



(51) 국제특허분류:

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003921

(22) 국제출원일: 2016년 4월 15일 (15.04.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0053425 2015년 4월 15일 (15.04.2015) KR
10-2015-0167802 2015년 11월 27일 (27.11.2015) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 염영일 (YEOM, Young Il); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이동철 (LEE, Dong Chul); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

박정찬 (PARK, Kyung Chan); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 손현암 (SOHN, Hyun Ahm); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 강민호 (KANG, Min Ho); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김정애 (KIM, Jung-Ae); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 조성찬 (CHO, Sungchan); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 30, Chungcheongbuk-do (KR).

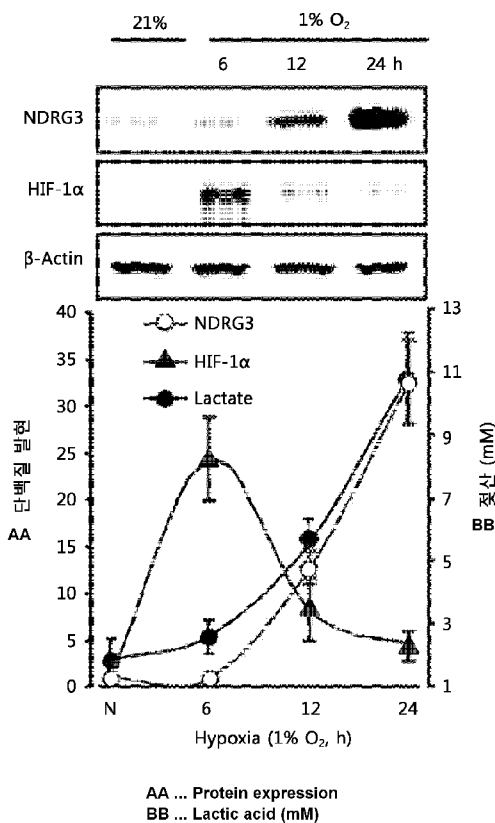
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR QUANTIFYING LACTIC ACID USING NDRG3 PROTEIN

(54) 발명의 명칭 : NDRG3 단백질을 이용한 젖산의 정량 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for quantifying lactic acid using the NDRG3 protein and, specifically, the present invention can diagnose ischemic diseases, inflammatory diseases, and related diseases, using a gene expression cassette comprising the NDRG3 protein, and can be favorably used in the treatment or prevention of the diseases or the development and research of related drugs in the future.

(57) 요약서: 본 발명은 NDRG3 단백질을 이용한 젖산의 정량 방법에 관한 것으로, 구체적으로 NDRG3 유전자를 포함하는 유전자 발현 카세트를 이용하여 허혈성 질환 및 염증성 질환 등의 관련 질병의 진단이 가능하고, 향후 상기 질병의 치료, 예방 또는 관련 신약 개발 및 연구 등에 유용하게 사용할 수 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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 (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 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: NDRG3 단백질을 이용한 젖산의 정량 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 NDRG3(N-myc downstream regulated gene 3) 단백질을 이용한 젖산의 정량 방법에 관한 것으로, 구체적으로 NDRG3 단백질 및 이의 돌연변이체의 발현양을 측정하여 세포 내 젖산의 함량을 정량하는 방법에 관한 것이다.
- [2] 또한 본 발명은 NDRG3 유전자 및 형광 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트에 관한 것이다.
- [3] 또한 본 발명은 NDRG3 유전자 및 루시퍼레이스(Luciferase) 유전자를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트에 관한 것이다.
- [4] 또한 본 발명은 Gal4DB(Gal4 DNA binding domain), 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자를 포함하는 제1벡터; 및 Gal4 업스트림 활성화 염기서열(UAS), 및 루시퍼레이스 유전자를 포함하는 제2벡터를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트에 관한 것이다.
- [5] 또한 본 발명은 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환의 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경기술

- [6] 세포 내 대사산물의 함량 측정은 생물학 연구와 의약학 산업 등에서 널리 사용되는데 이는 생체 상태 평가 및 질병 관리의 제어와 개선 등을 위해서는 대사산물 분석을 통한 신진대사 활성의 평가가 필수적이기 때문이다. 젖산은 저산소성 에너지 생산과정에서 근육세포, 적혈구, 뇌 및 다른 조직에서 생성되며, 정상시에는 혈중에 낮은 농도로 존재한다. 유산소성 에너지 생산과정 중에는 미토콘드리아에서 포도당과 산소를 이용하여 ATP(adenosine triphosphate)를 생산하나, 산소 농도가 감소하거나 미토콘드리아가 제대로 기능을 하지 못하게 되면, 생체는 저산소성 에너지 생산과정으로 전환되어 포도당을 미토콘드리아 기능 없이 대사하여 ATP를 생산하는데 이 과정에서 주로 발생하는 산물이 젖산이며, 이는 간이 분해할 수 있는 속도보다 더 빠르게 축적된다. 젖산은 신진대사 과정에서 가장 일반적으로 관찰되는 대사산물들 중 하나로서 혈중을 비롯한 생체 시료 중의 젖산은 허혈성 질환을 비롯한 다양한 생체 상태 및 질병 검출을 위한 마커가 되고, 이의 다양한 정량법의 개발은 의료 및 산업적 견지에서 강하게 요구되고 있다.
- [7]
- [8] 저산소유도인자(Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)는 저산소 상태에서 다량 유도 발현되는 핵 전사인자로서 세포 내에서의 산소 항상성을 유지하기 위해서, 적혈구 생성(erythropoiesis), 신혈관생성(angiogenesis) 및 해당과정(glycolysis)에 관련된 유전자를 발현시키는 기능을 한다. HIF-1은 α 와 β 두 가지의 군으로

나뉘어지며 HIF-1 α 는 전사인자로서 정상산소 분압에서는 분해되지만 저산소 상태에서는 단백질 자체가 안정화되는 것으로 알려져 있다. 안정화된 HIF-1 α 는 HIF-1 β 인 ARNT와 결합하여 핵으로 이동하여 혈관생성과 대사에 관여하는 유전자들을 발현시킨다(Semenza et al., 1999; Wang et al., 1995; Wang and Semenza 1995). HIF-1의 활성화는 암 발생과 전이, 류마티스성 관절염, 허혈성 뇌졸중, 동맥경화증 등 다양한 만성 대사성 질환의 병리학적 기전과 밀접한 관계가 있기 때문에 최근 주요 신약 표적으로 부상하고 있다. 그러나, HIF의 촉진만으로 저산소 반응 진행을 완전히 파악할 수 없고, 이를 통해 HIF-비의존적으로 유도되는 조절 경로가 존재한다고 보고되고 있다. 따라서, 저산소반응에 기한 세포 내 젖산의 정량을 위해 HIF 뿐만 아니라 HIF 비의존적-조절 경로에 관여하는 인자의 촉진 물질을 결합하여 분석하는 전략이 필요하다.

[9]

[10] NDRG(N-myc downstream regulated gene)군 유전자는 N-Myc 돌연변이 쥐에서 발현이 증가하는 유전자로써 Ndr1이라는 이름으로 처음 밝혀지기 시작했다. 이의 인간 올소로그(human ortholog) NDRG1이 인간 세포주에서 동정되면서부터 Drg1, Cap43, RTP/rit42등과 같은 이름으로 불려지기 시작했다. NDRG군 유전자에는 서로 다른 4종류의 구성 유전자들이 보고되어 있으며, 이들 4종류의 NDRG1, NDRG2, NDRG3 및 NDRG4는 높은 유사성 (homology)을 가지지만 개체의 발달과 성장에 따라 발현 형태가 상당히 다른 것으로 보고되어 있다(Qu et al., Mol Cell Biochem, 2002(229), 35-44, Deng et al., Int J Cancer, 2003(106), 342-7). 따라서, 이러한 발현차이로 보면 이들 유전자들이 서로 다른 기능을 할 것으로 예상되고 있으나, 아직 이들의 명확한 기능에 관한 보고는 없었다.

[11] 기존의 젖산 정량 방법으로는 TLC(Thin layer chromatography)를 이용한 젖산 분석, HPLC(high performance liquid chromatography) 이용한 젖산 분석, Lactate dehydrogenase를 이용한 젖산 분석 등이 있으나 정확도가 높은 세포 내 젖산의 정량 방법에 대해서 여전히 연구가 필요한 실정이었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 저산소 조건에서 생성되는 젖산을 정량하기 위한 방법을 찾기 위해 노력한 결과, 저산소 반응에서 생성된 젖산이 NDRG3 단백질과 결합하여 축적됨을 확인함으로써, 상기 NDRG3 단백질을 젖산 정량에 이용될 수 있음을 밝혀 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[13] 본 발명의 목적은 NDRG3(N-myc downstream regulated gene 3) 단백질의 발현양을 측정하는 단계를 포함하는 세포 내 젖산의 정량 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 NDRG3 유전자 및 형광 단백질을 코딩하는 유전자를

포함하는 젓산 정량용 유전자 발현 카세트를 제공하는 것이다.

- [15] 본 발명의 또 다른 목적은 NDRG3 유전자 및 루시퍼레이즈(Luciferase) 유전자를 포함하는 젓산 정량용 유전자 발현 카세트를 제공하는 것이다.

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 Gal4DB(Gal4 DNA binding domain), 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자를 포함하는 제1벡터; 및 Gal4 업스트림 활성화 염기서열(UAS), 및 루시퍼레이즈 유전자를 포함하는 제2벡터를 포함하는 젓산 정량용 유전자 발현 카세트를 제공하는 것이다.

- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 의심되는 개체로부터 분리되는 생물학적 시료에서 NDRG3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계(제1단계); 및 상기 측정된 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계(제2단계)를 포함하는, 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [18] 본 발명은, 저산소 조건에서 생성되는 젓산을 정량하기 위한 방법으로, NDRG3(N-myc downstream-regulated gene 3) 단백질 발현량의 측정을 통한 젓산 정량 방법을 제공하여 NDRG3 단백질에 기한 세포증식 및 혈관신생 등의 작용을 예측 및 분석이 가능하도록 함으로써 향후 암 및 허혈성 질환 등 관련 질병의 진단, 관리, 치료, 예방 또는 관련 신약 개발 및 연구 등에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1a는 NDRG3(N-myc downstream regulated gene 3) 과발현 형질전환 마우스의 제조하기 위하여 인간 NDRG3을 암호화하는 pCAGGS 플라스미드를 나타낸 도이다.
- [20] 도 1b는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스의 생산 과정에서, TG-2, TG-8 및 TG-13 마우스의 게놈 DNA에 인간 NDRG3 유전자가 삽입되어 있음을 확인한 도이다.
- [21] 도 1c는 확립된 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 TG-2, TG-8 및 TG-13의 간 조직에서 인간 NDRG3 유전자의 발현을 확인한 도이다.
- [22] 도 2는 제작한 레빗(rabbit) 항-NDRG3 항체와 인간 NDRG3 변이체(N66D)와의 항원-항체 반응을 확인한 도이다.
- [23] 도 3a는 PHD2(prolyl hydroxylase domain 2)와 결합하는 후보 단백질을 선별하는 과정을 모식화한 도이다.
- [24] 도 3b는 PHD2와 결합하는 단백질을 나타낸 도이다.
- [25] 도 3c는 PHD2 및 NDRG3 단백질의 결합을 나타낸 도이다.
- [26] 도 4a는 저산소 상태(hypoxia, 1 % O₂) 하에서(도 4a, 위) 및 시험관 내에서(in-vitro)(도 4a, 아래) PHD2 및 NDRG3의 결합을 나타낸 도이다.
- [27] 도 4b는 정상 산소 상태(normoxia, 21 % O₂) 하에 있는 MCF-7 세포에서 PHD2

- 억제에 의한 NDRG3 단백질 유도를 확인한 도이다.
- [28] 도 4c는 정상 산소 상태 하에 있는 HeLa 세포에서 PHD2 억제에 의한 NDRG3 단백질 유도를 확인한 도이다.
- [29] 도 5a는 정상 산소 상태에서 PHD 패밀리 군 및 VHL 결실에 의한 NDRG3 단백질 발현 증가를 확인한 도이다.
- [30] 도 5b는 PHD 패밀리 군 및 NDRG3 단백질의 결합을 확인한 도이다.
- [31] 도 6a는 단백질-단백질 도킹(docking) 시뮬레이션을 통해 NDRG3의 PHD2 도킹 부위(docking site)를 확인한 도이다.
- [32] 도 6b는 도킹 시뮬레이션으로 확인한 NDRG3의 PHD2 도킹 부위와 PHD2의 결합력을 확인한 도이다.
- [33] 도 7a는 정상 산소 상태에서 프로테아좀(proteasome) 억제제인 MG132 처리 후 NDRG3 단백질의 발현증가를 확인한 도이다.
- [34] 도 7b는 정상 산소 상태에서 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화를 확인한 도이다.
- [35] 도 8a는 산소 농도에 따른 NDRG3 단백질의 축적을 확인한 도이다.
- [36] 도 8b는 세포 내에서 지속적인 저산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 축적을 확인한 도이다.
- [37] 도 8c는 여러 종류의 암 세포에서 지속적인 저산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 축적을 확인한 도이다.
- [38] 도 8d는 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화 억제를 확인한 도이다.
- [39] 도 9a는 정상 산소 상태 및 지속적인 저산소 상태에 따른 NDRG3 단백질 발현 변화를 확인한 도이다.
- [40] 도 9b는 저산소 상태에서 정상 산소 상태로 회복될 때 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [41] 도 10a는 NDRG3 단백질의 하이드록실화(hydroxylation) 표적 부위를 확인한 도이다.
- [42] 도 10b는 NDRG3 단백질의 하이드록실화(hydroxylation) 표적 부위 변이 및 PHD2/VHL의 결합을 확인한 도이다.
- [43] 도 11a는 산소 상태 변화에 따른 NDRG3의 RNA 발현 변화를 확인한 도이다.
- [44] 도 11b는 HIF 단백질 억제에 따른 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [45] 도 11c는 저산소 상태 하에 있는 MCF-7(HIF-1^{+/+} 및 VHL^{+/+}) 및 786-O(HIF-1^{-/-} 및 VHL^{-/-}) 세포에서 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [46] 도 12a는 저산소 반응과 관련된 NDRG3 및 HIF-1의 기능을 분석한 도이다.
- [47] 도 12b는 정상산소 상태에서 NDRG3 변이(N66D) 단백질을 과발현 하는 세포 및 저산소 상태하에 있는 세포에서 상향 조절되는 각 유전자들의 기능을 분석한 도이다.
- [48] 도 13a는 저산소 상태에서 NDRG3 결실에 의한 혈관생성 활성의 변화를 확인한 도이다.

- [49] 도 13b는 저산소 상태에서 NDRG3 결실에 의한 신생혈관생성 마커 IL8, IL1 α , IL1 β COX-2 및 PAI-1의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [50] 도 13c는 NDRG3 결실에 의한 생체 내(in-vivo) 혈관생성 변화를 확인한 도이다.
- [51] 도 14a는 저산소 상태에서 NDRG3 결실에 의한 세포 성장 변화를 확인한 도이다.
- [52] 도 14b는 NDRG3 및/또는 HIF 결실에 의한 종양 형성 변화를 확인한 도이다.
- [53] 도 14c는 이소성(ectopic) 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 종양 형성 변화를 확인한 도이다.
- [54] 도 14d는 NDRG3 및/또는 HIF 결실된 종양 세포를 이식한 마우스에서 종양의 부피 변화를 확인한 도이다.
- [55] 도 14e는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현된 종양 세포를 이식한 마우스에서 종양의 부피 변화를 확인한 도이다.
- [56] 도 14f는 종양 조직에서 NDRG3 또는 HIF 결실에 의한 세포증식 마커 Ki-67 및 신생혈관생성 마커 IL8, CD31 단백질들의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [57] 도 14g는 종양 조직에서 NDRG3 또는 HIF 결실에 의한 신생혈관생성 마커의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [58] 도 15a는 산소 상태에 따른 NDRG3과 HIF-1 α 의 단백질 발현 및 젖산(Lactate)의 생성 변화를 확인한 도이다.
- [59] 도 15b는 LDHA(lactate dehydrogenase A) 억제제인 소듐 옥사메이트(sodium oxamate) 처리 후 지속적인 저산소 상태에 따른 NDRG3과 HIF-1 α 의 단백질 발현 및 젖산(Lactate)의 생성 변화를 확인한 도이다.
- [60] 도 15c는 저산소 상태에서 젖산 생성 억제에 따른 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [61] 도 15d는 저산소 상태에서 2-데옥시글루코오스(2-deoxyglucose, 2-DG)에 의한 해당과정(glycolysis) 억제에 따른 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [62] 도 15e는 피루베이트(Pyruvate) 또는 LDHA에 의한 과다한 젖산 생성에 따른 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [63] 도 15f는 젖산 생성에 의한 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화 변화를 확인한 도이다.
- [64] 도 16a는 NDRG3 단백질의 젖산 결합 부위를 돌연변이한 재조합 NDRG3(G138W) 변이체 및 재조합 NDRG3 야생형 단백질을 확인한 도이다.
- [65] 도 16b는 재조합 NDRG3 야생형 및 재조합 NDRG3(G138W) 변이체 단백질과 젖산의 결합을 확인한 도이다.
- [66] 도 16c는 저산소 상태에서 NDRG3의 L-젖산 결합부위를 돌연변이한 변이체의 발현 변화를 확인한 도이다.
- [67] 도 16d는 재산소화(reoxygenation)에 의한 NDRG3 단백질 발현을 확인한 도이다.
- [68] 도 17a는 저산소 상태(3% O₂)에서 젖산 생성 억제 및 이소성 변이체

- NDRG3(N66D) 발현에 의한 세포 성장 변화를 확인한 도이다.
- [69] 도 17b는 젖산 생성 억제 및/또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 세포 콜로니(colony) 형성 변화를 확인한 도이다.
- [70] 도 17c는 저산소 상태(3% O₂)에서 LDHA 결실 및/또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 세포성장 변화를 확인한 도이다.
- [71] 도 17d는 LDHA 결실 및/또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D)가 발현된 종양 세포를 이식한 마우스에서 종양 형성 변화를 확인한 도이다.
- [72] 도 17e는 지속적인 저산소 상태에서 젖산 생성 억제 및/또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 NDRG3 단백질 발현 변화를 확인한 도이다.
- [73] 도 17f는 지속적인 저산소 상태에서 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 젖산 생성 변화를 확인한 도이다.
- [74] 도 18은 지속적인 저산소 상태에서 젖산 생성 억제 및/또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 혈관생성 변화를 확인한 도이다.
- [75] 도 19a는 저산소 상태에서 NDRG3 결실에 의한 단백질의 인산화(phosphorylation) 변화를 확인한 도이다.
- [76] 도 19b는 NDRG3 단백질 발현에 따른 ERK1/2 단백질의 활성 변화를 확인한 도이다.
- [77] 도 19c는 지속적인 저산소 상태에서 NDRG3 결실에 의한 Raf-ERK1/2 활성 변화를 확인한 도이다.
- [78] 도 19d는 시험관 내에서(in-vitro, 왼쪽) 및 세포 내에서(오른쪽) NDRG3 및 c-Raf 단백질들의 결합을 확인한 도이다.
- [79] 도 19e는 NDRG3 단백질 결실 또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현에 의한 Raf-ERK1/2 활성 변화를 확인한 도이다.
- [80] 도 19f는 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 및/또는 PKC-I에 의한 PKC-β 활성 억제에 따른 c-Raf의 인산화 변화를 확인한 도이다.
- [81] 도 19g는 저산소 상태에서 젖산 생성 억제에 따른 NDRG3 단백질 발현 및 Raf-ERK1/2 활성 변화를 확인한 도이다.
- [82] 도 20a는 NDRG3 및 RACK-1 단백질들 간의 결합을 확인한 도이다.
- [83] 도 20b는 NDRG3 결실 또는 이소성 변이체 NDRG3(N66D), RACK-1 및/또는 Raf 발현에 따른 Raf-ERK1/2 활성 변화를 확인한 도이다.
- [84] 도 20c는 저산소 상태에서 RACK1 결실에 의한 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 및 PKC-β간의 결합을 확인한 도이다.
- [85] 도 20d는 저산소 상태에서 PKC-β활성 억제에 의한 ERK1/2 활성 변화를 확인한 도이다.
- [86] 도 20e는 제조합 이소성 변이체 NDRG3(N66D)와 c-Raf, RACK1 및 PKC-β 복합체 형성을 확인한 도이다.
- [87] 도 20f는 시뮬레이션을 통한 NDRG3, c-Raf, RACK1 및 PKC-β복합체 형성을 확인한 도이다.

- [88] 도 21a는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 종양 형성 여부를 확인한 도이다.
- [89] 도 21b는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 폐, 장 및 하복부(hypogastrium)에서 종양 형성을 확인한 도이다.
- [90] 도 21c는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 장간막 림프절(Mesenteric lymph node), 비장 및 간 조직에서 B 세포 및 T 세포를 확인한 도이다.
- [91] 도 21d는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 간 조직에서 간세포암종 마커(hepatocellular carcinoma, HCC)인 글루타민합성효소(glutamine synthetase, GS) 및 열충격단백질 70(heat shock protein 20, HSP), 및 세포증식 마커인 PCNA 및 Ki-67의 발현을 확인한 도이다.
- [92] 도 21e는 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 간조직에서 ERK1/2의 활성화 및 신생혈관생성 마커의 mRNA 발현을 확인한 도이다.
- [93] 도 22는 간암 환자에서 NDRG3의 발현 및 ERK1/2 활성을 확인한 도이다.
- [94] 도 23은 지속적인 저산소 반응에 있어서 젖산에 의해 유도된 Raf-ERK 경로의 매개자로서 NDRG3의 기전을 도식화한 도이다.
- [95] 도 24는 저산소 환경에서 LDHA 발현 감소시 외인성으로 처리된 젖산에 의한 NDRG3 단백질의 발현을 확인한 도이다.
- [96] 도 25는 저산소 환경에서 옥사메이트 처리후 외인성으로 처리된 젖산에 의한 NDRG3 단백질의 발현을 확인한 도이다.
- [97] 도 26은 정상 및 저산소 환경에서 MCT(monocarboxylate transporter) 1을 억제하여 외인성으로 처리된 젖산의 세포내 유입을 차단할 경우 NDRG3 단백질의 발현을 확인한 도이다.
- [98] 도 27은 정상산소 환경에서 옥사메이트(Oxamate) 처리 및 포도당 결핍을 유도한 후 외인성으로 처리된 젖산에 의한 NDRG3 단백질의 발현 과 MCT 1 의존성을 확인한 도이다.
- [99] 도 28은 본 발명의 젖산 정량용 유전자 발현 카세트에서 발현된 NDRG3/형광 단백질의 결합 단백질을 나타낸 도이다.
- [100] 도 29는 본 발명의 젖산 정량용 유전자 발현 카세트에서 발현된 NDRG3/루시퍼라제의 결합 단백질을 나타낸 도이다.
- [101] 도 30은 본 발명의 루시퍼레이즈 발현을 위한 GAL4/UAS 시스템을 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [102] 본 발명은 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 세포 내에서 NDRG3(N-myc downstream-regulated gene 3) 단백질의 발현양을 측정하는 단계를 포함하는 세포 내 젖산의 정량 방법을 제공한다.
- [103] 상기 세포는 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액 및 소변으로 구성된 군으로부터

- 선택된 어느 하나에서 채취할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [104] 상기 NDRG3 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 NDRG3 단백질은 젖산이 결합되지 않은 경우 분해되고, 젖산이 결합된 경우 축적될 수 있다.
- [106] 상기 젖산은 NDRG3 단백질의 아미노산 서열 중 62번째 아스파르트산, 138번째 글라이신, 139번째 알라닌 또는 229번째 타이로신에 결합할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [107] 상기 젖산의 정량 방법은 정상적인 NDRG3 단백질의 발현 수준과 젖산 결합 부위가 돌연변이된 NDRG3 단백질의 발현 수준을 비교하는 방법일 수 있다.
- [108] 상기 NDRG3 단백질은 젖산이 결합되지 않은 경우 분해되고, 젖산이 결합된 경우 축적될 수 있다.
- [109] 상기 발현양은 시험관 내 결합 분석법(in-vitro binding assay), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학염색, 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 단백질 칩(chip) 및 실시간 형광이미징 방법(Realtime Fluorescence Imaging Method)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [110] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 저산소증과 관련된 HIF(Hypoxia-inducible factor)-비의존적 인자를 찾기 위하여 HIF의 활성화에 관여하는 PHD2(prolyl hydroxylase domain 2) 단백질과 결합하는 후보 단백질 중 NDRG3(염기서열 83-1210, 서열번호 1)을 선별하였고, 저산소증에 있어서 NDRG3 단백질의 분자생화학적 기능을 확인하기 위하여 NDRG3 과발현 형질전환 C57/BL6 마우스 TG-2, TG-8 및 TG-13을 제작하였으며(도 1a 내지 도 1c, 및 도 3a 내지 도 3c 참조), 재조합 인간 NDRG3 단백질(아미노산 32-315, 서열번호 2)를 항원으로 레빗(rabbit)에서 항-NDRG3 다클론 항혈청을 획득하고 NDRG3 펩타이드(아미노산 244-255, 서열번호 3)를 이용하여 친화 크로마토그래피를 통해 정제하여 레빗 항-인간 NDRG3 다클론 항체를 제조하였다(도 2 참조).
- [111] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 산소 상태에 따른 PHD2 및 NDRG3 단백질의 관계를 확인하기 위하여 면역침전법(immunoprecipitation), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 시험관내(in-vitro) 풀-다운 분석법(pull-down assay) 및 RT-PCR을 수행한 결과, NDRG3 단백질은 4 종류의 PHD 패밀리 군 중 PHD2 단백질과 결합하고, PHD2 및 E3 유비퀴틴(ubiquitin) 연결효소(ligase) 복합체의 표적 단백질인 VHL 억제에 의해 NDRG3 단백질의 축적이 증가하는 것을 확인함으로써, NDRG3 단백질이 PHD2의 고유한 기질이며 NDRG3 단백질이 PHD2/VHL-매개 전사후 과정의 기질임을 확인하였다(도 4a 내지 도 4c, 및 도 5a 및 도 5b 참조). 또한, 단백질-단백질 도킹 시뮬레이션을 수행한 결과 NDRG3의 PHD2 도킹 부위(docking site)를 확인하고, 상기 PHD2 도킹 부위 중

NDRG3의 47번째 또는 66번째 아미노산 위치가 더욱 중요한 부위임을 확인하였으며(도 6a 및 도 6b), 생체 내 유비퀴틴화 분석법(In-vivo ubiquitination assay)을 수행한 결과 정상 산소 상태에서 PHD2가 상기 NDRG3 도킹 부위에 결합함으로써 PHD2/VHL-매개 프로테아좀(proteasome) 경로를 통해 NDRG3이 유비퀴틴화되어 제거됨을 확인하였다(도 7a 및 도 7b 참조).

[112] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NDRG3 단백질의 산소-의존성을 확인하기 위하여, 면역침전법, 웨스턴 블롯팅, 면역형광염색법 및 생체내 유비퀴틴화 분석법을 수행한 결과 유방, 간, 자궁경부, 신장 및 대장 등 여러 암세포에서 저산소 상태가 지속될수록 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화는 감소하고 NDRG3 단백질의 발현 및 축적이 증가하고 반대로, 정상 산소 상태로 산소 상태가 회복되면 NDRG3 단백질의 발현이 천천히 감소하며(도 8a 내지 도 8d, 및 도 9a 및 도 9b 참조), 특히, 질량 분석법을 수행한 결과 산소-의존적으로 NDRG3의 294번째 프롤린(proline)이 하이드록실화(hydroxylation) 되고 이 프롤린 아미노산이 알라닌(Alanine)으로 치환된 돌연변이체는 발현이 증가되므로 NDRG3의 294번째 프롤린 하이드록실화가 저산소증 표적 부위임을 확인하였다(도 10a 및 도 10b).

[113] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 저산소 반응에 있어서 NDRG3 단백질의 생화학적 기능을 확인하기 위하여 유전자 발현 프로파일링(profiling)을 수행한 결과, HIF와 달리 NDRG3 단백질은 세포증식(proliferation), 신생혈관생성(angiogenesis), 세포성장(cell growth)과 가장 관련성이 높음을 확인하였고(도 12a 및 도 12b), 생체내 혈관생성분석법(in-vivo angiogenesis assay) 및 생체내(in-vivo) 이식한 종양 부피 측정 및 MTT 분석법을 수행한 결과 저산소 반응에서 NDRG3에 의해 신생혈관생성 및 세포증식 및 종양 성장이 촉진됨을 확인하였다(도 13a 및 도 13c, 및 도 14a 내지 도 14g).

[114] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 저산소 상태에서 젖산 생성과 NDRG3 단백질의 발현 증가와의 관련성을 확인하기 위하여, MTT 분석법, 콜로니 형성 분석법(colony forming assay), 생체내 이식한 종양 부피 측정 및 튜브 형성 분석법을 수행한 결과 젖산 생성 억제에도 이소성 변이체 NDRG3(N66D)가 발현된 경우 세포증식 및 혈관생성이 촉진되는 것을 확인함으로써, NDRG3이 지속적인 저산소 상태에서 젖산에 의해 유도된 세포증식 및 혈관생성의 중요한 매개자로 작용함을 확인하였다(도 17a 내지 도 17f, 및 도 18 참조).

[115] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NDRG3에 의해 매개된 저산소 반응의 분자적 조절 기전을 확인하기 위하여 시험관내 키나아제 분석법(in-vitro kinase assay), 폴-다운 분석법, 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과 저산소 상태에서 NDRG3 발현 억제로 c-Raf 및 ERK1/2의 인산화가 억제되는 것을 확인함으로써 저산소 반응으로 유도된 젖산에 의해 활성화된

c-Raf-ERK1/2 경로에서 NDRG3이 c-Raf-ERK1/2 신호의 중요한 매개자임을 확인하였다(도 19a 내지 도 19g 참조). 또한, 단백질 구조 모델링을 수행한 결과 NDRG3이 RACK1과 결합하여 PKC-β를 유도하고 c-Raf와 함께 NDRG3-RACK1-PKC-β-c-Raf 복합체를 형성하며, 유도된 PKC-β에 의해 c-Raf 단백질이 인산화되어 c-Raf/ERK 신호가 활성화됨을 확인함으로써, 젖산에 의해 조절된 NDRG3이 c-Raf의 활성을 조절하는 스캐폴드 단백질(scaffold protein)임을 확인하였다(도 20a 내지 도 20f 참조).

[116] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NDRG3에 의한 병리학적 변화를 확인하기 위하여 상기 제작한 NDRG3 과발현 형질전환 마우스를 이용하여 면역조직화학적 분석법(immunohistochemical analysis)을 수행하고, NDRG3와 활성화된 ERK1/2 단백질의 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯팅, 유전자 발현변화를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, NDRG3 과발현 형질전환 마우스의 폐, 장, 간 등 다양한 장기에서 종양이 발견되고 장간막 림프절 및 비장 등 2차 림프기관에서 림프종 발현 B-세포 및 T-세포가 발견되는 것을 확인하였으며, 세포증식 마커 및 신생혈관생성 마커의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 21a 내지 도 21e 참조). 또한, 간암환자로부터 분리한 간암 조직 샘플에서도 NDRG3 단백질의 발현 및 ERK1/2 단백질의 활성이 촉진되는 것을 확인함으로써(도 22 참조), NDRG3의 비정상적인 발현이 c-Raf/ERK 경로를 활성화함으로써 종양 형성 및 신생혈관형성을 촉진함을 확인하였다.

[117] 아울러, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 외인성 젖산 처리가 NDRG3 단백질 발현 및 저산소성 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LDHA가 결실된 Huh-1세포에 L-젖산을 처리한 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행하였고, 외인성 젖산 처리와 옥사메이트(oxamate) 처리에 의한 영향과의 관계를 파악하기 위하여 Huh-1 세포에 소듐 옥사메이트(Sodium oxamate) 처리 후 L-젖산을 처리한 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 외인성으로 처리된 젖산이 NDRG3를 용량의존적으로 회복시키고 HIF-1α 단백질의 수준에는 영향을 미치지 않음을 확인하였으며(도 24), 이는 옥사메이트 처리(도 25)로 젖산생성을 억제한 경우에도 유사한 결과가 나타남을 확인하였다. 또한, 젖산의 세포내 유입을 차단할 경우 외인성 젖산 처리가 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 MCT(monocarboxylate transporter) 1을 억제한 Huh-1 세포에 젖산을 처리한 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행하였고, 정상산소 환경에서 Huh-1세포에 옥사메이트 처리 또는 포도당 결핍을 유도하고 외인성으로 L-젖산을 처리한 뒤 MCT 1을 억제하여 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, MCT 1을 억제할 경우 외인성 젖산에 의한 NDRG3 발현 회복 효과가 없어짐을 확인하였다(도 26 및 도 27).

[118] 따라서, 본 발명의 NDRG3 단백질은 젖산과 반응하여 분해가 억제되는 기전을 분석하고, 저산소 반응에서 생성된 젖산이 NDRG3 단백질과 결합하여 축적됨을 확인함으로써, 상기 NDRG3 단백질이 젖산 정량에 이용될 수 있음을 밝혔다.

[119]

- [120] 다른 양태로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자 및 형광 단백질(fluorescent protein, FP)을 코딩하는 유전자를 포함하는 젯산 정량용 유전자 발현 카세트를 제공한다.
- [121] 본 발명에서 용어, “발현 카세트”는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자와 형광 단백질을 코딩하는 유전자 또는 루시퍼레이스 유전자를 포함하고 있어, 젯산을 정량할 수 있는 단위 카세트를 의미한다. 상기 발현 카세트는 발현 구조체(construct) 또는 핵산 삽입체와 혼용할 수 있다.
- [122] 상기 형광 단백질은 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein, RFP), 증강된 적색 형광 단백질(Enhanced red Fluorescent Protein, ERFP), 청색 형광 단백질(Cyan Fluorescent Protein, CFP), 증강된 청색 형광 단백질(Enhanced cyan Fluorescent Protein, ECFP), 황색 형광 단백질(Yellow Fluorescent Protein, YFP), 증강된 황색 단백질(Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP), mTFP(monomeric teal Fluorescent Protein), 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP), 및 변형된 녹색 형광 단백질(modified green Fluorescent Protein, EGFP)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [123] 구체적으로, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자와 형광 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젯산이 과다 생성하는 환경에서 NDRG3/형광 단백질의 결합단백질을 발현할 수 있다(도 28). 따라서, 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젯산이 과다 생성하는 환경에서 발현된 형광 단백질을 측정하여 젯산 정량이 가능하다.
- [124]
- [125] 다른 양태로서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자 및 루시퍼레이스(Luciferase) 유전자를 포함하는 젯산 정량용 발현 카세트를 제공한다.
- [126] 본 발명에서 용어, “발현 카세트”는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [127] 상기 루시퍼레이스(Luciferase)는 생물체가 빛을 내는 데에 관여하는 발광효소를 의미한다.
- [128] 구체적으로, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자와 루시퍼레이스 유전자를 포함하는 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젯산이 과다 생성하는 환경에서 NDRG3/루시퍼레이스의 결합단백질을 발현할 수 있다(도 29). 따라서, 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젯산이 과다 생성하는 환경에서 발현된 루시퍼레이스 단백질을 측정하여 젯산 정량이 가능하다.
- [129]
- [130] 다른 양태로서, Gal4DB(Gal4 DNA binding domain), 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자를 포함하는 제1벡터; 및 Gal4 업스트림 활성화 염기서열(UAS), 및 루시퍼레이스(Luciferase) 유전자를 포함하는 제2벡터를 포함하는 젯산 정량용 유전자 발현 카세트를 제공한다.

- [131] 본 발명에서 용어, “발현 카세트”는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [132] 상기 Gal4는 사카로미세스속(*Saccharomyces*) 효모의 갈락토오스대사계 유전자 상류에 있는 Gal4 업스트림 활성화 염기서열(upstream activating sequence, UAS)에 결합하여 전사를 촉진하는 조절 단백질을 코딩하는 유전자를 의미한다.
- [133] 상기 UAS에 특이적으로 결합하여 전사를 촉진하는 GAL4를 이용한 GAL4/UAS 시스템은 발현시키고자 하는 유전자를 발현이 요구되는 시기에 발현이 필요한 조직에서 발현시키는 것을 가능하게 해주는 시스템을 의미한다. 본 발명에서 상기 발현시키고자 하는 유전자는 루시퍼레이스를 의미한다(도 30).
- [134] 구체적으로, 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젖산이 과다 생성하는 환경에서 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자와 Gal4DB(Gal4 DNA binding domain)을 포함하는 제1벡터가 NDRG3/GAL4의 결합단백질을 발현할 수 있다. 상기 결합단백질의 GAL4 단백질 영역은 제2벡터의 UAS 유전자에 결합하고, UAS 유전자 인근에 존재하는 루시퍼레이스 유전자의 전사 촉진에 의해 제2벡터가 루시퍼레이스 단백질을 발현할 수 있다. 따라서 본 발명의 유전자 발현 카세트는 젖산이 과다 생성하는 환경에서 발현된 루시퍼레이스 단백질을 측정하여 젖산 정량이 가능하다.
- [135]
- [136] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 NDRG3 단백질의 산소-의존성을 확인하기 위하여, 면역침전법, 웨스턴 블롯팅, 면역형광염색법 및 생체내 유비퀴틴화 분석법을 수행한 결과, HIF는 저산소 상태 초기 단계에 발현이 증가한 후 점점 감소하지만, 저산소 상태가 지속될수록 NDRG3 단백질의 발현 및 축적이 증가하는 것을 확인함으로써, NDRG3은 HIF-비의존적으로 지속적인 저산소 반응에서 중요한 기능을 함을 확인하였다(도 11a 내지 도 11c 참조).
- [137] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 저산소 상태에서 젖산 생성과 NDRG3 단백질의 발현 증가와의 관련성을 확인하기 위하여, 저산소 상태에서 젖산 생성 측정, 웨스턴 블롯팅, 면역침전법, 시험관내 유비퀴틴 분석법을 수행한 결과, 저산소 반응으로 젖산이 생성되고, 생성된 젖산이 NDRG3의 62번째, 138번째, 139번째 또는 229번째 아미노산을 포함한 젖산 결합 부위에 결합함으로써 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화가 억제되며 HIF-비의존적으로 발현이 증가함을 확인하였다(도 15a 내지 도 15f, 및 도 16a 내지 도 16d 참조).
- [138] 아울러, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 외인성 젖산 처리가 NDRG3 단백질 발현 및 저산소성 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 LDHA가 결실된 Huh-1세포에 L-젖산을 처리한 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행하였고, 외인성 젖산 처리와 옥사메이트(oxamate) 처리에 의한 영향과의 관계를 파악하기 위하여 Huh-1 세포에 소듐 옥사메이트(Sodium oxamate) 처리 후 L-젖산을 처리한 뒤 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 외인성으로 처리된 젖산이

NDRG3를 용량의존적으로 회복시키고 HIF-1 α 단백질의 수준에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 24).

[139] 따라서, 젖산이 과발현된 저산소 상태에서는 상기 유전자 발현 카세트를 통해 NDRG3 단백질이 과발현되고, 상기 발현된 NDRG3 단백질이 젖산과 결합하여 세포 내에 축적되므로, NDRG3의 신호를 확인하여 젖산의 정량이 가능함을 알 수 있었다.

[140]

[141] 다른 양태로서, 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 의심되는 개체로부터 분리되는 생물학적 시료에서 NDRG3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계(제1단계); 및 상기 측정된 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계(제2단계)를 포함하는, 허혈성 질환 또는 염증성 질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[142] 본 발명에서 용어, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 상기 진단은 고형암, 염증성 질환 또는 허혈성 질환의 발병 여부를 확인하는 것이다.

[143] 본 발명에서, 상기 고형암은 암이 장기에 암 종양이 발생한 암으로서, 암이 발생한 부위에 따라 비고형암과 구분된다. 상기 고형암은 저산소 반응으로 생성된 젖산과 NDRG3에 의한 젖산-NDRG3-Raf-ERK 신호 경로를 통해 발병할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[144] 상기 고형암은 자궁경부암, 신장암, 위암, 간암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 췌장암을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[145] 본 발명에서, 상기 염증성 질환은 염증을 주병변으로 하는 질환을 총칭하는 것으로서, 저산소 반응으로 생성된 젖산과 NDRG3에 의한 젖산-NDRG3-Raf-ERK 신호 경로를 통해 염증반응을 매개하는 사이토카인 발현의 촉진에 의해 발병할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[146] 상기 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 퇴행성 관절염, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 복막염, 포도막염, 피부염, 습진 및 다발성 경화증을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, 상기 허혈성 질환은 심장 및 기타 조직에서 혈액공급의 차단으로 산소와 혈액 내에 포함되어 있는 여러 가지 영양분이 공급되지 못해 발생하는 질환으로서, 저산소 반응에 의해 젖산이 과발현되는 현상을 나타낼 수 있다. 상기 허혈성 질환은 뇌허혈, 심장허혈,

당뇨병성 혈관심장 질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염, 허혈성 급성 신부전증, 뇌졸중, 뇌외상 및 신생아 저산소증을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[147]

[148] 제1단계는 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 의심되는 개체로부터 분리되는 생물학적 시료에서 NDRG3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 의미한다.

[149] 한편, 상기 NDRG3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계는 NDRG3 단백질 또는 상기 단백질의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 상기 시료와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[150] 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

[151] 상기 "앵타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다.

[152] 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상일 수 있으나 이들에 한정되지 아니한다. 본 발명의 앵타머는 NDRG3에 대하여 사용될 수 있다. 상기 NDRG3에 결합 활성을 갖는 앵타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

[153] 본 발명에서 용어, "개체"는 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 않는다.

[154] 제2단계는 제1단계에서 측정된 NDRG3 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계를 의미한다.

- [155] 본 발명에서 용어, “정상 대조군”은 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 발병되지 않거나, 발병이 의심되지 않는 개체를 의미한다.
- [156] 본 발명에서 용어, “시료”는 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 발병된 환자로부터 분리되어 NDRG3 단백질의 발현수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하며, 구체적으로 상기 생물학적 시료는 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [157] 상기 정보제공방법은 상기 생물학적 시료에서 측정한 NDRG3 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 해당 단백질 발현 수준보다 높은 경우, 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환으로 판단하는 단계(제3단계)를 추가로 포함할 수 있다.
- [158]
- [159] 본 발명은, 상기 NDRG3 단백질이 젖산에 의해 HIF-비의존적으로 축적되어 세포증식 및 혈관신생 등의 중요한 매개자로 작용하는 바, NDRG3 단백질 발현양의 측정을 통한 젖산 정량 방법을 제공하여 NDRG3 단백질에 기한 세포증식 및 혈관신생 등의 작용을 예측 및 분석이 가능하도록 함으로써 향후 허혈성 질환 등 관련 질병의 진단, 관리, 치료, 예방 또는 관련 신약 개발 및 연구 등에 유용하게 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [160] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [161]
- [162] <실시예 1> NDRG3 과발현 형질전환 마우스의 제작
- [163] NDRG3의 발현이 생화학적 특징에 미치는 영향을 확인하기 위하여 NDRG3 과발현 형질전환 마우스를 제작하였다.
- [164] 구체적으로, 도 1a의 모식도와 같이 인간 NDRG3 cDNA 서열(서열번호 1)을 CAG-프로모터(거대세포바이러스 인핸서(cytomegalovirus enhancer) 및 치킨(chicken) β -액틴 프로모터) 및 레빗 β -글로빈(globin) 폴리아데닐화(polyadenylation) 서열을 포함하는 pCAGGS 플라스미드에 클로닝하여 선형화한 후, 상기 선형화된 컨스트럭트(construct)를 3마리의 C57/BL6 마우스 수정란의 전핵(pronuclei)으로 주입하였다. 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위하여 상기 3마리의 C57/BL6 마우스 각각의 꼬리를 잘라 마우스 꼬리 용해 버퍼(mouse tail lysis buffer, 60 mM Tris pH 8.0/100 mM EDTA/ 0.5 % SDS, 500 ug/ml Proteinase K)를 이용해 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출한 후, 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 유전자형을 확인하였다(도 1b). 상기 3마리의 C57/BL6 마우스 각각에서 이식된 NDRG3을 발현하는 것을

확인한 후, 정상 마우스와 교배하여 F1 세대의 마우스 각각을 획득하고 상기와 동일한 방법으로 유전자형을 확인하여 NDRG3을 과발현하는 형질전환 마우스의 계통 TG-2, TG-8 및 TG-13을 확립하였다.

[165] [표1]

프라이머(primer)		서열(5'→3')
인간 NDRG3	정방향	AACCATAAATCCTGTTTCAATG(서열번호 9)
	역방향	TCCACAACATTGGTTGTCAGG(서열번호 10)

[166]

[167] 또한, 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 TG-2, TG-8 및 TG-13에서 NDRG3의 과발현을 다시 한번 확인하기 위하여 상기와 같이 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 1c).

[168]

[169] <실시예 2> 인간 NDRG3 항체의 제조

[170] 인간 NDRG3 단백질에 대한 항체를 제조하기 위하여, 재조합 인간 NDRG3 단백질의 아미노산 32-315 서열(서열번호 2)을 pET-28a 벡터로 클로닝 하고 대장균 균주 BL21로 형질전환하고, 상기 형질전환된 대장균 균주 BL21를 37에서 100 mg/ 옴피실린(ampicillin)이 포함된 LB 배지로 OD값이 OD₅₉₅=0.5가 될 때까지 배양한 후 1 mM 농도의 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)를 첨가하여 16°C에서 12시간동안 유도(induction)하였다. 그 다음, 상기 균주를 4°C에서 15분 동안 4,000 rpm으로 원심분리하고 버퍼[50 mM HEPES (pH 7.5) 및 150 mM NaCl]로 재현탁한 후, 2분 동안 3초 펄스(pulse)로 얼음통 안에서 초음파 분쇄(sonication)하고, 다시 4°C에서 15분 동안 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 그 다음, 재조합 단백질은 Ni-NTA 아가로오스 레진(Resin)을 이용하여 Ni-NTA 아가로오스 친화 크로마토그래피를 통해 제조사의 절차에 따라 정제하였다. 그 다음, 상기 정제한 인간 NDRG3 재조합 단백질(아미노산 32-315)을 레빗(rabbit, New Zealand White)에 면역화하였다. 다클론 항혈청(polyclonal antisera)의 생산은 AbFrontier(서울, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였다. 항혈청은 NDRG3 펩타이드(QNDNKSKTLKCS; 아미노산 244~255, 서열번호 3)를 이용하여 친화 크로마토그래피로 정제하여 항-NDRG3 항체를 획득하였다. 상기 항-NDRG3 항체의 특이성을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[171] 구체적으로, Myc-태그된 NDRG1 발현 벡터, Myc-태그된 NDRG2 발현벡터, Myc-태그된 NDRG4 발현벡터 및, Myc-태그된 NDRG3 발현 벡터를 클로닝하였다. 또한, NDRG3 변이체를 제작하기 위하여 상기 Myc-태그된 NDRG3 발현 벡터를 주형으로 하여 하기 표 2의 프라이머로

KOD-Plus-Mutagenesis 키트(Toyobo)를 이용해 제조사의 절차에 따라 부위-지정 돌연변이를 수행하여 NDRG3의 66번째 아스파라긴(Asn, N)을 아스파르트산으로 치환한 Myc-태그된 NDRG3(N66D) 변이체를 획득하였다. 그 다음, 상기 NDRG1-Myc, NDRG2-Myc, NDRG4-Myc 및 NDRG3(N66D)-Myc 각각을 10 % FBS(Gibco BRL) 및 100 U/ml 페니실린(penicillin, Gibco BRL)이 포함된 DMEM 배지로 배양한 HEK293T 세포(ATCC)에 리포펙타민(Lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 절차에 따라 형질전환(transfection)하였다. 그 다음, 상기 형질전환된 세포를 37°C, CO₂ 배양기(Sanyo)에서 24시간 동안 배양하고 회수하였다. 그 다음, 상기 회수한 세포를 용해 버퍼[1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 100 mM KCl, 20 mM HEPES(pH 7.9), 10 mM EDTA, 프로테아제 억제제(protease inhibitor) 각테일(Roche)]를 이용하여 용해하고, 상기 세포의 단백질을 용해물(30 µg)을 9 % SDS-PAGE로 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)(PALL Life Sciences)으로 전달시켰다. 그 다음, 일차 항체로 상기 획득한 항-NDRG3 항체를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(Pierce chemical co, USA)을 이용하여 확인하였다(도 2).

[172] [표2]

프라이머		서열
NDRG3(N66D)	센스(sense)	GACCATAAATCCTGTTTCAATGCATTCTT T(서열번호 11)
	안티 센스(antisense)	GAGGCCAATGTCATGATATGTTAGTATAA C(서열번호 12)

[173]

[174] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 제조된 항-NDRG3 항체는 NDRG1, NDRG2 및 NDRG4를 제외한 NDRG3(N66D) 변이체에만 결합하는 것을 확인함으로써, 상기 항-NDRG3 항체는 NDRG3 항체 및 변이체를 항원으로 결합하는 항체이며, 따라서, 본 발명의 NDRG3의 분자생물학적 기능을 확인하기 위해 사용하였다(도 2).

[175]

[176] <실시예 3> PHD2의 결합 단백질로서 NDRG3 확인

[177] 정상산소에서 PHD2(Prolyl-hydroxylase domain 2)는 저산소에 의해 유도되는 유전자의 발현에 중요한 전사인자인 HIF-1α(Hypoxia-inducible Factor-1a)의 활성을 조절한다고 보고되고 있다(Wenger, R. H. et al., Curr. Pharm. Des., 2009(15), 3886-3894). 따라서, 저산소 반응(hypoxia responses)에 있어서 PHD2에 의해 HIF-비의존적으로 조절되는 인자를 찾기 위하여,

면역침전법(immunoprecipitation), 면역염색(immunostaining) 및 마이크로-LC-MS/MS 분석법을 수행하였다.

- [178] 구체적으로, PHD2 결합 단백질을 확인하기 위하여 도 3a의 모식도와 같이 Flag-태그된 PHD2를 암호화하는 컨스트럭트(construct)를 제작한 후, 10 % FBS(Gibco BRL) 및 100 U/ml 페니실린(penicillin, Gibco BRL)이 포함된 DMEM 배지로 배양한 MCF-7 세포(ATCC)에 상기 컨스트럭트 및 대조군(mock)을 리포펙타민(Lipofectamine) (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 절차에 따라 형질전환(transfection)하였다. 그 다음, 상기 형질전환된 세포에 프로테아좀(proteasome) 억제제인 MG132 10 μ M를 처리하고 92-94 % N₂, 5 % CO₂ 및 1 % O₂로 구성된 혼합 기체가 포함된 O₂/CO₂ 배양기(Sanyo)를 이용하여 24시간 동안 저산소(hypoxia) 상태를 유지하고, 용해 버퍼[1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 100 mM KCl, 20 mM HEPES(pH 7.9), 10 mM EDTA, 프로테아제 억제제(protease inhibitor) 각테일(Roche)]를 이용하여 용해하였다. 상기 세포의 단백질 용해물(1 mg)을 항-FLAG M2 친화 겔(Sigma)을 이용하여 4°C에서 하루 동안 반응하고 원심분리하여 면역침전한 후, 9 % SDS-PAGE로 전기영동하고 코마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue, CBB)로 염색하였다. 그 다음, 상기 PHD2-Flag 샘플에서 다른 면역침전 패턴을 나타내는 단백질 밴드를 SDS-PAGE 겔로부터 분리하고 마이크로-LC-MS/MS 분석을 위하여 트립신(trypsin)으로 겔을 소화하였다. 상기 소화된 단백질은 8 cm의 5-mm 입자 사이즈 Aqua C18 역상 컬럼을 포함한 융합된 실리카 모세관 컬럼(100 mm 내부지름, 360 mm 외부 지름)에 주입하였다. 상기 컬럼은 Agilent HP 1100 4차 LC 펌프에 옮기고 분리 시스템으로 250 nl/분의 유속을 사용하여 펩티드를 분리하였다. 또한, 버퍼 A(5 % 아세토니트릴(acetonitrile) 및 0.1 % 포름산(formic acid)) 및 버퍼 B(80 % 아세토니트릴 및 0.1 % 포름산)를 120 분 구배(gradients)를 위해 사용하였다. 용출된 펩티드는 LTQ 선형 이온 트랩 질량분석기(Thermo Finnigan)로 2.3 kV DC 전위로 전기분무 방법으로 분리되었다. 하나의 전체 MS 스캔(400-1,400 m/z)으로 구성된 데이터 의존적 스캔 및 5개의 데이터 의존적 MS/MS 스캔은 용출된 펩티드의 MS/MS 스펙트럼을 발생시키기 위해 사용되었다. 그 다음, MS/MS 스펙트럼은 Bioworks version 3.1을 이용하여 NCBI 인간 단백질 서열 데이터베이스로부터 분석되었다. DTASelect는 검색 결과를 필터링하기 위해 사용하였고, Xcorr 값은 펩티드의 다른 전하 상태에 적용되었다: 1.8은 단일전하 펩티드(singly charged peptides)로 적용되었고, 2.5는 이중전하 펩티드로 적용되었고, 3.5는 삼중전하 펩티드로 적용되었다(도 3b).
- [179] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, PHD2-Flag 샘플로부터 적출된 단백질 중 질량분석으로 10 종류의 PHD2 결합 단백질을 확인하였고, 그 중 분화 및 발생, 저산소증뿐만 아니라 세포 증식(proliferation), 이동(migration) 및 침입(invasion)과 연관이 있는 유전자 패밀리에 속하는 NDRG3을 선택하였다(도 3b).

- [180] 또한, 상기 NDRG3이 PHD2 결합 단백질을 다시 한번 더 확인하기 위하여 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [181] 구체적으로, 상기 대조군 및 Flag-태그된 PHD2 컨스트럭트를 형질전환한 MCF-7 세포 용해물을 항-FLAG M2 친화 겔(Sigma)을 이용하여 면역침전한 후, 9 % SDS-PAGE로 전기영동하고 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)(PALL Life Sciences)으로 전달시켰다. 그 다음, 일차 항체로 항-NDRG3 항체 및 항-Flag 항체를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(Pierce chemical co, USA)을 이용하여 확인하였다(도 3c).
- [182] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, 면역침강된 FLAG 비드로부터 분리된 42 KDa의 단백질을 확인함으로써, NDRG3이 PHD2의 결합단백질을 확인하였다(도 3c).
- [183]
- [184] <실시예 4> PHD2의 고유 기질로서 NDRG3 확인
- [185] <4-1> PHD2 및 NDRG3의 상호작용 확인
- [186] PHD2의 결합 단백질로서 NDRG3과 PHD2의 상호작용 및 NDRG3 단백질 발현에 있어서 PHD2 및 NDRG3의 상호작용이 미치는 영향을 확인하기 위하여 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅, 및 시험관내(in-vitro) 풀-다운 분석법(pull-down assay)을 수행하였다.
- [187] 구체적으로, 상기 <실시예 3>과 같이 Flag-태그된 PHD2를 암호화하는 컨스트럭트를 10 % FBS(Gibco BRL) 및 100 U/ml 페니실린(penicillin, Gibco BRL)이 포함된 DMEM 배지로 배양한 HeLa 세포(ATCC)에 형질전환하고, 24시간 동안 1 % 산소로 저산소 상태를 유지한 후 용해하였다. 그 다음, 세포 용해물을 항-FLAG M2 비드를 이용하여 면역침전하고, 일차항체로 항-NDRG3 및 항-Flag 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4a, 위). 또한, 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 PHD2를 pET-28a 재조합 플라스미드에 클로닝하고 대장균 균주 BL21에 형질전환한 후, Ni-NTA 아가로오스 레진을 이용하여 정제하였다. 또한, NDRG3을 pGEX-4T-2 재조합 플라스미드에 클로닝하고 대장균 균주 BL21에 형질전환한 후, GST-결합 아가로오스 레진(ELPIS BIOTECH, 한국)을 이용하여 정제하였다. 그 다음, 상기 재조합 단백질 His-PHD2 10 μ g 및/또는 재조합 단백질 GST-NDRG3 10 μ g을 최종 농도 0.2 mg/로 Ni-NTA 아가로오스(Giagen) 레진(resin)과 함께 4°C에서 4 시간 동안 배양하였다. 그 다음 레진에 결합한 NDRG3 단백질을 SDS 시료 완충용액을 처리하고 상기 <실시예 3>과 같이 SDS-PAGE로 전기영동한 후, 일차항체로 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4a, 아래).
- [188] 또한, PHD2 및 NDRG3 간의 기능적 관계를 확인하기 위하여 MCF-7 세포(도 4b) 또는 HeLa 세포(도 4c)를 정상 산소 상태(21 % O₂)하에서 24 시간 동안 PHD2 억제제인 DFX(desferrioxamine)를 농도별로 처리한 후, 상기 <실시예 3>과 같이

세포를 용해하였다. 상기 세포 용해물은 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4b 및 도 4c).

[189] 그 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 하에서 면역침전된 PHD2와 NDRG3이 결합하며, 재조합된 PHD2 및 NDRG3이 결합하는 것을 확인함으로써, PHD2 및 NDRG3이 직접적으로 상호작용함을 확인하였다(도 4a).

[190] 또한, 도 4b 및 도 4c에 나타낸 바와 같이, HeLa 세포에서 NDRG3 단백질의 기본 발현 수준이 미비하지만, MCF-7 및 HeLa 세포 모두 PHD2 억제제인 DFX에 의해 PHD2의 활성이 억제된 경우 NDRG3 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, PHD2 활성이 억제됨에 따라 약물-의존적으로 NDRG3이 축적되며, NDRG3이 PHD2의 고유 기질임을 확인하였다(도 4b 및 도 4c).

[191]

[192] <4-2> PHD 패밀리 단백질 및 NDRG3의 상호작용 확인

[193] PHD 패밀리는 PHD1, PHD2, PHD3, P4HTM 및 P4HA1 으로 구성되어 있으며, 이들 패밀리는 HIF 단백질의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Wenger, R. H. et al., Curr. Pharm. Des., 2009(15), 3886-3894). 따라서, PHD2 이외 다른 PHD 패밀리 및 E3 유비퀴틴(ubiquitin) 연결효소(ligase) 복합체의 표적 단백질인 VHL와 NDRG3 간의 관련성을 확인하기 위하여, RNA 간섭으로 PHD가 낙다운(knockdown)된 세포 및 PHD 패밀리가 과발현된 세포를 이용해 RT-PCR, 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[194] 구체적으로, siVHL(siGENOME SMARTpool, Dharmacon) 및 삼천리제약(한국)에 의뢰하여 하기 표 3의 서열을 이용하여 siRNA를 제작한 후 리포펙타민 2000을 이용하여 제조사의 절차에 따라 HeLa 세포에 형질전환하여, GFP, PHD1, PHD2, PHD3, P4HTM, P4HA1 또는 VHL의 발현이 억제된 세포를 획득하고, 상기 각각의 발현이 억제된 세포를 48 시간 동안 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 유지 배양한 후 회수하였다. 그 다음, 상기 회수한 세포를 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 총 RNA를 분리한 후, 분리한 RNA 5 μ g을 역전사효소(reverse transcriptase)와 함께 반응시켜 cDNA를 합성하고, PCR 산물을 아가로스 겔로 전기영동한 후 시각화하였다(도 5a).

[195] [표3]

siRNA		서열
GFP	센스	GUUCAGCGUGUCCGGCGAGTT(서열번호 13)
	안티센스	CUCGCCGGACACGCUGAACTT(서열번호 14)
PHD1	센스	CAUCGAGCCACUCUUUGACTT(서열번호 15)
	안티센스	GUCAAAGAGUGGCUCGAUGTT(서열번호 16)
PHD2	센스	AACGGGUUAUGUACGUCAUTT(서열번호 17)
	안티센스	AUGACGUACAUAACCCGUUTT(서열번호 18)
PHD3	센스	CCAGAU AUGCUAUGACUGUTT(서열번호 19)
	안티센스	ACAGUCAUAGCAUAUCUGGTT(서열번호 20)
P4HTM	센스	GAGUGUCGGCUCAUCAUCCTT(서열번호 21)
	안티센스	GGAUGAUGAGCCGACACUCTT(서열번호 22)
P4HA1	센스	GAUCUGGUGACUUCUCUGATT(서열번호 23)
	안티센스	UCAGAGAAGUCACCAGAUCTT(서열번호 24)

[196]

[197] 또한, PHD 패밀리와 NDRG3 단백질의 상호작용을 확인하기 위하여 Flag-태그된 PHD1, Flag-태그된 PHD2, Flag-태그된 PHD3, Flag-태그된 P4HTM 및 Flag-태그된 P4HA1 발현 벡터, 및 NDRG3 발현벡터를 제작한 후, 상기 <실시예 3>에 기재된 방법으로 NDRG3 및 상기 Flag-태그된 PHD 패밀리 각각을 HeLa 세포로 형질전환하고, 정상 상태에서 20 μ M MG132를 8 시간 동안 처리한 후 세포를 획득하여 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물을 항-FLAG M2 비드로 면역침전하고, 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 5b).

[198] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, RNA 간섭을 이용하여 PHD2 및 VHL의 발현을 억제한 경우 NDRG3이 축적되는 것을 확인함으로써, PHD 패밀리 군 중에서 PHD2가 NDRG3 단백질의 안정화에 있어서 주된 전사후 조절자(posttranslational regulator)이고, 정상 산소 상태에서 NDRG3은 유비퀴틴(ubiquitin)의 표적 단백질이며, 따라서 NDRG3이 PHD2/VHL-매개 전사후 과정의 기질임을 확인하였다(도 5a 및 도 5b).

[199]

[200] <4-3> NDRG3에서 PHD2의 도킹부위 확인

[201] PHD2의 기질로서 NDRG3에 PHD2가 도킹(docking)하는 위치를 확인하기 위하여, 면역침전법 및 단백질 도킹 시뮬레이션(docking simulation)을 수행하고, 상기 도킹 시뮬레이션을 통해 확인한 NDRG3의 여러 추정상 PHD2-도킹 부위와

PHD2와의 결합력을 확인하기 위하여, 부위-지정 돌연변이(site-direct mutation)를 이용하여 도킹 부위를 돌연변이한 NDRG3 변이체를 이용하여 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

- [202] 구체적으로, 예측되는 표적 단백질의 단백질-단백질 도킹 시뮬레이션은 HEX6.3(D.W. Ritchie. et al., Genet, 2000(39), 178-194)에 의해 수행되었다. 계산 선택사항에 있어서, 모양(shape) 및 정전기학(electrostatics)은 상관관계 타입(correlation type)으로 선택되었고, 범프(bumps) 및 볼륨(volumes)은 과정 후 선택되었다. 나머지 선택사항은 디폴트 배열(default configuration)을 사용하였다. 단일 표적 도킹(즉, NDRG3-EGLN1)을 위하여, 시뮬레이션은 상기 나열된 선택사항을 한번 사용하여 수행되었다. 다중 표적 구조를 위한 도킹(즉, NDRG3 및 PHD2)은 두-단계 실험을 통해 수행되었다. 첫 단계에서는, NDRG3이 각각의 표적을 위한 도킹 실험에서 수용체 단백질로서 사용되었다. 두 번째 단계에서는, 결과물 단백질-단백질 상호작용이 다른 단백질의 도킹을 위한 수용체 단백질로서 사용되었다. 두 번째 실험을 위한 입력값(input order)는 PHD2로 하였다. 도킹 계산은 RMSD(root-mean-square deviation)에 의해 수행되었고 결과는 단일 입력으로부터의 산출값이 다중 입력으로부터의 산출값과 일치하는 곳에서 필터링하였다. 필터링된 결과값 중에서, 가장 안정된 하나를 HEX6.3 총 점수(모양 점수 및 정전기학 점수의 합)를 이용하여 선택하였다(도 6a).

- [203] 또한, 도킹 시뮬레이션으로 확인한 NDRG3의 도킹부위와 PHD2의 결합력을 확인하기 위하여 NDRG3-Myc 발현 벡터를 주형으로 KOD-Plus-Mutagenesis 키트(Toyobo)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 부위-지정 돌연변이를 수행하여 NDRG3의 47번째 알기닌(Arg, R)을 아스파르트산(Asp, D)으로 치환한 Myc-태그된 NDRG3(R47D) 변이체, NDRG3의 66번째 아스파라긴(Asn, N)을 아스파르트산으로 치환한 Myc-태그된 NDRG3(N66D) 변이체, NDRG3의 97번째 글루타민(Gln, Q)을 글루탐산(Glu, E)으로 치환한 Myc-태그된 NDRG3(Q97E) 변이체, NDRG3의 296번째 발린(Val, V)을 아스파르트산으로 치환한 Myc-태그된 NDRG3(V296D) 변이체를 획득하였다. 그 다음, 상기 <실시예 3>과 같이 상기 각각의 Myc-태그된 NDRG3 변이체, Flag-태그된 PHD2 및 HA-태그된 VHL 컨스트럭트를 동시에 HEK293T 세포(ATCC)로 형질전환하고, 상기 형질전환된 HEK293T 세포에 8 시간 동안 20 μ M MG132를 처리한 후 용해하였다. 상기 세포 용해물은 항-Myc 친화겔(Sigma)을 이용하여 면역침전하고, 일차항체로 항-Flag, 항-HA 및 항-Myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 6b).

- [204] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 공개된 PHD2 기질(Structure. 2009(7), 981-9)과 NDRG3 기질 사이의 도킹 모델로부터 NDRG3의 추정상 PHD2-도킹 부위로 47번째 알기닌(Arginine), 66번째 아스파라긴(Asparagine), 68번째 라이신(Lysine), 69번째 세린(Serine), 72번째 아스파라긴, 73번째 알라닌(Alanine), 76번째 아스파라긴, 77번째 페닐알라닌(Phenylalanine), 78번째

글루탐산(Glutamic acid), 81번째 글루타민(Glutamine), 97번째 글루타민, 98번째 글루타민, 99번째 글루탐산, 100번째 글라이신(Glycine), 101번째 알라닌, 102번째 프롤린(Proline), 103번째 세린, 203번째 류신(Leucine), 204번째 아스파르트산(Aspartic acid), 205번째 류신, 208번째 쓰레오닌(Threonine), 209번째 타이로신(Tyrosine), 211번째 메티오닌(Methionine), 212번째 히스티딘(Histidine), 214번째 알라닌, 215번째 글루타민, 216번째 아스파르트산, 217번째 이소류신(Isoleucine), 218번째 아스파라긴, 219번째 글루타민, 296번째 발린(Valine), 297번째 발린, 298번째 글루타민, 300번째 글라이신 및 301번째 라이신 부위를 확인하였고, 상기 PHD2-도킹 부위 중 47번째, 66번째, 97번째 및 296번째 아미노산 위치가 더욱 중요함을 확인하였다(도 6a).

- [205] 또한, 도 6b에 나타내 바와 같이, NDRG3(V296D) 변이체 및 NDRG3(Q97E) 변이체는 PHD2와 결합하는 반면, NDRG3의 47번째 위치 또는 66번째 위치를 돌연변이한 NDRG3 변이체가 PHD2와 결합하지 않으며, 또한, PHD2와 높은 친화도를 보이는 NDRG3 변이체는 VHL에 의해 많은 양으로 번역침전되는 것을 확인함으로써, NDRG3 변이체가 다양한 PHD2-결합력(V296D>Q97E>R47DN66D)을 나타내며, 정상 산소 상태에서 NDRG3의 47번째 및 66번째 아미노산 위치가 PHD2의 도킹에 중요하며, VHL과도 관련이 있음을 확인하였다(도 6b).

[206]

- [207] **<4-4> 정상산소 상태에서 PHD2/VHL-매개 프로테아좀 경로에 의한 NDRG3의 조절 확인**

- [208] 정상산소 상태 하에서 PHD2 및 E3 유비퀴틴 연결효소 복합체의 표적 요소인 VHL이 NDRG3의 단백질 발현 및 조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여, MG132를 이용하여 프로테아좀(proteasome) 활성을 억제하고 웨스턴 블롯팅 및 생체 내 유비퀴틴화 분석법(In-vivo ubiquitination assay)을 수행하였다.

- [209] 구체적으로, 전장 NDRG3 cDNA(서열번호 1) 및 pMSCVneo 레트로바이러스 벡터(Clontech)를 이용하여 형질감염용 벡터(MSCV 레트로바이러스 시스템)를 제작하였다. 바이러스 제작을 위하여, 리포펙타민(Lipofectamine)(Invitrogen)을 사용하여 GP293 세포주에 형질감염하였다. 48시간 후, NDRG3-레트로바이러스 또는 대조-레트로바이러스가 포함된 세포 상층액을 6 μ g/ml 폴리브렌(polybrene)과 같이 HeLa 세포에 24 시간 처리한 다음, 상기 NDRG3이 과발현된 세포에 8 시간 동안 20 μ M MG132를 처리 또는 무처리한 후 세포를 획득하고, 항-NDRG3 항체 및 항- β 액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 7a).

- [210] 또한, 정상 산소 상태에서 NDRG3의 유비퀴틴화를 확인하기 위하여 생체 내 유비퀴틴화 분석법을 수행하였다. 먼저, NDRG3의 발현을 억제하기 위해 shNDRG3(Sigma-Aldrich, 서열번호 4) 및 렌티바이러스(lentivirus) 벡터를 이용하여 형질감염용 벡터를 제작하였다. 바이러스 제작을 위하여, 상기과 같이

패킹 세포주에 형질감염하였다. 그 다음, 상기 NDRG3 shRNA 발현 렌티바이러스가 포함된 세포 상층액을 6 $\mu\text{g/ml}$ 폴리브렌(polybrene)와 함께 HeLa 세포에 처리한 후, 10 % FBS를 포함한 DMEM 배지에서 유지한 다음, 대조군 HeLa 세포, 상기 NDRG3 발현이 억제된 HeLa 세포 및 상기 NDRG3이 과발현된 HeLa 세포를 상기 <실시예 3>과 같이 HA-태그된 유비퀴틴로 형질전환하고, 8 시간 동안 20 μM MG132를 처리한 후 세포를 획득하여 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물은 30 μl 단백질 G-아가로오스 비드(bead, Santa Cruz Biotechnology)를 첨가하여 프리클리어(preclear)한 후 항-NDRG3 항체로 면역침전하고, 다유비퀴틴화된(polyubiquitinated) 형태의 NDRG3을 항-HA 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 7b).

- [211] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, 정상 산소 상태에서 MG132로 프로테아좀을 억제한 경우 NDRG3이 과발현된 세포에서 NDRG3 단백질이 활발하게 유비퀴틴화 되는 것을 확인함으로써, 정상 산소 상태에서 NDRG3이 유비퀴틴화 되어 프로테아좀 경로를 통해 분해되는 것을 확인하였다(도 7a 및 도 7b). 따라서, 상기 <실시예 4>의 결과들을 통해 NDRG3이 고유한 PHD2-상호작용하는 단백질이고, 상기 NDRG3 단백질의 발현은 PHD2/VHL-매개 프로테아좀 경로에 의해 전사후 조절됨을 확인하였다.

[212]

- [213] <실시예 5> 저산소 상태에서 NDRG3의 발현 확인

- [214] <5-1> NDRG3 단백질의 산소-의존적 발현 확인

- [215] PHD2의 활성은 O_2 유효성에 의존적이므로 PHD2의 고유 기질인 NDRG3 단백질 또한 안정성에 있어서 산소 상태가 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 산소 상태를 달리한 여러 세포를 이용하여 면역침전법, 웨스턴 블롯팅, 면역형광염색법 및 생체내 유비퀴틴화 분석법을 수행하였다.

- [216] 구체적으로, 10 % FBS 및 100 U/ml 페니실린이 포함된 DMEM 배지로 배양된 MCF-7 세포를 1 %, 3 %, 5 % 및 21 % O_2 와 92-94 % N_2 및 5 % CO_2 로 구성된 혼합 기체가 포함된 O_2/CO_2 배양기를 이용하여 시간별로 유지한 후, 세포를 획득하였다. 그 다음, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 용해하고, 세포 용해물을 항-NDRG3 및 항- β 액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅하여 NDRG3의 발현을 확인하고, 그래프화하였다(도 8a).

- [217] 또한, 10 % FBS 및 100 U/ml 페니실린이 포함된 DMEM 배지로 커버슬립(cover slips)에서 배양된 MCF-7 세포를 1 % O_2 와 94 % N_2 및 5 % CO_2 로 구성된 혼합 기체가 포함된 O_2/CO_2 배양기를 이용하여 저산소 상태를 시간별로 유지하였다. 그 다음, 20분 동안 4 % 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)/PBS로 고정하고, 상온에서 5분 동안 0.3 % TritonX-100/PBS로 침투화한 후, 차단 용액(1 % BSA가 포함된 PBS)으로 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 세포를 상온에서 1시간 동안 항-NDRG3 항체(1/1,000)로 반응하고 세척한 후, 2차 항체[Alexa Flour 488-접합된 고트(goat) 항-레빗 IgG (1/1,000), 또는 Alexa Flour 594- 접합된 고트

항-마우스 IgG (1/1,000; Amersham] 및 DAPI (3 μ M, Sigma)로 반응시켰다. 그 후, Zeiss LSM 510 공초점 현미경을 이용하여 시각화하였다(도 8b).

- [218] 또한, 10 % FBS 및 100 U/ml 페니실린이 포함된 DMEM 배지로 배양된 MCF-7(유방), PLC/PRF/5(간), Huh-1(간), HeLa(자궁경부), HEK293T(신장) 및 MCF-10A(유방) 세포 및 10 % FBS 및 100 U/ml 페니실린이 포함된 RPMI 1640 배지로 배양된 SW480(대장) 및 IMR-90(폐)를 상기와 같이 O₂/CO₂ 배양기를 이용하여 저산소 상태(1 % O₂)에서 시간별로 유지한 후, 세포를 획득하였다. 그 다음, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 용해하고, 세포 용해물을 항-NDRG3 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅하여 NDRG3의 발현을 확인하고, 그래프화하였다(도 8c).
- [219] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3의 유비퀴틴화를 확인하기 위하여 생체 내 유비퀴틴화 분석법을 수행하였다. 상기 <실시예 3>과 같이 HA-태그된 유비퀴틴 및 Myc-태그된 NDRG3을 HeLa 세포에 형질전환한 후, 40시간 동안 정상산소 상태에서 배양하고 8 시간 동안 20 μ M MG132를 처리하였다. 그 다음, 24시간 동안 추가적으로 저산소 상태(1 % O₂)에서 배양한 후, 세포를 획득하여 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물은 30 μ l 단백질 G-아가로오스 비드(bead, Santa Cruz Biotechnology)를 첨가하여 프리클리어한 후 항-Myc 항체로 면역침전하고, 항-HA 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅하였다(도 8d).
- [220] 그 결과, 도 8a 및 도 8b에 나타낸 바와 같이, 세포에서 O₂ 농도가 감소할수록, 그리고 시간이 지속될수록 NDRG3 단백질의 축적이 증가하는 것을 확인함으로써, O₂ 농도에 반비례하게 NDRG3 단백질이 축적됨을 확인하였다(도 8a 및 도 8b).
- [221] 또한, 도 8c에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 축적은 비-형질전환된 세포뿐만 아니라 대장, 간, 자궁경부, 신장, 폐 등 다양한 조직 유래 암세포에서 동일하게 나타나는 것을 확인함으로써, O₂ 농도 및 NDRG3 단백질의 반비례 관계는 전형적인 현상임을 확인하였다(도 8c).
- [222] 또한, 도 8d에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 하에 NDRG3 단백질이 유비퀴틴화가 감소하는 것을 확인하였다(도 8d). 따라서, 상기 결과들을 통해 정상산소 상태와 달리 저산소 상태 하에 NDRG3 단백질의 축적은 증가하고, 유비퀴틴화는 감소하는 것을 확인하였다.

[223]

[224] <5-2> 산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 안정성 확인

[225] 저산소 상태 및 정상 산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인하기 위하여, 산소 상태를 달리한 세포를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[226] 구체적으로, 지속적인 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 상기 실시예 <5-1>과 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 시간별로 유지 배양한 MCF-7 세포 및 정상 산소 상태(21 % O₂)에서 유지 배양한 MCF-7 세포를 획득하여 상기 <실시예 3>과 같이 용해한 후, 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴

항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅하고 그래프화하였다(도 9a).

[227] 또한, 정상 산소 상태로 회복될 때 NDRG3 단백질의 발현 변화를 확인하기 위하여 상기 실시예 <5-1>과 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양한 MCF-7 세포 및 정상 산소 상태(21 % O₂)에서 시간별로 유지 배양한 MCF-7 세포를 획득하여 상기 <실시예 3>과 같이 용해한 후, 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅하고 그래프화하였다(도 9b).

[228] 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타낸 바와 같이, HIF-1 α 단백질의 경우 저산소증 초기 단계에서 발현이 유도되고 저산소증이 지속됨에 따라 단백질의 발현이 감소하는 반면, NDRG3 단백질의 경우 저산소증 말기 단계까지 발현이 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 지속적으로 저산소 상태에 의해 유도된 NDRG3 발현은 세포가 정상 산소 상태로 다시 돌아갈 때까지 천천히 제거되는 것을 확인하였다(도 9a 및 도 9b).

[229]

[230] <5-3> 산소 상태에 따른 NDRG3 단백질의 안정성 조절 기전 확인

[231] 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 표적 부위를 확인하기 위하여, 마이크로-LC-MS/MS 분석법을 수행하고, 부위-지정 돌연변이로 제작한 NDRG3 변이체가 과발현된 세포를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 또한, 정상 산소 상태에서 NDRG3 단백질의 저산소 표적 부위와 PHD2/VHL의 관련성을 확인하기 위하여, 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[232] 구체적으로, 저산소 상태 하에서 NDRG3 단백질의 표적 부위를 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 획득한 NDRG3이 과발현된 MCF-7 세포에 10 μ M MG132를 처리한 후 세포를 획득하여 용해하고 상기 <실시예 3>과 같이 항-NDRG3 항체를 이용하여 면역침전하고 마이크로-LC-MS/MS 분석을 수행하였다(도 10a).

[233] 또한, 상기 마이크로-LC-MS/MS 분석법의 결과를 통해 확인한 NDRG3 단백질 표적 부위와 PHD2/VHL의 결합을 확인하기 위하여 먼저 NDRG3 단백질 표적 부위로 예상되는 294번째 프롤린(Pro, P)을 알라닌(Ala, A)으로 치환하기 위하여 상기 실시예 <4-3>과 같이 부위-지정 돌연변이를 수행하여 Myc-태그된 NDRG3 P294A 변이체를 제작하였다. 그 다음, 상기 NDRG3 변이체 또는 야생형 NDRG3 컨스트럭트를 상기 <실시예 3>과 같이 HEK293T 세포로 형질전환한 후, 40시간 동안 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 배양하고 추가적으로 8시간 동안 20 μ M MG132를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 획득하였다. 상기 획득한 세포는 용해 후, 항-Myc 및 항- β -액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 10b, 위). 또한, Flag-태그된 PHD2, HA-태그된 VHL, 및 상기 Myc-태그된 NDRG3P294A 변이체 또는 Myc-태그된 NDRG3을 상기 <실시예 3>과 같이 HEK293T 세포에 동시에 형질전환한 후, 40시간 동안 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 배양하고 추가적으로 8시간 동안 20 μ M MG132를 처리하여 세포를

획득하였다. 그 다음, 상기 획득한 세포를 용해 후, 항-Myc 친화겔로 면역침전하고, 항-Flag, 항-HA 및 항-Myc 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 10b, 아래).

[234] 그 결과, 도 10a에 나타낸 바와 같이, 질량 분석을 통해 NDRG3의 294번째 프롤린이 PHD2-매개 저산소증 표적 부위이며, 상기 부위가 산소 의존적으로 하이드록실화(hydroxylation) 되는 부위임을 확인하였다(도 10a).

[235] 또한, 도 10b에 나타낸 바와 같이, 예상되는 저산소증 표적 부위인 NDRG3 294번째 아미노산 부위를 알라닌으로 치환한 NDRG3 변이체를 과발현시킨 세포의 경우 정상 산소 상태에서 NDRG3 단백질 변이체의 축적이 증가하고(도 10b, 위), 또한, PHD2 및 VHL과의 결합이 감소하는 것(도 10b, 아래)을 확인함으로써, 상기 NDRG3 단백질 부위가 정상 산소 상태에서 PHD2/VHL과 상호작용하고, 산소 의존적으로 PHD2에 의해 조절됨을 확인하였다(도 10b).

[236]

[237] <5-4> 산소 상태에 따른 HIF-비의존적 NDRG3 발현 조절 확인

[238] 산소 상태에 따라 NDRG3 발현 조절이 HIF 단백질과 관련이 있는지 확인하기 위하여, 산소 상태를 달리한 세포를 이용하여 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR을 수행하였다.

[239] 구체적으로, 산소 상태에 따른 HIF 단백질의 발현을 확인하기 위하여 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21 % O₂)에서 24 시간 동안 유지 배양한 MCF-7 세포 및 저산소 상태(1 % O₂)에서 시간별로 유지 배양한 MCF-7 세포를 회수한 후, 절반은 상기 <실시예 3>과 같이 항-HIF-1 α , 항-HIF-2 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하여 단백질의 발현을 확인하고, 절반은 상기 실시예 <4-2>와 같이 RT-PCR을 수행하여 mRNA의 발현을 확인하였다(도 11a).

[240] 또한, HIF 및 PHD2의 억제에 따른 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 먼저, HIF-1 α 또는 HIF-2 α 의 발현을 억제하기 위하여 상기 실시예 <4-4>와 같이 shHIF-1 α (Sigma-Aldrich), shHIF-2 α (Sigma-Aldrich) 또는 대조군 shGFP 및 렌티바이러스 벡터를 이용하여 형질감염용 벡터를 제작하였다. 그 다음, 상기 shHIF-1 α 또는 shHIF-2 α 발현 렌티바이러스가 포함된 세포 상층액을 6 μ g/ml 폴리브렌(polybrene)와 함께 PLC/PRF/5 세포에 처리한 후, 10 % FBS를 포함한 DMEM 배지에서 유지한 다음, 대조군 PLC/PRF/5 세포, 상기 HIF-1 α 또는 shHIF-2 α 발현이 억제된 PLC/PRF/5 세포를 정상 산소 상태(21 % O₂)하에서 PHD2 억제제인 DFX(desferrioxamine) 1 mM을 시간별로 처리한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 획득하여 용해하고, 상기 용해물을 항-NDRG3, 항-HIF-1 α , 항-HIF-2 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 11b).

[241] 또한, HIF 및 VHL이 결실에 따른 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 MCF-7(HIF-1^{+/+} 및 VHL^{+/+}), 및 HIF-1 α 및 VHL 좌위(loci)가 유전적으로 방해된 786-O(HIF-1^{-/-} 및 VHL^{-/-}) 세포를 상기 실시예 <5-2>와 같이 저산소 상태(1 % O₂

)에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수하여 용해하고, 상기 세포 용해물을 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 11c).

[242] 그 결과, 도 11a에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 초기단계에서 HIF-1 α 단백질의 발현이 현저히 증가하는 것과 상관없이 저산소 상태가 지속되는 동안 NDRG3 mRNA의 발현 수준이 변화되지 않고 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다(도 11a).

[243] 또한, 도 11b 및 도 11c에 나타낸 바와 같이, 정상 산소 상태에서 HIF의 결실에 영향을 받지 않고 PHD2의 활성 억제가 지속됨에 따라 NDRG3 단백질의 축적이 증가함을 확인하였고(도 11b), 저산소 상태에서도 HIF 및 VHL 결실에 영향을 받지 않고 NDRG3 단백질이 발현이 보존됨을 확인하였다(도 11c). 따라서, 상기 <실시예 5>의 결과들을 통해, NDRG3 단백질의 발현은 산소 의존적으로 PHD2에 의해 조절되고, 저산소 상태가 지속될수록 NDRG3의 발현이 지속되며, 이때 NDRG3 단백질 및 mRNA의 발현은 HIF 활성화에 직접적으로 영향을 받지 않음을 확인하였고, 따라서 NDRG3이 HIF-비의존적으로 지속된 저산소 반응에 있어서 주요한 기능을 가짐을 확인하였다.

[244]

[245] <실시예 6> 지속적인 저산소 반응의 조절자로서 NDRG3 확인

[246] <6-1> 저산소 상태에서 NDRG3의 기능 확인

[247] 저산소 반응에 있어서 NDRG3의 기능을 확인하기 위하여, NDRG3의 발현이 억제된 세포를 이용하여 마이크로어레이-기반 트랜스크립톰 데이터(microarray-based transcriptome data)의 GAzer(Gene Set Analyzer)를 통한 유전자 발현 프로파일링(profiling)을 수행하였다.

[248] 구체적으로, shNDRG3 및 shHIF-1 α 를 이용하여 상기 실시예 <4-4> 및 실시예 <5-4>에 기재된 방법으로 NDRG3 또는 HIF-1 α 의 발현이 억제된 Huh-7 세포를 제작한 후, 상기 실시예 <5-2>와 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 시간별로 유지 배양하고 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기 회수한 세포로부터 전체 RNA를 RNA 분리 키트(RNeasy midi-prep, Qiagen)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 분리하였다. 그 다음, 마이크로어레이(microarray) 분석을 위하여 상기 분리한 전체 RNA 200 ng을 Illumina TotalPrep™ RNA 증폭 키트를 이용하여 증폭한 후, 증폭된 cRNA 700 ng을 HumanHT-12 v3/v4 발현 비드칩(Expression BeadChip)을 이용하여 16시간 동안 58 °C에서 혼성화하였다. 세척 및 염색 후, 비드칩을 일루미나 비드어레이 리더(Illumina BeadArray Reader) 및 비드 스캔(Bead Scan) 소프트웨어(Illumina)를 이용하여 스캐닝하였다. 발현된 유전자는 GO(gene ontology) 분석을 이용하여 기능별로 구분하였다(Ashburner, M. et al., Nat. Genet., 2000(25), 25-29). 이 과정에서, Z 점수(표준값) 변환은 각각의 유전자 그룹화에 의한 표준화된 편차 점수를 계산하기 위하여 사용되었다. Z 점수 값은 GO 생물학적 과정의 활성을 가리킨다(도 12a).

- [249] 또한, 상기 <실시예 3>과 같이 NDRG3(N66D) 변이체를 HeLa 세포에 형질전환한 후, 대조군 보다 1.5배 이상의 발현 증가를 나타내는 136개의 유전자, 정상산소 상태보다 저산소 상태에서 1.5배 이상의 발현 증가를 보이는 1535개 유전자, 그리고 NDRG3(N66D) 변이체의 과발현과 저산소 상태에서 공통적으로 증가되는 유전자 68개를 선발하고, 상기 선발된 유전자들의 기능을 조사하기 위해 GAZER(Gene Set Analyzer)분석을 통해 기능별로 분류한 생물학적 온톨로지의 Z 점수(표준값)를 다이어그램으로 나타내었다(도 12b).
- [250] 그 결과, 도 12a에 나타낸 바와 같이, NDRG3 결실은 통계학적으로 24시간 저산소 상태 하에 기능적 유전자 그룹에서 중요한 발현 변화가 나타나는 것을 확인하였고, NDRG3 결실에 의해 가장 많이 영향을 받은 저산소증 기능이 혈관생성(angiogenesis) 및 세포 증식(proliferation)임을 확인하였고, 반면 해당과정(glycolysis)은 가장 관련이 적은 기능 중 하나임을 확인하였다. 반대로, HIF-1 α 의 경우, 저산소증 기능 중 가장 관련성이 높은 기능이 해당과정인 반면, 혈관생성 및 세포증식은 관련성이 적음을 확인하였다(도 12a).
- [251] 또한, 도 12b에 나타낸 바와 같이, 정상 산소 상태에서 PHD2의 도킹 부위를 돌연변이한 NDRG3 N66D 변이체를 과발현시킨 경우, 혈관생성>세포증식>세포성장>세포사멸(apoptosis)>세포이동(cell migration)>해당과정 순으로 상향조절이 이루어짐을 확인하였다(도 12b). 따라서, 상기 결과를 통해 NDRG3이 저산소증 반응에 있어서 중요한 기능을 가짐을 확인하였다.
- [252]
- [253] <6-2> 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 혈관생성 촉진 확인
- [254] 상기 <6-1>의 분석으로 확인한 저산소증에서 NDRG3의 관련성이 높은 기능 중 혈관생성에 있어서 NDRG3의 영향을 확인하기 위하여, NDRG3 발현이 억제된 세포를 이용하여 튜브 형성 분석법(tube forming assay), RT-PCR, 웨스턴 블롯팅 및 생체 내 혈관생성 분석법(in-vivo angiogenesis assay)을 수행하였다.
- [255] 구체적으로, NDRG3 결실에 의한 혈관생성 활성 변화를 확인하기 위하여 튜브 형성 분석법을 수행하였다. 먼저, 상기 실시예 <4-4>에 기재된 방법으로 shNDRG3을 이용하여 NDRG3의 발현이 억제된 Huh-7 (2×10^5 세포/ml) 및 대조군 Huh-7 세포를 저산소 상태(1 % O₂)하에서 24시간 동안 배양한 다음 배양액 (1 ml)을 회수하여 HUVEC(human umbilical vein endothelial cells) (1×10^5 세포/ml) 세포 와 함께 미리 매트릭셀(Matrigel)로 코팅한 6-웰 디쉬에서 6-12 시간동안 배양하여 튜브 형성을 관찰하였다(도 13a).
- [256] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3 결실로 인한 신생혈관생성 마커인 IL8, IL1 α 및 IL1 β COX-2 및 PAI-1의 발현을 확인하기 위하여 상기 실시예 <6-1>에 기재된 방법으로 획득한 NDRG3 결실 Huh-7 세포 및 대조군 Huh-7 세포를 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 또는 저산소 상태 (1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후 세포를 회수하였다. 또한, 상기 실시예 <4-3>에 기재된 방법으로

제작한 NDRG3(N66D) 변이체를 상기 <실시예 3>과 같이 HeLa 세포에 형질전환하고 정상 산소 상태 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기 실시예 <4-4>에 기재된 방법으로 전체 RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하였다. 또한, 상기 각각의 세포 일부를 항-NDRG3 항체를 이용하여 상기 <실시예 3>과 같이 웨스턴 블롯팅을 수행하여 NDRG3의 발현을 확인하였다(도 13b).

[257] 또한, NDRG3 결실에 의한 생체내 혈관생성 분석을 위하여 매트릭셀 플러그 분석법(matrigel plug assay)을 수행하였다. 먼저, 차가운 매트릭셀(BD Biosciences)을 상기 실시예 <6-1>에 기재된 방법으로 획득한 NDRG3 결실 Huh-7 세포(1×10^6 세포/ml) 및 대조군 Huh-7 세포(1×10^6 세포/ml)와 혼합하였다. 그 다음, 상기 혼합된 매트릭셀 500 μ l를 6주된 암컷 BALB/c 마우스(Japan SLC)의 복부 부위로 피하주입하였다. 7일 후, 상기 마우스를 희생하고 매트릭셀 플러그를 획득한 후, 헤모글로빈 정량을 위하여(hemoglobin quantification) 얼음통 안에서 500 μ l 물로 균질화하고 4°C에서 15분 동안 12,000 rpm으로 원심분리하여 세척하였다. 그 다음, 상층액만 분리한 후, Drabkin's 시약(Sigma)을 이용하여 제조사의 절차에 따라 반응시키고 흡광광도계로 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 그래프화하였다(도 13c).

[258] 그 결과, 도 13a 및 도 13b에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 하에서 NDRG3 발현이 억제된 세포의 경우 대조군에 비해 튜브 형성이 감소하는 것을 확인함으로써, NDRG3 결실이 저산소 반응으로 유도된 혈관생성 활성을 억제함을 확인하였다(도 13a). 또한, 저산소 상태에 있는 NDRG3 결실된 세포(도 13b, 왼쪽)에서는 신생혈관생성의 표지 인자인 IL8, IL1 α 및 IL1 β COX-2 및 PAI-1 mRNA의 발현이 현저하게 감소하는 반면, PHD2 결합 부위가 돌연변이된 NDRG3(N66D) 변이체가 과발현된 세포(도 13b, 오른쪽)에서 상기 인자의 mRNA 발현이 증가하는 것으로 확인함으로써, 저산소증 반응에서 NDRG3에 의해 신생혈관생성 인자의 발현이 증가하여 혈관생성을 활성이 촉진됨을 확인하였다(도 13a 및 도 13b).

[259] 또한, 도 13c에 나타낸 바와 같이, NDRG3의 발현이 억제된 세포를 이식한 마우스에서 헤모글로빈 농도가 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 결과와 동일하게 생체 내에서 NDRG3에 의해 혈관생성이 촉진됨을 확인하였다(도 13c).

[260]

[261] <6-3> 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 세포증식 촉진 확인

[262] 상기 <6-1>의 분석으로 확인한 저산소증에서 NDRG3의 관련성이 높은 기능 중 세포증식에 있어서 NDRG3의 영향을 확인하기 위하여, MTT 분석법을 수행하여 세포성장을 분석하고, 생체내(in vivo) 이식한 종양 부피를 측정하고, 면역형광염색법, 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR을 수행하였다.

[263] 구체적으로, NDRG3 결실에 의한 세포성장을 확인하기 위하여 MTT 분석법을 수행하였다. 먼저, 상기 실시예 <6-1>에 기재된 방법으로 획득한 NDRG3 결실

Huh-1 세포 및 대조군 Huh-1 세포를 2,000 세포/웰의 개수로 96-웰(well) 플레이트(plaste)에 분주하고 37°C, 5 % CO₂ 배양기, 저산소 상태(3 % O₂)에서 시간별로 배양하였다. 그 다음, PBS로 희석한 1 mg/ MTT 용액을 처리하여 2시간 동안 반응한 후, 상기 MTT가 포함된 배지를 제거하고 MTT 포르마잔 크리스탈(formazan crystal)을 용해하기 위하여 100 DMSO를 처리하였다. 그 다음, 흡광광도계로 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(도 14a).

[264] 또한, NDRG3 및 HIF 결실에 따른 종양 형성 정도를 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-4> 및 <5-4>에 기재된 방법으로 제작한 NDRG3, HIF-1 α , HIF-2 α , NDRG3 및 HIF-1 α , 또는 NDRG3 및 HIF-2 α 발현이 억제된 Huh-7 세포(2×10^6 세포/100) 각각을 6 주된 암컷 BALB/c 마우스 옆구리의 피하에 투여하였다(도 14b). 또한, 상기 실시예 <4-3>에 기재된 방법으로 제작한 NDRG3(N66D) 변이체를 상기 <실시예 3>과 같이 형질전환한 Huh-1 세포(2×10^6 세포/100 μ l)를 상기와 같이 마우스 옆구리의 피하에 투여하였다(도 14c). 그 다음, 투여 후 16일, 20일 뒤 종양의 크기를 각각 비교하기 위해 이미지화하였다(도 14b 및 도 14c).

[265] 또한, 상기 NDRG3, HIF-1 α , HIF-2 α , NDRG3 및 HIF-1 α , 또는 NDRG3 및 HIF-2 α 발현이 억제된 Huh-7 세포를 이식한 마우스(도 14d) 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체가 과발현된 Huh-1 세포를 이식한 마우스(도 14e)에서 이식 후 주어진 시간에 캘리퍼(caliper)를 이용하여 종양의 부피를 측정하였다. 종양의 부피는 길이(a), 넓이(b) 및 높이(c)를 측정하여 하기 수학식 1과 같이 계산하여 그래프화하였다(도 14d 및 도 14e).

[266] [수학식 1]

[267] 종양부피 = 종양길이(a)×종양넓이(b)×종양높이(c)/2

[268]

[269] 또한, 상기 NDRG3, HIF-1 α 및 HIF-2 α 발현이 억제된 Huh-7 세포(2×10^6 세포/100)를 이식한 마우스의 종양 조직을 적출한 후, 상온에서 10 % 포르말린(formaline)으로 하루동안 고정하였다. 그 다음, 파라핀(paraffin)을 처리하고 4 섹션화하였다. 그 다음, 상온에서 5분 동안 0.3 % TritonX-100/PBS로 침투화하고 차단 용액(1 % BSA가 포함된 PBS)으로 30분 동안 배양한 후, 상기 실시예 <5-1>에 기재된 방법으로 일차 항체로 세포 증식 바이오마커인 Ki67 확인을 위한 항-ki67 항체 및 항-NDRG3으로 반응하고, 이차 항체[Alexa Flour 488-접합된 고트(goat) 항-레빗 IgG (1/1,000), 또는 Alexa Flour 594- 접합된 고트 항-마우스 IgG (1/1,000)] 및 DAPI로 반응 후 Zeiss LSM 510 공초점 현미경을 이용하여 시각화하였다(도 14f).

[270] 또한, 상기 NDRG3, HIF-1 α 및 HIF-2 α 발현이 억제된 Huh-7 세포(2×10^6 세포/100 μ l)를 이식한 마우스의 종양 조직을 적출한 후 액체질소로 동결하였다. 그 다음, 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 RT-PCR을 수행하여 mRNA의 발현을 확인하고, 상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 항-NDRG3 및 항- β 액틴 항체로 웨스턴 블롯팅을 수행하여 단백질의 발현을 확인하였다(도 14g).

- [271] 그 결과, 도 14a에 나타낸 바와 같이, 가벼운 저산소 상태에서 NDRG3이 결실된 세포의 경우 대조군에 비해 시간이 경과함에 따라 세포 성장이 감소하는 것을 확인하였다(도 14a).
- [272] 또한, 도 14b 내지 도 14e에 나타낸 바와 같이, NDRG3 발현이 억제된 세포를 이식한 마우스의 종양 크기가 대조군 및 HIF 발현이 억제된 세포를 이식한 마우스에 비해 시간이 경과함에 따라 억제되고, 특히, NDRG3 및 HIF-1 α 또는 -2 α 의 동시 결실된 세포를 이식한 마우스의 경우 종양이 생성되지 않는 것을 확인하였다(도 14b 및 도 14d). 반면, PHD2의 도킹 부위가 돌연변이된 NDRG3(N66D) 변이체를 과발현한 세포를 이식한 마우스의 종양 크기는 대조군에 비해 현저히 증가하고, 특히 이식 후 20일까지 대조군의 경우 종양이 형성되지 않는 반면 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 세포 이식 마우스의 경우 약 900 mm³까지 종양 크기가 증가하는 것을 확인함으로써, NDRG3(N66D) 변이체에 의해 종양 성장이 촉진됨을 확인하였다(도 14b 내지 도 14e).
- [273] 또한, 도 14f 및 도 14g에 나타낸 바와 같이, NDRG3 결실 세포 이식 마우스의 종양 조직의 경우 세포 증식 마커인 Ki-67의 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다(도 14f). 또한, NDRG3 결실 세포 이식 마우스의 종양 조직에서 종양 혈관생성 마커인 IL8 및 CD31의 단백질 및 mRNA 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 14f 및 도 14g). 따라서, 상기 <실시예 6>의 결과들을 통해 NDRG3이 지속적인 저산소 상태에서 혈관생성 및 세포증식을 촉진하는데 중요한 역할을 함을 확인하였다.
- [274]
- [275] <실시예 7> NDRG3-매개된 저산소 반응에서 L-젖산(L-Lactate) 생성과 외인성 L-젖산 처리에 의한 영향 확인 및 NDRG3 측정을 통한 L-젖산의 정량
- [276] <7-1> 저산소 상태에서 NDRG3 단백질 축적 및 젖산 생성 확인
- [277] 상기 실시예 <5-2>를 통해 확인한 장기 유도기(long lag periods)의 NDRG3 단백질 축적 및 분해는 NDRG3의 저산소성 발현 조절에 있어서 여러 단계가 관여함을 나타낸다. 따라서, 저산소증과 관련된 생화학적 특징 및 NDRG3의 관련성을 확인하기 위하여, 저산소 상태에서 젖산 생성 측정, 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR을 수행하고, NDRG3의 유비퀴틴화를 확인하기 위하여 시험관내(in-vitro) 유비퀴틴 분석법을 수행하였다.
- [278] 구체적으로, MCF-7 세포를 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양하거나 또는 저산소 상태(1 % O₂)에서 시간별로 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수하여 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물을 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, EnzyChrom™ L-젖산 분석법 키트(BioAssay Systems)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 L-젖산(L-Lactate) 생성을 측정하여 그래프화하였다. 값은 L-젖산 표준 곡선으로 정규화하였고, 이를 통하여 세포내 NDRG3 단백질 발현양에 따른 젖산 함량을 산출할 수 있음을 확인하였다(도

15a).

- [279] 또한, L-젖산 생성 억제제가 NDRG3 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MCF-7 세포에 LDHA(lactate dehydrogenase A) 억제제인 소듐 옥사메이트(sodium oxamate)를 농도별로 처리하고 상기 실시예 <5-2>와 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수하여 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, L-젖산(L-Lactate) 생성을 측정하여 그래프화하였다. 값은 L-젖산 표준 곡선으로 정규화하였고, 이를 통하여 세포내 NDRG3 단백질 발현양에 따른 젖산 함량을 산출할 수 있음을 확인하였다(도 15b).
- [280] 또한, L-젖산 생성 억제제가 NDRG3 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 siLDHA(siGENOME SMARTpool, Dharmacon) 또는 siMCT4(siGENOME SMARTpool, Dharmacon)를 LDHA 또는 젖산 수출(export)에 관여하는 모노카복실레이트 수송체(monocarboxylate transpporter)인 MCT4가 결실된 MCF-7 세포를 제작한 후, 상기 실시예 <5-2>와 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양하고, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수하여 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, L-젖산(L-Lactate) 생성을 측정하여 그래프화하였다(도 15c). 또한, LDHA 및 MCT4 결실을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>와 같이 RT-PCR을 수행하였다(도 15c).
- [281] 또한, 해당과정 억제제가 NDRG3 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MCF-7 세포에 해당과정을 억제하는 2-데옥시글루코스(2-deoxyglucose, 2-DG)를 농도별로 처리하고 상기 실시예 <5-2>와 같이 저산소 상태(1 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고 항-NDRG3 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 15d).
- [282] 또한, 과다한 젖산 생성에 의한 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 Flag-태그된 LDHA 발현 벡터를 제작한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 HeLa 세포에 형질전환하고 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에 24시간 동안 유지 배양하였다. 그 다음, 추가적으로 피루베이트(pyruvate) 50 mM을 처리하고 가벼운 저산소 상태(3 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 세포를 회수 및 용해하고 항-NDRG3, 항-Flag 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 15e).
- [283] 또한, 외인성으로 처리된 젖산에 의한 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 siLDHA(siGENOME SMARTpool, Dharmacon)를 이용하여 LDHA가 결실된 Huh-1 세포를 제작한 후 L-젖산을 농도별로 처리한 뒤 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21% O₂), 저산소 상태(1% O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α , 항-LDHA 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, NDRG3 단백질과 HIF-1 α

단백질의 발현을 확인하였다(도 24). 또한 NDRG3 mRNA에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>와 같이 RT-PCR을 수행하였다(도 24).

- [284] 또한, 옥사메이트를 처리하여 세포내 젖산을 제거한 후 외인성 젖산 처리에 의한 NDRG3 단백질의 발현을 파악하기 위하여 Huh-1 세포에 소듐 옥사메이트를 처리한 뒤 L-젖산을 농도별로 처리하고 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21% O₂), 저산소 상태(1% O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, NDRG3 단백질과 HIF-1 α 단백질의 발현을 확인하였다(도 25).
- [285] 또한, 외인성 젖산 처리에 의한 작용이 젖산의 세포내 유입을 차단할 경우에도 유지되는지 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 siMCT(siGENOME SMARTpool, Dharmacon)를 이용하여 젖산 유입에 관여하는 MCT(monocarboxylate transporter) 1을 억제한 Huh-1세포를 제작한 후 L-젖산을 처리한 뒤 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21% O₂), 저산소 상태(1% O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, NDRG3 단백질과 HIF-1 α 단백질의 발현을 확인하였다(도 26).
- [286] 또한, MCT(monocarboxylate transporter) 1의 억제에 의한 효과를 명확히 하기 위하여 상기와 같이 MCT 1을 억제한 Huh-1세포를 제작한 후 포도당 결핍 또는 옥사메이트 처리하여 세포내 젖산을 제거한 후 외인성으로 L-젖산을 처리한 뒤 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21% O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기와 같이 항-NDRG3, 항-HIF-1 α 및 항- β -액틴을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고, NDRG3 단백질과 HIF-1 α 단백질의 발현을 확인하였다(도 27).
- [287] 또한, 젖산 생성이 NDRG3의 유비퀴틴화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시험관내 유비퀴틴 분석법을 수행하였다. 먼저, Flag-태그된 PHD2 및 HA-태그된 VHL을 상기 <실시예 3>과 같이 HEK293T 세포에 형질전환한 후, 세포를 회수하여 용해하였다. 그 다음, 단백질 용해물(500 μ g)을 항-HA 친화겔(Sigma) 또는 항-Flag 친화겔 (Sigma)를 이용하여 4°C에서 하루동안 반응하고 원심분리하여 재조합 PHD2 단백질들 또는 VHL 단백질들을 획득하였다. 그 다음, L-젖산(pH 7.0, 20 mM)을 처리 또는 무처리하고, 상기 재조합 PHD2/VHL-결합 단백질들, 상기 실시예 <4-1>에 기재된 방법으로 획득한 재조합 인간 NDRG3-GST(4 μ g), 500 ng 유비퀴틴-활성 효소(ubiquitin-activating enzyme; E1, Upstate), 1 유비퀴틴-접합 효소(ubiquitin-conjugating enzyme; E2(UbcH5a), Upstate), 2.5 μ g 유비퀴틴-Flag (Sigma), 20 mM HEPES (pH 7.3), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 및 2 mM ATP가 포함된 50 μ l 용액으로 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 상기 혼합물을 GST-결합 아가로오스 레진으로 4°C에서

4시간 동안 배양한 후, 침전물을 세척하고 상기 <실시예3>과 같이 항-Flag을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 15f).

[288] 그 결과, 도 15a 및 15b에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 초기단계에서 HIF-1 α 단백질의 발현이 현저하게 증가한 후 감소하지만 젖산 생성 및 NDRG3 단백질의 축적은 저산소 상태가 지속될수록 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(도 15a). 반대로, 소듐 옥사메이트를 처리하여 젖산 생성을 억제한 경우, NDRG3 단백질 축적이 젖산의 발현과 비례하게 억제되는 것을 확인함으로써(도 15b), 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 발현은 젖산 생성과 관련이 있음을 확인하였다(도 15a 및 도 15b).

[289] 또한, 도 15c 내지 도 15e에 나타낸 바와 같이, LDHA 결실 또는 2-데옥시글루코오스 처리를 통해 해당과정을 억제하여 젖산 생성이 억제된 경우, 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 발현이 감소하는 반면, MCT4 결실, 또는 LDHA 과발현 및/또는 피루베이트 포함 배지 공급을 통해 젖산이 증가될 경우, 저산소 상태에서 NDRG3 단백질의 축적이 증가하는 것을 확인함으로써, HIF 단백질의 저산성 유도과 달리, NDRG3 단백질 축적에 있어서 산소 결핍뿐만 아니라 해당화 젖산(glycolytic lactate) 생산이 추가적으로 요구됨을 확인하였다(도 15c 내지 도 15e).

[290] 또한, 도 24 내지 도 27에 나타낸 바와 같이, Huh-1 세포에 외인성으로 처리된 젖산이, LDHA결실로 발현이 감소되었던 NDRG3를 용량의존적으로 회복시켰고, HIF-1 α 단백질의 수준에는 영향을 미치지 않았으며(도 24), 이는 옥사메이트 처리(도 25)로 젖산생성을 억제한 경우에도 유사한 결과가 나타남을 확인하였다. 그러나 MCT1(세포외 젖산을 세포내로 수송하는 역할을 하는 monocarboxylate transporter)을 표적으로 하는 siRNA에 의해, 젖산 매개에 의한 NDRG3 발현의 회복효과는 없어졌고 이는 정상산소 조건이든 저산소 조건이든 무관하였으며(도 26), MCT1을 킥다운(knockdown)시킨 Huh-1 세포에 포도당 결핍 또는 옥사메이트 처리한 경우에도 유사한 효과가 나타남을 확인하였다(도 27).

[291] 또한, 도 15f에 나타낸 바와 같이, 젖산을 처리한 경우 PHD2/VHL 복합체에 의한 재조합 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화가 감소되는 것을 확인함으로써, 저산소 상태 하에 젖산 생성으로 NDRG3 단백질의 유비퀴틴화가 억제되고 세포내에서 축적됨을 확인하였다(도 15f).

[292]

[293] <7-2> 저산소 상태에서 NDRG3 및 젖산의 결합 확인

[294] 산소 상태에 따른 젖산 및 NDRG3 단백질의 상호작용을 확인하기 위하여, NDRG3 재조합 단백질 및 부위-지정 돌연변이를 이용하여 NDRG3 변이체 재조합 단백질을 제작하고 이를 이용하여 시험관내(in-vitro) 결합 분석법(binding assay), 면역염색 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[295] 구체적으로, L-젖산 및 NDRG3 단백질의 상호작용을 확인하기 위하여 상기

실시에 <4-1>에 기재된 방법으로 클로닝한 pGEX-4T-2-NDRG3을 주형으로 하기 표 4의 프라이머를 이용하여 상기 실시에 <4-3>과 같이 부위-지정 돌연변이를 수행하여 NDRG3의 L-젖산 결합부위 중 138번째 아미노산인 글리신(Glycine, G)을 트립토판(Tryptophan, W)으로 치환된 pGEX-4T-2-NDRG3(G138W) 변이체 컨스트럭트를 획득하였다. 그 다음, 상기 제조된 재조합 단백질의 발현을 위하여, 상기 재조합 플라스미드 pGEX-4T-2-NDRG3 야생형 및 -NDRG3(G138W)를 대장균 균주 BL21에 형질전환하고, 상기 <실시에 2>와 같이 GST-결합 아가로오스 레진을 이용하여 정제하였다. 그 다음, 상기 <실시에 3>과 같이 9 % SDS-PAGE로 전기영동한 후, 쿠마쉬 브릴리언트 블루로 염색하여 검출을 확인하고, 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위하여 항-GST 및 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 16a).

[296] [표4]

프라이머		서열
NDRG3(G138W)	센스	GTTTGGGCTGGAGCTTACATCCTCAGC(서열번호 25)
	안티센스	TCCAATTCCAATGATGCTTTTCAGGCT(서열번호 26)

[297]

[298] 또한, L-젖산 및 NDRG3 단백질의 상호작용을 확인하기 위하여 시험관내 결합 분석법을 수행하였다. GST 또는 상기 GST-NDRG3 재조합 단백질(50 μ g)을 30°C에서 1시간 동안 비표지된 L-젖산(pH 7.0, Sigma) 및 L-[¹⁴C]-젖산(PerkinElmer) 0.5 μ Ci와 함께 반응시켰다. 그 다음, GST-결합 아가로오스 레진을 첨가하여 4시간 동안 반응한 후 상기 반응 혼합물에서 NDRG3-GST 단백질이 결합된 레진을 획득한 후, PBS로 불순물을 제거한 다음, 상기 NDRG3 결합된 아가로오스 레진을 2 ml LSC-각테일(PerkinElmer)이 포함된 섬광 용액으로 옮기어 ¹⁴C 값을 측정하여 그래프화하였다(도 16b, 왼쪽). 또한, GST, 상기 GST-NDRG3 재조합 단백질(50 μ g) 또는 상기 GST-NDRG3(G138W) 변이체 재조합 단백질(50 μ g)을 30°C에서 1시간 동안 L-[¹⁴C]-젖산(PerkinElmer) 0.5 μ Ci과 반응한 후, 상기과 동일한 방법으로 ¹⁴C 값을 측정하여 그래프화하였다(도 16b, 오른쪽).

[299] 또한, 저산소 상태에서 L-젖산 및 NDRG3 단백질의 결합부위와의 상호작용을 확인하기 위하여 NDRG3 변이체를 제작하였다. 먼저, Myc-태그된 NDRG3 발현 벡터를 주형으로 상기 실시에 <4-3>과 같이 부위-지정 돌연변이를 수행하여 NDRG3의 L-젖산 결합부위 중 62번째 아미노산인 아스파르트산(Asp, D)을 류신(Leu, L)으로 치환한 Myc-NDRG3(D62L) 변이체, NDRG3의 L-젖산 결합부위 중 138번째 아미노산인 글리신(G)을 아르기닌(Arg, R)으로 치환한

Myc-NDRG3(G138W) 변이체, NDRG3의 L-젖산 결합부위 중 139번째 아미노산인 알라닌(Ala, A)을 글루탐산(Glu, E)으로 치환한 Myc-NDRG3(A139E) 변이체 및 NDRG3의 L-젖산 결합부위 중 229번째 아미노산인 타이로신(Tyr, Y)을 프롤린(Pro, P)으로 치환한 Myc-NDRG3(Y229P) 변이체를 획득하였다. 그 다음, 상기 Myc-NDRG3 및 Myc-NDRG3 변이체 각각을 HEK293T 세포에 상기 <실시예 3>과 같이 형질전환한 후, 상기 실시예 <5-2>와 같이 정상 산소 상태(21 % O₂), 저산소 상태(1 % O₂), 또는 20 μM MG132 처리 후 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물을 항-Myc 및 항-β액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 16c).

[300] 또한, 저산소 상태에서 정상 산소 상태로 회복될 때 NDRG3 단백질의 발현을 확인하기 위하여 MCF-7 세포를 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 새로운 배지로 교체하고 추가적으로 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 시간별로 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물을 항-NDRG3, 항-HIF-1α 및 항-β-액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 16d).

[301] 그 결과, 도 16a 내지 16c에 나타낸 바와 같이, NDRG3 및 NDRG3의 젖산 결합 부위가 돌연변이된 NDRG3(G138W) 변이체의 재조합 단백질의 발현을 확인하였고(도 16a), 시험관 내에서 NDRG3 재조합 단백질의 경우 젖산과의 결합이 증가하고(도 16b, 왼쪽), NDRG3 변이체의 경우 젖산-결합력이 감소하는 것을 확인하였다(도 16b, 오른쪽). 또한, 저산소 상태에서 정상적인 NDRG3는 단백질의 축적이 증가하는 반면, NDRG3의 젖산 결합 부위를 돌연변이한 변이체 모두 저산소 상태에서 단백질 축적이 감소하는 것을 확인함으로써(도 16c), 저산소 상태에서 NDRG3이 젖산과 결합하고, 이는 NDRG3 단백질의 축적과 관련이 있음을 확인하였다(도 16a 내지 도 16c).

[302] 또한, 도 16d에 나타낸 바와 같이, HIF-1α 단백질은 재산소화(reoxygenation)되면 빠르게 제거되지만, 반면 저산소 상태에서 NDRG3 젖산 복합체를 이루어 축적된 NDRG3 단백질은 정상 산소 상태로 회복되어도 세포에서 안정하게 유지되는 것을 확인하였다(도 16d). 따라서, 상기 <실시예 7>의 결과들을 통해 저산소-유도된 젖산이 지속적인 저산소 반응에 있어서 NDRG3의 센서로 작용하여 NDRG3에 의한 HIF-비의존적 생물학적 반응이 촉진됨을 확인하였다.

[303]

[304] <실시예 8> 저산소 반응에서 젖산-의존적 NDRG3의 기능 확인

[305] <8-1> 저산소 반응에서 NDRG3에 의한 젖산-의존적 세포성장 촉진 확인

[306] 저산소 상태에서 젖산-의존적 세포성장에 있어서 NDRG3이 미치는 영향을 확인하기 위하여, NDRG3 변이체 및 젖산 생성이 억제된 세포를 이용하여 MTT 분석법, 콜로니 형성 분석법(colony forming assay) 및 생체내(in vivo) 이식한

종양의 부피를 측정을 수행하였다.

- [307] 구체적으로, 젖산 생성 억제 후 이소성(ectopic) 변이체 NDRG3(N66D)가 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-3>과 같이 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 발현 벡터를 Huh-1 세포에 형질전환한 후, 96-웰 플레이트에 Huh-1 세포 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포 1,000 세포/웰로 배양하고, 농도별로 소듐 옥사메이트를 처리하고 가벼운 저산소 상태(3 % O₂) 하에서 시간별로 유지 배양하였다. 그 다음, 세포 성장을 확인하기 위하여 상기 실시예 <6-3>과 같이 MTT 분석법을 수행하여 그래프화하였다(도 17a).
- [308] 또한, 젖산 생성 억제 후 이소성 변이체 NDRG3(N66D)가 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 콜로니 형성 분석법을 수행하였다. 6-웰 플레이트에 Huh-1 세포 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포 0.5×10⁴ 세포/2 ml로 접종한 후, 소듐 옥사메이트 40 mM을 처리 또는 무처리하고 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 3일 마다 새로운 배지로 희석하면서 10일 동안 배양하였다. 배양 10일 후 형성된 콜로니를 확인하여 100 % 메틸 알코올(methyl alcohol)로 고정한 다음, 30 % 김사 염색 용액(giemsa stain solution; Sigma)으로 염색하여 계수하였다(도 17b).
- [309] 또한, 저산소 상태에서 LDHA 결실에 의한 젖산 생성 억제 후 이소성 변이체 NDRG3(N66D)가 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT 분석법을 수행하였다. 먼저, 상기 실시예 <4-4>에 기재된 방법으로 LDHA가 결실된 Huh-1 세포를 제작한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 NDRG3(N66D) 변이체 발현벡터로 형질전환하여, LDHA 결실 및 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포를 획득하였다. 그 다음, 대조군 GFP 결실 Huh-1 세포, 상기 LDHA 결실 Huh-1 세포 및 상기 LDHA 결실/NDRG3(N66D) 과발현 Huh-1 세포를 96-웰 플레이트에 1,000 세포/웰로 배양하고, 가벼운 저산소 상태(3 % O₂) 하에서 시간별로 유지 배양하였다. 그 다음, 세포 성장을 확인하기 위하여 상기 실시예 <6-3>과 같이 MTT 분석법을 수행하여 그래프화하였다(도 17c).
- [310] 또한, 생체 내에서 LDHA 결실에 의한 젖산 생성 억제 후 이소성 변이체 NDRG3(N66D)가 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 마우스에 종양세포를 이식 후 종양 부피를 측정하였다. 상기 대조군 GFP 결실 Huh-1 세포, 상기 LDHA 결실 Huh-1 세포 및 상기 LDHA 결실/NDRG3(N66D) 과발현 Huh-1 세포를 상기 실시예 <6-3>에 기재된 방법으로 BALB/c 마우스에 이식한 후, 주어진 시간에 캘리퍼를 이용하여 종양부피를 측정하여 그래프화하였다(도 17d).
- [311] 또한, 지속적인 저산소 상태에서 젖산 생성 억제가 이소성 변이체 NDRG3(N66D) 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Huh-1 세포 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포에 소듐 옥사메이트 40 mM을 처리 또는 무처리하고 가벼운 저산소 상태 하에서 시간별로 유지 배양한 후 상기

<실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 상기 세포 용해물을 항-NDRG3 및 항- β 액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 17e).

[312] 또한, 지속적인 저산소 상태에서 젖산 생성에 있어서 이소성 변이체 NDRG3(N66D)의 영향을 확인하기 위하여 상기와 같이 소듐 옥사메이트를 처리 또는 무처리하고 가벼운 저산소 상태 하에서 시간별로 유지 배양한 Huh-1 세포 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포를 회수하여 상기 실시예 <7-1>에 기재된 방법으로 L-젖산(L-Lactate) 생성을 측정하여 그래프화하였다. 값은 L-젖산 표준 곡선으로 정규화하였다(도 17f).

[313] 그 결과, 도 17a 내지 17d에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태에서 소듐 옥사메이트를 처리한 경우 농도 의존적으로 세포 성장이 억제되는 반면, NDRG3의 이소성 변이체가 과발현된 경우 저산소 상태에서 소듐 옥사메이트를 처리하여도 세포 성장이 증가하는 것을 확인하였다(도 17a). 정상 산소 상태에서도 젖산 생성이 억제되어도 NDRG3 이소성 변이체가 과발현된 경우 저산소 상태와 마찬가지로 종양 성장이 촉진되는 것을 확인하였다(도 17b). 또한, LDHA 결실을 통해 젖산 생성을 저해한 경우 시험관 내에서 및 생체 내에서 종양 성장이 억제되는 반면, LDHA가 결실되어도 NDRG3 이소성 변이체가 과발현된 경우에는 종양 성장이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(도 17c 및 17d).

[314] 또한, 도 17e 및 도 17f에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태에서 소듐 옥사메이트를 처리하여 젖산 생성을 억제한 경우 NDRG3의 축적이 억제되는 반면, NDRG3 이소성 변이체가 과발현된 경우 젖산 생성 억제에도 불구하고 NDRG3 변이체의 축적이 지속되는 것을 확인하였다(도 17e). 또한, 저산소 상태에서 소듐 옥사메이트를 처리한 경우 무처리한 경우 모두 NDRG3 이소성 변이체가 과발현되어도 젖산 생성에는 변화가 없는 것을 확인함으로써, NDRG3 이소성 변이체는 젖산 생산에 직접적인 효과가 없음을 확인하였다(도 17f). 따라서, 상기 결과를 통해 지속적인 저산소 상태에서 젖산-유도된 세포성장에 있어서 NDRG3이 중요한 매개자임을 확인하였다.

[315]

[316] <8-2> 저산소 반응에서 NDRG3에 의한 젖산-의존적 혈관생성 촉진 확인

[317] 저산소 상태에서 젖산-의존적 혈관생성에 있어서 NDRG3이 미치는 영향을 확인하기 위하여, NDRG3 변이체 이소성 변이체 과발현 세포를 이용하여 튜브 형성 분석법을 수행하였다.

[318] 구체적으로, NDRG3(N66D) 변이체가 과발현된 Huh-1 세포를 제작한 후, 대조군 세포 및 상기 NDRG3(N66D) 변이체 과발현 Huh-1 세포에 소듐 옥사메이트를 처리 또는 무처리하고 저산소 상태(1 % O_2) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후 상기 실시예 <6-2>와 같이 세포를 회수하여 튜브 형성 분석법을 수행하였다(도 18).

[319] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, 소듐 옥사메이트를 처리하여 젖산 생성을 억제한 경우 저산소 상태에서 혈관생성이 억제되는 반면, NDRG3 이소성

변이체가 과발현된 경우 젖산 생성을 억제하여도 저산소 상태에서 혈관생성이 다시 증가하는 것을 확인함으로써, NDRG3이 지속적인 저산소 상태에서 젖산-유도된 혈관생성에 중요한 매개자임을 확인하였다(도 18). 따라서, 상기 <실시예 8>의 결과를 통해 젖산은 저산소성 세포증식 및 혈관생성의 중요한 신호이며, NDRG3이 지속적인 저산소 상태에서 젖산-유도된 세포증식 및 혈관생성의 중요한 매개자로 작용함을 확인하였다.

[320]

[321] <실시예 9> NDRG3-매개된 저산소 반응의 분자적 조절 확인

[322] <9-1> 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 c-Raf-ERK 활성화 조절 확인

[323] 저산소 상태에서 젖산-유도된 분자적 반응에서 NDRG3의 역할을 확인하기 위하여, 시험관내 키나아제 분석법(in-vitro kinase assay), 폴-다운 분석법, 면역침전법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[324] 구체적으로, 상기 실시예 <4-4>에 기재된 방법으로 대조군 shGFP 또는 shNDRG3을 이용하여 GFP 또는 NDRG3 결실 PLC/PRF/5 세포를 제작한 후, 상기 세포를 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수하였다. 그 다음, 인간 인산화-키나아제 어레이 키트(Human Phospho-Kinase Array kit)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 인산화된 단백질을 확인하였다(도 19a).

[325] 또한, NDRG3의 발현 정도에 따른 분자적 조절 기능을 확인하기 위하여 Huh-1, Huh-7 및 786-O 세포를 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고, 항-NDRG3, 항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2 및 항-β액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19b).

[326] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3의 분자적 기능을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-4>에 기재된 방법으로 대조군 shGFP 또는 shNDRG3을 이용하여 GFP 또는 NDRG3 결실 SK-HEP-1 세포를 제작한 후, 상기 세포를 저산소 상태 하에서 시간별로 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고, 항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19c, 위). 또한, 상기 제작한 세포를 저산소 상태 하에서 24시간 동안 유지 배양하고 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고, 항-NDRG3, 항-인산화-c-Raf(S338), 항-c-Raf, 항-인산화-B-RAF1(S445), 항-B-RAF1, 항-인산화-A-RAF(S299), 항-A-RAF 및 항-β액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19c, 아래).

[327] 또한, 시험관 내에서 저산소 반응에 의한 NDRG3 및 c-Raf의 상호작용을 확인하기 위하여 먼저 c-Raf를 암호화하는 재조합 플라스미드 pET-28a-c-Raf 컨스트럭트를 클로닝하였다. 그 다음, 상기 실시예 <7-1>과 같이 상기 c-Raf 발현 벡터를 BL21 대장균 균주에 형질전환하여 재조합 단백질을 획득한 후, 상기 c-Raf 재조합 단백질은 Ni-NTA 아가로오스 레진을 이용하여 제조사의 절차에

따라 정제하였다. 그 다음, 상기 실시예 <4-1>과 같이 상기 정제된 재조합 단백질 c-Raf-His 및 NDRG3-GST를 Ni-NTA 아가로오스 레진과 함께 반응시켜 His 풀-다운을 수행한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19d, 왼쪽). 또한, Flag-태그된 c-Raf 발현 벡터를 클로닝한 후, 상기 Flag-태그된 c-Raf 벡터를 상기 <실시예 3>과 같이 HeLa 세포에 형질전환 하였다. 그 다음, 상기 Flag-c-Raf 과발현된 HeLa 세포를 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 항-FLAG M2 비드를 이용하여 면역침전하고 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19d, 오른쪽).

[328] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3의 분자적 기능을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>와 같이 4 종류의 siNDRG3(siGENOME SMARTpool, Dharmacon)(서열번호 5 내지 서열번호 8)를 이용하여 NDRG3의 발현이 억제된 SK-HEP-1 세포를 제작하고, Flag-태그된 c-Raf 발현 벡터를 이용하여 상기 <실시예 3>과 같이 형질전환하여 NDRG3 결실/c-Raf 과발현 세포를 획득하였다. 또한, Myc-태그된 NDRG3(N66D) 및 Flag-태그된 c-Raf 발현 벡터를 이용하여 상기 <실시예 3>과 같이 형질전환하여 NDRG3(N66D) 및 c-Raf 과발현 HEK293T 세포를 획득하였다. 그 다음, 상기 세포들을 정상 산소 상태(21 % O₂)에서 24시간 동안 유지 배양하고, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해한 후, 항-NDRG3, 항-인산화-c-Raf(S338), 항-c-Raf, 항-인산화-B-Raf1(S445), 항-B-Raf1, 항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2 및 항-β액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19e).

[329] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 인산화를 확인하기 위하여 [-32P]-ATP(PerkinElmer) 표지를 이용하여 시험관내 키나아제 분석법을 수행하였다. 먼저, 상기 <실시예 3>과 같이 Myc-태그된 NDRG3(N66D) 발현 벡터로 형질전환된 HEK293T 세포를 제작한 후, 항-Myc 친화 겔을 이용하여 NDRG3 단백질을 면역침전하였다. 그 다음, 방사선 표지를 위하여 상기 면역침전된 NDRG3 복합체에 하고 PKC 억제제인 PKC-1 5 μM을 처리 또는 무처리하고 40 μl 반응 버퍼[PKC 활성 버퍼 및 SignaTECT 단백질 키나아제 C 분석 키트(Promega)에 포함된 PKC 공동활성 버퍼, 10 μCi의 [-32P]-ATP, 및 2 μg의 정제된 c-Raf-GST 재조합 단백질]로 30°C에서 1시간 동안 반응하였다. 그 다음, 상기 반응 혼합물을 8 % SDS-PAGE로 전기영동하고 ³²P-표지된 c-Raf는 자가방사선법(autoradiography)으로 검출하였다(도 19f).

[330] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3-매개된 분자적 경로 활성화의 젯산 의존성을 확인하기 위하여 MCF-7 세포를 정상 상태(21 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하고, 및 상기 실시예 <7-1>에 기재된 방법으로 획득한 LDHA 발현 억제된 MCF-7 세포, 소듐 옥사메이트를 처리 또는 무처리한 세포를 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양하였다. 그 다음, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해한 후, 항-NDRG3, 항-인산화-c-Raf(S338), 항-c-Raf,

항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2 및 항- β 액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 19g).

[331] 그 결과, 도 19a 내지 도 19d에 나타낸 바와 같이, NDRG3이 결실된 경우 지속적인 저산소 상태에서 ERK1/2의 인산화가 감소하며(도 19a, 및 도 19c, 위), 정상 산소 상태에서 NDRG3 단백질의 발현이 서로 다른 여러 종류의 세포에서 NDRG3 단백질의 발현 정도에 비례적으로 ERK1/2의 인산화 수준이 차이가 남을 확인함으로써(도 19b), 지속적인 저산소 반응에서 NDRG3이 ERK1/2를 활성화함을 확인하였다. 또한, NDRG3이 결실된 경우 저산소 상태가 지속될수록 ERK1/2 인산화뿐만 아니라, c-Raf 및 B-RAF1의 인산화도 억제되고(도 19c, 아래), 시험관 내에서(19d, 왼쪽) 및 세포 내에서 저산소 반응으로(19d, 오른쪽) NDRG3과 c-Raf가 상호작용하는 것을 확인함으로써, NDRG3이 저산소 상태에서 ERK 및 c-Raf의 활성화에 관여함을 확인하였다(도 19a 내지 도 19d).

[332] 또한, 도 19e 및 도 19f에 나타낸 바와 같이, 이소성 변이체인 NDRG3(N66D)가 과발현된 경우 정상 산소 상태에서도 ERK1/2 및 c-Raf의 인산화가 유도되고(도 19e), 시험관 내에서도 NDRG3 이소성 변이체 분자적 복합체가 제조합 c-Raf 단백질의 인산화를 매개함을 확인하였다(도 19f).

[333] 또한, 도 19g에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태에서 젖산 생성을 억제한 경우 NDRG3 단백질의 발현도 억제되고, c-Raf-ERK 경로의 활성이 억제되는 것을 확인하였다(도 19g). 따라서, 상기 결과들을 통해 NDRG3이 저산소 반응에서 젖산에 의해 유도된 c-Raf-ERK 신호 활성의 필수 매개자로서 역할을 함을 확인하였다.

[334]

[335] <9-2> 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 키나아제 경로 조절 확인

[336] RACK1은 PKC에 대한 스캐폴드 단백질(scaffold protein)로서 활성화 형태변환(active conformation)을 유지하는 것으로 잘 알려져 있고(Lendahl, U. et al., Nat. Rev. Genet., 2009(10), 821-832), PKC는 c-Raf를 인산화하고 활성화하는 것으로 보고되고 있다(Epstein, A. C. et al., Cell, 2001(107), 43-54, Mahon, P. c. et al., Genes Dev, 2001(15), 2675-2686). 따라서, 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 키나아제 경로 활성화에 있어서 RACK1의 관련성을 확인하기 위하여, 면역침전법, 웨스턴 블롯팅을 수행하고, NDRG3과 키나아제 경로에 관여하는 단백질들 간의 복합체 형성을 확인하기 위하여 단백질 구조 모델링을 수행하였다.

[337] 구체적으로, NDRG3과 RACK1의 상호작용을 확인하기 위하여 NDRG3 및/또는 Flag-태그된 RACK1 발현 벡터를 상기 <실시예 3>과 같이 HeLa 세포에 형질전환하고 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서 20 μ M MG132를 8시간 동안 처리하여 배양한 후, 세포를 회수 및 용해하고, 항-FLAG M2 비드를 이용하여 면역침전하였다. 그 다음, RACK-1와 결합한 NDRG3을 확인하기 위하여 항-NDRG3 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 20a).

[338] 또한, NDRG3에 의한 키나아제 경로에 관여하는 단백질 간의 관계를 확인하기

위하여 상기 실시예 <9-1>과 같이 C-Raf, RACK1 과발현 및/또는 NDRG3 결실 HEK293T 세포, 및 c-Raf, RACK1 및/또는 NDRG3(N66D) 과발현 HEK293T 세포에 PKC-I(LY333531) 5 μ M을 처리 또는 무처리하여 정상 산소 상태 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고 항-NDRG3, 항-인산화-c-Raf(S338), 항-c-Raf, 항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2, 항-RACK1 및 항- β 액틴 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 20b).

[339] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3에 의한 키나아제 경로에 관여하는 단백질 간의 관계를 확인하기 위하여 Myc-NDRG3(N66D) 발현벡터 및/또는 siRACK1(siGENOME SMARTpool, Dharmacon)을 이용하여 NDRG3(N66D) 과발현 및/또는 RACK1 결실 HeLa 세포를 제작하고 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 항-Myc 친화겔을 이용하여 면역침전하고 항-PKC- β -항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 20c).

[340] 또한, 저산소 상태에서 PKC가 ERK 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 HeLa 세포를 정상 산소 상태(21 % O₂) 하에서, 또는 PKC 억제제인 PKC-I(GO; GO 6976) 1 μ M 또는 PKC-I(LY; LY333531) 5 μ M을 처리하고 저산소 상태(1 % O₂) 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후, 상기 <실시예 3>과 같이 세포를 회수 및 용해하고 항-인산화-ERK1/2 및 항-ERK1/2 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 20d).

[341] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3-cRaf-RACK1-PKC- β -복합체의 형성을 확인하기 위하여 Flag-c-Raf 및 Flag-RACK1 발현 벡터, 및/또는 Myc-NDRG3(N66D) 발현벡터를 상기 <실시예 3>과 같이 HEK293T 세포에 형질전환하고 정상 산소 상태 하에서 24시간 동안 유지 배양한 후 세포를 회수 및 용해하였다. 그 다음, 항-Myc 친화 겔을 이용하여 면역침전한 후 SDS-PAGE로 전기영동한 후 항-Flag, 항-Myc 및 항-PKC- β 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 20e).

[342] 또한, 저산소 상태에서 NDRG3-cRaf-RACK1-PKC- β 복합체의 형성을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-3>과 같이 단백질 도킹 시뮬레이션을 수행하였다. 다중 표적 구조를 위한 도킹(즉, NDRG3, RAF1, RACK1(GNB2L1) 및 PKC- β)은 두-단계 실험을 통해 수행되었다. 첫 단계에서는, NDRG3이 각각의 표적을 위한 도킹 실험에서 수용체 단백질로서 사용되었다. 두 번째 단계에서는, 결과물 단백질-단백질 상호작용이 다른 단백질의 도킹을 위한 수용체 단백질로서 사용되었다. 두 번째 실험을 위한 입력값(input order)는 순서대로 c-Raf, RACK1 및 PKC- β 로 하였다. 도킹 계산은 RMSD(root-mean-square deviation)에 의해 수행되었고 결과는 단일 입력으로부터의 산출값이 다중 입력으로부터의 산출값과 일치하는 곳에서 필터링하였다. 필터링된 결과값 중에서, 가장 안정된 하나를 HEX6.3 총 점수(모양 점수 및 전정기학 점수의 합)를 이용하여 선택하였다(도 20f, 위), 또한, 단백질 구조 모델링을 위하여 하기의 일련의 과정을 수행하였다. 첫 단계에서, PDB(protein data bank) 서열 데이터베이스에서 잘 알려진 구조로부터 상동성 모델링에 사용되는 주형 후보를 찾기 위해

단백질-단백질 BLAST(BLASTp) 검색을 수행하고, 10^{-3} 보다 작은 p-값을 가지는 것 중에서 가장 일치도(identity scores)가 높은 하나를 확인하였다. 두번째 단계에서, 정렬 과정(alignment process)를 수행하기 위하여 BLAST를 수행하고, 구조에 있어서 제한된 공간(restrained spaces)을 확인하였다. 세번째 단계에서, 단백질 구조의 예측이 잘 알려진 상동성 모델링 프로그램인 Modeller 9v10 (N. Eswar, M. A. et al., Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30, 2006)을 이용하여 수행되었고, 마지막으로, 가장 좋은 단백질 모델을 DOPE(Discrete Optimized Protein Energy) 평가방법(Shen MY, et al., Protein Sci. 2006 Nov;15(11):2507-24)에 기반하여 선택하였다(도 20f, 아래).

[343] 그 결과, 도 20a 내지 도 20d에 나타낸 바와 같이, RACK1이 NDRG3과 상호작용하는 것을 확인하였다(도 20a). 또한, RACK1이 과발현되어도 NDRG3이 결실된 경우 c-Raf 및 ERK1/2 인산화가 억제되는 반면 NDRG3(N66D) 변이체가 과발현된 경우 c-Raf 및 ERK1/2 인산화가 증가하고, RACK1 및 NDRG3(N66D) 단백질이 과발현되어도 PKC의 활성이 억제된 경우 c-Raf 및 ERK1/2의 인산화가 억제되는 것을 확인하였다(도 20b). 특히, 저산소 상태에서 RACK1이 결실된 경우 NDRG3과 PKC의 상호작용이 억제되고(도 20c), PKC 억제제에 의해 PKC의 활성이 억제된 경우 저산소 상태에서 ERK1/2의 인산화가 억제되는 것을 확인함으로써(도 20d), 저산소 상태에서 NDRG3이 RACK1 및 PKC- β 와 상호작용하여 c-Raf-ERK 인산화를 촉진하는 것을 확인하였다(도 20a 내지 도 20d).

[344] 또한, 도 20e 및 도 20f에 나타낸 바와 같이 세포 내에서 NDRG3이 c-Raf, RACK1 및 PKC- β 와 복합체를 형성하여 존재하고(도 20e), 도킹 스피레이션을 및 단백질 구조 모델링을 통해 NDRG3-c-Raf-RACK1-PKC- β 4차(quaternary) 복합체 형성의 유연성을 확인하였다(도 20f). 따라서 상기 <실시예 10>의 결과들을 통해 NDRG3이 RACK1와 상호작용하고, 이를 통해 NDRG3-RACK1 복합체에 유도되는 PKC β 에 의한 c-Raf가 인산화되며, 따라서 젯산에 의해서 조절된 NDRG3이 c-Raf 및 RACK1의 스캐폴드 단백질임을 확인하였다.

[345]

[346] <실시예 10> NDRG3 발현에 따른 병리학적 변화 확인

[347] <10-1> NDRG3 과발현 형질전환 마우스에서 종양 형성 및 신생혈관생성 촉진 확인

[348] 병리학적으로 NDRG3의 발현이 미치는 영향을 확인하기 위하여, NDRG3 과발현 형질전환 마우스를 이용하여 면역조직화학적 분석법(immunohistochemical analysis)을 수행하여 종양 형성을 확인하고, NDRG3의 발현 및 활성화된 ERK1/2 단백질의 발현을 확인하기 위하여 웨스턴 블롯팅, 유전자 발현 변화를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

[349] 구체적으로, NDRG3 과발현이 종양 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 NDRG3 유전자가 전체적으로 과발현되도록

제작된 NDRG3 과발현 형질전환 C57/BL6 마우스 (40마리) 및 대조군 마우스 (32마리)에서 24개월 까지 시기별로 종양 생성 여부를 판별한 후 비-종양(tumor free) 카플란마이어(Kaplan Meier) 분석법을 이용하여 그래프화하였다(도 21a).

[350] 또한, NDRG3 과발현이 여러 조직의 종양 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 18개월 된 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 폐, 20개월 된 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 장, 및 9개월 된 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스의 하복부(hypogastrium) 조직을 적출한 후 종양 형성을 관찰하였다(도 21b).

[351] 또한, NDRG3 과발현이 림프종 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스에서 장간막 림프절(Mesenteric lymph node), 비장(spleen) 및 간(liver) 조직을 이용하여 면역조직학적 분석법을 수행하였다. 먼저, 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스에서 림프절, 비장, 및 간 조직을 적출한 후, 상온에서 10 % 포르말린으로 하루동안 고정하였다. 그 다음, 상기 고정된 조직에 파라핀을 처리하고 4 μ m로 섹션화한 후, 실라닌화된(silanylated) 슬라이드(Histoserv)로 옮겼다. 항원 검색을 위하여 상기 섹션화된 조직 슬라이드에 0.01 M 구연산염 버퍼(pH6.0)를 처리하고 100°C에서 2분 동안 가열하였다. 그 다음, 상기 슬라이드를 식히고 조직의 세포내 퍼옥시다아제(oxidase)를 비활성화하기 위하여 5분 동안 3 % 과산화수소(hydrogen peroxide)/PBS를 처리한 후, 10 % 비면역 마우스 또는 고트(goat) 혈청으로 30분 동안 차단하였다. 그 다음, 림프종에서 발현되는 B 세포 마커인 CD45R 및 T 세포 마커인 CD3의 검색을 위하여 항-CD45R 및 항-CD3 항체로 표지화하고, 상기 표지는 DAB(3, 3'-diaminobenzidine) 기질 크로모젠(chromogen) 용액을 이용하여 ABC(avidin-biotin complex) 방법으로 검출하고 현미경으로 관찰 및 촬영하였다. 또한, 상기 슬라이드는 헤마톡실린-에오진(H&E)으로 대조염색하여 현미경으로 관찰 및 촬영하였다(도 21c).

[352] 또한, NDRG3 과발현이 간종양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 제작한 3 종류의 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 TG-2, TG-8 및 TG-13 각각의 간 조직을 적출한 후, 상기와 같이 고정하여 섹션화하였다. 그 다음, 상기 섹션화된 간 조직을 이용하여 상기와 같이 면역조직학적 염색을 수행하고 시각화하였다. 세포증식 마커인 PCNA 및 Ki-67, 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 마커인 글루타민합성효소(glutamine synthetase, GS) 및 열충격 단백질 70(heat shock protein 70, HSP)의 검색을 위하여 항-PCNA, 항-HSP70, 항-Ki-67 및 항-GS 항체로 표지화하였다. 또한, 상기 섹션화된 조직을 상기 실시예 <4-1>에 기재된 방법으로 항-NDRG3 항체를 이용하여 면역형광염색하고 공초점 현미경을 이용하여 시각화하였다(도 21d).

[353] 또한, NDRG3 과발현이 분자적으로 간종양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 및 대조군 마우스에서 간 조직을 적출한

후 액체질소로 동결하였다. 그 다음, 상기 실시예 <4-2>에 기재된 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 또한, 상기 조직을 이용하여 상기 <실시예 2>와 같이 용해하고 항-NDRG3, 항-인산화-ERK1/2, 항-ERK1/2 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 21e).

[354] 그 결과, 도 21a 내지 도 21c에 나타낸 바와 같이, NDRG3 과발현 형질전환 마우스에서 9개월 이후 종양이 형성되기 시작하고(도 21a), 폐, 장 및 하복부를 포함한 다양한 장기에서 종양이 발견되는 것을 확인하였다(도 21b). 또한, NDRG3 과발현 마우스의 간뿐만 아니라 장간막 림프절 및 비장 등 2차 림프기관에서 림프종 발현 B-세포 및 T-세포가 발견되는 것을 확인하였다(도 21c).

[355] 또한, 도 21d 및 도 21e에 나타낸 바와 같이, 3 종류의 NDRG3 과발현 형질전환 마우스 모두 간세포암종 마커 및 세포증식 마커의 발현이 현저하게 높게 나타나고(도 20d), 분자적으로 신생혈관생성 마커인 IL-1 α , IL-1 β IL-6, COX-2 및 PAI-1 mRNA 발현이 증가하며, ERK1/2의 인산화가 증가하는 것을 확인함으로써(도 21e), 상기 결과들을 통해 NDRG3이 종양형성 및 신생혈관생성을 촉진하는 것을 조직학적으로 확인하였다.

[356]

[357] <10-2> 암환자에서 NDRG3 발현 및 키나아제 경로 활성화 확인

[358] 암에서 NDRG3의 임상적 관련성을 확인하기 위하여, 인간 간암환자의 간암 조직을 이용하여 조직 마이크로어레이(Tissue microarray) 분석법을 수행하였다.

[359] 구체적으로, 인제대학교 백병원에서 병리학적으로 정의된 HCC를 가진 환자로부터 적출된 조직 샘플을 제공받았다. 상기 모든 조직 샘플은 10 % 완충된 포르말린으로 고정하고 파라핀을 처리하였다. 그 다음, 상기 파라핀 처리된 HCC 조직 샘플(공여자 블록(blocks))을 가지고 코어 조직 생체검사(지름 2 mm)를 수행하고, 트레핀(trephine) 기구(Superbiochips Laboratories, Seoul, Korea)를 이용하여 새로운 수여자 파라핀 블록(조직 어레이 블록)에 정렬되었다. 결과 조직 어레이 블록은 104개 HCC 및 20개 비-신생 간조직을 포함하였다. 상기 조직 어레이 블록의 4-섹션을 이용하여 상기 실시예 <11-1>에 기재된 방법으로 면역조직학적 염색을 수행하였다. NDRG3 또는 인산화-ERK1/2 검색을 위하여 항-NDRG3 및 항-인산화-ERK1/2 항체로 표지화하였다. 또한, 일반 식염수가 음성대조군으로 사용되었다. >10 % 중경도의 세포질 염색을 보이는 샘플 및/또는 NDRG3에 대한 세포막 염색 및 >10 % 약경도의 인산화-ERK에 대한 핵염색은 양성 점수화 하였다. NDRG3 단백질 및 인산화-ERK의 발현 수준 사이의 통계학적 유의성은 2 테스트로 평가되었다(도 22).

[360] 그 결과, 도 22에 나타낸 바와 같이, 정상 간에서는 NDRG3 단백질이 거의 발견되지 않는 반면, HCC 환자의 간의 경우 세포질 및 원형질막에서 NDRG3 단백질의 발현이 강하게 나타나며, 이때 인산화된 ERK1/2 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 특히, NDRG3 단백질을 발현하는 25개

HCC 조직 중에서 19 (76 %)개 HCC 조직에서 ERK1/2 단백질이 인산화됨을 확인하였다(도 22). 따라서, 상기 결과를 통해 NDRG3의 비정상적인 발현이 종양 형성을 촉진하고 ERK1/2 경로를 활성화함을 확인하였다.

[361]

[362] <실시예 11> 저산소 반응에서 NDRG3의 조절 메커니즘 확인

[363] 상기 <실시예 3> 내지 <실시예 11>의 결과들을 바탕으로 저산소 반응에 있어서 NDRG3의 역할에 관한 도식 모델을 완성하였다.

[364] 도 23에 나타낸 바와 같이, 저산소 상태 초기 단계에 PHD2의 비활성으로 HIF-1 α 단백질의 축적이 유도되고, 그 결과 저산소증에 따른 세포의 대사 적응(metabolic adaptation)과 관련된 유전자(LDHA, PDK1 등)가 상향조절되어 해당과정이 활성화된다. 그 후, 저산소 상태의 PHD2 비활성에 의한 NDRG3의 저산소증 표적 부위인 294번째 프롤린 하이드록실화 억제 현상과 함께, 증가된 해당과정에 의해 생성/축적된 젖산에 의해 NDRG3 단백질의 발현이 증가하였다.

[365]

[366] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

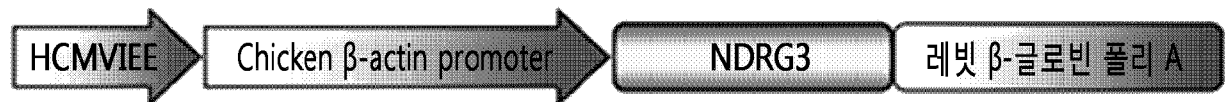
[367]

청구범위

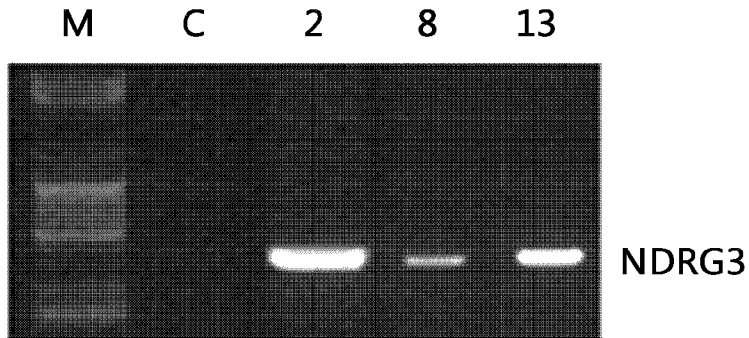
- [청구항 1] 세포 내에서 NDRG3(N-myc downstream-regulated gene 3) 단백질의 발현양을 측정하는 단계를 포함하는 세포 내 젖산의 정량 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 세포는 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나에서 채취한 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 NDRG3 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 젖산은 NDRG3 단백질의 아미노산 서열 중 62번째 아스파르트산, 138번째 글라이신, 139번째 알라닌 또는 229번째 타이로신에 결합하는 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 젖산이 결합되지 않은 NDRG3 단백질은 분해되는 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 젖산이 결합된 NDRG3 단백질은 축적되는 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 발현양은 시험관 내 결합 분석법(in-vitro binding assay), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학염색, 웨스턴 블롯팅(Western Blotting), 단백질 칩(chip) 및 실시간 형광이미징 방법(Realtime Fluorescence Imaging Method)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 젖산의 정량 방법.
- [청구항 8] 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자 및 형광 단백질(fluorescent protein, FP)을 코딩하는 유전자를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 형광 단백질은 적색 형광 단백질(Red Fluorescent Protein, RFP), 증강된 적색 형광 단백질(Enhanced red Fluorescent Protein, ERFP), 청색 형광 단백질(Cyan Fluorescent Protein, CFP), 증강된 청색 형광 단백질(Enhanced cyan Fluorescent Protein, ECFP), 황색 형광 단백질(Yellow Fluorescent Protein, YFP), 증강된 황색 단백질(Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP), mTFP(monomeric teal Fluorescent Protein), 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein, GFP), 및 변형된 녹색 형광 단백질(modified green Fluorescent Protein, EGFP)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 유전자 발현 카세트.
- [청구항 10] NDRG3 유전자 및 루시퍼레이즈(Luciferase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트.
- [청구항 11] Gal4DB(Gal4 DNA binding domain), 및 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 NDRG3 유전자를 포함하는 제1벡터; 및 Gal4 업스트림 활성화 염기서열(UAS), 및 루시퍼레이즈 유전자를

- 포함하는 제2벡터를 포함하는 젖산 정량용 유전자 발현 카세트.
- [청구항 12] 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환이 의심되는 개체로부터 분리되는 생물학적 시료에서 NDRG3 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계(제1단계); 및
상기 측정된 단백질 발현 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 발현 수준과 비교하는 단계(제2단계)를 포함하는, 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 고형암은 자궁경부암, 신장암, 위암, 간암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 췌장암을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 정보제공방법.
- [청구항 14] 제 12항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 뇌허혈, 심장허혈, 당뇨병성 혈관심장 질환, 심부전, 심근비대증, 망막허혈, 허혈성 대장염, 허혈성 급성 신부전증, 뇌졸중, 뇌외상 및 신생아 저산소증을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 정보제공방법.
- [청구항 15] 제 12항에 있어서, 상기 염증성 질환은 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염, 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 퇴행성 관절염, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 복막염, 포도막염, 피부염, 습진 및 다발성 경화증을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 정보제공방법.
- [청구항 16] 제 12항에 있어서, 상기 정보제공방법은 상기 생물학적 시료에서 측정한 NDRG3 단백질의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 해당 단백질 발현 수준보다 높은 경우 고형암, 허혈성 질환 또는 염증성 질환으로 판단하는 단계(제3단계)를 추가로 포함하는 것인, 정보제공방법.
- [청구항 17] 제 12항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 것인, 정보제공방법.

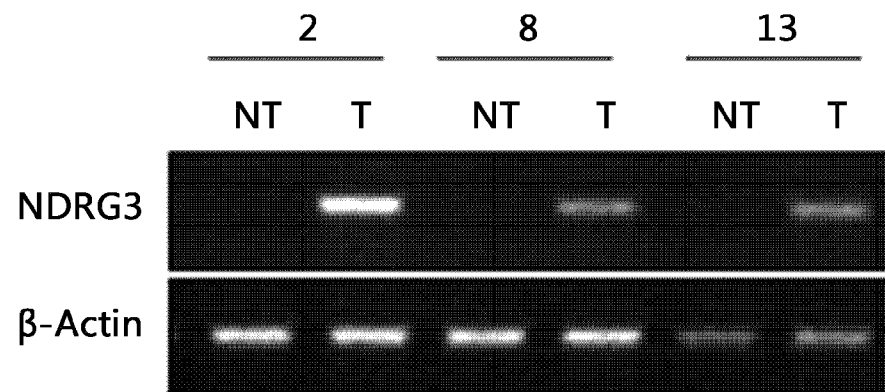
[도 1a]



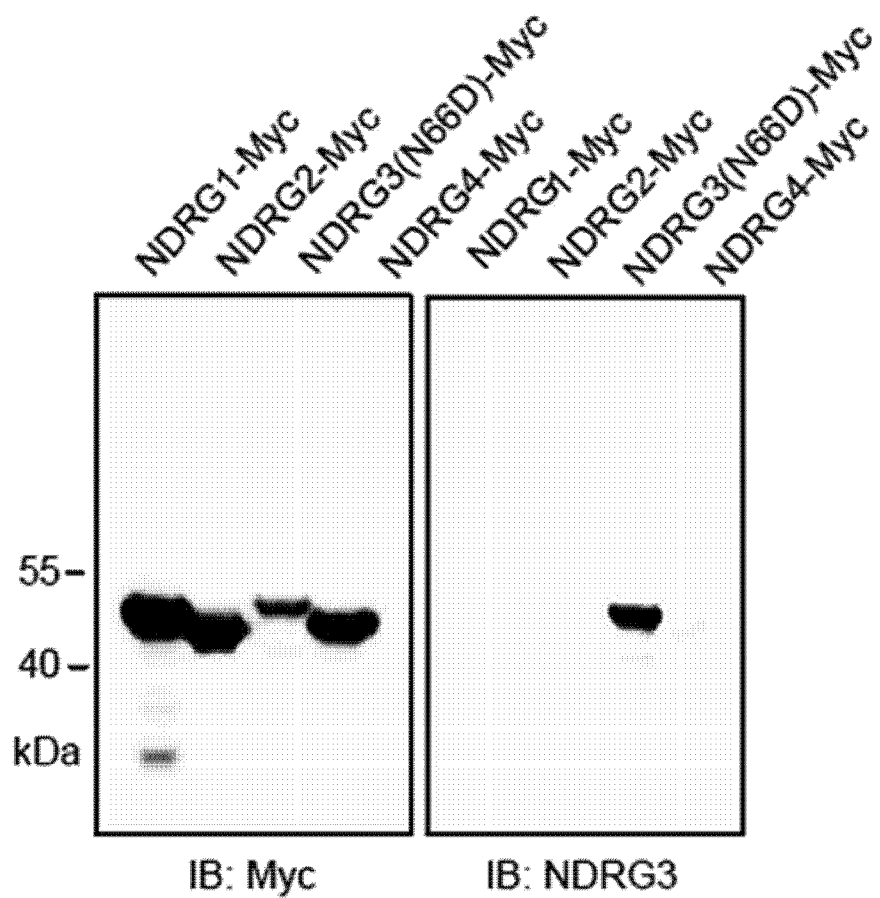
[도 1b]



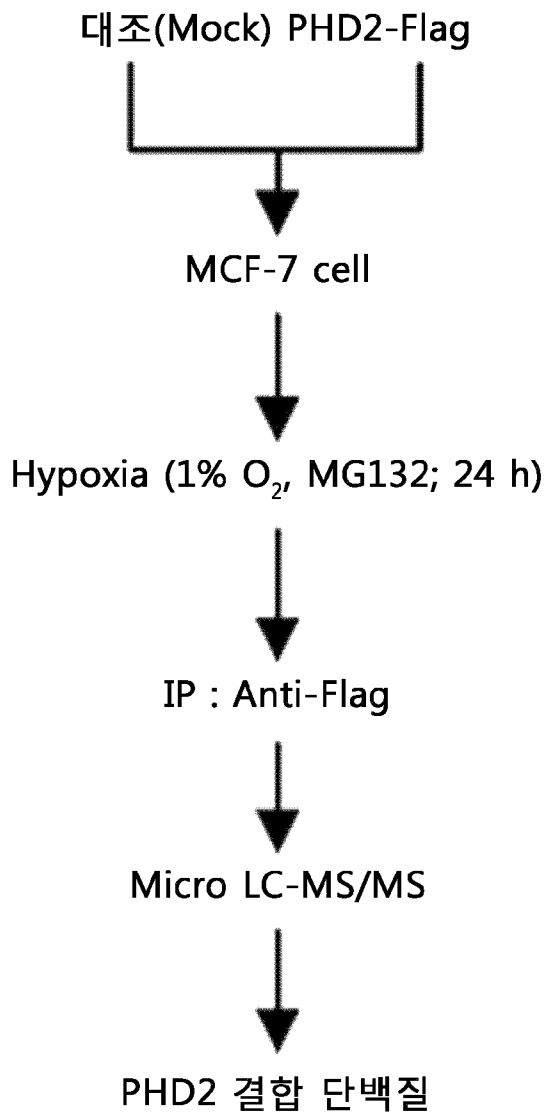
[도 1c]



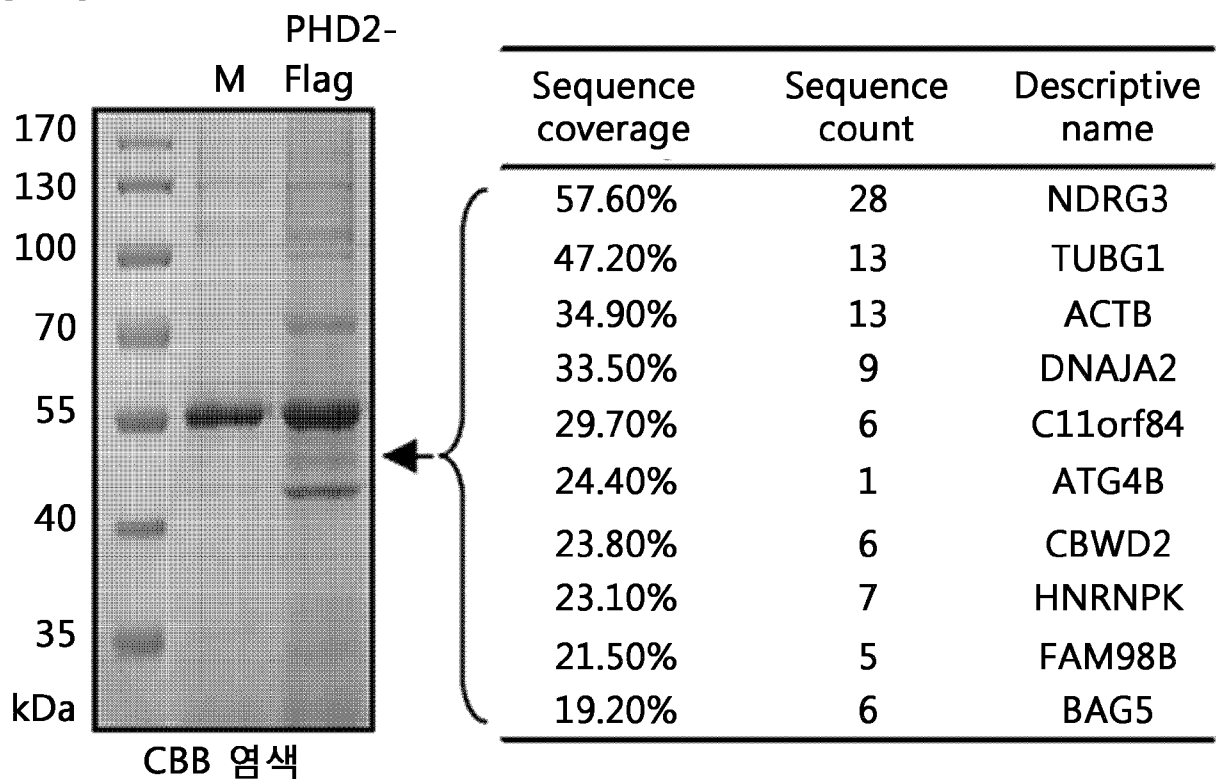
[도 2]



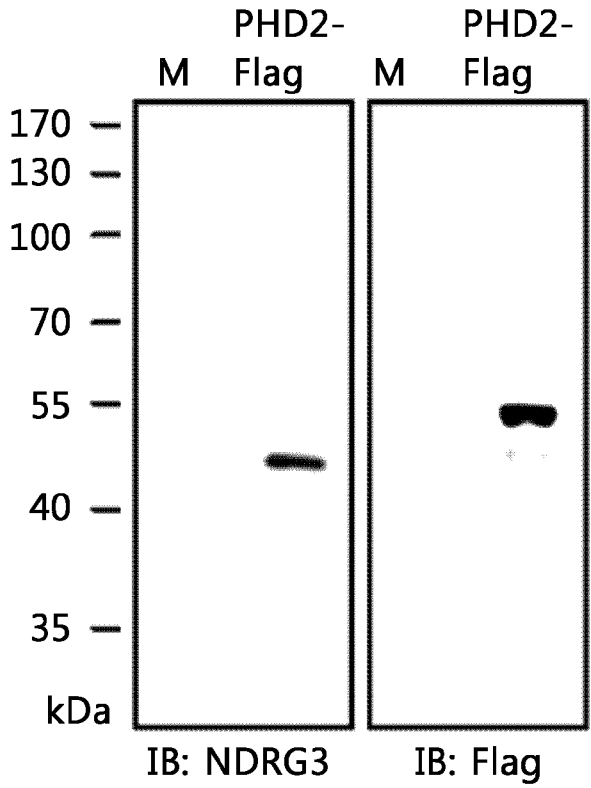
[도3a]



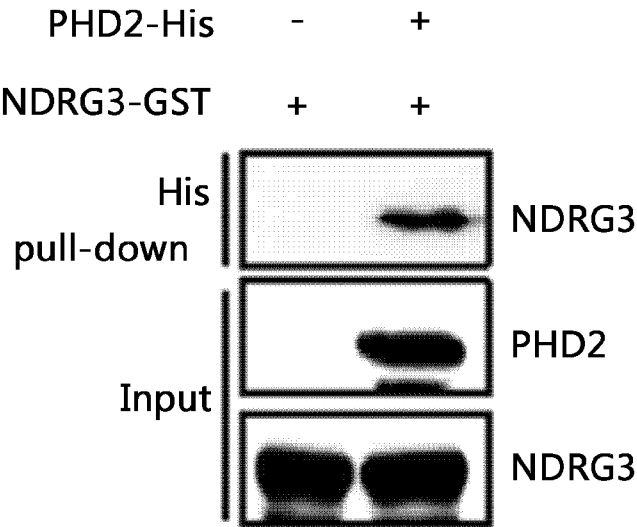
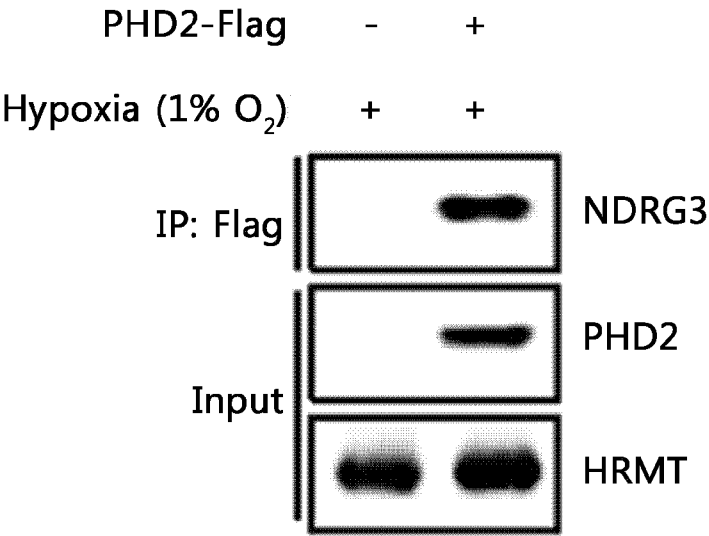
[도3b]



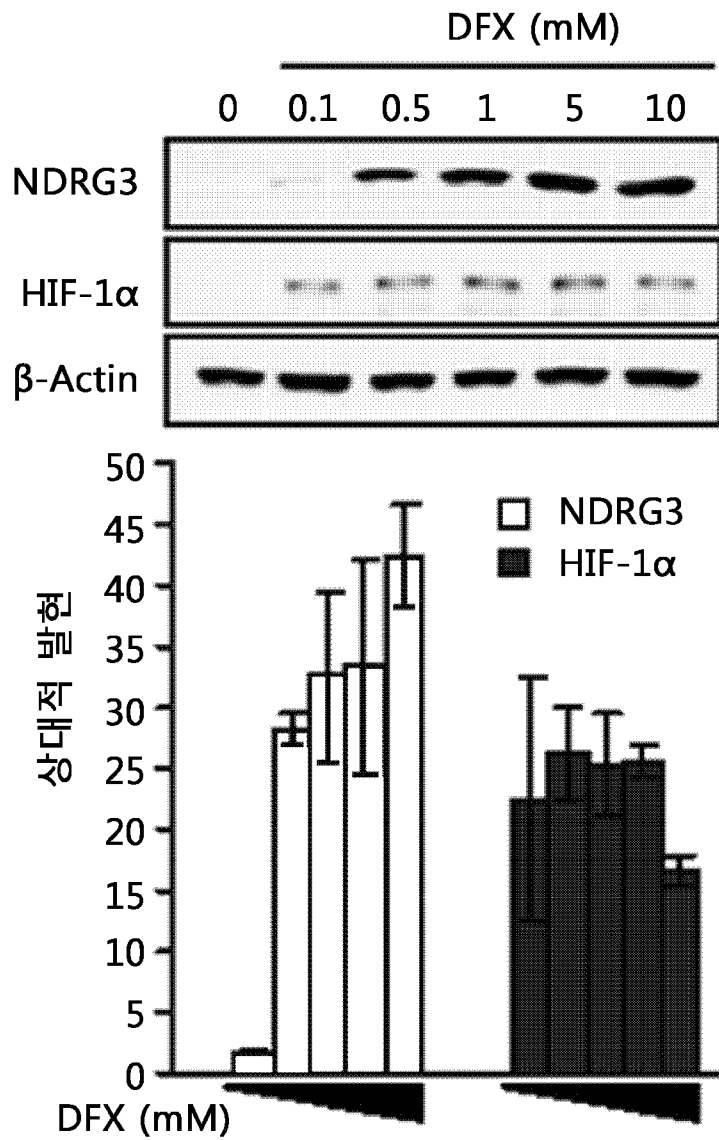
[도3c]



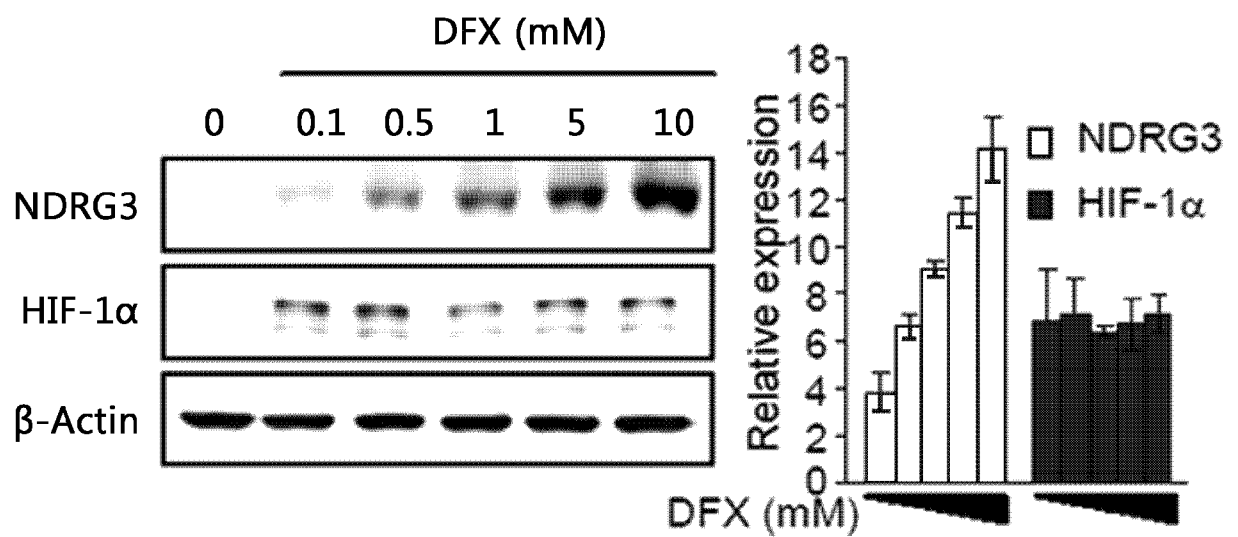
[도4a]



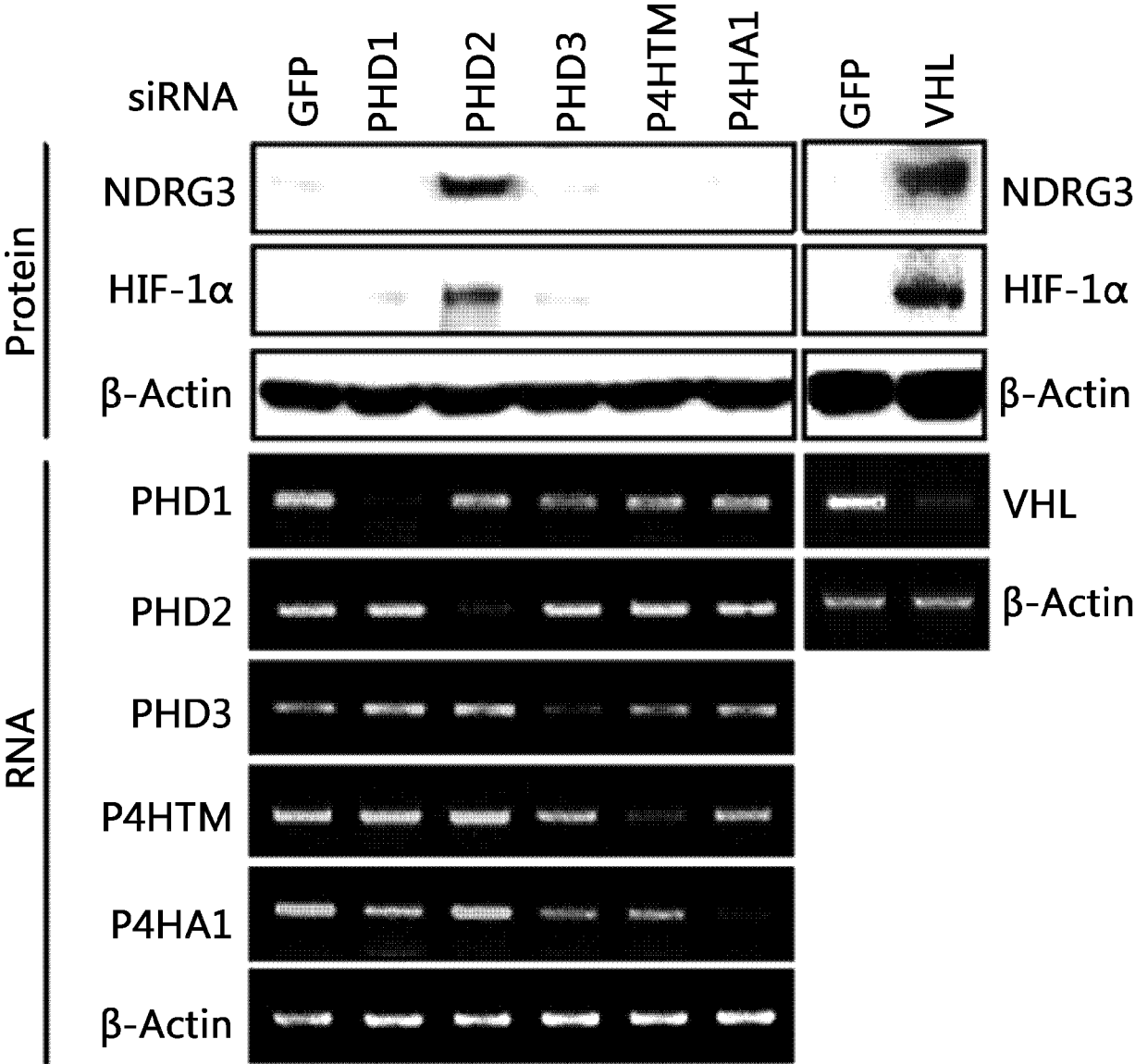
[도4b]



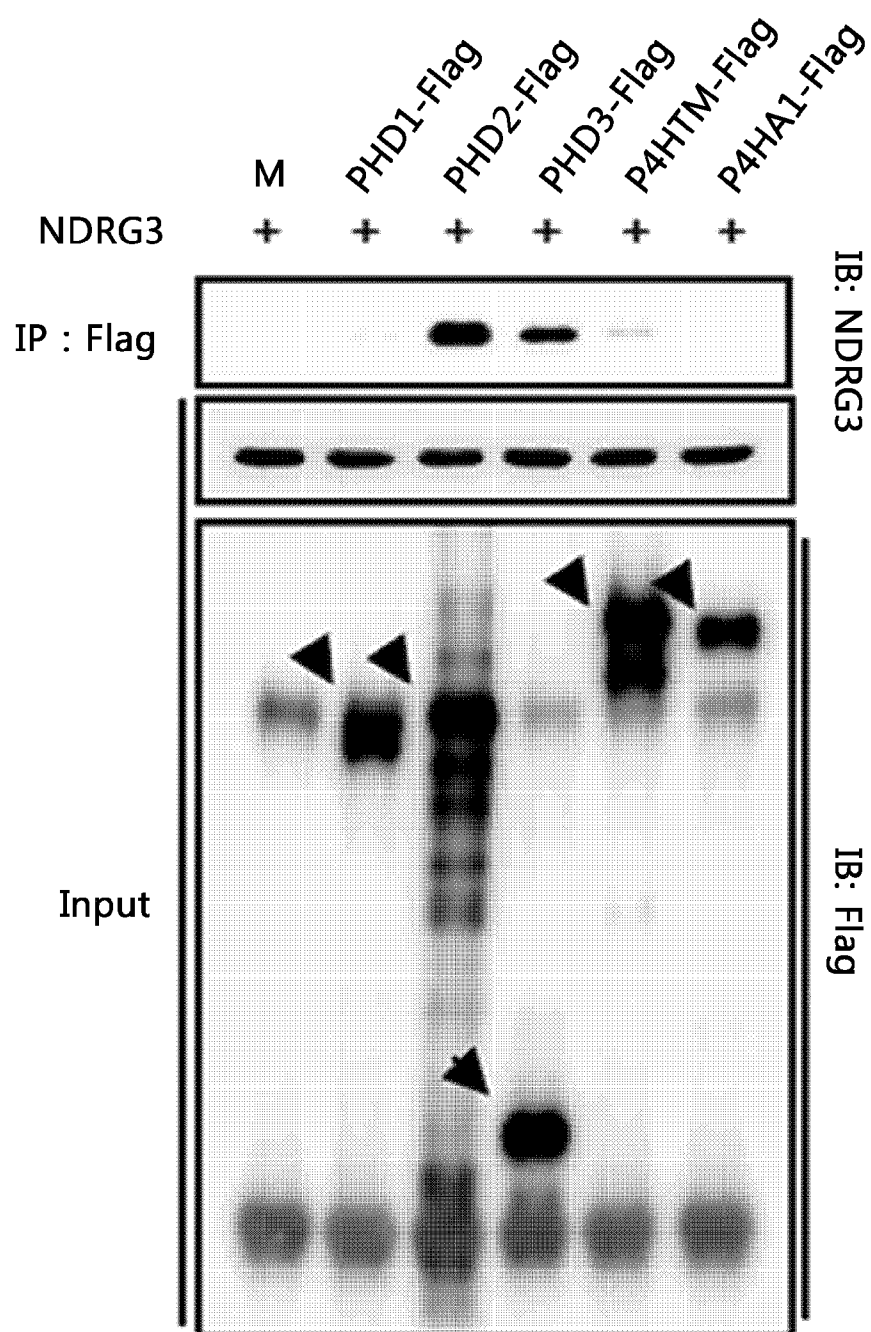
[도4c]



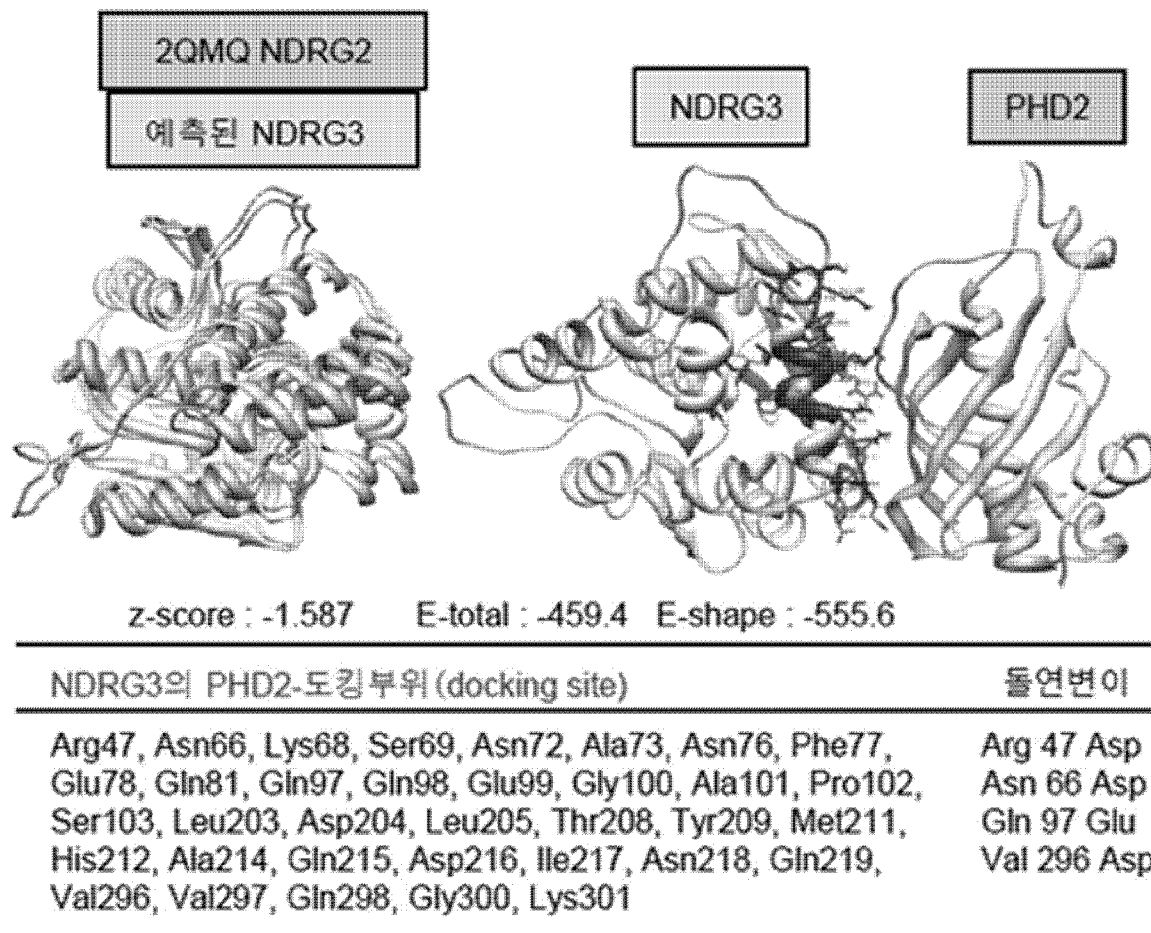
[도5a]



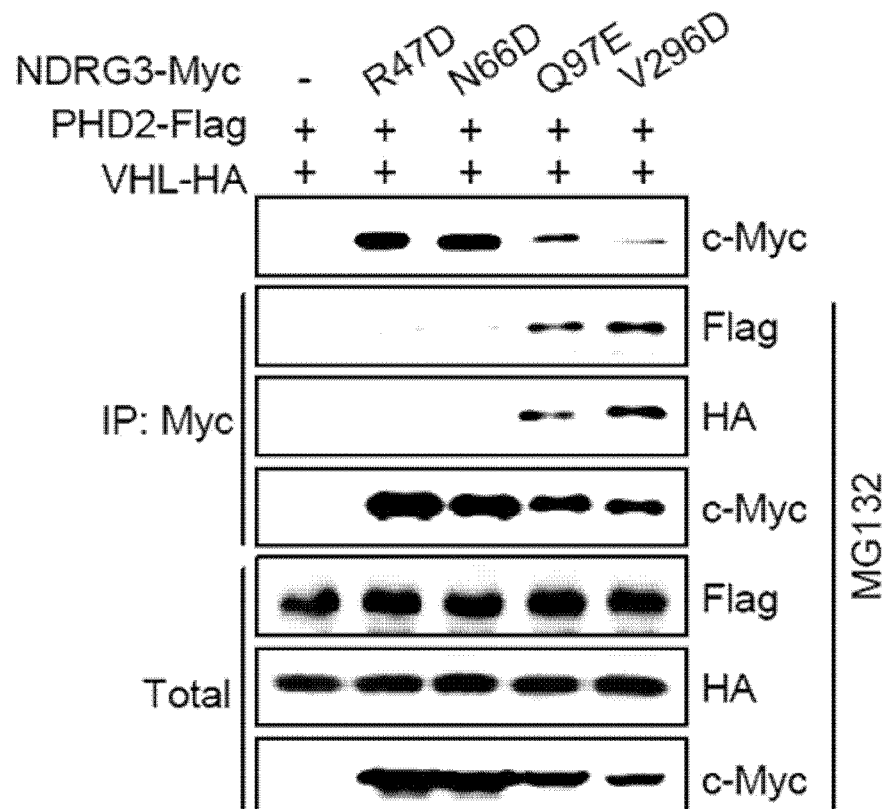
[5b]



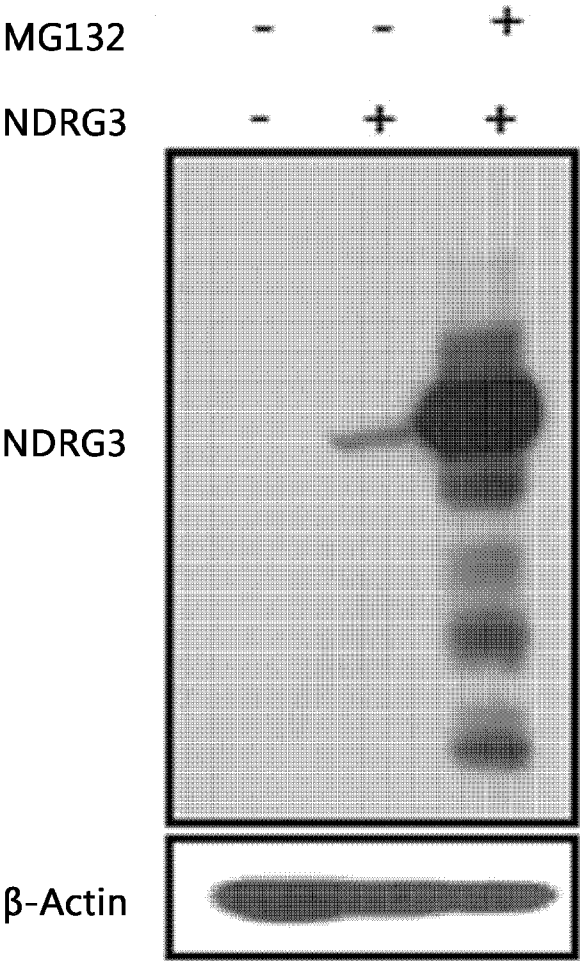
[도6a]



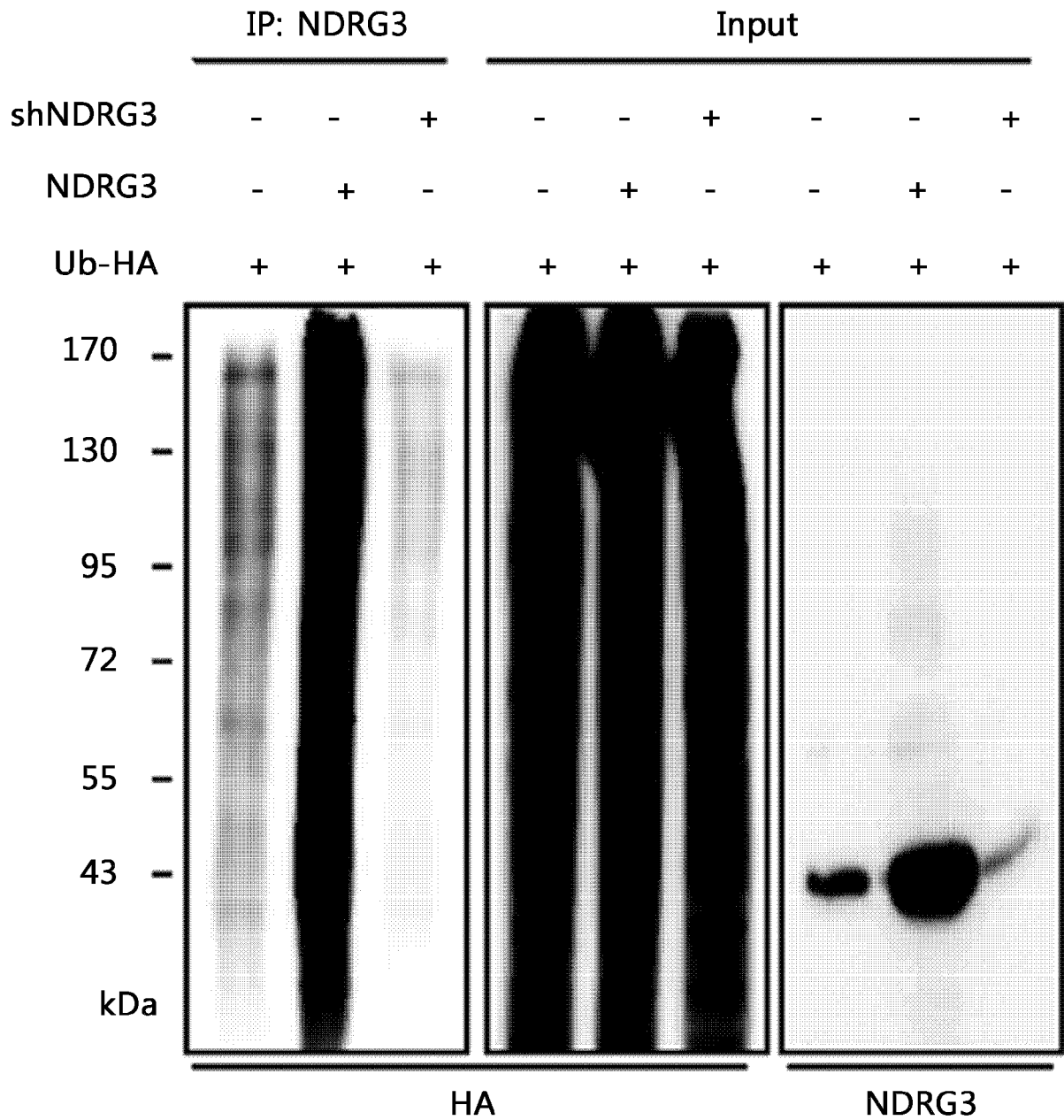
[도6b]



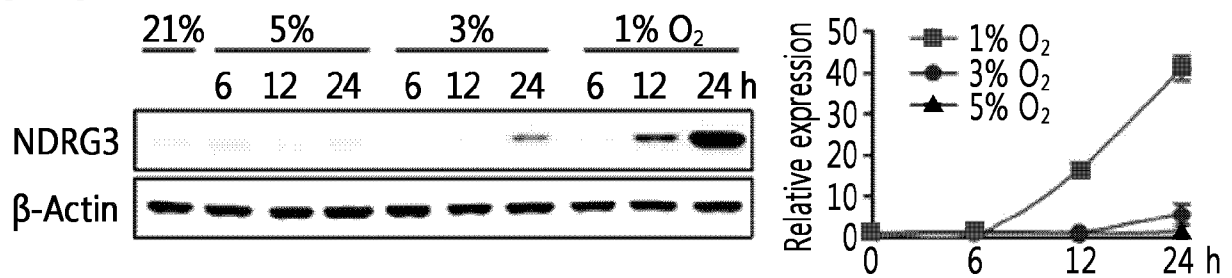
[도7a]



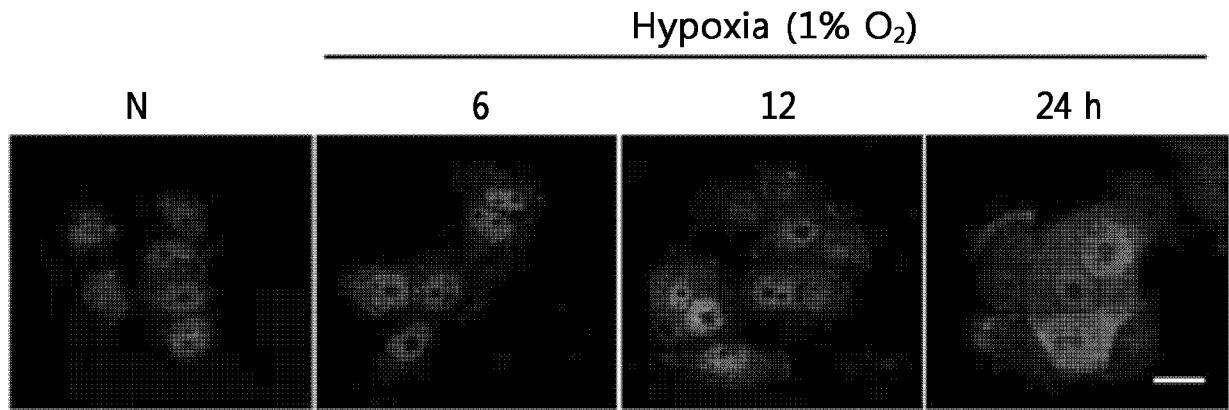
[도7b]



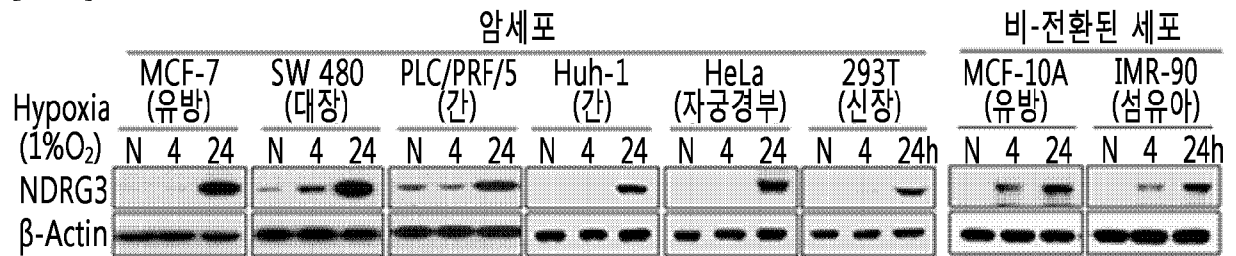
[도8a]



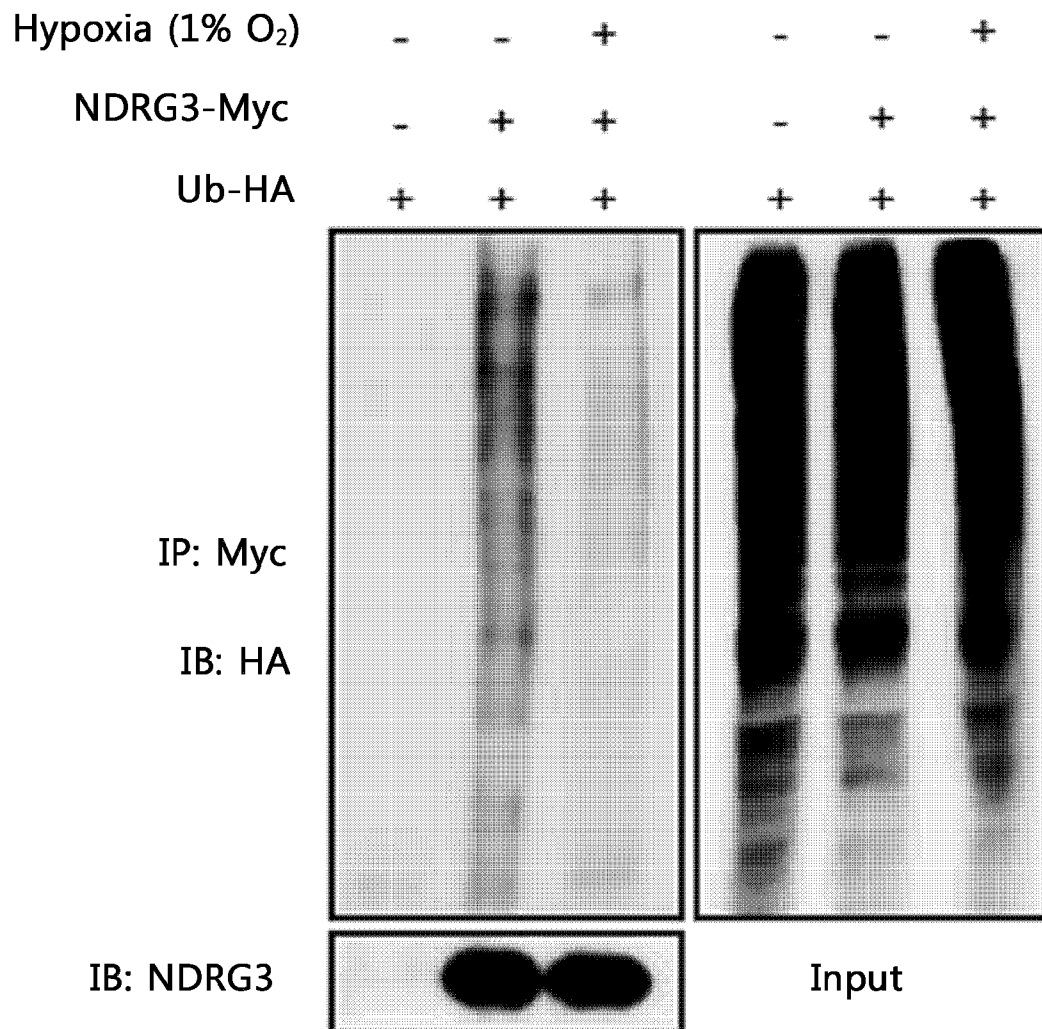
[도8b]



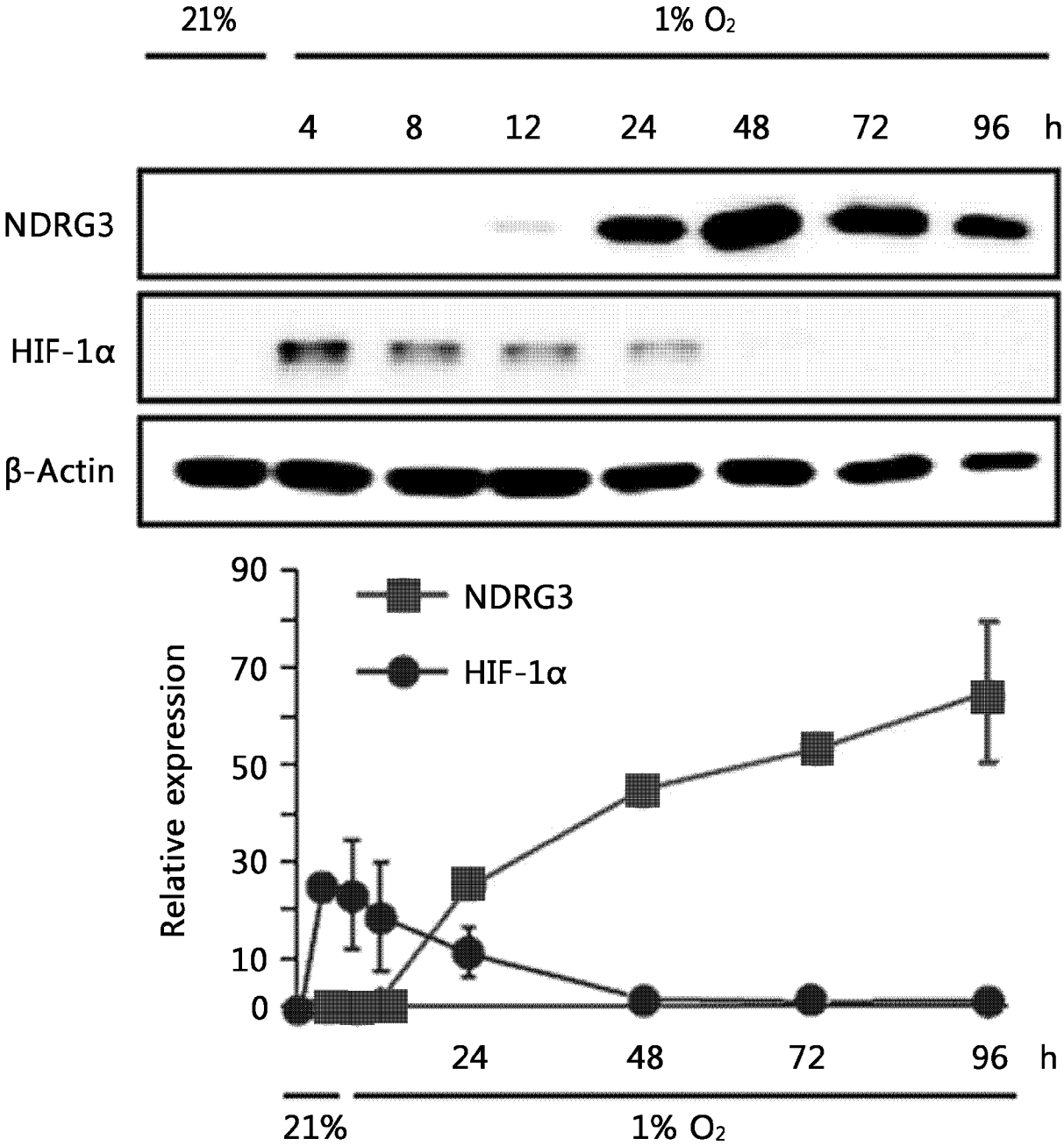
[도8c]



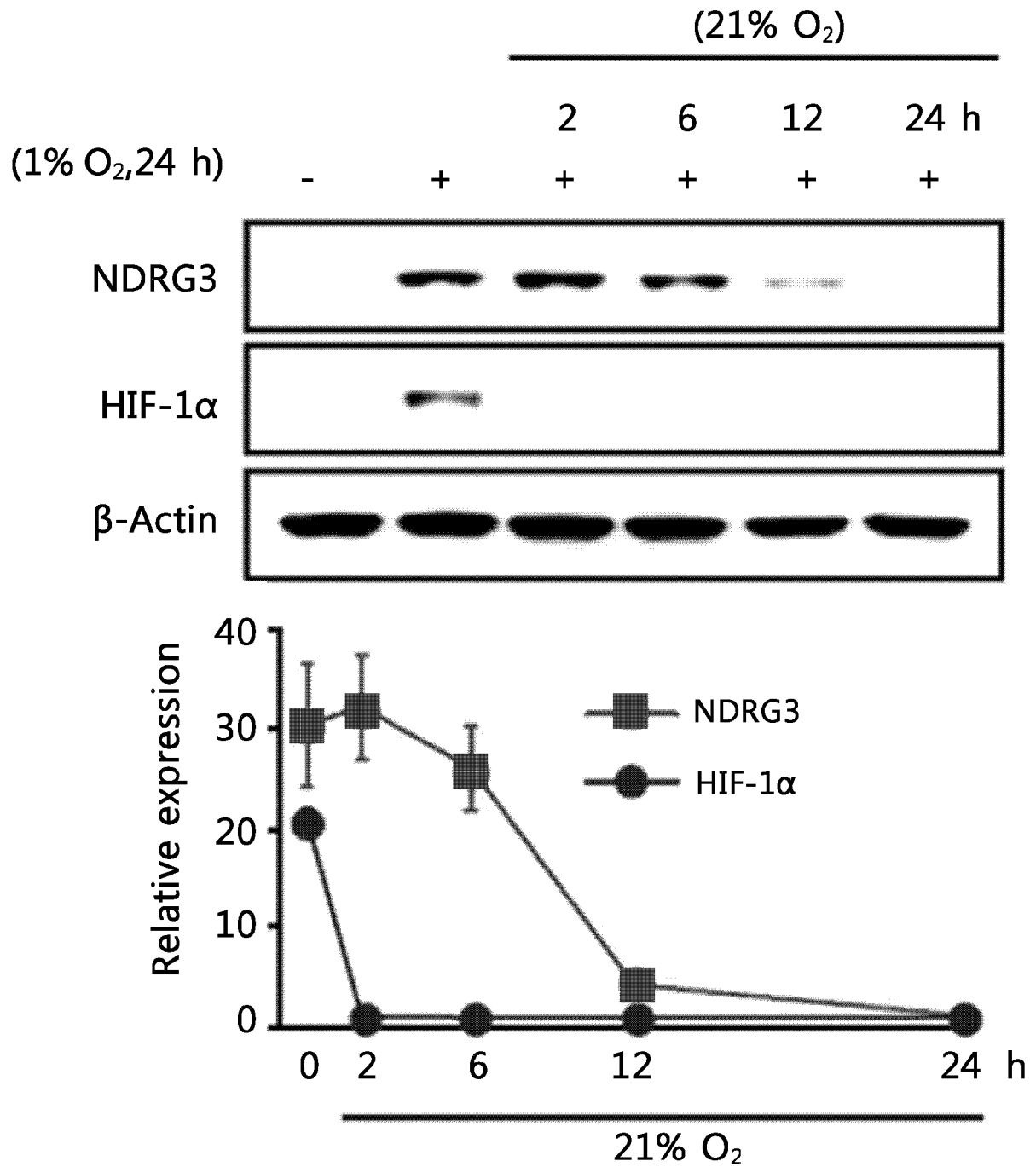
[도8d]



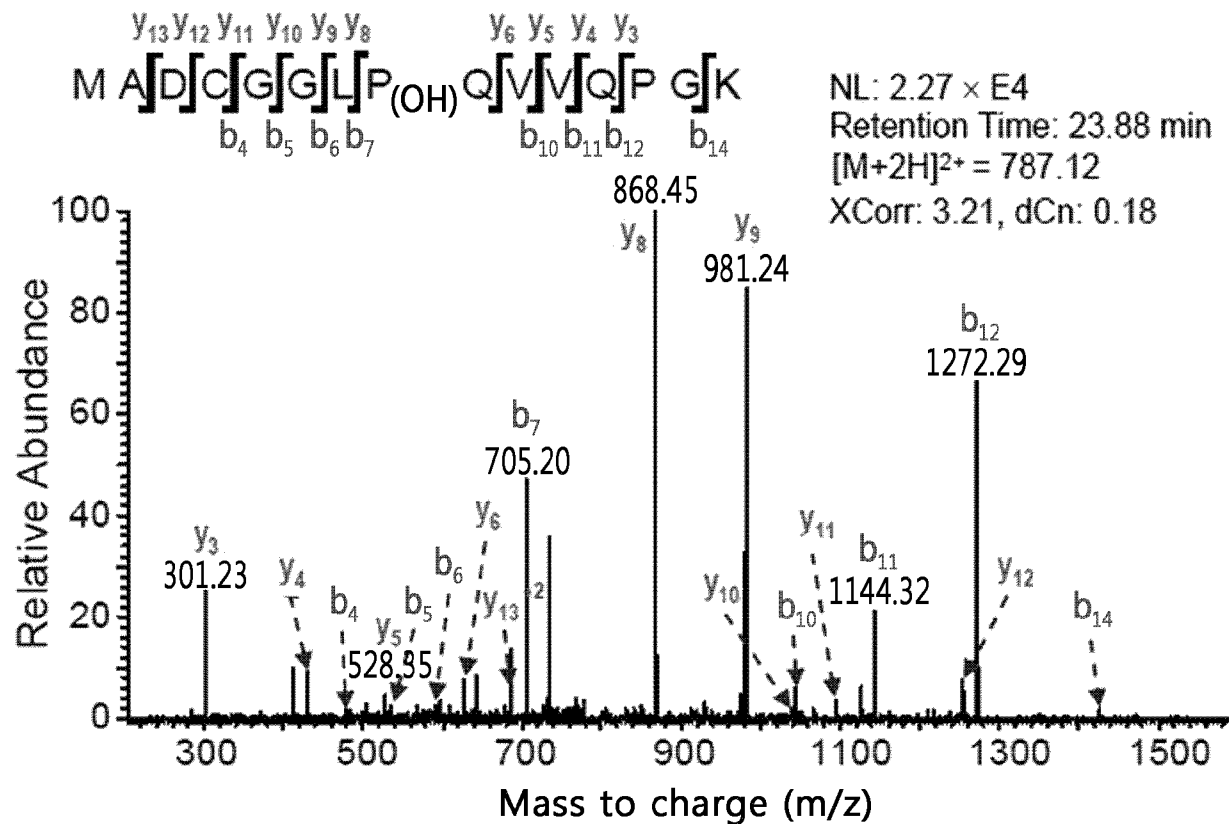
[도9a]



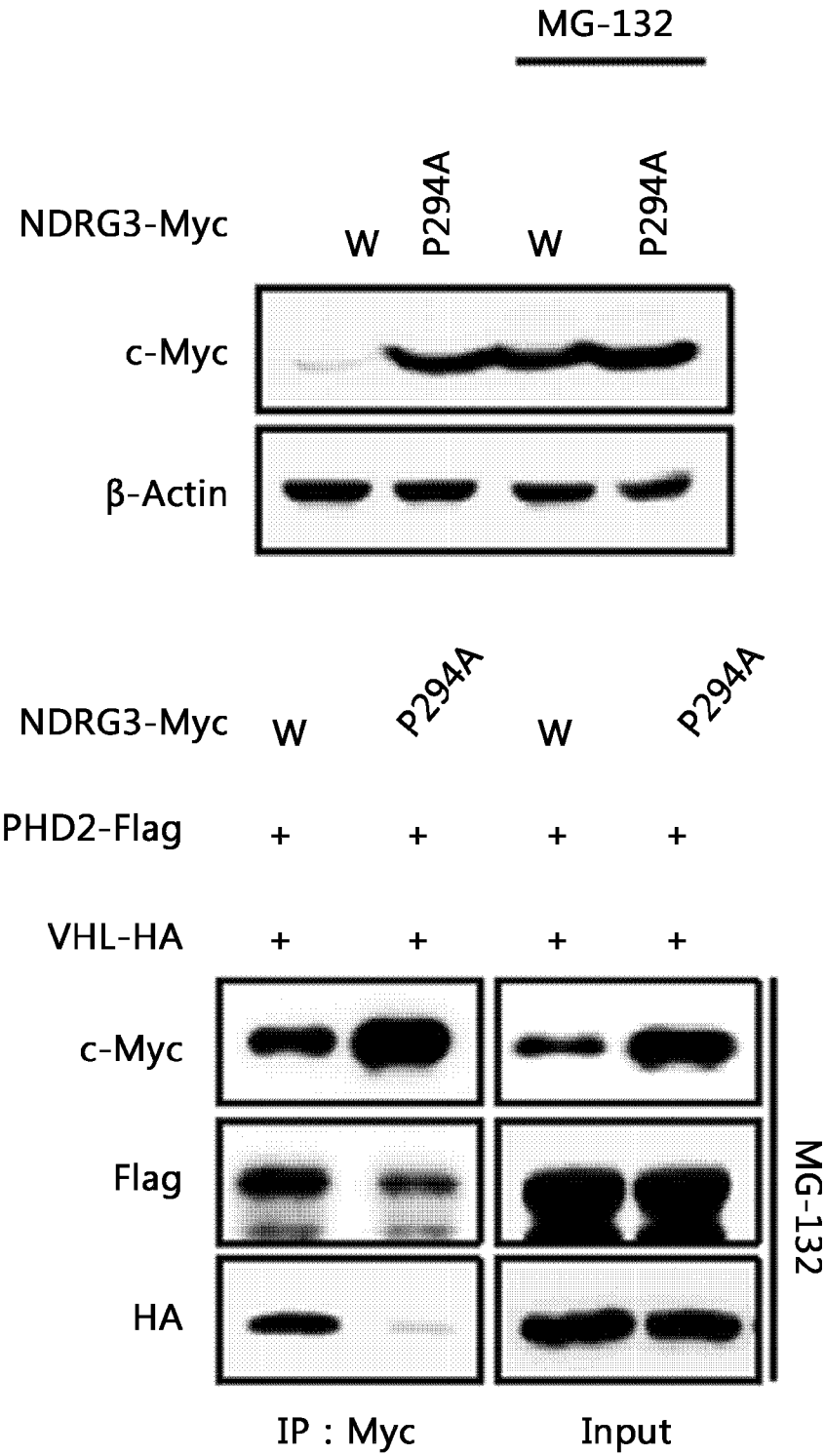
[도9b]



[도 10a]

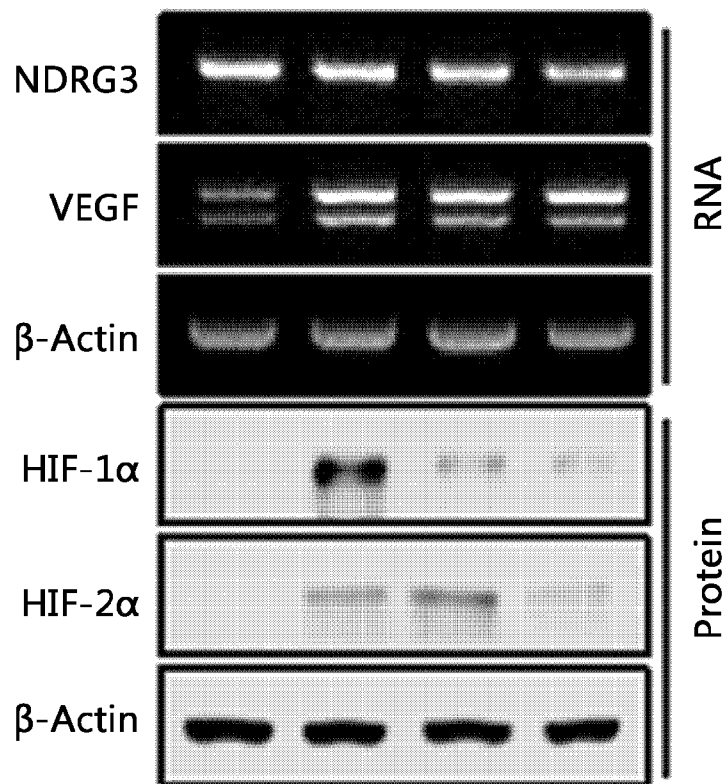


[도10b]

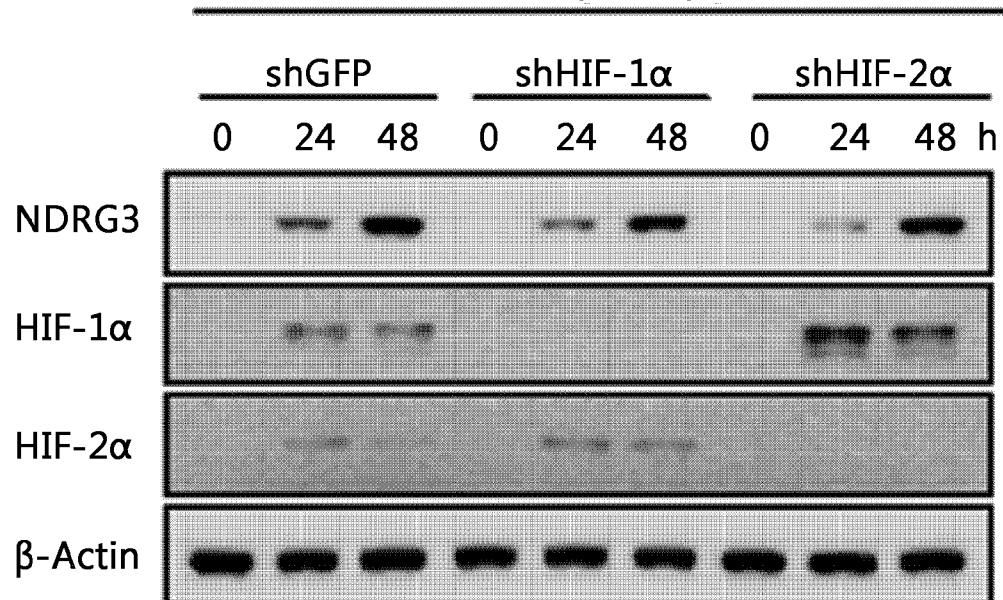


21% 1% O₂

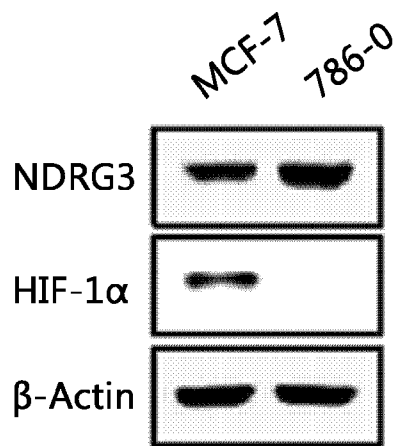
6 12 24 h



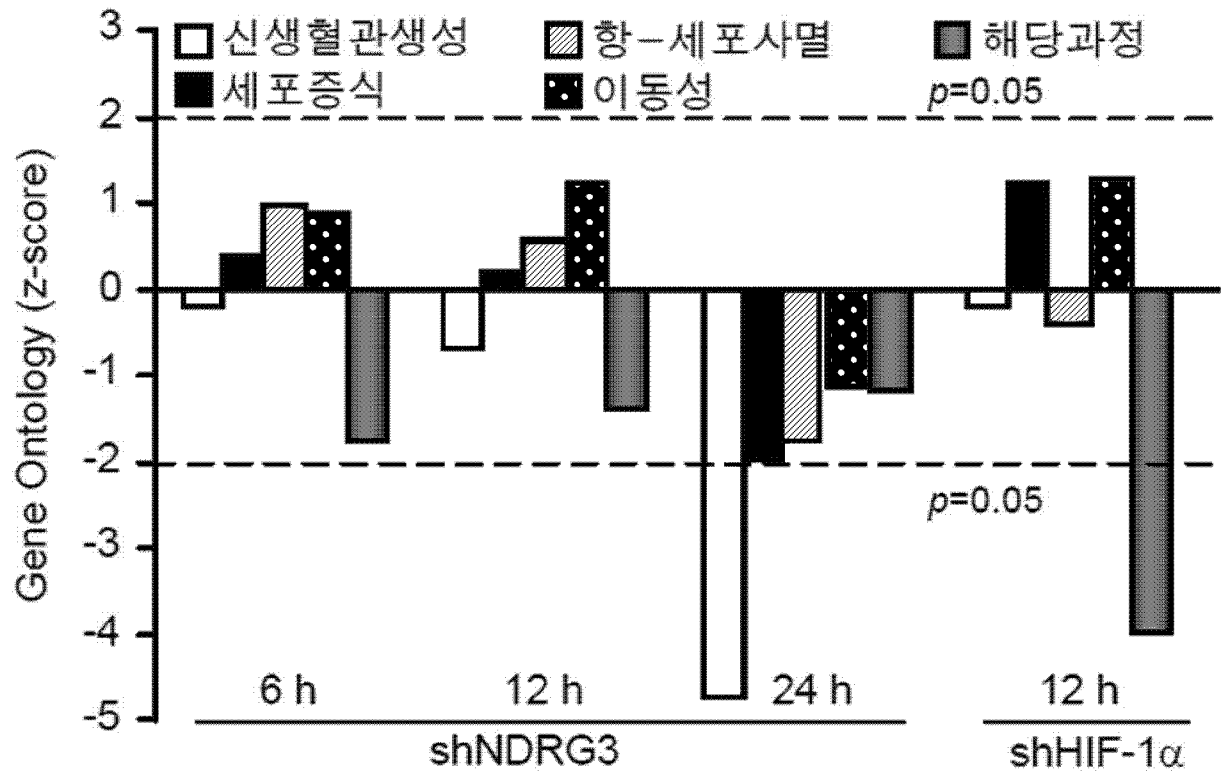
DFX (1 mM)



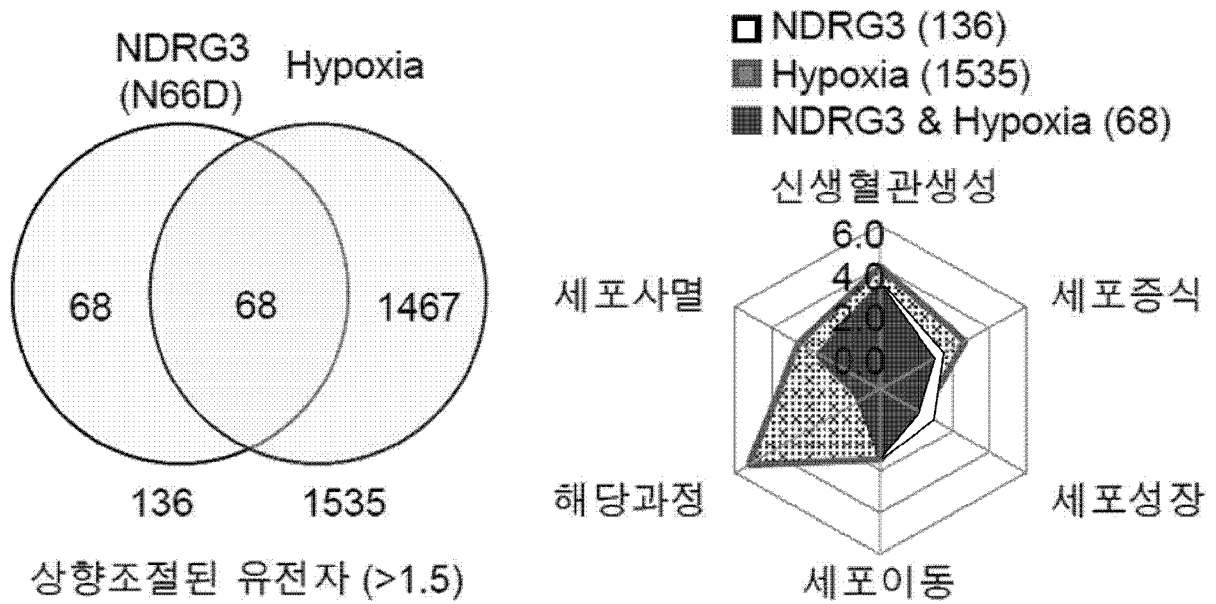
[도11c]

Hypoxia (1% O₂, 24 h)

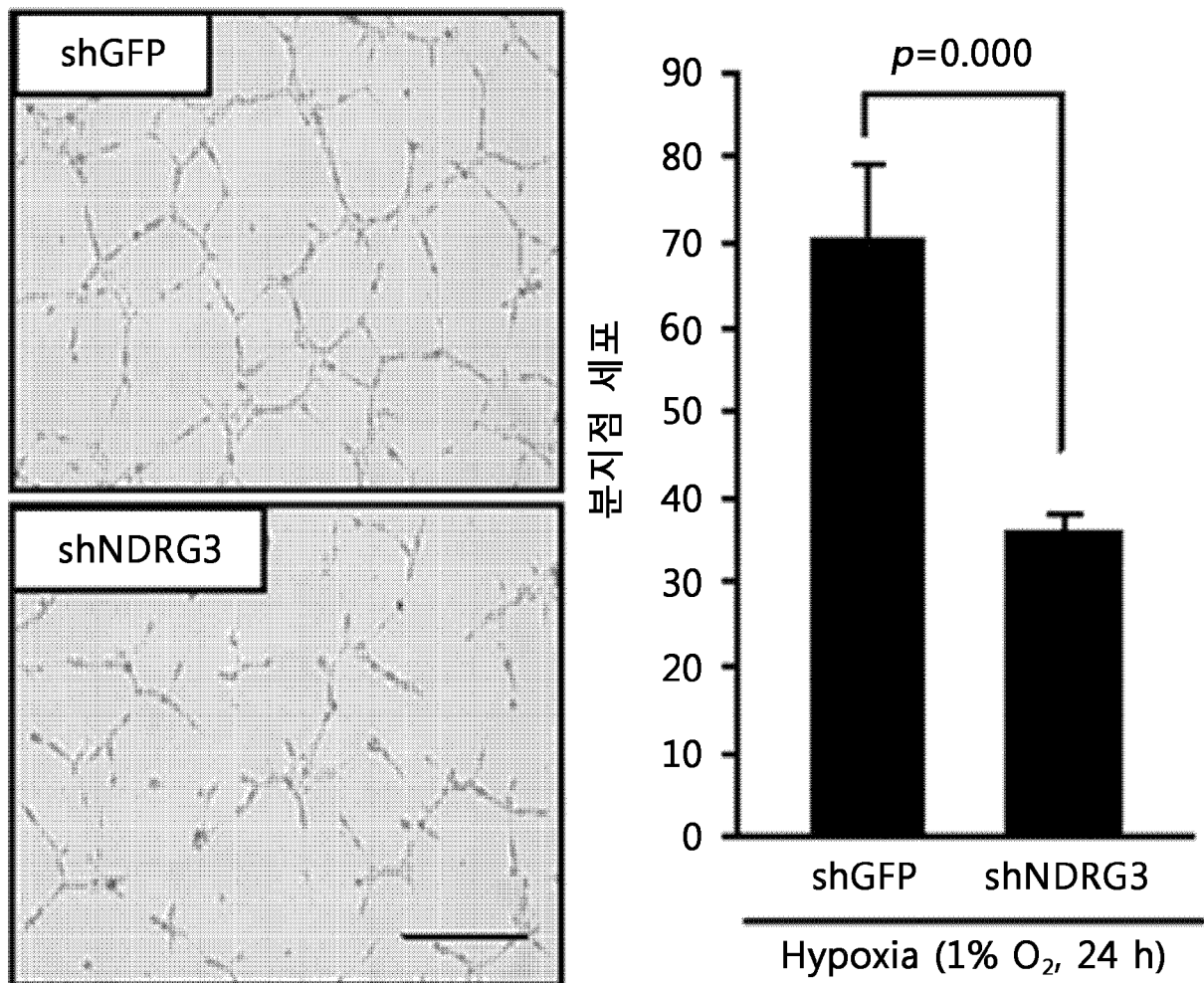
[도12a]



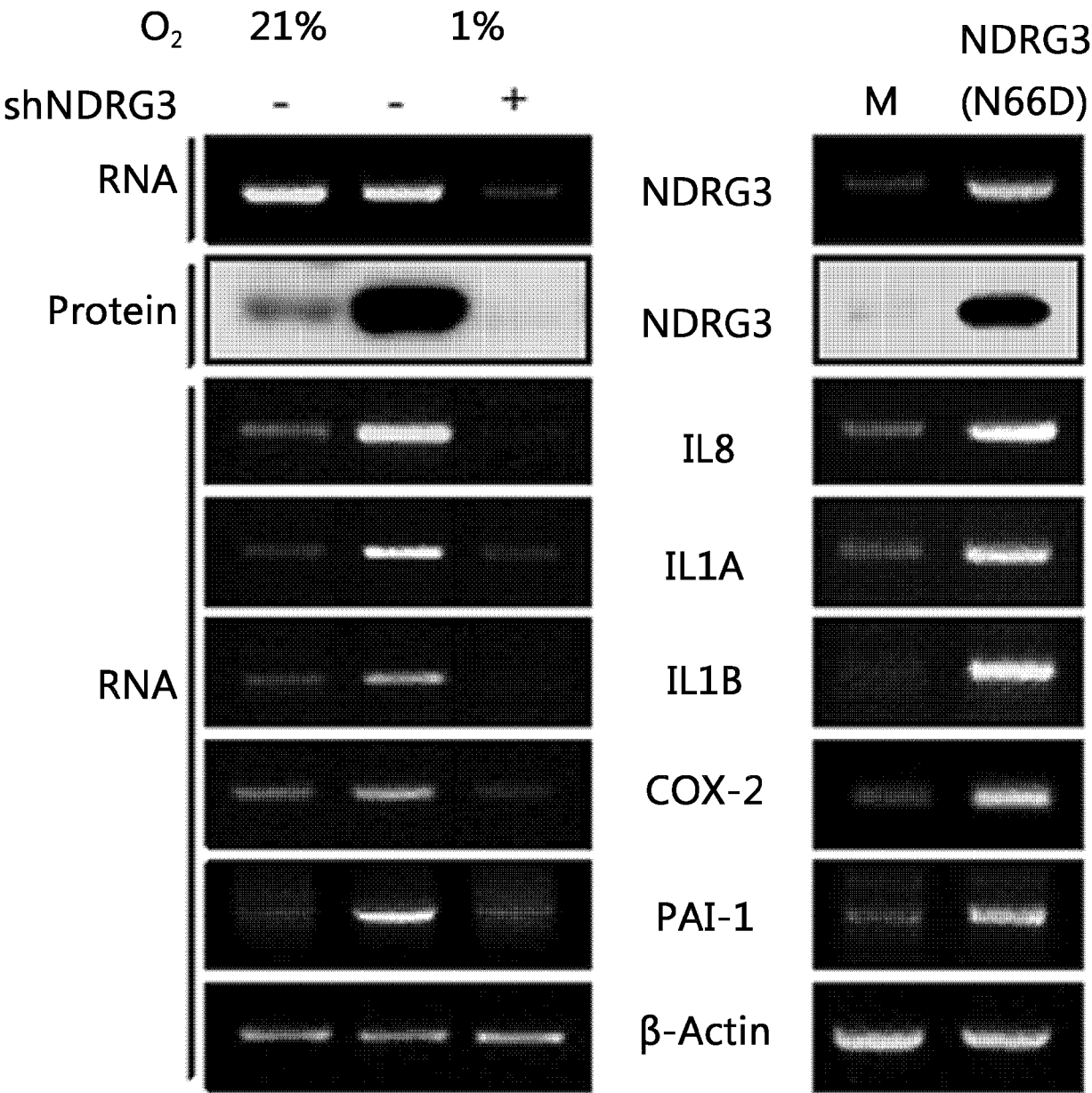
[도12b]



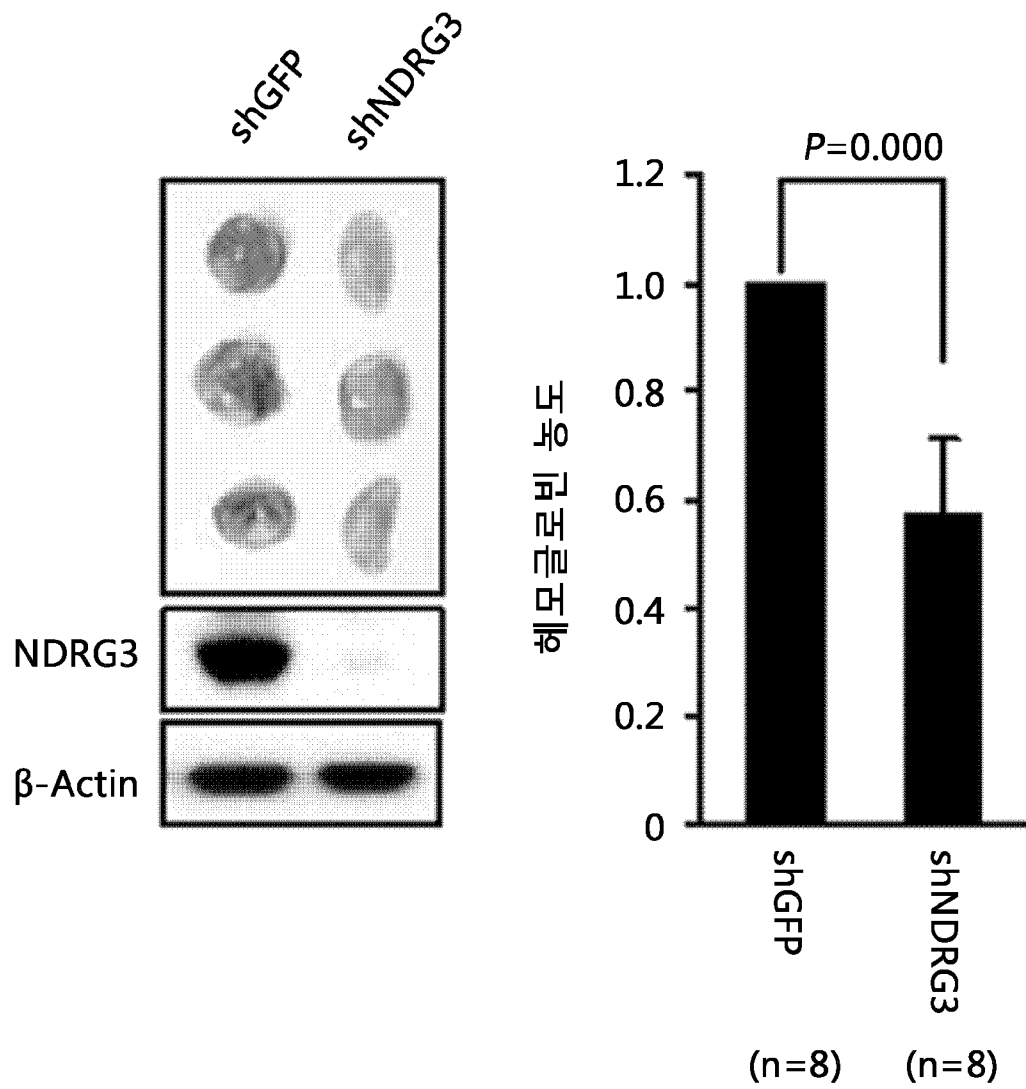
[도13a]



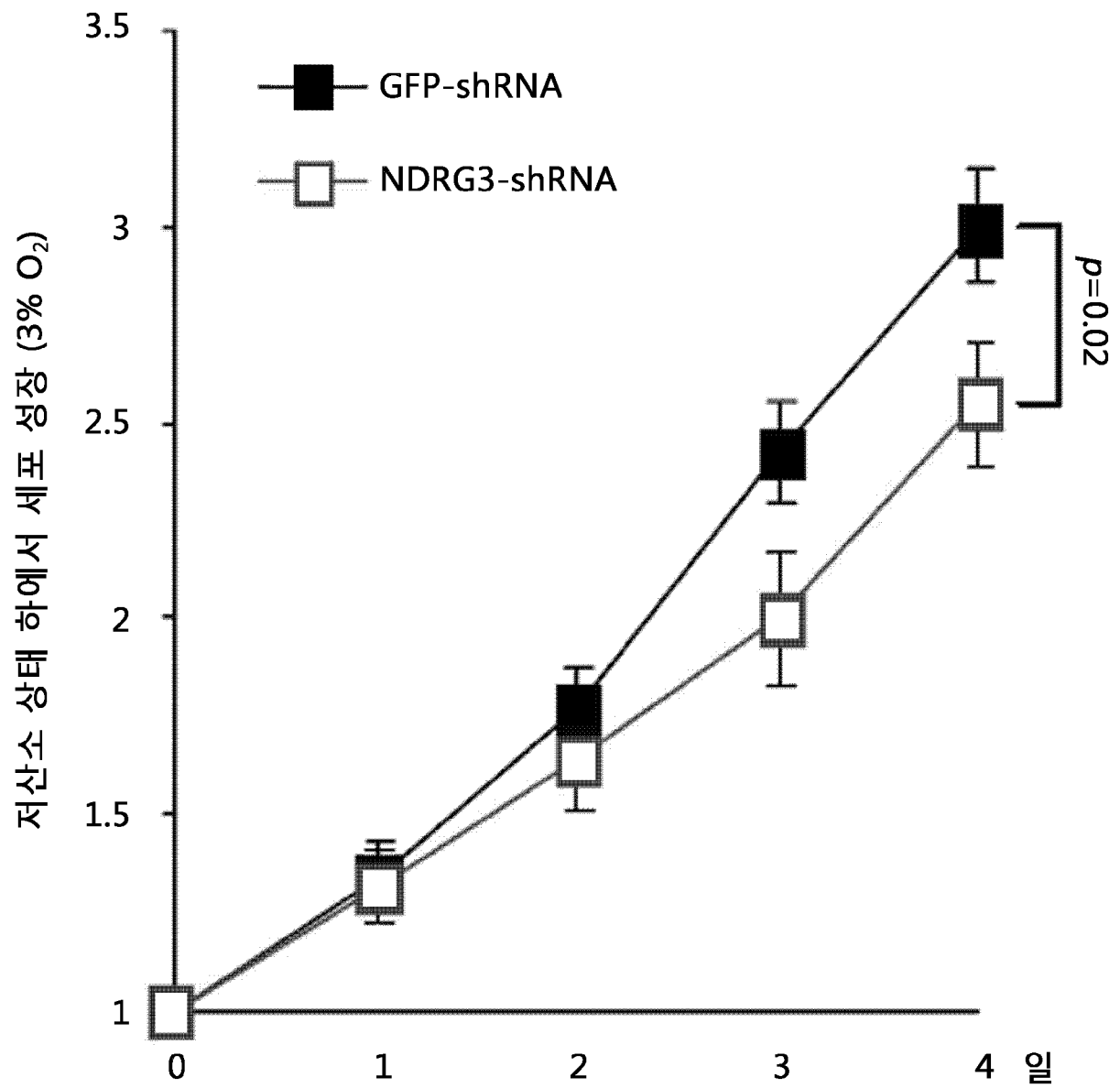
[도13b]



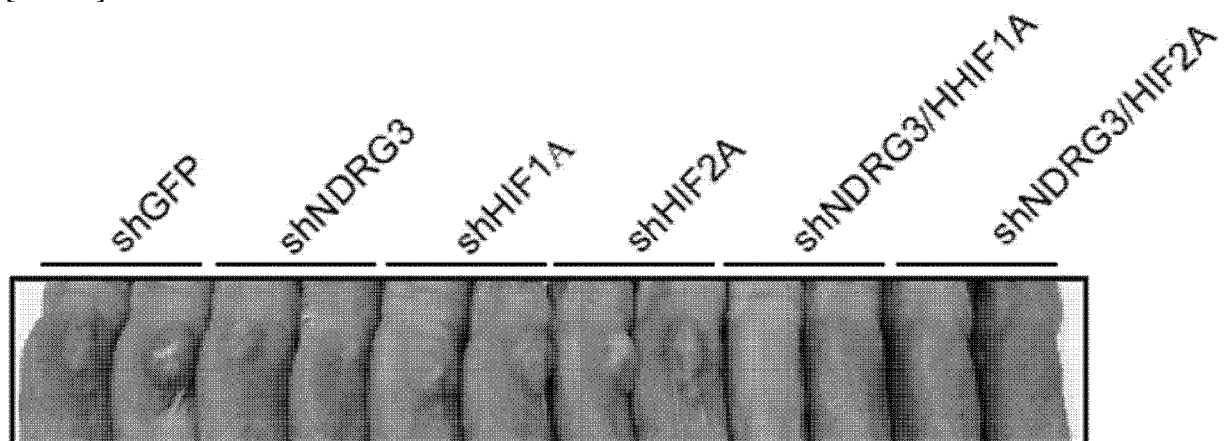
[도 13c]



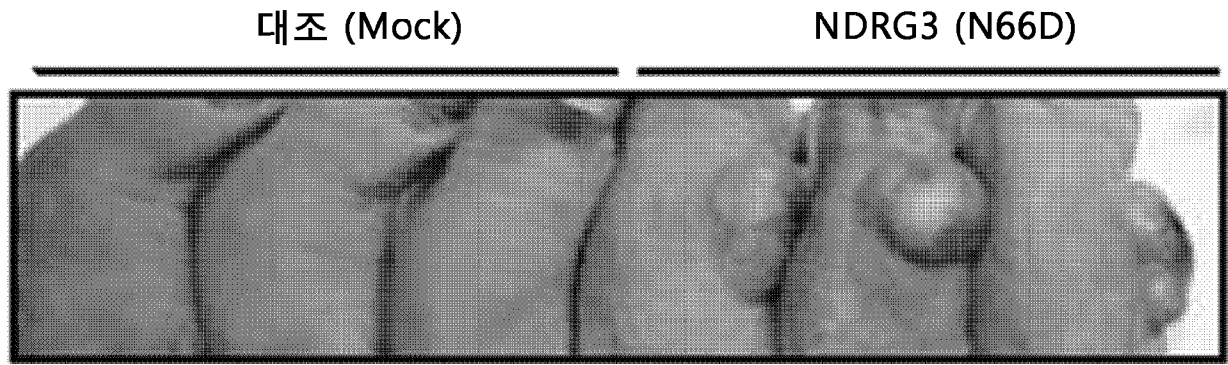
[도 14a]



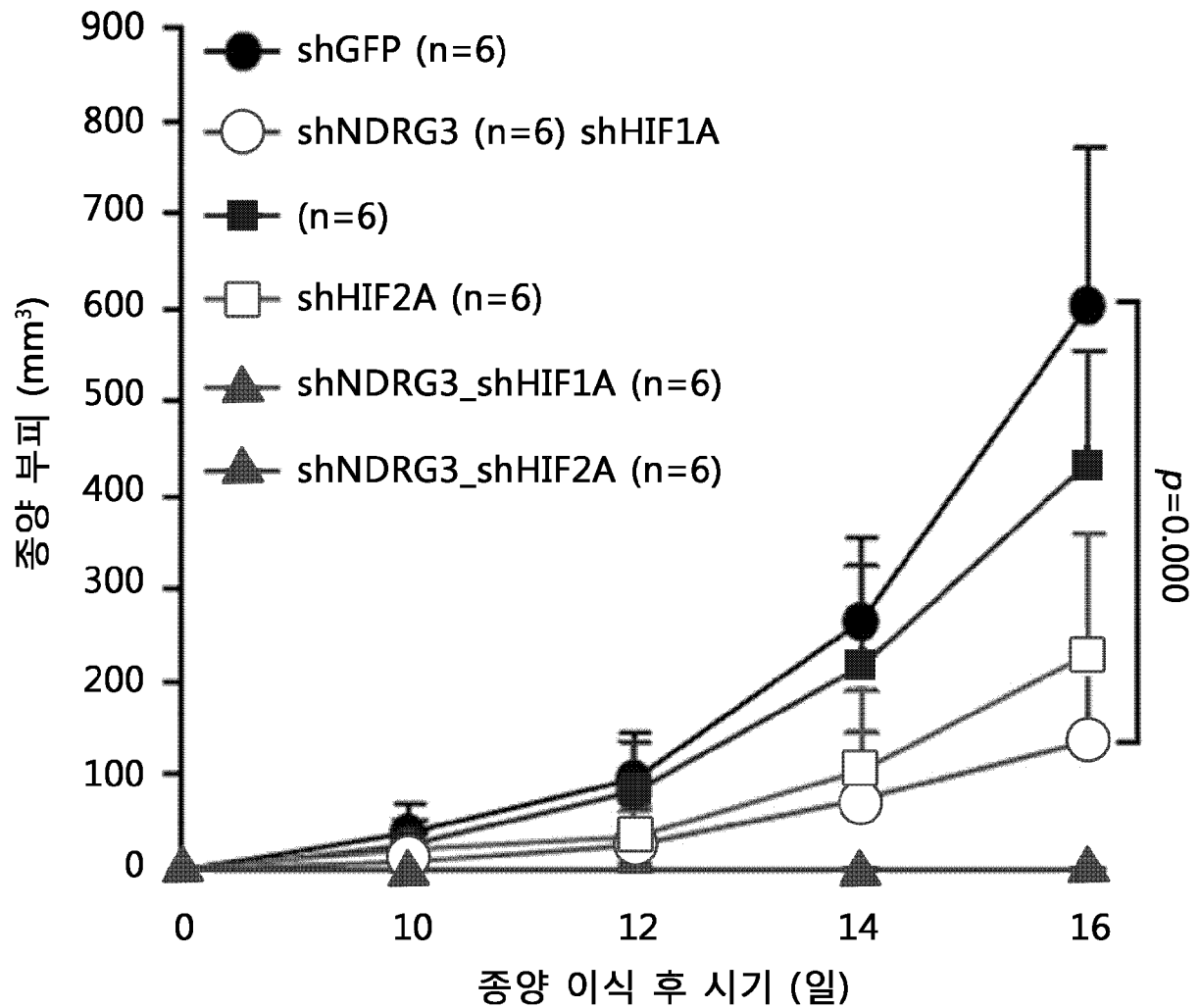
[도 14b]



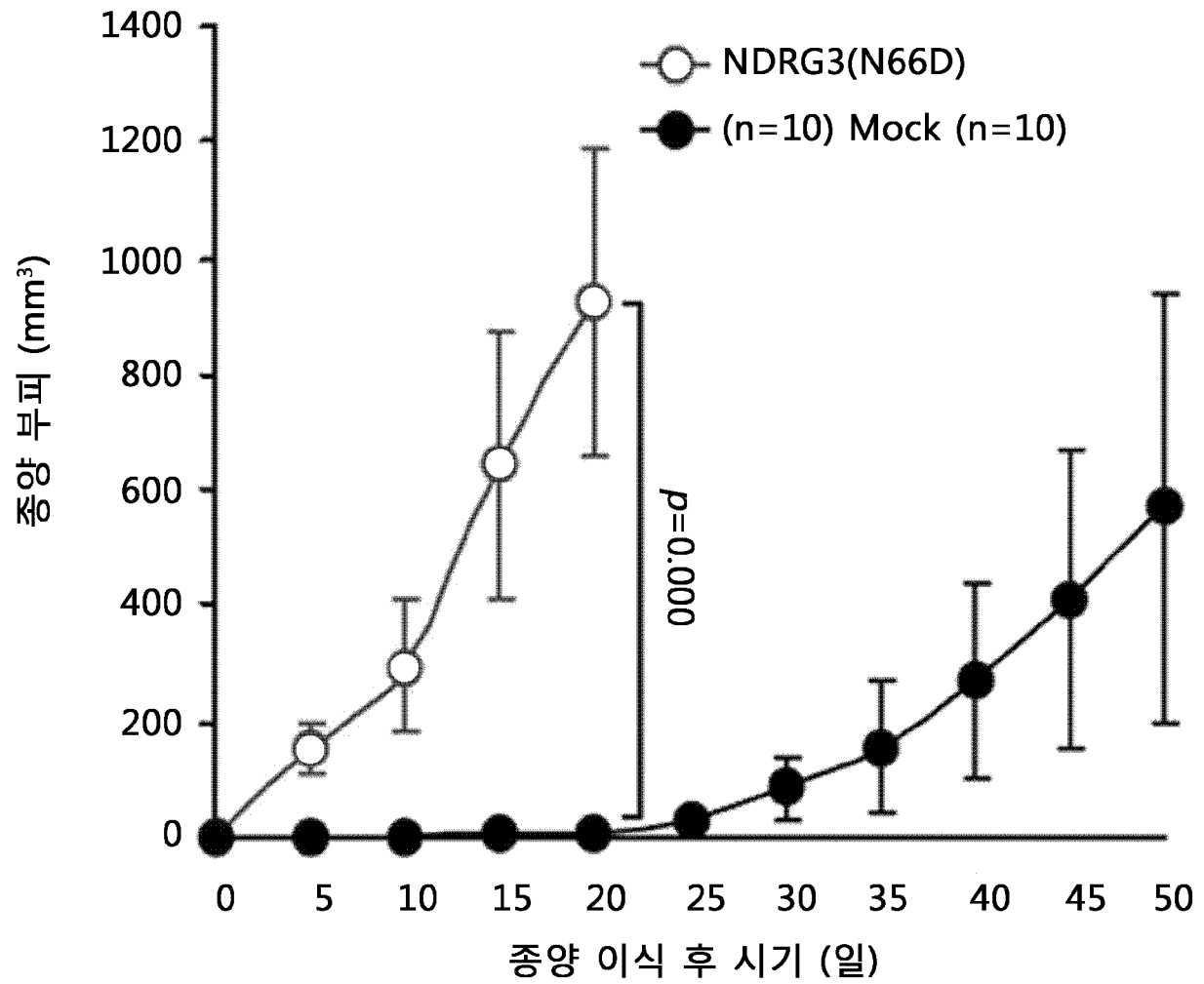
[도14c]



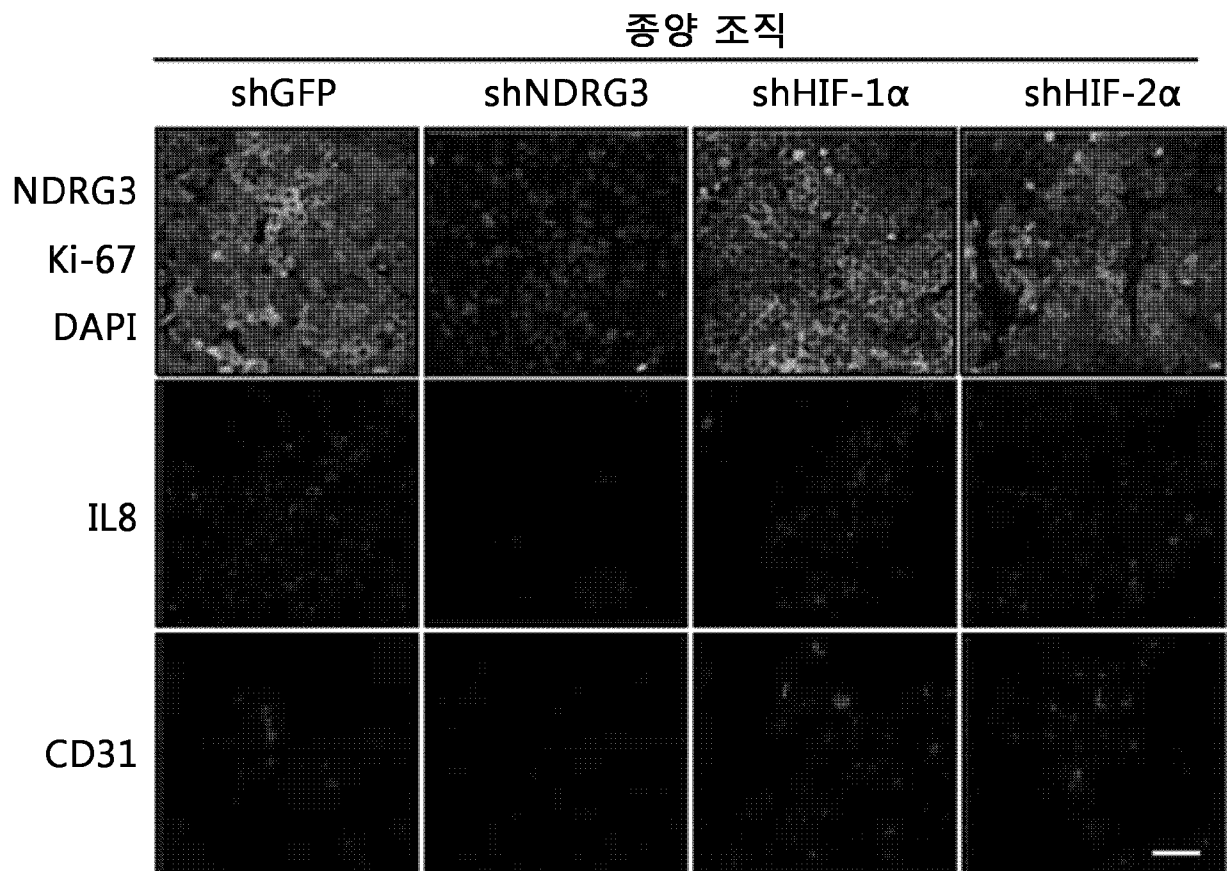
[도14d]



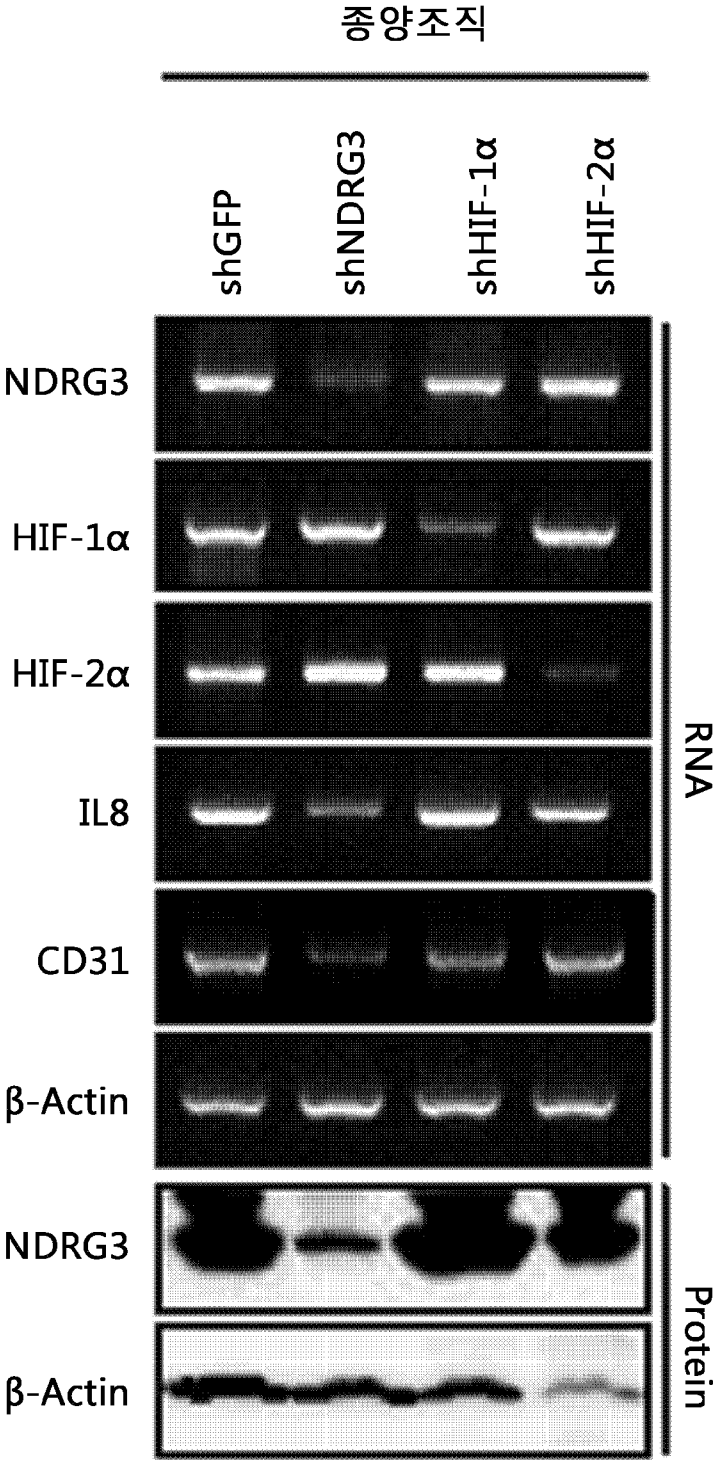
[도14e]



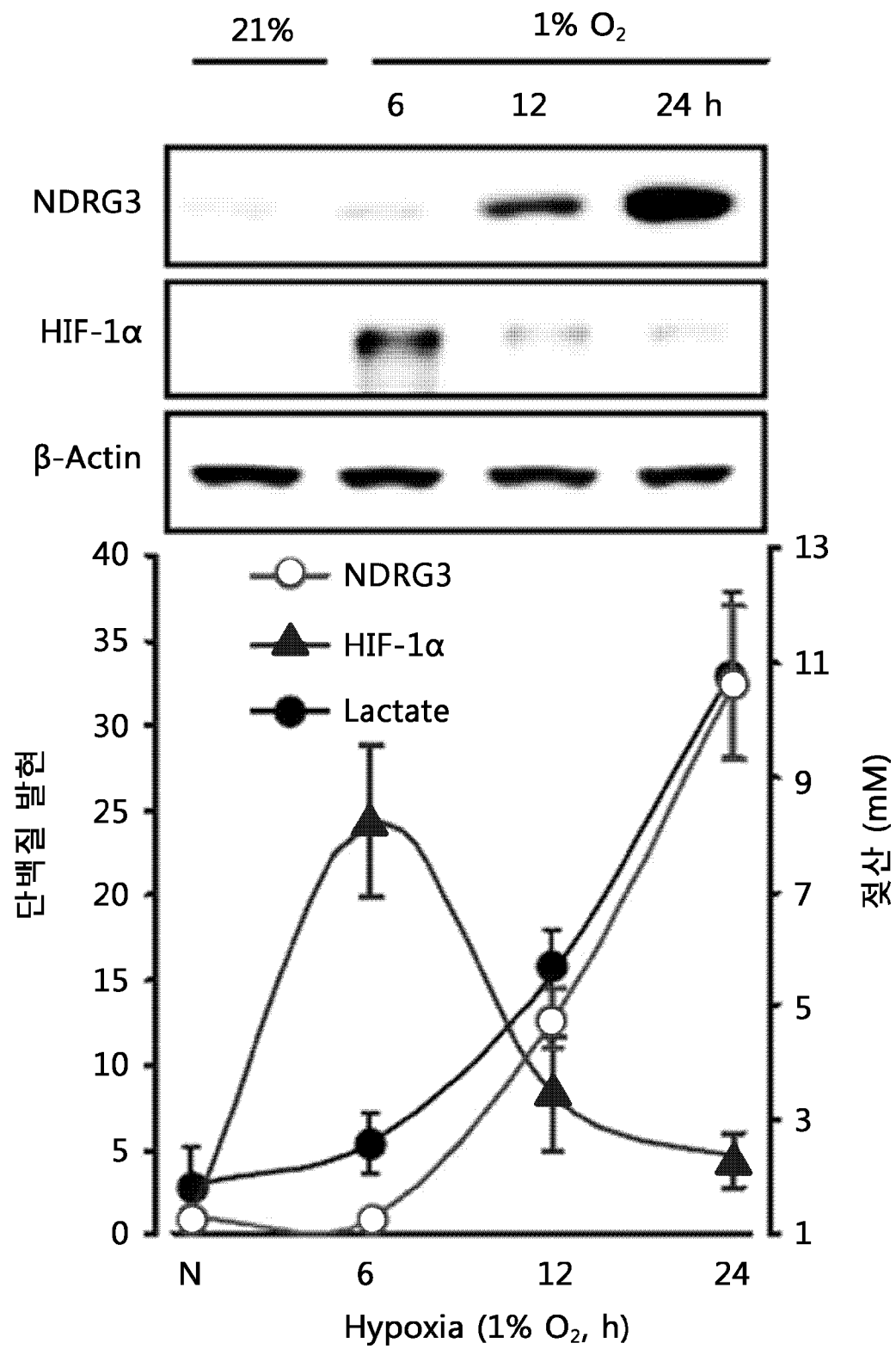
[도14f]



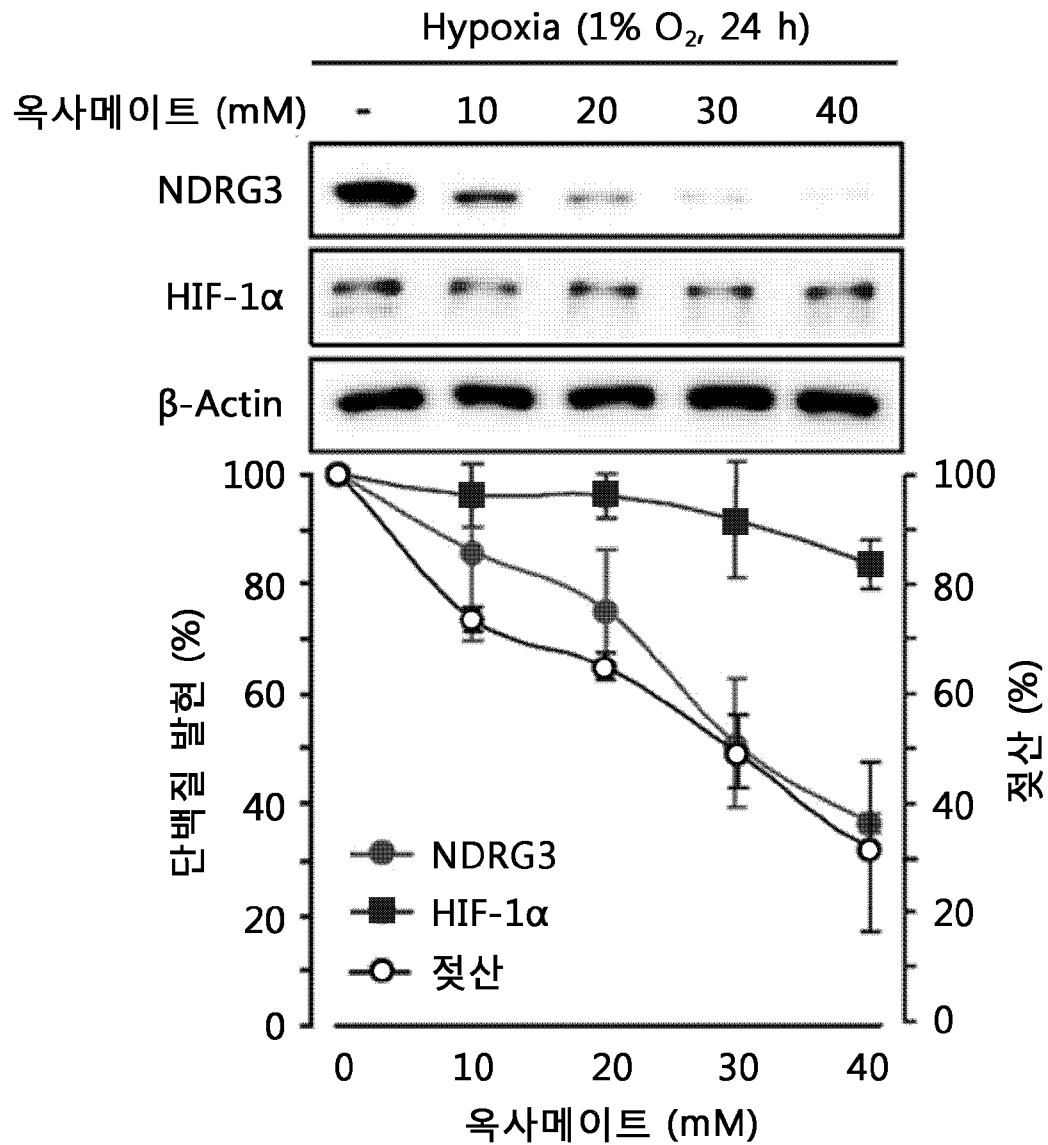
[도14g]



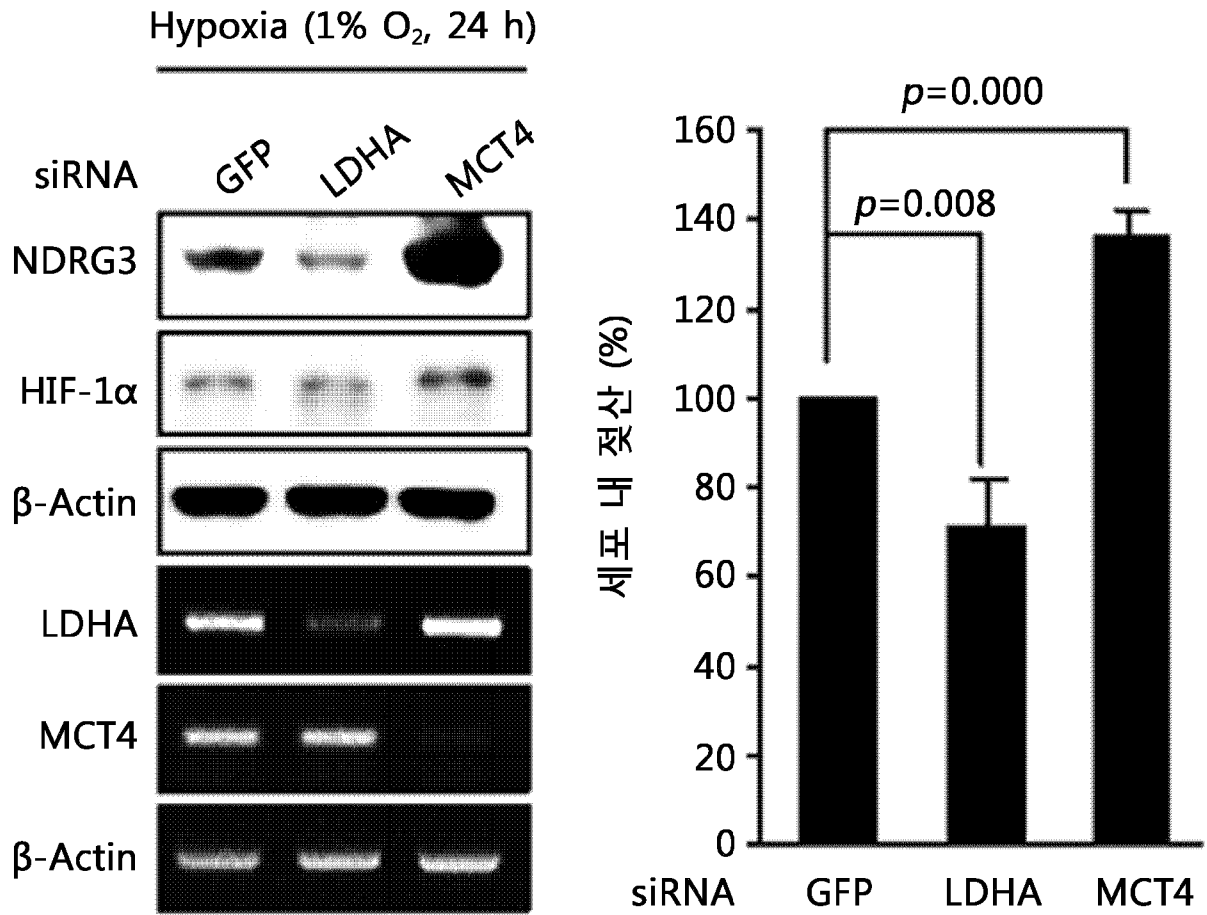
[도 15a]



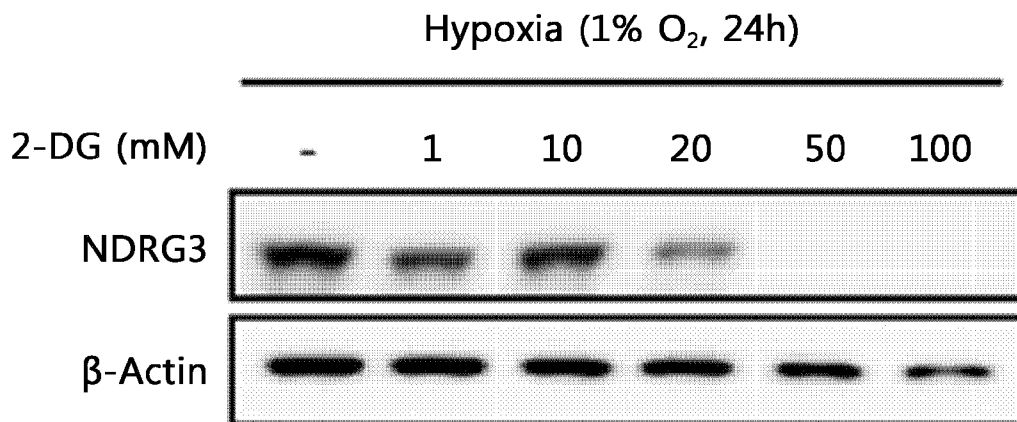
[도15b]



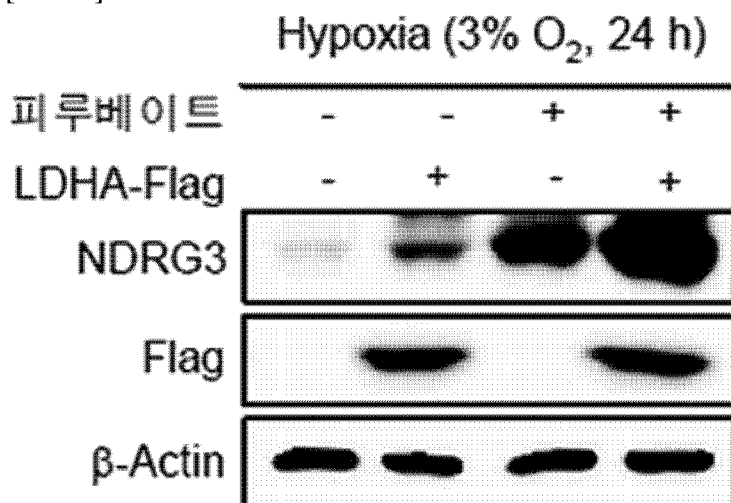
[도15c]



[도15d]

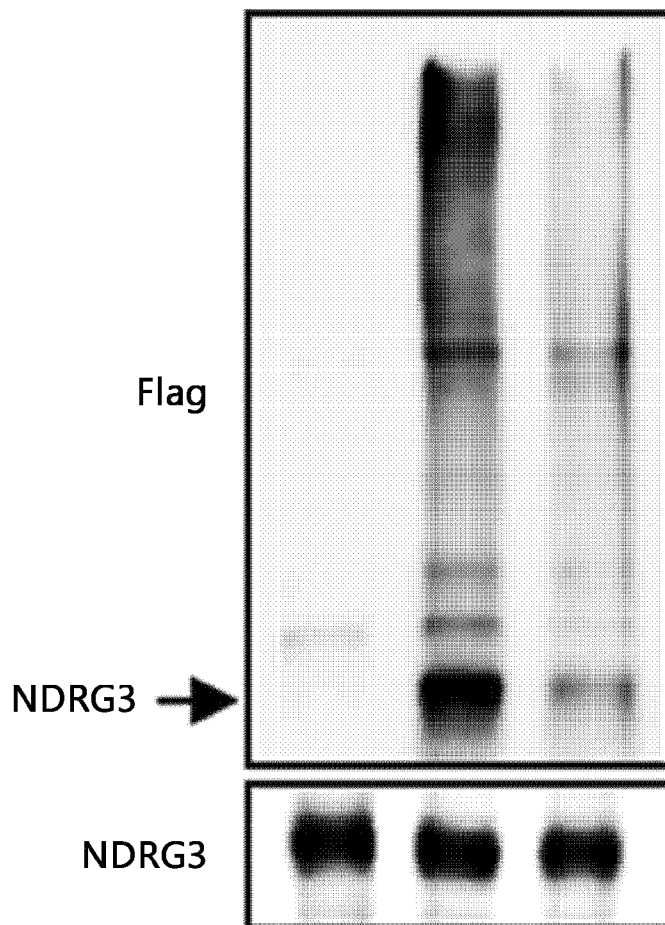


[도15e]

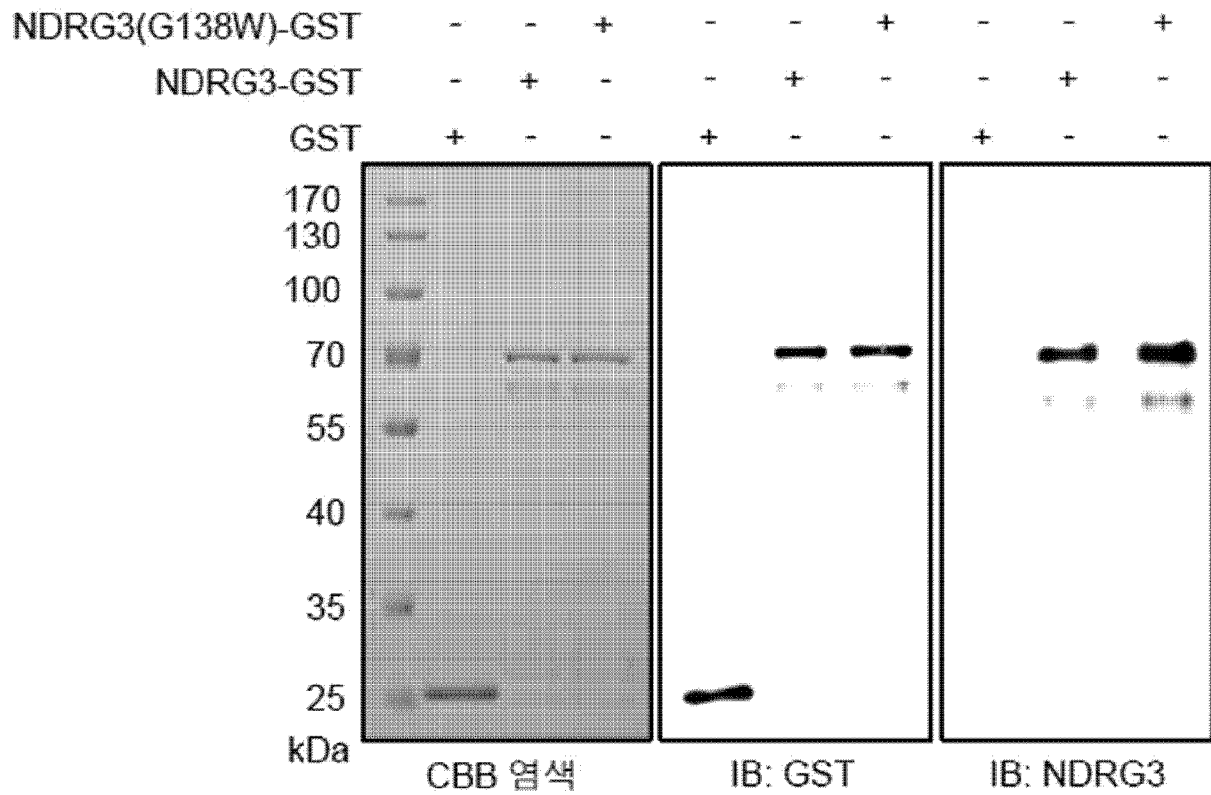


[도15f]

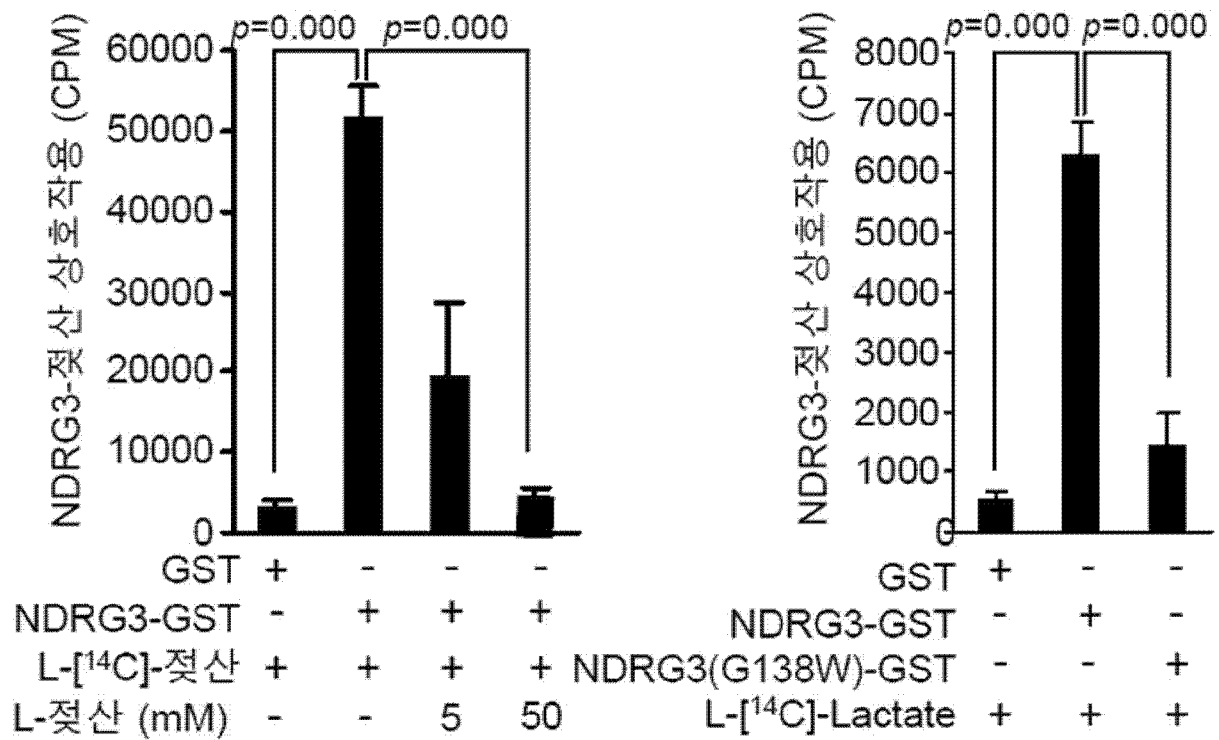
젖산 (50 mM)	-	-	+
PHD2/VHL	-	+	+
E1	+	+	+
E2	+	+	+
Ub-Flag	+	+	+
NDRG3-GST	+	+	+



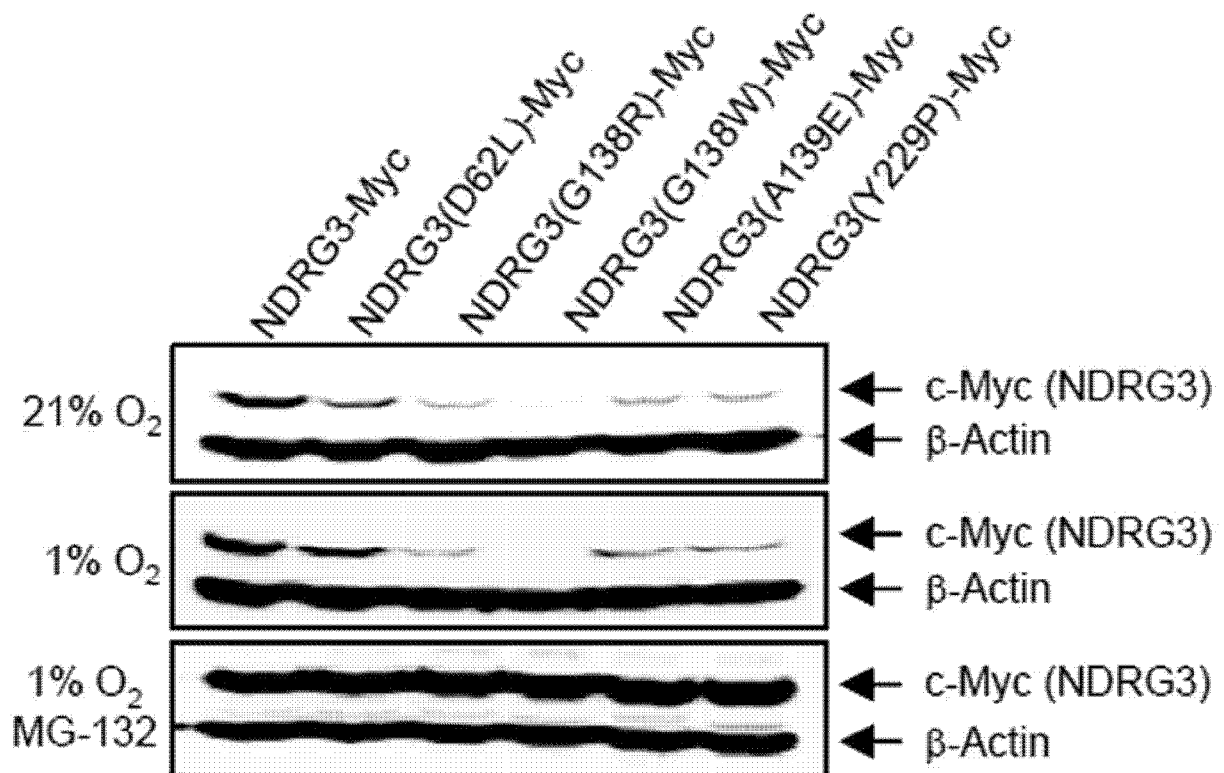
[도16a]



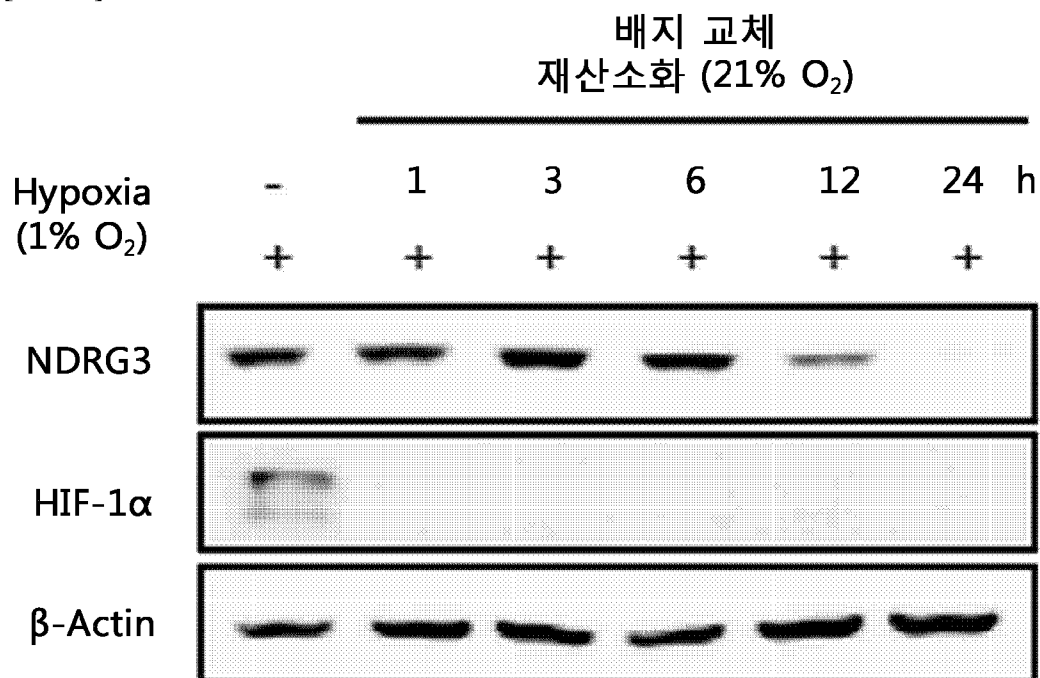
[도16b]



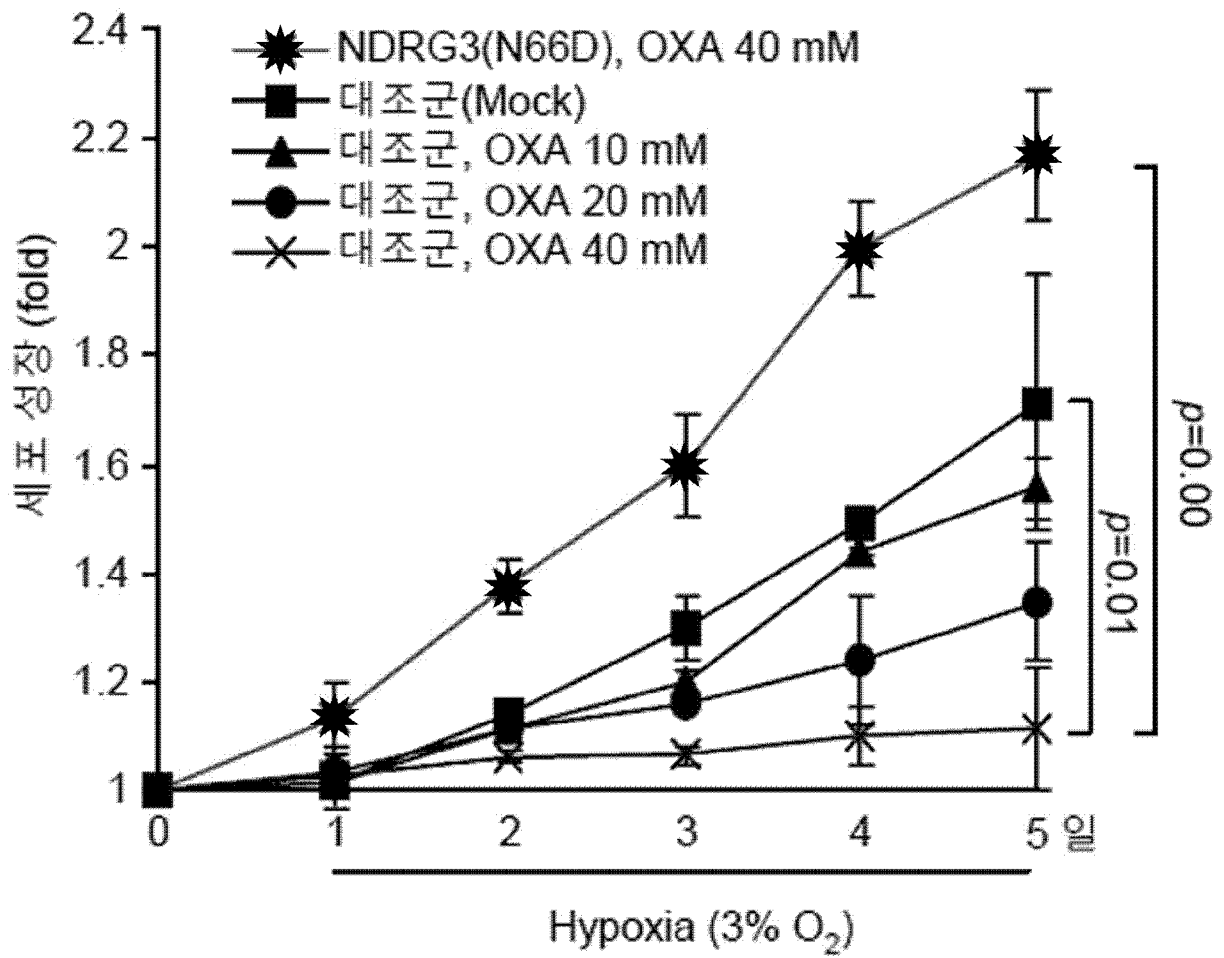
[도16c]



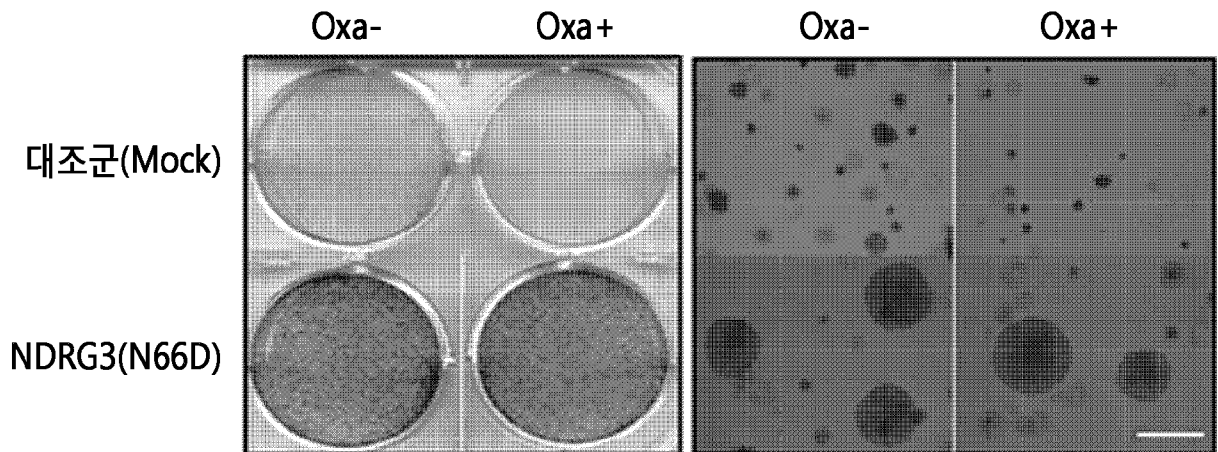
[도16d]



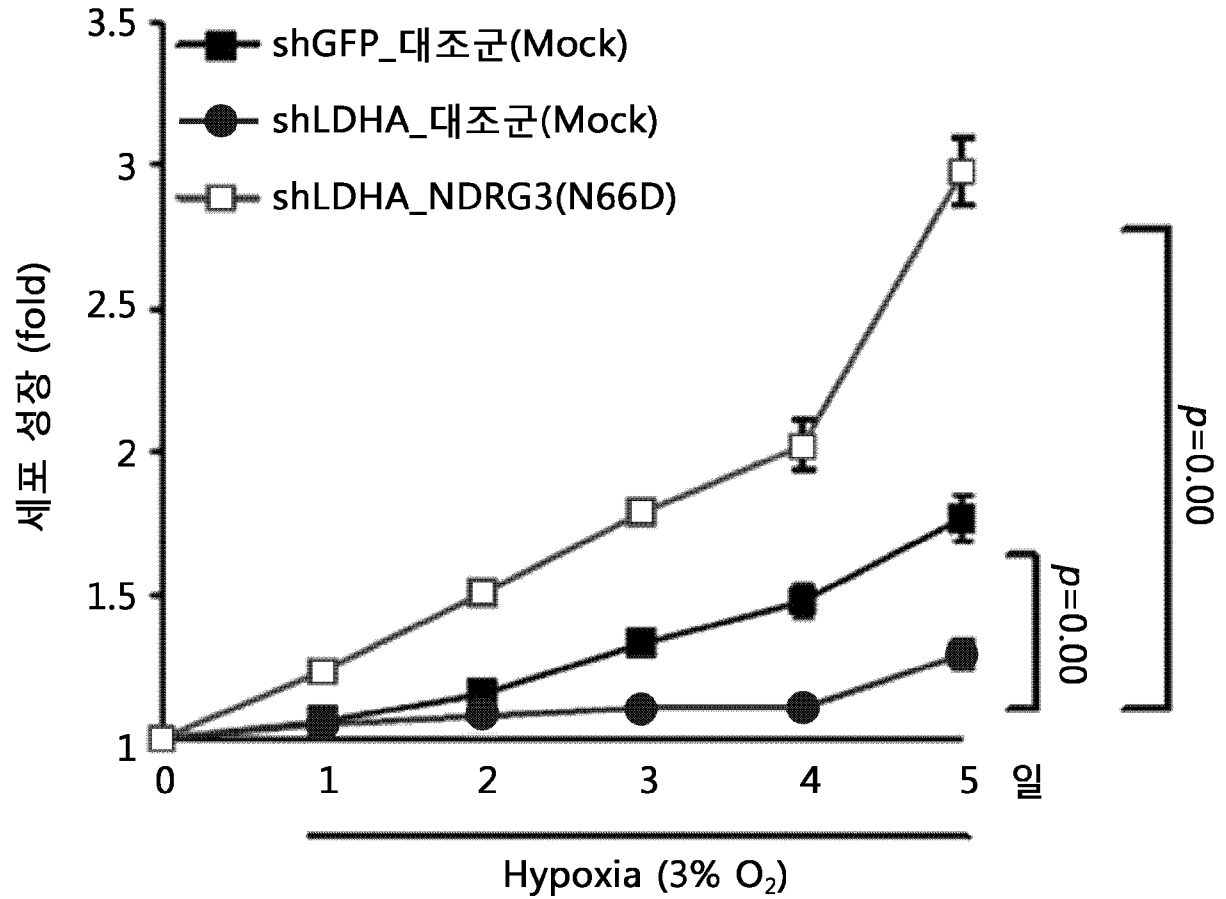
[도17a]



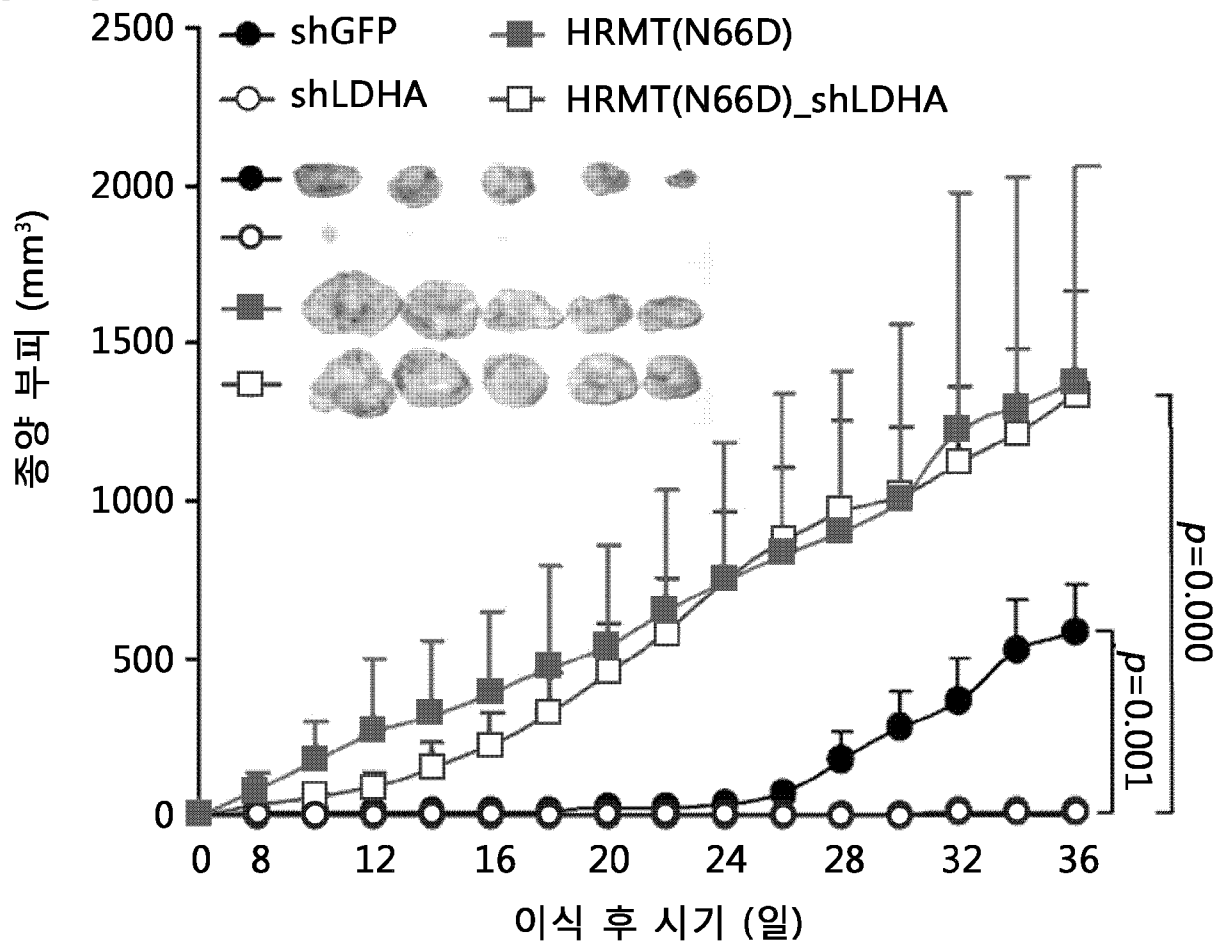
[도17b]



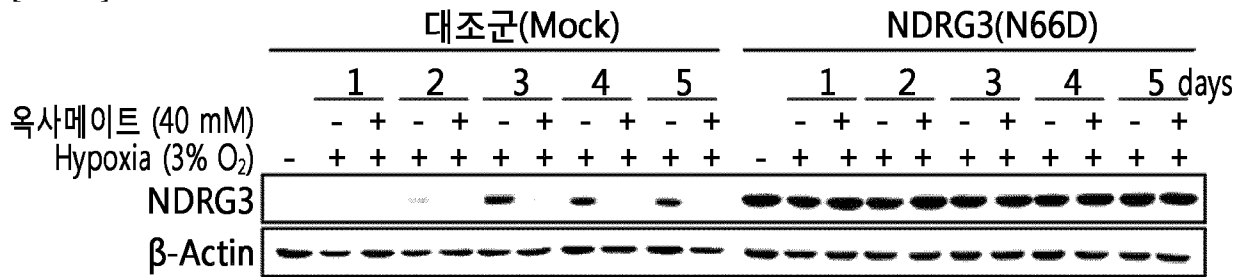
[도17c]



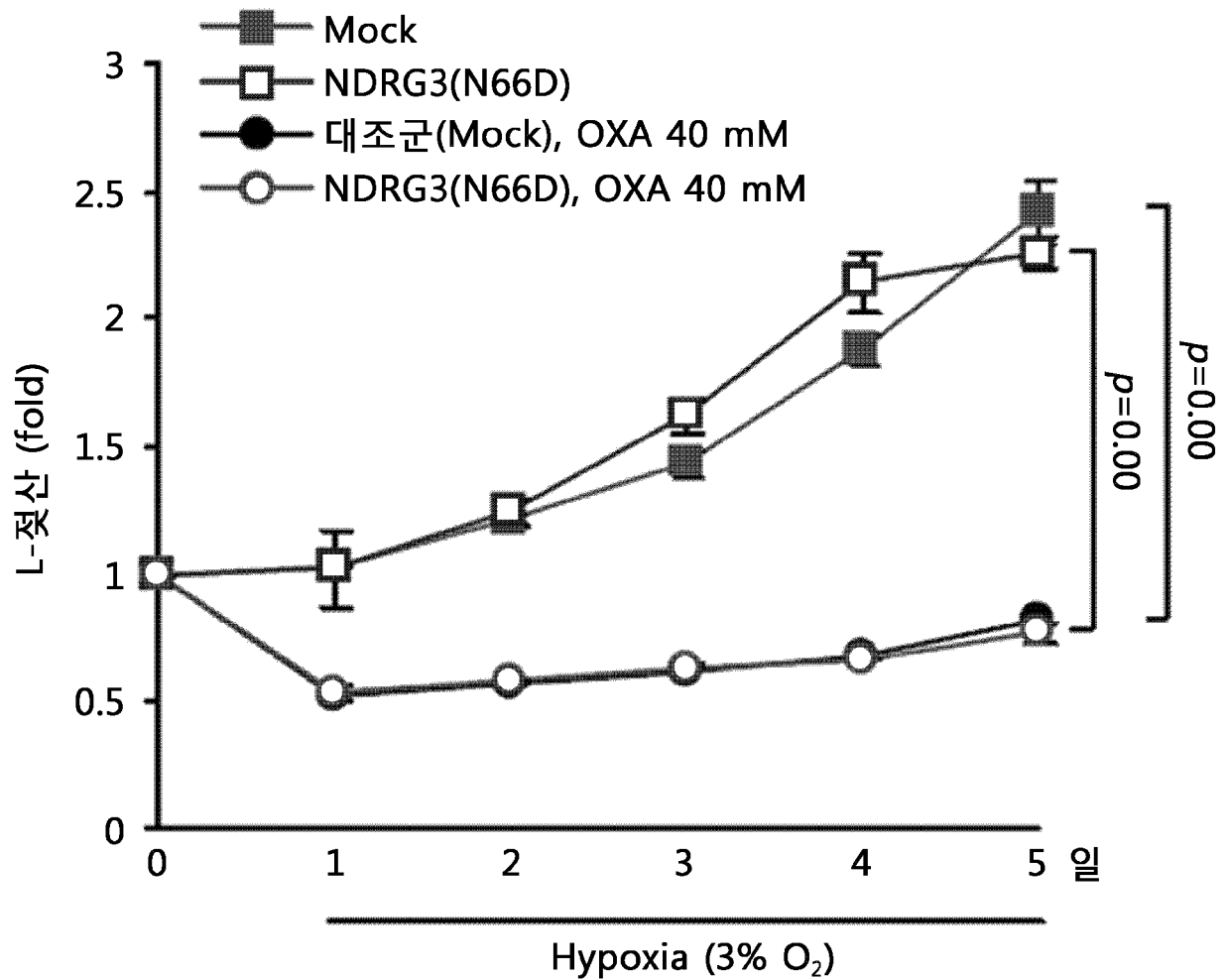
[도17d]



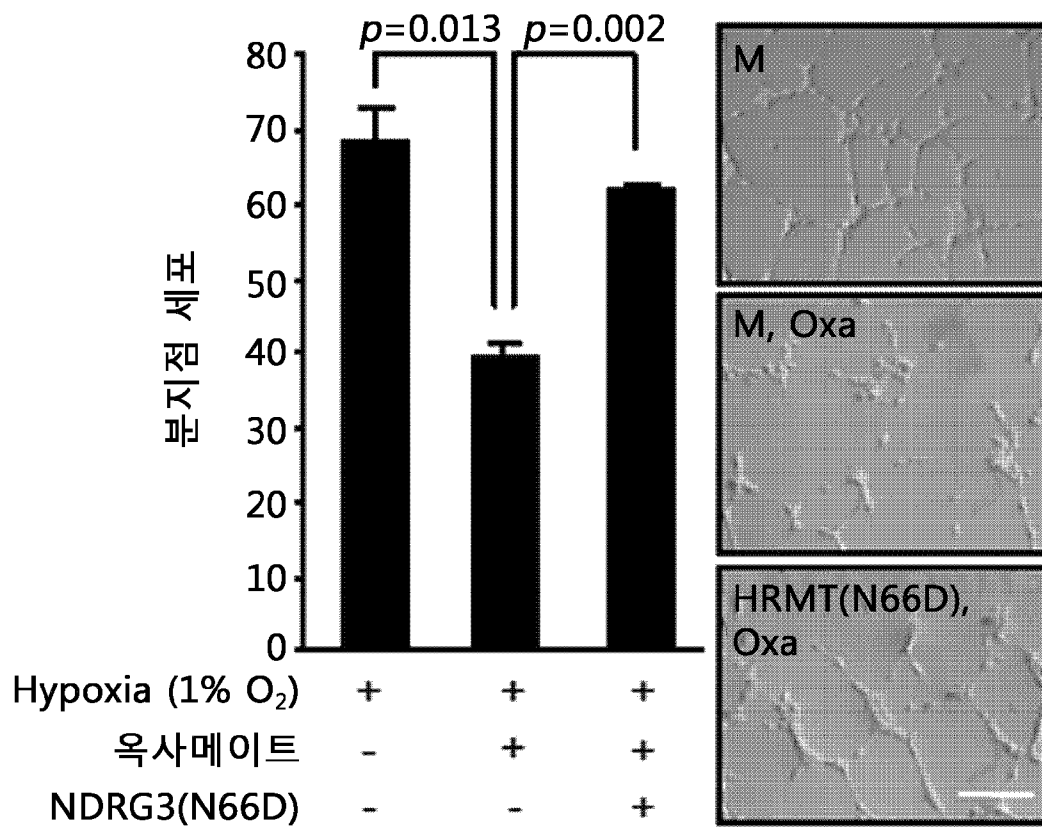
[도17e]



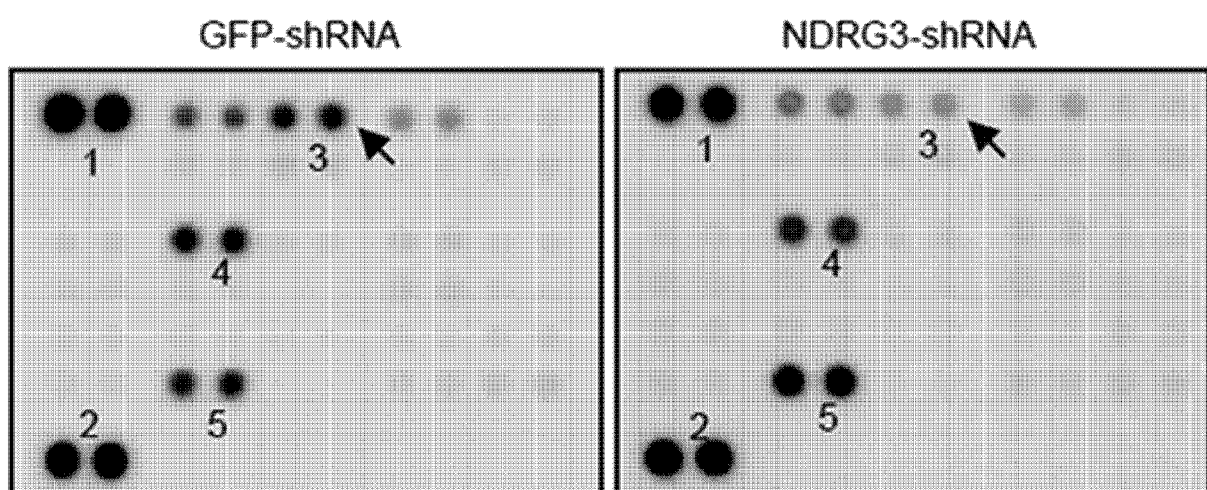
[도17f]



[도18]



[도19a]

Hypoxia (1% O₂, 24 h)

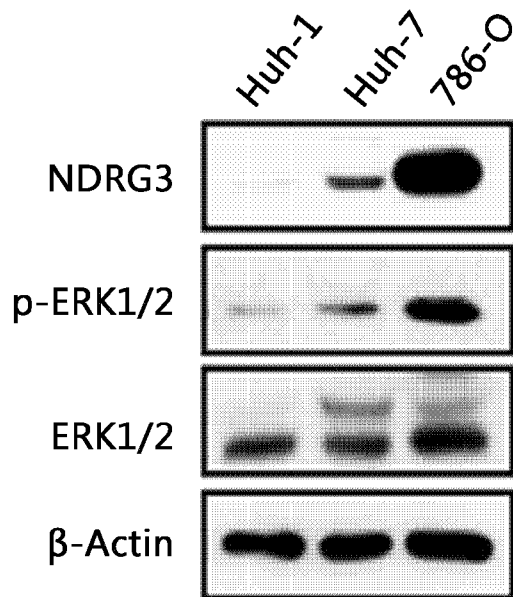
1,2: 양성 대조군

4: CREB (S133)

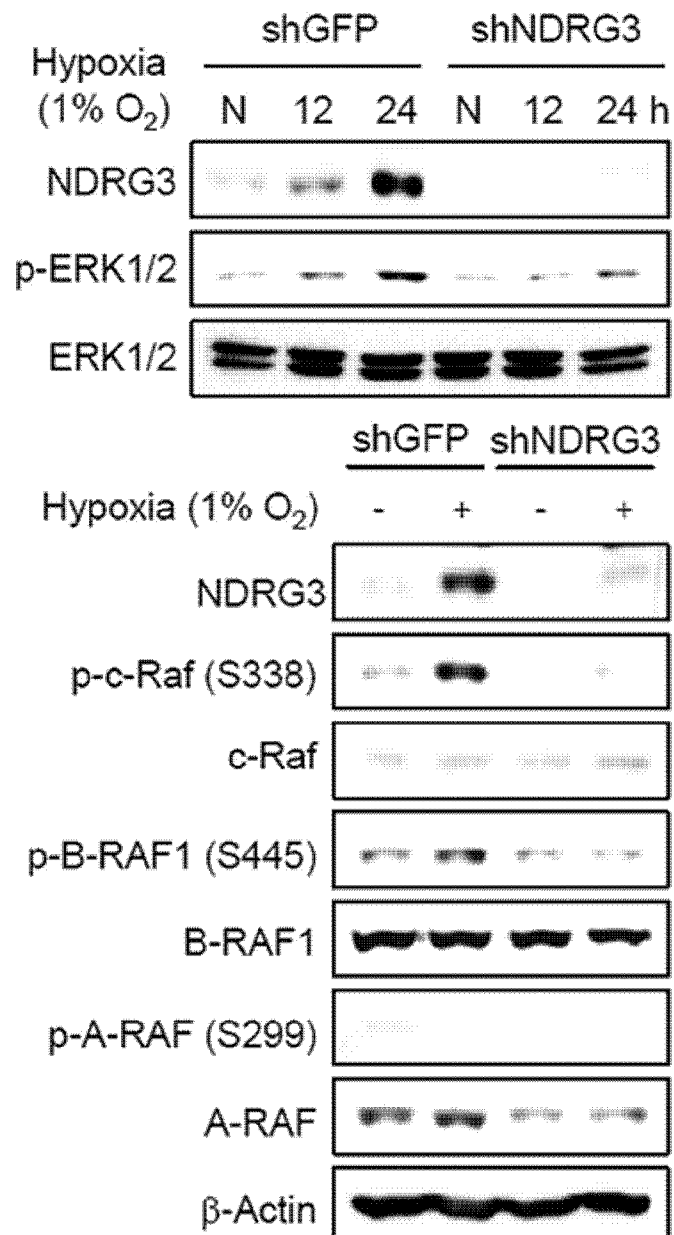
3: ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)

5: Chk-2 (T68)

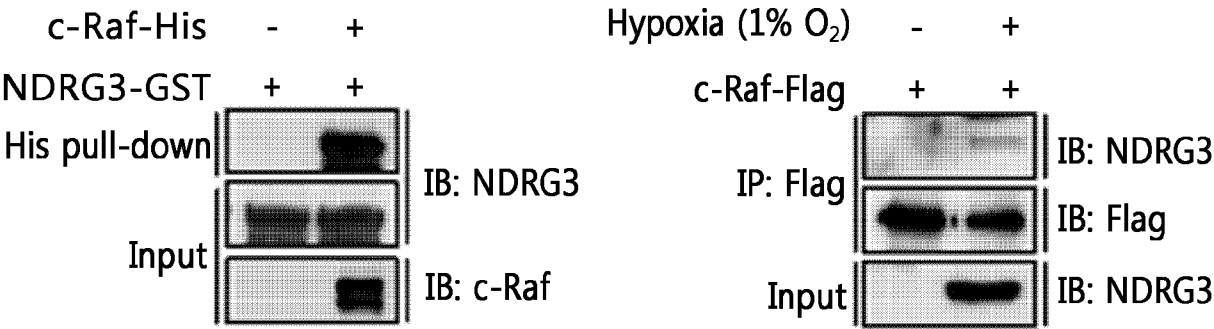
[도19b]



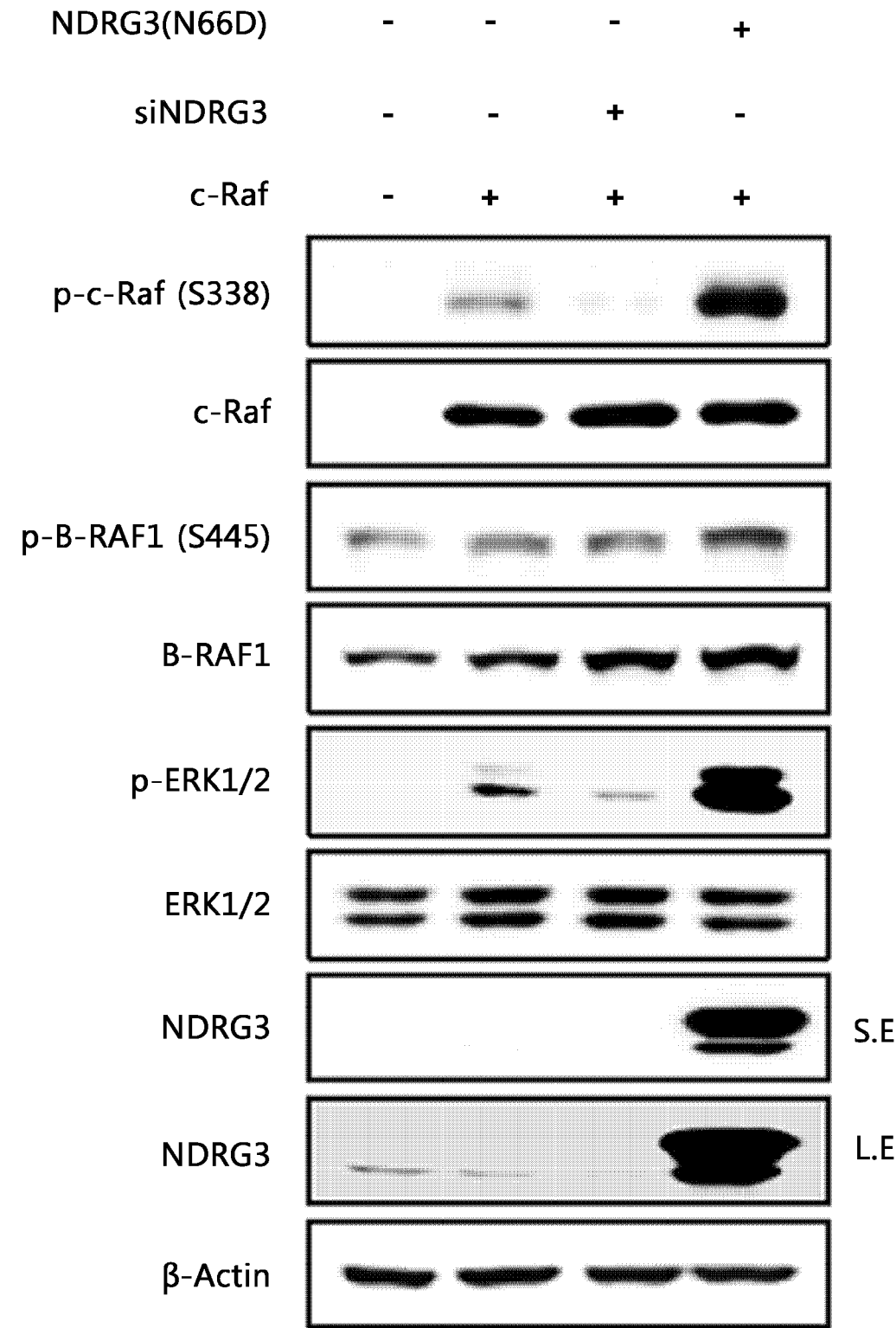
[도19c]



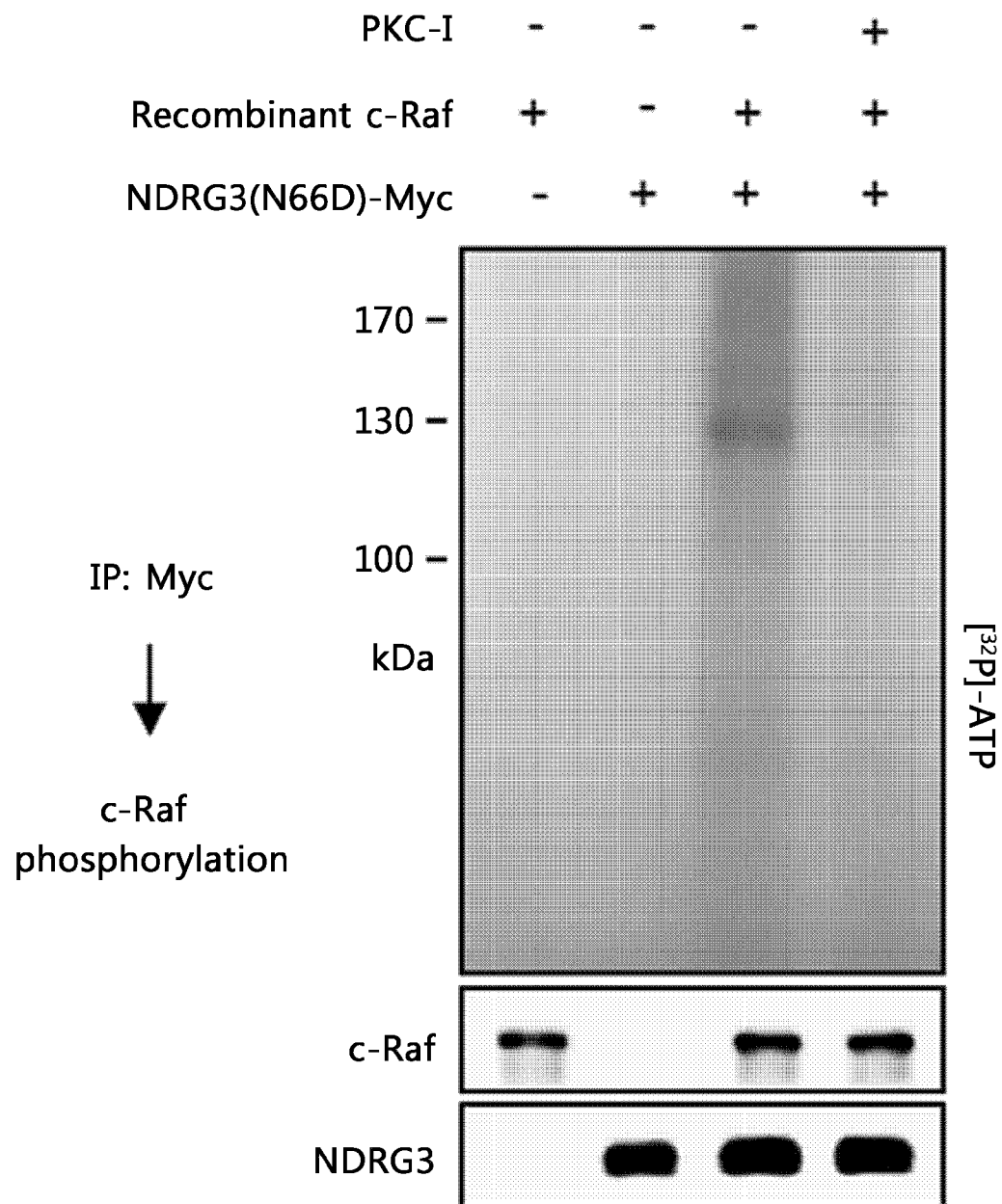
[도19d]



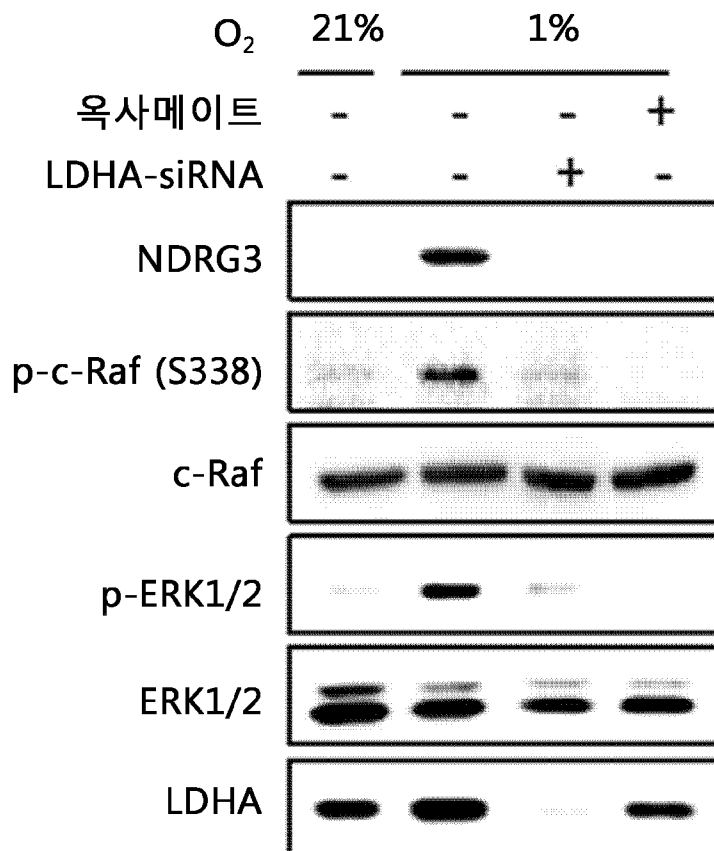
[도19e]



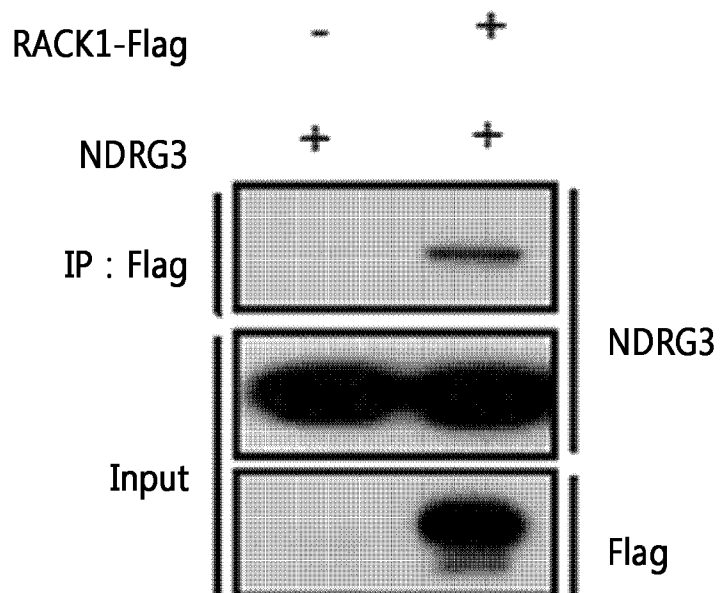
[도 19f]



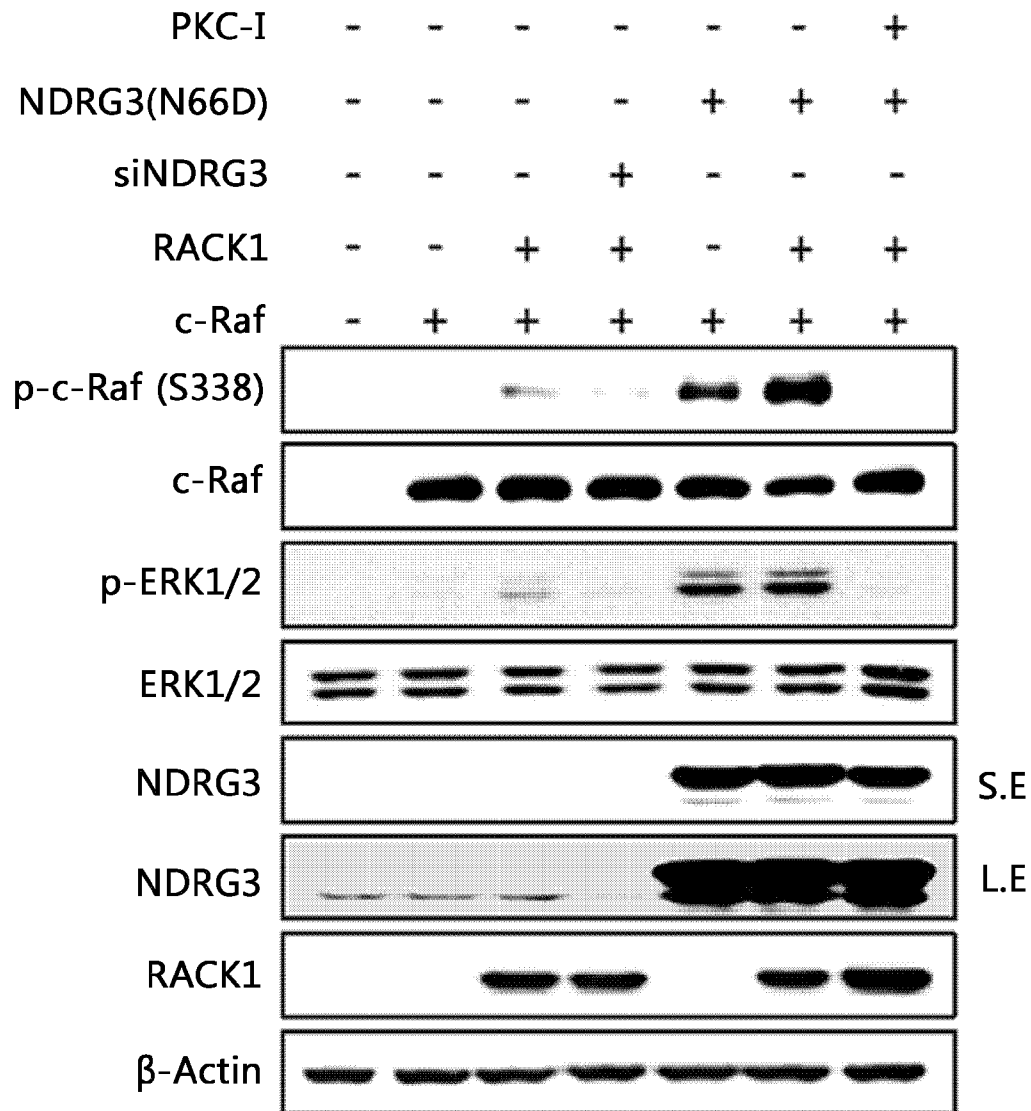
[도19g]



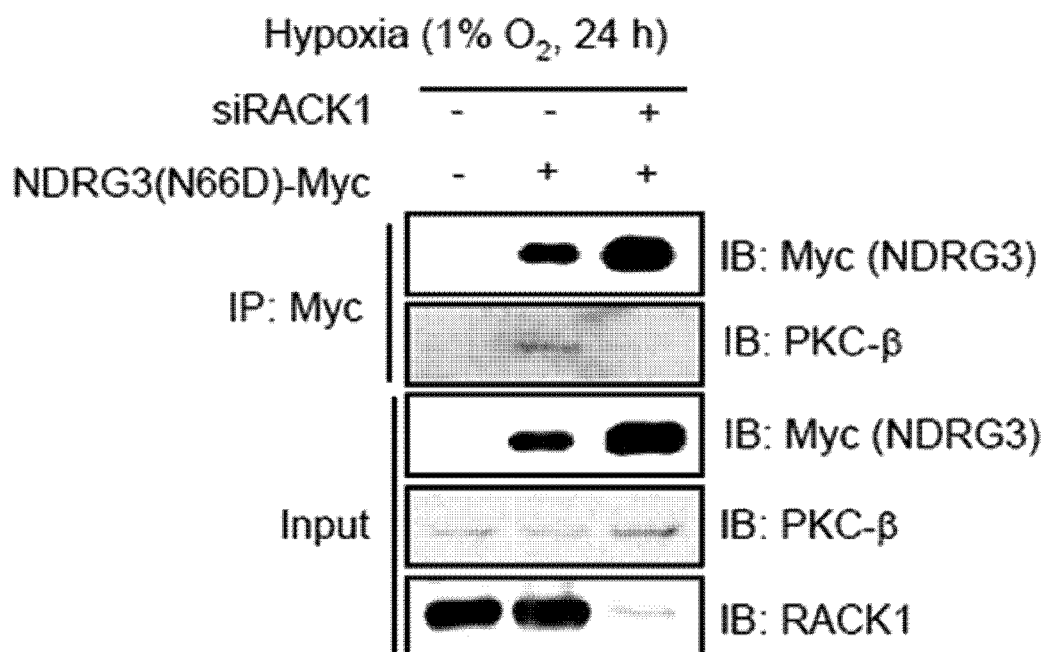
[도20a]



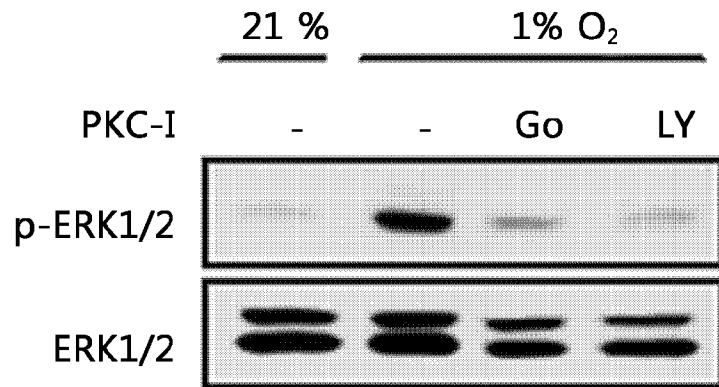
[도20b]



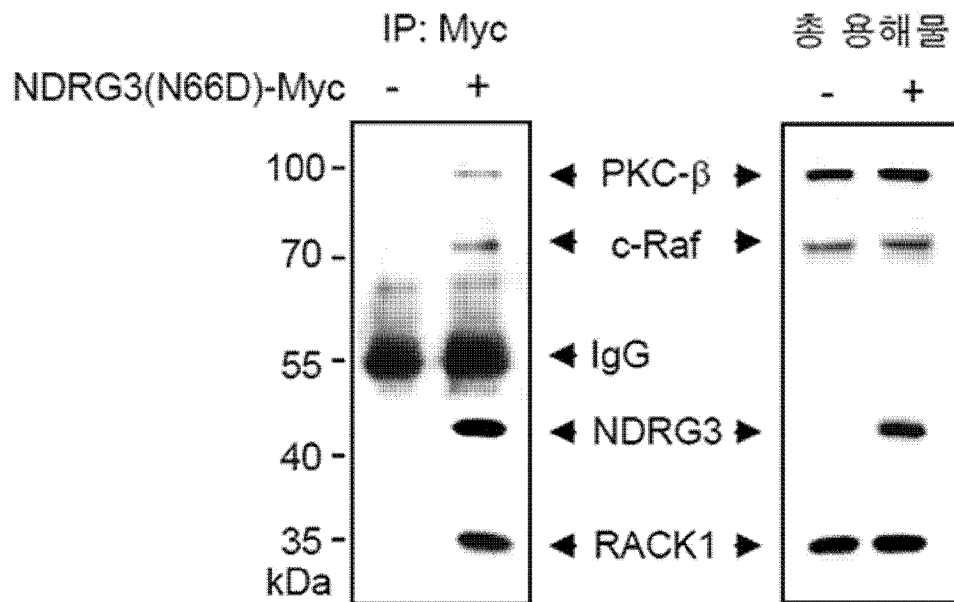
[도20c]



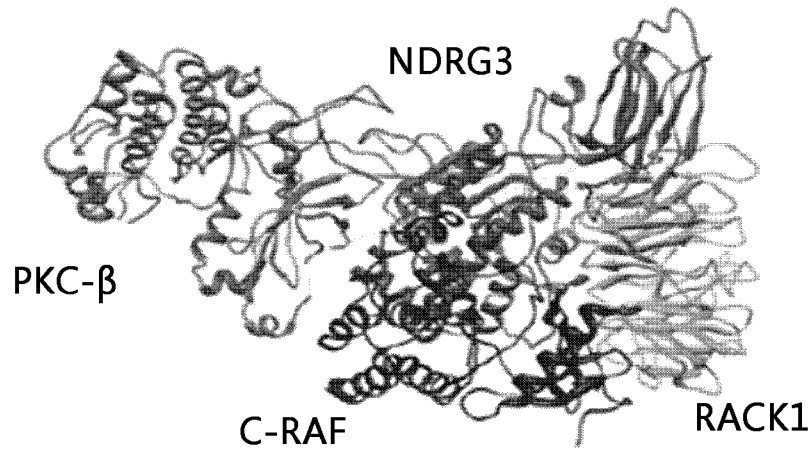
[도20d]



[도20e]

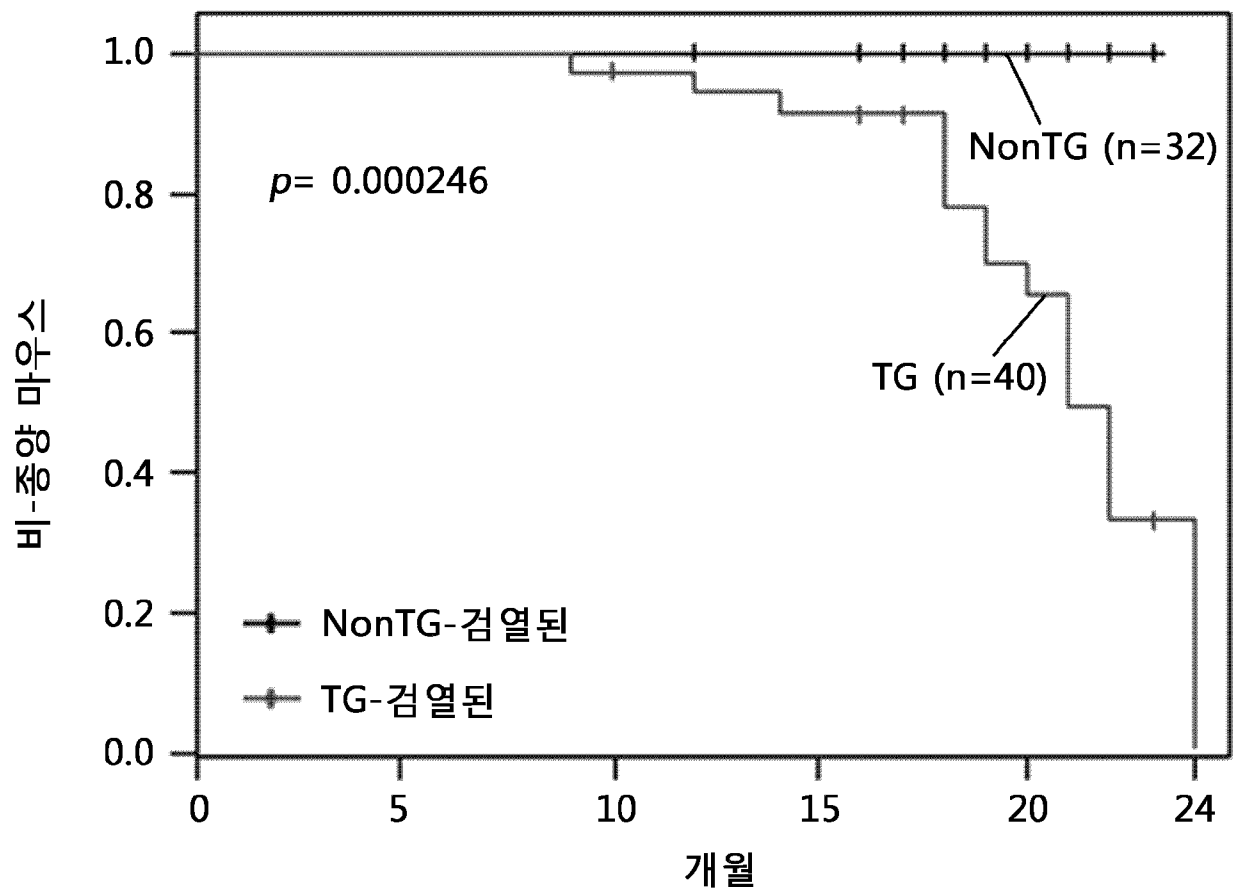


[도20f]

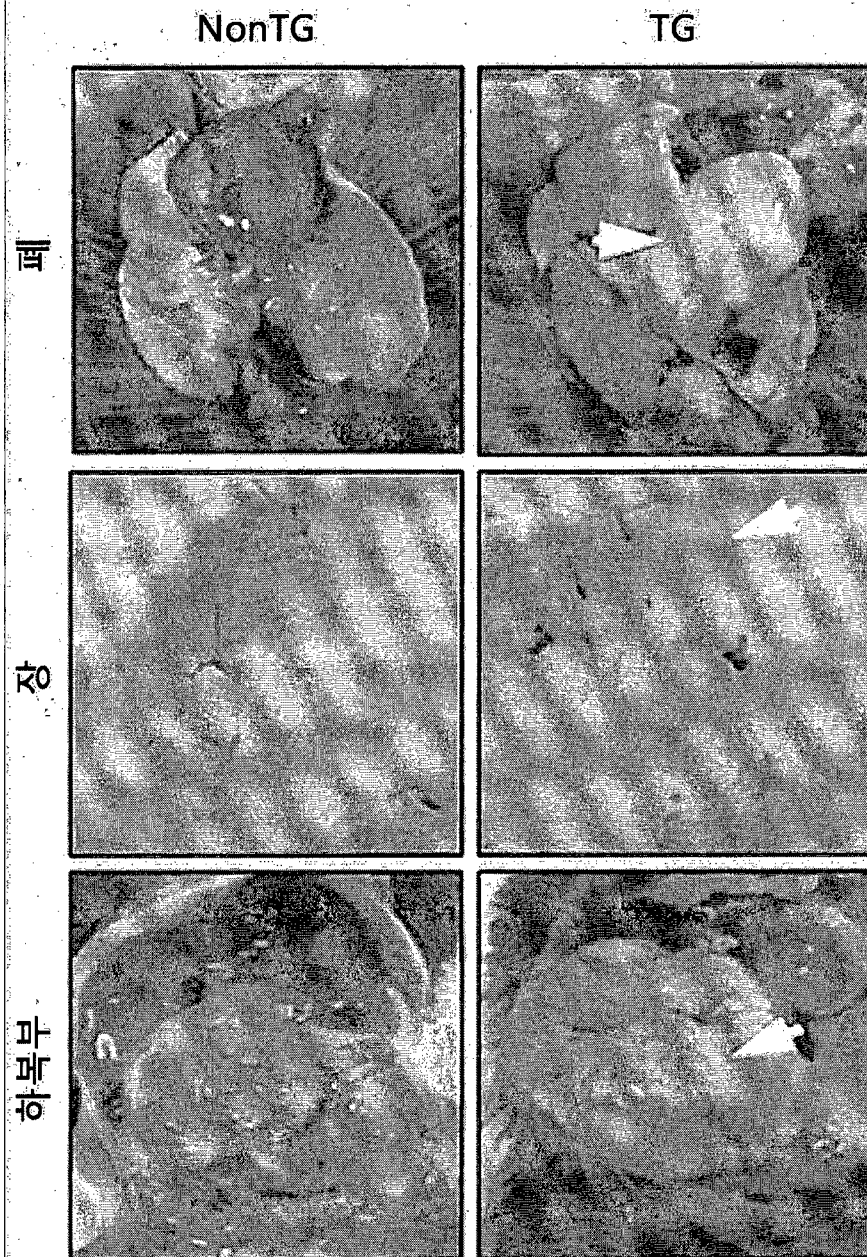


Target name	NCBI ID	Full length	Template	Coverage	Identity	p-value
NDRG3	NP_114402.1	375	2xmr A	30~316	61	1e-103
EGLN1 (PHD2)	NP_071334.1	426	3hqr A	184~408	99	3e-133
RAF1 (c-Ref)	NP_084056.1	684	3lb7 A	1~264	93	1e-152
GNB2L1 (RACK1)	NP_006089.1	306	2zkq A	1~306	100	0
PRKCB (PKC-beta)	NP_997700.1	671	3pfq A	101~668	88	0

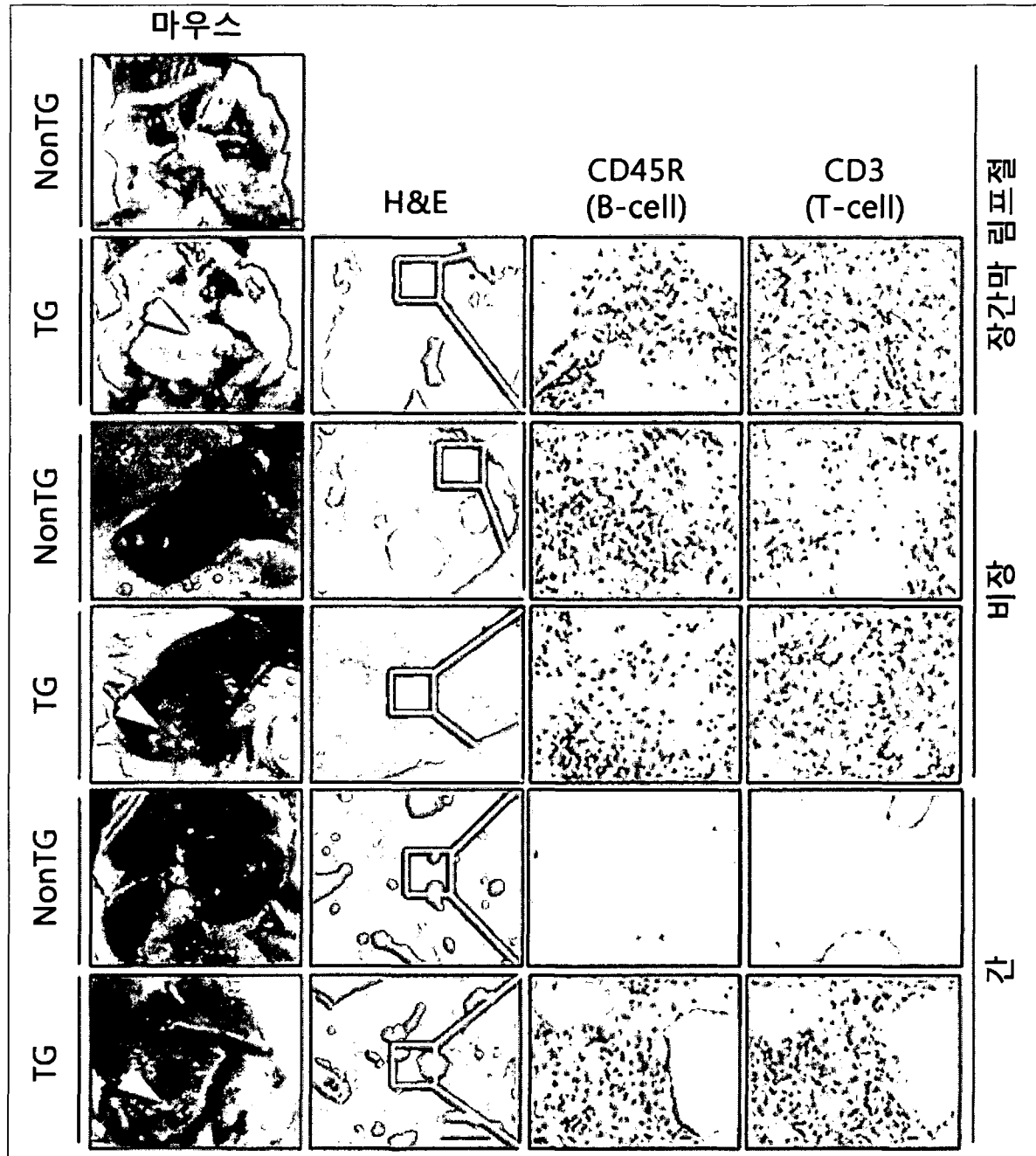
[도21a]



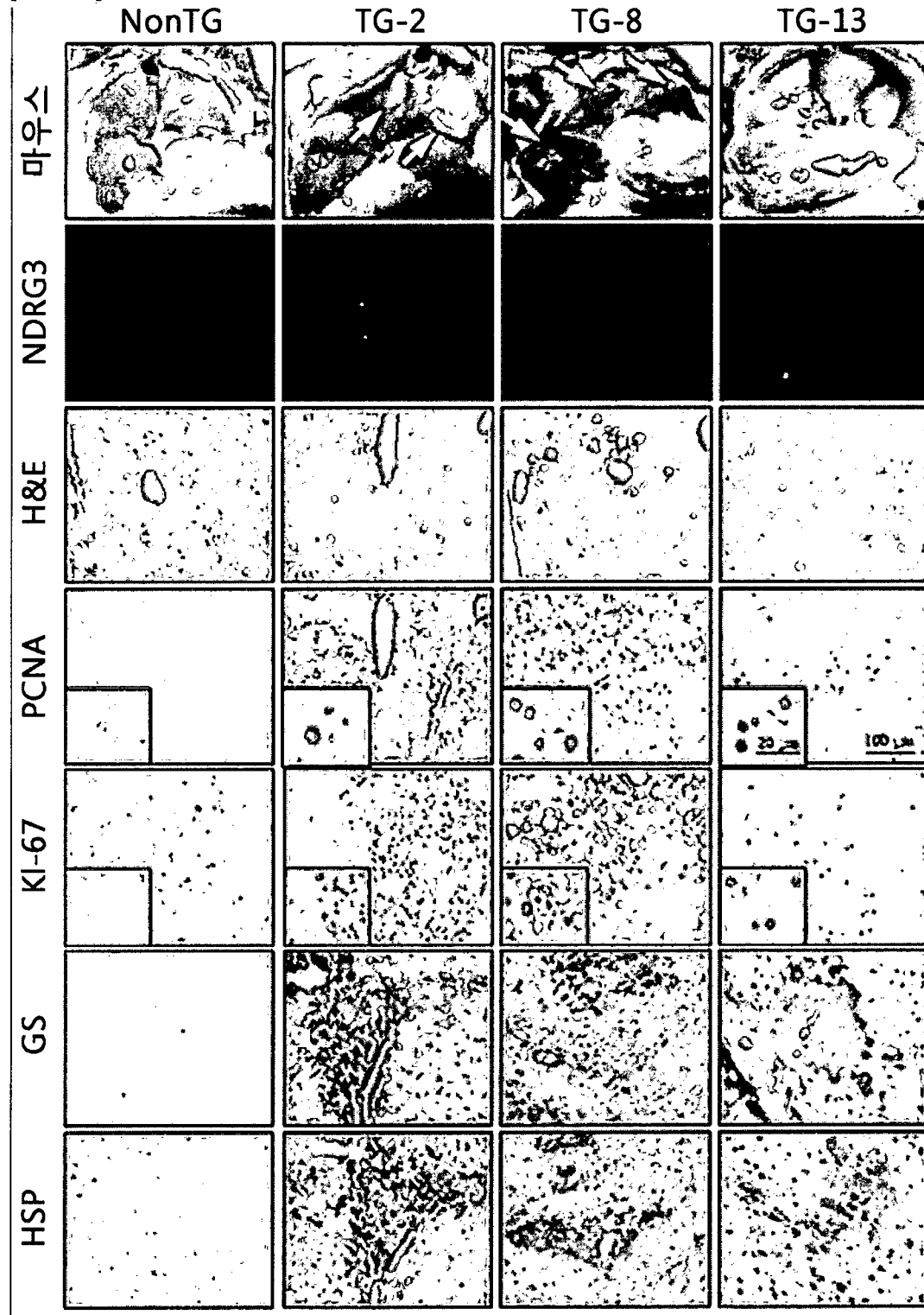
[도 21b]



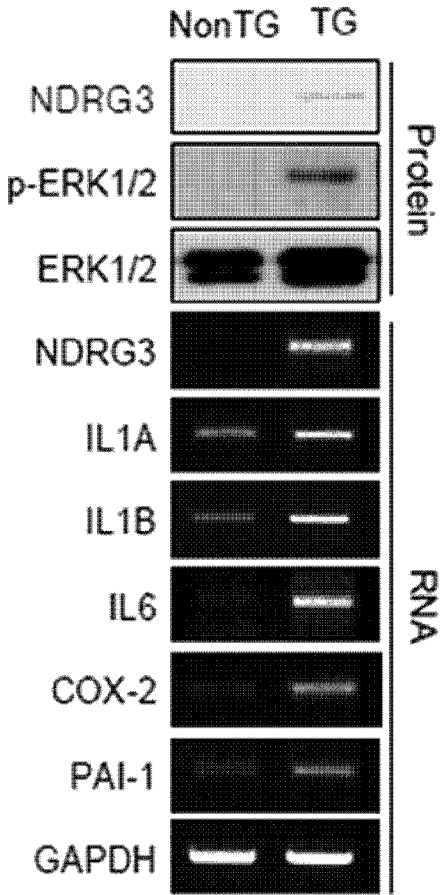
[도 21c]



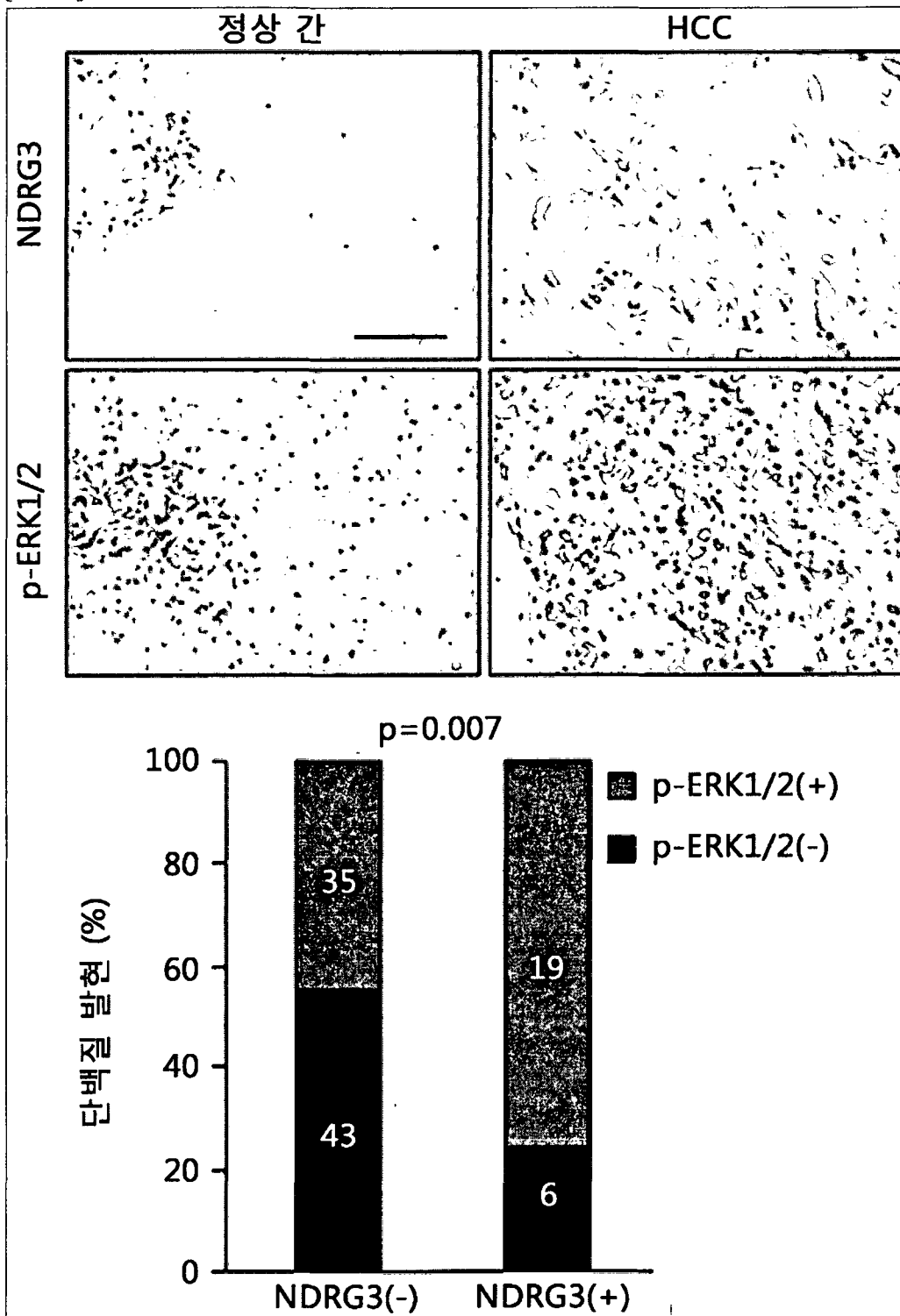
[도 21d]



[도21e]

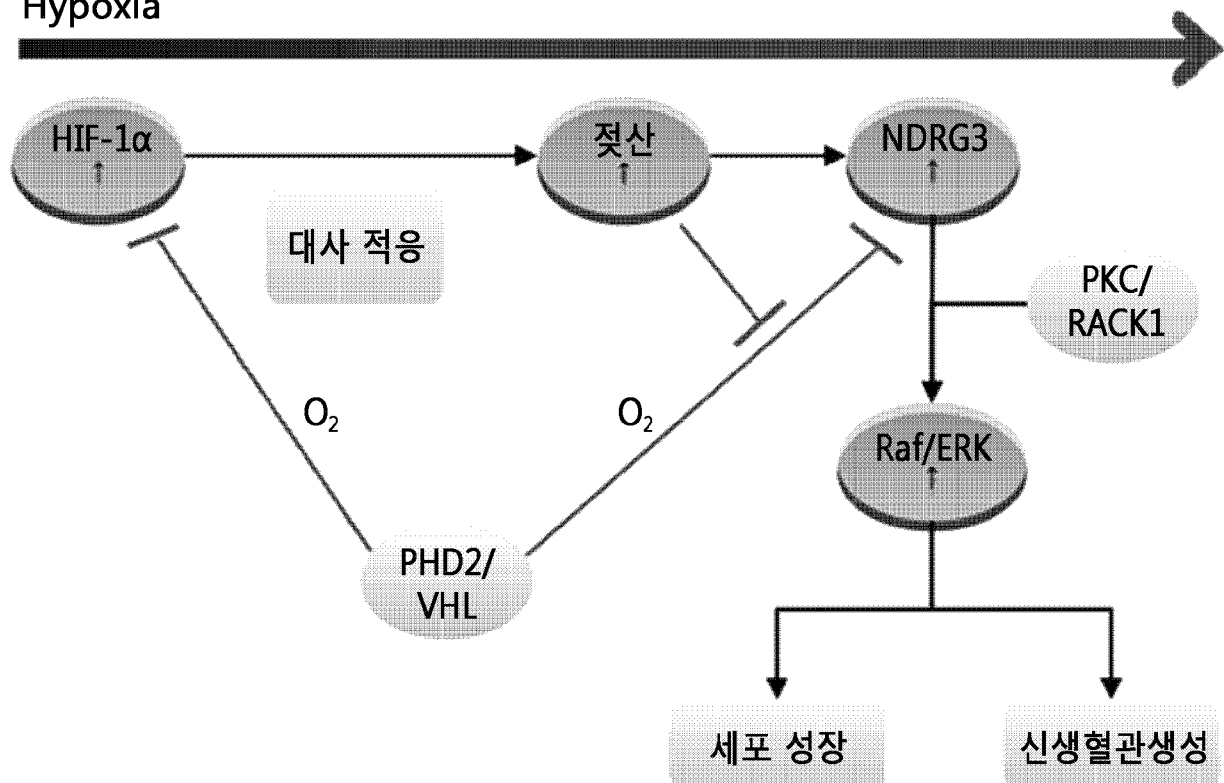


[도 22]

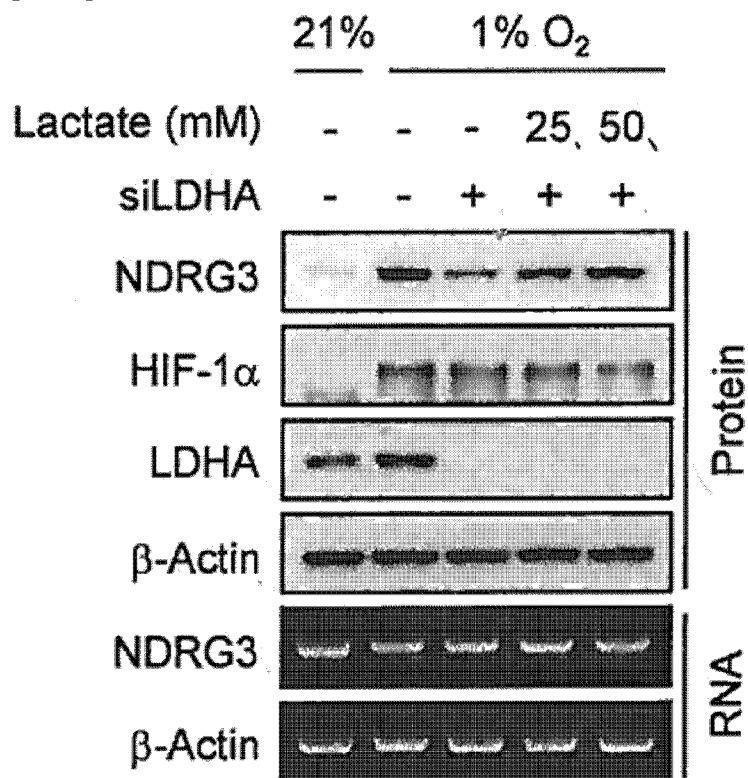


[도23]

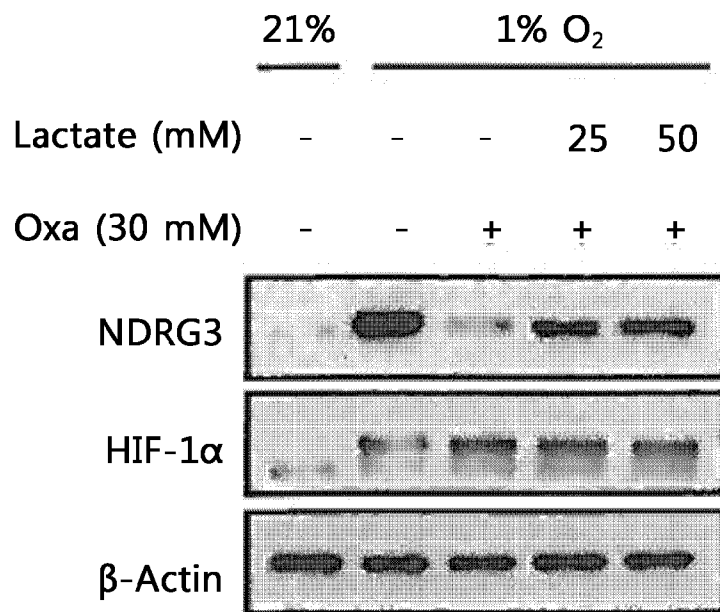
Hypoxia



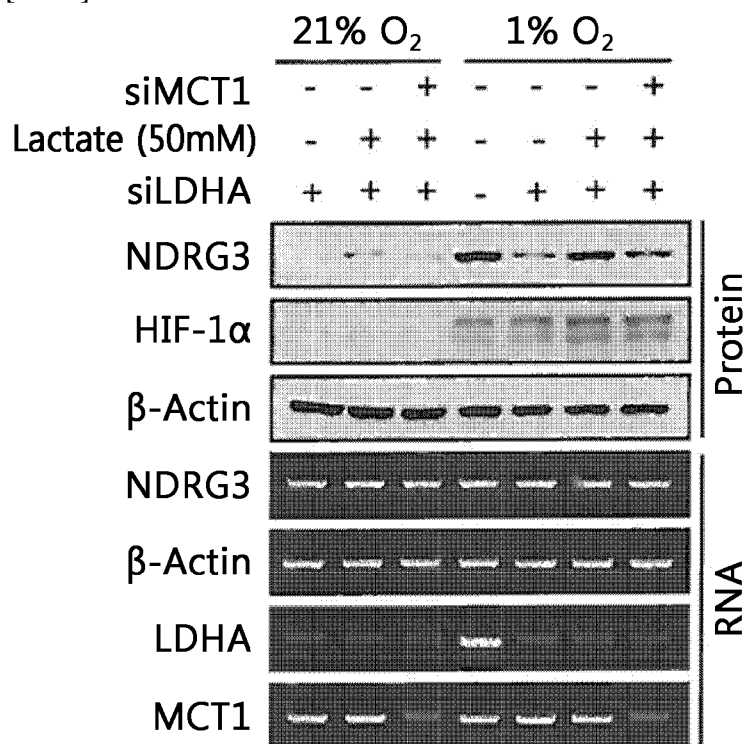
[도24]



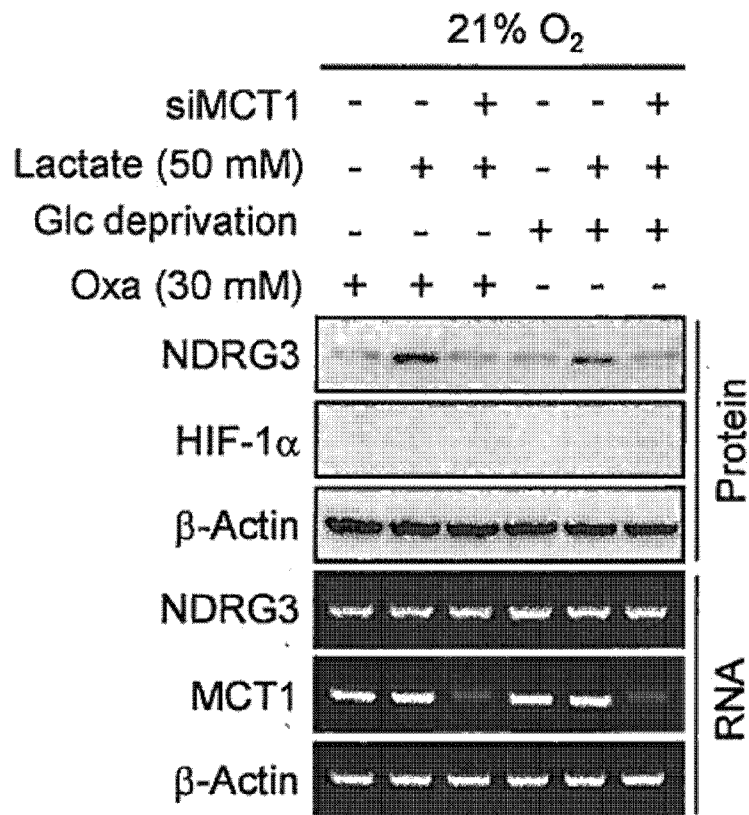
[도25]



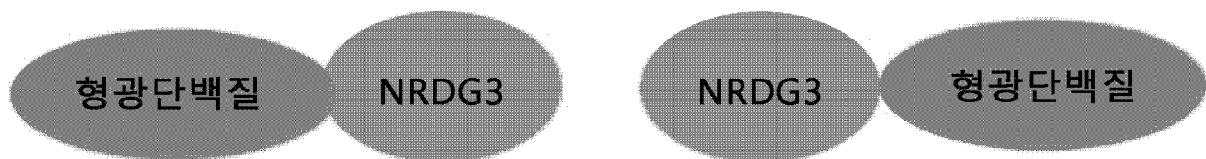
[도26]



[도27]



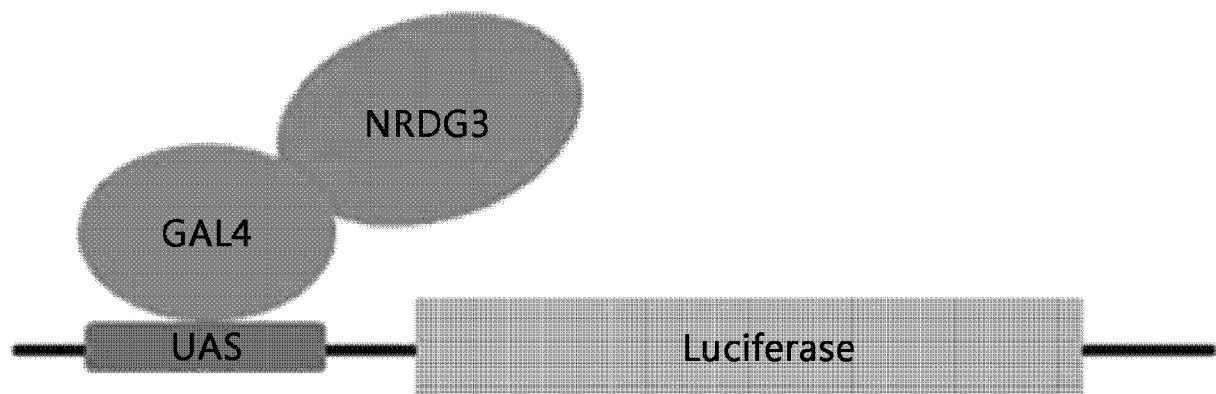
[도28]



[도29]



[도30]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003921

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(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)

G01N 33/68; A61K 39/395; A61K 31/7088; G01N 33/53; G01N 21/64; C12Q 1/68; G01N 33/574

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: NDRG3, lactate, luciferase, gene expression cassette, Gal4DB, solid cancer, ischemic disease, inflammatory disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG et al., "NDRG3 is an Androgen Regulated and Prostate Enriched Gene that promotes in Vitro and in Vivo Prostate Cancer Cell Growth", International Journal of Cancer, Vol. 124, pp. 521-530 (2009) See abstract; pages 523-525.	12-17
A		1-11
X	MELOTTE et al., "The N-myc Downstream Regulated Gene (NDRG) Family: Diverse Functions, Multiple Applications", The FASEB Journal, Vol. 24, pp. 4153-4166 (Published online: fj.09-151464, internal pp. 1-14) (2010) See abstract; table 2; page 9.	12-17
X	YANG et al., "NDRG3 and NDRG4, Two Novel Tumor-related Genes", Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol. 67, pp. 681-684 (2013) See abstract; table 3; page 638.	12-17
X	CN 101632833 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PLANNED PARENTHOOD RESEARCH) 27 January 2010 See the entire document.	12-17



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

22 JULY 2016 (22.07.2016)

Date of mailing of the international search report

22 JULY 2016 (22.07.2016)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

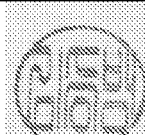
PCT/KR2016/003921

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MELOTTE et al., "N-Myc Downstream-regulated Gene 4 (NDRG4): a Candidate Tumor Suppressor Gene and Potential Biomarker for Colorectal Cancer", Journal of the National Cancer Institute, Vol. 101, Issue 13, pp. 916-927 (2009) See the entire document.	1-17
PX	LEE et al., "A Lactate-induced Response to Hypoxia", Cell, Vol. 161, pp. 595-609 (23 April 2015) See the entire document.	1-17

Information on patent family members

PCT/KR2016/003921

06/11/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/68; A61K 39/395; A61K 31/7088; G01N 33/53; G01N 21/64; C12Q 1/68; G01N 33/574 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: NDRG3, 젓산, 루시퍼레이즈, 유전자 발현 카세트, Gal4DB, 고품암, 허혈성 질환, 염증성 질환																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WANG 등, 'NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth' International Journal of Cancer, Vol.124, pp.521-530 (2009) 요약; 페이지 523-525 참조.</td> <td>12-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>MELOTTE 등, 'The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications' The FASEB Journal, Vol.24, pp.4153-4166 (published online: fj.09-151464, internal pp.1-14) (2010) 요약; 표 2; 페이지 9 참조.</td> <td>12-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>YANG 등, 'NDRG3 and NDRG4, two novel tumor-related genes' Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol.67, pp.681-684 (2013) 요약; 표 3; 페이지 638 참조.</td> <td>12-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 101632833 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PLANNED PARENTHOOD RESEARCH) 2010.01.27 전체 문헌 참조.</td> <td>12-17</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	WANG 등, 'NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth' International Journal of Cancer, Vol.124, pp.521-530 (2009) 요약; 페이지 523-525 참조.	12-17	A		1-11	X	MELOTTE 등, 'The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications' The FASEB Journal, Vol.24, pp.4153-4166 (published online: fj.09-151464, internal pp.1-14) (2010) 요약; 표 2; 페이지 9 참조.	12-17	X	YANG 등, 'NDRG3 and NDRG4, two novel tumor-related genes' Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol.67, pp.681-684 (2013) 요약; 표 3; 페이지 638 참조.	12-17	X	CN 101632833 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PLANNED PARENTHOOD RESEARCH) 2010.01.27 전체 문헌 참조.	12-17
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	WANG 등, 'NDRG3 is an androgen regulated and prostate enriched gene that promotes in vitro and in vivo prostate cancer cell growth' International Journal of Cancer, Vol.124, pp.521-530 (2009) 요약; 페이지 523-525 참조.	12-17																		
A		1-11																		
X	MELOTTE 등, 'The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications' The FASEB Journal, Vol.24, pp.4153-4166 (published online: fj.09-151464, internal pp.1-14) (2010) 요약; 표 2; 페이지 9 참조.	12-17																		
X	YANG 등, 'NDRG3 and NDRG4, two novel tumor-related genes' Biomedicine & Pharmacotherapy, Vol.67, pp.681-684 (2013) 요약; 표 3; 페이지 638 참조.	12-17																		
X	CN 101632833 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PLANNED PARENTHOOD RESEARCH) 2010.01.27 전체 문헌 참조.	12-17																		
☒ 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 2016년 07월 22일 (22.07.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 07월 22일 (22.07.2016)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																		

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MELOTTE 등, 'N-Myc downstream-regulated gene 4 (NDRG4): a candidate tumor suppressor gene and potential biomarker for colorectal cancer' Journal of the National Cancer Institute, Vol.101, Issue 13, pp.916-927 (2009) 전체 문헌 참조.	1-17
PX	LEE 등, 'A lactate-induced response to hypoxia' Cell, Vol.161, pp.595-609 (2015.04.23) 전체 문헌 참조.	1-17

국제출원번호
PCT/KR2016/003921

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 101632833 A	2010/01/27	CN 101632833 B	2013/11/06