**연구계획서(인체유래물용)**

Version : 1

\*연구계획서 내용 변경 시 반드시 버전을 업그레이드하여 표기하여야 함.

|  |
| --- |
| **1. 연구과제명** |
| 말초 혈액 단핵세포를 이용한 IgA 분비 페이에르판 모델 개발 |
|  |
| **2. 연구배경** |
| - 페이에르판(Peyer’s patch)은 소장에 위치한 림프조직으로 음식, 약물, 세균이나 바이러스 등에서 유래된 항원에 지속적으로 노출됨. 페이에르판은 혈액을 통해 페이에르판으로 이동한 면역세포와 항원의 상호작용을 통해 IgA 항체를 생성하고 분비하는 등 장관 면역에 주요한 역할을 함. 분비된 IgA는 항원의 무효화 및 제거, 병원균의 점막면 침입 방지 등 점막면에서 방어기능을 발휘함.  - 인간 및 다른 동물의 소화관에는 복잡한 미생물 군집이 살고 있으며 이를 장내 미생물군(Gut microbiota)이라 함. 장내 미생물군은 병원균의 장 침입 및 서식 방지, 면역조절, 장벽 기능 강화 등 장 기능 및 면역에 중요한 영향을 미침. 장내 미생물군은 IgA의 생성을 조절하고 생성된 IgA는 장내 미생물군의 조성을 조절하면서 상호작용 함. 이 복잡한 상호작용은 장내 미생물군의 항상성 유지에 기여하며 인체 건강에 매우 중요한 영향을 미침.  그림 1. 페이에르판에서의 면역반응(왼쪽)과 IgA 항체와 미생물군의 상호작용  - 다양한 원인으로 인해 장내 미생물군의 항상성이 붕괴 될 수 있는데 이를 장내 세균총의 불균형(Microbial dysbiosis)이라 함. 장내 세균총 불균형으로 인체에 해로운 미생물의 성장이 우세해지고 이로 인한 점막 감염은 심각한 염증 반응을 일으키며 다양한 위장 장애의 원인이 됨.  - 현재까지 페이에르판에서 분비되는 IgA 항체에 의한 점막면역을 생체 외에서 구현하는 기술이 없어 소장에서의 점막면역과 관련된 모든 연구는 주로 동물 실험이 사용됨. 그러나 동물 실험은 시간, 비용, 윤리적 측면 등에서 문제 뿐만 아니라 종간 차이로 인한 결과의 신뢰성 문제도 야기함. |
|  |
| **3. 연구 목적** |
| - 생체학적으로 페이에르판(Peyer’s patch)과 유사한 구조와 환경을 모사한 미세 유체 플랫폼에 혈액에서 추출한 면역세포를 배양하여 분자 수준에서 면역세포와 점막에 분포한 미생물의 상호작용을 관찰하고 그로 인한 점막면역의 변화를 분석하는 것을 목적으로 함.  - 위 기술을 통해 병원균 또는 장내 미생물군의 불균형에 의한 소화기 질환, 자가면역질환, 유산균의 장관에 미치는 영향 등 다양한 미생물과 장관의 상호작용을 연구하고 소화기 질환의 약물로 사용될 수 있는 유산균을 스크리닝하는 플랫폼으로 사용하고자 함. |
|  |
| **4. 인체유래물 등의 수집방법** |
| 취약성의 논란이 없고 자발적 의지를 가진 지원자를 선발하여 울산과학기술원에서 채혈할 예정(매 실험 시 30 mL이하 혈액 채취). 울산과학기술원 헬스케어센터(201동) 간호사 자격의 보건 담당자의 도움(협의 완료)을 통해 정맥주사로 혈액을 채취해 헤파린 튜브 (heparin tube) 에 담아 즉시 연구에 이용할 예정이며, 불가피한 경우 4 °C 연구시약 전용냉장시설에서 단시간(6시간이하) 보관할 예정임. 나이 및 성별을 수집하되, 개인식별정보 전부 고유식별기호로 대체될 것임. |
|  |
| **5. 제공기관** |
| 취약성 논란이 없고 자발적인 의지를 가진 자원자를 모집하여 울산과학기술원 헬스케어센터(201동) 간호사 자격의 보건 담당자의 도움(협의 완료)을 통해 정맥주사로 혈액을 채취할 예정임. |
|  |
| **6. 연구대상자 동의** |
| IRB\_서식6. 연구대상자 동의설명문 첨부함. |
|  |
| **7. 연구 방법** |
| 1. 채취한 인간 말초 혈액에서 밀도구배 원리를 이용한 원심분리법을 이용해 말초 혈액 단핵세포 (PBMC)를 분리.  2. 상기 과정에 의해 채취한 PBMC에서 B림프구, T림프구, 그리고 단핵구를 분리하기 위해 각각을 인식하는 항체가 결합된 비드를 처리함.  3. 분리한 단핵구로부터 수지상세포를 만들어냄.  4. 분리한 B림프구, T림프구, 그리고 단핵구를 세포외기질 요소인 matrigel과 콜라겐에 섞어 미세 유체 채널에 배양 후 특정 면역 반응을 유도할 수 있는 물질 주입.  이를 바탕으로 페이에르판에서 일어나는 점막 면역 반응을 생체 외에서 구현하여 장내 미생물군과 점막면역의 상호작용을 관찰하고 경구 백신을 스크리닝 할 수 있는 모델을 개발하는 것을 목표로 하는 연구를 함. |
|  |
| **8. 평가항목** |
| **1. 말초혈액에서 추출한 단핵구에서 분화된 수지상세포의 특성 파악**  - 단핵구로 부터 만들어진 수지상세포의 특성 파악  **2. 미세유체 플랫폼 기반 B림프구의 성숙도 파악**  - 미세유체 채널 내에서 B림프구의 IgA 항체 분비 형질세포로의 성숙을 위한 배양 조건 최적화  - B림프구의 분화와 관련된 마커 (부착 단백질, 수용체 등) 발현량 확인  **3. 병원균 또는 특정 항원의 주입으로 면역세포의 상호작용과 분자학 수준의 특성 확인**  - 세포의 생존성 확인  - 항원 특이적 IgA 항체 형성 확인  - 사이토카인 발현량 확인 |
|  |
| **8. 인체유래물의 보관과 폐기** |
| 채취한 혈액은 헤파린 튜브 (heparin tub) 에 담아 즉시 실험에 이용할 예정이나,불가피한 경우 4 °C 연구시약전용냉장시설에서 단시간(6시간이내) 보관할 예정이며, 남은 혈액을 폐기시 의료폐기물 폐기법 및 절차에 따라 안전하게 폐기할 예정임. |
|  |
| **9. 참고문헌** |
| - Liu, Hao-Yu, Antoine Giraud, Cedric Seignez, David Ahl, Feilong Guo, John Sedin, Tomas Walden, et al. “Distinct B Cell Subsets in Peyer’s Patches Convey Probiotic Effects by Limosilactobacillus Reuteri.” Microbiome 9, no. 1 (2021).  - Fransen, Floris, Elena Zagato, Elisa Mazzini, Bruno Fosso, Caterina Manzari, Sahar El&nbsp;Aidy, Andrea Chiavelli, et al. “BALB/C and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive Iga Abundance, Which Impacts the Generation of Antigen-Specific IGA and Microbiota Diversity.” Immunity 43, no. 3 (2015): 527–40.  - Lycke, N Y, and M Bemark. “The Regulation of Gut Mucosal IGA B-Cell Responses: Recent Developments.” Mucosal Immunology 10, no. 6 (2017): 1361–74.  - Biram, Adi, Anneli Strömberg, Eitan Winter, Liat Stoler-Barak, Ran Salomon, Yoseph Addadi, Rony Dahan, Gur Yaari, Mats Bemark, and Ziv Shulman. “BCR Affinity Differentially Regulates Colonization of the Subepithelial Dome and Infiltration into Germinal Centers within Peyer’s Patches.” Nature Immunology 20, no. 4 (2019): 482–92.  - Komban, Rathan Joy, Anneli Strömberg, Adi Biram, Jakob Cervin, Cristina Lebrero-Fernández, Neil Mabbott, Ulf Yrlid, Ziv Shulman, Mats Bemark, and Nils Lycke. “Activated Peyer′s Patch B Cells Sample Antigen Directly from M Cells in the Subepithelial Dome.” Nature Communications 10, no. 1 (2019).  - Reboldi, Andrea, Tal I. Arnon, Lauren B. Rodda, Amha Atakilit, Dean Sheppard, and Jason G. Cyster. “Iga Production Requires B Cell Interaction with Subepithelial Dendritic Cells in Peyer’s Patches.” Science 352, no. 6287 (2016).  - Borsutzky, Stefan, Balthazar B. Cazac, Jürgen Roes, and Carlos A. Guzmán. “TGF-β Receptor Signaling Is Critical for Mucosal IGA Responses.” The Journal of Immunology 173, no. 5 (2004): 3305–9.  - Goyal, Girija, Pranav Prabhala, Gautam Mahajan, Bruce Bausk, Tal Gilboa, Liangxia Xie, Yunhao Zhai, et al. “Ectopic Lymphoid Follicle Formation and Human Seasonal Influenza Vaccination Responses Recapitulated in an Organ‐on‐a‐Chip.” Advanced Science, 2022, 2103241.  - Nair, Smita, Gerald E. Archer, and Thomas F. Tedder. “Isolation and Generation of Human Dendritic Cells.” Current Protocols in Immunology 99, no. 1 (2012). |