

신약 개발 연구개발사업

(Research Program for New Drug Target Discovery)

세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의
상호작용을 이용한 암 제어 연구
Control of tumorigenesis by cross-talk between
TGF- β 1 and cell adhesion protein signals

광주과학기술원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의 상호작용을 이용한 암 제어 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2009. 06. 15

주관연구기관명 : 광주과학기술원

주관연구책임자 : 송 우 근

보고서 초록

| | | | | | |
|--|------------------|--|---------------------------------|-------------|--|
| 과제고유번호 | 2006-02594 | 해당단계 연구기간 | 2006. 5 ~ 2009. 4 | 단계구분 | (해당단계:최종) /(총 1단계 3년) |
| 연구사업명 | 중사업명 | 미래기반기술개발사업 | | | |
| | 세부사업명 | 신약타겟발굴사업 | | | |
| 연구과제명 | 대과제명 | | | | |
| | 세부과제명 | 세포 인식/부착단백질과 TGF-β1 신호의 상호작용을 이용한 암 제어 연구 | | | |
| 연구책임자 | 송우근 교수 | 해당단계 참여 연구원수 | 총 : 6 명 내부 : 6 명 외부 : 명 | 해당단계 연구비 | 정부 : 75,000천원 기업 : 천원 계 : 75,000천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원수 | 총 : 14 명 내부 : 14 명 외부 : 명 | 총연구비 | 정부 : 235,000천원 기업 : 천원 계 : 235,000천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 광주과학기술원 생명과학과 | | 참여기업명 | | |
| 국제공동연구 | 상대국명 : | 상대국연구기관명 : | | | |
| 위탁연구 | 연구기관명 : | 연구책임자 : | | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내) | | | | 보고서면수 | 53 page |
| <p>암질환과 연관이 깊은 TGF-β1/integrin경로의 crosstalk 현상을 밝히고 그 분자메커니즘을 이해하여 신약개발의 기초지식을 제공하고자 함. 이를 위하여,</p> <ul style="list-style-type: none"> - TGF-β1 신호의 세포증식 억제기능이 세포 부착 및 integrin신호 단백질인 p130Cas 에 의하여 저해됨을 발견하고, p130Cas과 TGF-β1 신호단백질인 Smad3의 상호작용을 동정하여 두 신호경로의 교차점을 규명함. - 세포증식 및 암세포의 중간엽성 세포전환(EMT)에 대한 p130Cas의 기능을 밝혔으며 TGF-β1신호가 p130Cas에 의하여 조절되는 기작이 세포내유입현상과 연관됨을 분석하였으며, 암세포에서 p130Cas가 과발현되거나 과인산화되었을 때 TGF-β1의 신호활성 및 세포반응이 둔화됨을 발견함. - 최종적으로 p130Cas-Smad3 상호작용이 암세포의 발달을 촉진하리란 결론을 얻고, 이 상호작용을 저해하기 위한 peptide-aptamer를 고안하여 제작중임. | | | | | |
| 색인어 | 한글 | 암, 세포인식단백질, 전이, 세포골격, 세포내 유입 | | | |
| (각 5개 이상) | 영어 | edcancer, cell adhesion protein, metastasis, cytoskeleton, endocytosis | | | |

요 약 문

I. 제 목

- 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의 상호작용을 이용한 암 제어 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 목적 : 세포 인식 및 부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호 조절기전 연구를 통해 암 발병기전을 규명하고 조절인자를 발굴하여 암 제어기술 확립 및 신약개발을 위한 기초기술을 제공한다.
- 필요성 : 국내외적으로 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의 상호작용에 의한 암 발생 및 전이에 대한 연구는 아직 초기단계이다. 따라서 이에 대한 보다 근본적인 이해는 암 제어기술의 확립에 기여하게 되는 동시에, 암의 조기진단 및 치유기술 개발에 응용될 수 있는 표적 물질의 발굴에 획기적인 지식을 제공하게 될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 세포 인식 및 부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호의 조절 기작 및 p130Cas의 기능 규명, p130Cas에 의한 TGF- β 1 활성조절 기작 규명 및 제어방법 탐색, 암 발병과 p130Cas의 연계성 연구

IV. 연구개발결과

- 세포주기에서 integrin과 TGF- β 1 신호의 상호작용 연구
- integrin과 TGF- β 1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 기능 연구
- 세포의 이동현상에 관여하는 p130Cas 및 v-Crk, Rac의 역할 규명
- 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF- β 1 활성화의 상관관계 규명
- 암세포의 중간엽성 세포 전환 (EMT) 기작에서 인테그린과 p130Cas의 기능 연구
- p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작과 TGF- β 1 활성화에 관한 연구
- p130Cas-Smad3 상호작용 저해를 위한 후보물질 연구

V. 연구개발결과의 활용계획

- 세포의 증식을 조절하는 TGF- β 1신호와 integrin 신호의 cross-talk에 기여하는 p130Cas 단백질의 역할을 규명하였고 그 분자적인 메커니즘을 밝혔으며, 이를 제어하기 위한 방법에 대하여 연구하였음. 이러한 연구결과는 TGF- β 1과 암 발달의 연관관계에 대한 이해를 넓혀 주며, 동시에 특히 유방암의 진행에 기여하는 것으로 알려져 있는 p130Cas 단백질을 표적으로 하는 항암물질 개발 및 진단방법 개발에 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료됨.

S U M M A R Y

I. Subject

- Control of tumorigenesis by cross-talk between TGF- β 1 and cell adhesion protein signals.

II. Purpose and Necessity

- Purpose : To provide fundamental knowledges for the control techniques of cancer disease and for the new target molecules of a drug development
 - ① To understand the role of p130Cas protein on the crosstalk between integrin and TGF- β 1 signaling
 - ② To develop new drug target based on the p130Cas protein role in cancer development

III. Contents

- To understand the regulatory mechanisms of TGF- β 1 signaling by cell-ECM adhesion /recognition
- To search the way to control TGF- β 1 activity by p130Cas protein
- To identify the relation between cancer development and p130Cas protein

IV. Results

- Crosstalk between integrin and TGF- β 1 signaling and its effect on the cell cycle progression
- The role of p130Cas on the crosstalk between integrin and TGF- β 1 signaling
- Identification of the function of p130Cas, v-Crk and Rac complex for cell migration
- Correlation of p130Cas and TGF- β 1 activity in cancer cell
- TGF- β 1-dependent epithelial-mesenchymal transition (EMT) promotion by p130Cas protein
- Negative regulation of endocytosis by p130Cas and its effect on TGF- β 1 activity
- Development of new drug target inhibiting the p130Cas function against TGF- β 1 signaling

V. Application

Our studies revealed the signal transduction crosstalk mediated by p130Cas between integrin and TGF- β 1 signaling. In addition, we identified the molecular mechanism and control method of the signal crosstalk. These results extend our understanding how TGF- β 1 signaling regulates cancer and can be applicable to the new drug or diagnosis development.

C O N T E N T S

| | |
|--|-----------|
| Chapter 1. Overview | 7 |
| Section 1. Background | 7 |
| Section 2. Purpose and Contents | 13 |
| Chapter 2. R&D state in the inside and outside of the country..... | 15 |
| Section 1. R&D results in the inside and outside institute of the country..... | 15 |
| Section 2. R&D results attainment level | 19 |
| Chapter 3. Contents and Results | 20 |
| Section 1. Experimental strategy and approach | 20 |
| Section 2. Results | 22 |
| Chapter 4. Evaluation of project | 40 |
| Section 1. Evaluation standard | 40 |
| Section 2. Attainment of project | 41 |
| Section 3. Contribution of project | 43 |
| Chapter 5. Plan of application | 48 |
| Section 1. Necessity of additional research | 48 |
| Section 2. Expending effect | 49 |
| Chapter 6. Information of foreign science and technology | 50 |
| Chapter 7. Reference | 51 |

※ Accompanying documents : Application plan of research product
Self-evaluation

목 차

| | |
|--|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 7 |
| 1절 연구개발의 배경 | 7 |
| 2절 연구개발의 목표 및 범위 | 13 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 15 |
| 1절 국내외 연구기관의 연구개발 내용과 결과 | 15 |
| 2절 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 | 19 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 18 |
| 1절 연구추진전략 및 방법 | 18 |
| 2절 연구내용 및 결과 | 22 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 40 |
| 1절 평가의 착안점 | 40 |
| 2절 계획대비 달성도 | 41 |
| 3절 관련분야에의 기여도 | 43 |
| 4절 선정연도 협약과 최종보고의 연구목표 비교 및 달성도 | 45 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 48 |
| 1절 추가연구의 필요성 | 48 |
| 2절 기술적·경제적 파급효과 | 49 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 50 |
| 제 7 장 참고문헌 | 51 |

※ 첨부서류 : 연구개발활용계획서
 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 필요성

1. 연구 배경

가. 암의 발달과 Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-β1) 신호

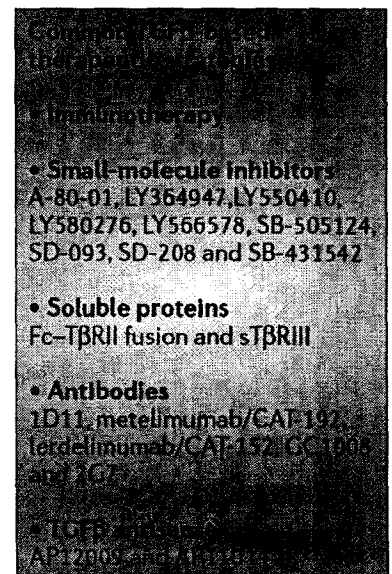
TGF-β1 신호물질은 세포의 증식을 억제하는 작용을 한다고 알려진 cytokine 중 가장 잘 알려져 있으며, 세포주기를 조절하는 작용 이외에도 세포분화, 이동 등 다양한 조절작용을 갖는다. TGF-β1은 세포 주기 중 G1기 정지를 일으켜 주고, 세포의 사멸을 유도하는 측면에서 세포와 조직의 성장을 제한하는 작용을 하기 때문에 암의 발달을 억제하는 기능을 한다. 하지만 TGF-β1의 작용이 그 미세환경 또는 세포내부의 신호전달 조건에 따라서 암조직의 발달을 도울 수 있는 면역억제, 세포간질형성 촉진, 전이 및 세포의 형질전환 (Epithelial-Mesenchymal transition) 등으로 나타날 수도 있으며, 실제로 암조직에서는 TGF-β1의 분비가 과다하게 증가되어 있음이 보고되어 있다. 단순화하여 요약하면, TGF-β1은 암 발달에 대하여 항진 또는 증진의 두 작용을 모두 한다. 양면적인 기능을 할 수 있는 이유는 바로 TGF-β1의 신호가 다양한 조절작용을 하기 때문인데, 암화가 진행된 조직/세포의 경우 TGF-β1의 항증식기능 경로가 돌연변이에 의하여 결핍되어 있음이 알려져 있다. 예를 들어 TGF-β1 수용체가 불활성화 되어 있거나, 세포내의 TGF-β1 신호 전달자 역할을 하는 Smad2/3 등의 기능이 약화되거나, 또는 TGF-β1 신호 저해활성을 갖는 inhibitory Smad (Smad6, Smad7) 등이 과다활성화된 암세포/조직이 보고된 바 있다. 반면 다른 암세포/조직에서는 TGF-β1을 과다 분비하여 주변환경을 암 발달에 유리하게끔 바꾸기도 하며, 이러한 방식으로 항증식기능보다 우선하여 암의 진행을 돕게 된다 [1-3].

나. TGF-β1 신호경로와 관련된 항암제 개발

위에서 언급한 것처럼 암종별로 TGF-β1 신호가 암을 촉진하는 경로는 암종별로 상이하기 때문에 TGF-β1 신호 경로를 조절하는 신약개발 연구의 타겟 또한 다양하다. TGF-β1의 세포증식 억제활성을 증가시키는 기능에 착안한 신약후보 물질들의 기작은 주로 TGF-β1 수용체 발현의 증가 유도, Smad2/3 신호전달경로 활성화 등이다. 이와는 반대로 TGF-β1 신호가 암세포/조직의 발달을 돕는 측면에 착안한 항암제 개발도 활발히 이루어지고 있다. TGF-β1 수용체를 차단하는 항체, 그 수용체의 인산화효소 활성을 억제하는 화학적 저해제, 또는 TGF-β 신호단백질 발현을 억제하는 anti-sense RNA 기반 신약 등이 개발 중에 있다 [4].

다. 해결하고자 하는 문제

TGF-β1 기반 신약들이 필연적으로 갖는 부작용의 우려는, TGF-β1 신호를 억제하면 암세포증식이 활발해질 수 있고, 반대로 TGF-β1 신호를 활성화시키면 면역불활성화 (특히 cytotoxic T-cell, [4]), 암 전이 가능성이 높아질 수 있다. 따라서, 특정 암종과 TGF-β1 신호와의 관계를 정확하게 규명하고 그 암세포/조직 내부의 신호경로의 분자



<TGF-β1 기반 항암제, [1]>

적인 기전을 밝혀낸다면, 복잡하고 광범위한 TGF-β1신호전달경로 전체를 변화시키는 것에서 벗어나서 보다 하위 단계의 세밀한 타겟에 기반한 신약 및 진단기술 개발이 가능할 것으로 생각된다 [1].

2. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

가. 기술적 측면

(1) 기술개발의 배경

현재 암치료에 사용되고 있는 항암제의 대부분은 화학요법제로, 이들은 암의 완치보다는 증상완화의 방법으로 사용되고 수명을 연장시켜 주는 수준이다. 항암제가 상당한 발전을 이루어서, 현재 일반적으로 사용되고 있는 화학요법제는 암의 증상과 증후를 일시적으로 제거하여 주지만, 부작용, 항암제 내성 등의 문제점을 유발한다. 항암제는 암세포만이 아니라 정상세포에도 영향을 미치기 때문에 원하지 않는 부작용을 나타내는 경우가 많으며, 아직까지는 암세포에만 작용하고 정상세포에는 영향을 미치지 않는 항암제는 개발되지 못하고 있는 것이 현실이다. 그럼에도 불구하고, 세계 항암제의 시장 성장률은 년 평균 약 15% 전후로서 전체 의약품 시장 평균 성장률을 능가할 뿐만 아니라 모든 약효군 중에서 가장 높은 성장률을 보이고 있다. 또한, 생명과학과 정밀화학이 결합되는 지식집약형 산업으로 신약개발과 첨단기술이 경쟁력의 요체가 되고 있고, 신의약품 개발이 어렵기 때문에 기술우위에 따른 독점력이 강하며 부가가치가 높은 특성이 있다. 본 연구는 암 발생과 전이에 대한 보다 근본적인 분자적 메커니즘을 규명할 수 있을 뿐만 아니라 암의 조기진단 및 제어를 위한 표지인자를 도출하여 암의 발생 및 전이를 억제하는 신약개발의 새로운 선도물질을 발굴할 수 있을 것이다.

(가) 현재 우리나라의 인구 5명중 1명이 암

으로 사망하고, 해마다 현저히 증가하는 추세에 있다. 암은 세계적으로 감염성질환 및 심혈관계질환에 이어 3위의 사망원인을 차지하고, 서구사회에서는 심혈관계 질환 다음인 2위의 사망원인을 차지하고 있는 질환으로서, 세계보건기구

<표> 한국의 암 발생 추이

(단위 : 명)

| 연도 | 1995년 | 1996년 | 1997년 | 1998년 | 1999년 | 2000년 | 2001년 | 2002년 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 남 | 35,945 | 39,565 | 43,410 | 44,037 | 46,908 | 48,005 | 51,753 | 60,711 |
| 여 | 28,774 | 32,745 | 35,387 | 32,831 | 35,412 | 35,841 | 40,191 | 49,436 |
| 성별불명 | 42 | 13 | - | - | - | - | - | - |
| 총계 | 64,761 | 72,323 | 78,797 | 76,868 | 82,320 | 83,846 | 91,944 | 110,147 |

(WHO)의 World Health Report에 따르면, 2001년에 총 사망자의 12.6%인 7,115,000명이 암으로 사망하였다. 또 식습관, 환경의 변화 및 수명연장으로 인해 향후 25년 내에 암 발생인구가 매년 약 3천만 명으로 늘어나고, 이중 2천만 명의 인구가 암으로 사망할 것으로 예상하고 있다.

(나) 현재 암치료에 사용되는 방법은 크

게 외과적 수술, 방사선 치료 및 약물치료 등이 있다. 이중 약물치료는 항암제를 경구나 주사로 투여하여, 암세포의 증식에 필요한 DNA나 관련 효소(enzyme)를 파괴하거나 억제하는 방법이다. 다른 치료방법에 비하여 약물치료가 가지는 장점은 몸의 어떤 부위에 생긴 암이라도 약물이 도달할 수 있고, 전이된 암을 치료할 수 있다는 것으로, 현재 약물치

<표> 항암제 분류

| 분류 | 약리작용 | 시판 약물 | |
|--------|---------|---|--------------------------|
| 화학요법제 | DNA알킬화제 | Meclorethamine, Chlorambucil, Busulfan 등 | |
| | 대사길항제 | Methotrexate, Fluorouracil, Doxifluridine 등 | |
| | 천연물 | Doxorubicin, Vinblastin, Mitomycin, Taxol 등 | |
| | 호르몬제 | Tamoxifen, Prednisone 등 | |
| | 기타 | Carboplatin, Mitoxantron, Hydroxyurea 등 | |
| 생물요법제 | 면역요법 | 사이토카인 | 인터루킨-2, 인터페론, 콜로니자극인자 등 |
| | | 재조합항체 | Rituximab, Trastuzumab 등 |
| | 유전자치료 | 암백신 | 임상실험단계 |
| | | 안티센스 | 임상실험단계 |
| | | p53, Toxin | 임상실험단계 |
| | | 신생혈관형성 억제 | 임상실험단계 |
| 다약제 내성 | 임상실험단계 | | |

료는 전이성 암 치료에 표준요법으로 사용되고 있다. 그러나 현재 암치료를 사용되고 있는 항암제의 대부분은 화학요법제로, 암의 완치보다는 증상완화의 방법으로 사용되고 있어서, 암의 증상과 증후를 일시적으로 제거해주고 수명을 연장시켜 주는 수준이다. 비록, 항암제가 상당히 발전해왔음은 분명하지만, 현재 사용되고 있는 화학요법제인 항암제는 부작용, 항암제 내성 등의 문제점을 가지고 있다.

(다) 대부분의 항암제는 암세포뿐만 아니라, 정상세포에도 독성을 가지고 있다. 따라서, 정상세포 같은 원하지 않은 부분에 악영향을 끼치는 부작용을 나타낸다. 또 다른 문제점으로는 약제에 대한 내성(drug resistance)이다. 약제에 대한 내성은 항암 약물치료를 할 때, 처음에는 항암효과를 나타내었다가 점차 효과가 줄어드는 현상으로서, 치료에 실패하는 가장 중요한 요인이 되기도 한다.

(라) 암 발생원인 중에서는 세포성 암 유전자(예:c-myc, ras 등)와 바이러스성 암 유전자들(예:EBV, HPV, HBV등)이 발견되었고 이들 유전자나 유전자 변이들 그리고 암 발생과의 관련성 및 기작에 관한 많은 연구 논문들이 발표되어 왔다. 나아가 암 억제 유전자(예:Smad3, p53, pRB 등) 그리고 세포주기 조절 인자(예:cyclins, cyclin dependent kinases, p21, p15등)와 암 유전자 관련 세포의 신호전달기전 관련인자들(예:integrin, protein tyrosine kinase dependent pathway 등)이 발견되어 암 발생 기작에 대한 분자 수준에서의 해석들이 점차 구체적으로 이루어지고 있다.

<표> integrin과 growth factor에 작용하는 항암제

| 신혈관형성 억제제 | 작용 기전 | 임상단계 |
|-------------|---|--------|
| Bevacizumab | 혈관내피세포성장인자에 대한 재조합 인간화 항체 (Avastin) | II/III |
| Arresten | integrin- $\alpha 1 \beta 1$ 과 결합하여 내피세포의 증식, 이동, 신생혈관증식을 저해 | I |
| Canstatin | integrin- $\alpha v \beta 3$ 과 결합하여 내피세포의 증식, 이동, 신생혈관증식을 저해 | I |
| Endostatin | integrin- $\alpha 5 \beta 1$ 과 결합하여 내피세포의 증식, 이동을 저해하고 세포자멸사를 유도 | I/II |
| NM-3 | 혈관내피세포성장인자를 저해하여 내피세포의 증식, 생성, 미세관형성을 선택적으로 저해 | I |
| Tumstatin | Binds to integrin $\alpha v \beta 3$ on endothelial cells, inhibits endothelial-cell proliferation and neovascularization | 연구단계 |
| Vitaxin | integrin $\alpha v \beta 3$ 에 대한 인간화 단일클론항체 | I/II |

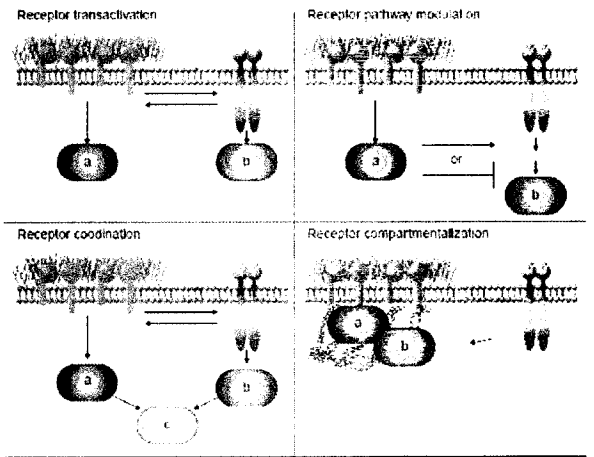
(마) Integrin과 세포주기는 촉진시키는 성장인자에 의한 신호전달 기작 및 암 발생 및 전이에서 역할에 대하여는 많은 연구가 이루어져 왔고, 이를 이용하여 여러 종류의 항암제도 개발되었으나 이러한 항암제 또한 부작용 및 항암제 내성 등의 문제점을 갖고 있다. 그러나 현재 integrin을 포함한 세포 인식/부착단백질과 다른 성장인자와는 반대로 세포주기를 억제하여 암 발생을 억제하는 TGF- $\beta 1$ 신호의 상호작용에 대한 분자적 메커니즘과 암 발생 및 전이에 관한 연구는 미개척 분야로 남아있다. 그러므로 세포 인식/부착단백질과 TGF- $\beta 1$ 신호 상호작용의 분자적 조절 기작의 규명을 통해 암 발생 및 전이를 제어할 수 있는 새로운 가능성을 개척할 수 있을 것으로 기대되며, 보다 안전하고 효과적인 새로운 치료제의 개발에 기초적인 지식을 제공할 수 있을 것으로 기대된다 [5].

(2) 기술의 중요성

(가) 세포 주기에서 세포 인식/부착 단백질과 성장인자(growth factor) 신호의 상호작용

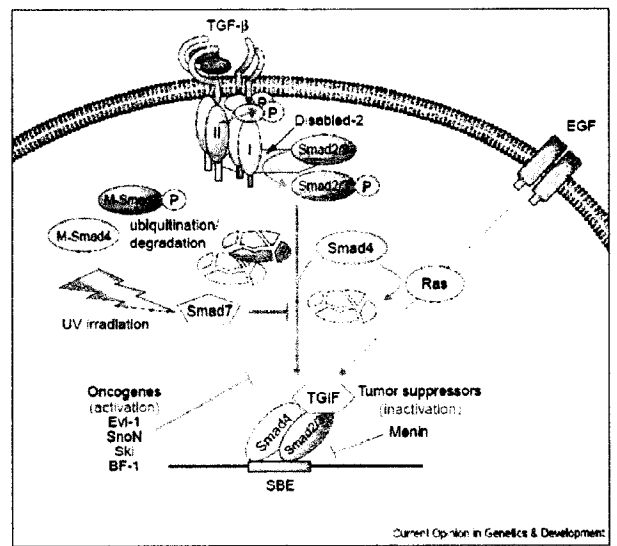
세포-세포외기질의 결합은 integrin을 활성화시켜 세포외부로부터의 신호를 세포 부착단백질군의 다양한 단백질들에 의해 세포 내부로 전달시켜서 세포주기, 세포이동, 분화 및 세포사멸등을 조절하며 조직의 항상성을 유지한다. 특히 integrin은 EGFR과 PDGFR과 같은 성장인자 수용체(Receptor Tyrosine Kinase; RTK)와 상호작용을 통하여 세포주기를 촉진시키고, 이러한 조절 메커

니즘에 관하여 많은 연구가 이루어졌다 [6-7]. 그러나 세포주기를 저해하여 암 발생을 억제하는 성장인자인 TGF- β 1에 의한 신호와 integrin사이의 상호작용에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 그러므로 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호 활성화의 분자적 조절 메커니즘을 규명하고 암 발생 및 전이와의 관계를 규명한다면 지금까지 개발되지 않은 새로운 조절인자를 발굴하여 암의 발생 및 전이를 억제하는 신약개발의 새로운 선도물질을 발굴할 수 있을 것이다.



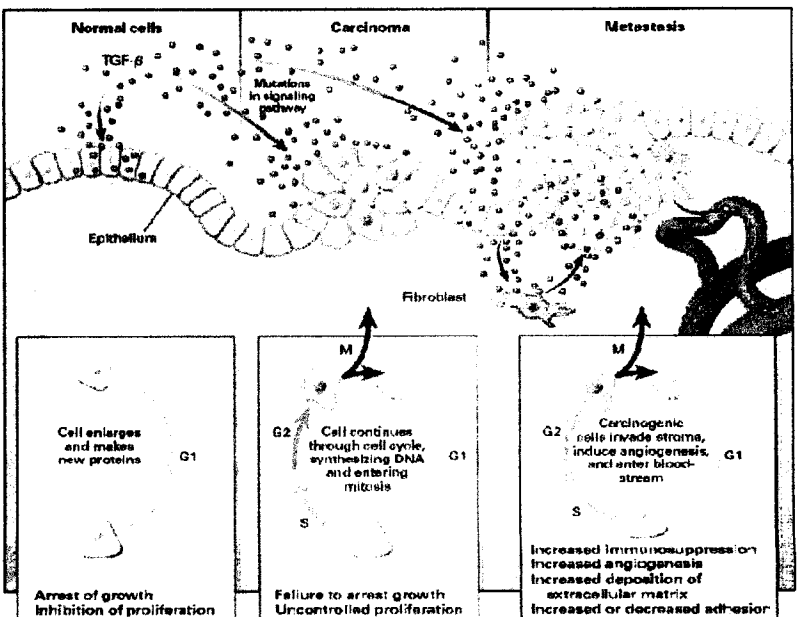
(나) 암 발생단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호의 조절기작

일반적으로 암 발생 초기단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 신호가 활성화되어 암 발생 및 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있는 반면, TGF- β 1에 의한 신호는 암 억제 단백질인 Smad3의 인산화를 유발하여 p15와 p21과 같은 세포주기 저해 단백질들의 발현을 증가시켜 암 발생을 억제한다. 그렇기 때문에 암이 생성되기 위해서는 그림에서 보는 바와 같이 세포내 다양한 분자적 메커니즘에 의하여 TGF- β 1 신호의 활성을 감소시켜야만 한다 [8-9]. 그러므로 세포 인식/부착단백질에 의한 신호가 어느 단계에서 어떻게 TGF- β 1 신호의 활성을 저해하는지를 규명한다면 암 발생을 제어하기 위한 새로운 방법을 제시해 줄 것이다.



(다) 암세포의 전이단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호의 조절기작

암세포의 전이단계에서는 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호 모두 암세포가 이동성을 갖는 중간엽성 세포로 전환되는 기작 (EMT)을 활성화시킴으로써 암세포의 전이를 촉진시킨다. 국내외 많은 과학자들이 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의 상호작용을 통하여 EMT가 활성화되어 암세포의 전이를 촉진할 것으로 판단하고 연구하고 있으나 아직까지 정확한 메커니즘이 규명되지 못했다. 이러한 상호작용을 분자적 수준에서 규명한다면 암세포의 전이를 제어할 수 있는 새로운 조절인자를 발굴할 수 있을 것이다 [10].



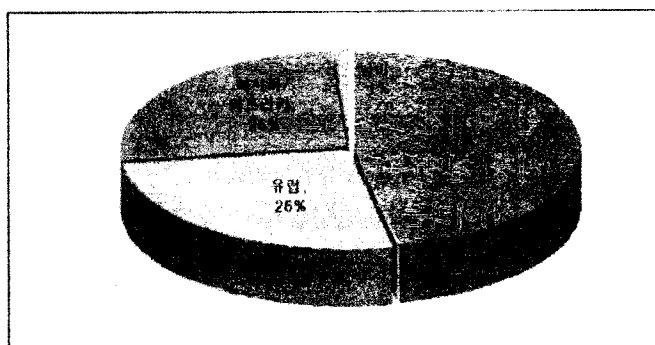
나. 경제. 산업적 측면

노년 인구의 증가 및 환경악화로 인하여 세계 암 발생율은 매년 7~8% 증가하고 있다. 오늘날 다른 주요사망원인인 뇌혈관질환, 심장질환에 의한 사망이 감소하는 동안에도, 암으로 인한 사망은 꾸준히 증가하고 있다. 발암 원인은 여러 종류의 암에서 아직 불분명하지만, 암의 발달과 전이에 대한 분자생물학적인 연구는 신개념의 항암제 및 진단방법을 가능하게 하였다. 그러나 암은 아직도 필요 약물의 개발이 미진한 시장성이 큰 분야로서, 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있으며, 국제적인 제약회사들과 국내의 제약회사들도 항암제 개발 및 판매에 몰두하고 있다. 항암제는 폭발적인 인구 증가와 발암환자 증가로 인해 커다란 성장 가능성을 내포하고 있고, 향후 거대시장으로 발전되어 갈 것으로 예상되고 있기 때문에 암에 대한 근본적인 이해와 분자적 접근을 통한 새로운 치료제 개발은 경제적, 산업적으로 상상할 수 없을 만큼의 기대효과를 가져올 것이다.

(1) 세계 의약품 시장은 연평균 10%의 성장을 하고 있으며 2002년에는 약 4,100억달러 규모의 시장을 형성했고, 이중 항암제 시장은 약 4.4%인 180억달러로 추정되고 있다. 세계 항암제 시장규모는 심순환계 약물이나 중추신경계 약물 등에 비해 작으나, 시장 성장률은 15%로서 의약품 시장 평균 성장률을 능가할 뿐만 아니라 모든 약효군 중에서 가장 높은 성장률을 보이고 있다.

(2) 세계 항암제 시장은 폭발적인 인구 증가와 발암환자 증가로 인해 커다란 성장 가능성을 내포하고 있다. 미국의 조사 컨설팅 회사인 디시전 리소시스는 최근에 중기 항암제 시장 전망(유럽, 미국, 일본 등 주요 7개국 대상)이라는 보고서에서 항암제의 시장규모가 1997년에 이미 80억달러를 넘었으며 2002년 130억달러, 2010년 350억달러로 성장할 것으로 전망하였다. 한편, 항암제는 미국이 가장 큰 시장을 차지하고 있다.

<그림> 세계 항암제 지역별 시장점유율



(3) 우리나라에서 항암제는 약 540개 품목이 허가되어 생산되고 있고, 오리지널제품 기준으로는 130개 정도의 품목이 판매되고 있다. 이중 20여개 품목이 전체 시장의 75-80%의 비중을 차지하고 있다. 시장규모는 2000년 1,300억원, 2003년 1,730억원을 달성하여 연평균 10% 정도의 성장률을 나타내고 있고 2008년에는 2,780억원 정도가 될 것으로 예상되고 있다. 그러나 우리나라의 항암제 시장은 외국계 제약회사들에 의해 주도되고 있으며, 이들 제품은 국내 시장의 75-80% 정도를 점유하고 있다. 따라서, 우리나라의 수입 항암제의 비중도 75-80%의 비중을 차지하고 있는 실정이다 [5].

(4) 세계적인 항암제 개발에는 산학연의 협력 활성화가 필수 불가결한 요소이고 이를 위해서 공통의 연구목표하에 여러 기업, 정부출연 연구소, 대학이 유기적으로 협력할 수 있는 R&D 네트워크와 국가의 효율적이고, 지속적인 연구지원이 요청되고 있다.

<표> 국내 항암제 시장규모

(단위 : 억원)

| 년 도 | 1996년 | 1997년 | 1998년 | 1999년 | 2000년 | 2001년 | 2002년 | 2003년 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 병원처방 기준 | 427 | 460 | 548 | 685 | 900 | - | - | - |
| 병원처방 +원의처방 | - | - | - | - | 1,300 | 1,430 | 1,450 | 1,730 |

다. 사회·문화적 측면

암은 치료 시에 그 비용이 매우 크며, 환자는 사회적인 역할을 장시간 수행할 수 없게 된다. 따라서 환자 자신뿐 아니라 환자가 속한 사회에도 큰 부담과 손실이 지워지게 된다. 암은 말기에 이르게 되면 치사율이 매우 높을 뿐 아니라, 환자가 느끼게 되는 물리적인 고통이 매우 심각하다. 따라서 이를 조기 진단하고 효과적으로 제어할 수 있다면, 본인뿐만 아니라 가족, 그리고 사회전체가 건강하고 풍요로운 삶을 영위할 수 있게 되며, 특정 부위/단계의 암에 대한 새로운 약제 개발과 치료기술의 상용화는 국민 보건 복지 향상에 크게 기여를 할 것이다.

- (1) 인류가 극복하지 못한 많은 질환 중에서 특히 암은 우리에게 가장 위협적인 질환인 것은 의심의 여지가 없다. 이같은 현상은 우리나라뿐만 아니라, 미국, 일본, 등 거의 대부분의 나라에서 공통적이다. 개인적, 사회적 피해가 큰 암을 치료하는 것은 21세기 인간의 수명연장과 아울러 인적, 물적 피해를 줄이는 의미가 크기 때문에 최우선적으로 극복해야 할 질병으로 인식되고 있다.
- (2) 질환별 사망자 수와 비교해 볼 때, 암은 아직도 필요 약물의 개발이 미진한 시장성이 큰 분야라고 할 수 있다. 고혈압이나 고지혈증과 같이 이미 우수한 효능의 약물이 많이 개발되어 있어서 환자가 약물을 복용하고 잘 관리를 하게 되면 삶의 질을 유지하면서 수명을 연장할 수 있는 질환과는 달리 항암제는 아직도 효과적인 치료제의 개발이 요구되는 분야라고 볼 수 있다.
- (3) 우리나라는 사회 평균연령의 노령화가 진행 중이며 삶의 질에 대한 관심이 크게 높아지고 있는 가운데, 식습관과 환경의 변화로 인하여 암으로 인한 사망률이 10년 전과 비교해 볼 때 매우 급격하게 증가하고 있는 실정이다. 즉 국가경제의 기반이 되는 연령층이 높아지고 개인 건강에 대한 관심이 높아지면서 암과 같이 노화과정과 연관성이 높은 대표적인 질병에 보다 적극적으로 대처하려는 인식이 확산되고 있다. 또한 과거부터 지속되어온 항암제 개발은 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인하여 부작용이 많고 내성이 증가하는 문제를 안고 있었다. 따라서 새로운 항암제의 개발은 여전히 필요하고 새로운 항암제들이 계속해서 출시되고 있다. 모든 신약 개발과 마찬가지로 항암제의 개발에는 10년 이상의 긴 소요기간이 요구되므로, 증가일로에 있는 국내의 수요에 부합하기 위한 관련 연구가 시급히 지원, 시행되어야 하며, 새로운 항암제의 개발은 엄청난 사회·문화적 실익을 유발할 있을 뿐만 아니라, 환자와 그 가족의 고통을 덜어주는 데 이바지 할 수 있다. 따라서 이러한 질환의 치료법과 예방법의 개발이 시급하다.

2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

| | |
|-------|---|
| 최종 목표 | 세포 인식 및 부착단백질에 의한 TGF-β1 신호 조절기전을 규명하고, 이를 근거로 암 발병기전 규명과 암 제어기술 및 신약개발을 위한 기초기술 제공 |
|-------|---|



| | |
|---------|--|
| 연구개발 내용 | <ul style="list-style-type: none"> ▶ 세포 인식 및 부착단백질에 의한 TGF-β1 신호의 조절기작 및 p130Cas의 기능 규명 <ul style="list-style-type: none"> ① 세포주기에서 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구 ② 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 기능 연구 ▶ p130Cas에 의한 TGF-β1 활성화 조절 기작 규명 및 제어방법 탐색 <ul style="list-style-type: none"> ① p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작과 TGF-β1 신호의 활성화에 관한 연구 ② 암세포의 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal transition; EMT)기작에서 인테그린과 p130Cas의 기능 연구 ③ 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 ▶ p130Cas의 in vivo에서의 기능분석; 암 발병과 p130Cas의 연계성 연구 <ul style="list-style-type: none"> ① In vivo에서 p130Cas의 활성화와 암 발병과의 상관관계 규명 ② In vivo에서 p130Cas의 활성화제어를 통한 암 제어법 탐색 |
|---------|--|



| | |
|-----|----------------------------|
| 응 용 | 암 제어 기술 및 신약개발을 위한 기초기술 제공 |
|-----|----------------------------|

2. 연차별 연구목표 및 범위

| 구 분 | 연구목표 | 연구 범위 |
|-----------------|--|--|
| 1차년도 (2006년) | 세포주기에서 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • 세포-세포외기질(ECM)의 결합에 의한 TGF-β1 신호 조절기작 규명 • TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서 인테그린의 역할 규명 • 세포 인식 및 부착단백질과 Smad3의 세포내 위치 규명 |
| | 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 활성화에 따른 p130Cas와 Smad3의 상호작용 연구 • p130Cas-Smad3의 상호작용에 의한 Smad3의 인산화와 세포내 위치 분석 • Smad3의 인산화와 활성화 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 • p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서의 역할 규명 • p130Cas와 Smad3의 항체 제조 • siRNA-p130Cas 제작을 통한 기능저해 기술 확립 |

| 구분 | 연구목표 | 연구 범위 |
|-----------------|--|--|
| 2차년도 (2007년) | p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작 및 TGF-β1 활성화에 관한 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 신호전달관련 p130Cas 결합단백질 탐색 및 동정 • p130Cas 및 인테그린에 결합하는 세포내 유입현상에 관련된 단백질 탐색 및 동정 • p130Cas의 결핍 및 과발현에 따른 소포(낭)의 변화와 세포내 유입 활성 분석 • p130Cas의 세포내 유입현상 조절을 통한 TGF-β1의 활성 분석 • 세포내 유입현상 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색을 통한 TGF-β1의 활성 제어 |
| | 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • 과발현 및 siRNA를 통한 TGF-β1에 의한 EMT에서 p130Cas의 역할 규명 • TGF-β1에 의한 암세포의 침윤과 전이에서 p130Cas 역할 규명 • p130Cas와 oncogene의 일종인 Crk에 의한 세포의 이동현상의 규명 |
| | 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 활성화에 내성을 갖는 암세포에서 p130Cas의 발현 및 인산화 분석 • 암세포에서 siRNA를 이용한 p130Cas의 기능저해에 따른 TGF-β1의 활성 분석 |
| 3차년도 (2008년) | 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • 2차년도에서 검색된 모델 암세포주를 이용하여 p130Cas의 양을 변화시켜 TGF-β1 신호에 대한 반응이 달라지는지 조사 • p130Cas-Smad3 상호작용 양을 면역침전으로 측정 • TGF-β1에 의하여 발현이 증가하는 p15, p21 발현량 조사 |
| | TGF-β1신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • p130Cas에 의한 TGF-β1-dependent EMT의 진행속도 관찰 및 • p130Cas 하위 단백질 중 EMT에 기여한다고 알려진 신호단백질의 기능 조사 |
| | TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사 | <ul style="list-style-type: none"> • p130Cas에 의한 세포내유입 조절의 현미경 분석 • p130Cas와 상호작용하는 세포내유입 조절단백질 조사하고 그 활성이 어떻게 조절되는지 메커니즘 규명 |
| | p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발 | <ul style="list-style-type: none"> • peptide aptamer 시퀀스 선정 • screening에 사용될 다량의 클로닝을 위하여 gateway system 구축 |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 국내·외 연구기관의 연구개발 현황

1. 국외 연구기관의 연구개발 내용 및 결과

가. 캐나다 Mount Sinai hospital의 Jeffrey L. Wrana 박사 연구팀은 형광현미경법과 면역학적 실험들을 통하여 TGF- β 1 신호전달이 두 가지의 서로 다른 소포낭 세포유입과정 (endocytosis)으로 활성화되기도 하고, 억제되기도 하는 것을 밝혀내었다. 즉, TGF- β 1과 그 수용체가 clathrin에 의해 형성된 소포낭에 실려서 세포내로 유입되면 신호가 활성화되며, 이에 반해 caveolin에 의한 소포낭으로 세포 유입되면 TGF- β 1 신호의 활성화가 억제된다는 것이다.

"Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover"

Nature Cell Biology, 5: 410-421, 2003

나. 미국의 Mayo clinic의 Sean P. Scully 교수를 비롯한 연구팀은 연골세포를 대상으로 한 면역학적 실험을 통하여 세포외 기질(Extracellular matrix : ECM) 신호물질 중 하나인 Type II collagen 처리가 TGF- β 1신호경로에 미치는 영향을 보았다. 실험 결과 TGF- β 1신호경로의 활성화가 일어나고 Type II collagen의 전사가 증가되는 현상이 일어났다. 또한 integrin 신호경로와 TGF- β 1신호경로가 TGF- β 1신호경로의 주요 매개체인 Smad2/3보다 앞선 단계에서 cross-talk하고 있음을 규명하였다.

"Signaling "cross-talk" between TGF-beta1 and ECM signals in chondrocytic cells."

Cellular Signalling, 16: 1133-1140, 2004

다. 미국 University Hospitals of Cleveland의 Vogelstein B. 교수를 비롯한 연구팀은 인간 결장암(colon cancer) 세포에서, TGF- β 수용체의 유전자에 많은 수의 돌연변이가 일어나 있음을 발견하였다. 필연적으로 이러한 돌연변이 세포는 TGF- β 에 의한 성장 제지기작을 회피할 수 있었으며, 이는 종양의 진전이 일어나는 기작과도 연관성이 있음을 밝혔다.

"Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability."

Science, 268: 1336-1338, 1995

라. 일본 Kyoto University의 Yoshiaki Ito 교수 및 충북대 의대 배석철 교수 연구팀은 합동연구를 통하여 위암세포주에서 삭제 돌연변이 빈도가 45~60%에 이르는 것으로 알려진 RUNX3의 역할을 밝혔다. 위암세포주를 nude mouse에 주입하여 발암정도를 측정하여 본 결과, RUNX3의 발현량이 높을수록 발암정도는 낮아지는 것을 알아 내었다. 또한, RUNX3 Knock out 세포주들은 세포증식을 억제하는 TGF- β 에 대한 반응성이 낮아졌으며, TUNEL assay를 실시하여 본 결과 RUNX3가 발현되지 않는 세포들은 TGF- β 에 의한 세포사도 일으키지 않았다. 이러한 연구결과는 RUNX3가 TGF- β 신호경로에 기여하며, RUNX3에 돌연변이가 일어나면 TGF- β 의 항암 억제효과가 사라진다는 것을 시사한다.

"Integrin signalling during tumour progression."

Nat Rev Mol Cell Biol., 5: 816-826, 2004

마. 미국의 Sloan-kettering Cancer Institute의 Guo W, Giancotti FG. 교수는 위의 리뷰 논문을 통하여 암의 발달과 전이과정에 기여하는 integrin 신호전달을 소개하였다. 즉, 암의 발달과정 중에 암세포에 유리한 integrin이 발현되는 integrin switching이 일어나게 되며 그 결과 암세포의 생존이 촉진되며, integrin과 수용체 Tyrosine기 인산화효소(receptor tyrosine kinase)와의 상호작용이 일어나서 암세포가 사이토카인과 성장인자(growth factor)에 반응하는 방식을 결정하게 된다. 특히 서로 다른 두 연구 결과를 인용하여, integrin isoform 중에서 $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ 복합체는 TGF- β 에 의하여 세포의 중간엽성 세포전환 기전(Epithelial- Mesenchymal Transition : EMT)이 일어나도록 도울 수 있다는 가능성을 예견하고 있다.

"Causal Relationship between the Loss of RUNX3 Expression and Gastric Cancer"

Cell., 109: 113-124, 2002

바. 미국의 Vanderbilt 대학의 Steven K Hanks 교수 연구팀은 integrin 신호전달 매개단백질인 p130Cas를 knock out시키고 Src kinase로 형질전환(transformatio)시킨 mouse embryogenic fibroblast (MEF) 및 정상 MEF를 이용하여, p130Cas가 세포의 침윤성에 어떤 역할을 하는지 규명하였다. Src kinase로 형질전환을 시켰어도 p130Cas가 있어야만 형태학적인 형질변환과, 세포부착에 비의존적인 성장이 이루어졌다. 그리고 p130Cas가 integrin 신호에 의한 Src의 tyrosine 인산화를 증가시켜주며, 침윤성 (invasiveness)과 관련된 형태학적 특성 및 효소의 활성화를 촉진함을 규명하였다.

"CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells."

Oncogene, 23: 7406-7415, 2004

사. 2006년 6월 Cell지에 미국 Xia Lin 교수팀이 Smad3를 탈인산화시키는 효소인 PPM1A를 발견하였고 보고하였다. TGF- β 1에 의하여 Smad3가 인산화되고 나서 그 신호를 종결시키는 기전은, 이전까지 Smad3의 degradation 경로만 알려져 있었다. 이 논문에서, PPM1A는 Smad2, Smad3와 상호작용하여 인산화를 저해하고 Smad2/Smad3와 Smad4간의 oligomerization을 차단함을 규명하였다. 또 핵 내에서 Smad 단백질들을 탈인산화시켜 핵 바깥으로의 유출을 촉진한다는 것을 밝혀내었다. TGF- β 1 신호 종결기작을 새롭게 규명한 이번 연구결과는, p130Cas가 Smad3의 인산화를 저해하는 기작을 연구하는데 참고해야 할 중요한 자료이다.

"PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGF β Signaling"

Cell, 125: 915-928, 2006

아. S. Inamoto 등이 2007년 Oncogene에 발표한 논문에서는, p130Cas와 유사한 p130Cas-lymphocyto

-type (Cas-L)과 TGF- β 1 신호의 inhibitor인 Smad6/7이 상호작용하여 그 결과 TGF- β 1 신호가 증진된다는 것을 규명하였다. 2000년 EMBO에 HEF1 (CasL과 동일, synonym)과 Smad3가 상호작용한다는 연구결과도 보고된 바 있었으며 이러한 연구결과들로 미루어 볼 때, 세포내에서 p130Cas family 단백질들과 Smad 단백질들 간의 상호작용이 보다 광범위한 방식으로 일어나고 있을 것이라 생각된다.

"Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor- β signaling by inhibiting Smad6 and Smad7"

Oncogene, 26: 893-904, 2007

자. 영국의 Shelia M. Violette 교수팀은 다양한 암조직에서 발현이 증가하여 암세포의 전이, 증식을 촉진하는 것으로 알려진 integrin α v β 5를 저해하는 단일클론 항체(6.3G9)의 암 억제효과를 보고하였다. 이와 동시에, TGF- β 1에 의하여 암의 증식 및 tumor 형성이 증진되는 case에서 6.3G9 항체의 기능이 어떠한지 보여주고 있다. 6.3G9 항체는 특이적으로 integrin α v β 5을 인지하여 그 기능을 억제할 뿐 아니라, latent TGF- β 1에 의한 Smad2/3 인산화 및 및 basal level의 Smad2/3 인산화도 억제함을 발견하였다. 하지만 active form의 TGF- β 1을 처리한 경우에는 거의 억제작용을 못 하였다. 따라서, integrin α v β 5 은 microenvironment에서의 latent TGF- β 의 활성을 돕는 것으로 생각된다. 그림 19는 6.3G9 항체(세포 부착 저해) 또는 TGF- β 1 저해신호물질에 의하여 tumor 형성이 억제되는 것을 보여주고 있다. 본 논문의 저자들은 항-인테그린 항체로서 암의 치료물질 개발이 가능할 것으로 예측하고 있다.

"Antibody-Mediated Blockade of Integrin α v β 6 Inhibits Tumor Progression In vivo by a Transforming Growth Factor- β 1-regulated Mechanism"

Cancer Research, 68: 561-570, 2008

차. 미국 H. William Schnaper 교수팀은 세포부착신호와 TGF- β 1신호간에 cross-talk이 일어나고 있음을 밝히려고 시도하였으며, 2007년 JCS의 연구내용에서 TGF- β 1신호에 의하여 FAK의 925번 Tyr 잔기가 인산화되며 이로 인하여 ERK의 활성화가 일어남을 보여주었다. 그리고 세포부착 신호에 의하여 FAK의 397번 Tyr 잔기에 인산화가 일어나서 ERK의 활성화가 일어난 경우는 그 ERK에 의하여 Smad3의 linker region에 인산화가 일어나는 연쇄적인 반응을 규명하였다. Smad3의 linker region의 인산화는 주로 Smad3 신호전달의 저해를 가져온다고 보고되었으므로, 세포부착신호가 결과적으로 Smad3 신호경로의 저해를 가져오는 것이라 추측을 가능케 한다.

"MAP-kinase activity necessary for TGF β 1-stimulated mesangial cell type I collagen expression requires adhesion-dependent phosphorylation of FAK tyrosine 397"

Journal of Cell Science, 120: 4230-4240, 2007

카. 미국 Amy H. Bouton 교수팀의 2008년 cancer research 논문은, p130Cas가 유방암세포주의 항암제인 Adriamycin 저항성을 높이는 기능을 할 것이라는 내용을 보고하였다. 특히 p130Cas에 의한 Adriamycin 저항성에는 Src 인산화효소의 활성이 필수적이었음을 밝히고 있다. Cas에 의한 암세포의 생

존/증식이 유지되는 데에는 Src, Akt, ERK1/2 등의 신호단백질이 기능하여 Adrimycin의 세포사멸 기작을 저해하였다. 따라서 p130Cas가 과다발현된 유방암 질환의 경우, p130Cas 신호전달경로를 제어할 필요가 있음을 암시하였다.

"A Selective Phosphatase of Regenerating Liver Phosphatase Inhibitor Suppresses Tumor Cell Anchorage-Independent Growth by a Novel Mechanism Involving p130Cas Cleavage"
Cancer Research, 68: 1162-1169, 2008

타. David A. Cheresh 교수팀은 암세포의 침투 및 전이현상에 있어서 integrin신호경로와 Receptor tyrosine kinase의 작용이 상호협동적인 효과를 갖는 것에 착안하여, EGFR과 integrin $\alpha\beta 5$ 신호경로간의 crosstalk을 연구하였다. 그 결과, EGF에 의하여 Src이 활성화되면, Src에 의한 p130Cas의 인산화가 증가하여 Rap1 및 $\alpha\beta 5$ integrin 신호가 활성화된다. 이러한 일련의 과정을 통하여 암세포의 이동성이 높아진다고 보고하였으며, EGFR신호 억제제로 개발된 항암제의 메커니즘을 일부 설명할 수 있을 것으로 간주하였다.

"Specific Cross-talk between Epidermal Growth Factor Receptor and Integrin $\alpha\beta 5$ Promotes Carcinoma Cell Invasion and Metastasis"
Cancer Research, 69: 1383-1391, 2009

2. 국외 연구기관의 연구개발 내용 및 결과

가. 서울대학교 방영주 교수를 비롯한 연구팀은 위암세포주 SNU-620을 이용하여 TGF- β 신호전달이 Fas ligand에 비의존적으로 Fas/FADD신호경로를 활성화시켜서 세포사를 촉진하는 현상을 밝혀내었다. TGF- $\beta 1$ 을 처리한 위암세포는 Fas 수용체의 발현과 활성화가 이루어지며 그 결과 Caspase-8에 의한 Bid 단백질의 절단과, cytochrome c를 유리시키는 mitochondrial 신호경로가 활성화되며 이들은 결국 세포사를 초래하게 된다. 위암세포에 대한 TGF- β 의 항암효과를 보여준 연구이다.

"Transforming Growth Factor- $\beta 1$ Induces Apoptosis through Fas Ligand-independent Activation of the Fas Death Pathway in Human Gastric SNU-620 Carcinoma Cells"
Molecular Biology of the Cell, 15: 420-434, 2004

나. 서울대학교 의대 방영주 교수 연구팀은 TGF- $\beta 1$ 신호전달의 주요 매개단백질인 Smad2/Smad3 비율이, TGF- $\beta 1$ 신호의 세포증식억제 효과와 상관관계에 있는지 규명하였다. Smad2와 Smad3의 siRNA를 이용하여 세포내의 두 단백질 비율을 조절하여 본 결과, Smad3가 Smad2에 비해 많은 경우 TGF- $\beta 1$ 의 세포증식 효과가 더욱 강하게 나타났으며 TGF- $\beta 1$ 신호에 대한 반응성이 상실된 세포에서 Smad2의 발현을 막자 TGF- β 에 의한 세포증식 억제효과가 회복되는 것을 관찰하였다. 즉, TGF- $\beta 1$ 의 세포증식 억제효과는 여러 Smad 단백질 중에서 특히 Smad3 단백질에 의하여 나타나게 됨을 규명하였다.

"The Endogenous Ratio of Smad2 and Smad3 Influences the Cytostatic Function of Smad3"
Molecular Biology of the Cell, 16: 4672-4683, 2005

다. 가톨릭의대 주천기 교수 연구팀은 상피세포 내에서 TGF- β 신호에 의하여 p130Cas가 인산화된다는 것을 밝혀내었다. 면역학적 분석 결과 이는 TGF- β 에 의하여 Src kinase가 활성화되면서 일어나는 현상이며, 이와 같은 과정으로 p130Cas가 인산화되기 위해서는 세포-세포외기질 부착이 아닌, E-cadherin에 의한 세포-세포 상호작용이 전제되어야 함을 규명하였다. 이 논문의 끝맺음에서는 TGF- β 에 의하여 활성화된 Src/p130Cas 단백질의 하부신호경로가 더 연구되어야 할 과제를 소개하였다.

“Involvement of Cell-Cell Interactions in the Rapid Stimulation of Cas Tyrosine Phosphorylation and Src Kinase Activity by Transforming Growth Factor- β 1”

J. Biol. Chem., 277: 31938-31948, 2002

라. 충북대 하현정 교수팀은 TGF- β 1신호경로의 새로운 조절기작을 2007년도 JBC에 보고한 바 있다. 이 논문에서는 NM23-H1 인산화 효소가 STRAP(TGF- β 1수용체 결합 단백질)과 직접 상호작용함을 발견하였으며, STRAP에 의한 TGF- β 1신호전달 저해가 NM23-H1과 STRAP 상호작용이 감소하는 조건에서 더 적게 일어남을 유전자 전사단계(luciferase assay)에서 밝혔다. 또한 이러한 신호조절 메커니즘에 의하여 TGF- β 1신호에 의한 세포사멸 및 Smad3 활성 조절 등을 감소시키는 NM23-H1의 기능을 규명하였다.

“NM23-H1 Tumor Suppressor Physically Interacts with Serine-Threonine Kinase Receptor-associated Protein, a Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Receptor-interacting Protein, and Negatively Regulates TGF- β Signaling”

J. Biol. Chem., 282: 12075-12096, 2007

2절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구실은 지난 3년 동안 TGF- β 1 신호와 integrin 신호의 crosstalk이 암세포 발달에 미치는 영향을 연구하였고, 그 결과

- 세포-세포외기질(ECM) 결합에 의한 TGF- β 1 활성 (Smad3의 인산화 및 세포증식 억제) 저해 현상 발견
- 세포 부착단백질인 p130Cas와 Smad3 단백질의 상호작용 동정
- TGF- β 1 활성화와 p130Cas-Smad3 상호작용과의 연관관계 규명
- TGF- β 1 신호와 integrin 신호의 cross-talk, 즉 p130Cas-Smad3 신호단백질 결합이 세포주기 진행을 촉진함을 발견
- TGF- β 1에 의하여 유도되는 암세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 현상에 대한 p130Cas 기능 연구
- 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF- β 1 활성화의 상관관계 규명
- p130Cas와 암세포의 TGF- β 1 신호활성 연관관계 조사
- p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절 저해 및 이에 의존한 TGF- β 1 활성 조절의 분자적 메커니즘 연구 및 p130Cas-dynamin 상호작용 동정

☞ 이러한 연구결과들을 바탕으로 하여, TGF- β 1신호의 세포증식 억제기작의 새로운 조절자로서 integrin 신호전달 단백질인 p130Cas를 동정하였고, 이러한 지식을 바탕으로 하여 TGF- β 1신호 및 암세포의 발달을 조절할 수 있는 새로운 방법을 제공하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 연구추진전략 및 방법

1. 연구개발 추진전략

- 가. 1차년도에는 p130Cas과 TGF-β1 신호경로 단백질인 Smad3의 세부적인 상호작용 기전 규명 및 이러한 상호작용이 TGF-β1 신호와 세포주기 신호에 미치는 영향을 조사하며,
- 나. 2차년도에서는 TGF-β1신호경로를 조절하는 p130Cas단백질의 세부기작을 밝히는데 힘쓰는 동시에 p130Cas가 실제 암세포의 TGF-β1 반응성을 조절하는지 여부를 규명하여
- 다. 3차년도에는 이러한 연구결과들을 바탕으로 p130Cas단백질의 TGF-β1 신호저해기능을 억제하는 방법을 탐색하여, 암세포의 발생을 억제하는 기술에 대한 기초지식을 제공하는데 역점을 둔다.

2. 연구개발 방법 및 내용

가. 실험적 접근방법

| 연구 방법 | 연구 내용 |
|---------------------------|--|
| 분자생물학적 분석 | 세포 부착/인식 단백질군 (integrin, p130Cas 등)과 TGF-β1 신호전달체계를 중심으로 inhibitor 및 activator를 이용한 인산화 측정등 생화학적 분석 (biochemical assay), mutant assay 등 분자생물학적 분석 (molecular and genetic approach)으로 규명. |
| 세포생물학적 분석 | 세포 인식/부착 단백질군과 TGF-β1에 의한 신호전달 과정에서 항체를 이용한 면역침전법과 면역염색법을 이용하여 단백질간의 상호작용 및 단백질의 세포내 위치이동을 규명. |
| 세포주기 분석 | 세포 인식/부착 단백질군과 TGF-β1 신호에 의해 조절되는 세포주기를 FACS (fluorescence activating cell sorting) analysis와 ³ H-thymidine incorporation assay를 통하여 측정. |
| 항체 제조 | 단백질을 분리/정제하여 토끼에 주입시켜 면역반응을 유도한 후 혈청을 분리하여 각각의 단백질에 대한 항체를 제조, 세포 생물학적 분석법에 이용. |
| siRNA 제조 | siRNA를 제작하여 transfection을 통해 세포내에 주입하여 p130Cas 또는 Smad3의 발현을 인위적으로 저해시킴으로써 TGF-β1 활성 조절 기작에서 p130Cas의 역할을 규명. |
| CCD 카메라를 이용한 live imaging | 배양된 세포를 37℃온도를 유지시켜주고, CO2를 공급해주는 imaging chamber에 설치하고 빛에 의한 손상을 막기 위하여 최소한의 illumination을 공급하면서, 고해상 CCD digital camera를 사용하여 일정시간간격으로 live imaging을 실시함. |

나. 연구수행 방법

| I. 연구범위 : 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF-β1 신호의 조절기작 규명 | |
|---|--|
| 목 표 | 연구수행 방법 |
| 세포주기에서 integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 및 p130Cas의 기능 규명 | <ul style="list-style-type: none"> ▶세포를 세포외기질에 결합시켜 integrin을 활성화시킨 후 TGF-β1 첨가에 의한 Smad3의 인산화도 및 ³H-thymidine incorporation assay를 통하여 세포주기 측정. ▶TGF-β1를 첨가한 후 면역침전법 및 면역염색법을 수행하여 p130Cas와 smad3의 상호작용 및 세포내 위치를 규명. ▶p130Cas 유전자가 결핍된 세포와 p130Cas를 과발현시킨 세포를 이용하여 TGF-β1 신호전달 과정에서 p130Cas의 기능 규명. ▶p130Cas의 돌연변이를 이용하여 Smad3의 인산화와 활성 조절에 관여하는 기능 부위 탐색. ▶p130Cas에 대한 siRNA 제작을 통한 기능저해 기술 확립 및 기능 규명 ▶p130Cas와 Smad3에 대한 항체 제조 |
| II. 연구범위 : 암세포에서 p130Cas와 TGF-β1 신호 활성과의 상관관계 규명 | |
| 목 표 | 연구수행 방법 |
| p130Cas에 의한 TGF-β1 신호의 활성 조절기작 규명 및 제어방법 탐색 | <ul style="list-style-type: none"> ▶p130Cas 유전자가 결핍된 세포와 p130Cas를 과발현시킨 세포에서 면역염색법을 수행하여 소포(낭)의 변화와 세포내 유입 활성을 분석. ▶TGF-β1를 첨가한 후 면역침전법 및 면역염색법을 수행하여 p130Cas와 상호작용하는 세포내 유입현상 및 TGF-β1 신호전달 관련 단백질 탐색 및 동정. ▶p130Cas이 과발현된 상피세포와 siRNA를 이용하여 TGF-β1에 의한 EMT에서 p130Cas의 역할 규명. ▶면역침전법을 수행하여 p130Cas와 결합하는 EMT관련 단백질의 탐색 및 동정 ▶Smad3에 대한 siRNA 제작을 통하여 EMT에서 p130Cas와 Smad3의 관계 규명. ▶p130Cas의 돌연변이를 이용하여 EMT에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색. ▶actin을 파괴시킨 후 p130Cas와 Smad3의 결합과 Smad3의 인산화정도를 측정함으로써 p130Cas에 의한 TGF-β1 활성 조절에서 세포 골격의 역할 규명. ▶TGF-β1 활성에 내성을 갖는 암세포에서 p130Cas의 발현 및 인산화 분석 ▶TGF-β1 활성에 내성을 갖는 암세포에서 siRNA에 의한 p130Cas의 기능저해에 따른 TGF-β1의 활성 분석 |
| III. 연구범위 : In vivo에서 p130Cas의 활성과 암 발생과의 연계성 규명 | |
| 목 표 | 연구수행 방법 |
| In vivo에서 p130Cas의 기능 분석과 p130Cas의 활성 제어를 통한 암 제어법 탐색 | <ul style="list-style-type: none"> ▶In vitro와 in vivo data 비교 분석 ▶p130Cas를 과발현시킨 암세포를 이용하여 p130Cas에 의한 TGF-β1 활성 조절 규명 ▶모델동물에서 TGF-β1 활성 저해에 의한 암 발생과정에서 p130Cas의 기능 규명. ▶각종 암 환자 sample의 수집과 분류 ▶정상 조직과 암 조직에서 p130Cas의 발현 및 인산화 정도에 따른 TGF-β1 활성을 비교 분석함으로써 암 발생과정에서 p130Cas에 의한 TGF-β1 활성 조절 기전을 규명하여 p130Cas의 활성 제어를 통한 암 제어법 탐색 |

2절 연구내용 및 결과

1. 연차별 연구개발 목표 및 연구개발 내용

| 구분 | 연구 목표 | | 연구내용 |
|-----------------|--|--|---|
| | 개발목표 | 계량적 목표 | |
| 1차년도 (2006년) | <p>integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 및 p130Cas의 기능 연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> • p130Cas 돌연변이 construction • p130Cas KO/WT MEF 확보 및 stable cell line 구축 • p130Cas 및 Smad3 항체 제작 • p130Cas 발현 저해 siRNA 제작 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서 integrin의 역할 규명 • p130Cas-Smad3의 상호작용에 의한 Smad3의 인산화와 세포내 위치 분석 • p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서의 역할 규명 • Smad3의 인산화와 활성 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 |
| 2차년도 (2007년) | <p>p130Cas의 TGF-β1신호저해 세부 매커니즘 규명 및 p130Cas와 암세포와의 연관관계 조사</p> | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 신호전달관련 p130Cas 결합단백질 탐색 및 동정 • SCI 논문발표 1건 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1신호를 조절하는 기전연구 -세포내유입과 관련된 p130Cas 상호작용 단백질 동정 • p130Cas 과발현 및 결핍시의 세포내유입 변화 관찰 • TGF-β1에 의한 암세포의 침윤과 전이에서 p130Cas 역할 규명 • 암세포에서 p130Cas의 발현 및 인산화 분석 |
| 3차년도 (2008년) | <p>TGF-β1신호를 저해하는 p130Cas의 활성 제어 방법 연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 학술대회 발표 1건 • SCI 논문발표 1건 | <ul style="list-style-type: none"> • 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명 • TGF-β1신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명 • TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사 • p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발 |

3. 대표적 연구개발결과

가. 1차년도 연구결과

(1) 연구목표 및 내용

| 연구 목표 | 연구 내용 |
|--|---|
| <p>integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 및 p130Cas의 기능 연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서 integrin의 역할 규명 • p130Cas-Smad3의 상호작용에 의한 Smad3의 인산화와 세포내 위치 분석 • p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서의 역할 규명 • Smad3의 인산화와 활성 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 |

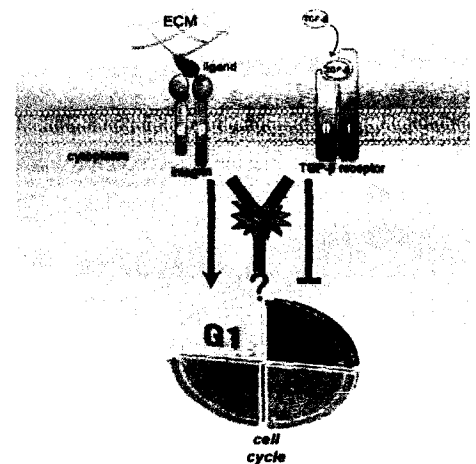
(2) 연구결과 논문발표 현황

| 번호 | 발표 논문 |
|----|--|
| 1 | Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. <i>Genes Cells</i> . 2006 Oct;11(10):1197-1211. |
| 2 | Modulation of b-catenin by cyclin-dependent kinase 6 in Wnt-stimulated cells. <i>Eur J Cell Biol</i> . 2007 Feb;86(2):111-123. |

(3) 주요 연구결과

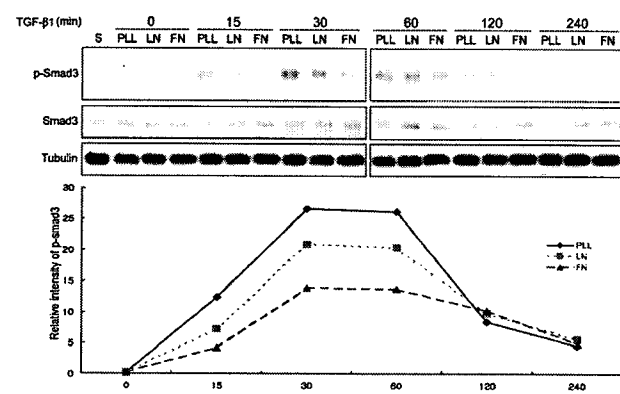
§ 실험결과 : 세포주기에서 integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구

▲ 세포가 세포외기질에 부착되고 이를 인식하였을 때 발생하는 integrin 신호는 세포증식을 촉진시켜 준다고 알려져 있음. 이러한 integrin의 작용은 다른 growth factor 신호경로들과 cross-talk을 하였을 때 더욱 증대된다는 보고도 있었음 [7, 11-13]. 최근 들어 세포의 증식을 억제하는 TGF-β1 신호와 integrin 신호경로의 상호작용에 대한 연구가 누적되기 시작하였으며, 이러한 상호작용을 통한 세포의 다양한 활성 조절이 보고되었음. 이와 관련하여 본 연구실에서는 integrin 신호와 TGF-β1 신호간의 상호작용 및 이로 인한 세포 활성조절기작, 그리고 암세포에서 TGF-β1신호경로를 억제/조절하는 현상에 대한 integrin신호의 연관성 연구를 진행하였음.



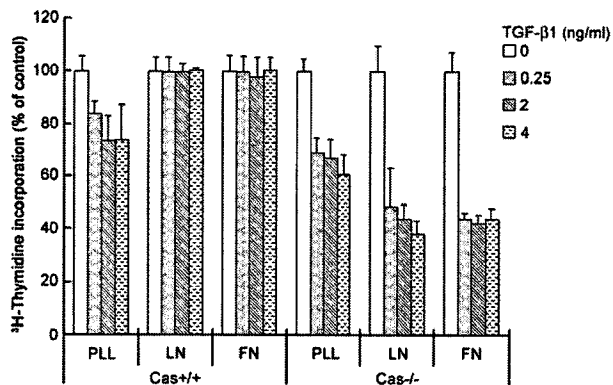
<그림 1. 1차년도 연구 개요도>

▲ 세포를 세포외기질에 부착시켜 integrin 신호를 활성화 한 후 TGF-β1신호경로에 어떠한 영향이 오는지 실험하여 본 결과, TGF-β1에 의하여 유도되는 Smad3의 인산화 및 Smad4와의 상호작용이 모두 저해되었음 (그림 2, 3).

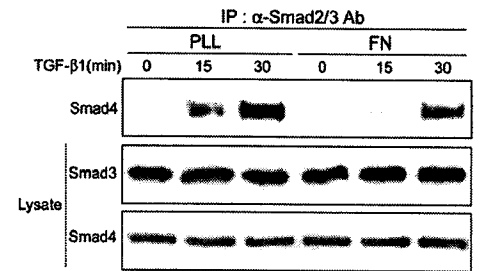


<그림 2. 세포외기질 자극에 의한 Smad3 인산화 저해>

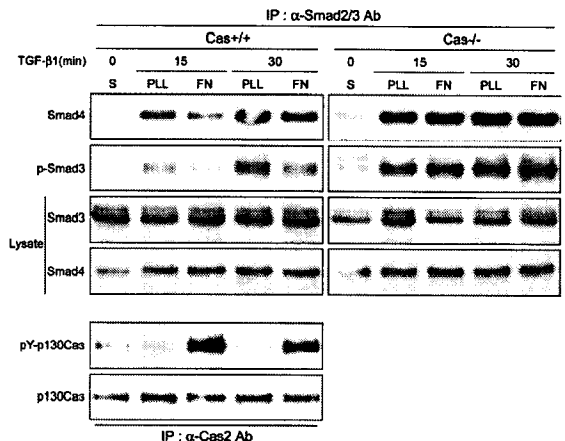
▲ 이러한 integrin 활성화에 의한 TGF-β1 신호전달의 억제는 p130Cas에 의하여 매개된다는 것도 p130Cas knock out 세포를 통하여 밝혀내었음. 더욱이 TGF-β1 신호전달에 의하여 유도되는 세포 증식의 억제도 integrin 신호가 저해하였고, 또한 TGF-β1 신호에 대한 integrin의 저해기능은 p130Cas에 의하여 매개됨을 볼 수 있었음 (그림 4, 5).



<그림 4. p130Cas 및 세포외기질 자극에 의한 TGF-β1 증식억제신호 저해>



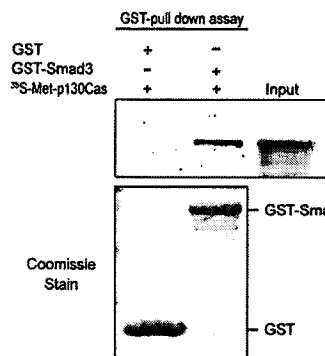
<그림 3. 세포외기질 자극시 Smad3-Smad4 상호작용 저해>



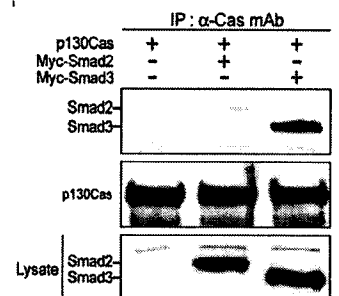
<그림 5. p130Cas 및 세포외기질 자극에 의한 Smad3-Smad4 상호작용 저해>

§ 실험결과 : integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 기능 연구

▲ p130Cas가 있을 때만 integrin에 의한 TGF-β1 신호의 활성화 저해 및 Smad3 인산화의 저해가 이루어졌던 선행 결과와 해외연구그룹의 연구 [14]를 참조하여, p130Cas와 Smad3 단백질들간의 상호작용이 있을 것이라 예측하고 이를 검증하였음. GST-pull down assay법 및 면역침전법 결과 Smad3가 p130Cas와 상호작용함을 보았으며, Smad2는 Smad3에 비하여 p130Cas에 대한 친화도가 낮았음. 면역염색법으로 p130Cas와 Smad3의 co-localization을 확인하였으며, Smad3-p130Cas의 상호작용 부위를 조사하여

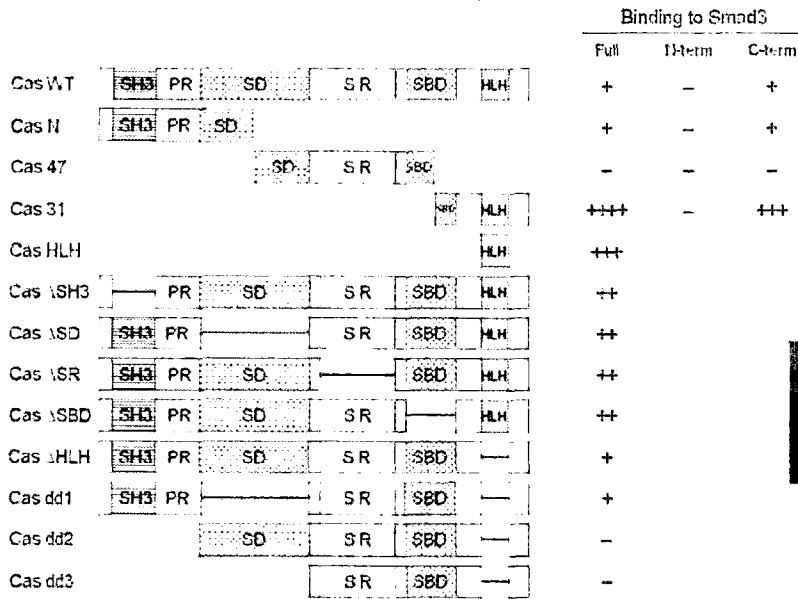


<그림 6. in vitro binding assay>

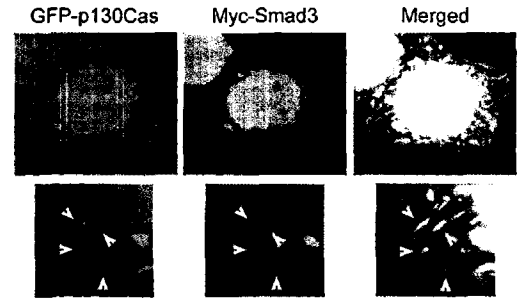


<그림 7. in vivo binding assay>

본 결과 그림 8.에 나타난 것과 같았음.

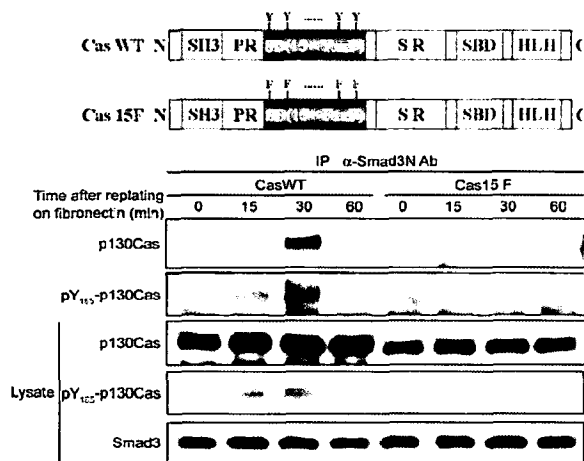


<그림 8. Cas-Smad3 상호작용 domain mapping>

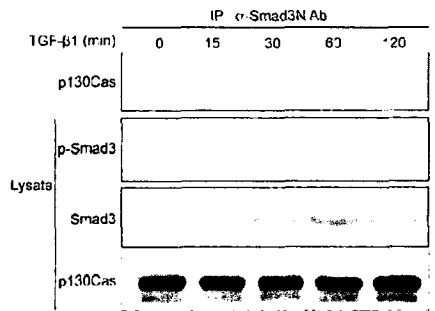


<그림 9. Cas-Smad3 colocalization>

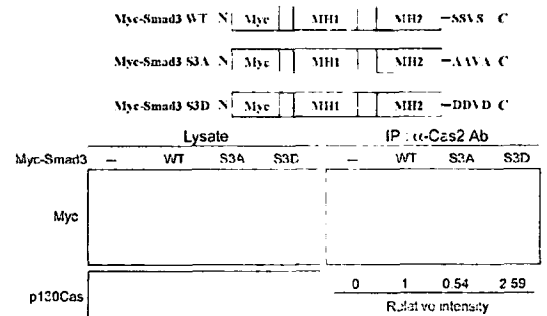
▲ 또한 TGF-β1처리에 의해서 p130Cas-Smad3 상호작용이 증가하며, Smad3의 인산화가 p130Cas에 대한 친화도를 증가시킨다는 것을 밝혀내었음. 세포외기질(fibronectin)의 자극에 의해 p130Cas가 인산화되는 조건에서도 Smad3에 대한 상호작용이 증가함을 증명하였음. 아래 그림에서 Smad3 S3D는 Smad3의 인산화구조를 모방한 돌연변이이며, p130Cas와의 상호작용이 상대적으로 많음을 볼 수 있음. 또한 p130Cas가 integrin신호에 의하여 인산화되는 Tyrosine 잔기가 Phenylalanine으로 치환된 돌연변이는 Smad3와의 상호작용이 상대적으로 훨씬 적게 일어났음.



<그림 11. p130Cas 돌연변이체와 Smad3 상호작용>



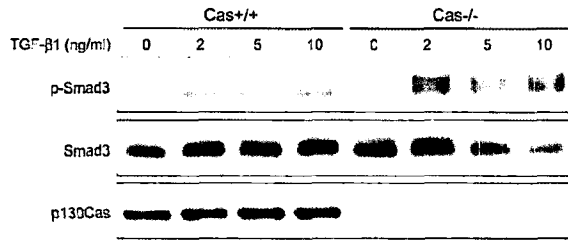
<그림 10. TGF-β1 처리에 따른 상호작용 증가>



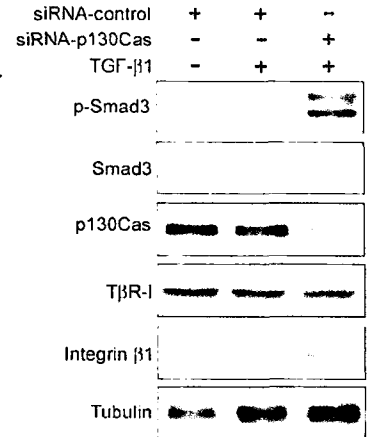
<그림 12. Smad3 돌연변이체와 상호작용>

▲ integrin 신호와 p130Cas가 TGF-β1 신호를 저해한 것이 과연 p130Cas-Smad3 상호작용에 의한 것인지 결정하기 위하여 p130Cas가 결핍/감소된 세포와 wild type 세포에 TGF-β1을 처리하고 비교하여 본 결과, p130Cas가 결핍/감소된 세포에서 인산화된 Smad3가 증가하였음 (그림 13, 14). 또한 Smad3에 의

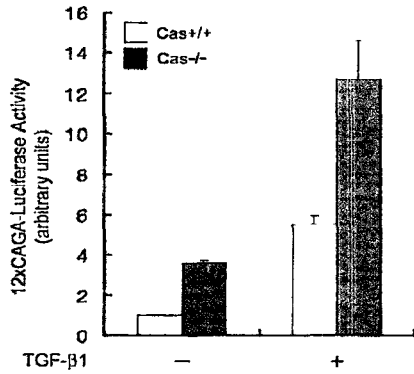
한 전사활성도를 측정하는 reporter gene assay 실험결과(그림 15)에서도 p130Cas가 knock out 되었을 때 TGF- β 1에 의한 전사 활성도가 높아짐을 볼 수 있었음. TGF- β 1에 의해서 Smad3가 핵으로 유입되는 현상도 p130Cas가 knock out 되었을 때 증가하였음 (그림 16). 이상의 실험결과로서 p130Cas가 TGF- β 1에 의한 Smad3의 인산화 및 전사활성을 억제하는 것을 알 수 있었음.



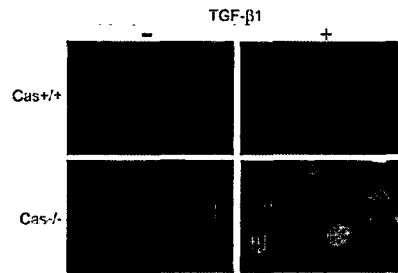
<그림 13. p130Cas에 의한 Smad3 인산화 저해>



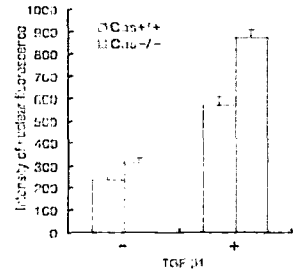
<그림 14. p130Cas발현 저해와 Smad3 인산화도>



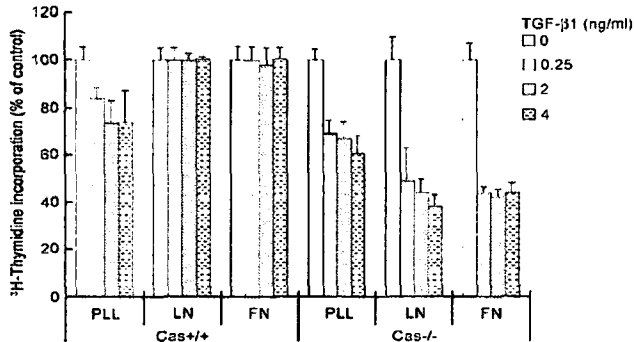
<그림 15. p130Cas와 TGF- β 1신호 억제>



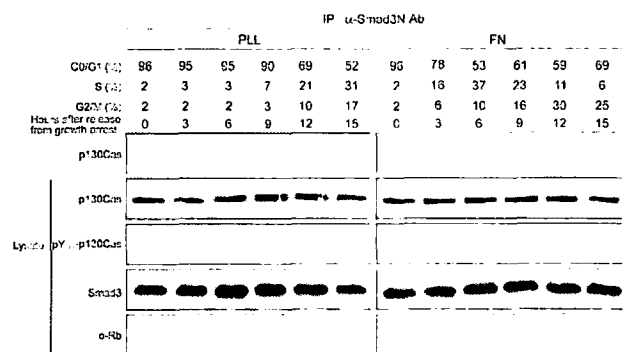
<그림 16. p130Cas에 의한 Smad3 핵이동 감소>



▲ 다음으로 p130Cas가 Smad3단백질의 활성화를 저해하는 현상이 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였음. p130Cas Knock out 세포로 3H-Thymidine incorporation assay를 하여 본 결과 p130Cas가 TGF- β 1 신호를 억제함으로써 세포의 증식을 촉진한다는 것을 규명하였음. 또한 면역침전법 및 FACS 실험 결과로서 fibronectin 처리 시에 p130Cas의 인산화가 증가하고 동시에 p130Cas-Smad3의 상호작용이 증가하는 현상을 볼 수 있었으며 반면 poly-L-lysine에 세포를 부착시켜 integrin 신호를 주지 않은 경우 p130Cas의 인산화 및 p130Cas-Smad3의 상호작용이 크게 감소하였고 세포주기의 진행도 훨씬 더디게 일어났음을 보았음. 이러한 실험결과는 integrin 신호를 받은 p130Cas가 Smad3 활성을 억제하고 세포증식을 촉진함을 시사함.

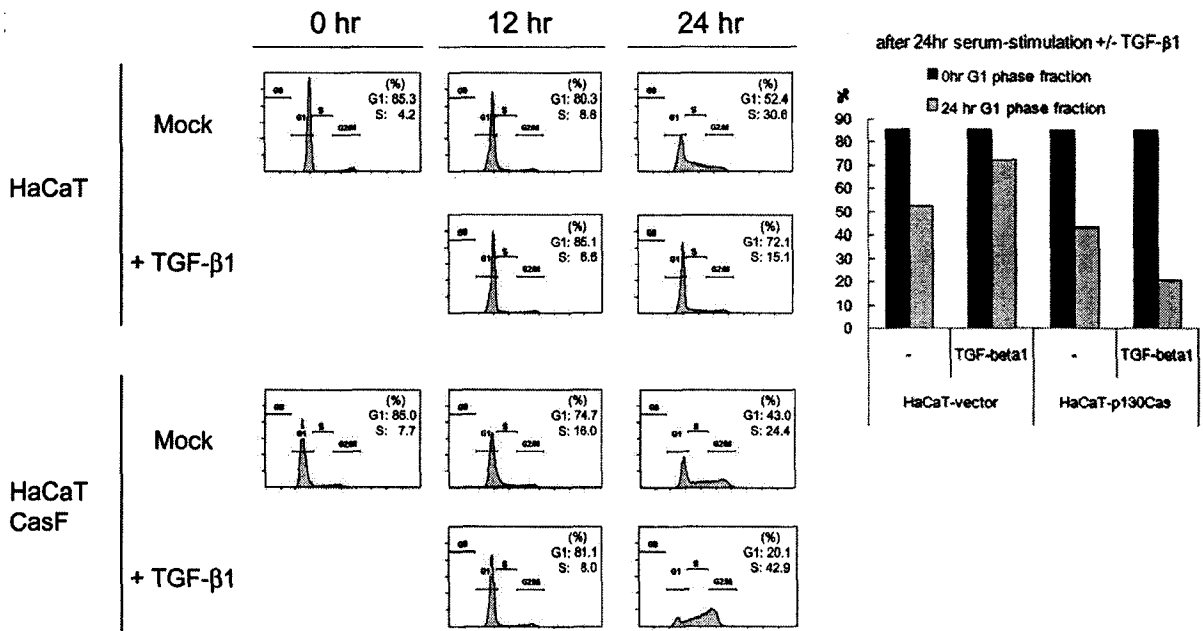


<그림 17. p130Cas와 ECM자극에 의한 TGF- β 1신호 저해, 그림 4와 중복>



<그림 18. 세포주기와 Smad3-p130Cas 결합>

▲ p130Cas가 TGF- β 1 신호를 저해하여 세포주기의 진행을 촉진하는 기능을 한다는 위의 연구결과들을 재확인하여 위하여 FACS assay를 수행하였음. HaCaT 세포주에 p130Cas를 과발현시킨 stable cell과 Myc-tag 만을 발현하는 stable cell에 TGF- β 1을 처리하고 세포주기가 어떻게 진행되는지 관찰하였음. 그림 19에 나와 있듯이, TGF- β 1을 처리한 경우 control 세포에서는 확연히 세포주기 진행이 더딘 것을 볼 수 있음. 반면에 Cas를 안정적으로 과발현하고 있는 세포는 TGF- β 1 처리에도 불구하고 G1기에서 S, G2/M주기로 더 빠르게 넘어감을 보여줌.



<그림 19. p130Cas stable 세포의 세포주기 진행 관찰 결과>

나. 2차년도 연구결과

(1) 연구목표 및 내용

| 연구목표 | 연구내용 |
|---|--|
| p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작 및 TGF-β1 활성화에 관한 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 신호전달관련 p130Cas 결합단백질 탐색 및 동정 • p130Cas 및 인테그린에 결합하는 세포내 유입현상에 관련된 단백질 탐색 및 동정 • p130Cas의 결핍 및 과발현에 따른 소포(낭)의 변화와 세포내 유입 활성 분석 • p130Cas의 세포내 유입현상 조절을 통한 TGF-β1의 활성 분석 • 세포내 유입현상 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색을 통한 TGF-β1의 활성 제어 |
| 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • 과발현 및 siRNA를 통한 TGF-β1에 의한 EMT에서 p130Cas의 역할 규명 • TGF-β1에 의한 암세포의 침윤과 전이에서 p130Cas 역할 규명 • p130Cas와 oncogene의 일종인 Crk에 의한 세포의 이동현상의 규명 |
| 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1 활성화에 내성을 갖는 암세포에서 p130Cas의 발현 및 인산화 분석 • 암세포에서 siRNA를 이용한 p130Cas의 기능저해에 따른 TGF-β1의 활성 분석 |

(2) 연구결과 논문발표 현황

| 번호 | 발표논문 |
|----|--|
| 1 | Focal Adhesion Targeting of v-Crk Is Essential for FAK Phosphorylation and Cell Migration in Mouse Embryo Fibroblasts Deficient Src Family Kinases or p130CAS. <i>Journal of Cellular Physiology</i> , (2008) 214, 604-613 |
| 2 | v-Crk Induces Rac-dependent Membrane Ruffling and Cell Migration in CAS- deficient Embryonic Fibroblasts. <i>Molecules and Cells</i> , (2008) 25, 131-137 |
| 3 | The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in TGF-β signaling. <i>Molecular Biology of the Cell</i> , (2008) 19, 2135-2146 |

(3) 주요 연구결과

§ 실험결과 : p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작 및 TGF-β1 활성화에 관한 연구

■ Published

저자 : Wook Kim et al.

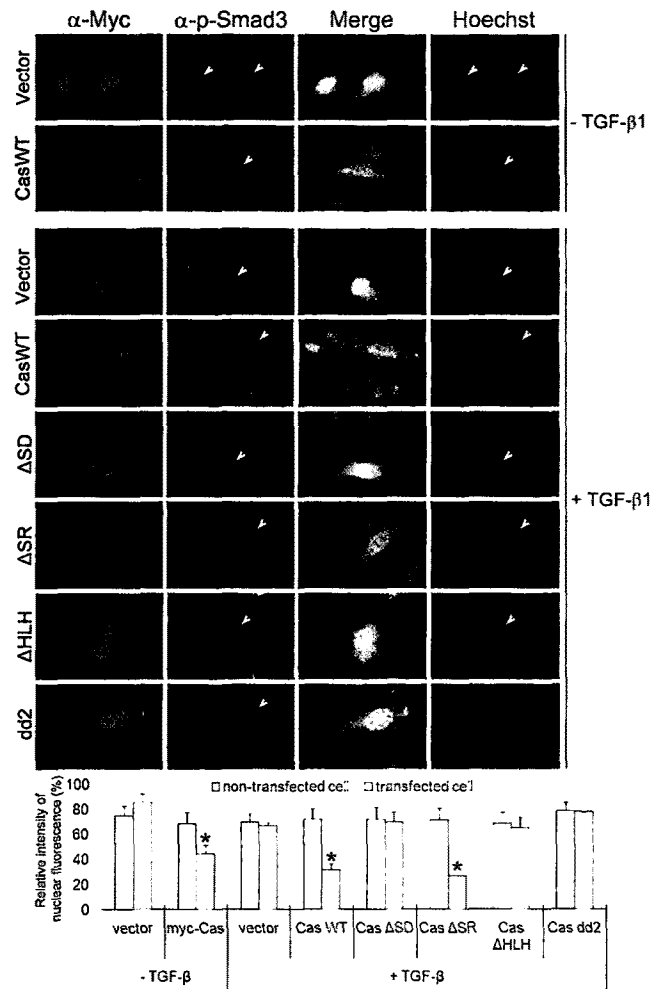
제목 : The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in TGF-β signaling.

논문 : Molecular Biology of the Cell, (2008) 19, 2135-2146

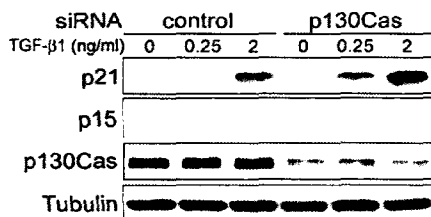
▲ 1차연도의 연구내용에서, p130Cas와 TGF-β1 신호전달 단백질인 Smad3가 어떤 도메인에서 상호작용하는지 맵핑을 시도하여 (그림8), p130Cas의 Helix-loop-Helix 도메인이 Smad3와의 상호작용 시에 크게 기여함을 발견함.

▲ p130Cas가 Smad3의 활성화(인산화 후 핵으로 이동)를 저해하는 기능적인 도메인을 검색하기 위하여, p130Cas KO 세포주에 wild type p130Cas 및 domain 삭제 돌연변이를 발현시킨 후, 핵 내로 이동한 Smad3를 phospho-Smad3 항체로 염색하여 TGF-β1신호의 활성도를 비교하였음. 그림 20. 하단의 그래프에 나타나 있듯이 substrate domain과 Helix-loop-Helix 부위가 삭제된 돌연변이 p130Cas를 발현하는 세포에서는 p130Cas wild type이 발현된 세포에서와는 달리 핵내로 이동한 Smad3 양이 변화하지 않았음. 즉, Smad3의 활성화를 저해하는 기능적 domain이 substrate domain 및 Helix-loop-Helix domain임을 밝힘.

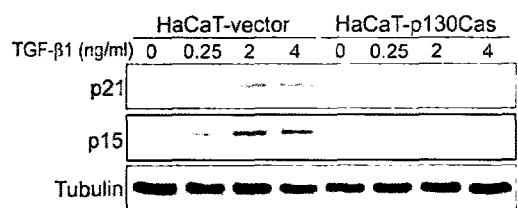
▲ p130Cas와 Smad3가 상호작용하면 Smad3의 인산화 및 전사활성도가 저해됨을 규명함. 또한 두 단백질간 상호작용은 TGF-β1 신호 또는 인테그린-ECM부착신호에 의하여 증가하며, TGF-β1에 의하여 발현이 증가하는 p15, p21등의 CDK inhibitor 들의 발현이 FN 등의 ECM 자극 또는 p130Cas 단백질의 발현량과 부적인 상관관계를 보였음 (그림 21, 22).



<그림 20. p130Cas의 기능적 도메인 검색>

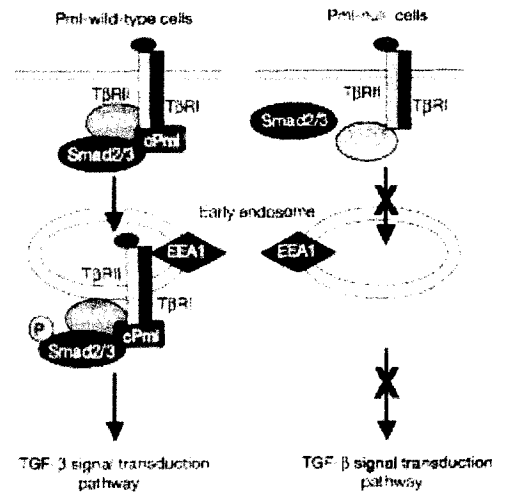


<그림 21. p130Cas에 의한 p15/21 발현 저해>

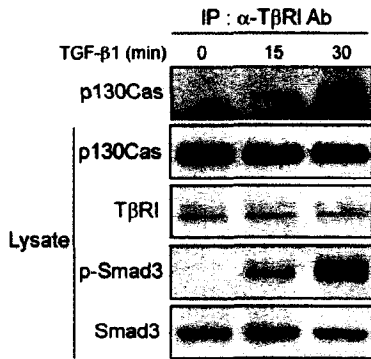


<그림 22. p130Cas에 의한 p15/21 발현 저해>

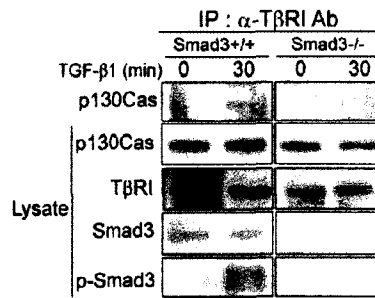
▲ 위 연구결과를 바탕으로, p130cas가 Smad3의 인산화를 저해하는 구체적인 메커니즘 및 기능적 도메인에 대한 연구를 진행하였음. p130Cas와 상호작용하는 TGF- β 1 신호전달 단백질을 추가로 찾기 위하여 SARA, cPML, TGF- β 1 receptor type I/II (그림 23. [15]) 등의 단백질을 대상으로 상호면역침전법 (co-immunoprecipitation) 실험을 수행하였음. 그림 24.에 나타난 것과 같이, TGF- β 1 receptor type I (T β RI)과 p130Cas가 상호작용하였으며 그 상호작용은 TGF- β 1처리시 증가하였음. 다만 이 상호작용이 Smad3 KO 세포주에서는 상실되는 것으로 보아, Smad3에 의하여 증개되는, 간접적인 것으로 보임 (그림 25.). 위 실험결과에 근거하여 p130Cas에 의한 Smad3의 활성 저해는 T β RI과 Smad3의 complex 형성에 p130Cas가 영향을 주기 때문임이 규명되었음.



<그림 23. TGF- β 1 수용체의 세포내 유입>



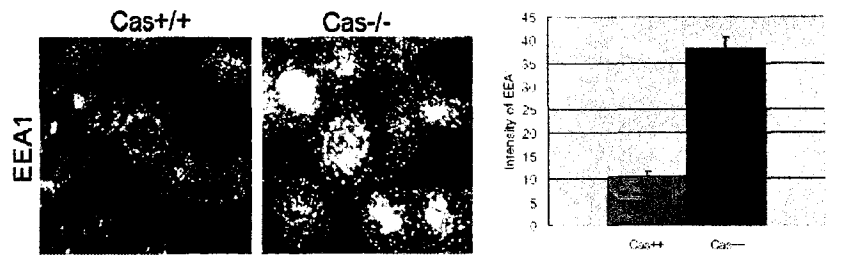
<그림 24. T β RI과 p130Cas의 상호작용>



<그림 25. Smad3에 의한 T β RI과 p130Cas의 상호작용>

▲ TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)신호경로는 TGF- β 1 ligand와 수용체간의 결합에 의해서 시작되며, 수용체의 serine kinase activity는 Smad3라는 전사인자를 인산화하여 세포핵까지 신호를 전달하게 됨 [15-17]. 이 때, 이미 다른 receptor tyrosine kinase들과 마찬가지로 TGF- β 1 수용체도 EEA1에 의하여 endosome 형태로 세포내에 유입되었을 때에 보다 더 신호전달이 활발하게 일어나게 된다고 알려져 있으며, 그 유입경로의 조절자가 돌연변이를 일으켜서 세포내 유입이 저해되면 TGF- β 1 신호도 낮아짐을 볼 수 있었음.

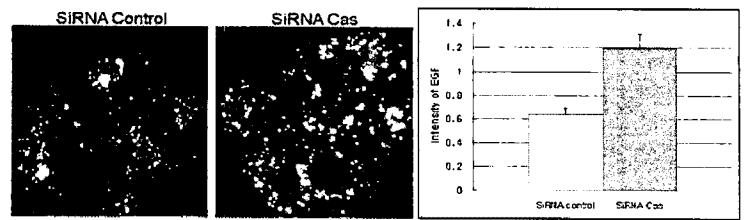
▲ p130Cas에 의한 TGF- β 1 신호의 저해가 TGF- β 1 수용체의 세포내 유입현상을 저해함으로써 이루어지는지 조사함. 먼저, EEA1에 의한 endosome의 형성과 p130Cas의 발현량과의 상관관계를 조사하기 위하여, 그림 26.에서 보는 바와 같이 p130Cas Knockout cell과 wild type 세포로 EEA1 면역염색을 실시하고 형광현미경 촬영후 분석프로그램 (MetaMorph Offline)으로 endosome 크기, 개수등을 정량하였음. p130Cas이 Knockout되었을 때에 훨씬 더 많은 endosome이 형성됨을 볼 수 있음.



<그림 26. Cas Knockout과 endosome 형성 변화>

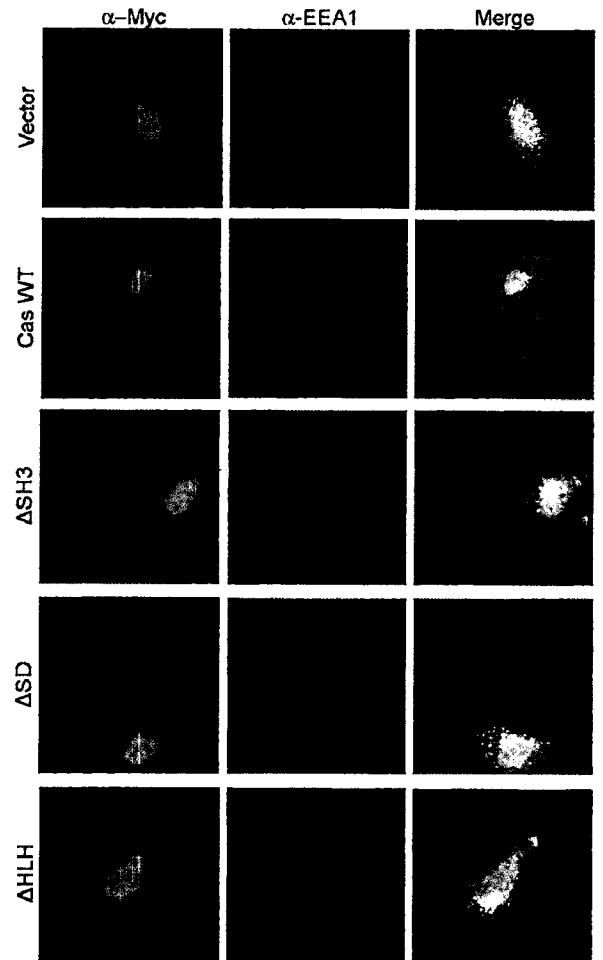
기 위하여, 그림 26.에서 보는 바와 같이 p130Cas Knockout cell과 wild type 세포로 EEA1 면역염색을 실시하고 형광현미경 촬영후 분석프로그램 (MetaMorph Offline)으로 endosome 크기, 개수등을 정량하였음. p130Cas이 Knockout되었을 때에 훨씬 더 많은 endosome이 형성됨을 볼 수 있음.

▲ TRITC가 연결된 EGF를 처리하여, endosome 형성 정도를 관찰할 수 있음. p130Cas을 knockdown시킨 경우 endosome 형성 개수가 증가하였으며, 이는 위의 결과와 마찬가지로 endosome 형성과 p130Cas의 발현량은 부적 상관관계임을 보여주고 있음. (그림 27).



<그림 27. Cas Knock down과 endosome 형성 변화>

▲ p130Cas의 어느 domain이 EEA1-endosome 형성을 저해하는 기능적 역할을 담당하는지 살펴보기 위하여, 단독 또는 2개 이상의 domain이 삭제된 돌연변이 p130Cas를 p130Cas KO 세포에 transfection 한 후 EEA1-endosome 형성을 관찰하였음. 그 결과 (그림 28), 돌연변이 p130Cas의 경우는 전부 EEA1-endosome 개수/크기에 변화를 주지 못하였음.



<그림 28. Cas deletion 돌연변이 발현과 endosome 형성>

§ 실험결과 : 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 I

■ Published

저자 : Yeo et al.

제목 : Focal Adhesion Targeting of v-Crk Is Essential for FAK Phosphorylation and Cell Migration in Mouse Embryo Fibroblasts Deficient Src Family Kinases or p130CAS.

논문 : Journal of Cellular Physiology, (2008) 214, 604-613

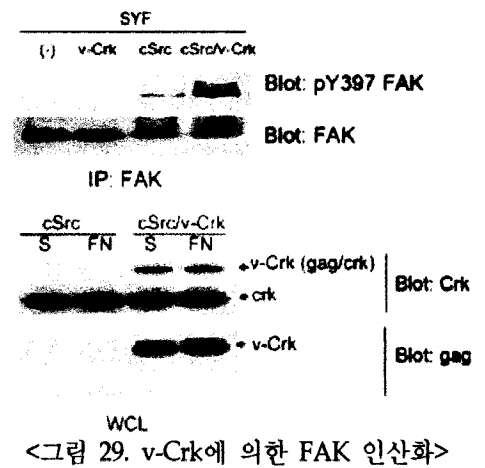
▲ 세포의 이동은 세포골격의 재배열 및 세포-세포외기질 과정을 포함하며, 배발생, 상처의 재생, 면역반응, 암의 전이 등에 기여함 [18]. p130Cas는 인테그린에 의한 세포부착신호를 전달 받아 Crk, Rac 등의 하위신호경로를 활성화시킨다고 보고되어 있음 [19-20].

▲ Crk는 p130Cas의 하위 신호전달 단백질로서, p130Cas가 인산화되면 결합하여 신호를 전달, 증폭하게 됨. v-Crk는 virus의 gag와 c-Crk의 SH2, SH3 domain이 연결된 형태를 갖고 있으며, Cellular Crk와 달리 kinase domain이 없지만 실험결과 FAK의 인산화를 증가시키고 (그림 29)

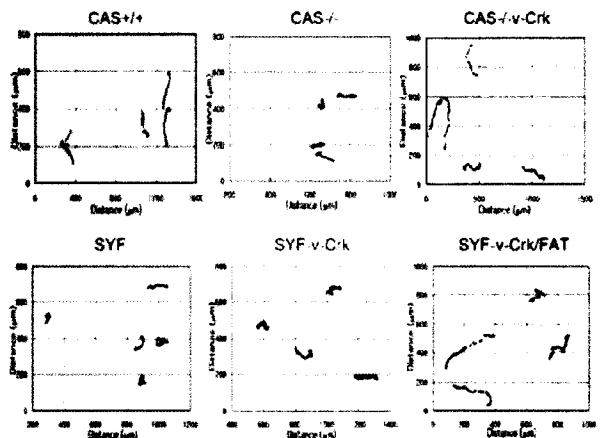
세포의 이동을 촉진할 수 있는 것을 발견하였음. 또한 p130Cas Knockout 세포는 wild type에 비하여 이동성이 현저히 낮는데, v-Crk을 발현시켜 주면 그 이동성이 회복되었음 (그림 30).

▲ Src kinase가 knockout된 세포도 이동성이 현저히 낮으며 v-Crk의 발현만으로는 이동성이 회복되지는 않았으나, focal adhesion으로 targeting되는 domain을 가진 v-Crk를 발현시킨 경우는 이동성이 회복되었음 (그림 30).

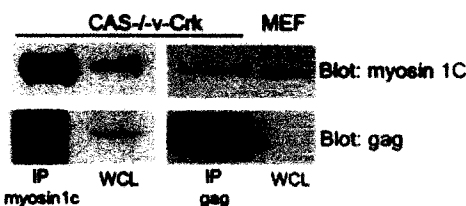
▲ 이처럼 v-Crk에 의해서 세포의 이동성이 증가할 때에는 기존에 알려지지 않은 binding partner가 있음을 발견하고, LC-MS/MS 분석을 통하여 myosin 1C 단백질을 밝혔음. 또한 myosin 1C에 대한 항체를 세포에 micro-injection하였을 때, v-Crk에 의한 Cas KO 세포의 이동성 회복이 저해됨을 발견하였음 (그림 31).



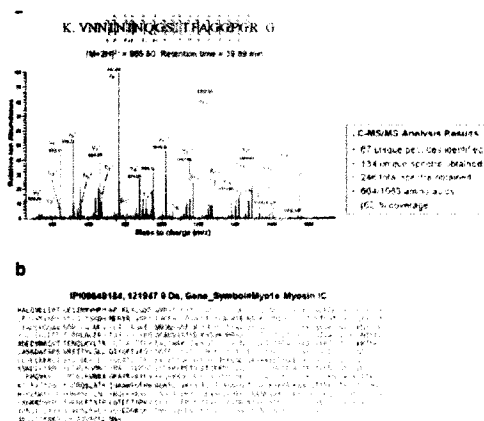
<그림 29. v-Crk에 의한 FAK 인산화>



<그림 30. v-Crk에 의한 세포이동성의 회복>



<그림 31. v-Crk와 상호작용 하는 Myosin 1C의 동정>



§ 실험결과 : 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 II

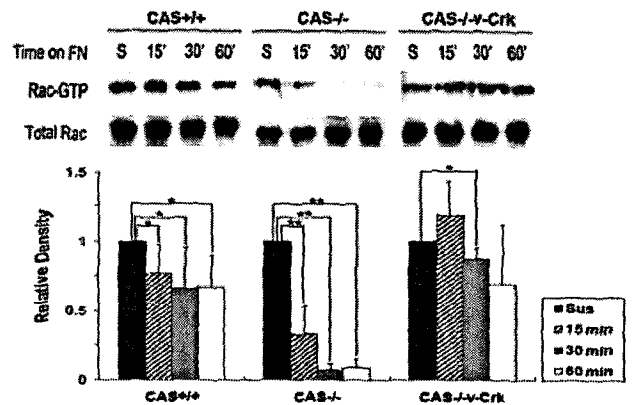
■ Published

저자 : Sung et al.

제목 : v-Crk Induces Rac-dependent Membrane Ruffling and Cell Migration in CAS- deficient Embryonic Fibroblasts

논문 : Molecules and Cells (2008) 25, 131-137

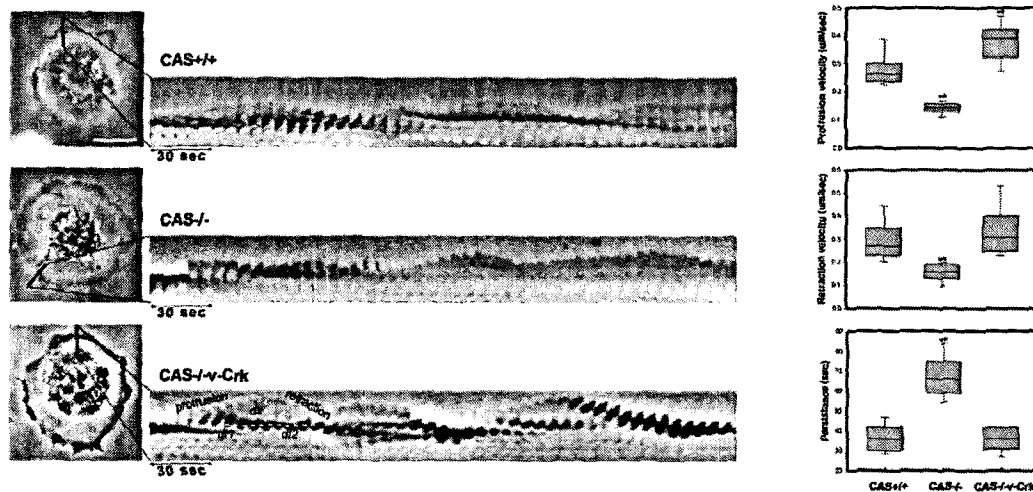
▲ v-Crk에 의하여 p130Cas KO 세포의 이동성이 회복됨을 앞서서 보았음 [21]. v-Crk와 myosin 1C등에 의하여 세포이동신호가 전달된다면, 과연 cellular Crk처럼 Rac GTPase를 활성화하여 신호를 전달하는지 실험하였음. 인테그린 수용체의 ligand인 Fibronectin 자극을 주었을때 wild type 세포와 v-Crk를 발현시킨 p130Cas KO 세포에서는 Rac의 활성이 서서히 감소한 반면, v-Crk를 발현시키지 않은 p130Cas KO 세포에서는 Rac 활성이 급격하게 감소하였음 (그림 32).



<그림 32. GTP-Rac 활성화와 v-Crk>

▲ p130Cas KO 세포는 wild type 세포에 비하여 막의 역동적인 ruffling이 줄어들어 있음. 막의 protrusion과 ruffling은 세포의 이동을 이루는 동력원임. v-Crk에 의하여 p130Cas KO세포주의 이동성이 회복된 것이 막의 역동성을 회복시킨 것에서 기인하는지 실험하였음. 그 결과, 그림 33에서 볼 수 있듯이 v-Crk를 p130Cas KO 세포에 발현시킨 경우 세포막의 역동성이 회복되었음을 볼 수 있었음.

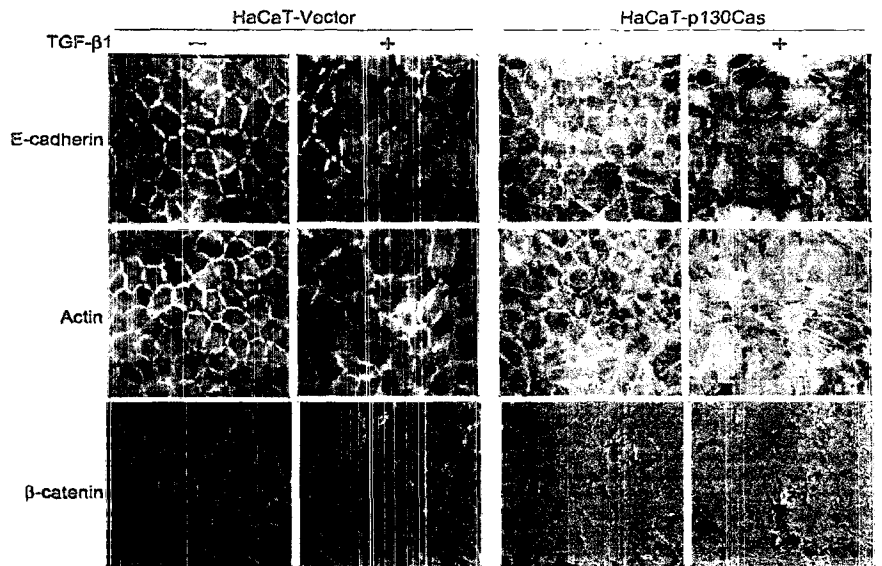
▲ p130Cas KO 세포에 v-Crk를 발현시켜서 Rac활성을 높임으로서 세포의 이동성이 회복되었다는 것을 재차 확인하기 위하여, Dominant negative form의 Rac을 v-Crk와 함께 p130Cas KO 세포에 발현시킨 결과 이동성이 회복되지 않았음 (결과그림 생략). 즉 v-Crk에 의하여 p130Cas KO세포의 이동성이 증가한 것은, v-Crk에 의하여 Rac이 활성화되었기 때문임.



<그림 33. v-Crk와 membrane의 dynamics, stroboscopic analysis>

§ 실험결과 : 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 III

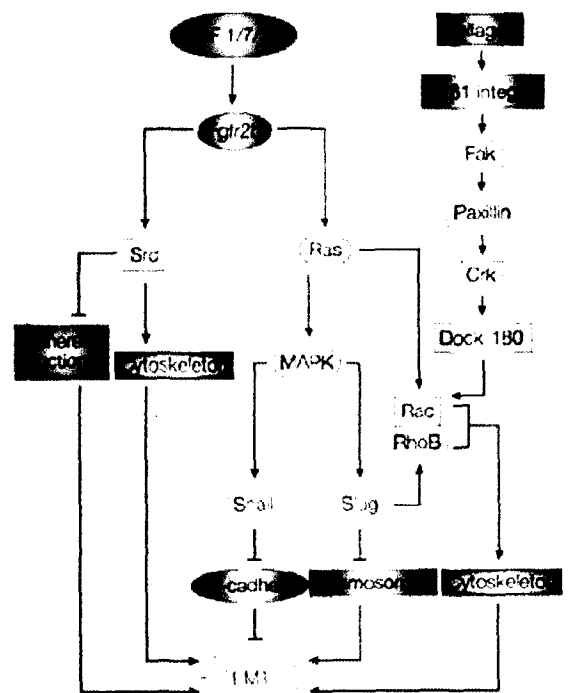
▲ TGF-β1신호는 세포의 탈분화 기작인 간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)을 유발하여, 암화가 진행중인 세포가 전이할 수 있는 이동성을 제공해 줌 [22]. 선행연구에서 p130Cas에 의하여 TGF-β1신호가 저해되는 것을 바탕으로, 세포의 EMT를 유발하는 과정에서는 p130Cas가 어떠한 작용을 할지 실험해 보았음. 그 결과, 그림 34.에서 볼 수 있듯이 p130Cas가 stable하게 발현된



<그림 34. p130Cas 발현과 EMT와의 관계>

HaCaT 세포에서 TGF-β1에 의한 EMT가 더 빠르게 일어남을 볼 수 있음. E-Cadherin이 세포막 주위에 더 빠르게 사라졌으며, actin cytoskeleton의 형태도 보다 더 변형되었고, β-catenin에 의한 세포경계도 HaCaT-Cas에서 더 불분명해졌음을 볼 수 있음.

▲ p130cas가 TGF-β1 신호를 억제한다면, TGF-β1에 의한 EMT역시 저해할 것이라 예상하였으나 그림 33.의 결과는 그러한 예상과 상반된 결과임. 이러한 결과가 나온 이유는 추측컨대 EMT를 유발한다고 보고된 FAK-(p130Cas)-Crk-DOCK180 신호경로(그림 35, [23])가 HaCaT-Cas 세포에서 더 활발히 일어나서, p130Cas가 TGF-β1신호를 저해하는 효과보다는 오히려 EMT를 촉진하였기 때문으로 생각됨.



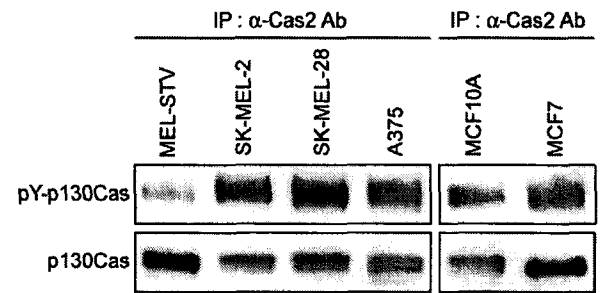
<그림 35. EMT 신호전달 경로. [22]>

§ 실험결과 : 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명

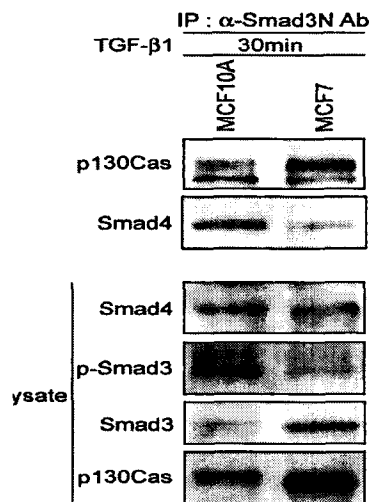
▲ 여러 종류의 암조직, 세포에서 TGF-β1이 많이 분비된다고 보고되어 있음 [3,10]. 이는 암조직, 암세포 자체에는 TGF-β1신호의 증식 억제 기능이 결여되어 있는 경우가 많으며, TGF-β1의 전이촉진능력 및 면역억제 능력이 암 발달에 유리하게 악용되고 있는 것임. 암세포 내에서 TGF-β1 신호가 억제되는 기전은 경로 자체의 돌연변이 또는 2차적인 조절 단백질의 돌연변이에서 찾을 수 있음.

▲ p130Cas는 melanoma나 breast cancer에서 암의 진행을 돕고 환자의 예후를 나쁘게 만든다는 연구결과가 있었음 [24-30]. 또한 본 연구실의 선행연구에서 p130Cas 단백질이 Smad3에 상호작용하여 TGF-β1 신호의 전달을 저해한다고 밝혔음. 따라서 p130Cas의 과발현 또는 과인산화가 일어난 암세포, 암종을 찾을 수 있다면, 그러한 현상이 암세포/조직 내부의 TGF-β1신호 억제의 원인이 되는지 시험해 볼 수 있음. 그 결과가 예상과 부합된다면 p130Cas가 암을 촉진하는 실제 증거를 제시할 수 있으며, 암 발달의 새로운 메커니즘을 규명할 수 있을 것임.

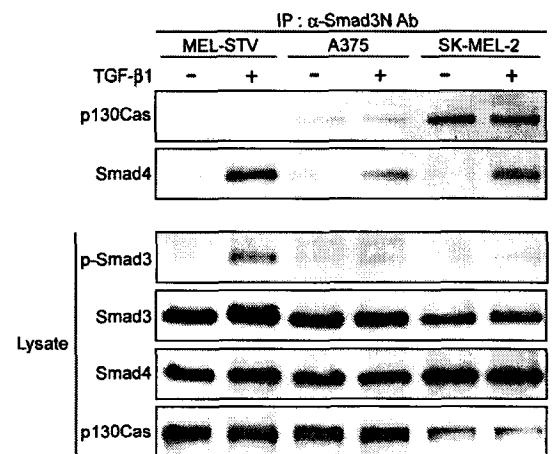
▲ 여러 종류의 암세포들, 특히 정상유방표피세포의 일종인 MCF10A와 유방암 세포인 MCF7세포, 그리고 알려진 oncogene으로 transformation 된 MEL-STV 세포와 실제 흑색종 조직에서 유래한 A375세포와 SK-MEL-2 세포주들 간의 비교를 통하여 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 신호의 억제현상 간의 연관성을 찾고자 실험을 진행하였음. 그 결과, 그림 36.에서 보이듯이 암화가 일어난 세포에서 비교적 p130Cas의 발현량 또는 인산화 수준이 높은 것을 볼 수 있음. 특히 MEL-STV에 비하여 나머지 melanoma 세포들의 경우 p130Cas 양에 비해서 인산화된 p130Cas의 양이 매우 증가해 있음. 그림 37.과 그림 38.에서는 암세포에서 정상세포보다 Smad3-p130Cas 상호작용이 더 많이 일어나고, 반면 Smad3의 활성이 증가되었을 때 나타나는 Smad3-Smad4 상호작용은 감소하였음을 볼 수 있음. 또한 lysate의 웨스턴 블랏 결과에서는, 암세포에서 Smad3의 인산화가 상대적으로 저해되는 것을 볼 수 있음.



<그림 36. 암세포간 p130cas, pY-p130Cas 비교>



<그림 37. MCF세포간 비교>



<그림 38. Melanoma 세포간 비교>

다. 3차년도 연구결과

(1) 연구목표 및 내용

| 연구 목표 | 연구 내용 |
|-------------------------------------|---|
| TGF-β1신호를 저해하는 p130Cas의 기능 제어 방법 연구 | <ul style="list-style-type: none"> 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명 TGF-β1신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명 TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사 p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발 |

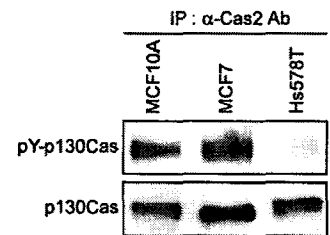
(2) 연구결과 논문발표 현황

| 번호 | 발표 논문 |
|----|---|
| 1 | v-Crk regulates membrane dynamics and Rac activation <i>Cell Adhesion & Migration</i> , (2008) 2, 174-176 |
| 2 | Regulation of dendritic spine morphology by SPIN90, a novel shank binding partner <i>Journal of Neurochemistry</i> , (2009) <i>in press.</i> |

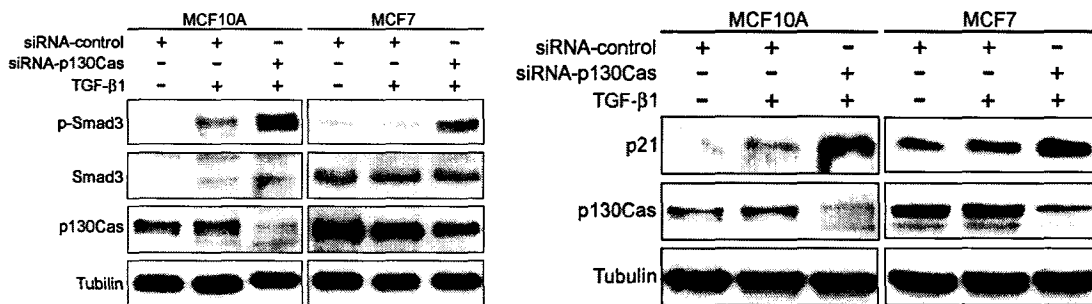
(3) 주요 연구결과

§ 실험결과 : 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명

▲ p130Cas 단백질 발현이 실제 암세포의 TGF-β1 반응성 둔화와 연관을 갖는지 여러 종류의 암세포에서 탐색하여 보았음. 먼저 breast cancer 세포주간에 p130Cas 발현량과 인산화도가 어떠한지 관찰하고 (그림 39), 암화가 진행된 세포에서 정상 세포보다 많은 p130Cas 발현과 인산화도가 보이는 경우 그림 40.와 같이 siRNA-Cas를 이용하여 TGF-β1 처리시의 효과 (Smad3 인산화 및 p21 발현 증가)가 어떻게 나타나는지 관찰하였음. MCF-7의 경우 siRNA-Cas를 처리하기 전에는 TGF-β1에 의한 p21 발현증가나 Smad3인산화 증가가 거의 없으나 p130Cas knockdown 후에는 TGF-β1 처리 효과가 나타남. 유방암 환자에게서 p130Cas의 발현이 증가한 경우 진단예후(암 전이성 및 생존 기간)가 나쁘다는 해외연구자들의 보고 내용과 부합하는 실험결과임.



<그림 39. p130Cas 발현량 비교>

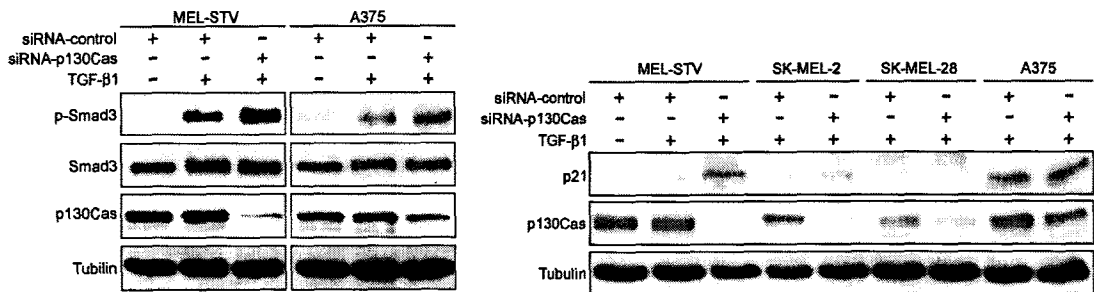


<그림 40. p130Cas knockdown에 의한 암세포주에서의 TGF-β1 민감성 회복>

▲ melanoma 모델 세포주인 Mel-STV, SK-Mel-28, A375 등에서도 위와 같은 비교를 시도하였음. Mel-STV는 비교적 암화특성이 적으며 다른 두 세포주는 전이성이 높은 악성종양의 암세포임. 그림 41에서 보이듯이 암화가 많이 진행된 세포주일수록 p130Cas의 발현량에 비하여 인산화도가 높음이 보이며, 그림 42에서는 그러한 조건에서 p130Cas-Smad3 상호작용이 더욱 증가하였음을 알 수 있음. 그림 43에서는 p130Cas 발현량을 siRNA로 저해시킨 후 암세포들의 TGF- β 1 민감도가 어떻게 되는지 관찰하였으나 눈에 띄는 민감도 회복은 관찰되지 않았음. 즉, 암종별로 p130Cas가 TGF- β 1 둔감화에 기여하지 않을수도 있음을 암시함.

<그림 41. p130Cas 발현량 비교>

<그림 42. p130Cas-Smad3 상호작용 비교>

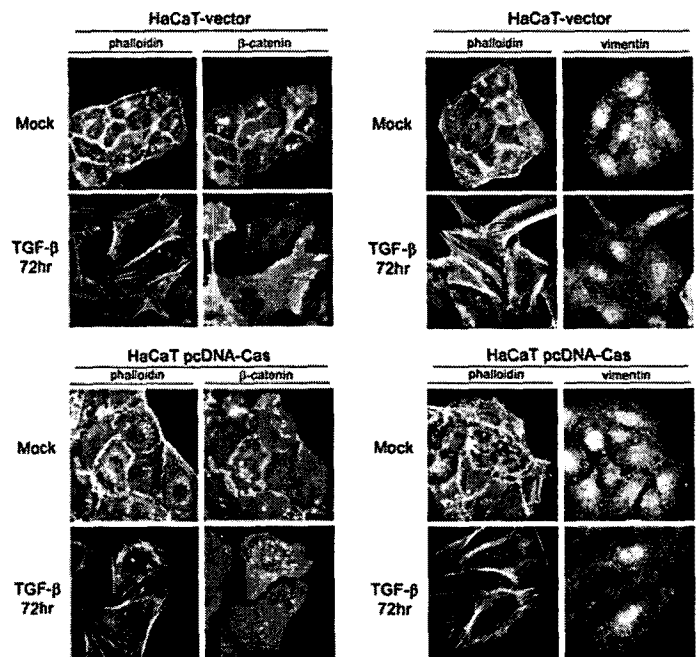


<그림 43. p130Cas knockdown과 TGF- β 1 반응성의 상관관계>

§ 실험결과 : TGF- β 1신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명

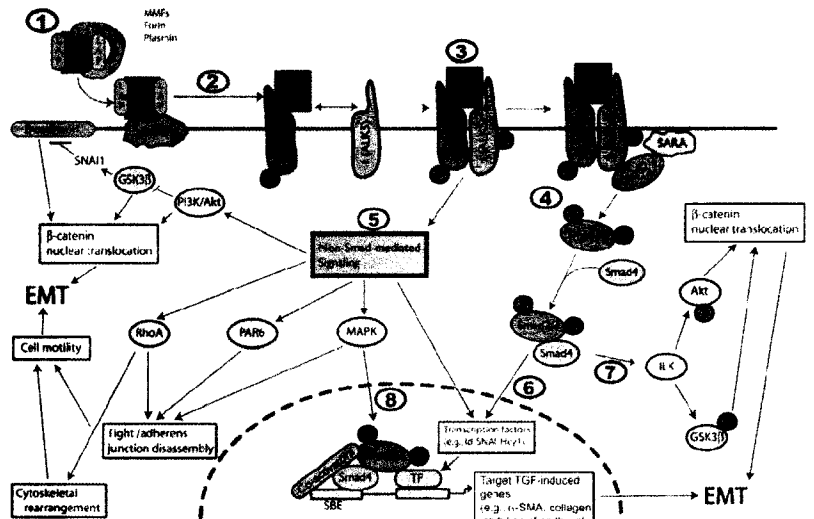
▲ TGF- β 1 처리시 EMT 현상을 보여주는 HaCaT 세포주를 이용하여, p130Cas-stable HaCaT과 HaCaT-vector 세포주를 구축한 후 그림 33과 같이 48hr 처리 조건에서 EMT 관련 실험을 진행하였음. 72hr EMT 조건의 실험을 추가로 진행하여 그림 44과 같은 결과가 나왔으며 이전과 마찬가지로 p130Cas 발현을 높여준 세포가 β -catenin 소실 및 vimentin 소실 등의 EMT 현상의 진행이 더 빨랐음.

▲ TGF- β 1에 의한 EMT는 그림 45의 모식도에 나타나 있듯이 다양한 신호경로들에 의하여 조절되며 Smad3 의존적인 경로와 비의존적인 경로가 함께 작용할 경우 더욱 강한 EMT현상을 유발하는 것으로 알려져



<그림 44. p130Cas에 의한 HaCaT세포의 EMT 촉진>

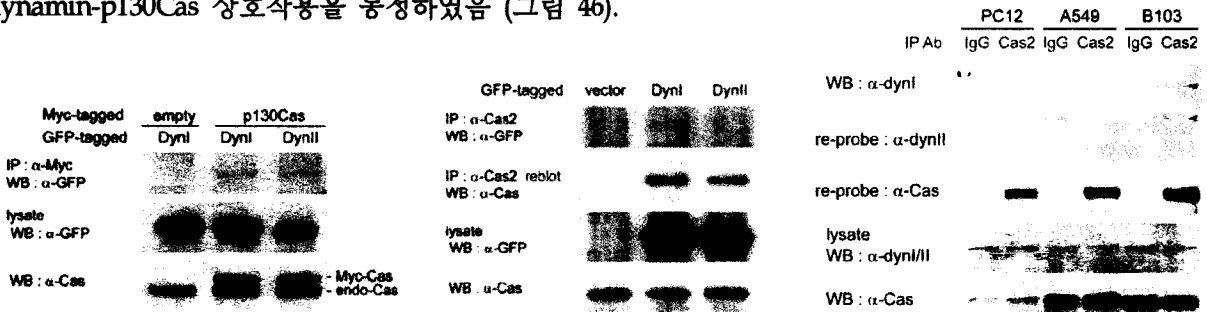
있음 [31]. 특히, Smad3 Knock out 조건이나 인산화효소 돌연변이, TGF- β 1 인산화 효소 불능 수용체등을 과 발현 시킨 경우 EMT 진행이 막히거나 저해되었음. 따라서 p130Cas 단백질이 Smad3신호를 저해함에도 불구하고 오히려 EMT를 촉진시킬 수 있는 이유는 ① Smad3에 대한 저해능이 아주 크지 않은 대신, ② 그림 34에 나온 바와 같이 Rac, DOCK180 등 인테그린 하부신호의 EMT 유발 신호 전달이 더 강해지기 때문으로 짐작할 수 있음.



<그림 45. TGF- β 1에 의한 EMT 유발 신호 전달>

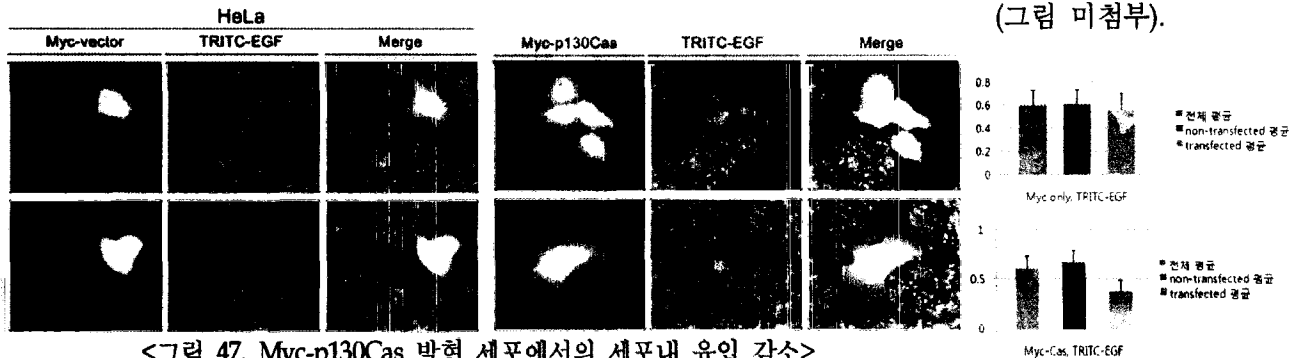
§ 실험결과 : TGF- β 1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사

▲ 2차년도 연구를 통하여 TGF- β 1신호를 저해하는 p130Cas 기능이, TGF- β 1 수용체의 세포내 유입과 연관되어 있음을 발견하였음. p130Cas에 의하여 막수용체 단백질의 세포내 유입이 저해되는 분자적 기작을 조사하기 위하여 다양한 세포내유입 소포체 형성 단백질들을 검색하였으며, 그 결과 dynamin-p130Cas 상호작용을 동정하였음 (그림 46).



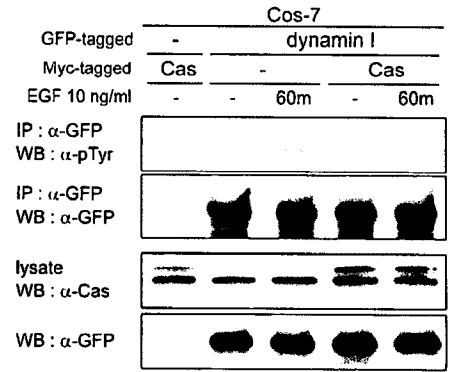
<그림 46. exogenous/endogenous interaction between p130Cas and dynamin>

▲ 막 수용체의 세포내유입을 조사하는 가장 일반적인 방법인 EGF-TRITC, Transferrin uptake assay 등을 수행하여 과연 p130Cas 발현량과 세포내유입이 상관관계를 조사하였음. 그 결과 p130Cas 발현이 높을수록 세포내유입이 감소하였고 (그림 47) p130Cas 발현을 줄이면 반대로 세포내 유입이 증가하였음 (그림 미첨부).



<그림 47. Myc-p130Cas 발현 세포에서의 세포내 유입 감소>

▲ p130Cas가 세포막 수용체의 세포내 유입을 저해하는 현상과 p130Cas-dynamin 상호작용의 연관성을 밝히기 위하여, dynamin을 이용한 세포내유입이 잘 밝혀진 EGF 시스템을 모델로 하여 실험을 진행하였음. EGF 수용체에 그 기질이 붙게 되면 EGF 수용체는 Src을 인산화시키고, 활성화된 Src은 다시 dynamin을 인산화시켜서 EGF수용체의 세포 내유입을 촉진하게 됨. 이렇게 세포내 소포체에 실려진 EGF수용체는 분해되거나 혹은 막으로 재배치되어 그 활성을 조절한다. p130Cas의 발현을 증가시켰을 때 이처럼 EGF에 의한 dynamin 인산화가 정상조건

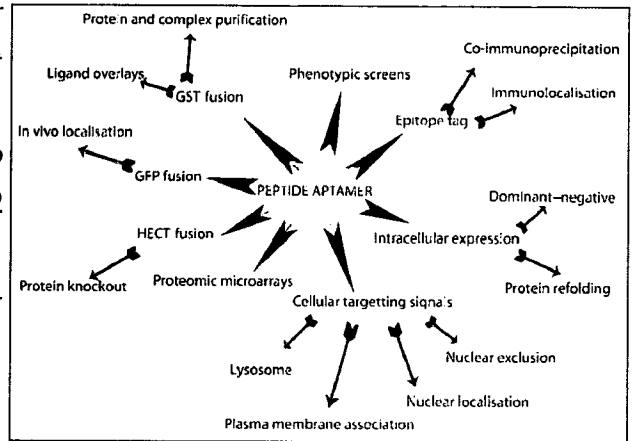


<그림 48. p130Cas에 의한 dyn I 인산화 저해>

에 비하여 감소하는 것을 보았으며, TGF-β1 수용체에 대하여서도 같은 방식으로 p130Cas-dynamin 상호작용이 기능하는지 추가연구가 필요함.

§ 실험결과 : p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발

▲ 1~2차연도 연구결과에서 p130Cas- Smad3 상호작용에서 p130Cas의 HLH domain (그림 8, [32])이 중요결합 부위임을 알아내었음. 또한, 본 연구실의 이전 연구결과[33]에 따르면, p130Cas의 Helix-loop-helix domain (HLH)이 전사인자인 E47, Id2, E12 등과 상호작용할 수 있음을 발견하였으며, 이들의 p130Cas 상호작용 부위 역시 HLH 부위임을 규명하



<그림 49. peptide aptamer의 응용범위>

▲ 최근 peptide aptamer를 응용한 기초연구 및 신약개발 연구가 대동하는 단계에 있음. Smad3와 관련한 peptide aptamer 논문 [34]에서는 Smad3와 결합하는 전사인자단백질의 아미노산 잔기 서열을 이용하여, Smad3와 특이적인 전사인자간의 상호작용을 저해하는 TGF-β1 신호전달 억제물질을 개발한 바 있음. 이러한 연구보고들을 참고하여

p130Cas의 HLH에 상호작용하는 것으로 알려진 Id2 family protein의 consensus 서열을 mammalian cell에서 발현해줄 vector에 클로닝 작업을 진행 중이며, 또한 다양한 시퀀스를 시험하기 위하여서, 다소 시간과 노력이 많이 요구되는 제한효소-ligase 방식이 아닌 gateway system을 도입하였음. (현재 실험 진행중)

| | HELIX I | LOOP | HELIX II |
|-----------|---|-----------|---------------------------|
| Id2 | VDDP INN YDNEE YSN IELVTEI | YDND | YK IIL A IYV L LGA |
| Id4 | -DEPALD TQNE YSN IELVTEI | YDND | YK IIL A IYV L LGA |
| Id1 | -SQSVL IELNS YSN IELVTEI | YDND | YK IIL A IYV L LGA |
| Id3 | ASEP-LM IELNS YSN IELVTEI | YDND | YK IIL A IYV L LGA |
| p130Cas | SDRQ--LQ FYE EQ SANLFTL IFAV AFFAWAAR, IYDNDL | | KS IIL A IYV L LGA |
| E12 | RQANNFBRERVVE IEFKELVPSI | IYDND | YK IIL A IYV L LGA |
| E2-2 | RQANNFBRERVVE IEFKELVPSI | IYDND | YK IIL A IYV L LGA |
| E47 | RQANNFBRERVVE IEFKELVPSI | IYDND | YK IIL A IYV L LGA |
| IdyD | RQANNFBRERVVE IEFKELVPSI | IYDND | YK IIL A IYV L LGA |
| C-Myc | RATHNFBRRRNEI IEFKELVPSI | IYDND | YK IIL A IYV L LGA |
| Consensus | R Q A N N F B R E R V V E I E F K E L V P S I | I Y D N D | Y K I I L A I Y V L L G A |

| | |
|-----|--|
| E47 | LYNMND <u>CYSKELVPSI</u> PQNKKVS <u>KMEILQHV</u> IDLQ-- |
| Id2 | VRD <u>INEAFRELGRMC</u> QLHLKSDKAQT <u>KLLILQQAVQVILGLE</u> QQ |

<그림 50. p130Cas 결합 단백질의 consensus sequence>

§ 실험결과 : 세포이동 조절 단백질 SPIN90에 의한 Shank 조절

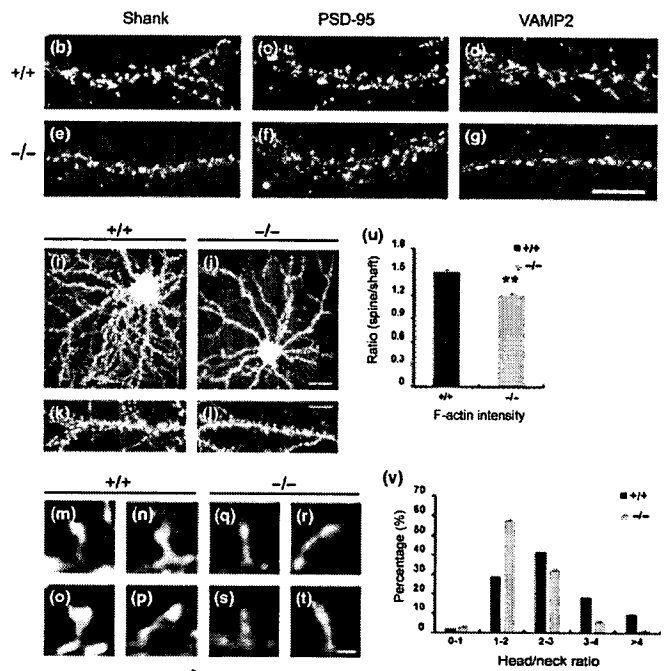
■ In press

저자 : Kim et al.

제목 : Regulation of dendritic spine morphology by SPIN90, a novel shank binding partner

논문 : Journal of Neurochemistry, (2009)

▲ SPIN90 단백질은 본 연구실에서 actin cytoskeleton 조절 단백질로서 새롭게 동정한 단백질이며, 이미 endocytosis, actin dynamics와 관련한 연구결과가 publish되어 있음. Shank라는 단백질은 신경세포의 수지상돌기의 발달과 성숙을 촉진하는 기능이 있다고 알려진 actin 결합 단백질임. 본 연구팀은 바로 SPIN90가 신경세포의 PSD에서 Shank1b와 상호작용하며, 그 결과 Shank에 의한 수지상돌기 형성을 돕는 것으로 밝혀내었음. 또한 SPIN90를 신경세포에 과발현시켜 보았더니 Shank, PSD-95 등 단백질이 수지상돌기에 축적되는 양이 증가하였음. 반대로 SPIN90를 Knockout 시킨 mice의 신경세포에서는 Shank나 PSD-95, VAMP2등의 신경수지상 단백질들의 배치가 비정상적인 분포를 보였음. 이러한 결과들은 SPIN90가 Shank1b와 상호작용하여서 신경수지상 돌기의 발달을 조절한다는 것을 보여줌.



<그림 51. SPIN90 knockout으로 인한 비정상적인 수지상돌기 발달>

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 평가의 착안점

| 구 분 | 세부연구목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 척도 |
|-----------------|--|-----|---|
| 1차년도 (2006년) | 세포주기에서 integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구 | 25% | integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 역할 규명 |
| | TGF-β1 활성화에 따른 p130Cas와 Smad3 단백질의 상호작용 연구 | 25% | - p130Cas 및 Smad3의 antibody 제조 - <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 에서 p130Cas-Smad3 상호작용 검증 및 상호결합 강화 조건 탐색 |
| | Smad3의 인산화와 활성화 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 | 15% | Smad3의 인산화와 활성화 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 동정 |
| | p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절에서의 역할 규명 | 35% | - p130Cas KO/WT MEF 및 stable cell line 구축 - siRNA제조를 통한 p130Cas의 기능저해 |
| 2차년도 (2007년) | p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작과 TGF-β1 활성화에 관한 연구 | 30% | - TGF-β1 신호전달관련 p130Cas 결합 단백질 탐색 및 동정 (1개 이상) - SCI 논문 1편 이상 발표 |
| | 암세포의 중간엽성 세포 전환 (EMT) 기작에서 인테그린과 p130Cas의 기능 연구 | 20% | EMT에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 |
| | 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 | 20% | 국내 및 국제학술대회 발표 1건 이상 |
| | 세포의 이동현상에 관여하는 p130Cas 및 v-Crk, Rac의 역할 규명 | 30% | - p130Cas 및 p130Cas의 하위 신호전달 단백질인 Crk 활성화에 의한 세포이동 규명 - SCI 논문 1편 이상 발표 |
| 3차년도 (2008년) | 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명 | 30% | 국내학회 발표 1건 이상 |
| | TGF-β1신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명 | 20% | SCI 논문 1편 이상 발표 |
| | TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사 | 30% | - p130Cas가 조절하는 세포내유입 조절 단백질 동정 및 기능 연구 |
| | p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발 | 20% | 저해 기전 연구 및 응용기술 확립 |

2절 계획대비 달성도

1. 1차년도

| 세부연구개발 목표 | 달성 내용 | 달성도 |
|--|--|------|
| 세포주기에 대한 integrin과 TGF-β1 신호의 효과 조사 | <ul style="list-style-type: none"> 대조군인 poly-L-lysine 처리 세포에 비해 세포외기질인 fibronectin을 처리한 세포에서 Smad3단백질의 인산화 저해가 뚜렷하게 나타남을 확인 마찬가지로 TGF-β1 신호의 세포증식 억제 효과도 세포외기질에서 키운 세포에서는 크게 저해됨을 규명 | 100% |
| p130Cas-Smad3 상호작용의 특성 분석 | <ul style="list-style-type: none"> integrin 신호경로가 TGF-β1 신호경로에 간섭하는 key point로서 integrin의 하위 신호전달 단백질인 p130Cas을 지목하고 TGF-β1 신호 전달 단백질인 Smad3와 상호작용함을 규명 p130Cas-Smad3의 상호작용이 각 단백질의 인산화 level, 즉 TGF-β1 신호 혹은 integrin 신호 활성화에 의하여 비례적으로 증가함을 발견 | 100% |
| Smad3의 인산화와 활성 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 | <ul style="list-style-type: none"> p130Cas 및 Smad3의 domain deletion mutant를 제작하고 면역침전법을 사용하여 상호작용 부위를 검색한 결과, Smad3에서는 c-terminal, p130Cas에서는 SH3-Proline rich region 및 HLH (helix-loop-helix) domain 지역이 기능하고 있음을 발견 | 100% |
| p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절에서의 역할 규명 | <ul style="list-style-type: none"> p130Cas의 증감에 따라서 TGF-β1 신호의 활성 정도, 즉 Smad3의 인산화 및 TGF-β1 target gene의 발현, 그리고 세포증식의 억제 효과도 반비례적으로 증감함을 규명 세포외 기질 처리에 의해서 세포주기가 진행될 때 이와 동시에 p130Cas의 인산화가 일어나면서 p130Cas-Smad3의 상호작용이 증가하였다가 감소하는 현상 발견 이상의 결과로서 integrin이 p130Cas를 통하여 TGF-β1 신호를 억제하고, 이러한 억제 현상은 p130Cas-Smad3 상호작용이 매개함을 규명 | 100% |

2. 2차년도

| 세부연구개발 목표 | 달성 내용 | 달성도 |
|---|---|------|
| p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작과 TGF-β1 활성화에 관한 연구 | <ul style="list-style-type: none"> p130Cas에 의하여 EEA1-mediated endosome 형성이 저해됨을 발견함. p130Cas과 TGF-β1 수용체 type I이 상호작용하며, 이는 Smad3의 중개가 필요함을 발견하였음. 따라서 위의 두 발견으로 TGF-β1신호가 p130Cas에 의하여 저해되는 기전을 설명할 수 있을 것으로 생각됨. | 100% |
| 암세포의 중간엽성 세포 전환 (EMT) 기작에서 인테그린과 p130Cas의 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> p130Cas 또는 p130Cas의 binding partner 단백질들에 의하여 암의 전이에 중요하게 작용하는 세포이동 신호전달이 어떻게 이루어지는지 규명하였음. 관련 연구내용은 두 편의 SCI급 저널(Journal of Cell Physiology, Molecules and Cells)에서 출판되었음. | 100% |

| | | |
|--|---|------|
| 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ TGF-β1에 의하여 HaCaT-vector, HaCaT-p130Cas, NMuMG 세포주 등에서 EMT가 발생됨을 확인 ◦ 예상과 달리 p130Cas이 더 많이 발현되었을 때에 TGF-β1에 의한 EMT의 진행이 빨라지는 현상을 발견 | 100% |
| 세포의 이동현상에 관여하는 p130Cas 및 v-Crk, Rac의 역할 규명 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ 다양한 암세포종 중에서 breast cancer 세포주, melanoma 세포주에서 p130Cas의 과발현 또는 과활성화, Smad3의 인산화 저해, 그리고 p130Cas-Smad3 상호작용의 증가가 발견됨. ◦ 이상의 결과로서 p130Cas를 통하여 TGF-β1 신호가 억제되는 현상이 실제 암세포에서도 일어남을 규명하였음. | 100% |

3. 3차년도

| 세부연구개발 목표 | 달성내용 | 달성도 |
|---|--|------|
| 암세포의 TGF-β1 반응성과 p130Cas 단백질과의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ 다양한 암종세포에서 TGF-β1의 민감도(Smad3 인산화 및 p21 발현 정도) 및 p130Cas 발현/인산화도를 조사하였으며, ◦ 유방암세포주와 정상세포주 모델 간에 TGF-β1 민감도가 차이가 있었으며 p130Cas 발현을 knockdown 시키자 민감도가 회복됨을 발견, melanoma 세포주에서도 p130Cas의 인산화가 증가된 것을 발견하였으나 p130Cas 단백질 knockdown이 TGF-β1 민감도에 영향을 주지 못함. ◦ p130Cas의 과다발현은 유방암질환의 악성 예후와 상관성이 높으며, 본 실험결과가 그러한 임상결과를 일부 설명 가능. | 100% |
| TGF-β1 신호에 의한 EMT와 p130Cas 신호경로와의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ p130Cas 단백질이 TGF-β1에 의한 EMT를 촉진함을 관찰, β-catenin 및 vimentin EMT 마커 단백질의 감소정도를 형광현미경으로 관찰 ◦ Cas→v-Crk→Rac으로 연결되는 세포이동성 경로에 대한 연구/고찰결과를 SCI급 논문으로 게재. | 100% |
| TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ p130Cas의 발현과 세포내유입현상의 빈도가 반비례함을 형광현미경법으로 규명 ◦ p130Cas과 세포유입 조절단백질 dynamin이 상호작용함을 밝혔으며 p130Cas에 의하여 Src-dependent dynamin 인산화가 감소함을 발견 ◦ TGF-β1 신호경로의 활성화에 세포내유입이 필요하다는 기존연구결과에 근거하여, p130Cas에 의한 TGF-β1 신호경로 억제기작이 세포내유입현상 억제와 연관성이 있음을 설명. | 100% |
| p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질 개발 | <ul style="list-style-type: none"> ◦ Smad와 주로 결합하는 p130Cas HLH도메인과 상호작용하는 것으로 알려진 E2A 전사인자단백질의 결합 consensus 서열을 모방한 peptide aptamer 고안 ◦ 현재 실험 진행중임. | 50% |

3절 관련분야에의 기여도

1. 신호경로간 crosstalk에 대한 p130Cas 단백질의 역할 규명

Receptor Tyrosine Kinase (RTK) 신호와 세포-세포외기질 부착 신호(integrin 신호경로)가 RTK 신호전달과 세포증식을 촉진하는 synergistic 효과를 갖는다는 연구결과가 많이 있음에도 불구하고, 대표적인 세포증식 억제신호경로인 TGF- β 1신호전달에 대한 integrin 경로의 기능은 많이 알려져 있지 않음.

- integrin 신호를 자극하는 세포외기질(fibronectin, laminin등)을 세포에 처리하면 TGF- β 1신호에 의한 Smad3 인산화 및 세포증식, 세포주기 진행이 억제됨을 발견함.
- p130Cas의 유사단백질(family protein)인 HEF1이 Smad3와 상호작용하여 TGF- β 1신호경로를 억제할 수 있다는 내용의 연구논문을 참고하여 p130Cas와 Smad3의 결합을 조사하여 본 결과 in vivo, in vitro 조건에서 상호작용을 하는 것으로 밝혀졌음.
- p130Cas Knockout 세포주를 이용하여, integrin 신호에 의한 TGF- β 1 신호 억제 기능은 p130Cas단백질이 기여하는 바가 크다는 것을 규명하였음. 이 실험결과는 p130Cas-Smad3 상호작용이 integrin 신호와 TGF- β 1 신호간의 crosstalk을 일으키는 분자 수준의 메커니즘일 가능성을 높여줌.
- p130Cas 단백질의 발현정도에 따라서 TGF- β 1신호의 세포 내 신호전달 정도 (Smad3의 인산화, 타겟 유전자 발현 등)가 반비례적으로 변화하였음.
- p130Cas-Smad3 상호작용을 강화하거나 약화시키는 내외적인 조건을 탐색하여, 과연 두 단백질 간 결합이 crosstalk을 매개하는 분자 메커니즘인지 조사하였음. 그 결과 TGF- β 1 자극이나 세포외기질 자극에 의하여 두 단백질간에 인산화가 일어나는 조건에서 그 상호작용이 더욱 증가하였고, 이러한 결과는 TGF- β 1 신호 자체의 negative feedback의 의미 또는 세포외기질 자극에 의하여 세포증식으로 가기 위한 세포내 신호경로간 조절현상으로 이해될 수 있음.

위의 연구결과들을 토대로 TGF- β 1의 세포증식 억제기작이 세포외부기질 자극에 의하여 억제됨을 밝혔으며 이는 새롭게 밝혀진 두 신호경로간 crosstalk임. 기존의 HEF1-Smad3상호작용 연구 결과는 integrin에 의한 조절을 알아내지 못하였으며 또한 TGF- β 1 신호가 저해되는 분자적인 조절조건을 밝히지 못하였던 데 반해 이번 연구결과는 p130Cas 단백질의 기능을 상세하게 규명하였음. 또한 이 연구결과를 바탕으로 하여 세포외부기질 부착신호, p130Cas 단백질 신호경로 및 TGF- β 1신호가 세포의 주기를 어떻게 조절하는지, 그리고 암세포가 어떻게 TGF- β 1에 대한 둔감성을 획득하는지에 대한 단서를 제공하였음.

2. 암세포 특성에 대한 p130Cas의 기능 규명

암에 대한 분자생물학적 연구가 몇 십년간 지속되어 오면서 상당히 많은 이해가 이루어졌음에도 불구하고 완치법의 개발이 어려운 이유 중 하나는 암종별로 지극히 다양한 발암원인이 존재하기 때문임. p130Cas 단백질은 integrin 신호전달 단백질의 하나로서 oncoprotein으로 분류되지는 않으나 유방암 환자 조직에서 과다발현이 발견되며, 암질환의 완치에 불리한 예후와 상관성이 높다고 알려져 있음.

- 먼저 TGF- β 1 신호경로가 정상세포 혹은 다른 암세포주에 비하여 둔감화되어 있으면서 동시에 p130Cas의 발현이 높거나 과도하게 인산화가 일어난 세포주를 검색함. breast cancer 세포주,

melanoma 세포주가 이러한 모델로 적합하여, 이 세포주들을 대상으로 TGF- β 1 둔감성이 p130Cas 단백질에 의한 것인지 siRNA-Cas를 이용하여 실험해 봄. 실험결과 breast cancer 세포주의 경우 p130Cas knockdown에 의하여 TGF- β 1 민감도가 확연하게 회복되었으나 melanoma 세포주에서는 그러한 변화가 잘 관찰되지 않았음.

- TGF- β 1 신호가 암세포에 대하여서는 탈분화(EMT)를 일으켜서 세포의 이동성과 암의 전이를 도와준다는 기존 보고를 참고하여, p130Cas 단백질의 과다발현이 TGF- β 1-dependent EMT에는 어떻게 작용하는지 시험해 보았음. 그 결과 예상과 다르게 EMT가 오히려 빠르게 일어났으며, 이러한 결과는 p130Cas에 의한 Smad3 신호 경로 저해 효과보다 p130Cas와 결합하는 다른 신호단백질 Rac, Crk, DOCK180 등의 EMT 유도가 더 강하게 작용하기 때문일 것으로 추측됨. Smad3 신호경로가 TGF- β 1에 의한 EMT 유도에 있어서 필수적임은 이미 알려져 있으나, 해당 연구는 Smad3 knock-out/인산화 불능 돌연변이 조건 또는 TGF- β 1 수용체 불활성화 조건에서 수행된 것임.

본 연구는 암세포/조직 특성에 대한 p130Cas 단백질의 역할을 밝힘으로써 특정 암 질환의 분자생물학적인 메커니즘을 규명하고 치료제 개발 및 진단에 대한 기초지식을 제공하였다.

3. p130Cas-Smad3 상호작용 저해를 표적으로 한 신약 물질 후보 선정

peptide aptamer는 표적 리간드에 높은 친화성을 갖고 결합할 수 있는 oligopeptide를 가리키며, 이를 이용한 신약 개발 및 기초연구가 활발하게 일어나고 있음. 특히 신호단백질간 결합을 저해하는 데 있어서 기존의 knockdown 또는 화학물질에 비하여 특이적인 상호작용만을 억제할 수 있는 장점이 있어서 앞으로의 응용에 더욱 기대가 모아지고 있음.

본 연구팀의 기존연구에 따르면 p130Cas의 HLH domain이 Smad3와 상호작용하는 주요 부위임. 본 연구팀이 2004년도 JBC에 보고한 바에 따르면, p130Cas의 HLH 도메인은 E2A 전사인자 단백질군과 상동성이 매우 높으며 이 부위를 통하여 E2A 전사인자들 - Id2, E47, E12 - 등과 상호작용함을 밝혀낸 바 있다. 상동성이 높은 결합부위의 서열을 mammalian 세포주에 안정적으로 발현시켜서 p130Cas-Smad3 상호작용을 경쟁적으로 저해할 수 있는 peptide aptamer를 제조하여 그 효과를 측정하고자 시도중임.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절 추가연구의 필요성

| 연구 목표 | 연구 결과 | 추가 연구 방향 |
|---|--|--|
| 세포주기에서 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1신호가 integrin(세포부착) 신호에 의하여 저해되어 세포주기 진행이 촉진됨. | - integrin α/β subunit type마다 TGF-β1에 대한 특이적 효과 연구 |
| 인테그린과 TGF-β1 신호의 상호작용에서 p130Cas의 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • integrin(세포부착)신호에 의한 TGF-β1신호 억제에 p130Cas가 있어야 가능함. | - p130Cas의 substrate tyrosine 잔기 중 어느 곳의 인산화가 Smad3와의 상호작용을 강화하는지 탐색 |
| p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작과 TGF-β1 활성화에 관한 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • dynamin과 p130Cas의 상호작용 동정 • p130Cas가 dynamin 인산화 억제 | - EGF/Src에 의한 dynamin 인산화를 억제하는 분자적 기작 연구 (Src-dynamin 상호작용 저해 또는 Src 저해 가능성) |
| 암세포의 중간엽성 세포 전환 (EMT) 기작에서 인테그린과 p130Cas의 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • p130Cas단백질 발현량 증가가 EMT 현상을 촉진 • p130Cas의 하위신호단백질에 의한 세포이동성 증가 | <ul style="list-style-type: none"> - TGF-β1에 의한 EMT유발시에 Rac, Crk 등의 활성이 어떠한지 관찰, - Smad신호경로의 저해 강도를 단계별로 조절하면서 EMT 진행에 미치는 영향이 어떠한지 관찰 |
| 암세포에서 p130Cas의 활성화와 TGF-β1 활성화의 상관관계 규명 | <ul style="list-style-type: none"> • 유방암세포주에서 p130Cas발현량과 TGF-β1 경로 활성도가 서로 반비례함. • TGF-β1 활성이 둔화된 암세포에서 p130Cas Knock-down에 의한 민감성 회복 | - 유방암세포주의 TGF-β1민감도 회복이 암세포 특성 (빠른 증식 및 침투 및 전이)에까지 영향이 미치는지 검증 |
| TGF-β1신호를 저해하는 p130Cas의 활성 제어 방법 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • p130Cas과 결합하는단백질의 consensus sequence를 이용한 p130Cas-Smad3저해방법 개발중 | - p130Cas-Smad3 상호작용 저해제의 활성을 in vivo, in vitro 조건에서 조사한 후 생리적활성 연구 |

2절 타연구에의 응용 및 기업화 추진방향

1. 타연구에의 응용

가. p130Cas 단백질의 세포내유입현상 저해 기능 연구

본 연구팀에서 TGF- β 1의 활성저해 메커니즘을 밝히기 위하여 p130Cas단백질과 세포내유입현상과의 관계를 파악하기 위한 실험결과에서 p130Cas 단백질이 세포내유입단백질인 dynamin과 상호작용하며 그 활성을 저해시킬 수 있음을 발견하였다. 또한 dynamin에 의한 세포내유입이 증대하는 EGFR, transferrin receptor 등의 세포내 이동 또한 p130Cas 단백질에 의하여 조절될 수 있음을 본 바 있다. 따라서 p130Cas에 의한 세포내유입이 TGF- β 1 신호 저해기작 뿐 아니라 다른 RTK신호전달 경로와 integrin경로간의 synergistic crosstalk을 설명할 수 있을지 시험해 보고자 한다.

나. p130Cas-Smad3 상호작용 저해 물질 개발 (peptide aptamer)

본 연구팀은 p130Cas-Smad3 상호작용 저해물질로서 peptide aptamer를 제작하여 그 활성을 검증하고자 계획중이다. peptide aptamer가 세포 등에서 발현되어 제 기능을 하려면 scaffold가 되는 tag protein의 선정도 매우 중요하다. 현재는 가장 잘 알려진 Trx (E.coli thioredoxin) 단백질을 scaffold 삼아서 target에 대하여 특이적이며 생리적인 활성을 갖춘 aptamer를 선택하기 위한 연구를 진행중이며, 이러한 배경지식은 다른 신호경로간 crosstalk 및 신호단백질 결합의 저해 연구를 위한 우수한 도구가 될 전망이다.

2. 기업화 추진 방향

본 연구내용의 결과는 응용단계로 넘어가기 위해서는 몇 단계의 추가적인 실험결과들이 필요하다고 생각된다. 첫째, 앞서 밝힌 바와 같이 p130Cas의 TGF- β 1 신호경로 저해를 막을 수 있는 신약 후보물질의 선택 및 효능을 높이기 위한 개선작업이 필요하며, 둘째, 동물모델 수준에서 이러한 저해제의 활성을 검사할 수 있는 시스템을 구축하여야 한다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

▲ 2006년도 Nature review에서 제시한 TGF- β 신호 저해 항암제 후보물질들은 TGF- β 에 의한 암조직의 미세환경을 제어하는데 초점을 두고 있다. 세부적인 작용기작별로 종류를 나누어 보면 ① TGF β -신호전달 경로에 기반한 면역 치료 요법, ② TGF β 수용체 저해제 (small-molecule inhibitors), ③ TGF β -특이적인 수용성 단백질과 중화저해 항체, ④ TGF β 발현 자체를 감소시키는 anti-sense compounds 등으로 구분된다. 이와 같은 신약후보물질의 개발시 계속하여 강조되는 점이 바로 TGF- β 신호경로의 복잡성이며, 결국 이러한 복잡성과 부작용의 가능성을 넘어설 수 있는 맞춤형 신약의 개발은 광범위한 분자 profile 검색기술을 필요로 한다. [2]

▲ p130Cas의 다른 이름은 BCAR1 (breast cancer antiestrogen resistance 1)으로서, 항암제 처리시 암조직에서 그 발현이 증가하거나, 과다발현 또는 과다 인산화 된 경우에 환자의 좋지 않은 예후로 연결될 수 있음이 이미 보고된 바 있다 [25,28].

- p130Cas가 암질환의 진행에 어떠한 기여를 하는지도 많은 연구가 되어 있으며, 최근 항암제에 대항하여 p130Cas가 어떻게 암세포의 증식을 유지시켜 주는지 밝혀졌다. 본 연구논문에 따르면 p130Cas에 의한 암세포 증식의 유지는 EGFR의 활성화와 관계없이 Erk, Akt 경로의 활성화와 연관되어 있고 그렇기 때문에 항 EGFR 약제에 대하여 암이 저항성을 획득할 수 있음을 규명하였다 [29].

- 또한 본 연구팀에서 2000년도~2004년도에 걸쳐서 발표한 논문의 결과에서 세포가 세포외기질에서 분리되면 세포사 경로를 밟게 되며, 그러한 현상의 메커니즘으로서 p130Cas가 caspase3에 의하여 잘리게 되면 c-terminal 쪽의 31kD 조각이 세포사를 더욱 촉진하는 경로로 진행된다는 내용의 연구를 발표한 바 있다. 연구팀은 다양한 종류의 암세포에서 PRL이라는 oncoprotein에 의하여 이러한 세포 탈착후 세포사(anoikis) 경로의 둔감화가 일어나는데, 바로 p130Cas 31kD 조각의 형성을 저해하여 세포사기전을 회피하기 때문으로 설명하고 있다 [30].

- p130Cas 단백질의 상위 신호단백질인 integrin (우측 표 참고)의 암에의 기여 또한 p130Cas의 역할을 간접적으로 보여준다. β_1 , β_3 , α_7 등의 integrin subunit은 그 암세포의 분자적 구성성분에 따라서 암의 진행에 도움이 되거나 오히려 막기도 하는 등의 다양한 역할을 할 수 있다. 특히 암세포의 이동과 혈관 속에서의 생존 및 새로운 조직에서의 colonization 현상에 있어서 β_1 integrin의 기능이 도움을 준다고 알려져서 p130Cas가 이러한 기능의 매개체가 될 가능성이 높은 것으로 사료된다 [35-37].

Table 1 Inducers of Cas phosphorylation

| Receptor/Ligand |
|-------------------------------|
| rPTK ligands |
| EGF |
| FGF |
| IGF-I |
| NGF |
| PDGF |
| GDNF |
| Adhesion receptors |
| β_3 integrin |
| β_1 integrin |
| α_7 integrin |
| ICAM-1, 2, 3 |
| GPCR agonists |
| LPA |
| Bombesin |
| Vasopressin |
| Endothelin |
| SPC |
| Thrombin |
| Angiotensin II |
| Bradykinin |
| Sphingosine 1-phosphate |
| CCK _A |
| Other receptor ligands |
| Growth hormone |
| Urokinase |

제 7 장 참고문헌

1. Pardali, K., and Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1775,21-62.
2. Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6,506-520.
3. Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3,807-821.
4. Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine* 7,1118-1122.
5. Gorelik, L., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165,4773-4777.
6. Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4,E83-90.
7. Schwartz, M.A., and Ginsberg, M.H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4,E65-68.
8. Wakefield, L.M., and Roberts, A.B. (2002). TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12,22-29.
9. Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14,627-644.
10. Blobel, G.A., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342,1350-1358.
11. Assoian, R.K., and Schwartz, M.A. (2001). Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 11,48-53.
12. Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15,565-571.
13. Moro, L., Dolce, L., Cabodi, S., Bergatto, E., Erba, E.B., Smeriglio, M., Turco, E., Retta, S.F., Giuffrida, M.G., Venturino, M., et al. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem* 277,9405-9414.
14. Liu, X., Elia, A.E., Law, S.F., Golemis, E.A., Farley, J., and Wang, T. (2000). A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *The EMBO journal* 19,6759-6769.
15. Lin, H.K., Bergmann, S., and Pandolfi, P.P. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* 431,205-211.
16. Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5,410-421.
17. Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113,685-700.
18. Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews* 10,63-73.
19. Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K., and Cheresch, D.A. (1998). CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *The Journal of cell biology* 140,961-972.
20. Cho, S.Y., and Klemke, R.L. (2000). Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular

matrix. *The Journal of cell biology* 149,223-236.

21. Yeo, M.G., and Song, W.K. (2008). v-Crk regulates membrane dynamics and Rac activation. *Cell adhesion & migration* 2,174-176.
22. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular biology of the cell* 16,1987-2002.
23. Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2,442-454.
24. Hamamura, K., Tsuji, M., Ohkawa, Y., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008). Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1780,513-519.
25. Dorssers, L.C., Grebenchtchikov, N., Brinkman, A., Look, M.P., van Broekhoven, S.P., de Jong, D., Peters, H.A., Portengen, H., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., et al. (2004). The prognostic value of BCAR1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 10,6194-6202.
26. Cabodi, S., Tinnirello, A., Di Stefano, P., Bisaro, B., Ambrosino, E., Castellano, I., Sapino, A., Arisio, R., Cavallo, F., Forni, G., et al. (2006). p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res* 66,4672-4680.
27. Cowell, L.N., Graham, J.D., Bouton, A.H., Clarke, C.L., and O'Neill G, M. (2006). Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway. *Oncogene*.
28. van der Flier, S., Brinkman, A., Look, M.P., Kok, E.M., Meijer-van Gelder, M.E., Klijn, J.G., Dorssers, L.C., and Foekens, J.A. (2000). Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J Natl Cancer Inst* 92,120-127.
29. Ta, H.Q., Thomas, K.S., Schrecengost, R.S., and Bouton, A.H. (2008). A novel association between p130Cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 68,8796-8804.
30. Daouti, S., Li, W.H., Qian, H., Huang, K.S., Holmgren, J., Levin, W., Reik, L., McGady, D.L., Gillespie, P., Perrotta, A., et al. (2008). A selective phosphatase of regenerating liver phosphatase inhibitor suppresses tumor cell anchorage-independent growth by a novel mechanism involving p130Cas cleavage. *Cancer Res* 68,1162-1169.
31. Willis, B.C., and Borok, Z. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *American journal of physiology* 293,L525-534.
32. Crawford, M., Woodman, R., and Ko Ferrigno, P. (2003). Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery. *Briefings in functional genomics & proteomics* 2,72-79.
33. Kim, W., Kook, S., Kim, D.J., Teodorof, C., and Song, W.K. (2004). The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *J Biol Chem* 279,8333-8342.
34. Cui, Q., Lim, S.K., Zhao, B., and Hoffmann, F.M. (2005). Selective inhibition of TGF-beta responsive genes by Smad-interacting peptide aptamers from FoxH1, Lef1 and CBP. *Oncogene* 24,3864-3874.
35. Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285,1028-1032.
36. Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5,816-826.
37. Bouton, A.H., Riggins, R.B., and Bruce-Staskal, P.J. (2001). Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene* 20,6448-6458.

| 연구개발 결과 활용계획서 | | | |
|--|---|------------|--------------|
| 사업명 | 중사업명 | 미래기반기술개발사업 | |
| | 세부사업명 | 신약타겟발굴연구사업 | |
| 과제명 | 세포 인식/부착단백질과 TGF-β1 신호의 상호작용을 이용한 암 제어 연구 | | |
| 연구기관 | 광주과학기술원 | 연구책임자 | 송우근 |
| 총연구기간 | 2006. 05. 01. ~ 2009. 04. 30. (36 개월) | | |
| 총 연구비 (단위 : 천원) | 정부출연금 | 민간부담금 | 합계 |
| | 235,000,000원 | - | 235,000,000원 |
| 기술분야 | | | |
| 참여기업 | | | |
| 공동연구기관 | | | |
| 위탁연구기관 | | | |
| <p style="text-align: center;">특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">첨부 : 연구결과 활용계획서 1부.</p> <p style="text-align: right;">2009 년 6 월 20 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 송 우 근 (인)</p> <p style="text-align: right;">연구기관장 : 선 우 중 호 (직인)</p> <p style="text-align: center;">교육과학기술부장관 귀하</p> | | | |

1. 연구개발 결과(연구종료시점까지)

가. 논문게재 현황

| 게재연도 | 논문명 | 저 자 | | | 학술지명 | Vol. (No.) | 국내외 구분 | SCI 구분 |
|------|---|---------|------|--|----------------------------------|------------|--------|--------|
| | | 주저자 | 교신저자 | 공동저자 | | | | |
| 2006 | Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. | 김성현 | 송우근 | 최현진, 이경우, 홍난형, 성봉환, 최규영, 김선명, 장성호, 엄수현 | GENES TO CELLS | 11 | 국외 | ○ |
| 2007 | Modulation of β -catenin by cyclin-dependent kinase6 in Wnt-stimulated cells. | 박천식 | 송우근 | 이미수, 오혜진, 최규영, 여명구, 전장수 | EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY | 86 | 국외 | ○ |
| 2008 | v-Crk induces Rac-dependent membrane ruffling and cell migration in CAS-deficient embryonic fibroblasts | 성봉환 | 송우근 | 여명구, 오혜진 | MOLECULES AND CELLS | 25 (1) | 국외 | ○ |
| 2008 | Focal adhesion targeting of v-Crk is essential for FAK phosphorylation and cell migration in mouse embryo fibroblasts deficient Src family kinases or p130CAS | 여명구 | 송우근 | 성봉환, 오혜진, 박지용, Marcantonio, Eugene E. | JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY | 214 (3) | 국외 | ○ |
| 2008 | The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in transforming growth factor- β signaling | 김옥, 강용석 | 송우근 | 김진수, 신나영, Hanks, Steven K | MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL | 19 (5) | 국외 | ○ |
| 2008 | v-Crk regulates membrane dynamics and Rac activation | 여명구 | 송우근 | - | Cell Adhesion & Migration | 2 | 국외 | ○ |

나. 특허 출원·등록현황 : 해당없음.

다. 기술료 징수 현황 : 해당없음.

라. 사업화 현황 : 해당없음.

마. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

| 지원 총인원 | 지원 대상 (학위별, 취득자) | | | | 성별 | | 지역별 | | |
|--------|------------------|----|----|----|----|---|-----|----|------|
| | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 대전 | 기타지역 |
| 4 | 2 | 2 | | | 3 | 1 | | | 4 |

- (2) 장·단기 연수지원 성과 : 해당없음.
- (3) 산업기술인력 양성 성과 : 해당없음.
- 바. 국제화/협력 성과 : 해당없음.
- 사. 경제사회 파급효과 : 해당없음.

2. 연구개발 성과 활용현황 (해당항목에(√)표시)

| | | | |
|------------------|----------------------|-----------------|---------------|
| 1. 기업화 () | 2. 기술이전() | 3. 후속연구추진(√) | 4. 타사업에 활용() |
| 5. 선행 및 기초연구 (√) | 6. 기타목적활용(교육,연구) (√) | 7. 활용중단(미활용)() | 8. 기타() |

3. 기술이전 및 연구결과 활용계획 : 해당없음.

4. 기대효과

항암제는 폭발적인 인구 증가와 발암환자 증가로 인해 커다란 성장 가능성을 내포하고 있고, 향후 거대시장으로 발전되어 갈 것으로 예상되고 있기 때문에 암에 대한 근본적인 이해와 분자적 접근을 통한 새로운 치료제 개발은 경제적, 산업적으로 상상할 수 없을 만큼의 기대효과를 가져올 것이다.

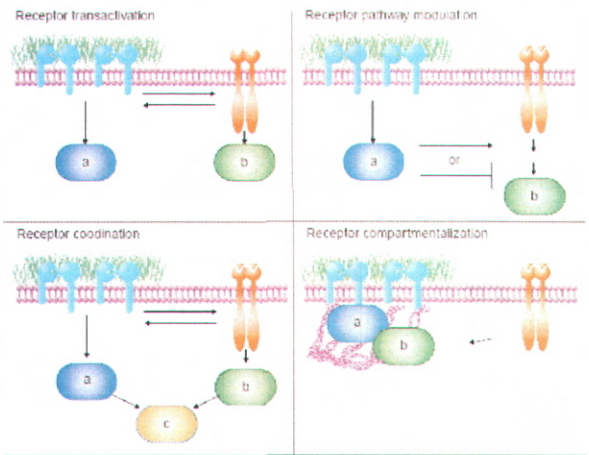
- 기술적 효과 : p130Cas를 표적으로 한 항암제 또는 aptamer 개발로 신기술의 조기확보와 숙련된 연구 인력의 양성을 이룸. 특정 암종에 대하여 특이적으로 작용하는 맞춤형 신약 개발의 단서를 제공.
- 사회·경제적 효과 : 경쟁이 치열한 신약개발 연구 분야에서 관련 질환의 분자메커니즘을 밝히는 선도적인 역할을 수행함.

5. 문제점 및 건의사항 : 없음.

주 의

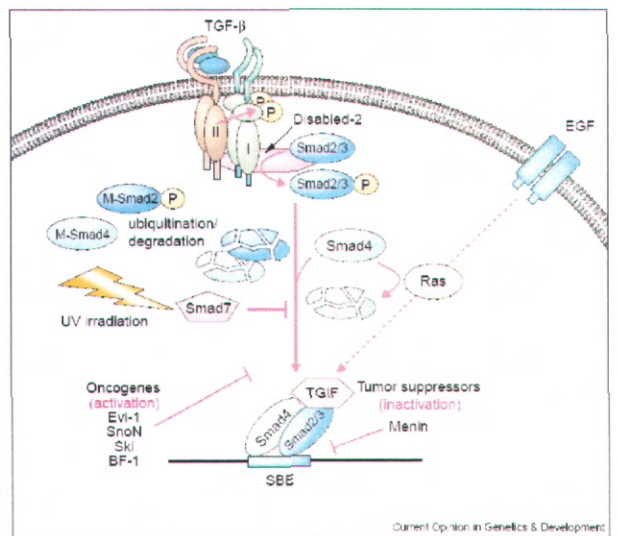
1. 이 보고서는 교육과학기술부 시행한 미래기반기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

니즘에 관하여 많은 연구가 이루어졌다 [6-7]. 그러나 세포주기를 저해하여 암 발생을 억제하는 성장인자인 TGF- β 1에 의한 신호와 integrin사이의 상호작용에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 그러므로 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호 활성화의 분자적 조절 메커니즘을 규명하고 암 발생 및 전이와의 관계를 규명한다면 지금까지 개발되지 않은 새로운 조절인자를 발굴하여 암의 발생 및 전이를 억제하는 신약개발의 새로운 선도물질을 발굴할 수 있을 것이다.



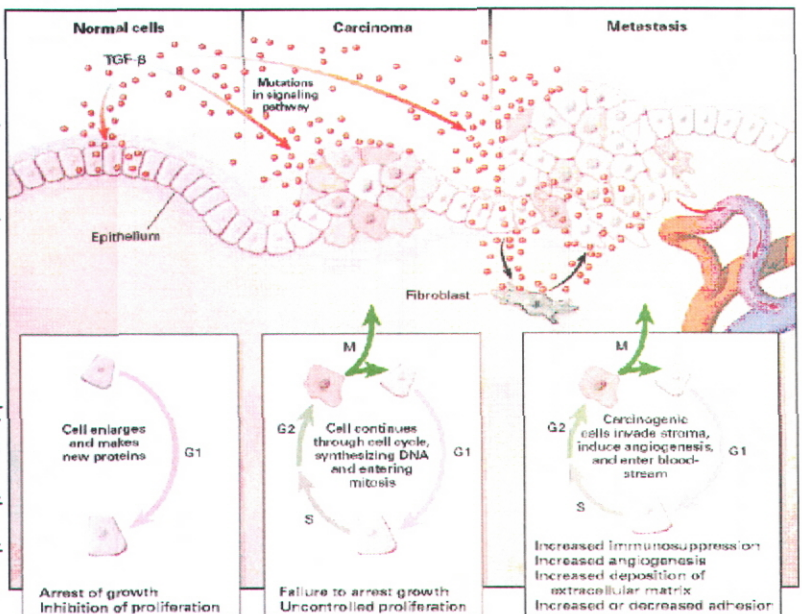
(나) 암 발생단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호의 조절기작

일반적으로 암 발생 초기단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 신호가 활성화되어 암 발생 및 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있는 반면, TGF- β 1에 의한 신호는 암 억제 단백질인 Smad3의 인산화를 유발하여 p15와 p21과 같은 세포주기 저해 단백질들의 발현을 증가시켜 암 발생을 억제한다. 그렇기 때문에 암이 생성되기 위해서는 그림에서 보는 바와 같이 세포내 다양한 분자적 메커니즘에 의하여 TGF- β 1 신호의 활성을 감소시켜야만 한다 [8-9]. 그러므로 세포 인식/부착단백질에 의한 신호가 어느 단계에서 어떻게 TGF- β 1 신호의 활성을 저해하는지를 규명한다면 암 발생을 제어하기 위한 새로운 방법을 제시해 줄 것이다.



(다) 암세포의 전이단계에서 세포 인식/부착단백질에 의한 TGF- β 1 신호의 조절기작

암세포의 전이단계에서는 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호 모두 암세포가 이동성을 갖는 중간엽성 세포로 전환되는 기작 (EMT)을 활성화시킴으로써 암세포의 전이를 촉진시킨다. 국내외 많은 과학자들이 세포 인식/부착단백질과 TGF- β 1 신호의 상호작용을 통하여 EMT가 활성화되어 암세포의 전이를 촉진할 것으로 판단하고 연구하고 있으나 아직까지 정확한 메커니즘이 규명되지 못했다. 이러한 상호작용을 분자적 수준에서 규명한다면 암세포의 전이를 제어할 수 있는 새로운 조절인자를 발굴할 수 있을 것이다 [10].



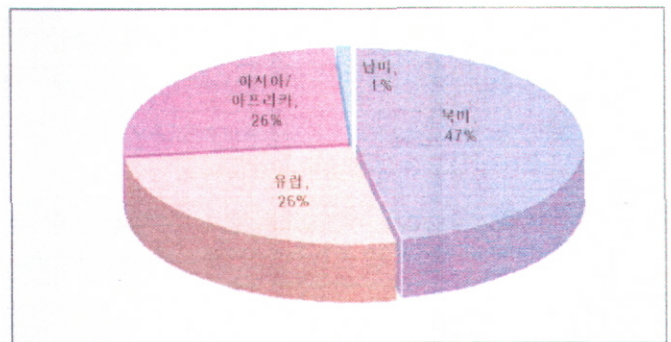
나. 경제. 산업적 측면

노년 인구의 증가 및 환경악화로 인하여 세계 암 발생율은 매년 7~8% 증가하고 있다. 오늘날 다른 주요사망원인인 뇌혈관질환, 심장질환에 의한 사망이 감소하는 동안에도, 암으로 인한 사망은 꾸준히 증가하고 있다. 발암 원인은 여러 종류의 암에서 아직 불분명하지만, 암의 발달과 전이에 대한 분자생물학적인 연구는 신개념의 항암제 및 진단방법을 가능하게 하였다. 그러나 암은 아직도 필요 약물의 개발이 미진한 시장성이 큰 분야로서, 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있으며, 국제적인 제약회사들과 국내의 제약회사들도 항암제 개발 및 판매에 몰두하고 있다. 항암제는 폭발적인 인구 증가와 발암환자 증가로 인해 커다란 성장 가능성을 내포하고 있고, 향후 거대시장으로 발전되어 갈 것으로 예상되고 있기 때문에 암에 대한 근본적인 이해와 분자적 접근을 통한 새로운 치료제 개발은 경제적, 산업적으로 상상할 수 없을 만큼의 기대효과를 가져올 것이다.

(1) 세계 의약품 시장은 연평균 10%의 성장을 하고 있으며 2002년에는 약 4,100억달러 규모의 시장을 형성했고, 이중 항암제 시장은 약 4.4%인 180억달러로 추정되고 있다. 세계 항암제 시장규모는 심순환계 약물이나 중추신경계 약물 등에 비해 작으나, 시장 성장률은 15%로서 의약품 시장 평균 성장률을 능가할 뿐만 아니라 모든 약효군 중에서 가장 높은 성장률을 보이고 있다.

(2) 세계 항암제 시장은 폭발적인 인구 증가와 발암환자 증가로 인해 커다란 성장 가능성을 내포하고 있다. 미국의 조사 컨설팅 회사인 디시전 리소시스는 최근에 중기 항암제 시장 전망(유럽, 미국, 일본 등 주요 7개국 대상)이라는 보고서에서 항암제의 시장규모가 1997년에 이미 80억달러를 넘었으며 2002년 130억달러, 2010년 350억달러로 성장할 것으로 전망하였다. 한편, 항암제는 미국이 가장 큰 시장을 차지하고 있다.

<그림> 세계 항암제 지역별 시장점유율



(3) 우리나라에서 항암제는 약 540개 품목이 허가되어 생산되고 있고, 오리지널제품 기준으로는 130개 정도의 품목이 판매되고 있다. 이중 20여개 품목이 전체 시장의 75-80%의 비중을 차지하고 있다. 시장규모는 2000년 1,300억원, 2003년 1,730억원을 달성하여 연평균 10% 정도의 성장률을 나타내고 있고 2008년에는 2,780억원 정도가 될 것으로 예상되고 있다. 그러나 우리나라의 항암제 시장은 외국계 제약회사들에 의해 주도되고 있으며, 이들 제품은 국내 시장의 75-80% 정도를 점유하고 있다. 따라서, 우리나라의 수입 항암제의 비중도 75-80%의 비중을 차지하고 있는 실정이다 [5].

(4) 세계적인 항암제 개발에는 산학연의 협력 활성화가 필수 불가결한 요소이고 이를 위해서 공통의 연구목표하에 여러 기업, 정부출연 연구소, 대학이 유기적으로 협력할 수 있는 R&D 네트워크와 국가의 효율적이고, 지속적인 연구지원이 요청되고 있다.

<표> 국내 항암제 시장규모

(단위 : 억원)

| 년 도 | 1996년 | 1997년 | 1998년 | 1999년 | 2000년 | 2001년 | 2002년 | 2003년 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 병원처방 기준 | 427 | 460 | 548 | 685 | 900 | - | - | - |
| 병원처방 + 원외처방 | - | - | - | - | 1,300 | 1,430 | 1,450 | 1,730 |

3. 대표적 연구개발결과

가. 1차년도 연구결과

(1) 연구목표 및 내용

| 연구 목표 | 연구 내용 |
|---|---|
| integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 및 p130Cas의 기능 연구 | <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서 integrin의 역할 규명 • p130Cas-Smad3의 상호작용에 의한 Smad3의 인산화와 세포내 위치 분석 • p130Cas의 결핍과 과발현을 통한 TGF-β1에 의한 세포주기 조절기작에서의 역할 규명 • Smad3의 인산화와 활성 조절에 관여하는 p130Cas의 기능부위 탐색 |

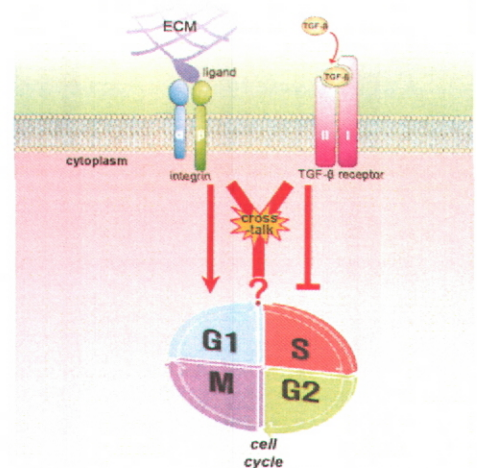
(2) 연구결과 논문발표 현황

| 번호 | 발표 논문 |
|----|--|
| 1 | Interaction of SPIN90 with syndapin is implicated in clathrin-mediated endocytic pathway in fibroblasts. <i>Genes Cells</i> . 2006 Oct;11(10):1197-1211. |
| 2 | Modulation of b-catenin by cyclin-dependent kinase 6 in Wnt-stimulated cells. <i>Eur J Cell Biol</i> . 2007 Feb;86(2):111-123. |

(3) 주요 연구결과

§ 실험결과 : 세포주기에서 integrin과 TGF-β1 신호의 상호작용 연구

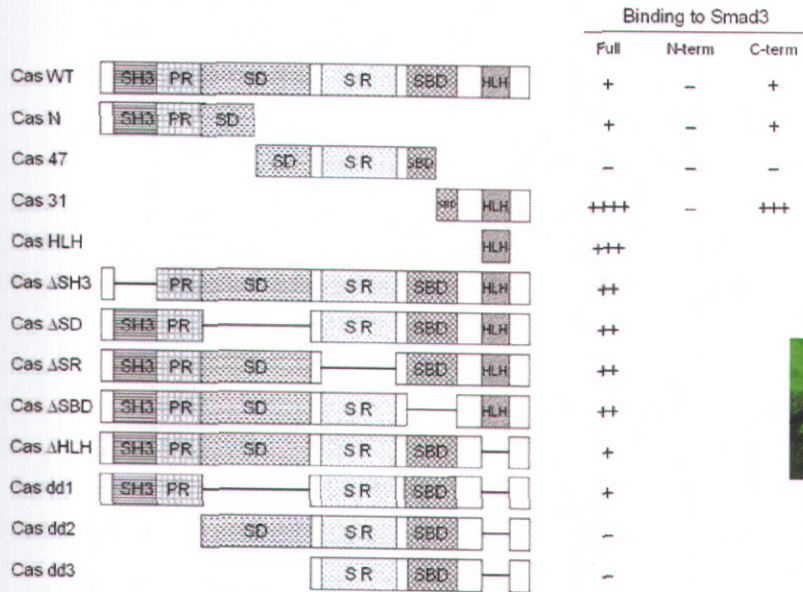
▲ 세포가 세포외기질에 부착되고 이를 인식하였을 때 발생하는 integrin 신호는 세포증식을 촉진시켜 준다고 알려져 있음. 이러한 integrin의 작용은 다른 growth factor 신호경로들과 cross-talk을 하였을 때 더욱 증대된다는 보고도 있었음 [7, 11-13]. 최근 들어 세포의 증식을 억제하는 TGF-β1 신호와 integrin 신호경로의 상호작용에 대한 연구가 누적되기 시작하였으며, 이러한 상호작용을 통한 세포의 다양한 활성 조절이 보고되었음. 이와 관련하여 본 연구실에서는 integrin 신호와 TGF-β1 신호간의 상호작용 및 이로 인한 세포 활성조절기작, 그리고 암세포에서 TGF-β1신호경로를 억제/조절하는 현상에 대한 integrin신호의 연관성 연구를 진행하였음.



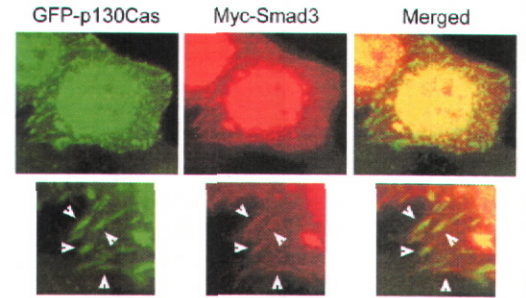
<그림 1. 1차년도 연구 개요도>

▲ 세포를 세포외기질에 부착시켜 integrin 신호를 활성화 한 후 TGF-β1신호경로에 어떠한 영향이 오는지 실험하여 본 결과, TGF-β1에 의하여 유도되는 Smad3의 인산화 및 Smad4와의 상호작용이 모두 저해되었음 (그림 2, 3).

본 결과 그림 8.에 나타난 것과 같았음.

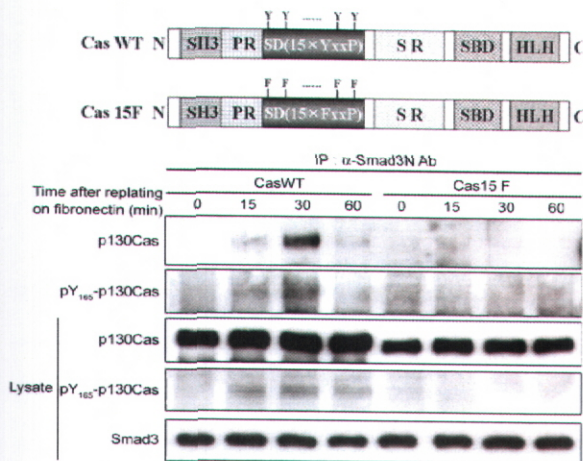


<그림 8. Cas-Smad3 상호작용 domain mapping>

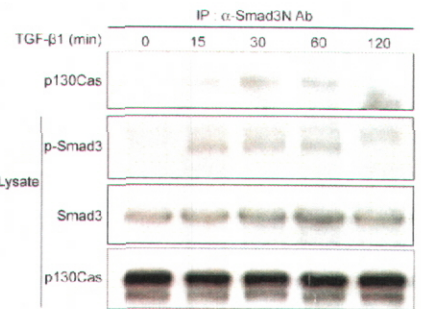


<그림 9. Cas-Smad3 colocalization>

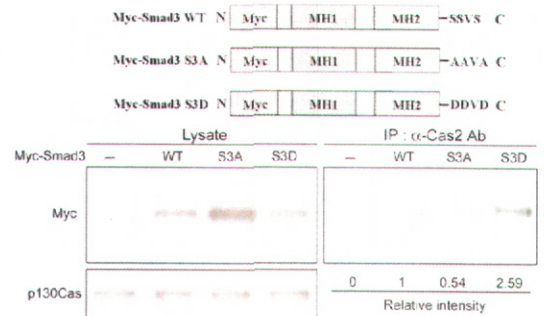
▲ 또한 TGF-β1처리에 의해서 p130Cas-Smad3 상호작용이 증가하며, Smad3의 인산화가 p130Cas에 대한 친화도를 증가시킨다는 것을 밝혀내었음. 세포외기질(fibronectin)의 자극에 의해 p130Cas가 인산화되는 조건에서도 Smad3에 대한 상호작용이 증가함을 증명하였음. 아래 그림에서 Smad3 S3D는 Smad3의 인산화구조를 모방한 돌연변이이며, p130Cas와의 상호작용이 상대적으로 많음을 볼 수 있음. 또한 p130Cas가 integrin신호에 의하여 인산화되는 Tyrosine 잔기가 Phenylalanine으로 치환된 돌연변이는 Smad3와의 상호작용이 상대적으로 훨씬 적게 일어났음.



<그림 11. p130Cas 돌연변이체와 Smad3 상호작용>



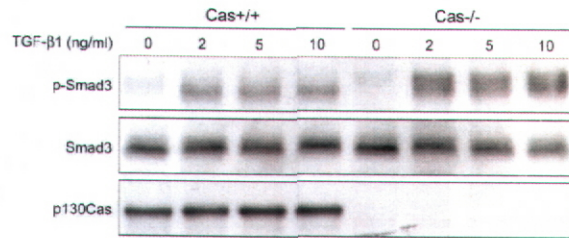
<그림 10. TGF-β1 처리에 따른 상호작용 증가>



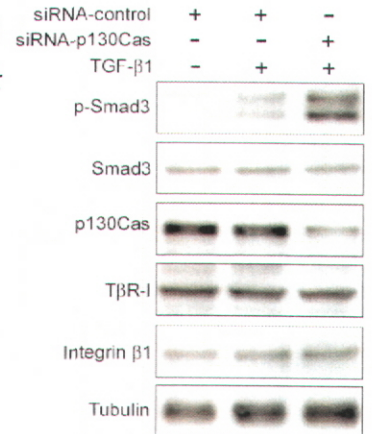
<그림 12. Smad3 돌연변이체와 상호작용>

▲ integrin 신호와 p130Cas가 TGF-β1 신호를 저해한 것이 과연 p130Cas-Smad3 상호작용에 의한 것인지 결정하기 위하여 p130Cas가 결핍/감소된 세포와 wild type 세포에 TGF-β1을 처리하고 비교하여 본 결과, p130Cas가 결핍/감소된 세포에서 인산화된 Smad3가 증가하였음 (그림 13, 14). 또한 Smad3에 의

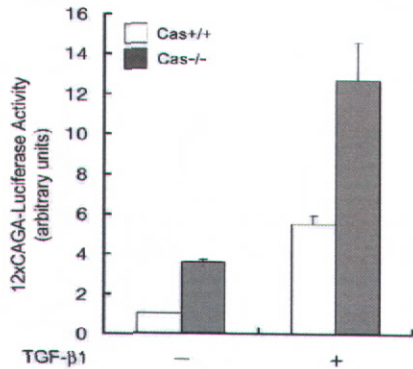
한 전사활성도를 측정하는 reporter gene assay 실험결과(그림 15)에서도 p130Cas가 knock out 되었을 때 TGF-β1에 의한 전사 활성도가 높아짐을 볼 수 있었음. TGF-β1에 의해서 Smad3가 핵으로 유입되는 현상도 p130Cas가 knock out 되었을 때 증가하였음 (그림 16). 이상의 실험결과로서 p130Cas가 TGF-β1에 의한 Smad3의 인산화 및 전사활성을 억제하는 것을 알 수 있었음.



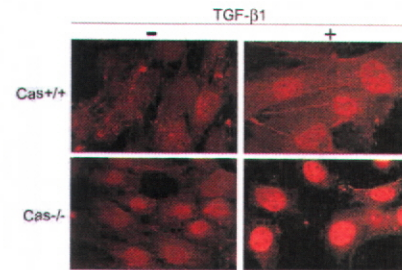
<그림 13. p130Cas에 의한 Smad3 인산화 저해>



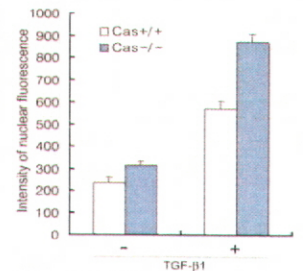
<그림 14. p130Cas발현 저해와 Smad3 인산화도>



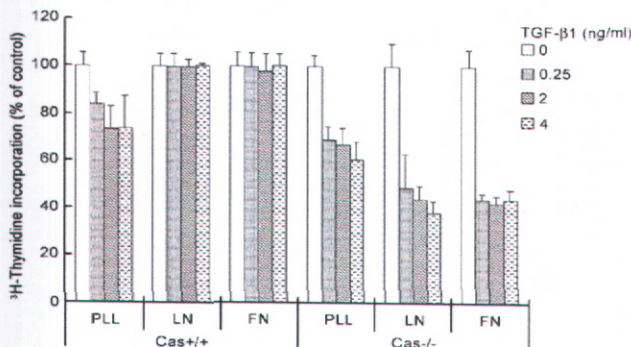
<그림 15. p130Cas와 TGF-β1신호 억제>



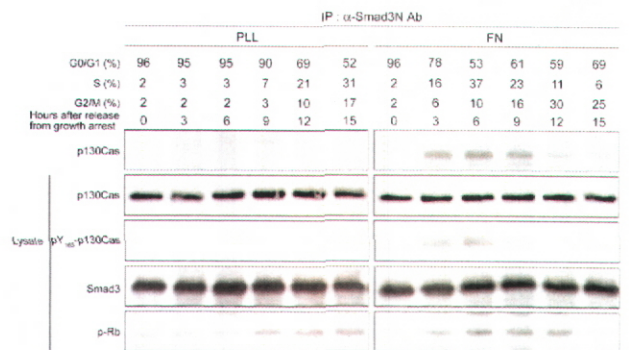
<그림 16. p130Cas에 의한 Smad3 핵이동 감소>



▲ 다음으로 p130Cas가 Smad3단백질의 활성화화를 저해하는 현상이 세포의 증식에 미치는 영향을 조사 하였음. p130Cas Knock out 세포로 3H-Thymidine incorporation assay를 하여 본 결과 p130Cas가 TGF-β1 신호를 억제함으로써 세포의 증식을 촉진한다는 것을 규명하였음. 또한 면역침전법 및 FACS 실험 결과로서 fibronectin 처리 시에 p130Cas의 인산화가 증가하고 동시에 p130Cas-Smad3의 상호작용이 증가하는 현상을 볼 수 있었으며 반면 poly-L-lysine에 세포를 부착시켜 integrin 신호를 주지 않은 경우 p130Cas의 인산화 및 p130Cas-Smad3의 상호작용이 크게 감소하였고 세포주기의 진행도 훨씬 더디게 일어났음을 보았음. 이러한 실험결과는 integrin 신호를 받은 p130Cas가 Smad3 활성을 억제하고 세포증식을 촉진함을 시사함.



<그림 17. p130Cas와 ECM자극에 의한 TGF-β1신호 저해, 그림 4.와 중복>



<그림 18. 세포주기와 Smad3-p130Cas 결합>

(3) 주요 연구결과

§ 실험결과 : p130Cas에 의한 세포내 유입현상 조절기작 및 TGF-β1 활성화에 관한 연구

■ Published

저자 : Wook Kim et al.

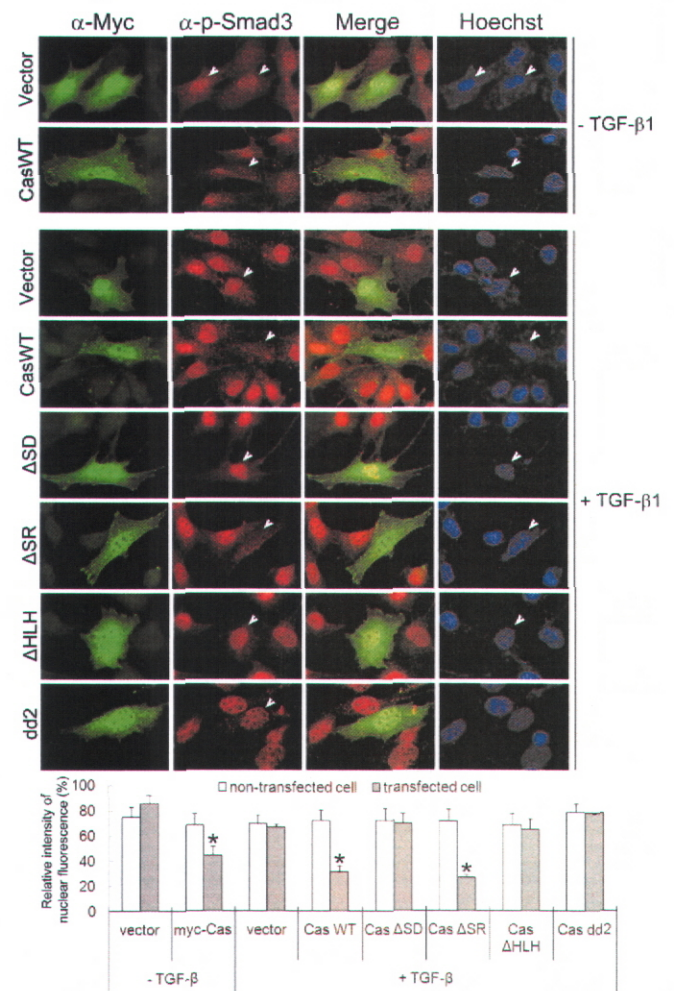
제목 : The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in TGF-β signaling.

논문 : Molecular Biology of the Cell, (2008) 19, 2135-2146

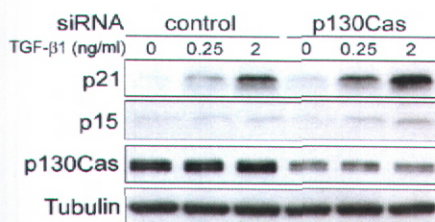
▲ 1차연도의 연구내용에서, p130Cas와 TGF-β1 신호전달 단백질인 Smad3가 어떤 도메인에서 상호작용하는지 맵핑을 시도하여 (그림8), p130Cas의 Helix-loop-Helix 도메인이 Smad3와의 상호작용 시에 크게 기여함을 발견함.

▲ p130Cas가 Smad3의 활성화(인산화 후 핵으로 이동)를 저해하는 기능적인 도메인을 검색하기 위하여, p130Cas KO 세포주에 wild type p130Cas 및 domain 삭제 돌연변이를 발현시킨 후, 핵 내로 이동한 Smad3를 phospho-Smad3 항체로 염색하여 TGF-β1신호의 활성도를 비교하였음. 그림 20. 하단의 그래프에 나타나 있듯이 substrate domain과 Helix-loop-Helix 부위가 삭제된 돌연변이 p130Cas를 발현하는 세포에서는 p130Cas wild type이 발현된 세포에서와는 달리 핵내로 이동한 Smad3 양이 변화하지 않았음. 즉, Smad3의 활성화를 저해하는 기능적 domain이 substrate domain 및 Helix-loop-Helix domain임을 밝힘.

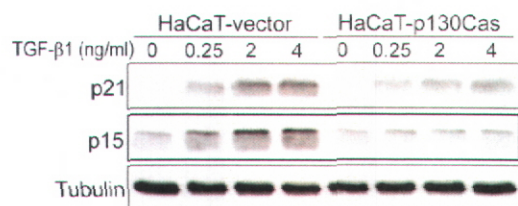
▲ p130Cas와 Smad3가 상호작용하면 Smad3의 인산화 및 전사활성도가 저해됨을 규명함. 또한 두 단백질간 상호작용은 TGF-β1 신호 또는 인테그린-ECM부착신호에 의하여 증가하며, TGF-β1에 의하여 발현이 증가하는 p15, p21등의 CDK inhibitor 들의 발현이 FN 등의 ECM 자극 또는 p130Cas 단백질의 발현량과 부적의 상관관계를 보였음 (그림 21, 22).



<그림 20. p130Cas의 기능적 도메인 검색>

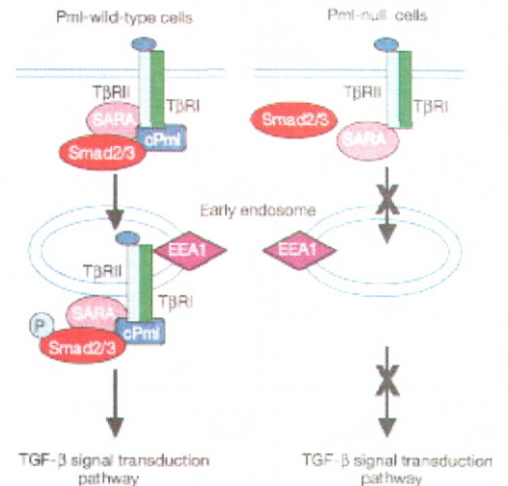


<그림 21. p130Cas에 의한 p15/21 발현 저해>

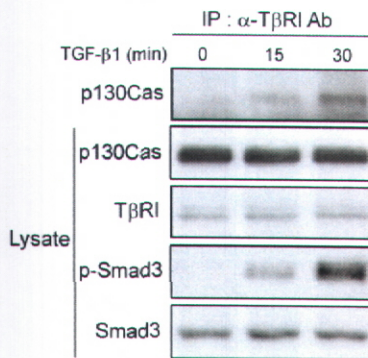


<그림 22. p130Cas에 의한 p15/21 발현 저해>

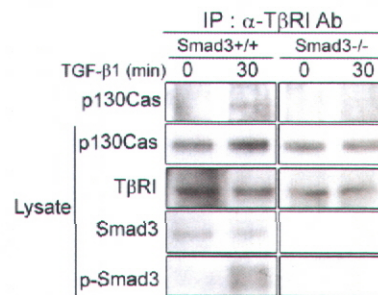
▲ 위 연구결과를 바탕으로, p130cas가 Smad3의 인산화를 저해하는 구체적인 메커니즘 및 기능적 도메인에 대한 연구를 진행하였음. p130Cas와 상호작용하는 TGF- β 1 신호전달 단백질을 추가로 찾기 위하여 SARA, cPML, TGF- β 1 receptor type I/II (그림 23. [15]) 등의 단백질을 대상으로 상호면역침전법 (co-immunoprecipitation) 실험을 수행하였음. 그림 24.에 나타난 것과 같이, TGF- β 1 receptor type I (T β RI)과 p130Cas가 상호작용하였으며 그 상호작용은 TGF- β 1처리시 증가하였음. 다만 이 상호작용이 Smad3 KO 세포주에서는 상실되는 것으로 보아, Smad3에 의하여 증대되는, 간접적인 것으로 보임 (그림 25.). 위 실험결과에 근거하여 p130Cas에 의한 Smad3의 활성 저해는 T β RI과 Smad3의 complex 형성에 p130Cas가 영향을 주기 때문임이 규명되었음.



<그림 23. TGF- β 1 수용체의 세포내 유입>



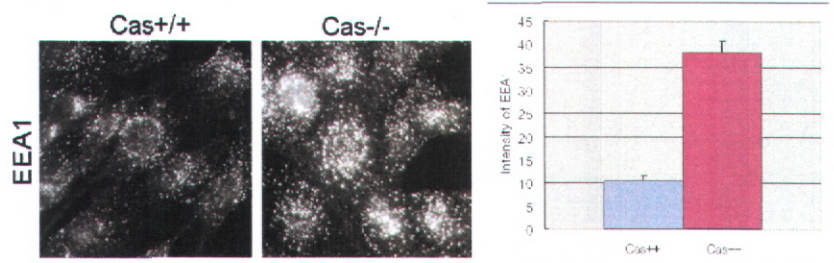
<그림 24. T β RI과 p130Cas의 상호작용>



<그림 25. Smad3에 의한 T β RI과 p130Cas의 상호작용>

▲ TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)신호경로는 TGF- β 1 ligand와 수용체간의 결합에 의해서 시작되며, 수용체의 serine kinase activity는 Smad3라는 전사인자를 인산화하여 세포핵까지 신호를 전달하게 됨 [15-17]. 이 때, 이미 다른 receptor tyrosine kinase들과 마찬가지로 TGF- β 1 수용체도 EEA1에 의하여 endosome 형태로 세포내에 유입되었을 때에 보다 더 신호전달이 활발하게 일어나게 된다고 알려져 있으며, 그 유입경로의 조절자가 돌연변이를 일으켜서 세포내 유입이 저해되면 TGF- β 1 신호도 낮아짐을 볼 수 있었음.

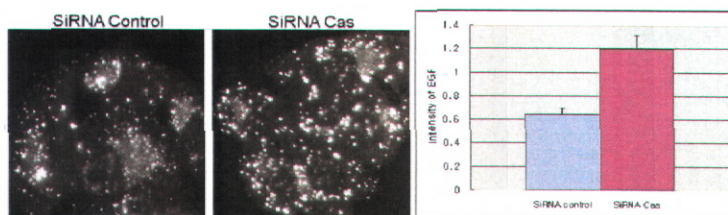
▲ p130Cas에 의한 TGF- β 1 신호의 저해가 TGF- β 1 수용체의 세포내 유입현상을 저해함으로써 이루어지는지 조사함. 먼저, EEA1에 의한 endosome의 형성과 p130Cas의 발현량과의 상관관계를 조사하기 위하여, 그림 26.에서 보는 바와 같이 p130Cas Knockout cell과 wild type 세포로 EEA1 면역염색을 실시하고 형광현미경 촬영후 분석프로그램 (MetaMorph Offline)으로 endosome 크기, 개수등을 정량하였음. p130Cas이 Knockout되었을 때에 훨씬 더 많은 endosome이 형성됨을 볼 수 있음.



<그림 26. Cas Knockout과 endosome 형성 변화>

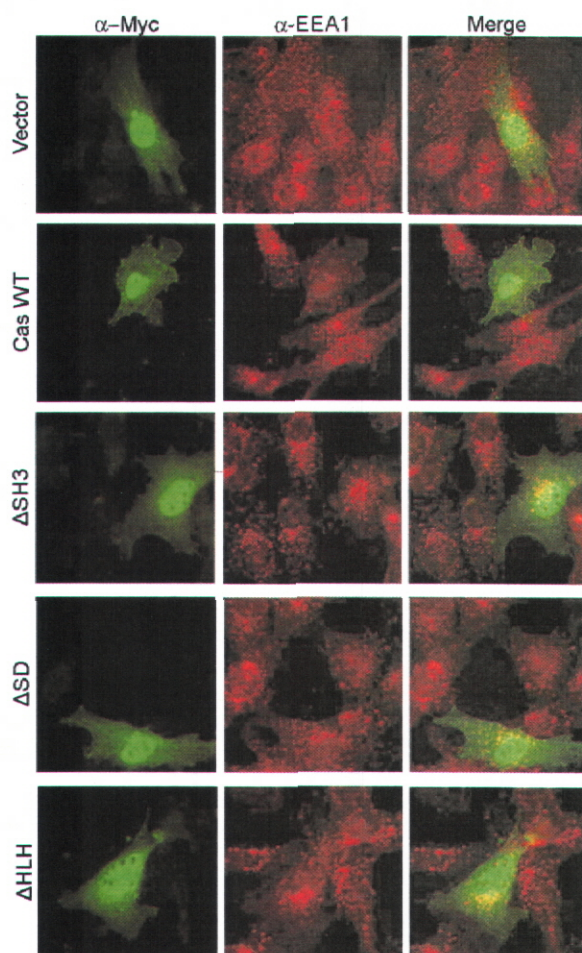
그림 26.에서 보는 바와 같이 p130Cas Knockout cell과 wild type 세포로 EEA1 면역염색을 실시하고 형광현미경 촬영후 분석프로그램 (MetaMorph Offline)으로 endosome 크기, 개수등을 정량하였음. p130Cas이 Knockout되었을 때에 훨씬 더 많은 endosome이 형성됨을 볼 수 있음.

▲ TRITC가 연결된 EGF를 처리하여, endosome 형성 정도를 관찰할 수 있음. p130Cas을 knockdown시킨 경우 endosome 형성 개수가 증가하였으며, 이는 위의 결과와 마찬가지로 endosome 형성과 p130Cas의 발현량은 부적 상관관계임을 보여주고 있음. (그림 27).



<그림 27. Cas Knock down과 endosome 형성 변화>

▲ p130Cas의 어느 domain이 EEA1-endosome 형성을 저해하는 기능적 역할을 담당하는지 살펴보기 위하여, 단독 또는 2개 이상의 domain이 삭제된 돌연변이 p130Cas를 p130Cas KO 세포에 transfection 한 후 EEA1-endosome 형성을 관찰하였음. 그 결과 (그림 28), 돌연변이 p130Cas의 경우는 전부 EEA1-endosome 개수/크기에 변화를 주지 못하였음.



<그림 28. Cas deletion 돌연변이 발현과 endosome 형성>

§ 실험결과 : 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 I

■ Published

저자 : Yeo et al.

제목 : Focal Adhesion Targeting of v-Crk Is Essential for FAK Phosphorylation and Cell Migration in Mouse Embryo Fibroblasts Deficient Src Family Kinases or p130CAS.

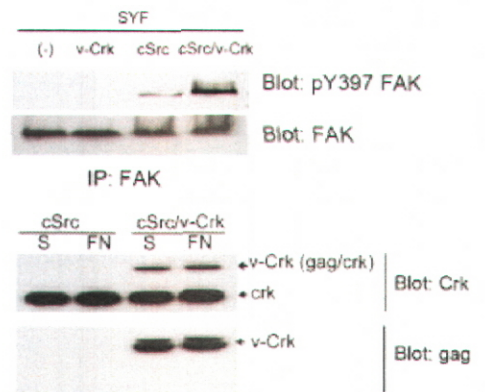
논문 : Journal of Cellular Physiology, (2008) 214, 604-613

▲ 세포의 이동은 세포골격의 재배열 및 세포-세포외기질 과정을 포함하며, 배발생, 상처의 재생, 면역반응, 암의 전이 등에 기여함 [18]. p130Cas는 인테그린에 의한 세포부착신호를 전달 받아 Crk, Rac 등의 하위신호경로를 활성화시킨다고 보고되어 있음 [19-20].

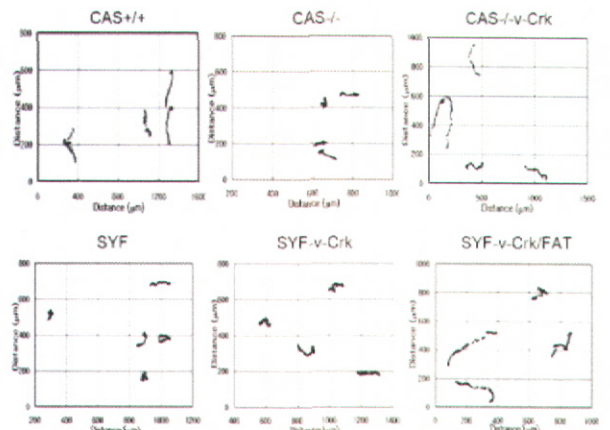
▲ Crk는 p130Cas의 하위 신호전달 단백질로서, p130Cas가 인산화되면 결합하여 신호를 전달, 증폭하게 됨. v-Crk는 virus의 gag와 c-Crk의 SH2, SH3 domain이 연결된 형태를 갖고 있으며, Cellular Crk와 달리 kinase domain이 없지만 실험결과 FAK의 인산화를 증가시키고 (그림 29) 세포의 이동을 촉진할 수 있는 것을 발견하였음. 또한 p130Cas Knockout 세포는 wild type에 비하여 이동성이 현저히 낮는데, v-Crk를 발현시켜 주면 그 이동성이 회복되었음 (그림 30).

▲ Src kinase가 knockout된 세포도 이동성이 현저히 낮으며 v-Crk의 발현만으로는 이동성이 회복되지는 않았으나, focal adhesion으로 targeting되는 domain을 가진 v-Crk를 발현시킨 경우는 이동성이 회복되었음 (그림 30).

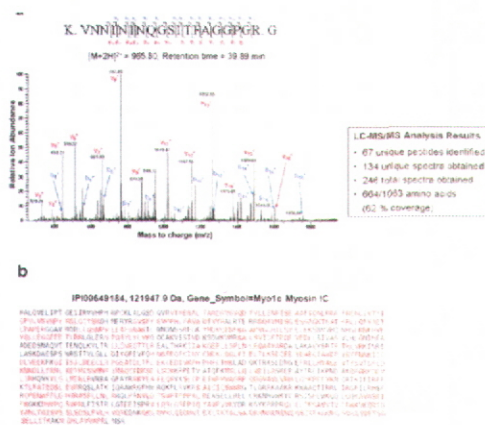
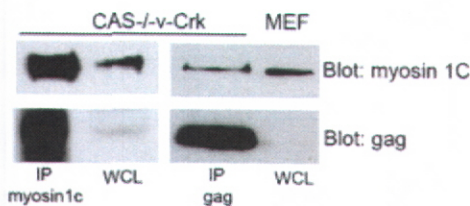
▲ 이처럼 v-Crk에 의해서 세포의 이동성이 증가할 때에는 기존에 알려지지 않은 binding partner가 있음을 발견하고, LC-MS/MS 분석을 통하여 myosin 1C 단백질을 밝혔음. 또한 myosin 1C에 대한 항체를 세포에 micro-injection하였을 때, v-Crk에 의한 Cas KO 세포의 이동성 회복이 저해됨을 발견하였음 (그림 31).



<그림 29. v-Crk에 의한 FAK 인산화>



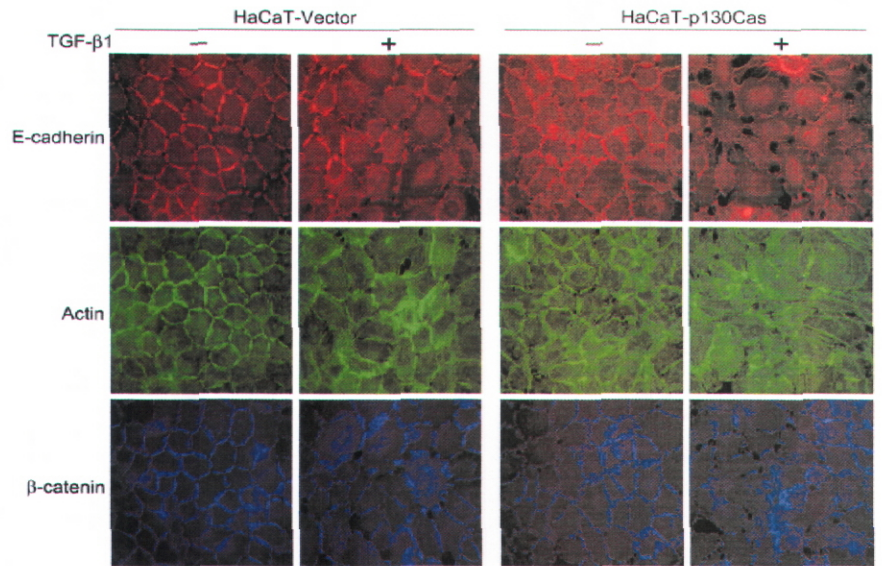
<그림 30. v-Crk에 의한 세포이동성의 회복>



<그림 31. v-Crk와 상호작용 하는 Myosin 1C의 동정>

§ 실험결과 : 세포의 이동, 침윤 및 중간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) 기작에서의 p130Cas 기능 연구 III

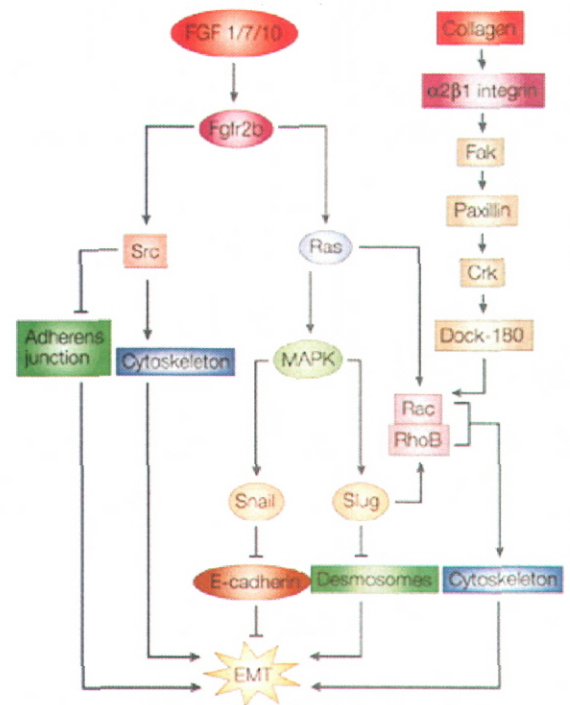
▲ TGF-β1신호는 세포의 탈분화 기작인 간엽성 세포 전환 (Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)을 유발하여, 암화가 진행중인 세포가 전이할 수 있는 이동성을 제공해 줌 [22]. 선행연구에서 p130Cas에 의하여 TGF-β1신호가 저해되는 것을 바탕으로, 세포의 EMT를 유발하는 과정에서는 p130Cas가 어떠한 작용을 할지 실험해 보았음. 그 결과, 그림 34.에서 볼 수 있듯이 p130Cas가 stable하게 발현된



<그림 34. p130Cas 발현과 EMT와의 관계>

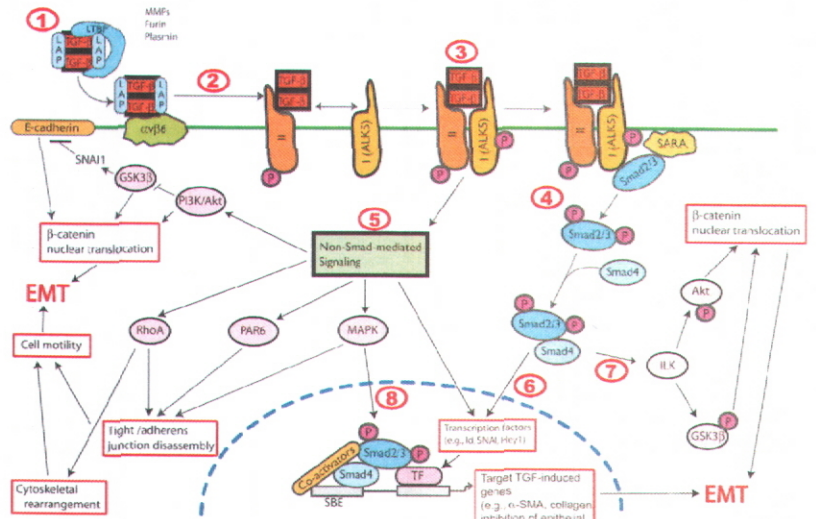
HaCaT 세포에서 TGF-β1에 의한 EMT가 더 빠르게 일어남을 볼 수 있음. E-Cadherin이 세포막 주위에 더 빠르게 사라졌으며, actin cytoskeleton의 형태도 보다 더 변형되었고, β-catenin에 의한 세포경계도 HaCaT-Cas에서 더 불분명해졌음을 볼 수 있음.

▲ p130cas가 TGF-β1 신호를 억제한다면, TGF-β1에 의한 EMT역시 저해할 것이라 예상하였으나 그림 33.의 결과는 그러한 예상과 상반된 결과임. 이러한 결과가 나온 이유는 추측컨대 EMT를 유발한다고 보고된 FAK-(p130Cas)-Crk-DOCK180 신호경로(그림 35, [23])가 HaCaT-Cas 세포에서 더 활발히 일어나서, p130Cas가 TGF-β1신호를 저해하는 효과보다는 오히려 EMT를 촉진하였기 때문으로 생각됨.



<그림 35. EMT 신호전달 경로. [22]>

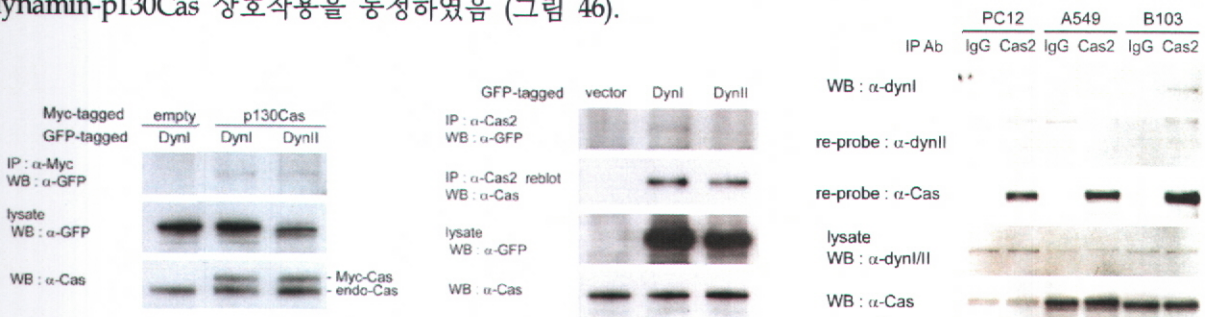
있음 [31]. 특히, Smad3 Knock out 조건이나 인산화효소 불능 수용체등을 과발현 시킨 경우 EMT 진행이 막히거나 저해되었음. 따라서 p130Cas 단백질이 Smad3신호를 저해함에도 불구하고 오히려 EMT를 촉진시킬 수 있는 이유는 ① Smad3에 대한 저해능이 아주 크지 않은 대신, ② 그림 34에 나온 바와 같이 Rac, DOCK180 등 인테그린 하부신호의 EMT 유발 신호 전달이 더 강해지기 때문으로 짐작할 수 있음.



<그림 45. TGF-β1에 의한 EMT 유발 신호 전달>

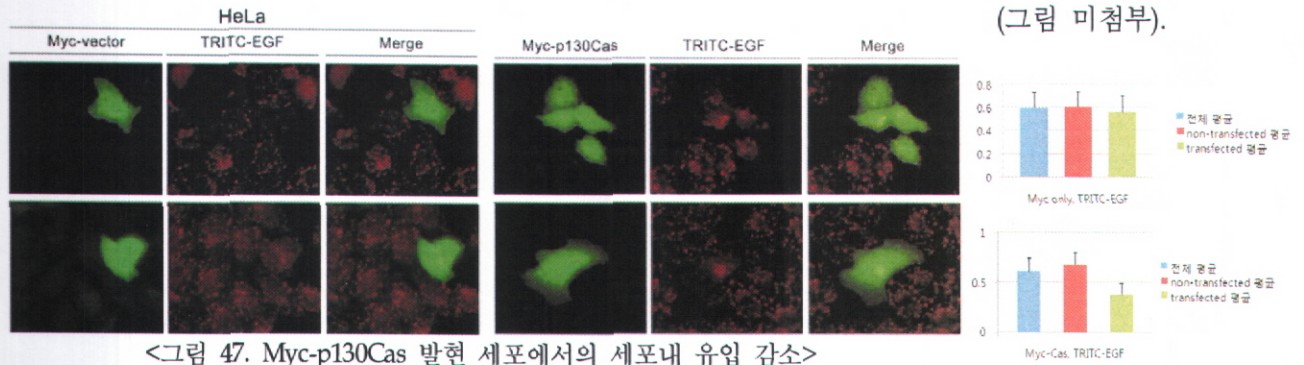
§ 실험결과 : TGF-β1 수용체의 세포내유입과 p130Cas 연관성 조사

▲ 2차년도 연구를 통하여 TGF-β1신호를 저해하는 p130Cas 기능이, TGF-β1 수용체의 세포내 유입과 연관되어 있음을 발견하였음. p130Cas에 의하여 막수용체 단백질의 세포내 유입이 저해되는 분자적 기작을 조사하기 위하여 다양한 세포내유입 소포체 형성 단백질들을 검색하였으며, 그 결과 dynamin-p130Cas 상호작용을 동정하였음 (그림 46).



<그림 46. exogenous/endogenous interaction between p130Cas and dynamin>

▲ 막 수용체의 세포내유입을 조사하는 가장 일반적인 방법인 EGF-TRITC, Transferrin uptake assay 등을 수행하여 과연 p130Cas 발현량과 세포내유입이 상관관계를 조사하였음. 그 결과 p130Cas 발현이 높을수록 세포내유입이 감소하였고 (그림 47) p130Cas 발현을 줄이면 반대로 세포내 유입이 증가하였음 (그림 미첨부).



<그림 47. Myc-p130Cas 발현 세포에서의 세포내 유입 감소>