

과제번호 M1-0108-00-0068

중점 뇌신경생물학연구사업

교세포 활성화가 허혈성 뇌세포사멸에 미치는 영향:
세포주기억제제 효과 연구

Modulation of ischemia-induced brain cell death by activated
glial cells: Effect of cell cycle inhibitors

이화여자대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “중점 뇌신경생물학연구사업에 관한 연구”과제 (세부과제 “교세포 활성화가 허혈성 뇌세포사멸에 미치는 영향: 세포주기억제제 효과 연구에 관한 연구”) 의 보고서로 제출합니다.

2004. 7. 18.

주관연구기관명 : 이화여자대학교

주관연구책임자 : 김 원 기

보고서 초록

과제관리번호	M1-0108-00-0068	해당단계 연구기간	2001.8 - 2004.5	단계 구분	2단계 / 총 3단계
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	중점뇌신경생물학연구개발사업			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	교세포 활성화가 허혈성 뇌세포사멸에 미치는 영향: 세포주기억제제 효과 연구			
연구책임자	김 원 기	해당단계 참여연구원수	총 : 17 명 내부 : 17 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 139,000 천원 기업: 천원 계: 139,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	이화여자대학교 약리학 교실		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>허혈에 대한 <i>in vivo</i> 및 <i>in vitro model</i>에서 교세포의 활성화 특징과 뇌세포 사멸의 명확한 측정법을 마련함. 정상세포의 대표적 항산화시스템인 글루타치온의 변동이 뇌조직 손상과 밀접히 관련되어 있음을 밝힘. NADPH-diaphorase 함유세포가 활성화 소교세포 자체이거나 일부 신경세포임을 밝히고 이들 세포들이 oxidative stress에 특히 강하게 저항하는 것을 밝힘. 뇌에 LPS microinjection한 뒤 MCAO를 하면 뇌손상이 크게 증가하며, 글루타치온 함량저하와 관련 있으며, iNOS 억제제에 의하여 억제됨. DWN series 약물이 MCAO 유발 항산화시스템 붕괴에 의한 뇌세포 사멸에 보호 작용을 가짐. LPS에 투여 후 허혈유발에 의한 세포사멸에 pro-inflammatory cytokines mRNA 발현이 증가되는데, DWN series 약물은 이들의 발현을 감소시킴으로써 LPS(1d)/MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 보호 작용을 가짐. DWE 유도체가 미토콘드리아의 기능 및 세포내 ATP level 저하를 억제하여 세포사멸을 감소시킴. 미토콘드리아의 손상은 미토콘드리아 막전압과 미토콘드리아 막공의 개폐에 의존적으로 일어남. DWE 유도체는 허혈에 의한 미토콘드리아의 손상을 억제함으로써 나타냄을 밝힘.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	뇌허혈, 교세포, 활성화, 항산화시스템, 미토콘드리아,			
	영 어	Cerebral ischemia, Glia, Activation, Anti-oxidant system, Mitochondria			

요 약 문

I. 제 목

교세포 활성화가 허혈성 뇌세포사멸에 미치는 영향: 세포주기억제제 효과 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

신경세포의 사멸기전에 대한 기전을 연구함으로써 뇌질환을 치료하고자 하는 많은 노력이 기울여져 왔음. 그러나 뇌세포의 대부분을 차지하며 신경세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있는 교세포가 신경세포 사멸에 미치는 영향에 대한 연구는 도외시되어 왔음. 뇌졸중 등의 허혈성 뇌질환의 경우 허혈 부위에서 교세포의 활성이 관찰되며, 활성화된 교세포는 다양한 종류의 생리활성물질들을 생성 유리하며, 여러 가지 사멸조건에서 신경세포의 사멸을 증가시키는 것이 일차 배양된 세포에서 관찰됨. 또한 활성화된 교세포 자신도 여러 가지 사멸조건에 취약하게 됨. 이러한 세포사멸의 증가는 필연적으로 허혈성 뇌질환의 정도를 심하게 할것으로 사료됨. 따라서 본 연구과제는 허혈 부위에서 일어나는 뇌세포의 사멸에 대한 활성화된 교세포의 역할에 대하여 연구하고 이를 조절함으로써 뇌세포의 사멸을 억제하는 방법을 개발하는 것을 연구목적으로 함.

III. 연구개발의 내용 및 방법

1. 1차년도 세부 연구 내용 및 방법은 다음과 같음.

- ① 허혈 유발 동물모델에서 교세포의 활성화와 뇌세포의 사멸과의 상관성 연구
 - ▶ 활동성 및 허혈 특이적 행동변화 관찰 및 수치화
 - ▶ Cresyl violet, H-E 및 acid fuchsin 염색
 - ▶ Map-2 항체를 이용한 면역조직화학염색
 - ▶ GFAP 항체를 이용한 면역조직화학염색
 - ▶ OX-1, OX-6, OX-18 및 ED-1 항체를 이용한 면역조직화학염색
 - ▶ OX-42항체를 이용한 면역조직화학염색
 - ▶ 교세포 활성화후 허혈에 따른 뇌조직/세포 손상 관찰
 - ▶ 교세포 활성화 억제제 선정을 위한 기본 연구
- ② 일차배양된 세포에서 면역억제제와 세포주기억제제의 효과 검색
 - ▶ 중추면역계에 대한 predni solone, wogonin의 영향 규명
 - ▶ 세포사멸에 대한 predni solone, wogonin의 영향 규명

- ▶ 중추면역계에 대한 ciclo pirox, mimosine의 영향 규명
- ▶ 세포사멸에 대한 ciclo pirox, mimosine의 영향 규명

2. 2차년도 세부 연구 내용 및 방법은 다음과 같음.

- ① 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴와 신경세포 및 교세포 사멸의 상관관계 연구
 - ▶ 일차배양된 세포에서,
 - LPS 및 IFN-gamma 혹은 IL-1beta 투여로 교세포 활성화 유도
 - 산화형 및 환원형의 글루타치온 함량 변화 측정
 - 허혈이나 포도당 결핍 유도후에 이들 변동의 측정
 - ▶ 허혈 유발 동물모델에서,
 - LPS (5ug/5ul)를 corpus calosum으로 microinjection 하여 교세포 활성화 유도
 - GSH의 분포 및 GSH 합성효소의 발현 및 분포
 - SOD-1 및 SOD-2의 발현 및 분포 연구
 - NADPH-diaphorase 함유세포와의 관계 연구
 - 세포내 철(Fe)의 축적 및 분포 연구
- ② 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴와 신경세포 및 교세포 사멸의 상관관계 연구
 - ▶ Fluoro-jade를 사용한 세포 사멸 확인
 - ▶ iNOS 혹은 non-specific NOS 억제제에 의한 신경세포 및 교세포 사멸 억제 작용 연구
- ③ 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴 조절
 - : 허혈동물모델에서 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴에 대한 면역억제제와 세포주기억제제의 효과 검색
 - ▶ 면역억제 작용을 가지는 DWN series 약물 및 DWE series 약물의 MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대한 보호 작용 검색
 - ▶ MCAO 유발 항산화시스템 붕괴에 대한 DWN series 약물 및 DWE series 약물의 효과 검색

3. 3차년도 세부 연구 내용 및 방법은 다음과 같음.

- ① 면역억제와 세포사멸억제와의 상관관계 연구
 - ▶ LPS 투여 후 허혈에 의한 뇌세포사멸에 pro- and anti-inflammatory cytokines의 영향 및 면역억제제인 DWN series 약물의 효과
- ② 세포주기 조절과 세포사멸억제와의 상관관계 연구
 - ▶ 세포주기 조절과 세포사멸억제 DWE series 약물의 효과
- ③ 미토콘드리아의 기능 조절에 대한 연구
 - ▶ 미토콘드리아의 기능 조절에 대한 연구 및 세포주기억제제의 효과

IV. 연구개발결과

허혈 유발 동물모델(2종)에서 교세포의 활성화에 대한 특징을 규명하였고, TTC, H-E 및 cresyl violet staining을 통한 뇌세포사멸을 명확히 측정함. 2종의 면역 억제제와 2종의 세포주기억제제를 선정하고 억제 효과 검색 완료함. 뇌세포 사멸의 명확한 측정법(LDH release, 미토콘드리아 기능 측정, ATP 함량)을 마련함. 정상 세포의 대표적인 항산화시스템인 글루타치온의 변동이 뇌조직 손상과 밀접히 관련되어 있음을 성공적으로 밝힘. SOD-2의 발현이 특이적으로 증가 되어 feedback-mechanism에 의한 발현 증대임을 알수 있었음. NADPH-diaphorase 함유세포가 활성화 소교세포 자체이거나 일부 신경세포임을 밝히고 이들 세포들이 oxidative stress에 특히 강하게 저항하는 것을 밝힘. 손상을 입는 세포들에 특이적으로 세포내 철(Fe)의 농도가 특히 높게 나타나 철과 산소라디칼 생성간의 상관관계를 예시해 주고 있음. LPS를 corpus calosum으로 microinjection한 뒤 MCAO를 하면 뇌손상이 크게 증가하는 것이 관찰되는데 이러한 세포사멸의 증가는 iNOS 혹은 non-specific NOS 억제제에 의하여 억제됨. LPS를 microinjection 후 MCAO에 의한 뇌손상 증가는 글루타치온 함량저하와 밀접한 관련이 있음. DWN series 약물이 MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 보호 작용을 가지는 것이 관찰 되었음. DWE series 약물의 미토콘드리아의 보호작용을 규명하였으며 세포 보호작용에 대한 연구도 수행함. MCAO 유발 항산화시스템 붕괴에 대하여 DWN series 약물들은 억제하는 것을 보였음. LPS의한 허혈유발에 의한 세포사멸에 pro-inflammatory cytokines mRNA 발현이 증가됨. DWN-series 약물은 LPS(1d)/MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 보호 작용을 가짐. 또한, 말초조직에서 면역세포가 뇌조직으로 밀려들어 오는 것을 억제 및 pro-inflammatory cytokines mRNA의 발현을 감소시키는 것으로 관찰 됨. DWE 유도체가 미토콘드리아의 기능 및 세포내 ATP level 저하를 억제하여 세포사멸을 감소시킴. 미토콘드리아의 손상은 미토콘드리아 막전압(mitochondrial trans-membrane potential)과 미토콘드리아 막공(mitochondrial permeability transition pore)의 개폐에 의존적으로 일어남. DWE 유도체는 허혈에 의한 미토콘드리아의 손상을 억제함으로 나타남을 밝힘.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과의 성공적인 수행은 뇌졸중 뿐만 아니라 활성화 교세포의 영향을 받는 알츠하이머병, 파킨스씨병, 두부외상 등의 퇴행성 신경질환에 대한 치료제 개발에 기여하게 될 것으로 사료됨.

본 연구과제에 사용되는 약물에 대한 완전한 이해와 함께 제약업체와의 지속적 연구를 통하여 보다 효율적인 약물을 개발할 것임.

본 연구과제의 결과를 제약회사 등에 기술이전하고 임상 연구기관과의 협력연구도 아울러 진행할 것임.

S U M M A R Y

I. Title

Modulation of ischemia-induced brain cell death by activated glial cells:
Effect of cell cycle inhibitors

II. Purpose

Much endeavor has been done to find the therapeutic way(s) for neurodegenerative diseases through understanding their underlying mechanisms. However, the role of glial cells that is the most popular cells in brain has been neglected. In case of ischemic neuropathies such as cerebral ischemic stroke, glial cells are found to be activated and produce a variety of biologically active molecules. These molecules are modulating the process and degree of neuroal injury. Moreover, activated glial cells themselves become more vulnerable to the noxious environment. Thus, the specific aim of the present proposal is to investigate the role of activated glial cells in cerebral ischemic lesion and to develop the therapeutic way to suppress the neuronal cells injury.

III. Contents and Methods

1. 1st year

- ① Relationship between glial cells activation and neuronal cell death
 - ▶ Observation, characterization and standardization of ischemia induced neurobehavioral changes
 - ▶ Staining with cresyl violet, H-E and acid fuchsin
 - ▶ Immunohistochemical staining with anti-Map-2 Ab
 - ▶ Immunohistochemical staining with anti-GFAP Ab
 - ▶ Immunohistochemical staining with anti-OX-1, -OX-6, -OX-18 or -ED-1 Abs
 - ▶ Immunohistochemical staining with anti-OX-42 Ab

- ▶ Ischemic insult after artificial glial cell activation.
- ▶ Basic study for the election of glial cell suppression
- ② Screening of cell cycle inhibitors in primary neuronal cell cultures
 - ▶ Effect of prednisolone and wogonin on central immune cell activity
 - ▶ Effect of prednisolone and wogonin on ischemia-induced cell death
 - ▶ Effect of ciclopirox and mimosine on central immune cell activity
 - ▶ Effect of ciclopirox and mimosine on ischemia-induced cell death

2. 2nd year.

- ① Relationship between the depletion of antioxidant system in activated glial cells and the neuronal and glial cell death in cerebral ischemic insult
 - ▶ In primary cultures
 - Glial cell activation by LPS / IFN-gamma or IL-1beta
 - Changes of reduced and oxidized glutathione levels
 - Determination of the glutathione levels after ischemia and/or glucose deprivation
 - ▶ In animal model(s)
 - Activation of glial cells by microinjecting LPS (5ug/5ul) into corpus calosum
 - Distribution of GSH and GSH synthetic enzymes
 - Distribution of SOD-1 and SOD-2
 - NADPH-diaphorase possessing cells
 - Intracellular accumulation of iron and its distribution
- ② depletion of antioxidant system in activated glial cells vs. neuronal and glial cell death in cerebral ischemic insult
 - ▶ Characterization of cell death by using Fluoro-jade
 - ▶ Role of iNOS in neuronal and glial cell death in cerebral ischemic insult
- ③ Modulation of the depletion of antioxidant system in activated glial cells in cerebral ischemic insult: Screening of the effects of immunosuppressants and cell cycle inhibitors on the depletion of antioxidant system in activated glial cells in cerebral ischemic insult
 - ▶ Neuroprotective effects of DWN and DWE derivatives in MCAO
 - ▶ Modulation by DWN and DWE derivatives of the depletion of antioxidant system in activated glial cells in cerebral ischemic insult

3. 3rd year.

- ① Relationship between immunosuppression and cell death
 - ▶ Roles of pro- and anti- inflammatory cytokines in augmented ischemic injury by intracorporus callosum microinjection of LPS : Effect of DWN

series

- ② Relationship between cell cycle inhibitors and cell death
 - ▶ Roles of cell cycle inhibition in augmented ischemic injury: Effect of DWN series
- ③ Regulation of mitochondrial function : Effect of DWN series

IV. Results

We characterized the activation of glial cells in two animal models and standardized the measurement of neuronal injury by using TTC, H-E and cresyl violet staining. We selected two immunosuppressants and two cell cycle inhibitors and studied their effect on cell death. We further standardized the measurements of cell death or injury: LDH release, mitochondria function, ATP level. We successfully determined the relationship between the level of glutathione the typical antioxidant in astroglial cells and neuronal injury/death. We found that the increased expression of SOD-2 was mediated through feedback-mechanism. NADPH-diaphorase-containing cells, i.e., microglial cells and neuronal cells, were resistant to oxidative stress. The level of iron was found to be high in injured cells, implying that the increased iron might be associated with the increased oxidative stress. Microinjection of LPS into corpus calosum augmented cerebral ischemic injury in MCAO model, which was largely suppressed by iNOS inhibitors. Augmented cerebral ischemic injury after microinjection of LPS into corpus calosum is well correlated with rapid depletion of glutathione. DWN and its derivatives successfully protected neuronal cells from cerebral ischemic insults and inhibited the depletion of glutathione in ischemic lesion. We characterized and screened the protective effect of DWE and its derivatives on mitochondrial injury in ischemia. LPS highly increased the mRNA expression of proinflammatory cytokines was highly increased in ischemic lesions. DWN and its derivatives suppressed the migration of microglia/monocytes into cerebral ischemic lesion. DWN and its derivatives repressed the mRNA expression of proinflammatory cytokines increased by LPS in ischemic lesions. DWE and its derivatives protected mitochondria from ischemia/hypoxia and restored ATP level, resulting in the neuronal cell protection. DWEc and its derivatives were found to inhibit the depolarization of mitochondrial trans -membrane potential and the opening of mitochondrial permeability transition pore caused by ischemia/hypoxia.

V. Application

The successful completion of the present research proposal may contribute for

the development of therapeutic agents of Alzheimer's disease, Parkinson's disease and brain trauma as well as cerebral ischemic stroke in which activation of glial cells play important roles.

Further studies will be designed for the development of new therapeutic agents with pharmaceutoical companies.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Current status of Dimetic and Foreign Research and Development

Chapter 3. Results

Chapter 4. Accomplishment of Purpose and Contribution

Chapter 5. Achivement and Proposal for Application

Chapter 6. Current research status of Foreign countries during our research

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

뇌졸중 등의 허혈성 뇌질환의 경우 허혈 부위에서 교세포의 활성이 관찰됨. 활성화된 교세포는 여러 가지 사멸조건에서 신경세포의 사멸을 증가시키는 것이 일차 배양된 세포에서 관찰되었음. 또한 활성화된 교세포 자신도 여러 가지 사멸조건에 취약하게 되었음. 이러한 세포사멸의 증가는 필연적으로 허혈성 뇌질환의 정도를 심하게 할것으로 사료됨. 따라서 본 연구과제는 허혈 부위에서 일어나는 뇌세포의 사멸에 대한 활성화된 교세포의 역할에 대하여 연구하고 이를 조절함으로써 뇌세포의 사멸을 억제하는 방법을 개발하는 것을 연구목적으로 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

○ 기술적 측면: 신경세포의 사멸기전에 대한 이해는 외상, 뇌졸중, 알츠하이머씨병, 파킨슨씨병, 다발성 경화증 등의 다양한 중추질환의 예방, 조절 및 치료법 개발의 기반이 되는 핵심기술임. 따라서 신경세포의 사멸에 대한 기전을 연구함으로써 뇌질환을 치료하고자 하는 많은 노력이 기울여져 왔음. 그러나 뇌세포의 대부분을 차지하며 신경세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있는 교세포가 신경세포 사멸에 미치는 영향에 대한 연구는 도외시되어 왔음. 지난 수년간 여러 연구진들에 의하여 퇴행성 신경질환에서 교세포가 활성화되며 활성화된 교세포는 다양한 종류의 생리활성물질들을 생성 유리하는 것으로 보고 하였음. 최근 본 연구자는 활성화된 교세포가 뇌세포의 사멸에 영향을 줄 수 있다는 것을 보고해 왔음. 따라서 퇴행성 신경질환에서 신경세포의 사멸을 완벽하게 방지하고 뇌기능의 저하 및 손상을 억제하기 위하여 신경세포의 사멸과 기능의 조절에 관여하는 교세포의 역할을 체계적으로 밝히는 것이 절대적으로 필요한 시점임. 이러한 신경세포의 사멸과 기능의 조절에 관여하는 교세포의 역할에 대한 이해는 다양한 퇴행성 뇌질환 (뇌졸중, 외상, 알츠하이머씨병, 파킨슨씨병, 등)의 치료에 크게 기여 할 것임.

○ 경제·산업적 측면: 퇴행성 뇌질환의 발병은 사회적 노령화와 함께 매우 빠르게 증가하고 있으며 따라서 이에 따른 경제적 손실은 매우 큼. 우리나라의 경우 1996년 사망통계에 의하면 인구 10만명당 뇌졸중으로 사망하는 사람은 약 75명으로 교통사고, 심장질환, 위암으

로 사망하는 사람보다 2배 이상 많음(통계청, 1996). 60세 이상의 인구에서 뇌졸중 환자 발생률은 급격히 높아져 우리 나라에서 남녀 모두 사망률 1 위를 차지하는 무서운 질환임. 따라서 이에 의한 가족 및 국가의 경제적 손실은 년 간 수천억 ~ 수조원에 이르는 것으로 추산됨. 미국의 경우 알츠하이머씨병 한 가지만 보더라도 65-74세 인구의 2%가 이 질환을 앓고 있음이 보고된 바 있고 이 질환의 경제적 비용은 미국내에서만 매년 1000억 달러 이상이 소요됨이 알려져 있으며 이는 매년 기하급수적으로 증가하고 있음. 현재 뚜렷한 치료제가 개발되어 있지 않은 점이 있지만 알츠하이머씨 병의 경우 국내에서 Eisai사의 Aricept (donepezil) 가 작년의 경우 24.7억원의 매출을 기록한 바 있으며 Parkinson씨 병 치료제인 로슈 사의 Madopar (benserazide + levodopa) 및 릴리사의 Celance (pergolide mesylate) 등은 80억원의 매출을 기록하였음. 이러한 수치는 이들 질환의 보다 효과적인 치료제가 개발될 경우 수백배 이상 증가할 것이며 전 세계적으로는 매년 300억 달러 이상의 시장 가치를 지니게 될 것으로 예상됨. 따라서 신경세포의 사멸과 기능의 조절에 관여하는 교세포의 역할에 대한 연구 결과는 뇌졸중, 알츠하이머씨병, 두부 외상, 등의 퇴행성 뇌질환 치료제 개발에 크게 기여하게 되어 경제적 손실을 줄이고 나아가 대외 수출을 통한 경제적 이윤을 증대시키게 될 것임.

○ 사회·문화적 측면: 뇌졸중 (중풍), 알츠하이머씨병, 파킨슨씨병, 등의 퇴행성 신경질환은 운동, 감각기능의 손상 및 기억, 학습, 연산, 추리 등 고차원적 기능의 저해를 야기하여 삶의 질을 파괴하며 환자가 사망에 이를 때까지 본인과 그 가족에게 많은 정신적, 육체적 고통을 야기함. 또한 현대 사회의 노령화 추세로 노인 인구의 급속한 증가가 이루어지고 있는 최근의 경향에 비추어 볼 때 뇌졸중, 알츠하이머씨병, 파킨슨씨병 등의 신경 퇴행성질환 발생과 발생 후 생존 기간의 증가는 큰 사회 문제로 대두되고 있음. 우리나라의 경우 뇌졸중은 단일 질환으로써 우리나라에서 사망원인 제 1 위를 차지 함 (통계청, 1997; 반면 미국 등 서구에서는 사망원인 제 3 위임). 현재 우리나라에서 뇌졸중에 의한 사망률은 미국, 캐나다, 호주 등의 나라에 비해 매우 높은 것으로 나타나 있음. 따라서 뇌졸중은 이제 우리나라에서 좌시할 수 없는 중요한 사회문제가 되어가고 있음. 중추신경계에 대한 교세포의 역할을 밝히는 것은 뇌졸중에 대한 치료제 뿐만 아니라 알츠하이머씨병등의 퇴행성 뇌질환의 경감 및 치료에 기여하게 되어 사회적, 경제적 손실을 최소화하는데 기여할 것임.

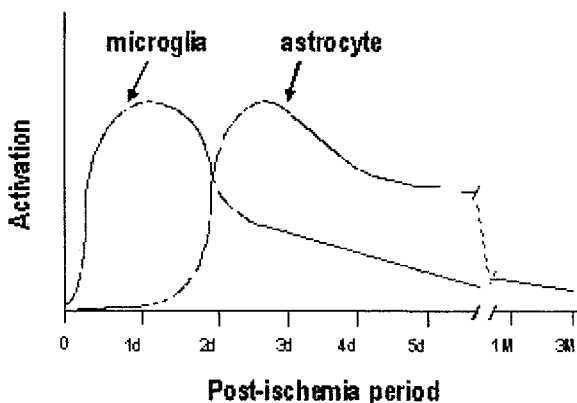
제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 허혈과 신경세포의 사멸

현재까지 신경세포의 사멸기전 연구는 주로 신경독성 유발인자의 파악과 이에 따른 신경세포 사멸의 형태학적 구분 및 이러한 세포사멸의 생화학적 매개자의 파악에 주력되어 왔음. 특히 흥분성신경전달물질인 글루타민산의 과도한 유리후 NMDA 수용체의 과활성, 세포내 산화적 손상인자의 증가 및 항산화계의 붕괴, nitric oxide/peroxynitrite의 생성에 관한 연구가 주를 이루어 왔음. 또한 기존의 연구 결과들은 세포사멸의 기능적, 형태학적 구분을 시도하여 이를 크게 necrosis와 apoptosis로 대별하였으며 주로 연구의 초점이 되어온 것은 신경세포의 apoptosis의 매개 혹은 조절인자와 그 기전의 규명이었음. 현재까지의 연구 결과들은 세포사멸 자극들은 다양한 경로를 거쳐 세포내 caspase등의 활성화를 유발하고 이것이 신경세포의 apoptosis를 매개함을 제시하고 있음 (Singh et al., 2001; Kirkland et al., 2001; Bachis et al., 2001). 최근 미토콘드리아가 이러한 과정에 중요한 역할을 담당하고 있음이 국내외 연구자들에 의해 속속 보고되고 있음. Caspase의 활성화에 미토콘드리아로부터의 cytochrome c 유리가 직·간접으로 연관되어 있으며 미토콘드리아 막전압의 탈분극은 신경세포의 necrosis 혹은 apoptosis와 연관되어 있음이 보고되고 있음 (Zhan et al., 2001; Whitfield et al., 2001; Letjens et al., 2001). 미토콘드리아는 세포내 에너지 생산에 필수적이며 신경세포의 사멸과 조절기전에 중요한 역할을 수행하고 있음. 본 연구자도 세포사멸에서 미토콘드리아가 매우 중요한 역할을 하고 있음을 밝힌바 있음 (Ju et al., 2000; Choi et al., 2000, 2001).

2. 교세포 활성화와 신경세포의 사멸

중추신경계는 약 10%의 신경세포와 90%의 교세포로 이루어져 있음. 교세포는 다시 90%의 성상세포 (astrocytes)와 나머지를 차지하는 소교세포 및 oligodendrocytes로 이루어져 있으며, 다양한 종류의 퇴행성 신경질환에서 교세포의 활성화가 관찰되어왔음. 뇌졸중의 경우 교세포의 활성화가 매우 빠른 시간 내에 일어남. 허혈성 뇌졸중 발병 후 수시간 내에 소교세포의 활성화가 관찰되며, 수십시간 후에 성상세포의 활성화가 관찰되고 이는 수개월간 유지되기도 함(그림 1). 알츠하이머병의 경우에도 senile plaque의 형성에 소교세포가 중요한 역할을 한다는 것은 매우 잘 알려져 있음. Ibuprofen등과 같은 소염제가 senile plaque의 형성을 억제하며 치매 발병을 예방할 수 있다는 것이 중요한 예임. 최근 말초 혈액 혹은 활성화된 교세포



포에서 생성되는 cytokine류 등이 흥분성 신경전달 물질, 간질, 퇴행성 신경질환에 의한 신경세포 독성을 유발하는 인자임이 파악되었음 (Combs et al., 2001).

그림 1. 허혈후 소교세포 및 성상세포의 시간 의존적 활성화도

허혈 후 교세포의 활성화에 대해서 많은 연구보고가 되어 있으나 활성화된 교세포가 허혈 후 신경세포에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 초보 단계임. 최근 Hewette 등은 활성화된 교세포가 신경세포의 사멸에 영향을 미칠 수 있다는 것을 발표하였음.(Hewette et al., 1994: 1996) 그러나 이들 연구자들의 이에 의한 지속적 연구는 이루어지지 않았음. 본 연구자는 1998년 이후 활성화된 교세포와 신경세포의 사멸에 관한 상호관계에 대하여 연구해왔으며 활성화된 소교세포에 의해 NMDA 혹은 포도당결핍에 의한 신경세포 독성이 증가된다는 것을 밝힌바 있음 (Choi and Kim, 1998; Kim et al., 1999) (그림 2). 이러한 신경세포 사멸 증가는 inducible NO synthase (iNOS)의 발현증가에 기인하는 것으로 밝혀졌음 (Choi and Kim, 1998; Kim et al., 1999).

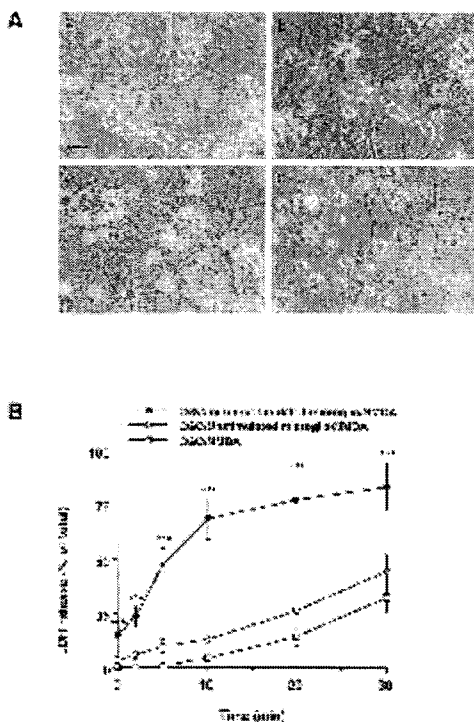


그림 2. Potentiation of NMDA-induced injury of cerebellar granule neurons by co-culture with immunostimulated microglial cells. A) CGC were co-cultured with unstimulated microglial cells without (a) and with (b) a 10-min exposure to 1 mM NMDA. c-d) CGC were co-cultured with immunostimulated microglia without (c) and with (d) a 10-min exposure to 1 mM NMDA. Micrographs were taken 20 hours after NMDA treatments and are representative of 4 separate experiments. Bar = 25 μ m. B) Time course of cell viability. CGC alone or in co-culture with unstimulated microglia or with immunostimulated microglia were incubated in the absence (time = 0 min) and presence (for the indicated times) of 1 mM NMDA. LDH levels were determined 18 - 22 hours later. N=6. *** P<0.001: compared to the amount of LDH released from the co-cultures of unstimulated microglia and CGC treated with NMDA at each corresponding time point; analysed for statistical significance using two-way ANOVA followed by Scheffes test for multiple comparison

3. 활성화된 교세포의 증가된 사멸

최근의 연구결과는 허혈 후 신경세포뿐만 아니라 교세포도 사멸됨을 보임. 일반적으로 교세포의 생존률은 신경세포에 비하여 높은 것으로 알려져 왔음. 그러나 최근 일련의 논문들이 허혈 시 교세포가 신경세포에 비하여 먼저 죽게 된다는 것도 보고하고 있어 이에 대한 관심이 크게 증가하고 있음 (Borlongan, 2000). 허혈 후 교세포의 사멸은 신경세포에서와 같이 활성산소종의 과생성, 에너지원의 공급 저하, 산소 공급저하에 기인하는 것으로 보임. 그러나 최근

본 연구자는 교세포의 사멸이 정상적인 조건에서는 쉽지 않으나 교세포가 활성화된 후에 세포 독성에 매우 취약하게 된다는 것을 밝힌바 있음 (Choi and Kim, 1998). 본 연구자는 일차 배양한 교세포를 IFN- γ 와 IL-1 β 혹은 IFN- γ 와 LPS으로 활성화 시키면 이들 교세포가 에너지원 결핍이나 산소결핍에 매우 민감하게 반응하여 빠르게 죽게 된다는 것을 보고하였음. (그림. 3)

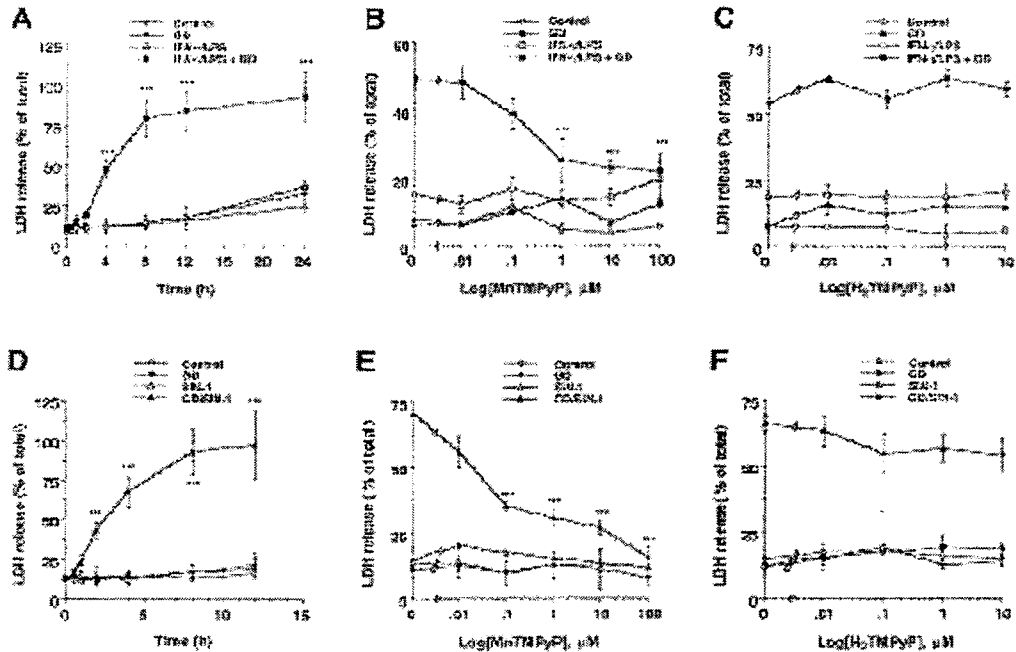


그림 3. Time course of cell viability. A. Control and immunostimulated glial cells were incubated in the absence (GD) and presence of 5.5 mM glucose for various periods of time. B - C. Immunostimulated glial cells were deprived of glucose for 6 h in the absence and presence of various concentrations of MnTMPyP (B) and H₂TMPyP (C). D. Glial cells were deprived of glucose in the absence and presence of SIN-1 (200 mM) for various periods of time. E - F. Glial cells were simultaneously exposed for 4 h to glucose deprivation and SIN-1 (200 mM) in the absence and presence of various concentrations of MnTMPyP (E) and H₂TMPyP (F). LDH levels were determined at 24 h (A), 12 h (D), 6 h (B and C) or 4 h (E and F) after starting the glucose deprivation. N=5 (A and D), 4 (B, E and F), and 3 (C). ***p<0.001: significant differences from the LDH releases at time 0 (A and D) or from immunostimulated (B) or SIN-1-treated (E) glial cells deprived of glucose in the absence of MnTMPyP.

4. 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴

일반적으로 교세포의 생존률은 신경세포에 비하여 높은 것으로 알려져 왔음. 이러한 교세포의 높은 생존율은 교세포의 항산화시스템에 의존하는 것으로 알려져 있으며 환원성 글루타치온(reduced glutathione)이 주요 항산화시스템으로 알려져 있음.

본 연구자는 면역활성화된 교세포는 정상 교세포와 달리 세포내 환원성 글루타치온을 급격히

소실하게 되어 peroxynitrite의 산화적 손상에 쉽게 취약해 지는 것을 발견하였음(Ju et al., 2000). Peroxynitrite에 의한 교세포의 사멸은 미토콘드리아 막저압(mitochondria transmembrane potential, MTP)의 탈분극을 유발함으로써 야기되peroxynitrite의 생성을 저해하는 porphyrin화합물에 의해 세포 사멸 및 MTP 저하가 억제되었음(Choi et al., 2000, 2001) (그림 3). 또한 본 연구진은 활성화된 교세포의 세포내 에너지(ATP) 수준이 크게 저하되며, 이러한 저하는 NO 및 peroxynitrite에 의해 매개됨을 규명한 바 있음 (Shin et al., 2001). 또한 본 연구의 예비 연구 결과로서 활성화된 교세포의 포도당 결핍성 세포 사멸은 에너지 전구물질인 Creatine등의 보충에 의해 억제됨을 확인하였음. (unpublished results).

교세포는 일반적으로 신경세포에 환원성 글루타치온을 공급함으로써 활성산소종에 대하여 신경세포를 보호하고 있는 것으로 알려져 있음. 이러한 교세포가 면역활성화된 후 활성산소종의 독성에 쉽게 취약해지고 세포내 환원성 글루타치온 함량이 크게 저하되는 것은 신경세포의 사멸이 증가되는 것을 쉽게 설명해주고 있음.

5. 아포토시스성 세포사멸과 세포주기의 상관관계

세포의 사멸은 괴사성 사멸(necrosis)과 아포토시스성 사멸(apoptosis)로 대별됨. 특히 아포토시스성 사멸의 경우 특정한 단백질이 세포사멸에 관여하는 것으로 예상되며 이는 단백질 합성억제제에 의하여 세포사멸이 억제되는 것으로 보아 알 수 있음. 최근 몇몇 연구는 세포주기 억제제가 여러 가지 사멸 조건에서 세포사멸을 억제하는 것으로 보고하였음. Camptothecin 유발 신경세포사멸이나 신경성장인자 제거 후 약이 되는 PC12 cell의 사멸을 mimosine, ciclopirox 등의 G1/S phase blocker들이 억제하였음(Farinelli and Greene, 1996; Park et al., 1997). 본 연구자는 활성화된 교세포가 에너지 결핍시 빠른 시간내에 죽게 되는 것이 세포증식속도에 의존적이란 것을 밝힌바 있음 (Choi and Kim, 1998). 따라서 이러한 활성화된 교세포의 세포사멸은 세포주기를 억제함으로써 조절할 수 있을 것으로 예상된다. 최근 본 연구자는 mimosine, ciclopirox 등의 G1/S phase blocker들이 이러한 활성화된 교세포의 세포사멸을 억제하는 것을 발견하였으며 지속적인 세포사멸 억제에 관련하는 기전연구를 수행하고 있음(그림 4).

6. 허혈에 의한 중추면역계 활성화에 대한 면역억제제의 효과

허혈은 소교세포 및 성상세포의 활성화를 유발함. 허혈동물모델에서 교세포의 활성화는 면역억제제 cyclosporin A의 투여로 억제된다고 보고되어 있음(Li et al., 2000; Wakita et al., 1995; Kondo et al., 1995; Pakzaban et al., 1995). 또한 이러한 교세포의 활성화는 cyclophosphamide나 cytarabine(Cyt-A)에 의해서도 억제되는 것이 보고되었음(Gould and Goshgarian, 1999). Cyclophosphamide나 cytarabine(Cyt-A)에 의한 교세포의 활성화 억제는 세포분열 억제작용에 기인하는 것으로 보임. Cyclosporin A에 의한 교세포 활성화의 억제는 prednisolone과 azathioprine의 병용투여에 의하여 효과가 증강되는 것으로 보고되었음(Pedersen et al., 1997). 그러나 이러한 면역억제제나 세포분열 억제 작용을 가지는 약물(일종의 항암제)들이 허혈시 야기되는 신경세포나 교세포의 사멸에 어떠한 영향을 미치는지는 알려져 있지 않음.

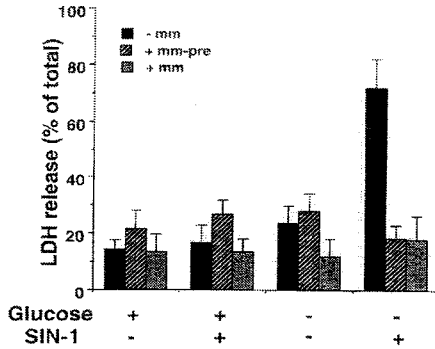


그림 4. Effect of mimosine on the increased death of immunostimulated and SIN-1-treated astrocytes deprived of glucose. Astrocytes pre- and co-treated with mimosine were exposed to SIN-1 during a 4-h glucose deprivation. LDH levels were determined 4 h after starting the glucose-deprivation.

이상의 연구 업적 및 예비 연구 결과들은 허혈 등의 에너지 결핍조건에서 활성화된 교세포가 신경세포 및 교세포 자신의 손상이나 사멸을 크게 증가시키는 것을 보여주고 있음 (그림 5). 이러한 세포사멸의 증가는 정상세포내 환원성 글루타치온을 급격히 소실로 인해 일어나는 것으로 보여짐. 또한 이러한 세포 사멸은 세포주기억제제에 의해 조절될 수 있으며 일반적인 면역억제제에 의하여 그 활성이 조절 될 수 있음을 보여주고 있음.

Ischemic insult

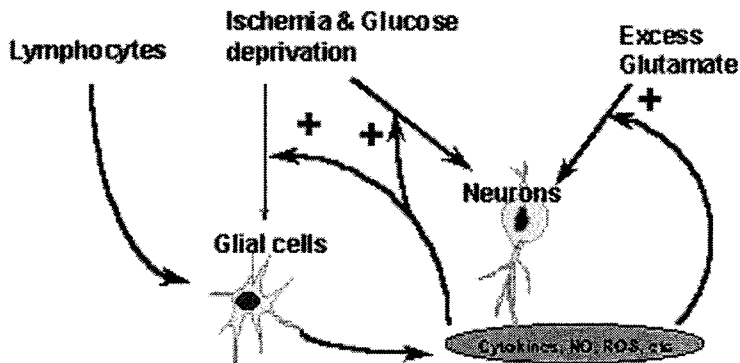


그림 5. 활성화 교세포의 신경세포 및 교세포 사멸에 미치는 영향

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: 1차년도 세부 연구 내용 및 결과

1. 허혈 유발 동물모델에서 교세포의 활성화와 뇌세포의 사멸과의 상관성 연구 (80%)
 - 허혈 유발 동물모델에서 교세포의 활성화 정립 (50%)
 - 교세포의 활성화와 뇌세포 사멸의 상관관계 연구 (30%)
2. 일차배양된 세포에서 면역억제제와 세포주기억제제의 효과 검색 (20%)

가. 허혈 유발 동물모델에서 교세포의 활성화와 뇌세포의 사멸과의 상관성 연구 (80%)

(1) 뇌허혈 모델 생성 및 신경행동학적 결과

저빌의 양측 온목동맥의 폐쇄 후 망막중심동맥으로 혈액의 흐름을 조사함. 해부학적으로 저빌의 경우 circle of willis이 불완전하기 때문에 global ischemia model로 이용됨. 95 %이상 뇌허혈이 일어남. 또한 허혈이 일어난 저빌은 활동성이 크게 저하되고, 몸이 활처럼 움크리는 자세를 취함. 한편, 망막중심동맥으로 혈액이 흐르는 저빌은 실험군에서 제외시킴.

랫드의 중간대뇌동맥 폐쇄여부를 확인하고자 랫드의 오른쪽 속목동맥 내로 약 17 mm의 실리콘 코팅된 나일론실을 삽입하고 1 시간에서 신경행동학적 검사를 수행한 결과 랫드의 꼬리를 완전히 들었을 때 왼쪽의 국부마비 (left hemiparesis) 및 왼쪽으로의 자발적인 circling이 일어남이 관찰되었으며, 수술한 랫드의 90 % 이상의 높은 성공률을 가지고 비교적 용이하게 뇌허혈을 유발시킬 수 있었음. 한편, 수술 후 circling이 일어나지 않은 랫드는 실험군에서 제외시킴.

(2) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining

일시적인 (transient) MCAO에 의한 뇌손상을 일차적으로 평가하기 위하여 TTC 용액으로 염색하고, 경색용적 (total infarct volume)을 측정하였음. 정상조직은 미토콘드리아 효소들이 TTC를 환원시킴으로써 진한 적색으로 염색되나, 손상된 조직은 미토콘드리아 손상에 의해 환원력을 소실함으로써 정상조직과 구분되어 짐. 각 실험군 뇌의 후각망울을 제외하고, 앞쪽으로 부터 2 mm 두께로 연속 절단한 6개 절편을 TTC 염색한 결과 2, 3 및 4번째 조직에서 뚜렷한 경색부위가 관찰되었음. 전체 경색용적은 허혈 1일에서 $310 \pm 23 \text{ mm}^3$ 으로 측정되었음. 또한, 경색이 일어난 대뇌반구에서 부종 (edema)이 관찰되었으며, 부종율은 $24 \pm 4 \%$ 로 나타났다.

(3) 조직학적 염색

- Global ischemic model

해마 (hippocampus) CA1부위의 신경세포 손상을 cresyl violet으로 염색하여 관찰하였음. 허혈 유발 후 2일까지 손상받은 신경세포가 관찰되지 않았음.

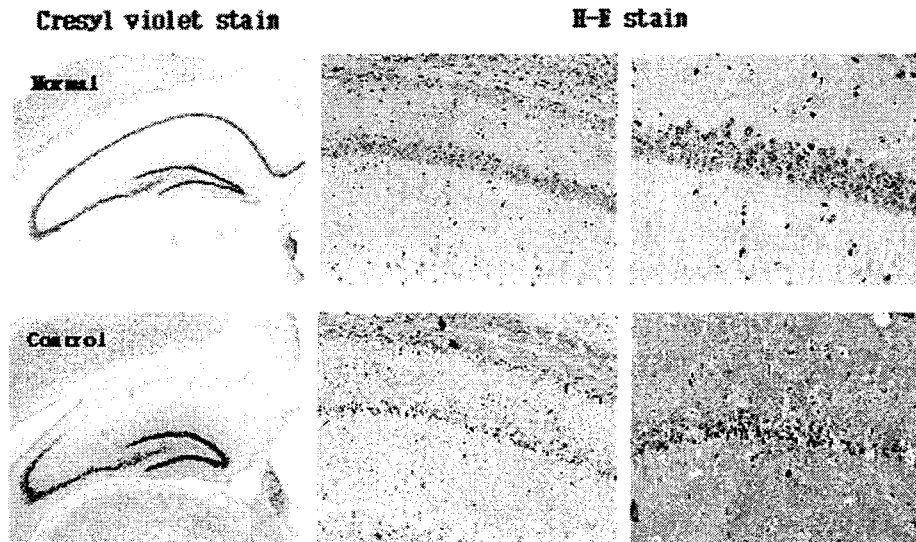


그림. 1. 허혈군과 정상군의 세포사멸

4일에서 신경세포의 위축 (shrinkage) 및 핵응축 (pyknosis)이 보였고, 일부 세포는 소실되었음. 이러한 신경세포의 소실은 7일에 더욱 증가하여 정상군과 비교하여 약 25 % 만이 존재하였음 (Fig. 1).

- Focal ischemic model

허혈을 2시간 유발하고 시간경과에 따른 조직학적 변화를 관찰하고자 cresyl violet 염색을 수행 하였음. 정상군의 대뇌피질은 표면쪽에서 안쪽으로 분자층 (molecular layer), 외과립층 (external granular layer), 외피라미드층 (external pyramidal layer), 내과립층 (internal granular layer), 내피라미드층 (internal pyramidal layer) 및 다형층 (multiform layer)으로 구분되었음. 선조체 (striatum)는 미상핵 (caudate nucleus)과 조가비핵 (putamen)으로 구성되고, 이들 세포들은 밀집되어 있으며 가는 섬유 다발이 관찰되었음. 허혈 후 3시간에서 허혈이 유발된 중심부위 (ischemic core region)에서 신경세포가 감소하였음. 시간이 지남에 따라 세포 소실이 증가하여 1일에서는 cresyl violet에 염색된 신경세포들이 관찰되지 않았으며, 일부 교세포만이 관찰되었음. 중심부위와 경계를 이루는 주변부위 (ischemic penumbra region)의 신경세포에서는 세포질 위축 및 핵응축 소견이 관찰되었음. 한편, 선조체에서도 바깥쪽 허혈 중심부위의 신경세포들은 cresyl violet에 염색되지 않았으며 주변부위에 손상받은 세포들이 관찰되었음. 4일의 경우 허혈 중심부위를 중심으로 혈관이 확장되고 혈관 내에 염색세포가 관찰되었음. 7일군에서 이들 세포들이 조직내로 침윤하여 세포가 소실된 부위를 중심으로 넓게 분포하였음. 이러한 세포들의 침윤이 점차 주변부위로 확대되었음. 또한, 정상교세포들이 밀집되어 glial scar를 형성하여 정상조직과 손상조직의 경계를 이루고 있었음. 한편, 15일에서는 허혈 중심부위로부터 조직의 괴사가 일어나 공포가 관찰되고 주변부위에서만 일부 세포들이 염색되었음. 한편, 일시적인 MCAO에서 H-E 및 acid fuchsin 염색을 통하여 세포변성을 확인하였음. 24시간에서 허혈 중심부위와 주변부위의 경계가 두드러지게 관찰되었으며, 중심부위에서 H-E에 염색된 신경세포들은 거의 소실되고, 일부 교세포들이 염색되었음.

주변부위에서는 신경세포와 교세포가 같이 분포하였는데 많은 수의 신경세포가 세포질 위축 및 핵응축의 소견을 보였다. 이러한 세포들은 acid fuchsin 염색에서도 뚜렷하게 확인되었음 (Fig. 2).

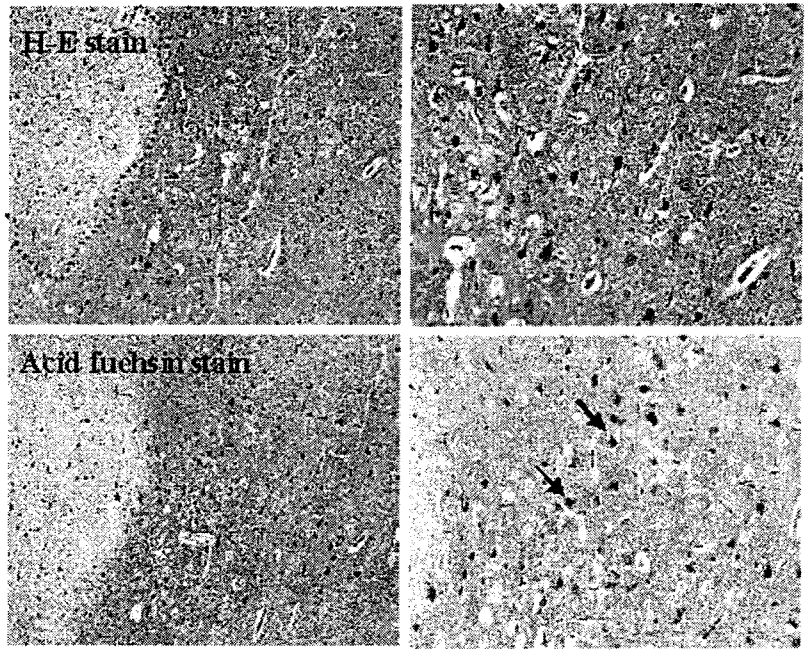


Fig. 2. 허혈군에서 H-E 및 Acid fuchsin staining

(4) 허혈에 의한 신경세포 및 교세포에 대한 면역조직화학적 염색

(가) 신경세포

- Global ischemic model

Global ischemic model에서 MAP-2 (microtubule associated protein-2) 항체를 이용하여 시간 경과에 따른 해마의 CA1지역 신경세포의 변화를 알아보려고 면역조직화학적 염색을 수행하였음. 정상군은 피라밋세포들이 면역염색되어 고르게 분포하였는데 주로 아래로 길게 뻗은 세포돌기들에서 관찰되었음. 4일에서 이들 세포체에서 면역반응이 증가하였고, 세포체는 위축되었음. 이들 세포의 세포돌기들은 불규칙하게 단절된 형태로 염색되었음. 이러한 경향은 7일에서 더욱 뚜렷하여 일부 위축된 세포체에서만 관찰되었음.

- Focal ischemic model

일시적인 중간대뇌동맥의 폐쇄로 대뇌피질 신경세포의 변화를 알아보려고 MAP-2 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 수행하였음. 정상군에서 면역염색된 세포돌기들이 전체에 고르게 분포하였으며, 이들은 위아래로 방향으로 길게 뻗어 있었음. 1일에서 허혈 중심부는 신경세포 소실로 인하여 면역반응이 관찰되지 않았으나, 주변부의 세포들은 돌기가 불규칙하게 비후되거나 단절된 형태로 염색되었음. 한편, 대뇌피질의 5번째 층에서 일부 피라밋세포들의 세포체에 강한 면역반응이 관찰되었음. 그러나, 4일에서 이들 세포들이 소실되어 염색성이 사라지고 세포돌기가 짧게 단절된 형태로 매우 약하게 염색되었음.

(나) 성상교세포

- Global ischemic model

전뇌 허혈에 따른 해마의 신경세포 손상에 대하여 성상교세포의 활성화 정도를 알아보고자 성상교세포의 marker인 GFAP (glial fibrillary acidic protein) 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였음. 정상군의 해마에서는 면역염색된 세포가 관찰되지 않았음. 1일에서는 hippocampal fissure 부위의 세포들에서 염색되었으나 다른 부위는 정상군과 비교하여 차이가 관찰되지 않았음. 한편, 2일에서 해마의 다형층 (polymorphic layer) 및 분자층 (molecular layer)에서 면역염색된 세포가 증가하기 시작하여 7일에서는 매우 높게 관찰되었음. 이들 염색된 세포들은 세포체 및 돌기의 비후가 뚜렷하였으며, 수적으로도 증가하였음.

- Focal ischemic model

일시적인 focal ischemic model에서 신경세포의 손상과 성상교세포의 관계를 보고자 GFAP에 대한 면역조직화학염색을 실시하였음. 정상군의 조직내 면역염색된 세포들이 관찰되지 않았으나, 중심부위 혈관에 인접한 일부 성상교세포들에서 염색성이 나타났음. 이들 세포의 돌기는 매우 가늘고 여러개로 분지되었다. 1일에서는 면역반응이 증가하여 나타났음. 주로 대뇌피질의 제일 상층인 분자층에서 염색된 세포들이 많이 관찰되었는데, 이들은 굵은 세포돌기들이 여러 방향으로 뻗어 있었음. 또한, 주변부위 혈관과 인접한 성상교세포에서 염색되었고, 정상군과 비교하여 긴 세포돌기를 가지고 있었음. 한편, 주변부위 밖의 손상 받지 않은 부위에서도 가는 돌기를 가진 세포들이 염색되었음. 4일에서 주변부위를 중심으로 많은 수의 성상교세포가 염색되었음. 즉, 중심부위와 인접한 성상교세포들은 돌기들이 중심부를 향해 길게 뻗고 있었음. 그리고 손상 받지 않은 부위의 세포들은 매우 가느다란 돌기를 가진 세포만이 관찰되었음.

(다) 소교세포

- Global ischemic model

전뇌 허혈에 따른 해마의 신경세포 손상에 대하여 소교세포의 활성화 정도를 알아보고자 Isolectin B4를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였음. 정상군의 해마에서는 면역염색된 세포가 관찰되지 않았음. 4일에서 해마층 주변부에서 면역염색된 세포가 증가하기 시작하여 7일에서는 매우 높게 관찰되었음. 이들 염색된 세포들은 세포체 및 돌기의 비후가 뚜렷하였으며, 수적으로도 증가하였음.

- focal ischemic model

뇌허혈에 의한 교세포의 활성화 정도를 확인하고자 major histocompatibility complex class II antigen을 인식하는 OX-6 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였음. 정상군을 포함한 허혈 유발 후 12시간까지 이들 항체에 면역반응된 세포들이 관찰되지 않았음. 1일에서 혈관을 둘러싸는 부위 및 그 주변부위의 세포에서 염색되었음. 이들 타원형의 세포들은 크기가 커져 있었고, 돌기는 매우 작거나 없는 것으로 관찰되었음. 이러한 면역염색된 세포들은 4 및 7일에서도 유사한 소견을 보였음. 한편, 7일에서 선조체의 경우 허혈 주변부위에서 염색된 세포들 중에서 길고 많은 돌기들을 가진 세포들이 보였음.

허혈 후 major histocompatibility complex class I antigen을 가진 교세포를 확인하고자 marker인 OX-18 항체로 면역조직화학염색을 수행하였음. 정상군 및 12시간에 면역염색된

세포들이 관찰되지 않았으나, 1일에서는 염색반응이 관찰되었음. 염색된 세포들은 신경세포에 비하여 작고, 짧은 돌기들을 가졌음. 또한, 혈관에 인접한 세포 및 혈관벽에서도 관찰되었음. 4일에서는 면역염색성이 더욱 증가하였음. 중심부위의 경우 대뇌피질에서는 세포표면 및 일부 세포돌기에서 면역반응을 보였음. 하지만 선조체는 주로 세포표면에만 국한되어 반응하였음. 한편, 대뇌피질 및 선조체의 주변부위에서는 신경세포 주변에 있는 세포에서 관찰되었음. 이들은 작고 많은 세포돌기를 가진 세포에 진하게 염색되었음. 이러한 OX-18에 대한 면역염색성은 7일군에서 더욱 증가하였음.

Focal ischemic model을 통해 뇌조직의 손상과 교세포의 활성화의 관계를 보고자 lysosomal antigen의 marker인 ED-1에 대한 면역조직화학염색을 실시하였음. 허혈 후 12시간에서 뇌를 둘러싸고 있는 막 및 허혈 중심지역 내 혈관 주변 세포에서 염색되었고, 타원형의 작은 세포들로 구성되었음. 이후 주변부위까지 더욱 증가하여 4일군에서는 모든 조직내에서 관찰되었음. 먼저 허혈 중심부위의 염색된 세포들은 주로 타원형으로 세포가 많이 밀집되었고, 주변부위에서는 타원형 및 짧은 돌기를 가진 세포들이 관찰되었음. 한편, 허혈 주변부위와 인접한 손상 받지 않은 곳의 세포에서도 염색된 세포들이 관찰되었음. 이들은 많은 돌기들이 길게 뻗어 주변의 신경세포와 인접하거나 감싸고 있는 모양으로 관찰되었음.

Leukocyte common antigen을 인식하는 OX-1에 대한 면역조직화학염색을 수행하였음. 허혈 유발 후 1일에서 허혈 중심부위 및 주변부위에서 염색된 세포들이 관찰되었고, 혈관의 주변에서 관찰되었음. 그러나, 시간 경과에 따라 OX-1에 염색된 세포들의 수는 증가되지 않았음.

(라). 허혈에 의한 교세포의 이중면역조직화학적 염색

Focal ischemic model에서 교세포의 marker인 ED-1, OX-6, OX-18들이 같은 세포에 공존하는지 알아보고자 이중면역조직화학염색을 실시하였음. 먼저 OX-6의 경우 ED-1 및 OX-18과 염색된 세포와 서로 공존하지 않았으며, ED-1 및 OX-18은 같은 세포에 공존함을 관찰하였음.

(5) 인위적인 교세포의 활성화

(가) 복강내 투여

Lipopolysachade (LPS)를 복강내 투여로 인위적인 교세포 활성을 유도하고, 교세포의 활성 정도를 GFAP 및 OX-42 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다. GFAP의 경우 정상군 및 LPS 투여 후 1 및 2일에서 염색된 세포가 대뇌피질 및 선조체에서 미약하게 관찰되었음. 한편, 2일에 뇌교량 (corpus callosum)에 있는 세포들이 정상군과 비교하여 매우 높게 염색되었음. 그러나, OX-42의 면역염색성은 GFAP와 차이를 보였는데, 2일에서 면역염색이 높게 증가되었음. 이들 세포들은 활성화된 형태인 두꺼운 세포돌기 및 세포체가 팽대되었음.

(나) 뇌실내 투여

LPS를 뇌실 내로 투여하여 교세포 활성을 유도하고, GFAP 및 OX-42 항체를 이용하여 교세포 활성정도를 확인하였다. 정상군의 대뇌피질 및 선조체에서 GFAP 및 OX-42에 대한 면역염색은 미약하였으나, 투여 후 4일에서는 면역염색이 증가되었음. 이들 세포는 굵은 세포돌

기 및 세포체 역시 팽대된 모양으로 활성화된 형태로 관찰되었음.

(다) LPS의 복강 및 뇌실 투여 후 허혈 유발시 신경세포사멸 감소 관찰됨. 이러한 관찰은 global ischemia와 focal ischemia 모두에서 관찰됨. 그러나 LPS 투여후 활성화의 정도와 허혈에 따른 신경세포사멸의 상관관계는 2차년도에 더 심도있게 다뤄질 예정임.

나. 일차배양된 세포에서 면역억제제와 세포주기억제제의 효과 검색 (20%)

(1) 면역억제제

면역억제제 prednisolone 및 wogonin이 활성화된 소교세포에서 NO, TNF- α 의 생성, 유리를 억제하였으며 이들에 대한 mRNA expression을 억제함.

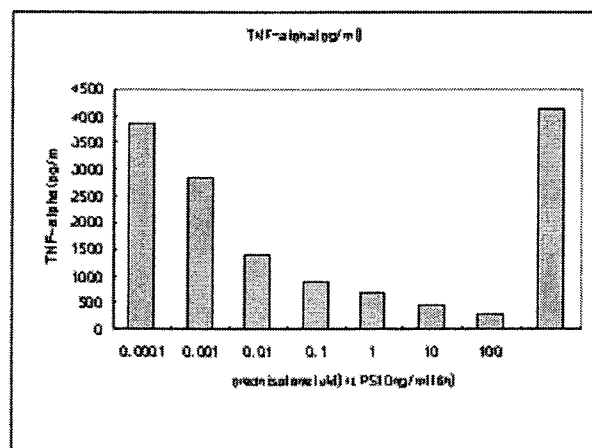


Fig. 3. LPS 활성화 소교세포에서 prednisolone에 의한 TNF- α 생성 억제

(2) 세포주기억제제

세포주기 G0/G1과 S phase의 transition을 억제하는 것으로 알려진 ciclopirox 및 mimosine이 활성화된 교세포에서 peroxynitrite의 독성을 억제하는 것이 관찰됨. Mimosine는 세포주기 억제 역할을 가지고 있으나 세포 사멸과 관련하여서는 peroxynitrite의 제거 효과가 세포사멸억제 기전으로 생각됨. Ciclopirox는 세포주기 억제 역할을 가지고 있으나 세포 사멸과 관련하여서는 미토콘드리아 기능 보호작용이 중요한 의미를 지니는 것으로 관찰됨. 이러한 연구결과는 간세포에서 분리하여 얻은 미토콘드리아에서도 직접적으로 관찰되었으며, ciclopirox가 활성산소종에 의한 미토콘드리아의 막전압 탈분극과 팽화를 억제하는 것이 관찰됨.

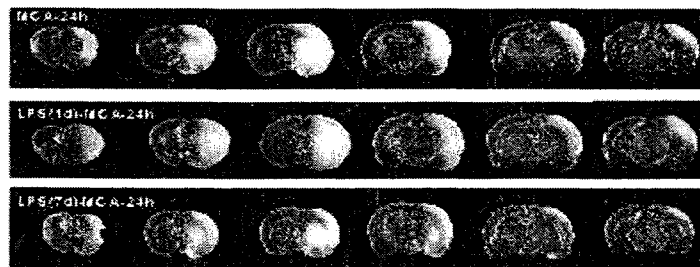
제 2 절: 2차년도 세부 연구 내용 및 결과

1. 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴와 신경세포 및 교세포 사멸의 상관관계 연구(50%)
 일차배양된 세포에서 인위적인 교세포 활성화 후 항산화시스템 변동 연구
 흰쥐의 두뇌 교세포를 인위적으로 활성화 후 항산화시스템 변동 연구
2. 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴와 신경세포 및 교세포 사멸의 상관관계 연구(30%)
 허혈동물모델에서 ▶ 뇌세포(신경세포 및 교세포)사멸의 명확한 측정
 ▶ 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴와 신경세포 및 교세포 사멸의 상관관계 연구
3. 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴 조절 (20%)
 허혈동물모델에서 ▶ 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴에 대한 면역억제제와 세포주기억제제의 효과 검색

(가) Lipopolysaccharide (LPS, 5 ug/5 ul)를 corpus calosum으로 microinjection 하면 ipsilateral hemisphere의 교세포 활성화가 유도 됨. 그러나 striatum이나 대뇌피질에 주입시 국소부위에서만 교세포의 활성화가 나타남. LPS를 corpus calosum으로 microinjection하여 나타나는 교세포의 활성화는 ED-1이나 B4-isolectin의 면역 염색으로 볼 때, LPS 주입후 하루째 가장 강하게 나타나며 소교세포나 monocyte는 형태학적으로 둥근(round-shaped), 식세포모양을 띰. 그러나 3일 이후에는 ED-1이나 B4-isolectin의 면역염색정도가 약화되고 모양도 ramified form으로 바뀜.

(나) (그림 4A, 그림 4B) LPS를 corpus calosum으로 microinjection하고 하루 뒤 MCAO를 하면 뇌조직 손상이 크게 일어남. 하지만 LPS를 corpus calosum으로 microinjection하고 7일 뒤에 MCAO를 하면 뇌조직 손상이 크게 줄어듦. 이러한 형상은 iNOS 의존적으로 일어나며 글루타치온 함량과 관련되어 있음. 따라서 iNOS 발현은 일찍 일어나고 이때 글루타치온의 함량이 크게 줄어 들어 있으나 7일 째는 iNOS 발현이 매우 적고 뇌조직에서 글루타치온의 함량이 정상적으로 회복되어 있음.

A)



B)

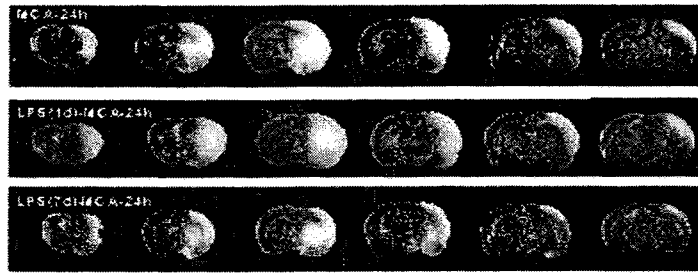


그림 4. A) LPS 주입후 1일 쯤 MCAO에 의한 뇌조직 손상의 증가
B) LPS 주입후 7일 쯤 MCAO에 의한 뇌조직 손상의 저하

(다) LPS를 corpus calosum으로 microinjection한 뒤 MCAO를 하면 SOD-2의 발현이 크게 증가됨. LPS 주입후 시간이 지나면서 SOD-2의 발현이 약간 증가되는 것으로 보임. 처음 예상은 LPS 투여군에서 MCAO를 하면 SOD-2의 발현이 크게 감소할 것을 예상하였으나 실제 SOD-2의 발현이 크게 증가되었음. 따라서 아마도 보상작용이 일어난 것으로 보임

(라) 정상군, LPS 투여군, MCAO군, LPS 투여후 MCAO군인 경우 신경세포나 성상세포의 사멸들을 명확히 그리고 신속히 이뤄지는 것이 필요함. 본 연구책임자는 fluoro-Jade를 사용하여 세포사멸을 명확히 관찰할 수 있었음.

(마) LPS를 corpus calosum으로 microinjection한 뒤 MCAO를 하면 뇌손상이 크게 증가하는 것이 관찰되는데 이러한 세포사멸의 증가는 iNOS 혹은 non-specific NOS 억제제인 aminoguanidine 및 N^G -nitroarginine에 의하여 억제됨. 이러한 억제는 특히 허혈 주변부 (penumbra region)에서 더욱 명확히 나타났음. 이러한 결과는 항산화효력을 가지는 글루타치온의 함량과도 밀접한 관계가 있음.

(바) DWN-series 약물은 강력한 면역억제 작용을 가지고 있으며 MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 보호 작용을 가지는 것이 관찰 되었음. 특히 DWN-006은 독성이 나타나지 않는 범위에서 MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 유의성있는 보호 작용을 나타냄 (Fig. 5). DWN-006은 또한 말초조직에서 면역세포가 뇌조직으로 밀려들어 오는 것을 억제 하는 효과도 가지고 있고 면역세포내 cAMP의 생성을 증가 시켜 여러 가지 면역세포 억제 작용과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 관찰 됨.

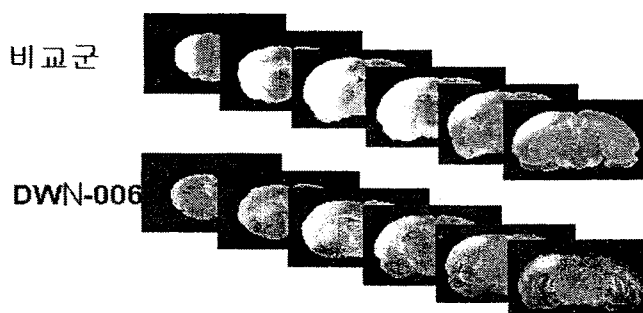


그림 5. DWN-006에 의한 MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대한 보호 작용

제 3 절: 3차년도 세부 연구 내용 및 결과

1. 면역억제와 세포사멸억제와의 상관관계 연구 (50%)

면역억제와 세포사멸억제와의 상관관계 규명

: pro- and anti-inflammatory cytokines의 생성 유리와 세포사멸 억제와의 상관관계 연구

2. 세포주기 조절과 세포사멸억제와의 상관관계 연구 (25%)

세포주기 조절과 세포사멸억제와의 상관관계 연구

세포주기조절효소의 활성화 및 발현 연구

3. 미토콘드리아의 기능 조절에 대한 연구 (25%)

미토콘드리아의 기능 조절에 대한 연구

가. LPS 투여 후 허혈에 의한 뇌세포사멸에 cytokines의 영향 및 면역억제제의 효과

LPS를 뇌교량 내 투여 후 1일에서 MCAO를 한 다음 재관류 0 및 3시간에서 RT-PCR, RPA 및 면역조직화학염색을 수행함. pro-inflammatory cytokines인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA의 발현이 LPS(1d)/MCAO군에서 더욱 증가하였음 (Fig. 5). DWN-series 약물은 강력한 면역억제 작용을 가지고 있으며 LPS(1d)/MCAO 유발 뇌세포 사멸에 대하여 보호 작용을 가지는 것이 관찰 되었음 (Fig. 6). 특히 DWN-006은 독성이 나타나지 않는 범위에서 LPS(1d)/MCAO의한 말초조직에서 면역세포가 뇌조직으로 밀려들어 오는 것을 억제 및 pro-inflammatory cytokines mRNA의 발현을 감소시키는 것으로 관찰 됨.

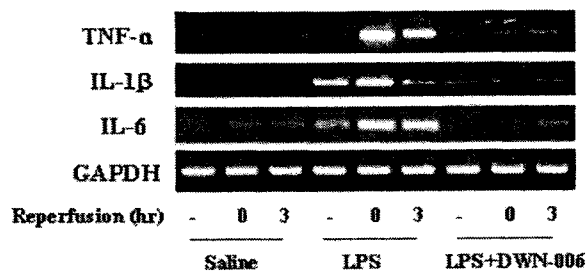


그림 6. LPS 투여후 1일째 허혈에 의한 염증성 사이토카인의 발현
과다 증가가 관찰되며 DWN-006에 의해서 감소됨.

나. 세포주기 조절과 세포사멸억제와의 상관관계 연구

세포주기 G0/G1과 S phase의 transition을 억제하는 것으로 알려진 ciclopirox 및 mimosine이 활성화된 교세포에서 peroxynitrite의 독성을 억제하는 것이 관찰됨. Mimosine는 세포주기 억제 역할을 가지고 있으나 세포 사멸과 관련하여서는 peroxynitrite의 제거 효과가 세포사멸억제 기전으로 생각됨. Ciclopirox는 세포주기 억제 역할을 가지고 있으나 세포 사멸과 관련하여서는 미토콘드리아 기능 보호작용이 중요한 의미를 지니는 것으로 관찰됨. 이

러한 연구결과는 간세포에서 분리하여 얻은 미토콘드리아에서도 직접적으로 관찰되었으며, ciclopirox가 활성산소종에 의한 미토콘드리아의 막전압 탈분극과 팽화를 억제하는 것이 관찰됨 (그림 7).

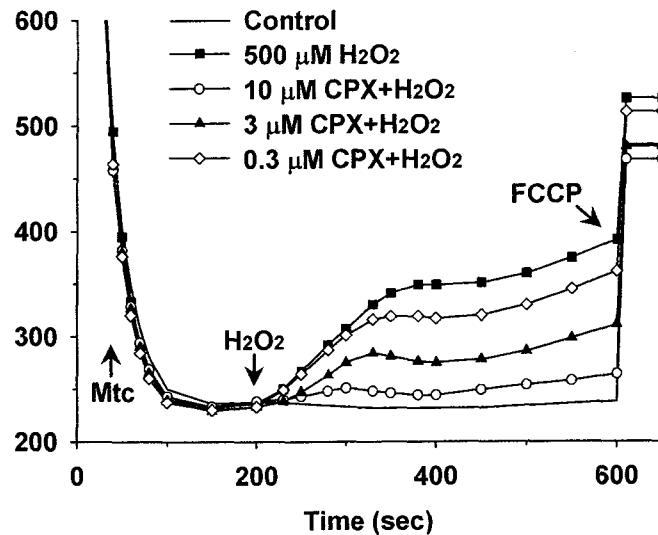


그림 7. CPX prevents H_2O_2 -stimulated m depolarization in cells. Fluorescence intensities were measured every 15 or 30 min for 3 h at 530 nm (J-monomer) and 590 nm (J-aggregate). Time 'zero' indicates the time of adding H_2O_2 and/or CPX after loading and washing out JC-1. Data are expressed as the ratios of aggregate fluorescence to monomer fluorescence. N=4.

다. 미토콘드리아의 기능 조절에 대한 연구 및 세포주기억제제의 효과

스트레스성 자극은 미토콘드리아에서 에너지원이 되는 ATP의 생성을 억제하고 칼슘의존적으로 미토콘드리아의 팽화(swelling)를 유발하게 되어 미토콘드리아의 손상과 함께 미토콘드리아 의존적인 세포사멸 유도물질인 cytochrome C를 유리하게 됨. 본 연구진은 세포주기억제제로서 DWE 유도체가 미토콘드리아의 기능 저하를 억제하는지 관찰한 결과 세포사멸이 100% 방지되며, 세포내 ATP level 저하를 억제하는, 등 그 효과는 탁월한 것으로 나타남. DWE 유도체는 세포내 미토콘드리아에 대한 작용이 매우 신속하게(수분 내에 효과 나타남) 나타남 (그림 8). 또한, 미토콘드리아의 손상은 미토콘드리아 막전압(mitochondrial transmembrane potential)과 미토콘드리아 막공(mitochondrial permeability transition pore)의 개폐에 의존적으로 일어남. DWE 유도체는 허혈에 의한 미토콘드리아의 손상을 막으며 따라서 이들 미토콘드리아 막전압 (MTP) 혹은 미토콘드리아 막공(MPTP)에 상호작용을 함으로써 약효를 나타내는 것으로 사료됨.

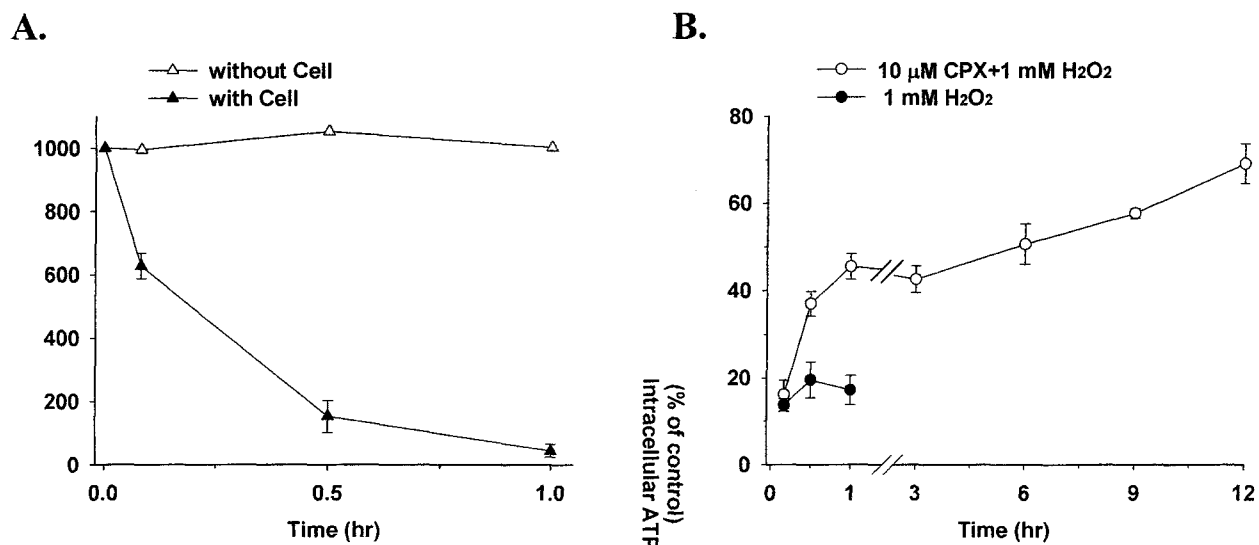


Fig. 8. CPX restores ATP levels depleted by H₂O₂. (A) H₂O₂ levels were determined in cell-free culture media (open triangle) and cell cultures (closed triangle). (B) ATP concentrations were determined in cells treated with 1 mM H₂O₂ in the absence and presence of CPX (10 μ M). In cells treated with H₂O₂ in the absence of CPX, ATP levels were measured only up to 1 h after addition of H₂O₂ due to cell injury or death. Data are expressed as a percent of the ATP level in control cells (not treated with H₂O₂). Sister cultures were used for both experiments. Data represent mean S.E.M. of five independent determinations.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1) 일차 배양된 세포에서 관찰된 활성화된 교세포가 신경세포의 사멸을 증가시키는 것이 실제 허혈 유발 동물모델에서도 일어남을 확인함으로써 면역활성화 교세포의 역할에 대한 이해를 증진시키게 되고 이에 대한 조절을 통하여 신경세포의 사멸을 억제할 수 있는 예방법 및 치료법 개발을 촉진할 것임.
- 2) 활성화된 교세포의 항산화시스템 붕괴가 신경세포 및 교세포 사멸의 원인으로 면역억제제 및 세포주기조절제가 신경세포 및 교세포의 사멸을 억제함으로써 또한 미토콘드리아의 기능, 세포내의 항산화계의 기능, apoptosis 매개 인자, 등 각종 세포사멸 조절인자들과 이에 미치는 세포주기조절제의 효과가 확인됨으로서 세포사멸 억제제 개발이 가능해 질 것임.
- 3) 세포주기조절제가 세포주기 억제 효과 외에 항산화시스템 붕괴와 미토콘드리아의 기능 조절기능을 있음을 확인함으로써 세포주기조절제가 질환치료제로 개발함으로써 신경계 질환 뿐만 아니라 세포사멸과 관련된 기타 질환, 예를 들면 간질환, 심장질환 등의 치료 및 예방에도 응용될 수 있음.

따라서 본 연구개발 결과는 허혈성 뇌세포사멸에서 중추면역계의 역할이 매우 중요하며, 이를 조절함으로써 뇌세포 사멸을 억제할 수 있음을 밝히는데 공헌을 하였음. 따라서 뇌세포 사멸을 조절할 수 있는 새로운 분야를 개척하게 됨으로써 향후 뇌세포 사멸과 관련된 연구의 수행에서 반드시 고려해야할 점을 제시 하게 된 것임. 또한, 면역억제제와 세포주기 억제제에 대한 특징을 규명함으로써 많은 연구자들이 향후 연구 계획 수립시 중요한 방향을 제시하게 될 것으로 사료됨.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구결과의 성공적인 수행은 뇌졸중 뿐만 아니라 활성화 교세포의 영향을 받는 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 두부외상 등의 퇴행성 신경질환에 대한 치료제 개발에 기여하게 될 것으로 사료됨.
- 본 연구과제에 사용되는 약물에 대한 완전한 이해와 함께 제약업계와의 지속적 연구를 통하여 보다 효율적인 약물을 개발할 것임.
- 본 연구과제의 결과를 제약회사 등에 기술이전하고 임상 연구기관과의 협력연구도 아울러 진행할 것임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제가 수행되는 동안 타 국가에서도 활성화 교세포가 뇌질환에서 매우 중요한 역할을 한다는 것에 더욱 많은 연구들이 행해지게 됨. 특히 2004년에는 Glia라고 하는 국제 학회지에서 허혈에 의한 뇌졸중에서 교세포의 역할이라는 special issue가 나올 정도로 그 중요도가 강조되고 있음. 하지만 본 연구에서 수행된 연구는 어떤 연구자들 보다도 앞서 있으며 특히 교세포 활성 조절제의 개발은 본 연구진에 의해서만 수행되어 충분한 경쟁력을 갖추고 있는 것으로 사료됨. 따라서 향후 이 분야에 대한 연구는 국제적 경쟁력을 갖추고 나가기 위하여 국가적 지원이 매우 절실한 상황임.

제 7 장 참고문헌

Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* (2000) 14:1307-1317.

Choi JJ, Kim WK Potentiated glucose deprivation-induced death of astrocytes after induction of iNOS. *J Neurosci Res.* (1998) 54:870-875.

Choi IY, Lee SJ, Ju C, Nam W, Kim HC, Ko KH, Kim WK Protection by a manganese porphyrin of endogenous peroxynitrite-induced death of glial cells via inhibition of mitochondrial transmembrane potential decrease. *Glia* (2000) 31:155-164.

Choi IY, Lee SJ, Nam W, Park JS, Ko KH, Kim HC, Shin CY, Chung JH, Noh SK, Choi CR, Shin DH, Kim WK. Augmented death in immunostimulated astrocytes deprived of glucose: inhibition by an iron porphyrin FeTMPyP. *J Neuroimmunol.* (2001) 112:55-62.

Farinelli SE and Greene LA Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. *J Neurosci.* (1996) 16:1150-1162.

Gould DJ, Goshgarian HG. The effects of mitotic inhibition on the spinal cord response to the superimposed injuries of spinal cord hemisection and peripheral axotomy. *Exp Neurol* (1999) 158(2):394-402

Hewett SJ, Csernansky CA and Choi DW Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* (1994) 13:487-494.

Hewett SJ, Muir JK, Lobner D, Symons A and Choi DW Potentiation of oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death after induction of iNOS. *Stroke* (1996) 27:1586-1591.

Ju C, Yoon KN, Oh YK, Kim HC, Shin CY, Ryu JR, Ko KH, Kim WK Synergistic depletion of astrocytic glutathione by glucose deprivation and peroxynitrite: correlation with mitochondrial dysfunction and subsequent cell death. *J Neurochem* (2000) 74:1989-1998.

Kim WK, Ko KH Potentiation of N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity by immunostimulated murine microglia. *J Neurosci Res* (1998) 54:17-26

Kim WK, Chung JH, Kim HC, Ko KH Nitric oxide-enhanced excitotoxicity-independent apoptosis of glucose-deprived neurons. *Neurosci Res* (1999) 33:281-289.

Kondo Y, Ogawa N, Asanuma M, Nishibayashi S, Iwata E, Mori A. Cyclosporin A prevents ischemia-induced reduction of muscarinic acetylcholine receptors with suppression of microglial activation in gerbil hippocampus. *Neurosci Res* (1995) 22(1):123-127

Li PA, Kristian T, He QP, Siesjo BK, Cyclosporin A enhances survival, ameliorates brain damage, and prevents secondary mitochondrial dysfunction after a 30-minute period of transient cerebral ischemia, *Exp Neurol* (2000) 165:153-163.

Pakzaban P, Deacon TW, Burns LH, Dinsmore J, Isacson O. A novel mode of immunoprotection of neural xenotransplants: masking of donor major histocompatibility complex class I enhances transplant survival in the central nervous system. *Neuroscience* (1995) 65(4):983-996

Park DS, Morris EJ, Greene LA and Geller HM G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* (1997) 17:1256-1270.

Pedersen EB, Zimmer J, Finsen B. Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood-brain barrier leakage. *Neuroscience* (1997) 78(3):685-701

Serkova N, Litt L, James TL, Sadee W, Leibfritz D, Benet LZ, Christians U. Evaluation of individual and combined neurotoxicity of the immunosuppressants cyclosporine and sirolimus by in vitro multinuclear NMR spectroscopy. *J Pharmacol Exp Ther* (1999) 289(2):800-806

Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kimura J. Protective effect of cyclosporin A on white matter changes in the rat brain after chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* (1995) 26(8):1415-1422

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서				
사업명	중사업명	국책연구개발사업		
	세부사업명	중점뇌신경생물학연구사업		
과제명	교세포 활성화가 허혈성 뇌세포사멸에 미치는 영향: 세포주 기억체제 효과 연구			
연구기관	이화여자대학교	연구책임자	김 원 기	
총연구기간	2001년. 8월. 1 일. ~ 2004년. 5월. 31일. (34개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	139,000	0	139,000	
기술분야				
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용 (교육,연구)(√)	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2004년 7월 25일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 김 원 기 (인) 연구기관장 : 신 인 령 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

세포의 사멸기전에 대한 기전을 연구함으로써 뇌질환을 치료하고자 하는 많은 노력이 기울여져 왔음. 그러나 뇌세포의 대부분을 차지하며 신경세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있는 교세포가 신경세포 사멸에 미치는 영향에 대한 연구는 도외시되어 왔음. 뇌졸중 등의 허혈성 뇌질환의 경우 허혈 부위에서 교세포의 활성이 관찰되며, 활성화된 교세포는 다양한 종류의 생리활성물질들을 생성 유리하며, 여러 가지 사멸조건에서 신경세포의 사멸을 증가시키며, 활성화된 교세포 자신도 여러 가지 사멸조건에 취약하게 됨. 이러한 세포사멸의 증가는 필연적으로 허혈성 뇌질환의 정도를 심하게 할 것으로 사료됨. 따라서 본 연구과제는 허혈 부위에서 일어나는 뇌세포의 사멸에 대한 활성화된 교세포의 역할에 대하여 연구하고 이를 조절함으로써 뇌세포의 사멸을 억제하는 방법을 개발하는 것을 연구목적으로 함.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
Glia	Mimosine prevents the death of glucose-deprived immunostimulated astrocytes by scavenging peroxynitrite	2002년 월 일	39	Wiley-Liss, Inc.	미국	○
Neuropharmacology	Ciclopirox prevents peroxynitrite toxicity in astrocytes by maintaining their mitochondrial function: A novel mechanism for cytoprotection by ciclopirox	2002년 월 일	43	Elsevier. Co	미국	○
Neurosci. Lett.	p38 mitogen-activated protein kinase mediates lipopolysaccharide, not interferon- γ , -induced iNOS expression in BV2 microglial cells	2002년 월 일	325	Elsevier. Co	미국	○
Neurosci. Res.	Blockade of peroxynitrite-mediated astrocyte death by manganese(III)-cyclam	2003년 월 일	45	Elsevier. Co	미국	○
계: 4 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
Euroglia2002	Wogonin reduces ischemic brain injury and microglial cell activation in rats	2002			이탈리아
Euroglia2002	Hydrogen peroxide induces astrocyte death via modulation of the activity of nuclear factor-kappa B	2002			이탈리아
FAONS	New compound KL1037 suppresses microglial activation by modulating cytokine expression, mitogen-activated protein kinase, and protein kinase A	2002			한국
Society for Neuroscience 32th Meeting	Acetylsalicylic acid maltol ester (AAME) attenuates methamphetamine-induced neurotoxicity in mice: Involvement of antiperoxidative effects	2002			미국
Society for Neuroscience 32th Meeting	Synergistic ATP depletion mediates the augmented death of rat primary astrocytes by immunostimulation and glucose deprivation	2002			미국
Society for Neuroscience 32th Meeting	Dimemorfan provides neuroprotection via activation of sigma-1 receptor and blocking L-type calcium channel; models of kainate and bay K-8644	2002			미국
Society for Neuroscience 32th Meeting	New Morphinan derivatives with negligible psychotropic effects attenuate convulsions induced by maximal electroshock in mice	2002			미국
계: 7 건수					

3. 연구성과

- 본 연구결과의 성공적인 수행은 뇌졸중 뿐만 아니라 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 두부의상 등에 의한 뇌질환에 대한 치료제 개발에 기여하게 될 것으로 사료됨.
- 또한 세포사멸에서 세포주기의 역할이 규명되고 세포주기 억제제를 질환치료제로 개발함으로써 신경계 질환뿐만 아니라 세포사멸과 관련된 기타 질환, 예를 들면 간질환, 심장질환 등의 치료 및 예방에도 응용될 수 있음.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

신경세포사멸에 관여하는 활성화된 교세포의 역할 및 그 기전 규명과 조절인자의 역할 파악에 의해 효율적인 신경손상 억제제의 개발이 가능해지므로 이러한 연구는 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 간질, 퇴행성 뇌질환시에 나타나는 신경손상의 억제제 개발이 가능할 것임. 또한 세포사멸(특히 아포토시스 세포사멸)에서 세포주기의 역할에 대한 규명은 세포사멸의 보

다 일반적인 사멸 억제에 대한 전략을 제시하고 세포사멸 억제제 개발에 크게 기여할 것으로 사료됨. 사회의 노령화에 따른 각종 신경손상과 관련된 중추질환의 발생율은 계속적으로 증가되는 추세에 있고 그 시장 규모가 세계적으로 수백억불에 이르고 있으므로 연구개발 결과의 활용 전망은 매우 밝다고 사료됨.

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

- 민간 제약기업과 공동 연구를 진행하여 연구개발 효율을 증대시키고 임상 연구기관과의 협력연구도 아울러 진행할 것임.

나. 활용방법

- 보다 효율적인 약물의 개발을 위해서는 이들 약물의 유도체를 합성하고, 약효 검색에 대한 효율적인 방안을 체계적으로 정립할 계획임. 또한 각종 신경퇴행성 질환과도 세포주기의 역할에 대하여 규명하고, 신경퇴행성 질환의 예방, 경감 및 치료에 핵심적인 기술과 치료법 개발을 진행할 것임.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

- 세포주기 억제제를 질환치료제로 개발을 목적으로 신경계 질환뿐만 아니라 세포사멸과 관련된 기타 질환, 예를 들면 간질환, 심장질환 등의 치료 및 예방에도 응용할 것임.

5. 기대효과

- 기존에 연구개발의 초점이 되어 왔던 신경세포사멸에 대한 활성산소종, 등의 신경 손상인자 혹은 caspase등의 신경사멸 매개인자에 최근 관심이 증가되고 있는 면역활성화 교세포의 역할에 대한 이해를 증진시키게 되고 이에 대한 조절을 통하여 신경세포의 사멸을 억제할 수 있는 예방법 및 치료법 개발을 촉진할 것임.
- 또한 미토콘드리아의 기능, 세포내의 항산화계의 기능, apoptos 매개 인자, 등 각종 세포사멸 조절인자들과 이에 미치는 세포주기조절제의 효과가 확인됨으로서 세포사멸 억제제 개발이 가능해 질 것임.
- 이러한 연구결과는 또한 알츠하이머씨병, 등 활성화된 교세포가 관련되어 있는 것으로 알려져 있는 각종 신경퇴행성 질환의 예방, 경감 및 치료에 핵심적인 기술과 치료법 개발을 촉진하게 될 것임.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호				
과제명				
사업명				
세부사업명				
연구기관		기관유형		
참여기관(기업)				
총연구기간				
총연구비	정부()천원	민간()천원	합계()천원	
연구책임자 1	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명		소속/부서	
	직위/직급		E-mail	
	전화번호		FAX	
	주소	(-)		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도 · 이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 기술이전 조건

이전형태	<input type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전 소요기간	년 개월	실용화예상시기	년도
기술이전시 선행요건			

- * 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술
 * 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
<input type="checkbox"/>	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
<input type="checkbox"/>	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
<input type="checkbox"/>	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
<input type="checkbox"/>	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
<input type="checkbox"/>	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
<input type="checkbox"/>	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
<input type="checkbox"/>	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
<input type="checkbox"/>	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
<input type="checkbox"/>	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
<input type="checkbox"/>	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
<input type="checkbox"/>	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
<input type="checkbox"/>	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			