

뇌신경생물학연구개발사업

뇌인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의
활성화와 신경세포사멸의 관련성 연구

아주대학교

과 학 기 술 부

제 출 문

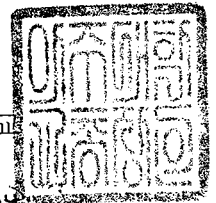
과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “내인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의 활성화와
신경세포사멸의 관련성 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 07. 21

주관연구기관명 : 아 주 대 학 교

주관연구책임자 : 진 병 관



보고서 초록

과제관리번호	M1-0108-00-0028	해당단계 연구기간	2001.8.1~2004.5.31	단계 구분	(3) / (3)
연구사업명	중 사업명	뇌신경생물학연구개발사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	내인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의 활성화와 신경세포사멸의 관련성 연구			
연구책임자	진 병 관	해당단계 참여연구원수	총 : 2명 내부 : 1명 외부 : 1명	해당단계 연구비	정부: 93,000천원 기업: 천원 계: 93,000천원
연구기관명 및 소속부서명	아주대학교 의과대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
					47
<p>최근 세계적으로 microglia의 활성화에 의한 신경세포사멸에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서 사용된 내인성물질인 thrombin은 상처치료와 지혈 등 생물학적으로 중요한 역할을 하는 복합기능을 가진 단백분해효소(serine protease)로 이런 기능과는 별도로 이번 연구과제를 통해 thrombin이 microglia활성화를 통해 중추신경계(substantia nigra, hippocampus, cortex)의 손상에 관여하고 유도한다는 연구결과를 얻을 수 있었다. 활성화된 microglia의 특성 규명과 신경세포사멸의 관련성 연구는 퇴행성신경계질환의 병인기전의 이해와 치료전략 수립에 필요한 기초자료를 제공할 것이다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	쓰롬빈, 흑질, 해마, 대뇌피질, 마이크로글리아			
	영 어	thrombin, substantia nigra, hippocampus, cortex, microglia			

요 약 문

I. 제 목

내인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의 활성화와 신경세포 사멸의 관련성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), multiple sclerosis, AIDS dementia complex, amyotrophic lateral sclerosis 등과 같은 신경질환의 발병 원인 및 병의 진행에 microglia의 활성화가 관련되어 있음이 보고되고 있다 (Raine et al., 1994; Meda et al., 1995; McGeer et al., 1998a,b; Hunot et al., 1999; Vila et al., 2001; Minagar et al., 2002; Williams 2002). 이런 연구 결과들을 배경으로 최근 활성화된 microglia에서 생산, 분비되는 독성물질들이 신경세포 사멸을 유도할 수 있다는 연구결과들이 보고되었다 (Ryu et al., 2000). 이 연구의 결과는 배양된 흰쥐의 microglia가 thrombin에 의하여 활성화되어 신경세포 사멸을 유도하는 염증매개물질들인 nitric oxide (NO), interleukin 1-beta, interleukin-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 생성한다는 것이다. 최근 TNF- α 가 배양된 중뇌도파민 신경세포의 사멸을 초래하고 (McQuire et al., 2001), MPTP 파킨슨병 동물모델에서 NO가 도파민신경세포의 사멸 기전에 관련되어 있으며 (Iravani et al., 2002), rotenone에 의하여 활성화된 microglia가 도파민신경세포 사멸을 유도한다는 (Du et al., 2002) 연구 결과는 microglia의 활성화가 신경세포사멸에 관련되어 있음을 증명하고 있다. 또한 본 연구책임자도 유사한 연구결과를 국외 SCI 논문에 보고하였으며 (Ryu et al., 2002), thrombin에 의한 microglia의 활성화가 흑질의 도파민신경세포의 사멸에 관련되어 있다는 본 연구과제의 연구 결과는 국외 SCI 논문에 발표하였다 (Choi et al., 2003).

퇴행성 신경질환들은 각각 손상된 뇌 부위가 다르므로 microglia의 활성화가 파킨슨병과 알츠하이머병과 같은 신경질환에 관련되어 있다면 뇌 부위별로 활성화된 microglia의 특성 규명과 신경세포 사멸의 관련성 연구는 퇴행성 신경질환의 병인기전의 이해와 치료 전략 수립에 필요한 기초 자료를 제공할 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

뇌에 존재하는 내인성물질인 thrombin에 의한 microglia의 활성화가 중추신경계의 여러부위에서 세포독성을 유발하는 여부와 그 기전을 탐색하고 분석함으로써 microglia의 활성화와 신경세포사멸과의 관련성을 밝히고 퇴행성뇌질환의 발병기전 연구와 새로운 치료전략 수립에 기초 자료를 제공한다.

IV. 연구개발결과

본 연구결과를 통해서 내인성물질인 thrombin에 의해서 뇌에 존재하는 면역세포인 microglia가 활성화되고 신경세포사멸과 thrombin이 관련됨을 관찰하였고, microglia가 활성화되었을 때 생성되는 물질들에 의해 뇌신경세포사멸들이 사멸됨을 관찰함으로써 microglia의 활성화와 신경세포사멸과의 밀접한 관련성을 밝힐 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

최근 세계적으로 microglia의 활성화에 의한 신경세포사멸에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서 사용된 내인성물질인 thrombin은 상처치료와 지혈 등 생물학적으로 중요한 역할을 하는 복합기능을 가진 단백질분해효소(serine protease)로 이런 기능과는 별도로 이번 연구과제를 통해 thrombin이 microglia활성화를 통해 중추신경계(substantia nigra, hippocampus, cortex)의 손상에 관여하고 유도한다는 연구결과를 얻을 수 있었다. 활성화된 microglia의 특성 규명과 신경세포사멸의 관련성 연구는 퇴행성신경계질환의 병인기전의 이해와 치료전략 수립에 필요한 기초자료를 제공할 것이다.

S U M M A R Y

I. Title

Studies on the endogenous toxic molecule-induced glial cell activation and neurodegeneration in the various brain regions

II. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder associated with a dramatic loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) (Giasson and Lee, 2001). Although little is known about the cause of PD, a growing body of evidence supports the notion that activated microglia play a critical role in the degeneration of nigral dopaminergic neurons (Hirsch, 2000; Le et al., 2001; Vila et al., 2001). Many studies have reported the presence of reactive microglia in the SN of PD patients (Hunot et al., 1999; Knott et al., 2000), and in the SN of animal models of PD produced by administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Kohutnicka et al., 1998; Liberatore et al., 1999; Dehmer et al., 2000; Wu et al., 2002) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (He et al., 2001; Rodrigues et al., 2001; Cicchetti et al., 2002). *In vivo* and *in vitro* studies have shown that death of dopaminergic neurons can also be produced by microglial activators such as lipopolysaccharide (LPS) (Castano et al., 1998; Kim et al., 2000). Additionally, beta-amyloid and prion have been implicated in the processes of neurodegeneration through the activation of microglia (Meda et al., 1995; Combs et al., 1999; Brown, 2001). In this regard, it has been suggested that microglia activator(s) could be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including PD. This hypothesis is supported by our most recent finding that trisilaoganglioside (GT1b), a component of the neuronal membrane, triggers *in vivo* degeneration of nigral dopaminergic neurons via microglial activation (Ryu et al., 2002a).

Thrombin is generated from the precursor prothrombin endogenously expressed in human, mouse, and rat brain, including dopaminergic neurons in the SN (Dihanich et al., 1991; Soifer et al., 1994; Weinstein et al., 1995). Prothrombin also exists and circulates in blood at micromolar levels (Fenton, 1986). Cerebrovascular injury triggers the rapid conversion of prothrombin to thrombin, resulting in extravasation into the CNS (Gingrich and Traynelis, 2000). In rat brain treated with thrombin, infiltration of inflammatory cells, brain edema, and reactive gliosis were observed (Nishino et al., 1993). In addition, thrombin induces various biological responses in the CNS, although its effect on neurons and astrocytes is either protective or toxic, depending on

thrombin concentration. Increased thrombin in brain has been shown to lead to the degeneration of the hippocampal neurons (Strigrow et al., 2000), spinal motoneurons (Turgeon et al., 1998), and astrocytes (Donovan et al., 1997). Recently, others and we reported that thrombin was directly toxic to dopaminergic neurons in mesencephalic cultures containing few of microglia (Debeir et al., 1998; Lee et al., 2001; Choi et al., 2003). However, these results do not rule out the involvement of microglia in thrombin-induced neurotoxicity *in vivo*. In this regard, recent studies, including ours, clearly demonstrate that thrombin activates cultured microglia, leading to increased production of pro-inflammatory cytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nitric oxide (NO) (Möller et al., 2000; Ryu et al., 2000; Suo et al., 2002) that have been proposed to play a pathological role in several neurodegenerative disorders such as PD and Alzheimer's disease (Dickson et al., 1993; Boka et al., 1994; Hunot et al., 1999; Hirsch, 2000).

All of these observations raise the possibility that thrombin may contribute to neurodegenerative diseases both directly, through toxicity to neurons, and indirectly, through activation of microglia. In the present study, we examined whether thrombin could activate microglia *in vivo* by injecting this protease into the rat SN, and whether activated microglia were implicated in thrombin-induced degeneration of dopaminergic neurons in the SN. We also investigated the molecular mechanisms underlying microglial activation by thrombin.

III. Results

Our results suggest that thrombin can activate microglia *in vivo* via mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) and p38 MAPK and this microglial activation can mediate degeneration of dopaminergic neurons in the SN by increased expression of iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokines, from activated microglia.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

1. An outline of subject	10
2. Up-to-date-Technical development	11
3. A subject of study and results.....	12
4. The achievement of goal and contribution.....	30
5. Practical application	31
6. Up-to-data-overseas technical information	32
7. References	35

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	30
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	31
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	32
제 7 장 참고문헌	35

본문 작성 요령

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ②, 등으로 하고
 - 장은 17 포인트 고딕계열
 - 절은 15 포인트 명조계열
 - 본문은 11 포인트 명조계열로 한다.
단, 본문의 내용중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있다.
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작한다.
3. 본문은 11 포인트 횡으로 작성한다.
4. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 11 포인트로 한다.
5. 각주는 해당 페이지 하단에 8포인트 활자로 표기하며, 본문과 구분토록 한다.
6. 페이지수는 편집순서 2의 제출문부터 시작한다.
단, 삽입물이 있을 때는 그 삽입물의 크기에 불문하고 1면을 한 페이지로 하여 일련번호를 붙인다.
7. 한글, 한문, 영문을 혼용한다.
8. 뒷면지에 주의문을 넣는다.
9. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문중에 사용처를 반드시 표시한다.

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 신경세포 사멸을 유도하는 신경교세포 (microglia) 활성화의 중요성

- 파킨슨병 (PD), 알츠하이머병 (AD) 등을 포함한 퇴행성 신경질환의 발병 원인 및 병의 진행에 microglia의 활성화가 관련되어 있음이 보고되고 있다 (Meda et al., 1995; McGeer et al., 1998a,b; Hunot et al., 1999). 이런 관점에서 최근 microglia를 활성화 시켜 신경세포 사멸을 유도할 수 있는 독성물질을 분비한다는 연구결과가 보고되었다 (Ryu et al., 2000). 이 연구의 결과는 배양된 흰쥐의 microglia가 thrombin에 의하여 활성화되어 신경세포 사멸을 유도하는 염증매개물질들인 nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 생성한다는 것이다.

퇴행성 신경질환들은 각각 손상된 뇌부위가 다르므로 microglia의 활성화가 PD, AD와 같은 신경질환에 관련되어 있다면 뇌 부위별로 활성화 된 microglia의 특성 규명과 신경세포 사멸의 관련성 연구는 퇴행성 신경질환의 병인기전의 이해와 치료 전략 수립에 필요한 기초 자료를 제공할 것이다.

2. 중추신경계에서 병리생리적 진행을 조절하는 내인성 독성물질의 중요성

- 본 연구에서 사용하고자 하는 내인성 독성물질인 thrombin은 상처치료와 지혈에 중요한 역할을 하는 복합기능을 가진 단백 분해효소 (serine protease)이다. Thrombin의 생물학적 기능은 혈액응고, fibrinogen을 fibrin으로 분해, platelets를 활성화하는 과정에 중요한 역할을 하는 것이다 (Berndt and Phillips, 1981). 이와 같은 기능과는 별도로 최근 중추신경계의 손상에 thrombin이 중요한 역할을 한다는 연구 결과들이 보고되고 있다. 배양된 신경세포에서 thrombin의 기능은 다양하다. 예를 들면, neuroblastoma 세포주 (Gurwitz and Cunningham, 1988), astrocytes (Cavanaugh et al., 1990; Nelson and Simon, 1990), 인간태아세포 (Grand et al., 1988)들에서 신경돌기의 진행을 억제한다. Thrombin은 astrocytes의 유사분열을 촉진하고 (Cavanaugh et al., 1990) 신경영양인자 (nerve growth factor)의 합성과 분비를 유도한다 (Neveu et al., 1993). 적정량의 thrombin은 저혈당, 산화적 스트레스, β -amyloid 독성과 같은 다양한 상해(insults)로부터 해마의 신경세포와 astrocytes를 보호한다는 연구 결과가 최근에 보고되었다 (Vaughan et al., 1995; Pike et al., 1996). 흥미롭게도 스트레스가 없는 조건에서 배양된 똑 같은 세포에서 높은 농도의 thrombin은 세포 사멸을 초래한다 (Smith-Swintosky et al., 1995; Debeir et al., 1996). 이와 같은 thrombin의 작용은 중추신경계가 손상을 당할 경우 이롭기도 하고 해롭기도 할 수 있다는 thrombin의 두 가지 상반되는 기능을 말해 주고 있다. Thrombin은 신경세포의 가소성 (plasticity)을 증가시키고 상해로부터 신경세포를 보호한다. 그러나 조절되지 않은 thrombin의 활성화는 신경세포의 사멸을 초래할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

"중국의 덩샤오핑(鄧小平)과 권투선수 무하마드 알리가 앓았던 파킨슨병은 요즘 우리 주위에서 흔히 볼 수 있는 병이 되었다. 이 병은 주로 50세를 넘긴 성인의 뇌 속에서 신경세포가 파괴되어 발병하는 만성병이며 오래 지속되는 난치병이다. 발병 초기에는 한쪽팔이나 다리가 떨리는 비교적 가벼운 증세를 나타내지만 차차 몸통이 굳어지면서 발병 후 6~7년이 지나면 자리에서 일어나지도 못하는 상태가 된다. 1817년 영국의 의사 제임스 파킨슨이 학계에 발표하면서 알려진 이 병은 200년 가까운 역사에도 불구하고 왜 신경세포가 파괴되는지 정확한 원인은 알려지지 않았다. 다만 뇌 깊숙이 위치한 흑색질에 있는 신경세포들이 '도파민(dopamine)'이라는 물질을 정상적으로 생산하지 못하면서 운동장애를 일으키는 것으로 확인됐다. 의학자들은 바이러스성 뇌염에 의한 감염설, 면역 기전이 관계된다는 면역설, 선천적으로 그 기질을 타고난다는 유전설, 유리기가 생성되어 신경세포를 파괴한다는 설, 도파민의 생성 및 대사과정에 문제가 있다는 설, 신경중독물질의 중독설 등 다양한 가설을 내놓고 파킨슨병의 원인을 해명하기 위해 노력해왔다.

아주대 의대 진병관교수 연구팀이 최근 파킨슨병이 일어나는 새로운 이유 하나를 더 찾아냈다. 그 는 뇌와 척수에 존재하는 '마이크로글리아(microglia)'라는 신경세포에 주목했다. 혈액응고단백질인 트롬빈이 마이크로글리아를 활성화시키면 염증물질이 증가해 도파민 신경세포를 죽이게 된다는 설명이다. 진교수팀은 thrombin을 흰쥐의 뇌(흑질치밀부)에 투여한 결과 마이크로글리아의 농도가 높아지면서 도파민 신경세포가 죽어간다는 것을 관찰했다. 또 시간이 경과함에 따라 뇌조직에 염증 매개물질이 증가하는 것과 마이크로글리아 억제제를 트롬빈과 함께 투여할 경우 도파민 신경세포의 사멸이 방지됨을 알게 됐다. 또 앞으로 흰쥐를 이용해 이같은 연구를 계속할 수 있도록 파킨슨병 질환모델 흰쥐를 생산했다. 이 연구결과는 내년에 신경과학계 전문잡지인 '저널 오브 뉴로사이언스'에 게재될 예정이다.

물론 이번 연구로 파킨슨병의 미스터리가 풀리는 것은 아니다. 진교수는 "도파민 신경세포가 파괴되는 많은 원인 중 하나로 마이크로글리아를 연구한 것"이라며 "파킨슨병을 퇴치하기 위한 아주 작은 단서에 불과하다"고 설명했다. 그러나 모든 과학발견이 그렇듯이 작은 단서가 예상치 못한 큰 성과를 가져올 수 있다. 한국과학재단의 김명석 전문위원은 "진교수의 연구는 파킨슨병 발병원인을 새로운 각도로 규명한 매우 흥미롭고 독특한 결과"라며 "인간 파킨슨병의 발병 원인을 규명하고 새로운 치료전략을 수립하는 계기가 될 것"이라고 내다봤다. <이은정 기자> [경향신문 2003년 11월25일]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 1차년도 (2001년 8월 1일 ~ 2002년 5월 31일)

▶ 연구내용 1 : Thrombin에 의한 뇌부위별 신경세포 사멸 관찰

▶ 연구내용 1의 결과 : Thrombin (20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 hippocampus, cortex, substantia nigra (SN)에 주사하고 1주일 후에 흰쥐의 뇌를 고정시키고 40 μ m 두께의 절편을 만들었다. 일반적인 신경세포의 지표인 nuclear neuronal protein (NeuN) antibody를 이용하여 hippocampus, cortex, 흑질의 신경세포를 염색한 후 사멸 유무를 관찰하였다.

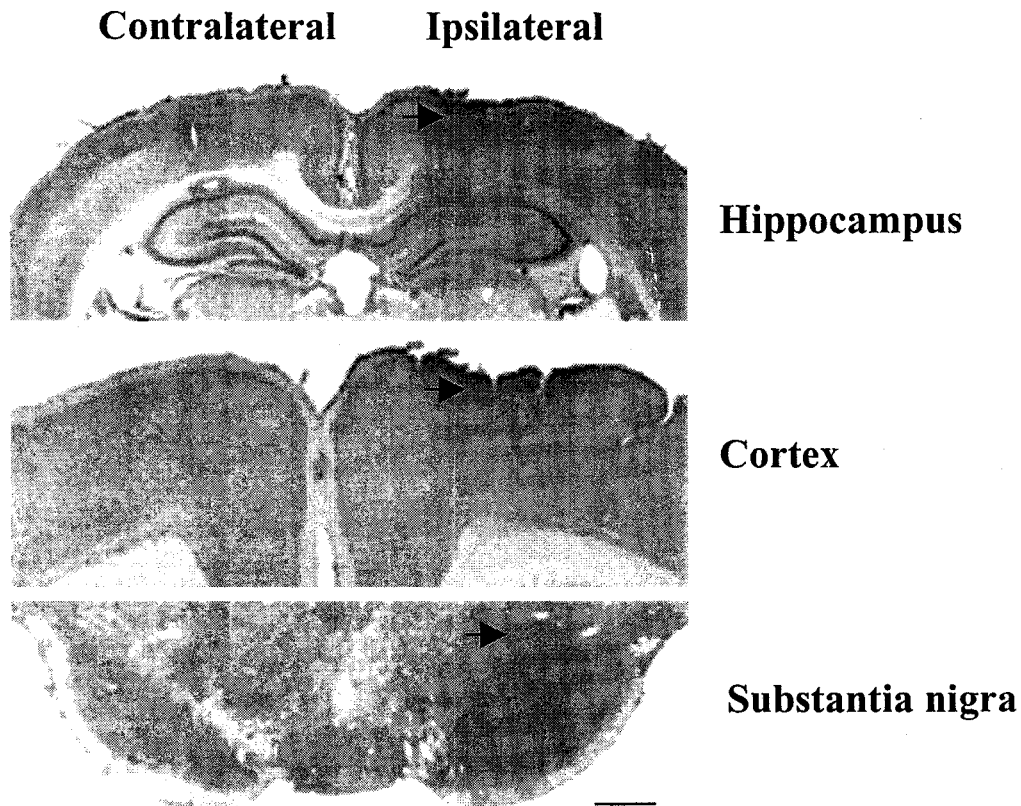


그림 1. Thrombin에 의하여 유도된 cortex, hippocampus, substantia nigra의 신경세포 사멸. Immunohistochemical staining을 실시한 결과 hippocampus, cortex, substantia nigra 세부분 모두에서 contralateral side와 비교하여 ipsilateral side에서는 needle tract과 그 주변부의 넓은 부분에서 신경세포의 사멸을 관찰할 수 있었다. Scale bar = 100 μ m

▶ 연구내용 2 : Thrombin의 specific inhibitor인 hirudin을 사용하여 thrombin 자체의 신경독성을 검증

▶ 연구내용 2의 결과 : 흰쥐 배아 (14일)에서 추출한 중뇌의 dopaminergic neuron을 배양시키고, thrombin을 단독으로 처리하거나 thrombin과 hirudin을 함께 처리하였다. 24시간 후 도파민성 신경세포의 지표인 tyrosine hydroxylase (TH) antibody를 이용하여 도파민성 신경세포들을 염색하였다. 그 결과 thrombin이 자체의 신경독성으로 도파민성 신경세포의 사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

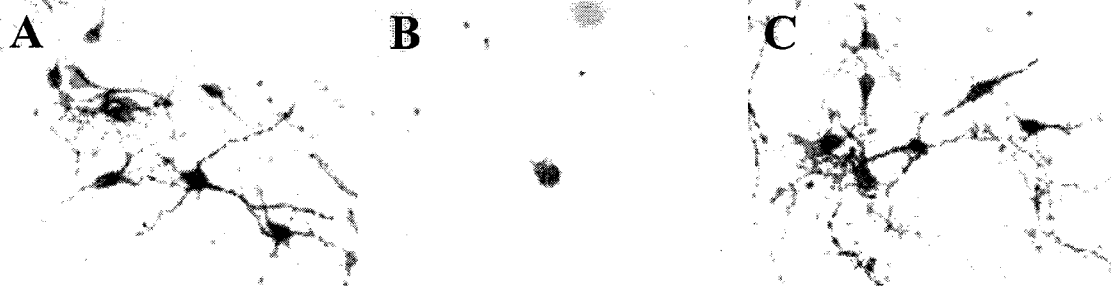


그림 2. Hirudin의 thrombin에 의한 도파민성 신경세포 사멸의 억제. A, Control. B, Thrombin (100 unit/ml) 처리한 세포군. C, Thrombin (100 unit/ml) + hirudin (100 unit/ml) 처리한 세포군. Control에서는 cell body와 길고 분명한 processes들을 관찰할 수 있으나, thrombin을 처리한 세포군에서는 대부분의 도파민성 신경세포들이 사멸되었음을 관찰할 수 있었다(B). 이런 thrombin의 효과는 specific inhibitor인 hirudin에 의해 거의 완벽하게 저해되는 양상을 관찰할 수 있었다(C).

▶ 연구내용 3 : Thrombin에 의한 흑질 (substantia nigra, SN) *in vivo* microglia 활성화 관찰

▶ 연구내용 3의 결과 : Thrombin (20 units/4 μl)을 흰쥐의 substantia nigra에 주사하고 1주일 후에 흰 쥐의 뇌를 고정시키고 40 μm 두께의 절편을 만들었다. Microglia의 표면항원 (CD11b)을 선택적으로 염색 하는 OX-42 antibody와 주조직적합성 복합체 (major histocompatibility complex class II; MHC class II)를 인식하는 antibody를 이용하여 조직절편을 염색한 후 microglial의 활성화 유무를 관찰하였다. Vehicle (PBS)를 주입한 substantia nigra에서는 needle tract 주변에서 microglia의 활성화를 관찰하였고, thrombin을 주입한 substantia nigra에서는 substantia nigra pars compacta area를 따라 많은 microglia의 활성화를 관찰할 수 있었다. 또한 정상상태에서는 발견되지 않는 MHC class II 표면항원이 thrombin을 투여한 substantia nigra에서 pars compacta area를 따라 다량 발현됨을 관찰할 수 있었다. Thrombin을 주입한 후 4시간 경과후 microglia가 작은 cell body와 여러개의 긴 process를 가진 형태에서 큰 cell body와 짧은 process를 가진 형태로 바뀌고, 24시간 후에는 거의 모든 microglia가 큰 cell body와 짧거나 혹은 process가 없는 형태를 나타내었다.

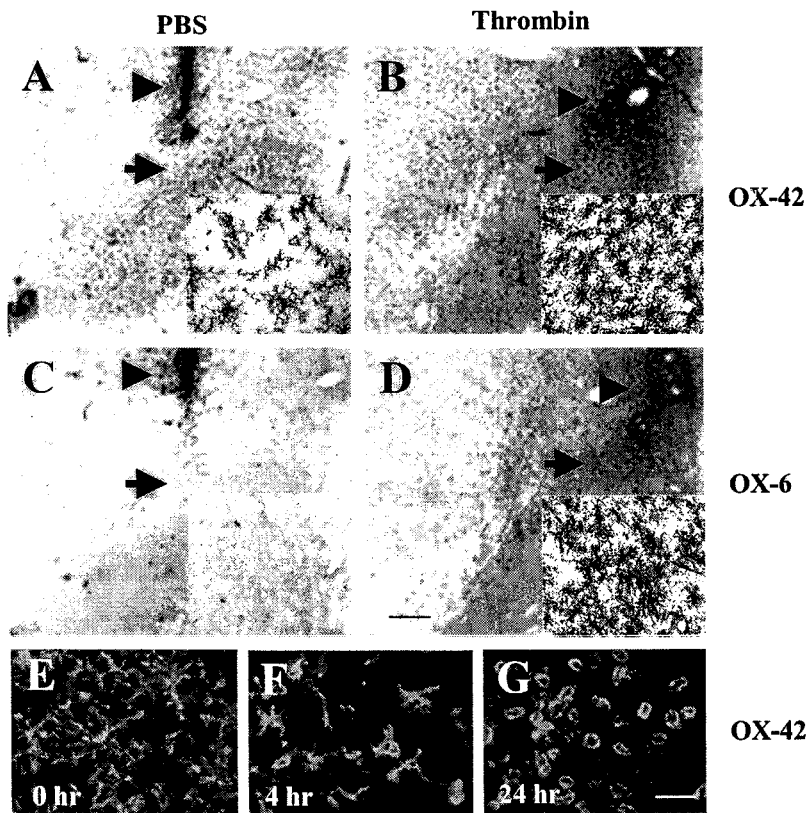


그림 3. Thrombin 에 의한 microglia의 활성화. (A, C) Vehicle (PBS) 주입군. (B, D) thrombin (20 units/4 μl) 주입군. (E-G) Thrombin에 의한 microglia의 형태학적인 변화. Scale bar, 25 μm .

▶ 연구내용 4 : Thrombin에 의한 pro-inflammatory cytokines들의 생성과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA의 발현 관찰

▶ 연구내용 4의 결과 : Thrombin (20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 substantia nigra에 주입하고 지정된 시간에 tissue을 얻어 mRNA를 추출하였다. 이어 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하고, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), iNOS의 primer을 이용하여 PCR을 실시하였다. Thrombin에 의해 염증반응과 세포사멸을 유도할 수 있는 물질들의 mRNA발현이 시간에 비례하여 증가함을 관찰할 수 있었다. IL-1 β 와 TNF- α 는 thrombin투여후 1시간내에 발현되어 4-8시간대에 최고의 발현양상을 나타내었고, 96시간까지 발현이 지속되었다. 한편 iNOS mRNA는 이보다 늦은 4시간후에 발현이 증가하였고 8~12시간대에 최고의 발현양상을 나타내었다.

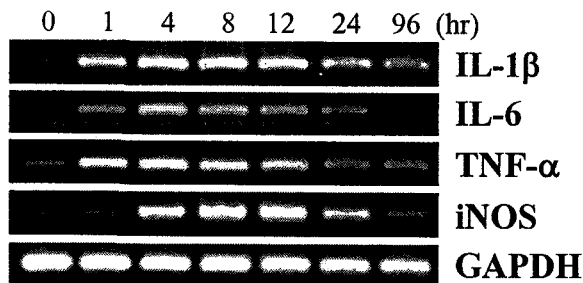


그림 4. thrombin처리후 substantia nigra에서 pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 과 iNOS mRNA의 발현 증가.

▶ 연구내용 5 : Thrombin에 의해 활성화된 microglia에서 iNOS의 발현 증가를 관찰

▶ 연구내용 5의 결과 : Thrombin (20 units/4 μ l)을 흰쥐의 substantia nigra에 주입한 후 지정된 시간에 tissue를 분리하고, iNOS antibody를 이용하여 Western blotting을 실시하였다 (A). 각 시간대 bands들을 densitometry로 측정한 결과 thrombin을 주입한 후 8~12시간대에서 최고의 발현을 나타내었고, 7일 후까지 발현을 나타내었다 (B). iNOS의 발현이 활성화된 microglia에서 유도된다는 것을 검증하기 위해 OX-42 antibody와 iNOS antibody를 동시에 붙여 형광현미경을 관찰하였다. 동일한 부분에서 찍은 그림을 합한 결과 iNOS는 활성화된 microglia에서 발현된다는 것을 확인할 수 있었다 (C). 이와는 반대로 astrocyte에서는 iNOS가 발현되지 않음을 관찰하였다 (D).

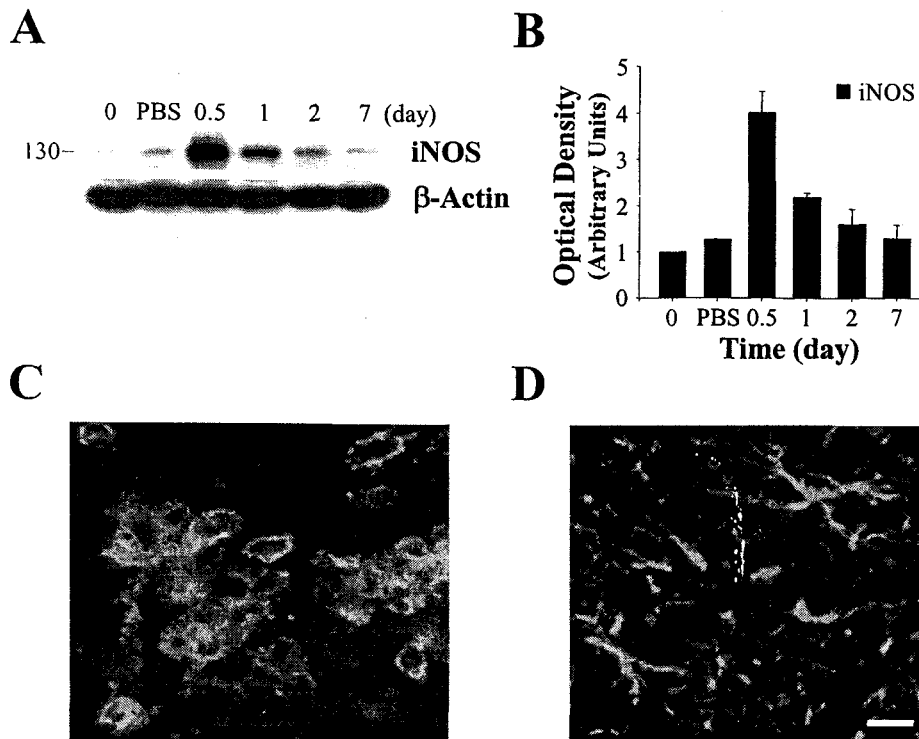


그림 5. 활성화된 microglia에서의 nitric oxide 생성효소 iNOS의 발현. A, 시간별로 iNOS 발현을 보여주는 Western blot 결과 B, Densitometric values of immunoblots. C-D. 이중형관염색 결과 (C) microglia (OX-42; green) and iNOS (red). (D) astrocytes (GFAP; green) and iNOS (red).

▶ 연구내용 6 : Nitric oxide합성효소 억제제인 L-NAME에 의한 도파민신경세포 생존 증가 관찰

▶ 연구내용 6의 결과 : L-NAME (50 mg/kg)를 복강내에 주사하고 한시간후에 thrombin을 흰쥐의 substantia nigra에 주입하였다. 대조군(A)과 비교하여 thrombin만을 주입한 tissue에서는 substantia nigra의 거의 모든 cell body와 processes가 사라짐을 관찰할 수 있었다(B). 이와 반대로 L-NAME를 전 처리한 실험군에서는 needle tract주변부에서만 도파민성 신경세포의 사멸을 관찰할 수 있었다(C). 도파민성 신경세포의 수를 헤아려 본 결과 매우 유의성있는 세포사멸억제 효과를 나타내었다 (D). 이 실험 결과를 통해 thrombin에 의해 활성화된 microglia에서 발현되는 iNOS에서 생성되는 nitric oxide가 substantia nigra의 도파민성 신경세포의 사멸에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

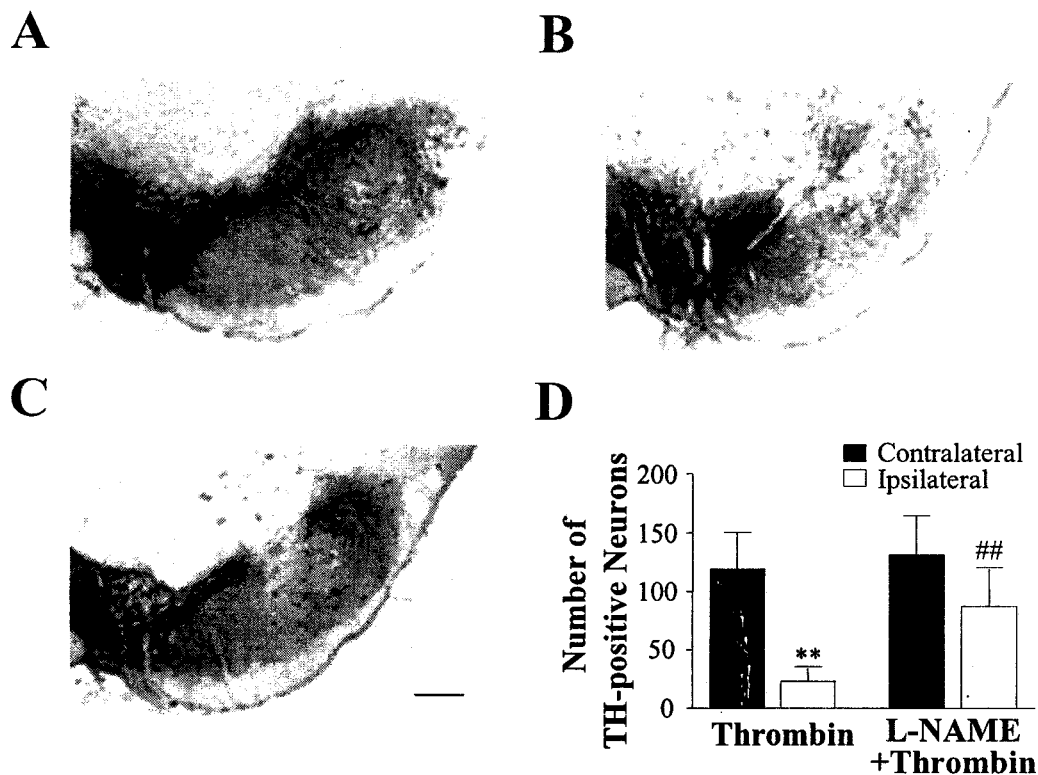


그림 6. L-NAME가 thrombin에 의한 도파민성 신경세포 사멸에 미치는 영향. A, Vehicle (PBS) 주입군. B, Thrombin (20 units/4 μ l) 주입군. C, L-NAME (50 mg/kg) + thrombin (20 units/4 μ l) 주입군. D, 각 실험군에서 도파민성 신경세포의 수

▶ 연구내용 7 : Microglia 활성화기전과 proinflammatory cytokine과 iNOS 발현에 관련된 signal transduction pathway들의 변화 관찰

▶ 연구내용 7의 결과 : Signal transduction pathway중 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)들의 발현 양상을 관찰한 결과 extracellular signal-regulated kinases (ERKs)와 p38 MAPK의 발현이 thrombin 투여후 약 30분전에 phosphorylation (activation)됨을 관찰할 수 있었다. ERKs가 microglia에서 발현됨을 확인하기 위해 phosphorylated form과 반응하는 P-ERK antibody와 OX-42 antibody를 동시에 붙여 형광현미경하에서 관찰하였다. 각각의 그림들을 합쳐본 결과 microglia에서 phospho-ERKs의 발현을 관찰할 수 있었다.

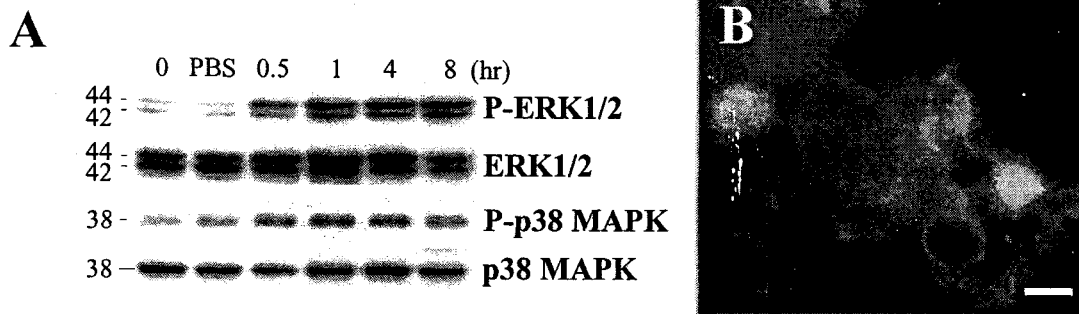


그림 7. Thrombin에 의한 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)들의 활성화. (A) Thrombin 처리에 의한 phospho-ERKs와 phospho-p38 MAPK의 발현증가를 Western blot analysis로 관찰. (B) Microglia에서 phospho-ERKs의 발현을 double-immunofluorescence로 관찰. Microglia (OX-42; green), phospho-ERKs (red).

▶ 연구내용 8: MAPK중 ERK활성화가 thrombin에 의해 유도되는 microglia의 활성화와 도파민성 신경세포사멸에 미치는 영향을 관찰하기 위해 specific inhibitor를 사용하여 그 반응을 관찰

▶ 연구내용 8의 결과: Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)의 specific inhibitor인 PD98059를 thrombin과 함께 처리한 결과 ERK의 phosphorylation이 감소함을 Western blot analysis를 통해 확인할 수 있었다 (A). 한편, microglia의 활성화에 미치는 영향을 OX-42와 OX-6 antibody를 이용해 immunohistochemistry를 실시한 결과 thrombin만을 처리한 것 (그림 3)보다 substantia nigra에서 상대적으로 적은 microglia의 활성화를 관찰할 수 있었다 (B, C). 따라서 PD98059에 의해 microglia의 활성화가 감소함으로써 microglia에 의해 생성되었던 proinflammatory cytokine들과 iNOS의 감소를 가져와 도파민성 신경세포의 사멸이 억제되는지 확인하기 위해 같은 조건으로 tyrosine hydroxylase antibody를 이용해 immunohistochemistry를 실시하고 substantia nigra에서 도파민성신경세포의 수를 counting한 결과 세포사멸을 억제함을 관찰할 수 있었다 (D).

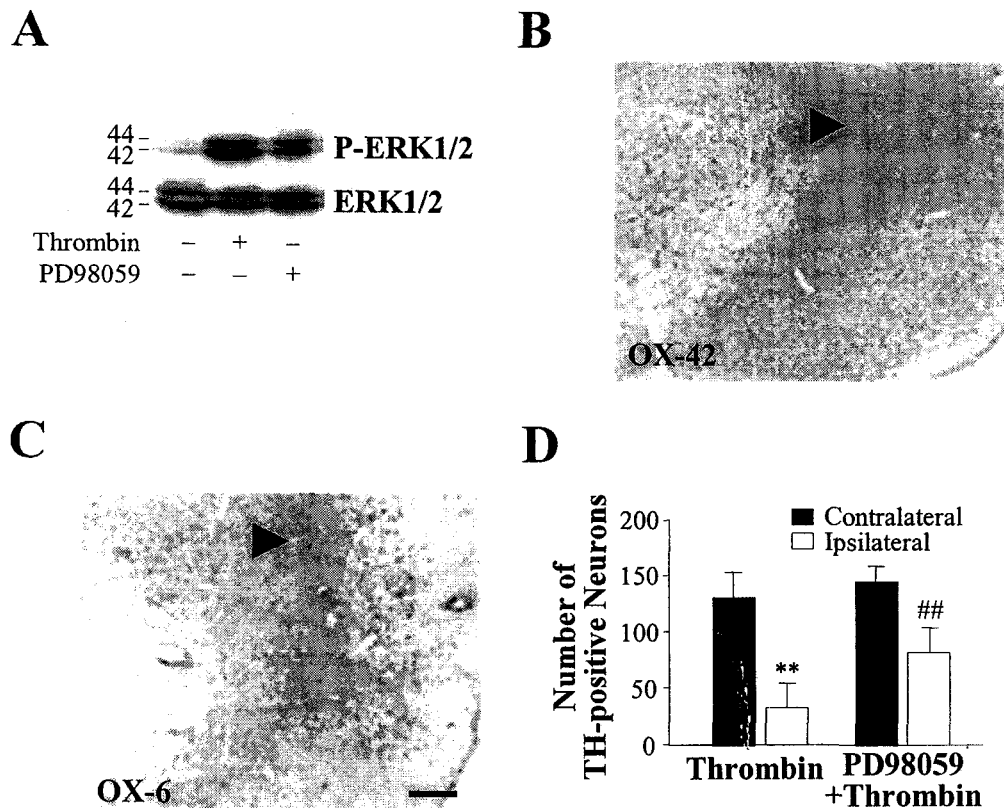


그림 8. ERK phosphorylation의 thrombin에 의해 유도된 microglia활성화와 도파민성 신경세포사멸에 미치는 영향. (A) PD98059 처리에 의한 ERK의 phosphorylation감소를 Western blot analysis로 관찰. (B, C) PD98059 처리에 의한 microglia의 활성화 감소를 immunohistochemistry로 관찰. (D) PD98059 처리에 의한 도파민성 신경세포사멸의 감소를 cell counting을 통해 관찰. Arrowheads는 thrombin injection site를 나타냄.

나. 2차년도 (2002년 6월 1일 ~ 2003년 5월 31일)

연구내용 1: Thrombin에 의한 Hippocampus CA1 신경세포 사멸 관찰

▶ 연구내용 1의 결과: Thrombin (5, 10, 20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 hippocampus에 주입하고 일주일 후에 흰쥐의 뇌를 고정시키고 40 μ m 두께의 절편을 만들었다. 일반적인 신경세포의 지표인 nuclear neuronal protein (NeuN) antibody를 이용하여 hippocampus의 신경세포를 염색한 후 사멸 유무를 관찰하였다. 그림 1에 제시된 바와 같이 농도의존적으로 hippocampus CA1부위의 신경세포들이 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다.

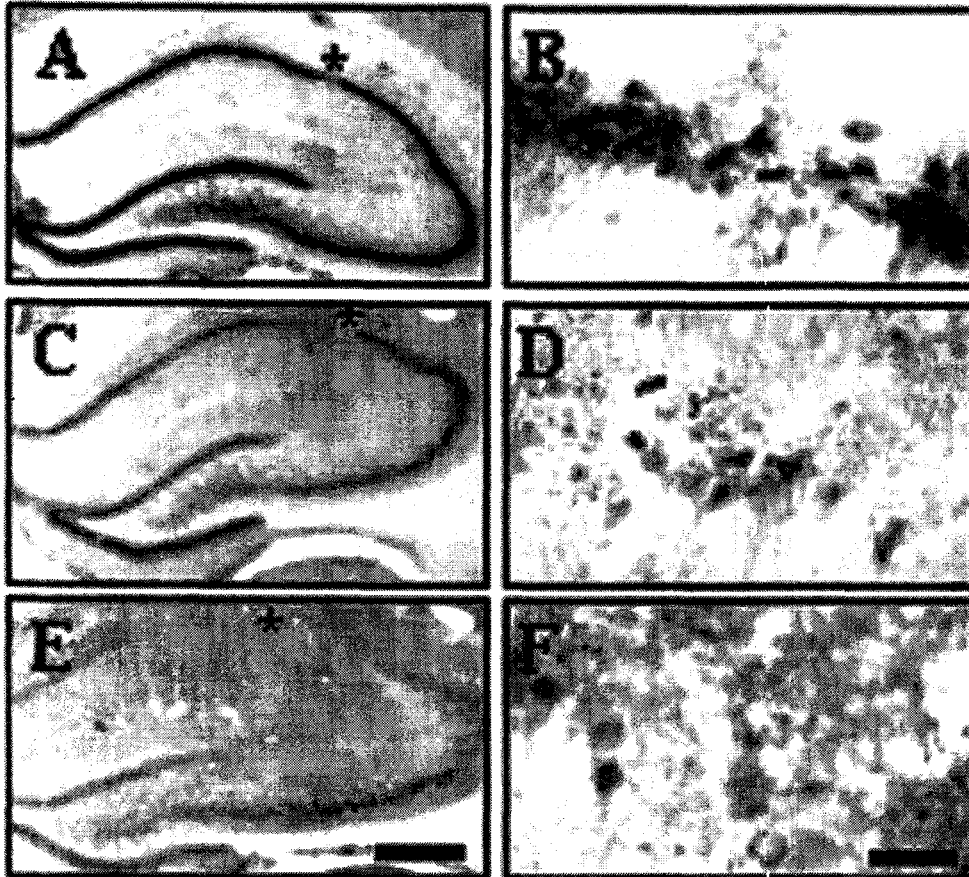


그림 1. Thrombin에 의한 hippocampus CA1 부위의 신경세포 사멸. 흰쥐의 hippocampus에 thrombin을 5 (A, B), 10 (C, D), 20 unit (E, F)을 주입하고, 일주일 뒤 뇌를 고정시키고 40 μ m로 절편을 만들고 일반적인 신경세포를 염색할 수 있는 NeuN항체로 immunohistochemistry를 실시하였다. 그림 B, D, F는 그림 A, C, E의 asterisk (*) 부위를 확대한 그림이다. Scale bar: A, C, E, 250 μ m; B, D, F, 50 μ m.

▶ 연구내용 2: Thrombin에 의한 Hippocampus 신경세포 사멸 관찰

▶ 연구내용 2의 결과: Thrombin에 의한 신경세포 사멸이 일시적인 세포내 효소 발현의 감소에 의한 현상이 아니라 thrombin 매개로 일어나는 세포사멸임을 확인하기 위해 cresyl violet을 이용하여 hippocampus 조직을 염색하였다. 그림 2의 D에서 보여주는 바와 같이 CA1 부위의 신경세포들이 대조군 (B)과 비교하여 세포크기가 줄어들고 그 수가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다.

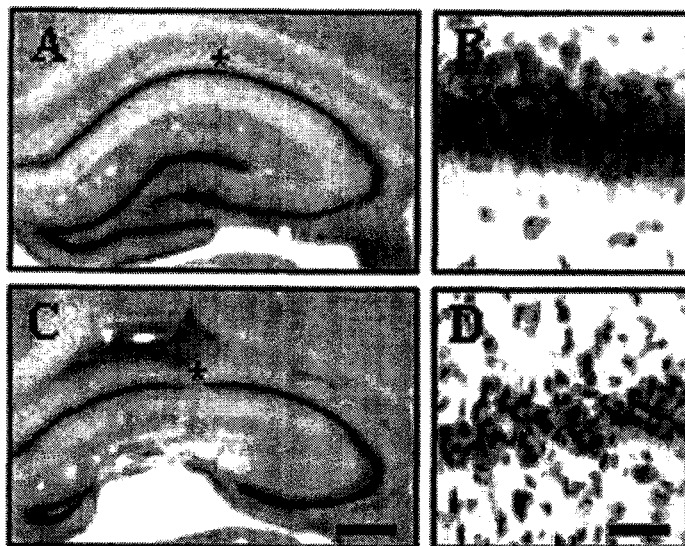


그림 2. Thrombin에 의한 hippocampus 신경세포의 사멸. Thrombin 20 unit을 흰쥐의 hippocampus 부위에 주입하고 일주일 뒤 뇌를 고정시키고 절편을 만들어 Cresyl violet을 이용하여 절편을 염색하였다. B, D는 A, C의 asterisk (*)부위를 확대한 그림이다. Scale bar: 250 μ m; 50 μ m.

▶ 연구내용 3: Thrombin에 의한 Hippocampus 부위의 microglia 활성화 관찰

▶ 연구내용 3의 결과: Microglia를 염색하는 세가지 특이적인 항체를 이용하여 immunohistochemistry를 실시한 결과 thrombin 주입으로 hippocampus의 CA1 부위에서 microglia의 활성화가 일어남을 확인하였다. OX-42항체로 염색한 결과(그림 3B) 세포가 둥글고 세포돌기가 짧아진 전형적인 활성화된 형태를 나타내었다. 활성화된 microglia만을 염색하는 OX-6항체로 염색한 결과(그림 3D) thrombin을 주입한 부위에서만 microglia의 활성화를 관찰할 수 있었다. 활성화된 microglia는 다른 세포들에 이롭거나 해로운 물질들을 분비하고, 사멸된 세포들을 포식하는 청소부 역할을 담당하고 있는데, 이런 포식작용을 나타내는 활성화된 microglia를 염색하는 ED1항체로 염색한 결과(그림 3F) thrombin을 주입한 CA1 부위에서 염색된 microglia를 확인할 수 있었다.

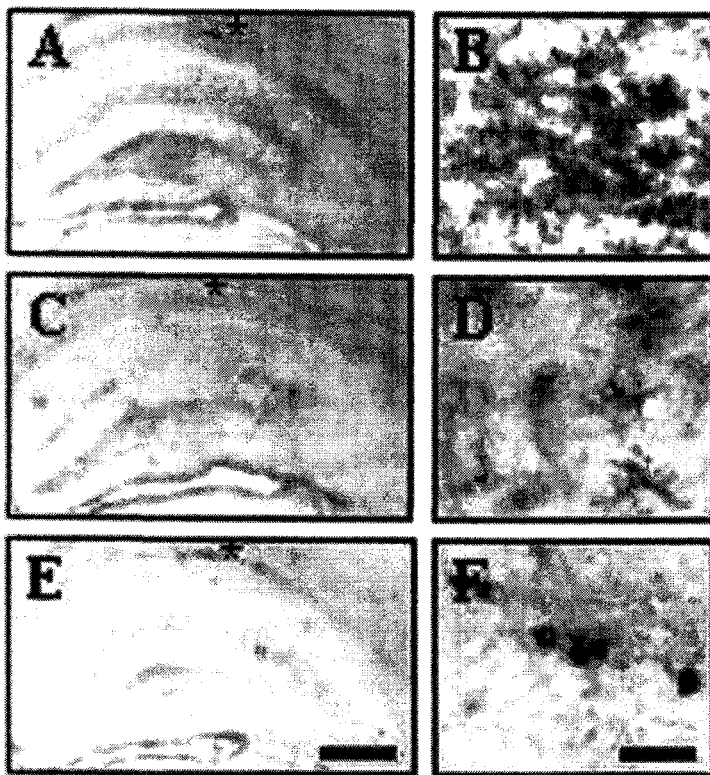


그림 3. Thrombin에 의한 hippocampus CA1 부위에서 microglia의 활성화. 흰쥐의 hippocampus 부위에 thrombin 20 unit을 주입하고 일주일 뒤 뇌를 고정시키고 절편을 만들어 microglia를 염색할 수 있는 세가지 항체를 이용하여 immunohistochemistry를 실시하였다. (A, B) 일반적인 휴지상태(resting form)와 활성화된 상태(activating form)의 microglia를 염색할 수 있는 OX-42 항체를 이용하였다. (C, D) Microglia의 활성화된 상태만을 염색할 수 있는 OX-6 항체를 이용하였다. (E, F) 활성화되어 포식작용을 하는 microglia를 염색할 수 있는 ED1 항체를 이용하였다. Thrombin 주입으로 hippocampus의 CA1 부위에서 microglia의 활성화가 일어남을 확인하였다. 그림 B, D, F는 그림 A, C, E의 asterisk (*) 부위를 확대한 그림이다. Scale bar: A, C, E, 250 μ m; B, D, F, 50 μ m.

▶ 연구내용 4: Thrombin에 의한 Hippocampus CA1부위에서 astrocyte의 형태학적 변화 관찰

▶ 연구내용 4의 결과: 흰쥐의 hippocampus에 thrombin을 주입하고 일주일 뒤 뇌를 고정하고 절편을 만들고, astrocyte를 선택적으로 염색할 수 있는 GFAP항체를 이용하여 절편을 염색하였다. Thrombin을 주입한 hippocampus CA1부위에서 astrocyte의 형태학적 변화를 관찰할 수 있었고 (C, D), 반면에 대조군으로 PBS를 주입한 CA1부위에서는 주사바늘 침입부위를 제외한 주위에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다.

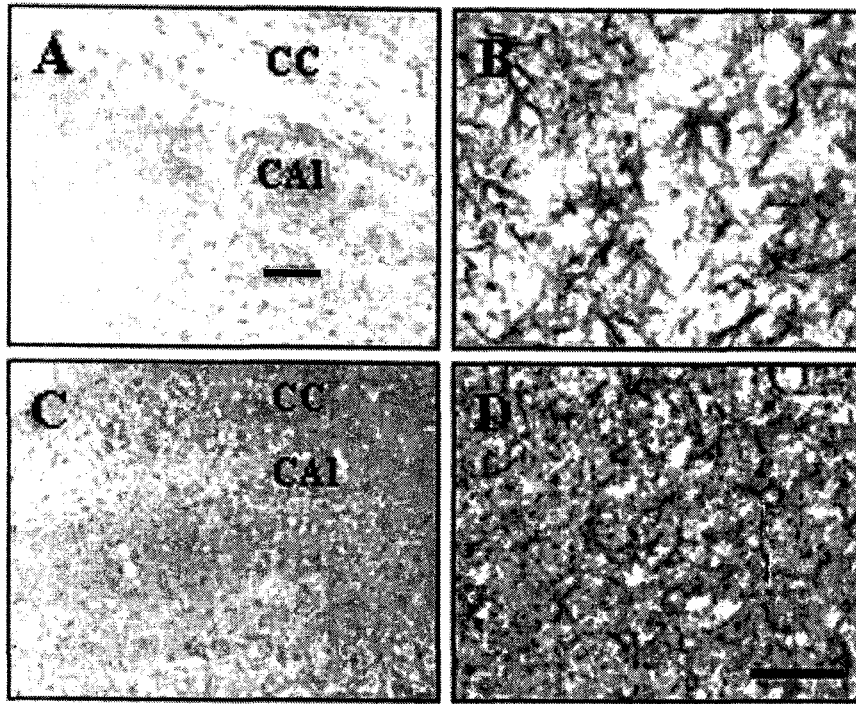
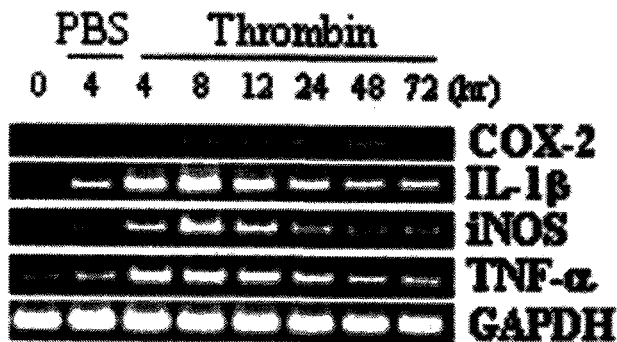


그림 4. GFAP항체를 이용하여 immunohistochemistry를 실시하여 CA1부위의 astrocyte변화를 관찰하였다. (A) PBS를 주입한 대조군. (C) Thrombin을 주입한 실험군. (B, D)는 A와 C를 고배율에서 관찰한 그림. Scale bar: A, C, 200 μ m; B, D, 50 μ m.

▶ 연구내용 5: Thrombin주입에 의한 hippocampus내 pro-inflammatory cytokines들의 생성과 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA의 발현 관찰

▶ 연구내용 5의 결과: Thrombin (20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 substantia nigra에 주입하고 지정된 시간에 hippocampus를 떼어내 mRNA를 추출하였다. 이어 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하고, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), COX-2, iNOS의 primer들을 이용하여 PCR을 실시하였다. Thrombin에 의해 염증반응과 세포사멸을 유도할 수 있는 물질들의 mRNA발현이 시간에 비례하여 증가함을 관찰할 수 있었다. IL-1 β , TNF- α 의 경우 72시간까지 발현이 지속되었고, iNOS의 경우 thrombin처리 뒤 8시간에서 최대 발현을 나타내었고 이후 감소되는 경향을 나타내었다. 한편, microglia의 chemoattraction에 관여하는 효소인 MCP-1이 hippocampus에서 thrombin처리후 증가되는 것으로 보아 microglia의 염증부위로의 이동에 이 효소가 관여하리라 사료된다.

A



B.

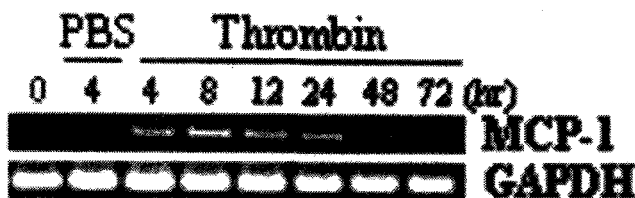


그림 5. Thrombin처리후 hippocampus에서 (A) pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α), COX-2, iNOS mRNA의 발현 증가, (B) MCP-1의 발현 증가.

다. 3차년도 (2003년 6월 1일 ~ 2004년 5월 31일)

■ 연구내용 1: Cortex에서 thrombin에 의한 비신경세포 활성화 관찰

■ 연구내용 1의 결과: Microglia를 염색하는 두가지 특이적인 항체를 이용하여 immunohistochemistry를 실시한 결과 thrombin 주입으로 cortex 부위에서 microglia의 활성화가 일어남을 확인하였다. OX-42 항체로 염색한 결과(그림 1B, D) 세포가 둥글고 세포돌기가 짧아진 전형적인 활성화된 형태를 나타내었다. 활성화된 microglia만을 염색하는 OX-6항체로 염색한 결과(그림 1F, H) thrombin을 주입한 부위에서만 microglia의 활성화를 관찰할 수 있었다.

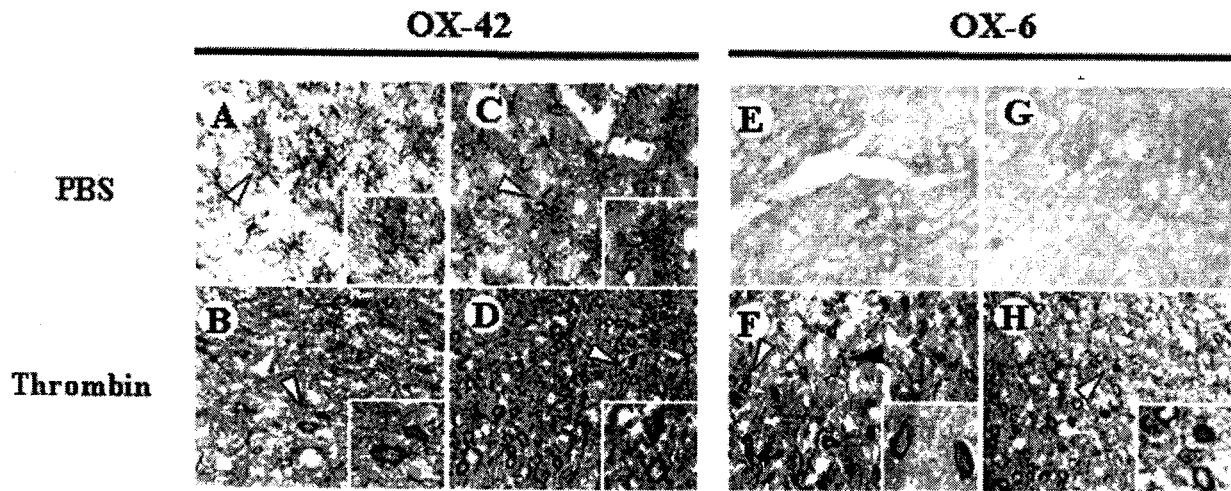


Figure 1. 마이크로글리아의 활성화 여부를 관찰하기 위하여 흰쥐의 대뇌 피질에 thrombin (20 U/4 l; B,D,F,H) 혹은 PBS (A,C,E,G) 주입하고 12시간 (A,B,E,F) 과 24시간 (C,D,G,H) 후 OX-42 antibody (A-D) 와 OX-6 antibody (E-H) 를 이용하여 면역 조직화학 염색법을 수행하였다. A-D,F,H의 inset은 화살표 부위를 확대한 사진이다.

■ 연구내용 2: Cortex에서 thrombin에 의한 신경세포사멸 관찰

■ 연구내용 2의 결과: Thrombin (10, 20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 cortex에 주입하고 일주일 후에 흰쥐의 뇌를 고정시키고 40 μ m 두께의 절편을 만들었다. 일반적인 신경세포의 지표인 nuclear neuronal protein (NeuN) antibody를 이용하여 cortex의 신경세포를 염색한 후 사멸 유무를 관찰하였다. 농도의존적으로 cortex부위의 신경세포들이 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다.

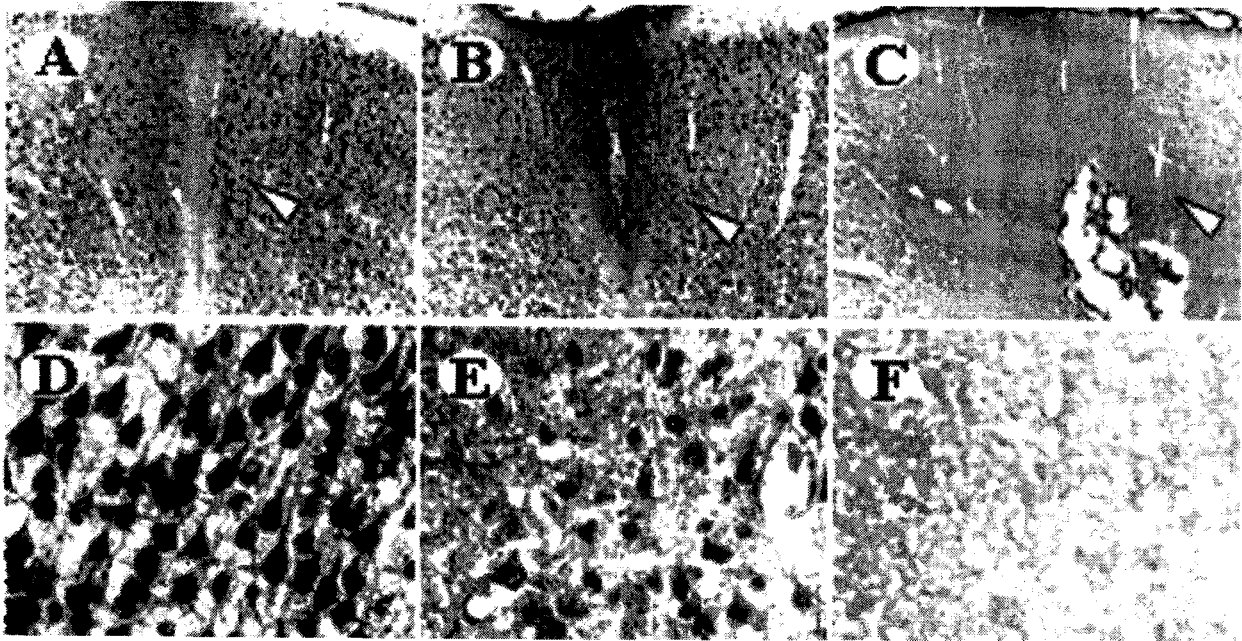


Figure 2. 흰쥐의 대뇌 피질에 thrombin 을 각각 10 U/4 μ l (B, E), 20 U/4 μ l (C, F) 주입하여 NeuN antibody를 사용한 면역조직화학 염색 (A-F) 을 수행하여 신경세포의 사멸을 관찰 하였다. A와 D는 PBS를 주입한 대조군이다. D-F 는 화살표 부위를 확대한 사진이다.

■ 연구내용 3: Cortex의 신경세포사멸 관찰

■ 연구내용 3의 결과: Thrombin (10, 20 unit/4 μl)을 흰쥐의 cortex에 주입하고 24시간 후에 흰쥐의 뇌를 고정시키고 40 μm 두께의 절편을 만들었다. NeuN antibody와 TUNEL assay kit을 이용하여 cortex의 신경세포를 염색한 후 사멸 유무를 관찰하였다. Thrombin을 주입한 cortex부위에서 TUNEL-positive인 신경세포들이 관찰되었다.

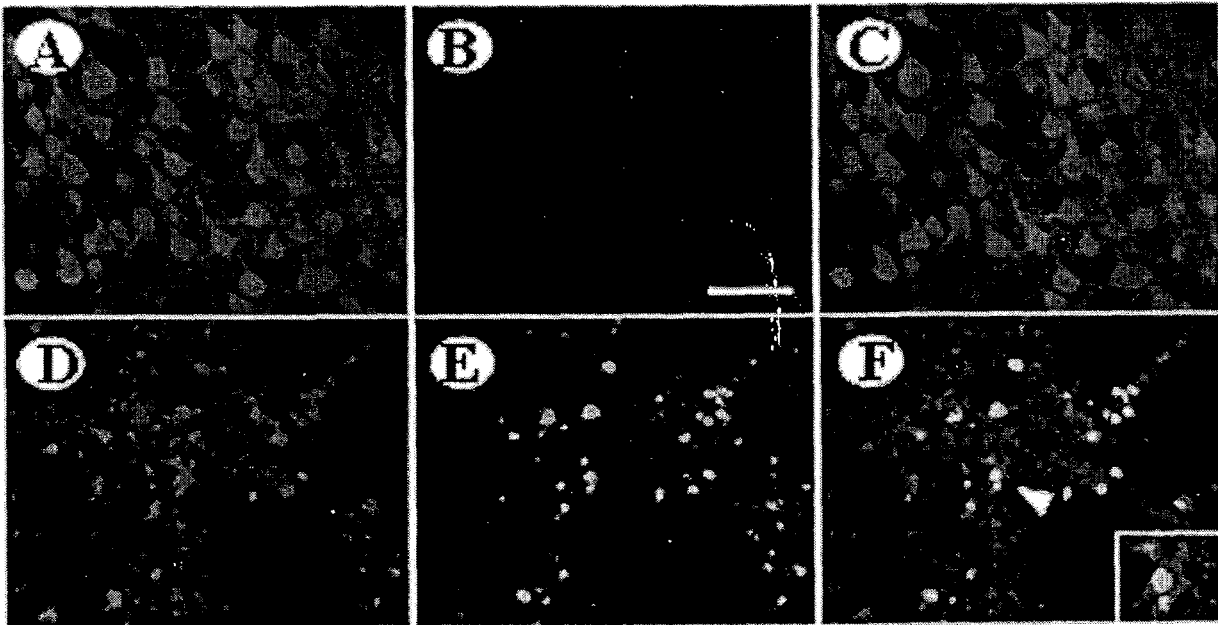


Figure 3. 대뇌피질의 신경세포 사멸 양상을 관찰하기 위해 흰쥐의 대뇌 피질에 thrombin (20 U/4 μl ; D-F) 혹은 PBS (A-C) 주입하여 24시간 후의 뇌 단편을 이용하여 TUNEL (B, E)과 NeuN antibody (A, D) 로 염색 하였다. C 와 F 는 각각을 merge한 사진이다. F의 inset은 화살표 부위를 확대한 것이다.

■ 연구내용 4: 활성화된 마이크로글리아에서 세포독성물질의 발현 관찰

■ 연구내용 4의 결과: Thrombin (20 unit/4 μ l)을 흰쥐의 cortex에 주입하고 지정된 시간에 cortex부위를 떼어내 mRNA를 추출하였다. 이어 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하고, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide (iNOS)의 primer들을 이용하여 PCR을 실시하였다. Thrombin에 의해 염증반응과 세포사멸을 유도할 수 있는 물질들의 mRNA발현이 시간에 비례하여 증가함을 관찰할 수 있었다. iNOS, IL-1 β , TNF- α 의 경우 48시간까지 발현이 지속되었고, IL-6의 경우 thrombin처리 뒤 8시간에서 최대 발현을 나타내었고 이후 감소되는 경향을 나타내었다. 이중형광염색법을 이용하여 iNOS, COX-2, TNF- α 가 활성화된 microglia에서 발현됨을 관찰할 수 있었다.

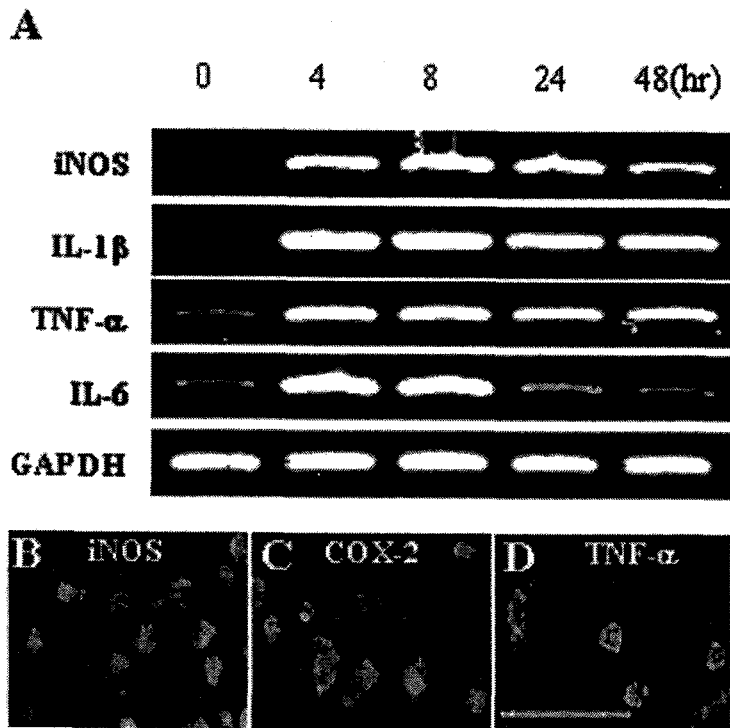


Figure 4. 마이크로글리아의 활성화에 의해 염증반응에 관여하는 사이토카인들과 세포 독성 물질의 발현 여부를 검증하기 위해 흰쥐의 대뇌 피질에 thrombin을 주입하고 조직을 분리하여 RT-PCR을 수행하였으며 (A) thrombin 주입후 24시간후 흰쥐의 뇌 단편으로 면역조직화학 염색을 수행 하였다 (B,C,D).

- 연구내용 5: Thrombin이 직접적으로 대뇌피질신경세포의 사멸에 관여하는지 여부 관찰
- 연구내용 5의 결과: Thrombin의 직접적인 세포독성효과를 검증하기 위하여 흰쥐의 피질신경세포를 순수배양하여 thrombin을 처리하였다. Thrombin처리하고 24시간후 신경세포를 염색하는 MAP-2 antibody를 이용하여 신경세포를 염색하여 관찰한 결과 마이크로글리아가 없는 상태에서 thrombin에 의해 세포가 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다.

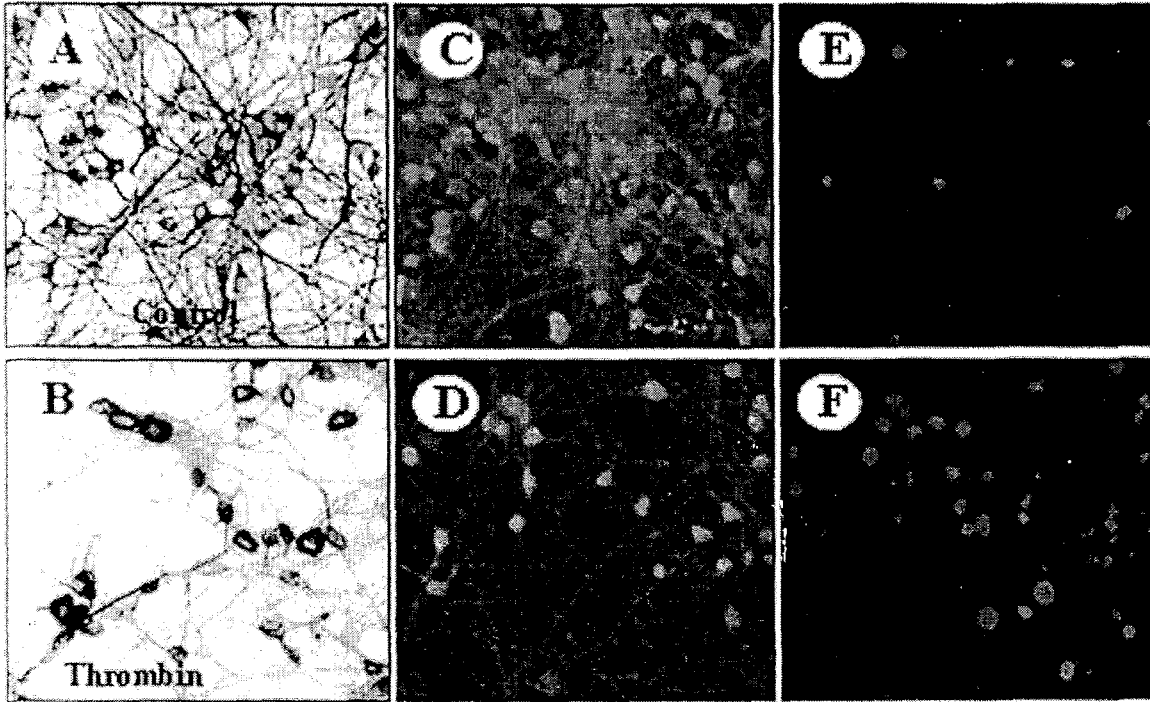


Figure 5. Thrombin이 피질 신경세포에 미치는 직접적인 영향을 알아보기 위해 순수 피질 신경세포 배양에 thrombin (40 U/ml; B, D, F), 혹은 PBS (A, C, E)을 처리하여 24시간후 MAP-2 antibody를 이용하여 염색, 혹은 live and dead cell 염색법을 이용하여 염색 하였다. C 와 D의 세포는 살아있는 세포를 나타내며 E 와 F의 세포는 죽은 세포를 나타낸다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2001)	뇌부위별로 thrombin에 의한 신경세포 사멸 관찰	- 뇌부위별 신경세포사멸의 형태학적 분석 - Thrombin자체의 신경독성 검증 - 흑질의 비신경세포 활성화와 활성화된 microglia에 의한 도파민신경세포 사멸분석	100%
2차년도 (2002)	Thrombin에 의한 hippocampus의 microglia활성화와 활성화된 microglia에 의한 신경세포 사멸 분석	- Hippocampus의 비신경세포 활성화를 시간별로 형태학적인 방법으로 분석 - Nitric oxide생성효소인 iNOS의 발현을 Western blot을 관찰 - iNOS/OX-42 이중형광염색으로 iNOS가 microglia에서 발현됨을 관찰 - Microglia의 활성화와 신경세포 사멸 관련성 분석	100%
3차년도 (2003)	Thrombin에 의한 cortex의 microglia활성화와 활성화된 microglia에 의한 신경세포 사멸 분석	- Cortex의 비신경세포 활성화를 시간별로 형태학적인 방법으로 분석 - Nitric oxide생성효소인 iNOS의 발현을 Western blot을 관찰 - iNOS/OX-42 이중형광염색으로 iNOS가 microglia에서 발현됨을 관찰 - Microglia의 활성화 기전연구 - Microglia의 활성화와 신경세포 사멸과 관련 분석	100%

본 연구결과를 통해서 내인성물질인 thrombin에 의해서 뇌에 존재하는 면역세포인 microglia가 활성화되고 신경세포사멸과 thrombin이 관련됨을 관찰하였고, microglia의 활성화와 신경세포사멸과의 관련성을 밝힘으로써 뇌질환의 발병기전 연구와 새로운 치료전략 수립에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

■ 활성화된 염증세포의 소멸과정과 그에 관여하는 인자를 이해하는 기초학문적인 발전에 기여.

■ 염증 반응은 조직에 손상이 왔을 때 감염으로부터 조직을 보호하기 위한 중요한 방어기전이지만, 염증 매개물질들에 의해 오히려 손상이 증폭되기도 한다. 그러므로 염증반응의 조절에 대한 연구를 통해 염증을 조절하는 방안을 강구할 수 있을 것으로 기대된다.

■ Microglia의 활성화는 퇴행성 신경질환등 신경계 질환과 깊은 관련성을 가지고 있으므로 이러한 연구에서 얻어지는 지식은 신경질환의 발병 기전 이해와 치료에 간접적 또는 직접적으로 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 알츠하이머병과 microglia의 활성화

알츠하이머 병으로 미국에서만 4백만명이나 고통을 받고 있지만, 치료방법은 고사하고 그 실체에 대해서도 거의 알지 못하고 있었다. 그러나 이제는 많은 연구자들이 달라붙어서 알츠하이머의 진행 과정에 대한 가설 하나를 강하게 뒷받침하는 증거들을 발표하기 시작하였다. 이 가설은 뇌의 면역계가 이 병의 진행을 촉진 시킨다는 내용이다.

알츠하이머 병의 징후 중에 하나는 베타-아밀로이드라 불리는 단백질의 덩어리로 이루어진 뇌의 상해이다. 이 베타-아밀로이드는 아밀로이드 전구체 단백질이라 불리는, 뉴런이나 뇌의 다른 구성 세포 등의 구조 인자가 파괴되어 생기는 산물이다. 원래 정상적으로 베타-아밀로이드는 계속해서 제거되지만, 아직 정확히 알지 못하는 유전자들과 관련된 이유로 인해서 몇몇 사람들이 이를 제거하지 못하게 되어 알츠하이머 병에 걸리게 되는 것이다. 이들의 뇌에서는 뉴런의 바깥쪽에 베타-아밀로이드가 쌓이게 되어 결국은 녹지 않는 단백질 덩어리가 된다.

비록 이들 단백질 덩어리가 알츠하이머와 연관이 있다는 것은 이미 알고 있었지만, 이것이 병의 원인인지, 결과로서 나타난 효과인지는 분명하지 않았었다. 분명한 것은 몇몇 이유로 이 근처의 뉴런들이 죽게 되어서 점차로 치매증을 일으킨다는 것이었다. 몇 년전에 몇 명의 신경과학자들은 알츠하이머 병이란 뇌의 면역 세포가 이 단백질 덩어리를 없애려 하는데, 부적절하게도 주위의 건강한 세포들도 죽이게 되는 것이라 의심했었다. 이러한 종류의 잘못된 면역 반응으로는 류마티스 관절염과 부스럼 같은 질병들이 이미 알려져 있었다.

이와 같은 가설은 10년 전까지 별다른 인정을 받지 못했는데, 그 이유는 뇌에는 면역세포가 존재하지 않는다고 알려졌었기 때문이다. 뇌의 모세혈관들은 몸의 다른 부분의 혈관과는 일종의 장벽으로 구분되어 있다. 모세혈관의 세포벽은 면역세포 및 다른 큰 분자들이 들어오는 것을 막아서 해로운 면역반응이 일어나지 못하게 한다. 그리고 성상세포 (astrocyte)라 불리는 부가적인 세포층이 이 장벽을 강화하는 역할을 해준다. 만일 면역세포가 뇌에 침입하게 되면 뇌의 정상적인 단백질을 공격하게 되고, 그 결과로 다양한 경화증으로 인한 점차적인 마비가 오게 된다고 생각했었다.

그러나 과거 십년 동안 연구자들은 뇌도 자신의 면역기능을 가지고 있다는 사실을 깨닫게 되었다. 바로 microglia라 불리는 특성화된 세포이다. 마크로파지가 몸의 다른 조직들을 돌아다니면서 죽은 세포들과 병원균 등을 잡아먹듯이, microglia는 뇌를 순찰하고 뉴런 주변을 기어다닌다. 이들은 손상된 뉴런들을 재생시키는 것을 도와주며, 뇌의 발달과정에서도 중요한 역할을 담당한다고 생각되어진다. 즉, 적절한 때에 태아의 뇌로 움직여서 올바른 신경 연결을 하지 못해서 죽어가는 여분의 뉴런들을 먹어치우는 역할을 하리라 생각하는 것이다. 밴쿠버의 킨스먼 신경학 연구소의 신경과학자인 패트릭 맥기어는 몇 년전에 알츠하이머 병에서 microglia의 역할에 관심을 갖게 되었다. 그는 microglia가 단순히 죽은 세포들을 먹어치우는 역할만 하는게 아니라, 단백질 덩어리들도 공격하며 이 과정에서 건강한 세포들도 죽이게 되리라고 생각하였다.

이를 밝히기 위해서 맥기어와 다른 연구자들은 알츠하이머로 죽은 주검의 뇌를 검사해서 보체 (complement)를 찾기 시작하였다. 이 보체란 이름의 단백질은 혈액을 떠다니다가 침입자 등에 붙어서 면역 세포들을 침입자 주위로 모으는 역할과 "보체 연쇄반응 (complement cascade)"을 통해서 자신이 직접 침입자의 막에 구멍을 내는 역할 등을 수행한다. 뇌에서 보체의 존재는 마이크로글리아가 단백질 덩어리를 공격하도록 활성화된다는 표시일 수 있다.

그러나 이 연구 이전까지는 아무도 보체 단백질이 뇌에서 발견되리라고는 생각하지 않았었다. 이런 믿음을 갖게 된 이유는 정교한 뇌 조직 근처에 보체가 존재한다는 것이 너무나 위험하게 생각됐기 때문이다. 보체 연쇄 반응 등은 침입자의 막뿐만 아니라 주위의 건강한 세포의 막도 뚫어서 파괴시켜 4분 안에 죽도록 만든다. 맥기어는 이 보체를 핵폭탄에 비유한다. 이들이 반응을 시작하면 연쇄반응이 일어나서 걷잡을 수 없고, 또 엄청난 손상을 입히기 때문이다.

작년에 맥기어와 몇 명의 다른 연구자들은 사망한 알츠하이머 환자들의 뇌에서 보체 단백질을 분리하였다. 게다가, 맥기어는 보체 단백질들이 베타-아밀로이드 덩어리와 microglia 세포에 모두 다 결합하는 것을 발견하였다.

맥기어는 이 증거가 뇌가 자신을 파괴한다는 사실을 뒷받침한다고 믿는다. 그의 알츠하이머 병의 진행에 관한 이론은 다음과 같다. 일단 단백질 덩어리가 형성되면, 보체 단백질들이 여기에 달라 붙는다. 그리고 마이크로글리아들을 끌어 모은다. 보체 단백질들이 비록 건강한 세포들에 구멍을 뚫지 않더라도, 마이크로글리아가 독성 물질을 분비하도록 한다는 것이다. 이 독성물질의 분비는 단백질 덩어리를 없애기 위한 거지만, microglia는 녹지 않는 이 덩어리를 분해할 수 없어서 계속해서 면역반응은 일어나게 된다. 그래서 종국에는 뉴런들이 손상을 입게 된다는 것이다.

면역계가 병원균보다 더 해로울 수 있다는 생각은 전혀 새로운게 아니다. 예를들면, 결핵에서는 폐가 세균에 의해 손상을 입는게 아니라 세균에 대한 면역 반응 때문에 손상을 입는다.

맥기어의 이론은 알츠하이머 환자의 치료에 새로운 가능성을 열었다. 항염제 (anti-inflammatory drug) 들은 마이크로글리아의 공격을 저해시킬 수 있을 것이고 이는 건강한 뇌 조직의 죽음을 막을 수 있을 것이다.

많은 연구들이 맥기어의 가설을 뒷받침 하고 있다. 그와 그의 동료들은 6달 동안의 항염제 처리가 28명의 환자의 인지 능력이 감소하는 것을 막아준다는 사실을 발견하였다. 다른 연구로는 50쌍의 쌍둥이 환자의 병력을 조사한 것이 있다. 여기서 항염제를 복용한 쌍둥이는 복용하지 않은 쌍둥이에 비해 알츠하이머 병에 걸린 확률이 적다는 것을 발견하였다. 그리고 발티모어 롱지튜디널 노화연구소의 명부에 기재된 2,000 명의 사람들에게 대한 15년간의 연구는 항염제를 복용하였을 경우, 알츠하이머 병에 걸릴 확률이 약 30에서 60%정도 준다는 것을 보여 주었다.

이러한 연구들에도 불구하고 존 홉킨스 의과대학의 신경학자인 클라우디아 카와스는 면역계에 의한 염증은 알츠하이머 병의 복잡한 여러 원인들 중 단 한가지에 불과할 수도 있다고 경고한다. 우리가 알기 시작한 것은 알츠하이머가 인생의 말년기에 갑자기 찾아오는 질병이 아니라 일생동안 조금씩 쌓인 결함으로 인한 것이란 사실 뿐이며, 염증은 그러한 원인들 중 한가지 일 수 있다는 통찰이라는 얘기이다. 하지만 그녀도 알츠하이머의 치료에 대해서는 낙관적인 생각을 갖고 있다. 아마도 자기 생전에 이 병의 치료법을 알게 될 것이라고 얘기한다.

2. 말기암환자의 만성적 통증과 microglia의 활성화

말기 암환자를 괴롭히는 만성통증은 뇌나 척수에 있는 특수세포가 과잉으로 작용하기 때문이라는 연구 결과가 나왔다. 일본 국립의약품식품위생연구소 신경약리학 이노우에 카즈히데 부장 등 연구팀은 신경세포 손상으로 통증의 감각이 과민해지는 만성질환인 신경인성 동통 발증에 척수세포에 존재하는 단백질이 관여하는 것으로 확인했다고 밝혔다. 신경인성 동통을 억제하는 치료법 개발에 길을 열어주는 연구성과로서, 2003년 8월 14일자 세계적 과학잡지 '네이처'에 발표됐다.

신경인성 동통은 암이나 척수손상, 당뇨병 진행 등으로 신경세포 그 자체가 손상되어 초래하는 것으로 알려져 왔으나, 상세한 메커니즘은 밝혀지지 않았다. 현재로서는 모르핀이나 항염제도 효과를 보이지 않는

등. 유효한 치료제가 없는 실정이다.

연구팀은 뇌나 척수세포 속에서 면역을 담당하는 microglia라는 세포에 주목했다. 지각신경을 파괴해 인공적으로 신경인성 동통을 일으킨 쥐를 제작하고 관찰한 결과, microglia 세포 표면에서 통증의 신호 전달에 관여하는 'P2X4'라는 단백질이 증가, 세포가 과잉 반응하는 것으로 확인됐다. 아울러 과잉 반응한 microglia를 정상 쥐의 척수에 주사했더니, 가벼운 자극에도 통증을 일으켰으며, 반대로 이 단백질이 발현하지 않도록 유전자 조작한 쥐에선 통증이 절반으로 감소했다는 것. 이노우에 부장은 P2X4의 작용을 막으면 통증을 억제할 수 있을 것으로 보고, 수년 내 치료제를 개발해 임상시험에 착수할 계획이라고 밝혔다.

제 7 장 참고문헌

- Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172: 151-154.
- Brown DR (2001) Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech* 54: 71-80.
- Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70: 1584-1592.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O (2002) Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15: 991-998.
- Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, Landreth GE (1999) Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of α -amyloid and prion proteins. *J Neurosci* 19: 928-939.
- Debeir T, Benavides J, Vige X (1998) Involvement of protease-activated receptor-1 in the in vitro development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 82: 739-752.
- Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB (2000) Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem* 74: 2213-2216.
- Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7: 75-83.
- Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D (1991) Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6: 575-581.
- Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD (1997) Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 17: 5316-5326.
- Fenton JW (1986) Thrombin. *Ann NY Acad Sci* 485: 5-15.
- Giasson BI, Lee VM (2001) Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 31: 885-888.
- Gingrich MB, Traynelis SF (2000) Serine proteases and brain damage: is there a link? *Trends Neurosci* 23: 399-407.
- He Y, Appel S, Le W (2001) Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 909: 187-193.
- Hirsch EC (2000) Glial cells and Parkinson's disease. *J Neurol* 247 [Suppl 2]: II58-II62.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor in glial cells. *J Neurosci* 19: 3440-3447.
- Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J*

- Neurosci 20: 6309–6316.
- Knott C, Stern G, Wilkin GP (2000) Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 16: 724–739.
- Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A (1998) Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39: 167–180.
- Le W, Rowe D, Xie W, Ortiz I, He Y, Appel SH (2001) Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: 8447–8455.
- Lee DY, Kim SU, Joe EH, Yang MS, Jin BK (2001) Thrombin induces cell death of dopaminergic neurons in mesencephalic culture: role of microglia. *Soc Neurosci Abstr* 27: 837.9.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5: 1403–1409.
- Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos Jr L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374: 647–650.
- Moller T, Hanisch UK, Ransom BR (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* 75: 1539–1547.
- Nishino A, Suzuki M, Ohtani H, Motohashi O, Umezawa K, Nagura H, Yoshimoto T (1993) Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *J Neurotrauma* 10: 167–179.
- Rodrigues RW, Gomide VC, Chadi G (2001) Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *Int J Neurosci* 109: 91–126.
- Ryu JK, Shin WH, Kim J, Joe EH, Lee YB, Cho KG, Oh YJ, Kim SU, Jin BK (2002a) Trisialoganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia. *Glia* 38: 15–23.
- Ryu JY, Pyo HK, Jou IR, Joe EH (2000) Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF- κ B. *J Biol Chem* 275: 29955–29959.
- Soifer SJ, Peters KG, O'Keefe J, Coughlin SR (1994) Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol* 144: 60–69.
- Weinstein JR, Gold SJ, Cunningham DD, Gall CM (1995) Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. *J Neurosci* 15: 2906–2919.
- Strigrow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G (2000) The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2264–2269.
- Suo Z, Wu M, Ameenuddin S, Anderson HE, Zoloty JE, Citron BA, Andrade-Gordon P, Festoff BW (2002) Participation of protease-activated receptor-1 in thrombin-induced microglial activation. *J Neurochem* 80: 655–666.

- Turgeon VL, Lloyd ED, Wang S, Festoff BW, Houenou LJ (1998) Thrombin perturbs neurite outgrowth and induces apoptotic cell death in enriched chick spinal motoneuron cultures through caspase activation. *J Neurosci* 18: 6882–6891.
- Vila M, Jackson–Lewis V, Guegan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K, Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14: 483–489.
- Wu DC, Jackson–Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1–methyl–4–phenyl–1,2,3,6–tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci* 22: 1763–1771.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

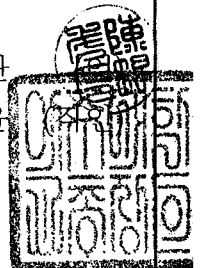
사업명	중사업명	뇌신경생물학연구개발사업		
	세부사업명			
과제명	내인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의 활성화와 신경세포사멸의 관련성 연구			
연구기관	아주대학교	연구책임자	진 병 관	
총연구기간	2001년 8월 1일 ~ 2004년 5월 31일 (34개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	93,000		93,000	
기술분야	신경과학			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구(√)	6. 기타목적활용 (교육연구) ()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2004년 7월 21일

연구책임자 : 진 병 관
연구기관장 : 박 재 운



과학기술부장관 귀하

[첨부1]

연구결과 활용계획서

연구목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	뇌부위별로 thrombin에 의한 신경세포 사멸 관찰	<ul style="list-style-type: none"> - 뇌부위별 신경세포사멸의 형태학적 분석 - Thrombin자체의 신경독성 검증 - 흑질의 비신경세포 활성화와 활성화된 microglia에 의한 도파민신경세포 사멸분석
2차년도 (2002)	Thrombin에 의한 hippocampus의 microglia활성화와 활성화된 microglia에 의한 신경세포 사멸 분석	<ul style="list-style-type: none"> - Hippocampus의 비신경세포 활성화를 시간별로 형태학적인 방법으로 분석 - Nitric oxide생성효소인 iNOS의 발현을 Western blot을 관찰 - iNOS/OX-42 이중형광염색으로 iNOS가 microglia에서 발현됨을 관찰 - Microglia의 활성화와 신경세포 사멸 관련성 분석
3차년도 (2003)	Thrombin에 의한 cortex의 microglia활성화와 활성화된 microglia에 의한 신경세포 사멸 분석	<ul style="list-style-type: none"> - Cortex의 비신경세포 활성화를 시간별로 형태학적인 방법으로 분석 - Nitric oxide생성효소인 iNOS의 발현을 Western blot을 관찰 - iNOS/OX-42 이중형광염색으로 iNOS가 microglia에서 발현됨을 관찰 - Microglia의 활성화 기전연구 - Microglia의 활성화와 신경세포 사멸과 관련 분석

뇌에 존재하는 내인성물질인 thrombin에 의한 microglia의 활성화가 중추신경계의 여러부위 (substantia nigra, hippocampus, cerebral cortex)에서 세포독성을 유발하는 여부와 그 기전을 탐색하고 분석함으로써 microglia의 활성화와 신경세포사멸과의 관련성을 밝히고 퇴행성뇌질환의 발병기전 연구와 새로운 치료전략 수립에 기초 자료를 제공한다.

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
Journal of Neuroscience	Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo	2003년 7월 2일	23	Society for Neuroscience	USA	O
Neurobiology of Disease	Thrombin induces nigral dopaminergic neurodegeneration in vivo by altering expression of death-related proteins	2003년 11월	14	Elsevier Science	USA	O
Glia	Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo	2004년 4월 15일	46	Wiley-Liss	USA	O
계: 3 건수						

학술회의 발표 실적 필요시 별지사용

학술회의 명칭	제목	개최연월일	호	발행기관	국명
Society for Neuroscience's 31rd Annual meeting in San Diego	THROMBIN-INDUCED IN VIVO NEURONAL CELL DEATH OF SUBSTANTIA NIGRA THROUGH ACTIVATION OF P53 AND CASPASE-3	2001년 11월 14일	661.12	Society for Neuroscience	USA
Society for Neuroscience's 32rd Annual meeting in Orlando	THROMBIN INDUCES DEGENERATION OF DOPAMINERGIC NEURONS IN THE RAT SUBSTANTIA NIGRA THROUGH MICROGLIAL ACTIVATION	2002년 11월 5일	493.17	Society for Neuroscience	USA
Society for Neuroscience's 33rd Annual Meeting in New Orleans	MINOCYCLINE PROTECTS NIGRAL DOPAMINERGIC NEURONS FROM THROMBIN-INDUCED NEUROTOXICITY BY INHIBITING MICROGLIAL ACTIVATION.	2003년 11월 9일	282.4	Society for Neuroscience	USA
계: 3 건수					

3. 연구성과

※ 기술이전이나 기업화 완료(추진중 포함) 실적

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

나. 활용방법

■ 활성화된 염증세포의 소멸과정과 그에 관여하는 인자를 이해하는 기초학문적인 발전에 기여.

염증 반응은 조직에 손상이 왔을 때 감염으로부터 조직을 보호하기 위한 중요한 방어기전이지만, 염증 매개물질들에 의해 오히려 손상이 증폭되기도 한다. 그러므로 염증반응의 조절에 대한 연구를 통해 염증을 조절하는 방안을 강구할 수 있을 것으로 기대된다.

■ Microglia의 활성화는 퇴행성 신경질환등 신경계 질환과 깊은 관련성을 가지고 있으므로 이러한 연구에서 얻어지는 지식은 신경질환의 발병 기전 이해와 치료에 간접적 또는 직접적으로 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

5. 기대효과

■ 동물조직을 이용한 신경생물학 연구에 기본이 되는 형태학, 분자신경생물학 등의 연구 기술 확립

■ 신경세포사멸의 기전으로 비신경세포의 활성화에 관한 연구를 수행함으로써 뇌질환의 병인기전 이해와 새로운 치료전략 수립에 기초자료 제공

뇌질환의 대부분이 노인병이며 노인 인구의 급증으로 발생하는 경제적 산업적 손실을 최소화하는데 기여

[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	M1-0108-00-0028			
과제명	내인성독성물질에 의한 뇌부위별 in vivo glial cells들의 활성화와 신경세포사멸의 관련성 연구			
사업명	뇌신경생물학연구개발사업			
세부사업명				
연구기관	아주대학교	기관유형	학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001년 8월 1일 ~ 2004년 5월 31일 (34개월)			
총연구비	정부(93,000)천원 민간()천원 합계(93,000)천원			
연구책임자 1	성명	진 병 관	주민번호	
	근무기관 부서	아주대학교	E-mail	bkjin@ajou.ac.kr
	직위/직급	조교수	전화번호	031-219-4560
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	진 병 관	소속/부서	아주대학교
	직위/직급	조교수	E-mail	bkjin@ajou.ac.kr
	전화번호	031-219-4560	FAX	031-216-6381
	주소	(443-749)경기도 수원시 영통구 아주대학교 의과대학		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도 · 이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 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			