



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월04일
(11) 등록번호 10-1314828
(24) 등록일자 2013년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7105 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0096918

(22) 출원일자 2011년09월26일

심사청구일자 2011년09월26일

(65) 공개번호 10-2013-0033075

(43) 공개일자 2013년04월03일

(56) 선행기술조사문헌

JP2007537197 A

KR100906145 B1

KR100934706 B1

(73) 특허권자

한국원자력연구원

대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)

(72) 발명자

김인규

대전광역시 유성구 어은로 57, 한빛APT 118-408 (어은동)

최수임

대전광역시 유성구 어은로 57, 130동 1502호 (어은동, 한빛아파트)

신병철

대전 유성구 덕진동 150-1

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 16 항

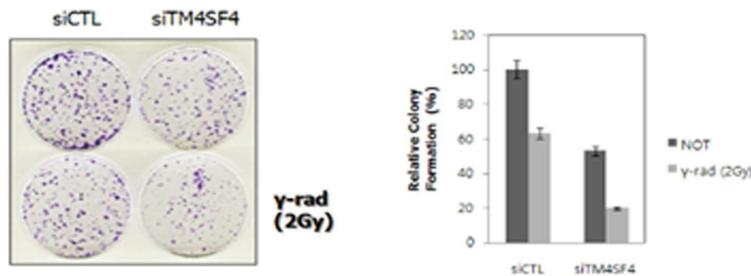
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 비소세포성 폐암에서 TM4SF4의 발현 또는 활성의 조절을 통한 방사선 저항성 및 암세포의 성장, 전이, 및 침윤능력을 저하시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 또는 활성을 조절하는 물질을 포함하는 비소세포성 폐암을 예방 및 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 항암 보조제에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 비소세포성 폐암 중 선암에서 TM4SF4의 발현을 감소시킴으로써 선암 세포의 성장, 전이 및 침윤 능력, 및 방사선 저항성을 감소시키고, 선암을 제외한 다른 비소세포성 폐암에서 TM4SF4의 발현을 증가시킴으로써 상기 세포의 성장, 전이 및 침윤, 및 방사선 저항성을 감소시킬 수 있는 것을 확인함으로써, TM4SF4의 발현 또는 활성 조절 물질의 비소세포성 폐암에 대한 항암제 또는 항암 보조제로서의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 57211-11

부처명 교육과학기술부

연구사업명 방사선기술개발사업

연구과제명 방사선유발돌연변이특성을 통한 방사선저항성관련 유전자기능연구 및 활용기술개발

주관기관 한국원자력연구원

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4) 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA), 또는 TM4SF4 단백질의 항체를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, TM4SF4가 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 비소세포성 폐암 중 선암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4) 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA), 또는 TM4SF4 단백질의 항체를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암에 대한 항암 보조제.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 항암 보조제는 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 대한 방사선 민감도를 증진시키는 것을 특징으로 하는 비소세포성 폐암 중 선암에 대한 항암 보조제.

청구항 7

TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자가 서열번호 2로 기재되는 유전자 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암에 대한 항암 보조제.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 항암 보조제는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 대한 방사선 민감도를 증진시키는 것을 특징으로 하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암에 대한 항암 보조제.

청구항 11

시험관내(*In vitro*)에서 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4) 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA), 또는 TM4SF4 단백질의 항체를 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 비소세포성 폐암 중 선암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법.

청구항 12

시험관내(*In vitro*)에서 TM4SF4 유전자를 포함하는 벡터를 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 상기 방사선은 감마 방사선인 것을 특징으로 하는 방사선에 대한 민감도 증진 방법.

청구항 14

- 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

- 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 16

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학법(immunohistochemistry), RT-PCR, 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 17

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 18

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 단계 3)의 방사선은 감마 방사선인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 또는 활성을 조절하는 물질을 유효성분으로 포함하는 비소세포성 폐암 예방 및 치료용 항암제 또는 항암 보조제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 폐암(lung cancer)은 남녀 모두의 성별에서 두 번째로 흔히 발생하는 암으로서, 모든 암에서 15%를 차지한다. 2011년 미국 암 학회(American cancer society)의 보고에 따르면, 한 해 22만건 이상이 폐암으로 진단을 받으며, 이 중 약 70%가 사망에 이르는데 이는 암 사망 중에서 27%를 차지한다. 폐암 중에서 비소세포성 폐암(non small lung cancer)은 상피성 암(carcinoma)의 일종으로 폐소성암(small lung cancer)이 아닌 모든 상피성 폐암(epithelial lung cancer)을 일컫으며, 폐암 전체의 약 85% 내지 90%를 차지한다. 비소세포성 폐암은 폐소성암에 비해 상대적으로 화학요법(chemotherapy)에 덜 민감하며, TNM 분류법에 기초하여 암의 단계를 나눈다: 종양의 크기(the size of tumor), 국소 림프절(reginal lymph node)로의 암 확산 정도 및 암 전이(metastasis)의 유무. 비소세포성 폐암의 치료에 있어서, 초기의 비전이성(non-metastatic) 비소세포성 폐암은 화학요법 및 방사선에 대한 민감도가 매우 낮기 때문에, 일반적으로 백금을 함유하는 시스플라틴(cisplatin)과 관련된 보조적인 화학요법(ancillary chemotherapy)와 함께 수술을 한다. 반면에 초기 단계를 지나, 전이성 비소세포성 폐암인 경우에는, 다양한 화학요법 및 방사선 치료가 사용된다. 비소세포성 폐암의 증상은 지속적인 기침, 흉부 통증, 체중감소, 손톱 손상, 관절 통증, 호흡의 단기화(shortness of breath) 등이 있으나, 비소세포성 폐암은 일반적으로 천천히 진행되기 때문에 초기에는 그 증상을 거의 보이지 않는다. 따라서, 비소세포성 폐암의 조기 발견 및 치료가 어려우며, 뼈, 간, 소장, 및 뇌 등 전신에 전이된 후에 발견할 가능성이 높다. 따라서, 높은 발병률과 사망률에도 불구하고 아직 비소세포성 폐암을 극복할 수 있는 어떠한 약물 또는 치료방법이 개발되지 않았으며, 그 필요성이 대두되고 있다. 비소세포성 폐암은 암세포의 크기, 모양 및 화학적 구성에 따라 몇가지 하위 종류로 나뉘며, 대표적으로는 선암(adenocarcinoma), 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암(large cell carcinoma)등이 있다. 선암은 전체 폐암의 40%이상을 차지할 정도로 가장 높은 빈도로 발생하는 폐암으로서, 폐의 바깥부위(outer region)에서 발견되며 다른 폐암보다 천천히 진행되는 경향이 있으나, 초기에 높은 전이 경향을 보이고 또한 높은 방사선 저항성을 보인다. 편평상피암은 전체 폐암의 25-30%를 차지하는 비소세포성 폐암의 한 종류로서, 기도(airway)를 이루고 있는 세포의 초기 단계(early version)에서 시작되며, 상기 암은 주로 흡연자에게서 높은 발병률을 보인다. 또한 전체 폐암의 10-15% 정도를 차지하는 대세포암은 폐의 어느 부위에서나 발견할 수 있으며, 그 진행속도가 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 유사할 만큼 빠르기 때문에 그 치료는 현재까지도 난제로 떠오르고 있다.

[0003]

[0004] 암의 발달은 비정상적인 세포의 성장으로부터 시작된다. 일반적으로 세포의 주기를 담당하는 유전자, 돌연변이를 자발적으로 제거하는 DNA 수선 기작 담당 유전자를 포함한 다양한 유전자의 DNA에 돌연변이가 생김으로써, 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)를 비활성화시키거나 종양 유전자(oncogene)을 활성화시켜 세포는 비정상적인 증식 또는 성장 능력을 가질 수 있다. 예를 들면, 비소세포성 폐암에서는 EGFR(epidermal growth factor receptor)의 돌연변이가 원인이 되어 그 리간드인 EGF(epidermal growth factor)가 없어도 계속 활성화

되어 비정상적인 증식 또는 성장 능력을 갖게 된다(비특허문헌 1). 세포의 증식 및 이동(migration) 등에 중요한 세포내 신호 경로(signal pathway)에는 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinases)-Akt(protein kinase B)가 있는데, 일반적으로 암세포에서는 상기 PI3K-Akt 신호경로가 일반 세포에 비해 항상 활성화되어 있다. 또한, 암세포의 대표적인 특징은 MMP(matrix metalloprotease)를 과발현한다는 것이다. MMP는 세포의 기질을 분해하는 단백질 분해효소로서, MMP의 활성화는 세포의 이동(cell migration), 혈관내유입(intravasation), 혈관외유출(extravasation), 혈관생성(angiogenesis) 및 전이(metastasis) 등에 필수적이다. 일반적으로 MMP는 조직의 리모델링(tissue remodeling) 또는 상처회복(wound healing)와 같은 경우에 발현되지만, 암세포는 MMP를 과발현하여 분비함으로써 혈관형성 통한 암세포의 이동(migration) 성장, 전이(metastasis) 등을 매개한다(비특허문헌 2). 따라서 정상세포에 비해 이러한 특징을 갖는 암세포는 비대한 성장을 하게 되고 다른 기관으로 전이되어, 결국 치료되지 않으면 암세포는 온몸으로 퍼져 정상조직을 파괴하게 된다.

[0005] TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)는 테트라스파닌(tetraspanin)이라는 세포막 단백질의 일종으로, L6계열의 막관통 4 대계열(transmembrane 4 superfamily)의 일원이다(비특허문헌 3). 테트라스파닌 대계열(tetraspanin superfamily)의 세포막 단백질은 암을 포함한 질병에 관련되어 있는 많은 생물학적 시스템에 관여하여, 세포에서 일어나는 다양한 과정(process)에 광범위한 스펙트럼으로 작용한다는 보고가 있다. 대부분의 연구에 의하면 테트라스파닌 단백질의 발현 정도에 따라 암 발생 마커가 조절되며 적어도 암세포의 악성화되는 과정에 관여한다고 한다(비특허문헌 4). 막관통 4 L6 대계열에는 L6, L6D, TM4SF4, TM4SF5가 있으며, 이들은 전체적인 구조는 유사하나, C-말단에 의해 다양성이 구축된다. TM4SF5는 종양형성과 전이에 밀접한 관련이 있고(비특허문헌 5-6), TM4SF4는 발생과정에서 쥐(rat)의 체장의 분화 및 간세포 재생에 관여한다고 보고되었다(비특허문헌 7-8). 또한 TM4SF4는 정상세포에서는 그 발현이 상대적으로 낮고 선암 세포(adenocarcinoma)에서는 발현이 높은 유전자 후보군으로 보고되기도 하였다(비특허문헌 9). 그러나, TM4SF4의 정확한 기능에 대한 보고는 아직 없을 뿐만 아니라, 특히 사람세포 및 암세포를 이용한 TM4SF4의 구체적인 기능에 관한 연구는 보고된 바가 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 암세포에서 TM4SF4의 기능을 알아보기 위해 노력한 결과, TM4SF4의 발현 수준이 비소세포성 폐암의 종류에 따라 차이가 있으며, TM4SF4의 발현수준의 조절에 의해 비소세포성 폐암의 방사선 민감도, 세포의 성장, 전이 및 침윤 능력에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 구체적으로 비소 세포암 중 선암 세포주(A549, Calu-3)는 다른 세포주보다 높은 TM4SF4의 발현을 나타냈으며, TM4SF4의 항체 또는 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 발현 또는 활성을 억제시켰을 때 세포의 암 진행화 능력, 즉 세포의 성장, 전이 및 침윤 능력이 감소되었을 뿐만 아니라 방사선 저항성도 감소 되는 것을 보였다. 반면, 상대적으로 낮은 TM4SF4의 발현을 나타내는 선암을 제외한 비소세포성 폐암의 세포주에서는 TM4SF4의 발현벡터를 이용하여 TM4SF4의 발현을 증가시켰을 때 세포의 성장 및 방사선 저항성이 감소되는 것을 보였다. 또한, 본 발명자들은 TM4SF4의 발현 및 활성 조절이 암 세포내의 IGF1R/PI3K-Akt/NK-κB의 활성화도 및 MMP의 발현을 조절함으로써 상기 효과를 나타내는 것임을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 TM4SF4의 발현을 감소시키는 약학적 조성물은 비소세포성 폐암 중 선암을 예방 및 치료하는데 효과적이고, TM4SF4의 발현을 증가시키는 약학적 조성물은 선암을 제외한 비소세포성 폐암을 예방 및 치료하는데 매우 효과적으로 이용될 수 있을 뿐 아니라 방사선 요법과 함께 사용하였을 때보다 더 효과적으로 이용될 수 있음을 제시하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Fresno Vara JA. et al., Cancer Treat Rev. 2004 Apr;30(2):193-204.
 (비특허문헌 0002) Joyce E. Rundhaug., Clin Cancer Res 2003;9(2):551-4.
 (비특허문헌 0003) Wright MD et al., Protein Sci 2000;9(8):1594-1600.
 (비특허문헌 0004) Zevian S et al., J. Biol. Chem. 2001;286(9):7496-7506
 (비특허문헌 0005) Lee SA et al., J. Clin. Invest. 2008;118(4):1354-66

- (비특허문헌 0006) Lee SA et al., Blood. 2009;113(8):1845-55
- (비특허문헌 0007) Liu Z et al., Biochim. Biophys. Acta 2001;1518(1- 2):183-9
- (비특허문헌 0008) Anderson KR et al., Development 2011;138(15):3213-24
- (비특허문헌 0009) Nakamura N et al., Oncogene 2006 28:4245-4255

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 또는 활성 조절제를 이용하여, 비소세포성 폐암 세포의 성장, 전이, 침윤능력을 저하시키고, 방사선에 대한 민감도를 증진시켜 효과적인 비소세포성 폐암을 치료를 위한 항암제 및 항암 보조제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, TM4SF4의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암에 대한 항암 보조제를 제공한다.
- [0011] 또한, TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암에 대한 항암 보조제를 제공한다.
- [0013] 또한, TM4SF4의 발현 또는 활성 억제제를 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 비소세포성 폐암 중 선암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, TM4SF4 유전자를 포함하는 벡터를 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 하기의 단계를 포함하는 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0016] 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0017] 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0018] 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계.
- [0019] 또한, 하기의 단계를 포함하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0020] 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0021] 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0022] 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 피검물질을 선별하는 단계.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 비소세포성 폐암 세포주에서 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 및 활성을 조절하여 암세포의 성장, 이동 및 침윤, 및 방사선 저항성의 감소하는 것을 보였다. 더 구체적으로 비소세포성 폐암 중 선암 세포주에서 TM4SF4 발현 또는 활성을 억제하였을 때, 암세포의 성장, 전이, 및 침윤능력이 감소하고 방사선에 대한 민감도가 현저하게 증가하는 것을 나타내었고, 이와는 반대로 선암을 제외한 다른 비소세포성 폐암의 세포주에서는 TM4SF4의 발현을 증가시켰을 때 세포의 성장 및 방사선 저항성의 감소효과를 나타내었다. 따라서, TM4SF4의 발현 또는 활성을 조절하는 약학적 조성물은 암 예방 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도1은 여러가지 폐암세포주에서 형질도입을 통해 TM4SF4의 과발현시키기 위해 발현벡터인 TM4SF4/pcDNA3.1을 클로닝하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 다양한 종류의 폐암세포주인 A549/H460/A431/H23/H1299/H2009/H358/Calu-3에서 역전사중합효소 반응 및 웨스턴 블랏팅(western blotting; WB)을 이용하여 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4) 발현량을 나타낸 그림이다.

도 3은 비소세포성 세포주 중 대세포암종(large cell carcinoma)인 H1299 또는 H460세포에 TM4SF4유전자를 과발현시켰을 때 세포의 성장(도 3의 a) 및 방사선민감성(도 3의 b)을 알아보기 위해 콜로니 형성 분석(colony formation analysis)의 결과를 나타낸 그림이다. 또한, 도 3의 c는 H460 세포에서 TM4SF4의 저발현시켰을 때 세포의 성장 및 방사선민감성을 알아보기 위해 콜로니 형성 분석의 결과를 나타낸 그림이다.

도 4는 A549 폐암세포주 중 선암 세포주인 A549세포에서 TM4SF4를 저발현시켰을 때 세포의 성장 및 방사선 민감성을 알아보기 위해 콜로니 형성 분석의 결과를 나타낸 그림이다.

도 5는 TM4SF4가 억제된 A549세포와 대조군 A549세포에서 세포 증식과 저항성에 관련된 세포내 신호(IGF1R/PI3K/Akt/NF-κB, EGFR, ERK)의 인산화를 웨스턴 블랏팅(western blotting)을 통해 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도 6은 TM4SF4가 억제된 A549세포와 대조군 A549세포의 이동성 차이를 시간별로 wound healing 방법을 통해 관찰한 결과를 나타낸 그림이다.

도 7은 TM4SF4가 억제된 A549세포와 대조군 A549 세포의 이동성과 침윤 정도를 비교한 실험의 결과를 나타낸 그림이다.

도 8은 A549세포에서 TM4SF4를 저발현시 MMP-2,7,9의 상관관계를 알아보기 위해 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 9는 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 세포성장 및 방사선 저항성을 알아보기 위해 콜로니 형성 분석을 나타낸 그림이다.

도 10은 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 세포 증식과 저항성에 관련된 마커들을 비교해보기 위해 IGF1R, PI3K/PDEN/Akt, NF-κB, ERK, EGFR의 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 11은 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 세포의 이동성 차이를 알아보기 위해 상처치유(wound healing) 방법을 통해 관찰한 결과를 나타낸 그림이다.

도 12는 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 세포의 이동성과 침윤 정도를 알아보기 위해 H&E(hematoxylin&eosin) 염색의 결과를 나타낸 그림이다.

도 13은 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 MMP-2,7,9의 상관관계를 알아보기 위해 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 그림이다.

도 14는 A549세포에서 TM4SF4를 과발현시 TM4SF4 항체를 농도에 따른 세포 증식을 알아보기 위한 콜로니 형성 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 TM4SF4(transmembrane 4 L six family member 4)의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 TM4SF4 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖지만 이에 한정되지 않으며, 상기 아미노산 서열에서 몇 개의 아미노산이 결실, 추가 또는 치환되는 아미노산 서열, 구체적으로 상기 아미노산 서열에 80% 이상, 보다 구체적으로 상기 아미노산 서열에 90% 이상의 상동성을 갖는 서열은 모두 사용 가능하다.
- [0028] 상기 TM4SF4의 발현을 억제하는 유효성분은 TM4SF4 유전자의 발현을 억제하는, 보다 구체적으로 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 작은 간섭(small interfering RNA; siRNA)이지만 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 상기 TM4SF4 단백질의 발현 억제제는 TM4SF4의 유전자의 전사(transcription), 전사 후(post-transcription) 번역(translation), 또는 번역 후(post-translational) 등의 과정을 저해하여 DNA에서 단백질로 되는 과정을 차단함으로써 정상적인 활성을 갖는 TM4SF4 단백질로의 발현을 차단하는 것으로, 보다 구체적으로 TM4SF4 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 단백질로의 발현을 억제하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머(monomer) 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 상기 siRNA는 인간 TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자(서열번호: 2)의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer), 보다 구체적으로 20-25머일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은 특별히 이에 한정되지 않고, 보다 구체적으로 19개의 염기로 구성될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드, 특히 mRNA를 표적으로 하는 siRNA의 유용성을 증명하였다 (Rothenberg *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포 흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0030] 상기 TM4SF4의 활성을 억제하는 유효성분은 TM4SF4 단백질의 활성을 저해하는, 보다 구체적으로 TM4SF4 단백질에 상보적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드미메틱스 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)는 TM4SF4 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드로서 TM4SF4 단백질의 활성을 억제하는 것이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어 (Nagai *et al.* *Tetrahedron Lett* 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson *et al.* *J Med Chem* 29:295, 1986; 및 Ewenson *et al.* in *Peptides: Structure and Function*(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman *et al.* in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger *et al.* in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜(Gordon *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey *et al.* in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0032] 본 발명자들은 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 및 웨스턴 블랏팅(Western blot)을 통하여 비소세포성 폐암 중 선암 세포주(A549, Calu-3)에서 다른 비소세포성 폐암의 세포주보다 TM4SF4의 발현이 높은 것을 보였다. 또한, siRNA를 이용하여 TM4SF4의 발현을 억제하였을 때, 콜로니 형성 분석을 통해 세포의 성장이 감소하는 것을 나타내었다. 또한 트랜스웰(transwell) 또는 상처회복(wound healing) 실험을 통하여 TM4SF4의 발현이 억제된 상기 암세포주가 이동 및 침윤 능력이 감소하는 것을 보였다. 또한, TM4SF4의 항체를 처리하여 상기 단백질의 활성을 중화하였을 때, 콜로니 형성 분석을 이용하여 처리한 항-TM4SF4 항체 농도 의존적으로 세포의 성장이 감소하는 것을 보였다. 또한, TM4SF4를 저발현시켰을 때 상기 세포 내에서 세포의 성장을 야기시키는 IGF1R β /PI3K-Akt/NK- κ B의 활성화가 감소하며, TM4SF4 발현백

터를 사용하여 TM4SF4의 과발현시 상기 신호전달체계의 활성화가 증가 되었다. 또한, TM4SF4 저발현시 전이(metastasis)에 중요한 혈관생성(angiogenesis)에 필수적인 MMP(matrix metalloproteinase)-2, 7 및 9의 발현이 감소하고, TM4SF4의 과발현시 MMP-2, 7 및 9의 발현이 증가하는 것을 보였다. 따라서, TM4SF4의 발현 및 활성을 억제하는 성분을 포함하는 약학적 조성물은 세포내 IGF1R β /PI3K-Akt/NK- κ B 및 MMP의 활성화의 감소를 통해 세포의 성장, 전이 및 침윤 능력을 감소시킴으로써 비소세포성 폐암 중 선암의 예방 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 TM4SF4의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 중 선암에 대한 항암 보조제를 제공한다.

[0034] 상기 항암 보조제는 비소세포성 중 선암세포의 방사선에 대한 민감도를 증진시킬 수 있다.

[0035] 상기 방사선은 감마 방사선, X선 또는 전자선 모두 이용할 수 있고, 보다 구체적으로는 감마 방사선, 보다 더 구체적으로 ⁶⁰Co γ -선을 이용할 수 있지만 이에 한정되지는 않는다.

[0036] 방사선 선량은 1회 0.2-20Gy, 보다 구체적으로 0.5-10Gy, 보다 더 구체적으로 2Gy를 사용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 방사선 선량 조사 속도는 0.02-2Gy/min, 보다 구체적으로 0.05-1Gy/min, 보다 더 구체적으로 0.2Gy/min를 이용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[0037] 본 발명에서는 TM4SF4의 발현 억제제가 방사선에 대한 세포의 민감도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 비소세포성 폐암 중 선암 세포주(A549)에서 TM4SF4 유전자, 보다 구체적으로 TM4SF4의 mRNA에 대한 상보적 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 발현을 억제하였을 때, 콜로니 형성 분석(colony formation analysis)을 통하여 방사선, 보다 구체적으로 감마 방사선에 대한 저항력을 확인하였다. 그 결과, 방사선 조사시 TM4SF4를 저발현하는 상기 A549 세포주의 콜로니가 현저하게 증가하는 것을 관찰하였으며, 이는 상기 세포주가 TM4SF4의 저발현시 방사선에 대하여 저항력이 감소하는 것, 즉 방사선에 대한 민감도가 증가하는 것을 가르킨다. 따라서, 암세포의 치료에 있어서 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성을 억제하여 암세포의 방사선에 대한 민감도를 증진시킴으로써 TM4SF4 단백질 발현 또는 활성 억제제는 방사선 치료와 함께 항암 보조제로써 유용하게 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탕액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 파립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 뉴클레오티드 또는 핵산은, 경구, 국소, 비경구, 비 내, 정맥 내, 근육 내, 피하, 안 내, 경피 등의 투여를 목적으로 제조될 수 있다. 바람직하게는, 핵산 또는 벡터가 주사가능한 형태로 사용된다. 이에 따라서 특히 처리될 영역으로는 직접적인 주입을 위하여 주사 가능한 조성물을 위한 임의의 약학적으로 허용되는 매개체와 혼합될 수 있다. 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 건조 특히 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 가능케 하는 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 환자의 증양으로의 핵산의 직접적인 주입은 치료 효율을 감염된 조직에 집중시키도록 하므로 유리하다. 사용되는 핵산의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 유전자, 벡터, 사용되는 투여 방식, 문제시되는 질병 또는 대안적으로 요구되는 치료기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 약 0.001 내지 100mg/kg이고,

바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

- [0042] 또한, TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현백터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기의 TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현백터는 서열번호 2로 기재되는 유전자 서열을 갖지만 이에 한정되지 않으며, 상기 유전자 서열에서 하나 또는 몇 개의 DNA가 결실, 추가 또는 치환되는 유전자 서열, 구체적으로 상기 유전자 서열에 대해 80% 이상, 보다 구체적으로 상기 유전자 서열에 대해 90%이상의 상동성을 갖는 서열은 포함될 수 있다.
- [0044] 백터는 비바이러스 백터 또는 바이러스 백터를 포함할 수 있다. 비바이러스 백터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA, 리포솜을 포함하며 이에 한정되지 않는다. 바이러스 백터는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 허피스바이러스를 포함하며 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 본 발명자들은 RT-PCR 및 웨스턴 블랏팅을 통하여 선암 세포주를 제외한 비소세포성 폐암의 세포주((H460, A431, H23, H1299, H2009 및 H358)에서 선암 세포주(A549, Calu-3)보다 TM4SF4를 적게 발현한다는 것을 보였다. 따라서, 본 발명자들은 상기 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포주에서 콜로니 형성 분석을 통하여 TM4SF4의 발현이 세포 성장에 미치는 영향을 알아보고자, TM4SF4의 발현백터인 pcDNA3.1을 이용하여 TM4SF4가 과발현시켰다. 그 결과, TM4SF4를 과발현하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포주의 성장이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서, 선암을 제외한 비소세포성 폐암에서, TM4SF4의 발현을 증가시키는 성분을 포함하는 약학적 조성물은 세포의 성장 능력을 감소시킴으로써 선암을 제외한 비소세포성 폐암의 예방 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [0046] 또한, TM4SF4 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현백터를 유효성분으로 함유하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암에 대한 항암 보조제를 제공한다.
- [0047] 상기 항암 보조제는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 대한 방사선 민감도를 증진시킬 수 있다. 사용되는 방사선의 특징, 조사법, 조사량 등은 상기와 동일하다.
- [0048] 상기의 선암을 제외한 비소세포성 폐암은 선암을 제외하며, 보다 구체적으로는 편평상피암(squamous cell carcinoma), 대세포암(large cell carcinoma)을 포함하며, 보다 더 구체적으로는 대세포암을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 서열번호 2로 기재되는 TM4SF4의 유전자를 발현하는 재조합 발현백터를 유효성분으로 하는 항암 보조제에서, 상기 TM4SF4의 유전자를 발현하는 재조합 발현백터의 함유량은 전체 항암 보조제의 조성물에 대하여 고형분 기준으로 0.01 내지 50% 중량일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 항암 보조제는 상기 TM4SF4를 발현하는 재조합 발현백터 이외에도 정제수, 부형제, 안정제 또는 보존제와 같은 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 상기 TM4SF4의 유전자를 발현하는 재조합 발현백터를 함유하는 항암보조제는 정제, 캡슐(capsules), 수액제, 과립제, 또는 환제 등의 여러 가지 제형으로 제조되어, 경구용, 주사용, 국소용, 또는 도포용 등으로 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, TM4SF4의 발현 또는 활성 억제제를 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 비소세포성 폐암 중 선암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.
- [0052] 또한, TM4SF4 유전자를 포함하는 발현백터를 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 투여하는 단계를 포함하는 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포의 방사선에 대한 민감도 증진 방법을 제공한다.
- [0053] 상기 방사선은 감마 방사선, X선 또는 전자선 모두 이용할 수 있고, 보다 구체적으로는 감마 방사선, 보다 더 구체적으로 ⁶⁰Co γ-선을 이용할 수 있지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0054] 방사선 선량은 1회 0.2-20Gy, 보다 구체적으로 0.5-10Gy, 보다 더 구체적으로 2Gy를 사용할 수 있으나 이에 한

정하지 않는다. 방사선 선량 조사 속도는 0.02-2Gy/min, 보다 구체적으로 0.05-1Gy/min, 보다 더 구체적으로 0.2Gy/min를 이용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

- [0055] 또한, 본 발명은
- [0056] 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계; 및
- [0057] 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성을 조절하는 물질을 선별하여 비소세포성 폐암에 대한 항암제 또는 항암 보조제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0058] 구체적으로, 본 발명은
- [0059] 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0060] 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0061] 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하는 피검물질을 선별하는 단계로 구성된 비소세포성 폐암 중 선암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0062] 또한, 구체적으로, 본 발명은
- [0063] 1) TM4SF4 단백질 발현 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0064] 2) 상기 세포주의 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- [0065] 3) 상기 TM4SF4 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 피검물질을 선별하는 단계로 구성된 선암을 제외한 비소세포성 폐암 세포에 대한 항암제 또는 방사선 민감도 증진제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0066] 상기 2가지 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 TM4SF4 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 가질 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0067] 상기 2가지 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 당업자에게 알려진 전사체 또는 그로부터 코딩된 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있고, 보다 구체적으로 면역침강법 (immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학법 (immunohistochemistry), RT-PCR, 웨스턴 블랏팅(Western blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군 으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군 으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0068] 상기 2가지 스크리닝 방법에 있어서, 단계 3)의 방사선은 감마 방사선, X선 또는 전자선 모두 가능하고, 보다 구체적으로 감마 방사선일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0069] 본 발명에서는 비소세포성 폐암 중에서도 선암과 그 외의 비소세포성 폐암에서 각각 TM4SF4의 발현 조절에 따라 세포의 성장, 전이 및 침윤, 및 방사선 민감도가 변하는 것을 관찰하였으며, 비소세포성 폐암 중 선암과 그 외의 비소세포성 폐암에서 서로 상반적인 작용이 나타남을 확인하였다. 보다 구체적으로 상기 선암에서는 TM4SF4 발현의 감소할 때 세포의 성장, 전이 및 침윤, 방사선 저항성이 감소하였으며, 선암을 제외한 비소세포성 폐암에서는 TM4SF4 발현이 증가할 때 세포의 성장 및 방사선 저항성이 감소하는 효과를 보였다. 따라서 TM4SF4의 발현에 영향을 주는 피검물질을 선별하여 비소세포성 폐암의 선암 또는 선암을 제외한 비소 세포성 폐암에 대한 항암제 또는 방사선 증진 효과가 있는 항암 보조제를 선별할 수 있다.
- [0070] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용을 한정하지 않는다.

실시예 1

- [0071] **형질도입(transfection)을 위한 TM4SF4 발현백터의 제작**
- [0072] 인간의 TM4SF4 유전자의 발현 백터를 만들기 위하여, 정방향 및 역방향 프라이머(primer) [EcoRI/정방향: 5'-CCACGAATTCATGTGCACTGGGGC-3'(서열번호 3), XhoI/역방향: 5'-TCCTCGAGTTAAACGGGTCCATCTCCC-3'(서열번호 4)]을 사용하여 TM4SF4가 높게 발현된 A549 세포의 유전체 DNA(genomic DNA)로부터 썬말 사이클러(Thermal cycler) (APOLLO, San Diego, USA)를 이용한 연쇄중합반응(PCR)에 의해 626bp 크기의 TM4SF4를 얻었다. 상기 PCR은 유전체 DNA 1 μ g, 10pmol의 프라이머를 각각 1 μ l, 맥심 PCR 프리믹스(MaximTM PCR PreMix, i-Taq) (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)의 조건으로 반응시켰다. PCR 사이클(cycle)의 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 1분(변성; denaturation), 58.9 $^{\circ}$ C에서 30초(어닐링; annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1분(신장; elongation)이며, 이를 30회 반복하였고, 신장후(post-elongation) 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 유지하였다.
- [0073] 발현백터인 pcDNA3.1(+)-백터를 동일한 제한효소인 EcoRI 및 XhoI(invotrogen) 각각 1 μ l씩과 완충액(buffer)를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 반응시켰다. 상기 발현백터, 상기의 PCR로 얻어진 TM4SF4 DNA, T4 리가아제(ligase) 및 T4 완충액(buffer)을 혼합하여 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 반응시켰다. 상기 발현백터 제작에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다. DH5 α (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea) *E. coli* 숙주와 제작된 상기 발현백터를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에 30분 방치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 90초 동안 열충격을 가하고, SOC배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 흔들배양기에서 1시간 배양 후, 항생제 마커로서 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB 고체배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에 16시간 배양하여 얻어진 콜로니에 DNA가 삽입되었음을 EcoRI 및 XhoI(invotrogen) 제한효소 처리와 시퀀싱을 통해 확인하였다. 암피실린이 첨가된 LB 액체배지(broth)에 시퀀스가 100% 일치하는 콜로니를 하룻밤 동안 배양한 후, DNA-스핀(spin) 플라스미드 DNA 추출 키트(Plasmid DNA Extraction kit) (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하여 플라스미드(plasmid) DNA 추출하였다. A549, H460, A431, H23, H1299, H2009, H358 및 Calu-3 세포를 6 웰(well) 플레이트에 4x10⁵ 세포/웰(cells/well) 넣어주고 효과적인 형질도입을 위해 옵티-MEM(opti-MEM)으로 배지를 바꾸어준다. 상기 추출한 TM4SF4/pcDNA3.1 DNA 4 μ g과 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, invitrogen) 10 μ l를 20분 동안 혼합한 후, 상기 세포에 넣어주고, 5시간 후 다시 RPMI1640으로 배지를 바꾸어 주어 일시적 형질도입을 시킨 세포들이 성장할 수 있도록 한다. 그 후 실험은 72시간 후에 수행하였다. RT-PCR이용하여 TM4SF4 발현백터에 의해 세포에서 TM4SF4의 발현 잘 되는 것을 확인하였다.

실시예 2

- [0074] **역전사중합효소반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통한 선암 세포주인 A549 및 Calu-3에서 TM4SF4의 과발현 확인**
- [0075] 선암 세포주를 포함한 다양한 폐암세포주에서 TM4SF4의 발현량을 조사하기 위해 역전사중합효소반응(RT-PCR) 및 웨스턴 블랏팅을 수행하여 각각 TM4SF4의 mRNA 및 단백질의 양을 알아보았다.
- [0076] RT-PCR은 맥심 RT 프리 믹스-올리고(dT) 15 프라이머(MaximTM RT PreMix-Oligo(dT)15Primer) (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)에 전체 RNA 1 μ g을 포함하여 총량 20 μ l로 반응 혼합액을 만든 뒤 45 $^{\circ}$ C에서 60분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 반응시켜 RT-PCR 산물인 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 TM4SF4 프라이머[정방향: 5'-CCACGAATTCATGTGCACTGGGGC-3'(서열번호 3)', 역방향: 5'-TCCTCGAGTTAAACGGGTCCATCTCCC-3'(서열번호 4)] 또는 β -액틴(actin) 프라이머[정방향: 5'-CATCTCACCCCTGAAGTACCC-3'(서열번호 5), 역방향: 5'-AGCCTGGATGCAACGTACATG-3'(서열번호 6)]를 각각 1 μ l, 멸균수 16 μ l로 총량을 20 μ l로 만들어 맥심 PCR 프리믹스(MaximTM PCR PreMix, i-Taq) (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)로 반응시켰다. PCR은 썬말 사이클러(Thermal cycler) (APOLLO, San Diego, USA)를 사용하였으며, 94 $^{\circ}$ C에서 1분(변성), 58.9 $^{\circ}$ C에서 30초(어닐링), 72 $^{\circ}$ C에서 1분(신장)의 조건으로 30회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분동안 유지시켰다(신장 후). PCR 산물은 1% 아가로오즈 젤(agarose gel) 상에서 EtBr(ethidium bromide) 염색법을 이용한 전기영동을 통하여 나타난 변화 양상을 관찰하였다.

- [0077] 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Hyclone) 및 항생제(100U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, Hyclone)를 포함한 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 세포를 배양하였다. 1x10⁷의 A549, H460, A431, H23, Calu-3, H1299, H2009 및 H358 세포를 수득하여 PBS로 2회 씻어준 후 단백질분해효소 억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail; 2mM AEBSF, 1mM EDTA, 130 µM bestatin, 1 µM leupeptin, 14 µM E-64, 0.3 µM aprotinin) 및 포스파타제 억제제(phosphatase inhibitor)를 포함한 RIPA 완충액(buffer)으로 부유한 세포를 얼음에 20분 동안 방치한 뒤, 빠르게 볼텍싱(vortexing)하는 과정을 3회 반복하였다. 그 후, 12000rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 상층액을 수거한 뒤, 다시 12000rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 깨끗한 상층액만을 수거하였다. 로우리 방법(Lowry method)을 이용하여 상층액에 있는 단백질을 정량한 뒤, 40 µg의 세포 총 용리액(whole cell lysate)를 7.5~12% 아크릴아마이드 젤(acrylamide gel, Bio-rad, Japan)를 이용하여 80V에서 1시간 및 100V에서 90분 동안 전기영동을 하였다. 100% 메탄올에 10초간 미리 적신 후 증류수로 충분히 수화시킨 PVDF 멤브레인(polyvinylidene fluoride membrane) (Bio-Rad, USA)에 세미-드라이 트랜스퍼(semi-dry transfer) (Bio-Rad, USA)를 이용하여 20V에서 1시간 동안 상기 전기영동으로 분리한 단백질을 옮겼다. 블럭킹(blocking) 용액(5% BSA, 0.1% Tween-20/TBS)를 이용하여 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 결합을 배제시킨 후, 1차 항체, 항-TM4SF4 항체(abcam, #ab102946) 및 항-β-액틴(actin) 항체(Sigma-aldrich, #A3854)를 4 °C에서 하룻밤 동안 결합시켰다. 그 후, 2차 항체인 페록시다아제(peroxidase)가 결합되어 있는 항-IgG 항체(Cell-signaling, #7076 및 #7074)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. ECL 탐지 키트(detection kit, Amersham, UK)를 이용하여 발색양상을 확인하여 TM4SF4의 발현 양상의 결과물 도 1에 나타내었다. β-액틴은 로딩대조군(loading control)로서 같이 수행하였으며 동일한 양의 β-액틴은 동일한 단백질 양이 로딩(loading)되었다는 것을 의미한다.
- [0078] 그 결과, RT-PCR 및 웨스턴블랏팅 모두에서 선암 세포주인 A549 및 Calu-3는 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 TM4SF4의 높은 발현량을 나타낸 반면, 다른 폐암 세포주(H460, A431, H23, H1299, H2009 및 H358)는 TM4SF4 mRNA 및 TM4SF4 단백질 모두 상대적으로 저발현을 나타낸다(도 2).

실시예 3

- [0079] 폐암세포 중 대세포암종(large cell carcinoma)세포주인 H1299 및 H460세포에서 콜로니 형성분석(colony formation assay)을 통한 TM4SF4의 과발현에 따른 세포 성장 및 방사선 저항성의 감소 확인
- [0080] 실시예 2의 결과에 따르면, 같은 폐암세포주임에도 불구하고 선암 세포주와 비선암 세포주는 TM4SF4의 다른 발현양상을 나타내었다. 따라서, TM4SF4의 기능을 조사하기 위해, 폐암 세포 중 대세포암종(large cell carcinoma)인 H1299 및 H460 세포에서 TM4SF4의 발현량이 암세포의 특징인 세포성장 및 방사선 저항성에 어떠한 연관성을 갖는지 조사하기 위해 본 실험을 수행하였다. 보다 구체적으로, siRNA 기술을 통하여 각 세포에서 TM4SF4를 저발현 시켰을 경우 및 실시예 1을 통해 만든 발현벡터인 TM4SF4/pcDNA3.1의 형질도입(transfection)을 통하여 TM4SF4를 과발현시켰을 경우에 대세포암종에서 세포성장 및 방사선 민감도가 어떻게 변하는지 콜로니 형성 분석을 통해 관찰하였으며, 콜로니의 수를 세어 대조군에 대한 퍼센트 비율로 콜로니 생존률(%)을 표시하였다.
- [0081] <3-1> H1299 및 H460 세포에서 TM4SF4의 과발현시 세포 성장의 억제 확인
- [0082] H1299 및 H460 세포의 2x10³개를 35-mm 세포배양용기에 배양하고, 상기 실시예 1에서 얻은 발현벡터인 TM4SF4/pcDNA3.1의 4 µg와 함께 리포펙타민 2000을 이용하여 실시예 1에 기재된 것과 같이 일시적 형질도입을 하였다. 8일 경과한 후, 0.5%(w/v) 크리스탈 바이올렛 용액으로 살아있는 세포를 염색하고 관찰하였다. 대조군은 공벡터를 이용하여 함께 실험을 수행하였다.
- [0083] 그 결과, 대세포암종 세포주인 H1299 및 H260 세포에서 TM4SF4이 과발현시 H1299 및 H460의 콜로니의 수는 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며(도 3의 a), 즉 TM4SF4의 과발현으로 인해 세포 성정이 억제되었다.
- [0084] <3-2> H460 세포에서 TM4SF4의 과발현시 세포 성장의 감소 및 방사선 민감도의 증가 확인

- [0085] H460 세포에서 TM4SF4를 과발현시키기 위해 상기 실시예 3-1과 동일하게 수행하였다. 방사선 민감성을 조사하기 위하여, TM4SF4의 과발현은 상기 실시예 3-1과 동일하게 수행하고 72시간 후에 세포를 수득하여 분석하여 방사선조사를 실시하였다. 방사선 조사는 ⁶⁰Co γ-선을 이용하여 1회 2Gy 선량을 0.2Gy/min으로 실시하였다. 세포를 8일 동안 5% CO₂, 36°C에서 배양한 후, 0.5 % (w/v) 크리스탈 바이올렛 용액으로 살아있는 세포를 염색하고 관찰하였다.
- [0086] 그 결과, 상기 실시예 3-1에서와 같이 H460 세포에서 TM4SF4의 과발현시 세포성장이 억제되는 것을 확인하였다(도 3의 b, 위). 또한, H460 세포에서 TM4SF4의 과발현시 2Gy ⁶⁰Co γ-선을 조사하였을 때 대조군에 비해 콜로니의 수가 현저히 감소하는 것을 보였다(도 3의 b, 아래). 따라서, H460 세포에서 TM4SF4 과발현시 세포 성장이 억제되었을 뿐만 아니라, 방사선에 대한 민감도가 증진, 즉 방사선 저항성이 감소되었다.
- [0087] <3-3> H460 세포에서 TM4SF4의 저발현시 세포 성장의 증가 및 방사선 민감도의 감소 확인
- [0088] TM4SF4의 저발현을 위하여 TM4SF4 유전자 발현을 억제하는 TM4SF4-siRNA 이중 올리고리보뉴클레오티드 프라이머(duplex oligoribonucleotides primer)를 5'-gccucucaaugugguuccuggaau-3'(서열번호 7: 센스)/5'-auuccaggaaccacauagagaggc-3'(서열번호 8: 안티센스)으로 제작하여 TM4SF4 유전자의 일부(서열번호 9)를 표적으로 하여 유전자 발현을 억제시키도록 하였다. 실시예 1에 기재된 것과 동일한 방법으로 리포펙타민TM RNAi MAX reagent(invitrogen)를 사용하여 StealthTM RNA 표적(targeting) TM4SF4(invitrogen)를 세포에 일시적으로 형질도입하였다. 그리고 72시간 후에 세포를 수득하여 분석하여 방사선조사를 실시하였다. 방사선 조사 및 그에 따른 세포 콜로니 형성 분석은 상기 실시예 3-2에 기재된 것과 동일하게 수행되었다. 대조군은 리포펙타민TM RNAi MAX reagent(invitrogen)만 주입하여 수행되었다.
- [0089] 그 결과, 상기 H460 세포에서 TM4SF4가 저발현 되었을 경우 대조군과 비교하였을 때 배양된 콜로니의 수가 증가하였다(도 3의 c, 위). 또한, 방사선 2Gy ⁶⁰Co γ-선을 조사하였을 경우 그 배양된 콜로니의 수가 증가함을 보였다(도 3의 c, 아래). 즉, 상기 세포에서는 TM4SF4가 저발현 되었을 때, 세포성장이 촉진될 뿐만 아니라 방사선에 대한 저항성이 증가, 즉 방사선의 민감도가 감소되었다.

실시예 4

- [0090] 폐암세포 중 선암 세포주인 A549에서 콜로니 형성분석을 통한 TM4SF4의 저발현에 따른 세포 성장 및 방사선 저항성 증가 확인
- [0091] 다른 폐암세포주에 비해 TM4SF4의 발현이 낮았던 선암 세포주 A549에서는 TM4SF4의 발현에 따라 세포의 성장 및 방사선 민감도가 어떻게 변하는지 알아보기 위해 본 실험을 수행하였다.
- [0092] A549 세포에서 TM4SF4의 저발현을 위해 TM4SF4의 siRNA를 이용하는 방법, 세포의 성장 및 방사선 민감도를 측정하기 위한 콜로니 형성 분석 및 그 결과를 생존률(%)로 기재하는 방법은 실시예 3-3에서 기재된 것과 동일하게 수행되었다.
- [0093] 그 결과, 비소세포성 폐암 중 대세포암종에서 나타난 결과와 다르게 선암 세포주인 A549에서는 TM4SF4가 저발현될 경우에 배양된 콜로니 및 방사선 조사 후 배양된 콜로니 모두 감소되었다(도 3). 이것은 선암 세포주에서 TM4SF4를 과발현하고 있는 A549에서 그 발현을 억제시켰을 때, 세포의 성장이 억제될 뿐만 아니라 방사선 저항성이 감소, 즉 방사선 민감도가 증가하는 것을 나타낸다.

실시예 5

- [0094] 폐암 세포 중 선암 세포주인 A549 세포에서 TM4SF4 저발현시 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통한 세포내 신호경로 활성도의 감소확인
- [0095] TM4SF4의 저발현은 선암 세포주인 A549에서 세포의 성장을 감소시키고 방사선 민감도를 증가시킨 결과에 따라,

세포의 성장을 매개하는 세포내 신호 경로의 활성화는 TM4SF4의 발현에 의해 어떠한 영향을 받는지 알아보고자 본 실험을 수행하였다. 세포내 신호는 일련의 여러 단백질이 순차적으로 연결되어 있으며 이들의 활성화는 일반적으로 세린(serine), 트레오닌(threonine) 및 티로신(tyrosine) 잔기의 인산화(phosphorylation)에 의해 매개된다. 따라서 인산화의 정도는 활성화된 정도를 의미하므로 본 실험에서는 TM4SF4가 과발현될 때 및 저발현될 때 웨스턴 블랏팅을 이용하여 세포내 여러가지 신호경로를 매개하는 단백질의 인산화 정도를 측정하였다.

[0096] 실시예 3-3에서 기술된 것과 같이 siRNA를 이용하여 TM4SF4를 저발현시킨 후 일반세포에 비해 암세포에서 과발현 또는 항시 발현되고 있는 몇 가지 세포내 신호전달의 활성도를 살펴보았다. DNA의 합성, 세포의 증식(priliferation)을 초래하고 세포의 전이(migration), 부착(adhesion)과 같은 세포의 표현형(phenotype)을 조절한다고 알려진 EGFR(epidermal growth factor receptor), 항-세포자멸사(anti-apoptotic) 특성을 갖으며 세포의 생존(survival), 증식(proliferation), 및 이동(migration)에 영향을 미치고, 항암 화학요법 및 방사선요법에 대한 민감성 증진을 담당한다고 알려진 IGF1R β (insulin-like growth factor 1 receptor β) 및 이들의 세포내 신호체계를 이루는 PI3K(phosphatidylinositol 3 kinase) 경로(예를 들면 PTEN, Akt 포함) 뿐만 아니라 전사인자 NK- κ B 및 ERK의 인산화를 알아보았다. 각 신호경로에 대한 인산화는 실시예 2에서 기술된 것과 동일하게 웨스턴 블랏팅을 수행하여 나타내었다. TM4SF4의 과발현 또는 저발현시, 아무 자극이 없을 때, 각 세포에서 나타나는 EGFR, IGF1R β , PI3K, NK- κ B 또는 ERK의 인산화의 결과를 각각의 항체(Cell signaling, USA)를 이용하여 웨스턴 블랏팅에 의해 도 5에 나타내었다.

[0097] 그 결과, 세포의 성장 및 방사선 민감성에 중요한 신호경로를 매개하는 EGFR, IGF1R β 및 PI3K의 활성화가 TM4SF4의 저발현시 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 5). 상기 결과와 일관성있게, PI3K의 탈인산화를 담당하는 PTEN은 TM4SF4의 저발현시 활성화되는 것을 확인하였다(도 5). 그러나 ERK의 활성화는 TM4SF4의 발현량에 크게 영향을 받지 않는 것으로 보여졌다(도 5). 즉, TM4SF4의 저발현은 EGFR, IGF1R 및 PI3K의 인산화를 억제 시킴으로써 세포의 성장 등 세포내 상기 신호 전달 경로 활성화와 관련된 세포의 이벤트(cellular event)를 조절한다.

실시예 6

[0098] 폐암 세포주 중 선암 세포주인 A549에서 상처회복(wound healing)를 통한 TM4SF4의 저발현에 따른 세포 이동성의 감소 확인

[0099] TM4SF4의 발현이 세포의 성장 뿐만 아니라 세포의 이동능력에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 본 실험을 수행하였다.

[0100] 실시예 3-3에서 기재된 것과 같이, A549 세포에 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 저발현을 유도한다. 72시간 후에 A549 세포를 35-mm 배양용기 옮겨 포화도(confluency) 90% 이상 될 때까지 배양한 후, PBS로 충분히 씻어내고 0.5%의 FBS를 포함한 RPMI 1640 배지로 배양액을 바꾸어 주어 하룻밤 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 기아상태(starvation)가 되도록 하였다. 용기바닥에 200 μ l 팁을 이용하여 세포를 긁은 선을 그은 후 PBS로 다시 천천히 씻어내고 다시 세포배양액을 채워서 배양하면서, 그 세포 사이의 간격을 0시간, 24시간 후, 36시간 후에 관찰하였다. 상기 세포 사이의 간격을 대조군에 대한 퍼센트 비율(%)로 표시하였다.

[0101] 그 결과, 36시간까지 이동성이 증가된 대조군에 비해 TM4SF4의 발현이 억제된 A549 세포는 24시간까지는 대조군과 비슷한 양상을 보이는 듯 했으나, 시간이 지남에 따라 그 이동성은 현저히 줄어들었다(도 6). 따라서, 본 결과를 통해 선암 세포주인 A549에서 TM4SF4의 발현이 세포의 지속적인 이동에 중요한 역할을 한다.

실시예 7

[0102] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549에서 TM4SF4의 저발현시 트랜스웰(transwell)을 통한 세포 이동성 및 침윤성의 감소 확인

[0103] 실시예 6에서 보여진 결과를 토대로 본 실험에서는 트랜스웰을 사용하여 TM4SF4의 발현에 따른 세포의 이동성 변화를 관찰하였다. 뿐만 아니라 본 트랜스웰을 사용하여 세포의 침윤능력에도 TM4SF4의 발현에 따른 변화가 있는지 알아보았다. 세포의 이동능력 및 침윤능력은 암세포의 전이(metastasis)에 필요한 필수적인 세포의 특

성으로 본 실험은 단순히 세포의 이동성 뿐만 아니라 TM4SF4의 발현이 암세포의 전이에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위한 것이다.

[0104] <7-1> A549 세포에서 TM4SF4의 저발현에 따른 세포의 이동성 감소 확인

[0105] 세포 이동성을 관찰하기 위해, 실시예 3-3에서 기재된 것과 동일한 방법으로 A549 세포에 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 저발현을 유도한다. 72시간 후에 A549 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS, Hyclone) 및 항생제(100U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin, Hyclone)를 포함한 RPMI 1640 배지에 배양하여 트랜스웰(Cell biolabs)의 챔버(chamber)에 $2 \times 10^5 / 300 \mu\text{l}$ 로 넣어준다. 아래 챔버에는 우태아혈청이 포함되지 않은 RPMI 1640 배지 500 µl를 첨가하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 트랜스웰 아래 면으로 이동한 세포를 관찰하기 위해 CyQuant[®] GR 염색 시약으로 염색 후 관찰하였다. 필드(field)에 나타난 세포의 수를 측정하여 대조군에 대한 퍼센트 비율(%)로 표시하였다.

[0106] 그 결과, 선암 세포주 A549에서 대조군과 비교하였을 때 TM4SF4의 과발현시 세포의 이동성은 약 30% 증가한 것을 알 수 있었으며(도 7의 위), 이는 상기 실시예 6에서 관찰된 결과와 일치한다.

[0107] <7-2> A549 세포에서 TM4SF4의 저발현에 따른 세포의 침윤성 감소 확인

[0108] 세포 침윤을 측정하기 위해, 실시예 3-3에서 기재된 것과 동일한 방법으로 A549 세포에 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 저발현을 유도하였다. 72시간 후에 A549 세포를 5×10^5 개로 준비하고 트랜스웰 윗면에 Matrigel[™] 10 µl로 코팅하여 건조시킨 후, 우태아혈청이 없는 RPMI 1640 배지로 상온에서 30분 배양시켰다. 그 후, 상기 실시예 7-1에 기재된 세포 이동성 측정 방법과 동일하게 트랜스웰을 사용하여 실험을 수행하였다. 배양이 끝난 후 침윤한 세포들을 관찰하기 위해 웰의 윗 표면 부분을 면봉으로 제거하고 CyQuant[®] GR 염색 시약으로 염색 후 관찰하였다. 필드(field)에 나타난 세포의 수를 측정하여 대조군에 대한 퍼센트 비율(%)로 표시하였다.

[0109] 그 결과, 선암 세포주인 A549에서 TM4SF4의 저발현은 침윤성 또한 약 40%가 증가하였다(도 7의 아래). 따라서 TM4SF4의 발현은 선암 세포주인 A549에서 세포의 이동성 및 침윤성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 곧 암세포의 전이를 촉진하는데 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

실시예 8

[0110] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549 세포에서 웨스턴 블랏팅을 통한 TM4SF4의 저발현에 따른 MMP(matrix metalloprotease) 발현의 감소 확인

[0111] 본 실험에서는 암세포의 전이를 위해 필수적인 혈관생성(angiogenesis)에 TM4SF4의 발현이 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 MMP의 발현량을 조사하였다. MMP는 세포외 기질(matrix)을 분해하는 단백질 분해효소로서 혈관생성에 필수적인 요소 중 하나로 잘 알려져 있다.

[0112] 실시예 3-3에서 기재된 것과 동일한 방법으로 A549 세포에 siRNA를 이용하여 TM4SF4의 저발현을 유도하였다. 72시간 후, 상기 실시예 2에서 기재된 것과 동일한 방법으로 아무 자극이 없는 세포의 총용리액(whole cell lysate)을 수득하여, MMP-2, 7, 9의 발현량을 각각의 항체(R&D system, USA)을 이용하여 웨스턴 블랏팅에 의해 확인하였다. β-액틴(actin)은 로딩 대조군(loadng control)로써 함께 수행되었다.

[0113] 그 결과, TM4SF4 발현의 억제에 의하여 세포내 MMP-2, 7, 9의 발현량이 현저하게 감소하는 것이 나타났다(도 8). 즉, TM4SF4는 세포내의 MMP-2, 7, 9의 발현을 조절한다.

실시예 9

[0114] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 TM4SF4의 과발현에 따른 세포 성장 및 방사선 저항성의 감소 확인

[0115] A549세포에서 TM4SF4를 과발현 하기 위해 TM4SF4/pcDNA3.1 발현벡터를 이용하는 방법, 세포의 성장 및 방사선

민감도를 측정하기 위한 콜로니 형성 분석 및 그 결과를 생존률(%)로 기재하는 방법이 실시예 3-2에서 기재된 것과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0116] 그 결과, 대세포암종에서 나타난 결과와 반대로, 선암 세포주인 A549에서는 TM4SF4가 과발현될 경우에 배양된 콜로니 및 방사선 조사 후 배양된 콜로니 모두 그 수가 증가하였다(도 9). 이는 실시예 4의 결과와 일관성 있는 것으로, 선암 세포주에서 TM4SF4의 과발현이 세포의 성장 및 방사선 저항성의 증가를 초래하였다.

실시예 10

[0117] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 TM4SF4 과발현시 웨스턴 블랏팅(Western blotting)을 통한 세포내 신호 경로 활성도의 증가 확인

[0118] 실시예 4 및 5에서 보여진 것처럼 TM4SF4의 저발현이 세포의 성장 및 방사선 저항성을 담당하는 세포내 신호의 활성도를 억제함으로써 그 세포의 성장 및 방사선 저항성을 감소를 초래하듯이, 본 실험은 TM4SF4의 과발현이 상기 세포내 신호의 활성도(EGFR, IGF1R β , PI3K, NK- κ B 및 ERK)에 영향을 주는지 확인하고자 하기 위해 수행되었다.

[0119] A549 세포에서 TM4SF4의 과발현은 상기 실시예 3-2에서 기재된 것과 같이 수행되었고, 세포내 신호경로의 활성화를 알아보기 위해 상기 실시예 5에 기재된 것과 같이 수행되었다.

[0120] 그 결과, 선암 세포주 A549 세포에서 TM4SF4의 과발현은 IGF1R β , PI3K, NK- κ B 인산화의 증가를 초래하였고, EGFR 및 ERK의 활성도에는 큰 영향을 미치지 못하였다(도 10). 따라서, TM4SF4의 과발현이 IGF1R β , PI3K, NK- κ B의 활성화를 증가시킴으로써 상기 실시예 9의 결과와 같은 세포 성장 및 방사선 저항성의 증가가 초래되었다.

실시예 11

[0121] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 상처회복을 통한 TM4SF4의 과발현에 따른 세포 이동성의 증가 확인

[0122] 실시예 6의 결과에서 나타난 것과 같이, A549에서 TM4SF4의 저발현은 세포의 이동성을 감소시켰다. 이를 다시 확인하기 위해, 본 실험에서는 동일한 선암 세포주 A549에서 TM4SF4를 과발현 시켰을 때 세포의 이동성에 변화가 있는지 알아보았다.

[0123] A549 세포에 TM4SF4를 과발현시키기 위한 방법은 실시예 3-2에 기재된 것과 동일하게 수행하였다. 그 후, 상처회복을 통한 세포의 이동성을 관찰하기 위해 상기 실시예 6에 기재된 것과 동일한 방법으로 세포의 이동성을 측정하고 그 결과를 나타내었다.

[0124] 그 결과, 선암 세포주인 A549에서 TM4SF4를 과발현시켰을 때, 대조군에 비하여 상처난 세포 사이의 간격이 24시간 후 감소하였다(도 11). 따라서, A549에서 TM4SF4의 발현이 증가되었을 때, 세포의 이동성이 증가하였다.

실시예 12

[0125] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 TM4SF4의 과발현시 트랜스웰을 통한 세포 이동성 및 침윤성의 증가 확인

[0126] 트랜스웰을 사용하여 A549 세포의 이동성 및 침윤성은 TM4SF4의 과발현에 의해 어떠한 영향을 받는지 확인하고자 본 실험을 수행하였다.

[0127] <12-1> A549 세포에서 TM4SF4의 과발현에 따른 세포의 이동성 증가 확인

[0128] 상기 실시예 3-2에 기재된 것과 동일한 방법으로 발현벡터 TM4SF4/pcDNA3.1를 사용하여 A549 세포에서 TM4SF4의 과발현을 유도하였다. 그 후, 실시예 7-1에 기재된 것과 같이 트랜스웰을 사용하여 세포의 이동성을 관찰하였다.

[0129] 그 결과, 선암 세포주인 A549에서 TM4SF4가 과발현되었을 때 세포의 이동성이 대조군에 비하여 약 30% 가량 증가 되었다(도 12, 위).

[0130] <12-2> A549 세포에서 TM4SF4의 과발현에 따른 세포의 침윤성 증가 확인

[0131] 상기 실시예 3-2에 기재된 것과 동일한 방법으로 발현벡터 TM4SF4/pcDNA3.1를 사용하여 A549 세포에서 TM4SF4의 과발현을 유도하였다. 그 후, 실시예 7-2에 기재된 것과 같이 트랜스웰을 사용하여 세포의 침윤성을 관찰하였다.

[0132] 그 결과, 선암 세포주인 A549에서 TM4SF4가 과발현되었을 때 세포의 침윤성이 대조군에 비하여 약 40% 가량 증가되는 것을 알 수 있었다(도 12, 아래).

실시예 13

[0133] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 웨스턴 블랏팅을 통한 TM4SF4의 과발현에 따른 MMP(matrix metalloprotease) 발현의 증가 확인

[0134] 실시예 6 내지 8의 결과에서 나타난 것과 같이, A549 세포에서 TM4SF4의 과발현은 MMP-2,7,9 과발현을 유도하였다. 상기 결과를 확인하고자, 본 실험에서는 A549 세포에서 TM4SF4의 과발현이 MMP-2,7,9의 과발현을 유도하는지 웨스턴 블랏팅을 통해 알아보았다.

[0135] 실시예 3-2에서 기재된 것과 동일한 방법으로 A549 세포에 TM4SF4의 과발현을 유도하였다. 그 후, 상기 실시예 2에서 기재된 것과 동일한 방법으로 세포 총 용리액(whole cell lysate)을 수득하여 웨스턴 블랏팅을 실시하여 MMP-2, 7, 9 발현량을 확인하였다.

[0136] 그 결과, 선암 세포주인 A549 세포에서 TM4SF4의 과발현은 MMP-2, 7, 9의 발현량을 증가시켰다(도 13).

실시예 14

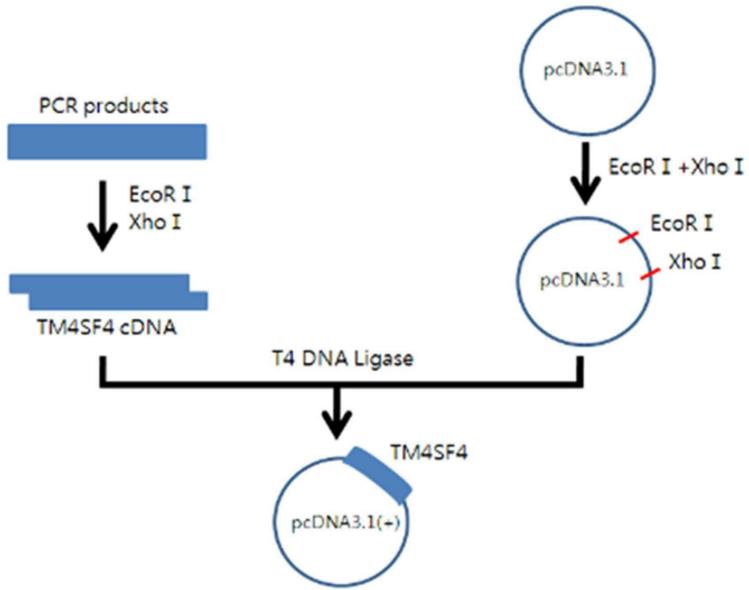
[0137] 폐암 세포 중 선암 세포주 A549세포에서 항-TM4SF4 항체의 처리에 따른 세포 성장의 감소 확인

[0138] A549 세포의 2×10^3 개를 60-mm 세포배양용기에 넣어 배양하고 중화 항-TM4SF4 항체(neutralizing anti-TM4SF4 antibody, Abcam)를 각각 $1 \mu\text{g/ml}$ 또는 $3 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 처리한 날로부터 5일 후 0.5%(w/v) 크리스트랄 바이올렛 용액으로 염색하고 관찰하여 콜로니들의 숫자를 세어 대조군에 대한 퍼센트 비율(%)로 콜로니 생존률을 표시하였다.

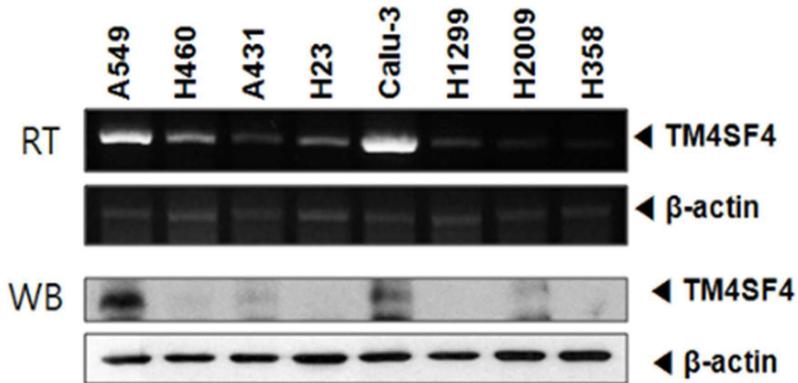
[0139] 그 결과, siRNA를 이용하여 TM4SF4의 발현을 억제한 것과 동일하게, 처리한 항체의 농도 의존적으로 관찰된 콜로니의 수가 감소하였다(도 14). 이것은 막 단백질인 TM4SF4는 비소성세포 폐암 중 선암 세포주(A549)의 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 나타내며, 막 단백질을 항체로 중화시켰을 때, siRNA로 그 발현을 억제하였을 때와 동일하게 세포의 성장능력이 크게 손상되었다.

도면

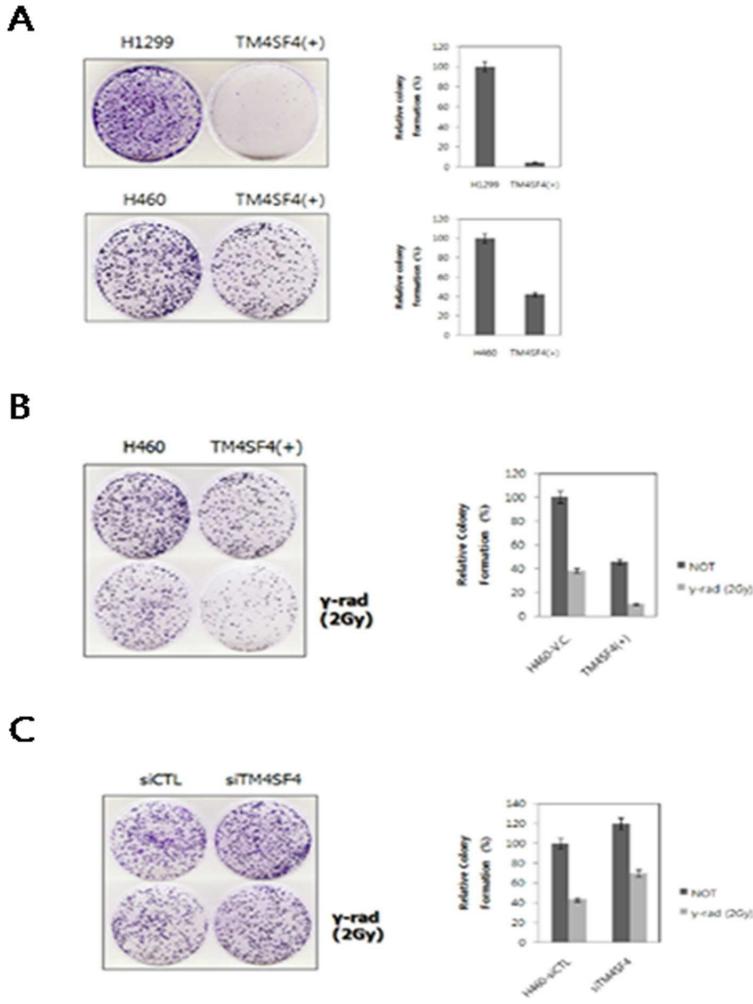
도면1



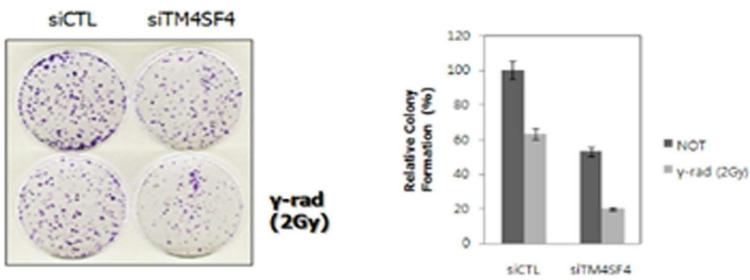
도면2



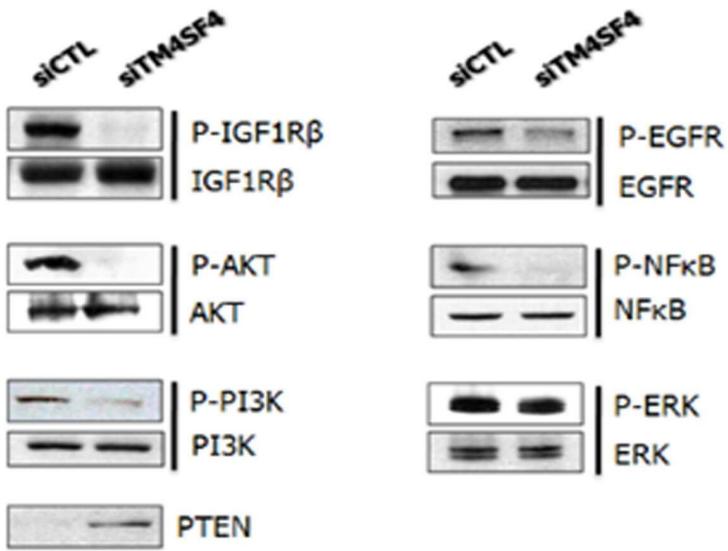
도면3



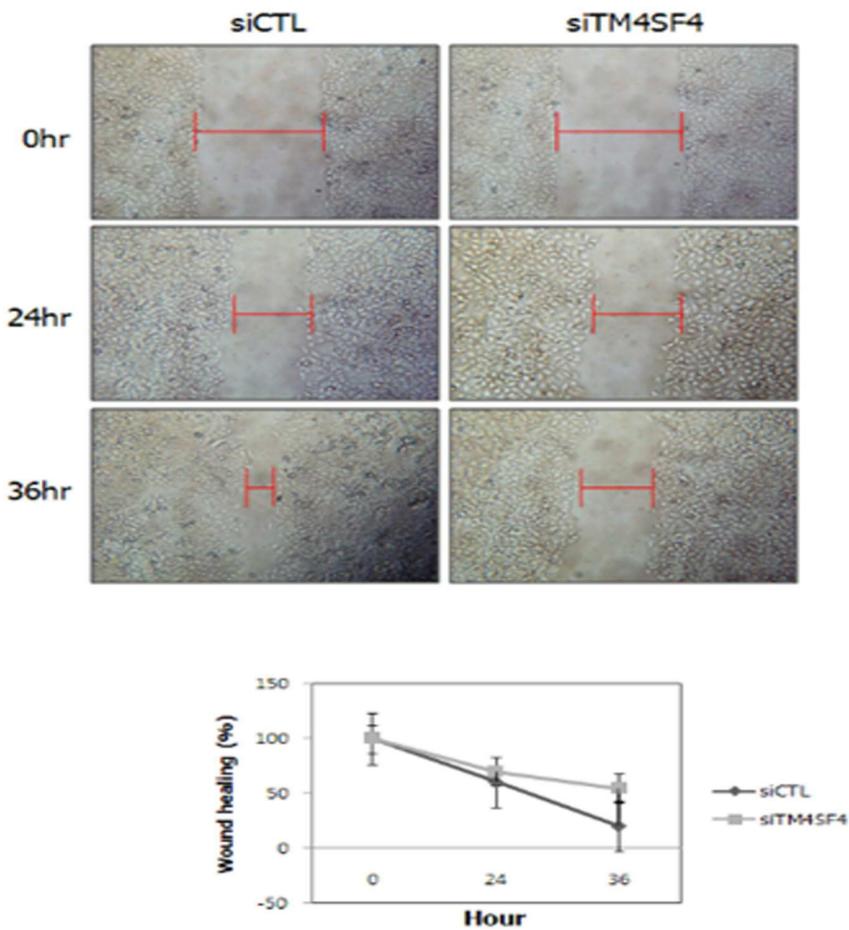
도면4



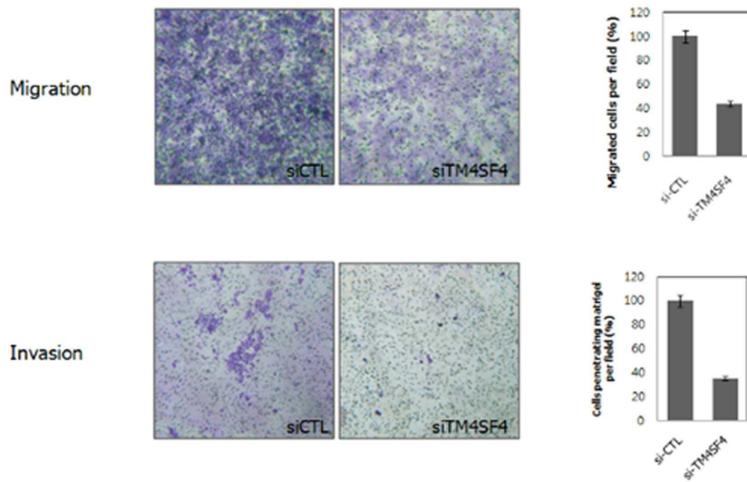
도면5



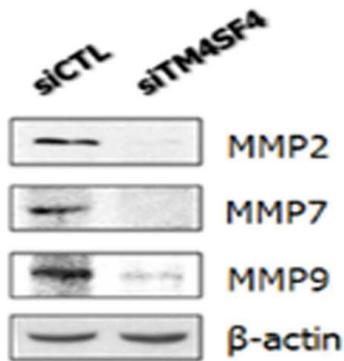
도면6



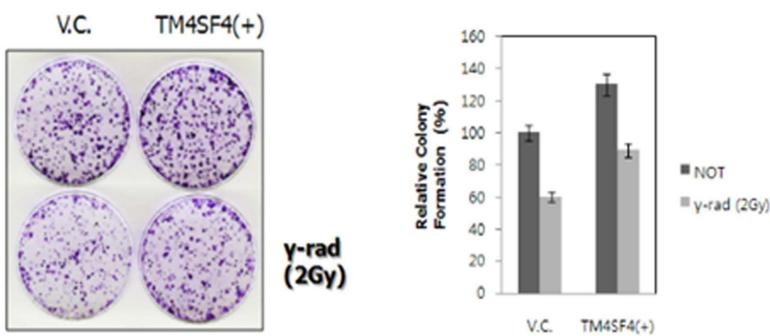
도면7



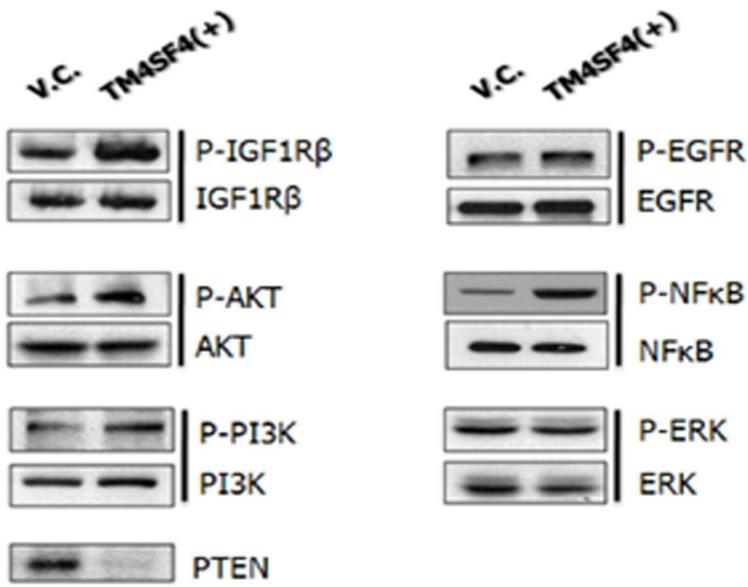
도면8



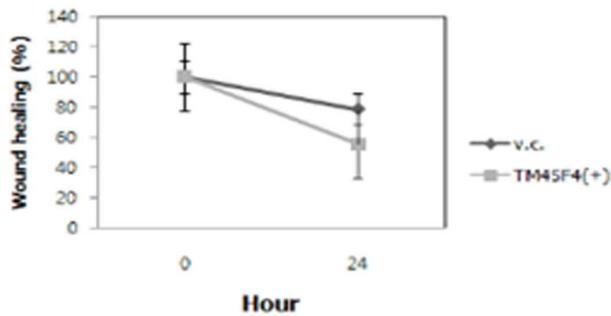
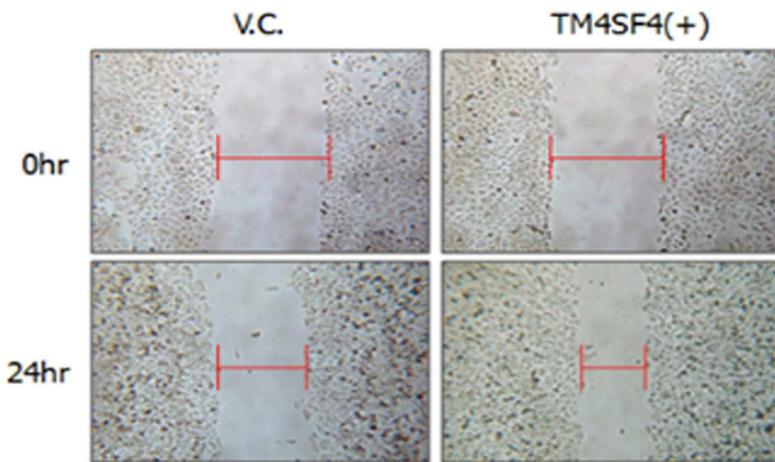
도면9



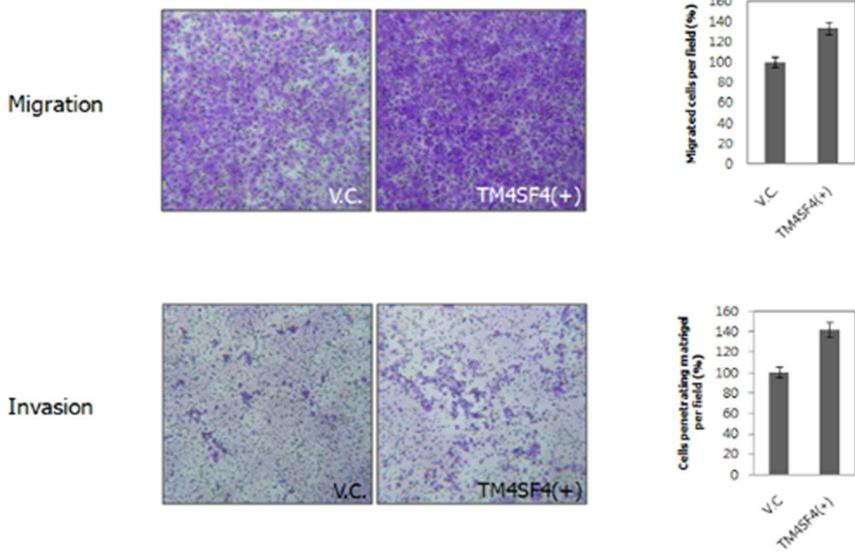
도면10



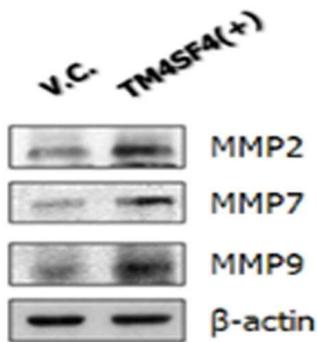
도면11



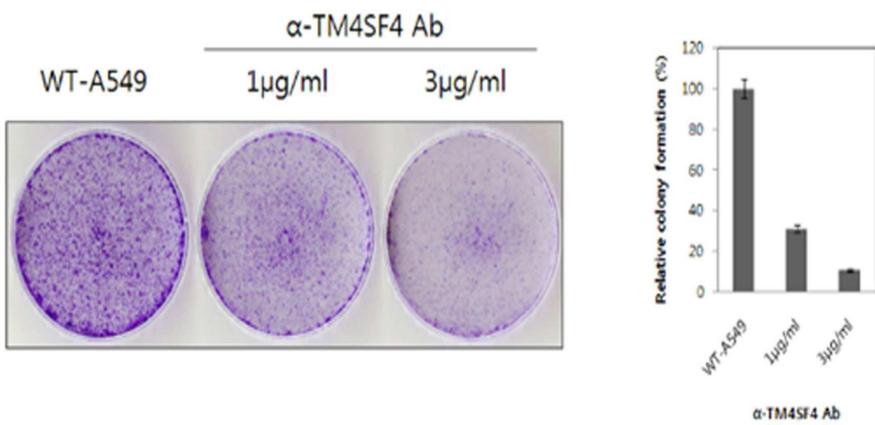
도면12



도면13



도면14



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)