

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 11월 2일 (02.11.2017) **WIPO | PCT**

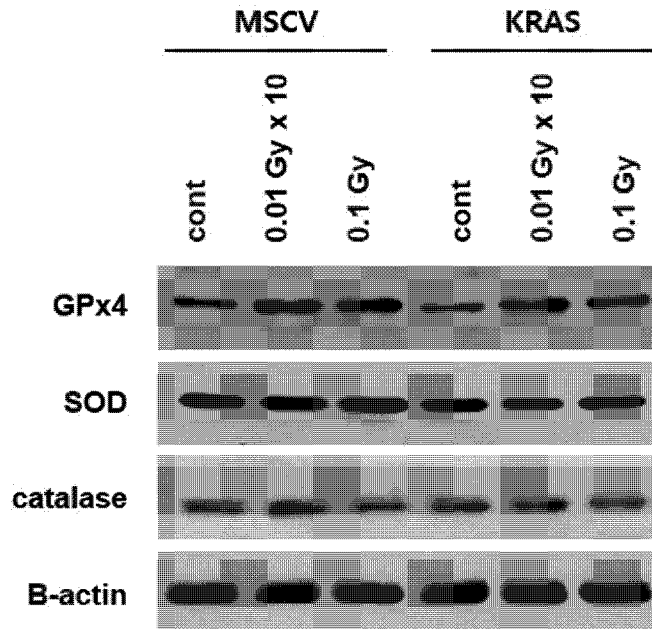


(10) 국제공개번호
WO 2017/188516 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 13/00* (2006.01) *A61N 5/10* (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009300
- (22) 국제출원일: 2016년 8월 23일 (23.08.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0053592 2016년 4월 29일 (29.04.2016) KR
- (71) 출원인: 한국수력원자력 주식회사 (**KOREA HYDRO & NUCLEAR POWER CO., LTD**) [KR/KR]; 38120 경상북도 경주시 양북면 불국로 1655, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 남선영 (**NAM, Seonyoung**); 04428 서울시 용산구 이촌로 347, 15동 906호, Seoul (KR). 양광희 (**YANG, Kwang Hee**); 01332 서울시 도봉구 도봉로150길 43, 101동 905호, Seoul (KR). 이수재 (**LEE, Su-Jae**); 03168 서울시 종로구 사직로8길 4, 105동 1204호, Seoul (KR). 김래
- (74) 대리인: 이은철 (**LEE, Un Cheol**); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123, 11층 5T국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: METHOD FOR PREVENTING CANCERIZATION DUE TO LOW-DOSE IRRADIATION

(54) 발명의 명칭: 저선량 방사선 조사에 의한 암화 예방 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preventing cancerization of normal cells due to low-dose irradiation. The method enables effective prevention of cancerization of normal cells by means of low-dose radiation which is innocuous to a subject.

(57) 요약서: 본 발명은 저선량 방사선 조사에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용함으로써, 대상(subject)에 무해한 저선량 방사선을 이용하여 정상 세포의 암화를 효과적으로 예방할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/188516 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예
외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 저선량 방사선 조사에 의한 암화 예방 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 저선량 방사선 조사에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] UNSCEAR은 1982년의 보고서(United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Ionizing radiation: sources and biologic effects. Vienna: United Nations; 1982.)에서 저선량 방사선에서는 암 이외의 다른 사망 위험 요인은 없다고 생각하였다. 그러나 이후 일련의 동물실험에서 암으로 인한 사망의 방사선과 관련된 수명 손실을 모두 설명할 수는 없었다. 더욱이 일본 원폭 생존자의 수명연구에서 얻은 최근 몇 년간의 데이터는 이러한 가능성이 높음을 보여주고 있다. 그러나 최근 2010년에 발표한 보고서에 따르면 백내장의 발생이 저선량 방사선 피폭과 관계되며 심혈관계 질환에 있어서도 계속적으로 연구할 필요가 있다고 하였다(United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report of the United Nations scientific on the effects of atomic radiation. Vienna: United Nations; 2010.). 이와 반대로, Aurengo, Tubiana 등을 중심으로 하는 프랑스 과학원의 경우는 고선량에서 관찰된 피폭-영향 관계를 저선량까지 외삽하는 방식에 문제가 있다는 주장을 하였다(Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005;63:317-319., The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. Radiology 2009;251:13-22.). 또한 미국의학물리학회(The AAPM statement on radiation dose from computed tomography, in response to the Brenner and Hall NEJM article published Nov 29, 2007)에서는 Brenner와 Hall(Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography: an increasing source of radiation exposure. N Engl J Med 2007;357:2277-2284.)의 논문에 대한 의견을 반박하며, 저선량 방사선에 대한 기준이 필요함을 나타내었다.
- [3] 방사선 조사에 의한 연구는 고선량에 의하여 나타나는 현상들에 국한되어 있다. 그 예로, 원폭생존자들을 대상으로 한 연구에서 암 발생은 100 mSv 이상의 피폭생존자에게서 의미 있게 증가하였다. 하지만 특수한 상황이 아니면 보통사람이 100 mSv 이상의 방사선에 피폭되는 경우는 매우 드물며, CT 촬영에서와 같이 저선량 방사선 피폭에서 방사선 피폭과 암의 관계를 추정하는 것이 실질적인 대중들에게 필요한 요소이다. 또한 방사선을 다루는 업종의 종사자들을 위한 저선량 방사선 피폭에 대한 조사도 이루어져야 한다. 100 mSv

이하에서 암 발생위험도를 추정하기 위해서는 알려진 데이터(100 mSv 이상에서 암 발생률)를 이용한 외삽(extrapolation)이 필요한데, 아직까지 여러 가지 모델이 제시될 뿐 정확한 지침이 없는 실정이다.

- [4] 한편, 정상적인 유전자가 여러 가지 요인으로 인해 발암 유전자(oncogene)로 전환될 수 있는 가능성을 지니고 있는 유전자를 원발암 유전자(proto-oncogene)라고 하는데, Ras 또한 이러한 유전자 가운데 하나이다. Ras 유전자에 의해 형성된 Ras 단백질은 21 kDa의 분자량을 갖고, 진핵세포에서 특이적으로 발현되며 모든 동물세포에서는 세 가지 타입의 Ras 단백질(H-Ras, K-Ras, NRas)이 존재한다. Ras 단백질은 티로신 카이네이즈 리셉터(tyrosine kinase receptor)를 활성화 시키는 외부 자극에 대한 반응으로 활성화 된다. 티로신 카이네이즈 리셉터가 외부자극에 의해 자기 인산화(autophosphorylation)가 일어나면 이때의 리셉터 활성화는 시그널 단백질(signal protein)을 연결시켜주는 어댑터 단백질(adaptor protein)인 Grb2가 SOS 단백질을 불러들여 복합체를 형성하게 된다. SOS 단백질은 활성화된 리셉터와 연결되어서 주위의 플라스마 막에 결합해 있는 비활성된 ras GDP를 GDP/GTP 교환을 일으키고 이를 통해 Ras가 활성화 된다. 활성화 된 Ras는 Raf-MAP 카이네이즈 경로와 같은 다양한 신호전달 과정을 활성화 시킴으로써 세포의 증식 및 분화를 조절하는 역할을 하게 된다.
- [5] 정상 조직에서의 K-Ras는 세포 성장과 분화를 조절하지만, 암 세포에서의 K-Ras는 비정상적인 분열 및 유지경로를 활성화하여 급격히 집적됨으로서 악성화 되고 항암치료에 대한 저항성을 획득하게 되며 궁극적으로 암의 재발을 야기한다고 제시되고 있다. 그러나 아직까지 암세포의 전이 및 유지를 조절하는 종양 인자의 실체와 상호작용에 대한 구체적인 기전연구는 진행되지 못하고 있다.
- [6] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 암 발생의 가장 큰 원인으로 제시되고 있는 원발암 유전자에 의한 암화 현상을 예방할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 저선량 방사선의 조사에 의해 정상 세포의 암화 현상을 예방할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 저선량 방사선을 포유류인 대상(subject)에 조사하는 단계를 포함하는 원발암 유전자(proto-oncogene)에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법을 제공하는데 있다.

- [9] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 저선량 방사선을 포유류인 대상(subject)에 조사하는 단계를 포함하는 원발암 유전자(proto-oncogene)에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법을 제공한다.
- [11] 본 발명자들은 본 발명자들은 암 발생의 가장 큰 원인으로 제시되고 있는 원발암 유전자에 의한 암화 현상을 예방할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 저선량 방사선의 조사에 의해 정상 세포의 암화 현상을 예방할 수 있음을 규명하였다.
- [12] 본 발명의 용어 "방사선"은 γ -방사선을 의미한다.
- [13] 본 명세서 상의 용어 "대상(subject)"이란 암화 유전자에 의한 세포의 암화 과정이 체내에서 발생가능한 모든 생물을 의미하며, 구체적으로 예를 들면 Ras 유전자를 포함하고, 이에 의해 세포의 암화가 진행될 수 있는 포유류를 의미한다. 특히 원발암유전자의 발현이 높아져 있거나 혹은 암화현상이 의심되는 대상으로서 본 발명의 저선량 방사선을 이용한 예방 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대되는 대상을 의미한다.
- [14] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 포유류는 인간을 제외한 포유류이다. 암화 유전자, 구체적으로 예를 들어 Ras 유전자는 인간 외의 포유류에서도 발견되며, 인간 외의 포유류를 대상으로 저선량 방사선을 조사함으로써, 인간에 대해 얻을 수 있는 암화 유전자-유도의 악성 암화를 억제하는 효과를 동일하게 얻을 수 있다.
- [15] 본 명세서 상의 용어 "저선량 방사선"은 종래 환자의 진단 및 치료에 사용해왔던 방사선의 누적 선량에 비하여 상대적으로 더욱 낮은 누적 선량의 방사선을 의미하며, 일반적으로 누적선량을 구체적으로 표기하지 않은 채 일반적인 용어로서 "저선량 방사선"이라는 표현을 사용하고 있는 실정이다.
- [16] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 저선량 방사선은 흡수선량이 1 Gy 이하이다. 더 구체적으로 본 발명의 저선량 방사선의 흡수선량은 0.01 Gy 내지 1 Gy이고, 더욱 더 구체적으로는 0.1 Gy 내지 1 Gy이다. 상기 흡수선량은 포유류 대상에 무해한 것으로 여겨지는 방사선 흡수선량에 해당하는 양이다. 본 발명인 방법에 의하면 일반적으로 대상에 유해하지 않은 흡수선량의 방사선 조사에 의해 정상 세포의 암화를 억제할 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 원발암 유전자는 K-ras 유전자이다. 정상적인 유전자가 여러 가지 요인으로 인해 발암 유전자(oncogene)로 전환될 수 있는 가능성을 지니고 있는 유전자를 원발암 유전자(protooncogene)라고 하는데, Ras 또한 이러한 유전자 가운데 하나이다. Ras 유전자에 의해 형성된 Ras 단백질은 21 kDa의 분자량을 가지는데 진핵세포에서만 특이적으로 발현되며

모든 동물세포에서는 세 가지 유형의 Ras 단백질(H-Ras, K-Ras, N-Ras)이 존재한다. 본 발명은 특히 K-Ras에 의해 유도되는 정상 세포의 암화를 예방할 수 있는 방법을 제공한다.

[18] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 암화 예방은 상술한 저선량 방사선 조사에 의한 GPx4의 발현 증가에 의한 것이다. 본 발명의 GPx4(Glutathione peroxidase 4)는 글루타치온 퍼옥시다아제 단백질 패밀리에 속하는 단백질로서, 본 발명자들은 저선량 방사선의 조사에 의해 상기 GPx4의 발현이 증가함을 규명하였다.

[19] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 GPx4의 발현 증가는 KRas에 의해 유도되는 활성 산소의 억제를 유도한다. K-Ras에 의한 활성산소종(Reactive oxygen species)의 생성은 이미 보고된 바 있다(Cell Death and Differentiation (2014) 21, 1185-1197). 활성산소는 세포의 암화를 촉진시킬 수 있다고 알려져 있고, 본 발명자들은 본 발명에서 억제되는 악성화 현상이 활성산소의 조절과 관련이 있음을 규명하였다.

발명의 효과

[20] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[21] (a) 본 발명은 저선량 방사선을 포유류인 대상(subject)에 조사하는 단계를 포함하는 원발암 유전자(proto-oncogene)에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법을 제공한다.

[22] (b) 본 발명인 암화 예방 방법을 이용하면, 대상(subject)에 무해한 저선량 방사선을 이용하여 정상 세포의 암화를 효과적으로 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[23] 도 1A 내지 도 1C는 저선량 방사선 조사의 세포 성장 속도 및 세포사에 대한 영향을 관찰한 결과를 나타낸 것으로, 도 1A는 0.1 Gy의 단일 조사와 0.01 Gy의 분할 조사 방법에 대한 것이고, 도 1B는 MSCV(Murine Stem Cell Virus)에 대한 저선량 방사선 조사와 K-Ras 과발현 세포에 대한 저선량 방사선 조사에 따른 세포수의 변화에 관한 것이며, 도 1C는 저선량 방사선에 의한 세포사를 관찰한 결과이다.

[24] 도 2A 내지 도 2D는 원발암 유전자의 과발현에 따른 세포의 이동 및 침윤 능력, 암화 현상을 관찰한 결과를 나타낸 것으로, 도 2A는 원발암 유전자 과발현시의 세포의 이동능력에 관한 것이고, 도 2B는 원발암 유전자 과발현시의 세포의 침윤 능력에 관한 것이며, 도 2C는 원발암 유전자 과발현시의 생성된 콜로니 수에 관한 것이고, 도 2D는 상피 세포의 암화에 따른 정상 상피 세포의 특징적인 구조의 붕괴를 나타낸다.

[25] 도 3A 내지 도 3D는 저선량 방사선의 조사에 의한 암화의 억제가 K-Ras에 의한 활성산소종의 조절에 의한 것인지 관찰한 결과를 나타낸 것으로, 도 3A는 저선량 방사선 조사에 따른 활성 산소종의 감소를 관찰한 결과를 나타내고, 도

3B는 항산화제로 알려진 N-아세틸시스테인 처리시 K-Ras에 의해 유도되는 침윤능을 관찰한 결과를 나타내며, 도 3C는 소프트 아가 분석에 의한 활성산소에 의한 암화현상 조절여부에 대한 실험 결과를 나타내고, 도 3D는 3차원 배양 상태에서 포도상 형태를 관찰한 결과를 나타낸다.

- [26] 도 4A 내지 도 4E는 원발암 유전자에 의하여 증가하는 활성산소를 저선량방사선 조사 받은 세포내에서 어떠한 기작에 의해 조절되는지 확인한 결과를 나타낸 것으로, 도 4A는 활성산소와 관련된 항산화 인자들 가운데 GPx4가 저선량 방사선 조사에 의해 증가하였음을 나타내고, 도 4B는 저선량 방사선 조사 세포에 GPx4를 억제시킨 결과 활성 산소의 농도가 다시 증가하였음을 나타내며, 도 4C는 세포의 이동과 침윤 능력 역시 GPx4를 감소시켰을 때 다시 증가하는 것을 나타내고, 도 4D는 3차원 배양을 통해서도 같은 결과를 도출할 수 있음을 나타내며, 도 4E는 소프트 아가 분석을 통해 같은 결과를 얻은 것을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [28]
- [29] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[30]

[31] 실시예 1. 정상 유방 세포주에 대한 방사선 조사의 영향

- [32] 정상 유방 세포주인 MCF10A 에 분할 방사선 (0.01 Gy씩 10회)과 일괄 방사선으로 (0.1 Gy 1회) 누적 선량 0.1 Gy(=10 cGy)를 조사 후(참조: 도 1A) 세포의 성장속도와 세포사를 관찰하였다. 먼저 원발암유전자인 K-Ras를 바이러스 감염을 통한 과발현 시스템을 통해 과발현시켜 세포의 성장속도를 비교한 결과, 저선량에 의한 효과는 보이지 않았지만, K-Ras에 의하여 성장속도가 빨라짐을 확인하였다(참조: 도 1B). 도 1B에서 MSCV는 대조구를 나타낸다. KRAS+cont는 방사선 조사에 대한 실험구로서 성장속도가 빨라진 것을 나타낸다. 저선량 방사선에 의하여 세포사가 나타나는지 확인을 해보고자 PI(Propidium iodide) 염색을 진행하였다. 그 결과 저선량 방사선과 K-Ras에 의한 세포사는 관찰되지 않았다(참조: 도 1C). 이로써, 저선량방사선은 세포의 성장속도나 세포사에는 영향을 주지 않고, K-Ras는 세포의 성장속도에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

[33]

[34] 실시예 2. 원발암유전자에 의한 암화현상에 대한 저선량 방사선 조사 효과

- [35] 저선량 방사선 조사가 원발암유전자에 의한 효과에 어떠한 역할을 하는지,

트랜스-웰(trans-well)을 이용한 이동(migration) 및 침윤(invasion) 분석을 수행하였다. 세포의 이동능력의 증가는 암화현상의 대표적인 현상이다. 이에, 원발암유전자(K-Ras)를 과발현시켜 정상유방세포의 이동능력을 측정하였다. 그 결과 원발암유전자에 의하여 증가한 이동능력이 저선량방사선을 조사한 군에서 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다(참조: 도 2A). 다음으로 세포의 이동능력 뿐 아니라 침투능력까지 확인을 해보고자 실험을 진행하였다. 세포를 분주한 후세포에 일정한 두께의 선을 그어 시간의 흐름에 따라 그 간격의 변화를 관찰하여 세포의 이동 능력을 측정하였다. 그 결과 앞선 결과와 마찬가지로 원발암유전자에 의하여 증가한 이동 및 침투능력이 저선량방사선에 의하여 감소함을 관찰하였다(참조: 도 2B). 세포의 암화 형질을 알아보기 위해 소프트 아가 분석(soft agar assay)을 수행한 결과 원발암유전자를 과발한 시킨 경우, 콜로니가 형성이 되고, 저선량 방사선을 조사받은 세포들은 그 수가 현저히 감소됨을 알 수 있었다(참조: 도 2C). 분비 선 유래 상피세포 (glandular epithelial cells)는 매우 잘 조직화된 구조 즉, 극성을 보이는 형태(polarized morphology), 특징적인 세포간 연결(specialized cell to cell contacts), 기저막 고착(attachment to underlying basement membrane) 등이 관찰되는데 특히, 3차원 배양(3D culture) 상태에서는 가운데 공간이 생기는 구형의 포도상 형태(acinar spheroid forms with centrally-localized, hollow lumen)를 나타낸다. 상피세포의 암화는 이러한 특징적인 구조를 무너뜨려 비정상적인 포도상 형태(abnormal acinar forms)를 유도한다. 세포외질(extracellular matrix) 성분을 이용해 암화된 세포를 배양하여 비정상적인 형태의 포도상의 빈도를 관찰하였다. 그 결과 포도상 형태를 보이던 세포가 원발암유전자에 의하여 비정상적인 형태를 나타내고, 저선량 방사선을 조사한 그룹에서는 다시 비정상적인 형태의 수가 급격히 줄어들음을 관찰 할 수 있었다(참조: 도 2D). 이로써, 저선량방사선 조사가 원발암유전자에 의한 암화현상을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[36]

[37] 실시예 3. 저선량 방사선 조사에 따른 활성 산소 발생에 대한 영향

[38] 유방표피세포의 특징을 3차원 세포배양을 통하여 저선량 방사선 자체의 현상과 원발암유전자에 의한 현상, 그리고 원발암유전자에 의해 나타나는 현상에 저선량방사선의 효과를 관찰하였다. K-Ras에 의한 활성산소(ROS: Reactive oxygen species) 생성은 이미 보고된 바 있다. 활성산소는 세포의 악성화를 촉진시킬 수 있다고 알려져 있어 저선량 방사선에 의해 억제되어지는 세포의 악성화현상이 활성산소의 조절과 관련이 있는지를 조사하였다. 활성산소를 억제시키는 항산화제를 처리하여 악성화 현상들을 관찰함으로써, 활성산소가 악성화현상에 영향을 주는지 확인하였다. 그 결과 저선량방사선에 의하여 원발암유전자에 의하여 증가하였던 활성산소가 감소하는 것을 확인 하였다(참조: 도 3A). 활성산소가 직접적인 악성화의 원인이 맞는지 항산화제로 알려진 NAC(N-acetylcysteine)를 처리하여 K-Ras에 의해 유도되는 침윤능을

관찰하였다. 일정한 수의 세포를 보이든 챔버(boyden chamber)에 분주(seeding)하여 얼마나 많은 세포가 chamber의 반대면으로 이동하였는지를 관찰하였다. 그 결과 활성산소의 농도 조절과 일치하게 침윤능이 관찰되었다(참조: 도 3B). 암화 형질을 알아보기 위해 아가(agar) 안에 세포를 넣어 3D 상태에서 세포가 자라는지를 관찰하는 방식으로 소프트 아가 분석을 수행한 결과, 역시 항산화제를 처리하였을 때, 콜로니의 수가 감소하는 것으로 보아, 활성산소에 의하여 암화현상이 조절됨을 확인 하였다. 3차원 배양(3D culture) 상태에서 포도상 형태를 관찰한 결과 앞선 결과들과 일치한 결과들을 얻을 수 있었다(참조: 도 3D). 이로서, 원발암유전자인 K-Ras는 활성산소 조절을 통하여 암화현상을 유도함을 알 수 있었다.

[39]

[40]

실시예 4. 저선량 방사선 조사에 의한 신호 전달 체계 확인

[41]

저선량 방사선 조사에 의해 세포 내에서 일어나는 신호 전달 체계를 확인하고자 원발암유전자가 이용하는 세포 내 대표적 신호 전달계의 주요한 단백질의 발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 원발암유전자에 의하여 증가하는 활성산소를 저선량방사선 조사 받은 세포내에서 어떠한 기작에 의하여 조절 되는지를 확인해 보고자 하였다. 활성산소와 관련된 항산화 인자들을 조사한 결과 GPx4가 저선량방사선에 의하여 증가하는 것을, 웨스턴 블랏을 이용한 단백질의 발현정도 비교를 통해 관찰하였다(참조: 도 4A). 저선량방사선 조사를 받은 세포에 GPx4를 siRNA를 이용하여 억제시킨 결과 저선량방사선을 조사 받은 세포에서 감소되었던 활성산소의 농도가 증가함을 관찰 하였다(참조: 도 4B). 또한 세포의 움직임과 침투능력 역시 GPx4를 감소시켰을 때, 줄어들었던 이동능력과 침투능력이 다시 증가하는 것을 알 수 있었다(참조: 도 4C). 3차원 배양을 통한 결과에서도 앞선 실험들과 같은 결과를 얻을 수 있었고(참조: 도 4D), 소프트 아가 분석(soft agar assay)을 통한 실험에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다(참조: 도 4E). 이러한 결과들을 종합하여 볼 때, 저선량방사선을 받은 세포는 항산화 인자인 GPx4를 증가시킴으로써, 원발암유전자인 K-Ras에 의하여 유도되는 활성산소를 억제시킴으로써 암화현상을 억제한다는 결과를 도출하였다.

[42]

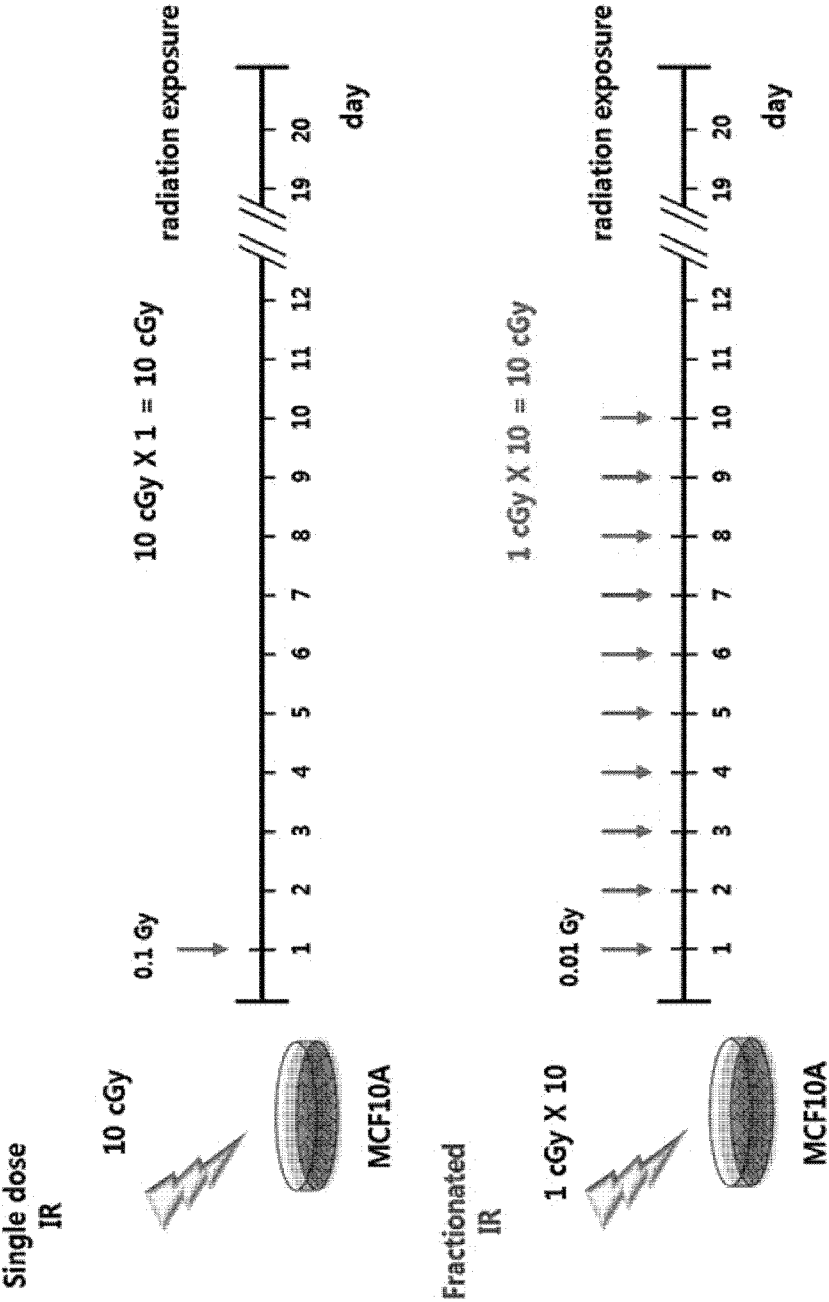
[43]

이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

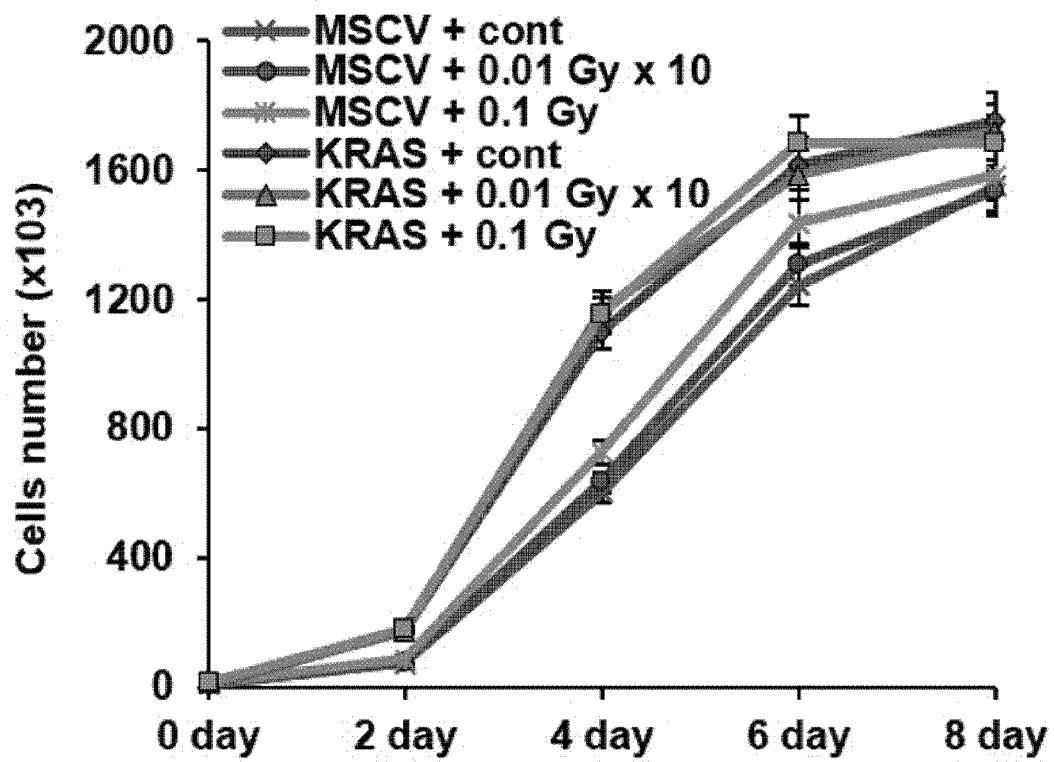
청구범위

- [청구항 1] 저선량 방사선을 포유류인 대상(subject)에 조사하는 단계를 포함하는 원발암 유전자(proto-oncogene)에 의한 정상 세포의 암화 예방 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 포유류는 인간을 제외한 포유류인 것을 특징으로 하는 정상 세포의 암화 예방 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 저선량 방사선은 흡수선량이 1 Gy 이하인 것을 특징으로 하는 정상 세포의 암화 예방 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 원발암 유전자는 K-RAS 유전자인 것을 특징으로 하는 정상 세포의 암화 예방 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 암화 예방은 상기 저선량 방사선 조사에 의한 GPx4의 발현 증가에 의한 것임을 특징으로 하는 정상 세포의 암화 예방 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
상기 GPx4의 발현 증가는 K-Ras에 의해 유도되는 활성 산소에 대한 억제제를 유도하는 것을 특징으로 하는 정상 세포의 암화 예방 방법.

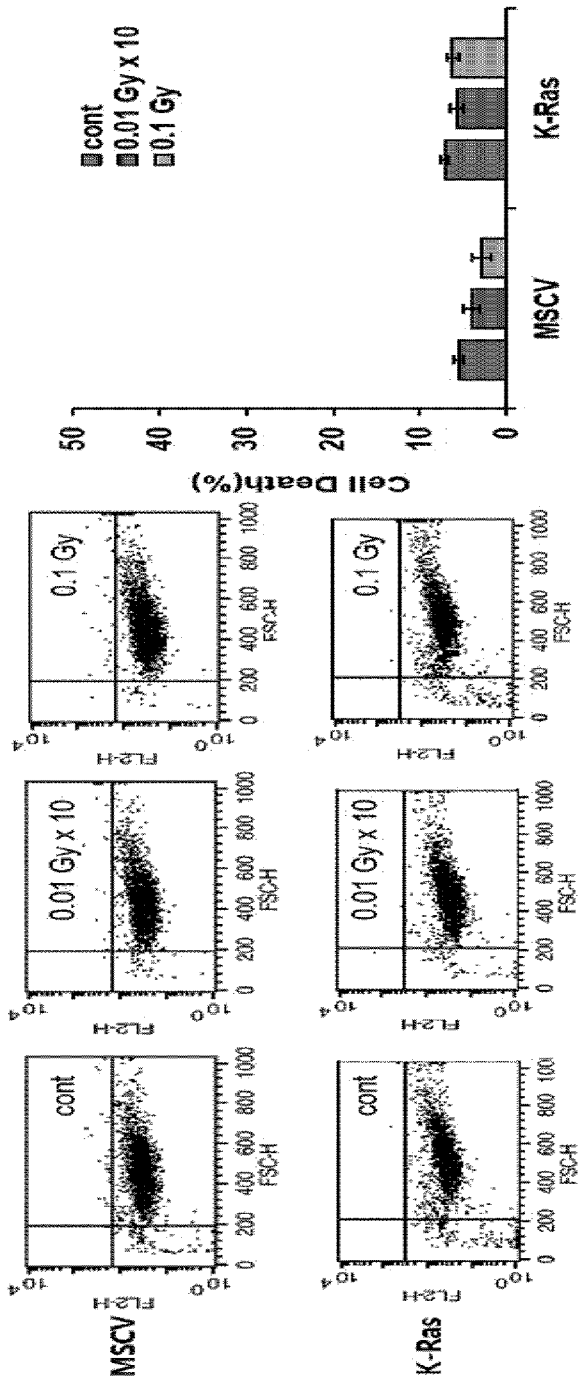
[도 1a]



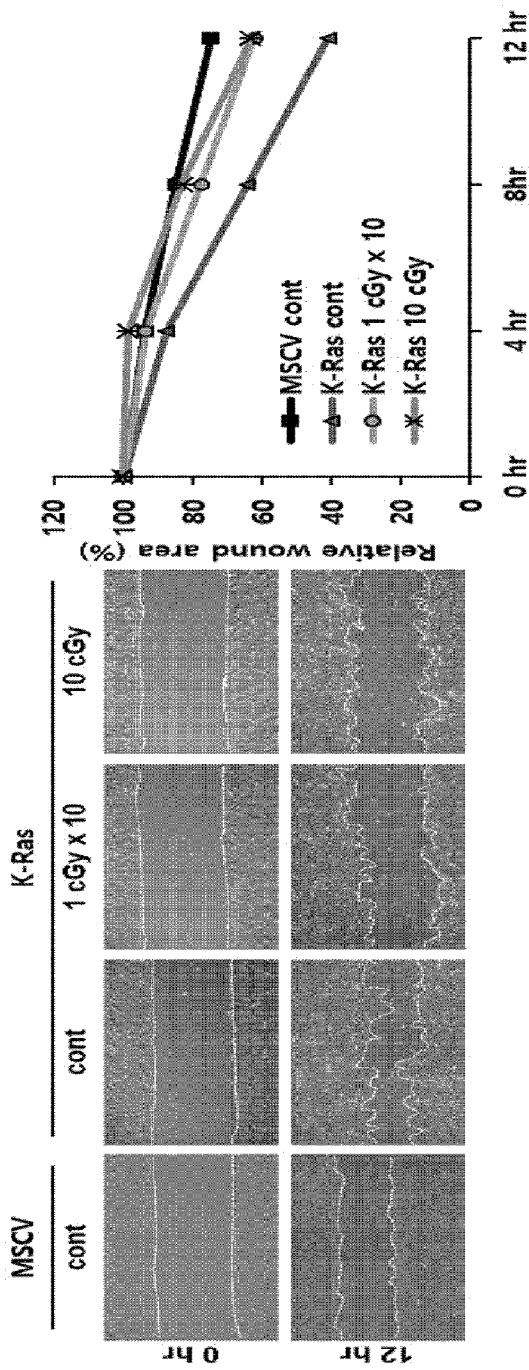
[도1b]



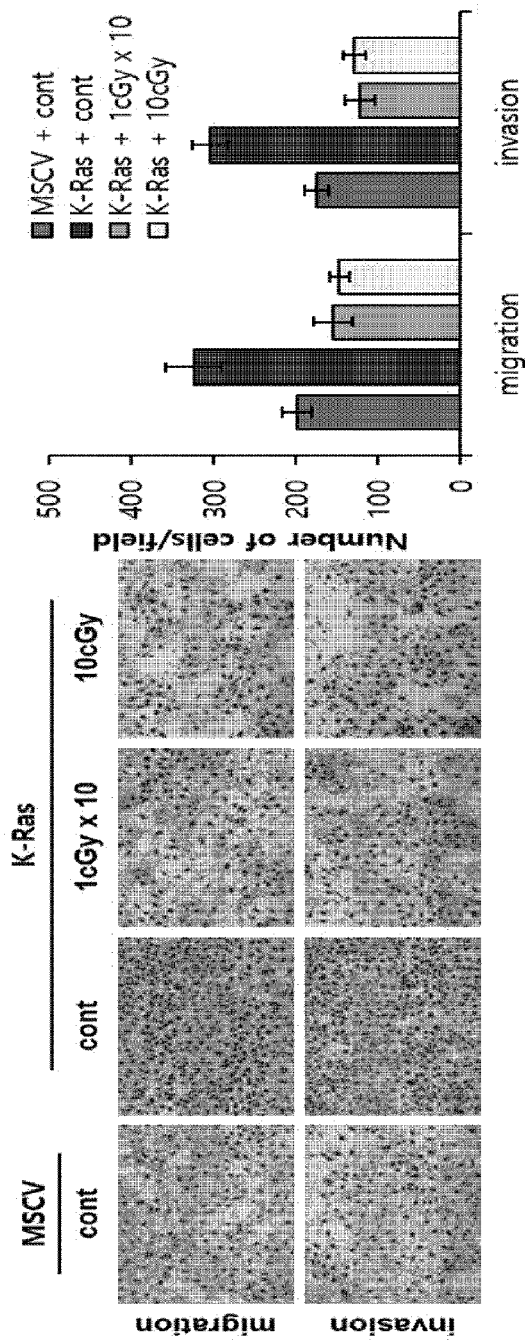
[도1c]



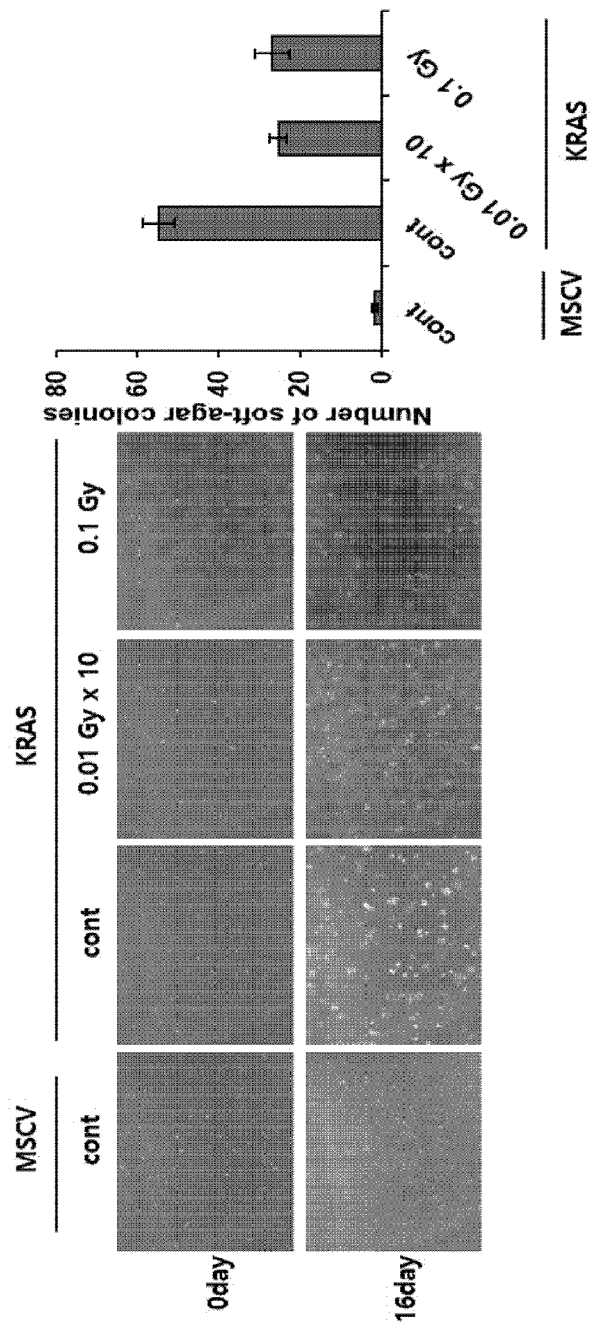
[도2a]



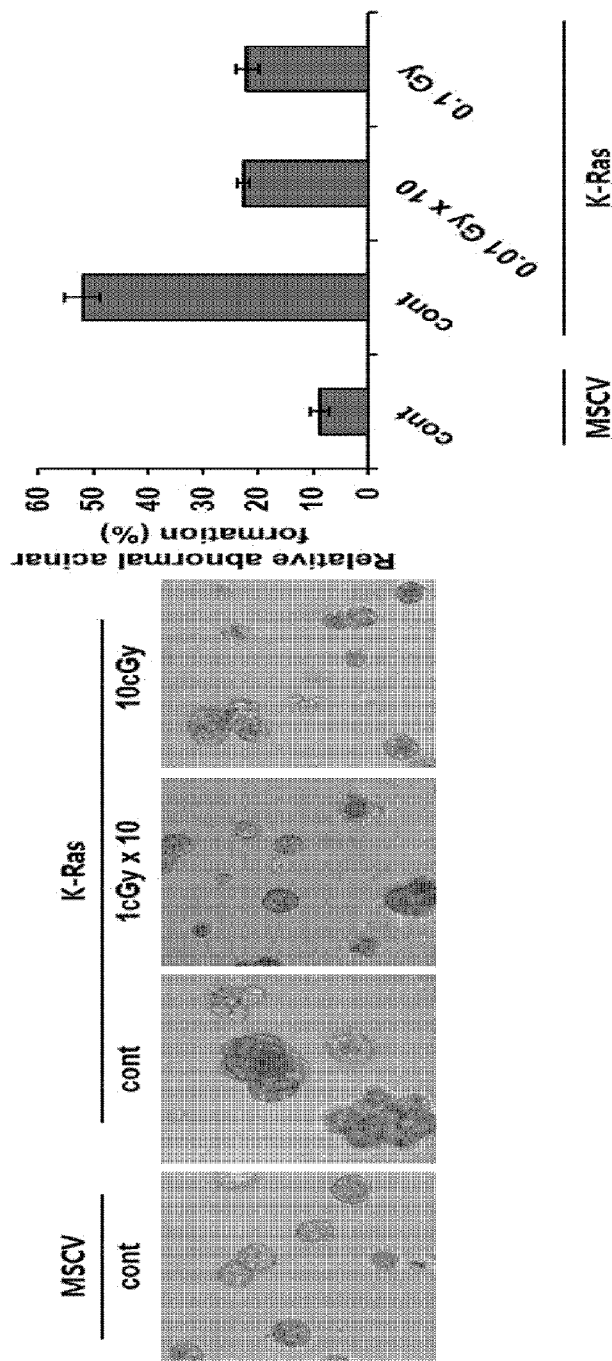
[도2b]



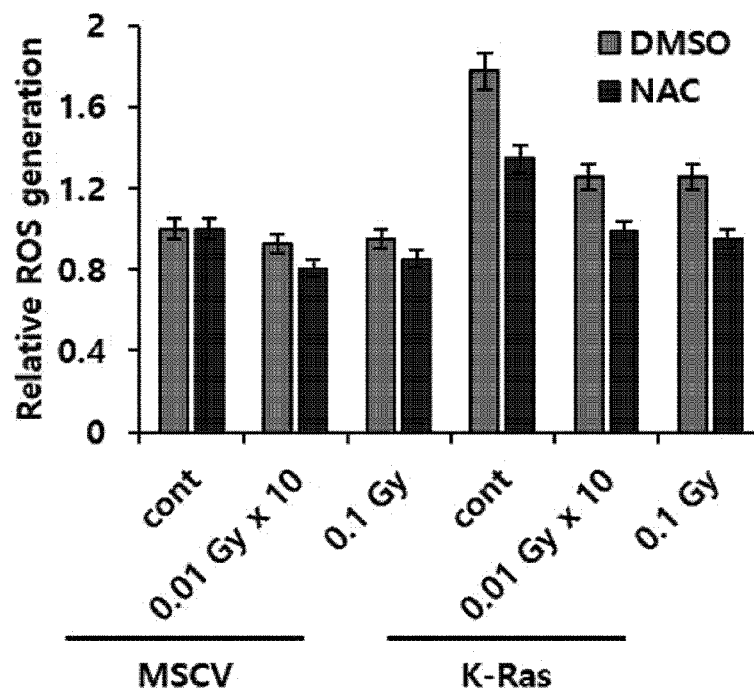
[도2c]



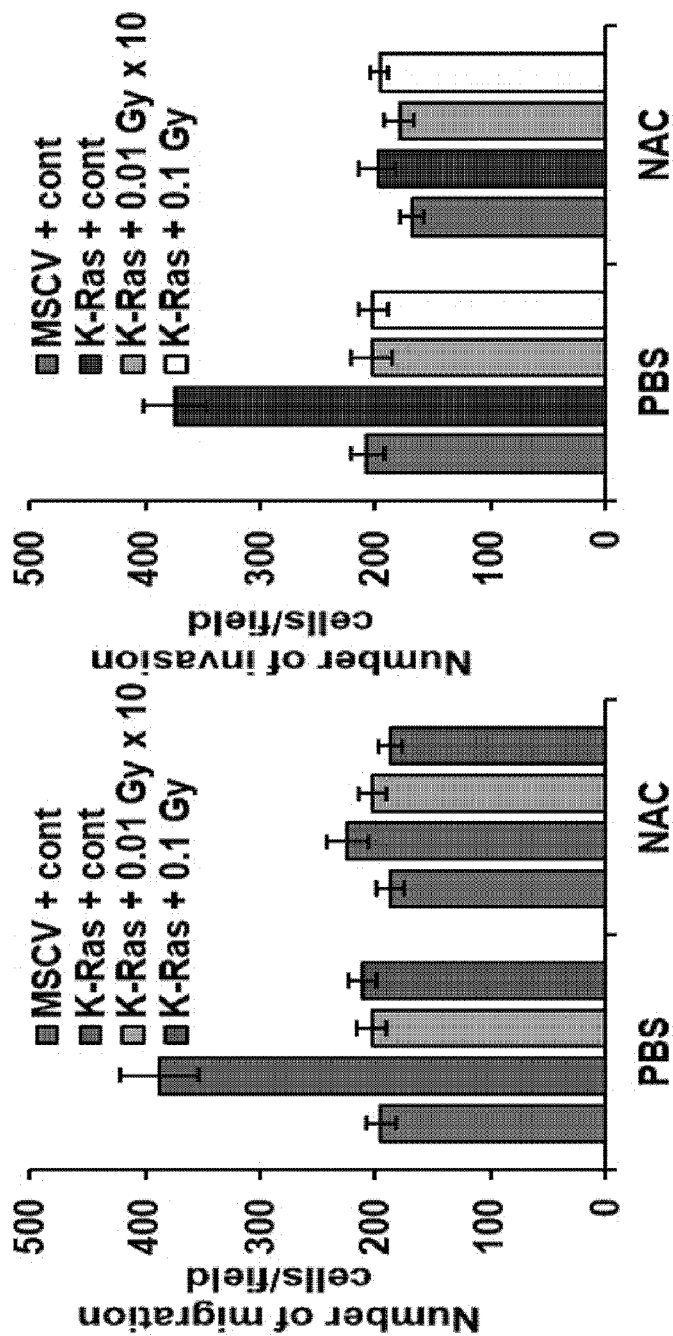
[도2d]



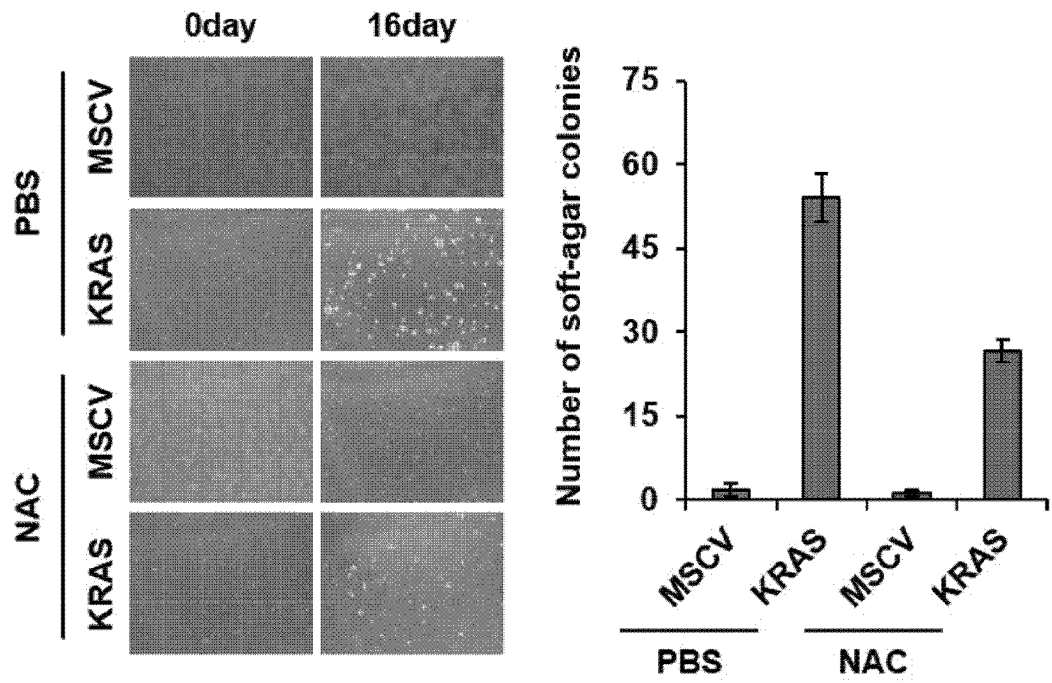
[도3a]



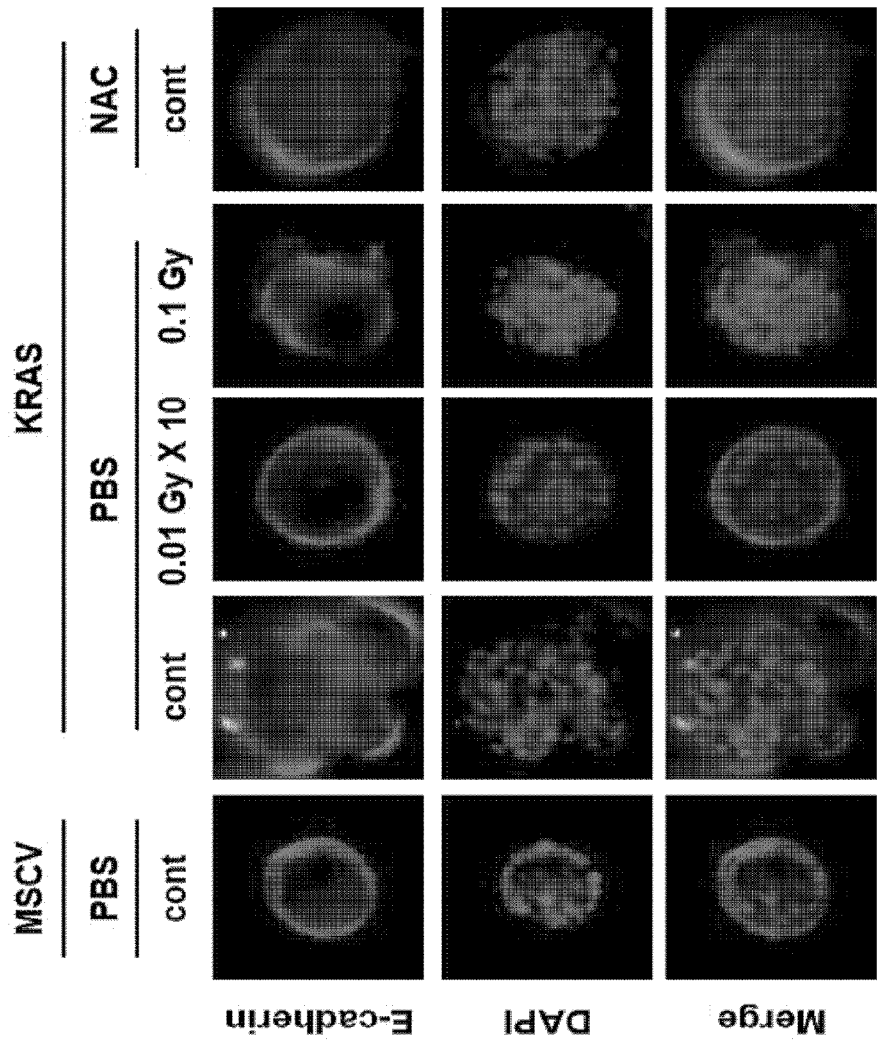
[도3b]



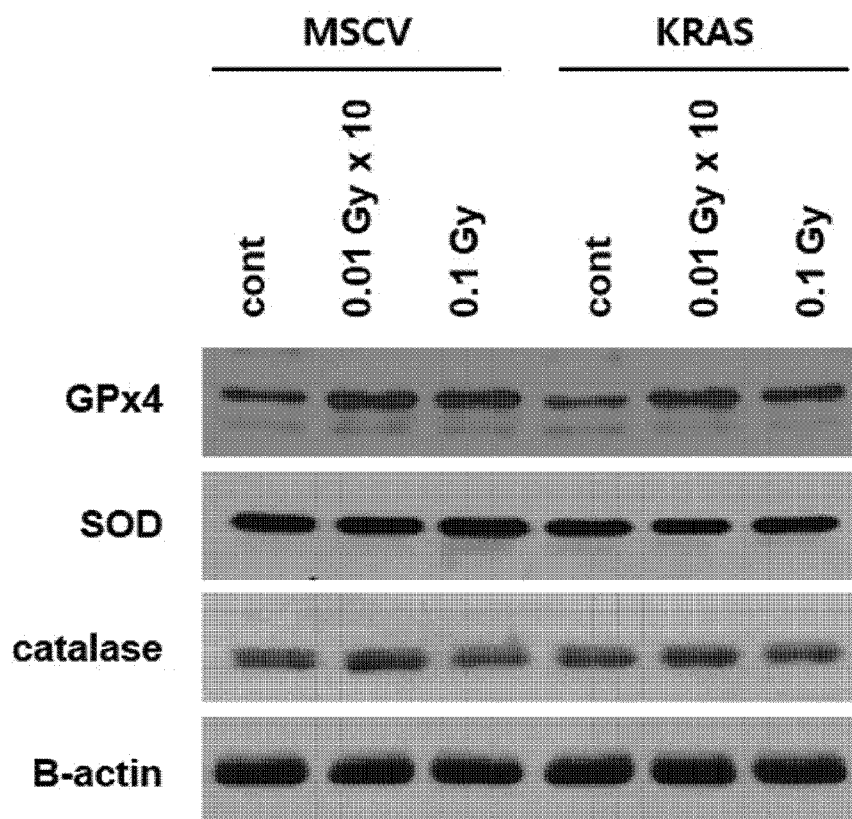
[도3c]



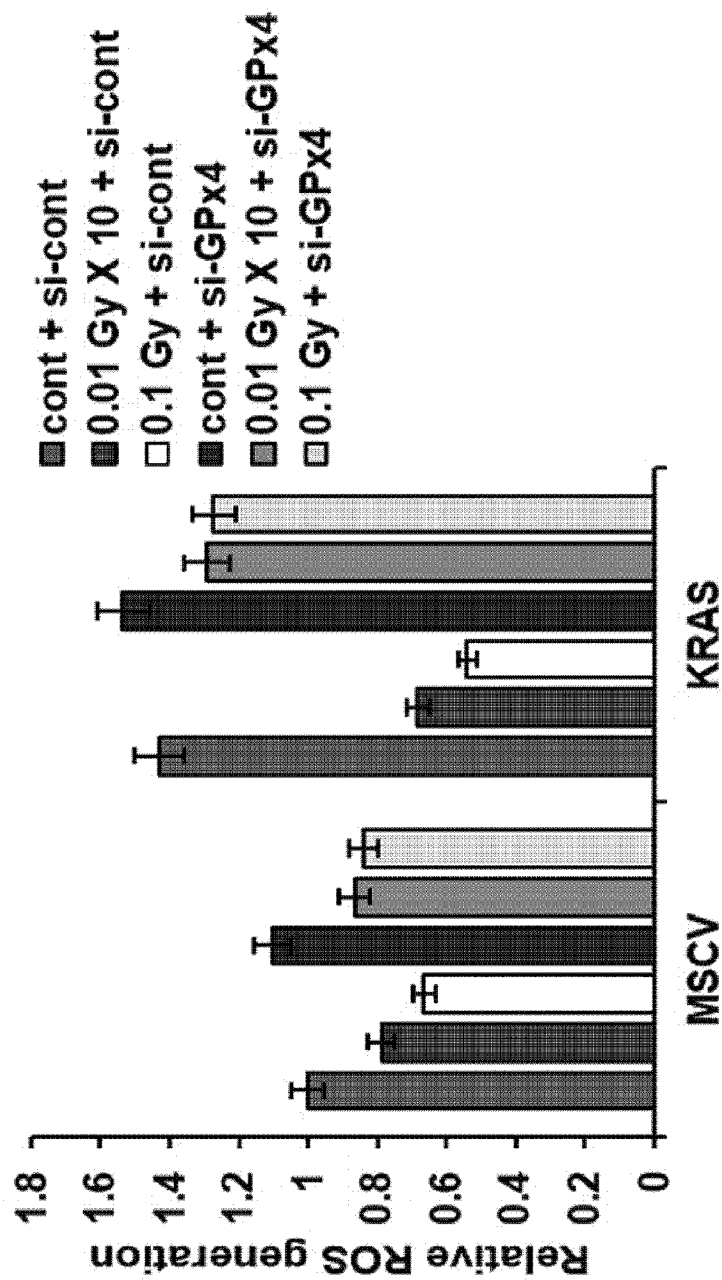
[도3d]



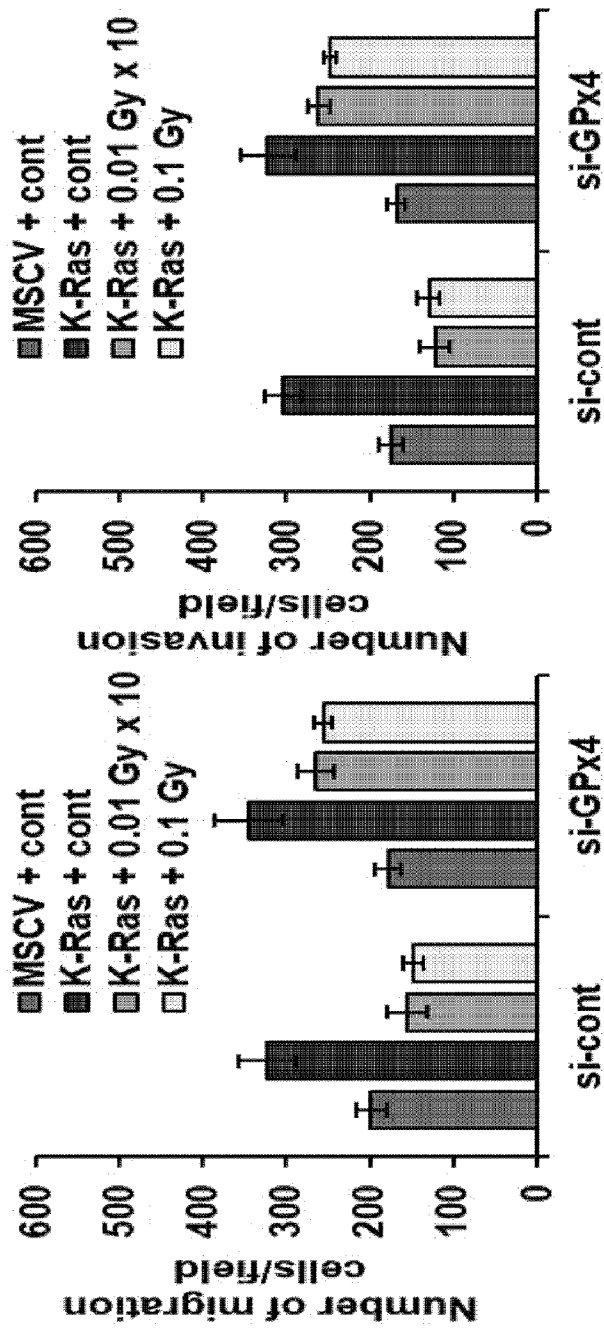
[E4a]



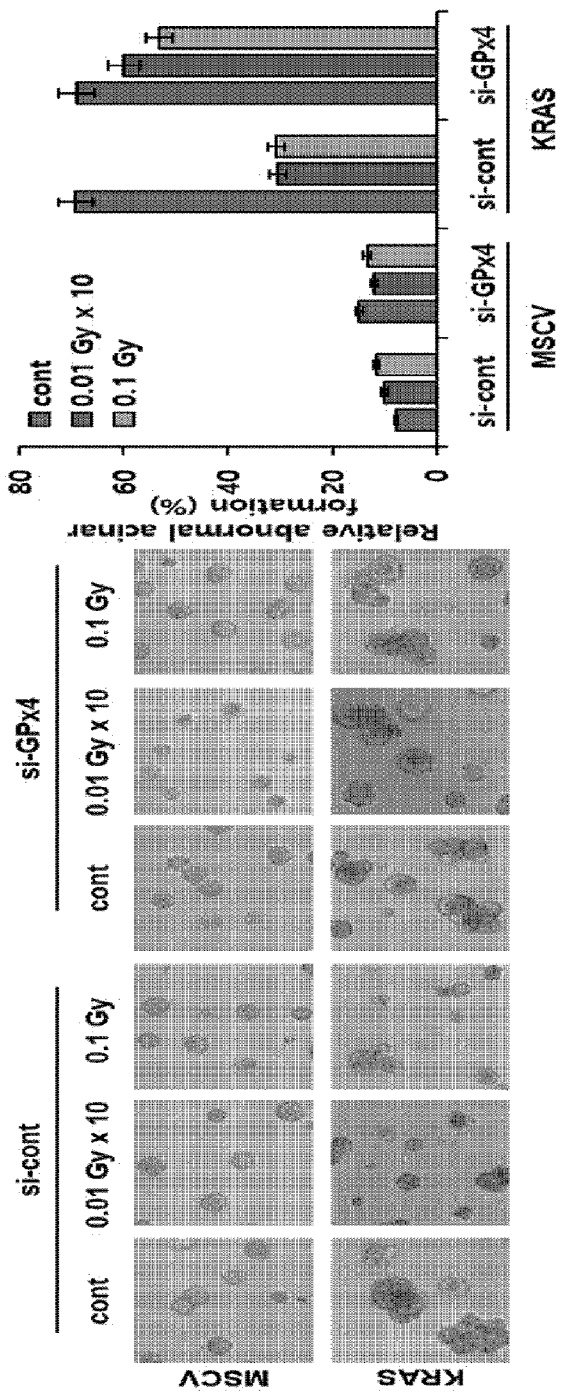
[도4b]



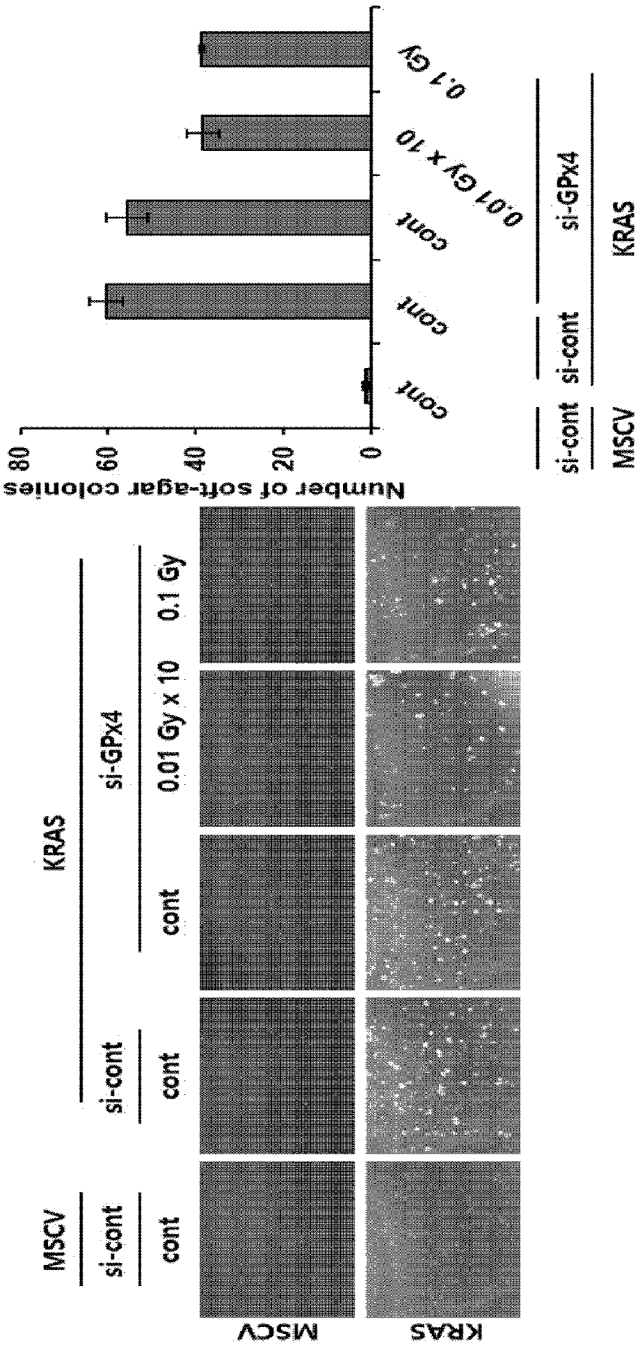
[도4c]



[도4d]



[도4e]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/009300**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 13/00(2006.01)i, C12N 15/01(2006.01)i, A61N 5/10(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 13/00; C12N 15/12; A61P 35/00; A61K 31/357; C12Q 1/68; C12N 15/01; A61N 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: low-dose radiation, K-RAS, GPx4, active oxygen, carcinogenesis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YIN, E. et al., "Gene Expression Changes in Mouse Brain after Exposure to Low-dose Ionizing Radiation", International Journal of Radiation Biology, October 2003, vol. 79, no. 10, pages 759-775 See abstract; figure 3; table 2.	1-6
Y	CHEN, Yuxin et al., "Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression", Cancers, 25 March 2016, vol. 8, no. 4, article no. 40, inner pages 1-15 See abstract; figure 1.	1-6
Y	SUH, Yong Joon et al., "KRAS-driven ROS Promote Malignant Transformation", Molecular & Cellular Oncology, (Electronic publishing) 22 January 2015, vol. 2, no. 1, e968059 (inner pages 1-3) See abstract; figure 1.	1-6
A	KR 10-2013-0086688 A (KOREA HYDRO & NUCLEAR POWER CO., LTD.) 05 August 2013 See abstract; claims 1-9.	1-6
A	KR 10-2015-0042590 A (JUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 21 April 2015 See abstract; claims 1 and 3.	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 JANUARY 2017 (26.01.2017)

Date of mailing of the international search report

26 JANUARY 2017 (26.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/009300

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KIM, Rae-Kwon et al., "Beneficial Effects of Low Dose Radiation in Response to the Oncogenic KRAS Induced Cellular Transformation", Scientific Reports, 30 October 2015, vol. 5, article no. 15809, inner pages 1-10</p> <p>See abstract; page 2, paragraph [4]-page 4; figures 1-5.</p> <p>(The present document is a document declaring "non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" by the applicant.)</p>	1-6
X	<p>KIM, Rae Kwon et al., "Low Dose Radiation Promotes the Reduction of Malignant Phenotypes of the Transformed Breast Epithelial Cells", In: 2015 Korean Society of Radiation Bioscience Spring Conference, Korea Atomic Energy Research Institute International Training Center, Korean Society of Radiation Bioscience, 21-23 May 2015, page 43, P-9</p> <p>See abstract.</p> <p>(The present document is a document declaring "non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" by the applicant.)</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/009300

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0086688 A	05/08/2013	KR 10-1320741 B1 WO 2013-111923 A1	21/10/2013 01/08/2013
KR 10-2015-0042590 A	21/04/2015	CN 102198163 A CN 102198163 B	28/09/2011 22/10/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 13/00(2006.01)i, C12N 15/01(2006.01)i, A61N 5/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 13/00; C12N 15/12; A61P 35/00; A61K 31/357; C12Q 1/68; C12N 15/01; A61N 5/10 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 저선량 방사선, K-RAS, GPx4, 활성 산소, 암화		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	YIN, E. 등, 'Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation', International Journal of Radiation Biology, 2003.10, 제79권, 제10호, 759-775 페이지 요약; 도면 3; 표 2 참조.	1-6
Y	CHEN, YUXIN 등, 'Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression', Cancers, 2016.03.25, 제8권, 제4호, Article No. 40, 내부페이지 1-15 요약; 도면 1 참조.	1-6
Y	SUH, YONGJOON 등, 'KRAS-driven ROS promote malignant transformation', Molecular & Cellular Oncology, (전자공개)2015.01.22, 제2권, 제1호, e968059(내부페이지 1-3) 요약; 도면 1 참조.	1-6
A	KR 10-2013-0086688 A (한국수력원자력 주식회사) 2013.08.05 요약; 청구항 1-9 참조.	1-6
A	KR 10-2015-0042590 A (한양대학교 산학협력단) 2015.04.21 요약; 청구항 1 및 3 참조.	1-6
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 01월 26일 (26.01.2017)		국제조사보고서 발송일 2017년 01월 26일 (26.01.2017)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, RAE-KWON 등, 'Beneficial effects of low dose radiation in response to the oncogenic KRAS induced cellular transformation' , Scientific Reports, 2015.10.30, 제5권, 아티클 번호 15809, 내부페이지 1-10 요약; 페이지 2, 단락 4-페이지 4; 도면 1-5 참조. (본 문헌은 출원인에 의해 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외`가 선언된 문헌임)	1-6
X	KIM, RAE KWON 등, 'Low dose radiation promotes the reduction of malignant phenotypes of the transformed breast epithelial cells' , In: 2015 방사선생명과학회 춘계학술대회, 한국원자력연구원 국제연수원, (사)방사선생명과학회, 2015.05.21-05.23, 43 페이지, P-9 요약 참조. (본 문헌은 출원인에 의해 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외`가 선언된 문헌임)	1-6

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/009300

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0086688 A	2013/08/05	KR 10-1320741 B1 WO 2013-111923 A1	2013/10/21 2013/08/01
KR 10-2015-0042590 A	2015/04/21	CN 102198163 A CN 102198163 B	2011/09/28 2014/10/22