

<붙임 4>

기관고유연구사업 결과 보고

결 재	과제책임자	과 장	부 장

※ 협조 :

- 사업단 소속 연구직의 경우 국가암관리사업단장
- 연구(의사직), 의사직, 의학물리학직의 경우 소속 센터장

본인이 수행한 20 ~ 20 년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	폐암의 발생 과정에 미치는 PI3K/Akt 경로의 역할과 조절 연구
과제책임자 (소속, 성명)	암실험자원연구과 오승현
총연구비	290,000 천원 (2008년: 110,000, 2009년: 90,000, 2010년: 90,000)
총연구기간	2008년 3월 1일 ~ 2010년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010년 12월 31일

과제책임자 오 승 현

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 0810420-1)

폐암의 발암과정에 미치는 PI3K/Akt 경로의 역할과 조절 연구

Implication of PI3K/Akt pathway for carcinogenesis

과제책임자 : 오 승 현

국립암센터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1142 1123 1704"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.<p>(14 pont, 고딕체)</p></div>	<p>↑ 5cm ↓</p> <p>과 제 명</p> <p>국 립 암 센 터</p> <p>↑ 3cm ↓</p>
---	---

↑
6cm
↓

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “폐암의 발암과정에 미치는 PI3K/Akt 경로의 역할과 조절 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12. 31

국립암센터

과제책임자 : 오승현

목 차

< 요약 문 >

(한글)	1
(영문)	3
1. 연구의 최종목표	5
2. 연구의 내용 및 결과	5
3. 연구결과 고찰 및 결론	16
4. 연구성과 및 목표달성도	18
5. 연구결과의 활용계획	20
6. 참고문헌	21
7. 첨부서류	22

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

연구분야(코드)	B1, B3		과제번호	0810420-1
과제명	폐암의 발암과정에 미치는 PI3K/Akt 경로의 역할과 조절 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2008년 3월 1일 ~ 2010년 12월 31일		290,000
	1차년도	2008년 3월 1일 ~ 2008년 12월 31일		110,000
	2차년도	년 월 일	~ 년 월 일	90,000
	3차년도	년 월 일	~ 년 월 일	90,000
과제책임자	성명	오 승 현	주민등록번호	*****-*****
	전화번호	920-2272	전자우편	eyeball@ncc.re.kr
색인단어	국문	PI3K/Akt, 발암		
	영문	PI3K/Akt, carcinogenesis		

◆ 연구목표

<최종목표>

- PI3K/Akt 경로 활성이 폐암 세포의 invasiveness 및 bronchial epithelial cell의 oncogenic transformation 에 미치는 효과분석과 새로운 PI3K 활성 저해물질에 의한 관련 폐암 세포 조절

<당해년도 목표>

- IGF-1R/Akt 경로 억제제 개발과 단독 또는 병행 치료에 의한 악성종양억제 효과 확인

◆ 연구내용 및 방법

- HDAC 억제제에 의한 PKC 각 isoform의 activity 변화
- > IGFBP-3는 구조적으로 protein kinase A (PKA), PKC, 그리고 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)에 대한 potential phosphorylation site를 갖고 있으므로 이러한 억제제에 대해 의해서 결과적으로 IGFBP-3의 stability가 증가하는지 확인.
- > HDAC 억제제와 recombinat IGFBP-3를 사용하여 xenograft 모델에서 종양억제효과 확인
- : xenograft 모델
- > IGFBP-3는 인산화 과정을 통해 stability가 조절됨. HDAC 억제제와 PKC isoform 특이적 억제제를 사용하여 어떤 특정 isoform 억제제가 IGFBP-3의 인산화를 억제하는지 확인
- : Kinase assay (IGFBP-3 + HDAC 억제제 또는 PKC isoform 억제제)

- > PKC 또는 PKA, DNA-PK 억제제와 IGFBP-3에 의한 암세포의 증식 억제효과 확인
: Anchorage independent colony formation assay (IGFBP-3 + HDAC 억제제 또는 PKC isoform 억제제)
- IGF-1R/Akt 경로를 통한 항암제 내성 세포주의 전이 기전 확인
-> 내성세포주에서 Cox-2의 발현이 PI3K/Akt 경로를 경유하여 증가한다는 것을 확인
: IGF, EGF 처리 후 Cox-2의 변화 (RT-PCR)
: PI3K/Akt, MAPK 억제제 등에 의해 특이적으로 Cox-2가 억제되는지 확인 (western blotting)
- > MCF-7/Dox 의 전이 확인 (동물모델)
: 누드 마우스의 미정맥으로 MCF-7/Dox 세포를 주입하여 폐전이 확인

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	3/3	100
IF 합		
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)

성 명

오승현, 강주희, 송기훈

주민등록번호

*****-*****, *****-*****, *****-*****,
*****-*****

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

편집순서 5 : 요약문 (영문)

Project Summary

Title of Project	Implication of PI3K/Akt pathway for carcinogenesis
Key Words	IGF-1R, Akt, carcinogenesis
Project Leader	Seung Hyun Oh
Associated Company	
<p>Since, insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) signaling has been known to be associated with cellular transformation and more recently with angiogenesis, invasion, metastasis, and resistance to various therapies, we predicted that the IGF signaling pathway would offer a target for lung cancer and head/neck cancer. Therefore we studied the importance of targeting IGF-1R pathway in cancer in vitro and in vivo mouse system.</p> <p>We reasoned that IGF binding protein (IGFBP-3, a natural IGF-binding protein), SCH66336 (farnesyl transferase inhibitor, ras inhibitor), and glucosamine could be effective for blocking this pathway.</p> <p>1) We found that noncytotoxic doses of recombinant IGFBP-3 in combination with HDAC inhibitors significantly decreased the cell proliferation, increased apoptosis NSCLC cells and suppressed the tumor growth in mouse mode. The ability of HDAC inhibitors to decrease PKC activation may enhance apoptotic activities of rIGFBP-3 in NSCLC cells <i>invitroandinvivo</i>;</p> <p>2) SCH66336 at a sublethal dose for HNSCC inhibited the migration and invasion of HNSCC cells. SCH66336 treatment also reduced the expression and activity of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), both important regulators of tumor metastasis. The inhibitory effect of SCH66336 was associated with the blockade of the IGF-1 receptor (IGF-1R) pathway via suppressing IGF-1R itself and Akt expression;</p>	

3) We found that glucosamine inhibited the growth of human non-small cell lung cancer cells and negatively regulated the expression of IGF-1R and phosphorylation of Akt in a time- and dose-dependent manner. Glucosamine decreased the stability of IGF-1R and induced its proteasomal degradation by increasing the levels of abnormal glycosylation on IGF-1R. Glucosamine sensitivity of each cell line was affected by the mutation status of *PIK3CA* and *PTEN*.

4) We found that the drug-resistant MCF-7/DOX cells were more invasive than the MCF-7 cells. the invasive activity of MCF-7/DOX cells is mediated by Cox-2, which was induced by the EGFR-activated PI3K/Akt and MAPK pathways. In addition, EP1 and EP3 are important in the Cox-2 - induced invasion of MCF-7/DOX cells.

Our results demonstrate that the IGF-1R pathway plays a major role in the proliferation, migration, and invasion of HNSCC cells, suggesting that therapeutic obstruction of the IGF-1R pathway would be a useful approach to treating patients with cancers.

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

○ PI3K/Akt 경로 활성이 폐암 세포의 invasiveness 및 bronchial epithelial cell의 oncogenic transformation 에 미치는 효과분석과 새로운 PI3K 활성 저해물질에 의한 관련 폐암 세포 조절

- 1) PI3K/Akt 경로 억제를 통한 암 억제 규명
- 2) 발암과정에서 PI3K/Akt 경로 변화 및 다른 유전자와의 관계 분석

2. 연구의 내용 및 결과

1) 폐암 발생에서 IGF-1R의 역할

가. in vitro 발암과정에서 IGF-1R 경로의 중요성

- 폐의 발암과정에서 IGF-1R의 변화

폐의 발암과정에서 IGF-1R경로의 변화를 확인하기 위해서 정상인간기관지상피세포 (NHBE)를 불활화시킨 BEAS-2세포와 이 세포로부터 유래되어 각각 점차 악성화 되어가는 1799, 1198, 1170 세포에서 IGF-1R의 발현과 활성화를 비교하였음. 그림 A에서 보는 바와 같이 불활화, 변형, 그리고 중앙형성을 하는 성질을 갖추는 과정에 있어서 IGF-1R의 활성화된 형태인 pIGF-1R의 발현은 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 NNK의 장기간 투여에 의한 IGF-1R의 활성화를 확인.

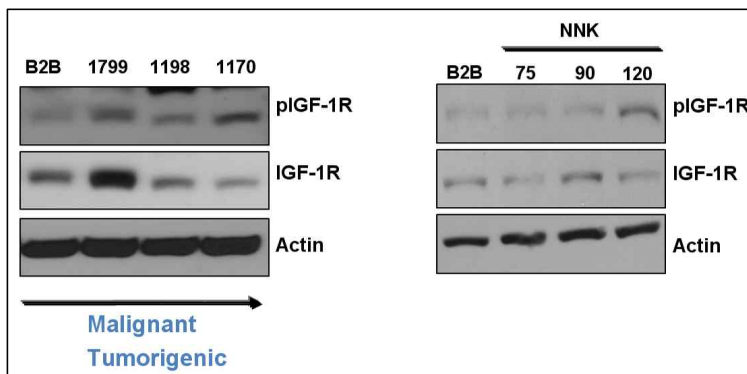


그림 A. BEAS-2B,1799, 1198, 1170 에서의 Western Blotting. B2B(BEAS-2B)

- 악성암에서 IGF-1R의 중요성 및 표적으로서의 가능성

암화과정(carcinogenesis)에서 IGF-1R의 중요성 및 표적으로서의 가능성을 알아보기 위하여 BEAS-2B,1799, 1198, 1170의 anchorage dependent 및 anchorage independent colony formation과정

중 IGF-1R 억제에 의한 각 세포들의 반응을 확인하였음. 그림 B, C에서와 같이 1198, 1170과 같은 premalignant 또는 tumorigenic 세포주에서는 1179 세포주에 비하여 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor (AG1024)에 민감하게 colony 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 결과는 폐암의 발생과정에서 IGF-1R의 활성화가 필수적이며 암에서 IGF-1R의 억제가 상당히 효과적인 방법이 될 수 있을 것이라는 것을 의미함.

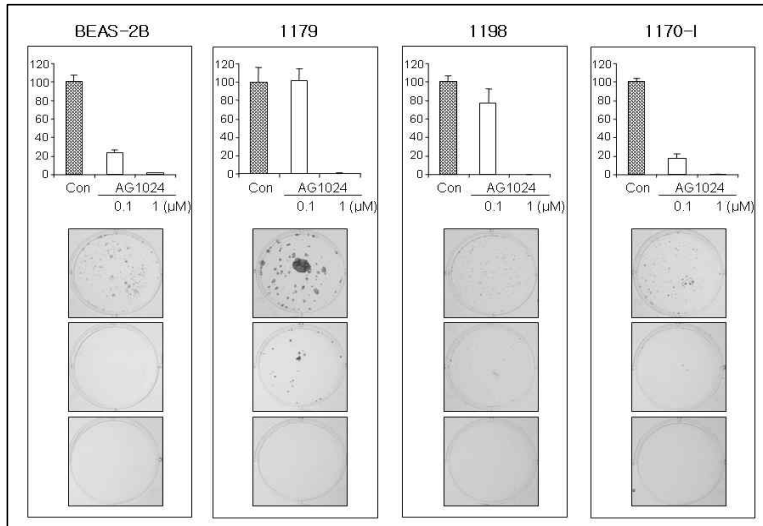


그림 B. BEAS-2B, 1179, 1198, 1170에서 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor인 AG1024에 의한 anchorage dependent colony formation 억제 효과

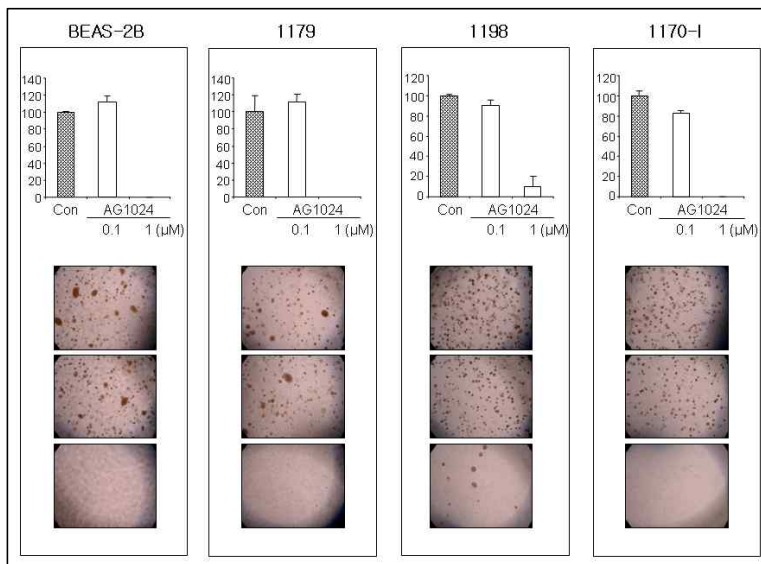


그림 C. BEAS-2B, 1179, 1198, 1170에서 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor인 AG1024에 의한 anchorage independent colony formation 억제 효과

나. 흡연에 의한 폐암발생에서 IGF-1R의 역할

- 담배 발암물질인 NNK의 colony 형성에 대한 영향

암환자의 70% 이상이 폐암과 관련이 있으나 만성 흡연자의 15% 정도에서만 폐암이 발생한다는 점에서 유전적 요인과 흡연에 의한 폐암 발생이 관련 있을 것이라는 가능성을 나타냄. 본 연구자는 앞서 밝힌 IGF-1R 경로의 암화과정에서의 활성화와 흡연에 의한 암 발생 또는 악성화가 관련이 있는지 알아보고자 BEAS-2 세포에 장기간 담배에 포함된 발암물질인 NNK를 처리하여 비교하였음. 그림 D의 결과는 NNK를 90동안 투여한 BEAS-2B세포주에서는 colony 형성 능력이 향상된다는 것을 확인한 결과이며 또한 대조군 BEAS-2B 세포주에 비하여 IGF-1R억제제에 민감하게 반응하여 colony형성이 억제되었음. 저산소 환경 (1% O₂)에서도 NNK에 의한 colony 형성은 증가하였으며 IGF-1R억제제에 의해서 colony 형성이 억제되었음.

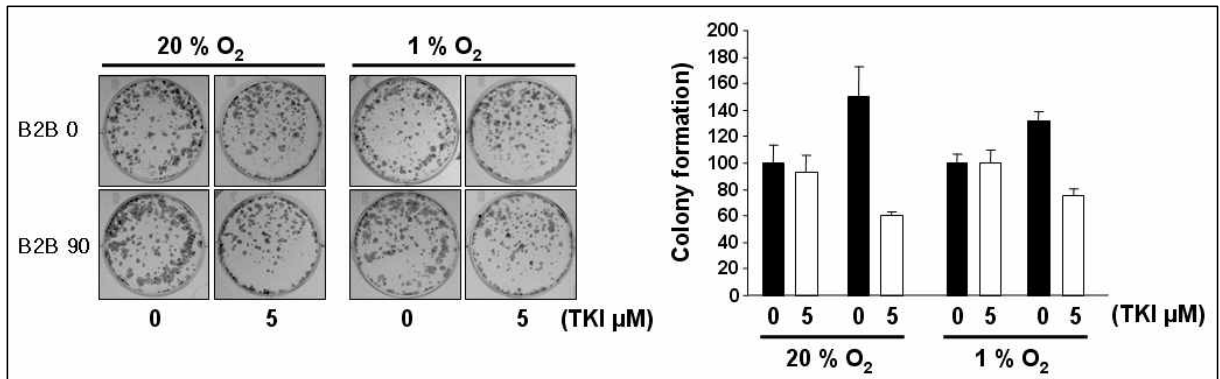


그림 D. NNK를 90일동안 장기간 투여한 BEAS-2B 세포주에서의 anchorage dependent colony 형성과 IGF-1R tyrosine kinase에 의한 억제효과

- NNK의 전이에 대한 영향

흡연과 악성암의 특징인 전이에 대한 관련성을 연구하기 위해서 BEAS-2B 세포주에 NNK를 처리한 후 전이관련 효소인 MMP-2, MMP-9, uPA의 활성도를 zymography를 통하여 확인하였음. 그림 E에서와 같이 NNK는 active MMP-9과 active MMP-2의 발현 및 활성을 증가시켰으며 uPA의 활성 또한 증가시켰음.

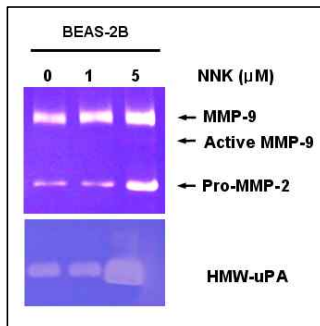


그림 E. BEAS-2B 세포주에서 NNK의 전이 관련 효소에 대한 영향

- NNK 의 세포 성장관련 유전자에 대한 영향

NNK에 의한 EGFR경로의 활성화가 보고되었으며 본 과제에서 NNK에 의한 colony 형성과 전이 관련 유전자들의 활성화가 관찰되어 EGFR과 밀접한 관련이 있는 IGF-1R 경로를 활성화 시킬 수 있는 IGF 유전자의 변화를 확인하였음. BEAS-2B 세포에 NNK를 처리한 후 배양액에서 IGF-1의 양을 ELISA assay로 측정된 결과로 NNK의 처리 농도에 따라 세포로부터 분비되는 IGF-1의 양이 증가하는 것을 확인.

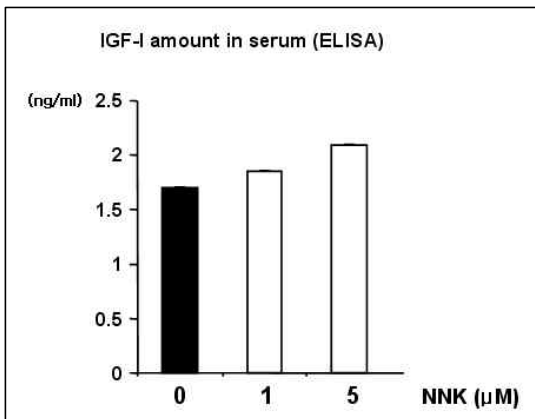


그림 F. NNK의 IGF-1 생성에 대한 영향 (ELISA)

다. 항암제 내성에 있어서 PI3K/Akt 경로의 중요성

- 항암제 내성 세포주 확립 및 PI3K/Akt 경로의 변화

MCF-7 세포주에 장기간 doxorubicin (2μM) 처리하여 내성을 확립한 MCF-7 세포주 (MCF-7/Dox)를 도입하여 doxorubicin에 대한 내성 확인을 하였음. 그림 G의 a에서 보는 바와 같이 0.7μM 농도의 doxorubicin 처리에 의해 MCF-7 세포주는 70% 이상이 성장 억제효과를 보였고 MCF-7/Dox의 경우 30% 이내의 성장 억제효과를 보였음. 이러한 내성의 획득에 PI3K/Akt경로가 어떠한 영향을 미쳤는지 알아보기 위하여 MCF-7과 MCF-7/Dox 세포주에서 western blotting을 실시하여 PI3K/Akt 경로 유전자 및 상위 유전자인 EGFR, IGF-1R의 발현을 조사하였음. 그림 G의 b에서와 같이 MCF-7/Dox 세포주에서는 EGFR, pAkt의 발현이 증가하였고 pAkt를 억제하는 PTEN의 발현은 감소하였음. 또한 암세포의 성장, 전이, 혈관신생 등과 관련이 있는 Cox-2 유전자의 발현이 증가하였음. 흥미롭게도 pAkt의 발현을 조절하는 IGF-1R의 발현은 감소하여 적어도 MCF-7/Dox에서 Akt의 활성화는 IGF-1R 보다는 EGFR 경로의 조절을 받는 것으로 확인되었음. EGFR과 Akt의 활성화의 보다 직접적인 관련성을 확인하기 위하여 MCF-7/Dox에서 EGFR의 발현을 siRNA를 사용하여 억제한 후

pAkt와 Cox-2의 발현 변화를 확인하였음. 그림 G의 c에서 보는 바와 같이 siRNA에 의한 EGFR의 발현 억제 후 pAkt와 Cox-2의 발현은 현저히 감소하여 이들 유전자가 밀접한 관계를 보임을 증명하였음.

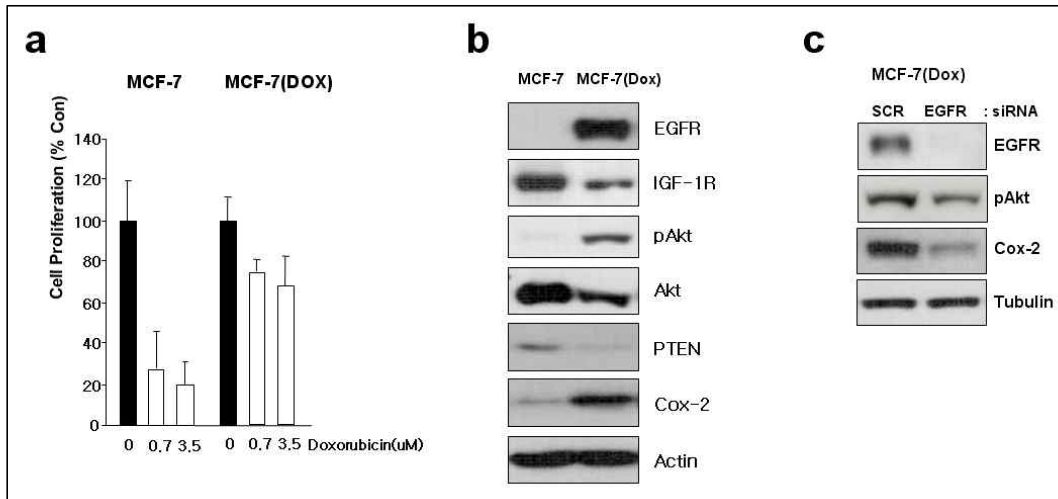


그림 G. Doxorubicin 내성 MCF-7 세포주에서 EGFR/Akt 경로의 변화

- PI3K/Akt 경로의 변화와 전이 능력의 획득

EGFR, pAkt, Cox-2 등은 암세포의 항암제 내성뿐만 아니라 악성암의 특징인 전이와도 밀접한 관련이 있어 전이 능력이 없는 MCF-7세포에 비해서 MCF-7/Dox세포가 전이 능력을 획득했는지 확인하였음. 그림 H의 a에서 보는 바와 같이 MCF-7/Dox세포에서는 CXCL12라는 chemokine의 수용체인 CXCR4가 발현되었으며 전이 억제 유전자의 E-cadherin의 발현이 완전히 사라졌음. 또한 암전이에서 직접적으로 ECM을 분해하는 효소인 MMP-9, MMP-2, uPA의 발현이 나타나고 강한 활성을 보였음. 이러한 결과로 MCF-7/Dox 세포가 전이 능력을 획득하였다고 추측되어 in vitro invasion assay를 실시하였음. ECM 성분인 matrigel로 코팅된 transwell을 사용하여 MCF-7세포와 MCF-7/Dox세포의 invasion activity를 비교한 결과 전이가 되지 않는 MCF-7에 비하여 MCF-7/Dox세포는 전이되는 세포의 수가 15배 정도 증가하였음 (그림 H의b)

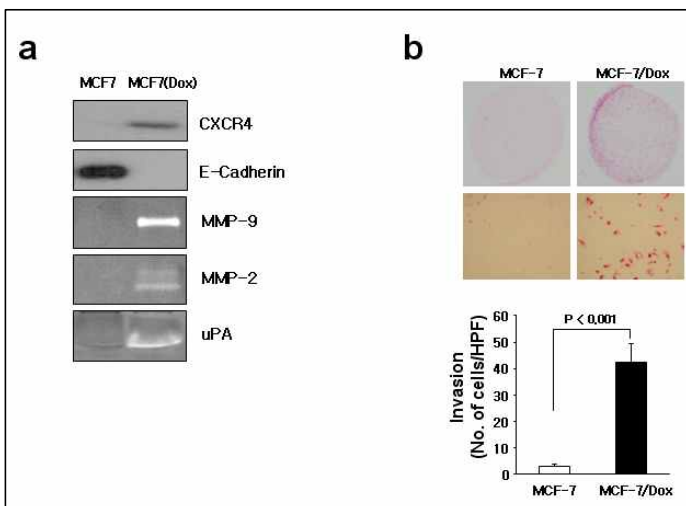


그림 H. Doxorubicin 내성 MCF-7 세포주에서 전이관련 유전자의 변화 및 전이 능력 획득

라. IGF-1R/Akt 경로를 억제할 수 있는 IGFBP-3 의 악성종양 억제 효과 확인

-> IGF-1R 경로를 제어하는 IGFBP-3 의한 세포성장 억제 효과 확인 (MTT, Colony formation)

: IGF-1R/Akt 경로를 억제할 수 있는 IGFBP-3에 의한 항암효과 확인을 위해 recombinant IGFBP-3 단백질을 H1299 세포주에 처리하여 세포성장 억제효과 확인 하였음 (MTT). 기존에 보고된 adenoviral IGFBP-3 에 비해 세포성장 억제효과가 미비함이 관찰되었음 (그림 I).

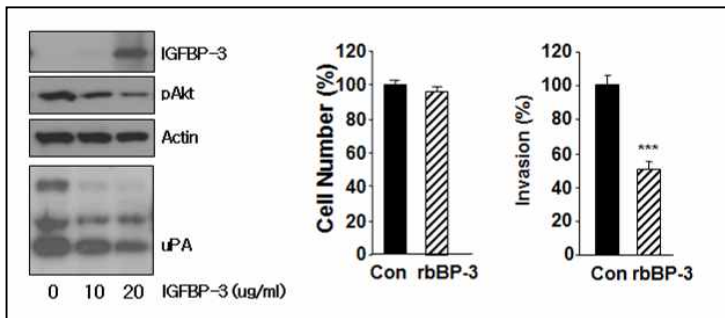


그림 I. IGFBP-3의 PI3K/Akt 경로 억제와 세포성장 억제효과

-> IGFBP-3 의 제한적 항암효과 원인 규명 (western blotting, MTT)

: IGFBP-3 가 효과적으로 pAkt를 억제하여 invasion 억제효과가 있지만 암세포의 apoptosis 유도하지는 못하는 것이 관찰됨 (그림 I). 이러한 제한적 효과가 recombinant IGFBP-3 단백질의 stability가 짧아지는 것에 기인하는지 알아보기 위하여 IGFBP-3 처치 6, 12, 24 시간 후 발현 확인 및 pAkt 의 activity를 확인한 결과 IGFBP-3 처치 후 24시간 이후에는 발현양이 현저히 감소하여 target인 pAkt의 발현양이 다시 증가하는 것이 확인되었음 (그림 J).

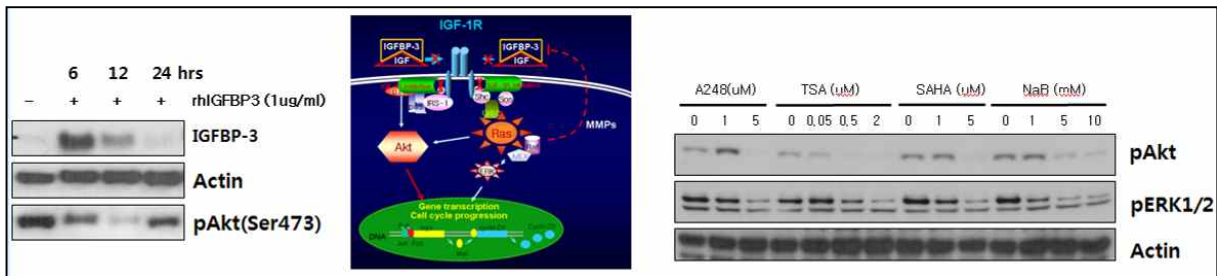


그림 J. recombinant IGFBP-3 단백질의 stability 조절과 HDAC 억제제의 MAPK 경로 조절

-> HDAC 억제제와 IGFBP-3의 병행투여에 의한 항암효과 확인

: MAPK 경로가 IGFBP-3를 분해한다고 알려져 있는 MMPs 들을 조절한다고 알려져 있음. 또한 HDAC 억제제는 MAPK 경로를 효과적으로 억제하는 것이 알려져 있었으며 본 실험에서도 확인함. MAPK 경로는 억제하는 HDAC 억제제가 IGFBP-3 와 병행사용 될 때 효과적으로 세포증식을 억제하는지 확인하였음 (그림 K, L).

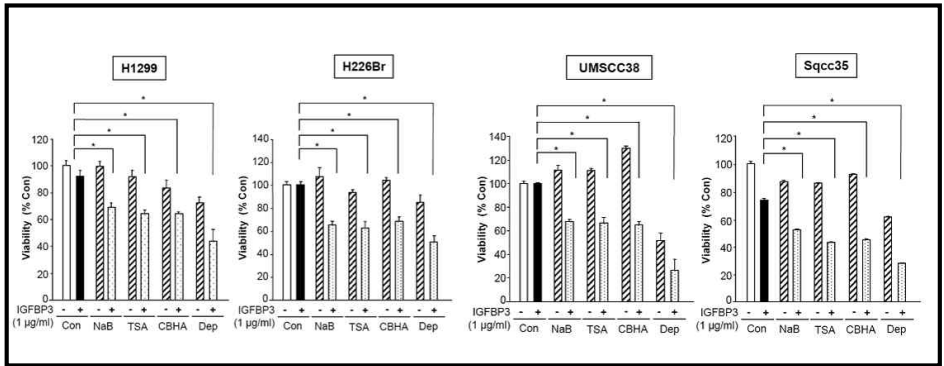


그림 K. recombinant IGFBP-3와 HDAC 억제제의 병행사용에 의한 세포성장 억제 상승효과 (MTT)

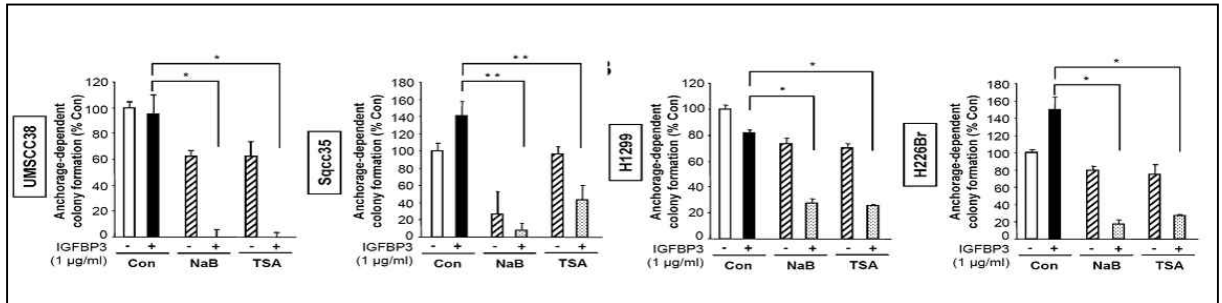


그림 L. recombinant IGFBP-3와 HDAC 억제제의 병행사용에 의한 세포성장 억제 상승효과 (colony formation assay)

-> HDAC inhibitor 와 IGFBP-3의 병행투여에 의한 향상된 세포증식 억제는 암세포의 apoptosis 의 증가에 의해 유도되었으며 이를 FACS 및 단백질 분석으로 확인

: 세포주기에 관련된 유전자에는 변화가 없었음.

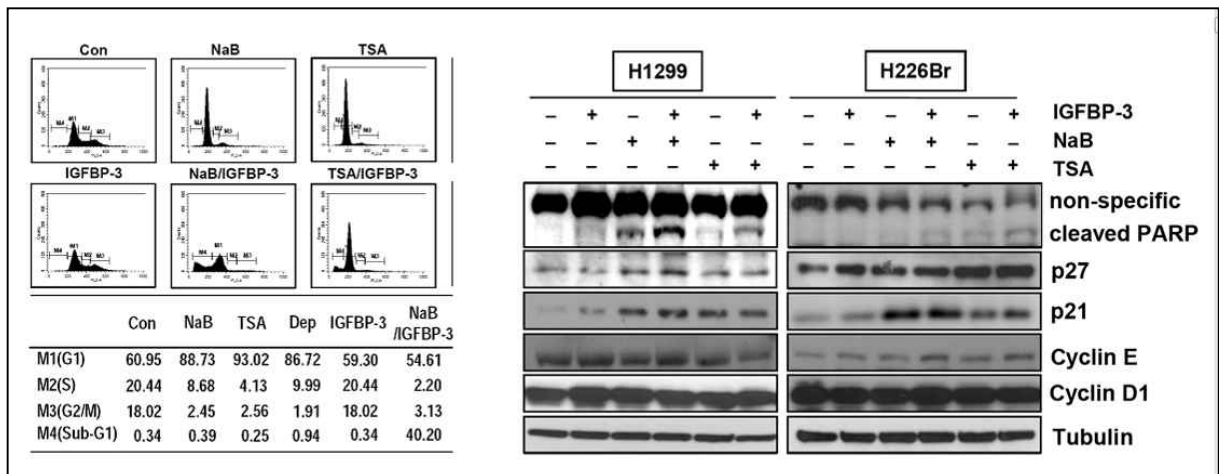


그림 M. IGFBP-3와 HDAC 억제제의 병행 투여에 의한 apoptosis의 증가

-> HDACi에 의한 IGFBP-3 stability 향상

: H1299 폐암세포주에서 recombinant IGFBP-3와 HDAC 억제제를 12시간 처리한 결과 3배이상 stability가 증가하는 것을 확인

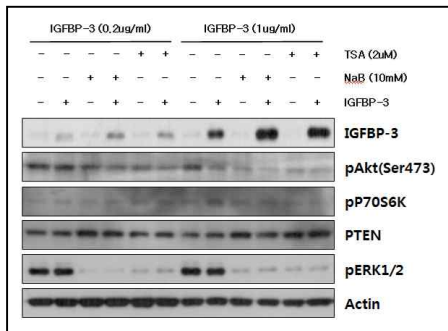


그림 N. HDAC 억제제에 의한 IGFBP-3의 stability 증가

-> PKC억제를 통한 HDACi에 의한 IGFBP-3 stability 향상

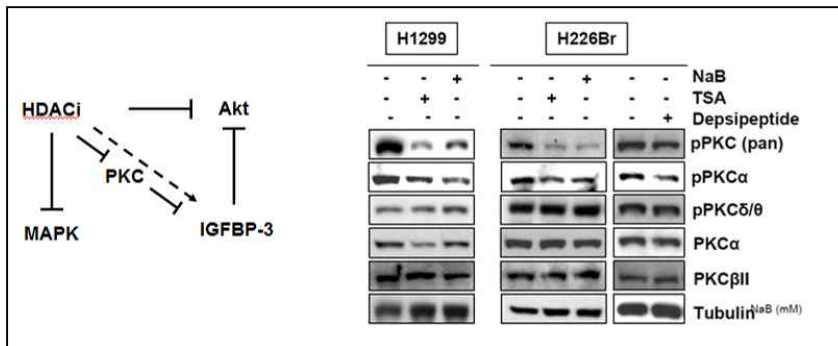


그림 O. HDAC억제제에 의한 PKC 조절

마. Glucosamine의 IGF-1R/Akt 경로 조절에 의한 항암 효과 확인

: 1950년대부터 항암 효과가 있다고 알려져 있는 glucosamine의 항암효과에 대한 기전이 최근알려지기 시작하였음. HIF-1a, p70s6k 등이 glucosamine의 표적이라는 논문들이 최근 보고됨. 이러한 표적들의 상위에 공통적으로 IGF-1R/Akt 유전자 위치해 있어 glucosamine의 IGF-1R에 대한 영향을 확인해보았음.

-> 폐암에서 glucosamine에 의한 IGF-1R/Akt 경로 조절 연구

: Glucosamine의 폐암세포주에 대한 세포증식 억제효과 확인 (MTT)

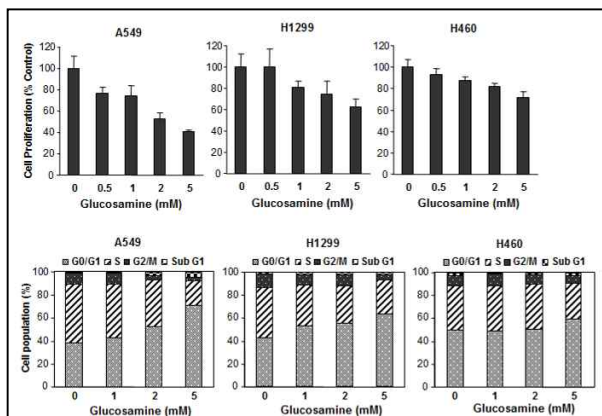


그림 P. Glucosamine의 폐암세포주 증식 억제 분석 (MTT, FACS)

(MTT assay, western blotting)

-> 폐암에서 glucosamine에 의한 apoptosis 유도 및 세포주기 변화
 : Glucosamine의 폐암세포주에 대한 세포증식 억제효과 확인 (MTT)

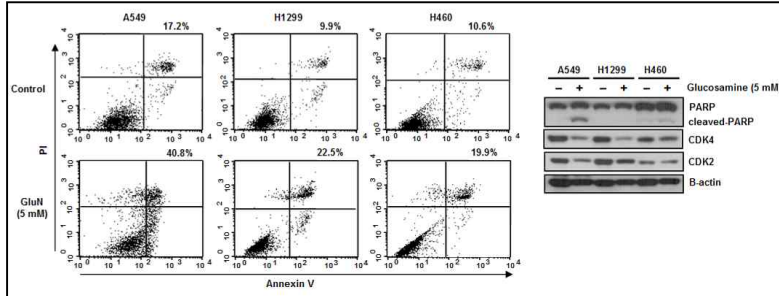


그림 Q. Glucosamine의 폐암세포 cell cycle에 대한 영향

-> TGase 억제제로 알려진 glucosamine과 항암효과와의 연관성 확인 (siRNA, western blotting)
 : Glucosamine의 TransglutaminaseII (TG2) 억제효과가 보고되었으므로 세포주에 따른 다른 증식억제효과가 TG2 발현양과 관련이 있는지 확인

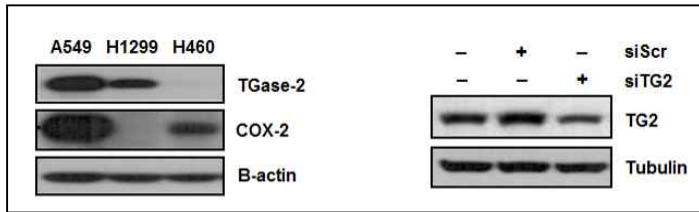


그림 R. 폐암세포주에서 TG2의 발현 및 siTG2의 특이적 발현 억제효과

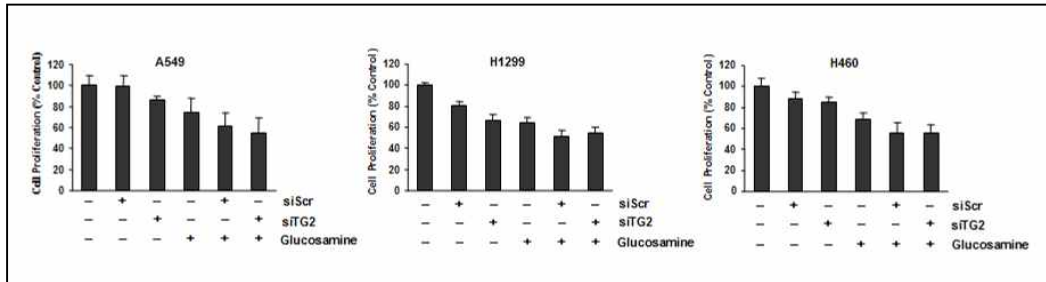


그림 S. TG2발현 억제후 glucosamine의 세포증식 억제효과

-> Glucosamine에 의한 IGF-1R 발현 변화
 : Glucosamine에 의해 IGF-1R/Akt 경로 조절되는 것을 확인

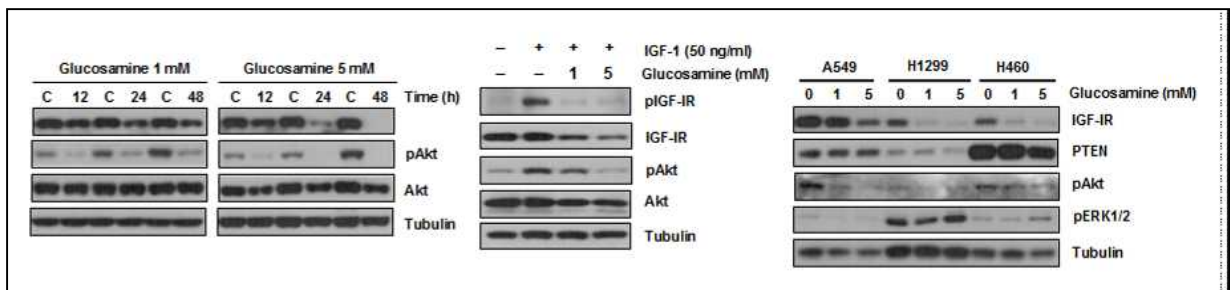


그림 T. 폐암세포주에서 Glucosamine에 의한 IGF-1R/Akt 발현 변화

바. SCH66336의 IGF-1R 억제에 의한 전이억제효과

: ras 억제제로 개발되었으나 Hsp90 또는 IGF-1R/Ak 경로를 조절하여 암세포성장을 억제한다고 알려진 SCH66336을 이용하여 암 전이 억제 효과 검증.

-> SCH66336의 암세포 전이 억제 효과 확인을 위해 두경부암 세포주를 이용하여 migration, invasion assay를 실시한 결과 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 조건하에서 migration, invasion을 억제하는 것을 확인함.

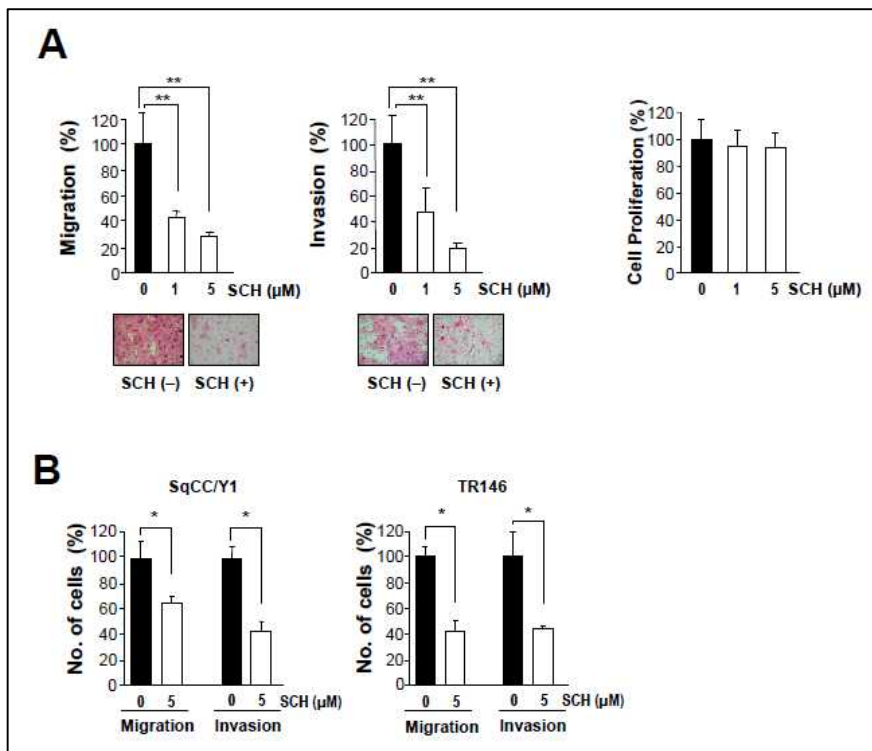


그림 U. 두경부암세포주에서 SCH66336에 의한 migration 또는 invasion 억제

-> SCH66336의 항전이 효과의 ras 경로와의 관련성 확인을 위해 H-ras 또는 RhoB 유전자를 siRNA를 이용하여 억제한 후 invasion 억제효과가 일어나는지 확인한 결과 H-ras 또는 RhoB 유전자와 무관하게 SCH66336이 두경부암세포의 invasion을 억제하는 것을 확인함.

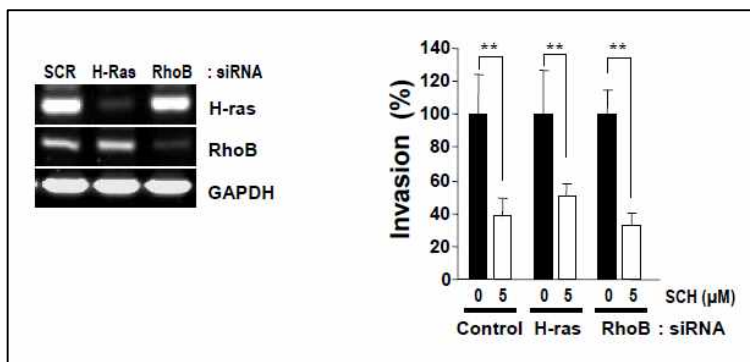


그림 V. H-ras 또는 RhoB siRNA transfection 후 SCH66336의 invasion 억제 효과

-> 전이와 관련된 유전자에 대한 SCH66336의 영향을 확인하기 위해 gelatin 또는 fibrinogen/plasminogen zymography를 실시한 결과 uPA, MMP-9 그리고 MMP-2의 activity가 SCH66336에 의해 감소되는 것을 세포주 및 동물실험에서 확인함.

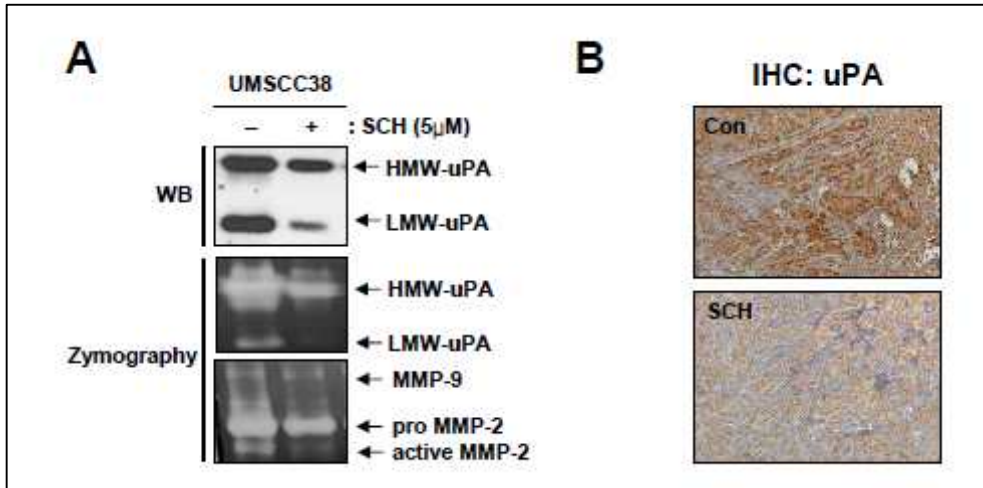


그림 W. 세포주 및 orthotopic 혀암 모델에서 SCH66336에 의한 uPA, MMP-2, 그리고 MMP-9의 억제

-> SCH66336의 전이 억제효과가 uPA 감소에 의해 발생하는 지 확인하기 위해 uPA를 발현하는 adenovirus를 이용하여 과발현시킨 후 SCH66336에 의한 전이 효과 확인 결과 SCH66336에 의해 유도된 전이가 uPA 과발현에 의해 감소되는 것을 확인함.

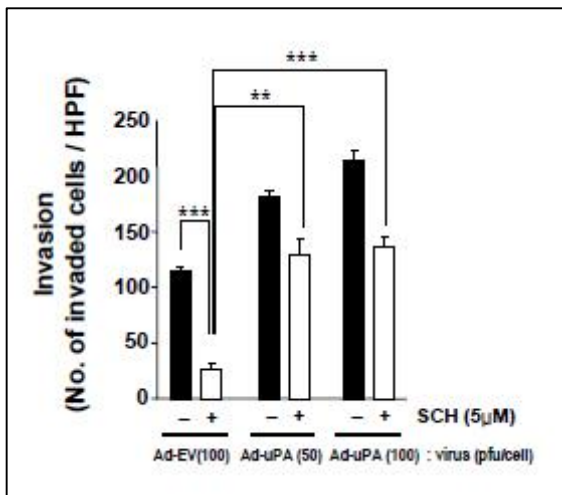


그림 X. uPA 과발현에 의한 SCH66336 유도 invasion 억제효과 감소

-> SCH66336에 의한 uPA 억제 및 invasion 감소가 IGF-1R pathway와 연관성이 있는지 확인하고자 IGF-1R pathway 관련 유전자들의 발현을 확인한 (Western blotting)

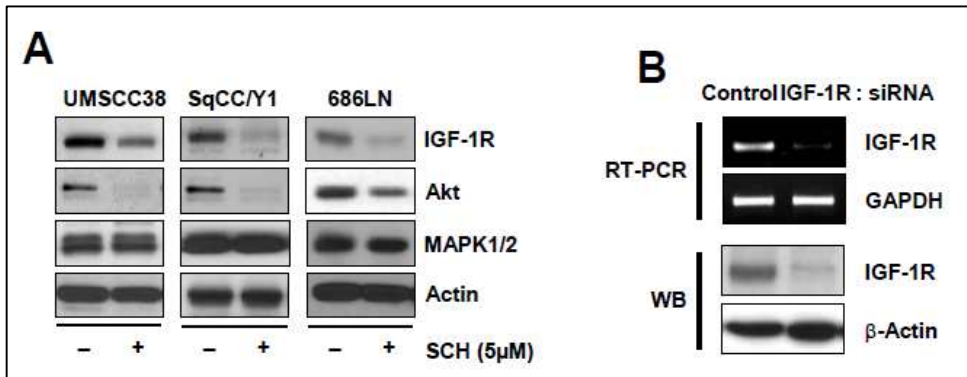


그림 Y. SCH66336의 IGF-1R 경로 유전자들에 대한 영향

-> SCH66336에 의한 uPA 억제 및 invasion 감소가 IGF-1R pathway와 연관성이 있는지 확인하고자 IGF-1R 또는 Akt siRNA를 이용하여 invasion assay를 실시함.

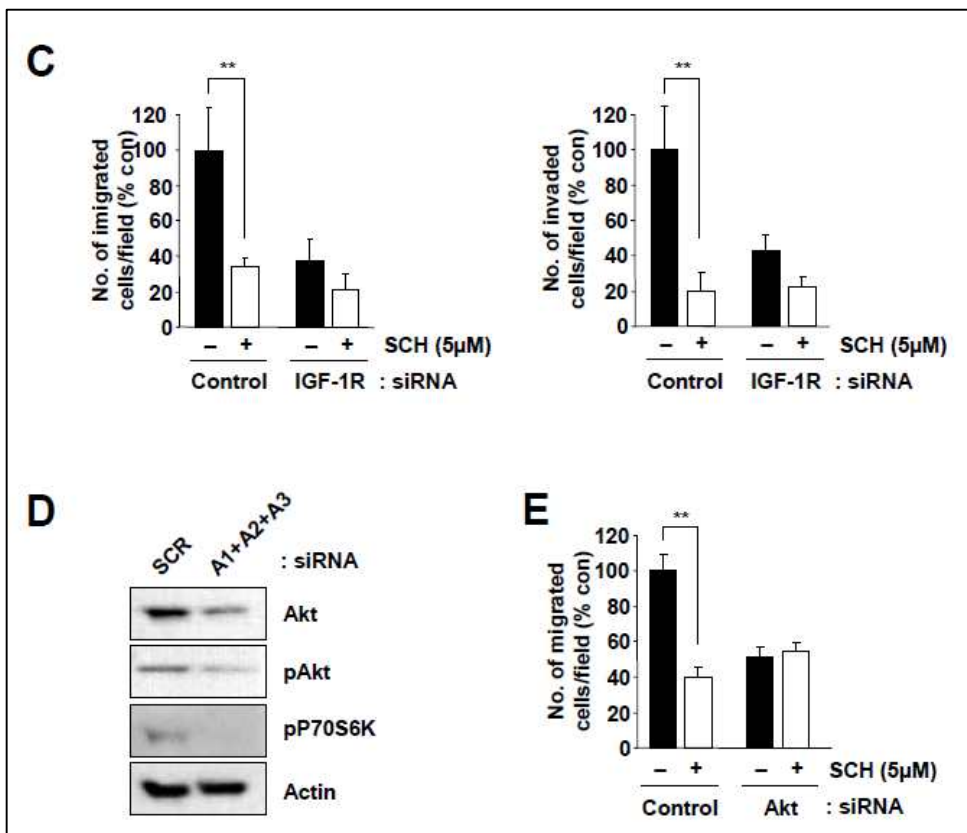


그림 Z. SCH66336에 의한 invasion 억제는 IGF-1R 의존적임

3. 연구결과 고찰 및 결론

- 최근 많은 tyrosine kinase activity를 갖고 있는 growth factor receptor들이 암발생 및 악성화에서 중요하다고 알려져있음 (1).
- 이러한 receptor를 통한 신호전달은 세포주기와 apoptosis 조절, 암세포와 주변환경과의 반응 조절, 그리고 지속적인 종양의 성장을 조절함.

- 여러 growth factor중 최근 IGF가 IGF-1R를 통한 PI3K신호전달을 통해 암세포의 성장 및 apoptosis 억제에 기여한다고 알려짐 (2).
- 세포주를 이용한 실험 또는 epidemiologic 결과들에 의하면 IGF-1R결로의 활성화는 폐, 유방, 전립선, 췌장, 간, 그리고 대장암등의 발생에 중요하다고 알려져 있음 (3-9).
- 폐암발생에 있어서 IGF-1R 경로의 변화를 확인하기 위해서 정상인간기관지상피세포 (NHBE)를 불활화시킨 BEAS-2세포와 이 세포로부터 유래되어 각각 점차 악성화 되어가는 1799, 1198, 1170 세포에서 IGF-1R의 발현과 활성화를 비교한 결과 중앙형성을 하는 성질을 갖추는 과정에 있어서 IGF-1R의 활성화된 형태인 pIGF-1R의 발현은 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었음
- 항암제 내성을 획득한 암세포에서 전이 능력을 획득하는 과정에서 IGF-1R 또는 하위 유전자인 Akt 경로의 역할을 확인하기 위해 Doxorubin 내성 MCF-7 를 이용하여 전이 능력 및 관련 유전자의 변화를 확인한 결과 내성의 획득 과정중 EGFR, IGF-1R의 활성화 및 Cox-2의 발현 증가를 확인하였음.
- 또한 EGFR, IGF-1R, Cox-2 에 대한 특이성 억제제 및 siRNA를 이용한 실험결과 전이관련 유전자들의 관련성 및 표적으로서의 효용성을 확인하였음.
- IGF-1R 경로를 억제할 수 있는 새로운 인자로서 IGFBP-3가 제시되고 있으나 짧은 stability로 인하여 그 효용성이 제한적이었음.
- 암세포에 IGFBP-3와 HDAC inhibitor를 병행투여한 결과 유의성 있는 상승효과를 관찰할 수 있었음.
- HDAC inhibitor가 IGFBP-3의 stability를 증가시켰으며 결과적으로 PI3K/Akt경로를 보다 오랫동안 억제할 수 있었음.
- HDAC inhibitor는 IGFBP-3의 stability 를 감소시키는 PKC의 activity를 감소시켰으며 이로 인해 IGFBP-3가 보다 오래 유지될 수 있었음.
- Glucosamine은 관절염 치료 보조제로서 사용되는 약물로서 최근 항암효과에 대한 연구가 시작되고 있으며 이에 대한 분자기전의 분석이 필요한 상황이었음 (10, 11).
- Glucosamine은 G1 cell cycle arrest 를 유도할 수 있으며 p21의 발현 유도를 cyclin D1의 증가가 확인되었음 (12).
- 최근 glucosamine의 표적유전자로서 단백질 translation 과 관련 있는 p70S6K, 현관신생과 관련 있는 HIF-1 α , 염증인자인 Cox-2 등이 보고되었음 (13-16).
- 보고된 이러한 유전자들이 IGF-1R/Akt 경로와 연관성이 있다는 사실에 근거하여 glucosamine이 IGF-1R/Akt 경로에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였고 glucosamine의 항암제로서의 가치를 연구하였음.
- Glucosamine 을 암세포에 처리한 결과 1-5mM의 농도에서 sensitive한 세포주와 상대적으로 resistant한 세포주들을 구별할 수 있었음.
- Glucosamine에 대해서 sensitive한 세포주들은 1-5mM의 농도에서 apoptosis가 유도되었으며

Transglutaminase 2 또는 Cox-2 의 발현과는 상관관계가 없었음.

- Glucosamine 에 대해 sensitive 한 세포주들에서는 IGF-1R/Akt 경로가 억제되었음.
- 흥미롭게도 PI3K3CA 또는 PTEN 의 mutation 상태가 glucosamine의 반응과 관련이 있었음.
- Resistant 세포주에서 PI3K 경로를 다른 약물로 억제했을 경우, glucosamine에 대해서 sensitization되는 것을 확인하였음.
- 결과적으로 glucosamine이 IGF-1R 단백질의 glycosylation을 억제함으로써 stability를 감소시키는 것을 확인하였음.
- 이러한 결과들은 IGF-1R pathway가 악성암의 특징인 세포성장, apoptosis 억제, invasion, metastasis, 혈관신생, 내성 등에 있어서 중요한 역할을 하며 효과적인 IGF-1R pathway 억제가 효과적인 치료방법이 될 수 있다는 것을 의미함.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Elevated epithelial insulin-like growth factor expression is a risk factor for lung cancer development	오승현 (제1)	Cancer Res (7.54)	2009; 69(18): 7439-7448	국외 SCI	없음
Glucosamine has novel IGF-IR/Akt - dependent anticancer activities	오승현 (교신)	Molecular Cancer (4.16)	in revision	국외 SCI	0810420-1
Anti-invasive effect of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336 through blockade of the insulin-like growth factor-1 receptor pathway in human head and neck cancer	오승현 (제1)	Int J Can (4.72)	in revision	국외 SCI	0810420-1
Histone Deacetylase Inhibitors Enhance the Apoptotic Activity of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 by Blocking PKC-Induced IGFBP-3 Degradation	오승현 (제1)	Mol Cancer Ther (4.95)	in submission	국외 SCI	0810420-1
Role of Cox-2 expression in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells	오승현 (교신)	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (4.09)	in preparation	국외 SCI	0810420-1
Role of ginsenoside Rp1 in inhibiting	오승현 (교신)	Planta Med	in preparation	국외 SCI	0810420-1

IGF-1R expression in breast cancer cells		(2..)			
--	--	-------	--	--	--

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
 - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
PI3K/Akt 경로 활성이 폐암 세포의	1차년도	In vitro 폐 발암 모델에서 PI3K/Akt 경로를 확인	PI3K/Akt 경로의 활성화	100	30
		BEAS-2B 세포주를			

invasiveness 및 bronchial epithelial cell의 oncogenic transformation에 미치는 효과 분석과 새로운 PI3K 활성 저해 물질에 의한 관련 폐암 세포 조절		이용하여 NNK에 의한 발암 과정에서 PI3K/Akt 경로의 변화	성화 또는 PTEN의 비활성화		
	2차년도	IGF-1R 경로를 억제할 수 있는 IGFBP-3를 이용한 단독 또는 병행 항암 효과 확인	IGFBP-3의 stability 증진을 통한 항암효과 증대 확인	100	60
		IGF-1R/Akt 경로가 활성화된 폐암 세포주를 이용한 동물 모델 확립과 항암 후보물질 효능 확인	동물모델 확립 및 후보물질 효능 확인		
	3차년도	HDAC억제제에 의한 IGFBP-3 stability 향상 I	HDAC억제제에 의한 IGFBP-3 stability 향상 기전 확인	100	100
항암제 내성 세포주의 폐전이능력 획득 기전 연구		IGF-1R/Akt 경로를 통한 항암제 내성 세포주의 전이 기전 확인			

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
폐암의 발생단계에서 IGF-1R 경로의 중요성을 확인하였는가?	in vitro carcinogenesis 모델을 이용하여 암세포의 악성화 과정중 IGF-1R 경로의 활성화를 확인하였음.
IGF-1R 경로를 억제할 수 있는 억제제 또는 보조제로 효과적으로 암을 억제할 수 있는 방법을 발견하였는가?	ras 억제제로 개발되었으나 임상적으로 효과가 미비한 SCH66336을 이용하여 IGF-1R를 새로운 분자표적을 제시하여 새로운 효용성을 밝혔음. 짧은 stability 때문에 그 사용이 제한적인 IGFBP-3를 HDAC inhibitor와 병행 사용하여 효과적인 중앙억제 및 분자기전을 제시하였음. Glucosamine이라는 관절염 보조제를 이용하여 항암제로서의 가능성을 제시하였음.
항암제 내성 및 전이능력의 획득 과정에서 IGF-1R/Akt 경로의 중요성 및 역할을 확인하였는가?	Doxorubicin에 대한 내성 세포주에서 내성세포주로 변화되는 과정중 전이능력이 획득되는 것을 확인하였으며 이러한 과정에서 IGF-1R, EGFR, Cox-2 등의 변화가 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	4	Glucosamine has novel IGF-IR/Akt - dependent anticancer activities - Molecular Cancer (4.16) -> in revision Anti-invasive effect of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336 through blockade of the insulin-like growth factor-1 receptor pathway in human head and neck cancer - Int J Can (4.72) -> in revision Histone Deacetylase Inhibitors Enhance the Apoptotic Activity of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 by Blocking PKC-Induced IGFBP-3 Degradation - Mol Cancer Ther (4.95) -> in submission Role of Cox-2 expression in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells - JPET (4.09) -> in preparation
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위 등을 구체적(특히 시간적 구체성, 예를 들어 몇 년 안에 치료기술 실용화 등)으로 기술하되, 참여기업이 포함되어 있는 과제인 경우 기업과 연계한 활용방안에 대해서도 기술함
- 추가 후속연구의 필요성에 대해서도 간략하게 기술함

6. 참고문헌

1. Baserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. Cell 1994; 79: 927-30.
2. Prager D, Li HL, Asa S, Melmed S. Dominant negative inhibition of tumorigenesis in vivo by human insulin-like growth factor I receptor mutant. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 2181-5.
3. Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. Eur J Cancer 2000; 36: 1224-8.
4. Surmacz E. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2000; 5: 95-105.
5. Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M. Insulin-like growth factors and prostate

- cancer. *World J Urol* 2001; 19: 225-33.
6. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001; 131: 3109S-20S.
 7. Sachdev D, Yee D. The IGF system and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 197-209.
 8. Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-44.
 9. Druckmann R. Progestins and their effects on the breast. *Maturitas* 2003; 46: S59-69.
 10. Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP, et al. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD002946.
 11. Matheson AJ, Perry CM. Glucosamine: a review of its use in the management of osteoarthritis. *Drugs Aging* 2003; 20: 1041-60.
 12. Masson E, Lagarde M, Wiernsperger N, El Bawab S. Hyperglycemia and glucosamine-induced mesangial cell cycle arrest and hypertrophy: Common or independent mechanisms? *IUBMB Life* 2006; 58: 381-8.
 13. Jang BC, Sung SH, Park JG, et al. Glucosamine hydrochloride specifically inhibits COX-2 by preventing COX-2 N-glycosylation and by increasing COX-2 protein turnover in a proteasome-dependent manner. *J Biol Chem* 2007; 282: 27622-32.
 14. Kim DS, Park KS, Jeong KC, Lee BI, Lee CH, Kim SY. Glucosamine is an effective chemo-sensitizer via transglutaminase 2 inhibition. *Cancer Lett* 2009; 273: 243-9.
 15. Oh HJ, Lee JS, Song DK, et al. D-glucosamine inhibits proliferation of human cancer cells through inhibition of p70S6K. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 840-5.
 16. Park JY, Park JW, Suh SI, Baek WK. D-glucosamine down-regulates HIF-1alpha through inhibition of protein translation in DU145 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 96-101.

7. 첨부서류