

연차 보고서(2차)

사업명	KAIST Grand Challenge 30 Project		
과제명	(국문) 비가역적 생명현상을 가역화 할 수 있을까?		
	(영문) Can we reverse irreversible biological processes?		
연구책임자	조 광 현	소 속	바이오및뇌공학과
총수행기간 (1단계)	2017. 05. 01. ~ 2021. 12. 31. (4년8개월)		
당해연도 협약기간	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31. (1년)		
당해연도 사업비(원)	25,000,000		

자체연구협약서(KAIST Grand Challenge 30 Project)제5조에 의거하여
연차보고서 2부를 제출합니다.

2019 년 1 월 15 일

연구책임자: 조 광 현



한국과학기술원 총장 귀하

I. 해당 연도 추진 현황

I-1 기술개발 추진 내용

대부분의 생명현상은 자연상태에서 비가역적(irreversible)이다. 간혹 우연한 발견을 통해 가역화(reversion)되는 현상이 보고된 바 있지만 그 메커니즘이 밝혀진 사례가 없으며, 다양한 생명현상의 가역화를 설명할 수 있는 이론 연구는 아직 시도된 바가 없었다. 본 연구는 세포 수준에서의 신호전달경로 제어를 통한 비가역적 생명현상의 가역화를 시도하였다. 일차년도에는 대표적인 비가역 생명현상인 정상세포의 암화 과정을 시스템 차원에서 설명할 수 있는 이론 모델을 최초로 제안하였다. 또한, 제안한 모델에 대장암세포 데이터를 적용하여 암의 특이적 메커니즘을 탐색하였으며, 암의 특징을 잃고 정상세포로 가역화되기 위해서는 암 특이적 강건성(robustness)이 감소되어야 함을 제안하였다. 본 연구의 이차년도인 올해에는 앞서 제안한 암 특이적 강건성을 제어하여 암을 실질적으로 치료할 수 있는 최적의 악성 상태를 설정하고, 이에 대한 가역화 타겟 분석에 연구 초점을 두었다.

암이 가지는 다양한 강건성 중 암의 약물 치료를 가장 어렵게 하는 요소는 외부의 조절 신호에 대한 강건성이다. 암은 악성이 증가하는 과정에서 침윤(invasion), 상피-간엽 전환(Epithelial-mesenchymal transition), 혈관계 순환(vascular circulation), 휴면(dormancy), 재발(reactivation) 및 전이(metastasis) 등의 다양한 상태를 거친다. 이러한 상태들 중 휴면상태는 암세포가 외부의 신호로부터 가장 강건해지는 상태이며, 약물 제어를 통해 세포 사멸(apoptosis)을 유도하는 것이 난해하여 치료 실패 및 암 재발의 주요 원인이 된다. 따라서 휴면 암세포의 여러 암적(cancerous) 특징 중 외부 신호에 대한 강건성을 감소시키는 것은 약물을 통한 암 치료에 반드시 필요한 요구조건이다.

암세포가 정상세포에 비하여 외부 신호에 대한 강건성을 획득하는 과정은 비가역적 현상이다. 암세포는 정상세포의 분자간 상호작용 네트워크에 다양한 돌연변이가 누적되어 발생하는 네트워크 질환이다. 일차년도 연구에서는 이러한 돌연변이 누적이 암세포가 가질 수 있는 표현형을 생존에 유리한 특정 상태로 유도하며 외부 신호에 대한 강건성을 획득함을 확인하였다. 즉, 휴면 암세포의 외부 신호에 대한 강건성 역시 비가역적 암화 과정을 통해 획득한 특성이며, 이를 가역화 제어(reverse control)를 통해 정상세포 수준의 외부 신호에 대한 반응성으로 회복시키면 휴면 암세포의 사멸을 유도할 수 있을 것이다. 따라서 기존의 암세포 사멸 유도 약물과 함께, 휴면 암세포의 비가역적 획득 형질(acquired phenotype)인 외부 신호에 대한 강건성을 가역화하는 약물을 처리하면 암의 재발율을 크게 낮춘 새로운 패러다임의 약물 치료가 가능할 것으로 기대할 수 있다.

이러한 제어 방법의 탐구를 위해 본 연구에서는 우선 휴면 암세포의 상태에 대응시킬 수 있는 순환 암 줄기세포(circulatory cancer stem cell)의 유전 정보

를 수집하고, 이를 원암의 유전 정보와 비교하여 DEG(differentially expressed genes) 분석을 수행하였다. 실제 휴면 암세포의 경우 실험적으로 배양 및 관측이 난해하기 때문에, 보다 쉽게 환자에게서 채취할 수 있는 순환 암 줄기세포가 휴면 암세포의 특성과 유사함에 착안하여 해당 데이터를 사용하였다. 그 결과 휴면 암세포에서 일반적인 암세포와 상이한 발현 정도를 가지는 58개의 분자 리스트를 추출할 수 있었다. 이들 58개 분자에 대하여 해당 순환 암 줄기세포의 암종에 대응하는 폐암에서의 PPI(Protein-protein interaction) 및 RPPA(Reverse phase protein lysate microarray) 데이터 기반 비방향성 네트워크 구조를 추론하면 다음 그림 1. 과 같이 278개의 상호작용 링크를 찾을 수 있다.

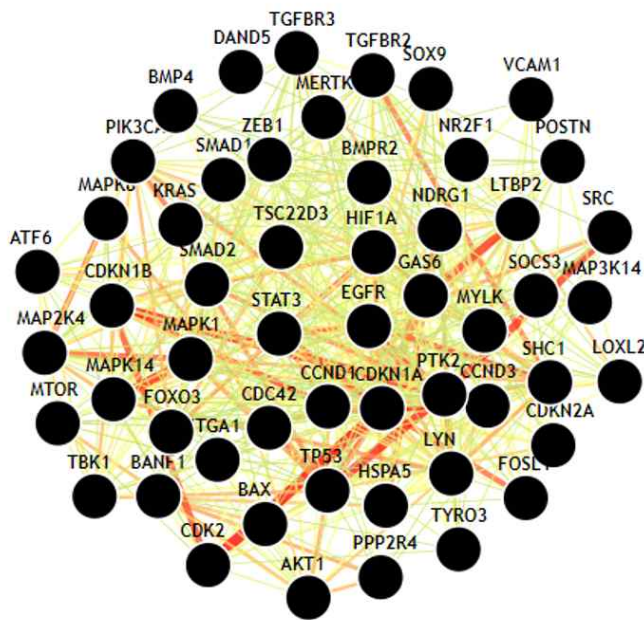


그림 1. 휴면 암세포 특징적 발현 유전자간의 비방향성 상호작용 네트워크

위 방법으로 추론된 비방향성 네트워크 구조는 58개 노드 중 9개(BMP4, EGFR, DAND5, LYN, TGFBR2, TGFBR3, TYRO3, VCAM1, HIF1A)를 입력 노드로 설정하고, 4개의 표현형 출력 노드(세포분열(proliferation), 분열정지(arrest), 휴면(dormant), 사멸(apoptosis))를 추가하여 방향성을 네트워크 구조 데이터베이스로부터 추출할 수 있다. 각 분자간의 상호작용 방향성은 Pathway Commons라는 문헌조사 기반의 분자간 상호작용 네트워크 데이터베이스로부터 추출하여 부여하였으며, 이후 네트워크의 구조를 축소(reduction)시키는 과정을 통해 세포의 모든 끌개(attractor) 상태를 시뮬레이션 가능한 규모로 제작하였다. 이렇게 완성된 휴면 암세포의 분자간 상호작용 네트워크는 다음 그림 2.와 같다.

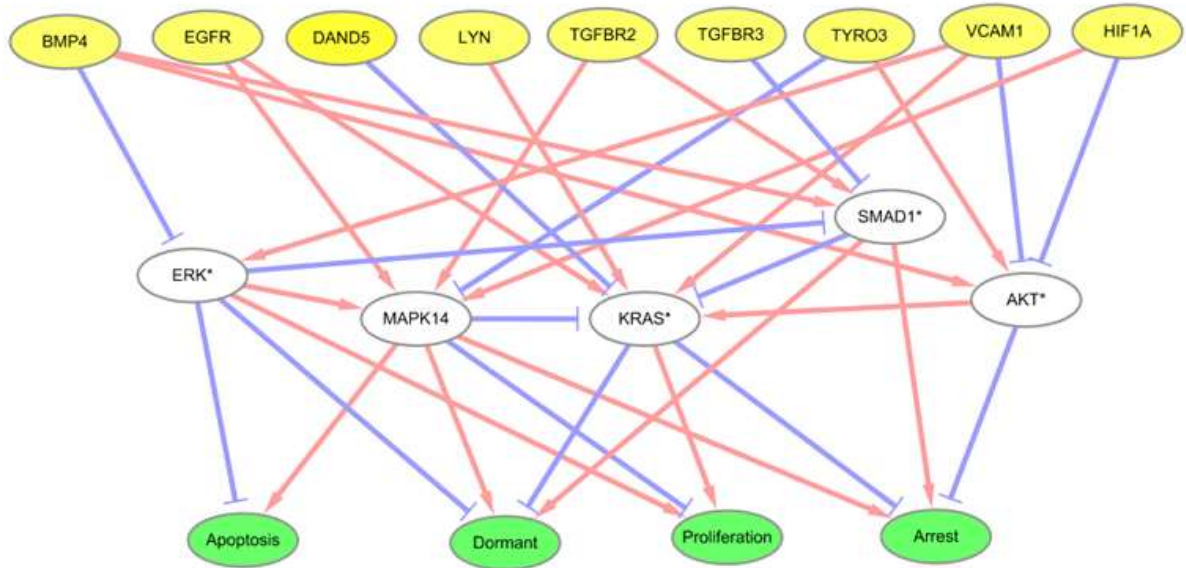


그림 2. 휴면 암세포의 축소된 분자간 입출력 상호작용 네트워크

위 그림에서 볼 수 있듯 네트워크 제작시 설정한 9개의 입력 노드 및 4개의 출력 노드는 유지되도록 네트워크 축소 알고리즘을 구동하였으며, 중간 노드로 남은 5개의 노드는 각각 대표 노드로 이름이 붙어있으나, 실제 분자의 작동 메커니즘이 아닌 신호전달의 중간 노드로 생각할 수 있다. 이와 같이 제작된 네트워크 모델은 유전 알고리즘(genetic algorithm) 및 문헌 기반 수정을 통해 순환 암 줄기 세포의 다양한 환경 조건에 대한 표현형을 재현할 수 있도록 제작되었다.

출력노드로 설정한 네 개의 노드 상태 조합에 따라 해당 네트워크의 상태를 다섯 가지 암세포 상태로 대응시킬 수 있으며, 이들 암세포상태간의 생물학적 변환 과정은 다양한 가역적 및 비가역적 흐름을 통해 다음 그림 3.과 같이 진행된다.

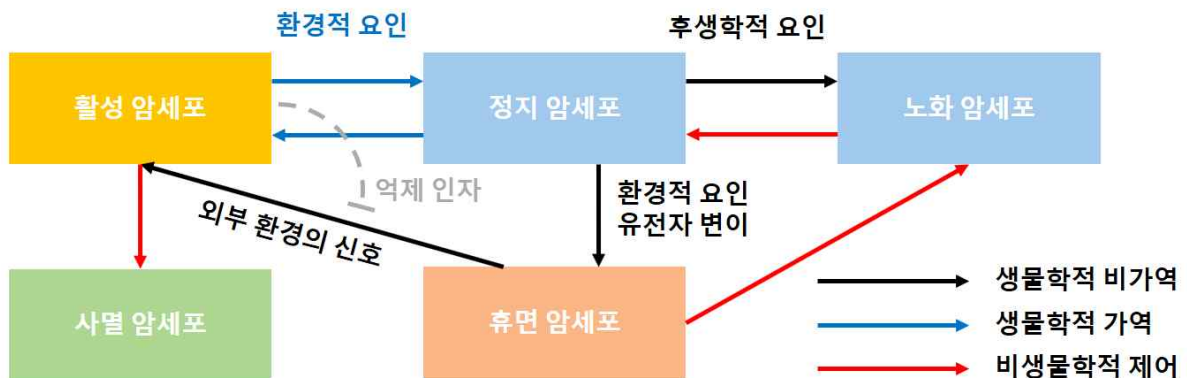


그림 3. 다양한 암세포상태간의 생물학적 변환 과정

일반적으로 휴면 암세포는 전이되기 이전의 원암이 활성화 암세포 (proliferative cancer) 상태로 존재하며 분비하는 억제인자에 의해 활성화되지 않는 상태로 유지된다. 약물 치료를 통하여 활성화 암세포를 사멸 유도할 경우, 분비되던 억제인자가 감소하고 활성화 암세포로 재발하게 된다. 본 연구의 목적은 활성화 암세포에서 분비되는 억제 인자에만 민감하게 반응하고 이외의 환경적 요인에는 강건성을 가지는 휴면 암세포의 특성을 가역화 하여 약물 치료에 대한 반응성을 높이는 것이다.

제작된 네트워크 모델은 다양한 초기조건에 대하여 총 16개의 끝개상태를 가지며, 그림 4.와 같이 활성화 암세포 2개, 정지 암세포(quiescent cancer) 2개, 사멸 암세포(apoptotic cancer) 2개, 휴면 암세포(dormant cancer) 8개에 대응되었다. 노화 암세포(senescent cancer)는 등장하지 않았다.

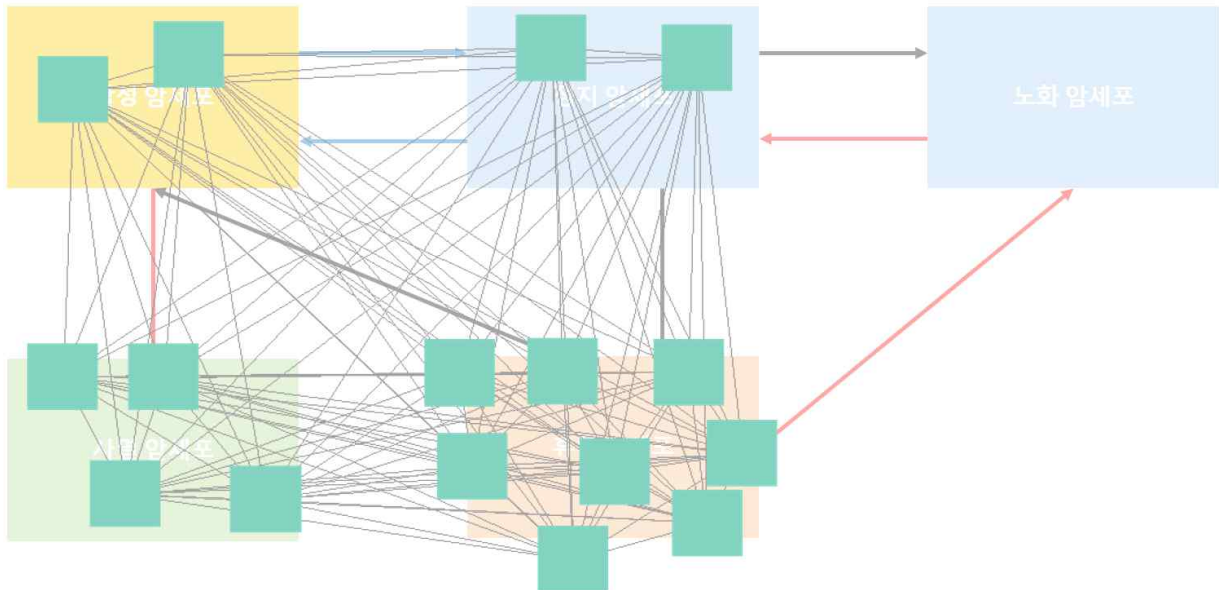


그림 4. 휴면 암세포 네트워크의 16개 끝개 상태의 분포

각 표현형 끝개중 외부 환경에 대한 반응성이 높은 활성화 암세포 및 사멸 암세포를 하나의 그룹으로 설정하고, 외부 환경에 강건한 휴면 암세포 및 정지 암세포를 다른 그룹으로 설정하여, 두 끝개간의 평균적인 노드 활성화도 차이가 크게 발생하는 분자들을 기존 네트워크 구조에서 추출하면 다음 그림 5.와 같다.

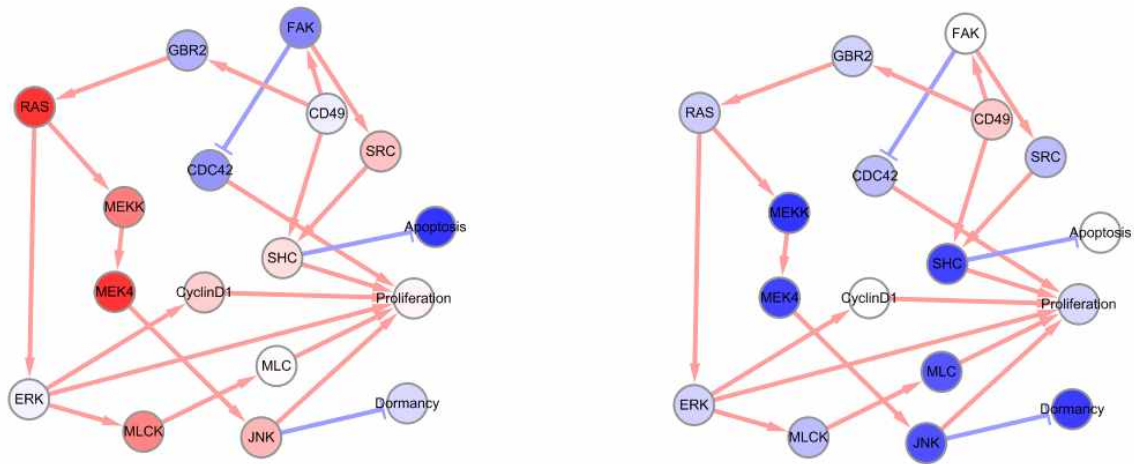


그림 5. 휴면 암세포(좌측) 및 사멸 암세포(우측)간의 활성화 차이 노드 집합

휴면 암세포의 강건성을 낮추고 사멸 및 외부 환경에 민감한 상태를 유도하는 가역화를 진행하기 위해서는, 그림 5.에 등장하는 분자간 상호작용 네트워크의 좌측 상태를 억제하고 우측 상태를 유지할 수 있는 제어 타겟을 찾아야 한다. 두 상태간의 변환을 발생시키기 위한 최소의 제어 노드는 해당 네트워크의 구조가 FAK 및 CD49로부터 선형적으로 신호가 진행되는 종속(cascade) 구조를 가지므로, FAK 및 CD49 두 개로 설정할 수 있다.

I-2 해당 연도 추진 실적

연차 개발 목표	달성 정도
휴면 암세포의 상태를 모사하는 네트워크 모델을 구축한다.	100%
신호전달네트워크의 다이내믹스를 문헌의 실험데이터로 검증한다.	100%
네트워크 모델에 축소 알고리즘을 적용하여 시뮬레이션을 수행한다.	100%
네트워크를 통해 여러 암의 상태를 끝개로 정의한다.	100%
암 표현형 끝개간 전환을 발생시키기 위한 소단위 네트워크를 선별한다.	100%
소단위 네트워크의 상태 가역화를 이룰 수 있는 제어 타겟을 제시한다.	100%

표 1. 본 연차의 개발 목표 목록 및 달성 정도

본 연구의 이년차 개발 목표 및 달성 정도는 다음 표 1. 에 기록된 바와 같다. 사업계획서에서 제안한 연차 개발 목표들 중에서 차년도 연구에 활용될 기반 연구들은 100% 달성도로 모두 잘 정립하였음을 알 수 있다. 휴면 암세포의 외부 환경에 대한 민감성 가역화 제어 타겟의 경우 폐암의 순환 줄기세포 데이터에 한정하여 검색하였으며, 실험적 검증을 완료하지 않은 상태이므로 추가적인 타겟 판별 가능성이 남아있다. 차년도 연구에 다른 암종 및 실험적 검증을 진행하여 이를

보완해야 한다. 암 가역화의 근본 기작 및 소단위의 경우 본 연구에서 확인된 강건성 소단위 이외에도 다양한 암화 및 암 가역화 근본 기작이 존재할 수 있으며 이는 다양한 암종에 따라 달라질 수 있다. 차년도 연구에서는 네트워크 축소 알고리즘을 적용하기 이전의 거대 네트워크에 대하여 구조적 정보를 바탕으로 제어 타겟을 선별하는 방법을 적용해 볼 수 있을 것이다. 암 가역화를 조절하는 일반적인 제어이론을 탐구하는 목표의 경우 본 일년차 연구 결과가 그 실현 가능성을 확인한 수준에 해당한다. 차년도 연구에서는 보다 구체적인 제어이론 및 그 알고리즘을 보다 심도있게 탐구할 것이다.

II. 기술개발결과

해당 사항 없음.

III. 결론 및 차년도 계획

본 연구는 휴면 암세포의 다이내믹스를 재현할 수 있는 신호전달네트워크를 구축 및 검증하였으며, 이를 분석하여 외부 신호에 대한 강건성을 감소시키고 정상세포 표현형으로의 가역화를 유도할 수 있는 제어 타겟을 제안하였다. 휴면 암세포의 신호전달 네트워크 구축 과정은 데이터 기반의 상호작용 추론 및 구조정보 데이터 기반의 방향성 도입, 유전자 알고리즘 기반의 로직 제작 등 선입관 없는(unbiased) 네트워크 구축 기법을 사용하였다. 이는 기존에 잘 알려져 있지 않던 휴면 암세포 내 분자간 상호작용을 추론하여 제작한 최초의 신호전달 네트워크라는 점에서 의의를 가진다. 휴면 암세포는 일차년도 연구에서 밝힌 외부 신호에 대한 강건성을 가장 특징적으로 나타내는 암세포이며, 이 세포의 분자간 상호작용 동역학을 온전히 이해한다면 신호에 대한 민감성을 재획득하는 암 역분화 과정을 가역화하여 암 전이를 치료하는 새로운 치료법을 개발할 수 있을 것이다. 또한, 암세포 상태간의 천이 지도와, 그들의 흐름을 제어할 수 있는 주요 분자간 상호작용을 언급함으로써, 휴면 암세포의 가역화 치료 이외에도 다양한 암종 및 세포 상태 특이적 약물 타겟을 제시할 수 있는 기틀을 제공했다는 의의를 가진다. 본 연구에서 구축한 네트워크 모델은 추후 다양한 제어 타겟 발굴 및 제어 이론(control theory) 개발에 응용될 수 있는 선행연구로 작용함에 큰 의미를 둘 수 있다.

즉, 본 연구에서 제안한 휴면 암세포 네트워크 및 그 분석을 통해 얻어낸 신호 강건성과 관련된 세포 내 제어타겟 및 상호작용 소단위는 이후의 차년도 연구 과정에서 다양한 암종의 발암 과정 및 악성 완화 기작 연구하는 데에 응용될 수 있다. 또한, 본 연구에서는 기존까지 연구되지 않았던 휴면 암세포를 암 가역화 현상을 유도하여 치료하기 위한 새로운 제어 타겟 탐색을 수행함으로써, 분자간 상호작용 소단위의 강건성에 기반한 암화 과정 가역화 근본 기작을 일부 제시하였

다. 이처럼 이차년도 연구 결과는 암 가역화라는 그 기작이 불분명하고 현재의 암 치료 방식과 다른 패러다임인 현상을 다양한 시스템생물학 바탕의 접근 방법을 도입하여 분석할 수 있다는 가능성을 보였음에 큰 의미를 가진다. 결과적으로 지난 일차년도의 네트워크 섭동 결과 정량적 분석 알고리즘 및 이차년도의 섭동분석 기반 및 암 가역화 기작을 바탕으로 차년도 연구에서 암 가역화를 유도하는 보다 근본적인 제어 이론을 제안하고, 이를 실험적으로 검증하여 암 가역화를 유도하는 기술을 보다 심도 있게 탐색할 수 있을 것으로 기대된다.

추가적으로 본 연구에서 구축된 네트워크에 환자의 정보를 반영할 경우 환자 특이적 약물 반응을 예측할 수 있을 것이다. 본 연구에 의하여 휴면 암세포를 특이적으로 가역화하여 약물처리를 통한 치료 가능성이 제시되었으므로, 이를 표적으로 하는 암 악성 완화 약물을 다양한 분자에 대해 추가적으로 밝혀낼 수 있을 것으로 기대된다. 이로써 암세포를 정상적인 표현형으로 변화시키는 제어를 통한 새로운 치료 패러다임을 열 수 있을 것으로 생각된다. 차년도 연구에서는 암세포의 강건성이 여러 네트워크 내 분자 제어에 의해 변화하는 정도를 정량적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하고, 이를 정량적으로 분석하여 다양한 암의 특징 각각을 가역화하여 역분화하는 연구를 수행할 계획이다. 그 결과 얻어진 각 암의 특성별 가역화 신호전달 네트워크 및 분자 타겟을 바탕으로 통합 신호전달 네트워크를 제작한다면, 다양한 환자 및 암종에 대한 여러 암 표현형의 가역화 및 역분화 분석을 자동화된 시스템으로 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 기타

사업계획서 대비 추가로 변경된 내용 없음.