



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월09일
 (11) 등록번호 10-1469917
 (24) 등록일자 2014년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
 G01N 33/574 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0007147
 (22) 출원일자 2013년01월22일
 심사청구일자 2013년01월22일
 (65) 공개번호 10-2014-0094763
 (43) 공개일자 2014년07월31일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020060031809 A
 KR1020120049758 A
 JP2012506238 A
 US20070105133 A1

(73) 특허권자
 한국원자력의학원
 서울특별시 노원구 노원로 75 (공릉동)
 (72) 발명자
 황상구
 서울 노원구 덕릉로71길 5, 102동 603호 (중계동, 성원아파트)
 김재성
 서울 노원구 공릉로46길 19, 107동 1104호 (공릉동, 한보아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

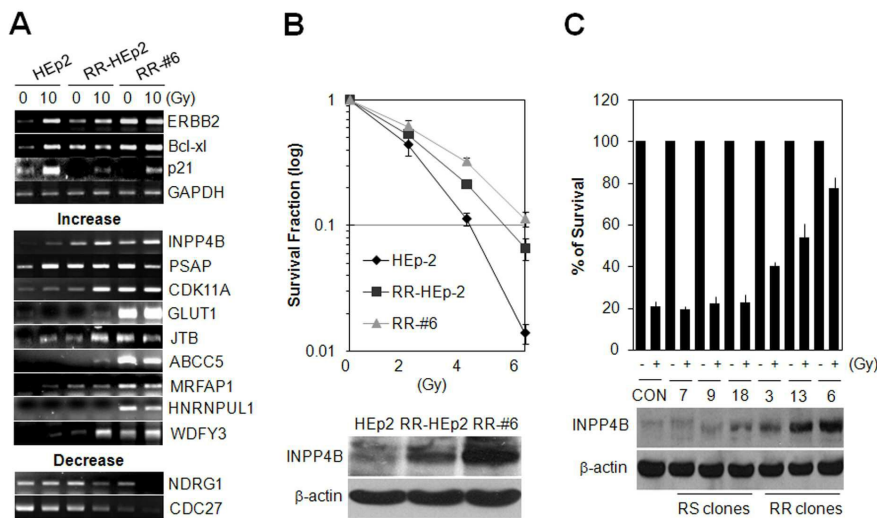
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **P S A P를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 암의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 마커를 선별하고, 상기 마커의 존재를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 키트 및 이를 이용하여 방사선 저항성 또는 민감성을 진단 또는 암 환자의 방사선 치료 예측방법에 관한 것이다. 본 발명의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 사용함으로써, 방사선 치료대상 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성을 판단하여 맞춤형 방사선 치료를 제공하며, 암환자에서 방사선 치료 적용 대상의 다양화를 통해 치료 효과 증진 및 부작용을 감소시킬 수 있다. 또한 방사선 치료환자의 예후를 판단(치료효과의 예측이 가능)하는데 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

엄홍덕

서울특별시 종로구 승인2동 청계현대힐스테이트아파트 105동 306호

박중국

서울 강동구 올림픽로98가길 47, 1110호 (암사동, 중앙하이츠아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M2A2A7012007

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원자력연구 개발사업(방사선기술 개발사업)

연구과제명 방사선 저항성 표적인자 응용 복합치료기술 개발

기여율 1/1

주관기관 한국원자력의학원

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

PSAP(Prosaposin, NCBI GenBank Gene ID: 5660) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 CDK11A(Cell division cycle2-like 2, NCBI GenBank Gene ID: 728642), MRFAP1(Mof4 family associated protein 1, NCBI GenBank Gene ID: 93621), HNRNPUL1(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1, NCBI GenBank Gene ID: 11100), WDFY3(WD repeat and FYVE domain containing 3, NCBI GenBank Gene ID: 23001), CDC27(Cell division cycle 27 homolog, NCBI GenBank Gene ID: 996) 및 INPP4B(Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II, NCBI GenBank Gene ID: 8821)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는, 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 INPP4B 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함하는 조성물은 항암제 저항성 진단을 추가로 할 수 있는 것인, 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것인 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유전자의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, 마이크로어레이 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 후두암세포의 방사선 저항성 진단용 키트.

청구항 9

PSAP 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여, 분리된 생물학적 시료로부터 mRNA 수준을 측정하는 단계;

상기 mRNA 수준의 변화를 정상 대조군 시료의 mRNA 수준과 비교하는 단계; 및

상기 생물학적 시료의 mRNA 수준이 정상 대조군 시료보다 높으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사성 저항성 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계; 및

상기 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 또는 INPP4B 유전자의 mRNA 수준이 대조군 시료보다 높으면; 또는 상기 CDC27 유전자의 mRNA 수준이 대조군 시료보다 낮으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사성 저항성 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 11

PSAP 유전자의 단백질에 특이적인 항체를, 분리된 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성으로 단백질 수준을 확인하는 단계;

상기 단백질 수준의 변화를 정상 대조군 시료의 단백질 수준과 비교하는 단계; 및

상기 생물학적 시료의 단백질 수준이 정상 대조군 시료보다 높으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사성 저항성 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 단백질 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계; 및

상기 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 또는 INPP4B 유전자의 단백질 수준이 대조군 시료보다 높으면; 또는 상기 CDC27 유전자의 단백질 수준이 대조군 시료보다 낮으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사성 저항성 진단을 위한 정보의 제공 방법.

청구항 13

방사선 치료를 받은 환자의 분리된 시료로부터 PSAP 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하는 단계; 및

상기 환자의 분리된 시료의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준이 정상 세포보다 높으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보의 제공 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계; 및

상기 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 또는 INPP4B 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준이 정상 세포보다 높으면; 또는 상기 CDC27 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준이 정상 세포보다 낮으면 방사성 저항성으로 판단하는 단계를 포함하는, 후두암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보의 제공 방법.

청구항 15

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 암의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 마커를 선별하고, 상기 마커의 존재를 측정하는 제제를 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 키트 및 이를 이용하여 방사선 저항성 또는 민감성을 진단 또는 암 환자의 방사선 치료 예측방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 현재 전세계적으로 현대인의 건강 및 죽음을 결정하는 가장 큰 요인으로 대두되고 있다. 통계적으로 암 환자의 약 30-50%는 치료시기 중 한 시점에 방사선 치료를 받는다. 그러나, 방사선 치료의 유효성은 암의 성질, 환자 및 방사선이 기타 치료와 조합되는 것에 따라 다양하다. 일반적으로 방사선 치료가 널리 시행되고 있는 암으로는 두경부암, 후두암, 자궁경부암, 인두암, 폐암, 뇌암, 유방암, 대장암 등이 있다. 이들 암종이 방사선 치료의 주요 대상이 될지라도 방사선 치료시 반응이 좋지 않은 경우가 빈번하므로 치료 효율을 높이는 전략이 필요하다. 이와 더불어 방사선 치료가 잘 되어 초기반응은 좋을지라도 재발하는 경우가 빈번하여 재발 암에 대한 대책을 세우는 것도 방사선 치료의 효율을 높이는데 중요하다. 암세포에 대한 방사선 치료의 감수성의 차이가 존재하지만 방사선 치료 전에 개인별로 방사선에 대한 감수성을 예측할 수 있는 기술을 개발하면, 개인별로 방사선 처리량을 조절하여 암을 치료함으로써, 개인에게 가장 적합한 방사선 치료를 제공할 수 있다.

[0003] 이에, 방사선 치료 전에 암세포의 방사선에 대한 감수성을 알아보기 위해, 암세포를 분리하여 방사선을 조사한 후, 암세포의 사멸 정도를 정확하고 신속하게 분석하는 방법이 필요하다. 가장 직접적이고 이상적인 방법은 세포에 트립판 블루(trypsin blue) 등을 처리한 후 현미경과 세포수 측정기를 이용하여 살아있는 세포를 세는 것이지만 시간과 너무 많은 노력이 요구되며, 검체 수가 많을 경우에는 사용할 수가 없는 문제점이 있다. 조직학적 소견이나 병기가 같은 암 환자의 경우에도 방사선 감수성은 매우 다르며, 이에 영향을 주는 많은 인자들이 있는 것으로 알려져 있다. 종양이 방사선 저항성을 가지게 되는 이유 중 가장 큰 요인으로 종양 세포의 내적인 방사선 감수성이다. 암세포가 방사선에 조사되면 복잡한 분자생물학적 변화에 의해 사망하거나 회복이 되는데 이러한 과정의 신호전달에 관여된 유전자와 단백질의 기능을 조절하는 기전들이 밝혀졌으며 근래에 와서 이러한 모든 것이 방사선 치료의 효과를 증진시킬 수 있는 표적이 될 수 있는 것으로 알려졌다. 지금까지 방사선 저항성에 대한 연구들이 진행되어 이 중 일부는 방사선 저항성을 극복하기 위한 방사선 민감제의 개발에 기초가 되고 있다. 그러나 종양의 선천적인 또는 후천적인 방사선 저항성은 방사선치료 효과를 제한하는 일부의 세포가 생존하도록 한다. 이러한 현상은 방사선 치료 후 후두암 환자의 좋지 않은 예후를 나타낸다. 일부 연구들은 방사선치료에 대한 진단 및 치료지표로 사용할 수 있는 종양 방사선저항성 마커를 발표하였다. 암세포는 종종 만성 방사선 손상으로부터 보호하기 위한 한 방법으로 세포구성요소를 바꾼다. 예를들어 EGFR(epidermal growth factor receptor), PI3K(phosphoinositide 3-kinase/Akt 및 RAS와 같은 증식 조절 단백질들은 방사선저항성 종양에서 활성화되거나, 과발현된다. p53 또는 Bcl-2/-x1의 상태/발현은 세포주기 및 세포사멸에 중요한 역할을 하며, 종양 방사선저항성과 관련이 있으며 peroxiredoxin-II 및 Mn-SOD(manganese superoxide dismutase)와 같은 세포 항산화 단백질은 자주 암세포의 산화 스트레스 내성에 관여한다. 게다가, 여러 연구자들은 방사선 치료가 P-당단백질 및 다중약물내성과 관련된 단백질을 조절함으로써 후천적 방사선 내성 및 항암제 약물 내성을 일으킬 수 있다고 보고하고 있다. 비록, 이러한 연구결과들이 암세포의 방사선 내성 및 항암제 약물내성에 대하여 일부 이해시킬 수 있을지라도, 이러한 현상을 기반으로 하는 특정 암 종류 및 자세한 분자기작의 바이오마커는 거의 없다. 현재까지 밝혀진 방사선 저항성과 관련된 인자들로는 시클로옥시게나아제-2(Terakado N, Shintani S, Yano J, Chunnan L, Mihara M, Nakashiro K, et al., Oral Oncol 2004; 40:383-9), 상피세포 성장인자 수용체(EGFR)(Milas L, FanZ, Andratschke NH, Ang KK., Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 58(3); 966-71), 시클린 D1(Milas L, Akimoto T, Hunter NR, Mason KA, Buchmiller L, Yamakawa M, et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002;52; 514-21), 인슐린-유사 성장인자 1 수용체(IGFBP-1 receptor), 망간 슈퍼옥사이드 디스뮤티아제, 수르비빈(survivin) 등이 있으나 아직까지는 부분적으로 기전이 밝혀져 있으며 방사선 치료 결과의 유용한 예측 인자로 활용되고 방사선 민감도를 증가시킬 수 있는 마커는 미비한 실정이다.

[0004] 후두암은 두경부암에서 가장 큰 하위군으로 세계에서 6번째로 빈번히 발생하는 암이다. 흡연과 알콜 소비가 증가하면서 후두암종의 주요 위험인자가 되며, 사람 유두종 바이러스 또한 또 하나의 잠재적 요소로 작용한다. 악성종양을 제거하기 위한 주요 치료방법 중 하나의 방법으로 방사선치료를 많이 사용하며, 일반적으로 후두암을 치료하기 위해 외과적인 수술, 화학요법과 함께 방사선 치료를 병행하며 다양한 형태의 암을 치료하기 위해 통상적으로 이용된다. 따라서 이러한 후두암에서 저항성을 진단할 수 있는 마커가 필요한 실정이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 암의 방사선 저항성 여부를 진단할 수 있는 마커를 찾기 위해 예의 노력한 결과, 방사선 저항성 세포주를 구축하고 방사선 저항성 세포주와 대조군 세포주를 분석하여 발현의 차이를 보이는 유전자를 확인하여, 신규한 방사선 저항성 진단용 마커 및 이의 용도에 대한 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 PSAP(Prosaposin, NCBI GenBank Gene ID: 5660) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 암 환자의 방사선 저항성 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 암환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 양태로서, 본 발명은 PSAP(Prosaposin, NCBI GenBank Gene ID: 5660) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 용어, "PSAP(Prosaposin)"란 당단백질로 사포신 A, B, C 및 4의 전구체로, 막주위의 지질 기질을 분리하여 수용성 절단효소 (degradative enzyme)에 접근을 보다 용이하게 한다. 그러나 PSAP와 방사선 민감성 및 저항성의 연관성에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다. PSAP와 방사선 민감성 및 저항성과의 관계에 대해서는 본 발명자들에 의해 처음으로 구명되었다.

[0012] 바람직하게는 상기 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물은 PSAP(Prosaposin, NCBI GenBank Gene ID: 5660) 이외에도 CDK11A(Cell division cycle2-like 2, NCBI GenBank Gene ID: 728642), MRFAP1(Mof4 family associated protein 1, NCBI GenBank Gene ID: 93621), HNRNPUL1(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1, NCBI GenBank Gene ID: 11100), WDFY3(WD repeat and FYVE domain containing 3, NCBI GenBank Gene ID: 23001) 및 CDC27(Cell division cycle 27 homolog, NCBI GenBank Gene ID: 996)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함할 수 있다. 상기 유전자는 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개일 수 있으며, 방사선 저항성 또는 방사선 민감성 진단용 마커로 사용될 수 있다.

[0013] 상기 6개 유전자인 PSAP, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 및 CDC27과 방사선 민감성 및 저항성의 연관성에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다. 상기 6개 유전자와 방사선 저항성 또는 민감성과의 관계에 대해서는 본 발명자들에 의해 최초로 규명되었으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면, PSAP, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1 또는 WDFY3이 방사선 저항성 세포주에서 정상 세포주보다 과발현되고, CDC27이 저발현되는 것을 확인하여(표 1, 도 1A), 상기 6개 유전자가 방사선 저항성 또는 민감성 유전자임을 확인하였다.

[0014] 또한, 상기 방사선 저항성 또는 방사선 민감성 진단용 조성물은 INPP4B(Inositol polyphosphate-4-phosphatase

type II, NCBI GenBank Gene ID: 8821) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 INPP4B 유전자는 항암제 저항성 진단을 추가로 할 수 있는 마커일 수 있다. 항암제는 본 발명의 마커 유전자로 저항성을 진단할 수 있는 항암제는 제한 없이 포함되나, 그 예로 블레오마이신, 시스플라틴, 에토포시드, 독소루비신일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면 INPP4B가 항암제에 저항성을 갖는 마커 유전자임을 확인하였다(도 5).

- [0015] 상기 유전자들의 정보는 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NCBI GenBank일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "방사선 저항성(radio-resistance)"은 방사선 조사에 의해 쉽게 영향을 받지 않으며, 방사선에 노출시 세포 복구 또는 증식에 거의 변화가 없는 상태를 말한다.
- [0017] 본 발명에서 용어 "방사선 민감성(radio-sensitive)"은 방사선 조사에 의해 쉽게 영향을 받으며, 방사선에 노출시 세포 복구 또는 증식에 변화를 보이는 상태를 말한다.
- [0018] 본 발명의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물은 정상 암세포 대비 방사선 저항성 암세포에서 차등적 발현수준을 갖는 유전자로 구성되어, 개체나 세포의 방사선 저항성을 판단할 수 있게 한다. 즉, 본 발명의 방사선 저항성 진단용 조성물의 발현 수준이 대조군 보다 높거나 낮은 개체나 암세포는 방사선 저항성 또는 민감성을 갖는 것으로 판단할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에서 방사선 민감성 진단용 마커로는 CDC27이 방사선 저항성 암세포주에서 상기 방사선 민감성 진단용 마커의 발현수준이 대조군 보다 낮게 발현되며, 반면에 방사선 저항성 진단용 마커로는 PSAP, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, 또는 INPP4B로 방사선 저항성 암세포주에서 상기 방사선 저항성 진단용 마커의 발현수준이 대조군 보다 높게 발현되는 것을 확인하였다.
- [0020] 방사선 치료 대상 암의 방사선 저항성 또는 민감성 여부 및 그 수준을 판단하면, 이를 반영하여 방사선 치료의 방사선 조사량을 정할 수 있기 때문에, 방사선 치료의 효율 및 치료 결과를 증진시킬 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란, 암세포 또는 암 질환을 가진 개체를 방사선 저항성 세포 또는 개체, 방사선 민감성 세포 또는 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 암세포에 비하여 방사선 저항성을 가진 암세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 (예: 단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다.
- [0022] 또한 본 발명의 상기 조성물에 의해 측정할 수 있는 암은 본 발명의 마커 유전자의 발현차이에 의해 구별할 수 있는 암은 제한 없이 포함되나, 바람직하게는 두경부암, 후두암, 자궁경부암, 인두암, 폐암, 뇌암, 유방암, 대장암 등이며, 보다 바람직하게는 폐암, 후두암, 대장암 또는 유방암이다.
- [0023] 생물학적 시료 중의 유전자 발현 수준은 mRNA 또는 단백질의 양을 확인함으로써 확인할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "mRNA 발현수준 측정" 이란, 방사선 저항성 및 민감성을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 상기 마커 유전자들의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 "단백질 발현수준 측정" 이란, 방사선 저항성 또는 민감성을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 상기 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 상기 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 공지의 데이터 베이스에 공지된 상기 유전자의 서열을 바탕으로 당업자가 다양한 프로그램을 이용하여 제작할 수 있다.

- [0027] 본 발명에서의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가다 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소탈렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 비오틴 등이 있다.
- [0028] 또한 상기 유전자의 단백질 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물이다.
- [0029] 본 발명에서의 용어, "항체"란, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기한 바와 같이 방사선 저항성 및 민감성 마커 단백질이 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 생성하는 것은 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기한 방사선 저항성 또는 민감성 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다. 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 과지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0031] 본 발명에서의 용어, "암세포"는 다세포 생물체의 조직 또는 기관에서 조절되지 않은 성장을 나타내는 임의의 세포를 말한다.
- [0032] 본 발명의 방사선 저항성 진단용 마커는 후두암세포주를 사용하여 방사선 저항성 세포주를 확립한 뒤 유전자 발현의 양을 대조군(정상 후두암세포;HEp-2 세포)과 비교하여 발굴하였으며, 이 마커들은 방사선 치료의 효과를 증진시키기 위해 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 방사선 저항성 세포주를 구축하여 확립된 방사선 저항성 세포주를 대상으로 방사선 저항성 여부를 판단하였다. 방사선 저항성 세포주와 대조군 세포주에서 RT-PCR 등으로 두 세포주간에 발현의 차이가 나는 유전자를 확인하였다. 방사선 저항성 세포주에서 대조군에 비해 낮은 발현량을 보이는 것으로 확인된 유전자는 염기서열을 분석해 본 결과, CDC27이며, 이와 반대로, 방사선 저항성 세포주에서 대조군에 비해 높은 발현량을 보이는 것으로 확인된 유전자는 염기서열을 분석해 본 결과, PSAP, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1 또는 WDFY3으로 모두 6개 였다. 이들 유전자는 아직까지 문헌에서 방사선, 특히 방사선 저항성과 민감성 연관된 기능을 갖는 것으로 개시된 바 없는 신규한 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 마커로 확인되었다.
- [0034] 본 발명에서의 용어, "방사선조사(irradiation)"란, 예를 들면, X-선, 자외선, 알파 입자 및 감마선을 포함하는 전자기 방사선 또는 알파 또는 베타 입자의 작용에 대한 노출을 포함한다.

- [0035] 본 발명에서의 용어, "그레이(Gy)"는 대표적인 생물학 조직 1kg에서 1J을 방출하는 방사선의 양이다.
- [0036] 또 하나의 양태로서 본 발명은 상기 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, 마이크로어레이 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 진단용 키트는 상기 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 사용하여 당업계에서 사용되는 통상의 방법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 상기 방사선 저항성 또는 민감성 유전자의 발현변화 측정은 본 발명에 따른 방사선 저항성 또는 방사선 민감성 진단용 마커를 포함하는 키트를 사용하여 수행할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서의 용어, "키트"란, PSAP 단독, 또는 추가로 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 단백질의 발현 수준을 확인하여 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성 여부를 진단할 수 있는 도구를 의미한다. 본 발명의 암세포의 방사선 저항성 여부 진단용 키트에는 방사선저항성 진단마커로서 PSAP 단독, 또는 추가로 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 발현수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 선택적으로 마커를 인지하는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0038] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 PSAP 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 암환자의 생물학적 시료로부터 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 상기 mRNA 수준의 변화를 정상 대조구 시료의 mRNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는 암 환자의 방사선 저항성 또는 민감성 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0039] 또한, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 암환자의 생물학적 시료로부터 mRNA 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계를 포함하는 암 환자의 방사선 저항성 또는 민감성을 진단을 위한 정보의 제공 방법을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0040] 또 하나의 양태로서 본 발명은 PSAP 유전자의 단백질에 특이적인 항체를 암 환자의 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성으로 단백질 수준을 확인하는 단계; 및 상기 단백질 형성량의 변화를 정상 대조군 시료의 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 암 환자의 방사선 저항성 또는 민감성 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [0041] 또한 CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 단백질 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계를 포함하는 암 환자의 방사선 저항성 또는 민감성 진단을 위한 정보의 제공 방법을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명의 목적상 암세포에서 CDC27 유전자의 mRNA와 단백질의 발현수준이 낮으면 방사선 저항성을 나타내는 암세포로 판단할 수 있으며, 반면에 상기 유전자의 발현수준이 높으면 방사선 민감성을 나타내는 암세포로 판단할 수 있다. 또한, PSAP, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 또는 INPP4B 유전자의 mRNA와 단백질의 발현수준이 높으면 방사선 저항성 암세포로 판단할 수 있고, 반면에 낮으면 방사선 민감성 암세포주로 판단할 수 있다.
- [0043] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 암환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 방사선 치료를 받은 환자의 시료로부터 PSAP 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 정상 세포의 발현 수준과 비교하여 방사선 저항성 진단용 마커를 검출하는 방법을 제공한다. 또한, CDK11A, MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3, CDC27 및 INPP4B로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 추가로 측정 및 비교하는 단계를 포함하는 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 마커를 검출하는 방법을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명의 방법에서, 상기 암세포는 두경부암, 후두암, 자궁경부암, 인두암, 폐암, 뇌암, 유방암, 대장암 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 상기 암세포는 폐암, 후두암, 대장암 또는 유방암 유래이다.
- [0044] 본 발명에서의 용어, "예후 예측"이란, 방사선 조사 후, 정상 대조군과 비교하여 방사선 저항성 암세포주에서 발현차이를 보이는 유전자를 통해 방사선 저항성 또는 민감성 암세포를 예측하는 것이다.

[0045] 본 발명에서의 용어, "차등적 발현"은 샘플 내 본 발명의 동일한 하나 이상의 바이오 마커의 발현 수준과 비교한 것으로서 하나의 샘플 내 바이오 마커의 mRNA의 양 또는 수준을 측정함으로써, 본 발명의 하나 이상의 바이오 마커의 mRNA의 발현 수준에 있어서의 차이를 말한다. "차등적으로 발현된"은 샘플의 집단 내 단백질 발현의 양 또는 수준과 비교하여 샘플 또는 샘플 집단 내 본 발명의 바이오 마커에 의해 암호화된 단백질의 측정을 또한 포함할 수 있다. 차등적 발현은 본 발명에 기술된 바와 같이 및 당해 분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이 측정할 수 있다.

[0046] 본 발명에서의 용어, "유전자 발현 패턴" 또는 "유전자 발현 프로파일" 또는 "유전자 특징"은 암세포의 방사선 저항성과 민감성 관련된 유전자의 상대적 발현을 말하며, 조합된 패턴이 본 발명의 바이오 마커 중 2, 3, 4, 5, 6, 7개 또는 모두를 포함하는 본 발명의 1개 이상의 바이오 마커의 발현 수준의 분석 결과임을 나타낸다. 유전자 발현 패턴 또는 유전자 발현 프로파일 또는 유전자 특징은 mRNA 및/또는 본 발명의 바이오 마커에 상응하는 유전자에 의해 발현된 단백질의 발현의 측정으로부터 획득될 수 있다.

[0047] 본 발명의 실시예에서는 INPP4B의 기능과 역할에 대해 알아보았다. 보다 상세하게는 HEp-2 모세포, RR-HEp-2 세포에서의 INPP4B의 발현 유도는 방사선 자극이나 특정 세포 유형에 제한되지 않음을 확인하였으며, INPP4B가 ERK-의존성 유도의 HEp-2 세포의 방사선 저항성 표현형을 촉진하는 것을 확인하여, INPP4B가 방사선 저항성을 증가하여, 방사선 유도 세포사멸에 대해 HEp-2 세포를 선택적으로 보호할 수 있음을 확인하였다. 아울러, INPP4B가 항암제 저항성 발생에 양성 바이오 마커임을 확인하였다. 또한, INPP4B가 방사선 또는 항암제와 같은 스트레스에 의한 INPP4B 유도가 암세포에서 Akt 생존 경로에 의한 저항성 표현형을 촉진하는 것을 확인하였다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 방사선 저항성 또는 민감성 진단용 조성물을 사용함으로써, 방사선 치료대상 암세포의 방사선 저항성 또는 민감성을 판단하여 맞춤형 방사선 치료를 제공하며, 암환자에서 방사선 치료 적용 대상의 다양화를 통해 치료 효과 증진 및 부작용을 감소시킬 수 있다. 또한 방사선 치료환자의 예후를 판단(치료효과의 예측이 가능)하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 HEp-2 세포에서 방사선 저항성과 관련된 단백질로서 INPP4B를 확인한 도이다. (A) HEp-2 모세포, 및 방사선 저항성 RR-HEp-2 및 RR-#6 클론변이체는 24시간 동안 10 Gy방사선을 처리하거나 처리하지 않았다. 유전자 전사체는 전형적인 RT-PCR을 실시하여 측정하였다. ERBB2 및 Bcl-x1은 양성 대조군으로 사용하였다; P21은 음성 대조군으로 사용하였다; 또한 GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다. (B) HEp-2 모세포, 및 RR-HEp-2 및 RR-#6 변이체는 표시된 방사선 량으로 처리하였다. 14일 후, 생존분획을 집락형성생존분석법으로 측정하였다; 결과는 생존곡선(상단)으로 표시하였다. INPP4B 단백질 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯으로 측정하였다(하단). (C) HEp-2 모세포(CON), 방사선 민감성(RS-#7, RS-#9 및 RS- #18) 및 방사선 저항성(RR-#3, RR-#6 및 RR-#13) HEp-2 세포는 4Gy 방사선을 처리하거나(+) 또는 처리하지 않았다. 14일 후 집락형성 생존분획은 자동화 콜로니 계수기에 의해 정량화하였다; 결과는 생존곡선으로 표시하였다(상단). INPP4B 단백질 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(하단). 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(3회 실시).

도 2는 방사선 또는 항암제를 처리함으로써 INPP4B 발현 암세포의 유도를 나타낸 도이다. (A) HEp-2 모세포(상단), 또는 HEp-2 모세포 및 RR-HEp-2, 및 RR-#6 변이체(하단)는 표시된 시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하였다. (B) A549, H460, HCT116 및 MCF7 세포는 24시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하거나(+) 또는 조사하지 않았다(-). INPP4B 전사수준은 내부 대조군으로 GAPDH를 사용한 정량적인 PCR을 실시하여 측정하였다. (C) HEp-2세포는 24시간 동안 방사선(IR; 10 Gy), bleomycin (Bleo; 10 μ M), cisplatin (Cis; 10 μ M), etoposide (Eto; 5 μ M), 또는 doxorubicin (Doxo; 1 μ M)을 조사하거나 또는 조사하지 않았다(CON). INPP4A 및 INPP4B 전사수준은 내부 대조군으로 GAPDH를 사용한 정량적인 PCR을 실시하여 측정하였다. (D) HEp-2 모세포 및 RR-HEp-2, 및 RR-#6 변이체는 24시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하였다. INPP4A, INPP4B 및 PTEN전사수준은 정량적인 PCR(상단) 또는 전형적인 PCR(하단)을 실시하여 측정하였다. GAPDH는 내부 대조군 또는 로딩 대조군으로 사용하였다. 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(4회 실시).

도 3은 HEp-2 세포에서 방사선에 의한 INPP4B 발현의 ERK 의존 유도를 나타낸 도이다. (A) MAPK 단백질 발현 및 인산화 수준은 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. (B) HEp-2 세포는 10 μ M PD98059(PD), 10 μ M SB203580(SB), 또는 SP600125(SP)이 존재하거나 존재하지 않은(vehicle) 상태에 10 Gy의 방사선을 조사하거나 (+) 또는 조사하지 않고 (-), 24시간 동안 배양하였다. INPP4B 단백질 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(상단). INPP4B 전사 수준은 전형적인 PCR(중간) 또는 정량적인 PCR(하단)을 실시하여 측정하였다. GAPDH는 내부 대조군 또는 로딩 대조군으로 사용하였다. (C) HEp-2 세포는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM ERK-1/2 siRNA(siERK)로 48시간 동안 형질트랜스펙션시킨 다음 24시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하거나(+) 또는 조사하지 않았다(-). INPP4B 및 ERK 단백질 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. INPP4B 전사 수준은 전형적인 PCR(중간) 또는 정량적인 PCR(하단)을 실시하여 측정하였다. GAPDH는 내부 대조군 또는 로딩 대조군으로 사용하였다. 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(3회 실시).

도 4는 HEp-2 세포에서 방사선 민감성의 INPP4B 의존적 조절을 나타낸 도이다. (A 및 B) HEp-2 모세포는 빈 벡터(CON) 또는 MYC-태그된 INPP4B 발현벡터(INPP4B)로 형질트랜스펙션시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 세포는 방사선(A) 또는 10 Gy 방사선(B)으로 표시한 방사선량으로 조사하였다. 14일 후, 집락형성은 자동화 콜로니 계수기를 사용하여 정량하였다; 결과는 생존곡선(A)으로 나타내었다. 48시간 후, 세포생존률은 FACScan 유세포 분석기를 사용하여 측정하였다; 데이터는 PI-양성세포의 비율로 나타내었다(B, 중간). 절단된 PARP 및 INPP4B 단백질 수준은 로딩대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(B, 오른쪽). (C 및 D) RR-HEp-2 세포는 대조군 siRNA (siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA (siINPP4B)로 트랜스펙션시킨 후, 48시간 동안 배양하였다. 상기 세포는 표시된 양의 방사선(C) 또는 10 Gy의 방사선을 조사하였다. (D) 세포생존(C), 세포 생존능력(D, 왼쪽), 세포형태(D, 중간) 및 웨스턴 블롯(D, 오른쪽) 실험을 A 및 B와 유사하게 수행하였다. 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(4회 실시).

도 5는 안정적으로 트랜스펙션된 INPP4B-HEp-2 세포에서 항암제 민감성에 대한 INPP4B 의존 조절을 나타낸 도이다. (A 및 B) HEp-2(CON) 및 안정적인 INPP4B-HEp-2(INPP4B)는 vehicle, 10 μ M bleomycin, 5 μ M etoposide, 또는 1 μ M doxorubicin을 24시간 동안 조사하였다. 절단된 PARP 및 Myc-태그된 INPP4B 발현수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(A, 상단). 세포사멸은 FACScan 유세포 분석기를 사용하여 측정하였다; 상기 데이터는 PI-양성 세포의 비율로 나타내었다(A, 하단). (C 및 D) INPP4B-HEp-2 세포는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA(siINPP 4B)를 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후, 추가 시간 24시간 동안 vehicle 또는 1 μ M doxorubicin을 처리하였다. 웨스턴 블롯(C, 상단), 세포사멸(C, 하단) 및 세포형태(D) 실험은 A 및 B에서와 같이 실시하였다. (E) INPP4B-HEp-2 변이체(INPP4B-#2, INPP4B-#4 및 INPP4B-#6)는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA(siINPP4B)를 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후, 추가로 24시간 동안 vehicle 또는 1 μ M doxorubicin을 처리하였다. 절단된 PARP 및 Myc-태그된 INPP4B는 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(4회 실시).

도 6은 폐암세포에서 INPP4B의 결핍에 의한 세포사멸 유도를 나타낸 도이다. (A) A549 및 H1299 세포는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA(siINPP4B)를 48시간 동안 트랜스펙션시켰다. INPP4B 단백질 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(상단). INPP4B mRNA수준은 내부대조군으로 GAPDH를 사용한 정량적인 PCR을 실시하여 측정하였다(하단). (B 및 C) A549(B) 및 H1299(C) 세포는 대조군 siRNA(-) 또는 100 nM INPP4B siRNA(+)로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후, 24시간 동안 1 μ M doxorubicin을 또는 48시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하거나(+) 또는 조사하지 않았다(-). 절단된 PARP 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다(상단 및 중간). 세포의 형태는 광학현미경으로 관찰하였다(하단). 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(4회 실시).

도 7은 후두암 및 폐암세포에서 INPP4B의 발현으로 인한 Akt 활성 변화를 나타낸 도이다. (A) HEp-2 모세포 및 방사선 저항성 RR-HEp-2 세포는 표시한 시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하였다. Akt 및 GSK3 α/β 발현 및 인산화 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. (B) RR-HEp-2 세포는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA(siINPP4B)으로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후 추가적으로 6시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하거나 또는 조사하지 않았다. Akt 및 GSK3 α/β 발현 및 인산화 수준은 로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. (C 및 D) 대조군 HEp-2(CON) 및 안정적으로 트랜스펙션된 INPP4B-HEp-2(INPP4B) 세포(C) 또는 RR-HEp-2, A549 및 H1299 세포(D)는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA(siINPP4B)로 48시간 동안 트랜스펙션시켰다. Akt 및 GSK3 α/β 발현 및 인산화 수준은

로딩 대조군으로 β -actin을 사용한 웨스턴 블롯을 실시하여 측정하였다. (E 및 F) RR-HEp-2 세포는 대조군 siRNA(siCON) 또는 100 nM INPP4B siRNA siINPP4B)로 48시간 동안 트랜스펙션시킨 후, 추가적으로 6시간 동안 10 Gy의 방사선을 조사하거나 조사하지 않았다. Akt(E) 또는 PP2A(F)는 각 표본으로부터 면역침강을 실시하여 얻은 면역복합체를 PP2A 인산화효소 활성을 측정하기 위하여 사용하였다. PP2A 억제제 okadaic acid은 양성 대조군으로 사용하였다. 상기 데이터는 형식적인 결과 또는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다(4회 실시).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0051] **실시예 1: 세포 준비 및 방사선 저항성 세포주 확립**

[0052] 폐암세포주 A549, H1299 및 H460, 후두암세포주 HEp-2, 대장암세포주 HCT116 및 유방암세포주 MCF7는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 구매하였다. 대장암세포주 HCT116 및 유방암세포주 MCF7는 10% FBS(fetal bovine serum), 50 μ g/mL streptomycin 및 50 units/mL penicillin이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, HEp-2)배지에서 배양하였으며, 폐암세포주 A549, H1299 및 H460는 10% FBS(fetal bovine serum), 50 μ g/mL streptomycin 및 50 units/mL penicillin이 포함된 RPMIM 1640(Roswell Park Memorial Institute medium 1640)배지에서 배양하였다.

[0053] 방사선 저항성 세포주인 RR-HEp-2 및 이의 변이체는 Proteomics에 개시한 방법으로 확립하였다(Kim JS et al. Chloride intracellular channel 1 identified using proteomic analysis plays an important role in the radiosensitivity of HEp-2 cells via reactive oxygen species production. Proteomics 2010; 10:2589-604). RR-HEp-2 세포 집락에서 분리된 여러가지 서브클론(#3, #6, #7, #9, #13 및 #18)은 4 Gy의 방사선 처리 후 자신의 집락 형성 생존분석법(clonogenic survival assay)을 기초로 하여 방사선 저항성 또는 방사선 민감성 HEp-2 변이체를 선정하였다. HEp-2 모세포는 대조군 세포로 유지하였다.

[0054] 상기 세포는 3.81Gy/min 방사선량으로 ¹³⁷Cs선(Atomic Energy of Canada, Mississauga, Canada)을 사용하여 조사하거나, 또는 10 μ M bleomycin(Sigma), 10 μ M cisplatin(Sigma), 5 μ M etoposide(Sigma), 또는 10 μ M doxorubicin(Sigma)을 처리하였다. PD98059, SB203580 및 SP600125(Calbiochem)는 각각 ERK, p38 및 JNK를 억제하는데 사용하였다.

[0055] **실시예 2: 방사선 저항성 또는 민감성 마커 유전자 선별**

[0056] HEp-2 모세포 및 RR-HEp-2 세포 주 (RR-HEp-2 및 RR-#6) 간에서 다르게 발현되는 유전자를 선별하여 새로운 방사선 저항성 또는 민감성 마커 유전자를 동정하고자 하였다.

[0057] **<1-1> 전형적인 PCR 분석과 정량적인 RT-PCR**

[0058] RNA STAT-60 (Tel-Test B Inc. USA)을 사용하여 분리한 총 RNA는 ImProm-IITM 역전사효소(Promega)를 사용하여 역전사시켰다. 정량적인 RT-PCR 반응은 Chromo-4 cycler(Bio-Rad) 및 SYBR Premix Ex Taq(Takara Bio)를 사용하여 3회 실시하였다. 전형적인 RT-PCR 실험에서, 타겟 유전자로부터 증폭신호는 동일한 반응에서 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 주기임계값(Ct 값, cycle threshold values)으로 표준화하였다.

[0059] 다음과 같은 프라이머 및 조건으로 수행하였다: Bcl-x1(151-bp 생성물, 결합 온도 55 $^{\circ}$ C, 32 사이클), 센스 프라이머- 5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'(서열번호 1) 및 안티센스 프라이머- 5'-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3'(서열번호 2); ERBB2(epidermal growth factor receptor 2)(402-bp 생성물, 결합 온도 55 $^{\circ}$ C, 31 사이클), 센스 프라이머- 5'-CAT ATG TCT CCC GCC TTC TG-3'(서열번호 3) 및 안티센스 프라이머- 5'-CCC ACA CAG TCA CAC CAT AAC-3'(서열번호 4); GAPDH(305-bp 생성물, 결합 온도 55 $^{\circ}$ C; 24 사이클), 센스 프라이머- 5'-CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA-3'(서열번호 5) 및 안티센스 프라이머- 5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT-3'(서열번호 6); INPP4A(inositol polyphosphate 4-phosphatase type I)(404-bp 생성물, 결합 온도 55 $^{\circ}$ C, 33 사이클), 센스 프

라이머- 5'-GGC TGC CAG TCC ATA ATC-3'(서열번호 7) 및 안티센스 프라이머- 5'-CAC ACT TTC TCC CAC TCC-3'(서열번호 8); INPP4B(440-bp 생성물, 결합 온도 55°C, 31 사이클), 센스 프라이머 5'-AAA GAA TGC AGG TAC ACA G-3'(서열번호 9) 및 안티센스 프라이머 5'-CTC TGT GCT GCT CTT AGG-3'(서열번호 10); PTEN(580-bp 생성물, 결합 온도 55°C, 31 사이클), 센스 프라이머 5'-GAA AGA CAT TAT GAC ACC G-3'(서열번호 11) 및 안티센스 프라이머 5'-TTA GCA TCT TGT TCT GTT TG-3'(서열번호 12); p21 (439-bp 생성물, 결합 온도 55°C, 34 사이클), 센스 프라이머 5'-TGT CCG TCA GAA CCC ATG-3'(서열번호 13) 및 안티센스 프라이머 5'-GGA GTG GTA GAA ATC TGT CAT G-3'(서열번호 14).

[0060] 그 외에, 방사선 저항성 또는 민감성 마커 유전자 확인을 위해 사용된 프라이머 서열 및 발현 양상을 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

[0061]

| 유전자 | NCBI ID | 프라이머 | 서열번호 | 발현양상 |
|----------|---------|--------------------------|------|------|
| INPP4B | 8821 | F:GAAACAGAAAGAAGAAATACC | 15 | 과발현 |
| | | R:CCCCTCTTCTCATCATAG | 16 | |
| PSAP | 5660 | F:GTGGTGCCAGAATGTGAAG | 17 | 과발현 |
| | | R:CTGAGGGTAGAGGAGGAGAG | 18 | |
| CDK11A | 728642 | F:GTCTGCACATCACCGAAC | 19 | 과발현 |
| | | R:CATTCTTCTCCTCACTTACTTC | 20 | |
| GLUT1 | 6513 | F:CTCATGGGCTTCTCGAAAC | 21 | 과발현 |
| | | R:CCGACTCTTCTCCTTCATCTC | 22 | |
| JTB | 10899 | F:CCACCTCTGCTGGTTGCTC | 23 | 과발현 |
| | | R:CTATATGGACTCGATTTGCTCC | 24 | |
| ABCC5 | 10057 | F:AAACAGGATCAGTAAAGAAG | 25 | 과발현 |
| | | R:AAGAACACCAGGATAACG | 26 | |
| MRFAP1 | 93621 | F:ATTATATATGCCGCTCCTAC | 27 | 과발현 |
| | | R:TGGCCTTCACTACCTGTTC | 28 | |
| HNRNPUL1 | 11100 | F:ACTCGTGAGGAACTGCC | 29 | 과발현 |
| | | R:CTTGGAACAGGATCAGGG | 30 | |
| WDFY3 | 23001 | F:TAAATGGTGCAACTCTG | 31 | 과발현 |
| | | R:TGGATGGTACTAAGAAGAAC | 32 | |
| NDRG1 | 10397 | F:AGATCTCAGGATGGACCCAAG | 33 | 저발현 |
| | | R:CATGCCCTGCACGAAGTAC | 34 | |
| CDC27 | 996 | F:ACAAATCTTATCTGGTGGAG | 35 | 저발현 |
| | | R:GTATCAGGTGAAATTACAGC | 36 | |

[0062]

[0063] 그 결과, HEP-2와 비교하여 RR-HEP-2에서 ERBB 및 Bcl-x1(양성 대조군)은 증가하였고, p21(음성 대조군)은 감소하는 것을 확인하여 체외시스템의 타당성을 확인하였다(도 1A, 상단). 일반적인 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 실시하여 얻은 자료에서 9가지 유전자의 mRNA 수준은 미처리된 대조군 및 HEP-2와 대조적으로 10 Gy의 방사선에 반응하는 HEP-2 또는 RR-HEP2에서 상향 조절(도 1A, 중간)되는 반면, 2가지 유전자는 하향조절(도 1A, 하단)됨을 확인하였다.

[0064] 아울러, 방사선 저항성 세포가 아닌 Hep-2 모세포에 비하여, 방사선 저항성 세포주인 RR-Hep2 세포주(RR-HEP-2 및 RR-#-6)에서 INPP4B(Inositol polyphosphate-4-phosphatase type II), PSAP(Prosaposin), CDK11A(Cell division cycle2-like 2), GLUT1(Glucose transport type 1), JTB(Jumping transport type 1), ABCC5(ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5), MRFAP1(Mof4 family associated protein 1), HNRNPUL1(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1) 및 WDFY3(WD repeat and FYVE domain containing 3)이 과발현되고, NDRG1(N-myc downstream regulated gene 1) 및 CDC27(Cell division cycle 27 homolog)이 저발현되는 것을 확인하였다(표 1 및 도 1A 내지 1C). 상기 유전자들 중에서 특히, PSAP, CDK11A,

MRFAP1, HNRNPUL1, WDFY3 및 CDC27인 6개 유전자가 방사선 저항성과 알려져 있지 않은 신규한 방사선 저항성 또는 민감성 마커가 될 수 있음을 확인하였다.

[0065] 이와 같은 결과들은 상기 유전자가 정상 암세포보다 방사선 저항성 또는 민감성 세포주들에서 발현이 특이적으로 증가하거나 감소하여, 상기 유전자의 발현 양상을 분석하면 방사선 저항성 또는 민감성을 특이적으로 진단할 수 있음을 시사한다.

[0066] **실시예 3: INPP4B 기능 분석**

[0067] 종양 방사선저항성과 관련되어, 상기 실시예 2에서 선정된 INPP4B(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, 이하 'INPP4B'로 명명함)의 기능은 대부분 밝혀지지 않았기 때문에, 본 발명에서는 먼저 방사선저항성 표현형을 중점으로 INPP4B의 역할 확인 및 방사선을 조사한 후, 그 기능을 분석하였다.

[0068] **<3-1> 집락형식 분석(Clonogenic assay)**

[0069] 세포생존률을 집락형성분석법으로 측정하였다. 보다 상세하게, 상기세포에 방사선량을 단독으로 조사한 다음 즉시 트립신을 처리해서 떼어내고 희석한 후, 60mm 조직배양접시에 다양한 세포밀도(각 조직배양접시에 각 0, 2, 4 및 6 Gy의 방사선 조사를 위한 200, 400, 1500 및 3000 세포)로 분주하였다. 상기 콜로니를 14일 동안 방사선을 조사한 후, 메탄올로 고정시키고, 트립판블루용액으로 염색하여 관찰하였다. 50개 이상의 세포로 이루어진 콜로니만 콜로니 카운터(Imaging Products)를 사용하여 살아있는 세포 수를 측정하였다.

[0070] 그 결과, RR-HEp-2 및 RR-#6 세포주는 집락형성생존분획법(clonogenic survival assays)을 실시한 결과(도 1B, 상단), 뚜렷한 방사선 표현형을 나타내었으며 HEp-2와 대조적으로 높은 농도의 INPP4B가 발현되었다(도 1B, 하단). 또한 본 발명에서는 방사선 민감성 및 방사선 저항성 HEp-2 클론을 사용하여 방사선저항성 표현형과 INPP4B의 관계를 확인하였다. 각 클론의 방사선 민감성은 4 Gy 방사선을 처리한 다음 콜로니 형성 분석을 통하여 확인하였다(도 1C, 상단).

[0071] 그 결과, 방사선 저항성 표현형(RR-#3, RR-#13 및 RR-#6)을 나타낸 클론은 HEp-2와 대조적으로 INPP4B 단백질의 두드러진 상향조절이 나타난 반면, INPP4B 수준은 방사선민감성 클론(RS-#7, RS-#9 및 RS-#18)에서 단지 미미하게 변화를 나타냈다(도 1C, 하단). 상기와 같은 결과들은 INPP4B의 증가된 수준이 HEp-2세포에서 방사선 저항성의 발생과 관련이 있을 수 있음을 시사한다.

[0072] **<3-2> 세포사멸 분석(Apoptosis analysis)**

[0073] 2×10^5 개의 세포를 60mm 접시에 분주하여 표시된 실험조건에 따라서 처리하였다. 세포사멸은 PARP(cleaved poly (ADP-ribose) polymerase)를 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였으며 또한 광학현미경하에서 세포사멸된 세포 형태를 관찰하였다. 세포사멸을 정량화하기 위하여 상기 세포를 FACScan flow cytometer (Becton Dickson)으로 분석하였다.

[0074] **<3-3> 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)**

[0075] 세포를 프로테아제 및 포스파타제 억제제(phosphatase inhibitors)가 포함된 50 mM TRIS-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 및 0.1% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 함유한 완충용액으로 용해하였다. 단백질을 검출하기 위하여 다음과 같은 항체들을 사용하였다: 래빗 폴리클로날 항-phospho-Akt (Ser473), 항-Akt, antiphospho-p38, 항-p38, 항-phospho-JNK, 항-JNK 및 항-절단된-PARP (Asp214) (Cell Signaling Technology); 래빗 모노클로날 항-phospho-GSK3 α/β (Ser21/9) (Cell Signaling Technology); 마우스 모노클로날 항-ERK (BD Transduction Laboratories); 마우스 모노클로날 항-phospho-ERK 및 항-myc (Santa Cruz Biotechnology Inc.); 마우스 모노클로날 항- β -actin (Sigma); 고트 폴리클로날 항-INPP4B (Santa Cruz

Biotechnology, Inc.).

[0076] <3-4> siRNA에 의한 INPP4B 및 ERKd의 녹다운 분석(Knockdown of INPP4B and ERK by siRNA)

[0077] 인간 INPP4B siRNA 5'-CAG AAU GUU UGA GUC ACU A-3'(서열번호 37), 인간 ERK-1 siRNA 5'-CUC UCU AAC CGG CCC AUC U-3'(서열번호 38) 및 인간 ERK-2 siRNA 5'-CAG AUC UUU ACA AGC UCU U-3'(서열번호 39)를 합성하였다. 밝혀진 유전자서열에 대하여 특별한 상동성을 나타내지 않으며 또한 유전자발현을 조절하지 않는 스크램블된 siRNAs는 음성 대조군으로 사용하였다.

[0078] 상기 세포는 제조사의 제조방법에 따라 Metafectene reagent (Biontexas)를 사용하여 5시간 동안 무혈청 배양배지에서 100 nM siRNA를 처리하여 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 상기 세포를 48 시간 동안 더 유지하여, 타겟 단백질 결손을 웨스턴 블랏 및 정량 RT-PCR 분석으로 측정하였다.

[0079] <3-5> INPP4B 구조체 및 트랜스펙션

[0080] 인간 INPP4B에 대한 cDNA는 KpnI 및 XhoI를 도입하기 위하여 설계된 특정 프라이머(센스 5'-GGG GTA CCG AGC CAC CAT GGA AAT TAA AGA GGA AGG G-3':서열번호 40, 및 안티센스 5'-CCG CTC GAG CGG GGT GTC AGC TTT TCC ATA AG-3':서열번호 41) 및 pCMV-Sport6-INPP4B (Open Biosystems)로 RT-PCR을 실시하여 준비하였다. 상기 cDNA를 pcDNA3.1 (+) Myc/His vector (Invitrogen)로 클로닝하였다. HEp-2 세포는 Metafectene reagent (Biontexas)를 사용하여 발현 벡터로 트랜스펙션시켰다. 안정적인 세포주를 확립하기 위하여, HEp-2 세포를 INPP4B cDNA 벡터로 감염시킨 후, 24시간 동안 기본 배양 배지에서 배양하였다. 배양된 세포에 1 mg/mL G418을 첨가하여 트랜스펙션된 세포를 선택하였다. INPP4B를 발현하는 안정적인 HEp-2세포를 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다.

[0081] <3-6> 포스파타제 분석(Phosphatase assay)

[0082] 세포는 50 mM TRIS-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 7.5% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM Na3VO4 및 complete protease inhibitors가 함유된 완충용액으로 용해시켰다. 상기 세포 용해물은 항-Akt 또는 항-PP2A 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 침전시켰다. 면역혼합물은 protein A sepharose beads를 사용하여 수집하였다; 세척된 비드의 1/4은 Akt 및 PP2A의 면역침강 효율을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 분석을 실시하는데 사용하였다. 나머지 3/4 비드는 제조사의 방법에 따라 RediPlat96 EnzChek Serine/Threonine Phosphatase assay kit [Invitrogen (Molecular Probes)]를 사용하여 PP2A 활성을 분석하였다. 형광물질은 Victor2 fluorescence microplate reader (Perkin Elmer Corp.)를 사용하여 측정하였다. PP2A 활성을 억제하는 오카다산(Okadaic acid, Sigma)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0083] 실험예 1: INPP4B 유도는 방사선 자극이나 특정세포유형에 제한되지 않음을 확인

[0084] 방사선에 대한 INPP4B 반응을 조사하기 위하여, HEp-2 모세포 및 RR-HEp-2에 10 Gy를 처리하였다. 그 결과, 방사선에 대해 INPP4B 단백질 수준은 HEp-2 모세포에서 시간 의존적으로 증가하였다(도 2A, 상단); 이러한 유도는 RR-HEp-2 세포에서 더욱더 심하게 나타났다(도 2A, 하단). 상기 결과는 INPP4B는 방사선 반응 단백질이며 이 단백질의 과다축적은 HEp-2 세포에서 방사선 저항성 표현형을 획득하기 위한 기작이 될 수 있음을 시사한다. INPP4B 발현의 방사선-매개 유도가 HEp-2 세포에 한정되는지를 조사하기 위하여, A549, H460, HCT116 및 MCF7 세포를 포함한 다른 인간 암세포에 10 Gy 방사선을 처리하였다. 정량 RT-PCR을 실시한 결과, 상기 방사선 처리가 모든 암세포주에서 INPP4B 전사수준의 증가를 유도함을 확인하였다(도 2B). 이러한 결과는 상기 현상이 모든 인간 암세포에서 일어나는 것임을 시사한다.

[0085] 또한 방사선 저항성 유전자의 조절은 종종 여러가지 유형의 암에서 항암제 저항성의 발생에 있어서, 하나의 역할을 수행하기 때문에, INPP4B가 HEp-2 세포에서 블레오마이신(bleomycin), 시스플라틴(cisplatin), 에토포시드(etoposide) 및 독소루비신(doxorubicin)을 포함하는 항암치료제에 의해 조절되는지를 조사하였다. 놀랍게도

정량 RT-PCR을 실시한 결과, 모든 약들은 INPP4B mRNA 수준을 증가하도록 유도한 반면, INPP4B 유전자의 상동체인 INPP4A는 상기 약들로 유도되지 않았다(도 2C).

[0086] 또한 상기 방사선유도 상황 조절이 다른 지질 포스파타제로 확장되는지, 또는 3-포스포이노시티드(3-phosphoinositide) 지질 네트워크를 조절하는 INPP4B로 제한되는지를 조사하였다. 그 결과, 정량 PCR(도 2D, 상단) 및 일반 PCR(도 2D, 하단) 분석을 통하여 INPP4B와 달리 지질 포스타파제 INPP4A 및 PTEN은 방사선 처리로 유도되지 않음을 확인하였다.

[0087] 상기와 같은 결과들은 INPP4B가 HEp-2세포의 방사선 저항성 표현형 발생을 조절하는 유일한 지질 포스파타제임을 시사하는 것이다.

[0088] **실험예 2: INPP4B의 ERK-의존성 유도가 HEp-2 세포의 방사선 저항성 표현형 촉진 확인**

[0089] 방사선은 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 단백질을 활성화하기 때문에, INPP4B 발현 유도가 HEp-2에서 MAPK 활성화에 관여하는지 여부를 조사하였다. 그 결과, 10Gy 방사선은 해당 단백질 수준의 변화없이 ERK, JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 p38 kinase의 활성 형태를 증가시켰다(도 3A).

[0090] 그 다음, 방사선을 처리하기 전에 각 MAPK의 특정 억제제를 세포에 전처리하였다. 그 결과, 도 3B에 나타난 바와 같이, PD98059에 의한 ERK 억제는 INPP4B 단백질(상단) 및 mRNA(중간) 수준에서 방사선 유도 증가를 차단하지만, SP600125에 의한 JNK 억제 또는 SB203580으로 p38 kinase 억제는 INPP4B 수준에 아무런 영향을 미치지 않았다. 정량 PCR을 실시하여 INPP4B 전사수준은 미처리된 대조군 세포와 비교하여 방사선이 처리된 HEp-2 세포에서 3.2배 증가하였고, 이와 같은 유도는 ERK 억제와 함께 1.3배 감소함을 확인하였다(도 3B, 하단).

[0091] INPP4B 발현을 조절하는 내생적 ERK를 확인하기 위하여 HEp-2 세포에서 siRNA(small interfering RNA)를 사용하여, 내생적 ERK를 낮추는(knock down)시켰다. 그 결과, 도 3C에 나타난 바와 같이 siRNA 처리는 ERK 발현을 효과적으로 낮추었다. 특히, 웨스턴 블랏(도 3C, 상단) 및 일반 RT-PCR(도 3C, 중간)을 실시하여, 내생적 ERK 결실이 방사선에 의한 INPP4B유도를 두드러지게 억제함을 확인하였다(도 3C). 정량 PCR분석으로, siRNA로 조절된 ERK 낮추는 방사선만 처리한 세포와 비교하여 방사선이 유도한 INPP4B mRNA수준을 38% 가까이 감소함을 확인하였다(도 3C, 하단). 이와 같은 결과는, 스트레스에 의해 유도된 INPP4B 발현이 ERK신호에 의존하지만 JNK 또는 p38신호에는 의존하지 않음을 시사하는 것이다.

[0092] INPP4B가 암 방사선 저항성에 필수적인 것인지를 확인하기 위하여, HEp-2 모세포에서 야생형 Myc으로 태그된 INPP4B를 과발현시켰다. 집락형성 생존분석을 실시한 결과, INPP4B의 과발현은 방사선에 노출된 후 세포생존을 증가시켰다(도 4A). 유세포분석 결과, 10Gy 방사선을 처리하여 유도된 세포사멸은 HEp-2 모세포(33% 이하)와 비교하여, INPP4B가 과발현된 HEp-2 세포에서 48시간째에 두드러지게 감소함을 확인하였다(도 4B, 왼쪽). 상기 결과는 세포형태를 관찰하여 확정하였다(도 4B, 중간).

[0093] 또한 세포사멸의 마커인 절단된 PARP 수준이 방사선이 처리된 HEp-2 모세포와 비교하여 방사선이 처리되어 INPP4B가 과발현되는 HEp-2 세포에서 또한 감소(도4B, 오른쪽)하는 것을 확인하였으며, 이는 상기 결과와 일치한다. 반대로, RR-HEp-2 세포에서 내생적 INPP4B의 siRNA 매개 낮추는 방사선을 처리한 다음 생존을 감소시킴을 확인하였다(도 4C).

[0094] 유세포분석으로 측정한 결과, 내생적 INPP4B 결실은 방사선 유도 RR-HEp-2 세포사멸을 16%(방사선 단독)부터 28%(방사선 및 INPP4B 낮추는 처리)까지 증가시켰고(도 4D, 왼쪽), 이와 같은 결과는 세포형태를 관찰하여 다시 확인하였다(도 4D, 중간). INPP4B를 타겟으로 하는 siRNA는 INPP4B를 효과적으로 낮추는 시키며 실질적으로 방사선이 처리된 RR-HEp-2 세포에서 절단된-PARP 수준이 증가(도 4D, 오른쪽)함을 확인하였다. 상기와 같은 결과들은 INPP4B이 방사선 저항성을 증가함으로써 방사선 유도 세포사멸에 대해 HEp-2 세포를 선택적으로 보호할 수 있음을 시사한다.

[0095] **실험예 3: INPP4B의 HEp-2 세포에서 항암제 내성 발생과 관련성 확인**

[0096] INPP4B가 항암제에 대한 저항성을 조절할 수 있는지를 확인하기 위하여, Myc가 태그된 INPP4B를 안정적으로 발현하는 HEp-2 세포(INPP4B-HEp-2 세포)를 확립하였다. 그 결과, 놀랍게도 INPP4B-HEp-2 세포는 항암제 bleomycin, cisplatin, etoposide 및 doxorubicin에 의해 추가로 유도된 INPP4B 기초 발현수준이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 상기 세포는 항암제들에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 갖고 있음을 절단된-PARP에 대한 웨스턴 블랏(도 5A, 상단) 및 유세포분석으로 확인하였다(도 5A, 하단). 비록 개개 약물에 의해 유도된 INPP4B의 정도는 다르나, INPP4B의 항-세포사멸 효과는 모든 항암제-처리 세포에서 형태학의 변화에 의해 확인하였다(도 5B).

[0097] 또한, INPP4B-HEp-2 세포에서 항-세포사멸 표현형에 대한 INPP4B 의존성을 확인하기 위하여, siRNA로 INPP4B를 억제하였다. 그 결과, INPP4B siRNA는 INPP4B발현을 효과적으로 차단하였고, 항암제로 유도된 세포사멸에 대해 현저하게 재감작시킴을 웨스턴 블랏으로 확인하였다(도 5C, 상단). 유세포분석 결과, INPP4B 결실은 세포사멸을 촉진하며, 33%(doxorubicin이 처리된 INPP4B-HEp-2 세포)에서 60%(INPP4B에 대한 siRNA로 감염된 doxorubicin이 처리된 INPP4B-HEp-2 세포)까지 세포사멸을 점진적으로 증가시킴을 확인하였다(도 5C, 하단). 이와 유사한 결과는 형태학적 변화 관찰로 확인하였다(도 5D). 다른 안정적인 INPP4B-HEp-2 클론(#2, #4 및 #6)을 사용하여 이와 같은 민감화 효과를 추가로 확인하였다. 또한, 상기 항암제-저항성 변이체들은 절단된-PARP에 대한 웨스턴 블랏 결과, INPP4B 녹다운후, 독소루비신-유도 세포사멸이 증가하는 것을 확인하여, 항암제 저항성 발생에 있어서, INPP4B가 양성 바이오 마커임을 확인할 수 있었다(도 5E).

[0098] **실례 4: 저항성 표현형에서 INPP4B 역할의 폐암세포에서 Akt 활성 변화 확인**

[0099] INPP4B의 저항성 기능이 HEp-2 후두암세포에 한정되는지를 확인하기 위하여, 방사선 및 항암제에 대한 저항성을 갖는 A549 및 H1299 폐암세포를 조사하였다. 그 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블랏(상단) 및 정량 PCR분석(하단)으로, INPP4B siRNA가 A549 및 H1299 세포의 INPP4B를 효과적으로 녹다운시킴을 확인하였다. HEp-2 세포에서 얻어진 결과와 동일하게, 절단된 PARP에 대한 웨스턴 블랏(도 6B, 상단 및 중간) 및 형태학적 변화를 조사(도 6B, 하단)함으로써, INPP4B 침묵현상은 A549세포에서 독소루비신 및 방사선에 의해 유도된 세포사멸을 현저하게 증가시킴을 확인하였다. 상기 실험과 동일한 조건 하에서, 이러한 민감화 효과는 A549 세포에서보다 H1299 세포에서 더 크게 나타났다(도 6C). p53은 H1299 세포(p53 결핍) 및 A549세포(야생형 p53) 사이에 차이가 있기 때문에, 상기 결과는 저항성에 대한 INPP4B의 역할은 p53 신호와 독립적임을 시사한다.

[0100] 이에, 방사선이 Akt 활성을 조절할 수 있는지 여부를 조사하였다. 또한 INPP4B가 Akt 활성을 양성적으로 조절하는지를 확인하기 위하여, RR-HEp-2 세포를 siRNA로 트랜스펙션시켜서, 내생적 INPP4B를 녹다운하였다. Akt 인산화는 Akt 활성을 나타내는 HEp-2 모세포와 비교하여 방사선에 노출된 RR-HEp-2 세포에서 높게 유도되었다; 이와 일치하게, Akt의 알려진 주요 타겟인 GSK3 α/β 인산화 또한 증가되었다(도 7A). 비록, RR-HEp-2 세포가 방사선 처리 후, 인산화된 높은 Akt 수준을 포함하고 있다고 할지라도, 이와 같은 Akt 활성은 Akt 기초수준을 변경하지 않고 INPP4B 결실로 크게 억제되었다(도 7B). 게다가 인산화된 Akt 수준은 INPP4B-HEp-2 세포에서 아주 높게 나타났지만, INPP4B 발현 및 Akt 활성 수준 사이에 밀접한 관계를 나타내는 INPP4B 녹다운으로 극적으로 하향조절되었다(도 7C). RR-HEp-2 세포에서 얻어진 결과와 동일하게, Akt 인산화 수준은 인산화된 GSK3 α/β 수준에서 수반되는 감소와 더불어서 A549 및 H1299에서 INPP4B 결실로 두드러지게 감소하였다(도 7D). 포스포타제 PP2A는 Akt 활성을 직접적으로 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명에서는 INPP4B가 PP2A 활성을 조절하는지를 측정하였다. PP2A 활성은 양성 대조군으로 사용된 오카다산(okadaic acid)을 처리한 RR-HEp-2 세포에서 크게 억제되었다(도 7E 및 도 7F). 그러나 방사선 처리 또는 INPP4B siRNA 감염이 RR-HEp-2 세포에서 PP2A 활성에 영향을 미치지 않음을 Akt 및 PP2A 면역복합침전분석법(도 7E 및 도 7F)으로 측정하여, PP2A 활성이 INPP4B 매개 Akt 활성과 관련이 없음을 확인하였다.

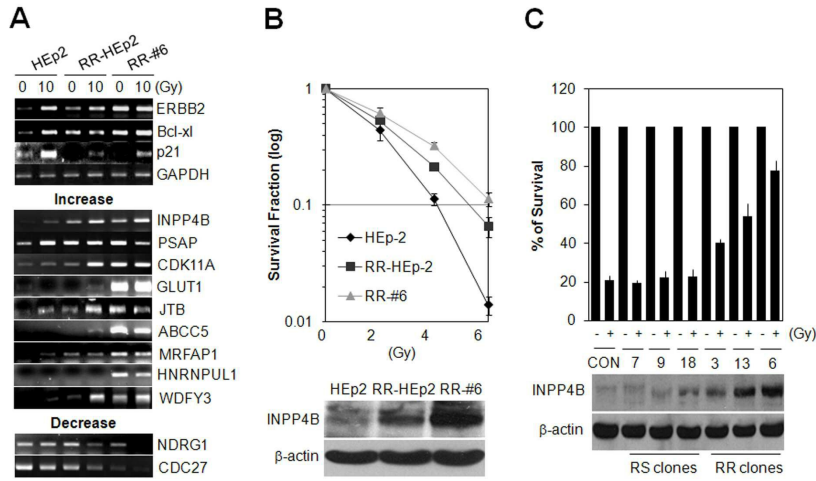
[0101] 상기와 같은 결과들은 스트레스(방사선, 항암제)에 의한 INPP4B의 유도가 암세포에서 Akt 생존 경로에 의해 저항성 표현형을 촉진하는 것을 뒷받침한다.

[0102] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는

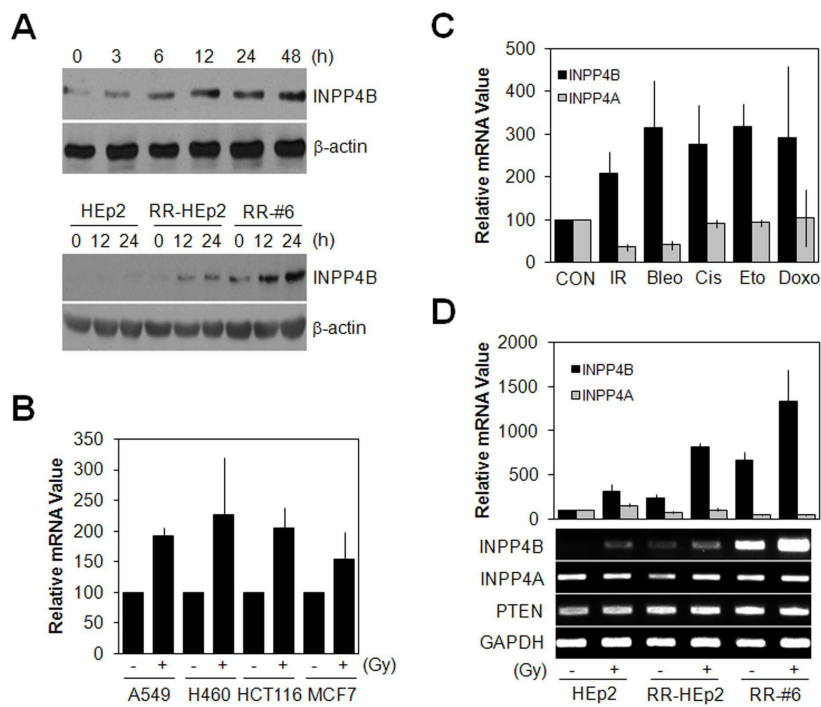
모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

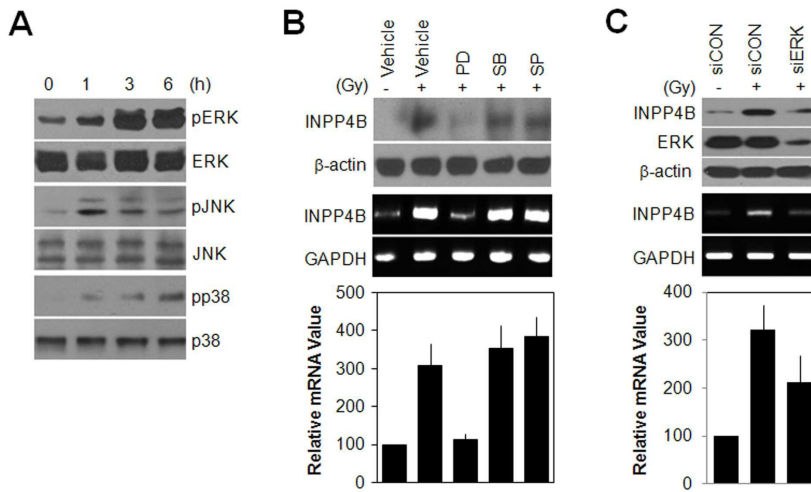
도면1



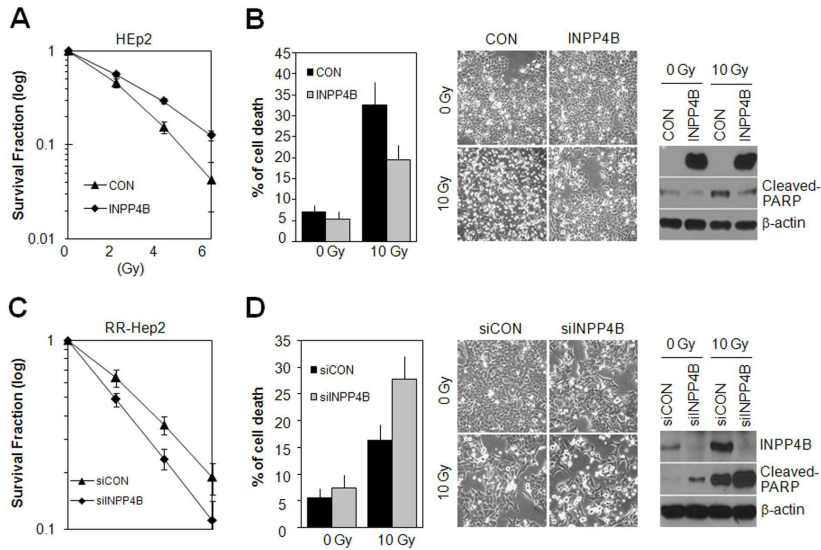
도면2



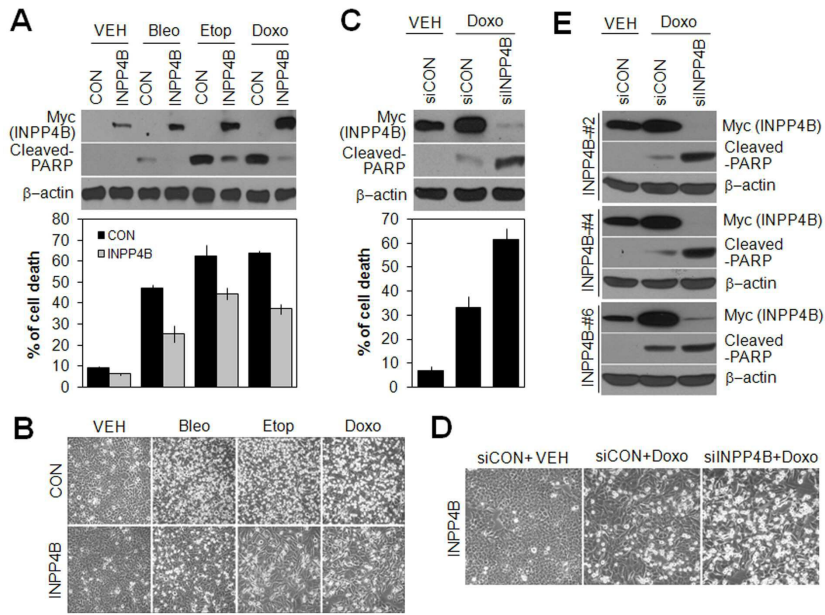
도면3



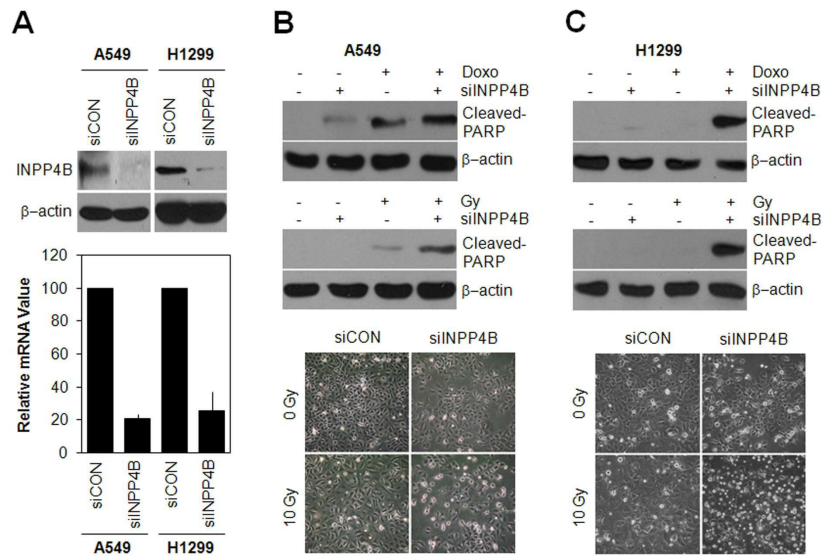
도면4



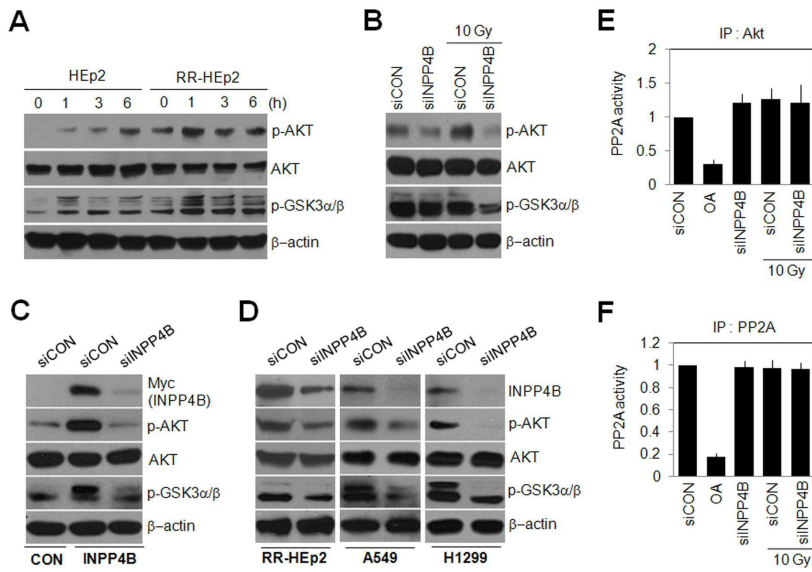
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> KOREA INSTITUTE OF RADIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES
- <120> Composition for diagnosis of radio-resistance or radio-sensitive PSAP marker and use thereof
- <130> PA120672/KR
- <160> 41
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Bcl-x1 Primer
- <400> 1
- cgggcattca gtgacctgac 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Bcl-x1 Primer
- <400> 2
- tcaggaacca gcggttgaag 20
- <210> 3

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ERBB2 Primer
 <400> 3
 catatgtctc ccgccttctg 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ERBB2 Primer
 <400> 4
 cccacacagt cacaccataa c 21
 <210> 5

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH Primer
 <400> 5
 catctctgcc cctctgctg a 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH Primer
 <400> 6
 ggatgacctt gcccacagcc t 21
 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INPP4A Primer
 <400> 7

ggctgccagt ccataatc 18

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INPP4A Primer
 <400> 8
 cacactttct cccactcc 18

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INPP4B Primer
 <400> 9
 aaagaatgca ggtacacag 19

<210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> INPP4B Primer
 <400> 10
 ctctgtgctg ctcttagg 18

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PTEN Primer
 <400> 11
 gaaagacatt atgacaccg 19

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

| | | |
|------------|--------------------------|----|
| <220><223> | PTEN Primer | |
| <400> | 12 | |
| | ttagcatcctt gttctgtttg | 20 |
| <210> | 13 | |
| <211> | 18 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | p21 Primer | |
| <400> | 13 | |
| | tgtccgtcag aacctatg | 18 |
| <210> | 14 | |
| <211> | 22 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | p21 Primer | |
| <400> | 14 | |
| | ggagtggtag aaatctgtca tg | 22 |
| <210> | 15 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | INPP4B Primer | |
| <400> | 15 | |
| | gaaacagaaa gaagaaatac c | 21 |
| <210> | 16 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | INPP4B Primer | |
| <400> | 16 | |
| | cccactcttc ctcatcatag | 20 |
| <210> | 17 | |
| <211> | 19 | |

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PSAP Primer
 <400> 17
 gtggtgccag aatgtgaag 19
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PSAP Primer
 <400> 18
 ctgagggtag aggaggagag 20
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDK11A Primer
 <400> 19
 gtctgcacat caccgaac 18

 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CDK11A Primer
 <400> 20
 cattttcttc tcacttactt c 21
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLUT1 Primer
 <400> 21
 ctcatgggct tctcgaac 19
 <210> 22

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GLUT1 Primer
 <400> 22
 ccgactctct tccttcactct c 21

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JTB Primer
 <400> 23
 ccacctctgc tggttgctc 19

<210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> JTB Primer
 <400> 24
 ctatatggac tcgatttgct tcc 23

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABCC5 Primer
 <400> 25
 aaacaggatc agtaaagaag 20

<210> 26
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ABCC5 Primer
 <400> 26

| | |
|----------------------------|----|
| aagaacacca ggataacg | 18 |
| <210> 27 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> MRFAP1 Primer | |
| <400> 27 | |
| attatatatg ccgctcctac | 20 |
| <210> 28 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> MRFAP1 Primer | |
| <400> 28 | |
| tggccttcac tacctgttc | 19 |
| <210> 29 | |
| <211> 18 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> HNRNPUL1 Primer | |
| <400> 29 | |
| actcgtgagg aaactgcc | 18 |
| <210> 30 | |
| <211> 18 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> HNRNPUL1 Primer | |
| <400> 30 | |
| cttgaacag gatcaggg | 18 |
| <210> 31 | |
| <211> 18 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> WDFY3 Primer | |

| | | |
|------------|-------------------------|----|
| <400> | 31 | |
| | | |
| | ttaaatggtg caactctg | 18 |
| <210> | 32 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | WDFY3 Primer | |
| <400> | 32 | |
| | tggatggtac taagaagaac | 20 |
| <210> | 33 | |
| <211> | 21 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | NDRG1 Primer | |
| <400> | 33 | |
| | agatctcagg atggacccaa g | 21 |
| <210> | 34 | |
| <211> | 19 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | NDRG1 Primer | |
| <400> | 34 | |
| | catgccttc acgaagtac | 19 |
| <210> | 35 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | CDC27 Primer | |
| <400> | 35 | |
| | acaaatctta tctggtggag | 20 |
| <210> | 36 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |

| | |
|---|----|
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> CDC27 Primer | |
| <400> 36 | |
| gtatcaggtg aaattacagc | 20 |
| <210> 37 | |
| <211> 19 | |
| <212> RNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> INPP4B siRNA | |
| <400> 37 | |
| cagaauguuu gagucacua | 19 |
| <210> 38 | |
| <211> 19 | |
| <212> RNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> ERK-1 siRNA | |
| <400> 38 | |
| cucucuaacc ggcccaucu | 19 |
| <210> 39 | |
| <211> 19 | |
| <212> RNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> ERK-2 siRNA | |
| <400> 39 | |
| cagaucuuua caagcucuu | 19 |
| <210> 40 | |
| <211> 37 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> INPP4B Primer | |
| <400> 40 | |
| ggggtaccga gccacatgg aaattaaaga ggaaggg | 37 |
| <210> 41 | |

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> INPP4B Primer

<400> 41

ccgctcgagc ggggtgtcag cttttccata ag

32