodeling을 이해하고 연구하는 것이 필요함. 마우스에서는 줄기세포를 이용해 이러한 chromatin remodeling 연구가 많이 진행되고 있으나 소에서는 없음. 이러한 이유로 본 연구에서는 핵이식 기법을 통해 생산된 배아를 통해 줄기세포를 생산하고 마이크로 어레이를 통해 유전자 변화를 확인함. 체외수정란 유래 줄기세포와 비교시 895개의 유전자

가 변화했고 이중 601개가 핵이식 배아줄기세포에서 증가하고 294개의 유전자는 감소함을 보임 (그림 84). GO term data base를 통해 분석한 결과 변화한 유전자는 대부분 cellular process와 관련 있는 것으로 확인됨 (그림 84). 비록 주된 그룹에 속하지 못했지만 변화된 유전자를 통해 chromatin remodeling 관련 유전자의 변화를 확인한 결과 유의적으로 변화 유전자는 5개 (총 77개 분석) 뿐임을 확인함 (그림 85a). 변화한 유전자는 Real-time PCR 분석을 통해 재검증함 (그림 85b). 이러한 유전자는 소에서 chromatin remodeling에 중요한 역할을 하고 배아 발달에 영향을 줄 것으로 생각되며 추가적인 연구를 통해 핵이식 배아 발달 메커니즘을 조금 더 명확하게 알 수 있을 것으로 생각됨.

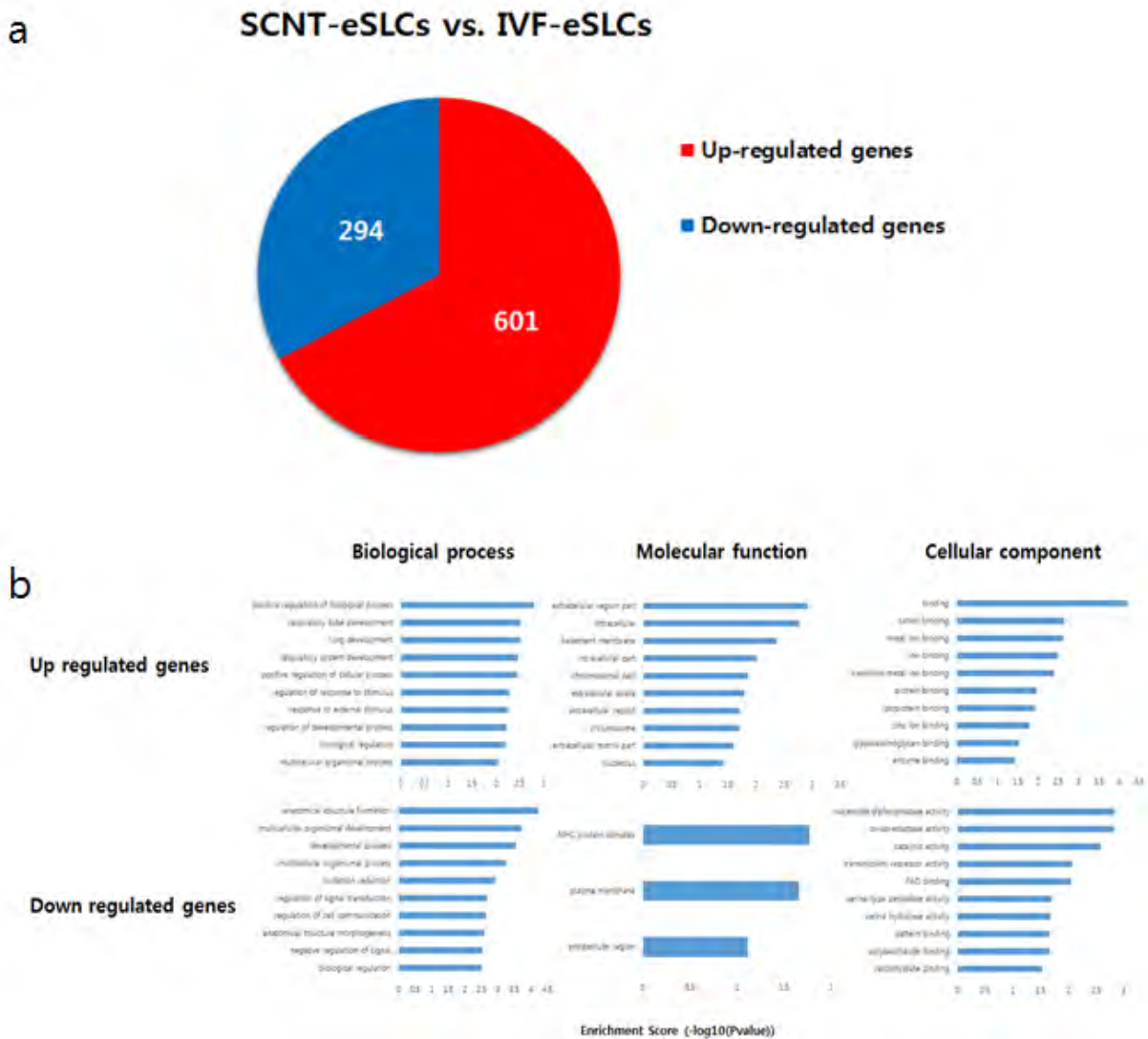


그림 84. (a) IVF 와 SCNT 유래 배아줄기세포 간에 유전자 발현 변화. (b) IVF와 SCNT 유래 배아줄기세포 간에 변화된 유전자 간의 biological process, molecular function 그리고 cellular component.

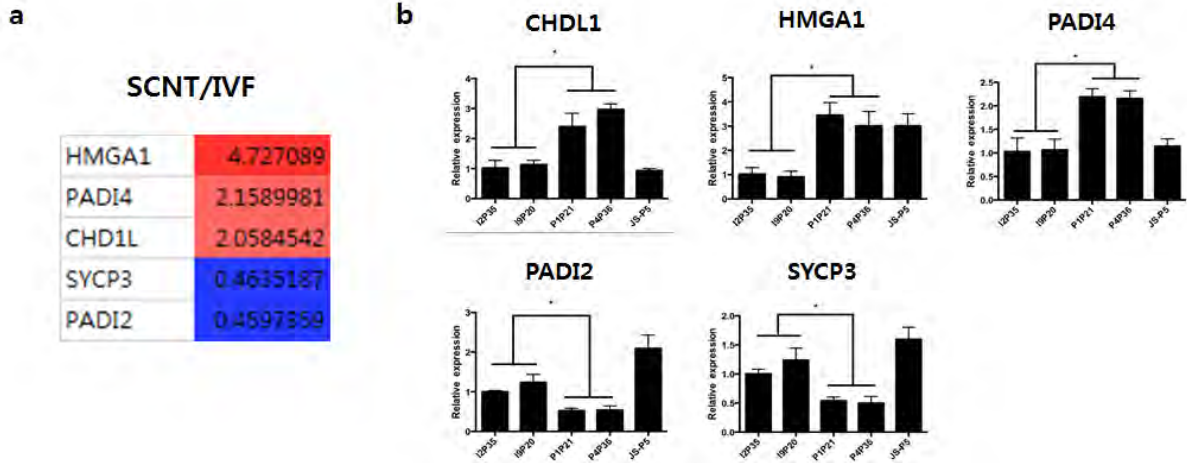


그림 85. IVF 와 SCNT 유래 배아줄기세포 간에 chromatin remodeling 유전자 발현 변화. (a) 마이크로 어레이 결과. (b) 유의적 변화가 있는 유전자의 Real-time PCR 검증 결과.

### (3) Imprinting 관련 유전자의 변화

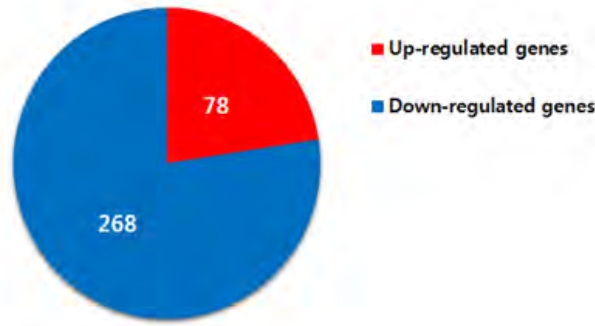
- 단성생식을 통해 생산된 배아는 발생 초기단계 연구에 매우 중요할 뿐만 아니라 imprinting 유전자 연구에도 중요함. 본 연구에서는 단성생식을 통해 생산된 배아 유래 줄기세포를 확립해 체외생식 유래 줄기세포와의 유전자 발현 차이를 확인하고 imprinting 관련 유전자 역시 조사함. 전체적으로 346개의 유전자가 유의적으로 변화했고 이중 78개는 단성생식 유래 줄기세포에서 증가하고 268개는 감소함을 확인함 (그림 86). GO term을 통해 분석한 결과 변화된 유전자들은 대부분 development와 관련이 있는 것으로 확인됨 (그림 86). 주된 그룹에 포함되지 않았지만 imprinting 관련 유전자를 조사한 결과 imprinted maternally expressed genes 증가하고 imprinted paternally expressed genes은 감소하는 것으로 확인됨 (표 29). 이러한 유전자 변화는 Real-time PCR로 재검증함 (그림 87). 이러한 결과는 생산된 줄기세포가 배아 수준에서 갖고 있던 imprinting pattern을 그대로 유지하는 것으로 생각되고 imprinting 유전자 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대됨.

표 29. IVF 와 PA 유래 배아줄기세포 간에 유전자 발현의 마이크로 어레이 결과

	Gene name	Fold change (PA/IVF)
Paternal expressed imprint genes	IGF2	0.450536
	SNRPN	0.4065958
	NAPIL5	0.3000457
	PEG3	0.2890593
	PLAGL1	0.2464155
Maternal expressed imprint genes	PHLDA2	5.5497327
	ASCL2	2.7512835
	H19	2.6649958
	MEG3	2.6293358
	TSSC4	2.4949528
	IGF2R	2.4294826

a

PA-eSLCs vs. IVF-eSLCs



b

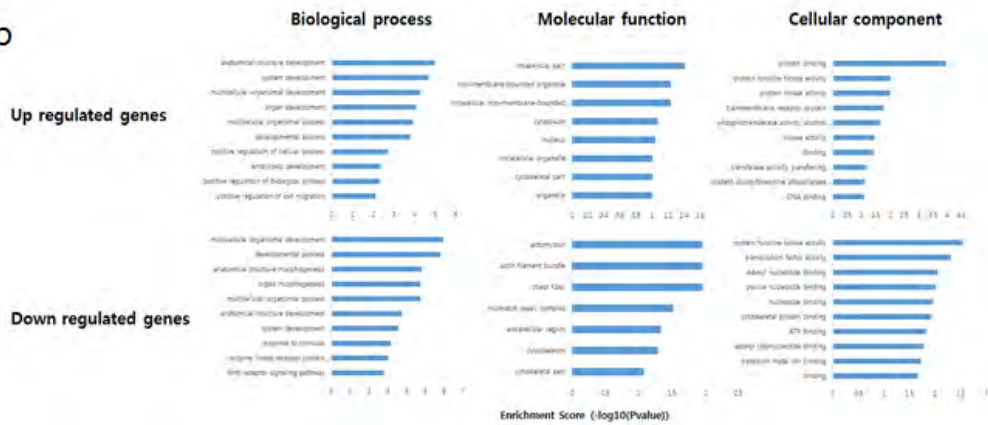
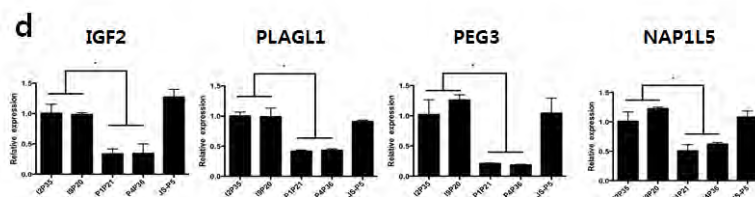


그림 86. (a) IVF 와 PA 유래 배아줄기세포 간에 유전자 발현 변화. (b) IVF 와 PA 유래 배아줄기세포 간에 변화된 유전자 간의 biological process, molecular function 그리고 cellular component.

Paternally expressed imprinting genes



Maternally expressed imprinting genes

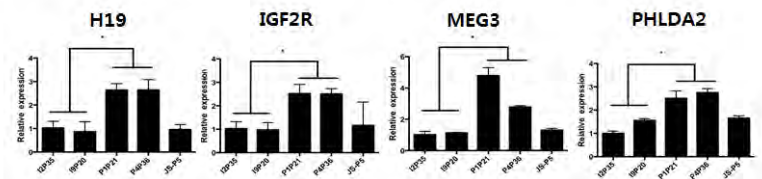


그림 87. IVF 와 PA 유래 배아줄기세포 간에 유의적 차이가 있는 유전자 발현의 Real-time PCR 결과.

(4) 소 전능성 관련 signaling pathway

- 앞서 다양한 배양조건에도 불구하고 진정한 전능성 줄기세포를 소에서 확립하지 못해 마이크로 어레이를 통해 생산된 줄기세포의 공통적인 signaling pathway를 찾아보고 이미 알려진 전능성 signaling pathway와의 차점 역시 찾고자함. 체세포와 비교해 세가지 줄기세포에서 공통적으로 변화한 유전자는 2,415개 이고 이중 1,014개가 증가하고 1,401개가 공통적으로 감소함을 확인함 (그림 88). 변화한 유전자를 DAVID data base를 통해 분석한 결과 54개의 signaling이 포함되어 있음을 확인함. 이 중에는 WNT, TGF  $\beta$ , LIF-STAT signaling가 같이 전능성과 관련된 것도 존재함. 각 그룹의 유전자가 모두 증가하는 것은 아니었지만 TGF  $\beta$ 와 WNT의 경우 signaling pathway가 활성화되는 방향으로 주요 유전자가 증가함이 확인되었고 (그림 89a, 90a) 관련 유전자를 Real-time PCR로 검증한 결과 역시 마이크로 어레이 데이터와 일치함 (그림 89b, 90b). 비록 LIF는 증가했지만 downstream에 존재하는 STAT3는 감소하는 것으로 보아 LIF signaling 은 마우스 전능줄기세포와 다르게 작동하지 않는 것으로 보임 (그림 91a). 또한 SOCS3가 증가해 LIF-STAT에 중계자인 JAK signaling이 억제되는 것으로 생각됨 (그림 91a). 이와 관련된 유전자 역시 Real-time PCR로 검증됨 (그림 91b). 이러한 결과는 WNT와 TGF  $\beta$  signaling은 소의 전능성을 유지하는 중요하고 활발하게 작동하는 것으로 생각됨. LIF-STAT signaling은 LIF가 많이 발현하는 것으로 보아 전능성 유지에 관여하지만 JAK-STAT 과 같은 downstream이 활성화 되지 않아 이를 연결해주는 신호의 활성을 유지하는 것이 소에서 진정한 줄기세포를 확립하는데 꼭 필요할 것으로 생각됨. 생산된 줄기세포의 추가적인 연구를 통해 이러한 문제를 극복할 수 있는 연구를 할 수 있을 것으로 생각됨.

Signaling pathway

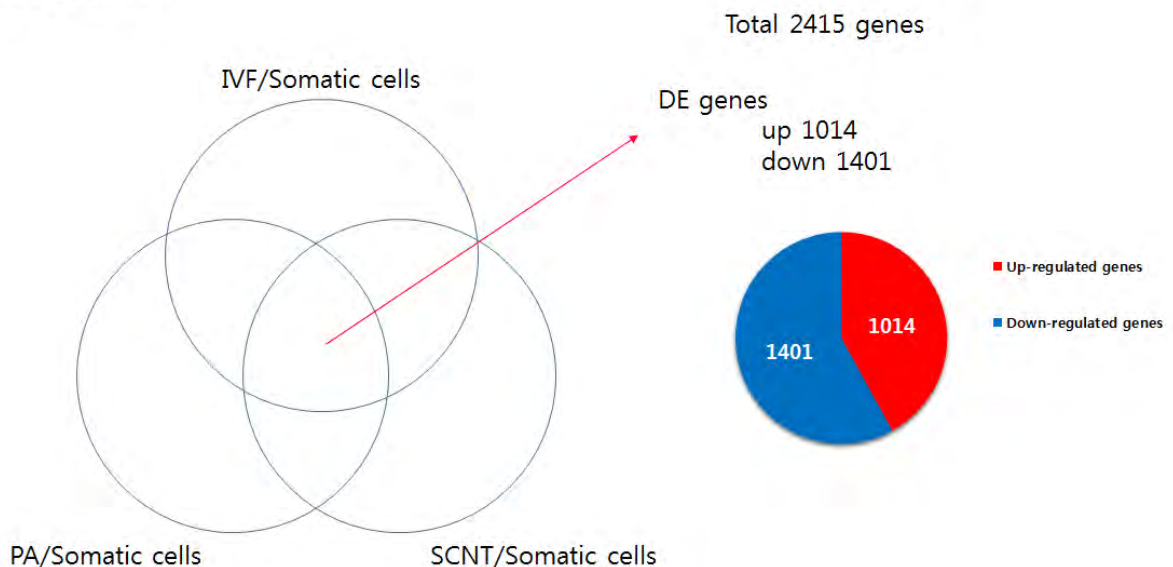


그림 88. IVF, SCNT 그리고 PA 유래 배아줄기세포 간에 공통적인 유전자 발현 변화.

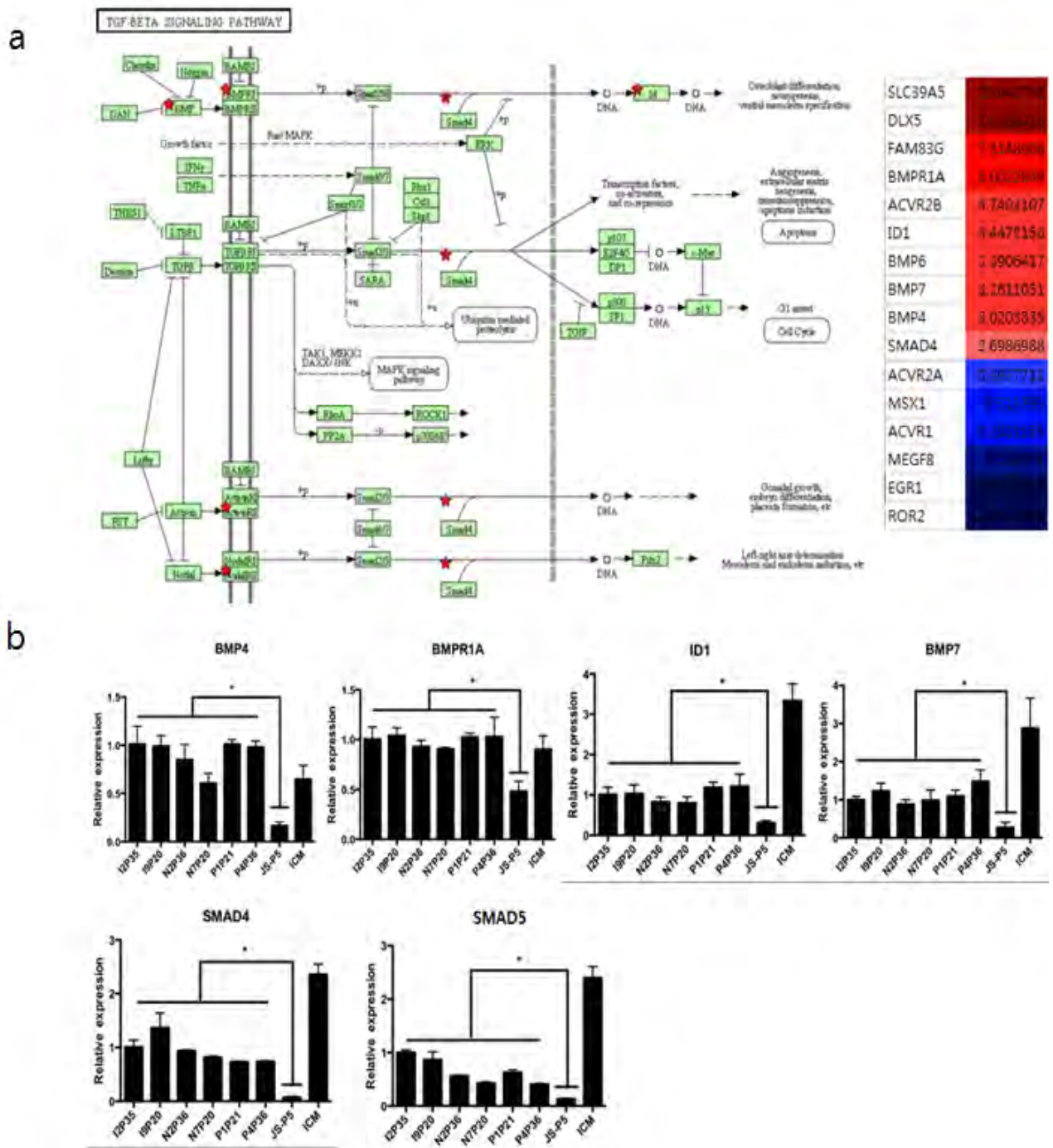
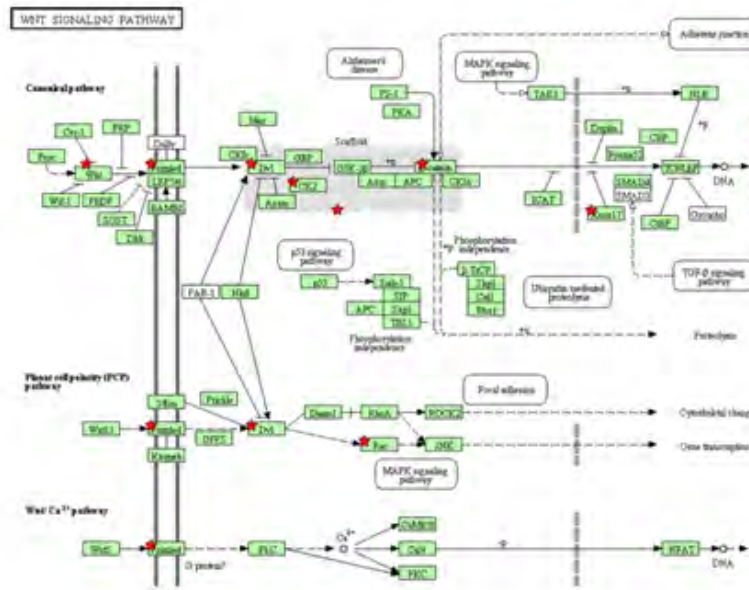


그림 89. 소 배아 줄기세포와 TGF  $\beta$  signaling. (a) KEGG data base를 통한 TGF  $\beta$  signaling 연관 유전자의 변화. (b) 변화된 유전자를 Real-time PCR을 통해 검증한 결과.

a



GATA3	5.666113	DCTN8	0.420004
WNT7A	3.210000	PROM2	0.410000
SLC9A3R1	2.800110	SLC31A2	0.390010
TMEM88	2.000000	AP5S1	0.380010
SLC16A9	1.800000	DKK1	0.370007
NDRG2	1.600000	CSNK1E	0.360010
SYNJ2	1.500000	MYC	0.350000
PITX2	1.400000	MITF	0.340010
CPE	1.300000	NXN	0.330010
CCL27	1.250000	WNT5A	0.320010
SOX17	1.100000	AMOTL2	0.310000
DVL1	1.000000	DOIT3	0.300000
AXIN2	0.900000	AMMECR1	0.290010
WNT6	0.800000	HBP1	0.280010
VOPP1	0.700000	TGFB11	0.270010
WNT10A	0.600000	LZTS2	0.260010
WNT4	0.500000	TCF7L2	0.250010
FZD10	0.400000	RETSAT	0.240010
FZD7	0.300000	CALCOCO1	0.230010
CCNE1	0.200000	LGR4	0.220010
WNT11	0.100000	FZD1	0.210010
WLS	0.000000	CCND1	0.200010
CSNK1B	0.000000	AMOTL1	0.190010
CTNNB1	0.000000	SMD	0.180010
HOXB9	0.000000	ROR2	0.170010
PIAS2	0.000000	FUOM	0.160010
VRK1	0.000000	CTHRC1	0.150010
WNT2B	0.000000	VLDLR	0.140010
RNF138	0.000000	CT	0.130010
RAC1	0.000000	SFRP2	0.120010
FZD9	0.000000	DKK3	0.110010

b

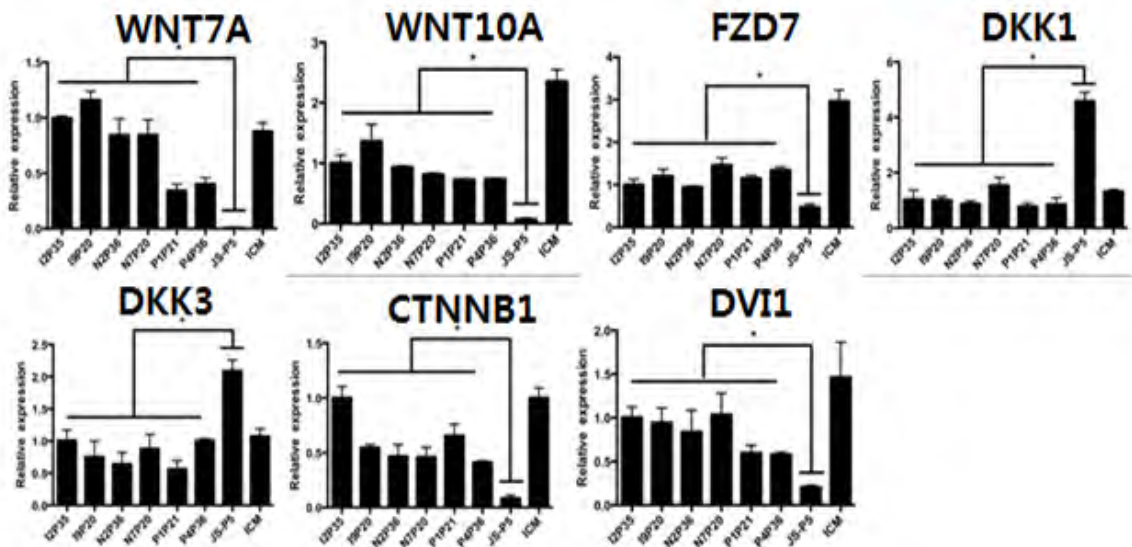


그림 90. 소 배아 줄기세포와 WNT signaling. (a) KEGG data base를 통한 WNT signaling 연관 유전자의 변화. (b) 변화된 유전자를 Real-time PCR을 통해 검증한 결과.

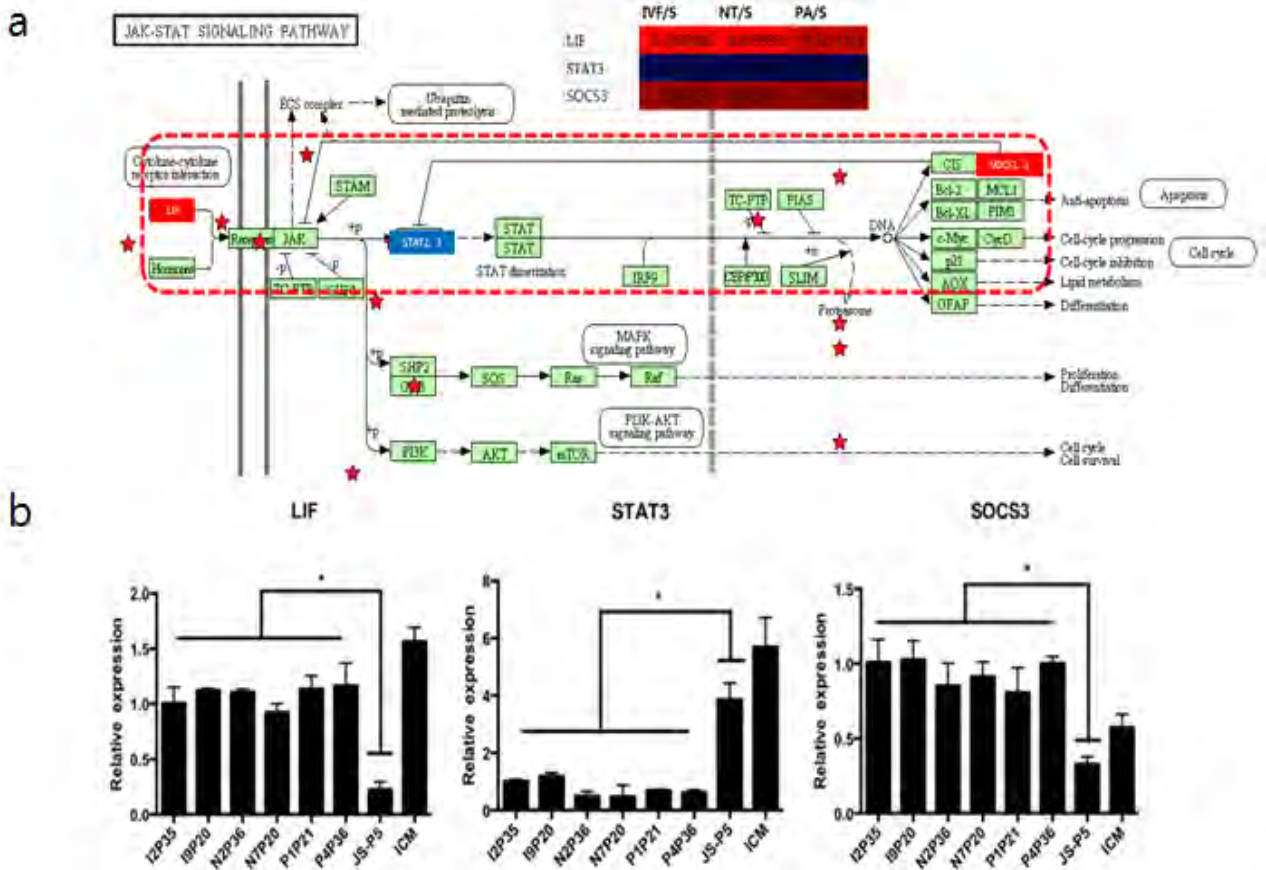


그림 91. 소 배아 줄기세포와 LIF-STAT3 signaling. (a) KEGG data base를 통한 LIF-STAT3 signaling 연관 유전자의 변화. (b) 변화된 유전자를 Real-time PCR을 통해 검증한 결과.

(5) Oncogene 과 tumor suppressor 관련 유전자 변화

- 소 유래 줄기세포 연구는 수 십년 전부터 진행되었으나 대부분 장기배양이나 전능성 유전자 유지에 실패함. 본 연구에서는 장기배양 및 전능성 유전자 유지에 성공하였으나 여전히 체내 분화능 검증 중 비정상 적인 embryonal carcinoma를 형성해 완전한 teratoma를 얻지 못함. 이러한 결과는 본 연구 결과를 포함에 대동물 줄기세포 연구들에서 많이 보고된 내용이지만 그 원인에 대한 연구는 지금까지 밝혀지지 않음. 게다가 암과 관련된 유전자는 전능성 유전자와 긴밀한 연관성이 있어 보다 높은 전능성을 갖는 줄기세포 생산에도 역시 도움을 줄 것으로 생각됨.

(가) 먼저 oncogene과 관련된 유전자를 스크린 한 결과 21개의 유전자가 감소하고 7개의 유전자가 증가했고 이러한 결과는 teratoma 유발과 연관있는 유전자 집단이 감소한 것으로 확인됨 (그림 92a). 대표적인 oncogene 관련 유전자인 MAML2, BCL11A, SMO 그리고 CCND1을 Real-time PCR로 검증한 결과 체세포 보다 낮게 나오고 ICM과 유사한 수준으로 발현하는 것으로 확인됨 (그림 92b). 이러한 결과는 oncogene 관련 유전자가 teratoma formation에 중요하게 영향을 주는 것으로 생각되고 소 전능성 줄기세포 배양동안 oncogene의 유지가 보다 높은 수준의 전능성 줄기세포를 확립을 지지하는 것으로 보임.



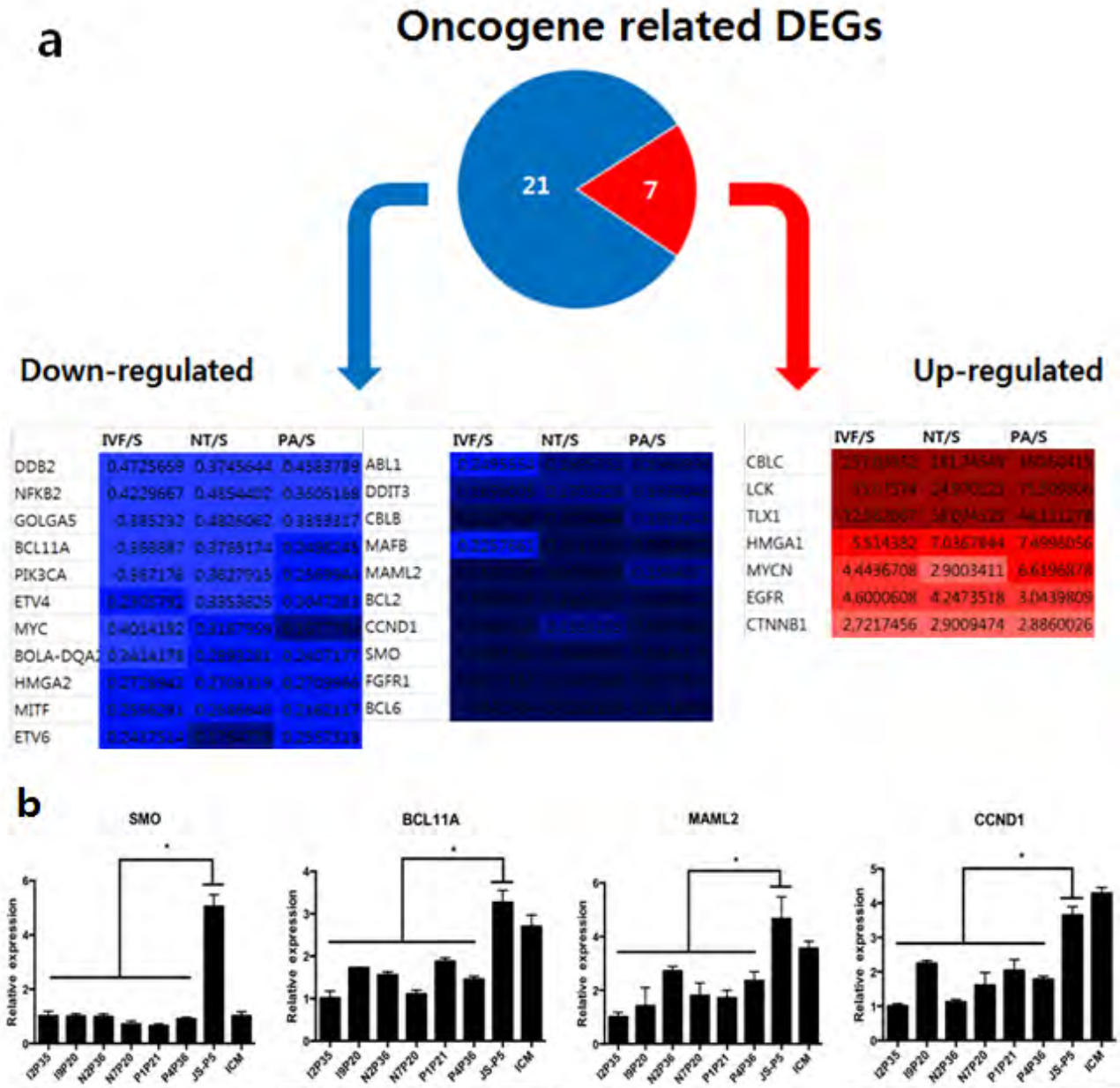
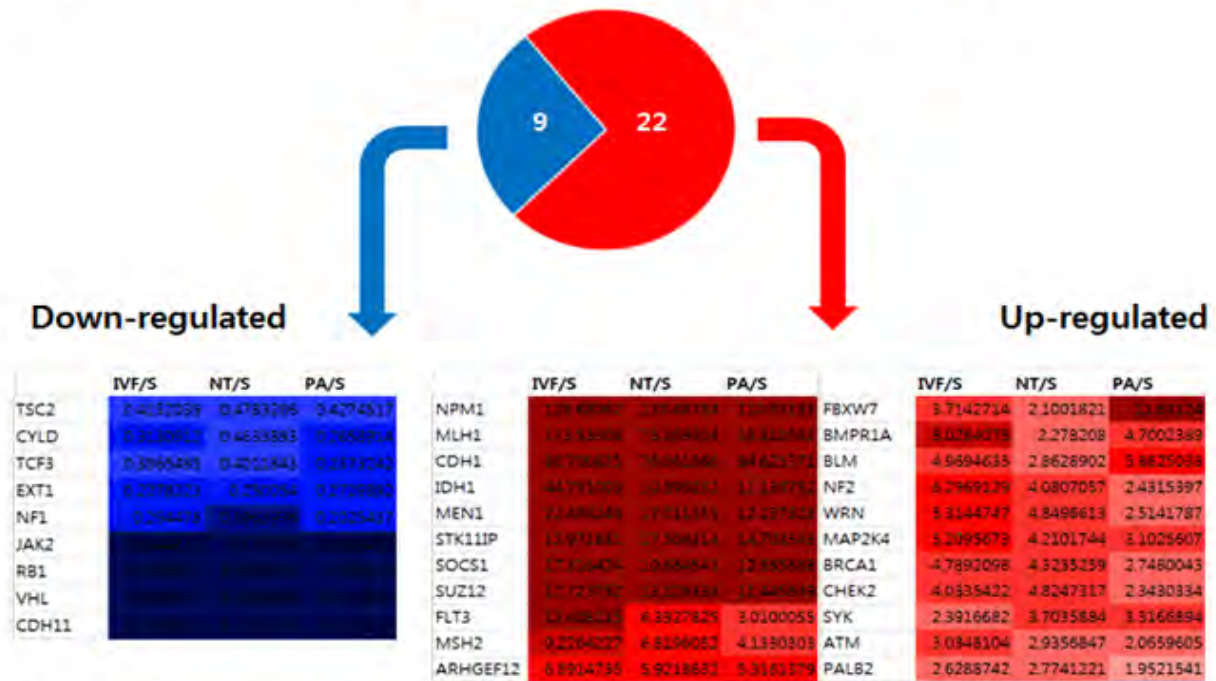


그림 92. IVF, SCNT 그리고 PA 유래 배아줄기세포 간에 공통적인 Oncogene 유전자의 변화. (a) 공통적인 Oncogene 유전자의 마이크로 어레이 결과. (b) 유의적인 변화가 있는 주요 유전자의 Real-time PCR 결과.

(나) tumor suppressor gene 관련된 유전자를 스크린 한 결과 9개의 유전자가 감소하고 22개의 유전자가 증가했고 이러한 결과는 잠재적으로 teratoma 유발 억제와 연관 있는 유전자 집단이 증가한 것으로 생각됨 (그림 93a). 대표적인 tumor suppressor 관련 유전자인 BRCA1, MSH2, MLH1, SUZ12 그리고 SOCS1을 Real-time PCR로 검증한 결과 체세포 보다 높게 나오고 ICM과 유사한 수준으로 발현하는 것으로 확인됨 (그림 93b). 이러한 결과는 tumor suppressor 관련 유전자가 teratoma formation에 중요하게 영향을 주는 것으로 생각되고 소 유래 전능성 줄기세포 배양동안 tumor suppressor 관련 유전자의 조절이 보다 높은 수준의 전능성 줄기세포를 확립하는데 도움을 줄 것으로 보임.

a

## Tumor suppressor related DEGs



b

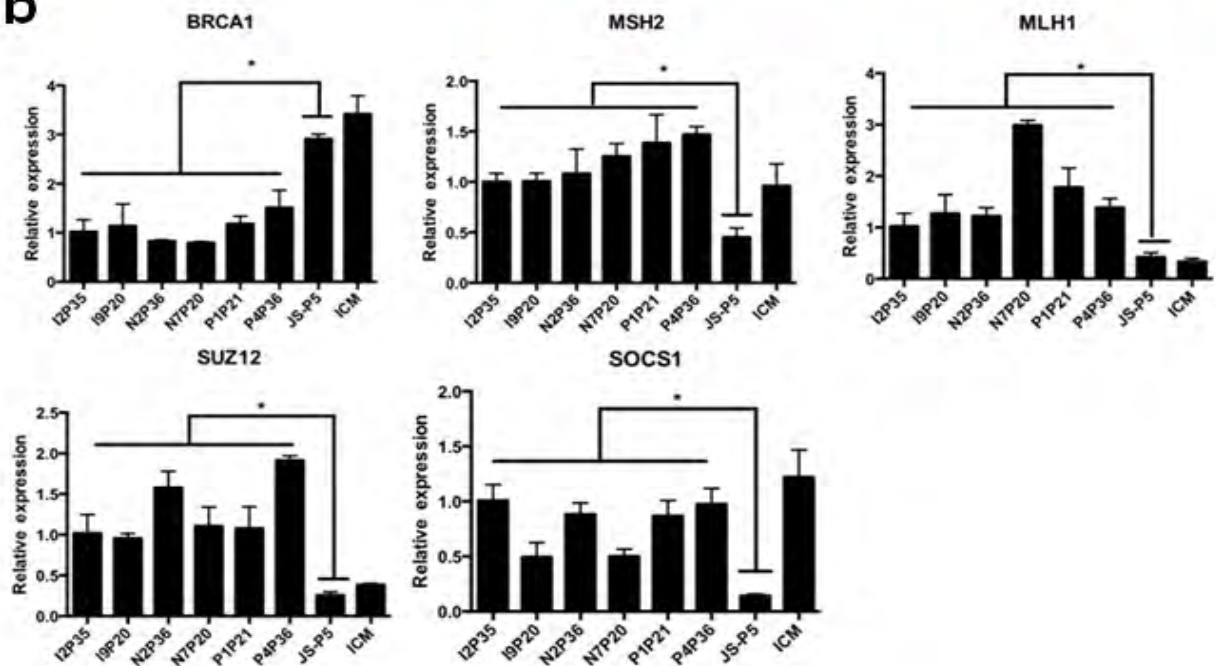


그림 93. IVF, SCNT 그리고 PA 유래 배아줄기세포 간에 공통적인 tumor suppressor 유전자의 변화. (a) 공통적인 tumor suppressor 유전자의 마이크로 어레이 결과. (b) 유의적인 변화가 있는 주요 유전자의 Real-time PCR 결과.

### (6) 그 외 teratoma 형성과 관련된 유전자 집단 조사

- tumor 관련 유전자로 분리 되지 않은 유전자 중 teratoma형성과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자를 스크린하고 이러한 유전자가 소 유래 전능성 줄기세포에 미치는 영향을 확인함.

(가) Defensin family

- Defensin family는 일반적으로 면연과 관련되어 많은 연구가 진행되었으나 최근 암형성 및 억제와 관련해 일부 보고가 있어 본 연구에서는 이러한 유전자의 변화를 확인함. 마이크로 어레이 결과를 보면 소 유래 줄기세포에서 defensin family와 관련된 유전자 중 암형성과 관련성이 알려진 DEFB1, DEFB3 그리고 DEFB7 모두가 증가해 teratoma 형성을 방해하는 것으로 보여짐 (그림 94a). 이러한 유전자 발현은 Real-time PCR을 통해 검증한 결과 체세포보다 그 발현이 월등히 높게 발현되었으며 ICM과 유사한 수준의 발현을 보임 (그림 94b).

(나) Smad3

- Smad3는 전능성 유전자와 긴밀한 연관이 있는 것으로 알려져 있으나 최근 teratoma 형성과 직접적으로 연관이 있는 것으로 보고됨. 이러한 내용을 배경으로 본 연구에서는 소 유래 줄기세포의 teratoma 형성에 smad3가 연관이 있을 것으로 예상하고 유전자 변화를 확인함. 마이크로 어레이 결과에서 확인할 수 있듯이 smad3의 발현이 체세포에 비해서 많이 감소하는 것으로 보임 (그림 94a). 또한 Real-time PCR 결과 체세포 뿐만 아니라 ICM에 비해 소 줄기세포에서 smad3 발현이 감소하는 것으로 확인됨 (그림 94b). 이러한 결과로 보아 smad3의 down-regulation이 소 유래 줄기세포의 전능성에 영향을 줄 것으로 보이고 teratoma 형성 조절에 관여 할 것으로 생각됨.

**a**

	IVF/S	NT/S	PA/S
DEFB1	6.5369269	8.8735961	12.502927
DEFB3	2.8986355	2.1395813	5.1729888
DEFB7	5.4970371	3.9674258	2.6500273
SMAD3	0.1225329	0.1591446	0.1035272

**b**

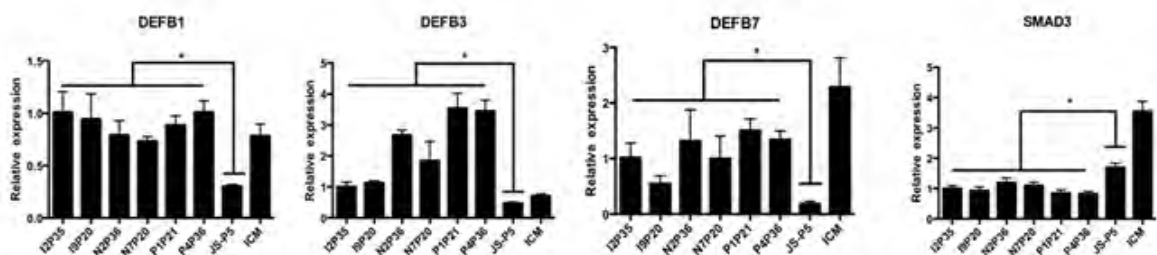


그림 94. IVF, SCNT 그리고 PA 유래 배아줄기세포 간에 공통적인 defensin family와 smad3 유전자의 변화. (a) 변화된 유전자의 마이크로 어레이 결과. (b) 유의적인 변화가 있는 주요 유전자의 Real-time PCR 결과.

5. 수립한 만능줄기세포에의 표지유전자도입 후 배아와의 응집을 통한 키메라 배아 생산유도 및 효율성 비교.

가. 확립된 각종 배아줄기세포에의 표지

- 줄기세포의 분화능을 확인하기위해 먼저 확립된 배아줄기세포를 표지하여 배아 내 분포를 확인하고 나아가 키메라 소를 생산해 조직 내 줄기세포의 분포를 확인하고자함. 그러나 확립된 줄기세포가 다른 일반적인 세포에 비해 크고 세포간에 점성이 존재하여 배아 내 주입 가능유무 확인이 먼저 필요해 간단하게 세포막을 염색할 수 있는 CellTracker™ 통해 염색함 (그림 95)

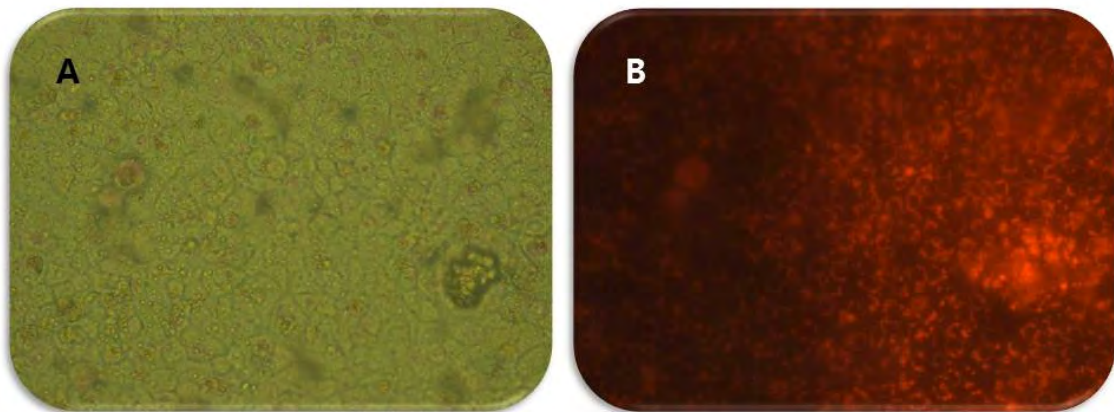


그림 95. 배아의 삼입 후 소 배아줄기세포를 추적할 수 있도록 CellTracker™ 을 통해 배아줄기세포를 염색

나. 할구기 배아 내 배아줄기세포 주입을 통한 키메라 배아 생산조건 확립

- CellTracker™으로 tagging을 한 전능성 줄기세포(본 연구에서는 핵이식 배아 유래 전능성 줄기세포를 먼저 진행함)를 4-, 8-세포기 또는 상실배 단계에서 주입함. 전능성 줄기세포를 완전한 단일 세포로 만들어 주입하면 세포가 분화되거나 쉽게 퇴화되는 현상을 보여 약 30 초간 tryPLE 처리 및 물리적 파이펫팅을 통해 전능성 줄기세포를 작은 클럼프 형태로 만들어 이용함. 10-13개 사이의 세포로 된 작은 클럼프 형태로 배아에 주입해 키메라 배아를 생산함 (그림 96)

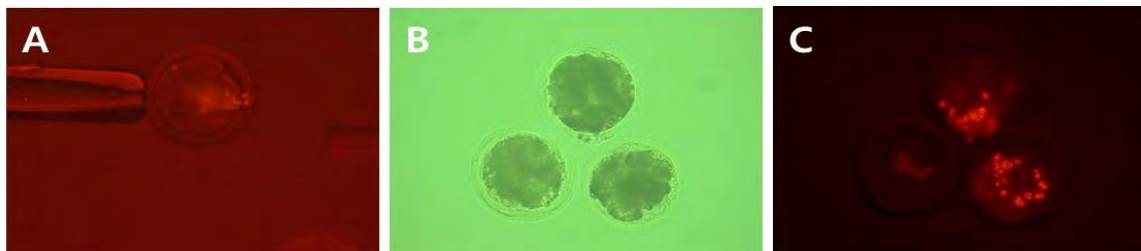


그림 96. 확립된 배아줄기세포의 표지와 배아 내 주입 초기 실험. (A) 배아 내 표지된 줄기세포 주입 모습. (B) 줄기세포 주입 후 상실배 배아의 모습. (C) 형광을 통해 주입된 배아 내 줄기세포의 모습.

- 주입된 전능성 줄기세포가 배반포 단계에서 어떠한 운명을 갖는지 확인하기 위해 키메라 배아를 체외 배양해 배반포 단계까지 배양한 후 형광 현미경으로 확인함. 전체적인 전능성 줄기세포가 삽입된 키메라 배아의 생산율과 삽입된 줄기세포의 분포는 표 30에 정리함. 먼저 다양한 단계에서 전능성 줄기세포를 삽입한 결과 8-세포기에서 삽입하는 것이 삽입 후 생존율이 가장 높은 것으로 나타났으며 삽입된 세포의 분포는 배반포 단계에서 확인한 결과 일부 배반포에서 삽입된 줄기세포가 세포내 괴 쪽 그리고 영양외배엽성 쪽에 모두 기여하는 것이 관찰 됨 (그림 97C, D). 그러나 대부분의 배아에 삽입된 전능성 줄기세포는 덩어리 상태로 배아 내 남아 있거나 일부 삽입된 클럼프 조각이 배반포 내 증식성 없이 남아있는 것도 관찰됨 (그림 97E, F). 이러한 문제는 체외배양된 전능성 줄기세포의 증식환경과 배아를 배양하는 환경의 차이가 있어 삽입된 전능성 줄기세포의 증식에 어려움이 있는 것으로 생각되며 향후 이러한 문제를 해결하기 위해 전능성 줄기세포 삽입 후 배양조건을 최적화하는 과정이 필요할 것으로 생각됨.

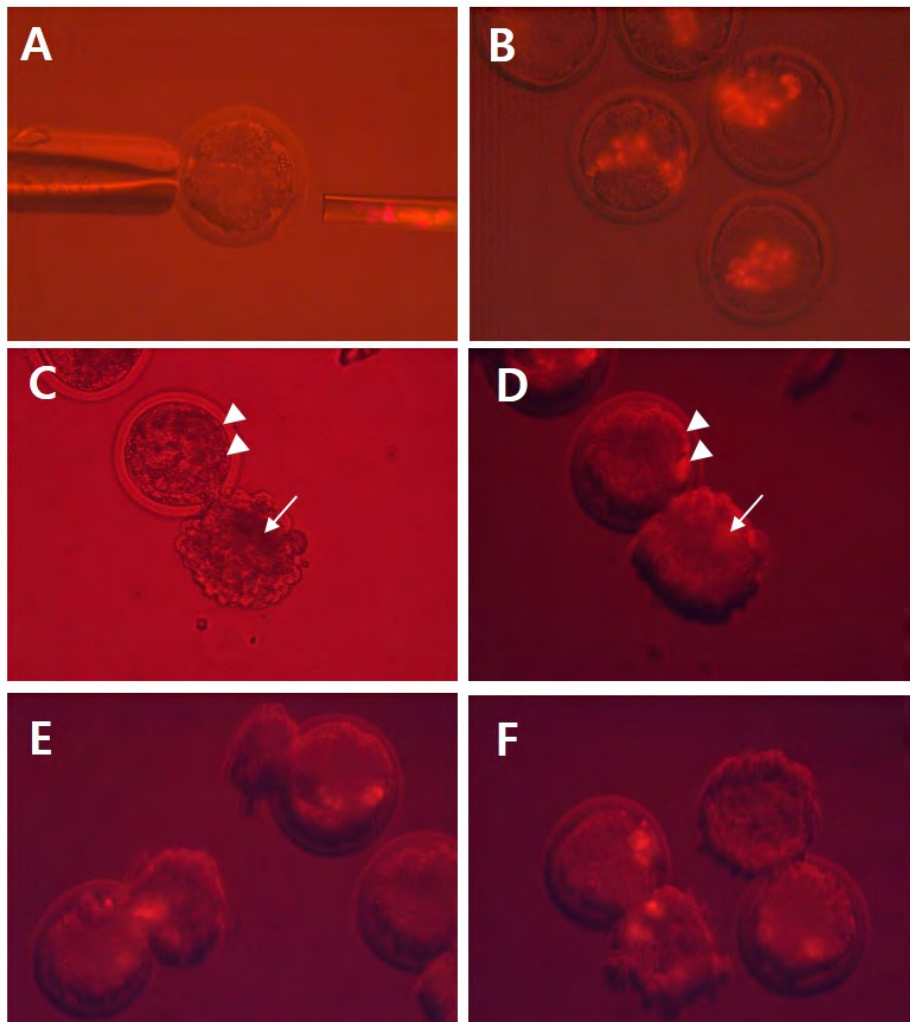


그림 97. 배아 유래 전능성 줄기세포를 이용한 키메라 배아 생산. (A) 전능성 줄기세포를 삽입하는 과정. (B) 표지된 전능성 줄기세포 삽입 후 배아 모습. (C, D) 표지된 전능성 줄기세포 삽입된 배반포단계의 배아. 표지된 줄기세포가 배반포의 세포내괴쪽 (화살표)과 영양외배엽쪽 (화살표 머리) 에 분포하는 것이 관찰됨. (E, E) 삽입된 줄기세포가 배반포내 덩어리 혹은 다단일 세포로 증식하지 못한 채 남아있는 모습.

표 30. Distribution of injected pluripotent stem cells (PSCs) in bovine in vitro fertilized embryos.

Total number of embryos	Group	Number embryos grouped	Number (%) of PSC*-injected embryos	Distribution of the progeny of the injected PSCs* (%)		
				ICM or TE only	Hemi-ICM/TE	Quiescence
60	4-cell stage	15	10 (66)	0 (0)	1 (10)	9 (90)
	8-cell stage	30	23 (76)	0 (0)	5 (22)	18 (78)
	Morula	15	9 (60)	0 (0)	0 (0)	10 (100)

다. 다양한 전능성 줄기세포를 이용한 키메라

- 형광 단백질인 dsred로 표지한 다양한 전능성 줄기세포 (핵이식, 체외수정, 단위발생)를 4-, 8-세포기 또는 상실배 단계에서 주입함. 전능성 줄기세포를 약 30초간 trypLE 처리 및 물리적 파이펫팅을 통해 각종 전능성 줄기세포를 작은 클럼프 형태로 만들어 삽입함. 8-10개 사이의 세포로 된 작은 클럼프 형태를 배아에 주입해 키메라 배아를 생산함 (그림 98A, B).
- 앞선 결과와 마찬가지로 8-세포기에서 삽입하는 것이 삽입 후 생존율이 가장 높은 것으로 나타났으며 삽입된 세포의 분포는 배반포 단계에서 확인한 결과 일부 배반포에서 삽입된 줄기세포가 세포내 괴 쪽 그리고 영양외배엽성 쪽에 모두 기여하는 것이 관찰 됨 (표 31, 그림 98C, D). 그러나 대부분의 배아에 삽입된 전능성 줄기세포는 덩어리 상태로 배아 내 남아 있거나 일부 삽입된 클럼프 조각이 배반포 내 증식성 없이 남아있는 것도 관찰됨. 이러한 문제는 체외배양된 전능성 줄기세포의 증식환경과 배아를 배양하는 환경의 차이가 있어 삽입된 전능성 줄기세포의 증식에 어려움이 있는 것으로 생각되며 향후 줄기세포 삽입 후 배양조건을 최적화하는 과정이 필요할 것으로 생각됨. 생산된 키메라 배반포 내의 삽입된 줄기세포의 분포는 줄기세포가 생산된 방법에 따라 차이를 보이지 않았고 이러한 내용은 다양한 방법으로 생산된 줄기세포가 키메라 생산 시 큰 차이를 보이지 않는다는 것을 확인함 (표 31)

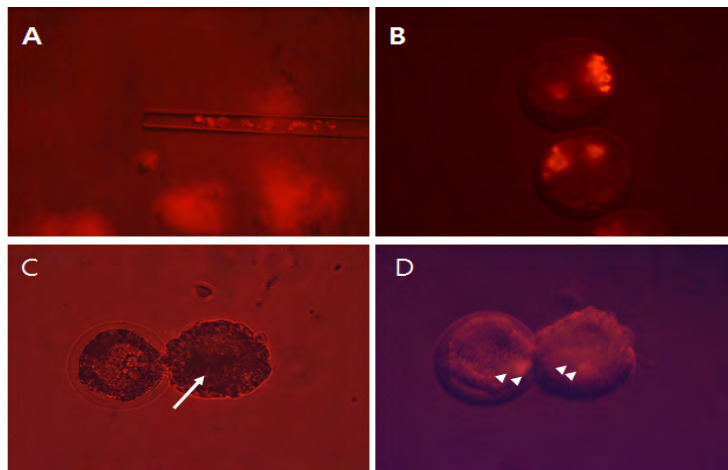


그림 98. 형광 단백질로 표지한 전능성 줄기세포를 통한 키메라 배아 생산. (A) 형광 단백질로 taggig 한 전능성 줄기세포. (B) 표지된 전능성 줄기세포를 클럼프 수준으로 만든 후 삽입한 배아 모습. (C와 D) 배반포 단계의 키메라 배아. ICM 부위 (화살표)와 trophectoderm 에 함께 위치한 모습이 관찰됨. 화살표 머리는 삽입된 줄기세포를 표시.

표 31. Distribution of injected pluripotent stem cells (PSCs) derived from three different ways in bovine in vitro fertilized embryos.

Group	Total number of embryos	Group	Number embryos grouped	Number (%) of PSC-injected embryos	Distribution of the progeny of the injected PSCs (%)		
					ICM or TE only	Hemi-ICM/TE	Quiescence
IVF	30	4-cell stage	10	3 (30)	0 (0)	0 (0)	3 (100)
		8-cell stage	10	8 (80)	0 (0)	4 (50)	4 (50)
		Morula	10	5 (50)	0 (0)	2 (40)	3 (60)
PA	30	4-cell stage	10	1 (10)	0 (0)	0	1 (100)
		8-cell stage	10	5 (50)	0 (0)	1 (20)	4 (80)
		Morula	10	5 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NT	30	4-cell stage	10	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
		8-cell stage	10	7 (70)	0 (0)	4 (57)	3 (43)
		Morula	10	6 (60)	0 (0)	3 (50)	3 (50)

6. 만능줄기세포를 공여핵으로 이용한 핵이식 배아 생산 및 체세포핵이식 배아와의 생산효율 및 특성 비교분석.

가. 체세포 및 형질전환 세포를 이용한 핵이식 복제배아 생산

(1) 형질전환 세포를 이용한 핵이식 복제배아 생산

(가) 인터페론 형질전환 세포주를 공여세포로 핵이식 배아 생산

- Interferon 형질전환 세포주 확립을 위한 2종 이상의 세포주 개발: 미리 primary culture를 하여 기확보된 adult 및 calf fibroblast cell에 transfection
- 이 두 종류의 세포를 각각 donor cell로 체세포핵이식에 사용하여 발달능력을 테스트한 결과 transfected calf cell line이 분할율( $67.4 \pm 15.6\%$  vs  $53.6 \pm 14.7\%$ ) 및 배반포형성율( $29.2 \pm 11.2\%$  vs  $18.4 \pm 7.5\%$ )을 보였음 (표 32).

표 32. Developmental competence and GFP expressed ratio and total cell number of blastocysts produced by SCNT using hNF-transfected calf fibroblasts or adult fibroblasts as donor cells

donor cell	No. of used oocytes	No. of fused oocytes(%)	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts(%)	No. of GFP expressed BLs	Total cell number
calf cell	1125	875 (79.3±9.9%)	580 (67.4±15.6%)a	256 (29.2±11.2%)a	223 (87.1%)	106.3±18.5
adult cell	1588	1100 (70.0±7.0%)	606 (53.6±14.7%)b	203 (18.4±7.5%)b	183 (90.1%)	94.5±19.2

(나) 사람의 적혈구 조혈인자 (EPO)가 삽입된 세포를 이용한 핵이식 배아 생산

- Promoter assay를 통해 EPO유전자의 프로모터별 활성도를 측정하여  $\alpha$  S1-casein을 선택하였으며 공여세포를 관찰하기 위해서 CMV promoter에 eGFP를 연결하였음. 성체 fibroblast에 lipofectamine으로 유전자를 삽입했으며 G418 selection 후 유전자도입 세포를 체세포핵이식에 이용하여 발달한 배반포의 체외배양 단계에서 형광발현을 확인하였음 (그림 99)

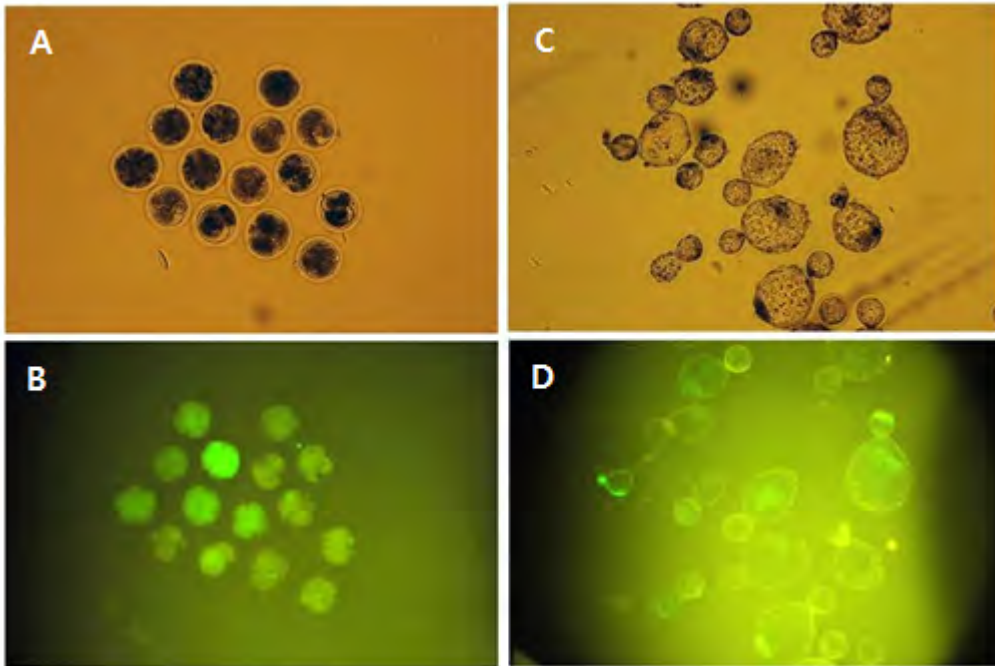


그림 99. GFP expression of transgenic embryos with EPO at cleavage stage (A, B) and at blastocyst stage (C, D).

(2) 체세포를 활용한 핵이식 복제배아 생산

(가) 한우 성체의 fibroblast를 공여세포로 한 체세포 핵이식 복제배아 생산

표 33. Developmental competence of blastocysts produced by SCNT using adult fibroblasts of Korean traditional cow as donor cells

donor cell	No. of used oocytes	No. of fused oocytes(%)	No. of cleaved oocytes (%)	No. of blastocysts(%)
HCF-1	158	120(76)	74(62)	30(25)
HCF-2	262	218(82)	148(69)	78(30)
HCM-1	329	258(78)	180(70)	74(35)

- 서로 다른 세 개체의 성체 한우로부터 체세포를 획득하고 이를 배양하여 세포주를 확립했음. 이 세포를 이용하여 핵이식 복제 배아를 생산했고 배반포까지는 25-35% 확률로 발달하였음(표 33)



(3) 소 핵이식 배아에 있어서 GSK3 억제제가 미치는 영향

- Serine/threonine glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)는 Wnt 그리고 Hedgehog 신호 전달, 단백질 합성, 글리코젠 대사, 유사분열 그리고 세포자멸사를 포함하는 세포생명 조절에 관여하는 다기능성 키나아제이다. 소의 체외 수정란에서의 이전 연구에서 GSK-3는 배아 발달 운명에 중요한 조절자로 또한 밝혀졌음. 본 연구의 목적은 체세포 이식을 통해 형성된 소 배아의 배양 과정 중 GSK-3 억제제 첨가의 적정농도 및 배아 발달과 배반포 품질에 미치는 영향을 확인하는데 있다. 체세포 핵이식 유래 배아들을 GSK-3의 선택적 억제제인 CHIR99021가 각각 0  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M 농도로 첨가된 mSOFaa 배지에서 배양시킴으로써 비교 관찰하였음.
- 배양 후 8일째 배반포 형성률은 3  $\mu$ M, 30  $\mu$ M 농도로 처리한 그룹에서 억제제를 처리하지 않은 그룹에 비하여 유의적으로 증가하는 효과를 보였으며 100  $\mu$ M 처리군에서는 배반포를 형성하지 않았음 (표 34)

표 34. Effect of different concentrations of CHIR99021 treatment during in vitro culture on SCNT bovine embryo development.

Treatment	No. of oocytes examined	% Cleaved at		% Blastocysts	
		day 2	Day 6	Day 7	Day 8
0uM	103	70.3 ± ± 13.1	20.8 ± ± 3.3	26.1 ± ± 3.5	26.5 ± ± 3.5
3uM	100	80.7 ± ± 3.0	35.1 ± ± 3.8*	41.7 ± ± 3.6*	44.7 ± ± 5.0**
30uM	100	69.9 ± ± 4.2	25.1 ± ± 4.2	30.1 ± ± 4.6	40.9 ± ± 2.6*
100uM	47	34.1 ± ± 5.7*	0***	0***	0***

- GSK3 억제제를 처리한 군과 비처리군 사이에서 배반포의 총 세포 수와 세포내덩어리/총세포수 비율은 유의적 차이를 보이지 않았음 (표 35)

표 35. Effect of different concentrations of CHIR99021 treatment during in vitro culture on Cell allocation of SCNT bovine embryo.

Treatment	No. of blastocyst	ICM cells	TE cells	Total cell number	ICM:total cells
0uM	25	34.2 ± 3.1	88.5 ± 6.7	122.7 ± 9.0	27.7 ± 1.3
3uM	22	31.4 ± 2.7	94.6 ± 6.8	126.0 ± 8.8	25.0 ± 1.3
30uM	26	32.8 ± 1.9	86.3 ± 7.4	119.1 ± 8.1	29.5 ± 1.9

- TUNEL 실험을 통하여 3  $\mu$ M과 30  $\mu$ M 농도로 첨가 시 체세포 유래 배반포들에서 처리하지 않은 그룹과 비교하여 유의적으로 낮은 세포자멸사율을 나타냄을 확인하였음 (표 36; 그림 100)

표 36. Effect of different concentrations of CHIR99021 treatment during in vitro culture on apoptotic index and total cell number of SCNT bovine embryo.

Treatment	No. of blastocyst	Cell no. of blastocysts (mean ± SEM)		
		Total	Apoptotic blastomere	Apoptosis index (%)
0uM	19	85.2±9.5	14.2±1.9	16.6±1.2
3uM	14	113.9±10.8	11.9±1.9	11.1±1.4*
30uM	16	116.1±19.6	10.7±3.0	8.2±1.3 **

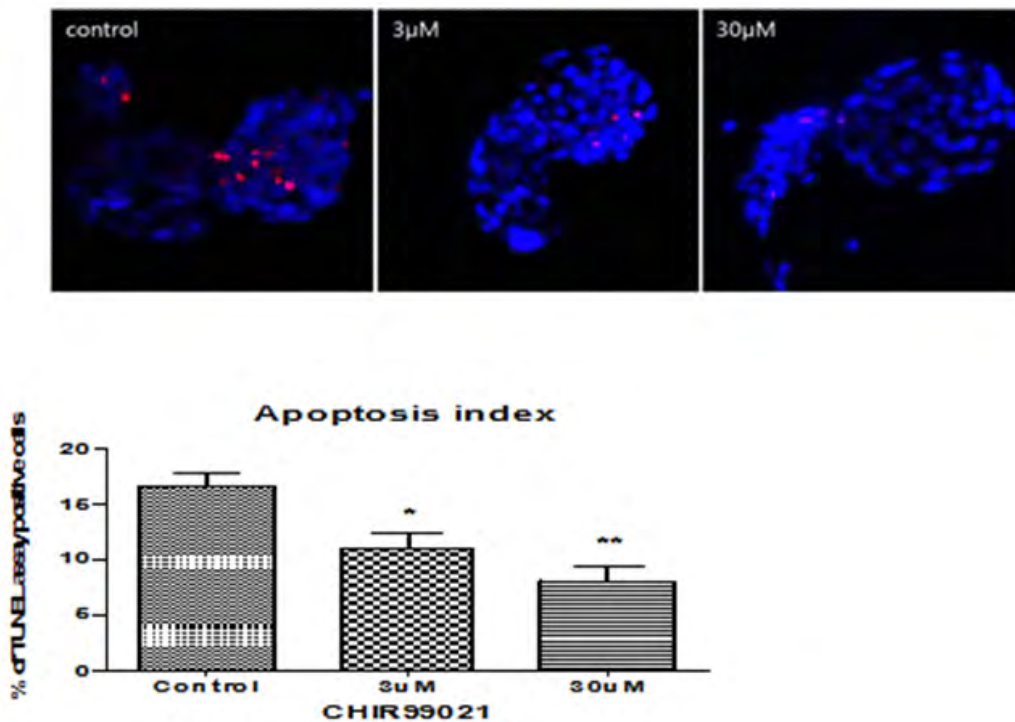


그림 100. Effect of CHIR99021 on the apoptotic status in bovine blastocysts. TUNEL assay images of bovine SCNT embryos (A). The apoptotic nuclei of TUNEL assay positive cells of blastocysts were stained red. Results are expressed as a percentage of TUNEL assay positive cells of blastocysts (B). This experiment was repeated three times. Columns marked with an asterisk indicate significant differences compared to controls (0 uM). \* = p <0.01, \*\* = p <0.001.

- 착상전 배아에서 중요하게 여겨지는 세포자멸사 (Bax, Bcl-2)와 전분화능 (Oct-4, Nanog, SOX2) 그리고 임신의 모체인식 (IFN- $\tau$ )과 배아 착상 (Cdx2)에 관련된 유전자들의 상대적인 발현량을 조사하였음 (그림 101). 배아 발달 동안 30  $\mu$ M CHIR99021을 처리한 그룹에서 다른 그룹에서 유래한 배반포들과는 달리 대부분의 유전자 발현 양상이 대조군인 체외수정 유래 배반포의 값과 유의적 차이를 나타내지 않았음. 결론적으로, 발달능의 측정과 세포자멸사의 정성 분석 그리고 상대적 mRNA 발현량 비교를 통하여볼 때, 우리는 소의 체세포 핵 이식 배아의 배양 과정 중 배양액에 30  $\mu$ M CHIR99021의 처리가 배아 발달능과 배아품질에 효과가 있음을 확인할 수 있었음.

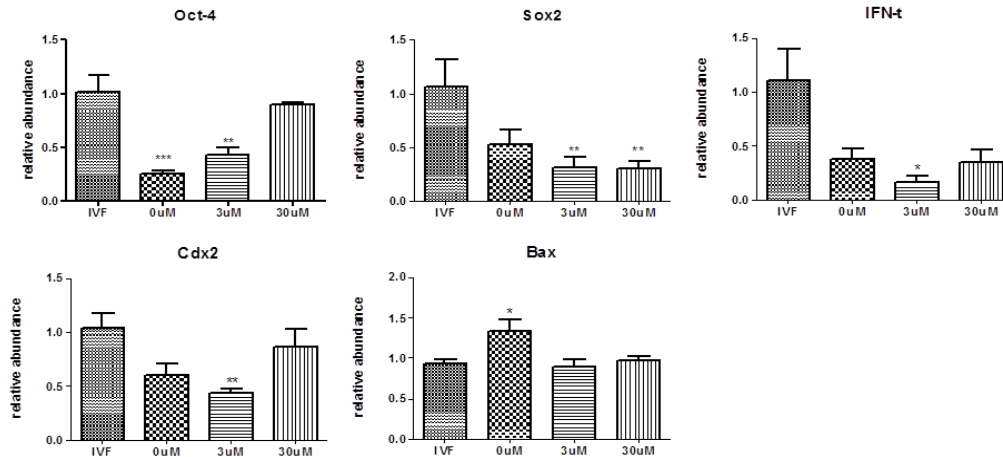


그림 101. Effect of CHIR99021 on relative abundance of various developmentally important gene transcript in bovine blastocysts. This experiment was repeated three times with  $\beta$ -actin used as the internal standard. Columns marked with an asterisk indicate significant differences compared to IVF group. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

#### 나. 전능성 줄기세포를 이용한 핵이식 배아 생산

- 전능성 줄기세포는 빠른 성장과 후생유전학적으로 재프로그래밍에 유리한 조건을 가지고 있음. 이러한 특징을 바탕으로 체외에서의 유전적 형질 변형이 용이하며 체세포 핵이식의 공여세포로 이용하였을 때, 체세포를 이용하였을 때 보다 결함이 적은 재조합 배아를 생산할 수 있고, 키메라 생산에 좀 더 유리한 조건을 갖고 있다고 알려져 있음.

##### (1) 체외수정 유래의 배아줄기세포를 공여세포로 이용한 핵이식 배아의 발달능

- 체외수정을 통해 만들어진 배아로부터 배아줄기세포를 유도하고, 이 배아줄기세포를 다시 공여세포로 이용하여 핵이식을 수행하고 섬유아세포를 이용하여 생산한 핵이식 배아와의 발달능을 비교.

##### (2) 배아줄기세포와 섬유아세포를 이용하여 생산된 배아의 발달능 비교.

###### 공여세포 준비와 핵이식

- 핵이식 과정에 이용되는 배아줄기세포는 체외수정 유래로 40-50 계대 사이의 세포주를 선택함. 배아줄기세포의 콜로니가 충분히 성장하는 단계인 배양 3-5 일에 유리 피펫을 이용하여 물리적으로 콜로니를 배양접시에서 분리함. 분리된 콜로니는 PBS 상에서 피펫팅을 통해서 남아있는 영양세포를 제거하는 과정을 거침. 이후 0.25%의 트립신을 37°C에서 2분간 처리하고 피펫팅을 거쳐서 단일 세포로 만듦. 원심분리를 통해 세포를 수득하고, 핵이식에 이용. 성체 유래의 섬유아세포는 배양 3-4일의 80% 이상의 confluency 상태에서 동일한 조건으로 트립신을 처리하고 단일세포를 수득함. 난자는 19시간 체외성숙을 거치고 제핵된 후, 5  $\mu$ g/ml의 cytochalasin B 처리 상태에서 두 종류의 공여세포를 각각 이용하여 재조합 됨. 공여세포가 주입된 난자는 2 pulses, 1.75 kV cm<sup>-1</sup>, 15  $\mu$ sec의 조건에서 전기적으로 융합됨. 1시간 뒤에 5  $\mu$ M ionomycin 처리로 4분 동안 활성화 과정을 거치고, 4시간의 1.9mM 6-dimethylaminopurine 처리 후에 mSOF 배지에서 배양됨.

(3) 재조합 배아의 융합률, 할구진행률, 배반포 발달률

- 표 37 과 그림 102 에서 나타나듯이 배아줄기세포를 이용하였을 때 섬유아세포 보다 융합률이 현저히 감소함. 융합된 배아에서 할구가 진행되는 비율은 두 그룹 사이에서 유의적 차이는 보이지 않음. 그러나, 배반포까지의 발달률은 배아줄기세포와 섬유아세포가 12.5%와 41.9%로 현저한 차이를 나타냄. 배아줄기세포를 이용한 핵이식 과정에서의 융합률 저조 현상의 원인은 크게 두 가지로 생각됨. 첫째, 배아줄기세포를 이용한 세포융합의 전기적 조건이 최적화 되지 않았을 가능성. 둘째, 체세포인 섬유아세포에 비해 세포주기가 빠른 배아줄기세포는 S기 상태의 세포가 많은 가능성. 배아줄기세포의 저조한 융합률에도 불구하고 할구 진행률은 두 그룹에서 차이가 나타나지 않았으나, 배아줄기세포 그룹에서 나타나는 낮은 배반포 발달률은 저조한 융합률에서 나타나는 최적화 되지 못한 재조합 조건에서 기인했을 가능성이 있음.

표 37. 소 배아줄기세포와 섬유아세포를 각각 공여세포로 이용하였을 때 재조합된 배아의 발달률. a, b, c, d는 각각 유의적으로 차이가 있음을 나타냄 (P<0.05).

Donor cell	No. of reconstucted embryo	No. of fused embryo (%)	No. of cleaved embryo (%)	No of blastocysts (%)
ES cell	179 (n=6)	64 (37.8) <sup>a</sup>	34 (50.7)	64 (37.8) <sup>c</sup>
Fibroblast cell	182 (n=5)	131 (76.7) <sup>b</sup>	86 (65.6)	64 (37.8) <sup>d</sup>

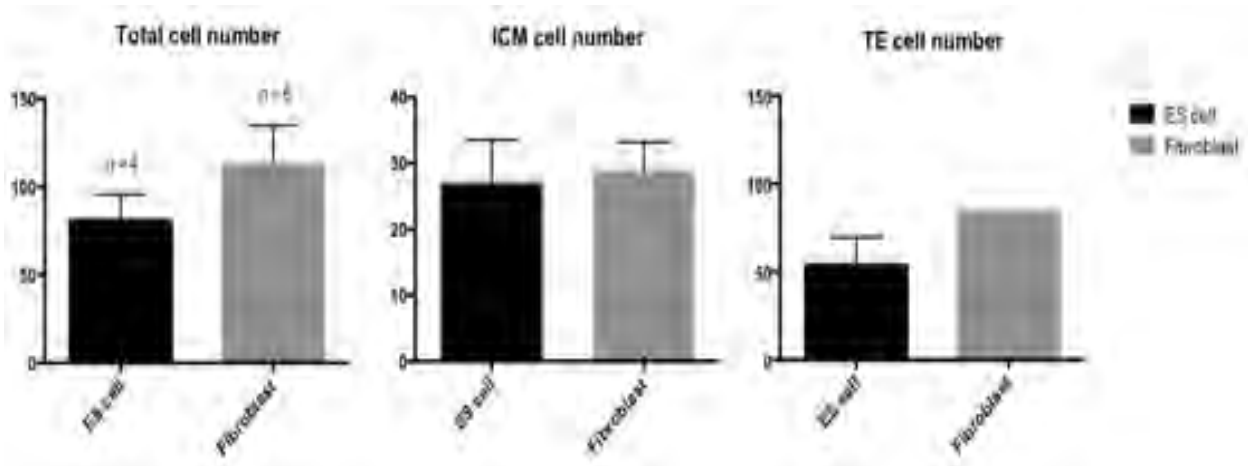


그림 102. 배아줄기세포와 섬유아세포를 이용하여 생산한 배반포의 총, ICM, TE 세포 수. (P<0.05).

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구분 연도	연구목표 및 내용	연구개발 수행 내용 및 결과	달 성 도
1차 년도 (2012)	소의 다양한 조직에서 체세포 및 성체줄기세포성 전구세포 분리유도	1. 소의 성체 및 태아의 피부, 구강 및 신경 조직에서 다양한 성체줄기세포 분리 및 배양 성공 2. 인간 치수 유래 성체줄기세포 분리 및 배양 성공 3. 마우스의 피부유래 성체줄기세포 분리 및 배양 성공	목표치 달성
	형질전환 세포를 통한 소 핵이식 배아 생산	1. 사람의 적혈구 조혈인자가 삽입된 세포를 통한 소 핵이식 배아 생산	목표치 달성
2차 년도 (2013)	다양한 인자를 통한 체세포 및 성체줄기세포의 역분화 및 교차분화유도	1. 바이러스 및 비 바이러스 방법을 이용해 초기 역분화줄기세포확립 및 성상 분석 결과 제시 2. 조정배지를 이용해 지방줄기세포를 침샘세포로 교차분화 유도 및 분석 결과 제시 3. 후성적 변화제어를 통해 전능성 유전자 증가를 확인하고 이와 관련된 유전자의 메커니즘 분석 결과 제시 4. 나노 수준의 물리적인 인자를 통한 치수유래 줄기세포의 분화 유도 및 분석 결과 제시	목표치 달성
3차년 도 (2014)	다양한 소분자물질을 이용한 전능성 줄기세포 배양 환경 조성 및 최적화	1. 15가지 이상의 소분자물질을 이용해 소 유래 전능성줄기세포 배양환경에 적용하고 최종적으로 전능성 유지에 중요한 3가지 물질, 증식에 좋은 1가지 물질을 선별하고 최적화 시킴.	목표치 달성
	수립한 만능줄기세포에의 표지유전자도입 후 배아와의 응집을 통한 키메라 배아 생산유도 및 효율성 비교	1. 생산된 소 유래 배아줄기세포를 세포막 염색 또는 Dsred유전자를 삽입해 표지후 4-,8- 또는 배반포에 삽입해 키메라 배아를 생산하고 삽입된 세포의 분포 분석 결과 제시	목표치 달성 (후속연구 진행중)
4차 년도 (2015)	각종 배아줄기세포와의 분자세포생물학 및 유전체학적인 특성 비교분석	1. 다양한 방법으로 생산된 소 유래 배아줄기세포의 성상을 검증하고 마이크로 어레이를 통한 전체적인 유전자 패턴 분석한 결과 소 고유의 전능성 메커니즘 및 특성을 확인	목표치 달성
	만능줄기세포를 공여핵으로 이용한 핵이식 배아 생산 및 체세포핵이식 배아와의 생산효율 및 특성 비교분석	1. 전능성 줄기세포를 이용한 핵이식 배아를 생산하고 일반적인 핵이식과의 융합률, 할구진행률 그리고 발달률 비교 분석 결과를 제시	목표치 달성

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 소 유래 전능성 줄기세포 확립에 있어 가장 큰 어려움은 장기 배양 및 전능성 유지였으나 본 연구에서는 세 가지 소분자 물질을 이용해 장기 배양 및 전능성 유지에 성공 했으며 확립된 소 유래 줄기세포가 기존에 보고된 사람이나 마우스 유래 줄기세포가 갖고 있는 성상과 매우 유사 함을 검증함. 이러한 내용은 소 분야의 기술발전예 크게 기여하였을 뿐만 아니라 다른 대동물 줄기세포 분야에 새로운 접근 방법을 선보임. 특히 생산된 줄기세포 수준에서 전체적인 유전자 발현 패턴을 확인해 확립된 줄기세포가 성상을 구체화 했으며 현재까지 소유래 줄기세포가 갖고 있는 한계점에 대한 원인 규명을 검증함. 또한 소유래 줄기세포의 공통적인 유전자 발현 패턴 변화를 분석해 소 유래 줄기세포만의 전능성 메커니즘을 밝히는데 추후 종간의 전능성 유지 메커니즘의 공통점 및 차이를 밝히는 연구에 이용될 수 있으며 이러한 결과는 전능성 줄기세포를 조금 더 이해하고 세포치료를 비롯한 줄기세포 이용분야 기술발전예 도움을 줄 것으로 생각됨.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문게재 성과 (SCI 급)

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	A simplified one-step nuclear transfer procedure alters the gene expression pattern and developmental potential of cloned porcine embryos	박상규	노상호 박종임		Journal of Veterinary Science	15(1)	국외	SCIE
2014	Analysis of imprinted IGF2/H19 gene methylation and expression in normal fertilized and parthenogenetic embryonic stem cells of pigs.	어경준	이창규 황우석	박치훈 최경환 박진규 정연우 노상호 현상환 신태영	Animal Reproduction Science	147(1-2)	국외	SCI
2014	A nanoscale ridge/groove pattern arrayed surface enhances adipogenic differentiation of human supernumerary tooth-derived dental pulp stem cells in vitro.	김대환	노상호	김중욱 현홍근 김기성	Archives of Oral Biology	59(8)	국외	SCI
2015	Transdifferentiation of mouse adipose-derived stromal cells into acinar cells of the submandibular gland using a co-culture system.	이진구	노상호	박상규	Experimental Cell Research	334(1)	국외	SCI
2015	Y-27632, a ROCK inhibitor, delays senescence of putative murine salivary gland stem cells in culture.	이진구	노상호	박상규	Archives of Oral Biology	60(6)	국외	SCI
2015	In vitro culture of stem-like cells derived from somatic cell nuclear transfer bovine embryos of the Korean beef cattle species, HanWoo.	김대환	노상호	박상규 정연길	Reproduction, Fertility and Development	28(*)	국외	SCI
2015	Thiazovivin, a Rho kinase inhibitor, improves stemness maintenance of embryo-derived stem-like cells under chemically defined culture conditions in cattle.	박상규 김대환	노상호	정연길	Animal Reproduction Science	161(1)	국외	SCI
2015	Murine somatic cell nuclear transfer using reprogrammed donor cells expressing male germ cell-specific genes.	강호인	노상호	박종임	The Journal of Veterinary Medical Science	78(1)	국외	SCI

2. 논문게재 성과 (일반)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Modification of Pluripotency and Neural Crest-Related Genes' expression in Murine Skin-Derived Precursor Cells by Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	박상규	노상호	-	International Journal of Oral Biology	37(4)	국내	비SCI
2012	Somatic cell nuclear transfer in rodents, the little big animals	노상호	-	-	Journal of Embryo Transfer	27(4)	국내	비SCI
2012	Comparison of three different culture systems for establishment and long-term culture of embryonic stem-like cells from <i>in vitro</i> -produced bovine embryos	김대환	노상호	박상규	Journal of Embryo Transfer	27(3)	국내	비SCI
2012	Pluripotin (SC-1) 처리를 통한 단위발생 마우스 배아줄기세포 생산효율 향상	강호인	노상호	-	Journal of Embryo Transfer	27(3)	국내	비SCI
2013	Effect of nanoscale ridge/groove pattern arrayed surface on <i>in vitro</i> differentiation of multi-potent pulp cells derived from human supernumerary teeth	김대환	노상호	조환성 이진구 김기성	International Journal of Oral Biology	38(4)	국내	비SCI
2014	Comparison of Various Transfection Methods in Human and Bovine Cultured Cells	김용훈	노상호	김대환	International Journal of Oral Biology	39(4)	국내	비SCI
2014	Combined treatment of Activin A and Heparin binding-EGF (HB-EGF) enhances <i>in vitro</i> production of bovine embryos	김세웅	노상호	정연길 박종임	Journal of Embryo Transfer	29(2)	국내	비SCI
2014	3-hydroxyflavone in maturation medium supports <i>in vitro</i> development of fertilized bovine oocytes	김세웅	노상호	박종임 정연길	Reproductive and Developmental Biology	38(4)	국내	비SCI
2014	Comparison of two different serum-free media for <i>in vitro</i> culture of bovine embryos	김세웅	노상호	정연길 박종임	Journal of Embryo Transfer	29(3)	국내	비SCI



## 1. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	소의 배아줄기세포 배양액 및 이를 이용한 배양방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2012-0145527	2015	소의 배아줄기세포 배양액 및 이를 이용한 배양방법	서울대학교 산학협력단	한국	101490229

## 2. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
5		5			4	1	5		

## 제 2 절 성과활용계획

### 1. 실용화, 산업화 및 교육지도 홍보 등 기술 확산 계획

- 가. 한우에서 배아줄기세포를 이용한 유전자원 보존기법개발로 새로운 한우유전자 관리시스템 구축 (embryo and stem cell banking)
- 나. 한우유전자 관리시스템을 통해 보존된 우량 유전자 줄기세포를 통해 손쉬운 품종개량 시도
- 다. 한우유전자 관리시스템을 통해 우량 유전자 연구를 통해 질병연구 및 특정질병에 강한 한우개량 시도
- 라. 산업체, 학계 및 지방자치단체의 협업에 의한 농축산 기술 증진 및 고급연구인력 생산을 통한 국내 및 국제 경쟁력 강화
- 마. 연구를 통한 기술 및 특허를 기업과 공유해 농·축산업에 접목해 실용화 구현

### 2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 가. 예정된 특허 및 논문은 앞의 연구성과 항목에 세부적으로 나열하였음.
- 나. 확보한 소 전능성줄기세포주를 추가적인 검증과정을 거쳐 세포주은행에 등록예정.

### 3. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 가. 현재 ‘첨단 배양 및 보존기법을 활용한 소 수정란 이식 효율 개선’ 이라는 제목으로 2016 년도부터 기업과 함께 본 연구에서 개발한 특허를 기반으로 소 수정란을 실온에서 보관할 수 있는 보존액 개발에 참여하고 있으며 이러한 추가적인 연구를 통해 본 연구에서 개발한 기술을 실용화 및 산업화에 활용할 계획임.
- 나. 본 연구를 통해 현재까지 밝혀진 소 전능성줄기세포 특성 정보를 바탕으로 안정적인 소 전능성줄기세포를 확립 연구를 지속할 계획임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제를 수행하며 관련연구로 상호교류하게 된 호주 모나시대학교의 세포재프로그래밍/줄기세포 연구그룹과 소 배아줄기세포 및 만능줄기세포와 관련된 정보교환을 수행하였으며 후속 연구를 통해 추가적인 공동연구 및 관련자료 교류를 실행중임. 특히 호주 연구진이 최초로 발표한 소의 유도만능줄기세포 확립 및 유지관련 노하우 및 기술을 연구원의 현지방문을 통해 공유하였음

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

-해당사항 없음

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

### 가. 연구실 안전조치 이행계획

서울대학교 환경안전원의 아래 지침에 따라 연구실을 운영하고 있음.

#### 가-1. 연구활동종사자 환경안전교육 실시

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「환경안전관리규정」에 의거 연구활동종사자를 대상으로 실험실 안전환경 조성 및 사고예방을 위한 환경안전교육 실시

##### 1) 정기 교육

이공계 및 미술대 대학원 신입생을 대상으로 년2회 집체교육 실시

- 기간 : 2월, 8월

- 대상 : 이공계 대학원생, 연구원 및 미술대학 대학원생

- 내용 : 환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)

##### 2) 온라인 교육

정기교육을 수강하지 못한 연구활동종사자를 대상으로 온라인 안전교육 실시

- 기간 : 3월, 9월

- 대상 : 이공계 대학원생, 연구원 및 미술대학 대학원생

- 내용 : 환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)

##### 3) 수시 교육

실험실 사고 발생, 신입 연구원 채용 등 실험실 안전교육이 필요시 기관의 요청에 의해 실시

#### 가-2. 실험실 안전점검 실시

연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 의거 이공계 대학, 연구소 실험실 및 미술대학 작업장을 [표1]과 같이 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

[표1] 안전점검 실험실 수

A유형 실험실	B유형 실험실	C유형 실험실	D유형 실험실	합계
328	364	269	292	1,253

\* 실험실 분류 기준 :

A형 : 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실

B형 : 화학약품 등을 사용하는 실험실

C형 : 기계·전기 설비 등을 사용하는 실험실

D형 : 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실

#### 가-3. 실험실 안전사고 대응 및 예방

실험실에서 발생하는 안전사고에 적절히 대응하여 그 피해를 최소화 하고 유사사고 방지를 위해 대책을 수립

##### 1) 화학약품 누출 대응 장비함 설치

화학약품 누출 및 폐수용기 폭발 등의 사고 발생 시 신속한 대응 및 확산방지를 위해 화학약품 누출대응 장비함을 설치

- 설치수량 : 34개(자연대 외 16개 기관)

- 비치장비 : 케미컬 흡착재, 보호장갑, 마스크 등 8종

##### 2) 실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시

실험실 안전사고 대응 및 처리 매뉴얼 「붙임2」에 따라 사고 전파, 조치하며 실험실 안전사고 대응훈련을 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상

- 실험실 안전사고 대응조직



3) 실험실 사고사례 전파

실험실 안전사고에 대한 경각심을 높이고 유사사고 예방하기 위해 국·내외 대학과 연구기관에서 발생하는 사고를 수집하여 학내 대학원생 및 연구원 등 연구활동종사자에게 이메일을 통해 전파

4) 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포

실험실사고 발생시 신속하고 정확하게 처리할 수 있도록 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작배포

가-4. 생물(LMO) 실험실 안전관리

「유전자변형생물체 국가간 이동 등에 관한 법률(2008.1)」 과 보건복지부 「실험실 생물안전지침 (2006.12)」 에 따라 실험실내 생물안전 확보를 위하여 생물실험에 대한 신고·허가/안전교육/안전점검을 '서울대학교 생물안전관리' 체계에 따라 운영

1) 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

- 기간 : 2월 ~ 8월
- 대상 : 생물안전등급 2등급 이상 연구활동종사자
- 내용 : 생물안전에 관한 이론교육(3시간) 및 실무교육 병행

2) LMO 실험실 안전점검

2등급 이상 생물안전연구시설(LMO)에 대하여 교과부와 공동으로 점검 실시 및 점검 후 개선여부 확인

가-5. 방사선 실험실 안전관리

방사선물질 취급 연구활동종사자 및 실험실 안전관리를 위해 교육, 점검, 관리 프로그램 구축

1) 방사선 안전교육

- 기간 : 2월
- 대상 : 방사선물질 취급 연구활동종사자
- 내용 : 방사선안전이론교육(6시간)과 방사선취급 실습교육 병행

2) 방사선 실험실 안전점검

방사선사용 장소에 대한 정밀안전점검을 실시하여 현장 안전지도 활동 확대

- 기간 : 5월, 10월
- 실시자 : 환경안전원 방사선 안전관리자
- 내용 : 방사선안전점검 표준지침서에 따라 전용장비를 이용하여 점검

3) 방사선안전관리 프로그램 구축

- 방사선피폭(사고)으로 인한 건강상의 영향을 평가하고 이상 시 대처할 수 있는 비상대응 체계 운영
- 방사선안전 사고사례 및 유사사고 방지대책을 신속하게 전파할 수 있는 온라인정보공유시스템 구축
- 방사선물질의 구매, 보관, 사용, 폐기 추적관리 프로그램 개발, 불법유통으로 인한 방사선사고 예방

가-6. 실험실 환경개선사업 실시

실험실내 화학약품은 대부분 개방형 시약장에 보관되고 있어 실내 공기오염이 가중되어 연구활동종사자의 건강을 위협받고 있으며 또한 인화성물질을 실험실내 다량 보관하고 있어 화재시 대형화재로의 위험이 높아 교과부에서 지원하는 실험실 환경개선사업을 통해 밀폐형시약장과 인화성 화학약품 저장 캐비닛을 각 기관에 배포하여 실험실 환경을 개선하도록 유도

가-7. 실험폐기물관리 강화

1) 실험폐수 관리강화 및 발생 저감 노력

실험실에서 발생하는 실험폐수 관리를 위해 처리의뢰부터 반출까지의 이력을 추적 관리하는 실험폐수처리 의뢰 프로그램 구축 및 실험폐기물 발생 저감을 위해 환경안전교육 실시

2) 방사성폐기물 관리강화

- 방사성폐기물의 분류항목을 보다 세분화하고, 현장 안전점검을 강화하여 방사성폐기물 발생 최소화
- 방사선이용 분야별 표준실험절차서를 개발·보급하여 불필요한 방사성폐기물 발생 방지

3) 생물(의료)폐기물 관리강화

- 생물(의료)폐기물의 수집 및 분류에 관한 교육실시 및 에어로졸 발생 최소화를 위한 용기덮개 배포

가-8. 공기오염도 조사 실시

연구·실험실내 공기오염도 조사를 통해 부적합 실험실에 대하여 환경개선을 기관에 요청하여 안전하고 쾌적한 실험실 환경을 구축

- 기간 : 9월 ~ 12월
- 대상 : 학내 연구·실험실 중 예비조사를 통해 대상자 선정
- 내용 : 미세먼지, 휘발성유기화합물, 포름알데히드, 이산화탄소 등 7가지 항목

가-9. 실험실 통합관리 프로그램 구축

기관별, 건물별, 층별, 실험실별로 위험요소 파악 및 안전관리 현황을 용이하게 파악하여, 실험실 안전사고를 예방하고, 쾌적한 실험실 환경을 조성 하고자 함

- 관악/연건 1,500여개 실험실 대상 기관별, 건물별, 층별, 실험실별 위험지도(Campus hazard map) 작성
- 위험요소 현황파악 및 실험실 안전점검에 활용
- 위험구역 대상 중점 관리구역 설정
- 화학물질관리시스템 구축
- 폐수 관리 시스템 구축
- 화재 등 사고발생 시 위험물질 정보 제공

가-10. 연구활동종사자 특수건강검진 실시

연안법 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시

가-11. 연구활동종사자 보험가입

- 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함
- 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제14조 제1항 및 시행령 제15조 제1항에 의거 의무적 가입
- 가입회사 : 교육시설재난공제회
- 가입대상 : 학부생, 대학원생, 연구원(보조연구원 포함)

나. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

시설번호	제LML11 - 73호	안전관리 등급	2등급
수입신고 (최근 1년간)		없음	

다. 유기용매 및 휘발성 화합물 관리개선 사례

1. 유기 용제가 튀어 눈에 들어감

전



후



변경전: 기존에 유기용매 등 옮기거나 따를 때, 장갑만 끼고 사용함

변경후: 실험복, 보안경, 마스크 구매하여 착용하고 실험 및 유기용매 취급

2. 휘발성 화합물의 직사광선 혹은 보관 용기 손상으로 누출 위험

전



후



변경전: 기존 전용용기가 아닌 곳에 유기 용매를 보관 하여 보관 용기가 손상 된 모습.

변경후: 이후 화학 용액 전용 보관 캐비닛 및 전용 용기에 담아 직사광선이 닿지 않는 곳에 보관.

## 제 9 장 참고문헌

1. Brinkhof, B., van Tol, H.T., Groot Koerkamp, M.J., Riemers, F.M., SG, I.J., Mashayekhi, K., Haagsman, H.P., and Roelen, B.A. (2015). A mRNA landscape of bovine embryos after standard and MAPK-inhibited culture conditions: a comparative analysis. *BMC genomics* *16*, 277.
2. Denicol, A.C., Dobbs, K.B., McLean, K.M., Carambula, S.F., Loureiro, B., and Hansen, P.J. (2013). Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. *Sci Rep* *3*, 1266.
3. Dyce, P.W., Li, D., Barr, K.J., and Kidder, G.M. (2014). Connexin43 Is Required for the Maintenance of Multipotency in Skin-Derived Stem Cells. *Stem cells and development* *23*, 1636-1646.
4. Furusawa, T., Ohkoshi, K., Kimura, K., Matsuyama, S., Akagi, S., Kaneda, M., Ikeda, M., Hosoe, M., Kizaki, K., and Tokunaga, T. (2013). Characteristics of bovine inner cell mass-derived cell lines and their fate in chimeric conceptuses. *Biology of reproduction* *89*, 28.
5. Huang, X., Han, X., Uyunbilig, B., Zhang, M., Duo, S., Zuo, Y., Zhao, Y., Yun, T., Tai, D., Wang, C., *et al.* (2014). Establishment of Bovine Trophoblast Stem-Like Cells from In Vitro-Produced Blastocyst-Stage Embryos Using Two Inhibitors. *Stem cells and development*.
6. Kawaguchi, T., Tsukiyama, T., Kimura, K., Matsuyama, S., Minami, N., Yamada, M., and Imai, H. (2015). Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. *PLoS one* *10*.
7. Kim, M.S., Kim, A.Y., Jang, K.J., Kim, J.H., Kim, J.B., and Suh, K.Y. (2011). Effect of nanogroove geometry on adipogenic differentiation. *Nanotechnology* *22*, 494017.
8. Lin, Y.C., Kuo, K.K., Wuputra, K., Lin, S.H., Ku, C.C., Yang, Y.H., Wang, S.W., Wang, S.W., Wu, D.C., Wu, C.C., *et al.* (2014). Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Are More Resistant to Apoptosis than Testicular Cells in Response to Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate. *Int J Mol Sci* *15*, 5011-5031.
9. Madeja, Z.E., Sosnowski, J., Hryniewicz, K., Warzych, E., Pawlak, P., Rozwadowska, N., Plusa, B., and Lechniak, D. (2013). Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC developmental biology* *13*.
10. McLean, Z., Meng, F., Henderson, H., Turner, P., and Oback, B. (2014). Increased MAP kinase inhibition enhances epiblast-specific gene expression in bovine blastocysts. *Biology of reproduction* *91*, 49.
11. Pashaiasl, M., Khodadadi, K., Richings, N.M., Holland, M.K., and Verma, P.J. (2013). Cryopreservation and long-term maintenance of bovine embryo-derived cell lines. *Reproduction, fertility, and development* *25*, 707-718.
12. Peng, R., Yao, X., Cao, B., Tang, J., and Ding, J. (2012). The effect of culture conditions



on the adipogenic and osteogenic inductions of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. *Biomaterials* *33*, 6008-6019.

13. Schiffmacher, A.T., and Keefer, C.L. (2013). CDX2 regulates multiple trophoblast genes in bovine trophoblast CT-1 cells. *Mol Reprod Dev*.
14. Shu, B., Xie, J.L., Xu, Y.B., Yu, J.X., Shi, Y., Liu, J., Wang, P., Liu, X.S., and Qi, S.H. (2014). Directed differentiation of skin-derived precursors into fibroblast-like cells. *Int J Clin Exp Pathol* *7*, 1478-1486.
15. Verma, V., Huang, B., Kallingappa, P.K., and Oback, B. (2013). Dual kinase inhibition promotes pluripotency in finite bovine embryonic cell lines. *Stem Cells Dev* *22*, 1728-1742.
16. Wang, P.Y., Li, W.T., Yu, J., and Tsai, W.B. (2012). Modulation of osteogenic, adipogenic and myogenic differentiation of mesenchymal stem cells by submicron grooved topography. *Journal of materials science Materials in medicine* *23*, 3015-3028.
17. Wang, S.W., Wang, S.S., Wu, D.C., Lin, Y.C., Ku, C.C., Wu, C.C., Chai, C.Y., Lee, J.N., Tsai, E.M., Lin, C.L., *et al.* (2013). Androgen receptor-mediated apoptosis in bovine testicular induced pluripotent stem cells in response to phthalate esters. *Cell death & disease* *4*, e907.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.