

최종보고서 [기관고유연구사업]

과제고유번호	1310200	연구분야 (코드)	T-2	지원 프로그램	창의 (일반연구)과제	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	암세포 침윤 관련 EMT 조절인자로서의 C/EBPbeta 역할						
과제책임자	성명	윤경실	소속	폐암연구과	직위	선임연구원	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
	(1세부)				성명	소속(직위)	전공
	(2세부)						
	(3세부)						
총연구기간	2013년 1월 ~ 2015년 12월 (총 3년)	해당단계 참여 연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 명	해당단계 연구개발비	연구비:	천원	
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 5명 내부: 5명 외부: 명		총연구개발비	연구비:	천원
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
	계	2013.1.1. ~ 2015.12.31	208,000	208,000	소계	현금	현물
	제1차	2013.1.1. ~ 2013.12.31	80,000	80,000			
	제2차	2014.1.1. ~ 2014.12.31	80,000	80,000			
	제3차	2015.1.1. ~ 2015.12.31	48,000	48,000			
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

2016년 3월 10 일
과제책임자 : 윤 경 실 (인)

국립암센터원장 귀하

< 국문 요약문 >

연구의 목적 및 내용	<p>< 최종목표 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ● C/EBPbeta의 EMT 조절 및 기전 연구를 통하여 암세포의 침윤을 극복할 수 있는 암치료 타겟으로의 가능성을 평가하고자 함. <p>< 내용 ></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ C/EBPbeta가 과발현 혹은 활성화된 암종 및 암세포주 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 정상 및 다양한 primary lung cancer와 metastatic lung cancer 조직에서 C/EBPbeta를 면역 염색하여 발현 정도를 비교하였을 때 정상 폐세포에서 보다 암조직에서, 일차암보다 전이암에서 C/EBPbeta의 발현이 높아져 있음을 관찰. - 정상 human bronchiolar epithelial primary 세포와 비교 시 다양한 폐암세포주에서 C/EBPbeta 단백질이 과발현됨을 관찰함. ○ C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟유전자 선별 <ul style="list-style-type: none"> - C/EBPbeta의 세포형태 및 actin organization 대한 영향을 확인 - 암세포에서 C/EBPbeta가 epithelial marker, mesenchymal marker, 기타 EMT 관련 전사조절인자, adherin junction protein, protease inhibitor, EGFR 등 EMT에 관여하는 인자들의 발현 변화에 관여함을 관찰. - C/EBPbeta knockdown으로 TGFbeta로 유도되는 EMT 조절 확인 - EMT 조절 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자를 단백질 및 mRNA 발현, promoter binding, transcription activity 변화를 확인함으로써 선별 ○ in vitro에서 C/EBPbeta의 암세포 침윤 작용 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration/invasion 조절 확인 ○ in vivo에서 C/EBPbeta의 기능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - C/EBPbeta의 기능을 in vivo에서 확인하기 위한 세포주 구축 - 대조군, C/EBPbeta 발현 저해 A549-luc 세포주를 이용한 폐전이 실험 수행 																
연구개발성과	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">구분</th> <th style="width: 30%;">달성치/목표치¹⁾</th> <th style="width: 30%;">달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>0/1</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>0/4</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p> <p><정성적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> - 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰하고, C/EBPbeta 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁜 것을 관찰함으로써 C/EBPbeta가 폐암진행 억제인자로서의 좋은 치료 타겟임을 제시함. - 암세포의 EMT 및 이동/침윤 조절인자로서의 C/EBPbeta의 새로운 기능 확인 					구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	0/1	0	IF 합	0/4	0	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)															
SCI 논문 편수	0/1	0															
IF 합	0/4	0															
기타 성과																	
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ● 암치료에 있어 전이와 재발은 극복해야 할 과제임. 암전이를 촉진하는 주요 요인 중 하나인 EMT에 대한 근본적인 이해가 이루어진다면 EMT를 유발하는 주요인자를 조절함으로써 전이 및 재발암을 치료하는데 있어 큰 발전을 가져올 것임. ● 암 치료효과를 증진시킬 수 있는 세포내 조절인자 C/EBPbeta를 발굴하고 기전을 밝힘으로써 암 치료의 효율을 증진시킬 수 있는 분자적 근거 및 암 치료제 개발의 소재를 마련함. 																
중심어 (5개 이내)	C/EBPbeta	EMT	침윤	폐암	전사조절인자												

< 영문 요약문 >

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ To elucidate the role and mechanism of action of C/EBPbeta in regulating EMT and cancer cell invasion and to further evaluate C/EBPbeta as a therapeutic target for cancer treatment. - To examine the expression or activity of C/EBPbeta in various tumor tissues with/without metastasis and cancer cell lines compared to corresponding control - To check if C/EBPbeta regulates EMT and if so, to identify the transcriptional target genes of C/EBPbeta - To check if C/EBPbeta is involved in cell migration/invasion in vitro - To confirm the function of C/EBPbeta in EMT/invasion/metastasis in vivo mouse model 				
<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Comparison of C/EBPbeta protein expression levels among normal lung tissue, primary or metastatic lung cancer tissues and various cell lines. <ul style="list-style-type: none"> - The protein expression of C/EBPbeta is high in the order of metastatic cancer tissues, primary cancer tissues, normal tissues of lung - Overall survival of the patient who has higher levels of C/EBPbeta mRNA is significantly shorter than that of the patient who has lower levels. - Most of lung cancer lines including various histological subtypes express higher levels of C/EBPbeta compared with normal epithelial bronchiolar epithelial cells. - Lung cancer cell lines which has higher levels of C/EBPbeta shows the higher levels of the vimentin and snail, suggesting the role of C/EBPbeta in EMT ○ To see if C/EBPbeta regulates EMT, migration and/or invasion of cancer cells. <ul style="list-style-type: none"> - C/EBPbeta knockdown cells display the epithelial phenotype and increased expression of several genes involved in EMT includes E-cadherin, EGFR, ZEB, Snail and decreased Vimentin, Claudin. - TGF-beta-induced EMT and hEGF-induced Snail expression was inhibited in C/EBPbeta knockdown cells. - It is also observed that migration and invasion is inhibited in C/EBPbeta knockdown cells. ○ To identify C/EBPbeta downstream target genes involved in cancer cell migration/invasion and to determine direct transcription regulation of those genes by C/EBPbeta. <ul style="list-style-type: none"> - Among the genes regulated by C/EBPbeta, identified transcription target of C/EBPbeta related to EMT are SNAIL-1 and CLDN-1. 				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ It is expected to establish the cornerstone for improvement of lung cancer therapy and molecular basis by identifying C/EBPbeta as promoting molecule for chemotherapeutic reagent ○ It is expected to be applied to overcome drug resistance of cancer cells to chemotherapeutic agents. ○ It is considered to be applicable to recurred and metastatic cancer 				
<p>Keywords</p>	<p>C/EBPbeta</p>	<p>EMT</p>	<p>invasion</p>	<p>lung cancer</p>	<p>transcription factor</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	2
3. 연구수행 내용 및 결과	2
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	11
5. 연구결과의 활용계획 등	12
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	12
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적	13
8. 참여연구원 현황	13
9. 기타사항	14
10. 참고문헌	14

<별첨> 자체평가의견서

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ C/EBPbeta의 EMT 조절 및 기전 연구를 통하여 암세포의 침윤을 극복할 수 있는 암치료 타겟으로의 가능성을 평가하고자 함.

- C/EBPbeta가 과발현 혹은 활성화된 암종 및 암세포주 선별
- C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인
- C/EBPbeta의 암세포 침윤 검증
- C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별
- in vivo에서 C/EBPbeta의 역할 검증

1-2. 연구개발의 필요성

○ 폐암은 발생 빈도 및 사망율이 높고, 전이와 재발이 치료실패의 원인으로 생각되어지고 있음. EMT의 암 전이 및 약물 저항성에 관련된 역할이 지속적으로 보고되고 있으나, 그 분자학적 기전에 관하여서는 면밀한 연구가 필요한 실정임. 암전이 과정에서 EMT의 역할에 관한 근본적인 이해가 이루어진다면 EMT를 조절함으로써 전이 및 재발암의 치료하는 등 암 치료에 큰 발전을 가져올 것임.

1-3. 연구개발 범위

- EMT 조절에 관여하는 것으로 알려진 adherens junction marker, 전사조절인자, 신호전달체계 활성화 인자, proteases 등의 C/EBPbeta로 인한 조절 여부 확인.
- TGFbeta에 의해 유도되는 EMT를 C/EBPbeta knockdown으로 조절할 수 있는지의 여부를 관찰.
- C/EBPbeta가 과발현되거나 활성화된 암세포에서 C/EBPbeta로 인한 암세포 운동성/이동/침윤을 확인
- 대조군 및 C/EBPbeta 저해 세포주에서 gene expression array와 C/EBPbeta-ChIP-on-chip assay를 실시하여 공통적으로 C/EBPbeta에 의해 조절되는 EMT/이동/침윤 관련 유전자를 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자로 선별하고, C/EBPbeta에 의한 전사조절을 확인.
- 선별된 타겟 유전자의 C/EBPbeta로 인한 EMT 조절 기능에 있어서의 역할 검증을 위해 C/EBPbeta 저해와 동시에 타겟 유전자의 과발현 혹은 발현을 억제하여 EMT 조절/이동/침윤 여부를 확인.
- 상용화된 human common cancer tissue microarray slide 및 normal tissue microarray slide, 정상 폐세포주와 다양한 종류의 폐암세포주에서 C/EBPbeta 과발현 및 활성화를 조사하고 암종 및 암세포주 선별. C/EBPbeta 발현과 1차년도에 도출된 EMT maker 상관관계 확립.
- C/EBPbeta를 저해함으로써 in vitro 실험에서 확인된 EMT 및 침윤 억제 효과를 재현할 수 있는 세포주 확립 및 in vivo 동물 실험

2. 국내외 기술개발 현황

- CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)는 basic leucine zipper계 전자조절인자로 C/EBPalpha, C/EBPbeta, C/EBPgamma, C/EBPzeta (CHOP) 등 6가지 이상의 구성원을 포함하고 있으며, 세포 성장, 분화, 염증반응, 대사 등 중요한 생물학적 반응을 조절하는 것으로 알려짐 (Ramji, 2002).
- 기능적으로는 C/EBPbeta가 caspase 8과 관련되어 세포고사 (apoptosis)를 억제하는 것으로 보고되어 C/EBPbeta의 세포고사에 관련된 기전이 밝혀진 바 있음 (Buck, 2001). 마우스에서 발암물질에 의한 피부종양유도 시 C/EBPbeta knockout 마우스는 정상 마우스와 비교 시 종양형성 프로토콜에 의해 종양 형성이 관찰되지 않았으며 (Zhu, 2002), 이는 DNA 손상 물질 처리 후 p53의 발현을 억제하여 손상 세포의 apoptosis를 저해한 결과임이 밝혀짐 (Yoon, 2007, Ewing, 2008).
- C/EBPs의 다른 member인 tumor suppressor로 알려진 C/EBPdelta는 최근 mammary gland에 Neu/Her2/ERBB2 proto-oncogene을 과발현하는 마우스에서 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 분해를 증진하는 F-box and WD repeat-domain containing 7 gene (FBXW7, FBW7, AGO, Cdc4)의 발현을 억제하여 유방암 전이를 증가시키는 것이 동물실험으로 증명된 바 있음 (Balamurugan, 2010). 결과적으로 C/EBPdelta는 저산소증 적응에 필요한 mTOR/AKT/S6K1 signalling을 증가시키고 hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)의 translation 및 활성을 증가시키는 것이 보고됨.
- C/EBPbeta는 위암, 예후가 좋지 않은 유방암 등에서 과발현되어 있고, Wilm's 종양에서는 재발 및 전이암에서 과발현되어 있다는 결과가 발표되어 종양형성 및 진행에 역할을 하고 있음이 제시됨 (Rask et al, 2000, Sundfeldt, 1999, Sankpal, 2006).

3. 연구수행 내용 및 결과

- 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함.
- TCGA overall survival 분석 시 C/EBPbeta 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁘게 나타남.
--> C/EBPbeta가 폐암진행 억제인자로서의 좋은 치료타겟임을 제시
- 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현이 증가해 있음을 관찰함.
- C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰하여 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시.
- 폐암세포주의 세포형태 및 actin organization에 대한 C/EBPbeta의 조절을 확인
- 암세포에서 C/EBPbeta가 epidermal marker (E-cadherin)와 mesenchymal marker (vimentin) 발현 변화에 관여함을 관찰.
- C/EBPbeta knockdown으로 TGFbeta로 유도되는 EMT 및 hEGF로 유도되는 Snail-1 발현 억제 확인
- C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별
- 폐암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration/invasion 조절확인
--> 전사조절인자인 C/EBPbeta가 폐암세포주에서 EMT, 암세포의 이동/침윤 관여하며, 그에 관여하는 하부 전사타겟 유전자를 밝혀 C/EBPbeta의 새로운 기능을 증명함.
- in vivo에서 C/EBPbeta의 기능 검증

■ 정상 및 원발성, 전이성 폐암 조직에서 C/EBPbeta 단백질 변화 관찰.

- 폐암 조직 TMA slide를 이용하여 C/EBPbeta 면역염색하여 정상 및 각종 폐암조직, primary lung cancer와 metastatic lung cancer 조직에서 C/EBPbeta 발현 정도를 비교함. 정상조직, 원발성 폐암 조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함. 정상조직의 경우 매우 약하게 C/EBPbeta가 발현되었으나 (score, 0), squamous cell carcinoma, large cell carcinoma의 경우 약 70~75%에서 adenocarcinoma의 경우 약 40%에서 C/EBPbeta 단백질 발현이 높아져 있었고, 전이성 암에서는 약 90%에서 과발현을 보임 (Fig.1, 위). TCGA database를 이용하여 overall survival 분석 시 C/EBPbeta mRNA 발현이 높은 환자의 예후가 lung adenocarcinoma와 squamous cell carcinoma 모두에서 유의하게 나쁘게 나타남 (Fig.1 아래).

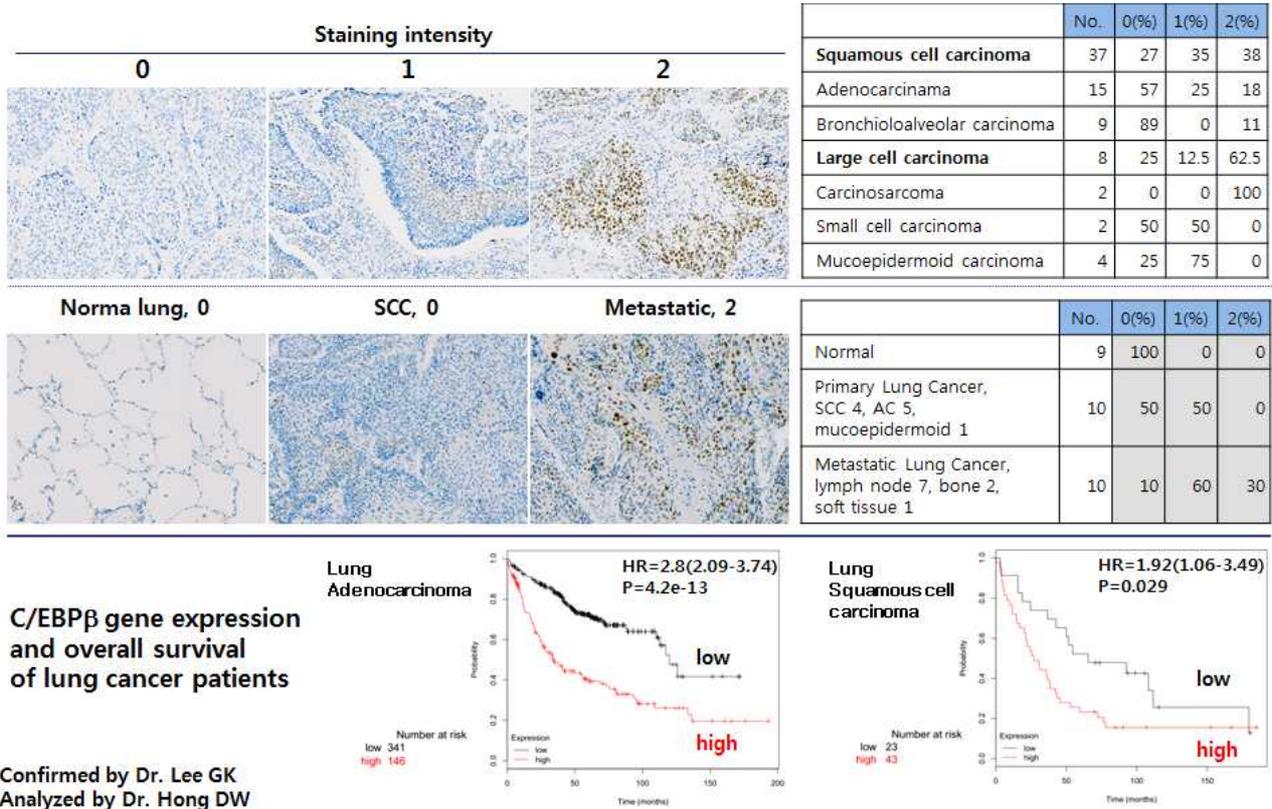


Fig. 1. C/EBPbeta expression in normal and lung cancer tissue and is related to overall survival of lung cancer patients.

■ 폐암세포주에서 C/EBPbeta의 발현 및 EMT 관련인자 발현과의 연관성

- 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현양을 관찰하였고, 대부분의 폐암세포주에서 정상 폐세포 (NHBE, normal human bronchiolar epithelial cells)와 비교 시 발현이 증가됨을 관찰함.
- 또한 C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰함으로써 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시함.

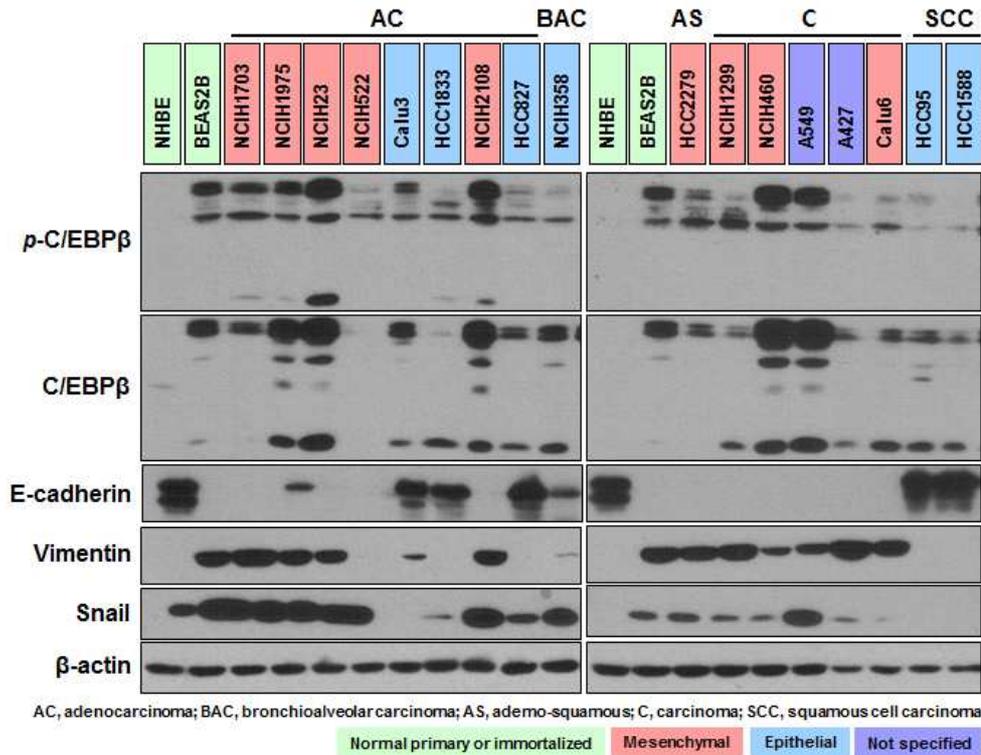


Fig. 2. Expression of C/EBPβ and EMT-associated proteins in various cancer cell lines.

■ 폐암세포주의 세포형태 및 actin organization에 대한 C/EBPbeta의 조절작용 확인.

- C/EBPbeta siRNA를 이용하여 A549 폐암세포주에서 C/EBPbeta를 knockdown 한 후 actin-phalloidin staining을 시행하였음. A549세포에 비해 C/EBPbeta가 저하된 세포에서 상피세포의 특성인 polygonal shape이 더 잘 나타나고, 세포 내 actin stress fiber의 형성이 줄어든 것으로 보이며 세포분열 후 세포 이동이 적어서인지 더 많이 군집되어 있음을 보여 EMT 및 세포이동에 영향이 있음을 시사함 (Fig. 3A,B).

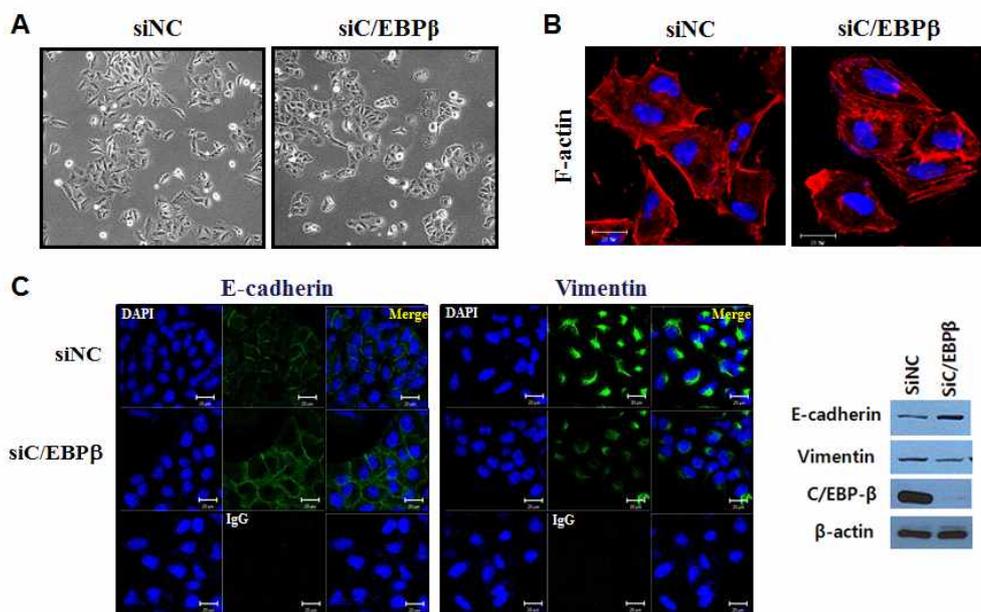


Fig. 3. C/EBPβ regulates cancer cell morphology and EMT markers.

- 암세포에서 C/EBPbeta가 epidermal marker (E-cadherin) 발현을 저해시키고 mesenchymal marker (vimentin) 발현을 증가시켜 EMT marker 변화에 관여함을 관찰 (Fig. 3C).

■ C/EBPbeta의 EMT 조절

- EMT 조절에 관여하는 것으로 알려진 adherens junction marker, transcription factor, 신호전달체계 활성화인자, proteases 등의 C/EBPbeta로 인한 조절 여부 확인.

- A549 세포에 C/EBPbeta를 siRNA를 사용하여 knockdown하고 EMT에 관련된 인자들의 단백질 변화 및 mRNA 변화를 관찰함. Fig. 4에서와 같이 C/EBPbeta에 의해 E-cadherin, Vimentin, ZEB1, EGFR을 단백질 수준에서 SNA1, CLDN-1, TIMP1, TIMP2 등을 mRNA 수준에서 조절함을 보임 (Fig. 4).

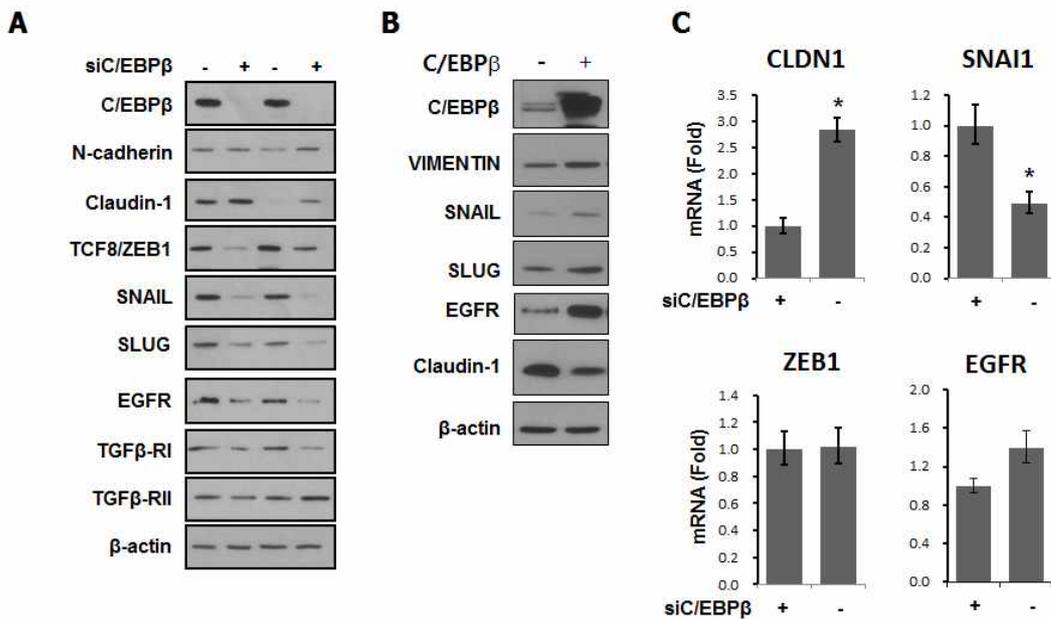


Fig. 4. C/EBPbeta Regulates Expression of EMT-Associated Genes.

■ C/EBPbeta knockdown으로 TGFbeta로 유도되는 EMT 조절

- A549와 NCI-H2279 세포에 C/EBPbeta를 siRNA를 사용하여 knockdown하고 TGFbeta 처리 시 control 세포에서는 EMT가 유도되었으나 siC/EBPbeta 세포는 TGFbeta를 처리하기 전의 형태를 유지하고 있음을 확인하므로써 TGFbeta가 유도하는 EMT에 C/EBPbeta가 중요한 역할을 하고 있음을 시사함 (Fig.5). 이 조건에서 EMT 관련 단백질의 발현 변화를 A549 및 NCC2279세포에서 관찰함 (Fig 5).

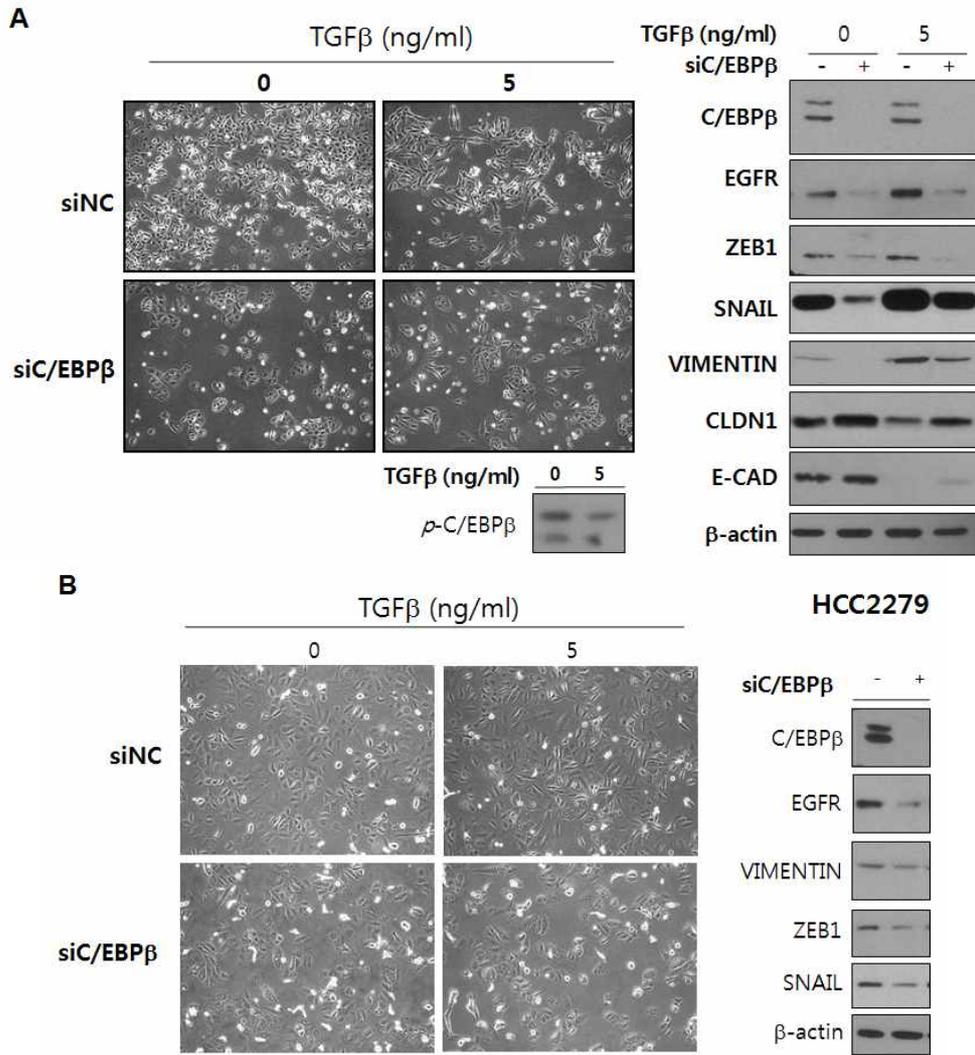


Fig. 5. Requirement of C/EBPbeta in TGFbeta-induced EMT in lung cancer cells

■ C/EBPbeta와 EGFR의 상호조절 및 C/EBPbeta의 EGF 신호전달경로에서의 역할

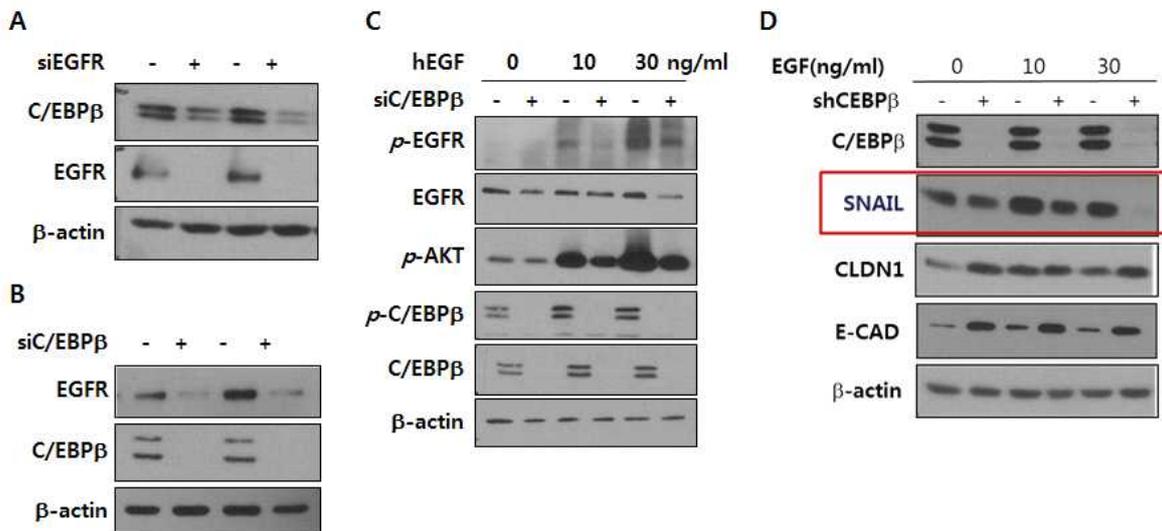
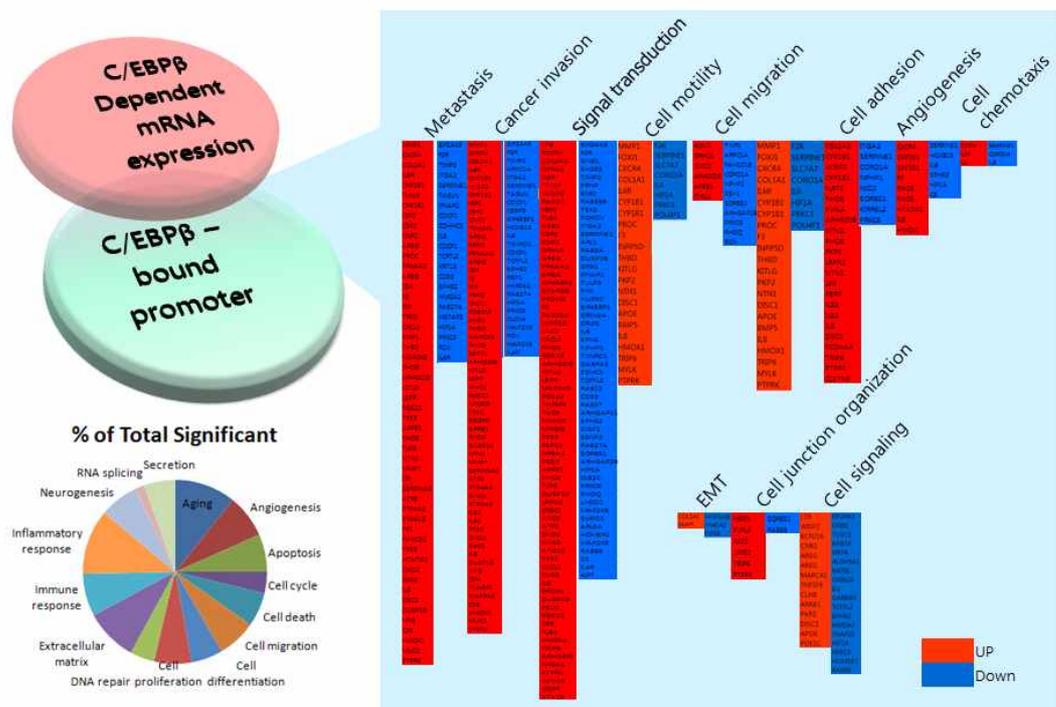


Fig. 6. Reciprocal regulation of C/EBPbeta and EGFR.

- 폐암세포주에 C/EBPbeta 저해 시 EGFR 단백질의 발현이 저해되고, 역으로 EGFR 저해 시 C/EBPbeta의 단백질 발현이 저해됨을 관찰함 (Fig.4A,B). hEGF 처리 시 증가되는 EGFR 및 Akt 인산화가 C/EBPbeta 저해 시 감소되었으며, Snail의 증가 또한 억제되는 것을 관찰하여, C/EBPbeta가 hEGF의 세포 생존 및 EMT 유도에 관여함을 제시함.

■ C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별

- C/EBPbeta는 전사조절인자이므로 기능과 관련하여 하부 유전자의 발현을 조절할 것으로 예상되므로 C/EBPbeta knockdown 세포에서 mRNA 발현이 현저히 저해되어 있고, C/EBPbeta에 의해 전사 조절되는 하부유전자 선별을 위해 ChIP-on-chip (chromatin immunoprecipitation-on-chip) 분석법을 시행하고 EMT, 암세포 침윤 및 전이 관련 유전자를 선별함 (Fig. 7).



Category	Gene name
Cancer invasion	activated ITGA2, IL6, TXNRD1, CDCP1, CLCN4, MAP2K3, RDX repressed IL6R, TM4SF1, AREG, OSGPL5, MARCKS, SEPP1, DUSP10, IL6, TM4SF1, MAP3K8, PTPRK
Metastasis	activated ITGA2, CDCP1, ZDHHC7, IL6, CDCP1, RDX repressed IL6R, AREG, MARCKS, IL6, IL8, PTPRK
Cell migration	activated IL6 repressed IL6R, IL8, PTPRK
Cell growth	activated RYK, CRLF3, C10orf90, IL6 repressed OGFRL
Cell death	activated PHLDA1, IL6, MAX repressed IL6R, IL8, PERP
Cell adhesion	activated ITGA2 repressed FERP, IL8, PTPRK
Actin filament based process	activated RHOQ, RDX repressed
Cell motility	activated IL6 repressed IL6R, IL8
Cell junction organization	activated RAB38 repressed MPP5, PTPRK
Cell aging	activated TP53 repressed
Cell cell signaling	activated IL6, GABRAS, SNAP25, RAB8B repressed AREG, MARCKS
Signal transduction	activated ITGA2, RYK, NUP50, CRLF3, IL6, TXNRD1, GABRAS, IGG30, RHOQ, MAP2K3, RAB8B, C3 repressed IL6R, TLE4, AREG, PRDM1, TLR3, DUSP10, IL6, PRDX4, PTPRK, OGFRL
Angiogenesis	activated IL6, C3 repressed IL6, IL8
Cell chemotaxis	activated IL6 repressed IL6R, IL8
Localization	activated SLC28A1, CP, RYK, NUP50, CP, IL6, GABRAS, SNAP25, CLCN4, RHOQ, RDX, RAB8B, C3 repressed IL6R, OSGPL5, MPP5, MARCKS, TLR3, ARCA12, IL8

Gene Symbol	Gene Name	ChIP	Fuction (GO)
C3	complement component 3	9.76	angiogenesis, localization
DUSP10	dual specificity phosphatase 10	3.87	cancer invasion
IL6	interleukin 6	2.89	cancer invasion, metastasis
ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B)	2.41	cancer invasion, metastasis, cell adhesion
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	5.53	cancer invasion
MAX	MYC associated factor X	2.70	cell death
RDX	radixin	9.39	cancer invasion, metastasis, actin filament based process, localization
RHOQ	ras homolog gene family, member Q	17.24	actin filament based process, localization
TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	17.17	metastasis, localization
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	3.13	cancer invasion, metastasis, cell junction organization, cell migration, cell adhesion, localization, cell motility

Fig. 7. Candidates of transcriptional target genes of C/EBPbeta.

- C/EBPbeta knockdown 세포에서 mRNA 발현이 현저히 저하되어 있고 ChIP-on-chip 결과에서 그 프로모터 부위에 C/EBPbeta가 결합되는 것으로 보여진 유전자에서 ChIP-on-chip에서 2배 이상의 결합을 보이는 프로모터 부위와 TFsearch를 이용하여 C/EBP가 결합할 가능성을 보이는 프로모터 부위 주변에 primer를 제작하여 C/EBPbeta-ChiP assay를 시행한 결과 두 target 유전자 프로모터 부위에서 약 7~10배 정도로 C/EBPbeta 결합이 증가되어 있음을 확인함 (Fig. 8).

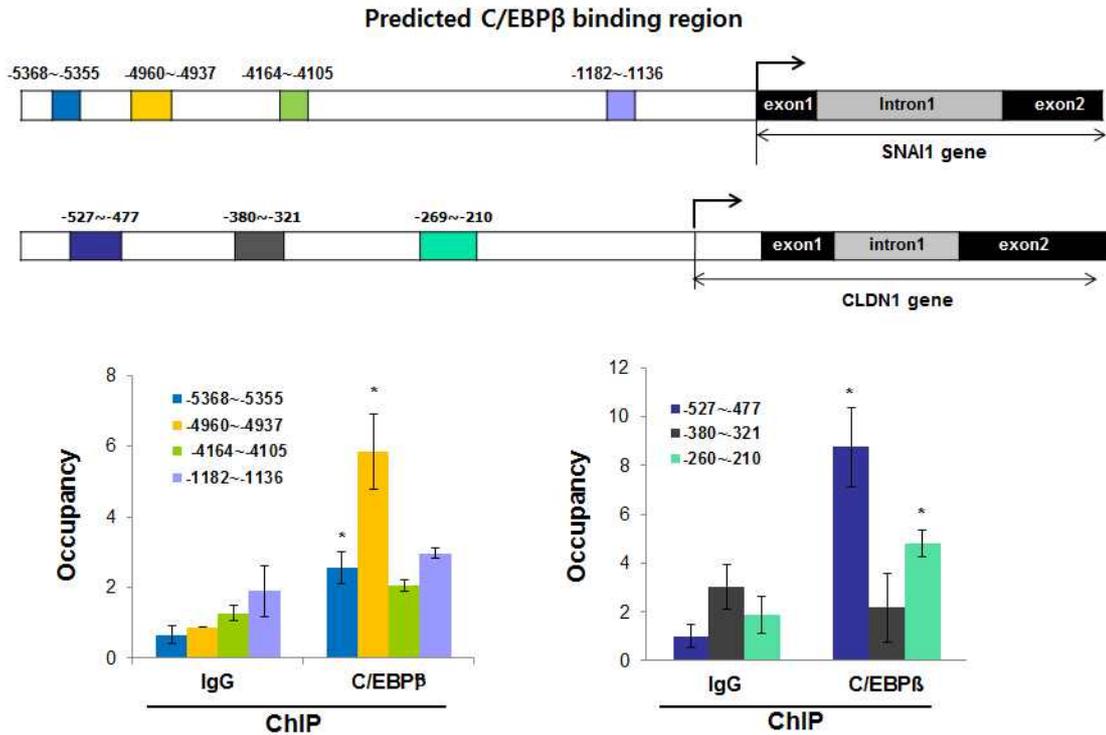


Fig. 8. Direct transcriptional target genes of C/EBPbeta.

- C/EBPbeta가 전사적으로 발현 조절하는 타겟유전자 프로모터에서의 전사조절기전을 탐색하기 위하여 histone modifying enzyme과의 상호작용을 조사해 본 결과, histone acetylase 1 (HDAC1)과의 상호작용은 관찰되지 않았으나, HDAC2와 상호작용이 일어남을 관찰함 (Fig. 9). C/EBPbeta와 결합한 HDAC2가 타겟유전자 (예, CLDN1) 프로모터 부위 히스톤 탈아세틸화를 통한 타겟유전자의 전사를 억제하는지 혹은 C/EBPbeta 단백질의 탈아세틸화를 통한 전사활성을 억제한 결과인지에 관해서는 추가적 검증이 필요함.

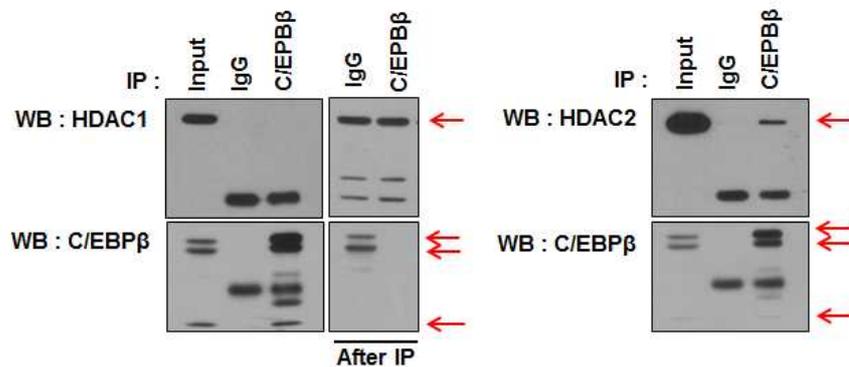


Fig. 9. Interaction of C/EBPbeta and HDAC2 histone deacetylase.

■ 암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration 조절

- 폐암세포주에 C/EBPbeta를 knockdown함으로써 C/EBPbeta가 암세포의 migration 및 invasion을 조절하는지의 여부를 관찰함. C/EBPbeta siRNA를 이용하여 A549에서 C/EBPbeta가 세포의 motility를 조절하여 migration (fig. 10A,B)과 invasion (fig.10C)을 증가시킴을 관찰함.

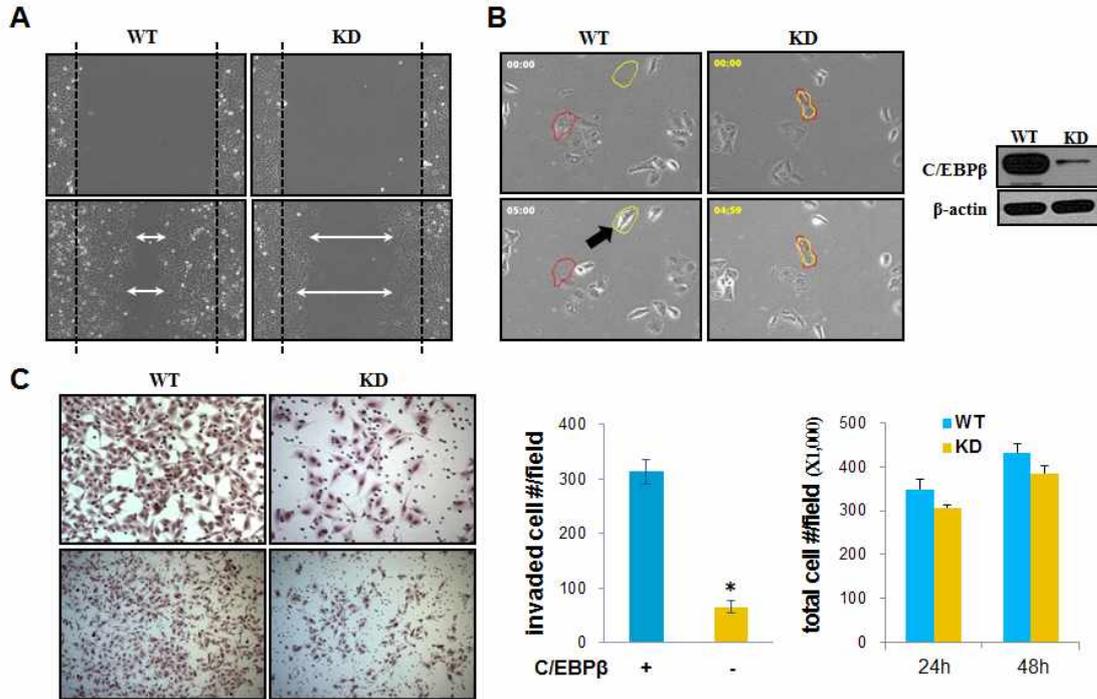


Fig. 10. The motility/migration and invasion of A549 lung carcinoma cells decreased by C/EBPbeta knockdown.

■ C/EBPbeta에 의해 조절되는 EMT 관련 단백질의 암세포 migration 조절

- 실험결과에 따르면 C/EBPbeta에 의해 조절되는 대표적인 EMT 관련 단백질로 Snail, Claudin을 들 수 있음. 따라서, C/EBPbeta 저해 세포주에서 보이는 migration의 감소가 C/EBPbeta 저해로 인한 Snail의 감소 혹은 Claudin의 증가로 인한 기능적 변화인지 확인하기 위해 C/EBPbeta 저해 세포주에 Snail, Claudin을 각각 과발현, knockdown하거나 동시에 Snail 과발현, Claudin을 저해하고, cell migration을 확인함. 그 결과 C/EBPbeta 저해군에 비해서 부분적인 migration의 회복을 보임 (Fig. 11).

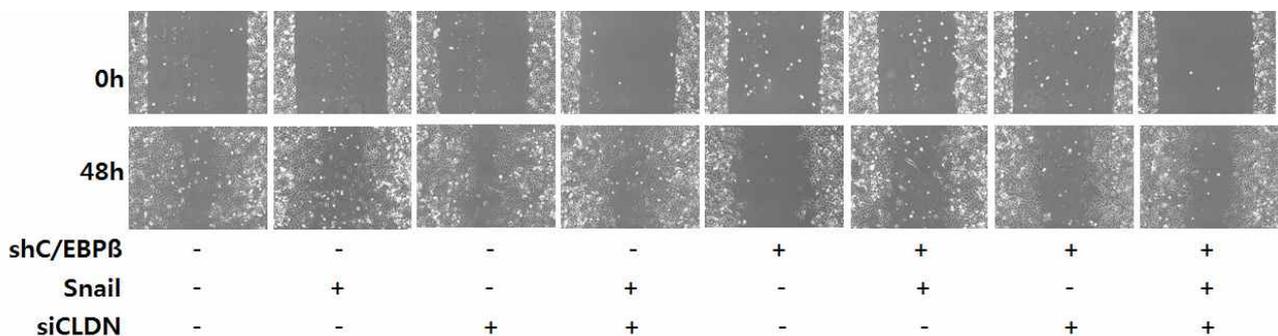


Fig. 11. Migration was partially recovered in C/EBPbeta-depleted A549 cells by overexpression of Snail and/or knockdown of Claudin.

■ in vivo에서 C/EBPbeta의 전이 조절 확인을 위한 세포주 확립 및 동물 실험

- control A549-luc 혹은 stable shC/EBPbeta A549-luc 세포를 200ul PBS에 섞어 꼬리정맥에 주입한 후 일주일 간격으로 luciferin 복강 주입 후 IVIS 영상장비로 마우스의 폐에 종양 생성 여부, 개수 및 크기를 촬영/관찰 및 luciferase activity 측정함 (Fig. 12). 약 7주 후부터 폐부위에 luciferase activity가 대조군에서 C/EBPbeta 발현이 저해된 암세포를 주입한 군보다 현저히 높게 측정되었으며, 이후 약 10주까지 관찰 하였을 때 형성된 종양이 빠르게 자라는 것을 관찰함. 형성이지연되고, 종양크기의 저하를 관찰함. 종합적으로 C/EBPbeta는 폐암세포의 EMT, migration, invasion을 유도하며 결과적으로 폐암세포의 전이 에 있어서 역할을 수행함을 제시함.

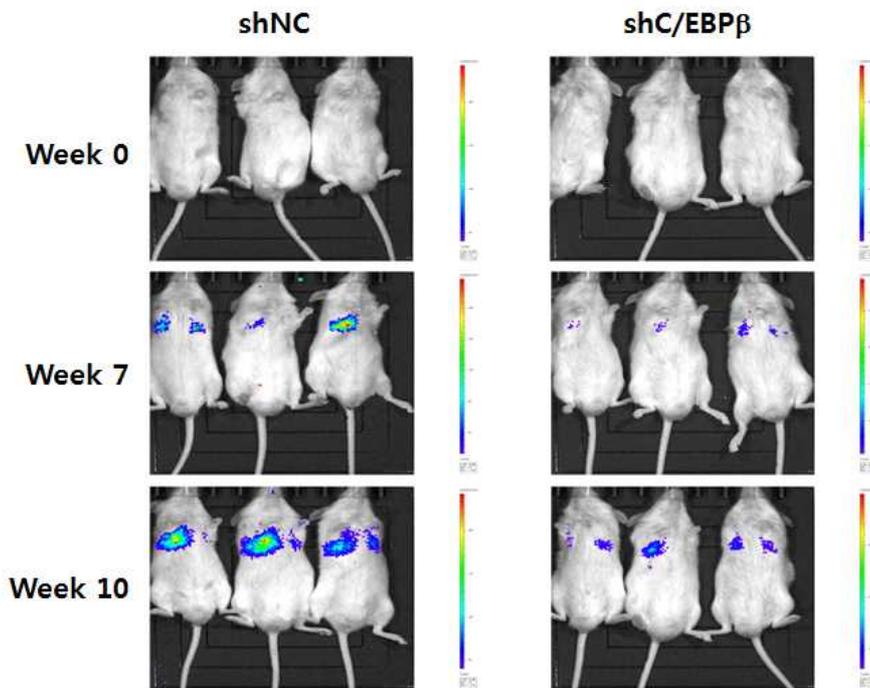


Fig. 12. Mice with C/EBPbeta knockdown A549 cells display decreased lung tumor formation.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

<p>4-1. 목표달성도</p> <p>○ 아래 표 참조</p> <p>4-2. 관련분야 기여도</p> <p>○ 전사조절인자인 C/EBPbeta가 폐암세포주에서 관련 단백질 발현 조절을 통해 EMT, 암세포의 이동/침윤 관여하며, 이 중 EMT 관련 유전자인 SNAI-1, CLDN-1의 전사를 직접적으로 조절하는 것을 밝혀 C/EBPbeta의 암세포에서의 새로운 기능을 증명함.</p> <p>○ 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰하고, TCGA overall survival 분석 시 C/EBPbeta mRNA 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁘게 나타남을 관찰하여 C/EBPbeta가 폐암진행 억제인자로서의 좋은 치료타겟임을 제시</p>

목 표	달성도 (%)	내 용
C/EBPbeta가 과발현 혹은 활성화된 암종 및 암세포주 선별	90	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현이 증가해 있음을 관찰하였고, - C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰하여 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시. - 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함. - 대장암, 폐암, 위암, 유방암, 부인암, 간암 등 여러 종류의 암종 및 정상 조직, 전이 조직 TMA에서 C/EBPbeta의 단백질 발현 차이를 조사하였음.
선별된 암세포주에서 C/EBPbeta의 암세포 이동성/침윤 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 폐암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration/invasion 조절확인
C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별	100	<ul style="list-style-type: none"> - A549 세포에서 C/EBPbeta knockdown시 세포 형태 및 F-actin staining 패턴, EMT관련 단백질 변화 등의 관찰 결과 MET 유사현상이 일어남을 관찰함. - TGFbeta로 EMT 유도 시 C/EBPbeta knockdown 세포에서 EMT가 저해됨을 관찰하므로써 C/EBPbeta가 EMT유도에 중요한 인자임을 밝힘. - 주요 관련 단백질 변화로 E-cadherin, Vimentin, Claudin, Snail, Slung, Zeb1, EGFR 등이 있음. - C/EBPbeta의 전사 타겟 유전자 선별을 위해 EMT 관련 유전자를 mRNA 변화 및 ChIP-on-chip assay를 통해 에서 관찰하고, 그 중 SNAI1, CLDN1 유전자의 프로모터에 C/EBPbeta가 결합함을 보임.
in vivo에서 C/EBPbeta의 EMT 및 침윤 조절 확인을 위한 세포주 확립 및 동물 실험	80	<ul style="list-style-type: none"> - luciferase를 발현하여 영상추적이 가능한 A549 세포에 C/EBPbeta knockdown stable cell line 구축하여 in vivo에서 종양의 성장 및 주변 조직 및 장기로의 침윤 전이에 적합한 동물실험 기반마련 - tail vein injection으로 전이 실험 진행 중이며 현재까지의 결과로 C/EBPbeta의 폐암 형성/전이 역할이 제시됨.

5. 연구결과의 활용계획

- 암치료에 있어 전이와 재발은 치료에 있어 극복해야 할 과제임. 암전이에 대한 EMT의 근본적인 이해가 이루어진다면 EMT를 조절함으로써 전이 및 재발암의 치료하는데 있어 암 치료에 큰 발전을 가져올 것임. 암 치료효과를 증진시킬 수 있는 세포내 조절인자 C/EBPbeta를 발굴하고 기전을 연구함으로써 암 치료의 효율을 증진시킬 수 있는 기반과 분자적 근거 마련할 것이며, 암 치료제 개발을 소재를 함께 제공할 것임.
- EMT를 억제하여 원발성 종양, 재발암, 전이암에 대한 암치료저항성을 극복할 수 있는 방법의 개발 및 그 기전을 규명하여 분자적 암치료 표적 발굴하여 암치료 저항성을 극복할 수 있는 가능성을 제시함.
- 타 암종에서도 항암제 내성기전 억제로 효과적인 암치료법의 개발에 기여할 것으로 기대됨.
- 일차 항암치료 후 재발 및 전이 극복 방법으로 활용 가능함.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- molecular signature로 부터의 reverse engineering과 unbiased 분석은 악성 glioma에서 mesenchymal 유전자의 발현을 활성화시키는 전사 module이 C/EBPbeta와 Stat3임을 제시함. 사람의 뇌암에서 C/EBPbeta와 STAT3의 발현은 mesenchymal 분화와 관련되어 있으며 임상적으로 나쁜 결과를 예측함 (Carro, 2010).
- 식도 편평상피암세포에서 EGF로 인해 C/EBPbeta가 유도되고, 이는 miR-203의 발현을 저하시켜 EMT에 관여함이 보고됨 (Li, 2014).
- 마우스 유방상피세포에서 C/EBPbeta isoform의 발현 비율에 따라 EMT가 조절됨이 제시됨. LAP의 과발현은 epithelial keratin의 발현과 함께 세포증식이 저하되었고, 역으로 LIP의 발현을 유도하면 EMT marker를 발현하고, alveolar-like 형태유지가 되지 않고, adenoma 세포의 형질을 획득하는 것으로 관찰되어, C/EBPbeta isoform의 밸런스가 전이를 조절할 가능성을 제시함 (Miura, 2014).
- 유방암에서 Mir-155는 C/EBPbeta의 발현을 저해시키고, TGF-beta 반응을 세포증식 억제에서 EMT, 침윤 및 전이 증가로 변화시킴이 관찰됨 (Johansson, 2013).
- 종합적으로 C/EBPbeta가 EMT 조절에 관한 보고가 최근 증가되고 있으며, 암종에 따라 EMT를 유도하거나 억제하는 것으로 관찰되어 C/EBPbeta의 EMT에서의 역할 규명에 있어서는 암종 혹은 환경에 따른 기전 확립 및 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각됨. C/EBPbeta는 세포증식 조절 측면에 있어서도 세포의 종류나 관련 신호전달경로에 따라 상이한 결과를 보이는 것이 이미 받아들여지고 있음 (Ramji, 2002).

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	학술 대회 발표	C/EBP β (CCAAT/enhancer binding proteins-beta) regulates EMT and lung cancer cell invasion	국립암센 터	교신	FEBS 2015 Conference s		yyyy.mm.dd		
2	학술 대회 발표	The CCAAT/enhancer-bin ding protein β (C/EBP β) is critical regulator for Wee1 in G2/M cell cycle progression	국립암센 터	교신	FEBS EMBO 2014 Conference s		yyyy.mm.dd		
3							yyyy.mm.dd		
4							yyyy.mm.dd		
5							yyyy.mm.dd		

8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학 기술인등록 번호	성별	취득 년도	학위 (전공)	과제참여 기간
	국립암센터 윤경실					

9. 기타사항

○

10. 참고문헌

1. Armstrong DA, Phelps LN, Vincenti MP. CCAAT enhancer binding protein- β regulates matrix metalloproteinase-1 expression in interleukin- β -stimulated A549 lung carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2009 Sep;7(9):1517-24
2. Balamurugan K, Wang JM, Tsai HH, Sharan S, Anver M, Leighty R, Sterneck E. The tumour suppressor C/EBP δ inhibits FBXW7 expression and promotes mammary tumour metastasis. *EMBO J.* 2010 Dec 15;29(24):4106-17.
3. Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest.* 2007 Jul;132(1):185-92
4. Buck M, Poli V, Hunter T, Chojkier M. C/EBP β phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival. *Mol Cell.* 2001 Oct;8(4):807-16.
5. Ewing SJ, Zhu S, Zhu F, House JS, Smart RC. C/EBP β represses p53 to promote cell survival downstream of DNA damage independent of oncogenic Ras and p19(Arf). *Cell Death Differ.* 2008 Nov;15(11):1734-44.
6. Feld R, Sridhar SS, Shepherd FA, Mackay JA, Evans WK; Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Use of the epidermal growth factor receptor inhibitors gefitinib and erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol.* 2006 May;1(4):367-76. Review.
7. Glasser, S. R., Mulholland, J. and Mani, S. K. (1991) *Trophoblast Res.* 5, 229-280
8. Irwin, J. C. and Giudice, L. C. (1999) Decidua. In *Encyclopedia of Reproduction* (ed. E. Knobil and J.
9. Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, Yeap BY, Jänne PA, Riely GJ, Ruiz MG, Giaccone G, Sequist LV, Johnson BE (August 2009). "Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials". *Clin. Cancer Res.* 15 (16): 5267-73.
10. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67. Review.
11. Langenskiöld, M., Holmdahl, L., Falk, P., and Ivarsson, M.L. (2005). Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 20, 245-252.
12. Lionel Larue1 and Alfonso Bellacosa2 Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways *Oncogene* (2005) 24, 7443-7454.
13. Liu, H., Zhang, T., Li, X., Huang, J., Wu, B., Huang, X., Zhou, Y., Zhu, J., and Hou, J. (2008a). Predictive value of MMP-7 expression for response to chemotherapy and survival in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 99, 2185-2192.
14. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (May 2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib". *N. Engl. J. Med.* 350 (21): 2129-39.
15. Mahmut Yilmaz & Gerhard Christofori. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* (2009) 28:15--33
16. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294-309. Review.
17. Niklinski J, Furman M.. Clinical tumour markers in lung cancer. *Eur J Cancer Prev.* 1995 Apr;4(2):129-38. Review.
18. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N,

- Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M' (June 2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy". *Science (journal)* 304 (5676): 1497-500.
19. Pal R, Janz M, Galson DL, Gries M, Li S, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Dörken B, Mapara MY, Borghesi L, Kardava L, Roodman GD, Milcarek C, Lentzsch S. C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3890-8.
 20. Ramji DP, Foka P.. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*. 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75. Review
 21. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al.(2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684
 22. Sakamoto T, Weng JS, Hara T, Yoshino S, Kozuka-Hata H, Oyama M, Seiki M. Hypoxia-inducible factor 1 regulation through cross talk between mTOR and MT1-MMP. *Mol Cell Biol*. 2014 Jan;34(1):30-42.
 23. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al.(2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792
 24. Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, Lam WK, Chiu SW, Girard L, Minna JD, Gazdar AF, Wong MP. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1647-53.
 25. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al.(2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:719-726.
 26. Vogel CL, Tripathy D, et al.(1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-2648.
 27. Walker, F.; Abramowitz, L.; Benabderrahmane, D.; Duval, X.; Descatoire, V (2009). "Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus☆". *Human Pathology* 40 (11): 1517-1527.
 28. Yoon K, Zhu S, Ewing SJ and Smart RC. Decreased survival of C/EBP-deficient keratinocytes is due to aberrant regulation of p53 levels and function *Oncogene* (2007) 26, 360-367.

<별첨작성 양식>

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		1310200	
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	T-2			과제구분	단위
사업명	기관고유연구사업				주관
총괄과제				총괄책임자	
과제명	암세포 침윤 관련 EMT 조절인자로서의 C/EBPbeta 역할			과제유형	(기초, 응용, 개발)
연구기관	국립암센터			연구책임자	윤경실
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2013.1.1~2013.1.2.30	80,000		
	2차년도	2014.1.1~2014.1.2.30	80,000		
	3차년도	2015.1.1~2015.1.2.30	48,000		
	계		208,000		
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016.3.10

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
폐암연구과	선임연구원	윤경실

4. 평가자(과제책임자) 확인 : 윤경실

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- C/EBPbeta 단백질은 정상세포보다 일차암, 전이암 순으로 발현이 증가되는 것을 폐암에서 관찰함. 이는 세포의 항상성 유지에는 상대적으로 영향을 덜 미치나, 종양형성 및 진행 시 활성화되는 인자로 생각되므로 암치료에 활용 시 부작용이 적고 효과적인 치료 표적이 될 것임. 본 과제는 C/EBPbeta가 EMT를 조절하여 암세포의 이동성 및 침윤에 대한 역할을 밝힘으로써 암치료 분자 타겟으로의 가능성을 제시하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- C/EBPbeta의 EMT에서의 분자적 수준에서의 기전은 아직 보고된 바가 적고, EMT는 암진행 및 치료저항성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 과제는 C/EBPbeta가 폐암세포에서 mesenchymal phenotype을 갖는데 중요한 역할을 할 뿐 아니라, TGFbeta 혹은 hEGF로 인한 EMT 유도에도 관여함을 증명함으로써 암에서 중요한 신호전달경로와의 연관성 또한 제시함. C/EBPbeta는 EMT marker인 E-cadherin, Vimentin, adherin junction 단백질인 Claudin, EMT 관련 전사조절인자인 Snail, Slug, ZEB의 발현을 조절하며, 그 중 Snail과 Claudin의 경우 프로모터 부위에 직접적으로 결합하여 전사조절함을 밝힘으로써 EMT 유도 및 침윤에 있어 분자적 수준의 이해를 더함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 암 치료효과를 증진시킬 수 있는 세포내 조절인자 C/EBPbeta를 발굴하고 기전을 밝힘으로써 암 치료의 효율을 증진시킬 수 있는 분자적 근거 및 암 치료제 개발의 소재를 제공함.
- EMT는 암화과정을 진행, 암세포의 이동, 침윤 및 전이 뿐 아니라 암치료저항성을 유발하는 과정에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있음. 본 연구를 통해 C/EBPbeta가 암세포에서 EMT 및 침윤을 조절하는 하는 것이 밝혀졌으므로, 기존의 방사선 혹은 화학요법과 더불어 C/EBPbeta를 억제하는 병용요법을 이용하여 원발성 종양, 재발암, 전이암의 치료 및 치료저항성 극복에 활용할 수 있을 것으로 예상됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함.
2. TCGA overall survival 분석 시 C/EBPbeta mRNA 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁘게 나타남.
3. 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현이 증가해 있음을 관찰함.
4. C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰하여 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시.
5. C/EBPbeta의 세포형태 및 actin organization에 대한 영향을 확인
6. 암세포에서 C/EBPbeta가 epidermal marker (E-cadherin)와 mesenchymal marker (vimentin) 발현 변화에 관여함을 관찰.
7. C/EBPbeta knockdown으로 TGFbeta로 유도되는 EMT 및 hEGF로 유도되는 Snail-1 발현 억제 확인
8. C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별
9. 폐암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration/invasion 조절을 확인하였음.
10. in vivo에서 C/EBPbeta의 기능 검증
 - 3년차에 연구비의 극심한 삭감 (3년차 연구비, 48,000천원)으로 인해 3년간 208,000의 예산으로 숙련된 인력과 재료가 부족한 상황에서 최대한 성실히 수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding proteins-beta) regulates EMT and lung cancer cell invasion.
 C/EBPβ is a critical regulator of Wee1 at the G2/M cell cycle progression.
 와 관련하여 연 1회 국제 및 국내 학회에 발표하였으며 현재 2편의 논문 투고를 준비하고 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
C/EBPbeta가 과발현 혹은 활성화된 암종 및 암 세포주 선별	20	90	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현이 증가해 있음을 관찰하였고, - C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰하여 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시. - 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함. - C/EBPbeta mRNA 발현이 높은 폐암환자군의 예후가 좋지 않음을 관찰.
C/EBPbeta의 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별	40	90	<ul style="list-style-type: none"> - A549 세포에서 C/EBPbeta knockdown시 세포 형태 및 F-actin staining 패턴, EMT관련 단백질 변화 등의 관찰 결과 epithelial phenotype 쪽으로 변화됨을 관찰함. - C/EBPbeta knockdown 세포에서 TGFbeta로 EMT 유도 시 EMT가 저해되고, hEGF로 인한 Snail의 발현이 저해됨을 관찰하므로써 C/EBPbeta가 EMT유도에 중요한 인자임을 밝힘. - 주요 EMT 관련 단백질 변화로 E-cadherin, Vimentin, Claudin, Snail, Slung, Zeb1, EGFR 등이 관찰됨. - C/EBPbeta의 전사 타겟 유전자 선별을 위해 EMT 관련 유전자를 mRNA 변화 및 ChIP-on-chip assay를 통해 하부유전자를 선별하고, 그 중 SNAI1, CLDN1 유전자의 프로모터에 C/EBPbeta가 결합하여 직접적 전사조절 타겟임을 밝힘.
암세포주에서 C/EBPbeta의 암세포 이동성/침윤에서의 기능 검증	20	100	<ul style="list-style-type: none"> - 폐암세포에서 C/EBPbeta knockdown 시 세포의 motility, migration, 침윤이 감소함을 관찰함.
in vivo에서 C/EBPbeta의 EMT 및 침윤 조절 확인을 위한 세포주 확립 및 동물 실험	20	80	<ul style="list-style-type: none"> - luciferase를 발현하여 영상추적이 가능한 A549 세포에 C/EBPbeta knockdown stable cell line 구축하여 in vivo에서 종양의 성장 및 주변 조직 및 장기로의 침윤 전이에 적합한 동물실험 기반 마련 - tail vein injection을 이용한 in vivo 전이 실험 결과 C/EBPbeta 저해군에서 폐종양의 형성이 지연되고, 종양크기의 저하를 관찰함.
합계	100점	90	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 종양 부위의 저산소증은 다양한 대사과정의 변화 및 혈관 형성을 유도시키는 등으로 암화과정을 진행시키는 것으로 알려져 있으며, 암세포의 이동, 침윤 및 전이를 유발시키는데, 이러한 저산소증으로 기인한 반응에 HIF-1 α 의 중요성이 알려져 있음.
- 본 과제에서는 1) 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함. 2) TCGA overall survival 분석 시 C/EBPbeta 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁜 것을 관찰함. 3) 다양한 histology subtype의 폐암세포에서 C/EBPbeta 발현이 증가해 있음을 관찰함으로써 **C/EBPbeta가 폐암진행 억제인자로서의 좋은 치료 타겟임을 제시함.** 4) C/EBPbeta 발현이 높은 폐암세포주에서 Vimentin, Snail이 증가, E-cadherin이 감소해 있음을 관찰하여 C/EBPbeta가 EMT 유도에 관여함을 제시. 5) C/EBPbeta의 세포형태 및 actin organization에 대한 영향을 확인 6) 암세포에서 C/EBPbeta가 epidermal marker (E-cadherin)와 mesenchymal marker (vimentin) 발현 변화에 관여함을 관찰. 7) C/EBPbeta knockdown으로 TGFbeta로 유도되는 EMT 및 hEGF로 인한 Snail 발현을 억제함을 발견함. 8) C/EBPbeta의 Claudin, Snail, Slung, Zeb1, EGFR 발현 조절로 인한 EMT 조절 여부 확인 및 관련 C/EBPbeta의 전사적 타겟 유전자 선별함. 9) 폐암세포에서 C/EBPbeta의 motility/migration/invasion 조절을 확인함으로써 **전사조절인자인 C/EBPbeta가 폐암세포주에서 EMT, 암세포의 이동/침윤 관여하며, 그에 관여하는 하부 전사타겟 유전자를 밝혀 C/EBPbeta의 새로운 기능을 증명함.**
- 따라서 C/EBPbeta의 발현 및 활성 억제를 통한 종양 진행 억제의 가능성을 제시하였으며. 이를 토대로 항암 관련 신약 타겟 발굴의 분자적 기초 및 실용화 가능성을 제공함으로써 보다 효과적인 암 치료법의 개발에 기여할 것으로 기대함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 본 과제는 C/EBPbeta가 폐암세포주에서 EMT, 암세포의 이동/침윤 관여함을 분자 수준에서 증명하였음. 또한 정상폐조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰하였고, overall survival 분석 시 C/EBPbeta 발현이 높은 환자의 예후가 유의하게 나쁜 것을 발견하였음.
- C/EBPbeta knockout 마우스는 폐의 표현형이 차이가 없어 C/EBPbeta는 세포의 항상성에는 상대적으로 영향을 덜 미치나, 종양형성 및 진행 시 활성화되는 인자로 생각됨.
- 따라서, 본 과제 수행의 결과로 폐암 진행 억제 혹은 치료저항성 극복에 좋은 치료 표적 도출의 근거가 마련됨. 즉, 암 치료효과를 증진시킬 수 있는 조절인자로서의 C/EBPbeta를 평가하여 분자적 근거 마련하고 암 치료제 개발의 소재를 제공하고자 한 당초의 목표에 부합한 것으로 사료됨.
- 본 과제는 3년 간 208,000천원의 연구비로 진행되었으며, 과제를 마무리할 3차년도에 많은 삭감으로 숙련된 인력의 퇴사 및 재료비 부족에 따른 성과 창출이 늦어짐을 고려해 주시기 바람.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 정상조직, 원발성 폐암조직, 전이성 폐암조직 순으로 C/EBPbeta 단백질 발현이 증가됨을 관찰함으로써 관찰함으로써 C/EBPbeta가 폐암 진행 억제에 대한 좋은 치료타겟임을 제시하였음. 또한 전사조절 인자인 C/EBPbeta가 폐암세포주에서 EMT, 암세포의 이동/침윤 관여하며, 그에 관여하는 하부 전사타겟 유전자를 밝혀 C/EBPbeta의 새로운 기능을 증명함. EMT는 방사선요법 혹은 화학요법의 저항성과 밀접한 관련이 있고 암치료 예후에 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로, 기존의 방사선 혹은 화학요법과 더불어 C/EBPbeta를 억제하는 병용요법을 이용한 원발성 종양, 재발암, 전이암에 대한 치료 저항성 극복에 관한 후속연구를 수행하고자 함.
- C/EBP β (CCAAT/enhancer binding proteins-beta) regulates EMT and lung cancer cell invasion. C/EBP β is a critical regulator of Wee1 at the G2/M cell cycle progression.
와 관련하여 논문 투고 준비 중에 있음.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과