돼지에 있어서 정소 생식세포의 이식 기법 개발

김병각[1] · 이용안[1] · 김방진[1] · 김기중[1] · 민관식[2] · 이장희[3] · 유재원[4] · 김인철[4] · 류범용[1,†]

[1]중앙대학교 동물자원과학과, [2]한경대학교 생물환경정보통신전문대학원, [3](주)바이오컬쳐, [4]농촌진흥청 축산과학원

Development of Techniques for Testicular Germ Cell Transplantation in Pigs

Byung-Gak Kim[1], Yong-An Lee[1], Bang-Jin Kim[1], Ki-Jung Kim[1], Kwan-Sik Min[2], Janghee Lee[3], Jae-Weon Ryu[4], In-Cheul Kim[4] and Buom-Yong Ryu[1,†]

[1]*Department of Animal Science & Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea*

[2]*Animal Biotechnology, Graduate School of Bio. & Information Technology, HanKyong National University, Ansung 456-749, Korea*

[3]*Bioculture Inc., Cheonan 332-822, Korea,* [4]*National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea*

ABSTRACT

The current study was designed to extend the technique of spermatogonial transplantation to economically important pig model. We evaluated the efficiency of pig to pig transplantation. Donor testis cells were harvested from testes obtained at castration of 10- to 14-day-old boars and were labeled with fluorescent marker(PKH26) before transplantation. The presence of infused dye or labeled pig testicular cells was confirmed in the seminiferous tubules from recipient pig. The most effective procedure of intratubular germ cell transfer was to insert an fine needle (21~25 gauge) through the cauda epididymis and testis into the rete testis under ultrasound guidance. Infusion of 5~7 ml of dye solution or cell suspension could fill the rete and up to 50% of seminiferous tubules of 14-week-old boars. Testis were examined for the presence and localization of labeled donor cells immediately after transplantation and labeled donor cells were found in numerous seminiferous tubules from recipient pig testes. These results indicate that germ cell transplantation is feasible in recipient pig testis. This study represents successful spermatogonial transplantation between individual animals in a livestock species.

(Key words : Spermatogonial transplantation, Pig, Testis, Donor, Recipient)

요 약

본 연구는 돼지에 있어서 정원줄기세포를 포함하는 정소세포를 recipient 돼지의 정소 내로 이식할 수 있는 기법을 개발하기 위하여 시행되었다. 공여세포는 10~14일령의 돼지로부터 채취된 정소에서 효소처리법을 이용하여 회수하였고, recipient의 정소 내로 이식하기 전 형광 마커(PHK26)로 표지하였다. 외과적 수술을 통하여 recipient 돼지로부터 정소를 꺼낸 후 초음파 기기와 이식 장치를 이용하여 형광표지된 공여세포를 recipient 정소의 세정관 내로 이식하였다. 14주령의 recipient 정소에 5~7 ml의 공여 세포부유액을 주입하여 정소 내 50% 이상의 세정관 내로 세포부유액의 주입이 가능하였고, 세포부유액이 주입된 세정관 내에서 형광표지된 정소세포들이 고루 이식되어짐이 관찰되었다. 본 연구에서 개발한 이식 기법을 이용하여 효율적인 정소세포의 이식이 가능함에 따라 향후 돼지 정원줄기세포의 연구 및 활용법 개발에 획기적인 돌파구가 마련될 것으로 기대된다.

서 론

가축을 포함한 포유동물에 있어서 생식세포인 정자는 웅성측 유전 정보를 다음 세대에 전달하는 매개체이다. 따라서 정자를 생산하는 일련의 복합적인 과정을 포함하는 정자 형성 과정(spermatogenesis)은 종의 보존과 유전적 다양성에 있어서 필수적인 과정이다(Russell 등, 1990). 정자 형성 과정은 성체의 세포생산 시스템 중 가장 생산적인 과정으로서 랫트의 경우, 성숙된 수컷은 매일 정소

* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070101034007)과 2008년도 중앙대학교 우수연구자 연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4687, E-mail: byryu@cau.ac.kr

그램(g) 당 10^7개의 정자를 생산하는 것으로 알려져 있다(Wing 등, 1982). 이와 같은 복합적이고 생산적인 정자 형성 과정에 있어서 정원줄기세포(spermatogonial stem cells)는 웅성의 생애 전반에 걸쳐 정자 형성 과정을 유지시키는 기본이자 토대를 제공하는 중요한 세포이다. 정원줄기세포는 여러 성체 줄기세포들이 지닌 특성과 같이 자가증식(self-renewal) 능력과 분화(differentiation) 능력을 지니고 있다(Meistrich와 van Beek, 1993). 정자 형성 과정의 첫 단계는 최종적으로 정자로 분화되는 다양한 단계의 분화된 daughter progeny를 생산할 수 있는 정원줄기세포의 분화기작 결정(fate decision)으로부터 시작된다. 비록 현재까지 단일 정원세포(single spermatogonia; A_s spermatogonia)군 중 정원줄기세포가 존재한다고 알려져 있지만(Potten, 1992) 아직까지 정확히 정원줄기세포를 구분할 수 있는 형태학적인 기준이나 마커로 활용될 수 있는 생화학적 혹은 분자생물학적 특성이 명확히 밝혀져 있지 않은 실정이다. 따라서 과거 여러 해 동안 정원줄기세포의 생물학적인 특성에 관한 연구들은 정원줄기세포를 구분하고 연구할 수 있는 분석 기법이 개발되지 못한 관계로 형태학적인 관찰에 의지한 이론적인 지식에 의존되어 왔다.

Brinster 등(1994a, 1994b)은 생쥐 정소세포의 이식 기법을 개발하여 생쥐의 정소에 정원줄기세포가 존재한다는 실증을 보임과 동시에 정원줄기세포의 기능적 특성을 직접적으로 연구할 수 있는 전기를 마련하였다. 이후 정소세포 및 정원줄기세포 이식 기법은 정원줄기세포의 생물학적인 특성과 활용법 개발에 있어서 필수적이고 가장 핵심적인 기술로 사용되고 있다. 그러나 상기 이식 기법은 현재까지 실험동물인 생쥐와 랫트에 있어서는 기술적으로 정립이 잘 되어서 널리 활용되고 있으나, 가축에 있어서는 생식기관의 해부학적 구조가 실험동물과는 많은 차이가 있기 때문에 실험동물에서 정립된 방법으로는 시행이 불가능한 실정이다. 최근에 Honaramooz 등(2002)이 가축인 돼지에서 정소생식세포 이식 방법을 보고하여 유용 가축으로의 이식 기법을 확대하는데 기여하였지만, 이들이 개발한 방법은 실제 적용에 있어서 완벽한 방법은 아니며 이식 효율을 높이기 위한 개선된 기술 개발에 대한 필요성이 절실하다.

따라서 본 연구는 유용 가축인 돼지에 있어서 정원줄기세포의 특성 연구 및 활용법 개발에 핵심적으로 사용될 수 있는 정원줄기세포를 포함하는 정소세포를 동종 recipient 동물의 정소 내로 효율적으로 이식할 수 있는 기법을 개발하기 위하여 시행되었다.

재료 및 방법

공시동물

본 연구에서는 생후 7~16주령의 3원 교잡종(Landrace × Yorkshire × Duroc)과 순종 요크셔 돼지를 정소세포 이식을 위한 recipient 동물로 사용하였다. 공여세포는 생후 10~14일령의 3원 교잡종 돼지 정소로부터 회수하였다.

돼지 공여세포(Donor Cell) 준비

공여세포의 준비를 위하여 공여돈으로부터 외과적인 방법으로 정소를 회수한 후 4℃ PBS 용액에 담아 실험실로 운반하였다. 백막을 제거하고 정소조직을 가위로 잘게 자른 후 collagenase(1 mg/ml, type Ⅳ; Sigma)와 hyaluronidase(1 mg/ml; Sigma)가 첨가된 PBS 용액에 넣어 37℃에서 10분간 배양하였다. 이후 분리된 세정관을 PBS로 3회 세척하고 0.25% trypsin-EDTA(Gibco) 용액으로 옮겨 37℃에서 5분간 처리하였다. 세포부유액에 우태아혈청(FBS; HyClone)을 첨가하여 효소 작용을 중지시킨 후 nylon mesh(pore size, 40 μm)를 통과시켜 정원줄기세포를 포함하는 정소세포를 회수하였다. 회수된 공여세포를 recipient 정소 내로 이식한 후 세정관 내로의 정확한 이식 여부를 관찰하기 위하여 공여세포를 이식하기 전에 Red Fluorescent Cell Linker(PKH26, Sigma)를 이용하여 형광표지하였다. 형광표지된 세포들을 FBS(100 μl/ml), D-Nase Ⅰ(0.7 mg/ml; Sigma), 0.4% trypan blue 용액(50 μl/ml; Gibco)이 첨가된 DMEM으로 희석하여 이식 전까지 4℃에 보관하였다.

외과적 수술 방법

공여세포의 recipient 정소 내로의 이식은 recipient 돼지를 전신 마취하고 무균적인 외과적 수술법으로 시행하였다. 수술 전날 오후부터 대상 동물의 급식을 중단하였다. 시술을 위한 마취 20분전 stresnil(0.1 ml/kg)을 근육주사하여 실험돈을 안정시켰으며, 마취는 페시실린(phencyclidine)계 유도체인 케타민과 럼푼을 1:1로 희석한 희석액 10 ml를 귀 정맥에 주사하여 실시하였다. 마취된 recipient 돼지를 고정틀에 고정하고 추가적인 국소 마취를 위하여 리도카인(0.1 ml/kg)을 음낭 주변에 주사하였다. 수술 중 동물의 상태에 따라 필요시 케타민과 럼푼 희석액을 5~10 ml 추가 주사하여 마취 상태를 유지하였다.

공여세포의 정소내 이식 및 분석

외과적 수술 방법으로 돼지의 음낭으로부터 정소를 꺼낸 후, 초음파 기기와 본 연구에서 고안된 이식 장치를 이용하여 공여 세포를 recipient 정소 내로 주입하였다. 본 연구에서 새롭게 고안된 이식 장치의 특징은 눈금이 새겨진 용기 2개를 이중 연결하여 주입되는 세포부유액의 용량을 측정할 수 있으며, 낙하되는 세포부유액 방울을 관찰하여 주입되는 속도를 원활히 조절할 수 있는 장점을 지니고 있다. 또한, 주입 과정 중 주사침의 막힘 현상이 발생할 경우 세포부유액 주입 튜부의 우측에 연결된 공기압 조절이 가능한 주사기(Fig. 1(A))를 이용하여 압력을 조정하는 방식으로 막힘을 제거할 수 있다는 특징이 있다. 이식을 위하여 초음파 프르브를 정소에 접촉시킨 후 초음파 장치의 영상을 관찰하면서 세포부유액이 충진된 이식 장치의 주사침(21~25 gauge)을 정소의 중앙부위인 정소망(rete testis)에 위치시키고 낙차를 이용하여 세포부유액을 주입하였다(Fig. 1(A)~(D)). 세포부유액의 주입시 낙하되는 세포부유액 방울을 관찰하면서 주입되는 양과 속도를 조절하였으며, 주입 과정 중 주사침의 막힘 등으로 주입이 원활치 않을 경우 이식 장치의 우측에 연결된 주사기(Fig. 1(A))를 이용하여 주입관 내로 공기의 유출입을 조절하는 방식으로 원활한 이식 과정을 수행하였다. 이식의 모든 과정은 *in vivo* 상태에서 수행하였고, 이식이 종료된 후 세포부유액이 이식된 정소를 적출하여

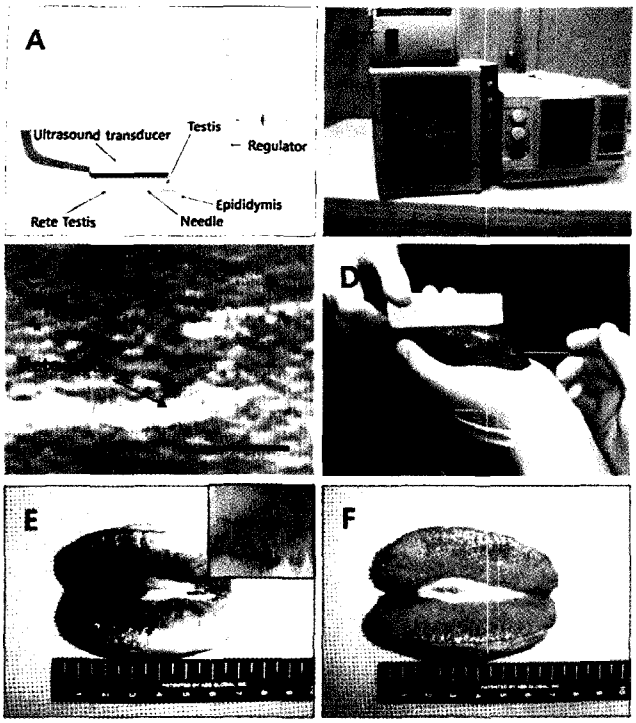

Fig. 1. Injection into the rete testis in pig testis. (A) Injection device. (B, C) Ultrasound image of a testis from a 14-week-old pig. Bar=500 μm (D) Injection of trypan blue solution into the rete testis of 14-week-old pig. (E) Longitudinal section of a 14-week-old pig testis immediately after infusion of 5 ml of a dye solution. (E, inset) Seminiferous tubules filled with dye solution. (F) Longitudinal section of a 14-week-old pig testis without treatment.

실체현미경과 형광현미경을 이용하여 정소 상태를 분석하였다.

결 과

본 연구에서 돼지 정소의 세정관 내로 정원줄기세포를 포함하는 정소세포들을 효율적으로 이식하기 위한 방법을 개발하기 위하여 시행하였던 연구 결과는 다음과 같다.

초기연구로서 본 연구에서 개발된 이식 장치를 이용하여 주령별 돼지 정소를 대상으로 trypan blue 액을 주입하는 연구를 시행하였다. 생후 7주령부터 일주일 간격으로 16주령까지의 돼지 정소에 trypan blue 액을 주입한 결과, 14주령 이상의 돼지에서 정소의 세정관 내로 염색액이 주입되는 것이 관찰되었다. 14주령 미만의 경우에는 대부분의 염색액이 세정관 내부가 아닌 정소의 간질 조직으로 흘러들어감이 관찰되었다. 본 연구의 결과는 Honaramooz 등(2002)이 8~12주령의 돼지 recipient를 이용하여 성공적인 주입 과정이 시행되었을 경우 50% 정도의 세정관 내로 염색액의 주입이 가능하였다는 보고와는 차이가 있었다. 원인 분석을 위하여 주령별 돼지 정소와 원활한 세포의 이식이 가능한 것으로 알려진 busulfan을 주사하여 세정관내 생식세포들이 인위적으로 제거된 생쥐

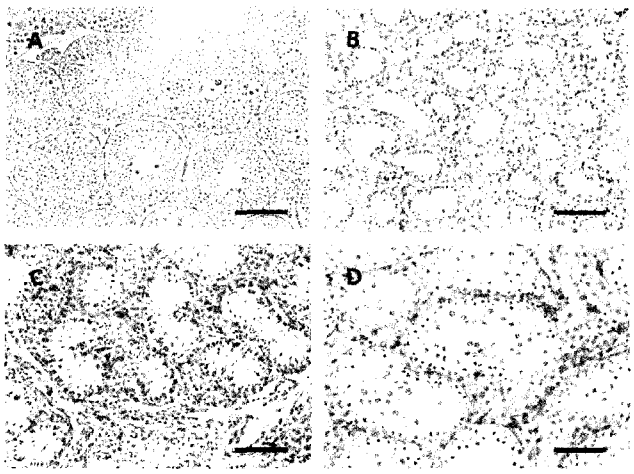

Fig. 2. Histological appearance of mouse and pig testes. (A) Adult mouse testis. (B) 7-week-old pig testis. (C) 9-week-old pig testis. (D) 14-week-old pig testis. Bar=100 μm (A~D).

정소 및 성숙한 생쥐 정소의 조직학 표본을 대상으로 세정관의 직경을 조사하였다. 돼지의 경우 7주령, 9주령, 14주령 각각에서 세정관의 직경(mean±SEM)은 55.0±1.0 μm, 64.6±1.5 μm, 113.5±2.3 μm이었으며(Fig. 2(B), (C), (D)), 생쥐의 경우 busulfan이 처리된 생쥐와 성숙한 생쥐 각각에서 세정관의 직경(mean±SEM)은 101.9±5.8 μm(사진 제시되지 않음), 160.3±2.1 μm(Fig. 2(A))이었다. Honaramooz 등(2002)의 보고에서는 연구에 공시한 recipient 정소의 세정관 직경에 대한 정보가 기술되지 않은 관계로 직접적으로 결과의 차이를 비교할 수는 없었지만, 상기 세정관의 직경 조사 결과를 토대로 미성숙한 돼지의 경우에 세정관의 크기가 일정 정도로 발육되어야만 이식을 위한 recipient로서 유용함을 알 수 있었다. 따라서 이후 연구는 14주령 이상의 돼지 정소를 대상으로 시행하였다.

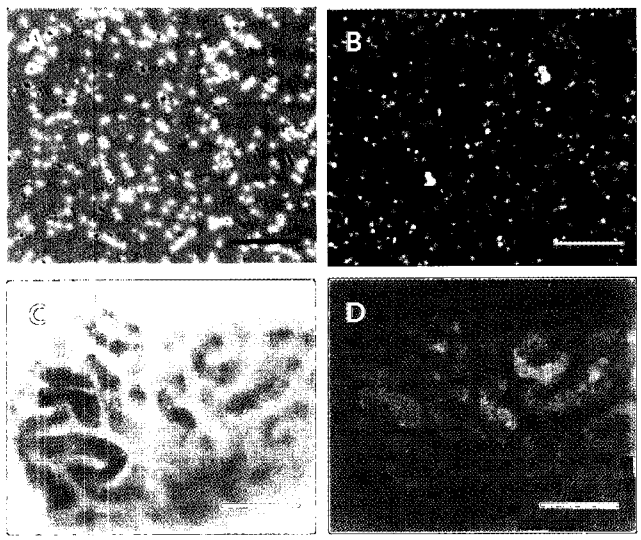

Fig. 3. Fluorescent-labeled donor cells in the seminiferous tubules of recipient pigs. (A, B) Light and corresponding fluorescence photomicrograph of dispersed donor testis cells. (C, D) Seminiferous tubules illustrating the presence of fluorescent-labeled cells immediately after transplantation. Bar=200 μm (A~D).

세정관 내로의 염색액 주입은 염색액이 주입되는 속도에 따라 많은 차이를 나타내었다. 염색액 주입시 주입되는 속도가 빠른 경우에는 정소 전체의 세정관 중 약 10% 정도에서 염색액이 관찰되었고 대부분의 염색액은 정소의 간질 조직으로 흘러들어감이 관찰되었다. 세정관 내로 효율적인 염색액의 주입을 위하여 분당 주입되는 염색액의 양을 조사한 결과 Honaramooz 등(2002)의 보고와 유사하게 분당 0.6~1 ml의 염색액을 주입할 경우 가장 좋은 주입 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 14주령의 돼지 정소의 경우, 상기 주입 속도를 유지하였을 때 정소의 세정관 내로 총 5~7 ml의 염색액 주입이 가능하였고, 정소 내 50% 이상의 세정관에서 관 내부에 염색액의 주입이 확인되었다. 반면, 주입되는 염색액의 양이 7 ml을 초과하였을 경우에는 염색액이 정소상체 두부 쪽으로 흘러들어감이 관찰되었다.

이상의 염색액 주입 결과에서 얻어진 최적의 이식 조건을 사용하여 돼지 정소세포의 recipient 정소 내로의 이식을 시행하였다. 공여돼지의 정소에서 단일 세포들을 분리한 후 회수된 세포들을 형광염색액(PKH26)을 이용하여 형광표지하였고(Fig. 3(A), (B)) trypan blue 액을 첨가하여 세포부유액을 준비하였다. 염색액만을 주입하였던 경우와 동일한 조건하에서 세포부유액의 세정관 내로의 주입은 전반적으로 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 세포부유액의 주입시 세포 농도가 높았을 경우(100×10^6 cells/ml) 간혹 주사침의 막힘 현상으로 인하여 원활한 주입이 이루어지지 않는 경우가 발생하기도 하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서 고안된 이식 기구의 우측에 공기의 유출입 조절이 가능한 주사기를 장착하여(Fig. 1(A)) 임의로 공기압을 조정하는 방식으로 막힘을 제거하여 원활한 이식 과정을 수행할 수 있었다. 이식 시 세포부유액에 첨가되었던 trypan blue 액의 푸른색을 이용하여 세포부유액의 세정관 내로의 주입 정도를 관찰하였고, 형광현미경을 이용한 관찰을 통하여 세정관 내로 정소세포들이 정확히 이식되었는지의 여부를 확인하였다. 정소 내 50% 이상의 세정관 내로 세포부유액이 주입되었고, 세포부유액이 주입된 세정관 내에서 형광 표지된 정소세포들이 고루 이식되어짐이 관찰되었다(Fig. 3(C), (D)).

고 찰

본 연구는 유용 가축인 돼지의 정소로부터 회수된 정원줄기세포를 포함하는 정소세포를 recipient 수돼지 정소에 이식하는 방법의 개발에 관한 것으로서, 초음파 장치의 유도하에 본 연구에서 고안된 세포 이식 장치를 이용하여 효율적인 세포 이식이 가능함에 따라 향후 돼지 정원줄기세포의 연구 및 활용법 개발에 획기적인 돌파구를 마련할 것으로 기대된다.

경제적 가치를 지닌 가축에 있어서 정원줄기세포의 이식 기법은 정원줄기세포의 특성 및 생물학적 활성도를 분석하는데 있어서 필수적인 실험 방법일 뿐 아니라 활용적인 측면에서 germ-line modification을 통한 형질전환가축의 생산 효율을 증진시킬 수 있는 새로운 접근법으로 활용될 수 있는 유용한 기법이다. 최근 가축을 대상으로 정원줄기세포의 이식 기법(Honaramooz 등, 2002; Honaramooz 등, 2003; Izadyar 등, 2003; 본 연구) 및 유전자 도입(Honaramooz 등, 2008; Ryu 등, 미발표) 등이 보고됨에 따라 정원줄기세포의 이식 기법을 이용한 형질전환가축 생산에 관한 가능성이 열리고 있다.

그간 정원줄기세포의 이식 기법을 이용한 연구들은 주로 생쥐나 랫트와 같은 실험동물을 대상으로 많은 발전이 이루어져 왔다. 생쥐와 랫트에서 정원줄기세포에서의 유전자 조작과 이식을 통하여 형질전환동물이 생산되었으며(Nagano 등, 2001; Hamra 등, 2002; Ryu 등, 2007), 생쥐의 경우, 정원줄기세포를 이용한 유전자적중 동물의 생산이 보고되었다(Kanatsu-Shinohara 등, 2006). 현재까지 실험동물을 대상으로 정원줄기세포와 이식 기법을 이용한 괄목할만한 성과들은 현재 배아줄기세포가 확립되어 있지 않은 가축에 있어서도 이를 이용한 유전자적중 동물의 생산 분야에 획기적인 발전을 이룰 수 있는 전기를 마련하였다고 생각된다.

정원줄기세포와 이식 기법을 이용한 활용법을 개발하기 위하여 선행되어야 할 조건들은 공여동물의 정소로부터 정원줄기세포의 순수도가 증진된 세포군을 확보할 수 있는 기술의 개발과 이식된 정원줄기세포가 이상 없이 자가증식(self-renewal)되고 분화될 수 있는 정소 환경을 제공하는 건강한 recipient 동물을 준비하는 것이다. 정소 내 정원줄기세포는 성체의 경우 극히 적은 수(생쥐, 1개의 정원줄기세포/3,333 정소세포(Tegelenbosch와 de Rooij, 1993); 랫트, 1개의 정원줄기세포/500 정소세포(Orwig 등, 2002))로 존재하기 때문에 그간 연구에 많은 어려움이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 정원줄기세포의 순수도가 증진된 세포군을 확보할 수 있는 기술인 세포외기질물질(extracellular matrix)을 이용한 정원줄기세포의 분리(Shinohara 등, 1999; Orwig 등, 2002), 정원줄기세포의 표면에서 특이적으로 발현되는 단백질을 발굴하여 이에 대한 항체와 FACS(fluorescence activated cell sorting) 및 MACS(magnetic activated cell sorting) 기법을 적용하여 순수도가 증진된 세포군을 확립하는 기술들이 보고되고 있다(Shinohara 등, 2000; Kubota 등, 2003; Ryu 등, 2004; Ryu 등, 2005). 그러나 돼지를 포함한 가축에 있어서는 현재까지 세포 표면에 발현되는 특이 단백질에 대해 개발된 항체 자원들이 실험 동물과 비교하여 부족한 상황이기 때문에 FACS나 MACS의 적용은 극히 제한적인 실정이다. 따라서 가축의 경우에는 Percoll을 이용한 원심분리법(Aponte PM 등, 2006; Geol 등, 2007)과 laminin이나 gelatin(Ryu 등, 미발표)과 같은 세포외기질물질을 이용하여 정원줄기세포의 순수도가 증진된 세포군의 확보에 관한 연구들이 진행되고 있다.

정원줄기세포의 이식에 있어서 효율적인 recipient 동물의 개발은 이식의 성공 여부를 결정할 수 있는 중요한 부분 중의 하나이다(Ogawa 등, 1999). Recipient 정소의 세정관에 내재적인 생식세포들이 여러 층으로 존재할 경우, 이식되어지는 정원줄기세포는 recipient의 세정관 내에서 기저부에 위치하는 niche에 도달하지 못하는 것으로 알려지고 있다(Shinohara 등, 2002, Ryu 등, 2003). 따라서 세정관 내에 내재적인 생식세포들을 제거하여 이식되는 정원줄기세포가 자리 잡을 수 있는 다수의 niche가 확보된 정소를 지닌 동물의 생산이 필요하다. 정원줄기세포의 이식을 위한 recipient 동물의 생산 방법으로서 다수의 방법들이 보고되고 있으며(Ogawa 등, 1999; Creemers 등,

2002; Giuili 등, 2002; Honaramooz 등, 2005), 이들 중 busulfan을 처리하는 방법이 보편적으로 널리 사용되고 있다. Busulfan 처리법에 있어서도 성숙된 성체, 미성숙 개체 또는 임신중인 암컷에 busulfan을 처리하여 수컷 태아에 busulfan의 영향이 미치게 하는 처리법들이 정원줄기세포 이식을 위한 recipient 동물의 생산 방법으로 사용되고 있다(Ogawa 등, 1999; Brinster 등, 2003; Ryu 등, 2003). 최근 돼지에 있어서 임신된 모돈에 busulfan을 처리한 후 분만된 수컷 산자에서 내재적인 생식세포들이 거의 제거된 건강한 정소를 지닌 동물 생산이 보고되었다(Honaramooz 등, 2005; Ryu 등, 미발표). 아직까지 돼지 정원줄기세포의 이식 기법을 통하여 공여 정원줄기세포에서 유래되어지는 산자 생산에 관한 결과는 보고되지 않았지만, 정원줄기세포의 순수도 증진 기법과 recipient 동물의 생산 및 효율적인 이식 기법 등의 개발로 인하여 곧 유용 가축인 돼지에서도 정원줄기세포의 이식 기법을 이용한 다각적인 활용 기법들이 획기적으로 발전할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

최근 Ryu 등(2006)은 정원줄기세포의 노화(aging)에 관한 연구에서 생쥐 정원줄기세포를 젊은 생쥐 recipient의 정소에 이식하고 3개월가량 배양한 후 recipient 정소로부터 이식되어졌던 정원줄기세포를 재회수하여 또 다른 젊은 생쥐 recipient 정소에 재이식하는 과정을 반복한 결과, 생쥐의 평균 수명 기간을 넘어선 3년 이상된 정원줄기세포에서도 정원줄기세포의 줄기세포능력이 유지된다고 보고하였다. 상기 결과는 일반적인 생명체의 노화 과정에 있어서 정원줄기세포의 경우에는 niche 환경이 적절할 경우, 노화되지 않는다는 특성을 객관적인 생체검증을 통하여 제시한 것으로서 적절한 환경 하에서 정원줄기세포를 장기간 활용할 수 있다는 가능성을 제시한 결과이다. 상기 결과를 가축에 적용한다면 질병이나 노화 등으로 정액채취가 불가능한 우수 종모돈의 정소로부터 정원줄기세포를 채취하고 젊은 recipient 정소에 이식하여, 인공수정 등에 유용한 이식된 종모돈의 정원줄기세포에서 유래된 정자를 생산하는 방법으로 우수 종모돈의 활용도를 증진시킬 수 있는 기술 개발 등에 활용이 가능할 것으로 사료된다. 이와 같은 기술 개발을 통하여 가축 산업에 있어서 우수 종모돈을 선발하는데 소요되는 기간과 경비 절감에 따른 경제 효과를 창출할 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 본 연구에서 개발된 돼지 생식세포의 이식 기법이 추후 정원줄기세포의 순수도 증진, 효율적인 돼지 recipient의 생산 등에 관한 기술들과 병행하여 활용된다면 정원줄기세포의 다양한 활용법 개발에 핵심 기술로 사용되어 생명공학 및 가축 산업 발전에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Aponte PM, Soda T, van de Kant HJ, de Rooij DG (2006): Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. Theriogenology 65:1828-1847.
2. Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE (2003): Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. Biol Reprod 69:412-420.
3. Brinster RL, Avarbock MR (1994a): Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 91: 11303-11307.
4. Brinster RL, Zimmermann JW (1994b): Spermatogenesis following male germ-cell ransplantation. Proc Natl Acad Sci USA 91:11298-11302.
5. Creemers LB, Meng X, den Ouden K, van Pelt AM, Izadyar F, Santoro M, Sariola H, de Rooij DG (2002): Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. Biol Reprod 66: 1579-1584.
6. Giuili G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F (2002): Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. EMBO Rep 3:753-759.
7. Goel S, Sugimoto M, Minami N, Yamada M, Kume S, Imai H (2007): Identification, isolation, and *in vitro* culture of porcine gonocytes. Biol Reprod 77: 127-137.
8. Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, Garbers DL (2002): Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 12:99:14931-14936.
9. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I (2002): Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod 66: 21-28.
10. Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Galantino-Homer H, Echelard Y, Dobrinski I (2003): Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. Biol Reprod 69:1260-1264.
11. Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, Azuma C, Echelard Y, Dobrinski I (2005): Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. J Androl 26:698-705.
12. Honaramooz A, Megee S, Zeng W, Destrempes MM, Overton SA, Luo J, Galantino-Homer H, Modelski M, Chen F, Blash S, Melican DT, Gavin WG, Ayres S, Yang F, Wang PJ, Echelard Y, Dobrinski I (2008): Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. FASEB J 22:374-382.
13. Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J, Lankveld DP, Spoormakers TJ, Colenbrander B, Oldenbroek JK, van der Ploeg KD, Woelders H, Kal HB, De Rooij DG (2003): Autologous and homo-

logous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction 126:765-774.
14. 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 23:103:8018-8023.
15. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2003): Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 27:100:6487-6492.
16. Meistrich ML, van Beek MEAB (1993): Spermatogonial stem cells. In: Desjardins C, Ewing LL (eds.), Cell and Molecular Biology of Testis. Oxford University Press, Oxford, New York, pp 266-295.
17. Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL (2001): Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 6:98:13090-13095.
18. Ogawa T, Dobrinski I, Brinster RL (1999): Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. Tissue Cell 31:461-472.
19. Orwig KE, Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (2002): Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. Biol Reprod 66:944-949.
20. Potten CS (1992): Cell Lineages. In: McGee JO, Isaacson PG, Wright NA (eds.), Oxford Textbook of Pathology vol 1. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 43-52.
21. Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990): Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, pp 1-40.
22. Ryu BY, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL (2003): Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. Dev Biol 15:263:253-263.
23. Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004): Phenotypic and functional characteristics of spermatogonial stem cells in rats. Dev Biol 1:274:158-170.
24. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2005): Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. Proc Natl Acad Sci USA 4:102:14302-14307.
25. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2006): Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. Stem Cells 24:1505-1511.
26. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Lin CC, Chang LJ, Avarbock MR, Brinster RL (2007): Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. J Androl 28:353-360.
27. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (1999): Beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 11:96:5504-5509.
28. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL (2000): Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proc Natl Acad Sci USA 18:97:8346-8351.
29. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL (2002): Germ line stem cell competition in postnatal mouse testes. Biol Reprod 66:1491-1497.
30. Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993): A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F_1 hybrid mouse. Mutat Res 290:193-200.
31. Wing TY, Christensen AK (1982): Morphometric studies on rat seminiferous tubules. Am J Anat 165: 13-25.

(접수일자: 2008. 8. 26 / 채택일자: 2008. 9. 12)