

# 도약연구사업(구 창의도약) 최종보고서

① 부처사업명(대)	기초연구사업		보안등급(보안, 일반)	일반
② 사 업 명(중)	중견연구자지원사업		공개가능여부(공개, 비공개)	공개
③ 세부사업명(소)	도약연구사업			
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)		비실용화
⑤ 과 제 명	국 문	통증발현연구		
	영 문	Studies on Pain Mechanisms for Clinical Application		
⑥ 주관연구기관	서울대학교			
⑦ 협동연구기관				
⑧ 주관연구책임자	성 명	오우택	직급(직위)	교수
	소속부서	약학대학	전 공	생리학

## □ 연구의 개요 및 필요성

### 1) 연구배경

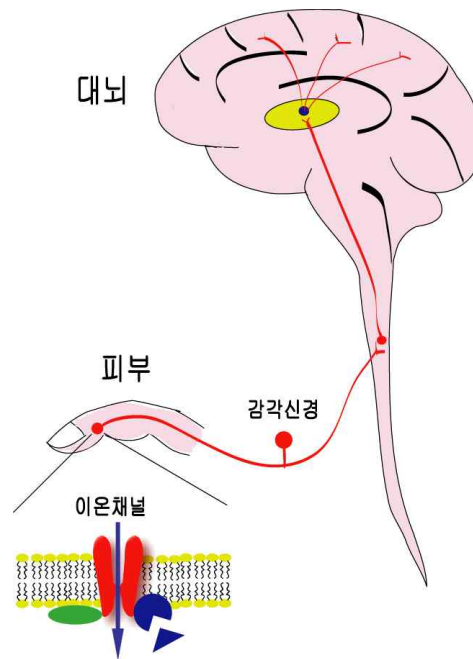
#### 통증이란?

통증이란 조직에 가해진 유해 자극이 조직을 손상시킬 때 이를 경고하는 생체방어 반사의 일종으로 감각신경계의 중요한 기능 중 하나이다. 통증이 조직의 손상을 보호하기 위하여 경고를 하는 방어기전의 일종이지만 이것이 심할 경우 고통을 동반하여 인간의 생활에 많은 지장을 준다. 이 때문에 많은 사람들이 통증의 제거에 힘쓴다. 통증이 인간의 생활에 깊은 관계가 있고 진통에 대한 관심이 지대한 만큼 이에 대한 연구 역시 관심의 대상이 되었다.

통증은 정도와 기간의 차이는 있을지라도 사는 동안 누구나 경험하며 특히 사회가 고령화될수록 더 많은 사람이 통증에 시달린다. 예를 들면, 암으로 고통 받는 사람이 늘고 있으며 암을 가진 많은 사람이 심한 통증을 겪게 된다. 중기 암환자의 38% 정도가 중증의 통증을 경험하며 말기 암환자의 60%가 아주 심한 통증을 경험한다 (Folley, 1979; Twycross and Fairchild, 1982). 더욱이 20-30% 정도의 말기 암환자는 통증을 치료할 수가 없어 진통을 하지 못한 채 사망한다 (Stjernsward, 1985). 동양 사람의 경우 뇌졸중과 같은 뇌혈관질환이 많으며 이 역시 심한 통증을 수반한다. 이외에도 거의 모든 질병에 통증이 수반되어 이의 치료가 요구되고 있다.

#### 통증의 전달

통증은 촉각, 압각 등과 함께 체성감각의 일종이다. 통증도 다른 감각계와 마찬가지로 통각을 감지하는 통각수용기(nociceptor)와 이를 중추신경계로 전달하는 통각신경, 그리고 통각신경정보를 종합하는 통각중추로 이루어져 있다 (Willis and Coggeshall, 1991; Basbaum and Jessel, 2000). 조직을 손상시킬 만한 강한 자극이 피부, 근육, 뼈, 및 관절에 주어지면 제일 먼저 감각수용기인 통각수용기가 이를 감지하여 여러 종류의 자극을 신경신호로 바꾼다(그림 1). 즉, 통각수용기에서의 신경신호는 세포 막전압의 탈분극에 의한 활동전압으로 나타나며 이 활동전압이 바로 신경신호가 된다. 통증의 신경신호는 감각신경 그 중에서 통각신경을 통하여 척수에 전달되고 나아가 중추에 연결됨으로 통각을 감지하게 된다 (그림 1).



[그림 1. 통증의 전달 경로]

### 통각수용기

오랫동안 통각수용기에 대한 연구가 진행되었지만 1970년대 가서야 비로소 통각수용기에 대한 연구가 활발히 시작되었다 (Willis and Coggeshall, 1991). 형태학적으로 볼 때 통각수용기는 촉각수용기가 캡슐처럼 여러 막으로 둘러싸인 것과는 다르게 말단이 특수한 수용기를 가지고 있지 않은 free nerve ending (또는 bare nerve ending) 으로 되어 있다 (Kruger et al., 1981; Kruger et al., 1985). Free nerve ending은 감각신경의 말단이 변형이 된 것으로 여러 종류의 자극을 감지하도록 되어 있다 (Bessou and Perl, 1969; Bessou et al., 1971). 통각수용기는 통각신경의 말단이 변형된 것으로 대부분 무수신경 (unmyelinated nerve fiber)으로 되어져 있다. 많은 무수신경은 다류성 수용기로서 화학적 자극, 열 자극 및 기계적 자극 모두에 반응 한다 (Bessou and Perl, 1969; Croze et al., 1976).

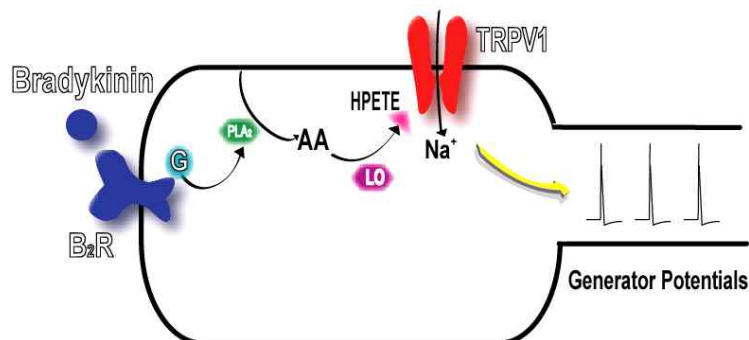
통각수용기 혹은 통각신경세포의 말단에는 여러 종류의 이온채널이 존재한다. 특히, 여기서 발생하는 막 전압의 변화를 활동전압으로 발전시키는 voltage-gated  $\text{Na}^+$  channel (Nav), voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel (Cav), 그리고 voltage-gated  $\text{K}^+$  channel (Kav)이 존재한다. 이외에도 캡사이신채널과 같이 화학물질을 감지하는 채널과 온도 (차가운 것과 뜨거운 것)를 감지하는 TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8, TRPA1과 같은 채널 등이 많이 있어 서로 다른 종류의 자극에 반응한다. 이러한 채널들은 바로 강한 유해자극을 탐지하는 분자센서 (Molecular sensor)가 되며 이 채널이 열리게 되면 유해자극을 감지하게 된다. 이러한 채널들의 활동에 따라 통각수용기가 다양한 자극에 다양한 반응을 나타나게 되고 우리는 풍부한 감각경험을 하게 된다. 따라서 통각수용기에 있는 이온채널들의 활성이 통증신호의 발생에 필수적이다.

### 통증관련 이온채널 연구

최근에 분자생물학 및 생물정보학 등 생명과학의 발달로 이온채널이 많이 발견되었다. 그 대표적인 것이 본 연구단을 중심으로 여러 과학자가 연구하고 있는 캡사이신채널, 즉 TRPV1이다. 이는 통증 발생에 중요한 인자가 되었고 이를 타겟으로 한 진통제의 개발이 본격화 되고 있기 때문이다. TRPV1이 발견된 이래 여러 종류의 TRP(Transient Receptor Potential)채널이 클로닝되었고 이들의 특성이 밝혀졌으며 TRP채널 이외에도 많은 채널들이 클로닝되어 이들과 통증과의 관계가 밝혀지고 있다.

## TRPV1

TRPV1은 TRP채널의 하나로서 고추의 매운 성분인 캡사이신에 의해 열린다 (Oh et al., 1996; Hwang et al., 2000). 캡사이신은 고추의 매운 성분으로서 통증을 강하게 일으킨다. 캡사이신이 통증을 일으키는 이유가 바로 이 채널을 열어주어 통각신경세포를 강하게 흥분시키기 때문이다. 본 연구자는 바로 캡사이신이 감각신경세포에서 어떠한 이온채널을 열어준다는 사실을 최초로 밝혔다 (Oh et al., 1996). 캡사이신이 열어주는 이온채널을 클로닝하여 찾은 것이 바로 TRPV1이다 (Caterina et al., 1997; Tominaga and Julius, 2000). 클로닝된 TRPV1은 6개의 Transmembrane domain을 지닌 전형적인 TRP채널의 모습을 가졌고 N-terminal과 C-terminal이 긴 구조적 특징을 지녔다. TRPV1은 캡사이신 뿐 아니라 산과 열(heat)자극 등에 의해서도 열린다는 것을 알았다. 그 동안 유해한 열자극에 의해 열리는 이온채널은 알려지지 않았다. 그래서 열에 의한 통증이 어떻게 발생하는가에 대해서는 그 동안 잘 알려져 있지 않았다. TRPV1이 바로 열자극에 의한 통증을 전달하는 센서로 여겨진다. 실지로 이 유전자를 knock-out시킨 마우스에선 열자극에 의한 통증의 일부가 소실된다는 보고도 있다 (Caterina et al., 2000). 특히, 본 연구자의 연구에 의하면 TRPV1은 브래디키닌과 같은 염증성 매개물질이 통증을 일으키는데 중요한 인자로 작용하고 있다고 알려져 있다. 즉, 통각신경세포에서 브래디키닌은 G-protein을 통해 PLA2를 활성화시켜 아라키돈산을 만들고 이것이 다시 리폭시게네아제를 통해 12-HPETE등의 대사산물을 생산하며 이것이 TRPV1을 활성화시켜 신경세포를 흥분시킨다(그림 2참조) (Hwang et al., 2000; Hwang and Oh, 2002; Shin et al., 2002). 이처럼 TRPV1은 염증성 통증을 발생시키는데 큰 역할을 하고 있고 따라서 이의 길항제는 진통제로서 통증 치료와 같은 것으로 응용될 가능성이 높다. 이러한 TRPV1의 통증과의 깊은 연관 때문에 이 채널의 길항제가 진통제로서의 가능성이 제기되었고 실지로 많은 제약회사가 이를 이용한 진통제의 개발에 심혈을 기울이고 있는 실정이다.



[그림 2. 브래디키닌의 감각 신경세포 흥분 기전]

## P2X3:

세포외액에 존재하는 ATP 역시 통증을 일으키는 하나의 인자로 알려져 있다 (Burnstock, 1996). 연고제로 ATP를 바른다는 정맥주사를 하면 통증을 유발한다고 알려져 있다 (Bleehen *et al.*, 1976; Bleehen and Keele, 1977) (Coutts *et al.*, 1981). 전기생리학적 연구에서는 ATP가 감각신경을 흥분시킨다는 보고가 있다. 최근의 생명공학의 발달로 ATP가 열어주는 이온채널인 P2X채널이 클로닝 되었다 (Ralevic and Burnstock, 1998; Khakh *et al.*, 2001; North, 2002). 구조적으로 P2X 채널은 2개의 transmembrane domain을 지니고 있으며 세포내 N- and C-termini를 지니고 있고 transmembrane domain 사이에 긴 세포 외 loop을 지니고 있다 (Khakh *et al.*, 2001; North, 2002; Vial *et al.*, 2004). P2X 채널은 7개의 아류를 지니고 있고 이 중 P2X3가 통각세포에 많이 발현되는 것으로 알려졌다 (Chen *et al.*, 1995). 이 P2X3채널이 조직 손상에 의한 ATP에 의해 통증을 매개한다는 것으로 알려졌다. 최근엔 P2X채널들이 염증성 통증이나 신경병증성 통증 (neuropathic pain)의 발생에 기여한다는 보고도 있다. 그러나 이 채널의 길항제를 이용한 진통제의 개발은 아직 잘 알려져 있지 않다.

### ASIC 채널:

조직의 산성화 (Tissue acidosis)는 조직에 염증이 생기거나 허혈 (ischemia)이 발생할 때 나타나며 이들이 통증의 주요원인으로 알려져 있다. 2 종류의 이온채널이 관여한다고 알려져 있는데 그것은 바로 TRPV1과 Acid Sensing Ionic Channels (ASIC) 이다 (Waldman *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1998; Reeh and Kress, 2001). 이 중 모든 ASIC 채널은 Na<sup>+</sup> 을 잘 통과 시키고 어떤 종류는 K<sup>+</sup> 과 Ca<sup>2+</sup>에도 약간의 투과성이 있다. 이 ASIC 채널 중에서 ASIC1과 ASIC3가 가장 산에 민감하고 약한 산에도 활성화 된다. 아직 ASIC 채널이 통증에 관련된다는 직접적인 증거는 없지만 그러나 ASIC 채널이 심장이나 근육의 통증에 관련될 가능성이 있다고 보고된다. ASIC 채널과 유사한 채널이 *C. elegans* 에서 기계적 자극에 의해 열리는 이온채널 (mec-4, mec-10)임으로 ASIC 채널이 기계채널일 가능성도 제시되었다. 그러나 아직 이를 뒷받침하는 어떠한 증거도 제시되지 않고 있는 실정이다.

### 새로운 진통제의 개발의 필요성

세계 진통제(analgesic) 시장은 2002~2004년에 매년 약 370~380억 달러의 시장을 형성하고 있다. 이 시장은 그러나 급격히 증가하여 오는 2010년에 이르면 약 750억 달러 규모로 2배 가까이 확대될 것이라는 전망이 나왔다 (리서치&마켓社). 현재 200곳이 넘는 제약기업과 생명공학기업들이 진통제를 개발 중이거나, 발매하고 있다.

최근 가장 널리 사용되고 있는 진통제들로 마약성 진통제와 비 스테로이드성 소염제(NSAID)이다. 마약성 진통제는 중추에 작용하는 진통제로서 약효가 가장 강력하며 여러 종류의 통증에 잘 듣는다. 그러나 내성이 강하고 탐약성이 강한 부작용이 있다. NSAID는 약효가 강하지 않고 염증성 통증을 완화하는 진통작용은 있으나 위궤양, 신장독성 및 혈관계 이상 등의 부작용을 가진다. 이 외에도 신경병증성 통증치료제로 케타민(ketamine)이나 NMDA 수용체 길항제를 비롯한 비 마약성 진통제와 가바펜틴(gabapentine)과 같은 항우울제·항경련제 등을 보조요법용으로 빈번히 사용하고 있다.

진통제의 시장이 크지만 소염진통제와 마약성 진통제의 약효와 독성에 한계가 있기 때문에 현재에도 많은 후보물질들이 개발되고 있는 실정이다. 현재 개발이 진행 중에 있는 진통제

후보약물들을 보면 주로 마약성 수용체 연결물질, 브래드키닌 길항제, 새로운 COX 저해제, 글루탐산 수용체 길항제, 뉴로키닌 수용체 길항제, P2X2 길항제, 질산염 계열의 길항제, 대마성분을 함유한 진통제 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 어류에서 추출된 성분으로 원래는 마약중독에 따른 금단작용에 초점이 맞춰져 있던 Voltage-gated Na<sup>+</sup> 채널 길항제인 테트로도톡신도 진통제로 개발될 가능성이 시사되고 있으며, 조개류에 함유된 Cav 채널 길항제인 코노톡신 (w-Conotoxin) 등도 임상시험 진행 중이다.

지금까지의 통증 치료법은 진통제에 의한 약물요법을 많이 이용하고 있다. 특히, 수술 후 통증 (급성통증)이나 말기 암에 의한 만성통증의 경우 마약성 진통제에 많이 의존하였다. 그러나 마약성 진통제는 내성이 있어 점차 투여량을 증가시켜야만 되고 결국 치사량까지 주게 된다. 이렇게 되면 더 이상의 약물에 의한 치료 방법이 없게 되고 외과적인 수술에 의존하는 수밖에 없다. 이와는 달리 말초에 작용하는 소염진통제는 널리 사용되기는 하나 진통 효과가 강하지 않고 염증성 통증에만 작용하는 한계가 있고 신부전이나 궤양 등의 부작용 또한 만만치 않아 그 사용이 제한적이다. 따라서 새로운 진통제의 개발이 요구된다.

### 기계채널 (Mechanosensitive Channel) 연구의 필요성

통증을 일으키는 자극은 크게 대별하여 3가지가 있다. 하나는 기계적 자극이고, 또 하나는 열 자극이며 마지막으로 화학적 자극이 있다. 이 자극들에 의한 통증은 종류와 느낌이 판이하게 다르다. 최근 생명과학의 발달로 열자극과 화학적 자극에 반응하는 이온채널이 다수 발견되었으며 이 채널들이 어떻게 통증을 일으키는가 하는 것이 많이 알려져 왔다.

지금까지는 본 연구단이 연구하였듯이 TRPV1이나 그 외의 채널은 열자극이나 화학적 자극에 반응하는 이온채널로서 기계적 자극에는 반응하지 않는다. 특히 캡사이신채널인 TRPV1은 감각신경세포에 많이 분포하지만 캡사이신이나 12-HPETE와 같은 물질에 의해 열린다. 이처럼 화학적 자극에 반응하는 TRPV1과 같은 채널들은 염증성 통증, 허혈성 통증이나 류마티즘과 같은 통증을 매개할 가능성이 크다. 따라서 이들을 억제하는 길항제는 염증성 통증 등을 완화시키는 진통제가 될 가능성이 있다. TRPV1외에도 많은 종류의 TRP채널들이 온도 자극에 의해 열린다. 예를 들면 TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8, TRPA1 등은 온도자극에 의한 열림으로 통증을 야기시키는 센서가 될 수 있다. 그러나 이들 채널은 기계적 자극에 의해 열리지 않는다. 따라서 이들은 기계통증을 매개할 수 없다.

기계적 자극에 의한 통증 (mechanical pain, 이하 기계통증)을 이해하려면 필수적으로 기계적 자극에 의해 열리는 채널 (기계 채널)을 알아야만 한다. 감각신경에 따라서, 기계통증을 전달하는 이온채널 즉 기계채널은 연구가 많이 되지 않은 상태이며 특히 유전자나 단백질의 구조는 전혀 알려지지 않았다. 따라서 기계통증의 원인을 분석연구 하기 위해선 기계채널에 대한 연구가 필수적이라 하겠다.

### 소양증 및 알러지 연구의 필요성

소양증은 아토피성 피부염과 같이 여러 피부질환의 대표적 증상이다. 아토피성 피부염의 경우 간지러움의 정도가 지나쳐 너무 피부를 긁은 나머지 피부를 다치거나 상처가 나게 한다. 이처럼 너무 가려울 경우 통증의 경우와 같이 정상적인 생활을 할 수 없다. 실제로 세계적으로 어린아이의 10%가 아토피성 피부염을 앓고 있고 이는 강한 간지러움을 동반한다. 간지러움이 발생하는 환자의 피부엔 히스타민이 많이 분비되고 있다. 이 히스타민 역시 감각신경세포를 흥분시켜 간지러움을 유발시킨다. 그러나, 어떠한 신경신호 기전에 의해 감각신경세포를

흥분시키지는 아직 알려져 있지 않았다. 따라서 히스타민에 의해 어떠한 이온채널이 어떠한 경로로 열리는지 등에 대한 연구가 필요하며 이러한 연구는 바로 피부염등에 의한 간지러움을 치료하는데 많은 도움을 주리라 예상된다.

또한, 알러지는 알러진이 Mast cell 등에 면역반응을 일으켜 시작되는 조직의 민감 반응이다. 특히, Mast cell에 있는 Fc 수용체에 IgE가 붙으면 마스터 세포가 히스타민, 인터루킨 등을 발생시켜 염증이나 다른 알러지 반응을 일으킨다. 비록 오랫동안 알러지의 downstream pathway는 많이 연구되어왔지만 아직 완전히 밝혀지지는 않고 있다. 따라서 알러지 반응 때 어떠한 기전으로 히스타민, 인터루킨 등을 발생시키는가를 연구할 필요가 있다. 이는 수 많은 사람들이 알러지 때문에 아토피성 피부염, 천식 등으로 고생을 하고 있고 이를 치료하기 위해선 이러한 기전 연구가 반드시 필요하다.

## 2) 연구의 최종목표

최근 감각신경세포에 발현되어 통증전달에 중요한 위치를 차지하는 이온채널들이 다수 발견되고 연구되고 있지만 아직도 통증을 매개하는 이온채널이 더 많이 존재할 것으로 예상된다. 특히, 열자극을 매개하는 이온채널은 더 많이 존재할 것으로 예상된다. 또한 기계채널 유전자에 대한 연구는 거의 전무하다. 기계통증은 임상적으로 대단히 중요하다. 출산을 한다든가 수술을 할 때 발생하는 통증이 바로 기계통증과 연관이 있다. 따라서 기계통증을 억제하기 위해선 먼저 이를 매개하는 이온채널에 대한 연구가 선행되어야 한다. 즉, 기계통증의 발생과정을 연구해야만 하며 이를 위해 필수적으로 기계채널을 연구해야만 한다. 그러나 기계채널에 대한 연구는 다른 채널에 비해 연구가 많이 되지 않은 상태에 있다. 몇 가지 이온채널이 기계채널일 가능성이 있는 것으로 보고가 되고 있지만 아직 이것이 기계채널임을 증명할 확실한 근거는 없는 실정이다. 감각신경에 분포하는 기계채널에 대한 연구는 본 연구단이 전기생리학적 방법으로 발견한 HT, LT, 및 LTSC채널 연구가 전부이다. 그러나 아직도 이들의 유전자가 밝혀지지 않고 있어 이 채널들의 구조 및 특성이 잘 알려지지 않고 있다. 따라서 이들에 대한 연구가 무엇보다 선결되어야 한다.

본 연구단은 도약과제 1단계에서는 새로운 이온채널 유전자를 클로닝하여 이들의 통증과의 관계를 밝히고자 한다. 특히 클론된 채널과 기계통증과의 관계를 연구하고자 하며 이와 함께 열자극에 의한 통증발생에 중요한 열채널의 연구도 심화시킬 예정이다.

### 연구의 최종 목표

- ▶ 채널의 유전자, 구조, 기능 연구를 통한 통증의 발생기전의 총체적 파악
- ▶ 마취제를 대체하는 강력한 진통제의 개발

## □ 연구성과의 활용 방안

### (1) 연구결과의 가치: 새로운 이온채널 연구를 통한 질병치료 연구

#### 1) 과학기술적 가치

Human Genome Project 이 후 유전자에 대한 정보 습득이 쉬워 많은 이온채널이 클로닝되었다. 그러나, 아직도 많은 이온채널의 유전자가 알려져 있지 않다. 이온채널의 유전자가 밝혀지면 이 유전자와 질병과의 관계를 쉽게 찾을 수 있다. 만약 유전자의 기능을 모르면 질병과의 관계를 찾을 수 없다. 따라서 질병의 원인을 이해하는데 채널 유전자를 확인하는 것이 필수적이다. 이는 기초학술적 가치가 매우 높을 뿐 아니라 질병치료에 응용될 수 있는 가능성도 있다. 생리적 기능이 중요한 새로운 이온채널을 클로닝하여 생리적 기능 및 세포기능을 파악하는 것과 생리적 기능이 중요한 ANOCTAMIN 채널들의 기능과 특성을 파악함으로써 여러 생리현상을 분자레벨에서 정확히 파악하게 하는 것은 기초 학술적 기반이론으로서 의의가 클 것으로 사료된다. 또한 forward genetics와 reverse genetics를 사용하여 새로운 이온채널을 찾는 기법은 역시 기술적 가치가 크다고 판단된다.

#### 2) 사회경제적 가치

채널의 유전자를 클로닝해야 되는 또 다른 이유는 채널의 유전자를 알게되면 이를 과발현하여 채널단백질에 작용하는 여러 길항제나 효능제를 찾을 수 있다. 이와 같은 효능제, 길항제는 바로 질병치료에 응용될 수 있다. 예로, K<sup>+</sup> channel opener 등은 허혈성 심근경색치료가 뇌졸중 치료제 등에 응용되어 개발되고 있다. 따라서, 새로운 이온채널의 유전자를 클로닝하는 것은 신약개발에 응용될 수 있어 큰 경제적 가치를 가진다. Cystic fibrosis (낭포성 섬유증)은 치료가 불가능한 질병이다. 본 연구단이 발견한 ANO1의 효능제가 개발될 경우 이 질병의 치료가 가능하여 많은 불치 환자들의 생명을 구할 가능성이 크다. 이온채널의 기능이상에 의한 만성질환 특히 정신질환이나 암 등은 현대 사회가 안고 있는 가장 심각한 질병들이다. 따라서 본 연구의 결과로 병인기전이 밝혀져 치료제를 포함한 치료 방법이 제시되면 사회적 가치는 매우 높다고 판단된다. 제안된 과제의 연구 성과로 진통제, 정신질환 및 암 등의 치료제가 개발될 경우 경제적 가치는 상상을 초월할 것으로 보인다.

### (2) 산업화 응용

- ANO1의 agonist를 발굴하여 cystic fibrosis치료제로 산업체와 협동으로 개발하고자 국내외 파트너를 찾고 있는 중
- ANO1 stable cell line을 확보하였으며 이를 HTS로 스크리닝하기 위한 protocol 확립
- Chemical library 50000종을 1차, 2차 및 3차 스크리닝을 마침
- 3차 스크리닝을 마친 active compound를 팻취클램프로 확인하여 active hit를 확립할 예정