



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086414
(43) 공개일자 2024년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2023.05)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0171930

(22) 출원일자 2022년12월09일

심사청구일자 2022년12월09일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박종선

대전광역시 중구 과례로 64, 이너프빌 202호

이현지

대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동104호 (정림동, 강변들보람아파트)

(74) 대리인

특허법인정진

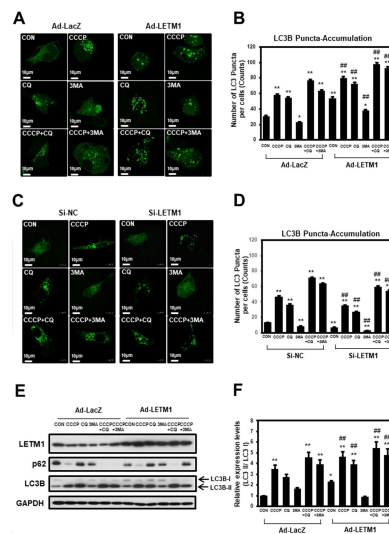
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 LETM1 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 LETM1 억제제를 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; LETM1 억제용 시약 조성물; 및 시험관 내 LETM1 억제 방법;에 관한 것이다. 본 발명에 따른 LETM1 억제제는 폐암 세포 내 LETM1 유도 미토파지를 효과적으로 차단하며, 이에 따라 폐암 세포의 괴사를 유도하는 것을 실험적으로 확인하였다. 이는 본 발명의 LETM1 억제제가 폐암 억제에 효과적임을 의미하는바, 폐암 치료 분야 및 LETM1 미토파지 연구 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167848
과제번호	2021R1A2C1008492
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구
연구과제명	대장암에서 PHF20에 의한 암세포 에너지 대사의 분자적 제어기술 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

호노키올(honokiol)을 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폐암은 비소세포폐암인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 비소세포폐암은 편평상피세포암, 선암, 대세포암, 선편평세포암, 육종양암, 카르시노이드 종양 및 침샘형 암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 호노키올은 농도가 조성물 전체 부피에 대하여 1 내지 50 μ M인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 호노키올은 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 유도 미토파지(mitophagy)를 차단하는 것인, 조성물.

청구항 6

호노키올을 포함하는 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 억제용 시약 조성물.

청구항 7

호노키올을 폐암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내(in vitro) LETM1 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 LETM1 억제제를 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; LETM1 억제용

[0001]

시약 조성물; 및 시험관 내 LETM1 억제 방법;에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 미토콘드리아는 암과 염증을 포함한 다양한 병태생리학적 상태와 관련된 많은 세포 과정의 핵심 조절자이다. 암 세포가 산소의 존재에도 불구하고 해당 작용 ATP 생산에 의존한다는 바르부르크 이론에 기초하여, 미토콘드리아 DNA 돌연변이 및 생리학적 기능 장애는 세포를 해당 작용에 의존하게 만드는 호흡 사슬의 기능 장애의 기저 메커니즘을 밝히기 위해 연구되었다. 미토콘드리아 결함이 암 발병의 원인인지 결과인지는 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, 미토콘드리아 기능장애는 다양한 암에서 흔한 현상으로 인식되고 있다. 미토콘드리아의 품질 관리는 오작동하는 미토콘드리아의 파괴적인 영향을 피하고 세포의 건강을 유지하기 위해 엄격하게 규제된다.
- [0003] 미토파지(Mitophagy)는 손상되거나 불필요한 미토콘드리아에 대한 선택적 autophagic 과정을 포함하는 미토콘드리아의 관리의 주요 메커니즘이다. 자가포식(Autophagy)은 재사용을 위해 세포 내 내용물의 리소좀 매개 분해 과정이다. 암 발병과 관련하여 자가포식은 기능 장애 미토콘드리아와 비정상 단백질을 제거하여 항종양 작용을 수행한다. 그러나 암 진행의 경우 종양 세포는 자가포식을 사용하여 재활용된 소기관과 단백질에서 영양분을 얻음으로써 대사 스트레스를 극복한다. 또한 자가포식 단백질의 고갈은 DNA 손상과 유전적 불안정을 초래하여 종양을 유발한다고 알려져 있다. 최근 연구는 혈청이 없는 상태에서 글루카곤으로 쥐의 간세포를 처리하면 미토콘드리아와 산성 리소좀의 탈분극이 일어나며, 이는 미토콘드리아에 특정한 자가포식을 유도한다는 것이 밝혀졌다. 상기 연구는 미토콘드리아의 기능 장애와 형태학적 변화가 미토파지 유도에 기여한다는 것을 제안한다.
- [0004] LETM1(Leucine zipper EF-hand-containing transmembrane protein 1)은 Wolf-Hirschhorn 증후군에서 유전자 결실로 확인되었고, 미토콘드리아 형태, 이온 항상성 및 세포 생존성을 조절하는 것으로 나타났다. 또한 LETM1은 폐암을 비롯한 다양한 인간 암에서 과발현되는 것으로 나타났다.
- [0005] 그럼에도 LETM1 억제 및 폐암의 연관성에 대해서 연구가 미진한바, LETM1 억제제에 대한 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 LETM1 억제 및 폐암의 연관성을 연구하던 중 호노키올이 유용한 LETM1 억제제임을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은, 호노키올(honokiol)을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, 호노키올을 폐암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내 LETM1 억제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 호노키올을 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 호노키올을 포함하는 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 호노키올을 폐암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내 LETM1 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 LETM1 억제제는 폐암 세포 내 LETM1 유도 미토파지를 효과적으로 차단하며, 이에 따라 폐암 세포의 괴사를 유도하는 것을 실험적으로 확인하였다. 이는 본 발명의 LETM1 억제제가 폐암 억제에 효과적임을 의미하는바, 폐암 치료 분야 및 LETM1 미토파지 연구 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1A 및 B는 H460 세포에서 LETM1-과발현에 의한 자가포식 유동 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 1C 및 D는 H460 세포에서 LETM1-녹다운에 의한 자가포식 유도 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1E 및 F는 웨스턴 블롯팅을 통해 H460 세포의 자가포식 유입에 대한 LETM1의 영향을 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 2A 및 B는 공초점 현미경 분석을 통해 미토콘드리아 특이적 자가포식에서 LETM1의 잠재적인 역할을 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 2C는 유세포 분석을 통해 H460 세포에서 미토파지 유도 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2D는 공초점 현미경 분석을 통해 H460 세포에서 미토파지 유도 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2E는 투과전자 현미경을 이용하여 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1이 감염된 H460 세포 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3A는 세포 염색법을 통해 H460 세포에서 미토콘드리아 형태에 대한 LETM1의 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3B는 LETM1이 과발현된 세포에서 JC-1 염료를 사용하여 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 모니터링한 결과를 나타낸 도이다.

도 3C는 공초점 현미경 분석을 통해 H460 세포에서 미토콘드리아 Ca^{2+} 수준의 변화를 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 3D는 면역블롯팅을 통해 미토콘드리아 Ca^{2+} 의 조절에 대한 LETM1의 효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3E 및 F는 유세포 분석을 통해 LETM1 과발현 세포의 mPTP 역학을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4A는 LETM1의 잠재적인 상호작용 파트너 조사 방법을 나타낸 개략도이다.

도 4B는 상기 도 4A의 방법으로 LETM1의 상호작용 파트너를 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4C는 다양한 면역침전제를 대상으로 LETM1 상호작용을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4D는 상기 도 4C의 결과에 기초하여, PLA를 추가 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 4E는 면역블롯팅을 통해 항-LETM1 항체를 갖는 면역침전 생성물을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4F는 LETM1의 내인성 상호작용을 모니터링한 결과를 나타낸 도이다.

도 5A는 공초점 현미경 분석을 통해 다양한 자극제 처리에 따른 LETM1/GRP78 복합체의 조절을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 5B는 웨스턴 블롯팅을 통해 다양한 자극제 처리에 따른 LETM1/GRP78 복합체의 조절을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 5C는 웨스턴 블롯팅을 통해 미토콘드리아로의 GRP78 전위에 대한 LETM1의 효과를 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 5D는 유세포 분석을 통해 H460 세포에서 LETM1으로 유도된 미토파지에서 GRP78의 역할을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 5E는 웨스턴 블롯팅을 통해 H460 세포에서 LETM1으로 유도된 미토파지에서 GRP78의 역할을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

도 6A는 공초점 현미경 분석을 통해 LETM1에서 GRP75-매개된 미토파지를 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 6B는 비오틴 표지 분석을 통해 LETM1, GRP75 및 GRP78의 복합체 형성을 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 6C는 웨스턴 블롯팅을 통해 LETM1, GRP75 및 GRP78의 복합체 형성을 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 6D에 나타난 웨스턴 블롯팅을 통해 LETM1 매개 자가포식에 대한 GRP75의 효과를 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 6E는 투과전자현미경을 통해 세포의 미세 구조를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 웨스턴 블롯팅을 통해 인간 폐암 조직에서 LETM1의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

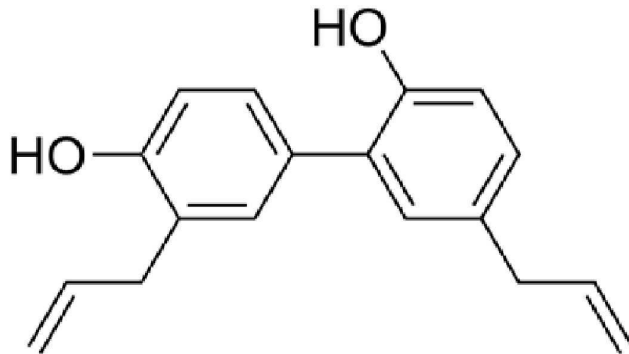
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 호노키올을 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 호노키올은 목련 속에 속하는 나무의 껍질, 씨앗 또는 잎에서 분리된 리그난으로, 하기 화학식 1로 표시된다. 전통적으로, 호노키올은 진통제, 불안의 치료제로 활용되어왔다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명의 구체예에서, 상기 폐암은 비소세포폐암인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 상기 비소세포폐암은 편평상피세포암, 선암, 대세포암, 선편평세포암, 육종양암, 카르시노이드 종양 및 침샘형암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 구체예에서, 상기 호노키올은 농도가 조성물 전체 부피에 대하여 1 내지 50 μ M인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 10 내지 40 μ M일 수 있으며, 가장 바람직하게는 25 μ M일 수 있다.

[0021] 본 발명의 구체예에서, 상기 호노키올은 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 유도 미토파지(mitophagy)를 차단하는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명에 있어서, 미토파지는 자가포식에 의한 미토콘드리아의 선택적 분해를 의미하며, 손상 또는 결함이 있는 미토콘드리아에 발생한다. 미토파지는 세포를 건강하게 유지하는데 중요한 메커니즘이다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물로 이용되는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물은 호노키올과 함께 폐암에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다.

[0027] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활

제들도 사용된다. 또한, 상기 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0028] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 호노키올은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.

[0030] 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가 염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼 화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0032] 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 0.05 내지 5 mg/kg의 농도로 투여되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.1 내지 0.4 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.2 내지 0.35 mg/kg, 더더욱 바람직하게는 0.25 mg/kg일 수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0036] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함된다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 폐암의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료,

화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 호노키올을 포함하는 LETM1(Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1) 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0040] 또한 본 발명은 호노키올을 폐암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내 LETM1 억제 방법을 제공한다.

[0041] 상기 호노키올은 LETM1의 억제제로, 폐암 세포 내 LETM1 유도 미토파지를 효과적으로 차단하며, 이에 따라 폐암 세포의 괴사를 유도하는 것을 실험적으로 확인하였다. 따라서 본 발명의 LETM1 억제용 시약 조성물 및 시험관 내 LETM1 억제 방법은 LETM1 미토파지 연구 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0043] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] [실험예]

[0048] 실험예 1. 항체 및 시약

[0049] 항-LETM1 항체는 Abnova(Cat. H00003954-M03, clone 6F7, 대만)에서 구입했다. 항-LC3B(Cat. L7543) 및 항-액틴(Cat. A2228) 항체는 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입했다. 항-GRP78(Cat. 3177), 항-튜불린(Cat. 2128 S) 및 항-PINK1(Cat. 6946)은 Cell Signaling(Massachusetts, USA)에서 구입했다. Anti-GRP75(Cat. sc-133137) 및 anti-Tom40(Cat. sc-365467)은 Santacruz Biotech(Dallas, Texas, USA)의 제품이다. HRP-conjugated Horseradish peroxidase-conjugated) 항-마우스 IgG 또는 항-토끼 IgG 2차 항체는 Komabiotech(서울, 한국)에서 구입했다. CCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine)(215911), 3-MA(3-methyladenine)(M9281), CQ(chloroquine)(C6628) 및 호노키올(honokiol, HNK)(H4914)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, 미국)에서 구입했다. Wortmannin(WM)(681676)은 Calbiochem(San Diego, USA)에서 구입했다.

[0051] 실험예 2. 발현 벡터

[0052] 야생형 LETM1에 대한 아데노바이러스 발현 벡터는 Piao L et.al.(2009)와 같이 제조하였다. pDsRed-Mito 벡터는 Clontech(California, USA)에서 구입했다. Crispr/Cas9-GRP75 플라스미드는 Santacruz Biotech(미국 캘리포니아)에서 구입했다.

[0054] 실험예 3. 세포 배양 및 자극

[0055] H460 세포는 10% FBS(Life Technologies, Grand Island, USA), 25mM HEPES(Healthcare life sciences, Utah, USA) 및 1% 항생제-항진균제(Life Technologies, Grand Island, USA)가 보충된 배지(RPMI)에서 유지하였다. A549 세포는 10% FBS, 1% 항생제-항진균제가 보충된 배지(DMEM)에서 유지하였다. 상기 세포는 제조업체가 제공한 지침에 따라 Lipofectamine(Invitrogen, California, USA) 또는 jet-PEI(Polyplus, New York, USA) 시약을 사용하여 일시적으로 Adenovirus(Ad)-LacZ 및 Ad-LETM1을 24시간 동안 형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 8시간 동안 30 μ M CCCP, 6시간 동안 10 μ M CQ, 2시간 동안 1 μ M WM, 8시간 동안 25 μ M HNK 또는 2시간 동안 10 μ M 3-MA를 처리하였다. H460 세포는 제조사의 지침에 따라 Lipofectamine(Invitrogen, California, USA) 시약을 사용하여 짧은 간섭 NC RNA(si-NC), si-LETM1로 일시적으로 형질감염시켰다.

[0057] **실험예 4. 면역블롯 분석**

[0058] 세포 배양 및 자극 후, 세포를 얼음 위에 놓고 용해 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1% v/v Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 25 mM sodium fluoride, 40 mM β -glycerol phosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine 및 2 μ M microcystin-LR 포함)으로 용해시켰다. 용해물을 x 12,000g에서 15분 동안 원심분리했다. 세포 추출물을 15, 12 및 10% SDS-PAGE로 분리하고 Immobilon-P membrane(Millipore, Darmstadt, Germany)으로 옮겼다. 멤브레인을 1시간 동안 1× tri-buffered saline buffer(TBS; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 250 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 1시간 동안 블로킹 처리하였다. 상기 1X TBS buffer는 5 % skimmed milk 및 0.2 % Tween-20를 포함한다. 블로킹 후 멤브레인을 4° C에서 1차 항체 (1:1000)로 밤새 배양하였다. 1차 항체 처리 후 멤브레인을 세척하였고, 2차 항체(1:5000)(HRP-conjugated anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG)를 처리하였다. 단백질 발현은 제조사의 매뉴얼(Healthcare life sciences, Utah, USA)에 따라 시각화하였다.

[0060] **실험예 5. 면역침전 분석**

[0061] H460 세포를 Ad-LacZ 및 Ad-LETM1로 24시간 동안 일시적 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 얼음 위에 놓고 용해 완충액(550 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5% v/v Nonidet P-40, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA (pH 8.0), 3 mM EGTA (pH 8.0), 40 mM h-glycerol phosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine 및 2 μ M of microcystin-LR)으로 용해시켜 무세포 추출물을 제조하였다. 무세포 추출물 1000 μ g에 정상 IgG 또는 LETM1 항체를 처리하여, LETM1 단백질을 면역침전시켰다. 면역침전물을 3회 세척하였고, 이를 SDS-PAGE 및 면역 블로팅을 통해 검출하였다.

[0063] **실험예 6. LETM1 면역침전물의 단백질체 분석**

[0064] H460 세포를 Ad-LacZ 및 Ad-LETM1로 24시간 동안 감염시킨 후 항-LETM1 항체로 면역침전시켰다. SDS-PAGE로 면역침전물을 추가 분석하였다. SDS-PAGE 겔을 환원(reduced), 알킬화(alkylated) 및 트립신으로 소화시켜(digested with trypsin) 펩타이드를 수득하였다. EASY-nLC 1000 시스템(Thermo Fisher Scientific)과 결합된 Q-Exactive 오비트랩 하이브리드 질량 분석기를 사용하여, 수득된 펩타이드를 분석하였다. 모든 tandem mass spectrometry(MS/MS) 스펙트럼은 27% 정규화된 충돌 에너지로 full mass spectrometry(MS) 스캔(m/z; 300-2000)에서 가장 풍부한 8개의 피크에 대한 데이터 종속 모드로 획득하였다. Dynamic exclusion duration은 15 초이고 isolation window는 2.0m/z로 설정하였다. MS/MS 스캔은 5.0×10^4 의 automated gain control target value로 17,500의 resolution(at m/z 200)으로 획득하였고, 고품질의 MS/MS 스펙트럼을 얻기 위해 최대 60ms의 이온을 주입하였다. 획득한 MS/MS 스펙트럼은 Proteome Discoverer 1.3(Thermo Fisher Scientific)의 Sequest 알고리즘을 사용하여 Uniprot Human 데이터베이스서 검색하였다. 각 데이터 세트(Ad-LacZ 및 Ad-LETM1)에서 확인된 단백질의 Peptide spectra match(PSM) 수를 비교하고 유의하게 상향조절된 단백질을 주요 추정 상호작용 파트너로 선택했다.

[0066] **실험예 7. 공초점 현미경을 이용한 미토콘드리아 형태 분석**

[0067] H460 세포를 유리 커버슬립에서 50-70% 컨플루언트하게 배양하였다. 그 후 Lipofectamine 또는 jet PEI 시약을 사용하여 GFP-LC3 컨스트럭트의 pDsRed-Mito로 세포를 형질감염시킨 후, 적절한 아데노바이러스(Ad -LETM1 또는 Ad-LacZ) 조합으로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 세포를 실온에서 10분 동안 4% 파라포름알데히드에 고정하고 실온에서 15분 동안 0.2% Triton X100에서 투과화(permeabilization)시켰다. 그런 다음 커버슬립을 Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 장착하고 Zeiss 공초점 현미경을 사용하여 시각화했다.

[0069] **실험예 8. 투과전자현미경을 이용한 세포내 구조 분석**

[0070] H460 세포를 Ad-LacZ 및 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시키고 CCCP로 8시간 동안 처리하였다. 그런 다음 세포를 1% Osmium Oxide(OsO₄) 완충액이 포함된 2.5% 글루타르알데히드 용액에 1시간 동안 고정하고 4° C에서 에탄올로 탈수시켰다. 탈수 후 세포를 프로필렌 옥사이드와 Epon의 1:1 혼합물에 침투시키고, 마지막으로 60° C에서

48시간 동안 중합하여 Epon에 포매했다. SPIRIT G2 전자 현미경을 이용하여 미세 구조 분석을 수행했다.

[0072] 실험예 9. 미토콘드리아 막 전위 측정

[0073] H460 세포를 Ad-LacZ 및 Ad-LETM1로 24시간 동안 감염시켰다. 그 후, 세포를 수집하고 JC-1 염료(Molecular probes, Invitrogen, Eugene, USA)로 30분 동안 염색했다. 세포는 염료로 염색하기 전에 미토콘드리아 탈분극을 유도하기 위해, 양성 대조군으로써 10분 동안 30 μ M CCCP로 처리하였다. 마지막으로, 세포를 FACS Canto 시스템(Becton Dickinson, Oxford, UK)으로 분석하였다.

[0075] 실험예 10. 미토콘드리아 기질 칼슘 측정

[0076] H460 세포는 커버슬립에서 50-70% 컨플루언트하게 배양하였다. 배양된 세포를 mTRP(mitochondria-targeted ratio-pericam) 플라스미드로 24시간 동안 형질감염시켰고, 그 후 24시간 동안 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1로 감염시켰다. Fluoview 1000 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 세포의 mTRP의 형광 값을 분석했다. 200초의 측정 후, 100 μ M ATP를 첨가하여 미토콘드리아 흡수를 증가시켰다. 값은 436 nm의 여기 파장(excitation wavelength)을 사용하여 측정하였다. 또는 미토콘드리아 칼슘 리포터 Rhod2-AM(Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA)도 사용하였다. H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포는 50-70% 컨플루언트하게 배양한 후 독시사이클린으로 처리하여 LETM1을 유도했다. 그런 다음 세포를 제조업체의 지침에 따라 15분 동안 2 μ M Rhod2-AM으로 염색했다. 세포를 세척하고 100nM Mito-tracker green(Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA)으로 염색한 다음 현미경으로 관찰했다.

[0078] 실험예 11. mPTP 역학 분석

[0079] 미토콘드리아 투과성 전환 기공(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 역학에 대한 LETM1의 효과를 조사하기 위하여, MitoProbe 전환 기공 분석 키트(Molecular Probes, Oregon, USA)를 사용했다. 이 분석은 mPTP가 닫힌 상태에 있을 때 미토콘드리아 내 칼세인 보유의 지표로서 CoCl_2 존재 하에서 칼세인 형광을 사용한다. CoCl_2 는 세포질 칼세인 형광을 소멸시켜 미토콘드리아 특이적 신호를 만든다. H460 세포를 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1로 24시간 동안 감염시켰다. 그 후, 세포를 최종 농도가 1×10^6 cells/mL 인 Ca^{2+} 가 포함된 미리 데워진 Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)에 재현탁했다. 재현탁 후 세포를 10nM calcein AM으로 염색하고 400 μ M CoCl_2 를 첨가했다. 양성 대조군의 경우, Ad-LacZ에 감염된 세포를 500nM ionomycin을 처리하였다. 샘플을 37° C에서 15분 동안 배양하였고, 빛으로부터 보호했다. 배양된 세포를 원심분리하여 펠렛을 얻었고, 상기 펠렛을 500 μ L PBS에 재현탁하였다. 유세포 분석을 위하여, 세포 현탁액을 FACS Falcon 튜브(Becton Dickinson, Oxford, UK) 내로 여과하였다. 샘플은 BD FACS Diva 소프트웨어와 함께 fluorescein에 적합한 488 nm 여기 및 방출 필터를 사용하여 분석되었다. 기기 설정에는 시약이 첨가되지 않은 샘플을 사용하였다.

[0081] 실험예 12. 미토콘드리아의 분리

[0082] H460 세포를 PBS로 세척하고, 세포를 얼음 위에서 15분 동안 미토콘드리아 분획 완충액(20mM Hepes, pH 8.0, 10mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 250mM sucrose, 1mM PMSF, 10g/mL leupeptin, 10g/mL aprotinin 및 0.2mM sodium orthovanadate)에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 1mL 주사기를 사용하여 균질화시켰다. 파괴되지 않은 세포 및 핵을 4° C에서 10분 동안 800g에서 원심분리하여 펠렛화하였다. 상층액을 4° C에서 10분 동안 17,000g에서 연속적으로 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겨 세포질 분획으로 사용하였다. 펠렛은 500 μ L의 미토콘드리아 분획 완충액으로 세척하고, 분리된 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 따라서 분리된 미토콘드리아는 프로테아제 억제제(Sigma Aldrich)가 보충된 세포 용해 완충액을 사용하여 얼음 위에서 10분 동안 용해시킨 후 볼텍싱했다. 그런 다음 용해물을 12,000g에서 15분 동안 원심분리했다. 상층액을 새 튜브로 옮기고 웨스턴 블롯팅으로 분석했다.

[0084] 실험예 13. H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포의 생성

[0085] H460 세포를 렌티바이러스-TET3G로 처리하고 G418(200 μ g/ml)로 선택하여, H460-TET3G 폐암 세포를 수득하였다. 다음으로, H460-TET3G 세포를 pLVX-TRE3G-LETM1로 일시적으로 형질감염시키고, H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포에 대해 퓨로마이신(1.25 μ g/ml)으로 선택하였다. LETM1 발현의 유도는 24시간 동안 100ng/ml 독시사이클린(doxycycline, Doxy) 배지에서 확인하였다.

[0087] 실험예 14. mito-Keima로 미토파지 측정

[0088] 형광 단백질 keima는 주변 pH 환경에 따라 다른 파장의 뚜렷한 형광 특성으로 잘 알려져 있다. 따라서 mitochondria-targeted keima(mt-Keima)는 세포에서 미토파지를 감지하는 데 사용하였다. mt-Keima는 당분야에 알려진대로 준비하였다. H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포를 pLESIP-mt-Keima로 형질감염시키고 100 ng/ml 독시사이클린과 함께 24시간 동안 배양하여 LETM1 과발현을 유도하였다. 그 후 세포에 25 μ M 호노키올 또는 30 μ M CCCP로 8시간 동안 처리했다. 그 후, 세포를 수집하였고, FACS 및 공초점 현미경으로 적색 및 녹색 형광을 분석했다. mitophagic event의 수준은 녹색에서 적색 형광(P2 집단)으로 전환하여 계산하였다.

[0090] 실험예 15. LETM1-APEX2에 의한 복합 단백질의 비오티화

[0091] apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease-2(APEX2)로 Desthiobiotin-phenol(DBP)를 표지하였다. 구체적으로, HEK293/LETM1-APEX2 안정 세포를 배양하였고, 세포가 60-80% 컨플루언트하게 성장하였을 때 500ng/ml 독시사이클린으로 유도하였다. 24시간 후, 플레이트의 배지를 30분 동안 250 μ M DBP를 포함하는 새로운 성장 배지로 교체했다. 그 후, H₂O₂(Sigma Aldrich H1009)를 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1분 동안 부드럽게 교반하였다. 이어서, 10mM Trolox, 20mM 아지드화 나트륨 및 20mM 아스코르브산 나트륨을 함유하는 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)를 첨가하여 반응을 켜쳤다. 켜친 후, 세포를 저온 냉각 용액(5mM Trolox, 10mM 아지드화 나트륨 및 10mM 아스코르브산 나트륨을 함유하는 DPBS)으로 3회 세척하였다. 세포를 저온 냉각 용액을 사용하여 분리하고 4 $^{\circ}$ C, 1500 xg에서 5분 동안 원심분리했다. 세포를 신선한 저온 냉각 용액으로 현탁시키고 다시 원심분리하였다. DBP 표지 단백질은 streptavidin bead를 사용하여 1000 μ g의 무세포 추출물에서 풀다운되었다. 비드를 세척한 후 면역 블로팅을 통해 GRP78과 GRP75를 검출하였다.

[0093] 실험예 16. 인간 폐암 조직

[0094] 인간 폐암 조직은 한국의 국립 바이오뱅크 회원인 바이오뱅크의 고려대학교 구로병원에서 입수하였다. 인체 조직을 이용한 실험은 서울대학교 기관심사위원회(SNUIRB-E1201/001-001)의 승인을 받았다.

[0096] 실험예 17. 통계 분석

[0097] 웨스턴 블롯 분석의 정량화는 Image J(1.47) 프로그램을 사용하여 수행하였다. 데이터는 세 가지 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 표현되었으며 Student's unpaired t-test(SPSS 버전 17.0 소프트웨어, SPSS Inc.)에 의해 분석되었습니다. p < 0.05(*)는 유의한 것으로 간주하였고, p < 0.01(**)은 해당 대조군 값과 비교하여 매우 유의하였다.

[0099] [실시예]

[0100] 실시예 1. H460 세포에서 LETM1-과발현 또는 LETM1-녹다운에 의한 자가포식 유동(autophagic flux)의 변화 확인

[0101] 1-1. H460 세포에서 LETM1-과발현에 의한 자가포식 유동 변화 확인

[0102] 본 실시예에서는 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 세포에서 자가포식 유동에 대한 LETM1-과발현의 효과를 평가하였다. 비소세포폐암 세포 H460 세포에서 자가포식 유동에 대한 LETM1의 효과를 평가한 결

과는 도 1A에 나타내었다. 또한 상기 도 1A의 실험 결과에 기초하여 작성한 그래프는 도 1B에 나타내었다.

[0103] 도 1A 및 B에 나타난 바와 같이, LacZ-아데노바이러스(Ad-LacZ)로 감염된 대조군 H460 세포는 GFP-LC3B의 확산 세포질 분포를 나타냈다. 한편, 아데노바이러스-LETM1(Ad-LETM1)에 감염된 H460 세포는 공초점 현미경 분석에서 GFP-LC3B 반점이 축적된 것을 확인하였고, 이는 세포에서 자가포식 유동이 향상되었음을 의미한다(도 1A, 각각 상단 왼쪽 패널).

[0104] GFP-LC3B 반점의 축적은 CCCP(화학적 자가포식 유도제; 도 1A, 각각 상단 오른쪽 패널) 및 CQ(자가포식소체와 리소좀의 융합 억제제; 도 1A 각각 중앙 왼쪽 패널)으로 처리된 세포에서도 나타났다.

[0105] 또한, LETM1에 의해 유도된 자가포식은 고전적인 자가포식 억제제인 WM(wortmannin) 및 3-MA(3-methyladenine; 도 1A, 각각 중앙 오른쪽 패널)에 민감하다. 예상대로 LETM1이 과발현된 H460 세포에 CQ를 처리하면, LETM1만 발현하는 H460 세포와 비교하여 GFP-LC3B의 축적이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(도 1A, 각각 하단 패널).

[0106] 상기 결과는 LETM1 과발현이 H460 세포에서 자가포식 유동을 촉진한다는 것을 의미한다.

[0108] 추가 실험을 진행한 결과, 다른 NSCLC 세포주인 A549 세포에서도 상기 H460 세포와 유사한 경향을 보인다는 것을 확인하였다.

[0110] 1-2. H460 세포에서 LETM1-녹다운에 의한 자가포식 유동 변화 확인

[0111] NSCLC 세포에서 자가포식 유동에 대한 LETM1-녹다운의 효과를 평가하였다. H460 세포에서 LETM1은 siRNA를 사용하여 녹다운시켰다. 비소세포폐암 세포 H460 세포에서 LETM1-녹다운의 효과를 평가한 결과는 도 1C에 나타내었다. 또한 상기 도 1C의 실험 결과에 기초하여 작성한 그래프는 도 1D에 나타내었다.

[0112] 도 1C 및 D에 나타난 바와 같이, H460 세포에서 LETM1-녹다운은 상기 실시예 1-1결과와 반대임을 확인하였다. 구체적으로, siRNA-대조군(si-NC)으로 매개된 대조군 H460 세포는 GFP-LC3B의 확산 세포질 분포를 나타냈다. 그러나 siRNA-LETM1(si-LETM1) 매개 H460 세포는 공초점 현미경 분석에서 GFP-LC3B 반점의 상당한 감소를 나타냈고, 이는 자가포식 유동이 감소되었다는 것을 의미한다. GFP-LC3B 반점은 미토파지를 유도하기 위해 CCCP 처리했음에도 불구하고 LETM1이 녹다운될 때 대조군보다 감소하였다.

[0114] 1-3. H460 세포의 자가포식 유입에 대한 LETM1의 영향 조사

[0115] H460 세포의 자가포식 유입에 대한 LETM1의 영향을 추가로 조사하였다. 상기 실시예 1-1과 동일한 조건에서 H460 세포를 배양하였고, 웨스턴 블롯을 통해 자가포식 마커 단백질 LC3B의 변화를 모니터링했다. 웨스턴 블롯 결과는 도 1E에 나타내었고, 이를 이미지화한 결과는 도 1F에 나타내었다.

[0116] 도 1E 및 F에 나타난 바와 같이, 자가포식소체 막에 모집된 LC3B-II의 발현은 LETM1-과발현 세포에서 증가하였다. 또한, 자가포식 수용체인 p62의 발현은 LETM1-과발현된 세포에서 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과는 LETM1 과발현은 H460 세포에서 자가포식 유동을 촉진하고, LETM1-녹다운이 H460 세포에서 자가포식 유동을 약화시킨다는 것을 의미한다.

[0118] 실시예 2. LETM1 과발현의 H460 세포의 미토파지에 미치는 영향 조사

[0119] 상기 실시예 1의 결과에 기초하여, GFP-LC3B 및 Red-Mito를 사용한 세포의 이중 염색법을 통해 미토콘드리아 특이적 자가포식에서 LETM1의 잠재적인 역할을 조사했다. 공초점 현미경 이미지는 도 2A에 나타내었고, 이를 정량화한 그래프는 도 2B에 나타내었다. 구체적으로, 도 2A의 첫 번째 및 세 번째 패널은 각각 H460 세포를 24시간 동안 Red-Mito로 일시적으로 형질감염시킨 후 Ad-GFP-LC3B 및 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 동시 감염시킨 것이고, 도 2A의 두 번째 및 네 번째는 미토파지를 유도하기 위해 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1에 감염된 세포를 8시간 동안 CCCP로 추가 처리한 것이다.

[0120] 도 2A 및 B에 나타난 바와 같이, Red-Mito로 표지된 미토콘드리아는 단편화되었다. 또한 상기 Red-Mito로 표시

된 미토콘드리아는 CCCP 처리 세포와 유사하게, LETM1 과발현된 세포에서 GFP-LC3B 반점과 함께 국소화된 점형 구조(dot-like structure)로 관찰되었다.

- [0122] LETM1에 의해 H460 세포에서 미토파지가 유도되는지 여부를 확실하게 결정하기 위하여, 이 세포를 mt-Keima 발현 벡터와 생체 내 미토파지 지표를 사용하여 유세포 분석을 수행하였다. 또한 위와 동일한 조건에서 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다. 유세포 분석 결과는 도 2C에 나타내었고, 공초점 현미경 이미지는 도 2D에 나타내었다.
- [0123] 도 2C에 나타난 바와 같이, LETM1-과발현된 세포는 녹색에서 적색으로 현저한 변화가 관찰되었다. Ad-LacZ 및 CCCP 처리 세포는 유사한 패턴을 나타냈다.
- [0124] 도 2D에 나타난 바와 같이, 공초점 현미경을 이용하여 확인한 결과, 붉은 반점은 Ad-LacZ와 유사한 LETM1-과발현 세포; 및 CCCP 처리된 세포;에서 확인되었다. 상기 결과는 LETM1이 H460 세포에서 미토파지 제거를 촉진할 수 있음을 의미한다.
- [0126] 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)을 이용하여, Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1이 감염된 H460 세포를 추가 분석하였다. TEM 이미지는 도 2E에 나타내었다.
- [0127] 도 2E에 나타난 바와 같이, 대조군 세포가 정상적인 형태(long tubular phenotype)를 갖는 미토콘드리아(검은 화살촉)를 나타낸다. 반면에 LETM1 과발현 세포는 단편화된 미토콘드리아가 작은 점-유사 구조(small dot-like structure)로 관찰되었으며, 대부분은 자가포식소체(검은색 화살표)와 매우 가까웠다. CCCP 처리된 세포에서도 관찰된 바와 같이, 자가포식소체의 축적 증가에 의해 삼켜진 것을 확인하였다. autophagosome의 형성 및 단편화된 미토콘드리아의 삼킴(engulfment)은 소포체(endoplasmic reticulum, ER; 흰색 화살표)와 매우 근접하여 발생했다. 상기 결과는 LETM1의 과발현이 미토콘드리아 이형(dysmorphology) 및 MAM(mitochondria-associated ER membrane)의 형성으로 이어지고, H460 세포에서 미토파지를 통해 이러한 미토콘드리아가 제거된다는 것을 의미한다.
- [0129] **실시예 3. LETM1-과발현된 H460 세포 결함이 미토콘드리아 기능에 미치는 영향 조사**
- [0130] H460 세포에서 미토콘드리아 형태에 대한 LETM1의 효과를 평가했다. H460 세포를 pDs-Red-Mito로 형질감염시킨 후 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시켰다. Ad-LacZ에 감염된 세포를 30 μ M CCCP로 8시간 동안 처리했다. 준비된 세포를 DAPI 및 Red-Mito로 염색하였고, 염색된 세포를 관찰하였다. 세포 관찰 결과는 도 3A에 나타내었다.
- [0131] 도 3A에 나타난 바와 같이, LETM1의 과발현은 미토콘드리아 세관 네트워크의 붕괴; 및 미토콘드리아 단편화;를 유도하는 것을 확인하였다. 또한 CCCP 처리 세포는 small dot-like phenotype의 축적이 확인되었다.
- [0133] Twig G, et al.(2008)은 미토콘드리아 분열 후에 생성된 탈분극된 딸 미토콘드리아(daughter mitochondria)가 정상적인 융합 주기를 계속할 수 없고, 미토파지에 의해 분해된다는 것을 입증했다. 따라서 본 실시예에서는 LETM1 과발현이 미토콘드리아 단편화를 유도하고 H460 세포에서 미토파지를 촉진하기 때문에 LETM1이 과발현된 세포에서 JC-1 염료를 사용하여 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)를 모니터링했다. 구체적으로, H460 세포를 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시켰다. Ad-LacZ에 감염된 세포를 15분 동안 30 μ M CCCP로 처리한 다음, 세포를 30분 동안 10ng/mL JC-1과 함께 배양했다. 유세포 분석을 통해 MMP를 분석하였다. 유세포 분석 결과는 RFP 신호(PE-A) 및 GFP 신호(FITC)의 상대 값(즉, 형광 밀도)로 표시하였다. 유세포 분석 결과는 도 3B에 나타내었다.
- [0134] 도 3B에 나타난 바와 같이, LETM1 과발현 세포 및 CCCP 처리 세포는 대조군에 비해 MMP가 현저히 감소된 것을 확인하였다.
- [0136] LETM1은 미토콘드리아 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter로 보고되었으며, 이는 특정 생리학적 조건에서 기질에서 Ca^{2+} 를 밀어내

어 기질과 막간 공간 사이의 평형을 유지할 수 있다. 이와 관련하여, mitochondria-targeted ratio-pericam plasmid를 이용하여 H460 세포에서 미토콘드리아 Ca^{2+} 수준의 변화를 측정하였다. 구체적으로, H460 세포를 24시간 동안 mtRP(mitochondria-targeted ratio-pericam)으로 형질감염시킨 후, 24시간 동안 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 감염시켰다. 칼슘 흡수는 200초 후에 $100\mu\text{M}$ ATP를 추가(그래프에 회색 막대로 표시)하여 시작되었다. mtRP의 형광 값은 FluoView 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 분석하였으며, 그 결과는 도 3C에 나타내었다.

[0137] 도 3C에 나타낸 바와 같이, LETM1-과발현된 세포는 ATP에 의해 유도된 미토콘드리아 Ca^{2+} 흡수가 대조군보다 감소한 것을 확인하였다.

[0139] 미토콘드리아 Ca^{2+} 의 조절에 대한 LETM1의 효과를 추가 조사하기 위하여, H460/Tet-On-유도성 LETM1 세포를 제조하였다. 독시사이클린에 의해 유도된 LETM1 과발현은 면역블롯팅으로 확인하였다. 면역 블롯팅 결과는 도 3D에 나타내었다.

[0140] 도 3D에 나타낸 바와 같이, Rhod2-AM을 사용한 적색 염색으로 검출된 미토콘드리아 Ca^{2+} 수준은 독시사이클린 처리된 H460/Tet-On-유도성 LETM1 세포에서 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과는 LETM1 과발현이 미토콘드리아에서 Ca^{2+} 수준을 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0142] 스트레스가 많은 세포 조건에서 미토콘드리아 Ca^{2+} 과부하는 mPTP 개방의 핵심 요소이며 궁극적으로 세포 사멸 또는 세포 사멸로 이어지는 대규모 미토콘드리아 변화를 유도한다. LETM1 과발현으로 인한 mPTP 역학의 가능한 변화를 조사하기 위하여, H460 세포를 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1로 24시간 동안 감염시켰다. Mito Probe Transition Pore 분석 키트 및 FACS를 사용하여, 감염된 세포의 mPTP 역학을 분석했다. mPTP의 활성화제인 이노마이신을 양성 대조군으로 사용하였다. mPTP 역학 분석 결과는 도 3E 및 F에 나타내었다.

[0143] 도 3E 및 F에 나타낸 바와 같이, 미토콘드리아 Ca^{2+} 감소에 관한 실험 결과(도 3C 및 D)와 일치하게, LETM1-과발현된 세포는 대조군 Ad-LacZ-감염 세포에 비해 CoCl_2 로 처리한 후 칼세인 AM 형광이 매우 강했다. 상기 결과는 LETM1을 과발현하는 세포에서 closed mPTP configuration을 나타낸다.

[0144] 추가 실험 결과, 세포호흡 능력은 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1에 감염된 H460 세포에서 세포 산소 소비율(oxygen consumption rate, OCR) 및 산화적 인산화(oxidative phosphorylation, OXPHOS) 복합체의 구성이 변경되지 않았기 때문에 두 세포 유형 모두에서 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

[0146] 실시예 4. GRP78이 미토파지에 미치는 영향 조사

[0147] 본 실시예에서는 LETM1 매개 미토파지 제거에서 역할을 할 수 있는 LETM1의 잠재적인 상호작용 파트너를 확인하였다. 구체적으로, LETM1이 과발현된 H460 세포를 사용하여 항-LETM1 항체가 있는 면역침전제를 제조하였다. H460 세포를 Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시켰다. 총 세포 용해물을 항-LETM1 항체로 면역침전시켰고, SDS-PAGE으로 분리하였다. 샘플의 각 레인을 동일하게 절단하고 질량 분석기로 분석했다. 본 실험의 결과는 도 4A에 간략히 나타내었고, SDS-PAGE 결과는 도 4B에 나타내었다. 또한 다양한 LETM1 결합 파트너에 대한 분석 결과는 도 4C에 나타내었다.

[0148] 도 4B에 나타낸 바와 같이, LETM1이 pull-down된 것을 확인하였다.

[0149] 도 4C에 나타낸 바와 같이, 후보 58개 중 GRP78(HSPA5) 및 GRP75가 가장 유망한 결합 파트너임을 확인하였다. 상기 GRP78(HSPA5) 및 GRP75는 각각 11배 및 4배로, 가장 높은 배수 변화를 보였다.

[0151] 상기 도 4C의 결과에 기초하여, Duolink-proximity ligation assay(PLA)로 추가 분석하였다. 구체적으로, H460 세포를 커버슬립에 시딩한 후, Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시켰다. 감염된 세포를 (i) 항-LETM1 항체; 또는 (ii) 항-LETM1 및 항-GRP78 항체의 조합;과 함께 배양하였고, Duolink PLA를 첨가하여 추가 배양하

였다. Duolink PLA 분석 결과는 도 4D에 나타내었다. 상기 도 4D의 상단 패널은 공초점 현미경 이미지이고, 하단 패널은 셀당 적색 점을 정량화한 결과를 나타낸다.

[0152] 추가적으로, HeLa 세포를 48시간 동안 pCMV5-Myc-LETM1로 형질감염시켰다. 항-LETM1 항체를 갖는 면역침전 생성물을 항-GRP78 항체로 면역 블롯팅하였다. 또한 GRP78 및 LETM1의 내인성 상호작용도 모니터링하였다. 면역 블롯팅 결과 및 내인성 상호작용 모니터링 결과는 각각 도 4E 및 F에 나타내었다.

[0153] 도 4D 내지 F에 나타난 바와 같이, GRP78이 H460 세포에서 LETM1의 상호작용 파트너임을 확인하였다.

[0155] 실시예 5. GRP78 활성이 MAM에서 LETM1 매개 미토콘드리아 기능 장애 및 복합체 형성에 미치는 영향 분석

[0156] 상기 실시예 4의 LETM1이 GRP78에 결합할 수 있다는 결과를 기반으로, 다양한 자극제 처리에 따른 LETM1/GRP78 복합체의 조절을 평가하였다. 본 실험에 사용한 자극제는 미토파지를 위한 CCCP, ER 스트레스에 대한 탐시가르긴(thapsigargin, TpG); 및 Ca^{2+} 이온통로 유도 활성화를 위한 A23817;를 사용하였다. 구체적으로, H460 세포를 커버슬립에 플레이팅하고 30 μ M CCCP, 1 μ M 탐시가르긴(TpG) 또는 5 μ M A23817로 8시간 동안 처리했다. LETM1과 GRP78 사이의 상호작용은 Duolink PLA에 의해 모니터링하였다. 공초점 현미경 이미지는 도 5A에 나타내었고, LETM1 및 GRP78의 상호 작용은 빨간색 신호로 표시된다.

[0157] 도 5A에 나타난 바와 같이, 각 자극제는 H460 세포에서 LETM1/GRP78 복합체의 뚜렷한 국소화와 연관되어 있는 것을 확인하였다. 구체적으로, LETM1-과발현된 H460 세포에서 LETM1/GRP78 복합체의 국소화와 유사하게(도 4D), CCCP 자극은 세포 세포질 전체에 분포하는 LETM1/GRP78 복합체의 국소화를 초래했다(도 5A, 두번째 패널). 반면에, TpG 또는 A23817의 처리는 핵에 가까운 LETM1/GRP78 복합체가 국소화되는 것을 확인하였다(도 5A, 세 번째 및 네 번째 패널).

[0159] 또한 상기 자극제가 8시간 동안 처리된 H460 세포를 용해하여 총 세포 용해물 샘플 및 미토콘드리아 분획 샘플을 얻었다. 웨스턴 블롯팅을 통해 수득된 샘플을 분석하였다. 상기 웨스턴 블롯팅은 항-LETM1, 항-GRP78, 항-Tom40 및 항-튜불린 항체를 사용하였다. 또한 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5B에 나타내었다.

[0160] 도 5B에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아에 국소화된 GRP78은 TpG 및 A23817 처리에 의해 증가되었지만, CCCP 처리에 의해 증가하지 않은 것을 확인하였다.

[0162] 미토콘드리아로의 GRP78 전위에 대한 LETM1의 효과를 추가로 조사하였다. H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포를 10cm 플레이트에 접종하였다. LETM1 발현은 24시간 동안 독시사이클린 100ng/ml과 함께 세포를 배양하여 유도하였다. LETM1 발현이 유도된 세포를 분획화하여, 총 세포 용해물 샘플 및 미토콘드리아 분획 샘플을 얻었다. 웨스턴 블롯팅을 통해 상기 샘플을 분석하였다. 상기 웨스턴 블롯팅은 항-LETM1, 항-GRP78, 항-Tom40 및 항-액틴 항체를 사용하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5C에 나타내었다.

[0163] 도 5C에 나타난 바와 같이, LETM1-과발현된 H460 세포에서 미토콘드리아 분획 샘플의 GRP78 수준에는 유의한 변화가 없었으나, LETM1의 발현은 독시사이클린 처리에 의해 증가된 것을 확인하였다. 이 결과는 상기 도 5B의 CCCP 처리된 샘플 분석 결과와 유사하다. 상기 결과는 LETM1/GRP78 복합체가 GRP78의 미토콘드리아 전위를 필요로 하지 않는 반면, 미토콘드리아 기능 장애를 유발하는 MAM의 핵심 구성요소일 수 있음을 시사한다.

[0165] H460 세포에서 LETM1으로 유도된 미토파지에서 GRP78의 역할을 평가하였다. 구체적으로, H460/Tet-On 유도성 LETM1 세포를 mt-Keima 발현 벡터로 형질감염시키고, 독시사이클린 100ng/ml과 함께 24시간 동안 배양하여 LETM1 과발현을 유도했다. LETM1 과발현 유도 후 세포에 25 μ M 호노키올(HNK) 또는 30 μ M CCCP를 8시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 트립신을 처리하여 수집한 후 유세포 분석 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. Sub-population P1은 높은 녹색 및 낮은 빨간색 신호를 포함하고, sub-population P2는 미토파지 세포를 나타내는 높은 빨간색 및 낮은 녹색 신호를 포함한다. 유세포 분석 결과는 도 5D에 나타내었고, 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5E에 나타내었다.

[0166] 도 5D에 나타난 바와 같이, CCCP 매개 미토파지는 mt-Keima-발현 H460 세포에서 대조군보다 P2 크기가 27.4% 증

가된 것을 확인하였다.

[0167] 도 5E에 나타난 바와 같이, 독시사이클린에 의해 유도된 LETM1 발현은 P2 집단 크기가 증가(9.5%)된 것을 확인하였다. 반면에 호노키올 전처리는 LETM1 유도 미토파지를 차단(4.0%)하여, 그 수준이 LETM1과 유사한 수준임을 확인하였다. 상기 결과는 GRP78 활성이 H460 세포에서 LETM1 매개 미토파지에 필요하다는 것을 시사한다.

[0169] 실시예 6. GRP75가 LETM1/GRP78 매개 미토파지 및 MAM에 미치는 영향

[0170] 이전 실시예에서 CCCP 처리 후 GRP78의 미토콘드리아 전위 또는 LETM1 과발현에 유의미한 변화가 없는 것을 확인하였다. 이에, 본 실시예에서는 LETM1에서 GRP75-매개된 미토파지를 조사하였다. 상기 GRP75는 상기 실시예 4 및 도 4C에서 확인된 또 다른 LERM1 결합 파트너이다. 구체적으로, H460 세포를 커버슬립에 시딩한 후, Ad-LacZ 또는 Ad-LETM1으로 24시간 동안 감염시켰다. 감염된 세포를 항-LETM1 항체 단독; 또는 항-LETM1 및 항-GRP75 항체 조합;과 함께 배양하였고, Duolink PLA와 함께 추가 배양하였다. 배양된 세포를 공초점 현미경으로 관찰하였고, 셀당 빨간색 점을 정량하여 그래프로 나타내었다. 공초점 현미경 관찰 결과는 도 6A에 나타내었다.

[0171] 도 6A에 나타난 바와 같이, Duolink-PLA는 Ad-LacZ에 감염된 H460 세포에서 LETM1과 GRP75가 상호작용하는 것을 확인하였다. GRP78과 유사하게, Ad-LETM1-감염 세포에서도 LETM1 및 GRP75의 강한 상호작용이 확인되었다.

[0173] 도 6B의 비오틴 표지 분석을 통해 LETM1, GRP75 및 GRP78의 복합체 형성을 추가 조사하였다. DBP(desthiobiotin-phenol)의 존재 하에 APEX2-LETM1(Peroxidase conjugation of LETM1 to APEX2)은 LETM1-인접 단백질의 비오틴화를 유도하였고, 이는 스트렙타비딘 비드에 의해 폴다운될 수 있다.

[0174] 구체적으로, 안정한 HEK293 세포에서 LETM1-APEX2를 독시사이클린으로 24시간 처리한 후 실험예에 설명된 대로 DBP 라벨링 실험을 수행했다. DBP-GRP75 및 DBP-GRP78은 스트렙타비딘 비드에 의해 폴다운시켰고, 이는 웨스턴 블롯팅으로 검출하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 6C에 나타내었으며, APEX2-LETM1 밴드는 화살표로 표시하였다.

[0175] 도 6C에 나타난 바와 같이, GRP75와 GRP78은 모두 DBP와 접합되었고 안정적인 HEK293 세포에서 APEX2-LETM1의 독시사이클린 유도 후 스트렙타비딘 비드로 폴다운된 것을 확인하였다. 상기 결과는 세포에서 LETM1/GRP78/GRP75 복합체가 형성될 수 있음을 의미한다.

[0177] LETM1 매개 자가포식에 대한 GRP75의 효과를 추가로 평가하였다. 구체적으로, H460/Tet-On-유도성 LETM1 세포를 10cm 플레이트에 시딩한 후 배양하였고, CRISPR/Cas9-GRP75 플라스미드를 사용하여 GRP75를 녹다운시켰다. LETM1 발현은 24시간 동안 100ng/ml 독시사이클린과 함께 세포를 배양함으로써 유도되었다. 양성 대조군은 세포를 8 시간 동안 30 μ M CCCP로 처리하였다. 세포를 용해시켰고, 이를 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 6D에 나타내었다.

[0178] 도 6D에 나타난 바와 같이, CRISPR/Cas9-GRP75로 형질감염된 H460 세포에서 GRP75 녹다운은 LC3B/II의 감소로 표시되는 LETM1 유도 자가포식을 차단하는 것을 확인하였다.

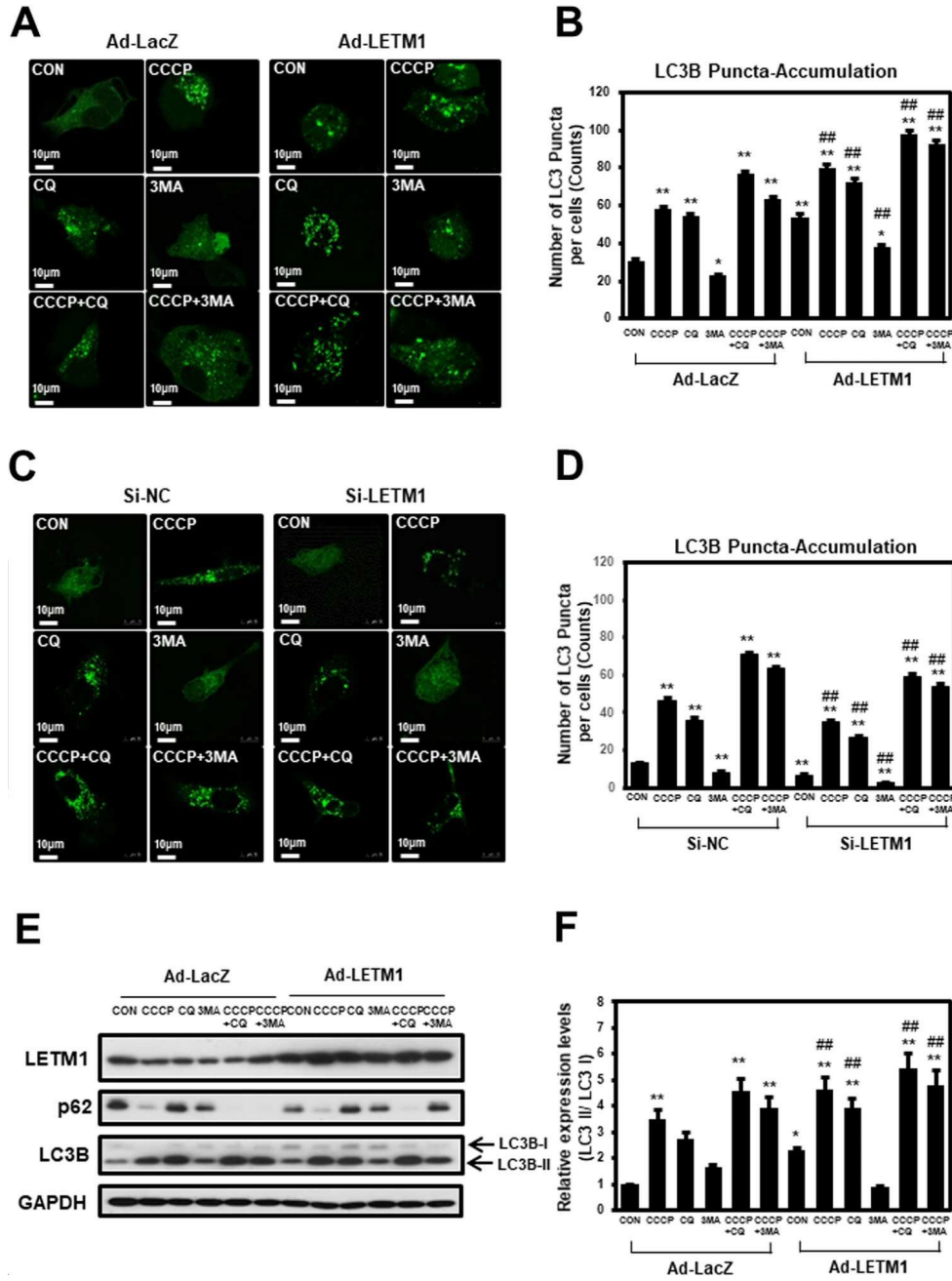
[0180] GRP75의 효과를 추가 확인하기 위하여, TEM을 사용하여 세포의 미세 구조를 분석했다. 구체적으로, CRISPR/Cas9-GRP75 플라스미드는 H460/Tet-On-유도성 LETM1 세포에서 녹다운하는 데 사용하였다. 양성 대조군은 세포를 8시간 동안 30 μ M CCCP로 처리하였다. 준비된 세포를 TEM으로 분석하였으며, 그 결과는 도 6E에 나타내었다.

[0181] 도 6E에 나타난 바와 같이, doxy-유도 LETM1 과발현 세포는 미토콘드리아 단편화가 대조군보다 많이 관찰되었다. 흥미롭게도, LETM1 과발현 세포에서 GRP75 녹아웃은 미토콘드리아 자가포식을 감소시키고 관 형태(검은 화살촉)를 증가시켰다. 또한 미토콘드리아 및 ER(흰색 화살촉) 사이의 MAM(mitochondria-associated ER membrane) 형성이 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과는 GRP75가 LETM1에 의해 유도된 자가포식에 필요하다는 것을 의미한다.

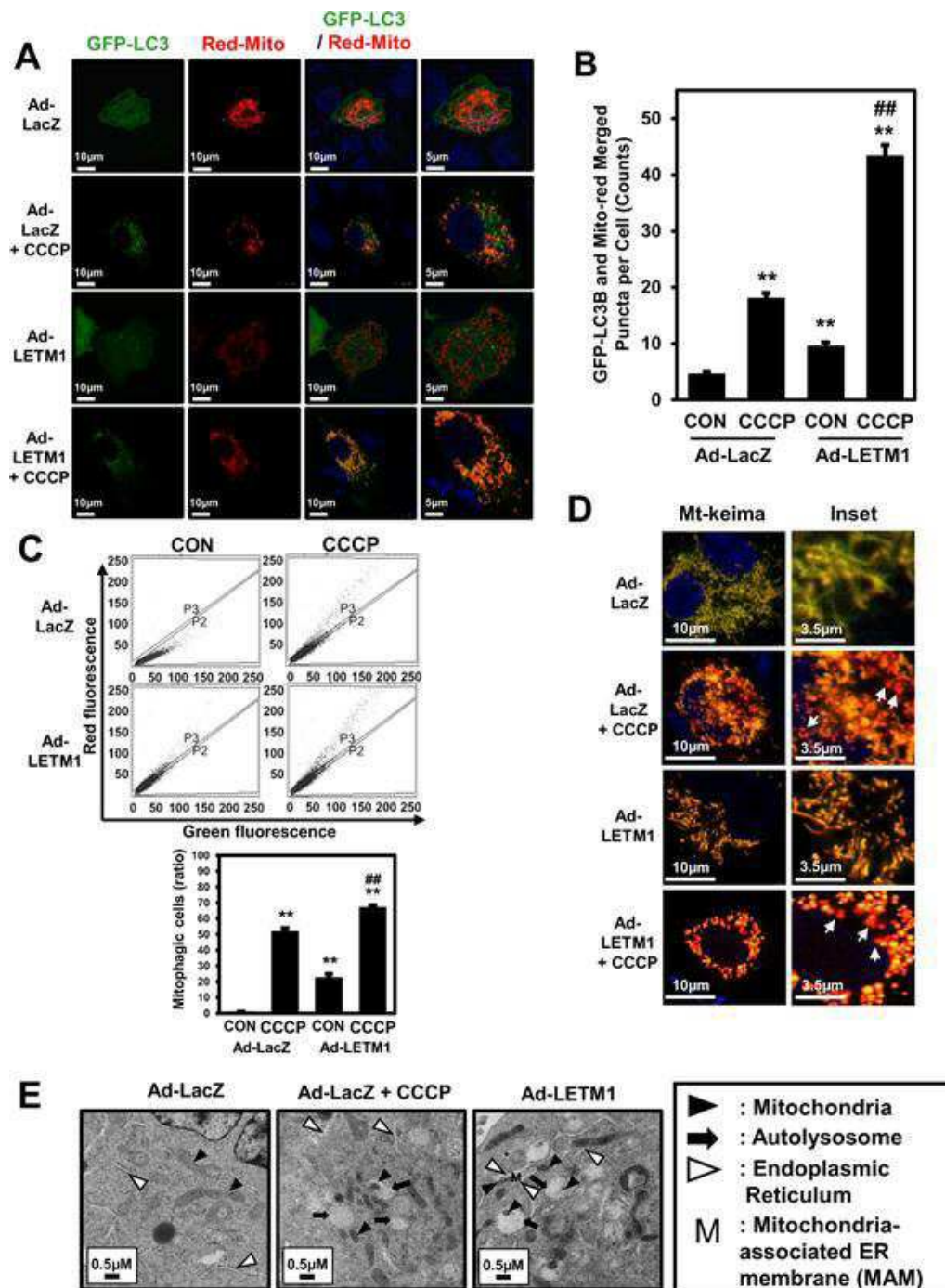
- [0183] 실시예 7. 인간 폐암 조직에서 LETM1의 발현 분석
- [0184] 인간 폐암 조직을 수집하고, 세포를 용해시켰다. 웨스턴 블롯팅을 통해 세포 용해물에서 LETM1 및 Pink1의 발현을 분석하였다. 상기 웨스턴 블롯팅은 항-LETM1, 항-PINK1 및 항-액틴 항체를 사용하였다. ImageJ 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 웨스턴 블롯팅 결과를 정량화하였다. LETM1 및 PINK1의 상대적 발현은 모든 밀도 값을 각 레인의 액틴 값으로 정규화하여 계산하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0185] 도 7에 나타낸 바와 같이, 인간 폐암 조직에서 LETM1 및 PINK1의 발현은 정상군보다 현저히 높은 것을 확인하였다. 특히 폐암의 병기가 진행될수록 LETM1의 발현이 증가되는 것을 확인하였다.
- [0187] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

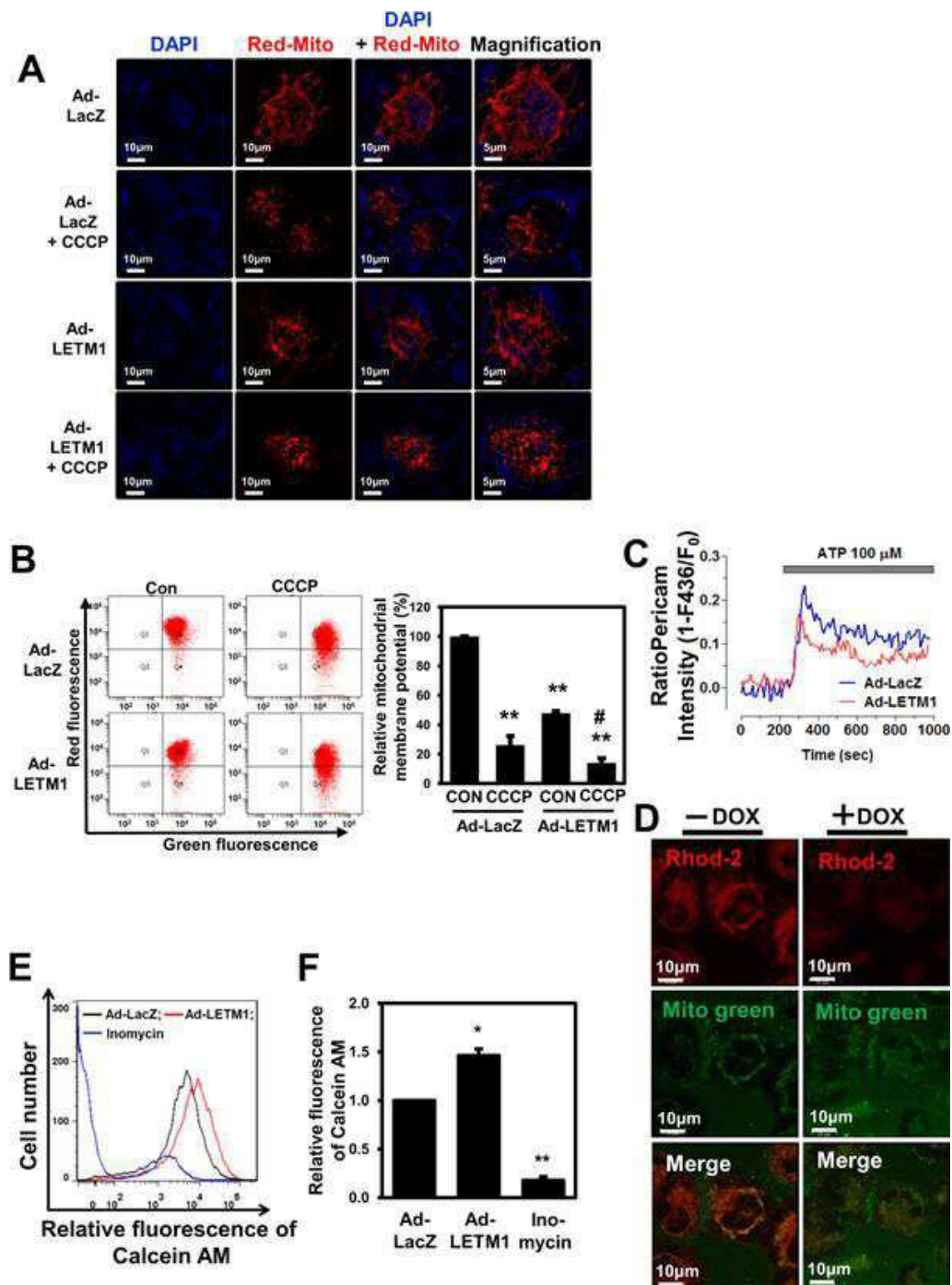
도면1



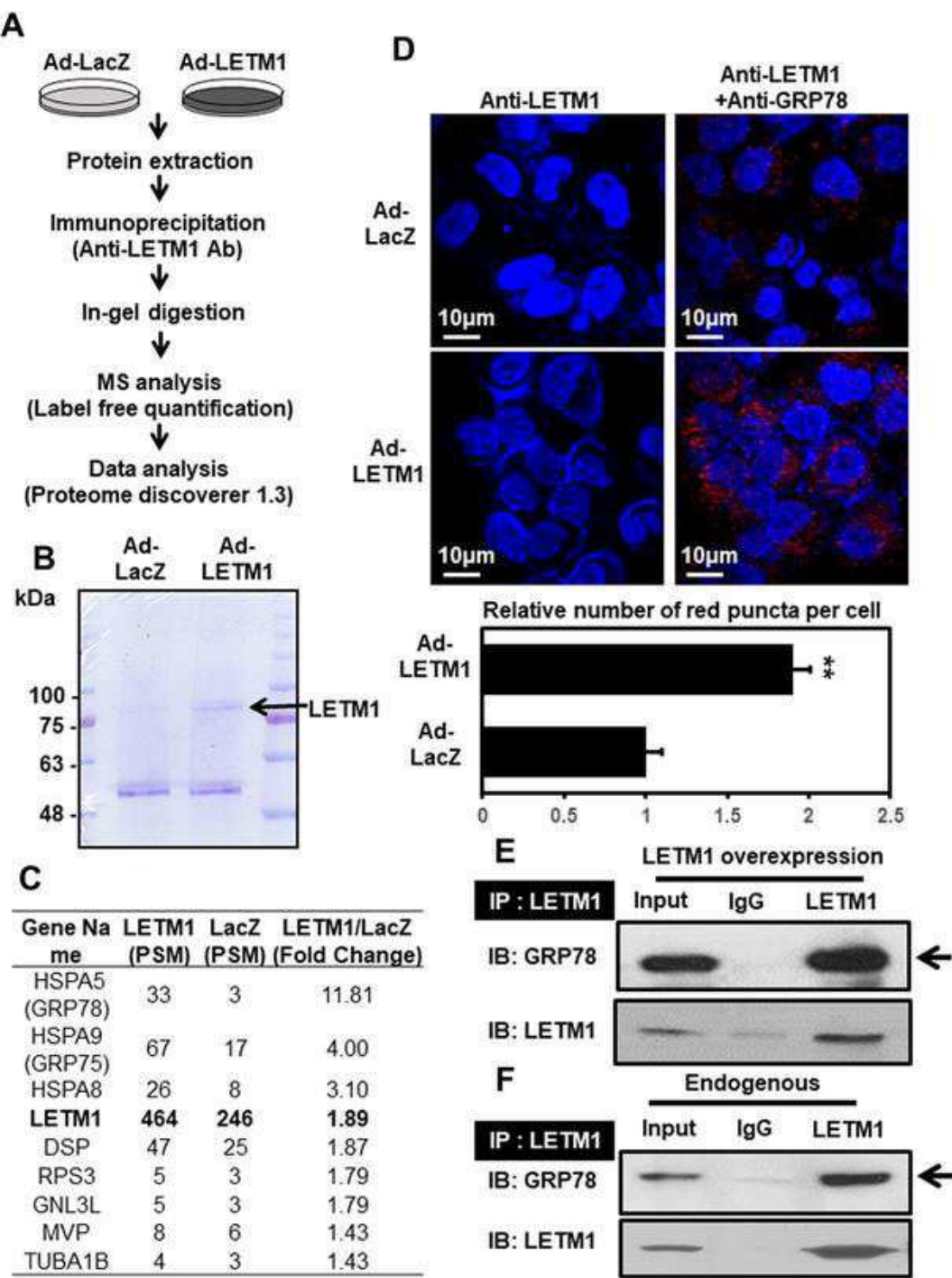
도면2



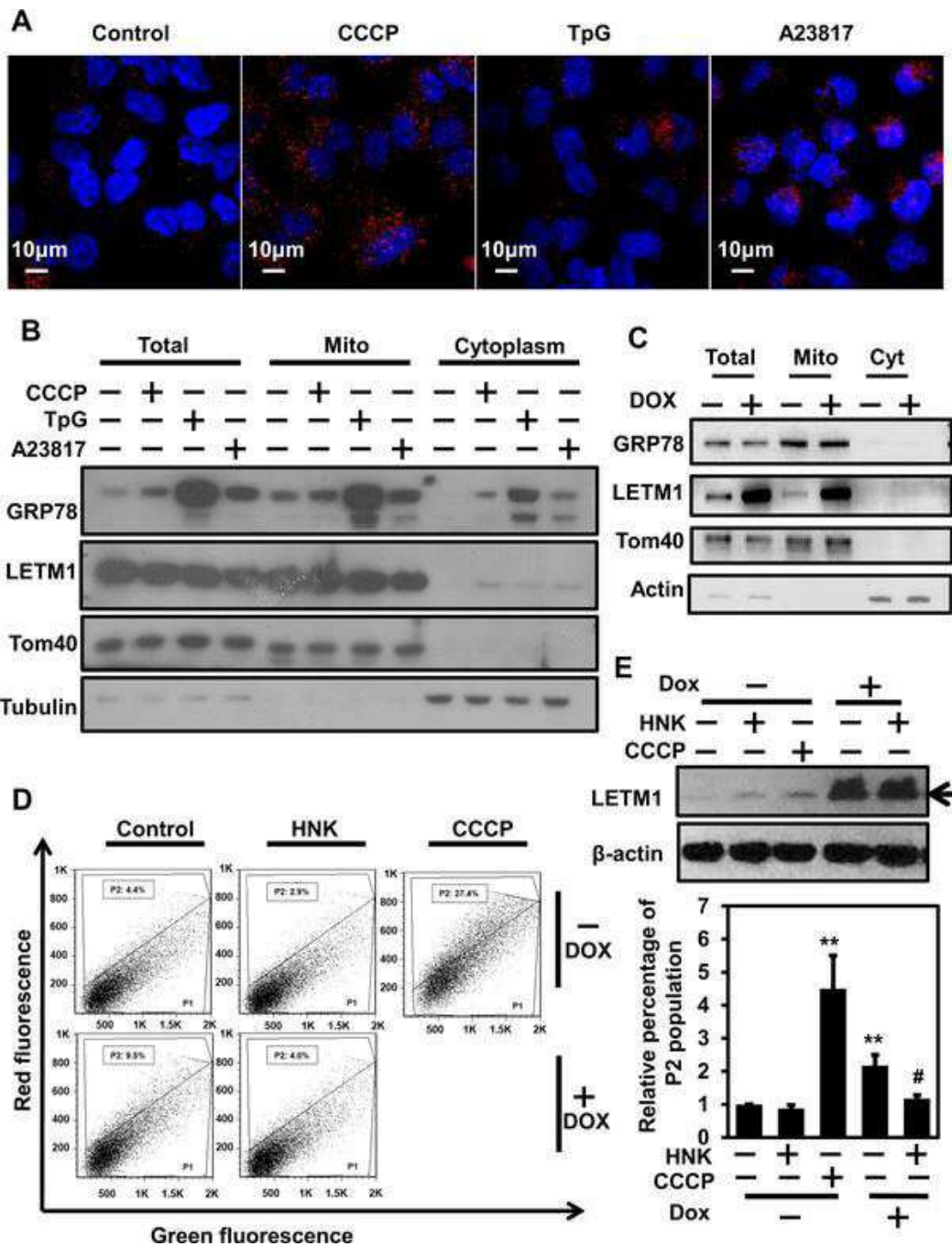
도면3



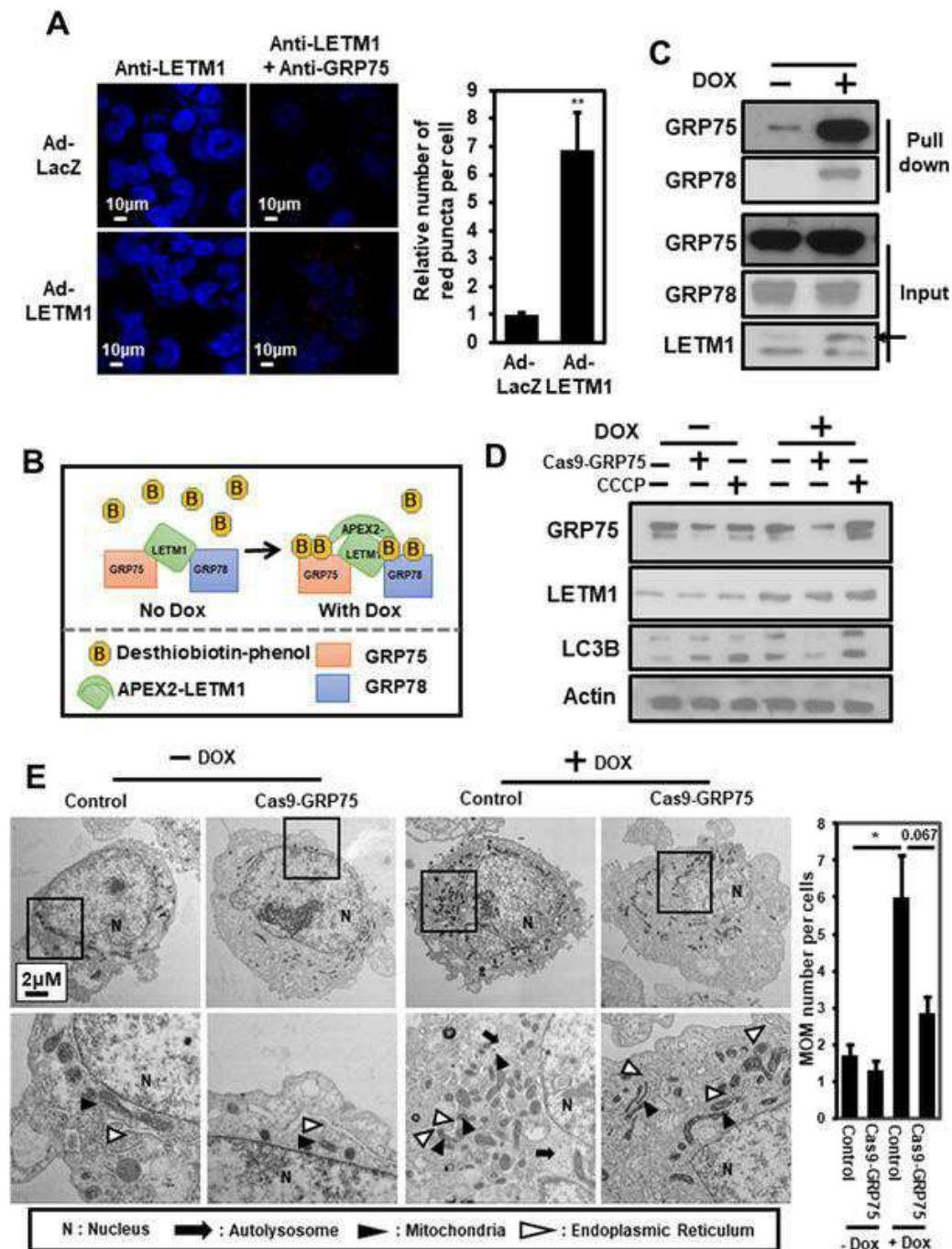
도면4



도면5

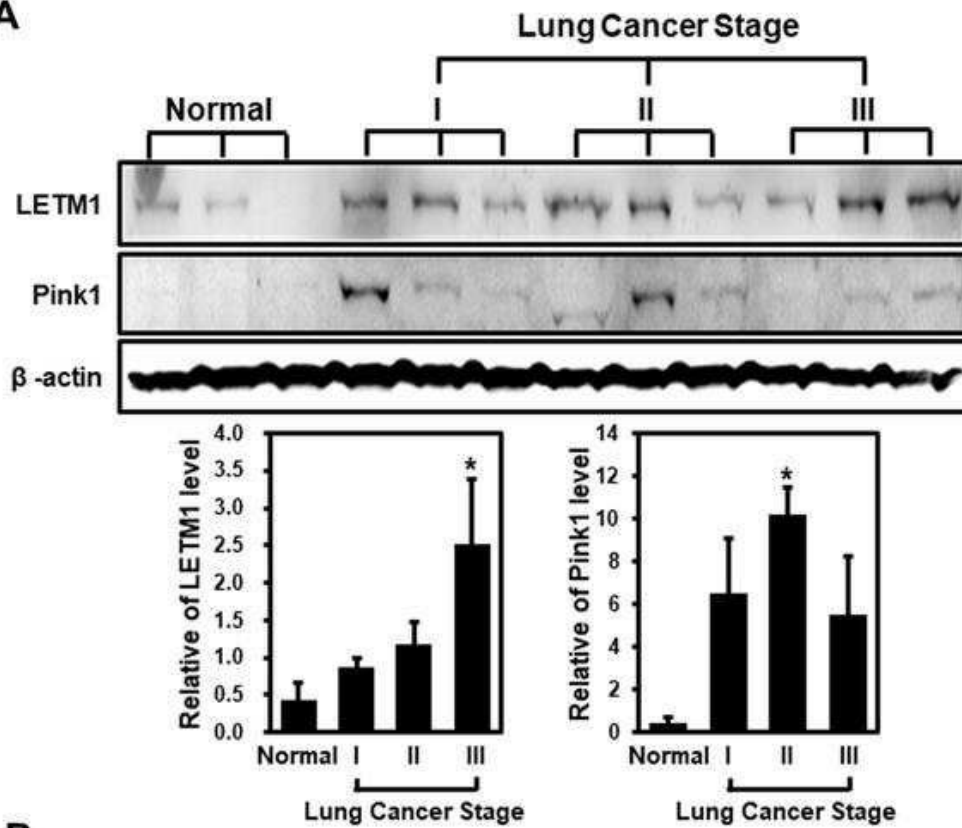


도면6



도면7

A



B

