

국가연구개발사업 최종보고서 · 요약서

질환 맞춤형 방사선치료 효율 증진기술 개발  
(Technological development of tailored-radiation therapy)

방사선 내성인자 활용을 통한 예후평가기술 개발  
(Technological development of the molecular prognosis using  
radiation resistance factor)

주관연구기관  
한국원자력의학원

교육과학기술부

## 제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

이 보고서를 “질환맞춤형 방사선치료 효율 증진기술 개발” 과제 (세부과제 “방사선 내성인자 활용을 통한 예후평가기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2012. 04. 05.

주관연구기관명 : 한국원자력의학원

주관연구책임자 : 황 상 구

연 구 원 : 박 인 철

” : 한 영 훈

” : 이 재 선

” : 김 재 성

” : 신 현 진

” : 이 기 호

” : 유 두 현

” : 이 은 주

” : 함 용 호

” : 우 상 혁

” : 홍 은 희

” : 한 나 경

” : 김 진 흥

협동연구기관명 : 해당사항 없음

협동연구책임자 : 해당사항 없음

## 보고서 요약서

과제고유번호	2011-0002300	해당 단계 연구 기간	2010.03- 2012.02	단 계 구 분	(2단계)/ (총2단계)
연구사업명	중사업명	방사선기술개발사업			
	세부사업명	방사선의학기술개발사업			
연구과제명	대과제명	질환 맞춤형 방사선치료 효율 증진기술 개발			
	세부과제명	방사선 내성인자 활용을 통한 예후평가기술 개발			
연구책임자	황상구	해당단계 참여 연구원수	총: 14.9명 내부: 14.9명 외부: 0명	해당단계 연구비	정부: 1,280,000 천원 기업: 0 천원 계: 1,280,000 천원
		총연구기간 참여 연구원수	총: 36.25명 내부: 36.25명 외부: 0명	총연구비	정부: 3,120,000 천원 기업: 0 천원 계: 3,120,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국원자력의학원 방사선암연구부			참여기업명:	해당사항 없음
국제공동연구	상대국명:	해당사항 없음		상대국 연구기관명:	해당사항 없음
위탁연구	연구기관명:	해당사항 없음		연구책임자:	해당사항 없음
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수:	54 page
<p><b>1. 방사선내성 연구시스템 확립 및 방사선내성 인자 탐색을 위한 분석기술을 확보함:</b> (1) 방사선내성 연구모델 구축: 암화유전자 이용한 형질전환 세포주 2종류, 암 세포주 방사선내성 모델 3종류, 조직/세포 노화 모델 11종류, 암 발생 동물모델 2종류 확립 (2) 방사선내성 인자의 탐색 기법 및 장비 확보: Proteomics 기술 및 장비 구축, EST DB 연구기술 확보, DD-PCR 기술 및 장비 구축, 분비단백질 스크리닝 기술 및 장비 구축</p> <p><b>2. 방사선내성 인자 발굴:</b> 연구모델 이용 방사선내성 인자 탐색: 방사선내성 세포주의 Proteomics 이용 16종류, DD-PCR 이용 7종류, 두경부암 EST DB 유전자 분석 기술 이용 11종류, 세포노화 모델로부터 10종류, 형질전환 세포주의 유전자 분석 이용 10종류 확보함</p> <p><b>3. 방사선내성 인자 작용기전 및 네트워크 구축:</b> (1)유형별 방사선내성 인자 기능 검증: 방사선내성 인자 (survivin, Bcl-xL, EGFR, Claudin-1, NEMO, NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, p31comet 등), 활성산소 조절 인자 (RTP801, ATF4, mTOR 등), 방사선 민감화 인자 (CLICK1, INPP4B, Hep16, Triad1 등), 발암/발암억제 유전자 (Plakoglobin, HDACs, Hep7 등), 세포노화 조절 유전자 (Rap2, NAMPT, SIRT1 등) 을 포함한 33개 이상의 방사선내성 관련 인자 기능을 검증 (2) 내성인자의 기능 검증으로 인자 상호간의 네트워크를 p53, MAPK, Akt 3개 그룹 중심으로 구축함</p> <p><b>4. 발굴된 인자들의 방사선/항암제내성 상호 활용성 검증:</b> (1) 방사선/항암제내성 인자간의 관련성 규명: 암유전자 형질전환에 의한 신호전달물질 8종, 활성산소 내성 세포주와 모세포주에서 DD-PCR로 6종, 항암제 내성인자의 방사선내성 인자로 활용성을 IKK, c-myc 중심으로 검증, 노화 조절인자의 항암제/방사선내성과의 상관성 규명함 (2) 방사선내성 치료조절 물질의 활용성 검증: Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, doxorubicin의 방사선 병용치료 효과를 후생유전학, 세포주기, 세포사멸, 세포전이 위주로 관련성 규명함</p> <p><b>5. 방사선내성 인자의 예후지표로서의 유효성 검증:</b> (1) 방사선내성 인자의 유효성 검증을 위해 두경부암 300예, 자궁경부암 280예 확보 (2) 동물샘플 및 암 환자 샘플조직을 확보하고 유효성 인자를 구축하였으나, 방사선치료 후 재발 환자의 검체를 통계적 신뢰도가 구축될 만큼 충분히 확보하지 못하여 적용기술을 위한 연구 내용이 다소 부족함. (3) 방사선내성 인자 p31, HDAC, Survivin 유효성 평가와 핵심인자 검증을 위한 네트워크를 구축함.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	방사선내성, 항암제저항성, 내성 모델, 세포형질전환, 세포노화, 내성인자, 방사선치료, 신호기전			
	영 어	Radiation resistance, Drug resistance, Resistance model, Cell transformation, Cellular senescence, Resistance factor, Radiotherapy, Signal transduction			

## 요약문

### I. 제 목

방사선 내성인자 활용을 통한 예후평가기술 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적: 다양한 방사선내성 연구모델로부터 새로운 방사선 내성관련 인자를 발굴하고 이를 활용하여 방사선치료 예후평가 지표의 개발을 목표로 함. 이를 위해 1단계 연구는 방사선내성 인자발굴을 위한 모델시스템 개발과 내성인자의 유효성 검증을 하며, 2단계에서는 방사선내성 및 예후평가에 공통으로 적용되는 핵심인자를 이용하여 맞춤치료법 적용 기술 개발을 목표로 함.

2. 연구개발의 필요성: 선진국에서의 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발은 거의 진행되지 않고 있으나, 방사선 내성 분야와 예후 평가기술 분야 자체의 연구는 활발히 진행되어 국내 수준과는 차이가 있으므로 시급히 추진되지 않을 경우 관련분야 기술을 선점 당하게 됨.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 방사선 내성 연구시스템 확립
2. 방사선내성 인자 발굴
3. 방사선내성 인자 작용기전 규명
4. 방사선내성과 항암제 저항성과의 상관성 탐색 및 상호활용성 검증
5. 방사선 내성인자의 발현분석을 통한 방사선 예후인자로서의 유효성 평가 시스템 구축

### IV. 연구개발결과

1. 방사선내성 연구시스템 확립 및 방사선내성 인자 탐색을 위한 분석기술을 확보함.

- (1) 형질전환 세포주 2종류
- (2) 방사선내성 모델 3종류
- (3) 세포노화 모델 11종류
- (4) 암 발생 동물모델 2종류
- (5) Proteomics 기술 확보
- (6) EST database 연구기술 확보
- (7) DD-PCR 기술 확보
- (8) 분비단백질 스크리닝 기술 확보

2. 연구모델 이용 여러 가지 분석기법으로 방사선 내성인자 다량 탐색하였음.

- (1) 방사선내성 세포주로부터 Proteomics 기법을 이용하여 내성인자 16종류
- (2) DD-PCR 기법을 이용한 내성인자 탐색하여 7종류

- (3) EST database 유전자 분석 기술을 이용하여 11종류
- (4) 세포노화 모델로부터 노화인자 관련 방사선내성 인자 10종류
- (5) 형질전환 세포주로부터 EST database 유전자 분석으로 방사선내성 인자 10종류

3. 유형별로 탐색된 방사선내성 인자 기능을 검증하였음.

- (1) 방사선 내성인자 survivin, Bcl-xL, EGFR, Claudin-1, NEMO, NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, p31comet 등
- (2) 활성산소에 의해 조절되는 인자 RTP801, ATF4, mTOR 등
- (3) 방사선 민감성 또는 저항성 인자 CLICK1, INPP4B, Hep16, Triad1 등
- (4) 발암유전자 또는 발암억제유전자 Plakoglobin, HDACs, Hep7 등
- (5) 세포노화 조절관련 유전자 Rap2, NAMPT, SIRT1 등
- (6) 인자 상호간의 네트워크를 p53, MAPK, Akt 3개 그룹 중심으로 구축함

4. 방사선 내성인자와 항암제 내성 인자와의 상호관련성을 규명하였음.

- (1) 암유전자의 형질전환에 의한 신호전달물질 8종의 방사선 및 항암제 내성 관련성
- (2) 활성산소 내성 세포주에서 DD-PCR로 6종의 항암제/활성산소 저항성유전자 발굴
- (3) IKK, c-myc 항암제 저항성 분석을 통한 방사선 내성인자로의 활용성 검증
- (4) 노화조절인자의 기능을 항암제 및 방사선 내성과의 상관성을 규명함.
- (5) Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, doxorubicin의 방사선 병용치료 효과를 후생유전학, 세포주기, 세포사멸, 세포전이 위주로 관련성 규명함

5. 방사선내성 인자의 예후지표로서의 유효성 검증을 위해 동물샘플 및 암 환자의 샘플조직이 두경부암 300예, 자궁경부암 280 예 이상으로 확보되었음.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 방사선 내성인자 및 항암제 저항성인자는 방사선치료 효과 증진제, 항암제 및 새로운 종양치료법 개발의 표적자로 활용되므로 지적재산권 확보를 일부 선점하였고 계속해서 특허등록을 함.
- 국내 미개척 분야로서 연구 내용이 국민 삶의 질을 향상시키고, 암 치료에 이용될 수 있는 기초 방사선의학 연구 분야이므로 사회적으로 중요함. 본 연구개발 결과를 국내 임상 치료에 실질적인 도움이 될 수 있도록 계획과 방안이 필요하며 이를 위해 활용함.
- 방사선치료 내성인자의 발굴을 통한 방사선치료 예후 평가기술은 방사선 치료 예측률 및 변별력을 향상시켜 맞춤형 치료기술 개발에 활용할 것이며, 방사선 내성 및 항암제 내성에 대한 보다 정확한 이해로 방사선치료 증진기술 및 항암치료기술 개발에 활용함.
- 방사선 치료환자의 재발과 관련된 인자와 방사선통합 네트워크를 위한 검체 추적시스템을 개발하고, 인체 종양에서 방사선 내성 및 치료인자 작용 네트워크를 확립하는데 활용함.

## SUMMARY

### I. Project Title

Technological development of the molecular prognosis using radiation resistance factor

### II. Goal of the Project

Discovery of the new radiation resistance factors from the various model systems and their application to develop the molecular prognostic index.

- Aims at the discovery of the new radiation resistance factors from the radiation resistant cell models, radiation-induced senescent cell model, transformed cell models, animal biopsy tissues in the first step.
- Aims at the development of the tools applicable for personalized therapy using key factors, which are discovered from various cancer cells and will use both radiation resistant and prognostic evaluations in the second step.

### III. Scope and Contents of the Project

1. Establishment of the research system for the radiation resistance
2. Discovery of the radiation resistance factors
3. Extraction of radiation resistance factors and the study on the reaction mechanisms
4. Validation of the applicability of the radiation resistance factors as drug resistance factors
5. Establishment of the evaluation system for the validity of the radiation resistance factors as radiotherapy prognostic factors

### IV. Results of the Project

1. Establishment of the research system for the radiation resistance
    - (1) Two transformation cell system
    - (2) Two radioresistance cell system
    - (3) Eleven cellular senescence system
    - (4) Two carcinogenesis animal model
    - (5) Proteomics technology
    - (6) EST database research technology
    - (7) DD-PCR technology
    - (8) Secretion protein screen technology
-

2. Searching for the radiation resistance factors from the types of models
    - (1) Identified 16 radioresistance related factor using Proteomics technology in the radioresistance cell system
    - (2) Identified 7 radioresistance related factor using DD-PCR technology in the radioresistance cell system
    - (3) Identified 10 radioresistance related factor using EST database technology in the radioresistance cell system
    - (4) Identified 10 radioresistance related factor using Proteomics technology in the cellular senescence model system
    - (5) Identified 10 radioresistance related factor using EST database technology in the transformation cell system
  
  3. Elucidation of the functions of the radiation resistance factors discovered from the model systems
    - (1) radioresistance related factor: survivin, Bcl-xL, EGFR, Claudin-1, NEMO, NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, p31comet
    - (2) ROS related factor: RTP801, ATF4, mTOR
    - (3) Radiosensitive related factor: CLICK1, INPP4B, Hep16, Triad1
    - (4) Oncogene and tumor suppressor gene related factor: Plakoglobin, HDACs, Hep7
    - (5) Cellular senescence related factor: Rap2, NAMPT, SIRT1
    - (6) Establishment of 3 signal networks: p53, MAPK, Akt
  
  4. Validation of the applicability as the radiation resistance factors through the connectivity analysis of drug resistance
    - (1) Eight signaling transduction related factors in the oncogene-mediated cell transformation system
    - (2) Six drug resistant related factors in ROS resistant cell lines
    - (3) IKK and c-myc transcription factors
    - (4) Five cellular senescence related factors
    - (5) Combination effect of radiation with Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, or doxorubicin
  
  5. Obtained 300 head-and-neck cancer samples and 280 cervical cancer samples from patients for the validity of the radiation resistance factors as radiotherapy prognostic factors
-

## V. Proposal for Applications

- Application to the development of the new technology to control carcinogenesis and overcome the radiation and drug resistance
- Contribution to the domestic development of the new materials and system to control radiation resistance (acquisition of intellectual property)
- Contribution to the scientific advancement of medical life sciences and application to the development of the new therapy for other diseases
- Application as the target molecules for the development of the new therapy and radiotherapy enhancer
- Application to develop the tailored therapy through the discovery of the radiation resistance factors

CONTENTS  
(영문목차)

Chapter 1 Background and Goal of R & D .....	11
Chapter 2 Current trends in the fields .....	14
Chapter 3 Contents and Results of R & D .....	19
Chapter 4 Achievements and Contributions .....	40
Chapter 5 Future plans for application .....	48
Chapter 6 Informations obtained from overseas during the R & D .....	49
Chapter 7 Equipment for Research .....	50
Chapter 8 References .....	50

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	11
제 1 절 연구개발의 목적	
제 2 절 연구개발의 필요성	
제 3 절 연구개발의 범위	
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	14
제 1 절 연구분야 기술개발 현황	
제 2 절 국내외 대표적 연구수행 기관	
제 3 절 국내외 기술개발 현황의 위치	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
제 1 절 연구개발의 실험적 접근방법	
제 2 절 연구목표별 연구내용	
제 3 절 연구결과	
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에서의 기여도 .....	40
제 1 절 년도별 연구목표 및 달성도	
제 2 절 관련분야 기술발전에서의 기여도	
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 .....	48
제 1 절 경제적 측면	
제 2 절 사회적 측면	
제 3 절 기술적 측면	
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	49
제 7 장 연구시설 장비 현황 .....	50
제 8 장 참고문헌 .....	50

# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 목적

다양한 방사선내성 연구모델로부터 새로운 방사선 내성관련 인자를 발굴하고 이를 활용하여 방사선치료 예후평가 지표의 개발을 목표로 함. 이를 위해 1단계 연구는 방사선내성 인자발굴을 위한 모델시스템 개발과 내성인자의 유효성 검증을 하며, 2단계에서는 방사선내성 및 예후평가에 공통으로 적용되는 핵심인자를 이용하여 맞춤형치료법 적용 기술 개발을 목표로 함.

## 제 2 절. 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 가. 선진국에서의 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발은 거의 진행되지 않고 있으나, 방사선 내성 분야와 예후 평가기술 분야 자체의 연구는 활발히 진행되어 국내 수준과는 차이가 있으므로 시급히 추진되지 않을 경우 관련분야 기술을 선점당하게 됨.
- 나. 치료 시작 전 개인별 치료의 효율을 미리 평가하거나 치료 후 암의 재발이나 생존예측을 가능하게 하는 기술개발 필요성이 대두되고 있으나, 현재의 예후 평가 시스템은 임상 병리적 지표를 중심으로 이루어져 정확한 예후, 특히 방사선치료 관련 예후평가는 불가능한 상태임.
- 다. 분자생물학적 예후 평가 시스템에 대한 관심이 증가하여 예후평가에 활용할 수 있는 생물분자들이 실제로 개발되고 있으나, 이들 인자들도 전반적인 치료 예후평가에 도움을 줄 수 있을 뿐 방사선치료 예후 평가 시스템으로 이용하기에는 부적합 함.
- 라. 최근 악성종양에서 수많은 인자 (유전자, 단백질)들의 과발현, 활성화, 변형이 방사선내성과 관련성이 있다는 사실이 알려지면서 이들의 조절을 통하여 방사선치료 효율을 증진하고자하는 시도들이 부각되고 있으므로, 방사선내성 인자의 발굴을 위한 실험모델을 개발하고 이를 활용하여 발암과정, 암종의 방사선 처리 시 나타나는 방사선 내성인자를 발굴하여 새로운 분자적 진단 및 예후평가 지표로 개발하는 것이 필요함.

### 2. 경제·산업적측면

- 가. 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발 연구는 방사선치료 효율을 향상시키는 새로운 기술이므로 발굴된 내성인자에 대한 특허 등록을 통한 지적재산권 확보를 쉽게 기대할 수 있으며, 특허된 인자를 방사선 지표로 상업적 사용을 하는 경우 royalty 획득이 가능 함.
- 나. 방사선내성 인자 발굴을 통한 표적암의 치료효율을 향상시키고, 내성인자를 표적으로 하는 방사선치료 증진기술개발은 항암제와 건강보조식품 수입 대체 효과를 가져와 연구결과가 의약품 개발로 이어질 경우 비용절감 효과가 발생할 것으로 예측됨.
- 다. 방사선 치료를 위한 정확한 표적 내성인자의 발굴과 이를 이용한 방사선치료 예후평가를 통한 효율적 방사선 치료응용 기술개발은 지금까지의 방사선 치료에 투자되는 비용

절감을 유도할 수 있을 뿐 아니라 나아가서는 방사선 관련 신약개발에 기초자료로 활용되어 재투자 비용의 절감효과를 창출해 낼 수 있을 것임.

- 라. 방사선내성 인자를 이용한 종양치료제 및 예후 평가 기술의 개발은 의생명과학 분야에서 연평균 100% 이상 성장할 수 있는 고성장 지식형 산업으로서 국내 제약 회사로 기술 이전을 통해 국내 산업의 자립 성장 기반을 제공하게 되고 세계적 시장으로의 수출 가능성을 높여 국가 경제력 확보에 도움이 될 것임.

### 3. 사회·문화적측면

- 가. 방사선내성 인자를 이용한 방사선 종양치료와 방사선치료 예후 평가기술은 개인별 맞춤형 암 치료 기술 개발을 위한 토대를 제공함으로써 암과 관련된 질병의 사회문제를 해결함으로써 국민의 건강한 삶, 인류 복지, 긍정적인 사회문화 형성에 기여함.
- 나. 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발은 방사선의 의학적 적용 규명에도 사회적 관심이 고조될 것이며, 특히 인체 암종에서 방사선치료 내성인자에 대한 체계적 분석과 이를 환자의 방사선치료 예후지표로 활용하는 것은 원자력 및 방사선사용에 대한 일반인의 이해 증진을 도모할 수 있을 것이며 방사선의 평화적 이용을 확대할 수 있는 계기를 제공할 것임.
- 다. 고도의 기술 집약적 개발 분야로써 고부가가치 산업으로 발전시키기 위해 산·학·연 인적 자원을 유기적으로 연계하여 고급 인력 양성과 사회적 문제로 부각된 이공계의 일자리 창출에 효과적임.
- 라. 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발은 방사선의학을 이용하여 난치성 질병의 치료효율을 증진함으로써 신의약 개발 분야 및 방사선 관련 여타 연구 분야의 기술적 발전을 도모할 수 있는 중요한 분야로 인식되어 방사선의학의 발전방향에 대한 관심을 유도하게 될 것임.

## 제 3 절. 연구개발의 범위

### 1. 방사선내성 연구시스템 확립 및 방사선내성 인자 탐색을 위한 분석기술

- 암화유전자를 이용한 형질전환 세포주 구축
- 암 세포주 이용한 임상실험법 적용한 방사선내성 모델 구축
- 조직, 세포를 이용한 노화 모델 구축
- 암 발생 소동물 모델 구축
- Proteomics 기술 및 장비 확보
- EST database 생명정보 활용 연구기술 확보
- DD-PCR 기술 및 장비 확보
- 분비단백질 스크리닝 기술 및 장비 확보

### 2. 방사선내성 인자 대량 발굴

- 형질전환 세포주의 유전자 분석 이용 인자 발굴
- 임상실험법 적용한 방사선내성 세포주의 Proteomics 기술 이용 인자 발굴
- 세포노화 모델로부터 Proteomics 기술 이용 인자 발굴

- 두경부암 조직의 EST DB 유전자 분석 기술 이용 인자 발굴
  - 폐암내성 세포주의 DD-PCR 이용 인자 발굴
3. 방사선내성 인자 작용기전 규명 및 네트워크 구축
- 방사선내성 조절 인자 (survivin, Bcl-xL, EGFR, Claudin-1, NEMO, NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, p31comet)의 세포내 기능 검증과 기전 규명
  - 활성산소 조절 인자 (RTP801, ATF4, mTOR)의 세포내 기능 검증과 기전 규명
  - 방사선민감화 인자 (CLICK1, INPP4B, Hep16, Triad1)의 세포내 기능 검증과 기전 규명
  - 발암/발암억제 유전자 (Plakoglobin, HDACs, Hep7)의 세포내 기능 검증과 기전 규명
  - 세포노화 조절 유전자 (Rap2, NAMPT, SIRT1)의 세포내 기능 검증과 기전 규명
  - 방사선내성 조절 인자 상호간의 네트워크를 p53, MAPK, Akt 3개 그룹 중심으로 구축
4. 방사선내성과 항암제 저항성과의 상관성 탐색 및 상호활용성 검증
- 발암과정에서 방사선내성 및 항암제 저항성 형질 상호관련성 규명
  - 세포노화 과정에서 발현 조절되는 방사선내성 및 항암제 저항성 형질 상호관련성 규명
  - 방사선 내성 모델에서 방사선 내성인자의 항암제 저항성 인자로서의 활용성 검증
  - 방사선내성 치료조절 물질 (Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, doxorubicin)의 활용성 검증
5. 방사선 내성인자의 예후지표로서의 유효성 평가 시스템 구축
- 방사선 내성인자의 발현 및 활성 유형 분석
  - 방사선 내성인자 상호작용 네트워크 조절에 따른 치료예후 개선효과 검증
  - 내성 인자의 예후평가 지표로서의 유효성 탐색
  - 방사선 치료 주 대상암에서 방사선 및 항암제치료 환자의 조직 확보
  - 생쥐의 유방암 및 자궁경부암 발암모델에서 방사선 및 항암처리 후 생검 검체 수집

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 연구분야 기술개발 현황

#### 1. 내재적 형질의 연구를 통한 방사선 기술개발 현황

- 가. 미국 매사추세츠대학 병원의 David J. Chen 교수그룹이 단일방사선 조사와 분할방사선 조사 연구에서 암세포의 암화과정에서 획득한 내재적 (intrinsic) 방사선 저항성 인자가 방사선 치료에 대한 종양세포 반응의 주요한 척도임을 밝혔음 (1). 따라서 내재적인 방사선 저항성 관련 인자에 관한 연구가 암치료에 필수적인 요소라고 주장함.
- 나. Johns Hopkins의 Vogelstein 그룹이 위장관의 세포암화 모델을 제시하였고 다수의 유전자들의 이상 발현, 활성화 및 변형이 수반된다는 사실을 밝혔으며, Whitehead Institute for Biomedical Research의 Weinberg RA 그룹이 사람 세포와 쥐 세포의 암화과정에서 세포암화 조건이 차별화되어 있음을 보고하였으며, 뉴욕 주립대의 Bar-Sagi D 그룹이 암화유전자에 의한 세포형질전환 과정에 Raf-1, PI3K, MAPK 등의 하위 신호전달인자들의 관련성을 보고하였으나 방사선내성 연구 또는 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후 평가기술 개발 연구와는 무관함 (2).

#### 2. 획득 형질의 연구를 통한 방사선 기술개발 현황

- 가. 방사선치료 후에 나타나는 획득(acquired)내성은 방사선치료 효율을 감소시키는 심각한 장애로 남아있으며 이를 극복하는 것은 radiation oncology 분야에서 가장 중요한 문제로 남아 있음. 그러므로 암세포의 획득 방사선 내성을 연구하기 위하여 많은 연구 그룹에서 방사선 내성 연구 시스템을 구축하고 있음
- 나. *In vitro*에서 일정 dose의 방사선을 반복적으로 조사하여 방사선 내성세포주를 구축하여 방사선 민감성 세포주와의 차이를 관찰하는데 많은 노력을 하고 있음 (3, 4). *in vitro*에서 암세포가 단세포로 존재하는 환경과 조직내에서 조직화되어 있는 환경에서의 암세포는 각각 다르게 방사선에 반응하므로 쥐에 xenograft를 한 이후 방사선을 반복적으로 조사하여 *in vivo*에서 방사선 내성 암세포를 구축하는 연구시스템을 활용하고 있음 (5).
- 다. 방사선에 대한 획득 내성의 기전은 주로 방사선 조사 후 유도되는 돌연변이 때문인 것으로 생각되었으나 일반적으로 그 역할은 중요하지 않은 것으로 간주되고 있음 (6). 오히려 방사선 저항성은 방사선 조사 후 유전인자의 발현변화에 기인하는 것이 대부분이며 EGFR, Glut-1, peroxiredoxin II, Rad51, TLK1B, Bcl-2, survivin, ku80, superoxide dismutase, cyclooxygenase (Pubmed 분석자료 의거) 등의 유전인자들의 과발현이 방사선 내성에 관련되는 것으로 보고되었으며 많은 연구자들이 이에 관련된 유전인자들을 계속해서 발굴하고 있는 실정임.

#### 3. 전사인자 조절 연구를 통한 방사선 기술개발 현황

- 가. 유전인자들의 과발현은 전사인자의 활성화와 유전인자들의 프로모터간의 상호작용으로 인하여 발생하는 일이므로 방사선 조사 후 전사인자의 활성화 및 프로모터와의 상호 작

동원리를 연구하는 것은 매우 필수적인 일이라 할 수 있음.

나. 현재 방사선 저항성에 가장 중요한 원인중의 하나인 NFkB 전사인자의 활성화는 방사선 치료시 가장 큰 문제로 인식되고 있으며 현재 NFkB의 억제제와 같이 복합치료를 하려는 시도가 세계적으로 추진되고 있는 실정임. 이외에도 현재 HIF-1alpha, STAT-1, -3, HSF-1 등의 전사인자가 방사선 내성에 관련되어 있음이 보고되어 있음.

#### 4. 방사선내성과 항암제 저항성의 상관관계 연구를 통한 방사선 기술개발 현황

가. 종양의 항암제 저항성은 drug uptake의 감소와 DNA repair의 증가에 기인하며, 방사선 내성은 radiotherapy후에 regression rate와는 독립적으로 방사선이 조사된 부위 내에서 다시 자라는 종양의 특성에 의해 생기게 되며 이러한 내성은 서로 cross-resistance (교차 내성)를 갖는다.

나. 방사성 내성은 크게 다음과 같은 네가지 요인에 의한다고 알려져 있는데, tumor-related factor, host-related factor, technical factor와 내성을 가질 확률 등이다. 이 중에서 tumor-related factor는 항암제 저항성과 방사선내성에 모두 관여한다고 알려져 있음 (7).

다. 최근 Christopher Haslett 그룹, Tashiro S. 그룹, Kamen B. 그룹에 의하여 조직내 종양이 진행됨에 따라 세포의 유전적 불안정성이 증가하며 결과적으로 세포의 heterogeneity가 증가되고, 이러한 변화는 궁극적으로 종양의 항암제 저항성과 관여한다는 사실을 보고함 (8, 9).

#### 5. 세포노화 조절 연구를 통한 방사선 기술개발 현황

가. 방사선에 의한 세포 노화 기전 연구 특히, 방사선 치료 시 효율 증진을 위한 세포 노화 기전 연구는 이제 막 시작된 단계임. 세계적으로 현재까지 많은 연구 실적이 보고 되지는 않았으며 독일의 Abend 그룹은 방사선에 의한 세포 사멸 (apoptosis)이 미비한 세포의 경우 다른 기전에 의한 세포 사 (cell death)나 노화가 고려되어야한다고 제시함 (10).

나. 캐나다의 Murray 그룹은 방사선에 의한 세포 노화의 유도를 2005년에 보고 하였고 (11), 미국의 Gewirtz 그룹은 방사선에 의한 종양세포의 노화와 p53과의 관련성을 보고하였으며 (12), 독일의 Schmidberger 그룹은 방사선 유도 clonogenic cell death와 노화와의 관련성을 보고하였음 (13).

## 제 2 절. 국내외 대표적 연구수행 기관

### 1. 국외 연구수행 기관

- 암 특이적 다양한 분자표적 발굴은 세계적으로 경쟁력이 무한한 분야이며, 특히, 원천 기술을 가진 앰나일래와 같은 회사들은 Astra Zeneca, 로슈, 화이자의 거대 제약사와 협력하여 상품 출시를 위해 끊임없이 연구 중에 있음.
- DNA Chip, proteomics, metabolomics 기법의 기술적 성숙으로 방사선에 의한 손상 평가 및 진단, 예후 측정, 바이오마커 활용 기술 개발에 접목하려는 시도가 BioTech 회사 및 제약회사를 중심으로 개발이 활발함.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 매사추세츠대학 병원의 David J. Chen 교수그룹	단일방사선과 분할방사선 조사 연구에서 내재적 방사선 저항성 인자가 방사선 치료에 대한 종양세포 반응의 주요한 척도임을 밝혔음	내재적인 방사선 저항성 관련 인자에 관한 연구가 암치료에 필수
캘리포니아대학 Robert C. Rickert 교수그룹	방사선 내성세포주를 구축하여 방사선 민감성 세포주와의 차이를 관찰하는데 많은 노력을 하고 있음	xenograft를 이용한 <i>in vivo</i> 방사선 내성 암세포를 구축하는 연구시스템 활용
캐나다 오타와대학 의과대학 Hoyun Lee 교수그룹	방사선에 대한 획득 내성의 기전은 주로 방사선 조사 후 유도되는 돌연변이로 추정	돌연변이의 역할보다는 인자의 발현변화가 주요원인으로 추정
호주 시드니대학 의과대학 Ian Olver 교수그룹	항암제 내성과 방사선내성의 상관관계규명	항암제내성과 방사선내성 인자의 교차내성 연구 활용
Sloan-Kettering Institute, Harvard Medical School	프로티오믹스 기술을 이용하여 암세포 특이적인 Hsp90 신호전달 네트워크를 구성 함.	2011년 9월 Nature 자매지에 논문게재 및 학술자료로 활용됨.
영국 에디버르그대학 의과대학 Christopher Haslett 교수그룹	세포의 유전적 불안정성에 의한 heterogeneity가 종양의 내성과 관여함을 연구	세포주기와 유전자의 기능조절 활용
독일 몬스터대학 의과대학 Abend Schuck 교수그룹	방사선에 의한 세포저항성은 세포노화와의 관련성 연구	캐나다의 Murray, 미국의 Gewirtz, 독일의 Schmidberger 연구그룹의 후속연구가 수행됨
University of Manchester	Radiogenomics Consortium*을 설립하여 표준 방사선치료에 대한 환자의 반응 예측과 정상세포 부작용에 대한 기작을 연구함. 10000명의 cohort 연구와 200/200 case/control 디자인으로 연구를 진행 중임	영국의 RAPPER, 미국의 GenePARE, 일본의 RadGenmoics 등 15개국, 90여 명의 연구자가 컨소시엄의 멤버로 구성된 ongoing project 임.

## 2. 국내 연구수행 기관

- 방사선치료의 기초연구는 작용기전과 관련된 신호전달이나 생명정보를 생산하는 것에 집중되어 있으며, 실제 임상에 적용할 수 있는 분야에 대한 투자가 미흡한 상황임.
- 유전체 및 단백질 연구를 진행하고 있으나 상용화 단계에는 아직 이르지 못함.
- 유전자를 이용한 분자진단을 시행하고 있으나 알려진 유전자들을 이용하거나 다국적

진단회사의 원천기술을 이용하므로 독자적인 바이오마커 확보가 필수적인 상황임.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
한양대학교 이수재 교수 연구그룹	방사선치료 효율증진을 위한 저항성, 민감성 조절물질 개발	Phytosphingosinedml 방사선 병용 처리효과 검증
제주대학교 현진원 교수 연구그룹	암세포의 방사선치료와 항암제의 병용처리에 의한 치료효율 검증연구	사람의 자궁경부암 세포에 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol의 응용 연구 활용
인하대학교 의과대학 이석호, 김현정 교수 연구그룹	방사선 단독 및 병용처리시 민감제로서의 효능물질 기능 규명 연구	사람의 자궁경부암 세포에 cisplatin의 응용연구 활용
동아대학교 의과대학 정민호 교수 연구그룹	방사선 민감성 변화에 미치는 인자들의 신호전달 기전 규명	백혈병 세포의 방사선 감수성 연구 활용
서울대학교 치과대학 유동수 교수 연구그룹	세포염증에 대한 방사선의 영향 연구	치주질환, 골육종암, 골다공증 치료에 미치는 방사선 영향연구
울산대학교 의과대학 이상욱 교수 연구그룹	방사선치료로 인해 발생하는 부작용 치료물질의 개선효과 연구	후두암 치료후 통증에 대한 물질개선 효과
한국원자력의학원 황상구 박사 연구그룹	방사선내성인자의 대량 탐색 및 기능연구	환자의 치료 예후예측 알고리즘 개발 활용예정
연세대학교 의과대학 성진실 교수 연구그룹	방사선 감수성 조절단백질의 분석과 기능연구	마우스 정상조직을 이용한 프로테오믹스 분석기법 활용

### 제 3 절. 국내외 기술개발 현황의 위치

국내외 기술개발 현황과 연구 수행 전 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 선진국에서의 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 수준은 방사선의학 관련 타 분야의 다양한 시도와는 달리 거의 진행되지 않고 있고 부분적으로 신호전달체계 규명 정도의 연구에만 치우쳐 있어 아직까지 연구결과에 대한 활용성이 낮아 개념 정립단계를 벗어나지 못하고 있음</li> <li>• 방사선치료에 대한 예후 평가 기술 분야는 환자의 병리적인 상태와 종양의 외부환경을 고려한 단순한 분류정도에 지나지 않고 있고 종양 자체의 방사선 내성 정도를 고려한 생물학적, 분자적 방사선치료예후 평가기술은 거의 시도되고 있지 않음. 방사선 내성인자 활용을 통한 방사선치료 예후평가기술 개발 연구는 선진국에서도 아직까지 체계적으로 수행된 바 없어 국내 기술과 선진국 기술 간의 격차가 심하지 않음.</li> <li>• 선진국의 경우 방사선 내성 분야나 예후 평가기술 부분 자체의 연구는 상술한 예와 같이 이미 활발히 진행되어 국내연구 수준과의 격차가 큰 만큼 조만간 방사선 내성인자 활용을</li> </ul>

통한 방사선치료 예후평가기술 개발 연구가 진행되어질 가능성이 있음.

- 특히 분자적 예후평가 (Molecular prognosis) 관련 연구는 세계적으로 왕성하게 진행되고 있어 조만간 방사선 내성인자를 활용한 방사선치료 예후 평가기술 연구 분야로 확대될 가능성이 높음.

#### 국내의 기술개발 현황과 연구 수행 후 국내의 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- 방사선내성 세포모델, 형질전환 세포모델을 이용하여 방사선내성 관련 인자를 발굴하고, 기능을 검증하였음. 이를 새로운 분자적 진단 및 예후평가 지표로 개발하여 맞춤치료법 적용기술 개발에 활용하고자 하는 다양한 수준에서의 독창성 있는 연구를 선점할 수 있는 계기를 마련하였음.
- 방사선 노화모델을 이용하여 방사선 내성과 노화와의 상관관계를 규명하였고 이를 통한 방사선 내성 극복 방안은 방사선에 의한 세포 증식 억제의 새로운 기전을 제공, 임상에서의 활용 가능성을 높이며, 방사선 치료 예후 평가에도 이용 가능한 타겟 분자의 발굴에 다가서는 계기가 되었음.
- 세포의 압화, 방사선 내성 및 항암제 저항성 조절에 대한 독창성 있는 연구를 수행하여 내성형질의 본질을 파악하고 있으며, 이를 활용한 방사선치료 예후 평가기술 및 예후 개선 기술, 방사선내성 제어기술 등을 개발한다면 관련분야 기술을 선점할 수 있는 계기를 마련 됨.
- 선진국과 상당한 차이를 보이고 있는 방사선 내성 분야와 예후 평가기술 부분 자체의 국내 기술수준 향상 효과를 가져와 현재의 기술격차를 현저히 줄일 수 있었음.

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 연구개발의 실험적 접근방법

#### 1. 년차별 추진전략

- 1차년도에는 방사선 내성인자 발굴을 위한 여러 가지 동물, 조직, 세포를 이용한 모델을 개발하고 시스템을 확립하는데 중점적으로 계획을 추진하였으며, 이와 더불어 방사선 내성 인자의 후보물질 대량 검출을 위해 DNA, RNA, 단백질의 다양한 분석 기법의 기술을 확립하고 기반 장비 및 시설을 갖추는데 역량을 집중하였음.
- 2차년도에는 확립된 모델시스템을 이용하여 다양한 분석 기법으로 방사선 내성인자를 집중적으로 탐색하였음. 특히 발굴된 인자의 기능을 *in vivo*, *in vitro*에서 우선 검증하고 유효성이 밝혀진 인자를 우선으로 항암제 내성과의 상관성을 규명하는데 중점적으로 계획을 추진하였음. 문헌 고찰로 이미 밝혀진 항생제 내성 인자를 이용하여 확립된 모델 시스템에서의 방사선 내성과의 상호관련성을 규명하고 이들 상호간의 교차 활용도를 규명하는데 역량을 집중하였음.
- 3-4차년도에는 유형별로 탐색된 내성인자의 기능을 우선 검증하고, 인자로서의 효율성을 세포 내 기전조절 규명을 통해 과학적으로 확립함. 인자들의 역할을 넓은 범위로 재조명하고 효율적인 제어 및 극복방안을 강구하기 위해서 신호전달의 네트워크를 확립하여 시스템화된 체계를 갖추기 위해 집중적인 연구역량을 할애하였음.
- 암조직 또는 세포로부터 방사선내성 조절 선도인자를 선별하여 암환자 방사선치료 예후를 평가하는 기술을 개발하고자 함. 특히, 방사선치료 예후평가를 위한 기초적인 알고리즘 구축을 위해 핵심유전자와 인터랙툼 유전자의 탐색을 수행하고 평가의 다변화에 신뢰성을 확보하도록 연구를 수행함.

#### 2. 참여연구자별 추진전략

- 참여 연구원은 각자의 전공과 관심도에 따라 방사선 내성인자 탐색을 위한 동물, 조직, 세포 수준의 연구모델을 개발하였으며, 이는 상호간의 공동적 연구를 위해 공유되도록 함.
- 참여 연구원은 확립된 모델을 통해 내성인자의 대량 탐색을 위한 실험기법을 확보하고 장비구비를 완료하도록 함.
- 방사선내성 인자의 탐색은 참여 연구원의 관심도에 따라 내재적, 외재적, 교차 내성인자로의 가능성을 우선으로 발굴하고, 발굴된 인자들은 전공관련 주제별로 전사인자, 노화인자, 세포접착 관련인자, 저산소 관련인자, 암화관련 인자 등등으로 분류하도록 함.
- 기능과 세포내 역할이 확립된 인자는 모델별, 분야별 상호 교차검증을 위해 공유되었으며 주기적인 세미나 개최를 통해서 연구의 관심도를 확보함. 특히, *in vitro*, 동물실험, 임상검체의 종합적인 연구결과를 도출하고 분석하기 위하여 단계별 전문적 분업을 완성하고 전문 분야별 토론을 위한 기회를 주기적으로 가짐.

### 3. 연구방법

#### 가. 생쥐 발암모델 및 세포형질전환모델 구축

- 6주령 암컷 Rat에 15mg/ml의 DMBA를 구강 투여한다. DMBA 투여 후 10주 이상 관찰하여 breast 부위에 암이 생긴 것을 확인하여 생쥐 발암모델을 확립함.
- retroviral 발현시스템을 이용하여 유전자가 발현되는 세포만을 분리한 후 soft agar plate에서 anchorage-비의존적인 성장을 통한 세포 형질전환 기능의 획득 여부를 확인하여 모델을 확립함.

#### 나. 방사선 내성 및 세포노화 모델 구축

- 각종 암 세포주를 배양한 후 1회에 2 Gy의 ionizing radiation을 1주일에 2번의 주기로 6개월간 조사한다. 세포를 96 well plate에 희석하여 방사선 저항성을 획득한 단일 clone들을 분리한다. 세포를 계속해서 계대 배양하여 방사선저항성 세포 모델로 구축한다.
- 암세포 계대배양 및 소동물의 정상조직을 채취하여 실험실에서 일차배양하며 방사선을 농도별로 조사한 후 시간에 따른 방사선 노화모델을 검증하여 확립함.

#### 다. 방사선내성 인자발굴을 위한 기술확립

- proteomics 기법, EST database, DDRT-PCR 및 다양한 생화학적 방법을 이용하여 단백질 이상발현 차이를 정상 조직과 비교하여 조사 한 후 차이가 있는 인자는 배양세포에 이식하고 과발현 및 발현억제 상태에서 방사선 내성 정도를 관찰하여 발굴인자의 방사선 내성 관련성 유무를 판별한다.
- Proteomics 기법: 단백질의 대량 탐색 및 구조/기능의 규명을 하기 위해 high throughput 기술이 요구되는 바 최근 개발된 2차 전기영동 기술과 MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption /ionization time of flight mass spectrometry)등 질량분석기를 조합한 proteomics 기술을 확립하고 실험을 위한 기반을 구축함.
- EST database 기법: 1) Unigene Library를 이용한 unknown gene 동정 : public database 중의 하나인 Unigene library의 유방암 및 후두암 EST database를 각각 분석함. 2) 동정된 유전자의 선별 : 대량의 동정된 유전자를 바탕으로 각각 유전자의 sequence clusters를 이용하여 유전자의 구조, 발현조직 및 모델 개체간의 유사성 등을 비교하여 유전자로서 기능할 EST 자료를 모음. 3) *In silico*를 이용한 방사선저항성 유전자 동정을 위한 유전자의 발현양상 유추는 SAGE virtual northern (<http://cgap.nci.nih.gov>)를 이용하며, 유전자 기능에 대한 예측은 Conserved Domain Database (CDD, SMART, PFAM)등 각종 bioinformatic tool을 이용함.

#### 라. 생쥐 발암 생검조직 확보 및 생검 검체의 관리 시스템 확립

- 소동물모델의 생검 조직을 확보한 후 방사선치료 성적에 따라 분류하고 파라핀 블록을 제작한다. 위의 각 연구 수행으로 도출된 후보인자의 방사선 내성 정도에 따른 발현 양상을 비교하여 방사선 치료예측인자로서 활용 가능성을 평가한다.
- 동물 방사선 조사기로 방사선치료 protocol에 따라 Rat의 종양 부위에 방사선을 조사하여

종양의 regression 정도를 살핀 후 방사선 치료성적과 발굴된 방사선 내성 후보인자들의 발현 정도와의 상관성을 동물 모델차원에서 판명한다.

마. DNA plasmid 구축

- 확보된 방사선저항 및 민감성관련 유전자를 pcDNA-myc/his vector에 클로닝함. cloning 후 유전자를 sequencing하여 확인함. 그 후 클로닝된 유전자를 세포에 transfection 후 24시간 후 이들 유전자의 발현양상을 전기영동을 이용하여 검증함.

바. siRNA 실험

- 확보된 방사선저항 및 민감성관련 유전자의 mRNA sequence를 이용하여 siRNA design tool 등(<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>)을 이용하여 유전자 발현 억제가 가능한 mRNA상의 candidate sequence를 확보 후 이들을 합성함.
- 합성된 유전자를 siRNA transfection reagent를 이용하여 세포주에 배양 후 특정 단백질의 knock-down유무를 48시간 후 전기영동을 이용하여 검증함.

## 제 2 절. 연구목표별 연구내용

세부연구목표	주요연구내용
방사선내성 연구시스템 확립 및 방사선내성 인자 탐색을 위한 분석기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 암화유전자를 이용한 형질전환 세포주 구축</li> <li>• 암 세포주 이용한 임상실험법 적용한 방사선내성 모델 구축</li> <li>• 조직, 세포를 이용한 노화 모델 구축</li> <li>• 암 발생 소동물 모델 구축</li> <li>• Proteomics 기술 및 장비 확보</li> <li>• EST database 생명정보 활용 연구기술 확보</li> <li>• DD-PCR 기술 및 장비 확보</li> <li>• 분비단백질 스크리닝 기술 및 장비 확보</li> </ul>
방사선내성 인자 대량 발굴	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 형질전환 세포주의 유전자 분석 이용 인자 발굴</li> <li>• 임상실험법 적용한 방사선내성 세포주의 Proteomics 기술 이용 인자 발굴</li> <li>• 세포노화 모델로부터 Proteomics 기술 이용 인자 발굴</li> <li>• 두경부암 조직의 EST DB 유전자 분석 기술 이용 인자 발굴</li> <li>• 폐암내성 세포주의 DD-PCR 이용 인자 발굴</li> </ul>
방사선내성 인자 작용기전 규명 및 네트워크 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 방사선내성 조절 인자 (survivin, Bcl-xL, EGFR, Claudin-1, NEMO, NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, p31comet)의 세포내 기능 검증과 기전 규명</li> <li>• 활성산소 조절 인자 (RTP801, ATF4, mTOR)의 세포내 기능 검증과 기전 규명</li> <li>• 방사선민감화 인자 (CLICK1, INPP4B, Hep16, Triad1)의 세포내</li> </ul>

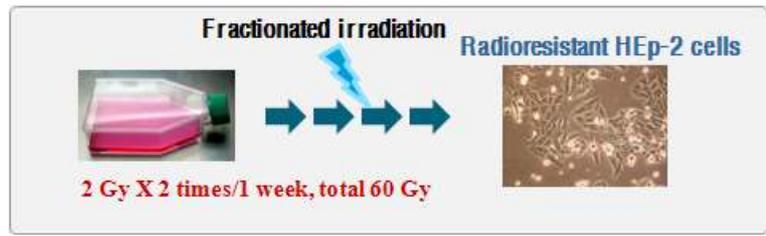
	<p>기능 검증과 기전 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 발암/발암억제 유전자 (Plakoglobin, HDACs, Hep7)의 세포내 기능 검증과 기전 규명</li> <li>• 세포노화 조절 유전자 (Rap2, NAMPT, SIRT1)의 세포내 기능 검증과 기전 규명</li> <li>• 방사선내성 조절 인자 상호간의 네트워크를 p53, MAPK, Akt 3개 그룹 중심으로 구축</li> </ul>
방사선내성과 항암제 내성과의 상관성 탐색과 상호 활용성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발암과정에서 방사선내성 및 항암제 저항성 형질 상호관련성 규명</li> <li>• 세포노화 과정에서 발현 조절되는 방사선내성 및 항암제 저항성 형질 상호관련성 규명</li> <li>• 방사선 내성 모델에서 방사선 내성인자의 항암제 저항성 인자로의 활용성 검증</li> <li>• 방사선내성 치료조질 물질 (Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, doxorubicin)의 활용성 검증</li> </ul>
방사선내성 인자의 예후지표로서의 유효성 평가 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 방사선 내성인자의 발현 및 활성 유형 분석</li> <li>• 방사선 내성인자 상호작용 네트워크 조절에 따른 치료예후 개선효과 검증</li> <li>• 내성 인자의 예후평가 지표로서의 유효성 탐색</li> <li>• 방사선 치료 주 대상암에서 방사선 및 항암제치료 환자의 조직 확보</li> <li>• 생쥐의 유방암 및 자궁경부암 발암모델에서 방사선 및 항암처리 후 생검 검체 수집</li> </ul>

### 제 3 절. 연구결과

#### 1. 유형별 방사선내성 연구시스템 구축

가. 임상실험법을 적용한 방사선내성 세포주 구축

- 후두암 세포주인 Hep-2, 자궁경부암 세포주인 HeLa, 폐암세포주인 H460에 1회 조사량은 2Gy이며 1주일에 2번을 조사함. 총량이 60 Gy 이상이 될 때까지 반복적인 방사선 조사 프로그램에 따라 방사선을 조사한 후 clonogenic assay와 세포염색법으로 방사선내성 세포주로서 구비하여야 할 특성을 검증하였음.

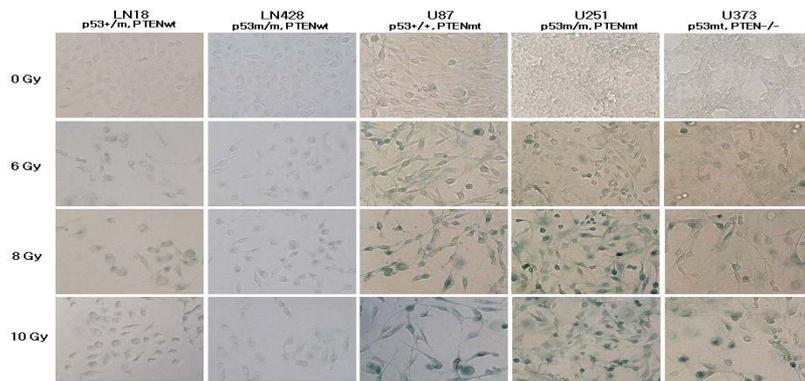


나. 활성산소 내성 세포주 구축

- 다수의 항암제는 활성세포를 발생함으로써 항암작용을 나타내므로 활성산소 중 하나인 과산화수소를 자궁경부암 세포주인 HeLa에 반복적으로 투여하여 활성산소 내성을 가지는 세포주를 확립하고 검증하였음.

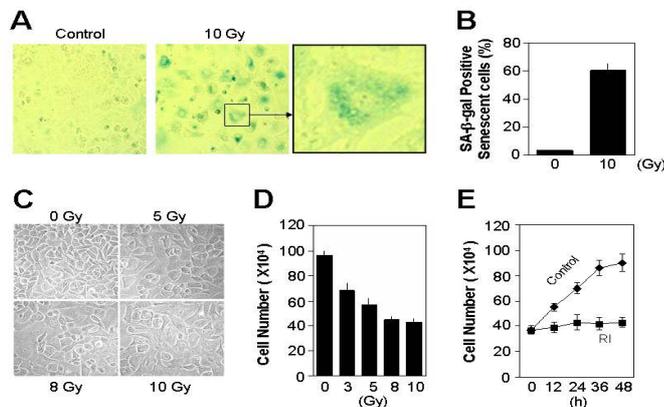
다. 암세포 수준의 방사선유도 세포노화 시스템 확립

- 유방암 (MCF7), 폐암 (H460), 대장암 (HCT116), 자궁암 세포주 (HeLa, SiHa), 신경교종 세포주 (U373, U87, LN18, LN428) 등 9종의 고행암 세포주에서 방사선 유도 세포노화 여부 분석. MCF7, H460, HCT116, HeLa, SiHa, U373, U87 에서 방사선 유도 종양 세포노화 시스템으로 확립. LN428, LN18은 방사선 유도 노화 저항성을 가지고 있음이 분석됨. 세포 노화여부를 세포 형태변화 관찰, 세포집락형성 분석, 세포주기 분석, 유전적 불안정성 획득 여부, 세포노화-관련 베타갈락토시다아제 분석법 등의 다양한 분석법을 이용하여 분석함.

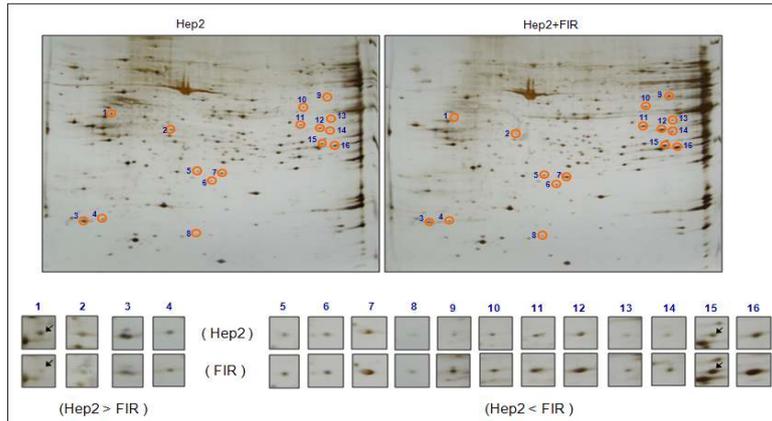


라. 정상조직 수준의 방사선유도 세포노화 시스템 확립

- 토끼의 정상 연골조직으로부터 분리한 연골세포를 일차배양하고 방사선을 조사하면 세포의 크기가 커지며, 세포노화의 지표인 베타 갈락토시다아제의 활성이 증가함을 관찰하였음.
- 방사선에 조사된 세포는 증식이 멈추고 이는 세포주기의 S기가 없어지고 G2기가 증가하여 나타나는 현상을 관찰하였음.







나. 자궁경부암 방사선내성 세포주에서 DD-PCR 기법을 이용한 인자 발굴

- 확립된 방사선내성 HeLa 세포모델을 대상으로 DD-PCR 방법으로 모세포주와 방사선내성 세포주에서 서로 발현이 상이한 방사선 내성 유전자를 7종 발굴하였음. 이 중에서 4개 유전자는 방사선 내성 세포주에서 높게 발현하였으며 3종은 모세포주에서 높게 발현하였음.

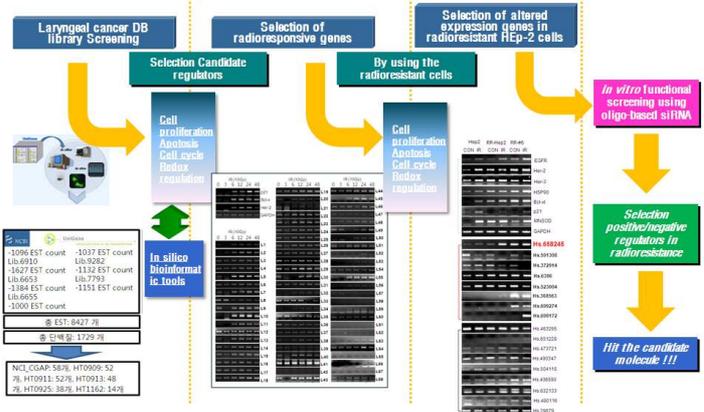
다. 활성산소 저항성 세포주에서의 DD-PCR 기법을 이용한 인자 발굴

- 확립된 활성산소 내성 세포주와 모세포주에서 mRNA를 추출하여 DD-PCR 방법을 수행한 결과 6종의 활성산소 내성유전자 6종을 발굴함. 이중 2종의 유전인자는 활성산소 내성 세포주에서 발현이 높게 나타났으며 4종의 유전인자는 모세포에서 높게 발현하였음. 발굴된 방사선 내성인자와 활성산소 내성인자 중 일치하는 유전자가 1종 발굴되었음. 이 유전인자는 방사선 내성과 항암제 내성의 교차내성인자일 가능성이 있을 것으로 추정되어 국내 특허 출원 되었음.

라. 폐암 및 후두암 세포주 library를 이용한 방사선내성 인자 발굴

- Laryngeal cancer library 7개를 이용하여 총 8427개의 EST를 분석하였고 1차적으로 정상 세포에 비해 암세포에서 많은 양적인 변화를 보일 것으로 예상하는 262개 분자를 선별하였음. 이 중에서 기능 및 연구 가능성을 고려하여 최종 68개의 유전자후보군을 확정하였음. 68개 유전자 primer를 자체 제작하여 Real-time PCR 기법으로 radiation에 반응하는 유전자 11개를 최종 확인하였음. 3개는 방사선 처리 전에 비해서 처리 후 발현양이 감소하였으며, 8개는 발현양이 증가하는 경향을 보였음. 동일한 방법으로 폐암 세포의 EST data base를 이용한 방사선치료조절 인자 후보군 49종을 확보하여 종합 117종의 후보군을 확보하고 이들의 RNA 수준을 검증하기 위

### Identification of radioresistance-related candidate genes from laryngeal EST DB



한 primary 은행을 구축함.

마. 종양 노화세포주에서 proteomics 기법을 이용한 인자 발굴

- Proteomics 기법을 이용한 방사선 유도 종양세포의 노화 관련 단백질 프로파일 확립: Proteomics 기법을 이용한 방사선-유도 노화 종양세포의 분비 단백질을 분석하였음. 노화된 종양세포의 배지를 수확하여 2차원 전기영동을 수행 분비단백질의 전기영동 양상이 노화과정에 의해 변화됨을 확인하고 이를 MalDI-TOF를 이용해 분석하여 노화과정에 의해 분비되는 새로운 단백질을 발굴하였음.

**Table 1.** List of identified IR-induced secreted proteins from MCF 7 cells by MALDI-TOF

Spot no.	Acc. number	pI	MW (kDa)	Cov (%)	Matched Peptides	Protein	
154	CAD38868.1	8.85	70652	24	12	Hypothetical protein	Paing
164	EAW74372.1	9.3	75762	32	10	FLJ16331 protein	Paing
167	EAW59833.1	5.75	62176	27	12	Neurofibromin 2	Paing
191	EAX07594.1	6.77	112465	19	18	Brain-specific angiogenesis inhibitor 2	Paing
215	AAH12933.1	10.27	147274	24	21	KIAA1683 protein	Paing
258	DAA00367.1	9.14	66087	27	10	TPA	Paing
142	NP_051381.2					Heat shock 90 protein 1	Paing
331	BAD96237.1	7.01	47111	50	19	Enolase 1 variant	Paing
339	3B97_A	6.99	47008	45	16	Chain A, Crystal structure of human enolase 1	Paing
387	AAW73223.1	6.32	21082	54	7	MHC class I antigen	Paing
390	NP_620059.1	5.55	51505	33	14	Mirror-image polydactyly 1	Paing
420	BAA78718.1	4.95	451560	9	25	Centrosome- and Golgi-localized PKC-associated protein	Paing
493	751846A	6.56	8446	63	6	Ubiquitin	Paing
519	NP_116093.1		50548		18	Tubulin alpha 6	Paing
528	EAW37333.1	9.23	61929	25	11	MAP microtubule affinity-regulating kinase 4	Paing
584	NP_002558.1	7.01	21044	64	10	Eukaryotic Raf kinase inhibitor protein	Paing
651	AAA62175.1	7.83	22313	48	12	Heat shock protein 27	Paing
660	NP_002620.1	6.67	28786	55	15	Phosphoglycerate mutase 1	Paing

바. 방사선 반응성 및 노화연관 유전자발현 프로파일 분석

- 방사선치료 효율증진을 위한 원천연구로 방사선에 대한 암세포주의 반응성 분석이 중요함. 이와 함께 방사선에 의해 암세포주는 장기적 반응으로 세포노화 기전을 수행하는 것이 알려져 있으나 방사선 유도 노화에 연관되는 유전자발현에 대한 분석결과가 세계적으로 미미함. 따라서 방사선에 대한 장기간의 유전자발현변화를 분석하고 이들 중 노화연관 유전자발현의 변화경로의 프로파일을 규명하였음.
- 방사선 조사 후 유방암 세포주 MCF7의 노화를 조건에서 다양한 노화지표로 분석하여 노화가 완성되는 시간대를 확인함. 방사선 조사 후 노화 완성이까지 일별로 MCF7 세포주를 수집하여 마이크로어레이 수행
- 생물정보학적 분석을 이용하여 방사선 단기반응성 유전자와 장기반응성 (노화연관) 유전자의 프로파일을 확보하고 노화연관 주요 유전자발현 변화기전관련 세포주기 및 세포증식 관련 유전자군과 세포골격관련 유전자 군 등의 프로파일을 규명함

List of genes encoding proteins involved in the cell cycle and cell proliferation

illumina ID	Symbol	FDR	r	0hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Role	Gene name
ILMN_19223	CDCM1	2.51E-05	0.95						Suppression	Cell adhesion molecule 7
ILMN_27003	CDK7	5.48E-06	0.94						Proliferation	Cyclin-dependent kinase 7
ILMN_20700	DUSP1	1.15E-07	0.95						Suppression	Dual specificity phosphatase 1
ILMN_22200	SH3P1	9.85E-06	0.91						Suppression	SH3 and SH3 domain containing 1
ILMN_18038	BTG1	2.88E-06	0.94						G0/G1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
ILMN_17355	GADD45A	1.91E-06	0.91						G2/M	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
ILMN_5948	PLK2	3.95E-05	0.91						Regulation	Polo-like kinase 2 (Drosophila)
ILMN_12370	SFN	9.27E-07	-0.92						G2/M	Stratfin
ILMN_8393	FOXM1	2.07E-07	-0.91						G2	Forhead box M1
ILMN_14702	CKS2	2.91E-08	-0.92						Regulation	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
ILMN_2618	POLD1	4.89E-06	-0.90						S	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 129/Delta
ILMN_27253	CCNF	9.79E-07	-0.90						G2/M	Cyclin F
ILMN_24237	HCFP1	6.02E-07	-0.92						Proliferation	Host cell factor C1 (H16-accessory protein)
ILMN_21399	TIMELESS3	7.27E-07	-0.93						S	Timeless homolog (Drosophila)
ILMN_18431	FOLE	9.95E-09	-0.93						S	Polymerase (DNA directed), epsilon
ILMN_18730	E2F2	1.44E-06	-0.90						G1/S	E2F transcription factor 2

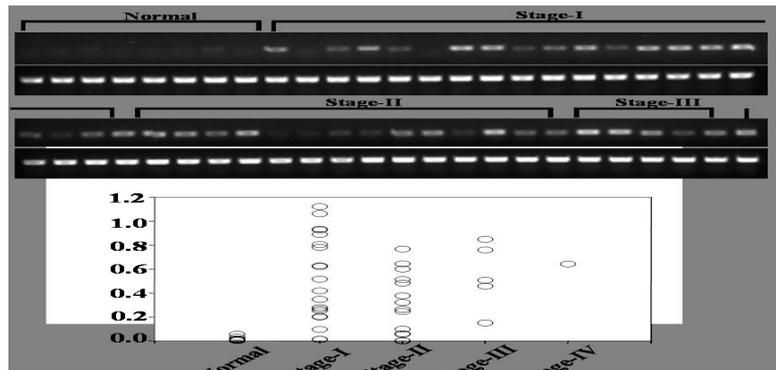
List of genes encoding factors associated with microtubules and spindles

illumina ID	Symbol	FDR	r	0hr	24hr	48hr	72hr	96hr	Role	Gene description
ILMN_16399	TUBB3	5.66E-05	0.91						Constituent	Tubulin, beta 3
ILMN_23893	MAP1LC3B	3.89E-05	0.95						Assembly	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
ILMN_26809	GAS8	2.61E-05	0.90						Physical interaction	Growth arrest-specific 8
ILMN_418	TCP1	1.89E-08	-0.91						Tubulin-folding	T-complex 1
ILMN_3509	TUBB4Q	2.89E-08	-0.92						Constituent	Tubulin, beta polypeptide 4, member Q
ILMN_27641	TUBB8	2.79E-07	-0.91						Constituent	Tubulin, beta 8
ILMN_137959	FAM33A	2.71E-06	-0.91						Spindle	Family with sequence similarity 33, member A
ILMN_23841	GTSE1	7.08E-06	-0.92						Physical interaction	G-2 and S-phase expressed 1
ILMN_11775	STIM1	3.96E-07	-0.90						Disassembly	Stathmin 1/oncoprotein 18
ILMN_12352	AURKA	3.66E-06	-0.90						Assembly	Aurora kinase A
ILMN_20208	TPX2	6.70E-06	-0.91						Spindle	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)
ILMN_18041	CENPH	2.31E-07	-0.93						Kinetochores	Centromere protein H
ILMN_4809	RACGAP1	1.59E-06	-0.93						Physical interaction	Rac GTPase activating protein 1
ILMN_3508	CALM3	4.24E-05	-0.92						Spindle	Calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)
ILMN_2123	RCC2	3.93E-06	-0.95						Physical interaction	Regulator of chromosome condensation 2
ILMN_23465	TBCD	2.42E-06	-0.95						Tubulin-folding	Tubulin folding cofactor D

### 3. 방사선내성 인자의 작용기전 연구

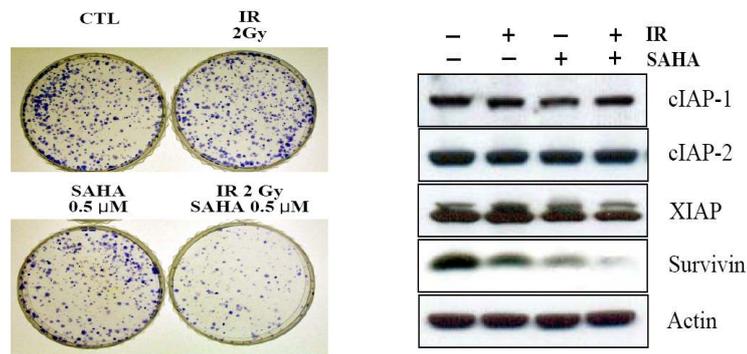
#### 가. 방사선 내성인자 survivin 기능 규명

- 폐암세포 8종을 대상으로 survivin의 발현양상을 분석한 결과 정상 폐세포에서는 survivin의 발현이 관찰되지 않았으나 8종의 폐암세포주에서 survivin의 발현이 관찰되었음. 다양한 stage의 폐암환자 40명의 암조직에서 추출된 mRNA를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과 survivin의 발현은 정상 폐조직에서 전혀 발현되지 않았으나 폐암조직 88%에서 survivin의 발현이 관찰됨.



#### 나. 방사선 내성인자 survivin을 표적으로 하는 방사선 민감제 개발

- HDAC 저해제인 SAHA와 방사선을 동시 처리하였을 때 폐암세포(A549, p53 wild-type)의 사멸을 관찰함. SAHA와 방사선을 각각 단독으로 처리하였을 때 survivin의 발현양이 약간 감소하였으나 SAHA와 방사선을 동시에 처리한 경우 survivin의 발현양은 현저히 감소하였음. SAHA와 방사선을 동시에 처리하여 현저한 폐암세포의 사멸유도는 특이적인 survivin 발현 감소인 것으로 사료됨. 결과는 HDAC 저해제인 SAHA를 방사선 저항성 유전인자 survivin을 표적으로 하는 방사선치료 보조제로서의 활용성을 시사함.



#### 다. 방사선 내성인자 EGFR의 새로운 활성화경로 규명

- 방사선을 선량 또는 시간별로 폐암세포에 조사하였을 때 EGFR는 낮은 선량에서부터 활성화되었으며 5분 이후부터 현저한 활성화가 관찰되었다. 방사선에 의한 EGFR의 활성화는 EGFR의 하위신호경로인 MAPK, Akt를 활성화하여 방사선 내성 및 항암제 내성을 유

도함.

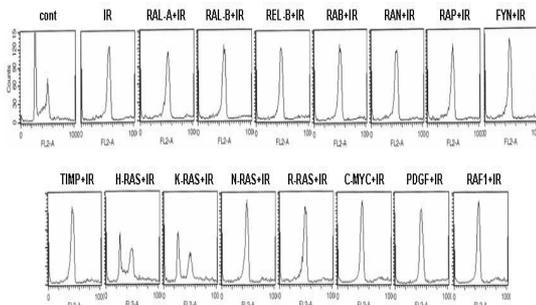
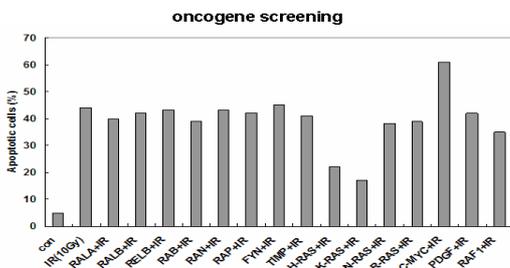
- 방사선에 의한 EGFR는 eNOS (endothelial nitric oxide synthase)에 의한 활성질소의 발생으로 인한 것으로 확인되었으며 이러한 결과는 방사선 내성인자인 EGFR의 새로운 활성경로를 규명한 것임.

라. 방사선 저항성 인자의 비활성화 기전 규명

- Telomerase는 암세포의 생존에 절대적으로 필요한 인자로 방사선 내성을 유발하는 인자로 알려져 있다. 이를 표적으로 하는 약물을 개발하기 위하여 telomerase의 활성화 기전을 연구하는 것이 절대적으로 필요한 실정임.
- Telomerase의 활성화를 위하여 HSP90과 p23 단백질의 상호작용이 절대적으로 필요하다는 것을 규명하였으며, 세포사멸 과정에서 caspase에 의한 p23의 절단화가 telomerase의 활성화를 저해한다는 사실을 규명함.

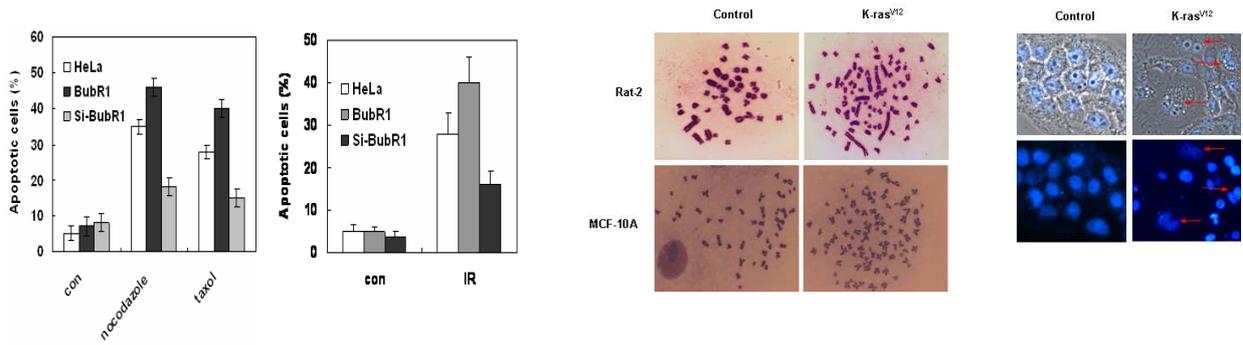
마. 암화 유전자 형질전환 모델에 의한 방사선내성 증가

- 세포 암화과정에 관련되어 있다고 알려진 15종의 암화유전자들을(RALA, RALB, RELA, RELB, Rab, RAN, RAP, FYN, TIMP, H-RAS, K-RAS, N-RAS, R-RAS, C-MYC, PDGF, RAF1) retrovirus 발현 시스템으로 구축하고, 그 각각을 자궁경부암 세포 HeLa에 infection하여 과 발현시킨 후 10Gy의 방사선을 처리함. 세포사멸과 관련된 방사선 민감성을 측정된 결과 H-RAS와 K-RAS를 과 발현시켰을 때 방사선 민감성이 현저히 저해되어지는 것을 알 수 있었으며 반대로 c-MYC을 과 발현시켰을 때는 방사선 민감성이 오히려 증가됨을 관찰함.

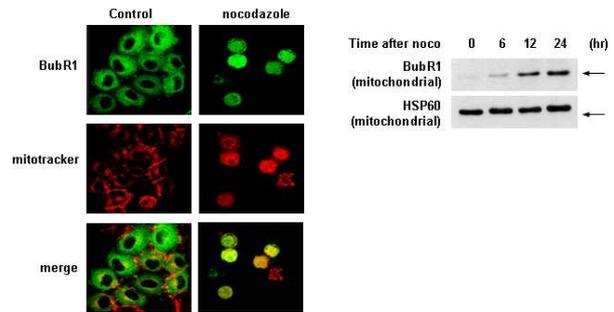


바. 암화 유전자에 K-Ras에 의한 BubR1 방사선내성 기전 규명

- 암화 유전자의 발현이 어떠한 작용기전에 의해 유전적 불안정성을 야기하고 이와 관련된 방사선 저항성을 유발하는지를 밝히고자 하였음. 본 연구자들은 방사선에 의한 세포사멸을 저해함과 아울러 방사선 조사에 따른 cell cycle checkpoint의 조절에 이상을 유발하는 암화유전자를 스크리닝함. • 정상 세포인 Rat2와 MCF-10A에 암화유전자 K-Ras를 과 발현시켰을 때 cell cycle checkpoint의 이상과 염색체 이상이 초래함.
- K-RAS를 MCF-10A에 과 발현하였을 때 mitotic checkpoint 조절에 중추적인 역할을 하는 BubR1의 단백질 수준이 현저히 감소하고 BubR1의 감소는 K-RAS의 신호전달 경로 중 JNK와 ERK 경로를 거쳐 야기됨.

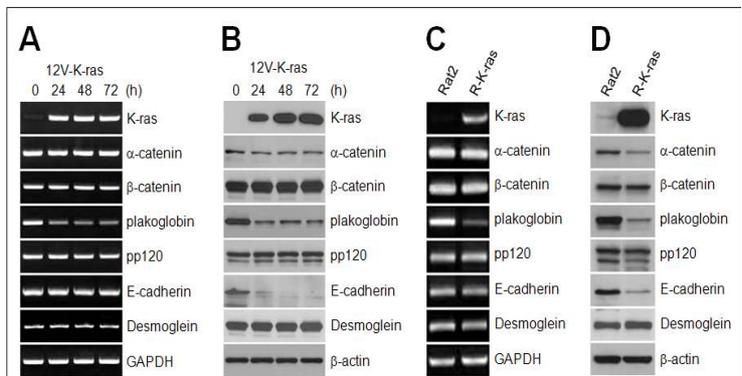


- BubR1 단백질은 세포질 내에 존재하며 세포내의 유전체의 항상성을 유지함에 있어서 중요한 역할을 수행함. Confocal 현미경 분석 결과, nocodazole과 taxol을 처리하여 세포사멸이 일어날 때 BubR1 단백질이 미토콘드리아로의 이동을 관찰할 수 있었고, 세포 소기관 분획법으로 미토콘드리아만을 분리한 후 실시한 Western blot 분석을 통하여 BubR1 단백질의 미토콘드리아로의 이동을 재확인함. 이 결과는 Mitotic checkpoint 조절 단백질인 BubR1의 방사선 및 항암제에 의하여 유발되는 세포사멸에서 중요한 제 2의 기능을 함을 시사하는 중요한 결과로 사료됨.



사. 암화 유전자 K-Ras에 의한 Plakoglobin 방사선저항성 기전 규명

- K-Ras 암화유전자에 의한 PG의 mRNA 및 단백질 발현양이 감소함. K-Ras 돌연변이 암화유전자를 Rat2 정상세포에 과발현시켜 세포의 이동과 전이가 활성화되는 형질전환을 유도하였음. 형질전환이 일어난 세포에 PG를 과발현시키면 K-Ras 암화유전자의 기능이 억제되며 원래 대조군 세포의 표현형질을 회복함.
- 세포에 PG를 과발현시킨 후 방사선을 농도별로 처리하여 상대적인 민감성 (혹은 저항성)을 관찰함. 방사선에 대한 세포의 저항성은 PG의 과발현에 의하여 효과적으로 증가하는 반면, siRNA-PG 처리에 의하여 유의성 있게 감소함을 관찰함. 이 결과는 암화유전자 K-Ras에 의한 방사선 저항성 획득이 본 연구진이 앞서 보여준 K-Ras에 의한 PG의 소실과 상관성이 있음을 증명함.

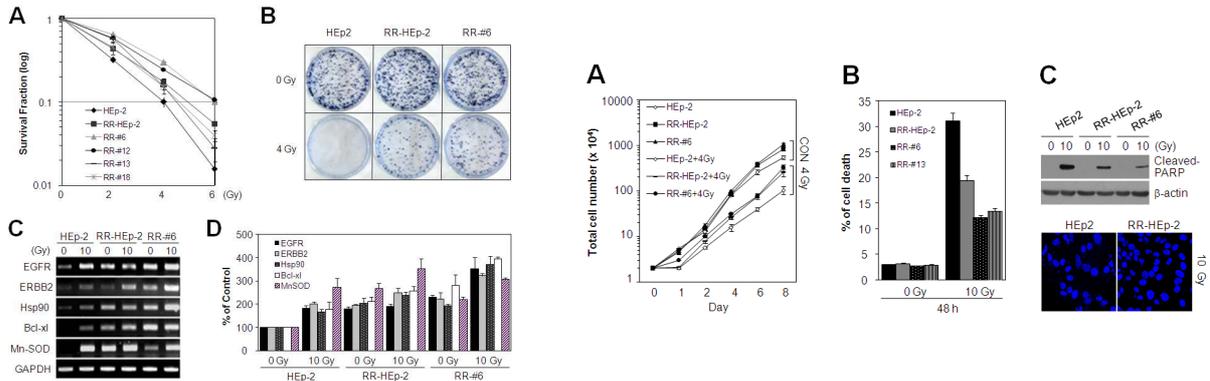


아. CLIC1의 방사선 민감성 조절 연구

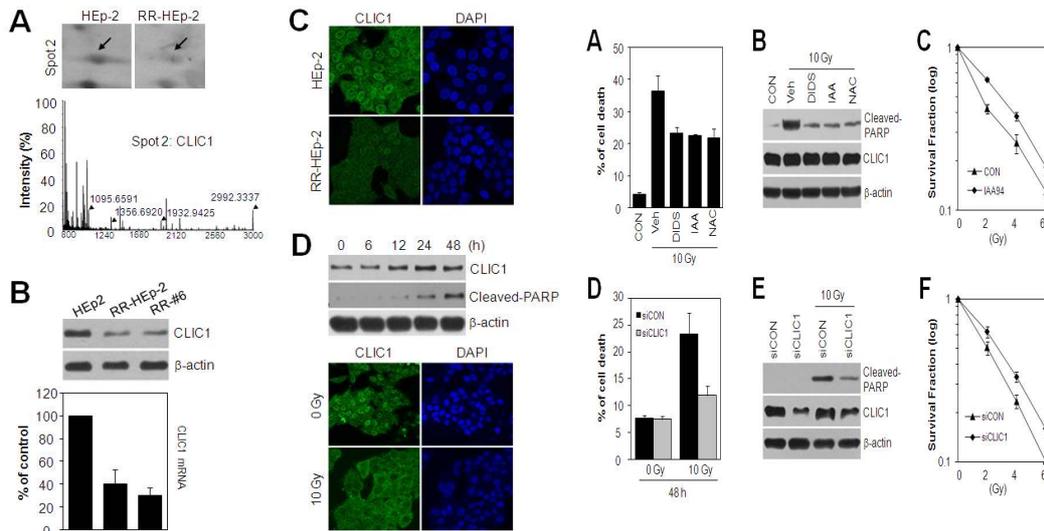
- 방사선치료조절 유전자군을 대상으로 후두암에서 발굴된 CLIC1의 방사선치료조절 가능

성을 검증하기 위해 후두암 세포주 (HEp-2)를 이용하여 방사선 저항성 세포주를 확립하고 세포주의 방사선 저항성에 대한 성질을 colony formation assay, 분자 마커들의 발현 및 방사선에 의한 세포고사의 정도를 측정하여 방사선저항성 세포주를 분석하였다.

- 동정된 CLIC1의 경우 단백질 수준에서 방사선 저항성 후두암 세포주 (RR-HEp-2)에서 유의성 있게 감소하였음을 confocal 및 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였고 또한 방사선에 의해 단백질의 양 및 세포내에서의 변화가 있음을 규명하였다.



- CLIC1 분자의 저해제 및 과발현을 통한 기능분석결과 방사선에 의한 민감성의 증가에 관여함을 분자생물학적으로 검증하였다. 또한 CLIC1에 의한 방사선 유도 활성 산소종의 변화를 관찰한 결과 CLIC1에 의한 방사선 민감도의 증가는 방사선 유도 활성산소종의 증가에 의한 것임을 확인하였다. 이들 결과를 바탕으로 편평상피 세포 종들에서의 발현 유의성을 조사한 결과 방사선 민감성이 높은 세포일수록 CLIC1의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 따라서 CLIC1 유전자의 경우 방사선 민감도를 증가 및 예측할 수 있는 분자로 확인할 수 있었다.



#### 자. 세포수준의 세포노화 모델에서 방사선내성 관련 신호기전 연구

- 세포사멸 저항성 종양세포주 MCF7과 H460 세포에 대한 방사선 노화기전 활용을 연구하였음. ROS 증가에 의한 DNA 손상이 노화 기전에 필수적이며 미토콘드리아 bcl-2 유전자의 인산화가 중요함을 입증하였음. 이는 두 세포주에서 공통적으로 JNK 신호전달 경로를

거치므로 JNK 억제제의 병용처리에 의한 방사선 유도 종양세포 노화의 중요성을 확인하였음.

- 종양이식생쥐에서 방사선을 처리한 종양의 경우 방사선을 처리하지 않은 종양에 비해 세포 증식이 현저히 감소하였고 이때 종양조직에서 세포노화가 일어나고 있음을 입증함. 따라서 *in vivo* 모델에서 방사선에 의한 종양세포 노화의 중요성을 입증하였음.
- 이들 세포주에서 방사선에 의한 종양세포 노화의 경우와 방사선유도 노화 저항성을 가지고 있는 신경교종 세포주의 경우, p53과 AKT 분자와 노화기전 활성화의 관계 분석결과 노화기전에서 p53보다는 AKT 활성화의 중요성을 규명하였음.

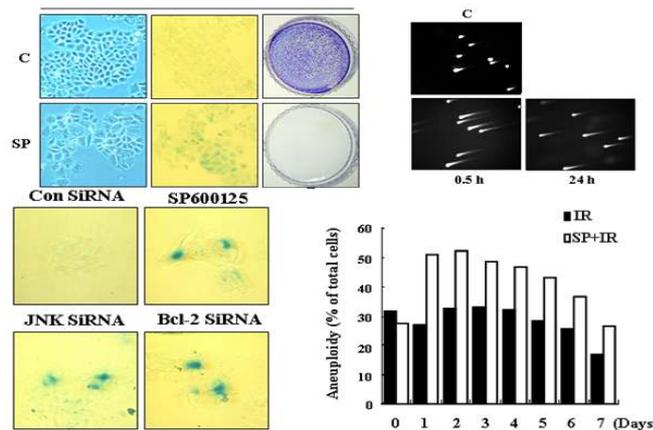
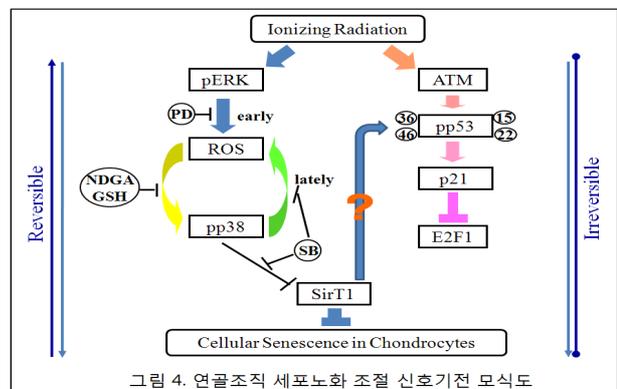


그림 3. SIRT1 유전자의 연골조직 세포노화 유도 검증



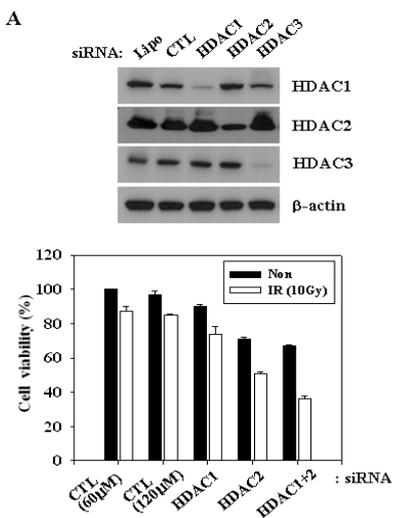
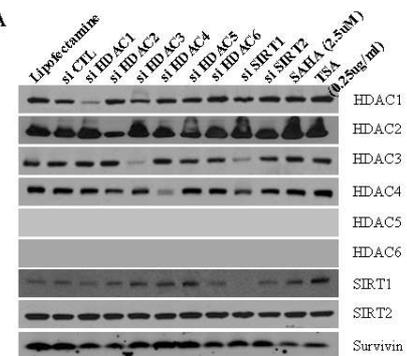
#### 차. 조직수준의 노화 모델에서 방사선내성 관련 신호기전 규명

- X선, 감마선을 이용한 방사선 암치료는 국내외적으로 50% 이상의 비중을 차지하는 중요한 치료법이다. 최근에는 방사선 관련기술의 발달로 골/연골육종암 환자에게도 방사선 치료의 적용이 점점 증가하는 추세이지만 방사선 사용에 대한 정상 연골조직의 부작용 초래에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 본 연구에서는 고농도의 감마방사선은 정상 연골조직 세포의 세포노화를 유발함을 세포노화 표지인자들의 실험적 결과 (베타-갈락토시데이즈 염색실험, 세포성장 실험, 세포크기 관찰실험)를 기초하여 밝혔다.

- 방사선에 의한 연골조직의 노화현상은 세포 내 MAPK 효소와 활성산소종 (ROS)의 발생에 기인하며 이들의 상관관계를 생화학적인 실험기법으로 검증하였다. 방사선에 의한 세포노화 유도시 MAPK 신호기전과 p53/p21, p16/pRb의 조절 신호기전이 상호관련성이 있는지 교차 검증을 하였으며 이들 인자들이 방사선 내성 관련성이 있는지를 규명함.
- 세포노화에 중요한 역할을 하는 SIRT1의 기능을 조절하는 여러 가지 인자들의 네트워크를 규명함으로써 노화와 관련된 보다 폭넓은 개념을 규명함. 이는 SIRT1 유전자 및 이를 조절하는 네트워크 관련 유전자를 이용하여 세포노화와 관련된 새로운 유전자치료법을 개발할 수 있을 것임.

카. 방사선 저항성 인자인 survivin을 조절하는 HDAC subfamily 규명

- 방사선 또는 항암제 치료시 암세포 사멸억제인자인 survivin의 발현조절인자를 규명하여 방사선저항성예측인자로 활용함과 동시에 druggable target으로서의 활용방안을 모색하기 위한 연구의 필요성이 제기되었음. Survivin을 조절하는 인자의 발견은 암세포 사멸에 대한 저항성을 판단하는 매우 중요한 마커로서 사용될 수 있으며 이를 표적으로 하는 약물의 사용 및 개발은 방사선 치료증진에 있어 매우 중요한 기술이 될 것으로 사료됨.
- Histone deacetylase (HDAC) inhibitors에 의해 survivin의 발현을 현저히 감소시킨다는 전년도 결과로부터 HDAC이 survivin의 발현을 촉진할 것이라는 것을 예측할 수 있었음. 따라서 10종 이상의 HDAC subfamily중 어떤 subfamily가 폐암세포에서 survivin의 발현을 유도하는지를 확인하였음. Survivin의 발현을 유도하는 특정 HDAC subfamily는 survivin을 매개로 방사선 저항성을 유도하므로 방사선 저항성 예측인자로 활용될 수 있으며 특정 HDAC subfamily의 siRNA는 방사선 치료 증진제로 활용가능할 것임. 실제로 특정 HDAC siRNA를 처리하고 방사선을 조사한 결과 방사선에 의한 폐암세포의 사멸이 현저함을 확인하였음.
- HDAC subfamily는 survivin을 매개로 방사선 저항성을 유도하므로 방사선 저항성 예측인자로 활용될 수 있고, 특정 HDAC subfamily의 siRNA는 방사선 치료 증진제로 활용가능

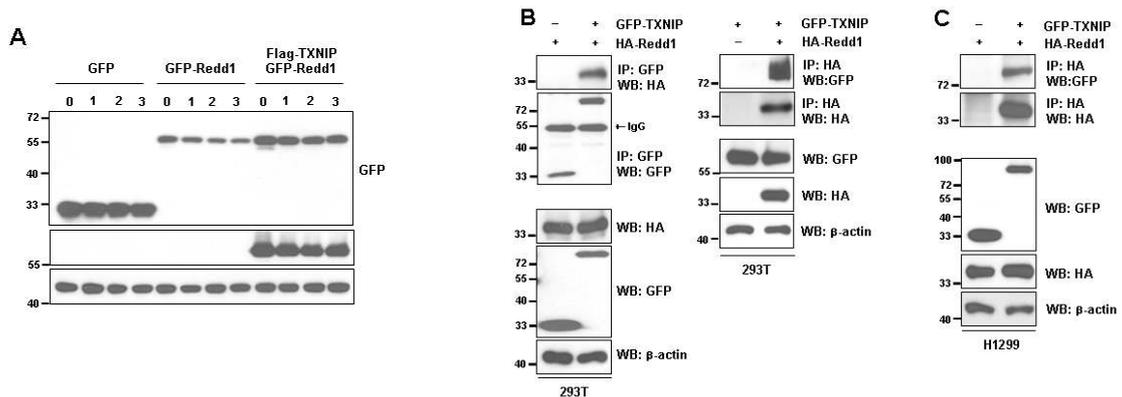


타. 방사선 저항성 및 항암제 표적인 mTOR를 조절하는 새로운 인자 발굴 및 기전 규명

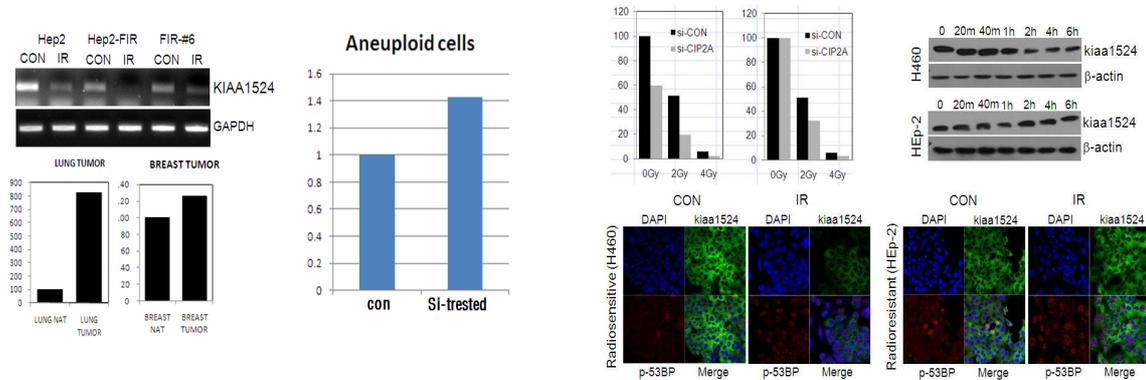
- Mammalian target of rapamycin (mTOR)은 PI3K/Akt의 신호 전달에 관여하는 단백질 키나아제로서 전사 (transcription), 번역 (translation), 세포의 크기 (cell size), 세포골격구조 (cytoskeleton organization) 및 자가식작용 (autophagy) 등을 조절하며 다양한 신호전달경로가

mTOR에 구심화된다고 해도 과언이 아닐 정도로 신호전달에 있어 중요하고 다양한 역할을 함. 따라서 PI3K/Akt/mTOR 경로의 조절부전은 암의 발생 및 진행과 매우 밀접한 연관을 가지며, 방사선 및 항암제 치료의 주 표적이 되고 있음. 이와 같은 이유로 mTOR를 조절하는 인자들의 발굴은 항암제 및 방사선 치료를 예측하는데 매우 중요할 것으로 판단됨.

- 방사선 치료시 가장 문제가 되고 있는 저산소증(hypoxia)에 의해 발현하는 Redd1/DDIT4/Rtp801은 저산소증에 의해 발현이 유도되어 mTOR의 활성을 억제하는 인자임. Redd1과 결합하는 인자를 발굴하고 그 인자들의 기능규명이 이루어진다면 저산소증에 의한 mTOR의 활성조절을 예측할 수 있으며 궁극적으로 저산소증에 의한 단백질 기능 네트워크를 규명할 수 있음. 이러한 기능 규명은 방사선 치료시 문제가 되는 저산소증을 극복하는데 학술적으로 매우 중요한 일이 될 것임.
- Redd1과 결합하는 단백질을 yeast two hybridization 기술을 이용하여 분석한 결과 VDUP1/TXNIP로 분석되었음. VDUP1은 Redd1과 결합하여 Redd1의 단백질 안정성을 증가시켰으며 이러한 결과로 다양한 스트레스 상황에서 mTOR의 활성을 더욱 더 감소시키는 결과를 유도하였음.
- mTOR를 조절하는 새로운 인자 발굴로 방사선 또는 항암제 치료시 예측인자로서의 활용 가능성이 있고, 저산소증 및 다양한 스트레스 상황에서의 단백질 인터랙툼 및 신호전달경로를 구성하는데 활용될 수 있음.

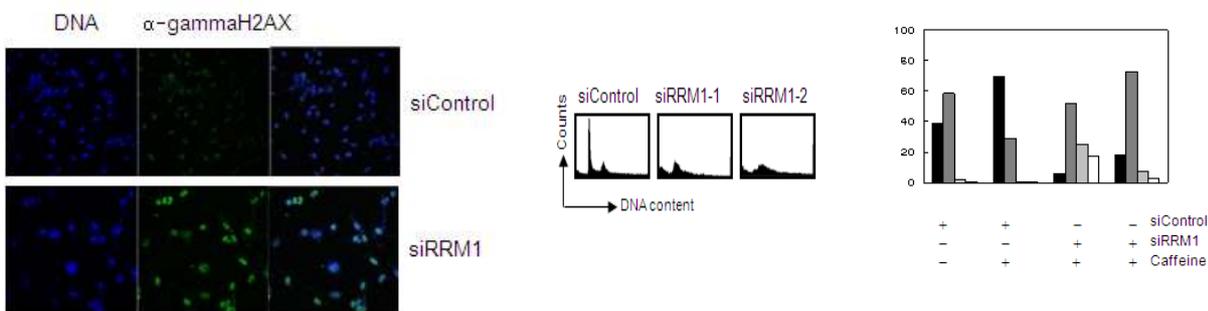


KIAA1524의 감소에 의해 방사선에 대한 민감도가 증가됨을 알 수 있었다. 또한 방사선 민감세포주에서 방사선에 의해 발현이 감소되었고 반대로 방사선 저항성 세포주에서 방사선에 의해 발현이 증가되었다. 이는 KIAA1524가 종양 특이적인 분자로 방사선저항성에 관여함을 시사하고 방사선치료시 예후인자로서의 가능성을 말해준다.



하. 방사선 저항성 인자 RRM1의 중심체 복제기능 규명

- 최근 방사선 저항성 인자로 알려진 RRM1은 11p15.5에 위치해 많은 암에서 LOH (loss of heterozygosity) 가 발견되었고 과발현에 의해 암발생이 낮아지는 효과 및 항암효과와 관련한 여러 현상이 보고됨. 최근 주요 손상 복구 인자인 Tip60과 결합하여 손상부위에 빠르게 위치하여 복구에 관여한다는 보고가 있음. 따라서 RRM1의 항암 기전 및 발현 억제에 의한 발암화 현상에 대한 메커니즘을 조사함.
- HeLa 세포주에 siRNA를 이용해 RRM1의 발현을 억제시키고 gamma tubulin 항체를 이용해 중심체를 관찰한 결과 중심체의 복제가 비정상적으로 증가해있음을 확인함. gammaH2AX 항체를 이용하여 DNA double strand break현상 및 DNA content를 관찰한 결과 급격히 DNA damage 및 세포사멸이 증가해 있음을 확인함. 이러한 증폭현상이 RRM1의 발현 억제에 의한 DNA손상 및 손상 신호전달과 관련 있는 지를 확인하기 위해 ATM/ATR 저해제인 caffeine 를 처리하여 중심체 증폭현상을 관찰함. 그 결과 caffeine에 의해 증폭현상이 급격히 감소함을 확인함.

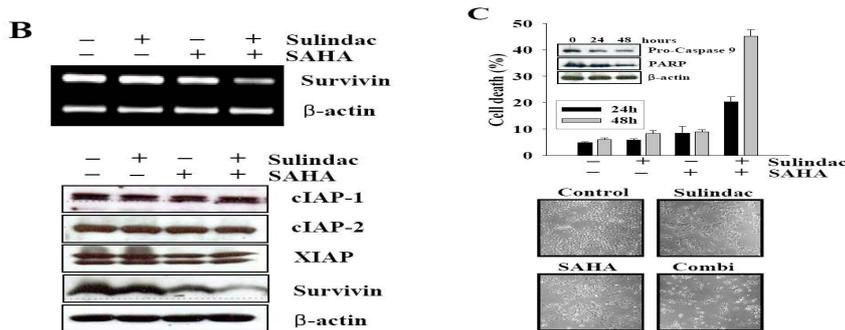


< siRRM1에 의한 DNA damage 및 세포사멸 > <caffeine에 의한 중심체 증폭현상의 억제>

#### 4. 방사선내성과 항암제 저항성과의 상관성 검증

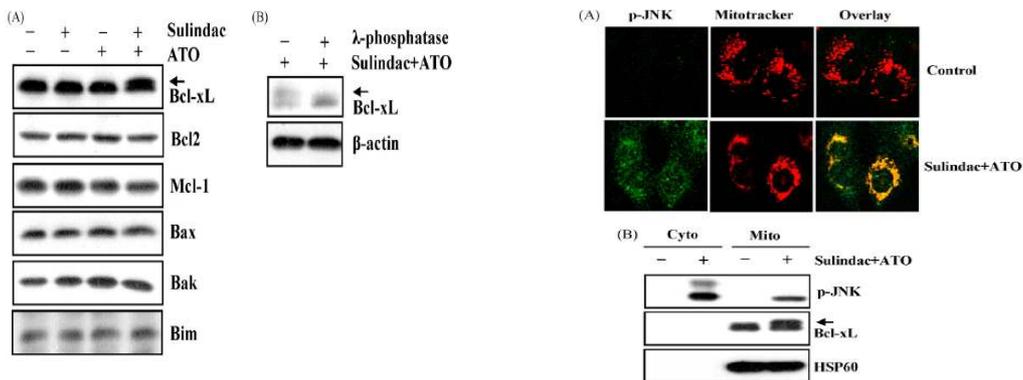
가. 방사선 내성인자 survivin을 표적으로 하는 항암제 개발

- NSAIDs 계열인 **sulindac** 또는 **celecoxib**와 HDAC 저해제인 **SAHA**를 병용처리 하였을 때 현저한 폐암세포(A549, p53wild-type)의 사멸을 관찰하였으며 이러한 세포사멸효과는 활성산소의 발생으로 인한 survivin의 발현감소 때문임.
- 약물처리시 survivin의 발현을 인위적으로 증가시킨 경우 세포사멸정도가 현저히 감소하였으며 반대로 survivin의 발현을 감소시킬 수 있는 siRNA를 처리한 결과 세포사멸의 상승효과를 관찰하였음. 이러한 결과는 폐암세포의 사멸효과는 두 약제의 병용처리에 의한 survivin의 발현감소 때문임.



나. 방사선 내성인자 Bcl-XL을 표적으로 하는 항암제 개발

- NSAIDs 계열인 **sulindac**과 **arsenic trioxide**를 각각 세포사멸에 영향이 없는 농도를 병용처리 하였을 때 현저한 폐암세포 (H1299, p53 mutant-type)의 사멸을 관찰하였으며 이러한 세포사멸효과는 JNK의 활성화를 통한 Bcl-XL의 인산화 때문임.
- 약물처리시 Bcl-XL의 발현을 인위적으로 증가시킨 경우 세포사멸정도가 현저히 감소하였으며 또한 JNK의 활성을 억제하였을 때로 현저히 감소된 세포사멸을 보임.



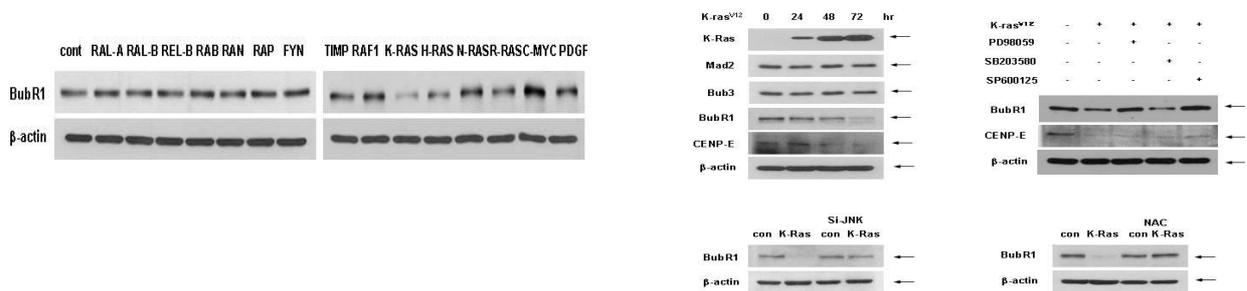
다. 암세포 활성산소 스트레스 적용반응 유전인자의 항암제 저항성 규명

- 방사선 및 항암제에 의한 내성은 이들에 대한 적응반응의 일종으로 방사선 및 항암제는 활성산소를 발생시켜 암세포를 사멸하는 특성을 가지고 있음. 활성산소에 의해 발현이 증가되는 유전인자 RTP801를 탐색하였고 그 발현 경로 및 그 기능을 규명하였음. RTP801

유전자는 활성산소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 발현이 증가되며, 이러한 발현은 ATF4라는 전사인자에 의해 유도됨을 확인하였으며, 발현된 RTP801은 mTOR의 활성을 저해하여 암화(tumorigenesis)과정중에 암세포의 생존을 유지하는데 기여하는 것으로 확인됨.

라. 암화 유전자 K-Ras에 의한 BubR1 단백질의 감소와 유전적불안정성 (genomic instability)

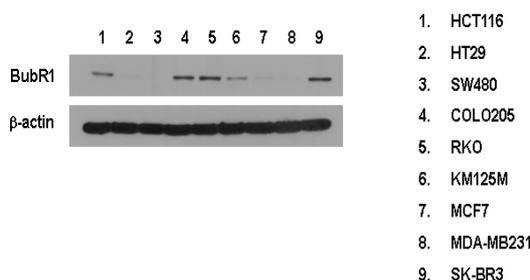
- 정상 Rat fibroblast 세포인 Rat2와 유방상피세포인 MCF-10A에 활성화된 암화유전자 K-Ras를 과 발현시켰을 때 두 세포 모두에서 cell cycle checkpoint의 이상과 아울러 염색체 이상이 초래되었는데 이는 암화유전자 K-RAS에 의한 cell cycle checkpoint 조절 단백질의 발현 및 활성 이상과 관련되어져 있을 가능성이 있으므로, 본 연구자들은 cell cycle checkpoint 중 방사선과 밀접한 관련성이 있는 mitotic checkpoint 관련 단백질들의 발현을 조사함.
- K-RAS를 인간유방상피세포인 MCF-10A에 과 발현하였을 때 mitotic checkpoint 조절에 중추적인 역할을 하는 BubR1의 단백질 수준이 현저히 감소함을 관찰함. 이와 아울러, 관찰된 BubR1의 감소는 K-RAS의 신호전달 경로 중 JNK와 ERK 경로를 거쳐 야기됨을 알 수 있었고, 이 과정이 활성산소 저해제인 NAC에 의하여 완벽하게 억제됨을 관찰하여 K-Ras에 의한 활성산소 생성과도 연관되어져 있음을 확인함. 또한 암화유전자 retrovirus를 이용한 스크리닝 결과, 윗 그림에서 보는바와 같이 15종의 암화유전자 중 K-RAS와 H-RAS 만이 선택적으로 mitotic checkpoint 단백질인 BubR1의 소실을 유발함을 확인함.



마. K-RAS에 의한 BubR1의 소실과 항암제 저항성 획득

- mitotic checkpoint에 관여하는 단백질이 제대로 작용을 하지 못하는 변이를 가지거나 단백질의 양이 감소하면 세포는 여러 종류의 스트레스 - UV, 항암제, 방사선 - 등에 저항성을 보여 암세포 사멸에 저항성을 가질 수 있는 기전을 제공할 수 있게 된다는 사실을 확인하고, 본 연구에서도 K-RAS에 의한 이러한 BubR1의 소실이 항암제 저항성과 관련되어져 있는지를 조사함.
- 자궁경부암세포에 BubR1을 과 발현하거나, siRNA knockdown 시스템을 이용하여 BubR1의 발현을 억제한 후 항암제인 nocodazol과 taxol을 처리하여 상대적인 민감성 (혹은 저항성)을 관찰함. 이들 항암제에 대한 세포의 민감성은 BubR1의 과 발현에 의하여 효과적으로 증가하는 반면, si-BubR1 처리에 의하여 유의성 있게 감소함을 관찰함. 이 결과는 암화유전자 K-Ras에 의한 방사선 저항성 획득이 본 연구진이 앞서 보여준 K-Ras에 의한 BubR1의 소실과 상관성이 있음을 증명함.

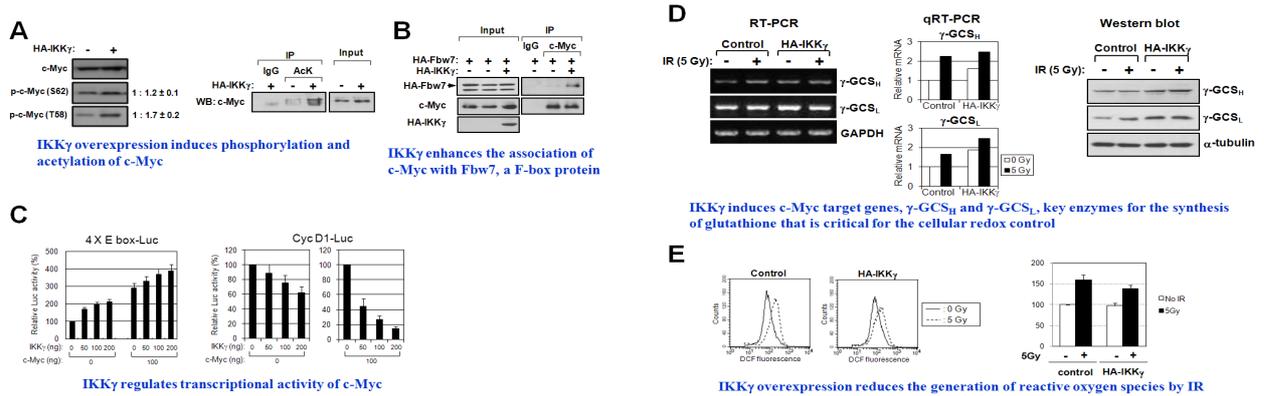
- 총 6종의 colon cancer 세포와 3종의 유방암 세포주를 사용하여 각 세포에서 mitotic checkpoint 조절 단백질인 BubR1의 발현 정도를 관찰함. 그 결과 HCT116, COLO205, RKO, KM125M, SK-BR3 세포주에서는 BubR1의 발현 정도가 뚜렷하게 관찰되었고, HT29, SW480, MCF-7, MDA-MB231 세포에서는 BubR1의 발현이 거의 관찰되지 않음을 확인함. 이들 세포에 항암제인 Taxol을 처리 후 세포사멸을 확인한 결과 BubR1의 발현이 뚜렷한 5종의 세포에서는 높은 수준의 세포사멸이 확인된 반면, BubR1 발현이 거의 없는 3종의 세포에서는 Taxol에 의한 세포사멸이 상대적으로 현저히 낮은 수준으로 일어남을 관찰함. 이 결과는 위에서 보여준 암화 유전자 K-Ras를 과 발현시킨 세포에서 BubR1 단백질 소실과 관련된 방사선과 항암제에 대한 저항성 획득 결과와 일치함을 확인.



바. 항암제저항성/발암 관련 IKKg 전사인자의 방사선 내성 관련성 검증

- IKKg에 의해서 전사인자 c-Myc이 안정화됨은 전년도 연구기간에 확인한 바 있는데, IKKg에 의한 c-Myc 단백질 안정화 과정에 단백질 수식화 (protein modification)가 동반됨을 확인하였다. c-Myc 단백질 안정성 조절에 중요하게 작용하는 Ser62와 Thr58 아미노산 잔기의 인산화가 IKKg에 의하여 증가하며, c-Myc 단백질의 아세틸화 정도도 증가함을 확인하였다 (그림 A). c-Myc의 ubiquitination에 의한 단백질 분해에 중요한 매개 단백질인 Fbw7과 c-Myc의 상호작용도 예상과 달리 IKKg에 의하여 증가함을 확인하였다 (그림 B). IKKg에 의해서 c-Myc의 ubiquitination이 감소한다는 사실을 고려하면, IKKg는 Fbw7과 c-Myc과의 상호작용 이후의 단계에서 c-Myc의 ubiquitination을 저해함으로써 c-Myc의 안정화에 기여한다고 할 수 있다. 이러한 c-Myc 수식화 및 안정화의 결과, IKKg는 c-Myc의 전사활성을 조절할 수 있음을 reporter assay를 통해 확인하였다 (그림 C).
- IKKg에 의한 c-Myc 단백질 안정화가 세포의 방사선에 대한 반응에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여, c-Myc의 타겟 유전자 중 세포 내 항산화반응의 대표적 물질인 glutathione 합성의 핵심 효소인 g-glutamyl-cysteine synthase (g-GCS) 유전자의 발현을 관찰하였다. GCS의 소단위체인 g-GCS<sub>H</sub>와 g-GCS<sub>L</sub> 단백질의 발현은 산화 스트레스에 의해서 인산화된 c-Myc의 전사활성에 의해서 유도된다고 알려져 있다. 따라서, 이 두 단백질의 발현을 방사선 조사 및 IKKg 과발현 여부에 따라 조사하였다. 방사선 조사에 의해서 g-GCS<sub>H</sub>와 g-GCS<sub>L</sub>의 발현이 증가함을 mRNA 및 단백질 수준에서 관찰할 수 있었으며, IKKg 과발현 시에는 이 두 단백질의 발현이 이미 증가되어있으며 방사선 조사 후 추가적인 약간의 발현 증가가 일어남을 mRNA 및 단백질 수준에서 확인 하였다 (그림 D). 이러한 결과로부터 예상되듯이, IKKg 과발현이 방사선 조사에 의한 활성산소 생성을 부

분적으로 억제함을 확인하였다 (그림 E).

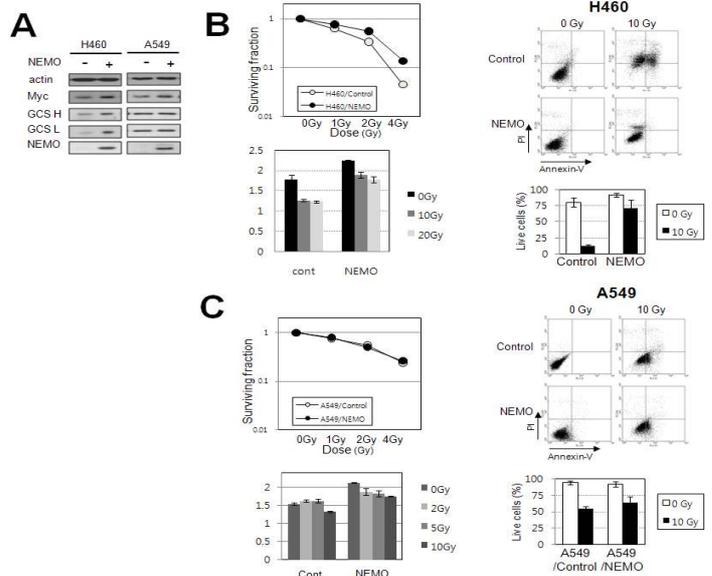


### 사. 방사선 저항성 유도 ATF4 전사인자 활성화 기전 규명

- 전사인자 ATF4는 방사선 저항성을 유도하는 전사인자 (transcription factor)로서 이 유전 인자의 활성화 과정이 명확하지 않은 실정임. 따라서 이 전사인자의 활성화 기전을 연구 하는 것은 방사선 내성 기전을 이해하는데 단초가 될 수 있음.
- 활성산소에 의해 발현이 증가하는 NUPR1 유전인자가 ATF4의 활성화를 급격히 증가한다는 사실을 규명함. 이러한 결과는 NUPR1이 방사선 내성표적이 될 수 있음을 시사 할 뿐 아니라 ATF4의 활성화를 저해할 수 있는 약물개발의 학술적 자료를 제공하는 연구 결과임.

### 아. NEMO (IKK $\beta$ )에 의한 c-Myc 안정화 관련성 규명

- 전사인자 c-Myc은 세포사멸에서 양면성 (anti-apoptotic/pro-apoptotic)을 갖고 있다고 알려져 있는데, 이것의 기전은 정확하게 알려져 있지 않음. c-Myc은 세포증식과 세포사멸 모두에서의 역할이 알려져 있는 바, 암치료에서 주 표적으로 삼는 이 두 개의 상반된 생명 현상을 표적으로 한 치료전략의 타겟으로 적합함.
- 전단계의 연구를 통하여 NEMO (IKK $\beta$ )가 c-Myc 단백질의 수식화를 통해서 안정화에 기여하며 c-Myc의 주요 타겟 유전자들의 발현을 조절한다는 사실을 규명한 바 있음. 본 연구에서는 NEMO에 의한 c-Myc 단백질 안정화가 폐암세포주의 방사선 민감도에 미치는 영향과 기전 규명을 목적으로 하였음.
- 두 개의 폐암세포주 (H460, A549)에서 NEMO가 c-Myc의 단백질 수준 변화와 c-Myc의 타겟 단백질 중 세



포 내 활성산소 조절에 중요한 역할을 하는 g-GCS의 발현 조절 여부를 결정한 결과, NEMO는 두 세포주 모두에서 c-Myc 발현을 높이지만, H460에서만 g-GCS 발현을 높임을 관찰함.

- 두 세포주에서 NEMO에 의한 방사선 반응성 변화를 MTS assay, colony formation assay, Annexin-V staining을 통해서 조사한 결과, g-GCS의 발현이 높아지는 H460에서는 방사선에 대한 저항성이 증가하며, g-GCS의 발현에 변화가 없는 A549에서는 방사선 민감도에 변화가 없음을 관찰 하였음. NEMO가 c-Myc의 안정화를 통해서 g-GCS의 발현을 증가시키므로써, 세포내 활성산소 작용을 완화하여 방사선에 대한 저항성에 기여함을 알 수 있음.
- c-Myc은 단백질 안정성의 조절이 중요한 조절기전이며, 암 치료의 표적분자로 활용하기 위한 많은 장점을 갖고 있다. 따라서, NEMO에 의한 c-Myc 단백질 안정성 조절의 새로운 기전에 기반하여 방사선 저항성에서의 역할이 규명되면, 기존의 접근법과는 다른 각도에서 NEMO와 c-Myc의 상호작용을 타겟으로 한 암치료법 개발에 기여할 것임.

## 5. 방사선내성 인자의 예후지표로서의 유효성 검증

가. 예후평가를 위한 방사선치료 암환자 조직 확보

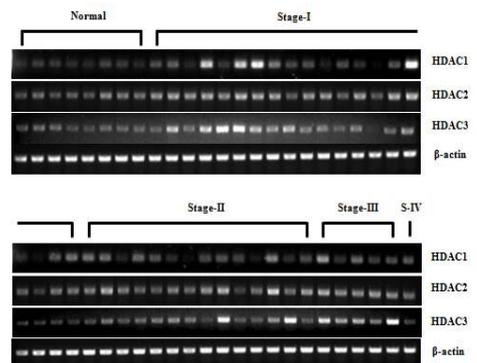
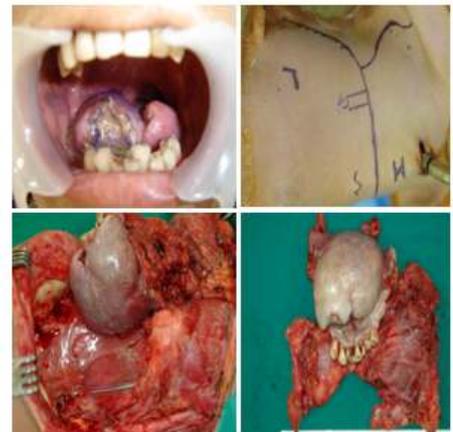
- 세포배양 시스템을 통하여 발굴된 방사선내성 인자의 임상 검증과 예후평가를 위한 방사선치료, 수술 및 복합치료를 받은 암환자 조직을 확보함.

[두경부암 300예, 자궁경부암 280 예]

나. 방사선치료 후 재발예측용 마커 선별

- 방사선치료를 받은 자궁경부암 환자를 재발군과 비재발군으로 나누어, 재발관련 유전자 p31을 선별하고 유효성을 평가하였음. 선별된 방사선치료 재발관련 유전자를 간암의 재발관련 유전자와 비교하여, 새로운 암 전이관련성 유전자를 발굴 하였음.
- 발암 단계별 폐암 인체 검체를 이용하여 방사선치료 조절에 관여하는 핵심인자 Survivin, HDAC 효소군 발현을 검증하고 유효성을 평가하였음.

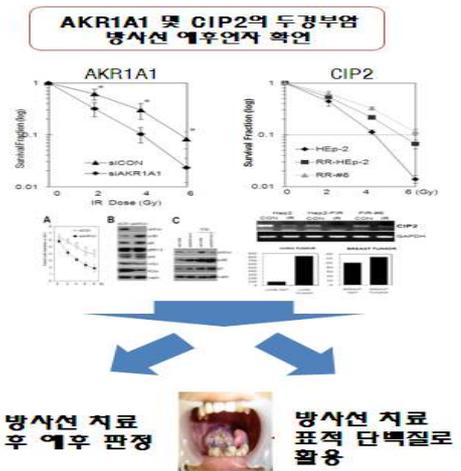
방사선치료 검체: 두경부암 조직 확보 (저항성)



폐암환자 검체를 활용한 방사선치료 조절 핵심인자 HDAC 효소군 발현 양상 검증

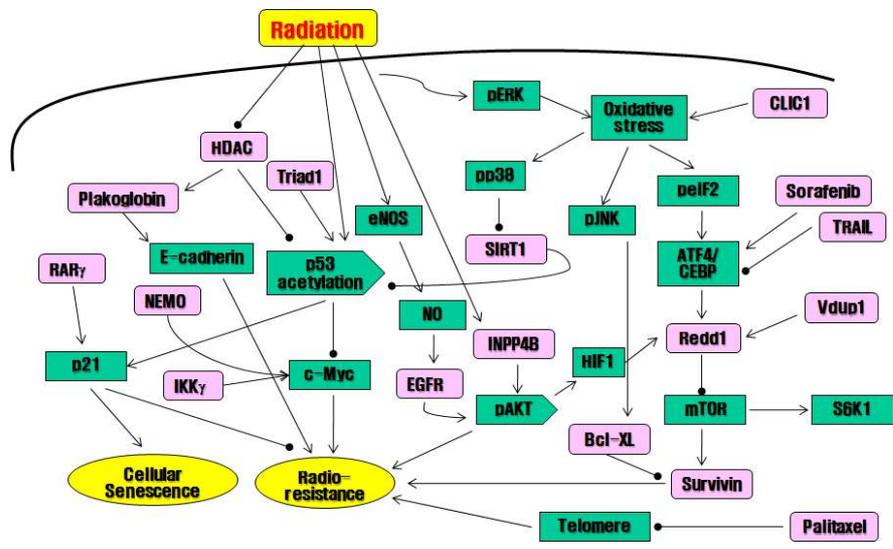
다. 두경부암 방사선치료 예후 표지인자 규명

- 두경부암의 방사선치료 저항성에 관여하는 유전자들 (CLIC1, INPP4B, AKR1A 및 CIP2)을 in vitro 수준에서 규명하였고, 이들이 암세포 활성을 증가시키므로서 세포암화 및 방사선치료 효율저하에 관여함을 규명함.
- 두경부암 환자의 방사선 치료시 예후를 측정할 수 있는 지표로 활용하고, 방사선치료에 대한 효율 및 치료 성적 판단의 표지인자로 활용할 수 있음



라. 두경부암, 폐암, 자궁경부암 등 방사선치료 예후 표지인자들의 유효성 검증과 핵심 인자 확보를 위한 네트워크 분석과 구축

- 30여종의 방사선내성 관련 인자들을 종합하여 각각의 신호기전에 대한 종합적인 분석을 통해 상호관련성을 규명하고 동시에 유효성 평가를 신뢰할 기능 검증을 피드백 하였음.
- 방사선내성 핵심인자와 조절인자간의 상호관련성을 흐름도를 통해 구체화하였으며, 보다 주요한 핵심인자의 관련성을 밝히기 위해 인터랙툼 연구를 통해 규명할 필요성이 있음.



6. 방사선 내성인자 이용 예후평가 기초기반기술 개발

- 폐암 및 후두암 세포주 library를 이용한 방사선내성 인자를 이용
  - 방사선 저항성 전사체 표적인자를 활용하여 예후평가기술 개발을 위해 차세대 염기서열 분석법의 한 종류인 RNA염기서열분석법 (RNA-sequencing)을 개발할 수 있음.
  - 현재 사용되는 전사체 분석 기술은 3가지이며, 이들 중 Illumina Genome Analyzer를 사용함. 2006년 출시한 Genome Analyzer는 clonal amplification에 emulsion PCR 대신

bridge amplification 방법을 이용하므로 유전자 수준에서의 발현뿐만 아니라 exon 수준에서의 발현, 변이, splicing 등 지금까지 방사선 의학 분야에서 미미했던 다방면에서의 연구가 가능함.

- 두경부암 방사선내성 세포주에서 proteomics 기법을 이용한 방사선내성 인자 이용
  - 현재 세계적으로 프로테오믹스 전체에 대한 발현 및 정량을 분석하는 혁신적인 방법은 없는 실정이며, 이는 post-translational modification(PTM)을 포함한 전체 프로테오믹스 분석을 위해서는 여러 가지 다양한 분석방법이 동원 되어야하기 때문임.
  - 2D gel 전기영동을 이용한 LC-MS 분석법은 검출해 낼 수 있는 분자량의 범위는 20~90KDa 정도임.
  - 보다 신뢰도가 높은 정보로 예측하기 위하여 ISB pipeline system을 도입하여 각 스펙트럼을 검정하며, 질량분석 데이터로부터 각각의 펩타이드를 정량하고 이를 최종적으로 단백질의 발현양의 증감을 확인함.
- 자궁경부암과 폐암의 방사선내성 세포주에서 DD-PCR 기법을 이용한 인자 이용
  - 2004년 Genomic Health Inc. 에서 21개 유전자에 대한 RT-PCR을 통해 조기 유방암 환자의 재발을 예측할 수 있는 분자진단 기술을 2004년 NEJM에 발표한 이후로 2007년 American Society of Clinical Oncology (ASCO) 와 National Comprehensive Cancer Network (NCCN)에서 어떤 환자에게 적용할 수 있는지 가이드라인을 제시하였음.
  - Genomic Health Inc.에서 초기 단계의 유방암 환자에 대한 재발가능성 지표를 제공하고 Oncotype DX 21-Gene Breast Cancer Assay를 개발하였으며, 이는 유방암과 관련된 21개의 유전자(16개의 암 유전자와 5개의 대조 유전자)에 대한 발현 정도를 분석하여 환자가 10년 이내에 종양이 재발할 위험성을 분류하여 결과를 제시함. 저위험군 환자는 치료비가 많이 들고 부작용이 심한 화학요법은 피하고 대신 호르몬 요법으로, 고위험군 환자는 재발 가능성이 높기 때문에 화학 요법을 병행한 좀 더 공격적인 치료방법을 권하게 됨
- 방사선내성 인자의 체내 분포에 따른 예후예측 기술 이용
  - 국내외적으로 진단법은 체액 (혈액, 타액, 소변 등)을 이용한 방법이 그 편리성으로 인해 최선의 방법으로 인정되고 있음.
  - 혈액을 이용한 방법이 가장 보편화된 방법이나 뚜렷한 마커가 없는 현실에서 질량분석법 등을 이용한 진단마커의 발굴에 연구투자가 이루어지고 있음.
  - 이미 개발된 ELISA 방법이 그 편리성으로 인해 진단법으로 정착되어 있으나, 이 또한 획기적인 진단마커의 부재로 마커발굴에 이용되는 방법이 진단법으로 개발되려는 경향을 보임. 방법적인 면에서 세계적인 수준과의 격차는 상당히 좁혀져 있으며 선진국 대비 90-95% 수준임.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 년도별 연구목표 및 달성도

#### 1. 1차년도 연구목표 및 달성도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	비고
유형별 방사선 내성 연구시스템 확립	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 암화유전자를 이용한 형질전환 세포주 2종류 확립</li> <li>2. 암 세포주를 이용한 방사선 내성 세포 모델 2종류 확립</li> <li>3. 조직 및 세포를 이용한 방사선 관련 세포노화 모델 11종류 확립</li> <li>4. Rat를 이용한 암발생 동물모델 2종류 확립</li> </ol>	30	100	-유형별 방사선 내성 연구모델 구축을 초과 달성하였음.
방사선내성 인자 탐색을 위한 분석기술 확보	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Proteomics 기술 확보 및 장비 구축</li> <li>2. EST database 관련 연구 제반 기술 확보 및 장비 구축</li> <li>3. DD-PCR 기술 확보 및 장비 구축</li> <li>4. 분비단백질 스크리닝 기술 확보 및 장비 구축</li> </ol>	30	100	-방사선 내성인자 탐색 기술을 확립하였으며, 중복 검증의 기회를 높여 신뢰성을 확보함.
방사선내성과 항암제내성과의 상관성 탐색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 암유전자의 형질전환에 의한 신호전달물질의 방사선 및 항암제 내성형질 상호관련성 탐색함</li> <li>2. 활성산소 내성 세포주와 모세포주에서 mRNA를 추출하여 DD-PCR 방법을 수행한 결과 6종의 항암제/활성산소 내성유전자를 발굴함.</li> <li>3. 암화유전자로 형질전환된 세포주로부터 항암제/방사선내성 교차인자 8종을 확보함.</li> <li>4. 항암제 내성 분석을 통한 방사선 내성인자로의 활용성 검증을 IKK, c-myc 단백질 복합체를 중심으로 탐색함.</li> <li>5. 노화조절인자를 조사하여 항암제내성</li> </ol>	25	100	-방사선내성과 항암제 내성의 관련성 규명을 위해 확보된 50종 이상의 후보군 있음.

	및 방사선내성과의 상관성을 탐색함			
생검 검체수집 및 표준화기술 개발	1. 유방암 발암 생쥐 모델 확립 2. 자궁경부암 발암 생쥐 모델 확립 3. 인체 생검 모집	15	100	3개 의과대학으로부 터 수집
	총계	100	100	

## 2. 2차년도 연구목표 및 달성도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	비고
유형별 방사선 내성 인자 발굴	<ol style="list-style-type: none"> <li>방사선내성 세포주로부터 Proteomics 기법을 이용하여 내성인자 16종류를 확보함.</li> <li>방사선내성 세포주로부터 DD-PCR 기법을 이용한 내성인자 탐색하여 7인자를 확보함.</li> <li>방사선내성 세포주로부터 EST database 유전자 분석 기술을 이용하여 11인자를 확보함.</li> <li>세포노화모델로부터 노화인자와 관련된 방사선내성 인자 20종 이상 확보함.</li> <li>암세포의 내재적 방사선내성 관련인자 6종 확보함.</li> </ol>	50	100	-방사선내성 인자 탐색을 초과 달성하였음 -계속적인 연구를 통해 새로운 내성인자의 발굴이 가능함.
방사선내성과 항암제내성과의 상호 활용성 검증	<ol style="list-style-type: none"> <li>방사선 내성인자 survivin, Bcl-XL을 표적으로 하는 항암제저항성 극복 항암제 개발</li> <li>활성산소에 의해 발현이 증가되는 항생제내성 유전인자 RTP801, NUPR1, ATF4의 방사선저항성 관련성 규명함</li> <li>K-Ras 암화유전자로 형질전환된 세포주로부터 BubR1의 소실과 항암제 저항성 획득 기전규명</li> <li>항암제 내성 분석을 통한 방사선 내성인자로의 활용성 검증을 IKK, c-Myc 단백질 중심으로 방사선내성 조절 관련성 규명</li> <li>노화조절인자 기능을 HDACs, SIRT1,</li> </ol>	30	100	-방사선 및 항암제 내성형질 상호관련성 규명을 통해 논문으로 출판되었음. - IKK는 방사선 내성과 관련하여 잘 밝혀지지 않은 것으로 주요 조절기전이 연구되어 중요도가 매우 높음.

	p31comet 위주로 검증이 진행되었고 주요 조절기전이 밝혀졌음.			
방사선 모델의 생검 검체 표준화 기술 확립	1. 동물 생검조직 40례 확보하여 연구 수행하였음. 2. 환자로부터 채취된 생검검체 100례가 확보되어 보관. 3. 모델로부터 확보된 생검조직 tissue array 제작기술 확립.	20	100	
총계		100	100	

### 3. 3차년도 연구목표 및 달성도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	비고
유형별 방사선내성 인자 작용기전 연구	1. 방사선 내성인자 EGFR의 활성화 경로 세포내 조절기전을 규명함. 2. 방사선 내성인자 survivin을 표적으로 하는 방사선 민감제 개발 3. 방사선 민감성 또는 저항성 인자로서의 CLICK1, INPP4B의 기능 검증과 세포내 조절기전 규명함. 4. 방사선 내성인자 p23의 기능을 telomerase를 통해 규명 5. 암화 유전자에 K-Ras에 의한 BubR1 방사선저항성 기전 규명 6. 암화 유전자 K-Ras에 의한 Plakoglobin 방사선저항성 기전 규명 7. 세포노화 조절관련 유전자 Rap2, SIRT1의 방사선내성 관련 기능을 검증하고 세포 내 조절기전 규명	70	100	-30종 이상의 방사선내성 인자의 기능 검증되어 목표치를 초과 달성하였음. - 인자들의 세포내 기전연구가 전문학술지에 게재되었음. - 계속적으로 새로운 내성인자의 기능검증 수행.
방사선내성 인자간 작용기전을 통한 네트워크 구축	1. 후두암/자궁경부암으로부터 탐색된 방사선내성 인자의 상호관련성 검증을 통한 네트워크 구축 2. K-Ras/Plakoglobin 암화유전자 형질 전환 세포주로부터 탐색된 방사선내성 인자의 상호관련성 검증을 통한 네트워크 구축 3. 조직/정상세포/암세포로부터 탐색된	10	100	- 인자간의 네트워크를 구축하기 위한 연구 진행.

	노화조절 인자간의 상호관련성 검증 을 통한 네트워크 구축 4. 인자들간의 세포내 신호기전 상호관 련성 규명을 통한 신호전달의 네트워 크 구축			
방사선내성 인자의 예후지표로서의 유효성 검증	1. 환자로부터 채취된 생검검체 두경부 암 300예, 자궁경부암 280 예 확보함. 조직, DNA, RNA, Protein 수준으로 분리 되었음. 2. 기능과 세포내 조절기전이 규명된 CLICK1의 발현유형과 방사선치료 효 율비교.	20	100	-암 환자의 샘플 조직이 100례 이 상 확보.
총계		100	100	

#### 4. 4차년도 연구목표 및 달성도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	비고
방사선내성 조 절관련 인자의 지속적인 기능 검증을 통한 새로운 유효인 자 확보	1. 후두암 EST database 분석: 후두암 library 7개를 이용하여 총 8,427개의 EST 분석. SAGE DB이용하여 262종 분류, 최종 68개의 후보군 확정. 이중 방사선내성에 반응하는 유전자 12개 확인. 2. 폐암 EST database 분석 폐암 library 2개 이용 총 15,681개의 EST 분석. SAGE DB이용하여 291종 분류하고, 45개의 후보군 확정 함. 이 중 방사선에 반응하는 유전자 10개 확인 함. 3. Proteomics 실험기법을 이용한 방사 선민감도 조절인자 16종의 발굴로 특 히 출원.	25	100	-PubMed Unigene Library를 이용한 unknown gene 동정하기 위해 public database인 EST database를 각각 분석함 - SAGE virtual northern 으로 유전자 기능을 예측하고 각종 bioinformatic tool을 이용. - Proteomics 실험적 기법으로 유전자 발현양상 분석.

<p>폐암, 두경부암, 자궁경부암 세포에서 예후평가 핵심인자로 판명되는 방사선내성 인자 작용기전 규명</p>	<p>1. 바이오인자의 방사선 저항성/민감성 관련 기능검증 및 신호기전 규명:  -방사선저항성과 관련된 Hs.414565의 기능 검증 및 ROS 활성 조절기전 규명. 방사선민감성 인자로서의 기능 밝혀 <b>Proteomics</b> 논문에 게재함.  -단백질 발현 및 패턴변화를 일으키는 Hs.658245인자의 기능을 방사선 감수성조절 관련하여 검증. Akt 생존신호 조절 기전 경로 규명하여 논문에 투고 됨.  -방사선 내성인자 <b>Claudin-1</b>을 표적으로 하는 방사선전이 관련 규명하여 JBC에 논문 게재되었음.  -방사선 내성인자 조절인자 <b>SIRT1</b>을 표적으로 하는 방사선노화 유도 기전을 규명하여 JBC에 논문 게재되었음.  -방사선 민감성 조절인자 <b>Triad</b>의 새로운 활성경로를 규명하고 세포사멸 조절기전을 규명하여 논문 게재됨.  -저선량 방사선의 <b>MAPK</b> 활성조절에 의한 세포노화 조절기전 규명으로 논문 게재됨.  -방사선내성 인자 <b>NEMO</b>와 <b>c-myc</b>의 상관성을 규명하여 논문에 게재함.  -텔로머레이즈 조절기전에 의한 방사선 치료 효율 증진 기술 개발로 논문 게재함.</p>	<p>30</p>	<p>100</p>	<p>- siRNA를 통한 유전자침묵으로 단백질을 감소시킴. 방사선에 반응하는 내성기능을 검증.</p>
<p>암환자의 예후를 평가하기 위한 지표로서 방사선내성 인자 핵산 수준의 유효성 평가</p>	<p>1. 활성산소 내성 세포주와 모세포주에서 mRNA를 추출하여 DD-PCR 방법을 수행하여 예후예측 기초 알고리즘 분석함.  2. 방사선 저항성 세포주와 모세포주에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR 방법을 수행하여 예후예측 기초 알고리즘 분석함.  - 유전자의 상대적인 증가가 방사선내성을 유도하는 경우로서 Hs.658245, Hs.523004 외 10종이 있으며, 유전자</p>	<p>25</p>	<p>100</p>	<p>-Conventional RT-PCR 실험기법을 이용한 mRNA 수준의 비교.  - Quantitative real-time PCR 실험기법을 이용한 정량적 mRNA 수준의 비교 .</p>

	의 상대적인 감소를 통해 내성을 유도하는 경우로서 Hs.372914, Hs.463295가 있으며 이들을 이용하여 기초적인 알고리즘을 구축함.			
암환자의 예후를 평가하기 위한 지표로서 방사선내성 인자 단백질 수준의 유효성 평가	<ol style="list-style-type: none"> <li>방사선 저항성 세포주와 모세포주에서 단백질을 추출하여 Western blot 방법을 수행하여 예후예측 기초 알고리즘 분석함.</li> <li>방사선 저항성 세포주와 모세포주에서 단백질을 추출하여 Maldi-top 기계 분석을 수행하여 예후예측 기초 알고리즘 분석함.</li> </ol> <p>- 단백질의 상대적인 증가가 방사선내성을 유도하는 경우로서 APRT, PRDX2 외 12종이 있으며, 단백질의 상대적 감소를 통해 내성을 유도하는 경우로서 EB1, CLIC1이 있으며 이들을 이용하여 기초적인 알고리즘을 구축함.</p>	20	100	-2차원 전기영동 실험기법에 의한 단백질 발현의 수준 비교 -Western blot analysis의 단백질 항체를 이용한 실험기법으로 단백질 발현 변화의 분석 비교
	총계	100	100	

5. 5차년도 연구목표 및 달성도

세부연구목표	주요 연구개발 실적	가중치 (%)	연구목표 달성도 (%)	비고
암치료 예후/예측 알고리즘 객관성 확보	<ol style="list-style-type: none"> <li>암치료 예후/예측 알고리즘 객관성 지속적 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>방사선치료 예후인자 NAMPT, g-GCS, Redd1, TXNIP, Rap2, p31comet 등의 방사선 저항성 관련 기능 검증 완료</li> <li>NAMPT, Rap2, Redd1, KIAA1524 등의 방사선내성 조절 신호전달기전 규명하여 논문 발표함</li> </ul> </li> </ol>	40	100	-6종 이상의 방사선내성 인자의 기능 검증되어 목표치를 초과 달성하였음. - 5종 이상의 인자들의 세포내 기전연구가 전문학술지에 게재되었음.
암치료 예후/예측	<ol style="list-style-type: none"> <li>암치료 예후/예측 평가의 다변화 지속적 구축</li> </ol>	20	100	- 인자간의 네트워크를

평가의 다변화 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 암에서 방사선내성 조절 유효인자 (CLIC1, INPP4B, KIAA1524, Rap2a, Survivin 외 5종 이상 유전자)간의 직접적 조절 관련성 검증 완료</li> <li>- 암에서 방사선내성 조절 유효인자 5종 간의 신호기전 네트워크 구축 평가 합</li> </ul>			구축.
방사선내성 암 치료효율 증가 기술 개발	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 방사선내성 암 치료효율 증가 검증합 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신호 네트워크 조절물질로서 MPK, NEMO, mTOR, c-myc, cyclin E 등을 탐색</li> <li>- 신호 네트워크 조절물질의 후생유전학, 세포주기 조절, 세포사멸 조절, 세포 전이 조절 관련 작용기능을 검증하였음.</li> </ul> </li> </ol>	15	100	-방사선 병용치료제의 암치료 효과 검증함
발굴된 병용치료제의 방사선내성 치료조절 활용성 검토	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 발굴된 병용치료제의 방사선내성 치료 조절 활용성 검증 결과 확보함 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sorafenib, HDAC inhibitor, Paclitaxel, Mitomycin C, doxorubicin의 방사선 병용치료 효과 검증함</li> <li>- 방사선 병용치료 물질과 방사선 표적 인자의 상호관련성을 후생유전학, 세포주기 조절, 세포사멸 조절, 세포 전이 조절 관련 작용기능 위주로 규명하였음.</li> </ul> </li> </ol>	15	100	-방사선 병용치료제의 암치료 효과 검증함
발굴된 암조직 방사선내성/예후인자의 암환자 맞춤형치료법 적용기술 개발	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 암조직 방사선내성/예후인자의 암환자 맞춤형치료법 적용기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 암조직에서 방사선 저항성 조절 인자의 기능 검증과 과학적 신뢰도를 확보함</li> <li>- 방사선치료 후 재발 환자의 검체를 통계적 신뢰도가 구축될 만큼 충분히 확보하지 못하여 적용기술을 위한 내용이 추후 필요함.</li> </ul> </li> </ol>	10	94	-핵심인자를 활용한 맞춤형치료법 최적화 응용기술 개발부분이 미진함 -핵심인자 활용 원천기술은 확보하였으나 재발 환자의 검체를 통계수준으로 확보하지 못함.
총계		100	98.8	

## 제 2 절. 관련분야 기술발전예의 기여도

1. 방사선내성 조절과 관련된 다양한 관련 분자적, 세포학적 양상을 이해함으로써 기초 의생명과학의 학문적 발달을 유도하고 다른 종류의 질병치료에 응용되는 기초기본기술을 축적함
2. 방사선 내성인자를 조절할 수 있는 새로운 저분자조절물질의 국내개발에 기여할 것임.
3. 방사선 내성인자는 방사선 치료 예후를 평가 할 수 있는 바이오키트 기술개발로 확대 적용될 수 있을 것임.

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절. 경제적 측면

- 방사선 내성인자 및 항암제 내성인자는 방사선치료 효과 증진제, 항암제 및 새로운 종양치료법 개발의 표적자로 활용될 수 있으므로 우선 지적재산권 확보를 일부 선점하였고 계속해서 특허등록을 수행함.
- 방사선 내성 인자 중 항암제 내성과 관련된 인자는 새로운 항암내성 표적자로 활용될 수 있으므로 연구에서 새로이 개발된 신규 물질, 바이오 인자 등을 실용화하고 세계적인 특허를 얻어 부가가치를 높이기 위해서는 단기 단발성의 연구보다는 연속성의 연구가 필요함
- 방사선 내성인자 및 항암제 내성인자는 방사선 및 항암제 내성 조절 시스템 및 생리활성물질의 개발에 기여할 수 있으므로 국내 유관기업 (삼양제넥스, 일양약품, 종근당)에 기술이전을 위한 방향을 병행하여 연구할 것임.

### 제 2 절. 사회적 측면

- 국내 미개척 분야로서 연구 내용이 국민 삶의 질을 향상시키고, 암 치료에 이용될 수 있는 기초 방사선의학 연구 분야이므로 사회적으로 중요함. 본 연구개발 결과를 국내 임상 치료에 실질적인 도움이 될 수 있도록 계획과 방안이 필요하며 이를 위해 활용함.
- 성공적 연구를 통해 균형을 갖춘 경쟁력 있는 연구 기관으로의 발전이 이루어져 필요하다면 이 분야에 대한 전문 연구인력을 양성할 수 있으며, 나아가 이공계 청년실업 문제를 해결하는데 활용함.

### 제 3 절. 기술적 측면

- 방사선치료 내성인자의 발굴을 통한 방사선치료 예후 평가기술은 방사선 치료 예측률 및 변별력을 향상시켜 맞춤형 치료기술 개발에 활용할 것이며, 방사선 내성 및 항암제 내성에 대한 보다 정확한 이해로 방사선치료 증진기술 및 항암치료기술 개발에 활용함.
- 발암 관련 방사선내성형질에 대한 정보를 이해하여 암의 예방 및 치료방법의 개발에 활용하고 새로운 세포암화 제어기술 개발과 방사선 및 항암제 내성극복 기술개발에 활용함.
- 새로운 예후 평가기술도입의 완성으로 세계 최고 권위의 학술지에 발표 가능하여 국내 방사선의학의 위상을 세계에 알리고 학문적 경쟁력을 통한 관련기술의 국제화에 기여.
- 연구가 이루어 지지 않은 종양 내의 방사선 내성유전자를 조절할 수 있는 분자적, 세포학적 양상을 이해하여 기초 의생명과학의 학문적 발달을 유도하고 타 질병치료에 응용되는 기초기반 기술을 축적.
- 방사선 치료환자의 재발과 관련된 인자와 방사선통합 네트워크를 위한 검체 추적시스템을 개발하고, 인체 종양에서 방사선 내성 및 치료인자 작용 네트워크를 확립하는데 활용함.

## 제 4 절. 4차 원자력연구개발사업과의 연계 활용성

- 방사선 암치료 효율 증진을 위한 방사선 저항성 표적유전자의 발굴과 기능 검증이 완료된 유효인자는 암의 방사선저항성 극복을 위한 실용화 기술 개발로 연계 활용되어야 함.
  - (1) 표적자를 방사선저항성 치료 타겟으로 활용 개발하고
  - (2) 방사선치료 효과를 예측하는 마커로서 이용하며
  - (3) 분자물질의 특성을 이용하여 기능을 조절하는 신약후보를 분석/발굴하는데 활용되며
  - (4) 방사선 치료효과 예후, 예측용 바이오키트 개발에 활용함.
- 방사선치료 기술의 활용화 측면에서 확보된 원천기술은 중개/임상연구로의 실용화를 위해 4차 원자력연구개발사업과 연계하여 계속적으로 수행이 이루어져야 할 것임.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 방사선에 대한 감수성/저항성의 차이는 세포의 종류와 조절기전에 따라 상이하게 이루어짐. 종양세포에 비해 정상세포가 감수성이 적은 것으로 알려져 있으나 동일세포 간에도 방사선 반응정도가 세포의 생리적 조건에 따라 달라짐을 보고함. 그러므로 방사선내성에 대한 인자의 표적화가 개인의 유전성을 고려하여 매우 조심스럽게 이루어져야 함을 보고함.
2. 암의 치료효과를 증대시키기 위해서 암의 발생에 중요한 역할을 하는 표적을 찾아야 하나 현재에도 표적인자들이 충분히 밝혀지지 않고 있음. 소수의 표적치료제도 초기에는 효과가 뛰어나지만 계속적 사용으로 암세포에서의 새로운 돌연변이의 유전학적 이상이 나타나 내성이 생길수 있음. 그러므로 고효율, 최적의 내성인자 표적치료제 개발이 중요하며 표적치료제가 만능이 아니므로 재발에 대한 피드백 인식이 필요함.
3. 최근에 방사선 저항성을 가지는 암세포가 종양덩어리에 매우 적은 숫자로 존재하며, 이를 암줄기세포라고 명명하고 있음. 일반적 개념의 종양뿐만 아니라 암줄기세포까지도 제어할 수 있는 개념이 종양의 완치를 이룬다는 새로운 학설이 제기되고 있음. 새로운 개념에 대한 학설의 검증이 필요함.

## 제7장 연구시설 · 장비 현황

해당 사항 없음

## 제8장 참고문헌

1. Leo E. Gerweck, Shashirekha Vijayappa, Akihiro Kurimasa, Kazuhiko Ogawa, and David J. Chen. Tumor Cell Radiosensitivity Is a Major Determinant of Tumor Response to Radiation. *Cancer Res.* 66:8352-8355, 2006.
2. Eric Ft. Fearon and Bert Vogelstein. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61:759-767, 1990.
3. Otero DC, Poli V, David M, and Rickert RC. Cutting edge: inherent and acquired resistance to radiation-induced apoptosis in B cells: a pivotal role for STAT3. *J. Immunol.* 177:6593-6597, 2006.
4. Tyrsina EG, Slanina SV, Kakpakova ES, Kalendo GS, Kan NG, Tyrsin OY, and Ryskov AP. Isolation and characterization of highly radioresistant malignant hamster fibroblasts that survive acute gamma irradiation with 20 Gy. *Radiat Res.* 164:745-754, 2005.
5. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, and Weichselbaum RR. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:1714-1719, 2004.
6. Pearce AG, Segura TM, Rintala AC, Rintala-Maki ND, and Lee H. The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells. *Radiat Res.* 156:739-750, 2001.
7. Marcu L, van Doorn T, and Olver I. Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer-a review of their cooperation. *Acta Oncologica.* 42:315-325, 2003.
8. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, and Haslett C. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Medicine* 5:662-668, 1999.
9. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, and Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to

anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas* 28:38-44, 2004.

10. Abend M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol.* 79:927-941, 2003.
11. Mirzayans R, Scott A, Cameron M, and Murray D. Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiat Res.* 163:53-62, 2005.
12. Jones KR, Elmore LW, Jackson-Cook C, Demasters G, Povirk LF, Holt SE, and Gewirtz DA. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int J Radiat Biol.* 81:445-458, 2005.
13. Rave-Fränk M, Virsik-Köpp P, Pradier O, Nitsche M, Grünefeld S, and Schmidberger H. In vitro response of human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int J Radiat Biol.* 77:1163-1174, 2001.

