

원자력연구기반확충사업

폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한
방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구

(Characterization and application of radiation-sensitizing
genes by DNA methylation in lung cancer cells)

한국원자력연구원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

이 보고서를 "폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한 방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구"과제의 보고서로 제출합니다.

2011. 4. 29

주관연구기관명 : 한국원자력연구원

주관연구책임자 : 정 일 래

연구 원 : 김 국 찬

" : 김 인 규

" : 강 효 진

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

보고서 요약서

과제고유번호	KAERI/RR-3244/2010	해당 단계 연구 기간	2009.04.01- 2011.03.31	단 계 구 분	(1단계)/ (총 1 단 계)
연구 사업 명	중 사업 명	원자력연구기반확충사업			
	세부사업명	미래기초연구 (핵심기초연구)			
연구 과제 명	대 과제 명	-			
	세부과제명	폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한 방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구			
연구 책임자	정일래	해당단계 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 3 명 외부 : 1 명	해당단계 연구비	정부:96,000천원 기업: 천원 계 :96,000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 3 명 외부 : 1 명	총연구비	정부:96,000천원 기업: 천원 계 :96,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국원자력연구원 원자력환경안전연구부		참여기업명	-	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면 수	41
<p>최근 종양관련 유전자의 기능 변화가 DNA 상의 특정 부위에 일어나는 메틸화 (methylation)에 의해 유발된다는 보고가 다수 있어왔다. 본 연구에서는 특히 방사선에 의해 발현이 변화하는 유전자군을 최신 pyrosequencing 기법에 의해 탐색하고, 그 중 두 가지 유전자를 선택하여 폐암세포주 H460과 A549에서의 기능을 분석하였다.</p> <p>두 세포 공히 방사선에 의해 심각한 G2/M arrest를 보였으며 특히 A549에서는 H460에 비해 신속히 arrest가 저하되는 결과를 보였다. 유전자 분석 결과 A549는 H460에 비해 PTEN 유전자가 고도로 메틸화되어 있었다 (저발현되었다). western blot 결과 PTEN은 pAkt의 음성조절자로 작용하며, pAkt 는 또한 방사선에 의해 유발되는 유전자인 p53의 음성조절자로 작용함을 발견하였다. 본 결과는 H460에서 보이는 높은 수준의 방사선 민감성이 해당 세포주에서 보이는 PTEN과 p53의 고발현에 기인함을 알 수 있었다.</p> <p>또한 Wnt-antagonist로 알려진 네 종류의 DKK (Dickkopf gene) 유전자 중, non-small cell lung cancer H460에서의 DKK3 유전자의 기능을 살펴보았다. 최신 pyrosequencing 기법을 이용하여 분석한 결과 DKK3 는 약 44% 수준으로 메틸화가 되어 있었지만, 여전히 높은 수준으로 발현되어 있었음을 보였다. SiDKK3 RNA를 처리하여 DKK3 발현을 완전히 억제한 결과, 방사선에 의해 유도되는 p53 유전자와 p21 유전자가 크게 증가하였고, 아울러 cyclin-dependent kinases D1과 E 역시 크게 증가하다. 또한 현미경적 관찰과 flow cytometry를 통해 전형적인 apoptosis가 유도됨을 발견하였다. 이 결과는 DKK3가 세포내 활성산소의 수준을 낮추어 줌으로써 antiapoptotic molecule로 작용함을 보여준다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	DNA 메틸화, PTEN, DKK3, 폐암세포주, 감마방사선 조사, 파이로시퀀싱			
	영 어	DNA methylation, PTEN, DKK3, non-small lung cancer cell, γ -ray radiation, pyrosequencing			

요약문

최근 종양관련 유전자의 기능 변화가 DNA 상의 특정 부위에 일어나는 메틸화 (methylation)에 의해 유발된다는 보고가 다수 있어왔다. 본 연구에서는 특히 방사선에 의해 발현이 변화하는 유전자군을 최신 pyrosequencing 기법에 의해 탐색하고, 그 중 두 가지 유전자를 선택하여 폐암세포주 H460과 A549에서의 기능을 분석하였다.

두 세포 공히 방사선에 의해 심각한 G2/M arrest를 보였으며 특히 A549에서는 H460에 비해 신속히 arrest가 저하되는 결과를 보였다. 유전자 분석 결과 A549는 H460에 비해 PTEN 유전자가 고도로 메틸화되어 있었다 (저발현되었다). western blot 결과 PTEN은 pAkt의 음성조절자로 작용하며, pAkt 는 또한 방사선에 의해 유발되는 유전자인 p53의 음성조절자로 작용함을 발견하였다. 본 결과는 H460에서 보이는 높은 수준의 방사선 민감성이 해당 세포주에서 보이는 PTEN과 p53의 고발현에 기인함을 알 수 있었다.

또한 Wnt-antagonist로 알려진 네 종류의 DKK (Dickkopf gene) 유전자 중, non-small cell lung cancer H460에서의 DKK3 유전자의 기능을 실험해보았다. 최신 pyrosequencing 기법을 이용하여 분석한 결과 DKK3 는 약 44% 수준으로 메틸화가 되어 있었지만, 여전히 높은 수준으로 발현되어 있었음을 보였다. SiRNA를 처리하여 DKK3 발현을 완전히 억제한 결과, 방사선에 의해 유도되는 p53 유전자와 p21 유전자가 크게 증가하였고, 아울러cyclin-dependent kinases D1과 E 역시 크게 증가하다. 또한 현미경적 관찰과 flowcytometry를 통해 전형적인 apoptosis가 유도됨을 발견하였다. 이 결과는 DKK3가 세포내 활성산소의 수준을 낮추어 줌으로써 antiapoptotic molecule로 작용함을 보여준다.

I. 제목

폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한 방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

다양한 폐암세포주의 DNA 메틸화 정도에 따른 방사선 민감성 조사, 방사선 감수성 관련 유전자 규명 및 이를 제어할 수 있는 활용 기술 개발

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 1) 방사선 민감도 차이를 보이는 폐암 세포주 선별
 - 감마 방사선 (γ -ray) 조사 조건 확립
 - 방사선 처리 후 (0-10Gy) 세포반응 실험
 - 실험 대조군 및 유용 세포주 선별
- 2) 선별 폐암 세포주에서 DNA 메틸화 비교 분석 및 관련 유전자 선별
 - 선별된 세포주에서 방사선 민감성 관련 유전자의 선별 및 규명
 - 방사선 처리 후 다양한 종류의 암세포 간의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교
 - 결과 분석을 통한 방사선 민감성 및 내성 관련 유전자 선별 및 확립
- 3) 방사선 민감성 관련 유전자 기능 분석 및 신규 제어물질 개발
 - 관련 유전자의 신호전달 체계 규명
 - SiRNA를 이용한 DNA 메틸화 제어기술 및 유전자 제어기술 타당성 검토
 - 신규 유전자 제어 물질 개발

IV. 연구개발결과

- non-small lung cancer cell인 H460과 A549에서의 방사선 민감도를 비교 분석하였고, 방사선 내성 및 민감성에 관여하는 두 유전자 (PTEN/DKK3)를 선별하여 그의 기능을 살펴봄
- flow cytometry 분석 결과 두 세포 공히 방사선에 의해 심각한 G2/M arrest를 보였으며 특히 A549에서는 H460에 비해 신속히 arrest가 저하되는 결과를 보임
- A549는 H460에 비해 PTEN 유전자가 고도로 메틸화되어 있었으며 그 결과 PTEN 발현량이 상당히 저하되어 있음
- SiRNA PTEN을 제작하였고, western blot 실험을 통해 분석한 결과 PTEN은 pAkt의 음성조절자로 작용하며, pAkt 는 또한 방사선에 의해 유발되는 유전자인 p53의 음성 조절자로 작용함을 발견
- 본 결과는 H460에서 보이는 높은 수준의 방사선 민감성이 해당 세포주에서 보이는 PTEN과 p53의 고발현에 기인함을 알 의미함
- Wnt-antagonist로 알려진 네 종류의 DKK (Dickkopf gene) 유전자 중 DKK3는 H460에서 약 44% 수준으로 메틸화가 되어 있었지만, 여전히 높은 수준으로 발현되어 있음

- SiRNA를 처리하여 DKK3 발현을 완전히 억제한 결과, 방사선에 의해 유도되는 p53 유전자와 p21 유전자가 크게 증가하였고, 아울러 cyclin-dependent kinases D1과 E 역시 크게 증가하였음
- 현미경적 관찰과 flowcytometry를 통해 DKK3 발현을 억제시킨 결과 전형적인 apoptosis가 유도됨을 발견하였고, 세포내 활성산소가 크게 감소함을 발견하였음
- 이 결과는 DKK3가 세포내 활성산소의 수준을 낮추어 줌으로써 antiapoptotic molecule로 작용함을 보여줌

V. 연구개발결과의 활용계획

인간 종양 세포에서 방사선 저항성 혹은 약제 저항성을 일으키는 유전자를 발굴하고 이 유전자의 기능을 규명하게 되면 원천적으로 방사선 및 약제내성을 일으키는 유전자를 상위 단계에서 제어함으로써 암 치료의 효과를 증진시킬 수 있을 뿐 아니라 환자별 맞춤 치료를 가능하게 할 것으로 기대된다. 과제 연구기간 동안 다양한 종양 세포 간 방사선 및 약제 내성 DNA 메틸화 결과 및 이의 기능연구를 토대로, 과제 종료 후 후속연구를 수행할 발판을 마련함은 물론 암 제어 물질의 개발 가능성을 타진할 계획이며 향후 국가 대형 연구과제 혹은 실용화 연구과제 등에 적극 응용 및 활용하고자 한다. 아울러 본 연구과제 완료 후 신규 항암후보물질에 대한 독성시험 및 임상시험을 적극 추진할 예정이다.

영문 요약서

The sensitivity or resistance of cancer cells and normal tissues to ionizing radiation plays an important role in the clinical setting of lung cancer treatment. However, to date the exact molecular mechanisms of intrinsic radiosensitivity have not been well explained. In this study, we compared the radiosensitivity or radioresistance in two non-small cell lung cancers (NSCLCs), H460 and A549, and investigated the signaling pathways that confer radioresistance. H460 cells showed a significant G2/M arrest after 12 h of irradiation (5 Gy), reaching 60% of G2/M phase arrest. A549 cells also showed a significant G2/M arrest after 12 h of exposure; however, this arrest completely disappeared after 24 h of exposure. A549 has higher methylated CpG sites in PTEN, which is correlated with tumor radioresistance in some cancer cells, than H460 cells, and the average of the extent of the methylation was ~4.3 times higher in A549 cells than in H460 cells. As a result, PTEN expression was lower in A549 than in H460. Conducting Western blot analysis, we found that PTEN acted as a negative regulator for pAkt, and the pAkt

acted as a negative regulator for p53 expression. According to the above results, we concluded that the radiosensitivity shown in H460 cells may be due to the higher expression of PTEN through p53 signaling pathway.

The expression of the Wnt-antagonist Dickkopf gene (DKK) is downregulated in several types of tumors as a consequence of epigenetic DNA modification; four DKK members, DKK1, DKK2, DKK3, and DKK4, have been identified. In this study, we investigated another function of DKK3 in non-small cell lung cancer H460 cells, in which DKK3 was hypermethylated (44%) but still expressed, by interfering with DKK3 expression using DKK3-silencing RNA (SiRNA). We found that knockdown of DKK3 expression by DKK3 SiRNA transfection led to the detachment of H460 cells from the bottom of the culture plate and caused apoptosis. The expression of cyclindependent kinases D1 and E were increased by DKK3 knockdown, indicating that cells with blocked DKK3 expression entered the apoptotic pathway. We also found that the intracellular level of reactive oxygen species was higher in cells with blocked DKK3 expression than in normal H460 cells, and levels of p53, p21, and Bax were also increased by the gene knockdown. These results indicate that DKK3 acts as an antiapoptotic molecule by decreasing the intracellular level of reactive oxygen species.

CONTENTS (영문목차)

Chap. 1 Outline	9
Para. 1 Necessity	9
1. Technical aspects	9
2. Economical/Industrial aspects	10
3. Commercial/Cultural aspects	10
Para. 2 Objectives	11
Para. 3 Goals and Scopes	11
para. 4 Strategies and Methods	12
Chap. 2 Current status of R&D	13
Para. 1 Research status	13
Para. 2 Performances	13
Para. 3 Weakness of current technologies	16
Para. 4 Prospects	16
Chap. 3 Research contents and Results	18
Para. 1 Scopes and Methods	18
1. Outline	18
2. Materials and Methods	19
Para. 2 Results	21
1. Comparison of radiation sensitivity	21
2. Pyrosequencing	21
3. Comparison of methylated-PTEN	21
4. Characterization of signal pathways	22
5. Analysis of methylated-DKK3	28
6. Cytotoxicity by the DKK3 gene expression	28
7. Apoptosis by the DKK3 gene expression	28
8. Characterization of signal pathways	28
9. Measurement of internal ROS level	29
Para. 3 Outputs	34
Chap. 4 Achievements and Contributions	35
Para. 1 Original research plans	35
Para. 2 Achievements	36
Para. 3 Contributions	37
1. Technological aspects	37
2. Economical/Industrial aspects	37
Chap. 5 Application plans	38
Chap. 6 Information on technologies oversea	39
Chap. 7 References	39

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	9
제 1절 연구개발의 필요성	9
1. 기술적 측면	9
2. 경제·산업적 측면	10
3. 사회·문화적 측면	10
제 2절 연구개발의 목적	11
제 3절 단계별 연구개발 목표 및 범위	11
제 4절 연구개발의 추진전략 방법 및 추진체계	12
제 2장 국내외 기술개발 현황	13
제 1절 국내외 연구현황	13
제 2절 지금까지의 연구개발 실적	13
제 3절 현 기술상태의 취약성	16
제 4절 앞으로의 전망	16
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1절 연구범위 및 연구수행 내용 및 방법	18
1. 실험 및 방법 개요	18
2. 재료 및 방법	19
제 2절 연구결과	21
1. 두 다른 폐암 세포주서의 방사선 내성/민감성	21
2. pyrosequencing	21
3. PTEN 유전자의 메틸화 비교 분석	21
4. PTEN 신호전달 규명	22
5. DKK3 유전자 부위에서의 메틸화 분석	28
6. DKK3 발현 억제에 의한 세포독성 효과	28
7. DKK3 발현 억제에 의한 apoptosis의 유도	28
8. 신호전달 경로 규명	28
9. ROS 수준 측정	29
제 3절 연구성과	34
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	35
제 1절 계획서 상의 추진일정	35
제 2절 연구목표 달성도	36
제 3절 관련분야에의 기여도	37
1. 기술적 측면	37
2. 경제적·산업적 측면	37
제 5장 연구개발결과의 활용계획	38
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	39
제7장 참고문헌	39

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 인류 공공의 적이 되고 있는 암은 그 원인이 다양하여 치료효과를 감소시키거나 암 재발률을 높이는 원인이 되고 있다. 현재 알려진 암 발병의 원인으로는 염색체 이상 및 염기서열의 돌연변이 등이 있는데, 최근의 연구 결과에 의하면 암의 발생을 근본적으로 이해하기 위해서는 이러한 직접적인 염기의 변화 외에도, 유전자의 기능소실에 관련된 후성유전학적 (epigenetics) 관점을 도입해야 한다는 사실이 속속 밝혀지고 있다. 이러한 후성유전학의 중심이 되고 있는 것이 DNA 메틸화 (DNA methylation)에 의한 유전자 기능의 이상이다.
- 인간은 정상적인 환경에서는 암억제 유전자 등이 정상적으로 발현됨으로써 암발생을 막고 있다. 그러나 특정 상황이 도래하면, 암 억제 유전자의 기능이 제대로 발휘되지 못하여 정상세포가 암으로 진행하게 되는데 이러한 암억제 유전자의 기능 소실이 이들 유전자의 특정 부위에 일어나는 비정상적인 DNA 메틸화에 의해 일어나고 있다는 사실이 밝혀지고 있다. 더구나 특정 유전자의 프로모터 부위에서 일어나는 DNA 메틸화는 지금까지 알려진 암의 원인인 돌연변이 및 암억제 유전자의 이상 등에 의한 것만큼 일반적인 현상임이 밝혀지고 있다. 따라서 이러한 DNA 메틸화 이상에 의한 암 발생이라는 관점에서의 접근은 암치료 시장에 있어 기술적으로 중요한 요소기술이 될 것으로 기대된다.
- 한편, 유전자의 기능소실과 관련된 DNA 메틸화 등의 후성유전학적 기작에 대한 정확한 이해와 분석은 이를 제어할 수 있는 물질의 개발을 가능하게 함으로써 효과적인 신규 항암제 개발을 유도하게 될 것이다.
- 방사선은 화학요법, 수술요법 등과 더불어 환자의 종양치료에 널리 이용되고 있으며, 나아가 방사선 및 약제를 동시에 이용하는 등의 복합치료 역시 임상에 보편적으로 적용되고 있다. 그러나 일반적으로 인간 종양의 상당수는 정상 세포 조직에 비해 약제 및 방사선에 대한 저항성이 강하여 방사선 치료시 정상 조직에 심각한 피해를 주게 되어 환자의 고통을 가중시키게 됨은 물론 환자별로 암발생 원인 및 그 진행정도가 다양하여 방사선 치료효과를 떨어뜨리게 하는 요인이 되고 있다. 따라서 이러한 방사선 치료 효과를 저하시키는 방사선 내성 및 민감성에 관여하는 유전자 및 그 원인을 규명하고, 이를 제어할 수 있는 기술을 개발한다면 방사선에 의한 항암치료 효과를 효과적이고 근본

적으로 높이는 데 크게 기여할 것으로 기대된다.

2. 경제·산업적 측면

- 전 세계적으로 종양치료 시장의 규모는 수백억불이 넘고 있고, 엄청난 수의 연구자들이 암치료제 또는 암치료법의 발명 및 연구를 위해 노력하고 있으며 그 결과 다양한 치료제와 치료법 쏟아져 나오고 있다. 하지만 아직 암 치료 분야에서 확실한 효과를 보고 있지 못하고 있는 실정이며, 이로 인해 환자는 불필요한 비용과 고통을 지불하고 있다. 암으로 인한 사회적 비용이 매년 14조에 달하고 있는 것으로 추산되고 있다.
- 또한 항암치료제로 개발되어 각광을 받던 기존의 암치료제 역시 환자 치료 후에도 암이 재발되는 현상을 종종 발견하고는 하는데 이것은 해당 항암제에 대한 내성이 생겨서 일어나는 것으로 알려져 있다. 마찬가지로 방사선 치료시에도 방사선 내성이 발생하여 기존의 항암치료요법을 무력화시킴으로써 암치료를 어렵게 함은 물론 환자의 생존을 크게 위협하고 있는 실정이다.
- 아울러 다양한 환자의 상태에 따라 갖가지 병용 요법이 사용되고는 있으나 암 발생 및 전이 등에 대한 명확한 이해가 부족하며, 개개인의 특성을 고려한 맞춤형 처방 역시 아직 요원한 실정이다. DNA 메틸화를 고려한 새로운 암치료 방법의 개발은 기존의 돌연변이 의존적인 암치료 시장에 후성유전학적 개념을 도입하게 됨으로써 새로운 고부가가치 치료법을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.
- 아울러 방사선 및 약제 저항성 및 민감도에 따른 인간 종양 유전자의 DNA 메틸화 차이를 파악하고 이를 고려하여 DNA 메틸화를 제어하거나 이용할 수 있는 방법을 개발한다면, 기존의 방사선 및 약제 항암치료와 더불어 신규 병용요법으로 적극 응용이 가능함은 물론 방사선 요법 자체의 능력을 극대화할 수 있을 것으로 보인다. 따라서 고부가가치 산업의 창출을 통한 국가 경제력 제고에 큰 도움이 될 것이며, 아울러 관련 산업의 신규 창출에 크게 기여할 것으로 기대된다.

3. 사회·문화적 측면

- 상기에서 설명했듯이, DNA 메틸화 이상에 의한 암 발생이라는 관점에서의 접근은 새로운 신규 항암 기술의 개발이라는 기술적인 측면 뿐 아니라, 새로운 항암치료의 목표가 되고 있다는 점에서 사회적으로도 큰 관심이 되고 있어 전국가적으로 공동연구 및 집중적인 연구 등을 통해 DNA 메틸화에 의한 암 발생 및 진행을 제어하고자 하는 노력이 경주되고 있다.

- 이러한 DNA 메틸화가 방사선에 의해 어떻게 반응하고 조절되는지를 이해하는 연구는 결국 항암치료시 널리 사용되고 있는 방사선요법의 적절한 사용을 위해 대단히 중요한 문제가 될 것이다.
- 따라서 항암치료시 개인별 맞춤 방사선 피폭량을 적용함으로써 치료효과를 극대화시킴은 물론 이로 인한 부작용을 최소화함으로써 방사선 생체방어에 적극적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 상기 기술의 개발은 방사선환경방호측면에서 방사선 안전과 국민보건향상을 위하여 반드시 필요하다.
- 현재 국내의 원자력 발전규모는 전체발전량의 40%이상을 담당하고 있어 높은 에너지 의존도를 보이고 있다. 또한 의학, 생물학, 식품 등 방사선기술 이용분야가 상당히 증대함에 따라 국민의 방사선영향에 대한 올바른 이해를 통하여 원자력에 의한 에너지 자립도를 증진시킬 필요가 있기 때문에 방사선의 생물학적 측면에서의 국민 건강에 이바지할 방사선생체영향 및 방호와 관련된 기술개발이 절실하다. 인간 종양 세포주에서 DNA 메틸화에 따른 방사선 및 약제 내성 저감화 기술을 개발한다면 개인별 맞춤 치료의 시대를 앞당기고 고부가가치 경제시대를 앞당기는 한편, 국민보건에 있어 원자력의 평화적 이용 측면에서도 상당한 의미를 갖게 될 것으로 보여 결국 원자력 문화에 대한 이해와 번영에 크게 기여할 것으로 기대된다.

제 2절 연구개발의 목적

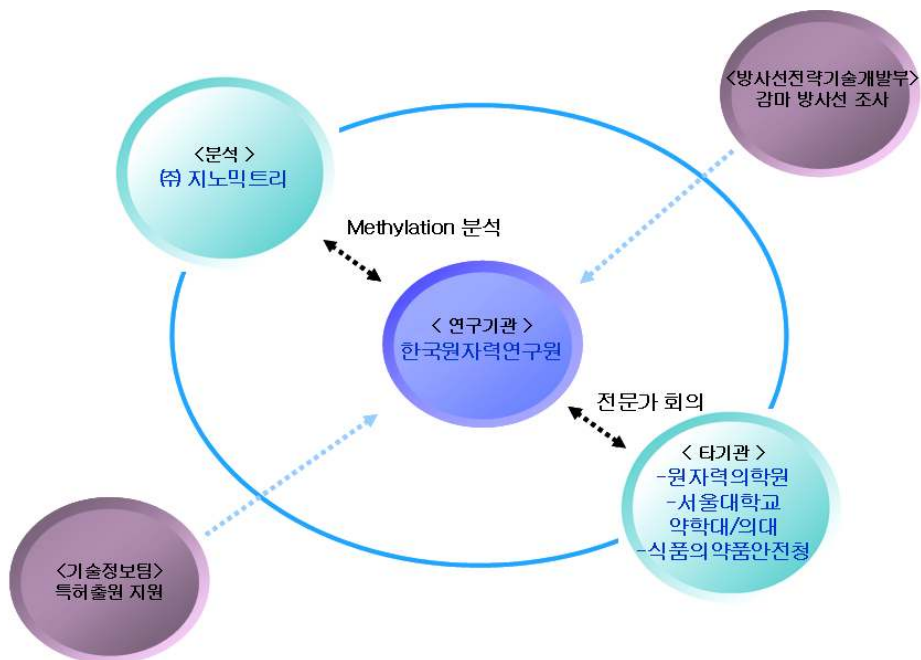
다양한 폐암세포주의 DNA 메틸화 정도에 따른 방사선 민감성 조사, 방사선 감수성 관련 유전자 규명 및 이를 제어할 수 있는 활용 기술 개발

제 3절 단계별 연구개발 목표 및 범위

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용	연구범위	연구비
1차년도	2009	DNA 메틸화 정도에 따른 방사선 민감성 조사	○방사선 조사 조건 확립 ○방사선 처리에 의한 세포반응 실험 ○실험 대조군 및 유용 세포주 선별	조건 확립 및 세포주 선발	2,000
		방사선 감수성 관련 유전자 규명	○선발 세포주에서의 DNA 메틸화 분석 ○방사선 처리 후 다양한 종류의 폐	메틸화 분석의뢰 및 관련 유전	2,800

			암세포 간의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교 ○결과 분석을 통한 민감성 및 내성 관련 유전자 선발 및 확립	자 선발	
2차년도	2010	방사선 민감성 관련 신호전달 회로 규명	○관련 유전자 신호전달 체계 규명 ○유전자 발현 조절 가능한 SiRNA 개발	신호전달 체계 규명	3,000
		방사선 민감성 제어 기술개발	○신규 제어물질 탐색 ○DNA 메틸화 제어기술 및 유전자 제어기술 타당성 검토 ○타겟 유전자의 SiRNA를 이용한 전사발현 조절 가능성 탐색 ○신규 유전자 제어물질 개발을 위한 근거 및 향후 타과제 활용 검토	SiRNA 및 기능성 약물을 통한 제어 기술 개발	1,800

제 4절 연구개발의 추진전략 방법 및 추진체계



제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내외 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한국원자력의학원	방사선 민감성 관련 유전자 규명	cell cycle 조절을 통한 방사선 민감성 변화 조사 수행중. 기타 활용 현황 없음
연세대학교 김영준 교수	뉴클레오솜 형성에 따른 유전자의 발현 차이 규명	사람에 따라 다른 질병 감수성의 차이를 설명 할 수 있는 근거를 제공하였고, 향후 질병 치료를 위한 유전자 발현 조절법 개발에 응용
MD Anderson Cancer Center, 미국	방사선 민감성 관련 유전자 규명	DNA repair 능력의 회복을 통한 방사선 민감성 극복 노력 수행 중. 기타 활용 현황 없음
NIH, 미국	생애 전단계를 통한 식습관과 환경요인에 의한 후생학적 변화에 대한 연구	후성 유전체 지도화 (epigenome mapping)가 시도되고 있음
Sna Diego epigenome center, 미국	배아세포의 epigenome 연구	2008년-2013년까지 5개년 계획으로 현재 연구 단계
Human Epigenome project, EU	인간의 후성유전학적 특성 및 비교 분석에 관한 연구	유럽 10개국 컨소시엄 구축

제 2절 지금까지의 연구개발 실적

최근의 암 연구 동향을 보면, 유전자 구조의 변화 없이 유전자 발현의 이상으로 인한 암 발생에 관심이 증가되고 있는 실정인데, 이러한 분야를 다루는 학문이 후성유전학 (epigenetics)이다. 이러한 후성유전학의 중심이 되고 있는 분야가 DNA 메틸화에 의한 유전자 발현의 이상인데, 특정 유전자의 promoter 부위에 DNA 메틸화가 일어나면 정상적인 mRNA 합성 과정이 억제되어 필수적인 단백질의 합성이 저하된다고 잘 알려져 있다. DNA 메틸화는 정상적으로는 분화, 발달, 여성에서 x-chromosome의 불활성화 등에 관여하는 것으로 알려져 오고 있으며, 최근에는 이러한 DNA 메틸화가 암, 노화에 관련이 되고 있다는 보고가 증가하고 있다.

암 환자에서 mRNA가 비정상적으로 발현되는 이유로는 결실, 전좌, 역위 등에 의한 염색체 이상, 단일 염기서열의 변화, 그리고 DNA 메틸화에 의한 후성유전학적 변화를 들 수 있다. 앞서 언급했듯이 이러한 mRNA의 비정상적 발현은 암, 노화 등과 밀접한 연관이 되어 있다는 결과가 속속 밝혀지고 있다. 이러한 몇 가지 mRNA 전사 변화 기작 중, DNA 메틸화는

인체 DNA를 염기서열 변화 없이 변형시키는 유일한 기작으로 이 과정은 DNA 메틸기전이 효소 (DNA methyltransferase, DNMT)라는 단백질에 의해 일어난다. 현재 인간을 비롯한 포유동물 세포에서 3종류의 메틸기전이효소가 알려져 있는데 그 중 DNMT1은 세포분열과정에서 DNA가 합성될 때 DNA 메틸화 상태를 유지시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있으며, 추가로 발견된 DNMT3a와 3b는 새로운 메틸화를 촉매하는 기능을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다.

앞서 설명한 직접적인 DNA의 돌연변이 등 유전적인 변화 (genetic alteration)는 비가역적인 데 비해, DNA 메틸화에 의한 후성유전학적 변화 (epigenetic alteration)는 가역적인 것으로 알려져 있다. DNA 메틸화가 특히 암치료 분야에서 각광받는 이유 중의 하나가 바로 앞에서 설명한 바와 같이 DNA 메틸화가 가역적인 변화라는 데에 있다. 즉, dietary agent인 셀레늄, 녹차, 마늘 뿐 아니라 epigenetic agent인 DNMT inhibitor 혹은 HDAC (histone deacetylase) inhibitor 등에 의해 DNA의 메틸화가 풀릴 수 있다는 사실이 밝혀져 있다. 따라서 이들 물질을 이용하여 DNA의 메틸화를 조절함으로써 암 치료 증진 효과를 진행시킬 수 있는 가능성이 대두되고 있다.

DNA 메틸화에 의한 유전자 기능의 이상에 관한 연구가 전세계적으로 진행이 되고 있으며, 최근에는 이러한 DNA 메틸화 기작에 있어 좀 더 정확한 내용이 보고되고 있다. DNA 메틸화는 우선 promoter의 CpG island (CpG 섬)에서 주로 일어나는데, 일단 DNA가 메틸화 되면 이 부위에 메틸기와 결합하는 methyl-binding domain (MBD)이라는 단백질이 유도된다. MBD는 현재 5종이 알려져 있으며 이 중 MeCP2, MBD2, MBD3는 히스톤 탈아세틸화효소 등이 결합한 복합체와 반응한다. 따라서 DNA 메틸화는 DNA 메틸화 자체 외에도 히스톤 단백질과의 복합체 형성 등 다양한 반응에 의해 유전자 기능의 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 그러나 역시 이러한 유전자 이상을 일으키는 비돌연변이성 원인으로 가장 근본이 되는 것은 DNA 메틸화이며, 현재 이러한 DNA 메틸화의 변화를 이해하고자 하는 노력이 경주되고 있는 실정이다.

지금까지 거의 대부분의 DNA 메틸화 연구는 국내외를 막론하고 암세포에서 기능이 소실된 유전자를 발굴하는 일이었다. 이를 위해 정상조직과 암조직 또는 각기 다른 환자에게서 적출한 암조직 사이에서의 유전적 차이를 이해하고 관련 유전자를 규명함으로써 항암제로 개발하고자 하는 시도는 많이 이루어지고 있으나, 아직까지는 단지 기초적인 관점에서 DNA 메틸화에 의한 유전자 발현의 이해가 연구의 주를 이루고 있다. 이러한 DNA의 메틸화는 후성유전학적 관점에서 암의 발생 및 진행에 밀접한 연관성을 갖게 되리라고 예상되고 있기 때문에 최근에는 대규모 검색시스템을 이용하여 암 계놈에서 전체 메틸화 패턴을 분석해 미지의 유전자를 발굴하려는 노력이 시도되고 있으며, 이를 위해 다양한 검색 시스템이 개발되어 활용되고 있다. 미국 등 선진국에서는 메틸화된 DNA를 찾는 여러 기술을 이용해 암발생과 관련된 암억제 유전자, 세포주기 관련 유전자, DNA 보수 유전자등을 밝혀냈으나 아직 실용

화를 위한 기술개발은 요원한 실정이다. 국내에서도 몇 개 대학과 벤처 연구소에서 대용량 유전체 분석 시스템을 이용하여 암세포에서 기능이상 발생 유전자를 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 이러한 연구는 단지 유전자 발현의 이상 또는 변화에 초점을 맞추고 있는 것이며 더욱이 방사선 민감성의 차이가 DNA 메틸화의 차이로 인해 결정된다는 내용에 대한 연구는 전무한 실정이다.

또한, 연세대학교 김영준 교수팀은 뉴클레오솜이 발현에 미치는 영향을 조사함으로써 후성 유전학적 관점에서의 유전자발현 양상을 규명하여 최근에 관련연구를 Nature Genetics에 발표하였다. 뉴클레오솜은 좌우로 움직이기도 하고 더 촘촘한 크로마틴 구조를 이루기 위해 뺄뺄하게 모이기도 하는데, 만약 프로모터에 뺄뺄한 크로마틴 구조가 형성되면 RNA 중합효소와 전사 단백질들이 프로모터에 결합을 하지 못하여 적절한 전사가 이루어지지 못하게 된다. 예를 들어 열충격이라는 외부 조건이 오면 어떤 프로모터의 뉴클레오솜은 형성이 되기도 하고 사라지기도 하는데, 이와 같은 환경의 변화, 유전적 변화에 의해 뉴클레오솜의 형성이 변경되면 이에 따라 그에 해당하는 유전자의 발현이 변하고 이것이 변이를 유발하게 된다는 것을 규명하였다. 이러한 결과는 최근에 과학계에서 논란이 되어 온 현상, 즉 환경변화와 밀접한 관계에 있는 유전자일수록 유전자 발현변이가 크다는 사실을 설명하는 과학적 근거로 제공될 수 있을 뿐 아니라, 환경에 대해 다양한 반응을 만들어 냄으로서 집단의 적응을 극대화하려는 진화원리의 기전을 제시할 수 있는 결과이다.

한편, 한국원자력연구원에서도 다양한 폐암세포주를 가지고 방사선 및 약제 민감도를 시험한 결과 같은 폐암 세포주임에도 불구하고 그 기원에 따라 방사선 내성 또는 민감도가 현저히 차이나 나는 현상을 관찰하였다. 이러한 방사선 및 약제에 의한 민감도의 차이가 DNA 메틸화에 의한 것인지 일차 검토해 본 결과 몇몇 유전자에서의 DNA 메틸화 정도가 종양 조직세포 사이에서 상당히 다르게 나타났다. 따라서 현재 한국원자력연구원에서는 DNA 메틸화의 차이에 의해 방사선 및 약제 민감도가 결정되는지를 자세히 분석 중에 있다. DNA 메틸화의 차이로 인해 방사선 및 약제 민감도가 결정된다는 것을 입증한다면, 이를 제어할 수 있는 신규 항암제를 개발하는데 있어 매우 중요한 근거를 제시해 줄 것으로 기대된다. 아울러 방사선 및 약제 치료시 환자별 민감도에 대한 차이를 설명하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 이러한 근거를 토대로 각 환자별 맞춤 방사선 및 항암약제 치료가 가능할 것으로 기대되어, 궁극적으로 새로운 치료법의 개발은 물론 이를 제어할 수 있는 항암제 개발에 적극 기여할 수 있게 될 것으로 기대된다.

제 3절 현 기술상태의 취약성

암 치료를 위한 접근법으로 진단마커의 개발, 암의 예측, 암의 예방, 그리고 치료 등 전방위적인 분야에서 연구가 이루어지고 있는데, 후성유전학적 개념을 통한 암의 치료는 초기 암 발생에 있어서의 진단마커로 사용이 가능할 것으로 기대되며 그 결과 정확한 진단효율을 증가시킬 것으로 기대된다. 일례로 이미 폐암에서는 p16 유전자가 고 메틸화되어 (hypermethylation) 있어 환자 진단시 일부 병원에서는 이미 환자별 p16의 메틸화 정도를 검사하고 있다.

이처럼 DNA의 메틸화에 의한 암 진단의 가능성이 적극 대두됨에 따라 선진국에서는 이미 DNA 메틸화에 대한 연구를 상당부분 진행시켜 오고 있으며 정상조직과 암 조직세포에서의 DNA 메틸화 차이를 광범위하게 비교 분석하여 오고 있다. 아울러 이러한 후성유전학적 screening 외에도 관련 분야인 DNA microarray에 의한 전체 유전체의 발현 패턴 분석 등 관련 연구 분야와의 통합적 이해를 통한 암 치료 접근 방법이 대두되고 있다. 우리나라 역시 이에 대한 연구를 진행시키고 있지만 아직 축적 정보량에서 상당한 정도로 기술격차가 있는 것이 현실이다. 따라서 이러한 상황에서 우리가 선점할 수 있는 분야 중의 하나가 바로 특정 분야에서의 DNA 메틸화 응용 가능성 여부를 타진하는 것이며, 그 일환으로 DNA 메틸화에 따른 방사선 내성 및 민감도의 차이를 규명하고자 한다. 이러한 특화된 연구를 통해 신규 항암제 개발에 적극 활용하고자 한다.

한국원자력연구원에서는 방사선에 의한 암세포 사멸 및 관련 유전자를 지난 십수년간 구축하여 왔음은 물론 관련 기술과 경험을 축적하여 왔다. 따라서, 방사선을 이용한 암억제 기능 연구 측면에서는 선진국과 비교해 볼 때 그 격차가 크지 않는 것으로 파악된다. 따라서 이러한 축적된 지식과 기술을 바탕으로 DNA 메틸화에 의한 암 제어 물질의 개발을 위한 선도적 기초연구는 독점적 기술 우위의 확보에 필요하며 타과제 및 항암치료 시장에서의 활용성이 크다고 할 수 있다.

제 4절 앞으로의 전망

유전자 전사과정의 후성유전학적 조절 메카니즘은 DNA 메틸화, 히스톤의 메틸화와 탈아세틸화, 염색질 리모델링 등 여러 가지 서로 다른 기작이 밀접하게 연결되어 있다. 따라서 가까운 미래에 암 환자를 관리하는데 있어 각 환자별 암세포가 갖고 있는 DNA 메틸화의 패턴이 매우 중요하게 활용될 것으로 보인다. 왜냐하면, 특정 유전자나 게놈 수준에서의 CpG 메틸화 패턴을 밝혀 암발생을 예측하거나 진단하는 표지자로 사용할 수 있기 때문이다. 한편

후성유전학적 조절 기작에 기초해 메틸기 전이효소, 탈아세틸화효소 등의 기능을 억제함으로써 기능이 소실된 유전자를 정상으로 회복시켜 항암효과를 얻는 임상실험이 진행중에 있어 DNA 메틸화를 통한 후생학적 암치료 시대가 열릴 것으로 기대된다.

이와 함께 같은 암 조직, 같은 유형의 암세포라 할지라도 방사선 및 약제 저항성이 모두 다르고 그 작용 기작도 다양하다. 이러한 다양성은 결국 암치료제 개발 분야에 있어 환자 맞춤형 및 암세포 적응성 등을 고려해야 함을 의미하는데, DNA 메틸화에 따른 방사선 및 약제 내성의 차이를 규명하게 되면 후성유전학 방법에 의한 신규 항암제 시장이 확대될 것으로 보인다. 아울러 방사선 및 약제에 대해 서로 다른 민감성을 보이는 암조직에서의 메틸화를 비교 분석함으로써 각각의 특성에 따른 효과적인 제어물질을 개발하려는 노력이 경주될 것이다.

특히, 현재 폐암의 경우 방사선 치료가 주되게 사용되고 있는 실정인데, 동일한 폐암 환자라 할지라도 방사선 민감성이 개인별로 틀리기에 환자별로 방사선 치료 효과가 모두 틀린 문제점이 대두되어 있다. 따라서 방사선 민감성의 차이가 DNA 메틸화에 의한 것임을 입증하고 이러한 DNA 메틸화에 관여하는 유전자를 규명한다면, 폐암의 방사선 치료시 각 개인별 적정 선량 (dose)를 결정하는데 핵심적으로 기여하게 될 것이며 이러한 활용 결과 개인별 치료 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구범위 및 연구수행 내용 및 방법

1. 실험 및 방법 개요

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
조건 확립 및 세포주 선발	○방사선 조사 조건 확립	한국원자력연구원에서 보유 중인 방사선원 C-60을 이용하여, 방사선 조사 조건을 확립 (0.1Gy/min, 총 2-10Gy)
	○방사선 처리에 의한 세포반응 실험	방사선 처리 후 세포반응을 Flowcytometry 및 현미경검사, MTT assay등을 실시
	○실험 대조군 및 유용 세포주 선발	방사선에 민감한 폐암 세포 중, 비소성폐암 세포주인 H460 및 대조군으로 A549를 선발
방사선 감수성 관련 유전자 규명	○선발 세포주에서의 DNA 메틸화 분석	두 세포주에서의 전체 지놈 상에서의 DNA 메틸화를 분석 (마크로젠에 용역 의뢰 후 결과 분석)
	○방사선 처리 후 다양한 종류의 폐암세포 간의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교	H460 및 A549에서 관심 유전자 PTEN의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교 H460에서 DKK3 유전자의 methylation 분석
	○결과 분석을 통한 민감성 및 내성 관련 유전자 선발 및 확립	PTEN 유전자 선발 완료 및 관련 회로 탐색 DKK3 유전자 선발 완료 및 관련 회로 탐색
	○flowcytometry를 이용한 세포주기/ROS	H460 및 A549에서의 세포주기 분석 및 ROS 분석

2. 재료 및 방법

가. 세포 배양 및 방사선 조사

모든 폐암세포주는 American Type Collection Center (ATCC, USA)에서 구입하여 사영하였다. 배양을 위한 세포배지는 10% FBS (Hyclone Lab. USA)와 penicillin/streptomycin 항생제를 함유한 RPMI1640 배지를 사용하였다. 세포배양은 95% air/5% CO₂ 로 충전된 배양기에서 수행되었다. 초기 세포 접종량은 1X10⁵ 개 였으며, 하루 배양 뒤 ⁶⁰Co γ -ray를 이용하여 0.2Gy/min의 선량으로 조사하였다.

나. cDNA 합성 및 PCR 증폭

total RNA는 QUIAGEN RNA extraction kit (QUIAGEN, USA)를 사용하여 추출되었다. 초기 dDNA를 합성하기 위해 cDNA 합성 kit (MBI Fermentas, Canada)를 사용하였다. 그 결과 획득된 cDNA는 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용되었으며 이 때 사용한 primer와 PCR 조건은 다음과 같다.

primer

PTEN-F : 5'-ACGGGAAGACAAGTTCATGTAC

PTEN-R : 5'-ACAGTAGAGGAGCCGTCAAA

DKK3-F : 5'-GTTGAGGAACTGQTGGAGGACA

DKK3-R : 5'-TTGCACACATACACCAGGCTGT

b-ACTIN -F : 5'-ATGTGCAAGGCCCGCTTCG

b-ACTIN-R : 5'-TTAATGTCACGCACGATTTC

PCR 조건

PTEN : denaturation (95도 30초) -> annealing (58도 30초) -> extension (72도 1분) / 35cycle

DKK3 : denaturation (94도 30초) -> annealing (61도 30초) -> extension (72도 1분) / 40cycle

GC-rich 부위를 증폭하기 위해서 I-GC capture solution (Intron Biotechnology, Korea)을 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel을 사용하여 분리 후 관찰하였다.

다. western blot 분석

Akt, pAkt (phospho Akt), cyclinE, b-actin은 Cell Signalling (USA)에서, p21은 Abcam (USA)에서 구입하여 사용하였으며 그 외의 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 정량은 Lowry kit (BioRad, USA)를 사용하여 수행되었다.

라. flowcytometry 분석

방사선으로 저사된 세포와 조사되지 않은 대조군 세포를 취득하여 PBS로 세척한 후, 암실에서 70% ethanol로 2시간 고정화하였다. 고정화된 세포를 propidium iodide (50 μ g/ml)로 염색한 후, DNA 함량

을 FACScan (EPICS XL, Beckman, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석은 Phoenix Multi-cycler software (USA)를 이용하여 수행하였다.

마. pyrosequencing 분석

pyrosequencing 분석은 대한민국 대전에 위치한 (주)지노믹트리의 도움을 받아 수행하였다.

바. 현미경 및 세포생존 분석

폐암세포주 간의 형태학적 차이를 분석하기 위해 위상차현미경 (Leica Microsystem, USA)를 이용하였고, 이미지는 Cannon digital camera system (model PowerShot S45)을 이용하여 저장하였다.

사. DKK3 발현 억제

SiDKK3 RNA (5'-AGCUGCUGCUAAAGCAUCAUCAGAA)는 Invitrogen (carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며 대조군 SiRNA (scrambled SiRNA)는 Bioneer (Korea)에서 구입하여 사용하였다. RNAi MAX reagent를 이용하여 세포에 transfection한 후 1-4일 후 분석에 이용하였다.

아. colony forming assay

세포를 transfection한 후, 하루 배양 뒤, trypsin으로 처리한 세포를 수득하여 35mm culture dish에 5×10^3 세포농도가 되도록 plating하였다. 일주일 후, 자라난 세포를 0.5% crystal violet으로 염색하여 관찰하였다.

자. 생존율 및 MIT assay

세포생존율을 조사하기 위해, trypsin으로 처리한 세포를 수거하여 현미경 하에서 직접 분석하였다. MIT cell proliferation assay를 위해, 96 well plate에 1,000-3,000 cell이 되도록 plating 한 후, 24, 48, 72시간 후에 0.1 ml의 MIT를 첨가한 후 37도에서 4시간 배양하였다. 배지를 제거한 후, MIT crystal을 DMSO로 용해시킨 후, Promega Glomax 96 Microplate luminometer를 이용하여 570 nm에서 분석하였다. 분석에 이용된 software는 Microplate Manager (Promega, USA)를 이용하였다.

차. reactive oxygen species (ROS) 분석

Carboxydichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포 속으로 들어간 후에 세포내의 esterase에 의해 극성물질인 DCFH로 변하게 되는 비극성 화합물이다. 이렇게 변화된 DCFH는 세포내 hydrogen peroxide에 의해 DCF로 급격하게 산화된다. trypsin으로 처리한 약 1×10^5 개의 세포를 PBS로 세척한 후, DCFH-DA를 최종 $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리 한 후, 37도 암실에서 30분간 배양하였다. 이렇게 배양된 세포를 flowcytometry를 이용하여 세포내 ROS 수준을 분석하였다.

제 2절 연구결과

1. 두 다른 폐암 세포주서의 방사선 내성/민감성

본 연구에서는 우선 두 종류의 폐암세포주인 H460과 A549에서 방사선 조사 후 세포주기의 변화를 관찰하였다. 해당 결과는 그림 1에 표시하였다. 그림 1에서 보듯이 H460 세포주는 방사선 조사 후 12시간 후에 심각한 G2/M arrest를 보였으며, 그 정도는 약 60%에 달하였다 (그림 1). A549 세포주 역시 방사선 조사 후 12시간 후에 심각한 G2/M arrest를 보였으나, 이러한 현상은 방사선 조사 후 24시간 이후에 현저하게 감소하였다.

더군다나, 방사선 조사된 H460 세포주는 A549와 달리 심각한 세포독성 효과를 보였다 (그림 2A). 이 때 A549는 10Gy에서 방사선에 대해 커다란 내성을 보였다. 이와 같이 H460에서 보이는 세포독성은 culture dish로부터의 세포 탈착 (cell detachment)에 기인하는 것으로 보이는데, 왜냐하면 많은 floating cell 들이 현미경에서 관찰되기 때문이다 (그림 2B). 이와 반대로 A549에서는 이러한 cell detachment 현상이 보이지 않았다.

2. pyrosequencing

한편, 이러한 두 세포간의 차이에 대해 보다 면밀히 연구하기 위해 두 세포주에서의 DNA 메틸화 정도를 비교분석하였다. 본 연구는 (주) 지노믹트리의 도움을 받아 pyrosequencing 기법을 이용하여 분석하였다 (그림 3). 본 결과를 분석한 결과 메틸화 정도에 심각한 차이를 보이는 PTEN 유전자와 DKK 유전자 등 두 개의 후보 유전자를 분리해 내었다. 따라서 본 두 유전자에 대한 보다 면밀한 분석 작업을 추후 수행하였다.

3. PTEN 유전자의 메틸화 비교 분석

PTEN은 몇 종의 종양세포주에서 방사선에 의한 내성에 관여한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 두 다른 폐암세포주인 H460과 A549에서 PTEN이 방사선 민감성/내성에 관여하는지, 관여한다면 어떤 경로를 통해 방사선 내성에 기여하는지를 조사하고자 하였다. 메틸화 정도를 분석하기 위해 bisulfite pyrosequencing 방법을 사용하였다. 각 primer는 PSQ assay program법에 의해 디자인하였고, 그림 4A에 나타내었다. 본 연구에서는 5개의 서로 다른 CpG 섬을 선택하였고 (position 1-5), bisulfite-modified gDNA를 EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research)에 의해 분리하였다. 그림 4B에서 "Y"는 이 다섯 개의 메틸화된 부위를 나타낸다.

그림 4C에서 보듯이, 조사된 모든 부위에서 A549에서 더 많이 메틸화가 이루어져 있었는데, 그 정도는 약 4.3배에 달하였다. 이러한 결과를 증명하기 위해 직접 PTEN 유전자의 발현량을 RT-PCR 법으로 조사하여 보았다. 그 결과 메틸화 분석 결과와 RT-PCR 분석 결과가 일치함을 알 수 있었다 (그림 4D). 즉, PTEN은 H460에서 고도로 발현되며, A549에서는 이보다 훨씬 덜 발현됨을 알 수 있었다.

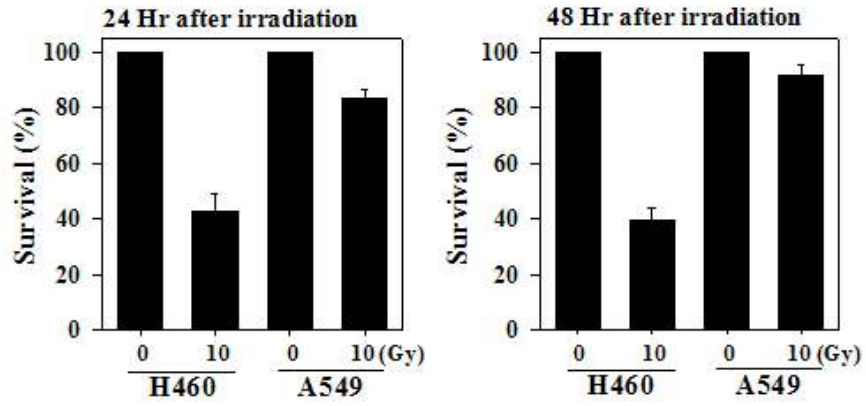
4. PTEN 신호전달 규명과 기타 유전자 발현 분석

PTEN의 신호는 p53에 전달된다고 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 두 다른 폐암 세포주에서도 이러한 PTEN-p53 경로가 작동하는지를 살펴보았다. 예측한대로, PTEN은 pAkt의 음성조절자로 작용하였으며, pAkt는 다시 p53의 음성조절자로 작용함을 알 수 있었다 (그림 5). 이상의 결과는 H460에서 보이는 방사선 민감성이 PTEN의 고발현과 관계가 있으며, 그 신호는 p53에 전달되어 결국 cell arrest가 크게 유도되는 것으로 결론지을 수 있다.

본 연구에서는 상기의 관련 신호회로를 폐암세포주에 국한하여 조사하였으나, 향후 이러한 신호전달 회로가 다른 조직에서도 존재하는지의 여부를 조사하기 위한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

또한 본 연구에서는 PTEN 관련 신호전달에 관여하는 유전자군을 중심으로 영향을 분석하였으나, 방사선에 의해 유도되는 다양한 유전자 군이 있음이 확인되었다. 이 중, GADD45는 방사선에 의해 약 4배 발현이 유도되는 stress response protein이며, ACTA2는 방사선에 의해 약 9배 유도되는 cytoskeletal protein으로 향후 관련 연구가 필요하다고 사료된다.

A)



B)

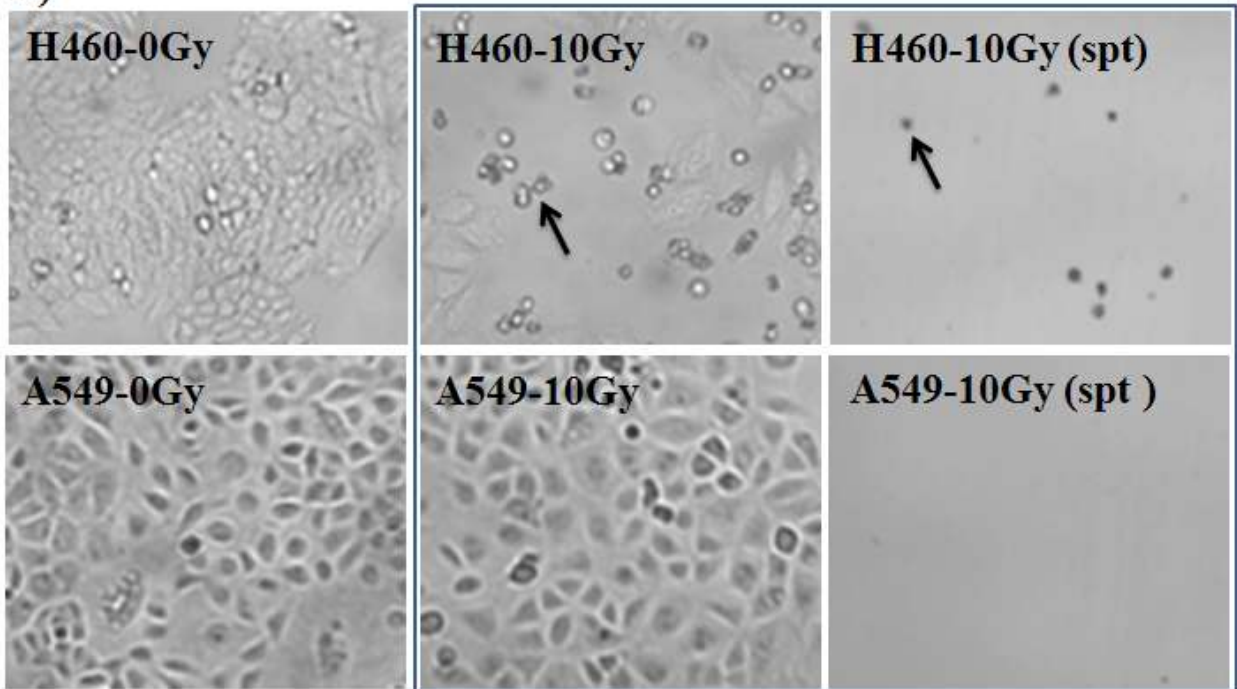


그림 1. H460에서 방사선 조사에 의한 G2/M arrest의 증가. (A) FACScan 분석 결과. (B) 두 세포주에
 서의 cell cycle fraction. dark gray, G2/M : bright gray, S phase : black. G1 phase. (Ref. 1)

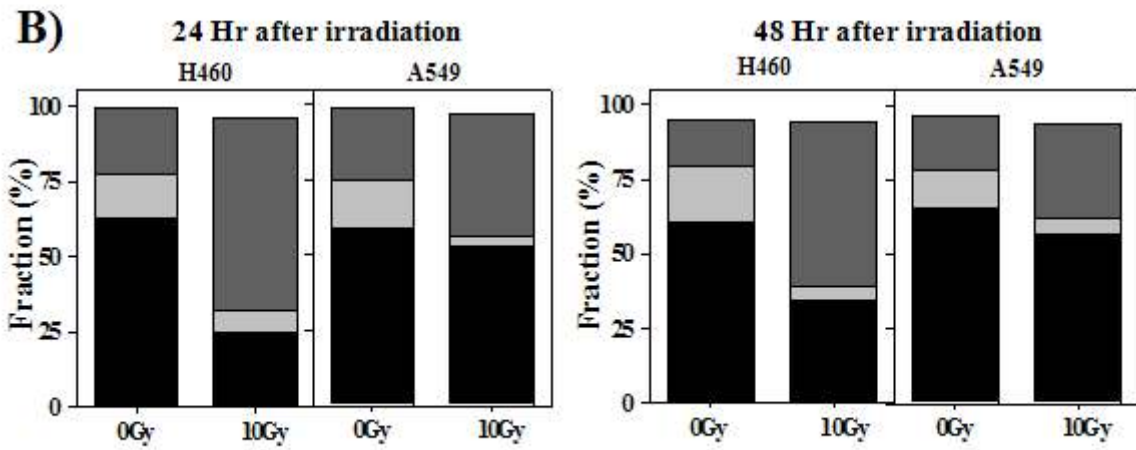
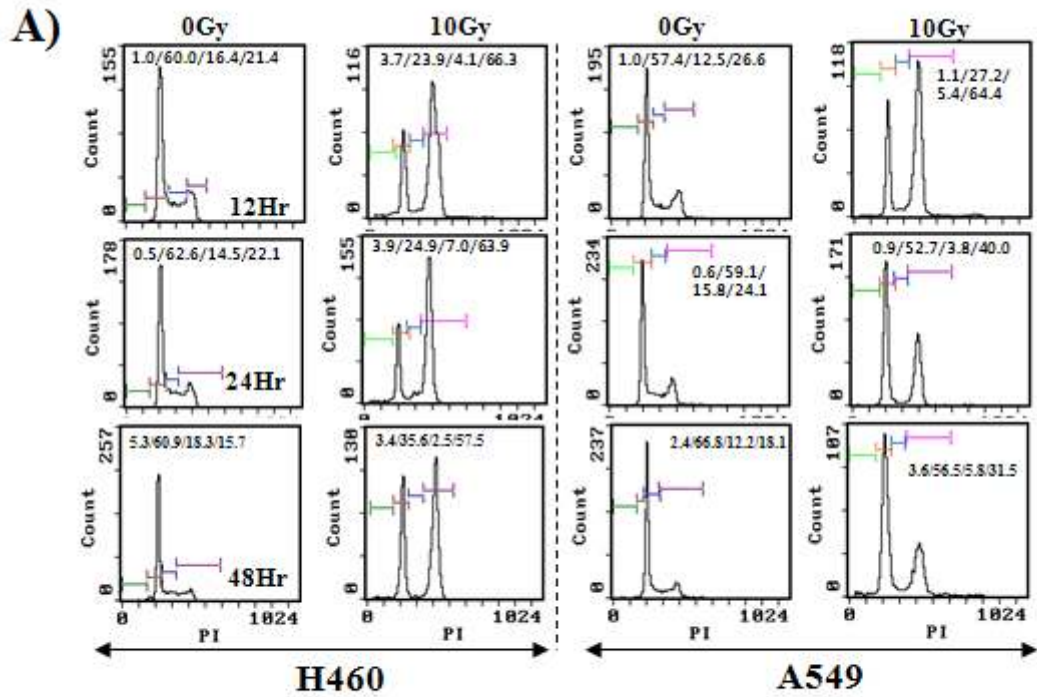


그림 2. 세포독성 비교. (A) H460과 A549에서 방사선 조사후 세포생존성 비교 (B) 방사선 조사 후 현미경 관찰 그림. floating cell은 화살표로 표시하였다. (Ref. 1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	all gene control=H460														
2	2E+07														
3	sample H460 vs. A549		H460 vs. H1299												
4	System	Normalized	Rd	Cont	Normalized	Fl	Rd	Cont	Genban	Gene Symb	Chr	Position	Description	DBid	
5	A_17_P1	0.0100	A	10	1485	0.4240	P	612	1445	NM_020850	RANBP10-TSNA	6q22.16	RAN binding prot	GeneID:5	
6	A_17_P0	0.0100	A	28	2866	0.0281	A	66	2331	NM_014992	DAAM1	4q23.14	dishevelled assoc	GeneID:2	
7	A_17_P0	0.0100	A	10	1126	1.0307	P	721	699	NM_002731	PRKACB	1p36.11	protein kinase, cA	GeneID:5	
8	A_17_P0	0.0100	A	10	1029	0.0946	A	37	394	NM_002006	FGF2	126-q.4	fibroblast growth	GeneID:2	
9	A_17_P0	0.0100	A	11	1139	0.4760	P	377	792	NM_002731	PRKACB	1p36.11	protein kinase, cA	GeneID:5	
10	A_17_P0	0.0100	A	20	2201	0.0235	A	40	1694	NM_206831	ZCSL2-OXNAD1	3p24.3	DPH3, KTI11 hom	GeneID:2	
11	A_17_P0	0.0100	A	14	1495	0.1020	A	37	363	NM_139279	MCFD2	2p21.2	multiple coagulat	GeneID:9	
12	A_17_P0	0.0100	A	10	1054	0.0661	A	79	1201	NM_004741	NOLC1	10q24.3	nucleolar and coil	GeneID:9	
13	A_17_P0	0.0100	A	10	1500	0.0290	A	44	1515	NM_017676	FLJ20125	5q21.15	Ty3/Gypsy integra	GeneID:5	
14	A_17_P1	0.0100	A	17	2042	0.0532	A	116	2173	NM_019001	XRN1	3q23.3	5'-3' exoribonucle	GeneID:5	
15	A_17_P0	0.0100	A	11	1635	0.0370	A	49	1334	M_00103726	EIF3S9	7p22.2	eukaryotic transla	GeneID:8	
16	A_17_P1	0.0100	A	12	1245	0.0661	A	39	594	NM_000365	TPI1	12p13.12	triosephosphate i	GeneID:7	
17	A_17_P0	0.0100	A	11	1276	0.0332	A	38	1157	NM_012135	FAM50B	125-pt.6	family with seque	GeneID:2	
18	A_17_P1	0.0100	A	10	1087	0.0389	A	41	1053	NM_017709	FAM46C	1p12.1	family with seque	GeneID:5	
19	A_17_P1	0.0100	A	11	2151	0.0446	A	86	1927	NM_207460	FLJ44313	0	PROMOTER		
20	A_17_P0	0.0100	A	13	1336	0.0553	A	69	1252	NM_152550	SH3RF2	5q32.5	SH3 domain cont	GeneID:1	
21	A_17_P0	0.0101	A	12	1229	0.0633	A	76	1192	NM_001999	FBN2	123-q.5	fibrillin 2 (conqen	GeneID:2	

그림 3. (주) 지노믹트리의 도움을 받아 H460 및 A549 세포주에서 유전체 전체에 대해 메틸화 분석을 실시함

(참고) 메틸화 분석 전체 데이터는 대용량 관계로 보고서에 기입을 하지 않고 자료로서 보관 중임

A)

Original sequences						
GTTTGGATGT	GGGTGCTTGT	GTAACCAGTT	CCCCAAGCGC	CAGCCCCGAC	AGCGCTCCTT	GGGAGGCTG
GTCCGAGCCC	CTGTTTCCGC	CGCGGCGCAG	GAAGGGTTGG	GGTTCGCTG	CCTGCACCAG	CAAGAGCAC
CCCGAGCAAA	GGAAGAAGAC	GACTTGCCTC	CGGAGCTATC	ACTGGGGAGT	GGGAATTTGG	
Bisulfite converted sequences						
GTTTGGATGT	GGGIGTTTGT	GTAATTAGTT	TTTTAACTGT	TAGTTCTGAT	ACYGTTTTTT	YGGGAGGTTG
GTCTGAGTTT	TTGTTTTYGT	YGYGGYGTAG	GAAGGGTTGG	GGTTTTYGTG	TTTGTATTAG	GTAAGAGTAT
TTYGAGTAAA	GGAAGAAGAY	GATTTGTTTT	YGGAGTTIAT	ATTGGGGAGT	GGGAATTTGG	

PTEN Forward primer : 5'-GGATGTGGGIGTTTGTGTAATTG-3'

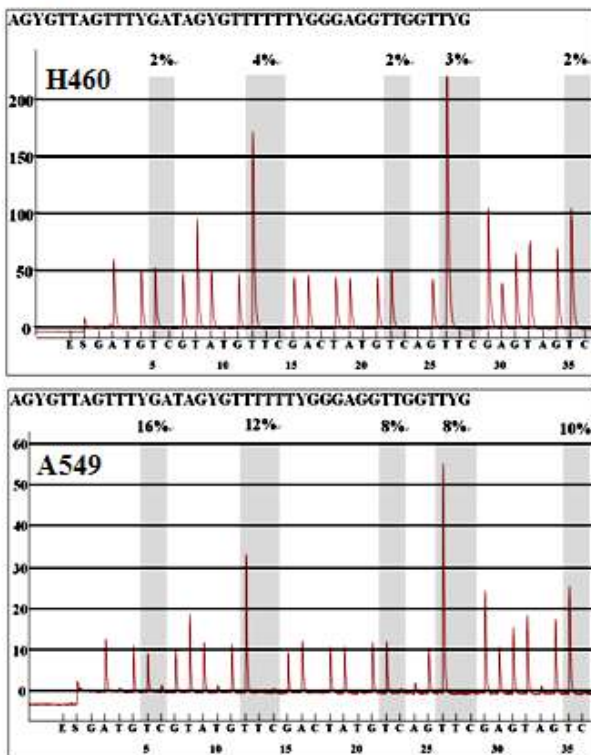
PTEN Reverse primer : 5'-AATTCCCCTCCCAATAATAAC-3'

PTEN Sequencing primer : 5'-TTTGTGTAATTAGTTTTTGA-3'

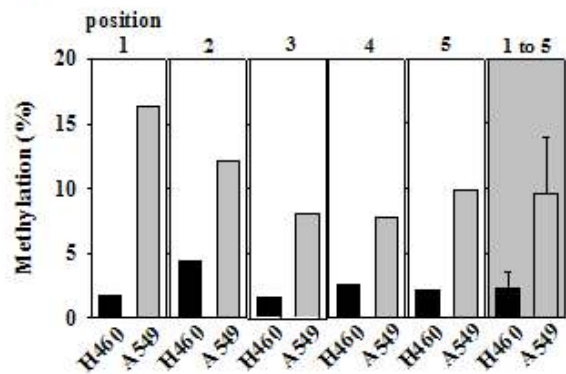
PTEN Sequence to analyze : AGYGT TAGTTCTGAT AGYTTTTTTT YGGGAGGTTG GTTYG

Y: methylated position in H460 and/or A549 (position 1 to 5)

B)



C)



D)

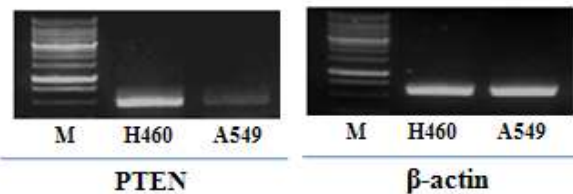


그림 4. PTEN에 존재하는 5개의 CpG 섬 (CpG island)에 대한 pyrosequencing 결과. (A) 원래의 PTEN 서열과 pyrosequencing을 위해 bisulfite로 전환된 서열. 붉은 색의 서열에 표시된 각각의 Y는 각 세포주에서 메틸화된 부위를 나타낸다. (B) pyrosequencing diagram. 각 box는 그림 A에 표시된 5개의 Y에 대한 부위를 의미한다. (C) 메틸화된 CpG 정도의 비교. 마지막 bar는 총 메틸화된 부위의 평균을 의미한다. (D) 두 세포주에서 PTEN 유전자의 RT-PCR 결과. (Ref. 1)

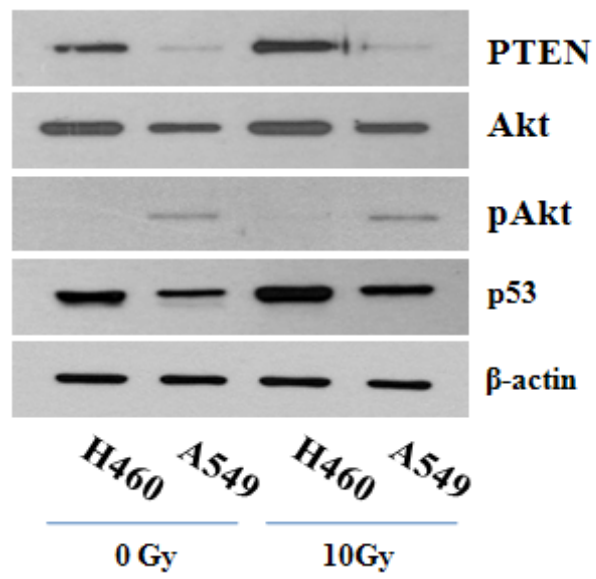


그림 5. western blot 분석 결과. 세포는 방사선 조사후 48시간 후에 수득하여 분석하였다. (Ref. 1)

5. DKK3 유전자 부위에서의 메틸화 분석

많은 암 세포주에서, DKK3 유전자 발현의 실패는 DKK3 유전자 promoter의 메틸화에 기여한다고 알려져 있다 (3,4,5,6,7,8,9). 따라서, 본 연구에서는 우선 폐암세포주인 H460에서 DKK3 유전자의 메틸화에 대해 분석해 보았다. 이를 위해 그림 6A에서 보듯이 4개의 CpG 섬을 선택하였다. PCR 증폭 후, 메틸화 정도를 4개의 각각의 CpG 섬에 대한 메틸화에 대한 정도의 평균을 이용하여 산출하였다. 그 결과 약 44% 수준으로 DKK3가 메틸화되어 있었으나, 여전히 DKK3 유전자가 발현이 되고 있었다 (그림 6B). 본 연구에서는 여전히 발현되고 있는 DKK3 유전자 발현을 완전히 억제시키기 위해 SiDKK3 RNA를 제작하였고, 이를 H460 세포주에 도입함으로써 여분의 DKK3 유전자 발현을 차단하였다 (그림 6B).

6. DKK3 발현 억제로 인한 세포독성 효과

DKK3 유전자 발현이 H460 세포주에서 세포 성장과 apoptosis에 영향을 미치는지 조사하기 위하여 SiDKK3 RNA를 H460에 transfection하였다. 그림 7A에서 보듯이, SiRNA 가 처리된 세포주에서는 culture dish에 정상적으로 부착하지 못하고, 뒹뒹 뜨게 되는 현상 (floating cells)이 관찰되었다. EH한 SiDKK3로 처리된 세포주는 약 70% 수준으로 심각한 성장 저해를 보였다 (그림 7B). 이와 반면에 SiRNA가 도입되지 않은 모 H460세포주의 경우에는 이러한 세포독성 현상이 보이지 않았다. 이처럼 H460/SiDKK3에서 보이는 cell detachment 현상은 세포의 부착성 저해에 의한 floating 효과에 의한 것으로 보인다. 이러한 비정상적인 성장 패턴은 MIT assay와 colony forming assay를 통해 다시 한번 입증되었다 (그림 7C 와 D).

7. DKK3 발현 억제에 의한 apoptosis의 유도

H460에서 DKK3 유전자의 억제에 의해 유도되는 세포독성 효과를 입증하기 위해, flowcytometry를 이용하여 분석을 수행하였다. DKK3-negative cell (H460/SiDKK3 RNA)는 그의 모세포주 (DKK3-positive cell)와 유사한 양상을 보였으나 모세포주에 비해 이틀 후에는 apoptotic phase에 진입함을 알 수 있었다.

한편 그림 8에서 보듯이, apoptosis에서 커다란 차이가 보였다. 모세포주 H460과 H460/negative SiRNA에서는 단지 3% 정도만의 apoptosis만을 보인 반면에, DKK3 발현이 억제된 H460/SiDKK3 RNA에서는 25% 정도의 apoptosis 를 보였다. 그러나 세포주기에서는 어떠한 심각한 변화가 보이지 않았다. 이러한 결과는 H460/SiDKK3 RNA에서 보이는 cell detachment와 비정상적인 생장이 DKK3의 downregulation에 기인함을 의미한다.

8. 신호전달 경로 규명

본 연구에서는 H460, H460/negative SiRNA, 그리고 H460/SiDKK3 RNA에서 apoptosis와 연관된 단

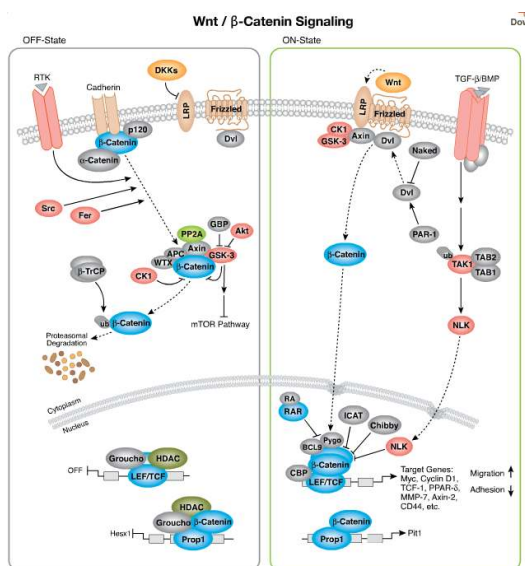
백질의 발현을 조사하였다 (그림 9A). DKK3 발현의 억제제는 cyclin D1과 cyclin E의 발현을 증가시켰으나, Cdk2와 Cdk4의 발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 더구나, H460과 H460/SiDKK3 RNA 사이에는 심각한 PTEN 수준의 변화가 보이지 않았는데, 이는 H460/SiDKK3 RNA에서 보이는 apoptosis 현상이 PTEN/pAkt 신호전달 경로와는 독립적임을 의미한다. 흥미롭게도, H460/SiDKK3 RNA에서 p53과 p21의 수준이 크게 증가하였는데, 이는 이 세포주가 세포내 높은 수준의 ROS에 의해 공격받고 있음을 의미한다. 또한 본 연구에서는 apoptosis 후에 핵으로 translocation되는 Bax의 발현을 western blotting 법으로 측정하였다. 그 결과, bax의 발현은 H460보다 H460/SiDKK3 RNA에서 더 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과는 DKK3의 결핍이 방사선 및 스트레스에 의한 민감성을 증진시키며 그 결과 cell apoptosis가 유도된다는 가설과 일치하는 결과이다.

9. ROS 수준 측정

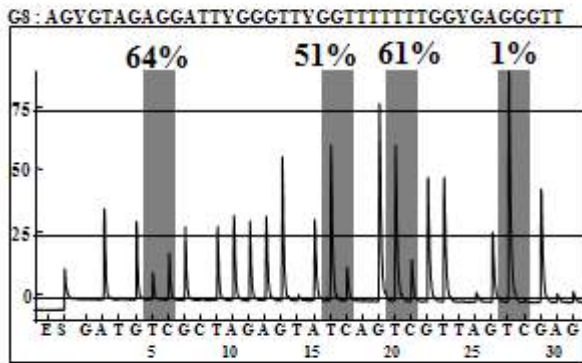
세포내 ROS의 증가, 방사선, 기타 스트레스에 의해 p53의 발현이 증가한다는 사실은 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 DKK3 발현의 변화가 H460에서 세포내 ROS의 수준을 변화시킬 수 있는지 여부에 대해 조사하였다. 이러한 세포내 ROS 수준은 DCFH-DA 를 이용하여 측정되었다 (27). 본 연구에서 산화된 DCF는 flow cytometry로 검출하였다. 그 결과, 세포내 ROS 수준은 DKK3 발현 억제에 의해 크게 증가함을 알 수 있었으며, 이러한 변화는 20시간 후에 최대치에 이르는 것을 알 수 있었다 (그림 9B). 이러한 결과는 결국 DKK3의 기능이 세포내 ROS 수준을 적절한 수준으로 유지시키는 것임을 의미한다.

10. DKK3 및 암세포 전이

본 경로는 암세포의 전이에 관여하는 기능을 갖는 것으로 일부 알려져 있어 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다. 아래 그림은 이러한 DKK의 기능과 관련하여 알려진 신호전달 경로를 보여주고 있다.



A)



B)

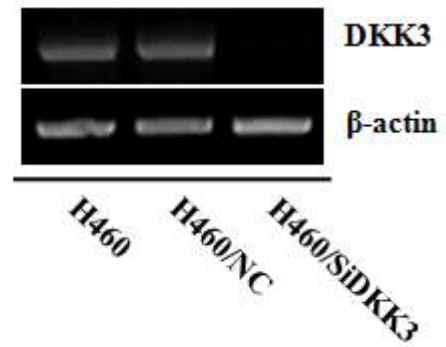


그림 6. 감마 방사선 조사에 의한 G2/M arrest의 유도. (A) Pyrosequencing analysis of DKK3. (B) SiDKK3 RNA transfection 후 DKK3의 발현 양상 조사. (Ref. 2)

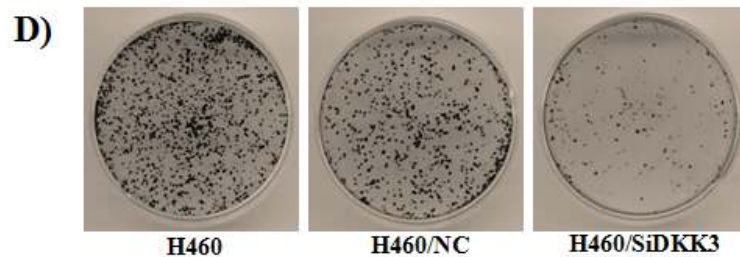
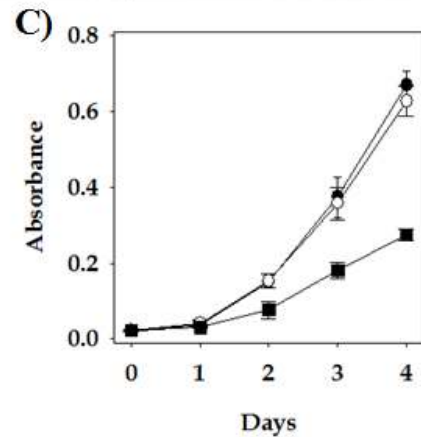
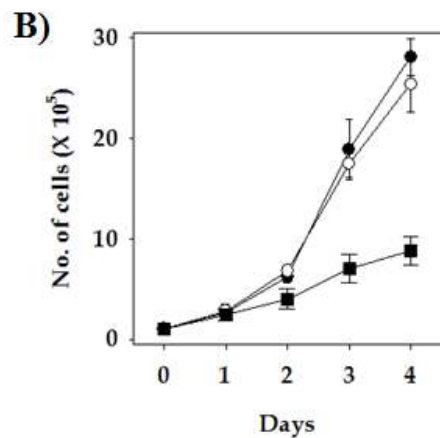
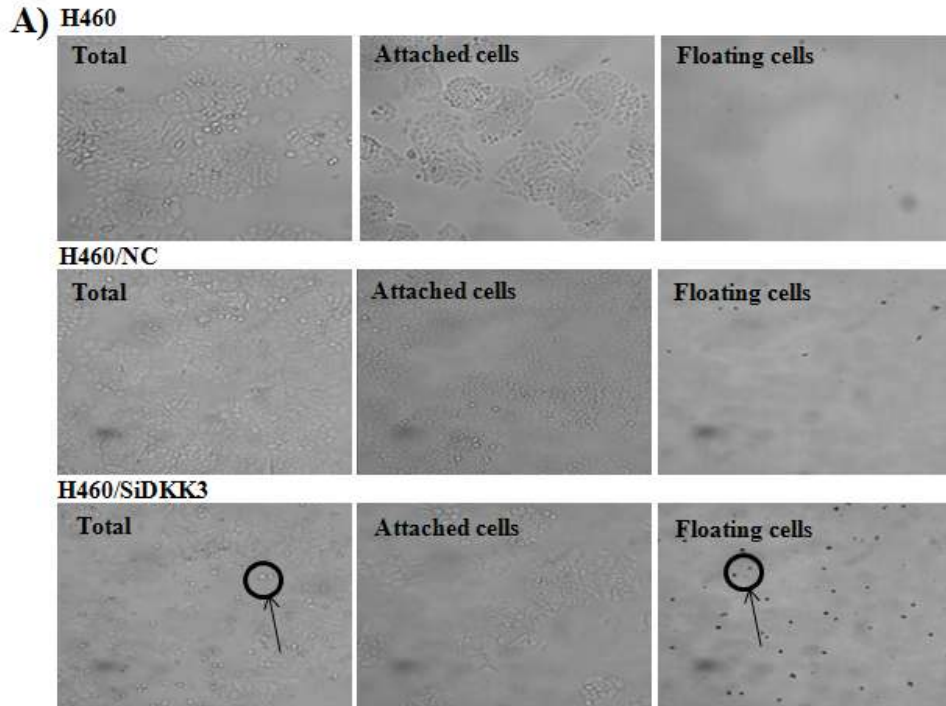


그림 7. DKK3 발현 억제에 의한 세포 생장의 손상. (A) 현미경 관찰 그림. Total, 총 세포; floating cell, 세포 배양액에 존재하는 세포 (화살표로 표시); attached cell, culture plate에 부착하여 자라는 세포. (B) SiDKK3 RNA 도입에 의한 세포 생존효과. closed circle, 정상의 H460 모세포주; open circle, H460/negative SiRNA; closed square, H460/SiDKK3 RNA. (C) MTT cell proliferation assay. (D) colony forming assay. (Ref. 2)

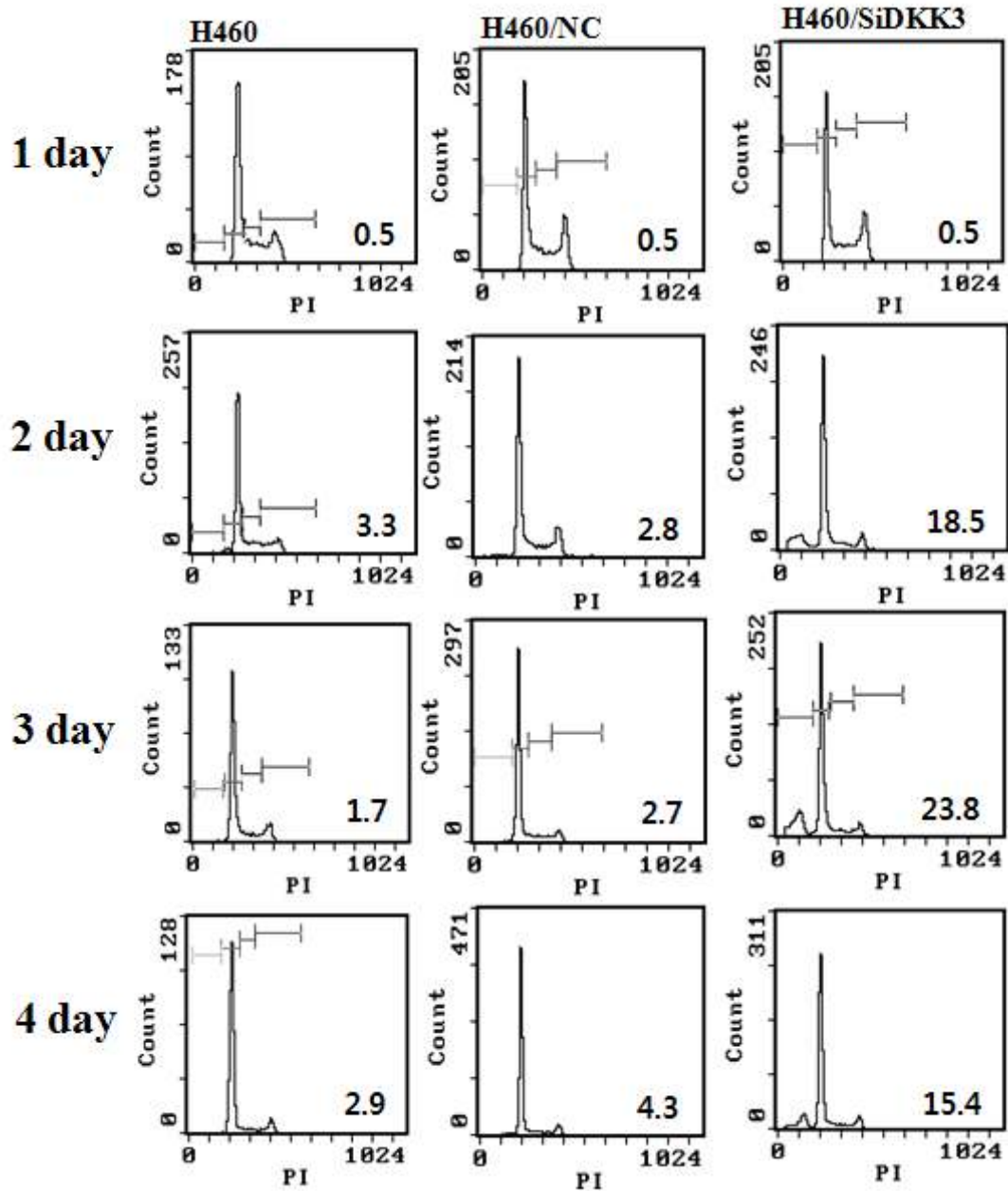


그림 8. flow cytometry 분석. (Ref. 2)

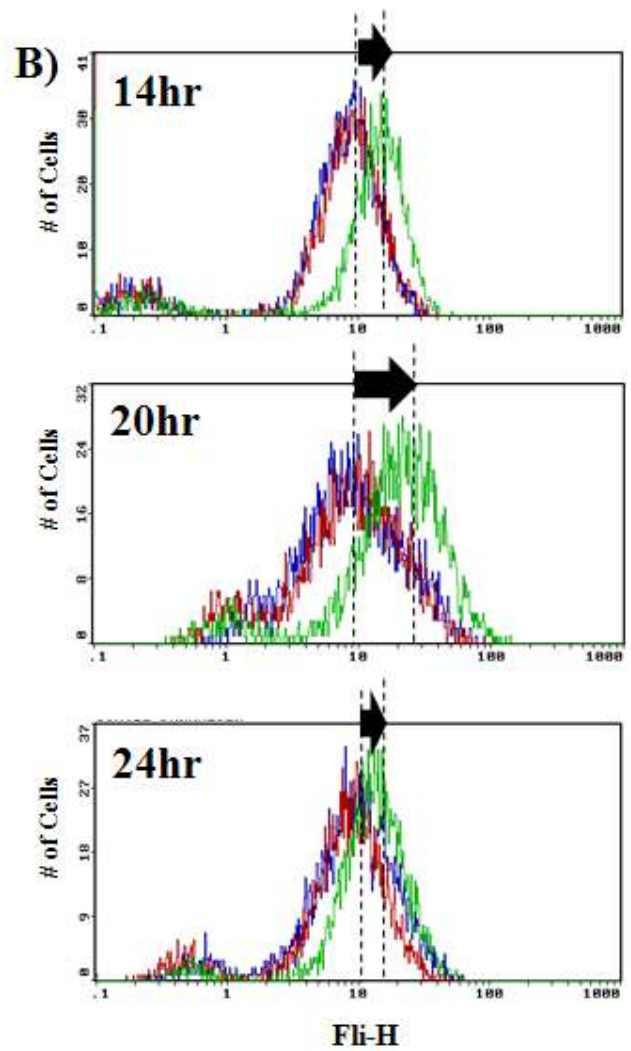
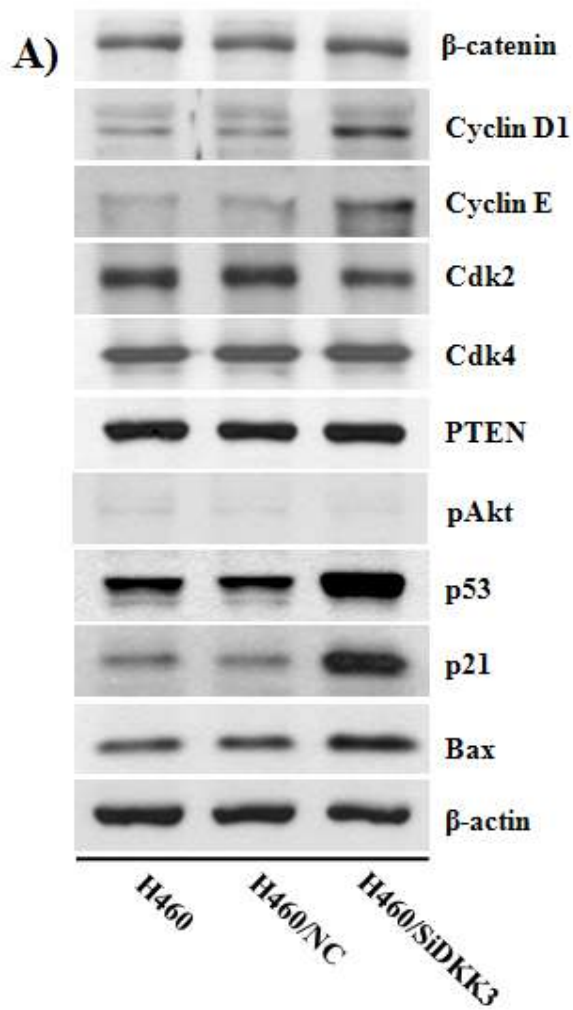


그림 9. western blot 분석 및 세포내 ROS 수준 분석. (A) 세포를 24시간 배양 후 단백질 발현 양상을 분석한 그림. (B) DCFH-DA에 의한 세포내 ROS 분석. (Ref. 2)

제 3절 연구성과

- SCI 논문 발표

Jung IL et al. Knockdown of the Dickkopf3 gene induces apoptosis in a lung adenocarcinoma. 2010. International journal of molecular medicine.

- 국내 특허 출원

정일래, 김인규. DKK3 발현 또는 활성 억제체를 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물. 2010/03/08. 출원번호 2010-0020363

- 국외 학술발표

Jung IL, Kim IG. Increased cell cytotoxicity by the down-regulation of MT1G. 2009. May. Asian Congress of Radiation Research.

Jung IL, Kim IG. Comparison for the γ -ray sensitivity in different lung adenocarcinomas. 2009. May. Asian Congress of Radiation Research.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 계획서 상의 추진일정

연도	연구개발의 내용	추진일정												연구비 (천원)	비고	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
2009	방사선 조사 조건 확립	■	■	■											3,000	
	방사선 처리에 의한 세포반응 실험			■	■	■	■	■							10,000	
	실험 대조군 및 유용 세포주 선별							■	■						5,000	
	선발 세포주에서의 DNA 메틸화 분석									■	■				10,000	
	폐암세포 간의 후성 유전학적 DNA 메틸화 차이 비교										■	■			15,000	
	민감성 관련 유전자 선발 및 확립											■	■		5,000	
2010	관련 유전자의 신호 전달 체계 규명	■	■	■	■	■	■								15,000	
	유전자 발현 조절 가능한 SiRNA 개발					■	■	■	■						13,000	
	신규 제어물질 탐색							■	■	■	■				13,000	
	DNA 메틸화 제어 기술 및 유전자 제어 기술 타당성 검토										■	■	■		5,000	
	타과제 활용 검토												■		2,000	

제 2절 연구목표 달성도

목 표	연구개발 수행내용/결과	달 성 도(%)
○방사선 조사 조건 확립	C-60을 이용한 방사선 조사 조건의 확립 (0.1Gy/min, 총 2-10Gy)	100
○방사선 처리에 의한 세포반응 실험	방사선 처리 후 세포반응을 Flow cytometry 및 현미경검사, MTT assay등을 실시	100
○실험 대조군 및 유용 세포주 선별	방사선에 민감한 폐암 세포 중, 비소성폐암 세포주인 H460 및 A549를 선별	100
○선발 세포주에서의 DNA 메틸화 분석	두 세포주에서의 전체 지놈상에서의 DNA 메틸화를 분석 (마크로젠에 용역 의뢰)	100
○방사선 처리 후 다양한 종류의 폐암세포 간의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교	H460 및 A549에서 관심 유전자 PTEN의 후성유전학적 DNA 메틸화 차이 비교	100
○결과 분석을 통한 민감성 및 내성 관련 유전자 선별 및 확립	PTEN/DKK3 유전자 선별 완료 및 관련 회로 탐색 및 생리적 특성 규명 완료	100
○관련유전자의 신호전달 체계 규명		100
○유전자 발현 조절 가능한 SiRNA 개발	PTEN/DKK3 유전자의 SiRNA 개발 완료	100
○신규 제어물질 개발	SiRNA를 이용한 유전자 제어를	100
○DNA 메틸화 제어 기술 및 유전자 제어 기술 타당성 검토	RT-PCR 및 western blot 방법으로 검증	100
○타과제 활용 검토	신규 타과제 (원자력 중장기 연구개발 사업)에 활용-현재 기획보고서 작성중	100

제 3절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

본 연구의 성공적인 수행 결과, 다양한 종양 세포에서의 방사선 및 항암 약제에 따른 내성 및 민감성의 차이가 DNA 메틸화에 의해 유발될 수 있음을 새로이 제시하게 될 수 있을 것이다. 이러한 결과는 종양학 학문 전체에 새로운 관점을 제공해 줄 수 있을 것이며 아울러 DNA 메틸화 분석기술의 향상에도 기여하리라 기대된다. 또한, 종양 세포에서의 방사선 및 항암 약제에 따른 DNA 메틸화에 따른 방사선 및 약제 민감성의 차이 및 이를 제어할 수 있는 기본 이론을 제공할 수 있고, 나아가 해당 암발생 관련 유전자의 기능을 최신의 분자생물학적 방법으로 규명함으로써 국가적으로 경제성이 있는 유용유전자원을 확보 할 수 있을 뿐 아니라 방사선 및 항암약제 치료시 치료 효과를 극대화 시킬 수 있을 것이다.

2. 경제적·산업적 측면

종양세포 간 방사선/약제 민감성을 밝히고, 방사선 및 약제 감수성을 증가시키는 독자적인 기술개발이 성공한다면, 방사선 및 약제를 이용한 항암 치료 분야에서의 치료 효과를 극대화시킴으로써 의료비용 및 고통절감, 고가의 수입의약 대체 효과 등 경제적 파급효과가 클 것으로 예상되며 세계시장 진출을 통한 기술료 획득과 제품화에 따른 고부가가치 산업으로서의 수익창출을 기대할 수 있다. 아울러 DNA 메틸화를 고려한 새로운 암 발생 기작의 근거를 제시함으로써 기존의 돌연변이 의존적 암치료 시장에 후성유전학적 개념의 도입을 가능하게 하여 산업적으로 새로운 항암치료 관련 분야를 창출할 것으로 기대된다. 아울러 항암 관련 유전자원의 확보 및 신규 항암기술의 개발은 생물 및 의료산업에 필수 불가결하며 관련된 국내 기술수준 향상을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라 방사선 및 원자력관련 바이오 원천기술의 수출 기회 및 확대를 도모할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

- DNA 메틸화 관련 방사선 민감성 및 내성 유전자군을 선별함으로써 신규 암치료 분야에서 고부가가치 유용유전자원 확보
- 신규 유전자원 확보를 통한 국내 생물 및 의료산업의 첨단 기술수준 향상
- 방사선 및 원자력관련 바이오원천기술의 수출 기회 및 확대
- 신규 항암시장의 선도적 역할 기대
- 수입 항암제 대체 효과 및 세계시장 진출을 통한 기술료 획득 등 고부가가치 산업으로서의 수익창출
- 다양한 폐암세포주에서 DNA 메틸화를 조절함으로써 방사선 저항성 감소 및 방사선 감수성을 증가시키는 기술에 적극 활용
- 다양한 폐암세포주 간 DNA 메틸화에 의한 방사선 민감성 조사 및 이의 기능연구를 토대로 암 제어 물질의 개발 가능성 타진
- microRNA, 생물정보학 등 관련 연구 분야와의 융합학문 태동 기대
- 향후 국가 대형연구과제 혹은 실용화 연구과제 등에 응용 및 활용 가능

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제7장 참고문헌

1. Jung IL, et al. PTEN/pAkt/p53 signalling pathway correlates with the radioresponse of non-small cell lung cancer. 2010. *Int. J. Mol. Med.* 25: 517-523.
2. Jung IL, et al. Knockdown of the Dickkopf3 gene induces apoptosis in a lung adenocarcinoma. 2010. *Int. J. Mol. Med.* 26: 33-38.
3. Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, Ohmura Y, Andou A, Miyazaki M, Shimizu N and Namba M: Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 19: 117-121, 2001.
4. Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N and Shimizu K: Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 282: 151-158, 2002.
5. Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arao Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H and Huh NH: Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* 171: 1314-1318, 2004.
6. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Barrios M, Andreu EJ, Prosper F, Heiniger A and Torres A: Transcriptional silencing of the Dickkops-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 91: 707-713, 2004.
7. Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J and Hermeking H: Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 4218-4227, 2005.
8. Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Kikuno N, Nakagawa M, Igawa M and Dahiya R: Combination analysis of hypermethylated Wntantagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res* 12: 2109-2116, 2006.
9. Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T and Shinomura Y: Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 28: 2459-2466, 2007.

서 지 정 보 양 식

서 지 정 보 양 식							
수행기관보고서번호		위탁기관보고서번호		표준보고서번호		INIS 주제코드	
KAERI/RR-3244/2010							
제목 / 부제		폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한 방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구					
연구책임자 및 부서명		정일래/원자력환경안전연구부					
연구자 및 부서명		김인규, 김국찬/원자력환경안전연구부					
출판지		발행기관	한국원자력연구원		발행년	2011	
페이지	41	도표	있음(0), 없음()		크기	Cm.	
참고사항							
공개여부	공개(0), 비공개()		보고서종류		일반보고서		
비밀여부	대외비(), _ 급비밀						
연구위탁기관				계약번호			
초록 (15-20줄내외)		<p>최근 종양관련 유전자의 기능 변화가 DNA 상의 특정 부위에 일어나는 메틸화 (methylation)에 의해 유발된다는 보고가 다수 있어왔다. 본 연구에서는 특히 방사선에 의해 발현이 변화하는 유전자군을 최신 pyrosequencing 기법에 의해 탐색하고, 그 중 두 가지 유전자를 선택하여 폐암세포주 H460과 A549에서의 기능을 분석하였다. 두 세포 공히 방사선에 의해 심각한 G2/M arrest를 보였으며 특히 A549에서는 H460에 비해 신속히 arrest가 저하되는 결과를 보였다. 유전자 분석 결과 A549는 H460에 비해 PTEN 유전자가 고도로 메틸화되어 있었다 (저발현되었다). western blot 결과 PTEN은 pAkt의 음성조절자로 작용하며, pAkt는 또한 방사선에 의해 유발되는 유전자인 p53의 음성조절자로 작용함을 발견하였다. 본 결과는 H460에서 보이는 높은 수준의 방사선 민감성이 해당 세포주에서 보이는 PTEN과 p53의 고발현에 기인함을 알 수 있었다. 또한 Wnt-antagonist로 알려진 네 종류의 DKK (Dickkopf gene) 유전자 중, non-small cell lung cancer H460에서의 DKK3 유전자의 기능을 살펴보았다. 최신 pyrosequencing 기법을 이용하여 분석한 결과 DKK3는 약 44% 수준으로 메틸화가 되어 있었지만, 여전히 높은 수준으로 발현되어 있었음을 보았다. SiRNA를 처리하여 DKK3 발현을 완전히 억제한 결과, 방사선에 의해 유도되는 p53 유전자와 p21 유전자가 크게 증가하였고, 아울러cyclin-dependent kinases D1과 E 역시 크게 증가하다. 또한 현미경적 관찰과 flowcytometry를 통해 전형적인 apoptosis가 유도됨을 발견하였다. 이 결과는 DKK3가 세포내 활성산소의 수준을 낮추어 줌으로써 antiapoptotic molecule로 작용함을 보여준다.</p>					
주제명키워드 (10단어내외)		DNA 메틸화, PTEN, DKK3, 폐암세포주, 방사선, 파이로시퀀싱					

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-3244/2010					
Title / Subtitle		Characterization and application of radiation-sensitizing genes by DNA methylation in lung cancer cells			
Project Manager and Department		IL LAE JUNG/Environmental Radiation Research Group			
Researcher and Department		In Gyu Kim. Kug Chan Kim /Environmental Radiation Research Group			
Publication Place		Publisher	Korea Atomic Energy Research Institute	Publication Date	2011
Page	41	Ill. & Tab.	Yes(0), No ()	Size	Cm.
Note					
Open	Open(0), Closed()		Report Type	RR (Research Report)	
Classified	Restricted(), ___Class Document				
Sponsoring Org.				Contract No.	
Abstract (15-20 Lines)					
<p>The sensitivity or resistance of cancer cells and normal tissues to ionizing radiation plays an important role in the clinical setting of lung cancer treatment. However, to date the exact molecular mechanisms of intrinsic radiosensitivity have not been well explained. In this study, we compared the radiosensitivity or radioresistance in two non-small cell lung cancers (NSCLCs), H460 and A549, and investigated the signaling pathways that confer radioresistance. H460 cells showed a significant G2/M arrest after 12 h of irradiation (5 Gy), reaching 60% of G2/M phase arrest. A549 cells also showed a significant G2/M arrest after 12 h of exposure; however, this arrest completely disappeared after 24 h of exposure. A549 has higher methylated CpG sites in PTEN, which is correlated with tumor radioresistance in some cancer cells, than H460 cells, and the average of the extent of the methylation was ~4.3 times higher in A549 cells than in H460 cells. As a result, PTEN expression was lower in A549 than in H460. Conducting Western blot analysis, we found that PTEN acted as a negative regulator for pAkt, and the pAkt acted as a negative regulator for p53 expression. According to the above results, we concluded that the radiosensitivity shown in H460 cells may be due to the higher expression of PTEN through p53 signaling pathway.</p> <p>The expression of the Wnt-antagonist Dickkopf gene (DKK) is downregulated in several types of tumors as a consequence of epigenetic DNA modification; four DKK members, DKK1, DKK2, DKK3, and DKK4, have been identified. In this study, we investigated another function of DKK3 in non-small cell lung cancer H460 cells, in which DKK3 was hypermethylated (44%) but still expressed, by interfering with DKK3 expression using DKK3-silencing RNA (SiRNA). We found that knockdown of DKK3 expression by DKK3 SiRNA transfection led to the detachment of H460 cells from the bottom of the culture plate and caused apoptosis. The expression of cyclindependent kinases D1 and E were increased by DKK3 knockdown, indicating that cells with blocked DKK3 expression entered the apoptotic pathway. We also found that the intracellular level of reactive oxygen species was higher in cells with blocked DKK3 expression than in normal H460 cells, and levels of p53, p21, and Bax were also increased by the gene knockdown. These results indicate that DKK3 acts as an antiapoptotic molecule by decreasing the intracellular level of reactive oxygen species.</p>					
Subject Keywords (About 10 words)		DNA methylation, PTEN, DKK3, non-small lung cancer cell, radiation, pyrosequencing			

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 원자력연구개발사업 (원자력연구 기반확충사업)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 원자력연구개발사업 (원자력연구기반확충사업)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

수정·보완요구사항 대비표

과제명: 폐암세포주에서 DNA 메틸화에 의한 방사선 감수성 극복 유전자 규명 및 활용 연구

주관기관(책임자) : 한국원자력연구원 (정일래)

전문기관의 수정·보완요구사항	주 ¹⁾ 수정·보완요구사항 반영내용 요약	주 ²⁾ 비 고
○ 본연구에서사용한폐암세포주이외에다른세포주또는조직에서결과를validation하는것이필요함.	본 연구의 목표가 폐암세포주에서의 영향을 연구하는 것이어서, 타 세포주에서에서의 연구를 진행하지는 못하였고, 차후 이와 관련된 후속연구를 계획하고 있음	22p
○ 계획대로연구가진행된것으로보이나독창성은높지않아보임	-	
○ 분석결과에서다른유망유전자의발굴이나유무에대한설명의보완이필요함.	본 연구에서는 기존의 잘 알려진 PTEN-Akt 경로에 있어서의 효과를 살펴보고, 아울러 Wnt-antagonist로 알려진 네 종류의 DKK (Dickkopf gene) 유전자 중, non-small cell lung cancer H460에서의 DKK3 유전자의 기능을 살펴 보았다. 본 경로는 암세포의 전이에 관여하는 기능을 갖는 것으로 일부 알려져 있어 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 보임. 관련 신호전달 회로에 대해 보완 설명함. 또한 방사선에 의해 유도되는 유전자 중, ACTA2 및 GADD45에 대한 후속연구의 중요성을 기재함	22p/29p

※ 주1) 수정·보완반영내용은 반드시 최종보고서 내에 반영하고 경우에 따라 별지를 사용하여 작성하기 바람.

주2) 비고란에는 수정·보완요구사항을 반영한 최종보고서의 해당 page를 기입하고 별지가 있을 경우 별지의 제목을 기입할 것.