

인간유전체기능연구
Functional Analysis of Human Genome

위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 기능 연구
Functional mechanism of RhoGDI2 in gastric cancer metastasis

경상대학교

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 기능 연구에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2010 . 05 .

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 유지윤

연 구 원 : 조희준

” : 백경은

” : 박선미

” : 김인규

” : 남인구

보고서 초록

과제관리번호	FG09-21-12	해당단계 연구기간	2006.09.01 - 2010.03.31	단계 구분	(3) / (3)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 기능 연구			
연구책임자	유지윤	해당단계 참여연구원수	총 : 26 명 내부 : 명 외부 : 26 명	해당단계 연구비	정부: 330,000 천원 기업: 천원 계: 330,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 생명과학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	37
<p>본 연구의 최종목표는 위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 작용 기작을 규명하는 것이었으며, 연구 과정동안 RhoGDI2가 위암의 전이뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다는 것을 확인하여 그 작용 기작을 규명하고자 하였다.</p> <p>본 연구의 결과는 다음의 6가지로 요약할 수 있다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증: RhoGDI2에 의한 위암 전이 촉진 능력을 in vitro와 in vivo 실험을 통해 검증하였다. 2) RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인: RhoGDI2에 의한 Rac1 하위 신호 전달 과정이 중요하다는 것을 확인하였다. 3) 위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인: RhoGDI2 유전자의 발현에 transcription factor인 AP-1의 중요성을 확인하였다. 4) RhoGDI2의 하위 target 유전자의 기능 규명: RhoGDI2의 하위 target으로서 VEGF-C의 중요성을 확인하였다. 5) RhoGDI2에 의한 암세포의 전이를 억제할 수 있는 약물 탐색: RhoGDI2에 의한 위암의 전이과정에 중요한 NF-kB activity를 억제하는 천연물을 탐색하였다. 6) RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명: RhoGDI2의 발현에 의해 여러 가지 항암제에 대한 내성이 유발되는 기작을 규명하였다. <p>위와 같이 본 연구의 세부 연구목표를 100% 달성하였다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	위암, 전이, 항암제 내성, RhoGDI2, 신호전달,			
	영어	Gastric cancer, Metastasis, Drug resistance, RhoGDI2, Signal transduction			

요 약 문

I. 제 목

위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 기능 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종목표는 위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 작용 기작을 규명하는 것이었으며, 연구 과정동안 RhoGDI2가 위암의 전이뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다는 것을 확인하여 그 작용 기작을 규명하고자 하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 세부 내용은 다음의 6가지로 요약할 수 있다.

- 1) RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증
- 2) RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인
- 3) 위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인
- 4) RhoGDI2의 하위 target 유전자의 기능 규명
- 5) RhoGDI2에 의한 암세포의 전이를 억제할 수 있는 약물 탐색
- 6) RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명

IV. 연구개발결과

본 연구의 결과는 다음의 6가지로 요약할 수 있다.

- 1) RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증: RhoGDI2에 의한 위암 전이 촉진 능력을 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 통해 검증하였다.
- 2) RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인: RhoGDI2에 의한 Rac1 하위 신호 전달 과정이 중요하다는 것을 확인하였다.
- 3) 위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인: RhoGDI2 유전자의 발현에 transcription factor인 AP-1의 중요성을 확인하였다.
- 4) RhoGDI2의 하위 target 유전자의 기능 규명: RhoGDI2의 하위 target으로서 VEGF-C의 중요성을 확인하였다.
- 5) RhoGDI2에 의한 암세포의 전이를 억제할 수 있는 약물 탐색: RhoGDI2에 의한 위암의 전이과정에 중요한 NF- κ B activity를 억제하는 천연물을 탐색하였다.
- 6) RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명: RhoGDI2의 발현에 의해 여러

가지 항암제에 대한 내성이 유발되는 기작을 규명하였다.

위와 같이 본 연구의 세부 연구목표를 100% 달성하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구의 결과 RhoGDI2가 위암세포의 전이를 촉진시킬 뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다는 것을 확인하였다. 하지만 아직 RhoGDI2가 다른 종류의 암에서 위암과는 상반된 결과를 보이는 이유와, RhoGDI2가 어떠한 기작으로 Rac1을 activation 시키는지, 또한 Rac1 이외의 다른 신호 전달 과정이 RhoGDI2에 의한 위암의 전이와 항암제 내성과정에서 관여하는지 등에 관한 연구가 이루어지지 못하였다. 또한 하위 target으로도 VEGF-C 이외의 여러 가지 유전자들의 발현이 RhoGDI2에 의해 변화됨을 확인하였는데, 이 유전자들 가운데 RhoGDI2에 의한 위암세포의 전이와 항암제 내성에 관여하는 유전자들을 검증하는 연구가 추가로 수행되어야 할 것이다.

향후 이러한 연구들이 마무리되어 RhoGDI2에 의한 위암세포의 전이와 항암제 내성 유발 기작이 더 자세히 규명되고 위암세포의 전이와 항암제에 대한 내성을 억제하는 치료제 개발의 target으로서의 유용성이 확인되면, 이후에는 유전자 치료제를 전문으로 연구하고 개발하는 산업체와의 연계를 통해 응용연구로 이어질 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

Gastric cancer is declining in incidence, but it remains the second most common cancer in the world and ranks second in terms of global cancer-related mortality. Although chemotherapy is commonly used for this type of cancer, the prognosis of advanced gastric cancer is still poor and treatment is usually unsuccessful. Cisplatin is a common anti-tumor agent that is used to treat various cancers. The initial tumor response to cisplatin treatment is robust however, the treatment efficacy decreases as the duration and number of therapy cycles increases. Resistance is acquired rapidly, contributing to therapy failure. However, the mechanisms by which cells develop resistance to cisplatin are not fully understood.

The biological activities of Rho GTPases, which control a wide range of signaling pathways that regulate a variety of biological processes, are controlled through a tightly regulated GDP/GTP cycle, which is stimulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and terminated by GTPase-activating proteins (GAPs). An additional level of regulation is provided by Rho GDP dissociation inhibitors (RhoGDIs). RhoGDIs were originally identified as negative regulator of Rho GTPases because they bind the majority of Rho GTPases in the cytoplasm, maintaining Rho in an inactive form in which it cannot interact with effector target proteins. On the other hand, recent reports suggest that RhoGDIs may also act as positive regulator of Rho GTPases because they are also associated with active forms of Rho, Rac, and Cdc42. This interaction results in an inhibition of the intrinsic and GTPase-activating protein-stimulated GTPase activities of the Rho GTPases, maintaining Rho in an active form.

Three human RhoGDIs have been identified thus far: RhoGDI1 (also referred to as RhoGDI or RhoGDI- α), RhoGDI2 (Ly-GDI or D4GDI or RhoGDI- β), and RhoGDI3 (RhoGDI- γ). RhoGDI2 is preferentially expressed in hematopoietic cells, RhoGDI3 is expressed in the brain, lungs, kidneys, testes, and pancreas, and RhoGDI1 is ubiquitously expressed in all mammalian organs. RhoGDI1 has been known to bind to and regulate most of the Rho GTPases, including RhoA, Rac and Cdc42. However, RhoGDI2 appears to have a narrow selectivity and lower binding affinity for Rho GTPases. RhoGDI2 associates with Rac1

and Rac3 in breast cancer cells, but not with RhoA, Cdc42, and RhoC, and negatively regulates their activities. On the other hand, RhoGDI2 was also described as an activator of Rac1 in human bladder cancer cells. Thus, RhoGDI2 may regulate cellular function by interacting primarily with Rac GTPase.

Several reports have assessed the expression levels of RhoGDI2 in a variety of cancer cells, revealing opposite patterns depending on the tumor type. For instance, RhoGDI2 expression has been shown to be inversely correlated with invasive capacity in bladder cancer cell lines. Furthermore, the reduced expression of the RhoGDI2 protein has been associated with a poor prognosis of patients with advanced bladder cancer. In contrast, the mRNA level of RhoGDI2 has been known to be significantly higher in ovarian adenocarcinoma than in benign adenoma. Consistent with this, RhoGDI2 is overexpressed in human breast cancer cell lines and increases cancer cell invasion and motility *in vitro*. We also recently showed that RhoGDI2 expression is positively correlated with tumor progression and metastasis potential in gastric cancer.

There are many reports showing the function of RhoGDI2 in tumor growth and malignant progression in many cancer types, however, the role of RhoGDI2 in resistance to genotoxic anticancer reagents has not been defined yet. In this study, we provide the first evidence to our knowledge that RhoGDI2 contributes to the resistance of gastric cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. Functional characterization of RhoGDI2 reveals its dual functions in promoting chemoresistance and metastasis of gastric cancer cells.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	----- 9
Chapter 2. State of Arts	----- 13
Chapter 3. Results	----- 15
Chapter 4. Achievement of Final Goal	----- 30
Chapter 5. Plans for Practical Uses	----- 33
Chapter 6. Global Science and Technology Information	----- 34
Chapter 7. References	----- 35

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	----- 9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	----- 13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	----- 15
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	----- 30
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	----- 33
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	----- 34
제 7 장 참고문헌	----- 35

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 한국인 위암의 연구배경

인간 게놈의 연구 성과와 유전자 기능의 해독으로 가장 괄목할 만한 연구 성과를 거둘 것이라고 예견되는 연구는 암의 진단 및 치료에 관한 연구이다. 암의 치료와 관련하여서는 그 동안 많은 연구를 통하여 외과적 수술, 항암화학 및 방사선 치료 등 다양한 치료방법이 개발되었고, 분자생물학적인 방법을 도입하여 치료 방법의 개선 및 암의 발생과 재발을 방지할 수 있는 방법을 개발하고 있으나 아직도 많은 연구가 필요함은 주지의 사실이다. 특히 한국인 암 발생의 수위를 점하고 있는 위암은 남자의 경우 전체 암 발생자중 약 25% 정도를 차지하며 여자의 경우 18%를 차지하고 있어 전체적으로 10명의 암 환자 중 2명이 위암 환자인 셈이다. 위암의 발병원인으로 만성위염, 장이형성, 식이요인, *Helicobacter pylori*의 감염, 기타 환경적 요인 등이 지목되고 있으나, 아직 이렇다 할 증거는 없는 실정이다. 위암은 다른 장기의 암에 비해 조직학적으로 다양하고, 서로 다른 조직학적 모양이 한 종양 내에 섞여서 나타나는 특징이 있다. 이 때문에 위암의 조직학적 분류가 제시되었음에도 불구하고 임상적 특성을 잘 나타내는 조직학적 분류법은 없는 실정이다. 이러한 특징도 위암의 치료와 진단의 걸림돌이 되고 있다. 위암의 경우 우리나라의 암 발생의 1위를 차지하는 질환이지만 국외적으로 이에 대한 연구는 아직 미진한데 그 이유는 미국을 비롯한 선진국에서는 발병률이 비교적 낮아 이에 대한 연구가 상대적으로 적기 때문이다.

제 2 절 암 전이 연구의 필요성

암의 진행은 크게 개시 (initiation), 촉진 (promotion), 전이 (metastasis)의 3 단계로 나뉜다. 초기 단계의 암은 외과적 절제와 방사선 치료 및 항암 화학요법 치료제를 이용하면 치료 성공률이 높으나 전이 단계에 들어가면 다양한 치료 방법을 동원해도 치료 효과와 생존율은 현저히 떨어진다. 지금까지 수행된 많은 연구결과에 의하면 암의 전이에는 여러 유전자가 관여된다는 것을 알 수 있으며, 암의 종류에 따라서도 많은 차이가 있다는 것을 알게 되었다. 전이 단계에 들어간 암의 진단과 치료를 위해서는 전이 관련 유전자와 이 유전자들의 작용에 중요한 영향을 끼치는 유전자들을 탐색하는 것이 필요하며, 이들 유전자의 작용기작에 대한 이해를 높이기 위한 연구가 다각적으로 필요하다. 암의 전이는 아주 복잡한 과정을 거쳐서 일어나는 암세포만의 특성으로서 아직까지 이를 해결할 만한 생물학적 특성이나 유전적 특성이 밝혀진 바는 없다. 현재까지 암의 전이에 필요한 생물학적 현상으로는 주변 조직을 침범해서 자라야 하는 능력과 전이된 곳에서 생존을 위해 혈관을 형성하는 것이 특이한 현상으로 알려져 있으며 이는 특수한 유전적 변화에 의한 것이라고 믿어진다. 그러나 이와 같은 두 가지의 특성만으로 전이는 결코 성공하지 못할 것이기 때문에 전이가 어떤 유전적 사건으로 시작되어 주변조직의 파괴와 침범, 혈관침범, 타 장기로의 침범과 침범한 곳에서 신생혈관을 유도하여 지속적인 성장을 하는가를

체계적으로 규명하여야 할 것이다. 암의 발생과 전이 과정동안 일어난 유전적 변화들은 여러 종류의 신호 전달 네트워크를 통하여 유기적으로 연결되어 있으며, 세포나 조직은 이 네트워크들의 종합적 상태를 인지하여 총체적으로 모든 신호들에 대하여 반응하여 각각의 운명을 결정하게 될 것이다. 암의 전이를 위해서는 이 과정들이 서로 연관되어 상호 작용하여야 하며 이들의 일괄적인 통제 체제가 존재할 것이다. 그러므로 이들 신호 전달망의 구성 인자들 중에서 암의 전이에 영향을 미치는 인자들을 탐색하고 동정하여 이들의 정확한 작용 기작을 생화학적, 분자생물학적으로 규명하는 노력은 암 전이의 기전 규명과 전이 억제 치료법 개발의 근간이 될 것으로 기대된다.

제 3 절 항암제 내성 연구의 필요성

암은 현재 국내에서 사망원인 1위를 차지하는 질병으로 향후 환경문제, 수명의 연장, 식문화의 서구화 등으로 암환자의 발생은 더욱 증가할 것으로 예상되어지고 있다. 암을 치료하는 방법은 크게 외과적 수술, 방사선 치료 및 약물치료의 세 가지가 있다. 각 방법은 암 치료를 위해 독자적으로 사용될 수도 있고 두 가지 이상의 방법이 함께 사용될 수도 있다. 많은 경우 초기단계의 암은 외과적 수술로 치료가 가능하지만, 암이 많이 진행되었거나 전이가 일어난 경우에는 외과적 수술만으로는 치료가 어렵고 다른 방법을 함께 사용해야 한다. 방사선 요법은 x-ray나 γ -ray를 암세포에 조사하는 것으로 이때 광선은 외부에서 조사하거나 투여한 방사성 물질에서부터 나오게 된다. 방사선 요법은 외과적 수술이 곤란한 부위나 방사선에 특히 반응성이 좋은 암의 치료에 사용되는데, 약물치료와 병행하거나, 외과적 수술 전후에 사용될 수도 있다. 약물요법은 항암제를 경구나 주사로 투여하여, 암세포의 증식에 필요한 DNA나 관련 enzyme을 파괴하거나 억제하는 방법이다. 약물요법이 방사선 치료나 외과적 수술에 비해 나은 점은 어떤 부위에 생긴 암이라도 약물이 도달할 수 있고 전이된 암을 치료할 수 있다는 점으로, 약물요법은 전이성 암 치료에 표준요법으로 사용되고 있다. 물론 약물요법으로 전이된 암을 완치시킬 수 있는 것은 아니지만 증상을 완화시켜 환자의 삶의 질을 개선시키고 수명을 연장시켜주는 중요한 역할을 한다. 최근 10년 동안 생명과학분야는 눈부신 발전을 하고 있어서 암을 치료할 수 있는 가능성과 희망을 높여주고 있다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 항암제는 크게 화학요법제와 생물요법제로 분류할 수 있다 (표 1). 화학요법제는 암세포의 각종 대사경로에서 주로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나, 핵산 전구체의 합성을 방해하고 세포분열을 저해함으로써 항암활성, 즉 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 약제를 총칭한다. 화학요법제로는 핵산알킬화제, 대사길항제, 항생제, 식물유래 알칼로이드 같은 천연물 및 호르몬제 등이 있다.

생물요법제는 우리 몸이 원래 가지고 있는 면역 기능을 회복시키거나 증가시켜 암세포의 활동력을 약화시킴으로 암의 진행을 막는 것을 치료적 근거로 삼고 있다. 본래 우리 몸은 면역 기능이 제대로 가동될 경우 암세포들을 효과적으로 사멸시킬 수 있으나, 그렇지 않은 경우는 암세포가 쉽게 증식하거나 혹은 다른 병원균들이 쉽게 공격을 가할 수 있게 된다. 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등은 일시적으로 정상세포 균에도 큰 해를

주어 면역기능을 떨어뜨릴 수 있으므로, 생물요법제가 그와 같은 단점을 보완하기 위해 다른 치료법들과 함께 사용되기도 한다. 현재 사용되거나 개발되고 있는 생물요법제로는 인터루킨, 인터페론 같은 사이토카인, 단일항체와 같은 재조합항체, 유전자치료제, 신생혈관형성 억제제 등이 있다.

표 1. 항암제의 분류

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

현재 암 치료에 사용되고 있는 항암제의 대부분은 화학요법제로, 이들은 암의 완치보다는 증상완화의 방법으로 사용되고 있어서 암의 증상과 증후를 일시적으로 제거해주고 수명을 연장시켜주는 수준이다. 비록 항암제가 상당히 발전해 왔음은 분명하지만, 여러 가지 부작용과 항암제 내성 등의 문제점을 가지고 있다.

화학요법제는 세포독성 약물로서, 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 가지고 있다. 따라서 정상세포같은 원하지 않는 부분에 악영향을 끼치는 부작용을 나타낸다. 정상세포보다 왕성하게 증식하는 암세포에 보다 많은 독성을 보이는 것이 사실이지만, 인체 내에는 새로운 세포의 증식이 왕성하게 일어나는 부분이 있어서 이들에 미치는 부작용이 심각하다. 세포의 증식이 활발히 일어나는 골수, 모낭, 위장관 내피세포 등은 화학요법제의 영향을 많이 받기 때문에, 약물치료를 받는 환자들은 골수에서 만들어지는 면역에 관계되는 세포들에 대한 부작용이 크다. 면역에 관계된 백혈구의 감소, 혈액응고에 관련된 적혈구, 백혈구 및 혈소판의 감소 등으로 세균감염, 자연출혈, 탈모, 메스꺼움 및 구토 등의 부작용을 겪게 된다.

화학요법제의 또 다른 문제점으로는 항암제에 대한 내성이다. 항암제에 대한 내성은 항암 약물치료를 할 때 처음에는 항암효과를 나타내었다가 점차 효과가 줄어드는 현상으로 결국 치료에 실패하는 가장 중요한 요인이 되기도 한다. 특히 어떤 한 종류의 약물치료를

받다가, 이와는 다른 화학구조나 작용기전의 약물에 대해서도 내성을 나타내는 다약제 내성 문제는 항암제 개발에서 중요하게 고려해야 할 점으로 꼽히고 있다. 지금까지 암에 대한 많은 연구가 계속되고 있음에도 불구하고 암 자체의 다양성 및 발병기전의 다양화로 인해 부작용이 적고 내성을 극복할 수 있는 새로운 항암제의 개발은 여전히 필요하고 이에 따라 새로운 항암제들이 계속해서 출시되고 있다. 새로운 항암제의 개발에 있어 고려해야 할 가장 필수적인 요소는 기존 항암제에 대한 내성기작과 다르거나 기존 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있는 물질의 개발이다. 이를 위해서는 먼저 여러 가지 항암제에 대한 암세포의 내성 기작의 규명이 선행되어야 하며, 이를 토대로 내성극복의 방법이 모색되어야 한다.

제 4 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2의 작용 기작을 규명하는 것이었으며, 연구 과정동안 RhoGDI2가 위암의 전이뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다는 것을 확인하여 그 작용 기작을 규명하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 암의 전이과정에서 Rho signal의 역할에 대한 국내외 연구현황

Rho signal pathway는 세포의 골격 구조와 세포의 이동성을 조절하는 대표적인 신호 전달 과정이다. 암의 전이과정에는 세포가 이동성을 갖는 것이 필수적이며, 세포가 이동성을 갖기 위해서는 많은 종류의 세포 골격 단백질의 역할이 중요하므로 Rho signal은 암의 발전 단계 중 특히 암의 전이에 관여할 것으로 예측되어 왔으며, 실제로도 전이가 일어난 암환자의 조직에서 Rho signal이 activation되어 있다는 많은 보고들이 있다. Rho family 단백질들은 GDP/GTP와 결합하는 분자량 21-25 kDa의 단백질 (small G protein)로 Rho, Rac, cdc42등이 있으며, Ras와 같이 GTPase의 효소 활성을 갖는다. Rho family 단백질은 세포질에서 GDP와 결합하고 있을 때에는 불활성인 상태이고, 세포막에서 GTP와 결합하였을 때 활성을 갖게 되며, 다양한 effector 단백질들과 결합하여 신호를 전달한다. Rho family 단백질은 여러 종류의 GDP/GTP 교환 단백질에 의해 그 활성이 조절되는데 대표적인 예로는 GTP의 결합을 유도하여 Rho 단백질을 활성화 시키는 Guanine nucleotide exchange factors (GEFs)와 GTP의 가수분해를 촉진시켜 Rho 단백질을 불활성화 시키는 GTPase-activating proteins (GAPs)이 있다. Rho family 단백질은 다양한 종류의 암에서 그 발현이 증가되어 있는 것이 발견 되면서 향후 항암제 개발의 유용한 target이 될 것이라고 생각되어 지고 있다. 하지만, 아직까지 Rho family 단백질의 직접적인 변이에 의해 암이 발생한다는 증거는 제시되지 않고 있고, 여러 가지 GDP/GTP 교환 단백질의 변이가 암의 발생과 전이에 영향을 미칠 것이라는 보고가 많이 나오고 있어 이들 GDP/GTP 교환 단백질들의 기능에 대한 연구가 필요한 상황이다. 또한 여러 종류의 암에서 GDP/GTP 교환 단백질들의 기능과 역할이 상반된 결과들이 나오면서 각각의 암에서 specific한 이들의 역할에 대한 연구가 요구되고 있다.

제 2 절 항암제 내성에 관한 국내외 연구현황

항암제에 대한 연구가 과거부터 지속되어 왔음에도 불구하고 암 자체의 다양성 및 발병 기전의 다양화로 인해 부작용이 적고 내성을 극복할 수 있는 새로운 항암제의 개발은 여전히 필요하고 새로운 항암제들이 계속해서 출시되고 있다. 또한 식습관, 환경의 변화 및 수명연장으로 인해 암으로 인한 사망률은 10년 전과 비교해 볼 때 매우 급격히 증가하고 있다. 세계 항암제의 시장규모는 2000년 148억 달러, 2005년 267억 달러, 2010년 350억 달러로 성장하면서 연평균 9%의 성장률을 나타낼 것으로 전망되고 있다 (영국의 IMS Health Incorporated와 미국의 business communications). 국내의 경우 2002년 1,450억 원이었으며, 2003년 2,090억 원, 2008년 2,780억 원 정도가 될 것으로 예상되고 있다 (약업신문). 지속적으로 증가하는 항암제 시장은 향후 거대시장으로 발전되어 갈 것으로 예상되고 있고 국제적인 메이저 제약회사들과 국내의 규모가 큰 제약회사들도 모두 항암제 개발 및 판매에 몰두하고 있다. 그러나 우리나라의 항암제 시장은 마케팅 능력이 우수하

고 풍부한 임상데이터를 갖고 있는 외국계 제약회사들에 의해 주도되고 있으며, 이들의 제품은 국내 시장의 75 ~ 80% 정도를 점유하고 있다.

항암제 내성에 관한 연구를 위해서는 먼저 항암제 내성과 관련된 유전자를 탐색하는 연구가 선행되어야 한다. 이를 위해 국외의 여러 기관에서는 항암제 내성을 보이는 세포주나 in vivo model을 확립하고 이로부터 항암제 내성 특이적 유전자를 동정하고 그 기능에 관한 연구를 수행하고 있는데, 항암제 내성 특이적 유전자의 탐색을 위해서는 주로 RNA differential display, Microarray, Proteomics나 Serial analysis of gene expression (SAGE)과 같은 방법들이 사용되고 있으며, 이를 통해 여러 가지 유전자들이 동정되어 기능연구가 수행되고 있다 (표 2).

표 2. 항암제 내성 유전자의 탐색방법 및 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Kyushu University	RNA differential display를 통한 항암제 내성 관련 유전자의 동정 및 기능 연구	Cisplatin 내성 관련 유전자로 T-plastin 동정 후 기능 연구
Massachusetts General Hospital		Taxol 내성 관련 유전자로 TRAG-3 동정 후 기능 연구
Humboldt University		Melanoma 세포에서 4종류 (vindesine, etoposide, fotemustine, cisplatin)의 항암제 내성 관련 유전자 11개 동정 후 기능 연구
University of California	Subtractive hybridization과 Microarray를 통한 항암제 내성 관련 유전자의 동정 및 기능 연구	Cisplatin 내성 관련 유전자 67개 동정 후 기능 연구
Robert Wood Johnson Medical School		Doxorubicin 내성 관련 유전자 동정 후 기능 연구
Massachusetts General Hospital		Taxol 내성 관련 유전자로 interleukin-6, -8, monocyte chemotactic protein I 동정 후 기능 연구
Children's Cancer Institute in Australia	Proteomics를 이용한 항암제 내성 관련 유전자의 동정 및 기능 연구	Vincristine, vinblastin 내성 관련 단백질 10개 동정 후 기능 연구
National Institute on Aging	Serial analysis of gene expression (SAGE)을	Cisplatin 내성 관련 유전자로 Collagen VI 동정 후 기능 연구
Johns Hopkins University School of Medicine	이용한 항암제 내성 관련 유전자의 동정 및 기능 연구	5-fluorouracin (5-FU) 내성 관련 유전자로 FDXR 동정 후 기능 연구

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 RhoGDI2에 의한 위암 전이 촉진 기작 규명

본 연구책임자는 약 200여명의 위암 환자의 정상조직과 위암조직 sample의 display proteomics를 통해 위암에서 선택적으로 발현이 증가되거나 감소되는 단백질을 탐색하였으며, 그 결과 위암조직에서 RhoGDI2라는 단백질의 발현이 증가한다는 것을 확인하였다 (그림 1, A and B). 이후에는 RhoGDI2의 발현이 실제 환자에서 위암의 진행 정도와 관련성이 있는지 확인하기 위해 26명의 환자로부터 외과적 수술을 통해 제거된 위암조직에서 RhoGDI2의 발현을 확인하였다. 그 결과 정상조직이나 초기 위암 환자 (Tumor stage I and II)의 경우 RhoGDI2의 발현을 거의 관찰할 수 없었으나, 후기 위암 환자 (Tumor stage III and IV)의 경우 RhoGDI2의 발현이 아주 높음을 알 수 있었다 (그림 1, C and 표 1). 특이한 사항은 lymphnode로의 전이 정도를 의미하는 N stage가 높을수록 RhoGDI2의 발현 또한 높다는 사실이었다 (표 3). 이러한 결과는 RhoGDI2의 발현이 실제 환자에서 위암의 진행 정도와 밀접한 관련이 있으며 위암의 전이를 촉진시키는 역할을 할 가능성이 높다는 것을 의미하는 것이다.

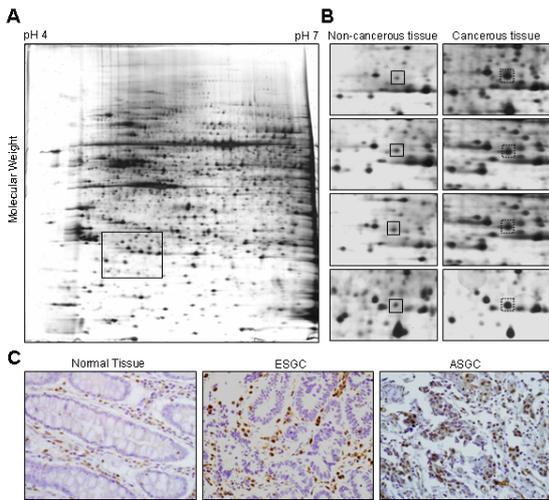


그림 1. 위암 환자 조직에서 RhoGDI2의 발현.

표 3. 위암의 진행 정도와 RhoGDI2 발현의 상관관계.

	No. of cases	RhoGDI2 positive cases (%)	P value*
Tumor stage			
I-II	12	0 (0)	0.016
III-IV	14	8 (57)	
Nodal metastasis			
N0,	6	0 (0)	0.018
N1, N2, N3	20	8 (40)	
Total	26	8 (31)	

* P values < 0.05 were considered to be statistically significant (stages III and IV versus stages I and II; N1, N2 and N3 versus N0).

위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 기능을 확인하고자 먼저 여러 가지 위암 세포주들에서 RhoGDI2의 발현을 확인하였다. 그 결과 특이하게도 RhoGDI2는 여러 가지 위암 세포주들 가운데 전이가 일어난 조직에서 유래한 세포들 (SNU-18, SNU-638)이나 전이 능력이 뛰어난 세포 (MKN-28)에서만 발현되었으며, primary tumor에서 유래한 세포들 (SNU-1, SNU-484, SNU-719)이나 전이 능력이 거의 없는 세포 (MKN-45)에서는 전혀 발현되지 않음을 확인하였다 (그림 2).

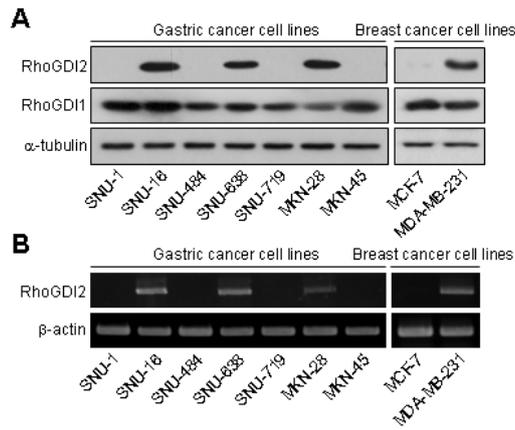


그림 2. 여러 종류의 위암 세포주에서 RhoGDI2의 발현 확인

RhoGDI2의 발현이 위암의 전이 능력 향상에 직접적으로 영향을 미치는지 확인하고자 RhoGDI2가 발현되지 않고 전이 능력이 없는 위암 세포주인 SNU-484와 SNU-719 세포에 RhoGDI2를 발현시킨 후 이들의 *in vitro* invasion 능력을 확인하였다. 그 결과 RhoGDI2가 발현됨에 따라 각 세포의 invasion 능력이 현저히 향상됨을 확인할 수 있었다 (그림 3). 이와는 반대로 RhoGDI2가 발현되는 SNU-638과 MKN-28 세포에 shRNA를 이용하여 RhoGDI2의 발현을 억제하면 각 세포의 invasion 능력이 현저히 억제됨을 확인하였다 (그림 4). 이러한 결과는 RhoGDI2가 위암 세포의 invasion 능력을 증가시켜 *in vivo*에서 위암의 전이를 촉진시킬 가능성이 높음을 의미하는 것이다.

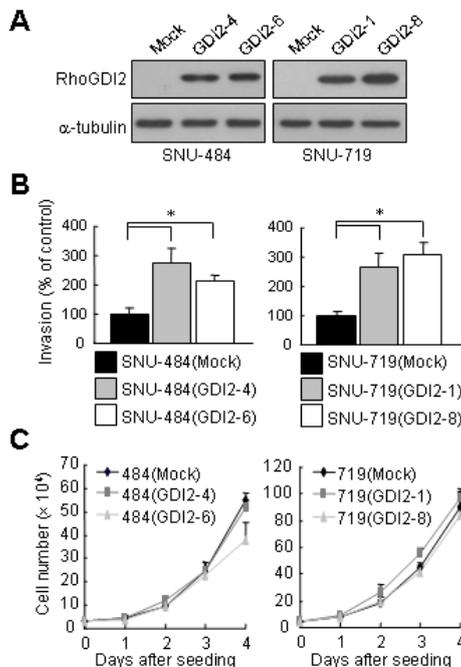


그림 3. RhoGDI2 과발현 세포의 invasion 능력 증가 확인

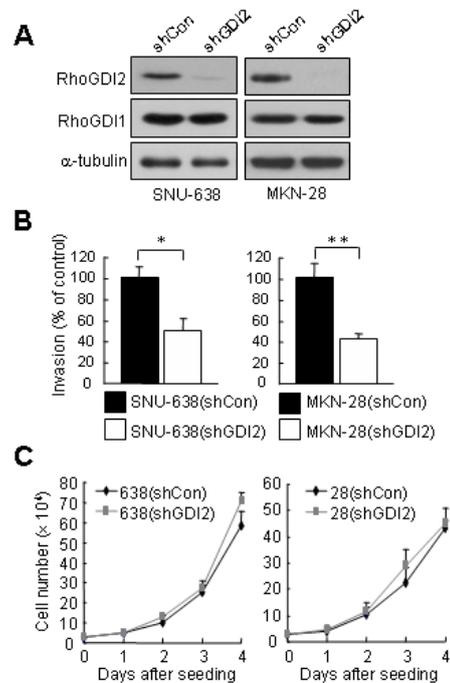


그림 4. RhoGDI2 발현 억제 세포의 invasion 능력 감소 확인

이후에는 RhoGDI2에 의한 위암 전이 촉진 능력을 *in vivo*에서 확인하기 위해 동물실험을 수행하였다. 4주령의 nude mice에 RhoGDI2가 과발현된 SNU-484 세포 (GDI2-4, GDI2-6)와 control SNU-484 세포 (Mock)를 각각 피하주사한 후 5주 동안 암의 크기를 조사한 결과, 첫 3주간에는 큰 차이가 없었으나 그 이후에는 RhoGDI2가 과발현된 세포가 주사된 nude mice에서 약 2배 증가한 암이 생성됨을 확인하였다 (그림 5, A). 또한 RhoGDI2가 과발현된 세포에서 유래한 암 조직에는 control 세포에서 유래한 암 조직에 비해 3배 정도 높은 혈관 생성 (angiogenesis)을 관찰할 수 있었다 (그림 5, B). 이뿐만 아니라 control 세포가 주사된 nude mice에서는 폐로 전이된 암세포를 거의 관찰할 수 없었으나 (8마리 가운데 1마리에서 관찰됨), RhoGDI2가 과발현된 세포가 주사된 nude mice의 경우 8마리 가운데 6마리에서 암세포가 폐로 전이된 것을 관찰할 수 있었으며 metastatic lung nodule도 현저히 증가하였음을 관찰할 수 있었다 (그림 5, C and D). 이러한 모든 결과는 RhoGDI2가 위암의 발생, 혈관 형성 및 전이를 촉진시키는 단백질임을 보여주는 것이다.

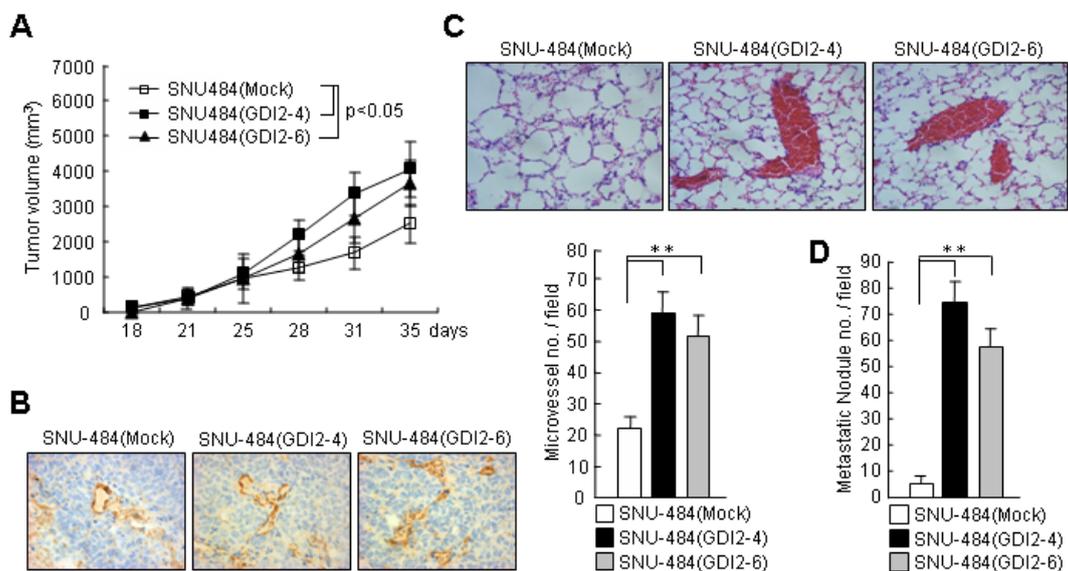


그림 5. RhoGDI2의 과발현에 의한 암의 생성, 혈관 형성 및 전이 촉진 확인

RhoGDI2가 어떠한 유전자들의 발현 변화를 유도하여 위암 세포의 전이를 촉진시키는지 확인하기 위해 RhoGDI2가 발현되지 않는 세포들과 RhoGDI2가 발현되는 세포들에서 서로 다른 발현 양상을 보이는 유전자들을 microarray analysis를 통해 탐색하였다. 그 결과 여러 가지 유전자들의 발현 변화를 관찰할 수 있었는데 (표 2) 특히 여러 종류의 VEGF family member들 가운데 VEGF-C의 발현이 증가함을 볼 수 있었다. 최근의 여러 보고에 의하면 VEGF-C는 암의 전이에 필수적인 lymphangiogenesis를 촉진시킨다고 알려져 있으며, 암세포의 invasion을 증가시켜 전이를 촉진시킬 수 있음이 밝혀져 있다. Microarray analysis 결과를 확인하기 위해 여러 종류의 VEGF와 VEGF receptor의 발현 변화를 RT-PCR로 관찰한 결과 RhoGDI2가 과발현된 세포에서 VEGF-C만이 특이적으로 증가하는 것을 확인하였다 (그림 6, A). 또한 shRNA로 RhoGDI2의 발현을 억제하였을 때 VEGF-C의 발현 또한 감소함을 확인하였고 (그림 6, B), parental 세포에서 RhoGDI2의 발현이 높은 세포에서만 VEGF-C의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다 (그림 6, C).

VEGF-C의 발현이 RhoGDI2에 의한 암세포의 invasion 증가에 필수적인지 확인하기 위해 VEGF-C에 대한 siRNA를 제조하고 그 효과를 확인한 후 (그림 6, D) 암세포의 invasion을 조사한 결과 VEGF-C의 발현을 억제하면 RhoGDI2에 의한 암세포의 invasion이 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 6, E). 이러한 결과는 RhoGDI2에 의한 암세포의 invasion 증가에 VEGF-C의 발현이 필수적임을 의미하는 것이다.

표 2. RhoGDI2에 의해 발현이 조절되는 후보 유전자들

Up-regulated gene by RhoGDI-2	4G4/4P	28Con/28siGDI	Down-regulated gene by RhoGDI-2	4G4/4P	28Con/28siGDI
angiominin	2.8	0.471	visinin-like 1 (VSNL-1)	0.309	3.8
SHC transforming protein 3	3.2	0.364	alpha-Synuclein	0.192	2.1
Calmodulin-like 3	2.5	0.559	Family with sequence similarity 5, member C	0.272	2.5
Tropomyosin 3	3.0	0.384	transmembrane 4 superfamily member 1	0.294	2.2
Neuropilin 2	2.6	0.599	Rho GTPase activating protein 24	0.336	1.8
Mutated in colorectal cancers	4.3	0.697	Endothelin receptor type A	0.337	2.3
Cerebellin 1 precursor	3.1	0.585	Enolase 1, (alpha)	0.386	2.0
Claudin 2	2.2	0.599	Insulin-like growth factor 2	0.257	2.9
Vascular endothelial growth factor C	3.9	0.207	Lactate dehydrogenase A	0.337	2.0
Angiopoietin 1	3.0	0.383	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	0.021	2.6
Regulator of G-protein signalling 5 (RGS5)	7.8	0.378	Neurotensin	0.128	4.7
Serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK)	7.0	0.373	Metastasis suppressor 1 (BRMS1)	0.449	2.6
Poliovirus receptor-related 3 (PRR3)	5.3	0.275	Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8)	0.308	2.4
Regulator of G-protein signalling 4 (RGS4)	6.3	0.406	Tumor protein D52-like 1(Tpd521)	0.395	2.5
lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)	1.9	0.420	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	0.331	2.7
NADH dehydrogenase Fe-S protein 3	2.5	0.425	EPH receptor A4 (EphA4 receptor)	0.300	2.6
Ras-induced senescence 1 (Ris1)	3.1	0.315	Runt-related transcription factor 1	0.402	2.6
Potassium voltage-gated channel member 1	2.3	0.432	WNT inhibitory factor 1	0.262	2.5
Thymidine kinase 1, soluble	2.0	0.445	Layilin	0.229	2.9
Kidney associated antigen 1	2.7	0.242	Transcription elongation factor A (SII)-like 2	0.319	2.8

RhoGDI는 일반적으로 Rho 단백질의 activity를 조절하는 단백질이지만 Rho 뿐만 아니라 같은 family 단백질인 Rac이나 cdc42와도 interaction하여 그들의 activity를 조절할 수 있다고 알려져 있다. RhoGDI2의 발현으로 invasion이 증가한 세포들에서 어떠한 Rho family 단백질이 RhoGDI2와 interaction하는지 확인한 결과 RhoGDI2는 Rac과만 specific하게 interaction하며 Rac1의 activity를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다 (그림 7, A and B). shRNA를 이용하여 RhoGDI2의 발현을 억제하였을 때 Rac1의 activity가 다시 감소하였으며 parental 세포에서 RhoGDI2의 발현이 높은 세포에서만 Rac1의 activity가 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 7, C and D). 또한 Rac1의 activation이 invasion의 증가와 VEGF-C의 발현 증가에 필수적임을 Rac1에 대한 inhibitor (NSC23766)를 이용하여 확인하였다 (그림 7, E and F).

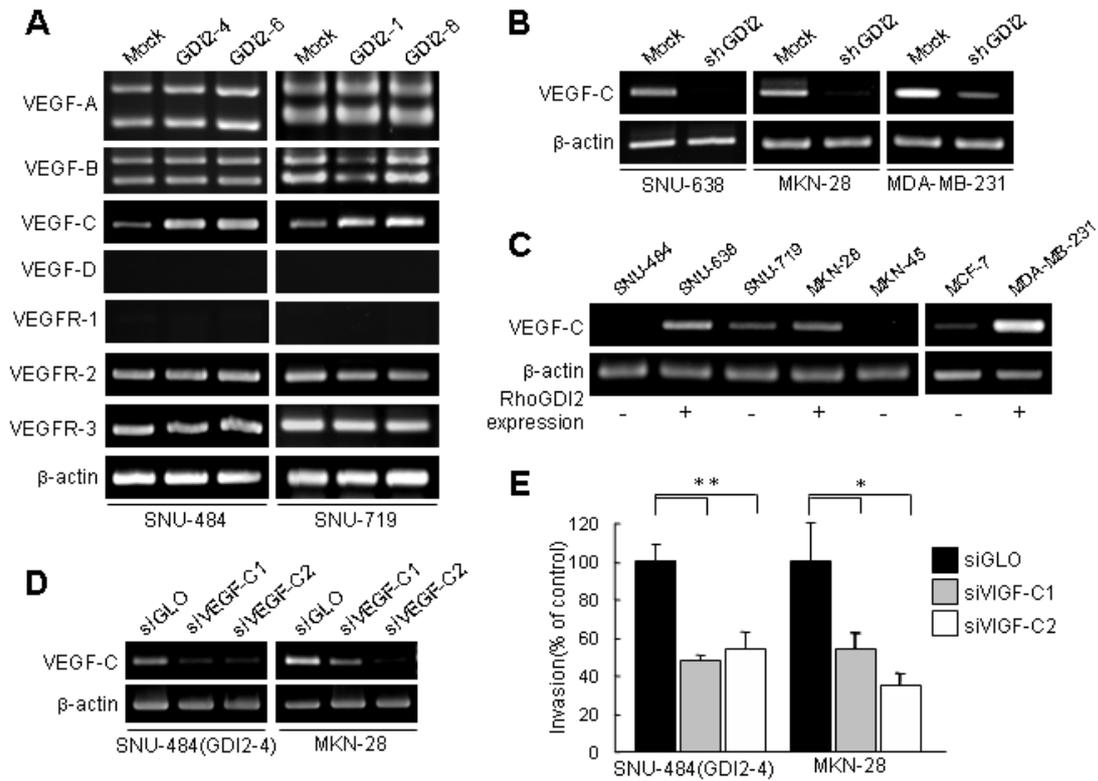


그림 6. RhoGDI2에 의한 암세포의 invasion에 미치는 VEGF-C의 기능 확인

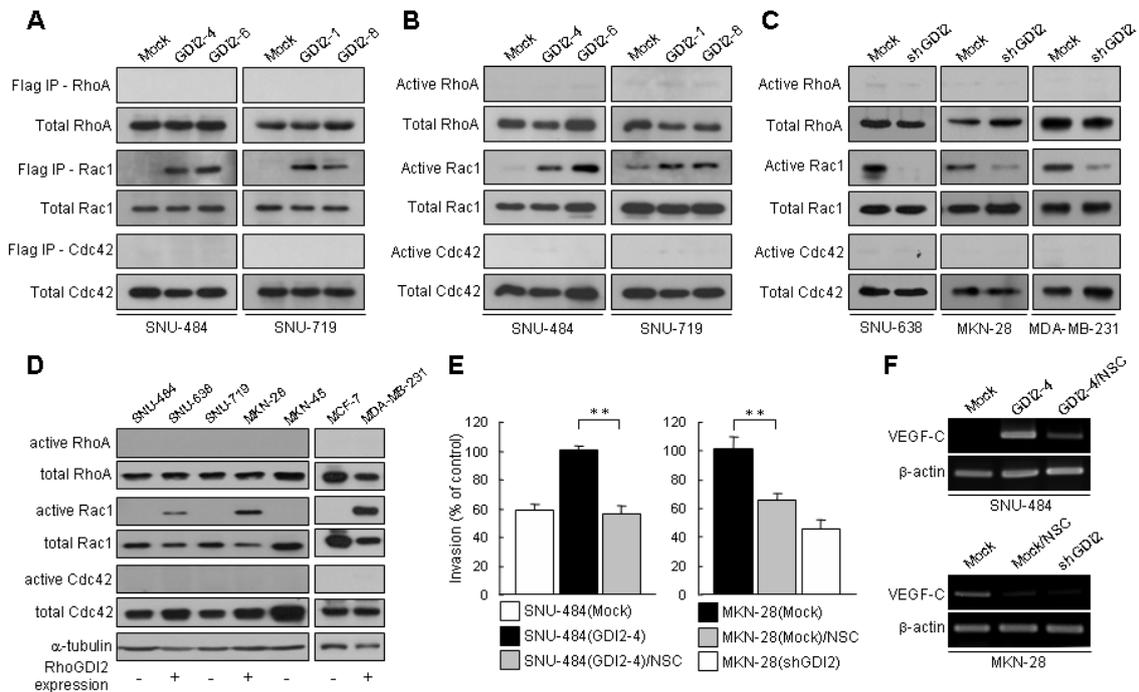


그림 7. RhoGDI2에 의한 암세포의 전이 및 VEGF-C의 발현에 미치는 Rac1의 영향 확인

위의 결과로부터 RhoGDI2에 의한 암세포의 전이에 Rac1의 activation과 VEGF-C의 발현이 중요함을 확인하였다. 이후에는 어떠한 경로를 통해 Rac1의 activation이 VEGF-C의 발현을 증가시키는지 알아보기 위해 먼저 RhoGDI2의 발현에 의해 Rac1이 activation 되어 있는 세포에서 NF- κ B의 activity를 확인하였다. 몇몇 보고에 의하면 VEGF-C의 발현이 NF- κ B에 의해 조절 된다고 알려져 있다. 그 결과 RhoGDI2가 발현된 세포에서 NF- κ B의 activity가 증가되어 있음을 확인할 수 있었으며 (그림 8, A), Rac1에 대한 inhibitor를 처리하였을 때 NF- κ B의 activity가 다시 감소하였으며 (그림 8, B), NF- κ B에 대한 inhibitor를 처리하면 RhoGDI2의 target 유전자인 VEGF-C의 발현이 감소함을 확인하였다 (그림 8, C). 이러한 결과는 RhoGDI2에 의한 VEGF-C의 발현 증가에 NF- κ B의 activity가 필수적임을 의미하는 것이다.

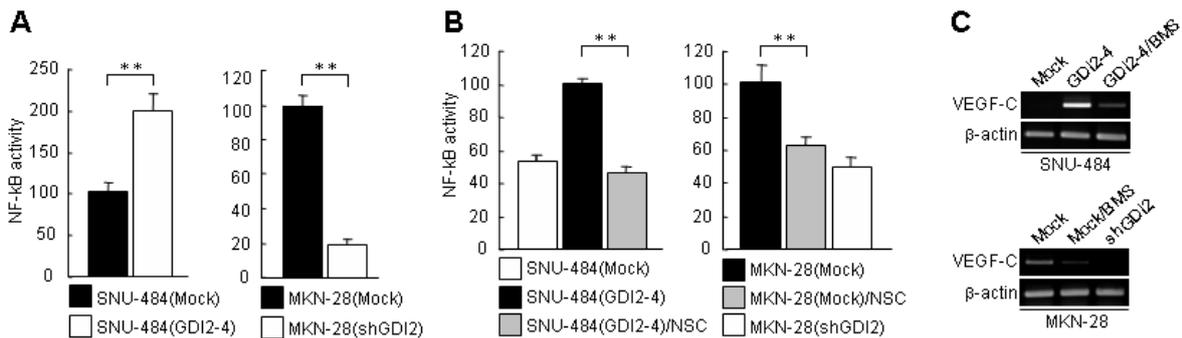


그림 8. RhoGDI2의 target 유전자인 VEGF-C의 발현에 미치는 NF- κ B의 영향 확인

또한 어떠한 과정을 통해 RhoGDI2가 발현되는 세포에서 NF- κ B의 activity가 증가하는지 확인하기 위해 NADPH oxidase와 ROS inhibitor를 사용하여 NF- κ B의 activity와 VEGF-C의 발현 변화를 확인하였다. 많은 보고에 의하면 Rac1이 activation되면 NADPH oxidase의 activity가 증가하게 되고, NADPH에 의해 ROS가 생성되게 되는데 이때 생성된 ROS에 의해 NF- κ B가 activation된다고 한다. 아래의 결과에서 볼 수 있듯이 NADPH oxidase와 ROS에 대한 inhibitor를 처리하였을 때 NF- κ B의 activity와 VEGF-C의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 9). 이러한 결과는 NADPH oxidase에 의해 생성된 ROS가 RhoGDI2에 의한 NF- κ B의 activity와 VEGF-C의 발현 증가에 필수적임을 의미하는 것이다. 이러한 모든 결과를 종합해 보면 RhoGDI2에 의해 Rac1이 activation되게 되고 Rac1에 의해 NADPH oxidase가 activation 되어 ROS가 증가하게 되면 NF- κ B가 activation되어 VEGF-C의 발현을 증가 시킨다는 것을 알 수 있다.

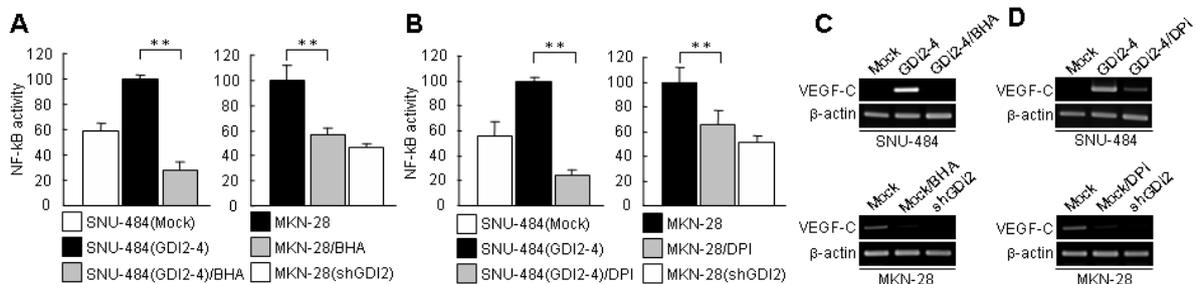


그림 9. RhoGDI2의 발현에 의한 NF- κ B activity와 VEGF-C의 발현에 미치는 NADPH oxidase와 ROS의 영향 확인

제 2절 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인

RhoGDI2가 어떠한 mechanism을 통해 전이암에서만 발현되는지 규명하기 위해 RhoGDI2의 promoter study를 수행하였다. 먼저 Genomic DNA로부터 RhoGDI2 유전자의 translation initiation site로부터 3,663 base upstream sequence를 PCR로 분리한 후 Luciferase reporter vector에 cloning 하였다. 이 construct를 RhoGDI2가 발현되는 MKN28 세포와 RhoGDI2가 발현되지 않는 MKN45세포에 transfection한 후 Luciferase activity를 확인한 결과 MKN45 세포에 비해 MKN28 세포에서 높은 activity가 나타남을 확인하였고 여러 가지 deletion constructs를 제조하여 promoter activity를 확인한 결과 translation initiation site로부터 563 base를 포함하는 construct는 promoter activity가 높지만 463 base를 포함하는 construct는 그 activity가 낮음을 확인할 수 있었다 (그림 10).

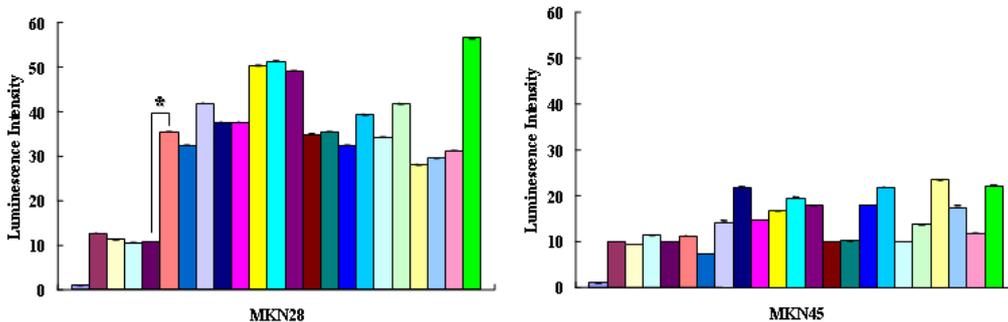


그림 10. MKN28과 MKN45 세포에서 RhoGDI2 promoter activity 확인

RhoGDI2 promoter의 563과 463 base 사이에는 암세포의 전이에 중요한 역할을 한다고 이미 많이 알려져 있는 AP-1 transcription factor가 binding할 수 있는 sequence가 존재하였으며, 이 부분의 sequence를 이용하여 Electrophoretic Mobility Shift Analysis를 수행하여 이를 확인하였으며 (그림 11), mutagenesis를 통해 AP-1 binding sequence가 RhoGDI2 promoter activity에 필수적임을 확인하였다 (그림 12).

Probe (0.1 pmole) : + + + + +
 N - E (10 μg) : - + + + +
 Competitor (5pM) : - - P M1 M2

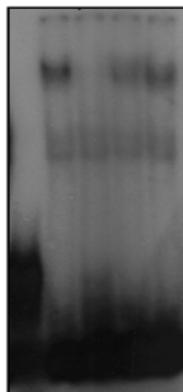


그림 11. AP-1 binding site의 EMSA analysis

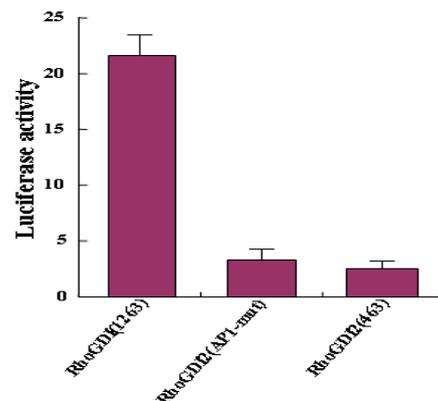


그림 12. AP-1 binding site가 RhoGDI2 promoter activity에 미치는 영향 확인

제 3절 RhoGDI2에 의한 위암세포의 전이를 억제하는 천연물의 탐색

앞선 연구를 통해 RhoGDI2에 의한 위암의 전이 과정에서 NF-κB의 활성이 중요한 기능을 한다는 것을 밝힌 바 있다. 이후의 연구에서는 위암의 전이를 억제하는 천연물을 탐색하기 위해, RhoGDI2에 의한 암세포의 전이에 필수적인 과정인 NF-κB의 활성을 저해하는 천연물을 screening하였다. 34종의 국내 농산자원 유래 천연물을 이용하여 NF-κB 활성을 조사한 결과 총 10종의 천연물이 NF-κB의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다 (그림 13).

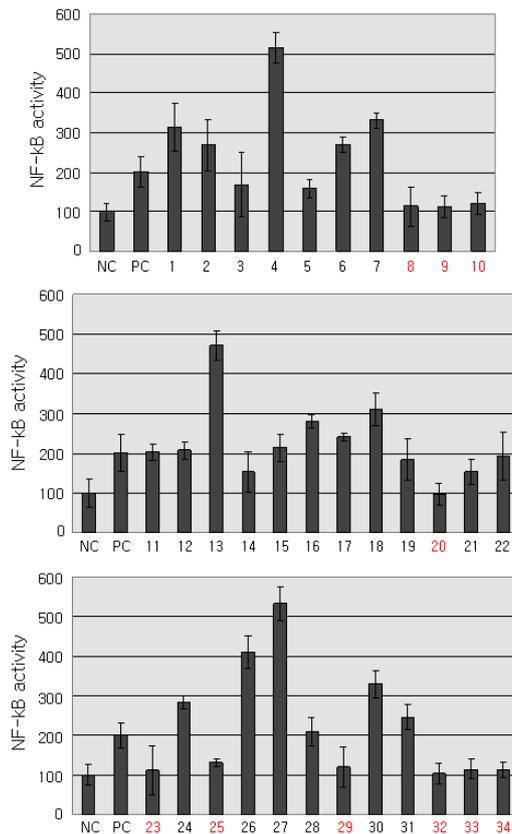


그림 13. NF-κB의 활성을 억제하는 천연물의 탐색

NF-κB의 활성을 억제하는 10종의 천연물 가운데 암세포의 전이를 *in vitro*에서 확인하는 invasion 능력을 조사해본 결과 그 가운데 2종의 천연물이 RhoGDI2에 의한 위암세포의 invasion을 효과적으로 억제함을 확인하였다 (그림 14).

최종적으로 탐색된 천연물이 위암의 전이를 촉진시키는 RhoGDI2 단백질의 target 유전자인 VEGF-C의 발현을 억제하는지 확인하였다. 그 결과 NF-κB의 활성을 억제하는 10종의 천연물 가운데 3종의 천연물이 VEGF-C의 발현을 억제함을 확인하였다 (그림 15). 특히 이들 3가지 천연물 가운데 2종 (20, 34)의 경우 본 연구에서 수행한 3종류의 screening을 모두 통과하였으므로, 위암 세포의 전이를 억제하는 새로운 천연물로서의

가능성이 아주 높다고 생각된다.

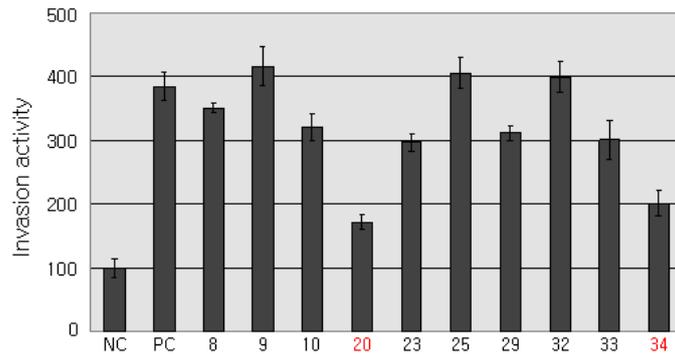


그림 14. 위암세포의 invasion을 억제하는 천연물의 탐색

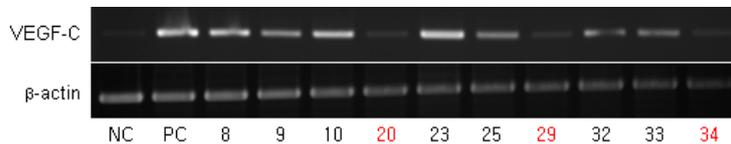


그림 15. 탐색된 천연물에 의한 VEGF-C의 발현변화 확인

제 4절 RhoGDI2에 의한 항암제 내성 촉진 기작 규명

RhoGDI2가 어떠한 유전자들의 발현 변화를 유도하여 위암 세포의 전이를 촉진시키는지 확인하기 위해 RhoGDI2가 발현되지 않는 세포들과 RhoGDI2가 발현되는 세포들에서 서로 다른 발현 양상을 보이는 유전자들을 microarray analysis를 통해 탐색한 결과 여러 가지 유전자들의 발현 변화를 관찰할 수 있었는데, 주목할 만한 사실은 암세포의 전이와 관련이 있다고 보고된 여러 가지 유전자들뿐만 아니라 항암제에 대한 내성을 유발하는데 중요하다고 알려져 있는 많은 유전자들의 발현이 RhoGDI2에 의해 변화된다는 것이었다.

이러한 결과를 바탕으로 RhoGDI2의 발현이 실제로 항암제에 대한 내성을 유발하는지 확인하고자 RhoGDI2가 발현되지 않는 control SNU-484 세포 (Mock)와 RhoGDI2를 과발현 시킨 SNU-484 세포 (GDI2-4 and GDI2-7)를 각각 cisplatin으로 처리한 후 MTS assay와 TUNEL analysis를 수행하고, caspase-3의 activation 및 PARP cleavage를 확인하였다. 그 결과 RhoGDI2를 과발현시킨 세포는 control 세포에 비해 cisplatin에 대해 상대적으로 높은 내성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 16, A-D). 또한 Nude mice를 이용한 in vivo 실험에서도 RhoGDI2가 과발현된 세포로부터 유래한 암의 경우 cisplatin에 대한 내성이 증가하였음을 확인하였는데 (그림 16, E), 이러한 모든 결과는 RhoGDI2의 발현이 위암세포가 cisplatin에 대해 내성을 나타내는데 중요한 기능을 담당한다는 것을 의미하는 것이다.

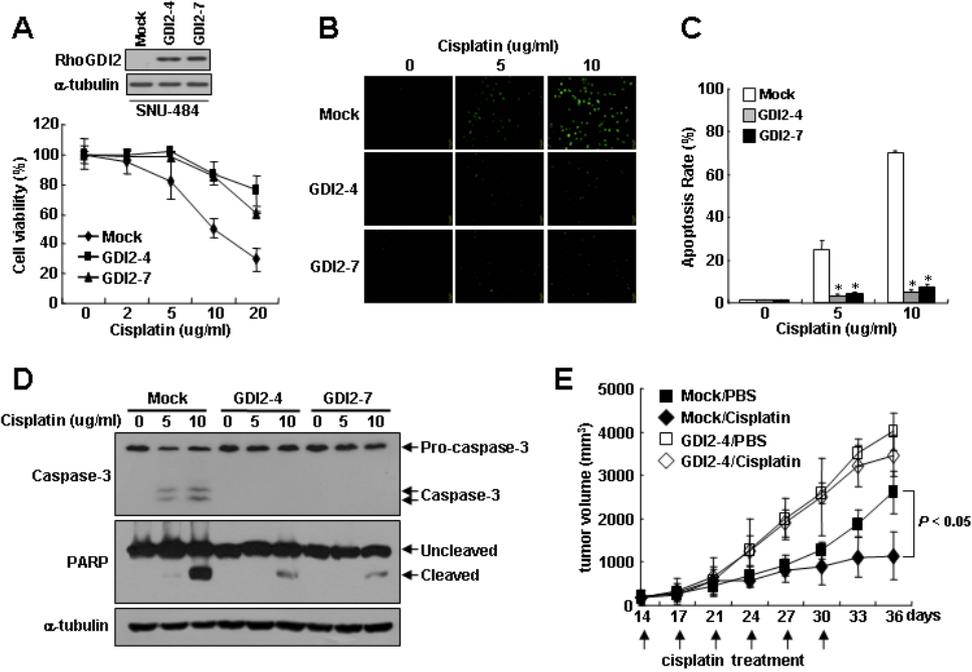


그림 16. RhoGDI2 발현에 의한 cisplatin 내성 확인

이와는 반대로 RhoGDI2가 발현되는 세포에 siRNA를 이용하여 RhoGDI2의 발현을 억제 하면 cisplatin에 대한 내성이 다시 억제됨을 확인하였다 (그림 17).

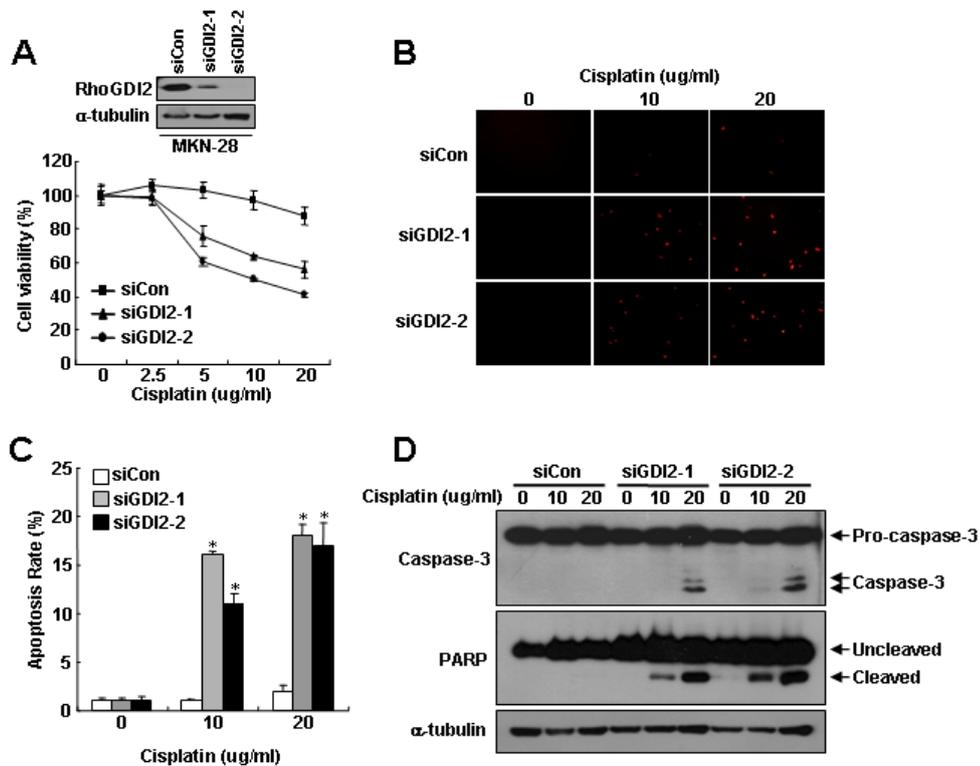


그림 17. RhoGDI2의 발현을 억제시킨 세포의 항암제 내성 억제 확인

RhoGDI2가 cisplatin 이외의 다른 항암제에 대한 내성에도 관여하는지 확인하기 위해 etoposide와 staurosporine을 처리한 후 동일한 실험을 수행한 결과 RhoGDI2의 발현이 cisplatin뿐만 아니라 etoposide와 staurosporine에 대해서도 내성을 유발한다는 것을 확인하였다 (그림 18).

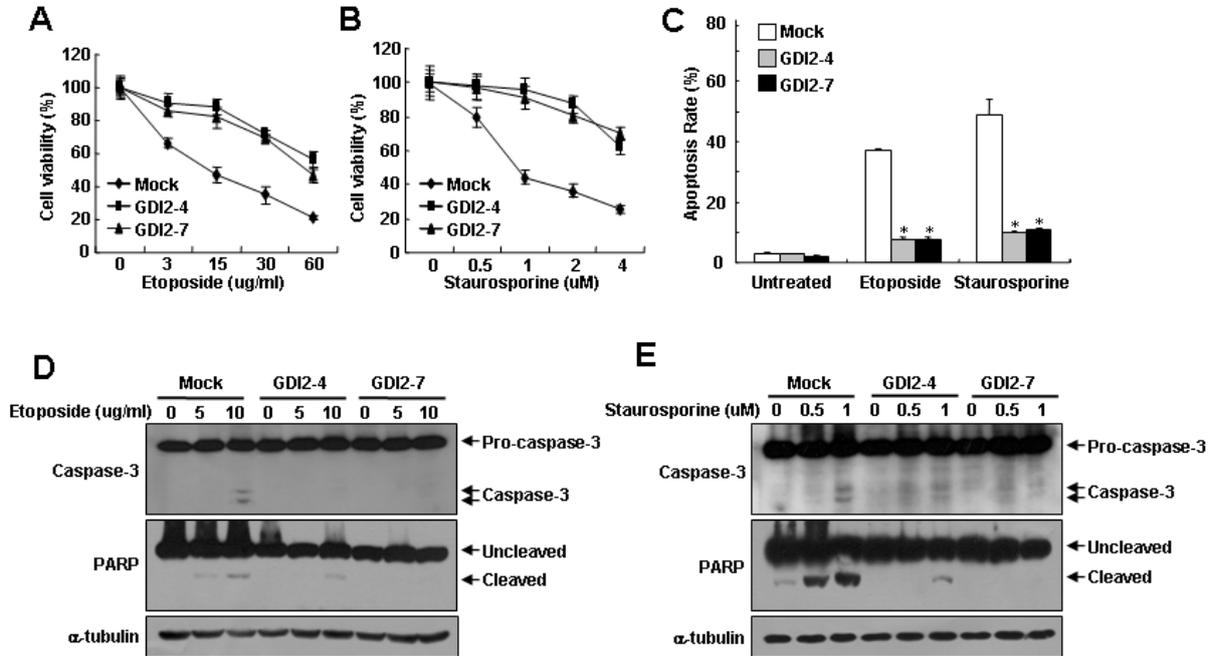


그림 18. RhoGDI2의 발현에 의한 etoposide와 staurosporine에 대한 내성 촉진 확인

기존의 많은 보고들에 의하면 여러 가지 항암제에 대한 내성 유발 과정에 Bcl-2 family 단백질의 발현이 중요하다는 결과들이 있어 본 연구에서도 RhoGDI2를 과발현시킨 세포와 발현을 억제한 세포에서 여러 가지 Bcl-2 family 단백질들의 발현을 확인한 결과 RhoGDI2가 과발현된 세포의 경우 Bcl-2의 발현이 증가하였고, 이와는 반대로 RhoGDI2의 발현을 억제한 세포에서는 Bcl-2의 발현이 억제됨을 확인하였다 (그림 19, A and B). Bcl-2의 발현이 RhoGDI2에 의한 항암제 내성을 유발하는데 중요한지 확인하기 위해 siRNA를 이용하여 Bcl-2의 발현을 억제시키고 Cisplatin에 의한 효과를 확인한 결과, RhoGDI2를 과발현시킨 세포에 Bcl-2의 발현을 억제하면 Cisplatin에 의한 세포사멸이 다시 증가하는 것으로 보아 Bcl-2의 발현이 RhoGDI2에 의한 항암제 내성에 필수적임을 확인하였다 (그림 19, C-E).

Microarray analysis를 통해 RhoGDI2의 발현에 의해 여러 가지 유전자들의 발현이 변화됨을 확인하였는데, 특히 여러 종류의 VEGF family member들 가운데 VEGF-C의 발현이 증가함을 볼 수 있었다. 최근의 여러 보고에 의하면 VEGF-C는 암세포의 전이뿐만 아니라 Bcl-2의 발현을 촉진시켜 암세포의 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다고 알려져 있다. Microarray analysis 결과를 확인하기 위해 여러 종류의 VEGF와 VEGF receptor의 발현 변화를 RT-PCR과 western blot analysis로 관찰한 결과 RhoGDI2가 과발현된 세포에서 VEGF-C만이 특이적으로 증가하는 것을 확인하였으며 (그림 20, A and C), siRNA로 RhoGDI2의 발현을 억제하였을 때 VEGF-C의 발현이 감소함

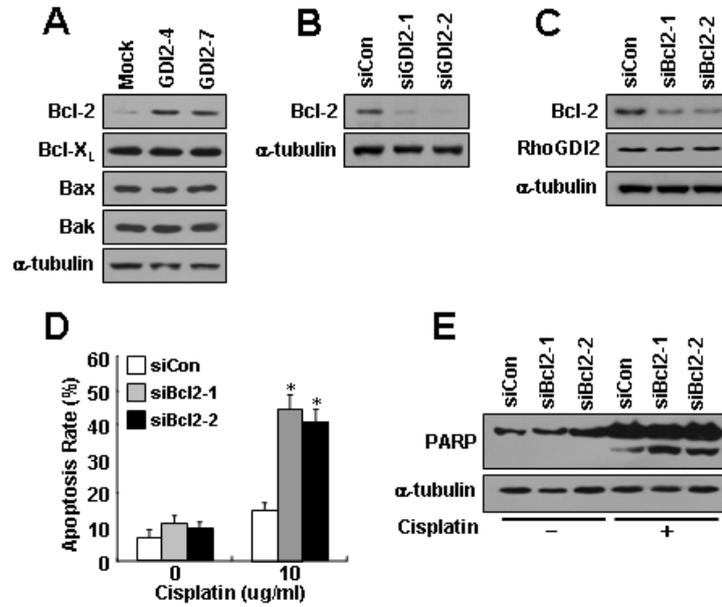


그림 19. RhoGDI2에 의한 cisplatin 내성 과정에서 Bcl-2의 역할 규명

을 확인하였다 (그림 20, B and D). 또한 HEK293 세포에 RhoGDI2를 발현하는 plasmid를 transient하게 transfection시켰을 때 VEGF-C의 발현이 증가함을 확인함으로써 VEGF-C가 RhoGDI2의 direct한 target임을 확인하였다 (그림 20, E). 이와 함께 여러 가지 parental 세포에서 RhoGDI2의 발현과 VEGF-C의 발현을 확인한 결과 RhoGDI2의 발현과 VEGF-C의 발현에 상당한 상관성이 있음도 확인하였다 (그림 20, F). RhoGDI2의 하위 target 유전자로 확인된 VEGF-C의 발현이 RhoGDI2에 의해 유도되는 항암제에 대한 내성에 미치는 영향을 확인하기 위해 shRNA를 이용하여 VEGF-C의 발현을 억제하였을 때 RhoGDI2가 과발현된 세포에서 Bcl-2의 발현이 억제됨을 확인하였으며 (그림 21, A),

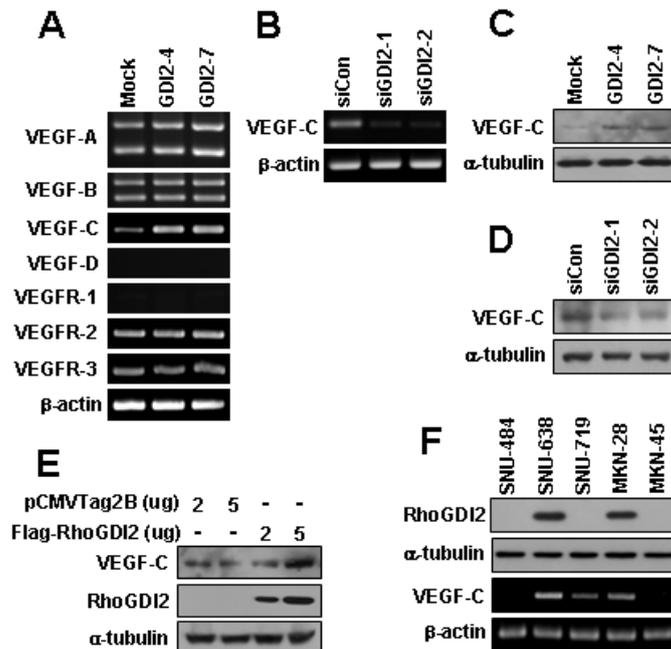


그림 20. RhoGDI2에 의한 VEGF-C의 발현 변화

cisplatin에 의한 세포사멸과 PARP의 cleavage가 증가됨을 확인할 수 있었다 (그림 21 B and C). Nude mice를 이용한 실험을 통해 in vivo에서도 VEGF-C의 발현이 RhoGDI2에 의한 cisplatin 내성에 중요함을 확인하였다 (그림21, D). 이러한 모든 결과는 RhoGDI2에 의해 유도되는 항암제 내성과 암세포의 전이과정에 VEGF-C가 중요한 기능을 담당한다는 것을 의미하는 것이다.

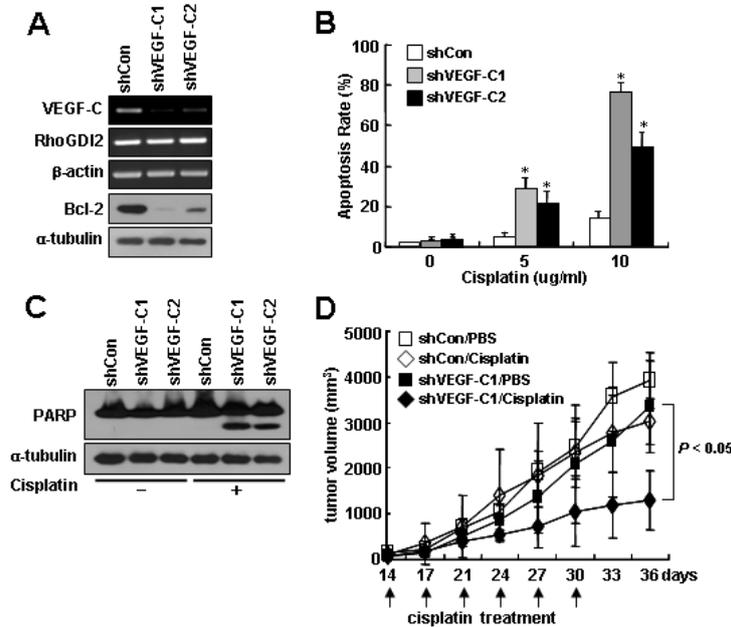


그림 21. RhoGDI2에 의한 항암제 내성을 조절하는 VEGF-C의 기능 확인

VEGF-C는 세포 밖으로 분비되어 VEGF-C receptor를 통한 신호를 전달한다고 알려져 있는데, 이후의 연구에서는 세포 밖으로 분비되는 VEGF-C의 기능을 확인하기 위해 RhoGDI2가 발현되는 세포의 conditioned medium (CM)을 RhoGDI2가 발현되지 않는 세포에 처리하고 항암제에 대한 내성이 유발되는지 확인하였다. 그 결과 RhoGDI2가 발현되는 세포의 CM을 처리한 세포의 경우 cisplatin에 의한 세포사멸과 PARP의 cleavage가 억제됨을 확인할 수 있었다 (그림 22, A and B). 또한 VEGF-C의 발현을 억제시킨 RhoGDI2 발현 세포의 CM을 처리하면 이러한 효과가 사라지는 것으로 보아 RhoGDI2가 발현되는 세포에서 분비되는 VEGF-C가 RhoGDI2에 의한 cisplatin 저항성에 중요하다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 22, C and D). 마지막으로 VEGF-C의 작용을 억제하는 neutralizing antibody를 RhoGDI2가 발현되는 세포에 처리할 경우 cisplatin에 의한 세포사멸과 PARP cleavage가 증가함을 확인하였는데 (그림 22, E and F), 이러한 모든 결과는 RhoGDI2의 발현에 의해 유도되는 cisplatin 저항성에 VEGF-C의 분비가 중요한 역할을 담당한다는 것을 의미하는 것이다.

RhoGDI는 Rho family 단백질들의 regulator로 알려져 있지만 RhoGDI2의 경우 어떠한 Rho family 단백질의 활성을 조절하는지 알려져 있지 않다. 본 연구자는 RhoGDI2를 과발현시킨 세포와 발현을 억제시킨 세포에서 여러 가지 Rho family 단백질들의 activity를 조사하였는데, 그 결과 RhoGDI2의 발현에 의해 Rac1이 specific하게 activation됨을 확인

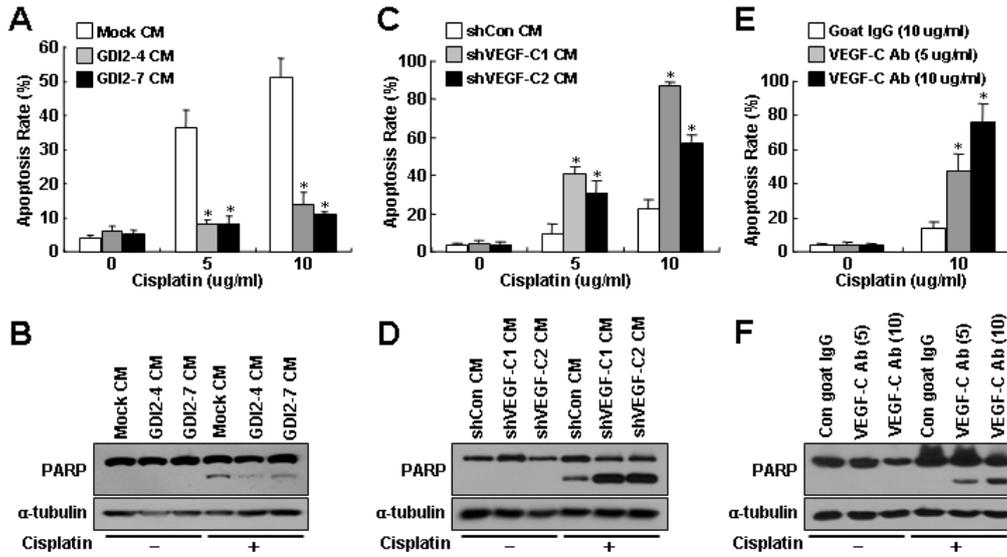


그림 22. RhoGDI2에 의한 cisplatin 저항성에 세포 밖으로 분비되는 VEGF-C의 중요성 확인

하였다 (그림 23, A and B). 또한 여러 가지 parental 세포에서 Rac1의 activity를 조사해 본 결과 RhoGDI2의 발현과 Rac1의 activation이 일치함을 확인하였다 (그림 23, C). 이러한 결과는 RhoGDI2가 여러 가지 Rho family 단백질들 가운데 Rac1을 specific하게 activation시킴을 의미하는 것이다. Rac1의 activation이 RhoGDI2에 의한 항암제 내성에 중요한지 확인하기 위해 siRNA를 이용하여 Rac1의 발현을 억제시키면 RhoGDI2에 의한

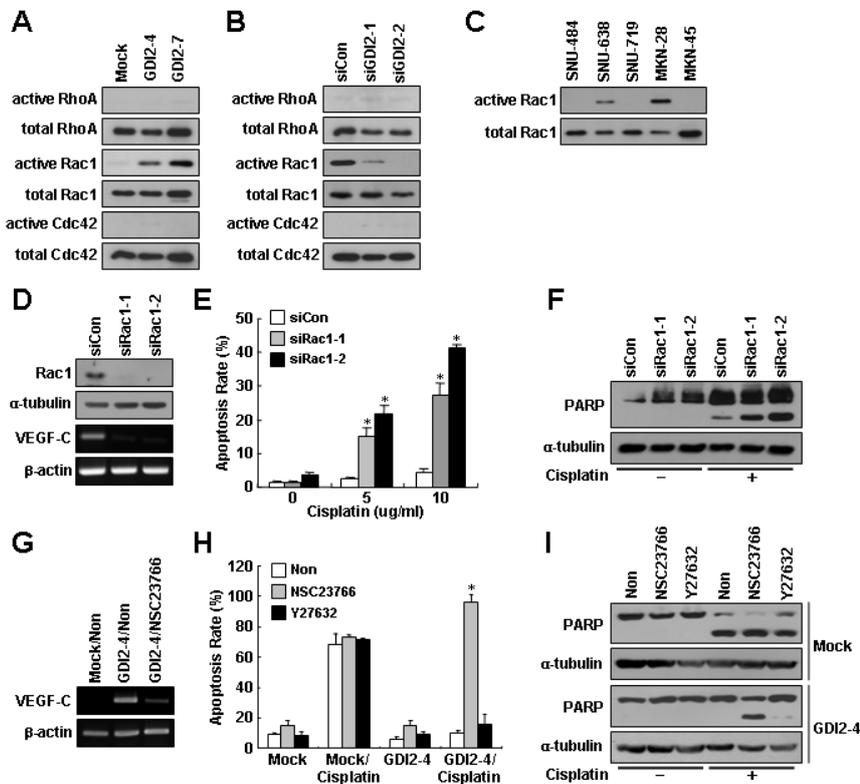


그림 23. RhoGDI2에 의한 cisplatin 저항성에 Rac1의 중요성 확인

항암제 내성에 필수적인 VEGF-C의 발현이 억제됨을 확인하였고 (그림 23, D), cisplatin을 처리하면 세포사멸과 PARP의 cleavage가 증가함을 확인하였다 (그림 23, E and F). 또한 이와 유사한 실험으로 Rac1에 specific한 chemical inhibitor인 NSC23766을 처리하면 VEGF-C의 발현이 감소하고 (그림 23, G), cisplatin에 의한 세포사멸과 PARP의 cleavage가 증가함을 확인하였다 (그림 23, H and I). RhoA의 specific한 chemical inhibitor인 Y27632를 처리하였을 때에는 이러한 효과가 보이지 않음을 통해 Rac1의 activation이 RhoGDI2의 target 유전자인 VEGF-C의 발현을 촉진함으로써 RhoGDI2에 의한 cisplatin 저항성을 매개한다는 것을 확인하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연도별 연구목표

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1 차 년 도	RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증	RhoGDI2가 과발현된 세포의 <i>in vivo</i> 전이능력 향상 검증: Nude mice를 이용하여 RhoGDI2를 과발현시킨 세포의 위암 전이 촉진 능력 확인 RhoGDI2의 발현이 억제된 세포의 invasion 능력 억제 검증: RhoGDI2의 siRNA를 이용하여 RhoGDI2의 발현을 억제하였을 때 위암세포의 invasion 능력 억제 확인
	RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2가 과발현된 세포에서 RhoGDI2에 의해 변화되는 Rho family 단백질 (Rho, Rac, cdc42)의 activity 확인: Rho, Rac, cdc42의 activity analysis를 통해 여러 종류의 Rho family 단백질 중 RhoGDI2에 의해 activity가 변화되는 단백질의 확인 RhoGDI2가 과발현된 세포에서 암의 전이와 관련된 여러 종류의 단백질 발현 및 조절여부 확인: RhoGDI2를 과발현 시킨 SNU484와 SNU719 세포에서 E-cadherin, Vimentin, MMPs, TIMP, VEGF, IL-8, COX-2 발현 및 조절여부 확인
2 차 년 도	RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증	RhoGDI2의 발현이 억제된 세포의 <i>in vivo</i> 전이능력 억제 검증: RhoGDI2의 siRNA를 이용하여 RhoGDI2의 발현이 억제된 세포의 <i>in vivo</i> 위암 전이 능력 억제 확인
	RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2가 과발현된 세포에서 RhoGDI2와 Rho family 단백질 (Rho, Rac, cdc42)의 interaction 확인: RhoGDI2가 과발현된 세포에서 RhoGDI2와 direct하게 binding하는 단백질의 확인 RhoGDI2에 의해 조절되는 Rho 신호 전달 과정의 조절 mechanism 연구: RhoGDI2에 의해 영향을 받는 신호 전달 경로의 탐색 및 여러 종류의 active한 mutant와 dominant negative mutant Rho family 단백질의 constructs를 이용한 mechanism 연구
	위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2 유전자의 암 전이 specific한 발현 mechanism 규명: RhoGDI2 promoter analysis

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3 차 년 도	RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2에 의해 조절되는 Rho 신호 전달 과정의 조절 mechanism 연구: RhoGDI2에 의한 Rho family 단백질의 activation mechanism 확인 RhoGDI2에 의해 발현이 조절되는 새로운 유전자의 탐색: RhoGDI2가 과발현된 세포에서 microarray analysis와 2-dimensional gel electrophoresis의 수행을 통해 새로운 RhoGDI2의 target 유전자 탐색
	위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2 유전자의 암 전이 specific한 발현 mechanism 규명: RhoGDI2 promoter analysis
4 차 년 도	RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인	방광암에서 RhoGDI2에 의한 암전이 억제 기작 규명: 방광암의 경우 동일한 RhoGDI2의 과발현이 어떠한 mechanism에 의해 전혀 반대의 결과를 초래하게 되는지 비교 분석 여러 종류의 암의 전이에 미치는 RhoGDI2의 영향 규명: 여러 종류의 다른 암세포에서 RhoGDI2의 발현을 조사하고 암의 전이에 미치는 영향을 확인
	위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2 유전자의 암 전이 specific한 발현을 유도하는 신호 전달 과정 탐색: 여러 가지 signal에 의해 유도되는 RhoGDI2의 발현 양상 확인
	전이 억제 후보 약물의 RhoGDI2에 의한 위암 전이 억제력 검증	Vitamin C 및 전이 억제 후보 약물 투여 후 RhoGDI2의 전이 능력 억제에 관한 연구: Vitamin C 및 여러 가지 항암 치료제의 후보 약물들을 이용하여 RhoGDI2가 위암 전이 억제 치료제의 target으로서의 가능성이 있는지 확인

2차년도의 연구결과 RhoGDI2가 위암의 전이를 촉진시킬 뿐만 아니라 항암제에 대한 내성을 나타내는 데에도 중요한 역할을 한다는 것을 알게 되어 이에 관한 내용을 추가로 3차와 4차년도에 수행하였다. (3차년도와 4차년도의 연차실적계획서에 기술하였고 승인받았음)

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3 차 년 도	RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명	RhoGDI2에 의해 유발되는 항암제 내성 기작을 규명한다.
4 차 년 도	RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명	항암제 내성을 유발하는 RhoGDI2의 하위 target 유전자인 VEGF-C와 Bcl-2의 상관관계를 규명하고 이들의 기능을 in vivo에서 규명한다.

제 2절 연구목표 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	RhoGDI2의 위암 전이 촉진 능력 검증	RhoGDI2에 의한 위암 전이 촉진 능력을 in vitro와 in vivo 실험을 통해 검증하였음.	100
2	RhoGDI2에 의해 조절되는 하위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2에 의한 Rac1 하위 신호 전달 과정이 중요하다는 것을 확인하였음.	100
3	위암의 전이 과정에서 RhoGDI2의 발현을 유도하는 상위 신호 전달 과정 확인	RhoGDI2 유전자의 발현에 transcription factor인 AP-1의 중요성을 확인하였음.	100
4	RhoGDI2의 하위 target 유전자의 기능 규명	RhoGDI2의 하위 target으로서 VEGF-C의 중요성을 확인하였음.	100
5	RhoGDI2에 의한 암세포의 전이를 억제할 수 있는 약물 탐색	RhoGDI2에 의한 위암의 전이과정에 중요한 NF-kB activity를 억제하는 천연물을 탐색하였음.	100
6	RhoGDI2의 발현에 의한 항암제 내성 기작 규명	RhoGDI2의 발현에 의해 여러 가지 항암제에 대한 내성이 유발되는 기작을 규명하였음.	100

제 3절 관련분야 기여도

앞서 여러 번 언급한바와 같이 암세포의 전이와 항암제에 대한 내성은 암환자 치료의 가장 큰 걸림돌이 되는 문제로서 많은 연구자들을 통해 이들과 관련된 신호 전달 과정과 target 유전자들을 발굴하는 연구들이 수행되고 있다. 특히 본 연구에서는 위암세포의 전이뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 동시에 유발하는 RhoGDI2 유전자의 기능과 작용 기작을 규명하였으므로 기존의 개별적인 target 발굴 노력에 비해 두 가지 현상을 함께 조절하는 새로운 연구의 방향을 제시하였다고 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구의 결과 RhoGDI2가 위암세포의 전이를 촉진시킬 뿐만 아니라 여러 가지 항암제에 대한 내성을 유발하는 데에도 중요한 기능을 담당한다는 것을 확인하였다. 하지만 아직 RhoGDI2가 다른 종류의 암에서 위암과는 상반된 결과를 보이는 이유와, RhoGDI2가 어떠한 기작으로 Rac1을 activation 시키는지, 또한 Rac1 이외의 다른 신호 전달 과정이 RhoGDI2에 의한 위암의 전이와 항암제 내성과정에 관여하는지 등에 관한 연구가 이루어지지 못하였다. 또한 하위 target으로도 VEGF-C 이외의 여러 가지 유전자들의 발현이 RhoGDI2에 의해 변화됨을 확인하였는데, 이 유전자들 가운데 RhoGDI2에 의한 위암세포의 전이와 항암제 내성에 관여하는 유전자들을 검증하는 연구가 추가로 수행되어야 할 것이다.

향후 이러한 연구들이 마무리되어 RhoGDI2에 의한 위암세포의 전이와 항암제 내성 유발 기작이 더 자세히 규명되고 위암세포의 전이와 항암제에 대한 내성을 억제하는 치료제 개발의 target으로서의 유용성이 확인되면, 이후에는 유전자 치료제를 전문으로 연구하고 개발하는 산업체와의 연계를 통해 응용연구로 이어질 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구개발 과정동안 외국의 연구자들에 의해 RhoGDI2가 Src kinase에 의해 phosphorylation될 수 있음이 알려지게 되었다. 본 연구자도 Src 이외에 다른 kinase에 의해 RhoGDI2가 phosphorylation될 수 있는지 확인하기 위해 Yeast two-hybrid screening을 통해 RhoGDI2와 interaction하는 새로운 단백질을 탐색하는 실험을 수행하고 있다. 또한 본 연구가 시작될 당시에는 RhoGDI2가 어떠한 Rho family 단백질의 activity를 조절하는지에 대한 연구가 수행되지 않았지만 본 연구의 결과 RhoGDI2가 Rac1을 specific하게 activation시킨다는 결과를 얻었으며, 외국의 다른 연구자들에 의해서도 동일한 결과가 발표되었다. 하지만 유방암 세포에서는 본 연구결과와 달리 RhoGDI2가 Rac1을 오히려 repression한다는 결과도 발표되었다. 하지만 여러 종류의 암세포에서 상반된 결과를 보이는 이유에 대해서는 아직 알려진 바가 없으며 본 연구자는 RhoGDI2가 여러 종류의 암에서 상반된 결과를 보이는 이유를 설명하기 위한 연구를 수행하고 있다.

제 7 장 참고문헌

❖ Rho GTPase와 Cancer의 관련성

- Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *BioEssays* 2003;25:452-63.
- Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:133-42.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.

❖ RhoGDI의 발현 양상 및 기능

- Adra CN, Manor D, Ko JL, et al. RhoGDI: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4279-84.
- Bromberg Y, Shani E, Joseph, et al. The GDP-bound form of the small G protein Rac1 p21 is a potent activator of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:7055-8.
- Chuang TH, Xu X, Knaus UG, Hart MJ, Bokoch GM. GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein. *J Biol Chem* 1993;268:775-8.
- DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 2005;15:356-63.
- Dovas A, Couchman JR. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 2005;390:1-9.
- Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the Rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* 1990;5:1321-8.
- Groyzman M, Hornstein I, Alcover A, Katzav S. Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducer in T cell antigen receptor-induced pathways. *J Biol Chem* 2002;277:50121-30.
- Hart MJ, Maru Y, Leonard D, Witte ON, Evans T, Cerione RA. A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science* 1992;258:812-5.
- Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, et al. cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1479-83.
- Lin Q, Fuji RN, Yang W, Cerione RA. RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation. *Curr Biol* 2003;13:1469-79.
- Scherle P, Behrens T, Staudt LM. Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA

GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:7568-72.

- Takaishi K, Kikuchi A, Kuroda S, et al. Involvement of Rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (RhoGDI) in cell motility. Mol Cell Biol 1993;13:72-9.

- Yin L, Schwartzberg P, Scharon-Kersten TM, Staudt L, Lenardo M. Immune responses in mice deficient in Ly-GDI, a lymphoid-specific regulator of Rho GTPases. Mol Immunol 1997;34:484-91.

❖ RhoGDI와 Cancer의 관련성

- Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. Br J Cancer 2002;87:635-44.

- Gildea JJ, Seraj MJ, Oxford G, et al. RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. Cancer Res 2002;62:6418-23.

- Jiang WG, Watkins G, Lane J, et al. Prognostic value of Rho GTPases and Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. Clin Cancer Res 2003;9:6432-40.

- Jones MB, Krutzsch H, Shu H, et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. Proteomics 2002;2:76-84.

- Schunke D, Span P, Ronneburg H, et al. Cyclooxygenase-2 is a target gene of Rho GDP dissociation inhibitor in breast cancer cells. Cancer Res 2007;67:10694-702.

- Seraj MJ, Harding MA, Gildea JJ, Welch DR, Theodorescu D. The relationship of BRMS1 and RhoGDI2 gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. Clin Exp Metastasis 2000;18:519-25.

- Tapper J, Kettunen E, El-Rifai W, Seppala M, Andersson LC, Knuutila S. Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. Cancer Genet Cytogenet 2001;128:1-6.

- Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF Jr. Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. Clin Cancer Res 2004;10:3800-6.

- Zhang Y, Zhang B. D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. Cancer Res 2006;66:5592-8.

❖ RhoGDI1과 항암제 내성과의 관련성

- Sinha P, Kohl S, Fischer J, et al. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 2000;21:3048 - 57.

- Takano M, Goto T, Sakamoto M, et al. Identification of paclitaxel-resistance related genes by differential display using cDNA microarray in ovarian cancer cell lines. Proc Am Soc Clin Oncol 2003;22:462.

- Poland J, Schadendorf D, Lage H, Schnolzer M, Celis JE, Sinha P. Study of therapy resistance in cancer cells with functional proteome analysis. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:221 - 34.
- Zhang B, Zhang Y, Dagher MC, Shacter E. Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 2005;65:6054-62.

주 의

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

F
G
0
9
-
2
1
-
1
2

위
암
의

전
이
를

촉
진
시
키
는

R
h
o
G
D
I
2
의

기
능

연
구

교
육
과
학
기
술
부