

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 26일 (26.04.2018) **WIPO | PCT**

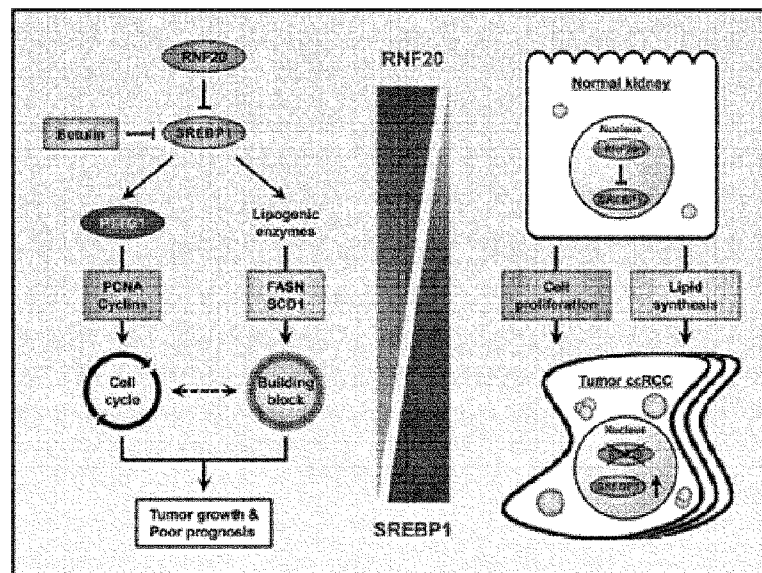


(10) 국제공개번호
WO 2018/074770 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/011172
- (22) 국제출원일: 2017년 10월 11일 (11.10.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0136569 2016년 10월 20일 (20.10.2016) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김재범 (KIM, Jae Bum); 08826 서울시 관악구 관악로 1, 105-209, Seoul (KR). 이재호 (LEE, Jae Ho); 16284 경기도 수원시 장안구 송원로86번길 35, 201호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 06224 서울시 강남구 논현로 412, 603호, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

(54) Title: USE OF RNF20 FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF KIDNEY OR LIVER CANCER AND SCREENING FOR THERAPEUTIC AGENTS FOR KIDNEY OR LIVER CANCER

(54) 발명의 명칭: RNF20의 신장암 또는 간암 진단, 치료 및 치료제 스크리닝 용도



(57) Abstract: Disclosed in the present application is a use of RNF20 as a therapeutic agent for kidney or liver cancer and as a marker for diagnosing kidney or liver cancer. In addition, disclosed in the present application is a method for screening for therapeutic agents for cancer associated with an abnormality of RNF20 by using a novel molecular mechanism, on the basis of RNF20-SREBP1c-PTTG1 and RNF20-SREBP1c-lipogenesis pathway.

(57) 요약서: 본원은 RNF20의 신장암 또는 간암의 치료제 및 진단용 마커로서의 용도를 개시한다. 또한 본원은 RNF20-SREBP1c-PTTG1 및 RNF20-SREBP1c-지방생합성 경로를 기반으로 하는 새로운 분자기전을 이용한 RNF20의 이상과 관련된 암 치료제 스크리닝 방법을 개시한다.

[다음 쪽 계속]

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: RNF20의 신장암 또는 간암 진단, 치료 및 치료제 스크리닝 용도

기술분야

- [1] 본원은 RNF20의 이상과 관련된 암의 진단, 치료 및 치료 약물 개발과 관련된 기술이다.

배경기술

- [2] 신장암은 60~70대의 노년층에서 주로 발생하고 지속적인 증가 추세를 보이고 있으며, 우리나라에서도 남성에서 발생하는 암 중 2.0%로 10위, 여성에서는 1.2%로 15위를 차지하고 있다. 신세포암에는 투명세포형 신세포암(clear cell RCC), 유두형 신세포암(papillary RCC), 험색소형 신세포암(chromophobe RCC), 수질형 신세포암(medullary RCC), 분류불능 신세포암(unclassified RCC), 신이행상피암(kidney transitional cell carcinoma, TCC), 신장 호산성과립세포종(ranal oncocytoma) 등이 있다. 이 중 투명세포형 신세포암이 66~75%를 차지하고, 유두형 신세포암이 약 15%를 차지하며, 험색소형 신세포암이 약 5%를 차지한다.
- [3] 신장암은 종양의 크기가 작을 때는 증상이 거의 없으며, 종양이 어느 정도 커져서 장기를 밀어낼 정도가 되어야 비로소 증상이 나타난다. 따라서 진단이 늦어지는 경우가 많아 처음 진단될 때 환자의 30% 정도는 이미 전이된 상태로 나타나게 되므로, 초기에 신장암을 진단할 수 있는 방법이 필요하다.
- [4] 현재 신장암 진단에 사용되고 있는 방법은 복부초음파, 복부 전산화단층촬영(CT) 등이 이용되는데, 고가의 장비를 사용하므로 스크리닝의 목적으로 사용하기에는 경제성이 떨어지는 단점이 있다.
- [5] 또한 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)은 성인 간암에서 가장 흔한 유형으로, 암으로 인한 사망원인 중 세 번째를 차지한다(Stefaniuk P, et al., 2010, World J Gastroenterol 16: 418-424). HCC는 상당히 진행 되서야 증상이 나타나는 질환으로 이로 인해 적절한 치료시기를 놓치는 경우가 빈번하고, 치료를 하는 경우도 예후가 극히 나쁘다. 특히 수술로 절제가 불가능한 경우는 1년 내 사망하는 심각한 질환으로, 진단방법이 개선이 될 경우, 치료에 있어서는 상당한 개선이 기대된다.
- [6] RNF20(Ring finger protein 20, RNF20)은 전사조절, DNA 손상 반응, 줄기세포 분화 및 지방생합성에 다양한 역할을 하는 E3 유비퀴틴 리가아제이다. RNF20은, 유전자 서브세트의 전사를 조절하고 크로마틴 리모델링에 기여하는 히스톤 H2B의 모노유비퀴틴화를 촉진시킨다(Minsky et al., 2008, Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. Nat Cell Biol 10, 483-488 ; 상기 Shema et al., 2011).

- [7] 미국 공개특허공보 제2011-0081362호는 암치료에 관한 것으로, RAS 활성화 돌연변이를 포함하는 암세포의 성장 또는 생존을 선택적으로 억제하기 위해 RNF20을 포함하는 다수의 세포내 과정에 관여하는 조절자를 억제하는 기술이 개시되어 있다.
- [8] 미국 공개특허공보 제2013-0295584호는 히스톤 단백질 폴리우비퀴틴화를 암 바이오마커의 용도에 관한 것으로, 히스톤 2B의 모노폴리퀴틴화를 갑상선암의 동정에 사용하며, CDC73 및 RNF20 사이의 상호작용에 근거한 히스톤 단백질의 모노우비퀴틴화를 조절하는 물질을 스크리닝하는 방법을 개시한다.
- [9] 그러나 RNF20이 감소 또는 결실된 암 및 이의 발현 증가를 통한 암의 진단 또는 암치료제로서의 용도 및 그 기전은 알려져 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본원은 새로운 분자 기전에 근거한 RNF20의 이상과 관련된 암 치료제, 진단 마커 및 치료제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 한 양태에서 본원은 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 RNF20의 감소 또는 결실과 관련된 암, 특히 고형암, 특히 신장암 또는 간암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. RNF20은 신장암 및 간암에서 그 발현이 현저히 감소되어 있으며, 인비보 및 인비트로에서 상기 유전자 또는 단백질의 발현 또는 내인성 RNF20 유전자의 탈메틸화 또는 과메틸화 억제를 통한 과발현시 종양이 억제되었다.
- [12] 일 구현예에서 본원에 따른 조성물이 사용되는 신장암은 특히 VHL 유전자 변이가 원인이 아닌, 신장암을 포함한다.
- [13] 다른 양태에서 본원은 또한 RNF20(Ring finger protein 20) 검출용 물질을 포함하는, RNF20의 감소 또는 결실과 관련된 암, 특히 고형암, 특히 신장암 또는 간암의 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다. 암 조직 또는 세포에서 RNF20은 유전자 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있고, 이를 근거로 신장암 또는 간암의 검출, 판단, 진단 또는 생존 예후 예측이 가능하다.
- [14] 또 다른 양태에서 본원은 또한 RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로를 표적으로 하는 RNF20의 감소 또는 결실과 관련된 암, 특히 고형암, 더욱 특히, 신장암 또는 간암의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [15] 일 구현예에서 상기 방법은 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포를 제공하는 제 1 단계; 상기 세포를 RNF20의 발현을 증가시킬 것으로 기대되는 시험물질로 처리하는 제 2 단계; 상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1 중 하나 이상의 발현을 측정하는 제 3 단계; 및 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서

상기 SREBP1c 또는 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 SREBP1c 또는 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 RNF20의 발현 이상과 관련된 암의 치료제 후보물질로 선별하는 제 4 단계를 포함한다.

- [16] 일 구현예에서 제 3 단계에서, 상기 SREBP1c에 발현을 측정하는 대신에, 또는 SREBP1c에 발현 측정에 부가하여, 상기 SREBP1에 의해 발현이 촉진되는 지질생합성에 관여하는 단백질 또는 그 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 이 경우 상기 제 4 단계에서 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 단백질 발현은 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포와 비교하여 감소한 경우, 후보 물질로 선별한다.
- [17] 다른 구현예에서 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포를 제공하는 제 1 단계; 상기 세포를 RNF20의 발현을 증가시키거나 또는 SREBP1c 발현을 억제시킬 것으로 기대되는 시험물질로 처리하는 제 2 단계; 상기 시험물질로 처리된 세포에서 PTTG1의 발현을 측정하는 제 3 단계; 및 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별하는 제 4 단계를 포함한다.
- [18] 또는 다른 양태에서 상기 제 3 단계 대신에, 상기 SREBP1c에 의해 발현이 촉진되는 지질생합성에 관여하는 단백질 또는 그 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하며, 그리고 상기 제 4 단계 대신에, 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 단백질 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 단백질의 발현이 상기 대조군의 지질생합성을 촉진하는 유전자 또는 단백질의 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별하는 단계를 포함한다. 본원에서는 신장암 또는 간암의 발생에 관여하는 두 종류의 독립적인 경로를 규명하였으며, 이는 특히 각각 기존에 신장암의 발병원인으로 알려진 VHL 기전과 독립적인 치료제 발굴에 사용될 수 있다.
- [19] 또 다른 양태에서 본원은 신장암 또는 간암의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 검사 대상체 유래의 생물학적 시료로부터 RNF20 바이오마커의 핵산 및/또는 단백질의 수준을 검출하는 단계; 상기 핵산 및/또는 단백질 수준 검출결과를 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 유래 시료의 핵산 또는 단백질 수준에 변화가 있는 경우, 상기 대상체의 신장암 또는 간암의 진단 또는 생존 예후와 연관시키는 단계를 포함하는, RNF20 바이오마커를 검출하는 방법, 또는 신장암 또는 간암의 진단 또는 예후 판단 방법을 제공한다.
- [20] 또 다른 양태에서 본원은 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기

유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 인비트로에서 신장암 세포의 RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로 조절용 용도 또는 키트를 제공한다.

- [21] 또 다른 양태에서 본원은 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 인비트로에서 신장암 세포의 RNF20-SREBP1c-지질생합성 경로 조절용 용도 또는 키트를 제공한다.

- [22] 본원에 따른 키트는 다양한 목적을 위해 인비트로에서 RNF20-SREBP1c-PTTG1, 또는 RNF20-SREBP1c-지질생합성 신호전달을 조절하는데 사용될 수 있다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본원에 따른 RNF20은 신장암의 치료제 및 진단용 마커로서 유용하게 사용될 수 있으며 또한 본원에서 규명된 새로운 분자기전인 RNF20-SREBP1c-PTTG1 및 RNF20-SREBP1c-지방생합성 경로는 신장암 치료제 발굴에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 RNF20의 발현량이 신장암 환자의 종양 조직에서 감소된 것을 나타낸 것이다. (A) 동일 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 qRT-PCR 분석을 수행한 결과 종양 조직에서 RNF20의 mRNA 발현량이 감소되어 있다. RNF20 발현량은 동일 신장암 환자의 정상 신장 조직으로 보정하였다. (B) 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 TCGA RNA-Seq 데이터베이스 분석을 한 결과 신장암 환자의 종양 조직에서 RNF20의 발현량이 감소되어 있다. (C) 신장암 환자의 T stage에 따른 RNF20 발현량을 분석한 것이다. RNA-Seq 데이터베이스는 TCGA에서 얻었다. $^{*}P < 0.01$ 정상 신장 조직과 비교; $^{***}P < 0.001$ 정상 신장 조직과 비교. (D) 신장암 환자의 종양 조직 마이크로어레이에서 RNF20 항체에 대한 면역조직화학법 염색 사진을 나타낸 것이다. (E) 동일한 신장암 환자의 종양과 종양 근처 정상 신장 조직에 대한 면역조직화학법 염색 사진을 나타낸 것이다. RNF20가 검출된 대표적인 조직 사진이다. 기준자는 100 μ m을 나타낸다. (F) ACHN 신장암 세포주에 RG108 처리 유무에 따른(+; 250 μ M or ++; 1 mM) RNF20 mRNA 발현량 변화를 qRT-PCR을 통해 측정하였다. RNF20 mRNA 발현량은 Cyclophilin mRNA 발현량으로 보정하였다. RNF20 mRNA 발현량은 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. (G) TCGA 데이터베이스에 등록된 532명의 신장암 환자에 대한 카플란-마이어 생존곡선을 나타낸 것이다. 환자는 RNF20 mRNA 발현량 중위값에 따라 두 군으로 나누었으며, 두 군의 차이는 로그-랭크 검정으로 확인하였다. RNF20 발현량이 낮게 관찰되는 신장암 환자의 생존 예후가

불량하게 관찰되었다. (H와 I) VHL 돌연변이 상태에 따른 생존 곡선 분석 결과를 나타낸 것이다. (J) ACHN 및 A498 신장암 세포주에 GFP(Mock) 또는 RNF20 발현 아데노바이러스를 감염시킨 후 CCK-8 기법을 활용하여 세포증식률을 측정하였다. RNF20가 과발현에 의해 신장암 세포의 증식이 억제됨을 관찰하였다. 결과는 독립 표본 다섯 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. CCK-8, 세포수 계산 키트(Cell Counting Kit-8). (K) ACHN 및 A498 신장암 세포주에 비특이적 대조 siRNA(siControl) 또는 RNF20 특이적 siRNA(siRNF20)를 처리한 후 세포성장 곡선을 CCK-8 기법으로 측정하였다. RNF20 억제에 의해 신장암 세포의 증식이 증가함을 관찰하였다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

- [26] 도 2는 신장암 환자 종양 조직에서 SREBP1 및 지방합성 유전자는 증가되어 있으며, 이는 RNF20 발현량과 역의 상관관계를 보인다는 것을 나타낸 것이다. (A) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 SREBP1c의 qRT-PCR 분석 결과 동일 환자의 정상 신장 조직에 비해 종양 조직에서 SREBP1c mRNA 발현량이 증가되어 있음을 관찰하였다. (B) 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 TCGA RNA-Seq 데이터베이스 분석을 한 결과 신장암 환자의 종양 조직에서 SREBP1의 발현량이 증가되어 있다. (C) 신장암 환자의 T stage에 따른 SREBP1 발현량 분석. RNA-Seq 데이터베이스는 TCGA에서 얻었다. ## $P < 0.01$ 정상 신장과 비교; ### $P < 0.001$ 정상 신장과 비교. (D) 동일 신장암 환자에서 종양과 정상 신장 조직의 단백질 양을 웨스턴 블랏팅 기법을 통해 분석하였다. 세포용해물을 SDS-PAGE에서 분리시킨 뒤 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 단백질 양도 mRNA 발현량과 비슷한 패턴임을 관찰하였다. (E) 동일 신장암 환자에서 종양과 정상 신장 조직을 면역조직화학법으로 염색하였다. RNF20와 SREBP1 염색을 한 대표적인 조직 절편을 나타내었다. 기준자는 100 μ m을 나타내었다. (F) TCGA 데이터베이스에서 얻은 RNF20와 SREBP1 mRNA 발현량의 상관관계를 피어슨 상관 분석을 이용하여 계산한 결과 역의 상관관계를 나타내었다. 환자 수(n), 피어슨 상관관계수(r), P 값(P). (G) FASN 발현량으로 나눈 군에서 분석한 카플란-마이어 생존 곡선. P 값은 로그-랭크 검정을 통해 계산하였다. FASN 발현량이 높게 관찰되는 신장암 환자의 생존 예후가 불량하게 관찰되었다.

- [27] 도 3은 RNF20가 SREBP1을 억제하여 지방대사 생합성과 신장암 세포증식을 억제함을 나타낸 것이다. (A) ACHN 신장암 세포주에 Myc-RNF20 또는 Flag-SREBP1c을 발현하는 아데노바이러스를 감염시켰다. 세포용해물을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. RNF20와 SREBP1c의 과발현 검증. (B) ACHN 신장암 세포주에 렌티바이러스를 이용하여 RNF20 또는 SREBP1c를 지속적으로 과발현시켰다. 상대적인 mRNA 발현량은 qRT-PCR을 통해 측정하였다. 각 유전자의 mRNA 양은 GAPDH 유전자의 mRNA 발현량으로 보정하였다. 각 mRNA 발현량은 Mock 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (C) 렌티바이러스를 통한 RNF20 또는 SREBP1c

과발현 세포 내 트리글리세리드 양을 측정하였다. 그 결과 RNF20 과발현에 의해 지방대사물 축적량이 감소하였다. (D) RNF20 또는 SREBP1c가 과발현된 ACHN 신장암 세포주에서 세포주기 조절유전자의 발현량을 qRT-PCR로 분석하였다. (E) RNF20 또는 SREBP1c가 과발현된 ACHN 신장암 세포주에서 콜로니 형성능력을 크리스탈 바이올렛 염색으로 측정하였다. (F) RNF20 또는 SREBP1c가 과발현된 ACHN 신장암 세포주에서 CCK-8 기법을 활용하여 세포증식률 곡선을 분석하였다. 결과는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. #P < 0.05 Mock 군과 비교; ##P < 0.01 Mock 군과 비교; ###P < 0.001 Mock 군과 비교; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

- [28] 도 4는 SREBP1c의 새로운 표적 유전자로 PTTG1을 동정한 것을 나타낸 것이다. (A) 정상 생쥐와 SREBP1c가 결핍된 생쥐의 간에서 RNA-Seq을 통해 분석한 전사체양을 산점도로 표현하였다. (B) RNF20 또는 SREBP1c가 과발현된 ACHN 신장암 세포주에서 PTTG1 mRNA 발현량을 분석하였다. PTTG1 mRNA 발현량은 GAPDH로 보정하였으며 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (C) ACHN 신장암 세포주에 siRNF20 또는 siSREBP1을 형질도입한 후 PTTG1 mRNA 양을 qRT-PCR을 통해 분석하였다. PTTG1 mRNA 발현량은 GAPDH로 보정하였으며, 모든 mRNA 발현량은 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (D) ACHN 신장암 세포에 siControl과 siRNF20를 형질도입한 후 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. RNF20 억제에 의해 SREBP1과 PTTG1이 단백질 수준에서 증가함을 관찰하였다. nSREBP1, 핵 SREBP1. (E) ACHN 신장암 세포주에 SREBP1c 아데노바이러스를 감염시키고 PTTG1 siRNA를 형질도입하였다. 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. SREBP1c 과발현에 의해 PTTG1 단백질 양이 증가함을 관찰하였다. (F) HEK293 세포주에 PTTG1 프로모터가 클로닝된 루시퍼레이즈 리포터 플라스미드와 베타-갈라토시데이즈, RNF20, 또는 SREBP1c 발현 벡터를 함께 형질도입시켰다. 세포용해물을 루시퍼레이즈와 베타-갈라토시데이즈 기법으로 분석하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. RLU, 상대적인 형광도 (G) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 PTTG1의 qRT-PCR 분석 결과 PTTG1 mRNA 발현량은 신장암 종양 조직에서 증가되어 있음을 관찰하였다. (H) 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 TCGA RNA-Seq 데이터베이스 분석을 한 결과 신장암 환자의 종양 조직에서 PTTG1의 발현량이 증가되어 있다. (I) 신장암 환자의 T stage에 따른 PTTG1 발현량 분석하였다. RNA-Seq 데이터베이스는 TCGA에서 얻었다. ###P < 0.001 정상 신장과 비교; ###P < 0.001 정상 신장과 비교. (J) TCGA 데이터베이스에서 얻은 RNF20와 PTTG1 mRNA 발현량의 상관관계를 피어슨 상관 분석을 이용하여 계산한 결과 역의 상관관계를 나타내었다. 환자 수(n), 피어슨 상관관계수(r), P 값(P) (K) PTTG1 발현량으로 나눈 군에서 분석한 카플란-마이어 생존 곡선을 나타내었다. P 값은 로그-랭크 검정을 통해 계산하였다. PTTG1 발현량이 높게 관찰되는 신장암

환자의 생존 예후가 불량하게 관찰되었다.

- [29] 도 5는 SREBP 억제제인 베툴린이 신장암 세포증식을 억제한다는 것을 나타내었다. (A) ACHN 및 A498 신장암 세포주에 다양한 농도의 베툴린을 12시간 동안 처리한 후 세포용해물을 SDS-PAGE로 분리하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. 베툴린에 의해 SREBP1, 지방대사 생합성, 세포주기 조절단백질의 양이 감소함을 관찰하였다. pSREBP1, 전구체 SREBP1; nSREBP1, 핵 SREBP1. (B와 C) ACHN 및 A498 신장암 세포주에 베툴린을 처리하고 세포증식률을 CCK-8 기법을 통해 측정하였다. 베툴린 처리에 의해 신장암 세포증식률이 억제되었다. 자료는 독립 표본 다섯 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. (D) ACHN 신장암 세포주에 베툴린을 처리한 후 세포를 고정하여 보디피(BODIPY, 녹색)와 다피(DAPI, 청색)로 염색하였다. 베툴린 처리에 의해 신장암 세포 내 지방대사물 축적량이 감소됨을 관찰하였다. 사진은 공초점현미경을 통해 얻었다. 기준자는 10 μ m를 나타낸다. (E) ACHN 신장암 세포주에 베툴린을 24시간 처리한 후 세포를 고정하여 프로피디움 아이오딘화합물로 염색하였다. DNA 양은 유동세포분석법으로 측정하였다. 각 세포주기의 백분율을 표현하였다. 베툴린 처리에 의해 신장암 세포의 세포주기가 G1 단계에 머무는 것을 관찰하였다.
- [30] 도 6은 SREBP1c가 세포주기와 지방대사를 조절하여 신장암의 세포 성장에 영향을 미친다는 것을 나타낸 것이다. (A) siRNA를 통한 PTTG1 또는 FASN 억제 및 약제를 통한 지방생합성 유전자(FASN, ACC)의 억제 효과를 검증하기 위한 실험 계획 모식도를 나타낸 것이다. (B와 C) 렌티바이러스를 통한 SREBP1c 과발현 ACHN 신장암 세포주에 PTTG1 siRNA를 형질도입하였다. 48시간 후 지방생합성과 세포주기 조절유전자들의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 측정하고 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. (D) (B와 C)에 서술한 세포의 상대적인 증식률을 CCK-8 기법으로 측정하였다. (E) ACHN 신장암 세포주에 ACC 억제제 토파(TOFA, 10 μ g/ml) 또는 FASN 억제제 C75(10 μ g/ml)를 24시간 동안 처리한 후 세포 내 트리글리세리드 양을 측정하였다. 지방생합성 억제에 따른 지방대사물 감소 효과를 검증한 것이다. (F) ACHN 신장암 세포주에 토파(10 μ g/ml) 또는 C75(10 μ g/ml)를 24시간 동안 처리한 후 PTTG1 mRNA 발현량을 qRT-PCR로 측정하였다. mRNA 양은 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. PTTG1 mRNA 발현량은 지방생합성 제어에 의해 변하지 않았다. (G) SREBP1c를 지속적으로 과발현하는 ACHN 신장암 세포주에 C75를 처리한 후 세포증식 속도를 CCK-8 기법을 통해 측정하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. *P < 0.05, **P < 0.01; CCK-8, 세포수 계산 키트-8.
- [31] 도 7은 RNF20 과발현이 이종 이식 생쥐의 종양 증식을 억제한다는 것을 나타낸 것이다. (A) BALB/c 누드 생쥐에 Mock 또는 RNF20 과발현 ACHN 신장암 세포를 피하로 주사하여 종양을 생성시켰다. 각 군은 다섯 마리의 생쥐에서 유래한

10개의 종양을 의미한다. 실험 종료 시 종양의 크기를 보여주는 대표적 사진은 개체 내 이종 이식 종양 성장에 RNF20 과발현이 끼치는 영향을 보여준다. 생체 내에서 RNF20 과발현에 의한 항암효과 검증. 기준자는 10mm를 나타낸다. (B) RNF20 과발현에 따른 ACHN 신장암 세포의 이종 이식 종양 부피를 35일에 걸쳐 측정하였다. 도표는 종양 부피를 평균 $\pm$ 표준오차를 나타낸다. (C) 실험 종료 시 종양 무게를 측정하고 표현하였다. (D) ACHN 신장암 이종 이식 종양 내 RNF20, nSREBP1, PTTG1 및 FASN 단백질 양을 웨스턴 블랏팅 기법을 통해 분석하였다. nSREBP1, 핵 SREBP1. (E) ACHN 신장암 이종 이식 종양에서 RNF20가 세포주기 및 지방생합성 유전자 발현량 조절에 미치는 영향을 qRT-PCR을 통해 분석하였다. 각 유전자의 mRNA 양은 GAPDH 유전자의 mRNA 발현량으로 보정하고 Mock 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (F) 신장암 이종 이식 종양의 조직학적 분석. Mock 또는 RNF20을 과발현하는 ACHN 이종 이식 종양 절편을 헤마톡실린 에오신(H/E) 또는 Oil red O로 염색하고 대표 사진을 실었다. 이종 이식 종양 절편을 Ki67과 TUNEL로 염색하였다. TUNEL, 말단데옥시뉴클레오티드전달효소 dUTP 틴새 말단 표지. RNF20 과발현에 의해 종양증식 억제 및 지방대사물 축적 감소효과를 검증하였다. 기준자는 100 μ m를 의미한다.

[32] 도 8은 신장암에서 RNF20의 SREBP1 의존적 지방생합성과 세포주기 제어를 통한 종양억제 기능을 제안하는 모델(요약모델)을 나타낸 것이다. 신장암 환자에서 RNF20의 발현량 저하와 SREBP1의 발현량 증가는 생존 이후 불량과 관련이 있다. RNF20 억제는 SREBP1의 활성화를 유도하여 신장암 종양발생을 유도한다. SREBP1은 새로운 표적 유전자인 PTTG1을 통해 세포주기를 조절한다. 또한 SREBP1 억제제인 베툴린은 지방생합성 제어와 G1세포주기 정지를 통해 신장암 세포증식을 억제한다. 종합하면 RNF20 발현 감소는 SREBP1 의존적 지방생합성과 세포증식 활성을 통해 신장암의 종양발생을 촉진한다.

[33] 도 9는 RNF20가 신장암 세포에서 종양억제 기능을 보이나, 정상 신장 세포의 세포증식에는 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸 것이다. (A) 사람 초계 신장 피질 표피(HRCE; human primary renal cortical epithelial) 세포주, HEK293와 같은 정상 신장 세포주와 ACHN, A498, Caki-2와 같은 신장암 세포주에서 RNF20 단백질 발현량을 웨스턴 블랏팅 기법을 통해 분석하였다. (B) HEK293 세포주에 RG108(+; 250 μ M or ++; 1 mM)을 48시간 동안 처리한 후 RNF20 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 측정하였다. RNF20 mRNA 발현량은 Cyclophilin mRNA 발현량으로 보정하고 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. n.s., 유의미하지 않음. (C) ACHN 및 A498 신장암 세포주에 GFP(Mock) 또는 Myc-RNF20 발현 아데노바이러스를 감염시켰다. 24시간 후 세포용해물을 SDS-PAGE로 분리시킨 뒤 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. (D) ACHN 신장암 세포주에 siControl과

siRNF20를 형질도입한 후 RNF20 발현량을 웨스턴 블랏팅 기법을 통해 측정하였다. (E) HRCE 및 HEK293 세포주에 Mock 또는 Myc-RNF20 발현 아데노바이러스를 감염시킨 후 세포용해물을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. (F) HRCE 및 HEK293 세포에 RNF20 발현 아데노바이러스를 감염시킨 후 CCK-8 기법을 활용하여 성장곡선을 측정하였다. 자료는 독립 표본 다섯 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. n.s., 유의미하지 않음. (G) HRCE 및 HEK293 세포에 siControl과 siRNF20를 형질도입한 후 세포용해물을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. (H) HRCE 및 HEK293 세포에 siRNF20를 형질도입한 후 상대적인 세포 성장속도를 CCK-8 기법을 통해 측정하였다.

- [34] 도 10은 신장암 종양 조직에서 지방생합성 효소의 발현이 증가되어 있으며 RNF20 발현과는 역의 상관관계를 보인다는 것을 나타낸 것이다. (A) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 FASN의 qRT-PCR 분석. mRNA 발현량은 동일 환자의 정상 신장 조직으로 보정하였다. (B) 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 보정된 FASN RNA-Seq 발현량을 나타낸 것이다. (C) 신장암 T stage에 따른 FASN 발현량을 분석한 것이다. (D) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 SCD1의 qRT-PCR 분석. mRNA 발현량은 동일 환자의 정상 신장 조직으로 보정하였다. (E) 신장암 종양 및 정상 신장 조직에서 보정된 SCD1 RNA-seq 발현량을 나타낸 것이다. (F) 신장암 T stage에 따른 SCD1 발현량을 분석한 것이다. $^{###}P < 0.001$ 정상 신장 조직과 비교하였다. (G) TCGA 데이터베이스에서 얻은 RNF20와 FASN mRNA 발현량의 상관관계를 피어슨 상관 분석을 이용하여 계산하였다(역의 상관관계). (H) TCGA 데이터베이스에서 얻은 RNF20와 ELOVL6 mRNA 발현량의 상관관계를 피어슨 상관 분석을 이용하여 계산하였다(역의 상관관계). (I) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 SREBP2의 qRT-PCR 분석. mRNA 발현량은 동일 환자의 정상 신장 조직으로 보정하였다. (J) 신장암 종양 및 정상 신장 조직에서 보정된 SREBP2 RNA-seq 발현량을 나타낸 것이다. (K) 동일 신장암 환자의 종양 및 정상 신장 조직에서 HMGCR의 qRT-PCR 분석. mRNA 발현량은 동일 환자의 정상 신장 조직으로 보정하였다. (L) 신장암 종양 및 정상 신장 조직에서 보정된 HMGCR RNA-seq 발현량을 나타내었다. $^{*}P < 0.05$; $^{***}P < 0.001$.

- [35] 도 11은 신장암 세포에서 RNF20 억제제는 지방생합성과 세포증식을 촉진시킨다는 것을 나타낸 것이다. (A) ACHN 신장암 세포주에 siRNF20 또는 siSREBP1을 형질도입하였다. 48시간 후 세포용해물을 SDS-PAGE에서 분리한 후 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. nSREBP1, 핵 SREBP1. (B와 C) ACHN 신장암 세포주에 siRNA를 이용하여 RNF20 또는 SREBP1을 녹다운 한 후 지방생합성 관련 유전자들의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다. mRNA 발현량은 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하였고, Mock 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (D) ACHN 신장암 세포주에 siRNF20 또는 siSREBP1을

형질도입한 후 세포 내 트리글리세리드 양을 측정하였다. (E) ACHN 신장암 세포주에 siRNF20 또는 siSREBP1을 형질도입한 후 세포주기 조절유전자들의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다. (F) ACHN 신장암 세포주에 siRNF20 또는 siSREBP1을 형질도입한 후 세포증식률을 CCK-8 기법을 통해 측정하였다. 모든 실험은 독립적으로 최소 세 번 수행되었으며 대표 결과를 표현하였다. #P < 0.05 siControl과 비교, ##P < 0.01 siControl과 비교, ###P < 0.001 siControl과 비교, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

- [36] 도 12는 PTTG1은 SREBP1c에 의해 유도되며, 신장암 환자의 종양조직에서 발현량이 증가되어 있다는 것을 나타낸 것이다. (A) 정상 생쥐와 SREBP1c가 결핍된 생쥐의 신장, 간 및 지방 조직을 분리하였다. 각종 조직에서 RNA를 추출한 후 SREBP1c와 PTTG1의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 분석하였다. mRNA 발현량은 TATA-결합 단백질(TBP) 발현량으로 보정하였다. EAT, 내장 지방조직, IAT; 피하 지방조직; BAT; 갈색 지방조직 *P < 0.01, ***P < 0.001. (B) 여러 종에서 PTTG 프로모터에 존재하는 SRE 모티프 및 E-BOX 서열을 도식화한 것이다.
- [37] 도 13은 베틀린은 신장암 세포증식을 효과적으로 저하시킨다는 것을 나타낸 것이다. (A와 B) ACHN 신장암 세포주에 siControl과 siRNF20를 형질도입하였다. 베틀린을 24시간 동안 처리한 후 qRT-PCR을 이용하여 지방생합성과 세포주기 조절유전자들의 mRNA 발현량을 측정하였다. mRNA 발현량은 GAPDH 발현량으로 보정하였다. 자료는 독립 표본 세 개의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다. #P < 0.05 대조군과 비교, ##P < 0.01 대조군과 비교, ###P < 0.001 대조군과 비교, *P < 0.01, ***P < 0.001. (C와 D) (A와 B)에 기술된 신장암 세포주의 성장곡선을 CCK-8 기법을 이용하여 측정하였다. P < 0.05, ***P < 0.001, n.s., 유의미하지 않음; CCK-8, 세포수 계산 키트-8.
- [38] 도 14는 SREBP1c는 신장암 세포증식을 두 가지 경로(지방생합성과 세포주기 조절)를 통해 조절한다는 것을 나타낸 것이다. (A와 B) ACHN 신장암 세포주에 토파(10 μ g/ml) 또는 C75(10 μ g/ml)를 24시간 동안 처리하였다. 지방생합성 및 세포주기 조절유전자들의 mRNA 발현량은 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하고 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. (C) (A와 B)에 서술된 세포의 성장속도를 CCK-8 기법을 통해 측정하였다. (D와 E) 렌티바이러스를 통해 SREBP1c를 과발현시킨 ACHN 신장암 세포주에 FASN siRNA를 48시간 동안 처리한 후 qRT-PCR을 이용하여 지방생합성 및 세포주기 조절유전자들의 mRNA 발현량을 측정하였다. 상대적인 mRNA 발현량은 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하고 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. #P < 0.05 대조군과 비교, ##P < 0.01 대조군과 비교. (F) (D와 E)에 서술된 세포의 성장속도를 CCK-8 기법을 통해 측정하였다.
- [39] 도 15는 신장암 이종 이식 종양에서 RNF20는 세포사멸촉진 및 세포사멸억제 유전자를 제어한다는 것을 나타낸 것이다. ACHN 신장암 이종 이식 종양에서

- RNF20 과발현이 세포사멸 유전자 발현량 제어에 미치는 영향을 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다. 상대적인 mRNA 발현량은 GAPDH mRNA 발현량으로 보정하고 Mock 대조군에 대한 상대값으로 표현하였다. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.
- [40] 도 16은 간암세포주인 HCC, Huh-7 및 HepG2 세포주에서 RNF20 및 SREBP의 상대적 발현량을 유전자(왼편) 및 단백질(수준)에서 측정한 결과로, 간암세포주에서 대조군(HEK293T)과 비교하여 RNF20의 발현량이 감소되고, SREBP는 증가되어 있음을 나타낸다.
- [41] HEK293T (human embryonic kidney cell; non-cancer cell); Huh-7 (human hepatocellular carcinoma cell; mutant p53-Y220C); HepG2 (human hepatoblastoma cell; wild-type p53). $*P < 0.05$ vs. HEK293T, $**P < 0.01$ vs. HEK293T.
- [42] 도 17은 RNF20 발현에 의해 세포 증식이 간암세포주에서 감소되는 것을 나타내는 결과로, 세포주를 RNF20을 발현하는 플라스미드로 전달이입 48시간 후에, CCK-8(cell counting kit-8)를 이용하여 측정하였다.
- [43] 도 18은 RNF20 발현에 의해 간암세포주에서 SREBP1c 단백질의 농도가 감소되는 것을 나타내는 웨스턴블랏 결과로, 분석은 세포주를 RNF20을 발현하는 플라스미드로 전달이입 48시간 후에 수행되었다.
- [44] 도 19는 RNF20 발현에 의해 간암세포주에서 지방생성 유전자의 발현이 감소하는 것을 나타내는 정량 RT-PCR 결과로, 분석은 세포주를 RNF20을 발현하는 플라스미드로 전달이입 48시간 후에 수행되었다. $*P < 0.05$ vs. Mock, $\#P < 0.05$.
- [45] 도 20은 RNF20의 발현을 siRNF20을 이용하여 억제한 간암세포주에서 세포 증식이 촉진되는 것을 나타내는 결과로, 분석은 세포주를 siRNF20 처리 48시간 후에, CCK-8(cell counting kit-8)를 이용하여 측정하였다.
- [46] 도 21은 RNF20의 발현을 siRNF20을 이용하여 억제한 간암세포주에서 SREBP1 단백질 농도가 증가하는 것을 나타내는 결과로, 분석은 세포주를 siRNF20 처리 72시간 후에 수행되었다.
- [47] 도 22는 RNF20의 발현을 siRNF20을 이용하여 억제한 간암세포주에서 지방생성 유전자의 발현이 증가하는 것을 나타내는 정량 RT-PCR 결과로, 분석은 세포주를 siRNF20 처리 72시간 후에 수행되었다. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

발명의 실시를 위한 형태

- [48] 본원은 신장암 및 간암 환자의 종양 조직에서 RNF20(Ring finger protein 20)의 발현량이 저하되고, RNF20의 과발현이 간암 또는 신장암 세포주 및 이중이식 동물 모델에서 간암 및 신장암 세포의 증식 및 지방대사 활성을 억제하며, 나아가 RNF20이 핵심 조절인자로서, RNF20-SREBP1c-PTTG1 및 RNF20-SREBP1c-지방생합성 경로를 조절하는 것을 규명하였다.
- [49] 이에 한 양태에서 본원은 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자 또는 그 단백질 또는 이와 기능적으로 동등한 변이체, 또는 RNF20 유전자의 메틸화억제를 통해

그 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 신장암 또는 간암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

- [50] 본원에 따른 조성물에 포함되는 RNF20(Ring finger protein 20)은, 전사조절, DNA 손상 반응, 줄기세포 분화 및 지방생합성에 다양한 역할을 하는 E3 유비퀴틴 리가아제의 한 종류로서, 크로마틴 리모델링에 기여하는 히스톤 H2B의 모노유비퀴틴화를 촉진시킨다(Minsky et al., 2008, Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol* 10, 483-488 ; 상기 Shema et al., 2011).
- [51] 본원에 따른 조성물에 포함되는 RNF20의 유전자 또는 단백질 서열은 본원에 따른 효과를 달성하는 한 다양한 형태 및 유래의 것이 사용될 수 있다. 일 구현예에서는 포유류, 특히 인간 유래의 RNF20 또는 이와 기능적으로 동등한 변이체가 사용되며, 그 유전자 및 단백질 서열은 각각 NCBI Entrez Gene ID: 56254 및 34878777로 공지되어 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 각각 서열번호 1 및 2의 RNF 유전자 및 단백질 서열이 사용된다.
- [52] 본원에 따른 유전자는 게놈 DNA, cDNA 및 화학합성 DNA를 포함한다. 게놈 DNA 및 cDNA는 당업계의 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 게놈 DNA는 예를 들어, 해당 유전자를 가지는 세포로부터 게놈 DNA를 추출하고 게놈 라이브러리(백터는 예를 들면 플라스미드, 파지, 코스미드, BAC, PAC 등이 이용될 수 있다)를 제작하고 상기 라이브러리를 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA(예를 들어, 서열번호 2)를 기초로 제작한 프로브를 이용하여 콜로니 또는 플러그 혼성화를 수행하거나, 본 발명의 단백질을 암호화하는 DNA(예를 들어, 서열번호 2)에 특이적인 프라이머를 작성하고, 이를 이용한 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 행함으로써 제조할 수도 있다. cDNA는 예를 들어, RNF20 유전자를 가지는 세포에서 추출한 mRNA를 기초로 cDNA를 합성하고, 상기 합성된 cDNA를 λZAP 등의 백터로 삽입하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 상기 cDNA 라이브러리를 전개하여, 상기과 동일하게 콜로니 또는 플러그 혼성화를 수행하거나 또는 PCR을 수행하여 제조할 수 있다.
- [53] 본원에서 용어 “기능적으로 동등한 변이체”란 특정 종 유래의 야생형 단백질 또는 이의 유전자 서열과 비교하여 변이가 있지만 본원에서 규명한 효능을 갖는 것을 말한다. 따라서, 예를 들면 본원발명의 RNF20 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 사람 유래의 서열로서, 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 암호화하는 돌연변이체(mutants), 유도체(derivatives), 대립유전자(alleles), 변형체(variants) 및 동질체(homologues)를 포함한다. 나아가, 예를 들어, 염기서열의 변이가 단백질 중의 아미노산의 변이를 수반하지 않는 경우(축중변이)도 있고, 이러한 축중변이체(degeneracy mutants)도 본 발명의 유전자에 포함된다.
- [54] RNF20 단백질 및 이와 기능적으로 동등한 단백질을 암호화하는 유전자는 당업계의 공지된 방법, 예를 들면 PCR 방법(Saiki et al., *Science*, 230: 1350-1354,

1985; Saiki et al., Science, 239: 487-491, 1988)을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 당업자라면 공지된 RNF20 유전자의 염기서열로부터 이에 특이적으로 혼성화할 수 있는 프라이머를 고안하여 RNF20 유전자와 높은 상동성을 가지는 다양한 포유류 유래의 유전자를 분리할 수 있을 것이다.

- [55] 상기와 같이 분리된 유전자는 아미노산 수준에 있어서, 인간 유래 RNF20 단백질의 아미노산 서열과 높은 상동성을 가진다. 높은 상동성이란 아미노산 서열 전체에서, 적어도 50% 이상, 더 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상(예를 들어, 95% 이상)의 서열의 동일성을 가리킨다. 아미노산 서열이나 염기서열의 상동성은 BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877, 1993)에 기초하여 개발된 BLASTN 이나 BLASTX라 불리는 프로그램(Altschul et al, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990)을 사용하여 분석될 수 있으며 구체적인 방법은 다음의 웹사이트에 공지되어 있다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- [56] 본원에 따른 조성물에 포함되는 RNF20 단백질 또는 유전자는 전장 또는 잘린 형태의 것이 모두 포함된다. 또한 동일한 숙주, 예를 들면 인간에서 유래된 것이라도 특정 개인, 지역, 환경 등에 따라 서열변이가 있을 수 있으며, 이러한 것은 물론 일부 서열이 변형(결실, 치환, 부가)되었으나, 기능적으로 동등한 변이체가 모두 본 발명에 사용될 수 있다. 한 구현예에서는 인간 유래의 것으로 이에 관하여는 앞서 언급한 바와 같다.
- [57] 본원에 따른 조성물이 RNF20 유전자 또는 이와 동등한 변이체를 포함하는 경우, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 재조합 DNA 기술 등 공지된 방법에 따라, 표적세포 예를 들면 포유류 유래의 종양세포, 특히 신장암 세포에서 RNF20 유전자를 발현할 수 있는 한 이로 제한되는 것은 아니나, 예를 들면, 선형 DNA, 플라스미드 벡터 또는 그 외 DNA 전달용 벡터로 도입되어 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 바람직하게는 비바이러스성이며, 진핵세포에서 RNF20 유전자를 발현할 수 있는 한, 특별히 제한되는 것은 아니며, 본원 실시예에 기재된 것을 참고할 수 있다.
- [58] 또한 본 발명의 RNF20 유전자는 유전자치료 시스템 등에 사용되는 발현벡터 예를 들면 바이러스벡터에 도입되어 공지된 방법에 따라 전달체로서 바이러스입자에 포함되어 사용될 수 있다. 상기의 바이러스 벡터는 본 발명의 단백질을 목적하는 세포 또는 조직내로 도입할 수 있는 것이면 제한되지 않으며 바람직하게는 아데노바이러스 벡터이며, 상기 바이러스성 벡터는 진핵세포에서 이에 포함된 유전자를 발현할 수 있는 한, 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [59] 본원에 따른 조성물이 단백질 또는 이와 기능적으로 동등한 변이체를 포함하는 경우, 예를 들면 상기 벡터를 공지된 방법에 따라 세포배양 시스템에서 적절한 세포에 트랜스펙션하여 발현시킨 후 단백질을 정제하여 사용할 수 있다. 이러한 본 발명의 단백질은 예를 들면 정제된 단백질, 수용성 단백질, 또는 표적 세포로의 전달 또는 투여를 위해 담체에 결합된 형태의 단백질 또는 아미노산 잔기와 융합된 형태의 것을 포함하는 것이다.

- [60] 본원에 따른 조성물에 포함되는 RNF20 발현을 증가시키는 물질은 상기 유전자, 특히 내인성 유전자 즉 세포 자체가 원래부터 가지고 있는 유전자의 프로모터 부위의 메틸화를 억제하는 물질로, 특히 CpG 섬에서의 메틸화를 억제하는 물질로, 메틸화의 억제에 의해 RNF20의 전사가 촉진되고, 결국 RNF20의 세포에서의 발현이 증가하게 된다. 따라서 이러한 효과를 나타내는 다양한 물질이 본원에 따른 조성물에 포함될 수 있다. 일 구현예에서는 DNMT (DNA methyltransferase) 억제제가 사용된다. DNMT (DNA methyltransferase) 억제제는 후생적 유전자 조절 약물로서 뉴클레오사이드 유사체로서 예를 들면 azacytidine, decitabine 및 zebularine을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니며, 상술한 효과를 포함하는 다양한 물질이 포함될 수 있다. 또한 비-뉴클레오사이드 유사체가 사용될 수 있으며, 이는 hydralazine, RG109, procainnamide, procaine, SCI-1027 등을 들 수 있다. 비-뉴클레오사이드 유사체는 DNMT가 CpG 섬에 결합하는 것을 방해하여 결국 메틸화를 억제하며, 이 과정에서 DNMT와 특이적으로 상호작용을 한다. 본원에 따른 일 구현예에서는 RG108이 사용된다.
- [61] 본원에 따른 조성물이 사용되는 신장암은 신장의 실질(신장에서 소변을 만드는 세포들이 모여 있는 부분으로 수질과 피질로 구성됨)에서 발생하는 신장세포암을 포함하며, 투명세포형 신세포암(clear cell RCC, ccRCC), 유두형 신세포암(papillary RCC), 혐색소형 신세포암(chromophobe RCC), 수질형 신세포암(medullary RCC), 분류불능 신세포암(unclassified RCC), 신이행상피암(kidney transitional cell carcinoma, TCC), 신장 호산성과립세포종(ranal oncocytoma)을 포함한다. 일 구현예에서는 ccRCC이다.
- [62] 본원에 따른 조성물이 사용되는 간암은 간세포암(Hepatocellular carcinoma, HCC)이다. 이는 알콜 남용, 바이러스성 간염 및 대상성 간질환과 같은 위험인자를 갖는 환자에서 발생하는 간조직 자체에서 발생하는 원발성 악성 종양을 일컫는 것이다.
- [63] 또한 본원에 따른 조성물은 신장암의 VHL (von Hippel-Lindau) 변이 또는 상태와 무관하게 효과를 나타내며, 따라서 보다 다양한 원인의 신장암의 치료 및 진단에 사용될 수 있다.
- [64] 현재까지 알려진 신장암의 주요 발병원인은 VHL 종양억제유전자의 결손 및 돌연변이에 따른 HIF 전사인자의 활성화로 알려져 있다(Nat Rev Cancer. 2008 Nov;8(11):865-73.). 그럼에도 불구하고 신장-특이적 VHL 결핍 생쥐의 경우 신장암 발병과 유사한 형질이 나타나지 않았으며(Cancer Res. 2006 Mar 1;66(5):2576-83.), HIF1이 과활성화된 신장암 세포의 이중 이식 동물 모델에서 종양 증식이 예상과 달리 억제된다는 결과가 보고되었다(J Mol Med (Berl). 2014 Aug;92(8):825-36.). 이상의 연구결과는 신장암 발병 이전에 VHL-HIF 경로 이외에 별도의 핵심 분자기전의 존재를 나타내는 것이며, 바로 본원에서 RNF20-SREBP1c 경로가 VHL 유전자와 결손/돌연변이와는 독립적으로 신장암 발생에 관여하는 것을 규명하였다.

- [65] 따라서 본원의 조성물 및 방법은 VHL 변이와 독립적으로 신장암의 치료 및 진단에 사용될 수 있다. 일 구현예에서는 본원의 조성물 및 방법이 사용되는 신장암은 VHL 변이를 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다. 다른 구현예에서는 본원의 조성물 및 방법은 VHL 변이가 원인이 아닌 신장암에 사용될 수 있다.
- [66] 본원에서 사용된 용어 “치료”란 질환, 또는 질환으로 인한 증상 또는 상태의 억제, 제거, 경감, 완화, 개선, 및/또는 예방을 포함하는 개념이다.
- [67] 본원의 조성물은 RNF20 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 본원의 약학 조성물은 신장암의 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 약물치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [68] 본원의 조성물은 상기 언급한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 씨딩 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제형화할 수 있다.
- [69] 본원의 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 공지된 투여방법을 적용할 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우 피부에 붙이는 패치형, 코/호흡기를 통해 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위해서는 정맥내 주사에 의한 투여가 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양할 수 있다. RNF20 유전자 또는 폴리펩타이드를 포함한 단백질 제제의 경우 비경구 투여가 선호될 수 있으나 다른 경로 및 수단을 배제하는 것은 아니다. 전형적인 약물의 경우 투약단위체는, 예를 들어 약 0.01mg 내지 100mg를 포함하나 상기 범위의 이하 및 이상의 범위를 배제하는 것은 아니다. 일일 투여량은 약 1 μ g 내지 10g 일 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.
- [70] 다른 양태에서 본원은 RNF20의 바이오마커로서의 용도에 관한 것으로 특히

이의 검출용 물질을 포함하는 간암 또는 신장암의 진단 또는 예후 측정용 조성물 또는 키트와 관련된 것이다.

- [71] 본원에서 용어 진단은 특정 질병 또는 질환에 대하여 검사 대상자의 질환에 대한 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상자의 예후(prognosis)(예컨대, 트랜지션성 암 상태의 동정, 암의 단계 또는 진행상태 판별 또는 치료에 대한 암의 반응성 결정)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [72] 본원에서 용어 진단용 바이오마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)란 암 발생한 조직 또는 세포를 정상 세포 또는 적절한 치료를 받은 조직 또는 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 검체에 비하여 질환이 발생한 조직이나 부위에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 단백질 또는 핵산을 포함한다. 본원에서 신장암 진단 마커는 신장암 조직에서 발현이 감소하는 RNF20 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산 또는 유전자이다.
- [73] 본원에서 생물학적 시료란 바이오마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 혈장, 및 혈청을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 생물체에서 직접적으로 유래된 것은 물론 인비트로에서 배양된 세포 또는 조직을 포함한다. 본원에 따른 간암 또는 신장암 마커의 검출을 위해 다양한 시료가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서는 전혈, 혈청 및/또는 혈장이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 간암 또는 신장암이 발생한 또는 발생이 의심되는 또는 발생가능성이 있는 생물체에서 수득한 신조직/세포 또는 인비트로 세포 배양물이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 상기 혈액, 세포 또는 조직의 분획 또는 유도물을 포함하는 것이다. 세포 또는 조직을 이용하는 경우, 세포 자체 또는 세포 또는 조직의 용해물이 사용될 수 있다.
- [74] 본원에서 RNF20 단백질 및 그 핵산 서열은 공지된 것이며, 또한 앞서 언급한 바와 같으나, 이로 한정하는 것은 아니며, 이의 기능적 동등체를 포함하는 것이다.
- [75] 본원에서 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [76] 본원에 따른 마커는 정량적 또는 정성적 분석을 통해 핵산, 특히 mRNA 및/또는 단백질의 존재 여부의 검출 및/또는 이의 발현량 자체, 발현량의 변화, 발현량 차이의 수준에서 검출될 수 있다.
- [77] 이러한 본원에 따른 간암 또는 신장암 진단용 마커는 이의 기능적 특징 및/또는

항원적 특징에 기반을 둔 것이다. 단백질의 활성, 기능 또는 단백질을 코딩하는 핵산, 특히 mRNA 및/또는 단백질 수준(level)에서 특이적으로 상호작용하는 제제를 사용하여 검출될 수 있다.

- [78] 이런 측면에서 본원은 또한 각 바이오 마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열의 단편, 또는 상기 핵산서열에 의해 코딩되는 단백질을 특이적으로 인식하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 신장암 진단용 마커에 관한 것이다.
- [79] 본원에서 용어 검출용 물질은 본원의 마커를 단백질 또는 핵산 예를 들면 mRNA 수준에서 정량적으로 또는 존재여부의 판단을 위해 검출할 수 있는 물질이다.
- [80] 단백질의 양, 존재여부 발현패턴의 분석을 위한 방법은 공지된 것으로 예를 들면 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등을 들 수 있다. 단백질 또는 핵산 수준검출을 위한 시약은 공지된 것으로서, 예를 들면 전자는 항원-항체반응, 상기 마커에 특이적으로 결합하는 기질, 핵산 또는 펩타이드 앵타머, 상기 마커와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자와의 반응을 통해 검출될 수 있거나, 또는 질량분광분석기를 이용할 수 있다. 상기 본원의 마커와 특이적으로 상호작용 또는 결합하는 시약 또는 물질은 칩 방식 또는 나노입자(nanoparticle)과 함께 사용될 수 있다.
- [81] 본원에 따른 진단 조성물은 RNF20 마커를 단백질 또는 핵산 예를 들면 mRNA 수준에서의 검출에 필요한 시약을 포함할 수 있다. 예를 들면 상기 단백질 수준에서 검출할 수 있는 시약은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 앵타머, 수용체, 리간드 또는 보조인자 등을 포함할 수 있다. 이러한 시약은 필요한 경우 나노입자 또는 칩에 통합하여 사용할 수 있다. 단백질은 또한 질량분광분석기를 이용하여 검출될 수 있다.
- [82] RNA 수준에서의 검출, 발현량 또는 패턴의 검출을 위해 전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)/중합효소연쇄반응, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR RNase 보호 분석법, 칩 또는 노던블랏 등을 이용한 방식이 사용될 수 있으며, 이러한 분석법은 공지된 것이며, 또한 시중의 키트를 사용하여 수행될 수 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 것을 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면 상기 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 RT-PCR로 측정하기 위한 방법에서 검출시약으로, 예를 들면 본원 마커의 mRNA에 특이적인 프라이머를 포함한다. 프라이머는 주형과 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 주형의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다.

- [83] 본원에 사용되는 상기 검출 시약은 신호검출을 위해 형광물질과 같은 발색물질과 컨쥬게이션 된 것일 수 있다.
- [84] 본원에서 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 것 방법을 선택할 수 있을 것이다. 원의 일 구현예에 따르면 검출시약은 항체를 포함하며, 본원의 RNF20 단백질 검출은 이에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 이용하여 실시된다.
- [85] 본원에 이용될 수 있는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불멸 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 단백질을 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.
- [86] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA(enzyme-linked immunosorbant assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석하여 즉, 정상 시료와의 시그널 대조를 수행함으로써, 질환 발생 여부를 진단할 수 있다.
- [87] 본원의 다른 구현예에 따르면 검출시약은 RNA 분석용 시약으로, 본원에 따른 검출은 mRNA 수준에서 실시된다. mRNA 검출은 통상 노던블랏이나 역전사

PCR (중합효소연쇄반응)을 통해 수행된다. 후자의 경우 검체의 RNA를 특히 mRNA를 분리한 후, 이로부터 cDNA를 합성한 후, 특정 프라이머, 또는 프라이머 및 프로브의 조합을 사용하여, 검체 중의 특정 유전자를 검출하는 것으로, 특정 유전자의 존재/부존재 또는 발현량을 결정할 수 있는 방법이다. 이러한 방법은 예를 들면 (Han, H.; Bearss, D. J.; Browne, L. W.; Calaluca, R.; Nagle, R. B.; Von Hoff, D. D., Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res* 2002, 62, (10), 2890-6)에 기재되어 있다.

- [88] 본원에서는 RNF20가 저발현되는 간암 및 신장암 세포주 또는 이를 이식한 마우스에서 RNF20의 과발현은 SREBP1c 발현을 감소시키고, 이는 다시 PTTG1의 발현을 감소시켜, 신장암 세포주의 사멸을 증가시키고, 증식은 억제하는 것을 발견하였다. 나아가 상기 SREBP1c 발현을 감소는 간암 및 신장암 세포에서 지질대사에 관여하는 유전자의 발현의 감소로 이어지고, 암세포의 증식이 억제되는 것을 발견하였다.

- [89] 따라서 다른 양태에서 본원은 RNF20-SREBP1c(Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1c)-PTTG1(Pituitary Tumor Transforming 1) 또는 RNF20-SREBP1c-지방생합성 촉진 단백질 신호전달 경로를 표적으로 하는 RNF20의 발현 이상과 관련된 암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

- [90] 본원에서는 RNF20의 저발현 또는 발현 억제 또는 결여가 신장암 또는 간암의 발생과 연관되어 있으며, 또 그 기전을 규명한 것으로 RNF20의 발현 이상 특히 저발현 또는 결여가 암의 발생으로 이어진 경우라면, 다양한 암에 대한 치료제가 본원의 스크리닝 방법에 의해 발굴될 수 있다. 이러한 암의 예로는 특히 신장암, 또는 간암을 포함하는 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서 신장암, 특히 VHL (von Hippel-Lindau) 유전자 변이가 원인이 아닌 신장암으로, 상술한 바와 같이 이러한 신장암은 VHL 변이를 포함할 수도 있고, 하지 않을 수도 있으며, VHL 변이를 포함하는 경우에도 이러한 변이가 신장암의 원인이 아니다.

- [91] 본원에 따른 방법은 일 구현예에서 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포를 제공하는 제 1 단계; 상기 세포를 RNF20의 발현을 증가시킬 것으로 기대되는 시험물질로 처리하는 제 2 단계; 상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1 중 하나 이상의 발현을 측정하는 제 3 단계; 및 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 SREBP1c 또는 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우, 이를 RNF20의 발현 이상과 관련된 암의 치료제 후보물질로 선별하는 제 4 단계를 포함한다.

- [92] 본원에 따른 방법에서 RNF20의 발현의 감소 또는 결여는 RNF20 유전자 자체의 변이 또는 후생적 조절에 의해 단백질로의 발현이 감소 또는 억제되었거나, 또는 유전자의 이상을 수반하지 않는 경우라도 발현된 단백질이 후생적 조절 등에 의해 목적하는 기능을 하지 못하는 경우를 포함하는 것으로,

당업자라면, 정상 세포 및 본원의 실시예에 기재된 것을 참조하여 발현이 감소 또는 억제된 정도를 판단할 수 있을 것이다. 예를 들면 RNF20의 유전자 발현(또는 전사)이 억제되어 단백질 발현(또는 번역) 감소로 이어진 경우, 또는 단백질로 발현되었으나, 유전자 변이 등으로 인해 단백질이 목적하는 기능을 하지 못하는 경우, 유전자가 메틸화되어 유전자의 발현이 억제된 경우 등을 포함한다. 결여된 경우의 예로는 RNF20의 유전자는 존재하나, 메틸화 등의 후생적 조절에 의해 발현되지 않는 경우를 포함한다.

- [93] 본원에 따른 방법에서는 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포로는 신장 또는 간암 조직 유래의 세포 또는 세포주가 사용된다. RNF20의 발현은 유전자 및/또는 단백질 수준에서의 감소 또는 결여를 의미하는 것으로, 발현의 감소 또는 결여는 정상 신장 세포주를 대조군으로 사용하여 이와 비교하여 감소된 것으로 당업자면 본원의 개시사항 및 당업계의 수준을 근거로 감소된 수준을 판단할 수 있다. 일 구현예에서 본원에 따른 방법에 사용되는 RNF20의 발현이 감소된 세포는 신장 세포주로 ACHN, A498, 또는 Caki-2, 간암 세포주로는 Huh-7 또는 HepG2를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [94] 일 구현예에서 상기 방법은 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포를 제공하는 제 1 단계; 상기 세포의 RNF20의 발현을 증가시키거나 또는 SREBP1c 발현을 억제시킬 것으로 기대되는 시험물질로 처리하는 제 2 단계; 상기 시험물질로 처리된 세포에서 PTTG1의 발현을 측정하는 제 3 단계; 및 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별하는 제 4 단계를 포함한다.
- [95] 다른 구현예에서는 상기 제 3 단계에서, 상기 SREBP1c의 발현을 측정하는 대신에, 또는 이에 부가하여, 상기 SREBP1c에 의해 발현이 촉진되는 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 그 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하며, 이 경우 상기 제 4 단계에서 상기 후보물질은 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포와 비교하여 상기 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 단백질 발현이 감소한 것이다.
- [96] 또 다른 구현예에서는 상기 제 3 단계 대신에, 상기 SREBP1c에 의해 발현이 증가, 향상 또는 촉진되는 지질생합성에 관여하는 단백질 및/또는 그 유전자의 발현을 측정하는 단계를 포함하며, 그리고 상기 제 4 단계 대신에, 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 지질생합성에 관여하는 단백질 및/또는 유전자의 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 지질생합성에 관여하는 단백질의 발현이 상기 대조군의 지질생합성에 관여하는 단백질의 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별하는 단계를 포함한다.
- [97] 본원에 따른 방법에서 RNF20-SREBP1c-지질생합성 촉진 경로를 발견한

것으로, 본원에서 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 그 단백질이란 SREBP1c에 의해 그 전사가 증가되고, 또한 단백질로의 발현이 증가되는 것으로, 발현증가에 의해 세포에서 지질의 합성이 증가 또는 촉진된다. 따라서 이러한 특징을 갖는 한 특별히 제한하는 것은 아니나, 신장암에서는 지질대사에 관여하는 물질은 FAS(Fatty acid synthase, 또는 유전자는 FASN), SCD1(Stearoyl-CoA desaturase-1), 또는 ELOVL6(Elongation of very long chain fatty acids protein 6)의 유전자 또는 단백질의 발현을 측정하여 선별할 수 있다. 상기 각 단백질 및 그 유전자 서열은 예를 들면 FASN NCBI 유전자 ID (2194), 단백질 DB (41872631); ACC1 유전자 ID (31), 단백질 DB (38679960); SCD1 유전자 ID (6319), 단백질 DB (53759151); 및 ELOVL6 유전자 ID (79071), 단백질 DB (195539343)로 공지된 것으로 당업자라면, 상기 서열 및 본원에 개시된 것을 근거로 상기 단백질 또는 유전자의 발현을 용이하게 측정할 수 있을 것이다. 또한 상기 유전자 이외에 지질 생합성에 관여하는, SREBP1c의 표적 유전자로서 공지된 다른 유전자의 측정을 배제하는 것은 아니다. 측정 결과 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 지질대사에 관여하는 단백질의 발현이 상기 대조군의 지질대사에 관여하는 단백질의 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별할 수 있다.

- [98] 본원에 따른 방법에서 분자 표적은 RNF20 및/또는 SREBP1c로서, 전자의 발현을 증가시키는 물질 또는 후자의 발현을 감소시키는 물질은 신장암 치료제 스크리닝의 시험물질로 사용될 수 있다.
- [99] 본원의 방법에 사용되는 시험물질은 상술한 표적 유전자 또는 단백질의 발현 및/또는 활성을 조절할 것으로 기대되는 물질로, 예를 들면 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.
- [100] 상기와 같은 시험물질의 처리에 의한 RNF20의 발현을 증가시키거나 또는 SREBP1c 발현을 억제하는 상기 세포에서 PTTG1의 발현을 측정하여 결정될 수 있다. PTTG1는 그 서열이 공개된 것으로 인간 cDNA 서열은 GenBank ID: NM_004219, 단백질 서열은 NP_001269311를 참조할 수 있다. PTTG1의 발현은 단백질 또는 유전자 수준에서 검출될 수 있으며, 이에 대하여는 앞서 기술한

바를 참고할 수 있다.

- [101] 후보물질은 상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우 이를 신장암 치료제 후보물질로 선별할 수 있다.
- [102] 또한 상기와 같은 시험물질의 처리에 의한 RNF20의 발현을 증가시키거나 또는 SREBP1c 발현을 억제하는 상기 세포에서 지질대사에 관여하는 단백질의 발현을 측정하여 결정될 수 있다.
- [103] 본 방법에서 사용되는 세포의 종류 및 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재 하에서 상기 단백질 발현 또는 활성의 감소를 가져오는 물질을 후보 물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이상 감소, 약 95% 이상 감소, 약 90% 이상 감소, 약 85% 이상 감소, 약 80% 이상 감소, 약 75% 이상 감소, 약 70% 이상 감소, 약 65% 이상 감소, 약 60% 이상 감소, 약 55% 이상 감소, 약 50% 이상 감소, 약 45% 이상 감소, 약 40% 이상 감소, 약 30% 이상 감소, 약 20% 이상 감소, 약 10% 이상 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [104] 또 다른 양태에서 본원은 간암 또는 신장암의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 검사 대상체 유래의 생물학적 시료로부터 RNF20 바이오마커의 핵산 및/또는 단백질의 수준을 검출하는 단계; 상기 핵산 및/또는 단백질 수준 검출결과를 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 유래 시료의 핵산 또는 단백질 수준에 변화가 있는 경우, 상기 대상체의 신장암 진단 또는 생존 예후와 연관시키는 단계를 포함하는, RNF20 바이오마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [105] 본원에 따른 방법에 사용되는 마커의 발현양의 검출은 단백질 및/또는 mRNA 발현 수준에서 결정될 수 있으며, 이에 관해서는 언급한 바와 같다. 또한 대상체 생물학적 시료는 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다.
- [106] 본원에 따른 방법에서 상기 연관시키는 단계에서, 상기 대조군은 정상 대조군이며, 상기 정상 대조군에서 결정된 마커의 수준과 비교하여 상기 마커의 수준이 상기 대상체에서 감소한 경우 상기 대상체를 신장암 또는 생존 예후가 좋지 않은 것으로 예측할 수 있다. 생존 예후란 신장암으로 진단되어 치료 후에 5년 생존율을 일컫는 것으로, 병리학적, 임상적 및 분자생물학적 소견을 종합하여 결정할 수 있다. 생존률은 특히 암의 병기와도 관련성이 있으며, 신장암의 병기에 따른 일반적으로 제 1기는 88-100%, 제 2기는 63-88%, 제 3기는 34-59% 그리고 제 4기는 0-20%이며, 이와 비교하여 낮은 것을 의미한다.
- [107] 판단을 위해 대조군 예를 들면 정상 대조군 또는 완치된 대조군의 값과

비교하여 예를 들면 RNF20이 유의하게 감소된 경우, 대상체에서 상기 질환이 발생한 것으로 진단하는 정보를 제공할 수 있다. 본원 일 구현예에 따르면 상기 연관시키는 단계는 정상 대조군과 대상체의 시료를 비교한 후, 상기 각 마커에 대하여 발병여부를 진단할 수 있는 임계값을 설정한 후, 대상체의 검출 결과를 상기 임계값과 비교할 수 있다. 임계값 설정은 예를 들면 본원 실시예에 기재된 방법을 참조할 수 있다.

[108] 본원의 방법은 간암 또는 신장암의 진단 또는 예후에 관한 정보를 제공하기 위해, 마커 분석 결과에 추가하여, 환자의 비단백질 임상정보 즉, 마커 이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 비단백질 임상정보란, 예를 들면 환자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환, 초음파, 전산화단층촬영(CT) 중 하나 이상을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[109] 또 다른 양태에서 본원은 인비트로 또는 동물에서 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현 증가를 가져오는 물질을 이용한 세포의 RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로 조절 방법 또는 키트에 관한 것이다.

[110] 또 다른 양태에서 본원은 또한 인비트로 또는 동물에서 RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현 증가를 가져오는 물질을 이용한 세포의 RNF20-SREBP1c-지질생합성 경로 조절 방법 또는 키트에 관한 것이다.

[111] 상기 키트 및 방법에 사용되는 물질 및 이를 이용한 조절 기전에 대한 설명은 앞서 언급한 바를 참조할 수 있다. 본원에 따른 방법 및 키트는 신장 또는 간암의 치료, 기존의 약물 테스트, 신약 개발, 연구툴로서 유용하게 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[112] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[113] 실시예

[114] 실험방법

[115] 세포배양 및 화합물

[116] ACHN, A498, HEK293, Caki-2 및 정상 신장 피질 표피(HRCE; human primary renal cortical epithelial) 세포주, HEK293T, Huh-7 및 HepG2는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 획득하였고, 공급자의 메뉴얼대로 배양되었다. 요약하면 ACHN과 A498 세포주는 10% 소태아혈청(FBS; fetal bovine serum), 페니실린(100U/ml), 스트렙토마이신(100μg/ml)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium(MEM) 배지에서 배양하였다. HEK293과 Caki-2 세포주는 10% FBS와 페니실린, 스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 배지에서 배양하였다. HRCE 세포주는 0.5% FBS, 10 nM 트라이아이오도타이로닌, 10ng/ml 표피생장인자, 100ng/ml 하이드로코티손,

5 μ g/ml 인슐린, 1 μ M 에피네프린, 5 μ g/ml 트랜스페린, 2.4 mM L-알라닌-L-글루타민, 페니실린과 스트렙토마이신을 첨가한 신장 표피세포 배양배지에서 배양하였다. 모든 세포는 5% 이산화탄소, 37°C 조건에서 배양하였다. 베틀린(Betulin) 및 보디피(BODIPY) 493/503은 시그마-알드리치를 통해 구입하였다. C75 및 TOFA는 Abcam에서 구입하였다. 프로피디움 아이오딘화합물은 BD 바이오사이언스에서 구입하였다.

[117] **인간 신장암 및 간암 조직 샘플**

[118] 간암 및 신장암 환자의 종양 조직과 정상 신장 조직 표본은 서울대학교병원에서 제공하였다. 서울대학교병원 내 심의기관에서 본 연구를 승인하였다(승인번호: H-1501-011-636). 본 연구의 후향적 특성상 환자의 실험 동의서는 필요하지 않았다.

[119] **TCGA RNA-Seq 및 생존 분석**

[120] VHL 돌연변이 상태 및 환자의 임상 자료는 The Cancer Genome Atlas(TCGA)에서 2015년 9월에 획득하였다. 533개의 신장암 종양 조직 및 72개의 정상 신장 샘플에 대한 RNA 서열분석 결과를 box plot 분석은 1-99번째 백분위수(막대), 25-75번째 백분위수(상자) 및 중간값(상자 내 선)을 나타내었다. 생존 분석을 위하여 TCGA RNA-Seq 자료에서 얻은 유전자 발현량에 따라 환자의 순위를 매겼다. 유전자 발현량이 평균 이상인 환자는 ‘높은’ 집단, 나머지를 ‘낮은’ 집단으로 정의하였다. 전반 생존 곡선은 카플란-마이어 생존 분석을 통해 추정하였으며, 두 집단의 생존 차이는 로그-랭크 분석을 통해 비교하였다.

[121] **조직 마이크로어레이 및 면역조직화학법**

[122] 신장암 환자의 종양 조직 및 정상 신장 조직 절편에 대한 면역조직화학법은 제조사의 설명서에 따라 시행되었다. 간략하게 설명하면 조직 마이크로어레이에는 50개의 신장암 종양 조직 절편과 9개의 정상 신장 조직이 포함되었다. 면역조직화학 분석에서 RNF20와 SREBP1을 검출하기 위해 스트렙타비딘-바이오틴 복합체 기법을 사용하였으며, 각각의 항체는 Abcam과 BD 바이오사이언스에서 구입하였다.

[123] **제조합 아데노바이러스 제작**

[124] 아데노바이러스 플라스미드는 이전 논문에 보고한대로 제작되었다 (1). 간단히 설명하면, 랫 SREBP1c 아미노산 1-403번과 생쥐 RNF20 전체를 암호화하는 cDNA를 AdTrack-CMV 서플 벡터에 클로닝하였고 Ad-Easy 아데노바이러스 벡터 시스템을 통해 제작하였다. 모든 실험에서 GFP를 암호화하는 아데노바이러스를 대조군으로 사용하였다. 아데노바이러스는 HEK293A 세포주에서 증식시켰으며, 기존에 보고된 CsCl 밀도구배원심법을 이용하여 정제하였다 (2).

[125] **렌티바이러스 제작 및 바이러스 형질도입**

[126] Flag 표지가 달린 RNF20와 SREBP1c cDNA를 렌티바이러스 벡터

pLVX-EF1 α -AcGFP1-N1에 클로닝하였다. 리포펙타민 2000을 이용하여 렌티바이러스 벡터와 pAX2 및 pMD2.G 벡터를 HEK293T 세포주에 형질도입하였다. 형질도입 48시간 후에 바이러스를 수집하여 0.45- μ m 필터를 통해 불순물을 걸러냈다. 이후 ACHN 세포주에 바이러스와 8 μ g/ml의 폴리브렌을 함유한 배양액에 18시간 동안 배양하였다. 감염된 세포를 48시간 동안 회복시킨 후 퓨로마이신에 저항하는 콜로니들만 선별하여 실험에 이용하였다.

[127] **웨스턴 블랏팅 분석**

[128] 세포 및 조직을 150 mM 염화나트륨, 50 mM 트리스-황산(pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% 소듐디옥시콜레이트, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, and 단백질을 분해 효소 억제제 혼합물을 함유한 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) 버퍼에 용해시켰다. 각 시료에서 동량의 단백질을 SDS-PAGE 겔에서 분리하였으며, 이후 폴리비닐리덴 다이플루오라이드(PVDF) 막으로 옮겼다. 이후 PVDF 막을 0.1% Tween-20를 함유한 TBS 용액에 5% 무지방 우유 또는 3% 소혈청알부민 첨가하여 비특이반응을 억제하고 RNF20, SREBP1, FASN, SCD1, PTTG1, Cyclin B1, Cyclin E, Myc-tag, Flag-tag 또는 β -actin과 결합하는 항체를 PVDF 막에 결합시켰다. 홀스래디시 과산화효소가 결합된 2차 항체를 PVDF 막에 결합시킨 후, LuminoImager(LAS-3000) 기계를 이용한 화학발광 검출을 통해 단백질을 시각화 하였다.

[129] **RNA 추출 및 qRT-PCR**

[130] 전체 RNA를 TRIzol 용해 시약으로 추출하였다. RevertAid 역전사효소를 이용하여 동량의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 상대적인 mRNA 발현량은 정량적 리얼타임 PCR 분석법(qRT-PCR)을 통해 측정하였으며, GAPDH 또는 Cyclophilin mRNA 양으로 보정한 뒤 계산하였다.

[131] [표 1] qRT-PCR의 프라이머 서열

[132]

Species	Gene	Sequence (5' to 3')	Direction
Human	RNF20	CACAGGAGAGCCAAAAGGAG	Forward
		GCATCCTCATCAGCCATTTT	Reverse
	SREBP1c	CCATGGATTGCACTTTCGAA	Forward
		CCAGCATAGGGTGGGTCAAA	Reverse
	FASN	GCCTACACCCAGAGCTACCG	Forward
		GCCATGGTACTTGGCCTTG	Reverse
	ACC1	CAACGAGATTTCACTGTGGCT	Forward
		TTCTGCATTGGCTTTAAGGTCT	Reverse
	SCD1	ACAAACCTGGCTTGCTGATG	Forward
		CCACAGCTCCAAGTGAAACC	Reverse
	ELOVL8	CTCTGGTCTCTGACCCCTGC	Forward
		CTCCTAGTTCGGGTGCTTTG	Reverse
	SREBP2	CAAGCTTCTAAAGGGCATCG	Forward
		GGCTCATCTTTGACCTTTGC	Reverse
	HMGR	ATTTGGCAGCTCAGCCATT	Forward
		TGAGGAGAAGGATCAGCTATCC	Reverse
	PCNA	CATGGCGGTGAACCTCACC	Forward
		CACAGCTGTACTCCTGTTCTGG	Reverse
	Cyclin A	CCTTAGGGAAATGGAGGTTAAA	Forward
		CCAAATGCAGGGTCTCATTC	Reverse
Mouse	Cyclin D1	TTCTCTCCAAATGCCAGA	Forward
		CAGTCCGGGTCACTTTCAT	Reverse
	Cyclin E	TCAGTGGTGGACATAGAGAA	Forward
		TGTCCAGCAAATCCAAGCTG	Reverse
	PTTG1	GGGTCTGGACCTTCAATCAA	Forward
		GGCAGGAACAGAGCTTTTG	Reverse
	GAPDH	TTCAACCATGGAGAAGG	Forward
		CTAAGCAGTTGGTGGTGCAG	Reverse
Human	Cyclophilin	TGCTGGACCCAACACAAATG	Forward
		GTCCACAGTCAGCAATGGTG	Reverse
	SREBP1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	Forward
		CAGGAAGGCTTCCAGAGAGG	Reverse
	PTTG1	GGCATCTAAGGATGGGTGA	Forward
		GGGGTTTGCCAGTCTTCATA	Reverse
	TBP	GGGAGAATCATGGACCAGAA	Forward
		CCGTAAAGGCATCATTCGACT	Reverse

[133] siRNA 형질도입

[134] RNA20, SREBP1, PTTG1 및 FASN의 siRNA 이중가닥은 바이오니어(대한민국)에서 합성하였다. 리포펙타민 RNAiMAX 시스템을 사용하여 제공사 설명서에 따라 ACHN 신장암 세포주에 siRNA 형질도입을 실시하였다.

[135] [표 2] siRNA Oligos의 서열

[136]

Species	Gene	Sequence (5' to 3')	Direction
Human	RNF20	GGAUAAAGAGAAAGCAAA	Sense
		UUUGCCUUUCUCUUUAUCC	Antisense
	SREBP1	CCACCGUUUCUUCGUGGAU	Sense
		AUCCACGAAGAAACGGUGG	Antisense
	PTTG1	CUCAGAUGAAUCCGGCUGU	Sense
		ACAGCCGCAUUCAUUCUGAG	Antisense
	FASN	UCAACCUGGACAGCUCACU	Sense
		AGUGAGCUGUCCAGGUUGA	Antisense

[137] CCK-8을 이용한 세포증식 분석

[138] 세포증식은 기존에 보고된 세포수 계산 키트(CCK-8, Cell Counting Kit-8) 시스템을 사용하여 측정하였다 (3). 간단히 설명하면, 살아있는 세포의 대사체를 감지하는 민감비색분석을 수행하여 세포 성장곡선을 얻었다.

[139] 균집형성능분석

[140] RNF20 또는 SREBP1c를 과발현하는 렌티바이러스를 지닌 ACHN 세포주를 6-well 판에서 배양하였다. 세포를 5% 이산화탄소, 37°C 조건에서 7일간 배양한 후 포르말데히드로 고정하고 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

[141] 세포주기 분석

[142] 트립신에 처리된 세포를 인산완충식염수(PBS)로 세척한 후 4°C에서 70% 에탄올을 30분 처리하여 고정하였다. 고정된 세포를 인산완충식염수로 두 번 세척한 후 0.1% 노니덱 P-40, 100µg/ml RNA 분해효소와 2.5µg/ml 프로피디움 아이오딘화합물(PI, propidium iodide)을 함유한 용액에 30분간 염색하였다. 염색된 세포를 FACS 칸토 II 기계를 이용한 유동세포분석법으로 분석했으며, 각 세포주기에 있는 세포 수는 ModFit LTTM 세포주기 분석 프로그램을 통해 계산하였다.

[143] 세포 내 트리글리세리드 측정

[144] 세포 내 트리글리세리드는 기존에 보고한 대로 세포용해물을 비색분석법을 통해 측정하였으며, 세포 내 단백질 mg 당 지질 mg으로 표현하였다 (1). 간단히 설명하면, 세포용해물을 5% 트리톤 X-100을 이용하여 추출한 후 80°C 수조에 담그고 얼음에 담그는 과정을 2번 반복하였다. 12,000 rpm에 5분 동안 원심 분리한 후, 상층액을 모아 Infinity 트리글리세리드 분석법을 이용하여 세포 내 트리글리세리드 양을 측정하였다. 측정값은 BCA 단백질 정량키트로 분석한 전체 단백질 양으로 보정하였다.

[145] 보디피 염색

[146] ACHN 신장암 세포주를 10µM 베툴린 유무 조건에서 24시간 배양하고 인산완충식염수로 두 번 세척한 후, 4% 파라포르말데히드로 10분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 트윈-20를 함유한 인산완충식염수로 2번 세척한 후,

암실에서 1시간 동안 보디피 493/503이 결합된 플루오레세인 아이소싸이오시안산염(FITC, fluorescein isothiocyanate)으로 염색하였다. 표본은 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 함유한 벡타실드 용액으로 염색하였으며 Zeiss LSM 700 공초점 현미경을 이용하여 관측하였다. 모든 사진은 같은 조건에서 관찰하고 분석하였다.

[147] **PTTG1 리포터 및 루시퍼레이즈 분석**

[148] PTTG1 프로모터 부위(전사시작지점 -908 ~ +25 뉴클레오타이드)를 PCR하여 pGL3-basic 벡터에 클로닝하였다. 이전에 보고된 칼슘-인산 방법을 이용하여 DNA 플라스미드를 HEK293 세포주에 형질도입하였다 (4). 36시간 배양 후 형질도입된 세포를 수확하여 25 mM 트리스-인산(pH 7.8), 10% 글리세롤, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, and 1% 트리톤 X-100이 함유된 버퍼를 사용하여 세포용해물을 추출하였다. 루시퍼레이즈 및 베타-갈라토시데이즈 활성은 제공사의 지시에 따라 측정하였다. 루시퍼레이즈 활성은 베타-갈라토시데이즈 활성으로 보정하였다.

[149] **이종 이식 실험(xenograft experiment)**

[150] 피하 이종 이식 실험은 서울대학교병원의 동물실험관리원의 승인을 받았다(IACUC number: 13-0080). 1×10^7 개의 대조군 ACHN 세포와 RNF20가 지속적으로 발현되는 ACHN 세포를 다섯 마리의 BALB/c 암컷 무흉선 누드 생쥐의 피하에 주입하였다. 주입 전 세포를 인산완충식염수 200 μ l에 풀고 동량의 마트리젤과 섞었다. 종양이 뚜렷이 나타난 후 종양 크기는 1주일마다 캘리퍼를 이용하여 측정하였으며 종양 부피는 다음의 공식으로 계산하였다. 부피(mm³) = (길이 $\times$ 너비²) $\times$ π /6. 이식 5주 후에 생쥐를 이산화탄소 흡입을 통해 안락사시켰으며 이종 이식 종양을 꺼내 분석하였다. 이종 이식 조직 표본을 4% 파라포름알데히드에 고정시키고 30% 수크로스에 넣은 후 OCT 용액에 고정시켰다. 이종 이식 종양 조직 절편을 헤마톡실린/에오신(H/E)과 오일 레드 오 염색과 면역조직화학법을 수행하였다 (5). 간단히 설명하면 Ki67 단백질 및 TUNEL 기법은 스트렙타비딘-바이오틴 복합체 시스템을 이용하여 수행하였다. 사진은 EVOS ORIGINAL 현미경과 NIKON TMS 도립현미경을 이용하여 관찰하였다.

[151] **통계 분석**

[152] 결과는 평균 $\pm$ 표준편차 또는 평균 $\pm$ 표준오차(그림 7B와 7C)로 표현되었다. 다군 비교는 일원분산분석 또는 두 가지 조건이 있을 경우 이원분산분석을 통해 수행하였다. 두 군의 차이는 양쪽 Student's t-검정을 통해 분석하였다. 통계 분석은 Prism 그래프패드를 통해 수행하였으며 $P < 0.05$ 일 때 차이가 유의미하다고 보았다.

[153] **실시예 1. RNF20의 신장암 및 간암에서 하향조절 규명**

[154] ccRCC(clear cell Renal Cancer Carcinoma)에서는 이소성(ectopic) 지질 축적이 상당히 상향조절된다(Rezende et al., 1999, Differential diagnosis between

monomorphic clear cell adenocarcinoma of salivary glands and renal (clear) cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 23, 1532-1538; Valera and Merino, 2011, Misdiagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol* 8, 321-333). RNF20이 SREBP1c를 저해함으로써 신생 지질 생성의 음성 조절자로 작용한다고 알려져 있으므로(Lee et al., 2014, Ring finger protein20 regulates hepatic lipid metabolism through protein kinase A-dependent sterol regulatory element binding protein1c degradation. *Hepatology* 60, 844-857), 본 발명자는 RNF20이 ccRCC 종양에서도 조절이상이 되는지를 조사하였다. 도 1의 A에 나타난 바와 같이, RNF20 mRNA 발현은 동일 환자 유래 정상 신장 조직과 비교하여 ccRCC 종양에서 상당히 하향조절되어 있다. 이와 유사하게, TCGA(the Cancer Genome Atlas)에서 얻은 RNA-Seq 데이터에서도 ccRCC 종양에서의 RNF20 mRNA 발현이 상당히 감소된 것으로 나타났는데, 이는 RNF20 발현이 낮은 것이 진행성 종양 단계와 밀접하게 연관된다는 것을 말한다(도 1C). 또한, 면역조직화학(IHC) 분석에서 RNF20 단백질 발현이 인접 정상 신장조직보다 ccRCC 종양에서 더 낮은 것으로 나타났다(도 1의 D). 이와 일치하게도, 동일 환자의 정상 신장 및 종양 조직에서 얻은 RNF20 염색 데이터에서도 ccRCC에서 RNF20 발현이 감소된 것으로 나타났다(도 1의 E). RNF20 발현은 또한, 인간 초기 신장 피질 내피세포(human primary renal cortical epithelial ; HRCE) 및 HEK293 정상 신장 세포에서와 비교하여 ccRCC 세포주 A498, Caki-2, 및 ACHN에서 감소되었다(도 9의 A). 또한 도 16에 나타난 바와 같이 RNF20은 단백질 및 유전자 수준에서 간암세포에서도 감소된 것으로 나타났다.

- [155] RNF20 프로모터의 과메틸화에 의해 ccRCC에서 RNF20 발현이 하향조절되는지 알아보기 위하여, 본 발명자는 저해제인 RG108을 사용하여 DNA 메틸트랜스퍼라아제(DNMTs)를 저해하여 ccRCC 세포에서 RNF20 mRNA의 발현레벨을 측정하였다. RG108을 처리하였을 때, HEK293 비-암세포에는 영향을 미치지 않았고 ccRCC 세포에서 RNF20 발현을 상승시켰다(도 1의 F 및 9의 B).
- [156] 또한, 본 발명자는 RNF20 발현 및 임상결과 사이의 상관관계를 연구하여, RNF20의 발현이 낮은 것이 생존율이 낮은 것과 상당히 관련되어 있다는 것을 밝혔다(도 1G). RNF20과 낮은 생존율 사이의 이러한 밀접한 상관관계는 VHL 야생형 및 VHL 돌연변이 ccRCC 환자에서 관찰되었다(도 1H 및 1I). 따라서, 낮은 RNF20 발현에 의한 종양생성에 대한 결과를 평가하기 위하여, 본 발명자는 RNF20이 VHL 야생형 ACHN 및 VHL-결실된 A498 ccRCC 세포에서의 세포 증식에 영향을 미치는지를 알아보았다. 상기 실험에서, ACHN 및 A498 ccRCC 세포에서 RNF20의 과발현에 의해 세포증식이 억제되었다(도 1의 J 및 9C). 역으로, RNF20의 siRNA-매개 억제에 의해 ACHN 및 A498 세포를 포함한 ccRCC 세포주 및 간암세포주에서 세포 성장이 증가하였다(도 1K 및 9D, 도 20). 반대로, RNF20이 과발현되지 않거나 또는 siRNA-매개 녹다운되지 않으면, RNF20의

레벨이 높은 HRCE 및 HEK293 정상 신장 세포의 성장에 영향을 미치지 않았다(도 9의 E-H). 상기 데이터는 RNF20이 VHL 상태와는 독립적으로 ccRCC 세포에서 종양 억제자로 작용할 수 있다는 것을 의미한다.

- [157] 즉, 낮은 RNF20 발현이 VHL 돌연변이 상태와 상관없이 ccRCC 환자의 낮은 생존율과 강하게 연관되어 있었는데(도 1G-I), 이는 RNF20 발현이 ccRCC 진행과 역으로 관련되어 있다는 것을 의미한다. 이와 일치하게, RNF20의 이소성 발현이 VHL 야생형 및 결실된 ccRCC 세포주 둘다에서 SREBP1c 및 세포 증식을 억제하였지만(도 1J; 도 3A 및 F), 기저 RNF20 발현이 높은 HRCE 및 HEK293 정상 신장 세포의 증식에 영향을 미치지 않았다(도 9의 A 및 F).
- [158] 따라서, 테메틸라제 저해제 RG108을 ACHN ccRCC 세포에 처리하면 RNF20 mRNF 발현이 실질적으로 증가하지만, HEK293 세포에서 관찰되지는 않았는데(도 9의 B), 이는 RNF20 프로모터 과메틸화가, 최소 일부분은, ccRCC에서 RNF20 발현을 감소시키게 할 수 있다는 것을 의미한다.
- [159] 실시예 2. **SREBP1** 및 지방생합성 유전자의 신장암 및 간암에서의 상향조절 및 **RNF20** 발현과 역의 상관관계 규명
- [160] 교아세포종(glioma), 간암, 전립선암 및 췌장암과 같은 몇몇 타입의 종양에서 SREBP1 및 지방생합성 유전자가 고레벨로 발현되는데, 이는 또한 악성 진행 및 나쁜 결과와 양의 상관관계에 있다(Guo et al., 2009, EGFR signaling through an Akt-SREBP-1-dependent, rapamycin-resistant pathway sensitizes glioblastomas to antilipogenic therapy. *Sci Signal* 2, ra82; Huang et al., 2012, Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 10, 133-142; Sun et al., 2015, SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumour Biol* 36, 4133-4141). 그러나, SREBP1 및 지방생합성 유전자가 ccRCC에서 이소성 지질 저장과 연관되어 있는지는 불분명하다. 따라서 본 발명자는 정상 신장 및 ccRCC 종양 조직에서의 지방생합성 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 동일 환자(patient-matched)의 정상 샘플과 비교하여 ccRCC 종양에서 SREBP1c mRNA가 상당히 상향조절되어 있었다. 또한, TCGA RNA-Seq 데이터에서, SREBP1이 ccRCC 종양에서 상향조절되어 있었고(도 2B), 진행성 종양 단계와 양의 상관관계(도 2C)인 것으로 나타나 있었다. 이러한 데이터와 일치하게도, FASN 및 SCD1에 대한 SREBP1 타겟 유전자의 mRNA 레벨이 ccRCC 종양에서 상승되었다(도 10A-F). 또한, SREBP1 및 지방생합성 효소인 FASN 및 SCD1의 단백질 발현이 동일 환자의 정상 신장 조직과 비교하여 ccRCC 종양에서 동시에 증가하였고, 반면 RNF20 단백질이 하향조절되었다(도 2D). 이러한 결과는 간암세포주를 사용한 실험에서도 관찰되었으며, 결과는 도 16에 기재되어 있다.
- [161] 다음으로, 본 발명자는 동일 ccRCC 환자에서 유래한 정상 신장 및 종양 조직

섹션을 IHV 염색을 하여 RNF20 및 SREBP1 발현 사이의 상관관계를 조사하였다. RNF20 시그널 강도는 ccRCC 종양 조직에서 감소하였지만, 반면 SREBP1 시그널을 증가하였다(도 2E). 이어 TCGA 분석으로 ccRCC 종양 조직에서 RNF20 및 SREBP1 발현이 서로 역 상관관계임을 밝혔다(도 2F).

- [162] 결과적으로, RNF20의 mRNA 발현은 SREBP1c 타겟 유전자 FASN 및 ELOVL6의 것과 역으로 연관되어 있고(도 10G 및 H), FASN mRNA 발현은 낮은 생존율과 양으로 연관되어 있다(도 2G). 반대로, qRT-PCR 및 TCGA RNASeq 분석에서 SREBP2 및, 이의 타겟 유전자이며 콜레스테롤 합성의 속도제한 효소의 유전자인 HMGCR의 mRNA 레벨은 ccRCC 종양에서 감소되었다(도 10 I-L).
- [163] 종합하면, 상기 결과는 ccRCC에서 SREBP1 레벨이 상승되고, 그 결과 지방생합성 활성화가 증가되고 임상 결과가 더 나빠진다는 것을 의미한다.
- [164] ccRCC에서 VHL의 손실에 기인한 HIF의 구성성분 활성화가 병인적 대사 변형을 야기한다는 것은 잘 알려져 있다. 그러나, 신장-특이적 VHL 결핍 마우스에서는 ccRCC-유사 대사 표현형이 나타나지 않았는데, 이는 ccRCC 종양 형성에 대한 추가적 메카니즘이 있음을 의미한다. 상기 실시예 1에서, RNF20 하향조절에 의해 SREBP1c가 활성화됨으로써 ccRCC 종양생성이 촉진된다는 것이 입증되었다. RNF20 발현이 정상 신장 조직과 비교하여 ccRCC 종양에서 감소하였고(도 1A-E) SREBP1 및 지방생합성 유전자 발현과 역의 상관관계에 있다(도 2A-F; 도 10A-H).
- [165] ccRCC에서 지질이 풍부하고 지방생합성이 증가한다는 종래 관찰들과 일치하게, 본원에서는 SREBP1 및 지방생합성 활성이 상향조절된 것으로 나타났다(도 2A-E; ch 10 A-F). 그러나, SREBP2 및 HMGCR과 같은 이의 타겟 유전자의 mRNA 레벨이 ccRCC 종양에서 감소하였는데(도 10I-L), 이는 SREBP1 및 신규 지방생합성이 초기 종양생성 역할을 할 수도 있다는 것을 의미한다.
- [166] 실시예 3. RNF20에 의한 신장암 및 간암 세포에서 SREBP1c의 억제를 통한 지방생합성 및 세포 증식 감소효과 확인
- [167] ccRCC 세포에서 RNF20 및/또는 SREBP1c 과발현의 효과를 조사하였다. VHL 야생형 ACHN ccRCC 세포에서, RNF20의 이소성 발현에 의해 내인성 및 이소성 핵 SREBP1 단백질이 둘다 분명히 억제되었다(도 3A). 그러나 siRNA를 사용하여 RNF20을 급성으로 억제시키면 SREBP1c mRNA 및 단백질 발현이 증가되었다(도 11A 및 B).
- [168] 이와 일치하는 것으로 SREBP1c 과발현되면 ACHN 세포에서 FASN, ACC1, SCD1, 및 ELOVL6를 포함하는 지방생합성 유전자의 mRNA 레벨이 증가되었다(도 3B). 반대로, RNF20은 대조군 및 SREBP1c-과발현하는 ACHN 세포 둘다에서 지방생합성 유전자의 mRNA 발현을 강력히 저해하였다(도 3B). 그러나 RNF20을 억제하면 지방생합성 유전자의 mRNA 발현을 증가시키고, 그리고 RNF20 및 SREBP1 둘다 낙다운하면 지방생합성 유전자 발현에 대한

RNF20 siRNA의 효과가 없어졌다(도 11C). 따라서, 세포내 트리글리세라이드 축적은 대조군 ACHN 세포에서보다 SREBP1c-과발현시키는 ACHN 세포에서 더 컸다(도 3C). 역으로, RNF20을 억제하면 세포내 트리글리세라이드 레벨이 증가하였다(도 11D). 상기와 같은 siRNF20을 이용한 RNF20의 억제는 간암세포주에서 SREBP1 단백질 농도를 증가시키고 지방생합성이 증가하는 것으로 나타났다 (도 21 및 도 22).

- [169] SREBP1c 과발현이 ccRCC 세포에서 PCNA, cyclin A, D1, 및 E를 포함한 세포주기 조절자의 mRNA 발현을 촉진시켰으며(도 3D), 나아가 RNF20 과발현은 과발현된 SREBP1c의 효과를 감소시켰다(도 3D). RNF20 낙다운은 또한 ccRCC 세포에서 세포주기 유전자 발현을 촉진시켰다(도 11E). 반대로, RNF20 과발현은 콜로니 형성을 감소시킨 반면 이소성 SREBP1c 발현은 ACHN 세포에서 콜로니 형성을 증가시켰다(도 3E). 또한, SREBP1c 과발현은 ccRCC 세포 증식을 강화시켰으며(도 3F), SREBP1의 낙다운은 대조군 및 RNF20-억제 세포 둘다에서 ccRCC 세포 증식을 감소시켰다(도 11F). 상기와 같은 결과는 간암세포주에서도 관찰되었으며, 결과는 도 17, 18 및 19에 기재되어 있다.
- [170] 이러한 데이터는 RNF20이 SREBP1c-유도 지방생합성 및 세포주기 진행을 억제시킴으로써 ccRCC 세포 증식을 저해한다는 것을 나타내는 것으로, RNF20이 신장암 치료제로 유용하게 사용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [171] 또한 지방생합성을 억제하는 약물을 ccRCC에 대한 항암약물로 사용될 수 있음을 나타내는 것이다. 본원에서는 SREBP 저해제 베틀린이 VHL 유전자 돌연변이와 상관없이 SREBP1 및 지방생합성을 저해함으로써 ccRCC 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다(도 5A-C). 또한, 베틀린은 RNF20의 억제 후의 세포 증식 및 지방생합성 활성 증가를 제거하였다(도 13A-D). ccRCC에서 RNF20 하향조절과 더불어 SREBP1 및 지방생합성이 과활성화되면(도 1 및 2), 자유로운 SREBP1은 지방생합성 활성화를 통해 ccRCC 종양 발달을 촉진하는 것을 나타냈다. 따라서, SREBP1 및 지방생합성 경로가 ccRCC에 대한 치료 타겟이 될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [172] 실시예 4. 신장암 세포에서 SREBP1c의 새로운 타겟 유전자로서 PTTG1 규명
- [173] 전사 활성인자로서, SREBP1c는 지방산 대사 및 세포 주기 진행을 자극한다고 보고되어 있다(Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2006, Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle* 5, 1708-1718; Jeon et al., 2013, An SREBP-responsive microRNA operon contributes to a regulatory loop for intracellular lipid homeostasis. *Cell Metab* 18, 51-61; Williams et al., 2013, An essential requirement for the SCAP/SREBP signaling axis to protect cancer cells from lipotoxicity. *Cancer Res* 73, 2850-2862). ccRCC에서 SREBP1c-유도 세포 주기 진행에 관여하는 인자를 더 확인하기 위하여, 본 발명자는 야생형 및 SREBP1c 결핍 마우스의 간 조직에서 RNA-Seq 분석을 이용하여 세포주기 조절에 관여하는 SREBP1c 타겟 유전자를 분석한 결과, SREBP1c의 새로운 타겟

유전자로서 PTTG1을 확인하였다(도 4A).

- [174] 도 12A에 나타난 바와 같이, PTTG1 발현은 야생형 마우스와 비교하여 SREBP1c 결핍 마우스의 신장, 간 및 지방조직에서 현저히 감소되어 있었다. 결과적으로, 본 발명자는 SREBP1c-과발현 ACHN 세포에서의 PTTG1 발현을 조사하였고 이소성 SREBP1c 발현이 PTTG1 mRNA 발현을 증가시키는 반면, RNF20 공동 발현이 이러한 효과를 약화시킨다는 것을 발견하였다(도 4B). 그러나, SREBP1 낙다운 조건하에서, RNF20은 PTTG1 mRNA (도 4C) 또는 단백질(도 4D) 발현을 억제하지 않았다. 따라서, SREBP1c는 ccRCC 세포에서 PTTG1 단백질 발현을 촉진시켰다(도 4E, 레인 3). 그러나, PTTG1의 siRNA 매개 억제는 SREBP1c 또는 FASN 단백질 발현에 영향을 미치지 않았다(도 4E, 레인 4). SREBP1c가 PTTG1 전사를 직접적으로 조절하는지를 입증하기 위하여, 본 발명자는 인간, 원숭이, 개, 마우스 및 랫트의 PTTG1 유전자의 프록시말 프로모터 부위에 있는 SREBP1c에 대한 결합부위인, EBOX 모티프 및 잠정적 SRE(sterol regulatory element)를 분석하였다(도 12B). 그 결과 인간 PTTG1 프로모터 존재하의 루시퍼라아제 리포터 분석에서, SREBP1c 발현에 의해 루시퍼라아제 활성 및 RNF20의 공동발현이 억제된 SREBP1c-매개 PTTG1 프로모터 활성화가 유도되었다(도 4F). ccRCC 종양에서, 동일 환자 유래의 정상 신장조직에서와 비교하여, PTTG1 mRNA 레벨이 상당히 상향조절되었다(도 4G). 또한 TCGA 분석에서 PTTG1 mRNA 레벨이 ccRCC 종양조직에서 상당히 증가하였고(도 4H), PTTG1 mRNA 발현은 종양단계 진행과 양적으로 연관되어 있었다(도 4I). 또한, PTTG1 발현은 ccRCC 종양 조직에서의 RNF20 발현과 역의 상관관계에 있었다(도 4J). 더욱이, PTTG1이 과발현되는 것이 ccRCC 환자의 생존율이 낮은 것과 관련이 있었다(도 4K).
- [175] 종합하면, 상기 결과는 ccRCC에서 RNF20의 발현이 감소하고, 이는 활성화된 SREBP1c에 의해 새로운 타겟 유전자인 PTTG1의 과발현이 유도된다는 것을 나타낸다.
- [176] 상기에서 PTTG1이 또한 ccRCC에서 세포주기 진행 및 종양생성에 관여되어 있어 SREBP1c의 신규 타겟 유전자로 작용한다는 것을 보여주었다. 또한 PTTG1의 과 발현이 ccRCC 환자에서 진행성 종양 단계 및 낮은 생존율과 밀접하게 연관되어 있다는 것을 밝혔다(도 4I 및 K). 또한, SREBP1은 PTTG1의 mRNA 및 단백질 발현, 및 몇몇 세포-주기 조절자를 강력하게 자극시켜, ccRCC에서 암세포 증식이 일어났다(도 3 및 4). 이와 반대로 RNF20 과발현은 ccRCC 세포 및 이종이식 종양 둘다에서 PTTG1을 억제하며(도 4B; 도 7D 및 E), RNF20 억제에 의해 PTTG1의 mRNA 및 단백질 레벨이 증가하였다(도 4C 및 D).
- [177] 실시예 5. SREBP 저해제인 베툴린에 의한 신장암 세포 증식 저해 확인
- [178] 베툴린은 SREBP 단백질의 단백질분해 과정을 저해하여 지질-저하 효과를 나타내는 약물학적 저해제이다(Soyal et al., 2015, Targeting SREBPs for treatment of the metabolic syndrome. Trends Pharmacol Sci 36, 406-416; Tang et al., 2011,

Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab* 13, 44-56). 또한, 베틀린은 세포-주기 조절자를 포함한 다양한 종양 인자를 저해함으로써 다양한 암의 성장을 약화시킨다(Chintharlapalli et al., 2007, Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* 67, 2816-2823; Li et al., 2014, Betulin inhibits lung carcinoma proliferation through activation of AMPK signaling. *Tumour Biol* 35, 11153-11158). 이에 본 발명자는 SREBP 저해에 대한 베틀린의 효과를 조사하여 ccRCC 세포에서의 항-종양효과를 측정하였다. VHL 야생형 ACHN 및 VHL-고갈 A498 ccRCC 세포에 베틀린을 처리한 결과, 핵 SREBP1 단백질이 용량-의존적 방식으로 감소한 반면, SREBP1의 전구체 형태는 영향을 받지 않았는데(도 5A), 이는 베틀린이 SREBP1 단백질의 프로세싱을 억제한다는 것을 의미한다. 이와 유사하게, 베틀린-처리 ccRCC 세포에서 PTTG1과 싸이클린 B1 및 E를 포함한 세포주기 조절자의 단백질 레벨이 감소하였다(도 5A).

- [179] 또한, 베틀린을 처리하면 지방생합성 효소인 FASN 및 SCD1의 단백질 발현이 감소되었다(도 5A). 베틀린이 ccRCC 세포 성장을 억제하는지 조사하기 위하여, 본 발명자는 ACHN 및 A498 세포에서의 세포 증식에 대한 베틀린의 효과를 측정하여(도 5B 및 5C), 용량 의존적 항-증식 효과를 보여주었다. 이어, RNF20 억제 후 ccRCC 세포 증식 증가가 SREBP 활성화에 필요한지를 알아보기 위하여, ccRCC 세포에 베틀린 및 RNF20 siRNA를 처리하였다. 상기 결과와 일치하게(도 1K), RNF20 siRNA 존재시에 ccRCC 세포 증식이 증가하였으며(도 13C 및 D), 이와 같은 조건에서 베틀린은 세포성장을 약화시켰다(도 13C 및 D).
- [180] 또한, ccRCC 세포에서 RNF20을 억제하면 지방생합성 및 세포주기 조절에 관여하는 여러 베틀린-민감성 유전자의 발현을 증강시켰다(도 13A 및 B).
- [181] 이러한 데이터는 RNF20가 SREBP1c 제어를 매개함으로써 지방생합성 및 세포주기 조절 유전자 발현 조절을 통해 ccRCC 세포의 성장을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.
- [182] 이러한 유전자 발현 변화는 또한 베틀린이 처리된 ccRCC 세포에서 세포내 지질 축적이 감소하는 것과 일치한다(도 5D). PTTG1 및 특정 싸이클린을 포함한, 세포-주기 조절 유전자의 발현이 감소되는 것과 일치하게(도 5A), 베틀린은 약간 그러나 실질적으로 G1기에서 ccRCC 세포 수를 증가시킨다(도 5E). 이러한 데이터는 베틀린이 SREBP1-의존적 지방생합성 및 세포 주기 진행을 조절함으로써 ccRCC 세포 증식을 억제한다는 것을 의미한다.
- [183] 실시예 6. SREBP1c의 세포 주기 및 지방생합성에 영향을 미치는 이중 모드 작용을 통한 신장암 세포 성장 조절 규명
- [184] 상기 실시예의 결과는 SREBP1c-의존적 ccRCC 세포 증식동안의 PTTG1 및 지방생합성사이의 상관관계를 나타내었다. 따라서, 본 발명자는

SREBP1c-과발현 ccRCC 세포에서 지방생합성 및/또는 세포 증식에 대한 PTTG1의 효과를 조사하였다(도 6A).

- [185] PTTG1 억제제는 SREBP1c 또는 FASN의 mRNA 발현을 변경시키지 않았지만(도 6B), 반면 이소성(ectopic) SREBP1c 발현은 ccRCC 세포에서 PCNA, cyclin A, D1, 및 E를 포함하는 세포-주기 조절자 및 PTTG1의 mRNA 발현을 촉진시켰다(도 6B 및 C). 반대로, ccRCC 세포에서 PTTG1 발현을 억제하면 이들 세포-주기단백질을 하향조절시켰다(도 6C). 또한, PTTG1을 억제하면 대조군 및 SREBP1c-과발현 ACHN 세포 둘다에서 세포 증식을 저해하였다(도 6D).
- [186] 다음으로, 본 발명자는 ACC 저해제 TOFA 또는 FASN 저해제 C75 존재 또는 부존재시에 PTTG1 발현 및 세포 증식을 측정하였다(도 6A). 도 6E에 나타난 바와 같이 TOFA 및 C75를 처리하면 ACHN 세포에서 세포내 트리글리세라이드 축적이 감소되었다. 그러나 TOFA 또는 C75에 의한 지방생합성 활성의 감소는 PTTG1 또는 세포-주기 조절자 PCNA, 싸이클린 A, D1 및 E의 mRNA 발현에 상당한 영향을 미치지 않는 않았다(도 6F; 도 14A 및 B). 이와 유사하게, FASN의 siRNA-매개 억제가 PTTG1 및 세포-주기 조절 유전자의 mRNA 레벨을 크게 변경시키지는 않았다(도 14D 및 E). 그러나, FASN이 C75-매개 약물학적 저해되거나 siRNA-유도 FASN 낙다운된 경우 모두에서 ccRCC 세포 증식이 상당히 감소되었다(도 14C 및 F). 나아가, FASN의 약물학적 유전적 저해에 의해 ACHN 세포에서 세포 성장에 대한 SREBP1c 과발현의 효과를 감소시켰는데, 이는 지방생합성 저해가 SREBP1c-의존적 경로를 통해 ccRCC 세포 증식을 약화시킬 수 있다는 것을 의미한다(도 6G 및 F).
- [187] 종합하면 상기 결과는 SREBP1c-지방생합성 조절 기전과 더불어 새로이 규명한 SREBP1c-PTTG1 경로를 통해 세포주기를 조절함으로써 ccRCC 세포의 증식을 조절할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [188] 상기 실시예 4에서 본 바와 같이, PTTG1 발현은 RNF20 발현과 역의 상관관계에 있어, ccRCC 종양 조직에서 SREBP1c의 조절을 반영하고(도 4J 및 8) RNF20 하향조절이, 일부분으로는, PTTG1을 상향조절시킴으로써 ccRCC 발달 및 진행을 촉진한다. 이와 일치하게도, PTTG1의 siRNA 낙다운은 지방생합성 활성을 변경시키지 않으면서 세포주기 조절 유전자의 mRNA 발현을 감소시키게 하였다(도 6C 및 E). 나아가, PTTG1 억제제는 ccRCC 세포 증식에 대한 활성화된 SREBP1c의 효과를 약하게 하였다(도 6D). 따라서, 이러한 결과는 RNF20-SREBP1c-PTTG1 축이 ccRCC 세포 증식 및 종양생성의 중심이 됨을 나타낸다.
- [189] SREBP1이, 현저하게 신규 지방생합성을 증가시킴으로써 지방생합성을 조절한다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 본 발명자는 신규 지방생합성의 유전적 약물학적 저해제 존재시에 지방생합성이 PTTG1 발현과 연관되어 있는지를 시험하는데, ACHN ccRCC 세포에서 PTTG1의 mRNA 발현이 TOFA 또는 C75를 사용한 지방생합성의 약물학적 저해(도 6F) 또는 FASN의 siRNA 매개 낙다운(도

14D)에 의해 영향을 받지 않았다. 이는 SREBP1c에 의한 지방생합성 활성화 기전과 독립적으로 PTTG1이 유도된다는 것을 의미한다. 따라서, SREBP1c는 서로 다른 표적 유전자 군을 조절함으로써 지방생합성과 세포주기 진행에 영향을 미쳐, 궁극적으로 ccRCC에서 종양 발달을 촉진시킬 수 있다.

[190] 실시예 7. RNF20 과발현에 의한 신장암 세포 이종이식에서 종양 성장 억제 효과 확인

[191] 인비보 ccRCC 종양 성장에 미치는 RNF20의 기능을 평가하기 위하여, 누드 마우스에서 암세포를 이식하여 이에 미치는 효과를 분석하였다. 그 결과 ACHN 이종이식 종양에서, 이소성 RNF20 발현에 의해 종양 성장 비율이 상당히 감소되었고(도 7A 및 B) 종양 질량 감소가 유도되었는데(도 7C), 이는 RNF20이 ccRCC 종양 성장을 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 웨스턴 블랏 분석에서 RNF20의 이소성 발현이 이종이식 종양에서 SREBP1, PTTG1 및 FASN의 단백질 발현을 저해하였다(도 7D). 또한, RNF20은 이종이식 종양에서 SREBP1c, 세포-주기 조절자, 및 지방생합성 유전자의 mRNA 발현을 약화시켰다(도 7E). H&E 염색실험에서, RNF20 발현이 높은 ACHN 종양은 투명한(clear) 세포 형태를 지닌 세포의 수가 감소된 것으로 나타났다(도 7F). 이와 일치하게도, 오일 레드 O 염색에서, 이소성 RNF20 발현에 의해 지질 축적이 감소되었다(도 7F). 또한 Ki67 염색 분석에서 외인성 RNF20 발현에 의해 이종이식 종양에서 세포 증식이 감소되었다(도 7F).

[192] 또한, TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 분석에서 RNF20 과발현에 의해 이종이식 종양에서 세포사멸이 유도되었다(도 7F). 또한 이소성 RNF20 발현 후에 Bax, Bid, 및 카스파제-3를 포함하는 항(pro)-세포사멸 유전자의 mRNA 발현이 증가되며, 반면 항-세포사멸 유전자 Bcl-2, cIAP-2, 및 XIAP의 항-세포사멸 유전자의 mRNA 발현은 감소한 것을 관찰하였다(도 15). 이러한 인비보 결과는, RNF20이 ccRCC에서 SREBP1c를 매개로 지방생합성 및 세포 주기 조절을 저해함으로써 종양억제자로 작용한다는 것을 의미한다.

[193] 종합하면 상기 결과는 RNF20의 과발현으로, SREBP1c 발현 및 지방생합성을 억제하여 암의 성장을 억제할 수 있음을 나타내는 것이다(도 7). 또한 상기 결과는 ccRCC에서 RNF20의 하향 조절은 SREBP1c의 발현이 증가로 이어지고 이는 ccRCC에서 PTTG1 및 지방생합성 유전자의 발현이 증가로 이어져(도 8) 종양 성장 및 진행(progression)을 유발된다는 것을 의미한다.

[194] 또한 본원에서는 RNF20이 SREBP1c-매개 지방생합성 및 세포주기 조절을 저해함으로써 종양 억제자로 작용하는 모델을 제시하였다(도 8). 역으로, 상기 데이터는 RNF20 하향조절은 ccRCC 종양에서 SREBP1c를 활성화시킴으로써 종양생성을 촉진한다는 것을 의미하며, RNF20의 하향 발현은 암의 마커로 작용할 수 있다는 것이다. 또한 본 발명에서 SREBP1c가 ccRCC에서 PTTG1을 유도함으로써 세포주기 진행을 자극하는 새로운 메커니즘을 확인하였고,

RNF20이 SREBP1c-지방생합성 축 및 SREBP1c-PTTG1 축을 조절할 수 있음을 밝혔다.

- [195] 이를 종합하여 보면, 본 발명에 의해 RNF20이 ccRCC에서 신규 종양 억제자이며 암에서 RNF20-SREBP1c-지방생합성 축 및 RNF20-SREBP1c-PTTG1 축 경로의 요소를 표적으로 하는 새로운 치료접근법이 임상적으로 효과가 있음을 나타내는 것이다.
- [196] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.
- [197] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

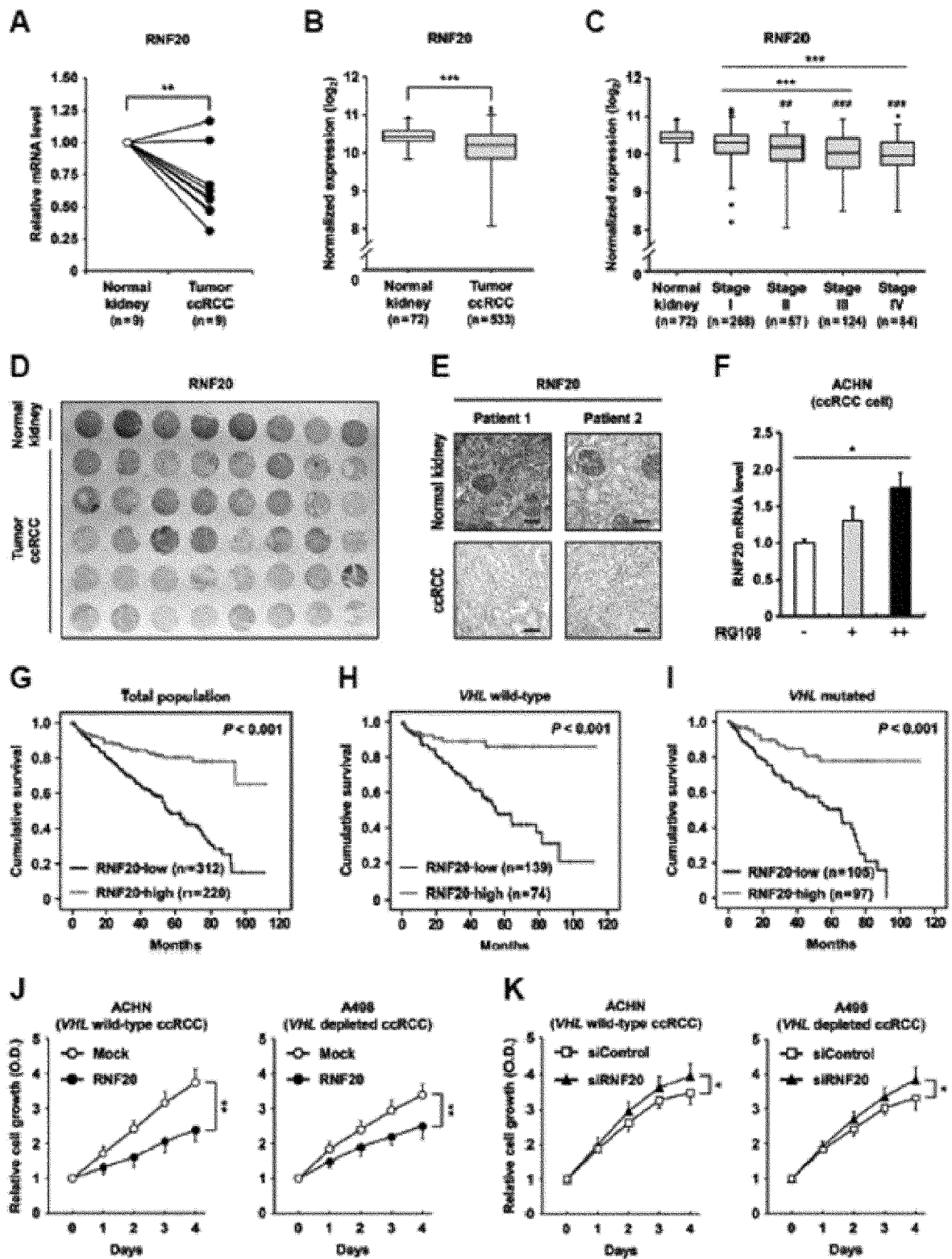
- [청구항 1] RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 RNF20 유전자의 메틸화억제제를 포함하는, 신장암 또는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에서, 상기 신장암은 VHL (von Hippel-Lindau) 유전자 변이에 의한 것이 아닌, 신장암 또는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] RNF20(Ring finger protein 20) 검출용 물질을 포함하는, 신장암 또는 간암진단 또는 예후 측정용 조성물.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 검출용 물질은 상기 마커를 단백질 또는 핵산 수준에서 검출할 수 있는 시약으로,
상기 단백질 수준 검출 시약은 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석, 또는 단백질 마이크로어레이용 시약인,
상기 핵산 수준 검출 시약은 중합효소연쇄반응, 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이 또는 노던블랏에 사용되는 시약인, 신장암 또는 간암 진단 또는 예후 측정용 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 단백질 수준의 검출 시약은 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체단편, 앵타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)를 포함하고,
상기 핵산 수준의 검출 시약은 상기 마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 프라미어 쌍, 또는 프로브, 또는 프라이머쌍 및 프로브인, 신장암 또는 간암 진단 또는 예후 측정용 조성물.
- [청구항 6] RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로를 표적으로 하는 RNF20의 발현 이상과 관련된 암의 치료제 스크리닝 방법으로, 상기 방법은
RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포를 제공하는 제 1 단계;
상기 세포를 RNF20의 발현을 증가시킬 것으로 기대되는 시험물질로 처리하는 제 2 단계;
상기 시험물질로 처리된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1 중 하나 이상의 발현을 측정하는 제 3 단계; 및
상기 시험물질과 접촉된 세포와 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1 발현을 비교하여, 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 SREBP1c 또는 PTTG1의 발현이 상기 대조군의 SREBP1c 또는 PTTG1 발현과 비교하여 감소한 경우, 이를 RNF20의 발현

이상과 관련된 암의 치료제 후보물질로 선별하는 제 4 단계를 포함하는, RNF20의 발현 이상과 관련된 암의 치료제 스크리닝 방법.

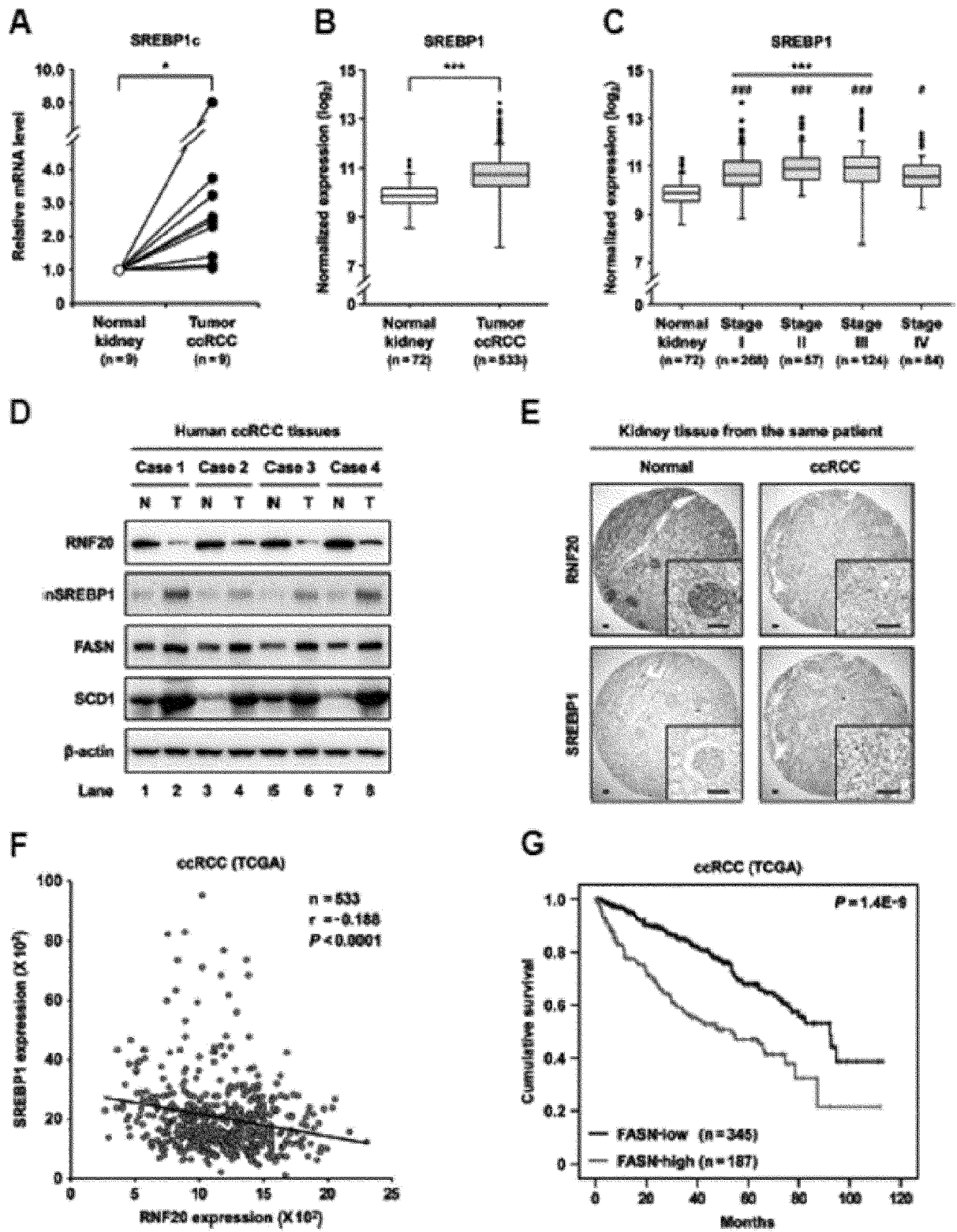
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 제 3 단계에서, 상기 SREBP1c의 발현을 측정하는 대신에, 또는 이에 부가하여, 상기 SREBP1c에 의해 발현이 촉진되는 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 그 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하며, 이 경우 상기 제 4 단계에서 상기 후보물질은 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 시험물질과 접촉되지 않은 대조군 세포와 비교하여 상기 지질생합성에 관여하는 유전자 또는 단백질 발현이 감소한 것인, 방법.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 지질생합성에 관여하는 단백질은 FASN, ACC1, SCD1, 또는 ELOVL6 중 하나 이상인, 방법.
- [청구항 9] 제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,
상기 RNF20의 발현이 감소 또는 결여된 세포는 신장암 또는 간암 세포주인, 방법.
- [청구항 10] 제 6 항 또는 제 7 항에 있어서,
상기 RNF20의 발현 이상과 관련된 암은 신장암 또는 간암인, 방법.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 신장암은 VHL (von Hippel-Lindau) 유전자 변이에 의한 것이 아닌, 방법.
- [청구항 12] 신장암 또는 간암의 진단 또는 예후 판단을 위하여,
검사 대상체 유래의 생물학적 시료로부터 RNF20을 핵산 및/또는 단백질의 수준을 검출하는 단계;
상기 핵산 및/또는 단백질 수준 검출결과를 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및
상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 유래 시료의 핵산 또는 단백질 수준에 변화가 있는 경우, 상기 대상체를 신장암 또는 간암의 진단 또는 생존 예후와 연관시키는 단계를 포함하는, RNF20 바이오마커를 검출하는 방법.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 연관시키는 단계에서, 상기 대조군은 정상 대조군이며, 상기 대상체에서 결정된 RNF20의 수준이 상기 대조군과 비교하여 감소한 경우, 상기 대상체를 신장암 또는 생존 예후에서 5년 생존율이 낮은 것으로 판단하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 14] RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 인비트로 또는 인간을 제외한 동물에서 세포의 RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로 조절용 키트.

- [청구항 15] RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 인비트로 또는 인간을 제외한 동물세포의 RNF20-SREBP1c-지질생합성 경로 조절용 키트.
- [청구항 16] RNF20(Ring finger protein 20) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 신장암 또는 간암 진단용 용도.
- [청구항 17] RNF20(Ring finger protein 20) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 인비트로 또는 인간을 제외한 동물세포의 RNF20-SREBP1c-지질생합성 경로 조절 용도.
- [청구항 18] RNF20(Ring finger protein 20) 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질, 또는 상기 유전자의 발현을 증가시키는 물질을 포함하는 인비트로 또는 인간을 제외한 동물에서 세포의 RNF20-SREBP1c-PTTG1 신호전달 경로 조절 용도.

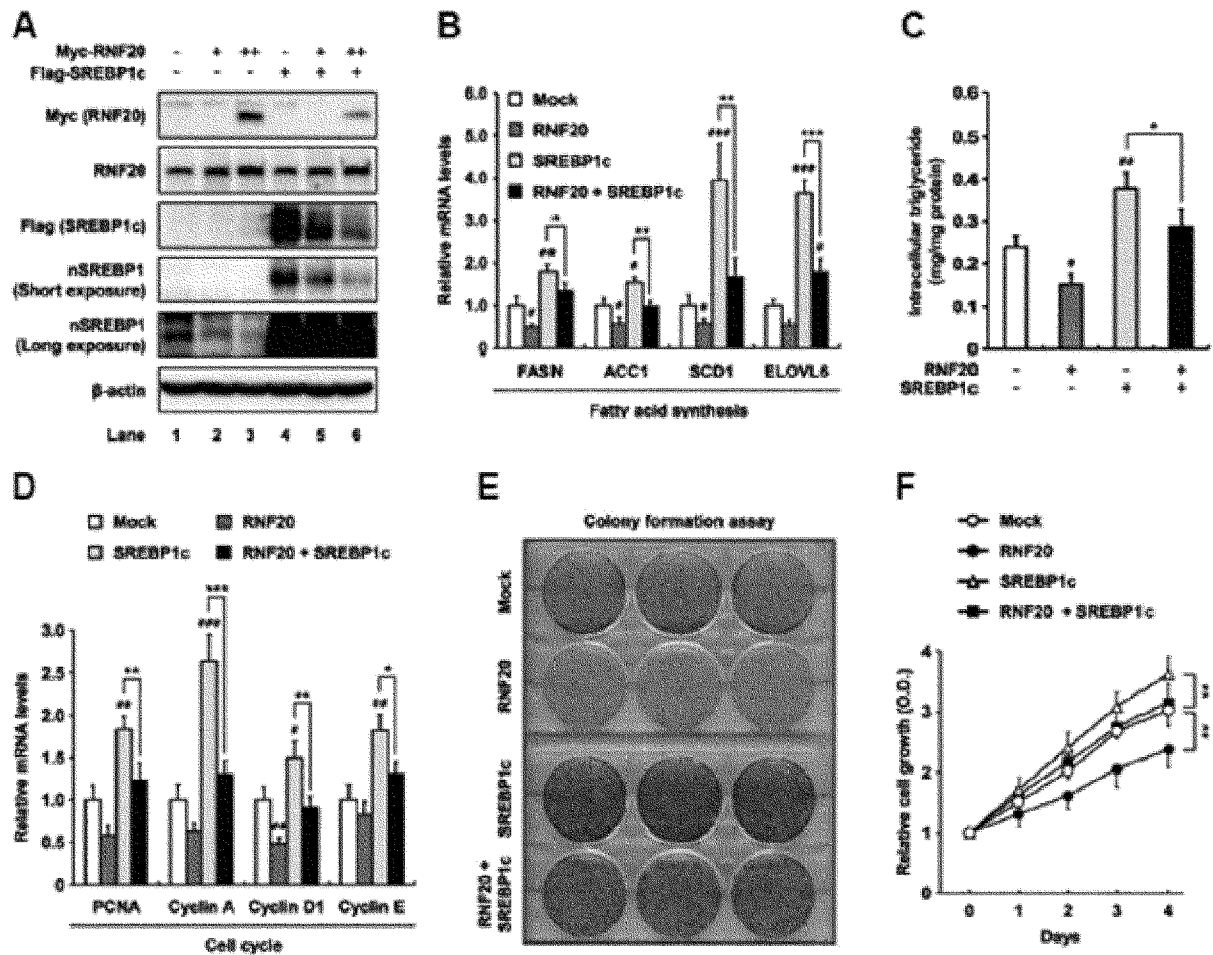
[도1]



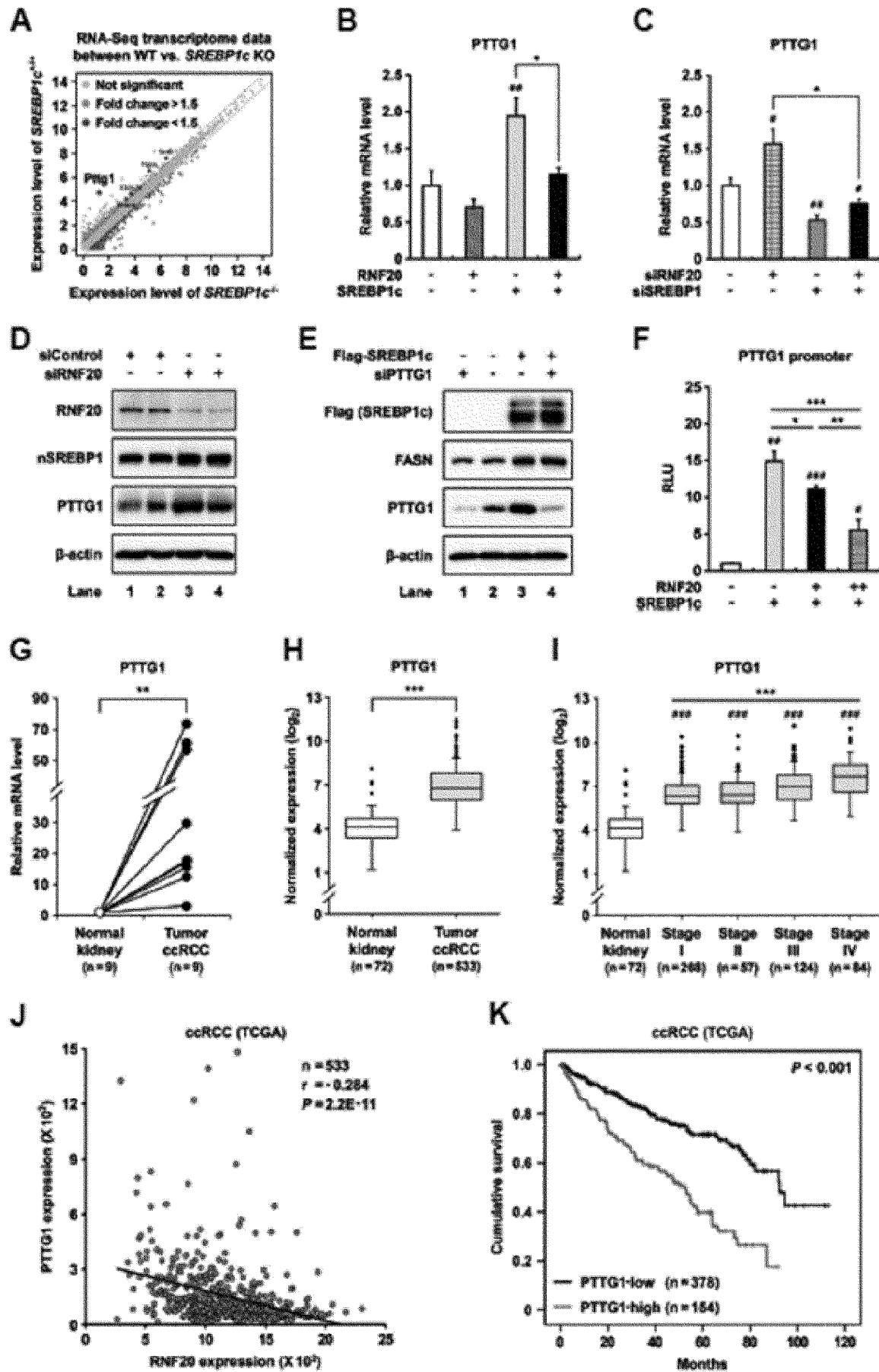
[도2]



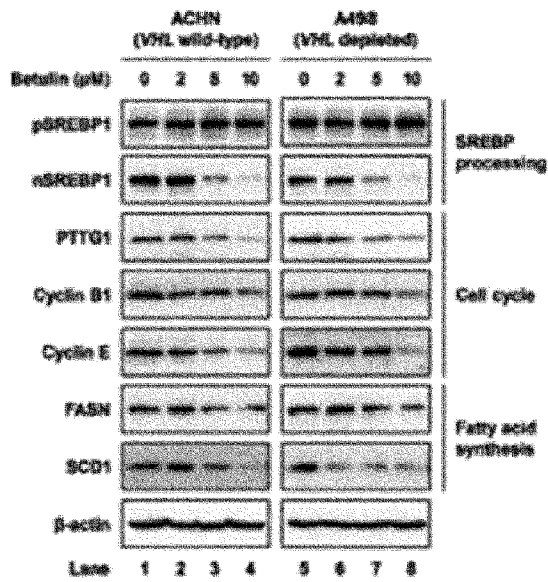
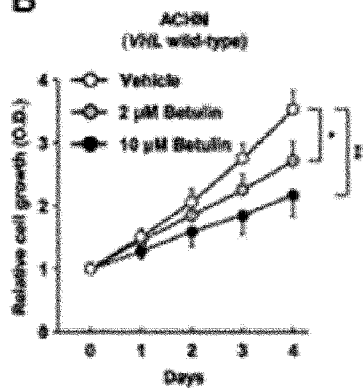
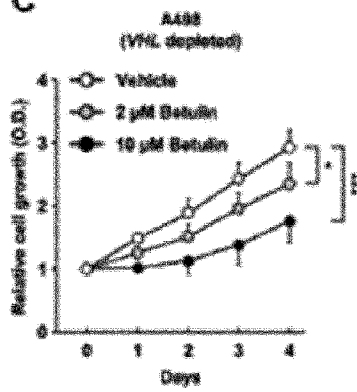
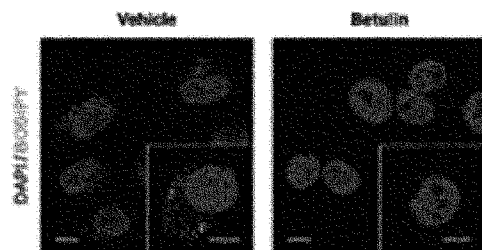
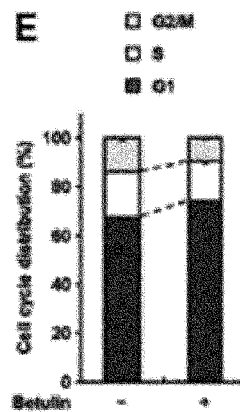
[도3]



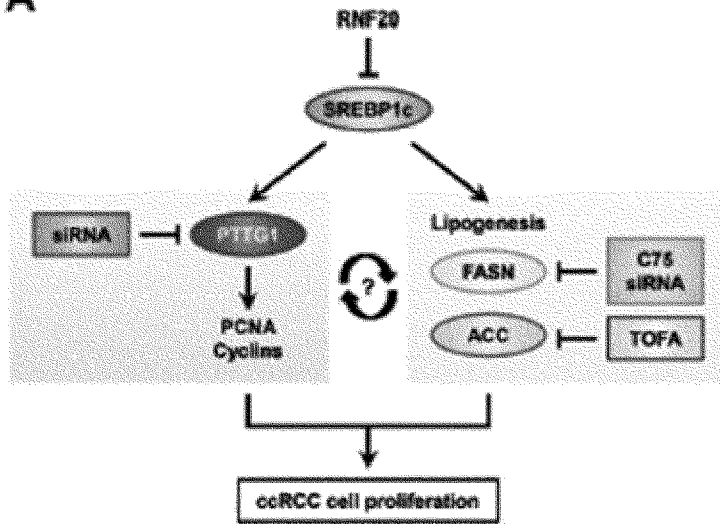
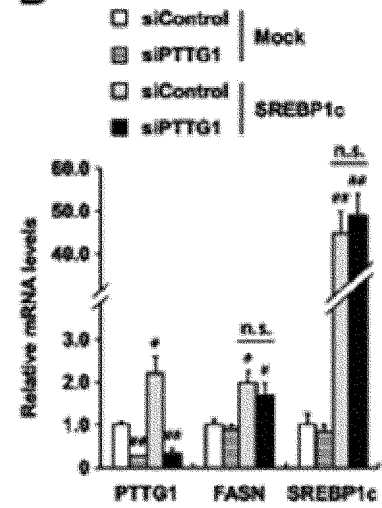
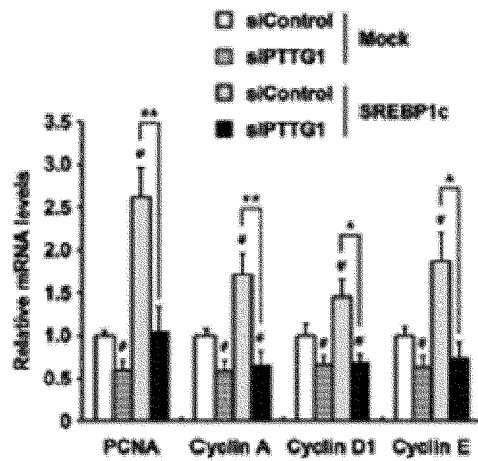
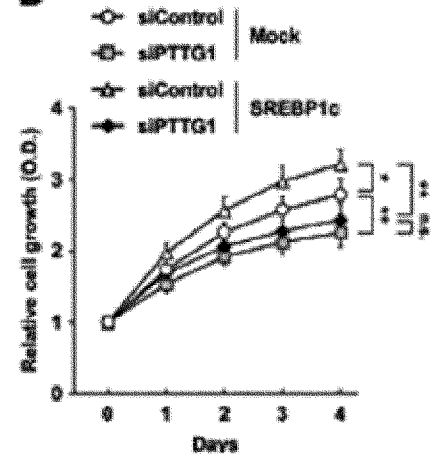
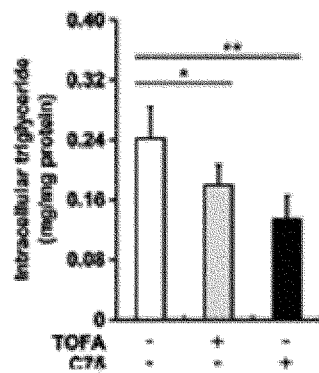
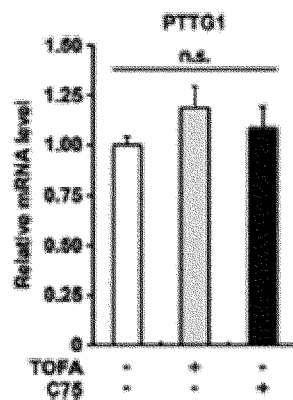
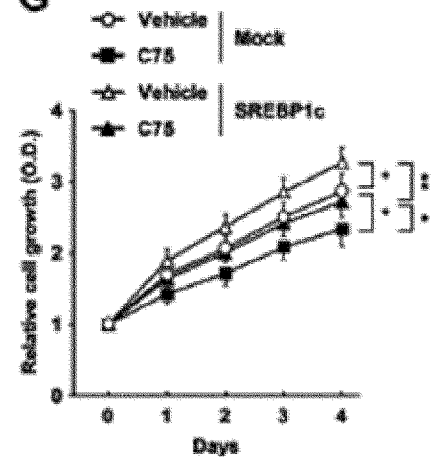
[도4]



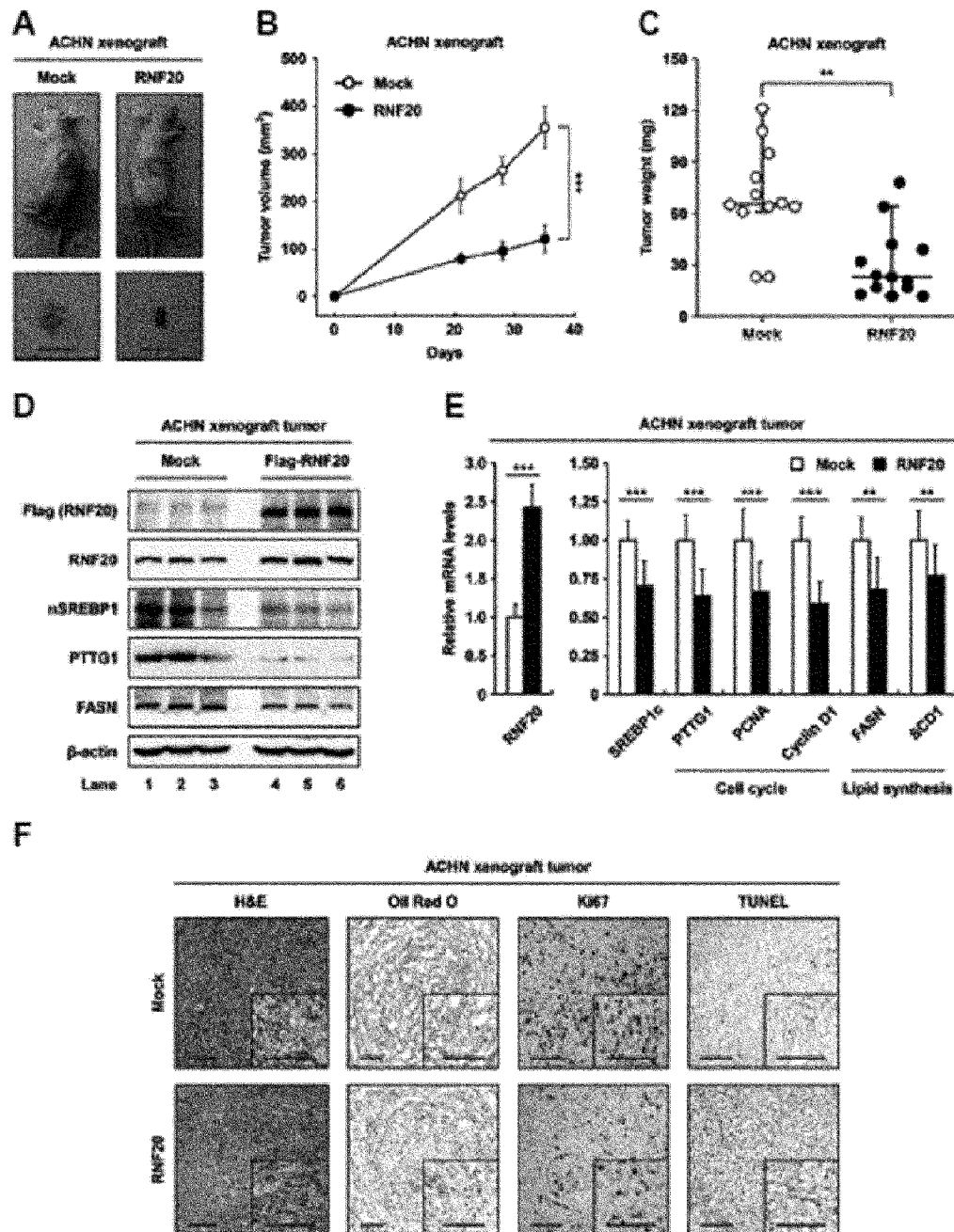
[도5]

A**B****C****D****E**

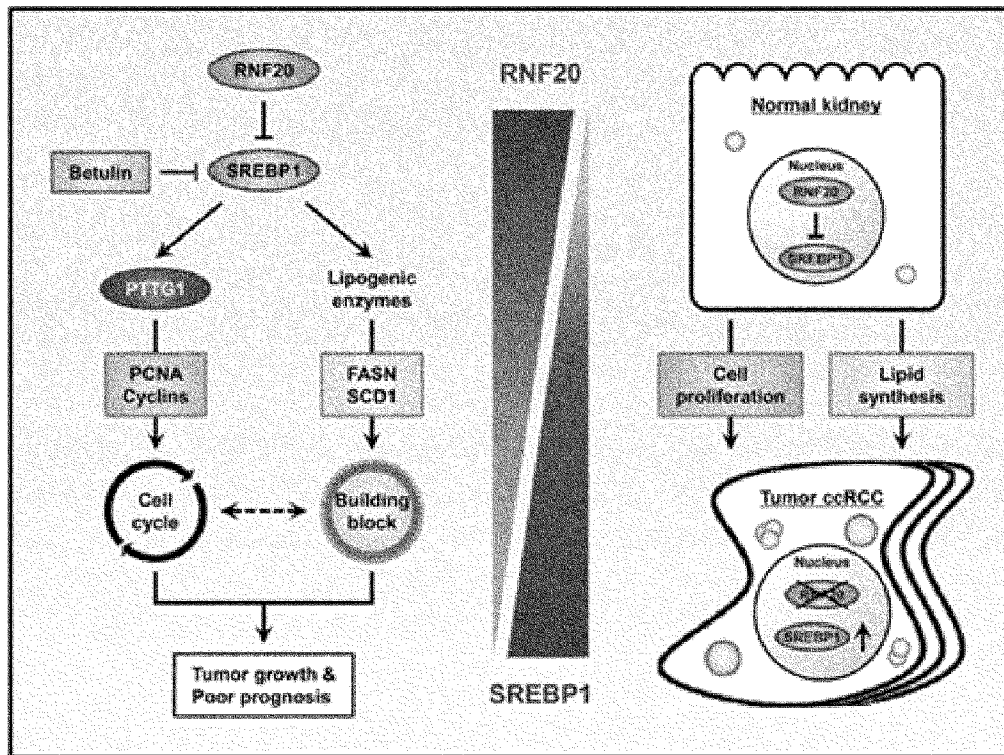
[도6]

A**B****C****D****E****F****G**

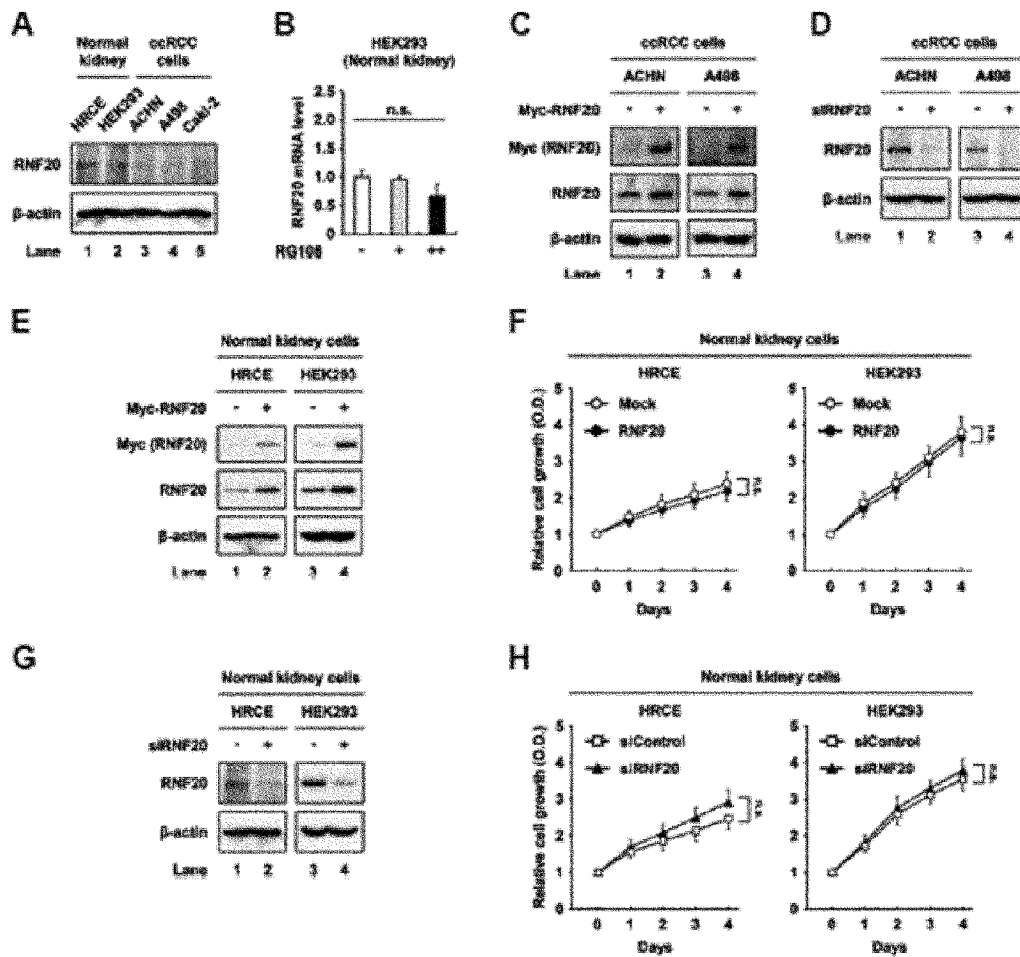
[도7]



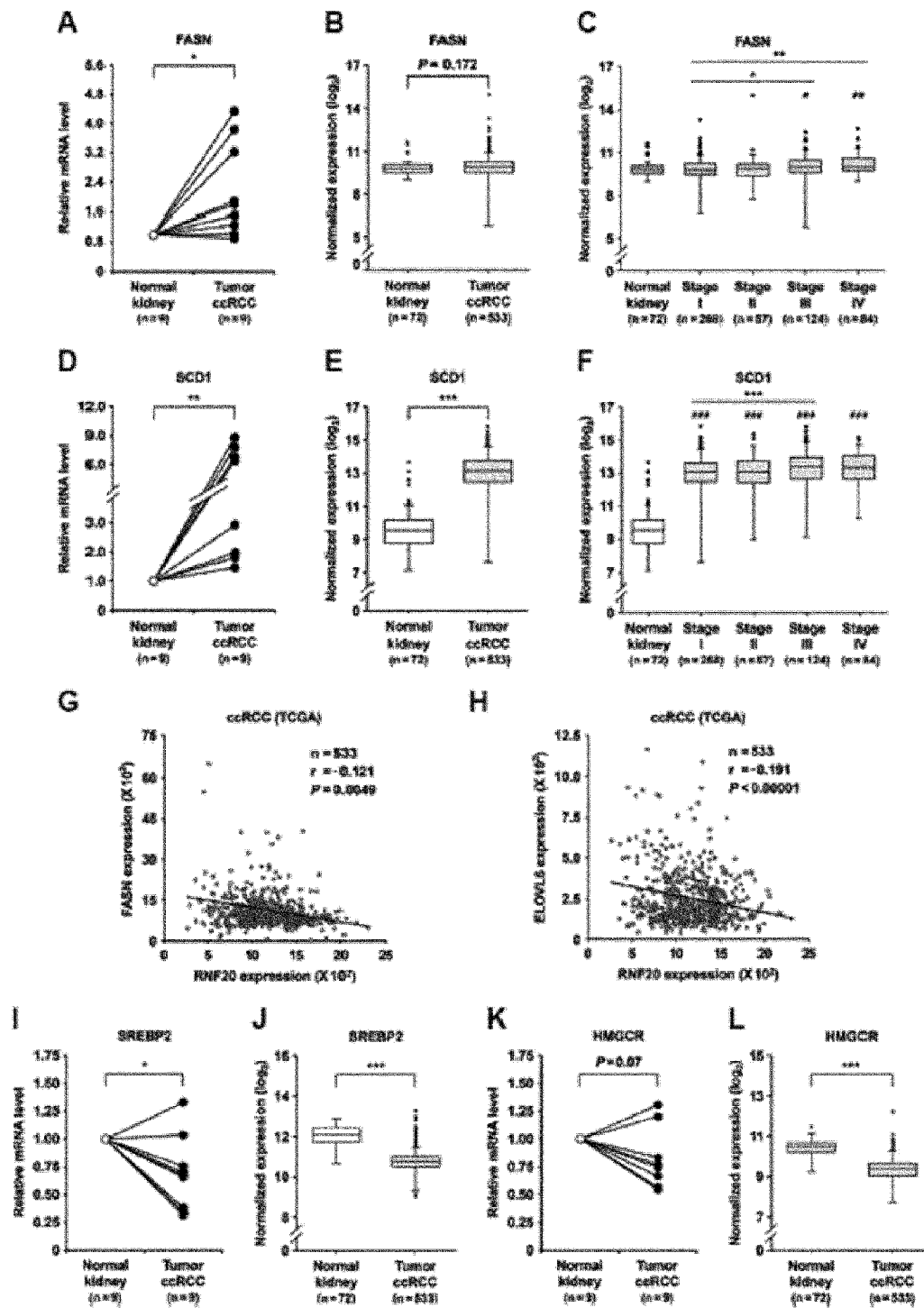
[도8]



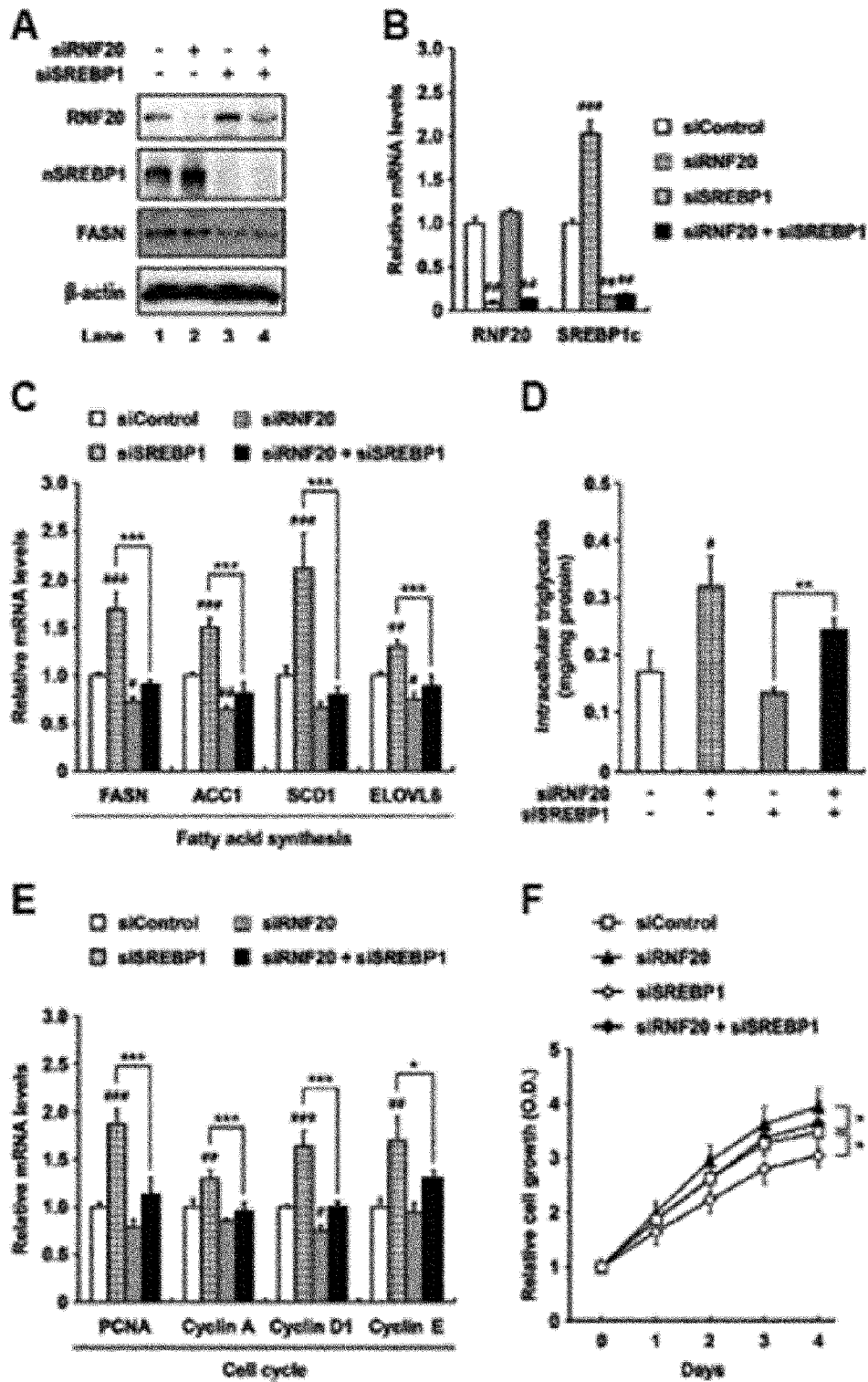
[도9]



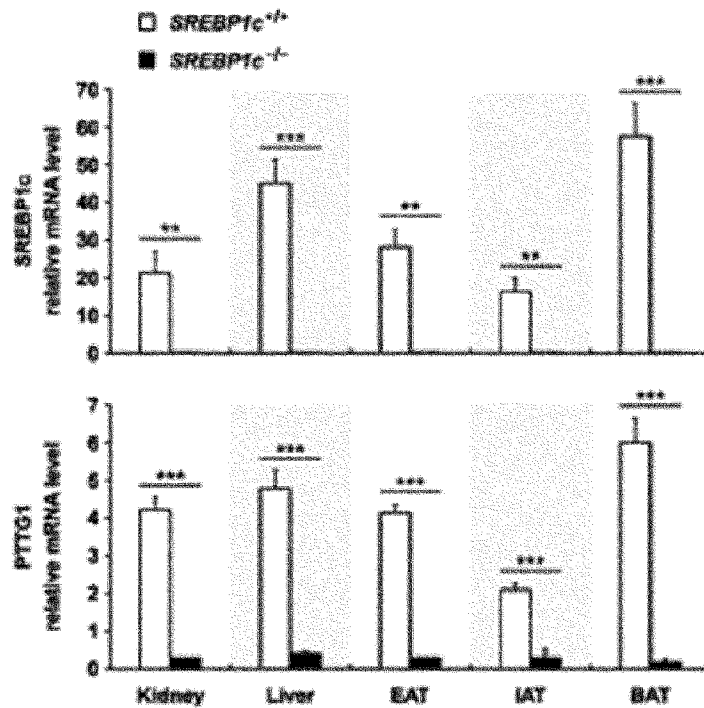
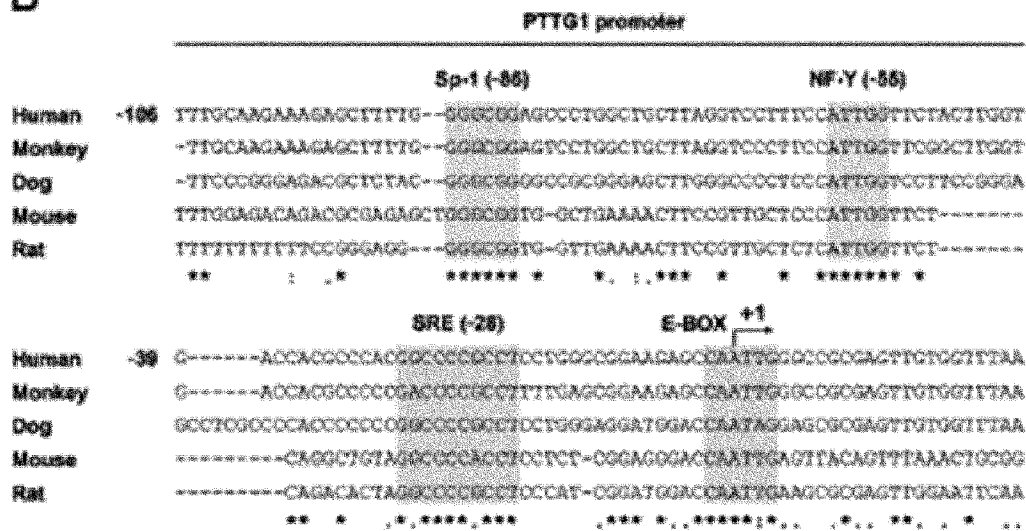
[도10]



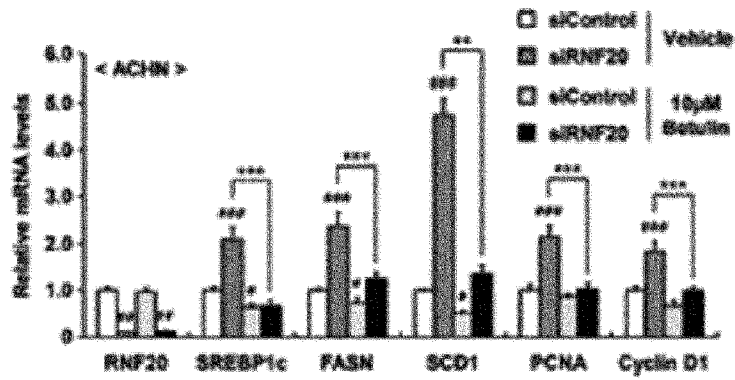
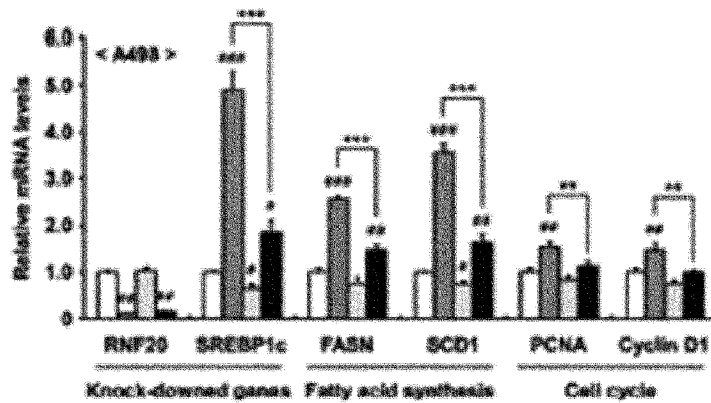
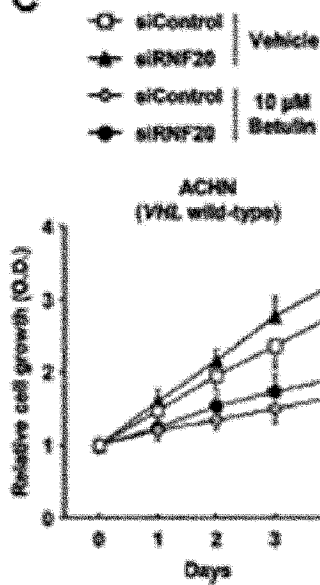
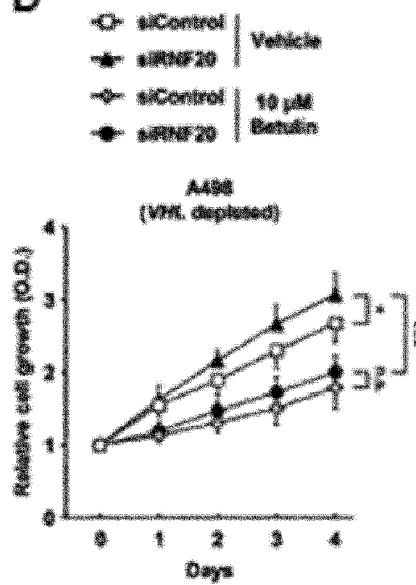
[도11]



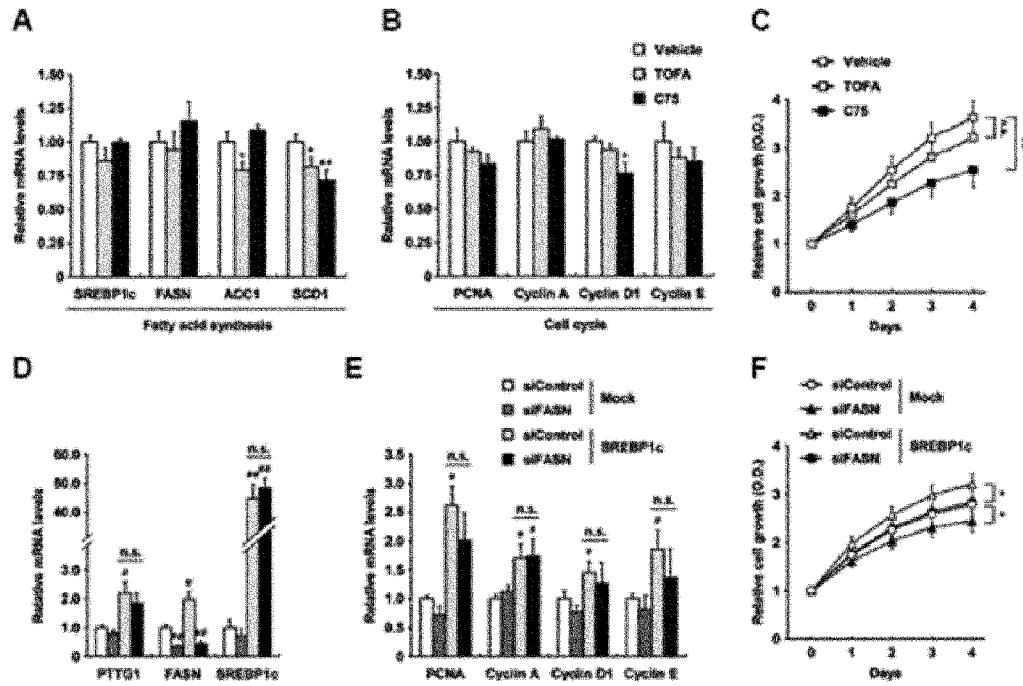
[도12]

A**B**

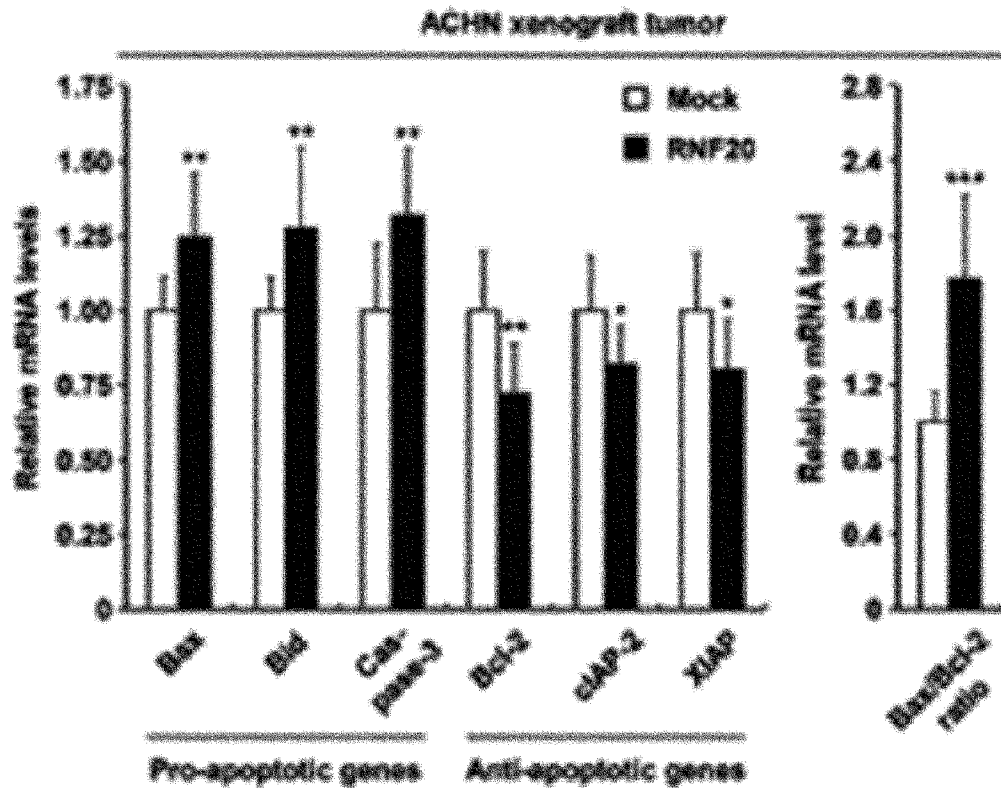
[도13]

A**B****C****D**

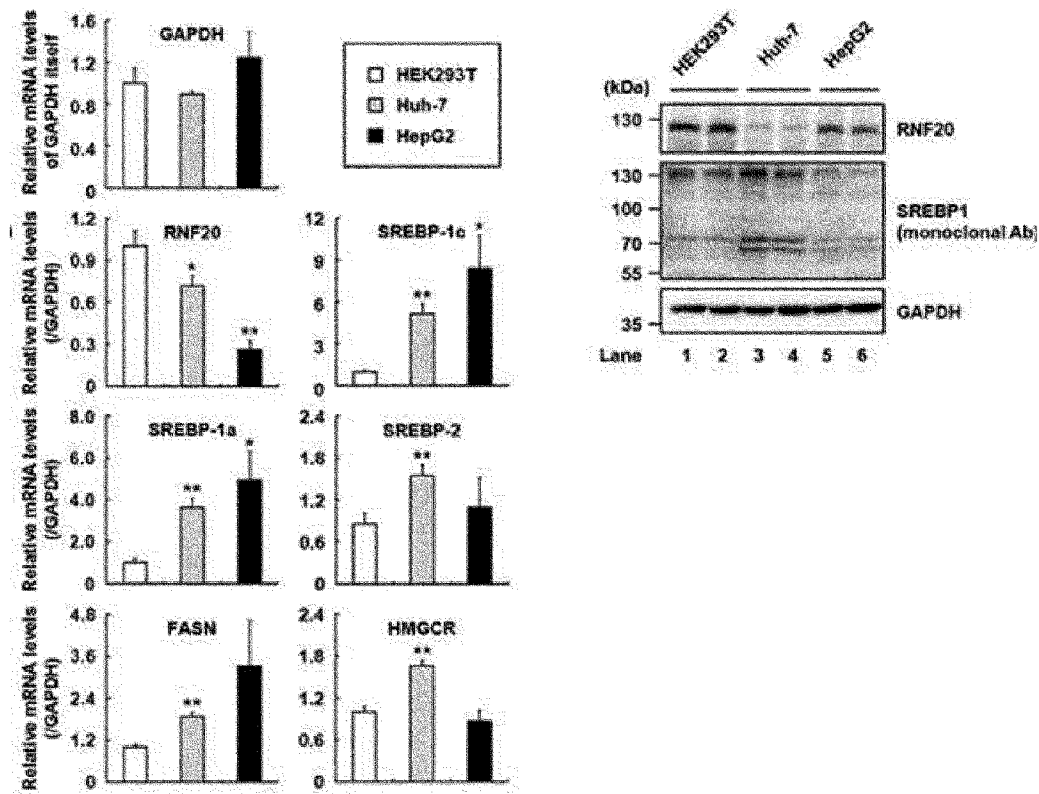
[도14]



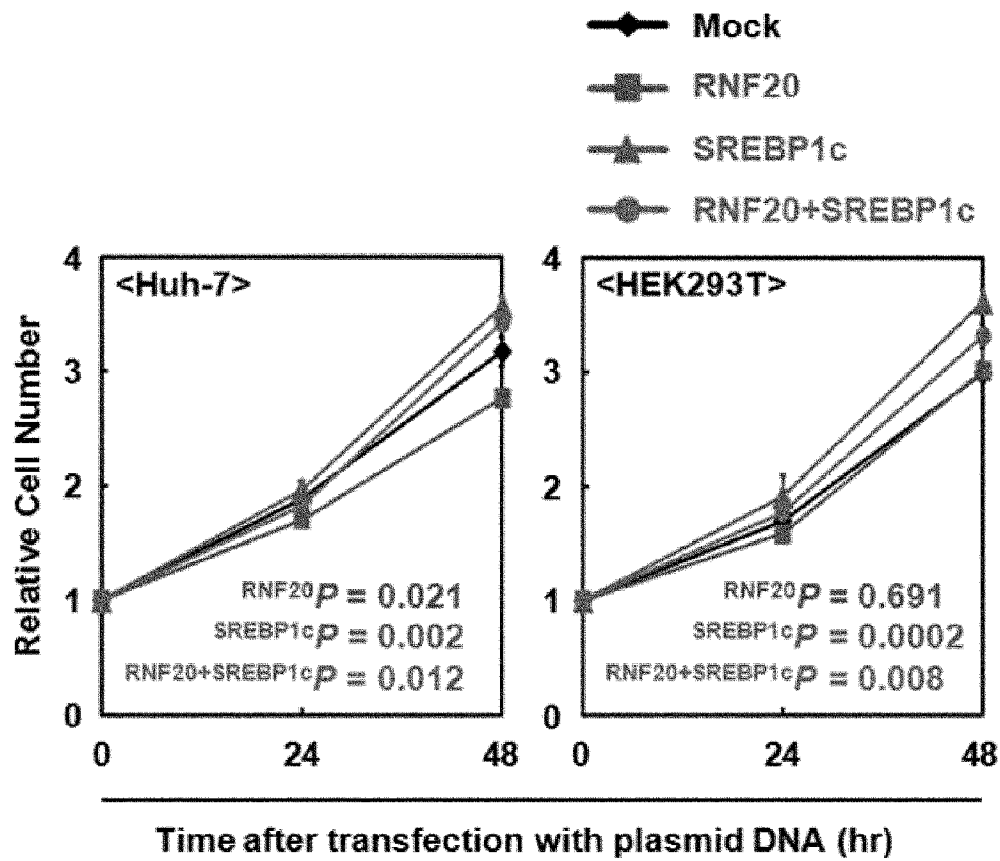
[도15]



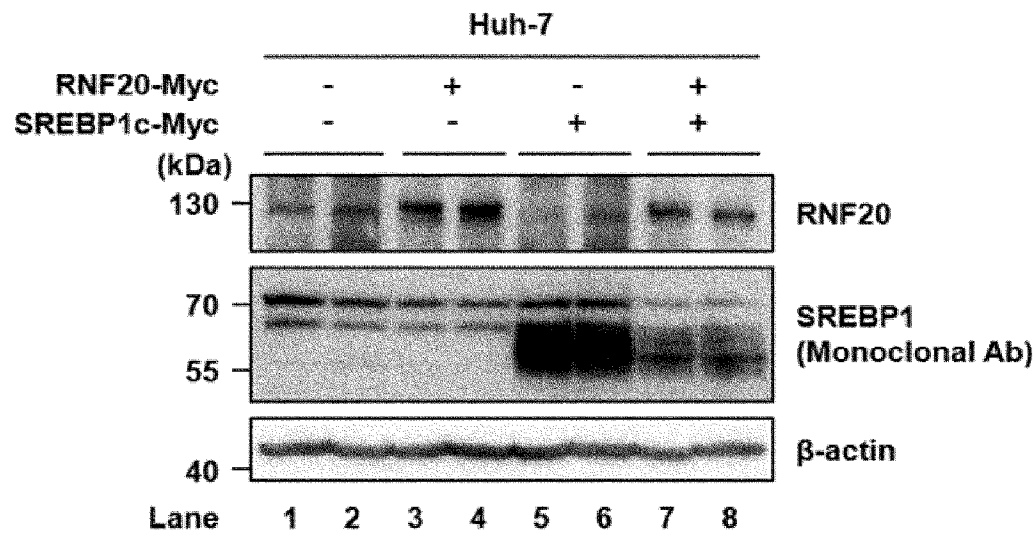
[도16]



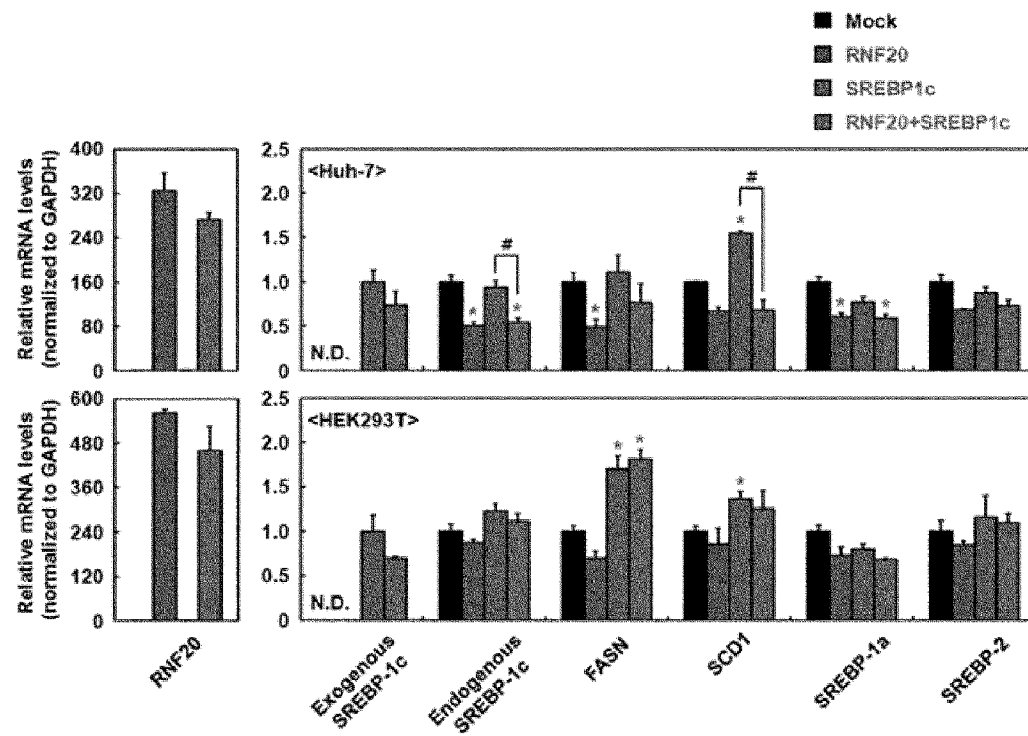
[도17]



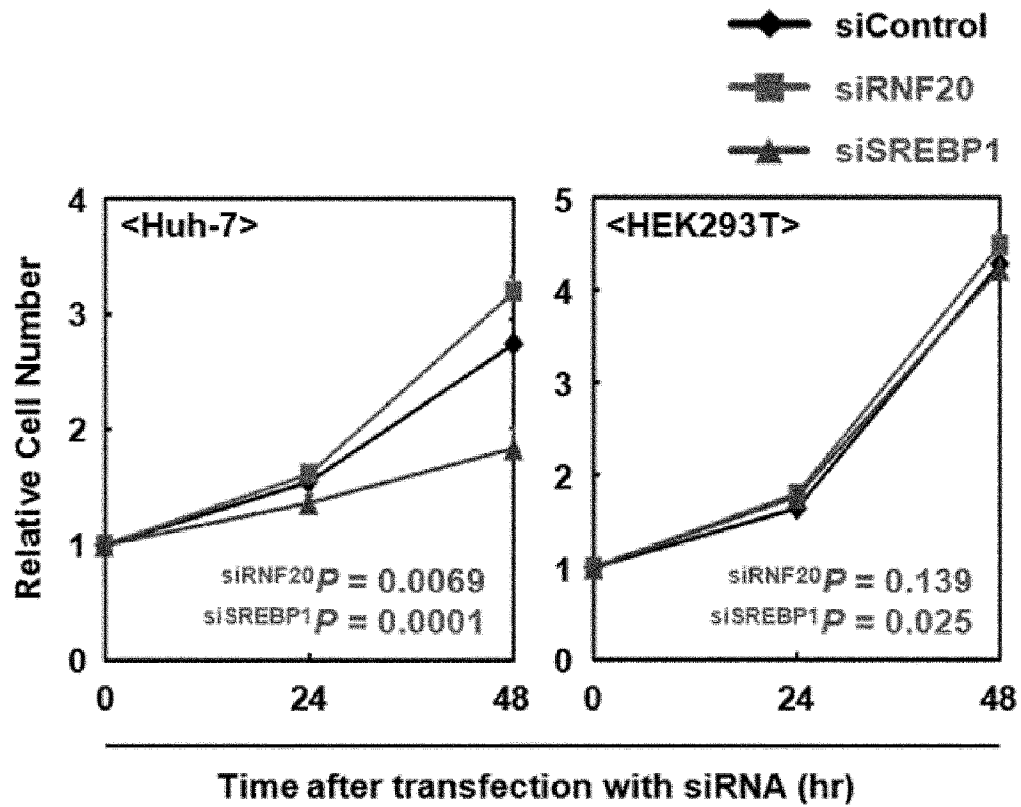
[도18]



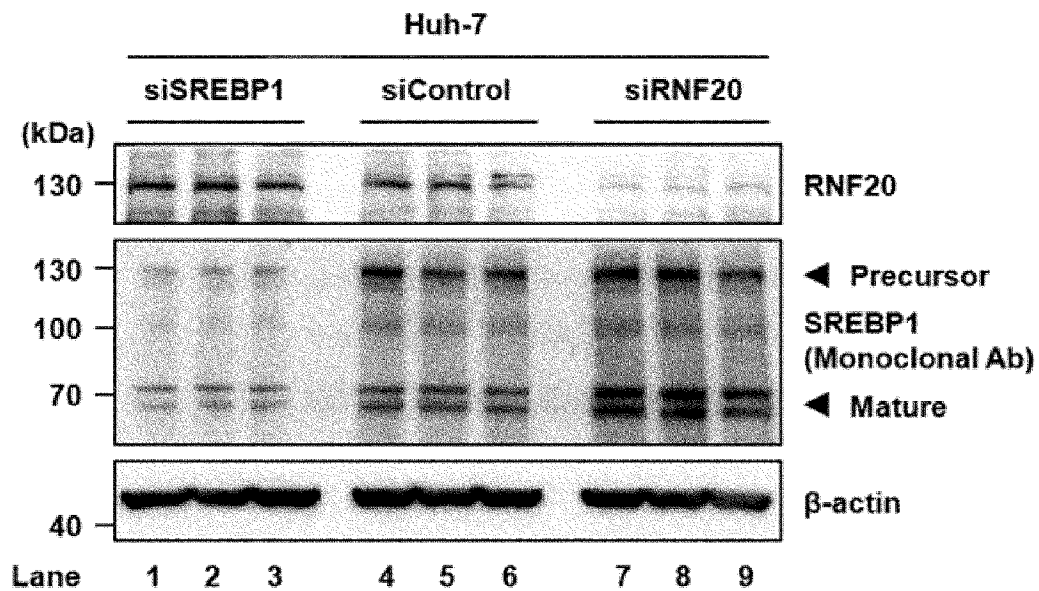
[도19]



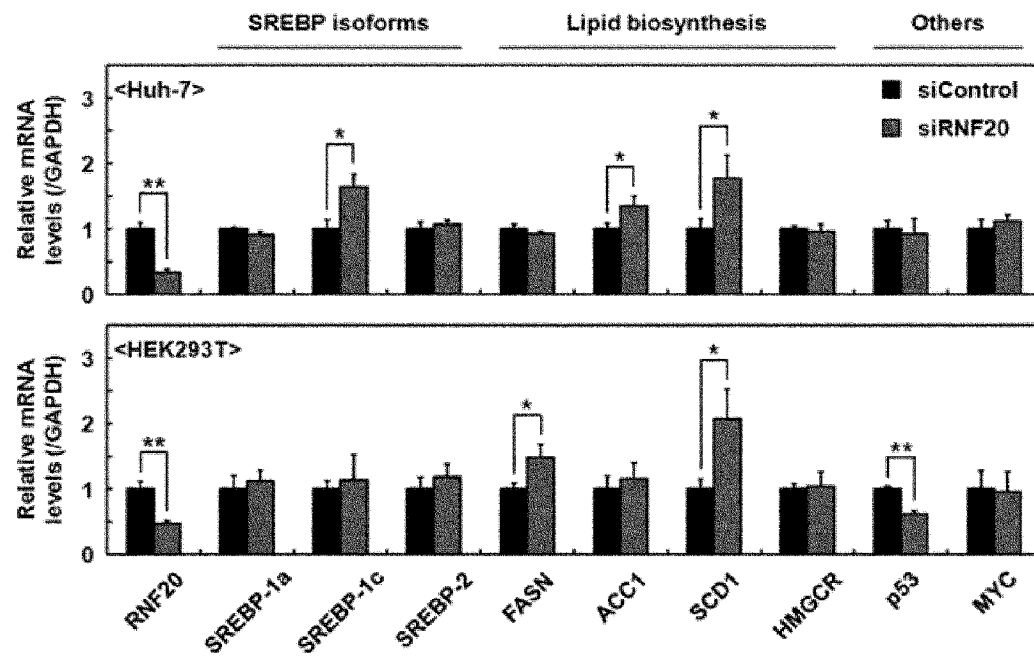
[도20]



[도21]



[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/011172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, C12Q 1/68(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)

A61K 48/00; A61K 39/395; A61K 31/7105; G01N 33/68; G01N 33/574; G01N 33/50; C12Q 1/68

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: RNF20, renal cancer, hepatocarcinoma, methylation inhibitor, SREBP1c, PTTG1, signal transmission path, lipid biosynthesis path, expression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, J. H. et al., "Ring Finger Protein20 Regulates Hepatic Lipid Metabolism through Protein Kinase A-dependent Sterol Regulatory Element Binding Protein1c Degradation", <i>Hepatology</i> , 2014, vol. 60, pages 844-857 See abstract; pages 847-854; figures 4, 5 and 8.	1-18
A	US 2013-0295584 A1 (MARSH, D. J. et al.) 07 November 2013 See abstract; claims 1 and 23-27.	1-18
A	US 2011-0081362 A1 (ELLEEDGE, S. J. et al.) 07 April 2011 See claims 53 and 58.	1-18
A	BEAVEN, S. W., "La Mort de la Lipogenese: RNF20 Lashes Ubiquitin to SREBP-1c", <i>Hepatology</i> , 2014, vol. 60, no. 3, pages 776-778 See figure 1.	1-18
PX	LEE, J. H. et al., "RNF20 Suppresses Tumorigenesis by Inhibiting SREBP1c-PTTG1 Axis in Kidney Cancer", <i>Molecular and Cellular Biology</i> , 21 August 2017, vol. 37, no. 22, document no. e00265-17 See abstract.	1-18



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

18 JANUARY 2018 (18.01.2018)

Date of mailing of the international search report

18 JANUARY 2018 (18.01.2018)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/011172

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0295584 A1	07/11/2013	AU 2010-241416 B1 EP 2638394 A1 EP 2638394 B1 WO 2012-061904 A1	24/05/2012 18/09/2013 10/05/2017 18/05/2012
US 2011-0081362 A1	07/04/2011	WO 2009-099991 A2 WO 2009-099991 A3	13/08/2009 29/10/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61K 39/395; A61K 31/7105; G01N 33/68; G01N 33/574; G01N 33/50; C12Q 1/68

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: RNF20, 신장암, 간암, 메틸화억제제, SREBP1c, PTTG1, 신호전달 경로, 지질생합성 경로, 발현

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE, J. H. 등, 'Ring finger protein20 regulates hepatic lipid metabolism through protein kinase A-dependent sterol regulatory element binding protein1c degradation', Hepatology, 2014, 60권, 페이지 844-857 초록; 페이지 847-854; 도면 4, 5 및 8 참조.	1-18
A	US 2013-0295584 A1 (MARSH, D. J. 등) 2013.11.07 요약; 청구항 1 및 23-27 참조.	1-18
A	US 2011-0081362 A1 (ELLEGE, S. J. 등) 2011.04.07 청구항 53 및 58 참조.	1-18
A	BEAVEN, S. W., 'La mort de la lipogenese: RNF20 lashes ubiquitin to SREBP-1c', Hepatology, 2014, 60권, 3호, 페이지 776-778 도면 1 참조.	1-18
PX	LEE, J. H. 등, 'RNF20 suppresses tumorigenesis by inhibiting SREBP1c-PTTG1 axis in kidney cancer', Molecular and Cellular Biology, 2017.08.21, 37권, 22호, 문헌번호 e00265-17 초록 참조.	1-18

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 01월 18일 (18.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 18일 (18.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

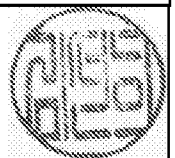
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0295584 A1	2013/11/07	AU 2010-241416 B1 EP 2638394 A1 EP 2638394 B1 WO 2012-061904 A1	2012/05/24 2013/09/18 2017/05/10 2012/05/18
US 2011-0081362 A1	2011/04/07	WO 2009-099991 A2 WO 2009-099991 A3	2009/08/13 2009/10/29