

일반연구자지원사업 최종(결과)보고서

							양식A101	
① 부처사업명(대)	기초연구사업			보안등급(보안, 일반)		일반		
② 사업명(중)	일반연구자지원사업			공개가능여부(공개, 비공개)		공개		
③ 세부사업명(소)	기본연구							
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)			비실용화			
⑤ 과제명	국문	급성전골수성백혈병 동물모델에서 비소화합물 (Arsenic hexaoxide; As ₄ O ₆)의 치료효과						
	영문	Therapeutic efficacy of tetraarsenic hexaoxide (As ₄ O ₆) in the treatment of acute promyelocytic leukemia in animal model						
⑥ 주관연구기관	차의과학대학교							
⑦ 협동연구기관								
⑧ 주관연구책임자	성명	오도연		직급(직위)	교수			
	소속부서	내과학 교실		전공	혈액종양학			
⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)								
년도	정부출연금(A)	기업체부담금			정부의 출연금(B)	상대국 부담금(F)	합계 G=(A+B+E)	참여 연구원수
		현금(C)	현물(D)	소계 E=(C+D)				
1차년도	39,000			0			39,000	2
2차년도				0			0	
3차년도				0			0	
4차년도				0			0	
5차년도				0			0	
합계	39,000	0	0	0	0	0	39,000	2
⑩ 총연구기간	2012. 05. 01 ~ 2013. 04. 30 (12개월)							
⑪ 다년도협약연구기간	기재하지 않음							
⑫ 당해연도연구기간	2012. 05. 01 ~ 2013. 04. 30(12개월)							
⑬ 참여기업	중소기업수		대기업수		기타		계	
								0
⑭ 국제공동연구	상대국연구기관수		상대국연구개발비		상대국연구책임자수			
<p>관계 규정과 모든 지시사항을 준수하면서 국가연구개발사업에 따라 수행 중인 연구개발과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출 합니다.</p> <p style="text-align: center;">2013 년 6월 20일</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 : 오도연</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : 이부영</p> <p style="text-align: center;">교육과학기술부장관 귀하</p>								

〈 목 차 〉

I. 연구결과 요약문	3
II. 연구내용 및 결과	
1. 연구과제의 개요	4
2. 국내·외 기술개발 현황	5
3. 연구수행 내용 및 결과	5
4. 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	12
5. 연구결과의 활용 계획	12
6. 연구과정에서 수집한 해외 과학기술 정보	13
III. 연구성과	14

I. 연구결과 요약문

본 연구를 통해 급성전골수성백혈병(Acute promyelocytic leukemia; APL)의 동물 모델을 확립하여 신약 후보로서 비소화합물인 tetraarsenic oxide(TAO)의 효과를 검증하여 TAO의 임상 적용 가능성에 대한 근거를 제시하고자 하였다.

(1) NB-4 세포주를 이용한 실험에서 XTT assay에서 TAO를 첨가하였을 때 모든 세포주가 TAO의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소하였다.

(2) NB-4 세포주를 이용한 Flow cytometry 분석에서 TAO는 APL 백혈병세포의 분화과정을 거치지 않고 세포사멸을 유도하였다.

(3) ATO와 TAO를 처리한 NB-4세포에서 Caspase 3의 활성이 증가할 때, 세포 사멸에 관련된 인자인 anti-apoptotic 단백질 Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1L은 감소한 반면, pro-apoptotic 단백질 Bax 와 P53는 증가하였다.

(4) 마우스에 방사선(TBI 3.0Gy)으로 전처리하여 하루를 경과 한 후 마리당 1×10^7 개의 NB-4 세포를 피하 주사하여 만든 피하종양 모델에서 3군으로 나누어 각 군에 PBS, ATO(As₂O₃, 10mg/Kg), TAO(As₄O₆, 10mg/Kg)를 매일 10일간 주사한 후 3주 동안 종양 크기를 관찰하였을 때, 종양의 크기는 치료하지 않은 군에 비해서 ATO 또는 TAO 치료 군이 월등하게 종양 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.

(5) 꼬리 정맥을 통해 NB4 백혈병 세포주를 주입하였을 경우 방사선 조사 후 백혈병 세포가 생착되어 복강과 등 등에 고형암은 생성했으나 비장 골수 등에 백혈병이 발생하지 않고 고형암의 발현율도 매우 낮아 약제 실험을 위한 동물실험모델로 부적합하다고 판단되었다.

(6) NB-4 세포주(3×10^6 개)를 생후 8주된 마우스의 복강에 이식하여 복수가 유발되는 마우스 모델을 재현하였다. 이 모델은 실험기법 상 방사선 조사의 번거러움을 피할 수 있는지를 알아보기 위하여 NB3 세포의 이식 전 전처리로 방사선조사를 하지 않고 cyclophosphamide을 이용하여 재현하였다.

II. 연구내용 및 결과

1. 연구과제의 개요

급성전골수성 백혈병(acute promyelocytic leukemia; APL)은 급성골수성백혈병의 일종으로 15번 성염색체의 장완에 위치한 유전자인 PML과 17번에 위치한 RAR α 의 전좌에 의해 만들어진 융합유전자에 의해서 발생하는 백혈병이다. APL은 다른 백혈병에 비해 미성숙전골수세포(promyelocyte)의 증식을 특징으로 하는 질환으로 출혈의 병인이 APL의 미성숙전골수세포에 포함된 응고촉진물질과 섬유소용해물질 때문임이 밝혀지고, ATRA가 유전자결함을 교정할 수 있음이 밝혀지기 전인 1990년대 초반까지만 해도 치료를 기다리다가 혹은 치료중 파중성혈관내응고 등 출혈 질환로 사망률이 높았던 질환이다. 이 질환은 전통적인 항 백혈병 치료제인 anthracycline, cytosine arabinoside 등의 전통적인 항암화학요법에 감수성이 있으나 이들만으로 치료시에는 치료중 출혈 합병증이 발생하여 조기에 사망하거나 심각한 후유증을 종종 발생시키는 질환이었다.

APL은 all-trans retinoic acid (ATRA)와 같은 분화요법에 의해 관해가 되며 (Castaigne et al. 1990). ATRA 및 anthracycline을 포함하는 항암화학요법의 병용요법으로 63% ~ 90%에 가까운 생존율을 보인다 (Tallman et al. 1997). 그러나 APL이 ATRA를 포함하는 항암치료에 반응하지 않거나 재발할 경우 조혈모세포이식이 선택할 수 있는 유일한 치료방법이었지만 이 방법의 성공률은 매우 불량하고 그나마도 고령이나 활력이 저하된 환자에서는 시행할 수 없는 실정이다.

1970년대 초 중국에서 arsenic trioxide(삼산화비소, As₂O₃, ATO)가 APL, 림프종 및 다른 여러 암에서 효과가 있다고 보고되었고, 이후 재발성 혹은 불응성 APL 환자에서 ATO의 투여로 52%에서 96%에 이르는 높은 완전관해율을 보이는 것이 알려졌다. 이후 다기관 연구에서 재발한 APL에서 85%의 완전관해율 및 ATO 치료 2 cycle 후에 PML-RAR α PCR 음성율은 78% 이었다 (Sanz et al. 2005; Shen et al. 2004). ATO의 부작용으로는 retinoic acid syndrome과 유사한 증상, 심전도 이상(QTc 간격연장), 말초신경염 등이 있다. ATO는 골수억제 및 기타 다른 독성이 적은 장점이 있으며, ATRA와 교차내성이 없는 것으로 알려졌다. ATO는 세포사멸사 및 분화유도에 의해 항암효과를 보이는 것으로 추정된다. 현재 ATO는 재발성 혹은 불응성 APL 환자의 치료에서 표준 치료제로 알려져 있다.

APL의 치료제로 ATO의 탁월한 효과에도 불구하고 현재 우리나라에서는 ATO는 전량 수입에 의존하는 고가의 약품으로 의료비 경감과 국내 제약산업의 발전을 위해서 ATO와 유사한 약제의 국산화가 필요할 것이다. 또한, 최근 ATO는 APL 치료에서 ATRA와 비슷한 치료성적과 교차내성이 없어 재발성, 불응성 뿐만 아니라 APL의 초기 관해 유도 치료에도 점차 적응증이 확대되려는 추세로 연구가 진행되는 추세이다. 본 연구자들은 최근 실험실 연구를 통해 ATO 유사체로 연구 중인 tetra arsenic oxide (TAO)(Park 등, 2003)가 APL 세포주에서 ATO와 거의 비슷하거나 우월한 항 백혈병 효과를 가지고 있음을 확인하였으며 APL 세포주를 이용한 xenograft 피하종양생성 마우스 모델에서도 항백혈병 효과가 ATO와 유사하다는 것을 확인하였다. 그러나 이 모델은 피하종양모델로 고형암 모델이지 사람에서 발생하는 백혈병과 같은 혈액에 백혈병세포가 존재하는 혈액암 모델은 아니므로 사람의 백혈병과 유사한 혈액암 모델을 확립하며 확보한 APL mouse 모델에서 TAO가 ATO와 유사한 APL 치료 효과가 있는지 평가하고자 본 연구를 수행하였다.

2. 국내외 기술개발 현황

APL 동물모델은 현재까지 3가지가 주로 전임상 시험의 모델로 인정받고 있다. 첫 째는 환자의 백혈병세포나 이미 확립된 APL 세포주를 누드 마우스의 피하에 이식하는 xenograft 모델이 있다 (Caretto P, 등 1989; Kosugi H, 등, 1989; Ninomiya M, 등, 2001). 두 번째로 환자의 백혈병세포나 이미 확립된 APL 세포주를 누드 마우스의 복강에 이식하여 복수가 유발되는 ascites 모델이 있다(Zhang SY, 등, 1996). 그러나 이 두 가지 모델은 피하 및 복강내에 종양이 국한되어 APL이 조혈기관에 발생한 혈액질환으로 비장, 골수, 혈액 등 조혈기관에 병변이 발생하는 질환 본래의 병리현상을 정확히 반영했다고 할 수 없다.

세 번째 APL 모델은 이러한 혈액암의 성상을 가장 재현하여 사람의 APL과 가장 흡사한 모델로 PML/RAR α 유전자 도입을 통한 형질전환 마우스가 개발되었다(He LZ, 등, 1997). 이 모델은 human cathepsin-G(hCG)가 백혈구가 분화할 때 발현된다는 점에 착안하여 PML/RAR α 유전자 앞에 hCG 유전자를 결합시켜 형질전환 마우스를 개발한 것이다. 그러나 이 동물모델에서는 APL 유전자의 penetrance가 낮아 백혈병이 조기에 발현되지 않고 latent 한 시기를 지나 6-18개월이 소요됨이 알려졌다. 이후 마우스에서는 사람에서와 달리 APL의 발현을 위해서 PML/RAR α 외에 다른 추가 자극이 필요함을 알게 되었다.

Rego E 등(2001, 2012)은 이후 hCG-PML-RAR α 형질전환 마우스 (TM)의 낮은 penetrance를 해결하기 위해 syngeneic transplantation 모델을 개발하였다. 이 방법을 간단히 요약하자면, leukemic TM 을 희생시킨 후 비장이나 골수에서 얻은 백혈병세포를 냉동보관 하였다가, wild type의 마우스에 방사선을 400-700 cGy (33 cGy/min 혹은 200cGy 3시간 간격 2번) 조사 후 4- 12시간후 2-3 x 10⁻⁶ 개의 냉동보관했던 APL 발현마우스의 백혈병세포를 이식할 마우스의 정맥에 주사하여 이식을 시도하였다. 이 때 치료하지 않은 마우스는 모두 3-4 주 사이에 죽었으며 치료약제는 대개 이식후 1주일이 경과한 후 매일 혹은 주 3회 복강으로 2-3주 주사하였다. 이때 이식된 마우스에서 APL의 발현율은 100% 이었다. 이는 마우스에서 백혈병을 발현시키기 위해서는 APL의 발현에 필요한 PML/RAR α 융합유전자와 추가의 돌연변이 혹은 PML/RAR α 의 copy 수의 현저한 증가를 위한 조처가 필요함을 알게 되었다(Rego EM, 등, 2001).

그러나 아직 국내에서는 현재까지 APL의 치료제 개발에 필요한 연구가 별로 이루어진 바가 없으며, 세포주를 이용한 실험으로, ATO가 microtubule의 depolymerization을 유발함(Baek JH 등, 2012), reactive oxygen 생성에 관여하여 APL 세포사멸에 관여함(Mun YC 등, 2013), Src Family kinase를 통한 세포분화에 관여함 등의 연구(Cheong HJ 등, 2013)등 세포에서의 기전을 탐구하는 연구가 소수 이루어지고 있으나 아직 전임상 연구에 필수인 동물모델을 이용한 시도는 본 연구가 유일한 실정이다.

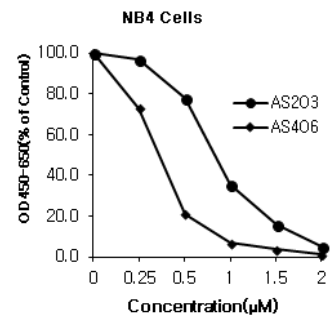
3. 연구수행 내용 및 결과

(1) 세포사멸과 관련 신호전달 인자에 대한 영향 관찰

1) XTT 분석을 통한 TAO의 항 백혈병 효과

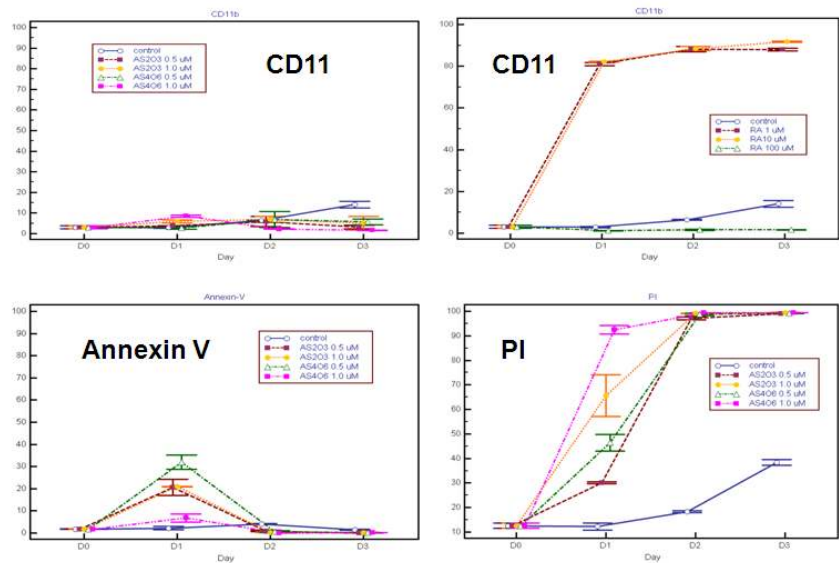
APL 세포 주인 NB-4 (1x 10⁶ cells/ml)와 UF-1(1x 10⁶ cells/ml)을 여러 농도의 ATRA, ATO, TAO 와 함께 96well plate에 분주한 후 4일간 배양하였다. 그후 검사당일 10 ul의 XTT(5ug/ml)를 각 well에 넣고 배양후 4시간 후 0.04 N HCl로 반응을 중단시킨 후 OD570에서 흡광정도를 측정하였다. XTT assay에서 TAO

를 첨가하였을 때 모든 세포주가 TAO의 농도 증가에 따라 세포 생존율이 감소하였으며, 그 정도는 ATO의 효과와 비교하여 큰 차이가 없었다.



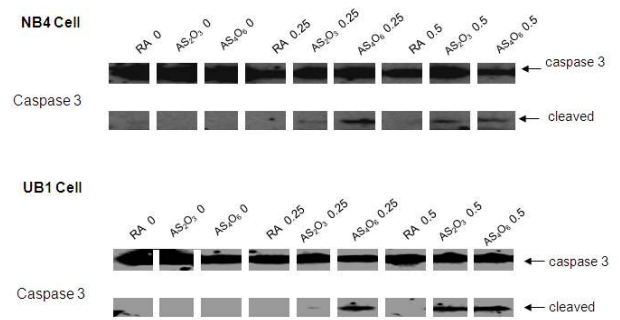
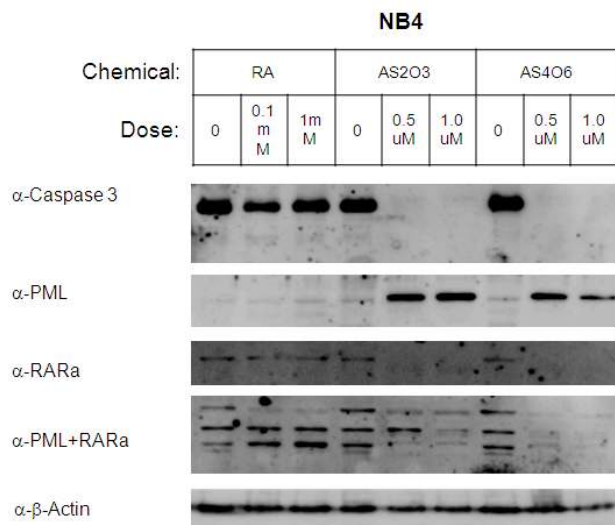
2) Flow cytometry 분석을 통해 세포사멸 영향 분석

NB-4 세포주를 이용한 Flow cytometry 분석에서 ATO 또는 TAO를 각각 첨가하였을 때 TAO 농도 증가에 따라 세포사멸 표지자인 Annexin V 및 Propidium iodide(PI) 발현의 증가를 확인하고 분화 표지자인 CD11b의 발현에는 영향이 없어서 TAO는 APL의 치료효과가 ATO와 같은 작용기전으로 in vitro상에서 ATRA(아래 그림에서는 RA로 표시)처럼 백혈병세포의 분화를 유도하여 효과를 발휘하기 보다는 분화과정을 거치지 않고 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다.

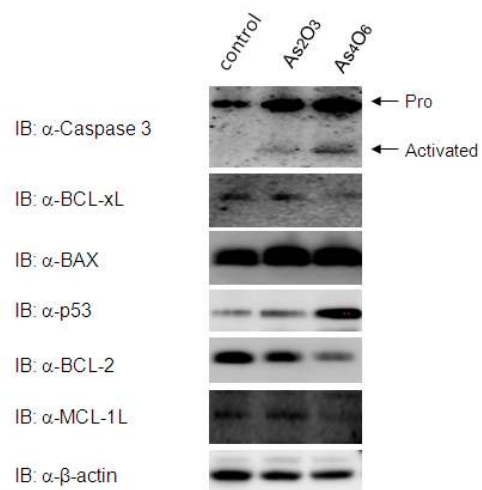


3) Western Blot 분석을 통한 세포사멸 기전에 관여하는 단백질 인자의 변화

세포사멸 기전을 보다 잘 이해하기 위하여 NB-4 세포주를 ATO 또는 TAO를 첨가후 4일이 경과한 후 세포 분획에서 단백질을 추출하여 Western-blot을 시행하였다. NB-4, UF-1 세포 모두에서 ATO의 농도의 증가에 따라 PML/RARα 융합단백의 양이 감소하면서 caspase 3의 활성이 증가함을 알 수있어 세포사멸시 caspase의 활성이 증가함을 알 수 있었으며, TAO 역시 ATO와 같은 양상으로 농도의 증가에 따라 apoptosis 표지자인 활성화된 caspase 3의 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 한편 예상대로 ATRA(그림에서는 RA로 표기)를 처리한 세포에서 caspase의 발현은 관찰되지 않았다.

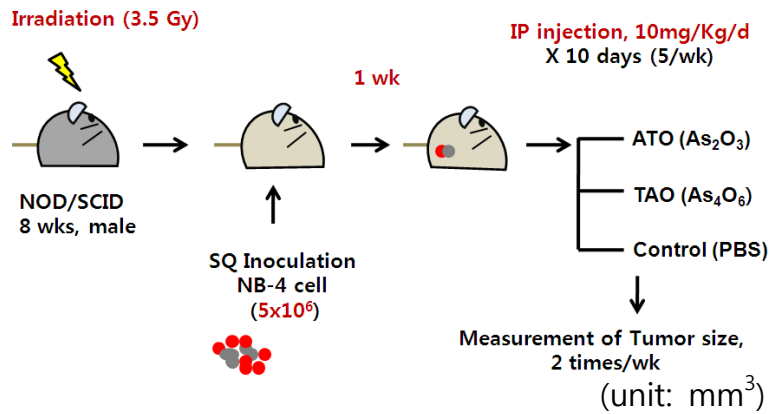


ATO와 TAO를 처리한 NB-4세포에서 Caspase 3의 활성이 증가할 때, 세포 사멸에 관련된 인자인 anti-apoptotic 단백질 Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1L은 감소한 반면, pro-apoptotic 단백질 Bax 와 P53는 증가하였다.

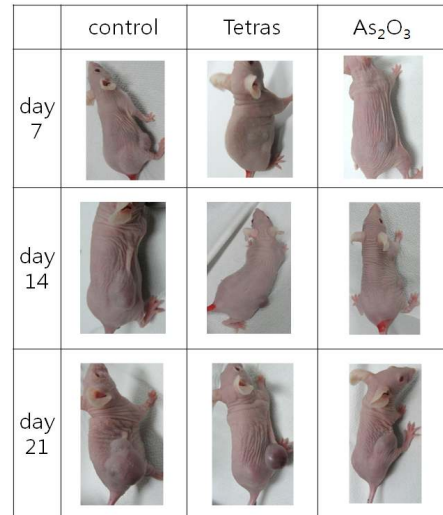
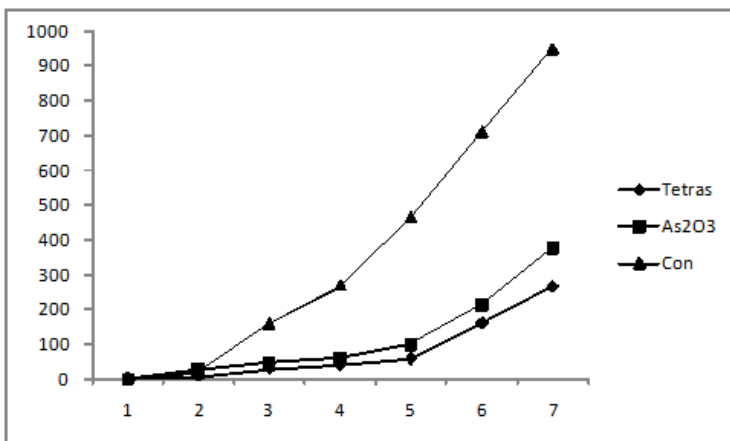


4) 피하종양 마우스 모델에서 TAO가 백혈병 증식 억제에 미치는 영향

생후 6주된 체중 150-200g의 누드 (BALB/cByJ-nu) 마우스에 방사선(TBI 3.0Gy)으로 전처치하여 하루를 경과 한 후 마리당 1×10^7 개의 NB-4 세포를 피하 주사하여 2주가 경과하여 피하종양이 확인되면 3군(1군 당 5마리)으로 나누어 각 군에 PBS, ATO(As₂O₃, 10mg/Kg), TAO(As₄O₆, 10mg/Kg)를 매일 10일간 주사한 후 3주 동안 종양 크기를 관찰하였다. 종양의 크기는 치료하지 않은 군에 비해서 ATO 또는 TAO 치료 군이 월등하게 종양 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.



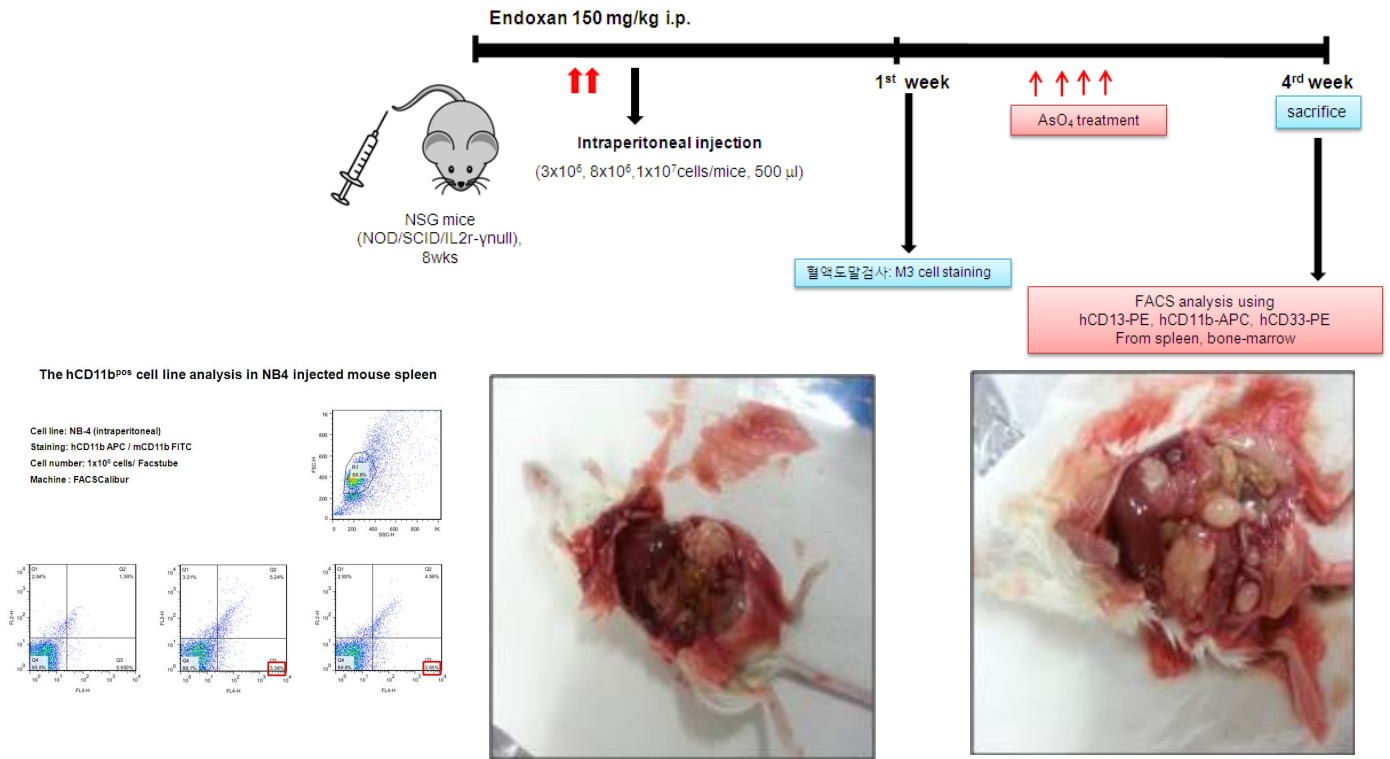
injection No.	1	2	3	4	5	6	7
control	1.1	16.8	157.0	267.5	463.8	708.7	947.4
As ₄ O ₆	1.1	5.4	28.3	39.6	57.3	160.8	265.0
As ₂ O ₃	1.1	29.0	48.6	59.6	98.9	212.6	376.5



5) NB-4 세포주를 이용한 APL 마우스 모델의 개발

NB-4 세포주(3×10^{-6} cells)를 생후 8주된 마우스의 복강에 이식하여 복수가 유발되는 ascites mouse 모델을 재현하였다. 이 모델은 실험기법 상 방사선 조사의 번거러움을 피할 수 있는지를 알아보기 위하여 NB3 세포의 이식 전 전처리로 방사선조사를 하지 않고 cyclophosphamide(Endoxan)을 이용하였다. 결과는 아래와 같이 APL 복수 마우스모델이 만들어 질 수 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 APL세포가 복강에 이식된 마우스는 마르고 털이 빠지며 복강과 등의 피하에 복수와 종양이 형성됨을 관찰할 수 있었으나, 피하종양모델에서

와 마찬가지로 사람 백혈병에서 흔히 관찰되는 비장과 골수에 NB-4 세포가 증식된 증거는 관찰할 수 없어 사람의 백혈병을 재현한 모델은 아님을 알 수 있었다.



따라서 NB-4 세포주(3×10^6 cells)를 방사선 처리 한 마우스(8주령)의 꼬리 정맥에 주사하여 혈액, 골수와 비장에 백혈병이 발생하는 지를 조사하였다. 이 연구는 여러 가지 난관이 있었다. 우선 꼬리 정맥에 1×10^6 세포 이상 주사하면 마우스가 죽곤 하여, 세포를 2-3일에 걸쳐 주사하는 번거로움이 있었다. 많은 세포의 주입으로 마우스가 죽은 원인은 폐색전증으로 추정하고 있다. NB-4 를 복강에 주입하여 수립한 복수 백혈병 모델과 동일하게 피하 종양은 생성되었으나 관찰한 3주간 혈액, 비장 및 골수에 백혈병 세포가 생착되어 증식하고 있는 증거는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 NB-4를 이용한 다른 연구자(Zhang SY 등, 1996)의 연구결과와 일치하는 결과로 NB-4세포주를 이용한 백혈병 모델의 수립을 이해서는 향후 여러 조건의 추가 연구가 필요함을 알 수 있었다.

현재 NB-4를 이용한 마우스모델의 확립을 위한 연구와 함께, 마지막으로 사람의 PML/RAR α 유전자를 마우스에 발현시킨 형질전환 마우스 모델을 이용한 실험 모델을 추가 연구하고 있다. 이는 현재 전 세계적으로 가장 널리 인정되는 마우스 모델이지만 원래 연구계획서에는 포함되지 않았던 내용이다. 연구의 특성 상 형질전환 마우스를 개발함은 비용이나 연구기간 상 가능하다고 판단되지 않았고 모델을 개발한 극소수의 연구자들만이 이 모델을 활용하는 기술을 보유하고 있는 실정이며 이들은 최근까지 마우스 모델을 공개 상용화 하지 않았기 때문이다. 그러나 이 연구가 진행되고 있는 동안 연구자는 2013년부터 Jackson Lab에서 APL mouse 모델 (C57BL/6-pml-tm1(PML/RAR α)Ley/]; stock number 017959) 을 판매함을 알게 되어 추가연구를 계획하게 되었다. 이 PML/RAR α 형질전환 마우스 역시 phenotype은 정상으로 PML/RAR α 유전자는 갖고 있지만 외형적으로 백혈병의 발현은 않고 감염에 susceptible 한 것으로 알려져 있다. 따라서 이 모델에서도 Rego

EM 등이 제시한 것처럼 장기간의 latent period를 경과하여 APL 백혈병의 발현이 유도될 것이므로 향후 이 형질전환 마우스를 사육하여 1년 간 기다린 후 백혈병이 발현하면 발현된 마우스의 골수와 비장에서 얻은 APL 백혈병 세포를 동종의 마우스에 syngeneic transplantation을 시도하여 APL 이 쉽게 발현이 유도되는 지를 시도하고자 실험을 추진하고 있다.

참고문헌

Baek JH, Moon CH, Cha SJ, Lee HS, Noh EK, Kim H, Won JH, Min YJ. Arsenic trioxide induces depolymerization of microtubules in an acute promyelocytic leukemic cell lines. Korean J Hematol. 2012 ;47:105-112

Cheong HJ, Jung YS, KIm SJ, Jeon YW, Yoon J, Kim HJ, Kim KH, Kim SH, Kim HJ, Lee SC, Bae SB, Kim CK, Lee N, Lee KT, Park SK, Hong DS, Park HS, Won JH. Src family kinase inhibitor PP2 enhances differentiation of acute promyelocytic leukemia cell line induced by combination of ATRA and arsenic trioxide. Blood Res 2013;48:Suppl2:S92

Caretto P, Forni M, d'Orazi G, Scarpa S, Feraiorni P, Jemma C, et al. Xenotransplantation in immunosuppressed nude mice of human solid tumors and acute leukemias directly from patinets or in vitro cell lines. Ric Clin Lab 1989;19:231-243

dos Santos GA, Abreu e Lima RS, Pestana CR, Lima AS, Scheucher PS, Thomé CH, Gimenes-Teixeira HL, Santana-Lemos BA, Lucena-Araujo AR, Rodrigues FP, Nasr R, Uyemura SA, Falcão RP, de Thé H, Pandolfi PP, Curti C, Rego EM. (+)α-Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. Leukemia. 2012;26:451-460

He LZ, Tribioli C, Rivi R, Peruzzi D, Pelicci PG, Soares V, Cattoretti G, Pandolfi PP. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARa transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:5302-5307

Jacomo RH, Santana-Lemos BA, Lima AS, Assis PA, Lange AP, Figueiredo-Pontes LL, Oliviera LO, Bassi SC, Benicio MT, Baggio MS, Garcia AB, Falcao RP, Rego EM. Mthionine-induced hyperhomocysteinemia reverts fibrinolytic pathway activation in a murine model of acute promyelocytic leukemia. Blood 2012;120:207-213

Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, et al. In vitro effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in NOD/Shi-scid/scid mice. Jpn J Cancer Res 2001;92:529-536

Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Kogan S, Chen Z, de Thé H. Opinion: how patients have benefited from mouse models of acute promyelocytic leukemia. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:821-827

Mun YC, Ahn JY, Yoo ES, Huh J, Lee KE, Nam E, Lee SN, Seong CM. Oxidation of peroxiredoxins by inhibition of thioredoxin is involved in arsenic trioxide-induced reactive oxygen species formation and its cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood Res* 2013;48:Suppl2:S91

Ninomiya M, Kiyoi H, Ito M, Hirose Y, Ito M, Naoe T. Retinoic acid syndrome in NOD/scid mice induced by injecting an acute promyelocytic leukemia cell line. *Leukemia* 2004;18:442-448.

Rego EM, Pandolfi PP. Analysis of the molecular genetics of acute promyelocytic leukemia in mouse models. *Semin Hematol* 2001;38:54-70

Zhang SY, Zhu J, Chen GQ, Du XX, Lu LJ, Zhang Z, et al. Establishment of a human acute promyelocytic leukemia ascites model in SCID mice. *Blood* 1996;87:3404-3409

4. 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

본 연구를 통해서 새로운 APL 마우스 모델을 확보하여 TAO의 효과를 검증하고자 하였다. 원래 계획이었던 TAO 약제의 항 백혈병 기전의 연구는 세포실험의 특성상 항상 실험이 가능하여 100% 달성이 가능하였다. 그러나 APL 마우스 모델의 확립은 동물 실험의 특성상 한 번의 시험에 최소 4개월이 소요되는 단점으로 철저한 계획하에 연중 실험을 지속 하였음에도 불구하고 고행암 모델은 재차 확인하였으나 최종 목표인 인간 백혈병과 유사한 혈액암 모델은 시간과 예산의 부족으로 아직 완성 단계에 이르지 못하고 있다. 하지만 현재 예산외 추가의 사적 연구비를 출연하여 추가 실험을 계속 진행 중이고, 수년간 실험을 진행하면서 APL 동물모델의 세계적인 연구동향과 정보를 확보하였으므로, 조만간 계획하였던 APL 마우스 모델의 최종 목표에 도달할 수 있으리라 여겨져, 향후 이 분야의 연구에서 국제 경쟁력의 향상과 TAO 의 임상 시험을 통한 신약개발에 지속적으로 기여하게 될 수 있을 것으로 판단된다.

구분	목표 (달성도)	주요 연구개발 내용
1년차 (12-13년)	세포사멸과 관련 신호전달 인자에 대한 영향 관찰 (100%)	<ul style="list-style-type: none"> • XTT 세포 분열능 분석 • Flow cytometry 분석을 통해 세포사멸 영향 분석 • Western Blot 분석을 통해 Bcl-2, Bcl-xL, A1, Bcl-w, Mcl-1, Bak, Bax, Bok, Noxa, Bad, Bim, Bid 변화 관찰
	APL mouse 모델 정립 (80%)	<ul style="list-style-type: none"> • NB-4 세포주 이용한 백혈병 마우스 모델 정립
	동물모델에서의 TAO 항백혈병 효과 규명 (80%)	<ul style="list-style-type: none"> • ATO와 TAO 항백혈병 효능 비교 • 마우스모델에서 TAO 적정 용량 정립

5. 연구결과의 활용계획

- 1) 본 연구 결과, TAO의 효과가 마우스 모델에서 입증되었으므로, TAO의 실용화를 위한 임상연구로 진입이 가능하므로, 향후 임상시험에 필요한 전임상 연구의 자료로 활용될 수 있다.
- 2) 본 연구에서 개발되었고 향후 추가로 개발될 APL 동물 모델은 국내에 처음 소개되는 동물모델로 앞으로 신약 개발 등이 분야 연구의 활성화에 기여할 것이다.
- 3) 연구 수행 중 얻어진 정보를 통해 세계적인 동향으로서 향후 APL 연구와 신약의 개발을 위해서 형질전환 마우스 APL 모델 개발이 필수적임을 알게 되었고, 단기간의 연구기간이었으나 이를 개발하기 위한 충분한 연구 인프라를 갖추었다고 판단되므로 APL 마우스 모델의 최종 목표인 형질전환 마우스 APL 모델의 확립을 위해서 최소 2년 이상의 추가 연

구가 필요하리라 생각된다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 1) 현재 전 세계적으로 극소수의 연구자들만이 형질전환 APL 마우스 모델을 활용하는 기술을 보유하고 있음. 미국의 슬로언 케터링 암 센터, 브라질의 상파울로 대학, 워싱턴 대학(세인트루이스), 프랑스 파리 대학, 중국 상하이교통병원 정도에서 기술보유 및 연구.
- 2) 미국의 Jackson Lab에서 APL mouse 모델 (C57BL/6-pml-tm1(PML/RAR α)Ley/]; stock number 017959)을 판매함. 이 쥐는 워싱턴 대학의 Ley 교수가 개발한 형질전환 마우스임.
- 3) 현재까지 NB4를 이용한 APL 마우스에서는 고행암, 복수는 만들어 지지만 골수, 비장, 말초혈액에 백혈병이 유도되기 어려움.

Ⅲ. 연구성과

사업명	기본연구지원사업	연구책임자	오도연	주관기관	차의과학대학교
과제번호	2012R1A1A2007678	과제명	급성전골수성백혈병 동물모델에서 비소화합물 (Arsenic hexaoxide; As ₄ O ₆)의 치료효과		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)

전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)

학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	1	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)

과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)

기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

학위배출인력 성과정보

과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2012R1A1A2007678	201302	석사		남성	차의과학대학교	의학과	취업(박사후연구원 포함)

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2012R1A1A2007678	201302	Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Have an Immunomodulatory Effect That Can Control Acute Graft-Versus-Host Disease in Mice	장문주 김혜선 이혜진 김기진 전황균 신현수 장세경 허진형 정소영 오도연 정형민	직접입력	A C T A HAEMATOL OGICA	129(4)	국외	SCI등재	1.354	아니오	50