

중견연구자지원사업(핵심연구) 최종보고서

							양식A101	
① 부처사업명(대)	기초연구사업			보안등급(보안, 일반)		일반		
② 사 업 명(중)	중견연구자지원사업			공개가능여부(공개, 비공개)		공개		
③ 세부사업명(소)	핵심연구(공동연구)							
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)			비실용화			
⑤ 과 제 명	국 문	미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암조절 기전연구						
	영 문	Studies on antitumor mechanism through mitochondrial respiratory inhibition						
⑥ 주관연구기관	대구가톨릭대학교							
⑦ 협동연구기관								
⑧ 주관연구책임자	성 명	장영채		직급(직위)	부교수			
	소속부서	병리학교실		전 공	세포생물학			
⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)								
년 도	정부출연금 (A)	기업체부담금			정부외 출연금 (B)	상대국 부담금 (F)	합계 G=(A+B+E)	참여 연구원수
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)				
합계	366,600							
⑩ 총연구기간	2008. 09. 01 - 2011. 08. 31 (36개월)							
⑪ 다년도협약연구기간	2008. 09. 01 - 2011. 08. 31 (36개월)							
⑫ 당해연도연구기간	2010. 09. 01 - 2011. 08. 31 (12개월)							
<p>관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 국가연구개발사업에 따라 수행중인 연구개발과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출 합니다.</p> <p style="text-align: center;">2011 년 08 월 25 일</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 : 장 영 채 (인)</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : 소 병 욱 (인)</p> <p style="text-align: center;">교 육 과 학 기 술 부 장 관 귀 하</p>								

※ 주요항목 작성요령

- ② 공개가능여부 : 기초연구사업은 공개를 기본으로 함. 단 불가피하게 비공개(평가용도 이외에는 연구보고서 배포를 제한하는 경우)로 하는 경우 사유를 양식 중 <연구내용 및 결과>의 10.기타사항 란에 명확히 기재함
- ③ 세부사업명(소) : **핵심연구(공동연구)**
- ⑤ 과제명 : 당초 연구과제(과제명 변경을 재단에서 승인받은 경우는 승인된 과제명)명을 기재함
- ⑨ 정부출연금 : 전체 연구기간의 **총 연구비를** 기재함
- ⑩ 총연구기간 : 연구시작일 부터 연구종료일 까지 **총 연구기간을** 기재

※참여연구원수는 **연구책임자를 제외한** 본 연구에 참여하는 모든 연구인력(연구보조원 포함) 인원수를 기재함

※ 셀 보호된 내용 수정방법 : 해당셀 선택>마우스 우측버튼 클릭>표셀속성 선택>셀 선택>셀보호 해제

「중견연구자지원사업(핵심연구) 협약 연구기간 적용 안내」

선정연도	연구기간	연차	과제수	총 연구기간	다년도 협약기간	당해연도 협약기간	비고
2007년	3년	4	3	2007.9.1~2011.8.31	2010.9.1~2011.8.31	2010.09.01~2011.08.31	
2008년	2년	3	199	2008.9.1~2011.8.31	2008.9.1~2011.8.31	2010.09.01~2011.08.31	
2009년	1년	2	5	2009.9.1~2011.8.31	2009.9.1~2011.8.31	2010.09.01~2011.08.31	

< 목 차 >

I. 연구계획 요약문

1. 국문요약문	4
----------------	---

II. 연구결과 요약문

1. 국문요약문	5
2. 영문요약문	6

III. 연구내용

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	12
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	44
5. 연구결과의 활용계획	45
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	46
7. 주관연구책임자 대표적 연구실적	47
8. 참고문헌	47
9. 연구성과	55
10. 기타성과	59

〈 연구계획 요약문 〉

양식 A201

연구의 목표	<p>미토콘드리아의 호흡 저해를 통해 암세포의 생리적 변화를 관찰하고, 이를 바탕으로 다음과 같은 항암기전의 기초 자료를 제공하고자 한다. 첫째는 미토콘드리아의 호흡 저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전을 규명과 세포주기 조절 기전 규명을 규명하고, 둘째는 미토콘드리아 호흡저해에 의한 원형질막 수용체 조절기전 및 종양 이주 및 침투 억제 기전을 규명하고, 셋째는 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명과 조직병리학적 생체 반응을 분석 및 규명한다. 본 연구를 통해 항암 물질 개발의 기초 자료를 마련 할뿐 아니라, <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> system의 검증을 통해 새로운 항암 표적인자를 발굴한다.</p>		
연구내용	<p>비능률적인 미토콘드리아 호흡연쇄 (mitochondrial respiratory chain)를 극복하기 위해 암세포는 해당과정에 의존하여 부족한 에너지 소모 (ATP 합성)를 충족한다. 암세포는 이 에너지를 성장뿐만 아니라 약물 및 세포사멸 유도 신호에 대한 내성을 개발하는데 사용한다. 이러한 특성 때문에 미토콘드리아를 표적으로 하는 약물에 대해 암세포는 정상세포에 비해 높은 감수성을 갖는다. 암세포의 이러한 특성을 바탕으로 하여 미토콘드리아를 표적으로 하여 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 미토콘드리아 호흡저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전 규명 및 세포주기 조절 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 호흡저해에 의한 p53 활성화 및 p53의 전사 활성 조절 확인 - 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 활성화의 차이점 분석 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절에 p53 관련성 및 전사인자 조절 기전 규명 ● 미토콘드리아 호흡저해에 의한 원형질막 수용체 조절기전 및 종양 이주 및 침투 억제 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 EGFR, VEGFR 등의 수용체 활성화 기전 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 FAK 활성화 기전 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 MMPs의 활성화 조절 기전 규명 ● 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명 및 조직병리학적 생체 반응을 분석 및 규명 <ul style="list-style-type: none"> - Phage display를 이용한 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 항신생혈관 조절 기전 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 항종양 전이 기전 규명 		
연구결과의 기대효과	<p>미토콘드리아 호흡 저해에 대한 새로운 약리작용을 규명함으로써 국제저명 학술지에 투고를 통한 중앙생물학 분야에 공헌할 수 있으며, 나아가 기초과학 선진국의 위상을 드높일 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 수립하게 될 암세포의 생화학적 기전 규명은 항암 효과 극대화에 대한 유용성 평가 및 항암 효과를 극대화의 방안 연구를 통하여 학제간 혹은 산·학간 유용가치가 있을 것이다. 그리고 미토콘드리아의 호흡 억제 기전에 대한 기초연구를 통한 항암 기전의 분자 유전적, 생물학적 과학기술은 연구 인력이 습득할 수 있는 교육적 효과를 기대할 수 있으며, 유전자 정보에 근거하여 첨단 생명공학 기법을 이용한 생명과학 분야의 연구인력 양성에 있어 많은 기여를 할 것이라 기대한다.</p>		
중심어	미토콘드리아 호흡	세포주기	수용체
	파지디스플레이	혈관신생	종양 침투 및 전이

☞ 작성시 유의사항

- 1) 연구계획서(지원신청서) 제출시의 국문 연구요약문을 그대로 작성함 (당초내용을 복사 사용 가능함)
- 2) 본 요약문의 내용은 외부에 공개할 수 있음
- 3) 반드시 1페이지 이내로만 기재함

〈 연구결과 요약문 〉

〈한글요약문〉

양식 A 202

연구의 목적 및 내용	<p>미토콘드리아의 호흡 저해를 통해 암세포의 생리적 변화를 관찰하였고, 이를 바탕으로 다음과 같은 항암기전의 기초 자료를 제공하고자 하였다. 첫째는 미토콘드리아의 호흡 저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전을 규명하고 세포주기 조절 기전 규명을 규명하였고, 둘째는 미토콘드리아 호흡저해를 통한 세포주기 조절 및 신호전달 기전을 규명하였고, 셋째는 미토콘드리아 호흡저해를 통한 혈관신생 저해 및 AMPK 조절기전을 규명을 목적으로 하였다. 본 연구를 통해 항암 물질 개발의 기초 자료를 마련 할뿐 아니라, <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> system의 검증을 통해 미토콘드리아 호흡저해 경로의 새로운 항암 표적인자를 발굴 하였다.</p>		
연구결과	<p>비능률적인 미토콘드리아 호흡연쇄 (mitochondrial respiratory chain)를 극복하기 위해 암세포는 해당과정에 의존하여 부족한 에너지 소모 (ATP 합성)를 충족한다. 암세포는 이 에너지를 성장뿐만 아니라 약물 및 세포사멸 유도 신호에 대한 내성을 개발하는데 사용한다. 이러한 특성 때문에 미토콘드리아를 표적으로 하는 약물에 대해 암세포는 정상세포에 비해 높은 감수성을 갖는다. 암세포의 이러한 특성을 바탕으로 하여 미토콘드리아를 표적으로 하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 미토콘드리아 호흡저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전 규명 및 세포주기 조절 기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 호흡저해에 의한 p53 활성화 및 p53의 전사 활성 조절 확인 - 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 활성화의 차이점 분석 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절에 p53 관련성 및 전사인자 조절 기전 규명 ● 미토콘드리아 호흡저해를 통한 세포주기 조절 및 신호전달 기전 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 분석 및 관련인자의 발현양상 분석 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 전사인자 활성화측정 및 새로운 표적인자 검증 - 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 세포주기조절의 신호전달 기전 분석 ● 미토콘드리아 호흡저해를 통한 혈관신생 저해 및 AMPK 조절기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 VEGF 활성화 조절 기전 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 HIF-1α의 안정화 조절 기전 규명 - 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 AMPK 조절 기전 규명 		
연구결과 의 활용계획	<p>미토콘드리아 호흡 저해에 대한 새로운 약리작용을 규명하여 국제저명 학술지에 게재하였으며, 이를 통한 중앙생물학 분야에 공헌할 수 있었다. 또한 본 연구에서 수립하게 될 암세포의 생화학적 기전 규명은 항암 효과 극대화에 대한 유용성 평가 및 항암 효과를 극대화의 방안 연구를 통하여 학제간 혹은 산·학간 유용가치가 있을 것이다. 그리고 미토콘드리아의 호흡 억제 기전에 대한 기초연구를 통한 항암 기전의 분자 유전적, 생물학적 과학기술은 연구 인력이 습득할 수 있는 교육적 효과를 기대할 수 있으며, 유전자 정보에 근거하여 첨단 생명공학 기법을 이용한 생명과학 분야의 연구인력 양성에 있어 많은 기여를 할 것이라 기대한다.</p>		
중심어	미토콘드리아 호흡	세포주기	EGFR
	HIF-1 α	혈관신생	AMPK

※ 표양식 변경 및 삭제불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함
 ※ 본 요약문은 정보제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

< SUMMARY >

양식 A 203

Purpose& contents	<p>To investigate the antitumor mechanisms through mitochondrial respiratory inhibition, we designed the purposes as followed.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Study of antitumor activities involved p53 activation and cell cycle regulation through mitochondrial respiratory inhibition. ● Study of cell cycle regulation and its signaling pathways through mitochondrial respiratory inhibition. ● Study of anti-angiogenesis and regulation of AMPK through mitochondrial respiratory inhibition. <p>Through these researches, we would clarify the antitumor mechanisms through mitochondrial respiratory inhibition.</p>		
Result	<ul style="list-style-type: none"> ● Study of antitumor activities involved p53 activation and cell cycle regulation through mitochondrial respiratory inhibition. <ul style="list-style-type: none"> - Activation and phosphorylation of p53 by mitochondrial respiratory inhibitors. - Effects of p53 activation by mitochondrial respiratory inhibitors distinct from DNA damaging agents. - Assay of cell cycle distribution and kinase activity by mitochondrial respiratory inhibition. - Study of cell cycle regulated factor (p53, Rb, E2F <i>et al</i>) in cell signalling pathway. ● Study of cell cycle regulation and its signaling pathways through mitochondrial respiratory inhibition. <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of cell cycle distribution and cell cycle related factors by mitochondrial respiratory inhibition. - Assay of activation of transcriptional factors and finding new target genes by mitochondrial respiratory inhibition. - Mechanism of cell cycle related signaling pathways by mitochondrial respiratory inhibition. ● Study of anti-angiogenesis and regulation of AMPK through mitochondrial respiratory inhibition. <ul style="list-style-type: none"> - Mechanism of VEGF regulation by mitochondrial respiratory inhibition. - Mechanism of HIF-1α stabilation by mitochondrial respiratory inhibition. - Mechanism of AMPK regulation by mitochondrial respiratory inhibition. 		
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ● Investigation of antitumor mechanisms by mitochondrial respiratory inhibitors <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>. ● Establishment of antitumor mechanisms by new anticancer drugs. ● Technical elevation of life science and clinical medicine, development of anticancer drugs. ● A great services to contribution towards of development of tumor biology. 		
Keywords	mitochondrial respiration	cell cycle	EGFR
	HIF-1 α	Angiogenesis	AMPK

※ 표양식 변경 및 삭제불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함
 ※ 본 요약문은 정보제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

< 연구내용 및 결과 >

양식 A301

- ◎ 1. 연구개발과제의 개요 ~ 10. 중요 연구변경 사항을 항목에 따라 작성함
- ◎ 제목 14point, 소제목 12point, 본문내용은 10point로 작성하며, 줄 간 간격은 조정 가능함
- ◎ 연구내용 및 결과는 50페이지 이내로 작성함
- ◎ 내용 작성과 관련한 설명내용(청색 박스로 표시된 부분)은 내용 작성 시 제거하고 기술함

1. 연구개발과제의 개요

가. 국내외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- 미토콘드리아는 세포의 생존과 사멸에 관련된 많은 경로에 본질적인 역할을 하는 세포기관으로 지난 40년 동안 많은 연구의 대상이 되어 왔다. “세포의 발전소 (powerhouse)”라 일컬어지는 미토콘드리아는 세포의 에너지 대사 (energy metabolism), 칼슘 유량 (calcium flux) 조절 그리고 세포사멸 (apoptosis)에 중심적 역할을 한다. 이 세포기관은 세포의 호흡과 생존에 필요한 ATP의 80-90 %를 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation)에 의해 생성하며, 이 세포기관 내에는 기질산화와 ATP합성을 연결하는 효소복합체와 TCA cycle 관련 효소들이 존재한다.

- 암세포의 성장은 정상세포에 비해 성장 속도가 빠르고 연속적이며 높은 에너지를 필요로 한다. 높은 에너지 효율을 요하는 암세포의 미토콘드리아는 정상세포와 달리 기능 장애 및 돌연변이, 결손, 전좌와 같은 유전적 불안정성을 보인다. 그래서 암세포는 비능률적인 미토콘드리아 호흡연쇄 (mitochondrial respiratory chain)를 극복하기 위해 해당과정에 의존하여 부족한 에너지 소요 (ATP 합성)를 충족한다. 암세포는 이 에너지를 성장뿐만 아니라 약물 및 세포사멸 유도 신호에 대한 내성을 개발하는데 사용한다. 이러한 특성 때문에 미토콘드리아를 표적으로 하는 약물에 대해 암세포는 정상세포에 비해 높은 감수성을 갖는다.

- 기존의 항암제 대다수는 p53 또는 죽음수용체 (Death receptor)를 포함하는 다양한 신호 전달계를 경유해 암세포의 미토콘드리아에 간접적으로 독성을 유도하여 항암 치료의 가능성을 보였다. 그러나 최근에는 암세포 미토콘드리아 특성을 바탕으로 하여 미토콘드리아의 DNA 생합성 (mtDNA biosynthesis) 저해, 미토콘드리아 호흡연쇄 저해, 투과성전이세공 (permeability transition pore, PTP)의 활성화, 칼륨통로 (potassium channel)의 개방 등을 통한 미토콘드리아의 기능을 방해하는 다양한 접근법이 제안되고 있다. 이 가운데 F_0F_1 -ATPase 및 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)와 관련한 미토콘드리아 호흡연쇄 저해는 항암활성 물질을 동정하고 개발하는데 유망한 표적이 될 것이다.

- 본 연구팀은 미토콘드리아 호흡 저해를 통한 항암조절 기전 규명을 위해 다음과 같은 새로운 과학적 질문을 제기하고 연구를 수행하고자 한다. ① 미토콘드리아 호흡 저해에 관여하는 신호전달기작은 무엇인가? ② 미토콘드리아 호흡 저해에 관여하는 p53의 인산화 조절기전은 무엇인가? ③ 미토콘드리아 호흡 저해는 세포주기 조절 및 세포사멸과 어떠한 관련성이 있는가? ④ 미토콘드리아 호흡 저해는 암세포성장에 중요한 역할을 하는 원형질막 수용체에 어떠한 영향을 미치는가? ⑤ 미토콘드리아 호흡 저해는 암세포의 이주 및 전이에 어떠한 영향을 미치는가?

⑥ 항암활성을 갖는 물질과 미토콘드리아 호흡 저해는 어떠한 관련성이 있는가? ⑦ *in vivo* 모델에서 미토콘드리아 호흡 저해제는 항암활성을 가지는가?

- 본 연구실은 종양억제 기능과 관련한 세포내 미토콘드리아 호흡저해 기전에 대한 항암 메커니즘 규명에 대한 우수한 예비 연구결과들을 도출하였다. 따라서 미토콘드리아 호흡 저해 기능을 가진 항암 활성 물질을 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 조절기전 규명은 암 뿐만 아니라 여러 질환을 모델로 하여 치료가 가능할 것이고, 암전이 예방 및 치료에 다양한 생명공학 기술의 응용이 가능할 것으로 사료된다.

나. 연구목표

● 궁극적 연구목적

- 암은 21세기 인간수명 연장을 위해 최우선적으로 극복해야 할 과제이며, 고부가가치 첨단 의료산업 분야이다. 암유전자나 종양억제 유전자의 조절기전 연구는 암의 발생기전을 규명하고 궁극적으로 암을 치료하는 근본적인 연구라 할 수 있다. 전 세계의 암연구자들은 획기적인 신기술을 이용해 근본적인 기초연구를 통해 암의 발생 및 암의 전이를 예측하고, 전이를 극복할 수 있는 연구를 수행하고 있으며, 항암제 개발에 노력을 기울이고 있다. 따라서 본 연구과제에서 수행할 미토콘드리아 호흡저해 기전 연구는 새로운 항암제의 개발과 가능성에 대한 학문적인 토대를 마련하고, 국제저명 학술지 투고를 통한 중앙생물학 분야에 공헌하여 국가의 과학기술 경쟁력을 강화하고, 고부가가치산업인 항암제 생산에 대한 원동력을 제공하여 우리나라가 기초과학의 선진국임을 입증할 것이다.

● 최종 연구목표

- 미토콘드리아의 호흡 저해를 통해 암세포의 생리적 변화를 관찰하고, 이를 바탕으로 다음과 같은 항암기전의 기초 자료를 제공하고자 한다. 첫째는 미토콘드리아의 호흡 저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전을 규명과 세포주기 조절 기전을 규명하고, 둘째는 미토콘드리아 호흡저해에 의한 원형질막 수용체 조절기전 및 종양 이주 및 침투 억제 기전을 규명하고, 셋째는 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명과 조직병리학적 생체 반응을 분석 및 규명한다. 본 연구를 통해 항암 물질 개발의 기초 자료를 마련 할뿐 아니라, *in vitro* 및 *in vivo* system의 검증을 통해 새로운 항암 표적인자를 발굴한다.

● 연도별 연구목표

구분	연구목표	주요 연구개발 내용
1년차 (’08년)	미토콘드리아 호흡저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전 규명 및 세포주기 조절 기전 규명	• 미토콘드리아 호흡저해 및 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 발현 양상 및 p53의 전사 활성화 조절 확인
		• 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 활성화의 차이점 분석
		• 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 확인
		• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절에 p53 관련성 및 전사인자 조절 기전 규명
2년차 (’09년)	미토콘드리아 호흡저해에 의한 원형질막 수용체 조절기전 및 중앙 이주 및 침투 억제 기전 규명	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 EGFR, VEGFR, PDGFR 등의 수용체 활성화 기전 규명
		• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 FAK 활성화 기전 규명
		• 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 MMPs의 활성화 조절 기전 규명
3년차 (’10년)	미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명 및 항신생혈관 조절기전 규명	• Phage display를 이용한 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명
		• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 항신생혈관 조절 기전 규명 (tumor xenograft model)
		• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 항종양 전이 기전 규명 (Spontaneous lung metastasis model)

● 학술활동계획, 특허 등 지적재산권 출원계획, 연구조원 인력양성계획

- 논문게재 등의 학술활동계획, 특허 등 지적재산권 출원계획, 연구조원 인력양성계획 등을 서술하고 제시된 표에 정량적인 내용을 건수 또는 인원수로 기재함.

- 논문게재 등의 학술활동계획

지금까지 본 연구자의 연구결과발표를 참조하여 과제수행을 통한 연구결과를 The Journal of Biological Chemistry, Carcinogenesis, Gene Therapy, Oncogene, Journal of Cellular Physiology, Journal of Proteome Research, Proteomics, Journal of Cellular Biochemistry, 등 국제적으로 인정되는 우수학술지에 연간 2편 이상 게재할 예정임. 또한 국내에서 발행하는 국제학술지에도 본 과제에 대한 우수연구내용을 매년 1편씩 게재할 예정임.

- 특허 등 지적재산권 출원계획

본 연구를 통해 3년간 국내 및 국제 특허를 각각 1개씩 출원을 목표로 한다.

- 연구조원 인력양성계획

본 연구의 수행으로 박사 3명, 석사 2명 이상의 배출실적을 목적으로 하며, 실험을 수행할 기초과학 분야의 연구원을 2명 이상 육성한다.

< 연도별 목표 >

구분	국외논문		국내논문		특허출원		인력양성	
	SCI	비SCI	SCI	비SCI	국외	국내	석사	박사
1차년도	2		1					1
2차년도	2		1			1	1	1
3차년도	2		1		1		1	1

2. 국내외 기술개발 현황

가. 관련 연구동향 및 차별성

● 국외의 연구동향

- 미국의 하버드 대학 Mootha VK. 연구팀은 미토콘드리아의 다섯 가지 대표적 기능 (세포 독성 물질 생산, 에너지 대사 조절, 약물 대사 관여, 미토콘드리아 막 전압 및 미토콘드리아 유전자 발현)을 측정할 수 있는 방법을 개발하고, 널리 사용되고 있는 주요 약물들이 미토콘드리아 각각의 기능에 어떤 영향을 주는지를 규명함. (*Nat Biotechnol.* doi:10.1038/nbt1387, 2008)
- 일본 도쿄대학의 Iwamura H. 연구팀이 Respiratory chain/ complex I 저해제인 N-Methyl-2-n-dodecyl-3-methylquinolinium (MQ18)과 N-methyl-4-[2-methyl-3-(p-tert-butylphenyl)] propylpyridinium (MP6)을 합성 및 발굴함. (*J Biol Chem.* 272(26), 16176-83, 1997)
- 러시아 모스크바 주립대학의 Vinogradov AD. 연구팀이 rotenone의 Respiratory chain/ complex I 저해 기능을 규명함. (*Biochim Biophys Acta.* 1319(2-3), 223-32, 1997)
- 스페인의 CIBE-Merck 연구소의 Tormo JR. 연구팀이 Respiratory chain/ complex I 저해제인 rolliniastatin-1의 기능을 규명하고 rolliniastatin-1의 유도체를 합성함. (*Oncol Res.* 13(12), 521-8, 2003)
- 이탈리아의 Immunovirology and Biotherapy 연구소의 Dolcetti R. 연구팀이 mofarotene (Ro 40-8757)의 Respiratory chain/ complex I 저해 기능을 규명함. (*Oncogene.* 22(6), 906-18, 2003)
- 일본 도쿄 대학의 Iwamura H. 연구팀이 Respiratory chain/ complex III 저해제인 antimycin A의 기능을 규명하고 antimycin A의 유도체를 합성함. (*Biochim Biophys Acta.* 1229(2), 149-54, 1995)
- 미국의 일리노이 대학의 Ramirez VD. 연구팀이 polyphenolic phytochemical인 resveratrol과 17-Estradiol의 F₀F₁-ATPase/ATP synthase 저해 기능을 규명함. (*Br J Pharmacol.* 130(5), 1115-23, 2000)
- 미국의 스탠포드 대학의 Khosla C. 연구팀이 apoptolidin, ossamycin, oligomycin의 F₀F₁-ATPase/ATP synthase 저해 기능을 규명함. (*Proc Natl Acad Sci USA.* 97(26), 14766-71, 2000)

● 국내의 연구동향

- 국내의 미토콘드리아와 관련한 세포 신호전달기전의 연구가 외국에서 발굴한 화합물을 중심으로 이루어지

고 있으며, 대부분 구조가 밝혀지지 않은 천연물에 치중하고 있다. 또한 미토콘드리아와 관련한 세포 신호전달기전의 연구는 '세포사멸 (apoptosis, programmed cell death)'을 중심으로 이루어지고 있으며, 미토콘드리아 호흡 저해를 통한 총체적 종양제어 신호전달 연구가 시작되는 단계임.

● 연구의 차별성

- 본 연구책임자는 암의 주요 인자로 알려진 PTEN, p53, Rb, E2F/DP complex, MMP-9과 관련한 NF-kB, AP-1의 활성화 분자기전, 세포신호전달 기전 및 항암기전에 관한 연구를 수년간 수행해왔으며, 이와 관련한 다양한 종류의 신호전달 저해물질들을 확보하고 있어 발굴된 표적인자의 validation을 결정하는데 강점을 갖고 있다. *in vitro* 시스템에서의 연구뿐만 아니라 *in vivo* 시스템에서 항암활성을 연구할 수 있는 기반이 본 연구실에 잘 구축되어 있어, 관련 연구진들이 체계적이고 집중적인 연구를 수행할 수 있는 장점을 갖고 있다.

- 이전 예비연구에서 항암 후보물질로 탐색·개발한 Ascochlorin과 그 유도체들(그림 1)은 면역체계의 활성조절에 의한 항암 활성조절 등이 보고되었으며, 최근의 본 연구실의 연구 결과 이러한 화합물들이 종양의 성장과 진행을 억제 한다는 새로운 종양 억제 메커니즘을 제시하여 다음과 같은 우수학술지에 교신저자로 발표하였다. (Cho H.J. *et al.* (2007) *Carcinogenesis*. 28, 1104-1110, Kang J.H. *et al.* (2006) *J Proteome Res.* 5, 2620-31, Hong S. *et al.* (2005) *J Biol Chem.* 280, 25202-25209).

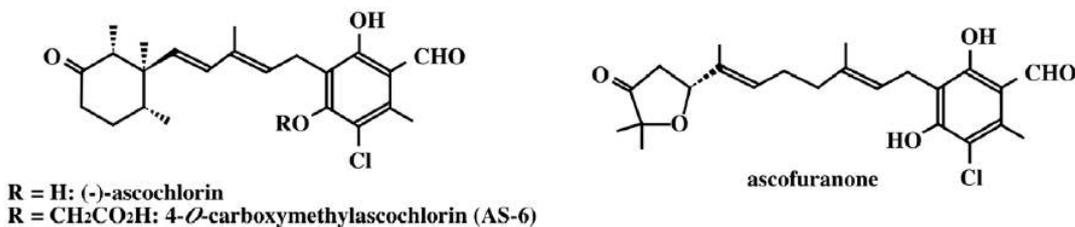


그림 1. ascochlorin과 그 유도체들의 구조

나. 연구과제의 중요성

- 기존의 화학요법에 사용되던 항암제들은 주로 DNA 손상을 통한 암세포의 세포사멸이나 세포의 성장에 관련된 암유전자 혹은 종양억제 유전자 조절을 통해 항암 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 항암활성을 갖는 약물에 대한 세포내 표적 유전자를 찾을 수 있는 프로테오믹스(proteomics) 등의 연구를 통해 기존의 암유전자 뿐만 아니라 새로운 표적 유전자에 대한 항암기전 연구가 진행되고 있다. 뿐만 아니라, 이런 표적 유전자의 기존 기능과 또 다른 기능이 해석되면서 항암기전 규명에 대한 연구는 새로운 국면을 맞이하고 있다.

- 본 연구과제를 통해 수행할 미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암기전 연구는 기존 항암제와 다른 독특한 항암 활성 경로로 작용한다는 새로운 생물학적 기전해석으로 새로운 항암 물질 개발의 기초를 마련 할뿐만 아니라, 기존의 항암제에 대한 새로운 해석을 할 수 있는 기초자료를 제공할 것이다. 그리고 연구과제를 통해 수행할 유전자 및 단백질 발현 조절 기술 (미토콘드리아 호흡저해제 개발기술, 단백질 발현분석기술, 종양관련 표적인자 탐색기술, 세포주기 분석 기술, 암전이 제어기술, knock-down, shRNA, chIP)은 우수한 국외의 연구실에서 수행하고 있는 동일한 기술을 보유하고 있다. 또한 새로이 개발된 항생물질인 ascochlorin 및 그 유도체들

은 중앙 억제 기전 연구에 중요한 양성대조 물질 및 항암 후보 물질로서 활용 가능할 것으로 사료된다. 따라서 미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암기전 연구는 국외의 연구보다 한발 앞선 항암조절 기전 규명에 대한 토대를 마련할 것이다.

3. 연구수행 내용 및 결과

3.1. 1차년도('08년) 연구 내용 및 연구 결과

▶ 미토콘드리아 호흡저해 및 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 발현 양상 및 p53의 전사 활성 조절 확인

- 미토콘드리아 호흡저해와 p53의 안정화의 관련성을 확인하기 위해 U2OS(wild-type p53 osteosarcoma)와 Saos-2(p53-deficient osteosarcoma)를 이용하여 실험을 수행하였다. 미토콘드리아의 호흡을 저해하는 ascochlorin과 그 유도체들을 U2OS와 Saos-2 암세포주에 농도별로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay법으로 세포의 성장을 확인하였다. U2OS 세포의 경우 동일한 농도에서 ascochlorin, ascofuranone 그리고 AS-6 (그림 1)의 순으로 성장억제 효과를 보이는 반면, Saos-2 세포의 경우 ascochlorin과 그 유도체들에 대해 아무런 성장억제 효과가 관찰되지 않았다 (그림 2). p53 유전자를 가진 세포에서 나타난 이 결과는 미토콘드리아 호흡저해에 p53이 관련성을 확인할 수 있다.

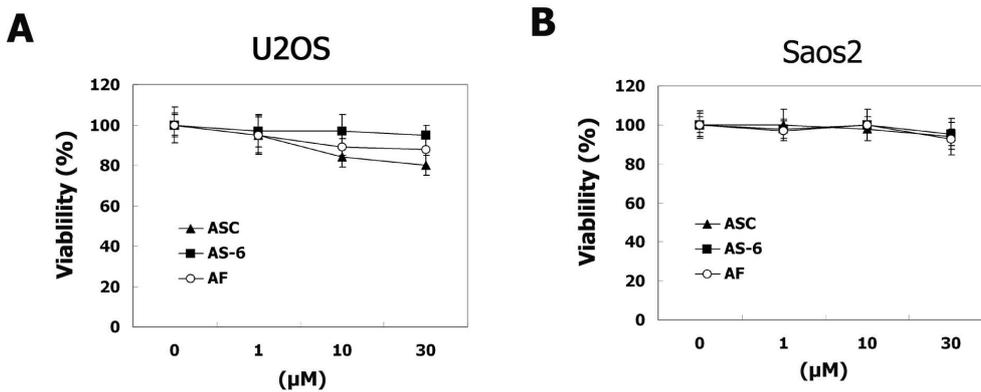


그림 2. 미토콘드리아 호흡저해제 (ascochlorin과 그 유도체들)에 의한 암세포의 증식저해 효과

- 미토콘드리아의 호흡 저해 확인은 ascochlorin과 그 유도체들 그리고 대표적인 미토콘드리아 호흡저해제로 알려진 antimycin A, oligomycin A, rotenone을 처리하여 ATP 농도를 ATP assay kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany)를 이용하여 확인하였다. U2OS 세포에 다양한 미토콘드리아 호흡 저해 억제제를 처리하여 ATP 농도를 측정된 결과 AS-6는 세포내 ATP 농도에 영향을 주지 못하였으나, ascochlorin과 ascofuranone 은 antimycin A, oligomycin A 및 rotenone과 함께 세포 내 ATP 농도를 감소한다는 새로운 현상을 발견하였다. (그림 3). 그리고 ascochlorin과 그 유도체들은 막전이의 와해를 초래하지 않아 독성이 없는 것을 관찰하였다 (그림 4).

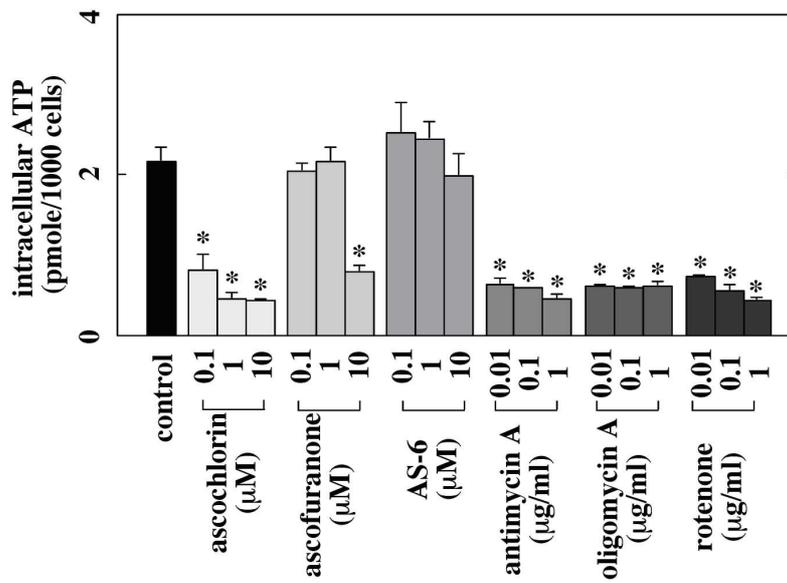


그림 3. 다양한 미토콘드리아 호흡 저해제에 의한 세포내 ATP 농도 측정

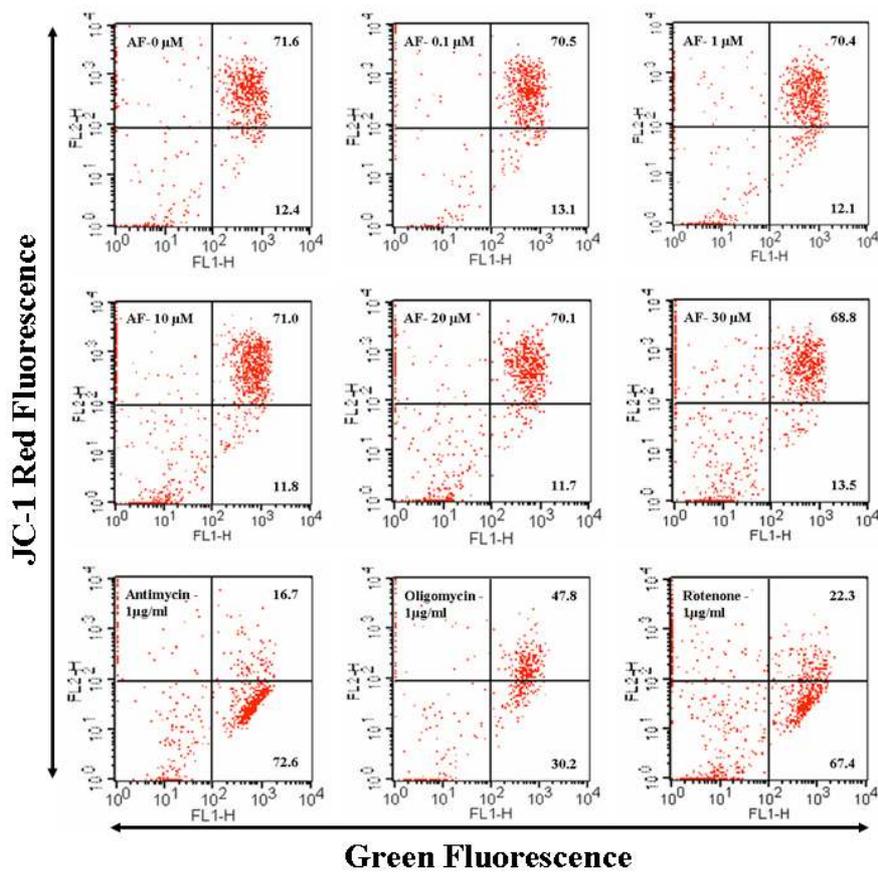


그림 4. 다양한 미토콘드리아 에너지 대사 저해제에 의한 미토콘드리아 막전이 수준 측정

- U2OS 세포에서 ascochlorin과 그 유도체들에 의한 p53의 단백질 변화를 조사하였다. U2OS 세포에 처리한 ascochlorin과 ascofuranone은 p53의 발현이 증가하였으나, p53의 발현을 유도한 ascochlorin의 4'-hydroxy group을 carboxymethoxyl group으로 치환된 AS-6 경우에는 p53의 발현증가가 관찰되지 않았다 (그림 5. A). 또한 p53의 단백질 변화와 동일하게 p53의 하위 신호전달에 관여하는 p21^{WAF1}과 인산화를 통하여 프로테오솜/유비퀴틴 시스템에 의해 p53을 조절하는 Hdm2의 발현이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 HeLa 세포에서 관찰되었으며 p53이 결핍된 Saos-2세포와 p53이 변이된 C33A 암세포에서는 p53, p21, hdm2 발현 증가가 관찰되지 않았다 (data not shown). 미토콘드리아의 호흡 저해 활성을 가진 양성 대조물질로 antimycin A, oligomycin A, rotenone을 U2OS 세포에 처리하여 ascochlorin, AS-6, ascofuranone과 단백질의 변화를 비교 관찰하였다. antimycin A, oligomycin A, rotenone은 AS-6를 제외한 ascochlorin과 그 유도체들과 함께 p53과 그 하위신호전달 인자들의 발현을 증가시켰다 (그림 5. B).

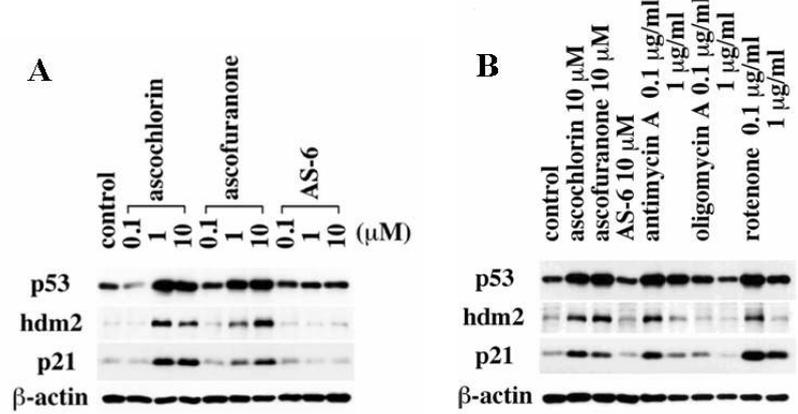


그림 5. ascochlorin과 그 유도체들 및 대표적 호흡저해제들에 의한 세포내 단백질 변화.

- U2OS 세포에서 ascochlorin과 그 유도체들에 의한 p53 활성화를 확인하기 위해 consensus motif의 binding activity를 측정하였다. ascochlorin과 ascofuranone은 binding activity를 나타내었으나, AS-6에 의한 binding 활성은 관찰되지 않았다 (그림 6. A) 이 binding activity는 p53 consensus motif를 가지고 있는 cold oligonucleotide의 첨가에 의해 감소하였으나 mutant motif에서는 감소하지 않았다. 그리고 이 binding activity는 핵단백질에서 p53의 binding activity를 확인하기 위해 p53에 specific한 monoclonal antibody를 첨가 하였을 때 supershift가 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (그림 6. B).

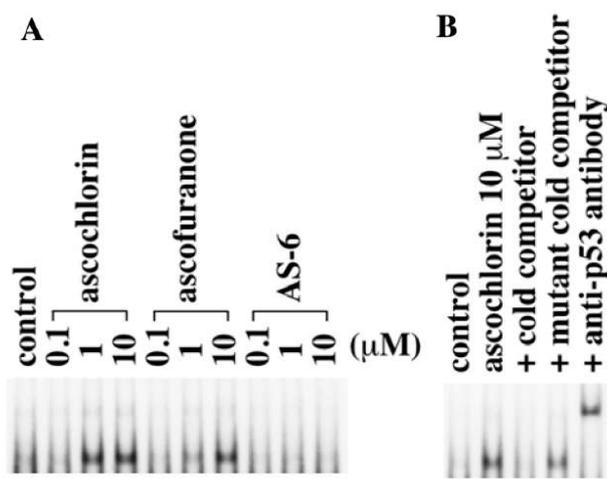


그림 6. ascochlorin과 그 유도체들에 의한 p53의 binding activity 측정.

▶ 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 활성화의 차이점 분석

- U2OS 세포(그림 7. A, B) HCT116 세포(그림 7. C)에 미토콘드리아 호흡저해제, DNA 손상 약물을 처리하여 20시간 반응 후 western blot analysis를 이용하여 p53 단백질의 발현과 p53 단백질의 ser15, ser 20 그리고 ser392번 잔기의 인산화를 확인하였다. 그 결과 DNA 손상 약물인 doxorubicin과 etoposide는 ser15, ser 20 그리고 ser392번 잔기를 모두 인산화 하였고, ascochlorin 및 ascofuranone은 ser392번 잔기를 특이적으로 인산화 하였다. 또한 proteasome inhibitor인 MG132에 의해 ser392번 잔기를 특이적으로 인산화되었다. ascochlorin 및 ascofuranone에 의한 p53의 인산화는 Hdm2의 발현조절을 통해 미토콘드리아 호흡저해제인 antimycin과 MG132와 가장 유사하다는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 EMSA를 통한 p53의 DNA binding activity를 확인한 결과, ascochlorin 및 ascofuranone의 p53 활성화는 MG132와는 달리 미토콘드리아 호흡저해제인 antimycin과 가장 유사하다는 것을 확인 할 수 있었다.

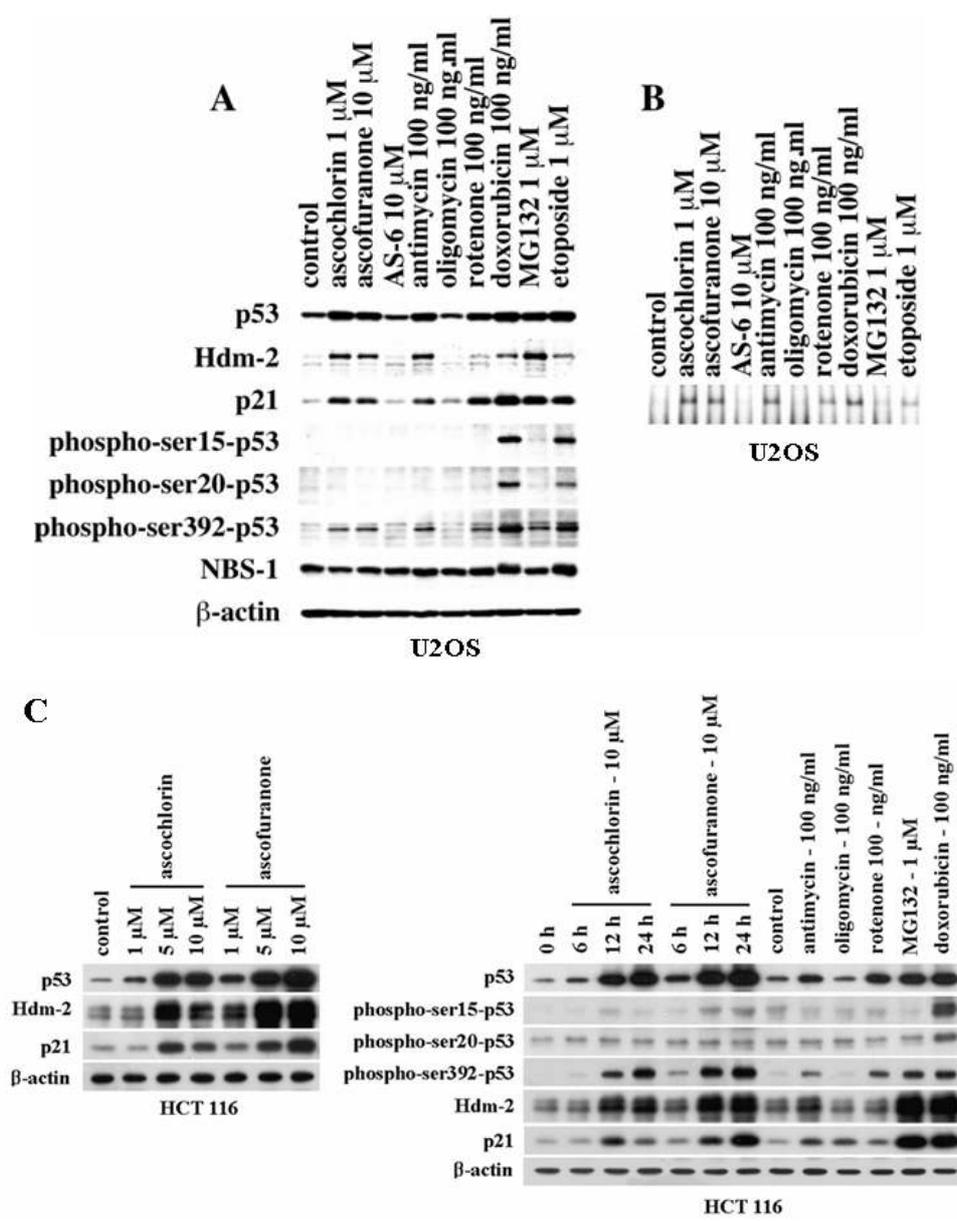


그림 7. 여러 p53 유도물질과 ascochlorin 및 ascofuranone에 의한 p53 활성화의 비교

- U2OS 세포(그림 8. a)와 HCT116 세포(그림 8. b)에 미토콘드리아 호흡저해제, DNA 손상 약물을 처리하여 20시간 반응 후 real-time PCR법을 이용하여 p53 단백질의 표적 유전자들에 대한 전사활성을 mRNA 발현을 정량하여 분석하였다. 그 결과 ascochlorin 및 ascofuranone에 의한 *hdm2*, *p21*, *gadd45*, *puma*의 전사활성은 antimycin과 가장 유사한 발현양상을 보였으며, doxorubicin과 etoposide는 *p21*을 MG132는 *gadd45*를 특이적으로 높은 수준의 전사활성을 유도하였다.

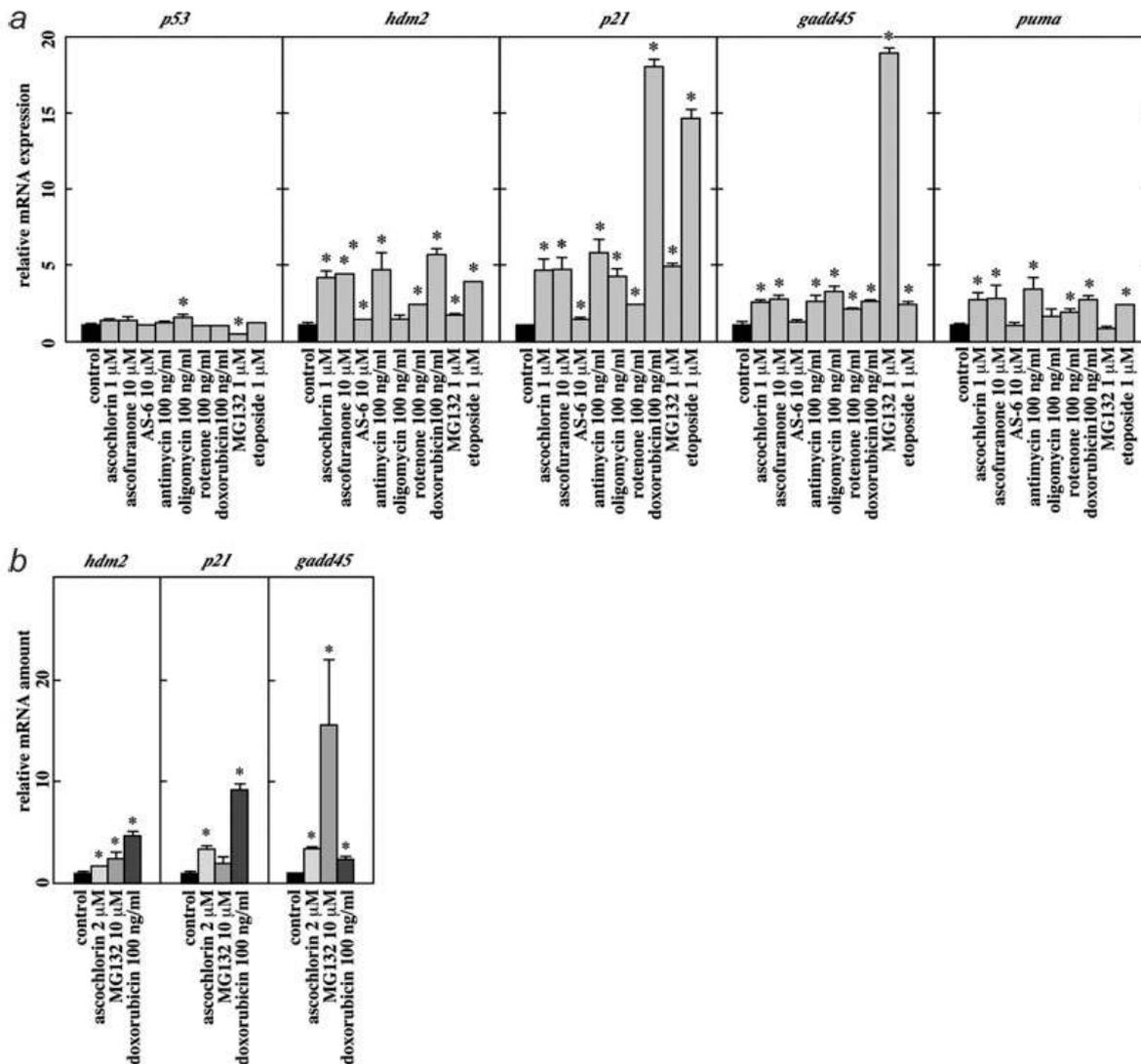


그림. 8 여러 p53 유도물질과 ascochlorin 및 ascofuranone에 의한 p53 단백질의 전사활성 비교

- U2OS 세포에 미토콘드리아 호흡저해제, DNA 손상 약물을 처리하여 20시간 반응 후 Immunofluorescence를 이용하여 phospho-Ser317-CHK1와 phospho-Ser1981-ATM 항체를 반응시키고 형광의 강도를 공초점 현미경 (Leica, Solms, Germany)으로 관찰 하였다. 1 μ M 농도의 ascochlorin은 DNA 손상약물인 doxorubicin과는 달리 phospho-Ser317-CHK1 및 phospho-Ser1981-ATM의 형광에 대한 반응이 확인되지 않았다 (그림 9 a). 또한 comet assay (single-cell gel electrophoresis)를 통한 DNA 손상을 확인한 결과, ascochlorin은 doxorubicin과는 달리 DNA의 손상이 없음을 확인하였다 (그림 9 b, c).

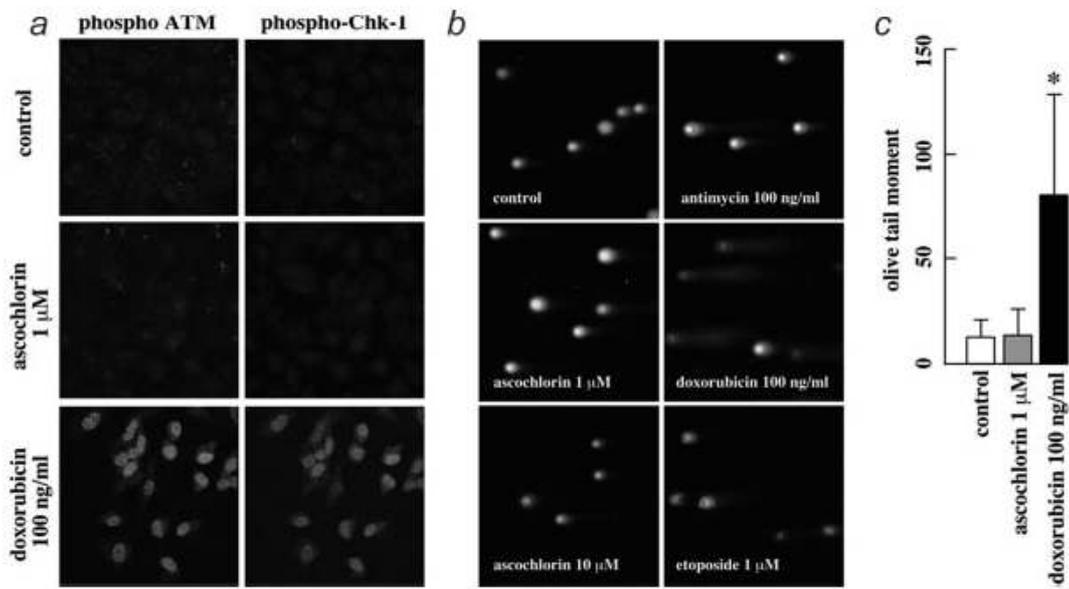


그림 9. ascochlorin에 의한 DNA 손상 확인

- U2OS 세포에 단백질 합성저해제인 Cycloheximide (10 ug/mL)를 24시간 동안 처리한 후 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물을 20 시간 동안 처리하여 Western Blot Analysis로 p53 단백질의 합성 정도를 비교·분석하였다. 그 결과 ascochlorin에 의한 p53 단백질의 합성정도는 proteasome inhibitor인 MG132보다는 적지만 control에 비해서는 증가하였고 doxorubicin과는 유사한 수준으로 증가하였다 (그림 10 a, b).

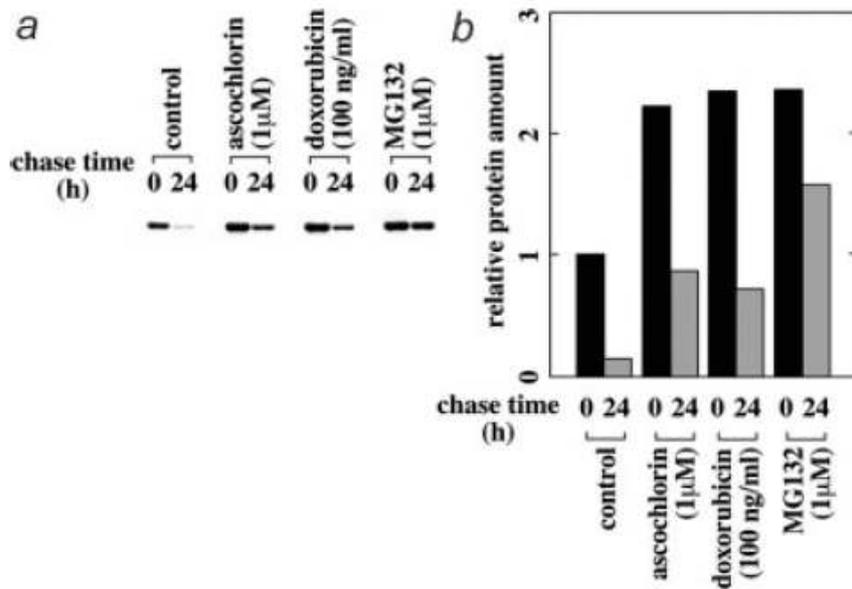


그림 10. 여러 p53 유도물질과 ascochlorin에 의한 p53 단백질의 합성정도 비교

▶ 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 확인

- 미토콘드리아 호흡저해 물질인 ascochlorin과 그 유도체들이 세포주기에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. ascochlorin과 그 유도체들 및 다양한 약물을 이용하여 세포주기를 측정하였다. U2OS (Rb+, p16-, p53+), Saos-2(Rb-, p16+, p53-), C33A(Rb-, p16-, p53-) 및 HeLa 세포를 이용하여 유전자의 변화에 따른 세포의 주기를 확인하였다. doxorubicin, γ -ray, MG132, nocodazole, UV, etoposide는 세포에 따라 G0 기에 세포주기를 억제하였고, ascochlorin, ascofuranone, aphidicoline, doxorubicin, hydroxyurea, mimosin은 세포에 따라 G1 기에 세포주기를 억제하였으며, γ -ray, MG132, etoposide는 세포에 따라 G2 기에 세포주기를 억제하였다 (그림 11).

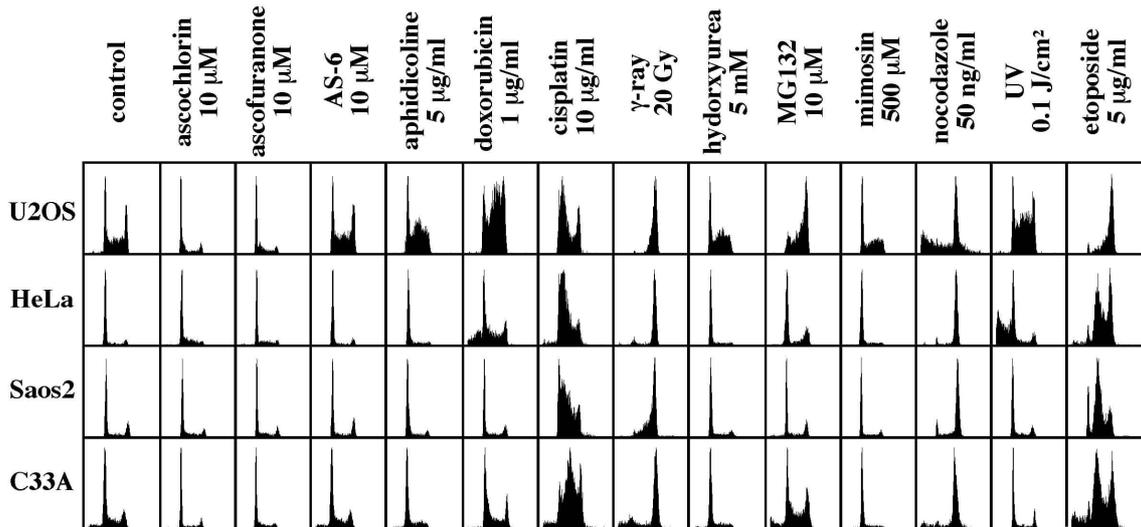


그림 11. 미토콘드리아 호흡저해제와 다양한 약물에 의한 암세포의 세포주기 조절 측정

3.2. 2차년도('09년) 연구 내용 및 연구 결과

▶ 미토콘드리아 호흡저해제 (ascochlorin 및 그 유도체 그리고 ascofuranone)에 의한 암세포의 세포주기 분석

- ascofuranone이 항-증식 효과를 나타내는 메커니즘을 이해하기 위해, 우선 MTT 검정을 사용하여 다양한 인간 암세포주에서 ascofuranone의 세포독성을 검정했다. ascofuranone을 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 사용했으며, DMSO는 그 자체로는 세포 증식에 어떤 영향도 미치지 않는다(데이터는 나타내지 않음). 세포 생존율의 감소는 0.01-30 μ M의 ascofuranone으로 처리하고 24시간 후에 U2OS에서 6-15%, A549에서 1-4%, HepG2에서 1-25% 그리고 MCF-7에서 1-10%이었다 (그림 12).

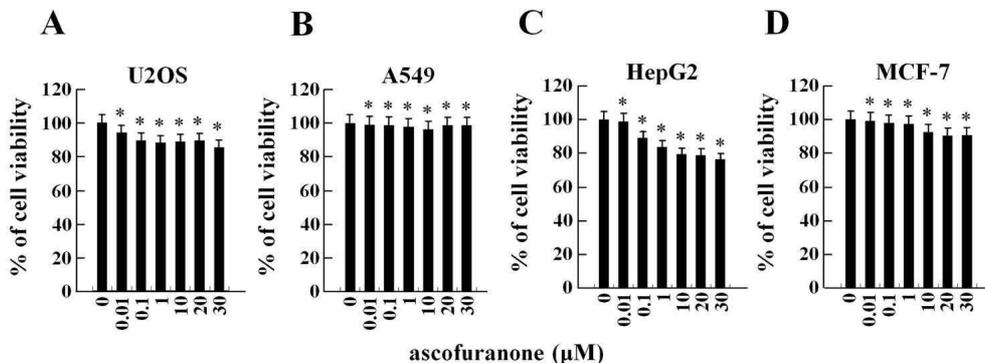


그림 12. ascofuranone에 의한 암세포의 세포생존률 측정

- U2OS 세포 및 HCT116 변이 세포 ($p53^{WT}$, $p53^{-/-}$ 및 $p21^{WAF1^{-/-}}$)에서의 ascochlorin의 증식 저해 효과를 조사하기 위해, ascochlorin (0-30 μ M)을 24시간 동안 처리한 후 MTT 검정으로 생존율을 측정했다. ascochlorin 처리한 후 24시간 후에 도 2에 나타난 바와 같이 U2OS 세포의 세포 생존율은 6-20% ($P < 0.05$) 범위로, HCT116 $p53^{WT}$ 세포에서는 4-21% ($P < 0.05$) 범위로, HCT116 $p53^{-/-}$ 세포에서는 3-12% ($P < 0.05$) 범위로, HCT116 $p21^{WAF1^{-/-}}$ 세포에서는 0-20% ($P < 0.05$) 범위로 감소했다 (그림 13). 고농도의 ascochlorin (30 μ M)은 유의할만한 세포독성을 나타내지 않았으며 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)에 이르지 않았다.

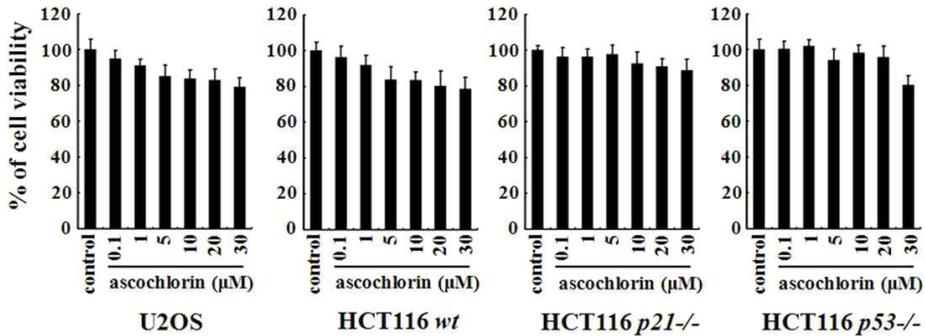


그림 13. ascochlorin에 의한 암세포의 세포생존률 측정

- ascofuranone의 세포독성이 증명되지 않았고 이전의 연구에서 ascofuranone에 의해 $p21^{WAF1/CIP1}$ 의 발현이 증가되었으므로, FACS를 사용하여 암세포에서 ascofuranone이 세포 주기를 조절하는지 여부를 조사했다. 그림14에 도시된 바와 같이, ascofuranone을 U2OS 세포를 처리하면 G1기의 세포가 농도의존적으로 증가한다. G1기 세포의 백분율은 하기와 같이 증가했다 (그림 15): ascofuranone 비처리 대조군 (57.5%, $P < 0.05$)와 비교했을 때, 1 μ M ascofuranone 처리에 의해 2.6% 증가(60.1%, $P < 0.05$), 10 μ M ascofuranone 처리에 의해 29.0% 증가 (86.5%, $P < 0.05$), 30 μ M ascofuranone 처리에 의해 29.8% 증가(87.3%, $P < 0.05$). ascofuranone은 1 μ M에서 세포 주기에 부분적으로 영향을 미치며, 세포 일부가 G1기에서 S기로 세포주기를 진행한다. S기 세포에서의 유사한 증가 또한 관찰되었는데, DNA 합성 저해제인 hydroxyurea의 처리로 인해 G1기 세포에서 10.6% 세포 증가 (68.1%, $P < 0.05$) 및 S기 세포에서 6.7% 세포 증가 (21.3%, $P < 0.05$) 및 G2/M기에서는 17.3% 세포 감소하였으며 (10.6%, $P < 0.05$), 유사분열 저해제인 nocodazole의 처리로 인해 G2/M기에서 42.7% 증가하고 (70.6%, $P < 0.05$) sub-G1기에서 11.6% 증가를 나타냈는데, 이는 apoptosis의 유도를 나타내는 것이다. 반대로, ascofuranone은 sub-G1기를 증가시키지 않는다. 이러한 결과는 ascofuranone이 G1기에서 세포주기를 억제하는 것이다.

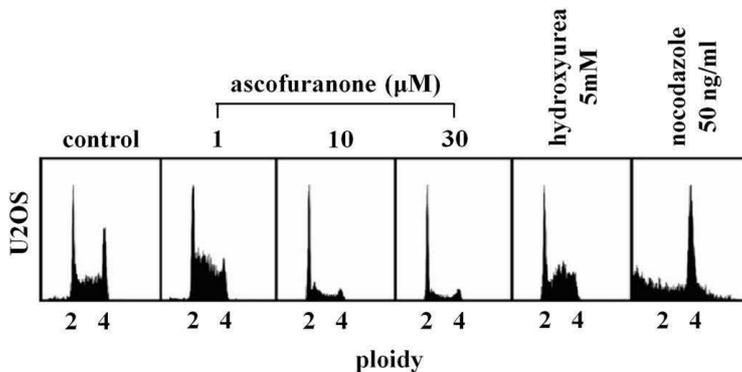


그림 14. ascofuranone에 의한 U2OS세포의 세포주기 억제

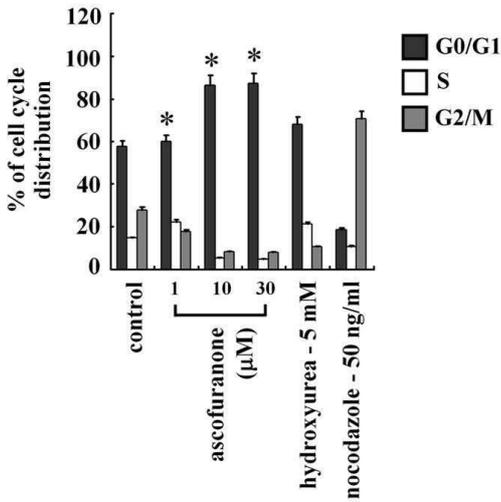


그림 15. ascofuranone에 의한 U2OS세포의 세포주기 분포

- ascochlorin이 암세포에서 세포 주기 조절을 표적으로 하는지 여부를 FACS를 사용하여 조사했다. U2OS 세포를 0.1% FBS를 포함하는 저농도-혈청 배지에서 48시간 동안 단식배양한 후 다양한 농도의 ascochlorin (0.01-10 μM)의 존재 또는 부재 하에서 10% FBS 함유 완전 배지로 24시간 동안 재자극시켰다. 단식배양에 따라, U2OS 세포는 48시간 동안 G1 기에서 정지해 있었으며 (세포 중 80.2%), 그 후 그림 16에서 보여지는 바와 같이 24시간 동안 FBS로만 재자극시켜 세포가 G2/M 기로 이동했다 (세포 중 55.4%). 이에 반해 ascochlorin을 처리한 U2OS 세포는 G2/M기로 진행하지 못했으며, 이는 ascochlorin이 G1기의 세포의 농도의 증가를 야기하며 10 μM이 효과적인 투여량임을 나타내는 것이다. DNA 합성의 저해제인 hydroxyurea 또한 ascochlorin과 유사하게 U2OS 세포를 G1기에 머무르게 하고 G2/M기에서 주목할만한 세포의 감소를 야기하며, 유사분열의 저해제인 nocodazole은 G2/M기에서의 세포를 증가시키고 G1기에서 세포를 유의할만하게 감소시키는데, 이는 G2 세포주기 억제를 의미하는 것이다. ascochlorin을 처리한 U2OS 세포에서 세포 주기 분포로부터의 데이터를 그림 17에 나타냈다.

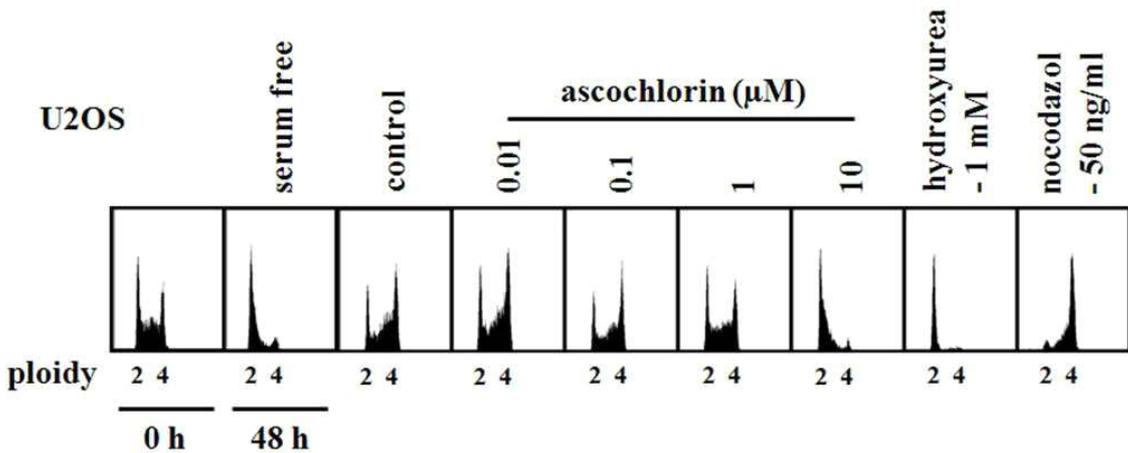


그림 16. ascochlorin에 의한 U2OS세포의 세포주기 억제

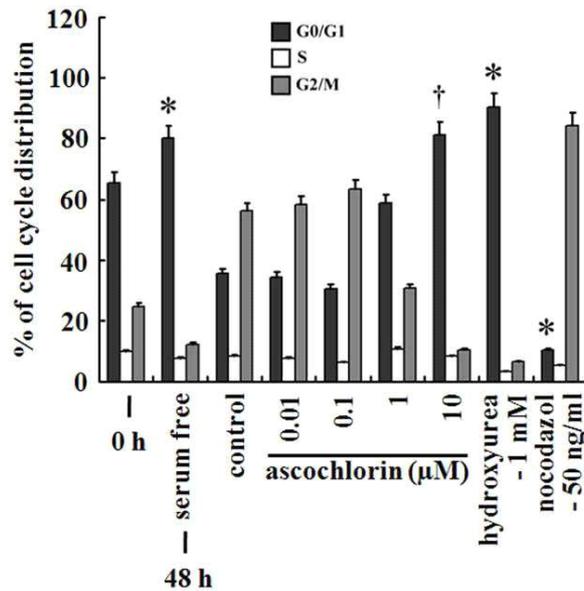


그림 17. ascochlorin에 의한 U2OS세포의 세포주기 분포

▶ 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 관련인자의 발현 양상 확인

- ascofuranone에 의한 G1기에서 세포주기 조절 관련 유전자를 웨스턴 블롯 분석으로 평가했다. 10 μM ascofuranone을 24시간까지 처리한 암세포는 p53 및 p21^{WAF1/CIP1}의 발현에서의 두드러진 증가를 나타냈다 (그림 18). 10 μM ascofuranone으로 24시간 동안 처리한 암세포에서 p53 및 p21^{WAF1/CIP1} 발현의 증가는 다음과 같다: 각각 ascofuranone 비처리 대조군과 비교했을 때, U2OS 세포에서 p53 5.3배 증가 및 p21^{WAF1/CIP1} 2.1배 증가, A549 세포에서 p53 3.1배 증가 및 p21^{WAF1/CIP1} 10.4배 증가, HepG2 세포에서 p53 1.6배 증가 및 p21^{WAF1/CIP1} 3.7배 증가, 및 MCF-7 세포에서 p53 5.1배 증가 및 p21^{WAF1/CIP1} 2.4배 증가. 이전에 보고된 바와 같은 Quantitative PCR (그림 19)에 의해 증명된 이러한 세포주에서의 p21 mRNA의 유의할만한 증가는 하기와 같으며, 이러한 증가가 전사 활성의 결과임을 나타낸다: 각각 ascofuranone 비처리 대조군과 비교했을 때, A549 세포에서 5.5배 증가, HepG2 세포에서 5.8배 증가, MCF-7 세포에서 1.8배 증가 및 U2OS 세포에서 1.8배 증가. 다른 CKI, p27^{KIP1}의 발현은 ascofuranone에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터에 대한 이전 실험들에 의해 증명된 것으로, ascofuranone 처리에 의해 루시페라제의 유의할만한 증가를 증명한다 (그림 20). 그림 20에 나타난 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터 활성의 결과는 각각 p21P-트랜스팩션 대조군과 비교했을 때, 10 μM ascofuranone 처리로 인해 HCT116 ++ 세포에서 1.5배 증가, HCT116 p53-/- 세포에서 1.9배 증가, HCT116 p21-/- 세포에서 1.9배 증가함을 나타낸다. ascofuranone에 의해 유도된 세포증식억제성 G1 세포주기 억제와 일관되게, ascofuranone으로 세포를 처리하면 G2 정지에 관련된 인자 (14-3-3σ 및 사이클린 B) 또는 세포사멸(proapoptotic) 인자 Bax 에 영향을 주지 않고 G1-S 전환에 관련된 사이클린인 사이클린 D 및 사이클린 E의 발현에서 시간의존적 감소를 야기한다 (그림 18). 10 μM ascofuranone으로 24시간 동안 처리한 암세포에서의 사이클린 E 발현의 변화는 다음과 같이 감소했다: 각각 ascofuranone 비처리 대조군과 비교했을 때, U2OS 세포에서 23.0배 감소, A549 세포에서는 발현되지 않음, HepG2 세포에서는 15.0배 감소 및 MCF-7 세포에서는 발현되지 않음. 또한 아폽토시스 및 세포 증식의 조절자인 c-Myc가 ascofuranone에 의해 다음과 같이 상당히 억제됨을 발견했다: 각각 ascofuranone 비처리 대조군과 비교했을 때, U2OS 세포에서는 발현되지 않음, A549 세포에서 4.6배 감소, HepG2 세포에서 4.0배 감소 및 MCF-7 세포에서 5.8배 감소. 반대로, c-Myc뿐만 아니라 사이클린 E에 대한 mRNA 수준의 두드러진 변화는 관찰되지 않았는데 (그림 19), 이는

전사 후 조절이 이러한 분자의 ascofuranone-매개 하위조절의 주요 경로임을 제시하는 것이다. 아스코푸라논은 세포 당 RNA 회수에도 GAPDH 발현에도 유의할만한 영향을 미치지 않았다. 그러므로, 아스코푸라논은 세포 전사에서 일반적인 영향력을 갖지 않음을 알 수 있다.

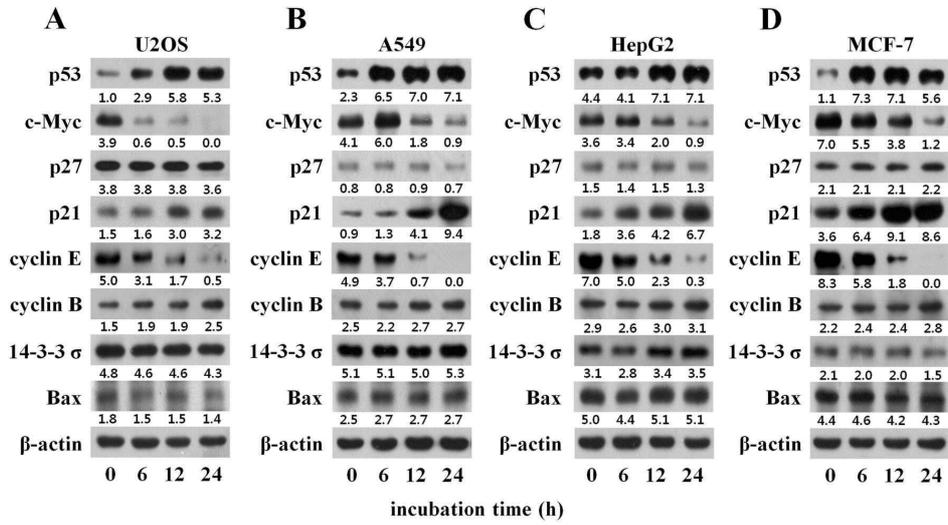


그림 18. ascofuranone에 의한 다양한 암세포의 세포주기 관련 단백질 변화 분석

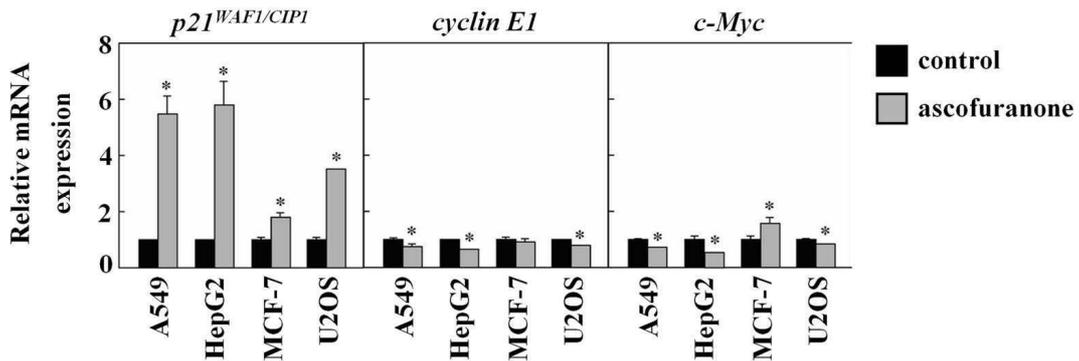


그림 19. ascofuranone에 의한 다양한 암세포의 세포주기 관련 mRNA 정량 변화 분석

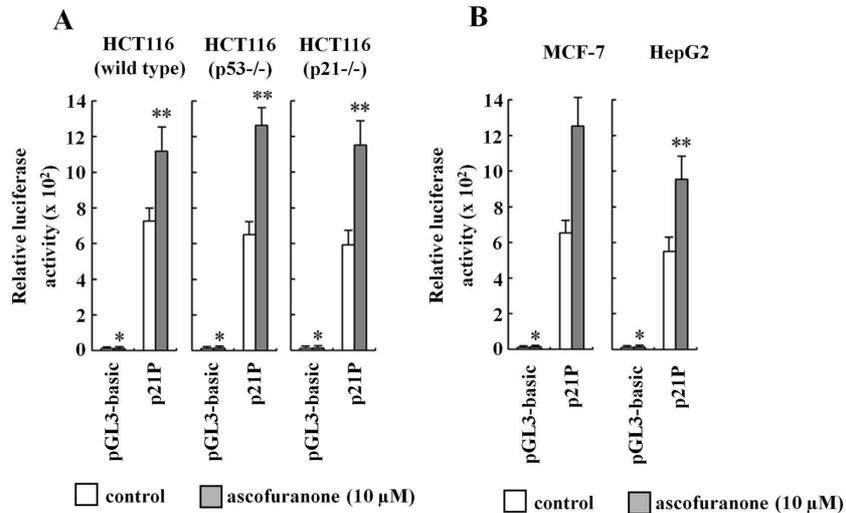


그림 20. ascofuranone에 의한 다양한 암세포의 p21 전사활성 측정

- U2OS 세포 및 HCT116 세포 ($p53^{WT}$, $p53^{-/-}$ 및 $p21^{WAF1/CIP1}$)를 다양한 농도의 ascochlorin (0.1-10 μ M)으로 24시간 동안 처리한 후, $p53$ 야생형 세포 또는 $p53$ 결핍 세포에서 $p53$ 및 $p21^{WAF1/CIP1}$ 발현이 현저하게 증가한 반면 (그림 21), $p27^{KIP1}$ 은 아스코클로린에 의해 영향을 받지 않았다. 그리고 상기 세포주에서 RT-PCR에 의해 $p21$ mRNA이 유의할만하게 증가함을 확인했다 (그림 22). 게다가, 이러한 결과는 $p21^{WAF1/CIP1}$ 프로모터에 대한 실험에 의해 확인된 것으로 아스코클로린 처리에 의한 루시퍼라제 유전자의 유의할만한 증가를 증명했다 (그림 23). 이러한 결과는 ascochlorin에 의한 $p21^{WAF1/CIP1}$ 발현 증가가 전사 활성화에 의한 것임을 나타낸다.

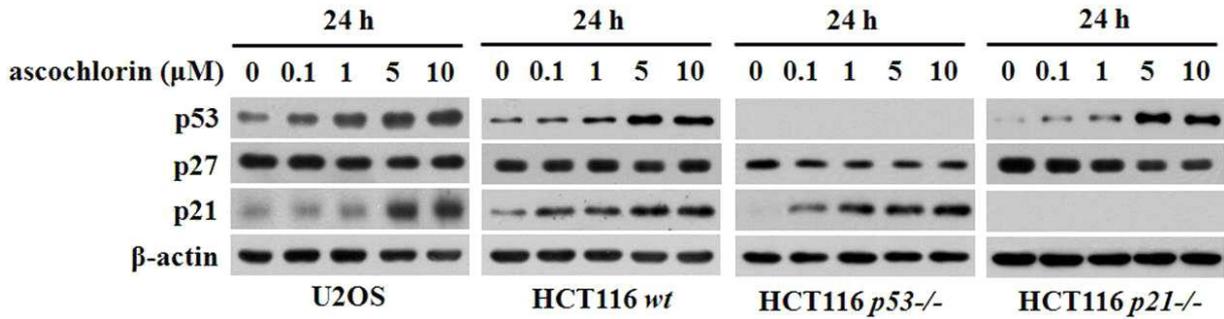


그림 21. ascochlorin에 의한 다양한 암세포의 세포주기 관련 단백질 변화 분석

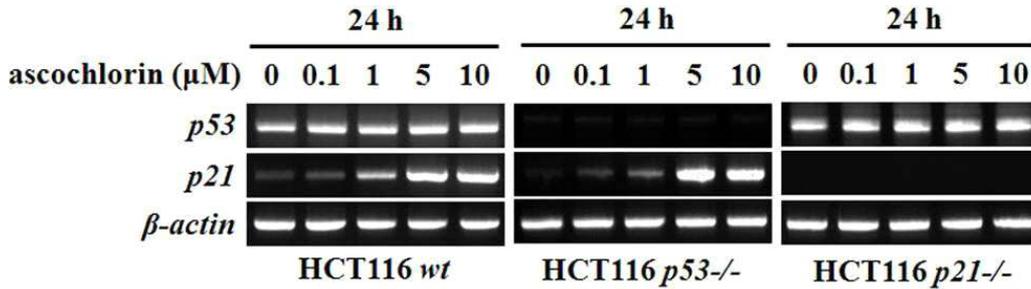


그림 22. ascochlorin에 의한 HCT116세포의 p53, p21 mRNA 발현분석

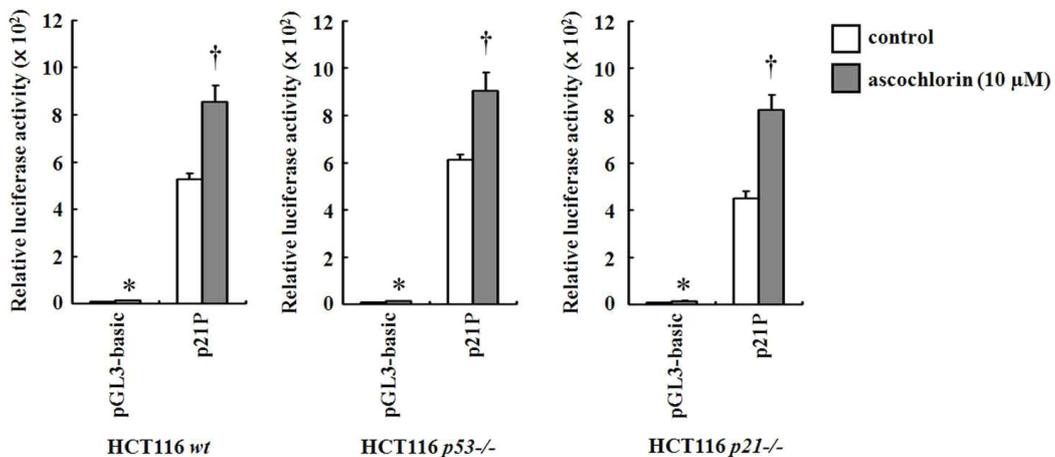


그림 23. ascochlorin에 의한 HCT116세포의 p21 전사활성 측정

▶ 미토콘드리아 호흡저해제 (ascochlorin 및 그 유도체 그리고 ascofuranone)에 의한 세포주기 조절에 관여하는 새로운 전사 인자 발굴

- p53이 p21^{WAF1/CIP1} 유전자 발현의 주요 조절자이기 때문에, HCT116과 p53 및 p21이 결핍된 HCT116을 p53 활성화 및 ascofuranone-유도 G1 세포주기 억제 사이의 관계를 알아내기 위해 사용했다. ascofuranone의 처리는 HCT116 세포에서 각각 ascofuranone 비처리 대조군에 비해 G1기에서 세포수를 30.1% 증가시키고(83.8%, $P < 0.05$) G2-M 기에서 세포수를 17.8% 감소시킨다(10.7%, $P < 0.05$). 그러나 예상치못하게 ascofuranone은 p53 결핍 세포주에서 G1 세포주기 정지를 유도했으나 (G1기의 30.3% 증가) p21^{F1/CIP1} 결핍 세포주에서는 유의할만하게 G1 세포주기 정지를 유도하지 못했는데(G1기의 5.6% 증가), 이는 p53이 ascofuranone-유도 G1 세포주기 억제에 관련되어 있지 않으며 p21^{WAF1/CIP1}이 G1 세포주기 억제를 유도하는데 필수적임을 나타내는 것이다 (그림 24). 이러한 ascofuranone-처리 세포의 웨스턴 블롯팅으로 p21^{WAF1/CIP1} 발현의 유도뿐만 아니라 사이클린 E, 사이클린 D 및 c-Myc의 억제가 p53의 결핍시 명백히 나타나며, 사이클린 E, 사이클린 D 및 c-Myc의 발현은 p21^{WAF1/CIP1} 결핍 세포주에서도 여전히 유의할만하게 억제됨을 증명했다 (그림 25). 10 μ M ascofuranone으로 24시간 동안 처리한 HCT116 p21^{-/-} 세포에서 세포 주기 진행에 관련된 단백질의 발현은 다음과 같이 변화했다: 각각 ascofuranone 비처리 대조군과 비교했을 때 p53의 발현은 17.5배 증가, c-Myc의 발현은 11.7배 감소, 사이클린 D의 발현은 21.0배 감소, 사이클린 E의 발현은 2.3배 감소 및 p27 또는 사이클린 B의 발현은 변화없음. 게다가, ascofuranone은 p53 또는 p21^{WAF1/CIP1}이 결핍된 HCT116 서브라인에서 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터 활성을 증가시키는데, 이는 p53이 ascofuranone에 의한 p21의 전사 활성화에 반응하는 주요 인자가 아님을 나타낸다. ascofuranone 처리에 따른 단백질 발현은 HCT116 p53^{-/-} 및 ^{+/+} 세포에서와 실질적으로 상이함을 주목해야 하는데 (그림 25), 이는 아마도 ascofuranone에 의해 영향을 받는 c-Myc 및 p53 둘 다에 의한 세포 주기 조절자의 조절이 조정되기 때문이다. 또한 그림 26에서와 같이 ascofuranone이 이들 세포주에서 c-Myc 전사에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 c-Myc이 ascofuranone-처리 세포에서 p21^{WAF1/CIP1} 발현의 상위 저해자임을 나타내는 것이다.

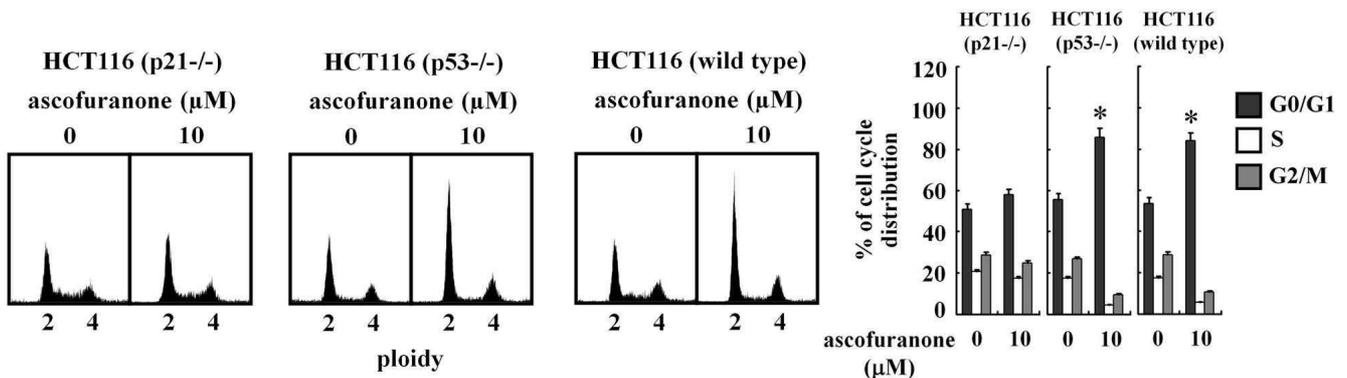


그림 24. ascofuranone에 의한 HCT116세포의 세포주기 분석

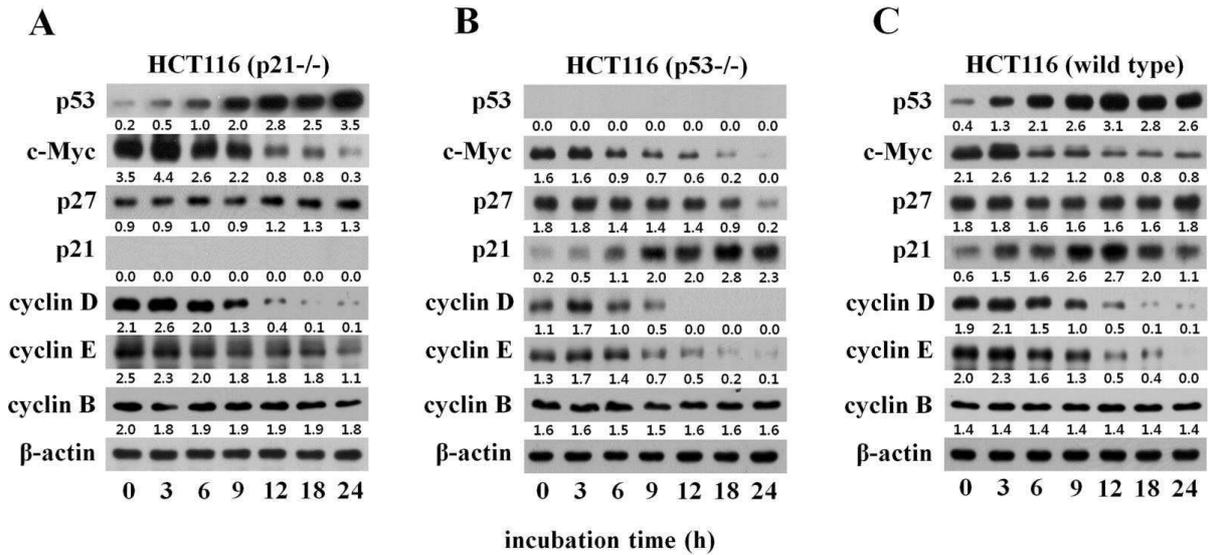


그림 25. ascofuranone에 의한 HCT116세포의 단백질 발현 변화 분석

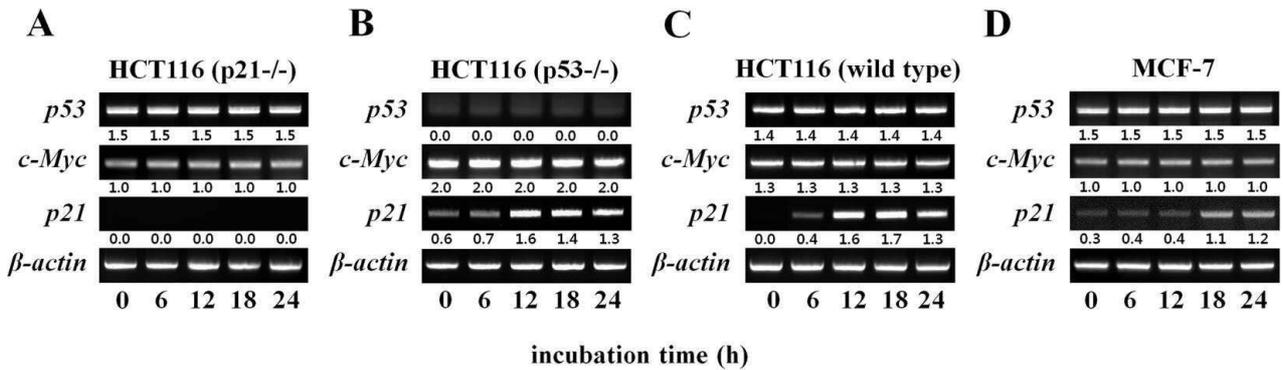


그림 26. ascofuranone에 의한 HCT116세포 및 MCF-7 세포의 mRNA 발현 변화 분석

- p21^{WAF1/CIP1}의 리포터 유전자, mRNA 및 단백질이 p53 결핍 세포에서 ascochlorin에 의해 증가되거나 활성화되는데 이는 ascochlorin에 의한 p21^{WAF1/CIP1} 활성화가 p53과 독립적으로 이루어지는 것임을 나타낸다. 이에 따라, p21^{WAF1/CIP1}의 다른 c-Myc 조절자가 G1/S 세포 주기 진행에 관련되어 있다고 사료된다. 따라서, ascochlorin이 c-Myc 발현에 영향을 미치는지를 웨스턴 블롯 분석으로 분석했다. 그 결과로서, p53 야생형 세포 또는 p53 결핍 세포에서 ascochlorin의 농도의존적으로 c-Myc가 유의할만하게 억제됨을 확인했으나 (그림 27), RT-PCR을 통해 c-Myc의 mRNA 수준은 주목할만한 변화가 없음을 관찰했다 (그림 28). 이는 전사후 조절이 c-Myc의 ascochlorin-유도 하위조절의 주요 경로임을 나타내는 것이다. ascochlorin은 세포에 의한 RNA 회복에도 그리고 β-액틴 발현에도 유의할만하게 영향을 미치지 않았다. 그러므로, ascochlorin은 세포 전사에 일반적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

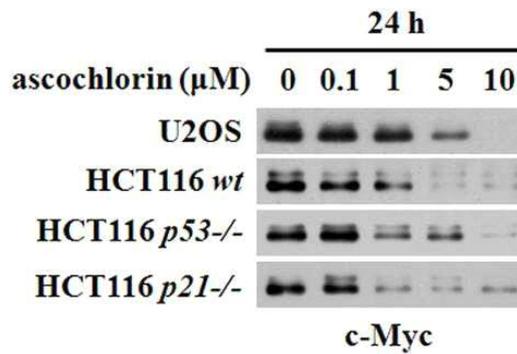


그림 27. ascochlorin에 의한 다양한 암세포의 c-Myc 단백질 발현 변화 분석

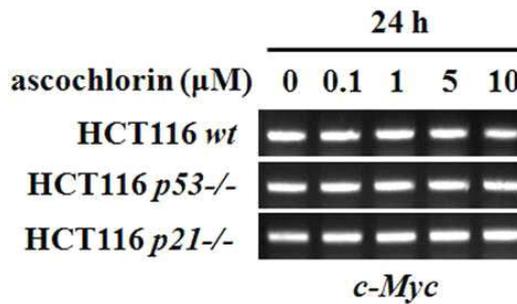


그림 28. ascochlorin에 의한 HCT116세포의 c-Myc의 mRNA 발현 변화 분석

- c-Myc은 DNA-결합 단백질 Miz-1에 의해 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터에 직접적으로 결합하며 이러한 결합은 p21^{WAF1/CIP1} 발현을 저해한다. ascofuranone-처리 HCT116 또는 MCF-7에서 c-Myc가 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터에 결합했는지 여부를 평가하기 위해, ChIP 검정을 실시했다. Miz-1 및 Sp1에 대한 항체를 c-Myc에 대한 항체와 비교하기 위해 사용했다. 이러한 항체와 함께 면역침강시킨 후에 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터와 인접한 영역을 특이 프라이머 세트를 사용하는 PCR로 증폭시켰다 (그림 29). c-Myc 면역침강 후에, 강한 신호가 비처리 세포에서 검출되고 ascofuranone-처리 세포에서는 완전히 사라졌다. p53 또는 p21^{WAF1/CIP1} 결핍 세포에서의 ChIP 검정을 실시하여 ascofuranone이 p53에 관계없이 p21 프로모터로부터 c-Myc를 해리시킴을 발견했다. 반대로, 유사한 신호가 ascofuranone-처리 및 비처리 세포 둘 다에서 Miz-1 및 Sp1에 대한 항체와 면역침강된 크로마틴 단편에서 검출되었다. 증폭된 산물은 본 발명에서 사용된 항체의 특이성을 확인하는 대조 IgG에 의해 검출되지 않았다. 이러한 결과는 아스코퓨라논이 c-Myc 발현의 하위조절을 통해 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터의 c-Myc-매개 억제체를 특이적으로 감소시킴을 나타낸다.

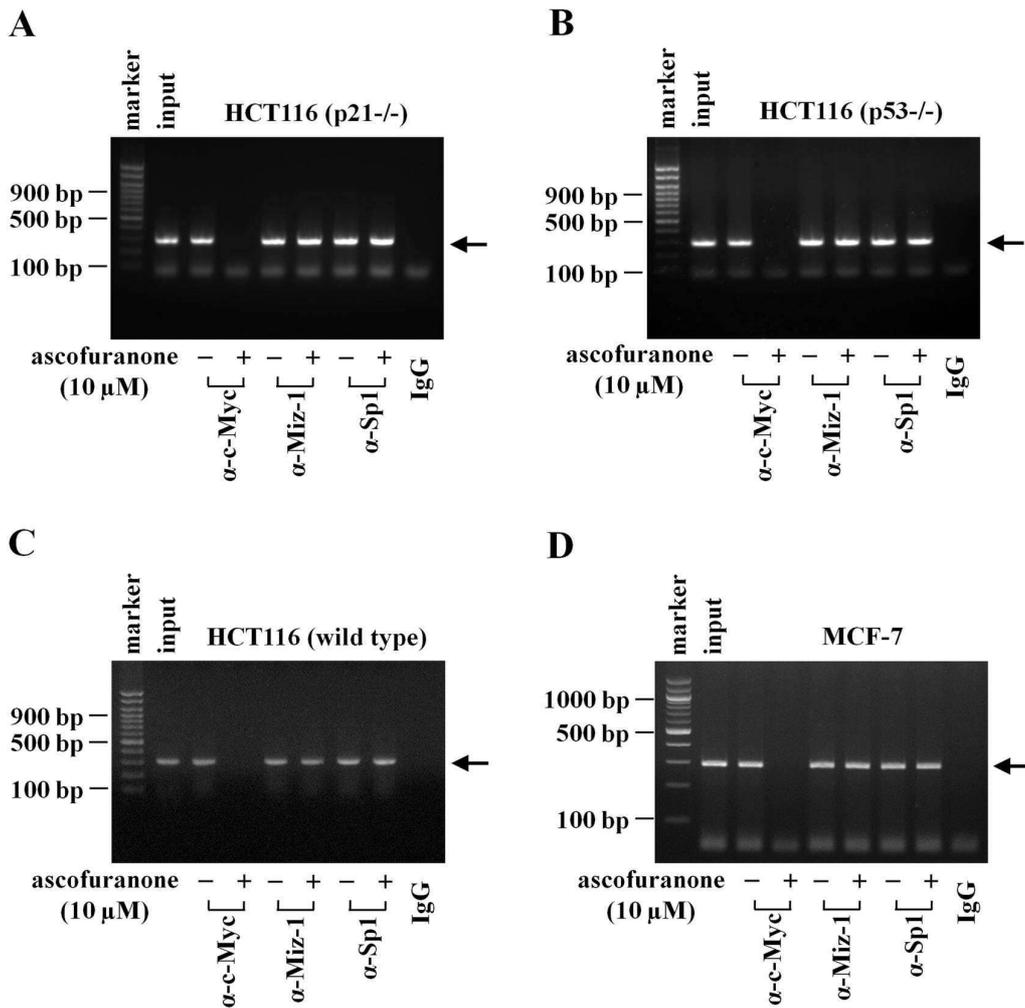


그림 29. ascofuranone에 의한 p21프로모터 영역의 c-Myc의 결합 활성 측정

- c-Myc의 ascofuranone 유도 하위조절에 의한 p21^{WAF1/CIP1}의 활성화를 확인하기 위해, c-Myc 특이 siRNA 듀플렉스 또는 p53 특이 siRNA 듀플렉스로 RNA(siRNA)를 간섭하였다. c-Myc 또는 p53을 표적으로 하는 siRNA 또는 음성 대조로서 비-특이 siRNA를 HCT116 또는 MCF-7에 트랜스펙션시키고 웨스턴 블롯 분석으로 c-Myc, p53, p21^{WAF1/CIP1} 및 ββ-액틴의 발현을 분석했다. 각 siRNA는 표적 분자의 발현을 특이적으로 저해하였으며 ascofuranone-유도 p21^{WAF1/CIP1} 발현은 p53 발현억제가 아닌 c-Myc 발현억제에 의해 완전히 저해되었다 (그림 30). ascofuranone을 처리한 c-Myc 발현억제 세포에서 p21^{WAF1/CIP1}의 발현은 ascofuranone을 처리하지 않은 대조군에 비해 유의할만하게 증가하지 않았다 (1.2배 증가). 그리고 c-Myc 발현억제는 p21^{WAF1/CIP1}의 발현 정도를 증가시키며 이는 ascofuranone으로 처리하지 않은 대조 siRNA에 비해 9.8배 증가한 것이다. 게다가, p53 발현억제 세포에서 p21^{WAF1/CIP1}의 발현은 전혀 발현하지 않은 ascofuranone으로 처리하지 않은 대조군에 비해 매우 증가했다 (임의단위로 2.1 밀도). 이와 함께, 이러한 결과는 c-Myc가 정상적인 성장 세포에서 p21^{WAF1/CIP1} 발현 수준을 결정하는 주요 음성 조절자임을 나타내는 것이다.

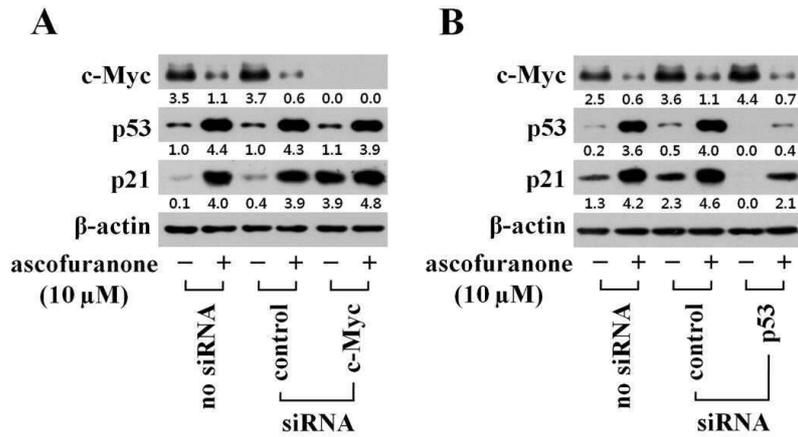


그림 30. c-Myc에 의한 p21 발현 조절 및 ascofuranone에 의한 p21 발현 조절

- ascofuranone-유도 G1 세포주기 억제 메커니즘을 명백히 하기 위해, siRNA로 트랜스펙션시킨 HCT116에서 세포 주기 진행을 분석했다(그림 31). siRNA의 c-Myc 발현억제로 인해 비-특이 siRNA로 트랜스펙션시킨 대조 세포에 비해 G1기에서 세포수가 16.3% 증가했으며 (70.0%, $P < 0.05$) ascofuranone-유도 G1 세포주기 억제를 완전히 없앴다. 반대로, p53 발현억제 뿐만 아니라 비특이 siRNA 트랜스펙션은 비처리 세포에서의 G1기 세포수도 증가시키지 못하고 ascofuranone-유도 G1 세포주기 정지도 억제하지 못했다. 이러한 결과는 p53이 아닌 c-Myc가 ascofuranone-유도 p21^{WAF1/CIP1} 발현증가 및 뒤이은 G1 세포주기 억제에서 중요한 역할을 함을 나타낸다.

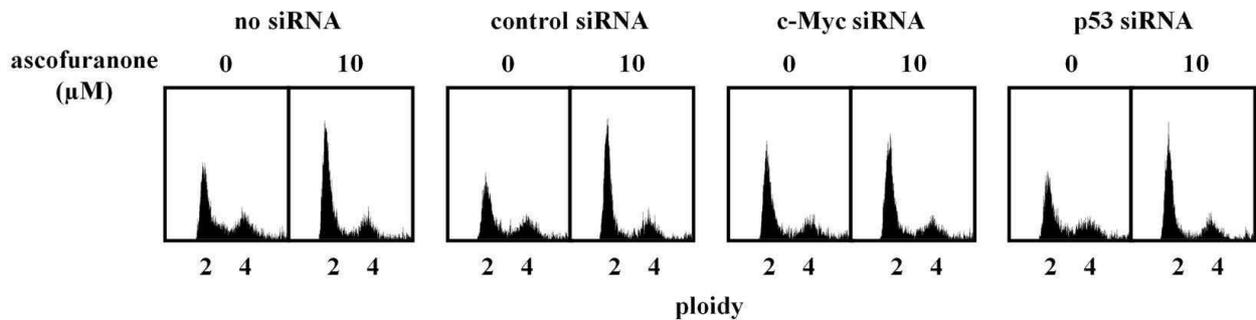


그림 31. c-Myc에 의한 G1기 세포주기 억제 및 ascofuranone에 의한 세포주기 조절

- c-Myc 특이 siRNA 듀플렉스 또는 p53 특이 siRNA 듀플렉스로 RNA (siRNA) 간섭을 실시하고, c-Myc 나 p53을 표적으로 하는 siRNA 또는 음서대조로서 비-특이 siRNA로 트랜스펙션시킨 HCT116 세포의 p53, c-Myc, p21^{WAF1/CIP1}, 및 β-액틴의 발현을 웨스턴 블롯으로 분석했다. ascochlorin에 의한 p21^{WAF1/CIP1}의 증가는 p53 발현억제에 의해 억제되지 않았지만 c-Myc 발현억제에 의해서는 억제되었으며 이의 발현 수준 또한 c-Myc의 발현억제에 의해 증가된다 (그림 32). 이러한 결과는 p53이 아닌 c-Myc가 G1 세포주기 억제에 관련된 ascochlorin-유도 p21^{WAF1/CIP1} 발현증가에서 중요한 역할을 함을 나타낸다.

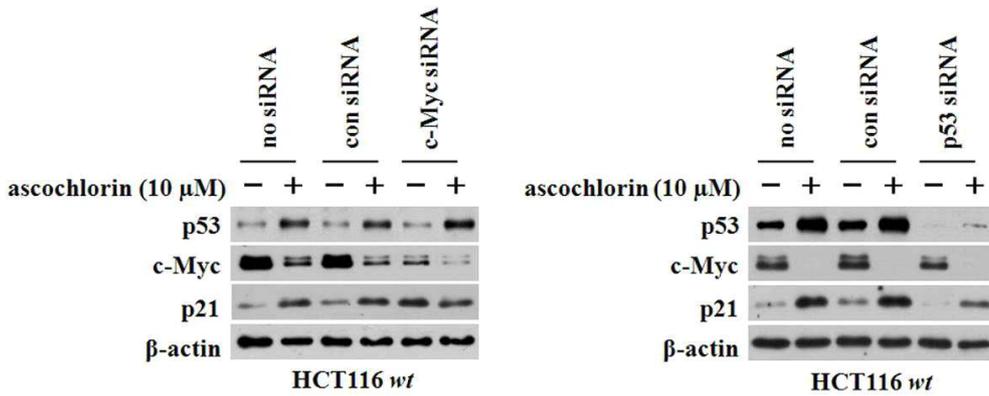


그림 32. c-Myc에 의한 p21 발현 조절 및 ascochlorin에 의한 p21 발현 조절

- ascochlorin-처리 HCT116 세포(p53^{WT}, p53^{-/-}, and p21^{WAF1/CIP1}^{-/-})에서 c-Myc가 p21^{WAF1/CIP1}의 프로모터 영역에 결합했는지 여부를 검사하기 위해, p53 또는 p21^{WAF1/CIP1} 결핍 세포에서 Miz-1, Sp1 및 c-Myc에 대항하는 항체를 사용하여 ChIP 검정을 실행했다. 상기 항체들로 면역침강시킨 후에 p21^{WAF1/CIP1}의 프로모터 영역을 이의 근위 영역에 대한 특이 프라이머 세트를 사용하는 PCR로 증폭시켰다. ascochlorin-비처리 세포에서 c-Myc에 대한 항체로 면역침강시킨 크로마틴 단편에 의해 강하게 증폭된 PCR 산물은 ascochlorin 처리에 의해 완전히 제거되었으며, Miz-1 및 Sp1에 대한 항체로 면역침강시킨 크로마틴 단편에 의해 증폭된 PCR 산물은 ascochlorin 처리에 의해 변화가 없었다. 반면, ascochlorin을 처리한 세포에서는 c-Myc, Miz-1 및 Sp1에 대한 항체로 면역침강시킨 크로마틴 단편에 의해 증폭된 PCR 산물은 변화가 없었다 (그림 33). 이러한 결과는 ascochlorin이 p53에 관계없이 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터로부터 p21^{WAF1/CIP1}의 상위 억제자인 c-Myc를 해리시키고 c-Myc 발현의 하위조절을 통해 p21^{WAF1/CIP1} 프로모터의 c-Myc-매개 억제를 특이적으로 감소시킴을 나타낸다.

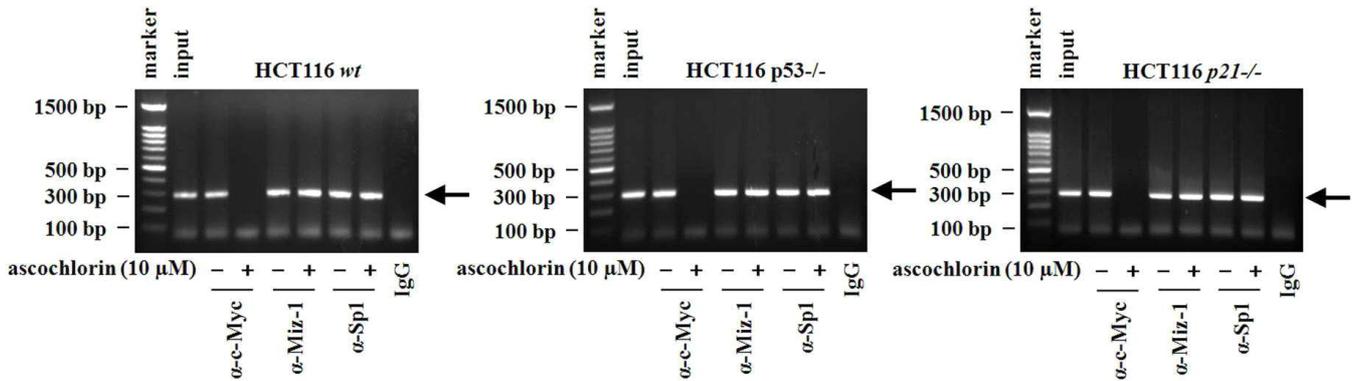


그림 33. ascochlorin에 의한 p21프로모터 영역의 c-Myc의 결합 활성 측정

▶ 기존의 미토콘드리아 호흡저해제 (antimycin, oligomycin, rotenone)에 의한 세포주기 관련인자의 발현 양상 비교분석

- c-Myc의 안정성은 N-말단 인산화에 의해 조절된다. 세린 62에서의 ERK-매개 인산화는 c-Myc를 안정화시키며, Thr 58에서의 글리코젠 합성 키나아제(Glycogen synthase kinase; GSK)-3-매개 인산화는 단백질의 유비퀴틴-매개 분해를 촉진한다. 그러므로, ERK의 저해제인 PD98059는 c-Myc를 불안정화시킨다.

PI3K의 저해제인 워트만닌(wortmannin) 또한 GSK-3을 인산화시키고 불활성화시키는 AKT의 억제를 통해 c-Myc의 분해를 촉진한다. ascofuranone은 PI3K/ERK 신호 전달 경로 및 미토콘드리아 호흡을 저해한다. HCT116 및 p53 및 p21이 결핍된 이의 아세포주에서 PD98059, 워트만닌, 안티마이신 및 로테논을 포함하는 이러한 세포 활동의 저해제가 각각 대조군에 비해 2.2배 내지 12.3배 감소 범위로 c-Myc 발현을 억제한다. 반면에, 올리고마이신을 제외한 상기 저해제로 처리한 HCT116 세포 및 p53 및 p21이 결핍된 이의 아세포주에서 p21^{WAF1/CIP1}의 발현을 대조군에 비해 각각 1.6배 이상 증가시킴을 관찰했다 (그림 34). 이러한 결과는 미토콘드리아 호흡 및 PI3K/ERK 경로의 저해가 ascofuranone-매개 c-Myc 억제에 관련된 것임을 나타내는 것이다.

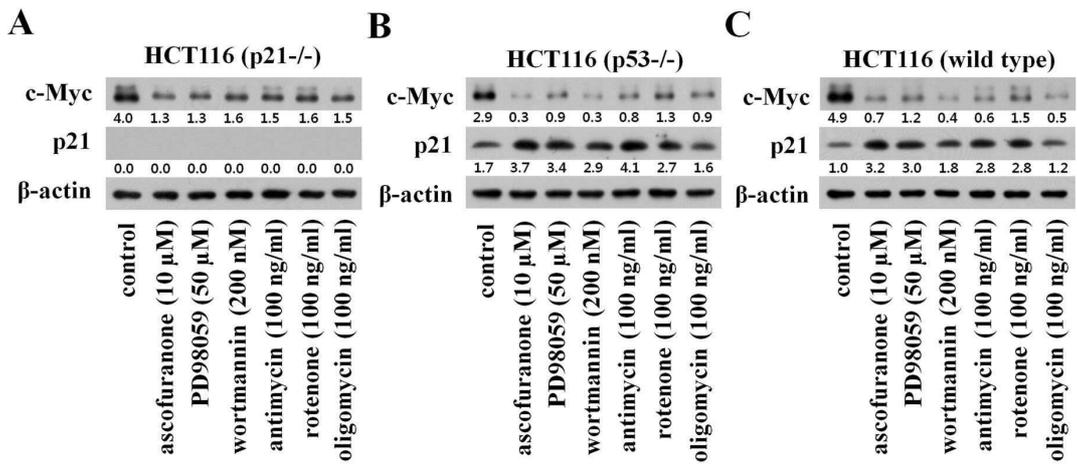


그림 34. 미토콘드리아 호흡저해제 및 다양한 키나아제 저해제에 의한 c-Myc과 p21의 발현조절 양상

▶ 미토콘드리아 호흡저해에 의한 세포주기 관련 전사인자의 새로운 모델 제시
 - p21^{WAF1/CIP1}은 CDK2-사이클린 E의 결합을 방해하여 CDK2 키나아제의 불활성을 야기하는데, 이는 이후에 pRb의 과인산화 및 E2F의 결과적 활성화와 세포 주기 진행에 관련된 이의 하위 표적 유전자의 전사 활성을 저해시켜 G1-S 전환을 차단시킨다. ascofuranone의 처리는 p21^{WAF1/CIP1} 및 CDK2를 이소성 발현하는 MCF-7 세포에서 p21^{WAF1/CIP1}-CDK2 복합체를 2.4배 증가시킬 뿐만 아니라 CDK2 및 사이클린 E를 이소성 발현하는 세포에서 CDK2-사이클린 E 복합체를 21배 감소시킨다(그림 35).

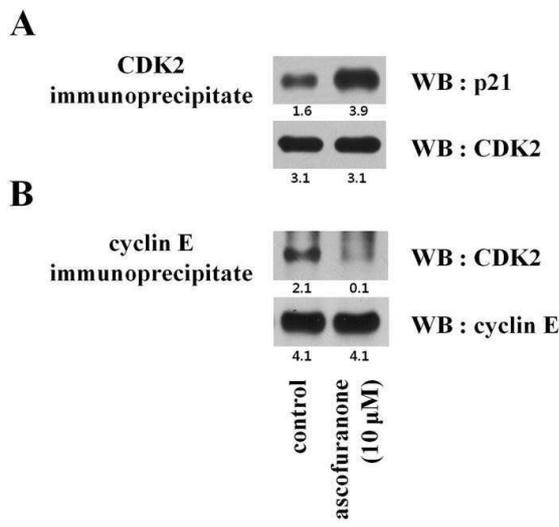


그림 35. ascofuranone에 의한 p21과 CDK2의 결합 및 CDK2와 cyclin E의 결합에 대한 효과

- ascochlorin-유도 G1 세포주기 억제에서 pRb의 역할을 밝히기 위해, pRb의 인산화 상태를 평가했다. 10 μ M 아스코클로린의 존재 또는 부재 하에서 pRb의 인산화 상태를 각각 혈청-자극 HCT116 세포에서 인산화의 변화를(저인산화로부터 과인산화로) pRb 항체로 웨스턴 블롯 분석하여 확인했다. 혈청에 의한 자극은 12시간으로부터 24시간까지 저인산화 (pRb)에서 과인산화 (ppRb)로의 규칙적인 상향 변화를 이끌어낸다. 이와는 반대로, 아스코클로린 처리는 도 12에 나타난 바와 같이 12시간이 지난 후 pRB의 저인산화를 유도하였다 (그림 36).

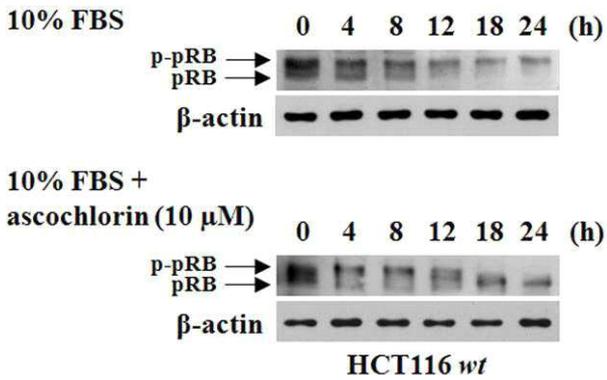


그림 36. ascochlorin에 의한 RB 단백질의 활성 저해에 대한 효과

- ascofuranone은 또한 E2F-리포터 플라스미드 및 E2F-1에 대한 발현 플라스미드 및 이의 이중이량체 파트너인 DP-1으로 트랜스펙션시킨 MCF-7 세포에서 E2F 전사 활성을 4.1배 감소시켜 억제한다 (그림 37). E2F-1 발현 벡터로 트랜스펙션시킨 것이 단지 부분적으로 전사를 19.6배 증가시켜 활성화시키고 대조 벡터 플라스미드는 활성화시키지 못했기 때문에, 이러한 리포터 시스템은 특이적으로 이소성 발현된 E2F-1/DP-1 복합체의 전사 활성을 검출한다. 이러한 결과는 ascofuranone이 p21^{WAF1/CIP1} 전사의 c-Myc 매개 억제의 감소를 통해 G1 체크포인트에 관련된 생화학적 활동을 유도함을 나타낸다 (그림 39).

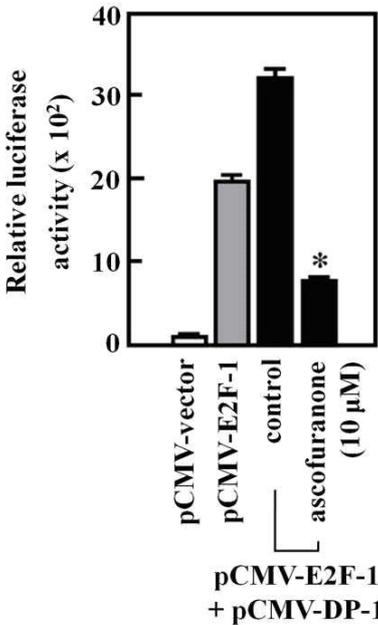


그림 37. ascofuranone에 의한 전사인자인 E2F-1의 전사활성 저해 효과

- E2F가 pRb와의 결합으로 인해 조절되므로, 혈청-자극 HCT116 세포에서 E2F 전사 활성에서의 ascochlorin의 효과를 평가했다. E2F1 프로모터 검정에서, E2F1-luc, E2F1-(Δ E2F)-luc 및 [E2F]x4 리포터 구조물 (그림 38)을 24시간 동안 HCT116 세포에 단독으로 트랜스펙션시키거나 DP1과 함께 공동-트랜스펙션시키고 ascochlorin을 24시간 동안 처리한 후 루시페라제 활성을 측정했다. 그림 38에 도시된 바와 같이, E2F1-luc 유전자 발현은 pCMV-벡터로 트랜스펙션된 세포에 비해 pCMV-E2F1로 트랜스펙션된 HCT116 세포에서 2.7배까지, pCMV-E2F1 및 pCMV-DP1로 트랜스펙션된 HCT116 세포에서 3.9배까지 활성화되었다. 그러나, 루시페라제 활성은 24시간 동안 10 μ M ascochlorin으로 처리한 pCMV-E2F1 및 pCMV-DP1로 공동-트랜스펙션된 HCT116 세포에서 1.6배까지 감소했다. 예상된 바와 같이, 루시페라제 활성은 ascochlorin으로 처리하지 않은 조건 하에서 E2F1-(Δ E2F)-luc로 트랜스펙션된 HCT116 세포에서도 pCMV-E2F1 및 pCMV-DP1로 공동-트랜스펙션된 HCT116 세포에서도 변화가 없었다. [E2F]x4 루시페라제 리포터에서, 루시페라제 활성은 pCMV-벡터로 트랜스펙션된 세포에 비해 pCMV-E2F1로 트랜스펙션된 HCT116 세포에서 17.5배까지, pCMV-E2F1 및 pCMV-DP1로 공동-트랜스펙션된 HCT116 세포에서 22.9배까지 매우 활성화되었다. E2F1-luc 유전자 발현에서의 결과와 유사하게, [E2F]x4 루시페라제 활성이 24시간 동안 10 μ M ascochlorin 처리에 의해 6.9배까지 상당히 감소했다. 이와 함께, 이러한 결과는 아스코클로린 이 pRB의 과인산화 및 E2F1의 전사를 억제하여 G1 체크포인트에 관련된 생화학적 활동을 유도함을 나타낸다 (그림 39).

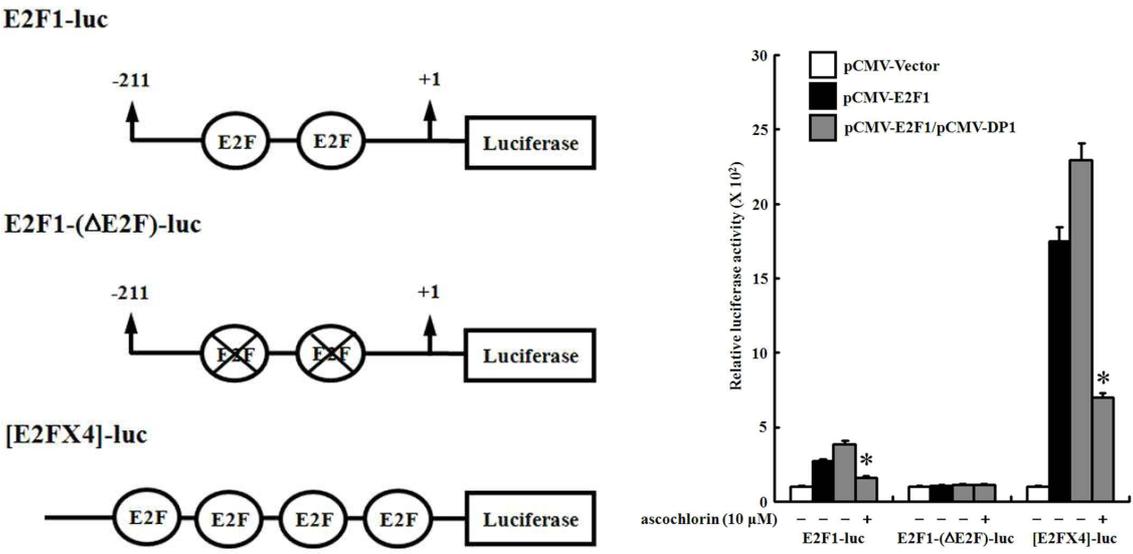


그림 38. ascochlorin에 의한 전사인자인 E2F-1의 전사활성 저해 효과

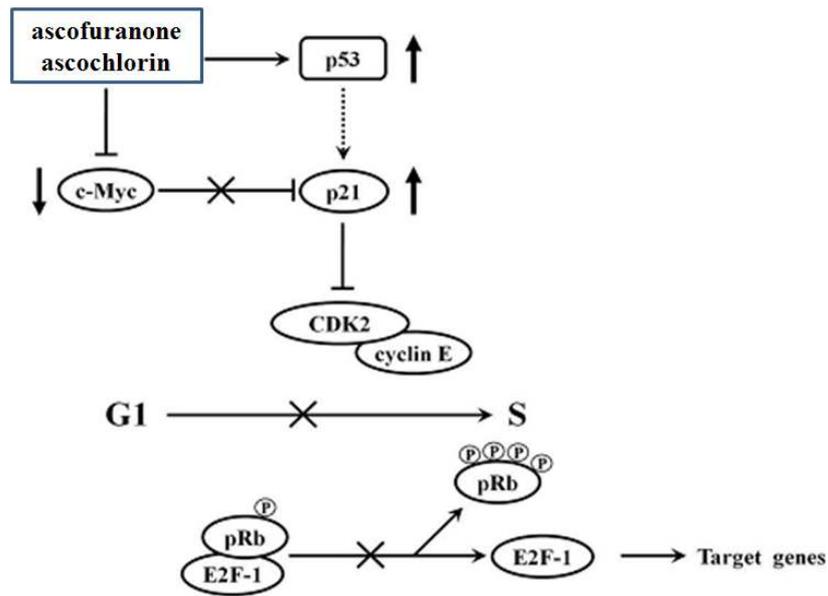


그림 39. ascofuranone 및 ascochlorin에 의한 G1 세포주기 억제 모델

3.3. 3차년도('10년) 연구 내용 및 연구 결과

▶ 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 HIF-1 α 의 안정화 및 VEGF 활성화 조절 기전 규명

- 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin을 자궁경부표피암세포인 CaSki 세포주에 12시간 및 24시간 동안 농도별로 처리하여 세포의 생존률을 MTT assay법으로 확인하였다. 그 결과 12시간 동안 ascochlorin을 처리하였을 경우 30 μ M의 고농도에서 80%이상의 생존률을 보였으며, 24시간 동안 ascochlorin을 처리하였을 경우 30 μ M의 고농도에서 70%이상의 생존률을 보였다. 본 연구의 1년차 연구결과에서 확인했듯이 각각의 세포에 대해 약물의 감수성은 다르더라도 DNA에 손상을 주지 못하는 것으로 판단된다 (그림 40). 그리고 이후의 실험은 80%이상의 생존률을 유지하는 12시간 이내에서 수행되었다.

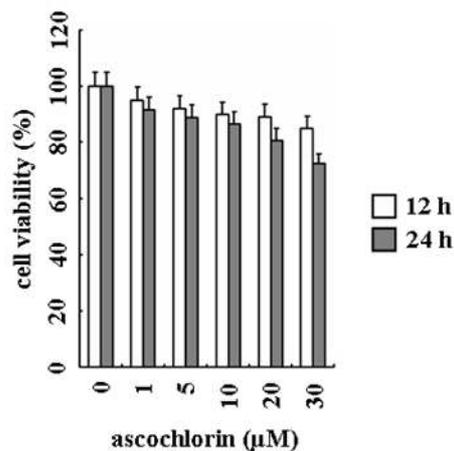


그림 40. ascochlorin에 의한 CaSki 세포의 세포생존률 측정

- HIF-1 α 는 저산소 상태에서 안정화 된다고 알려져 있으며, 또한 CoCl₂와 같은 이온이나 growth factors 또는 cytokines에 의해서도 안정화 된다. 본 연구에서는 Epidermal growth factor(EGF), 전이금속인 CoCl₂, 그리고 hypoxia chamber를 이용하여 HIF-1 α 의 안정화 조건을 확인 후 각각의 조건에 대해 ascochlorin이 HIF-1 α 의 안정화를 저해하는지 western blot 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 6시간 동안 처리한 EGF에 의해서는 20 ng/ml의 농도에서 CoCl₂에 의해서는 200 μ M의 농도에서, 그리고 hypoxia chamber (1% O₂)에서는 6시간이후 HIF-1 α 의 안정화를 확인하였다. 이들의 안정화 조건을 확인 후 ascochlorin을 1-30 μ M의 농도로 30분 동안 전처리 후 각각의 안정화 조건에 CaSki세포를 노출시켰다. 그 결과 EGF에 의한 HIF-1 α 단백질의 안정화를 ascochlorin이 농도의존적으로 저해하는 것을 확인하였다 (그림 41). 이는 ascochlorin이 EGF에 의한 신호전달 경로를 통해 HIF-1 α 단백질을 특이적으로 저해하는 것을 예상 할 수 있었다.

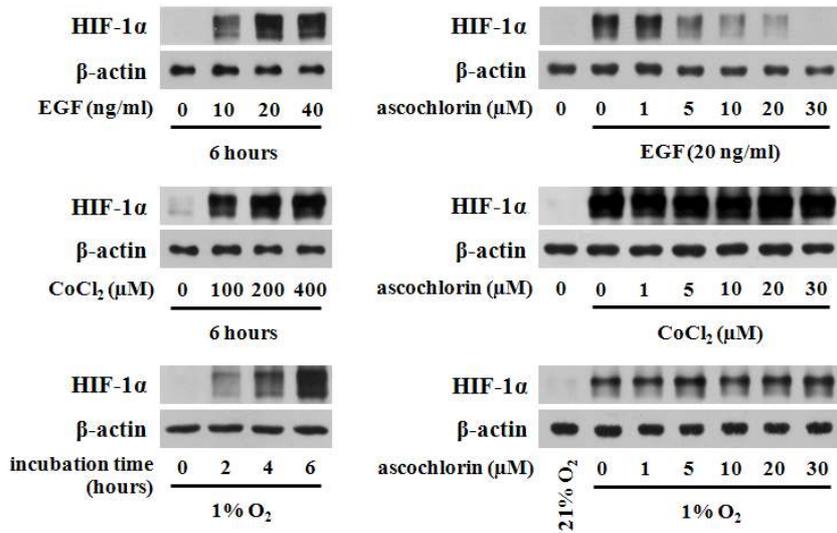


그림 41. 다양한 HIF-1 α 의 안정화 조건에서 ascochlorin에 의한 HIF-1 α 의 발현 조절 양상

- EGF에 의해 안정화된 HIF-1 α 단백질이 ascochlorin에 의해 단백질 합성이 저해되는지를 확인하기위해 단백질합성저해제인 cyclohexamide를 이용하여 연구를 수행하였다. EGF를 6시간 동안 처리하고 cyclohexamide를 시간별로 처리한 결과 HIF-1 α 단백질의 half-life는 약 20분이었으며, cyclohexamide와 ascochlorin을 함께 처리한 경우 HIF-1 α 단백질의 half-life는 약 10분이었다 (그림 42). 이 결과를 통해 ascochlorin이 단백질 합성 저해를 통해 HIF-1 α 단백질의 half-life를 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다.

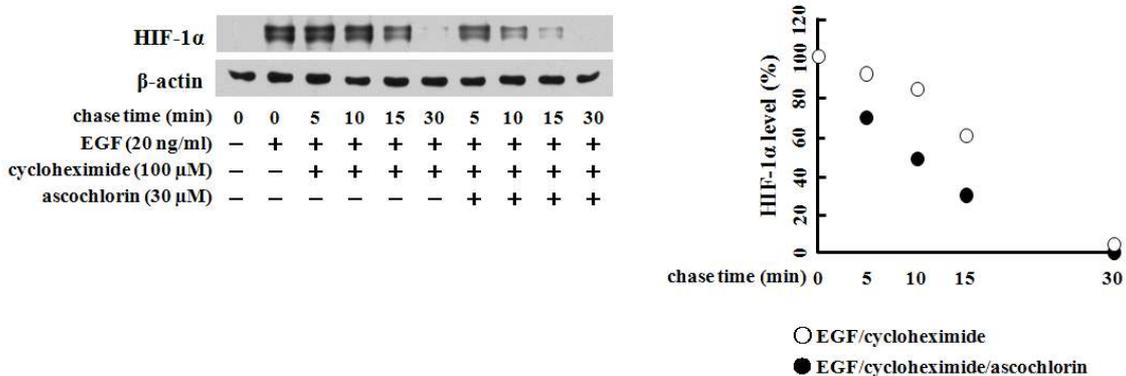


그림 42. cyclohexamide 및 ascochlorin에 의한 HIF-1 α 의 half-life 측정

- HIF-1 α 는 안정화된 후 핵내로 이동하여 HIF-1 β (ARNT)와 heterodimer를 이루어 전사활성을 갖게 된다. HIF-1 β 는 산소농도와 관계없이 언제나 안정하며, ARNT(aryl hydrocarbon translocator)라고도 불린다. 그러나 HIF-1 α 는 정상 산소 농도 (21% O₂)에서 ODDD(oxygen-dependent degradation domain)에 있는 프롤린 잔기에 hydroxyl기가 붙어, degradation 된다. HIF-1 α 에 -OH기를 전달하는 효소를 PHD(prolyl hydroxylase)라 하며, PHD에 의해 생긴 hydroxylated 프롤린에는 E3 ubiquitin ligase인 pVHL(von Hippel-Lindau protein)이 결합하여 프로테오솜에 의한 degradation을 유도한다. PHD는 저산소 상태에서 활성을 잃어버리며, 이에 의해 HIF- α 가 안정화되어 저산소 상태에 적응하기 위한 유전자를 전사할 수 있게 된다. 그리고 HIF-1 α 는 DNA의 hypoxia response element (HRE)에 결합하여 하위표적 유전자들의 전사를 유도한다. 또한 저산소 상태뿐만 아니라 메탈과 growth facto, cytokine에 의해서도 비슷한 기작으로 안정화되며, 본 연구에서는 HIF-1 α 의 대표적인 표적유전자인 VEGF를 Epidermal growth factor(EGF), 전이금속인 CoCl₂, 그리고 hypoxia chamber를 이용하여 HIF-1 α 의 안정화 조건을 확인 후 각각의 조건에 대해 ascochlorin이 HIF-1 α 의 전사활성을 저해하는지 HRE-Luciferase reporter gene assay를 통해 확인하였다. 그 결과 EGF에 의한 HIF-1 α 의 전사활성을 ascochlorin이 90%이상 저해하였으며, CoCl₂에 의한 HIF-1 α 의 전사활성을 20%, 1% 농도의 산소 조건에 의한 HIF-1 α 의 전사활성을 25% 저해하였다 (그림 43). 이 결과는 ascochlorin이 EGF에 의한 HIF-1 α 의 전사활성을 특이적으로 저해하는 것을 예상 할 수 있었다.

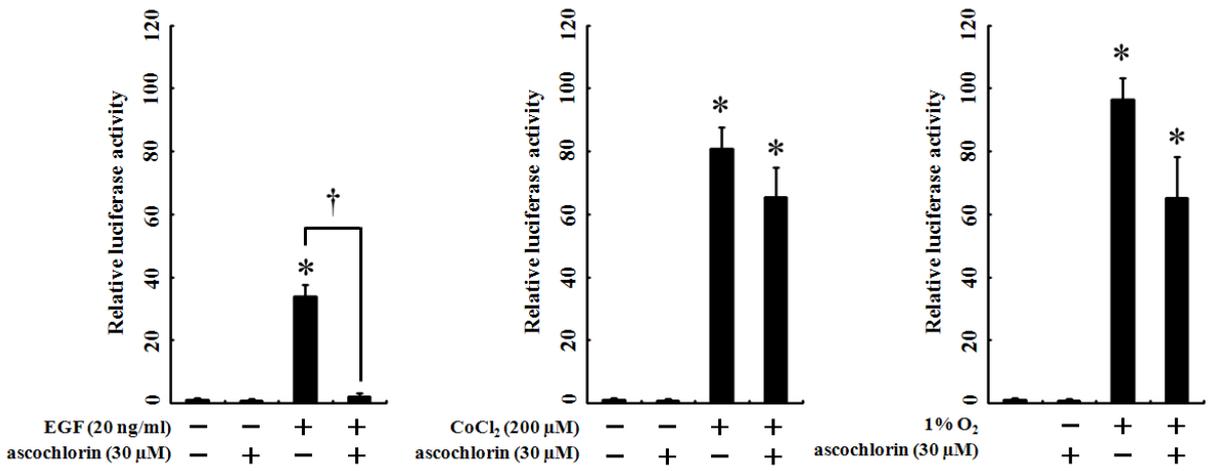


그림 43. 다양한 HIF-1 α 의 전사활성 조건에서 ascochlorin에 의한 HIF-1 α 의 전사활성 저해 양상

- VEGF의 activity는 혈관신생에 매우 중요할 뿐 아니라 세포내의 신호전달에도 매우 중요한 역할을 하지만, 미토콘드리아 호흡저해에 의한 VEGF의 조절에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin에 의한 VEGF의 전사활성을 알아보기 위하여 자궁경부암세포인 CaSki 세포주에 EGF와 ascochlorin을 처리하여 RT-PCR법으로 확인하였다. EGF에 의해 증가된 VEGF가 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin 처리에 의해 VEGF의 전사활성을 농도 의존적으로 감소하였다 (그림 44). 또한 VEGF의 세포외 분비를 확인하기 위해 VEGF ELISA법을 이용한 결과 ascochlorin에 의해 VEGF의 분비가 저해되었으며, 특히 CaSki 세포주에서 CoCl₂와 1% 농도의 산소 조건에서 VEGF의 분비가 유도되지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin이 신생혈관형성을 억제할 수 있는 가능성을 확인하였다 (그림 45).

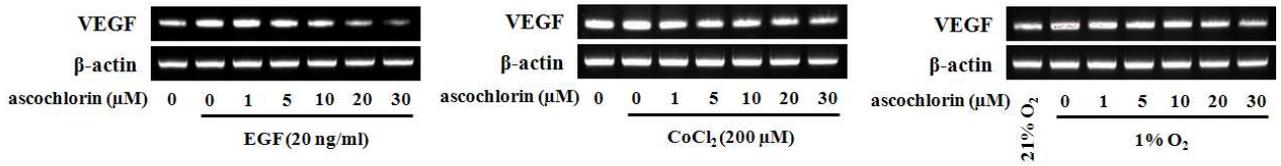


그림 44. 다양한 HIF-1 α 의 전사활성 조건 하에서 ascochlorin에 의한 VEGF의 mRNA 발현 저해 양상

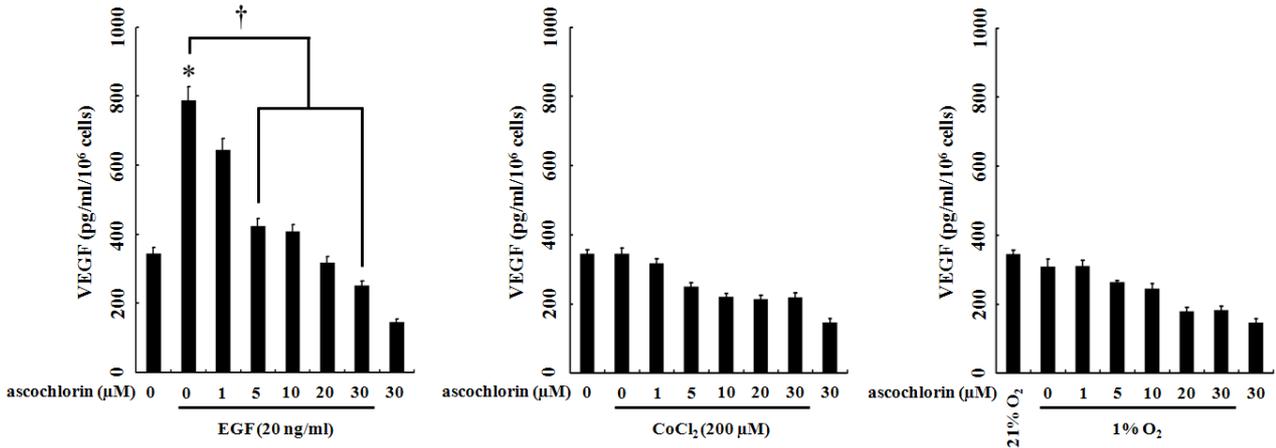


그림 45. 다양한 HIF-1 α 의 전사활성 조건 하에서 ascochlorin에 의한 VEGF의 세포의 분비 저해 양상

- 상피성장인자수용체 (epidermal growth factor receptor, EGFR)는 type I receptor tyrosine kinase 혹은 ErbB 수용체의 하나로서, EGFR (ErbB1/EGFR/HER1)이외에 ErbB2 (HER2/*neu*), ErbB3 (HER3) 및 ErbB4 (HER4)의 4종류로 구분된다. ErbB 수용체는 세포외 ligand-binding domain, transmembrane domain과 세포내 tyrosine kinase (TK) domain으로 구분된다. Ligand가 ErbB 수용체에 결합하여 homo- 혹은 heterodimeric complex를 형성하면 세포내 tyrosine kinase domain이 인산화되고, 이에 따라 Ras-Raf-MAP-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), stress-activated protein kinase (protein kinase C & Jak/Stat) 등의 세포내 신호전달이 활성화된다. 본 연구에서 ascochlorin에 의한 EGFR을 경유한 HIF-1 α 의 신호전달 저해 경로를 확인하기 위하여 western blot 분석을 수행하였다. ascochlorin을 농도별로 30분 동안 전처리 후 20 ng/ml농도의 EGF를 CaSki세포에 15분간 처리하였다. 그 결과 ascochlorin은 AKT/mTOR 신호전달 경로에는 영향을 미치지 못하였으며, EGFR/ERK/p70S6K 신호전달 경로를 특이적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 46).

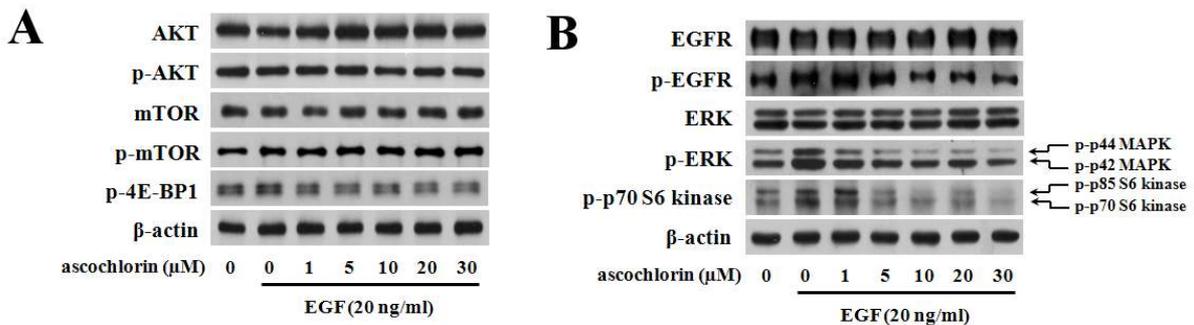


그림 46. CsSki세포에서 ascochlorin에 의한 EGFR/ERK/p70S6K 신호전달 경로 저해 결과

- EGF에 의한 HIF-1 α 의 안정화 경로에 관여하는 키나아제를 확인하기 위해 알려진 키나아제 저해제를 이용하여 HIF-1 α 의 안정화를 western blot 분석을 통해 확인하였다. 사용된 키나아제 저해제는 EGFR 저해제인 AG1478 (10 μ M), mTOR 저해제인 rapamycin (100 nM), p38 저해제인 SB203580 (100 nM), ERK 저해제인 PD98059 (50 μ M), JNK 저해제인 SP600125 (10 μ M)을 각각 이용하여 1시간 전처리 후 EGF (20 ng/mL)를 6 시간 동안 처리하여 HIF-1 α 의 안정화를 유도하였다. 그 결과 ascochlorin, AG1478, rapamycin, PD98059에 의해 HIF-1 α 의 안정화가 저해 되었으며, SB203580 및 SP600125에 의해서는 HIF-1 α 의 안정화가 저해되지 않았다 (그림 47 A). 또한 HRE-Luciferase reporter gene assay 및 VEGF ELISA를 통해 HIF-1 α 의 전사 활성 및 VEGF의 분비 또한 동일한 양상을 나타냄을 확인하였다 (그림 47 B, C). 이 결과들을 통해 EGF에 의한 HIF-1 α 의 안정화는 EGFR/ERK 혹은 mTOR 신호전달 경로를 통해 저해됨을 알 수 있었다.

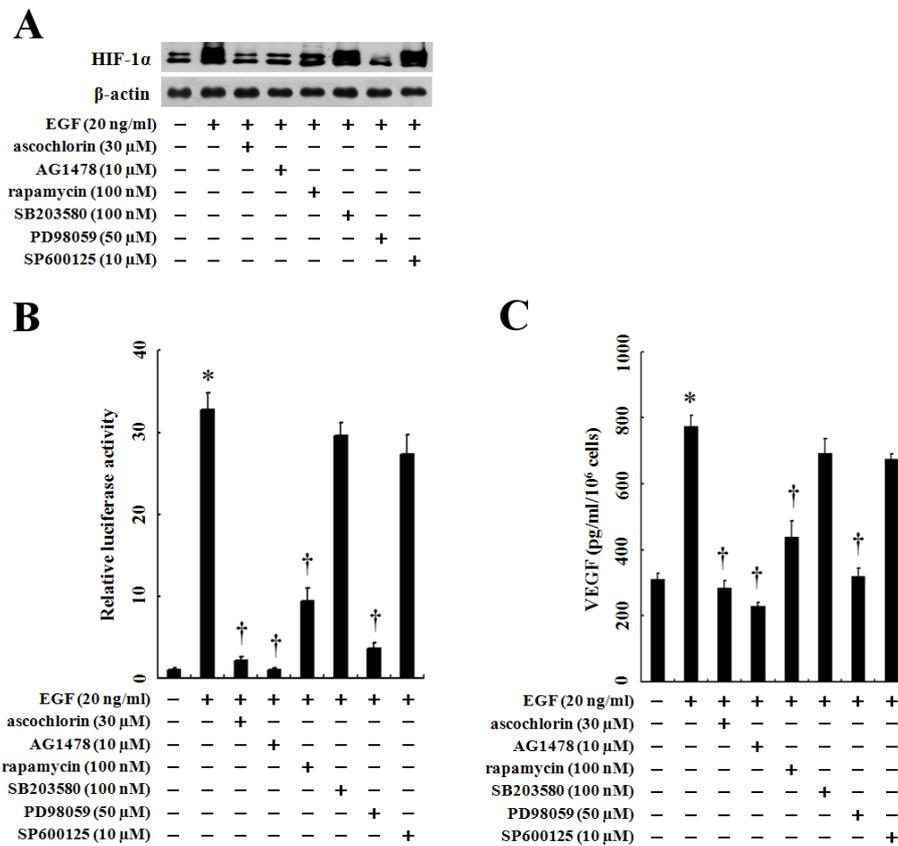


그림 47. CsSki세포에서 다양한 키나아제 저해제에 의한 EGFR/ERK 및 mTOR 신호전달 경로 저해 결과

- ascochlorin에 의한 HIF-1 α 안정화의 저해가 EGFR을 경유하는지 확인하기 위해 EGFR siRNA를 이용하여 EGFR을 knock-down시킨 후 HIF-1 α 안정화의 안정화를 확인 하였다. 그림 48 A에서 보듯이 no siRNA 및 control siRNA에 의해서는 ascochlorin에 의해 그림 41 및 47과 동일한 결과를 나타내었으며, EGFR siRNA를 이용한 경우 EGF에 의해 HIF-1 α 안정화가 control siRNA비해 많이 유도되지 않았을 뿐만 아니라 ascochlorin에 의해 저해되는 결과를 얻을 수 없었다. 또한 EGFR siRNA를 이용하여 VEGF의 세포외 분비를 VEGF ELISA를 통해 확인한 결과 HIF-1 α 단백질의 양상과 유사하게 VEGF의 세포외 분비가 이루어 지는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 48 B). 이 결과들을 통해 ascochlorin의 HIF-1 α 안정화 저해가 EGFR을 매개하여 이루어지는 것을 재확인할 수 있었다.

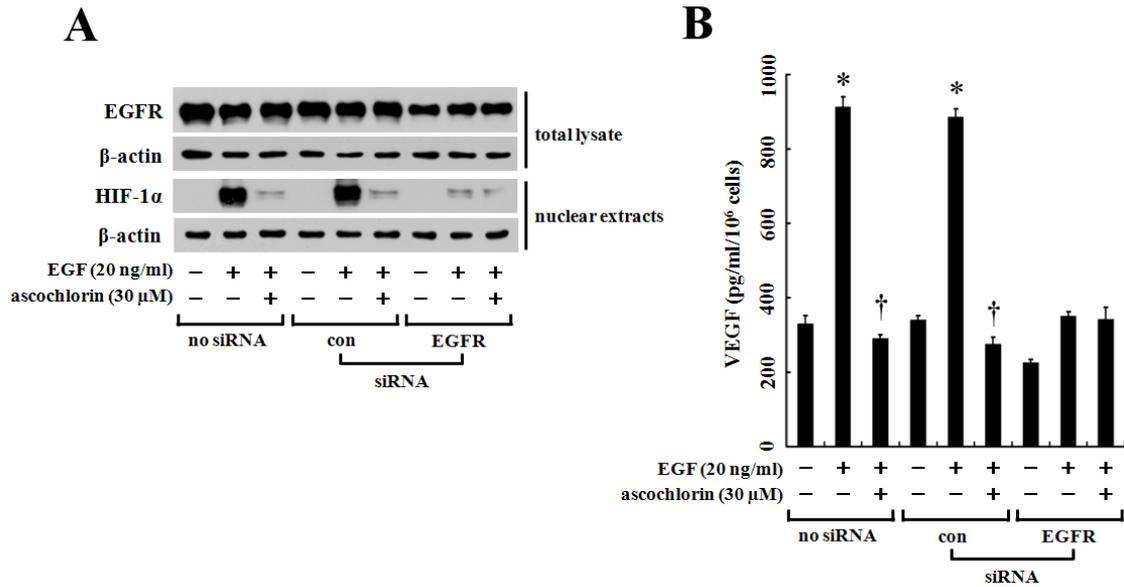


그림 48. EGFR의 knock-down에 의한 HIF-1α의 안정화 및 VEGF의 분비 양상

- *in vivo*에서 ascochlorin에 의한 암의 혈관신생 저해 효과를 확인하기 위해 Matrigel plug assay를 수행하였다. 100 ng/ml의 VEGF, heparin (16 units/ml) 및 ascofuranone이 포함된 Matrigel을 잘 섞은 후 1 ml syringe에 600 μl씩 준비하여, C57BL/6 mice를 ethyl ether로 마취한 후 Matrigel 혼합물 600 μl를 동물의 복부에 피하주사하였다. 1주일 후, 동물을 희생하여 복부 부위에 굳은 Matrigel이 드러나도록 피부를 벗겨내고 gel을 원형 그대로 제거한 후, 각각의 gel을 대조군과 실험군별로 관찰하였다. 그 결과 EGF와 CaSki 세포를 혼합하여 주사한 matrigel의 경우 혈관의 생성이 유도되어 붉은색을 나타내었으며, EGF와 CaSki 세포 및 ascochlorin을 혼합한 matrigel의 경우 대조군에 비해 혈관의 생성이 감소되어 분홍색을 나타내었다 (그림 49 A). 이 결과를 통해 ascochlorin이 *in vivo*에서도 암의 혈관신생을 저해하는 것을 알 수 있었다. 그리고 matrigel 내의 혈관생성 정도를 확인하기 위해 헤모글로빈의 양을 Drabkin's reagent kit를 사용하여 측정하였다. Matrigel과 3차 증류수 500 μl를 1.5 ml microtube에 넣고 혈액이 빠져 나오도록 가위로 잘게 부순 뒤 4°C에서 보관하여 12시간 후 1.5 ml microtube를 4 °C에서 꺼내어 15,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액만 분리한다. Drabkin's reagent kit를 사용하여 각각의 상등액에 대해 UV/Visible spectrophotometer로 540nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 헤모글로빈의 양을 확인하였다. 그 결과 matrigel의 붉은색의 정도와 유사하게 matrigel 내의 헤모글로빈 양이 ascochlorin에 의해 감소한 것을 확인할 수 있었다 (그림 49 B).

- 이상의 결과들을 종합한 결과, ascochlorin이 EGFR을 경유하여 HIF-1α의 안정화에 대한 저해 신호전달 경로를 그림 49 C에 나타내었다. ascochlorin은 EGF에 의해 유도되는 EGFR의 인산화를 저해한 후, ERK/p70S6K의 신호전달 경로를 차단하여 단백질의 합성 억제를 통해 HIF-1α 단백질의 안정화를 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 HIF-1α에 의해 전사활성을 갖는 VEGF의 방출을 억제함으로써 혈관내피 세포의 증식을 억제하는 것을 예상할 수 있었을 뿐만 아니라, 동물실험을 통한 생체 내에서의 암의 혈관신생을 차단함으로써 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin이 암의 혈관신생을 억제하는 후보물질로서의 가능성을 제시하였다.

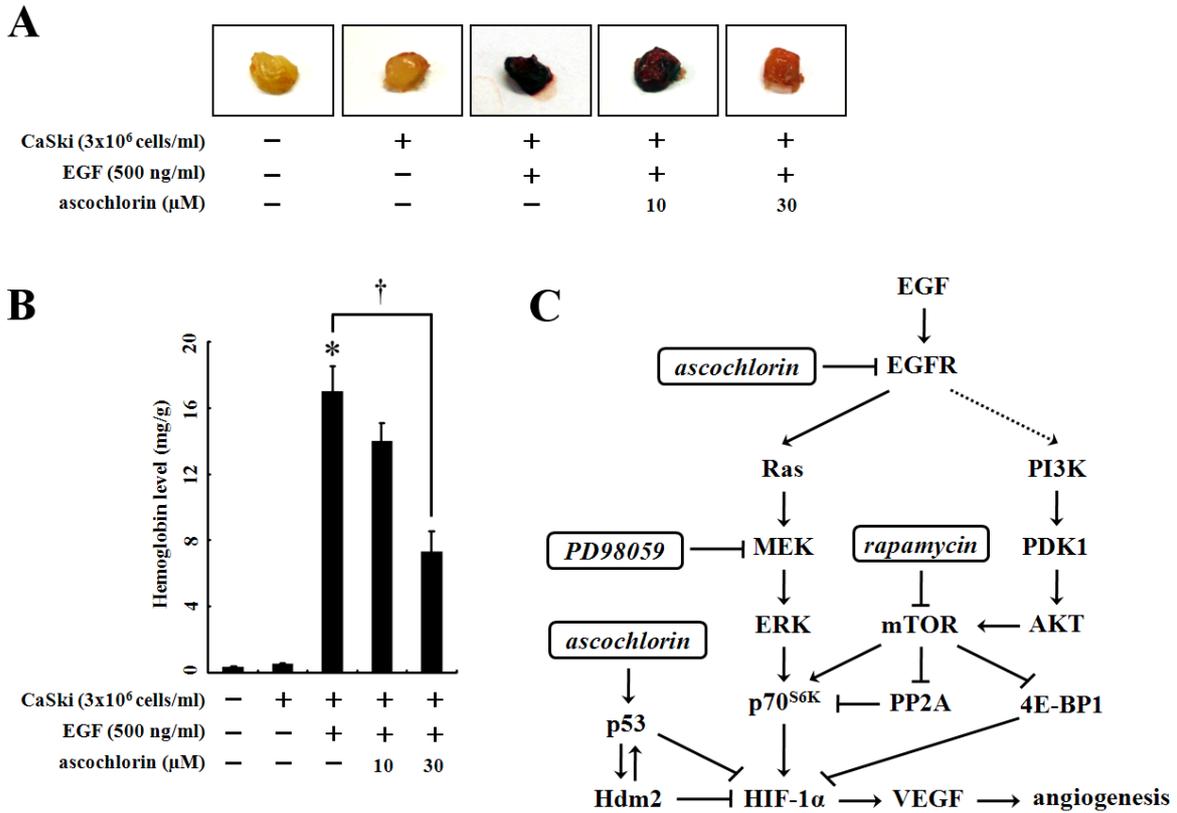


그림 49. ascochlorin에 의한 in vivo에서의 혈관신생 저해 효과 및 HIF-1 α 안정화 신호전달 저해 경로

▶ 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 AMPK 조절 기전 규명

- 암세포는 정상세포와는 달리 미토콘드리아의 산화적 인산화과정을 통한 에너지 생산이 어려우므로 해당 (glycolysis) 과정에 의존하여 ATP를 생산하며, 에너지는 암세포의 성장과 확산에 주요한 역할을 한다. 이와 관련하여 단백질, 지방과 글리코겐 합성과 같은 동화작용을 억제시키는데 주요한 역할을 하는 유전자인 AMP-activated protei kinase (AMPK)를 표적으로 하여 미토콘드리아 호흡저해제가 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다. 본 연구팀이 발굴한 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin과 ascochlorin에 carboxylmethyl 잔기를 치환한 AS-6, 그리고 methyl 잔기를 치환한 MAC (그림 50 A)을 이용하여 연구를 수행하였다. 먼저 각각의 미토콘드리아 호흡저해제를 MCF-7세포에 30 μ M 농도로 처리하여 AMPK의 인산화 및 AMPK의 하위 유전자인 ACC의 인산화를 western blot 분석을 이용하여 확인하였다. 그 결과 AMPK 및 ACC의 활성화 (인산화)가 ascochlorin의 methyl 잔기를 치환한 유도체인 MAC에 의해서만 이루어지는 것을 확인하였다 (그림 50 B). 또한 AMPK의 활성화에 의해 암의 혈관신생과 관련하여 HIF-1 α 의 안정화가 이루어진다는 보고되어 암세포의 핵추출을 통해 HIF-1 α 의 안정화를 western blot 분석을 이용하여 확인하였다. 그 결과 AMPK 및 ACC의 활성화와 동일하게 MAC에 의해서만 HIF-1 α 의 안정화를 확인할 수 있었다 (그림 50 B). 그리고 MAC을 1-30 μ M 농도별로 처리한 후 AMPK와 ACC의 활성화 및 HIF-1 α 의 안정화를 확인한 결과 농도의 존적으로 각각의 활성화 및 안정화가 이루어지는 것을 확인하였다 (그림 50 C). 또한 AMPK의 활성화에 의해 증가하는 glucose를 측정된 결과 세포내의 glucose uptake가 증가하였다. 그리고 AMPK의 활성을 통한 glucose uptake의 증가인지를 확인하기 위해 AMPK 저해제인 compound C를 함께 처리한 결과 MAC에 의한

세포내 glucose uptake의 감소하였다 (그림 50 D). 이 결과는 MAC에 의한 세포내 glucose uptake의 증가는 AMPK의 활성을 경유한다는 것을 제시한다. 이 결과들은 ascochlorin의 4번 탄소 부위의 methyl 잔기가 암세포의 에너지 대사와 관련하여 AMPK의 활성화 및 HIF-1 α 단백질의 안정화에 중요한 역할을 하는 것을 제시한다.

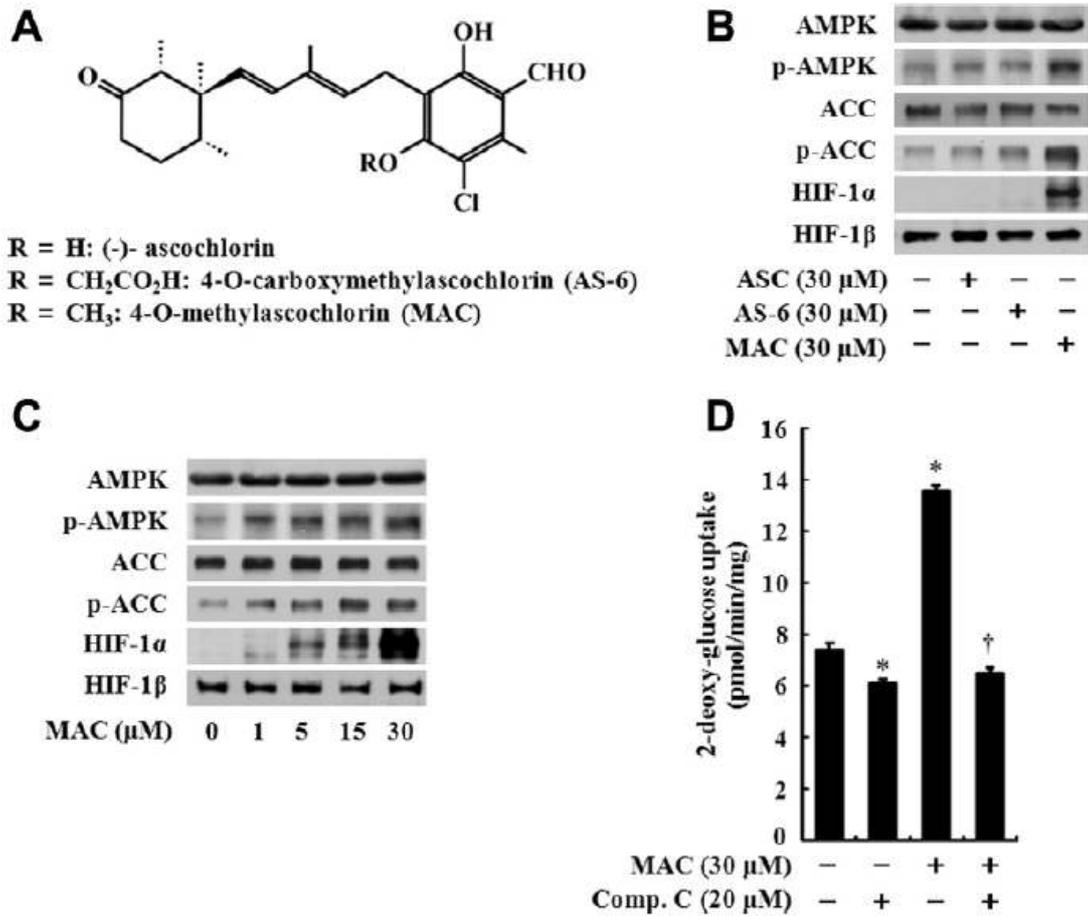


그림 50. ascochlorin 유도체인 MAC에 의한 AMPK 활성화와 HIF-1 α 안정화

- HIF-1 α 는 DNA의 hypoxia response element (HRE)에 결합하여 하위표적 유전자들의 전사를 유도한다. HIF-1 α 의 전사활성을 측정하기 위해 HRE-Luciferase reporter gene assay를 이용하였다. ascochlorin, AS-6, MAC 그리고 CoCl₂ (양성대조물질)를 12시간 동안 MCF-7 세포에 처리하여 HIF-1 α 의 전사활성을 측정된 결과, MAC에 의해서만 대조군에 비해 전사활성이 3배 증가한 결과를 확인하였다 (그림 51 A). 또한 AMPK와의 관련성을 확인하기 위해 compound C를 함께 처리한 결과 대조군에 비해 전사활성이 0.5배로 감소한 것을 확인하였다. 이는 HIF-1 α 의 전사활성이 AMPK의 활성을 매개한 것임을 확인하는 결과이다. 양성대조물질인 CoCl₂에 의해서는 대조군에 비해 HIF-1 α 의 전사활성이 9배 증가하였다. HIF-1 α 의 대표적인 하위 표적 유전자로 알려진 VEGF, GLUT-1, EPO의 mRNA 발현을 RT-PCR을 수행하여 확인하였다. 그 결과 VEGF와 GLUT-1은 MAC에 의해서만 발현이 증가하였으며, EPR는 ascochlorin, AS-6, MAC 모두에 의해서 증가하는 결과를 확인하였다 (그림 51 B). MAC에 의한 이 표적유전자들의 발현증가가 AMPK를 매개하여 이루어지는 것인지를 확인하기 위하여 AMPK 저해제인 compound C를 MAC과 함께 처리한 결과, MAC에 의해

증가된 VEGF, GLUT-1, EPO 모두 compound C에 의해 감소하는 것을 확인하였다 (그림 51 C). 이 결과들은 MAC에 의한 HIF-1 α 의 안정화 및 하위 표적 유전자들의 발현이 AMPK의 활성을 통해 이루어진다는 것을 제시한다.

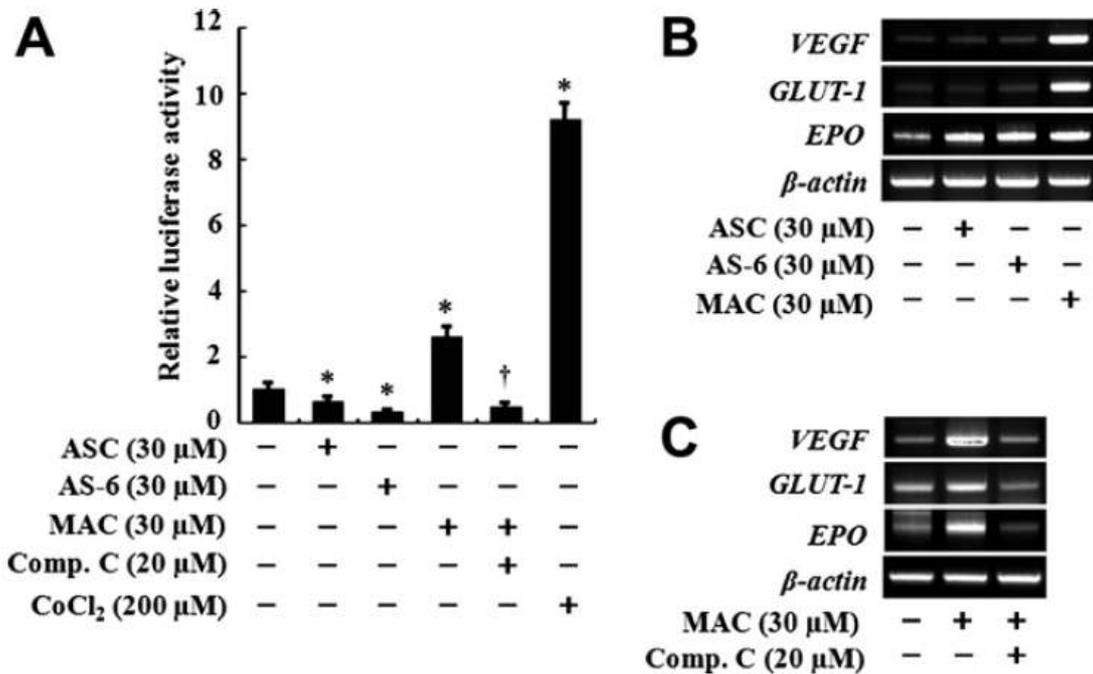


그림 51. MAC에 의한 HIF-1 α 의 전사 활성 및 하위 표적 유전자들의 발현 증가

- AMPK의 활성을 조절하는 세포내 인자로 ATP 및 ROS가 알려져 있다. 본 연구에서 확인한 MAC에 의한 AMPK의 활성의 원인을 조사하기 위해 세포내 ATP 및 ROS를 각각 측정하였다. 먼저 세포내 ATP의 생성 정도를 확인하기 위해 ascochlorin, AS-6, MAC 그리고 양성대조물질인 antimycin A, oligomycin, rotenone을 처리한 후 ATP assay kit를 이용하였다. 그 결과, ascochlorin과 MAC는 양성대조물질인 antimycin A 등과 유사한 수준으로 세포내 ATP의 합성을 저해하였으며, AS-6는 고농도인 30 μ M에서 대조군에 비해 낮은 수준의 감소를 보였다 (그림 52 A). 그리고 세포내 ROS의 생성 정도를 확인하기 위해 ascochlorin, AS-6, MAC 그리고 양성대조물질인 H₂O₂를 처리하여 DCFH-DA를 이용하였다. 그 결과 ATP의 생성 억제와는 대조적으로 AS-6에 의해 세포내 ROS의 생성이 증가되었으며, MAC에 의해서는 오히려 ROS가 감소되는 경향을 보였다. 또한 양성대조물질인 H₂O₂에 의해서는 8배 이상의 높은 수준의 ROS 생성을 확인할 수 있었다 (그림 52 B). 이 결과들은 MAC에 의한 AMPK의 활성화가 세포내 ATP의 생성 억제를 통해 이루어진다는 것을 예상할 수 있으며, 비록 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin에 의해 세포내 ATP의 생성이 억제되더라도 AMPK의 활성화에는 직접적인 영향을 미치지 못한다는 것을 예상할 수 있었다. 또한 AMPK의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 ROS 생성은 ascochlorin과 그 유도체들이 AMPK의 활성화에 영향을 미치지 못한다는 것을 제시한다.

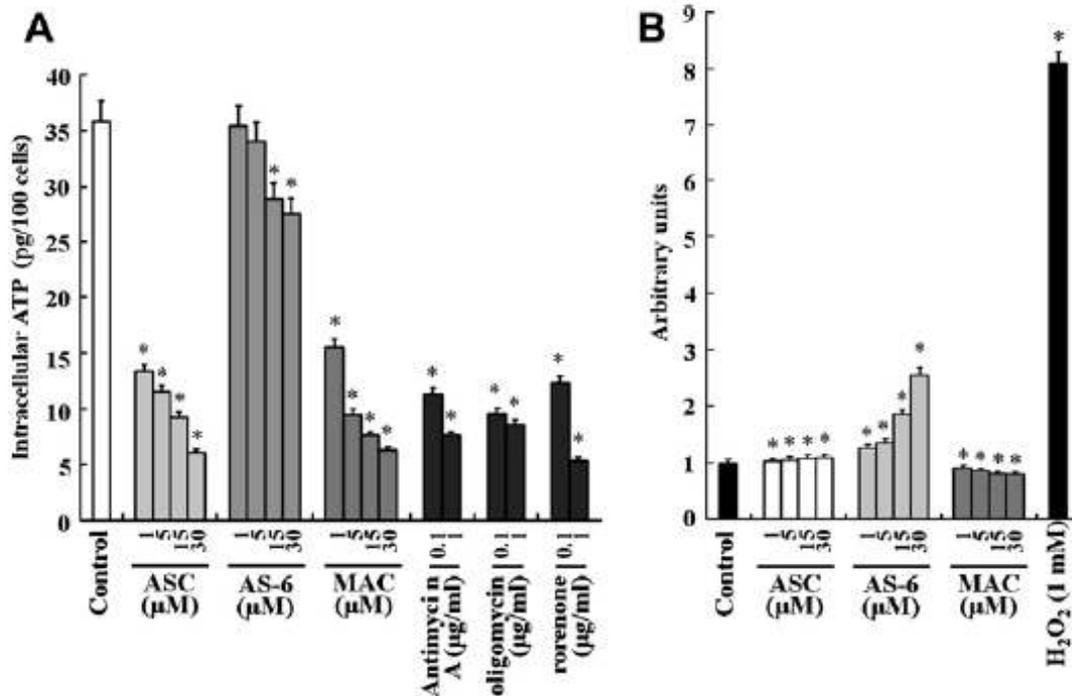


그림 52. ascochlorin 및 그 유도체들에 의한 세포내 ATP 생성 및 ROS 생성에 대한 영향

- AMPK의 활성을 조절하는 신호전달 경로를 확인하기 위해 MAC에 의해 ERK, mTOR, p70S6K, 4E-BP-1의 인산화 및 HIF-1α의 안정화를 western blot 분석법을 이용하여 확인하고, 또한 AMPK 저해제인 compound C를 처리하여 AMPK의 관련성을 확인하였다. AMPK의 활성에 의해 저해되는 것으로 알려진 ERK의 인산화는 MAC의 처리에 의해 감소되었으나, compound C의 처리에 의해 회복되지 않았다 (그림 53 A). 그러나 mTOR, p70S6K, 4E-BP-1의 인산화는 MAC의 처리에 의해 감소되었다가 compound C의 처리에 의해 대조군과 같은 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 53 A). 이 결과를 통해 AMPK의 하위에 mTOR를 경유하여 단백질 합성과 관련된 인자인 p70S6K, 4E-BP-1이 HIF-1α 단백질의 합성에 관여한다는 것을 예상할 수 있었다. 그래서 mTOR 저해제인 rapamycin을 이용하여 MAC과 함께 처리한 후 mTOR, p70S6K, 4E-BP-1의 인산화를 다시 확인하였다. 그러나 예상과는 rapamycin에 의해 MAC에 의해 감소된 mTOR, p70S6K, 4E-BP-1의 인산화가 회복되지 않았으며, HIF-1α의 안정화 또한 변화가 없었다 (그림 53 B). 이 결과들은 AMPK 하위의 신호전달 경로에 있어 mTOR, p70S6K, 4E-BP-1가 MAC에 의해 조절된다면 MAC에 의한 HIF-1α의 안정화에 영향을 미치지 못한다는 것을 제시한다. 한편, MAC에 의한 AMPK의 활성화가 HIF-1α 단백질의 안정화에 대한 관련성을 AMPK siRNA를 이용하여 확인하였다. AMPK siRNA를 이용하여 AMPK를 knock-down 시킨 후, MAC을 처리하여 HIF-1α의 안정화를 확인한 결과 AMPK를 knock-down 시켰을 경우 HIF-1α의 안정화가 유도되지 않는 것을 확인 하였다 (그림 53 C). 또한 AMPK를 knock-down 시킨 후 HIF-1α의 하위 표적인자인 VEGF, GLUT-1, EPO의 mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과 VEGF와 GLUT-1은 AMPK의 knock-down에 의해 MAC을 처리 하더라도 발현이 증가되지 않았으며, EPO의 경우 오히려 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다 (그림 53 D). 이 결과들을 통해 MAC에 의한 HIF-1α의 안정화가 AMPK를 매개하여 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

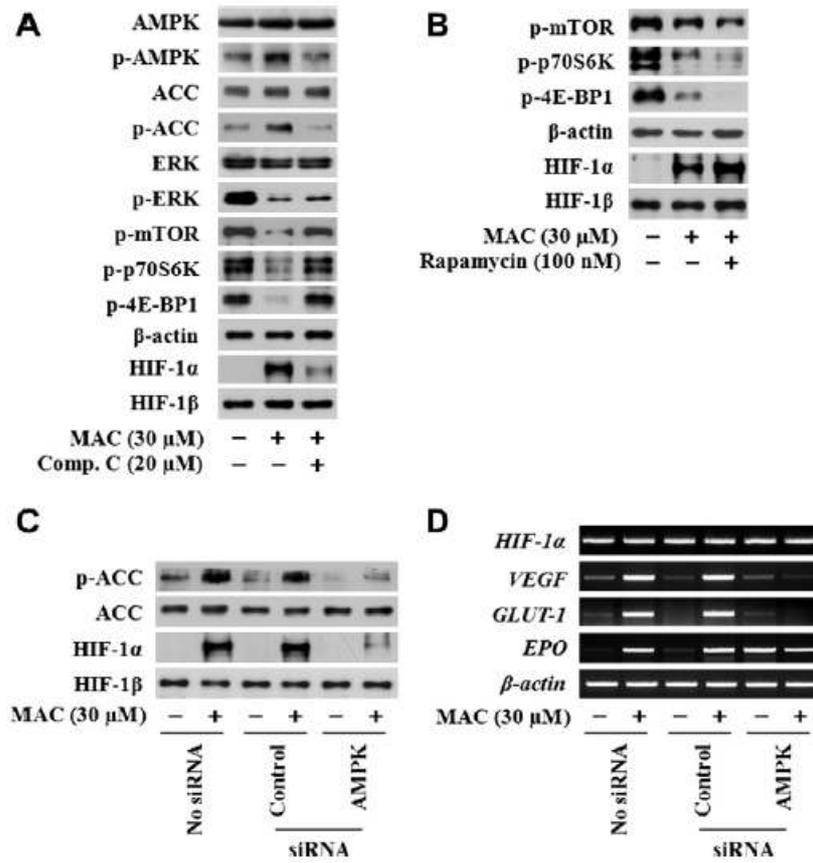


그림 53. MAC에 의한 신호전달 경로 및 AMPK에 의한 HIF-1 α 의 안정화

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4.1. 연구목표의 달성도

	목 표	달성도 (%)	내 용
1차 년도	미토콘드리아 호흡저해를 통한 p53의 활성화 및 인산화 기전 규명 및 세포주기 조절 기전 규명	100	• 미토콘드리아 호흡저해 및 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 발현 양상 및 p53의 전사 활성 조절 확인
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 활성화의 차이점 분석
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 확인
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절에 p53 관련성 및 전사인자 조절 기전 규명
2차 년도	1차년도 연구수행 후 변경된 목표: 미토콘드리아 호흡저해를 통한 세포주기 조절 및 신호전달 기전 분석 (기존 목표: 미토콘드리아 호흡저해에 의한 원형질막 수용체 조절기전 및 중앙 이주 및 침투 억제 기전 규명)	100	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 분석 및 관련인자의 발현양상 분석
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 전사인자 활성측정 및 새로운 표적인자 검증
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 세포주기조절의 신호전달 기전 분석
3차 년도	2차년도 연구수행 후 변경된 목표: 미토콘드리아 호흡저해를 통한 혈관신생 저해 및 AMPK 조절기전 규명 (기존 목표: 미토콘드리아 호흡저해제의 화학유전체학적 기능 규명 및 조직병리학적 생체 반응을 분석 및 규명)	100	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 VEGF 활성화 조절 기전 규명
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 HIF-1 α 의 안정화 조절 기전 규명
		100	• 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 AMPK 조절 기전 규명

4.2. 관련분야에의 기여도

- 해당분야 학문발전의 기여효과

미토콘드리아 호흡 저해에 대한 새로운 약리작용을 규명하여 국제저명 학술지에 게재하였으며, 이를 통한 종양생물학 분야에 공헌할 수 있었다. 또한 본 연구에서 수립하게 될 암세포의 생화학적 기전 규명은 항암 효과 극대화에 대한 유용성 평가 및 항암 효과를 극대화의 방안 연구를 통하여 학제간 혹은 산·학간 유용가치가 있을 것이다. 본 연구 과제를 통해 규명된 기초과학 이론은 암세포의 혈관신생 및 전이기관의 상호관계에 관한 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

- 산업 발전에의 기여도 등 국가 경제에 미치는 효과

본 연구 과제를 통한 미토콘드리아 호흡 저해에 대한 새로운 항암기전 규명은 년 간 수십조 원에 달하고 있는 21세기의 고부가가치산업인 항암제 생산에 대한 원동력을 제공할 것이다. 또한 본 연구과제에서 수행할 ascochlorin 및 그 유도체를 이용한 미토콘드리아 호흡저해와 관련한 세포생명공학기술은 21세기 지식산업 시대에 국가의 기술 경쟁력 강화에 기여할 것이다. 또한 본 과제를 수행함으로써 불균형을 이루고 있는 지역 지식산업의 발전을 이루고, 지역 경제의 활성화에 활기를 줄 것으로 사료된다.

- 연구수행 과정을 통한 연구 인력 양성 효과 등

본 연구 과제의 수행을 통해 획득하게 될 미토콘드리아의 호흡 억제 기전에 대한 기초연구 결과는 항암 기전의 분자 유전적, 생물학적 특성을 연구 인력이 습득할 수 있는 교육적 성과를 이루었으며, 유전자 정보에 근거하여 첨단 생명공학 기법을 이용한 생명과학 분야의 석·박사 연구인력 양성에 있어 많은 기여를 하였다.

5. 연구결과의 활용계획

본 연구에서는 미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암유전자인 p53의 조절기전, c-Myc의 저해를 통한 세포주기의 조절, HIF-1 α 안정화 저해를 통한 혈관신생 억제, AMPK 활성을 통한 세포대사 조절을 연구하였다. 미토콘드리아 호흡조절을 통한 p53의 조절기전은 지금까지 알려진 항암제와는 달리 DNA에 손상을 주지 않고, p53 단백질의 ser392의 인산화를 특이적으로 유도하는 것을 밝혔다. 이러한 연구 결과는 앞으로 항암제 개발을 연구하는데 있어 DNA의 손상을 주지 않는 새로운 항암제의 개발 가능성을 제시하였고, 학문적인 기초를 제공할 것으로 사료된다. 또한 DNA의 손상을 주지 않음으로써 일반 항암제의 정상 장기에 대한 손상을 예방할 수 있다는 가능성을 제시하여 새로운 항암제 개발의 기초자료로써 활용 가능하다. 그리고 p53의 안정화와 관련하여 미토콘드리아 호흡저해를 통한 G1세포주기 억제의 연구 결과를 보고하였는데, 이는 일반적으로 알려진 p53단백질의 안정화의 과정과는 달리 c-Myc의 발현억제를 통해 CDK저해자인 p21을 증가시킴으로써 G1세포주기를 억제한다는 것이다. 이 결과는 DNA에 손상을 주지 않고 원암유전자로 알려진 c-Myc의 발현 감소를 통해 세포주기를 억제하는 메커니즘을 통해 새로운 항암제를 개발할 수 있는 학문적 기초자료를 제공하고 활용 가능성을 보여주는 것이다.

HIF-1 α 안정화의 저해는 암의 혈관신생에 중요한 표적으로 알려져 있다. 본 연구에서는 HIF-1 α 안정화에 있어서 저산소 상태 (1% 이하의 산소조건)나 전이금속인 CoCl₂에 의한 HIF-1 α 안정화의 저해가 아닌 미토콘드리아 호흡저해를 통한 세포표피성장인자인 EGFR의 인산화 및 단백질 합성경로의 저해를 통한 HIF-1 α 단

백질의 안정화 저해에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과 EGFR/ERK/p70S6K의 신호전달 경로를 통한 HIF-1 α 단백질의 발현 저해의 결과를 확인하였으며, 이는 암의 혈관신생을 억제함으로써 2차적인 전이를 예방할 수 있는 학문적 자료로서의 기초를 제공한 것이다. 뿐만 아니라 기존의 항암제를 활용하여 세포의 원형질막 수용체에 대한 활성저해를 통해 암의 혈관신생을 억제할 수 있는 이론적 근거로서 활용할 수 있다.

또한 본 연구에서 세포내 에너지 대사와 관련한 표적인자인 AMPK의 활성화와 관련하여 미토콘드리아 호흡저해제의 기능을 밝혔다. 보고된 바에 의하면 본 연구팀에서 사용한 미토콘드리아 호흡저해제의 유도체인 MAC은 백혈병세포에 apoptosis를 유도하는 것이 밝혀졌다. 이를 바탕으로 하여 본연구팀은 MAC이 apoptosis를 유도하는 조절기전에 대해 연구를 수행하였다. MAC은 고형암세포에서 apoptosis를 유도하기 전 AMPK의 활성화를 초래하였고, AMPK의 활성화에 의해 HIF-1 α 단백질의 안정화를 유도한 것을 확인하였다. 이 결과들을 통해 기존의 항암제들이 apoptosis나 세포주기를 억제하여 암세포를 사멸하는 과정에 있어서 AMPK의 활성화와 초기 항암제에 대한 저항성을 갖는 과정에서 HIF-1 α 단백질의 안정화를 유도하는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 미토콘드리아의 호흡저해를 유도하는 물질들이 AMPK의 활성을 통한 세포내 에너지 대사를 방해함으로써 암의 성장억제 및 세포고사를 유도를 통한 새로운 항암제의 개발 가능성을 제시할 것으로 사료된다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구는 미생물 대사산물에서 획득한 미토콘드리아 호흡 저해 물질인 ascofuranone과 ascochlorin의 c-Myc 및 HIF-1 α 단백질의 활성을 통하여 암세포 세포주기 억제와 apoptosis를 유도할 수 있었다. 연구과정 중 원암유전자인 c-Myc의 발현과 암세포의 저산소 상태에서 발현되는 HIF-1 α 의 조절이 미토콘드리아 호흡저해와 관련이 있음을 해외에서 또한 많은 연구가 진행되고 있었다. 그에 따르면 ascofuranone뿐만 아니라 다른 미토콘드리아 호흡저해제는 세포주기 조절 표적 유전자인 p53의 활성을 증가시켰으며, p53의 하위 유전자의 전사를 활성화시키며 보고되었다. 또한 미토콘드리아 호흡저해는 c-Myc의 발현을 상당히 억제시켰으며 c-Myc이 전사억제 인자로서 작용하는 유전자인 p21의 발현을 증가시켰다. p21의 발현 증가는 미토콘드리아 호흡저해 뿐만 아니라 저산소 상태와도 관련이 있다. 저산소 상태의 세포에서는 p21의 전사가 증가되어 G1기의 세포수가 증가되는 것으로 나타났으며, 이는 HIF-1 α 과 c-Myc을 포함하고 있는 매커니즘을 통하여 증가된 것임을 확인하였다(*J Natl Cancer Inst.* 92, 376- 387, 2000).

정상산소 상태에서는 ubiquitin/proteasome system에 의하여 HIF-1 α 가 감소되어 적은 양으로 발현하다가 저산소 환경에서는 안정화에 의해 HIF-1 α 의 활성이 증가하며 Miz-1을 통하여 c-Myc이 p21 프로모터 사이트에 결합되어 있는 부분에 교체되어 p21의 활성은 증가시키며 c-Myc은 감소시킨다. 그러나 이러한 매커니즘과는 미토콘드리아 호흡저해 매커니즘과는 상반되는 결과를 나타내는데 이는 미토콘드리아 호흡저해제인 antimycin A는 HIF-1 α 의 활성을 억제시키는 결과가 도출되었기 때문이다(*Cell Death Differ.* 15, 672- 677, 2008). c-Myc 또한 HIF-1 α 와 마찬가지로 ubiquitin/proteasome system에 의해 감소되며, 단백질의 NH₂-terminal 인산화에 의해 조절된다 (*Genes Dev.* 14, 2501- 2501, 2000). 이런 앞선 연구를 통해 인간 암세포종에서 유전자의 증폭과 chromosome 전위와 같은 유전자 재배열에 의하여 c-Myc의 발현이 활성화되어 있으며, c-Myc 발현 억제는 세포의 부착과 세포 전이를 억제한다는 연구를 확인할 수 있었다.

7. 주관연구책임자(공동연구원) 대표적 연구실적

번호	논문명/특허명/기타	소속기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	논문게재일 /특허등록일	특기사항 (SCI여부)
1	4-O-methylascochlorin, methylated derivative of ascochlorin, stabilizes HIF-1 α via AMPK activation.	대구가톨릭대학교	교신저자	Biochemical and Biophysical Research communications	2011.02.15	IF: 2.548 (SCI)
2	p53-independent induction of G1 arrest and p21WAF1/CIP1 expression by ascofuranone, an isoprenoid antibiotic, through downregulation of c-Myc.	대구가톨릭대학교	교신저자	Molecular Cancer Therapeutics	2010.06.01	IF 5.12 (SCI)
3	Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic, induces G1 arrest via downregulation of c-Myc in a p53-independent manner.	대구가톨릭대학교	교신저자	Biochemical and Biophysical Research communications	2010.07.01	IF 2.548 (SCI)
4	Ascofuranone prevents ER stress-induced insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase in L6 myotube cells	대구가톨릭대학교	교신저자	Biochemical and Biophysical Research communications	2010.06.01	IF 2.548 (SCI)
5	Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents	대구가톨릭대학교	교신저자	International Journal of Cancer	2009.05.01	IF 4.862 (SCI)

- ※ 대표연구실적은 총 연구기간 중 발표(게재확정 포함)된 대표적 연구실적(논문, 특허 등)을 5건 이내로 기재
- ※ 소속기관명 : 연구성과 발표 시 소속된 기관명을 기재
- ※ 역할 : 논문의 경우 만 작성하며 제1저자, 교신저자, 참여저자 중 선택하여 기재
- ※ 특허등록국가 : 특허를 등록한 국가명을 한글로 기재(예시, 대한민국, 미국, 일본 등)
- ※ 특기사항에는 인용횟수나 우수논문수상 등과 같이 특별히 기술 할 필요가 있는 사항을 기재
- ※ 상기의 대표적 논문 및 특허 등록에 대한 내용은(별첨1:대표연구업적) 서식에 따라 요약문을 작성

8. 참고문헌

- Adhikary, S. & Eilers, M. 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. Nat Rev Mol Cell Biol, 6, 635-45.
- Ashikaga, T., Honma, M., Munemura, K., Kataoka, T., Endo, T., Yamasaki, M., Magae, J. & Nagai, K. 1998. Selective induction of interleukin-1 production and tumor killing activity of macrophages through apoptosis by the inhibition of oxidative respiration. Biosci Biotechnol Biochem, 62,1115-21.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C.,

- Reiss, Y., Shiloh, Y. & Ziv, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281, 1674–7.
- Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. & Peet, D. J. 2003. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1376–93.
- Breier, G. 2000. Angiogenesis in embryonic development—a review. *Placenta*, 21 Suppl A, S11–5.
- Bringold, F. & Serrano, M. 2000. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*, 35, 317–29.
- Bruick, R. K. & McKnight, S. L. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, 294, 1337–40.
- Bublil, E. M. & Yarden, Y. 2007. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 124–34.
- Chang, Y. C., Illenye, S. & Heintz, N. H. 2001. Cooperation of E2F-p130 and Sp1-pRb complexes in repression of the Chinese hamster dhfr gene. *Mol Cell Biol*, 21, 1121–31.
- Chang, Y. C., Lee, Y. S., Tejima, T., Tanaka, K., Omura, S., Heintz, N. H., Mitsui, Y. & Magae, J. 1998. mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Growth Differ*, 9, 79–84.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. & Halazonetis, T. D. 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13777–82.
- Chen, G. L., Yang, L., Rowe, T. C., Halligan, B. D., Tewey, K. M. & Liu, L. F. 1984. Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem*, 259, 13560–6.
- Chen, K., Albano, A., Ho, A. & Keaney, J. F., Jr. 2003. Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *J Biol Chem*, 278, 39527–33.
- Cho, H. J., Kang, J. H., Kim, T., Park, K. K., Kim, C. H., Lee, I. S., Min, K. S., Magae, J., Nakajima, H., Bae, Y. S. & Chang, Y. C. 2009. Suppression of PAI-1 expression through inhibition of the EGFR-mediated signaling cascade in rat kidney fibroblast by ascofuranone. *J Cell Biochem*, 107, 335–44.
- Cho, H. J., Kang, J. H., Kwak, J. Y., Lee, T. S., Lee, I. S., Park, N. G., Nakajima, H., Magae, J. & Chang, Y. C. 2007. Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms. *Carcinogenesis*, 28, 1104–10.
- Claassen, G. F. & Hann, S. R. 2000. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9498–503.
- Craig, A. L., Burch, L., Vojtesek, B., Mikutowska, J., Thompson, A. & Hupp, T. R. 1999. Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem J*, 342 (Pt 1), 133–41.
- Cuddihy, A. R., Wong, A. H., Tam, N. W., Li, S. & Koromilas, A. E. 1999. The double-stranded RNA

- activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene*, 18, 2690–702.
- Dang, C. V. 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*, 19, 1–11.
- Datto, M. B., Yu, Y. & Wang, X. F. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem*, 270, 28623–8.
- Dynlacht, B. D. 1997. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature*, 389, 149–52.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107, 43–54.
- Faller, D. V. 1999. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26, 74–84.
- Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669–76.
- Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M. & Morgan, D. O. 1995. Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell*, 83, 47–57.
- Folkman, J. & Shing, Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267, 10931–4.
- Guillemin, K. & Krasnow, M. A. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*, 89, 9–12.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X. & Dunphy, W. G. 2000. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev*, 14, 2745–56.
- Hao, M., Lowy, A. M., Kapoor, M., Deffie, A., Liu, G. & Lozano, G. 1996. Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*, 271, 29380–5.
- Harris, C. C. 1996. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1442–55.
- Harris, S. L. & Levine, A. J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24, 2899–908.
- Hellwig-Burgel, T., Stiehl, D. P., Wagner, A. E., Metzen, E. & Jelkmann, W. 2005. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 297–310.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, J., Saluz, H. P., Haenel, F. & Eilers, M. 2002. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell*, 10, 509–21.
- Hong, S., Park, K. K., Magae, J., Ando, K., Lee, T. S., Kwon, T. K., Kwak, J. Y., Kim, C. H. & Chang, Y. C. 2005. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway: inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 280, 25202–9.
- Hosokawa, T., Ando, K. & Tamura, G. 1985. An ascochlorin derivative, AS-6, reduces insulin resistance in the genetically obese diabetic mouse, db/db. *Diabetes*, 34, 267–74.

- Hosokawa, T., Okutomi, T., Sawada, M., Ando, K. & Tamura, G. 1981. Unusual concentration of urine and prevention of polydipsia by fungal prenylphenols in DOCA hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 69, 429–38.
- Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y. & Dong, Z. 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*, 274, 12229–35.
- Huang, C., Zhang, Z., Ding, M., Li, J., Ye, J., Leonard, S. S., Shen, H. M., Butterworth, L., Lu, Y., Costa, M., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Vallyathan, V. & Shi, X. 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem*, 275, 32516–22.
- Huang, L. E. 2008. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ*, 15, 672–7.
- Iruela-Arispe, M. L. & Dvorak, H. F. 1997. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost*, 78, 672–7.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S. & Kaelin, W. G., Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, 292, 464–8.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y. & Semenza, G. L. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*, 12, 149–62.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468–72.
- Jeong, J. H., Nakajima, H., Magae, J., Furukawa, C., Taki, K., Otsuka, K., Tomita, M., Lee, I. S., Kim, C. H., Chang, H. W., Min, K. S., Park, K. K. & Chang, Y. C. 2009. Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents. *Int J Cancer*, 124, 2797–803.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J. & Kim, K. W. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111, 709–20.
- Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H. & Gassmann, M. 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*, 15, 1312–4.
- Kang, J. H., Kim, J. K., Park, W. H., Park, K. K., Lee, T. S., Magae, J., Nakajima, H., Kim, C. H. & Chang, Y. C. 2007. Ascochlorin suppresses oxLDL-induced MMP-9 expression by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway in human THP-1 macrophages. *J Cell Biochem*, 102, 506–14.
- Kapoor, M. & Lozano, G. 1998. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2834–7.
- Keller, D., Zeng, X., Li, X., Kapoor, M., Iordanov, M. S., Taya, Y., Lozano, G., Magun, B. & Lu, H. 1999. The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 261, 464–71.
- Keller, D. M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q. H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y. & Lu, H. 2001. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell*, 7, 283–92.

- Lakin, N. D. & Jackson, S. P. 1999. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18, 7644–55.
- Li, H. & Wu, X. 2004. Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 860–7.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. & Robinson, J. P. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 278, 8516–25.
- Liu, L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*, 58, 351–75.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L. A. & Elledge, S. J. 2000. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 14, 1448–59.
- Lu, H., Taya, Y., Ikeda, M. & Levine, A. J. 1998. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6399–402.
- Maeda, M., Hasebe, Y., Egawa, K., Shibamura, M. & Nose, K. 2006. Inhibition of angiogenesis and HIF-1 α activity by antimycin A1. *Biol Pharm Bull*, 29, 1344–8.
- Magae, J., Hayasaki, J., Matsuda, Y., Hotta, M., Hosokawa, T., Suzuki, S., Nagai, K., Ando, K. & Tamura, G. 1988. Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone, and activation of phagocytes. *J Antibiot (Tokyo)*, 41, 959–65.
- Magae, J., Hosokawa, T., Ando, K., Nagai, K. & Tamura, G. 1982. Antitumor protective property of an isoprenoid antibiotic, ascofuranone. *J Antibiot (Tokyo)*, 35, 1547–52.
- Magae, J., Munemura, K., Ichikawa, C., Osada, K., Hanada, T., Tsuji, R. F., Yamashita, M., Hino, A., Horiuchi, T., Uramoto, M. & et al. 1993. Effects of microbial products on glucose consumption and morphology of macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57, 1628–31.
- Magae, J., Suzuki, S., Nagai, K., Yamasaki, M., Ando, K. & Tamura, G. 1986. In vitro effects of an antitumor antibiotic, ascofuranone, on the murine immune system. *Cancer Res*, 46, 1073–8.
- Maxwell, P. & Salnikow, K. 2004. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther*, 3, 29–35.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. & Ratcliffe, P. J. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271–5.
- Meek, D. W., Simon, S., Kikkawa, U. & Eckhart, W. 1990. The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J*, 9, 3253–60.
- Metzen, E. & Ratcliffe, P. J. 2004. HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem*, 385, 223–30.
- Molitor, J. A., Walker, W. H., Doerre, S., Ballard, D. W. & Greene, W. C. 1990. NF- κ B: a family of inducible and differentially expressed enhancer-binding proteins in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 10028–32.
- Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374, 131–4.

- Nagy, P., Arndt-Jovin, D. J. & Jovin, T. M. 2003. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp Cell Res*, 285, 39-49.
- Nakajima, H., Mizuta, N., Sakaguchi, K., Fujiwara, I., Mizuta, M., Furukawa, C., Chang, Y. C. & Magae, J. 2007. Aberrant expression of Fra-1 in estrogen receptor-negative breast cancers and suppression of their propagation in vivo by ascochlorin, an antibiotic that inhibits cellular activator protein-1 activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 60, 682-9.
- Nawata, Y., Ando, K., Tamura, G., Arima, K. & Iitaka, Y. 1969. The molecular structure of ascochlorin. *J Antibiot (Tokyo)*, 22, 511-2.
- Nevins, J. R., Leone, G., DeGregori, J. & Jakoi, L. 1997. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*, 173, 233-6.
- Nurse, P., Masui, Y. & Hartwell, L. 1998. Understanding the cell cycle. *Nat Med*, 4, 1103-6.
- Nurse, P. M. 2002. Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep*, 22, 487-99.
- O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C., Meltzer, P. & DePinho, R. A. 2000. Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet*, 24, 113-9.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19, 3159-67.
- Otsuka, K., Koana, T., Tauchi, H. & Sakai, K. 2006. Activation of antioxidative enzymes induced by low-dose-rate whole-body gamma irradiation: adaptive response in terms of initial DNA damage. *Radiat Res*, 166, 474-8.
- Passaniti, A., Taylor, R. M., Pili, R., Guo, Y., Long, P. V., Haney, J. A., Pauly, R. R., Grant, D. S. & Martin, G. R. 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest*, 67, 519-28.
- Ratan, H. L., Gescher, A., Steward, W. P. & Mellon, J. K. 2003. ErbB receptors: possible therapeutic targets in prostate cancer? *BJU Int*, 92, 890-5.
- Ruas, M. & Peters, G. 1998. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378, F115-77.
- Ryan, H. E., Lo, J. & Johnson, R. S. 1998. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17, 3005-15.
- Sakaguchi, K., Nakajima, H., Mizuta, N., Furukawa, C., Ozawa, S., Ando, K., Chang, Y. C., Yamagishi, H. & Magae, J. 2005. Selective cytotoxicity of ascochlorin in ER-negative human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 329, 46-50.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19, 183-232.
- Sawada, M., Hosokawa, T., Okutomi, T. & Ando, K. 1973. Hypolipidemic property of ascofuranone. *J Antibiot (Tokyo)*, 26, 681-6.
- Semenza, G. L. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J*

- Appl Physiol, 88, 1474–80.
- Semenza, G. L. 2002. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, 8, S62–7.
- Semenza, G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 721–32.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. & Giallongo, A. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271, 32529–37.
- Senderowicz, A. M. 2003. Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene*, 22, 6609–20.
- Senderowicz, A. M. & Sausville, E. A. 2000. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst*, 92, 376–87.
- Seoane, J., Le, H. V. & Massague, J. 2002. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 419, 729–34.
- Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366, 704–7.
- Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672–7.
- Sherr, C. J. & McCormick, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, 103–12.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13, 1501–12.
- Sherr, C. J. & Roberts, J. M. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18, 2699–711.
- Takatsuki, A., Tamura, G. & Arima, K. 1969. Antiviral and antitumor antibiotics. XIV. Effects of ascochlorin and other respiration inhibitors on multiplication of Newcastle disease virus in cultured cells. *Appl Microbiol*, 17, 825–9.
- Tamura, G., Suzuki, S., Takatsuki, A., Ando, K. & Arima, K. 1968. Ascochlorin, a new antibiotic, found by the paper-disc agar-diffusion method. I. Isolation, biological and chemical properties of ascochlorin. (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. I). *J Antibiot (Tokyo)*, 21, 539–44.
- Togashi, M., Ozawa, S., Abe, S., Nishimura, T., Tsuruga, M., Ando, K., Tamura, G., Kuwahara, S., Ubukata, M. & Magae, J. 2003. Ascochlorin derivatives as ligands for nuclear hormone receptors. *J Med Chem*, 46, 4113–23.
- Topisirovic, I., Ruiz-Gutierrez, M. & Borden, K. L. 2004. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res*, 64, 8639–42.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M. & Haupt, Y. 1999. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J*, 18, 1805–14.
- van Oijen, M. G. & Slootweg, P. J. 2000. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res*, 6, 2138–45.
- Waldman, T., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, 55, 5187–90.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a

- basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.
- Wang, G. L. & Semenza, G. L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270, 1230-7.
- Wang, J. Y., Knudsen, E. S. & Welch, P. J. 1994. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res*, 64, 25-85.
- Warner, B. J., Blain, S. W., Seoane, J. & Massague, J. 1999. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol*, 19, 5913-22.
- Xie, S., Wang, Q., Wu, H., Cogswell, J., Lu, L., Jhanwar-Uniyal, M. & Dai, W. 2001. Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. *J Biol Chem*, 276, 36194-9.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L. P. & Sonenshein, G. E. 2001. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*, 20, 1688-702.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127-37.
- Ye, J., Wang, S., Leonard, S. S., Sun, Y., Butterworth, L., Antonini, J., Ding, M., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., Castranova, V. & Shi, X. 1999. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 274, 34974-80.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W. & Semenza, G. L. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60, 1541-5.

9. 연구성과

사업명	핵심연구지원사업(협동)	연구책임자	장영채	주관기관	대구가톨릭대학교 산학협력단
과제번호	2008-0060976	과제명	미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암조절 기전연구		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	7	0	0	4	5	2	0	0	0	1	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
3	1	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)					
기술확산			연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)		
기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료
0	0	0	0	0	0

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	SCI여부	IF	국제공동연구 논문여부	기여도
2008-0060976	2009.06	Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents	Jeong, Ji-Hak; Nakajima, Hiroo; Maga e, Junji; Furukawa, Chiharu; Taki, Keiko; Otsuka, Kensuke; Tomita, Masanori; Lee, In-Seon; Kim, Cheorl-Ho; Chang, Hyeun-Wook	SCI	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER	124(12)	국외	SCI등재	4.555 (jcr2007)	예	100%
2008-0060976	2010.06	Ascofuranone prevents ER stress-induced insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase in L6 myotube cells	Hwang, Seung-Lark; Chang, Hyeun-Wook; Lee, In-Kyu; Yang, Byung-Keun; Magae, Junji; Chang, Young-Chae	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	396(4)	국외	SCI등재	2.648 (jcr2008)	예	50%
2008-0060976	2010.07	Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic, induces G1 arrest via downregulation of c-Myc in a p53-independent manner	Jeong, Ji-Hak; Chang, Young-Chae ;	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	398(1)	국외	SCI등재	2.548 (jcr2009)	아니오	50%
2008-0060976	2010.07	p53-Independent Induction of G(1) Arrest and p21(WAF1/CIP1) Expression by Ascofuranone, an Isoprenoid Antibiotic, through Downregulation of c-Myc	Jeong, Ji-Hak; Kang, Shin-Sung; Park, Kwan-Kyu; Chang, Hyeun-Wook; Magae, Junji; Chang, Young-Chae ;	SCI	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	9(7)	국외	SCI등재	4.953 (jcr2009)	예	50%
2008-0060976	2010.11	Therapeutic Possibility of Ascofuranone for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease - Response	Jeong, Ji-Hak; Magae, Junji; Chang, Young-Chae	SCI	MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS	9(11)	국외	SCI등재	4.953 (jcr2009)	예	100%
2008-0060976	2011.03	4-O-methylascochlorin, methylated derivative of ascochlorin, stabilizes HIF-1 alpha via AMPK activation	Jeong, Ji-Hak; Kang, JeongHan; Hwang, Seung-Lark; Cho, Hyun-Ji; Park, Kwan-Kyu; Park, Yoon-Yup; Chung, Il-Kyung; Chang, Hyeun-Wook; Kim, Cheorl-Ho; Min, Kwan-Sik	SCI	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS	406(3)	국외	SCI등재	2.548 (jcr2009)	예	60%

지식재산권 성과정보

과제번호	출원등록 연월	재산권 구분	출원등록 구분	발명제목	출원 등록인	출원등록국	발명자명	출원등록번호	활용 형태	기여 도
2008-00 60976	2010.05.20	특허	출원	아스코클로린을 포함하는 c-Myc 활성저해 및 항암치료용 조성물	기관	대한민국	장영채, 정지학, 조현지, 정윤정, 정일경, 마가에 준지	10-2010-0047 581	보유기관 자체활용	100%
2008-00 60976	2010.05.20	특허	출원	아스코퓨라논을 포함하는 c-Myc 활성저해 및 항암치료용 조성물	기관	대한민국	장영채, 정지학, 조현지, 정윤정, 정일경, 마가에 준지	10-2010-0047 580	보유기관 자체활용	100%

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2008-0060976	2009.11	2009 International Symposium on TGF- β Signaling, Inflammation, and Cancer Prevention	Ji-Hak Jeong, Shin-Sung Kang, wan-Kyu Park, Hyeun-Wook Chang, Young-Chae Chang	p53-Independent induction of G1 arrest and p21WAF1/CIP1 expression by ascofuranone, an isoprenoid antibiotic, via downregulation of c-Myc	국제학술대회	대한민국
2008-0060976	2009.11	2009 International Symposium on TGF- β Signaling, Inflammation, and Cancer Prevention	Ji-Hak Jeong, Kwan-Kyu Park, Hyeun-Wook Chang, Young-Chae Chang	Ascochlorin Activates p53 in a Manner Distinct from DNA Damaging Agents	국제학술대회	대한민국
2008-0060976	2010.05	2010 KSBMB Annual Meeting	Ji-Hak Jeong, Jae-Moon Shin, Young-Chae Chang	Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic, induces G1 arrest via downregulation of c-Myc in a p53-independent manner	국제학술대회	대한민국
2008-0060976	2010.05	2010 KSBMB Annual Meeting	Yun-Jeong Jeong, Ji-Hak Jeong, Hyo-Jin Lee, Young-Chae Chang	Ascofuranone suppresses EGF-induced hypoxia-inducible factor-1 α by inhibition of mTOR/p70S6-kinase pathway in breast cancer cells	국제학술대회	대한민국
2008-0060976	2010.08	The Ninth International Congress on Targeted Therapies in Cancer	Ji-Hak Jeong, Hyun-Ji Cho, Young-Chae Chang	Ascochlorin inhibits growth factor-induced HIF-1 α activation and tumor-angiogenesis through the suppression of EGFR/ERK/p70S6K signaling pathway in human epidermoid cervical carcinoma cells	국제학술대회	미국
2008-0060976	2009.01	발암기전 암예방 연구회	정지학, 강신성, 박관규, 장영채	Ascofuranone activates p53-independent p21 expression via downregulation of c-myc	국내학술대회	대한민국
2008-0060976	2009.05	한국생화학분자생물학회	Ji-Hak Jeong, Kwang-Kyun Park, Hyeun-Wook Chang, Hyang-Sook Seol, Young-Chaehang	Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents	국내학술대회	대한민국
2008-0060976	2009.08	대한암예방학회 및 암예방 연구회	정지학, 장영채	Ascochlorin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression via EGFR signaling pathway	국내학술대회	대한민국
2008-0060976	2010.07	발암기전 및 분자암예방 연구회	Ji-Hak Jeong, Young-Chae Chang	Ascochlorin inhibits growth factor-induced HIF-1 α activation and tumor-angiogenesis through the suppression of EGFR/ERK/p70S6K signaling pathway in human epidermoid cervical carcinoma cells	국내학술대회	대한민국

수상실적 성과정보							
과제번호	수상연월	수상명	수상자		시상기관	시상국가	수상사유
			성명	소속기관			
2008-0060976	2009.11	우수포스터상	정지학, 박관규, 장현욱, 장영채	대구가톨릭대학교 (대명동캠퍼스)	대한암예방학회	대한민국	대한암예방학회, 이길여 암·당뇨연구원 공동주관으로 개최한 "2009 International Symposium on TGF-β Signaling, Inflammation, and Cancer Prevention" 학술대회에서 "Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents"라는 포스터를 발표하여 수상함

학위배출인력 성과정보							
과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2008-0060976							
2008-0060976							
2008-0060976							
2008-0060976							

10. 기타사항

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	4-O-methylascochlorin, methylated derivative of ascochlorin, stabilizes HIF-1α via AMPK activation.		
연구업적 유형	학술지게재논문(O) 저서() 역서() 특허()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	- 참여연구원: 정지학 (제1저자) - 주관연구책임자: 장영채 (교신저자)	참여자수	14
<p>Biochemical Biophysical Research Communication. 406(3), 353-358. 2011 (SCI 논문. IF: 2.548)</p> <p>Chemopreventive or anticancer agents induce cancer cells to apoptosis through the activation of adenosine AMP-activated protein kinase (AMPK), which plays a major role as energy sensors under ATP-deprived condition or ROS generation. In this study, we compared the effects of ascochlorin (ASC), from the fungus Ascochyta viciae, and its derivatives on AMPK activity. We also examined a regulatory mechanism for hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) stabilization in response to 4-O-methylascochlorin (MAC). We found that AMPK activation was mainly involved with MAC, but not ASC and 4-O-carboxymethylascochlorin (AS-6), indicating that the substitution of 4-O-methyl group from 4-O-hydroxyl group of ASC is important in the activation of AMPK and the expression of HIF-1α. MAC-stabilized HIF-1α via AMPK activation triggered by lowering the intracellular ATP level, not by ROS generation, increases glucose uptake and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and glucose transporter 1 (GLUT-1), major target genes of HIF-1α. Moreover, MAC-induced AMPK activity suppressed survival factors, including mTOR and ERK1/2 or translational regulators, including p70S6K and 4E-BP1. Our data suggest that AMPK is a key determinant of MAC-induced HIF-1α expression in response to energy stress, further implying its involvement in MAC-induced apoptosis.</p>			

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	p53-independent induction of G1 arrest and p21WAF1/CIP1 expression by ascofuranone, an isoprenoid antibiotic, through downregulation of c-Myc.		
연구업적 유형	학술지게재논문(O) 저서() 역서() 특허()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	- 참여연구원: 정지학 (제1저자) - 주관연구책임자: 장영채 (교신저자)	참여자수	6
<p style="text-align: center;">Molecular Cancer Therapeutic. 9(7), 2102-2113. 2010 (SCI 논문. IF: 5.12)</p> <p>Ascofuranone has been shown to have antitumor activity, but the precise molecular mechanism by which it inhibits the proliferation of cancer cells remains unclear. Here, we study the effects of ascofuranone on cell cycle progression in human cancer cells and find that ascofuranone induces G(1) arrest without cytotoxicity with upregulation of p53 and p21(WAF1/CIP1) while downregulating c-Myc and G(1) cyclins. Chromatin immunoprecipitation assay and RNA interference studies with cells deficient in p53 and p21 show that ascofuranone induces p21(WAF1/CIP1) expression and subsequent G(1) arrest through the release of p21(WAF1/CIP1) promoter from c-Myc-mediated transcriptional repression, independent of p53. Ascofuranone-induced p21(WAF1/CIP1) associates with CDK2 and prevents CDK2-cyclin E complex formation, leading to the inactivation of E2F transcriptional activity. These results suggest that ascofuranone upregulates p21(WAF1/CIP1) through p53-independent suppression of c-Myc expression, leading to cytostatic G(1) arrest. Thus, ascofuranone represents a unique natural antitumor compound that targets c-Myc independent of p53.</p>			

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic, induces G1 arrest via downregulation of c-Myc in a p53-independent manner.		
연구업적 유형	학술지게재논문(O) 저서() 역서() 특허()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	- 참여연구원: 정지학 (제1저자) - 주관연구책임자: 장영채 (교신저자)	참여자수	2
<p style="text-align: center;">Biochemical Biophysical Research Communication. 398(1), 68–73. 2010 (SCI 논문. IF: 2.548)</p> <p>Numerous anti-cancer agents inhibit cell cycle progression via a p53-dependent mechanism; however, many of these carcinostatic substances are toxic. Here, we show that ascochlorin, an isoprenoid antibiotic, is a non-toxic anti-cancer agent that induces G1 arrest via the induction of p21(WAF1/CIP1) in a c-Myc, but not a p53, dependent manner. Ascochlorin has a broad spectrum of anti-tumor and anti-metastatic activities, but the molecular mechanism by which it inhibits cell cycle progression of cancer cells remains to be elucidated. We demonstrated that cytostatic G1 arrest by ascochlorin is mainly associated with the upregulation of p21(WAF1/CIP1), and the downregulation of c-Myc. Furthermore, we used a chromatin immunoprecipitation assay, RNA interference, and p53-deficient cells to verify that p21(WAF1/CIP1) induction by ascochlorin is related to transcriptional repression of c-Myc. Ascochlorin abolished pRB hyperphosphorylation, which resulted in the inactivation of E2F transcriptional activity. These results suggest that ascochlorin induces G1 arrest via the p53-independent suppression of c-Myc. Thus, we reveal a role for ascochlorin in inhibiting tumor growth via G1 arrest, and identify a novel regulatory mechanism for c-Myc.</p>			

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Ascofuranone prevents ER stress-induced insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase in L6 myotube cells		
연구업적 유형	학술지게재논문(O) 저서() 역서() 특허()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	- 참여연구원: 황승락 (제1저자) - 주관연구책임자: 장영채 (교신저자)	참여자수	6

Biochemical Biophysical Research Communication. 396(4), 967-972. 2010 (SCI 논문. IF: 2.548)

The current study presents that ascofuranone isolated from a phytopathogenic fungus, *Ascochyta viciae*, has antitumor activity against various transplantable tumors and a considerable hypolipidemic activity. AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a critical role in cellular glucose and lipid homeostasis. We found that ascofuranone improves ER stress-induced insulin resistance by activating AMPK through the LKB1 pathway. In L6 myotube cells, ascofuranone treatment increased the phosphorylation of the Thr-172 residue of the AMPK alpha subunit and the Ser-79 subunit of acetyl-CoA carboxylase (ACC) and cellular glucose uptake. Ascofuranone-induced phosphorylation of AMPK and ACC was not increased in A549 cells lacking LKB1. Interestingly, ascofuranone treatment also improved insulin signaling impaired by ER stress in L6 myotube cells. These effects were all reversed by pretreatment with Compound C, an AMPK inhibitor or with adenoviral-mediated dominant-negative AMPK alpha 2. Taken together, these results indicated that ascofuranone-mediated enhancement of glucose uptake and reduction of impaired insulin sensitivity in L6 cells is predominantly accomplished by activating AMPK, thereby mediating beneficial effects in type 2 diabetes and insulin resistance.

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Ascochlorin activates p53 in a manner distinct from DNA damaging agents		
연구업적 유형	학술지게재논문(O) 저서() 역서() 특허()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	- 참여연구원: 정지학 (제1저자) - 주관연구책임자: 장영채 (교신저자)	참여자수	14
<p style="text-align: center;">International Journal of Cancer, 124(12), 2797–2803, 2009 (SCI 논문. IF: 4.7)</p> <p>Ascochlorin, a prenylphenol antitumor antibiotic, profoundly increases the expression of endogenous p53 by increasing protein stability in the human osteosarcoma cells and human colon cancer cells. Ascochlorin also increases DNA binding activity to the p53 consensus sequence in nuclear extract and enhances transcription of p53 downstream targets. Ascochlorin specifically induces p53 phosphorylation at ser 392 without affecting ser 15 or 20, whereas DNA damaging agents typically phosphorylate these serines. Moreover, ascochlorin does not induce phosphorylation of ATM and CHK1, an established substrate of ATR that is activated by genotoxins, nor does it increase DNA strand break, as confirmed by comet assay. The structure–activity relationship suggests that p53 activation by ascochlorin is related to inhibition of mitochondrial respiration, which is further supported by the observation that respiratory inhibitors activate p53 in a manner similar to ascochlorin. These results suggest that ascochlorin, through the inhibition of mitochondrial respiration, activates p53 through a mechanism distinct from genotoxins.</p>			

자체평가 의견서

1. 과제 현황

		과제번호		2008-0060976	
사업구분	기초연구사업				
연구분야	20802	20801	과제구분	단위(✓)	
사업명	중견연구자지원사업(핵심연구)			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암조절 기전연구		과제유형	(기초, 응용, 개발)	
연구기관	대구가톨릭대학교산학협력단		연구책임자	장영채	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간 (yyyy.mm ~ yyyy.mm)	정부	민간	계
	1차년도	2008.09 ~ 2009.08	120,000		120,000
	2차년도	2009.09 ~ 2010.08	126,600		126,600
	3차년도	2010.09 ~ 2011.08	120,000		120,000
	4차년도				
	5차년도				
	계(총연구기간)	2008.09 ~ 2011.08	366,600		366,600
참여기업					
상대국			상대국연구기관		

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자)

소속	직위	성명
대구가톨릭대학교	부교수	장영채

4. 평가자(연구책임자) 확인

본인은 평가 대상 과제에 대한 연구 결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을
확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초 자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구 개발 실적

※ 다음 각 평가 항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구 개발 결과의 우수성 및 창의성

■ 등급 : 아주 우수

본 연구팀은 미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암유전자의 조절기전, 세포주기 조절기전, 혈관신생 억제 조절기전, 그리고 세포내 에너지대사 조절기전에 대한 우수한 연구 결과를 도출하였으며, 이 결과들을 IF 5점 이상의 SCI 저널에 게재하였다. 또한 미토콘드리아의 호흡저해라는 연구 주제로 기존의 연구와는 차별된 결과를 도출하여 연구 개발 결과의 우수성과 창의성에 대해 높은 평가를 할 수 있다.

2. 연구 개발 결과의 파급 효과

■ 등급 : 아주 우수

본 연구팀의 연구 개발 결과는 항암 기전에만 국한된 것이 아니라 다양한 질환을 표적으로 하여 치료제의 개발 가능성을 제시한 것이다. 본 연구팀은 미토콘드리아 호흡저해제를 항암모델만을 대상으로 적용한 것이 아니라 비만과 당뇨와 같은 질환을 대상으로 연구하여 SCI 저널에 게재한 바 있으며, 이는 미토콘드리아 호흡저해가 암을 비롯한 다양한 질환의 치료대상으로서 가능성을 제시한 것으로 그 파급효과는 아주 클 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 본 연구팀은 미토콘드리아 호흡저해제가 ADPKD(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease)의 치료가능성에 대한 letter를 Molecular cancer Therapeutics에 게재한 바 있다.

3. 연구 개발 결과에 대한 활용 가능성

■ 등급 : 아주 우수

본 연구팀은 기존의 항암제에 대한 연구 결과와는 차별된 미토콘드리아 호흡저해제에 대한 항암기전을 연구하여 SCI 저널에 보고하였으며, 이는 DNA에 손상을 주지 않는 새로운 방식의 항암제의 개발 가능성을 보여주는 것이다. 그리고 항암기전이라는 하나의 주제 아래 다양한 방식의 모델을 제시하였으며, 이는 하나의 항암 후보 약물의 다양한 기능을 보여줌으로써 다양한 질병의 치료제로서의 가능성을 제시하는 것이다. 본 연구팀이 발굴한 미토콘드리아 호흡저해제를 이용하여 향후 다양한 염증을 비롯한 다양한 만성질환모델을 통해 치료제로서의 개발 가능성을 제시할 계획이다.

4. 연구 개발 수행 노력의 성실도

■ 등급 : 아주 우수

본 연구팀은 1년차의 과제 계획 초기의 목표를 완벽히 수행하였으며, 1년차의 연구 수행 결과를 통해 초기의 계획보다 더 많은 결과를 확보하였다. 그리고 1년차의 연구결과와 연계하여 2년차의 선행 연구결과를 확보하였고 이를 통해 Molecular cancer Therapeutics 등의 SCI 저널에 게재할 수 있었다. 2년차와 3년차의 연구목표의 변경은 있었지만, 변경된 연구목표를 모두 성실히 수행하여 특허출원 및 SCI저널 투고를 통해 우수한 성과를 발표하여 기본 목표에 대한 계획을 성실히 수행하였다.

5. 공개 발표된 연구 개발 성과(논문, 지식재산권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주 우수

본 연구팀은 연구의 수행결과로 International Journal of Cancer (IF: 4.558), Molecular Cancer Therapeutics (IF: 5.296), Biochemical and Biophysical Research Communications (IF: 2.720) 등의 국제 저명 학술지 게재의 우수한 논문 성과를 이루었다. 또한 본 연구의 수행을 통해 2건의 국내 특허를 출원하였다. 그리고 분자세포생물학회를 비롯한 국제학술 대회에 참가였고, 그 결과 “International Symposium on TGF- β Signaling, Inflammation, and Cancer Prevention“ 국제학술 대회에서는 우수포스터상을 수여하였다.

II. 연구 목표 달성도

세부 연구 목표 (연구계획서 상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해 및 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 발현 양상 및 p53의 전사 활성 조절 확인 	5	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제인 ascochlorin과 그 유도체, rotenone, antimycin, oligomycin 등의 약물과 DNA 손상을 주는 doxorubicin, etoposide 등의 항암제와 p53의 발현 조절 및 전사활성의 양상을 western blot, EMSA의 방법으로 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 p53 단백질의 활성화의 차이점 분석 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상을 주는 항암제의 p53의 발현 조절을 p53의 잔기별로 각각의 인산화 및 전사활성을 western blot, EMSA의 방법으로 비교분석하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상 약물에 의한 세포주기 분석 및 조절 인자 확인 	5	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제와 DNA 손상을 주는 항암제를 이용하여 FACS를 이용한 세포주기 분석 및 세포주기 또는 DNA손상과 관련된 키나아제의 활성을 비교분석하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절에 p53 관련성 및 전사인자 조절 기전 규명 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 p53의 관련성을 p53-knock-out 세포주 및 p53 siRNA를 이용하여 western blot 및 FACS의 방법으로 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 분석 및 관련인자의 발현양상 분석 	5	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절인자인 c-Myc의 발현양상을 western blot, RT-PCR의 방법으로 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 전사인자 활성측정 및 새로운 표적인자 검증 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 세포주기 조절인자인 c-Myc의 전사활성을 ChIP assay, siRNA를 이용하여 검증하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 세포주기조절의 신호전달 기전 분석 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 세포주기와 관련한 c-Myc의 조절기전을 다양한 키나아제저해제를 이용하여 신호전달 경로 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 VEGF 활성화 조절 기전 규명 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 VEGF의 발현조절을 저산소 상태, 전이금속, 표피성장인자 등의 다양한 조건하에서 RT-PCR, VEGF ELISA를 이용하여 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제를 통한 HIF-1α의 안정화 조절 기전 규명 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 HIF-1α의 안정화를 저산소 상태, 전이금속, 표피성장인자 등의 다양한 조건하에서 western blot, luciferase assay를 이용하여 확인, 다양한 키나아제 저해제를 이용하여 HIF-1α의 안정화에 대한 신호전달 경로 확인하였음
<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제에 의한 AMPK 조절 기전 규명 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> • 미토콘드리아 호흡저해제와 그 유도체를 이용하여 AMPK의 활성화 및 HIF-1α의 안정화를 western blot, glucose uptake 등의 방법을 통해 확인하였음
합계	100		

Ⅲ. 종합 의견

1. 연구 개발 결과에 대한 종합 의견

- 본 연구팀은 미토콘드리아 호흡저해를 통한 항암유전자의 조절기전, 세포주기 조절기전, 혈관신생 억제 조절기전, 그리고 세포내 에너지대사 조절기전에 대한 우수한 연구 결과를 도출하였다. 그리고 International Journal of Cancer (IF: 4.558), Molecular Cancer Therapeutics (IF: 5.296), Biochemical and Biophysical Research Communications (IF: 2.720) 등의 국제 저명 학술지 게재의 우수한 논문 성과를 이루었다.
- 본 연구팀은 미토콘드리아 호흡저해를 발굴하여 기존의 항암제와는 다른 방식으로 DNA의 손상 없이 p53 단백질의 ser 392 잔기를 인산화하여 p53의 활성을 유도한다는 것을 최초로 보고하였다. 이는 미토콘드리아 호흡저해제의 항암제로서의 가능성을 제시하는 유용한 학문적 자료로서 가치를 높게 평가한다.
- 본 연구팀의 연구 개발 결과 가운데, 세포주기의 조절이 기존의 약물과는 달리 미토콘드리아 호흡저해제가 c-Myc의 발현조절을 통해 이루어진다는 것을 최초로 보고하였다. 이 결과는 CDK저해자인 p21단백질의 조절이 DNA의 손상을 주지 않는 항암 후보물질의 경우 c-Myc이 주요조절자의 역할을 한다는 것을 제시한 것이다. 따라서 항암제의 표적인자가 항암유전자인 p53이 아니라 c-Myc을 통해 세포의 주기를 조절함으로써 항암효과를 가질 수 있다는 것을 제시하는 결과라 사료된다.
- 본 연구팀의 연구는 미토콘드리아 호흡저해제가 p53의 활성 및 세포주기 조절뿐만 아니라 EGFR의 신호전달 경로를 통해 암의 혈관신생을 억제한다는 연구 결과를 도출하였다. 이는 미토콘드리아 호흡저해제가 미토콘드리아의 대사과정을 통해 이루어지는 암세포의 조절기전과 더불어 암의 진행과 성장에 관여하는 키나아제등의 다양한 인자들의 활성을 조절해 암의 성장과 혈관신생을 저해하는 항암제로서의 다양한 가능성을 제시한 것이다.
- 본 연구팀의 연구는 최근 연구의 동향에 맞추어 AMPK의 활성화와 HIF-1 α 의 조절기전을 미토콘드리아 호흡저해제를 이용하여 규명하였으며, 이 결과들은 미토콘드리아 호흡저해제의 암세포 내 대사조절기전의 기본 원인을 밝힌 것으로 높이 평가 할 수 있다. 이러한 연구는 기존의 항암제의 또 다른 효능에 대한 가능성과 항암제의 기능뿐만 아니라 다양한 질병의 치료제로서의 가능성을 제시하는 것으로 사료된다.
- 본 연구팀은 1년차의 과제 계획 초기의 목표를 완벽히 수행하였으며, 1년차의 연구 수행 결과를 통해 초기의 계획보다 더 많은 결과를 확보하였다. 그리고 1년차의 연구결과와 연계하여 2년차와 3년차의 연구계획을 수립하였다. 2년차와 3년차의 연구목표는 최초의 연구계획의 변경은 있었지만, 변경된 연구목표를 모두 성실히 수행하여 특허출원 및 SCI저널 투고를 통해 우수한 성과를 발표하여 기본 목표를 달성하였다.

2. 평가 시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구팀이 도출한 결과들은 미토콘드리아 호흡저해라는 기존의 연구 결과를 최근의 연구 동향과 새로운 관점에서 재해석함으로써 미토콘드리아호흡저해제를 이용한 항암기능 규명의 새로운 패러다임을 제시하였습니다. 아울러 연구계획 수립 당시 목표했던 연구 성과를 성실히 달성했을 뿐만 아니라, 연구 성과의 양뿐만이 아니라 IF 5점 이상의 International Journal of Cancer (IF: 4.558), Molecular Cancer Therapeutics (IF: 5.296), Biochemical and Biophysical Research Communications (IF: 2.720) 등의 국제 저명 학술지 (SCI)에 게재하여 연구 성과의 질적인 면도 평가에 고려해 주시기를 바랍니다.

3. 연구 결과의 활용 방안 및 향후 조치에 대한 의견

- 본 연구팀의 연구 결과는 미토콘드리아를 표적으로 하는 항암제 개발의 기초 자료로써 활용 가능할 것으로 사료된다. 또한 DNA에 손상을 주지 않고 항암기능을 갖는 새로운 패러다임의 항암제에 대한 기능 규명을 가능하게 할 것이다.
- 본 연구팀의 최초 연구계획 수립 당시의 목표들은 많은 양의 새로운 선행연구 결과를 도출함으로써 미토콘드리아 호흡저해와 관련한 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 예를 들면, 미토콘드리아 호흡저해에 의한 c-Myc에 대한 발현양상을 확인하였으나 신호전달 경로를 규명해야 할 것이며, 고형암세포 뿐만 아니라 백혈병세포에서도 Bcr/abl과의 관련성 또한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토 의견, 연구기관 자체의 보안성 검토 결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2 연구기관 자체의 검토 결과

--