

유전자변형 다분화능 정원줄기세포를 이용한 키메라 생쥐의 생산

임정은¹ · 엄진희^{1,2} · 김형준² · 박재균² · 이현정² · 이동률^{1,2*}

¹차의과학대학교 의생명과학과, ²차병원 여성의학연구소

Production of Chimeric Mice Following Transgenesis of Multipotent Spermatogonial Stem Cells

Jung Eun Lim¹, Jin Hee Eum^{1,2}, Hyung-Joon Kim², Jae Kyun Park²
Hyun Jung Lee² and Dong Ryul Lee^{1,2*}

¹Dept. of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seoul 135-081, Korea

²Fertility Center of CHA Gangnam Medical Center, College of Medicine, CHA University, Seoul 135-081, Korea

ABSTRACT : Multipotent spermatogonial stem cells (mSSCs), derived from uni-potent SSC, are a type of reprogrammed cells with similar characteristics to embryonic stem cells (ESCs). The aim of this study was to evaluate the potential for transgenesis of mSSC derived from outbred mice and the production of transgenic animal by the mSSC-insertion into embryo. mSSCs, established from outbred mice (ICR strain) in the previous study, were maintained and then transfected with a lenti-viral vector expressing green fluorescent protein (GFP), CS-CDF-CG-PRE. Embryonic stem cells (ESCs) were derived from inbred transgenic mice (C57BL/6-Tg (CAG-EGFP)) and were used as an experimental control. Transfected mSSCs were well proliferated *in vitro* and maintained their characteristics and normal karyotype. Ten to twelve mSSCs and ESCs were collected and inserted into perivitelline space of 8-cell mouse embryos, and then transferred them into uteri of poster mothers after an additional 2-days of culture. Percentage of mSSC-derived offsprings was 4.8% (47/980) and which was lower than those (11.7% (67/572)) of ESC-derived ones ($P<0.05$). However, even though different genetic background of mSSC and ESC origin, the production efficiency of coat-colored chimeric offspring in mSSC group was not different when compared it with ESC (6.4% (3/47) vs. 7.5% (5/67)). From these results, we confirmed that mSSC derived from outbred mice has a pluripotency and a potential to produce chimeric embryos or mice when reaggregation with mSSC is performed.

Key words : Multipotent spermatogonial stem cells, Transgenic mice, Outbred strain.

요약 : 다분화능 정원줄기세포의 장기간 체외배양 중에 확립되는 다분화능 정원줄기세포는 배아줄기세포와 유사한 특성을 가져 3배엽성 세포로 체외분화가 가능하며 기형종을 형성할 수 있다. 본 연구에서는 선행 연구를 통해 outbred 생쥐 (ICR strain)로부터 확립된 다분화능 정원줄기세포의 형질전환 가능성을 확인하며, 배아 내로 주입하여 유전적 키메라를 형성하는 효율을 배아줄기세포와의 비교를 통하여 검증하고자 하였다. 다분화능 정원줄기세포를 넣은 배아로부터 태어난 산자는 총 47마리(4.8%)가 태어나, 67마리(11.7%)가 태어난 배아줄기세포군에 비해 그 효율이 낮았다($P<0.05$). 그러나 산자들 중의 키메라 생쥐의 비율은 다분화능 정원줄기세포 군으로부터 3마리(6.4%)가 태어나 배아줄기세포 군으로부터 태어난 5마리(7.5%)와 유사하였다($P>0.05$). 태어난 유전자변형 생쥐의 장기를 확인한 결과, 췌장, 심장, 뇌, 근육, 위, 피부, 정소에 GFP가 발현되는 것을 확인하였다. 또한 배아의 근육, 위, 뼈 등에서 anti-GFP 항체의 발현을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면 outbred 생쥐로부터 확립된 다분화능 정원줄기세포가 inbred 생쥐로부터 확립된 배아줄기세포와 마찬가지로 키메라 생쥐를 생산할 수 있는 전분화능을 가짐을 확인하였고, 새로운 유전자변형 동물의 생산을 위한 매개체로서의 가능성을 가진 것으로 여겨진다.

* 교신저자: 서울시 강남구 역삼동 606-5 차의과학대학교 강남차병원
여성의학연구소. (우) 135-081, (전) 02-3468-3421, (팩) 02-3468-2610,
E-mail: drleedr@cha.ac.kr

서 론

기존에 알려지지 않은 유전자의 특성과 기능을 연구하는데 있어 유전자변형동물의 제작은 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으며, 실제로도 가장 널리 사용되고 있다. 유전자변형동물의 생산에는 유전자를 조작하는 기술과 조작된 유전자를 전달하는 기술이 필수적이다. 우선, 유전자의 기능을 연구하기 위한 조작에는 유전자를 과발현시키는 방법과 유전자를 불활성화시키는 knock-out, 대체시키거나 추가하는 knock-in 기술들이 주로 이용되고 있다. 그리고 조작된 유전자의 전달을 위해서는 유전자 벡터를 수정란의 웅성전핵(male pronucleus)에 주입하거나 조작된 유전자를 가진 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)를 배아에 주입하여 유전적 키메라를 만드는 방법이 일반적으로 이용되고 있다(Poueymirou et al., 2007). 웅성전핵에 유전자를 주입하는 방법은 유전자의 과발현에 널리 사용되고 있으나, 그 효율이 저조한 단점이 있다(Wall, 2001). 한편, 배아줄기세포는 전분화능(pluripotency)을 가지며, 체외배양과 분화를 통해서 3배엽으로 분화가 가능하고, 특히 포배기 배아에 주입되었을 때 배아의 발생에 참여할 수 있는 특성을 가지기 때문에 유전자변형동물의 생산에 많이 사용되고 있다. 하지만 배아줄기세포는 그들의 유전적 배경에 따라서 확립되는 효율이 매우 다양하며, 배아 내에 주입되었을 때 생식계통으로의 전이효율(germ-line transmission) 또한 그 차이가 매우 심하다. 따라서 일반적으로 유전자변형생쥐의 생산에 가장 널리 사용되는 배아줄기세포는 129 strain과 같은 유전적 동질성이 높은 특정 inbred strain 또는 특정종의 혼합종(hybrid)에서 유래된 것을 선호한다(Ware et al., 2003; Schoonjans et al., 2003; Eggan et al., 2001). 실제로 유전적 동질성을 가진 inbred strain 안에서의 homologous recombination의 효율은 비동질성 종간에 비해 20배 정도 높은 것으로 알려져 있다(Te Riele et al., 1992). 이에 반해 유전적 동질성이 낮은 outbred strain의 생쥐는 유전적인 동질성이 낮은 대동물이나 인간 연구의 연구모델로 유리한 실험동물이나, 이러한 특징 때문에 상대적으로 배아줄기세포의 확립효율이 매우 저조하며, 또한 유전자변형동물의 생산에도 도입하였을 때에는 생식계통으로의 전이효율 역시 매우 저조한 것으로 알려져 있다(Suzuki et al., 1999).

Kanatsu-Shinohara 등(2004)은 정자를 생산하는 미성숙 생쥐의 정원줄기세포(spermatogonial stem cell, SSC)의 장기

간 배양 중에 배아줄기세포와 유사한 특성을 가진 세포를 분리하였고, 이들을 배아줄기세포 배양환경에서 장기간 배양에 성공하였다. 이러한 줄기세포는 다분화능 정원줄기세포(multipotent spermatogonial stem cell, mSSC)로 명명되었고, 3배엽성 세포로의 체외분화와 기형종(teratoma) 형성, 키메라의 생산 성공을 통해 전분화능을 가진 것으로 확인되었다. 그리고 Guan 등(2006)과 Seandel 등(2007)은 성체생쥐의 정소 내에서도 이러한 다분화능 정원줄기세포의 분리과 증식의 성공을 보고한 바 있다. 한편, Shinohara와 연구진들은 배아줄기세포의 특성을 가진 다분화능 정원줄기세포를 이용한 유전자변형동물의 생산기법의 개발에 성공하였고, 장기간 배양이 어렵고 증식속도가 느린 단점으로 인해 형질전환에 어려움을 가졌던 정원줄기세포에 비해 유전자변형동물의 생산 효율이 증진되었음을 보고한 바 있다(Kanatsu-Shinohara et al., 2006; Takehashi et al., 2007). 그러나 다분화능 정원줄기세포는 배아줄기세포와 유사한 특징을 가지면서 미성숙 또는 성체의 정소 내에서 분리가 가능하여 응용범위가 넓고 특히 면역적합성을 맞추기에 용이한 장점을 가지는데 반해, 정소 내 다른 세포들에 비해 그 수가 매우 적어 그들의 분리 및 회수가 어려운 특징을 가진다. 따라서 기존의 연구에서는 다분화능 정원줄기세포가 소수의 특정 inbred strain이나 정원줄기세포의 마아커에 report system을 가진 형질전환생쥐에서만 용이한 단점을 가지고 있었다.

본 연구진은 선행 연구를 통하여 임상적 적용 가능성을 증진시키기 위해 가장 실험에 널리 사용되는 outbred wild type인 Institute of Cancer Research(ICR) strain의 생쥐로부터 유전자의 조작 없이 배양법만을 이용하여 2종의 다분화능 정원줄기세포주의 확립에 성공하였다(Kim et al., 2009). 따라서 본 연구에서는 lentiviral transfection에 의한 outbred strain에서 확립된 다분화능 정원줄기세포주의 형질전환과 배아 내 주입을 통한 키메라의 생산을 통해 전분화능을 확인하고 유전자변형동물의 생산 가능성을 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에 사용된 실험동물은 항온 및 항습이 유지되면서 낮밤(낮 12시간, 밤 12시간)이 조절되는 사육실에서 사육하였다. 동물 실험은 차의과학대학교 동물실험윤리위원회의 승

인 하에 진행하였다.

2. 다분화능 정원줄기세포의 배양 및 형질전환

본 연구는 동결보관되어 있던 5일령 ICR strain 생쥐의 태아(fetus)의 정소로부터 유래된 다분화능 정원줄기세포주(ChamSSC-1, Passage No.6)를 공급받아 해동 후 배양하여 진행하였다(Kim et al., 2009). 유전자변형동물의 생산 가능성을 연구하기 위한 모델로서 본 연구진은 lentivirus system을 이용하여 outbred strain에서 확립된 다분화능 정원줄기세포를 형질전환하였다.

연구에 사용된 lentiviral 벡터는 Hiroyuki Miyoshi 박사(Riken Tsukuba Institute, Ibaraki, Japan)로부터 공여 받은 CS-CDF-CG-PRE 플라스미드(Fig. 1)를 사용하였고, packaging 벡터로는 pMDLg/pRRE를, envelop으로는 pCMV-VSV-G-RSV-Rev를 사용하였으며, 4인산2칼슘 침전법을 이용했다. 세 플라스미드를 packaging 세포가 있는 완충액에서 4인산2칼슘 침전법으로 침전시키고 16시간 이후 배양액을 교체하였다. 48시간 후에 다시 상층배양액을 회수하여 이를 0.22 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA)로 필터한 후에 초고속원심분리기를 이용해 50,000 \times g에서 150분간 4 $^{\circ}$ C에서 농축하였다. Viral pellet을 배양액으로 희석한 후 다분화능 정원줄기세포의 배양액에 첨가하였다. 배양 48시간 후에 GFP의 발현을 형광현미경 하에서 관찰하였다. 바이러스는 배양액을 교

체하기 전까지 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C에서, 배양액을 교체하고 회수하기 전까지는 10% CO₂와 37 $^{\circ}$ C 온도 하에서 배양하였다.

또한 본 연구에 대조군으로 사용된 생쥐 배아줄기세포는 green fluorescence protein(GFP)이 항상 발현되는 형질전환 생쥐(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP), Japan SLC, Inc)의 배아로부터 회수된 내세포괴(inner cell mass)로부터 분리, 배양하여 사용하였다. 생쥐의 미분화 다분화능 정원줄기세포와 배아줄기세포는 0.1% 젤라틴(Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA)이 코팅된 배양접시 위에 mitomycin-C(Sigma)가 처리된 mouse embryonic fibroblast(MEF) 세포 위에서 배양하였으며, 3~4일마다 새로운 MEF 위로 계대배양을 하였다. 다분화능 정원줄기세포와 배아 줄기세포의 배양에는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) high glucose (Hyclone, Logan, UT, USA)에 20% Knockout serum replacement(KSR, GIBCO, Grand Island, NY, USA)와 1x non-essential amino acid(GIBCO), 50 μ m β -mercaptethanol(GIBCO), 100 U/ml penicillin(Hyclone), 100 μ g/ml streptomycin(Hyclone), 10³ U/ml ESGRO(Cemicon, Temecula, CA, USA)가 포함된 배양액을 사용하였고, 모든 줄기세포 배양은 100% 습도와 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 배양기 내에서 진행되었다.

3. 줄기세포의 특성 확인 및 핵형 분석

배양 중인 다분화능 정원줄기세포와 배아줄기세포의 일부를 채취하여 4% paraformaldehyde(PFA) 용액에 10분 동안 고정하고, 염색할 때까지 4 $^{\circ}$ C의 PBS에 보관하였다. 염색을 위해서 PBS를 이용하여 세척하고 proteinase K(Dako North America, Inc. Carpinteria, CA, USA) 용액을 15분간 처리하였다. 그리고 상온에서 1시간 동안 protein block 용액(Dako North America, Inc.)에 blocking하였다. 미분화 세포의 특성 확인을 일차항체로 rabbit polyclonal anti-Nanog(1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), mouse monoclonal anti-Oct4(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 4 $^{\circ}$ C에서 17~24시간 동안 처리하였다. 2차 항체로는 Alexa fluor 555[®] goat anti-rabbit IgG(H+L)(1:400, Invitrogen, Eugene, OR, USA), Cy3[®] goat anti-mouse IgG(H+L)(1:200, Invitrogen)을 사용하였다. 그리고 핵의 대조 염색을 위해 DAPI (Chemicon)를 1:500으로 희석하여 사용하였다. 또한 전분화능의 또 다른 마커인 alkaline phosphatase(AP; Sigma-Aldrich)도 염색하였다. 염색이 완료된 세포는 형광현미경(NIKON

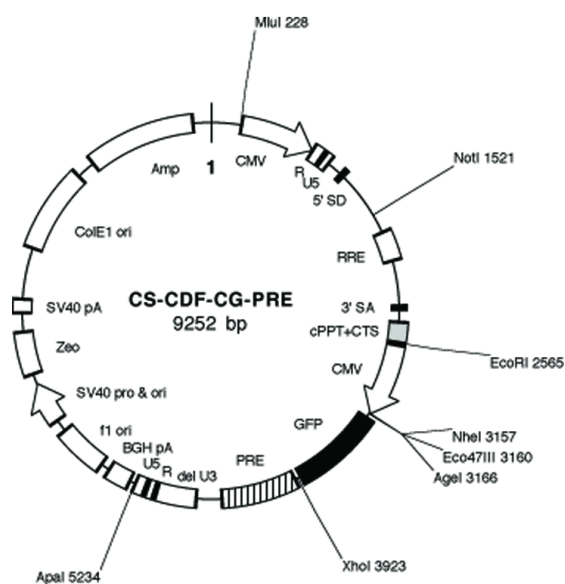


Fig. 1. Lentiviral vector constructs (pCS-CDF-CG-PRE construct).

Eclipse TE-2000 U, Nikon, Tokyo, Japan) 하에서 관찰하였다.

핵형 분석을 위해서 증식 중인 세포를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ KaryoMAX colcemid(Invitrogen)를 처리하여 2시간 배양하고, 37°C에서 저장액(1% sodium citrate)에 30분간 처리한 후 Carnoy 고정액(3:1 methanol : acetic acid)에 resuspension 하여 4°C에 보관하였다. 염색체의 분석은 전문검사 기관(네오딘의학연구소, Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다.

4. 배아의 획득과 배양

2-세포기 배아를 채취하기 위해 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG; Sigma)와 5 IU human chorionic gonadotropin(hCG; Sigma)를 48시간 간격으로 4주령 B6D2F1 strain 생쥐의 복강 내에 주사하여 과배란을 유도한 뒤 B6D2F1 strain 수컷과 합사시키고, 다음 날 아침 질전을 확인하였다. hCG 주사 후 48시간째에 난관을 채취하여 modified human tubal fluid medium(HTF; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) 내에서 난관의 팽대부를 통한 관류법으로 배아를 회수하였다. 배아의 기본배양액으로 Quinn's Advantage Cleavage medium(SAGE In-Vitro Fertilization, Inc., Tumbull, CT, USA)과 potassium simplex optimization medium-amino acids(KSOM/AA, Millipore)을 사용하였다. 4-well 배양 접시에 50 μl 의 배양액 소적을 만들고 oil(SAGE In-Vitro Fertilization, Inc., Trumbull, CT)을 덮어 2-세포기 배아를 그 속에 넣어 배양하였다.

5. 미세조작과 배아 이식

다분화능 정원줄기세포를 이용한 유전자변형동물의 생산 가능성을 확인하기 위해서 체외배양을 통해 2-세포에서 8-세포기로 발생한 배아에 형질이 전환된 다분화능 정원줄기세포를 미세주입하였다. 8-세포기 배아를 holding pipette으로 잡고 위관강(perivitelline space) 내에 injection pipette을 이용하여 10개 전후의 줄기세포를 주입하였다. 주입이 완료된 배아는 배아배양액에 4%의 배아줄기세포 배양액이 첨가된 배양액에서 배반포기까지 발달시키고(Ramirez et al., 2009), 2.5 dpc의 ICR strain 생쥐 대리모 자궁 내로 이식하였다. 키메라 생쥐의 형질전환을 확인하기 위해 임신 18일에 회수된 태아와 정상 분만된 생쥐를 이용하여 조직절편을 제작하였고, anti-GFP antibody(Millipore)를 이용한 후 염색하여 관

찰하였다.

6. 통계분석

배아이식 후 생산되는 산자와 그 중 키메라 생쥐의 생산효율의 비교는 Chi-square 검정을 이용하였으며, $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

연구의 진행에 앞서 연구에 사용될 GFP 유전자가 형질전환된 다분화능 정원줄기세포와 GFP-발현 생쥐의 배아줄기세포의 특성을 확인하기 위해 전분화능 줄기세포의 마아커인 AP activity와 *Nanog*, *Oct4* 유전자의 발현을 분석하였다(Fig. 2). 형질전환된 다분화능 정원줄기세포는 GFP단백질의 발현을 보였으며, 전분화능 줄기세포의 마아커인 AP의 높은 activity와 높은 *Nanog*, *Oct4* 유전자의 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 연구의 대조군으로 사용된 GFP-발현 생쥐의 배아줄기세포 역시 전분화능 세포의 마아커에 강한 발현을 보였다. 또한 다분화능 정원줄기세포와 배아줄기세포는 연구에 사용된 각각 29세대와 10세대에서 정상적인 핵형을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3).

형질전환동물의 생산가능성을 분석하기 위해서 GFP가 발현하는 생쥐의 다분화능 정원줄기세포와 배아줄기세포를 미세조작기를 이용하여 8-세포기 배아에 주입하고, 배아이식을 통해 형질전환된 배아와 키메라 생쥐를 얻고자 하였다. 줄기세포의 주입이 끝난 배아는 추가로 2일간의 배양을 통해 포배로 발생을 유도하였고, 이 과정에서 주입한 세포의 생존율을 높이기 위해 배아 배양액에 줄기세포의 배양액을 4% 추가 하여 배양하였다. 주입된 줄기세포가 배아의 내세포괴에 재구축(reconstruction) 되었는지를 세포 주입 후 24시간째에 확인하였으며, 배아 이식 전 배반포기의 내세포괴에 형광이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4A).

다분화능 정원줄기세포의 유전자변형동물의 생산효율을 비교하기 위해서 태어난 산자의 수와 키메라의 비율을 배아줄기세포의 결과와 비교하였다. 다분화능 정원줄기세포를 넣은 배아로부터 태어난 산자는 47마리(4.8%)로 67마리(11.7%)가 태어난 배아줄기세포를 넣은 배아에 비해서 산자 생산효율이 낮았다($P < 0.05$). 그러나 키메라 생쥐는 다분화능 정원줄기세포 군으로부터 3마리(6.4%)가 태어나 5마리(7.5%)가

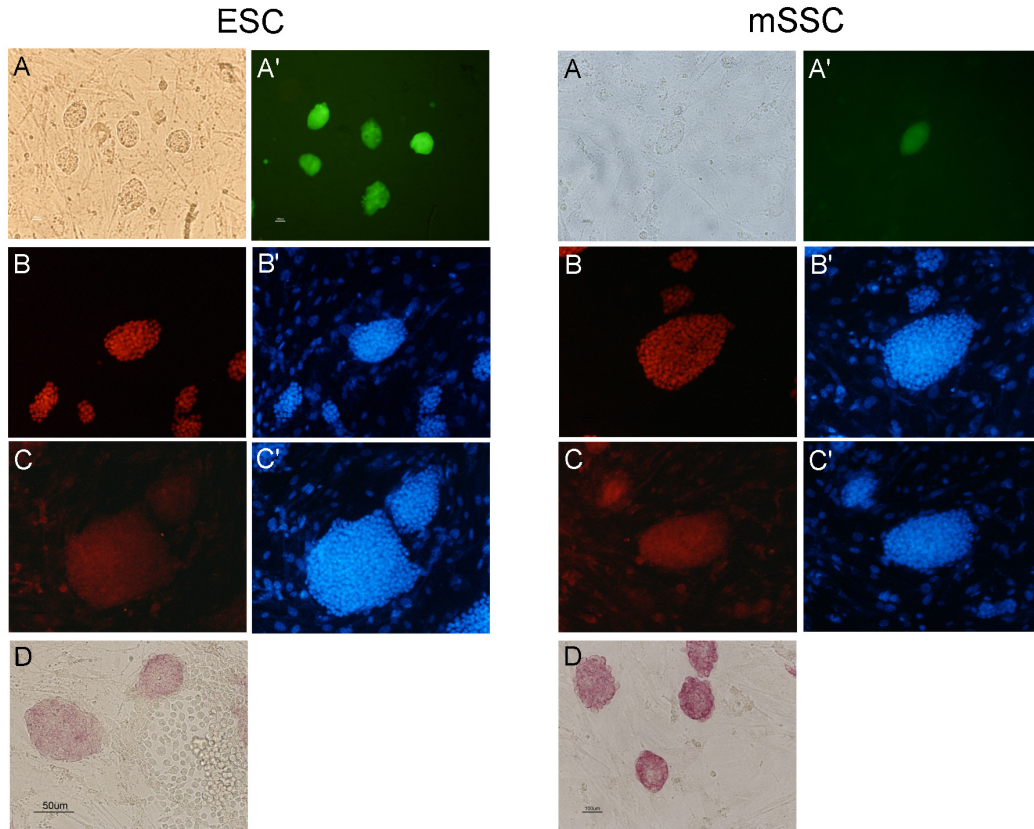


Fig. 2. Characterization of mouse ESCs and mSSCs. ESCs and mSSCs after lentiviral vector-mediated gene-transfection are shown under bright field (A) and fluorescent (A'). Both cell lines expressed GFP. *Oct4* (B) *Nanog* (C) and alkaline phosphatase were expressed as pluripotent markers (D). Nuclei were stained with DAPI (blue color; B', C').

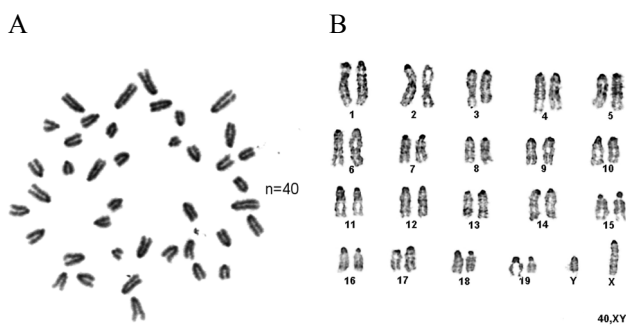


Fig. 3. Karyotyping. Karyotype of mouse ESCs (A) and mSSCs (B). Both cell lines showed normal karyotypes at passage 10 and 29.

태어난 배아줄기세포 군과 그 생산효율이 두 군에서 유사하였다($P>0.05$, Table 1).

배아줄기세포 유래의 키메라 생쥐의 장기들에서 형질전환

을 확인한 결과, 췌장, 심장, 뇌, 근육, 위, 피부, 정소에 GFP가 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 4E). 또한 다분화능 정원줄기세포를 넣은 배아로부터 태어난 산자를 whole section 하여 anti-GFP 항체로 염색한 결과 근육, 위, 뼈 등에서 발색되는 것을 확인하였다(Fig. 4F).

고 찰

본 연구의 선행 연구에서 확립된 다분화능 정원줄기세포는 outbred wildtype인 ICR strain의 생쥐로부터 확립되었으며, 배아줄기세포와 유사한 특징을 가지고 있어 전분화능 줄기세포의 마아커를 발현하고 3배엽성 유래의 세포로의 분화도 가능하였다(Fig. 2; Kim et al., 2009). 또한 본 다분화능 정원줄기세포는 특정 strain의 유전자변형동물 또는 inbred strain에서 확립된 다분화능 정원줄기세포와도 유사한 특징을

Table 1. Efficiency in the production of chimeric mice from embryonic stem cells (ESCs) and multipotent spermatogonial stem cells (mSSCs) by injection into eight-cell embryos

	No. transferred total embryo	No. recipient mice	No. pregnant mice	No. offspring		No. chimera mice	
				No	%	No	%
ESC	572	39	28	67	11.7 ^a	5	7.5 ^a
mSSC	980	57	18	47	4.8 ^b	3	6.4 ^a
Total	1,552	96	46	114	7.3	8	7.0

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

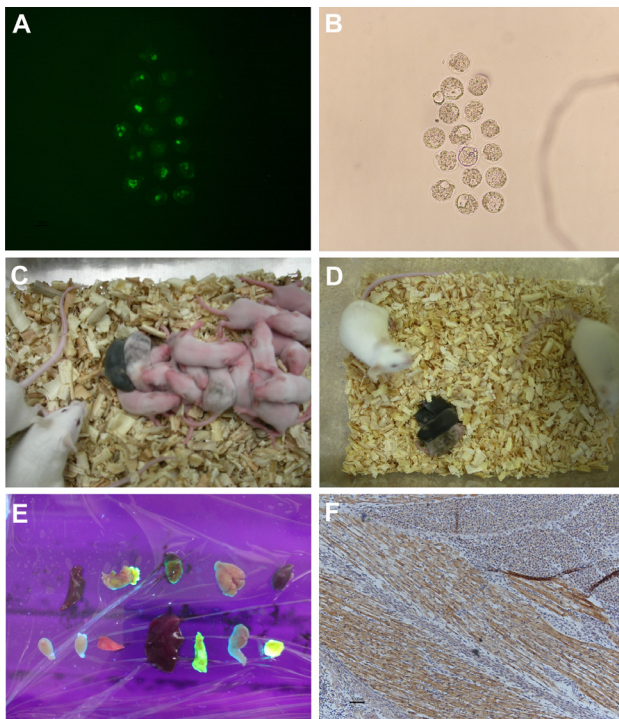


Fig. 4. Chimera production. The blastocysts which incorporated with GFP-positive ES cells under UV-light (A) and bright field (B). The chimeric mice were produced from the ESCs- (C) and mSSCs-injected embryos (D). (E) The organs from ESC-derived chimeric mouse were visualized under UV-light. Clockwise from upper left, spleen, stomach, heart, brain, kidney, muscle, gut, skin, liver, lung, testis. GFP is expressed in the heart, brain, testis, skin, gut and muscle. (F) Histological appearance of a section from mSSCs-derived pup's muscle. Muscles stained with anti-GFP antibody (brown).

가지고 있다(Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Guan et al., 2006; Seandel et al., 2007). 일반적으로 outbred strain으로부터 배아줄기세포의 확립은 그 효율이 매우 낮아 이들 중에서의 형

질전환을 통한 유전자변형동물의 생산에는 많은 어려움이 있다. 따라서 본 연구를 통한 outbred strain의 생쥐로부터 다분화능 정원줄기세포주의 확립과 이들의 형질전환을 통한 유전자변형동물의 가능성의 확인은 배아줄기세포를 이용할 경우 특정 strain에서만 제한적으로 생산 가능한 유전자변형 생쥐의 생산이 많은 종으로의 확대를 가능케 한다는 점에서 큰 의미가 있다. 실제로 다른 연구자들의 연구 결과에 의하면 생쥐의 strain마다 배아줄기세포를 확립할 수 있는 효율이 다르며, 서로 다른 특성을 가진다(Kawase et al., 1994; Ware, 2003; Kirchain et al., 2008). Inbred, hybrid, 그리고 outbred strain 배아줄기세포 사이의 비교 연구가 있었지만 outbred 인 ICR은 불충분한 배아 수로 비교할 수 없었다(Kirchain et al., 2008). 하지만 본 연구결과는 다분화능 정원줄기세포를 이용한 유전적 키메라의 생산기술이 outbred 생쥐에서 가능하였고, 이러한 기술이 유전자변형동물의 생산으로 발전한다면 그 효율이 낮은 가축과 대동물 시스템에도 적용이 가능할 것으로 여겨진다.

본 연구에 사용된 outbred strain에서 유래된 다분화능 정원줄기세포는 배아줄기세포에 비해 산자의 생산에 기여하는 바가 낮았다. 하지만 태어난 산자 중에 키메라의 생산효율은 배아줄기세포에 비해 별다른 차이가 없었다. 더욱이 본 연구에 사용된 배아가 BDF1 hybrid(DBA/2xC57BL/6) 생쥐로부터 회수되고, 대조군 공여자로 사용된 배아줄기세포의 strain이 C57BL/6 strain인 점을 감안한다면 ICR strain의 전분화능 정원줄기세포를 공여자로 사용해서 산자의 생산이 낮아진 점은 충분히 설명이 가능하다(Table 1). 더군다나 산자의 생산이 저조합에도 불구하고 유전자가 변형된 키메라 생쥐의 생산효율의 차이가 없다는 점은 다분화능 정원줄기세포가 배아줄기세포에 비해 충분한 경쟁력을 가질 수 있다는 점을 증명하고 있다.

본 연구에서는 coat color의 확인을 통해 유전자변형동물의 생산가능성을 확인하기 위해 ICR strain에서 유래된 다분화능 정원줄기세포를 BDF1 hybrid 생쥐의 배아와 섞어 주었다. 따라서 ICR strain의 배아에 주입되어 outbred strain의 유전자변형동물의 생산은 시도하지 못했고, strain과 inbred/outbred 간의 생산효율의 직접적인 비교도 시행할 수 없었다. Shinohara 등(2007)은 inbred strain인 DBA/2 strain으로부터 다분화능 정원줄기세포를 확립하였고, 이들을 이용하여 유전자변형생쥐의 생산에 성공한 바 있다. 따라서 이러한 inbred strain 다분화능 정원줄기세포를 확립하거나 분양받아서 직접적으로 비교하는 추가의 연구가 필요하다.

본 연구를 통해 outbred strain으로부터 확립된 다분화능 정원줄기세포도 inbred strain에서 확립된 배아줄기세포와 다분화능 정원줄기세포와 마찬가지로 전분화능을 가지고 있으며, 배아 내로 주입되었을 때 키메라 생쥐의 생산이 가능하여 유전자변형동물의 생산이 가능함을 확인할 수 있었다. 따라서 실제로 생식계통으로 전이가 되는 형질전환동물의 생산을 위한 추가의 연구가 절실하다. 그리고 다분화능 정원줄기세포는 이러한 장점 이외에도 신생 또는 성체의 정소로부터 회수가 가능하여 면역거부반응을 피할 수 있는 맞춤형 줄기세포로서의 장점도 가지고 있어 세포치료제 부분에서도 보다 많은 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(2009-0093821).

인용문헌

- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R (2001) Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6209-6214.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440:1199-1203.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyushima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119:1001-1012.
- Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T (2006) Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8018-8023.
- Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N (1994) Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 38:385-390.
- Kim HJ, Lee HJ, Lim JJ, Kwak KH, Kim KS, Lee DR (2009) Reprogramming of neonatal out-bred spermatogonial stem cells into a multipotent state using a unique multiculture system. *Mol Cells* in revision.
- Kirchain SM, Hayward AM, Mkandawire JM, Qi P, Burds AA (2008) Comparison of tetraploid blastocyst microinjection of outbred Crl:CD1 (ICR), hybrid B6D2F1/Tac, and inbred C57BL/6NTac embryos for generation of mice derived from embryonic stem cells. *Comp Med* 58:145-150.
- Poueymirou WT, Auerbach W, Friendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Dore AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, DeChiara TM, Valenzuela DM (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 25:91-99.
- Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Perez-Crespo M, Pericuesta E, Gutierrez-Adan A (2009) Effect of stem cell activation, culture media of manipulated embryos, and site of embryo transfer in the production of F0

- embryonic stem cell mice. *Biol Reprod* 80:1216-1222.
- Schoonjans L, Kreemers V, Danloy S, Moreadith RW, Laroche Y, Collen D (2003) Improved generation of germline-competent embryonic stem cell lines from inbred mouse strains. *Stem Cells* 21:90-97.
- Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S (2007) Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 449:346-350.
- Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M, Kusanagi M (1999) Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells. *Exp Anim* 48:213-216.
- Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T (2007) Production of knockout mice by gene targeting in multipotent germline stem cells. *Dev Biol* 312:344-352.
- Te Riele H, Maandag ER, Berns A (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5128-5132.
- Wall RJ (2001) Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3:209-220.
- Ware CB, Siverts LA, Nelson AM, Morton JF, Ladiges WC (2003) Utility of a C57BL/6 ES line versus 129 ES lines for targeted mutations in mice. *Transgenic Res* 12:743-746.
-
- (received 23 October 2009, received in revised form 27 November 2009, accepted 27 November 2009)