

발명의 설명

발명의 명칭: 암 세포를 정상 세포로 가역화 하는 핵심 유전자 발굴 및 약물의 용도 재창출

기술분야

- [1] 본 발명은 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암 세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [2] 또한, 본 발명은 ERCC3를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 항암제는 크게 세포독성 화학항암제, 표적항암제 및 면역항암제로 구분된다. 세포독성 항암제는 정상 세포보다 빠른 속도로 증식하는 암세포의 특성을 이용해 암세포를 사멸시키는데, 일반적으로 치료 효과를 높이고 교차내성을 억제하기 위해 작용기전이 서로 다른 약물을 사용하는 복합 화학요법이 이용된다. 세포독성 화학항암제는 정상 세포에도 영향을 미치는데, 특히 암(종양)세포만큼이나 빠른 성장 속도를 보이는 혈액세포, 모근세포, 점막세포, 생식세포 등도 손상되면서 골수기능 저하(백혈구/적혈구/혈소판 감소), 탈모, 구내염, 설사, 불임 등의 특징적인 부작용이 나타날 수 있다. 표적항암제는 암 연관 특징을 유도하는 과발현된 단백질을 표적으로 하는 약물로서, 특정 단백질을 차단하여 암의 성장과 전이에 필요한 혈관 생성을 억제하거나 암의 성장을 지연시키는 방식으로 작용한다. 표적항암제는 세포독성 화학항암제에 비하여 정상 세포에 미치는 영향이 적어 부작용이 적으나, 암세포가 표적항암제에 빠르게 적응하여 내성을 획득하는 문제가 있다. 최근에 대두되는 면역항암제는 암세포에 대한 면역 억제를 차단함으로써 면역 작용을 상승시키는 방식으로 작용하는 항암제이다. 그러나, 면역항암제의 경우에도 예컨대 반응율이 낮아서 소수의 환자에서만 적용될 수 있고, 장기간 추적 관찰에서 재발 위험이 있으며, 심근염 등 치명적인 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다.
- [4] 기존의 암 분화 치료 전략은 암세포의 분화를 유도하여 암세포능을 간접적으로 억제하는 것으로 그 효과는 제한적이었으며, 신경모세포종, 갑상선암, 일부 혈액암(예컨대, 급성 전골수성 백혈병 및 일부 아형의 급성 골수성 백혈병) 등 일부 암종에서만 적용된 바 있다. 이러한 제한적 효과의 주된 원인은 암세포의 분화 상태와 암세포능이 서로 독립적으로 조절되는 경우가 많아서 단순한 분화 유도만으로는 암세포 고유의 무한 증식 능력을 효과적으로 억제할 수 없기 때문이

다. 한편, 일부 대장암의 경우 원격 전이(distant metastasis)가 일어난 4기 암 환자임에도 불구하고, 분화 상태가 좋은 원발암(primary cancer)이 발견되고 있다.

- [5] 암화 과정에서 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)는 줄기세포능의 획득(역분화성)과 암세포능의 획득이라는 두 가지 핵심 축을 통해 암화된다는 것에 착안하여, 암세포의 역분화성과 암세포능을 함께 억제함으로써 암화 과정을 역행시키는 '암세포의 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로의 가역화' 전략이 필요하다.
- [6] 암세포의 정상 분화 유도과 암세포능의 감소는 암 치료에 있어서 가장 중요한 두 가지 축이라고 할 수 있다. 본 발명자들은 유전자 네트워크의 컴퓨터 모델상에서 가능한 모든 유전자를 녹아웃(knock-out)하였을 때 암 세포의 분화를 측정할 수 있는 프레임워크 (framework)를 개발하여, 암세포의 분화와 동시에 암세포능을 낮출 수 있는 새로운 표적(target)인 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 발굴하였다.
- [7] 또한, 본 발명자들은 ERCC3를 억제하였을 때, 정상 세포에는 거의 영향을 미치지 않고, 암세포의 역분화성과 암세포능을 함께 억제함으로써, 암세포의 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로의 가역화에 의해 부작용 없는 암 치료, 완화 또는 예방이 가능하다는 것을 규명하였다.
- [8] 또한, 본 발명자들은 기존에 항알도스테론제 및 칼륨 보존 이뇨제로서 고혈압, 부종, 심부전, 간경변에 의한 복수, 원발성 알도스테론증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 과잉증상(여드름, 다모증 등), 저칼륨혈증 등에 사용되는 스피로노락톤(spiro lactone) 등과 같은 저분자 화합물들이 ERCC3 억제를 통한 암세포의 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로의 가역화에 현저히 우수한 효과를 나타낸다는 것을 규명하였다.
- [9] 또한, 본 발명자들은 스피로노락톤이 대장암 뿐만 아니라 유방암, 폐암, 피부암(특히, 흑색종) 등의 고형암(solid cancer)에서 암세포의 증식(성장)을 억제하고 분화를 유도한다는 것을 확인함으로써, ERCC3 억제를 기반으로 한 가역화 치료 전략이 전암(pan-cancer) 수준에서 적용 가능하다는 것을 입증하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다. 즉, 본 발명의 목적은 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)에는 거의 영향을 미치지 않고, 암세포의 역분화성과 암세포능을 함께 억제함으로써, 암세포의 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로의 가역화에 의해 부작용 없는 암 치료, 완화 또는 예방이 가능하도록 하는 것이다.

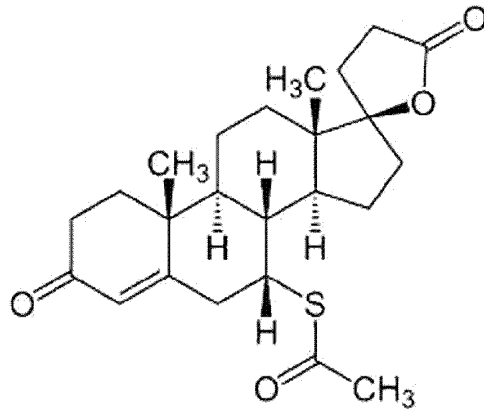
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 하기 화학식 1의 스피로노락톤(spironolactone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 하기 화학식 2의 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

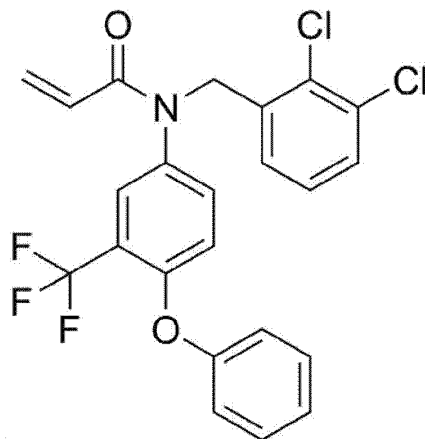
[13] [화학식 1]

[14]



[15] [화학식 2]

[16]



- [17] 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노락톤 (spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 B PK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral on cogene homolog), HMGA1(High-Mobility Group AT-Hook 1) 및 G3BP1(GTPase A ctivating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1)으로 이루어진 군으로부터 선택 되는 1종 이상의 유전자의 발현을 감소시킨다. ERCC3는 KRAS의 전사를 직접 유도하며, 이를 통해 암세포의 증식을 촉진한다. 또한 ERCC3는 HMGA1 및 G3 BP1의 발현을 증가시켜 WNT 신호 경로를 활성화시키며, 이로 인해 암세포의 줄기세포 특성이 강화된다. KRAS, HMGA1, G3BP1의 프로모터 영역에서 ERCC 3의 특이적인 결합이 확인되었으며, ERCC3를 억제할 경우 이들 유전자의 발현 이 유의하게 감소하는 것으로 보아, ERCC3는 해당 유전자들의 전사 활성화에 직접 적으로 참여하여 해당 유전자의 전사활성(Transcriptional activation)에 기여하는 것으로 판단된다. ERCC3가 결합한 유전자들(KRAS, HMGA1, G3BP1)은 암의 증 식 및 발달에 기여하는 기능을 가지며, 특히 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenc hymal transition, EMT)와 같은 암의 악성 진행에 관련된 특징을 포함한다. KRAS 는 대장암의 증식과 밀접한 관련이 있고, HMGA1과 G3BP1은 WNT 신호전달 경 로 활성을 통한 암세포의 증식 및 줄기세포능의 활성화와 밀접한 관련이 있다. 따 라서, 스피로노락톤 (spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능 한 염, 또는 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암세포의 증식을 저 해하고 줄기세포능을 억제한다.
- [18] 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노 락톤 (spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BP K-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 BMP2(Bone Morphogenetic Protein 2) 유전자의 발현을 증가시킨다. 스피로노락톤 (spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능 한 염은 ERCC3를 특이적으로 억제하는데, ERCC3 발현이 억제되면 BMP2의 발 현이 유의하게 증가하게 되고, 궁극적으로 암세포가 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 정상 분화되도록 유도한다.
- [19] 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노 락톤 (spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BP K-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암 관련 유전자인 MYC과 세포 증 식 핵심 유전자인 MKI67 및 PCNA의 암세포 내 과발현을 감소시킨다. ERCC3의 억제는 KRAS(MAPK 경로와 연관됨) 및 WNT 신호전달 경로를 저해함으로써, M YC를 비롯한 암 관련 유전자들과 MKI67, PCNA 등 세포 증식 관련 유전자들의 암세포 내 과발현을 감소시킨다.
- [20] 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노 락톤(spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BP K-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 특이적으로 정상 대장 세포의 분화

마커인 KRT20(Keratin 20), KLF4(KLF Transcription Factor 4), 또는 KRT20과 KLF 4의 발현을 증가시킨다. KRT20, KLF4, 또는 KRT20과 KLF4의 발현 증가는 대장 암 세포의 정상 대장 유사 세포(또는 정상 대장 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.

- [21] 또한, 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노락톤(spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 특이적으로 유방 정상 세포의 분화 마커인 GATA3(GATA Binding Protein 3)의 발현을 증가시킨다. GATA3의 발현 증가는 유방암 세포의 정상 유방 유사 세포(또는 정상 유방 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [22] 또한, 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노락톤(spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 특이적으로 정상 폐 세포의 분화 마커인 NKX2-1(NK2 homeobox 1), SCGB1A1(secretoglobulin family 1A member 1), 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현을 증가시킨다. NKX2-1, SCGB1A1 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현 증가는 폐암 세포의 정상 폐 유사 세포(정상 폐 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [23] 또한, 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물에 있어서, 유효성분인 스피로노락톤(spironolactone)(Aldactone®) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 특이적으로 정상 피부 세포의 분화 마커인 KRT1(Keratin 1)의 발현을 증가시킨다. KRT1의 발현 증가는 흑색종 세포의 정상 피부 유사 세포(정상 피부 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [24] 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물은 대장암, 유방암, 폐암, 피부암(예: 흑색종) 등 다양한 암종에서 암세포능을 감소시키고 동시에 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로의 정상 분화를 유도하는 전암(pan-cancer) 수준의 가역화 효과를 보인다.
- [25] 또한, 본 발명은 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법으로, (a) *in vitro*에서 암세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 후보물질이 처리된 암세포에서 ERCC3의 발현 수준을 측정하는 단계; (c) 상기 ERCC3의 발현 수준이 후보물질 미처리 대조군에 비해 낮은 수준을 나타내는 후보물질을 선별하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 선별된 후보물질 중에서 KRAS, HMGA1 및 G3BP1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 감소시키고, BMP2 유전자의 발현을 증가시키는 후보물질을 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물로 판정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [26] 본 발명의 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 MYC 등 암 관련 유전자 발현 감소를 유도하고 또한 MKI67, PCNA 등 세포 증식 관련 유전자들의 암세포 내 과발현을 감소시킨다.
- [27] 본 발명의 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 특이적으로 정상 대장 세포의 분화 마커인 KRT20(Keratin 20), KLF4(KLF Transcription Factor 4), 또는 KRT20과 KLF4의 발현을 증가시킨다. KRT20, KLF4, 또는 KRT20과 KLF4의 발현 증가는 대장암 세포의 정상 대장 유사 세포(또는 정상 대장 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [28] 본 발명의 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 특이적으로 정상 유방 세포의 분화 마커인 GATA3(GATA Binding Protein 3)의 발현을 증가시킨다. GATA3의 발현 증가는 유방암 세포의 정상 유방 유사 세포(또는 정상 유방 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [29] 본 발명의 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 특이적으로 정상 폐 세포의 분화 마커인 NKX2-1(NK2 homeobox 1), SCGB1A1 (secretoglob in family 1A member 1), 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현을 증가시킨다. NKX2-1, SCGB1A1 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현 증가는 폐암 세포의 정상 폐 유사 세포(정상 폐 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.
- [30] 본 발명의 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법에 있어서, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 특이적

으로 정상 피부 세포의 분화 마커인 KRT1(Keratin 1)의 발현을 증가시킨다. KRT1의 발현 증가는 흑색종 세포의 정상 피부 유사 세포(정상 피부 기능 세포)로의 가역화가 유도됨을 의미한다.

- [31] ERCC3는 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 핵심적인 타겟 유전자이고, ERCC3의 특이적인 억제제인 암세포능을 억제함과 동시에 정상 분화를 촉진하는 암 가역화 치료 전략으로 활용될 수 있다.

발명의 효과

- [32] 대장암 세포주 및 정상 대장 세포주에서 ERCC3 유전자의 발현을 저해시킬 때, 대장암 세포주에서는 증식이 억제되고, 정상 분화된 대장 상피 세포주와 유사한 유전자 발현이 나타나는 반면에, 정상 대장 세포주에서는 증식(성장) 억제가 나타나지 않는다. 따라서, ERCC3 저해 시 정상 대장 세포주에는 영향을 미치지 않으면서 대장암 특이적으로 분화를 유도하고 암세포능을 억제할 수 있다. ERCC3는 대장암뿐 아니라 유방암, 폐암, 피부암(특히 흑색종) 등 다양한 고형암에서 암세포 증식을 억제하고 정상 분화를 유도하였다. 이를 통해, ERCC3 억제를 기반으로 한 가역화 치료 전략이 전암(pan-cancer) 수준에서 적용 가능성을 입증하였다.

도면의 간단한 설명

- [33] 도 1은 유전자 조절 네트워크를 이용한 인실리코 시뮬레이션(in silico simulation) 기반의 대장암 세포의 가역화 유도 약물 타겟 유전자(ERCC3)의 발굴 및 기능 검증에 위한 전체 분석 과정과 핵심 결과를 요약한 것이다.
- [34] (A)는 실험 설계 개요를 나타낸 것이다. 좌측 패널은 대장암 환자의 종양 및 인접 정상 조직으로부터 조직 샘플을 수집한 후, 이를 이용하여 대장암 오가노이드 및 정상 대장 오가노이드를 제작하는 과정을 나타낸 것이다. 중앙 패널은 단일세포 전사체 (Single-cell RNA-seq) 데이터를 생성하고, 이를 기반으로 세포 상태를 반영하는 유전자 조절 네트워크를 구축하는 과정을 나타낸 것이다. 우측 패널은 모든 유전자에 대하여 인실리코(in silico) 유전자 녹아웃(knockout) 시뮬레이션을 수행하여, 암세포의 재분화를 유도할 수 있는 후보 약물 타겟 유전자를 발굴하는 분석 흐름을 제시한 것이다.
- [35] (B)는 단일세포 전사체 데이터에 대한 저차원 맵핑 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) 분석 결과를 제시한 것이다.
- [36] (C)는 각 세포 군집별로 대표 마커 유전자의 발현 수준과 발현 세포 비율을 나타낸 도트 플롯(dot plot)이다.
- [37] (D)는 정상 대장 오가노이드와 대장암 오가노이드에서 각 세포 유형의 구성 비율을 비교한 것이다.
- [38] (E)는 저차원 맵핑 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) 분석 결과에 기반한 클러스터링 분석을 통해 줄기세포 군집이 두 개의 하위 클러스터로 분리되는 현상을 시각화한 것이다.

- [39] (F)는 줄기세포 하위 클러스터 간 MYC 타겟 유전자, 암 시그니처, 세포 증식 관련 시그니처 점수를 비교한 박스플롯(boxplot)이다.
- [40] (G)는 전사 나이 지수(Transcriptional Age Index, TAI) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [41] (H)는 클러스터 1과 분화된 세포 간에 ERCC3에 의해 조절되는 차등 발현 (Differentially Regulated, DR) 유전자의 시그니처 점수를 비교한 것이다.
- [42] (I)는 ERCC3에 의해 발현이 조절되는 유전자에 대한 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [43] (J)는 ERCC3 유전자의 발현량을 비교한 바이올린 플롯(violin plot)이다.
- [44] (K)는 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 대장암 환자 데이터를 기반으로 ERCC3 발현 수준에 따른 생존율을 분석한 Kaplan-Meier 생존 곡선이다.
- [45] 도 2는 ERCC3의 유전자 조절 기능 및 대장암에서의 암화 촉진 역할을 분석한 것으로서, ERCC3가 암화 과정에서 유전자 발현 조절에 미치는 영향을 평가한 분석 결과이다.
- [46] (A)는 대장암 세포주 HT29에서 ERCC3의 DNA 결합 위치를 규명하기 위한 ChIP-seq(Chromatin Immunoprecipitation sequencing) 분석 실험 설계 과정을 도식화한 것이다.
- [47] (B)는 ChIP-seq. 분석 결과를 나타낸 것으로서, ERCC3의 전체 결합 영역 중 90% 이상이 원위 유전자간(distal intergenic) 및 인트론(intron) 영역에 존재하고, 전체 결합 영역 중 약 4.4%는 유전자의 프로모터(promoter) 영역에 위치한다는 것을 보여준다.
- [48] (C)는 ERCC3가 실제로 유전체 상의 프로모터 영역에 결합하는지를 확인하기 위해, H3K4me3(활성 프로모터 마커)와 RNA 중합효소(polymerase) II의 시그널이 ERCC3 ChIP-seq. 피크(peak) 주변에 나타나는지를 비교한 것이다.
- [49] (D)는 ERCC3가 어떤 유전자의 프로모터에 주로 결합하는지를 확인한 결과인데, KRAS, HMGA1, G3BP1의 프로모터 영역에 ERCC3의 특이적인 결합(peak)이 존재한다는 것을 보여준다.
- [50] (E)는 ERCC3의 표적 유전자들이 공통적으로 어떠한 기능을 가지는지 평가하기 위해 유전자 온톨로지(GO) 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [51] (F)는 상기 (A)~(E)를 종합적으로 나타낸 것으로서, ERCC3가 KRAS의 발현을 통한 암세포 증식을 촉진하고, HMGA1과 G3BP1의 발현을 통해 WNT 신호전달 경로의 활성화 및 줄기세포능 증가를 유도함으로써, 대장암의 암세포능(증식 및 미분화 특성)을 강화시키는 역할을 수행한다는 것을 나타낸다.
- [52] 도 3은 ERCC3 발현 억제를 통한 KRAS-MAPK 및 WNT 신호전달 경로 억제와 이로 인한 대장암 증식 억제 효과의 기전(mechanism)을 분석한 것이다.
- [53] (A)는 대장암의 무한 증식 능력이 KRAS(MAPK 경로와 연관됨) 및 WNT 경로의 활성화와 밀접히 연관되어 있음을 확인하고, 이를 바탕으로 ERCC3 발현의 감소

가 해당 경로의 억제로 이어지는지를 평가하기 위해 유전자 집합 농축 분석(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)를 수행한 결과를 나타낸다.

- [54] (B)는 위 (A)의 실험 결과를 단백질 수준에서 검증하기 위해 HT29 세포주에서 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 수행한 결과를 나타낸다.
- [55] (C)는 KRAS 및 WNT 경로의 활성이 실제로 하위의 증식 관련 유전자에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하기 위해 유전자 온톨로지(GO) 분석을 수행한 결과를 나타낸다.
- [56] (D)는 3종의 대장암 세포주(HT29, HCT116 및 CACO2)를 대상으로 ERCC3 억제가 실제로 세포 증식에 미치는 영향을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [57] (E)는 대장암 세포의 가역화 타겟인 ERCC3의 경우에 정상 대장세포의 증식에는 영향이 없거나 미미하다는 것을 나타낸 것이다.
- [58] (F) 및 (G)는 3종의 대장암 세포주(HT29, HCT116 및 CACO2)를 마우스에 이식한 후, ERCC3 억제 효과를 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- [59] 도 4는 ERCC3 억제를 통한 BMP2 발현 유도 및 대장암 세포의 정상 유사 (또는 정상 기능) 대장세포로의 분화 유도 메커니즘을 나타낸 것이다.
- [60] (A)는 대장암 세포주 HT29에서 ERCC3를 억제하면, X축상의 암세포 특성은 감소하고, Y축상의 정상 상피세포로의 분화 특성은 증가한다는 것을 나타낸 것이다.
- [61] (B)는 대장암 세포에서 분화가 유도될 경우, 대장의 정상 기능과 관련된 유전자들의 발현이 회복되는지를 확인하기 위해 유전자 발현 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [62] (C)는 ERCC3 억제 시, 정상 대장 조직의 대표적인 구조적 특징인 솔 가장자리 (brush border)와 밀착 연결(tight junction) 관련 유전자, 그리고 정점 연결 복합체(apical junction complex) 등 대장 상피세포의 분극성과 장벽(barrier) 기능 유지에 핵심적인 유전자들의 발현이 증가함을 나타낸 것이다.
- [63] (D)는 2종의 대장암 세포주(HT29 및 CACO2)를 대상으로 ERCC3를 억제한 결과, 대장 상피세포의 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 모두 증가한다는 것을 나타낸 것이다.
- [64] (E) 및 (F)는 대장암 세포의 정상 대장 상피세포로의 분화 현상이 BMP2 발현 증가와 밀접한 관련이 있다는 것을 나타낸 것이다.
- [65] (G)는 ERCC3의 억제에 따른 WNT 신호전달 경로의 억제가 BMP2 활성을 유도하고 대장암 세포의 정상 대장 상피세포로의 분화를 유도하는 기전을 설명한 것이다.
- [66] 도 5는 ERCC3를 특이적으로 분해하는 약물인 스피로노락톤(spironolactone)이 대장암의 증식을 억제하고, 분화 유도를 촉진함으로써, 대장암의 가역화를 유도한다는 것을 나타낸 것이다.
- [67] (A)는 CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주 (CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에

스피로노락톤을 처리하였을 때, ERCC3 특이적 분해를 통한 증식 억제 및 분화 유도 효과를 확인한 것이다.

- [68] (B)는 CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 세포 증식이 감소하는 것을 나타낸 것이다.
- [69] (C)는 CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 정상 대장세포 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 증가한다는 것을 나타낸 것이다.
- [70] (D)는 정상 대장 세포주(NCM-460)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 세포 증식의 변화가 없음을 나타낸 것이다.
- [71] (E)는 정상 대장 세포주(NCM-460)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, ERCC3의 분해가 촉진된다는 것을 나타낸 것이다.
- [72] (F)는 CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)와 정상 대장 세포주(NCM-460)의 스피로노락톤에 대한 IC₅₀을 계산한 결과이다. 이는 대장암 세포주는 스피로노락톤의 처리에 민감한 반면, 정상 대장 세포주는 스피로노락톤의 처리에 둔감함을 보여준다.
- [73] (G)는 대장암 세포주(HT29)와 정상 대장 세포주(NCM460)에 ERCC3 억제 또는 스피로노락톤(Spironolactone)을 처리한 후, 세포 사멸 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다. 이는 ERCC3 유전자 발현의 직접적인 억제 또는 가역치료효과를 유발하는 농도의 스피로노락톤 처리에 따른 ERCC3의 감소는 모두 암세포 및 정상 대장 세포의 사멸을 유도하지 않는다는 것을 보여준다.
- [74] (H)는 피부에 대장암을 이식한 마우스에 스피로노락톤을 경구 투여한 결과, 종양 크기와 증식 속도가 유의하게 감소하는 것을 나타낸 것이다.
- [75] (I)는 피부에 대장암을 이식한 마우스에 스피로노락톤을 복강 내 투여한 결과, 종양 억제 효과를 확인한 것을 나타낸다.
- [76] (J)는 대장암을 마우스의 장에 이식한 모델에서 스피로노락톤을 경구 및 복강 내 투여한 결과, 종양 억제 효과가 있음을 보여준다.
- [77] (K)는 마우스에 스피로노락톤을 경구 투여 후, 간 및 신장의 조직학 이미지이다. 이를 통해서 스피로노락톤에 의해 가역치료효과가 있는 약물의 농도는 마우스의 간과 신장에 독성이 없음을 나타낸 것이다.
- [78] 도 6은 ERCC3를 특이적으로 분해하는 약물인 BPK-21의 대장암 가역화 유도를 나타낸 것이다.
- [79] (A)는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에 BPK-21을 처리하였을 때, 대장암 세포의 증식이 유의적으로 감소한다는 것을 나타낸 것이다.

- [80] (B)는 3종의 대장암 세포주(HT29, HCT116 및 CACO2)에 BPK-21을 처리하였을 때, 정상 대장세포 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 증가한다는 것을 나타낸 것이다.
- [81] 도 7은 ERCC3를 특이적으로 분해하는 약물인 스피로노락톤이 유방암, 폐암 및 피부암(예: 흑색종)에서도 암세포의 증식을 억제하고 분화를 유도한다는 것을 나타낸 것이다.
- [82] (A)는 유방암 세포주 MCF7, 폐암 세포주 A549 및 피부암 세포주 A375에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 암세포 증식이 유의적으로 감소한다는 것을 나타낸 것이다.
- [83] (B)는 유방암 세포주 MCF7, 폐암 세포주 A549 및 피부암 세포주 A375에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 세포 분화를 유도하는 인자인 BMP2 및 세포 분화 마커[정상 유방 세포 (Breast luminal cell)의 분화 마커: GATA3, 정상 폐포 세포 (Lung AT1 cell) 분화 마커: NKX2-1과 SCGB1A1, 정상 피부(Keratinocytes) 세포 마커: KRT1)]의 발현이 증가한다는 것을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [84] 하기 실시예에 의해 본 발명의 바람직한 실시태양을 예시적으로 설명한다. 하기 실시예에 의해 본 발명의 범주가 제한되는 것으로 해석되어서는 아니된다. 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자("통상의 기술자")에게 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다.
- [85] ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit) [XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]는 DNA 복구와 유전자 전사에 관여하는 TFIIH 복합체의 핵심 헬리카제 단위(TFIIH Core Complex Helicase Subunit)를 암호화하는 유전자이다. ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit 또 다른 명칭으로서 XPB, Xeroderma Pigmentosum group B) 단백질은 DNA 복제나 손상 복구 과정에서 DNA 이중나선을 풀어주는 헬리카제(helicase)로 기능한다.
- [86] 정상 세포(normal cell)은 우리 몸의 모든 조직과 장기를 구성하는 기본 단위인데, 정해진 세포 주기(cell cycle)에 따라 분열하고 성장하며, 손상되면 스스로 죽는 세포자멸사(apoptosis) 과정을 거쳐 세포 수의 균형을 유지한다. 정상 세포의 주요 특징으로는 정상적인 세포 주기 조절, 분화 능력, 접촉 억제, 유한한 수명 및 정상적인 형태(현미경으로 보았을 때 규칙적인 모양과 크기를 가지며, 핵과 세포질의 비율도 일정함)이다.
- [87] 암 세포(cancer cell)는 정상 세포의 유전자에 돌연변이가 발생하여 비정상적으로 변형된 세포이다. 암 세포는 정상적인 세포 조절 기능을 상실하여 무한히 증식하고 주변 조직을 침범하며 다른 장기로 전이될 수 있는 악성 특성을 가진다. 정상 세포와 비교하였을 때 암 세포의 주요 특징은 무제한 증식, 분화 이상, 접촉

억제 상실, 세포자멸사 회피, 침윤 및 전이, 비정상적인 형태(현미경으로 보았을 때 크고 불규칙한 핵, 비정상적인 세포질, 핵-세포질 비율 증가 등)이다.

- [88] 정상 유사 세포(normal-like cell) 또는 정상 기능 세포 (normal-functioning cell)는 의학 및 생물학 분야에서 다양한 맥락으로 사용되는 용어인데, 본 발명에서는 정상 세포(normal cell)와 유사한 전사체(Transcriptome) 발현, 기능 및 형태 등을 가진 세포의 의미로 사용된다.

[89] 실시예

[90] 대장암 가역화를 위한 타겟 유전자인 **ERCC3** 발굴

- [91] 대장암 환자의 종양 및 인접 정상 조직으로부터 제작된 대장암 오가노이드-정상 대장 오가노이드 쌍으로부터, 두 오가노이드를 단일세포 수준으로 분리한 뒤 단일세포 전사체 데이터를 획득하여, 세포 분포를 분석하였다[도 1의 (A) 좌측 패널 참조]. 생존 세포를 선별하여 단일세포 RNA 전사체(Single-cell RNA-seq) 데이터를 생성하고, 이를 기반으로 세포 상태를 반영하는 유전자 조절 네트워크를 구축하였다[도 1의 (A) 중앙 패널 참조]. 단일세포 전사체 데이터를 기반으로 유전자 조절 네트워크를 구축하고, 이를 활용하여 모든 유전자에 대해 인실리코(in silico) 유전자 녹아웃(knockout) 시뮬레이션(simulation)을 수행하여 암세포의 역분화를 유도할 수 있는 후보 약물 타겟 유전자를 발굴하는 분석을 수행하였다. 이를 통해 암세포의 정상 분화를 유도하고 암세포 억제에 기여할 수 있는 후보 약물 타겟 유전자를 발굴하는 분석을 수행하였다. 후보 유전자의 선별은 정상 오가노이드에서 상대적으로 낮은 발현을 보이며, 동시에 암 오가노이드에서는 높게 발현되는 유전자 집합을 기반으로 수행하였다. 이는 억제하였을 때 정상 기능 회복에 기여할 가능성이 높은 유전자들을 우선적으로 고려한 전략이다[도 1의 (A) 우측 패널 참조]. 암 가역화 후보 약물의 차등 조절(differentially regulated, DR) 유전자는 악성 줄기 세포에서 높게 발현되고, 분화된 정상 장상피세포(enterocytes)에서 낮게 발현되는 것을 확인하였다. 이로부터 ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XPB(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 발굴하였다.

- [92] 단일세포 전사체에 대한 저차원 맵핑 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) 분석을 수행하였다. 분석 결과, 대장암 오가노이드와 정상 대장 오가노이드 내에 존재하는 다양한 세포 군집을 식별할 수 있었다. 식별된 세포 군집은 대장 줄기세포(colon stem cell), 전이-증식 세포(tansit-amplifying cell), 장상피세포 전구체(early enterocyte) 및 분화된 장상피세포(differentiated enterocyte)로 구성된다. 도 1의 (C)에 각 세포 군집별로 대표적인 마커 유전자의 발현 수준과 발현 세포 비율을 함께 나타내었다. 완전히 분화된 장상피세포의 대표적인 마커 유전자는 KRT20과 KLF4임을 확인하였다. 정상 대장 오가노이드와 대장암 오가노이드에서 각 세포 유형의 구성 비율을 비교하였을 때, 대장암 오가노이드에서는 줄기세포 및 전이-증식 세포의 비율이 증가한다는 것을 확인하였다[도 1의 (D) 참조].

- [93] 저차원 맵핑 UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection) 분석 결과에 기반한 클러스터링(clustering) 분석을 통해 줄기세포 군집이 2개의 하위 클러스터로 분리되는 현상을 시각화하였다[도 1의 (E) 참조]. 클러스터 1(cluster 1)은 주로 대장암 세포로 구성되어 있으며, 해당 세포 군집은 대장암 줄기세포로 분류하였다. 줄기 세포 하위 클러스터간 MYC 타겟 유전자, 암 시그니처, 세포 증식 관련 시그니처 점수를 비교하였을 때, 암 줄기세포로 분화된 클러스터 1에서 암 관련 시그니처의 활성도가 높게 나타남을 확인하였다[도 1의 (F) 참조]. 세포가 원시 단세포 생물의 유전자 발현 특징을 더 많이 가지는지 또는 다세포 생물의 유전자 발현 특징을 더 많이 가지는지 정량적으로 평가하는 지표인 전사 나이 지수 (Transcriptional Age Index, TAI) 분석을 수행하였다. TAI 수치가 높을수록 다세포 특성(정상세포의 특성)이 강하고 TAI 수치가 낮을수록 단세포 특성(암세포의 특성)이 강한 상태로 판별되는데, 일반적으로 암세포는 전사적 미성숙도(transcriptional immaturity)를 지니며 원시 단세포의 발현 특징을 많이 가지는 것으로 알려져 있다. 분석 결과, 클러스터 1은 클러스터 2 및 분화된 세포들에 비하여 전사적 미성숙도가 더 높게 나타남을 확인하였다. 이는 암세포의 특징이 강력한 것으로 예상되는 클러스터 1의 TAI 수치가 더 낮게 나타나 원시세포(암세포의 특성)와 유사한 특징이 더욱 잘 나타난다는 것을 의미한다.
- [94] 클러스터 1과 분화된 세포 간에 ERCC3에 의해 차등적으로 조절되는 (differentially regulated, DR) 유전자와 연관된 다양한 세포들의 시그니처 점수를 비교하였다. 그 결과, 클러스터 1에서는 ERCC3에 의해 조절되는 유전자들 중 종양유전자(oncogene)의 발현이 높게 나타났다[도 1의 (H) 참조]. ERCC3에 의해 발현이 조절되는 유전자 집합에 대한 유전자 온톨로지(Gene ontology, GO) 분석을 수행하였다. 그 결과, WNT 신호전달, 세포 주기, 대장암 관련 신호전달 경로 등이 유의한 수준으로 풍부하게 포함되어 있다는 것을 확인하였다.
- [95] ERCC3 유전자의 발현량을 비교하여 바이올린 플롯(violin plot)으로 나타낸 결과, 대장암 오가노이드에서 정상 대장 오가노이드 대비 ERCC3의 발현이 통계적으로 유의하게 높았다[도 1의 (J) 참조]. TCGA(The Cancer Genome Atlas) 대장암 환자 데이터를 기반으로 ERCC3 발현 수준에 따른 생존율 분석을 수행하여 Kaplan-Meier 생존 곡선으로 나타낸 결과, ERCC3 고발현 군에서 생존율이 유의하게 낮음을 확인하였다[도 1의 (K) 참조].
- [96] **ERCC3의 암 가역화 메커니즘**
- [97] ERCC3의 결합 위치를 특이적으로 검출하기 위해 FLAG 태그가 부착된 ERCC3 유전자를 대장암 세포주 HT29에 도입하고, ChIP-seq. 실험을 통해 ERCC3가 DNA에 결합하는 위치를 전장 유전체 수준에서 분석하였다. 대장암 세포주 HT29에서 ERCC3의 DNA 결합 위치를 규명하기 위한 ChIP-seq. 분석 실험 설계는 도 1의 (A)에 나타나 있다. ChIP-seq. 분석 결과, ERCC3는 전체 결합 영역 중 90% 이상이 원위 유전자간(distal intergenic) 및 인트론(Intron) 영역에 존재하였다. 이는 ERCC3가 뉴클레오티드 절제 복구(Nucleotide Excision Repair, NER) 관련 기능을

수행하는 위치에 결합하고 있음을 의미한다. 전체 결합 부위 중 약 4.4%는 유전자의 프로모터(promoter) 영역에 위치하며, 이 경우 ERCC3가 유전자 발현 조절 기능을 수행하는 것으로 해석된다[도 2의 (B) 참조]. 프로모터 부위에서의 전사는 DNA의 수소결합 해리가 필요하며, 이를 반영하여 H3K4me3(활성 프로모터 마커)와 RNA 중합효소(polymerase) II의 시그널이 ERCC3 ChIP-seq. 피크(peak) 주변에 존재하는지 분석하였다. 그 결과, 프로모터 영역에 위치한 ERCC3 피크 주변에서 H3K4me3(활성 프로모터 마커)와 RNA 중합효소 (polymerase) II의 시그널이 함께 존재한다는 것을 확인하였다[도 2의 (C) 참조].

- [98] HMGA1은 WNT 신호전달 경로의 활성 인자로서, WNT 표적 유전자의 전사를 가능하게 하는 후성유전학적 변화를 유도한다. G3BP1 G3BP1 (GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein 1)은 β -catenin의 분해를 매개하는 APC destruction complex (Adenomatous Polyposis Coli destruction complex)의 기능을 억제하여, β -카테닌(β -catenin)의 핵 내 이동(nuclear localization)을 증가시켜 WNT 타겟 유전자의 전사를 촉진한다. 해당 complex는 APC, AXIN, GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 beta), CK1 (Casein Kinase 1) 등으로 구성되며, β -카테닌(β -catenin)의 인산화를 통해 유비퀴틴화 및 분해를 유도한다. 또한, KRAS는 RAS-MAPK 신호전달 경로의 중심 유전자로서, 세포 증식과 생존에 관여하며, 특히 대장암을 포함한 다양한 고형암에서 돌연변이나 과발현을 통해 암세포의 증식 및 진행을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 ERCC3가 특정 유전자의 프로모터 영역에 결합하는지를 분석한 결과, KRAS, HMGA1, G3BP1의 프로모터에 ERCC3가 특이적으로 결합함을 확인하였다. ERCC3를 억제할 경우 이들 유전자의 발현이 유의하게 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 ERCC3가 이들 유전자의 전사 활성화에 직접적으로 기여함을 입증하는 것이다. KRAS는 암세포의 증식에, HMGA1과 G3BP1은 WNT 신호전달 경로의 활성화 및 암세포의 줄기세포성 유지에 핵심적인 역할을 하므로, ERCC3의 조절을 통해 암세포의 주요 종양 촉진 경로를 동시에 억제할 수 있음을 시사한다[도 2의 (D) 참조].
- [99] ERCC3의 표적 유전자들이 공통적으로 어떠한 기능을 가지는지 평가하기 위해 유전자 온톨로지(gene ontology, GO) 분석을 수행하였다. 그 결과, ERCC3가 결합한 유전자들은 주로 대장암의 증식 및 발달에 기여하는 기능을 가지며, 특히 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition, EMT)와 같은 대장암의 악성 진행에 관련된 특징을 포함하였다. ERCC3는 KRAS 및 WNT 신호전달 경로 관련 유전자들의 프로모터 영역에 결합함으로써 암 유발 핵심 경로 활성화에 직접 기여한다는 것을 확인하였다[도 2의 (E) 참조].
- [100] ERCC3는 KRAS 발현을 통해 증식을 촉진하고, HMGA1과 G3BP1 발현을 통해 WNT 신호전달 경로의 활성 및 줄기세포능 증가와 암세포의 증식을 유도한다는 것을 규명하였다. 이는 ERCC3가 대장암 암세포능(증식, 미분화 특성)을 강화시키는 역할을 수행한다는 것을 의미하고[도 2의 (F) 참조], 더 나아가 ERCC3 발현

억제가 대장암세포의 가역화를 위한 핵심적인 분자적 접근점이 될 수 있다는 것을 시사한다.

- [101] 대장암의 무한 증식 능력이 KRAS(MAPK 경로와 연관됨) 및 WNT 신호전달 경로의 활성화와 밀접히 관련되어 있다는 것을 확인하기 위해, ERCC3 발현의 감소가 해당 경로의 억제로 이어지는지를 평가하기 위해, 유전자 세트 농축 분석(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)을 수행하였다. 그 결과, ERCC3를 억제할 경우 KRAS-MAPK 및 WNT 신호전달 관련 유전자들의 발현이 전반적으로 감소하였다[도 3의 (A) 참조]. 이는 ERCC3 발현 감소가 KRAS-MAPK 및 WNT 경로의 활성을 동시에 억제할 수 있다는 것을 시사한다. 또한, 위와 같은 결과를 단백질 수준에서 검증하기 위해, HT29 세포주에서 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 수행하였다. ERCC3 억제 시 KRAS 및 그 하위 신호전달 경로인 MAPK 경로의 활성화 감소가 명확히 확인되었다[도 3의 (B) 참조]. 추가적으로, KRAS 및 WNT 신호전달 경로의 활성화가 실제로 하위의 증식 관련 유전자에 어떠한 영향을 미치는지 평가하기 위해 유전자 온톨로지(GO) 분석을 수행하였다. MYC를 비롯한 대장암 증식 관련 유전자들과 MKI67, PCNA 등 세포 증식에 핵심적인 유전자들의 암세포 내 과발현이 ERCC3에 의해 조절됨을 확인하였다[도 3의 (C) 참조]. 이는 ERCC3의 억제가 KRAS(MAPK 경로) 및 WNT 신호전달 경로를 저해함으로써, MYC를 비롯한 암 관련 유전자뿐만 아니라 MKI67, PCNA 등 세포 증식 관련 핵심 유전자의 암세포 내 과발현을 효과적으로 억제함을 의미한다.
- [102] 대장암 세포주를 이용한 ERCC3의 암 가역화 치료 효과
- [103] 3종의 대장암 세포주(HT29, HCT116, CACO2)를 대상으로 ERCC3 억제가 실제로 암 가역화를 통해서 세포 증식에 미치는 영향을 평가하였다. 3종의 대장암 세포주 모두에서 서열번호 1(GCCATTTCTAAGACTGCTGAA)의 shERCC3 #1과 서열번호 2(CGGAATATGTGGCAATCAAA)의 shERCC3 #2를 사용하여 ERCC3를 억제한 결과, ERCC3 억제가 대장암 세포의 증식을 유의하게 억제함을 확인하였다[도 3의 (D) 참조]. 하지만, 대장암 세포의 가역화 타겟인 ERCC3는 정상 대장 세포의 증식에는 영향이 없거나 미미할 것이라 예측할 수 있다. 실제로, 정상 대장 상피세포주 NCM460에서 ERCC3를 억제한 결과, 세포 증식 속도에 거의 변화가 없거나 미미한 수준임을 확인하였다[도 3의 (E) 참조]. 이는 ERCC3 억제가 암세포 특이적으로 작용함을 의미하고, 부작용 없는 치료 전략이 가능하다는 것을 시사한다.
- [104] 대장암 이식 마우스 모델을 이용한 ERCC3의 암 가역화 치료 효과
- [105] 3종의 대장암 세포주(HT29, HCT116, CACO2)를 마우스에 이식하여 in vivo에서 ERCC3 억제 효과를 평가하였다. 시간에 따른 종양의 부피 증가를 측정한 결과, 3종의 대장암 세포주 모두에서 ERCC3 억제가 종양의 증식 속도를 유의하게 감소시킨다는 것을 확인하였다[도 3의 (F) 참조]. 또한, 실험 종료 시점에서 측정된 종양 조직의 무게를 측정한 결과, ERCC3 억제 군에서 종양 조직의 무게가 유의하게 감소함을 확인하였다[도 3의 (G) 참조].

- [106] **ERCC3의 억제를 통한 대장암의 가역화 검증**
- [107] 대장암 세포주 HT29에서 ERCC3의 발현을 억제한 결과, 암세포 특성이 감소하고 정상 대장 상피세포의 분화 관련 형질이 증가하였다. 이에 따라, ERCC3 억제가 대장암 세포의 정상 세포로의 분화 유도에 기여함을 확인하였다. 또한, 대장암 세포에서 정상 분화가 유도될 경우 정상 대장의 기능과 관련된 유전자들의 발현이 회복되는지 여부를 평가하기 위해, 유전자 발현 분석을 수행하였다. 대장 특이적 소화효소 분비, 밀착 연결(tight junction) 형성, 미세융모(microvilli) 구조 유지, 이온 채널(ion channel), 대장 특이 전사인자 발현 등 다양한 정상 대장 기능 관련 유전자들의 발현이 ERCC3의 억제에 따라 증가한다는 것을 확인하였다. ERCC3 억제 시, 정상 대장 조직의 대표적인 구조적 특징인 솔 가장자리(brush border), 밀착 연결(tight junction) 관련 유전자, 그리고 정점 연결 복합체(apical junction complex) 등 대장 상피세포의 분극성과 장벽 (barrier) 기능 유지에 핵심적인 유전자들의 발현이 증가하였다[도 4의 (A)-(C) 참조].
- [108] 대장암의 가역화를 확인하기 위해 정상 장상피세포의 마커인 KLF4와 KRT20의 발현을 분석하였다. KLF4는 정상 대장 상피세포에서 특이적으로 발현되며, 장 점막 보호에 중요한 역할을 하는 IAP(intestinal alkaline phosphate)의 발현을 조절하는 전사 인자여서 정상 대장 상피세포의 마커로 선정하였다. KRT20 역시 대장 상피세포의 분화 마커로 선정하였는데, 이는 정상 대장 조직에서 KRT20가 분화된 장상피세포에서 특이적으로 발현되는 것이 보고되었기 때문이다.
- [109] 2종의 대장암 세포주(HT29, CACO2)를 대상으로 ERCC3를 억제하였을 때, 정상 대장 상피세포의 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 모두 통계적으로 유의미하게 증가하였다[도 4의 (D) 참조]. 이는 ERCC3 발현 억제가 대장암 세포의 분화 상태를 유도한다는 것을 의미한다.
- [110] 위와 같은 정상 분화 현상은 BMP2 발현 증가와 밀접한 관련이 있다. 정상 대장 상피세포는 장샘(Crypt) 기저부의 WNT 신호가 풍부한 환경에서 증식 및 초기 분화를 시작한 후, 점차 상부로 이동하면서 WNT 신호가 감소하고 BMP 신호가 증가하는 환경에 노출되며, 완전히 분화된 기능성 상피세포로 전환된다. 이 과정에서 BMP2는 세포의 완전한 분화 및 기능 회복을 유도하는 핵심 신호로 작용한다. ERCC3는 이러한 분화 억제 환경을 스스로 유지하는 역할을 하는 것으로 생각되었고, 이를 검증하기 위해 GSEA 분석과 BMP2 발현량 비교 결과 ERCC3 발현이 억제되면 BMP2의 발현이 유의하게 증가한다는 것을 확인하였다[도 4의 (E) 및 (F) 참조]. 앞서 ERCC3의 억제가 WNT 신호의 활성을 저해함을 확인하였으며, 이러한 WNT 신호의 억제는 BMP2 신호의 활성화를 유도하고, 그 결과 대장암 세포의 정상 분화를 촉진하였다. 이는 ERCC3 발현 감소가 BMP2 신호를 활성화시켜, 대장암 세포를 정상 장상피세포와 유사한 상태로 정상 분화시키는 기전적 연관성을 설명하는 결과이다[도 4의 (G) 참조].
- [111] **ERCC3 선택적 억제제인 스피로노락톤을 이용한 대장암 가역 치료**

- [112] 스피로노락톤(Spironolactone)은 알도스테론 수용체 길항제로 알려진 기존 약물이지만, 최근 연구에 따르면 뉴클레오티드 절제 복구(Nucleotide Excision Repair, NER) 경로의 핵심 구성 요소인 ERCC3의 단백질 수준을 감소시키는 기능을 가지는 것으로 보고되었다. 이는 ERCC3의 유비퀴틴화 및 프로테아좀 의존적 분해를 유도함으로써 NER 활성을 저해하는 기전을 갖는 것으로 보고되었다. 분자적 특징에 따라 대장암은 CMS(Consensus Molecular Subtype)1, CMS2, CMS3 및 CMS4의 4가지 유형으로 분류되는데, 각 CMS는 고유한 유전자 발현 특성과 약물 반응성의 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. ERCC3의 발현이 암세포능 유지에 공통적으로 중요하다는 점에 착안하면, ERCC3를 타겟으로 하는 가역화 치료 전략이 CMS 아형에 관계없이 효과를 발휘할 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 관점에서, CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, ERCC3 분해를 통해 증식 억제 및 분화 유도가 나타난다는 것을 확인하였다[도 5의 (A) 참조].
- [113] CMS(Consensus Molecular Subtype) 1-4에 해당하는 5종의 대장암 세포주(CMS-1: SW48, CMS-2: NCI-H508, CMS-3: HT29, CMS-4: HCT116 및 CACO2)에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 세포 증식이 감소하고, 대장 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 증가하였다[도 5의 (B) 및 (C) 참조]. 이는 스피로노락톤이 ERCC3의 특이적 분해를 유도함으로써, 대장암 세포의 증식을 억제하고 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)와 유사한 상태로 가역화를 유도한다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 스피로노락톤이 정상 세포에는 상대적으로 적은 영향을 미칠 것임을 시사한다. 실제로 정상 대장 세포주(NCM460)에 스피로노락톤을 처리한 결과, 대장암 세포주와는 달리 세포 성장의 억제가 거의 발생하지 않음을 확인할 수 있었다 [도 5의 (D) 및 (E) 참조]. 또한, 스피로노락톤 처리 시 대장암 세포주와 정상 대장 세포주의 IC₅₀ 값을 비교해보면, 대장암 세포의 경우 IC₅₀이 공통적으로 200 μ M 미만으로 나타나 스피로노락톤에 민감한 반면, 정상 대장 세포주는 이보다 3배 이상 높은 IC₅₀ 값을 보여 세포 증식에 있어서 상대적으로 높은 저항성이 있음을 알 수 있다[도 5의 (F) 참조]. 한편, 스피로노락톤 처리 및 ERCC3 발현 억제 후 대장암 세포의 사멸 여부를 분석한 결과, 유전자 조절 또는 약물 처리를 통한 ERCC3의 단독 억제만으로는 세포 사멸이 거의 발생하지 않았다[도 5의 (G) 참조]. 종합적으로 볼 때, 스피로노락톤은 대장암의 가역 치료 과정에서 암세포에 선택적으로 작용하여 증식을 억제하면서도, 정상 세포에 대한 부작용은 최소화하는 치료 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다
- [114] 스피로노락톤을 주성분으로 하는 Aldactone®을 피부의 피하 및 대장에 대장암을 이식한 마우스에 경구 투여하였을 때, 종양 크기 및 증식 속도가 유의하게 감소하였고[도 5의 (H) 및 (J) 참조], 스피로노락톤을 마우스에 복강내 투여하였을 때에도 경구 투여시와 마찬가지로 종양 억제 효과가 재현되었다[도 5의 (I) 및 (J) 참조]. 이는 스피로노락톤이 ERCC3를 특이적으로 분해하여 대장암의 증식을 억

제하고, 동시에 정상 분화를 유도함으로써 암세포의 가역화를 유도할 수 있음을 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 입증하였음을 의미한다. 또한, ERCC3의 억제가 대장암 치료에는 탁월한 효과를 보이는 반면, 마우스의 간과 신장에서는 독성이 나타나지 않음을 확인하였다 [도 5의 (K) 참조]. 이러한 결과는 향후 대장암 환자를 대상으로 ERCC3 억제를 기반으로 한 약학적으로 허용 가능한 임의 사용할 경우, 부작용이 최소화될 가능성이 있음을 시사한다.

[115] **ERCC3 선택적 억제제인 BPK-21을 이용한 대장암 가역 치료**

[116] ERCC3의 기능적 억제제(효소 활성 억제제)인 BPK-21을 5종의 대장암 세포주 (HT29, HCT116, CACO2, SW48, NCI-H508)에 처리한 결과, 암세포의 증식이 유의하게 감소하고, 처리 농도에 따라 대장 분화 마커인 KRT20 및 KLF4의 발현이 증가함을 확인하였다[도 6의 (A) 및 (B) 참조]. 이는 BPK-21이 ERCC3의 기능을 효과적으로 저해함으로써, 대장암 세포의 증식 억제뿐 아니라 정상 대장 상피세포와 유사한 분화 상태로의 전환(가역화)을 유도할 수 있음을 시사한다.

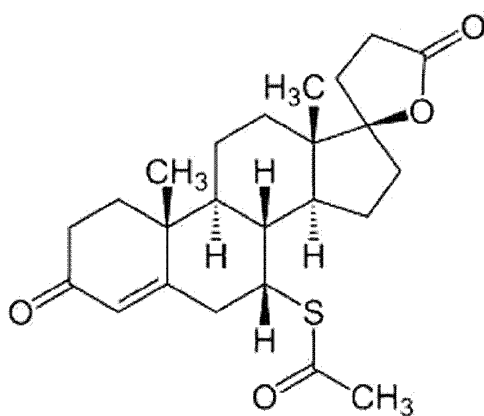
[117] **ERCC3 선택적 억제제인 스피로노락톤을 이용한 암 가역 치료의 확장**

[118] 유방암 세포주 MCF7, 폐암 세포주 A549 및 피부암(흑색종) 세포주 A375에 스피로노락톤을 처리하였을 때, 암세포 증식이 농도 의존적으로 감소하고, 동시에 암세포 증식에 관여하는 KRAS의 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, 세포 분화를 유도하는 인자인 BMP2의 발현 및 세포 분화 마커(정상 유방 세포 (Breast luminal cell)의 분화 마커: GATA3, 정상 폐포 세포 (Lung AT1 cell)마커: NKX2-1과 SCGB1A1, 정상 피부(Keratinocytes) 세포 마커: KRT1)의 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다[도 7의 (A) 및 (B) 참조]. 이는 스피로노락톤이 ERCC3를 분해함으로써, 대장암 이외의 암종(예컨대, 유방암, 폐암 및 피부암 등)에서도 암세포능을 억제하고 분화를 유도하는 가역화 치료 효과를 발휘한다는 것을 입증한다.

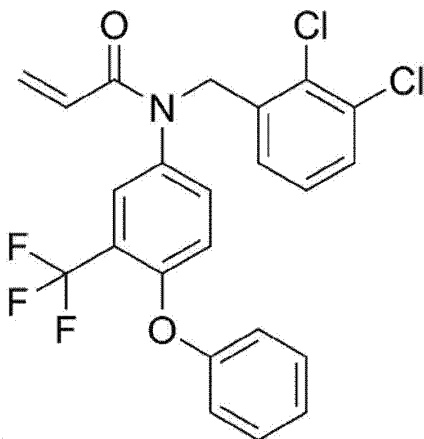
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1의 스피로노락톤(spironolactone) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 하기 화학식 2의 BPK-21 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물로서, ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XP B(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



[청구항 2] 제1항에 있어서, KRAS, HMGA1 및 G3BP1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, BMP2 유전자의 발현을 증가시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 암 관련 유전자인 MYC 및 암세포에서 과발현되는 세포 증식 관련 핵심 유전자인 MKI67 및 PCNA의 암세포 내 과발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 암은 대장암, 유방암, 폐암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 암은 대장암이고, 상기 조성물은 KRT20, KLF4, 또는 KRT20과 KLF4의 발현을 증가시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 암은 유방암이고, 상기 조성물은 GATA3의 발현을 증가시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 상기 조성물은 NKX2-1, SCGB1A1, 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현을 증가시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 암은 흑색종이고, 상기 조성물은 KRT1의 발현을 증가시키는 것인 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] ERCC3(ERCC Excision Repair 3, TFIIH Core Complex Helicase Subunit)[XP B(Xeroderma Pigmentosum group B)라고도 칭함]를 특이적으로 억제하여, 암세포의 증식을 억제함과 동시에 정상 분화를 유도함으로써, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법으로서,
 (a) in vitro에서 암세포에 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 후보물질이 처리된 암세포에서 ERCC3의 발현 수준을 측정하는 단계;
 (c) 상기 ERCC3의 발현 수준이 후보물질 미처리 대조군에 비해 낮은 수준을 나타내는 후보물질을 선별하는 단계; 및
 (d) 상기 단계 (c)에서 선별된 후보물질 중에서 KRAS, HMGA1 및 G3BP1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유전자의 발현을 감소시키고, BMP2 유전자의 발현을 증가시키는 후보물질을 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물로 판정하는 단계를 포함하는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물은 암 관련 유전자인 MYC 및 세포 증식 관련 핵심 유전자인 MKI67 및 PCNA의 암세포 내 과발현을 감소시키는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.

- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 암은 대장암, 유방암, 폐암 및 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 암은 대장암이고, 상기 조성물은 KRT20, KLF4, 또는 KRT20과 KLF4의 발현을 증가시키는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 암은 유방암이고, 상기 조성물은 GATA3의 발현을 증가시키는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 상기 조성물은 NKX2-1, SCGB1A1, 또는 NKX2-1과 SCGB1A1의 발현을 증가시키는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 암은 흑색종이고, 상기 조성물은 KRT1의 발현을 증가시키는 것인, 암세포를 정상 유사 세포(또는 정상 기능 세포)로 가역화하는 약물을 스크리닝하는 방법.