

연구 계획서 작성의 이해 -연구재단 과제

순천향대학교 부천병원 내과
박성우

사업			사업목적 및 특성	지원대상		최초지원		후속지원			
						연평균 연구비 (간접비포함)	연구기간	연평균 연구비 (간접비포함)	연구기간		
우수 연구	리더 연구	유형1	미래의 독자적 과학기술과 신기술 개발을 위해 세계적 수준에 도달한 연구자의 심화연구 집중 지원	대학이공분야 교원(전임·비전임) 및 국(공)립·정부출연·민간 연구소의 연구원		8억원 내외	9년(3+3+3)	기존 지원 규모 내외	3년		
		유형2				8~15억원	5년(3+2)	8억원 내외	3년		
	중견 연구	유형1	창의성 높은 개인연구를 지원하여 우수한 기초연구 능력을 배양하고 리더연구자로의 성장·발판 마련			2억원 내외	1~5년	기존 지원 규모 내외/3년 (3년 이상 수행 종료 과제 대상, 후속 횟수 제한 없음.)			
		유형2				2억원 초과 4억원 내외					
	신진 연구	우수신진	신진연구자의 창의적 연구의욕 고취 및 연구역량 극대화를 통해 우수 연구인력으로 양성			박사학위 취득 후 7년 이내 또는 만 39세 이하인/대학이공분야 소속 및 국(공)립·정부출연·민간 연구소 소속	전임교원 또는 정규직 연구원	1.5억원 내외 (필요시 최소 혁신 실험실 연구비 0.5~1억원 추가 지원*)	1~5년(최소 혁신 실험실 연구비는 1년)	2억원 내외(중견연구유형1로 연계 지원)	3년
		세종과 학펠로우십(신규)	박사후 연구원 등 젊은 과학자가 원하는 연구를 수행함으로써 핵심 과학기술 인재로 성장·정착할 수 있도록 펠로우십을 통한 연구 몰입 장려			전임교원이 아닌 연구자 또는 비정규직 연구원	1.3억원 내외	5년(3+2)	-	-	
생애 기본 연구	제도약연구		우수연구과제 수행 연구자가 연구 단절 시 제도약할 수 있도록 지원	대학이공분야 교원(전임·비전임) 및 국(공)립·정부출연 연구소의 비정규직 연구원, ※요건** 충족 필요	연간 직접비 0.3억원, 0.5억원	1년	-	-			
	기본연구		이공학분야 개인 기초연구를 폭넓게 지원하여 연구 기반을 확대하고 국가 연구역량 제고	대학이공분야 전임 교원 및 국(공)립·정부출연·민간 연구소의 연구원	0.5억원 내외	1~3년	-	-			
	생애 첫 연구		연구역량 갖춘 신진연구자의 연구 기회 확대 및 초기 연구 정착 유도	기초연구 사업 수혜 경험이 없는 4년제 대학 전임교원으로, 박사학위 취득 후 7년 이내 또는 만 39세 이하	0.3억원 내외	1~3년	-	-			

※ 연평균 연구비: 2021년부터 직접비/간접비 분리 확대 시행으로 사업별 연평균 연구비(직접비) 지원에 대한 사항 및 신청 가능한 최대 연간 직접비는 별도 신청요강 참조

연구재단 개인연구과제

과제 (선정률)	대 상	연구비(년간)/ 기간
생애 첫 연구 (50% 내외)	기존 연구재단 수혜가 없는 전임교원, 박사 취득 7년 이내 or 39세 이하	0.3억 (간접비제외) / 3년
기본연구 (25-30%)	전임교원, 연구소 연구원	0.5억 / 3년
신진연구 (25% 내외)	전임교원, 박사 취득 7년 이내 or 39세 이하	최대 1.5억 / 최대 5년
중견연구 (20-22%)	이공분야 전임, 비전임	유형 1. 2억 이내 5년 이내 유형 2. 2-4억
리더 연구 (12-15 과제)	세계적 수준 도달 연구자의 심화 연구	3-8억 / 최대 9년

My research career

- 2003년 부터 연구비신청 시작 -조교수 2년 차
연구 재단, 복지부 과제 : 5번 계속 탈락
- 2005년 대학교수 해외방문 연구지원
- 2008-2012년 기본연구 x 2
- 2011-2014년 중견연구 (협동)
- 2014-2016년 중견연구
- 2016-2019년 전략과제
- 2019년- 현재 중견연구

연구비 잘 받는 비법은 ?? --- 운 + skill + 역량 (업적)

국책 과제 평가 항목 및 지표

평가 항목	평가지표	배 점
연구의 창의성 (원천성) 및 도전성	<ul style="list-style-type: none"> 연구주제 및 내용의 창의성 (원천성) 및 도전성 연구 목표의 우수성 및 적절성 기존 연구와의 차별성 또는 심화. 발전 가능성 	40
연구내용 및 방법의 적합성	<ul style="list-style-type: none"> 연구의 필요성 및 중요성, 연구방법의 타당성 	20
연구비 및 연구기간의 적정성	<ul style="list-style-type: none"> 연구비 규모 및 연구기간의 적정성 	10
연구자(연구팀)의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> 연구 책임자(연구팀)의 연구 수행 능력 탁월성 및 연구 업적의 질적 우수성 	20
연구성과의 활용 및 기대효과	<ul style="list-style-type: none"> 해당 분야 또는 관련분야 학문적/ 기술적 파급효과 응용연구 연계 및 실용화 등 사회적 기여 가능성 	10
		100

연구업적, 연구여건, 계획서

1) 연구 업적 (publication, 최근 5년)

- 많을 수록 좋으나 나의 기여도가 중요 (제1저자, 교신저자)
- 현재의 연구과제 제안과의 연관성 (같은 분야, 임상 or 중개 or 기초)
- 연구과제서와 같은 분야/내용의 적어도 **하나 이상의 핵심논문**이 필요함
- 현재 연구제안서 관련 연구관련 pilot study, 예비연구를 시행하자

2) 연구 여건 (환경)

- 연구인력, 장비(ex, 실험용, 검체 바이오뱅크), 공동 연구 network

3) 연구계획서

- 향후 어떤 연구를 할지에 대한 내용, 가장 중요

연구 계획서 작성

- 심사위원의 입장
 - 많은 연구제안서를 심사 (8- 12개)
 - 해당 분야의 전문가가 아닐 수도 있음
(호흡기, 알레르기, 이비인후과, 기초의학, 자연과학, 바이오텍 연구원)
- (심사위원들이) **읽기 편한 제안서를 만들자**
 - 심플, 핵심을 잘 포장 해야함
: 두괄식, summary figure , 키워드 강조
 - 양식에 맞는 구성, 오타가 없게
 - 그림과 문단이 적절히 배치되어 읽기 편하게

연구 계획서

생애 첫 연구, 신진 연구 5장 이내
중견 연구 10장 이내로 작성

- 요약문
- 배경/ 연구의 필요성, 국내외 연구 현황
- 관련된 선행/ 예비연구
- 연구목표/ 내용
- 기대효과
- 인용논문
 - 각 항목당 balance 를 맞추어서 기술해야 함
 - 배경/ 연구필요성/ 연구 현황 1-1.5 장
 - 선행/ 예비연구 1-1.5장
 - 연구 목표 내용 2- 2.5 장
 - 기대효과 0.5장 이내

1. 제목과 요약문 - 매우 중요하다 !!

- 제목 : 간결, 전체를 포함, 구체적으로 표시해야 한다.
- 요약문엔 연구 목적, 방법 등이 구체화되어야 함

제목_예시

2010년 기본연구과제, 3년

			양식A101
① 부처사업명(대)	기초연구사업		보안등급(보안, 일반)
② 사업명(중)	일반연구자지원사업		공개가능여부(공개, 비공개)
③ 세부사업명(소)	지역대학우수과학자		
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)	실용화
⑤ 과제명	국문	천식모델에서 Apolipoprotein A1에 의한 기도상피세포 및 수지상세포에서의 선천면역 조절기전연구	
	영문	Regulatory mechanism of innate immune response on bronchial epithelium and dendritic cells by Apolipoprotein A1 in murine asthma	
⑥ 주관연구기관	순천향대학교		
⑦ 협도연구기관			

< 한글 요약문 >

		양식A201
연구목표 (500자내외)	<p>Apolipoprotein A-1(ApoA1)은 지질대사에 핵심적 성분일 뿐만 아니라 항염증 및 항산화 기능을 지닌 것으로 알려져 있으나 작용기전을 아직 불분명하다. 최근에 본 연구실은 천식 동물모델에서 ① ApoA1을 비강내로 투여했을 때 기도염증과 기도과민성을 억제함을 관찰하였다. ② 또한 기도와 폐에서 immature dendritic cells (iDC)에 특이적인 chemokine인 CCL20의 발현과 더불어 기도수지상세포가 감소되는 것을 관찰하였다. ③기전을 좀더 명확히 규명하기 위해 ApoA1이 기도상피세포(epithelial clara cell)에만 특이적으로 과량발현하는 transgenic mice를 제작하였다. 이러한 예비결과를 바탕으로 본 연구는 ApoA1-transgenic mice, 폐 및 골수에서 직접 분리한 수지상세포와 기도상피세포를 이용하여 ApoA1이 상피세포와 수지상세포에 의한 선천면역반응을 조절하는 기전을 규명하고 이에 관여하는 핵심조절물질을 발굴함으로써 기도염증 질환의 치료제 개발에 기초를 제공하고자 한다.</p>	
연구내용 (1000자내외)	<p>① ApoA1의 상피세포에서의 면역조절작용: MTEC(mouse tracheal epithelium culture) 및 NHBE (normal human bronchial epithelium)세포, ApoA1-transgenic mice의 기도상피세포에서 ApoA1과 집먼지진드기(HDM), chitin, chitinase, LPS등의 여러 알레르겐들의 자극 후, 여러 면역관련 cytokiens (chemokines)의 생성 변화를 Real Time-PCR, in situ hybridization, immunohistochemistry, Western blot 등으로 관찰한다.</p> <p>② ApoA1의 iDC에 미치는 영향 평가</p> <p>1. 폐 및 골수에서 수지상세포를 채취 후 배양하여 ApoA1과 자극물질 (TNF-α, LPS) 투여 후, 수지 상세포의 성숙 및 이동 등에 대해 검증한다. </p> <p>2. ApoA1이 수지상세포와 CD4 T세포간의 항원전달능력(antigen presentation capacity)을 조절하는지를 ex vivo에서 확인한다.</p> <p>③ ApoA1의 상피세포 및 수지상세포에서의 작용기전을 분자생물학적 수준에서 규명</p> <p>1. 알레르겐과 관련되어 작용하는 수용체인 TLR2/6, TLR4, PAR2(protease activating receptor2)의 발현 및 활성도의 변화를 확인</p> <p>2. 상피세포 tight junction의 구성 molecules(ZO-1, E-cadherin, ccludin)의 역할 및 연관된 세포내 신호전달체계의 변화 확인</p> <p>3. 세포막에 존재하는 lipid raft를 통한 수용체의 translocation과 이로 인한 세포내로의 염증관련(NFκB, MAPK)신호전달체계의 변화 관찰</p>	
기대효과 (500자내외) (응용분야 및 활용범위 포함)	<p>① ApoA1의 기도 상피세포 및 수지상세포에서의 선천면역조절기전을 밝힘으로써 알레르겐 또는 외부 유해자극에 의한 폐의 선천면역반응을 조절할 수 있는 약물개발의 초석을 제공하게 될 것이다. 특히 알레르기성 천식에서 ApoA1을 투여는 알레르겐들, 또는 감염(virus 또는 LPS)에 의한 증상악화를 치료 뿐 아니라 예방효과를 가질 가능성이 높다.</p> <p>② ApoA1으로 인한 작용의 핵심물질 개발, 또는 다른 타입의 ApoA1 mimetics의 국내개발에 큰 도움이 될 수 있으며, 타 만성기도질환 및 대사질환에 응용을 할 수 있음.</p> <p>③ 직접 신약개발 산업의 활성화와 연관되어 관련 산업 및 국가경제 차원에서의 이득을 추구할 수 있음.</p>	

2. 연구 배경, 필요성, 국내외 연구 현황

- 전체 → 본인 연구분야로 소개
- 배경엔 관련 주제에서 밝혀진, 아직 밝혀지지 않은 점 등을 명확히 기술 (타 연구에 대한 review → 한계점)
- 본인 연구가 기존연구와의 차이가 무엇인지 표현
- 본인 연구(가설)가 가능한 근거제시 (예비연구)

기존의 지식

알려지지 않은 점들

내가 연구하고자 하는 분야에 대한 설명

(1) 연구의 배경과 필요성 및 현재 국내외의 연구현황

1. 연구의 배경

본 연구의 핵심단어인 ApolipoproteinA1(이하 ApoA1으로 표기함), 기도수지상세포 (airway or pulmonary dendritic cells; 이하 기도DCs라고 표기함) 및 천식에서의 항원과 기도DCs와의 관계에 대해 간략히 소개하고 연구개발의 필요성을 기술하고자 한다.

1) ApoA1의 역할 -지질대사 및 항염증, 항산화작용

- ✓ ApoA1은 HDL(high density lipoprotein)의 핵심 성분(core component)으로서 지질대사에서 LDL(low density lipoprotein)/콜레스테롤을 간으로 이동시켜서 체외로 배출하는 역할을 한다. 따라서 ApoA1은 동맥경화 및 심혈관 질환에서 HDL/LDL 평형이론에 의한 LDL 콜레스테롤을 배출에 관한 역할 측면에서 많이 연구되어 왔다 (Navab M et al. 2004, Cockerill G.W. et al. 1995).
- ✓ 최근에 ApoA1의 항염증(anti-inflammatory), 항산화(anti-oxidant) 효과에 대한 연구가 집중적으로 이루어져 왔다. 특히 동물모델을 이용한 류마티스 관절염, 패혈성 쇼크, 동맥경화 등의 연구에서 ApoA1를 전신투여 하였을 때 항염증효과가 있음이 밝혀졌다(Christian CS et al. 2008, Yan-ling J et al. 2008, Navab M et al. 2006).
- ✓ 그러나 이들 연구들은 조직학적, 기능적인 면에서 ApoA1의 항염활성을 확인하였으나, 이에 대한 명확한 분자생물학적인 기전은 밝혀지지 않은 상태임.

2) 폐에서의 ApoA1의 역할

폐에서는 ApoA1이 type I, type II pneumocyte에서 발현되며, ApoA1이 함께 binding하는 ABCA-1 (ATP-binding cassette transporter A1)의 activity에 의해 폐포의 cholesterol efflux작용을 하여 폐포에서의 지질항상성에 관여하며, 폐포의 surfactant유지, 외부자극(air pollutant)에 대한 항산화작용으로 인한 폐포의 염증반응감소에 중요한 역할을 하리라 여겨지나 (Bares SR et al. 2008), 현재까지 폐질환에서의 ApoA1의 역할 또는 관련성은 밝혀져 있지 않다.

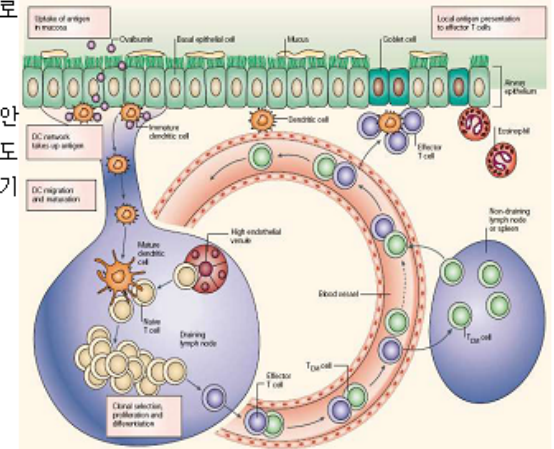
3) 선천면역과 관련된 기도수지상세포의 역할

- A. 기도수지상세포 (기도DCs)의 개괄
- ✓ 천식에서 관찰되는 기도 염증은 IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하는 Th2 cells에 의해 조절된다는 것이 현재 널리 받아들여지는 정설이다. 이들 Th2 cytokines은 내피세포에서의 adhesion 분자의 발현 증가와 chemokines 생성 유도를 통한 면역세포의 유입, 호산구의 과립단백 분비(degranulation), IgE의 합성과 평활근의 과민성(hyperreactivity of smooth muscle cells)을 촉진하고 조절한다 (Herrick CA et al. 2003).
- ✓ 기도에서 Native T cells의 Th2 effector 기능을 획득하기 위해서는 기도DCs와 같은 강력한 항원제시세포

- ✓ 그곳에서 기도DCs는 일련의 co-stimulatory 분자 (CD28, CD40, CD80 등)와 MHC Class II 분자의 발현을 증가시키면서 성숙화되어 (matured) naive T cells이 증식과 분화와 더불어 effector Th2 cells이 생성된다.

- ✓ 이와 같이 기도DCs는 흉부림프절로의 제한된 이동으로 말미암아 구획화된 면역반응 (compartmentalized immune response)의 성격을 지닌다. 면역반응의 작용기 (effector phase) 동안에 effector T cells은 기도로 다시 침윤되며 기도 DCs에 의해서 자극 받아 cytokines을 분비하여 기도 염증을 총 지휘한다.

그림 1: 기도에서의 면역반응 동안 기도 DCs의 활성화, 흉부림프절로의 이동과 T cells의 증식 및 활성화 [Lambrecht BN & Hammad H. Nat Rev Immunol (2003)에서 발췌]



- ▶ 따라서, 항원의 기도상피세포와 기도DC에서의 uptake 기능을 차단하거나 억제하는 것은 천식을 치료하는 떠오르는 방법으로 제시되고 있다 (Hammad H and Lambrecht BN, 2006).

- 연구 필요성

-나의 선행연구가 관련이 있음을 설명

2. 연구의 필요성

본 연구자는 ApoA1의 천식에서의 역할에 대한 연구로(2008년 기초과학연구), 아래와 같은 결과를 얻었으며 이번 연구를 진행하게 된 과정 및 이번 연구의 특징점이 설명되어 있음.

1) 천식 환자 및 천식동물모델의 기도에서 ApoA1의 양이 감소함을 확인

- ✓ 천식환자의 기관지폐포세척액의 proteom을 분석한 결과, 정상인의 그것과 비교할 때 ApoA1가 현저히 적음을 발견하고, ELISA와 Immunoblot으로 soluble ApoA1의 level을 정량화한 결과에서도 동일한 결과를 얻음. 또한 천식환자의 폐 대식세포 중 foamy macrophage의 양이 증가됨을 관찰함. 이는 oxidized LDL cholesterol을 과다 섭취한 대식세포가 증가된 것으로서, 비정상적인 지질대사가 폐 내에서 발생함을 의미함. OVA로 유도된 천식동물에서도 폐에서 ApoA1 양이 감소됨을 확인하였으며, 이는 ApoA1의 감소가 기도 염증의 원인 또는 결과로서 발생할 수 있음을 의미함 (선행연구 참조).

3. 가설, 핵심질문의 제시

제목으로부터 출발



현재까지 알려진 사실, but 아직 모르는 점



가설



해결방법

초점을 앞 부분에 집중 배치 (두괄식)

- 가설의 근거
 - 가설의 적시
- 강조 : 글자, 그림

immunity 과정에의 조절기능이 있을 가능성을 시사함.

위 실험의 과정을 간략히 설명을 하면 다음과 같다.

BALB/c mice에 OVA와 alum을 첫날에 IP로 투여하여 OVA에 대한 sensitization을 시행함. D18,19,20에 각각 ApoA1을 비강을 통해 소량(0.4, 4.4, 44ng) 투여 후 30분 후에 OVA를 challenge를 시행함. 다음날 physics 측정 및 조직을 얻음.

Naive T cell은 OVA에 감작된 후에 OVA-specific Th2 cell로 전환이 된 상태임. 이 후에 ApoA1과 OVA로 비강을 통해서 challenge 후 Th2 response와 pro-inflammatory response가 감소된 것은 ApoA1이 다음과 같은 과정에서 조절기능을 보였을 것으로 생각됨(가설).

1. ApoA1이 기도 상피세포에서의 억제 작용

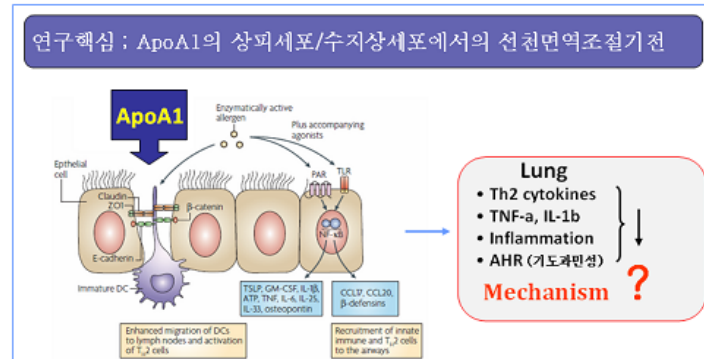
OVA에 의해 기도 상피세포에서 danger signal을 받은 후, 상피세포의 PRR(pattern recognition receptors)들을 통해 여러 proinflammatory cytokine들을 분비하며, chemokine(특히 CCL20)을 통해 immature dendritic cell (iDC)의 상피세포로의 aggregation을 유도함. 비강을 통해 투여된 ApoA1이 기도 상피세포에서의 여러 chemokine, 사이토카인의 생성을 억제하여 iDC가 상피세포로 모이는 것을 막음.

2. ApoA1이 iDC의 OVA 섭취, ova specific Th2과의 antigen presentation과정을 억제.

OVA에 의해서 상피세포의 tight junction을 손상됨은 알려져 있음(Liaw J et al. 2001). 손상된 TG을 통해 내려온 OVA를 iDC이 섭취 후 흉강 L/N에서 OVA-specific Th2 cell에 antigen presentation을 하여 Th2 세포가 effector 로 전환됨. ApoA1이 첫째, tight junction 손상을 막거나, 둘째, iDC의 OVA 섭취를 막거나, 셋째, DC-Th2 antigen presentation과정을 막는 역할을 할 수 있음.

가설

▶ ApoA1은 천식반응의 초기단계에서 선천면역반응의 주된 역할을 하는 기도 상피세포 또는 수지상 세포에서 조절 기능을 할 가능성이 높음.



4. 본 과제 수행과 관련된 선행, 예비연구 및 연구 자원

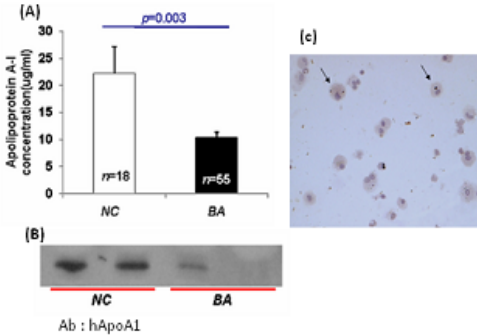
- 본 연구(가설) 수행할 능력/ 가능성 평가
- 선행연구 - 과거 본인 논문 (해당 질환에 대한)
 - : 해당분야의 연구능력 척도
 - : 단순기술이 아닌 압축, 요약으로 제시
- 예비연구 - 현 연구와 관련된 preliminary data
 - : 현재 연구주제의 가설 관련 실행, 성공 가능성의 척도
 - : 구체적 실험 데이터 및 의미, 해석을 제시
- 연구자원 -인체 유래자원들, 질환 코호트, TG, KO mice,,,,,

좀더 간단히
요약해서
작성해도
좋음

(2) 본 과제 수행과 관련된 선행, 예비연구 및 연구 자원

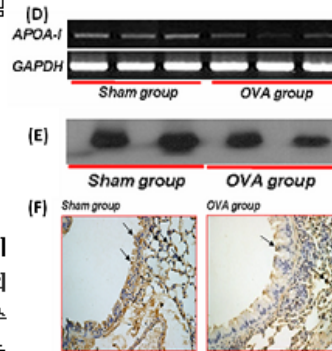
1) 천식 및 천식동물모델에서 폐내 ApoA1 양은 정상군에 비해 감소되어 있음.(2008년도 기초연구과제 결과)

- ✓ 천식환자의 기관지폐포세척액에서 ApoA1을 ELISA(A) 및 Immunoblot(B)으로 측정된 결과 정상군에 비해 현저히 감소되어 있음을 확인함. 또한 천식환자의 기도내의 대식세포(arrows,C)에서 세포질내에 foamy한 모습으로 변함(Foamy macrophage). 이는 ApoA1부족으로 인해 폐대식세포에서 LDL-cholesterol의 제거가 원활히 이루어지지 못해 oxidized LDL이 증가되어 있음을 시사함. 본 연구자는 천식에서 Foamy 대식세포가 정상군에 비해 유의하게 증가됨을 관찰하였고 이는 천식에서 외부 자극으로 인한 염증반응으로 비정상적인 폐내 지질대사가 발생됨을 시사함.



- ✓ Ovalbumin으로 유도된 천식동물모델에서도 ApoA1이 폐조직에서 감소되어 있음을 RT-PCR(D), Immunoblot(E), 면역조직화학염색(F) 등으로 확인함.

이런 결과들은 천식이라는 만성기도염증질환에서 폐내 ApoA1이 감소되었고, 동물실험 모델에서도 같은 결과가 나타나서 ApoA1의 감소가 기도 염증의 원인이나 혹은 결과로서 발생할 수 있음을 의미함. 또한 OVA 동물천식모델이 ApoA1의 역할을 연구하는 적합한 모델임을 보여줌.



2) OVA로 유도된 천식동물모델에서 ApoA1 투여로 기도내 항염증, 기도과민성감소의 효과를 보임 (2008년도 기초 연구과제 결과).

- ✓ OVA로 감작시킨 mouse에서 D20-22일에 비강을 통해 ApoA1을 OVA challenge하기 30분전에 투여함. 폐포내의 total cell 및 macrophage, Neutrophil, Eosinophil등이 ApoA1투여로 dose dependent하게 유의하게 감소되었으며, 기도 과민성도 ApoA1투여로 억제됨을 알 수 있음(아래그림).

내용이 많으면
좀더 간단히
요약해서
작성해도 좋음

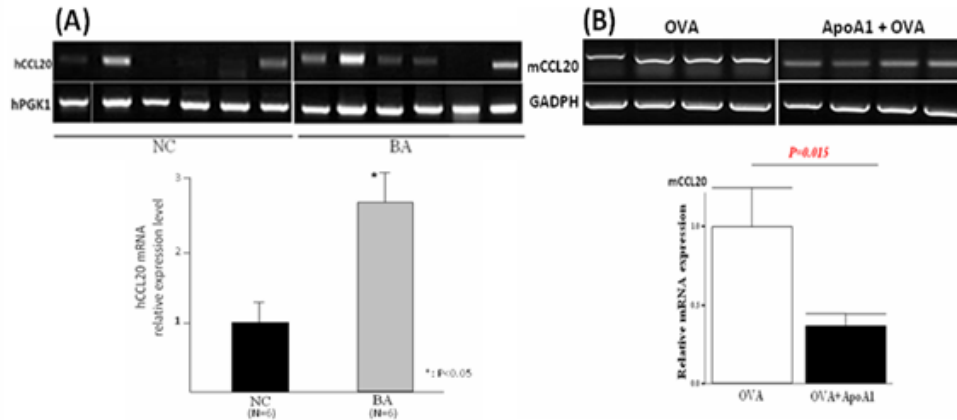
<현 과제를 위한 예비연구 결과>

(3) 천식환자의 기도상피세포에서는 CCL20 mRNA 발현이 정상군에 비해 증가되어 있으며, OVA 천식쥐에서 ApoA1 투여로 기도상피세포의 CCL20의 mRNA 발현이 현저히 감소됨.

CCL20(Chemokine (C-C motif) ligand 20)은 MIP-3a라고도 하며, 주로 기도에 inducible form으로 IL-1b, TNF-a, LPS와 같은 proinflammatory stimuli에 반응하여 증가됨(Scapini P et al.2002). CCL20은 CCR6의 ligand로서 반응하는 유일한 chemokine임, CCR6는 미성숙 수지상세포의 표면에 존재하는 receptor로서 수지상세포의 localization에 중요한 역할을 함(Cook D.N. et al. 2000). 조직의 CCL20을 통해서 미성숙 수지상세포, effector 또는 memory CD4 T 세포, B 세포등이 외부 자극물질에 대하여 염증조직으로 이동(migration) 하는 역할이 이루어짐(Sierro F et al. 2001).

✓ 천식환자의 기도

기관지내시경(bronchoscopy with brushing)을 통해 얻은 천식환자의 기도점막상피세포에서 CCL20의 mRNA를 측정 한 결과 정상인에 비해 현저히 증가되어 있다(아래 그림 A). 6명의 천식환자들 모두 흡입용 스테로이드 제제 및 항천식약물치료를 3개월 이상 받고 무증상의 안정적인 천식(stable asthma) 상태로서, 스테로이드에 의해서는 기도내 CCL20의 발현이 완전히 억제되지 않음을 보여주고 있음.



5. 연구목표/내용

- 가능한 최대한 현실적인 구체화된 목표 및 이를 이루기 위한 실험 내용을 적시
 - 연구비 규모, 기간에 적합한 내용이어야 함
- 논리적, 현실적 타당한 실험계획 제시 (ref포함)
 - 보편성과 참신성의 조화
 - 유용성/독창성이 있는 방법은 강조한다
 - 본인의 선행연구에 의한 방법이 아니면 경험이 많은 조연자/ 공동 연구자가 같이함을 명확히 해야함
- 실험적으로 어려운 내용이면 문제점 보완할 대체 언급
- 세계적인 동향을 제시, 주목받는 부분, 유일한 연구 등을 강조

연구 목표

(3) 연구 목표 및 내용

가. 연구의 최종 목표

본 연구팀은 천식동물모델로부터 ApoA-1에 의해 기도염증억제, 기도과민성감소의 효과가 있고 이는 ApoA-1의 기도 상피세포에서의 CCL20 발현억제 효과, 기도내 수지상 세포의 감소등과 관련이 있음을 밝혔다 (선행연구 참조).

이러한 사전지식을 바탕으로 본 연구는 ApoA1의 선천면역반응조절 기전을 1) 기도 상피세포에서의 반응 2) 미성숙 기도수지상세포의 이동 및 성숙에 미치는 영향에 대한 분자적 수준의 메커니즘을 밝히고 3) 이를 기반으로 천식 및 만성기도 염증질환의 치료제를 개발하는 기초를 확립하는데 있다.

나. 연구개발의 목표와 성격

1) 기존 연구와의 차이점

- ✓ 기존 연구에서 ApoA1을 이용하여 만성기도질환에 응용한 바가 없다.
- ✓ 기존 연구에서는 ApoA1의 항염증작용을 생리적, 기능적인 차이만 확인하였고, 분자생물학적 레벨에서의 기전규명은 이루어진 바가 없다.
- ✓ 본 연구팀에서 ApoA1의 폐내 농도와 천식과의 관련성이 있음을 확인함 (선행연구참조). 이는 타 연구에서 단순히 ApoA1을 투여하여 기능적인 효과를 관찰한 바에 비해서, 실제로 ApoA1 감소가 천식악화, 또는 진행에 연관됨을 시사하는 것으로, 이에 대한 면역학적인, 분자생물학적인 접근이 실제적으로 병인과 직접 관련됨을 알 수 있음.

2) ApoA1의 기도상피세포 및 수지상세포에서의 면역조절작용에 대한 분자적 수준의 기전 규명

- ✓ 본 연구팀에서는 ApoA1의 기도에서의 작용을 좀더 명확히 규명하기위해서 ApoA1이 기도 상피세포에서 과발현된 human ApoA1 over-expression transgenic mice를 제작하여, 최근에 정상적으로 생쥐의 기도 상피세포에서 hApoA1 단백질이 대조군에 비해 과발현됨을 확인하였다(선행연구 참조).
- ✓ primary normal human bronchial epithelium (NHBE cell), MTEC (mouse primary tracheal epithelial cell)등을 배양하였으며, 이들 세포 및 hApoA1 TG mice의 tracheal epithelial cell등을 이용하여 실제 천식환자에서 많이 알레르겐으로 작용하는 집먼지진드기(HDM), LPS, chitin, chitinase등으로 자극하여 ApoA1으로 인한 면역조절작용을 확인할 예정이다.
- ✓ 수지상세포의 attraction, activation에 ApoA1이 미치는 영향을 primary culture를 통해 연구.
- ✓ transgenic mice의 ApoA1기도상피세포를 배양하여 상기 알레르겐들로 자극후 RNA Chip, proteomics를 통한 핵심조절 단백질 발굴이 용이.

-구체적 적시

- 기존 관련 연구와의 차이점

- 차별화 수준 높은 연구

연구 내용 예시

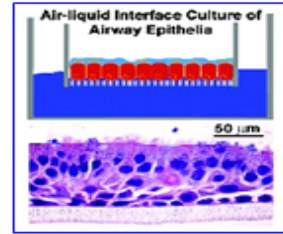
- 세세한 방법 기술(보편성+참신성)
- 실험 목표와 연계가 되도록 유기적으로 구성
- 수준높은 방법은 강조 (그림등)

(4) 연구의 추진 전략 및 방법

가. 연구방법

1) primary epithelial cell 배양 후, 여러 종류의 알레르겐 처리

- ✓ **가설**: ApoA1에 의한 OCL20감소는 1) 여러 알레르겐에 의한 기도 상피세포에 존재하는 여러 종류의 PRR(pattern recognition receptor)의 activation을 감소, 2)epithelium을 유지하는 tight junction을 안정화 등에 의할 것임.
- ✓ MTEC(Mouse tracheal epithelium)나 NHBE(normal human bronchial epithelium)를 3주간 배양하여 ALI(air liquid interface)를 확립하여 최대한 in vivo상태에 근접하게 만든다. 본 연구자는 상기 두가지 일차세포를 배양하여 IL-13의 자극으로 기도 상피세포에서의 mucin발현에 대한 연구 경험이 있음 (Zhen G, Park SW et al. AJRCMB 2007).
- ✓ 알레르겐들의 처리
 - ALI가 완성된 후 transwell의 apical surface에 투여,
 - 천식에서 가장 흔한 알레르겐인 HDM(질먼지진드기), LPS, OVA, 그리고 최근에 관심이 되고 있는 Chitin, Chitinase등으로 ApoA1과 함께 자극함.
- ✓ 얻어진 샘플은 RNA, protein, paraffin bloc, supernatant(basolateral surface)등으로 보관하여 여러 분자적 방법으로 현상들을 관찰.
 - TLR(toll like receptor)2, TLR4, PAR(protease activated receptor)2 activation 확인
 - E-cadherin, ZO-1, claudinin-1등의 tight junction molecules의 disruption확인
 - tight junction 관련 signal pathway인 B-catenin 경로 확인,
 - NF-KB, MAPK signal pathway 검증
 - down stream cytokine들인 TSLP, GM-CSF, IL-1b, TNF-a, IL-25, IL-33 측정
 - microarray, proteomics를 이용한 candidate molecule 탐색



< Air liquid interface >

임상관련 연구

- 대상자 수 선정의 근거 제시
- 연구기간내 가능한지??

2) 수지상 세포배양 CD4 T cell을 분리하여 ApoA1처리

- ✓ **가설**: ApoA1에 의해,
 - 1) 미성숙 수지상 세포(immature dendritic cell)가 알레르겐을 phagocytosis 과정이 저해
 - 2) 수지상세포- CD4 T 세포간의 APC(antigen presentation capacity)과정 저해
 - 3) 미성숙 수지상세포의 성숙 및 활성화 과정의 저해등이 발생할 것이다.
- ✓ 폐의 수지상세포 분리는 이미 예비연구에서 시행하여 flow-cytometry로 확인한바 있음.
 - 골수에서 미성숙 수지상세포(bone marrow derived myeloid immature DC)들을 분리 (Journal of Immunological Methods 223 1999,77-92)의 방법으로 시행.
 - DC maker : CD11c(+), MHC II, CD80, CD86, CD40등으로 maturation확인
 - D5, D7, D9등에 ApoA1을 처리후 DC maturation을 Flow-cytometry로 확인
 - DC activation을 TNF-a, LPS등을 ApoA1과 함께 상기 날짜에 자극 후 확인.
- ✓ Naive OVA specific CD4 T cell 분리 및 Effector T cell 완성
 - naive CD4 T cell은 WT mice에서 소량으로 있어서 분리하기가 힘들. 본 연구팀은 Ova specific TCR

연차 별 연구 목표

예시

- 실험 목표와 연계가 되게 유기적으로 구성

년도	연구목표	연구내용
1차년도 (2010)	Primary bronchial epithelium culture 구축	MTEC(mouse tracheal epithelial culture), NHBE(normal human bronchial epithelial cell)를 배양하여 실제 기도내의 세포와가장유사한 ALI(air liquid interface)상태를 확립한다.
	hApoA1 transgenic mice에서 tracheal epithelium culture	Doxycycline으로 hApoA1 gene이 기관지상피세포의 clonal cell에서 Turn-on 됨. Ex-vivo culture후 ALI 유지.
	Mouse lung dendritic cell, marrow myeloid dendritic cell, CD4 T cell 분리 및 배양	<ul style="list-style-type: none"> • Lung DC은 여러 종류의 mature, immature DC specific CD marker를 이용하여 MAC로서 sorting한다. • Marrow dendritic cell precursor는 GM-CSF, TNF-a등의 자극하에 7-10일동안 배양함. • OVA specific TCR TG mice의 spleen에서 CD4 T cell 분리 및 culture
2차년도 (2011)	Epithelium에서 ApoA1의 일레르겐에 대한 작용 규명	ApoA1를 투여후 OVA, HDM(침먼진진드기), Chitin, Chitinase, LPS등을 ALI 된 epithelium에서 apical area basolateral area에 투여후 RNA, supernatant를 harvest하여 여러 사이토카인 및 epithelium locating receptor들의 activity를 분석한다.
	Dendritic cell(DC)의 maturation, attracting activity 및 APC(antigen presentation capacity)에 대한 ApoA1의 작용 탐색	<ul style="list-style-type: none"> • DC의 maturation시기에 맞추어서 ApoA1및 타 allergen등으로 자극하여 DC의 변화를 관찰. • CD4 T cell을 Th2 polarization 후 DC과 co-culture 시행, ApoA1에 의한 Antigen presentation capacity 변화 여부 탐색
	ApoA1의 epithelium및 DC에서의 작용에 핵심역할을 하는 단백질 규명	Primary culture및 ApoA1 TG mice의 epithelium에서 harvest한 RNA및 protein을 RNA chip, proteomics등을 이용하여 후보 물질군을 탐색
3차년도 (2012)	알려진 상피세포 수용체 및 tight junction에서의 여러 자극에 의한 ApoA1의 작용을 분자수준의 규명	<ul style="list-style-type: none"> • Receptor translocation에 대한 검증 • 알려진 signal pathway에서의 역할 검증 • 후보핵심단백이 상피세포 선천면역에 미치는 영향 검증 • lipid rafts modulation 연관성 규명
	In vivo에서 ApoA1에 의한 Dendritic cell 정착과정, activation, DC-Th2 cell interaction 규명	<ul style="list-style-type: none"> • hApoA1 TG mouse에서 FITC-OVA투여후 L/N, spleen, lung에서의 DC및 CD4 T cell의 역할을 규명 • lipid rafts modulation 관련 규명
	타 호흡기 질환모델의 응용가능성 타진 및 결과 정리	<ul style="list-style-type: none"> • smoking으로 인한 폐기종 동물모델, bleomycin 유도 폐섬유화증 모델, ozone 유도 폐손상모델에서의 응용가능성 검토

추가 도움이 될 사항

- 연구비 과제 작성 자체가 큰 공부가 된다
- 연구비를 획득한 분들의 연구제안서를 참조하자
- 관련 연구 논문업적을 만들자
- 실패해도 지속적으로 도전하자
 - 심사자, 경쟁자, 연구비 규모에 따라 선정 가능성이 해마다 다를 수 있다
- 작은 규모 과제부터 시작 – 교내, 학회과제
- 연구비 심사에 참여하자

떨어질 가능성이 높은 계획서

1. 연구개발의 목표 및 내용에서 동료 연구자가 볼 때 참신성이 없거나 목표가 별로 가치가 없다.
2. 연구개발의 필요성, 목표 및 내용, 추진전략 및 방법, 활용 방안, 기대성과 등의 기술에서 일관성이 없고, 내용이 많이 중복되며 중언부언하는 내용이 많다.-> logical 하지않다
3. 추진전략 및 방법에서 구체성, 현실성이 결여되어 있다.
4. 활용방안 및 기대성과가 너무 추상적이거나 실용성이 떨어진다.
5. 연구계획서 작성에 성의가 없어 보이거나 인용문헌에서 최근 문헌이 다수 빠져 있다.

요약

- 요약문으로 본 연구의 개요가 쉽게 이해되게 해야 한다
- 배경 및 필요성
: 참신성, 차별화와 성공 가능성을 잘 표현(포장) 하라
- 선행연구/ 예비연구가 중요
- 비전공자들도 알 수 있게 쓴 건지 검토하라
: 리뷰어의 관점으로 적어도 3번은 읽자
- 선배 (멘토) 2-3인에게 2-3주전에 피드백을 받아라
- 최소 1-2달 전에 작성하고, 고치고 또 고쳐라 !!!