

연구개발 최종보고서·요약서

I. 인쇄 규격

1. 크기: A4 신판(가로 210mm * 세로 297mm)
2. 제본: 좌철
3. 용지
 - 가. 표지: 백상지(150g/m²)
 - 나. 내용: 백상지(80g/m²)
4. 인쇄 방법
 - 가. 표지: 바탕 백색, 활자 흑색
 - 나. 내용: 흑색 지정 활자

II. 편집 순서

1. 표지
2. 제출문
3. 보고서 요약서
4. 국문 요약문
5. 영문 요약문
6. 영문 목차
7. 본문 목차
8. 뒷면지

III. 참고 사항

전자 조판 인쇄 시에는 이에 준한다.

IV. 편집 순서별 서식

2. 제출문

제 출 문

한국연구재단 귀하

‘중간엽줄기세포를 이용한 심혈관계 및 근골격계 질병의 세포치료 최적화를 위한 대사제어연구’(연구개발 기간 : 2012.10.01 ~ 2017.09.30) 과제의 최종보고서 1 부를 제출합니다.

2017.09.01.

주관연구기관명 : 충남대학교 (대표자)오덕성(인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구기관책임자: 충남대학교 이주용
협동연구기관책임자:
참여기관책임자:

훈령 제35조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	2012M3A9C6050 087	해당 단계 연구 기간	2단계 5년	단계구분	2/2
연구사업명	중사업명	바이오·의료기술개발사업			
	세부사업명	세포재생기술개발사업			
연구과제명	대과제명	다기능성 나노컴플렉스 기반 중간엽줄기세포 치료기술 최적화			
	세부과제명	중간엽줄기세포를 이용한 심혈관계 및 근골격계 질병의 세포치료 최적화를 위한 대사제어연구			
연구책임자	이주용	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:220,000천원 기업: 천원 정부 외: 천원 계:220,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:550,000천원 기업: 천원 정부 외: 천원 계:550,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	충남대학교 분석과학기술대학원			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자: 이주용	
<input type="checkbox"/> 자가포식과정과 커플링되어 있는 선천면역기능이 동일 HDAC6-RIG-I regulatory axis에 의해 조절됨을 밝힘. <input type="checkbox"/> HDAC6가 p53의 deacetylase로서 p53을 탈아세틸화 하는 것이 중간엽 줄기세포의 apoptosis를 억제하는 데 중요함을 밝힘. <input type="checkbox"/> GCA-TRAF6-ULK1에 의한 자가포식과정의 조절이 세포의 생존에 중요함을 밝힘. <input type="checkbox"/> 저산소 처리시 HDAC6와 미토콘드리아 ubiquitinase인 MITOL이 서로 상호작용을 통하여 MFN2의 레벨을 조절하는 것을 밝힘 <input type="checkbox"/> 세포의 대사스트레스 상황에서 HDAC6에 의한 MFN1의 deacetylation에 의해 대사스트레스 감수성이 감소하여 세포의 생존율이 향상됨을 밝힘. <input type="checkbox"/> RAP80-C1QBP 간의 상호결합에 의해 미토콘드리아의 기능이 조절되고 이에 의해 에너지대사 특성이 변화함을 밝힘 <input type="checkbox"/> HDAC6에 의한 품질관리형 자가포식 및 저산소처리 유도 미토콘드리아 형태조절 기능이 루게릭병의 진행에 중요함을 밝힘. <input type="checkbox"/> RAP80에 의한 에너지대사 조절이 세포의 간엽-중간엽 전환 (EMT) 과정에 중요함을 밝힘. 특히 lung으로 Targeting에 특징적인 효과를 보임.				보고서 면수 43	

4. 국문 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구의 목표는 심혈관계와 근골격계 질병의 치료를 위하여 중간엽줄기세포의 재생기능 및 면역조절기능을 이용한 세포치료기술에 대사제어기술을 적용하여 최적화시킴으로서 세포치료효과를 최대화하는 동시에 부작용을 최소화하는 것이다. 즉, 중간엽줄기세포의 증식, 생존성, 분화 및 면역조절기능에 관여하는 자가포식과정 (autophagy) 그리고 대사과정(metabolism)을 제어하는 유전자를 발굴하고 조절기전을 밝힘으로서 중간엽줄기세포의 치료가능성을 높일 수 있는 나노기술을 활용한 중간엽줄기세포 전처리기술에 적용한다. 또한, 나노기술을 이용한 세포추적 기술 및 손상조직 타겟팅기술을 활용하여 주입된 중간엽줄기세포에 의한 microenvironment 변화를 조절할 수 있는 세포신호전달계를 발굴한다.</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>□ 자가포식 조절에 의한 세포기능 조절 분야</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 자가포식과정과 커플링되어 있는 선천면역기능이 동일 HDAC6-RIG-I regulatory axis에 의해 조절됨을 밝힘. (EMBO J, 2016). 중간엽 줄기세포에서도 면역조절기능이 HDAC6에 의해 조절됨을 밝힘. ● HDAC6가 p53의 deacetylase로서 p53을 탈아세틸화 하는 것이 중간엽 줄기세포의 apoptosis를 억제하는 데 중요함을 밝힘. (j int mol sci 투고 중) ● GCA-TRAF6-ULK1에 의한 자가포식과정의 조절이 세포의 생존에 중요함을 밝힘. (Blood 투고 중) 중간엽 줄기세포에서도 동일한 과정이 중요함 <p>□ 저산소처리에 의한 세포기능 조절 분야</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 저산소 처리시 HDAC6와 미토콘드리아 ubiquitinase인 MITOL이 서로 상호작용을 통하여 MFN2의 레벨을 조절하는 것을 밝힘 (Biochem Biophys Res Commun. 2015) 이에 따라서 루게릭병 모델에서 근육의 손실에 저항을 가질 수 있는 기전으로 HDAC6와 MITOL을 발굴함 (Neurodegener. dis. 2015) 중간엽 줄기세포를 이용한 루게릭병 근육손실 치료에 응용하고자 함. <p>□ 에너지대사 조절에 의한 세포기능 조절분야</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 세포의 대사스트레스 상황에서 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소의 양을 최소화 하기 위한 기전으로 HDAC6에 의한 MFN1의 deacetylation이 중요함을 밝힘. 이에 따라 미토콘드리아의 대사스트레스 감수성이 감소하여 세포의 생존율이 향상됨을 밝힘. (J. Cell. Sci. 2014) ● RAP80-C1QBP 간의 상호결합에 의해 미토콘드리아의 기능이 조절되고 이에 의해 에너지대사 특성이 변화함을 밝힘 (Biochem Biophys Res Commun. 2017, accepted). <p>□ 중간엽줄기세포의 줄기세포의 세포치료 응용 분야</p> <ul style="list-style-type: none"> ● HDAC6에 의한 품질관리형 자가포식 및 저산소처리 유도 미토콘드리아 형태 조절 기능이 루게릭병의 진행에 중요함을 밝힘. (Neurodegener. dis. 2015) ● RAP80에 의한 에너지대사 조절이 세포의 간엽-중간엽 전환 (EMT) 과정에 중요함을 밝힘. 특히 lung으로 Targeting에 특징적인 효과를 보임. (Cancer sci. 2016)
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>□ HDAC6-RIG-I regulatory axis에 의한 선천면역조절기능을 중간엽 줄기세포의 면역조절 기능을 이용한 치료에 적용하고자 함.</p> <p>□ HDAC6-p53 억제기능을 이용하여 중간엽줄기세포의 apoptosis를 억제하여 배양을 유지하는데 적용하고자 함.</p> <p>□ GCA-TRAF6-ULK1에 의한 자가포식과정의 조절이 중간엽줄기세포의 스트레스 민감도를 줄이는 데 적용하고자 함.</p> <p>□ 저산소처리와 비슷한 효과를 유도한 HDAC6-MITOL 유전자의 기능을 이용하여 부작용 없는 저산소처리 개발에 응용하고자함. 동일 기전을 중간엽 줄기세포를 이용한 루게릭병 근육손실 치료에 응용하고자 함.</p> <p>□ HDAC6에 의한 MFN1의 deacetylation을 미토콘드리아의 대사스트레스 감수성이 감소기전으로하여 중간엽 줄기세포의 유지배양시 대사스트레스를 감소시키는</p>

	기전으로 응용하고자 함.				
	<input type="checkbox"/> RAP80-C1QBP 조절을 중간엽줄기세포의 에너지대사조절에 응용하고자 함.				
핵심어 (5개 이내)	중간엽줄기세포	대사	자가포식	저산소처리	히스톤탈아세틸 화효소6

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

Purpose & Contents	<p>We aim to optimize mesenchymal stem cell culture system controlling metabolic and autophagic signals and to elucidate biomolecular pathway for the hypoxic pretreatment of mesenchymal stem cells. Autophagy and metabolic regulation plays an important role in proliferation, maintenance and differentiation. Importantly, hypoxic pretreatment has been widely used to improve the performance of mesenchymal stem cell therapy without mechanistic understanding. Thus, we aim to modify and optimize metabolic, autophagic and hypoxic cellular signals for the improvement of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular and osteomuscular diseases</p>				
Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. HDAC6-RIG-I regulatory axis controls autophagy and innate immune response (EMBO J, 2016). 2. HDAC6 deacetylates p53 to control apoptosis (Submitted to j int mol sci) 3. GCA-TRAF6-ULK1 controls autophagy to desensitize cellular stresses. (submitted to Blood) 4. HDAC6-MITOL-MFN2 axis regulates Hypoxia induce mitochondrial fusion (Biochem Biophys Res Commun. 2015) HDAC6 also involved in ALS (Neurodegener. dis. 2015) 5. HDAC6 deacetylates MFN1 to control mitochondrial fusion induced by metabolic stresses (J. Cell. Sci. 2014) 6. RAP80-C1QBP interaction regulates mitochondrial activity resulting metabolic shift to quiescence state (Biochem Biophys Res Commun. 2017, accepted). 7. HDAC6 dependent quality control autophagy and stress induced mitochondrial fusion is related with ALS (Neurodegener. dis. 2015) 8. RAP80 controls epithelial mesenchymal transition enhancing the repositioning to lung (Cancer sci. 2016) 				
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> 1. To elucidate signal transduction network of metabolism and autophagy for mesenchymal stem cell proliferation, maintenance and differentiation. 2. To minimize the risk of cancer using other oncogenes 3. To expand our knowledge for metabolism and autophagy to aging research. 4. To expand our knowledge for microenvironmental change to cancer development relating epithelial-mesenchymal transition. 5. To develop a mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular and osteomuscular disease. 				
Keywords	Mesenchymal Stem Cell	Metabolism	Autophagy	Hypoxia	HDAC6

6. 영문 목차

7. 본문 목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 국내외 기술 개발 현황	10
3. 연구 수행 내용 및 성과	10
4. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	34
5. 연구개발성과의 활용 계획	37
6. 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보	37
7. 연구개발성과의 보안등급	37
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	38
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적	39
10. 연구개발과제의 대표적 연구 실적	39
11. 기타 사항	41
12. 참고 문헌	42

8. 본문

제1장. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

- 대사 및 자가포식과정 조절을 통한 중간엽줄기세포 증식, 유지 및 치료기능 최적화
- 저산소 전처리에 관련하는 세포 신호전달계 확립과 세포치료효율 향상을 위한 시스템 구축
- 중간엽줄기세포의 대사물질 분비조절을 통한 세포치료 최적화 기술개발

2. 연구개발의 필요성

한국을 포함한 선진국에서의 주요 사망원인인 심혈관계질환 환자의 수는 지속적으로 증가하고 있으며, 고령화사회 진입에 따른 노인층의 증가에 의해 골, 연골, 골격근 등의 퇴행성 근골격계질환 환자의 수가 급격하게 증가하고 있다. 현재의 줄기세포치료를 제외한 다른 치료법은 이러한 질환들의 주요 원인들의 근본적인 해결을 할 수 없고, 치료효과가 제한적이고 개선의 여지가 적다. 따라서, 이러한 질병에 대한 효과적인 치료방법의 개발의 중요성이 매우 커지고 있다. 줄기세포치료법은 이러한 표준적인 치료법의 한계를 극복하기 위한 대안으로 제시되었으며, 심혈관계질환과 근골격계 질환에 대한 연구는 전체 줄기세포연구의 40%이상을 차지할 정도로 활발히 연구가 진행 중이다. 그 이유는 심근 및 연골세포의 분열 및 증식이 가능함이 보고되고, 손상조직을 스스로 재생하려는 기전이 인체 내에도 존재함이 알려졌기 때문이다. 하지만, 자연 재생능력이 손상조직을 완전히 복구할 정도로 충분치 못하므로, 치유능력을 가진 중간엽줄기세포를 인위적인 방법을 사용하여 대량으로 손상조직으로 이동시키고 조직의 재생을 유도하는 방법이 제안 되었다. 하지만, 초기의 놀라운 치료효과에도 불구하고 현재까지 극복되지 못하고 있는 기술적인 한계가 존재한다.

첫째, 단순한 채취만으로는 질병의 치료에 사용될 수 있을 정도의 중간엽줄기세포를 확보하지 못한다. 따라서 본 연구에서는 충분한 치료용 중간엽줄기세포의 확보를 위해 대사(metabolism) 조절과 자가포식(autophagy) 조절을 이용하여 지속가능한 중간엽줄기세포증식기술을 개발하고자 한다.

둘째, 손상조직에서의 중간엽줄기세포의 재생능력을 최대화하기 위한 저산소 전처리기술의 신호전달체계 및 작용기전을 밝히고 이를 응용하여 전처리기술을 최적화 하고자 한다.

셋째, 중간엽줄기세포의 손상조직에서의 치료효과는 그 재생능력과 더불어 마이크로환경(microenvironment) 조절을 통하여 주변세포를 자극하여 조절되는 면역반응효과를 포함한다. 본 연구에서는 이러한 마이크로환경조절인자 (대사물질, cytokine, chemokine, 신호전달물질 등)를 secretome을 이용하여 밝히고 이를 줄기세포치료에 응용하고자 한다.

3. 연구개발 범위

1) 대사 및 자가포식과정 조절을 통한 중간엽줄기세포 증식, 유지 및 치료기능 최적화 기술
자가포식과정은 세포가 기본적으로 살아남기 위한 에너지 및 영양소를 긴급히 얻을 수 있는 리소좀에 의한 세포내 분해과정이다. 최근 연구에 의하면 이러한 자가포식기전이 체내에서 줄기세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 함이 밝혀졌다. 즉, 자가포식기전이 제거된 동물 모델에서 성체줄기세포의 수가 감소하고 조직 재생능력이 현저하게 저하됨이 관찰되었다. 따라서, 성체줄기세포인 중간엽줄기세포에서의 자가포식기전 관련 신호전달유전자를 제어하여 세포치료에 이용될 수 있는 줄기세포를 최대한 얻을 수 있도록 하는 기술을 개발하고자 한다.

2) 저산소 전처리에 관련하는 세포 신호전달계 확립과 세포치료효율 향상을 위한 시스템 구축
중간엽줄기세포의 효과적인 세포치료를 위하여 저산소 전처리과정이 중간엽줄기세포의 치료효능을 높이기 위하여 사용되고 있으나 이에 대한 중요 신호전달계와 작용기전에 대한 연구는 매우 미흡하다. 하지만 심혈관계 및 근골격계 질환의 세포치료에 있어 저산소 전처리의 효능은 다양하게 검증되었다. 따라서 본 연구에서는 저산소를 포함한 전처리과정에서 중요하게 작동하는 세포신호전달계를 발굴하고 이들이 세포치료에 작용하는 기전을 밝히고자 한다. 또 이를 이용하여 심혈관계 및 근골격계 질환

치료에 최적화된 중간엽줄기세포 전처리 기술을 개발하고자 한다.

3) 중간엽줄기세포의 대사물질조절을 통한 세포치료 최적화 기술

개발심혈관계질환 및 근골격계질환의 중간엽줄기세포치료는 줄기세포 자체의 재생능력 뿐만 아니라 여러가지 조절인자 (cytokines, chemokine, lysophosphatidic acid 등)의 분비를 통한 마이크로환경 (microenvironment)를 조성함으로써 다른 줄기세포의 분화 및 면역반응조절 함으로써 다차원적으로 이루어진다. 따라서, 이러한 기전에 관련하는 신호전달계 및 관련 조절인자에 대한 연구가 매우 필요하다. 본 연구를 통하여 HDAC6 유전자적 혹은 효소적 제어가 중간엽줄기세포에 의한 마이크로환경 조절에 미치는 영향을 파악하고 이를 최대의 세포치료효과를 거둘 수 있도록 최적화 하는 기술을 개발하고자 한다.

제2장. 국내외 기술 개발 현황

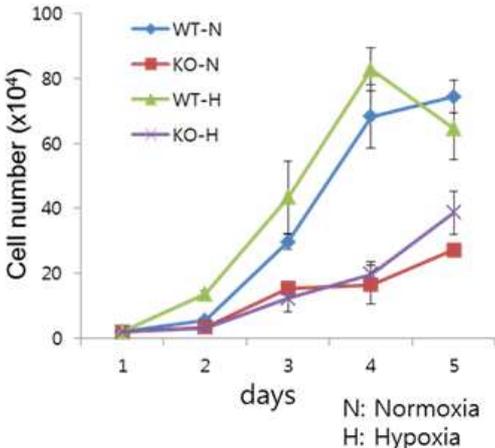
1. 세계적 수준

자가포식 및 대사조절을 통한 중간엽줄기세포의 증식 및 분화능 유지 기술은 현재 개념적으로 제시되어 있으며 구체적인 작용기전 또는 실용화 연구는 진행되지 않았다. 또한, 중간엽줄기세포의 저산소 전처리역시 치료효과 부분은 많은 연구가 진행되었으나 구체적인 작용기전 그리고 이를 이용한 전처리방법의 개선에 대한 연구는 미흡하다.

2. 국내수준

- 국내의 중간엽줄기세포치료는 주로 체외배양을 하지 않고 바로 환자에 주입하는 방법이 사용되고 있음
- 골수채취 중간엽줄기세포의 경우 채취시 심한 고통을 수반하며, 그 숫자가 매우 적어서 치료효과가 제한적이다.
- 다른 조직이나 제대혈 유래 중간엽줄기세포 역시 정도의 차이가 있지만 체외배양을 통한 대량 증식없이는 치료효과가 제한적이다.
- 따라서 이를 체외배양을 통하여 multipotency를 유지시키며 대량증식할 수 있는 기술의 개발이 필수적이다.

제3장. 연구 수행 내용 및 성과

연구 수행 내용 및 성과	연구 결과
<p>○ HDAC6 유전자가 없는 중간엽줄기세포의 경우 성장속도가 정상 중간엽줄기세포에 비하여 저하되었음을 밝힘</p>	 <p>The graph plots Cell number (x10⁴) on the y-axis (0 to 100) against days on the x-axis (1 to 5). The legend indicates: WT-N (blue circles), KO-N (red squares), WT-H (green triangles), and KO-H (purple diamonds). WT-H shows the highest growth, reaching approximately 85 x10⁴ cells by day 4. WT-N reaches about 75 x10⁴ cells by day 5. KO-N and KO-H show significantly lower growth, reaching approximately 28 x10⁴ and 40 x10⁴ cells respectively by day 5. Error bars are shown for each data point.</p> <p>N: Normoxia H: Hypoxia</p>

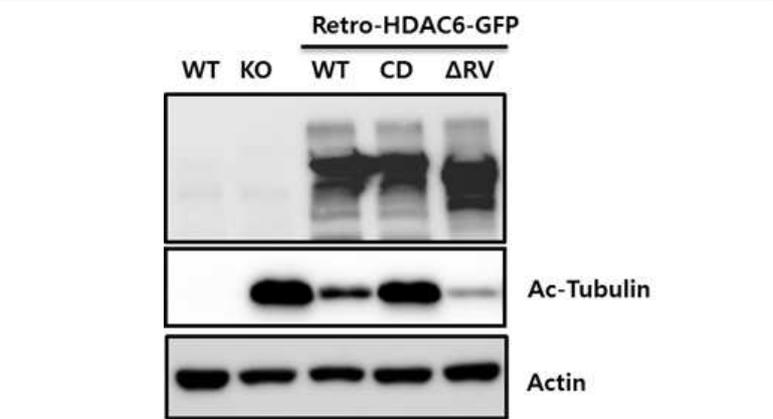
○ 골세포로 분화시켰을 때 HDAC6 KO 중간엽 줄기세포의 분화능이 정상세포에 비하여 현저히 떨어짐을 밝힘.



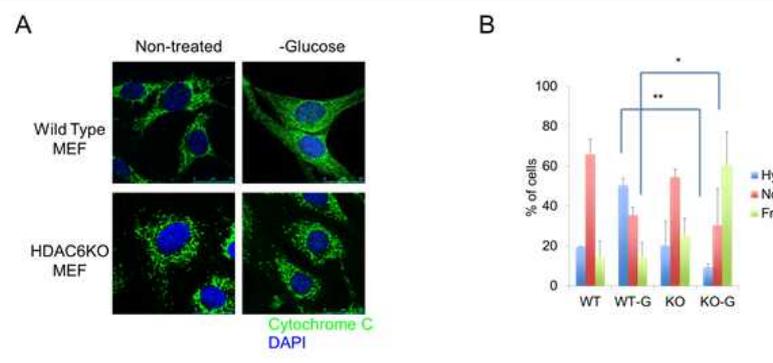
○ 지방세포로 분화시켰을 때 HDAC6 KO 중간엽 줄기세포의 분화능이 정상세포에 비하여 현저히 떨어짐을 밝힘.



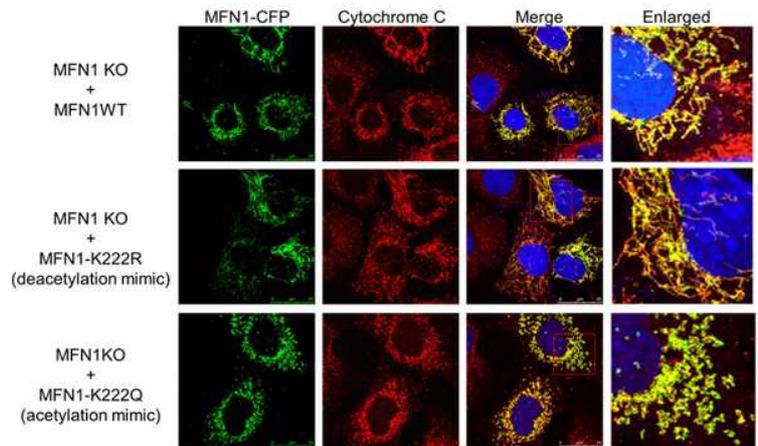
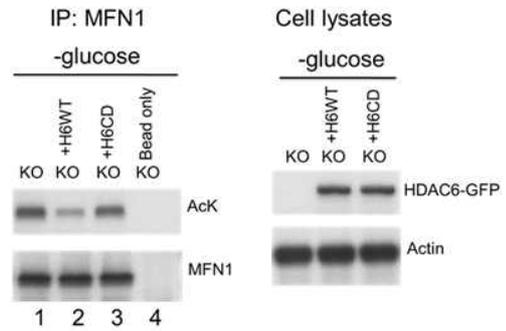
○ 레트로 바이러스를 이용하여 HDAC6 Knock-out 생쥐로부터 분리한 중간엽 줄기세포에 HDAC6 wild type과 catalytic inactive 그리고 ubiquitin-binding deficient mutant를 발현시킨 MSC세포주를 구축하여 연구기반 마련



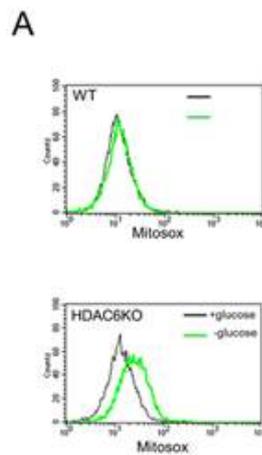
○ 포도당 조절과 같은 대사조절에 의해 미토콘드리아의 fusion이 유도됨을 밝힘



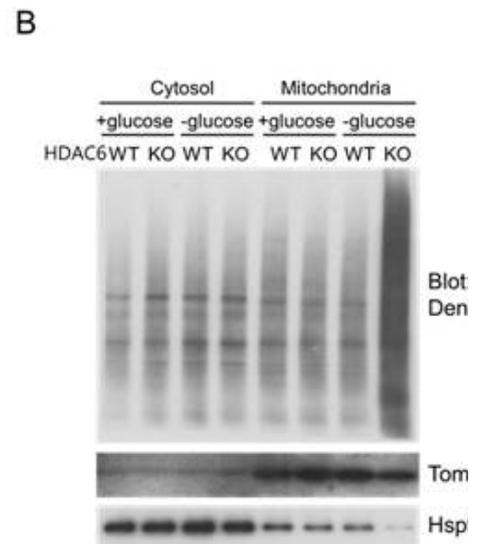
○ 세포에너지대사의 중심인 미토콘드리아의 fusion이 HDAC6에 의한 MFN1의 탈아세틸화에 의해 조절 됨을 밝힘.



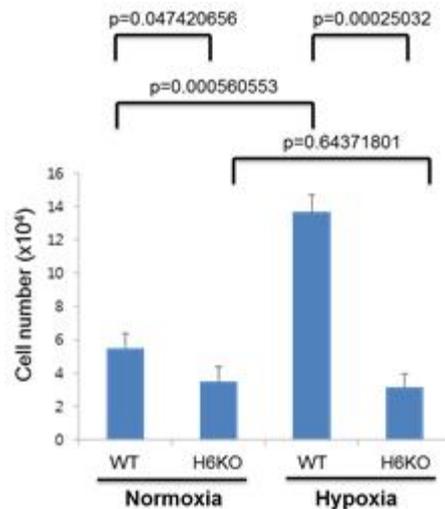
○ 포도당결핍과 같은 대사적 스트레스 상황에서 HDAC6와 MFN1에 의한 미토콘드리아의 fusion은 미토콘드리아에서 생산되는 활성산소를 감소시키는 것을 밝힘.



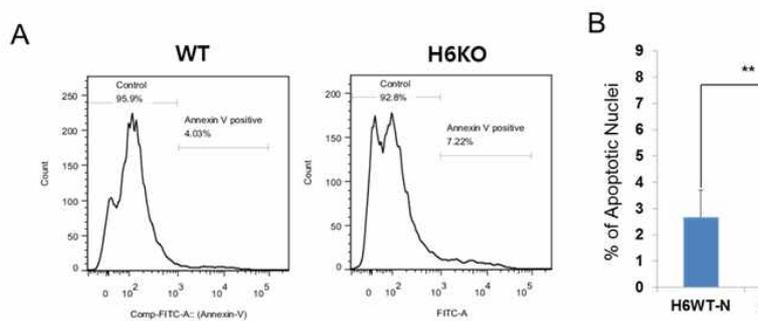
○ HDAC6 knock-out 세포에서 활성산소의 증가와 미토콘드리아의 단백질의 산화 손상과의 연관관계를 밝힘.



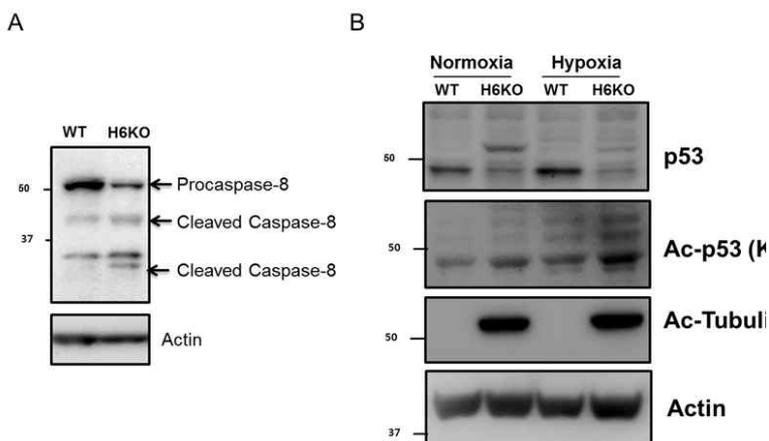
- Hypoxia에 의한 강제적 미토콘드리아 에너지대사 제한이 중간엽 줄기세포의 성장에 도움을 줄 수 있음을 밝힘
- HDAC6가 Hypoxia처리에 의한 중간엽 줄기세포성장증진효과에 중요한 역할을 함을 밝힘.



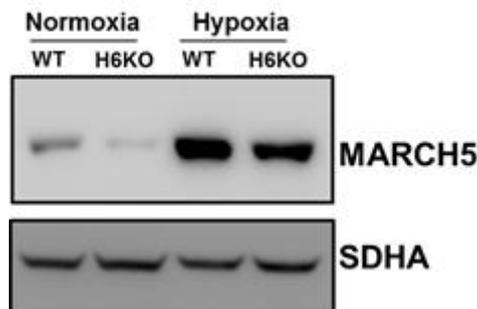
- HDAC6 knock-out 중간엽줄기세포에서 정상세포보다 높은 세포자살률 (apoptotic death)을 관찰



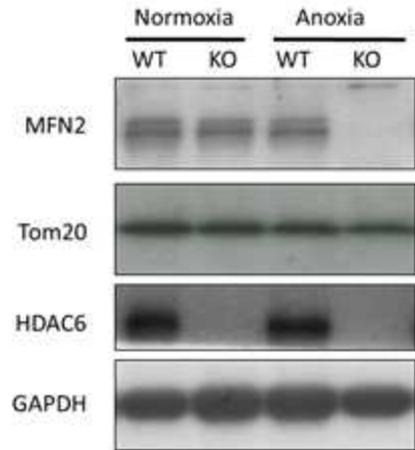
- HDAC6에 의한 p53의 deacetylation이 p53의 세포자살관련 기능에 역할을 함을 밝힘.



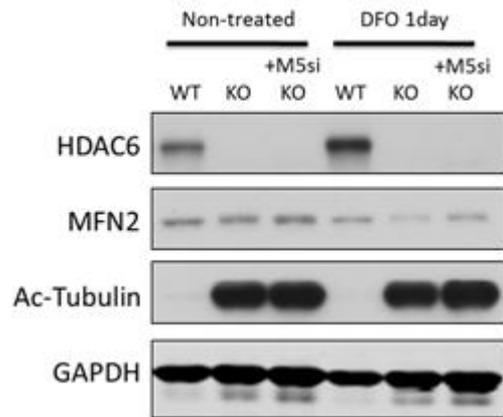
- 저산소처리시 미토콘드리아의 ubiquitin ligase인 MARCH5의 단백질 양이 현저히 증가됨을 밝힘.



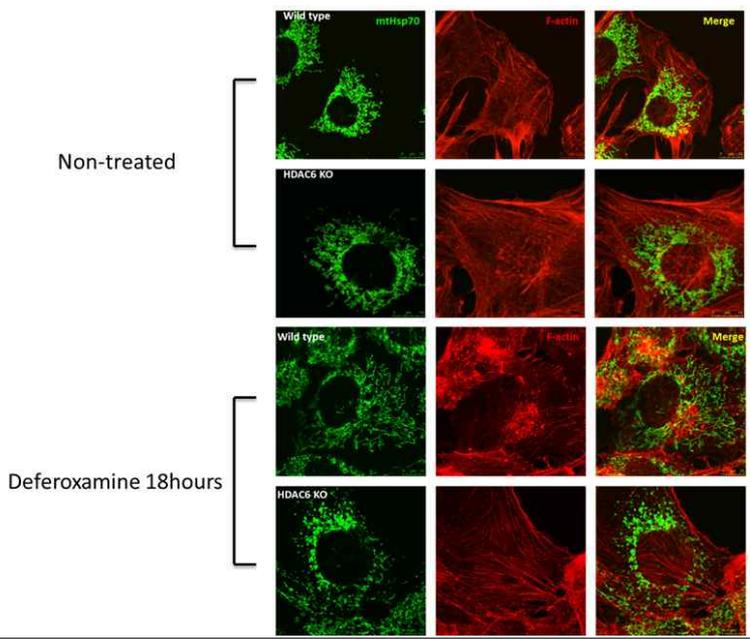
○ 무산소처리시 증가된 MARCH5에 의해 HDAC6 Knock-out 세포에서 MFN2의 proteasome dependent degradation이 증가함을 보임.



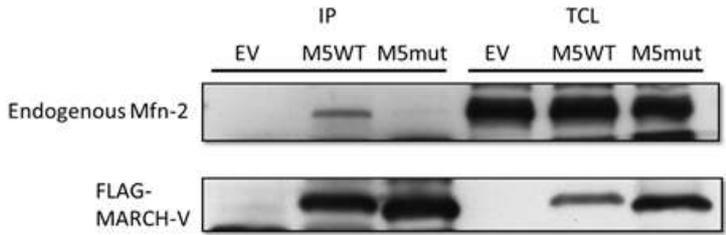
○ HDAC6 Knock-out세포에서 저산소처리 약물인 DFO를 처리에 의해 감소된 MFN2 단백질이 MARCH5 knock-down에 의해 다시 복구됨을 보임.
○ MARCH5의 MFN2 ubiquitin ligase 기능을 보임.



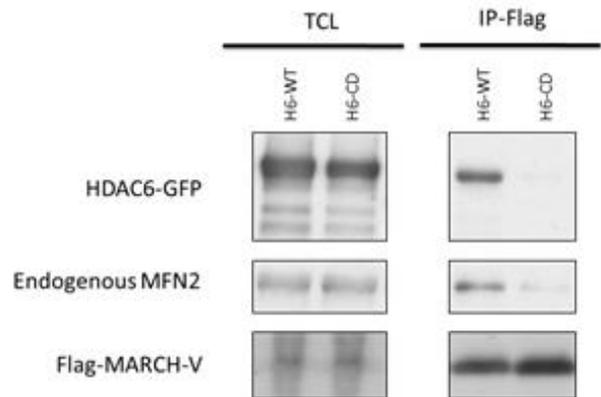
○ MFN2의 레벨변화에 의해 실지로 mitochondrial fusion이 HDAC6 knock-out세포에서 억제되는 것을 확인.



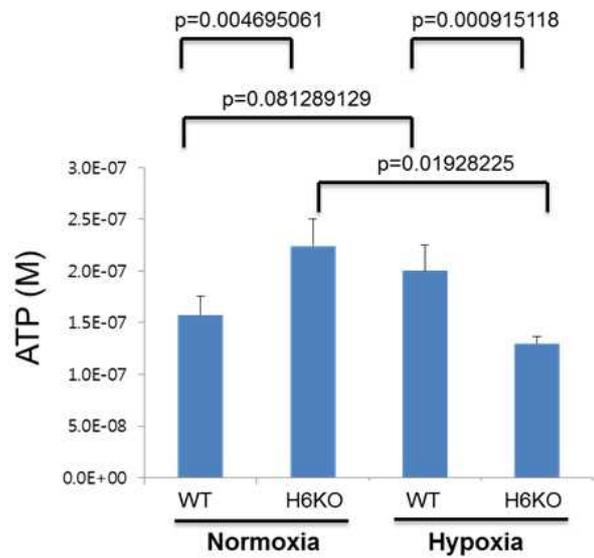
○ MARCH5의 ubiquitin ligase activity가 endogenous MFN2와의 결합에 중요함을 밝힘.



○ HDAC6의 catalytic activity가 MARCH5-MFN2-HDAC6 complex를 이루는데 중요함을 밝힘.



○ HDAC6 knock-out 중간엽줄기세포에서 저산소처리시 세포에너지대사 조절기능 이상을 발견



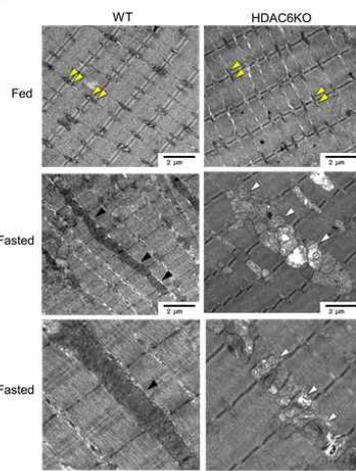
○ 2012년 연구결과에서 에너지스트레스 상황에서 미토콘드리아 기능을 유지하기 위해 동일양의 ATP생성시 발생하는 활성산소의 양을 감소시킴으로써 에너지 항상성을 유지함을 밝혔고 이 과정이 HDAC6에 의한 MFN1의 탈아세틸화에 의해 조절 됨을 밝힘.

○ 2013년 본 연구에서는 동물실험을 수행하여 절식을 통해 에너지스트레스를 발생시켰을 때 세포에서 일어났던 미토콘드리아 결함에 의해 거대 미토콘드리아가 출현하고 HDAC6 유전자를 제거하여 결함을 억제할 경우 미토콘드리아의 구조적 기능적 결함이 일어남을 밝힘. (위 결과는 본 과제의 결과물로 Journal of Cell Science에서 revision 중임.)

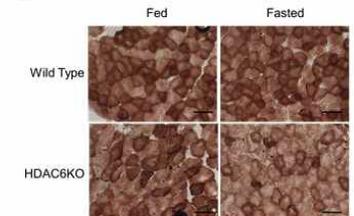
○ HDAC6 발현 조절에 의한 미토콘드리아 기능조절의 가능성을 보임으로서 중간엽줄기세포에서의 미토콘드리아 기능조절의 가능성을 보임.

○

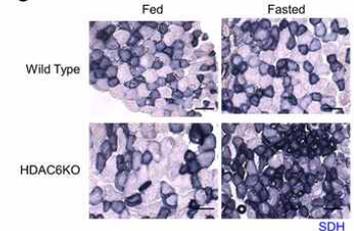
A



B



C

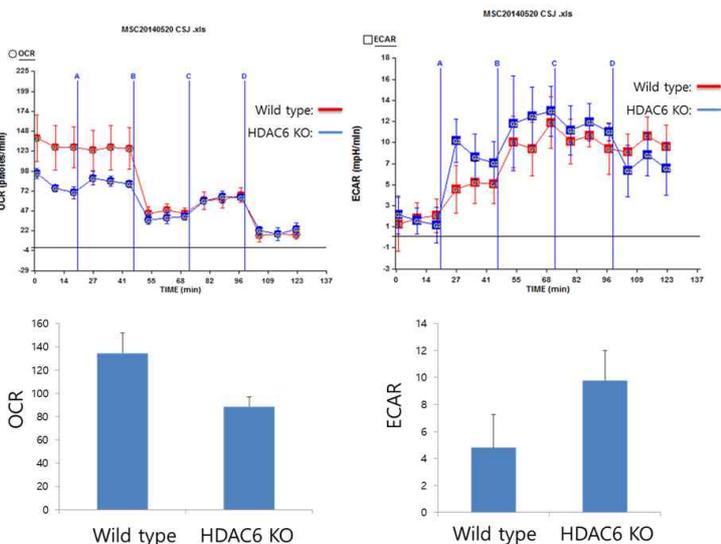


○ HDAC6의 발현조절에 의한 미토콘드리아 기능조절이 가능함을 밝힘.

○ 정상 혹은 HDAC6 knock-out 생쥐의 골수에서 골수유래 중간엽 줄기세포를 확보하여 각 세포에서 실시간으로 산소호흡량과 산도변화(pH)를 측정하여 미토콘드리아에서 일어나는 에너지대사와 해당과정의 변화를 관찰하였음.

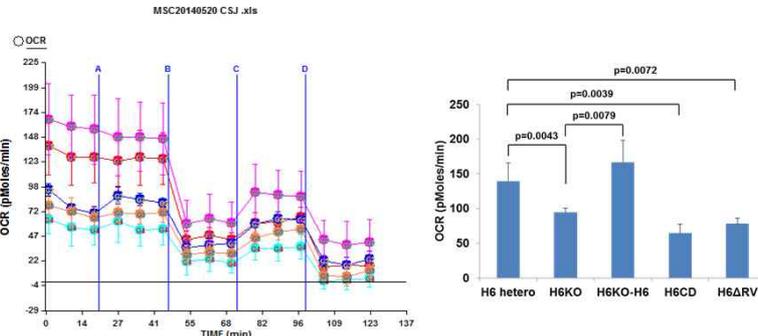
○ 그 결과 HDAC6 knock-out 생쥐의 골수유래 중간엽줄기세포의 경우 산소호흡량이 감소하고 lactic acid 발생에 의한 배지의 산성화가 진행되는 것으로 보아 에너지대사가 미토콘드리아보다 해당과정으로 집중되는 것으로 판단됨.

○



○ HDAC6 knock-out 중간엽줄기세포에 HDAC6 wild type (H6), catalytic dead (H6cd) 그리고 ubiquitin-binding deficient (H6RV) mutant를 발현시킨 후 산소 호흡량을 관찰한 결과 정상 HDAC6를 재발현 시킬 경우 산소 호흡량이 복원되지만 기능이 상실된 HDAC6를 재발현시킬 경우는 산소호흡량이 복원되지 않음을 보임.

○

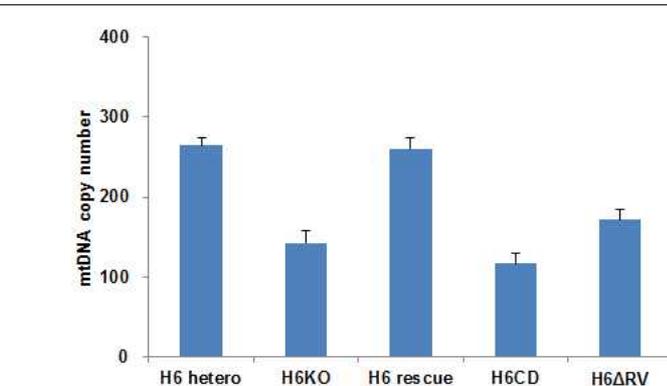


○ HDAC6 유전자에 의해 미토콘드리아의 생합성이 조절될 가능성을 보임.

○ 골수유래 HDAC6 knock-out 중간엽줄기세포내 미토콘드리아 DNA 수가 정상세포에 비해 크게 감소되어 있음을 밝힘.

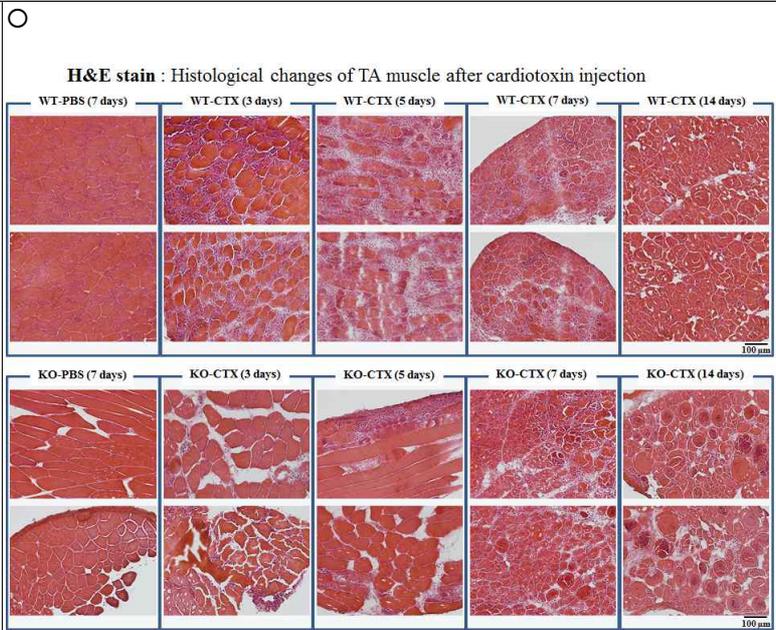
○ 중간엽줄기세포의 산소호흡량 감소와 마찬가지로 미토콘드리아 DNA 감소도 정상 HDAC6에 의해서 복원이 되지만 mutant HDAC6에 의해서는 복원되지 않음을 보임.

○

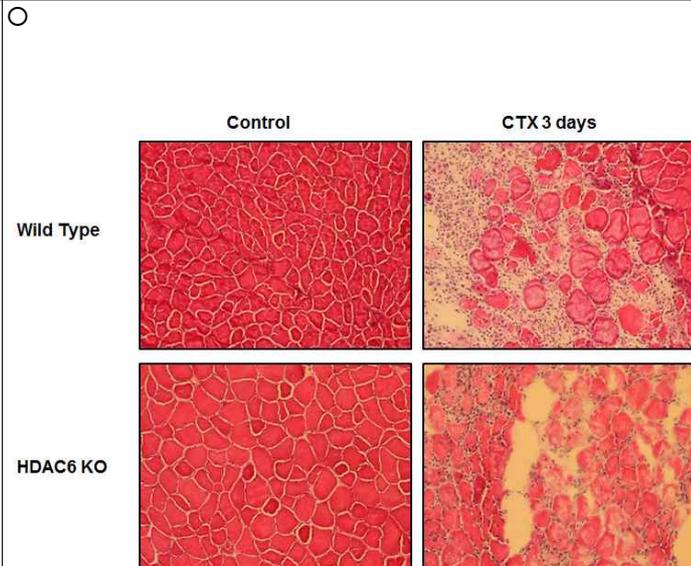


○

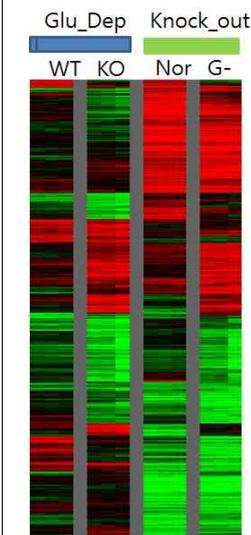
- CTX에 의한 근육손상모델을 구축하여 정상생쥐와 HDAC6 knock-out 생쥐에서 근육손상정도를 관찰함.
- HDAC6 knock-out 생쥐에서 5일 이후 일어난 근육재생의 경우에는 큰 차이를 보이지 않으나 5일 이전에 일어나는 근육내 inflammation이 크게 감소함을 보임.



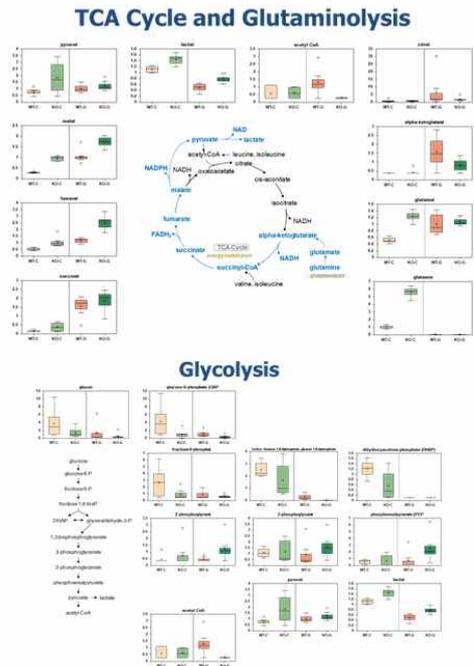
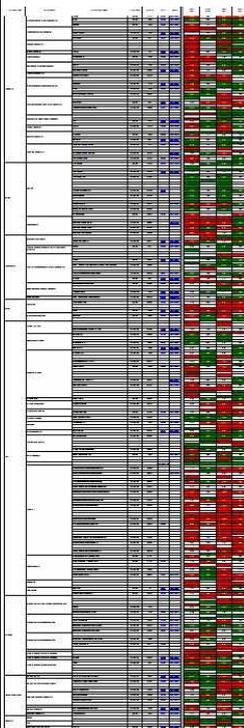
- CTX에 의한 근육손상모델에서 HDAC6 knock-out 생쥐의 경우 정상생쥐에 비해 염증반응에 의한 면역세포의 근육내 침윤이 현저하게 감소함.
- 최근 LPS등에 의한 면역억제 사이토카인인 IL-10의 발현이 HDAC6에 의해 조절되는 보고가 있음.
- 현재 근육내 MSC에 의한 IL-10 등의 면역억제 사이토카인들의 발현이 HDAC6에 의해 조절되는 지 여부를 탐색 중임.



- 새로운 자가포식조절 유전자를 찾기 위하여 품질관리적 자가포식조절 유전자로 알려진 HDAC6 knock-out 세포와 정상세포에서 microarray분석을 통하여 증가 혹은 감소하는 RNA를 분석하고 이 결과를 현재 분석 중에 있음.
- 새로운 자가포식조절 유전자를 찾기 위하여 포도당결핍에 의한 자가포식을 유도하고 이에 의한 transcriptome의 변화를 정상과 HDAC6 knockout 세포에서 분석하고 이 결과를 현재 분석 중임.



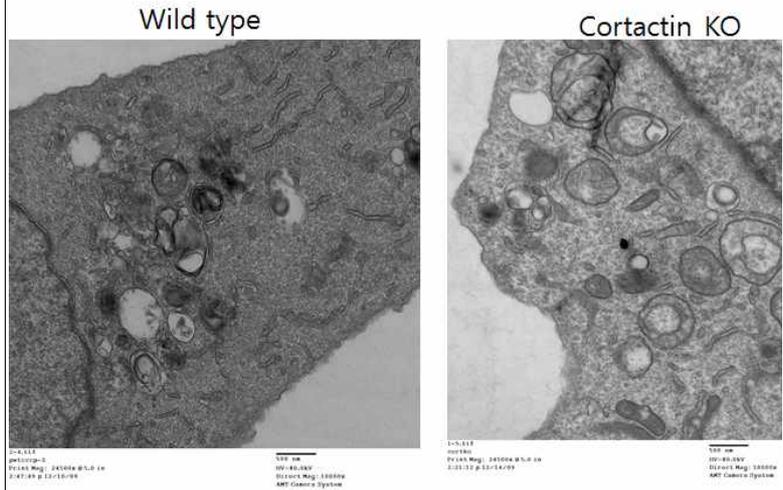
- 세포에너지대사의 변화를 추적할 수 있는 기술적 기반을 마련하기 위해 metabolomic data를 수집함.
- HDAC6의 결핍에 의해 조절되는 에너지대사와 이에 의한 대사물질의 변화를 추적하기 위해 정상과 HDAC6 knockout 세포에서 대사물질을 분석하여 그 결과를 옆 그림과 같이 대사기전에 대입하여 분석 중에 있음.
- 포도당결핍으로 자가포식을 정상 혹은 HDAC6 knock-out 세포에서 유도하고 대사물질을 분석하여 그 결과를 옆 그림과 같이 대사기전에 대입하여 분석 중임.



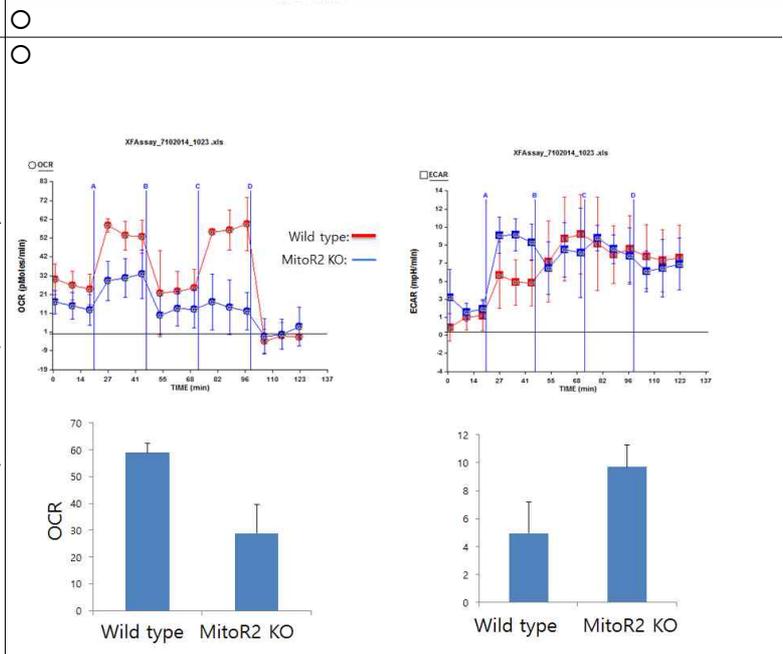
- 저산소반응 조절 유전자인 HDAC6 knock-out 세포에서 lysolipid 계열의 대사물질이 비정상적으로 축적됨을 발견
- lysolipid 계열 중 G protein coupled Receptor의 ligand인 lysophosphatic acid의 분비가 크게 증가함을 발견
- cAMP조절을 통해 lipolysis를 조절함을 밝힘.

Lysolipid	Z-score
-dipalmitoylglycerophosphoethanolamine	1.29
2-palmitoylglycerophosphoethanolamine*	1.31
2-palmitoleoylglycerophosphoethanolamine*	1.26
1-stearoylglycerophosphoethanolamine	1.84
1-oleoylglycerophosphoethanolamine	0.52
2-oleoylglycerophosphoethanolamine*	4.54
2-linoleoylglycerophosphoethanolamine*	1.08
1-arachidonoylglycerophosphoethanolamine*	1.11
2-arachidonoylglycerophosphoethanolamine*	14.19
2-docosapentaenoylglycerophosphoethanolamine*	7.02
2-docosahexaenoylglycerophosphoethanolamine*	8.13
1-myristoylglycerophosphocholine	2.69
2-myristoylglycerophosphocholine*	1.47
1-pentadecanoylglycerophosphocholine*	10.27
1-palmitoylglycerophosphocholine	13.55
2-palmitoylglycerophosphocholine*	9.87
1-palmitoleoylglycerophosphocholine*	2.48
2-palmitoleoylglycerophosphocholine*	10.41
1-stearoylglycerophosphocholine	1.60
2-stearoylglycerophosphocholine*	17.48
1-oleoylglycerophosphocholine	4.64
2-oleoylglycerophosphocholine*	4.50
1-linoleoylglycerophosphocholine	8.29
2-linoleoylglycerophosphocholine*	1.00
1-arachidoylglycerophosphocholine	1.23
2-eicosatrienoylglycerophosphocholine*	24.51
2-arachidonoylglycerophosphocholine*	7.17
2-docosapentaenoylglycerophosphocholine*	1.84
2-docosahexaenoylglycerophosphocholine*	0.92
1-palmitoylglycerophosphoinositol*	1.14
1-stearoylglycerophosphoinositol	2.57
1-oleoylglycerophosphoinositol*	0.96
1-linoleoylglycerophosphoinositol*	0.76
1-palmitoylplasmenyethanolamine*	

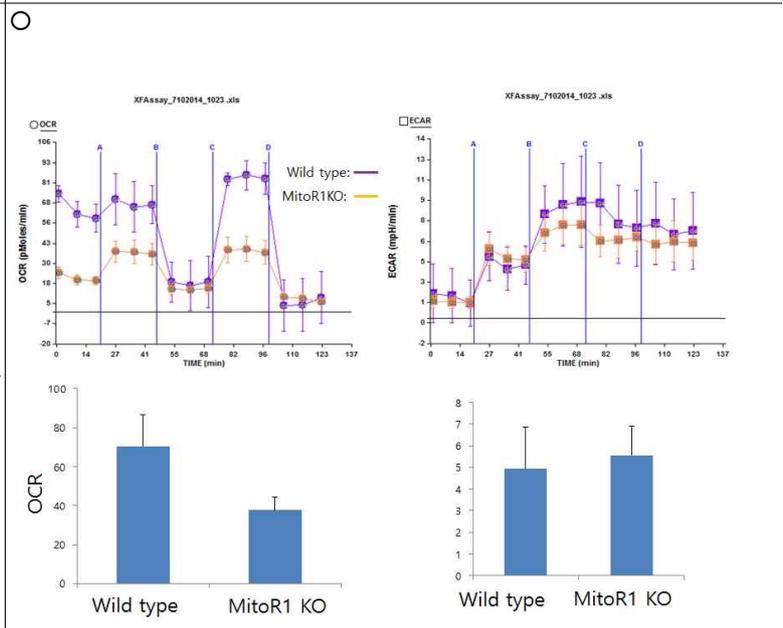
○ 본 연구팀에 의해 품질관리적 자가포식 조절유전자로 밝혀진 cortactin이 결핍될 경우 손상된 미토콘드리아를 제거하기 위한 자가포식이 억제됨을 보임.



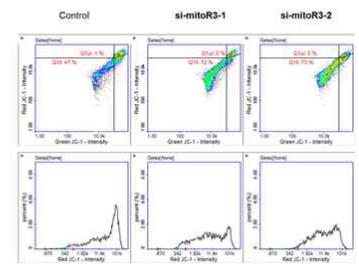
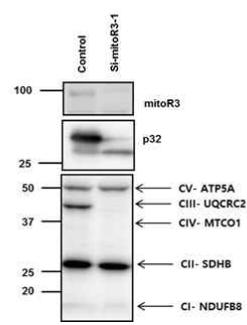
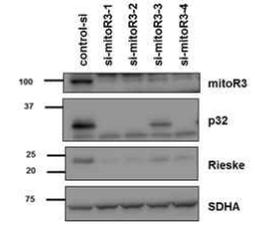
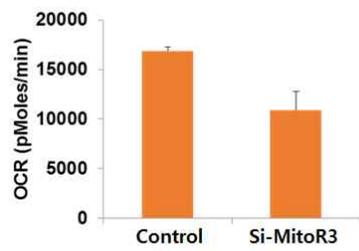
○ 본 연구팀의 위 결과에 의해 미토콘드리아 결합을 조절하는 기전이 세포 에너지대사를 변화시킬 수 있음이 밝혀짐.
○ 이를 토대로 미토콘드리아 결합을 조절하는 다른 유전자인 mitoR2가 knockout된 세포에서 산소호흡량이 감소하고 해당과정이 증가됨을 밝힘.
○ 현재 이러한 에너지대사조절에 의한 중간엽 줄기세포의 기능변화를 추적 중임.



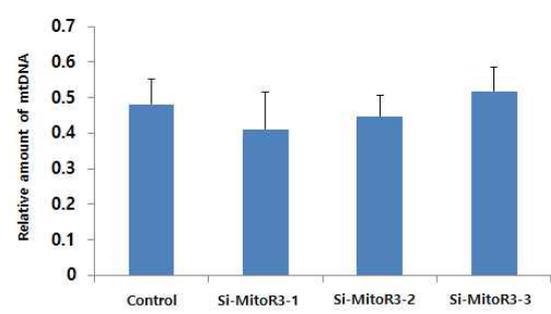
○ 에너지 대사조절과 자가포식조절에 의한 transcriptome의 변화 분석을 통해 발견된 다른 유전자인 mitoR1이 knockout된 세포에서 산소호흡량이 감소하고 해당과정이 증가됨을 밝힘.
○ 현재 이러한 에너지대사조절에 의한 중간엽 줄기세포의 기능변화를 추적 중임.



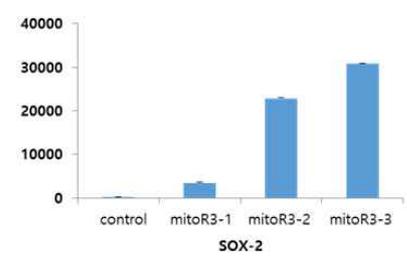
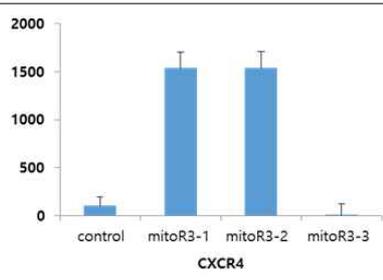
- 에너지 대사조절과 자가포식조절에 의한 transcriptome의 변화 분석을 통해 발견된 다른 유전자인 mitoR3가 knock-down된 세포에서 산소호흡량이 감소하는 등의 에너지대사의 변화가 관찰됨.
- mitoR3 발현 억제에 의한 미토콘드리아 산소호흡의 감소는 미토콘드리아의 translation을 조절하는 p32 유전자의 발현 감소에 의한 것으로 확인됨.
- p32의 발현 감소가 complexIII 유전자의 발현을 감소시키고 이에 의해 미토콘드리아의 membrane potential을 감소시키는 것을 FACS analysis를 통해 보임.



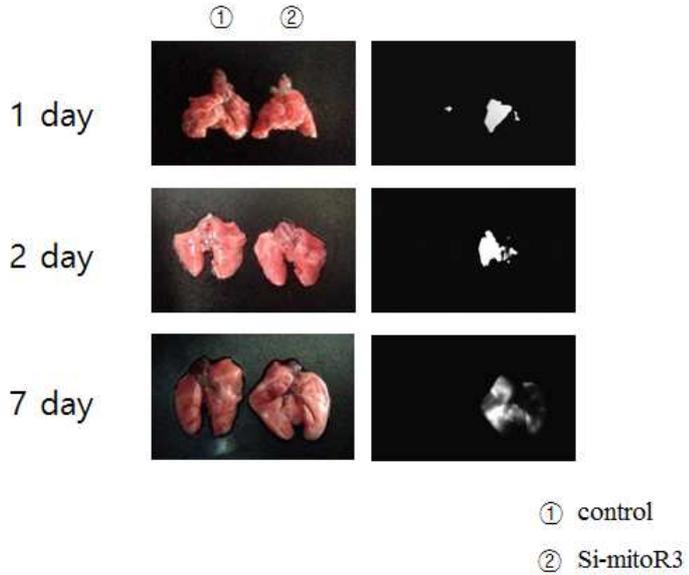
- 미토콘드리아의 biogenesis 자체는 크게 영향을 주지 않음을 미토콘드리아 DNA 숫자 분석을 통해 밝힘.



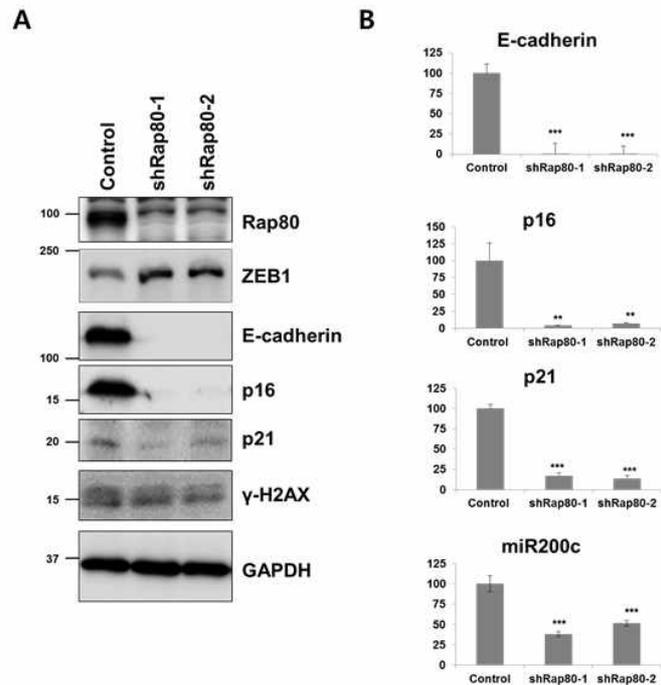
- mitoR3 발현 억제에 의한 미토콘드리아 에너지대사조절에 의하여 줄기세포에서 중요한 단백질의 발현이 크게 증가함을 보임.



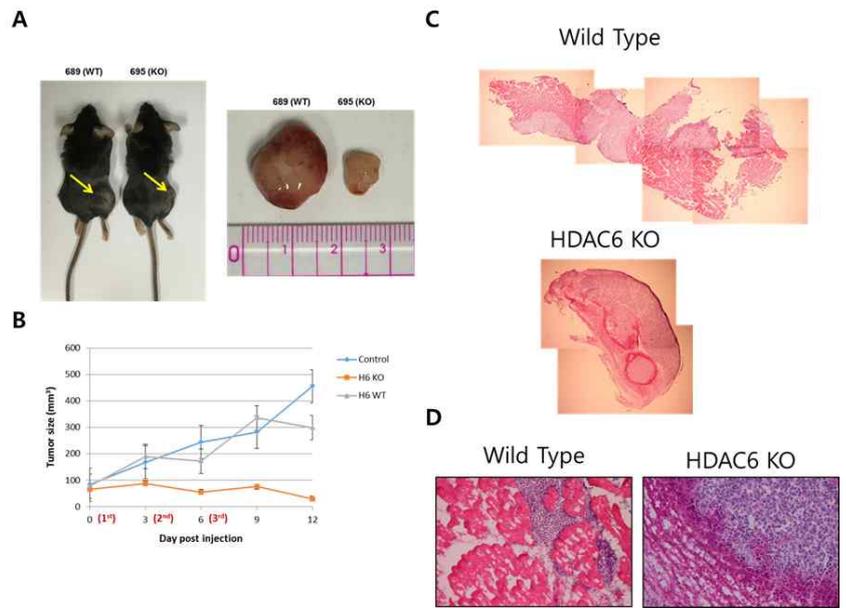
- mitoR3 발현을 억제하여 미토콘드리아 에너지대사조절가 조절된 세포를 ICG (1mg/ml 3hours labeling)로 표지하여 꼬리정맥으로 주사한 후 lung으로의 침윤정도를 관찰한 결과 옆의 그림과 같이 대조군 세포에 비하여 lung으로의 침윤 및 유지정도가 크게 증가하는 것을 보임.
- 현재 근육손상모델에서 중간엽줄기세포의 손상근육으로 targeting 기능이 향상되는 지 그리고 유지 및 증식기능이 향상되는 지를 평가하고 있음.



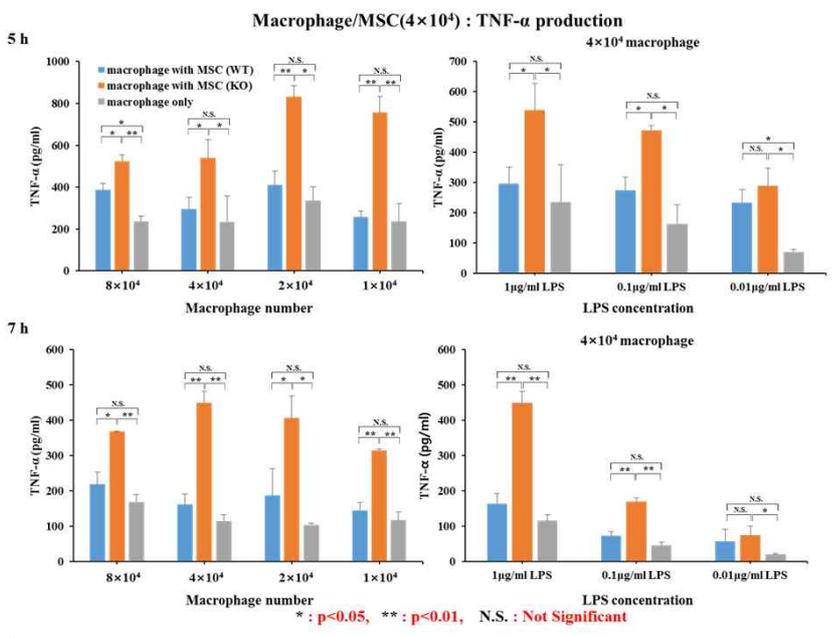
- mitoR3가 Rap80 단백질을 밝히고 꼬리 정맥으로 주입한 세포가 폐로 타겟팅되는 현상이 epithelial mesenchymal transition (EMT)에 의해 조절 되는 것으로 밝힘.
- Rap80 발현을 siRNA로 억제하였을때 미토콘드리아의 산소호흡량이 감소하고 해당과정(glycolysis)이 증가하는 에너지대사 전이(metabolic transition)에 의해 대표적인 EMT regulator인 ZEB1의 단백질량이 증가하고 이에 의해 EMT가 촉발됨을 보임.



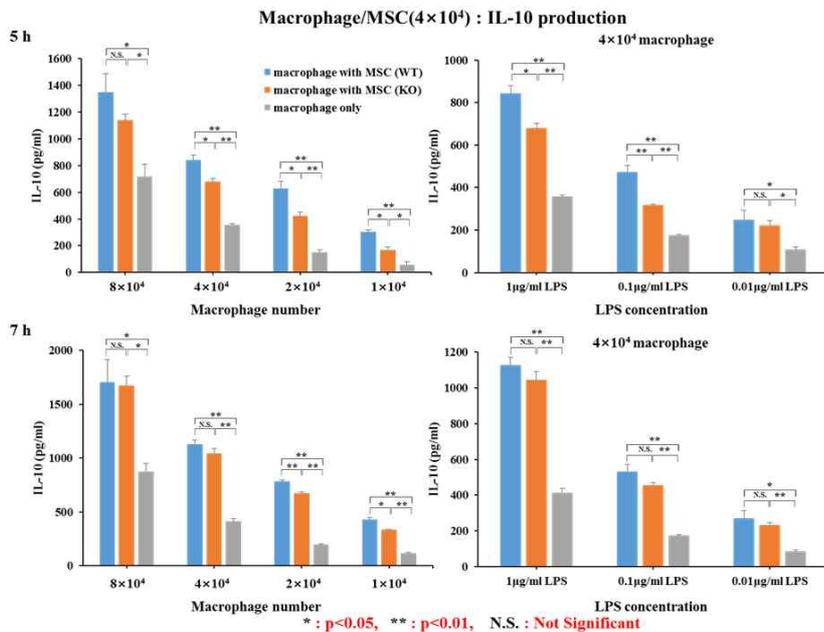
- 제 1세부과제 연구와 공동으로 아래 연구과제를 수행함.
- 품질관리적 자가포식작용을 조절하는 HDAC6 발현을 억제한 중간엽줄기세포가 EG7-OVA세포에 의해 유도된 종양을 억제하는 효과가 있음을 밝힘.
- EG7-OVA세포를 B6 생쥐에 피하주입하여 종양을 유도한 후 mesenchymal stem cell을 종양 내부에 3일간격으로 세 번 주입한 후 종양의 크기를 관찰한 결과 HDAC6 발현을 억제한 mesenchymal stem cell을 주입한 군에서 종양이 사라짐을 관찰함.
- H&E 염색을 통해 확인한 결과 HDAC6의 발현이 억제된 중간엽줄기세포를 주입한 종양조직내 면역세포가 많이 침윤되어 있음을 보임.



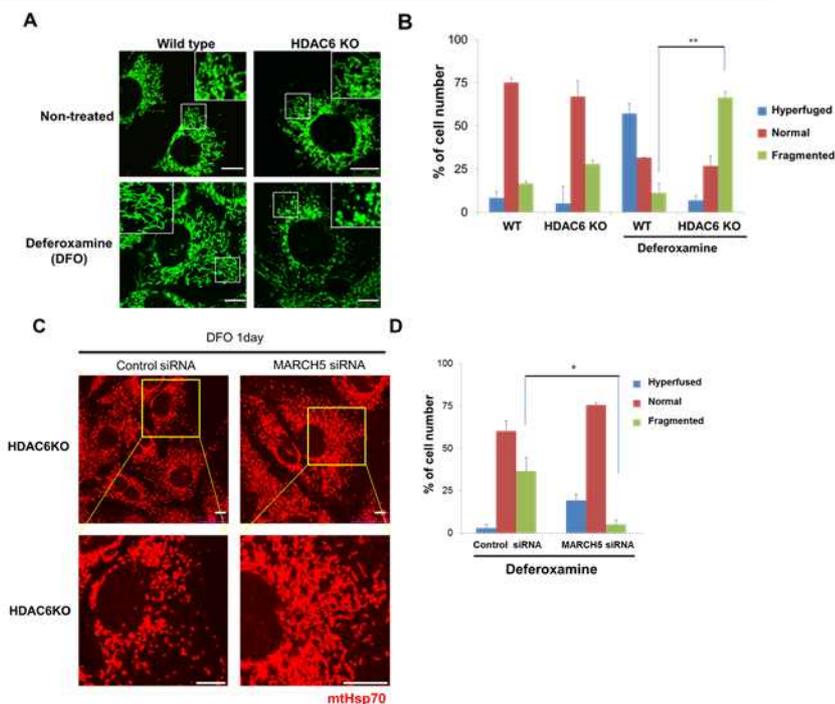
- 제 1 세부과제 연구와 공동으로 아래 연구를 수행함.
- 자가포식을 조절하는 HDAC6의 발현이 억제된 중간엽줄기세포와 대식세포 (macrophage)를 coculture하여 여기에 면역자극을 하였을 때 이에 의해 분비되는 항암 cytokine인 TNF- α 가 크게 증가함을 보임.
- 자가포식조절에 의해 MSC의 secretome이 변화되어 대식세포의 기능을 향상시킬 수 있음을 보임.



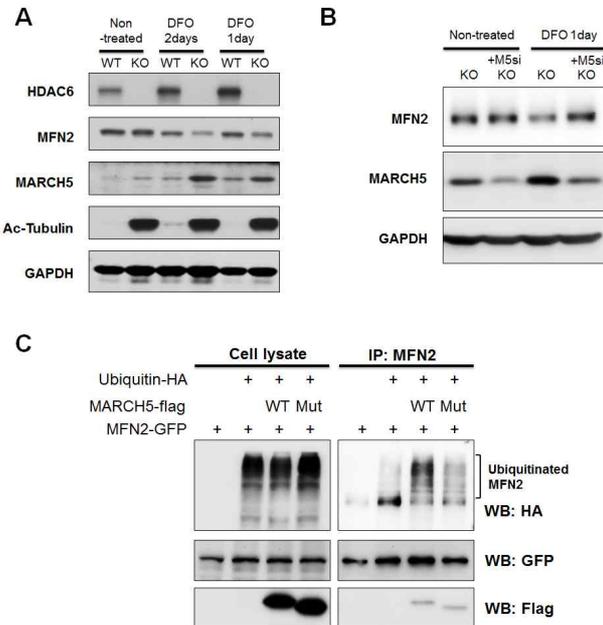
- 제 1세부과제 연구와 공동으로 아래 연구과제를 수행함.
- 자가포식을 조절하는 HDAC6의 발현이 억제된 중간엽줄기세포와 대식세포 (macrophage)를 coculture하여 여기에 LPS에 의한 면역자극을 하였을 때 이에 의해 분비되는 면역억제 cytokine인 TNF-a가 크게 증가함을 보임.
- 자가포식조절에 의해 MSC의 secretome이 변화되어 대식세포의 기능을 향상시킬 수 있음을 보임.



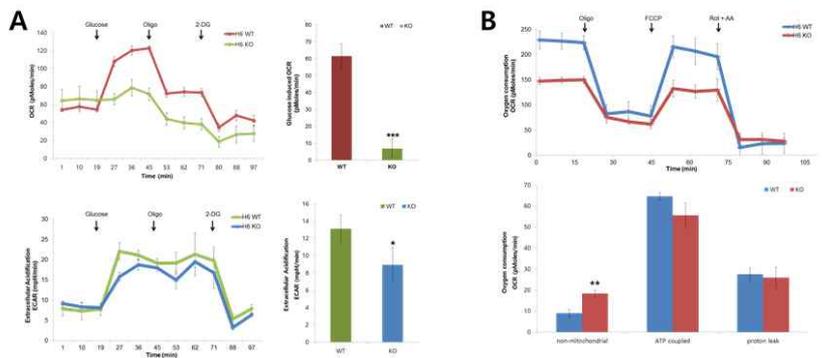
- 저산소자극에 의한 미토콘드리아의 fusion이 HDAC6 발현 억제에 의해 저해됨을 밝힘.
- HDAC6 와 MARCH5/MITOL의 발현을 동시에 억제할 경우 저산소 환경에 의한 미토콘드리아 결합이 정상적으로 복원됨을 보임.
- 이 결과로 미루어 보아 HDAC6 발현 억제에 의한 미토콘드리아 결합 저해 현상은 미토콘드리아 ubiquitin ligase인 MARCH5/MITOL에 의한 기전임을 밝힘.



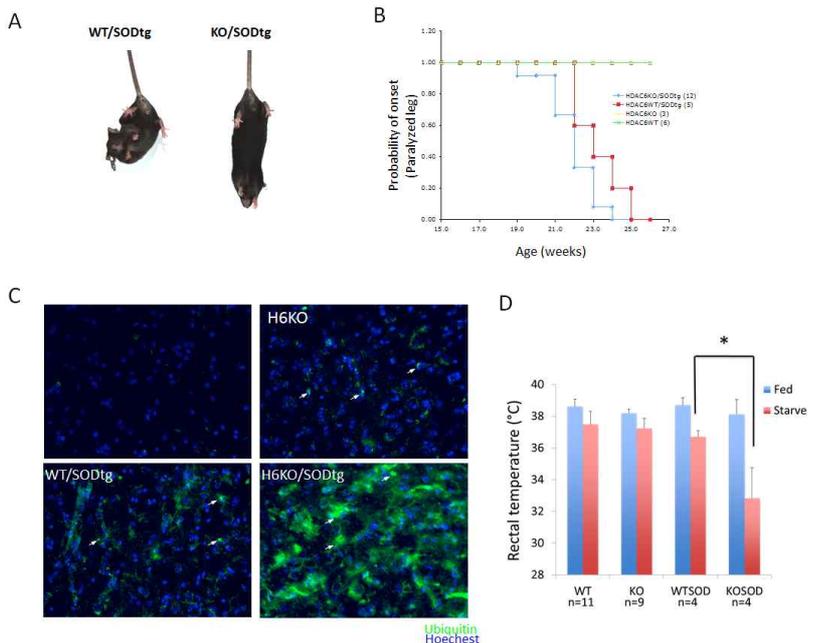
- 저산소자극에 의하여 세포에너지대사의 중심인 미토콘드리아의 역동적인 fusion and fission이 HDAC6에 의해 조절됨을 보임.
- HDAC6 발현이 억제될 경우 저산소 환경이 주어질 때 미토콘드리아의 ubiquitin ligase인 MARCH5/MITOL이 MFN2의 ubiquitination을 통해 proteasomal degradation을 일으킴을 보임.
- 저산소 환경에서의 미토콘드리아 결합이 HDAC6와 MARCH5/MITOL 그리고 MFN2의 상호조절기전에 의해 일어남을 보임.



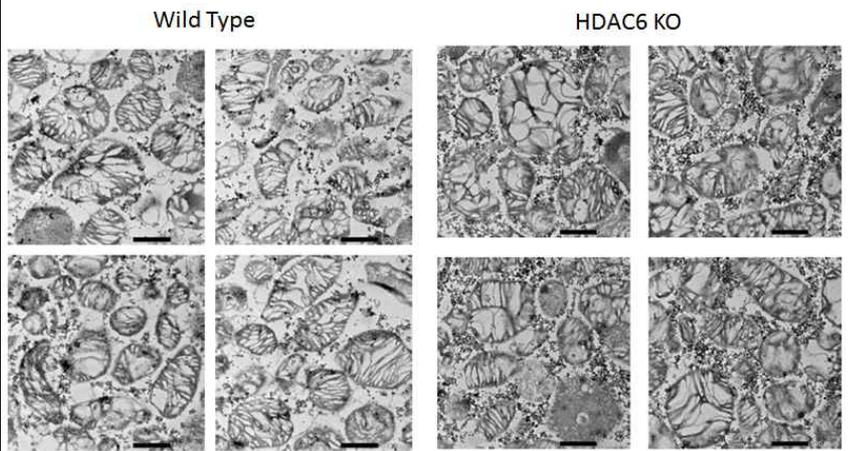
- HDAC6에 의한 에너지대사 조절 특성을 밝히기 위해 산소호흡량과 해당과정 (glycolysis)에 의한 젖산 생성을 실시간으로 측정함.
- HDAC6의 발현억제에 의하여 glucose에 의한 산소호흡량은 크게 감소하고 해당과정 (glycolysis) 또한 약간 감소함을 보임.
- HDAC6가 glucose와 lipid 간의 에너지대사 전환에 중요한 역할을 함을 밝힘.



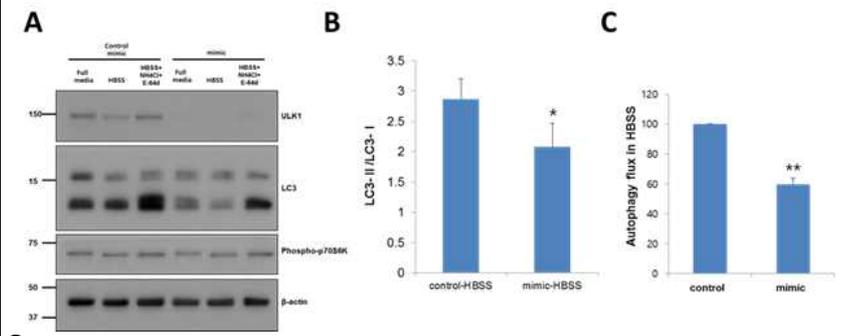
- HDAC6에 의한 자가포식조절이 노화관련 질병에 미치는 영향 분석
- HDAC6 knockout 생쥐를 근위축성 축색경화증 모델인 SODG93A 형질전환 생쥐와 교배하여 double mutant (HDAC6KOSOD1G93A)를 만든 결과 근위축성 축색경화증이 대조군에 비해 발병시기가 빨라지고 증상이 악화됨을 보임.
- 또한 double mutant (HDAC6KOSOD1G93A) 생쥐에서 질병의 증상이 나타나기 전에 체온의 감소가 두드러지는 것을 밝힘.
- 이는 HDAC6가 자가포식 뿐만아니라 에너지대사에도 중요한 조절작용을 함을 보임.



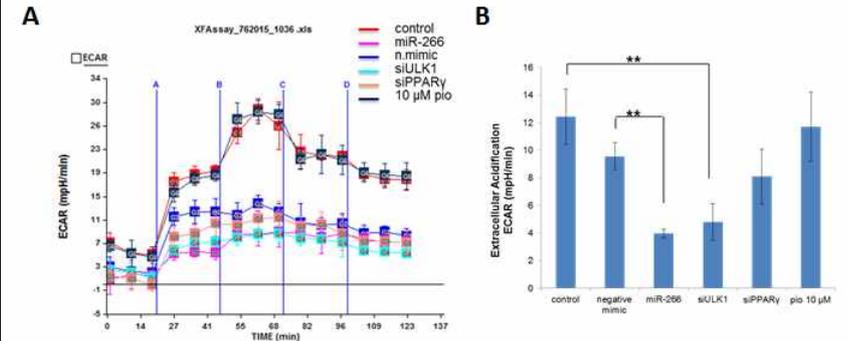
- 정상생쥐와 HDAC6 knockout 생쥐의 신경조직으로부터 미토콘드리아를 분리하여 전자현미경으로 구조를 관찰
- HDAC6 knockout 생쥐의 신경조직으로부터 분리한 미토콘드리아에서 crestae 구조가 기형적이고 부풀어 오른 degenerative mitochondria의 수가 크게 증가되어 있음을 보임.
- HDAC6 knockout 쥐의 신경조직 미토콘드리아 에너지대사 이상이 구조결함에 의한 것일 수 있는 가능성을 보임.



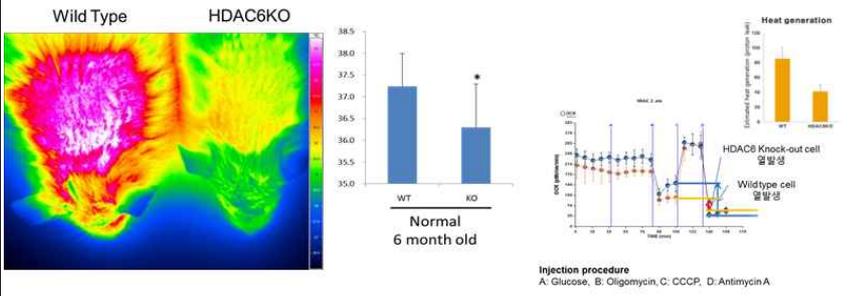
- miRNA인 miR-26에 의한 자가포식 조절
- miR-26 mimic RNA를 transfection하였을 때 자가포식이 크게 억제됨을 보임.



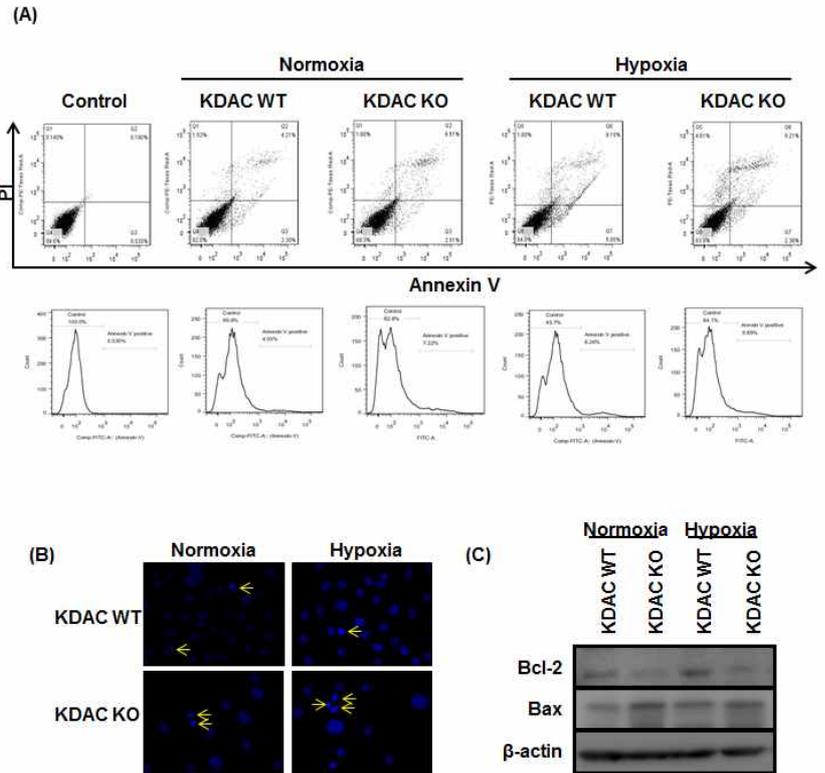
- miRNA인 miR-26에 의한 glycolysis 조절
- miR-26 mimic RNA를 transfection하였을 때 해당과정 (glycolysis)이 크게 억제 됨을 보임.
- miR-26에 의해 발현이 억제되는 Ulk1의 발현을 Ulk1 siRNA를 사용하여 억제하였을 때도 동일하게 glycolysis가 억제됨을 보임.



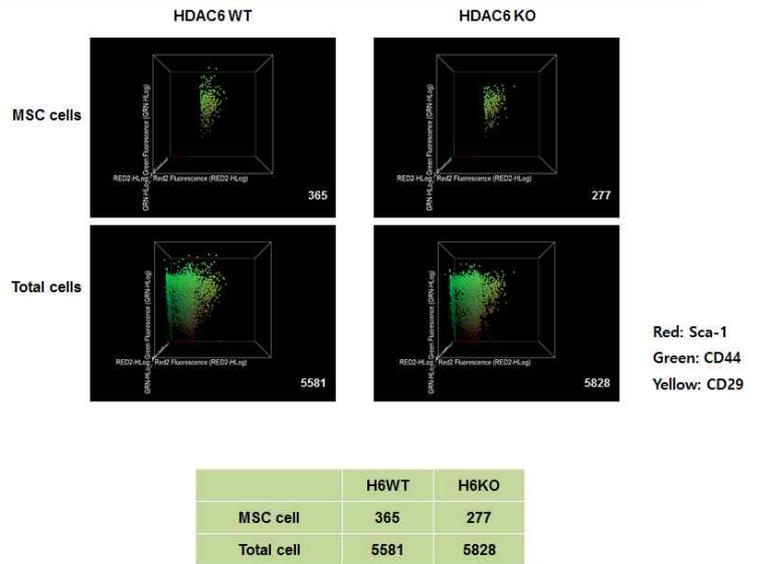
- 에너지대사추적을 위하여 동물모델에서 열발생을 모니터링 하기 위하여 열영상 이미징을 통해 미토콘드리아에서 발생하는 열을 추적함.
- 세포수준에서 실험을 통하여 증명한 미토콘드리아 열발생의 차이를 동물 모델에서 증명함.



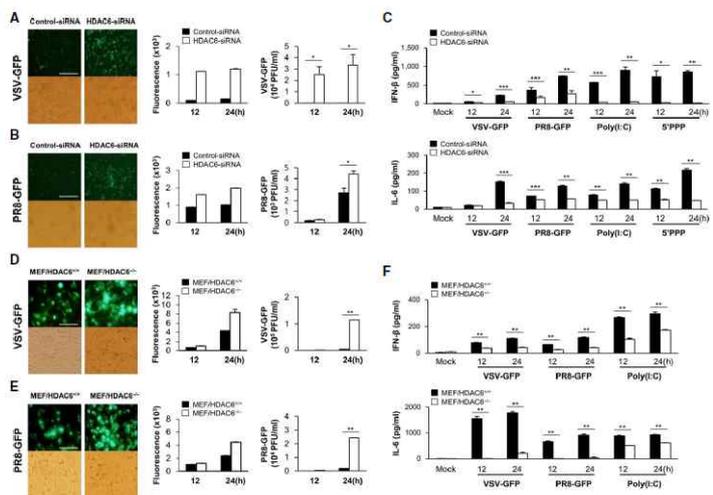
- HDAC6 유전자가 자가포식 및 에너지 대사과정 조절을 통하여 중간엽 줄기세포의 성장 뿐만 아니라 저산소 처리에 의한 부작용인 Apoptosis에 대한 민감성을 조절함을 밝힘.
- 즉 HDAC6 유전자의 손실에 의하여 일반적으로 정상세포에서는 유도되지 않은 저산소 처리에 의한 세포사멸 과정이 유도됨을 밝힘.



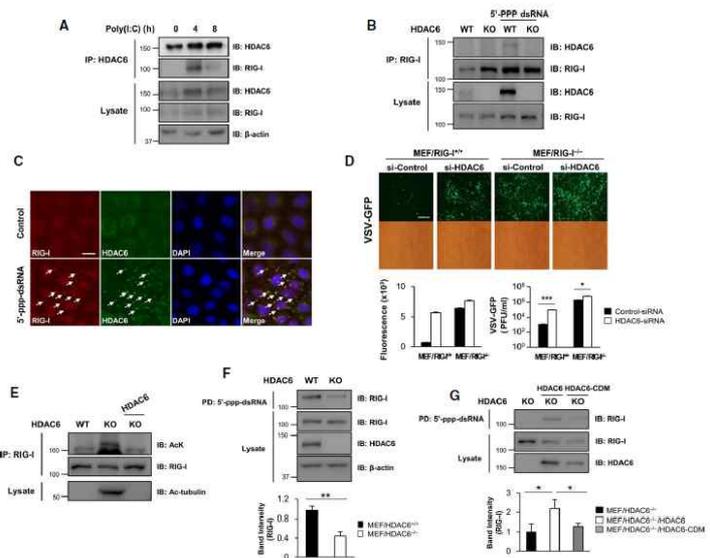
- HDAC6에 의한 중간엽줄기세포의 성장 및 세포사멸조절을 확인하기 위하여 HDAC6 knockout mouse의 골수에서 중간엽줄기세포의 숫자를 확인함.
- HDAC6 knockout mouse의 골수에서 확인된 중간엽줄기세포의 숫자가 정상 생쥐의 그것보다 20%정도 감소함을 보임으로서 HDAC6 유전자가 중간엽줄기세포의 성장 및 유지에 중요함을 동물모델에서 밝힘.



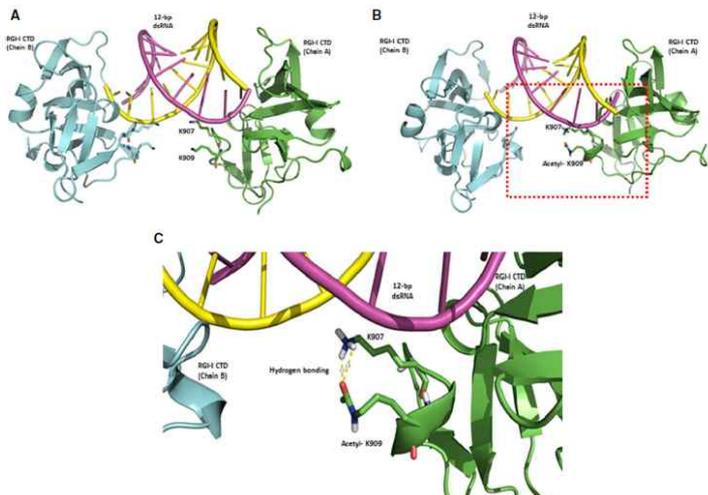
- 자가포식 및 에너지대사를 조절하는 HDAC6 유전자가 선천면역과정을 제어하는 기전을 밝힘.
- HDAC6 결핍에 의하여 선천면역을 제어하는 cytokine의 발현이 제어됨을 HDAC6 knockout mouse와 세포에서 밝힘.
- 위 기능이 골수의 중간엽줄기세포에 적용될 가능성을 제시.
- 골수의 중간엽줄기세포의 면역반응 조절에 HDAC6 유전자가 사용될 수 있는 가능성을 제시.



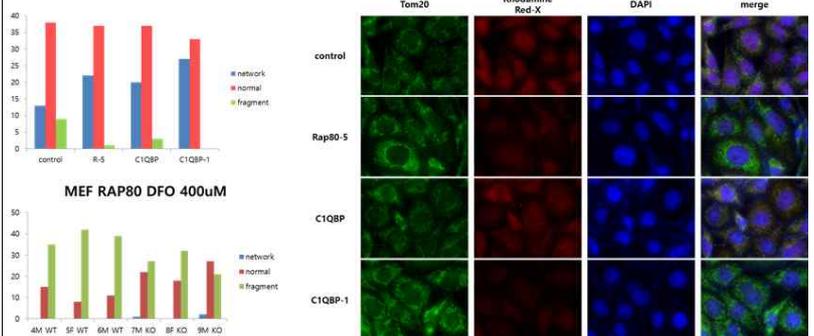
- HDAC6에 의한 선천면역조절의 분자적 기전을 밝힘.
- RIG-I 단백질의 탈아세틸화를 조절하는 효소로서 HDAC6의 기능을 밝히고 이를 증명함.
- RIG-I의 탈아세틸화가 선천면역조절에 중요한 기능을 함을 증명함으로써 중간엽줄기세포의 치료용 면역기능 조절에 응용할 가능성을 보임.



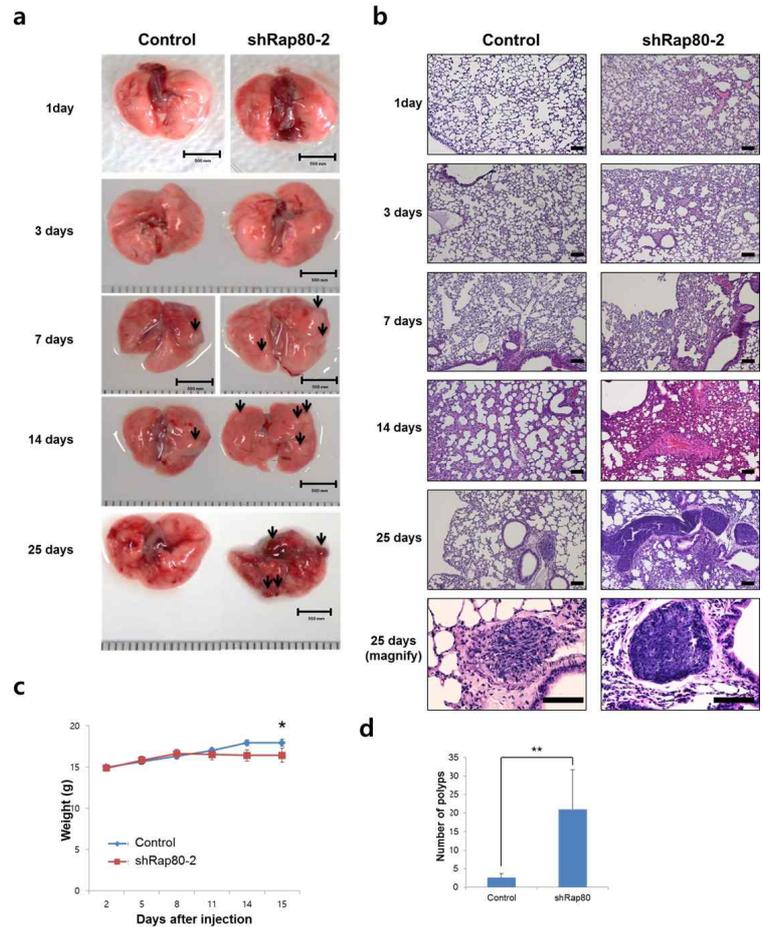
- HDAC6에 의한 RIG-I 단백질의 탈아세틸화 라이신 부위를 밝히고 이를 단백질 구조 모델링을 통해 구조의 변화를 보임.
- RIG-I 단백질의 909번째 라이신기가 HDAC6에 의해 탈아세틸화 되며 이 과정이 RIG-I 단백질의 기능에 중요함을 보임.
- HDAC6에 의한 RIG-I의 탈아세틸화의 단백질 구조변화를 밝힘으로서 이를 이용한 제어약물개발에 응용될 수 있을 것임.



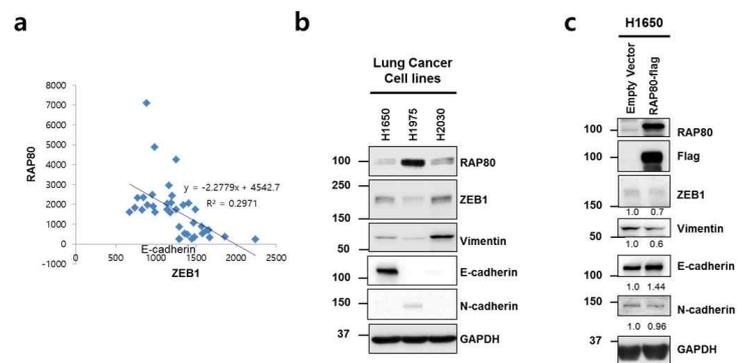
- Rap80에 의한 세포에너지대사 조절이 C1QBP 단백질과의 상호작용을 통해 이루어 짐을 밝힘
- RAP80와 C1QBP의 상호작용이 저산소처리에 의한 미토콘드리아 구조변화와 연관성이 있음을 밝힘.
- 중간엽줄기세포의 저산소처리에 의한 성장변화의 분자적 기전을 설명하는데 응용하고자 함.



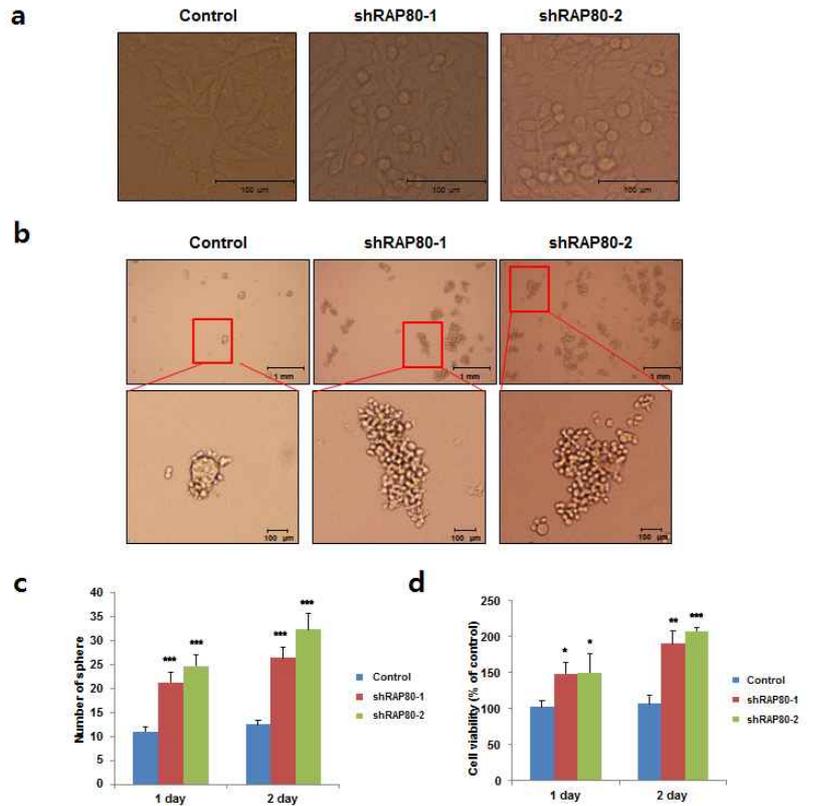
- 에너지대사과정을 조절하여 산소호흡에 의한 에너지 생산을 줄이고 해당 과정에 의한 에너지 생산을 늘림으로서 대사를 조절하는 것으로 본 과제를 통해 제안한 Rap80 유전자의 간엽-중간엽 전환 기능을 밝힘.
- Rap80 유전자 억제에 의한 해당과정으로의 대사 전환에 의해 간엽-중간엽 전환이 유도되고 이에 의해 세포의 이동 및 전이가 촉진됨을 동물모델을 통하여 규명함.



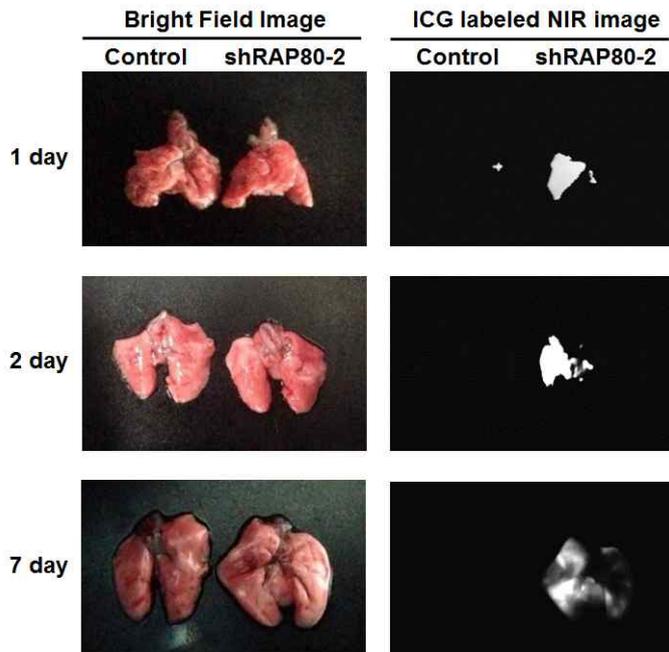
- Rap80 단백질에 의한 간엽-중간엽 전환이 ZEB1 단백질에 의해 조절됨을 밝힘.
- Rap80의 발현 정도와 ZEB1의 발현 정도가 서로 negative correlation 관계에 있음을 확인하고 Rap80에 의해 ZEB1의 발현이 억제됨을 확인함.
- 위 제어과정이 중간엽줄기세포에 적용될 가능성을 탐색



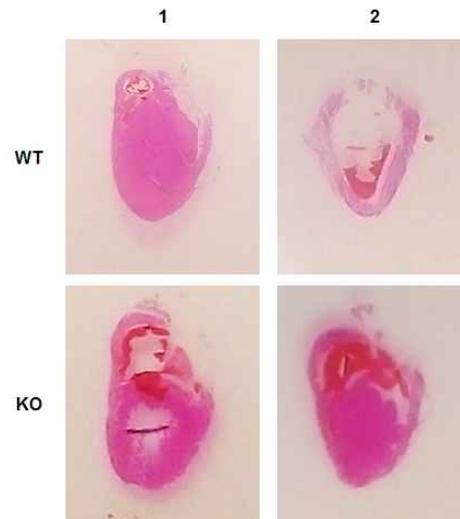
- 본 과제를 통해 Rap80 유전자 억제에 의해 에너지대사과정을 미토콘드리아 호흡에 의한 에너지생산을 줄이고 해당과정(glycolysis)에 의한 에너지생산을 늘이는 것으로 밝힘.
- 위와 같은 에너지대사 전환에 의해 간엽-중간엽 전환과정이 유도될 수 있음을 보임.
- Rap80 유전자가 중간엽줄기세포의 성장 및 분화를 조절할 가능성을 제시.



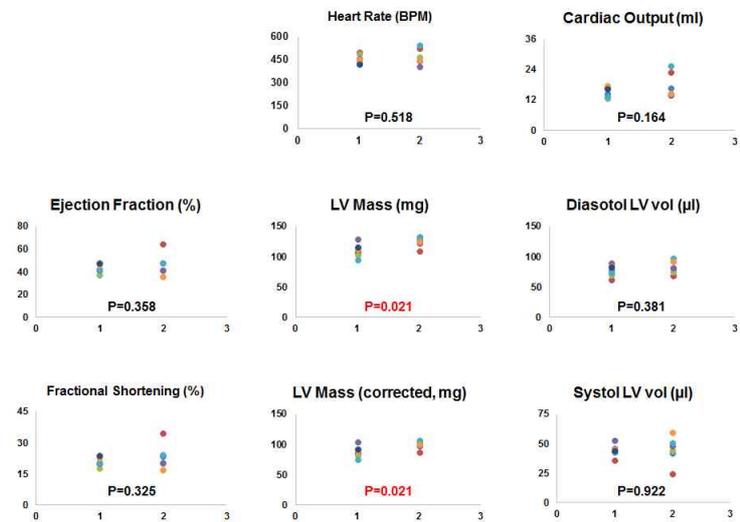
- 1세부과제에서 개발한 근적외선을 이용한 imaging 기법을 사용하여 세포의 이동 및 전이를 추적함.
- Rap80 유전자 조절에 의한 세포의 이동 및 전이과정을 동물모델에서 추적하기 위해서 1세부에서 개발한 근적외선 염색시약으로 세포를 염색 후 동물모델에서 세포의 이동과 전이를 추적함.
- 중간엽줄기세포의 이동경로 추적에 응용할 수 있을 것임



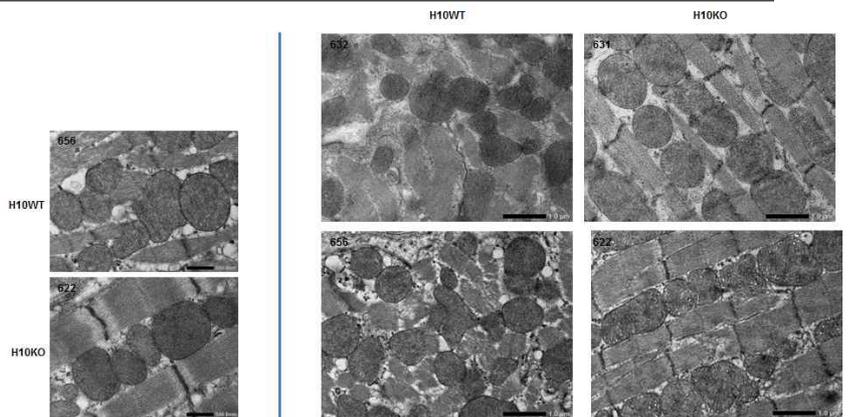
- 심혈관계 질환의 하나인 심근비대증 현상이 자가포식과정과 세포에너지 대사과정을 조절하는 것으로 본 과제에서 제안한 HDAC10 유전자를 결손시킨 생쥐에서 발견됨
- 심근비대에 의한 심실확장 및 심장기능 이상을 확인 중임
- 중간엽줄기세포의 면역조절기능을 통한 치료효과를 확인할 수 있는 모델로서 가치가 있을 것임



- 심장초음파이미징을 통하여 Ejection fraction, Heart rate, cardiac output, LV mass, Diasotol LV volume, fraction shortening, Systol LV volume을 측정함.
- 개체간 차이가 매우 크게 나타나서 유의적인 변화는 LV mass 이외에는 관찰하기 어려웠음.

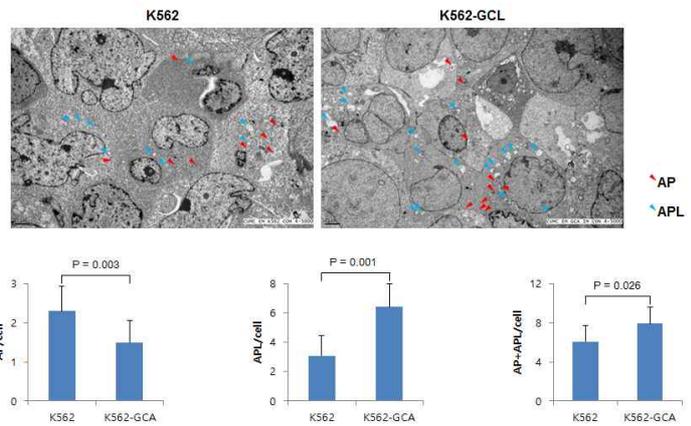


- 본 연구와 다른 연구진의 연구를 통해 밝힌 HDAC10 유전자의 기능이 자가포식 및 세포에너지대사 조절임을 고려하여 심장의 전자현미경 분석을 통하여 미토콘드리아 및 자가포식체의 구조를 분석함
- 미토콘드리아의 크기 및 배열이 정상 심장근에 비하여 크고 불규칙함을 보임

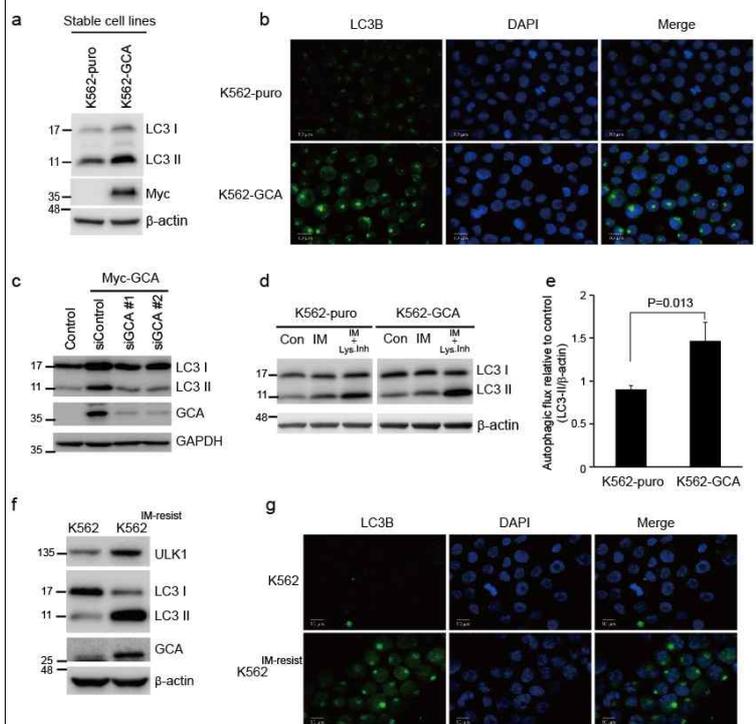


- GCA의 조절에 의해 TRAF6의 K-63 ubiquitination이 조절됨을 밝힘.

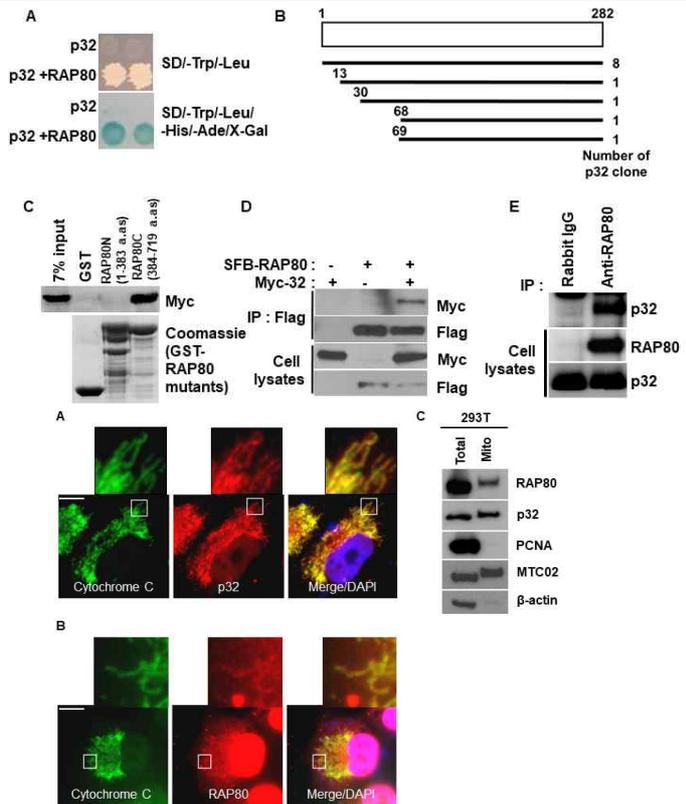
- 동물모델에서 주입한 세포의 자가포식체를 추적하기 위하여 전자현미경 분석을 이용함.
- 동물모델에서 중간엽줄기세포의 자가포식체를 추적하는데 사용될 수 있을 것임.



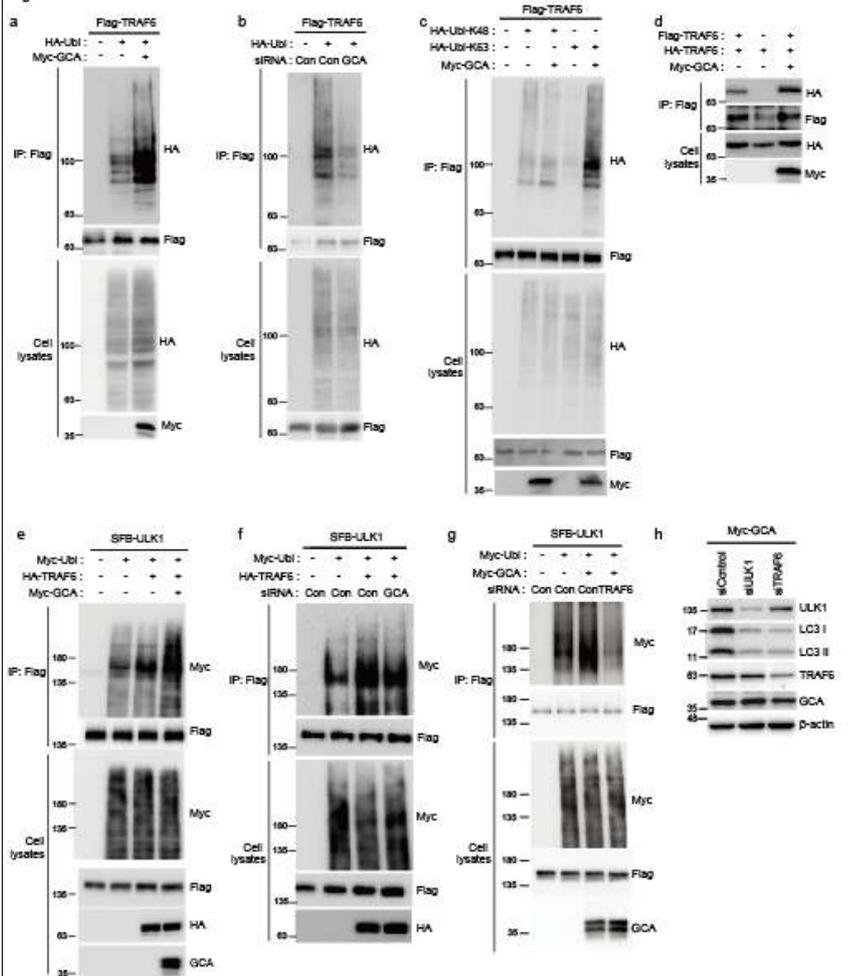
- Grancalcin (GCA) 단백질에 의한 새로운 자가포식 조절기전을 밝힘.



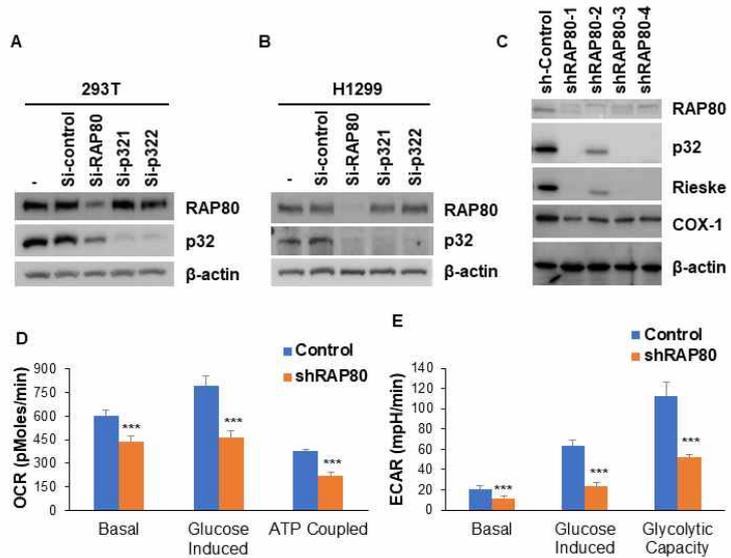
- 핵에 주로 존재하면서 DNA damage response를 조절한다고 알려진 RAP80 단백질이 미토콘드리아 단백질인 p32와 결합하고 있으며 일부 미토콘드리아에 존재함을 밝힘.
- 각각의 C-terminal region이 RAP80-p32 interaction에 중요함을 밝힘.



- GCA 단백질의 발현 정도에 의해 TRAF6의 K-63 ubiquitination 시킬 수 있는 활성이 조절됨을 밝힘.
- GCA-TRAF6에 의한 K63 ubiquitination이 ULK1의 K-63 ubiquitination을 조절함을 밝힘.
- GCA-TRAF6에 의한 ULK1의 K63 ubiquitination이 ULK1의 stability와 활성을 증가시켜 자가포식과정을 조절함을 밝힘.



- RAP80 유전자의 조절에 의해 p32 단백질의 양이 조절됨을 밝힘.
- p32의 mitochondrial translation기능이 RAP80에 의해 조절되고 이에 세포의 에너지대사 특성이 energetic 상황에서 quiescence 상황으로의 전환이 일어남.
- 위 기능을 이용하여 중간엽줄기세포의 분화를 억제하고 줄기세포로서의 특성을 유지시키는 quiescence 조건을 수립 중임.



제4장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 목표 달성도

- 1) 대사 및 자가포식과정 조절을 통한 중간엽줄기세포 증식, 유지 및 치료기능 최적화 기술
 - 자가포식 조절에 의한 중간엽줄기세포에 미치는 영향 조사.
 - 중간엽줄기세포의 성장과 분화에 자가포식 조절유전자로 알려진 HDAC6의 역할이 중요함을 밝힘.
 - HDAC6에 의한 p53의 acetylation이 중간엽줄기세포 특이적인 기능이 있음을 밝혔음.
 - 이들 유전자의 조절에 의해 중간엽 줄기세포에 미치는 영향에 대한 평가를 할 수 있을 것임.
 - 중간엽줄기세포에서의 자가포식관련 조절기술 개발
 - 새로운 자가포식조절 유전자를 찾기 위하여 포도당결핍에 의한 자가포식을 유도하고 이에 의한 transcriptome 분석
 - HDAC6 knock-out에서 증가 혹은 감소하는 RNA를 분석하고 이 결과를 현재 분석 중에 있음.
 - 에너지 대사조절과 자가포식조절에 의한 transcriptome의 변화 분석을 통해 발견된 다른 유전자인 mitoR1이 knockout된 세포에서 산소호흡량과 해당과정을 측정
 - 품질관리적 자가포식 조절유전자로 밝혀진 cortactin이 결핍될 경우 손상된 미토콘드리아를 제거하기 위한 자가포식이 억제됨을 보임.
 - 자가포식관련 조절기술을 이용한 중간엽줄기세포의 체외증식 기술개발
 - 자가포식작용을 조절하는 HDAC6 발현을 억제한 중간엽줄기세포가 EG7-OVA세포에 의해 유도된 종양을 억제하는 효과가 있음을 밝힘.
 - HDAC6에 의한 자가포식 및 에너지대사 조절이 노화관련 질병에 미치는 영향 분석
 - miRNA인 miR-26에 의한 자가포식 조절기전을 밝힘
 - 에너지 대사조절이 중간엽 줄기세포에 미치는 영향 조사.
 - HDAC6에 의한 MFN1의 아세틸화(acetylation)이 미토콘드리아의 dynamics를 조절함을 밝힘.

- 이러한 조절에 의해 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소 (ROS, reactive oxygen species)를 조절할 수 있음을 보임.
- 이는 중간엽 줄기세포의 성장 및 유지에 중대한 영향을 미칠 것으로 보임.
- 특히 HDAC6의 경우 미토콘드리아에서 일어나는 산소호흡의 에너지 의존도를 결정할 수 있는 중요 인자로 발굴되었음.
- 이는 줄기세포의 대사를 인위적으로 조절할 수 있는 중요한 도구로 사용될 수 있을 것임.

□ 중간엽줄기세포에서의 에너지대사 조절기술개발

- 에너지스트레스 발생시 미토콘드리아 결합에 의해 거대 미토콘드리아가 출현하고 HDAC6 유전자를 제거하여 결합을 억제할 경우 미토콘드리아의 구조적 기능적 결합이 일어남을 밝힘.
- HDAC6 발현 조절에 의한 미토콘드리아 기능조절의 가능성을 보임으로서 중간엽줄기세포에서의 미토콘드리아 기능조절의 가능성을 보임.
- 미토콘드리아 결합을 조절하는 다른 유전자인 mitoR2가 knockout된 세포에서 산소호흡량이 감소하고 해당과정이 증가됨을 밝힘.
- mitoR3 발현 억제에 의한 미토콘드리아 에너지대사조절에 의하여 세포의 조직내 migration 및 생존성이 증가.

□ 에너지대사 조절기술을 이용한 중간엽줄기세포의 체외 증식 및 분화기술 개발

- HDAC6의 발현억제에 의하여 glucose에 의한 산소호흡량은 크게 감소하고 해당과정 (glycolysis) 또한 약간 감소함을 보임으로써 HDAC6가 glucose와 lipid 간의 에너지대사 전환에 중요한 역할을 함을 밝힘.
- 에너지대사를 조절하는 mitoR3가 Rap80 단백질을 밝히고 꼬리 정맥으로 주입한 세포가 페로 타겟팅되는 현상이 epithelial mesenchymal transition (EMT)에 의해 조절 되는 것으로 밝힘.
- HDAC6 knockout 쥐의 신경조직 미토콘드리아 에너지대사 이상이 구조결합에 의한 것일 수 있는 가능성을 보임.
- miRNA인 miR-26에 의한 에너지대사 중 glycolysis 조절 기전을 밝힘.
- HDAC6 knockout 쥐의 신경조직 미토콘드리아 에너지대사 이상이 구조결합에 의한 것일 수 있는 가능성을 보임.

2) 저산소 전처리에 관련하는 세포 신호전달계 확립과 세포치료효율 향상을 위한 시스템 구축

□ Hypoxia 처리에 의한 중간엽줄기세포의 신호전달 네트워크 연구

- Hypoxia (1% O₂) 조건에서 MARCH5의 발현이 크게 증가하였음.
- 이에 의하여 미토콘드리아의 dynamics를 조절하는 중요단백질인 MFN2의 양이 조절될 수 있음을 보였음.
- HDAC6가 결핍될 경우 p53의 acetylation이 증가하고 p53에 의한 세포자살(apoptosis)가 중간엽줄기세포 특이적으로 일어나고 있음을 밝힘.
- 이는 HDAC6가 중간엽줄기세포 특이적으로 p53의 아세틸화를 조절하고 이에 의해 세포 성장과 사멸이 조절되고 있음을 밝힘.

□ 저산소 전처리가 microenvironment에 미치는 영향분석

- 세포에너지대사의 변화와 microenvironment의 변화를 추적할 수 있는 metabolomics 분석 기초 확립
- 저산소반응 조절 유전자인 HDAC6 결핍 생쥐에서 5일 이후 일어난 근육재생의 경우에는 큰 차이를 보이지 않으나 5일 이전에 일어나는 근육내 inflammation이 크게 감소함을 보임.
- 저산소 반응 조절 유전자인 HDAC6 knock-out 모델에서 근육손상시 일어나는 염증반응이 억제되어 있음을 확인하고 microenvironment의 변화를 추적하고 있음.
- 발굴된 미토콘드리아 에너지 대사 조절유전자들의 발현조절을 통해 저산소 전처리효과를 얻을 수 있을지 microenvironment분석을 통해 탐색 중

□ 저산소 전처리에 의해 분비되는 신호전달물질 및 대사물질의 생물학적 기능분석

- 저산소 환경에서의 미토콘드리아 결합이 HDAC6와 MARCH5/ MITOL 그리고 MFN2의 상호조절기전에 의해 일어남을 보임.

- 저산소환경 반응을 조절하는 HDAC6를 중간엽줄기세포에서 발현을 조절하면 공동배양되는 대식세포 (macrophage)를 면역자극하여 항암 cytokine인 TNF- α 의 분비가 크게 증가하고 면역억제 cytokine인 IL-10은 감소함을 보임.
- 이는 MSC의 secretome이 변화되어 대식세포의 기능을 향상시킬 수 있음을 보임.

3) 중간엽줄기세포의 대사물질조절을 통한 세포치료 최적화 기술

□ 동물모델에서의 자가포식조절 및 추적 기술 개발

- 본 연구와 다른 연구진의 연구를 통해 밝힌 HDAC10 유전자의 기능이 자가포식 및 세포에너지 대사 조절임을 고려하여 심장의 전자현미경 분석을 통하여 미토콘드리아 및 자가포식체의 구조를 분석함
- 미토콘드리아의 크기 및 배열이 정상 심장근에 비하여 크고 불규칙함을 보임
- 동물모델에서 주입한 세포의 자가포식체를 추적하기 위하여 전자현미경 분석을 이용함.

□ 동물모델에서의 에너지대사 조절 및 추적 기술 개발

- 에너지대사추적을 위하여 동물모델에서 열발생을 모니터링 하기 위하여 열영상 이미징을 통해 미토콘드리아에서 발생하는 열을 추적함.
- 세포수준에서 실험을 통하여 증명한 미토콘드리아 열발생의 차이를 동물 모델에서 증명함.
- 1세부과제에서 개발한 근적외선을 이용한 imaging 기법을 사용하여 세포의 이동 및 전이를 추적함.

□ 저산소 전처리에 의해 분비되는 신호전달물질을 이용한 중간엽줄기세포 체외 세포 분화 최적화

- HDAC6 유전자가 자가포식 및 에너지대사과정 조절을 통하여 중간엽 줄기세포의 성장 뿐만 아니라 저산소 처리에 의한 부작용인 Apoptosis에 대한 민감성을 조절함을 밝힘.
- 즉 HDAC6 유전자의 손실에 의하여 일반적으로 정상세포에서는 유도되지 않은 저산소처리에 의한 세포사멸과정이 유도됨을 밝힘.
- HDAC6에 의한 중간엽줄기세포의 성장 및 세포사멸조절을 확인하기 위하여 HDAC6 knockout mouse의 골수에서 중간엽줄기세포의 숫자를 확인함.
- HDAC6 knockout mouse의 골수에서 확인된 중간엽줄기세포의 숫자가 정상 생쥐의 그것보다 20% 정도 감소함을 보임으로서 HDAC6 유전자가 중간엽줄기세포의 성장 및 유지에 중요함을 동물모델에서 밝힘.

□ 심혈관계질환의 동물모델을 이용한 자가포식과정이 조절된 중간엽 줄기세포의 치료효과 검증

- 자가포식과정을 조절하는 HDAC6 유전자의 발현을 조절하여 IL-10등의 cytokine 분비를 조절하여 중간엽 줄기세포의 면역억제기능을 향상시킬 수 있음을 발견
- 자가면역질환과 심혈관계 질환이 서로 연관이 있다는 보고에 따라 자가면역 모델에서 위 HDAC6 발현조절 MSC를 사용하여 효과를 테스트 함.

2. 관련 분야 기여도

□ 자가포식 조절에 의한 세포기능 조절 분야

- HDAC6, GCA 유전자의 기능이 자가포식과정을 조절하는 것임을 밝히고 이러한 자가포식 조절에 의해 세포의 생존을 및 기능의 변화가 유도됨을 밝힘. HDAC6의 경우 이러한 자가포식과정과 커플링되어 있는 선천면역기능이 동일 HDAC6-RIG-I regulatory axis에 의해 조절됨을 밝힘. 이로서 세포내 고장난 단백질 및 소기관을 처리하는 기전과 침입한 바이러스를 처리하는 기전이 동일 HDAC6 단백질에 의해 조절 됨을 밝힘. 특히 immune cytokines에 의한 microenvironment의 특징적인 변화를 보임. (EMBO J, 2016). 중간엽 줄기세포에서도 면역조절 기능이 HDAC6에 의해 조절됨을 밝힘.
- 더 나아가 HDAC6가 p53의 deacetylase로서 p53을 탈아세틸화 하는 것이 중간엽 줄기세포의 apoptosis를 억제하는 데 중요함을 밝힘. (j int mol sci 투고 중)
- GCA 유전자의 기능이 TRAF6를 조절하여 TRAF6 자신과 ULK1의 K63 ubiquitination을 조절 함을 밝힘. 이러한 GCA-TRAF6-ULK1에 의한 자가포식과정의 조절이 세포의 생존에 중요함을 밝힘.

(Blood 투고 중) 중간엽 줄기세포에서도 동일한 과정이 중요함을 보임.

□ 저산소처리에 의한 세포기능 조절 분야

- 저산소 처리시 발생하는 세포내 미토콘드리아 형태의 변화를 조절하는 기전으로 HDAC6와 미토콘드리아 ubiquitinase인 MITOL이 서로 상호작용을 통하여 MFN2의 레벨을 조절하는 것을 밝힘 (Biochem Biophys Res Commun. 2015) 이에 따라서 루게릭병 모델에서 근육의 손실에 저항을 가질 수 있는 기전으로 HDAC6와 MITOL을 발굴함 (Neurodegener. dis. 2015) 중간엽 줄기세포를 이용한 루게릭병 근육손실 치료에 응용하고자 함.

□ 에너지대사 조절에 의한 세포기능 조절분야

- 세포의 대사스트레스 상황에서 미토콘드리아에서 발생하는 활성산소의 양을 최소화 하기 위한 기전으로 HDAC6에 의한 MFN1의 deacetylation이 중요함을 밝힘. 이에 따라 미토콘드리아의 대사스트레스 감수성이 감소하여 세포의 생존율이 향상됨을 밝힘. (J. Cell. Sci. 2014) 중간엽 줄기세포에서도 동일한 기전이 작동하고 이를 중간엽 줄기세포의 유지배양시 대사스트레스를 감소시키는 기전으로 응용하고자 함.
- RAP80-C1QBP 간의 상호결합에 의해 미토콘드리아의 기능이 조절되고 이에 의해 에너지대사 특성이 변화함을 밝힘 (Biochem Biophys Res Commun. 2017, accepted) 동일 유전자의 조절을 중간엽줄기세포의 에너지대사조절에 응용하고자 함.

□ 중간엽줄기세포의 줄기세포의 세포치료 응용 분야

- HDAC6에 의한 품질관리형 자가포식 및 저산소처리 유도 미토콘드리아 형태조절 기능이 루게릭병의 진행에 중요함을 밝힘. (Neurodegener. dis. 2015) 이를 통해 HDAC6발현이 조절된 중간엽 줄기세포를 이용한 루게릭병 근육손실 치료에 응용하고자 함.
- RAP80에 의한 에너지대사 조절이 세포의 간엽-중간엽 전환 (EMT) 과정에 중요함을 밝힘. 특히 lung으로 Targeting에 특징적인 효과를 보임. (Cancer sci. 2016) RAP80 조절에 의한 중간엽 줄기세포의 이동성 조절에 응용하고자 함.

제5장. 연구개발성과의 활용계획

- 대사조절에 의해 조절되는 미토콘드리아의 막결합을 유도할 수 있는 조절유전자인 HDAC6, MFN1, MFN2, MARCH5의 기능을 이용한 유전자조절을 통해 중간엽줄기세포의 성장 및 분화를 조절하고자 함.
 - HDAC6 단백질의 기능을 조절함으로써 에너지대사조절에 의한 기능조절에 대한 특허를 준비 중임.
 - HDAC6 발현 조절에 의한 미토콘드리아 기능조절의 가능성을 보임으로서 중간엽줄기세포에서의 미토콘드리아 기능조절에 응용할 것임.
 - RAP80 발현 억제에 의한 미토콘드리아 에너지대사조절에 의하여 세포의 조직내 migration 및 생존성이 증가 기전을 이용하여 중간엽줄기세포 조절 기술에 응용할 것임.
 - HDAC6에 의한 MFN1의 탈 아세틸화가 대사조절에 미치는 영향을 밝히고 이를 중간엽 줄기세포의 성장 및 분화 조절에 응용할 수 있도록 함.
 - HDAC6와 MARCH5/MITOL에 의한 MFN2의 조절이 저산소 환경에 미치는 영향을 밝히고 이를 중간엽 줄기세포의 성장 및 분화 조절에 응용할 수 있도록 함. 근위축성 측색경화증에 HDAC6와 MARCH5/MITOL에 의한 조절기전을 규명하고 중간엽줄기세포를 이용한 치료에 응용하고자 함.
 - 미토콘드리아 산소호흡 조절을 통한 줄기세포의 전분화능 유지 및 분화 조절 기술 개발에 활용하고자 함.
 - 노화관련 질병 및 대사성 질병의 조기 진단 및 치료에 응용할 수 있는 유전자 마커 및 대사표지 인자 개발에 활용하고자 함.
-

- 에너지대사 조절을 통한 중간엽 줄기세포의 성장 및 분화 조절 기술 개발에 활용하고자 함.
- 미토콘드리아의 역동적인 막결합 조절을 통한 세포신호전달 변화와 이를 이용한 중간엽 줄기세포의 치료능력 확대 기술 개발에 응용하고자 함.
- 근위축성 측색경화증, 근손상, 심근손상 모델에서 HDAC6, MFN1, MFN2, MITOL등의 유전자의 발현 조절이 미치는 효과 검증.
- 에너지대사 및 자가포식과정을 조절하는 HDAC6 유전자에 의한 선천면역체계 제어기전을 1세 부과제와의 공동연구에 적용하여 중간엽줄기세포의 면역조절기능을 제어하고자 함.
- RAP80에 의한 간엽-중간엽 전이과정 조절에 의해 세포의 전이 이동 및 조직 침투과정에 대한 분자적 기전을 이용하여 중간엽줄기세포의 이동 및 전이조절 및 추적에 응용하고자 함.
- 동물모델에서 자가포식체를 추적할 수 있는 방법을 수립하여 동물모델에서의 중간엽줄기세포의 자가포식체 추적에 응용하고자 함.

제6장. 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

2014, The 4th international symposium of asian society for aging research, 2014
노화와 관련된 줄기세포치료에 대한 최신동향 수집

2015, Cold spring harbor asia conference Mitochondria
미토콘드리아와 관련된 에너지대사 조절과 줄기세포 조절에 대한 최신 연구동향 수집

제7장. 연구개발성과의 보안등급

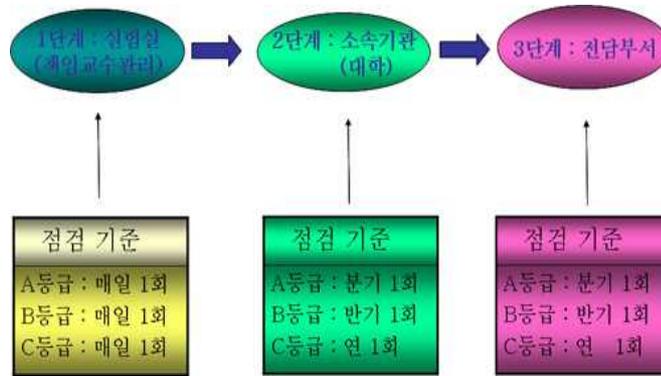
없음: 공개

제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록 번호

제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적

- 가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시
- 1) 실험실 안전 점검 체계



※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

나. 교육 훈련

- 1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
- 2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등
- 3) 단계별 교육 이수과정 :
 - 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)
 - 2단계 : 특수실험실
- 4) 교육구분
 - 정기교육 : 방학기간 중 2회 출석 수업 실시
 - 비정기 임시교육 :
 - o 대상 : 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
 - o 방법 : 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등
 - 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

다. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	설비안전팀
	대인대물일괄	전체	“
	제3자 치료비 보상	제3자 보상	“
	학생교내외치료비	학생	“
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해 : 1억원 의사상자 상해위험 : 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상 연구활동중사자보험 포함(특별약관)	학부생, 대학원생	학생복지처
교직원 단체안심보험	사망, 후유장해, 질병사망 의료비지원 - 암치료비 - 입원의료비지원 - 상해의료실비	교직원	인사팀

제10장. 연구개발과제의 대표적 연구 실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허 등록 국가	영향력 지수	논문 게재일 /특허 등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기 사항 (SCI 여부/인용 횟수 등)
1	논문	H D A C 6 r e g u l a t e s c e l l u l a r v i r a l R N A s e n s i n g b y d e a c e t y l a t i o n o f R I G - I .	충남대 학교	교신 저자	EMBO J.	9.792	2016.01.08	중복사사	SCI/18
2	논문	R A P 8 0 r e g u l a t e s e p i t h e l i a l m e s e n c h y m a l t r a n s i t i o n r e l a t e d w i t h m e t a s t a s i s a n d m a l i g n a n c y o f c a n c e r .	충남대 학교	교신 저자	C a c n e r S c i .	3.974	2016.02.10	중복사사	SCI/5

3	논문	M F N 1 deacetylation activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria.	충남대 학교	교신 저자	J Cell Sci.	5.432	2014.09.30	중복사사	SCI/19
4	논문	Uncoupling of Protein Aggregation and Neurodegenerati on in a Mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis Model.	충남대 학교	교신 저자	Neurodege nerative Diseases	3.511	2015.09.12	중복사사	SCI/8
5	논문	H D A C 6 maintains mitochondrial connectivity under hypoxic stress by suppressing MARCH5/MIT OL dependent M F N 2 degradation.	충남대 학교	교신 저자	Biochem Biophys Res Commun.	2.371	2015.07.23	중복사사	SCI/6

제11장. 기타 사항

- GCA-TRAF6-ULK1 regulatory axis에 의한 자가포식조절기전에 관한 논문이 Blood (IF: 11.847)에 투고중임.
- 이외에도 Biochemical and Biophysical Research Communications (IF:2.466), International Journal of Molecular Sciences (IF:3.226)에 각각 논문이 accept되었음.

제12장. 참고 문헌

- [1] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell*, 148 (2012) 399-408.
 - [2] T. Koshiba, S.A. Detmer, J.T. Kaiser, H. Chen, J.M. McCaffery, D.C. Chan, Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes, *Science*, 305 (2004) 858-862.
 - [3] A. Santel, M.T. Fuller, Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin, *Journal of cell science*, 114 (2001) 867-874.
 - [4] A. Olichon, L. Baricault, N. Gas, E. Guillou, A. Valette, P. Belenguer, G. Lenaers, Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 278 (2003) 7743-7746.
 - [5] A. Roux, K. Uyhazi, A. Frost, P. De Camilli, GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission, *Nature*, 441 (2006) 528-531.
 - [6] E. Smirnova, L. Griparic, D.L. Shurland, A.M. van der Bliek, Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells, *Molecular biology of the cell*, 12 (2001) 2245-2256.
 - [7] D.C. Chan, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development, *Cell*, 125 (2006) 1241-1252.
 - [8] D.I. James, J.C. Martinou, Mitochondrial dynamics and apoptosis: a painful separation, *Developmental cell*, 15 (2008) 341-343.
 - [9] H. Kim, M.C. Scimia, D. Wilkinson, R.D. Trelles, M.R. Wood, D. Bowtell, A. Dillin, M. Mercola, Z.A. Ronai, Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia, *Molecular cell*, 44 (2011) 532-544.
 - [10] D.F. Suen, K.L. Norris, R.J. Youle, Mitochondrial dynamics and apoptosis, *Genes & development*, 22 (2008) 1577-1590.
 - [11] J.Y. Lee, M. Kapur, M. Li, M.C. Choi, S. Choi, H.J. Kim, I. Kim, E. Lee, J.P. Taylor, T.P. Yao, MFN1 deacetylation activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria, *Journal of cell science*, 127 (2014) 4954-4963.
 - [12] M. Karbowski, A. Neutzner, R.J. Youle, The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division, *The Journal of cell biology*, 178 (2007) 71-84.
-

9. 뒷면지

주 의

1. 이 최종보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 세포재생기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 최종보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 과학기술정보통신부에서 시행한 사업의 연구개발성과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]