



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士學位論文

간 섬유화 및 재생과정에서

system Xc 의 역할

The Role of System Xc

in Hepatic Fibrosis and Regeneration

2022년 2월

서울대학교 대학원

약학대학 약물학 전공

김 현 영

약학박사 학위논문

간 섬유화 및 재생과정에서
system Xc 의 역할

The Role of System Xc
in Hepatic Fibrosis and Regeneration

2022 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

김 현 영

간 섬유화 및 재생과정에서
system χ_c 의 역할

The Role of System χ_c
in Hepatic Fibrosis and Regeneration

지도교수 강 건 욱

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함
2021 년 12 월

서울대학교 대학원
약학과
김 현 영

김현영의 약학박사 학위논문을 인준함
2022 년 2 월

위 원 장 이 승 희 (인)

부위원장 구 자 현 (인)

위 원 김 상 건 (인)

위 원 김 상 겸 (인)

위 원 강 건 욱 (인)

국문요약

간 섬유화 및 재생과정에서 system X_c 의 역할

The Role of System X_c in Hepatic Fibrosis and Regeneration

김 현 영

지도교수: 강 건 옥

혈중 pH 조건에서 시스테인(cysteine)은 시스틴(cystine) 이온 형태로 존재한다. System X_c 는 이러한 시스틴을 세포 내로 유입시키고 세포 내 글루타메이트를 세포 밖으로 배출하는 아미노산 수송체이다. System X_c 를 통하여 세포 내로 이동한 시스틴은 시스테인으로 전환되어 세포 내 항산화 과정 및 세포성장에 필수적인 글루타치온(glutathione)의 합성에 사용된다. System X_c 는 빠르게 자라나는 암세포의 산화적 스트레스를 조절하는데 중요한 역할을 하기 때문에 system X_c 를 억제하는 다수의 약물들이 항암제로 보고된 바 있다.

본 연구자는 system X_c 를 통해 세포 내로 유입되는 시스틴이 증식하는 정상세포에서도 중요하다는 가정 하에 간 전구세포(liver progenitor cell), 간암세포 및 간의 비실질세포에서의 system X_c 역할을

연구하였다. 분화가 완료된 간세포는 더 이상 분열하지 않으며, 메티오닌을 시스테인으로 전환하는 황 전환경로가 잘 발달되어 있어 system Xc 를 통한 시스테인의 유입에 대해 의존도가 낮다. 하지만 심각한 급성 간 손상 시에 나타나는 수복과정에서는 간 전구세포가 활발히 분열하고, 만성 간 손상 시에는 대식세포와 간 성상세포를 포함하는 비실질세포가 간에서 분화 및 증식하게 된다. 본 연구에서는 급성 및 만성적 손상을 입은 간에서 간을 구성하는 세포들의 산화적 스트레스 조절기전에서 system Xc 의 역할을 구명하였다.

위장관암에서 system Xc 가 암 줄기세포 지표로 알려진 CD (cluster of differentiation) 44 와 결합하여 세포 내 시스테인 공급에 중요한 역할을 한다고 보고되었다. CD44 는 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함한 세포 외 기질에 결합하는 막 단백질로 임상적으로 급성 간염이나 간염바이러스 감염을 포함하는 손상된 간 조직에서 발현이 증가한다고 관찰되었다. 간은 심각한 급성 손상 후 간 전구세포를 이용한 재생 과정을 통하여 그 기능을 회복한다. 간 전구세포는 분화된 간세포와는 다르게 증식할 수 있으며, CD44 를 포함하는 줄기세포 지표들을 발현한다. 본 연구자는 재생하는 간 세포를 이용하여 세포 손상 시 CD44 를 매개로 한 system Xc 의 활성 증가를 급성 간 손상 모델에서 입증하고, 이에 대한 분자적 기전을 구명하고자 하였다. 간 전구세포에서 높게 발현되는 CD44 는 세포막에서 system Xc 의 구성요소인 xCT 단백질을 안정화시켜 세포 내 시스테인 공급을 증가시켰다. 증식하는 정상 간 세포주에서 CD44 를 결손시킬 경우, 세포

내 GSH 가 감소하고 산화적 스트레스가 증가하였으며, 간세포의 성장속도가 감소하였다.

한편 간 전구세포에서 CD44 가 세포의 system *Xc* 에 대한 의존도를 증가시킨다는 연구결과를 바탕으로, 간암세포의 CD44 발현 수준을 이용하여 항암 후보물질로 활발히 연구되고 있는 system *Xc* 억제제에 대한 반응성을 예측할 수 있다는 사실을 확인하였다. System *Xc* 가 억제되면 세포 내 시스테인이 고갈되고, 이에 따라 세포 내 축적된 활성산소는 지질 과산화를 동반하는 페로토시스(ferroptosis)를 유발한다. 다양한 간 유래 세포를 이용하여 CD44 의 발현과 system *Xc* 억제제를 처리하였을 때 페로토시스가 일어나는 정도를 비교분석 하였다. 이를 통하여 간 유래 세포에서 CD44 의 발현이 system *Xc* 억제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 지표임을 확인하였다.

만성적으로 간이 손상되는 경우에는 간에서 정상세포와 대식세포가 활성화 되고 증식한다. 본 연구에서는 간 섬유화 전단계인 간염 환자의 간 조직에서 system *Xc* 의 구성요소인 xCT 단백질 발현이 높다는 점을 확인하였다. 따라서 간 섬유화 모델에서는 비실질세포에서 system *Xc* 억제약물의 간 섬유화 치료제로서의 가능성을 연구하였다. System *Xc* 의 기능을 차단하기 위해 미국 FDA (US Food and Drug Administration) 에서 류마티스 치료제로 승인한 오라노핀(auranofin)을 사용하였다. 오라노핀은 저농도에서부터 system *Xc* 의 기능을 억제하였다.

NLRP3 인플라마좀(inflammasome)은 NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3), ASC (associated speck-like protein containing a CARD) 와 procaspase-1 으로 이루어진 다량체 단백질 복합체로서, 인터루킨(Interleukin-) 1 β 를 포함한 염증성 사이토카인(cytokine) 분비와 염증 형태의 세포사멸과정인 pyroptosis 를 매개한다. NLRP3 인플라마좀의 활성화는 간에서 섬유화 진행을 매개한다고 보고되었다. 간 섬유화 진행에서 system Xc 를 차단하였을 때 비실질세포에서 특이적으로 발생하는 활성산소 생성은 NLRP3 인플라마좀의 활성을 감소시켰다. 오라노핀은 인플라마좀 활성을 억제하여 대식세포의 염증성 사이토카인 분비, 염증성 세포사멸과 간 정상세포의 이동능을 감소시켰다. 반면, 오라노핀은 세포 내 기저 GSH 수준이 높은 간세포에서는 산화적 스트레스를 유발하지 않았다. 오라노핀의 간 섬유화 억제효과를 티오아세트아미드(thioacetamide)에 의해 유도된 간 섬유화 모델에서 확인하였다. 또한 본 연구에서 확인한 기전을 바탕으로 오라노핀의 간 섬유화 억제효과를 매개하는 활성대사체로서 aurocyanide 를 규명하였다.

본 연구결과를 종합하면, 간에서 증식하는 세포들은 system Xc 를 통해 유입된 시스틴에 대한 의존도가 높다. 세포 내로 유입된 시스틴은 시스테인으로 환원되어 세포의 산화적 스트레스를 조절하고, 세포 증식에도 관여한다. 본 연구는 병리상황에서 증식이 활발한 간 전구세포, 간암세포 및 간의 비실질세포에서 system Xc 의 역할을 규명하는데 초점을 맞추었다. 그 결과로서 간 전구세포에서는 CD44 의 발현증가가

system Xc 활성증가를 매개한다는 사실을 밝혔다. 이를 바탕으로 간암세포에서는 system Xc 억제제에 대한 민감도를 예측하기 위한 지표로서 CD44 의 활용가능성을 제시하였다. 또한 간 섬유화 시 활성화되고 증가하는 대식세포 및 간 정상세포에 있어서 system Xc 억제제인 오라노핀이 섬유화를 개선할 수 있다는 사실을 확인하였다.

본 연구에서 구명한 새로운 약리기전을 통해 오라노핀의 간 섬유화에 대한 약물로의 신약 재창출(drug repositioning)을 기대할 수 있다. 실제로 위의 실험결과들을 바탕으로 하여 오라노핀은 간 섬유화를 동반한 비알콜성지방간염의 치료제로 IND (Investigational New Drug) 승인 및 임상 2 상의 진행단계에 있다. 또한 이러한 약리기전을 바탕으로 오라노핀의 인체 내 활성대사체로서 aurocyanide 를 지정하였다. Aurocyanide 는 구조가 단순하여 신약전구물질로의 사용은 어려울 것으로 예상되지만 오라노핀의 효과를 예측하는 지표로서 추후 활용이 기대된다. 하지만 본 연구결과에 따르면 system Xc 의 억제가 간 전구세포에 미치는 영향을 고려하였을 때, 간의 재생과정이 회복에 중요한 간 질환에 있어서는 오라노핀을 포함한 system Xc 억제제의 사용이 제한될 수 있다는 점도 보여준다. 그러므로 기존에 보고된 간 질환들의 병리기전과 본 연구에서 규명한 system Xc 의 역할을 바탕으로, 향후 간 질환의 치료표적으로서 system Xc 를 활용할 수 있을 것으로 예측된다.

주제어: system Xc , 시스틴, 간 섬유화, 간 재생, 오라노핀

목차

국문요약.....	i
목차	vi
List of figures	x
List of abbreviations	xii
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	14
1. 시약 및 재료.....	14
2. 인체조직 및 시료	15
3. 세포 배양	16
4. 마우스의 일차배양세포 분리 및 배양	17
4-1. 간세포(hepatocyte) 분리	17
4-2. 간 성상세포(hepatic stellate cell) 분리	18
4-3. 쿠퍼세포(Kupffer cell) 분리	18
4-4. 간 전구세포(liver progenitor cell) 배양	19
4-5. 골수 유래 대식세포(bone marrow derived macrophage) 배양	19
5. 세포 분획법	20
6. 면역화학적 분석.....	21
7. RNA 분리 및 RNA-sequencing 과 real-time qPCR ...	22

8. 형질도입	25
8-1. small interfering RNA (siRNA)를 이용한 녀다운 모델 구축	25
8-2. CRISPR-cas9 시스템을 이용한 녀아웃 모델 구축	26
9. 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화 모델	26
10. 아세트아미노펜 유도 간 손상 모델	27
11. 조직병리학적 분석	28
12. 혈청 (serum) 분석	28
13. 면역침강법 (immunoprecipitation)	29
14. 리포터 유전자 분석	29
15. Caspase-3/7 활성 평가	30
16. 공초점 현미경 분석.....	30
17. 세포 분석법	31
17-1. 세포사멸 분석법	31
17-2. IncuCyte [®] ZOOM live-cell 분석법	32
18. 동위원소 분석	32
19. 유세포 분석	33
20. 글루타메이트 정량	34
21. 글루타치온 정량.....	34
22. 지질 과산화 (lipid peroxidation) 정량	34
23. 통계처리	35

Ⅲ. 연구결과	36
1. 간 재생과정에서 system <i>Xc</i> 의 역할 연구	36
1-1. 마우스의 재생하는 간 세포에서 CD44의 발현이 증가한다.	36
1-2. CD44는 세포막에서 xCT를 안정화하여 system <i>Xc</i> 의 활성을 증가시킨다.	43
1-3. 아세트아미노펜을 투여한 마우스에서 분리한 간세포는 system <i>Xc</i> 활성에 높은 의존도를 나타낸다.	51
1-4. 간 손상 후 CD44를 매개로 한 system <i>Xc</i> 의 활성증가가 간 재생과정에 중요하다.	54
2. 간암 세포주에서 CD44와 system <i>Xc</i> 의 상관성 연구	61
2-1. 마우스의 재생하는 간 세포에서 CD44의 발현이 증가한다.	61
2-2. 간암 세포주에서 CD44의 발현과 system <i>Xc</i> 억제제에 대한 반응성은 긴밀한 상관관계를 가진다.	65
3. 간 섬유화 과정에서 system <i>Xc</i> 의 역할 연구	69
3-1. 간 섬유화 과정에서 system <i>Xc</i> 의 발현이 증가한다.	69
3-2. 오라노핀은 system <i>Xc</i> 의 활성을 억제하여 세포 내 GSH를 고갈시킨다.	72
3-3. 활성산소는 인플라마좀 활성을 억제한다.....	75
3-4. 오라노핀은 인플라마좀 활성을 억제한다.....	78

3-5. 오라노핀 처리에 의해 간 정상세포의 이동능이 감소한다.....	84
3-6. 간세포는 오라노핀 처리에 의한 GSH 고갈과 인플라마좀 반응성이 낮다.	87
3-7. 오라노핀은 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화를 저해한다.....	90
3-8. Aurocyanide 는 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화를 저해한다.....	93
IV. 고찰	98
V. 참고문헌.....	109
VI. Abstract.....	117

List of figures

Figure 1. System <i>Xc</i> and glutathione	2
Figure 2. Cysteine source in the liver.....	3
Figure 3. LPC–mediated liver regeneration.....	4
Figure 4. Progenitor cells in liver regeneration.....	6
Figure 5. Mechanism of ferroptosis	8
Figure 6. Hepatic cells in liver injury.....	9
Figure 7. Multi–hit mechanism of liver fibrosis.....	10
Figure 8. NLRP3 inflammasome	12
Figure 9. Increase of CD44 in regenerative hepatocytes	38
Figure 10. Distribution of CD44–expressing hepatocytes	40
Figure 11. CD44–expressing hepatocytes proliferate.....	41
Figure 12. Knockdown of CD44 inhibits system <i>Xc</i> activity	46
Figure 13. CD44 stabilizes xCT in the cell membrane and contributes to cysteine homeostasis	48
Figure 14. APAP increases xCT expression in plasma membrane and promotes extracellular cystine uptake	52
Figure 15. Administration of IKE inhibits APAP–induced liver regeneration	56
Figure 16. Regeneration is abrogated in hepatocyte–specific CD44 knockdown mice.....	58

Figure 17. The role of system <i>Xc</i> in regenerative hepatocyte	60
Figure 18. Sensitivity to erastin–induced ferroptosis	63
Figure 19. CD44 expression is correlated to ferroptosis sensitivity.....	67
Figure 20. System <i>Xc</i> is upregulated in profibrotic conditions	70
Figure 21. Auranofin inhibits system <i>Xc</i>	73
Figure 22. ROS generation inhibits activation of NLRP3 inflammasome.	76
Figure 23. Auranofin inhibits NLRP3 inflammasome–mediated IL–1 β release	79
Figure 24. Auranofin inhibits pyroptosis and induces apoptosis in macrophages.....	82
Figure 25. Auranofin inhibits migratory ability of activated HSCs.....	85
Figure 26. Hepatocytes are resistant to the effect of auranofin	88
Figure 27. Auranofin inhibits thioacetamide–induced liver fibrosis.....	91
Figure 28. Aurocyanide inhibits thioacetamide–induced liver fibrosis.....	95
Figure 29. Knockdown of CD44 using lentiviral injection	103
Figure 30. Schematic figure of system <i>Xc</i> and aurnaofin	108

List of abbreviations

4F2hc: 4F2 cell–surface antigen heavy chain

ALB: Albumin

ALT: Alanine transaminase

AML12: Alpha mouse liver 12

APAP: Acetaminophen (N–acetyl–para–aminophenol)

APC: Allophycocyanine

ASC: Associated speck–like protein containing a CARD

AST: Aspartate transaminase

ATF4: Activating transcription factor 4

ATP: Adenosine 5'–triphosphate

BMDM: Bone marrow derived macrophage

CD44: Cluster of differentiation 44

CHX: Cycloheximide

DILI: Drug–induced liver injury

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

FDA: US Food and Drug Administration

GAPDH: Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase

GEO: Gene Expression Omnibus

GFP: Green fluorescent protein

GSH: Glutathione

GPX: Glutathione peroxidase

H&E: Hematoxylin and eosin

HA: Hyaluronic acid

HCC: Hepatocellular carcinoma

HCV: Hepatitis C virus

LPC: Liver progenitor cell

HSC: Hepatic stellate cell

HMGB1: High mobility group 1

IHC: Immunohistochemistry

IKE: Imidazole ketone erastin

IL-: Interleukin-

KO: Knockout

KD: Knockdown

NLRP3: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3

LV: Lentivirus

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

Diphenyltetrazolium Bromide

MCSF: Macrophage colony-stimulating factor

NAC: N-Acetyl-cysteine

NASH: Nonalcoholic steatohepatitis

NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease

NRF2/ARE: Nuclear erythroid 2-related factor 2/Antioxidant response element

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PCR: Polymerase chain reaction

PH: Partial Hepatectomy

PLP: Pyridoxal phosphate

ROS: Reactive oxygen species

shRNA: Small hairpin RNA

siRNA: Small interfering RNA

SLC7A11: Solute carrier family 7 member 11

SLC3A2: Solute carrier family 3 member 2

t-BHP: *tertiary*-butyl hydroperoxide

TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1

Trx: Thioredoxin

TrxR: Thioredoxin Reductase

I. 서론

System Xc는 경사슬인 xCT와 중사슬인 4F2hc (4F2 cell-surface antigen heavy chain)로 구성된 단백질로서 아미노산 수송체이며 면역계와 중추신경계 및 암세포에서 발현이 높게 나타난다(1). 생리학적 pH 조건에서 혈중의 시스테인(cysteine)은 극성 시스틴(cystine) 이온 형태로 존재한다. System Xc는 이러한 혈중 시스틴을 세포 내로 유입시키고 세포 내 글루타메이트(glutamate)를 세포 밖으로 배출한다(2). 글루타메이트는 신경조직에서 흥분성 신호전달에 관여하는 대표적인 아미노산이기 때문에 중추신경계에서의 system Xc는 주로 글루타메이트의 조절과 관련하여 연구되었다. 특히 system Xc는 뉴런에 흡수된 글루타메이트를 다음 신호전달을 위하여 뉴런 밖으로 내보내는 역할을 한다고 보고되었다(3, 4).

반면 면역세포 및 다수의 암세포에서는 system Xc를 통하여 세포 내로 이동한 시스틴이 환원 형태인 시스테인으로 빠르게 전환되어 글루타치온(glutathione)의 합성에 사용된다고 보고되었다(5). 글루타치온은 인체의 모든 세포에서 항산화 역할을 하는 펩타이드로 글루타메이트, 시스테인과 글리신(glycine)의 세 가지 아미노산으로 구성된다(Fig. 1). System Xc는 빠르게 자라나는 암세포의 산화적 스트레스를 조절하는데 중요한 역할을 하기 때문에 이를 억제하는

다수의 약물들이 항암제로 보고된 바 있다(6, 7). 특히 위장관암에서 system Xc 가 암 줄기세포 지표로 알려진 CD (cluster of differentiation) 44와 결합하여 세포 내 시스테인 공급에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(8).

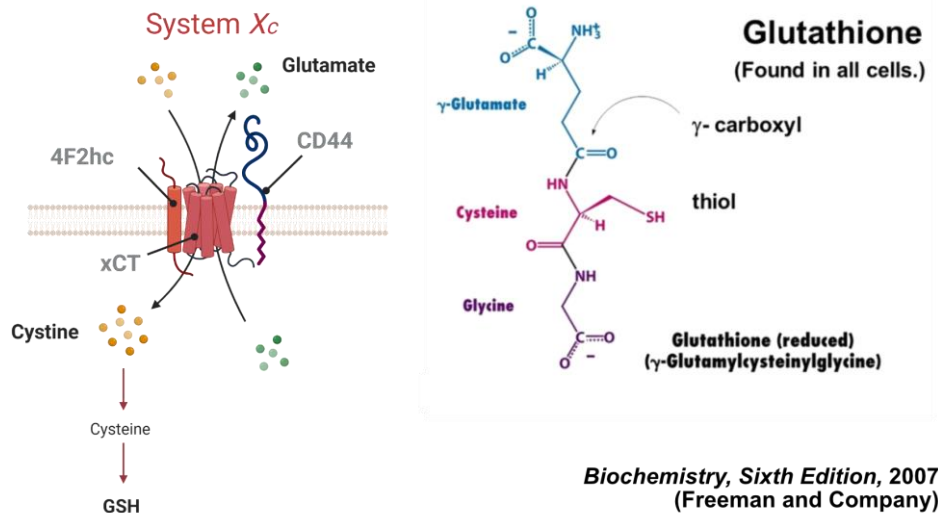


Figure 1. System Xc and glutathione

CD44 는 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함한 세포 외 기질에 결합하는 막 단백질이다(9). CD44 는 췌장암과 난소암을 포함하는 고형암에서 상피-간엽전이(epithelial to mesenchymal transition) 및 암세포의 전이에 관여한다고 알려져 있다(10, 11). CD44 는 세포분열을 하지 않는 분화된 간세포에서는 발현하지 않지만, 분열이 활발한 간 전구세포(liver progenitor cell) 및 간암세포에서는 높게 발현한다(12, 13). 급성 간염이나 post-hepatitis C virus (HCV)를 포함하는 심각한 간 손상 진단을 받은 환자의 간 조직 표본에서 CD44 의 발현이 확인되었다(14). 또한 CD44 의 유전적 다형성(polymorphism)이

아세트아미노펜 과다복용에 의한 간 손상 정도에 중요한 역할을 한다고 임상적으로 보고된 바 있다(15). 이처럼 유의미한 CD44 의 발현이 재생이 필요한 간 조직 임상시료에서 관찰 되었으므로 CD44 가 간의 재생에 어떠한 역할을 하는 지에 대해 연구를 진행하였다.

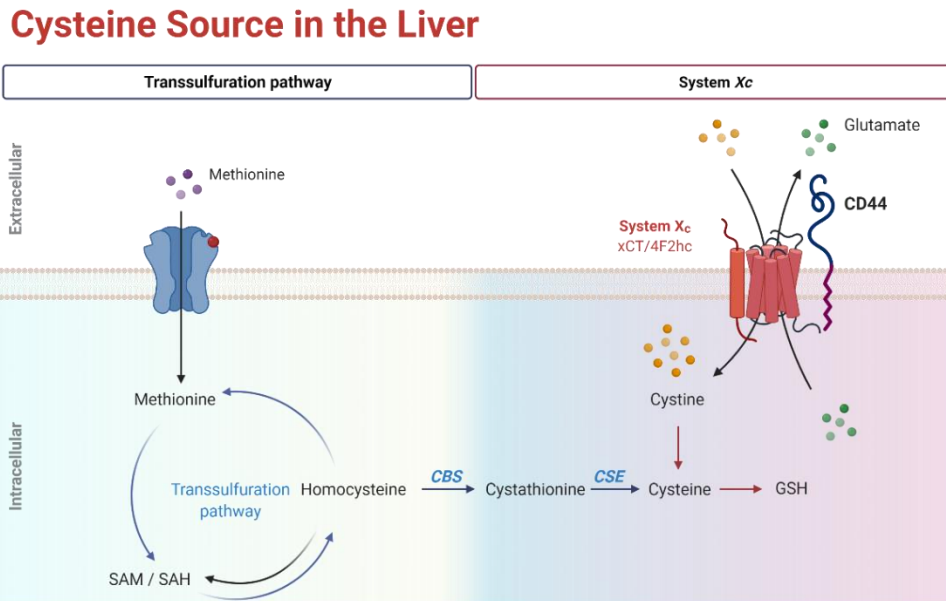


Figure 2. Cysteine source in the liver

본 연구자는 system Xc 를 통해 유입되는 시스틴이 암세포뿐만 아니라 증식하는 정상세포에서도 중요한 역할을 할 것이라는 가정 하에 본 실험을 진행하였다. 특히 간 전구세포에서 나타나는 CD44 의 발현이 system Xc 의 활성을 증가시킬 것이라고 예측하였다. 분화가 완료된 간세포에는 메티오닌(methionine)을 시스테인으로 전환하는 황 전환경로가 잘 발달해 있어서 system Xc 를 이용한 시스틴의 유입에 대한 분화된 간세포의 의존도는 낮다(Fig. 2)(16). 하지만 심각한 급성 간 손상 시 이를 복구하기 위하여 간 전구세포가 활발히 분열하고,

만성적인 손상 시에는 대식세포와 간 성상세포를 포함하는 비실질세포가 간에서 분화 및 증식하게 된다. 본 연구에서는 이러한 급성 및 만성적 손상 후 간을 구성하는 세포들의 산화적 스트레스 조절기전에서 system Xc와 CD44의 역할을 규명하였다.

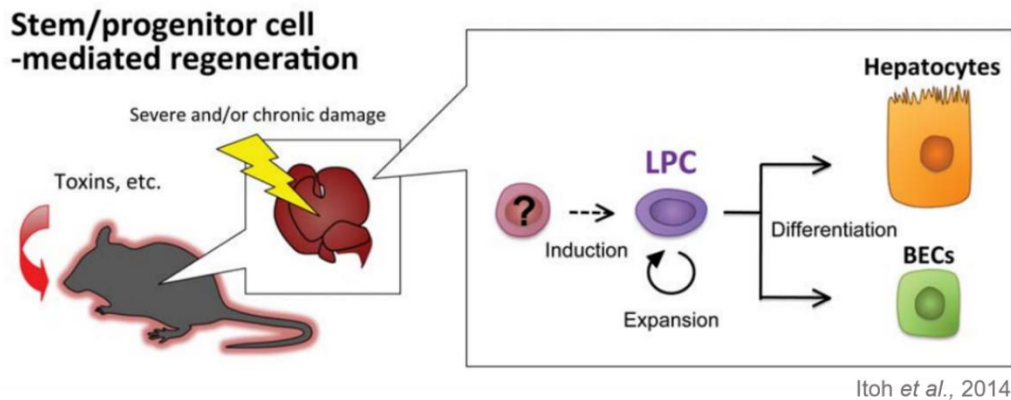
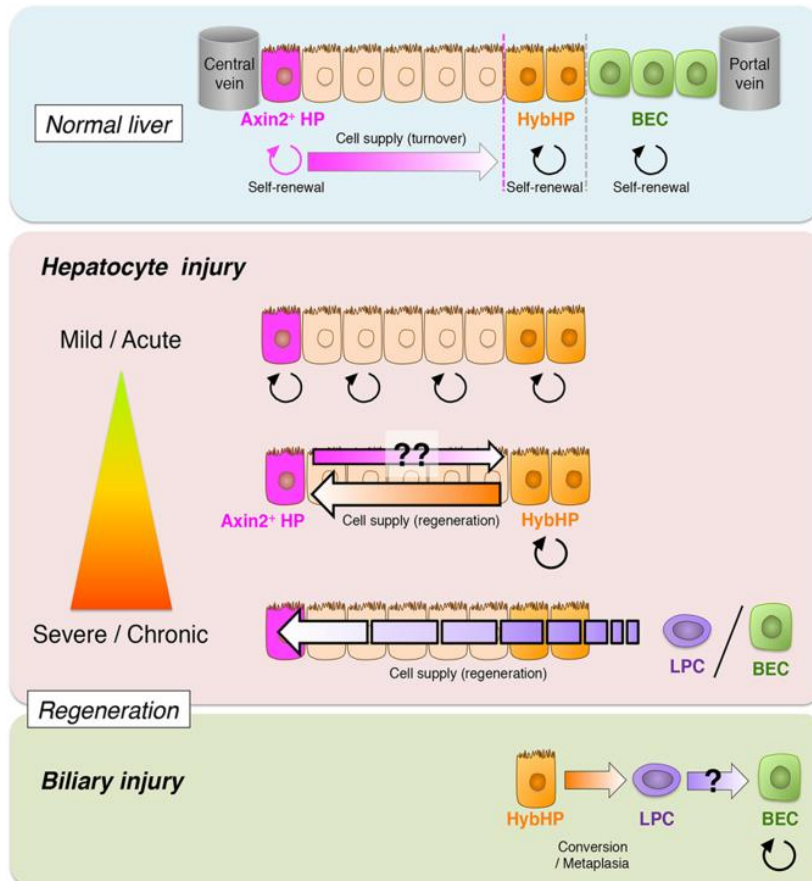


Figure 3. LPC-mediated liver regeneration

간은 절제 및 손상에 대해 재생(regeneration)이 가능한 장기이며 이러한 재생 과정은 일차적으로 간세포의 분열을 통해 나타난다(17). 현재까지 간 전구세포를 특징지을 수 있는 지표들에 대한 다수의 연구들이 발표되었다(18-20). 하지만 간 손상을 유도하는 자극원에 따라서 간 전구세포의 특징이 다양하여 이를 정의할 수 있는 지표를 찾기에는 어려움이 있었다. 간소엽(hepatic lobule)은 간을 구성하는 기본단위이며 중심정맥(central vein)을 중심으로 방사상 구획(zone 1-3)으로 나누어진다. 간에 손상을 가한 후 분화 및 증가하는 간세포를 fate mapping 기법을 이용하여 확인한 결과, 간 손상 모델에 따라 간 재생에 기여하는 구획이 다르다는 사실을 확인할 수 있었다(21). 또한 간 손상 모델에 따라 회복과정에 관여하는 간 전구세포의 유래가

다르다는 사실을 lineage tracing 기법으로 확인할 수 있었다. 사염화탄소로 마우스에 급성 간 손상을 유도한 경우 일부 간세포가 증식하여 간 전구세포로서 간 손상을 회복한다(22). 반면 CDE (choline-deficient ethionine-supplemented diet) 식이로 마우스에 간 손상을 유도한 경우 담도상피세포(biliary epithelial cell)로부터 유래한 간 전구세포가 회복과정에 기여한다(19, 23). 이처럼 간을 수복하는 과정에서 증식하는 세포들은 다양한 기원(origin)을 가지고 있다.

따라서 최근연구에서는 간 전구세포를 간 손상 시 실질세포의 회복에 도움을 주는 분열 가능한 세포로 포괄적으로 정의하고 있다(Fig. 3)(24, 25). 즉, 간 전구세포는 간 손상 시 활성화 되어 간의 실질세포(담관세포 또는 간세포)로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. 또한 유전자 및 단백질의 발현지표들을 이용하여 간 전구세포인지를 확인하기 위해서는 간 손상을 유도하기 위해 사용된 모델과 해당 모델에서 보고된 간 전구세포의 지표들에 대한 종합적인 검토가 필요하다(21).



Itoh *et al.*, 2016

Figure 4. Progenitor cells in liver regeneration

중등도 이하 수준의 간 손상의 경우 일부 간세포가 스스로 분열하여 빠르게 손상된 세포를 복구한다. 하지만 간세포 분열만으로 손상을 회복하기 어려운 심각한 간 손상의 경우, 간 전구세포의 활성화가 간의 수복과정을 도와준다(Fig. 4). 간 절제술(80% 이상의 간 절제) 및 과용량의 아세트아미노펜 투여에 의한 급성 손상 후 간 전구세포가 활성화된다(18, 26). 이 때 나타나는 간 전구세포는 분화된 간세포와는 다르게 증식하여 손상된 간 실질세포의 회복에 도움을 준다(13).

본 연구자는 심각한 간 손상 시 나타나는 증식하는 간 세포를 이용하여 CD44를 매개로 한 system Xc 의 활성화 증가를 밝혔다. 이를 바탕으로 간 재생 과정 중 시스템인 공급에 있어서 system Xc 에 대한 의존도가 증가한다는 사실을 급성 간 손상 모델에서 입증하였고, 이에 대한 분자적 기전을 마우스에 과량의 아세트아미노펜을 투여 후 분리한 간 전구세포 및 마우스 정상 간 세포주에서 구명하였다.

아세트아미노펜은 가장 많이 판매되는 일반의약품 중 하나이지만, 과다복용 시 간독성을 유발한다고 알려져 있다. 하지만 이에 대한 약물학적 치료제는 극히 제한적이다(27). 복용 8시간 이내의 N-아세틸시스테인(N-acetyl-cysteine, NAC)의 투여만이 아세트아미노펜에 의해 유도된 간 손상을 완화시키는 유일한 임상적 중재요법이다(28). 또한 이러한 간 손상은 환자가 치료를 받기 전, 빠른 시간 내에 진행되기 때문에 간 재생 과정을 조절하여 아세트아미노펜에 의해 손상된 간을 회복시키는 치료학적 접근이 반드시 필요하다. 따라서 본 연구에서 진행한 간 재생과정에서의 system Xc 의 역할을 바탕으로 추후 아세트아미노펜에 의한 간 손상을 치료하기 위한 새로운 접근방법을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

간암세포주에서도 CD44 의 발현과 system Xc 활성화 사이의 연관성을 확인하였다. 정상 간조직에서는 CD44 의 발현이 매우 낮지만, 간세포암종(hepatocellular carcinoma) 에서는 CD44 의 발현이 매우 높다(29). CD44 의 발현은 간암세포의 성장과 전이를 촉진하기 때문에

간암환자의 좋지 않은 예후와도 연관되어 있다(30, 31). 본 연구에서는 증식하는 간세포에서 CD44 의 발현을 매개로 system Xc 에 대한 의존도가 증가하기 때문에, 최근 항암제로 활발히 연구되고 있는 system Xc 억제제에 대한 간암세포의 반응성을 CD44 의 발현정도로 예측할 수 있다고 추정하였다.

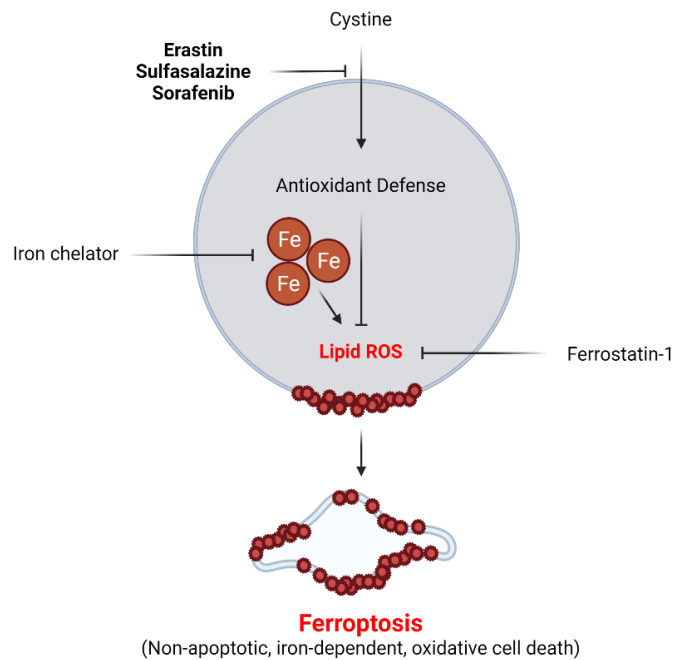


Figure 5. Mechanism of ferroptosis

세포 내 시스테인의 공급에 system Xc 의 역할이 중요한 암세포에서 system Xc 를 억제할 경우 철분 의존성 세포사멸인 페로토시스가 나타난다. System Xc 억제는 세포 내 시스테인을 고갈시키고, 이에 따라 세포 내 축적된 활성산소는 지질 과산화를 동반하는 페로토시스를 유발한다(Fig. 5) (32). 하지만 세포마다 system Xc 억제에 의해 페로토시스가 나타나는 민감도가 다르기 때문에 system Xc 억제제가 항암제로 개발되기 위해서는 이를 예측할 수 있는 지표에 대한 연구가

필요하다. 본 연구에서는 정상 간세포, 간모세포종(hepatoblastoma) 및 간세포암종을 포함하는 총 9종의 간 유래 세포에서 각각의 CD44 의 발현과 system Xc 억제제인 erastin 을 처리하였을 때 페로토시스가 일어나는 정도를 비교, 분석 하였다.

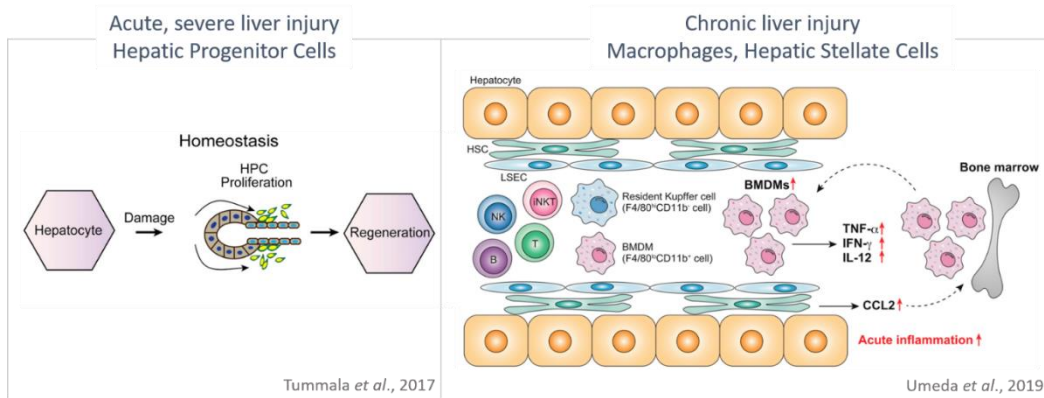


Figure 6. Hepatic cells in liver injury

만성적으로 간이 손상되는 경우에는 간에서 활성화 된 간 성장세포와 대식세포가 증가하고(Fig. 6), 이들에서 system Xc 의 구성요소인 xCT 단백질 발현이 높다는 점을 확인하였다. 따라서 간 섬유화 모델에서는 비실질세포에서의 system Xc 를 차단하였을 때 발생하는 산화적 스트레스와 연관된 system Xc 억제 약물의 간 섬유화 치료제로서의 가능성을 연구하였다. 간 섬유화는 현재까지도 간 이식만이 유일한 치료학적 접근이어서 치료제 개발이 절실하지만, 다양한 간 구성 요소 세포들의 신호체계를 교란하는 병리로 인해 치료제 개발이 매우 어렵다(33).

간 섬유화 과정은 간염바이러스 감염, 알코올, 지질에 의하여 간세포가 손상되면서 시작된다. 최근에는 바이러스성 간염에 대한

치료제가 개발되고, 사람들의 식단이 서구화됨에 따라 비알코올성지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)에서 유래한 간 섬유화의 유병률이 증가하고 있다(33). 과도한 지질에 의해 손상 받은 간세포는 간 내에서 대식세포인 쿠퍼세포(Kupffer cell)를 활성화시키고 골수 유래성 대식세포의 침윤을 유도하는 염증매개인자를 방출한다. 또한 간 정상세포는 강력한 염증성 및 간 섬유화 반응을 나타내는 근섬유모세포로 분화하여 세포외 기질을 축적한다(34). 간 섬유화는 이처럼 다양한 간 구성요소 세포들이 관여하는 병리 기전 때문에 다중표적(multi-hit)으로 질환을 치료하려는 전략이 필요하다(Fig. 7).

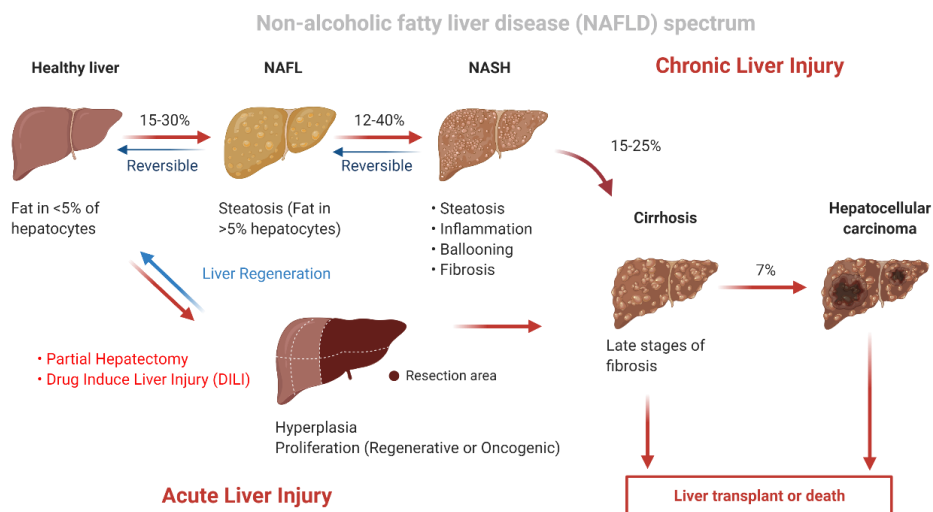


Figure 7. Multi-hit mechanism of liver fibrosis

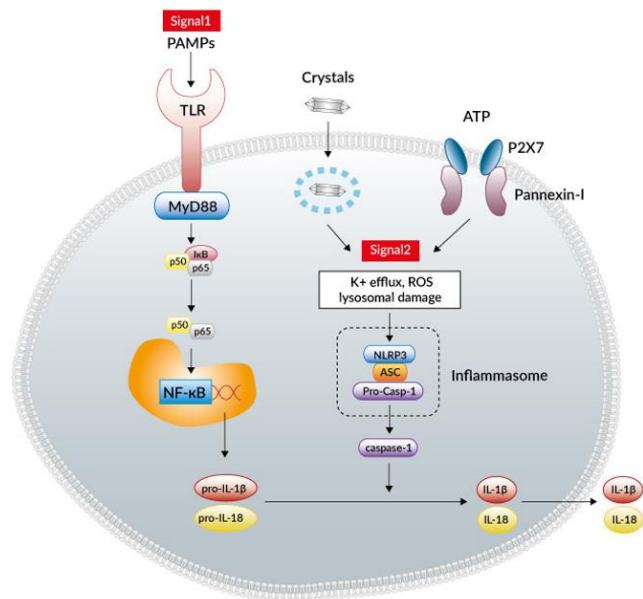
현재까지 FDA 가 승인한 간 섬유화 치료제는 전무하다(35). 현재까지 유일하게 임상 3상까지 진행 중인 Farnesoid X receptor 효능제(agonist)인 obeticholic acid 는 지방간염(nonalcoholic

steatohepatitis, NASH)을 동반한 간 섬유화증에 대한 반응률이 매우 저조한(15개월 이상 복용 시, 35 %) 상태이다(36). 따라서 간 섬유화 치료제 개발을 위한 관련 대한 연구가 반드시 필요하다. 본 연구자는 간 섬유화 진행에서 system Xc 를 차단함으로써 비실질세포들에서 선택적으로 활성산소 생성과 간 섬유화 억제효과를 나타낼 수 있다고 추정하였다.

System Xc의 기능을 차단하기 위해 FDA에서 류마티스 치료약으로 승인한 오라노핀(auranofin)을 사용하였다. 오라노핀(상품명: 리도라정)은 금을 포함하는 착화합물로서 티오레독신(thioredoxin) 환원효소 억제가 약효의 기전으로 제시된 경구용 항 류마티스제이다(37). 하지만 본 연구에서는 대식세포와 간 정상세포에서 오라노핀의 섬유화 억제효과가 두드러지게 나타났지만, 이러한 효과는 티오레독신 환원효소와는 무관하다는 사실을 확인하였다. 나아가 system Xc 차단을 오라노핀의 새로운 약리기전으로 제시하고, 이를 바탕으로 한 간 섬유화 억제효과를 입증하였다.

오라노핀을 처리하여 system Xc 를 차단하면 산화적 스트레스가 발생하여 NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) 인플라마솜 활성이 저해되었다. NLRP3 인플라마솜은 NLRP3, ASC (associated speck-like protein containing a CARD)와 procaspase-1으로 이루어진 다량체 단백질 복합체인데, 인터루킨(Interleukin, IL)-1 β 를 포함한 염증성 사이토카인 분비와 염증 형태의 세포사멸과정인

pyroptosis 를 매개한다(Fig. 8) (38, 39). NLRP3 인플라마솜의 활성화는 간에서 섬유화 진행을 매개한다고 보고되었다(38, 40). 이러한 연구들을 바탕으로 본 연구자는 오라노핀 처리에 의한 system Xc 의 기능 억제가 NLRP3 인플라마솜 활성을 저해하고, 동물모델에서 간 섬유화를 억제한다는 사실을 확인하였다(41).



<https://www.invivogen.com/review-nlrp3-inflammasome>

Figure 8. NLRP3 inflammasome

오라노핀은 1989년도에 FDA 허가를 받은 약물이며, 물질의 특허기간이 만료되었기 때문에 약물 재창출(drug repositioning) 전략을 활용하여 적응증을 확대할 수 있다(42). 하지만 간 섬유화 억제제로 사용하기에는 오라노핀은 체내에서 빠르게 대사되어 체내의 오라노핀 활성 농도를 확인하고 효과를 예측하기 어려웠다. 본 연구에서 확인한 기전을 바탕으로 오라노핀의 간 섬유화 억제효과를 매개하는 활성대사체를 구명하였다. 간 섬유화 억제효과의 약리 기전을 기반으로

선정한 오라노핀의 활성대사체는 추후 오라노핀의 간 섬유화 억제효과를 예측하는 지표로서 활용이 기대된다.

이러한 연구배경에 근거하여 본 연구에서는 다양한 간 질환 상황에서 system Xc 역할을 구명하고 이를 간 섬유화에 대한 새로운 약물 작용점으로 제시하고자 하였다. 이를 위하여 1) 간 재생과정에서 나타나는 간 전구세포의 CD44 가 system Xc 의 활성을 조절하는 기전 연구, 2) 간암세포에서 CD44 와 system X 억제제에 대한 반응성의 상관관계 확인, 3) 간 섬유화 과정에서 오라노핀을 이용한 system Xc 의 억제가 간을 보호할 수 있으며, 간을 구성하는 세포들에서 이에 대한 약리기전의 규명을 세부 연구목표로 설정하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 시약 및 재료

오라노핀은 Enzo Biochem Inc. (Farmingdale, NY, USA)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), N-acetyl-L-cysteine (NAC), Thioacetamide (TAA), Palmitate, Monosodium Urate Crystal (MSU), Nigericin sodium salt, Sulforaphane 와 Adenosine triphosphate (ATP)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Erastin 과 Imidazole ketone erastin 은 MedchemExpress (Shanghai, China)에서 구입하였다.

실험에 사용한 항체는 다음과 같다. CD44 와 rabbit normal IgG 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. Cystathionine- γ -lyase (CSE) 항체는 Abnova (Tapei, Taiwan) 에서 제공받았다. NOD-, LRR-and Pyrin domain-containing protein (NLRP)3, Caspase-1 (p20), 과 Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (ASC) 항체는 Adipogen (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. E-cadherin 항체는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다. Caspase-3, cleaved Caspase-3, pSmad3, Smad3, pSmad2, Smad2, Thioredoxin (Trx)1, Cyclin D1, albumin,

Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-mouse IgG 와 HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 으로부터 구입하였다. xCT 항체는 Novus Biologicals (Centennial, CO, USA) 에서 구입하였다. Nitric Oxide Synthase (NOS)2, Caspase-1, Gasdermin-D, N-terminal (GSDMDC)1, Thioredoxin Reductase (TrxR)2, Trx2, TrxR1, cystathionine- β -synthase (CBS), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)과 4F2 cell surface antigen (4F2hc)은 Santa Cruz (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다. α Smooth Muscle Actin (α SMA)와 β -actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다. Donkey anti-mouse IgG (H+L) Alexa Flour 488 과 Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Flour 564 는 ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA)로부터 구입하였다.

2. 인체 조직 시료

한양대학교 병원(Seoul, Korea)에서 외과적 수술에 의한 간 조직 제거 수술을 받은 환자로부터 기증받은 비알콜성 지방간염 조직과 정상 조직 시료를 사용하였으며 한양대학교 의과대학 내과학교실의 전대원 교수님 연구실에 의뢰하여 인체 조직 시료에 대한 분석을 진행하였다. 실험 프로토콜은 한양대학교 기관생명윤리위원회 의 승인(Institutional Review Board, HYUH 2019-12-028-006)을 받았다.

3. 세포 배양

LX-2 세포는 2% fetal bovine serum (Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA), 50 U/mL penicillin 및 50 µg/mL streptomycin (HyClone; Logan, UT, USA)을 함유한 High glucose Dulbecco's modified Eagle's 배지(HyClone; Logan, UT, USA)에서 계대배양 하였다. 마우스 정상 간세포주인 AML12 세포는 10% fetal bovine serum, 50 U/mL penicillin 및 50 µg/mL streptomycin, 1% Insulin-Transferrin-Selenium-X (ITSX; Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA)와 0.1 µM dexamethasone (Tokyo Chemical Industry; Tokyo, Japan)을 함유한 DMEM/F12 (Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 계대 배양 하였다. 인간 간암세포주인 SKHep1, Huh7, SNU449, SNU423 와 SNU475 는 10% fetal bovine serum (Biowest; Nuaille, France), 50 U/mL penicillin 및 50 µg/mL streptomycin 을 함유한 High glucose Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 계대배양 하였다. 모든 배양 조건은 37°C에서 5% CO₂ 환경에서 유지되었다. HepG2 는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA), 50 U/mL penicillin 및 50 µg/mL streptomycin 을 함유한 Low glucose Dulbecco's modified Eagle's 배지(HyClone; Logan, UT, USA)에서 계대 배양 하였다. 모든 배양 조건은 37°C에서 5% CO₂ 환경에서 유지되었다.

4. 마우스의 일차배양세포 분리 및 배양

콜라겐 분해효소를 사용한 비순환 2 단계 관류법(two-step collagenase perfusion)을 이용하여 8-12 주령 수컷 C57BL/6 마우스의 간에서 세포를 분리하였다(43). 마우스를 줄레틸과 럼폰 희석액을 복강 투여한 후 간문맥에 카테터(24 G)를 삽입하고, 하대정맥을 절단하여 방혈한다. 먼저 0.5 mM 의 EGTA (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)가 포함된 wash buffer 를 10 mL 통과시켜 혈액을 세척한다. 이후 1 mg/mL 의 콜라겐 분해효소(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)가 포함된 Digestion Medium 을 10-15 ml 통과시켜 간의 기질을 분해한다. 관류액에 의해 간은 부풀어 오르다가 시간이 지남에 따라 흐물흐물해진다. 간을 떼어 wash buffer 가 담겨있는 petri dish 위에서 핀셋을 이용하여 피막을 벗겨내고, 간을 흔들어 세포를 조직으로부터 분리한다.

4-1. 간세포(hepatocyte) 분리

세포혼탁액을 70 μ m strainer에 여과시킨다. 세포혼탁액을 원심분리기에 서 50 \times g로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거한다. 세포들을 배지로 재현탁 후 50 \times g로 5분간 한번 더 원심 분리하여 세포에 있는 부유물들을 제거해준다. 회수된 세포를 희석하여 콜라겐 type I 이 코팅된 플레이트(Corning, Inc; Corning, NY, USA)에 배양한다.

4-2. 간 성상세포(hepatic stellate cell) 분리(44)

세포혼탁액을 70 μm strainer에 여과시킨다. 세포혼탁액을 원심분리기에
서 50 \times g로 5분간 원심분리한 후 상층액을 취한다. 회수한 상층액을
600 \times g로 10분간 원심 분리한 후 세포가 포함된 펠렛(pellet)을 9 mL
의 퍼콜용액(GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 과 1 mL의 퍼콜용액
(GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 혼합액에 풀어준다. 세포 현탁액 위
에 1 mL의 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Biowest;
Nuaille, France)을 조심스럽게 넣어 층을 만들고 4°C에서 1400 \times g로
20분(가속 1, 감속 0) 원심분리한다. DPBS 아래 생긴 비활성(quiescent)
간 성상세포층을 회수하여 배지에 희석 후 플레이트에서 배양한다(44).
플레이트에서 7일간 배양 이후 간 성상세포가 활성화(activation)된 것을
세포 내 αSMA 의 발현으로 확인하였다.

4-3. 쿠퍼세포(Kupffer cell) 분리(45)

DNase I (Roche, Mannheim, Germany)과 0.5 mM EGTA가 포함된
wash buffer를 사용하여 세포혼탁액을 5배 희석하고 37°C에서 20분간
흔들어준다. 세포혼탁액을 원심분리기에서 50 \times g로 5분간 원심 분리한
후 상층액을 취한다. 상층액을 515 \times g로 10분간 원심 분리하여 원심
분리한 후 세포가 포함된 펠렛(pellet)을 5 mL의 20% Optiprep
(Kyongshin Scientific Co. Ltd., Seoul, Korea) 에 풀어준다. 이 위에 5
mL의 11.5% Optiprep과 0% Optiprep을 조심스럽게 넣어 층을 만들고
4°C에서 1811 \times g로 20분 (가속 1, 감속 0) 원심분리한다. 아래에서

첫 번째 생긴 층에 쿠퍼세포가 포함되어 있으며, 이를 회수하여 RPMI-1640 배지(HyClone; Logan, UT, USA)에 희석 후 플레이트에 넣는다. 1 시간 후 부착하지 못한 세포를 제거하고 배지를 변경한다.

4-4. 간 전구세포(liver progenitor cell) 배양(46)

세포혼탁액을 70 μm strainer에 여과시킨다. 세포혼탁액을 원심분리기에서 50 \times g로 1분간 원심분리한 후 상층액을 취한다. 상층액을 50 \times g로 5분간 원심분리한 후 아래에 모인 작은 간세포(small hepatocyte)를 배양 배지에 희석하여 히알루론산(hyaluronic acid)으로 코팅된 6웰 플레이트(well plate)에 각 웰 별로 5 \times 10⁵ 세포씩 접종한다. 간 전구세포의 배양 배지는 10% fetal bovine serum, nicotinamide (10 mM), ascorbic acid-2 phosphate (1 mM), insulin-transferrin-selenium, epidermal growth factor (10 ng/mL)과 dexamethasone (0.1 μM)을 포함한다. 2일마다 배지를 교체하며 총 21일 동안 24시간 간격으로 IncuCyte[®] ZOOM live-cell 시스템을 이용하여 세포를 스캔하였다.

4-5. 골수유래 대식세포(bone marrow derived macrophage) 배양(47)

8 주령 C57BL/6 수컷 마우스에서 대퇴골(femur)과 정강뼈(tibia)를 분리한다. 70% 에탄올을 이용하여 주변 근육을 완전히 제거한다. 22 G 주사기를 이용하여 대퇴골과 정강뼈 내에 있는 세포를 10% fetal bovine serum, 50 U/mL penicillin 및 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin과 25 mM

HEPES (Sunngam, Korea)가 포함된 RPMI-1640 배지로 압출한다. 세포현탁액을 충분히 풀어준 후 $400 \times g$ 로 5분 원심분리하여 세포를 모은다. ACK lysis buffer (Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA)로 적혈구를 제거한 후 $400 \times g$ 로 5분 원심분리하여 골수세포를 모은다. Petri dish에 골수세포를 각 1×10^7 개씩 분주하고 30 ng/mL의 M-CSF (Peprotech; Rocky Hill, NJ, USA) 를 6 일간 처리하여 대식세포로 분화시킨다. 분화된 대식세포는 차가운 DPBS를 이용하여 petri dish에서 수확하여 실험에 사용하였다.

5. 세포 분획법

배양한 세포는 DPBS로 세척 후 cell lysis buffer를 이용하여 전세포 추출액(whole cell lysate)을 회수하였다. Cell lysis buffer는 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 30 mM sodium pyrophosphate, protease inhibitor, phosphatase inhibitor II, phosphatase inhibitor III, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 와 5 mM glycerol-phosphate를 포함한다. Cell lysis buffer를 이용하여 세포를 4°C에서 1시간 용해시킨 후 4°C, $14,000 \times g$, 15 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

세포 배양 시 배지 내의 단백질을 확인하기 위해서 일정량의 배양 배지를 취한 후 trichloroaceticacid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 최종 부피의 20% 수준으로 추가하고, 4°C 환경에서 1시간 동안 배지

내의 단백질을 석출시킨다. 이후 4℃ 환경에서 14,000 × g, 30분 동안 원심분리하여 석출된 단백질을 모은다.

좌측 간엽조직에서 0.05 g의 간 조직을 추출 후 RIPA buffer를 이용하여 간조직 추출액(Liver tissue lysate)을 회수하였다. RIPA buffer는 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP40, 1 mM EDTA, protease inhibitor, phosphatase inhibitor II, phosphatase inhibitor III, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄와 5 mM glycerol-phosphate을 포함한다. RIPA buffer와 조직분쇄기를 이용하여 간 조직을 분쇄 후 4℃, 1시간동안 용해 후 4℃ 환경에서 14,000 × g, 15 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

단백질 농도는 Bradford assay 방법에 따라 PRO-Measure™ protein measurement solution (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea) 을 사용하여 정량하였다.

6. 면역화학적 분석

본 연구실의 방법에 따라 세포 용해물에서 얻은 단백질을 겔 전기영동 장치를 사용하여 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하였다. 세포 및 조직 추출액에 Sample Treatment Buffer (STB; Glycerol, SDS, Tris-HCl pH6.8, β-mercaptoethanol, bromophenol blue)을 추가한 후 100℃에서 5분 동안 끓여 전기영동 분석을 위한 샘플을 만들었다.

8~12% 겔을 사용하여 전극 완충용액(1 L 용액 중 3.025 g Tris base, 14.4 g glycine, 1 g SDS 함유) 내에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 마친 겔을 전이용 전기영동 장치를 이용하여 전이 완충용액(1 L 용액 중 3.025 g Tris base, 14.4 g glycine, 20% methanol) 내에서 190 mA로 90분 동안 나이트로셀룰로오즈(nitrocellulose)막에 단백질을 전이시켰다. 나이트로셀룰로오즈에 부착된 단백질을 5% 탈지유 용액에 1시간 반응시킨 후 4℃ 환경에서 1차 항체와 12시간 이상 반응시켰다. 이후 2차 항체인 HRP-conjugated IgG를 1-2시간 반응시키고 ECL 검출 시스템(ECL chemiluminescence system; Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 발색시켰다.

7. RNA 분리 및 RNA-sequencing과 Real-time qPCR

TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) 용액을 사용하여 세포에서 1 µg RNA를 추출하고 Maxime RT PreMix kit (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 이용하여 cDNA를 얻었다. 오라노핀을 처리한 마우스 일차배양세포들에서의 RNA-sequencing은 한양대학교 의생명공학전문대학원 황정욱 교수님 연구실의 도움을 받아 진행하였다.

Real-time qPCR은 다음의 선택적 primer들을 사용하여 진행되었다.

Target	Sequence	Supplier
<i>18s rRNA</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CCATCCAATCGGTAGTAGCG Reverse (5'→3') GTAACCCGTTGAACCCCAT	Cosmo- genetech
<i>ACTA2</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CTTTGACTTGCCGCCTACAC Reverse (5'→3') ACAGTAAAGCCTGACCCCAA	Bioneer
<i>COL1A1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') ATCTCCTGGTGCTGATGG Reverse (5'→3') GCCTCTTTCTCCTCTCTGA	Bioneer
<i>TGF-β1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') GGATTTTGCCCCTTCGTTCC Reverse (5'→3') GCCCATTTCTCCTGGTCGTGTT	Bioneer
<i>Colla1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') GCCCGAACCCCAAGGAAAAGAAGC Reverse (5'→3') CTGGGAGGCCTCGGTGGACATTAG	Bioneer
<i>Timp1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CTTGGTTCCTGGCGTACTC Reverse (5'→3') ACCTGATCCGTCCACAAACAG	Bioneer
<i>Ctgf</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CACTCTGCCAGTGGAGTTCA Reverse (5'→3') AAGATGTCATTGTCCCCAGG	Bioneer

<i>Acta2</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') GGCTCTGGGCTCTGTAAGG Reverse (5'→3') CTCTTGCTCTGGGCTTCATC	Bioneer
<i>CD44</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') ACAGTACCTTACCCACCATG Reverse (5'→3') GGATGAATCCTCGGAATT	Bioneer
<i>Cd44</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') ACAGTACCTTACCCACCATG Reverse (5'→3') GGATGAATCCTCGGAATT	Bioneer
<i>Slc7a11</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CCTGGCATTGACGCTACAT Reverse (5'→3') TCAGAATTGCTGTGAGCTTGCA	Bioneer
<i>Slc3a2</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CTCCCAGGAAGATTTTAAAGACCTT CT Reverse (5'→3') TTCATTTTGGTGGCTACAATGTCAG	Bioneer
<i>Ccnd1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') GCGTACCCTGACACCAATCTC Reverse (5'→3') CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC	Bioneer
<i>Pcna</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') GCTTGGCAATGGGAACATT Reverse (5'→3') TCATCTTCAATCTTGGGAGC	Bioneer

<i>Prom1</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') CTCCCATCAGTGGATAGAGAACT Reverse (5'→3') ATACCCCTTTTGACGAGGCT	Bioneer
<i>EpCAM</i> primer for qPCR	Forward (5'→3') AGAATACTGTCATTTGCTCCAAACT Reverse (5'→3') GTTCTGGATCGCCCCTTC	Bioneer

Real-time PCR 증폭은 SYBR green 용액 (Bioneer, Daejeon, Korea) 을 이용하여 real-time PCR 분석 (Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 을 수행하였다.

8. 형질도입

8-1. small interfering RNA (siRNA) 를 이용한 녀다운 모델 구축

마우스 정상 간세포주인 AML12 세포에서 CD44 의 발현을 일시적으로 감소시키기 위해 사전 제작된 mouse siCD44 (#1; 12505-1, #2; 12505-3) 를 Bioneer (Daejeon, Korea) 에서 구입하였다. Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) 을 이용하여 AML12 세포에 siCD44 또는 AccuTarget™ Negative Control siRNA 을 도입하였다.

8-2. CRISPR-cas9 시스템을 이용한 녀아웃 모델 구축

AML12 세포에서 CD44 의 발현을 영구적으로 감소시키기 위해 mouse CD44 exon2 를 표적하는 U6-CD44/CMV-Cas9-RFP 플라스미드(sgCD44)를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. AML12 세포에 sgCD44 또는 음성 대조군에 해당하는 플라스미드(U6-gRNA/CMV-Cas9-GFP)를 Lipofectamine 2000 을 이용하여 도입하였다. GFP 또는 RFP 를 발현하는 세포를 BD Aria FACS cell sorter (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA)로 분류하고, 형질이 도입 된 single cell 을 96 웰 플레이트에서 배양하여 CD44 가 녀아웃 된 AML12 세포주를 제작하였다.

9. 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화 모델

7 주령 Balb/c 수컷 마우스를 SLC Inc. (Kotoh-cho, Japan)에서 구입하였다. 마우스는 한 케이지 당 최대 5 마리 수용하였으며, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도, $50 \pm 5\%$ 습도와 12 시간 명암 주기조건을 유지하며 사육하였다. 1 주간의 순화 기간 후 티오아세트아마이드를 100 mg/kg 용량으로 복강 내 주 2 회 투여하여 간 섬유화를 유도하였다. 이와 동시에 Vehicle (60% polyethylene glycol), 오라노핀(1, 3, 또는 10 mg/kg) 또는 aurocyanide(10 mg/kg)를 매일 1 회 경구 투약하였다. 해당 동물실험은

서울대학교 동물실험윤리위원회 의 승인(Institutional Animal Care and Use Committee, SNU-171127-2, SNU-190924-6)을 받았다.

10. 아세트아미노펜 유도 간 손상 모델

7 주령 C57BL/6 수컷 마우스를 Orientbio Inc. (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 마우스는 한 케이지 당 최대 5 마리 수용하였으며, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도, $50 \pm 5\%$ 습도와 12 시간 명암 주기조건을 유지하며 사육하였다.

1 주간의 순화 기간 후 12 시간 절식 및 Vehicle (DPBS) 또는 아세트아미노펜을 250 mg/kg 용량으로 복강 내 투여하여 간 손상을 유도하였다.

간 재생과정에 있어서 imidazole ketone erastin 투약이 미치는 영향을 연구하기 위하여 아세트아미노펜 투약 24 시간 후 Vehicle(60 % polyethylene glycol) 또는 40 mg/kg 수준의 imidazole ketone erastin 을 복강 내 투여하였다. 아세트아미노펜 투약 48 시간 후에 실험을 종료하고 마우스의 간 조직 및 혈액을 채취하였다. 해당 동물실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SNU-210723-1)을 받았다.

간 재생과정에서 아세트아미노펜에 의해 유도되는 CD44 발현의 역할을 확인하기 위하여 렌티바이러스를 이용한 유전자 발현 시스템을 구축하였다. 5 주령 C57BL/6 수컷 마우스를 Orientbio Inc. (Seongnam, Korea)에서 구입하였다. 1 주간의 순화 기간 후 알부민 프로모터 하위에 sh(short hairpin)CD44 를 발현하는 렌티바이러스 입자(particle)

농축액을 2×10^7 TU/마우스 수준으로 정맥(intravenous)주사 하였다. 아세트아미노펜을 2 주 후 복강 내 주사하였고 48 시간 이후 실험을 종료하고 마우스의 간 조직 및 혈액을 채취하였다. 해당 동물실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SNU-210628-10)과 생물안전위원회의 승인(Institutional Biosafety Committee)SNUIBC-R210405-3)을 받았다.

11. 조직병리학적 분석

마우스 간 조직 중 좌측 간엽, 중간 간엽과 우측 간엽의 일부는 10% buffered neutral formalin (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)으로 고정하여 조직병리학적 분석을 진행하였다. 고정한 조직은 파라핀 블록으로 제작하여 추후 실험에 사용하였다. 조선대학교 의과대학 병리과 임성철 교수님 연구실에 의뢰하여 Masson's trichrome 염색을 진행하고 fibrosis score 및 fibrotic area 를 측정하였다. 또한 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 절단하고 면역조직화학적 염색을 진행하여 조직에서 단백질의 발현량을 확인하였다.

12. 혈청(serum) 분석

실험을 종료한 직후 마우스를 Zoletil[®]50 (30 mg/kg, Virbac Laboratories, Carros, France) 와 Rompun[®] (10 mg/kg, Bayer Korea,

Korea) 혼합액으로 마취한 후 0.6 ml 내외의 혈액을 심 채혈하였다. 혈액을 상온에서 30 분이상 반응시킨 후 $3,000 \times g$, 30 분간 원심분리하여 혈청을 회수하였다. 혈청의 alanine transaminase (ALT)과 aspartate transaminase (AST)는 서울대학교 약학대학 실험동물실에 보유한 자동 혈액 분석기인 Spectrum[®] (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

13. 면역침강법 (immunoprecipitation)

CD44 와 xCT 의 결합을 관찰하기 위해 세포 용해물의 단백질 1,000 μg 에 표적 단백질에 대한 항체 또는 정상 IgG 를 4 μg 넣고 4 $^{\circ}C$ 에서 18 시간 동안 반응시켰다. 항원-항체 결합체를 단백질 G-agarose bead (Millipore; Billerica, MA, USA)와 4 $^{\circ}C$ 에서 2 시간 동안 반응시킨 후, 이를 침전시키고 95 $^{\circ}C$ 에서 5 분간 반응시켰다. 4 $^{\circ}C$ 환경에서 $14,000 \times g$, 15 분간 원심분리 후 상층액을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

14. 리포터 유전자 분석

Dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 리포터 유전자 분석을 진행하였다. AML12 세포에 antioxidant response element (ARE)-luciferase 플라스미드와 Renilla-luciferase 플라스미드를 Lipofectamine 2000 을 사용하여

형질도입 하였다. 형질도입 48 시간 후 세포를 용해시키고 luminometer (Berthold, Wildbad, Germany)를 이용하여 발광정도를 측정하였다.

15. Caspase-3/7 활성 평가

Incucyte[®] Caspase-3/7 염색 시약(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) 을 이용하여 IncuCyte[®] ZOOM live-cell 분석시스템으로 caspase-3/7 활성을 평가하였다. 마우스 골수유래 대식세포를 96 웰 플레이트에 준비하고, Incucyte[®] Caspase-3/7 염색 시약 5 μ M 과 오라노핀을 농도별로 처리하여 48 시간동안 배양하였다. 세포를 IncuCyte[®] ZOOM live-cell 분석기기에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 환경에서 4 시간마다 세포를 스캔하였다.

16. 공초점 현미경 분석

세포 내 4F2hc 와 xCT 가 발현하는 위치를 확인하기 위하여 면역세포학적 염색을 진행하였다. 커버슬립(coverlip) 위에 세포를 배양 후 4% 파라포름알데히드(iNtRON Biotechnology; Sungnam, Korea)로 고정시킨다. 고정한 세포는 0.1% Triton X-100(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) 과 반응시켜 세포 투과성을 높이고 10% goat/horse 혈청(Gibco BRL; Gaithersburg, MD, USA) 과 1 시간 반응시켜 항체의

비특이적 결합을 방지한다. 4°C 환경에서 18 시간동안 1 차 항체, 상온 환경에서 2 시간 동안 형광이 표지 된 2 차항체 (Alexa Flour 488, Alexa Flour 564) 및 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)와 순차적으로 반응시킨 후 커버슬립을 슬라이드글라스 위에 ProLong™ Gold Antifade (ThermoFischer Scientific; Waltham, MA, USA)를 사용하여 부착시켰다.

아세트아미노펜을 손상된 간 조직에서 CD44 의 발현위치를 확인하기 위하여 면역세포화학적 염색을 진행하였다. 동결건조한 간 조직 샘플은 면역세포화학적 염색을 진행한 후 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 형광을 관찰하였다.

17. 세포 분석법

17-1. 세포사멸 분석법

마우스 간세포, 간 정상세포 및 골수유래 대식세포를 48 웰 플레이트에 각 웰 마다 2.5×10^4 개씩 세포를 접종하고 오라노핀을 농도별로 처리한 배지에서 배양하였다. 48 시간 후에 세포사멸 정도를 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 를 최종적으로 0.3 mg/mL 수준으로 가해서 2 시간 동안 반응시켰다. 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO; Duksan Pure Chemical Co., Ansan,

Korea)를 0.3 mL/well 씩 가하여 포르마잔을 용해한 후, ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)를 이용하여 540 nm 에서의 흡광도를 측정하였다.

17-2. IncuCyte[®] ZOOM live-cell 분석법

AML12 의 세포성장을 IncuCyte[®] ZOOM live-cell 분석시스템(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 스캔하였다. 96 웰 플레이트에 각 웰마다 1×10^3 개씩 세포를 접종한 후 erastin 을 농도별로 처리한 배지에서 배양하였다. 세포성장을 확인하기 위하여 플레이트를 IncuCyte[®] ZOOM live-cell 분석기기에 넣고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 4 시간마다 스캔하였다.

18. 동위원소 분석

AML12 세포 및 마우스의 일차배양 세포에서 ¹³C₆-cystine 또는 ³⁴S-Methionine 을 이용한 대사체 추적을 진행하였다. ¹³C₆-cystine 이 포함된 배지에서 AML12 세포를 0, 15, 30 및 60 분동안 반응시킨 후 세포 내 ¹³C-cysteine 과 ¹³C-GSH 를 정량하기 위하여 세포에 80% 메탄올을 처리하여 고정하였다. 세포를 -70°C에서 15 분간 메탄올에 노출시킨 후 세포혼탁액을 회수하고 부피를 기재하였다.

마우스 일차배양 간세포는 $^{13}\text{C}_6$ -cystine 또는 ^{34}S -Methionine 이 포함된 배지에서 6 시간동안 배양하였다. 마우스의 골수유래 대식세포는 $^{13}\text{C}_6$ -cystine 이 포함된 배지에서 15 분동안 배양하였다. 동위원소로 표지된 세포 내 대사체를 추적하기 위하여 세포에 80% 메탄올을 처리하여 고정하였다. 세포를 -70°C 에서 15 분간 메탄올에 노출시킨 후 세포혼탁액을 회수하고 부피를 기재하였다. 추후 동위원소로 표지된 대사체 분석은 충남대학교 예방약학/분자독성학 연구실의 김상겸 교수님 연구실에 의뢰하여 SCIEX API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 실시하였다.

19. 유세포 분석

마우스 일차배양 간세포를 분리한 후에 유세포 분석을 진행하였다. 간세포를 Accutase (BioLegend; San Diego, CA, USA)를 사용하여 플레이트에서 분리하고 고정한 후 APC-CD44 항체(BioLegend; San Diego, CA, USA)와 30 분동안 4°C 환경에서 반응시켰다. Novocyte (Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 APC (allophycocyanine)를 높게 발현하는 세포를 정량하였다.

20. 글루타메이트 정량

Phenol red 가 결핍된 배지에서 세포를 배양한 후, 세포 배양과정에서 배지로 배출된 글루타메이트의 양을 Amplex™ Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 정량하였다. 배지 내 글루타메이트와 반응하여 나타나는 형광(excitation; 530–560 nm, emission; ~590 nm)은 형광계(fluorometer)를 이용하여 측정하였다.

21. 글루타치온 정량

배양한 세포를 MES Buffer로 회수한 후 ultra-sonicator를 이용하여 용해시켰다. 이후 세포 내 글루타치온의 총량(GSH+GSSG)을 제조사의 지시법에 따라 GSH assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 정량하였다.

22. 지질 과산화 (lipid peroxidation) 정량

간암세포주와 마우스 일차배양 간세포에서 BODIPY™ 581/591 C11 (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 지질 과산화를 정량하였다. 24 웰 플레이트에 세포를 접종하고 BODIPY™ 581/591 C11 시약과 erastin 을 농도별로 포함한 배지에서 배양하였다. 플레이트를 IncuCyte® ZOOM live-cell 분석기기에 넣고 37°C, 5%

CO₂ 환경에서 12 시간마다 형광 및 이미지를 스캔하였다. 각 세포에서 erastin 처리에 의한 지질 과산화 정도는 형광의 세기 및 면적의 총합을 세포의 밀도로 나눈 값으로 표기하였다.

23. 통계 처리

모든 데이터는 $n \geq 3$ 일 경우 통계처리를 진행하였으며, 산술평균 \pm SD 로 표기하고 통계적 유의성은 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 와 $***p < 0.001$ 을 기준으로 하였다. 두 군 간의 유의적 차이를 결정하기 위해서는 unpaired, student's t -test 를 진행하였다. 세 군 이상에서 유의적 차이를 검증하기 위해서는 one-way ANOVA 를 진행하였다. 군 별로 표본수가 동일할 경우에는 사후검정(post hoc multiple comparison)으로 Tukey's test, 군 별로 표본수가 다를 경우에는 Dunnett's test 를 사용하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 간 재생과정에서 system Xc의 역할 연구

1-1. 마우스의 재생하는 간 세포에서 CD44의 발현이 증가한다.

사람(GSE15239)이나 랫드(GSE97429)에서 간 절제술을 시행하였을 때, 수술 전에 비해 수술 후 CD44의 유전적 발현이 유의적으로 증가한다는 사실을 GEO (Gene Expression Omnibus) 데이터 분석을 통해 확인하였다(Fig. 9A). 특히 랫드에서는 절제한 간의 비율이 증가할수록 CD44의 발현이 유의적으로 높게 나타났다. 실험적으로는 마우스의 좌측 간엽을 80% 이상(0.25 ± 0.02 g) 절제하고 회복되는 과정에서 CD44 단백질 발현이 세포증식 지표인 PCNA와 동일한 경향으로 증가한 후 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 9B). 이러한 CD44의 발현 증가가 간의 구성요소 중 간세포에서 나타나는지 확인하기 위하여 절제 후 회복 중인 마우스의 간엽에서 간세포를 분리하였다. 단백질 정량, qPCR 및 면역세포화학적 기법으로 간세포에서 CD44의 발현증가를 관찰하였다(Fig. 9C-E).

아세트아미노펜으로 유도한 간 손상에 의해서도 CD44의 발현이 유의적으로 증가하였다. 마우스를 12시간 절식 후 250 mg/kg의 아세트아미노펜을 복강 주사하고 6, 12, 24 및 48시간 후에 평가한 결과,

간 조직에서 CD44 의 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 9F). 또한 아세트아미노펜으로 간 손상을 유도한 후 간세포를 분리, 일차 배양한 조건에서도 CD44 가 간세포에서 발현이 증가함을 단백질 및 mRNA 수준에서 확인하였다(Fig. 9G, H).

아세트아미노펜을 투여한 마우스에서 일차배양 간세포를 분리하여 유세포 분석을 실시한 결과, 8~10%의 간세포에서 CD44 의 발현이 높게 나타났다(Fig. 10A, 11A). 해당 세포를 분리하여 세포증식 지표인 PCNA 를 확인하였을 때 CD44 의 발현이 높은 세포에서 증식이 나타남을 관찰하였다(Fig. 11B). 손상된 간 조직을 면역 형광 염색하여 PCNA 와 간 전구세포(liver progenitor cell)의 지표인 EpCAM(epithelial cell adhesion molecule)과 발현 위치가 일치함을 확인하였다(Fig. 11C, D). 이는 재생을 위해 증식하는 간세포에서 CD44 가 높게 발현됨을 시사한다.

CD44 는 히알루론산에 결합한다는 사실을 바탕으로(9), vehicle 투여 마우스 또는 아세트아미노펜을 투여한 마우스로부터 분리한 일차배양 간세포를 히알루론산 코팅 플레이트에서 배양하였다(46). 그 결과, 아세트아미노펜을 투여한 마우스로부터 분리한 간세포만 플레이트에 부착하였으며, 14 일 배양 시 CD44 를 높게 발현하는 간세포가 군집을 형성하며 자라는 것을 확인하였다(Fig. 11E, F). 이러한 세포 부착 및 성장은 CD44 를 발현하는 마우스 간세포주인 AML12 에서도 관찰되었다(Fig. 11G, H).

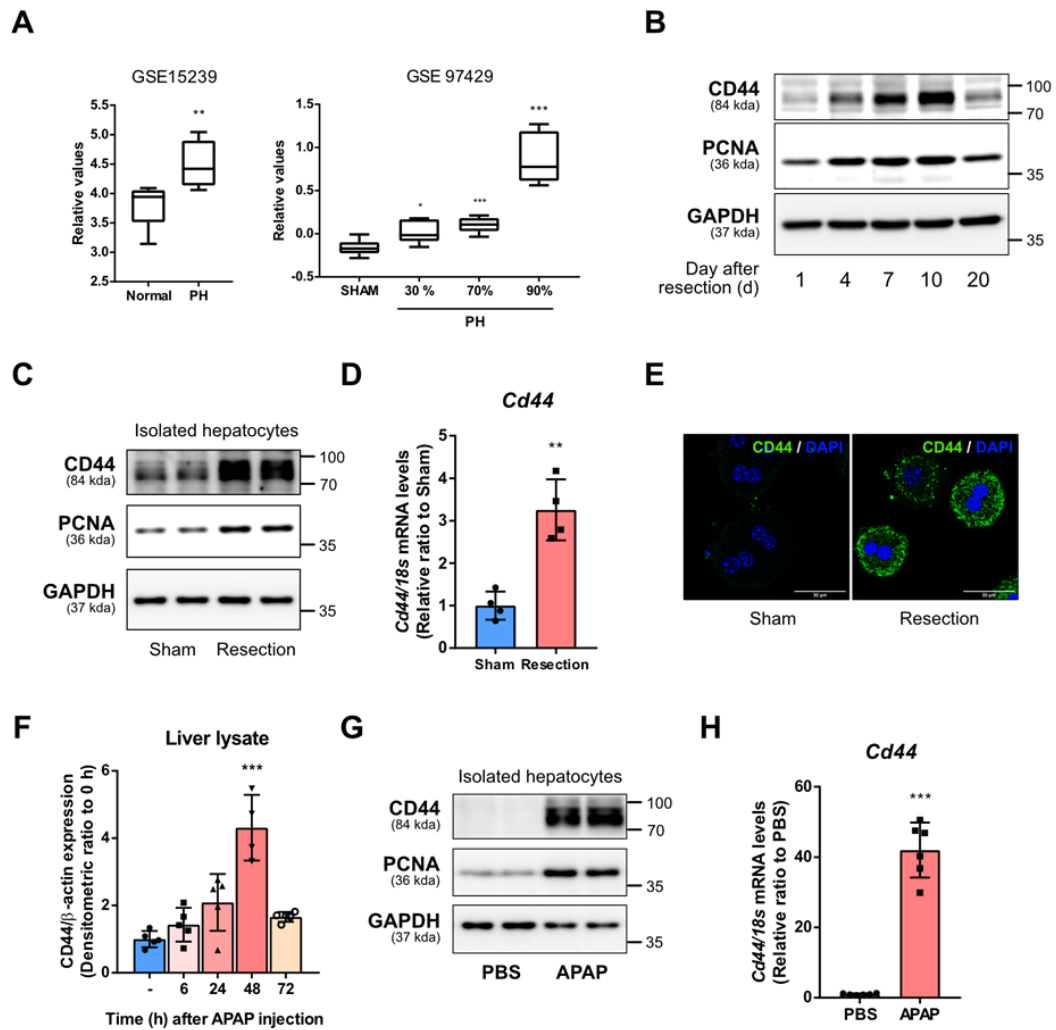


Figure 9. Increase of CD44 in regenerative hepatocytes

(A) CD44 expression in liver specimens from patients shortly (0.5 h, 1 h, and 1.5 h) after partial hepatectomy (GSE15239). CD44 expression in liver samples from rats 24 h after partial hepatectomy was analyzed according to the size of the withdrawn livers (GSE97429). PH; Partial hepatectomy.

(B) Mice were sacrificed after the indicated day following liver resection. Tissue lysates from the left lobe were analyzed by immunoblot analysis.

(C) Primary hepatocytes were isolated from mice 10 days after liver

resection. Protein levels of PCNA and CD44 were measured by immunoblot analysis.

(D) mRNA level of *Cd44* was quantified by qPCR. n=4 per group.

(E) Immunofluorescence images (Scale bars; 30 μm) of CD44 in primary hepatocytes from mice 10 days after liver resection. Representative dataset from n=3 per group.

(F) Mice were sacrificed at the indicated time points following 250 mg/kg APAP injection. n = 4 or 5 mice per group. *** $p < 0.001$ compared to the PBS group, analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett' s test.

(G and H) Primary hepatocytes were isolated from mice 48 h after APAP injection. Protein levels of PCNA and CD44, mRNA level of *Cd44* were quantified in the isolated primary hepatocytes from APAP-injected mice. (A, D, and H) Data are presented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to normal, sham or PBS group, analyzed by unpaired student' s t -test.

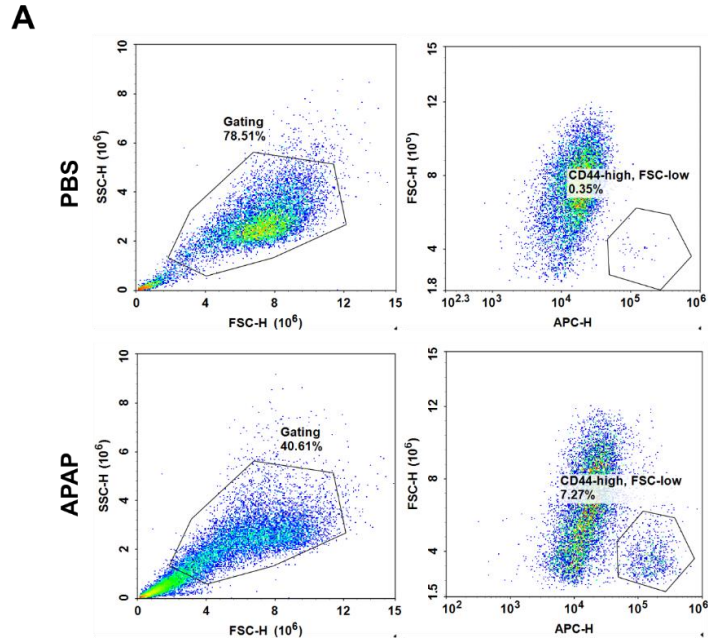


Figure 10. Distribution of CD44-expressing hepatocytes

(A) FSC and SSC were measured in CD44-APC stained primary hepatocytes using flow cytometry. Hepatocytes from PBS or APAP-injected mice were isolated and a total of 10,000 live cells were gated using FSC and SSC. FSC of CD44-high hepatocytes were analyzed among the gated populations. This experiment is the representative of the three replicates.

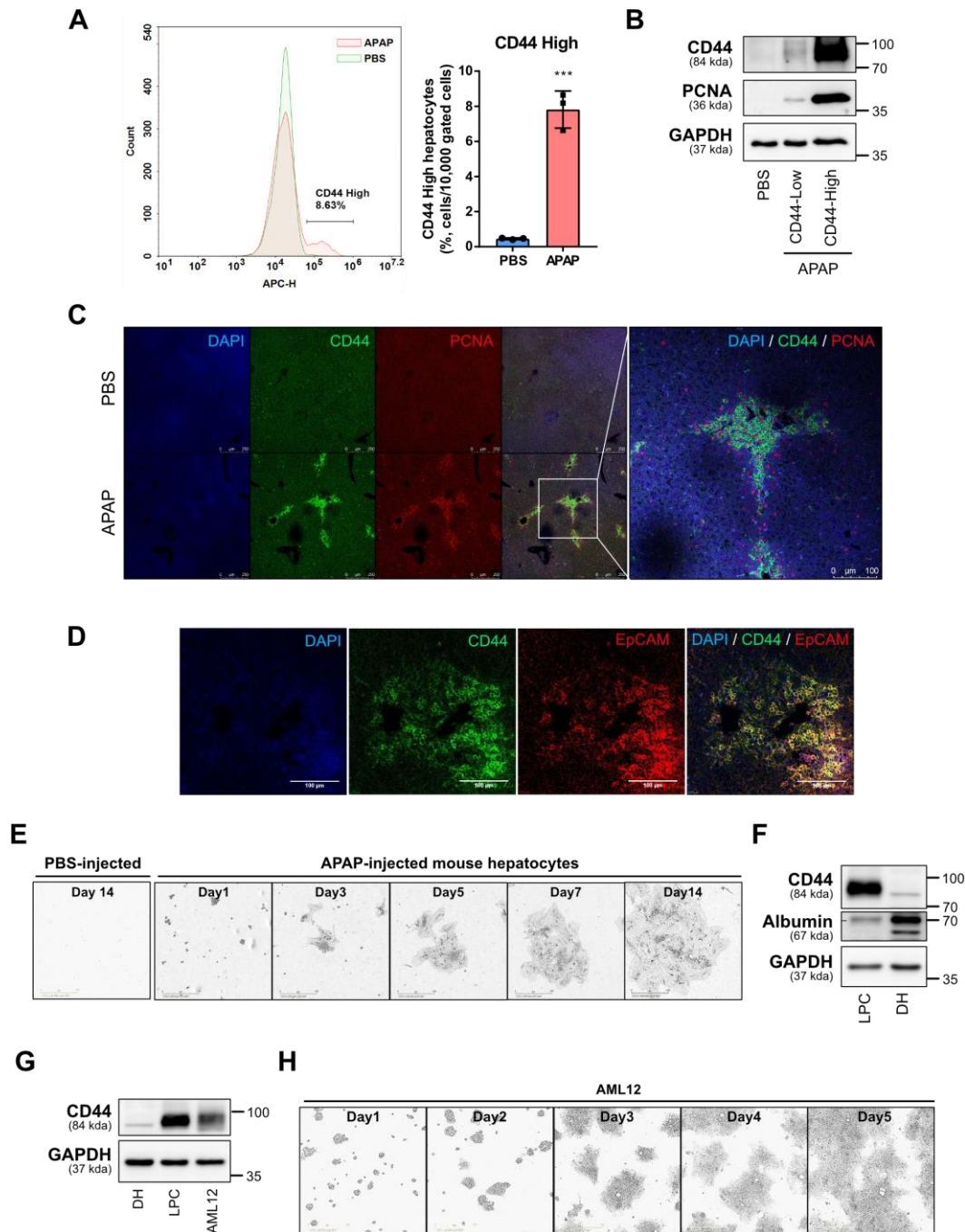


Figure 11. CD44-expressing hepatocytes proliferate

(A) Flow cytometry analysis of CD44-APC in hepatocytes isolated from APAP-injected mouse. $n=3$ mice per group. Data are presented as mean \pm SD; *** $p < 0.001$ compared to PBS-injected group, analyzed by unpaired student's t -test.

(B) CD44-expressing hepatocyte population was sorted using flow

cytometry and lysed to evaluate the expression level of PCNA.

(C) Immunofluorescence images (Scale bars; 250 μm , and 100 μm) of CD44 and PCNA in liver tissues from mice 48 h after APAP injection. Representative dataset from n=3 per group.

(D) Immunocytochemistry of CD44 and EpCAM in liver tissues from mouse 48 h after APAP injection (Scale bars; 100 μm).

(E) Isolated small hepatocytes from PBS or APAP-injected mice were seeded on an HA-coated plate. Representative images (Scale bars; 400 μm) of cultured cells were captured on the indicated day using Incucyte[®] S3.

(F) Small hepatocytes cultured on an HA-coated plate for 14 days were considered as liver progenitor cells (LPC). Mouse primary hepatocytes were indicated as differentiated hepatocytes (DH). Protein levels of albumin were measured in LPC and DH.

(G) CD44 levels were quantified in LPC, DH, and AML12.

(H) Representative images (Scale bars, 400 μm) of AML12 cells cultured on an HA-coated plate.

1-2. CD44 는 세포막에서 xCT 를 안정화시켜 system Xc 의 활성을 증가시킨다.

재생하는 간세포에서 CD44 의 역할을 구명하기 위하여 기저에 CD44 발현이 높은 AML12 세포에서 짧은 간섭 RNA (siRNA)를 이용하여 일시적으로 CD44 발현을 낮추었다(Fig. 12A). CD44 를 낮추어 AML12 세포에서 *tertiary*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) 처리에 의한 활성산소 생성이 더 높게 나타났다(Fig. 12B). 이는 세포 내 주요 항산화물질인 GSH 함량이 CD44 발현과 함께 유의적으로 감소하였기 때문으로 해석된다(Fig. 12C). 안정동위원소로 표지한 시스틴이 포함된 배지를 이용하여 AML12 를 배양한 후 세포 내 GSH 를 정량한 결과, 세포 내 GSH 의 80% 이상이 세포 외부의 시스틴 유입으로 생성된 시스테인으로부터 만들어진다는 것을 확인하였다(Fig. 12D). 위의 결과들은, CD44 의 발현이 시스틴을 세포 내로 유입하는 과정에 영향을 미쳤음을 나타낸다.

System Xc 는 세포 외부의 시스틴을 세포 내로 유입하는 시스틴/글루타메이트 수송체이다. 세포 내로 유입되는 시스틴의 양이 감소한 결과를 바탕으로, CD44 를 낮추어 system Xc 수송체의 경사슬인 xCT 를 단백질 수준에서 정량하였다(Fig. 12E). CD44 를 낮추어 AML12 세포에서 xCT 의 발현이 유의적으로 감소하였다. 특히, 막 단백질을 분리하여 이러한 xCT 의 발현이 세포막에서 특이적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 12F). 세포 밖으로 나오는

글루타메이트와 세포 내로 들어가는 시스틴을 정량하여 system Xc 수송체의 활성을 평가하였다. 그 결과, CD44를 억제시킨 AML12 세포에서 system Xc 수송체의 활성이 감소하였다(Fig. 12G-I).

유전자 편집기술을 이용하여 AML12 세포에서 CD44를 영구적으로 결손시켰다(Fig. 13A). 면역침강법을 이용하여 CD44와 xCT의 결합을 확인하였으며(Fig. 13B), CD44가 xCT의 전사조절에 미치는 영향을 평가하였다. Activating transcription factor 4 (ATF4)와 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)는 xCT의 전사를 조절한다(6). CD44를 정상적으로 발현하는 AML12 세포와, 결손된 AML12 세포에 NRF2 활성제인 설폴라판(sulforaphane)을 처리하여 xCT의 발현을 유도하였다. CD44가 결손된 AML12 세포에서는 설폴라판을 3 μ M 수준으로 처리하여 유도한 xCT의 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 13C). 하지만 CD44가 영구적으로 결손된 AML12 세포의 xCT의 기저 발현은 CD44를 정상적으로 발현하는 AML12 세포와 차이가 없었다. 이는 지속적인 CD44의 결손으로 인해 발생하는 세포 내 산화적 스트레스로 인해 NRF2 활성에 의한 xCT의 전사(*Slc7a11*)과정이 증가했기 때문이다. CD44가 결손된 AML12 세포에서 system Xc의 구성요소인 xCT와 4F2hc(*Slc3a2*)의 전사 및 NRF2-ARE 경로가 유의적으로 활성화되어 있었다(Fig. 13D-F).

CD44와의 물리적 결합이 xCT의 단백질 안정성에 미치는 영향을 확인하였다. 시클로헥시미드(cycloheximide)를 처리하여 단백질 합성을

억제한 후 xCT 단백질의 안정성을 평가하였다. 그 결과 CD44가 결손된 AML12 세포에서는 xCT 단백질의 안정성이 현저히 감소한 것을 확인하였다(Fig. 13G). 세포막에서 xCT의 안정성이 감소하면서 system Xc가 제대로 기능을 하기 위한 복합체 형성이 저해되었다. 면역형광염색법으로 system Xc를 구성하는 4F2hc와 xCT를 염색하였을 때 CD44 결손 세포에서 4F2hc와 xCT의 복합체 형성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 13H). 이로 인하여 CD44 결손 세포에서 system Xc의 활성이 억제되고 세포 내 시스테인 및 GSH이 유의적으로 감소하였으며, 세포 성장이 저해되었다(Fig. 13I-L). 한편, CD44가 결손된 세포에서 메티오닌을 시스테인으로 전환하는 보상적 경로(48)는 활성화되지 않았다(Fig. 13M). 위의 결과들을 종합하여 볼 때, CD44는 간세포에서 system Xc의 구성요소인 xCT의 안정성을 조절하여 세포의 항산화 능력과 세포증식능에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있다.

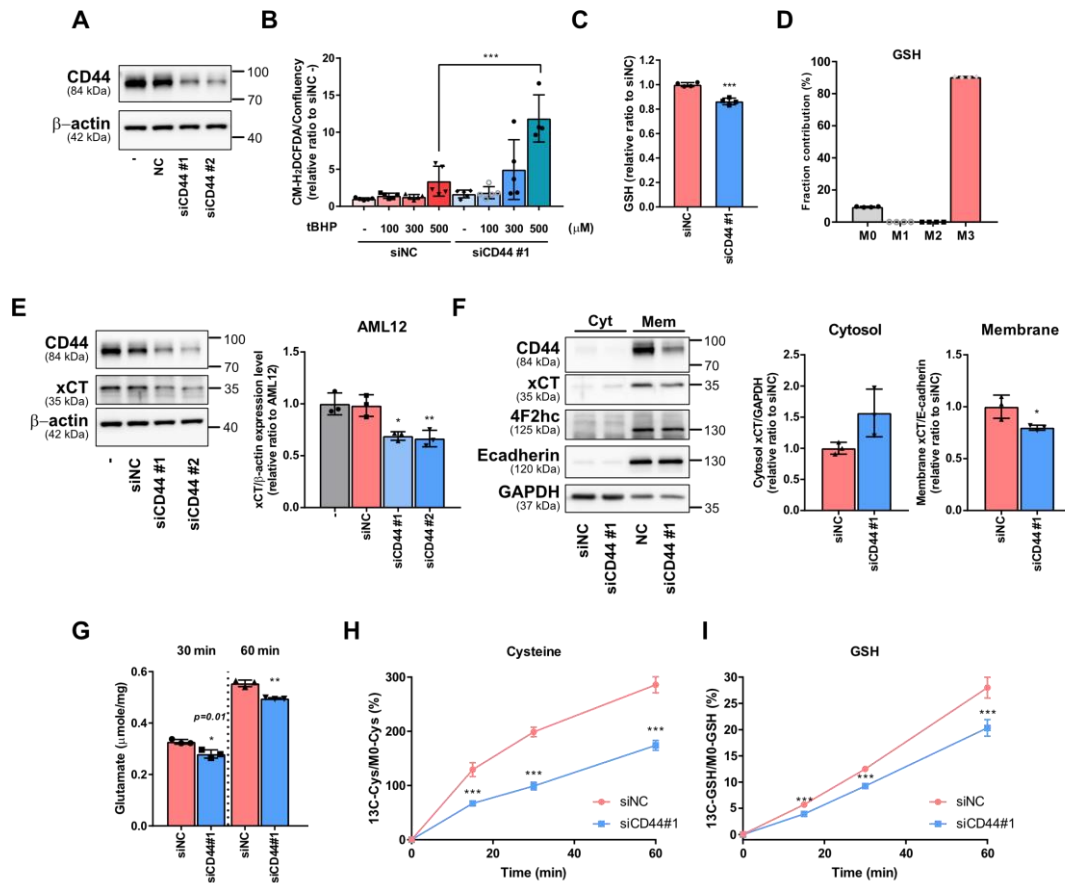


Figure 12. Knockdown of CD44 inhibits system *Xc* activity

(A) CD44 was knocked down in AML12 by siRNA. –; non-transfected AML12, siNC; AML12 transfected with negative control siRNA, siCD44 #1 or siCD44 #2; AML12 transfected with siCD44 #1 or 2.

(B) ROS generation was measured using CM–DCFDA after incubation with *t*–BHP in siNC (negative control siRNA) or siCD44–transfected AML12. $n=4$ per group; $***p < 0.001$ compared to indicated group, analyzed by one–way ANOVA followed by Tuckey’ s test.

(C) Intracellular GSH level in CD44–knockdown AML12.

(D) AML12–CtrlIV was incubated in media containing universal ^{13}C –cysteine. ^{13}C –labeled GSH was measured in lysates of AML12, 12 h

after the medium change. The bar graph visualizes the proportion of GSH that contains the stable isotope.

(E) Protein expression of xCT in CD44–knockdown AML12.

(F) AML12 cells transfected with CD44 siRNA were fractionated to obtain plasma membrane and cytosol samples and then subjected to immunoblot analysis. E–cadherin and GAPDH were assessed as protein markers for plasma membrane and cytosol fraction, respectively. Cyt; Cytosolic fraction, Mem; membrane fraction.

(G) Extracellular glutamate levels in culture media, 30 or 60 min after incubation.

(H and I) siNC or siCD44#1–transfected AML12 cells were incubated with media containing universal ^{13}C –cystine. Isotope labeled–cysteine and isotope–labeled GSH were measured in cell lysates after the indicated time. (C, E–I) Data are presented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to siNC, analyzed by unpaired student' s t –test.

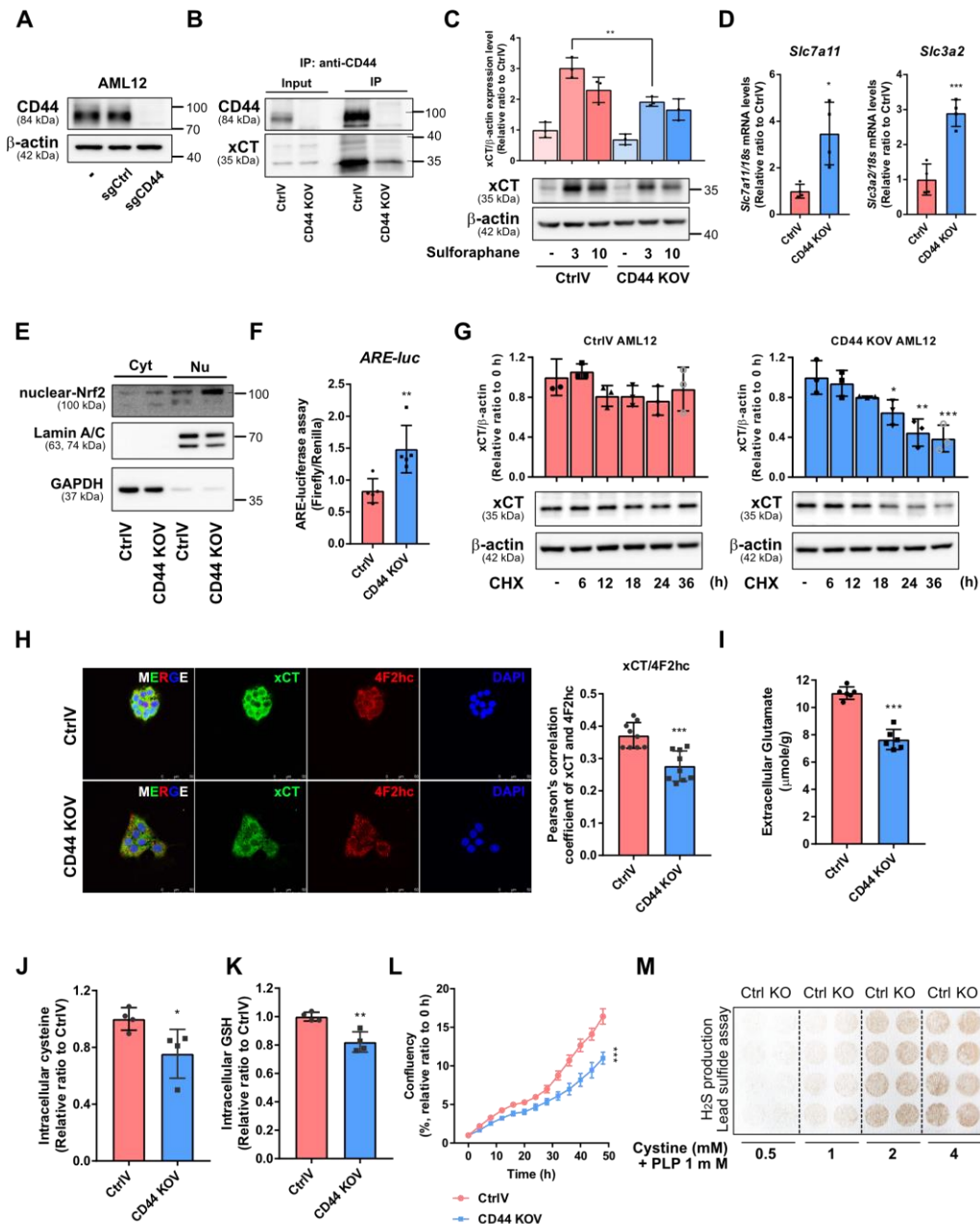


Figure 13. CD44 stabilizes xCT in the cell membrane and contributes to cysteine homeostasis

(A) Stable CD44–knockout AML12 cells were produced using CRISPR–Cas9.

(B) Lysates of Crispr–sgCtrl (CtrlV) and Crispr–sgCD44 (CD44 KOV) cells were subjected to immunoprecipitation using anti–CD44 antibody.

(C) AML12 cells were incubated with sulforaphane for 12 h. Protein expression of xCT and β -actin were measured in cell lysates after the incubation. n=3 per group; data are presented as mean \pm SD, ** $p < 0.001$ compared to an indicated group, analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey' s test.

(D) Basal mRNA expression of *Slc7a11* and *Slc3a2* was quantified using qPCR. n=4 per group.

(E) Immunoblot analysis of the nuclear and cytoplasmic fractions of AML12 cells expressing sgCtrl or sgCD44. Cyt; Cytosolic fraction, Nu; nuclear fraction.

(F) Regulation of the Nrf2/ARE pathway was determined by ARE-luciferase assay. n=5 per group.

(G) AML12 CtrlV or CD44 KOV cells were incubated with 40 μ g/mL of cycloheximide for indicated times. Immunoblot analysis of xCT and β -actin (loading control) and the densitometric ratio of xCT/ β -actin band intensity relative to the corresponding value for the zero-time point (0). Data are presented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to the value of 0 h, analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett' s test.

(H) Immunofluorescence analysis of xCT and 4F2hc in AML12 CtrlV or CD44 KOV cells (scale bar, 50 μ m). The colocalization between xCT and 4F2hc was quantified using Pearson' s correlation coefficient (3 pictures per sample, n=3 per group).

(I) Extracellular glutamate was measured in the media after incubation of AML12 CtrlV or CD44 KOV cells for 5 h. n=6 per group.

(J) Relative ratios of intracellular cysteine in AML12 CtrlV or CD44 KOV cells were quantified by LC–MS/MS. n=4 per group.

(K) Intracellular GSH level was measured using the GSH assay kit. Lysates of AML12 CtrlV or CD44 KOV cells were obtained by sonication. n=4 per group.

(L) Proliferation rates of CtrlV or CD44 KOV–expressing cells were measured using Incucyte[®] S3. n=5 per group.

(M) The production of H₂S by AML12 cells was analyzed 24 h after incubation with the indicated concentration of cystine and PLP (pyridoxal phosphate) using the lead sulfide assay (n = 3 replicates per group). (D, F, H–L) Data are presented as mean \pm SD; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 compared to the value of AML12 CtrlV, analyzed by unpaired student' s *t*-test.

1-3. 아세트아미노펜을 투여한 마우스에서 분리한 간세포는 system Xc 활성화에 높은 의존도를 나타낸다.

CD44 발현에 의한 system Xc의 활성화 증가를 일차배양 세포에서 확인하기 위하여 아세트아미노펜을 투여한 마우스에서 간세포를 분리하였다. xCT(*Slc7a11*)의 발현은 mRNA 수준에서 변화가 없었으나(Fig. 14A), 세포막의 단백질 수준에서 xCT의 유의적 증가가 관찰되었다(Fig. 14B). 이와 함께, 간세포 배양 시 배지로 방출되는 글루타메이트를 정량하여 system Xc의 활성화가 높아져 있음을 확인하였다(Fig. 14C). ^{13}C 이 표지된 시스틴 또는 ^{34}S 가 표지된 메티오닌을 이용하여 세포 내 시스테인과 GSH에 각각의 아미노산이 기여하는 비율을 측정하였다. 정상 간세포와 비교하여 아세트아미노펜을 투여한 마우스에서 분리한 간세포는 세포 밖에 존재하는 시스틴의 이용률이 높았고 메티오닌의 이용률은 낮았다(Fig. 14D-G). 이는 재생하는 간세포에서 간 손상 시 나타나는 system Xc에 대한 의존도가 높아져 있음을 시사한다.

마우스의 정상 간세포를 분리하여 system Xc의 억제제인 erastin을 처리하였을 때, 세포사멸 반응이 나타나지 않았다(Fig. 14H). 반면 아세트아미노펜 투여 마우스에서 분리한 CD44 발현이 높은 간 전구세포와 AML12 세포의 세포 증식은 erastin 처리에 의해 매우 민감하게 억제되었다(Fig. 14I).

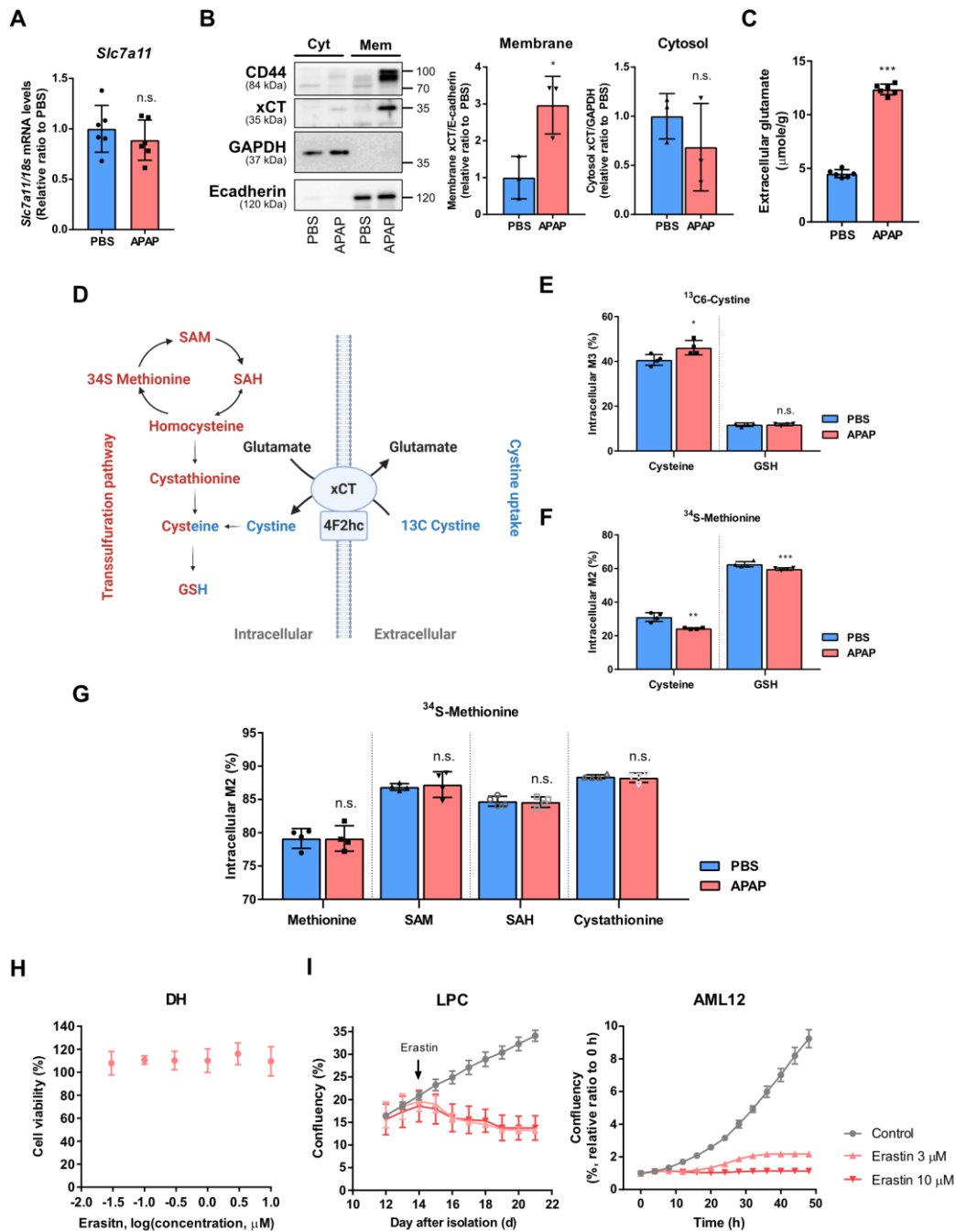


Figure 14. APAP increases xCT expression in plasma membrane and promotes extracellular cystine uptake

(A) Primary hepatocytes were isolated from mice 48 h after PBS or APAP injection. *Slc7a11* mRNA levels of the hepatocytes were measured using qPCR. n.s.; not significant

(B) The hepatocytes were fractionated to obtain plasma membranes and

cytosol samples and then used for immunoblot analysis. The levels of E-cadherin and GAPDH were assessed as protein markers for plasma membrane and cytosol fraction, respectively. Cyt; cytosolic fraction, Mem; membrane fraction, n.s.; not significant.

(C) Exported glutamate level was quantified in the media after incubation of the hepatocytes for 5 h.

(D) Proposed graphical representation of transsulfuration pathway and system *Xc*-mediated glutathione synthesis.

(E) Isolated primary hepatocytes from mice 48 h after PBS or APAP injection were incubated in cystine-free medium supplemented with universal ¹³C-labeled cystine for 6 h.

(F and G) Primary hepatocytes were isolated from mice 48 h after PBS or APAP injection. The isolated hepatocytes were incubated in methionine-free medium supplemented with ³⁴S-labeled methionine for 6 h. The bar graph shows the proportions of methionine metabolites in cell lysates.

(H) Relative cell viability of DH (differentiated hepatocyte) upon treatment with erastin for 48 h.

(I) The effect of erastin on cell proliferation of LPC (liver progenitor cell) and AML12 were assessed using Incucyte[®]S3. (A–C, E, F) Data are presented as mean \pm SD; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, and n.s.; not significant, compared PBS-injected group, analyzed by unpaired student's *t*-test.

1-4. 간 손상 후 CD44 를 매개로 한 system Xc 의 활성증가가 간 재생과정에 중요하다.

간 손상 후 재생되는 과정에서 system Xc 활성의 기여도를 알아보기 위하여 8주령 C57BL/6 수컷 마우스에 아세트아미노펜을 투여하고 24시간 경과 후에 대사적으로 안정한 system Xc 억제제인 imidazole ketone erastin(IKE) (7)을 투여하였다(Fig. 15A). 48시간 후 조직을 분리하여 확인한 결과 IKE 투약군에서는 아세트아미노펜 손상 후 회복과정에서 나타나는 세포증식 지표가 감소하였다(Fig. 15B-F). 또한, 간 전구세포 지표가 IKE 투여에 의하여 유의적으로 감소하였다(Fig. 15G). 즉, system Xc는 아세트아미노펜으로 손상된 간의 회복과정에서 간 전구세포의 증식에 중요한 역할을 담당한다는 사실을 확인하였다.

또한 앞에서 연구한 CD44의 기능이 마우스 모델에서도 유효한지 그 여부를 확인하기 위하여 마우스에서 CD44 발현을 간세포 특이적으로 감소시켰다(Fig. 16B). 손상된 간에서 CD44가 면역세포와 간 정상세포에서도 발견되었기 때문에 알부민 프로모터를 사용하여 shCD44(short hairpin CD44)-렌티바이러스를 제작하였다(Fig. 16A). 비록 알부민의 발현은 분화된 간세포에 비하여 간 전구세포에서 상대적으로 낮게 나타나지만, 대부분의 간 전구세포는 최종적으로 간세포로 분화하게 되기 때문에 알부민 프로모터를 활용하여 분화능을 가지는 간 전구세포만을 선택적으로 할 수 있다고 예측하였다.

마우스에 렌티바이러스를 주입하여 간세포 특이적으로 CD44의 발

현을 저해한 후 아세트아미노펜으로 간 손상을 유도하였다. 일차배양 간 세포를 분리하여 확인한 결과, 간세포 특이적으로 CD44의 유도가 억제되었고 세포막에서 xCT의 발현이 감소하였다(Fig. 16C, D).

이와 동시에 아세트아미노펜에 의한 간 세포증식 지표와 간 전구세포 지표의 증가가 shCD44-렌티바이러스 투여에 의해 억제되었다(Fig. 16E-G). 위의 모든 결과를 종합해 볼 때, CD44의 발현에 의해 조절되는 system Xc의 기능이 간 재생과정에서 중요하다고 결론 내릴 수 있다(Fig. 17).

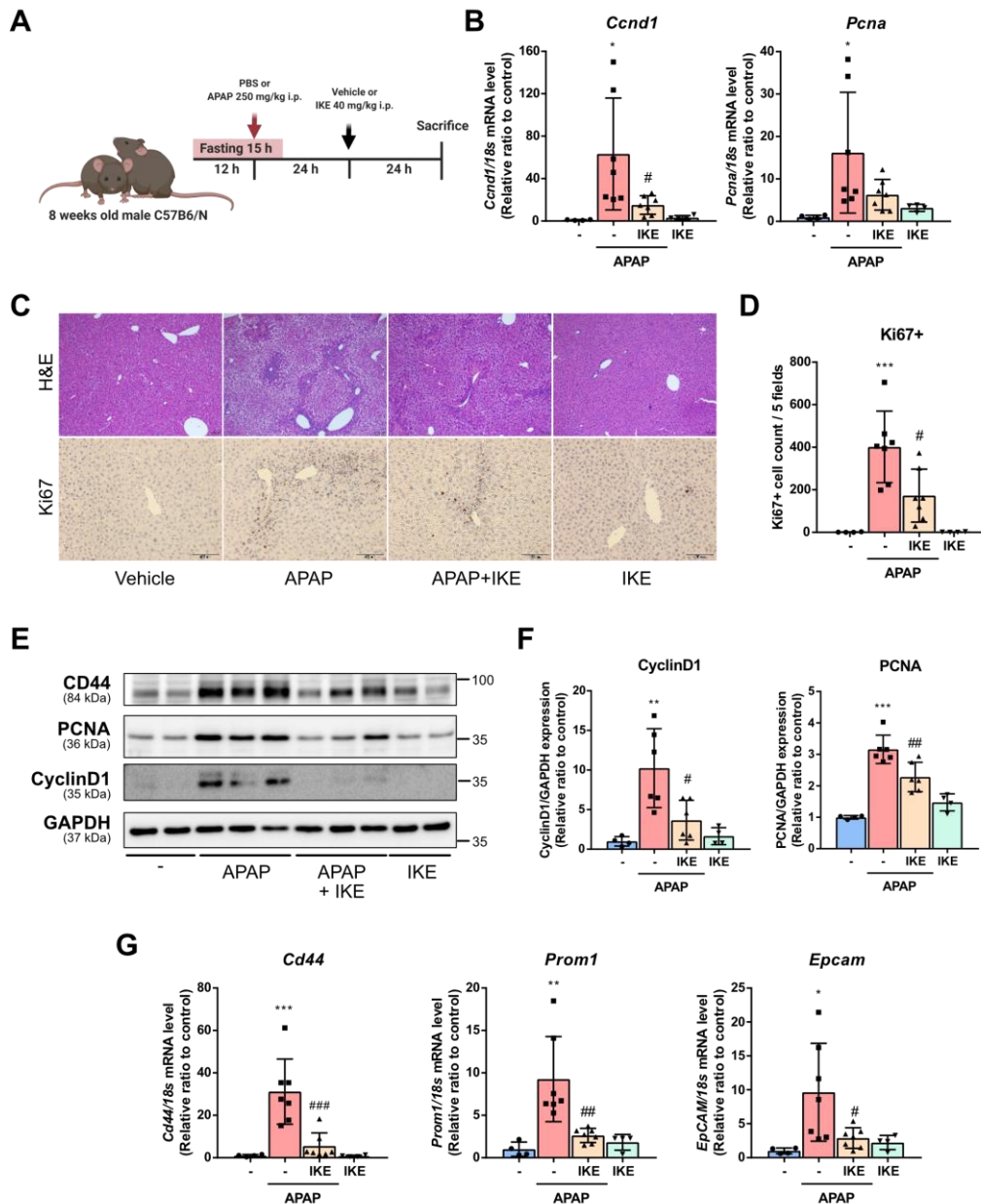


Figure 15. Administration of IKE inhibits APAP-induced liver regeneration

(A) Schematic diagram of mice receiving an intraperitoneal injection of vehicle or IKE after APAP dosing. Administration of APAP and IKE were spaced for 24 h. n=4 for PBS-injected groups, and n=7 for APAP-injected groups.

(B) mRNA levels of *Ccnd1* and *Pcna* were analyzed in liver lysates using qPCR.

(C) Representative images of H&E or Ki67 stained liver sections, (Scale bars; 100 μm).

(D) Ki67 positive cells were counted using 5 fields per Ki67-stained sample.

(E) Immunoblots of CD44, PCNA, and CyclinD1 in liver lysates after injection of APAP and IKE.

(F) Protein expression levels of proliferation markers (PCNA and CyclinD1) were quantified using densitometric analysis.

(G) mRNA expression levels of LPC markers (*Cd44*, *Prom1*, and *Epcam*) were measured using qPCR. (B, D, F, G) Data are presented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared to PBS-injected group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ compared to APAP-injected group, analyzed by one-way ANOVA followed by Tuckey' s test.

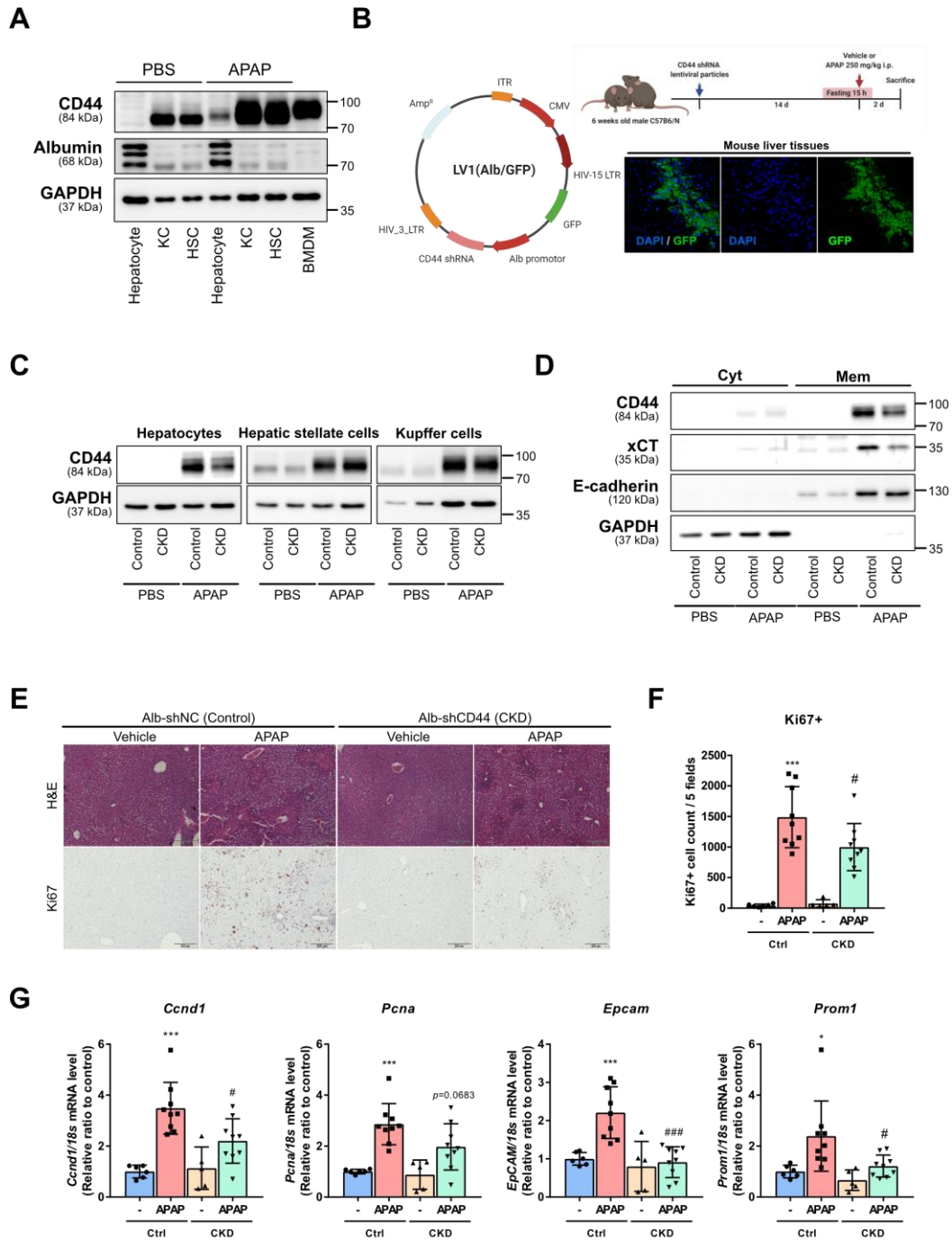


Figure 16. Regeneration is abrogated in hepatocyte-specific CD44 knockdown mice

(A) CD44 expression was assessed in isolated primary cells from PBS or APAP-injected mice; Hepatocyte, Kupffer cell (KC), and hepatic stellate cell (HSC). Bone marrow cells were isolated from the tibia and femur of mice. Using 30 ng/mL of M-CSF, bone marrow cells

were differentiated (7 days) into bone marrow–derived macrophages (BMDMs).

(B) Schematic of APAP injury in hepatocyte–specific CD44 knockdown mice. Mice were intravenously injected with either LV–Alb–shNC(control) or LV–Alb–shCD44(CKD) to specifically delete CD44 in hepatocytes. 12 h–fasted control and CKD mice were injected with APAP (250 mg/kg) or PBS 2 weeks after virus administration.

(C) Protein expression of CD44 in isolated primary cells from control or CKD mice after PBS or APAP injection.

(D) Hepatocytes from control or CKD mice were fractioned to obtain plasma membranes and cytosol samples and both the fraction samples were subjected to immunoblot analysis. Cyt; cytosolic fraction, Mem; membrane fraction.

(E) Representative images of H&E or Ki67 stained liver sections, (Scale bars; 200 μ m). n=6 for control–PBS injected group, n=9 for control–APAP injected group, n=5 for CKD–PBS injected group, and n=9 for CKD–APAP injected group. (F) Ki67 positive cells were counted using 5 fields per Ki67–stained sample.

(G) mRNA expression levels of proliferation markers (*Pcna*, and *Ccnd1*), and LPC markers (*Epcam* and *Prom1*) were measured in liver tissues using qPCR. Data are presented as mean \pm SD; * p < 0.05, and *** p < 0.001 compared to vehicle group (LV–GFP–Albp–shNC i.v. injection followed by PBS i.p. injection); # p < 0.05, and ### p < 0.001 compared to APAP–treated group (LV–GFP–Albp–shNC i.v. injection followed by APAP i.p. injection) analyzed by one–way ANOVA followed by Tuckey’ s test.

Cysteine source in liver

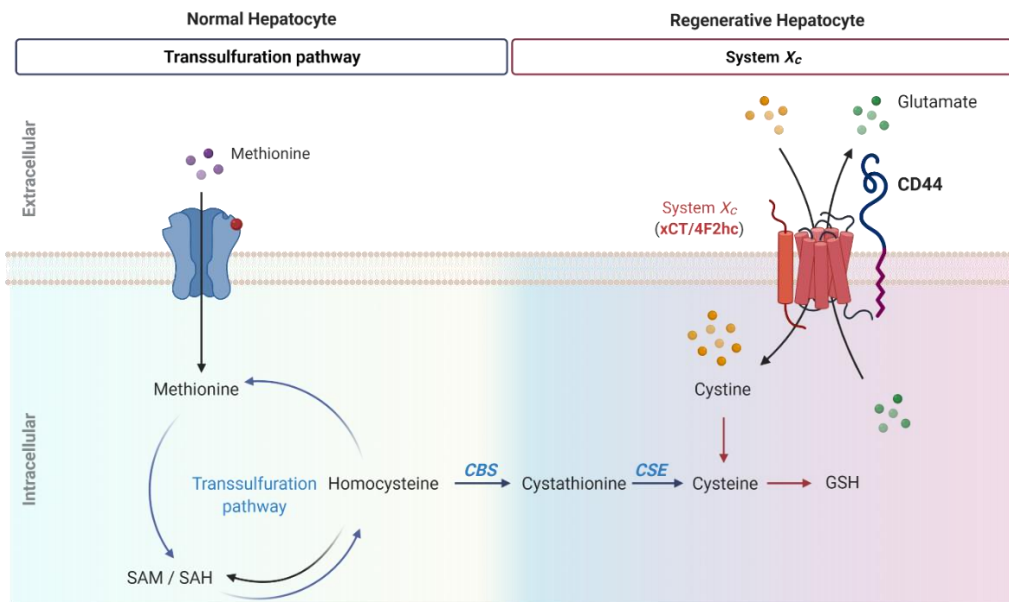


Figure 17. The role of system X_c in regenerative hepatocyte

2. 간암 세포주에서 CD44 와 system Xc 의 상관성 연구

2-1. 정상 간세포 및 간암 세포주에서 system Xc 억제제에 대한 반응성에 차이가 난다.

시스테인은 세포의 산화적 스트레스를 조절하고 세포의 성장에 중요한 역할을 한다. 간을 구성하는 세포들이 시스테인을 공급받는 경로는 크게 두 가지로 보고되어 있다(2). 먼저 황전환경로(transsulfuration pathway)를 이용하여 메티오닌을 시스테인으로 전환할 수 있다. 이러한 황전환경로에는 중간체인 시스타티오닌(cystathionine)을 통해 시스테인과 호모시스테인(homocysteine)을 상호 전환하는 cystathionine- β -synthase(CBS)와 cystathionine- γ -lyase(CSE) 효소가 중요한 역할을 한다(49). 분화된 간세포는 이러한 황전환경로가 잘 발달한 세포로 보고되어 있다. 반면 간암세포에서는 system Xc 를 매개로 한 세포 내로의 시스틴 유입과 이를 이용한 시스테인 공급이 중요하다(50).

시스테인의 공급에 System Xc 의 역할이 중요한 세포에서 system Xc 를 억제할 경우 철분 의존성 세포사멸인 페로토시스(ferroptosis)가 나타난다. 페로토시스는 세포 내에서 발생하는 활성산소에 의한 지질 과산화물 수반하며, erastin 을 포함한 저분자화합물들이 system Xc 억제제로서 암세포에서 페로토시스를 유발한다는 사실이 보고된 바 있다(32). 실제로 암세포는 정상세포에 비해 빠른 성장속도로 인해 산화적 스트레스에 취약하며, 이러한 system Xc 억제를 매개로 한

세포사멸 작용은 새로운 항암치료전략으로 주목받고 있다. 하지만 system *Xc* 억제제 처리에 대한 반응성은 암세포의 종류에 따라 크게 차이 나기 때문에 system *Xc* 억제제를 항암제로 개발하기 위해서는 이에 대한 반응성을 예측할 수 있는 바이오마커(biomarker)의 개발이 필요하다(51, 52). 본 연구자는 선행 연구에서 확인한 CD44 의 발현이 system *Xc* 의 활성화에 미치는 영향을 바탕으로, 간암세포주에서 CD44 의 발현이 system *Xc* 억제제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 지표로 활용될 수 있다고 판단하였다.

8 종의 인간 간암세포주(SNU387, SNU423, SNU475, SNU 449, SNU761, SKHep1, Huh7, HepG2)와 마우스 일차배양 간세포에서 erastin 처리에 대한 반응성을 확인하였다. BODIPY™ 581/591 C11 염색 시약과 IncuCyte® ZOOM live-cell 분석시스템을 이용하여 확인한 결과 마우스 일차배양 간세포, Huh7, HepG2 와 SNU761 에서는 erastin 처리에 의해 지질과산화와 세포 사멸이 유의적으로 증가하지 않았다(Fig. 18A). 반면 SKHep1, SNU387, SNU423, SNU449 와 SNU423 세포에서는 erastin 처리에 의한 지질 과산화와 세포사멸이 36 시간 이내에 유의적으로 관찰되었다(Fig. 18B).

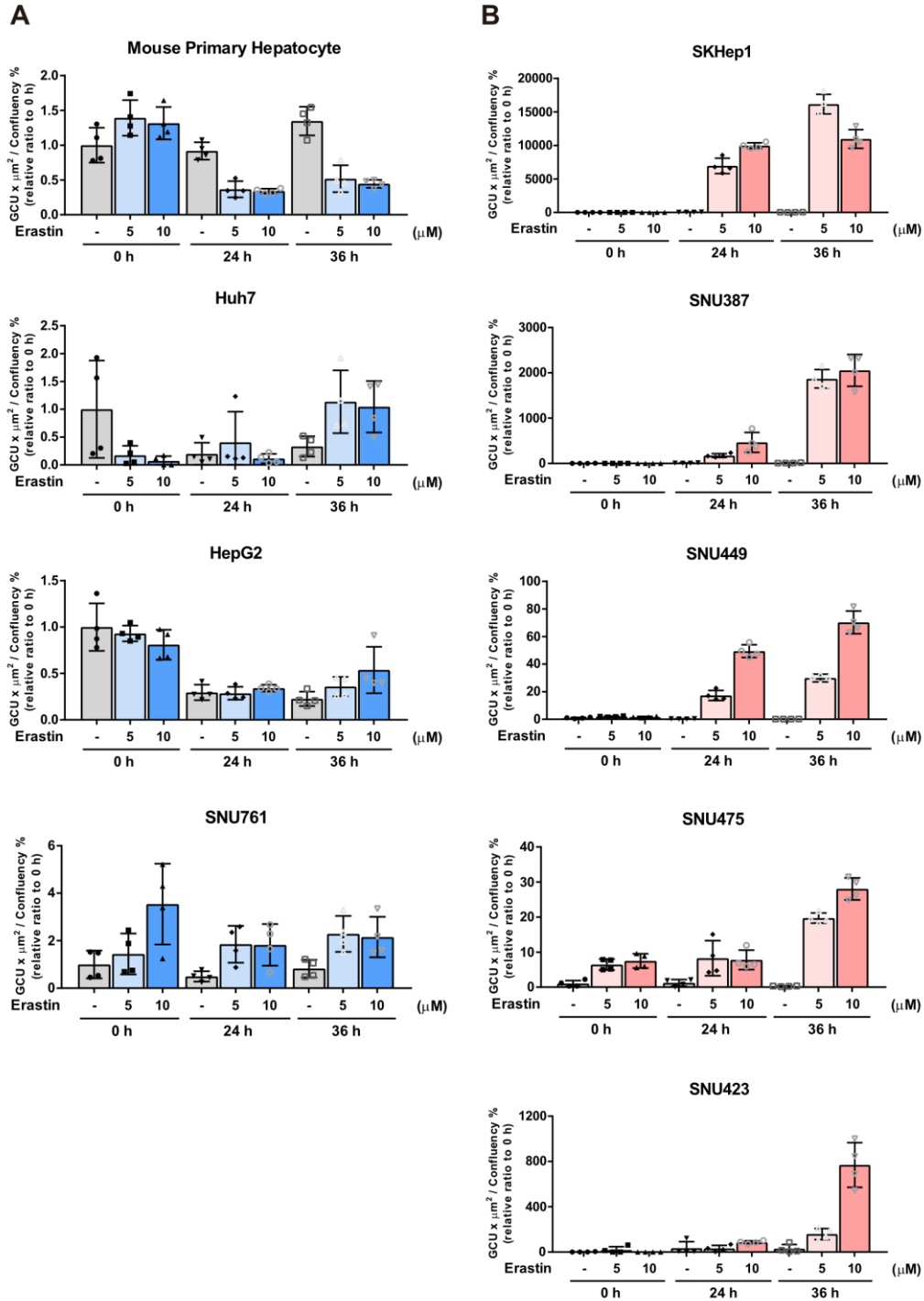


Figure 18. Sensitivity to erastin-induced ferroptosis

(A) Sensitivity to erastin was measured using BODIPY™ 581/591 C11 staining. Lipid peroxidation (green fluorescence) and cell death (phase) were monitored by IncuCyte® ZOOM live-cell analysis system after exposure to erastin (5 or 10 μM). y-axis values are

green Integrated Intensity per well / Phase area confluence, relative ratio to 0 h. Mouse primary hepatocytes, Huh7, HepG2, and SNU761 cells were resistant to erastin treatment.

(B) Sensitivity to erastin is measured using BODIPY™ 581/591 C11 staining. SKHep1, SNU387, SNU449, SNU475, and SNU423 cells were sensitive to erastin treatment.

2-2. 간암 세포주에서 CD44 의 발현과 system Xc 억제제에 대한 반응성은 긴밀한 상관관계를 가진다.

본 연구자는 erastin 처리에 대해 반응성이 낮은 정상 간 조직과 간암세포주(HepG2 와 Huh7)들에서 황전환경로에 중요한 CBS 와 CSE 효소의 발현수준이 상대적으로 높다는 사실을 단백질 정량으로 확인하였다(Fig. 19A). 황전환경로가 발달한 세포들의 경우, erastin 을 처리하여 system Xc 를 억제하더라도 메티오닌으로부터 세포성장에 필요한 시스테인을 공급할 수 있기 때문에 세포 사멸이 나타나지 않는다. 반면 erastin 처리에 민감하게 반응하는 간암 세포주(SKHep1, SNU387, SNU423, SNU449, SNU423)의 경우 CBS 또는 CSE 가 결핍되어 있고, CD44 를 상대적으로 높게 발현하였다. 이런 간암세포주들은 세포 외부에서 system Xc 를 통하여 유입되는 시스틴에 대한 의존도가 높다. 선행 연구결과를 바탕으로 생각해 보았을 때, 이러한 간암세포주들에서 높은 CD44 발현은 system Xc의 활성화에 도움을 주었을 것으로 추정된다.

세포 내 CBS 또는 CSE 의 발현과 CD44 의 발현은 매우 유의적인($|r| > 0.7$) 역상관관계를 나타냈다(Fig. 19B). 또한 CD44 와 system Xc 에 대한 반응성은 매우 유의한 상관관계를 보여주었다. 한편 CD44 의 발현과 system Xc 의 구성요소인 xCT 의 발현은 단백질 및 mRNA 수준에서 유의적인 상관관계가 나타나지 않았다(Fig. 19C). System Xc 의 활성화가 증가하기 위해서는 xCT 와 4F2hc 의 발현이 증가하고 세포막에서 복합체(complex)를 이루어야 하기 때문이다.

따라서 xCT(*Slc7a11*)의 발현보다 CD44 의 발현이 erastin 처리에 대한 반응성에 대해 더욱 긴밀한 상관관계를 가진다고 추정된다. 본 연구를 바탕으로 추후 간암조직에서의 CD44 의 발현수준으로 system Xc 억제제를 사용 시 페로토시스에 대한 민감도를 예측할 수 있을 것이라고 생각한다.

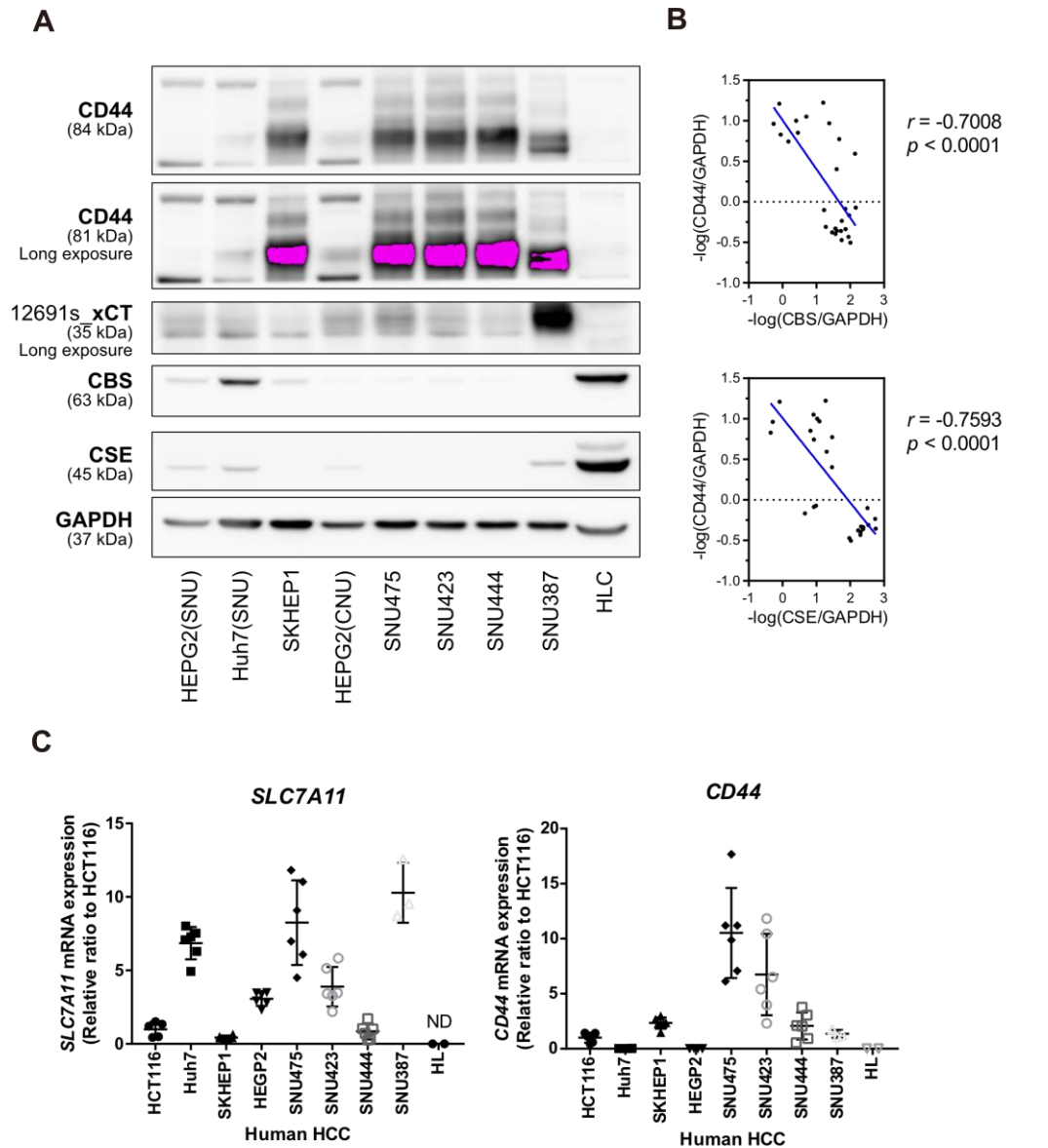


Figure 19. CD44 expression is correlated to ferroptosis sensitivity

(A) Protein expression of CD44, xCT, CBS, and CSE in liver cancer cells. HLC; Human Liver Cytosol.

(B) Correlation between CD44 and (CBS or CSE) was analyzed using their protein expression levels. Three replicates of protein analysis were processed in 9 types of liver cells (total 27 dots). Pearson's correlation coefficient r with p -value are indicated in the right side of the panels.

(C) mRNA expression of *SLC7A11* (xCT) and *CD44* in hepatocellular carcinoma (HCC) was measured using real-time qPCR.

3. 간 섬유화 과정에서 system Xc의 역할 연구

3-1. 간 섬유화 과정에서 system Xc의 발현이 증가한다.

선행 연구결과로부터 손상된 간의 대식세포 및 간 정상세포에서 CD44가 높게 발현됨을 확인하였다. 또한 간을 구성하는 세포 종류 별 xCT를 정량 하였을 때, 대식세포 및 간 정상세포에서 xCT가 높은 수준으로 발현되는 것을 관찰하였다(Fig. 20A).

간 섬유화 진행 전 단계인 간염 환자(n=64)의 간 조직에서 xCT를 면역조직화학기법으로 염색한 결과, 정상 간 조직(n=14)과 비교하여 xCT 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 20B). xCT와 간 정상세포의 지표인 α SMA를 면역조직형광기법으로 염색하여 확인한 결과, xCT가 α SMA와 동일한 세포에 위치하는 것을 관찰하였다(Fig. 20C). 또한 티오아세트아미드로 간 섬유화를 유도한 마우스의 간 조직에서 xCT가 mRNA 수준에서 현저히 증가하고, xCT와 대식세포 표지자인 F4/80의 발현 위치가 상당 부분 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 20D, E). 이는 간 섬유화가 진행됨에 따라 증가하는 간 정상세포와 대식세포에서 xCT의 발현이 유의적으로 높아져 있음을 시사한다. 따라서 본 연구자는 system Xc를 표적하여 간의 비실질세포 특이적으로 신호체계를 교란하고, 간 섬유화 치료효과를 기대할 수 있을 것이라 예상하였다.

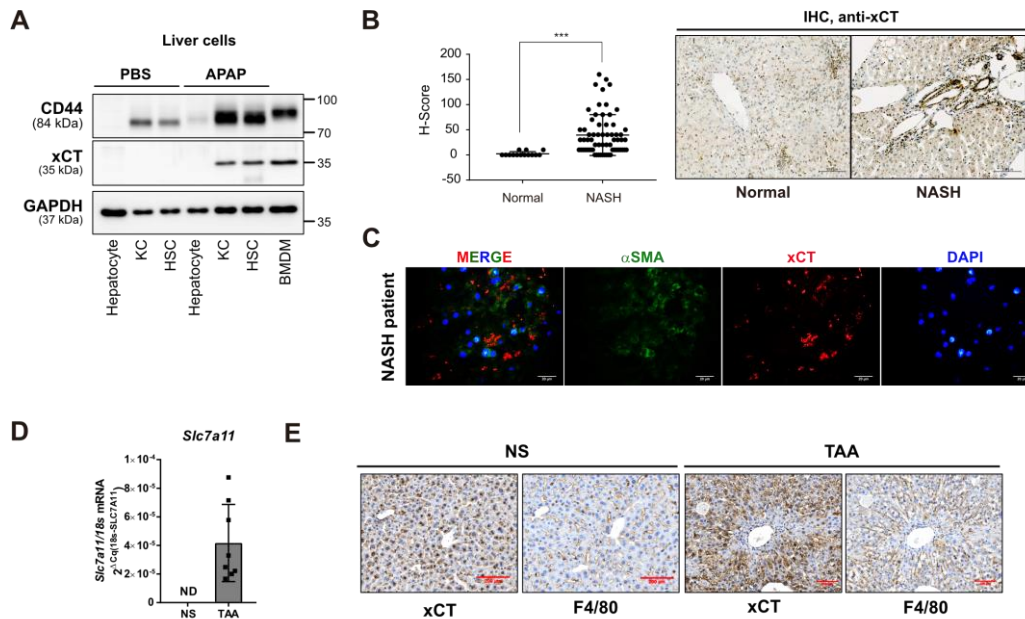


Figure 20. System *Xc* is upregulated in profibrotic conditions

(A) Hepatic cells were isolated from liver of normal mice and liver of acetaminophen-injected mice. Protein levels of CD44 and xCT were measured in the hepatic cells, and bone marrow derived macrophage (BMDM). KC; Kupffer cell, HSC; hepatic stellate cell.

(B) H-score based on xCT stained IHC of liver samples from 14 normal and 64 NASH patients. Data are presented as mean \pm SD, analyzed by unpaired student *t*-test; ***p* < 0.01. Representative images of xCT stained IHC in normal and NASH liver. Scale bar = 100 μ m.

(C) Immunofluorescence images showing the localization of xCT in frozen liver sample from profibrotic NASH patient. Liver tissues were labeled with α SMA (green), xCT (red) and DAPI (blue). Scale bar = 20 μ m.

(D) *Slc7a11* (xCT) mRNA expression level was measured using real-time qPCR in TAA-induced fibrotic liver (n=8 mice per group). NS;

normal saline, ND; not detected, *Slc7a11* Cq value > 35.

(E) IHC images showing the localization of xCT in liver samples. Liver tissues were labeled with F4/80 and xCT. NS; normal saline, scale bar = 200 μm .

3-2. 오라노핀은 system Xc의 활성을 억제하여 세포 내 GSH를 고갈시킨다.

본 연구자는 골수유래 대식세포에서 오라노핀이 저농도에서부터 system Xc 활성을 강력하게 억제한다는 것을 확인하였다(Fig. 21A, B). 현재까지 오라노핀은 티오레독신 환원효소의 억제제로 보고된 바 있다(37). 하지만, 본 연구에서는 골수유래 대식세포에 오라노핀을 처리 시 세포 내로 들어가는 오라노핀의 용량이 전체의 10-20% 밖에 되지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 21C). 비가역적 티오레독신 환원효소 억제제로 알려진 D9은 인플라마좀 억제효과를 나타내지 않았다(Fig. 21D). 또한 기존에 알려진 보고와는 다르게 오라노핀의 세포사멸 효과가 높게 나타나는 간 정상세포와 골수유래 대식세포에서는 티오레독신 환원효소의 발현이 현저히 낮았다(Fig. 21E, F). 이는 오라노핀이 일차적으로 세포질에 위치한 티오레독신 환원효소 보다는 세포막에 위치한 단백질을 표적으로 할 가능성이 높다는 점을 시사한다.

LPS와 ATP로 활성화된 골수유래 대식세포에 오라노핀을 처리하고 RNA-sequencing을 진행하였다(GSE176346). 오라노핀 처리에 의해 유의적으로 가장 많이 변한 유전자로서 GSH 과산화효소 1(*Gpx1*)이 확인되었다(Fig. 21G). 실제로 세포 내 GSH를 정량한 결과, 오라노핀 처리 1시간 이내 세포 내 GSH가 빠르게 고갈되는 것을 확인하였다(Fig. 21H). GSH의 결핍은 세포 내 산화적 스트레스로 이어져 오라노핀 처리 시 농도 의존적으로 골수유래 대식세포에 활성산소가 축적되는 것을 확

인할 수 있었다(Fig. 21I).

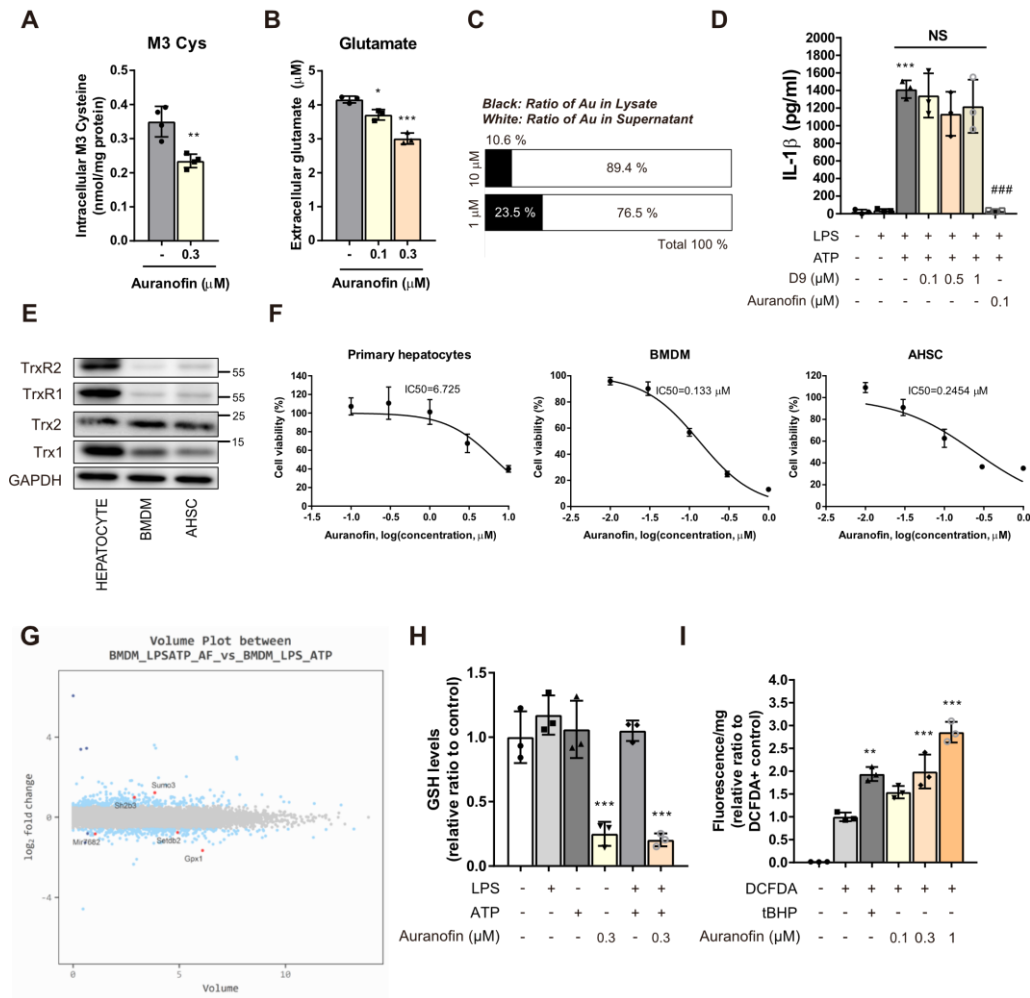


Figure 21. Auranofin inhibits system Xc

(A) Using stable isotope of cystine (M6), intracellular M3 cysteine were measured in BMDM after treatment with auranofin (0.3 μM) for 15 min, n = 4. Cys; cysteine.

(B) After exposure of BMDM with auranofin for 3 h, extracellular glutamate levels were measured by glutamate assay kit in supernatant of BMDM, n = 3. Data are presented as mean \pm SD, analyzed by unpaired student *t*-test; **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and, ****p* < 0.001 compared to control.

(C) BMDMs were treated with 1 or 10 μM auranofin for 1 h. Ratio of gold elements in supernatant and cell lysates of BMDM were evaluated using ICP–MS.

(D) Effects of thioredoxin reductase inhibitor, D9, on ATP triggered IL–1 β release of LPS–primed BMDM, $n = 3$. Data are presented as mean \pm SD, analyzed by one–way ANOVA followed by Tuckey’ s test; *** $p < 0.001$, compared to control; ### $p < 0.001$, NS; not significant compared to NLRP3 inflammasome–induced group.

(E) Intracellular protein levels of thioredoxin and thioredoxin reductases in hepatocyte, BMDM and activated HSC.

(F) IC₅₀ values of auranofin were determined using MTT assay on mouse primary cells including hepatocyte, BMDM, and AHSC. AHSC; Activated Hepatic Stellate Cell. $n = 7$, $n = 5$, and $n = 4$ per group for hepatocyte, BMDM, and AHSC, respectively.

(G) Volume plot between LPS/ATP–treated BMDM and LPS/ATP–treated BMDM with 0.3 μM auranofin.

(H) Intracellular GSH levels in BMDM treated with LPS (100 ng/mL), ATP (1 mM) and auranofin (0.3 μM), $n = 3$; *** $p < 0.001$ compared to control.

(I) Intracellular ROS levels were measured by green fluorescence of DCFDA–positive BMDM, $n = 3$; ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, compared to DCFDA–positive group.

3-3. 활성산소는 인플라마좀 활성을 억제한다.

본 연구자는 세포 내 GSH의 고갈이 간 섬유화 과정에서 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 다음 실험을 수행하였다. 활성산소가 직접적으로 인플라마좀의 caspase-1 활성을 억제한다는 보고(53)를 토대로 GSH 고갈상태 또는 활성산소를 처리했을 때 NLRP3 인플라마좀의 활성을 평가하였다. C57BL/6 마우스로부터 분리한 골수세포를 macrophage-colony stimulating factor (MCSF, 30 ng/mL)를 처리하여 대식세포로 분화시킨 후, Lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL, Adenosine triphosphate (ATP) 1 mM을 각각 처리하여 인플라마좀 활성을 유도하였다. 능동 혹은 수동적 활성산소 유발물질들인 buthionine sulfoximine (BSO), diethyl maleate (DEM), 또는 *t*-BHP를 처리 시 인플라마좀을 매개로 대식세포 밖으로 분비되는 IL-1 β 의 양이 현저히 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 22A-C). 또한 배지의 시스틴을 고갈시키거나, system Xc의 활성을 저해한다고 알려진 erastin 또는 sulfasalazine을 처리하였을 때도 쿠퍼세포와 골수유래 대식세포에서 인플라마좀 활성이 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 22D-H).

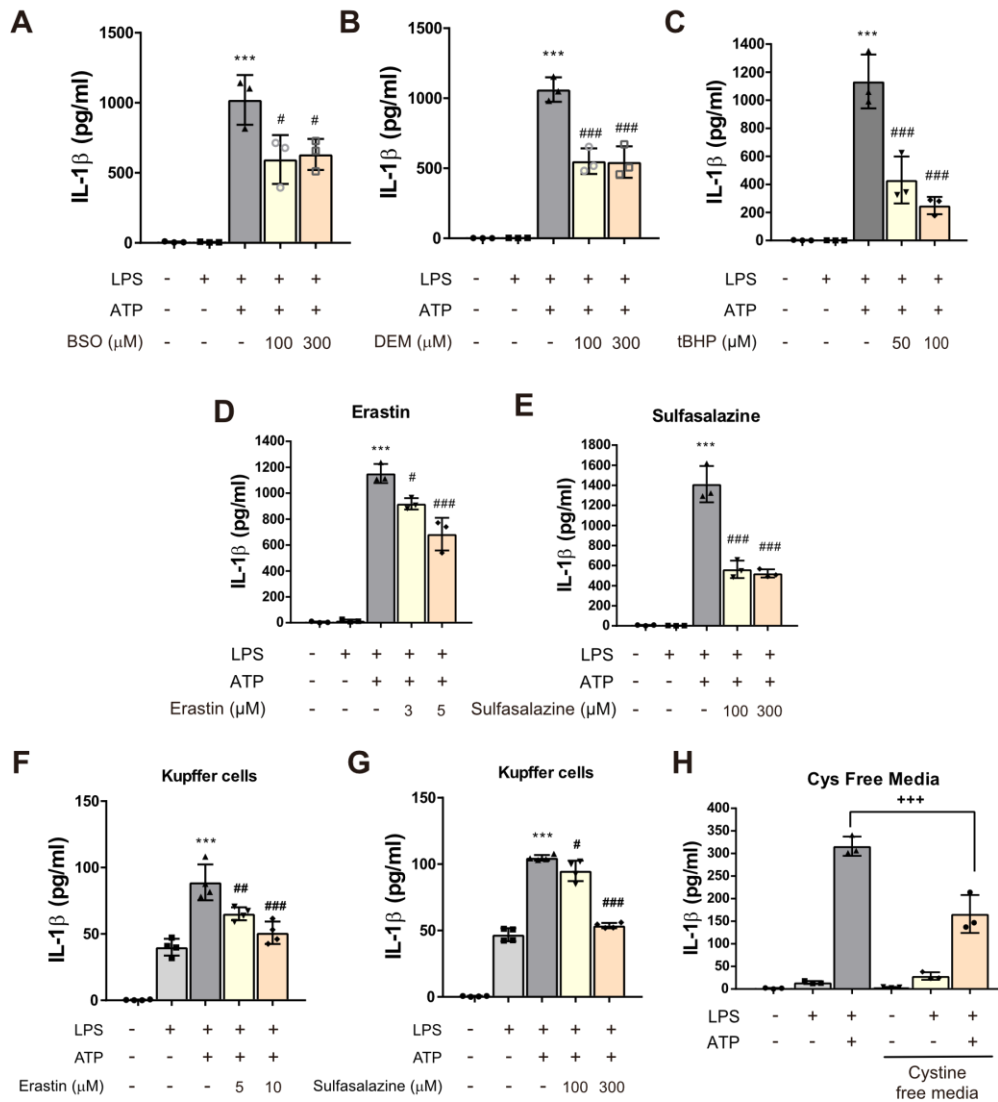


Figure 22. ROS generation inhibits activation of NLRP3 inflammasome

(A) Effects of GSH depleting agents on ATP triggered IL-1 β release in LPS-primed BMDM. BMDMs were treated with BSO (100 μ M) and LPS (100 ng/mL) for 4 h, followed by exposure to ATP (1 mM) for 1 h, n = 3.

(B) BMDMs were primed with LPS for 4 h, followed by exposure to ATP and DEM (300 μ M) for 1 h, n = 3.

(C) Effects of *t*-BHP on ATP triggered IL-1 β release of LPS-primed BMDM, n = 3; Data are presented as mean \pm SD (A, B, and C),

analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ compared to NLRP3 inflammasome-induced group.

(D, E, and H) Effects of erastin, sulfasalazine and cystine free media on ATP triggered IL-1 β release of LPS-primed BMDM.

(F, G) Effects of erastin and sulfasalazine on ATP triggered IL-1 β release of LPS-primed Kupffer cells. Data are presented as mean \pm SD (D-G), analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. $n = 3$ for D, E, H and $n = 4$ for F, G. *** $p < 0.001$, compared to control; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ compared to LPS, and ATP-treated group; +++ $p < 0.001$, compared to LPS, and ATP-treated group in DMEM media.

3-4. 오라노핀은 인플라마좀 활성을 억제한다.

System *Xc* 억제 및 GSH 고갈 시 인플라마좀 활성이 감소한다는 기존의 연구결과를 바탕으로 오라노핀 처리 시 NLRP3 인플라마좀 활성을 평가하였다. LPS로 활성화된 골수유래 대식세포에 ATP와 오라노핀을 처리하였을 때, 오라노핀 0.01 μ M 수준부터 오라노핀 농도에 의존적으로 IL-1 β 의 분비가 유의적으로 감소하였다(Fig. 23A, B). 또한 오라노핀의 인플라마좀 활성 억제효과는 N-acetyl cysteine (NAC)을 처리하여 활성산소를 제거하였을 때 완전히 반전되었다(Fig. 23C). 오라노핀은 LPS로 활성화된 골수유래 대식세포에 ATP 이외에도 팔미트산, monosodium urate (MSU) 또는 nigericin을 처리하여 활성화시킨 NLRP3 인플라마좀에도 억제효과를 나타냈다(Fig. 23D, E). 또한 간에 상주하는 대식세포인 쿠퍼세포에서도 동일한 오라노핀의 효과가 관찰되었다(Fig. 23F).

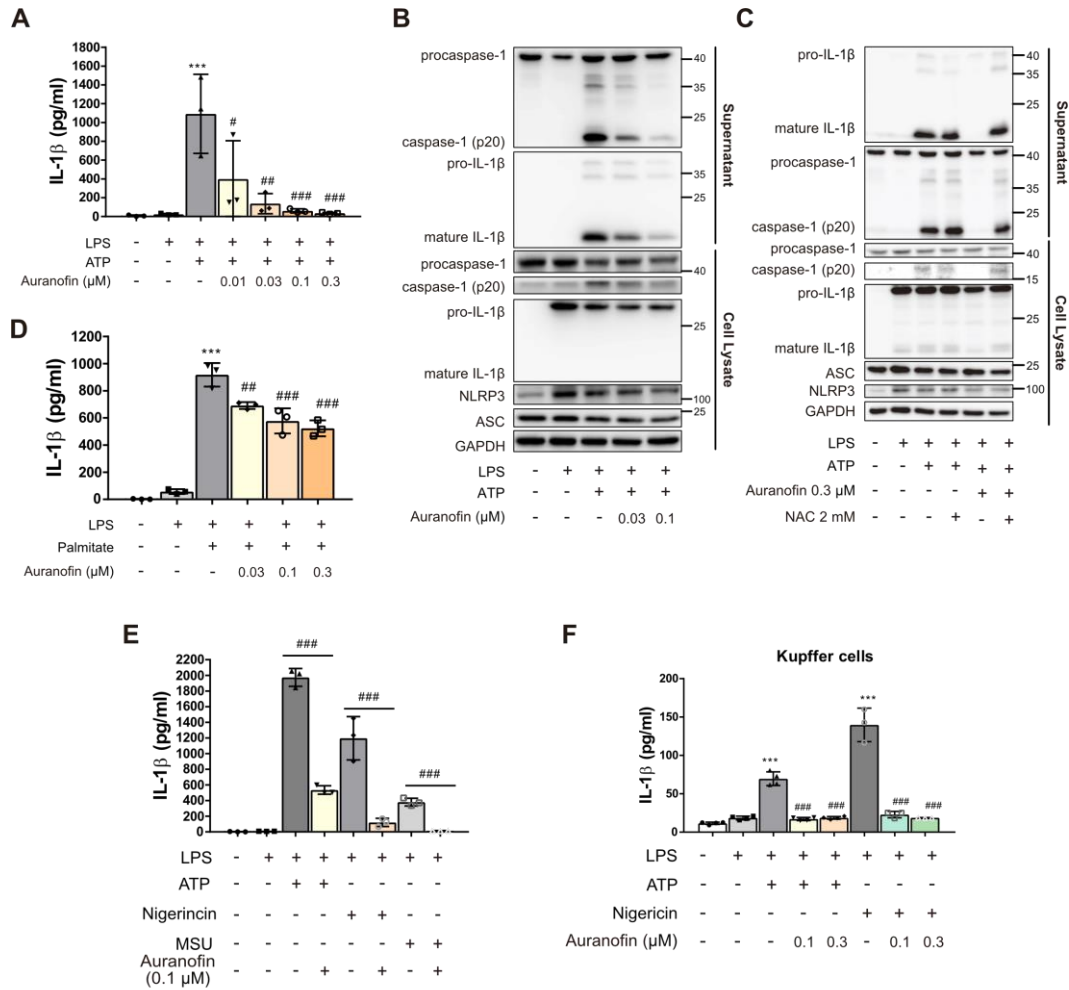


Figure 23. Auranofin inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1β release

(A and B) Effects of auranofin on ATP triggered IL-1β release in LPS-primed bone marrow-derived macrophage (BMDM), n=3. BMDMs were primed with LPS (100 ng/mL) for 4 h, followed by exposure to ATP (1 mM) and auranofin for 1h.

(C) ATP triggered IL-1β release by NLRP3 inflammasome was determined by western blot analysis in LPS-primed BMDM after cotreatment of NAC with auranofin.

(D) Effect of auranofin on palmitate (400 μM) triggered IL-1β release in LPS-primed BMDM, n=3.

(E) Effects of auranofin on nigericin (2 μ M) or 200 μ g/ml monosodium urate (MSU) triggered IL-1 β release in LPS-primed BMDM, n=3.

(F) Effects of auranofin on ATP (1 mM) or nigericin (2 μ M) triggered IL-1 β release in Kupffer cells, n=3 or 4. Data are presented as mean \pm SD (A, D, E, and F), analyzed by one-way ANOVA followed by Tuckey' s test; *** p < 0.001, compared to control; # p < 0.05, ## p < 0.01, and ### p < 0.001 compared to NLRP3 inflammasome-induced group.

대식세포에서 NLRP3 인플라마솜이 지속적으로 활성화 될 경우, 잘려진 caspase-1 (p20) 단백질이 gasdermin (GSDMD)을 절단하여 GSDMD-N 단백질이 세포막에 구멍(pore)을 형성하고 ‘pyroptosis’라고 불리는 세포 사멸을 유도한다(39). 오라노핀은 인플라마솜 활성을 억제하여 pyroptosis 형태의 세포사멸을 저해하였다(Fig. 24A).

한편, 오라노핀 처리에 의해 caspase-3의 활성화를 매개로 한 세포사멸사가 증가하였다. 인플라마솜 자극원에 노출되었지만 장시간(16시간)의 오라노핀 0.3 μ M 농도 처리군부터 caspase-3의 활성형이 관찰되었고 오라노핀 1 μ M 처리군에서 annexin-V 결합이 증가하였다(Fig. 24B, C). Incucyte[®] caspase-3/7 염색시약 (Incucyte[®] caspase-3/7 green apoptosis assay reagent)을 사용하여 caspase-3 활성을 정량했을 시에도 오라노핀 처리에 의한 농도 의존적 caspase-3 활성화를 확인하였다(Fig. 24D). 즉, 오라노핀은 인플라마솜 자극원에 노출된 대식세포에서 괴사성 세포사멸(pyroptosis)이 아닌 능동적인 세포사멸사를 유도하였다. 오라노핀에 의한 pyroptosis 억제와 세포사멸사의 유도는 NAC처리에 의해 반전되었다. NAC를 오라노핀과 함께 처리 시, GSDMD를 매개로 한 pyroptosis 는 활성화 되었고 세포사멸사는 억제되었다(Fig. 24E-H).

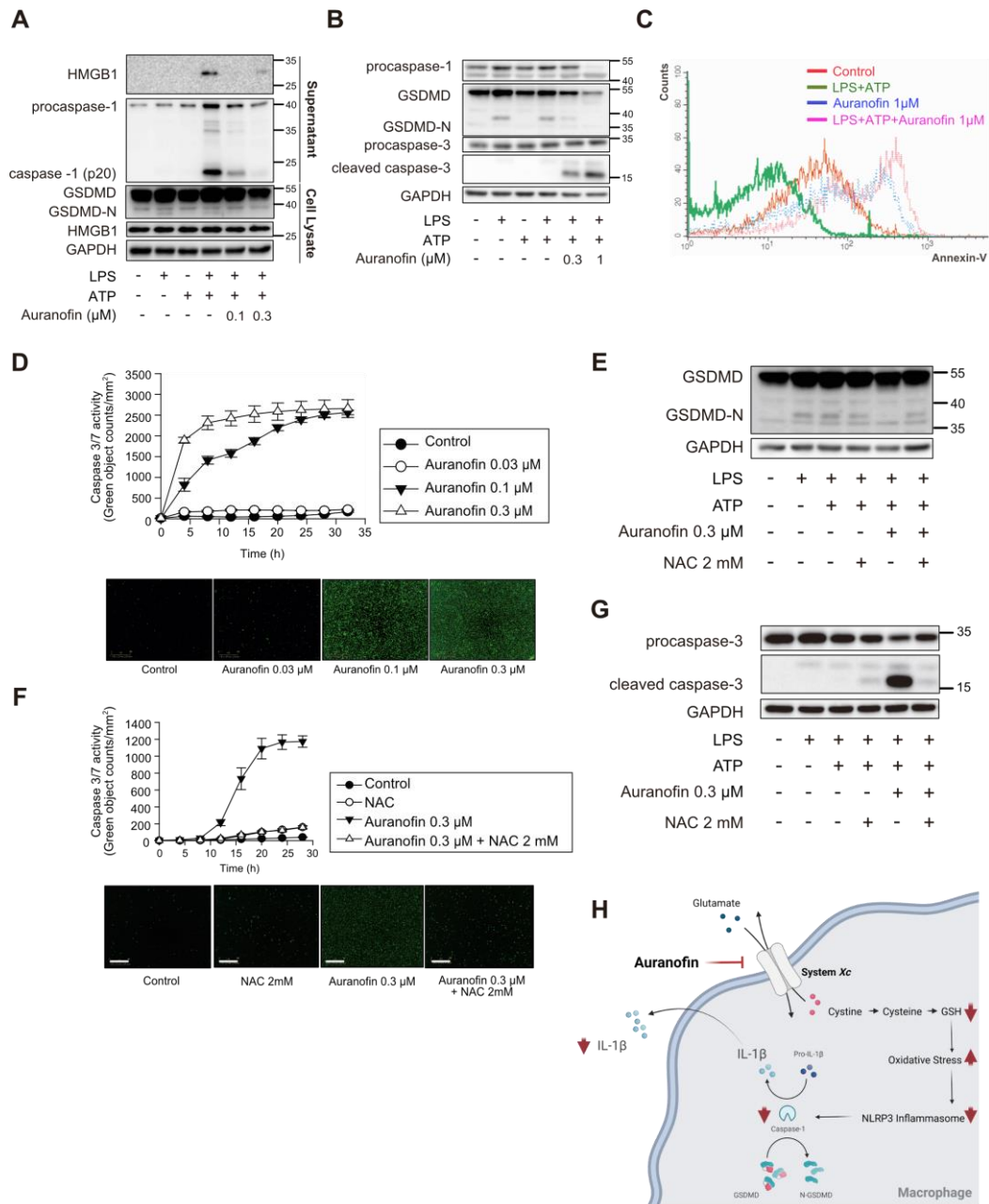


Figure 24. Auranofin inhibits pyroptosis and induces apoptosis in macrophages

(A) Secretion of HMGB1 was determined by immunoblot analysis of supernatants. GSDMD–N was measured in cell lysates.

(B) Cleavage of caspase–3 and GSDMD–N were measured in cell lysates of BMDM primed with LPS followed by exposure of ATP (1 mM) and auranofin for 16 h.

(C) Annexin-V staining in the auranofin-treated BMDM.

(D) Auranofin-treated BMDMs were stained using Incucyte[®] caspase3/7 green reagent and detected using Incucyte[®] ZOOM, n=5. Data are presented as mean \pm SEM. Scale bar = 300 μ m.

(E) BMDMs were primed with LPS (100 ng/mL) for 4 h, followed by exposure to ATP (1 mM), NAC (2 mM) and auranofin for 16 h. GSDMD-N was measured using western blot analysis.

(F) BMDM treated with 0.3 μ M auranofin and 2 mM NAC. Apoptotic cells were counted using green fluorescence of Incucyte[®] caspase3/7 reagent. Data are presented as mean \pm SEM, n = 4. Scale bar = 300 μ m.

(G) BMDMs were primed with LPS (100 ng/mL) for 4 h, followed by exposure to ATP (1 mM), NAC (2 mM), and auranofin for 16 h. Cleaved caspase-3 were measured using western blot analysis.

(H) Proposed schematic image of the auranofin's mechanism in macrophage.

3-5. 오라노핀 처리에 의해 간 정상세포의 이동능이 감소한다.

간에서 System Xc는 대식세포뿐만 아니라 간 정상세포에도 다수 분포한다. 간 섬유화를 유도한 마우스에 오라노핀을 투여 시 간 정상세포를 표지하는 α SMA와, desmin으로 면역화학 염색된 부분이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 25A). 하지만 간 정상세포의 활성화 과정에서 오라노핀을 처리하였을 때, 활성화 지표의 변화는 없었다(Fig. 25B). 또한 간 정상세포의 대표적 활성화 신호인 Smad2/3의 인산화 정도는 오라노핀에 의해서 영향을 받지 않았다(Fig. 25C).

간 정상세포에서 오라노핀의 작용 양상을 평가하기 위하여, 활성화된 정상세포에 오라노핀을 처리 후 RNA-sequencing 을 진행하였다. RNA-sequencing 결과, 세포 이동능에 영향을 미치는 ECM 수용체 상호작용(ECM receptor interaction) 관련 유전자군 변화가 관찰되었다(Fig. 25D). 또한, 인플라마즘 활성화는 간 정상세포의 이동능을 매개한다는 기존의 연구결과를 고려하여, 오라노핀이 간 정상세포의 이동능에 미치는 영향을 평가하였다. 오라노핀을 저농도로 처리한 후에, 활성화된 간 정상세포 또는 인간 간 정상세포주인 LX-2 세포에서 세포의 이동을 Incucyte[®] S3 migration assay 또는 transwell assay를 이용하여 정량하였다. 저농도의 오라노핀 처리에 의해 FBS로 유도한 간 정상세포의 이동이 감소하였으며, LX-2세포를 이용한 wound healing assay에서도 오라노핀 처리에 의해 유의미한 이동 억제효과가 관찰되었다(Fig. 25E-G).

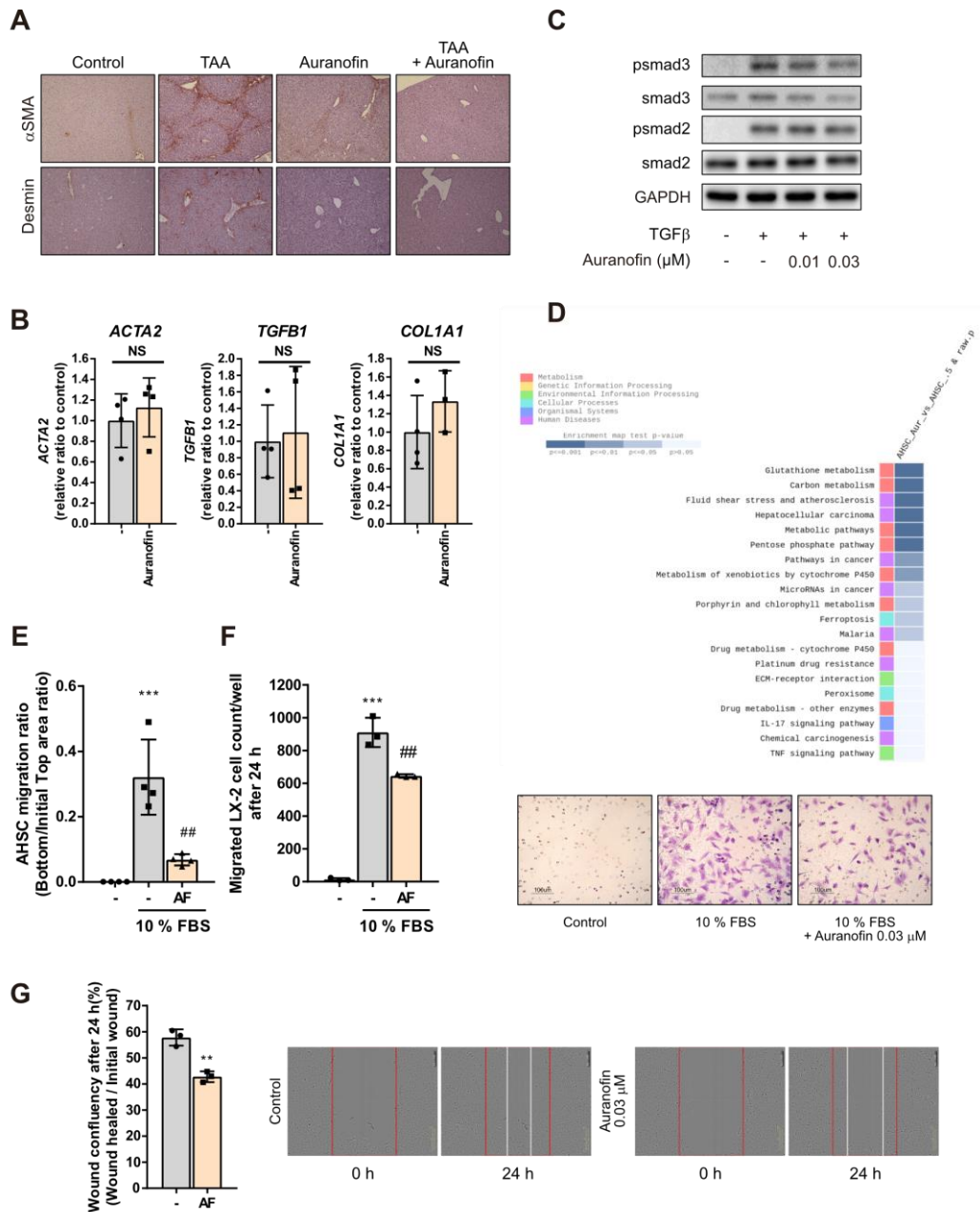


Figure 25. Auranofin inhibits migratory ability of activated HSCs

(A) α SMA and desmin stained liver sections showing distribution of hepatic stellate cells in TAA injected mice. Scale bar = 200 μ m.

(B) Isolated primary mouse HSCs were cultured on uncoated plastic plates in the presence of serum and auranofin (0.03 μ M) containing media, HSCs activation markers including *ACTA2*, *TGFB1*, and *COL1A1* were evaluated after incubation for 7 days, n=4. NS; not

significant.

(C) Smad2/3 phosphorylation following treatment of TGF- β 1 (5 ng/mL) and auranofin for 1 h.

(D) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways analysis based on gene enrichment database. RNA samples for RNA sequencing were isolated from primary HSCs exposed to vehicle or 0.03 μ M auranofin for 12 h was used.

(E) Migration of HSCs was measured by Incucyte[®] chemotaxis assay, n=4.

(F) Migration of LX-2 measured by transwell assay. Migrated LX-2 cells were stained with 0.1% crystal violet and counted per well, n=3. Data are presented as mean \pm SD (E, and F), analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey' s test; *** p < 0.001, compared to control; ## p < 0.01 compared to chemoattractant (10% FBS) added group. Scale bar = 100 μ m. AF; auranofin 0.03 μ M.

(G) Effect of auranofin on wound healing of LX-2 cells. Scratch closure changes were measured after creating wounds on cells using 96-well Incucyte[®] ImageLock plate and incubation with auranofin-containing media, n=3. Scale bar = 300 μ m. Data are presented as mean \pm SD, analyzed by unpaired student' s t -test. AF; auranofin 0.03 μ M, ** p < 0.01 compared to healed wound confluency of control.

3-6. 간세포는 오라노핀 처리에 의한 GSH 고갈과 인플라마솜 반응성이 낮다.

간세포는 간 전체의 70%를 구성하는 실질세포이다. 하지만 선행 데이터에서 간을 구성하는 다른 세포들과 비교하였을 때 마우스에서 분리한 일차배양 간세포는 오라노핀 고농도 처리에 의해서도 세포사멸이 거의 일어나지 않았다(Fig. 21F). 오라노핀에 대한 이러한 반응성 차이는 세포 내 GSH 함량 차이에 기인하였다. 선행연구에서 오라노핀은 마우스 골수 유래 대식세포에서 system Xc를 차단하여 세포 내 GSH를 고갈시키고 산화적 스트레스를 유발하였다(Fig. 21H, I). 하지만 간세포는 다른 비실질세포(골수 유래 대식세포 및 간 정상세포)와 비교하여 기저에 상당히 높은 수준의 GSH를 가지고 있어서(Fig. 26A) 오라노핀을 처리하여도 GSH의 고갈이 유도되지 않았다(Fig. 26B).

또한 골수 유래 대식세포와 비교하여 간세포는 인플라마솜 구성성분인 NLRP3와 ASC 및 pro-IL1 β 을 현저히 낮게 발현하였다 (Fig. 26C). 따라서 간세포에서 인플라마솜의 활성을 평가하였을 때 골수 유래 대식세포와 유사하게 오라노핀에 의한 IL-1 β 의 분비 감소 경향은 나타났지만 상층액으로 분비되는 IL-1 β 의 양이 10 pg/mL 수준으로 매우 낮았다(Fig. 26D). 이는 간세포가 NLRP3 인플라마솜을 매개로 한 간 섬유화 진행에 기여하지 않음을 시사한다. 간세포에서의 결과를 종합하여 볼 때, 오라노핀이 간 섬유화에 효과를 가지는 약리기전은 실질세포인 간세포와는 상대적으로 무관함을 확인할 수 있다.

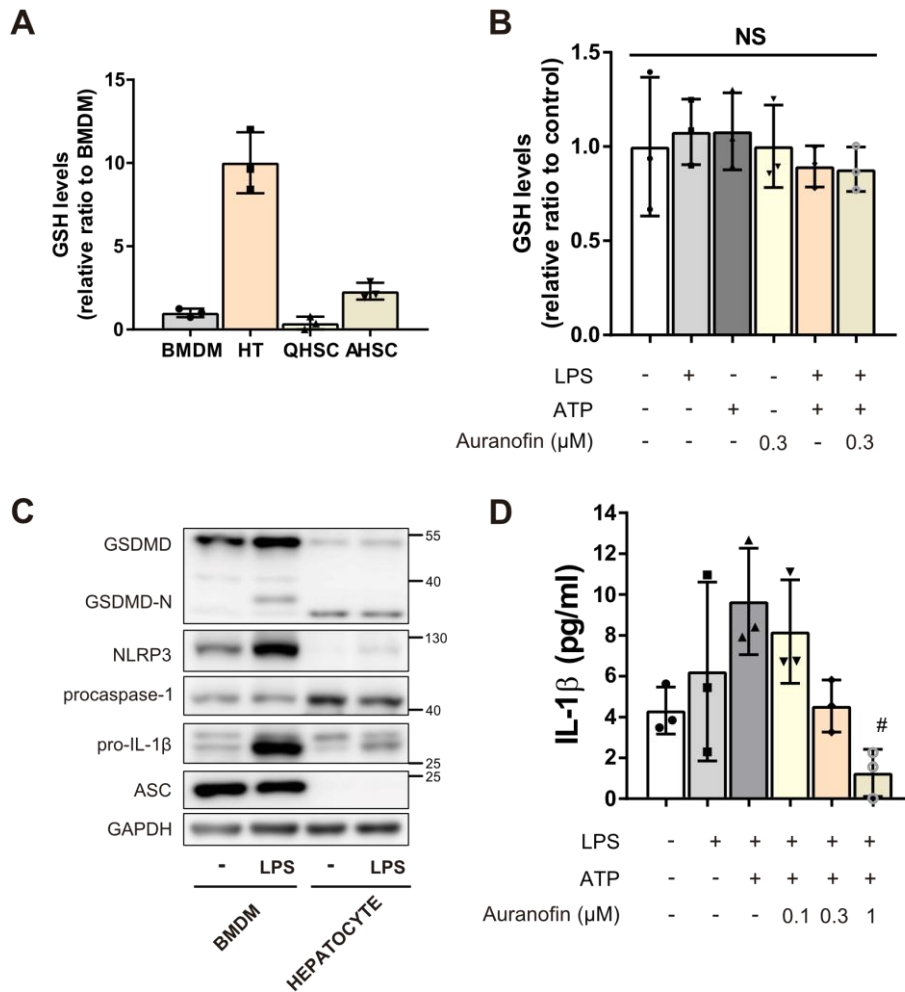


Figure 26. Hepatocytes are resistant to the effect of auranofin

(A) Intracellular GSH levels of hepatocyte (HT), BMDM (Bone marrow derived macrophage), QHSC (Quiescent hepatic stellate cell), and AHSC (Activated hepatic stellate cell), n=3.

(B) Intracellular GSH levels of primary hepatocytes followed by LPS (100 ng/mL), ATP (1 mM) and auranofin (0.3 μM) treatment, n=3. Data are presented as mean±SD, analyzed by one-way ANOVA followed by Tuckey' s test. NS; not significant.

(C) Protein levels of GSDMD, GSDMD-N, pro-IL-1β, NLRP3, procaspase-1, and ASC were evaluated by western blot analysis.

(D) Primary hepatocytes were primed with LPS (100 ng/mL) for 4 h, followed by exposure to ATP (1 mM) for 1 h. IL-1 β release by NLRP3 inflammasome activation was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD, analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. n=3, # $p < 0.05$, compared to NLRP3 inflammasome-induced group.

3-7. 오라노핀은 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화를 저해한다.

BALB/c 마우스에 티오아세트아마이드 (thioacetamide, TAA)를 100 mg/kg 용량으로 8주간 주 2회 복강 내에 투여하고 동시에 오라노핀을 주 5회 1, 3 및 10 mg/kg 용량으로 경구 투약한 후 간 섬유화 정도를 확인하였다. Masson's Trichrome staining 기법으로 간 조직의 콜라겐을 염색한 결과, 티오아세트아마이드 8주 처리군에서 명확하게 관찰되는 콜라겐 축적 현상이 오라노핀 경구 투약군에서는 현저하게 감소하였다. 실제 병리학자의 맹검평가로 진행한 fibrosis score 와 간 무게/몸무게 비도 오라노핀 투약군에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 27A-C).

오라노핀 투약군에서 혈청 간 독성 지표인 AST와 ALT 수치가 개선되었다(Fig. 27D). 또한, 마우스의 간 조직에서 mRNA와 단백질을 분리하여 확인한 결과, 간 섬유화 지표인 *Acta2*, *Colla1*, *Timp1* 및 α SMA의 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 27E, F). 간 조직에서 분리한 단백질에서는 오라노핀 투약에 의해 NLRP3 인플라마솜의 구성요소인 NLRP3, procaspase-1, ASC의 발현과 NLRP3 인플라마솜의 활성화 지표인 caspase-1 (p20), mature IL-1 β 가 모두 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 27G). 위의 결과를 종합하여 볼 때, 오라노핀은 system Xc를 매개로 한 NLRP3 인플라마솜 활성을 억제하여 간 섬유화 진행을 저해한다는 사실을 알 수 있다.

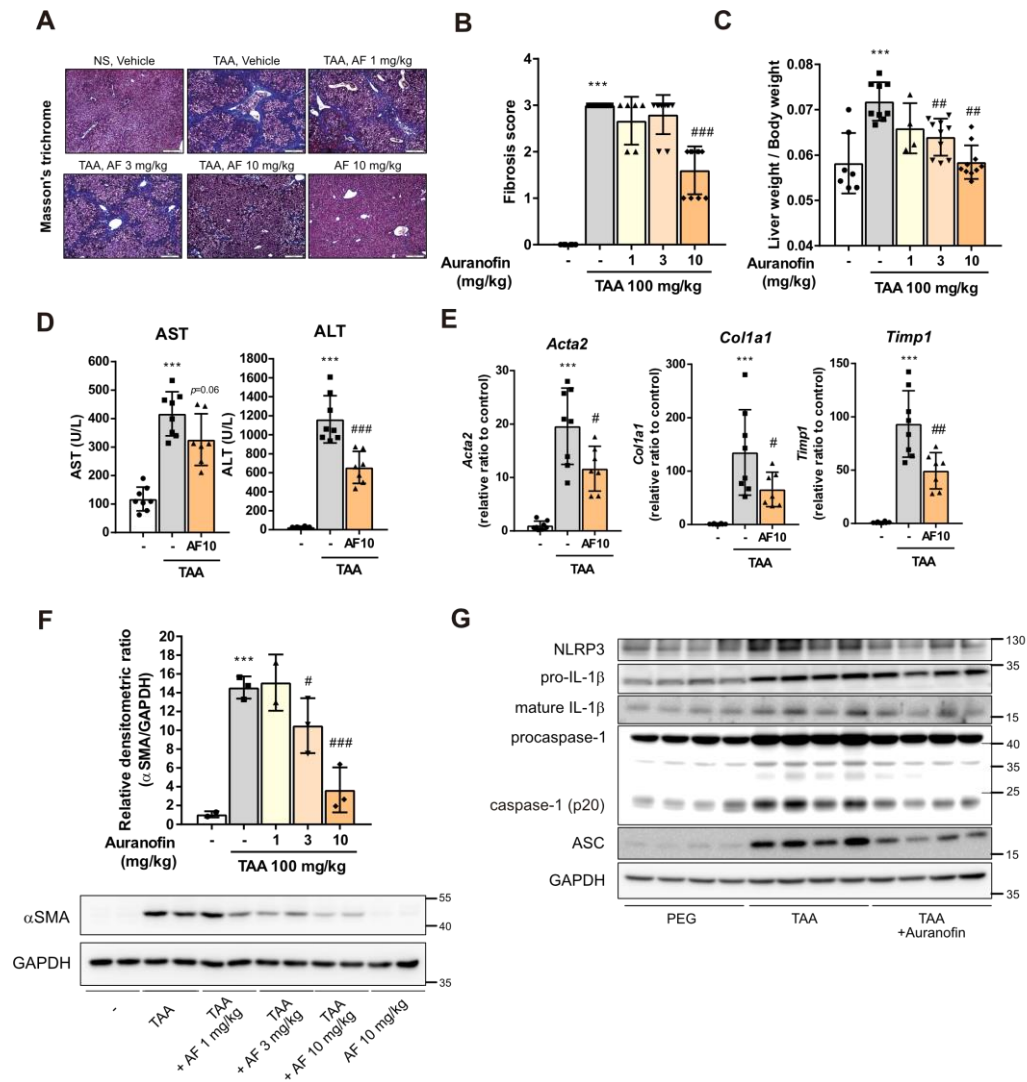


Figure 27. Auranofin inhibits thioacetamide–induced liver fibrosis

(A) Representative Masson's Trichrome stained liver sections demonstrating collagen deposition in thioacetamide (TAA) injected mice. NS; normal saline, AF; auranofin.

(B) Fibrosis score assessed by liver pathologist in a blind manner.

(C) Elevation of relative liver weight was decreased by the administration of auranofin. Data are presented as mean \pm SD; n=6 mice for control group, n=7 mice for TAA + auranofin 10 mg/kg administered group and n=8 mice for the rest of the groups.

(D) Serum AST and ALT levels.

(E) *Acta2*, *Colla1*, and *Timp1* levels were measured by qPCR.

(F) Quantification of α SMA by western blot analysis and Data are presented as mean \pm SD; n=8 mice for control group and TAA-administered group, n=7 mice for TAA + auranofin 10 mg/kg administered group. *** $p < 0.001$, versus control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, versus TAA group by one-way ANOVA followed by Tuckey' s test.

(G) Western blot analysis of NLRP3, pro-IL-1 β , mature IL-1 β , procaspase-1, caspase-1 (p20) and ASC in liver lysates.

3-8. Aurocyanide는 티오아세트아마이드 유도 간 섬유화를 저해한다.

선행연구에서 밝힌 오라노핀의 기전을 바탕으로 오라노핀의 활성 대사체를 확인하기 위하여 오라노핀의 대사체로 예측되는 화합물 7개 (Fig. 28A)에 대하여 system Xc 활성 억제 효과를 평가하였다. 골수유래 대식세포에 1 μ M 농도 수준으로 오라노핀 및 오라노핀의 예측 대사체 화합물을 처리하고 3시간 후 배지로 방출된 글루타메이트를 정량하였다. 그 결과 M1, M4, M6, M7 화합물이 오라노핀과 유사하거나 더 높은 system Xc 활성 억제효과를 나타냈다(Fig. 28B).

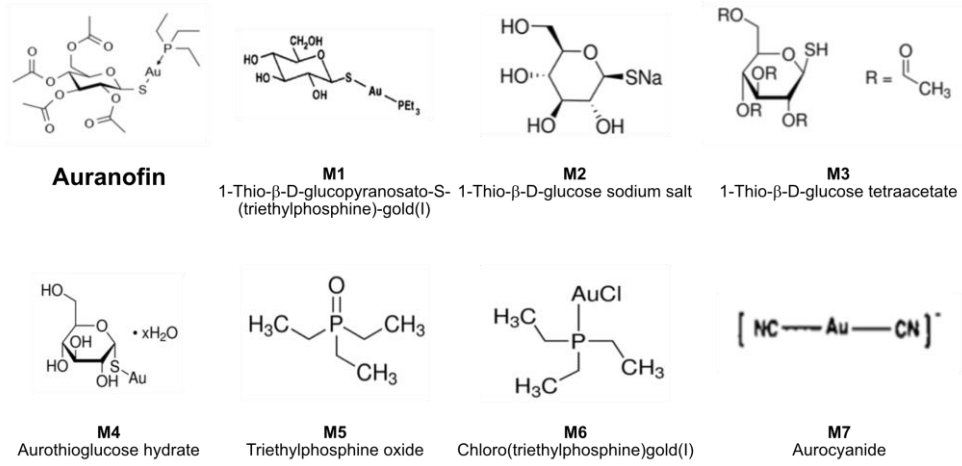
골수유래 대식세포에서 오라노핀은 system Xc를 억제하여 NLRP3 인플라마솜의 활성을 유도하였다. 골수유래 대식세포에 오라노핀 또는 M1, M4, M6, M7 화합물을 각각 0.1 μ M씩 처리하여 각 화합물들이 LPS와 ATP로 유도된 NLRP3 인플라마솜에 미치는 효과를 평가하였다. M1 또는 M7 화합물을 처리한 결과 오라노핀과 유사한 수준의 NLRP3 인플라마솜 억제효과가 나타났다(Fig. 28C). 이 중 M1 화합물은 오라노핀의 단순 가수분해로 생기는 화합물이었다. 본 연구자는 이후 M7를 이용하여 오라노핀과 간 섬유화 억제효능을 비교하기 위한 동물실험을 진행하였다.

오라노핀의 활성 대사체로 선정된 M7은 aurocyanide (AC)로 확인되었다. BALB/c 마우스에 8주간 티오아세트아마이드를 100 mg/kg 용량으로 주 2회 복강 내 투여하였으며 이와 함께 주 6회 오라노핀 또는 aurocyanide를 10 mg/kg 용량으로 경구 투약하였다. Masson ' s

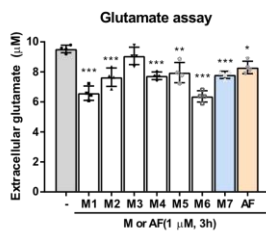
Trichrome staining 기법으로 간 조직의 콜라겐을 염색한 결과, 티오아세트아마이드 8주 처리군에서 명확하게 관찰되는 콜라겐 축적 현상이 오라노핀 또는 aurocyanide를 경구 투약한 군에서 모두 현저하게 감소하였다(Fig. 28D). 실제 병리학자의 맹검평가로 진행한 섬유화 면적 및 fibrosis score 정량 결과도 이와 동일하게 관찰되었다(Fig. 28E, F). 오라노핀 투약군 및 aurocyanide 투약군에서 혈청 간 독성 지표인 AST와 ALT 수치가 개선되었다(Fig. 28G). 나아가 간 조직에서 섬유화의 대표적 지표인 *Timp1*, *Ctgf*, *Colla1*과 *Acta2*의 mRNA 발현, α SMA의 단백질 발현이 두 군에서 모두 유의적으로 감소되었다(Fig. 28H, I). 이를 바탕으로 간 섬유화를 매개하는 오라노핀의 활성 대사체로 aurocyanide 를 제시할 수 있다.

Aurocyanide 는 구조적으로 사이안(cyanide) 잔기를 포함하는 화합물이다. 따라서 혈구 독성 및 신기능 감소가 나타날 수 있다고 예측하여 해당 독성을 aurocyanide 단독 투여군의 혈청에서 평가하였다. 하지만 신기능 감소로 인해 나타나는 혈액요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 및 크레아티닌(creatinine)의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 28J).

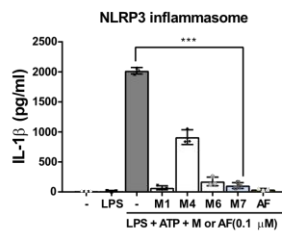
A



B



C



D

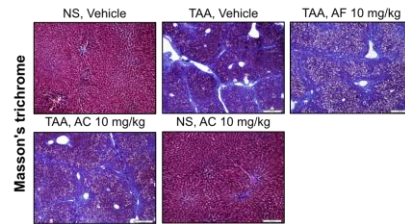


Figure 28–1. Aurocyanide inhibits thioacetamide–induced liver fibrosis

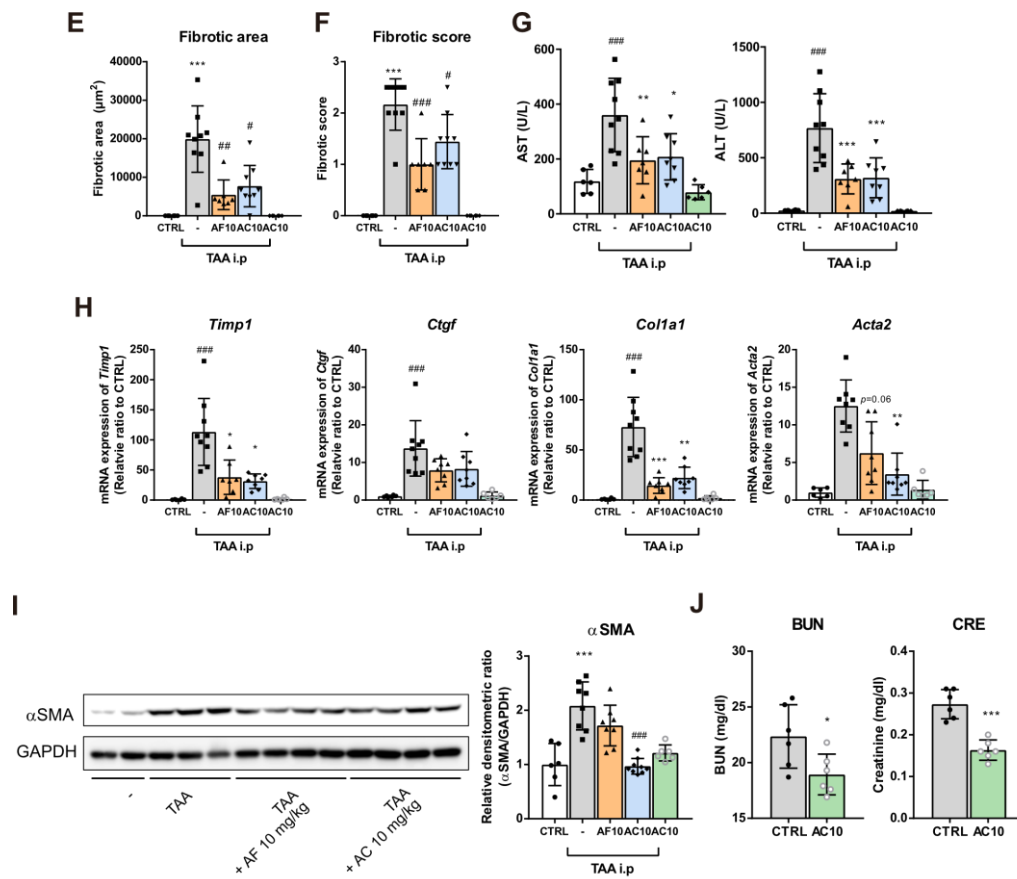


Figure 28–2. Aurocyanide inhibits thioacetamide–induced liver fibrosis

(A) Metabolites of auranofin (M1–M7).

(B) Effect of the auranofin’ s metabolites on system *Xc* activity.

(C) Effect of the metabolite candidates on activation of NLRP3 inflammasome. AF; auranofin. M7 (aurocyanide) potently inhibited system *Xc* activity and inflammasome–mediated IL–1 β secretion.

(D) Representative Masson’ s Trichrome stained liver sections demonstrating collagen deposition in thioacetamide (TAA) injected mice (n = 7–8 mice per group). NS; normal saline, AF; auranofin 10 mg/kg.

(E and F) Fibrosis area and fibrosis score assessed by liver pathologist in a blind manner.

(G) Serum AST and ALT levels.

(H) Quantification of *Timp1*, *Ctgf*, *Colla1* and *Acta2* by qPCR.

(I) Western blot analysis of α SMA using liver tissue lysates.

(J) Serum BUN (blood urea nitrogen), CRE (creatinine) levels. Data are presented as mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, versus control group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, versus TAA group by one-way ANOVA followed by Tuckey' s test.

IV. 고찰

최근 System Xc 는 암세포에서 그 역할이 활발히 연구되고 있으며 항암제의 표적으로 많은 주목을 받고 있다. 반면 간 전구세포, 대식세포 및 간 정상세포를 포함하는 증식 가능한 정상세포에의 system Xc 에 관한 연구는 아직 많이 부족한 상태이다. 본 연구에서는 급성 간 손상 시 나타나는 간 전구세포에서 system Xc 의 활성이 증가하고, CD44의 발현이 이를 매개한다는 사실을 확인하였다. 또한 류마티스 치료제인 오라노핀을 사용하여 간 섬유화 과정에서 대식세포와 정상세포에서 발현하는 system Xc 활성을 억제하여 간을 보호할 수 있음을 입증하였다. 본 연구를 종합하여 보면, system Xc 활성은 간암세포 또는 급성 손상 후 나타나는 간 전구세포의 증식에 중요한 역할을 한다. 하지만, 만성적 손상으로 간 전구세포의 기여도가 낮고, 비실질세포를 매개로 한 염증반응 및 섬유화 반응이 주로 나타나는 간 섬유화 질환에서는 system Xc 활성을 억제하여 치료효과를 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있다.

CD44는 세포 외 기질과 결합하는 막 단백질로 이전에는 암세포와 면역세포의 침윤과정과 관련하여 주로 연구되었다(29). 현재까지 간에서 CD44는 간 전구세포의 지표로 보고되었지만, 그

역할에 대한 연구는 부족하였으며, CD44 의 역할은 일부 대식세포 또는 간 정상세포에서만 보고되었다. Patouraux *et al.* 는 CD44의 발현이 대식세포의 침윤과 M1로의 분극(polarization)을 촉진하여 비알콜성지방간염을 진행시킨다고 보고하였다(54). Höchst *et al.* 는 활성화된 간 정상세포에서 CD44의 발현이 면역반응을 억제하는 myeloid derived suppressor cells 를 유도한다고 발표하였다(55). 본 연구에서는 이러한 선행 보고와는 달리 간 전구세포에서 CD44의 역할을 구명하였다.

간 전구세포는 간 손상 시 활성화 되어 간의 실질세포(담관세포 또는 간세포)로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. 본 연구에서 사용한, CD44 를 발현하면서 증식하는 간세포를 간 전구세포로 간주할 수 있는 근거는 다음과 같다. 1) 본 연구에서 CD44 발현은 일시적으로 증가하였다. CD44 는 간에서 암 줄기세포 지표(cancer stem cell marker)로서도 보고되어 있다. 하지만 본 연구에서 확인한 CD44 발현은 간을 절제하고 20 일 이후 또는 아세트아미노펜을 처리하고 72 시간 이후에 손상 이전의 수준으로 감소한다. 이는 본 연구에서 확인한 CD44 의 발현 증가가 간암세포의 발생과는 무관하다는 사실을 뒷받침한다. 2) 급성 간 손상 이후 CD44 를 발현하는 세포는 간세포로 분화하는 과정에서 나타나는 작은 간세포(small hepatocyte)의 특징이라는 내용이 이전 논문들에서 보고된 바 있다(13). 분화된 간세포와 작은 간세포를 DNA microarray 기법으로 비교한 결과

증식하는 작은 간세포에서만 CD44가 특이적으로 발현하였다. 3) 간 손상이 심하지 않을 경우 zone 2의 간세포가 분열하며 손상된 부분을 채운다(21). 반면 본 연구에서 사용한 80% 이상의 간 절제 및 아세트아미노펜 유도 간 손상 모델은 간 전구세포가 재생에 관여한다고 보고된 중증도의 간 손상모델이다(26, 56). 4) 본 연구에서 간 전구세포의 형질임을 확인하기 위해서 CD44 이외에 기존에 보고된 간 전구세포 지표(20)들을 함께 확인하였다. 간 손상 후 재생하는 간 조직에서 CD44 를 높게 발현하는 세포가 다른 간 전구세포 지표인 EpCAM 도 높게 발현함을 면역형광기법으로 확인하였다. 동물실험에서는 EpCAM 과 Prom1 (CD133)의 발현을 정량하였다.

정상상태의 간 실질세포에서는 CD44가 거의 발현하지 않지만, 심각한 간 손상 후에는 간 전구세포에서 CD44가 높게 발현한다. 본 연구의 데이터에 따르면 아세트아미노펜에 의해 손상된 간에서 분리한 간세포의 약 8%의 세포가 간 전구세포로서 높은 수준의 CD44를 발현한다. 간세포가 간 전체의 약 70%를 구성한다는 점(57)을 고려할 때, CD44를 발현하는 간 전구세포는 간 재생에 기여하는 핵심 세포로 간주 할 수 있다. 본 연구에서는 간 전구세포의 CD44가 세포막에 xCT 를 안정화하여 system Xc 의 활성을 증가시키고, 간 전구세포의 증식에 기여한다는 내용을 확인하였다.

간 전구세포와 간암세포는 모두 증식하는 형질을 가진 간세포이다. 본 연구자는 간 전구세포에서 확인한 CD44와 system Xc 의 연관성이

간암세포에서도 나타날 것이라고 예측하였다. 실제로 다양한 간암세포주에 system Xc 억제제인 erastin 을 처리하여 확인하였을 때, system Xc 억제에 대한 페로토시스의 반응성은 CD44의 발현에 비례하였다. Erastin 처리에 대해 민감한 세포는 CD44 발현이 높은 반면, erastin 처리에 대해 저항성을 가지는 세포들은 황전환경로의 효소들인 CBS 와 CSE 의 발현이 높았다. 메티오닌을 시스테인으로 전환하는 황전환경로가 정상 간세포에서 주요한 시스테인 공급원이기 때문에(58), 간세포가 간암세포로 변화하면서 더 효율적으로 세포 내로 시스테인을 공급하기 위하여 황전환경로를 대신하여 system Xc 에 대한 의존도가 증가하였다고 생각해 볼 수 있다. CD44는 세포막에 위치하기 때문에, 본 연구에 기반하여 CD44는 현재 활발히 항암제로 개발 중인 system Xc 억제제에 대한 반응성을 예측할 수 있는 지표로도 활용이 기대된다.

비록 간 전구세포에서의 CD44의 발현은 손상 후 간 재생과정에서 중요하지만, 간의 기능을 회복하는데 간 손상 시 증가하는 비실질세포에서 CD44의 역할도 반드시 고려되어야 한다. 간 손상 시 간 성상세포는 간 섬유화를 유발하는 근섬유아세포 유사세포로 활성화된다(59). 또한 손상된 간 조직으로 다량의 대식세포가 유입되며 염증반응을 유발한다(60). 간 전구세포는 이러한 간의 비실질세포들과 같은 공간에 존재하기 때문에 간에서 CD44의 유도가 미치는 영향은 특정 병리상황에서 간을 구성하는 모든 세포들을 고려하여 종합적으로 평가되어야 한다.

CD44의 발현 증가가 간의 재생을 도와준다는 본 연구결과와는 다르게 CD44 중화항체 처리에 의한 간 보호 효과도 보고된 바 있다. CD44 중화항체를 투여할 경우 메티오닌 및 콜린 결핍식이(Methionine and Choline Deficient Diet, MCDD)에 의한 간 염증 및 대식세포의 유입이 개선되었다(54). 또한 CD44의 차단은 하대정맥 결찰로 유도한 간 섬유화를 개선하였다(61). 하지만 본 연구에서 간세포 특이적으로 CD44 발현을 결손시켰을 때, 아세트아미노펜으로 유도한 간 손상 후 재생과정이 억제되었다. 또한 U6프로모터를 이용하여 비특이적으로 CD44 발현을 결손 시킬 경우에도 간 재생정도는 감소되었다(Fig. 29). 본 연구자는 이러한 차이가 간 전구세포의 기능이 각 질환모델에 기여하는 정도의 차이라고 생각하였다. 간 전구세포의 증식이 회복에 중요한 급성의 심각한 간 손상의 경우, 간 전구세포의 증식 부족은 비실질세포에서 CD44 발현과 무관하게 간 재생을 지연시킬 수 있다고 생각하였다. 즉, 간 손상 후 CD44의 역할을 평가하려면 해당 질병 진행과정에서 비실질세포와 간 전구세포 기여도를 엄밀하게 비교해 보아야 한다.

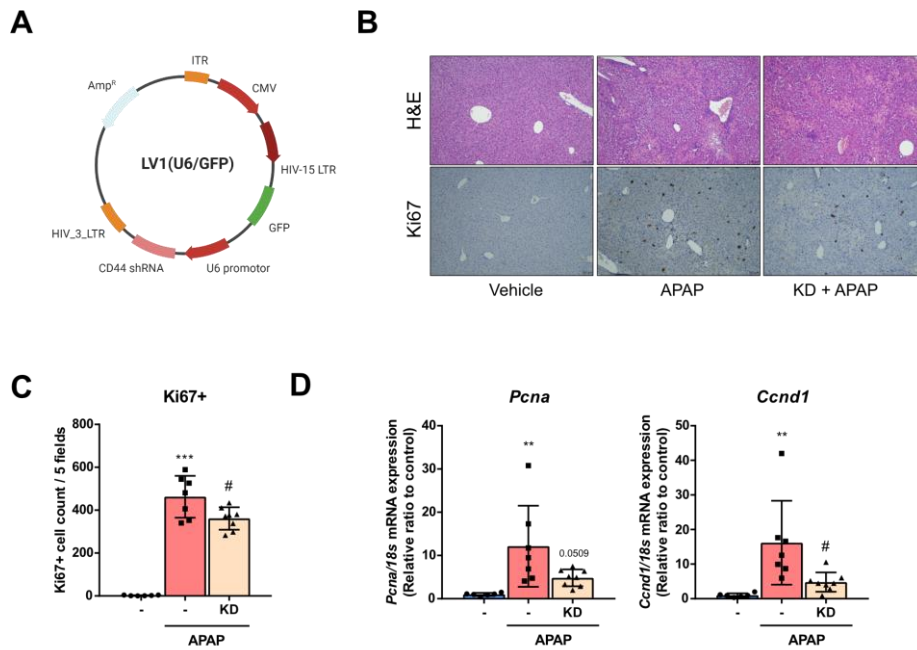


Figure 29. Knockdown of CD44 using lentiviral injection

(A) Mice were intravenously injected with LV–U6–shCD44 to delete CD44. 12 hour–fasted KD mice were injected with APAP (250 mg/kg) or PBS, 2 weeks after virus administration. n=6 for PBS–injected groups, n=7 for APAP–injected group, and n=8 for KD–APAP injected group.

(B) Representative images of H&E or Ki67 stained liver sections (Scale bars; 100 μ m).

(C) Ki67 positive cells were counted using 5 fields per Ki67–stained samples.

(D) mRNA expression levels of proliferation markers (*Pcna* and *Ccnd1*). Data are presented as mean \pm SD; ** $p < 0.001$, versus control group; # $p < 0.05$ versus APAP–injected group by one–way ANOVA followed by Tuckey’ s test.

간 섬유화 과정에서는 대식세포 및 간 정상세포가 질병의 진행에 매우 중요한 역할을 한다(62). 반면, 간 전구세포는 만성적으로 진행되는 간 섬유화 과정에서 나타나지 않는다(63). 간이 손상되어 생기는 빈 공간을 간 정상세포가 활성화되며 섬유소로 채우기 때문이다. 따라서 본 연구자는 간 섬유화 과정에서 system Xc 억제제의 처리가 비실질세포 특이적으로 간 보호효과를 나타낼 수 있을 것이라 추정하였다.

최근 항암치료제로 다양한 System Xc 를 억제하는 화합물이 다수 개발되고 있지만, 본 연구자는 약물 재창출(drug reposition) 기법을 이용하여 기허가 된 의약품에서 간 섬유화 억제효과를 평가하였다. 오라노핀은 FDA 에서 류마티스 치료제로 승인한 경구용 의약품이다(42). 티오레독신 환원효소를 억제하여 약리활성을 나타낸다는 기존 보고(37)와 달리, 오라노핀은 매우 저농도에서부터 system Xc 활성을 차단하고 세포 내 산화적 스트레스를 유발하였다. 이러한 산화적 스트레스는 대식세포 및 간 정상세포에서 NLRP3 인플라마솜 활성을 저해하여 간 섬유화를 억제하였다. 한편 오라노핀 처리에 의한 산화적 스트레스 및 인플라마솜 활성 저해효과는 간세포에서 나타나지 않았다. 이는 간세포에서 GSH 함량이 매우 높고 NLRP3와 ASC 를 포함하는 인플라마솜 구성요소들의 발현이 현저히 낮기 때문이다.

세포 내 산화적 스트레스와 염증반응과의 상관관계에 대해서는 서로 상반되는 내용들이 다수 보고되어 있다(53, 64, 65). 실제로 NLRP3 인플라마솜 활성도 지속적인 미토콘드리아의 산화적 스트레스에 의하여

유도될 수 있다고 밝혀진 바 있다(66). 또한 활성산소를 제거하는 NAC 는 장시간 처리(4시간 이상)할 경우 pro-IL-1 β 를 포함한 인플라마좀 구성요소의 전사를 감소시킬 수 있다. 하지만, 본 연구에서는 오라노핀을 ATP 와 함께 단시간 (1시간) 처리한 후 인플라마좀 활성을 확인하였다. 그 결과 오라노핀이 인플라마좀 구성요소의 발현에는 영향을 주지 못했으나, 인플라마좀이 복합체를 이루어 caspase-1을 활성화시키는 단계를 저해한다는 사실을 확인하였다. 이러한 실험적 설계를 고려하였을 때, 본 연구에서 확인한 system Xc 억제에 의한 인플라마좀 활성 저해는 세포 내에서 생성된 활성산소가 직접적으로 caspase-1의 활성을 감소시킨다는 기존 보고를 뒷받침한다(53).

간 정상세포에서 system Xc 를 억제하는 전략이 직접적으로 간 섬유화를 개선시킬 수 있는지에 대해서는 아직도 논란이 있으므로 추후 연구가 필요하다(67). 간 정상세포에서 system Xc 의 활성을 지속적으로 억제할 경우 페로토시스가 유발된다고 보고된 바 있다(68). 즉, 오라노핀을 지속적으로 사용하면 간 구성요소들의 수가 전반적으로 감소할 수 있다. 하지만 간에서 섬유소의 축적은 비가역적이기 때문에 이를 매개하는 활성화 된 간 정상세포의 사멸은 질환의 치료에 도움이 될 수 있다고 보여진다. 실제로 sorafenib, berberin 과 같은 화합물들이 간 정상세포의 페로토시스를 유도하여 간 보호효과를 나타낸다고 보고된 바 있다(68, 69). 그러므로 오라노핀의 간 섬유화에 대한 보호 효과 기전 중 하나로 간 정상세포에서의 system Xc 억제를 제안해 볼 수 있다.

본 연구진은 실제로 오라노핀을 간 섬유화에 대한 약물로서 적응증 확대를 시도 중에 있다. 위의 실험결과들을 바탕으로 하여 오라노핀은 간 섬유화를 동반한 비알콜성지방간염의 치료용도로 임상시험계획이 승인되어 임상 2상이 진행중에 있다. 특히 이미 임상에서 사용된 약물로 동일 용법 및 용량(3 mg, 1일 2회, 경구)을 사용하여(70), 신약개발의 가장 큰 장애요소인 비임상독성시험을 제외할 수 있었다. 본 연구에서는 기존에 허가된 류마티스 치료제로서 오라노핀의 비임상실험 시와 동일한 투여용량 (마우스, 10 mg/kg)을 경구투약하여 오라노핀의 간 보호효과를 검증하였다.

본 연구에서 확인한 오라노핀의 기전을 바탕으로 간 섬유화 억제효과에 대한 활성대사체를 지정할 수 있었다. 오라노핀은 투약 후 대사가 매우 빠르게 일어나기 때문에 약물의 유효농도를 예측하기 위한 활성대사체를 특정하는데 어려움이 있었다. 오라노핀의 예측 대사체 중 aurocyanide 는 system Xc 와 NLRP3 인플라마솜의 활성을 가장 두드러지게 억제하였다. 대구경북신약개발지원센터에 의뢰하여 얻은 약동학적(pharmacokinetics) 평가결과에 근거하면 aurocyanide 를 오라노핀과 동일한 양으로 마우스에 투여하였을 때, 오라노핀과 비교하여 전신순환에 도달한 활성약물의 총량(area under curve)이 증가하였다. 또한 aurocyanide 를 오라노핀과 동일한 양으로 투여한 동물실험에서 오라노핀과 동등한 수준의 간 섬유화 억제효과가 관찰되었다. Aurocyanide 의 경우 구조가 단순하여 신약전구물질로의 사용은 어려울

것으로 예상되지만 약동학적으로 안정적인 양상을 보이므로 오라노핀의 효과를 예측하는 지표로서 추후 활용이 기대된다.

하지만 system Xc 의 억제가 간 전구세포에 미치는 영향을 고려하였을 때 본 연구의 결과들은, 회복하는데 간의 재생과정이 중요한 간 질환에 있어서는 오라노핀을 포함한 system Xc 억제제의 사용이 제한될 수 있다는 점도 보여준다. 오라노핀을 투약 시 간 재생이 해당 간 질환 개선에 필수적인지 신중히 고려되어야 한다. 간 섬유화의 경우 그 중증도가 심해지면 질병의 진행에서 간 재생과정이 거의 나타나지 않는다. 만성적으로 간이 손상되면 간 전구세포는 간세포로 분화하지 못하고 간 내의 disse 공간에는 간 정상세포를 매개로 세포외기질(extracellular matrix; ECM)이 축적된다. 특히 간 손상이 심할 경우 간 전구세포는 간실질세포가 아닌 간암세포로 분화할 수 있다(25). 간 섬유화의 진행은 비가역적이기 때문에 오라노핀의 투약은 간 섬유화 진행 초기부터 권장된다. 하지만 본 연구에서 확인한 오라노핀의 기전을 바탕으로, 간 재생과정의 역할을 배제할 수 있는 중증도의 간 섬유화에서 오라노핀을 더욱 안전하게 사용 가능하다고 판단된다 (Fig. 30). 이처럼 기존에 보고된 간 질환들의 병리기전과 본 연구에서 규명한 system Xc 의 역할을 바탕으로, 향후 간 질환의 치료표적으로서 system Xc 를 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

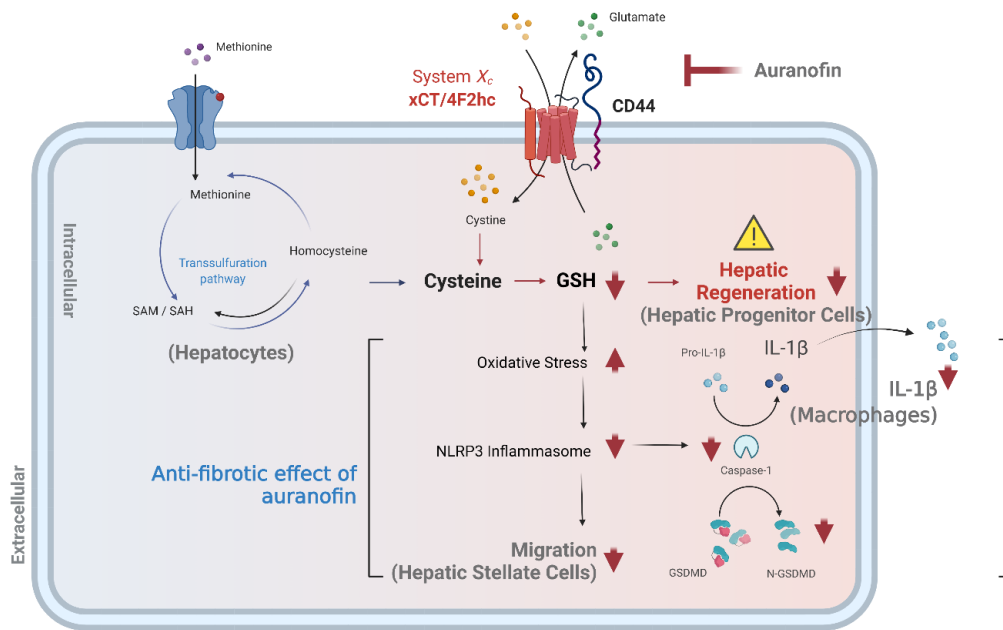


Figure 30. Schematic figure of system Xc and auranofin

V. 참고문헌

1. Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc-cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British journal of pharmacology* 2012;165:20–34.
2. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB journal* 1999;13:1169–1183.
3. Piani D, Fontana A. Involvement of the cystine transport system xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *The Journal of Immunology* 1994;152:3578–3585.
4. Sears SM, Roberts SH, Hewett SJ. Hyperexcitability and brain morphological differences in mice lacking the cystine/glutamate antiporter, system xc⁻. *Journal of neuroscience research* 2021.
5. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. *Amino acids* 2012;42:231–246.
6. Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein & Cell* 2020:1–22.
7. Zhang Y, Tan H, Daniels JD, Zandkarimi F, Liu H, Brown LM, Uchida K, et al. Imidazole ketone erastin induces ferroptosis and slows tumor growth in a mouse lymphoma model. *Cell chemical biology* 2019;26:623–633. e629.
8. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer cell* 2011;19:387–400.
9. He Y, Wu GD, Sadahiro T, Noh S-I, Wang H, Talavera D, Wang

- H, et al. Interaction of CD44 and hyaluronic acid enhances biliary epithelial proliferation in cholestatic livers. 2008;295:G305–G312.
10. Bhattacharya R, Mitra T, Ray Chaudhuri S, Roy SS. Mesenchymal splice isoform of CD44 (CD44s) promotes EMT/invasion and imparts stem-like properties to ovarian cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 2018;119:3373–3383.
 11. Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, et al. Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer research* 2012;72:1438–1448.
 12. Haramaki M, Yano H, Fukuda K, Momosaki S, Ogasawara S, Kojiro M. Expression of CD44 in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* 1995;21:1276–1284.
 13. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *Journal of hepatology* 2006;45:90–98.
 14. Spee B, Carpino G, Schotanus BA, Katoonizadeh A, Vander Borgh S, Gaudio E, Roskams T. Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* 2010;59:247–257.
 15. Harrill AH, Watkins PB, Su S, Ross PK, Harbourt DE, Stylianou IM, Boorman GA, et al. Mouse population-guided resequencing reveals that variants in CD44 contribute to acetaminophen-induced liver injury in humans. *Genome research* 2009;19:1507–1515.
 16. Zhu J, Berisa M, Schwörer S, Qin W, Cross JR, Thompson CB. Transsulfuration activity can support cell growth upon extracellular cysteine limitation. *Cell metabolism* 2019;30:865–876. e865.
 17. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45–S53.

18. Bria A, Marda J, Zhou J, Sun X, Cao Q, Petersen BE, Pi LJJr. Hepatic progenitor cell activation in liver repair. 2017;1:81–87.
19. Itoh T, Miyajima AJH. Liver regeneration by stem/progenitor cells. 2014;59:1617–1626.
20. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MDJH. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. 2007;45:139–149.
21. Wei Y, Wang YG, Jia Y, Li L, Yoon J, Zhang S, Wang Z, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes. Science 2021;371.
22. Huang W–J, Zhou X, Fu G–B, Ding M, Wu H–P, Zeng M, Zhang H–D, et al. The combined induction of liver progenitor cells and the suppression of stellate cells by small molecules reverts chronic hepatic dysfunction. Theranostics 2021;11:5539.
23. Shin S, Upadhyay N, Greenbaum LE, Kaestner KH. Ablation of Foxl1–Cre–labeled hepatic progenitor cells and their descendants impairs recovery of mice from liver injury. Gastroenterology 2015;148:192–202. e193.
24. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. Cell stem cell 2014;14:561–574.
25. So J, Kim A, Lee S–H, Shin D. Liver progenitor cell–driven liver regeneration. Experimental & Molecular Medicine 2020;52:1230–1238.
26. Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J, Hussain M, Swenson S, Theise ND. Dose-and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. Hepatology 2005;41:1252–1261.
27. Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen toxicity: novel

insights into mechanisms and future perspectives. *Gene expression* 2018;18:19.

28. Widjaja AA, Dong J, Adami E, Viswanathan S, Ng B, Pakkiri LS, Chothani SP, et al. Redefining IL11 as a regeneration-limiting hepatotoxin and therapeutic target in acetaminophen-induced liver injury. *Science translational medicine* 2021;13.

29. Asai R, Tsuchiya H, Amisaki M, Makimoto K, Takenaga A, Sakabe T, Hoi S, et al. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line. 2019;8:773–782.

30. Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *Journal of hepatology* 2000;32:78–84.

31. Lee D, Na J, Ryu J, Kim HJ, Nam SH, Kang M, Jung JW, et al. Interaction of tetraspan (in) TM4SF5 with CD44 promotes self-renewal and circulating capacities of hepatocarcinoma cells. 2015;61:1978–1997.

32. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149:1060–1072.

33. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* 2016;65:1038–1048.

34. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2016;150:1769–1777.

35. Powell EE, Wong VW-S, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet* 2021.

36. Vuppalanchi R, Nouredin M, Alkhouri N, Sanyal AJ.

Therapeutic pipeline in nonalcoholic steatohepatitis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021;18:373–392.

37. Zhang X, Selvaraju K, Saei AA, D'Arcy P, Zubarev RA, Arnér ES, Linder S. Repurposing of auranofin: Thioredoxin reductase remains a primary target of the drug. *Biochimie* 2019;162:46–54.

38. Wree A, McGeough MD, Inzaugarat ME, Eguchi A, Schuster S, Johnson CD, Peña CA, et al. NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: roles of IL-17 and TNF in mice. *Hepatology* 2018;67:736–749.

39. Shao F. Gasdermins: making pores for pyroptosis. *Nature Reviews Immunology* 2021;21:620–621.

40. Mridha AR, Wree A, Robertson AA, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, Haczeyni F, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *Journal of hepatology* 2017;66:1037–1046.

41. Kim HY, Choi YJ, Kim SK, Kim H, Jun DW, Yoon K, Kim N, et al. Auranofin prevents liver fibrosis by system Xc⁻-mediated inhibition of NLRP3 inflammasome. *Communications Biology* 2021;4:1–15.

42. Roder C, Thomson MJ. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs in R&D* 2015;15:13–20.

43. Li W-C, Ralphs KL, Tosh D: Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. In: *Mouse Cell Culture*: Springer, 2010; 185–196.

44. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nature protocols* 2015;10:305–315.

45. Choi W-M, Kim H-H, Kim M-H, Cinar R, Yi H-S, Eun HS, Kim S-H, et al. Glutamate signaling in hepatic stellate cells drives alcoholic steatosis. *Cell metabolism* 2019;30:877–889. e877.

46. Chen Q, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nature protocols* 2007;2:1197–1205.
47. Kim HY, Kim KS, Kim MJ, Kim H-S, Lee K-Y, Kang KW. Auranofin Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Suppressing Inhibitors of κ B Kinase and Inflammasome-Mediated Interleukin-1 β Secretion. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019;2019:3503912.
48. Shang Y, Siow YL, Isaak CK. Downregulation of glutathione biosynthesis contributes to oxidative stress and liver dysfunction in acute kidney injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016.
49. Zuhra K, Augsburger F, Majtan T, Szabo C. Cystathionine- β -synthase: Molecular regulation and pharmacological inhibition. *Biomolecules* 2020;10:697.
50. Nie J, Lin B, Zhou M, Wu L, Zheng T. Role of ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2018;144:2329–2337.
51. Cao JY, Poddar A, Magtanong L, Lumb JH, Mileur TR, Reid MA, Dovey CM, et al. A genome-wide haploid genetic screen identifies regulators of glutathione abundance and ferroptosis sensitivity. *Cell reports* 2019;26:1544–1556. e1548.
52. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2016;478:1338–1343.
53. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nature immunology* 2008;9:866–872.
54. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebeaupin C, Luci C,

- Canivet CM, Schneck A-S, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* 2017;67:328–338.
55. Höchst B, Schildberg FA, Sauerborn P, Gäbel YA, Gevensleben H, Goltz D, Heukamp LC, et al. Activated human hepatic stellate cells induce myeloid derived suppressor cells from peripheral blood monocytes in a CD44-dependent fashion. *Journal of hepatology* 2013;59:528–535.
56. Gilgenkrantz H, de l'Hortet AC. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *The American journal of pathology* 2018;188:1316–1327.
57. Wang M-J, Chen F, Lau JT, Hu Y-P. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell death & disease* 2017;8:e2805–e2805.
58. Rao AM, Drake MR, Stipanuk MH. Role of the transsulfuration pathway and of γ -cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *The Journal of nutrition* 1990;120:837–845.
59. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2017;14:397–411.
60. Kazankov K, Jørgensen SMD, Thomsen KL, Møller HJ, Vilstrup H, George J, Schuppan D, et al. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2019;16:145–159.
61. Osawa Y, Kawai H, Tsunoda T, Komatsu H, Okawara M, Tsutsui Y, Yoshida Y, et al. Cluster of Differentiation 44 Promotes Liver Fibrosis and Serves as a Biomarker in Congestive Hepatopathy. *Hepatology Communications* 2021.

62. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021;18:151–166.
63. Chen J, Chen L, Zern MA, Theise ND, Diehl AM, Liu P, Duan Y. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver International* 2017;37:1260–1271.
64. Zhang X, Zhang J-H, Chen X-Y, Hu Q-H, Wang M-X, Jin R, Zhang Q-Y, et al. Reactive oxygen species-induced TXNIP drives fructose-mediated hepatic inflammation and lipid accumulation through NLRP3 inflammasome activation. *Antioxidants & redox signaling* 2015;22:848–870.
65. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research* 2018;122:877–902.
66. Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell research* 2011;21:558–560.
67. Kim KM, Cho SS, Ki SH. Emerging roles of ferroptosis in liver pathophysiology. *Archives of Pharmacal Research* 2020:1–12.
68. Yuan S, Wei C, Liu G, Zhang L, Li J, Li L, Cai S, et al. Sorafenib attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis via HIF-1 α /SLC7A11 pathway. *Cell proliferation* 2021:e13158.
69. Yi J, Wu S, Tan S, Qin Y, Wang X, Jiang J, Liu H, et al. Berberine alleviates liver fibrosis through inducing ferrous redox to activate ROS-mediated hepatic stellate cells ferroptosis. *Cell Death Discovery* 2021;7:1–16.
70. Bombardier C, Ware J, Russell IJ, Larson M, Chalmers A, Read JL, Arnold W, et al. Auranofin therapy and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. Results of a multicenter trial. *The American journal of medicine* 1986;81:565–578.

VI. Abstract

The Role of System *Xc* in Hepatic Fibrosis and Regeneration

KIM HYUN YOUNG

Advisor: KANG KEON WOOK

System *Xc* is an amino acid antiporter composed of a light chain, xCT, and a heavy chain, 4F2hc. It transports the anionic form of extracellular cystine for intracellular glutamate. The imported cystine is reduced to cysteine and subsequently assembles with glutamate and glycine to form glutathione (GSH). In differentiated hepatocytes, most of the intracellular cysteine is synthesized from methionine through the transsulfuration pathway. However, most of the proliferating hepatic cells lack the transsulfuration pathway. They are highly dependent on the system *Xc*-mediated cystine influx. Proliferating hepatic cells including liver progenitor cells (LPCs), hepatocellular carcinomas, and nonparenchymal cells express a high level of xCT. In this study, we focus on identifying the role and regulation mechanism of the system *Xc* in these proliferating hepatic cells.

For the first part of the study, we identified the regulation mechanism

of system X_c activity after acute liver injury. Liver regeneration triggered by fulminant liver damage accompanies the proliferation of LPCs. CD44 is one of the proposed LPC markers for distinguishing the subpopulation of hepatocytes that can clonally proliferate. In a gastric cancer cell, Ishimoto *et al.* reported that CD44 supports cysteine metabolism by stabilizing xCT. We hypothesized that this role of CD44 is also relevant in the context of LPCs, which require efficient cysteine supply for cell proliferation.

After liver resection or exposure to acetaminophen, the CD44 expression level was elevated in mouse primary hepatocytes isolated from regenerative liver tissues. Flow cytometry data identified LPCs, a subpopulation of hepatocytes with a high CD44 expression level and proliferation rate. To elucidate the role of CD44 in LPC proliferation, we knocked it down in AML12 cells. Knockdown of CD44 decreased the expression of xCT as well as the uptake of extracellular cystine through system X_c . CD44 ablation resulted in a diminished intracellular cysteine, glutathione (GSH), and a decreased proliferation rate. The proliferation of LPC isolated on a hyaluronic acid-coated dish was highly sensitive to inhibition of system X_c . Administration of system X_c inhibitor abrogated liver regeneration after acetaminophen (N-acetyl-*p*-aminophenol; APAP)-induced liver injury. Moreover, liver regeneration following APAP injection

was significantly inhibited in hepatocyte-specific CD44 knockdown mice. The obtained results delineate the central role of CD44 in modulating liver-regenerative capacity. Specifically, CD44 contributes to the intracellular redox balance and cell proliferation by enhancing extracellular cystine uptake through system *Xc*.

In addition, we could confirm the correlation between CD44 expression level and sensitivity to erastin-induced ferroptosis in hepatocellular carcinomas. Ferroptosis is an iron-dependent cell death that is induced by system *Xc* inhibition. CD44-expressing hepatocellular carcinomas lacked the enzymes critical for the transsulfuration pathway (CBS or CSE). Consequently, they were highly sensitive to the treatment of erastin. Based on this finding, we proposed CD44 as a biomarker for ferroptosis sensitivity in hepatocellular carcinomas.

For the last part of the study, we identified the role of system *Xc* in nonparenchymal cells. Unlike the acute liver injury, LPCs rarely participate in the progression of liver fibrosis. Instead, macrophages and hepatic stellate cells (HSCs) mainly engage in the disease progression; liver fibrosis progresses following 'multi-hit' processes involving activation and proliferation of hepatic stellate cells and macrophages. Because these nonparenchymal cells highly express

CD44 and xCT, we could estimate that blockade of system *Xc* may inhibit liver fibrosis.

We assessed the effect of system *Xc* inhibition on liver fibrosis by using auranofin. Auranofin is an oral anti-rheumatic agent that is approved by FDA. In this study, we found that auranofin inhibits system *Xc* activity, thereby depleting intracellular GSH and inducing oxidative burst. The instant oxidative stress-mediated anti-fibrotic effects in both macrophages and HSCs. Auranofin potently inhibited activation of the NLRP3 inflammasome in bone marrow-derived macrophages and Kupffer cells. It also reduced the migratory ability of HSC. Auranofin significantly inhibited thioacetamide-induced liver fibrosis.

Taken together, to the best of our knowledge, we propose the use of auranofin as an anti-liver fibrotic agent. It should, however, be noted that system *Xc* plays a central role in the self-renewal capacities of the liver. The importance of nonparenchymal cells activation and LPC proliferation in disease progression should be thoroughly concerned before the use of auranofin on liver injuries other than liver fibrosis.

Keywords: system *Xc*, cystine, hepatic fibrosis, hepatic regeneration, auranofin