Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society
Vol. 20, No. 9 pp. 306-314, 2019

https://doi.org/10.5762/KAIS.2019.20.9.306
ISSN 1975-4701 / eISSN 2288-4688

Human dipeptidylpeptidase-4(DPP-4) 발현 형질전환 돼지의 생산

정학재[1], 사수진[1], 백선영[1], 조은석[1], 김영신[1], 홍준기[1], 조규호[1], 김지윤[2], 박미령[2], 김경운[3*]
[1]농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과, [2]동물바이오공학과, [3]기획조정과

Generation of a transgenic pig expressing human dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4)

Hak Jae Chung[1], Soo Jin Sa[1], Sun Young Baek[1], Eun Suek Cho[1], Young Shin Kim[1], Jun Ki Hong[1], Kyu Ho Cho[1], Ji Youn Kim[2], Mi Ryung Park[2], Kyung Woon Kim[3*]
[1]Swine Science Division, [2]Animal Biotechnology Division,
[3]Planning & Coordination Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

요 약 Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해제는 부작용이 적어 제2형 당뇨병의 2차 용법으로 널리 사용되고 있다. 우리는 human DPP-4 (hDPP-4) 유전자를 돼지 zygote의 전핵에 주입한 후, 1 세포 단계의 수정란을 외과적 방법으로 이식하였고, 마지막으로 꼬리에서 hDPP-4 유전자가 발현되는 형질 전환 돼지를 생산하는데 성공했다. 이식한 3두의 임신돈에서 16두의 자돈이 생산되었고, 이들 가운데 1두의 수컷 자돈에서 형질전환 개체가 확인되었다. Western blot 과 RT-PCR 분석을 통해 hDPP-4가 형질 전환 돼지의 막 세포에서 강하게 발현되고, hDPP-4 유전자가 다양한 조직과 꼬리에서 각각 발현되고 있음을 확인하였다. 이것은 발현 벡터가 형질 전환 돼지에서 정상적으로 발현된다는 것을 시사한다. 이번 연구 결과는 인슐린 저항성에 대한 내분비 기능을 확인하는 모델 동물로, hDPP-4 형질 전환 돼지가 인슐린 저항성에 대한 내분비 기능을 확인할 수 있는 새로운 신약에 대한 검증의 소재로서 가치를 높일 것으로 기대된다.

Abstract As dipeptidyl peptidase-4(DPP-4) inhibitors are used widely as a secondary treatment for type 2 diabetes because they tend to be well tolerated with minimal side effects, the human DPP-4(hDPP-4) gene was injected into a pig zygote through micro-injection, and 1-cell stage fertilized embryos were then transplanted surgically into the oviduct. Three pigs were fertilized with hDPP-4 genes and produced sixteen piglets, in which one male piglet was identified to be transgenic. Finally, transgenic pigs showing hDPP-4 gene expression in the tail were produced. Western blot and RT-PCR analysis confirmed that the hDPP-4 is expressed strongly in the membrane cells of the transgenic pig, and that the hDPP-4 gene appears in various tissues and tails. This suggests that the expression vector is normally expressed in transgenic pigs. These results are anticipated to be a model animal to check the endocrine function for insulin resistance that occurs in a hDPP-4 transgenic pig and to increase its value for use as a material in newly developed medicines.

Keywords : Insulin-Resistant, Dipeptidylpeptidase-4(DPP-4), Micro-Injection, Transgenic, Pig, Gene-Expression

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01359301)의 지원에 의해 이루어진 것임
Corresponding Authors : Kyung-Woon Kim(National Institute of Animal Science)
email: kw72kim@korea.kr
Received July 2, 2019 Revised August 7, 2019
Accepted September 6, 2019 Published September 30, 2019

1. 서론

당뇨병은 체내에 필요한 인슐린이 충분하게 분비되지 못하거나 세포가 인슐린에 적절하게 반응하지 못하여 혈액 내 혈당 수치가 높게 유지되는 대사질환이며, 당뇨환자의 약 10% 는 선천적이거나 면역적인 문제로 인슐린을 분비하지 못하는 제1형 당뇨병이고 나머지는 체내에 상대적으로 부족한 인슐린과 인슐린 저항성이 복합적으로 작용하여 만성적인 고혈당이 지속되는 제2형 당뇨병이다[1-2]. 예전에는 주로 과체중인 중년층에서 발병하던 제2형 당뇨병이 최근에는 소아비만과 관련되어 아동을 비롯한 청소년층에서도 빈번하게 발생하고 있다[3]. 또한, 흔히 말하는 대사증후군도 인슐린 저항성, 고지혈증 및 고혈압 등과 같은 증상의 총칭으로 주요한 사망 원인으로 대두되고 있는 심혈관 질환의 위험인자로 인식되고 있다[4]. 이러한 대사증후군(metabolic syndrome)의 증가도 당뇨병과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측되고 있다.

인크레틴(Incretin) 효과는 동량의 당분을 정맥 주사했을 때보다 당분을 먹었을 때 더 활발한 인슐린 분비가 일어나는 것을 말하며, 이러한 인크레틴 효과는 혈당의 증가에 따라 높아지며, 건강한 사람에 비해 당뇨병 환자의 경우에 이러한 효과가 낮다[5]. 인크레틴 호르몬인 GIP(glucose-dependent insulinotropic peptide), GLP-1(glucagon like peptide-1) 및 이에 대한 생리적 분해효소인 DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4)의 발견은 당뇨병의 새로운 치료 약제인 GLP-1 agonist와 DPP-4 억제제의 개발을 가능케 하였다[6-7].

Dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)는 110-kDa 크기의 단백질로써 adenosine deaminase complexing protein 2 또는 CD26(cluster of differentiation 26)로도 알려져 있으며 세포표면에 존재하는 Type II transmembrane 당단백질이다[8]. DPP-4 분해활성은 목적단백질 및 펩타이드의 N-말단에서 두 번째 아미노산이 프롤린 혹은 알라닌인 경우 그 말단에서 2개의 아미노산을 제거하는 단백질 분해효소이고 세포형태나 환경인자에 따라 다양한 생물학적 역할을 나타내고 있다.

DPP-4 억제제의 경우 GLP-1 agonist의 여러 장점을 공유하면서도 상대적으로 싼 가격과 경구 투여라는 장점 덕분에 임상 의사들이 손쉽게 선택하는 약제가 되었다. 지금까지 개발된 DPP-4 억제제는 총 6종으로 sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, linagliptin, alogliptin 및 gemigliptin이 시판되고 있다[9-14]. 그러나, 이러한 새로운 약제 개발은 신약들의 효능 및 안전성 그리고 사람과 유사한 대상의 충분한 실험적 증거를 제시하지 못하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 사람과 생리·해부학적으로 유사하다고 알려진 돼지를 이용하여 hDPP-4유전자가 과발현되는 형질전환 돼지를 생산하였고, 이러한 형질전환 돼지는 새롭게 개발되는 DPP-4억제 의약품들에 대한 약효성 검증과 체내 안전성과 관련된 대사산물에 대한 중요한 연구결과를 제시해 줄 수 있을 것으로 기대된다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시동물

본 연구에 사용된 동물들은 국립축산과학원에서 사육중인 돼지를 사용하였으며, 연구에 사용된 동물 관리 및 절차에 관해서는 국립축산과학원 동물실험윤리위원회의 승인(NIAS2015-593)을 얻어 그에 준하여 실시하였다.

2.2 Human DPP-4유전자 클로닝 및 미세주 입용 발현벡터 구축

사람 DPP-4(hDPP-4) 유전자를 클로닝하기 위해 GeneBank(Accession number:NM_001935)에 등록된 염기서열을 기초로 특이적 primer를 디자인하였으며, 사용한 primer 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

PCR은 HEK293세포에서 합성한 cDNA 1uL, sense와 anti-sense primer 각각 10 pM과 HS LA-Taq polymerase(TaKaRa, Japan) 반응액을 섞은 후 진행하였으며, PCR 반응조건은 94℃ 1분(pre-incubation), 98℃ 10초, 68℃ 5분(30 cycles) 조건으로 반응시키고 마지막 증폭단계에서 10분을 추가하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에 전기영동으로 증폭산물을 확인하고 Gel extraction kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 정제한 후 pCR2.1-TA vector(ThermoFisher, USA)에 cloning하여 삽입된 클론을 선별하였다. 선별된 클론들은 전체 염기서열을 분석하였고, NCBI blast 프로그램을 통해 상동성을 비교하여 GeneBank에 등록된 human DPP-4(hDPP-4)와 서열이 일치한 클론을 선별하였다.

Table 1. The primer sequence for PCR, RT-PCR, and real-time PCR

Primer name		Sequence(5'→3')	Size
RT-PCR	hDPP4-For	ATGAAGACACCGTGGAAGGTTCTTC	2301
	hDPP4-Rev	CTAAGGTAAAGAGAAACATTGTTTTATGAAGT	
Vector cloning	hDPP4-F	GAATTCGCCGCCACC**ATG**AAGACACCGTGGAAGGTTCTTC	2349
	hDPP4-HA-R	GGATCCCTA**AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA**AGGTAAAGAGAAACATTGTTTTATGAAGT	
PCR	354-hDPP4-F	CAAATTGAAGCAGCCAGACA	354
	354-hDPP4-R	CAGGGCTTTGGAGATCTGAG	
Real-Time PCR	SYBR-hDPP4-F	AAAGGCACCTGGGAAGTCATCG	153
	SYBR-hDPP4-R	CAGCTCACAACTGAGGCATGTC	
	SYBR-pDPP4-F	GATAATCGCTGGTCAGAGCTTCG	
	SYBR-pDPP4-R	CACCTCTGATGGAAGCAGCTTC	
	SYBR-pACTB-F		
	SYBR-pACTB-R		

Under line: Restriction enzyme site, Italic: Kozak consensus sequence, Bold: First methionine, Bold-under line: HA-tagging sequence

형질전환동물 생산에 사용할 미세주입용 발현벡터는 조직에서 지속적인 발현을 위해 CMV enhancer와 chicken beta-actin promoter가 삽입되어 있는 pCAGEN(Addgene, USA)을 기본 벡터로, 앞서 클로닝한 hDPP-4 유전자에 발현벡터 구축을 위한 제한효소 절단부위와 형질전환동물 생산 후 내재성 돼지 유래 DPP-4(pDPP-4) 단백질과 구별을 위한 hDPP-4유전자 C-말단에 HA-tag를 삽입한 단편을 프로모터 3'-위치에 도입하여 구축하였다. 최종적으로 만들어진 벡터구조는 Fig. 1과 같다.

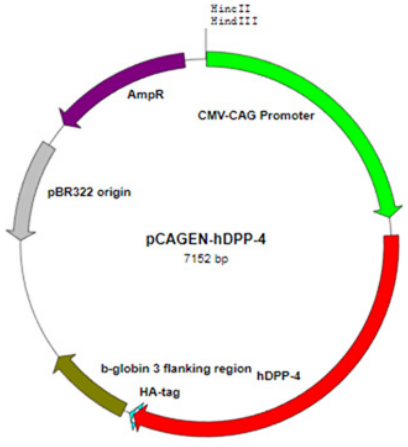

Fig 1. A schematic representation of the hDPP-4 expression vector used to generate transgenic pigs

구축된 미세주입용 발현벡터는 염기서열분석을 통해 전체 염기서열을 다시 한번 검정하였고 검증된 발현벡터는 HincII와 HindIII 제한효소로 처리하여 직선화된 형태 pCAG-hDPP-4를 만들었으며 0.5% agrose gel에 전기영동하여 실험에 사용할 4,638 bp 단편만을 겔로부터 정제하여 최종농도 10 ng/uL으로 희석하여 수정란 미세주입 실험에 사용하였다.

2.3 유전자미세주입 및 수정란 이식

미세주입에 사용된 돼지 수정란은 국립축산과학원에서 사육되고 있는 Landrace 암컷에서 채취하여 사용하였다. 수정란 채란을 위해 암컷을 발정동기 처리한 후, 자연교미를 통해 종부를 진행하고 외과적 방법으로 1-세포기 수정란을 채취하였다. 회수된 난자의 전핵에 형질전환 동물 생산용 hDPP-4 유전자를 미세주입하고 외래유전자가 주입된 수정란은 외과적 방법으로 돼지 난관에 이식하였다. 수정란 이식 후 임신 40일과 114일째 임신 진행 상황을 체크하기 위해 초음파 진단을 실시하였다.

2.4 생산된 형질전환 돼지의 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통한 유전자 검정

수정란 이식으로 생산된 자돈은 genomic DNA PCR을 통해 형질전환 여부를 검증하였다. 생산된 자돈의 꼬리, 신장, 간장, 심장 및 귀 조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR 주형으로 사용하여 실험을 진행하였다. PCR반응은 HS Taq(GenetBio)을 이용하여 200 ng의 genomic DNA, 10 uM의 primer mixture를 함유한 반응액을 만들어 사용하였다. 반응조건은 94℃에서 10분간 pre-incubation하였으며, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분의 조건으로 35 cycles을 진행한 후, 72℃에서 5분을 추가로 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.0 % agarose gel에 전기영동으로 확인하였다.

2.5 세포배양 및 형질전환돼지 체세포 배양

형질전환 돼지유래 체세포 배양을 위한 귀 표면의 체모를 제거한 후 알코올로 소독살균을 실시하고 일회용 펀치를 이용하여 귀조직을 채취하였다. 채취된 귀조직은 실험실에서 1X Anti-Anti(ThermoFisher)가 첨가된 1X HBSS버퍼로 3번이상 세척하여 오염원을 제거하고 표피조직을 제거한 연골부분만을 분리하여 배양액이 들어있는 플레이트에서 배양하여 체세포(pig Ear cell Fibroblast-DPP-4, pEF-DPP-4)를 확보하였다. 세포

배양은 M106(ThermoFisher, USA), 10% ES FBS (ThermoFisher, USA), 1X Anti-Anti(ThermoFisher, USA), 0.5X LSGS(ThermoFisher, USA)을 포함하는 배지를 이용하였고 계대배양은 90% confluent할 때 실시하였다.

2.6 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 의한 hDPP-4유전자의 발현유형 분석

실험에 사용할 일반돼지 체세포와 형질전환돼지 유래 체세포(hDPP-4)를 배양한 다음 각각 회수하여 Trizol (ThermoFisher, USA)를 사용하여 total RNA를 회수하였다. 이를 random hexamer primer와 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit(Roche, Germany)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 세포 내 hDPP-4 유전자 발현을 확인하기 위하여 RT- PCR을 수행하였다. 사용된 primer는 Table 1에 나타낸 것과 같고 PCR반응을 위한 조성액은 1/50으로 희석한 cDNA, sense와 antisense primer 각각 10 pM 씩, 2X enzyme mixture(Toyobo, Japan)를 포함한 반응액을 조제하고 Roter-Gene 6000 system(Corbett Research, USA) 을 이용하여 아래와 같이 수행하였다. PCR 조건은 pre-denaturation단계로 95℃에서 10분간 반응을 시킨 후, 95℃에서 10초간 denature, 60℃에서 45초간 annealing과 extension을 동시에 진행하는 조건으로 40 cycle을 수행하여 hDPP-4 절편을 증폭시켰다. 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

2.7 Western Blot

Western blotting에 사용한 시료는 적절한 농도로 희석하여(V1, V2 라인: 1/5, V3 라인 1/500) 실험에 사용하였다. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 30 ul의 시료와 6% acrylamide gel을 사용하여 진행하였고, nitrocellulose membrane(Amersham Biosciences, Sweden)에 transfer하였다. Membrane을 1시간 동안 blocking buffer(5% nonfat milk powder와 0.1% Tween-20을 함유한 20 mM Tris-HCl-buffered saline)에서 교반한 후, polyclonal-rabbit anti-human DPP-4/HRP를 blocking buffer와 1:500으로 섞은 buffer에서 반응시켰다(16hr, 4℃). Washing buffer(0.1% Tween-20을 함유한 20 mM Tris-HCl-buffered saline)로 10분씩 3번 washing 후 ECL(enhanced chemiluminescence) 방법으로 감광하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 구축된 pCAG-hDPP-4 벡터 COS7 세포 내 발현

F0 형질전환돼지 생산에 사용하기 위해 구축한 pCAG-hDPP-4 벡터가 세포 내에서 정상적으로 발현되는지 확인하고자 공벡터인 pCAGEN과 구축된 pCAG-hDPP-4 절편을 COS7세포에 transfection시키고 각각의 COS7세포들을 회수하여 western blot을 수행하였다.

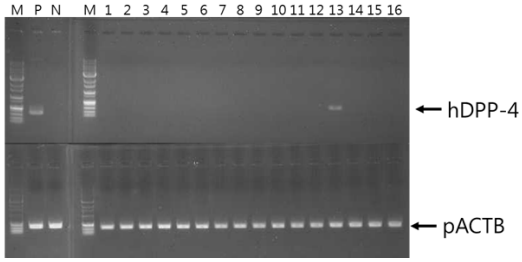

Fig. 2. Identification of transgenic piglet by genomic PCR. The PCR products resolved on a 1 % agarose gel. M: 1kb Marker, P: hDPP-4 microinjected vector transiently transfected PK-15 cell as positive control, N: wild type pig ear cell as negative control, No. 1~13: piglet ear cells

그 결과 pCAG-hDPP-4 벡터가 transfection된 세포에서 hDPP-4 단백질 발현을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 2), 이는 본 연구에서 구축한 pCAG-hDPP-4 벡터가 생산하려는 형질전환 개체에서도 정상적으로 발현이 이루어질 것으로 생각된다.

3.2 미세주입 및 형질전환돼지(F0) 생산

형질전환 개체 생산을 위해 돼지 수정란에 pCAG-hDPP-4유전자 미세주입을 실시하였다. 수정란은 국립축산과학원에서 사육되고 있는 공란돈 27두에서 배란된 684개 수정란을 채란하여 1-세포기 수정란을 선별하였고 pCAG-hDPP-4 벡터는 수정란 전핵에 미세주입을 실시하였다. 먼저 hDPP-4 유전자가 수정란 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pCAG-hDPP-4 벡터를 주입한 4개의 배반포(Blastocyst:BL)를 분석한 결과, 3

개에서 pCAG-hDPP-4 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었고 (3/4 BL : 75%) 대조군인 단위발생 배반포에서는 hDPP-4 유전자는 확인되지 않았다(Fig. 3). 이를 통해 미세주입 한 hDPP-4 유전자는 수정란 발달에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

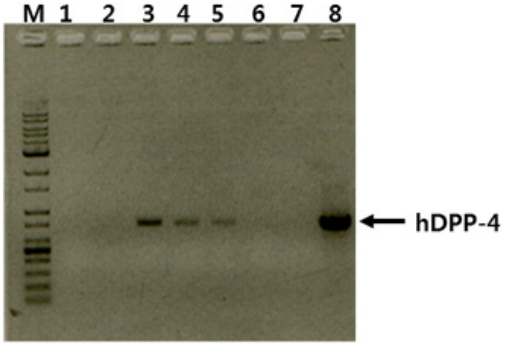

Fig. 3. Identification of hDPP-4 gene in blastocysts

pCAG-hDPP-4가 미세주입 된 수정란 478개는 외과적 수술로 대리모 난관 상층부에 이식하였고, 그 결과 대리모 15두 가운데 4두가 임신하였으나 1두는 임신중반에 유산되었다. 임신상황은 수정란 이식 후 40일째와 114일째 초음파로 진행여부를 확인하였으며(Fig. 4) 최종적으로 3두가 분만하여 수정란 이식 자돈 16두(F0)를 생산하였다.

Fig. 4. Identification of pregnancy by ultrasound

생산된 자돈들에 대한 형질전환여부는 귀조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR로 분석하여 확인하였고, 분석결과 수컷 1두에서 hDPP-4 유전자가 삽입된 것을 확인하였다(Fig. 3). 본 연구의 외래유전자 미세주입 전이율은 6.25% (Table 2)이었으며 Lee et.al.[15]등에 의한 보고(1.96%) 보다는 높았으나 Lee et. al.[16]등의 보고(19.2%) 보다는 낮은 결과를 보였다. 이러한 결과는 사용된 수란돈과 생산된 자돈의 수와도 관계가 있을 수 있으나 형질전환 동물생산을 위해서는 수정란 생산부터 최종 착상단계까지 동물생산에 대한 효율성을 높이는 개선이 필요할 것으로 생각된다.

Table 2. Analyses of transgenic gene transfer in piglets

Class	No.of recipents/sows	No. piglets		Trnasgenic pigs		Transfer rate of transgene (%)
		Male	Female	Male	Female	
F0	16	9	7	1	0	6.25

3.3 형질전환돼지 유래 세포에서의 hDPP-4 유전자 발현

생산된 형질전환 개체에서 hDPP-4의 발현 위치를 확인하기 위하여 western blot와 미세 주입 후 외래유전자 hDPP-4 발현을 전사 수준에서 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 먼저 실험에 사용할 체세포를 확보하기 위해 생산된 자돈 귀 조직으로부터 체세포를 분리 배양하여 형질전환 개체 유래 체세포 (pEF-hDPP4)를 확보하였다. hDDP-4 antibody를 이용한 귀 세포로부터 분리 배양된 계대 배양 세포에서 세포막 부분과 세포질 부분으로 나누어 발현 양상을 확인한 결과 세포막에서 hDPP-4의 강한 발현이 나타나고 있는 반면, 세포질에서는 발현 양상을 확인할 수 없었다(Fig. 5).

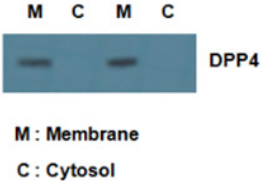

Fig. 5. Western blot analysis of hDPP-4 expression in ear cells of transgenic piglet

한편, 형질전환 복제돼지 재생산을 위한 donor 세포주 확보를 위해 hDPP-4 형질전환 개체로부터 체세포를 분리하여 계대배양을 실시하였고 계대배양 동안 가지고 있는 세포핵형에 이상이 발생하였는지 확인하기 위해 핵형분석(karyotype)을 실시하였다. 20개의 metaphase를 판독한 결과, 구축된 pEF-hDPP4 체세포는 정상적인 38개 상염색체(XY)를 가지고 있었고 결실, 역위 등 염색체 구조상에 발생하는 이상 현상은 발견되지 않았다(Fig. 6). 또한, pEF와 pEF-hDPP4 세포에서 유전자 발현 정도를 분석한 결과, hDPP-4유전자는 대조군인 pEF세포에는 발현이 확인되지 않았고 형질전환 세포인 pEF-DPP4에서만 발현이 확인되었다. 이러한 결과로 본 연구에서 생산된 형질전환 돼지에서는 외래 유전자인

hDPP-4유전자가 정상적으로 발현되고 있다고 판단된다.

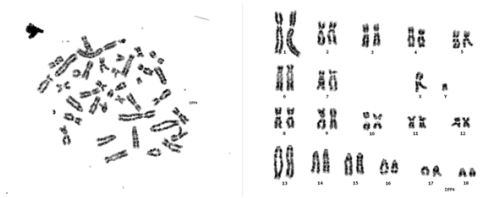

Fig. 6. Karyotype in somatic cells of transgenic piglet

4. 결론

지금까지 질병에 대한 기전연구나 약물효과를 확인하기 위해 주로 설치류 등 소형동물을 중심으로 다양한 연구가 시도되었고[17-18], 발병 인자로 가능성이 있는 여러 유전자들에 대한 형질전환 동물을 개발하여 일부 발병요인 등을 확인하였지만 설치류에서 나타나는 질환의 특징이 인간 발병기작과 차이가 있고 번식·수명 및 행동양상 등의 차이로 인해 임상실험에 적용하기에도 많은 어려움을 느끼고 있다. 이러한 이유로 보다 인간과 가까운 동물을 이용한 질환모델 개발에 대한 필요성이 제기되고 있으나 인간과 가장 가까운 영장류는 그 희소성과 사육관리에 투입되는 비용 및 전문성이 필요하기 때문에 극히 제한적인 분야에서만 질환연구가 진행되고 있는 실정이다.

한편, 돼지는 기존 설치류 모델과 비교하여 생존기간이 길고 생리·해부학적으로 인간과 유사성이 높아 기존의 한계성을 극복할 수 있는 질환모델 동물로 활용하고자 하는 욕구가 높아지고 있다. 또한 돼지는 산업적인 동물로 다른 중·대 동물을 질환모델로 사용하는 것보다 윤리적인 측면에서도 문제점을 피해갈 수 있는 장점이 있고 안정적인 사육시스템이 확립되어 비교적 저렴한 비용과 시설에서 질환연구를 수행하기 위한 동물로 활용하고자 하는 연구가 증가되고 있다.

최근 국내 연구진이 아밀로이드와 관련된 유전자를 가진 알츠하이머 치매형 형질전환돼지를 생산하여 MRI로 분석한 결과, 대조군과 비교하여 형질전환돼지의 뇌가 위축되어 있고 PET/CT 분석결과도 뇌의 전반적인 부위에서 대사활동의 감소가 관찰되었다고 보고하였다. 이러한 돼지를 이용한 알츠하이머 질환모델은 인간과 유사한 긴 수명, 질병 패턴 및 유전적 유사성 때문에 알츠하이머 유발 유전자에 대한 체계적인 형질전환 돼지 개발은 치매에 대한 조기 진단 및 치료법 개발에 매우 효과적인 연구재료가 될 것으로 생각된다[19].

비록 본 연구에서는 hDPP-4유전자가 삽입된 형질전환돼지를 생산하기는 했지만 삽입된 hDPP-4 유전자가 세포 내에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 결과는 제시하지 못하였다. 향후 체계적인 계대번식을 통해 생산된 형질전환 돼지에 대한 이화학적 분석 및 생리적인 다양한 측면에서 분석을 진행한다면 삽입된 hDPP-4 유전자가 돼지 체내에 미치는 영향을 확인할 수 있을 것이다. 이를 통해 본 연구를 진행한 최종 목적인 현재 개발되고 있는 DPP-4 억제 의약품에 대한 체내 반응성에 대한 추가적인 실험을 통해 의약품에 대한 대사 및 안전성에 대한 생리·해부학적인 결과를 제시할 가능성이 있을 것으로 사료된다.

References

[1] S. E. Kahn, R. L. Hull, K. M. Utzschneider. "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes", Nature, vol. 444, pp. 840-846. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nature05482

[2] G. Kloppel, M. Lohr, K. Habich, M. Oberholzer, P. U. Heitz. "Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited", Survey and Synthesis of Pathology Resesrch, vol.4, pp. 110-125. 1985.

[3] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. "Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus", Diabetes Care, vol. 26, pp. S5-S20. 2003.

[4] J. P. Despres, I. Lemieux. "Abdominal obesity and metabolic syndrome", Nature, vol. 444, pp. 881-887. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nature05488

[5] M. A. Nauck, E. Homberger, E. G. Siegel, R. C. Allen, R. P. Eaton, R. Ebert, W. Creutzfeldt. "Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses", The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 63, pp. 492-498. 1986.
DOI: http://dx.doi.org/10.1210/jcem-63-2-492

[6] D. J. Drucker. "The biology of incretin hormones", Cell Metabolism, vol. 3, pp. 153-165. 2006.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.004

[7] J. R. Ussher, D. J. Drucker. "Cardiovascular biology of the incretin system", Endocrine Reviews, vol. 33, pp. 187-215. 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1210/er.2011-1052

[8] R. Yazbeck, G. S. Howarth, C. A. Abbott. "Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease?", Trends in Pharmacological Sciences, vol. 30, pp. 600-607. 2009.

DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2009.08.003

[9] S. Blech, E. Ludwig-Schwellinger, E. U. Gräfe-Mody, B. Withopf, K. Wagner. "The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans", Drug Metabolism and Disposition, vol. 38, pp. 667-678. 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1124/dmd.109.031476

[10] A. J. Scheen, G. Charpentier, C. J. Ostgren, A. Hellqvist, I. Gause-Nilsson. "Efficacy and safety of saxagliptin in combination with metformin compared with sitagliptin in combination with metformin in adult patients with type 2 diabetes mellitus", Diabetes Metabolism Research and Reviews, vol. 26, pp. 540-549. 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1114

[11] E. J. Rhee, W. Y. Lee, K. W. Min, V. K. Shivane, A. R. Sosale, H. C. Jang, C. H. Chung, I. S. Nam-Goong, J. A. Kim, S. W. Kim; Gemigliptin Study 006 Group. "Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor gemigliptin compared with sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone", Diabetes Obesity and Metabolism, vol. 15, pp. 523-530. 2013.
DOI: http://dx.doi.org/10.1111/dom.12060

[12] Y. L. He, R. Sabo, J. Campestrini, Y. Wang, M. Ligueros-Saylan, K. C. Lasseter, S. C. Dilzer, D. Howard, W. P. Dole. "The influence of hepatic impairment on the pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitor vildagliptin", European Journal Clinical Pharmacology, vol. 63, pp. 677-686. 2007.

[13] N. Matikainen, S. Mänttäri, A. Schweizer, A. Ulvestad, D. Mills, B. E. Dunning, J. E. Foley, M. R. Taskinen. "Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes", Diabetologia, vol. 49, pp. 2049-2057. 2006.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0340-2

[14] B. Eliasson, D. Möller-Goede, K. Eeg-Olofsson, C. Wilson, J. Cederholm, P. Fleck, M. Diamant, M. R. Taskinen, U. Smith. "Lowering of postprandial lipids in individuals with type 2 diabetes treated with alogliptin and/or pioglitazone: a randomized double-blind placebo-controlled study", Diabetologia, vol. 55, pp. 915-925. 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00125-011-2447-3

[15] H. C. Lee, H. M. Kim, S. Lee, K. B. Oh, H. J. Chung, B. C. Yang, K. W. Kim, P. Lee, J. K. Park, W. K. Chang. "Production of a Transgenic Pig Overexpressing Phosphoprotein Enriched in Astrocytes 15 (PEA 15)", Reproductive & Developmental Biology, vol. 35, pp. 239-245. 2011.

[16] H. G. Lee, H. C. Lee, S. W. Kim, P. Lee, H. J. Chung, Y. K. Lee, J. H. Han, I. S. Hwang, J. I. Yoo, Y. K. Kim, H. T. Kim, H. T. Lee, W. K. Chang, J. K. Park. "Production of recombinant human von Willebrand factor in the milk of transgenic pigs", Journal of Reproduction and Development, vol. 55, pp. 484-490. 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.1262/jrd.20212

[17] L. D. Itz, F. Ishikawa, D. L. Greiner. "Humanized mice in translation biomedical research", Nature Reviews Immunology, vol. 7, pp. 118-130. 2007.

[18] I. H. Drespe, G. K. Polzhofer, A. S. Turner, Grauer JN. "Animal models for spinal fusion", The Spine Journal, vol. 5, pp. S209-S216. 2005.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2005.02.013

[19] J. K. Lunney. "Advances in swine biomedical model genomics", International Journal of Biological Sciences, vol. 3, pp. 179-184. 2007.
DOI: http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.3.179

정 학 재(Hak-Jae Chung) [정회원]

- 1993년 3월 : 일본 Nagoya University 농생명연구과 동물생명공학전공 (농학석사)
- 1999년 8월 : 일본 Nagoya University 농생명연구과 동물생명공학전공 (농학박사)
- 2000년 5월 ~ 2002년 9월 : University of Pennsylvania(미국) 박사후 연구원
- 2003년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
동물발생 내분비, 생명공학

사 수 진(Soo-Jin Sa) [정회원]

- 2002년 2월 : 강원대학교 축산대학 축산학과 (농학석사)
- 2006년 2월 : 강원대학교 축산대학 축산학과 (농학박사)
- 2007년 2월 ~ 2009년 1월 : University of Nottingham(영국) 박사후연구원
- 2009년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
동물번식, 생명공학

백 선 영(Sun-Young Baek) [정회원]

- 2000년 2월 : 건국대학교 동물생명공학과 (농학사)
- 2006년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
생명공학, 동물발생

조 은 석(Eun-Suek Cho) [정회원]

- 2007년 3월 : 경남과학기술대학교 동물소재공학과 (농학석사)
- 2011년 8월 : 경상대학교 응용생명공학 (이학박사)
- 2012년 1월 ~ 2015년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연구원
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
가축육종, 유전체학

김 영 신(Young-Shin Kim) [정회원]

- 2009년 2월 : 전남대학교 동물공학과 (농학석사)
- 2012년 8월 : 전남대학교 동물공학과 (농학박사)
- 2012년 8월 ~ 2015년 2월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원
- 2018년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
가축육종, 유전체학

홍 준 기(Jun-Ki Hong) [정회원]

- 2012년 2월 : 충남대학교 농과대학 축산학과 (농학석사)
- 2017년 2월 : 한경대학교 미래기술대학원 동물자원과 (이학박사)
- 2007년 8월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
가축육종, 유전체학

조 규 호(Kyu-Ho Cho) [정회원]

- 2000년 2월 : 한경대학교 농과대학 축산학과 (농학석사)
- 2007년 2월 : 한경대학교 농과대학 축산학과 (농학박사)
- 1996년 8월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구관

〈관심분야〉
가축육종, 통계육종

김 지 윤(Ji-Youn Kim) [정회원]

- 2003년 2월 : 동아대학교 생명자원과학대학 생명자원과학과 (이학석사)
- 2009년 3월 : 일본 University of Tokyo 농학생명과학연구과 응용생명공학전공 (농학박사 수료)
- 2009년 4월 ~ 2012년 3월 : 일본 University of Tokyo 연구생
- 2012년 6월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구원

〈관심분야〉
생명공학, 미생물학, 분자생물학, 생화학

박 미 령(Mi-Ryung Park) [정회원]

- 2000년 2월 : 경상대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 1월 ~ 2012년 12월 : 건국대 동물자원 전임연구원
- 2013년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
동물발생, 생명공학

김 경 운(Kyung-Woon Kim) [정회원]

- 1995년 2월 : 원광대학교 분자생물학과 (이학사)
- 2000년 2월 : 동아대학교 일반대학원 농화학과 (농학석사)
- 2005년 9월 : 일본 University of Tokyo 이학계연구과 생물화학 (이학박사)
- 2008년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

〈관심분야〉
분자생물학, 생명공학