creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

약학박사 학위 청구논문

미세소관과 히스톤 탈아세틸화 효소 표적 항암후보물질들의 소포체 스트레스를 수반한 항암작용 및 기전 연구

Endoplasmic reticulum stress-related anti-cancer effects of microtubule- or histone deacetylase-targeting agents and its mechanistic basis

2022 년 8 월

서울대학교 대학원
약학과 약물학 전공
김 수 진

미세소관과 히스톤 탈아세틸화 효소 표적 항암후보물질들의 소포체 스트레스를 수반한 항암작용 및 기전 연구

Endoplasmic reticulum stress-related anti-cancer effects of microtubule- or histone deacetylase-targeting agents and its mechanistic basis

指導敎授 姜 建 旭

이 論文을 藥學博士 學位論文으로 提出함
2022 년 7 월

서울大學校 大學院
藥學科 藥物學專攻
金 秀 珍

金 秀 珍의 藥學 博士 學位 論文을 認准함
2022 년 8 월

위 원 장 이 승 희 (인)

부위원장 노 민 수 (인)

위 원 김 형 식 (인)

위 원 김 상 겸 (인)

위 원 강 건 욱 (인)

국문초록

미세소관과 히스톤 탈아세틸화 효소 표적 항암후보물질들의 소포체 스트레스를 수반한 항암작용 및 기전 연구

김수진

약학과

서울대학교 대학원

소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 단백질 및 지질의 합성, 칼슘의 저장과 신호전달 등을 담당하는 중요한 세포 소기관이며, 소포체 스트레스(ER stress)는 암, 퇴행성 신경질환, 대사질환, 염증 질환 등의 질병들과 관련이 있다는 많은 보고가 있었다. 특히 암에서 소포체 스트레스는 암세포의 생존, 성장, 신생혈관, 전이, 약물 저항성 등과 관련되어 있으며, 종양 미세환경(tumor microenvironment)에서는 활성산소(reactive oxygen species, ROS), 저산소증(hypoxia), 영양분 고갈(nutrient deprivation)로 인해 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)이 일어날 수 있다. 본 학위논문에서는 소포체 스트레스와 관련된 항암제인 튜불린 중합 저해제(tubulin polymerization inhibitor) 및 히스톤 탈아세틸 효소 저해제(histone deacetylase inhibitor)에 관한 연구를 수행한 내용을 다루었다.

튜불린 중합 저해제 기전의 vascular disrupting agent (VDA)인 CKD-516 (valecobulin)은 임상 1 상 및 이리노테칸과의 병용 임상 1 상을 통하여 안전성을

확인하였으며, 특히 대장암 환자를 대상으로 진행된 이리노테칸(irinotecan) 병용 1 상 임상시험에서는 79%의 환자에서 안정성 병변(stable disease, SD) 이상의 약효를 보인 신규 항암제 후보물질이다. 이 논문에서는 CKD-516 에 의한 세포사멸에 소포체 스트레스의 관련 여부를 확인하였다.

CKD-516 의 활성대사체인 S516 을 이용한 시험관 내 시험에서 CKD-516 은 튜불린(tubulin)에 결합하는 vascular disrupting agent (VDA)임을 확인하였다. 다음으로 폐암 세포주를 이용한 실험에서, S516 이 소포체와 미토콘드리아에서 활성산소 생성을 증가시켰으나, 암세포 사멸 효과는 활성산소 생성에 의한 것이 아님을 확인하였다.

S516 은 폐암세포에서 소포체 스트레스 마커인 inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α) 와 protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)의 인산화를 증가시켰고, 스트레스 마커의 활성화는 *N*-acetylcysteine (NAC)에 의해 부분적으로 저해되어, S516 에 의해 유도된 미세소관의 와해 및 이로 인한 활성산소의 생성이 소포체 스트레스를 유발한 것으로 생각된다. 또한 활성산소 저해제나 소포체 스트레스 저해제가 S516 에 의한 미세소관의 와해를 저해하지 못하는 것으로 미루어, 미세소관의 와해와 활성산소 생성에 의해 소포체 스트레스가 일어나는 것으로 생각된다. CKD-516 은 폐암 이식모델에서 종양 성장 억제효과를 보였으며, 카보플라틴(carboplatin)과 병용 시에는 항암 효과가 우수하여, 비소세포폐암의 치료에 적절할 수 있음을 제시한다.

다음으로, histone deacetylase (HDAC) 저해제인 CKD-581 (alteminostat)은 림프종(lymphoma) 및 다발골수종(multiple myeloma) 환자를 대상으로 한 임상 1 상 시험에서 안전성을 확인하였으며, 44% (16/36 환자)의 환자에서 안정성 병변(stable disease, SD) 이상의 반응을 나타낸 항암제 후보물질이다.

CKD-581 은 class I, II 를 모두 저해하는 pan-HDAC 저해제이다. CKD-581 에 의해 혈액암 세포에서 Wnt/β-catenin 신호전달이 유의하게 변화되었으며, 특히

dishevelled binding antagonist of beta catenin 3 (DACT3)의 발현이 두드러지게 증가되었다. 다발골수종 세포에서 Wnt/β-catenin 신호전달의 negative regulator 인 DACT3 의 증가로 인해 Wnt/β-catenin 신호 전달의 하위 신호인 β-catenin 및 c-MYC 의 발현이 감소되고, cyclin D1 과 cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)와 같은 세포 주기와 관련된 인자의 발현 역시 감소되었다. 뿐만 아니라, p53 활성화 및 p21 의 발현 증가와 함께 세포자멸사(apoptosis)가 일어나는 것이 관찰되었다. 다발골수종 이식 마우스 모델에서도 CKD-581 에 의한 암 성장 억제가 관찰되어, 동물모델에서도 항암효과가 나타남을 알 수 있었다.

다발골수종에서 CKD-581 이 항암 효과를 보인 것과 마찬가지로, 또 다른 혈액암인 림프종에서도 항암 효과가 나타나는지 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)은 기존의 HDAC 저해제들이 아직까지 허가를 받지 못한 암종이며, 림프종 중 가장 많은 환자가 고통을 받는 질환이다. CKD-581 은 림프종에서 히스톤 단백질과 튜불린의 아세틸화를 유도하였으며, DLBCL 환자의 중요한 예후 인자인 MYC 과 BCL-2 및 BCL-6 의 발현을 줄였다. 또한 항암제에 대한 저항성과 관련 있는 BCL-2 family 인 BCL-$_X$L 과 MCL-1 의 발현을 줄였으며, phosphorylated histone H2AX (γH2AX) 와 poly (ADP ribose) polymerase 1 (PARP1)을 증가시켜 세포자멸사가 유도됨을 알 수 있었다. 한편, 림프종 세포에 CKD-581 을 처리한 결과 IRE1α와 PERK, activating transcription factor 6 (ATF6) 및 glucose-regulated protein 78 (GRP78)과 같은 소포체 스트레스 지표가 증가하는 것이 관찰되어, 소포체 스트레스와 관련이 있음을 확인하였다. CKD-581 은 2 종의 림프종 이식 동물모델에서 항암효과를 보였으며, 특히 CD20 이 발현되는 SU-DHL-2 모델에서, DLBCL 의 중요한 치료제인 리툭시맙 (rituximab)과 유사한 정도의 종양 성장 억제효과를 보였다. 그러므로, CKD-581 은 림프종 치료제로서 항암 효과가 있을 것으로 기대된다.

본 학위논문에서는 튜불린 중합 저해제인 CKD-516 과 HDAC 저해제인 CKD-581 의 작용 기전에 대해 밝혔으며, 강한 항암 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이들 항암제 후보 물질들은 현재 임상 시험을 진행 중이며, 향후 암으로 고통받는 환자를 위한 좋은 치료제로 사용될 가능성이 있는 것으로 생각된다.

주 요 어 (keywords): 소포체 스트레스, Wnt/β-catenin 신호전달, 활성산소, 튜불린 중합 저해제, HDAC 저해제, 폐암, 다발골수종, 미만성 거대 B-세포 림프종

학번: 2012-31106

목 차

국문초록 ..... **i**

목차 ..... **v**

List of Tables ..... **vii**

List of Figures ..... **viii**

List of Abbreviations ..... **ix**

I. 서론 **1**

II. 시약 및 실험방법

1. 시약 및 항체 6
2. 세포배양 6
3. 튜불린 중합체 형성 분석 7
4. 튜불린 결합 위치 동정 7
5. 세포골격 면역염색 8
6. HUVEC 튜브 형성 8
7. 활성산소 측정 8
8. JC-1 염색 9
9. Mito-HyPer 및 ER-HyPer 아데노바이러스를 이용한 미토콘드리아와 소포체 ROS 의 실시간 분석 9
10. HDAC 효소 저해 활성 분석 9
11. 히스톤 단백질 추출 9
12. cDNA microarray 및 유전자 발현 분석 10
13. 웨스턴 블롯팅 10
14. 종양 이종 이식 마우스 모델 11
15. 통계분석 11

III. 결과

1. 튜불린 중합 저해제, CKD-516

1) S516 의 미세소관 결합 위치 동정 12
2) S516 에 의한 혈관 내피세포의 미세소관 붕괴 15
3) 폐암 세포에서 S516 에 의한 활성산소 생성 동정 15
4) S516 에 의한 폐암 세포에서의 소포체 스트레스 유도 19
5) 폐암 이종이식 모델에서의 CKD-516 의 항암효과 22
6) CKD-516 과 카보플라틴 병용에 의한 항암 효과의 상승 22

2. 히스톤 탈아세틸 효소 저해제, CKD-581

1) CKD-581 에 의한 HDAC 효소의 저해 26
2) CKD-581 에 의한 림프종과 다발골수종 세포의 사멸 26
3) CKD-581 에 의한 DACT3 의 선택적 유도 및 Wnt/β-catenin 신호 전달의 저해 29
4) CKD-581 에 의한 세포자멸사 유도 33
5) CKD-581 의 다발골수종 동물모델에서의 항암효과 35
6) 림프종에서 CKD-581 에 의한 HDAC 타겟 단백질의 아세틸화 39
7) CKD-581 에 의한 림프종 세포 사멸의 유도 39
8) CKD-581 에 의한 림프종의 나쁜 예후 인자의 감소 39
9) 림프종에서 CKD-581 에 의한 DNA 손상 44
10) CKD-581 에 의한 소포체 스트레스의 증가 46
11) CKD-581 의 림프종 동물 모델에서의 항암효과 49

IV. 고찰 51

V. 참고문헌 59

VI. Abstract 71

VII. Appendix 74

List of Tables

Table 1. CKD-581 is a potent HDAC inhibitor..... 27
Table 2. KEGG pathway analysis of differentially expressed genes by CKD-581 treatment
..... 30

List of Figures

Figure 1. Endoplasmic reticulum (ER) stress signaling 2
Figure 2. S516 inhibits tubulin polymerization and disrupts the cellular microtubule network 13
Figure 3. S516 stimulates ROS production and loss of mitochondrial membrane potential in lung cancer cells. 16
Figure 4. S516 induces ER stress in lung cancer cells 20
Figure 5. Potent *in vivo* anti-cancer activities of CKD-516 in xenografts implanted with Calu-6, A549 and H460 cells.. 23
Figure 6. Synergistic anti-cancer activity of CKD-516 with carboplatin in NSCLC xenograft 25
Figure 7. CKD-581 induces acetylation of target proteins and suppresses cell proliferation in hematological cancer cells 28
Figure 8. CKD-581 down-regulates Wnt/β-catenin pathway 32
Figure 9. CKD-581 decreases the expression of cell cycle related proteins 34
Figure 10. CKD-581 activates tumor suppressors and induces apoptosis in MM 36
Figure 11. CKD-581 suppresses tumor growth in MM1.S xenograft model 38
Figure 12. CKD-581 is a potent HDAC inhibitor 40
Figure 13. CKD-581 reduces the protein expression of prognostic markers for DLBCL 41
Figure 14. CKD-581 induces DNA damage and apoptosis 45
Figure 15. CKD-581 decreases anti-apoptotic proteins in DLBCL 47
Figure 16. CKD-581 induces ER stress in lymphoma cell 48
Figure 17. CKD-581 suppressed DH-DLBCL tumor growth in the mouse xenograft models 50
Figure 18. Proposed mechanism of CKD-516 52
Figure 19. Proposed mechanism of CKD-581 56

List of Abbreviations

4-PBA: 4-phenylbutyric acid

ABC-DLBCL: Activated B cell-DLBCL

ANOVA: Analysis of variation

ASK1: Apoptosis signal-resulting kinase 1

ATCC: American Type Culture Collection

ATF6: Activating transcription factor 6

BTZ: Bortezomib

Carboplatin: Cyclobutane-1,1-dicarboxylate-*O*,*O'*

CDK4: Cyclin-dependent kinase 4

CHOP: C/EBP homologous protein

CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone

CTCL: Cutaneous T cell lymphoma

Cys: Cysteine

DACT3: Dishevelled binding antagonist of beta catenin 3

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCFH-DA: 2',7'-dichlorofluorescin diacetate

DCR: Disease control rate

DE-DLBCL: Double expressor DLBCL

DH-DLBCL: Double hit-DLBCL

DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic acid

DPI: Diphenyleneiodonium

DSB: Double strand break

EBI: *N*,*N*'-ethylene-bis(iodoacetamide)

ER: Endoplasmic reticulum

ERAD: ER-associated degradation

FBS: Fetal bovine serum

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GRP78: Glucose-regulated protein 78

GRP94: Glucose-regulated protein 94

GCB-DLBCL: Germinal center B-cell DLBCL

HAT: Histone acetyltransferase

HCC: Hepatocellular carcinoma

HDAC: Histone deacetylase

HRP: Horseradish peroxidase

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

IACUC: Institutional animal care and use committee

IMDM: Iscove's modified dulbecco's medium

IMiD: Immune-modulatory drug

IRE1α: Inositol-requiring enzyme 1α

JNK: c-JUN amino-terminal kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MCL-1: Myeloid cell leukemia-1

MM: Multiple myeloma

MOI: Multiplicity of infection

MTCC: Modern cell & tissue technologies

NAC: *N*-acetylcysteine

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NSCLC: Non-small cell lung cancer

NQO1: NAD(P)H dehydrogenase

PARP1: Poly (ADP-ribose) polymerase 1

PBS: Phosphate-buffered saline

PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PTCL: Peripheral T cell lymphoma

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer

ROS: Reactive oxygen species

SAHA: Suberoylanilide hydroxamic acid

SD: Stable disease

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SP1: Site-1 protease

SP2: Site-2 protease

TBS-T: Tris-buffered saline

TCD: *N*-deacetyl-*N*-(chromone-2-carbonyl)-thiocolchicine

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2

UPR: Unfolded-protein response

VDA: Vascular disrupting agent

XBP1: X-box binding protein-1

I. 서 론

소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 단백질 및 지질의 합성, 칼슘의 저장, 신호전달 등을 담당하는 중요한 세포소기관이다 [1]. 단백질들은 소포체에서 구조 형성 및 변형을 거친 후 적절한 위치로 운송된다. 소포체 내에 미접힘 단백질(unfolded protein) 또는 잘못 접힘 단백질(misfolded protein)이 증가하는 소포체 스트레스(ER stress)는 단백질의 항상성 네트워크를 변화시키는 다양한 원인에 의해 발생한다 [1].

소포체 막(ER membrane)에 존재하는 3 개의 스트레스 센서(stress sensor) [Inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) 및 activating transcription factor 6 (ATF6)]는 미접힘 단백질 반응(unfolded-protein response, UPR)을 일으키는 것으로 알려져 있다 [2]. 미접힘 단백질이 없을 시, glucose-regulated protein 78 (GRP78, Bip)은 센서 단백질들에 결합하여, 센서 단백질을 비활성화 상태로 유지시킨다. 소포체 내강(lumen)에 미접힘 단백질이 축적되면, GRP78 이 센서 단백질로부터 떨어져 나오게 되며, 센서 단백질들은 활성화 상태로 전환되고, UPR 이 발생된다 (Figure 1). UPR 과정에서는 (1) 단백질 번역(translation)의 지연, (2) GRP78, glucose-regulated protein 94 (GRP94)와 같은 ER 샤페론(charperone) 및 protein disulfide isomerase 와 같은 folding enzyme 의 증가, (3) 미접힘 단백질을 제거하기 위한 ER-associated degradation (ERAD)이 촉진된다 [1, 3].

소포체 스트레스는 암, 퇴행성 신경질환, 대사질환, 염증 질환 등의 질병들과 관련이 있다는 많은 연구가 보고되고 있다 [4]. 특히 암에서 소포체 스트레스는 암세포의 생존, 성장, 신생혈관, 전이, 약물 저항성 등과 관련되어 있으며, 종양 미세환경(tumor microenvironment)에서는 저산소증(hypoxia), 활성산소(reactive oxygen species, ROS), 영양분 고갈로 인해 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)이 일어날 수 있다 [5, 6]. 따라서 소포체

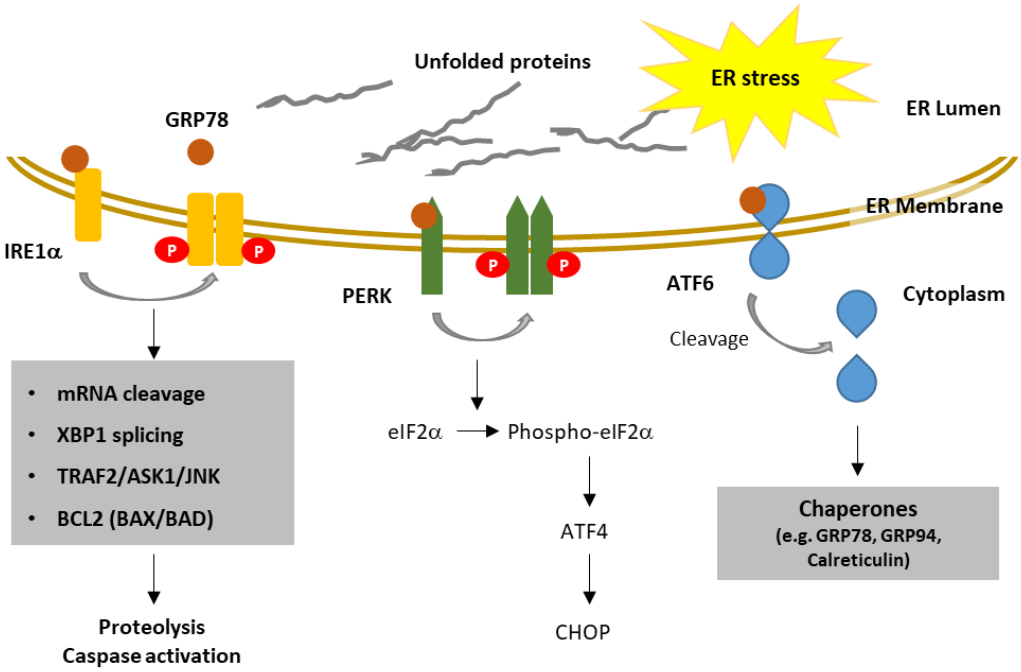


Figure 1. Endoplasmic reticulum (ER) stress signaling.

Accumulation of unfolded / misfolded proteins in the ER lumen results in UPR. Once ER stress occurs, GRP78 is dissociated from the ER stress sensors (IRE1α, PERK and ATF6). IRE1 is activated upon dimerization of IRE1α and IRE1β, and then autophosphorylated. PERK is also activated by dimerization and phosphorylation. ATF6, a member of the leucine zipper transcription factor family, is transferred to the Golgi and cleaved by S1P (site-1 protease) and S2P to generate ATF6α, its active form. Activated ER stress sensors initiate the relevant downstream signaling pathways.

스트레스의 신호전달 기전에 대한 연구와 더불어 이를 타깃으로 하는 치료 방법을 개발하려는 시도가 다양하게 이뤄지고 있다.

본 논문에서는 소포체 스트레스와 관련된 항암제인 튜불린 중합 저해제(tubulin polymerization inhibitor) 및 히스톤 탈아세틸 효소 저해제(histone deacetylase inhibitor, HDAC inhibitor)에 관해 연구한 내용을 다루었다.

1. 튜불린 중합 저해제

미세소관(microtubule)은 α-, β-튜불린의 이종 이량체(heterodimer)의 중합에 의해 이루어진 원통형 구조(cylindrical structure)를 형성하며, 미세섬유(micro-filament), 중간섬유(intermediate filament)와 함께 세포골격(cytoskeleton)의 중요한 요소 중 하나로서, 세포 모양 유지, 세포 운동성, 세포내 수송과 세포 분열 등을 담당한다 [7, 8].

미세소관은 세포 분열 과정에서 방추사(spindle)를 형성하여 염색체 분열(chromosomal segregation)을 일으킨다. 튜불린에 결합하는 물질들은 방추사의 역할을 저해하여 세포 주기를 정지시키고 세포 사멸을 일으키기 때문에, 튜불린 중합 저해제는 항암화합요법제로서 중요성을 갖는다 [7].

미세소관은 세포 분열과 더불어 스트레스 반응에도 중요한 역할을 한다. 암세포가 산소나 영양분이 고갈되거나 방사선 조사(irradiation)를 받는 등의 스트레스 상황이 되면 미접힘 단백질은 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(ubiquitin-proteasome system, UPS)에 의해 제거된다 [9]. 미접힘 단백질 반응은 미접힘 또는 잘못 접힘 단백질을 분해하여 재사용하기 위한 과정이며, 비정상적인 단백질들은 유비퀴틴화 되어, 프로테아좀(proteasome)과 애그리좀(aggresome) 경로에 의해 분해된다 [10]. 애그리좀을 통한 단백질 분해에서, 다중 유비퀴틴화된 비정상적인 단백질들을 애그리좀이라 하며, 이들은 HDAC6 와 결합하여, 다이닌(dynein)이라는 운동 단백질(motor protein)에 붙어 세포질로부터 소포체로 이동하는데, 이 때 미세소관은 이들의

이동 통로의 역할을 한다 [10]. 그러므로, 미접힘/잘못접힘 단백질의 응집(aggregation)은 미세소관의 기능에 의존적이라고 할 수 있다 [11]. 따라서, 튜불린 중합 저해제에 의한 미세소관의 와해는 미접힘/잘못접힘 단백질의 분해를 어렵게 하여 소포체 스트레스를 증가시킬 수 있다.

CKD-516 (valecobulin)은 튜불린 중합 저해제 기전의 vascular disrupting agent (VDA)이다. CKD-516 은 임상 1 상 및 이리노테칸과의 병용 임상 1 상을 통하여 안전성을 확인하였으며, 특히 대장암 환자를 대상으로 진행된 이리노테칸 병용 1 상에서는 79%의 환자에서 안정성 병변(stable disease, SD) 이상의 약효를 보인 신규 항암제 후보물질이다. 이 논문에서는 CKD-516 에 의한 세포사멸에 소포체 스트레스의 관련 여부를 확인하였다.

2. 히스톤 탈아세틸 효소 저해제

진핵생물(eukaryote)의 deoxyribonucleic acid (DNA)는 각 두개씩의 H2A, H2B, H3 및 H4 로 이루어진 히스톤(histone) 옥타머(octamer)에 감겨져 존재하며, 이를 뉴클레오솜(nucleosome)이라고 한다. 뉴클레오솜은 크로마틴(chromatin)의 기본 단위이며, 양전하(positive charge)를 띄는 히스톤과 음전하(negative charge)를 띄는 DNA 간의 상호작용에 의해 DNA 의 응축을 유지한다. 히스톤 라이신(lysine) 잔기의 아세틸화(acetylation)는 히스톤의 양전하를 중성화(neutralization)시켜, 히스톤과 DNA 간의 상호작용을 약화시킨다 [12]. 이로 인한 뉴클레오솜의 구조적 변화에 의해 전사인자(transcription factor)들의 DNA 로의 접근성이 영향받게 된다.

단백질의 아세틸화는 해독 후 변경 과정(post-translational modification) 중 하나이며, 이중 히스톤의 아세틸화에 대해서 많은 연구가 이루어져왔다. 히스톤의 아세틸화는 크게 두 가지의 효소-히스톤 아세틸기 전달 효소(histone acetyltransferase, HAT) 및 히스톤 탈아세틸 효소(histone deacetylase, HDAC)에 의해 조절이 된다 [13, 14].

HDAC 저해제는 후생학적 작용 약물(epigenetic drug)이며, DNA 의 변화없이 유전자 발현을 조절함으로서, 암세포를 정상화(normalization)시키는 작용을 한다 [15]. HDAC 은 다양한 혈액암에서 역할을 하고 있기 때문에, 이들 암종에서 효과적인 항암제로서 개발되고 있다. HDAC 저해제는 림프종(lymphoma)과 다발골수종(multiple myeloma, MM)의 치료제로 승인되었다. 예를 들어, Vorinostat 은 피부 T 세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma, CTCL)의 치료제로 허가 받았으며, Romidepsin 은 CTCL 및 말초 T 세포 림프종(peripheral T cell lymphoma, PTCL), Belinostat 은 PTCL, Panobinostat 은 다발골수종의 치료제로 각각 허가 받았다 [16].

몇몇 HDAC 저해제들은 소포체 스트레스를 매개하여 항암 효과가 나타남을 밝힌 바 있다 [17, 18]. Class I 및 pan-HDAC 저해제는 여러 암종에서 소포체 스트레스를 일으키는 것이 알려져 있다 [19, 20]. 또한 Class II 에 속하는 HDAC6 는 암세포에서 과발현된 잘못접힘 단백질을 애그리좀 경로를 통해 제거하는 과정에 관여한다는 것이 알려져 있다 [21].

CKD-581 (Alteminostat)은 HDAC class I 과 class II 를 모두 억제하는 HDAC 저해제이다. 림프종 및 다발골수종 환자를 대상으로 한 임상 1 상 시험에서 안전성을 확인하였으며, 44% (16/36 환자)의 환자에서 안정성 병변 이상의 반응을 나타낸 항암제 후보물질이다 [22].

이러한 연구 배경을 바탕으로 본 학위논문에서는 소포체 스트레스와 관련되어 있는 두 가지 항암제 후보물질의 작용 기전 및 항암효과를 밝히고자 하였다.

II. 시약 및 실험방법

1. 시약 및 항체

CKD-516과 S516, CKD-581은 종근당 (서울, 한국)으로부터 공급받았다. 카보플라틴 (cyclobutane-1,1-dicarboxylate-*O*,*O*′, carboplatin)과 tunicamycin, 4-phenylbutyric acid (4-PBA), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 리툭시맙(Rituximab)은 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하였다. CKD-516과 카보플라틴, CKD-581, 리툭시맙은 식염수(saline)에 녹여 동물실험에 사용하였다. S516은 dimethylsulfoxide (DMSO)로 녹여 사용하였다. IRE1α와 p-PERK, PERK, BCL-2, BCL-6, BCL-xL, Dishevelled binding antagonist of beta catenin 1 (DACT1), Dishevelled binding antagonist of beta catenin 3 (DACT3), Cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), HRP-conjugated goat anti-mouse, anti-rabbit IgG들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. GRP78과 ATF6, phosphorylated H2AX (γH2AX) 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. C/EBP homologous protein (CHOP)과 ubiquitin, histone H3, acetylated histone H3, histone H4, acetylated histone H4, tubulin, acetylated tubulin, myeloid cell leukemia-1 (MCL-1), poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), p21, phosphorylated p53에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)로부터 구입하였다. MYC과 CD20, DACT2, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 항체는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit 는 Promega (Madison, Wi)에서 구입하였다. β-actin 항체 및 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

A549 (비소세포폐암)와 H460 (비소세포폐암), Calu-6 (비소세포폐암), SU-

DHL-2 (ABC/DH) and SU-DHL-4 (GCB/DH), HH (T 세포 림프종), MJ (T 세포 림프종), MM.1S (다발골수종), RPMI8226 (다발골수종) 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다. OCI-LY1 (GCB/DH)와 U2932 (ABC/DE) 세포주는 서울삼성의료원 유해용 교수님으로부터 분양받았다. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)은 Modern Cell & Tissue Technologies (MCTT, Seoul, Korea)에서 구입하였다. OCI-LY1 및 MJ 세포 배양에는 20%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 첨가한 IMDM 배지 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하였고, HUVEC 세포는 EGM-2 배지 (Lonza, Basel, Switzerland)를 사용하여 배양하였다. 나머지 세포들의 배양에는 10% FBS를 첨가한 RPMI1640 배지를 이용하였다. 모든 세포들은 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양되었다.

3. 튜불린 중합체 형성 분석

S516이 튜불린 중합체 형성에 영향을 주는지 알아보기 위해, HTS-Tubulin Polymerization Assay Kit (Cytoskeleton, Denver, CO)을 이용하였으며, 제조사로부터 제공된 실험법에 따라 실험하였다.

간단히 요약하면, S516 또는 DMSO와 정제된 튜불린 단백질을 4℃에서 섞은 후, 37℃로 설정한 FlexStation 3 (Molecular devices, San Jose, CA)에서 340 nm 파장으로 혼탁도(turbidity)를 시간에 따라 측정하였다. DMSO가 처리된 시료에 비해 혼탁도가 저해된 정도를 계산하여, 튜불린 중합체 형성 저해능을 확인하였다.

4. 튜불린 결합 위치 동정

H460 세포에 S516과 *N*,*N*'-ethylene-bis(iodoacetamide) (EBI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 순차적으로 처리하였다. 처리가 끝난 세포는 150 μL Laemmli sample buffer (12 mM Tris–Cl pH 6.8, 0.5% SDS, 2% glycerol, 1% β-mercaptoethanol,

0.005% bromophenol blue)로 녹인 후, 10분간 끓여주었다. 이렇게 얻어진 시료는 웨스턴 블롯팅 방법으로 분석되었다.

5. 세포골격 면역염색

HUVEC 세포를 커버 글라스(cover glass) 상에서 EGM-2 배지로 2일간 배양한 후, 100 nM S516을 제시된 약물 처리 시간에 따라 처리하였다. H460과 A549, Calu-6 세포들은 하룻밤(overnight) 동안 커버 글라스 상에서 RPMI1640 배지로 배양한 후, 100 nM S516을 2시간 동안 처리하였다. 약물 처리가 끝난 세포는 4% paraformaldehyde로 15분간 고정하였으며, β-tubulin 단일클론 항체를 30분간 처리하고, 다시 rhodamine phalloidin (Sigma-Aldrich)으로 30분간 염색하였다. 모든 검체는 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 포함한 ProLong Gold Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific)로 마운팅(mounting)하였다. 염색이 완료된 검체는 Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다.

6. HUVEC 튜브 형성

HUVEC 세포는 matrigel (BD Biosciences, Mississauga, ON) 상에서 EGM-2 배지로 배양하였다. 모세혈관 모양의 구조(capillary-like tube)로 분화된 세포에는 S516을 한 시간 처리한 후, EGM-2 배지로 씻어주었다. 그 후, Nikon Eclipse Ti-s (Nikon, Tokyo, Japan) 현미경으로 관찰하였다.

7. 활성산소 측정

H460 세포에 S516을 24시간 동안 처리한 후, 20 μM 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 30분간 처리하였다. DCF 형광은 FlexStation 3 (Molecular Devices, San Jose, CA)로 측정하였다.

8. JC-1 염색

JC-1은 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential)를 관찰하기 위해 널리 사용된다. H460 세포에 30 또는 100 nM S516을 24시간 동안 처리한 뒤, 30분 동안 2 μg/mL JC-1으로 염색하였다. 형광은 Incucyte S3 live cell analysis system (Essen BioScience, Ann Arbor, MI)로 시각화 및 분석하였다.

9. Mito-HyPer 및 ER-HyPer 아데노바이러스를 이용한 미토콘드리아와 소포체 ROS의 실시간 분석

Mito-HyPer와 ER-HyPer를 발현하는 아데노바이러스는 J. Sadoshima (University California, San Diego, CA)에게서 기증받아 사용하였다. 10 MOI (multiplicity of infection)의 Mito-HyPer 또는 ER-HyPer 아데노바이러스로 H460 세포를 24시간 동안 감염시켰다. 감염된 세포에는 30 또는 100 nM S516을 24 시간 동안 처리하였다. 형광 측정은 Incucyte S3 live cell analysis system으로 수행하였고, 형광의 상대값은 녹색 형광을 발현하는 세포의 수를 살아있는 전체 세포 수로 나누어 계산하였다.

10. HDAC 효소 저해 활성 분석

CKD-581의 HDAC 효소 저해 활성은 사람의 재조합 HDAC 단백질들 (human recombinant HDAC proteins)을 사용하여, Reaction Biology Corporation (Malvrn, PA, USA)에서 수행되었다. 1/3 배씩 연속 희석된 10 구간의 CKD-581을 각 HDAC 동종효소에 처리하여, 활성도를 측정하였다. IC_{50} 값은 GraphPad Prism 5 프로그램(Irvine, CA, USA)을 이용하여 평가하였다.

11. 히스톤 단백질 추출

CKD-581 및 SAHA, DMSO를 각각 SU-DHL-2 또는 MM.1S 세포에 6시간 동안 처리한 후, phosphate buffered saline (PBS)로 2번 씻어주었다. 세포는 차가

운 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 6.5), 50 mM sodium bisulfate, 1% Triton X-100, 10 mM $MgCl_2$, and 8.6% sucrose] 50 μL로 녹인 후, 원심분리 (1500g, 10분, 4℃)하였다. 침전된 핵(nucleus)은 50 μL 0.4*N* H_2SO_4로 풀어주고, 1시간 동안 반응시킨 후, 원심분리 (1500g, 10분, 4℃)하였다. 상층액에는 차가운 아세톤(acetone) 500 μL를 첨가한 후, -20℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 원심분리 (1000g, 10분, 4℃)하여 회수되었으며, 50 μL 증류수로 녹여 실험에 사용하였다.

12. cDNA microarray 및 유전자 발현 분석

HH 및 MJ 세포에 CKD-581을 시간에 따라 처리한 후, Trizol (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 total RNA를 추출하였고, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany)을 사용하여 정제(purification)하였다. Microarray hybridization은 Infinium® HumanHT-12 BeadChip을 사용하여 수행되었고, R version 3.5.2를 이용하여 분석하였다. 얻어진 데이터는 quantile algorithm을 이용하여 normalization하였으며, glplots R package (version 3.0.1.1)의 heatmap.2를 이용하여 그래프를 만들었다.

13. 웨스턴 블롯팅

시험물질들은 암세포에 기재된 시간 및 농도에 따라 처리되었다. 약물 처리가 끝난 세포들은 단백질 분해효소 저해제(protease inhibitor, Roche)와 탈인산화 효소 저해제(phosphatase inhibitor, Roche)가 포함된 RIPA 완충액(buffer)으로 녹였다. 추출된 단백질들은 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gel을 사용하여 전기영동 하였고, nitrocellulose 막으로 옮겼다. 0.05% Tween20을 포함한 tris-buffered saline (TBS-T)에 녹인 5% 탈지 우유(skim milk)로 블로킹(blocking)을 한 후, 1 차와 2 차 항체를 순차적으로 반응시켰다. Chemiluminescence는 Chemidoc (BioRad, Hercules, CA)으로 분석하였다.

14. 종양 이종 이식 마우스 모델

폐암 세포주인 H460, A549, Calu-6의 이식을 위해서는 BALB/c nu/nu 마우스를 이용하였고, 림프종인 SU-DHL-2와 SU-DHL-4 및 다발골수종인 MM.1S의 경우에는 NOD.CB17 SCID 마우스를 이용하였다. 암세포를 실험동물의 피하에 이식하고, 종양이 잘 자라는 것을 확인한 후, 종양 부피에 따라 군 분리(grouping)를 하였으며, 각 군의 마우스에는 투여 스케줄에 따라 실험 약물 또는 vehicle을 복강 투여 하였다. 종양 부피와 몸무게는 일주일에 2회 측정하였다. 종양 부피는 캘리퍼(caliper)로 측정하였으며, (단경^2 x 장경)/2 수식에 따라 계산하였다.

15. 통계 분석

실험군의 유의성은 one-way analysis of variation (ANOVA)를 수행하여 확인하였으며, 종양 이종 이식 마우스 모델 실험에서는 two-way ANOVA를 사용하였다. 유의성은 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$로 표시하였다. 모든 결과값은 GraphPad Prism 5 프로그램을 사용하여 검정하였다.

III. 결 과

1. 튜불린 중합 저해제, CKD-516

1) S516 의 미세소관 결합 위치 동정

CKD-516 (Figure 2A)은 전구 약물(prodrug)로서, 활성 대사체(active metabolite)인 S516 으로 전환된다 [23]. 따라서, 시험관 내 실험(*in vitro* assay)에서는 S516 을 시험 물질로 사용하였다. S516 은 G2/M 기에서 세포 주기를 정지시키는 것으로 알려져 있으며 [24], Figure 2B 에서 보이는 것과 같이, 농도의존적으로 미세소관 중합을 억제하여 튜불린 중합 저해제임을 확인하였다.

미세소관에는 파클리탁셀(paclitaxel) 결합 위치와 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 결합 위치, 콜히친(colchicine) 결합 위치 등, 3 가지의 결합위치가 존재한다는 것이 알려져 있다. S516 은 튜불린 중합 억제 효과를 보였기 때문에, 이들 3 가지 위치 중, 빈카 알칼로이드 또는 콜히친 결합 위치에 결합할 것으로 예상하였다. 따라서 *N,N'*-ethylene-bis(iodoacet-amide) (EBI)를 이용하여 S516 의 결합 위치를 확인하였다. EBI 는 특이적으로 β-튜불린(β-tubulin)의 콜히친 결합 위치에 자리한 시스테인(cysteine) 239, 354 잔기를 연결시킨다 [25, 26]. EBI 를 처리하면 EBI-β-튜불린 중합체(adduct)를 형성하기 때문에, S516 이 콜히친 위치에 결합을 했는지는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 상의 전기영동 패턴의 차이로서 확인이 가능하다. 이 실험에서 S516 은 농도 의존적으로 EBI-β-튜불린 중합체의 형성을 억제한다는 것을 알 수 있었다 (Figure 2C). 결론적으로, S516 은 β-튜불린의 콜히친 결합 위치에 결합함으로써 미세소관 중합을 억제한다고 할 수 있다.

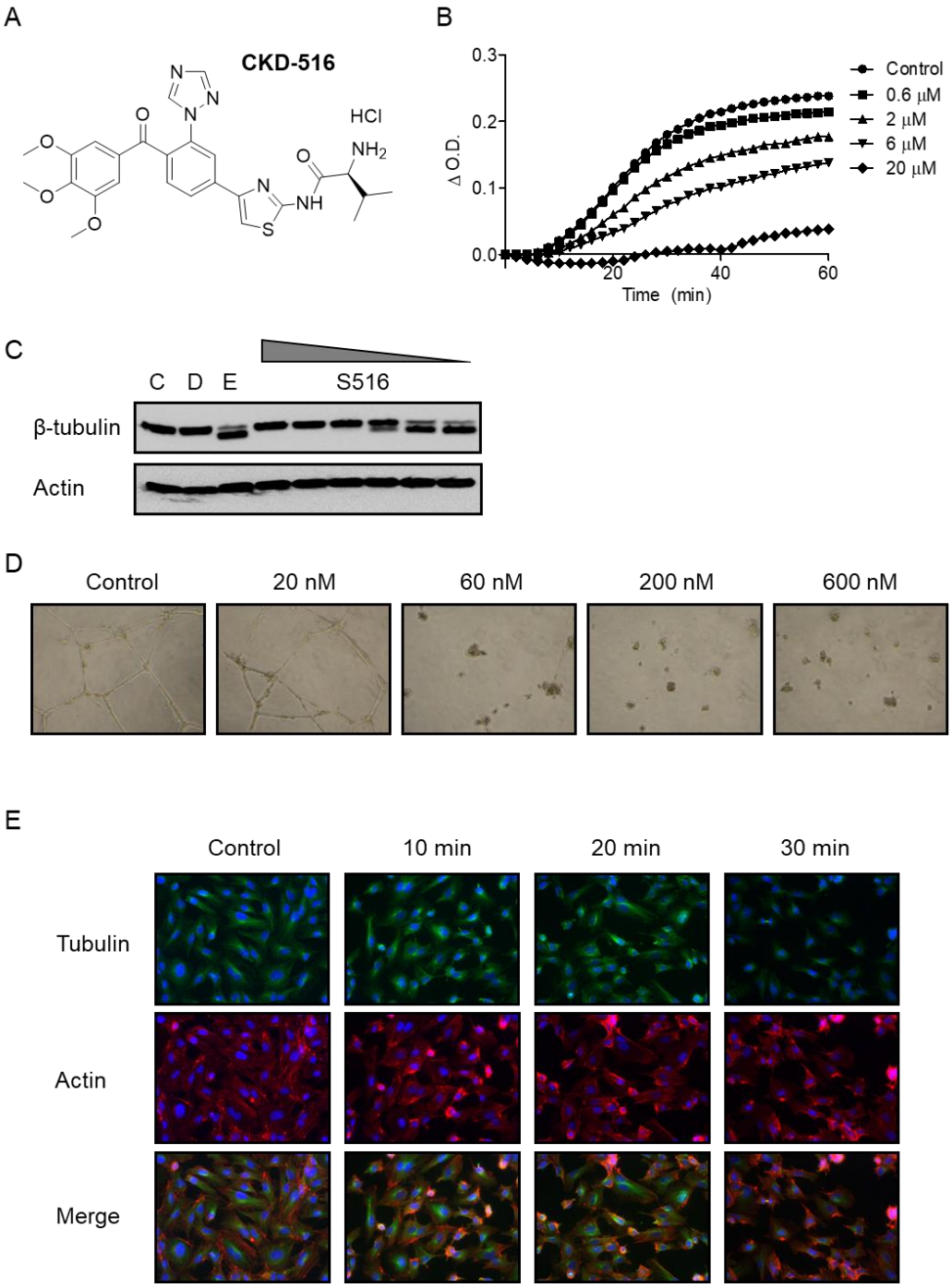

A
CKD-516
HCl
B
Control
0.6 μM
2 μM
6 μM
20 μM
ΔO.D.
Time (min)
C
C D E
S516
β-tubulin
Actin
D
Control
20 nM
60 nM
200 nM
600 nM
E
Control
10 min
20 min
30 min
Tubulin
Actin
Merge

Figure 2. S516 inhibits tubulin polymerization and disrupts the cellular microtubule network.

(A) CKD-516 structure. (B) Concentration-dependent effect of S516 on tubulin polymerization. Purified tubulin protein was exposed to 0.6-20 μM S516 or vehicle for the indicated time points and optical density (O.D.) at 340 nm wavelength was determined. (C) Competitive binding of S516 with EBI on H460 cells. H460 cells were exposed to S516 (40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 μM). The covalent binding of EBI to β-tubulin forms an adduct that migrates faster than the native β-tubulin on SDS-PAGE. (D) Effect of S516 on HUVEC capillary tube formation on matrigel layer. HUVECs incubated on matrigel for 4 h were further exposed to S516 for 1 h and examined by light microscopy. (E) Fluorescence microscopic visualization of microtubule (green), actin (red) and nucleus (blue) in HUVEC. Incubation with 100 nM S516 led to a destruction of the microtubules while actin microfilaments were intact. 400-fold magnification.

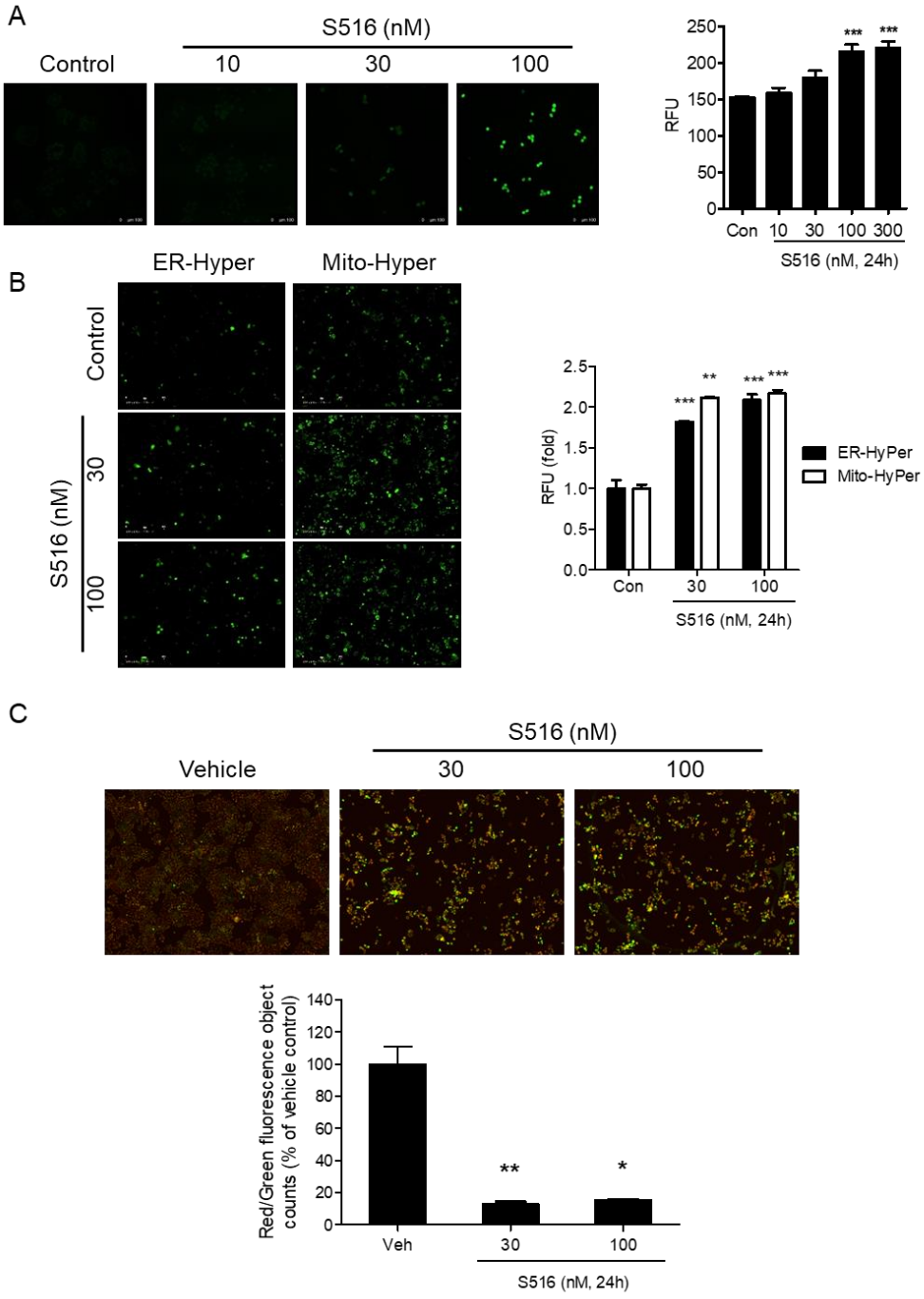
2) S516 에 의한 혈관 내피세포의 미세소관 붕괴

S516 의 혈관 붕괴 효과(vascular-disrupting effect)를 혈관 내피 세포에서 확인하기 위해, HUVEC 세포주를 이용하였다. HUVEC 세포를 matrigel 상에서 모세혈관과 유사한 형태(capillary-like tube)로 분화하도록 유도한 후 S516 을 처리하였을 때, S516 은 농도 의존적으로 모세혈관 유사 형태를 와해시켰다 (Figure 2D). 또한, HUVEC 세포에 S516 을 처리한 후 세포골격(cytoskeleton)을 염색한 결과, 수 분내에 미세소관이 사라지는 것이 관찰되었다 (Figure 2E). 이 때 액틴 섬유(actin filament/microfilament)에는 변화가 없었기 때문에, S516 은 미세소관에 선택적으로 작용하는 VDA 임을 알 수 있다.

3) 폐암 세포에서 S516 에 의한 활성산소 생성 동정

미세소관 교란은 활성산소 생성과 관련이 있는 것이 알려져 있기 때문에 [27], 폐암 세포주를 이용하여 S516 에 의한 활성산소 생성 여부를 확인하였다. S516 에 24 시간 노출시킨 H460 세포에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 처리하여, 생성된 활성산소를 측정하였다. 그 결과, 100 또는 300 nM S516 이 유의미하게 활성산소 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3A).

S516 에 의한 활성산소의 생성이 어느 세포 소기관에서 일어나는지 알아보기 위해, ER- 또는 Mito-HyPer green fluorescent protein 을 발현시키는 아데노바이러스를 이용하였다. H460 세포에 이들 아데노바이러스를 감염(infection)시키고, 감염된 세포는 다시 S516 에 24 시간 동안 노출시켰다. 그 결과 S516 은 소포체와 미토콘드리아에서 모두 활성산소를 증가시키는 것이 관찰되었다 (Figure 3B). 다음으로 JC-1 (미토콘드리아 막 전위 표지자) 염색을 통해, 미토콘드리아 막 전위의 변화를 관찰하였다. H460 세포에 약물을 처리한 결과, 빨간색 형광/초록색 형광의 비율이 유의하게 낮아지는 것이 관찰되었다 (Figure 3C). 이는 S516 에 의해 미토콘드리아 막 전위가 붕괴


A
S516 (nM)
Control
10
30
100
RFU
250
200
150
100
50
0
***
***
Con
10
30
100
300
S516 (nM, 24h)
B
ER-Hyper
Mito-Hyper
Control
S516 (nM)
30
100
RFU (fold)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
***
***
***
Con
30
100
S516 (nM, 24h)
ER-HyPer
Mito-HyPer
C
S516 (nM)
Vehicle
30
100
Red/Green fluorescence object counts (% of vehicle control)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
*
Veh
30
100
S516 (nM, 24h)

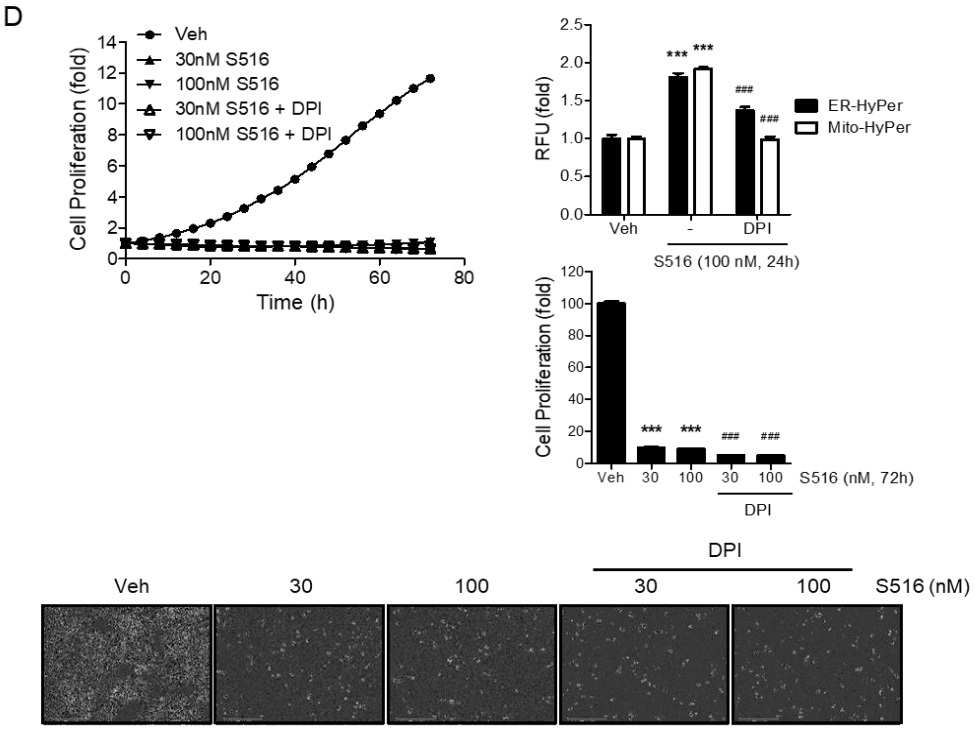


Figure 3. S516 stimulates ROS production and loss of mitochondrial membrane potential in lung cancer cells.

(A) ROS accumulation by S516 treatment. ROS levels were measured by DCF fluorescence. H460 cells were treated with S516 or vehicle for 24 h. Representative images (left). Fluorescence intensity was represented by histogram (right). Data represent mean ± SEM (significant vs. vehicle treated control cells; ***$p < 0.001$). (B) Subcellular ROS production by S516. H460 cells were infected with adenoviral ER- or Mito-HyPer expressing ROS-sensitive GFP in specific subcellular compartment, and then the infected cells were exposed to 30 or 100 nM S516 for 24 h. Representative fluorescence images (left). Fluorescence intensity was measured by Incucyte S3 live cell analysis system. Relative green fluorescence intensity was represented by histogram (right). Data represent mean ± SEM of at least three independent experiments (significant vs. vehicle treated

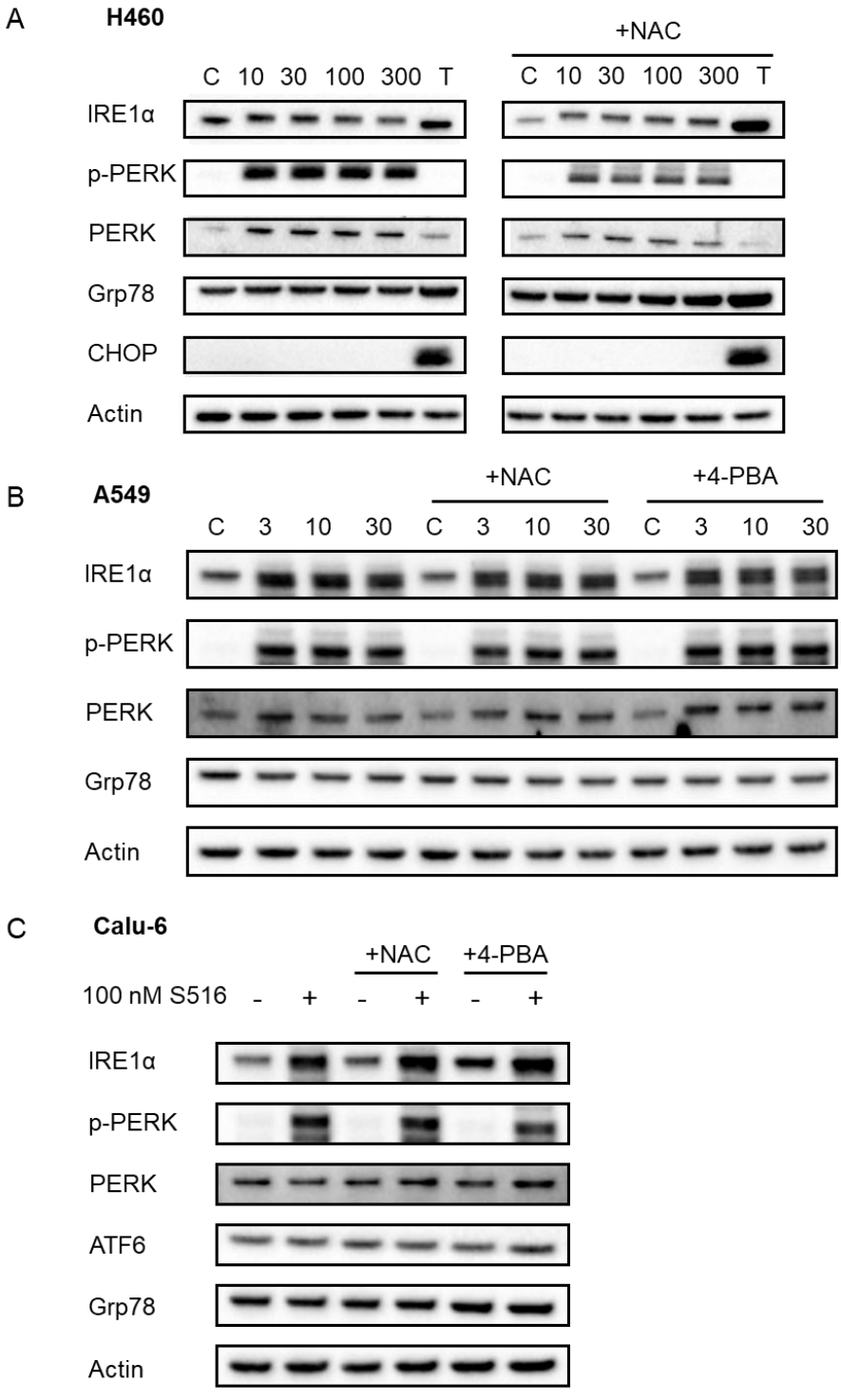
control cells; ***$p < 0.001$). (C) Mitochondrial membrane potential was determined by JC-1 staining. H460 cells were treated with S516 (30 or 100 nM) or vehicle for 24 h, and then stained with JC-1 (2 μg/mL) for additional 30 min. Representative images (upper). Relative red/green fluorescence object counts were represented by histogram (lower). (D) Effects of diphenyleneiodonium chloride (DPI) on subcellular ROS production and cell death induced by S516. 5 μM DPI diminished S516-stimulated ROS production in both ER and mitochondria (upper right), however, it did not affect cell proliferation inhibition by S516 (upper left). Representative images of cell proliferation inhibition effects by S516 with or without DPI at 72 h (lower). Data represent mean ± SEM of at least three independent experiments (significant vs. vehicle treated control cells; ***$p < 0.001$, significant vs. S516 treated cells; $^{###}p < 0.001$).

되었음을 보여준다. Diphenyleneiodonium (DPI)는 NADPH 산화 효소의 특이적인 저해제로서, 활성산소 생성 및 미접힘 단백질 반응의 활성화를 막는 작용을 한다 [28]. DPI 는 소포체와 미토콘드리아에서 S516 에 의한 활성산소 생성을 저해하였으나 (Figure 3D, 오른쪽 위), 세포 성장 저해에는 영향을 주지 못했다 (Figure 3D, 아래). 그러므로, S516 의 암세포 사멸 효과는 소포체나 미토콘드리아에서의 활성산소 생성에 의한 것이 아님을 알 수 있다.

4) S516 에 의한 폐암 세포에서의 소포체 스트레스 유도

단백질 접힘은 소포체에서 세밀하게 조절된다. 잘못 접힘 단백질의 축적은 소포체의 항상성을 해치게 되는데, 이로 인해 소포체 스트레스가 발생하고, 미접힘 단백질 반응이 활성화된다. IRE1α와 PERK, ATF6 의 3 개의 스트레스 센서가 미접힘 단백질 반응에 관여한다 [29, 30]. 소포체 스트레스와 활성산소는 모두 미세소관 상태와 관련되어 있다. 잘못접힘/미접힘 단백질들은 유비퀴틴화 되고, 다중의 유비퀴틴이 붙은 단백질은 미세소관을 통해 애그리좀으로 운송된다 [10, 11, 31]. 그러므로, 미세소관의 이상은 잘못접힘 단백질의 축적을 유발할 수 있다. 튜불린 중합 저해제인 *N*-deacetyl-*N*-(chromone-2-carbonyl)-thiocolchicine (TCD)의 경우, 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC) 세포에서 미세소관을 와해시켜 소포체 스트레스를 활성화시킨다는 것이 밝혀진 바 있다 [32]. 그러므로, S516 에 의한 세포 사멸에 대한 소포체 스트레스의 연관성을 확인하기 위한 연구를 진행하였다.

S516 에 의해 3 가지의 폐암세포들에서 IRE1α와 PERK 의 발현이 증가되었으나, ATF6 및 GRP78 의 발현에는 영향을 주지 않았다 (Figure 4A-C). 흥미롭게도, 활성산소 차단제(scavenger)인 *N*-acetylcysteine (NAC)은 H460 세포에서 부분적으로 PERK 의 인산화를 저해하였다 (Figure 4A). 그러므로, S516 에 의해 유도된 미세소관의 와해 및 이로 인한 ROS 생성이 IRE1α와 PERK 를 매개한 소포체 스트레스를 유발한다는 것을 알 수 있다.


A
H460
+NAC
C 10 30 100 300 T
C 10 30 100 300 T
IRE1α
p-PERK
PERK
Grp78
CHOP
Actin
B
A549
+NAC
+4-PBA
C 3 10 30 C 3 10 30 C 3 10 30
IRE1α
p-PERK
PERK
Grp78
Actin
C
Calu-6
+NAC
+4-PBA
100 nM S516 - + - + - +
IRE1α
p-PERK
PERK
ATF6
Grp78
Actin

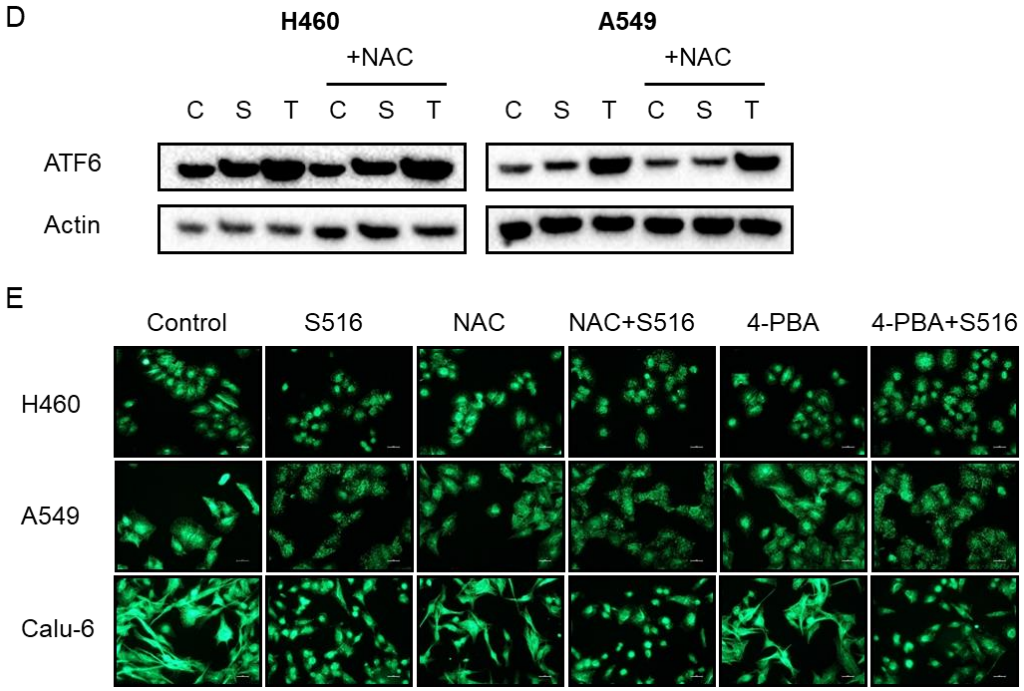


Figure 4. S516 induces ER stress in lung cancer cells.

(A) Western blot analyses of ER stress marker proteins in H460 cells, (B) A549 cells, (C) and Calu-6. Three cell lines were treated with S516 or tunicamycin (T) in the presence or absence of 1 mM NAC or 0.25 mM 4-PBA for 24 h. (D) Expression levels of ATF6 in H460 and A549 lung cancer cells treated with S516 (S) or tunicamycin (T) with or without 1 mM NAC for 24 h. (E) Effect of NAC or 4-PBA on microtubule shortening by S516 in three different lung cancer cells. Three lung cancer cells were treated with S516 and/or NAC or 4-PBA for 2 h.

S516 에 의한 미세소관 와해에 활성산소 저해제 (NAC)나 소포체 스트레스 저해제 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA)가 영향을 주는지 알아보기 위해, 100 nM S516 과 1 mM NAC 또는 0.25 mM 4-PBA 의 조합을 3 가지 암세포에 각각 처리하고, β-튜불린을 면역염색하여 미세소관의 변화를 관찰하였다. S516 은 3 가지의 모든 폐암 세포들에서 미세소관의 길이를 짧아지게 하는 효과를 보였고, NAC 이나 4-PBA 는 이를 저해하지 못하였다 (Figure 4E). 그러므로, S516 에 노출된 폐암 세포에서는 소포체 스트레스나 활성산소에 의해 미세소관의 와해가 유도되는 것이 아니라, 반대로 미세소관의 와해와 미토콘드리아 또는 소포체에서의 활성산소 생성에 의해 소포체 스트레스가 일어나는 것으로 생각된다.

5) 폐암 이종이식 모델에서의 CKD-516 의 항암효과

CKD-516 이 종양 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 Calu-6 또는 A549, H460 폐암을 이식한 이종이식 마우스 모델을 사용하였다. CKD-516 을 4 일에 한 번씩 복강 주사한 결과, 3 가지 폐암 모델에서 모두 종양 성장 억제효과가 나타났다 (Figure 5A-C). 이러한 결과는 CKD-516 이 폐암에 대한 치료효과를 가지고 있음을 보여준다.

6) CKD-516 과 카보플라틴 병용에 의한 항암 효과의 상승

소포체 스트레스는 백금 화합물(platinum-based agent)를 포함한 세포독성 항암제에 대한 암세포의 감수성을 높인다 [7]. 카보플라틴은 2 세대 백금 화합물로서 비소세포폐암의 치료에 널리 사용된다. 백금 화합물은 폐암에서 활성산소를 유도한다는 것이 알려졌다 [33]. 그러므로, CKD-516 과 카보플라틴의 병용이 상승효과가 있는지를 알아보고자 하였다. H460 이종이식 마우스 모델을 이용한 실험에서 CKD-516 과 카보플라틴은 다소 약한 항암 효과를 보였으며, 고용량 (100 mg/kg) 카보플라틴에 의해서는 심각한

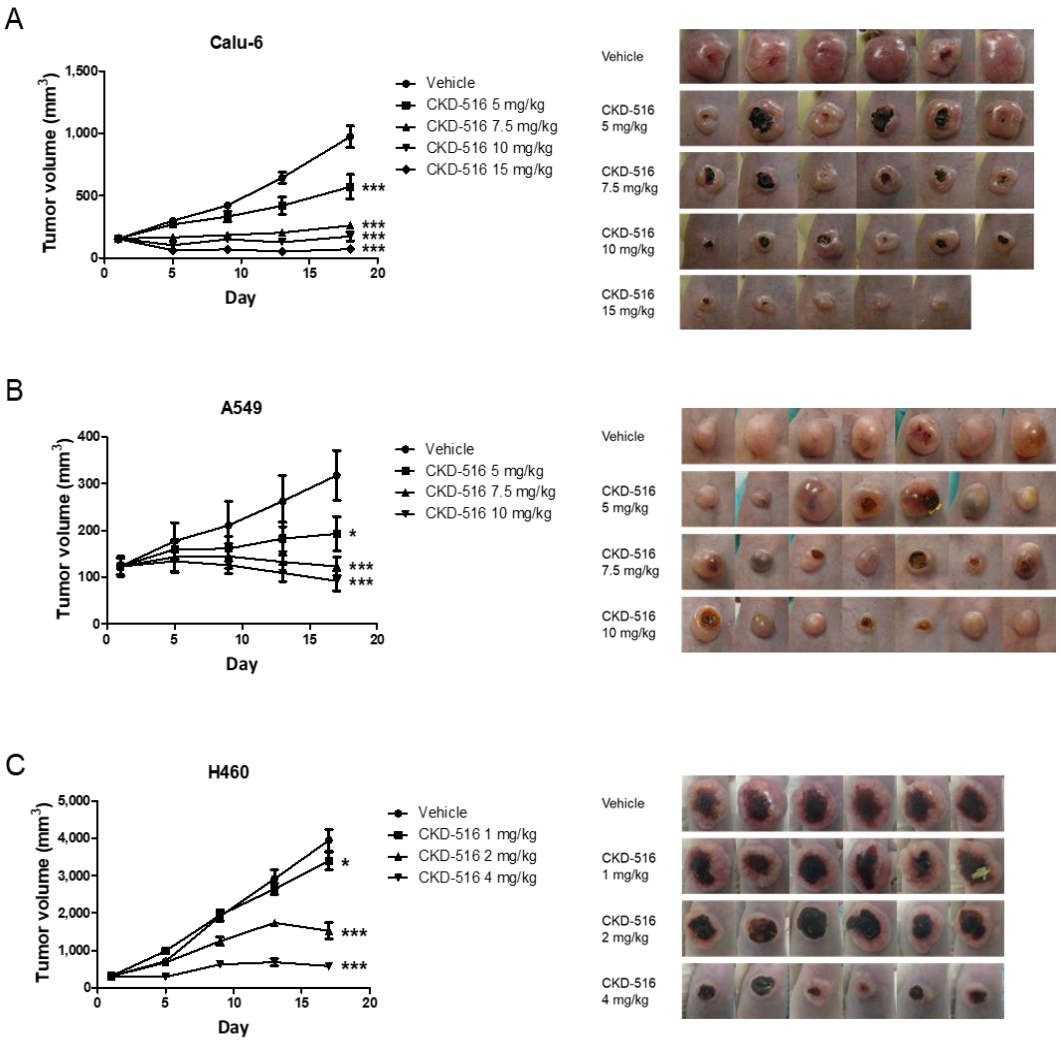


Figure 5. Potent *in vivo* anti-cancer activities of CKD-516 in xenografts implanted with (A) Calu-6, (B) A549 and (C) H460 cells. CKD-516 was intraperitoneally injected once every four days. All data represent mean ± SEM (significant vs. vehicle treated group; **p* < *0.05*, ****p* < *0.001*).

수준의 체중 감소가 나타났다. 반면, 저용량 (50 mg/kg) 카보플라틴과 CKD-516 (3 mg/kg)의 병용은 고용량의 카보플라틴 보다 높은 수준의 항암 효과를 보였으며, 체중감소는 나타나지 않았다 (Figure 6A-B). 이러한 결과는 CKD-516 과 카보플라틴의 병용이 비소세포폐암의 치료에 카보플라틴의 용량을 낮추어 부작용을 경감시키는 새로운 화학요법으로 적용 가능함을 제시한다.

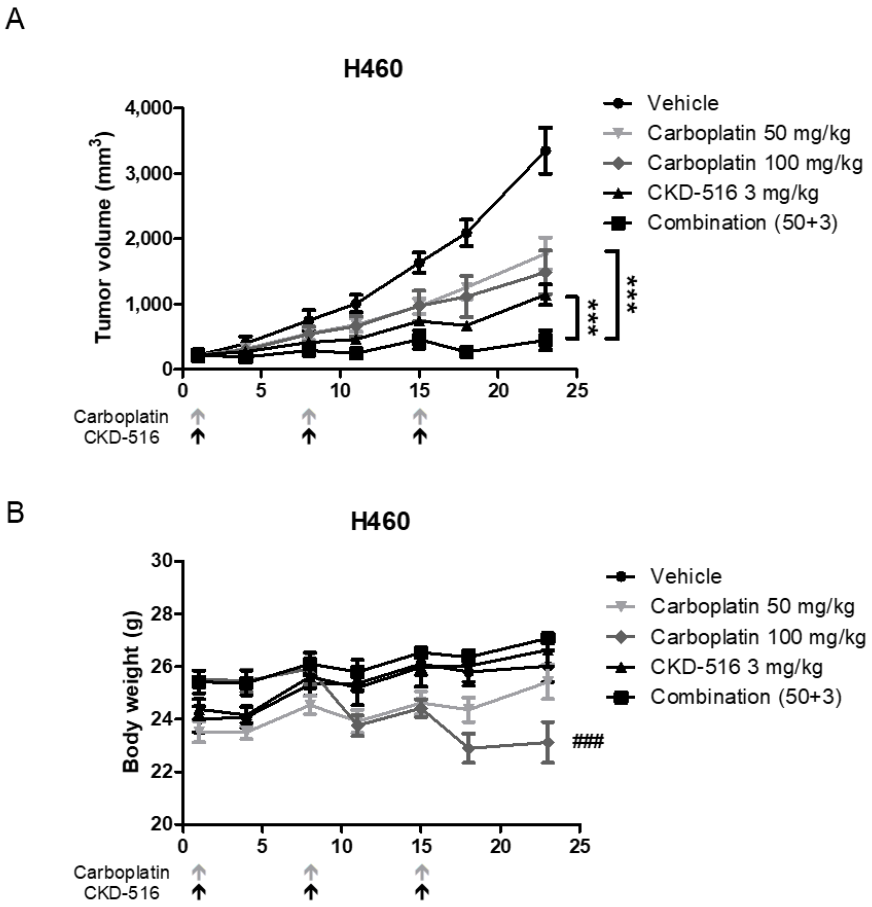


Figure 6. Synergistic anti-cancer activity of CKD-516 with carboplatin in NSCLC xenograft.

(A) Enhanced anti-cancer activity by combination injection of CKD-516 (3 mg/kg) with carboplatin (50 mg/kg) in xenografts implanted with H460 cells. Both CKD-516 and carboplatin were intraperitoneally injected. (B) No body weight loss by combination injection of CKD-516 with carboplatin. High dose (100 mg/kg) of carboplatin showed severe body weight loss. All data represent mean ± SEM (significant vs. each treatment groups; ***$p < 0.001$, significant vs. vehicle group; $^{###}p < 0.001$).

2. 히스톤 탈아세틸 효소 저해제, CKD-581

1) CKD-581 에 의한 HDAC 효소의 저해

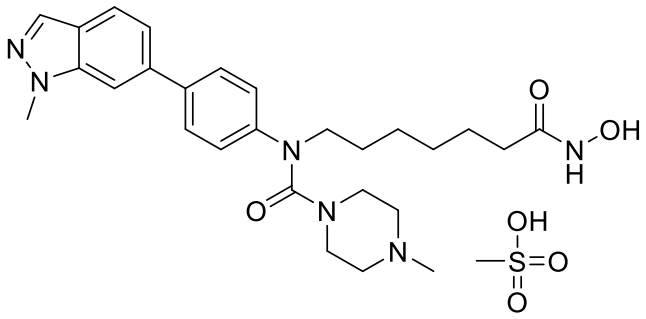
CKD-581 의 HDAC 효소 저해능을 확인하고자, 정제된 HDAC 동종 효소(isozyme)들을 이용하여 *in vitro* HDAC assay 를 수행하였다. CKD-581 은 HDAC 동종 효소의 대부분을 저해하였으며, 특히 HDAC1, 2, 3, 6, 9, 10, 11 에 대해서는 30 nM 이하의 농도에서도 강하게 저해하였다 (Table 1). 이 결과로써 CKD-581 은 강력한 pan-HDAC 저해제임을 알 수 있다.

SAHA 는 재발성 피부 T 세포 림프종(cutaneous T cell lymphoma, CTCL)의 치료제로 허가 받은 HDAC 저해제이다 [12, 14]. CKD-581 과 SAHA 는 MM.1S 세포에서 히스톤 H3 와 H4 의 아세틸화를 증가시켰다. 또한 튜불린의 아세틸화를 증가시키는 것도 확인되었다 (Figure 7A). 이러한 결과는 CKD-581 이 class I 과 II HDAC 효소의 활성을 저해함으로서, 다발골수종 세포에서 타겟 단백질의 아세틸화를 유도하였음을 보여준다.

2) CKD-581 에 의한 림프종과 다발골수종 세포의 사멸

림프종 세포 (HH, MJ)와 다발골수종 세포 (MM.1S, RPMI8226)에 대한 CKD-581 의 세포사멸 효과를 평가하기 위해, CellTiter-Glo luminescent cell viability assay system 을 사용하였다. CKD-581 은 림프종과 다발골수종 세포들의 사멸을 농도의존적으로 유도하였다. CKD-581 의 IC_{50} 값은 HH 와 MJ, MM.1S, RPMI8226 에서 각각 32.9±1.3, 93.3±4.2, 38.8±1.3, 53.3±5.0 nM 이었다. 이는 CKD-581 이 림프종과 다발골수종 세포 모두에서 암세포 사멸을 유도한다는 것을 보여준다 (Figure 7B).

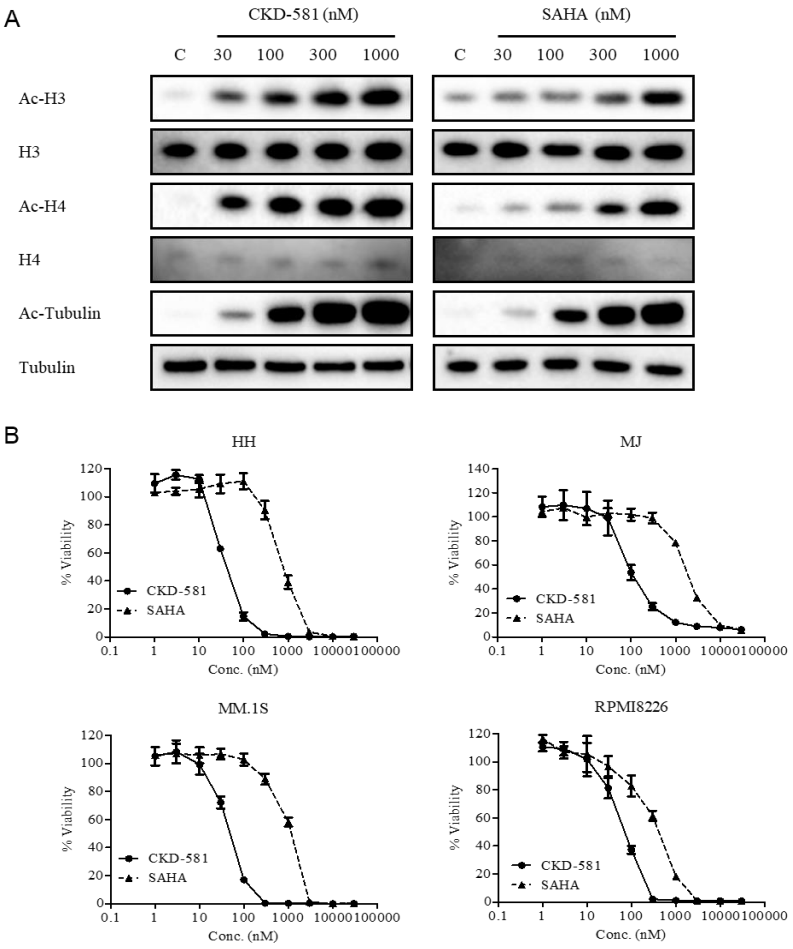
CKD-581



HDAC enzyme assay IC_{50} (nM)		
Class I	HDAC1	0.50±0.11
	HDAC2	2.22±0.39
	HDAC3	0.61±0.09
	HDAC8	49.82±18.24
Class IIa	HDAC4	1502±109
	HDAC9	0.95±0.69
	HDAC11	26.91±19.12
Class IIb	HDAC6	2.62±0.32
	HDAC10	1.14±0.76

Table 1. CKD-581 is a potent HDAC inhibitor.

HDAC enzyme activity was measured using recombinant HDAC isozymes. Data represent mean ± SEM of at least three independent experiments.



IC_{50} (nM)	CKD-581	SAHA
HH	32.9±1.3	858.2±41.6
MJ	93.3±4.2	2212.0±72.8
MM.1S	38.8±1.3	1059.3±7.9
RPMI8226	53.3±5.0	315.6±13.5

Figure 7. CKD-581 induces acetylation of target proteins and suppresses cell proliferation in hematological cancer cells.

(A) Acetylation of histone H3, H4 and tubulin. MM1.S cells were treated with 30-1000 nM CKD-581 or SAHA for 6 h, and total cell lysates were obtained. Acetylation of proteins was determined by immunoblottings. (B) Comparison of inhibitory effects of CKD-581 and SAHA on proliferation of four hematological cancer cell lines. Data represent mean ± SEM of at least three independent experiments.

3) CKD-581 에 의한 DACT3 의 선택적 유도 및 Wnt/β-catenin 신호 전달의 저해

혈액암 세포에서의 CKD-581 의 약리학적 기전을 알아보기 위해, 두 가지의 림프종 세포를 이용하였다. Infinium® HumanHT-12 BeadChip 을 이용하여, CKD-581 을 시간에 따라 6, 12, 24 시간 처리한 암세포의 mRNA 발현 패턴의 변화를 microarray 로 분석하였다. 발현율이 4 배 이상 증가하거나 감소한 유전자들을 선택한 후, 이들 유전자들의 역할(functional role)을 알아보기 위해 KEGG pathway 분석을 수행하였다. KEGG pathway 분석 결과는 Wnt/β-catenin 신호전달이 유의미하게 변화하였다는 것을 제시하였다 (Table 2). Wnt/β-catenin 신호 전달은 암의 성장과 줄기세포화(stemness)를 조절하는데 핵심적인 신호 전달 중 하나이다 [34-38]. DACT3 는 Wnt/β-catenin 신호전달의 negative regulator 로 알려져 있으며 [39, 40], DACT3 의 발현은 흥미롭게도 두 가지 암세포에서 모든 시간대에 공통적으로 증가되었다 (Figure 8B).

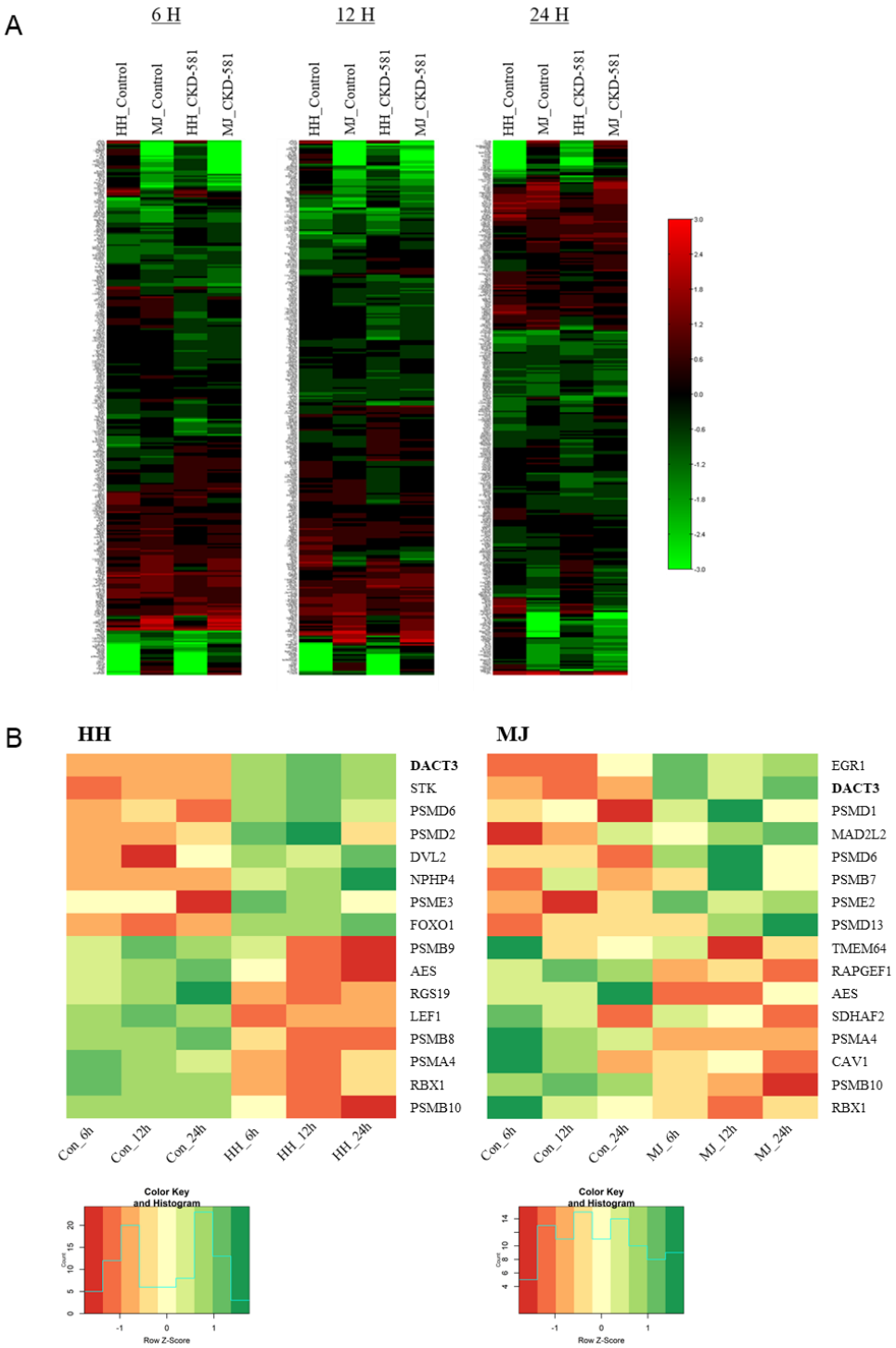
다발골수종 세포에서 CKD-581 에 의해 DACT3 가 단백질 수준에서 증가하는지 알아보기 위해, DACT3 family 에 대한 면역 블롯팅을 수행하였다. DACT3 의 발현은 30-300 nM CKD-581 에 의해 유의하게 증가되었으며, 다른 두 가지의 DACT family member 인 DACT1 과 DACT2 의 발현에는 변화가 없었다 (Figure 8C). DACT3 의 발현은 히스톤의 변화(modification)에 의해 조절된다는 것이 알려져 있으며 [39], 또한 CKD-581 뿐만 아니라 1000-3000 nM SAHA 도 역시 DACT3 의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었다 (Figure 8C). 이러한 결과들은 암세포에서 HDAC 저해제들이 공통적으로 DACT3 의 과발현을 통해 Wnt/β-catenin 신호 전달을 조절할 수 있음을 제시한다.

다음으로, 다발골수종 세포에서 Wnt/β-catenin 신호 전달의 하위 신호인 β-catenin 과 c-MYC 의 변화에 대해 관찰하였다. 기대했던 바와 같이, HDAC 저해제들은 두 가지 다발골수종 세포인 MM.1S 와 RPM8226 에서 β-catenin 과 c-MYC 의 발현을 감소시켰다 (Figure 8D). 이러한 결과들은 타 연구 그룹들이

Pathway Name	Genes in pathway	Impact Factor	#Genes in Pathway	#Input Genes in Pathway	#Pathway Genes on Chip	%Input Genes in Pathway	%Pathway Genes in Input	Corrected gamma p-value
Phosphatidylinositol signaling system	DGKQ	41.84	76	1	76	1.04	1.32	2.9E-17
Pathways in cancer	WNT10A	7.67	330	1	328	1.04	0.30	0.004
Basal cell carcinoma	WNT10A	7.66	55	1	55	1.04	1.82	0.004
Wnt signaling pathway	WNT10A	5.31	152	1	150	1.04	0.66	0.03
MAPK signaling pathway	HSPA1B, ZAK	5.23	272	2	266	2.08	0.74	0.03

Table 2. KEGG pathway analysis of differentially expressed genes by CKD-581 treatment.

Wnt signaling pathway is significantly altered in HH cell treated with CKD-581 for 6h.


A
6 H
12 H
24 H
HH_Control
MJ_Control
HH_CKD-581
MJ_CKD-581
B
HH
MJ
DACT3
STK
PSMD6
PSMD2
DVL2
NPHP4
PSME3
FOXO1
PSMB9
AES
RGS19
LEF1
PSMB8
PSMA4
RBX1
PSMB10
EGR1
DACT3
PSMD1
MAD2L2
PSMD6
PSMB7
PSME2
PSMD13
TMEM64
RAPGEF1
AES
SDHAF2
PSMA4
CAV1
PSMB10
RBX1
Con_6h
Con_12h
Con_24h
HH_6h
HH_12h
HH_24h
MJ_6h
MJ_12h
MJ_24h
Color Key and Histogram
Row Z-Score

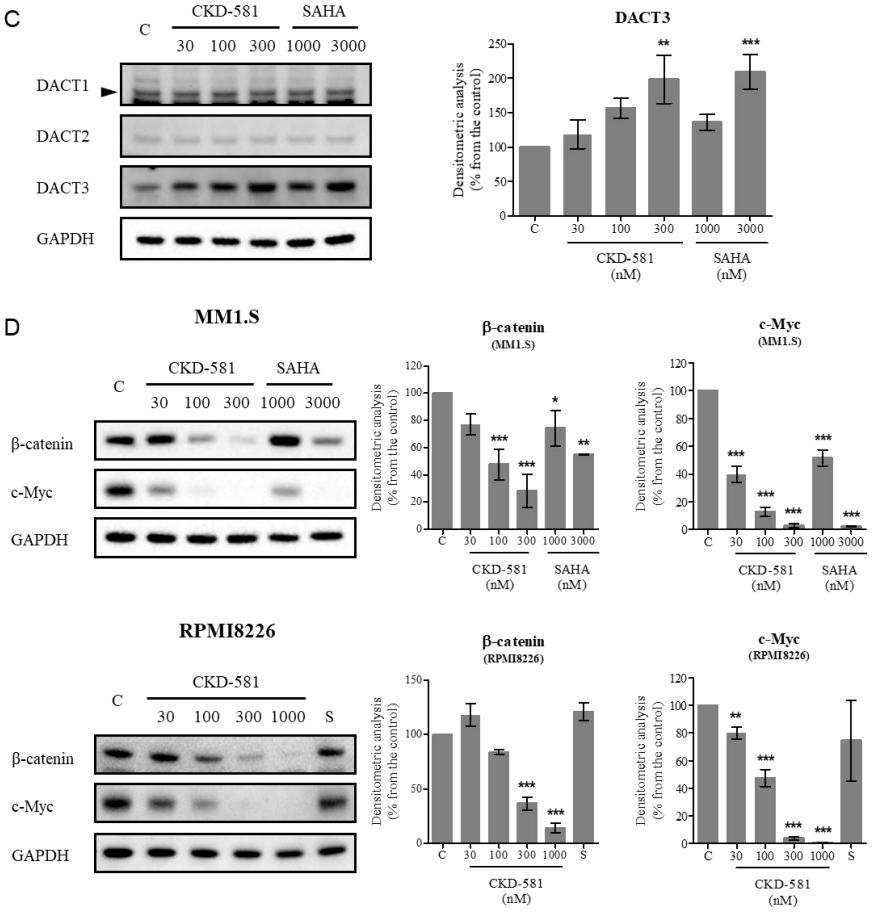


Figure 8. CKD-581 down-regulates Wnt/β-catenin pathway.

(A) Heatmap analysis of gene expression profiles of 34k genes. HH and MJ cells were treated with vehicle or 100 nM CKD-581 for 6, 12 and 24 h, and total RNA samples were obtained and reverse transcribed to cDNA. Expression level of mRNA was analyzed with the Infinium® HumanHT-12 BeadChip. (B) Heatmap analysis of Wnt/β-catenin target genes altered by 4-fold or above. (C) MM1.S cells were treated with 30-300 nM CKD-581 or 1000-3000 nM SAHA for 24 h, and total cell lysates were subjected to immunoblotting for DACT1, 2 and 3. (D) MM1.S and RPMI8226 cells were treated with various concentration of CKD-581 or SAHA for 24 h, and immunoblotted for β-catenin and c-Myc. Data represent mean ± SEM (significant vs. control; *$p < 0.05$, **$p<0.01$, ***$p < 0.001$). S, 1000 nM SAHA.

보고한 HDAC 저해제에 의한 Wnt/β-catenin 신호 전달의 감소와 일치한다 [36, 41].

β-catenin 의 과발현은 *CCND1* 및 *c-myc* 과 같은 타겟 유전자의 발현을 증가시킨다 [42]. *CCND1* 유전자 산물인 Cyclin D1 은 사람의 종양에서 암세포가 성장 단계로 전환하는 것을 조절하는 중요한 조절인자이다 [43-45]. D cyclin 들은 CDK4 또는 CDK6 와 활성 복합체(active complex)를 형성하는데, 이것이 세포주기를 G1 에서 S 기로 전환하도록 유도한다 [43, 44]. 면역 블롯팅 결과들은 다발골수종 세포들에서 CKD-581 이 농도와 시간 의존적으로 cyclin D1 과 CDK4 의 발현량을 감소시킨다는 것을 보여준다 (Figure. 9A, B). SAHA 또한 고농도에서 CDK4 와 cyclin D1 의 발현량을 줄였다. 이러한 결과는 CKD-581 이 혈액암 세포들에서 DACT3 의 발현을 유도함으로써, Wnt/β–catenin 신호 전달을 저해함을 제시한다.

4) CKD-581 에 의한 세포자멸사 유도

β-catenin 과 c-Myc 은 p53 에 의해 유도되는 세포자멸사의 핵심 조절자(key regulator)이기 때문에, Wnt/β-catenin 신호전달의 저해는 암세포에서 세포자멸사를 유도할 것으로 예측할 수 있다 [46, 47]. 그러므로, 다발골수종 세포들에 후보물질 처치 후 세포자멸사의 발생 여부를 관찰하였다. 유세포 분석 결과는 CKD-581 이 MM.1S 와 RPMI8226 세포에서 농도 의존적으로 sub-G1 의 비율을 증가시켰음을 보여준다. 1000 nM CKD-581 을 24 시간 처리한 MM.1S 세포에서는 대조군과 비교하여 sub-G1 의 비율이 5.45±0.16%에서 26.61±1.80%로 증가하였으며 ($p<0.001$), RPMI8226 세포에서는 9.99±0.15%에서 17.10±0.25%로 증가하였다 ($p<0.001$, Figure 10A).

Sub-G1 비율의 증가가 세포자멸사에 의한 것인지를 확인하기 위해, 세포자멸사와 관련된 종양 억제자(tumor suppressor)의 변화를 면역 블롯팅을 통해 확인하였다. p53 의 전사 조절자로서의 역할은 단백질 번역 후 변형(post-

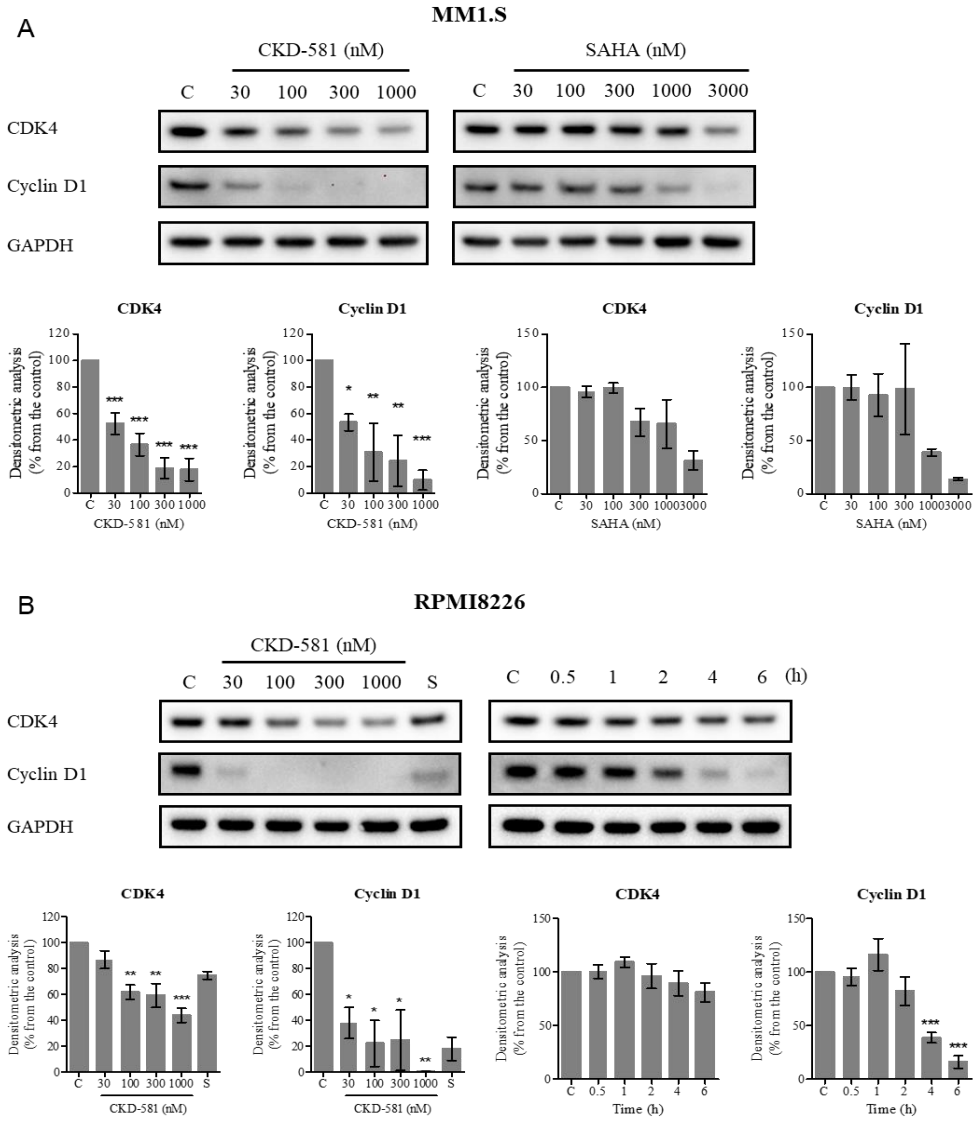


Figure 9. CKD-581 decreases the expression of cell cycle related proteins.

(A) MM1.S cells were treated with 30-1000 nM CKD-581 or 30-3000 nM SAHA for 24 h. (B) RPMI8226 cells were treated with CKD-581 (30-1000 nM) or 1000 nM SAHA for 24 h (left). RPMI8226 cells were also treated with 300 nM CKD-581 for 0.5-6 h (right), and total cell lysates were obtained and subjected to immunoblottings for CDK4 and Cyclin D1. Data represent mean ± SEM (significant vs. control; *$p < 0.05$, **$p<0.01$, ***$p < 0.001$).

transcriptional modifications) 과정에 의해 조절되고, p53 의 활성화는 DNA 수선(repair)이나 세포자멸사에 관련되어 있는, p21 이나 Bax, PUMA 와 같은 다양한 유전자의 발현을 조절한다 [48]. 이러한 유전자 중, p21 은 CDK 를 저해함으로써 세포 주기의 진행을 막는 중요한 역할을 한다. Figure 10B 에서 보이는 바와 같이, CKD-581 은 다발골수종 세포들에서 p21 의 발현량을 증가시켰으며, p21 의 발현은 p53 (Ser^{15})의 인산화와 함께 증가하였다 (Figure 10B). 이와 더불어, 다발골수종 세포에서는 24 시간의 CKD-581 처리에 의해 caspase-3 의 활성화가 일어난 것이 확인되었으며, 1000 nM SAHA 에 의해서는 미약한 정도의 활성화만이 관찰되었다 (Figure 10C). 종합적으로, CKD-581 은 종양 억제 유전자의 발현을 증가시켰으며, 이로 인해 다발골수종 세포에서 세포자멸사가 유도된 것으로 유추할 수 있다.

5) CKD-581 의 다발골수종 동물모델에서의 항암효과

CKD-581 의 항암효과를 동물모델에서 평가하기 위해, 다발골수종 이종이식 마우스를 제작하였다. CKD-581 (40, 60 mg/kg) 또는 vehicle 을 일주일에 두 번씩 MM.1S 암세포가 이식된 SCID 마우스들에 복강 투여하였다. CKD-581 투여군에서는 종양 크기가 vehicle 투여군에 비해 유의하게 작았다 ($p<0.001$, Figure 11A, B). CKD-581 투여군에서 체중 증가폭이 약간 낮았으나 (Figure 11C), 육안으로 관찰되는 독성 증상은 없었다. 그러므로, 체중 증가가 적은 것은 CKD-581 의 항암 효과로 인해 작아진 종양의 무게가 반영된 결과로 생각된다.

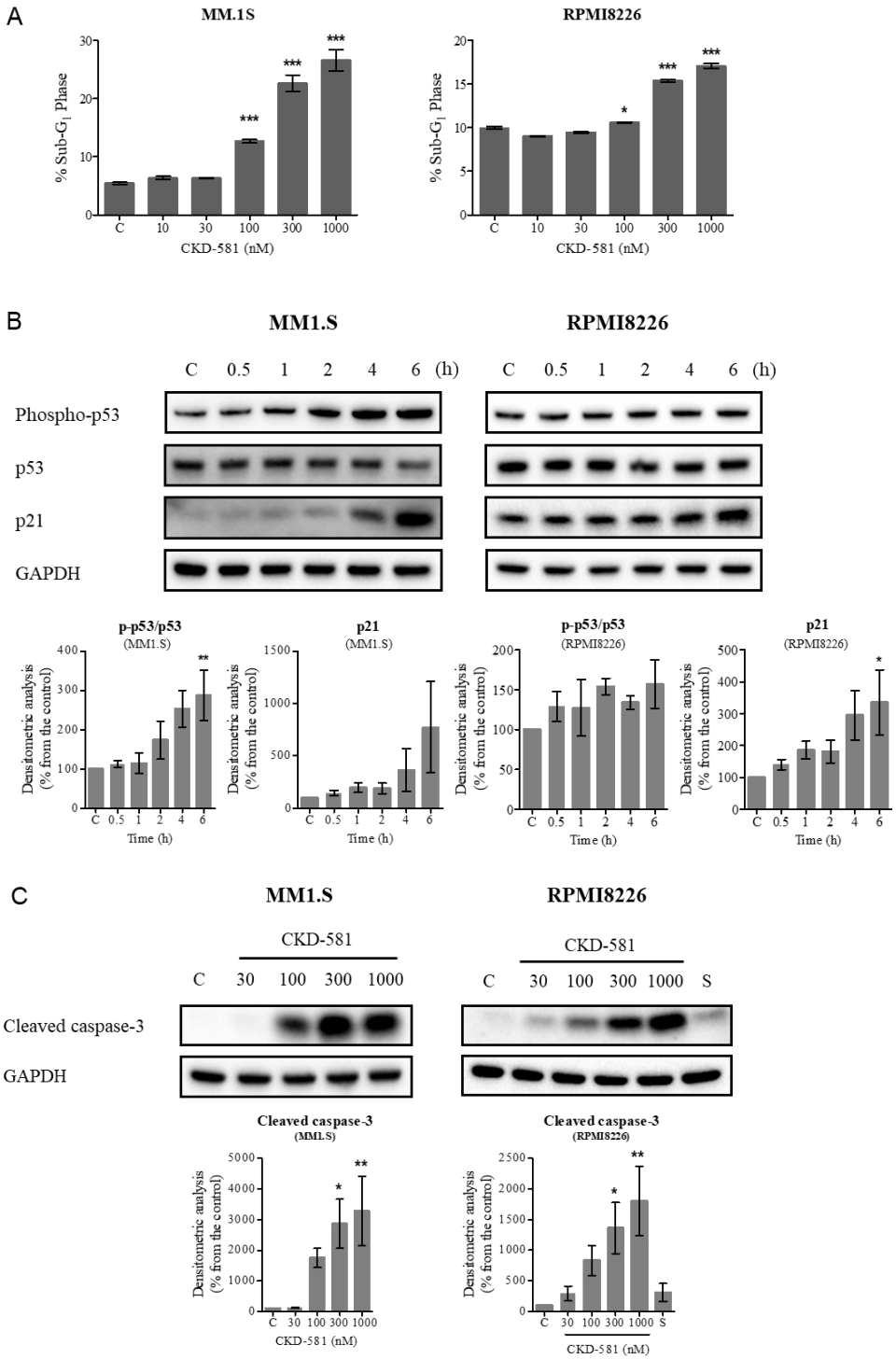

A
MM.1S
RPMI8226
% Sub-G1 Phase
CKD-581 (nM)
B
MM1.S
RPMI8226
C 0.5 1 2 4 6 (h)
Phospho-p53
p53
p21
GAPDH
p-p53/p53 (MM1.S)
p21 (MM1.S)
p-p53/p53 (RPMI8226)
p21 (RPMI8226)
Densitometric analysis (% from the control)
Time (h)
C
MM1.S
RPMI8226
CKD-581
C 30 100 300 1000 S
Cleaved caspase-3
GAPDH
Cleaved caspase-3 (MM1.S)
Cleaved caspase-3 (RPMI8226)
CKD-581 (nM)

Figure 10. CKD-581 activates tumor suppressors and induces apoptosis in MM.
(A) MM1.S and RPMI8226 cells were treated with various concentration of CKD-581 for 24 h, and sub-G1 population was analyzed using flow cytometry. (B) MM1.S and RPMI8226 cells were treated with 300 nM CKD-581 in a time-dependent manner, and total cell lysates were subjected to immunoblottings for phosphorylated p53 (ser^{15}), p53 and p21. (C) MM1.S and RPMI8226 cells were treated with CKD-581 or SAHA for 24 h. Cleaved caspase-3 was detected by immunoblotting. Data represent mean ± SEM (significant vs. control; $*p < 0.05$, $**p<0.01$, $***p < 0.001$).

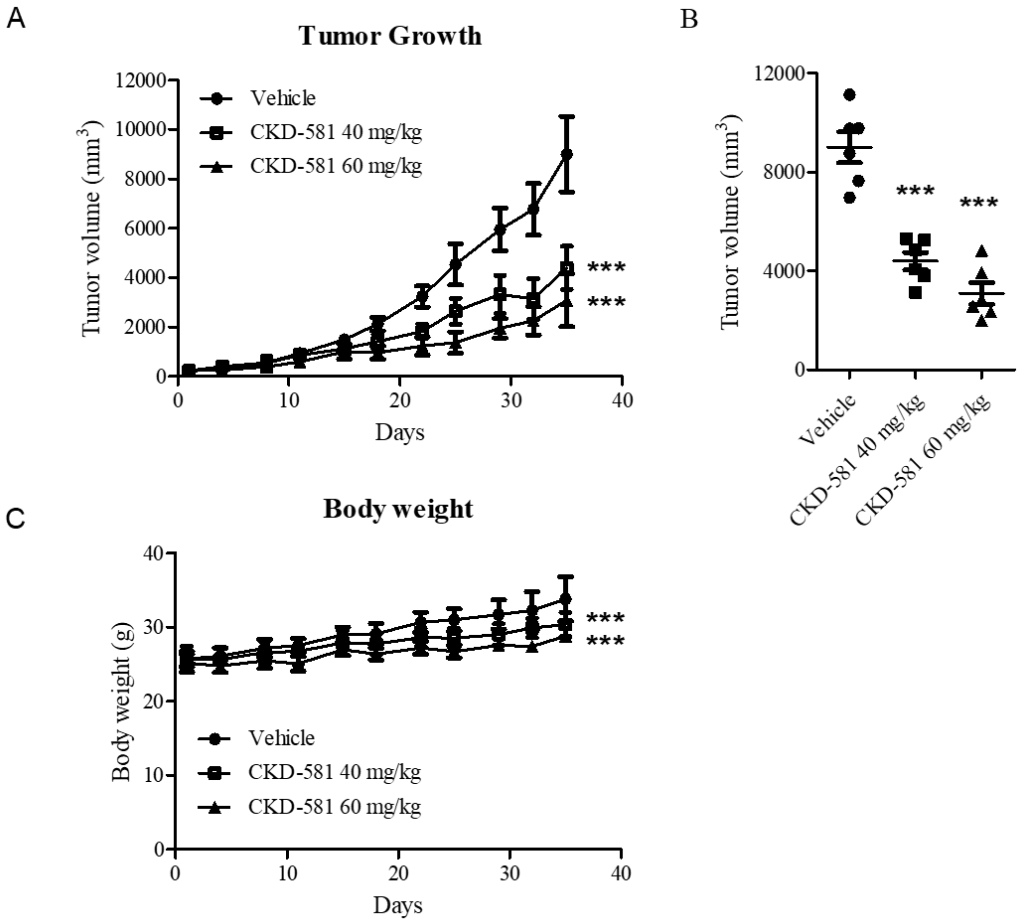


Figure 11. CKD-581 suppresses tumor growth in MM1.S xenograft model.

(A) NOD.CB17 SCID mice were implanted with MM1.S ($1x10^6$ cells/mouse). When tumors grew to about 100 mm^3, the mice were intraperitoneally injected with vehicle or CKD-581 (40 and 60 mg/kg) bi.wk. (B) Dot graph showed individual tumor size after 35 day-treatment. (C) Body weight change was monitored before sacrifice. Data represent mean ± SEM (significant vs. vehicle group; ***$p < 0.001$).

6) 림프종에서 CKD-581 에 의한 HDAC 타겟 단백질의 아세틸화

다발골수종에서 CKD-581 이 항암 효과를 보인 것과 마찬가지로, 또 다른 혈액암인 림프종에서도 항암 효과가 나타나는지 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)은 기존의 HDAC 저해제들이 아직까지 임상 사용 허가를 받지 못한 암종이며, 림프종 중 가장 많은 환자가 고통을 받는 질환이기 때문에 대상 암종으로 선정하였다.

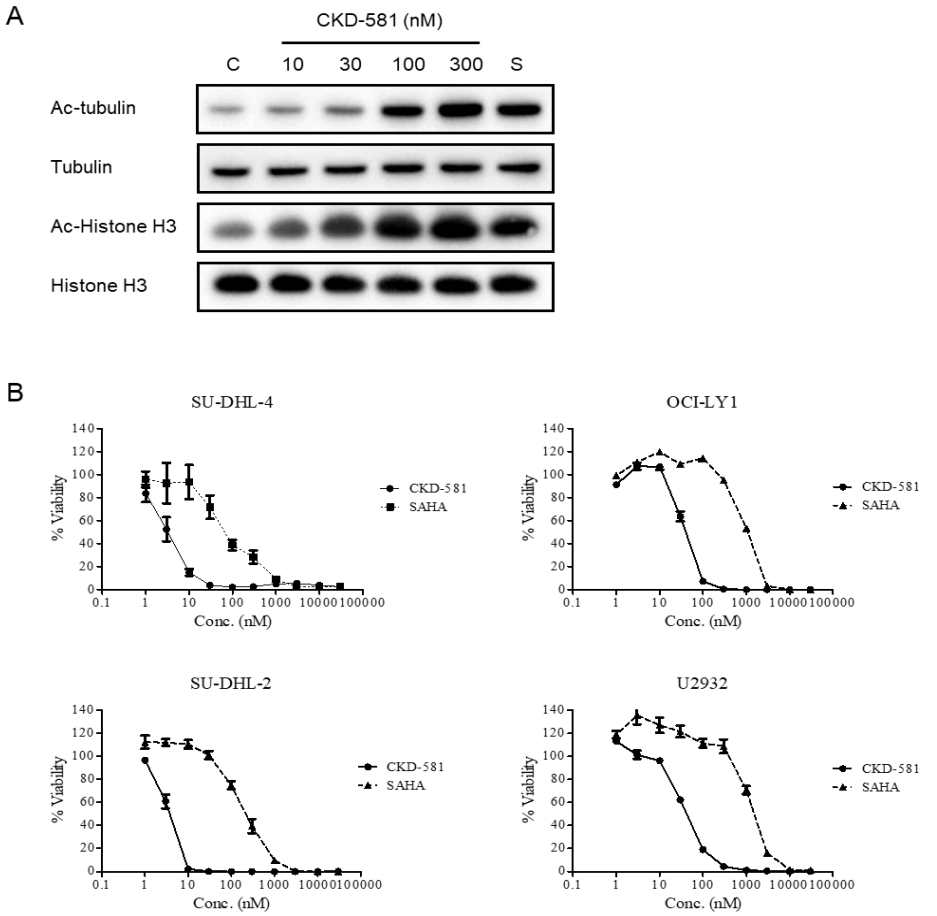
먼저, DLBCL 에서 CKD-581 이 HDAC 저해제로서 작동하는지 확인하기 위해, 타겟 단백질의 아세틸화를 확인하였다. HDAC 은 다양한 단백질의 아세틸화에 관여한다. 히스톤 단백질의 아세틸화는 핵내에서 HDAC class I 에 의해 조절되고, 튜불린의 아세틸화는 세포질에서 HDAC class II 에 의해 조절되는 것이 알려져 있다 [49]. CKD-581 은 SU-DHL-2 세포주에서 히스톤과 튜불린의 아세틸화를 모두 유도하였다 (Figure 12A). 그러므로, CKD-581 은 다발골수종에서와 마찬가지로 림프종에서도 HDAC class I, II 를 모두 저해함으로서 타겟 물질들의 아세틸화를 증가시킴을 알 수 있다.

7) CKD-581 에 의한 림프종 세포 사멸의 유도

CKD-581 에 의한 세포사멸 효과는 CellTiter Bright-Glo assay 를 이용하여 알아보았다. 3 가지의 DH-DLBCL 세포주 (SU-DHL-2, SU-DHL-4, OCI-LY1)와 하나의 DE-DLBCL 세포주 (U2932)를 사용하였다 [50, 51]. CKD-581 은 모든 암세포들에서 대조물질인 SAHA 보다 낮은 IC_{50} 값을 보였다 (Figure 12B).

8) CKD-581 에 의한 림프종의 나쁜 예후 인자 감소

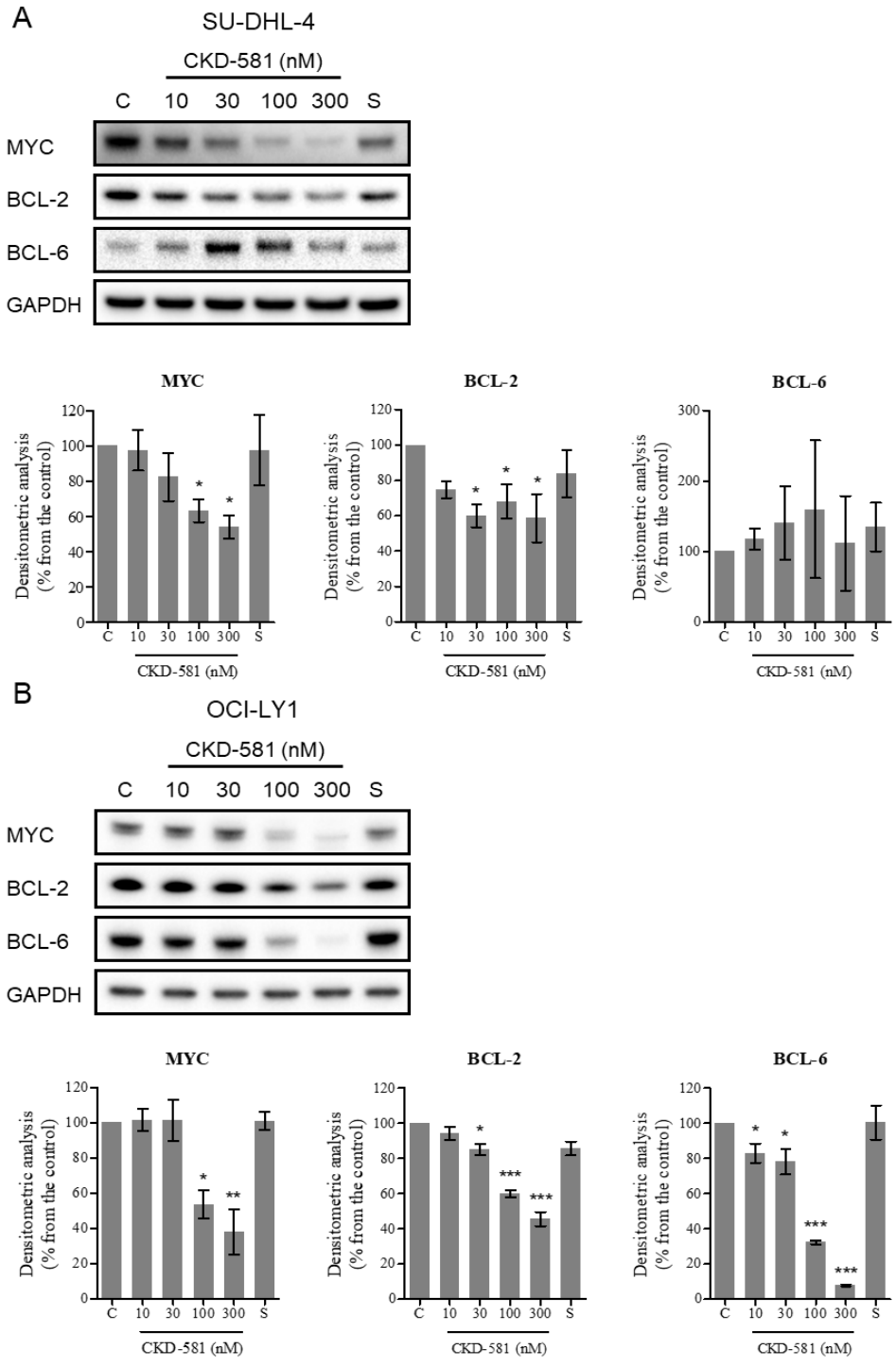
림프종의 예후 인자들의 발현에 CKD-581 이 영향을 미치는 지 알아보기 위해, 면역 블롯팅을 통해 몇 가지의 관련 인자에 대한 연구를 진행하였다 (Figure 13A-D). CKD-581 은 GCB-DLBCL 세포들에서 MYC 과 BCL-2 의 발현을



	DHL			DEL
COO	**GCB**		**ABC**	
Cell line	**SU-DHL-4**	**OCI-LY1**	**SU-DHL-2**	**U2932**
CKD-581 IC_{50} (nM)	1.31±0.47	36.91±2.41	1.18±0.29	31.99±1.06
SAHA IC_{50} (nM)	80.24±12.54	1027.33±11.39	184.77±33.23	1212.33±18.68

Figure 12. CKD-581 is a potent HDAC inhibitor.

(A) Acetylation of tubulin or histone H3. SU-DHL-2 cells were treated with vehicle control (C), CKD-581 (10–300 nM), or 300 nM SAHA (S) for 6 h. (B) Comparison of inhibitory effects of CKD-581 and SAHA on cell viability of four DLBCL cell lines. SU-DHL-4, OCI-LY1, SU-DHL-2, and U2932 cells were incubated with CKD-581 and SAHA for 72 h, and cell viability was assessed by a CellTiter Bright-Glo assay. Data represent mean ± SEM (n = 3).


A
SU-DHL-4
CKD-581 (nM)
C 10 30 100 300 S
MYC
BCL-2
BCL-6
GAPDH
MYC
BCL-2
BCL-6
Densitometric analysis (% from the control)
CKD-581 (nM)
B
OCI-LY1
CKD-581 (nM)
C 10 30 100 300 S
MYC
BCL-2
BCL-6
GAPDH
MYC
BCL-2
BCL-6
Densitometric analysis (% from the control)
CKD-581 (nM)

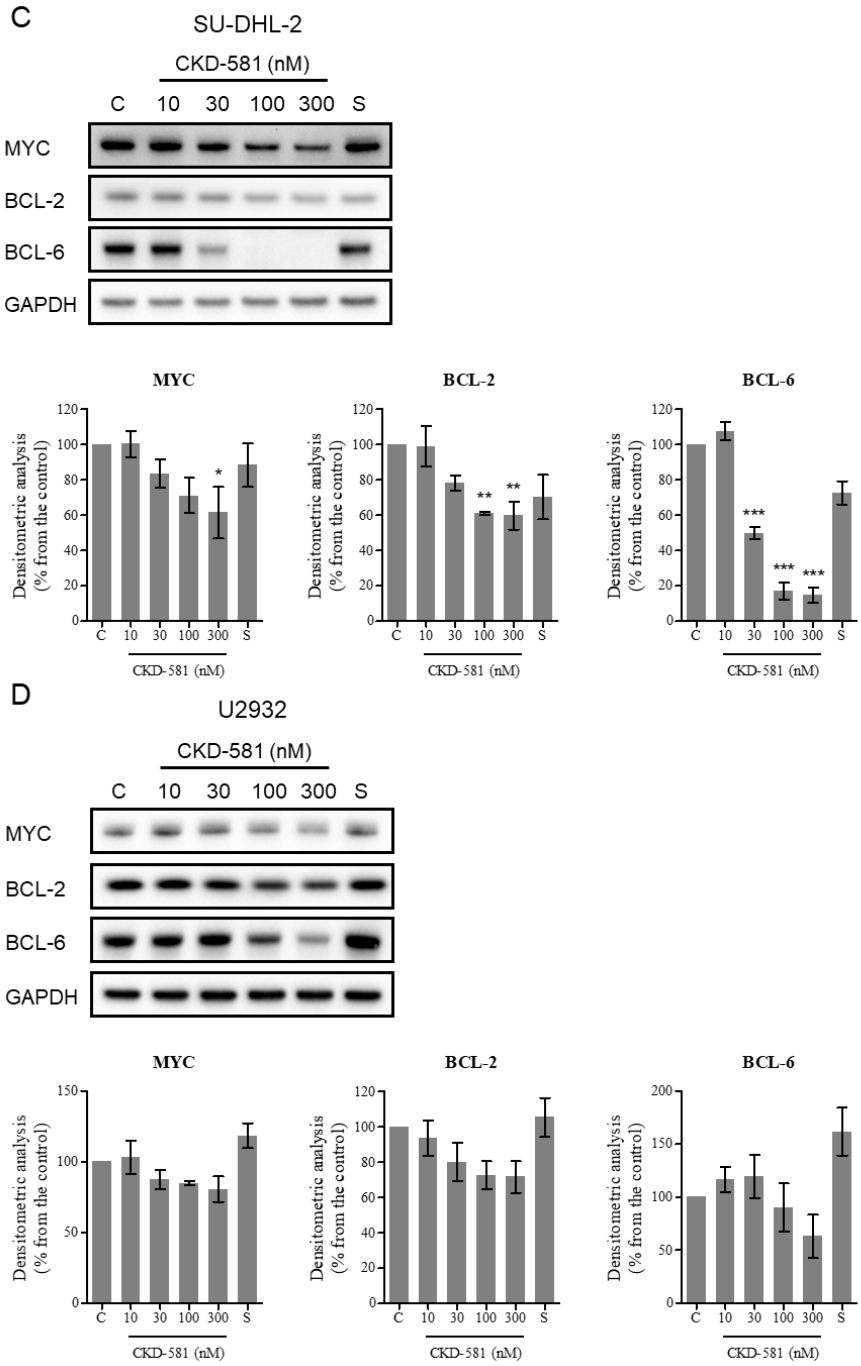

C
SU-DHL-2
CKD-581 (nM)
C 10 30 100 300 S
MYC
BCL-2
BCL-6
GAPDH
MYC
BCL-2
BCL-6
Densitometric analysis (% from the control)
CKD-581 (nM)
D
U2932
CKD-581 (nM)
C 10 30 100 300 S
MYC
BCL-2
BCL-6
GAPDH
MYC
BCL-2
BCL-6
Densitometric analysis (% from the control)
CKD-581 (nM)

Figure 13. CKD-581 reduces the protein expression of prognostic markers for DLBCL.

(A) SU-DHL-4, (B) OCI-LY1, (C) SU-DHL-2, and (D) U2932 cells were treated with vehicle control (C), various concentrations (10–300 nM) of CKD-581, or 300 nM SAHA (S) for 24 h, and total cell lysates were subjected to immunoblottings for MYC, BCL-2 and BCL-6. Data represent mean ± SEM of three independent experiments (n = 3, significant vs. control; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

효과적으로 감소시키는 것을 알 수 있었고 (Figure 13A-B), ABC-DLBCL 에서는 MYC 과 BCL-6 의 발현을 줄이는 것을 확인하였다 (Figure 13C-D). 대조 물질인 SAHA 의 경우, MYC 과 BCL-2 및 BCL-6 의 발현을 약간 줄이는 것이 관찰되었다. 이러한 결과들은 CKD-581 이 DLBCL 에서 흔히 증가하는 종양 단백질(onco-protein)의 발현을 효과적으로 감소시킨다는 것을 보여준다. 또한, 각 세포들에서의 IC_{50} 값으로 보아, CKD-581 이 종양 단백질 발현에 미치는 영향은 항암 효과와 관련성이 있는 것으로 생각된다.

9) 림프종에서 CKD-581 에 의한 DNA 손상

CKD-581 에 의한 DNA 손상 여부를 알아보기 위해, poly (ADP ribose) polymerase 1 (PARP1)과 phosphorylated histone H2AX (γH2AX)에 대한 연구를 진행하였다. PARP1 분해(cleavage)는 DNA 사슬 절단(DNA strand break, DSB)과 caspase-3 에 의한 분해에 의해 시작된다. PARP1 은 89 와 24 kDa 크기의 조각으로 분해되며, 세포자멸사의 대표적인 지표로 알려져 있다 [52]. 또한, γH2AX 는 DNA 이중 사슬 절단(DNA double-strand break)의 지표이다 [52]. 실험에 사용된 모든 DLBCL 세포들에서 24 시간 동안의 300 nM CKD-581 처리는 γH2AX 와 PARP1 분해를 증가시켰다 (Figure 14A-D).

한편, BCL-xL 과 MCL-1 은 BCL-2 family 에 속하는 세포 자멸사 억제 인자들이며, 다양한 암에서 과발현되는 것으로 알려져 있다 [53]. 선행 연구들은 BCL-xL 이나 MCL-1 의 손실이 MYC 에 의한 B 세포 림프종의 발생을 늦춘다는 것을 보고하였다 [54, 55]. 반면에, BCL-xL 과 MYC 의 과발현은 B 세포 림프종을 유발하고, 또한 과발현된 MCL-1 은 MYC 에 의한 B 세포 림프종의 악화(development)를 촉진한다 [56, 57]. 그 뿐만 아니라, BCL-xL 과 MCL-1 의 과발현은 리툭시맙과 다른 항암 화학 요법에 대한 저항성과도 관련이 있다 [58, 59]. 그러므로, BCL-xL 과 MCL-1 의 발현을 낮추는 것은 DLBCL 과 같은 B 세포 림프종을 치료하는데 도움이 될 수

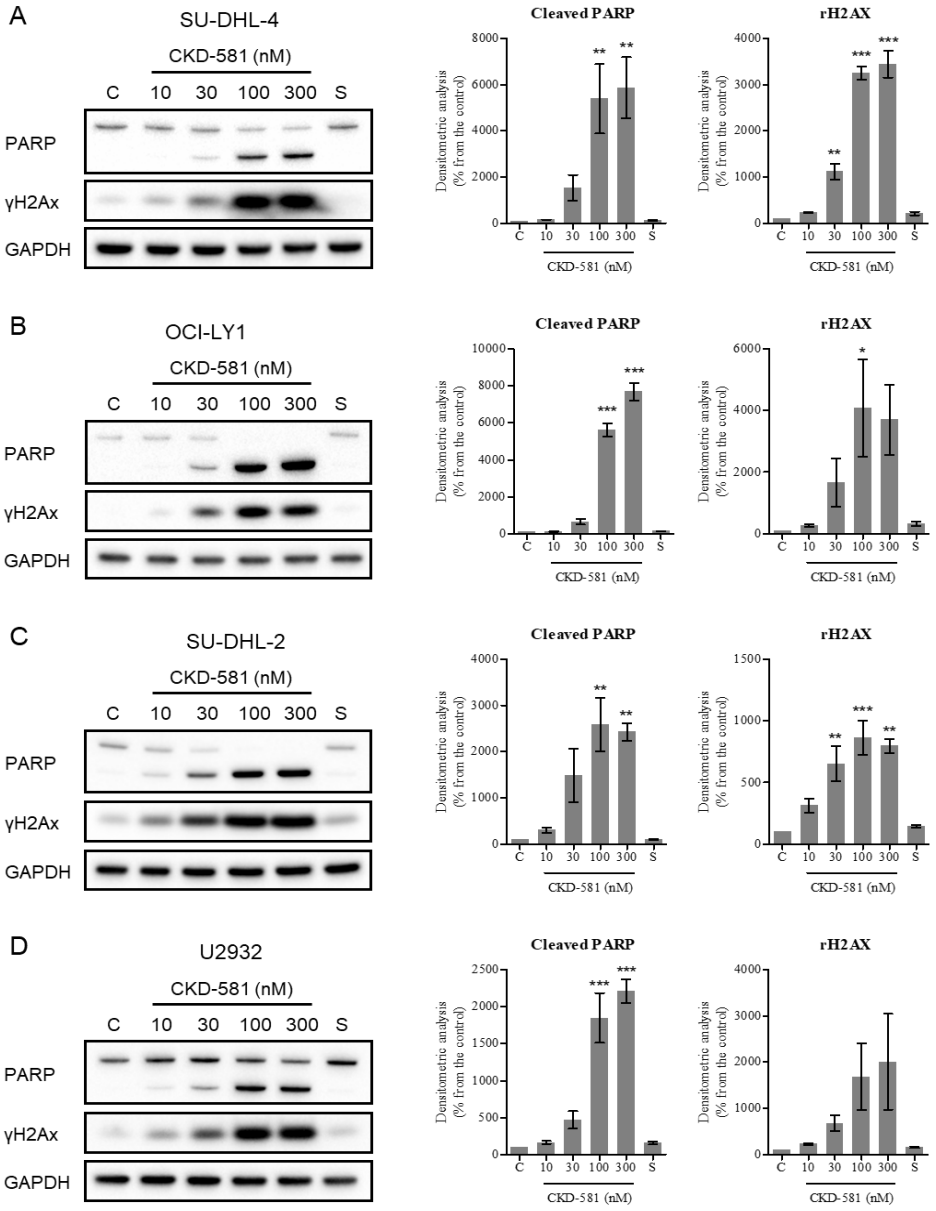


Figure 14. CKD-581 induces DNA damage and apoptosis.

(A) SU-DHL-4, (B) OCI-LY1, (C) SU-DHL-2, and (D) U2932 cells were treated with vehicle control (C), CKD-581 (10–300 nM), or 300 nM SAHA (S) for 24 h, and total cell lysates were subjected to immunoblotting for γH2AX and PARP1 (PARP). Data represent mean ± SEM (n = 3, significant vs. control; **p* < *0.05*, ***p* < *0.01*, ****p* < *0.001*).

있을 것이다. BCL-xL 저해제 (AT-101, ABT-263)와 MCL-1 저해제 (AZD5991, MIK665, AMG 176)들은 DLBCL 치료제로 개발되고 있으며, 현재 임상시험을 진행하고 있다 [60, 61]. HDAC 저해제가 이들 BCL-2 family 에 영향을 주는지 알아보기 위해, CKD-581 과 SAHA 를 24 시간 동안 DLBCL 세포들에 처리하였다. BCL-xL 은 4 가지 세포들에서 모두 발현율이 높았고, MCL-1 은 대부분의 세포주에서 발현율이 높았으나 SU-DHL-2 세포에서만 낮은 발현율을 보였다 (Figure 15A-D). CKD-581 은 대부분의 세포들에서 BCL-xL 과 MCL-1 의 발현을 농도의존적으로 낮추었으며 (Figure 15A-D), 또한 SU-DHL-2 세포에서의 낮은 기초 발현에도 불구하고 MCL-1 의 발현도 낮추었다 (Figure 15D). 그러나, CKD-581 은 SU-DHL-4 세포에서는 MCL-1 발현에 영향을 주지 못하였는데 (Figure 15A), 이 결과로 볼 때 CKD-581 의 항암효과가 SU-DHL-4 세포에서는 MCL-1 을 제외한 BCL-2 나 BCL-xL 과 같은 다른 BCL-2 family 단백질에 의해 매개되는 것임을 유추할 수 있다. 이상의 결과들은 CKD-581 이 DLBCL 에서 DNA 이중 사슬 절단(DNA double-strand break)을 유도하고, 이를 통해 암세포의 사멸이 일어난다는 것을 제시한다.

10) CKD-581 에 의한 소포체 스트레스의 증가

몇몇 HDAC 저해제들이 소포체 스트레스를 매개하는 세포자멸사를 유도한다는 것이 알려져 있기 때문에 [19, 21], CKD-581 에 의한 세포자멸사에도 소포체 스트레스가 관여하는지 알아보았다.

SU-DHL-4 림프종 세포에 CKD-581 을 24 시간 처리한 후, 소포체 스트레스 지표의 변화를 면역 블롯팅을 통해 확인하였다. IRE1α와 PERK, ATF6 및 GRP78 과 같은 소포체 스트레스 지표 단백질들의 변화가 관찰되어, CKD-581 에 의해 소포체 스트레스가 증가함을 알 수 있었다 (Figure 16A). p-PERK 와 ATF6 는 CKD-581 고농도 처리 시 감소하는 것으로 보였는데, 이는 caspase-3 의 활성화에서 알 수 있는 바와 같이 세포자멸사가 일어남으로써

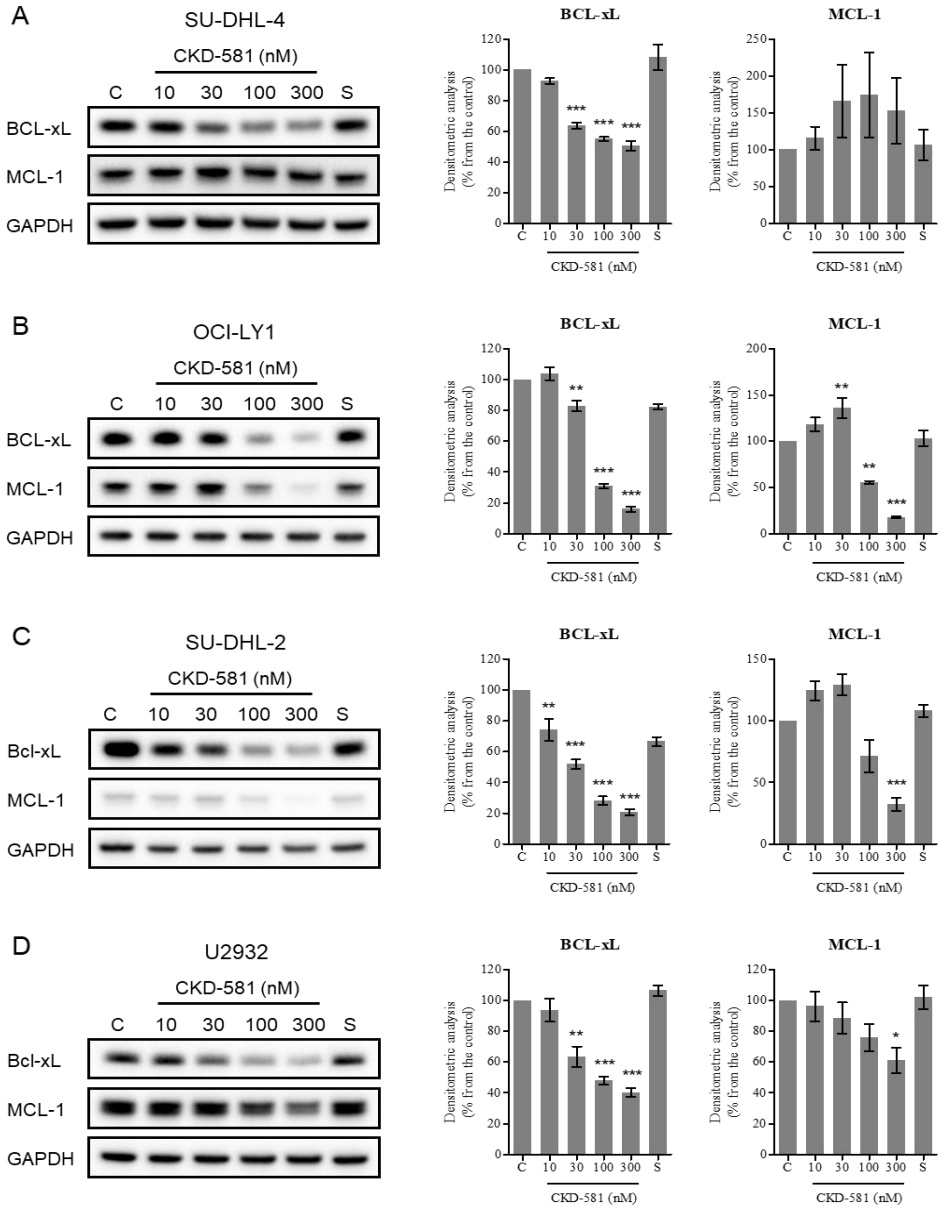


Figure 15. CKD-581 decreases anti-apoptotic proteins in DLBCL. (A) SU-DHL-4, (B) OCI-LY1, (C) SU-DHL-2, and (C) U2932 cells were treated with vehicle control (C), CKD-581 (10–300 nM), or 300 nM SAHA (S) for 24 h, and total cell lysates were subjected to immunoblotting for BCL-XL and MCL-1. Data represent mean ± SEM (n = 3, significant vs. control; **p* < *0.05*, ***p* < *0.01*, ****p* < *0.001*).

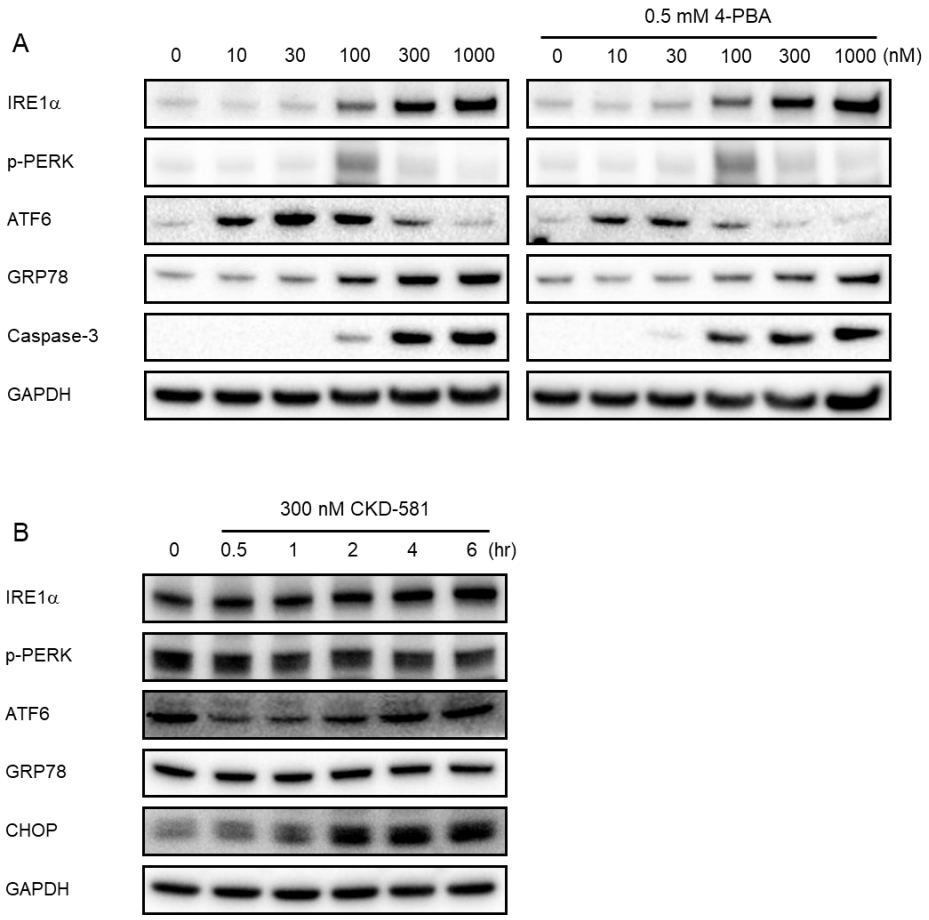


Figure 16. CKD-581 induces ER stress in lymphoma cell.

(A) Western blot analyses of ER stress marker proteins in SU-DHL-4. SU-DHL-4 cells were treated with 10-1000 nM CKD-581 in the presence or absence of 0.25 mM 4-PBA for 24 h. (B) SU-DHL-4 cells were treat with 300 nM CKD-581 for 0.5-6 hr.

이들의 신호전달이 완료되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 소포체 스트레스 저해제인 4-PBA 처리에 의해 ATF6 와 GRP78 의 감소가 일어나는 것으로 보아, 소포체 스트레스의 일부가 감소되는 것으로 생각된다. CHOP 의 경우, 다른 소포체 스트레스 지표들의 변화보다 빠르게 증가했다가 24 시간 째에는 오히려 감소하는 것으로 보아 (Figure 16B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) family 등의 다른 신호전달에 의해 발현이 조절되는 것으로 생각된다 [62].

11) CKD-581 의 림프종 동물 모델에서의 항암효과

동물에서의 CKD-581 의 항암효과를 확인하기 위해, SU-DHL-4 와 SU-DHL-2 이종 이식 마우스 모델을 사용하였다. NOD.CB17 SCID 마우스에 두 종류의 암세포를 각각 이식하였고, 일정한 크기로 암이 자란 후 실험에 사용하였다. 실험동물에는 vehicle 또는 CKD-581 (20, 40 mg/kg)을 일주일에 두번씩 복강 투여하였다. CD20 은 SU-DHL-4 세포에서는 발현되지 않았고, SU-DHL-2 에서만 발현되었기 때문에 (Figure 17A), 리툭시맙 (CD20 단일클론항체)을 SU-DHL-2 모델에서 양성대조군(positive control)으로 사용하였다. 이 때, 리툭시맙은 일주일에 한 번씩 복강 투여하였다. CKD-581 은 SU-DHL-4 이종 이식 모델에서 제한적이기는 하지만, 유의한 종양 성장 억제효과를 보였다 (Figure 17B). 반면, SU-DHL-2 이종 이식 모델에서 CKD-581 은 10 mg/kg 리툭시맙과 유사한 정도로 종양 성장 억제효과를 보였다 (Figure 17C). 그러므로, CKD-581 은 림프종 치료제로서 항암 효과가 있을 것으로 기대된다.

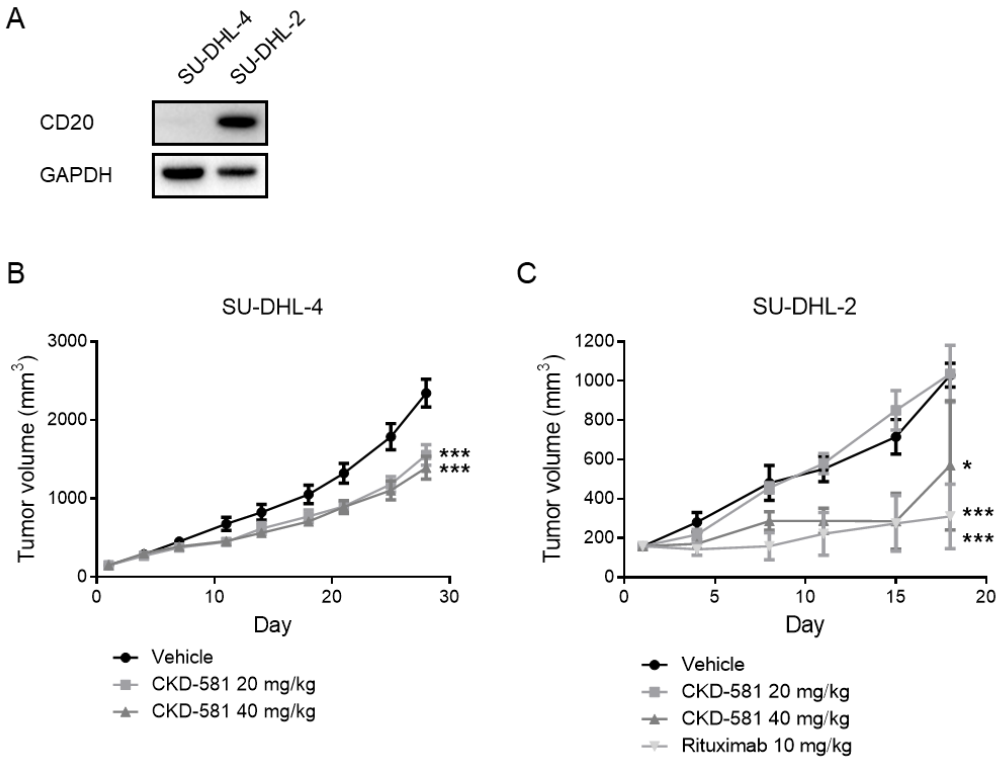


Figure 17. CKD-581 suppressed DH-DLBCL tumor growth in the mouse xenograft models.

(A) CD20 expression in DH-DLBCL cells. CD20 expression levels were compared in SU-DHL-4 and SU-DHL-2 cells by immunoblotting. (B, C) Xenograft tumor growth assays. NOD.CB17 SCID mice were implanted with (B) SU-DHL-4 (1×10^6 cells/mouse) or (C) SU-DHL-2 (1×10^6 cells/mouse) cells. When tumors grew to about 150 mm^3, the mice were intraperitoneally injected with vehicle, CKD-581 (20 and 40 mg/kg), or rituximab (10 mg/kg) according to the treatment schedule. Data represent mean ± SEM (n = 10, SU-DHL-4; n = 6, SU-DHL-2) significant vs. vehicle group; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

IV. 고 찰

소포체 스트레스는 암 및 여러 질병들과 관련이 있다는 것이 보고되었으며, 특히 암에서 소포체 스트레스를 조절하여 암세포의 성장 및 전이를 저해하고, 약물 저항성을 낮추어 항암효과를 높이기 위한 연구가 이뤄지고 있다 [4]. 본 논문에서는 소포체 스트레스와 관련된 항암제인 튜불린 중합 저해제 및 HDAC 저해제에 대한 연구 내용을 다루었다.

미세소관은 여러 가지 고형암에서 잘 밝혀진 항암제의 타겟이다. VDA 인 CKD-516 은 간암 모델에서 종양의 혈류를 줄인다는 것을 밝힌 바 있다 [63-65]. VDA 는 종양 혈류를 줄이고, 이로 인한 저산소증(hypoxia) 및 허혈(ischemia)을 유발하여, 결국에는 암세포의 사멸을 일으킨다 [66]. 비록 VDA 가 종양 중심부에 괴사(central necrosis)를 일으키기는 하지만, 종양 조직의 주변부에는 살아남는 테두리(viable rim)를 남기며 [67], 이 부위로부터 종양의 재성장이 시작될 수 있다. 그러므로 VDA 는 다른 항암제와의 병용요법의 개발을 통해, 암세포의 약물저항성을 극복할 수 있을 것이다. 여러 연구자들은 이미 CA4P [68, 69], AVE8062 [70-72], ZD6126 [73-75], MBRI-001 [76], ICT2588 [77] 등의 VDA 가 폐암 동물 모델에서 암성장 저해 효과가 있음을 보고한 바 있다.

본 논문에서는 CKD-516 이 종양 혈관을 통한 VDA 효과를 보일 뿐 아니라, 직접적으로 암세포에 작용함을 증명하였다. 이 암세포에 대한 직접적인 효과가 CKD-516 의 강력한 항암 효과를 설명해줄 수 있을 것이다 (Figure 18). 또한, CKD-516 의 대상 질환(therapeutic indication)은 종양 혈관에 비교적 덜 의존적인 백혈병(leukemia)이나 림프종으로도 확대될 수 있을 것이다. 아직까지 CKD-516 에 의한 암세포 사멸에 대한 기전 연구가 이루어지지 않았었기 때문에, 이 논문에서는 이 약물이 소포체 스트레스와 활성산소 생성을 동반한 암세포 사멸을 유도함을 밝혔다.

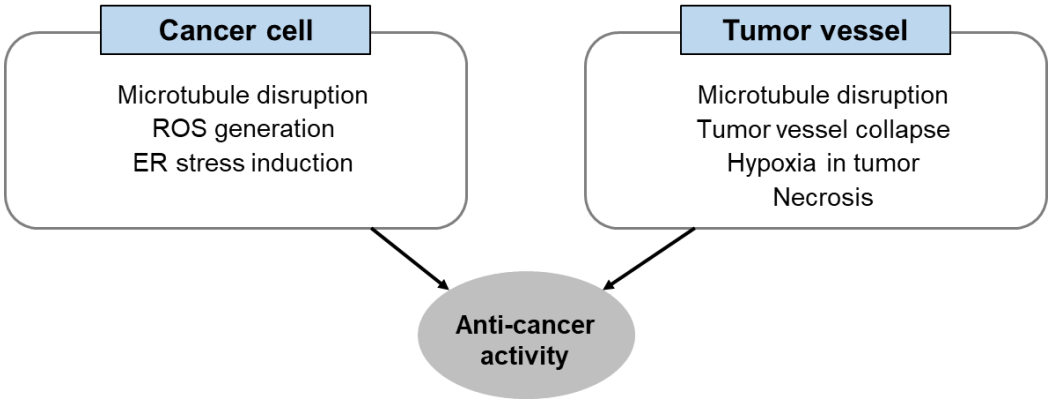


Figure 18. Proposed mechanism of CKD-516.

CKD-516 disrupts the cellular microtubule network in cancer cell. And it causes ROS generation and ER stress. In the other hand, CKD-516 induces collapse of tumor blood vessels, leading to hypoxia and consequent necrosis of tumor tissue. Consequently, CKD-516 acts on both cancer cell and tumor vessel, it results in anti-cancer activity.

CKD-516 의 기전 연구들은 튜불린 중합체 형성을 저해하여 암세포 분열(mitosis)을 막는 효과 [23, 24] 및 *in vivo* 종양 모델에서 종양 혈관을 파괴함으로 인한 종양 괴사의 유도 [63, 64, 78-80]에 관한 것이었다. 본 논문에서는 S516 이 β-튜불린 소단위(subunit)의 콜히친 결합 자리에 결합함을 보고하였다 [81]. *In vitro* 시험에서 S516 은 HUVEC 세포를 이용한 실험에서 미세소관을 와해 시킴을 확인하였다. 그러므로, 이 논문은 CKD-516 의 결합 위치를 새로이 규명하였다고 할 수 있다.

S516 에 노출된 폐암 세포에서는 활성산소가 생성되고, 소포체 스트레스가 증가되었다 (Figure 4). 그러나 S516 의 영향은 항산화제 (NAC)이나 케미컬 샤페론 (4-PBA)에 의해 회복되지 않았으므로, 활성산소와 소포체 스트레스는 S516 에 의한 암세포 사멸을 매개하지 않는다는 것을 알 수 있다. 비록 몇 개의 논문에서 컴브레타스타틴(combretastatin) 또는 유도체들이 활성산소를 생성하고 소포체 스트레스를 일으킨다는 것을 보고하였으나 [82, 83], VDA 에 의한 이러한 작용들이 암세포의 사멸과 어떤 연관성이 있는지는 확인한 바가 없었다. 미세소관은 잘못접힘 단백질의 수송에 중요한 역할을 한다 [7]. 암세포에서 생성된 미접힘/잘못접힘 단백질은 프로테아좀과 애그리좀 경로를 통해 분해된다 [10].

애그리좀 경로에서 다량체의 유비퀴틴이 결합한 미접힘/잘못접힘 단백질(aggresome)은 HDAC6 와 함께 다이닌 운동 단백질에 결합하여, 미세소관을 따라 리소좀(lysosome)으로 이동한다 [10]. 또한, 잘못접힘 단백질의 침전은 미세소관의 기능에 의존적이라는 것이 알려져 있다 [11]. 그러므로, 폐암 세포에서 관찰된 S516 에 의한 소포체 스트레스는 미세소관의 기능적 이상 및 이로 인한 비정상적인 단백질들의 생성으로 인한 것이라고 유추된다.

폐암은 세계적으로 암과 관련된 사망의 첫번째 원인이며 [84], 카보플라틴은 비소세포폐암의 1 차 요법제이다 [85]. CKD-516 은 폐암 이식

모델에서 카보플라틴의 항암효과를 증대시켰다 (Figure 6). 이러한 항암효과의 상승은 1) VDA 와 세포 독성 항암제가 작용하는 종양 조직의 공간적인 차이와 2) 미세소관과 DNA 라는 타겟 물질의 차이에 의한 것일 수 있다.

간략히 정리하면, CKD-516 은 β-튜불린 소단위의 콜히친 결합 부위에 선택적으로 작용하여, 여러 폐암 세포들에서 항암 활성을 보였다. 또한 소포체 스트레스와 활성산소의 생성은 미세소관이 와해에 의해 유도되며, 이러한 현상은 폐암 세포의 사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다.

다음으로, CKD-581 은 HDAC class I 과 II 를 모두 저해하는 넓은 스펙트럼을 가진 HDAC 저해제이다. CKD-581 은 임상 1 상을 통해 다발골수종과 림프종 환자에서의 안전성과 약동학(pharmacokinetics) 및 약력학적(pharmacodynamics) 분석이 진행되었다 [22]. 이 논문에서는 CKD-581 의 적응증으로 예상되는 다발골수종 및 림프종에서의 약효 및 기전에 대해 연구하였다.

다발골수종은 형질 세포(plasma)에서 발생하는 혈액암의 일종이다 [86]. 프로테아좀 저해제나 면역조절제(immune-modulatory drug, IMiD), 단클론 항체(monoclonal antibody)들의 개발로 인해 다발골수종 환자의 생존율(survival rate)은 향상되었으나, 궁극적으로 모든 형태의 치료 요법에 저항성을 갖게 된다 [87-89]. 그러므로 새로운 치료제에 대한 필요성이 대두되고 있다.

이 논문에서는 CKD-581 이 Wnt/β-catenin 신호전달을 저해함으로서 세포자멸사를 유도함을 보여주었다. Wnt/β-catenin 신호전달은 혈액암의 진행(progression)에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다 [90-92]. 많은 연구들은 Wnt/β-catenin 신호전달이 암의 진행과 전이(metastasis), 화학요법제에 대한 내성(chemo-resistance), 면역 항암요법(immune-oncology therapy)에 대한 좋은 치료 타겟임을 보고하였다 [42, 93-98]. 몇몇 HDAC 저해제들은 c-Myc 발현을 감소시키며 암세포의 세포자멸사를 유도한다는 것이 알려져 있으며 [99], DACT3 의 발현은 히스톤의 아세틸화나 메틸화에

의해 조절된다는 것 또한 알려져 있다 [39]. 그러나 아직까지 다발골수종에서 HDAC 저해제에 의해 유도되는 DACT3 과발현의 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

이 논문은 Wnt/β-catenin 신호전달의 negative regulator 인 DACT3 의 발현이 CKD-581 이나 SAHA 와 같은 HDAC 저해제에 의해 조절된다는 것을 제시한다. 또한 DACT3 의 발현량이 다발골수종 세포의 생존율과 음의 상관관계가 있음을 보였다. 이러한 결과는 CKD-581 과 같은 HDAC 저해제의 작용기전을 이해하는데 도움이 될 것이다.

이와 더불어, CKD-581 은 p53 의 인산화 (Ser^{15})를 증가시켰다. Ser^{15} 에서 인산화 된 p53 과 p21 의 발현은 암에서 예후 인자(prognostic factor)로 활용된다 [100, 101]. 또한 많은 연구자들이 Ser^{15} 에서의 p53 인산화가 암세포의 세포자멸사와 연관성이 있다는 것을 보고하였다. 그러므로, CKD-581 이 p53 이나 p21 과 같은 종양 억제자를 활성화 시키는 것은 종양 치료의 측면에서 긍정적인 평가를 받을 수 있을 것이다.

림프종은 다발골수종과 함께 CKD-581 의 적응증이 될 수 있는 암종이다. DLBCL 은 전체 림프종 중 약 30%를 차지한다 [102]. DLBCL 에서 리툭시맙은 중요한 치료제이다. 리툭시맙은 단독 투여로도 효과를 보이며 [103], CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone)과의 병용요법 (R-CHOP)으로도 DLBCL 환자에서 좋은 치료효과를 보인다 [104]. 그렇기 때문에, 리툭시맙은 DLBCL 을 포함한 NHL 환자를 위한 1 차 요법 치료제로 허가되었다 [105]. 그러나, DLBCL 환자의 30–40%는 초기 치료에 대한 반응 후, 반응이 없어지거나 병의 재발에 의해 고통받게 된다 [106]. 또한 리툭시맙의 항암효과는 BCL-xL 이 발현되는 DLBCL 에서는 제한적이라는 한계가 있다 [58]. 그러므로, 이들 환자를 위한 새로운 요법의 개발이 필요하다.

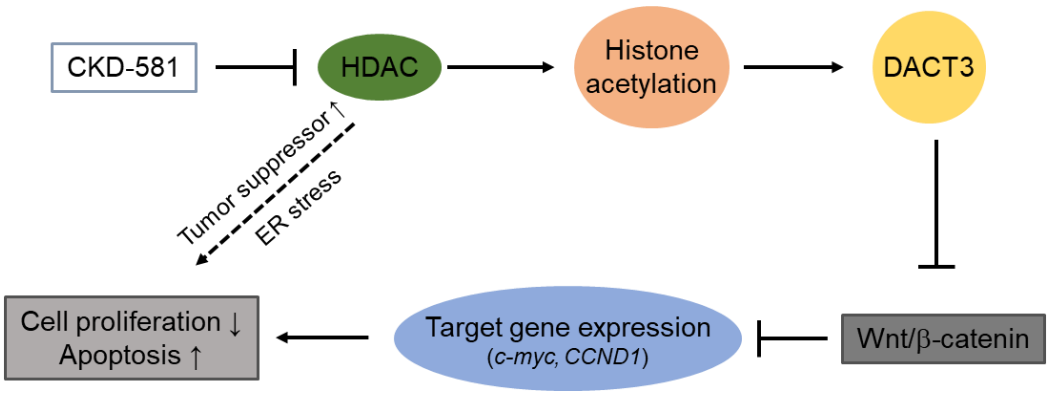


Figure 19. Proposed mechanism of CKD-581.

CKD-581 is a HDAC inhibitor. Therefore, it induces hyperacetylation of histone proteins. Acetylated histone proteins loosen the interaction between DNA and histone proteins. Because loosened chromatin is accessible to RNA polymerase, which increases gene expression. DACT3 is the markedly altered gene by CKD-581. DACT3 blocks Wnt/β-catenin signaling pathway, causing anti-cancer activity.

CKD-581 은 DH-와 DE-DLBCL 타입 등 위험도가 높은(aggressive) DLBCL 세포들에서 세포 성장을 저해하였다. 또한 CKD-581 은 c-Myc 과 세포자멸사를 막는 BCL-2 family 들의 발현율을 낮추는 효과를 보였으며, 세포자멸사를 유도하는 것이 확인되었다. 림프종을 이식한 동물모델에서는 CD20 을 발현하는 DLBCL 에서 리툭시맙과 유사한 수준으로 암성장 억제효과를 보였다 (Figure 17C). 그러므로, CKD-581 은 CD20 이나 BCL-xL 발현 여부와는 상관없이 항암효과를 보일 수 있는 것으로 생각되며, 림프종, 특히 리툭시맙을 포함한 치료법에 실패한 림프종 환자를 위한 치료 후보 물질이 될 수 있을 것이다.

병용요법은 임상에서의 암의 치료효과를 개선하기 위해서 널리 적용되는 방법이다. 이는 단독요법제들에 대한 저항성 등에 의한 충분하지 않은 치료효과를 개선하기 위함이다 [107, 108]. CKD-581 이 암세포 또는 암이식 동물 모델을 사용한 실험들에서 좋은 항암효과를 보여주긴 했지만, 임상에 적용했을 시에는 약효가 불충분할 수 있을 것이다. 그러므로, CKD-581 의 임상에서의 약효는 다른 작용 기전을 가진 항암제와의 병용을 통해 향상될 수 있을 것이다.

예를 들어, HDAC 저해제가 프로테아좀 저해제에 의한 잘못접힘 단백질의 축적을 더욱 촉진한다고 보고되었기 때문에 [109, 110], 보르테조밉(bortezomib)과 같은 약물은 CKD-581 과의 병용 약물로 적절할 수 있다. 또한, Bruton's tyrosine kinase (BTK) 저해제 역시 적절한 병용약물일 수 있는데, 이는 림프종에서 획득 내성(acquired resistance)를 극복할 수 있는 방법이기 때문이다 [111]. HDAC 저해제는 UPR 에 의해 IRE1 의 과발현을 유도하여, B-cell receptor (BCR) 경로를 활성화시킨다. HDAC 저해제와 BTK 저해제의 병용은 UPR 과 BCR 경로를 모두 저해함으로서 종양 성장을 저해하게 된다. 그러므로 CKD-581 은 이러한 여러 종류의 항암제와의 병용요법으로 DLBCL 치료제로 개발될 수 있을 것이다.

지금까지 소포체 스트레스를 매개하여 항암 효과를 보이는 두 가지의 항암제 후보 물질에 대해 알아보았다. 이 논문을 통해, 튜불린 중합 저해제인 CKD-516 과 HDAC 저해제인 CKD-581 의 작용 기전에 대해 밝혔으며, 강한 항암 효과가 나타남도 확인하였다. 이들 항암제 후보 물질들은 현재 임상 시험을 진행중이며, 향후 암으로 고통받는 환자를 위한 좋은 치료제로 사용될 가능성이 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

[1] Y. Lin, M. Jiang, W. Chen, T. Zhao, Y. Wei, Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response, Biomed Pharmacother, 118 (2019) 109249.

[2] B. Fan, Y.J. Sun, S.Y. Liu, L. Che, G.Y. Li, Neuroprotective Strategy in Retinal Degeneration: Suppressing ER Stress-Induced Cell Death via Inhibition of the mTOR Signal, Int J Mol Sci, 18 (2017).

[3] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, R. Prywes, ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals, Dev Cell, 3 (2002) 99-111.

[4] D.N. Hebert, M. Molinari, In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases, Physiol Rev, 87 (2007) 1377-1408.

[5] V. Zismanov, L. Drucker, M. Gottfried, ER homeostasis and motility of NSCLC cell lines can be therapeutically targeted with combined Hsp90 and HDAC inhibitors, Pulm Pharmacol Ther, 26 (2013) 388-394.

[6] Y. Chen, Y.H. Tsai, S.H. Tseng, HDAC Inhibitors and RECK Modulate Endoplasmic Reticulum Stress in Tumor Cells, Int J Mol Sci, 18 (2017).

[7] A.L. Parker, M. Kavallaris, J.A. McCarroll, Microtubules and their role in cellular stress in cancer, Front Oncol, 4 (2014) 153.

[8] Y.B. Zheng, J.H. Gong, X.J. Liu, S.Y. Wu, Y. Li, X.D. Xu, B.Y. Shang, J.M. Zhou, Z.L. Zhu, S.Y. Si, Y.S. Zhen, A Novel Nitrobenzoate Microtubule Inhibitor that Overcomes Multidrug Resistance Exhibits Antitumor Activity, Sci Rep, 6 (2016) 31472.

[9] D. Senft, Z.A. Ronai, Adaptive Stress Responses During Tumor Metastasis and Dormancy, Trends Cancer, 2 (2016) 429-442.

[10] T. Hideshima, J.E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S.L. Schreiber, K.C. Anderson, Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma, Proc Natl Acad Sci U S A, 102 (2005) 8567-8572.

[11] Y. Nakajima, S. Suzuki, Environmental stresses induce misfolded protein aggregation in plant cells in a microtubule-dependent manner, Int J Mol Sci, 14 (2013) 7771-7783.
[12] Mark A. Dawson, T. Kouzarides, Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy, Cell, 150 (2012) 12-27.
[13] E. Sanchez, J. Shen, J. Steinberg, M. Li, C. Wang, B. Bonavida, H. Chen, Z.-W. Li, J.R. Berenson, The histone deacetylase inhibitor LBH589 enhances the anti-myeloma effects of chemotherapy in vitro and in vivo, Leukemia Research, 35 (2011) 373-379.
[14] A.K. Singh, A. Bishayee, A.K. Pandey, Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy, Nutrients, 10 (2018) 731.
[15] P. Mondello, A. Younes, Emerging drugs for diffuse large B-cell lymphoma, Expert Rev Anticancer Ther, 15 (2015) 439-451.
[16] Y. Li, E. Seto, HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy, Cold Spring Harb Perspect Med, 6 (2016).
[17] M. Cosenza, M. Civallero, L. Marcheselli, S. Sacchi, S. Pozzi, Ricolinostat, a selective HDAC6 inhibitor, shows anti-lymphoma cell activity alone and in combination with bendamustine, Apoptosis, 22 (2017) 827-840.
[18] L. Yu, R. Xie, T. Tian, L. Zheng, L. Tang, S. Cai, Z. Ma, T. Yang, B. Han, Q. Yang, Suberoylanilide hydroxamic acid upregulates histone acetylation and activates endoplasmic reticulum stress to induce apoptosis in HepG2 liver cancer cells, Oncol Lett, 18 (2019) 3537-3544.
[19] K.F. Hui, A.K. Chiang, Combination of proteasome and class I HDAC inhibitors induces apoptosis of NPC cells through an HDAC6-independent ER stress-induced mechanism, Int J Cancer, 135 (2014) 2950-2961.
[20] J. Liu, M. Edagawa, H. Goshima, M. Inoue, H. Yagita, Z. Liu, S. Kitajima, Role of ATF3 in synergistic cancer cell killing by a combination of HDAC inhibitors and agonistic anti-DR5 antibody through ER stress in human colon cancer cells, Biochem Biophys Res Commun, 445 (2014) 320-326.
[21] J.L. Kaufman, C. Fabre, S. Lonial, P.G. Richardson, Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: rationale and evidence for their use in combination therapy, Clin

Lymphoma Myeloma Leuk, 13 (2013) 370-376.
[22] H. Cho, D.H. Yoon, K.P. Kim, K.S. Bae, W.S. Kim, H.S. Eom, J.S. Kim, J.Y. Hong, S.J. Kim, H. Lee, S.J. Kim, C. Suh, Phase I study of CKD-581, a pan-histone deacetylase inhibitor, in patients with lymphoma or multiple myeloma refractory to standard therapy, Invest New Drugs, 36 (2018) 877-885.
[23] J. Lee, S.J. Kim, H. Choi, Y.H. Kim, I.T. Lim, H.M. Yang, C.S. Lee, H.R. Kang, S.K. Ahn, S.K. Moon, D.H. Kim, S. Lee, N.S. Choi, K.J. Lee, Identification of CKD-516: a potent tubulin polymerization inhibitor with marked antitumor activity against murine and human solid tumors, J Med Chem, 53 (2010) 6337-6354.
[24] C.H. Moon, S.J. Lee, H.Y. Lee, T.K. Dung le, W.J. Cho, H. Cha, J.W. Park, Y.J. Min, CKD-516 displays vascular disrupting properties and enhances anti-tumor activity in combination with chemotherapy in a murine tumor model, Invest New Drugs, 32 (2014) 400-411.
[25] M. Little, R.F. Luduena, Structural differences between brain beta 1- and beta 2-tubulins: implications for microtubule assembly and colchicine binding, EMBO J, 4 (1985) 51-56.
[26] S. Fortin, J. Lacroix, M.F. Cote, E. Moreau, E. Petitclerc, C.G. R, Quick and simple detection technique to assess the binding of antimicrotubule agents to the colchicine-binding site, Biol Proced Online, 12 (2010) 113-117.
[27] W.H. Chiu, S.J. Luo, C.L. Chen, J.H. Cheng, C.Y. Hsieh, C.Y. Wang, W.C. Huang, W.C. Su, C.F. Lin, Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells, Biochem Pharmacol, 83 (2012) 1159-1171.
[28] C.X. Santos, A.A. Nabeebaccus, A.M. Shah, L.L. Camargo, S.V. Filho, L.R. Lopes, Endoplasmic reticulum stress and Nox-mediated reactive oxygen species signaling in the peripheral vasculature: potential role in hypertension, Antioxid Redox Signal, 20 (2014) 121-134.
[29] M. Kitamura, Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces, Am J Physiol Renal Physiol, 295 (2008) F323-334.

[30] R. Sano, J.C. Reed, ER stress-induced cell death mechanisms, Biochim Biophys Acta, 1833 (2013) 3460-3470.
[31] Y. Kawaguchi, J.J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, T.P. Yao, The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress, Cell, 115 (2003) 727-738.
[32] C.T. Ho, Y.J. Chang, L.X. Yang, P.L. Wei, T.Z. Liu, J.J. Liu, A Novel Microtubule-Disrupting Agent Induces Endoplasmic Reticular Stress-Mediated Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, PLoS One, 10 (2015) e0136340.
[33] L. Wang, P. Chanvorachote, D. Toledo, C. Stehlik, R.R. Mercer, V. Castranova, Y. Rojanasakul, Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells, Mol Pharmacol, 73 (2008) 119-127.
[34] Y.X. Wang, J.H. Zhang, Z.W. Gu, [Wnt/beta-catenin signal pathway and malignant hematological disease -- review], Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 17 (2009) 234-237.
[35] C.D. Zimberlin, C. Lancini, R. Sno, S.L. Rosekrans, C.M. McLean, H. Vlaming, G.R. van den Brink, M. Bots, J.P. Medema, J.H. Dannenberg, HDAC1 and HDAC2 collectively regulate intestinal stem cell homeostasis, FASEB J, 29 (2015) 2070-2080.
[36] Y. Li, X. Zhang, R.D. Polakiewicz, T.P. Yao, M.J. Comb, HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization, J Biol Chem, 283 (2008) 12686-12690.
[37] Y. Cui, W. Ma, F. Lei, Q. Li, Y. Su, X. Lin, C. Lin, X. Zhang, L. Ye, S. Wu, J. Li, Z. Yuan, L. Song, Prostate tumour overexpressed-1 promotes tumourigenicity in human breast cancer via activation of Wnt/beta-catenin signalling, J Pathol, 239 (2016) 297-308.
[38] Y. Wang, M. Liu, Y. Jin, S. Jiang, J. Pan, In vitro and in vivo anti-uveal melanoma activity of JSL-1, a novel HDAC inhibitor, Cancer Lett, 400 (2017) 47-60.
[39] X. Jiang, J. Tan, J. Li, S. Kivimae, X. Yang, L. Zhuang, P.L. Lee, M.T. Chan, L.W. Stanton, E.T. Liu, B.N. Cheyette, Q. Yu, DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications, Cancer Cell, 13 (2008) 529-541.

[40] H. Xue, Z. Xiao, J. Zhang, J. Wen, Y. Wang, Z. Chang, J. Zhao, X. Gao, J. Du, Y.G. Chen, Disruption of the Dapper3 gene aggravates ureteral obstruction-mediated renal fibrosis by amplifying Wnt/beta-catenin signaling, J Biol Chem, 288 (2013) 15006-15014.
[41] J.M. Shieh, Y.A. Tang, F.H. Hu, W.J. Huang, Y.J. Wang, J. Jen, S.Y. Liao, Y.H. Lu, Y.L. Yeh, T.W. Wang, P. Lin, Y.C. Wang, A histone deacetylase inhibitor enhances expression of genes inhibiting Wnt pathway and augments activity of DNA demethylation reagent against nonsmall-cell lung cancer, Int J Cancer, 140 (2017) 2375-2386.
[42] Y. Xi, Y. Chen, Wnt signaling pathway: implications for therapy in lung cancer and bone metastasis, Cancer Lett, 353 (2014) 8-16.
[43] S. Qie, J.A. Diehl, Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment, J Mol Med (Berl), 94 (2016) 1313-1326.
[44] E.A. Musgrove, C.E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, R.L. Sutherland, Cyclin D as a therapeutic target in cancer, Nat Rev Cancer, 11 (2011) 558-572.
[45] T. VanArsdale, C. Boshoff, K.T. Arndt, R.T. Abraham, Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment, Clin Cancer Res, 21 (2015) 2905-2910.
[46] D.F. Riascos-Bernal, P. Chinnasamy, L.L. Cao, C.M. Dunaway, T. Valenta, K. Basler, N.E. Sibinga, beta-Catenin C-terminal signals suppress p53 and are essential for artery formation, Nat Commun, 7 (2016) 12389.
[47] B. Kwak, D.U. Kim, T.O. Kim, H.S. Kim, S.W. Kim, MicroRNA-552 links Wnt signaling to p53 tumor suppressor in colorectal cancer, Int J Oncol, 53 (2018) 1800-1808.
[48] K.H. Vousden, p53: death star, Cell, 103 (2000) 691-694.
[49] H.-J. Kim, S.-C. Bae, Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs, Am J Transl Res, 3 (2011) 166-179.
[50] W. Li, S.K. Gupta, W. Han, R.A. Kundson, S. Nelson, D. Knutson, P.T. Greipp, S.F. Elsawa, E.M. Sotomayor, M. Gupta, Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors, J Hematol Oncol, 12 (2019) 73.
[51] W. Deng, A. Clipson, H. Liu, Y. Huang, R. Dobson, M. Wang, P. Johnson, M.Q. Du,

Variable Responses of MYC Translocation Positive Lymphoma Cell Lines To Different Combinations of Novel Agents: Impact of BCL2 Family Protein Expression, Transl Oncol, 11 (2018) 1147-1154.
[52] P. Mullen, PARP cleavage as a means of assessing apoptosis, Methods Mol Med, 88 (2004) 171-181.
[53] C.M. Adams, S. Clark-Garvey, P. Porcu, C.M. Eischen, Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma, Front Oncol, 8 (2018) 636.
[54] P.N. Kelly, S. Grabow, A.R. Delbridge, A. Strasser, J.M. Adams, Endogenous Bcl-xL is essential for Myc-driven lymphomagenesis in mice, Blood, 118 (2011) 6380-6386.
[55] G.L. Kelly, S. Grabow, S.P. Glaser, L. Fitzsimmons, B.J. Aubrey, T. Okamoto, L.J. Valente, M. Robati, L. Tai, W.D. Fairlie, E.F. Lee, M.S. Lindstrom, K.G. Wiman, D.C. Huang, P. Bouillet, M. Rowe, A.B. Rickinson, M.J. Herold, A. Strasser, Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53, Genes Dev, 28 (2014) 58-70.
[56] M. Linden, N. Kirchhof, C. Carlson, B. Van Ness, Targeted overexpression of Bcl-XL in B-lymphoid cells results in lymphoproliferative disease and plasma cell malignancies, Blood, 103 (2004) 2779-2786.
[57] P. Zhou, N.B. Levy, H. Xie, L. Qian, C.Y. Lee, R.D. Gascoyne, R.W. Craig, MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes, Blood, 97 (2001) 3902-3909.
[58] C. Stolz, G. Hess, P.S. Hahnel, F. Grabellus, S. Hoffarth, K.W. Schmid, M. Schuler, Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis, Blood, 112 (2008) 3312-3321.
[59] R.C. Thompson, I. Vardinogiannis, T.D. Gilmore, The sensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cell lines to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis is modulated by BCL-2 family protein activity, PLoS One, 8 (2013) e62822.
[60] M.H. Kang, C.P. Reynolds, Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy, Clin Cancer Res, 15 (2009) 1126-1132.
[61] W. Xiang, C.Y. Yang, L. Bai, MCL-1 inhibition in cancer treatment, Onco Targets

Ther, 11 (2018) 7301-7314.
[62] G.S. Hotamisligil, R.J. Davis, Cell Signaling and Stress Responses, Cold Spring Harb Perspect Biol, 8 (2016).
[63] K.W. Kim, J.M. Lee, Y.S. Jeon, I.J. Lee, Y. Choi, J. Park, B. Kiefer, C. Kim, J.K. Han, B.I. Choi, Vascular disrupting effect of CKD-516: preclinical study using DCE-MRI, Invest New Drugs, 31 (2013) 1097-1106.
[64] I. Joo, J.H. Kim, J.M. Lee, J.W. Choi, J.K. Han, B.I. Choi, Early quantification of the therapeutic efficacy of the vascular disrupting agent, CKD-516, using dynamic contrast-enhanced ultrasonography in rabbit VX2 liver tumors, Ultrasonography, 33 (2014) 18-25.
[65] S.J. Ham, Y. Choi, S.I. Lee, J. Kim, Y.I. Kim, J.W. Chung, K.W. Kim, Enhanced efficacy of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma using a novel vascular disrupting agent, CKD-516, Hepatol Int, 11 (2017) 446-451.
[66] J.H. Gill, K.L. Rockley, C. De Santis, A.K. Mohamed, Vascular Disrupting Agents in cancer treatment: Cardiovascular toxicity and implications for co-administration with other cancer chemotherapeutics, Pharmacol Ther, (2019).
[67] M. Taylor, F. Billiot, V. Marty, V. Rouffiac, P. Cohen, E. Tournay, P. Opolon, F. Louache, G. Vassal, C. Laplace-Builhe, P. Vielh, J.C. Soria, F. Farace, Reversing resistance to vascular-disrupting agents by blocking late mobilization of circulating endothelial progenitor cells, Cancer Discov, 2 (2012) 434-449.
[68] X. Liu, C. Jiang, D. Zhang, M. Gao, F. Peng, D. Huang, Z. Sun, Y. Ni, J. Zhang, Z. Yin, Tumor necrosis targeted radiotherapy of non-small cell lung cancer using radioiodinated protohypericin in a mouse model, Oncotarget, 6 (2015) 26400-26410.
[69] S. Dey, S. Kumari, S.P. Kalainayakan, J. Campbell, 3rd, P. Ghosh, H. Zhou, K.E. FitzGerald, M. Li, R.P. Mason, L. Zhang, L. Liu, The vascular disrupting agent combretastatin A-4 phosphate causes prolonged elevation of proteins involved in heme flux and function in resistant tumor cells, Oncotarget, 9 (2018) 4090-4101.
[70] K. Hori, S. Saito, Y. Sato, H. Akita, T. Kawaguchi, K. Sugiyama, H. Sato, Differential relationship between changes in tumour size and microcirculatory functions induced by therapy with an antivascular drug and with cytotoxic drugs. implications for the evaluation

of therapeutic efficacy of AC7700 (AVE8062), Eur J Cancer, 39 (2003) 1957-1966.
[71] K. Hori, S. Saito, Y. Nihei, M. Suzuki, Y. Sato, Antitumor effects due to irreversible stoppage of tumor tissue blood flow: evaluation of a novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, Jpn J Cancer Res, 90 (1999) 1026-1038.
[72] K. Hori, S. Saito, K. Kubota, A novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, strongly stanches tumour blood flow and inhibits growth of tumours developing in various tissues and organs, Br J Cancer, 86 (2002) 1604-1614.
[73] D. Raben, C. Bianco, V. Damiano, R. Bianco, D. Melisi, C. Mignogna, F.P. D'Armiento, L. Cionini, A.R. Bianco, G. Tortora, F. Ciardiello, P. Bunn, Antitumor activity of ZD6126, a novel vascular-targeting agent, is enhanced when combined with ZD1839, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, and potentiates the effects of radiation in a human non-small cell lung cancer xenograft model, Mol Cancer Ther, 3 (2004) 977-983.
[74] H. Goto, S. Yano, H. Zhang, Y. Matsumori, H. Ogawa, D.C. Blakey, S. Sone, Activity of a new vascular targeting agent, ZD6126, in pulmonary metastases by human lung adenocarcinoma in nude mice, Cancer Res, 62 (2002) 3711-3715.
[75] T. Hoang, S. Huang, E. Armstrong, J.C. Eickhoff, P.M. Harari, Augmentation of radiation response with the vascular targeting agent ZD6126, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 64 (2006) 1458-1465.
[76] M. Ma, J. Zhao, H. Cheng, M. Deng, Z. Ding, Y. Hou, F. Li, G. Dou, W. Li, In vitro and in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic study of MBRI-001, a deuterium-substituted plinabulin derivative as a potent anti-cancer agent, Bioorg Med Chem, 26 (2018) 4687-4692.
[77] J.H. Gill, P.M. Loadman, S.D. Shnyder, P. Cooper, J.M. Atkinson, G. Ribeiro Morais, L.H. Patterson, R.A. Falconer, Tumor-targeted prodrug ICT2588 demonstrates therapeutic activity against solid tumors and reduced potential for cardiovascular toxicity, Mol Pharm, 11 (2014) 1294-1300.
[78] S.Y. Ahn, J.M. Goo, K.H. Lee, S. Ha, J.C. Paeng, Monitoring tumor response to the vascular disrupting agent CKD-516 in a rabbit VX2 intramuscular tumor model using

PET/MRI: Simultaneous evaluation of vascular and metabolic parameters, PLoS One, 13 (2018) e0192706.
[79] I.J. Lee, M. Lee, S.J. Kim, Y.K. Kim, J.Y. Won, J.W. Chung, Chemoembolization with Vascular Disrupting Agent CKD-516 Dissolved in Ethiodized Oil in Combination with Doxorubicin: A VX2 Tumor Model Study, J Vasc Interv Radiol, 29 (2018) 1078-1084.
[80] I. Joo, J.M. Lee, J.K. Han, B.I. Choi, Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging for monitoring the therapeutic efficacy of the vascular disrupting agent CKD-516 in rabbit VX2 liver tumors, Radiology, 272 (2014) 417-426.
[81] G.M. Tozer, C. Kanthou, B.C. Baguley, Disrupting tumour blood vessels, Nat Rev Cancer, 5 (2005) 423-435.
[82] I. Petit, M.A. Karajannis, L. Vincent, L. Young, J. Butler, A.T. Hooper, K. Shido, H. Steller, D.J. Chaplin, E. Feldman, S. Rafii, The microtubule-targeting agent CA4P regresses leukemic xenografts by disrupting interaction with vascular cells and mitochondrial-dependent cell death, Blood, 111 (2008) 1951-1961.
[83] N. Hura, A.V. Sawant, A. Kumari, S.K. Guchhait, D. Panda, Combretastatin-Inspired Heterocycles as Antitubulin Anticancer Agents, ACS Omega, 3 (2018) 9754-9769.
[84] S. Grasse, M. Lienhard, S. Frese, M. Kerick, A. Steinbach, C. Grimm, M. Hussong, J. Rolff, M. Becker, F. Dreher, U. Schirmer, S. Boerno, A. Ramisch, G. Leschber, B. Timmermann, C. Grohe, H. Luders, M. Vingron, I. Fichtner, S. Klein, M. Odenthal, R. Buttner, H. Lehrach, H. Sultmann, R. Herwig, M.R. Schweiger, Epigenomic profiling of non-small cell lung cancer xenografts uncover LRP12 DNA methylation as predictive biomarker for carboplatin resistance, Genome Med, 10 (2018) 55.
[85] A. Rossi, M. Di Maio, Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles, Expert Rev Anticancer Ther, 16 (2016) 653-660.
[86] P.L. Bergsagel, W.M. Kuehl, Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma, Journal of Clinical Oncology, 23 (2005) 6333-6338.
[87] Y. Imai, M. Hirano, M. Kobayashi, M. Futami, A. Tojo, HDAC Inhibitors Exert Anti-

Myeloma Effects through Multiple Modes of Action, Cancers (Basel), 11 (2019) 475.
[88] P. de la Puente, B. Muz, F. Azab, M. Luderer, A.K. Azab, Molecularly targeted therapies in multiple myeloma, Leuk Res Treatment, 2014 (2014) 976567-976567.
[89] N. Giuliani, F. Accardi, V. Marchica, B. Dalla Palma, P. Storti, D. Toscani, E. Vicario, F. Malavasi, Novel targets for the treatment of relapsing multiple myeloma, Expert Review of Hematology, (2019) 1-16.
[90] Y.W. Qiang, Y. Endo, J.S. Rubin, S. Rudikoff, Wnt signaling in B-cell neoplasia, Oncogene, 22 (2003) 1536-1545.
[91] M. Schmidt, E. Sievers, T. Endo, D. Lu, D. Carson, I.G. Schmidt-Wolf, Targeting Wnt pathway in lymphoma and myeloma cells, Br J Haematol, 144 (2009) 796-798.
[92] I. Spaan, R.A. Raymakers, A. van de Stolpe, V. Peperzak, Wnt signaling in multiple myeloma: a central player in disease with therapeutic potential, J Hematol Oncol, 11 (2018) 67.
[93] H. Yao, E. Ashihara, J.W. Strovel, Y. Nakagawa, J. Kuroda, R. Nagao, R. Tanaka, A. Yokota, M. Takeuchi, Y. Hayashi, C. Shimazaki, M. Taniwaki, K. Strand, J. Padia, H. Hirai, S. Kimura, T. Maekawa, AV-65, a novel Wnt/beta-catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model, Blood cancer journal, 1 (2011) e43.
[94] M. Abe, [Wnt inhibitors and the suppression of bone formation in multiple myeloma], Clin Calcium, 23 (2013) 867-875.
[95] B.A. Narayanan, N.A. Doudican, J. Park, D. Xu, N.K. Narayanan, R. Dasgupta, A. Mazumder, Antagonistic effect of small-molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin in multiple myeloma, Anticancer Res, 32 (2012) 4697-4707.
[96] M.S. Roca, E. Di Gennaro, A. Budillon, Implication for Cancer Stem Cells in Solid Cancer Chemo-Resistance: Promising Therapeutic Strategies Based on the Use of HDAC Inhibitors, J Clin Med, 8 (2019).
[97] W. Yang, Y. Li, R. Gao, Z. Xiu, T. Sun, MHC class I dysfunction of glioma stem cells escapes from CTL-mediated immune response via activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway, Oncogene, 39 (2020) 1098-1111.

[98] B. Wang, T. Tian, K.H. Kalland, X. Ke, Y. Qu, Targeting Wnt/beta-Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy, Trends Pharmacol Sci, 39 (2018) 648-658.
[99] A. Nebbioso, V. Carafa, M. Conte, F.P. Tambaro, C. Abbondanza, J. Martens, M. Nees, R. Benedetti, I. Pallavicini, S. Minucci, G. Garcia-Manero, F. Iovino, G. Lania, C. Ingenito, V. Belsito Petrizzi, H.G. Stunnenberg, L. Altucci, c-Myc Modulation and Acetylation Is a Key HDAC Inhibitor Target in Cancer, Clin Cancer Res, 23 (2017) 2542-2555.
[100] T. Yang, Y. Choi, J.W. Joh, S.K. Cho, D.S. Kim, S.G. Park, Phosphorylation of p53 Serine 15 Is a Predictor of Survival for Patients with Hepatocellular Carcinoma, Can J Gastroenterol Hepatol, 2019 (2019) 9015453.
[101] J.T. Kao, S.K. Chuah, C.C. Huang, C.L. Chen, C.C. Wang, C.H. Hung, C.H. Chen, J.H. Wang, S.N. Lu, C.M. Lee, C.S. Changchien, T.H. Hu, P21/WAF1 is an independent survival prognostic factor for patients with hepatocellular carcinoma after resection, Liver Int, 27 (2007) 772-781.
[102] K.E. Hunt, K.K. Reichard, Diffuse large B-cell lymphoma, Arch Pathol Lab Med, 132 (2008) 118-124.
[103] B. Coiffier, C. Haioun, N. Ketterer, A. Engert, H. Tilly, D. Ma, P. Johnson, A. Lister, M. Feuring-Buske, J.A. Radford, R. Capdeville, V. Diehl, F. Reyes, Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study, Blood, 92 (1998) 1927-1932.
[104] P. Feugier, A. Van Hoof, C. Sebban, P. Solal-Celigny, R. Bouabdallah, C. Ferme, B. Christian, E. Lepage, H. Tilly, F. Morschhauser, P. Gaulard, G. Salles, A. Bosly, C. Gisselbrecht, F. Reyes, B. Coiffier, Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte, J Clin Oncol, 23 (2005) 4117-4126.
[105] R. Mohammed, A. Milne, K. Kayani, U. Ojha, How the discovery of rituximab impacted the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphomas, J Blood Med, 10 (2019) 71-84.
[106] B. Coiffier, C. Sarkozy, Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to

do?, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2016 (2016) 366-378.
[107] M. Wu, M. Sirota, A.J. Butte, B. Chen, Characteristics of drug combination therapy in oncology by analyzing clinical trial data on ClinicalTrials.gov, Pac Symp Biocomput, (2015) 68-79.
[108] R. Bayat Mokhtari, T.S. Homayouni, N. Baluch, E. Morgatskaya, S. Kumar, B. Das, H. Yeger, Combination therapy in combating cancer, Oncotarget, 8 (2017) 38022-38043.
[109] Y. Imai, M. Hirano, M. Kobayashi, M. Futami, A. Tojo, HDAC Inhibitors Exert Anti-Myeloma Effects through Multiple Modes of Action, Cancers (Basel), 11 (2019).
[110] J.E. Amengual, P. Johannet, M. Lombardo, K. Zullo, D. Hoehn, G. Bhagat, L. Scotto, X. Jirau-Serrano, D. Radeski, J. Heinen, H. Jiang, S. Cremers, Y. Zhang, S. Jones, O.A. O'Connor, Dual Targeting of Protein Degradation Pathways with the Selective HDAC6 Inhibitor ACY-1215 and Bortezomib Is Synergistic in Lymphoma, Clin Cancer Res, 21 (2015) 4663-4675.
[111] J.E. Amengual, S.A. Prabhu, M. Lombardo, K. Zullo, P.M. Johannet, Y. Gonzalez, L. Scotto, X.J. Serrano, Y. Wei, J. Duong, R. Nandakumar, S. Cremers, A. Verma, O. Elemento, O.A. O'Connor, Mechanisms of Acquired Drug Resistance to the HDAC6 Selective Inhibitor Ricolinostat Reveals Rational Drug-Drug Combination with Ibrutinib, Clin Cancer Res, 23 (2017) 3084-3096.

Abstract

Endoplasmic reticulum stress-related anti-cancer effects of microtubule- or histone deacetylase-targeting agents and its mechanistic basis

Soo Jin Kim
Advisor: Prof. Keon Wook Kang

The endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle, playing major roles in synthesis of proteins and lipids, calcium storage and signal transduction. ER stress is closely related with the pathogenesis of inflammatory and degenerative diseases such as cancer, neurodegenerative disease and metabolic disease. Moreover, many previous studies reveled that survival, growth, angiogenesis, metastasis and chemoresistance in cancer cells are partly due to ER stress. Oxidative stress, hypoxia and nutrient deprivation lead to unfolded protein response (UPR) in the tumor microenvironment. This thesis describes the ER stress-related anti-cancer activities of tubulin polymerization inhibitor and HDAC inhibitor.

CKD-516, a tubulin polymerization inhibitor, was reported to be safe and tolerable in a single and irinotecan combination phase 1 clinical studies. And disease control rate (DCR) in metastatic colorectal cancer patients co-treated with CKD-516 and irinotecan was 79%.

In the present study, S516 was used in cell-based experiments, because S516 is an active metabolite of CKD-516. S516 showed vascular disrupting activity to disrupt HUVEC capillary-like tubes. And reactive oxygen species (ROS) was increased by S516 in endoplasmic reticulum and mitochondria. However, cancer cell death was not induced by ROS generation in response to S516.

S516 activated ER stress markers, inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α) and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). ROS scavenger, *N*-acetylcysteine (NAC), partially blocked ER stress, indicating that ER stress was likely caused by ROS, induced by microtubule disturbance in lung cancer cells. CKD-516 suppressed tumor growth in lung cancer xenograft models, and combination of CKD-516 with carboplatin was more efficacious without body weight decrease. Therefore, CKD-516 combined with carboplatin would be suitable for the treatment of NSCLC.

CKD-581 (alteminostat), a HDAC inhibitor, was reported to be safe and tolerable in phase 1 study, and 44% (16 of 36) patients with lymphoma or multiple myeloma (MM) achieved stable disease status or better. CKD-581 as a pan-HDAC inhibitor, inhibits class I and II HDACs. CKD-581 modulated Wnt/β-catenin signaling pathway in hematologic cancer cell lines. In particular, dishevelled binding antagonist of beta catenin 3 (DACT3) expression was markedly increased by CKD-581 treatment in HH and MJ cells. The expression levels of β-catenin and c-Myc were decreased by DACT3, a negative regulator of Wnt/β-catenin signaling pathway. And cell cycle related factors, such as cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), were also decreased by CKD-581. In addition, p53 phosphorylation, p21 expression and apoptosis were increased by CKD-581 treatment in MM1.S and RPMI8226 cells. I further showed that CKD-581 potently suppressed tumor growth of MM1.S cells in xenografts.

Another hematologic cancer was used to test the anti-cancer activity of CKD-581. Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma, and there is still no HDAC inhibitor clinically approved for DLBCL. CKD-581 induced acetylation of histone and tubulin in lymphoma. The poor prognostic markers in DLBCL patient such as MYC, BCL-2 and BCL-6 were decreased by CKD-581 in SU-DHL-4, OCI-LY1, SU-DHL-2, U2932 cells. And the expression levels of other BCL-2 family members, BCL-$_X$L and MCL-1 were also reduced in lymphoma cell lines treated with CKD-581. Apoptosis in DLBCL was also assessed by determining γH2AX expression and cleavage of poly (ADP ribose) polymerase 1 (PARP1). CKD-581 increased the protein levels of γH2AX and cleaved form of PARP1 in DLBCL cell lines. In addition, activation

of IRE1α, PERK, activating transcription factor 6 (ATF6) and glucose-regulated protein 78 (GRP78) was seen in cells treated with CKD-581.

In a DLBCL SCID mouse xenograft model, CKD-581 exhibited anti-cancer effects comparable with those of rituximab (CD20 mAb). Overall, CKD-581 would be beneficial for lymphoma treatment.

Here, anti-cancer activities of CKD-516, a tubulin polymerization inhibitor and CKD-581, a HDAC inhibitor were assessed in NSCLC and two hematological malignancies, respectively. I also studied possible mechanistic basis for their anti-cancer activities focusing on ER stress responses. These two anti-cancer drug candidates are now in clinical trials, and could be promising therapeutic options.

Appendix

Kim, S. J., U. J. Kim, H. Y. Yoo, Y. J. Choi, and K. W. Kang. Anti-Cancer Effects of CKD-581, a Potent Histone Deacetylase Inhibitor against Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Int J Mol Sci 21 (12)

Kim, S. J., K. H. Jegal, J. H. Im, G. Park, S. Kim, H. G. Jeong, I. J. Cho, and K. W. Kang. Involvement of ER Stress and Reactive Oxygen Species Generation in Anti-Cancer Effect of CKD-516 for Lung Cancer. Cancer Chemother Pharmacol 85 (4) : 685-97.

Kim, H. K., J. W. Kang, Y. W. Park, J. Y. Kim, M. Kim, **S. J. Kim**, S. M. Kim, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of the Vascular-Disrupting Agent CKD-516 (NOV120401) in Patients with Refractory Solid Tumors. Pharmacol Res Perspect 8 (2) : e00568.

Kim, J. W., D. K. Yadav, **S. J. Kim**, M. Y. Lee, J. M. Park, B. S. Kim, M. H. Kim, H. G. Park, and K. W. Kang. "Anti-Cancer Effect of GV1001 for Prostate Cancer: Function as a Ligand of GNRHR." Endocr Relat Cancer 26(2): 147-62.

Lee, I. J., M. Lee, **S. J. Kim**, Y. K. Kim, J. Y. Won, and J. W. Chung. Chemoembolization with Vascular Disrupting Agent CKD-516 Dissolved in Ethiodized Oil in Combination with Doxorubicin: A VX2 Tumor Model Study. J Vasc Interv Radiol 29 (8): 1078-84.

Nagarajan, S., M. J. Choi, Y. S. Cho, S. J. Min, G. Keum, **S. J. Kim**, C. S. Lee, and A. N. Pae. Tubulin Inhibitor Identification by Bioactive Conformation Alignment Pharmacophore-Guided Virtual Screening. Chem Biol Drug Des 86 (5): 998-1016.

Lee, J., S. Bae, S. H. Lee, H. Choi, Y. H. Kim, **S. J. Kim**, G. T. Park, et al. Discovery of a Potent Tubulin Polymerization Inhibitor: Synthesis and Evaluation of Water-Soluble Prodrugs of Benzophenone Analog. Bioorg Med Chem Lett 20 (21): 6327-30.

Choi, H., J. Lee, Y. H. Kim, D. S. Im, I. C. Hwang, **S. J. Kim**, S. K. Moon, et al. Discovery of Potent, Selective, and Orally Bioavailable PDE5 Inhibitor: Methyl-4-(3-Chloro-4-Methoxybenzylamino)-8-(2-Hydroxyethyl)-7-Methoxyquinazolin-6-Ylmethylcarbamate (CKD-533). Bioorg Med Chem Lett 20 (1): 383-6.

Lee, J., S. J. Kim, H. Choi, Y. H. Kim, I. T. Lim, H. M. Yang, C. S. Lee, et al. Identification of CKD-516: A Potent Tubulin Polymerization Inhibitor with Marked Antitumor Activity against Murine and Human Solid Tumors. J Med Chem 53 (17): 6337-54.

Kim, Y. H., H. Choi, J. Lee, I. C. Hwang, S. K. Moon, **S. J. Kim**, H. W. Lee, et al. "Quinazolines as Potent and Highly Selective PDE5 Inhibitors as Potential Therapeutics for Male Erectile Dysfunction." Bioorg Med Chem Lett 18 (23): 6279-82.

In, J. K., M. S. Lee, J. E. Yang, J. H. Kwak, H. Lee, S. K. Boovanahalli, K. Lee, **S. J. Kim** et al. Synthesis of Novel Diaryl Ethers and Their Evaluation as Antimitotic Agents. Bioorg Med Chem Lett 17 (6): 1799-802.

Kim, S. J., S. Jeon, E. Y. Shin, E. G. Kim, J. Park, and C. D. Bae. AMPA, Not NMDA, Activates RhoA GTPases and Subsequently Phosphorylates Moesin. Exp Mol Med 36 (1): 98-102.