

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 것에 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	실험디자인 (연구책임자)
이예슬	생명과학과	연구원	010-9036-9957	BIC Study-202108-1592	수술, 조직채취, 안락사 (관리 및 참여연구자)
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 (관리 및 참여연구자)
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 기입해주시요.
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 월 일 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)

* 생체효능검증실험로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.

(대한바이오파마, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)

* 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

구분	1		2		3	
품종(Species)	mouse		mouse		mouse	
계통명(Strain)	NZBW/J F1		DBA/1		C57BL/6	
유전자형 (Genotype)	Wild(V)	GEM()	Wild(V)	GEM()	Wild(V)	GEM()
성별(Sex)	F		M		M	
일령, 주령(Age)	18wks		6-8wks		6-8wks	
체중(Weight)	30~40g		20~25g		20~25g	
수량(Numbers)	400		168		240	
미생물 성장 (Microbiological status)	germfree	SPF	germfree	SPF	germfree	SPF
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional
공급처(시설명) Source(vender)	중앙실험동물(Central Lab. Animal Inc.)		Orient Yeungnam branch (Orient)		Hyochang Science (Daehan Biolink)	

* 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):

1. J Immunol. 2010 Feb 15;184(4):2175-82. doi: 10.4049/jimmunol.0903153

2. 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. NZBW/J F1 mice의 경우, 자연발생적 루푸스 질환모델로서 80% 이상에서 단백뇨가 나타나는 23주령에 치료를 개시함
2. C57BL/6 마우스는 면역관련 실험시 비교적 동일한 실험결과를 얻을 수 있으며, 가장 일반적으로 사용되고 있음.
3. 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):

1. 자연발생적 루푸스 질환동물 모델에서 TonEBP 저해제 효능 검증

23주에서 10주간 TonEBP inhibitor인 신약을 2일에 한번 25mg/kg 투여하는 그룹과 positive control로 Cyclophosphamide 투여하는 그룹, DMSO를 투여하는 대조군 그룹 총 3개 그룹으로 나누어 진행함. 루푸스 질환 동물 모델은 개체 별로 증상의 차이가 큰 특성이 있어 각 그룹 당 n=20-25으로 실험 시작하여 대조군 그룹이 50% 생존율을 보일 때, 각 약물처리에 따른 생존율을 비교하고자 함.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
NZBW/J F1	TonEBP 저해 신약 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	NZBW/J F1 280 마리 (신약 4종 *70마리) 1. 대조군 그룹 (n=100) 2. Cyclophosphamide(CTX) 처리 그룹 (n=80) 3. 신약 Xmg/kg 처리 그룹 (n=100)

2. collagen antibody induced arthritis(CAIA) mouse model 와 Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model 구축 및 TonEBP 저해제 신약 효능 검증

1) 항체 유도성 관절염 모델(collagen antibody induced arthritis)collagen antibody induced arthritis(CAIA)

- 보통 6-8주의 C57BL/6J 유전적 배경을 가진 야생형(WT) 마우스에서 CAIA를 유도하기 위해 단일클론항체의 복합액을 주입한다. CAIA는 유전자 변형 동물을 포함한 대부분의 마우스 계통에서 유도될 수 있으며 관절염 발병률은 거의 100%에 이른다.
- C57BL/6J 유전적 배경을 가진 동물에서 전체 관절염 표현형을 연구하는데, 시중에 판매하는 단일클론항체 각 테일 주사제를 녹여 8mg용량이 되도록 복강 내 주입한다.
- DMSO투여하는 negative control, MTX(Methothexate hydrate) 5mg/kg투여하는 positive control, 약 10종의 신약을 Xmg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.
- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종과 몸무게를 측정하여 비교 하여, 2주 이내로 실험을 종료한다.
- 동물 마취 후 채혈 및 간 조직 비장 조직 채취

- 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 간 조직 및 비장조직 채취.
- 채취한 비장 및 간 조직의 무게 및 크기를 측정 혈액은 혈청 분리 후 독성 검사 예정.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
C57BL/6	TonEBP 저해 신약 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	C57BL/6 240마리 *신약 10종 1. 대조군 그룹 (n=80) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=80) 3. 신약 Xmg/kg 처리 그룹 (n=80)

2) 콜라겐 유도성 관절염 모델 (CIA:Collagen-induced arthritis(CIA))

- 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, 약 4종의 신약을 Xmg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.
- 이후 효과가 나타날 시 실험에 투여 횟수와 투여량등을 조절하여 반복 실험 후, 가장 효과적인 투여 방법과 횟수를 확인한다.
- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종과 몸무게를 측정하여 비교 하여, 대조군과 크기 차이가 확실히 나타나면 실험을 중단한다. (약 5주가량 관찰)
- 동물 마취 후 채혈 및 간 조직 비장 조직 채취, 염증 부위(발목) 채취
- 채취한 간조직 및 지장조직, 발목에서 H&E염색법과 FACS를 이용하여 조직학적, 면역학적 분석 및 사이토카인 레벨 차이를 확인하기 위해 serum과 조직에서 RNA발현 및 단백질 발현을 조사한다.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
DBA/1	TonEBP 저해 신약 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. 신약 50mg/kg 처리 그룹 (n=24)
DBA/1	TonEBP 저해 신약 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. 신약 50mg/kg 처리 그룹 (n=32)

- CIA 관절염 모델이 실험을 위해서는 최소 6-8주가 소요되는 반면, 항체 유도성 관절염 모델은 실험기간이 2주 이내로 비교적 짧아서 항염증 효과를 가지는 약물의 효과를 신속하게 평가할 수 있는 장점이 있다.
- 따라서 CAIA 모델로 부종 확인하여 일부 효과를 가진 신약에 대해서 CIA모델로 효과를 검증하고 각 면역 기관등을 이용하여 생화학적, 면역학적 지표 확인 예정이다.

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 미생물 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) (Require of Mechanical Restraint)		No search remarks (v)
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) 비율로 섞어서 30g 마우스에 0.3ml 복강 투여/1회	신고운	
진통(Analgesics)			V
기타방법(Others)			V

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
CO ₂	이예슬

- * 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO₂)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	No search remarks (v)
---	--------------------------

need criteria, describe what the reason))

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):					
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]

1. 루푸스 신염 조절 연구의 필요성

- 전신 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus, SLE)는 자가항원에 대한 자가항체를 형성하여 신장, 혈구, 중추신경계 등의 표적 기관에 비정상적 염증이 일으켜 체내 손상을 유발하는 난치성 자가 면역 질환으로 원인과 예후가 정확히 규명되지 않음. 최근 5년간 국내 전신 홍반성 루푸스의 환자는 증가 추세에 있고, 여성이 남성보다 더 많이 발병함. 특히 생식 연령층에 해당하는 15세 이상 44세까지의 가임기의 여성에서 주로 발병하고 증가하는 추세를 보이는 것으로 확인되므로, 여성의 임신, 출산 및 사회경제적 활동에 파급효과가 큰 질병으로 급부상함.
- 루푸스에서 주로 쓰이는 효능제로는 스테로이드, 비스테로이드 항염제, 항말라리아제, 아자티오프린, 사이클로포스파마이드 등과 같은 면역억제제로, 루푸스로 인해 나타나는 파생 병리를 완화하는 것이지 근본적인 치료제로 작용하지 못함. 또한 현재의 치료방식으로 면역억제제 및 스테로이드의 병행 치료가 주로 이루어지고 있고, 현재 효능제들이 가지고 있는 부작용들이 루푸스 환자들에게 합병증을 유발할 위험이 있어 새로운 치료제에 대한 미충족 수요가 매우 높음.
- 루푸스의 시장 규모는 2017년 기준 2조 원으로 추계되고, 2025년까지 시장의 연평균 성장률이 7% 상승하여 2025년까지 32조 원 이상에 이를 것으로 전망하고 있음. FDA와 EMA의 승인을 받은 루푸스 신염 치료제가 거의 없으므로, 신약 개발 시에 큰 경제적 이득이 발생할 수 있음.

2. 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 루푸스 및 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

- 루푸스 및 자가면역성 관절염의 발병예측 및 진단에 활용가능한 생체지표 발굴로 진단키트 개발과 같은 제품화 가능함.
- 루푸스 및 자가면역성 관절염 치료제 개발로 지적 재산권 확보 가능하며, 이를 통한 경제적 성과를 도출 가능함.
- 효과적인 루푸스 및 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))

실험 1. 루푸스 신염 실험

총 실험 기간 : 2024년 1월 1일-2024년 12월 31일

[자연발생적 루푸스 질환 동물 모델에서 TonEBP 저해제 신약 효능 검증]

23주에서 10주간 TonEBP inhibitor 신약을 2일에 한 번 25mg/kg 투여하는 그룹과 positive control로 Cyclophosphamide 투여하는 그룹, DMSO를 투여하는 대조군 그룹 총 3개 그룹으로 나누어 진행함. 루푸스 질환 동물 모델은 개체별로 증상의 차이가 큰 특성이 있어 각 그룹 당 n=20-25로 실험 시작하여 대조군 그룹이 50% 생존율을 보일 때, 각 약물 처리에 따른 생존율을 비교하고자 함.

- 동물 마취 후 채혈 및 비장조직 및 신장조직 채취
- 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 비장 및 신장조직 채취함.
- 채취한 비장 및 신장 조직의 무게 및 크기를 측정하고 H&E 염색법을 통해 생물학적, 조직학적 분석.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
NZBW/J F1	TonEBP 저해 신약 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	NZBW/J F1 280마리 (약물 당 70마리, 총 4회 신약 실험) 4. 대조군 그룹 (n=100) 5. Cyclophosphamide(CTX) 처리 그룹 (n=80) 6. 신약 Xmg/kg 처리 그룹 (n=100)

실험 2. 자가면역성 관절염 실험

총 실험 기간 : 2024년 1월 1일-2024년 12월 31일

[collgen antibody induced arthritis(CAIA) mouse model 와 Collagen-induced arthritis(CIA) mouse model 구축 및 TonEBP 저해제 신약 효능 검증]

1) 항체 유도성 관절염 모델(collgen antibody induced arthritis)collgen antibody induced arthritis(CAIA)

- 보통 6-8주의 C57Bl/6J 유전적 배경을 가진 야생형(WT) 마우스에서 CAIA를 유도하기 위해 단일클론항체의 복합액을 주입한다. CAIA는 유전자 변형 동물을 포함한 대부분의 마우스 계통에서 유도될 수 있으며 관절염 발병률은 거의 100%에 이른다.
- C57Bl/6J 유전적 배경을 가진 동물에서 전체 관절염 표현형을 연구하는데, 시중에 판매하는 단일클론항체 각 테일 주사제를 녹여 8mg용량이 되도록 복강 내 주입한다.
- DMSO투여하는 negative control, MTX(Methothexate hydrate) 5mg/kg투여하는 positive control, 약 10종의 신약을 Xmg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.
- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종과 몸무게를 측정하여 비교 하여, 2주 이내로 실험을 종료한다.
- 동물 마취 후 채혈 및 간 조직 비장 조직 채취

- 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 간 조직 및 비장조직 채취.
- 채취한 비장 및 간 조직의 무게 및 크기를 측정 혈액은 혈청 분리 후 독성 검사 예정.

유전자형	실험 목적	필요한 동물 수
C57BL/6	TonEBP 저해 신약 처리에 따른 표현형 및 조직학적, 생화학적 지표 확인	C57BL/6 240마리 *신약 10종 1. 대조군 그룹 (n=80) 2. MTX(Methothexate hydrate)처리 그룹 (n=80) 3. 신약 Xmg/kg 처리 그룹 (n=80)

2) 콜라겐 유도성 관절염 모델 (CIA:Collagen-induced arthritis(CIA))

- 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 확산 시켜만든 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, 신약을 50mg/kg 투여하는 실험군으로 각 3그룹을 나누어 4일에 한번 투여한다.
- 각 그룹당 8마리로 실험을 시작하여, 4일에 마다 부종을 측정하여 비교 하여, 대조군과 크기 차이(X%)가 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 저해 신약 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. 신약 50mg/kg 처리 그룹 (n=24)
DBA/1	TonEBP 저해 신약 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. 신약 50mg/kg 처리 그룹 (n=32)

