

α -1,3-Galactosyltransferase Knock Out(GalT KO) 돼지유래 골수 중간엽 줄기세포의 특성 규명

옥선아*, 오건봉, 황성수, 임석기, 김영임, 박진기

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통학과

Establishment and Characterization of Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells (MSCs) Derived from α -1,3-Galactosyltransferase Knock Out(GalT KO) Pig

Sun-A Ock, Keon Bong Oh, Seongsoo Hwang, Seoki Im, Youngim Kim and Jin-Ki Park

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration,
Suwon 441-706, Republic of Korea

ABSTRACT

A major barrier to progress in pig to primate organ transplantation or cell therapy is the presence of terminal α -1,3-galactosyl epitopes on the surface of pig cells. Therefore, the purpose of this experiment was to establish and characterize mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) derived from α -1,3-galactosyltransferase (GalT) knock out (GalT KO) pig to confirm their potential for cell therapy. Bone marrow (BM)-MSCs from GalT KO pig of 1 month old were isolated by Ficoll-Paque PLUS gradient and cultured with A-DMEM + 10% FBS on plastic dishes in 5% CO₂ incubator at 38.5. GalT KO BM-MSCs were analyzed for the expression of CD markers (CD45⁻, 29⁺, 90⁺ and 105⁺) and *in vitro* differentiation ability (adipogenesis and osteogenesis). Further, cell proliferation capacity and cell aging of GalT KO BM-MSCs were compared to Wild BM-MSCs by BrdU incorporation assay (Roche, Germany) using ELISA at intervals of two days for 7 days. Finally, the cell size was also evaluated in GalT KO and Wild BM-MSCs. Statistical analysis was performed by T-test ($P < 0.05$). GalT KO BM-MSCs showed fibroblast-like cell morphology on plastic culture dish at passage 1 and exhibited CD45⁻, 29⁺, 90⁺ and 105⁺ expression profile. Follow in induction in StemPro adipogenesis and osteogenesis media for 3 weeks, GalT KO BM-MSCs were differentiated into adipocytes, as demonstrated by Oilred Ostaining of lipid vacuoles and osteocytes, as confirmed by Alizarinred S staining of mineral dispositions, respectively. BrdU incorporation assay showed a significant decrease in cell proliferation capacity of GalT KO BM-MSCs compared to Wild BM-MSCs from 3 day, when they were seeded at 1×10^3 cells/well in 96-well plate. Passage 3 GalT KO and Wild BM-MSCs at 80% confluence in culture dish were allowed to form single cells to calculate cell size. The results showed that GalT KO BM-MSCs ($15.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$) had a little larger cell size than Wild BM-MSCs ($13.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$). From the above findings, it is summarized that GalT KO BM-MSCs possessed similar biological properties with Wild BM-MSCs, but exhibited a weak cell proliferation ability and resistance to cell aging. Therefore, GalT KO BM-MSCs might form a good source for cell therapy after due consideration to low proliferation potency *in vitro*.

(Key words: α -1,3-galactosyltransferase knock out pig, mesenchymal stromal/stem cells, bone marrow, BrdU incorporation assay)

서 론

중간엽 기질/줄기세포(mesenchymal stroma/stem cell, MSCs)는 재생의학적 측면에서 많은 관심을 받고 있다. 그 이유는 비교적 적은 수의 세포로 늙고 병든 세포를 교체할 수 있으며,

체외에서 뼈, 지방, 연골, 심장세포, 신경세포로 분화할 수 있고, 또한 동종 간 이식 혹은 이종 간 이식 시 비교적 적은 거부 반응을 유도하거나 완화할 수 있는 것으로 알려져 있기 때문이다(Vacanti 등, 2005; Lermen 등, 2010).

21세기는 경제 성장과 인구 고령화와 재해의 증가로 필요

* 본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린 21 (과제번호: PJ009038022013)연구비지원에 의해 수행되었다.

* Correspondence : E-mail : ocksa@korea.kr

장기의 수는 급증하고 있지만, 실제 공급되는 장기수는 매우 제한적임으로써 많은 연구자들이 동물 장기를 이용한 이종 간 장기 이식 연구에 매진하고 있다. 그러나 이종 장기 연구에 있어 첫 번째 장벽은 서로 다른 종에 의한 면역 거부 반응이다. 사람의 경우 동물과 달리 세포 표면에 α -1,3-galactosyl epitopes를 가지고 있지 않아, 돼지와 같은 동물의 장기 이식 시 보체 반응에 의한 초급속 거부 반응이 유도되어 24시간 내에 사망에 이르게 할 수 있기 때문이다(Good 등, 1992; Galili, 2001). 이러한 문제점을 해결하기 위해 α -1,3-galactosyltransferase(GalT) knock out(GalT KO) 돼지가 생산되었고(Dai 등, 2002; Kuwaki 등, 2005), 국내에서도 생산되어 초급속 거부 반응을 제어할 수 있는 단계에 이르게 되었다(Ahn 등, 2011; 황 등, 2012).

GalT KO 돼지는 이종 간 장기 이식 측면뿐만 아니라, 세포 치료제 측면에서도 매우 유용한 세포원이라 할 수 있다. 대표적인 예로서 GalT KO 돼지로부터 중간엽 줄기세포를 회수하여 제 1형 당뇨병 치료를 위한 췌장 세포 분화를 유도하여 이식할 수 있다면 당뇨병도 고통 받고 있는 많은 사람들을 위한 새로운 대안이 될 수 있다(Abrahante 등, 2011). 왜냐하면 돼지의 인슐린은 사람과 비교하여 단 1개의 염기 서열만이 다르므로 면역 거부 반응 없이 사람에서 분비되는 인슐린 분비 세포 역할을 할 수 있을 것으로 기대할 수 있기 때문이다. 실제로 Wild 돼지 췌도를 영장류에 이식하였을 때보다 GalT KO 돼지의 췌도를 이식하였을 때 보체에 의한 선천성 면역 반응의 민감성을 감소시켜 정상 혈당으로 개선할 수 있음이 보고되었다(Thompson 등, 2011).

이상의 목적 아래 이 실험의 목적은 GalT KO 돼지로부터 성공적으로 MSCs를 분리하고, 그 특성을 Wild BM-MSCs와 비교하는 것이었다. 분석 항목으로는 GalT KO 돼지의 골수로부터 MSCs를 분리 후 세포의 형태, 중간엽 줄기세포 특이인자(CD45⁻, 29⁺, 90⁺ and 105⁺)의 발현, 체외 분화 능력(뼈세포와 지방세포), 세포 증식 능력, 세포 크기를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

이 실험에 사용된 모든 시약은 특별한 언급이 없는 경우 Sigma Chemical Company(St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 배양액은 Gibco(Life Technologies, Rockville, MS, USA)에서 구입하였다. 모든 배양액은 pH 7.2, 삼투압 280 mOsm/kg으로 조정하여 사용하였다.

2. 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stroma Cells, MSCs)의 추출 및 배양

이 실험은 국립축산과학원 동물윤리위원회의 승인을 받아

수행되었다. GalT KO 돼지는 황 등(2012)의 방법에 의해 생산되었고, 골수유래 중간엽 줄기세포 (BM-MSCs)는 5주령 돼지의 대퇴부 골수로부터 외과적으로 회수되어 Faast 등(2006)의 방법에 의해 Ficoll-Paque Plus(Amersham Science, USA)를 사용하여 제조사의 분리방법에 따라 분리되었다. GalT KO BM-MSCs를 위한 기본 배양액으로는 Advanced Dulbecco's modified Eagle medium(ADMEM)에 10% 소 혈청, 1 mM Na-pyruvate, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 사용하였고, 세포들은 모두 38.5°C 인큐베이터 속에서 5% CO₂ 농도를 유지하면서 배양되었다. 이 실험에 사용된 세포는 모두 5 passages까지만 사용되었고, 대조구로는 같은 연령의 Wild BM-MSCs를 사용하였다.

3. GalT KO BM-MSCs의 중간엽 줄기세포 마크 분석

중간엽 줄기세포 특이 마크인 CD 29, 90, 105와 조혈줄기세포 마크인 CD 45를 분석하기 위해 3 passages에 도달한 세포들을 trypsin EDTA를 사용하여 single cell로 만들었다. 분리된 세포들은 1 \times 10⁶ cell/100ul의 농도로 조정되었고, 그 세포들은 FITC conjugated mouse anti pig CD 45(AbD serotec, USA), Alex Fluor 647 conjugated mouse anti pig CD 29(BD Pharmingen, UAS), FITC mouse anti-Human CD 90(Thy-1) (BD Pharmingen, BD Pharmingen) 혹은 FITC conjugated CD 105(Thermo scientific, USA)로 각각 1 μ g/100ul의 농도로 처리되었다. Control과 같은 Isotype controls도 같은 회사의 제품으로 같은 농도로 각각 mouse IgG1(for CD 45), Alex Fluor 647 mouse IgG1 k(for CD 29), FITC mouse IgG1 k(for CD 90) 혹은 FITC conjugate mouse IgG2a(for CD 105)가 각각 처리되었다. 모든 샘플들은 4°C 얼음 속에서 1시간 동안 염색되었고, a flow cytometry를 이용하여 10,000개의 세포를 분석하였다. 분석 후 그림에서 나타나는 검은색 라인은 Isotype controls을 나타낸 것이고, green line은 FITC positive reaction을 red line은 Alex Fluor 647 positive reaction을 나타내었다.

4. GalT KO BM-MSCs의 체외 분화

3 passage의 GalT KO BM-MSCs는 배양 접시 위에 80% confluence로 배양되었을 때 지방(StemPro[®] Adipogenesis Differentiation Kit, Life Technologies, USA)과 뼈(StemPro[®] Osteogenesis Differentiation Kit, Life Technologies, USA)로 분화할 수 있는 배양액으로 교체되어 3주간 배양이 유도되었고, 각각의 분화 배양액은 신선한 배양액으로 3일마다 교체되었다. 뼈 분화를 확인하기 위해 70% 에탄올에 1시간 고정 후 2% Alizalin red S 용액에 1시간 염색하고, 증류수로 3번 수세 후 미네랄의 축적을 붉은색 발현을 통해서 현미경 아래 확인하였다. 지방 분화를 확인하기 위해 4% formalin으로 1시간

고정하고, 0.36% Oil red O 용액을 사용하여 1시간 염색 후 증류수로 3번 수세하여 지방방울이 붉게 염색되는지를 현미경 아래 관찰하였다.

5. GalT KO BM-MSCs의 세포 증식율

세포들의 증식율을 분석하기 위해 세포들은 single cell로 분리 후 96 well plate에 한 well 당 1×10^3 cells가 뿌려졌고, 한 well 당 200 ul의 세포 배양액이 있는 상태로 7일간 배양되었다. 세포의 증식율은 이를 간격으로 3일, 5일, 7일째 분석되었다. 이때 세포 증식율을 평가하기 위해 Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) kit(Roshe, Germany)를 사용하였고, 분석하기 전 24시간에 BrdU를 첨가하여 24시간 배양 후 ELISA를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이 실험은 3~5 passage를 사용하여 3번 반복·분석하였다. 이 실험의 대조구는 같은 연령의 같은 passage의 Wild BM-MSCs를 사용하여 비교·분석하였다.

6. GalT KO BM-MSCs의 세포크기 측정

세포의 노화 정도를 확인하기 위해 배양 dish에 80% confluence 상태인 GalT KO BM-MSCs를 single cell로 만들고, 0.4 % Trypan blue 용액으로 염색하여 Luna™ automated cell counter(Logos Bio systems, Inc. Korea)를 사용하여 세포의 크기를 분석하였다(Fig. 4B). 이 실험에 사용된 세포는 4~5 passage를 사용하였고, 대조구는 같은 연령의 같은 passage의 Wild BM-MSCs를 사용하여 비교·분석 하였다. 이 실험은 5 반복 수행되었다.

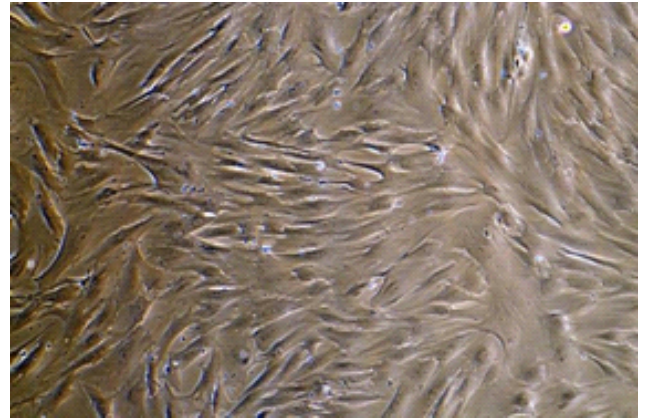
7. 통계학적 분석

이 실험의 Fig. 3과 4의 결과는 모두 엑셀을 이용하여 기술 통계와 T-test를 수행하였고, 유의성은 $P < 0.05$ 일 때 유의성을 가지는 것으로 판정하였다. 그리고 결과들은 모두 mean은 Standard Deviation(SD)로 표시하였다

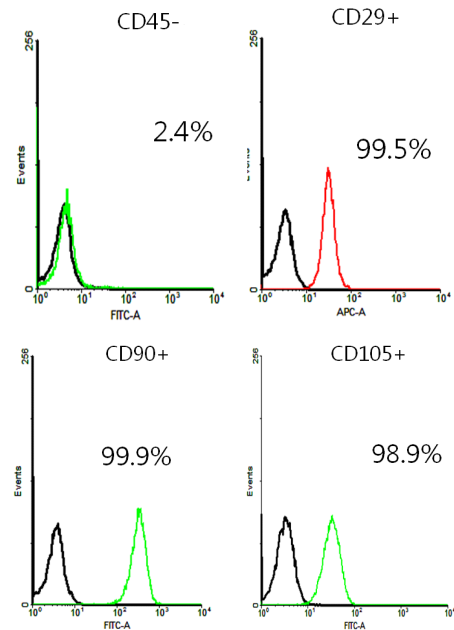
결 과

1. GalT KO BM-MSCs일반적인 특성

GalT KO 돼지의 BM으로부터 회수된 세포는 평판배양 조건 아래서 배양되었고, 평판배양 조건 아래서 MSCs의 대표적인 특징인 fibroblast like cell의 형태를 1 passage에서 나타냄을 확인하였다(Fig. 1). 그리고 Fig. 1B와 같이 MSCs를 확인 후 계대 배양하여 3 passage에서 중간엽 줄기세포 대표 마크인 CD 45⁻, CD 29⁺, CD 90⁺, CD 105⁺를 유세포 분석기를 통하여 분석한 결과, 각각 2.4%, 99.5% 99.9%, 98.9%를 보임으로서 조혈 줄기세포 인자인 CD 45⁻는 거의 발현되지 않음과 MSCs 특이 인자인 CD 29⁺, CD 90⁺, CD 105⁺는 아주 강하게 발현됨



(A)



(B)

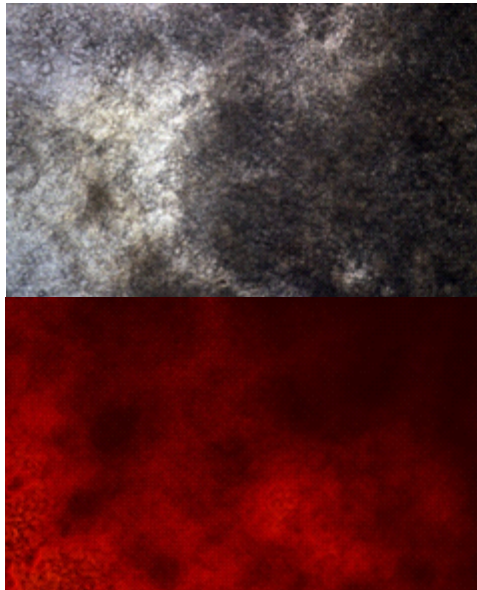
Fig 1. Morphology and expression of specific MSCs CD marks of GalT KO BM-MSCs isolated from a femur of GalT KO pig. A : cells attached on plastic cultured dish at passage one(40×), B : expression of specific MSCs CD marks(45⁻, 29⁺, 90⁺ and 105⁺). 1×10^6 cells/sample were analyzed by a flow cytometer. Open Black histograms meant isotype matched controls and open green and red histograms meant positive reactions.

을 확인함과 동시에 정상적인 GalT KO BM-MSCs가 회수되었음을 확인할 수 있었다.

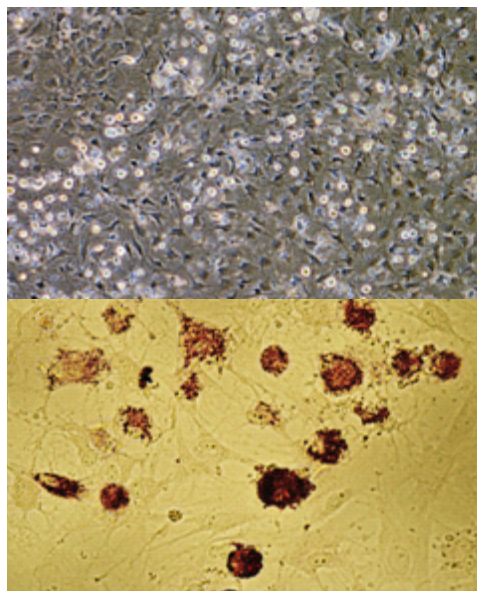
2. GalT KO BM-MSCs의 체외 분화

GalT KO BM-MSCs는 체외에서 3주 동안 골세포 혹은 지방세포로 분화하기 위해 각각 특수한 분화 배양액 속에서 배양되었다(Fig. 2). 골세포 분화 시 나타나는 미네랄 축적을 확

인하기 위해 Alizalin red S 용액으로 염색을 수행하였고, 지방 분화를 확인하기 위해 지방 방울을 염색시킬 수 있는 Oil red O 염색약을 사용하여 분화를 확인하였다. 골세포 분화가 유도된 GalT KO BM-MSCs는 Alizalin red S 용액으로 염색하기 전에는 하얀색 미네랄이 많이 축적되어 빛의 반사에 의해



(A)



(B)

Fig. 2. *In vitro* differentiation of GalT KO BM-MSCs. A : Cell with (b) or without (a) Alizalin red S solution after osteogenic induction for 3 weeks(40×), B : Cell with (b) or without (a) Oil red O solution after adipogenic induction for 3 weeks (100×).

현미경 상으로는 검게 나타남을 확인할 수 있었고, 염색 후에는 축적된 미네랄에 의해 강하고 붉게 염색됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2Aa). 지방세포 분화가 유도된 GalT KO BM-MSCs는 작은 지방 방울들이 생기다 그것이 합쳐지는 형태로 분화가 유도되었고, Oil red O 염색 시 지방이 축적된 부위에 붉게 염색이 됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2Ab). GalT KO BM-MSCs가 체외에서 뼈와 지방으로 분화가 정상적으로 이루어짐을 확인함과 동시에 MSC임을 확인할 수 있었다.

3. GalT KO BM-MSCs의 세포 증식력

GalT KO BM-MSCs의 세포 증식력을 확인하기 위하여 Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) kit를 사용하여 같은 연령의 wild BM-MSCs를 대조구로 사용하여 세포 증식력을 비교하였다. 세포들은 96 well plate에 한 well 당 1×10^3 cell을 뿌리고, 7일간 배양하며, 3일, 5일, 7일째 ELISA 를 사용하여 흡광도를 분석하였다(Fig. 3). 배양 3일째부터 GalT KO BM-MSCs는 Wild BM-MSCs 시보다 유의적으로($p < 0.05$) 낮은 흡광도를 보였고(GalT KO BM-MSCs vs. Wild BM-MSCs, 0.180 ± 0.010 vs. 0.200 ± 0.005 , respectively), 5일(GalT KO BM-MSCs vs. Wild BM-MSCs 0.212 ± 0.010 vs. 0.343 ± 0.027 , respectively) 과 7일(GalT KO BM-MSCs vs. Wild BM-MSCs 0.270 ± 0.070 vs. 0.364 ± 0.026 , respectively)째도 유의적으로($p < 0.05$) 낮은 흡광도를 나타내었다. 따라서 GalT KO BM-MSCs가 Wild BM-MSCs보다 낮은 세포 증식력을 가짐을 확인할 수 있었다.

4. GalT KO BM-MSCs의 세포 크기

GalT KO BM-MSCs의 세포 노화를 확인하기 위하여 세포 크기를 같은 연령의 Wild BM-MSCs를 대조구로 사용하여 분석하였다(Fig. 4). 비교적 초기 passage(4~5)임에도 불구하고,

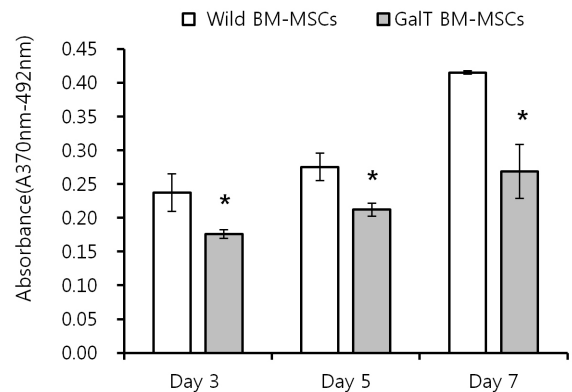


Fig. 3. Cell proliferation of GalT KO BM-MSCs by Cell Proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) kit. Cells were seeded 1×10^3 cells/well of 96 well plate and analyzed cell proliferation at intervals of two days for 7 days by triplicate. * $P < 0.05$.

GalT KO BM-MSCs($15.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$)가 Wild BM-MSCs($13.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$)보다 유의적으로($p < 0.05$) 큰 크기의 세포 사이즈를 가짐을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 0.4% Trypan blue 염색에 의해 Luna™ automated cell counter에 의해 분석된 사진에서 보면 GalT KO BM-MSCs가 비교적 크기가 Wild BM-MSCs보다 큰 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

고찰

돼지 MSCs는 사람의 세포 치료제로 사용되기에 다양한 이점을 가지고 있다. 대표적인 것으로는 사람의 동종 이식보다 무균돼지 유래 MSCs의 이식의 경우, 전염성 질환의 전파 확률이 낮고, 세포학적 생리학적 사람의 세포와 유사하며, 윤리적 문제점을 덜 유발하고, 세포 치료제로 활용을 위한 충분한 수의 세포를 획득이 용이한 것으로 알려져 있기 때문이다(Thomas 등, 2013). 게다가 MSCs는 cellular rejection을 피하기 위한 MSCs의 local host environment 조절 능력인 면역 반응 능력이 우수한 것으로 보고되기 때문이다(Nauta와 Fibb,

2007). 그리고 이 실험에서 사용한 GalT KO 돼지는 이중 간 초급성 거부 반응을 제어하기 위한 목적으로 생산되었고(Phelps 등, 2003), 돼지와 영장류 이식 시에 체액성·세포성 거부 반응을 최소화 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 선행보고에 따르면 GalT KO 돼지 유래 MSCs가 높은 면역 관용력과 면역 거부 반응이 최소화 될 수 있음이 보고되었다(Ezzelarab 등, 2012). 따라서 이 실험은 GalT KO 돼지 유래 BM-MSCs를 추출 배양하여 Wild BM-MSCs와 비교하여 같은 MSCs 능력을 가지는지를 비교하여 안정적인 세포 치료제로 사용하고 자 하였다. 그 결과, GalT KO BM-MSCs는 세포 형태나, CD marks의 발현, 체외 분화 능력에서는 Wild BM-MSCs와 차이가 없었지만, 세포 치료적 측면에서 중요한 세포 증식력과 세포 노화가 비교적 빠르게 진행됨을 체외에서 BrdU incorporation 실험과 세포 크기 측정에서 확인할 수 있었다.

GalT KO 돼지로부터 회수된 BM-MSCs는 평균 배양 조건 아래서 MSCs의 전형적인 fibroblast like cell의 형태를 보였고 중간엽 줄기세포의 특인 인자인 CD mark들에도 95% 이상의 강한 반응을 나타내었고, 조혈줄기세포 마크인 CD 45에서는 거의 발현되지 않음으로써 BM-MSCs임을 확인할 수 있었다. 또한 중간엽 줄기세포의 중요한 특징인 체외 분화 능력에서도 뼈세포 분화와 지방세포분화가 염색을 통하여 각각 유도됨을 확인함으로써 Wild BM-MSCs가 가지는 특성과 같은 특성을 보유함을 확인할 수 있었다. 비록 세포원은 다르지만 Thomas 등(2013)과 Kumar 등(2012)이 GalT KO 돼지 유래 지방 MSCs가 체외에서 정상적으로 분리 증식됨을 보고하였다.

세포를 세포 치료제로 사용되기 위해서는 선결되어야 할 가장 중요한 요인은 병든 세포의 교체나 조직 재생을 위한 충분한 세포수의 증식이라고 볼 수 있다. 그러나 MSCs의 경우, embryonic stem cell(ES cell)보다 낮은 증식력을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 체외에서 장기간 배양되거나 나이와 비례하여 증식 능력이 감소하는 것으로 알려져 세포 치료제로서 사용하는데 제약이 되고 있다(Carrington, 2005; Vacanti 등, 2005; Zhou 등, 2008). 따라서 이 실험은 세포 치료제로서 사용하기 위해 Wild BM-MSCs와 비교하여 세포 증식력과 세포 크기의 변화를 비교하였다. Ock 등(2010)의 보고에 따르면 BM-MSCs는 일반 체세포들보다 낮은 증식력을 가지고 있는 것으로 보고되었고, 이 실험은 비교 방법은 다르지만 세포가 증식과 분열시 증폭되는 DNA에 삽입되는 BrdU incorporation에 의한 발광 물질의 검출 분석을 Wild BM-MSCs와 비교하였다. GalT KO BM-MSCs는 Wild BM-MSCs보다 느린 증식률을 배양 3일부터 7일까지 나타내었다. 선행 보고에 의하면 GalT KO BM-MSCs는 사람의 BM-MSCs보다는 빠른 증식력이 알려져 있지만, GalT KO BM-MSCs와 Wild BM-MSCs 간에 직접적인 비교는 없었다(Thomas 등, 2013). 따라서 이 연구 결과는 매우 중요한 연구 결과라 할 수 있다. 선행 보고에

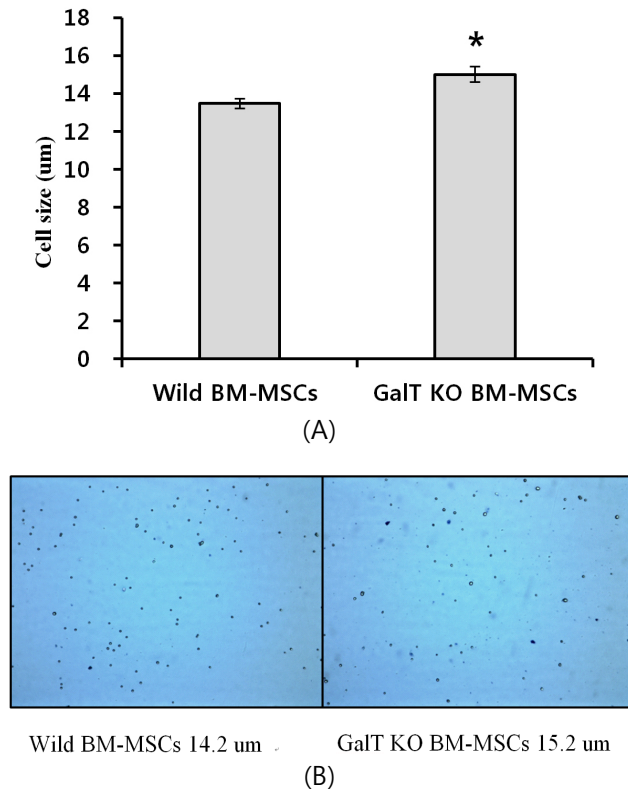


Fig. 4. Analysis of cell size of GalT KO BM-MSCs. A : MSCs size calculated by Luna™ automated cell counter at passages 4~5 by 5 replicates. * $P < 0.05$, B : MSCs analyzed by Luna™ automated cell counter after 0.4% trypan blue solution staining.

따르면 돼지 MSCs를 장기간 체외 배양 시 actin accumulation과 reduced substrate adherence과 같은 노화 현상이 유도됨이 보고되었다(Vacanti 등, 2005). 따라서 이러한 현상이 반영된 결과인지는 명확하지는 않지만, GalT KO BM-MSCs ($15.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$)는 Wild BM-MSCs($13.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$)보다 세포 크기가 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 비록 데이터에는 없지만 Wild 돼지 귀세포 유래 체세포의 경우, Wild BM-MSCs와 세포 크기 차이는 보이지 않았다. 이러한 세포 크기의 차이는 GalT KO BM-MSCs의 특징인 노화에 의한 결과인지는 추후 더 많은 검증이 필요할 것으로 생각된다. 일반적인 사실로서 GalT KO BM-MSCs 세포의 크기를 정확하게 보고한 보고는 알려져 있지 않으므로, 앞으로 세포 치료제로서 정맥혈 주사 방법을 통해 이식 시 고려해야 할 부분으로 생각된다.

이상의 결과들을 바탕으로 GalT KO 돼지로부터 성공적으로 GalT KO BM-MSCs가 구축될 수 있음을 확인하였으며, 중간엽 줄기세포 능력에 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 그러나 GalT KO BM-MSCs는 Wild BM-MSCs보다 낮은 세포 증식력과 큰 세포 크기를 가짐으로써 세포 치료제로서 사용 시 이 부분을 고려하여야 할 것으로 생각되며 차후 세포 노화와 관련된 유전자의 분석을 통해 노화의 특징인 세포 자체의 특성인지를 규명하고 동시에 사람 BM-MSCs와의 차이도 규명해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Abrahante JE, Martins K, Papas KK, Hering BJ, Schuurman HJ and Murtaugh MP. 2011. Microbiological safety of porcine islets: comparison with source pig. *Xenotransplantation* 18: 88e93.
- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB and Shim H. 2011. Resurrection of an alpha-1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theor. Appl. Genet.* 75: 933-999.
- Carrington JL. 2005. Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 700-708. Review.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lam born AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA and Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20: 251-255.
- Ezzelarab M, Ezzelarab C, Wilhite T, Kumar G, Hara H, Ayares D and Cooper DK. 2011. Genetically-modified pig mesenchymal stromal cells: xenoantigenicity and effect on human T-cell xenoresponses. *Xenotransplantation* 18: 183-195.
- Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, McIlpatrick SM, Ashman RJ and Nottle MB. 2006. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells* 8: 166-173.
- Galili U. 2001. The alpha-Gal epitope(Galalpha1-3 Galbeta1-4-GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie.* 83: 557-563.
- Im GS, Hwang SS, Oh KB, Kim DH, Woo JS, Shim HS, Yun IJ and Park JK. 2012. Production of alpha1,3-galactosyltransferase(GalT) double knock-out(-/-) transgenic pigs for xenotransplantation. *J. Emb. Trans.* 27: 9-14.
- Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N and Lamontagne LR. 1992. Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* 24: 559-562.
- Kumar G, Hara H, Long C, Shaikh H, Ayares D, Cooper DK and Ezzelarab M. 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from genetically modified pigs: immunogenicity and immune modulatory properties. *Cytotherapy.* 14: 494-504.
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH and Cooper DK. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 11: 29-31.
- Lermen DE, Gorjup, PW, Dyce H, von Briesen and Müller P. 2010. Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. *PLoS One* 29: e8968.
- Nauta AJ and Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499e 506.
- Ock SA, Jeon BG and Rho GJ. 2010. Comparative characterization of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow extract and skin tissues. *Tissue Eng. Part C Methods.* 16: 1481-1491.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris

- AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y and Ayares DL. 2003 Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299: 411-414.
- Schubert T, Poilvache H, Galli C, Gianello P and Dufrane D. 2013. Galactosyl-knock-out engineered pig as a xenogenic donor source of adipose MSCs for bone regeneration. *Bio-materials*. 34: 3279-3289.
- Thompson P, Badell IR, Lowe M, Cano J, Song M, Leopardi F, Avila J, Ruhil R, Strobert E, Korbitt G, Rayat G, Rajotte R, Iwakoshi N, Larsen CP and Kirk AD. 2011. Islet xenotransplantation using gal-deficient neonatal donors improves engraftment and function. *Am. J. Transplant.* 11: 2593-2602.
- Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM and Lee T. 2005. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J. Cell Physiol.* 205: 194-201.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS and Glowacki J. 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 7: 335-343.
-
- (접수: 2013. 08. 12/ 심사: 2013. 08. 13/ 채택: 2013. 08. 30)