

최종보고서

[기관고유연구사업]

과제고유번호	1310660	연구분야(코드)	B-1	지원 프로그램	목적과제 도약연구	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	b2-spectrin의 결실에 의한 암발생 기전에 관한 연구						
과제책임자	성명	김상수	소속	방사선의학연구과		직위	책임연구원
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
	(1세부)				성명	소속(직위)	전공
	(2세부)						
	(3세부)						
총연구기간	2013년 3월 ~ 2015년 12월 (총 2년 10개월)		해당단계 참여 연구원 수	총: 8 명 내부: 8 명 외부: 명	해당단계 연구개발 비	연구비: 725,000 천원 민간: 천원 계: 725,000 천원	
			총 연구기간 참여 연구원 수	총: 8 명 내부: 8 명 외부: 명	총 연구 개발비	연구비: 725,000천원 민간: 천원 계: 725,000천원	
연구기간 및 연구 구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센터	기업부담금		
	계	2013년3월-2015년12월	725,000	725,000	소계	현금	현물
	제1차	2013년3월-2013년12월	250,000	250,000			
	제2차	2014년1월-2014년12월	250,000	250,000			
	제3차	2015년1월-2015년12월	225,000	225,000			
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		

요약: b2-spectrin의 결손은 배아상태에서 심장근의 발달의 저해를 보이며 이는 세포의 성장과 분화, 골격단백질의 발현과 분포에 영향을 주어 과다한 세포사를 일으키기 때문임. b2-spectrin의 발현억제는 간에서 통계적으로 유의한 bile duct세포의 성장을 촉진. 이의 원인을 규명하기 위해 간 손상을 준 경우에서 APAP에 의한 간손상은 b2-spectrin의 절단을 유도하고 이를 통해 TGF-b-의존적인 세포사와 전사조절에 영향을 줌. 또한 APAP에 의한 간손상에서 b2-spectrin의 결실은 간손상을 억제하며 이의 절단을 억제하는 caspase-억제제는 급성간손상에 의한 혈액지표와 치사를 효과적으로 억제하여 가능한 치료제로서의 가능성을 제시

2015년 11월 01일

과제책임자 : 김 상 수 (인)

국립암센터원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>◆ 연구목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - b2SP 단백질의 돌연변이로 유발된 간암의 발생기전에서 b2SP의 역할과 b2SP의 결실을 통해 암이 형성되는 과정을 분석하여 이에 의한 암의 발생기전을 동물모델을 이용하여 세포수준과 더불어 조직과 개체수준에서 알아보고자 함. - 암 억제 유전자인 b2SP의 돌연변이 혹은 발현저하에 의해 생성되는 암의 발생기전을 분석하여 이를 통해 얻어진 연구 성과로 항암치료에서 지표로 사용하여 치료효율을 높임으로써 암억제유전자의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 저해제의 개발에 기여하고자 하는 것. - 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿을만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능. <p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>(1) b2SP의 돌연변이 마우스모델의 유지, 자료 축적 과 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 현재 보유하고 있는 b2SP 돌연변이 마우스의 유전형과 운용은 <ul style="list-style-type: none"> a) b2SP knockout 마우스: heterozygote 돌연변이 형태로 유지하며 whole body에 돌연변이가 분포하여 전체조직내의 이상을 동정하는데 사용되며 b2SP의 발현을 측정할 수 있는 X-gal assay를 통해 특정한 발현의 조사에 이용. b) b2SP conditional knockout 마우스: 조직특이적인 결실을 유도하는데 사용되며 현재 간 특이적인 결실을 유도할 수 있는 albumin-cre transgenic mice와의 교배를 통해 간 특이적인 이상의 관찰에 주로 사용. 추후 neuron, intestine, pancreas 에 특이적인 결실의 유도를 준비중에 있음. - 각 돌연변이 마우스는 최소 20마리이상의 수컷을 동수의 대조군과 같이 group하여 최소 주 1회이상의 관찰을 통해 이상을 관찰하고 이에 이상이 관찰될 시에는 해부를 통해 표적장기를 적출하여 장기를 생화학, 분자생물학적 분석과 조직학적 분석을 통해 이상을 동정함. - 각 이상을 촉진시키기 위해 정상사육 이외에 고지방식을 이용한 사육이 진행되고 있으며 이 외에 줄기세포의 성장촉진을 유도하는 DDC가 포함된 사료를 이용한 사육이 연내에 시작될 예정임. <p>(2) b2SP의 결실을 이용한 간 특이적 마우스모델의 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - b2SP의 결실이 간 손상의 유도를 통한 간암의 발생에 영향을 주는지 알아보기 위해 위의 마우스모델을 사용하여 간 손상을 유도하는 acetaminophen (APAP)을 주사하여 간 손상을 유도. 4-8주령의 wild type과 heterozygote 돌연변이 쥐에 200 mg/kg의 APAP를 주사하고 3일과 7일 후 간 조직을 적출하여 간의 손상과 회복정도를 H&E staining과 기타 항체염색을 통해 시행하고 이와 더불어 세포수준에서도 HepG2 간세포주를 사용하여 b2SP를 shRNA를 사용하여 발현억제 한 후 APAP에 대한 민감도와 성장도를 측정하여 간 손상에서 b2SP의 역할을 분석.
------------------------	--

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>(3) b2SP의 결실에 의한 embryonic lethality에서의 이상 분석 (II)</p> <ul style="list-style-type: none"> - b2SP가 완전 결실된 homozygote 돌연변이 마우스의 경우 배아의 발달 중에 다양한 이상 현상을 보이며 이 중 neural tube disclosure defect와 같은 신경계 발달의 이상과 심혈관 계통의 이상이 관찰되고 배아발생단계에서 b2SP의 발현이 심장과 spinal cord에서 높게 나타남. - 적절한 발달시기의 배아를 얻기 위해 b2SP^{+/-} 간의 교배를 통해 배아를 얻어내고 이를 genotype을 통해 유전형질을 동정하고 이의 형태적인 특징과 더불어 조직학적인 분석을 수행. 또한 각 조직은 항체를 이용한 면역염색을 통해 발달과정에 관여하는 성장요인과 신호전달 물질을 분석. 																
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="411 674 1347 815"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>1/2</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>5.94/12</td> <td>49.5</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"> - b2SP의 돌연변이에 의한 암의 발생과정에서 다른 조절단백질과의 상호작용을 분석 - b2SP를 항암치료에서 지표로 사용하여 치료효율을 높이며 이를 통해 각각의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 억제제의 개발에 기여 - b2SP 마우스 모델은 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능. 					구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	1/2	50	IF 합	5.94/12	49.5	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)															
SCI 논문 편수	1/2	50															
IF 합	5.94/12	49.5															
기타 성과																	
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>(1) 진료적인 측면: 암의 발생과정에서 발생한 genetic determination은 항암치료효과에 영향이 있음. 특히 b2SP와 같이 세포생장과 더불어 암전이를 조절하는 단백질은 이에 더욱 밀접하게 연관되어 있음. 본 연구를 통해 얻어진 연구결과는 항암제 개발에 있어 근간이 되는 훌륭한 분자표적을 개발하는 데 기여할 것으로 기대되며 이를 통해 암환자의 예후 예측과 적절한 치료법 고안에 기여할 것으로 기대하며 항암치료의 효과가 극대화되기 위해서는 항암제에 대한 종양의 반응 예측인자에 대한 조직적이고 체계적인 생물학적 연구가 절실하므로 본 연구를 통해 얻어진 연구 성과는 이의 지표로 사용하여 치료효율을 높이는데 기여하고자 함.</p> <p>(2) 지식 및 기술적 측면: b2SP를 포함한 TGF-β의 신호조절 기전은 아직도 기초연구가 필요한 분야로 이 연구를 mice와 human에 대해 <i>in vitro</i>와 <i>in vivo</i>수준에서 동시에 접근하는 것은 현재 매우 발달된 연구접근법임. 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿을만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 모델은 유전자 특이적 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.</p>																
<p style="text-align: center;">중심어</p>	b2-spectrin	암	TGF- β	동물모델													

< 영문 요약문 >

<SUMMARY>

<p>Purpose& Contents</p>	<p>◆ Research Goals</p> <ul style="list-style-type: none"> - In liver cancer from b2SP alteration, we will investigate the role of b2SP, and the cellular events caused of loss of b2SP by this animal model. - By analysis of liver cancer from the loss or downregulation of b2SP, alteration of b2SP will be applied for the indicator of cancer prognosis which will improve the treatment efficiency. - The mouse model will be available to development of therapeutic agents for cancer, for each of the genetic alteration to the target. <p>◆ Research Methods</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Maintenance, data collection and analysis of b2SP mutant mouse model (2) Investigation of conditional knockout mouse with liver-specific loss of b2SP (3) Analysis of embryonic lethality due to loss of b2SP 				
<p>Results</p>	<p>◆ Qualitative Performance</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analyze the interactions of other regulatory proteins in the pathogenesis of cancer by alteration of b2SP - Using as an index in the chemotherapy b2SP increase the treatment efficiency contribute to the development of new therapeutic agents and inhibitors of cancer through which each of the mutant - B2SP mouse models are used as the best model for the development of therapeutic agents for cancer, genetic alteration in target. 				
<p>Expected Contribution</p>	<p>(1) Therapeutic view: cancer occurred in genetic alteration which may be affects the prognosis of the anti-cancer treatment. In particular, b2SP protein which regulates the cell growth and cancer metastasis may be more closely related to this. In order to contributing the cancer drug development, this study are expected to investigation of good molecular targets. Thus, this research is intended to contribute to enhance the therapeutic efficiency in using the obtained results.</p> <p>(2) knowledge and technical aspects: the signal modulation of TGF-b, including regulation of b2SP is still need to be investigated. Especially, this study is focused on the in vivo level, which is highly developed research in current trend and be able to draw reliable conclusions by using several models including cell, tissue, and animal. And, animal model created this study will be available in the best model of drug development for a specific cancer casued from the alteration of b2SP.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>b2-spectrin</p>	<p>cancer</p>	<p>TGF-b</p>	<p>Mouse Model</p>	

< 목 차 >

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

<별첨> 자체평가의견서

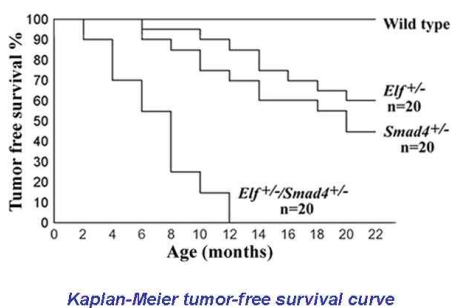
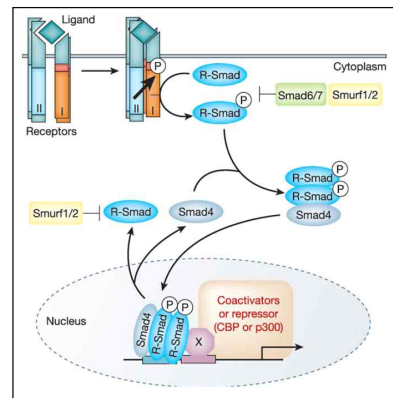
1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- b2SP 단백질의 돌연변이로 유발된 간암의 발생기전에서 b2SP의 역할과 b2SP의 결실을 통해 암이 형성되는 과정을 분석하여 이에 의한 암의 발생기전을 동물모델을 이용하여 세포수준과 더불어 조직과 개체수준에서 알아보고자 함.
- 암 억제 유전자인 b2SP의 돌연변이 혹은 발현저하에 의해 생성되는 암의 발생기전을 분석하여 이를 통해 얻어진 연구 성과로 항암치료에서 지표로 사용하여 치료효율을 높임으로써 암억제유전자의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 저해제의 개발에 기여하고자 하는 것.
- 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿을만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.

1-2. 연구개발의 필요성

- 간암은 세계적으로 매우 높은 빈도를 보이는 암으로 세계적으로는 세 번째, 국내에서는 두 번째로 높은 사망률을 보이는 암임 (WHO report 2006, 암통계 2006). 간암은 상대적으로 매우 예후가 좋지 않은 암으로 외과적 처치가 가장 널리 사용됨. 간암의 중요한 원인은 간염바이러스에 감염되는 경우이며 그 외에 발암물질에 의하거나 알코올성 간염과 모든 원인의 간경변증 (간경화증) 이 간암 발생을 일으킬 수 있음.
- TGF-b는 세포내에서 세포의 성장, 분화, 이동, 및 세포사의 조절에 관여하는 인자로 암의 발생에서 암의 생성촉진과 암의 생성억제에 모두 관여한다고 알려져 있음. 따라서 세포에서의 TGF-b에 대한 반응성 상실은 암의 특징으로 알려져 있음. TGF-b는 이의 수용체인 TGF-b receptor I 과 receptor II를 활성화 시켜 전달자인 Smad들을 인산화 시키며 이들을 세포내에서 핵으로 이동을 시켜 TGF-b의 target gene들을 활성화시킴.
- b-Spectrin (b2SP, ELF)는 Spectrin의 한 종류로서 대부분의 세포에 존재하는 것으로 알려져 왔으며 최근에 TGF신호 전달과정에서 TGF-b 신호의 전달자인 Smad3/Smad4와의 생화학적 결합으로 이들과 같이 세포내에서 이동이 알려짐.
- 또한 b2SP의 유전자를 제거한 마우스의 발현 형질이 Smad의 돌연변이 마우스와 유사하게 발생과정에 여러 가지 공통적인 이상을 보임. *b2sp*의 발현이 억제된 heterozygote인 경우 간경변과 더불어 40-70%의 빈도로 간암을 자연적으로 발생함. 반면 b2SP의 돌연변이 쥐를 Smad4의 돌연변이 쥐와 교잡을 시킨 경우 그의 암 발생이 기하급수적으로 증가하며 동시의 암의 발생부위에서 위암의 비중이 높아짐.

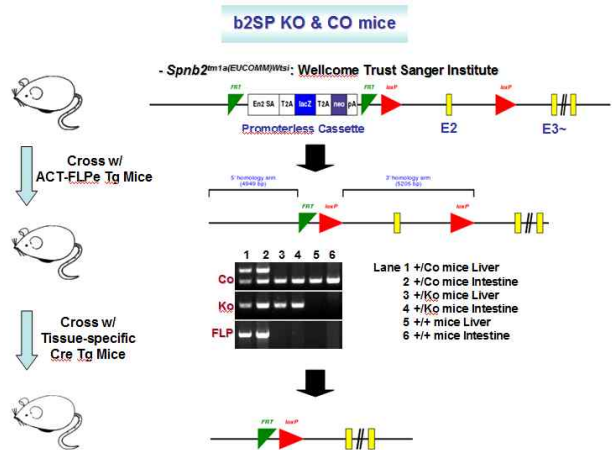


- 사람의 암조직을 b2SP에 대한 특이적인 항체로 분석해본 결과 통계적으로 유의하게 b2SP의 발현이 억제되는 것으로 나타났으며 이는 암의 발생에서 b2SP의 결실이 촉진되는 것을 시사함.

1-3. 연구개발 범위

(1) b2SP 돌연변이 마우스의 운용과 개발

- 기존의 b2SP와 별개의 돌연변이 마우스가 영국의 Wellcome Trust Institute에서 도입되어 사육중임. 이 돌연변이 쥐는 기존의 개별로 제조되는 targeting방식의 장점을 채용한 promoterless cassette를 가지고 b2SP 유전자의 발현을 splicing accept를 이용하여 전사수준에서 termination 시켜 b2SP의 유전자를 결실시킴. b2SP의 promoterless cassette를 사용한 knockout mouse의 경우 기존의 knockout mouse와 같이 homozygous mutant인 경우 embryonic lethality를 보이는 것으로 보아 유사한 결실 효과를 보이는 것으로 추정.
- 이렇게 도입된 마우스는 homozygous mutation을 조직특이적으로 도입하기 위해 1차로 FLP-recombinase를 도입하기 위해 actin promoter의 영향을 받는 FLP-recombinase의 transgene을 포함하는 마우스와 교배를 통해 promoterless cassette의 결실을 유도하여 conditional knockout 마우스를 만든 후 tissue-specific cre를 가진 transgenic마우스와 교배를 통해 조직특이적인 conditional knockout 마우스를 확립할 수 있음. 현재 b2SP마우스인 경우 conditional knockout 마우스의 확립이 완료되었고 간 특이적인 b2SP의 결실을 유도하기 위해 albumin유전자의 promoter를 가진 cre마우스와의 교배를 통해 founder 마우스의 간암모델의 확립이 완료되어 이의 추가 교배를 통해 관찰군을 만들고 있는 중임.



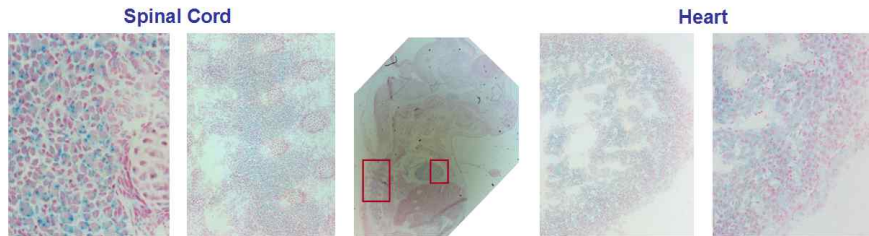
(2) b2SP 돌연변이 마우스의 표현형 분석

- 현재 보유하고 있는 b2SP-knockout 마우스의 발현형은 기존에 쓰인 KO 마우스와 동일하게 배아 발달 중에 치사를 보이며, wild type과 heterozygote 돌연변이 마우스를 각 20 마리이상씩 grouping하여 이상의 발생을 관찰하며 암의 발생빈도와 성장곡선을 조사하고 있음.
- 이 외에 b2SP가 완전 결실된 homozygote 돌연변이 마우스의 경우 배아의 발달 중에 다양한 이상 현상을 보이며 이 중 neural tube disclosure defect와 같은 신경계 발달의 이상과 심혈관 계통의 이상이 관찰 되어 이에 대한 연구를 진행 중임.



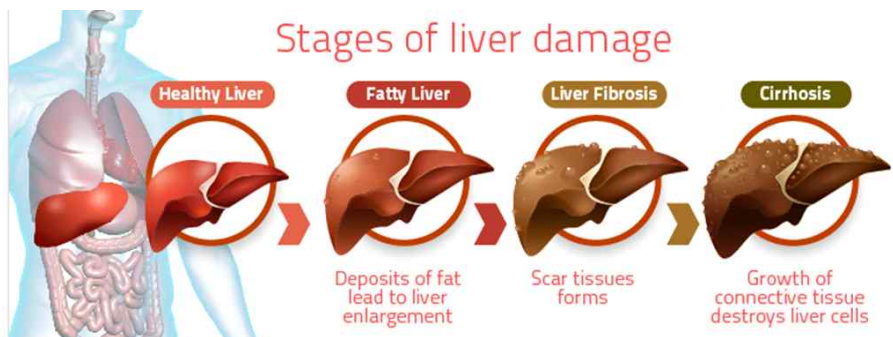
- b2SP의 결실에 의한 신경계의 이상은 배아의 발달과정에서 다양한 형태의 neural tube disclosure defect를 보임. 13.5 dpc의 배아에서 돌연변이 배아는 exencephaly와 caudal defect를 보이나 (위 좌측 그림) 16.5 dpc의 배아에서 caudal defect만이 관찰되었음. 이 표본을 조직학적으로 분석해 보니 척추신경계의 발달은 돌연변이 배아에서도 정상적인 구조를 가지나 주위의 조직에서 이상이 관찰됨. 이는 신경계의 발달이 지연됨으로써 주위 조직의 형성에 영향을 주었으리라 추측 됨. 또한 심혈관계에서는 돌연변이 배아에서만 미성숙 거대 혈관이 관찰되었음. 이는 본 연구자들이 발표한 b2SP의 돌연변이가 endothelial세포의 성장을 촉진하나 성숙을 억제하여 확장된 혈관을 자주 보이는 것과 유사한 결과를 보임. 또한 심장의 발달과정에서 돌연변이 배아의 심장은 정상 배아와 달리 혈관벽이 매우 얇고 혈액분포에서 이상이 관찰됨.

- b2SP가 이 조직들의 발달에 영향을 주는지 알아보기 위해 배아의 발생에서 b2SP의 발현을 돌연변이 promoterless cassette에 있는 b-galactosidase의 활성을 X-gal을 사용하여 측정. 16.5 dpc의 배아를 frozen section하여 X-gal staining을 한 결과 조직내에서 b-galactosidase의 활성이 가장 높게 나타나는 조직은 심장과 spinal cord로 나타나 b2SP가 돌연변이가 된 배아에서 이들 조직에서 가장 두드러진 표현형이 나온 것과 일치한 결과를 보임 (아래 그림).

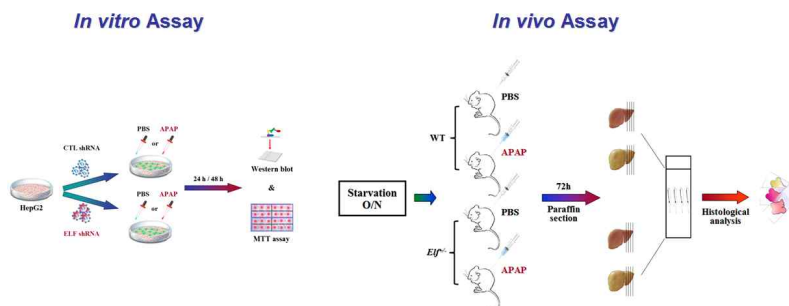


- 향후 다양한 발달 단계에서 위 조직들의 이상을 관찰함으로써 배아의 발달에서 b2SP의 역할에 대해 연구할 예정임.

(3) b2SP knockout 마우스에 대한 Acetaminophen-유도 간 손상모델의 확립



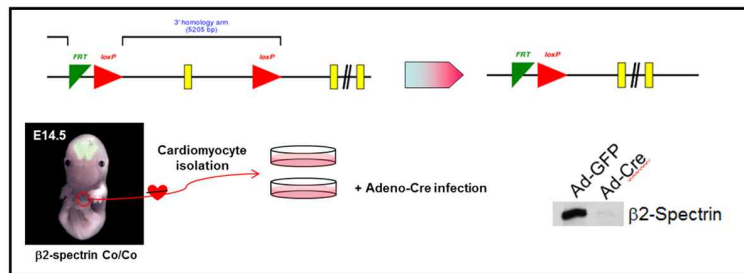
- 간암의 발생은 그의 발달이 잘 알려져 있고 그의 전개과정에서 지방의 축적이나 섬유화와 같은 간 손상이 초기에 일어나므로 (위 그림), b2SP의 결실이 간 손상의 유도를 통한 간암의 발생에 영향을 주는지 알아보기 위해 위의 마우스모델을 사용하여 간 손상을 유도하는 acetaminophen (APAP)을 주사하여 간 손상을 유도. 4-8주령의 wild type과 heterozygote 돌연변이 쥐에 200 mg/kg의 APAP를 주사하고 3일과 7일 후 간 조직을 적출하여 간의 손상과 회복정도를 H&E staining과 기타 항체염색을 통해 시행하고 이와 더불어 세포수준에서도 HepG2 간 세포주를 사용하여 b2SP를 shRNA를 사용하여 발현억제 한 후 APAP에 대한 민감도와 성장도를 측정하여 간 손상에서 b2SP의 역할을 분석 (아래 그림).



- b2SP가 간 손상에 미치는 역할이 확인되면, 간 손상을 유도하는 방법으로 hepatectomy, DEN, CCL4의 주입등과 같이 다양한 방법을 통해 시행하여 b2SP가 간 손상의 어느 과정에 영향을 주는 지 분석.

(4) Primary cultured cell에서의 b2SP의 결실유도를 통한 효과 확인

- 현재 본 실험에서 사용되고 있는 암조직에서 유래된 세포주를 사용하여 shRNA를 통한 knockdown을 시킨 in vitro system과는 별도로 쥐의 정상조직에서 유래된 primary culture를 이용하여 cre recombinase를 가진 adenovirus를 infection시켜 배양된 primary cell에서 b2sp를 결실시켜 b2sp의 역할을 알아보고자 함. 아래 그림에서 나타나듯이 심장의 발달에서 b2네의 역할을 알아보기 위해 b2sp conditional knockout mouse에서 심장을 적출하여 심장근을 배양하고 추후 cre를 포함하는 adenovirus를 infection시킨 결과 b2sp가 효과적으로 결실되는 것이 관찰됨. 이러한 세포 배양의 적용은 기존의 암세포주, 돌연변이 마우스, 사람의 병리조직등에서 도출된 결과의 효과적인 확인 방법으로 사용됨.



(5) 세포골격 조절에서 b2SP의 결실유도를 통한 효과 확인

- b2SP는 spectrin complex의 한 component로 spectrin의 역할인 cell-cell interaction, membrane integrity, shape과 polarity유지에 관여하리라 추측됨. 또한 이전의 연구과 본 연구에서도 다른 골격 단백질과의 결합이 확인됨.
- b2SP의 활성이 세포의 골격의 유지에 연관되어 있을 가능성이 있으며 이의 결실이 세포골격의 변화를 통한 신호전달체계의 이상을 유발하리라 추측되나 현재 b2SP의 결실이 어떠한 세포골격의 이상을 유발하는 지에 대해서는 연구가 많이 되어 있지 않는 상태임.
- 이에 본 연구진은 최근에 사용가능한 위에 언급된 b2sp를 결실시킨 쥐의 심장근세포를 사용하여 여러 가지 골격단백질의 분포를 조사하고 이를 정상근과 대조하여 보니 근육의 수축과 연관되어 있는 dystrophin의 발현과 분포에 b2sp가 필요하며 근육의 수축에 필요한 구조인 Z-band 단백질의 분포도 b2sp가 결실되는 경우 근 조직 특이적인 band 형태의 분포가 사라지며 분산된 형태로 나타나는 것으로 보아 이러한 세포골격 단백질의 분포에 b2SP가 필요함을 알 수 있었음 (위 그림 좌측). 이러한 골격단백질의 구조형성에 b2SP의 필요성이 세포뿐 아니라 조직에서도 나타나는 지 알아보기 위해 배아의 근조직에서 dystrophin의 분포를 확인해보니 정상에서 나타나는 dystrophin의 band 형태의 분포가 b2sp가 결실된 근조직에서는 전혀 보이지 않음으로 이의 필요성이 다시 확인 됨 (위 우측).
- 특이하게도 이러한 세포의 경우에서 b2SP의 신호체계에서 상위에 위치하는 Smad단백질의 인산화 발현이 억제되는 현상을 보이고 이러한 결과는 b2SP의 결실이 TGF-b 신호의 전달을 방해할 뿐만 아니라 이의 2차적인 비활성화를 통해 억제. 따라서 이와 같이 b2SP가 외부 신호를 받아 활성을 매개할 뿐만 b2SP의 결실은 새로운 골격구조를 가짐으로써 신호전달체계에 변화를 줄 가능성을 시사함.

2. 국내외 기술개발 현황

- 간암은 세계적으로는 세 번째, 국내에서는 두 번째로 높은 사망률을 보이는 암으로 매우 예후가 좋지 않음. 간암의 중요한 원인은 간염바이러스에 감염되는 경우와 발암물질/알코올등 간손상물질에 의한 간손상의 축적이 간암 발생의 요인으로 생각됨.
- 본 과제는 b2-Spectrin이라는 골격 단백질이 TGF신호 전달과정에서 TGF-b 신호의 전달자인 Smad3/Smad4와의 생화학적 결합으로 TGF-b-의존성 세포 성장, 분화, 이동, 및 세포사의 조절에 관여할 수 있는 가능성에 착안하여 b2-spectrin의 결손에 의한 암의 생성촉진을 통한 암발생의 기전을 설명하고자 함.
- 현재 연구에 사용되는 b2SP의 유전자를 제거한 마우스의 확보에서 본 연구 그룹은 전세계적으로 가장 발전된 동물모델을 보유하고 운용 중임. 또한 본 연구자와 공동 연구하고 있는 Dr. Lopa Mishra의

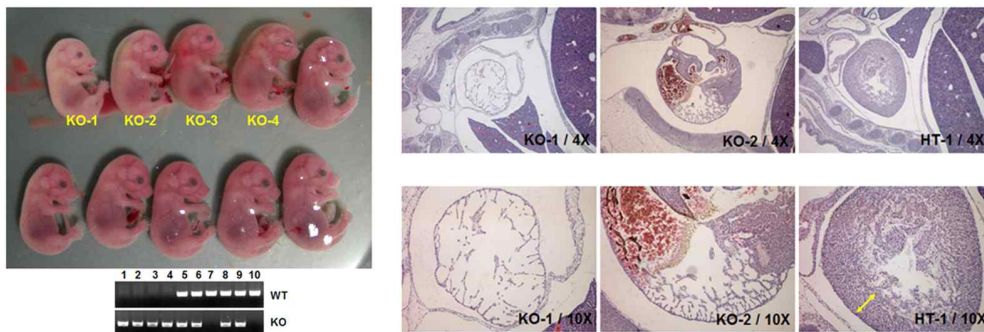
경우 본 실험실도 보유하고 있는 b2SP의 유전자 결손 마우스 모델을 최초로 확립한 연구자로 이 단백질의 결손에 의한 이상현상 분석에 있어서 가장 발전된 연구결과를 생산하고 있음. 또한 유일하게 조직특이적인 결손유도 마우스 (conditional knockout mouse)를 보유하고 운용중임.

- 연구의 진행에서 이상형질의 발현 원인의 규명이 다각도로 이루어 지고 있으나 이의 원인을 간손상의 축적에 두고 연구를 진행하는 것은 본 연구그룹이 유일하며 이는 b2SP의 유전자를 제거한 knockout 마우스의 경우 완전결실의 경우 발생과정의 이상으로 생존가능하지 않으며 heterozygous 돌연변이 마우스인 경우 이의 결손이 간 이외의 조직에서도 나타나 간-특이적 모델로의 이용에 제한적임. 따라서 본 과제의 운용은 확보된 동물모델의 운용을 통한 간-특이적인 접근은 현재 연구분야에 있어서 충분히 경쟁력이 확보하고 있음.

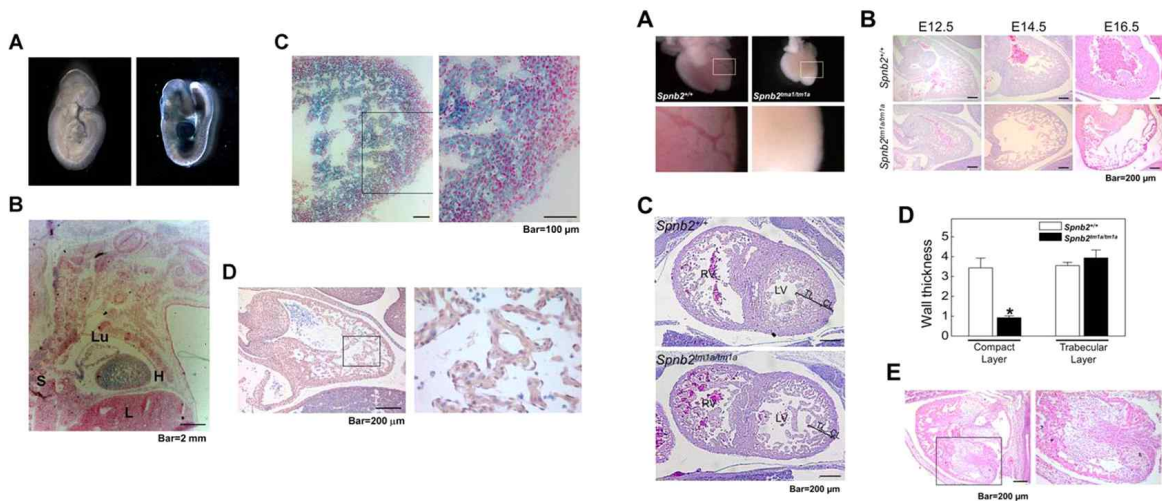
3. 연구수행 내용 및 결과

□ b2SP의 결실에 의한 심장발달에서의 이상분석

- b2SP이 완전히 결실된 homozygote 돌연변이 마우스는 배아발달 중에 치사를 보이며 이는 b2SP가 발달과정에 중요한 역할을 할 것임을 제시. 이에 heterozygote 마우스간의 교배를 통해 homozygote 를 만들어 발생과정에서 발달에 미치는 영향을 조사. 위의 그림에서 나타나듯이 교배를 통해 얻어진 배아에서 homozygote 돌연변이의 경우 wild type 이나 heterozygote돌연변이 배아에 비해 작고 dorsal neural tube defect를 보이며 조직학적인 검사를 통해 본 결과 심장이 정상적으로 발달되지 않음을 알게 됨.

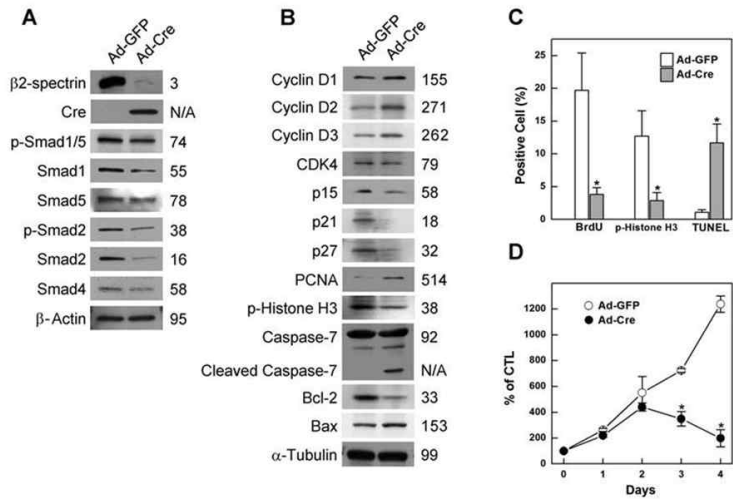


- 발달에서 b2SP의 발현 분석: 발달에서 b2SP의 발현을 알아봄으로써 b2SP가 어떤 기관의 형성에 관여하는지를 분석. b2SP의 발현은 targeting construct에 존재하는 IRES-LacZ의 발현을 배아에 직접 염색하거나 동결시키고 절단한 배아의 section을 사용하여 X-gal assay를 하여 발색된 LacZ의 활성을 모니터링 함. E9.5일의 염색의 경우 심장위치에서 두드러진 발색이 나타나며 E16.5의 경우 심장에서 뚜렷한 염색이 관찰되어 b2SP의 발현이 심장의 발생과정에서 타 기관에 비해 매우 높게 나타남을 알 수 있었음 (아래 좌측 그림).

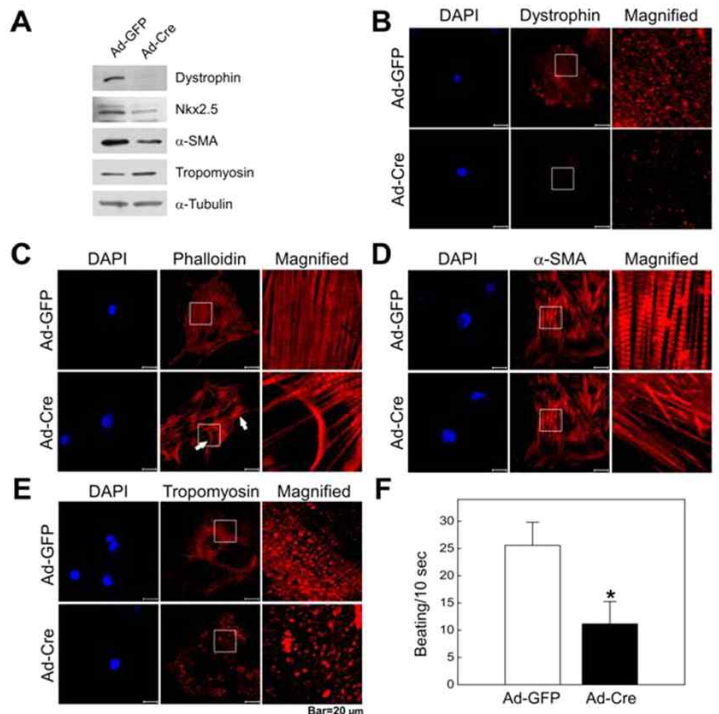


○ **b2SP의 결손에 의한 심장발달의 이상:** 발달과정에서 b2SP를 결손시키고 이에 의해 심장발달에서 이상이 생기는 지를 관찰하니 돌연변이 배아의 심장은 정상에 비해 상대적으로 작고 심장에서의 혈관형성이 잘 되지 않음을 관찰. 심장의 이상은 발달이 진행됨에 따라 심해지고 정상배아와 달리 심장벽이 형성이 잘되지 않으며, 측정을 통해 얻어진 결과로 분석해본 결과 통계적으로 유의한 compact layer의 감소가 관찰됨 (위 우측 그림).

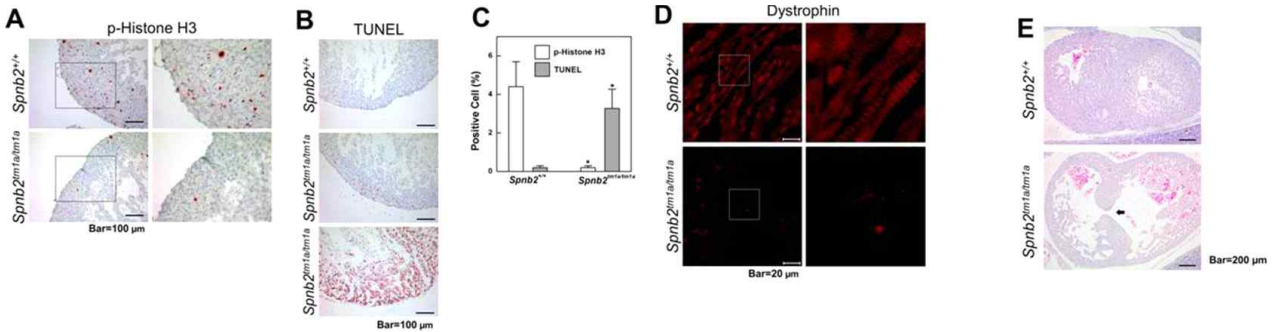
○ **b2SP의 결손에 의한 심장근세포의 단백질 변화 분석:** b2SP의 결손이 심장발달의 이상을 초래하는 원인 분석을 위해 b2SP conditional mouse의 배아에서 심장을 적출하여 근세포를 배양하고 이 세포에서 b2SP의 결손을 위해 cre-adenovirus를 감염시켜 대조군과 비교하니 b2SP를 결손시킨 결과 TGF- β /Smad 신호전달 단백질의 발현 감소가 일어나거나 활성화가 억제되며 근세포의 성장을 촉진하는 단백질의 발현이 증가하는 반면에 세포사를 조절하는 물질의 발현이 동시에 증가하는 양상을 보임. 또한 정상근세포와 b2SP결손 근세포에서 세포의 성장과 세포사를 측정해 보았을 때 통계적으로 유의한 세포생장의 감소와 세포사의 증가가 관찰되며 세포의 성장을 배양과정에서 측정해보았을 때 세포배양 3일 후부터 통계적으로 유의하게 감소됨.



○ **b2SP의 결손에 의한 심장근세포의 분화와 세포골격의 유지에서의 역할 변화 분석:** 앞의 결과에서 보이는 TGF- β /Smad 신호전달과 성장조절에서의 b2SP의 역할이 근세포의 분화에 직접적으로 영향을 주는지 알아보기 위해 배양된 심장근세포에서 b2SP의 결손을 유도하고 이를 통한 근세포 특이적인 단백질 발현 패턴의 변화를 분석해보니 b2SP의 결손은 Dystrophin, Nkx2.5, α -SMA와 같은 근세포 특이적인 단백질의 축적을 저해. 이와 더불어 b2SP가 결손된 심장근세포는 이들 단백질의 정상적인 분포가 나타나지 않거나 근섬유 특유의 분포가 없어짐을 관찰. 이러한 b2SP의 결손으로부터 유도된 근세포 특이적인 단백질의 축적이 억제되거나 분포의 이상이 기능과 연관되어 있는지 알아보기 위해 근수축을 알아볼 수 있는 자발적인 근세포의 수축을 측정하여보니 b2SP가 결손된 근세포의 경우 자발적인 근세포의 수축의 횟수가 정상의 절반에 미치지 못하고 이러한 차이는 통계적으로 유의함. 이에 b2SP는 근세포의 분화를 조절하며 이를 통해 근세포 특이적인 단백질의 발현을 조절하며 근세포 특이적인 골격단백질의 정상적인 분포에 필요하며 이러한 조절은 근세포의 기능인 수축작용에 필요함을 시사.

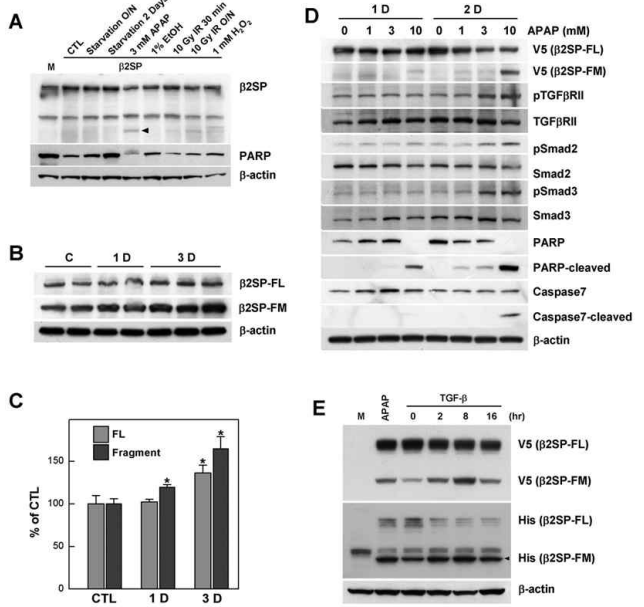


- **b2SP의 결손에 의한 심장근세포의 분화와 세포골격의 유지에서의 역할 변화 분석:** b2SP에 의한 분화와 세포골격의 유지에서의 역할이 심장근세포뿐만 아니라 발생중인 배아에서도 유사한 조절을 하는지 알아보기 위해 발생중인 b2SP돌연변이 배아에서 생장의 정도를 비교해 보니 b2SP의 결손은 세포의 성장을 저하하고 세포사를 증가시키는 것으로 관찰. 또한 세포골격단백질인 dystrophin의 위치를 분석해보니 정상에서 나타나는 band형태의 위치가 돌연변이에서는 관찰되지 않음으로써 배아의 성장과 세포골격의 유지에도 b2SP가 관여함을 알수 있음. 또한 심장근의 두께형성에 미치는 영향이외에도 b2SP돌연변이 배아의 심장에서 ventricular septal defect와 같은 심장형성에 이상이 관찰되어 b2SP의 존재가 심장의 발달의 다양한 단계에 관여함을 보여줌.

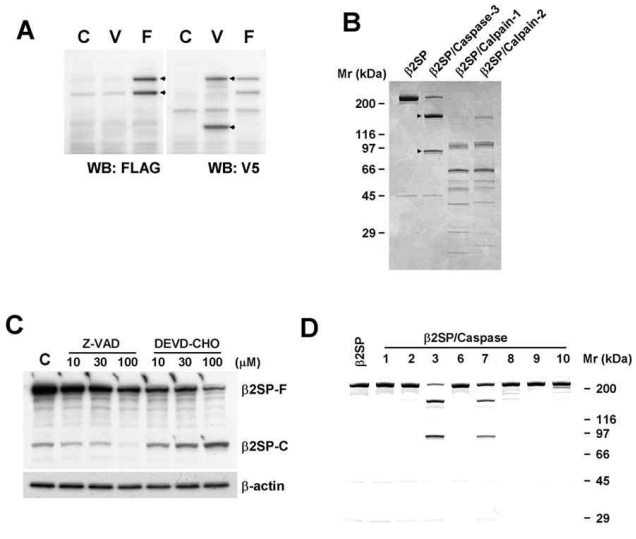


□ **Acetaminophen (APAP)에 의한 간손상에서 b2SP의 역할에 관한 연구**

- **간의 손상에서의 b2SP의 변화:** (A/B/C) 간손상과 b2SP와의 관계를 알아보기 위해 간손상조건 및 손상유도 물질을 처리하여 b2SP의 변화를 관찰한 결과 고용량에서 간독성을 유발하는 것으로 알려진 acetaminophen (APAP)을 처리한 결과 전기영동상에서 b2SP의 수준 감소와 면역양성을 보이는 fast migrating band가 관찰됨. 이 fast migrating band를 쥐에 APAP를 투여한 후 조사해보니 APAP 처리후 통계적으로 유의한 증가가 관찰됨으로 APAP에 의한 유도가능성을 제시. (D) APAP에 의해 유도되는 간손상에 관여하는 조절기전을 분석하니 b2SP의 fast migrating band의 유도와 더불어 TGF- β pathway와 apoptosis의 증가가 관찰 됨. (E) fast migrating band의 파악을 위해 V5/His-tag을 이용한 결과 이는 TGF- β 에 의해 유도되며 b2SP full-length에서 유래되는 것으로 보임.



- **b2SP의 절단:** (A) 간 손상에 의해 생기는 작은 분자가 b2SP에서 유도된 물질인지를 알아보기 위해 b2SP의 발현과정에서 말단에 각기 FLAG/V5 두 개의 다른 표지를 붙이고 COS7 세포주에서 발현시켜 본 결과 이 분자는 240 kDa인 full length protein이 repeat region내에서 절단이 이루어져 N-말단쪽은 약 150 kDa으로 C-말단쪽은 90 kDa의 두 개의 조각으로 나뉘어져 생성됨. (B) 이의 절단에 관여하는 protease의 동정을 위해 b2SP를 순수정제하여 기질로 사용하여 in vitro assay를 시행하여 분석한 결과 caspase-3에 의해 생성됨. (C/D) 반면 세포내에서 caspase-3의 저해제를 통해 절단을 방해하여도 절단이 일어나나 pan-caspase의 저해제는 절단의 억제효과를 보여 다른 caspase가 절단에 관여할 가능성을 보임. 이에 caspase family를 통해 분석하니 caspase-3이외에 caspase-7이 절단에 관여함을 보임.

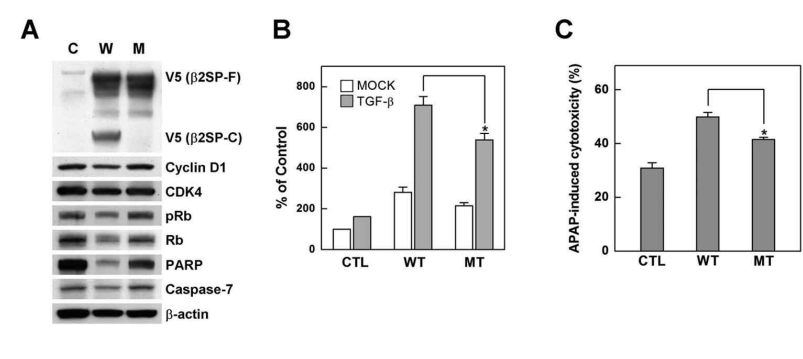


○ **b2SP 단백질 분해 위치의 돌연변이와 Fragment의 cloning:**

(A) TGF- β 에 의해 유도되는 b2SP의 cleavage는 recombinant caspase와의 반응을 통해 caspase-3 와 caspase-7에 의해 절단되고, caspase-3/7에 의해 절단되는 단백질의 1차 구조를 분석해 본 결과, caspase-3 와 caspase-7에 의해 공통적으로 인식되는 기질의 1차 구조는 DEVD sequence가 b2SP내의 17개의 alpha-helix repeat중의 13번째에 부위(1454-1457)에 이 sequence가 존재. 이 13번째 alpha-helix repeat에 존재하는 DEVD sequence가 caspase-3/7에 의해 인식되고 절단되는 부위 인지를 확인하기 위해 1457번 아미노산인

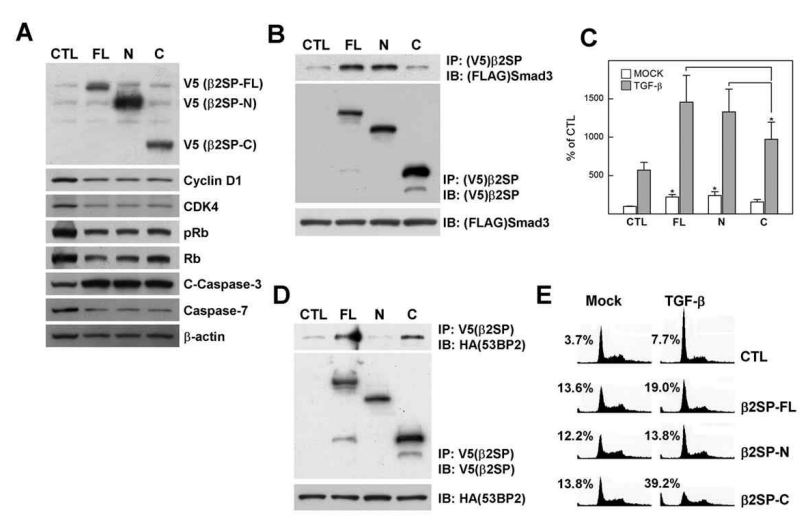
aspartic acid를 alanine으로 site-directed mutagenesis를 통하여 돌연변이를 제조하고 이를 정상 b2SP단백질과 절단여부를 비교. 절단위치를 DEVA로 변환시킨 b2SP의 경우 정상단백질에서 관찰되는 90 kDa크기의 fragment가 전혀 관찰되지 않는 것으로 보아 이 위치가 caspase-3/7에 의해 인식

되어 절단되는 부위임을 동정. (B/C) 또한 절단이 일어나지 않는 돌연변이와 비교를 통해 절단되는 b2SP가 통계적으로 유의한 세포사멸과 TGF- β 의존적 전사조절의 활성이 높은 것으로 비추어 이 절단이 이들 활성 조절에 영향을 줄 것으로 생각됨



○ **b2SP와 각 Fragment들의 세포주기조절능력의 비교:**

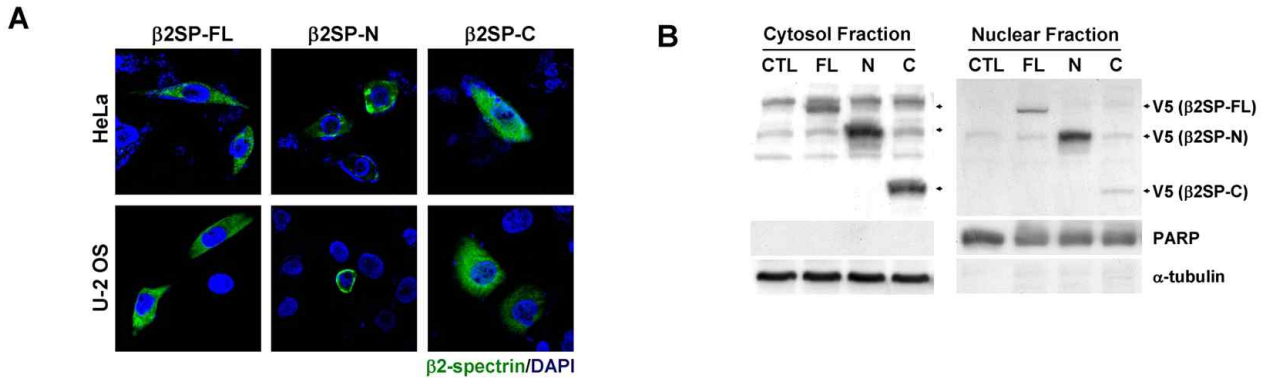
(A) b2SP의 절단으로 생성된 fragment가 세포 주기의 조절에서 어떠한 효과를 매개하는지 알아보기 위해 Full-length b2SP와 절단된 두 개의 fragment를 세포에서 과발현시키고 세포주기 조절에 관여하는 단백질의 양적변화를 western blot으로 확인 한 결과 두 fragment 단백질은 모두 G1/S checkpoint arrest에 관여하는 Rb의 인산화, CDK4, cyclin D1을 감소시키고 apoptosis에 관여하는 caspase-7을 활성화 시킴. (B/D) 각 말단에 특이적인 결합단백질을 조사해보니 N-말단의 경우 TGF- β 의 신호전달에 관여하는 Smad3의 특이적인 결합이 확인 되었고, C-말단의 경우 p53과 결합하여 세포사를 조절하는 53BP2의 특이적인 결합이 확인됨. (C/E) 이 특이적인 결합을 활성화와 연관지어보니 N-말단의 경우 TGF- β 의 의존적 전사조절에 통계적으로 유의한 효과를 보이는 반면, C-말단 fragment가 apoptosis의 조절에 연관되어 있음을 보여줌.



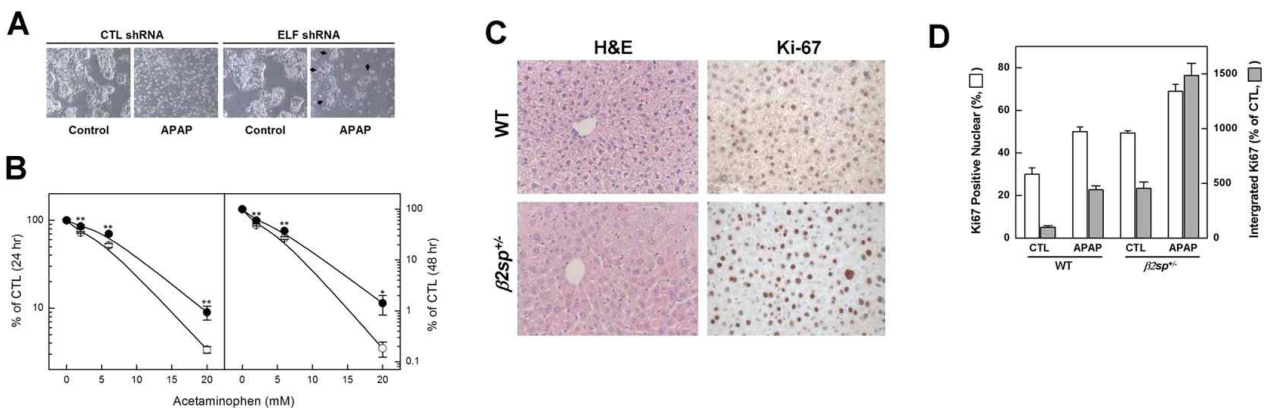
○ **b2SP의 위치변화:**

(A) b2SP의 절단이 b2SP의 위치조절과 연관이 있는지 알아보기 위해 Full-length

b2SP와 절단된 두 개의 fragment를 U2OS세포와 HeLa세포에서 발현시킨 후 세포를 고정하고 vector에 존재하는 V5-tag을 대상으로 V5에 대한 항체를 사용하여 세포내에서 b2SP의 위치를 조사. 두 가지의 세포 모두에서 Full-length b2SP의 경우 세포질에서 발현이 주로 나타나는 데 비해 N-말단의 Fragment는 핵막주위에서 집중되어 분포하고 C-말단의 fragment는 세포질에 분포하여 b2SP의 절단이 b2SP의 위치조절에 관여할 수 있는 가능성을 제시. 이를 확인하기 위해 세포를 분획을 통해 세포질과 핵으로 나눈 후 각 이의 분포를 항체를 통해 확인한 결과 N-말단의 경우 다른 b2SP와 달리 핵에 높은 분포로 존재함을 확인.



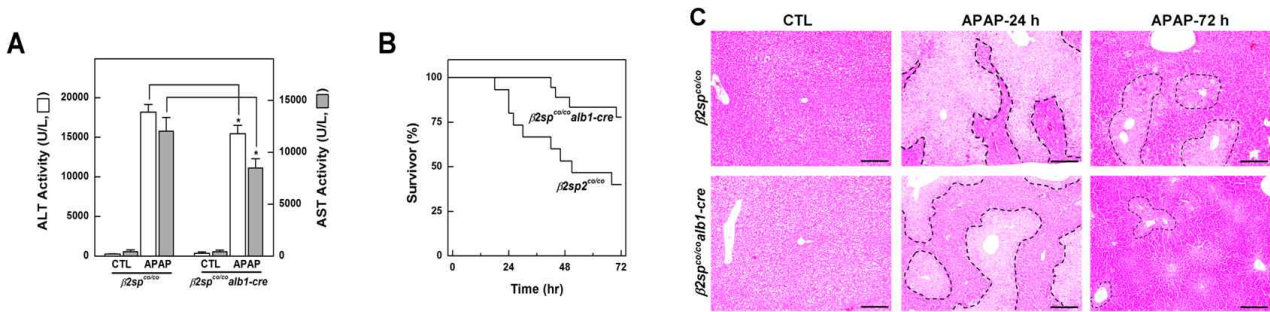
○ **b2SP의 APAP-유도 간손상에서의 역할:** (A/B) b2SP의 APAP-유도 간손상에서의 역할을 알아보기 위해 간세포주인 HepG2세포에 APAP를 처리하고 그의 손상정도를 MTT assay를 통해 검사. 또한 이 세포주에 b2SP의 발현을 조절하기 위해 b2SP에 특이적인 shRNA와 이의 대조군으로 CTL shRNA를 처리한 HepG2세포를 이용하여 발현조절. b2SP의 발현이 억제된 HepG2세포주의 경우 대조군에 대비해 APAP처리 후 24시간과 48시간에서 공히 APAP에 대해 통계적으로 유의한 저항성을 보이는 것으로 보아 APAP에 의해 유도된 간 손상 반응에 b2SP가 관여함을 보임. (C/D) b2SP가 APAP에 의해 유도되는 간손상 과정에서의 역할을 검증하기 위해 b2SP의 발현이 절반으로 줄어든 b2SP heterozygote mouse에 APAP를 주사하고 간손상이 최대로 나타나는 3일 후 쥐의 간을 적출하고 조직을 조사. H&E 염색을 통해 조사하였을 때 정상 쥐의 경우 간의 손상이 나타나는 반면에 돌연변이 쥐의 경우 간의 조직이 정상과 유사한 형태로 나타나며 간세포의 성장정도를 Ki-67로 염색하여 보았을 때 돌연변이 쥐의 경우 정상 쥐보다 높은 Ki-67 수치를 보이는 것으로 보아 손상에 의한 생장의 억제가 일어나지 않은 것으로 판단 됨. 이러한 결과는 b2SP가 APAP에 의해 유도되는 간손상에서 중요한 역할을 하고 b2SP의 결실이 이러한 과정이 잘못되어 손상받은 간의 성장을 통해 암의 발생빈도를 높일 것으로 추정됨.



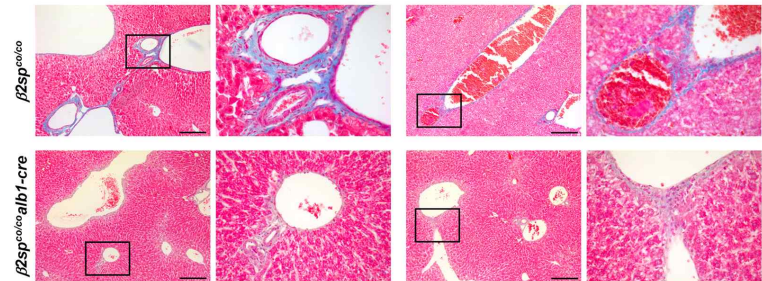
● 이 결과는 급성간부전의 가장 대표적인 원인인 과다 복용된 APAP에 의한 간독성의 진행되는 과정에서 b2SP의 절단이 일어나고 이에 의해 생성된 b2SP의 절단이 TGF-b의 신호전달과정에서 나타나는 transcriptional activation과 apoptosis가 조절함을 시사하며 이과정의 조절을 통해 APAP-의존성 급성간부전의 새로운 치료제의 도출이 가능함을 시사함.

□ APAP에 의한 간손상에서 b2SP의 역할에 관한 연구

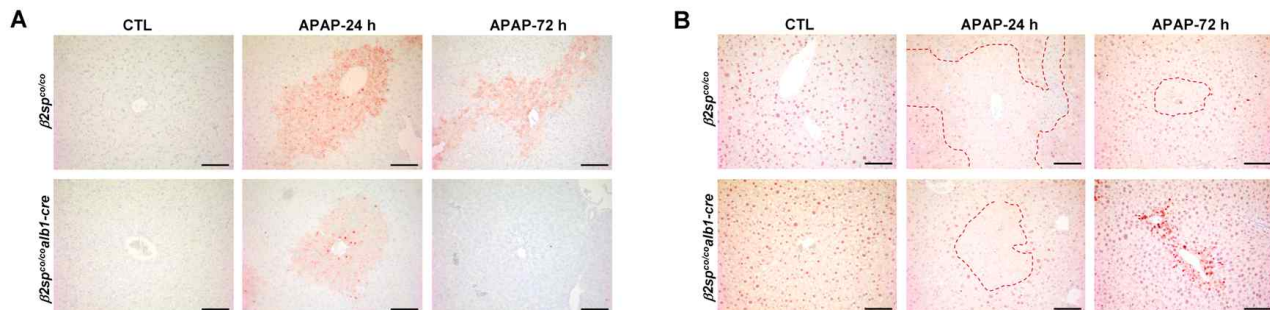
○ **b2SP의 결손에 의한 APAP-유도 간손상:** b2SP의 APAP-유도 간손상에서의 역할을 알아보기 위해 간 특이적인 b2SP의 결손을 유도한 돌연변이 마우스(*b2sp^{co/co}alb1-cre*)와 정상마우스에 APAP를 고농도 (500 mg/kg)로 주사하고 24시간이 경과한 후 혈청을 취득하여 간손상과 관련된 효소인 ALT와 AST의 수치를 비교해보니 b2SP의 결손은 APAP에 의한 간손상에서 통계적으로 유의한 저항성을 보임. 또한 해당 농도에서 APAP에 의한 급성간부전에 의한 사망률을 비교해보니 *b2sp^{co/co}alb1-cre*마우스의 경우 정상마우스에 비해 치사율이 통계적으로 유의하게 저하됨을 보임. 이러한 b2SP의 결손이 APAP에 의한 간손상에서 차이를 보이는 이유를 알아보기 위해 정상 쥐와 *b2sp*돌연변이 쥐의 간을 적출하고 조직을 H&E 염색을 통해 분석해 보았을 때 *b2sp^{co/co}alb1-cre*마우스의 경우 정상 쥐에 비해 동일 시간에 손상부위가 상대적으로 작고 빨리 회복됨이 관찰됨.



○ **APAP-유도 급성간부전에서 b2SP의 결손에 의한 간섬유화 억제:** 고 농도의 APAP에 의한 급성간부전은 간세포의 apoptosis를 유도하고 손상받은 간은 섬유화현상을 보이며 이러한 섬유화의 유무를 collagen의 축적을 표시하는 Masson의 Trichrome염색으로 시도해보니 정상쥐의 간의 경우에는 과사가 빈번하게 일어나는 부위에서 파란색으로 collagen의 축적이 관찰되나 간 특이적으로 b2SP의 결손을 유도한 *b2sp^{co/co}alb1-cre* 돌연변이 마우스에서는 동일한 부위에서 collagen의 축적이 관찰되지 않음 (우측 그림).

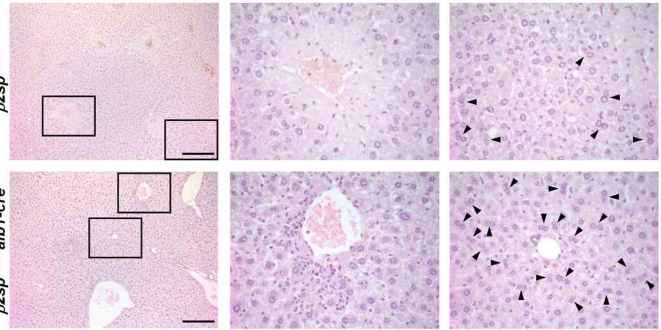


○ **APAP-유도 급성간부전에서 b2SP의 결손에 의한 영향분석:** APAP에 의한 급성간부전에서 b2SP의 결손은 간손상에 저항성을 보이는데 이 원인의 분석을 위해 간조직에서 세포사멸과 성장을 TUNEL과 PCNA염색을 통해 조사. 간조직의 괴사의 경우 정상조직의 경우 b2SP가 결손된 경우에 비해 괴사가 일어난 면적이 넓게 분포하고 괴사가 오랫동안 지속되는 양상을 보임. 반면에 간세포의 성장의 경우 반대로 b2SP가 결손된 경우에서 생장이 일어나는 부위가 넓고 성장회복이 정상의 경우보다 빨리 일어남이 관찰됨 (아래 그림).



○ **b2SP의 결손시 APAP-유도 간손상의 심각성:** 급성간부전의 관점에서 보면 b2SP의 결손은 오히려 간

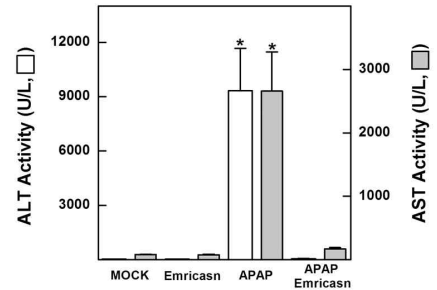
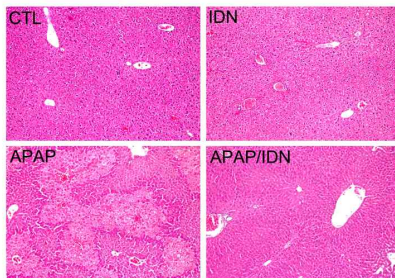
손상이 억제되는 장점이 있으나 다른 문제점이 발생할 수 있는 가능성을 조사해보니, 손상된 $b2sp^{co/co}alb1-cre$ 돌연변이 마우스의 간조직에서는 bile duct주위와 간세포에서 현저히 높은 생장이 관찰됨 (우측 그림). 이는 손상된 간조직에서 분비되는 인터류킨에 의해 촉진된 생장이 b2SP의 결손된 세포에 영향을 주어 성장을 과다하게 촉진하는 것으로 생각됨. 따라서 b2SP의 발현저하에 의해 생기는 간암의 원인이 손상에 따른 다른 반응성으로 생각됨. 이를 확인하기 위해 저농도의 APAP (250 mg/kg) 에 의한 손상을 반복적(월2회 X 6개월)으로 주고 간이상이 관찰되는지 확인 중임.



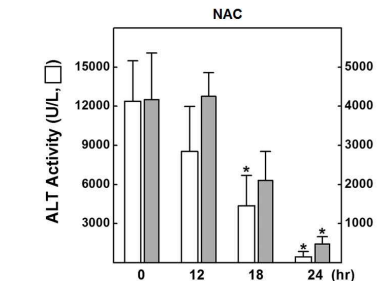
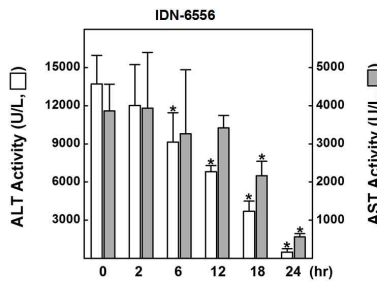
- 위 결과는 b2SP가 APAP-의존성 간손상을 매개하고 이에 의해 세포사를 촉진하며 세포생장의 억제를 통해 간손상을 유발함을 시사함. 그러나 b2SP의 발현저하 혹은 결실은 이 과정을 저해하여 APAP-의존성 간손상은 억제하나 이는 간세포의 성장을 촉진하여 이의 반복적인 자극은 간암과 같은 이차적인 간질환을 유발할 가능성을 제시함.

□ Caspase의 활성억제에 의한 APAP에 의한 급성간부전의 회복에 관한 연구

- b2SP의 절단억제에 의한 APAP-유도 간손상의 억제: 본 연구에서 APAP는 간손상시 b2SP의 절단을 유도하고 이에 의해 간세포에 손상이 축적되고 세포사를 일으키므로 급성간부전의 치료의 관점에서 b2SP의 주요한 조절작용인 절단을 억제할 경우 간손상과 급성간부전을 억제할 수 있는지를 조사함. 이를 위해 개체수준에서 caspase를 억제하는 것으로 알려진 IDN-6556 (Emricasan)을 10 mg/kg의 용량으로 복강에 투입하였을 때 APAP에 의한 간손상을 혈액과 조직에서 확인. 흥미롭게도 APAP에 의해 생기는 간손상시 IDN-6556을 동시에 주었을 때 조직에서 APAP에 의해 생기는 간조직의 과사가 효과적으로 사라지고 혈액에서는 간손상 수치인 ALT/AST의 수치도 통계적으로 유의하게 정상수준으로 회복됨을 관찰함. 이는 APAP에 의한 간손상이 b2SP의 절단에 관여하는 caspase의 억제를 통해 효과적으로 억제됨을 보여줌.



- APAP-유도 간손상에서 IDN-6556과 NAC의 효과 비교: 급성간부전의 치료에서 본 연구에서 제시된 IDN-6556과 기존의 사용되어 온 NAC와 효과를 비교하기 위해 APAP를 주사하여 급성간부전을 일으킨 마우스에 시간



에 따라 IDN-6556 (10 mg/kg)과 NAC (500 mg/kg)를 주사하여 간손상정도를 비교. APAP주사후 24시간 경과

후 측정을 기준으로 하였을 때 NAC의 경우에는 통계적으로 유의한 간보호 효과를 보이기 위해서는 최소 18시간 전의 투입 (APAP손상 후 6시간 이내)이 필요하나 IDN-6556은 혈액채취 6시간 전의 투입(APAP손상 후 18시간 경과)후에도 효능을 보임이 관찰 됨.

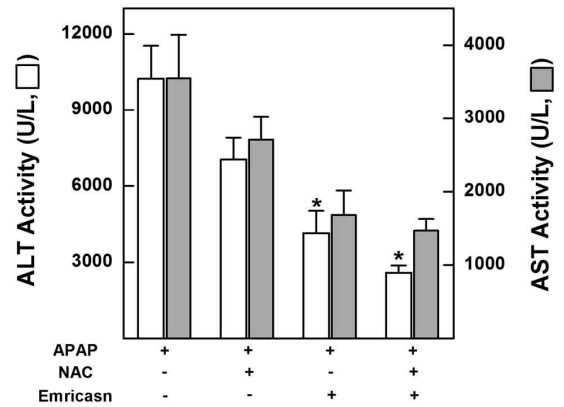
- APAP-유도 간손상에서 IDN-6556과 NAC의 복합효과: 급성간부전의 치료에서 IDN-6556은 손상에 의

한 세포사를 억제하는 반면에 기존에 사용되어온 NAC는 손상을 일으키는 원인물질을 PQIP를 제거하여 손상의 생성을 방지하는 작용을 함. 따라서 서로 다른 효과를 보이는 두 약물의 복합 처방이 급성 간부전의 회복에 보다 효과적이지 알아보기 위해 APAP (400 mg/kg)를 주사하여 급성간부전을 일으킨 마우스에 12시간 후 IDN-6556 (10 mg/kg)과 NAC (500 mg/kg)를 주사하고 12시간 후 간손상 정도를 비교. 두 약물의 단독처리에서는 이전의 실험과 같이 주어진 환경에서 NAC에 비해 IDN-6556이 효과적인 결과를 보였으나 이 두 결과보다는 복합처방이 가장 좋은 예후를 보이는 것으로 관찰 됨.

- 따라서 위의 결과는 가장 빈번하게 일어나는 급성간부전의 원인인 APAP에 의한 간손상에서 b2SP의 조절에 관여하는 caspase의 억제에 이에 적합한 적절한 치료법이 될 가능성을 제시함.

□ **지속적 간손상에서 b2SP-결손에 의한 간질환 연관성에 관한 연구**

○ **APAP-유도 간손상에서 IDN-6556과 NAC의 복합효과:** 마우스에서 b2SP의 발현저하나 결손은 자연적으로 지방간을 유발하고 간암과 같은 간질환을 유발하는 것으로 알려짐. 그러나 간손상이 이러한 질환과의 연관성은 잘 알려지지 않음. 따라서 본 연구는 저자극의 지속적인 간손상을 유도하였을 때 위 질환으로 손쉽게 유도되는지 관찰하고자 함. 현재 계획되고 있는 간손상 방법은 마우스의 사료에 지방함량을 높은 고지방사료(45% Fat diet)로 사육하여 지방간을 촉진하거나, 줄기세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려진 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocolidine(DDC) 함유 사료로 사육하거나 위에 사용된 APAP를 저농도로 지속적으로 주어 b2SP의 결손이 대상 간질환의 발생을 촉진하는지 확인하고 더 나아가 더 심각한 질환으로 유도되는지 관찰. 이러한 노력은 간손상의 기전연구 뿐만 아니라 간손상에 의해 생기는 간질환에 대한 새로운 치료제의 발굴과 확인을 위한 적합한 동물모델로 개발하여 해당 환자를 대상으로 하는 특이적 치료제 발굴을 촉진하고 치료효율을 높이는데 기여하고자 함.



4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

목표	세부연구목표	달성내용	달성도
b2SP 모델 시스템을 이용한 간 손상 Data의 축적 (2013년)	b2SP의 KO 마우스모델의 조직분석과 결과도출	b2SP의 KO에서 통계적으로 유의한 bile duct 세포의 과다성장 확인	100%
	b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 관찰과 자료 축적	1.5년의 기간동안에 b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 관찰과 자료 축적 완료	100%
	APAP를 사용한 간 손상에서의 b2SP의 역할 규명	APAP에 의한 b2SP의 절단과 세포사와 TGF-b-의존적 전사 조절	100%
	b2SP KO 마우스에 대한 간암유도를 통한 간암 모델의 확립	고지방식의 투여에 의한 지방간과 이에 관련 병리형질의 확인	100%
	b2SP의 결실에 의한 embryonic lethality에서의 이상분석 (I)	b2SP의 결실에 의한 심장발달 이상의 확인	100%
b2SP 모델 시스템을 이용한 간 손상 결과의 분석 (2014년)	b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 조직분석과 결과도출	간특이적 b2SP의 결실시 KO 마우스와 동일한 bile duct 세포의 과다성장 확인	100%
	b2SP의 결실이 간 손상과 암 발생에 미치는 영향의 상관관계분석	b2SP의 결실시 간손상의 역제가 일어나고 동시에 회복시 간조직세포에서 과다생장이 촉진됨을 확인	100%
	간암유도를 통한 암 발생에서의 b2SP의 역할 규명	APAP에 의한 b2SP의 절단과 세포사와 TGF-b-의존적 전사 조절	100%
	간손상 유도에서의 b2SP의 위치변화의 분석	APAP에 의한 b2SP의 절단시 N-말단과 C-말단의 핵막과 세포질로 위치 변화 확인	100%
b2SP-의 이상분석 (II)	b2SP의 결실이 심장근세포의 신호전달, 세포성장, 및 세포분화의 이상 확인	100%	
b2SP-의	b2SP의 조직 특이적-conditional KO 마우스모	간특이적 b2SP의 결실시 KO 마우스와 동일한 bile	100%

존성 암발생 기전의 분석과 타겟 도출 (2015년)	델의 관찰과 자료 추적	duct 세포의 과다성장 확인	
	유도를 통한 조직 손상에서의 b2SP의 역할 규명	APAP에 의한 간손상시 b2SP의 결실시 간손상에 억제 및 치사의 감소관찰	100%
	b2SP KO 마우스에 대한 간암유도를 통한 간암 모델의 확립	간손상의 유도를 위해 지방간, 줄기세포촉진, 간손상을 통한 간암유도	100%
	b2SP와 결합 골격단백질의 상관관계 분석	b2SP의 결실이 심장근세포의 다수의 골격단백질의 분포 및 발현의 이상 확인	100%
b2SP의 위치변화에 따른 결합 골격단백질의 변화 분석	APAP에 의한 간손상시 주요골격단백질의 b2SP의 절단에 의한 위치변화와 더불어 주요골격단백질의 발현변화의 확인	100%	

4-2. 관련분야 기여도

- b2SP의 유전자를 제거한 마우스의 확보에서 본 연구 그룹은 Dr. Lopa Mishra를 통해 b2SP의 유전자 결손 마우스 모델을 공여받았으며 또한 유일하게 Sanger Institute를 통해 조직특이적인 결손유도 마우스 (conditional knockout mouse)를 공여받아 운용중임. 연구의 진행에서 이상형질의 획득과 이의 원인분석을 통해 동물모델의 확보가 매우 중요한데 본 연구그룹은 전세계적으로 가장 다양한 b2SP의 결손 마우스 모델을 확보하고 이 동물모델의 운용을 통한 간-특이적인 접근은 현재 연구분야에 있어서 충분히 경쟁력이 확보하고 있음.
- b2SP를 포함한 TGF-b의 신호조절 기전에 대한 기초연구뿐 아니라 암발생기전에 대한 원인 규명은 연구를 *in vitro*와 *in vivo*수준에서 동시에 접근하는 것은 현재 매우 발달된 연구접근법으로 연구과정에서 동물모델과 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 모델은 유전자 특이적 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.

5. 연구결과의 활용계획

- **진료적인 측면:** 암의 발생과정에서 발생한 genetic determination은 항암치료효과에 영향이 있음. 특히 b2SP와 같이 세포생장과 더불어 암전이를 조절하는 단백질은 이에 더욱 밀접하게 연관되어 있음. 본 연구를 통해 얻어진 연구결과는 항암제 개발에 있어 근간이 되는 훌륭한 분자표적을 개발하는 데 기여할 것으로 기대되며 이를 통해 암환자의 예후 예측과 적절한 치료법 고안에 기여할 것으로 기대하며 항암치료의 효과가 극대화되기 위해서는 항암제에 대한 종양의 반응 예측인자에 대한 조직적이고 체계적인 생물학적 연구가 절실하므로 본 연구를 통해 얻어진 연구 성과는 이의 지표로 사용하여 치료효율을 높이는데 기여하고자 함.
- **지식 및 기술적 측면:** b2SP를 포함한 TGF-b의 신호조절 기전은 아직도 기초연구가 필요한 분야로 이 연구를 mice와 human에 대해 *in vitro*와 *in vivo*수준에서 동시에 접근하는 것은 현재 매우 발달된 연구접근법임. 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 모델은 유전자 특이적 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 간암은 세계적으로는 세 번째, 국내에서는 두 번째로 높은 사망률을 보이는 암으로 매우 예후가 좋지 않음. 간암의 중요한 원인은 간염바이러스에 감염되는 경우와 발암물질/알코올등 간손상물질에 의한 간손상의 축적이 간암 발생의 요인으로 생각됨.
- 본 과제는 b2-Spectrin이라는 골격 단백질이 TGF신호 전달과정에서 TGF-b 신호의 전달자인 Smad3/Smad4와의 생화학적 결합으로 TGF-b-의존성 세포 성장, 분화, 이동, 및 세포사의 조절에 관여

< 별첨작성 양식 >

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	1310660		
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야	B-1			과제구분	단위
사업명	기관고유연구사업				주관
총괄과제	b2-spectrin의 결실에 의한 암발생 기전에 관한 연구			총괄책임자	김상수
과제명	b2-spectrin의 결실에 의한 암발생 기전에 관한 연구			과제유형	기초
연구기관	국립암센터			연구책임자	김상수
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2013. 03-2013. 12	250,000		250,000
	2차년도	2014. 01-2014. 12	250,000		250,000
	3차년도	2015. 01-2015. 12	225,000		225,000
	계	2013. 03-2015. 12	725,000		725,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2015. 10. 25

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
국립암센터 방사선의학연구과	책임연구원	김상수

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구는 이의 b2-spectrin의 결실에 의해 일어난 이상현상을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿을만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 knockout 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 가능하다. 또한 세포골격단백질의 발현조절이 신호전달에 영향을 줄 가능성을 제시함으로써 기존의 사고에 반하여 골격단백질의 중요성을 규명함,

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

암의 발생과정에서 발생한 genetic determination은 항암치료효과에 영향이 있다. 특히 b2-spectrin와 같이 세포생장과 더불어 암의 전이를 조절하는 단백질은 이에 더욱 밀접하게 연관되어 있어서 본 연구를 통해 얻어진 연구결과는 항암제 개발에 있어 근간이 되는 훌륭한 분자표적을 개발하는 데 기여할 것으로 기대됨. 또한 간손상과정에서 b2-spectrin의 역할을 규명하고 이에 연관된 caspase의 억제를 통한 급성간손상의 회복은 해당 질환의 중요한 치료방법의 근거가 되리라 예상.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

b2-spectrin의 비활성화 및 변이에 의한 암 발생기전에 대한 규명은 이를 통해 암환자의 예후 예측과 적절한 치료법 고안에 기여할 것으로 기대하며 항암치료의 효과가 극대화되기 위해서는 항암제에 대한 종양의 반응 예측인자에 대한 조직적이고 체계적인 생물학적 연구가 절실하므로 본 연구를 통해 얻어진 연구 성과는 이의 지표로 사용하여 치료효율을 높이는데 기여하고자 한다. 암의 발생과 더불어 caspase의 억제제인 IDN-6556에 의한 급성간손상에서 간손상억제 및 치사율감소와 같은 효과는 현재사용되고 있는 N-acetylcysteine과는 다른 작용기전을 이용하여 간손상을 억제하는 치료제로 이의 활용가능성이 매우 높을수 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

본 연구진은 3년간의 연구 사업을 진행하면서 계획된 연구목표를 100% 달성하였으며 본 연구과제의 지원을 통해 1편의 연구논문을 게재되었고 1편이 심사중에 있으며 향후 2년이내에 2편의 연구논문을 추가로 투고할 예정입니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (미흡)

연구지원 기간동안에 본 연구책임자는 1편의 논문이 Cardiovascular Research (IF: 5.940)이 게재되었고 이 저널은 Journal citation reports의 기준으로 총 8659개의 저널 중 상위 433번째 (5.00%) 에 위치하는 저널이며, 또 1편의 논문이 International Journal of Biological Sciences (IF: 4.509)에 투고하여 Revision중이며 이 저널은 Journal citation reports의 기준으로 총 8659개의 저널 중 상위 737번째 (8.51%) 에 위치하는 저널이다. 또한 향후 2년 이내에 2편의 연구논문을 추가로 투고할 예정입니다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
b2SP의 KO 마우스모델의 조직분석과 결과도출	6	6	b2SP의 KO에서 통계적으로 유의한 bile duct 세포의 과다성장 확인
b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 관찰과 자료 축적	6	6	1.5년의 기간동안에 b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 관찰과 자료 축적 완료
APAP를 사용한 간 손상에서의 b2SP의 역할 규명	7	7	APAP에 의한 b2SP의 절단과 세포사와 TGF-b-의존적 전사 조절
b2SP KO 마우스에 대한 간암유도를 통한 간암 모델의 확립	7	7	고지방식의 투여에 의한 지방간과 이에 관련 병리형질의 확인
b2SP의 결실에 의한 embryonic lethality에서의 이상분석 (I)	7	7	b2SP의 결실에 의한 심장발달 이상의 확인
b2SP의 간 특이적-conditional KO 마우스모델의 조직분석과 결과도출	6	6	간특이적 b2SP의 결실시 KO 마우스와 동일한 bile duct 세포의 과다성장 확인
b2SP의 결실이 간 손상과 암 발생에 미치는 영향의 상관관계분석	6	6	b2SP의 결실시 간손상의 역제가 일어남과 동시에 회복시 간조직세포에서 과다생장이 촉진됨을 확인
간암유도를 통한 암 발생에서의 b2SP의 역할 규명	7	7	APAP에 의한 b2SP의 절단과 세포사와 TGF-b-의존적 전사 조절
간손상 유도에서의 b2SP의 위치변화의 분석	7	7	APAP에 의한 b2SP의 절단시 N-말단과 C-말단의 핵막과 세포질로 위치 변화 확인
b2SP의 결실에 의한 embryonic lethality에서의 이상분석 (II)	7	7	b2SP의 결실이 심장근세포의 신호전달, 세포성장, 및 세포분화의 이상 확인
b2SP의 조직 특이적-conditional KO 마우스모델의 관찰과 자료 축적	6	6	간특이적 b2SP의 결실시 KO 마우스와 동일한 bile duct 세포의 과다성장 확인
유도를 통한 조직 손상에서의 b2SP의 역할 규명	6	6	APAP에 의한 간손상시 b2SP의 결실시 간손상에 억제 및 치사의 감소관찰
b2SP KO 마우스에 대한 간암유도를 통한 간암 모델의 확립	7	7	간손상의 유도를 위해 지방간, 줄기세포촉진, 간손상을 통한 간암유도
b2SP와 결합 골격단백질의 상관관계 분석	7	7	b2SP의 결실이 심장근세포의 다수의 골격단백질의 분포 및 발현의 이상 확인
b2SP의 위치변화에 따른 결합 골격단백질의 변화 분석	7	7	APAP에 의한 간손상시 주요골격단백질의 b2SP의 절단에 의한 위치변화와 더불어 주요골격단백질의 발현 변화의 확인
합계	100점	100점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

b2-spectrin 단백질의 돌연변이로 유발된 간암을 비롯한 다양한 암에서 빈번히 관찰되고 있으나 이의 결실에 의한 발생기전은 잘알려져 있지 않음. 본 연구는 이의 규명을 위해 b2-spectrin의 생화학적 상호작용을 하는 타겟을 발굴하고 이의 역할을 규명하여 b2-spectrin의 돌연변이로 부터 발생된 간암이 발생기전을 밝힘으로써 항암제 개발에 있어 근간이 되는 훌륭한 분자표적을 개발하는 데 기여할 것으로 기대됨. 또한 간손상과정에서 b2-spectrin의 역할을 규명하고 이에 연관된 caspase의 억제를 통한 급성간손상의 회복은 해당 질환의 중요한 치료방법의 근거가 되리라 예상.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구의 핵심 분야인 Knockout mice의 사용으로 인하여 결과도출에 걸리는 시간이 다른 세포중심 과제에 비해 오래 걸리는 특성이 있어 이의 고려가 요구된다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제는 암억제 유전자인 b2-spectrin의 돌연변이가 혹은 발현저하에 의해 생성되는 암의 발생을 분석하여 본 연구를 통해 얻어진 연구 성과를 항암치료에서 지표로 사용함으로써 치료효율을 높이며 이를 통해 각각의 돌연변이 암의 새로운 치료제 및 저해제의 개발에 기여하고자 하는 것임. 또한 본 연구는 이의 작용기전을 밝혀내는 과정에서 knockout mice와 이에서 유래된 세포나 조직을 사용함으로써 보다 믿음만한 결론을 이끌어 낼 수 있어서 상대적으로 우수한 논문을 생산할 수 있는 가능성을 가지고 있으며 이를 통해 만들어진 마우스 모델은 각각의 genetic alteration에 적합한 암을 target으로 하는 치료제 개발의 최적의 모델로 이용 하고자 함. 암의 발생과 더불어 caspase의 억제제인 IDN-6556에 의한 급성간손상에서 간손상억제 및 치사율감소와 같은 효과는 현재 사용되고 있는 N-acetylcysteine과는 다른 작용기전을 이용하여 간손상을 억제하는 치료제로 이의 활용가능성이 매우 높을수 있어 이에 대한 추가 연구를 통해 급성간손상에 대한 치료제로서의 가능성을 제시하고자 함.

IV. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

해당 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과