



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월04일
(11) 등록번호 10-2260319
(24) 등록일자 2021년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0153686
(22) 출원일자 2018년12월03일
심사청구일자 2018년12월03일
(65) 공개번호 10-2020-0067296
(43) 공개일자 2020년06월12일
(56) 선행기술조사문헌
JP2009509508 A
<https://www.origene.com/catalog/gene-expression/knockout-kits-crispr/kn405143/rarres1-human-gene-knockout-kit-crispr>
US20180100201 A1

(73) 특허권자
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
(72) 발명자
김경태
서울특별시 마포구 새창로 52, 110동 1003호 (도화동, 도화동현대아파트)
김현숙
경기도 고양시 일산서구 후곡로 10, 906동 2002호 (일산동, 후곡마을9단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 18 항

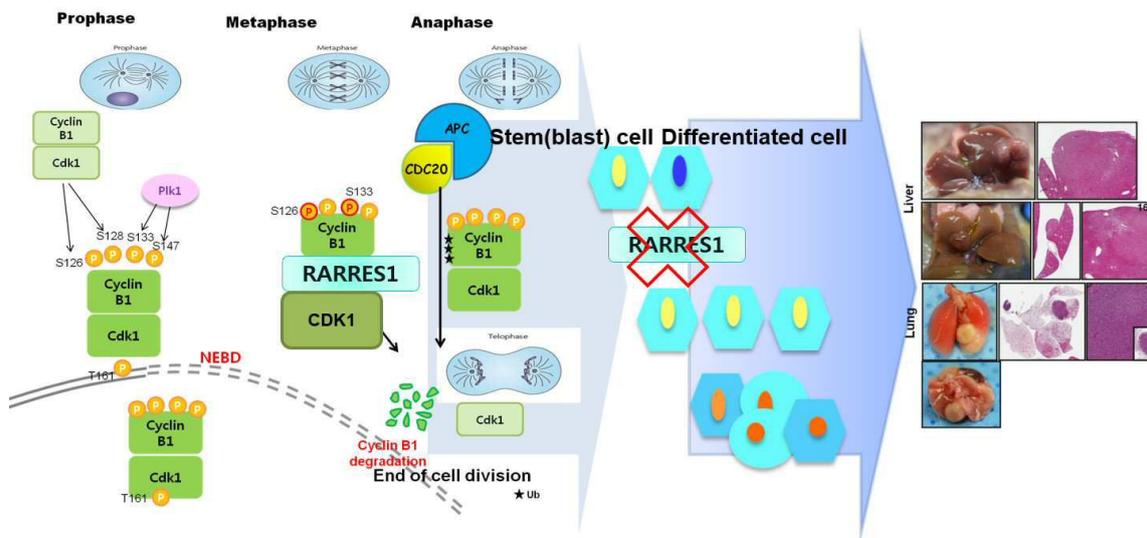
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 RARRES1 유전자 녹아웃 동물 모델 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 RARRES1 유전자 일부와 조건적 녹아웃(conditional knockout) 동물모델의 제작에 사용되는 서열들을 포함하는 표적 벡터(targeting vector), 상기 표적 벡터를 이용하여 생성된 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포, 이를 이용하여 얻은 종양형성 RARRES1^{-/-} 동물 모델, 그 제조방법 및 이를 이용한 암 치료물질의 스크리닝 방법 (뒷면에 계속)

대표도 - 도15



법 등에 관한 것이다. 이에, 본 발명자들은 암의 진단 및 예후 예측을 위한 분자적 기작을 밝혀내기 위해 예의 연구한 결과, RAREES1^{-/-} 동물 모델에서 자발적인 종양에 걸리기 쉽고, CDK1 및 Cyclin B1의 인산화 증가 및 CDK1-Cyclin B1 복합체의 활성이 높다는 것을 확인하여 이는 단백질 분해능 감소에 의하여 종양세포주기 진행이 특이하게 빠르다는 것을 확인하였으며, 특히 줄기세포성 세포 증식이 증가하였고, 더불어 유사분열의 결함을 유발 및 유사분열 시 염색체가 불안정함을 확인하였는 바, RAREES1이 암 진단 및 예후 예측, 치료에 중요한 인자임을 확인하였다. 나아가, RAREES1과 CDK1-Cyclin B1 복합체의 관계, CDK1-Cyclin B 단백질의 양적 조절, 줄기세포성 세포 증식능의 증가를 통하여 암의 치료물질의 스크리닝 및 의약품 개발 용도로도 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

- C12N 15/65 (2013.01)
- C12N 15/8509 (2013.01)
- G01N 33/5088 (2013.01)
- A01K 2217/075 (2013.01)
- A01K 2217/206 (2013.01)
- A01K 2227/105 (2013.01)
- A01K 2267/0331 (2013.01)
- C12N 2015/8572 (2013.01)
- C12N 2800/30 (2013.01)

이수형

경기도 군포시 광정로 122 (산본동, 주몽아파트)

이호

경기도 고양시 일산동구 강송로 195, 812동 401호
(마두동, 강촌마을8단지아파트)

(72) 발명자

박찬이

경기도 고양시 일산서구 강선로 30, 1505-801 (주엽동, 강선마을15단지아파트)

유도영

경기도 의왕시 갈미1로 17, 104동 403호 (내손동, 의왕상록아파트)

윤은경

경기도 고양시 일산서구 킨텍스로 456, 103동 1204호 (일산동, 후곡마을1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465024317
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	기관고유연구사업
연구과제명	새로운 암억제 유전자를 이용한 표적치료 선도 물질 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	국립암센터
연구기간	2015.02.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465017625
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	암연구소및국가암관리사업본부운영
연구과제명	Cyclin B circuit 에 의한 발암과정의 조절
기여율	1/2
과제수행기관명	국립암센터
연구기간	2014.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 약물 저항성 유전자 부위; RARRES1 게놈 유전자의 3번째 엑손을 포함하는 유전자 절편; 및 제 2 loxP 부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 인간을 제외한 종양형성 동물 모델 제작용 레티노산 수용체 반응인자 1(Retinoic acid receptor responder 1; RARRES1) 표적 벡터(targeting vector)가 형질도입된 인간을 제외한 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포를 낭배(blastocyst)에 주입하여 제조한 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위 앞에, 스플라이싱 수용체(splicing acceptor; SA), β -갈락토시다제(β -galactosidase; β gal), 및 SV40 polyA signal(pA)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약물 저항성 유전자 부위는 네오마이신 저항성 유전자인 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델.

청구항 4

제1항의 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델과 cre 재조합효소를 발현하는 인간을 제외한 동물을 교배시켜 제조한 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 cre 재조합효소를 발현하는 인간을 제외한 동물은 cre 재조합효소를 코딩하는 유전자가 Zona pellucida 3(Zp3) 프로모터와 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델.

청구항 6

하기 단계를 포함하는 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델 제조방법.

(a) 제1항의 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델을 제조하는 단계;

(b) 상기 (a)단계의 키메라 동물 모델을 교배시켜 인간을 제외한 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계의 인간을 제외한 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델을 교배하여 얻어진 자손들 중에서 인간을 제외한 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델을 선별하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델은 $RARRES1$ 이 결손되어 종양이 유발된 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 종양은 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 10

제6항의 제조방법에 의하여 제조된 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 동물 모델은 유사분열 결함 유발용 또는 유사 분열 스트레스 저항용인 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 동물 모델은 체세포 돌연변이를 유도하는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 동물 모델은 유사분열 세포주기에서 $Ccnd1$, $Cdkn1a$, $Cdkn2A$, $Nanog$, $Psrc1$, 및 $Nup214$ 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자가 과발현되는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 종양은 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 유발된 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 종양형성 *RARRES1*^{-/-} 동물 모델.

청구항 15

하기의 단계를 포함하는, 종양 치료물질의 스크리닝 방법:

(a) 인간을 제외한 종양형성 *RARRES1*^{-/-} 동물 모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 피검체의 사이클린-의존성 키나아제 1(Cyclin-dependent kinase 1; CDK1)과 사이클린 B1(Cyclin B1)의 인산화 정도를 측정하는 단계,

CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계,

Mist1 및 LGR5의 발현 또는 활성을 측정하는 단계, 또는

SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 후보물질 비처리군에 비해,

CDK1과 Cyclin B1의 인산화 정도가 감소되는 후보물질,

CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성이 감소되는 후보물질,

Mist1(Muscle, intestine and stomach expression 1) 및 LGR5(Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)의 발현 또는 활성이 감소되는 후보물질, 또는

SPC양성 세포의 활성이 감소되는 후보물질을 종양 치료물질로 선정하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 피검체는 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리된 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 종양은 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

상기 Mist1, LGR5, 또는 SPC은 줄기세포 마커인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RARRES1 유전자 녹아웃 동물 모델에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 RARRES1 유전자 일부와 조건적 녹아웃(conditional knockout) 동물모델의 제작에 사용되는 서열들을 포함하는 표적 벡터(targeting vector), 상기 표적 벡터를 이용하여 생성된 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포, 이를 이용하여 얻은 종양형성 *RARRES1*^{-/-} 동물 모델, 그 제조방법 및 이를 이용한 암 치료물질의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ‘종양(tumor)’ 이라고 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하며, 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 양성종양이 비교적 성장 속도가 느리고 전이(metastasis)되지 않는 것에 반해 악성종양은 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 된다. 따라서 악성종양을 암과 동일한 의미로 생각할 수 있다. 신체를 구성하는 가장 작은 단위인 세포(cell)는 정상적으로는 세포 자체의 조절 기능에 의해 분열 및 성장하고, 수명이 다하거나 손상되면 스스로 사멸하여 전반적인 수의 균형을 유지한다. 그러나 여러 가지 원인에 의해 이러한 세포 자체의 조절 기능에 문제가 생기면 정상적으로는 사멸해야 할 비정상 세포들이 과다 증식하게 되며, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는데, 이러한 상태를 암(cancer)으로 정의할 수 있다.

[0003] 이러한 암의 진단을 위해, X선검사는 폐암이나 골수종은 단순촬영 및 단층촬영 등으로 음영을 얻는 경우가 많으며 내장암은 조영제를 사용하여 여러 가지 음영을 관찰함으로써 진단의 실마리를 잡게 된다. 특히 위암 및 대장암 등에서는 이중조영법으로 점막의 상태를 점검하여 조기위암이나 대장암 등의 미세한 병변까지도 구별해 냄으로써 조기발견에 많은 도움을 주고 있다. 내시경검사로 경식 내시경은 오래 전부터 내장검사에 사용되어 왔으나 육안으로 볼 수 있는 범위가 한정되어 진단에 큰 도움을 못 주었다. 그리하여 현재는 S결장경만이 이용되고 있다. 마음대로 구부러질 수 있는 연식내시경(flexible fiberoscope)의 발달은 각종 내장암에 대한 진단, 특히 조기진단에 큰 몫을 담당하게 되었다. 내시경을 통한 생검도 가능하여 확진에도 좋은 단서를 제공하며 일반적인 병원검사 외에도 집단검진에 사용할 수 있어서 위암 등에서는 더욱 유용하게 사용된다. 현재 임상에서 널리 사용되는 것으로 위내시경(flexible gastrofiberscope), 대장내시경(flexible colonofiberscope), 직장 및 S결장 내시경(sigmoidoscope) 등이 있고, 이 밖에도 복강경(peritoneoscope), 종격동 내시경(mediastino scope), 기관지경(bronchoscope) 등이 사용되고 있다. 세포진단으로 G.N.파파니콜로가 자궁 분비물의 도말표본에서 악성종양 세포의 특징을 찾아낸 이래로 자궁경부암의 집단검진과 진단 및 특히 조기진단에 획기적인 진보를 가져왔다. 현재 자궁암 이외에도 위 · 폐 · 전립선 · 유방 · 요로 · 췌장 등의 분비물에 이용되고 있으며 갑상선 · 유방 등의 천자에 의한 세포진단도 널리 이용되고 있다. 암의 확진은 생검(biopsy)을 통해 얻은 조직편의 병리조직학적인 현미경검사로 이루어진다. 이런 조직편은 내시경을 통한 방법, 유방 · 질 등 수술조작을 하며 얻는 방법이 있다. 이러한 진단을 통해 암을 진단할 수 있으나, 보통 암이 처음 진단되었을 때 이미 주변 조직으로 전이된 상태이거나 원격전이 발생한 경우가 많으며, 암 환자의 생존율은 늦게 발견될수록 그 예후가 좋지 않으므로, 조기진단이 매우 중요하다. 따라서, 암의 발병 및 진행에 대한 이해가 매우 중요하나, 발병을 유도하는 분자적 기작에 대한 연구 및 효과적인 진단은 미흡한 실정이다.

[0004] 한편, 레티노산 수용체 반응인자 1(retinoic acid receptor responder 1; RARRES1) 유전자는 처음에 합성 레티노이드인 타자로텐에 의한 피부 다수 양식(raft culture)에서 가장 상향 조절된 유전자로 확인되었다. 이 유전자는 소수의 포유류에서만 발견되며, 종 중에서 진화적으로 보존된 유전자이다. 인간에서는 염색체 3의 q arm 25.32 유전자좌에 국한되어 있다. 다른 방법으로 두 개의 별개의 아형(isoform)을 암호화하는 접합된 전사 유전적 변이(spliced transcript variants)(택일적으로 접합된 transcript 변이체)가 존재한다. 아형 1(RARRES1-1)은 6개의 엑손으로 이루어져 있고, 294개의 단백질을 암호화하고, 아형 2(RARRES1-2)는 5개의 엑손으로 이루어져 있고, 228개의 단백질을 암호화한다. C-말단과 3'-비 번역 영역(UTR)은 이 2 개의 아형 사이에서 상이한 형태였다. 전립선, 유방, 폐, 간, 결장암, 위암, 식도, 비 인두, 자궁 내막 및 두경부암을 비롯한 다양한 종양 조직 및 세포주에서 RARRES1의 발현은 대부분 프로모터 영역의 과메틸화로 인해 흔히 사라지게 되거나, 침묵된다.

[0005] 이에, 암에 대한 효과적인 진단 및 치료에 대한 필요성이 요구되고 있으며, 이러한 암의 메커니즘 및 치료법 연

구에 필요한 생체 시료 개발을 위하여 적합한 동물모델의 확립은 필수적이다. 그러나, 아직까지 RARRES1이 암의 진단, 암세포의 발병, 및 진행에 미치는 영향이나 이와 관련한 동물 모델에 대한 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국등록공보 KR10-1348852

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 약물 저항성 유전자 부위; RARRES1 게놈 유전자의 3번째 엑손을 포함하는 유전자 절편; 및 제 2 loxP 부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 종양형성 동물 모델 제작용 레티노산 수용체 반응인자 1(Retinoic acid receptor responder 1; RARRES1) 표적 벡터(targeting vector)가 형질도입된 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포를 낭배(blastocyst)에 주입하여 제조한 종양형성 *RARRES1*^{+/^N 키메라 동물 모델을 제공한다.}

[0008] 또한, 본 발명은 상기 *Rarres1*^{+/^N 키메라 동물 모델과 cre 재조합효소를 발현하는 동물을 교배시켜 제조한 종양형성 *Rarres1*^{+/⁻ 동물 모델을 제공한다.}}

[0009] 또한, 본 발명은 (a) 상기 *RARRES1*^{+/^N 키메라 동물 모델을 제조하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 키메라 동물 모델을 교배시켜 *RARRES1*^{+/⁻ 동물 모델을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 *RARRES1*^{+/⁻ 동물 모델을 교배하여 얻어진 자손들 중에서 *RARRES1*^{-/⁻ 동물 모델을 선별하는 단계 를 포함하는 종양형성 *Rarres1*^{-/⁻ 동물 모델 제조방법을 제공한다.}}}}}

[0010] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 종양형성 *Rarres1*^{-/⁻ 동물 모델을 제공한다.}

[0011] 또한, 본 발명은 (a) 종양형성 *RARRES1*^{-/⁻ 동물 모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 사이클린-의존성 키나아제 1(Cyclin-dependent kinase 1; CDK1)과 사이클린 B1(Cyclin B1)의 인산화 정도를 측정하는 단계, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계, Mist1 및 LGR5의 발현 또는 활성을 측정하는 단계, 또는 SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, CDK1과 Cyclin B1의 인산화 정도가 감소되는 후보물질, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성이 감소되는 후보물질, Mist1(Muscle, intestine and stomach expression 1) 및 LGR5(Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)의 발현 또는 활성이 감소되는 후보물질, 또는, SPC 양성 세포의 활성이 감소되는 후보물질을 종양 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 종양 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.}

[0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 약물 저항성 유전자 부위; RARRES1 게놈 유전자의 3번째 엑손을 포함하는 유전자 절편; 및 제 2 loxP 부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 종양형성 동물 모델 제작용 레티노산 수용체 반응인자 1(Retinoic acid receptor responder 1; RARRES1) 표적 벡터(targeting vector)가 형질도입된 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포를 낭배(blastocyst)에 주입하여 제조한 종양형성 *RARRES1*^{+/^N 키메라 동물 모델을 제공한다.}

[0014] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위 앞에, 스플라이싱 수용체(splicing

acceptor; SA), β -갈락토시다제 (β -galactosidase; β gal), 및 SV40 polyA signal(pA)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 약물 저항성 유전자 부위는 네오마이신 저항성 유전자일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 *Rarres1*^{+N} 키메라 동물 모델과 cre 재조합효소를 발현하는 동물을 교배시켜 제조한 종양 형성 *Rarres1*^{+/-} 동물 모델을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 cre 재조합효소를 발현하는 동물은 cre 재조합효소를 코딩하는 유전자가 *Zonapellucida 3(Zp3)* 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 (a) 상기 *RARRES1*^{+N} 키메라 동물 모델을 제조하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 키메라 동물 모델을 교배시켜 *RARRES1*^{+/-} 동물 모델을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 *RARRES1*^{+/-} 동물 모델을 교배하여 얻어진 자손들 중에서 *RARRES1*^{-/-} 동물 모델을 선별하는 단계를 포함하는 종양형성 *Rarres1*^{-/-} 동물 모델 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 동물은 마우스일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 *Rarres1*^{-/-} 동물 모델은 *RARRES1*이 결손되어 종양이 유발될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 종양 형성 *Rarres1*^{-/-} 동물 모델을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 동물 모델은 유사분열 결함을 유발하거나, 유사 분열 스트레스에 저항할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 동물 모델은 체세포 돌연변이를 유도할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현 예로, 상기 동물 모델은 유사분열 세포주기에서 *Ccnd1*, *Cdkn1a*, *Cdkn2A*, *Nanog*, *Psrc1*, 및 *Nup214*로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자가 과발현될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 (a) 종양 형성 *RARRES1*^{-/-} 동물 모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 사이클린-의존성 키나아제 1(Cyclin-dependent kinase 1; CDK1)과 사이클린 B1(Cyclin B1)의 인산화 정도를 측정하는 단계, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계, *Mist1* 및 *LGR5*의 발현 또는 활성을 측정하는 단계, 또는 SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, CDK1과 Cyclin B1의 인산화 정도가 감소되는 후보물질, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성이 감소되는 후보물질, *Mist1*(Muscle, intestine and stomach expression 1) 및 *LGR5*(Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)의 발현 또는 활성이 감소되는 후보물질, 또는, SPC 양성 세포의 활성이 감소되는 후보물질을 종양 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 종양 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예로, 상기 피검체는 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 종양은 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 상기 *Mist1*, *LGR5* 또는 SPC은 줄기세포 마커일 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명자들은 암의 진단 및 예후 예측을 위한 분자적 기작을 밝혀내기 위해 예의 연구한 결과, *RAREES1*^{-/-} 동물 모델에서 자발적인 종양에 걸리기 쉽고, CDK1 및 Cyclin B1의 인산화 증가 및 CDK1-Cyclin B1 복합체의 활성이 높다는 것을 확인하여 이는 단백질 분해능 감소에 의하여 종양세포주기 진행이 특이하게 빠르다는 것을 확인하였으며, 특히 줄기세포성 세포 증식이 증가하였고, 더불어 유사분열의 결함을 유발 및 유사분열 시 염색체가 불안정함을 확인하였는 바, *RAREES1*이 암 진단 및 예후 예측, 치료에 중요한 인자임을 확인하였다. 나아가, *RARRES1*과 CDK1-Cyclin B1 복합체의 관계, CDK1-Cyclin B 단백질의 양적 조절, 줄기세포성 세포 증식능의 증가를 통하여 암의 치료물질의 스크리닝 및 의약품 개발 용도로도 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1a는 표적 RARRES1 대립 유전자를 생성하기 위한 전략을 나타낸 도이다.

도 1b는 Rarres1 녹아웃 배아로부터 RNA를 추출하여 Rarres1 유전자 결핍을 확인한 도이다.

도 1c는 Rarres1 녹아웃 배아로 DNA를 추출하여 Rarres1 엑손 3 결손을 확인한 도이다.

도 1d는 마우스의 꼬리 게놈 DNA의 실시예 1-6의 방법에 따른 PCR 유전형 분석하여, 야생형 및 Rarres1-결핍 마우스의 유전형을 확인한 도이다.

도 1e는 $RARRES1^{+/+}$, $RARRES1^{+/-}$, 및 $RARRES1^{-/-}$ 마우스 배아 섬유 아세포(Mouse embryo fibroblasts; MEFs)의 RNA로부터 제조된 cDNA, 엑손 1(sense) 엑손 6(antisense), 및 특이적 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)를 이용한 실시예 1-1의 방법에 따른 RT-PCR 통해 상이한 유전자형에서의 RARRES1 유전자 발현을 확인한 도이다.

도 1f는 배아된지 13.5일(E13.5)에 전체 배아에서 웨스턴 블롯(Western blot)을 통하여 RARRES1 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1g는 배아된지 11.5일에서 14.5일(E11.5 ~ E14.5) 때 이형접합배아에서 실시예 1-8에 따른 LacZ 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 동일한 연령(18개월령)의 야생형, $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 골수, 비장, 말초혈액에서 분리한 백혈구의 표현형을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3a는 연령이 동일한 야생형, $RARRES1^{+/-}$, 및 $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 Kaplan-Meier cancer-free 생존 곡선을 나타낸 도이다.

도 3b는 RARRES1 이종접합 및 동형 접합 마우스에서 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)염색을 통해 자발적인 종양의 육안적 형태 및 조직학적 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3c는 $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 위, 간, 폐, 갑상선에서 자연적으로 발생한 종양의 조직학적 형태를 나타낸 도이다.

도 3d는 $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 다양한 장기에서 다발성으로 발생한 림프종을 특이적인 마커(CD3)에 대해 면역조직화학적으로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 3e는 야생형 마우스와 $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 골수와 비장에서 myeloid 계열 세포의 비중을 확인하기 위해 특이적인 마커(myeloperoxidase; MPO)에 대해 면역조직화학적으로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 19에서 21.5 개월된 $RARRES1^{+/+}$, $RARRES1^{+/-}$, 및 $RARRES1^{-/-}$ 마우스의 의 비장, 간, 신장의 모양과 상대적인 무게를 확인한 도이다.

도 5는 야생형(Wild type; WT) 및 녹아웃(Knockout; KO) 마우스에서 [18 F] FDG 에 의한 실시예 1-9에 따른 PET / CT 이미징을 통해 포도당 섭취량을 모니터링한 도이다.

도 6은 야생형 또는 RARRES1 결핍 MEF에서 유래된 세포 용해물을 표시된 항체로 실시예 1-3에 따른 면역 블로팅한 결과를 나타낸 도이다.

도 7a는 각 유전자형 당 2×10^4 개의 MEF 세포를 파종하고 표시된 시기에 계수하여 얻어낸 각 유전자형의 성장곡선을 나타낸 도이다.

도 7b는 WT 및 KO MEF의 실시예 1-5에 따른 유동 세포 계측 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7c는 표시된 항체와 상기 도 7b에 기술된 바와 같이 처리된 WT 및 KO MEF 세포에 대하여 웨스턴 블랏 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7d는 $RARRES1^{+/+}$ 및 $RARRES1^{-/-}$ MEF의 실시예 1-5에 따른 유동 세포 계측 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7e는 상기 도 7d에 기술된 바와 같이 처리된 *RARRES1*^{+/+} 및 *RARRES1*^{-/-} MEF 세포에서 CDK1 및 Cyclin B1 단백질의 발현 및 인산화를 확인한 도이다.

도 8a는 *RARRES1*^{-/-} MEF에서 유사 분열시 오류가 발생한 것을 확인한 도이다.

도 8b는 체외 배양(*in vitro*)으로 배아된 지 13.5일째(E 13.5) 되는 날에 야생형(WT) 또는 실시예 1-7에 따른 *RARRES1*^{-/-} 배아 섬유 아세포를 α-튜불린(적색), phalloidin(녹색), DAPI(청색)에 대한 항체로 염색한 결과를 확인한 도이다.

도 8c는 실시예 1-7에 따른 WT과 KO 섬유아세포에서의 세포분열기에서 나타나는 오류들에 대한 대표적인 사진들과 이를 정량화 한 것을 나타내는 도이다.

도 8d는 상기 도 8a에서 H2AX(적색)에 대한 항체 및 DAPI(청색)로 대비염색한 WT 및 KO MEFs에서 전체 micronuclei 세포 중에서 H2AX 염색을 보이는 micronuclei 세포를 따로 정량화 한 것을 나타내는 도이다.

도 9a는 50 및 100ng/ml 노코다졸 또는 DMSO로 48시간 처리한 WT 및 KO MEF의 실시예 1-5에 따른 유동 세포 계측 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9b는 상기 도 9a에서 처리된 PI 염색 세포를 통하여 sub-G1 DNA함량을 정량화 한 것을 나타낸 도이다.

도 9c는 상기 도 9a에서 처리된 WT 및 KO MEF에서 총 세포 수의 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 9d는 노코다졸(50 및 100 ng / ml)으로 40시간 처리된 MEF에서 PARP 및 Caspase3 단백질에 대하여 웨스턴 블랏으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 10a는 phospho-Cyclin B1-Ser126, 및 phospho-CDK1-T161로 염색한 WT 또는 *RARRES1* KO 마우스로부터 절단된 정상 또는 암에 걸린 마우스의 간 및 폐 절편을 통하여 조직병리학적 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 10b는 동일한 연령(18개월령)의 야생형 마우스와 *RARRES1*^{+/+}, *RARRES1*^{-/-} 마우스 폐의 연속 절편된 단면에서 세포증식을 나타내는 마커(ki67), CDK1, 인산화된 Rb protein에 대해 면역조직화학적으로 염색한 결과이다.

도 11a는 동일한 연령(18개월령)의 야생형 마우스와 *RARRES1*^{-/-} 마우스의 폐에서 제2형 폐포세포(SP-C에 양성)의 세포증식활성(Ki67에 양성)을 비교한 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 도이다.

도 11b는 야생형 마우스와 위(stomach) 특이적으로 *RARRES1*를 결핍시킨 마우스의 위에서 장기 특이적 줄기세포의 마커로 알려진 Mist1과 LGR5에 대해 면역조직화학적으로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 11c는 동일한 연령(18개월령)의 야생형 마우스와 *RARRES1*^{+/+}, *RARRES1*^{-/-} 마우스의 위에서 Mist1과 CDK1에 대해 면역조직화학적으로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 11d는 야생형 마우스와 *RARRES1*^{-/-} 마우스의 배아에서 분리한 상피세포에 CDK1 활성 저해제인 R03306을 처리했을 때, 줄기세포의 특성이 어떻게 달라지는지를 확인한 spheroid formation assay결과를 나타낸 도이다.

도 11e는 도 11d spheroid formation assay결과를 수치화해 나타낸 도이다.

도 11f는 야생형 마우스와 *RARRES1*^{-/-} 마우스의 위에서 분리한 세포의 줄기세포 특성을 확인하기 위한 organoid 형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11g는 야생형 마우스와 *RARRES1*^{-/-} 마우스의 체외 배양으로 배아된지 19일(E19)과 생후 10개월, 18개월의 폐를 RNQ sequencing을 위해 준비한 것을 나타낸 도이다.

도 12는 각 종양 샘플에 대한 복제 수 변이체(CNV) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13a는 WNT 신호 및 유사분열 경로에 관여하는 차별적으로 발현된 유전자와 상향조절된 유전자를 나타낸 도이다.

도 13b는 펼쳐진 단백질 반응(unfolded protein response; UPR)에서 WT를 KO와 비교하였을 때, KO 종양에서 활성화된 반대 활성을 나타내는 것을 확인하였는 바, 경로로부터 추정된 경로 활동을 나타낸 도이다.

도 13c는 UPR 중 Hspa8의 mRNA 발현 상태 및 IgG 실험으로 인한 높은 결합 친화력을 나타낸 도이다.

도 13d는 차별적으로 발현된 유전자를 이용하여 유전자 집합 농축 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 14a는 사람에서 발현되는 폐선암에 대한 게놈의 특징을 알아보기 위한 도로서, CDK1 mRNA, 단백질 발현 및 상관 상태를 나타낸 도이다.

도 14b는 각 아형에 대한 RARRES1 mRNA 발현을 나타낸 도이다.

도 14c는 세포주기 경로에서 하향 조절을 보여준 낮은 RARRES1 그룹 C1을 나타낸 도이다.

도 14d는 마우스 데이터 세트 및 인간 폐선암을 이용한 폐세포 존재량 추정을 나타낸 도이다.

도 14e는 인간 폐암(TCGA LUAD)의 아류형 6가지에 대한 유전자 발현 특징을 분석한 도이다.

도 15는 Rarres1 유전자가 결핍된 쥐에서의 암을 유발되는 메커니즘을 대략적으로 나타낸 도이다. RARRES1이 없으면 세포분열기 조절단백질인 Cdk1의 비정상적인 활성화로 인하여 전반적인 세포주기의 이상이 야기됨으로써 암이 발생할 수 있음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명자들은 암의 진단 및 예후 예측을 위한 분자적 기작을 밝혀내기 위해 예의 연구한 결과, RAREES1^{-/-} 동물 모델에서 자발적인 종양에 걸리기 쉽고, CDK1 및 Cyclin B1의 인산화 증가를 확인하고, CDK1-Cyclin B1 복합체의 활성이 높다는 것을 확인하여 종양세포주기 진행이 특이하게 빠르다는 것을 확인하였으며, 유사분열의 결함을 유발 및 유사분열 시 염색체가 불안정함을 확인하였는 바, RAREES1이 암 진단 및 예후 예측, 치료에 중요한 인자임을 확인하고 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0033] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는, RARRES1의 생체 내 생리기능을 결정하기 위해, 조건부 RARRES1 녹아웃(Knockout; KO) 마우스를 유도하였다(실시예 2 참조).

[0036] 본 발명의 다른 실시예에서는, RARRES1 녹아웃(Knockout; KO) 마우스에서 자발적으로 종양이 형성되는지 확인하기 위해, 이종교배한 RARRES1 이형 접합 마우스(C57BL/6)에, RARRES1^{+/+} (n=30), RARRES1^{+/-} (n=57), 및 RARRES1^{-/-} (n=63) 마우스의 집단을 형성하고 22 개월까지 관찰한 결과, RARRES1^{+/-} 와 RARRES1^{-/-} 마우스가 RARRES1^{+/+} 마우스보다 자발적으로 종양에 더 많이 걸리기 쉽다는 것을 발견하였고, RARRES1^{+/-} 와 RARRES1^{-/-} 마우스는 비장, 흉선, 간, 폐, 신장, 갑상선, 소장, 위, 자궁 내막 및 눈을 포함하여 RARRES1^{+/+} 마우스와는 다른 종류의 종양이 발생을 확인할 수 있었으며(도 3), 비장, 간, 신장을 포함한 기관의 크기는 19개월된 마우스에서 유전자형에 따라 점차적으로 증가함을 확인할 수 있었다(도 4). 또한, 실시예 1-9에 따른 PET/CT 이미징을 통해 종양이 야생형(Wild Type;WT) 마우스보다 RARRES1 KO 마우스에서 훨씬 초기에 발생된 것을 확인할 수 있었는 바(도 5), RAREES1 유전자의 결실만으로 종양 형성될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다(실시예 4 참조).

[0037] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, RARRES1 KO 마우스에서 CDK1-cyclin B1 복합체 형성 및 이의 활성화가 종양 형성을 촉진시킨다는 것을 확인하기 위하여, 체외 배양(*in vitro*)을 위해 배아가 된지 13.5일에 배아에서 야생형 및 실시예 1-7에 따른 RARRES1-결핍 MEF를 준비하고 웨스턴 블랏(western blot)으로 확인한 결과, CDK1의 트레오닌 14 및 161 잔기에서의 인산화는 KO MEFs에서 강화되었지만 다른 MEF 세포에서는 CDK1 발현이 변하지 않았으며, Rb 단백질은 KO MEFs에서 증가되고 CDK1의 다른 기질인 Separase는 KO 세포에서 절단되었는데, 이는 CDK1-Cyclin B1 활성이 RARRES1의 결실에서 나타남을 확인할 수 있었다(도 6). 또한, CDK1-Cyclin B1 활성의 증가로 인해 MEF세포의 세포 성장에 영향을 줄 수 있는지를 알아보기 위해, MEF 세포를 6-웰 플레이트에 시딩하고, 5일 동안 세포 수를 매일 카운트한 결과, RARRES1^{-/-} MEFs는 빠르게 성장함을 확인할 수 있었고(도 7a), RARRES1^{-/-} MEFs에서 관찰되었던 향상된 종양세포 증식이 변경된 세포주기의 진행에 의한 것인지를 평가하기 위해, 실시예 1-2에 따른 세포 동기화 실험을 한 결과 세포주기의 G1에서 G2 / M 단계까지 RARRES1^{-/-} 세포가 더 빨리 진행한다는 것을 확인할 수 있었으며(도 7b), WT 세포에서 Cyclin E의 발현은 혈청 자극 후 30시간에 최대치를 나타내었고 빠르게 감소했지만, KO 세포에서 Cyclin E는 30 시간에 최고점에 달했고 약간 감소했다는 것을 확인할 수 있었다(도 7c). 그리고, FACS 및 웨스턴 블랏 분석과 함께 노코다졸(nocodazole)-방출 방법을

통해, WT 세포에 비해 RARRES1 결핍 세포에서 유사 분열의 종결이 빠르다는 것을 확인할 수 있었으며(도 7d), KO 세포에서 CDK1의 기질인 Rb의 인산화는 방출 후 6시간에서 18시간까지 증가하였는 바(도 7e), 이를 종합해봤을 때 RARRES1 KO MEFs에서 CDK1-Cyclin B1의 활성이 높은 것을 확인하였는 바, WT MEF과 비교했을 때 종양세포주기 진행의 시기가 부적절하고 빠르다는 것을 확인할 수 있었다(실시예 5 참조).

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, RARRES1 결핍 세포에서 유사 분열 결함이 일어나는지 여부를 확인 하기 위해, 몇 가지 유형의 유사 분열 오류를 관찰한 결과,

[0039] RARRES1 KO MEFs의 유사 분열 동안 KO 세포에서 염색체 정렬이 불일치되고 염색체의 비분리가 일어남을 확인할 수 있었고(도 8a 및 8b), RARRES1의 녹다운이 염색체 안정성에 영향을 줄지 여부를 확인하기 위해, 콜세미드(colcemide)로 실시예 1-7에 따라 배양된 *RARRES1*^{+/+} 및 *RARRES1*^{-/-} MEFs의 실시예 1-11에 따른 중기 확산(metaphase spreads)를 분석한 결과, 중기에서의 *RARRES1*^{-/-} MEFs의 20 % 이상은 상당한 이수성 또는 배수성을 보였으며, RARRES1 결핍 세포의 소핵 및 일차 핵 모두에서 히스톤 변이체 H2AX(H2AX 초점 형성)의 손상-의존성 인산화로 측정했을 때 상당한 DNA 손상을 확인할 수 있었는 바, 염색체 비분리가 증가하는 이유가 RARRES1 결핍 세포에서 DNA 손상 초점(DNA damage foci) 및 이수 배수체의 발생과 관계된다는 것임을 확인할 수 있었다(실시예 6 참조).

[0040] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, RARRES1 KO MEFs에서 노코다졸과 같은 유사 분열 스트레스를 유도하는 의약이 RARRES1 KO MEFs에 어떠한 영향을 미치는 지를 확인하기 위해, MEF 세포를 노코다졸 또는 DMSO로 처리하고 실시예 1-5에 따른 유동 세포 계측법 및 세포 계수를 수행한 결과, 노코다졸에 의해 유도된 세포 사멸이 RARRES1 결핍 MEFs에서 용량 의존적으로 상당히 감소했으며(도 9a 및 b), 노코다졸 처리에 의해 WT MEF보다 세포 수가 감소하지 않았으며(도 9c), 이러한 결과와 일치하여, PARP 및 Caspase3의 절단이 WT 세포와 비교했을 때, KO 세포에서 감소됨을 확인하였는 바(도 9d), RARRES1의 손실을 통해 nocodazole 처리의 저항성을 유발한다는 것을 확인할 수 있었다(실시예 7 참조).

[0041] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, RARRES1 KO 마우스에서 발생한 간암과 폐암에서 phospho-Cyclin B1-Ser126과 phospho-CDK1-T161에 대한 실시예 1-12에 따른 면역 조직 화학을 시행한 결과, RARRES1 결핍 마우스의 종양 절편은 phospho-Cyclin B1-S126과 phospho-CDK1-T161로 강하게 염색되었지만, 암이 아닌 암세포 주변에서는 이 두 항체에 음성 염색을 보였는 바(도 10a), RARRES1 결핍 마우스에서 Cdk1-Cyclin B1의 활성이 종양 발생과 관련이 있음을 확인할 수 있었다(실시예 8 참조).

[0042] 따라서, 본 발명은 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 약물 저항성 유전자 부위; RARRES1 게놈 유전자의 3 번째 엑손을 포함하는 유전자 절편; 및 제 2 loxP 부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 종양형성 동물 모델 제작용 레티노산 수용체 반응인자 1(Retinoic acid receptor responder 1; RARRES1) 표적 벡터(targeting vector)가 형질도입된 종양형성 동물 모델 제작용 동물 세포를 낭배(blastocyst)에 주입하여 제조한 종양형성 *RARRES1*^{+/-} 키메라 동물 모델을 제공한다.

[0043] 상기 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위 앞에, 스플라이싱 수용체(splicing acceptor; SA), β-갈락토시다제(β-galactosidase; βgal), 및 SV40 polyA signal(pA)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않고, 상기 약물 저항성 유전자 부위는 네오마이신 저항성 유전자일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 상기 표적 벡터에서 RARRES1 유전자의 전부 또는 일부는 인간을 제외한 포유류, 특히 마우스에서 상기 DNA 순서에 따라 “플록스드(floxed)” 된다. 플록스드된 RARRES1는 형질전환 동물에서 Cre 재조합효소를 발현하게 하는 방식으로 결실, 역위 등에 의해 기능을 제거할 수 있다. 또한 CRE 재조합 효소를 조직 특이적으로 발현하는 형질전환 동물은 조직특이적으로 RARRES1를 제거(knockout; KO) 할 수 있다.

[0045] 상기 Cre 재조합효소와 loxP를 이용한 Cre-loxP 시스템은 유전자 녹아웃(Knockout) 시스템으로 loxP 부위를 목적하는 표적 유전체에 삽입하고, Cre 재조합효소를 발현시켜 표적 유전자에 돌연변이를 유발하는 공지된 방법이다. 표적하는 유전자가 플록스드된 경우, 두 개의 loxP 사이트는 일정 간격을 두고 목적하는 유전자의 내부, 예를 들면 인트론 부위 또는 그 주위에 삽입되고, Cre 효소의 존재시 loxP 사이트간에 재조합이 일어나, 그 사이의 유전자가 결실 또는 역위된다. 본원에서 제 1 및 제 2 loxP 부위는 RARRES1 유전자의 전부 또는 일부를 플랭크(flank) 할 수 있고, 그 결과 Cre의 존재시 RARRES1 활성의 전부 또는 일부가 결실된다. Cre가 존재하지 않는 경우, 플록스드된 RARRES1는 영향을 받지 않는다.

- [0046] 상기 SV40에서 유래한 스플라이싱 도너/스플라이싱 수용체(SA)가 포함된 인트론과 폴리아데닐화 시그널(pA), 그리고 진핵세포 번역개시 시그널을 갖는 전장 대장균 β-갈락토시다제(βgal) 유전자를 함유하는 pCMVβ는 인간 거대세포바이러스 전초기유전자 프로모터의 포유류 세포에서 β-갈락토시다제를 발현하도록 고안된 포유류의 리포터 벡터이다. pCMVβ는 높은 수준의 β-갈락토시다제를 발현하며 다른 리포터 유전자 구조를 형성할 때 레퍼런스 플라스미드로 사용될 수 있으며, β-갈락토시다제 활성을 분석하기 위해 표준 분석법 또는 염색을 사용하여 형질 감염 프로토콜을 최적화하는데 사용될 수 있다. 대안으로, β-갈락토시다제 유전자는 포유류 세포에서의 발현을 위해 pCMVβ 벡터 골격에 다른 유전자를 삽입하거나 다른 발현 벡터에 β-갈락토시다제 단편을 삽입할 수 있도록 각 말단의 Not I 부위를 사용하여 절제할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 상기 네오마이신(neomycin) 저항 유전자는 상기 유전자가 없으면 네오마이신을 처리한 환경에서 세포가 살 수 없기 때문에, 운반체가 삽입되지 않은 세포들을 걸러낼 수 있는 특성이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 상기 동물 세포는 바람직하게는 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)일 수 있으며, 상기 배아줄기세포는 일반적으로 시험관 내에서 배양한 착상 전 초기 배아(preimplantation embryos)로부터 획득될 수 있다. ES 세포는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 배양될 수 있다. 상기 표적 벡터의 배아줄기세포로의 도입은 당업계에 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 전핵주입법(pronuclear microinjection), 레트로바이러스 매개 유전자 트랜스퍼(retrovirus mediated gene transfer), 유전자 표적(gene targeting), 전기충격(electroporation), 정액 매개 유전자 트랜스퍼, 칼슘 포스페이트/DNA 공 침전법 및 미세주입법(microinjection) 등이 있다. 상기 배아줄기세포를 형질감염시킨 후 특정 항생물질을 포함하는 선택 배지에서 배양하여 내성을 나타내는 배아줄기세포 클론을 선별함으로써 동형재조합이 이루어진 세포만을 선별한다. 본 발명에 따른 일 구현예에서는 loxP끼리 재조합되어 그 사이에 있는 3번 엑손이 결실되어 RARRES1가 녹아내린다. Cre 재조합효소의 발현을 위해 형질전환 동물이 제조될 수 있다. 이 경우 Cre 재조합효소는 형질전환 동물의 모든 세포에서 또는 특정 조직의 세포에서만 발현되도록 할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 동물 세포를 낭배에 주입한 후, 이를 대리모에 착상시켜 키메라 동물 모델을 제공할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델과 cre 재조합효소를 발현하는 동물을 교배시켜 제조한 중앙형성 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델을 제공할 수 있고, 상기 상기 cre 재조합효소를 발현하는 동물은 cre 재조합효소를 코딩하는 유전자가 Zona pellucida 3(Zp3) 프로모터와 작동 가능하게 연결될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에 사용되는 용어 "Zona pellucida 3"은 Zona pellucida 정자-결합 단백질 3, zona pellucida glycoprotein 3, 또는 정자 수용체로도 알려져 있으며, 사람에서 ZP3 유전자에 의해 코딩되는 ZP 모듈 함유 단백질이다. ZP3은 수정의 초기에 정자를 결합하는 zona pellucida의 수용체이나 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 또한 본 발명의 다른 양태로서, (a) 상기 $RARRES1^{+/N}$ 키메라 동물 모델을 제조하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 키메라 동물 모델을 교배시켜 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 $RARRES1^{+/-}$ 동물 모델을 교배하여 얻어진 자손들 중에서 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델을 선별하는 단계를 포함하는 중앙형성 $Rarres1^{-/-}$ 동물 모델 제조방법을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 상기 제조방법에 의하여 제조된 중앙형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델을 제공한다.
- [0054] 상기 동물 모델은 RARRES1이 결손되어 중앙이 유발될 수 있고, 유사분열 결합 유발되거나 유사 분열 스트레스에 저항할 수 있으며, 체세포 돌연변이를 유도할 수 있고, 유사분열 세포주기에서 Ccnd1, Cdkn1a, Cdkn2A, Nanog, Psrc1, 또는 Nup214 등의 유전자가 과발현될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 또한, 상기 동물 모델은 인간을 제외한 포유동물을 이용하여 제조될 수 있으며, 상기 인간을 제외한 포유동물은 원숭이, 랫트, 생쥐, 토끼, 개, 영장류 등일 수 있으며, 바람직하게는 쥐과(Muridae) 동물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 중앙형성 $RARRES1^{-/-}$ 동물 모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 사이클린-의존성 키나아제 1(Cyclin-dependent kinase 1; CDK1)과 사이클린 B1(Cyclin B1)의 인산화 정도를 측정하는 단계, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계,

Mist1 및 LGR5의 발현 또는 활성을 측정하는 단계, 또는 SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, CDK1과 Cyclin B1의 인산화 정도가 감소되는 후보물질, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성이 감소되는 후보물질, Mist1(Muscle, intestine and stomach expression 1) 및 LGR5(Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)의 발현 또는 활성이 감소되는 후보물질, 또는, SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성이 감소되는 후보물질을 중앙 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 중앙 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명에서, (a) *In vitro* 상에서 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 사이클린-의존성 키나아제 1(Cyclin-dependent kinase 1; CDK1)과 사이클린 B1(Cyclin B1)의 결합 정도를 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, CDK1과 Cyclin B1의 결합정도가 감소되는 후보물질을 암 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 암 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0058] 상기 (b)단계에서 상기 조직의 레티노산 수용체 반응 1 유전자(Retinoic acid receptor responder 1; RARRES 1)와 CDK1 또는 Cyclin B1의 결합 정도를 측정하는 단계; 및 상기 (c)단계에서 CDK1과 Cyclin B1의 결합정도가 감소되고, 상기 RARRES1와 CDK1 또는 Cyclin B1의 결합 정도가 증가되는 후보물질을 암 치료물질로 선정하는 단계를 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않고, 결국 (c)단계에서 RARRES1가 CDK1 또는 Cyclin B1과 결합하여 CDK1-Cyclin B1 복합체 형성을 억제하는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.

[0059] 또한, 상기 (b) 단계는 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 또는 면역형광염색법(immunofluorescence)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.

[0060] 또한, 상기 피검체는 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리된 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않고, 상기 피검체는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0061] 또한, 상기 CDK1과 Cyclin B1의 결합정도가 감소되는 것은 Cyclin B1 단백질의 126번째 세린의 인산화가 억제되는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않으며, RARRES1와 CDK1의 결합 정도가 증가되는 것은 RARRES1 단백질 중 269~294번 아미노산을 포함하는 C-terminal부위에서 불활성화된 CDK1과 결합되는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.

[0062] 또한, 상기 후보물질은 인산화 정도를 측정하기 위하여 스크리닝에서 사용되는 미지의 물질, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정하기 위하여 사용되는 미지의 물질, Mist1 및 LGR5의 발현 또는 활성을 측정하기 위하여 사용되는 미지의 물질, SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정하기 위하여 사용되는 미지의 물질, 또는 CDK1과 Cyclin B1의 결합정도 또는 RARRES1과 CDK1 또는 Cyclin B1의 결합정도를 측정하기 위하여 스크리닝에서 사용되는 미지의 물질을 의미하며, 바람직하게는 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않으며, 상기 핵산은 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.

[0063] 또한, 상기 피검체의 인산화 정도의 측정, CDK1과 Cyclin B1 단백질의 양 또는 활성을 측정, Mist1 및 LGR5의 발현 또는 활성을 측정, SPC(surfactant protein) 양성 세포의 활성을 측정, 또는 상기 피검체의 CDK1과 Cyclin B1의 결합정도 또는 RARRES1과 CDK1 또는 Cyclin B1의 결합정도의 측정은 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 또는 면역형광염색법(immunofluorescence)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.

[0064] 또한, 상기 중앙은 비장암, 흉선암, 간암, 폐암, 신장암, 갑상선암, 소장암, 위암, 자궁암, 및 골수성 백혈병으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0065] 또한, 상기 Mist1, LGR5, 또는 SPC는 줄기세포 마커로서, 바람직하게는 마우스에서 분리한 줄기세포 마커일 수 있다. 또한, 상기 Mist1, LGR5, 또는 SPC는 마우스의 여러 장기에서 분리할 수 있으며, 바람직하게는 Mist1 또는 LGR5는 마우스의 위에서 분리한 줄기세포 마커이고, SPC는 마우스이 폐에서 분리한 줄기세포 마커이나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0068] [실시예]

[0069] 실시예 1. 실험준비 및 실험방법

[0070] 1-1. RT-PCR

[0071] 제조업체의 지시에 따라 TRIZOL 시약(Invitrogen)을 사용하여 쥐의 배아 섬유아세포에서 총 RNA를 추출하고, 1 μ g의 총 RNA를 Superscript® III 역전사 효소(Invitrogen)로 cDNA로 전환시켰다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: Rarres1-F(GCGCTGCACTTCTCAACTT), Rarres1-R (GCCATAGCTGATGCTCCAT). Gapdh-F (TGACCACCAACTGCTTA), Gapdh-R (GGATGCAGGGATGATGTC), 상기 프라이머들은 653bp와 177BP의 예측된 크기의 PCR 산물을 산출했다.

[0072] 1-2. 세포 동기화(Cell synchronizations)(혈청 기아 및 노코다졸 방출)

[0073] 쥐의 배아 섬유아세포(MEFs)를 G0기에 동기화하기 위하여, 세포를 PBS로 4번 닦아낸 다음 0.1% 소태아혈청(FBS)를 포함하는 배지에 72 시간 동안 배양하였다. 이후에 10% FBS를 포함하는 정상 배지로 바꿔주어서 세포주기를 시작하도록 한 다음 특정시간에 세포를 거두어들였다.

[0074] 세포분열기를 마치는 것을 모니터링 하기 위하여 노코다졸 방출을 시행하였다. 30~40% 정도 자란 MEF에 80 ng/ml 노코다졸을 포함하는 배지에 12시간 동안 배양한 다음, 세포를 PBS로 4번 닦아낸 다음 정상배지로 바꾸어서 세포분열기를 빠져나가도록 한 다음 특정시간에 세포를 거두어들였다.

[0075] 1-3. 면역 블로팅(Immunoblotting)

[0076] 상기 세포를 용해 완충액(20 mM Tris, pH7.4, 5mM EDTA, 10mM Na₄P₂O₇, 100mM NaF, 1% NP-40, 1mM PMSF, 0.2% protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor)에서 용해시켰다. 세포 용해물의 단백질 농도는 Pierce BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, USA)를 사용하여 측정하였다. 이어서, 단백질 용해물을 로딩 완충액에 재현탁시키고, 5분간 끓인 다음 SDS-PAGE를 수행하고 지시된 항체로 면역 블로팅하였다. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce)를 사용하여 화학 발광으로 단백질 발현을 검출했다.

[0077] 1-4. 항체 및 시약

[0078] 다음의 주요 항체는 실시예 1-3에 따른 면역 블로팅, 실시예 1-10에 따른 간접 면역 형광에 사용되었다 : Cdc2/cdk1에 대한 마우스 단일 클론 항체(Santa cruz, sc-54,1/1000), cyclin B1(Cell signaling, #4135, 1/2000), cyclin D1(Santa cruz, sc-246, 1/1000), Rb(Cell signaling, #9309, 1/2000), histone H3-phospho-Ser 10(abcam, ab14955, 1/500), β -actin, and α -tubulin(Sigma-Aldrich, 1/5000), γ H2AX(Millipore, #05-636, 1/500). 토끼 다 클론 항체 Cdk1-phospho-Thr 14(Abgent, AP7517d, 1/500)뿐만 아니라, Cdk1-phospho-Thr 161(Cell signaling, #9114, 1/1000, phosphor-(ser) CDKs substrate(Cell signaling, #2324, 1/1000), cyclin B1(Cell signaling, #4138,1/1000), cyclin B1-phospho-ser 126(abcam, ab55184,1/1000), cyclin B1-phospho-ser 128(Santa Cruz, sc-130591, 1/1000), cyclin B1-phospho-ser 133(Cell signaling, #4133, 1/1000), cyclin B1-phospho-ser 147(Cell signaling, #4131, 1/1000), separase(Abcam, ab3762, 1/1000), cyclin E(Santa cruz, sc-481, 1/1000), Rb-phospho-Ser 807,811(Cell signaling, #9308, 1/1000), PARP(Cell signaling, #9542, 1/1000), caspase3(Cell signaling, #9602, 1/1000), Ki-67(Abcam, ab15580, 1/3000) 그리고 RARRES1에 대한 염소 항체(R&D systems, AF4255, 1/1000). Alexa Flour 488 phalloidin (Invitrogen)은 F-actin을 염색하는데 사용하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다아제-태그된 2차 항체(horseradish peroxidase-tagged secondary antibodies)(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, USA)를 사용하였다. 이 연구에서 사용된 다른 시약은 달리 명시되지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입했다. 모든 시약은 제조자의 권장 프로토콜에 따라 사용되었다.

[0079] 1-5. 유동 세포 계측법(Flow cytometry)

[0080] 세포주기 또는 sub-G1 DNA 함량 분석을 위해 세포를 얼음처럼 차가운 80%에탄올로 고정시키고, 4 °C에서 보관하였다. 50 μ g/ml 요오드화 프로피디움(propidium iodide; PI)와 100 μ g ml RNase A를 함유한 PBS로 37 °C에서 30분간 염색하였다. DNA 함량은 FACS Calibur 세포 계측법으로 분석하였으며, 결과는 Cellquest 소프트웨어 (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Diego, CA) 및 Modfit LT 3.3 소프트웨어로 분석했다. 1 샘플

플 당 최소 10000개의 세포가 분석되었다.

[0081] 1-6. RARRES1 녹아웃 마우스의 생성

[0082] RARRES1 녹아웃 마우스에 대한 ES 세포 클론(F07 및 A05)은 녹아웃 마우스 프로젝트(KOMP)를 통해 획득했다. 쥐의 RARRES1 유전자의 인트론 2에 베타-갈락토시다제(β -galactosidase; β gal)와 네오마이신-저항성(neomycin-resistant; neo) 선별 카세트를 넣었다. ES 세포의 포배(blastocyst)주입을 통해 키메라(chimeras)를 생성시켰고, RARRES1에 대한 이형 접합 마우스를 얻기 위해 배아 줄기 키메라를 C57BL/6균주에 역교배 시켰다. 모든 마우스는 C57BL/6 유전적 배경에서 사용되었으며, 병원체가 없는 장벽 환경에 수용되어 정상적인 식이로 유지되었다. 배아 및 마우스의 유전자형 분석은 프라이머 KO-1F(CTGGGTCTAGCCAGTTTACAGTT), Ex3-R(ACTCAGCTTTGGGTAGCATTAGTC), F4 (CAGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA), KO-2R(CTCAGGTTCTAGACTTCCCTGAAA)를 사용하여 상기 프라이머들은 593bp(야생형 대립 유전자)와 478bp(녹아웃 대립 유전자)의 예측된 크기의 PCR산물을 산출했다.

[0083] 1-7. 마우스 배아 섬유 아세포 및 상피세포(Mouse embryo fibroblasts and epithelial cells)의 배양

[0084] 마우스 배아 섬유 아세포(MEF)s와 마우스 배아 상피 세포(MEEs)는 이전에 설명한대로 13.5일 된 태아에서 과생되었다. 즉, 머리 및 내부 장기를 제거한 후 배아를 인산 완충 식염수(PBS)로 씻고 잘게 자른 후 trypsin/EDTA를 처리하여 단일 세포화 하였다. 배아 섬유아세포(MEFs)는 10% FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM nonessential amino acids, 55uM beta-mercaptoethanol, 100IU/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin을 포함하는 DMEM에 재현탁되었다. 세포 배지 및 시약은 GIBCO(Paisley, England)로부터 얻었다. 배아 상피세포(MEEs)는 1% FBS, 1 mg Insulin, 1 mg Hydrocortisone, 12.5 μ g EGF, 10 mg Ascorbic acid, 10 mg Transferin, 14.1 mg Phosphoethanolamine, Na selenite, 1 μ g Cholera toxin, 6.5 μ g Triiodo thyronine, 35 mg Bovine pituitary extract, Ethanolamine, 50 IU/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin을 포함하는 D-MEM/F-12 배지에 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂의 습한 챔버에서 배양되었다. 배아 분해 후, 도금은 passage 0으로 간주되었다. 모든 실험은 3개의 상이한 배지로부터 passage 5 이내의 세포를 사용하여 수행되었다. Genotyping PCR에 의해 MEF와 MEEs 유전자형이 확인되었다. 유전자형 당 최소 3개의 독립적으로 생성된 세포 라인이 사용되었다.

[0085] 1-8. 마우스 배아의 M. LacZ 염색

[0086] RARRES1의 발현을 시각화하기 위해, 녹아웃 대립 유전자로부터 LacZ의 발현을 분석했다. 11.5(E11.5) ~ 14.5(E14.5)일이 된 배아를 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 얼음 위에서 밤새도록 고정시키고, PBS로 세척하고, 염색 용액(1mg/ml X-gal [5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside], 1mM potassium ferricyanide, 1mM potassium ferrocyanide in washing buffer)에서 밤새 배양했다. 배아를 세정 완충액(2mM MgCl₂, 0.01% deoxycholate, 0.02% NP-40, 0.1M sodium phosphate, pH 7.3)으로 3회(각각 20분) 세척하고, 2% 파라포름알데히드로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 재고정한 다음 70% 에탄올로 탈수시켰다.

[0087] 1-9. PET / CT 이미징

[0088] 모든 쥐는 PET/CT 스캔을 위하여 최소 6시간을 금식(오직 물만 제공)시켰다. 18F-fluorodeoxyglucose(FDG)(370MBq)를 정맥 주사한 후, PET스캐너에서 축 방향 원시 데이터를 얻었다. 획득 시간은 약 20분이었다. 축 영상은 Shepp-Logan 필터(컷오프 주파수, 픽셀 당 0.35 사이클)로 재구성되었고, 관상 및 시상 면에서 재배열되었다. 공간 해상도는 6.1 \pm 6.1 \pm 4.3 mm이었다.

[0089] 1-10. 면역 형광법(Immunofluorescence)

[0090] MEF를 실온(RT)에서 10분동안 PBS/3.7% 파라포름알데히드에서 고정시키고, 0.2% PBS/Triton X-100에서 5분 간 투과시키고, 실온에서 30분 동안 PBS/3% BSA에서 차단시켰다. 샘플을 1차 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 그 다음 0.05% Tween-20/PBS 세척(3회)하고, RT에서 2시간 동안 2차 항체를 배양하고 RT에서 5분 동안 DAPI (0.5ug/ml)후 PBS로 세척했다. 커버슬립(coverlips)은 Prolong Gold antifade reagent(Invitrogen)를 사용하여 유리 슬라이드에 장착하고, confocal microscope(Zeiss 510 Meta, Carl Zeiss)으로 관찰했다. 감마-H2AX 양성 세포의 정량화를 위해, 각 MEF라인 당 적어도 100개의 세포가 분석되었다.

[0091] 1-11. 중기 확산(Metaphase spreading)

[0092] MEF로부터 중기 확산을 준비하고, 이수배수체를 통해 그들을 분석하기 위해, passage 5의 MEFs를 37 $^{\circ}$ C에서 4-5시간 동안 0.1ug/ml Colcemide(GIBCO BRL)로 처리 하였다. 트립신 처리 후, 세포를 800rpm에서 10분간 원심

분리하고, 0.075M KCl 5ml에 재현탁시키고, 37°C에서 20분 동안 배양했다. 그들은 새로 준비된 Carnoy용액(메탄올 : 빙초산 = 3 : 1)에 고정시킨 다음, 적절한 양의 Carnoy용액에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 현미경/유리 슬라이드 상에 떨어뜨려 공기 건조시켰다. 염색체를 DAPI(0.5ug / ml)염색으로 시각화하고, 100X 대물 렌즈를 사용하여 confocal microscope(Zeiss 510 Meta, Carl Zeiss) 하에서 분석하였다.

[0093] **1-12. 면역 조직 화학(Immunohistochemistry; IHC)**

[0094] 마우스를 희생시키고 그들의 기관을 완충 포르말린(10 %)에 넣고 ~ 24 시간 동안 고정시키고 파라핀에 끼웠다. 파라핀 내장 조직 블록은 4µm의 두께로 자르고 섹션은 56°C에서 1시간 건조시켰다. 면역 조직 화학 염색법은 다음과 같이 자동화 염색기구 Discovery XT(Ventana Medical System, Inc.Tucson Medical System, Inc., Tucson Arizona, USA)를 사용하여 수행하였다. 섹션을 탈 파라핀화시키고 EZ prep(Ventana)으로 재수화하여 반응 완충액(Ventana)으로 세척하였다. Phospho-cyclin B1-Ser126, anti-phospho-Cdk1-Thr 161 및 anti-Ki67에 대해 90°C에서 30분 간 pH6.0 구연산 완충액(Ribo CC, Ventana)에서 열처리하여 항원을 회수하였다.

[0095] **1-13. 전체 게놈 시퀀싱 및 RNA-Seq에 대한 차세대 시퀀싱 분석**

[0096] WGS 데이터는 각 샘플의 게놈 DNA에서 생성되었으며, 게놈 DNA는 증폭되어 HiSeq 2500을 사용하여 시퀀싱 처리되었다. Trimmomatic v.0.36을 사용하여 저품질 판독 값을 줄였으며, 줄여진 판독 값은 BWA 0.7.13을 사용하여 mm10 기준으로 정렬되었다. GATK 3.5 및 Picard 2.7.1을 사용하여, 공동 세정 및 사후 정렬 품질 관리를 수행했다. MuTect2를 사용하여 종양 샘플과 정상 샘플의 일치 쌍에 대한 체세포 돌연변이를 확인했다. 일치하는 정상 샘플이 없는 경우, 대조군으로 3개의 일치하지 않는 정상 샘플 각각을 사용하여 변형 호출을 수행하고, 적어도 2번 호출된 변이체를 선택했다. 모든 체세포 돌연변이를 필터링하여, 야생형 배아라고 불리는 germline 변이체를 배제하고, ANNOVAR 2016.2.1을 사용하여 주석을 달았다. GATK 모범 사례에 따라, 모든 정상 샘플을 정상 패널로 사용하였을 때, 체세포 복제 수 변이체(CNV)가 검출되었다. Manta v1.3.2를 사용하여 체세포 구조 변이체(Somatic Structural Variants; SV)를 호출했다. 비교할 수 없는 종양 샘플의 경우, 대조군으로서 3개의 비교할 수 없는 정상 샘플 각각을 SV 호출을 수행하였고, 교차점을 선택하였다. 또한, RNA-Seq 저해상도 판독을 정돈하고, STAR 2.5.2b를 사용하여 mm10 및 RefSeq 유전자 모델 참조에 정렬했다. 유전자 발현 프로파일은 RSEM 1.3.0을 사용하여 정량화되었다. wildtype 그룹에 비해 녹아웃(knockout) 그룹에서 시간에 따라 크게 변하는 유전자를 확인하기 위해 다음 비교를 테스트했다.

[0097] 1. 녹아웃 군의 3 가지 시점 (18 개월된 종양 샘플과 함께), 2. 녹아웃 군의 3 가지 시점 (18 개월된 정상 샘플과 함께), 3. 야생형 군의 3 가지 시점, 4. 18 개월된 종양 및 정상 샘플.

[0098] R 패키지 'EBSeqHMM'은 처음 세 가지 검사에서 차별적으로 발현된 유전자를 확인하는 데 사용되었다. 네 번째 테스트는 R 패키지 'limma'를 사용하여 수행되었다. 첫 번째 테스트에서 유의미한 유전자 중, 네 번째 테스트에서 차별적으로 발현되지 않은 유전자는 걸러 냈지만, 두 번째 및 세 번째 테스트에서는 통계적으로 유의미한 결과를 보였다. DAVID 6.7을 사용하여 선택된 유전자 세트에 대해 유전자 집합 농축 분석(GSEA)을 수행하고, MSigDB HALLMARK 경로 유전자 세트를 참조하여, GSVA(gene set variation analysis)를 사용하여 경로 활성을 평가했다.

[0099] 또한, 단백질-단백질 상호작용(PPI) 네트워크를 통한 차별적인 발현 분석의 결과를 통합했다. 먼저, 실험적으로 검증된 단백질 상호 작용을 마우스 BioGRID 네트워크에 추가하여 PPI 네트워크를 구축했다. 첫번째와 네번째 테스트에서 조정된 p값으로 계산된 총 p값을 기반으로, R 패키지 "BioNet"을 사용하여 PPI 네트워크에서 최적 서브 네트워크를 유도했다. 다시한번, 최적 서브 네트워크의 유전자에 대해 GSEA를 수행했다.

[0100] **1-14. TCGA 폐선암을 이용한 추가 기능 연구 및 폐 단일 세포 프로파일과의 비교**

[0101] TCGA 폐선암으로부터 RARRES1의 체세포 돌연변이, CNVs, 유전자 발현 프로파일 및 관련 경로를 조사했다. TCGA level3 데이터에서 체세포 돌연변이와 CNV를 유도했다. 다음으로 GSVA를 이용하여 각 클러스터에 대한 경로 활동을 추정하였고, 주요 마커의 유전자 발현을 유전자 발현 프로파일로부터 조사하였다. 또한, RARRES1과 결합하는 Cdk1의 단백질 및 mRNA 상태를 RPPA와 유전자 발현의 비교로부터 조사하였다. 정상 및 간질성 폐세포의 풍부한 상태는 단일 세포 마우스 아틀라스(scMouse) 폐 조직 결과로부터 추정되어, 24개의 정상 폐세포 및 그 마커 유전자(Supple 1)를 정의한다. 마커 유전자를 참조하는 MCP-카운터를 이용하여 24개의 폐세포에 마우스 유전자 발현 프로파일을 사용하여 세포 디콘볼루션을 시도했다. TCGA 폐선암종 발현 프로파일에서 동등한 추정을 수행하였고, TCGA 연구에서 정의된 각 아형에 대한 평균 세포 존재도를 요약하였다.

[0102] 1-15. 세포증식 (Cell proliferation)

[0103] 13.5일 된 태아에서 유래한 MEFs를 사용하여 성장을 확인하였다. 세포를 6 well plate에 20000개의 세포/well를 깔 뒤, 다음날부터 5일동안 매일 세포 수를 측정하였다. 세포분열 억제제인 노코다졸(nocodazole)에 대한 세포 생존 반응을 알아보고 위하여, 세포에 50과 100 ng/ml 노코다졸을 48시간동안 처리하여 키웠다. 이후에 세포를 trypsin/EDTA를 처리하여 떼어낸 다음 세포 수를 측정하였다.

[0104] 1-16. 라이브 셀 이미징(Live cell imaging)

[0105] 하루 전날 lab-tekII chamber에 깔아놓은 배아 상피세포에 H2B-separase sensor를 발현시킬 수 있는 Retro virus를 감염시켰다. 3일 후에 비디오 현미경 플랫폼 내부의 37 °C 및 5 % CO2에서 가습 배양기 조건에서 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 5분 간격으로 총 3개의 z-stack을 넣어서 형광 이미지를 촬영했다. 촬영된 이미지의 z-stack을 모두 합친 후, 각 이미지마다 염색체 내의 형광 intensity를 Zen 2 pro blue software를 사용하여 측정하였다.

[0107] 실시예 2. RARRES1 녹아웃 마우스의 생성

[0108] RARRES1의 생체 내 생리기능을 결정하기 위해, 녹아웃 마우스 프로젝트(knock out mouse project; KOMP)에 대한 마우스 배아줄기(ES) 세포 클론(F07 및 A05)으로부터 조건부 RARRES1 녹아웃 마우스를 유도했다. 스플라이싱 수용체(splicing acceptor; SA), β-galactosidase(βgal), 및 SV40 polyA signal(pA)를 포함하는 표적 구조 (이 다음에는 β-actin promoter에 의해 조절되는 플록스된 네오마이신-저항성 카세트(floxed neomycin-resistance cassette; neo)으로 이어진다)를 마우스 RARRES1 유전자의 인트론 2에 삽입했다. 또한, 3번째 loxP가 인트론 3에 삽입되어 위치해 있어, 결과적으로, 엑손 3는 cre 재조합효소(Cre recombinase)에 의해 인식되고 제거되는 두 개의 loxP 서열에 의해, 둘러 쌓이게 된다(도 1a). 올바르게 표적화된 ES 클론을 포배에 주입하여 RARRES1^{+N} 자손을 얻었다. RARRES1^{+/-} 마우스는 RARRES1^{+N} 수컷을 생식세포계열에서 cre 재조합효소를 발현하는 형질전환 암컷과 교배시킴으로써 만들어졌으며, 이는 마우스 zona pellucida 3(Zp3)프로모터에 의해 조절된다. 또한, Rarres1의 녹아웃 서류의 생성 확인을 위하여 RARRES1 RNA-seq의 서열분석으로 확인한 RARRES1의 coverage를 표로 나타내었다(도 1b). 또한 DNA exon3 서열의 deletion으로 RARRES1 전체 mRNA 발현이 정상적으로 이루어지지 못함을 whole genome 염기서열 분석을 통해 확인하였다(도 1c). 이로 인해 해당 염기서열의 RNA-seq coverage가 0이 됨을 확인하였다.

[0109] RARRES1^{+/+}, RARRES1^{+/-}, 및 RARRES1^{-/-} MEFs의 꼬리 게놈 DNA(도 1d) 및 실시예 1-1의 방법에 따른 RT-PCR의 PCR 유전형 분석(도 1e)을 통해 자손을 생산한 RARRES1^{+/-} 마우스를 교차 분석하여 검증했다. 배아된 지 13.5일이 되었을 때, 전체 배아 용해물의 웨스턴 블롯 분석은 RARRES1^{+/+}에 비해 RARRES1^{+/-}에서 단백질 발현 수준이 감소하지 않았지만, RARRES1 단백질의 수준은 RARRES1^{-/-} 배아에서 낮은 것으로 나타났다(도 1f). RARRES1과 βgal의 융합으로 인해, RARRES1^{+/-} 배아에서 RARRES1의 발현은 실시예 1-8에 따른 LacZ 염색을 통해 쉽게 모니터링 할 수 있다. 도 1g에 도시된 바와 같이, RARRES1은 배아된 지 11.5일에서 14.5일까지 전체 배아에 제한적인 발현을 나타내었으며, 주로 앞다리와 뒷다리 주위에 실시예 1-8에 따른 LacZ로 염색되었으며, 배아의 눈에는 약하게 염색되었다.

[0110] 또한, RARRES1 녹아웃이 배아의 치사에 미치는 영향을 알아보기 위해, 13.5일에 이형 접합체와 배아의 유전형을 교차 분석하고, 유아 마우스를 대상으로 조사했다. 표 1에서 볼 수 있듯이, 82마리의 배아와 165마리의 신생아 마우스가 예상 멘델 비율로 존재했다. RARRES1 이형접합체 마우스와 동형접합체 마우스는 모습과 건강 상태가 정상적이었다. 따라서, RARRES1의 이 표적 녹아웃은 배아 발생 기간 동안 생존에 영향을 미치지 않았다.

표 1

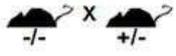
Age of embryo/infant mice	No. of embryos/infants	No. of embryos or infant mice with indicated actual genotype			No. of embryos or infant mice with indicated expected genotype		
		+/+	+/-	-/-	+/+	+/-	-/-
E13.5	82	20	41	22	20	42	20
After birth	165	48	81	36	41	83	41

[0111]

[0112]

다음으로, *RARRES1*^{-/-} 암컷과 *RARRES1*^{+/-} 수컷 또는 *RARRES1*^{-/-} 수컷과 *RARRES1*^{+/-} 암컷을 교배시킴으로써 *RARRES1*-결핍 마우스가 불임을 앓고 있는지 여부를 테스트했다. 성별에 관계없이 KO 마우스가 생식력에 이상이 있다면 새끼는 태어날 수 없다. 신생아 동물은 멘델의 유전법칙에 따라 예측하였던 대로 생존하였고, 겉으로 보기에는 정상적이고 건강하였는 바, *RARRES1*-결핍 마우스는 정상적인 생식력을 가지고 있음을 암시했다(표 2).

표 2

 $-/- \times +/-$	No. of infants	No. of embryos or infant mice with indicated actual genotype		No. of embryos or infant mice with indicated expected genotype	
		+/+	-/-	+/+	-/-
-/- Female					
After birth	77	41	36	39	38
-/- Male					
After birth	82	44	38	41	41

[0113]

[0115]

실시예 3. *RARRES1* 녹아웃 마우스의 비림프성 조혈 종양 확인

[0116]

Rarres1 녹아웃 마우스(KO mice)에서 비림프성 종양(nonlymphoid neoplasia)형성 가능성을 확인하기 위하여 *Rarres1*^{+/-} 및 *Rarres1*^{-/-}의 유전자 형의 서류에서 골수, 비장, 말단 혈액의 세포를 추출하였다. 이를 FACS buffer(1×PBS with 0.1% bovine calf serum and 0.05% sodium azide)에 4℃에서 30분간 아래의 항체들과 반응시켰다- eFluor 450-conjugated anti-mouse hematopoietic lineage antibody cocktail [CD3 (17A2), CD45R (RA3-6B2), CD11b (M1/70), TER-119 (TER-119), Gr-1 (RB6-8C5)] (eBioscience, San Diego, CA, USA), eFluor 450-conjugated anti-Ly-6G (RB6-8C5, eBioscience), eFluor 450-conjugated anti-CD3ε (145-2C11, eBioscience), Alexa Fluor 488-conjugated anti-CD8α (53-6.7, eBioscience), phycoerythrin-cyanine7 (PE-Cy7)-conjugated anti-CD11b (M1/70, eBioscience), allophycocyanin-eFluor 780 (APC-eFluor 780)-conjugated anti-CD11c (N418, eBioscience), APC-eFluor 780-conjugated anti-CD4 (GK1.5, eBioscience), Alexa Fluor 488-conjugated anti-Sca-1 (D7, BioLegend, San Diego, CA, USA), PE-conjugated anti-CD45R (RA3-6B2, BioLegend), PE-conjugated anti-CD25 (PC61, BioLegend), Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD117 (2B8, BioLegend), Alexa Fluor 647-conjugated anti-Ly-6c (HK1.4, BioLegend), PE-Cy7 conjugated anti-CD16/32 (93, BioLegend), PE-Cy7 conjugated anti-CD19 (6D5, BioLegend), Brilliant Violet 650 (BV650)-conjugated anti-CD11b (M1/70, BioLegend), BV650-conjugated anti-I-A/I-E (M5/114.15.2, BioLegend), BV650-conjugated anti-CD44 (IM7, BioLegend).

[0117]

세포내의 염색을 위하여는 실온에서 20분간의 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정 후 1×PBS로 세척하고 0.5 % Triton X-100로 세포 투과성을 확보하고, Alexa Fluor 647-conjugated anti-FOXP3(MF-14, BioLegend) 로 실온에서 1시간 염색과정을 거쳤다. 염색된 세포들은 BD LSRFortessa (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 이의 형광값의 정도를 분석하고 결과는 FlowJo software(TreeStar, Ashland, OR, USA)이용하여 분석하였다. 이를 통해 myeloid세포의 전구 층으로 알려진 c-Kit 양성 염색, Sca-1 음색 염색 세포군이 녹아웃 서류군에서 증가하였고 CMP(common myeloid progenitor), GMP(granulocyte, monocyte progenitor)세포들이 녹아웃 비장에 증

가하였다. 실제 말단 혈액에서 골수(myeloid) 세포 수의 증가를 관찰하였다(도 2).

[0119] **실시예 4. 자발적인 종양에 걸리기 쉬운 RARRES1 녹아웃(Knockout; KO) 마우스**

[0120] RARRES1 KO 마우스에서 자발적으로 종양이 형성되는지 확인하기 위해, 이종교배한 RARRES1 이형 집합 마우스 (C57BL/6)에, *RARRES1*^{+/+} (n=30), *RARRES1*^{+/-} (n=57), 및 *RARRES1*^{-/-} (n=63) 마우스의 집단을 형성하고, 22개월까지 관찰했다. 동물은 실험 과정에서 사망한 직후 부검을 시행하거나, 이산화탄소 질식으로 희생시키고 이 마우스의 종양을 찾기 위해 부검을 시행하였다.

[0121] 부검 후, 각 마우스의 실질 장기는 10% 중성 포르말린에 즉시 고정했으며, 고정한 조직을 파라핀 블록 및 절편으로 만든 뒤 통상적인 헤마톡실린/에오신 염색을 실시하여 병리조직학적으로 검사했다. 각 장기에 대한 병리조직학적 검사에서는, 정상 조직학적 구조와 구분되는 비정상적 신생물을 종양으로 정의했으며, 주변 정상 조직을 압박하는 양상을 띠고 침습, 전이 소견을 보이지 않는 신생물을 양성 종양, 침습 또는 전이 소견을 보이는 신생물을 악성 종양으로 진단했다.

[0122] 그 결과, *RARRES1*^{+/-} 와 *RARRES1*^{-/-} 마우스가 *RARRES1*^{+/+} 마우스보다 자발적으로 종양에 더 많이 걸리기 쉽다는 것을 발견했다. 또한, *RARRES1*^{+/-} 와 *RARRES1*^{-/-} 마우스는 비장, 흉선, 간, 폐, 신장, 갑상선, 소장, 위, 자궁 내막 및 눈을 포함하여 *RARRES1*^{+/+} 마우스와는 달리 다양한 종류의 종양이 발생했음을 확인하였다(표 3). *RARRES1*^{-/-} 마우스에서는 간, 폐, 및 위 종양과 같은 다양한 주요 장기에서의 고행 종양이 발생했고 갑상선에서 발생한 고행 종양의 경우 간으로의 전이 소견을 보였다(표 3 및 도 3a, 3b 및 3c). 또한 *RARRES1*^{+/+} 마우스와 달리 *RARRES1*^{-/-} 마우스에서는 흉선, 신장, 방광 등 다양한 장기로 전파된, 보다 진행된 형태의 T림프구 유래 림프종(T cell lymphoma)이 발생한 것을 T 림프구 마커인 CD3에 대한 면역조직화학적 염색을 통해 확인했다(표 3 및 도 3d). 이 외에도 골수와 비장이 연관된 골수성 백혈병(myeloid leukemia)이 *RARRES1*^{-/-} 마우스에서 더 빈번하게 발생한다는 것을 골수성 세포 마커인 myeloperoxidase에 대한 면역조직화학적 염색을 통해 확인했다(도3e). 한편, 이와 관련해서 비장, 간, 신장을 포함한 기관의 크기는 19개월 된 생쥐에서 유전자형에 따라 점차적으로 증가했다(도 4).

[0123] 또한, *RARRES1*^{+/+} (n=6), *RARRES1*^{+/-} (n=6), and *RARRES1*^{-/-} (n=6) 마우스 집단을 대상으로 실시예 1-9에 따른 PET/CT을 이용해 종양 성장을 모니터 했는데, 생후 6개월부터 15개월까지 동일한 마우스를 두 달에 걸쳐 관찰했다. 실시예 1-9에 따른 [¹⁸F] FDG PET/CT 이미징(imaging)을 이용했을 때, 생후 10개월까지는 KO 마우스와 WT 마우스 사이의 마우스 FDG(fludeoxyglucose) 흡수 정도를 구별할 수 없었으나, 10개월된 마우스와 연령대가 비슷한 야생형 마우스와 비교하였을 때, 주로 척수 주위에 *RARRES1* 결핍 마우스의 FDG 흡수 강도가 증가되었다. 14.5 개월에, WT 마우스와 비교하였을 때는, RARRES1 KO 마우스의 간에서 FDG 흡수의 강도가 점차적으로 향상되었다(2/6 (33 %)). 실시예 1-9에 따른 PET/CT 이미징은 WT 마우스보다 RARRES1 KO 마우스에서 훨씬 초기에 종양이 시작된 것으로 나타났다(도 5).

[0124] 종합적으로, RARRES1 발현의 녹다운과 암 발달 사이의 인과 관계를 확립했으며, RARRES1 결실만으로 종양 형성을 일으키는 데 충분하다는 사실을 확인하였다.

표 3

Epithelial tumor	Wild-Type (n=51)		Hetero (n=47)		RARRES1 KO (n=59)	
	Adenoma	Carcinoma	Adenoma	Carcinoma	Adenoma	Carcinoma
Stomach	0	0	0	1	2	1
Small intestine	1	0	0	0	1	0
Large intestine	0	0	0	0	1	0
Lung	1	0	2	0	2	1
Liver	0	0	0	0	1	2
#Thyroid gland	0	0	0	0	0	1
Subtotal	2	0	2	1	7	5*
	2 (3.92%)		3 (6.38%)		12 (20.3%)**	
Lymphoma						
Focal	4		5		15	
Multifocal	2		2		2	
Systemic	0		0		2†	
Subtotal	6		7		19	
	6 (11.8%)		7 (14.9%)		19 (32.2%)*	
Histiocytic sarcoma						
Focal	5		12		10	
Multifocal	7		7		6	
Subtotal	12		19		16	
	12 (27.5%)		19(40.4%)		16 (27.1%)	
§Other tumor	0		2		2	
Total	19		25		37	
	19 (37.3%)		25 (53.2%)		37 (62.7%)**	

*p value < 0.05 and **p value < 0.01 versus WT mice

§other tumor: leiomyoma in uterus and leiomyosarcoma in small intestine of RARRES1 KO; hemangiosarcoma in skin and luteoma in ovary of RARRES1 heterotype.

†systemic lymphoma related to parenchymal organ such as liver, kidney and urinary bladder

#Thyroid gland carcinoma with metastasis to liver

[0125]

[0127] 실시예 5. RARRES1 녹아웃(Knockout; KO) 마우스에서 CDK1-Cyclin B1 활성의 미세 조정 조절(fine tuning regulatin)을 통한 세포주기 진행

[0128] RARRES1이 유사 분열에서 CDK1-cyclin B1 활성을 억제하고, RARRES1 KO 마우스가 종양 형성을 증가시킨다는 것을 발견했다. 또한, Cyclin B1 형질 전환 마우스는 종양에 매우 잘 걸리는 것으로 나타났다. 이를 통해 각 성분마다 RARRES1의 직접 결합에 의해 조절되는 CDK1-cyclin B1의 활성화가 RARRES1 KO 마우스에서 종양 형성을 촉진시키는 지 여부를 테스트하기 위하여, 체외 배양을 위해 배아가 된 지 13.5일에 배아에서 야생형 및 실시예 1-7에 따른 RARRES1 결핍 MEF를 준비하고, 웨스턴 블랏(western blot)을 수행했다. 예상대로, CDK1의 트레오닌 14 및 161 잔기에서의 인산화는 KO MEFs에서 강화되었지만, 다른 MEF 세포에서는 CDK1 발현이 변하지 않았다. 또한, Cyclin B1 인산화(세린 126, 128, 133 및 147)는 RARRES1 결핍 MEFs에 WT 상대물과 비교했을 때 더 촉진되었다. CDK 기질의 서열인, (K/R)(S*)PX(K/R) 모티프에서 phospho-serine을 검출하는 인산화된 CDK 기질에 대한 항체를 사용하여 CDK 활성을 측정하였는데, 이는 결핍 MEF에서 상승했다. G1에서 인산화되고 탈 인산화되고, 세포주기의 S에서 M까지 인산화되는 Rb는 CDK1의 기질이며, 유사 분열에서 활성 CDK1-cyclin B1 복합체에 의해 인산화된다. Rb 단백질은 KO MEFs에서 증가되고 인산화되었다. CDK1의 다른 기질인 Separase는 KO세포에서 절단되는데, 이는 RARRES1의 결핍으로 인해 CDK1-Cyclin B1 활성이 나타남을 나타낸다(도 6).

[0129] 다음으로 CDK1-Cyclin B1 활성이 증가되면 MEF세포의 세포 성장에 영향을 줄 수 있는지를 조사했다. MEF 세포를 6-웰 플레이트 세포당 2 x 10⁴ 세포의 밀도로 3번 시딩하고, 5일 동안 세포 수를 매일 카운트했다. RARRES1^{+/+} 세포와 비교했을 때, RARRES1^{-/-} MEFs는 더 빠르게 성장했다(도 7a).

[0130] RARRES1^{-/-} MEFs에서 관찰되었던 향상된 종양세포 증식이 변경된 세포주기의 진행에 의한 것인지를 평가하기 위해, 실시예 1-2에 따른 세포 동기화 실험을 사용하여 G1에서 G2/M 상으로, G2/M에서 G1로의 전이를 연구했다. 최대 42시간 동안 혈청 자극(10 % FBS)에 이은 72시간 동안 혈청 기아(0.1 % FBS)는 세포주기의 G1에서 G2/M 단계까지 WT 세포와 비교하였을 때 RARRES1^{-/-} 세포에서 더 빨리 진행되고, 훨씬 더 오래 G2/M 단계에서 지속되었다는 것을 나타냈다(도 7b). G1시기 동안 발현 후 결합하고 DNA 합성을 준비하기 위해 G1 시기동안 CDK4/6을 활성화하는 것으로 밝혀진 Cyclin D의 발현이 방출 후 24시간 후에 WT 세포의 혈청 기아로부터 새로운 배지에서 정점을 이루었으나, 이 단백질 발현은 KO세포의 전반적인 기간 동안 하향 조절되었다. CDK4/6-cyclin D 복합체

의 활성화는 '하이포-인산화(hypo-phosphorylation)'이라 불리는 다중 인산화에 의해 G1시기의 Rb 망막아세포종을 비활성화시킨다. Rb 인산화는 혈청 자극 후 27시간 이내에 양 세포주에서 모두 피크를 보였다. 그러나, RARRES1이 결여된 세포에서, 인산화는 42시간까지 유지되었다. Rb는 초기 G1 단계에서 E2F 전사 인자에 결합하고, 하이포-인산화된(hypo-phosphorylated) Rb는 CDK2를 결합 및 활성화시키는 사이클린 E의 발현을 이끄는 E2F의 방출을 유도하여, 하이포-인산화에 의해 Rb 단백질을 비활성화시키는 CDK2-사이클린 E 복합체의 활성화를 초래한다. WT세포에서 Cyclin E의 발현은 혈청 자극 후 30 시간에 최대치를 나타내었고 빠르게 감소했지만, Cyclin E는 30 시간에 최고점에 달했고 KO 세포에서는 약간 감소했다(도 7c 및 7d). FACS 및 웨스턴 블랏(western blot) 분석과 결합된 노코다졸(nocodazole)-방출 방법을 사용하여, WT세포에 비해 RARRES1 결핍 세포에서 유사 분열의 종결이 빠르다는 것을 알아냈다(도 7e). 이러한 세포주기의 차이는 CDK1과 Cyclin B1의 활성화 차이를 동반했다. KO세포는 CDK1의 활성 인산화(Threonine 161) 및 Cyclin B1의 인산화(Serine 126, 133 및 147)를 강화시켰다. 높은 CDK1 활성은 분리 효소의 활성을 조절함으로써 자매 염색 분체의 분리로 이어지지만, 세포질 분열을 완료하지는 못한다. 분리효소의 발현은 전체 시간 동안 증가하고, 18시간 후에 이 활성화에 의해 절단되었고, KO 세포에서 CDK1의 기질인 Rb의 인산화는 방출 후 6시간에서 18시간까지 향상되었는데(도 7f), 이는 *RARRES1*^{-/-} 세포가 CDK1-Cyclin B1 활성을 증가시켰음을 나타낸다. 이 결과를 통해 RARRES1 KO MEFs에서 WT MEF과 비교했을 때 CDK1-Cyclin B1 복합체의 활성이 높은 바, 세포주기 진행의 시기가 부적절하고 빠르다는 것을 확인할 수 있었다.

[0132] **실시예 6. 유사 분열의 결합 및 염색체 불안정을 초래하는 RARRES1의 손실**

[0133] RARRES1 결핍 세포에서 유사 분열의 결합이 일어나는지 여부를 조사하였는데, 이를 통해 CDK1-Cyclin B1 복합체의 높은 활성 및 조절되지 않는 세포주기의 진행을 확인하였다. 정렬불일치 염색체(misalignment chromosome), 염색질 다리(chromatin bridge), 및 지체 염색체(lagging chromosome)을 포함한 몇 가지 유형의 유사 분열 오류를 관찰했다(도 8a). 실시예 1-10에 따른 면역형광법으로 분석한 결과, RARRES1 KO MEFs의 유사 분열 동안 KO 세포에서 염색체 정렬이 불일치되고 염색체의 비분리가 일어남을 확인할 수 있었다(도 8b 및 도 8c).

[0134] 최근 유사 분열에서의 염색체 분리 오류가 이수성(수치적) 및 구조적 이상(전위와 결실)을 포함한 염색체 이상을 유발한다는 것을 밝힌 바 있으므로 RARRES1의 녹아웃이 염색체 안정성에 영향을 줄지 여부를 확인하기 위해, 콜세미드(colcemide)로 배양된 실시예 1-7에 따른 *RARRES1*^{+/+} 및 *RARRES1*^{-/-} MEFs에서의 실시예 1-11에 따른 중기 확산(metaphase spreads)를 분석하고 염색체 번호를 결정했다. 5회 passage시(P5), *RARRES1*^{+/+} MEFs가 거의 정상 핵형을 가졌지만, 중기에서의 *RARRES1*^{-/-} MEFs의 20 % 이상은 상당한 이수성 또는 배수성을 보였다(표 4).

표 4

MEF genotype (n)	Mitotic cells inspected	Karyotypes with the indicated chromosome number							
		<38	39	40	41	42	43	70-79	>80
<i>Rarres1</i> ^{+/+} (3)	100	2	5	87	3	3			
<i>Rarres1</i> ^{+/-} (3)	100	3	5	73	10	4	1	1	3
<i>Rarres1</i> ^{-/-} (3)	100	4	7	59	9	1	2	7	11

[0135]

[0136] MEF 세포의 구조적 이상을 조사했다. RARRES1 결핍 세포의 소핵 및 일차 핵 모두에서 히스톤 변이체 H2AX(감마-H2AX 초점 형성)의 손상-의존성 인산화로 측정했을 때 상당한 DNA 손상을 보였다. 이와 비교했을 때, 감마-H2AX 병합은 WT MEF에서 거의 발견되지 않았다(도 8c 및 도 8d). 이를 종합해 봤을 때, RARRES1 결실 세포에서 DNA 손상 초점(DNA damage foci) 및 이수 배수체의 발생에 의하여 염색체 비분리가 증가할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0138] **실시예 7. RARRES1 녹아웃(Knockout; KO) 세포에서의 노코다졸(Nocodazole) 내성**

[0139] 노코다졸과 같은 유사 분열 스트레스를 유도하는 의약이 RARRES1 KO MEFs에 어떠한 영향을 미치는 지를 결정했다. MEF 세포를 노코다졸(50 및 100ng/ml) 또는 DMSO로 48시간 동안 처리하고, 실시예 1-5에 따른 유동 세포 계측법 및 세포 계수를 수행했다. 그 결과, 노코다졸에 의해 유도된 세포 사멸이 RARRES1 결핍 MEFs에서 용량의 존적으로 상당히 감소했으며(도 9a 및 도 9b), WT MEF보다 노코다졸 처리에 의해 세포 수가 감소하지 않았다(도 9c). 이러한 결과와 일치하여, PARP 및 Caspase3의 절단은 WT 세포와 비교했을 때, KO 세포에서 감소되었는 바(도 9d), RARRES1의 손실은 nocodazole 처리의 저항성을 유발한다는 것을 확인 할 수 있었다.

[0141] **실시예 8. RARRES1 결핍 마우스의 고형 종양에서 CDK1과 Cyclin B1의 인산화 증가**

[0142] RARRES1 KO 마우스에서 발생한 간암과 폐암에서 phospho-Cyclin B1-Ser126과 phospho-CDK1-T161에 대한 실시예 1-12에 따른 면역 조직 화학(IHC)을 시행하였다. WT 마우스의 간과 폐 절편에는 이 두 항체가 음성으로 염색되었으나, RARRES1 결핍 마우스의 종양 절편에서는 phospho-Cyclin B1-S126과 phospho-CDK1-T161로 강하게 염색되었고, 암이 아닌 암세포 주변에서는 이 두 항체에 음성 염색을 보였다(도 10a). 이러한 IHC 결과를 통해, RARRES1 결핍 마우스에서 Cdk1-Cyclin B1의 활성이 종양 발생과 관련이 있음을 시사한다. 한편, 동일한 연령(18개월령)의 마우스 폐 조직에서 세포 주기의 활성화를 나타내는 마커인 Ki67, CDK1, 인산화된 Rb protein에 대해 면역조직화학 염색을 실시한 결과, RARRES1^{+/+}에 비해 RARRES1^{+/-}, RARRES1^{-/-} 마우스에서는 위의 세 가지 마커에 대해 양성 반응을 보이는 세포가 다수 관찰되었다(도 10b).

[0144] **실시예 9. 기관-미분화 세포의 항상성(organ-blast cell homeostasis)에 기여하는 RARRES1**

[0145] 동일한 연령(18개월령)의 마우스에서 얻은 폐 조직에 각각 전구세포로 알려진, 제2형 폐포세포(type II pneumocyte) 마커 surfactant protein C(SPC)와 세포주기 활성화를 나타내는 Ki67에 대해 형광 발색을 이용해 동시에 면역조직화학 염색을 실시한 결과, RARRES1^{+/+}에 비해 RARRES1^{-/-}에서 세포주기가 활성화된 제 2형 세포가 더 빈번하게 관찰되었다(도 11a). 위 특이적으로 RARRES1을 결핍시킨 3개월령 마우스(도 11b)와 전신에서 RARRES1을 결핍시킨 18개월령의 마우스(도 11c)에서 얻은 위 조직에 위 특이적 줄기세포 마커인 Mist1, LGR5(3개월령) 또는 Mist1, CDK1(18개월령)으로 형광-면역조직화학적 염색을 실시한 결과, RARRES1이 전신적으로 결핍된 마우스와 위 특이적으로 결핍된 마우스 모두에서 대조군 마우스에 비해 다수의 위 특이적 줄기세포가 관찰되었다(도 11b 및 11c).

[0146] Spheroid-formation assay의 경우, 위에서 언급한 것과 같이 배아상피세포(embryonic epithelial cell) 배양에 사용한 advanced DMEM/F12 배지를 이용하였고, 24 well plate에 well당 2000개 또는 5000개의 세포를 300ul의 배지에 부유시켜 분주하였다(seeding). 3-4일에 한번씩 300ul의 배지를 추가해주면서 형성된 구(sphere)의 크기와 개수를 측정하였다. 또한 대조군 마우스와 RARRES1이 결핍된 마우스에서 얻은 배아상피세포에 CDK1의 활성을 저해하는 R03306을 처리하여 구의 형성이 어떻게 달라지는지 확인하였다. 그 결과, R03306을 처리하지 않은 그룹에서 대조군 마우스에 비해 RARRES1이 결핍된 마우스에서 얻은 배아상피세포의 구 형성이 활발했다. 한편, R03306을 처리해 CDK1의 활성을 억제한 그룹에서는 전반적으로 구 형성이 크게 감소해, CDK1의 활성이 구 형성에 중요한 인자임을 확인하였다. 또한 대조군 마우스의 배아상피세포는 구 형성을 거의 하지 못한 반면, RARRES1이 결핍된 마우스에서 얻은 배아상피세포는 구를 형성했기 때문에 RARRES1의 결핍이 CDK1의 활성을 증가시켜 줄기세포능을 유지시킨다는 것을 알 수 있었다 (도 11d, 11e).

[0147] 마우스의 위 오가노이드(gastric organoid)의 경우, 마우스의 위를 꺼낸 뒤, 위의 기저부(fundus)와 유문(pylorus)를 구분해 각각 8mM EDTA solution에 넣고 자른 뒤(chopping), 4℃에서 1시간동안 배양하였다. 그 후, 원심분리(centrifugation) 및 필터링(filtering)을 통해, 단일 세포로 분리하였다. 그 다음, 매트리지젤(matrigel)로 현탁(suspension)시킨 뒤 48 well plate에 분주하였다(seeding). 37℃에서 5-10분 정도 배양(incubation)시켜, 매트리지젤(matrigel)을 굳힌 뒤, 매트리지젤(matrigel) 주변에 advanced DMEM/F12 media를 기본으로 하여 성장 인자(growth factor)를 넣어준 배지를 채워주었다. 그 후, 2-3일에 한번씩 배지 및 성장 인자(growth factor)를 교체해서 유지시켰다. 그 결과, 위(stomach)에서 RARRES1이 결핍된 마우스에서 얻은 위 오가노이드가 대조군 마우스에서 얻은 오가노이드에 비해 더 빨리 형성되는 것을 확인할 수 있었다(도 11f 참조).

[0149] **실시예 10. 전체 게놈 시퀀싱을 이용한 체세포 변형 분석**

[0150] 표 5에 나타난 바와 같이, 모든 비-침묵의 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 밝혀 냈다. 특히, 마우스의 BRAF p.V637E 돌연변이는 Vemurafenib 인간 BRAF p.V600E 변이체의 타겟과 일치했다. 그것은 RARRES1 KO 마우스 모델이 목표를 정할 수 있는 체세포 돌연변이를 유도한다는 것을 의미한다. Bc191 비유사(Bc191 nonsynonymous)(p.S898T)와 Gnas(p.N964delinsNG) 비 골격 구조 이동 삽입(nonframeshift insertion)은 암 관

런 유전자에서 발견되었다. 모든 체세포 돌연변이가 표 6에 나타나 있다.

표 5

[0151]

Sample	Chr	Start	End	Ref	Alt	Gene.	ExonicFunc	AChange
						refGene	refGene	refGene
6T	chr6	39627783	39627783	A	T	Braf	nonsynonymous SNV	exon18:c.T1910A;p.V637E
4T	chr2	174345439	174345439	-	CGG	Gnas	nonframeshift insertion	exon8:c.2891_2892insCGG;p.N964delinsNG
5T	chr9	44507447	44507447	T	A	Bc191	nonsynonymous SNV	exon7:c.T2692A;p.S898T

표 6

[0152]

Cell	Marker
Alveolar bipotent progenitor	Krt8,Emp2,Aqp5,Sftpd,Sftpa1
Alveolar macrophage	Ear2,Ear1,Cd68,Marco,Siglecf,Chi13,Pclaf,Marco,Siglecf,Ccna2
AT1 Cell	Ager,Igfbp2,Hopx,Clic5,Pdpn
AT2 Cell	Sftpc,Sftpa1,Sftpb,Sfta2,Dram1
B Cell	Cd79a,Ms4a1,Cd79b,Ighd,Cd19
Basophil	Cc14,Cc13,I16,Cd69,Cd200r3
Ciliated cell	Ccdc153,Tmem212,1110017D15Rik,Foxj1,Ccdc17
Clara Cell	Scgbla1,Aldh1a1,Cyp2f2,Scgb3a1,Hp
Conventional dendritic cell	Gngt2,Lst1,Plac8,Itgb2,Cd68,Cd209a,Itgax,Cd74,H2-Eb1,Itgam,Fscn1,Cc122,Nudt17,H2-M2,Syng2
Dendritic cell	Naaa,Irf8,Cd74,Itgax,Itgae
Dividing cells	Cdc20,Ube2c,Stmn1,Pclaf,Tubb5
Dividing dendritic cell	Cd74,H2-Aa,H2-Ab1,Naaa,Ccnb2
Dividing T cells	Thy1,Cd8b1,Cdk1,Cd3g,Cd3d
Endothelial cell	Eng,Kdr,Flt1,Cdh5,Pecam1,Car4,Kdr,Flt1,Cdh5,Pecam1,Vwf,Kdr,Flt1,Cdh5,Pecam1
Eosinophil granulocyte	G0s2,C1ec4d,S100a9,S100a8,Cd14
Ig-producing B cell	Jchain,Igha,Igkc,Ighm,Igkv2-109
Interstitial macrophage	C1qc,C1qa,Pf4,Cd74,Adgre1
Monocyte progenitor cell	Elane,Mpo,Ctsg,Prtn3,Ms4a3
Neutrophil granulocyte	Ngp,S100a9,S100a8,Cd177,Ly6g
NK Cell	Nkg7,Klra8,Klra4,Klrb1c,Klra13-ps
Nuocyte	Cxcr6,Icos,Thy1,S100a4,I17r
Plasmacytoid dendritic cell	Ms4a6c,Plac8,Bst2,Irf7,Irf5
Stromal cell	Dcn,Col3a1,Fgf10,Tcf21,Hoxa5,Inmt,Gsn,Fgf10,Tcf21,Hoxa5,Acta2,My19,Fgf10,Tcf21,Hoxa5
T Cell	Trbc2,Cd8b1,Cd3d,Cd3g,Thy1

[0153]

모든 마우스 종양 샘플(n = 5)의 체세포 복제 수 변이체(CNV)와 구조 변이체(SV)는 계놈 안정형 암을 고려하여 낮은 빈도(low frequency)에서 발생했다. 도 12에 나타난 바와 같이, 세그멘트화 레벨(segmentation-level)의 증폭 또는 결실 CNV는 종양 샘플에 존재하지 않았다. 그 사이에, 표 7에 나타난 바와 같이, 64개의 체세포의 구조 변이체(SV)가 종양 샘플에서 확인되었다. 결실(n = 27)와 전좌(n = 32)가 가장 자주 발생했다. 특히 KO4T 표본에서 chr17 지역 : 27975841-29991317 주변의 Cdkn1a 결실이 존재한다.

표 7

[0154]

SAMPL E	CHROM1	POS1	CHROM2	POS2	SVCLASS	GENE	CANCE RGENE	INFO	FO RM AT R	TU MO R
---------	--------	------	--------	------	---------	------	-------------	------	------------	---------

T18_K02T	chr12	111538547	chr12	111539406	Deletion	Eif5	.	END=111539406;SVTYPE=DEL;SVLEN=-859;CIGAR=1M859D;CIP OS=0,1;HOMLEN=1;HOMSEQ=G;SOMATIC;SOMATICSCORE=115	P R: SR	4 2, 1 5: 4 2, 19
T18_K02T	chr12	111539685	chr12	111539798	Deletion	Eif5	.	END=111539798;SVTYPE=DEL;SVLEN=-113;CIGAR=1M113D;CIP OS=0,4;HOMLEN=4;HOMSEQ=AGGT;SOMATIC;SOMATICSCORE=71	P R: SR	1 0, 0: 5 1, 20
T18_K02T	chr12	111539882	chr12	111540129	Deletion	Eif5	.	END=111540129;SVTYPE=DEL;SVLEN=-247;CIGAR=1M247D;SOMATIC;SOMATICSCORE=87	P R: SR	4 6, 1 2: 4 4, 25
T18_K02T	chr12	111540571	chr12	111541704	Deletion	Snora28,Eif5	.	END=111541704;SVTYPE=DEL;SVLEN=-1133;CIPOS=0,1;CIEND=0,1;HOMLEN=1;HOMSEQ=G;SOMATIC;SOMATICSCORE=49	P R: SR	5 4, 4: 5 6, 9
T18_K02T	chr12	111541844	chr12	111542150	Deletion	Eif5	.	END=111542150;SVTYPE=DEL;SVLEN=-306;CIGAR=1M306D;CIP OS=0,2;HOMLEN=2;HOMSEQ=GG;SOMATIC;SOMATICSCORE=85	P R: SR	4 1, 1: 3 9, 19
T18_K02T	chr12	111542841	chr12	111543099	Deletion	Eif5	.	END=111543099;SVTYPE=DEL;SVLEN=-258;CIGAR=1M258D;SOMATIC;SOMATICSCORE=65	P R: SR	5 2, 3: 6 2, 18
T18_K02T	chr12	111543262	chr12	111543524	Deletion	Eif5	.	END=111543524;SVTYPE=DEL;SVLEN=-262;CIGAR=1M262D;CIP OS=0,3;HOMLEN=3;HOMSEQ=AGG;SOMATIC;SOMATICSCORE=65	P R: SR	4 8, 0: 5 7, 18
T18_K02T	chr12	111543659	chr12	111544526	Deletion	Eif5	.	END=111544526;SVTYPE=DEL;SVLEN=-867;CIGAR=1M867D;CIP OS=0,4;HOMLEN=4;HOMSEQ=AGGT;SOMATIC;SOMATICSCORE=96	P R: SR	5 9, 4: 5 3, 27
T18_K02T	chr5	45985059	chr5	45986594	Deletion		.	END=45986594;SVTYPE=DEL;SVLEN=-1535;CIPOS=0,8;CIEND=0,8;HOMLEN=8;HOMSEQ=AGGAAGCT;SOMATIC;SOMATICSCORE=115	P R: SR	2 7, 2 0: 2 0, 15
T18_K02T	chr5	121093327	chr5	151725086	Inversion		.	END=151725086;SVTYPE=INV;SVLEN=30631759;INV3;SOMATIC;SOMATICSCORE=33	P R: SR	5 1, 2: 5 0, 2

T18_K04T	chr3	95073759	chr10	81306111	Translocation	Pip5k1a,Pip5k1c	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:1714:0:1:0:0: 0:1;IMPRECISE;CIPOS= - 242,242;SOMATIC;SOMA TICSCORE=18;BND_DEPT H=39;MATE_BND_DEPTH= 38	PR	5 8, 6
T18_K04T	chr6	90596933	chr6	90638559	Tandem- duplicatio n	Aldh111,S1c41 a3	.	END=90638559;SVTYPE= DUP;SVLEN=41626;CIPO S=0,1;CIEND=0,1;HOML EN=1;HOMSEQ=C;SOMATI C;SOMATICSCORE=95	P R: SR	5 0, 1 3: 5 0, 12
T18_K04T	chr6	122323813	chr6	122325457	Deletion	Phc1	.	END=122325457;SVTYPE =DEL;SVLEN=- 1644;CIPOS=0,2;CIEND =0,2;HOMLEN=2;HOMSEQ =CT;SOMATIC;SOMATIC SCORE=36	P R: SR	4 2, 2: 3 9, 8
T18_K04T	chr7	16475870	chr7	16475933	Deletion	Npas1	.	END=16475933;SVTYPE= DEL;SVLEN=- 63;CIGAR=1M63D;CIPOS =0,8;HOMLEN=8;HOMSEQ =GCCCGCGC;SOMATIC;SO MATICSCORE=74	P R: SR	1, 0: 1 5, 13
T18_K04T	chr7	108528278	chr5	34913634	Translocat ion		.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:31880:0:3:0: 0:0:0;IMPRECISE;CIPO S=- 261,261;SOMATIC;SOMA TICSCORE=58;BND_DEPT H=50;MATE_BND_DEPTH= 40	PR	3 7, 7
T18_K04T	chr7	119308417	chr13	84011843	Translocat ion		.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:9143:0:1:0:0: 0:1;IMPRECISE;CIPOS= - 281,281;SOMATIC;SOMA TICSCORE=30;BND_DEPT H=39;MATE_BND_DEPTH= 19	PR	6 2, 6
T18_K05T	chr11	104535053	chr11	104536427	Deletion	Cdc27	.	END=104536427;SVTYPE =DEL;SVLEN=- 1374;IMPRECISE;CIPOS =-186,186;CIEND=- 185,186;SOMATIC;SOMA TICSCORE=11	PR	4 5, 4
T18_K05T	chr12	9077711	chr12	9184781	Tandem- duplicatio n		.	END=9184781;SVTYPE=D UP;SVLEN=107070;CIPO S=0,2;CIEND=0,2;HOML EN=2;HOMSEQ=GC;SOMAT IC;SOMATICSCORE=92	P R: SR	4 9, 1 1: 4 2, 9
T18_K05T	chr12	111538547	chr12	111539406	Deletion	Eif5	.	END=111539406;SVTYPE =DEL;SVLEN=- 859;CIGAR=1M859D;CIP OS=0,1;HOMLEN=1;HOMS EQ=G;SOMATIC;SOMATIC SCORE=55	P R: SR	3 8, 7: 2 5, 5
T18_K05T	chr12	111539882	chr12	111540129	Deletion	Eif5	.	END=111540129;SVTYPE =DEL;SVLEN=- 247;CIGAR=1M247D;SOM ATIC;SOMATICSCORE=31	P R: SR	3 4, 4: 3 9, 4

T18_K05T	chr12	111542841	chr12	111543099	Deletion	Eif5	.	END=111543099;SVTYPE=DEL;SVLEN=-258;CIGAR=1M258D;SOMATIC;SOMATICSCORE=45	PR: 3, 4, 6, 10, 12, 16
T18_K05T	chr12	111543659	chr12	111544526	Deletion	Eif5	.	END=111544526;SVTYPE=DEL;SVLEN=-867;CIGAR=1M867D;CIPOS=0,4;HOMLEN=4;HOMSEQ=AGGT;SOMATIC;SOMATICSCORE=61	PR: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
T18_K05T	chr14	95923489	chr14	95924636	Deletion		.	END=95924636;SVTYPE=DEL;SVLEN=-1147;CIPOS=0,2;CIEND=0,2;HOMLEN=2;HOMSEQ=TT;SOMATIC;SOMATICSCORE=46	PR: 1, 5, 9, 11, 13, 15
T18_K05T	chr2	169539577	chr2	169540156	Inversion		.	END=169540156;SVTYPE=INV;SVLEN=579;CIPOS=0,11;CIEND=-11,0;HOMLEN=11;HOMSEQ=ACACACACACC;INV5;SOMATIC;SOMATICSCORE=16	PR: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16
T18_K05T	chr5	75143783	chr5	75145463	Deletion	Gm19583	.	END=75145463;SVTYPE=DEL;SVLEN=-1680;CIPOS=0,2;CIEND=0,2;HOMLEN=2;HOMSEQ=TA;SOMATIC;SOMATICSCORE=172	PR: 1, 4, 8, 12, 16
T18_K05T	chr6	143203342	chr1	40661555	Translocation	Etnk1	Etnk1	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:20826:0:1:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=28;BND_DEPTH=34;MATE_BND_DEPTH=43	PR: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
T18_K05T	chr7	55643330	chr12	111546658	Translocation	Eif5	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:7387:2:3:0:0:0:0;IMPRECISE;CIPOS=-352,353;SOMATIC;SOMATICSCORE=84;BND_DEPTH=44;MATE_BND_DEPTH=36	PR: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17
T18_K05T	chr7	55643415	chr12	111538242	Translocation	Eif5	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:7387:0:2:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=108;BND_DEPTH=41;MATE_BND_DEPTH=46	PR: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
T18_K05T	chr7	108528280	chr5	34913636	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:32855:0:2:0:0:0:0;IMPRECISE;CIPOS=-258,259;SOMATIC;SOMATICSCORE=20;BND_DEPTH=50;MATE_BND_DEPTH=40	PR: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
T18_K06T	chr1	42137470	chr1	42137678	Deletion		.	END=42137678;SVTYPE=DEL;SVLEN=-208;CIGAR=1M208D;CIPOS=0,30;HOMLEN=30;HOMSEQ=CAGCAGAGTCTTGCCCAACACCCGAAGGG;SOMATIC;SOMATICSCORE=35	PR: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99

T18_K06T	chr1	127908344	chr1	127908502	Deletion	Rab3gap1	.	END=127908502;SVTYPE=DEL;SVLEN=-158;CIGAR=1M158D;CIP OS=0,9;HOMLEN=9;HOMSEQ=CACACACAC;SOMATIC;SOMATICSCORE=13	PR	17,3,5
T18_K06T	chr1	171070172	chr1	171077780	Deletion		.	END=171077780;SVTYPE=DEL;SVLEN=-7608;IMPRECISE;CIPOS=-537,537;CIEND=-332,333;SOMATIC;SOMATICSCORE=19	PR	247,11
T18_K06T	chr15	30984772	chr15	30986359	Tandem-duplication	Ctndd2	.	END=30986359;SVTYPE=DUP;SVLEN=1587;IMPRECISE;CIPOS=-266,266;CIEND=-384,385;SOMATIC;SOMATICSCORE=10	PR	71,5
T18_K06T	chr18	9575535	chr14	13358092	Translocation	Synpr	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:11510:0:1:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=32;BND_DEPTH=49;MATE_BND_DEPTH=44	PR	92,2:83,2
T18_K06T	chr19	42469585	chr12	97249299	Translocation	Gm38437	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:7967:0:2:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-281,281;SOMATIC;SOMATICSCORE=20;BND_DEPTH=44;MATE_BND_DEPTH=66	PR	84,7
T18_K06T	chr3	19700070	chr11	91724710	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:5232:0:1:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-257,258;SOMATIC;SOMATICSCORE=21;BND_DEPTH=50;MATE_BND_DEPTH=34	PR	81,10
T18_K06T	chr3	109622539	chr13	20487851	Translocation	Vav3,Elmo1	Vav3	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:8855:0:6:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-258,258;SOMATIC;SOMATICSCORE=10;BND_DEPTH=49;MATE_BND_DEPTH=38	PR	48,6
T18_K06T	chr3	120703425	chr14	70715950	Translocation	6530403H02Rik,Xpo7	Xpo7	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:12704:4:8:0:0:0:0;IMPRECISE;CIPOS=-236,237;SOMATIC;SOMATICSCORE=10;BND_DEPTH=49;MATE_BND_DEPTH=41	PR	85,5
T18_K06T	chr4	25544294	chr13	102567888	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:10932:0:1:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=25;BND_DEPTH=56;MATE_BND_DEPTH=44	PR	71,2:77,2

T18_K06T	chr4	125060132	chr12	97601280	Translocation	Dnal11	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:7966:0:1:0:0: 0:0;CIPOS=0,1;HOMLEN =1;HOMSEQ=G;SOMATIC; SOMATICSCORE=16;BND_ DEPTH=44;MATE_BND_DE PTH=52	P R: SR	5 5, 2: 5 2, 2
T18_K06T	chr5	33111812	chr1	126334627	Translocation	Slc5a1,Nckap5	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:25541:0:2:0: 0:0:1;IMPRECISE;CIPO S=- 250,251;SOMATIC;SOMA TICSCORE=10;BND_DEPT H=35;MATE_BND_DEPTH=48	PR	8 4, 5
T18_K06T	chr5	81150341	chr5	81150535	Deletion	Adgr13	.	END=81150535;SVTYPE= DEL;SVLEN=- 194;CIGAR=1M194D;CIP OS=0,8;HOMLEN=8;HOMS EQ=TGTTGTGTG;SOMATIC; SOMATICSCORE=10	P R: SR	2 7, 2: 3 4, 4
T18_K06T	chr5	128099724	chr1	141912421	Translocation	Tmem132d	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:9003:0:1:0:0: 0:0;SOMATIC;SOMATIC CORE=11;BND_DEPTH=5 4;MATE_BND_DEPTH=42	P R: SR	8 3, 2: 6 4, 2
T18_K06T	chr6	90775745	chr13	65106495	Translocation	Iqsec1,Mfsd14b	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:9855:0:2:0:0: 0:0;IMPRECISE;CIPOS= - 229,230;SOMATIC;SOMA TICSCORE=38;BND_DEPT H=66;MATE_BND_DEPTH=45	PR	7 6, 6
T18_K06T	chr6	94897007	chr6	94897062	Deletion		.	END=94897062;SVTYPE= DEL;SVLEN=- 55;CIGAR=1M1155D;SOM ATIC;SOMATICSCORE=13	P R: SR	2, 0: 1 8, 8
T18_K06T	chr7	81108995	chr3	62201316	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:1:7082:12215: 0:0:0:1;IMPRECISE;CI POS=- 271,272;SOMATIC;SOMA TICSCORE=23;BND_DEPT H=50;MATE_BND_DEPTH=70	PR	4 9, 6
T18_K06T	chr8	4479310	chr7	54004741	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:8256:9:10:0: 0:0:0;IMPRECISE;CIPO S=- 253,253;SOMATIC;SOMA TICSCORE=11;BND_DEPT H=41;MATE_BND_DEPTH=53	PR	6 9, 5
T18_K06T	chr8	57572028	chr14	63280308	Translocation	Galnt7	.	SVTYPE=BND;MATEID=Ma ntaBND:1:8069:8070: 0:1:0:1;SOMATIC;SOMA TICSCORE=50;BND_DEPT H=47;MATE_BND_DEPTH=84	P R: SR	4 3, 6: 4 7, 6

T18_K06T	chr9	60802071	chr18	35854024	Translocation	Uaca, Cxxc5	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:8011:3:6:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-244,244;SOMATIC;SOMATICSCORE=26;BND_DEPTH=39;MATE_BND_DEPTH=44	PR	86,10
T18_K06T	chrX	18640983	chr18	33772125	Translocation	Gm14345, Gm14346, Gm10921	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:1:41100:41101:0:0:0:0;IMPRECISE;CIPOS=-270,271;SOMATIC;SOMATICSCORE=14;BND_DEPTH=29;MATE_BND_DEPTH=44	PR	65,6
T18_K06T	chrX	75637613	chr9	52949211	Translocation		.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:23533:1:2:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-323,324;SOMATIC;SOMATICSCORE=20;BND_DEPTH=28;MATE_BND_DEPTH=60	PR	57,8
T18_K07T	chr17	50143150	chr14	12743313	Translocation	Rf tn1, Cadps	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:13894:0:1:0:0:0:1;CIPOS=0,1;HOMLEN=1;HOMSEQ=G;SOMATIC;SOMATICSCORE=29;BND_DEPTH=55;MATE_BND_DEPTH=48	PR:SR	70,2:61,2
T18_K07T	chr18	25838191	chr12	117721570	Translocation	Rapgef5	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:10175:2:5:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-249,249;EVENT=MantaBND:10175:2:5:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=0;JUNCTION_SOMATICSCORE=10;BND_DEPTH=55;MATE_BND_DEPTH=39	PR	54,5
T18_K07T	chr18	25838370	chr12	117721238	Translocation	Rapgef5	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:10175:2:5:1:0:0:1;CIPOS=0,1;HOMLEN=1;HOMSEQ=G;SVINSL EN=85;SVINSEQ=TGAATACTCACCACAGAAGAAGAAATAAGCCCTTTCCACCAATT CAGTCTTAAGGAGAACTGGC TCCAGCACAGAGGAAGTGTG;EVENT=MantaBND:10175:2:5:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=0;JUNCTION_SOMATICSCORE=0;BND_DEPTH=50;MATE_BND_DEPTH=69	PR:SR	47,1:35,10
T18_K07T	chr19	17533464	chr16	27971791	Translocation	Pcsk5	Pcsk5	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:19884:0:1:0:0:0:1;CIPOS=0,1;HOMLEN=1;HOMSEQ=T;SOMATIC;SOMATICSCORE=25;BND_DEPTH=50;MATE_BND_DEPTH=62	PR:SR	77,2:76,2

T18_K07T	chr4	154211152	chr15	97566353	Translocation	Megf6	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:2:9296:10229:1:0:0:0;IMPRECISE;CIPOS=-252,253;EVENT=MantaBND:2:9296:10229:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=24;JUNCTION_SOMATICSCORE=0;BND_DEPTH=31;MATE_BND_DEPTH=47	PR	7, 3, 2
T18_K07T	chr4	154211357	chr15	97566889	Translocation	Megf6	.	SVTYPE=BND;MATEID=MantaBND:2:9296:10229:0:0:0:1;IMPRECISE;CIPOS=-391,391;EVENT=MantaBND:2:9296:10229:0:0:0:0;SOMATIC;SOMATICSCORE=24;JUNCTION_SOMATICSCORE=2;BND_DEPTH=69;MATE_BND_DEPTH=41	PR	3, 9, 4
T18_K07T	chr7	97887440	chr7	97887904	Deletion	Pak1	Pak1	END=97887904;SVTYPE=DEL;SVLEN=-464;CIGAR=1M464D;CIPOS=0,7;HOMLEN=7;HOMSEQ=CTGGCCT;SOMATIC;SOMATICSCORE=16	PR	6, 4, 5, 1, 6

[0156] **실시예 11. 유전자 발현 프로파일 및 기능 조사**

[0157] 유전자 발현 프로파일 분석은 각각의 경우 내에서 일치된 특성을 나타내었다. KO 종양 마우스의 종양과 정상 샘플(FDR < 1.0e⁻⁰⁵)을 비교하였을 때, 유전자 제거 후에 방법에 기술된 시간 계수(FDR < 1.0e⁻⁰⁴)에 의존하여, 차별적으로 발현된 유전자를 선택했다. 또한, 서브 네트워크 유전자를 선택하여 DEG 세트에 1720개의 유전자를 선택했다. 유전자 집합 농축 분석(gene set enrichment analysis; GSEA)의 결과로, 표준 Wnt 신호, 세포주기 및 유사 분열(도 13a)에 관여하는 경로를 확인하고, 추가로 펼쳐진 단백질 반응(unfolded protein response; UPR)은 KO와 WT 사이에서 반대 경로로 활동하는 것으로 나타났다. 상대적으로, UPR 유전자 Ciar, Eif2s1, Hspa5, Hspa8 및 Hsp90b1은 WT보다 KO 정상에서 하향 조절되었지만, KO 종양에서는 높게 발현되었다(도 13b). 또한, 도 13c에 나타난 바와 같이, Hspa8은 IgG 증거로부터 RARRES1과의 결합 단백질로 확인되었다. Wnt 신호 또는 유사 분열 세포주기에서, KO 마우스 종양 샘플 중 Ccnd1, Cdkn1a, Cdkn2A, Nanog, Psrc1 및 Nup214가 고도로 발현되었다(도 13d).

[0158] Cdk1 mRNA는 KO 종양과 KO 정상 사이의 배수 변화(fold change) XXX를 나타냈다. 그러나, TCGA LUAD RNA-Seq와 RPPA 비교로부터, mRNA 발현과 단백질 존재량 사이의 낮은 상관 관계(XXX)를 확인했다. 그 외에는, Cdk1-RARRES1의 강한 결합 가능성(도 13c)을 IgG 실험을 통해 입증했다는 것을 밝혀냈다.

[0159] **실시예 12. TCGA 폐선암종과 폐 세포 존재량 디콘볼루션에서의 RARRES1 상태**

[0160] TCGA 인간 폐선암종의 DNA 및 RNA 증거 모두에서 RARRES1 상태를 조사했다(TCGA LUAD, n = 230). 도 14a에 나타난 바와 같이, Rarres1 변이형은 1.3 % CNV 증폭되었고, 체세포 변이가 없었다. 또한, 도 14b에 나타난 바와 같이, Rarres1 mRNA 발현은 6개의 TCGA LUAD subtype cluster 사이의 명확한 차이가 있었다. C1 그룹은 Rarres1 낮은 발현에 속한다(log2 배 변화 = -1.52, T- 테스트 P- 값 = 5.58e⁻⁰⁸, 도 14b 및 도 14c).

[0161] 유전자 발현 프로파일을 사용하여 알려진 24가지 폐 세포의 존재를 추정했다. 대부분의 세포의 비율은 WT와 KO 상태가 일치했다. 그러나, 폐포 타입 2(alveolar type 2; AT2) 세포는 KO 종양 샘플에서만 극도로 풍부하게 보였으나, 다른 모든 조건에서는 낮은 농도를 나타냈다(KO 정상과 KO 종양 사이의 배수 변화 2.8, 도 14d). 또한, 인간 TCGA LUAD에서 C1그룹은 AT2 세포의 비율이 높았다(배수 변화 2.7, 도 14d).

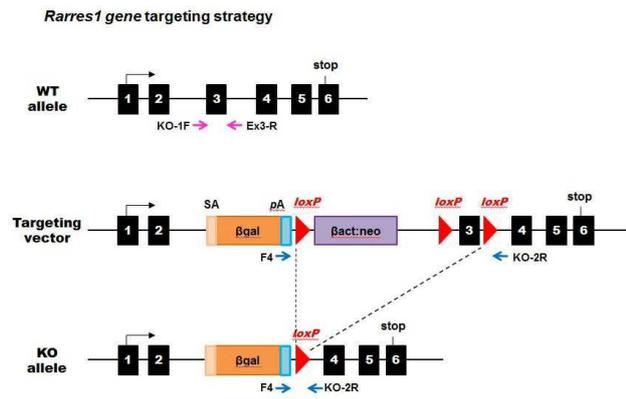
[0162] 또한, 도 14e에 나타난 바와 같이, 오른쪽 상단 그래프를 통해, RARRES1는 인간 폐암 아류형 중 C1 그룹에 가장 낮은 발현을 보임을 알 수 있었고, 왼쪽 그래프를 통해, 폐 세포 정량 추정시 마우스 폐암 모델과 동일하게 인

간 폐암 아류형 중 C1 그룹에서 AT2 cell과 Alveolar bipotent progenitor가 가장 많이 나타남을 볼 수 있었으며, 오른쪽 하단 히스토그램을 통해, 폐의 progenitor세포인 AT2 세포의 정량 전체 분포 히스토그램에서 인간 폐암 아류형 중 C1 그룹이 제일 높게 나타남을 알 수 있었다.

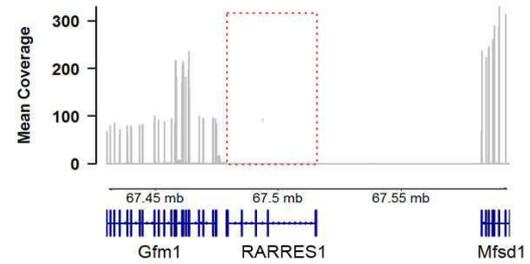
[0164] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

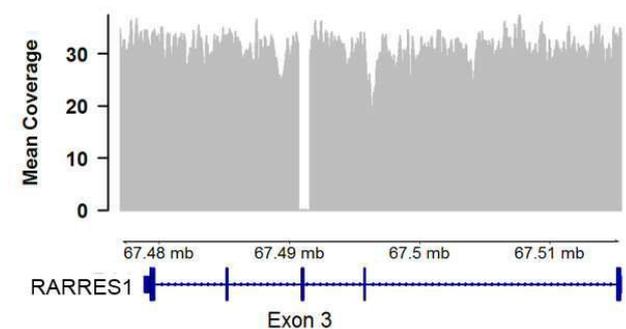
도면1a



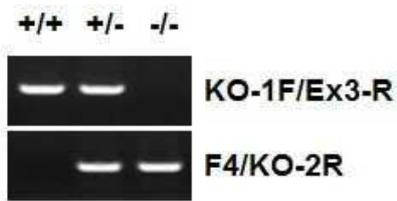
도면1b



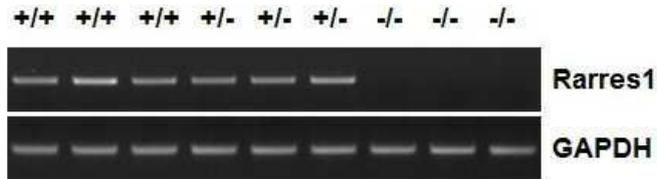
도면1c



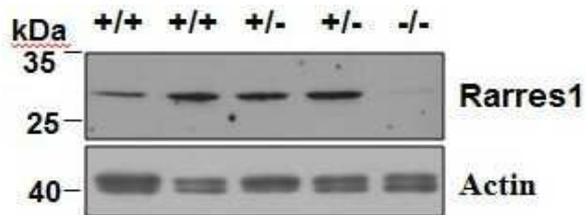
도면1d



도면1e



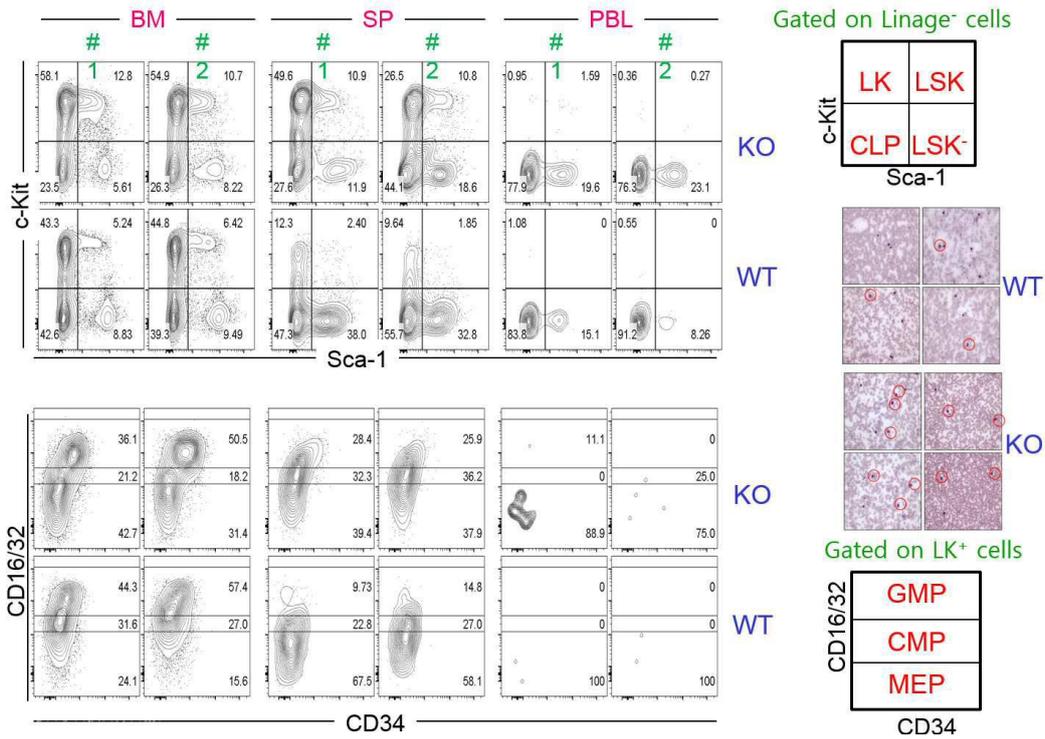
도면1f



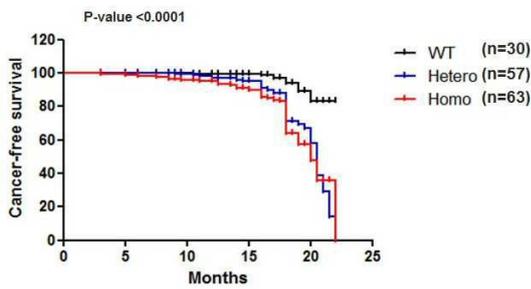
도면1g



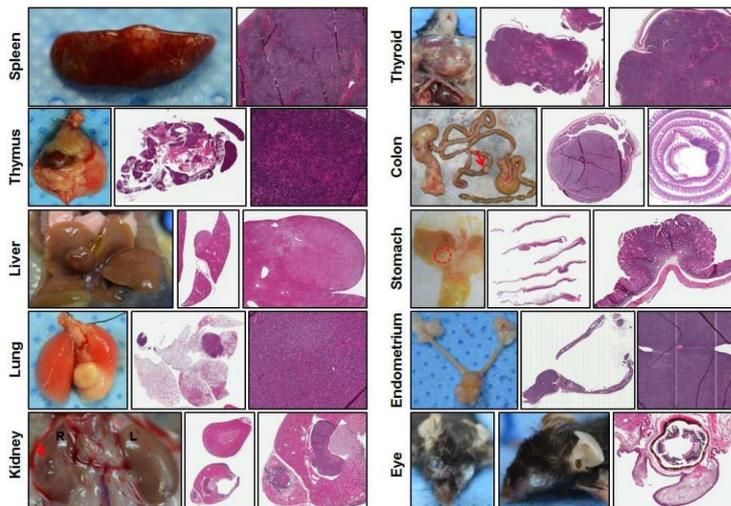
도면2



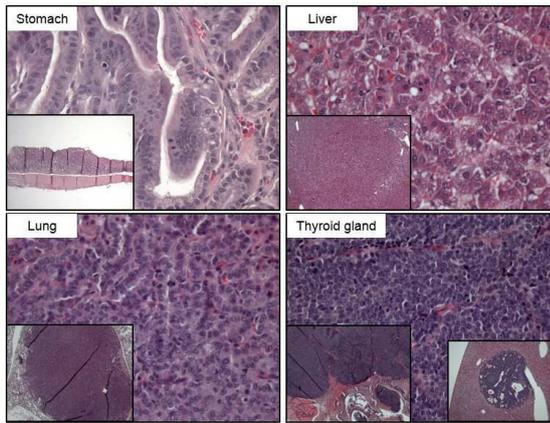
도면3a



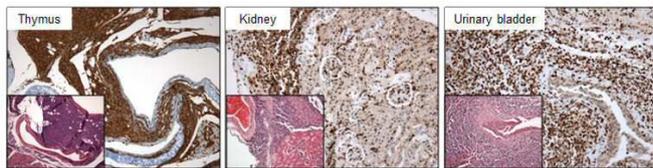
도면3b



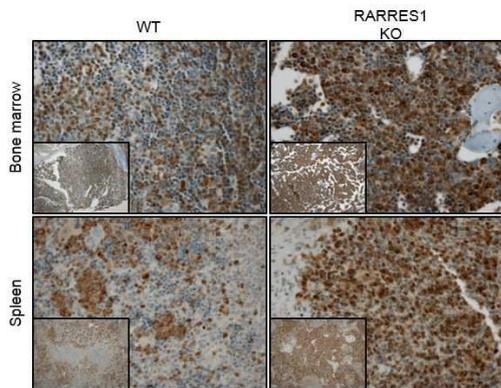
도면3c



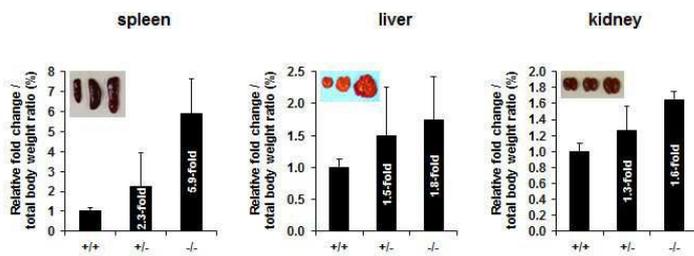
도면3d



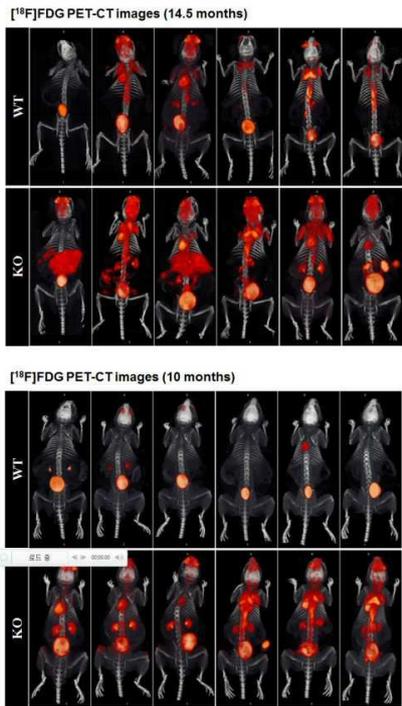
도면3e



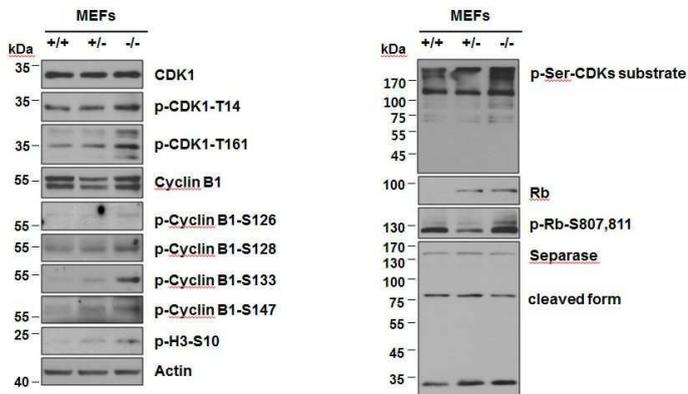
도면4



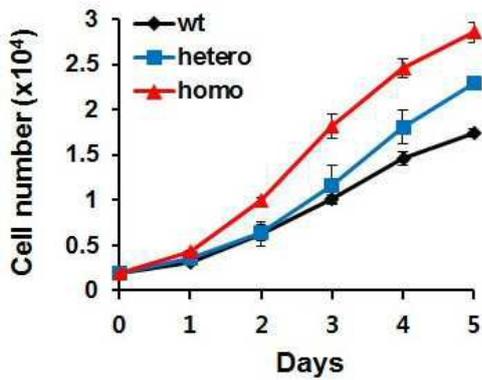
도면5



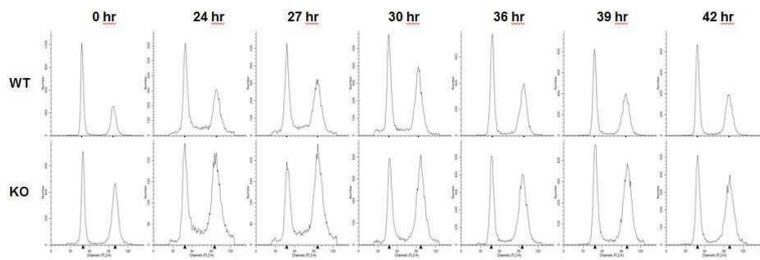
도면6



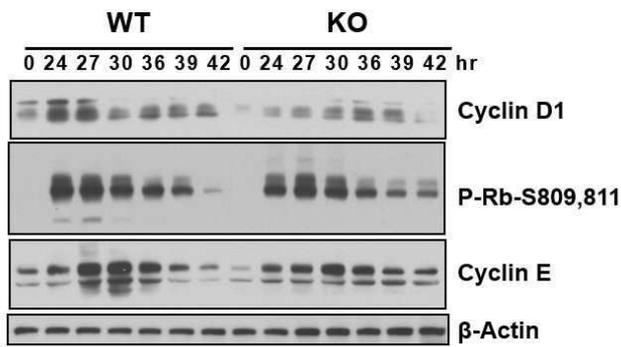
도면7a



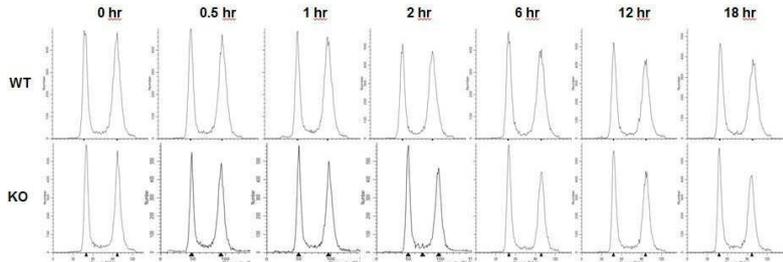
도면7b



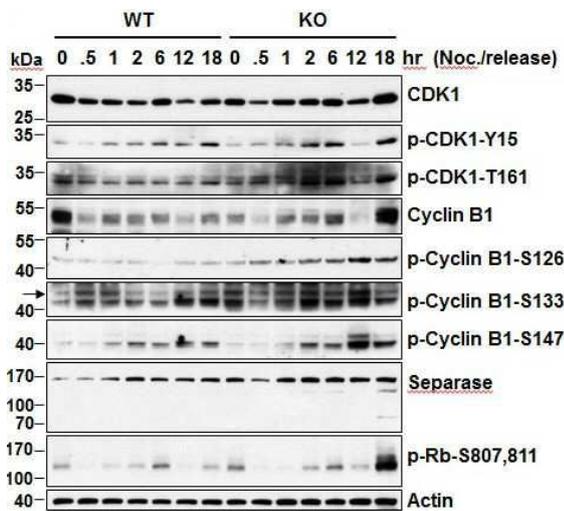
도면7c



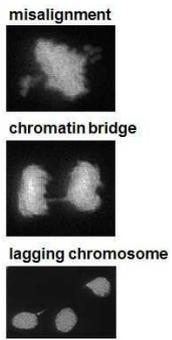
도면7d



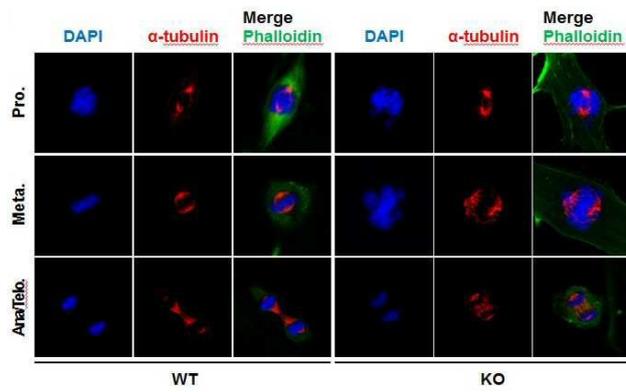
도면7e



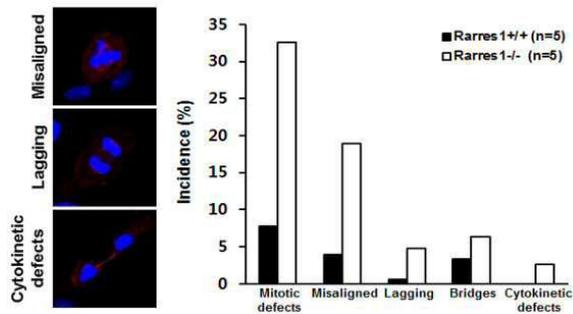
도면8a



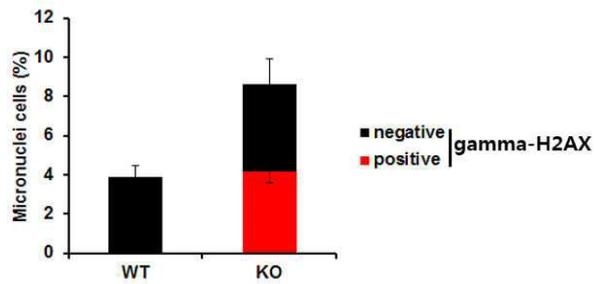
도면8b



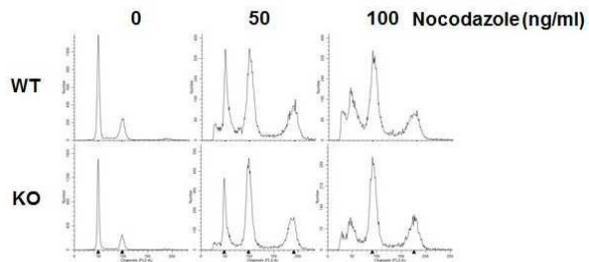
도면8c



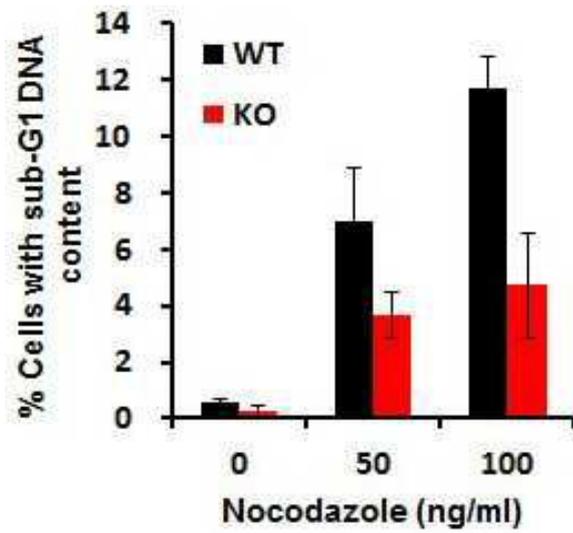
도면8d



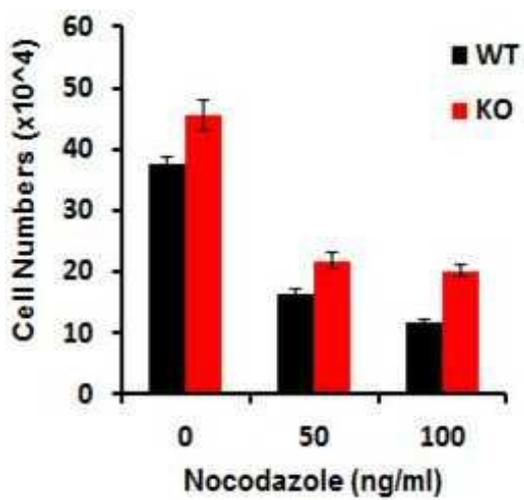
도면9a



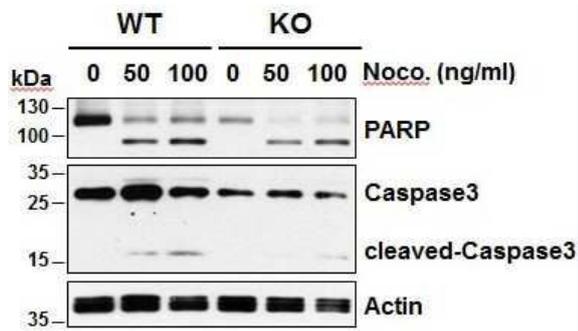
도면9b



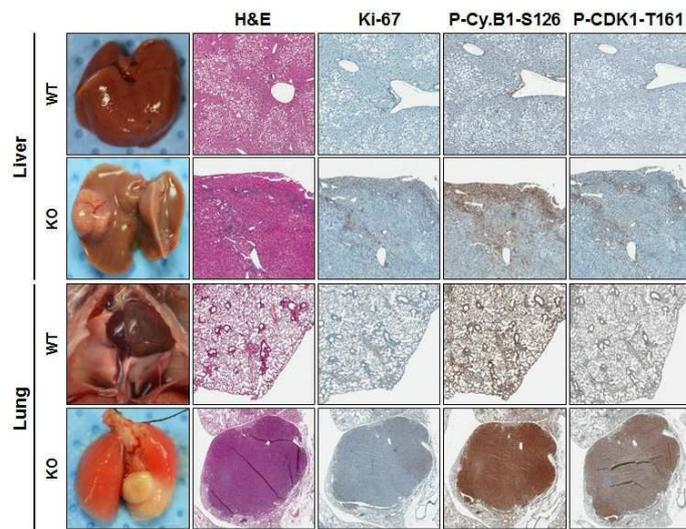
도면9c



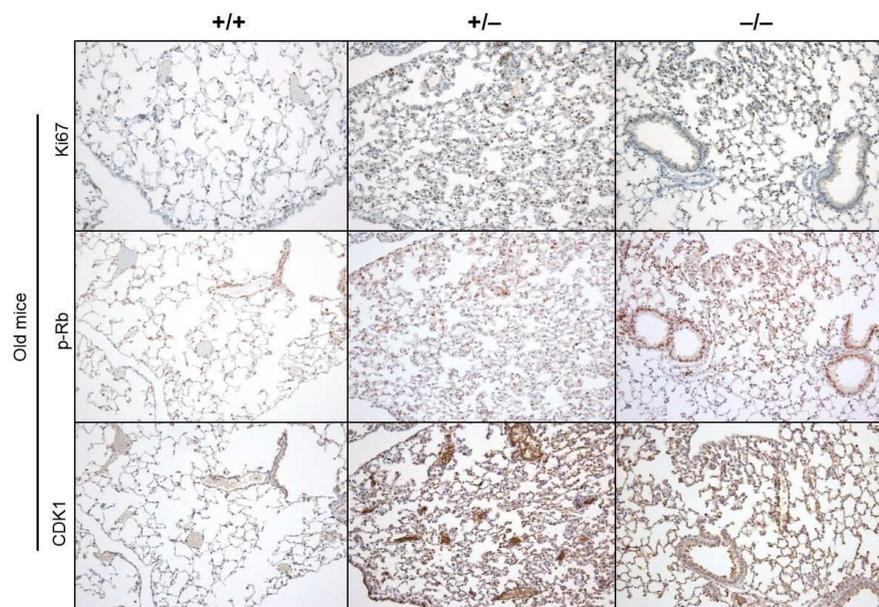
도면9d



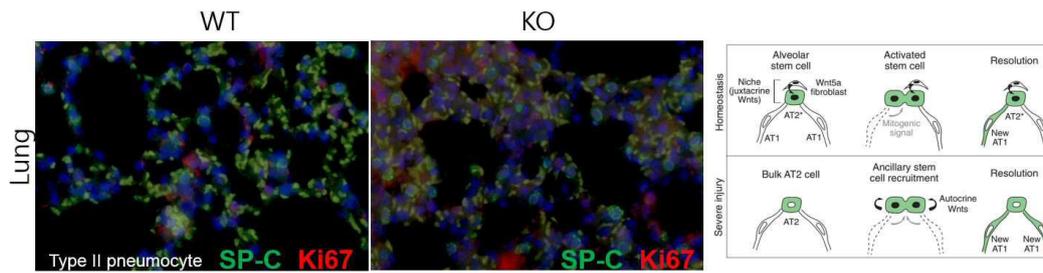
도면10a



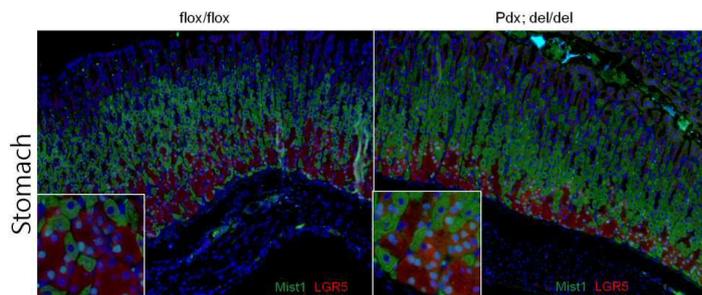
도면10b



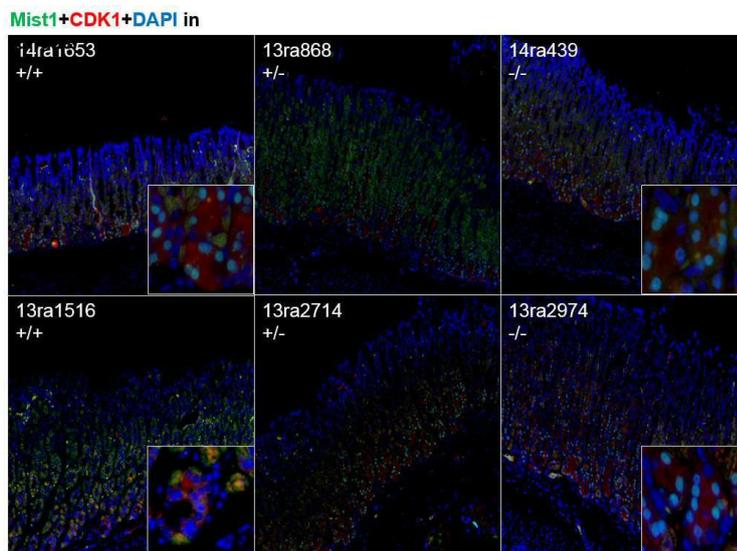
도면11a



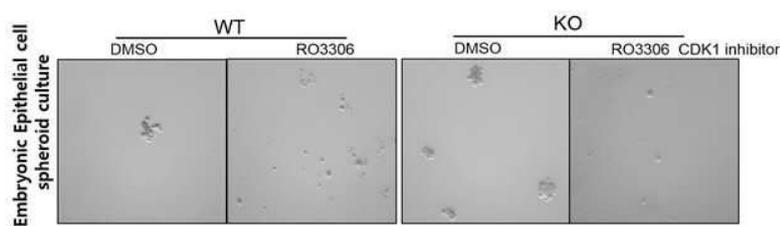
도면11b



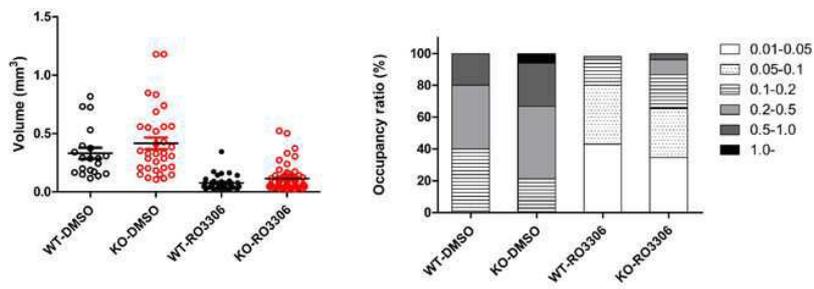
도면11c



도면11d



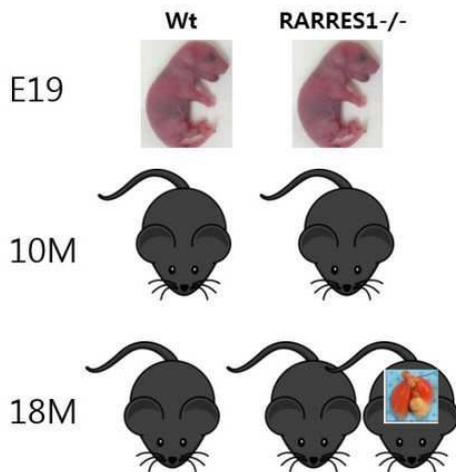
도면11e



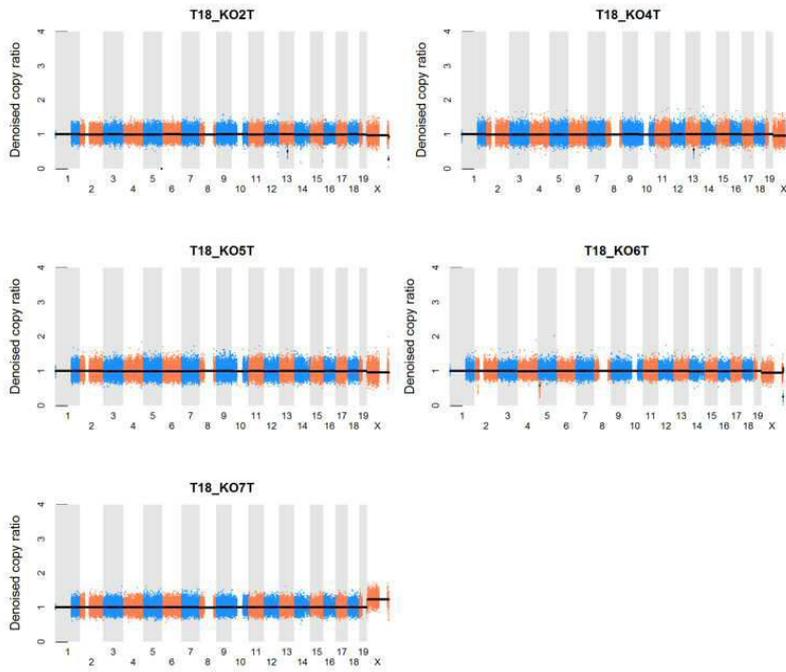
도면11f



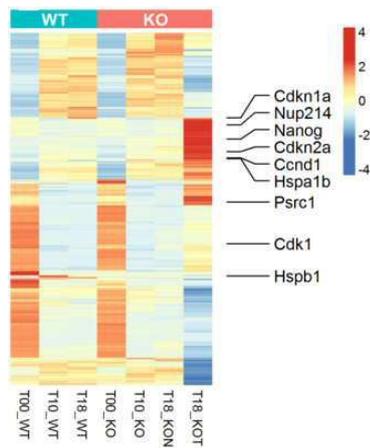
도면11g



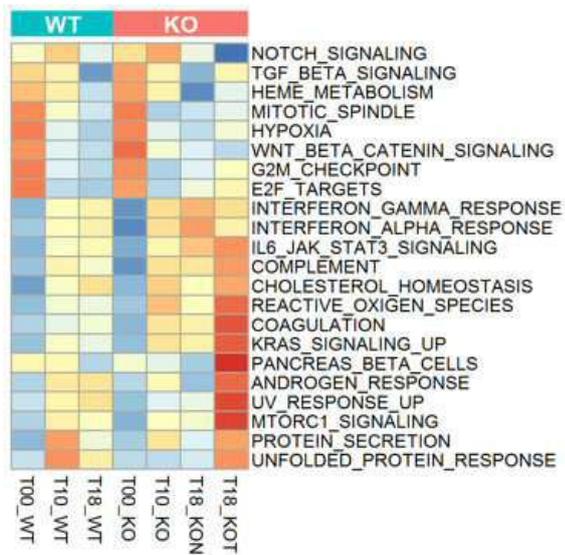
도면12



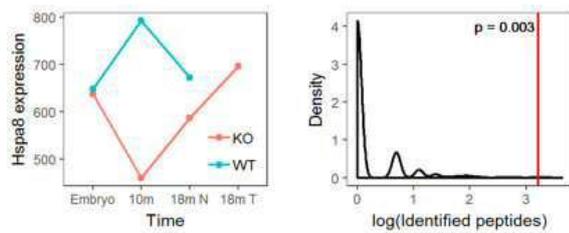
도면13a



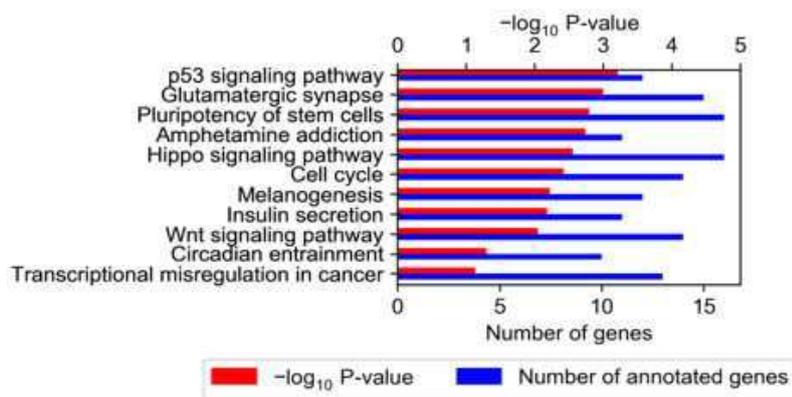
도면13b



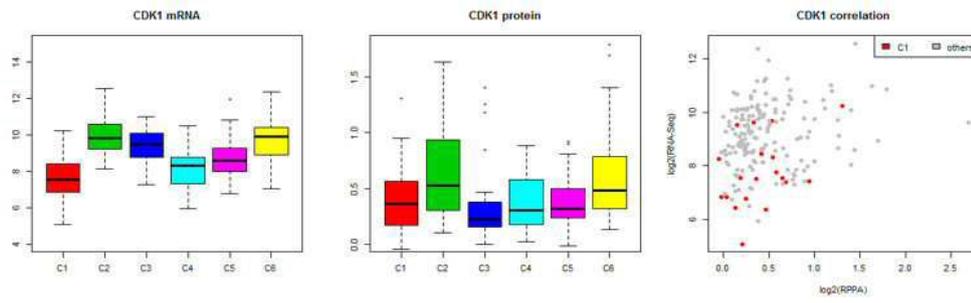
도면13c



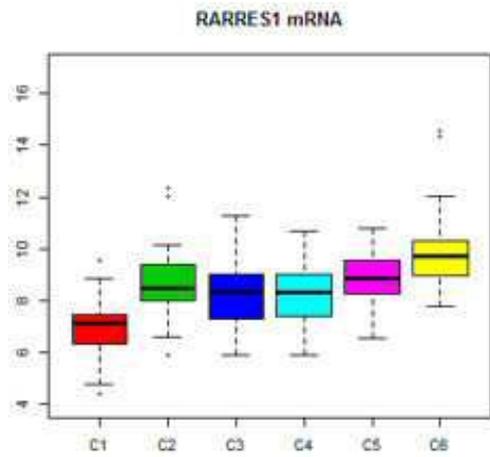
도면13d



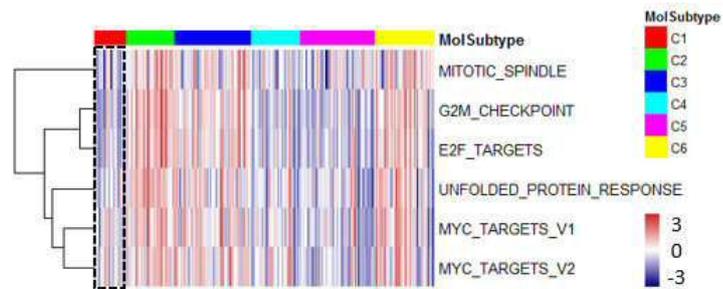
도면14a



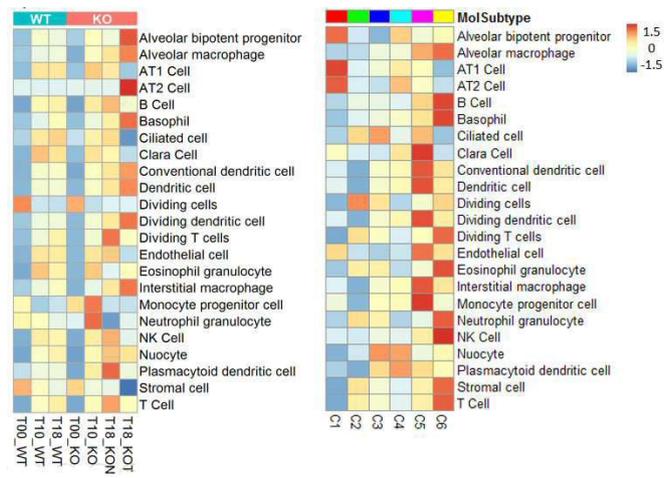
도면14b



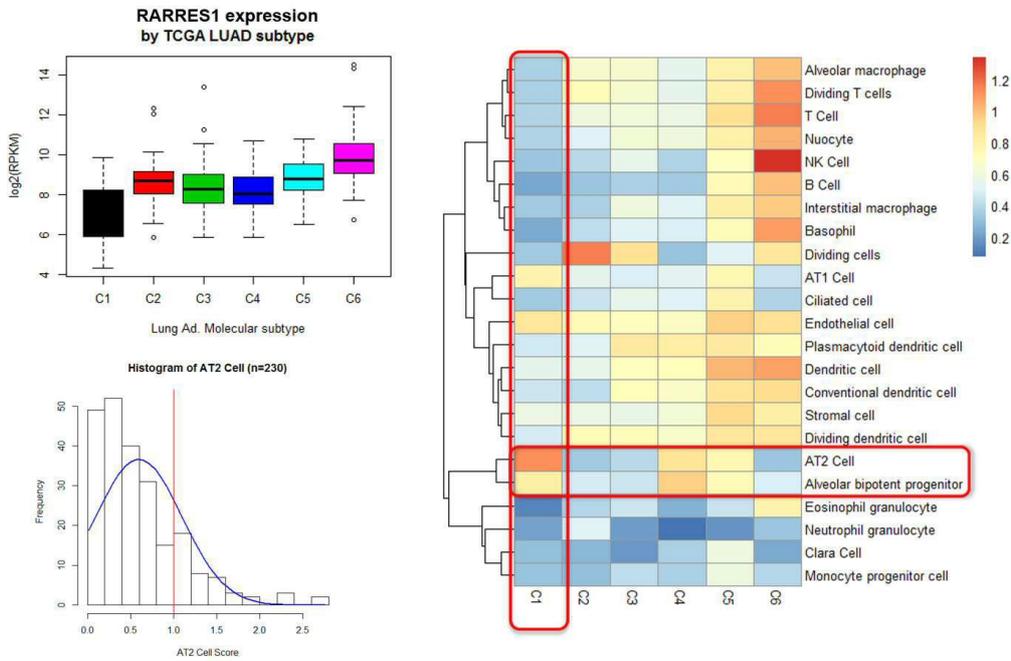
도면14c



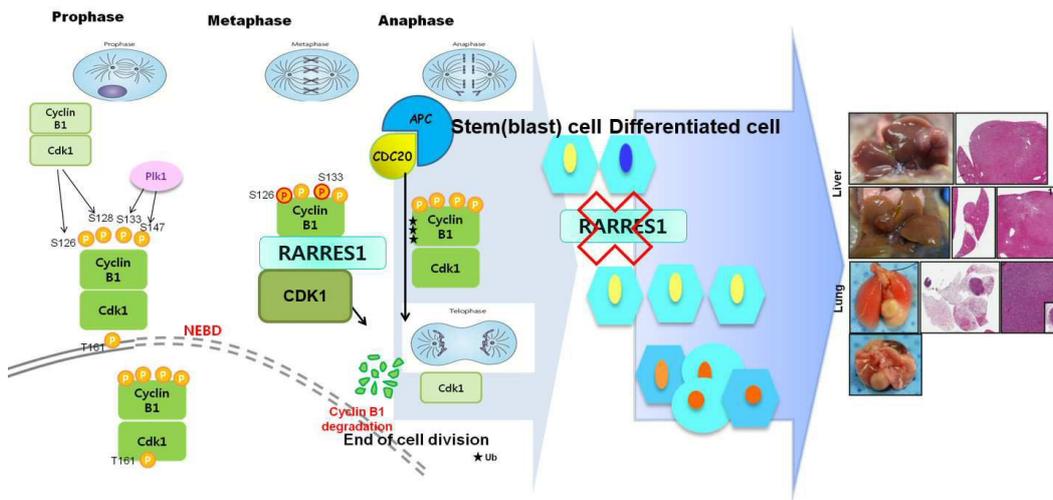
도면14d



도면14e



도면15



서열 목록

- <110> National Cancer Center
- <120> Retinoic acid receptor responder 1(RARRES1) gene knockout animal model and method for its production
- <130> MP18-188
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Rarres1-F
- <400> 1
- gcgctgcaact tcttcaactt 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Rarres1-R
- <400> 2
- gccatagctg atgcttccat 20
- <210> 3

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gapdh-F
 <400> 3
 tgcaccacca actgctta 18
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gapdh-R
 <400> 4
 ggatgcaggg atgatgttc 19
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> KO-1F
 <400> 5
 ctgggttcta gccagtttac agtt 24
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ex3-R
 <400> 6
 actcagcttt gggtagcatt agtc 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F4
 <400> 7
 cagttggtct ggtgtcaaaa ataa 24

<210> 8

<211> 24

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KO-2R

<400> 8

ctcaggttct agacttcct gaaa

24