

## 동물실험계획 승인신청서

접수일자 : 2023 . 11. 15.

연구 과제명	(국문) 비알콜성 지방 간염과 루푸스 신염에서의 TonEBP 역할 연구			
	(영문) The role of TonEBP in NASH and lupus nephritis			
연구 책임자	성 명	권혁무	직 위	교수
	소 속	UNIST / 생명과학과		
	연락처	052-217-2535	E-mail	hmkwon@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		BIC Study-202203-521	

\* 동물실험계획 심의 후 승인 된 건에 한해서만 승인번호를 부여합니다. \*

### [ 윤리적 동물실험 방법의 준수 ]

1. 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
2. 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
3. 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
4. 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
5. 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 것입니다.
6. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 기간 만료 전 재승인(연장)신청을 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.

계획서에 기재된 사항들은 정확하며 위 사실의 위반 시 동물실험 및 동물실험시설의 이용 제한을 포함한 불이익을 감수할 것을 아래와 같이 서약합니다.

2023 년 11월 15일

연구책임자

권혁무

(서명 또는 인)





## 1. 실험 수행 기본 정보 (Information of Investigators)

1-1. 동물실험 수행자에 대한 정보를 기입하여 주십시오.

성명 (Name)	소속 (Department)	직급 (Position)	연락처(Contact) (Cell-phone#)	동물실험윤리교육 이수번호	연구자의 역할 (Role) (담당연구자/참여연구자)
권혁무	생명과학과	교수	TEL)052-217-2535 C.P.)010-3028-3200	BIC Study-202203-521	<b>실험디자인 (연구책임자)</b>
이예슬	생명과학과	연구원	010-9036-9957	BIC Study-202108-1592	수술, 조직채취, 안락사 <b>(관리 및 참여연구자)</b>
박현	생명과학과	대학원생	010-6812-4828	BIC Study-202204-849	수술, 조직채취, 안락사 (참여연구자)
신고운	생명과학과	대학원생	010-6665-7303	BIC Study-202311-2553	수술, 조직채취, 안락사 <b>(관리 및 참여연구자)</b>
김휘영	생명과학과	연구원	010-4266-6117	BIC Study-202111-1956	수술, 조직채취, 안락사 (참여연구자)

\* 동물실험을 수행할 모든 연구자를 기입하기 바라며, 각 연구자가 실험 중 어떤 역할을 하는지 기입해주십시오.

연구책임자가 직접 동물실험을 수행할 경우 아래와 같이 위 란에 해당 정보를 기입하여 주시기 바랍니다.

\* 관리담당연구자는 동물실험윤리위원회(IACUC) 및 생체효능검증실과 연락 및 관련 업무 관리를 담당해야 합니다.  
반드시 한 명 이상 지정해야 합니다.

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2024 년 12월 31일 까지 / 총 ( 1 )년 중 ( 1 )년째

\* 1회 과제 승인 기간은 최대 1년이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 기간 만료 전 재승인(연장) 신청이 이루어  
져야 합니다.

\* 재승인 신청은 최대 2회(총 연구기간 3년)까지 가능합니다.

## 2. 동물실험의 범주 및 종류 (Grade and Procedure of Study)

2-1. 동물실험의 범주를 선택하여 주십시오. (Level of Pain)

	Grade A: 죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구
	Grade B: 척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구
	Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구
V	Grade D: 척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구
	Grade E: 척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구



2-2. 동물실험의 종류를 선택하여 주십시오. (V) (Select Procedure)

V	시료의 투여 및 접종 (Material injection or inoculation)	V	재료 및 시료의 채취 (Sampling)	유전 및 육종 (Genetics or Breeding)
V	외과적 처치 (Surgical procedure)		방사선 조사 (Irradiation)	감염 (Infection)
	생리적 상태 및 행동 관찰 (Observation of physical status or behavior)		발암 (Carcinogenesis)	기타 (Other)

3. 실험동물 (Laboratory Animals)

- \* 생체효능검증실로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.  
(대한바이오링크, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)
- \* 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18 개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

구분	1		2		3	
품종(Species)	mouse					
계통명(Strain)	DBA/1					
유전자형 (Genotype_	Wild( V )					
	GEM( )					
성별(Sex)	M					
일령, 주령(Age)	6-8wks					
체중(Weight)	20~25g					
수량(Numbers)	168					
미생물 성상 (Microbiological status)	germfree	SPF				
	gnotobiotic	conventional				
공급처(시설명) Source(vender)	Orient Yeungnam branch (Orient)					

- \* 필요한 경우 동물정보 입력 칸은 추가하여 입력가능 하며, 추가하실 경우 위 표를 [복사]해서 이 줄에 [붙여넣기] 하시면 됩니다.

#### 4. 동물실험 대체법과 불필요한 동물실험의 금지 (Alternatives and Rationale for Animal use)

\* 가능하면 동물실험을 줄이기 위한 노력을 확인하고자 합니다.

4-1. 동물실험의 타당성을 확인하기 위한 것입니다. 다음 사항을 기술하여 주십시오.

(To verify the validity of animal experiments. Please describe the followings.)

정보 확인처 또는 데이터 베이스(Data References):

Ye et al. Cell Death and Disease (2020) 11:421 <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2632-8>

동물 중 선택의 적절성(Appropriateness of the selected species):

1. DBA/1 마우스의 경우, 류마티스관절염 환자의 혈청에서 콜라겐에 대한 항체가 발견되고, 관절에 존재하는 제2형 콜라겐이 자가항원으로 작용할 수 있다는 점에서 착안되어 고안된 모델 마우스에서 유도되는 CIA(Collagen-induced arthritis)가 주로 사용되고 있음. DBA/1(H-2q)마우스가 CIA에 감수성을 나타내기 때문에 CIA의 제작에 사용됨.

사용동물 수에 대한 적절성(Appropriateness of the number of animals):

[Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model 구축 및 TonEBP 저해제 효능 검증]

- 보통 7~9주령 사이의 수컷 DBA/1 마우스를 대상으로 CIA를 유도한다.
- 1차 주사로 Bovine 제2형 콜라겐 2 mg/mL 농도로 녹여 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA, 유화제와 mineral oil의 혼합물을 건조시킨 mycobacteria에 확산시켜 만든 용액)와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 이 혼합액을 꼬리의 기저- 부 아래 피내 100ul씩 주입한다.
- 2차 주사는 약 2주 후 시행. 콜라겐 2 mg/mL 농도로 녹여 용액을 동일한 농도의 Incomplete Freund's adjuvant와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 마우스 발바닥에 75ul 주입한다.
- 이후 10% DMSO가 함유된 PBS negative control로, MTX(Methothexate hydrate) 5mg/kg투여하는 positive control, celulenin을 50mg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.
- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종을 측정하여 비교 하여, 대조군과 크기 차이가 확실히 나타나면 실험을 중단한다. (약 5주가량 관찰)
- 동물 마취 후 채혈 및 간조직 비장 조직 채취, 염증 부위(발목) 채취
- 채취한 간조직 및 지장조직, 발목에서 H&E염색법과 FACS를 이용하여 조직학적, 면역학적 분석 및 염증 관련 사이토카인 확인

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
DBA/1	TonEBP 저해제 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	DBA/1 72마리 (3번 반복 실험) 1. 대조군 그룹 (n=24) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=24) 3. Cerulenin 50mg/kg 처리 그룹 (n=24)
DBA/1	TonEBP 저해제 처리에 따른 면역학적 분석(비장/간/발목) 및 염증 사이토카인 분석	DBA/1 96마리 (4번 반복 실험) 1. 대조군 그룹 (n=32) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=32) 3. Cerulenin 50mg/kg 처리 그룹 (n=32)

#### 5. 실험동물의 사육관리 (Husbandry Management)

\* 생체효능검증실 이용자 교육을 이수하지 않은 연구자는 생체효능검증실에 출입할 수 없습니다.

\* 생체효능검증실에서 사육되는 실험동물은 수의사와 실험동물 기술사에 의해 사육관리가 수행됩니다.





\* 생체효능검증실에서는 정기적으로 마생물 모니터링과 환경모니터링을 실시합니다.

#### 5-1. 실험동물 사육장소 (V) (Housing Zone)

V	Small animals zone		Return animal zone
	BSL-2 zone		Others ( _____ )

\* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층·호수, 연구실 명 등을 기재하여 주시기 바랍니다.

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)	No search remarks (v)
생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구: syringe	
특정사료 공급:	V
그 외 기타:	V

\* 생체효능검증실에서 제공하는 물품 이외의 장비 및 도구를 연구자가 실험실 내로 직접 반입하고자 하는 경우, 사전에 담당자와 협의 후 멸균하여 반입

5-3. 실험동물 사육구역 이외의 장소로 실험동물 이동(Relocation)	No search remarks (v)
장소:	V
사용장비:	V
실험내용:	V

\* 생체효능검증실 SPF 구역 내의 mouse, rat은 외부 반출 후 SPF zone으로의 재반입이 불가능합니다.

\* 동물이 반출되는 모든 경우, 반출되기 최소 2일전에 허가를 받아야 합니다. (반출신청서 작성하여 제출)

\* 실험동물 사육구역(4zone) 내에서 해당 구역 이외의 장소로 동물을 이동시켜 실험할 경우 장소, 이용 장비 및 연구 내용을 기재하여 주십시오. (생체효능검증실 지하층 영상분석실은 사육구역에 포함되지 않습니다.)

5-4. 사료 및 음수 제한 (실험과정 중 실험동물의 사료 및 음수 섭취를 강제적으로 제한 할 경우) (Restriction of Feed and Water)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V
1회 처치 시간	V
반복 횟수	V
제한 사유	V

5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제적으로 제한할 경우)	No search remarks (v)
---	-----------------------

(Require of Mechanical Restraint)		
실험기간		V
방 법		V
1회 처치 시간		V
반복 횟수		V
제한 사유		V

## 6. 실험동물의 수의학적 관리 (Veterinary care)

- \* 실험과정 중 또는 종료 시에 실험동물의 고통을 줄이기 위해서 적절한 조치를 취해야 합니다.
- \* 해당 약제에 표시하여 주십시오. 기타 약제일 경우 기타 난에 기입하여 주십시오.
- \* 약품 구입시 처방전이 필요할 경우 생체효능검증실에서 발행해 드립니다.

(문의 : 생체효능검증실 수의사 이윤진, T.5214, leeyj0926@unist.ac.kr)

6-1. 실험 중 실험동물의 고통 관리(마취제/ 용량/투여방법/횟수) Pain Control (description of agent name, dose and route)		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
진정/마취제 (Tranquilization/Anesthesia)	① Zoletil 45mg/kg ② Rompun 5.5 mg/kg (Zoletil 4: Rompun 1: PBS 45) 비울로 섞어서 30g 마우스에 0.3ml 복강 투여/1회	이예슬	
진통(Analgesics)			V
기타방법(Others)			V

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO <sub>2</sub>	이예슬

- \* 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO<sub>2</sub>)을 권장합니다.
- \* 안락사에 대한 2007년 미국 수의사회 가이드라인(AVMA Guideline on Euthanasia : Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007) : <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>참고

6-3. 수술 후 관리(*생존성 수술인 경우, 약제종류/용량/투여방법/횟수 등) (Postoperative Care (Describe agent name, dose and route in the survival surgery))		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
항생제 투여 (Antibiotics Therapy)			V
진통제 투여 (Analgesics Therapy)			V
기타 (Others)			V

6-4. 인도적인 실험 종료의 기준 (*만약 인도적인 안락사 기준이 필요 없을 시라도 그 사유에 대하여 기술해 주십시오.) (Criteria of Endpoint in Animal study (*If don't need criteria, describe what the reason))	No search remarks (v)
---	--------------------------





실험 중 임상증상의 발현 등이 관찰되거나 감염 등으로 인해 비슷한 주령의 정상동물의 체중과 비교하여 20%이상의 체중감소가 있을 시 실험을 중단하고 안락사 예정

- \* 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상되는 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준을 제시하여 주십시오. (예: 통증으로 인한 사료섭취량의 감소나 정상 체중의 20% 이상 체중감소 시, 정상 체중의 10%를 초과하는 종양의 형성, 발암 실험의 경우 암 병소의 지름이 20mm이상 발생 시 등)

## 7. 생물학적 위해 물질 실험 (Animal Study using Biohazards)

- \* 안전성 관련 서류를 계획서에 첨부해 주십시오. (예: RI 동위원소의 경우 “방사성동위원소 사용허가증” 첨부, 생물학적 안전도에 대한 근거자료 및 LMO신고서류 등)
- \* Infectious agent의 경우 미국 CDC의 Biological level을 참조하시기 바랍니다. 판매처에 근거자료를 요청하시면 편리합니다.
- \* 생체효능검증실은 BSL 1~2 등급의 생물학적 위해물질을 이용한 동물실험이 가능한 시설입니다. 그 외 병원균을 이용한 실험은 생체효능검증실로 문의해 주십시오. (이용 가능 물질 : 유전자재조합지침 별표2 참고)

7-1. 실험과정 중 방사선 핵종, 생물학적 물질, 위험 화학물, 재조합 DNA 등을 투여하는 경우 (Injection of Radionuclides, Biological agents, hazardous chemicals, recombinant DNA and Others)					No search remarks (v)			
투여 물질(Agent):					V			
용량 및 횟수(Dose):								
투여 방법(Route):								
처리 방법(Disposal Method):								
위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards):								
<table border="1"> <tr> <td>동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)</td> <td>동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)</td> </tr> <tr> <td>생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)</td> <td>배출 경로(Excretion route) :</td> </tr> </table>						동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)	동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)	생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)
동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)	동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)							
생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)	배출 경로(Excretion route) :							
7-2. 생물학적 안전도 (생물학적 물질을 투여하는 경우)(v) (Bio-safety Level)					No search remarks (v)			
Grade	BS- I	BS-II	BS-III	BS-IV	V			

## 8. 동물실험의 내용 (Outline of Animal Study)

- \* 실험동물에 행해지는 동물실험의 내용에 관하여 상세히 기술해 주십시오.  
특히 실험동물을 각 군으로 나눌 경우 이에 관하여 상세히 기술하십시오.

- \* 비전문가도 이해할 수 있는 용어로 써주시고, 인간과 동물복지, 학문 및 사회발전에 미치는 영향에 대해 설명하여 주십시오.
- \* 필요한 만큼 칸을 확장하여 기술해 주십시오.
- \* 필요한 경우, 관련 서류를 첨부해 주십시오.

## 8-1. 동물실험의 목적과 예상되는 성과 (Objective and Expected Results of Animal Study)

### [동물실험 목적]

#### 자가면역성 관절염 조절 연구의 필요성

- 자가면역성 관절염은 면역 기능에 이상이 생겨 관절을 둘러싼 활막에 염증이 생기고 통증과 뼈 손상을 일으키는 난치성 질환으로 원인이 정확하게 밝혀지지 않음. 조기 발견이 어렵고 치료 시기를 놓칠 경우 조기 사망까지 이를 수 있는 질환으로 100명 중 1명이 앓는 흔한 질병이며 남성보다 여성이 약 3배 정도 많음. 특히 주요 연령층이 20~60대로 다양한 연령층에서 발병되며 최근 20-30대 젊은 연령층에서의 발병률이 높아지고 있기 때문에 사회경제적 파급효과가 큰 질병으로 급부상함.
- 자가면역성 관절염 에 주로 쓰이는 효능제로는 비스테로이드성 소염진통제, TNF억제제 계열 약물 등과 같은 면역억제제로, 자가면역성 관절염으로 인해 나타나는 파생 병리를 완화하는 것이지 근본적인 치료제로 작용하지 못함.
- 2019년 자가면역성 관절염 치료제 매출이 252억 달러로 2029년까지 연평균 성장률(CAGR) 1%로 291억 달러까지 완만한 성장을 예상하고 있음. FDA 및 EMA의 승인을 받은 자가면역성 관절염 치료제가 거의 없으므로, 신약 개발 시에 큰 경제적 이득이 발생할 수 있음.

### [예상되는 성과]

1. 학문적, 인력양성 측면
  - 현재, 계속 증가 추세에 있는 자가면역성 관절염 관련 새로운 분자기작에 대한 연구결과는 새로운 위험요인과 발병원인을 발굴 가능함.
  - 본 연구과제를 통해 제시된 새로운 개념과 신기술을 토대로 국내 및 국제 공동 연구 및 임상 연구를 진행하여 국제 공동 연구의 토대가 될 것으로 기대함.
2. 기술적, 사회적, 경제 산업적 측면
  - 자가면역성 관절염의 발병예측 및 진단에 활용가능한 생체지표 발굴로 진단키트 개발과 같은 제품화 가능함.
  - 자가면역성 관절염 치료제 개발로 지적 재산권 확보 가능하며, 이를 통한 경제적 성과를 도출 가능함.
  - 효과적인 자가면역성 관절염 진단 및 치료 기술의 기반을 제공함으로써 사회적, 경제적 질병 부담을 감소시키고 건강한 대한민국 일조할 수 있음.

## 8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)

(Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))

### 자가면역성 관절염 실험

총 실험 기간 : 2024년 1월 1일-2024년 12월 31일

#### [Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model 구축 및 TonEBP 저해제 효능 검증]

- 보통 7~9주령 사이의 수컷 DBA/1 마우스를 대상으로 CIA를 유도한다.
  - 1차 주사로 Bovine 제2형 콜라겐 2 mg/mL 농도로 녹여 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA, 유화제와 mineral oil의 혼합물을 건조시킨 mycobacteria에 확산시켜 만든 용액)와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 이 혼합액을 꼬리의 기저- 부 아래 피내 100ul씩 주입한다.
  - 2차 주사는 약 2주 후 시행. 콜라겐 2 mg/mL 농도로 녹여 용액을 동일한 농도의 Incomplete Freund's adjuvant와 1 : 1의 비율로 혼합하며, 마우스 발바닥에 75ul 주입한다.
- 이후 10% DMSO가 함유된 PBS negative control로, MTX(Methothexate hydrate) 5mg/kg투여하는 positive



control, celulenin을 50mg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.

- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종을 측정하여 비교 하여, 대조군과 크기 차이가 확실히 나타나면 실험을 중단한다. (약 5주가량 관찰)
- 동물 마취 후 채혈 및 간조직 비장 조직 채취, 염증 부위(발목) 채취
- 채취한 간조직 및 지장조직, 발목에서 H&E염색법과 FACS를 이용하여 조직학적, 면역학적 분석 및 염증 관련 사이토카인 확인.
- 마취는 Zoletil 45mg/kg와 Rompun 5.5 mg/kg를 PBS와 섞어서(Zoletil 4: Rompun 1: PBS 45 비율) 마우스에 0.01mg/g으로(30g 마우스에 0.3mL) 복강 투여/1회로 진행함.
- 채혈은 전신마취 후 안와채혈로 진행함. 이는 중등도 이상의 고통을 동반하지만, 심장 채혈에 비해 용혈 가능성이 작고 혈청에서 여러 염증, 자가면역질환 관련 지표 분석을 위해서는 많은 양의 혈액이 필요하므로 안와채혈 진행함. 마리당 0.3-0.5 ml의 혈액 얻어내고 단시간 내 간조직 및 비장조직, 발목 채취함.
- 채취한 간조직 및 비장조직의 무게 및 크기를 측정하고, 발목 사진찍어 기록 후 H&E 염색법을 통해 생물학적, 조직학적 분석.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
DBA/1	TonEBP 저해제 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	DBA/1 72마리 (3번 반복 실험) 1. 대조군 그룹 (n=24) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=24) 3. Cerulenin 50mg/kg 처리 그룹 (n=24)
DBA/1	TonEBP 저해제 처리에 따른 면역학적 분석(비장/간/발목) 및 염증 사이토카인 분석	DBA/1 96마리 (4번 반복 실험) 1. 대조군 그룹 (n=32) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=32) 3. Cerulenin 50mg/kg 처리 그룹 (n=32)