

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년07월12일 10-0599454 2006년07월04일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2004-0029205 2004년04월27일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2005-0104045 2005년11월02일
------------------------	--------------------------------	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자	재단법인서울대학교산학협력재단 서울특별시 관악구 봉천동 산 4-2
(72) 발명자	김성훈 서울특별시 강남구 도곡동 467-17(9/3) 타워팰리스아파트 F-1709
(74) 대리인	김석현

심사관 : 김윤경

(54) 종양 억제자로 작용하는 AIM3의 신규 용도

요약

본 발명은 종양 억제자로 작용하는 AIM3의 신규 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 AIM3 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적 조성물, 암 진단용 키트 및 항암 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물의 유효성분인 AIM3 단백질은 ATM/ATR과 상호작용하여 종양 억제 유전자인 p53을 상향조절(upregulation)함으로써 암세포의 증식을 억제할 뿐 아니라 아포토시스를 유도한다. 따라서 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암을 치료하는데 유용하게 이용될 수 있다. 또한, AIM3 단백질은 항암제 개발을 위한 새로운 표적 및 암 진단용 마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 2a

색인어

AIM3, ATM/ATR, p53, 암 치료

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 AIM3 유전자 내에 삽입된 유전자 트랩 벡터를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 1b는 유전자 트랩 벡터의 삽입 여부를 확인하기 위하여 게노믹 PCR 분석을 수행한 결과이다.

M: 분자량 마커

+/+ : 야생형 마우스

+/-: AIM3 이형접합성 마우스

도 1c는 유전자 트랩 벡터의 삽입 여부를 확인하기 위하여 서던 블롯 분석을 수행한 결과이다.

+/+ : 야생형 마우스 +/-: AIM3 이형접합성 마우스

도 1d는 야생형 마우스(+/+) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+/-)의 각 기관에서 AIM3의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 비교한 결과이다.

도 2a는 AIM3 이형접합성 마우스에서 분리한 다양한 조직과 기관을 면역조직화학적 염색으로 관찰한 결과이다.

도 2b는 림프종 세포가 간과 폐로 전이된 것을 보여주는 항-B220 단일클론 항체하여 관찰된 사진이다.

도 2c는 야생형 마우스(+/+) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+/-)에서 나이(age, month)에 따른 종양의 발생률을 조사한 결과이다.

흰색 막대: 검시된 야생형 마우스의 수(+/+)

회색 막대: 검시된 AIM3 이형접합성 마우스의 수(+/-)

검정색 부분: 종양이 생긴 마우스의 수(tumor +)

도 3a는 야생형 마우스(+/+) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+/-)에서 분리한 비장세포의 세포 주기를 분석한 결과이다.

도 3b는 세포 주기에 따른 AIM3의 발현 수준을 FACS로 조사한 결과이다.

왼쪽 패널(left panel): DNA 함량(Y축)과 AIM3(X축)의 발현을 FACS로 분석하여 세포의 밀도를 등고선으로 표시한 것이다. S로 표시된 부분은 DNA 함량을 기준으로 DNA 합성단계의 세포들이고, G1로 표시된 부분은 G1/G0 단계의 세포들이다.

오른쪽 패널(right panel): 왼쪽 패널에서 G1과 S로 각각 표시된 부분의 AIM3의 발현량을 히스토그램(histogram)으로 표시한 것으로서, X축은 AIM3의 발현량을, Y축은 세포수(cell number)를 나타낸다.

도 3c는 세포의 증식 조건에 따른 AIM3의 세포 내 위치를 조사한 결과이다.

SF: 세포를 무혈청 배지(serum-free media)에서 배양한 경우

CM: 세포를 완전 배지(complete media)에서 배양한 경우

도 4a는 아드리아마이신(Adr) 처리에 의한 AIM3 이형접합성 마우스(+/-) 유래 비장세포의 아포토틱 반응(apoptotic response)을 야생형 마우스(+/+)와 비교하여 조사한 유세포 분석 결과이다.

M1: 아넥신 V-FITC 양성 개체군(annexin V-FITC positive polulations)

도 4b는 아드리아마이신(Adr) 처리에 따른 AIM3 발현 수준의 변화를 처리 시간에 따라 조사한 RT-PCR 분석 및 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

도 5a는 야생형 마우스(+/+) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+/-)에서 분리한 마우스 배아 섬유아세포(MEFs)의 세포 증식을 티미딘 혼입법으로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 야생형 마우스(+ /+) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+ /-)에서 분리한 다양한 조직에서 세포의 증식율을 항-Ki67 항체(초록색)를 이용한 면역형광 염색법으로 관찰한 사진이다.

도 5c는 AIM3 유전자를 도입한 세포의 증식율을 티미딘 혼입법으로 조사한 결과를 나타내는 그래프이다.

EV: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염한 HCT116 세포

AIM3: AIM3 발현 벡터로 형질감염한 HCT116 세포

도 6a는 p53 발현에 대한 AIM3의 효과를 AIM3 이형접합성 마우스(+ /-) 유래의 마우스 배아 섬유아세포(MEFs)와 AIM3 발현 벡터로 형질감염한 HCT116 세포를 대상으로 조사한 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

+ /+: 야생형 마우스 + /-: AIM3 이형접합성 마우스

EV: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염한 HCT116 세포

AIM3: AIM3 발현 벡터로 형질감염한 HCT116 세포

도 6b는 p21의 p53-의존성 전사에 대한 AIM3의 효과를 조사한 RT-PCR 분석 결과이다.

-: AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

+: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

도 6c는 p21의 p53-의존성 전사에 대한 AIM3의 효과를 p21 프로모터와 융합된 루시퍼라제 유전자를 함유하고 있는 벡터를 이용한 루시퍼라제 어세이로 조사한 결과이다.

EV: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포에 아무것도 처리하지 않은 경우

EV+ ADR: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포에 아드리아마이신을 처리한 경우

AIM3: AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포에 아무것도 처리하지 않은 경우

AIM3+ ADR: AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포에 아드리아마이신을 처리한 경우

도 6d는 야생형 HCT116 세포(WT), p53 유전자가 결손된 HCT116 세포(p53-/-) 및 p21 유전자가 결손된 HCT116 세포(p21-/-)의 증식에 대한 AIM3의 효과를 나타낸 그래프이다.

EV: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

AIM3: AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

도 6e는 UV 조사 및 아드리아마이신(ADR) 처리에 의한 p53의 유도에 대한 AIM3의 효과를 조사한 결과이다.

EV: 안티센스-AIM3를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

As-AIM3: 안티센스-AIM3를 포함하는 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

도 7a는 p53 유도에 대한 AIM3의 효과를 알아보기 위하여 ATM 억제제인 카페인을 처리한 후 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과이다.

-: AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

+ : AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

도 7b는 p53 유도에 대한 AIM3의 효과를 알아보기 위하여 ATM의 활성을 특이적으로 저해하는 KD-ATM 도메인을 세포에 도입한 후 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과이다.

- : AIM3 유전자를 포함하지 않는 빈 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

+ : AIM3 발현 벡터로 형질감염시킨 HCT116 세포

도 8a는 AIM3와 ATM 간의 상호작용을 알아보기 위하여 UV 및 아드리아마이신을 처리한 후 공동-면역침전법을 수행한 결과이다.

도 8b는 AIM3와 ATM 간의 직접적인 상호작용을 알아보기 위하여 시험관 내 풀 다운 어세이를 수행한 결과이다.

도 8c는 AIM3와 ATR 간의 상호작용을 알아보기 위하여 UV 조사 후 공동-면역침전법을 수행한 결과이다.

도 8d는 야생형 마우스(+ / +) 및 AIM3 이형접합성 마우스(+ / -)로부터 분리한 비장세포 및 흉선세포에서 ATM의 기질인 H2AX의 인산화 수준을 측정된 웨스턴 블롯 결과이다.

p-H2AX: 인산화된 H2AX

도 8e는 ATM의 기질인 H2AX의 인산화에 대한 AIM3의 효과를 안티센스-AIM3(As-AIM3)를 이용하여 분석한 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

- : 아토포시스 유도제인 VP16을 처리하지 않은 경우

+ : 아토포시스 유도제인 VP16을 처리한 경우

도 9a는 다양한 인간 암 세포주에서 AIM3의 발현 수준을 RT-PCR로 분석한 결과이다.

도 9b는 다양한 인간 암 세포주에서 AIM3 DNA 양을 조사하기 위하여 게노믹 PCR을 수행한 결과이다.

도 9c는 9명의 백혈병 환자로부터 얻은 조직에서 AIM3와 p21의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

APML: 급성 전골수구성 백혈병

CML: 만성 골수성 백혈병

도 9d는 9명의 간암 환자로부터 분리한 정상 조직과 암 조직에서 AIM3의 발현 수준을 비교 조사한 RT-PCR 분석한 결과이다.

N: 종양 인접 부위의 정상 조직

T: 간암 조직

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 종양 억제자로 작용하는 AIM3의 신규 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 AIM3 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적 조성물, 암 진단용 키트 및 항암 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

세포는 다양한 안전장치를 가지고 있다. 그 중 하나는 염색체 DNA가 손상되었을 때 세포 분열을 중단하고 먼저 그 손상이 복구되도록 함으로써 돌연변이가 확립되지 못하도록 하는 것이다. 자외선 등으로 인해 DNA가 손상되었을 때 그것이 복구되지 않은 채 세포 분열이 계속되면 손상된 상태로 염색체 DNA가 복제되어 돌연변이가 축적된다. 이와 같이 돌연변이가 축적됨에 따라 암세포의 발생 확률도 높아진다. 따라서, 세포는 DNA가 손상되었을 때 그것을 복구하는 과정과 복구가 이루어지기까지 세포의 증식을 중단하는 세포 내 피드백 기작(feedback mechanism)을 작동시켜 암의 발생을 억제한다. 이러한 피드백 기작은 세포 분열 각 주기 동안의 체크포인트(checkpoint)에 의해 매개된다. DNA 손상에 의해 개시되는 세포 주기 체크포인트는 주로 ATM(ataxia-telangiectasia-mutated)과 ATR(ATM-and Rad3-related)에 의해 조절된다(Shiloh, Y. *Curr. Opin. Gent. Dev.*, 11:71-77, 2001; Abraham, R. T. *Genes Dev.*, 15:2177-2196, 2001). ATM과 ATR이 결핍된 세포는 방사선에 반응하여 세포 분열 주기를 멈추는데 결함을 나타내었으며, 특히 ATR이 결핍된 세포에서는 이중 나선 파손(double strand breaks)이라 알려진 심각한 손상이 일어났다. 또한 ATM/ATR이 변이되었을 때 종양 발생 확률이 매우 증가하는 것으로 알려졌다.

ATR과 ATM은 상동성이 높으며, 동일한 기질을 갖는다. 그러나, 이들은 다른 유전독성 스트레스에 의해 활성이 증진된다는 면에서 다르다. ATM은 주로 DNA 이중 가닥을 파괴하는 IR(ionizing radiation)와 같은 제제(agent)에 대해 반응하는 반면, ATR은 IR를 비롯하여 DNA 상에서 벌키한 부가물(bulky adducts)을 생성시키거나 단일 가닥의 DNA를 생성하는 제제에 대해 반응한다. 또한 ATM과 ATR은 다른 방법으로 활성화된다. ATM은 자가인산화(autophosphorylation)를 통해 활성화되는데, ATM이 자가인산화되면 이량체 형태가 붕괴된다(Bakkenist, C. J. *et al.*, *Nature*, 421:499-506, 2003). ATM의 자가인산화가 어떻게 일어나는지에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않았다. ATR 또한 자가인산화될 수 있으나, 그것이 세포 내에서 불활성형 이량체를 형성하는지 활성형 단량체를 형성하는지에 대해서는 명확치 않다. 또한 ATM/ATR이 활성화되는데 다른 서브유닛이나 보조인자가 요구되는지에 대해서도 아직 명확히 밝혀지지 않았으며, DNA 손상에 의하여 ATM/ATR이 활성화가 되어 작동되는 신호전달체계의 생화학적인 세포 내 작용기작 또한 완전히 규명되지 않았다.

ATM/ATR에 의해서 직접 인산화되는 표적단백질로서 p53, c-Abl, 복제 단백질 A(replication protein A) 등이 밝혀졌으며, 그 중에서 p53은 ATM/ATR에 의해 세린 15(serine 15)에서 인산화가 일어난다. p53가 과발현되면, G2가 정지되고 또한 세포가 G2에서 M으로 들어가는데 필요한 두 개의 단백질인 CDK1(cyclin-dependent kinase 1) 및 사이클린 B1(cyclin B1)의 합성이 저해된다고 보고된 바 있다. 이와 같이 p53은 세포의 비정상적 분열과 증식을 억제할 뿐만 아니라 DNA가 손상되었을 때에 세포 주기를 정지시켜 손상된 DNA를 복구하는 기능을 수행한다. 최근 p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서만 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암종에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고 있다. 또한 p53은 또 다른 종양 억제 유전자인 p21의 전사를 증가시켜 G1/S 전사를 억제할 뿐 아니라 p53-의존성 아포토시스(apoptosis)를 일으킨다. p53에 의하여 발현되는 p21은 CKI(cyclin-dependent kinase inhibitor)의 일종으로서 세포의 분열과 증식을 억제하는 기능을 하는 것으로 알려졌다.

따라서, 세포 주기 조절에 관여하는 인자들 또는 이들을 활성화하는 물질을 이용하여 새로운 항암제를 개발하려는 노력이 계속되고 있다.

한편, 아미노아실-tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetases; ARSs)들은 단백질 합성의 첫 번째 단계를 촉매하는 중요한 효소로서 다양한 생물학적 기능에 관여하는 다기능 단백질들이다(Ko *et al.*, *Proteomics*, 2:1304-1310, 2002). 이들 중 MRS(methionyl-tRNA synthetase), QRS(glutaminyl-tRNA synthetase), RRS(arginyl-tRNA synthetase), KRS(Lysyl-tRNA synthetase), DRS(aspartyl-tRNA synthetase) 등과 같은 다양한 포유동물의 tRNA 합성효소들은 p43, p38 및 p18로 명명된 세 개의 비효소 보조인자들(non-enzyme cofactors)과 결합하여 고분자 단백질 복합체(macromolecular protein complex)를 형성한다(Han *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303:985-993, 2003). ARSs가 단백질 합성에 필수적인 효소이기 때문에, 상기 복합체는 단백질 합성을 돕기 위해 형성되는 것으로 사료되고 있다.

ARSs와 결합하는 상기 비효소 보조인자들 중에서 p43은 면역 반응과 혈관신생에서 사이토카인으로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ko *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:23028-23033, 2001b; Park *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277:45234-45248, 2002). 또한 p38은 원종양 유전자(protooncogene)인 c-myc을 하향조절(downregulation)하고, 폐 분화에 관여하는 것으로 밝혀졌다(Kim *et al.*, *Nat. Genet.*, 34:330-336, 2003). 마지막 보조인자인 p18은 신장 요소 서브유닛(elongation factor subunits; EF-1)과 서열상동을 보이기 때문에(Quevillon and Mirande, *FEBS Lett.*, 395:63-67, 1996), 단백질 합성에 관여할 것으로 추정되고 있다. 그러나, p18의 생리학적 기능에 대해서는 아직까지 명확히 규명되지 않았으며, 특히 p18과 암의 관련성에 대해서는 전혀 연구된 바 없다.

이에 본 발명자들은 p18의 생리학적 기능을 규명하기 위하여 연구를 거듭하던 중, p18이 DNA 손상신호에 의하여 작동되는 ATM/ATR의 신호전달체계에서 ATM/ATR와 상호작용하여 그들을 활성화시키고 종양 억제 유전자인 p53을 상향조절(upregulation)한다는 새로운 사실을 규명하여 p18이 강력한 종양 억제자로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 p18(**A**RS- **i**nteracting **m**ultifunctional protein **3**) 단백질의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 p18(ARS-interacting multifunctional protein 3) 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

(a) p18(ARS-interacting multifunctional protein 3) 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보 물질을 배양하는 단계 및;

(b) p18(ARS-interacting multifunctional protein 3) 단백질의 활성화 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 p18(ARS-interacting multifunctional protein 3) 단백질을 암호화하는 핵산, 이의 단편, 이들로부터 암호화되는 펩타이드 및 상기 펩타이드에 대한 항체로 구성되는 군에서 선택되는 하나를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 아미노아실-tRNA 합성효소(aminoacyl-tRNA synthetases; ARS) 복합체의 보조인자로 알려진 p18의 새로운 활성을 규명하였다. 본 발명자들은 상기 p18을 'AIM3(**A**RS- **i**nteracting **m**ultifunctional protein **3**)'라 재명명하였다.

본 발명에서 규명한 AIM3의 생리학적 활성(기능)은 다음과 같다.

첫째, AIM3는 DNA 합성 단계와 DNA가 손상되었을 때 핵 내로 이동되고, 높은 수준으로 유도된다.

둘째, 세포에 대하여 항-증식 활성(anti-proliferation activity)을 나타낸다.

셋째, 세포의 아포토시스를 유도한다.

넷째, ATM/ATR과 직접적으로 상호작용하여 종양 억제 유전자인 p53을 상향조절(upregulation)한다.

다섯째, AIM3 발현 수준의 감소는 종양형성을 유도하며, 암 세포주와 암환자로부터 분리된 조직에서 낮은 수준으로 발현된다.

이와 같이 본 발명에서는 AIM3가 ATM/ATR 및 p53을 포함하는 신호전달 경로에서 작용하는 종양 억제 유전자, 보다 구체적으로 한 쪽 대립인자로 불충분한 종양 억제 유전자(haploinsufficient tumor suppressor gene)임을 최초로 규명하였다.

본 발명의 일 실시예에서는 AIM3의 생물학적 기능을 규명하기 위하여 유전자 트랩 방법(gene trap method)을 이용하여 AIM3 유전자가 결손된 마우스를 제조하였다. 이후, 유전자 트랩 벡터의 삽입으로 인해 돌연변이가 유발된 게노믹 DNA를

마우스의 배 줄기세포(embryonic stem cell)에 도입하여 돌연변이체 라이브러리(mutant library)를 제작하였다. 상기 라이브러리로부터 돌연변이된 AIM3 유전자를 함유하고 있는 클론을 탐색하고, 이를 이용하여 AIM3 이형접합성 돌연변이체 마우스(heterozygous mutant mice)를 제조하였다.

본 발명의 다른 실시예에서는 AIM3 돌연변이체 마우스 내에 있는 AIM3 대립 유전자(allele)의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 유전자 트랩 벡터가 AIM3 유전자 내 첫 번째 엑손(exon)과 두 번째 엑손 사이에 삽입되었음을 확인하였다(도 1a 참조). 또한 게노믹 PCR과 서던 블롯을 수행하여 AIM3 돌연변이를 확인하였으며(도 1b 및 도 1c 참조), AIM3의 발현에 대한 돌연변이의 효과를 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인하였다(도 1d 참조).

또한, 상기 AIM3 이형접합성 돌연변이체 마우스(이하, 'AIM3^{+/-} 마우스'라 함)를 이종교배하여 얻은 자손들의 출생 후 유전형 및 시간 경과에 따른 배아의 유전형을 조사한 결과, AIM3^{+/-} 마우스가 야생형 한 배 새끼(littermates)들과 유사한 비율로 나타남을 확인하였다(표 1 참조). 이는 AIM3^{+/-} 마우스의 약 50%가 출생 전 단계(pre-natal stage)에서 치사됨을 나타내는 것이다. 또한 AIM3 동형접합성 마우스(이하, 'AIM3^{-/-} 마우스'라 함)는 배아 초기에 치사됨이 확인되었다(표 1 및 표 2 참조). 이로부터 AIM3가 생체 내에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 사료되었다. 특히, DNA-손상 반응(DNA-damaging response)과 수복 시스템(repair system)에 관여하는 Rad51, Chk1/2 및 ATR과 같은 단백질들의 유전적 소실(genetic eradication)이 배아 초기에 치사를 유발함을 볼 때(de Klein *et al.*, *Curr. Biol.*, 10:479-482, 2000; Lim and Hastay, *Mol. Cell Biol.*, 14:7133-7143, 1996; Takai *et al.*, *Genes Dev.*, 14:1439-1447, 2000), AIM3가 DNA-손상 반응과 수복 시스템에 관여하는 것으로 사료되었다.

AIM3 단백질이 단백질 합성에 관여하는 멀티-tRNA 합성효소 복합체와 관계가 있으므로(Han *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303:985-993, 2003), 본 발명자들은 AIM3 수준의 감소가 마우스의 전체적인 신체 성장에 영향을 미칠 것으로 예상하였다. 그러나, 흥미롭게도, AIM3^{+/-} 마우스들의 성장률은 성별에 상관없이 야생형 마우스에 비해 다소 증가함이 관찰되었다(결과 미도시). 이는 단백질 합성이 AIM3 수준의 감소에 의해 저해받지 않음을 암시하는 것이다.

본 발명의 또 다른 실시예에서는 AIM3 유전자의 기능을 알아보기 위하여, AIM3^{+/-} 마우스로부터 분리한 조직 및 기관의 조직학적 특성을 조사하였다. 그 결과, AIM3^{+/-} 마우스 유래의 조직과 기관에서 다양한 종양이 발견되었으며, 종양의 발생률은 출생 후 15개월이 경과한 후 급격하게 증가함을 볼 수 있었다(도 2a 내지 도 2c 및 표 3 참조). 특히, AIM3^{+/-} 마우스에서는 림프종이 높은 빈도로 발생하였다(표 3 참조). 이는 DNA 수복 기능의 소실이 림프종을 일으킬 수 있다는 이전의 보고와 일치하는 것이다(Bassing *et al.*, *Cell*, 114:359-370, 2003; Celeste *et al.*, *Cell*, 114:371-383, 2003). 이와 같이 AIM3가 결손된 마우스들에서 다양한 종양들이 자발적으로 생성된다는 결과는 AIM3가 종양형성 기작(tumorigenic pathway)에 관여하는 강력한 종양 억제자임을 나타낸다.

빠른 세포 주기는 종양형성의 전형적인 징후이다(Evan and Vousden, *Nature*, 411:342-348, 2001). 따라서 본 발명의 다른 실시예에서는 AIM3가 세포 주기 조절에 관여하는지 조사하였다. 그 결과, AIM3가 결손된 마우스로부터 유래한 세포는 야생형 세포에 비해 더 빠른 세포주기를 보였다(도 3a 참조). 또한 세포 주기와 관련하여 AIM3의 발현을 유세포 분석법(flow cytometry)으로 조사한 결과, AIM3가 DNA 합성 단계에서 현저하게 유도됨을 확인하였다(도 3b 참조). DNA 합성 단계에서 AIM3가 유도되는 이유를 알아보기 위하여 성장이 멈춘 상태와 증식하는 상태에서 AIM3의 세포 내 위치를 조사한 결과, 세포 성장이 혈청 결핍에 의해 억제되었을 때 AIM3는 주로 세포질(cytoplasm)에서 검출되었으나, 세포가 증식하는 단계에서는 핵에서 검출되었다(도 3c 참조). 상기 결과는 DNA 합성 동안에 AIM3가 유도될 뿐 아니라 핵 내로 이동한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 AIM3가 핵 내에서 신규한 기능을 할 수 있다는 것을 제시한다.

아포토시스에 대한 세포의 저항성 또한 전형적인 종양형성의 징후이다(Evan and Vousden, *Nature*, 411:342-348, 2001). 따라서 AIM3가 아포토시스 조절에도 관여하는지 조사하기 위하여, DNA 손상을 유도하는 아드리아마이신(adriamycin)을 이용하여 AIM3^{+/-} 마우스 유래 세포의 반응을 조사하였다. 그 결과, AIM3^{+/-} 마우스 유래 세포는 아포토시스에 대해 저항성을 나타내었다(도 4a 참조). 또한 DNA 손상에 따른 AIM3 수준의 변화를 조사한 결과, 아드리아마이신 등 DNA 손상제의 처리에 의해 AIM3의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 유도됨을 확인하였다(도 4b 참조).

또한 본 발명의 또 다른 실시예에서는 AIM3가 세포 증식에 관여하는지 조사하였다. 그 결과, AIM3가 결손된 마우스 유래의 세포 및 조직이 야생형에 비해 높은 세포 증식율을 나타냄을 확인하였다(도 5a 및 도 5b 참조). 또한, AIM3 유전자가 도입된 세포의 증식이 야생형 세포에 비해 감소함을 확인하였다(도 5c 참조). 이는 AIM3가 세포에 대하여 항-증식 활성(anti-proliferation activity)을 나타냄을 제시한다.

AIM3가 DNA 합성 단계와 DNA가 손상되었을 때 높은 수준으로 유도되며, 다른 DNA 수복 단백질들(Falck *et al.*, *Nature*, 410:842-847, 2001; Lim *et al.*, *Mol. Cell*, 7:683-694, 2000)과 마찬가지로 항-증식 활성을 갖는다는 상기 결과들은, AIM3가 DNA 복제 또는 DNA 손상으로 부터 야기되는 DNA 수복에 반응하는 신호전달경로에 기능적으로 관여함을 나타내는 것이다.

한편, 종양 억제 유전자인 p53은 세포의 비정상적 분열과 증식을 억제할 뿐만 아니라 세포 DNA가 손상되었을 때 세포 주기를 정지시켜 손상된 DNA를 복구하는 기능을 수행하며, DNA가 무제한적으로 증폭되는 것을 방지하기 위해 세포증식 및 아포토시스(apoptosis)의 조절에 관여한다고 알려져 있다(Levine, *Cell*, 88:323-331, 1997; Vousden, *Cell*, 103:691-694, 2000). 따라서 본 발명자들은 AIM3와 p53의 기능적 연관성을 조사하였다. 그 결과, AIM3 유전자로 형질 감염시킨 세포에서 p53 뿐 아니라 p53의 타겟 유전자인 p21의 수준 또한 증가됨을 확인할 수 있었다(도 6a 및 도 6b 참조). 이러한 증가는 아포토시스를 유도하는 아드리아마이신의 처리에 의해 더욱 증가하였다(도 6c 참조). 또한 AIM3 유전자로 형질감염된 세포의 증식은 야생형 세포에 비해 감소하였으며, 이러한 AIM3의 항-증식 활성은 p53 또는 p21이 소실된 암세포에서는 소멸되었다(도 6d 참조). UV 또는 아드리아마이신에 의한 p53의 유도는 AIM3가 억제되었을 때 저해되었다(도 6e 참조). 이는 AIM3가 DNA 손상에 의해 유도되는 p53의 발현을 상향조절하며, p53을 통해 암세포 증식을 억제함을 나타내는 것이다. 상기 결과들로부터 AIM3가 항암제로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

포유동물의 ATM과 ATR은 세린-쓰레오닌 키나제(serine-threonine kinase)로서, 다른 유전독성 스트레스(genotoxic stress)들에 반응하는 DNA 수복 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(Yang *et al.*, *Carcinogenesis*, 24: 1571-1580, 2003). 또한 ATM과 ATR은 DNA 손상에 반응하여 p53을 직접적으로 활성화시킨다고 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 AIM3가 ATM/ATR을 통하여 p53을 조절하는지 조사하였다. 그 결과, AIM3가 ATM의 FAT 도메인과 직접적으로 상호작용하여 ATM의 양성 조절자(positive modulator)로 작용하며, 또한 ATM과의 상호작용을 통하여 p53을 상향조절함을 확인하였다(도 7a 내지 도 7b 및 도 8a 내지 도 8e 참조).

마지막으로 본 발명자들은 암과 AIM3의 기능적 연관성을 규명하기 위하여 여러 종류의 암 세포주들에서 AIM3의 발현 수준을 조사하였다. 그 결과, AIM3의 발현 수준이 몇몇 암 세포주들에서 감소됨을 확인하였다(도 9a 참조). 그 원인을 게놈 PCR 분석으로 조사한 결과, 상기 세포주들의 AIM3 DNA의 양이 적음을 확인하였다. 이는 상기 세포주들에서 하나의 AIM3 대립인자가 결손된 것을 나타낸다(도 9b 참조). 또한 9명의 백혈병 환자로부터 분리된 조직에서 AIM3의 발현 수준을 조사한 결과, 3명의 환자의 조직에서 AIM3가 낮은 수준으로 발현됨을 관찰되었다. 이 경우에는 p53의 타겟 유전자인 p21의 발현 또한 강하게 억제되었다(도 9c 참조). 상기 결과로부터 AIM3의 저발현이 다양한 암 세포주 및 암환자의 조직과 높은 빈도로 연관되어있음을 알 수 있었다. 이는 AIM3의 발현 수준을 측정하여 암 환자를 진단할 수 있음을 나타내는 것이다.

따라서, 본 발명은 AIM3 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 AIM3 단백질은 천연형 또는 재조합 AIM3 단백질 또는 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질을 말한다. 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/재조합 AIM3 단백질과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다. 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 AIM3 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다. 또한 상기 "기능적 유도체"는 상기 AIM3 단백질의 물리/화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 AIM3 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.

본 발명의 AIM3 단백질의 아미노산 서열은 공지되어 있으며, 포유동물로부터 유래된 것이다. 바람직하게는 상기 포유동물은 인간을 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 AIM3 단백질은 **서열번호 1**로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 말한다. 본 발명에 사용되는 AIM3 단백질은 공지된 서열로부터 당업계에 공지된 유전공학적인 방법으로 제조할 수 있다.

또한, 상기 AIM3 단백질을 유효성분으로 하는 약학적 조성물은 경구적으로 또는 정맥 내, 피하, 비강 내 또는 복강 내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육 내 주사 및 정맥 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다. 이외에 본 발명 약학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. 또한 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함함으로써 각종 제형의 형태로 제조할 수 있다. 상기 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투

여시에는 결합제, 활탁제, 봉해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료를 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제 및 안정화제를 혼합하여 사용할 수 있으며 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 유허제 및 보존제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트포키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼(wafer) 등의 형태로 제조할 수 있으며 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다.

또한 본 발명의 약학적 조성물은 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 함유할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함한다. 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간으로부터 유래된 AIM3 단백질을 암호화하는 DNA를 말한다. 상기 인간 AIM3 유전자는 공지되어 있다(GenBank accession No. AB011079). 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 핵산은 바람직하게는 **서열번호 2**로 표시된다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물에는 AIM3 단백질의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산이 포함될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상기 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산 또는 그에 상보적인 염기서열을 포함하는 핵산과 적어도 80%, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 핵산이 포함된다.

상기 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산은 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 삽입시킨 후, 상기 발현 벡터를 감염(infection) 또는 형질도입(transduction) 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시켜 유전자 치료에 사용할 수 있다.

플라스미드 발현 벡터를 이용한 유전자 전달 방법은 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로서, FDA로부터 승인받은 사람에게 사용할 수 있는 방법이다(Nabel, E. G., *et al.*, *Science*, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

본 발명에 따른 핵산을 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 갈슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 종양 세포 내로 도입할 수 있다(Wu *et al.*, *J. Bio. Chem.*, 267:963-967, 1992; Wu and Wu, *J. Bio. Chem.*, 263:14621-14624, 1988).

또한, 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 바이러스 발현 벡터로는 이에 한정되지는 않으나, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 허피스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 등이 포함된다.

상기 레트로바이러스 벡터는 바이러스 유전자가 모두 제거되었거나 또는 변경되어 비-바이러스 단백질이 바이러스 벡터에 의해 감염된 세포 내에서 만들어지도록 작제된 것이다. 유전자 요법을 위한 레트로바이러스 벡터의 주요 장점은 다량의 유전자를 복제세포 내에 전달하고, 세포 DNA 내로 전달된 유전자를 정확하게 통합하며, 유전자 형질 감염 후 연속적인 감염이 유발되지 않는 것이다(Miller, A.D., *Nature*, 357:455-460, 1992). FDA에서 인증 받은 레트로바이러스 벡터는 PA317 암포트로픽 레트로바이러스 패키지 세포를 이용하여 제조한 것이다(Miller, A.D. and Buttimore, C., *Molec. Cell Biol.*, 6:2895-2902, 1986).

비-레트로바이러스 벡터로는 상기에서 언급한 바와 같은 아데노바이러스가 있다(Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992; Jaffe *et al.*, *Nature Genetics*, 1:372-378, 1992; Lemarchand *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6482-6486, 1992). 아데노바이러스의 주요 장점은 다량의 DNA 단편(36kb 게놈)을 운반하고, 매우 높은 역가로 비-복제세포를 감염시킬 수 있는 능력이 있다는 것이다. 또한, 허피스 바이러스도 사람 유전자 요법을 위해 유용하게 사용될 수 있다(Wolfe, J.H., *et al.*, *Nature Genetics*, 1:379-384, 1992). 이외에도, 공지된 적절한 바이러스 벡터가 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있다.

상기 AIM3 유전자를 발현시킬 수 있는 벡터는 공지의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 국소적으로, 비경구, 경구, 비강, 정맥, 근육 내, 피하 내 또는 다른 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 특히, 상기 벡터는 표적 조직의 종양세포를 치료하기 위한 유효량으로 표적 암 또는 종양세포 내로 직접 주사할 수 있다. 특히, 눈, 위장관, 비뇨생식기관, 폐 및 기관지 시스템과 같은 체강(body cavity)에 있는 암 또는 종양의 경우에는 본 발명의 약학적 조성물을 암 또는 종양에 의해 영향을 받는 유강 기관(hollow organ) 내에 바늘, 도관(catheter) 또는 다른 종류의 수송튜브를 이용하여 직접 주입할 수 있다.

이때, X-선, 소노그램(sonogram), 또는 광섬유 시스템(fiberoptic visualization system)과 같은 영상 장치가 표적조직의 위치확인이나 바늘 또는 도관의 주입에 사용될 수 있다. 그 밖에, 직접적으로 도달할 수 없거나 분석학적으로 분리해낼 수 없는 종양 또는 암의 경우에 본 발명에 따른 약학적 조성물을 혈액순환계 내로 투여할 수 있다.

AIM3 단백질을 암호화하는 핵산을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제로는 분산제, 습윤제, 현탁제, 희석제 및 충전제가 포함된다. 특정의 약학적으로 허용되는 담체와 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 발현벡터의 비율은 조성물의 용해도와 화학적 성질, 특정의 투여방식 등에 의해 결정될 수 있다.

본 발명에 따른 약학적 조성물의 치료학적 또는 예방학적 유효량은 투여대상, 연령, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 이상 세포의 과증식 즉, 암의 치료에 매우 효과적이다. 암으로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종과 같은 암 또는 이들 암의 하나 이상의 조합일 수 있다. 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 p53 유전자 이상으로 인한 암의 치료에 효과적이다. 또한 본 발명에 따른 약학적 조성물은 ATR/ATM의 활성화 저하로 유발되는 암, 특히 백혈병(leukemia)과 림프종의 치료에도 사용될 수 있다.

또한, 본 발명에서 규명한 바와 같이 AIM3는 ATM/ATR과 직접적으로 상호작용하여 p53의 발현을 유도함으로써 암세포의 아포토시스를 촉진하고, 암세포의 증식을 억제하는 활성을 지닌다. 이러한 AIM3의 특성은 암의 치료 또는 예방에 효과적인 항암 물질을 스크리닝하는 데 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명은 (a) AIM3 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양하는 단계; 및 (b) AIM3 단백질의 활성 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 상기에서 AIM3 단백질 활성은 ATM/ATR과의 결합 활성 또는 p53의 발현을 유도하는 활성을 의미한다. 또한 AIM3 단백질의 세포 내 수준 증가라 함은 AIM3 유전자의 발현이 증가되거나 또는 AIM3 단백질의 분해가 억제되어 AIM3 단백질의 농도가 증가되는 것을 말한다. 상기 AIM3 유전자 발현은 AIM3 유전자의 전사 및 단백질로의 번역 과정을 포함한다. 따라서, 본 발명에서 스크리닝되어지는 항암 물질은 AIM3와 ATM/ATR과의 결합 또는 p53의 발현을 촉진시키거나 세포 내 AIM3 단백질의 수준을 증가시키는 특성을 지닌 물질이다. 상기 항암 물질은 단백질 뿐 아니라 천연에서 분리되거나 화학적으로 합성된 화합물 또는 추출물을 포함한다.

AIM3 단백질의 활성 및 세포 내 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 여러 가지 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 공동-면역침전법(co-immunoprecipitation), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사능면역분석법(RIA), 면역조직화학, 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)이 포함된다.

또한, 본 발명의 AIM3를 표적으로 한 스크리닝 방법은 고효율 스크리닝(high throughput screening; HTS)을 적용할 수 있다. HTS는 다수의 후보물질을 병행 시험하여, 다수의 후보물질의 생물학적 활성에 대해 동시에 또는 거의 동시에 스크리닝하는 방법이다. 특정 양태로서, 96-웰 미세역가 플레이트 또는 192-웰 미세역가 플레이트에서 세포주를 배양하고, 여기에 다수개의 후보물질을 처리한 다음 면역화학적 방법에 의해 AIM3의 발현정도를 측정할 수 있다. 이 포맷에서는, 96회의 독립적인 시험을 96개의 반응 웰을 함유하는 단일 8cm×12cm 플라스틱 플레이트 상에서 동시에 수행할 수 있다. 상기 웰은 전형적으로 50 μ l 내지 500 μ l에 이르는 검정 용적을 필요로 한다. 플레이트 이외에, 96-웰 포맷을 광범위한 균일계 및 불균일계 검정에 적합하게 하기 위해 다수의 계기, 기구, 피펫터, 로봇, 플레이트 세척기 및 플레이트 관독기가 상업적으로 이용 가능하다.

한편, 암 환자로부터 수득된 생물학적 샘플(예를 들면, 혈액, 혈청, 객담, 뇨 및/또는 종양 생검)에서 AIM3 유전자 또는 AIM3 단백질의 발현 수준을 정상인과 비교하여 암을 진단할 수 있다. 구체적으로는 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산, 이의 단편, 이들로부터 암호화되는 펩타이드 및 상기 펩타이드에 대한 항체로 구성되는 군에서 선택되는 하나를 프라이머 또는 탐침으로 이용하여 암을 진단할 수 있다. 암을 진단하기 위한 방법은 AIM3의 발현을 전사 또는 번역 수준에서 검출할 수 있는

방법(예컨대, RT-PCR, 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 면역학적 분석 등)을 모두 포함한다. 따라서 본 발명은 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산, 이의 단편, 이들로부터 암호화되는 펩타이드 및 상기 펩타이드에 대한 항체로 구성되는 군에서 선택되는 하나를 포함하는 진단용 키트를 제공한다.

AIM3 단백질을 암호화하는 핵산 및 이의 단편은 공지된 AIM3 유전자의 서열을 참고로 하여 합성할 수 있다. 상기 핵산의 단편은 AIM3 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머인 것이 바람직하다.

또한 AIM3 단백질을 암호화하는 핵산 또는 이의 단편으로부터 암호화되는 펩타이드는 당분야에 공지된 기술로 합성할 수 있다(Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., NY, 1983). 펩타이드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다(Williams *et al.*, Eds., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; Atherton & Sheppard, Eds., *A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, England, 1989).

또한 상기 펩타이드에 대한 항체는 AIM3 단백질 또는 이의 단편을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 상기 항체는 다클론 항체와 단일 클론 항체를 포함한다.

다클론 항체는 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 칠면조, 토끼, 마우스 또는 래트와 같은 여러 온혈 동물로부터 당해 분야의 통상적인 기술 중의 하나를 사용할 수 있다. 즉, 항원을 복막 내, 근육 내, 안 내 또는 피하 주사를 통해 동물을 면역시킨다. 상기 항원에 대한 면역성은 보조제, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 사용하여 증가시킬 수 있다. 부스터(booster) 면역처리에 따른 다음, 혈청의 소형 샘플을 수집하고 목적하는 항원에 대한 반응성을 시험한다. 동물의 역가가 일단 항원에 대한 이의 반응성의 관점으로 정제 상태에 도달하면, 다량의 다클론 면역혈청을 1주 마다의 출혈 또는 동물을 방혈시킴으로써 수득할 수 있다.

단일 클론 항체도 공지된 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다(Kennettm McKearn, and Bechtol(eds.), *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, 1980). 다클론 항체는 AIM3 단백질 또는 이의 단편을 면역원으로 하여 동물을 면역화시키고, 면역화된 동물의 비장세포를 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마를 생성하고, AIM3 단백질을 선택적으로 인식하는 하이브리도마를 선별하며, 선별한 하이브리도마를 배양하고, 하이브리도마의 배양액으로부터 항체를 분리함으로써 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론 항체는 상기 하이브리도마를 동물에 주입하고, 주입 후 일정기간이 지난 다음 회수한 동물의 복수로부터 분리함으로써 제조할 수도 있다.

본 발명의 진단용 키트에 포함되는 항체는 바람직하게는 고체 기질상에 고정된다. 항체는 문헌에 개시된 바와 같은 다양한 방법을 이용하여 고정될 수 있다(*Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). 적합한 고체 기질에는 막대, 합성 글래스, 아가로우스 비즈, 컵, 플랫 팩(flat packs) 또는 그 외의 고체 지지체에 의해 지지되거나, 이러한 것들에 부착된 막이나 코팅을 갖는 것들이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막을 들 수 있다.

본 발명에 따른 진단용 키트는 AIM3 단백질을 선택적으로 인식하는 항체와 함께 면역학적 분석에 사용되는 시약이 포함될 수 있다. 상기 면역학적 분석은 본 발명 항체에 대한 항원의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 침강소 반응법, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법 및 면역형광법이 있다.

면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

적합한 담체로는 이에 한정되지는 않으나 가용성 담체, 예컨대 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액들 중 어느 한가지(예를 들어, PBS) 또는 불용성 담체, 예컨대 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교텍스트란, 폴리스카라이드, 락텍스에 금속을 도금한 자성미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 효소로는 퍼옥시다아제, 알카린포스파타아제, β -D-갈락토시다아제, 글리코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-

6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있으며, 형광물질로는 플루오르신이소티옥시아네이트, 피코빌리 단백질 등을 사용할 수 있고, 발광물질로는 이소루시놀, 루시제닌 등을, 방사성 물질로는 I_{131} , C_{14} , H_3 등을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

본 발명의 키트로 진단될 수 있는 암은 상기 기재한 바와 같다. 바람직하게는 폐암, 대장암, 간암, 림프종 및 백혈병일 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

AIM3 유전자가 결손된 돌연변이 마우스의 제조

본 발명자들은 유전자 트랩 방법(Zambrowicz, B.P. *et al.*, *Nature*, 392:608-611, 1998)을 이용하여 AIM3 결손 마우스를 제조하였다. 유전자 트랩 벡터가 무작위로 삽입되어진 129/SvEvBrd 마우스의 배아 줄기세포 라이브러리(OmniBank Library, Lexicon Genetics) 중에서 유전자 트랩 벡터의 도입에 의해 변이된 AIM3 유전자를 포함하고 있는 OST377244 클론을 찾아내었다. 상기 클론을 이용하여 렉시콘 제네틱스 사의 권장방법에 따라 AIM3 이형접합성 C57BL6/알비노 마우스(C57BL6/albino AIM3 heterozygous mice)를 제조하였다. 동형접합성 자손을 얻기 위하여 이형접합성 마우스를 이중 교배시켰다.

<실시예 2>

AIM3 유전자가 결손된 돌연변이 마우스의 유전적 및 표현형적 특성 조사

<2-1> AIM3 대립 유전자 내 유전자 트랩 벡터가 삽입된 위치 확인

AIM3 돌연변이체 대립 유전자(AIM3 mutant allele) 내에서 진 트랩 벡터가 삽입된 위치를 확인하기 위해 서열분석(sequencing)을 수행하였다. 이 때 서열분석은 염기서열 분석 회사인 판제노믹스(Pangenomics)에 의뢰하였다. 그 결과, 도 1a에 도시된 바와 같이, 유전자 트랩 벡터가 AIM3 유전자의 첫 번째 엑손(Exon I)과 두 번째 엑손(Exon II)의 사이에 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.

<2-2> 게노믹 PCR 분석

상기 실시예 1에서 제조한 각 마우스의 꼬리로부터 게노믹 DNA를 분리하였다. 이후, AIM3 유전자의 엑손 I 영역을 포함하는 약 1.5 kb 크기의 DNA 단편을 증폭하기 위한 p18F-1 및 p18R-1 프라이머쌍(서열번호 3 및 서열번호 4)을 이용하여 PCR을 수행하였다(도 1a 참조). 또한 AIM3 유전자 일부와 유전자 트랩 벡터의 일부를 포함하는 약 0.8 kb 크기의 DNA 단편을 증폭하기 위하여, 상기 p18F-1 프라이머와 게놈 내에 삽입된 유전자 트랩 벡터(약 5.7 kb)에 결합하는 LTR 프라이머(서열번호 5)를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 1a 참조). 이 때 PCR은 94°C에서 5분 동안 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 30회 반복 수행하였다.

그 결과, 흥미롭게도 제조된 돌연변이 마우스들은 모두 1.5 kb 및 0.8 kb 크기의 DNA 단편을 둘 다 생산하는 이형접합성 마우스(AIM3^{+/-} 마우스)인 것으로 나타났다(도 1b 참조). 반면, 야생형 마우스(AIM3^{+/+} 마우스)에서는 1.5 kb의 크기의 밴드 하나만을 확인할 수 있었다.

<2-3> 서던 블롯 분석

각 마우스 꼬리로부터 게노믹 DNA를 분리하여 *Sac*I 으로 절단한 후, 겔 전기영동(gel electrophoresis)을 수행하여 절단된 DNA 절편들을 분리하였다. 이후, 서열번호 6 및 서열번호 7로 표시되는 p18F-2 및 p18R-2 프라이머에 의해 증폭된 AIM3 유전자의 엑손 II 영역을 포함하는 PCR 산물을 방사성 동위원소로 표지한 후(도 1a 참조), 이를 탐침으로 하여 상기 절단된 DNA 절편들과 혼성화시켰다(southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975).

그 결과, 도 1c에 도시된 바와 같이, 야생형 마우스에서는 12kb 근처에서 하나의 밴드가 검출된 반면, 이형접합성 마우스에서는 약 3kb 크기의 밴드가 하나 더 검출되었다.

<2-4> AIM3 유전자 결손에 의한 배아 치사 유발 확인

상기 실시예 <2-2> 및 <2-3>의 분석에서 동형접합성 유전형의 자손을 찾을 수 없었다. 따라서, 본 발명자들은 AIM3 유전자의 결손이 배아 치사(embryonic lethality)를 유발하는지를 조사하기 위하여, 출생 후 마우스의 유전형 및 수정 후 시간 경과에 따른 배아의 유전형을 상기 실시예 <2-2>와 동일한 방법에 따라 게노믹 PCR을 수행하여 조사하였다. 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

하기 표 1에서 보는 바와 같이, 생존한 총 262 마리의 마우스 중에서 야생형 마우스(+ / +)가 114 마리, 이형접합성 마우스(+ / -)가 148마리로 조사되었다. 생존한 동형접합성 마우스(- / -)는 한 마리도 없는 것으로 나타났다. 특히, 이형접합성 마우스는 야생형 한 배 새끼(littermates)들과 유사한 비율로 나타났는데, 이는 이형접합성 마우스의 약 50%가 출생 전 단계에서 죽는다는 것을 의미한다. 또한 하기 표 2에서 보는 바와 같이, 7.5 - 9.5일령에 분리된 총 83개의 배아 중에서 동형접합성 유전형을 함유하고 있는 배아는 8.5일령에서 단 하나 검출되었다. 이는 AIM3 동형접합성 마우스는 배아 초기에 치사된다는 것을 나타내는 것이다.

[표 1]

AIM3 이형접합성 C57BL6/알비노 마우스 간의 이종교배로 얻은 자손들의 생후 유전형 분리 비율

	총계	+ / +	+ / -	- / -
생존한 마우스 수	262	114	148	0
%	100	43.5	56.5	0

[표 2]

AIM3 이형접합성 C57BL6/알비노 마우스 간의 이종교배로 얻은 자손들의 배아 유전형 분리 비율

임태 일수	총계	+ / +	+ / -	- / -	태내 재흡수(Resorbed)
E7.5d	28	7	15	0	6
E8.5d	34	11	16	1	6
E9.5d	21	8	8	0	5
총계	83	26	39	1	17
%		31.3	47.0	1.2	20.5

상기 결과들로부터 AIM3 유전자가 모두 소실되면 배발생 단계에서 치사가 유발됨을 확인할 수 있었다.

<2-5> 웨스턴 블롯 분석

지아크 등의 방법(Ziak, M, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:363-367, 2001)에 따라 여러 기관(소장, 신장, 심장 및 비장)으로부터 단백질을 분리하였다. 이후, 박 등의 방법(Park S. G., *et al.*, *J. Biological Chemistry* 274:16673-16676, 1999)에 따라 다클론 래빗 항-AIM3 항체(polyclonal rabbit anti-AIM3 antibody)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 상기 항-AIM3 항체는 김 등의 방법(Kim, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:21768-21772, 2000)에 따라 제작하였다.

그 결과, 도 1d에 도시된 바와 같이, 각 기관에 따라 감소 정도가 다르기는 하였으나, AIM3^{+/-} 마우스의 기관에서의 AIM3 발현 수준이 야생형 마우스의 기관에서보다 현저히 낮음을 확인할 수 있었다.

<실시예 3>

AIM3^{+/-} 마우스의 조직학적 특성 조사

본 발명자들은 AIM3 유전자의 기능을 알아보기 위하여, AIM3^{+/-} 마우스로부터 조직과 기관을 분리하고 이들의 조직학적 특성을 분석하였다.

먼저, 시간 간격을 두고 마우스를 희생시킨 후, 다양한 조직을 분리하였다. 분리된 조직을 10% 포르말린으로 고정시켰다. 고정된 조직을 파라핀에 박아 넣은 후, H&E 염색을 하였다. 또한 B 세포 전이(B cell metastasis)를 확인하기 위하여 파라핀 슬라이드를 표면 마커 B220으로 면역조직화학적 염색(immunohistochemical staining)을 수행하였다. 자일렌(xylene)으로 파라핀을 제거한 후, 슬라이드를 항-B220 항체(santacruz biotech.)를 함유하는 블로킹 버퍼(1:100, 5% BSA 및 0.1% 트윈 20/PBS)에서 2시간 동안 배양하였다. 이후, 슬라이드를 PBS로 세척한 후, 아비딘-결합 2차 항체와 DAB 용액과 함께 조직을 다시 배양하였다.

그 결과, AIM3^{+/-} 마우스에서 여러 종류의 종양이 발견되었다(표 3 및 도 2a 참조). 흥미롭게도, 종양이 발달하고 있는 18 마리의 AIM3^{+/-} 마우스 중 14마리는 비장(spleen) 또는 림프절(lymph node)로부터 유래한 림프종(lymphoma)을 포함하고 있었으며, 5 마리의 마우스에서는 복합성 종양들이 발견되었다. 구체적으로 살펴보면, 15개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-63) 및 23개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-95)의 유방에서 선암(adenocarcinoma)이 발견되었다. 또한 19개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-103)의 정낭(seminal vesicle)에서는 선암종이 발견되었으며, 22개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-207)에서는 간암종과 유래 미상의 육종(sarcoma)이 발견되었다. 이러한 모든 종류의 암들은 역형성(anaplasia) 및 침투성(invasiveness)과 같은 전형적인 악성 표현형을 나타내었다. 또한 22개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-232)의 림프절에서는 림프종이 발견되었으며, 17개월령 AIM3^{+/-} 마우스(B-14)에서는 세기관지 상피(bronchiole epithelium)로부터 잘 분화된 선암종이 관찰되었다.

몇몇 림프종들은 간, 신장, 폐 및 타액선과 같은 다른 기관으로 전이된 것으로 나타났다(도 2b 참조). 이러한 종양의 발생률은 출생 후 15개월이 지난 후에 현저하게 증가하는 것으로 나타났다(도 2c 및 표 3 참조).

[표 3]
AIM3^{+/-} 마우스에서 발견된 종양

	마우스 ID	종양 위치 (locus)	전이	월령 (age, month)
단일 고형 종양 (single solid tumor)	B-2	간, 이형성증(dysplasia)	_*	8
	B-268	간	-	23
	B-63	유방(선암종)	-	15
	B-233	정낭 내 선종	-	21
림프종 (lymphoma)	B-191	비장	타액선, 신장, 폐	25
	B-262	비장	폐	20
	B-275	장간막 림프절(mesenteric lymph node)	간, 비장	17
	B-148	비장	-	24
	B-264	비장	타액선	15
	B-143	경부 림프절(cervical lymph node)	간, 폐	25
	B-226	비장	폐	22
	B-261	비장	폐	20
	B-321	비장	간	1
복합성 암 (multiple tumor)	B-103	정낭 내 선암종, 전이성 림프종	비장, 신장	19
	B-14	폐 내 선암종, 전이성 림프종	타액선	17
	B-95	유방 내 선암종(고형 종양), 전이성 림프종	타액선, 비장	23
	B-232	폐 내 선암종(고형 종양), 림프종(림프절)	-	22
	B-207	전이성 육종(간); 간암종(간), 전이성 림프종	비장, 간, 폐, 타액선	22

*: 전이되지 않음(negative)

이와 같이 AIM3가 결손된 이형접합성 마우스들에서 다양한 종양들이 자발적으로 생성된다는 것은 AIM3가 일반적인 종양 형성 기작에 관여하는 강력한 종양 억제자임을 나타낸다.

<실시예 4>

세포 주기와 AIM3의 연관성 규명

빠른 세포 주기는 종양형성(tumorigenesis)의 전형적인 징후이다(Evan and Vousden, *Nature*, 411:342-348, 2001). 따라서 AIM3가 세포 주기 조절에 관여하는지 조사하였다.

<4-1> AIM3^{+/-} 마우스 유래 세포에서 세포 주기 변화 조사

4주령 야생형 마우스 및 AIM3^{+/-} 마우스로부터 비장세포를 분리하여 하룻밤 동안 배양하였다. 이후, 세포를 1% PFA로 고정하고 PI로 염색하였다. 각 샘플 당 20,000개의 세포를 대상으로 FACS 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 3a에서 보는 바와 같이, AIM3^{+/-} 마우스로부터 분리된 비장세포는 야생형 세포보다 더 빠른 세포 주기를 보였다.

<4-2> 세포 주기에 따른 AIM3의 발현 수준 변화 조사

이후, 세포 주기 동안의 AIM3의 기능을 알아보기 위하여, AIM3가 세포 주기에 의존하여 발현하는지 조사하였다. 먼저, HCT116 세포를 1% PFA로 고정시킨 후 중화시켰다. 이후, 세포를 항-AIM3 단일클론 항체와 함께 배양하였다. FITC-결합 항-마우스 염소 IgG 항체(Pierce)를 첨가하여 더 배양한 후, PI로 세포를 공동-염색하였다. 이후, FACS 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 3b에서 보는 바와 같이, AIM3는 DNA 합성단계에서 현저하게 유도되었다. 이를 더욱 확인하기 위하여, 본 발명자들은 세포 주기를 동시에 일어나게 한 후, 혈청 결핍(serum deprivation) 상태와 혈청을 제공급한 상태에서 AIM3의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 비교 분석하였다. 그 결과, 상기 FACS 결과와 일치하는 결과를 얻었다(결과 미도시). 이로부터 AIM3가 DNA 합성 단계에서 유도됨을 확인할 수 있었다.

<4-3> 세포 증식에 따른 AIM3의 세포 내 위치 조사

본 발명자들은 DNA 합성 단계에서 AIM3가 유도되는 이유를 알아보기 위하여, 세포의 성장이 멈춘 상태와 세포가 증식하는 상태에서 AIM3의 세포 내 위치를 조사하였다. 이를 위해 DU145 세포를 10% 혈청이 함유되어 있는 RPMI-1640 배지(complete media; CM)와 혈청이 없는 배지(serum free media; SF)에서 각각 배양한 후, 100% Me-OH로 고정하고 항-AIM3 단일클론 항체와 반응시켰다. 이후 항-마우스 염소 IgG-FITC(anti-mouse goat IgG-FITC)(Pierce)와 반응시키고 PI로 염색하여 형광현미경 하에서 세포 내 AIM3의 위치를 조사하였다.

그 결과, 도 3c에서 보는 바와 같이, 혈청 결핍에 의해 세포 성장이 억제되었을 때 AIM3는 주로 세포질에 위치하는 반면, 세포가 증식하는 단계에서는 핵에 위치하는 것으로 나타났다. 이로부터 DNA 합성 동안 AIM3가 유도될 뿐 아니라 핵 내로 이동함을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 AIM3가 핵 내에서 신규한 기능을 할 수 있음을 제시한다.

<실시예 5>

아폽토시스와 AIM3의 연관성 규명

아폽토시스에 대한 세포의 저항성 또한 종양형성의 전형적인 징후이다(Evan and Vousden, *Nature*, 411:342-348, 2001). 따라서 AIM3가 아폽토시스 조절에도 관여하는지 조사하였다.

<5-1> 아폽토시스 조절에 대한 AIM3 유전자의 결손 효과 조사

세포의 아포토시스 조절에 있어서 AIM3의 역할을 더 알아보기 위하여, 프로-아포토틱 스트레스(pro-apoptotic stress)에 대한 AIM3^{+/-} 마우스 유래 비장세포의 반응을 조사하였다.

먼저, 야생형 마우스와 AIM3^{+/-} 마우스로부터 비장세포를 분리하였다. 아포토시스를 유발하기 위하여, 상기 분리된 비장세포에 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아드리아마이신(Adr, Sigma)을 2시간 동안 처리하였다. 세포를 FITC-결합 아넥신 V(FITC-conjugated annexin V, Roche)와 5분 동안 배양하였다. 이후, 세포를 PBS로 세척한 후, FL-1H 검출기 하에서 FACS 분석을 수행하였다. 분석에는 샘플 당 20,000개의 세포를 사용하였다.

그 결과, 도 4a에서 보는 바와 같이, 야생형 세포의 경우에는 아드리아마이신 처리에 의해 아포토시스가 진행중인 세포가 현저하게 증가하였으나, AIM3^{+/-} 세포는 아드리아마이신에 의해 유도되는 아포토시스에 대해 저항성을 나타내었다. 이는 AIM3가 DNA 손상에 의해 유도되는 아포토시스에 대해 세포를 민감하게 하는데 필요하다는 것을 암시한다. 이로부터 AIM3가 DNA 손상에 의한 세포의 아포토시스를 촉진함을 확인할 수 있었다.

<5-2> 아포토시스 유도제에 의한 AIM3 수준 변화 조사

이후, AIM3의 수준이 아드리아마이신 처리에 의해 영향을 받는지 RT-PCR 분석 및 웨스턴 블롯 분석으로 조사하였다.

HCT116 세포에 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아드리아마이신을 처리하였다. 이후, 시간별로 세포를 수득한 후, Sol D 용액(4 M guanidine thiocyanate, 1% laurosarcosine, 25 mM sodium citrate, and 0.1% b-mercaptoethanol)으로 세포를 용해시켰다. 세포 추출물(cell extracts)을 산성 페놀(acidic phenol)과 4% 이소아밀알코올을 함유하는 클로로포름에서 배양한 후, 볼텍싱하였다. 혼합물을 14,000 rpm에서 원심분리하였다. 수득한 상층액(upper layer)에 이소프로판올을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 100% 에탄올로 세척한 후, 1 μg 의 RNA를 증류수에 용해시켜 RT-PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 이후, 서열번호 8 및 서열번호 9로 기재되는 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 때 AIM3의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 GAPDH의 발현 수준을 함께 측정하였다.

한편, 웨스턴 블롯 분석을 위해 아드리아마이신을 처리한 세포를 단백질 분해효소 카테일을 함유하는 RIPA로 용해시켰다. 14,000rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 추출된 단백질을 20 μg 을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이후, 박 등의 방법(Park S. G., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:16673-16676, 1999)에 따라 폴리클로날 래빗 항-AIM3 항체(polyclonal rabbit anti-AIM3 antibody)를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이 때 AIM3의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 튜블린의 발현 수준을 함께 측정하였다.

그 결과, 도 4b에서 보는 바와 같이, 아드리아마이신에 반응하여 AIM3의 전사 및 번역이 모두 유도되었다. 또한 AIM3의 유도는 UV, 액티노마이신 D(actinomycin D, Act.D) 및 시스플라틴(CDPP)와 같은 다른 DNA 손상제에 의해서도 관찰되었다(결과 미도시). 특히, AIM3는 UV나 아드리아마이신에 노출 후 5분 이내에 유도되었다.

상기 결과들은 AIM3가 DNA 복제 또는 DNA 손상으로부터 야기되는 DNA 수복에 반응하는 신호전달경로에 기능적으로 관련되어 있음을 나타낸다.

<실시예 6>

세포 증식과 AIM3의 연관성 규명

본 발명자들은 상기 실시예 4를 통하여 AIM3의 결손에 의해 세포 주기가 빨라지며, AIM3가 DNA 합성 과정 중 높은 수준으로 유도됨을 확인하였다. 따라서, AIM3가 세포 증식에도 관여하는지 알아보았다.

<6-1> AIM3 유전자의 결손에 의한 세포 증식을 변화 조사

a. 티미딘 혼입법(thymidine incorporation)

야생형 마우스 및 AIM3^{+/-} 마우스로부터 분리한 마우스 배아 섬유아세포(MEFs, E14.5d)를 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [³H] 티민을 포함하는 배지에서 배양하였다. 배양된 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, 핵산을 침전시키기 위해 10% TCA 용액에서 30분 동안 배양하였다. 이후, 0.1 N NaOH로 세포를 용해시킨 후, 침전물 내에 혼입된 방사성 티미딘의 양을 액체 섬광 계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 정량하였다. 실험을 총 3회 수행하여 그 평균값을 도출하였다.

그 결과, 도 5a에서 보는 바와 같이, AIM3^{+/-} 마우스로부터 분리된 MEFs는 야생형 MEFs에 비해 더욱 높은 증식율을 보였다.

b. 인 시투 면역형광 염색법(*in situ* immunofluorescence staining)

AIM3^{+/-} 마우스로부터 장(intestine), 정소(testis), 비장(spleen) 및 흉선(thymus)을 분리하였다. 이후, 상기 조직들에서의 세포 증식율을 조사하기 위하여 세포 증식 마커인 Ki-67을 이용하여 인 시투 면역형광 염색법을 수행하였다(Gerdes J. *et al.*, *J. Immunol.*, 133:1710-1715, 1984).

그 결과, 도 5b에서 보는 바와 같이, AIM3^{+/-} 마우스 유래의 각 조직에서 야생형 조직에 비해 증가된 세포 증식이 관찰되었다.

<6-2> AIM3의 발현 증가에 의한 세포 증식율 변화 조사

본 발명자들은 상기 실시예 <6-1>를 통하여 AIM3의 발현 감소에 의하여 세포 증식이 증가되었음을 확인하였다. 따라서, AIM3의 발현이 증가되면 세포 증식이 억제되는지 조사하였다.

AIM3 유전자(서열번호 2)를 pcDNA3(Invitrogen) 벡터에 삽입하여 AIM3 발현 벡터를 제조하였다. 이후, 상기 벡터를 HCT116 세포에 도입시켰다. 형질감염된 각 세포의 세포 증식율을 상기 실시예 <6-1>의 a.와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 이 때 AIM3 유전자를 함유하고 있지 않은 pcDNA3 벡터(empty vector; EV)로 형질감염시킨 HCT116 세포를 대조군으로 사용하였다.

그 결과, 도 5c에서 보는 바와 같이, AIM3 유전자가 도입된 세포에서 세포 증식이 감소되었다. 이로부터 AIM3가 세포에 대하여 항-증식 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

<실시예 7>

p53의 상향조절자로서의 AIM3의 기능 규명

종양 억제 단백질인 p53은 DNA 손상에 의해 유도되는 세포 주기 정지(cell cycle arrest)와 아포토시스를 조절하는데 있어서 주요한 역할을 한다(Levine, *Cell*, 88:323-331, 1997; Vousden, *Cell*, 103:691-694, 2000). 따라서 AIM3와 p53의 기능적 연관성에 대해 조사하였다.

<7-1> AIM3에 의한 p53의 수준 측정

AIM3^{+/-} 마우스 및 야생형 마우스로부터 분리한 마우스 배아 섬유아세포(MEFs) 내에서 p53 및 AIM3의 발현 수준을 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯으로 조사하였다. 또한, 상기 실시예 <6-2>에서 제조한 AIM3 발현 벡터를 HCT116 세포에 도입시킨 후, 형질감염된 HCT116 세포에서 AIM3 및 p53의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 조사하였다.

그 결과, 도 6a에서 보는 바와 같이, p53의 발현 수준은 야생형 마우스에 비해 AIM3^{+/-} 마우스의 MEFs에서 더 낮았다. 한편, AIM3 유전자를 도입시킨 HCT116 세포에서는 AIM3 유전자를 도입시키지 않은 대조군 세포에 비해 p53의 수준이 증가하였다. 이는 AIM3의 이소발현(ectopic expression)이 p53의 발현을 향상시킴을 나타내는 것이다.

<7-2> AIM3에 의한 p21 수준 측정

AIM3의 증가가 p53-의존성 전사(p53-dependent transcription)를 강화시키는지 조사하기 위하여, p53의 타겟 유전자로 알려진 p21의 AIM3-의존성 전사를 조사하였다.

상기 실시예 <7-1>에서 AIM3 유전자(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 형질감염된 HCT116 세포를 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법에 따라 RT-PCR 분석을 수행하였다. 그 결과, **도 6b**에서 보는 바와 같이, AIM3 유전자를 도입시킨 HCT116 세포에서 p21의 발현이 증가되었음을 확인할 수 있었다.

<7-3> AIM3와 아드리아마이신에 의한 p21의 수준 측정

이후, 본 발명자들은 p21 전사에 있어서 AIM3 및/또는 아드리아마이신의 효과를 알아보기 위하여, 루시퍼라제 유전자와 융합된 p21 프로모터를 포함하는 벡터를 이용하여 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.

루시퍼라제 유전자가 p21 프로모터 하에서 발현되도록 조작한 pGL-3 벡터(Promega)와 AIM3 유전자를 함유하는 재조합 AIM3 발현 벡터(1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 HCT116 세포를 공동-형질감염시켰다. 대조군 세포에는 상기 pGL-3 벡터와 AIM3 유전자를 함유하고 있지 않는 빈 벡터를 공동 도입하였다. 이후, 형질감염된 각 세포에 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아드리아마이신을 2시간 동안 처리하였다. 세포를 용해한 후 루시퍼라제 기질을 첨가하고 상온에서 30분 동안 배양하였다. 각 샘플 5 μl 를 루미노미터 플레이트(luminometer plate)에 옮긴 후, 제조사(Promega)의 지침에 따라 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

그 결과, **도 6c**에서 보는 바와 같이, p21 프로모터에 의해 조절되는 루시퍼라제의 활성이 AIM3의 형질감염에 의해 높은 수준으로 증가되었고, 여기에 아드리아마이신을 추가로 처리한 경우에는 그 활성이 더욱 증가되었다.

상기 결과들로부터 AIM3가 p53의 중요한 조절자라는 것을 확인할 수 있었다.

<7-4> AIM3의 항-증식 활성과 p53 및 p21의 연관성 규명

상기 실시예 <7-1> 및 <7-2>를 통하여 p53과 p21의 발현이 AIM3에 의존함을 확인하였다. 따라서, AIM3가 p53과 p21을 통하여 세포 증식을 억제하는지 조사하였다.

상기 실시예 <6-2>에서 제조한 AIM3 발현 벡터 또는 빈 벡터(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 HCT116 세포, p53 유전자가 결손된 p53-null HCT116 세포 및 p21 유전자가 결손된 p21-null HCT116 세포에 각각 도입하였다. 이후, 형질감염된 각 세포의 세포 증식율을 상기 실시예 <6-1>의 a.와 동일한 방법에 따라 조사하였다.

그 결과, **도 6d**에서 보는 바와 같이, AIM3의 항-증식 활성(anti-proliferation activity)은 기능적인 p53 또는 p21의 부재에 의해 소멸되었다. 이는 AIM3가 p53과 p21을 통하여 세포 증식을 억제함을 나타낸다.

<7-5> AIM3 발현 억제에 의한 p53 수준 감소 측정

본 발명자들은 안티센스 AIM3(As-AIM3)을 이용하여 AIM3의 발현을 억제한 후 p53 유도가 영향을 받는지 조사하였다.

먼저, **서열번호 10** 및 **서열번호 11**로 기재되는 프라이머를 이용하여 ATG를 함유하는 AIM3 유전자의 N-말단 176 bp의 영역을 PCR로 증폭하였다. PCR 산물을 pcDNA 3.1 벡터에 역방향(reverse orientation)으로 삽입하였다. 안티센스 AIM3를 함유하는 벡터(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 HCT116 세포에 도입하였다. 형질감염된 세포를 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포에 UV 및 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아드리아마이신을 각각 처리하였다. 이후, 항-AIM3 항체 또는 항-p53 항체(Santacruz)를 이용하여 상기 실시예 <2-5>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이 때 AIM3 및 p53의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 액틴(actin)의 발현 수준을 함께 측정하였다.

그 결과, **도 6e**에서 보는 바와 같이, p53의 수준은 UV 또는 아드리아마이신 처리에 의해 증가한 반면, As-AIM3에 의한 AIM3의 억제는 p53의 유도를 저해하였다. 상기 결과로부터 p53의 발현을 증가시키는데 AIM3가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 또한 p53의 직접적인 초기 타겟 유전자인 PUMA의 전사 또한 UV 조사에 의해 증가되었으며, 그 유도는 AIM3가 As-AIM3에 의해 억제되었을 때 저해되었다(결과 미도시).

상기 결과들은 AIM3가 DNA 손상에 의한 p53의 유도를 매개한다는 것을 나타내는 것이다.

<실시예 8>**AIM3의 p53 조절 기작 규명**

ATM/ATR은 DNA 손상에 반응하여 p53을 직접적으로 활성화시키는 물질이다(Canman *et al.*, *Science*, 281:1677-1679, 1998). 따라서 본 발명자들은 AIM3가 ATM/ATR을 통하여 p53을 조절하는지 조사하였다.

<8-1> 카페인에 의한 ATM/ATR의 억제 실험

ATM/ATR의 저해제로 알려진 카페인(caffeine)의 존재 하에서 p53이 AIM3에 의존적으로 유도되는지를 조사하였다. 먼저, HCT116 세포를 AIM3 발현 벡터 또는 빈 벡터(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 24시간 동안 형질감염시켰다. 이후, 20 mM 카페인을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 대조군에는 PBS를 첨가하여 배양하였다. 그리고 나서, AIM3와 p53의 수준을 조사하기 위하여 상기 실시예 <7-5>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이 때 AIM3 및 p53의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 액틴(actin)의 발현 수준을 함께 측정하였다.

그 결과, 도 7a에서 보는 바와 같이, AIM3에 의해 유도된 p53의 발현은 카페인에 의해 저해되었다. 또한 p53의 타겟 유전자인 PUMA의 발현도 AIM3에 의해 유도되었으나, 이 또한 카페인에 의해 저해되었다(결과 미도시). 한편, AIM3의 항-증식 활성 및 AIM3에 의해 유도된 아포토시스 또한 카페인에 의해 저해되었다(결과 미도시). 상기 결과들은 p53의 AIM3-의존성 유도에서 ATM/ATR이 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

<8-2> KD-ATM에 의한 ATM/ATR의 억제 실험

p53의 AIM3-의존성 유도에서 ATM/ATR이 중요한 역할을 한다는 것을 보다 특이적으로 확인하기 위하여, ATM의 키나제-데드 도메인(KD-ATM)으로 HCT116 세포를 형질감염시켰다(Canman *et al.*, *Science*, 281: 1677-1679, 1998). 상기 KD-ATM은 ATM의 활성을 특이적으로 저해한다.

먼저, KD-ATM 도메인 또는 야생형 ATM을 함유하는 벡터(St. Jude Children's Hospital의 Micheal Kastan으로부터 제공받음)를 AIM3 발현 벡터(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 함께 HCT116 세포에 각각 도입하였다. AIM3 발현에 대한 대조군을 위해서는 상기 벡터들을 AIM3 유전자를 함유하고 있지 않은 빈 벡터와 함께 HCT116 세포에 각각 도입시켰다. 이후, 형질감염된 각 세포에서의 p53과 AIM3의 발현 수준을 상기 실시예 <6-5>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석으로 조사하였다. 이 때 AIM3 및 p53의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 액틴(actin)의 발현 수준을 함께 측정하였다.

그 결과, 도 7b에서 보는 바와 같이, AIM3의 발현 증가에 의한 p53 유도는 KD-ATM에 의해 저해된 반면, 야생형 ATM에 의해서는 저해되지 않았다. 이는 p53의 AIM3-의존성 유도에 ATM이 필요하다는 것을 더욱 뒷받침하는 결과이다.

상기 결과들로부터 AIM3가 ATM/ATR을 통해 p53을 상향조절(upregulation)한다는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 9>**AIM3와 ATM/ATR의 상호작용 분석****<9-1> AIM3와 ATM의 상호작용 분석****a. 공동-면역침전법(co-immunoprecipitation)**

AIM3와 ATM 간의 상호작용을 조사하기 위하여 공동-면역침전법을 수행하였다. 먼저, UV 및 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아드리아마이신을 각각 처리한 HCT116 세포로부터 시간 별로 단백질을 추출하였다. 단백질 추출물을 정상 IgG와 단백질A/G-아가로스(protein A/G-agarose)와 2시간 동안 배양하였다. 이후, 비특이적 IgG 결합 단백질을 제거하기 위하여 원심분리를 수행하였다. 원심분리로 수득된 상층액(supernatant)에 항-ATM 항체(Santacruz) 2 μg 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 진탕 배양하였다. 이후, 단백질A/G-아가로스를 첨가하였다. 차가운 PBS로 2회 세척한 후, PIRA로 1회 더 세척하였다. 침전물들을 SDS-샘플 버퍼에 용해시킨 후, 6% SDS-PAGE로 분리하였다. SDS-PAGE로 분리된 단백질을 PVDF 막으로 옮긴 후, 항-18 단일항체 및 2차 항체(horseradish peroxidase conjugated secondary antibody)와 차례대로 반응시켰다.

그 결과, 도 8a에서 보는 바와 같이, AIM3와 ATM의 상호작용은 UV 및 아드리아마이신과 반응하여 5분 이내에 증가하였다. AIM3의 분해속도(dissociation kinetics)는 아드리아마이신이 처리된 세포에서 더 늦게 나타났는데, 이는 UV 스트레스는 세포에 일시적인 영향을 주는 반면, 아드리아마이신은 배양하는 동안 배지 내에 계속 존재하기 때문인 것으로 사료된다.

b. 시험관 내 풀-다운 분석(in vitro pull down assay)

AIM3와 ATM 사이의 직접적인 상호작용을 확인하기 위하여 GST 풀-다운 어세이를 수행하였다.

먼저, AIM3는 GST와 융합된 형태로 발현시켜 제조사(Pharmacia)의 권장 방법에 따라 정제하였다. 한편, 전체 ATM은 그 크기가 매우 커서 합성하기에 곤란하였으므로 본 발명자들은 ATM의 기능 도메인과 AIM3의 상호작용을 시험하였다. 이를 위해, ATM의 구조에서 FAT 도메인을 포함하는 612개의 아미노산으로 이루어진 단편을 서열번호 12 및 서열번호 13으로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 또한 C-말단 도메인을 가지는 145개의 아미노산 이루어진 단편(대조군)은 서열번호 14 및 서열번호 15로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이후, 증폭된 PCR 산물을 시험관 내 전사 및 번역이 가능한 벡터인 pcDNA3.1(Invitrogen)에 클로닝하였다. 이 때 단백질의 합성은 방사성 메티오닌의 존재 하에서 시험관 내 번역 방법(in vitro translation)으로 수행하였다. 합성된 TNT 산물 10 µl을 GST 또는 GST-융합 AIM3 단백질이 고정된 글루타치온-세파로즈 비드 상에서 5분간 배양하였다. 이후, 결합 버퍼(0.2% sarcosine 및 0.2% Triton X100을 포함하는 PBS)로 6회 세척한 후, 10% SDS-PAGE에서 용해하였다. 각 도메인에 대한 GST-융합 AIM3의 결합을 자가방사기록(autoradiography)으로 분석하였다.

그 결과, 도 8b에서 보는 바와 같이, GST-융합 AIM3 단백질은 ATM의 기능 도메인인 FAT 도메인과는 결합하였으나, ATM의 C-말단 도메인과는 결합하지 않았다. 이로부터 AIM3가 ATR과 직접적으로 상호작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

<9-2> AIM3와 ATR의 상호작용 분석

ATR 또한 FAT 도메인을 포함한다(Abraham R, *Genes Dev.*, 15:2177, 2001). 따라서 AIM3와 ATR의 상호작용을 공동-면역침전법으로 조사하였다.

먼저, Flag이 태깅된 ATR(Flag-tagged ATR)을 포함하는 ATR 벡터(하버드 대학 Elledge S.로부터 제공받음)로 293 세포를 형질감염시켰다. 형질감염된 293 세포에 UV를 처리한 후, 시간 별로 단백질을 추출하였다. 이후, 항-ATM 항체 대신 항-FLAG 항체(Sigma)를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 <9-1>의 a.와 동일한 방법에 따라 수행하였다.

그 결과, 도 8c에서 보는 바와 같이, AIM3는 FLAG로 태깅된 ATR(Flag-tagged ATR)과 공동-면역침전되었으며, 상기 상호작용은 UV 노출 하에서 더욱 강화되었다. 이로부터 AIM3가 ATM에 작용한 것같이 ATR에도 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

<9-3> AIM3에 의한 ATM의 활성화 분석

ATM이 AIM3와의 상호작용에 의해 활성화되는지를 조사하기 위하여, ATM의 기질로 알려진 H2AX(Burma *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 42462-42467, 2001; Ward, I. M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 47759-47762, 2001)를 이용하여 ATM의 활성을 조사하였다.

먼저, 야생형 마우스와 AIM3^{+/-} 마우스에서 흉선세포와 비장세포를 분리한 후, 상기 세포들에서 H2AX의 인산화 수준을 상기 실시예 <7-5>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 그 결과, 도 8d에서 보는 바와 같이, H2AX의 인산화(p-H2AX)가 AIM3^{+/-} 마우스 유래의 세포에서 급격히 감소되었음을 확인할 수 있었다.

이후, 본 발명자들은 DNA 손상제인 VP16(Clarke *et al.*, *Nature*, 362:849-852, 1993)을 세포에 처리한 후, As-18의 존재 하에서 H2AX의 인산화가 AIM3의 억제에 의해 저해되는지 조사하였다. 상기 실시예 <7-5>에서 제조한 안티센스 AIM3를 함유하는 벡터(2 µg/ml)를 HCT116 세포에 도입하였다. 형질감염된 세포를 24시간 동안 배양한 후, 아포토시스 유도제인 VP16(Sigma)를 100 µM의 농도로 4시간 동안 처리하였다. 이후, 항-53 항체, 항-AIM3 항체 및 항-p-H2AX 항체(Cell signaling)를 각각 이용하여 상기 실시예 <7-5>와 동일한 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 이 때

각 단백질의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해 액틴(actin)의 발현 수준을 함께 측정하였다. 그 결과, 도 8e에서 보는 바와 같이, VP16 처리에 의해 H2AX의 인산화가 강화되었으나, 이는 AIM3 억제에 의해 저해되었다. 이는 ATM의 활성화에 AIM3가 필요하다는 것을 나타낸다.

상기 모든 결과에 의해 AIM3가 p53의 유도를 유발하는 ATM/ATR을 활성화한다는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 10>

암과 AIM3의 기능적 연관성 규명

<10-1> 인간 암 세포주에서 AIM3의 발현 수준 측정

a. RT-PCR 분석

인간 암과 AIM3의 기능적 연관성을 규명하기 위하여, 본 발명자들은 하기 표 4에 기재된 여러 종류의 암 세포주들 내에서 AIM3 수준을 RT-PCR로 조사하였다. RT-PCR은 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법에 따라 수행하였다.

[표 4]

	세포주 명	유래	p53 기능
1	HCT116	대장	+
2	SW480		-
3	H23		-
4	H157	폐	-
5	A549		+
6	H460		+
7	Raji		+/-
8	K-562	림프구	-

그 결과, 도 9a에서 보는 바와 같이, 시험된 세포주 중 HCT116, A549 및 H460 세포주에서 AIM3의 발현이 낮은 것으로 나타났다. 보다 구체적으로 살펴보면, 활성화형 p53을 포함하는 세포주(p53(+)) 세포: HCT116, A549 및 H460)에서는 AIM3 수준이 낮은 반면, 활성화형 p53이 부족한 세포(p53(-)) 세포: SW460, H23, H157 및 K-562)에서는 정상적이었다. 또한 부분적으로 활성화된 p53을 포함하는 Raji 세포(Bhatia *et al.*, *FASEB J.*, 7:951-956, 1993)에서는 AIM3가 p53(+) 세포와 p53(-) 세포사이의 중간 수준으로 발현되었다. 상기 결과로부터 AIM3의 발현수준이 p53과 기능적으로 연관되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 결과는 AIM3와 p53 중에서 어느 하나만 변이(aberration)되어도 세포가 변형될 수 있으며, AIM3와 p53이 동일한 신호전달경로에서 작용한다는 가능성을 더욱 확인해 주는 것이다.

또한 상기 표 4의 세포주들 중 폐암 세포주만을 대상으로 AIM3의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 비교한 결과, 상기 RT-PCR 분석 결과와 일치하는 결과를 얻었다(결과 미도시).

상기 결과들은 AIM3의 발현 수준이 몇몇 암 세포주들에서 감소된다는 것을 제시한다.

b. 게노믹 PCR 분석

몇몇 암 세포주들에서 AIM3의 발현 수준이 낮은 원인을 규명하기 위하여 본 발명자들은 PCR 분석을 이용하여 AIM3 유전자의 DNA 양을 비교하였다. H157, H460, HCT116, A549 및 DU145 세포주를 대상으로 상기 실시예 <2-2>와 동일한 방법에 따라 게노믹 PCR 분석을 수행하였다. 대조군으로서 액틴(actin) 유전자를 이용하였다.

그 결과, 도 9b에서 보는 바와 같이, H460 및 A549 세포주는 다른 세포주들보다 더 적은 양의 AIM3 DNA를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 상기 두 세포주에서 하나의 AIM3 대립인자가 결손된 것을 의미한다.

<10-2> 암환자로부터 분리된 조직에서의 AIM3 및 p21의 발현 수준 측정

다음으로 암 환자들로부터 분리된 조직에서 AIM3 및 p21의 발현 수준을 조사하였다. 9명의 백혈병 환자(5명: 급성 전골수구성 백혈병(acute promyelocytic leukemia; APML), 4명: 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia; CML))의 백혈구세포로부터 총 RNA를 분리하였다. 이후, 상기 실시예 <5-2>와 동일한 방법에 따라 RT-PCR을 수행하였다. p21을 위한 RT-PCR 분석에서는 **서열번호 16** 및 **서열번호 17**로 기재되는 프라이머를 이용하였다.

그 결과, **도 9c**에서 보는 바와 같이, 3명의 환자의 조직에서 AIM3가 낮은 수준으로 발현됨이 관찰되었다. 이 경우에는 p53의 타겟 유전자인 p21의 발현도 강하게 억제된 것으로 나타났다. 이로부터 p53의 조절에 AIM3가 기능적으로 관여한다는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

<10-3> 간암 환자의 정상 조직과 암 조직에서의 AIM3 발현 수준 비교 측정

고형 종양은 그 빈도가 매우 낮았지만 AIM3^{+/-} 마우스에서도 발견되었으므로, 본 발명자들은 간암 환자들로부터 분리된 정상조직과 암 조직에서 AIM3의 수준을 RT-PCR 분석으로 비교하였다. 이 때 대조군으로서 액틴의 발현 수준을 함께 측정하였다. 25개의 환자 샘플을 분석한 결과, 12개의 샘플에서 AIM3가 암-특이적으로 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 대표적인 8개 샘플의 결과를 **도 9d**에 나타내었다.

상기 모든 결과들은 낮은 수준의 AIM3 발현이 다양한 인간 암 세포주 및 환자 조직과 높은 빈도로 연관되어있음을 제시한다. 또한 상기 결과들은 AIM3의 발현 수준을 측정하여 암을 진단할 수 있음을 나타낸다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 AIM3가 강력한 종양 억제자로서 작용함을 규명하였다. AIM3 단백질은 ATM/ATR의 FAT 도메인에 결합하여 이들을 활성화시킴으로써 종양 억제 단백질인 p53의 발현을 유도한다. 따라서, AIM3 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산은 암 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 항암제 개발을 위한 타겟 및 다양한 암의 진단 마커로서 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

AIM3(ARS-interacting multifunctional protein 3) 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산을 유효성분으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 AIM3 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 핵산은 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 핵산은 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5.

제4항에 있어서, 상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, 상기 플라스미드는 pRK5, pVL1392 및 pcDNA3로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7.

제5항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 허피스바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 암은 유방암, 정낭암, 타액선암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종과 같은 암 또는 이들 암의 하나 이상의 조합임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9.

(a) AIM3 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 재조합 세포와 후보물질을 배양하는 단계 및;

(b) AIM3 단백질의 활성화 또는 세포 내 수준 증가에 미치는 효과를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 물질의 스크리닝 방법.

청구항 10.

제9항에 있어서, 상기 (b) 단계의 AIM3 단백질의 활성화는 ATM/ATR과의 결합 활성화 또는 p53의 발현을 유도하는 활성화인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

제9항에 있어서, 상기 (b) 단계의 AIM3 단백질의 세포 내 수준의 증가는 AIM3 유전자의 발현이 증가되거나 단백질 분해가 억제되어 단백질 농도가 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

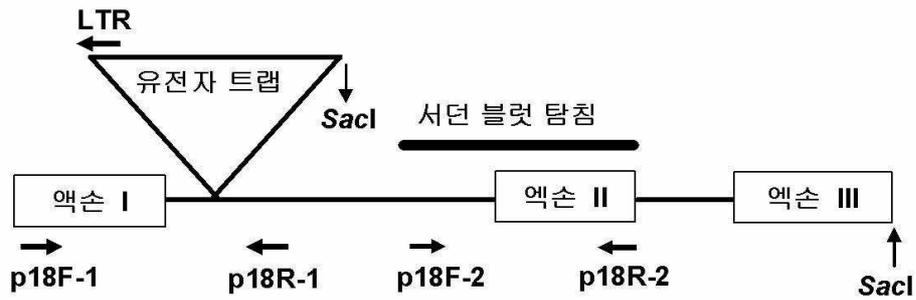
제9항에 있어서, 상기 AIM3 단백질의 활성화 또는 세포 내 수준은 면역침전법(co-immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

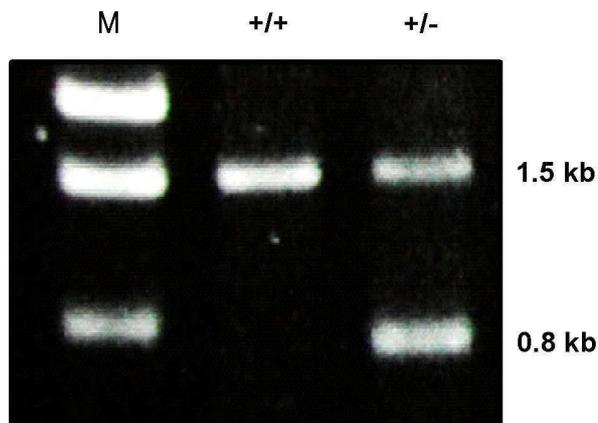
AIM3 단백질을 암호화하는 핵산, 이의 단편, 이들로부터 암호화되는 펩타이드 및 상기 펩타이드에 대한 항체로 구성되는 군에서 선택되는 하나를 포함하는 암 진단용 키트.

도면

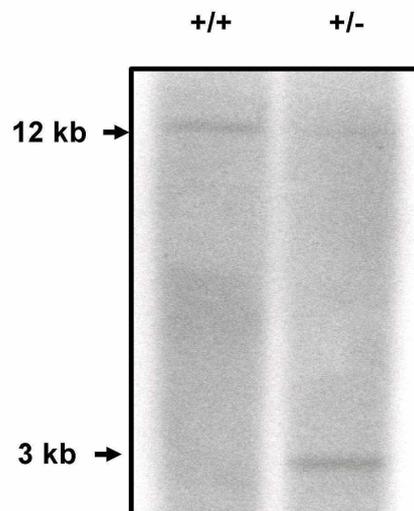
도면1a



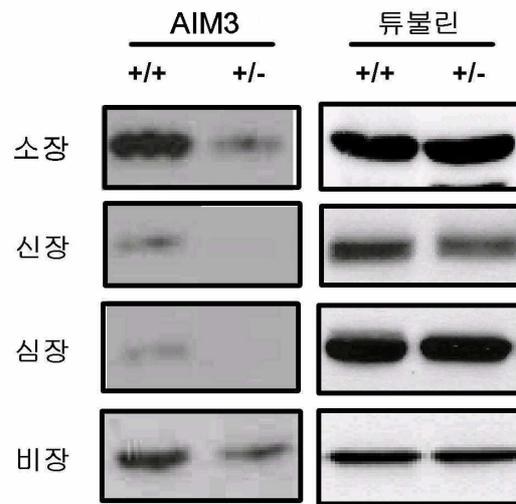
도면1b



도면1c

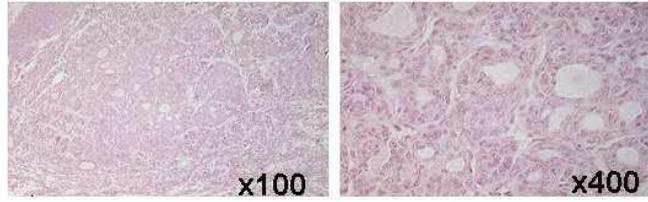


도면1d

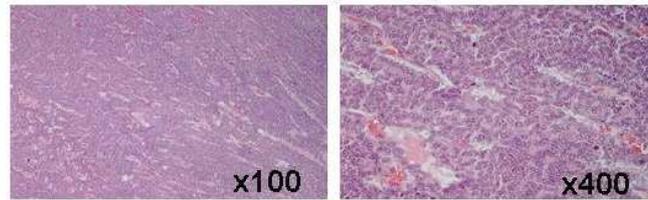


도면2a

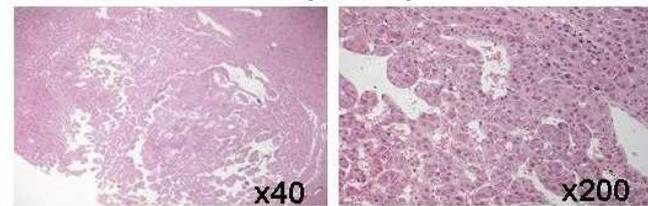
유방 (B-95)



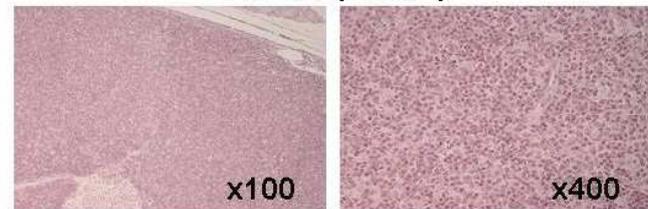
정낭 (B-103)



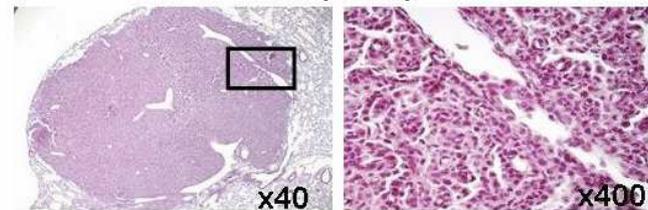
간 (B-207)



림프절 (B-232)

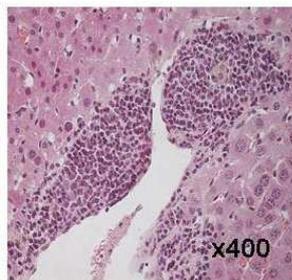


폐 (B-14)

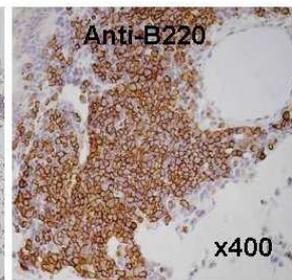
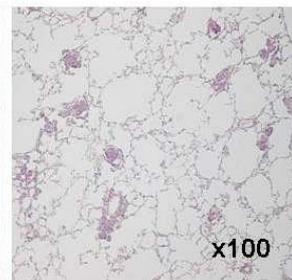


도면2b

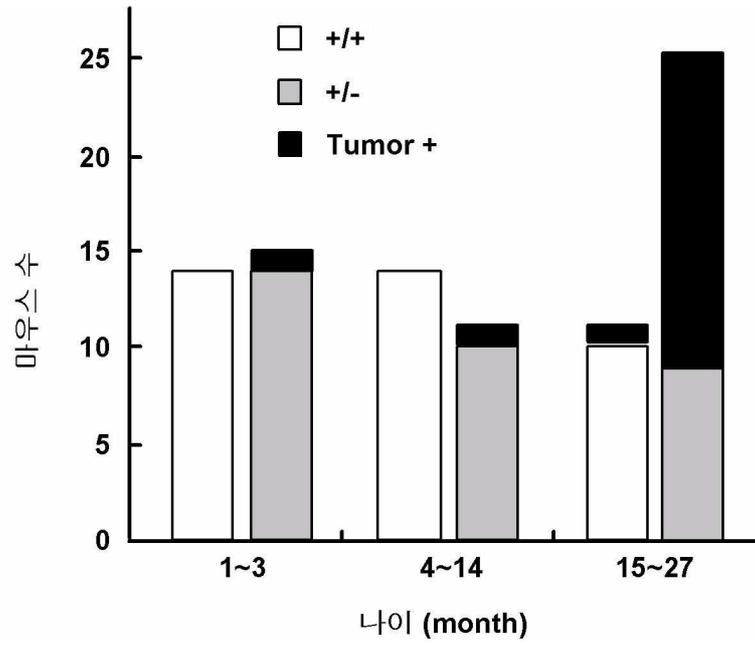
간 (B-207)



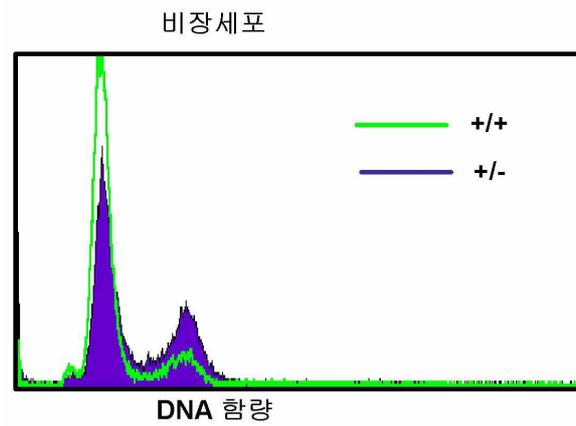
폐 (B-207)



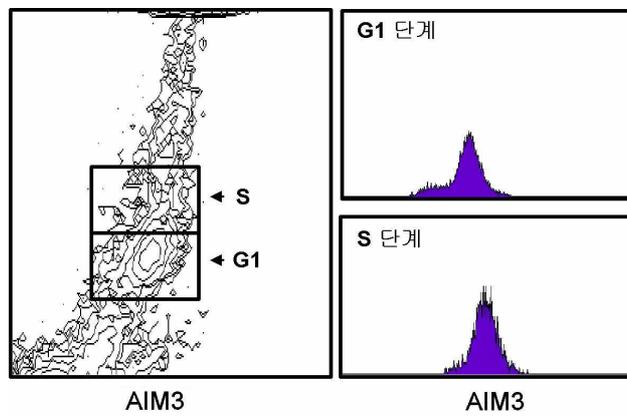
도면2c



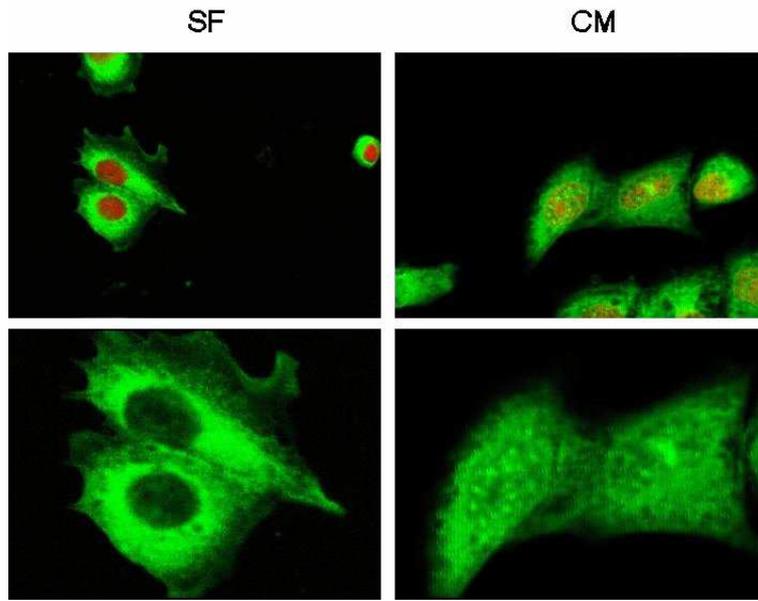
도면3a



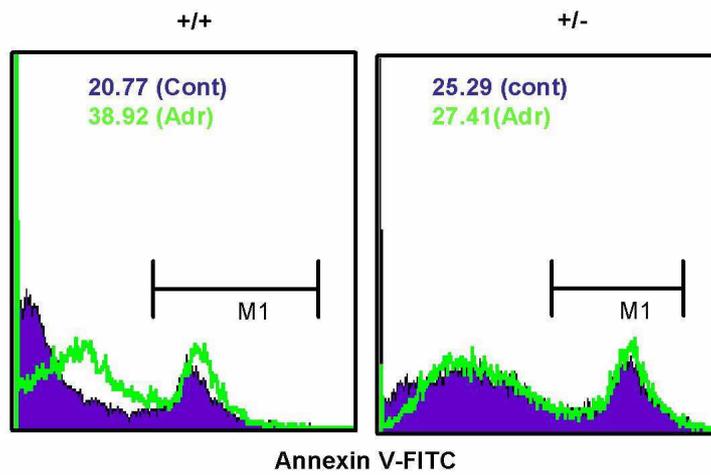
도면3b



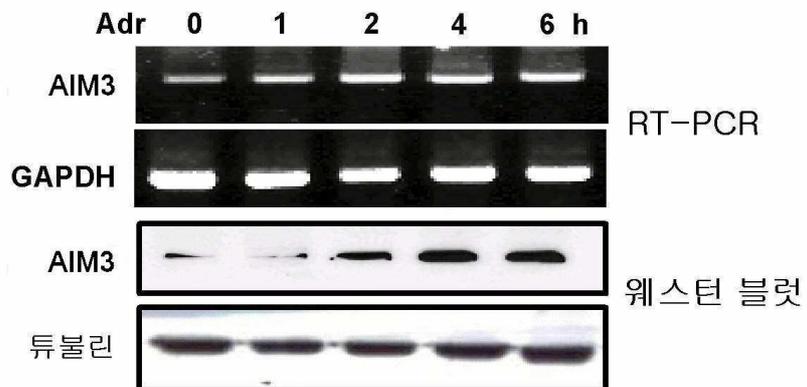
도면3c



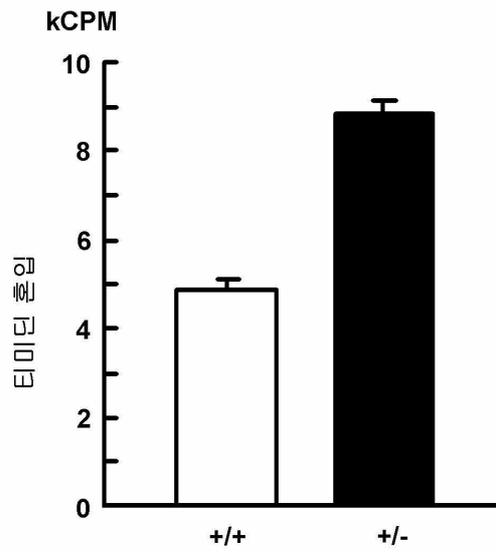
도면4a



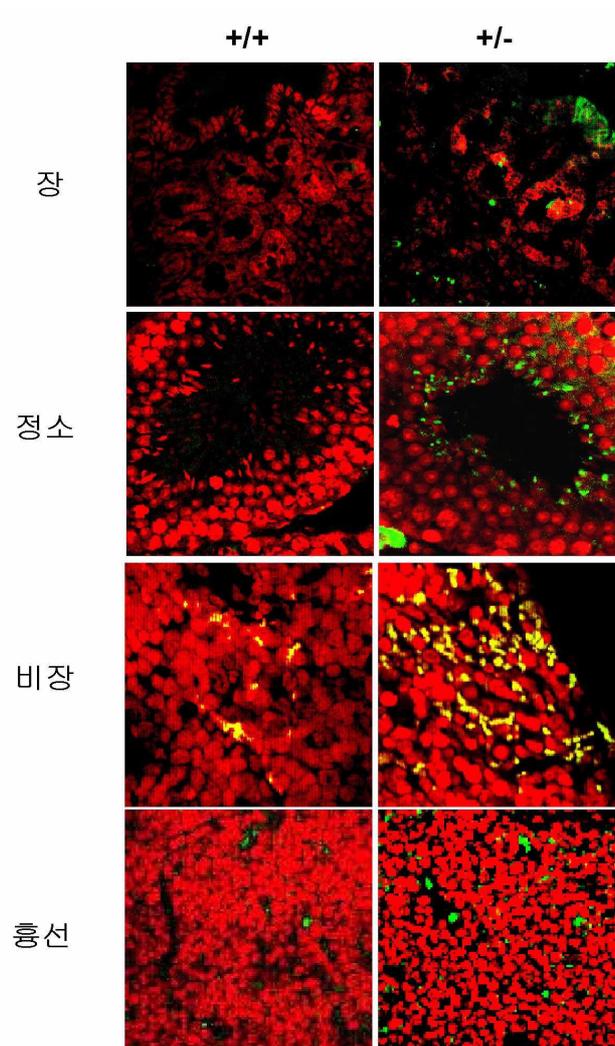
도면4b



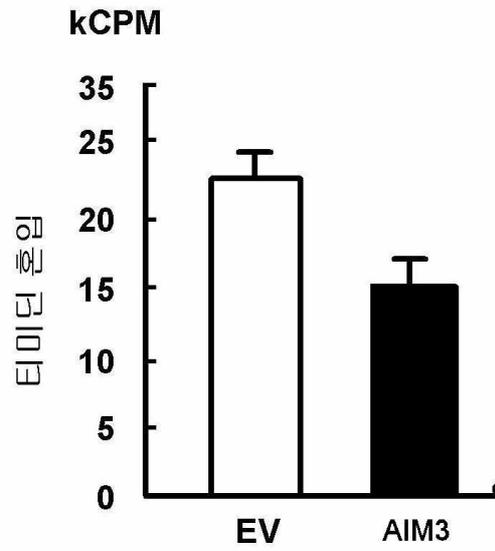
도면5a



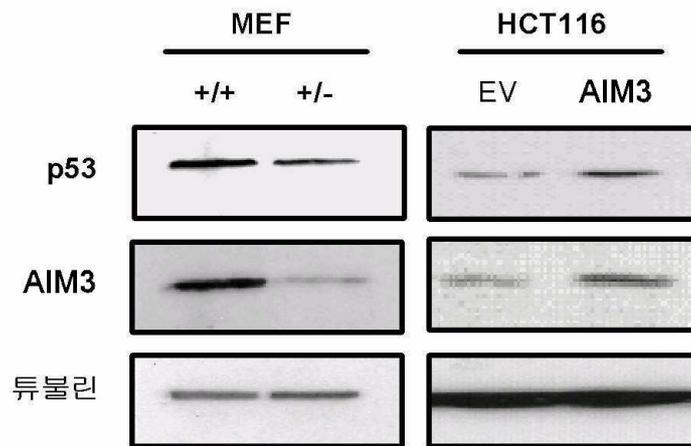
도면5b



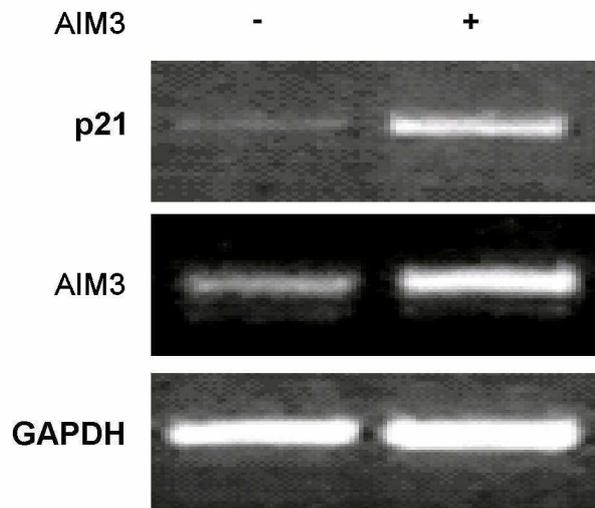
도면5c



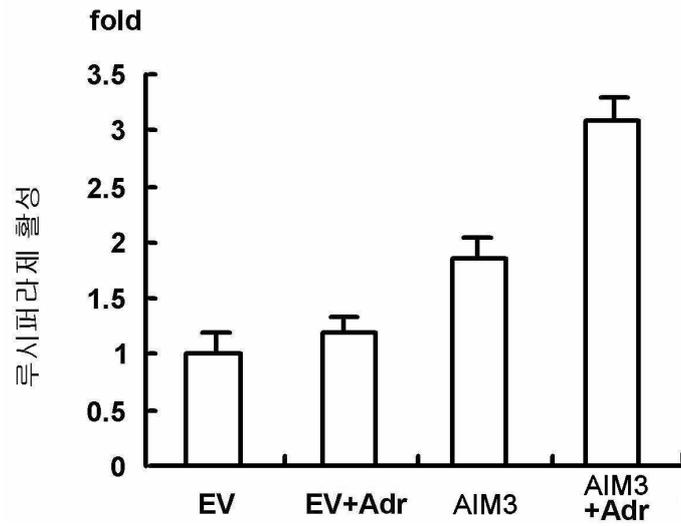
도면6a



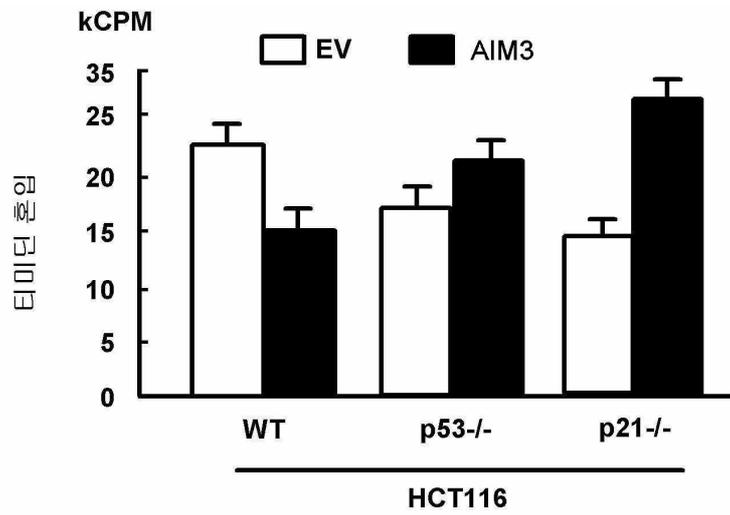
도면6b



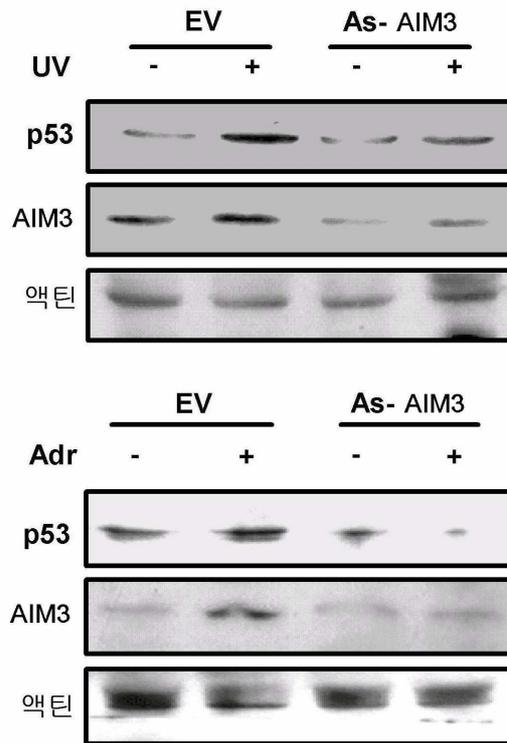
도면6c



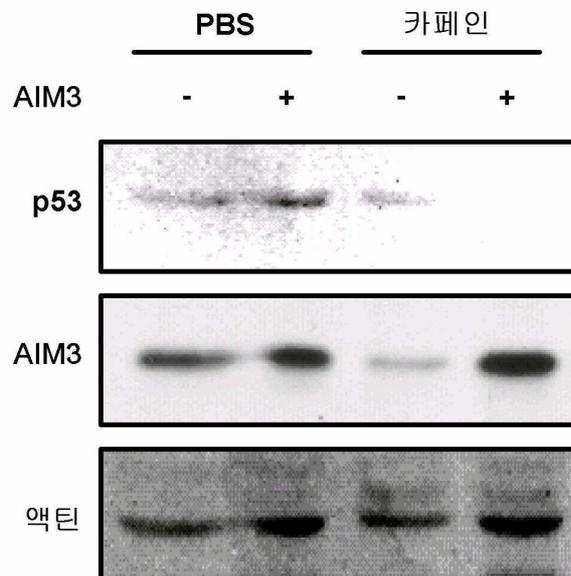
도면6d



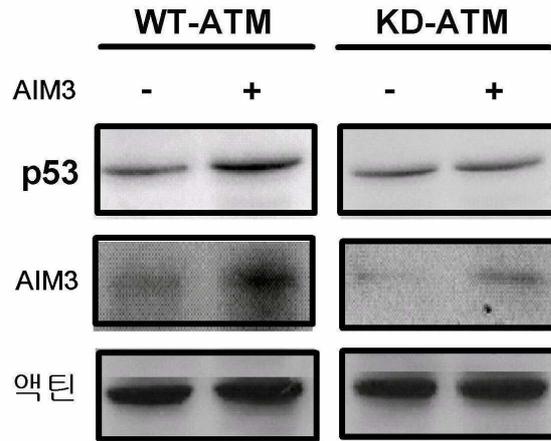
도면6e



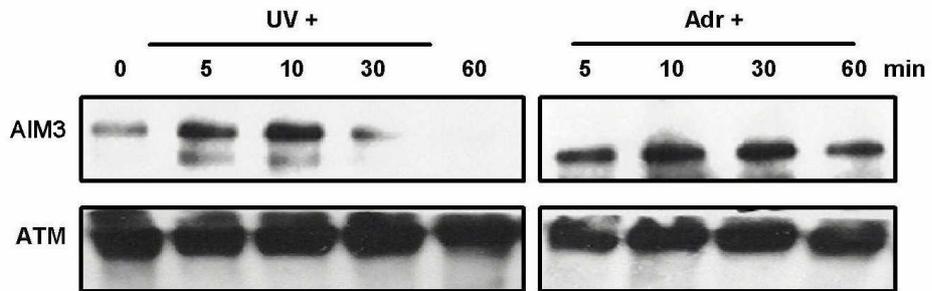
도면7a



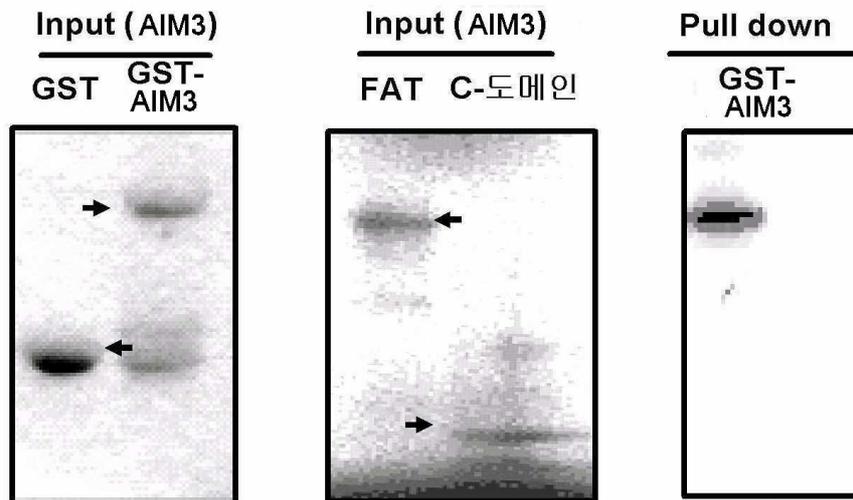
도면7b



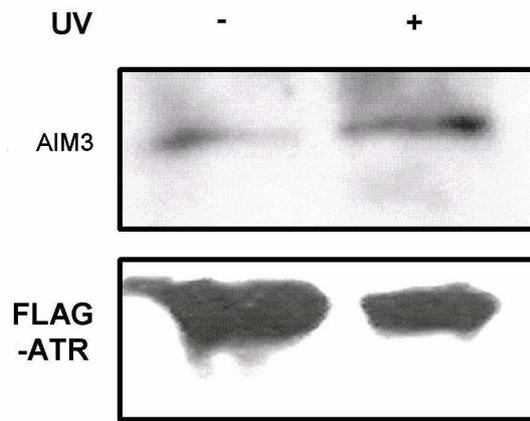
도면8a



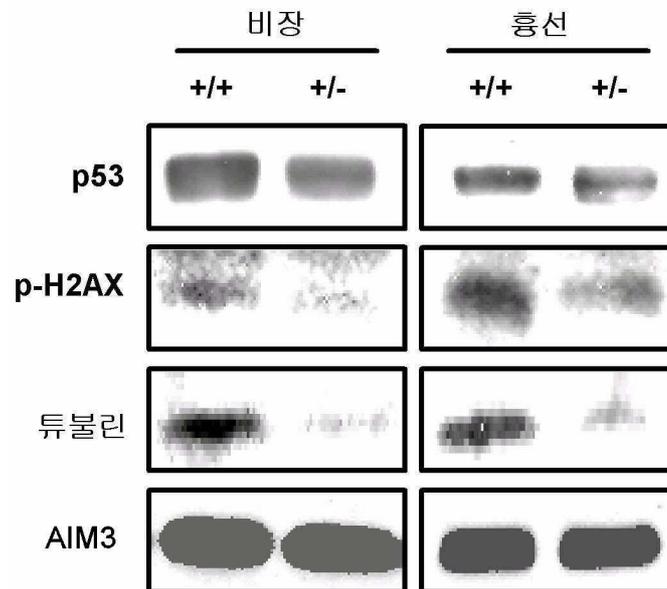
도면8b



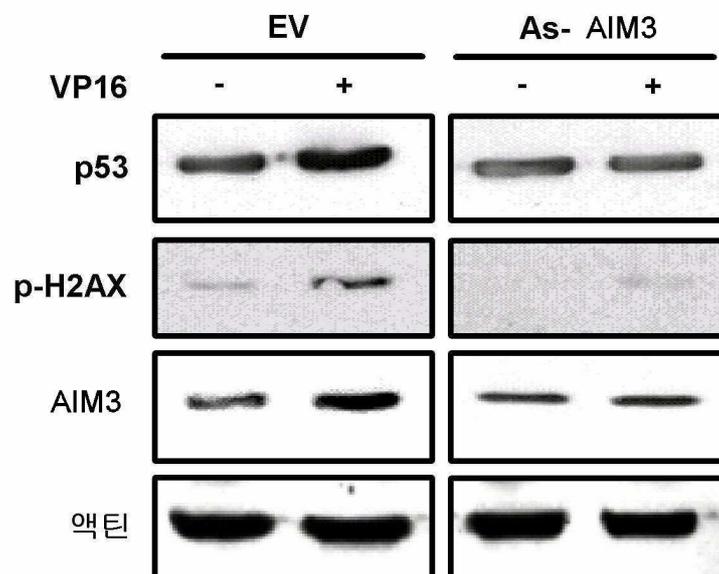
도면8c



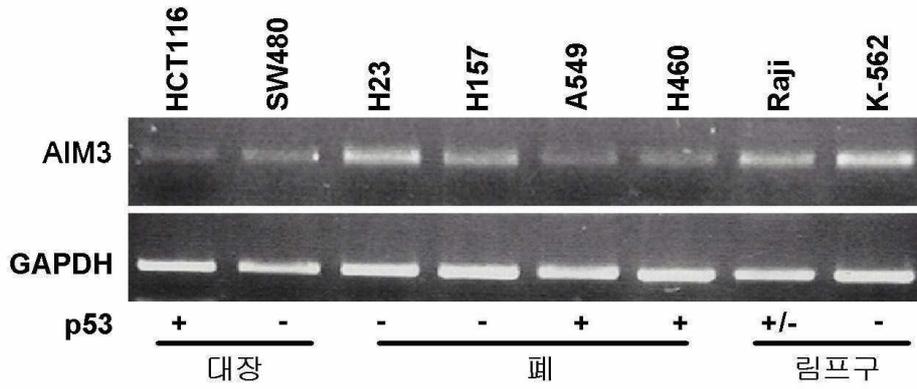
도면8d



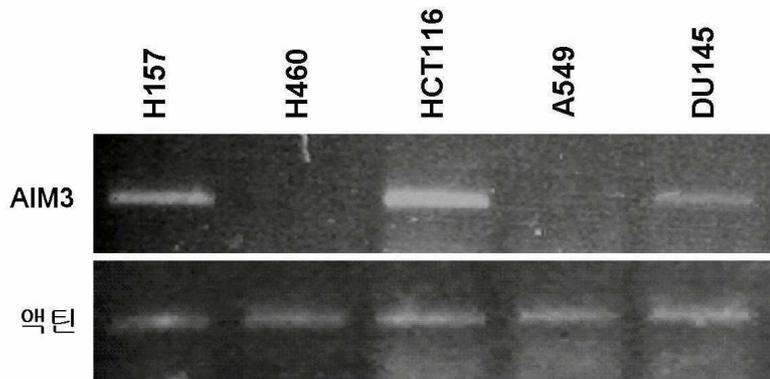
도면8e



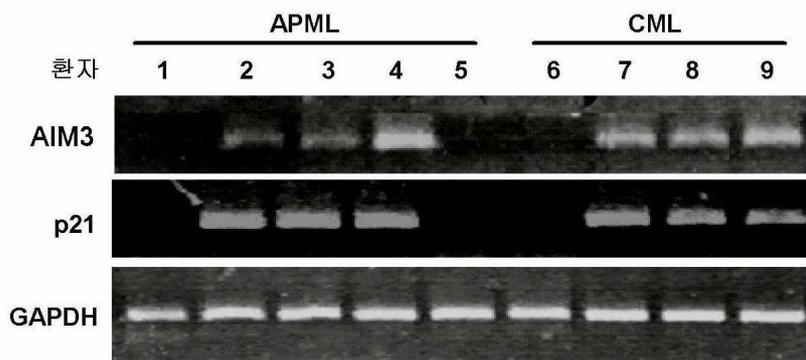
도면9a



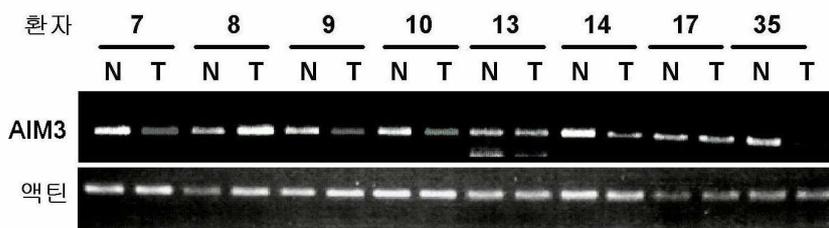
도면9b



도면9c



도면9d



서열목록 전자파일 첨부