

## 돼지 혈관내피세포 특이적 CD73 발현 벡터가 도입된 돼지 섬유아세포 생산

오건봉<sup>†</sup>, 이해선, 황성수, 옥선아, 정학재, 변승준, 이풍연, 임기순

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과 전라북도 완주군 이서면 콩쥐팍쥐로 1500, 55365

## Production of porcine fibroblasts carrying a vector enforced specific expression of CD73 to endothelial cells

Keon Bong Oh<sup>†</sup>, Haesun Lee, Seongsoo Hwang, Sun-A Ock, Hak-Jae Chung, Sung June Byun, Poongyeon Lee, Gi-Sun Im

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, 1500, Kongjiwipatjwi-ro, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 55365

### ABSTRACT

Nucleotide metabolism in endothelium is variable between different species. Recent studies demonstrated that this variability could contribute coagulation dysfunction, even though organs of the *alpha 1,3-galactosyltransferase* gene knockout pig were transplanted into the primate. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) is an enzyme at cell surface catalyzing the hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine, which plays role on a substance for anti-inflammatory and anti-coagulant. Thus, overexpression of CD73 in endothelial cells of the pig is considered as an approach to reduce coagulopathy. In this study, we constructed a human CD73 expression vector under control of porcine *Icam2* promoter (*pIcam2-hCD73*), which is expressed specifically at endothelial cells, and of *CMV* promoter as a control (*CMV-CD73*). First, we transfected the *CMV-CD73* vector into HEK293 cells, and then confirmed CD73 expression at cell surface by flow cytometry analysis. Next, we transfected the *pIcam2-CD73* and *CMV-CD73* vectors into primary porcine fibroblasts and endothelial cells. Consequence was that the *pIcam2-CD73* vector was expressed only at the porcine endothelial cells, meaning that the *pIcam2 promoter* lead to endothelial cell-specific expression of CD73 *in vitro*. Finally, we nucleofected the *pIcam2-hCD73* vector into passage 3 fibroblasts, and enforced hygromycin selection of 400mg/ml. We were able to obtain forty three colonies harboring *pIcam2-CD73* to provide donor cells for transgenic cloned porcine production.

(Key word: CD73, porcine *Icam2* promoter, coagulation, porcine fibroblasts)

### 서 론

돼지의 장기를 영장류에 이식하게 되면 초급성 면역거부반응이라고 알려진 거부반응이 이식된 장기에서 발생한다(Yang and Sykes, 2007). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 이 반응의 원인 유전자인 *α1,3-Galactosyltransferase*(GalT)의 기능이 제거된 돼지(knock out, KO)가 생산되었고(Kolber-Simonds et al., 2004; Nottle et al., 2007; Fujimura et al., 2008; Li et al., 2013), 이 돼지의 신장과 심장을 영장류에 이식한 결과 생존 기간이 크게 연장되었다고 보고되었다(Chen et al., 2005; Kuwaki et al., 2005; Yamada et al., 2005; Lin et al., 2010).

그렇지만, 결국 이식된 영장류는 사망하게 되는데 이식된 돼지의 장기를 분석한 결과 초급성 면역거부반응은 발견되지 않았지만, 혈액이 응고되면서 발생하는 혈전성미소혈관증(thrombotic microangiopathy)이 사망의 주요원인이라고 보고되었다(Houser et al., 2004; Kuwaki et al., 2005; Tseng et al., 2005; Shimizu et al., 2008).

이식된 GalT KO돼지의 조직에서 발생하는 혈액응고(coagulation, thrombosis)의 원인의 한 가지는 돼지와 영장류 사이에 혈액응고항 혈액응고 조절시스템의 불일치(incompatibility)에 의해 발생한다고 알려져 있다(Cowan and d'Apice, 2009; Lin et al., 2009; Ekser et al., 2012). 혈관에 존재하는 adenosine

<sup>†</sup> Correspondence: Keon Bong Oh  
Tel: +82-63-238-7254  
E-mail: keonoh@korea.kr

5'-triphosphate(ATP)와 같은 핵산과 아데노신과 같은 대사체들은 혈전증(thrombosis)이나 염증반응을 조절하는데 혈관내피세포 표면에 위치하는 CD73(ecto-5'-nucleotidase)은 CD39와 더불어 핵산을 아데노신으로 분해시키는 역할을 하는 효소이다 (Baron et al., 1986; Zimmermann, 1992). 분해된 아데노신은 세포보호 기능, 면역억제 기능, 혈소판 활성화제의 생리 및 약리적 특성을 갖고 있다 (Daval et al., 1991; Delikouras et al., 2003; Sitkovsky et al., 2004). CD73의 활성이 감소하면 아데노신 생산이 감소하며, 이로 인해 세포 보호 기능 인자 발현이 감소하고 혈액 응고 조절 기능 이상이 발생한다(Daval et al., 1991; Delikouras et al., 2003; Sitkovsky et al., 2004). 실제로 사람의 심장과 돼지의 심장에서 CD73의 활성능을 비교한 결과 돼지에서 낮았으며, 또한 아데노신과 같은 핵산의 대사체의 혈액 내 농도가 차이를 나타내었다(Khalpey et al., 2007). 이러한 이유로 GalT KO와 동시에 추가로 CD39와 CD73 유전자를 발현하는 돼지의 장기를 영장류에 이식하면 혈액응고와 더불어 염증반응이 억제될 것으로 기대되고 있다(Cooper et al., 2012).

본 연구에서 혈관내피세포에서 특이적으로 발현하는 돼지의 *Intercellular adhesion molecule2(Icam2)* 프로모터에 CD73 유전자를 연결한 *plcam2-CD73* 발현백터를 제작하였다. 상기 백터를 돼지에서 추출한 초기 섬유아세포와 혈관 내피세포에 도입시킨 후 발현을 분석한 결과 CD73은 혈관 내피세포에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다 이러한 결과로 *plcam2-CD73* 백터를 활용하면 이종이식용 형질전환 돼지를 생산하여 혈액응고를 억제시킬 수 있는 모델동물 생산에 적용할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 사람 CD73 cDNA 발현 백터의 제작

사람 CD73 cDNA 클론은 21C Frontier Human Gene Bank(Korea, Clone ID, Hmu001092)에서 구입하였다. 양쪽 말단에 제한 효소 *Not I*과 *Xho I* 인식 염기서열을 삽입시킨 앞쪽 프라이머 5'-ATGCGGCCGCTTTCGCACCCAGTTCAC-3'와 뒤쪽 프라이머 5'-AATCTCTCGAGCTATTGGTATAAAACAAAG-3'로 PrimeSTAR™ HS DNA polymerase (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)를 사용하여 PCR 방법으로 합성하였다. 돼지의 *Icam-2* 프로모터는 돼지 귀 조직에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 제한효소 *Nru I*과 *Hind III* 인식 염기서열을 삽입시킨 프라이머 5'-TATCGCGATCTAGAAACACACTGCAAGTCC-3'와 5'-ATAAGCTTAGGAAAGAGCCGAGGACCGCCT-3'를 사용하여 PCR 방법으로 합성하였다. 합성된 CD73 cDNA를 *pcDNA3.1 hygro* 백터의 *Not I*과 *Xho I* 인식 염기서열에 연결

시켜 *pCMV-hCD73* 백터를 완성하였다(Fig. 1A). 완성된 *pCMV-hCD73* 백터를 제한효소 *Nru I*과 *Hind III*로 절단한 후 *CMV* 프로모터를 제거하였다 그리고 나서 합성된 *Icam-2* 프로모터를 *Nru I*과 *Hind III* 인식 염기서열에 연결시켜 *plcam2-CD73* 백터를 완성하였다(Fig. 1B).

### 세포의 분리 및 배양

HEK-293 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, CA, USA)에 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen)이 첨가된 배양액으로 배양하였다. 귀 조직에서 섬유아세포의 분리 및 배양방법은 이전의 연구에 자세하게 서술되어 있다(Oh et al., 2013). 섬유아세포는 DMEM(Invitrogen)에 15%(v/v) fetal bovine serum (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), 0.1 mM b-mercaptoethanol (Invitrogen), 1% antibiotic/antimycotic (Invitrogen), 0.1x Low Serum Growth Supplement (LSGS; Invitrogen)가 첨가된 배양액으로 37°C에서 배양하였다. 혈관 내피세포 배양을 위하여 3주령 MGH 미니돼지에서 대동맥을 채취하였다. 절개한 대동맥의 혈관내벽을 0.2%(v/v) collagenase type I (Sigma)이 첨가된 6-well 배양접시에 부착시켰다 약 3 시간 후 혈관내벽에서 분리된 세포를 회수하여 0.1%(v/v) gelatin(Sigma)으로 덮인 6-well 배양접시에서 배양하였다. 혈관 내피세포 배양은 EBM™-2 endothelial basal 배양액(Lonza, Koln, Germany)에 EGM™-2 SingleQuots™ (Lonza)을 첨가한 배양액으로 37°C에서 배양을 실시하였다.

### 발현백터의 도입, 선별 및 유전자 분석

HEK-293 세포에 발현백터는 Fugene HD transfection reagent (Promega corporation, WI, USA)를 사용하여 제공되는 실험 방법에 따라 도입하였다. 돼지 섬유아세포 및 대동맥내피세포에 발현백터를 도입하기 위하여 nucleofection 방법을 사용하였으며, 방법은 이전의 연구에 자세하게 서술되어 있다(Ko et al., 2013). 돼지 혈관 내피세포에 외래 유전자를 도입하기 위하여 primary mammalian endothelial cells, Amaxa® Basic Nucleofector® Kit(Lonza)를 이용한 nucleofection 방법을 사용하였다. Nucleofection 후 48시간에 400 mg/ml 농도로 hygromycin이 첨가된 배양액에서 세포를 배양하였다. 선별에 의해 형성된 클론의 유전자 분석을 위하여 세포의 일부를 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH 8.3], 2 mM MgCl2, 0.45%(v/v) NP-40, 0.5%(v/v) Tween 20, and 100 mg/ml of proteinase K가 함유된 용해 용액으로 55°C에서 2시간 동안 항온조에서 용해시켰다. *pCMV-hCD73* 백터 삽입 확인을 위하여 앞쪽 프라이머 5'-ctattgacgtcaatgacggta-3'와 뒤쪽 프라이

며 5'-CAAACCCGAATGTCCAGTGCAA-3'를 사용하였고, *plcam2-CD73* 벡터의 삽입 확인을 위하여 앞쪽 프라이머 5'-ACTTAGTCATGGTGACTGCATGCC-3'와 위의 뒤쪽과 동일한 프라이머를 사용하였다

웨스턴 블롯 분석

돼지의 세포를 Phosphate-buffered saline (PBS)로 3회 세척 후 회수하여 protease inhibitor, phosphatase inhibitor cocktail, 0.5M EDTA (Thermo, IL, USA) 첨가된 mammalian protein extract reagent 용액(Thermo)으로 0 °C에서 1시간 동안 용해시켰다. 단백질 추출 후 Bradford 분석 방법(Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 정량 하였다 20µg의 단백질을 4-20% mini-protean® TGX™ precast gel (Bio-Rad)에서 분리시킨 후, polyvinylidene fluoride membrane (Bio-Rad)으로 이동시켰다. 그리고 나서 membrane을 사람 CD73에 대한 생쥐 단일항체 (AbD serotec, MS, UK)를 첨가한 차단 완충용액에 침지하여 4°C에서 16시간 1차 항체 반응을 유도하였다 차단 완충용액은 0.1%(v/v) Tween 20, 5%(v/w) 지방이 제거된 분유가 첨가된 PBS를 사용하였다. 차단 완충용액에 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz, CA, USA)가 첨가된 용액으로 2차 항체 반응을 유도한 후 ECL chemiluminescence kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 CD73 발현을 확인하였다.

유세포 분석(Flow cytometry analysis)

배양접시에서 배양중인 돼지의 세포를 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 3회 세척 하고 나서, enzyme-free cell dissociation solution (EMD Millipore Corporation, MA, USA)을 사용하여 세포를 배양접시로부터 분리시켰다원심분리를 사용하여 분리된 세포를 회수하여 PBS 용액에 PE-conjugated 사람 CD73 항체(BioLegend, CA, USA)가 첨가된 용액으로 부유시킨 후 1시간 동안 0°C에서 항체 반응을 유도

하였다. 그리고 나서 유세포분석기(BD FACSvantage™SE, Germany)를 사용하여 CD73의 발현을 분석하였다

결과 및 고찰

CD73은 다양한 조직의 혈관내피 세포와 상피세포 그리고 혈액의 면역세포 등 다양한 형태의 세포에서 발현된다(Resta et al., 1993). 그런데 CD73은 신경교종, 백혈병, 방광암, 난소암, 대장암, 유방암 등의 다양한 암 조직에서 과발현되며 이로 인해 과도하게 생성된 아데노신이 암 세포의 성장을 촉진한다고 알려져 있다(Allard et al., 2012). 따라서 본 연구에서는 CD73의 발현을 혈관 내피세포로 제한하고자 발현 조절 부위를 *Icam-2* 프로모터로 사용하기로 하였다 이전의 연구에서 사람 *Icam-2* 프로모터는 체외와 체내에서 혈관 내피세포에 특이적으로 외래 유전자의 발현을 조절한다고 보고 되었으며(Cowan et al., 1998), 돼지에 있어서도 약 900bp의 *Icam-2* 프로모터는 혈관 내피세포 특이적 발현을 유도한다고 보고되었다(Godwin et al., 2006). 재료 및 방법에서 설명한 것처럼 920bp의 돼지 *Icam-2* 프로모터를 사람 CD73 cDNA에 연결한 *plcam2-CD73* 벡터를 제작하였고, 대조군 벡터로서 *CMV-CD73* 벡터도 제작하였다 (Fig. 1). 상기 벡터로부터 CD73이 발현되는지 확인하기 위하여 *CMV-CD73* 벡터를 사람 유래 세포 HEK293에 도입하였다. 도입된 세포로부터 웨스턴 블롯 분석을 실시한 결과 CD73은 HEK294 세포의 내인성 CD73과 동일한 크기로 발현된다는 것을 확인하였다. CD73은 세포막의 glycosilphosphatidylinositol (GPI)에 anchor된 단백질이다. 그러므로 CD73이 세포막에서 발현하는 지를 알아보기 위하여 flow cytometry 분석 방법으로 분석한 결과 도입된 벡터로부터 거의 모든 97.6%의 세포 표면에서 발현된다는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

돼지의 *Icam2* 프로모터의 조절에 의해 CD73의 발현이 혈관내부 세포에만 제한적으로 발현이 조절되는지 알아보기 위

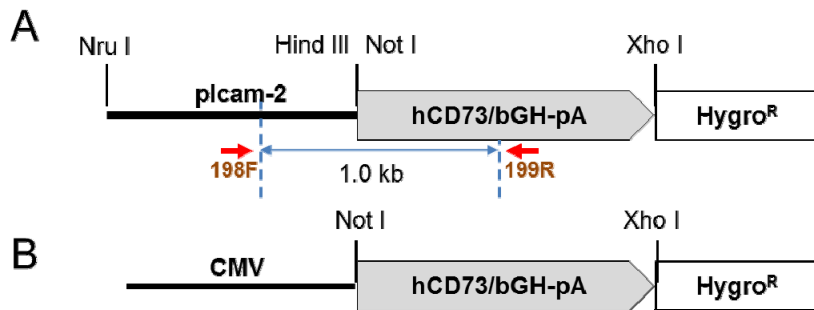


Figure 1. Structure of the vector designed for expressing CD73 specifically at endothelial cells (A) and whole cells as a control. The primer sites to validate integration of the *plcam2-CD73* vector were shown as 198F and 199R.

하여 초기 돼지 섬유아세포와 돼지 혈관 내피세포에 위의 두 벡터를 nucleofection 방법으로 도입하였다. 그림 3A에 나타난 것처럼 웨스턴 블롯 분석한 결과 돼지 섬유아세포에서는 CMV 프로모터의 조절에 의해 CD73이 발현되지만 돼지 *Icam-2* 프로모터에 의해서는 CD73이 발현되지 않았다. 그렇지만 돼지 혈관 내피세포에서는 비록 CMV 프로모터에 의한 것보다 발현 수준이 낮았지만, 돼지 *Icam2* 프로모터에 의해 발현되는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 약 900bp의 돼지 *Icam-2* 프로모터는 혈관 내피세포에서의 특이적 발현을 유도할 수 있다는 것을 의미한다

위의 결과로부터 본 연구에서 클로닝한 돼지 *Icam-2* 프로모터는 혈관 내피세포에 특이적 발현을 유도할 수 있고, 또한 CD73이 세포막에서 발현하므로 *pIcam2/CD73* 벡터가 삽입된 형질전환 세포주를 제작하기로 하였다 이를 위해 섬유아세포에 *pIcam2/CD73* 벡터와 *CMV-CD73* 벡터를 nucleofection 방법으로 도입한 후 hygromycin을 사용하여 유전자가 도입된 세포를 선별하였다. Table 1에서 처럼 선별 후 형성된 각각의 콜로니 46개와 53개를 분석한 결과 43개(Fig 4)와 37개(자료 미제출)의 콜로니에 *pIcam2/CD73* 벡터와 *CMV-CD73* 벡터가 각각 삽입되었다는 것을 확인하였다

GalT 유전자의 기능이 제거를 기본으로 급성 및 혈관성 거부반응을 억제시키기 위한 보체 조절 단백질 CD46과 혈액응고 인자의 작용을 억제하는 thrombomodulin, endothelial protein C receptor 등을 동시에 발현하는 형질전환 돼지가 생산되고 있다(Iwase 등, 2014; 2015). 본 연구에서는 혈액응고 억제뿐

만 아니라 보체 C2의 생성을 억제하고, 혈류 조절에 관여함과 동시에 종양괴사인자인 TNF- $\alpha$ 나 각종 염증성 사이토카인으로부터 조직을 보호하고 면역세포의 기능을 억제하는 역할을 수행하는 아데노신의 기능에 주목하였다(Lappin and Whaley, 1984; Meldrum et al., 1997; Sitkovsky et al., 2004). 돼지의 혈액에 존재하는 아데노신은 ATP의 분해산물인 AMP로부터 혈관내피세포막에 존재하는 핵산 분해효소인 CD73에 의해 생성된다. 아데노신은 신장을 이식 받은 환자에게 면역억제제인 cyclosporine A를 처리하였을 때 그 농도가 증가하여 자연적인 면역억제제로서의 기능을 수행한다고도 알려진 바 있다(Guieu et al., 1998). Hasegawa 등(2008)은 CD73이 결핍된 쥐의 심장을 동종의 다른 개체에 이식하는 실험을 통해 CD73이 염증반응을 억제하며 심장 이식 부작용으로 생성되는 심장 동종 이식 혈관병증(cardiac allograft vasculopathy)을 완화시켜 개체의 생존율을 높인다고 보고하였다

혈액에서 ATP가 아데노신으로 분해되는 과정인 퓨린 신호 전달(purinergic signaling) 경로에는 핵산 분해효소인 CD39도 관여하여 ATP를 adenosine 5'-diphosphate(ADP), adenosine 5'-monophosphate(AMP)로 분해시킨다. 특히 CD39는 핵산 분해효소 중에서 다른 효소들과 비교하였을 때 가장 효과적으로 CD73과 상호작용을 한다고 보고되고 있다(Fausther et al., 2012). 현재까지 CD39를 발현하는 형질전환 돼지는 개발되었으나(Wheeler et al., 2012), CD73을 도입한 돼지에 관해서는 보고된 바가 없기 때문에 형질전환 돼지 개발의 필요성이 제기되고 있다.

Table 1. Summary of the production of porcine fibroblasts carrying *pIcam2-CD73* vector

Vector Name	No. of analyzed colonies	No. of PCR positive colonies	Percentage of positive colonies
pIcam2-CD73	48	45	93.8
pCMV-CD73	53	37	69.8

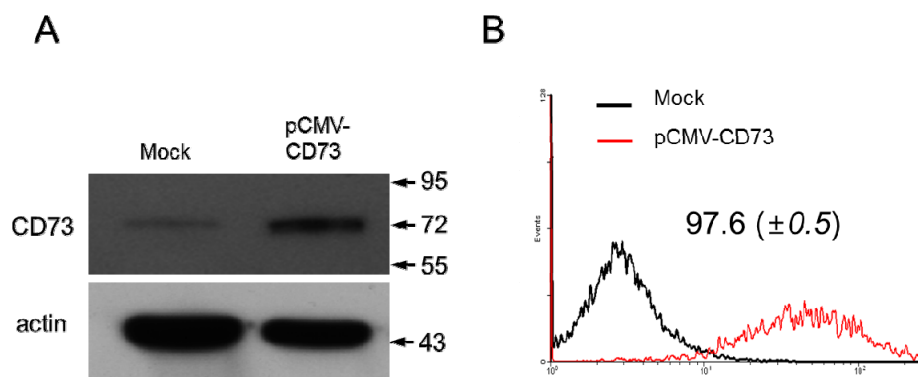


Figure 2. Consistent expression of CD73 in the cells. The *pCMV-CD73* vector was introduced into HEK293 cells. Western blot(A) and flow cytometry(B) analyses for CD73 expression.

CD73이 높은 수준에서 발현되면 암세포의 성장 촉진 (Allard et al., 2012) 등의 부작용이 발생할 가능성이 있으므로, 이를 억제하고자 본 연구에서는 돼지의 혈관내피세포에서 특이적으로 CD73이 발현되도록 돼지의 *plcam2* 프로모터를 이용하였다. 그림 3B에서 보여진 것처럼 *plcam2-CD73* 벡터가 도입된 돼지 혈관 내피에서의 CD73의 발현 수준은 *CMV-CD73* 발현 벡터가 도입된 세포에서 보다 낮았다. Khalpey 등(Khalpey et al., 2007)은 돼지 심장에서 CD73의 활성능은 사람의 심장에서 보다 약4배 정도 낮으며, 신장과 혈관 내부세포에서도 유사한 비율로 사람의 것보다 돼지에서 낮다고 보고하였다. 이러한 관점에서 보면 혈관 내부세포에서 *plcam2-CD73* 벡터로부터 발현된 CD73의 수준은 낮은 것이 아니라고 판단되며, 또한 특이적인 발현을 유도하므로 혈관성 거부반응 제어 관련 유전자 발현을 위한 프로모터로 활용하는데 적당하다고 생각된다.

사람의 *CD39*를 과발현하는 형질전환 돼지를 개발한 Wheeler 등(2012)은 심장에 심근허혈재관류 손상을 유도했을 때 허혈 손상 부위와 경색 부위의 면적이 일반돼지에 비해 유

의하게 감소하였다고 보고하였다. CD39와 순차적으로 핵산을 분해하는 기능을 고려할 때 *CD73*을 과발현하는 형질전환 돼지에서도 동일한 효과를 보일 것으로 추정된다. 그렇지만, 원숭이에 장기를 이식했을 때 과발현된 CD39 또는 CD73에 의해 생성된 아데노신이 혈액응고를 효과적으로 억제할 것인지는 아직 알려지지 않았다.

최근의 보고에 의하면 GalT KO를 기본으로 보체 조절 단백질 CD46과 혈액응고인자의 작용을 억제하는 Thrombomodulin을 과발현하는 형질전환 돼지의 심장을 바분 원숭이에 이식하여 최장 945일 생존하였다고 보고되었다(Mohiuddin et al., 2016). 본 연구에서 개발한 *CD73* 발현 벡터가 도입된 체세포주를 활용하여 돼지가 생산된다면 GalT KO/CD46 돼지(Hwang et al., 2013; Ko et al., 2013)와 교배를 통해 복합 형질전환 돼지를 개발한 후 그 장기를 원숭이에 이식하는 이중 이식용 모델로서 활용한다면 염증반응과 혈액응고 반응과 같은 급성 혈관성 거부반응을 이해하고 제어하기 위한 연구 재료가 가치가 있을 것이라 기대된다.

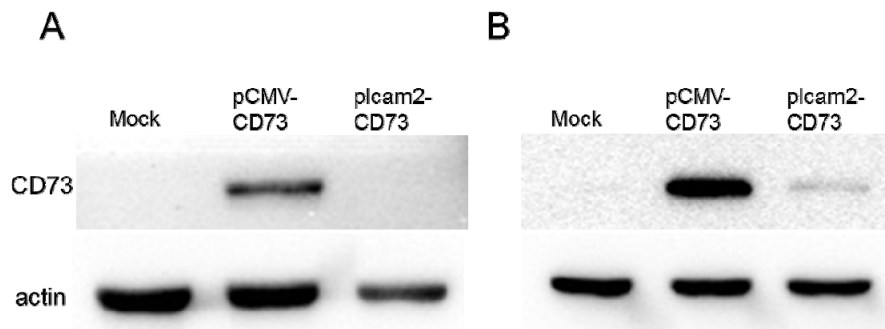


Figure 3. Endothelial cell specific expression of CD73 in the cells. The *pCMV-CD73* vector and *plcam2-CD73* vector were introduced into porcine fibroblasts (A) and endothelial cells (B). Western blot analysis showed that CD73 expression from the *plcam2-CD73* vector was restricted to porcine endothelial cells.

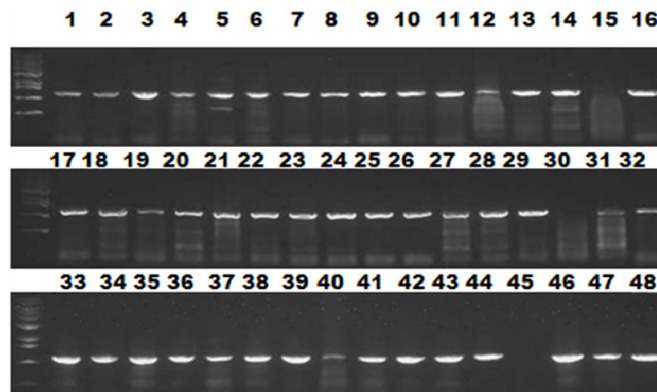


Figure 4. PCR analysis to confirm insertion of *plcam2-CD73* vector into porcine fibroblasts. Nucleofected fibroblasts were selected with hygromycin as described in materials and methods in detail. Primer set was presented in figure 1.

## 사사

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 프로그램과제번호 PJ012022)의 지원에 의해 이루어진 것임

## 결론

혈관에서 발생하는 핵산의 대사 과정과 대사체는 동물의 종에 따라 다르다고 알려져 있다 최근의 연구에 의하면 *alpha 1,3-galactosyltransferase* 기능이 제거된 돼지의 장기를 영장류에 이식하였을 때 혈액 응고 현상이 발생하는 데 돼지와 영장류의 핵산 대사 차이가 한 원인이라고 보고되었다 CD73은 adenosine triphosphate을 항 염증 반응과 항 응고 반응에 관여하는 아데노신으로 분해하는 효소이다 본 연구에서 혈관내피세포에서 특이적으로 발현하는 *Icam2* 유전자의 프로모터와 전 조직에서 발현을 유도하는 *CMV* 프로모터에 사람 CD73 cDNA를 연결하여 *pIcam2-hCD73* 벡터와 대조군으로서 *CMV-CD73* 벡터를 각각 제작하였다. HEK293 세포에 *CMV-CD73* 벡터를 도입한 후 발현을 유세포 분석 방법으로 분석한 결과 세포막에서 CD73이 발현되는 것을 확인하였다. 상기 벡터를 돼지에서 추출한 섬유아세포와 혈관내피세포에 도입시킨 후 CD73 발현을 분석한 결과 *CMV-CD73* 벡터는 돼지 섬유아세포와 혈관내피세포에서 발현이 확인되었지만, *pIcam2-hCD73* 벡터는 돼지 혈관내피세포에서만 발현이 확인되었다. 마지막으로 형질전환 복제돼지 생산을 위한 공여세포로서 *pIcam2-hCD73* 벡터가 도입된 43개의 콜로니를 생산하였다.

## REFERENCES

- Allard B, Turcotte M, Stagg J. 2012. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol* 2012:485156.
- Baron MD, Pope B, Luzio JP. 1986. The membrane topography of ecto-5'-nucleotidase in rat hepatocytes. *Biochem J* 236:495-502.
- Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DK, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ, Zhong R. 2005. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 11:1295-1298.
- Cooper DK, Eksler B, Burlak C, Ezzelarab M, Hara H, Paris L, Tector AJ, Phelps C, Azimzadeh AM, Ayares D, Robson SC, Pierson RN, 3rd. 2012. Clinical lung xenotransplantation--what donor genetic modifications may be necessary? *Xenotransplantation* 19:144-158.
- Cowan PJ, d'Apice AJ. 2009. Complement activation and coagulation in xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 87:203-208.
- Cowan PJ, Tsang D, Pedic CM, Abbott LR, Shinkel TA, d'Apice AJ, Pearse MJ. 1998. The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J Biol Chem* 273:11737-11744.
- Daval JL, Nehlig A, Nicolas F. 1991. Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci* 49:1435-1453.
- Delikouras A, Fairbanks LD, Simmonds AH, Lechler RI, Dorling A. 2003. Endothelial cell cytoprotection induced in vitro by allo- or xenoreactive antibodies is mediated by signaling through adenosine A2 receptors. *Eur J Immunol* 33:3127-3135.
- Eksler B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. 2012. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 379:672-683.
- Fausther M, Lecka J, Soliman E, Kauffenstein G, Pelletier J, Sheung N, Dranoff JA, Sevigny J. 2012. Coexpression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 with specific NTPDases differentially regulates adenosine formation in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G447-459.
- Fujimura T, Takahagi Y, Shigehisa T, Nagashima H, Miyagawa S, Shirakura R, Murakami H. 2008. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene-deficient pigs by somatic cell nuclear transfer: a novel selection method for gal alpha 1,3-Gal antigen-deficient cells. *Mol Reprod Dev* 75:1372-1378.
- Godwin JW, Fasicaro N, d'Apice AJ, Cowan PJ. 2006. Towards endothelial cell-specific transgene expression in pigs: characterization of the pig ICAM-2 promoter. *Xenotransplantation* 13:514-521.
- Guiou R, Dussol B, Devaux C, Sampol J, Brunet P, Rochat H, Bechis G, Berland YF. 1998. Interactions between cyclosporine A and adenosine in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 53:200-204.

- Hasegawa T, Bouis D, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. 2008. Ecto-5' nucleotidase (CD73)-mediated adenosine generation and signaling in murine cardiac allograft vasculopathy. *Circ Res* 103:1410-1421.
- Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, Gollackner B, Cheng J, Shimizu A, Schuurman HJ, Cooper DK. 2004. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* 11:416-425.
- Hwang S, Oh KB, Kwon DJ, Ock SA, Lee JW, Im GS, Lee SS, Lee K, Park JK. 2013. Improvement of cloning efficiency in minipigs using post-thawed donor cells treated with roscovitine. *Mol Biotechnol* 55:212-216.
- Khalpey Z, Yuen AH, Lavitrano M, McGregor CG, Kalsi KK, Yacoub MH, Smolenski RT. 2007. Mammalian mismatches in nucleotide metabolism: implications for xenotransplantation. *Mol Cell Biochem* 304:109-117.
- Iwase H, Ekser B, Hara H, Phelps C, Ayares D, Cooper DK, Ezzelarab MB. 2014. Regulation of human platelet aggregation by genetically modified pig endothelial cells and thrombin inhibition. *Xenotransplantation* 21:72-83.
- Iwase H, Liu H, Wijkstrom M, Zhou H, Singh J, Hara H, Ezzelarab M, Long C, Klein E, Wagner R, Phelps C, Ayares D, Shapiro R, Humar A, Cooper DK. 2015. Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: longest life-supporting organ graft survival to date. *Xenotransplantation* 22:302-309.
- Ko N, Lee JW, Hwang SS, Kim B, Ock SA, Lee SS, Im GS, Kang MJ, Park JK, Oh SJ, Oh KB. 2013. Nucleofection-mediated alpha1,3-galactosyltransferase gene inactivation and membrane cofactor protein expression for pig-to-primate xenotransplantation. *Anim Biotechnol* 24:253-267.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS, Hawley RJ. 2004. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7335-7340.
- 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, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 11:29-31.
- Lappin D, Whaley K. 1984. Adenosine A2 receptors on human monocytes modulate C2 production. *Clin Exp Immunol* 57:454-460.
- Li P, Estrada JL, Burlak C, Tector AJ. 2013. Biallelic knockout of the alpha-1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases. *The Journal of surgical research* 181:e39-45.
- Lin CC, Cooper DK, Dorling A. 2009. Coagulation dysregulation as a barrier to xenotransplantation in the primate. *Transpl Immunol* 21:75-80.
- Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R, Ekser B, Long C, Hara H, Echeverri G, Torres C, Watanabe H, Ayares D, Dorling A, Cooper DK. 2010. Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation. *Am J Transplant* 10:1556-1568.
- Meldrum DR, Cain BS, Cleveland JC, Jr., Meng X, Ayala A, Banerjee A, Harken AH. 1997. Adenosine decreases post-ischaemic cardiac TNF-alpha production: anti-inflammatory implications for preconditioning and transplantation. *Immunology* 92:472-477.
- Mohiuddin MM, Singh AK, Corcoran PC, Thomas Iii ML, Clark T, Lewis BG, Hoyt RF, Eckhaus M, Pierson Iii RN, Belli AJ, Wolf E, Klymiuk N, Phelps C, Reimann KA, Ayares D, Horvath KA. 2016. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat Commun* 7:11138.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ, d'Apice AJ. 2007. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339-344.
- Oh KB, Kim B, Hwang S, Ock S-A, Im S, Park J-K. 2013. Generation of Female Porcine Fibroblasts Expressing Efficiently Membrane Cofactor Protein at alpha1, 3-Galactosyltransferase locus. *Journal of Embryo Transfer* 28:289-295.
- Resta R, Hooker SW, Hansen KR, Laurent AB, Park JL, Blackburn MR, Knudsen TB, Thompson LF. 1993. Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue

- distribution. *Gene* 133:171-177.
- Robson SC, Cooper DK, d'Apice AJ. 2000. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 7:166-176.
- Sandrin MS, Loveland BE, McKenzie IF. 2001. Genetic engineering for xenotransplantation. *J Card Surg* 16:448-457.
- Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, Robson SC, Schuurman HJ, Cooper DK, Sachs DH, Yamada K, Colvin RB. 2008. Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol* 172:1471-1481.
- Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, Ohta A, Thiel M. 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22:657-682.
- Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. 2005. alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* 80:1493-1500.
- Wheeler DG, Joseph ME, Mahamud SD, Aurand WL, Mohler PJ, Pompili VJ, Dwyer KM, Nottle MB, Harrison SJ, d'Apice AJ, Robson SC, Cowan PJ, Gumina RJ. 2012. Transgenic swine: expression of human CD39 protects against myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 52:958-961.
- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, O'Malley P, Nobori S, Vagefi PA, Patience C, Fishman J, Cooper DK, Hawley RJ, Greenstein J, Schuurman HJ, Awwad M, Sykes M, Sachs DH. 2005. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 11:32-34.
- Yang YG, Sykes M. 2007. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 7:519-531.
- Zimmermann H. 1992. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 ( Pt 2):345-365.

---

Received July 22, 2016, Revised September 06, 2016,

Accepted September 12, 2016