



약학박사학위논문

Antiproliferative Activity of Piceamycin and Krukovine in Anticancer Drug-resistant Pancreatic Cancer Cells

항암제 내성 췌장암 세포에서 Piceamycin과 Krukovine의 암세포 성장 억제 효능 연구

2023년 8월

서울대학교 대학원 약학과 천연물과학전공 이 지 형

Antiproliferative Activity of Piceamycin and Krukovine in Anticancer Drug-resistant Pancreatic Cancer Cells

항암제 내성 췌장암 세포에서 Piceamycin 과 Krukovine 의 암세포 성장 억제 효능 연구

지도교수 이 상 국

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함 2023년 8월

> 서울대학교 대학원 약학과 천연물과학전공 이 지 형

이지형의 박사 학위논문을 인준함 2023년 8월

위 육	^원 장	노 민 수	(인)
부위	원장	오 동 찬	(인)
위	원	이 상 협	(인)
위	원	김 기 대	(인)
위	원	이 상 국	(인)

초록

항암제 내성 췌장암 세포에서 Piceamycin과 Krukovine의 암세포 성장 억제 효능 연구

서울대학교 대학원

약학과

천연물과학 전공

이지형

암은 인간의 죽음에 주요한 원인으로 환경적 요인, 식습관, 유전적 요인 등에 의하여 그 발병률이 점차적으로 증가하고 있다. 특히나 췌장암에서는 수술적 요법이 초기단계의 환자를 치료하는 가장 좋은 방법이지만, 대부분의 췌장암 환자의 경우 진행이 된 상태로 발견이 되고, 15-20%의 환자만이 수술 가능하며 나머지 80% 이상의 환자의 경우 고식적인 약물치료 외에는 적합한 방법이 없는 실정이다. 납-파클리탁셀과 젬시타빈 그리고 폴피리녹스 요법이 췌장암에서 일선으로 쓰이는 약물이지만, 이들 약물에 대한 내성이 왕왕 발생하여 병의 진행을 더욱 가속화하게 된다. 그러므로 현재의 쉬이 내성이 발생하는 상용되는 약물을 보완할 수 있는 약물을 발굴하는 것이 필요하다.

i

본 연구에서는 첫째, 비록 젞시타빈에 기반한 치료법이 췌장암 연구에 서 널리 사용되고 있지만, 젞시타빈의 사용으로 인하 내성 또하 가과할 수 없는 문제점이므로 젬시타빈 내성이 있는 췌장암세포에서 효과적인 약물을 발굴하고자 연구를 진행하였다. Alpha-actinin-4 (ACTN4)는 많은 암 에서 암을 유발하고 전이하는 것에 영향을 끼친다고 알려진 유전자이다. 뿐만 아니라 악성 암에서 그 발현이 더욱 활성화 되어있다고 알려져 있 다. Piceamycin (PCM) 은 누에, Bombyx mori의 장에서 분리한 Streptomyces sp. SD53 strain (스트렙토미세스 속. SD53 스트레인)에서 생산된 이차대사 산물이다. PCM은 다양한 암에서 생장 저해를 유도한다고 알려져 있다. 그러나 췌장암에서의 항암효과와 그 기전은 아직까지 연구된 바가 없으 므로 이 연구에서는 젬시타빈 저항성이 있는 췌장암 세포 (gemcitabineresistant AsPC-1 cells)에서 PCM의 항암기전을 연구하였고, 또한 췌장암 환 자 유래의 오가노이드에서 PCM의 생장 저해 효과를 확인하였다. PCM은 gemcitabine-resistant AsPC-1 cells에서 효과적으로 생장을 저해하고 또한 ACTN4의 발현을 억제하였다. PCM 은 gemcitabine-resistant AsPC-1 cells에서 효과적으로 암세포의 침윤과 이동을 저해시켰다. 이것은 액틴 중합, focal adhesion과 상피 간엽 이행 (epithelial-mesenchymal transition) 바이오마커가 PCM 처리시 저해됨을 통해 확인할 수 있었다. 또한 PCM에 의해 G₀/G₁ cell cycle arrest가 일어났고, PCM을 오랜 시간 처리 (48시간) 하였을 때 PCM 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다. 또 한 gemcitabine-resistant AsPC-1 cells세포에서 PCM과 젬시타빈의 병합요법 의 효과도 확인할 수 있었다. 이 모든 것을 종합해 볼 때 PCM은 젬시타 빈 내성이 있는 췌장암에서 효과적인 하나의 치료제로 쓰일 수도 있을

ii

둘째로, 옥살리플라틴은 폴피리녹스 요법에서 사용되는 약물 중에 하 나로 췌장암치료에서 1st line chemotherapy로 가장 널리 사용되는 약물이 다. 따라서 이 약물에 저항성이 있을 때 다른 대체할 수 있는 약물이 제 한적이다. Krukovine (KV) 은 Abuta grandifolia (Mart.) Sandw. (Menispermaceae) 이라는 식물의 껍질에서 분리된 알칼로이드로 다른 여 러 암에서 항암효과를 보여주었지만 췌장암에서는 아직 그 효과에 대한 연구가 발표되지 않았으므로, 이 연구에서는 옥살리플라틴 저항성이 있 는 췌장암세포에서 KV에 의해 생장이 저해되는 효과를 확인하고, 어떠 한 기전으로 생장이 저해되는지 확인하였다. 옥살리플라틴 저항성의 췌 장암세포에 KV을 처리하였을 때 생장 저해 효과를 나타내었으며, 특히 나 세포의 이동과 전이에 관련 있다고 알려진 단백질인 TMEM139의 전 사체 및 단백체 발현을 억제시켰다. KV은 KRAS 돌연변이가 있는 췌장 암세포와 환자 유래 췌장암 오가노이드의 생장을 저해하였고, PI3K - Akt mTOR 및 Erk-RPS6K-TMEM139 기전의 단백질 발현을 억제함으로 세포 생장 및 전이를 저해시켰다. 또한 KV을 처리시 oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells 세포의 이동과 침윤을 저해시켰다. 그리고 옥살리플라틴에 상대적 으로 저항성을 나타내는 오가노이드에 KV과 함께 병합요법을 하였을 때 시너지 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이를 통해 KV이 옥살리플라틴 에 저항성이 있는 췌장암 환자의 치료를 위한 병합요법을 위한 하나의 후보 물질이 될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

이 연구를 통해 기존의 췌장암 치료에 널리 쓰이는 젬시타빈과 옥살리

iii

플라틴에 저항성이 있는 췌장암 세포에서 효과가 있는 약물의 발굴 및 그 기전을 탐색함으로써 현재 고식적인 치료방법 외에는 부재한 췌장암 약물 연구에 일조할 수 있을 것으로 기대한다.

주요어: 췌장암, 천연물, Alpha-actinin-4 (ACTN4), piceamycin (PCM),
 젬시타빈 내성 췌장암세포, 상피 간엽 이행, 항암, krukovine (KV), 옥살리플라틴 내성 췌장암 세포, 환자 유래 췌장암 오가노이드, Transmembrane 139 (TMEM139)

학번: 2015-31193

Table of Contents

Abstracti
Table of Contentsv
List of Figuresix
List of Tables
Part I: Antiproliferative Activity of Piceamycin by Regulating Alpha-actinin-4
in Gemcitabine-resistant Pancreatic Cancer Cells1
1. Introduction
2. Materials and Methods
2. 1. Kaplan–Meier Plotter analysis5
2. 2. Cell culture and reagents
2. 3. Cell proliferation assay
2. 4. RNA-seq analysis
2. 5. Protein-Protein Interaction (PPI) network analysis
2. 6. Western blot analysis
2. 7. Cell cycle analysis
2. 8. Caspase 3/7 activity assay10
2. 9. Colony formation assay10
2. 10. Annexin V-fluorescein isothiocyanate and PI double staining10
2. 11. Wound healing assay (cell migration assay)11
2. 12. Transwell cell invasion assay11

2. 13. Organoid culture medium and 3D culture viability assay
2. 14. Data analysis
3. Results
3. 1. The clinical significance of ACTN4 expression in pancreatic cancer
patients13
3. 2. Antiproliferative activity of piceamycin (PCM) in pancreatic cancer
cells15
3. 3. The effects of PCM on gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells
3. 4. The effects of PCM on the ACTN4 expression in gemcitabine-resistant
AsPC-1 cells
3. 5. PCM suppressed actin polymerization signaling pathway in
gemcitabine-resistant AsPC-1 cells25
3. 6. The combination of gemcitabine and PCM is effective in the
gemcitabine-resistant AsPC-1 cells
3. 7. The effects of PCM on the expressions of focal adhesion biomarkers
in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells
3. 8. The effects of PCM on the expressions of epithelial-mesenchymal
transition biomarkers in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells37
3.9. The effect of PCM on the cell cycle regulation in gemcitabine-resistant
AsPC-1 cells
3. 10. The effect of PCM on apoptosis in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

	3.11.	Antiprolif	eration ac	tivity of P	CM i	n patient-deri	ved p	ancreatic canc	er
		organoids	(PDPCO	s)					51
4	4. Disc	cussion							5
Part	II:	Antiproli	ferative	Activity	of	Krukovine	by	Regulating	of
Tran	smem	brane Pro	tein 139	(TMEM1	39) i	n Oxaliplatir	1-resi	stant Pancrea	atic
Canc	er Ce	lls							59
	1. Intr	oduction.							60
,	2. Mat	terials and	Methods	5					62
	2. 1.	Cell culture	es and rea	gents					62
	2. 2.]	MTT assay	(cell viat	oility assay)				62
	2. 3.	RNA prepa	aration, lib	orary prepa	ratio	n, and RNA-s	eq		62
	2. 4.	Kaplan–Me	eier Plotte	er analysis .					64
	2. 5.	Protein-Pro	otein Inter	action (PP)	I) net	work analysis	5		64
	2. 6.	Western bl	ot analysi	s					65
	2.7.	Wound hea	ling assay	y (cell mig	ratior	n assay)			65
	2. 8. 7	Transwell o	cell invasi	on assay					66
	2. 9.	Organoid n	nedium						66
	2.10	Organoid	viability a	assay					66
	2. 11.	Mutation	profile of	PDPCOs .			•••••		67
	2. 12.	Data anal	ysis				•••••		67
	3. Re	sults							69
	3. 1.	Krukovine	(KV) sho	ws an antij	prolif	erative effect	towa	rd KRAS-	
	1	mutated pa	ncreatic c	ancer cells				6	9

3. 2. Antiproliferative activity of KV in oxaliplatin-resistant pancreatic
cancer cells72
3. 3. RNA levels of KV-treated pancreatic cancer cell show major metabolic
pathway74
3. 4. The clinical significance of <i>TMEM139</i> expression in pancreatic cancer
patients77
3. 5. The effects of KV on the TMEM139 expression in oxaliplatin-resistant
AsPC-1 cells79
3. 6. The effects of KV on the TMEM139-associated signaling pathway in
oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells
3. 7. KV inhibits the PI3K-Akt-mTOR pathway in oxaliplatin-resistant
AsPC-1 cells
3. 8. KV inhibits migration and invasion in oxaliplatin-resistant AsPC-1
cells
3. 9. KV showed an antiproliferative effect toward KRAS-mutated patient-
derived pancreatic cancer organoids (PDPCOs)
3. 10. KV enhanced the anticancer effects of oxaliplatin in KRAS-mutated
PDPCOs97
4. Discussion
102

References103Abstract in Korean112Acknowledgement115

List of Figures

Figure 1.	The Kaplan-Meier survival curve according to the ACTN4
	expression level14
Figure 2.	The chemical structure of piceamycin16
Figure 3.	Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score21
Figure 4.	Top 20 terms of GO (Gene Ontology) functional analysis22
Figure 5.	The effect of PCM on ACTN4 mRNA expression23
Figure 6.	The effect of PCM on ACTN4 protein expression in
	gemcitabine-resistant AsPC-1 cells24
Figure 7.	Protein-Protein Interaction (PPI) for ACTN4 from the search
	tool (STRING) database
Figure 8.	The effect of PCM on mRNA expression of actin polymerization
	related genes27
Figure 9.	Normalized value (mRNA level) of ACTB and ACTG1 treated
	with PCM in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells
Figure 10.	Modified KEGG pathway of the genes related to actin
	polymerization signaling pathway
Figure 11.	The effect of PCM on the proteins related to actin polymerization
	(VCN and ACTB)
Figure 12.	Heatmap of mRNA expression related to the focal adhesion
	signaling pathway in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells34

Figure 13.	Modified KEGG pathway of the genes related to focal adhesion
	signaling pathway35
Figure 14.	The protein expressions of focal adhesion-related biomarkers
Figure 15.	The protein expression of epithelial-mesenchymal transition
	(EMT)-related biomarkers
Figure 16.	The effect of PCM on gemcitabine-resistant AsPC-1 cell
	migration
Figure 17.	The effect of PCM on gemcitabine-resistant AsPC-1 cell
	invasion
Figure 18.	PCM induced G ₀ /G ₁ cell cycle arrest in gemcitabine-resistant
	AsPC-1 cells
Figure 19.	Heatmap of the genes related to the cell cycle signaling pathway
Figure 20.	Normalized value (mRNA level) of CDK2, Cyclin E2, and
	Cyclin D1
Figure 21.	The effect of PCM on the cell cycle regulatory proteins in
	gemcitabine-resistant AsPC-1 cells45
Figure 22.	Induction of apoptosis by PCM in gemcitabine-resistant AsPC-
	1 cells
Figure 23.	The effect of PCM on caspase activity in gemcitabine-resistant
	AsPC-1 cells

Figure 24.	The effect of PCM on the expression of apoptotic biomarkers in
	gemcitabine-resistant AsPC-1 cells49
Figure 25.	The effect of PCM on colony formation in gemcitabine-resistant
	AsPC-1 cells
Figure 26.	Drug response (AUC) heatmap based on gemcitabine treatment
Figure 27.	Antiproliferative effect of PCM on PDPCOs53
Figure 28.	The level of cell apoptosis by flow cytometry
Figure 29.	The structure of krukovine (KV)70
Figure 30.	Cell viability assay of KV on KRAS-mutated pancreatic cancer
	cell lines71
Figure 31.	Antiproliferative effect of KV in oxaliplatin-resistant AsPC-1
	cells
Figure 32.	Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score75
Figure 33.	Top 19 terms of KEGG pathway76
Figure 34.	The Kaplan-Meier survival curve according to the TMEM139
	expression level78
Figure 35.	The effect of KV on TMEM139 protein expression in
	oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells81
Figure 36.	Protein-Protein Interaction (PPI) for TMEM13983
Figure 37.	The effects of KV on the TMEM139-associated signaling
	pathway in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells

Figure 38.	Protein-Protein Interaction (PPI) for PI3K-Akt and PI3K-Akt-
	mTOR signaling pathway
Figure 39.	The effects of KV on the PI3K-Akt-TOR signaling pathway in
	oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells
Figure 40.	The effect of PCM on oxaliplatin-resistant AsPC-1 cell
	migration
Figure 41.	The effect of PCM on oxaliplatin-resistant AsPC-1 cell invasion
Figure 42.	Top 20 terms of GO (Gene Ontology) functional analysis91
Figure 43.	KRAS mutation profile of PDPCOs93
Figure 44.	Multi-drug response heatmap on PDPCOs94
Figure 45.	Antiproliferative effect of KV on PDPCOs95
Figure 46.	KV inhibited the growth of the tested PDPCO (SNU-4340-TO)
	in a dose-dependent manner96
Figure 47.	Cell viability assay for combination effect of KV with oxaliplatin
Figure 48.	Combination effect of KV with oxaliplatin on the growth of
	multi-drug resistant PDPCO (SNU-4425-TO)99
Figure 49.	The effects of KV on the cleaved-PARP expression in multi-drug
	resistant organoid (SNU-4425-TO)100

List of Tables

Table 1. Antiproliferative activities of PCM against human pancreatic
cancer cell lines17
Table 2. Drug resistant profiles of AsPC-1 cells with resistance to
gemcitabine19
Table 3. Cell viability was measured after combined PCM and gemcitabine
treatment for 48h in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells
Table 4. TMEM family mRNA expression (fold change) and p-value in
oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells treated with KV80

Part I

Antiproliferative Activity of Piceamycin by Regulating Alpha- actinin-4 in Gemcitabineresistant Pancreatic Cancer Cells

Piceamycin의 젬시타빈 저항성 췌장암 세포에서 Alpha-actinin-4 조절을 통한 세포 생장 저해 효과

1. Introduction

췌장암은 조기 진단의 어려움과 빠른 병의 진행, 진단이 되더라도 적절한 치료 방법이 부족하며 치료에 대한 반응 역시 좋지 않아, 현재 널리 사용되는 gemcitabine 기반의 항암화학요법에도 반응률이 20% 내외로, 예후가 불량하며 평 균 5년 생존율이 10% 미만으로 암종별로 보았을 때 아래 그래프에서도 확인할 수 있듯이 가장 낮은 수준이다 (주요 암종 5년 생존률 추이, 국가 암정보센터).



* 중감: '93-'95년 대비 '11-'15년 암발생자의 생존율 차이

2021년 암 통계에 따르면 췌장암은 전체 암 사례의 약 8%를 차지하며 암 사 망의 다섯 번째로 집계된다 (Siegel et al., 2021). 췌장암은 환경, 생활 습관, 유전적 요인 및 의학적 상태를 포함한 여러 요인으로 인해 꾸준히 증가하고 있다 (Zhao and Liu, 2020; Park et al., 2021). 외과적 절제술은 초기 췌장암 치료에 가장 효과적 인 전략으로 간주되지만 (Park et al., 2021). 진행성 췌장암의 경우 고식적인 전신 화학 요법 외에는 적절한 치료 옵션이 없다. 젬시타빈과 납-파클리탁셀은 일반적 으로 1차 화학요법으로 사용되지만 (Siegel et al., 2021), 약물 내성의 빈번한 발달 은 질병의 공격적인 진행으로 이어진다 (Zhao and Liu, 2020). 따라서, 후천성 약물 내성 췌장암의 효율적인 치료를 위해 (종래의 세포독성제를 보완하기 위한) 신규 한 제제의 발견이 필요하다. Alpha-actinin-4 (ACTN4)는 액틴 결합 단백질의 family 로서, 마이크로 필라멘트 와 세포 연접부위 및 세포 전이단계를 조절한다고 알려져 있다 (Tentler et al., 2019). 여러 논문에서 ACTN4 가 암세포의 침습 및 전이를 촉진하는 전이 관련 유전자의 조절에 중추적인 역할을 한다고 보고하고 있다 (Tentler et al., 2019). 최근 연구에서는 ACTN4 억제가 항종양 활성을 강화할 수 있다고 보고하였다 (Gao et al., 2015; Watanabe et al., 2015; Wang et al., 2017; Tentler et al., 2019). 이러한 선상에서 ACTN4 신호 전달을 표적으로 하는 것은 췌장암에서 후천성 약물 내성을 극복하기 위한 하나의 유망한 접근 방식이 될 수 있다. 따라서 ACTN4 조절제를 사용한 ACTN4 신호 전달의 조절은 세포 독성 화학 요법에 반응하지 않는 췌장암 환자에게 도움이 될 수 있다.

천연물은 약물 발견 및 개발에 중요한 역할을 해왔다. 50% 이상의 항암제가 천연 물질에서 유래한 작은 분자 물질이다 (Lichota and Gwozdzinski, 2018). Piceamycin 은 *Bombyx mori* 라는 누에의 장에서 분리한 *Streptomyces* sp. SD53 strain(스트렙토미세스 속. SD53 스트레인)으로부터 생성된 마크로락탐계열의 단일 물질로 (Schulz et al., 2009; Yu and Sun, 2013; Shin et al., 2020), 이전 연구에 따르면 결장, 유방, 간, 및 폐를 포함한 여러 암세포주에 대해 항생 및 세포 독성 활성을 나타낸다고 알려져 있다 (Schulz et al., 2009; Yu and Sun, 2013; Shin et al., 2020). 그러나 췌장암 세포에서 piceamycin 의 항증식 활성 및 분자 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았다.

오가노이드는 인간의 장기를 모방한 3D 구조로서, 2D 세포 배양에 비해 인체 구조와 더 유사하다 (Nagle et al., 2018; Kim et al., 2020). 최근 장기의 특이적 세포를 포함하고, 장기가 지닌 특정 기능을 재현하며, 실제 장기와 유사한 형태로 공간적 조직화가 가능한 오가노이드 (organoid) 모델을 사용하는 것이 대두가 되고 있다. 현재 거의 모든 암 환자 조직 유래 오가노이드 (Patientderived Organoid, PDO)가 수립되었다. 이러한 오가노이드 모델은 여러 연구를 통해 다른 실험 모델과 비교하여 췌장암을 포함한 실제 종양의 유전적 발현 패턴과의 유사함, 독성 실험에서도 동물실험과 유사성 결과를 보여주는 등 약물 스크리닝에서 활용 가능성을 보여주었고, 정밀의학에 긍정적인 발판이 될

3

가능성을 보여주었다. 따라서 약물의 평가를 위하여 인간의 장기와 유사한 오가노이드를 활용하는 것은 약물을 평가하는데 유용한 접근이라고 볼 수 있다 (Nagle et al., 2018; Kondo and Inoue, 2019; Kim et al., 2020; Vivarelli et al., 2020; Liu et al., 2021).

본 연구에서는 젬시타빈 내성 췌장암 세포와 환자 유래 췌장암 오가노이드에서 천연물 유래의 순수 분리 물질인, piceamycin 의 항증식 활성과 분자 메커니즘을 확인하였다. 특히나 piceamycin 에 의해서 ACTN4 단백질의 조절이 췌장암 세포에서 후천성 젬시타빈 저항성을 극복에 연관이 있음을 밝혔다.

2. Materials and Methods

2. 1. Kaplan–Meier Plotter analysis

Kaplan-Meier Plotter (http://kmplot.com/analysis/) 분석은 췌장암 환자의 전체 생존율 (Overall Survival; OS) 및 무진행 생존율 (Relapse-Free Survival; RFS)을 평가하는 데 사용되었다. 95% 신뢰 구간 (CI)과 log rank *p*-value 를 사용한 위험비 (Hazard Ratio; HR)도 계산되었다.

2. 2. Cell culture and reagents

췌장암 세포 (AsPC-1, MiaPaCa-2, 및 Panc-1)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) 로부터 구입하였다. 세포들은 penicillin-streptomycin (10,000 units/mL sodium penicillin G, 10,000 µg/mL streptomycin) 와 10% FBS 가 들어간 미디어 (DMEM; Panc-1, MiaPaCa-2, RPMI; AsPC-1)에서 5% CO₂, 37°C, 수분이 유지되는 인큐베이터 환경에서 키웠다. 세포 배양에 사용된 모든 시약은 Gibco® Invitrogen Corp 에서 구입하였다 (Grand Island, NY, USA). Piceamycin (HPLC 분석에 의한 순도> 98%)은 *Bombyx mori* 라는 누에의 장에서 분리한 *Streptomyces* sp. SD53 strain (스트렙토마이세스 종. SD53 균주)으로부터 분리한 것이다. Stock 용액(1 mg/mL)을 멸균 PBS 에서 제조하고,-20°C 에서 보관하였다. 젬시타빈은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. MTT 분석에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터, AnnexinV/PI 염색 키트는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Caspase-Glo® 3/7 분석 키트는 Promega Corporation 에서 구입하였다 (Madison, Wisconsin, United States).

2. 3. Cell proliferation assay

체장암 세포 (2 × 10⁴ cells/mL)를 96 well plate 에 seeding 하고 밤새 배양하였다. 다음으로, 세포를 지시된 농도의 piceamycin 또는 젬시타빈으로 처리하고 지시된 시간 동안 5% CO₂, 37°C 의 가습 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 후, 세포에 MTT 를 넣고 37°C 에서 4 시간 동안 배양하였다 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.5 mg/mL). 상층 배지를 조심스럽게 제거하고, DMSO (200 μL)를 각각의 well 에 첨가하였다. 각 well 의 홉광도를 570nm 에서 측정하여 세포 생존율을 결정하는데 사용하였다. IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 을 사용하여 비선형 회귀 분석에 의해 계산되었다 (version 7.01; GraphPad Software, Inc.). 시험 약물의 조합 효과는 다음과 같이 조합 지수 (CI)의 방정식에 의해 계산되었다 (CI = D1/(Dx)1 + D2/(Dx)2, D1 및 D2 는 예상되는 효과를 달성하는 결합된 시험 약물의 농도이고 (Dx)1 및 (Dx)2 는 단일 농도 처리의 농도이다.). CI 값은 보고된 기준으로 Chou-Talalay 방법에 의해 결정되었다 (Chou, 2010).

2. 4. RNA-seq analysis

2. 4. 1 RNA preparation, library preparation, and RNA-Seq

RNA 는 각각 piceamycin (1.25 μM) 처리된 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포 및 piceamycin 으로 처리되지 않은 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포로부터 무작위로 선택된 각각 3 개의 well 로부터 수집하였다. 총 RNA 는 제조자의 지시에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen Life Technologies, NY, USA)을 사용하여 추출하였다. 모든 RNA 농도는 Quant-IT RiboGree 의해 계산되었다 (Invitrogen, #R11490). 전체 RNA 의 무결성을 평가하기 위해 샘플은 TapeStation RNA 스크리닝 테이프를 실행하였다 (#5067-5576, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RIN 이 7.0 보다 큰 고품질 RNA 만 RNA 라이브러리 구축에 사용되었다.

라이브러리를 Illumina TruSeq Stranded mRNA 샘플 전처리 키트에 의해 각 샘플에 대해 1µg 의 total RNA 로 독립적으로 제조하였다 (#RS-122-2101, Illumina, Inc., San Diego, CA, USA,). 첫번째 단계는 poly-T-부착 마그네틱 비드를 사용하여 mRNA

6

분자를 포함하는 poly-A 를 정제하고, 정제 후, mRNA 는 고온 하에서 2 가 양이온을 사용하여 작은 조각으로 단편화 하였다. 절단된 RNA 단편은 SuperScript II 역전사효소와 random primers 를 사용하여 첫번째 가닥 cDNA 로 복사되었다 (#18064014, Invitrogen Life Technologies, NY, USA). 이어서 DNA 중합효소 I, RNase H 및 dUTP 를 사용한 제 2 가닥 cDNA 합성을 진행한다. 이러한 cDNA 단편은 최종 복구 과정, 단일 'A'염기 추가 및 어댑터 과정을 거친 다음 생성물을 PCR 로 정제하고 농축하여 최종 cDNA 라이브러리를 생성한다. 라이브러리는 qPCR 정량 프로토콜 가이드 (#KK4854, KAPA BIOSYSTEMS, Basel, Switzerland)에 따라 Illumina seq 플랫폼용 KAPA 라이브러리 정량화 키트를 사용하여 정량화되었으며, TapeStation D1000 ScreenTape 를 사용하여 검증되었다 (, # 5067-5582, Agilent Technologies). 다음 색인화된 라이브러리를 Illumina NovaSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)에 제출하고, Macrogen Incorporated 에서 페어링 말단 (2×100 bp) 시퀀싱을 수행하였다.

2.4.2 Data processing

라이브러리 준비는 Illumina TruSeq Stranded mRNA LT 샘플 전처리 키트에 의해 수행하였다. Illumina 장비에서 생성된 쌍단 시퀸싱 판독값 (101 bp)을 FastQC 로 서열 품질을 검증하였다 (version 0.11.7). 분석을 시작하기 전에 Trimmomatic (버전 0.38) (Bolger et al., 2014)을 사용하여 어댑터 시퀸스를 제거하고 최종 read 에서 기본 품질이 3 보다 낮은 베이스를 제거하였다. 또한 슬라이딩 윈도우 트림 방법을 사용하면 창 크기 =4 및 평균 품질 = 15 에 해당하지 않는 베이스가 제거된다. 그런 다음 최소 길이가 36 bp 인 판독 값을 제거하여 정리된 데이터를 생성한다.

2. 4. 3 Aligning reads to homo sapiens reference genome

정리된 판독 값은 HISAT v2.1.0 (Kim et al., 2015)을 사용하여 호모 사피엔스 (GRCh38)에 정렬되었다. 전사체 어셈블리는 정렬된 판독과 함께 StringTie v2.1.3b (Pertea, Mihaela, et al., 2015, 2016)에 의한 참조 유전자 주석에 기초하여 수행된다.

판독 횟수로 정량화되고 FPKM (매핑된 100 만 개의 단편의 엑손의 킬로베이스당 단편) 및 TPM (매핑된 백만 개의 판독당 전사체의 킬로베이스당 전사체)과 같은 정규화된 값을 사용하는 유전자/전사체 수준 발현 프로파일링은 전사체 길이 및 적용 범위를 고려한 발현 수준에 대한 정규화된 메트릭이다.

2. 4. 4 Differentially Expressed Genes (DEG) analysis

HISAT-StringTie 파이프라인에 의해 정량화된 발현 프로필은 비교 가능한 샘플 간에 차등적으로 발현된 유전자를 분석하는 데 사용된다. 데이터 전처리 단계에서, 샘플에서 0 이 된 판독 카운트 값이 하나 이상인 유전자는 제외되었다. 편향 없이 샘플을 쉽게 비교할 수 있도록 판독 카운트 데이터로부터 크기 인자 및 유전자별 변이를 추정하고, 판독 카운트 데이터를 DESeq2 R 라이브러리에서 상대 로그 발현 (RLE) 방법으로 정규화 하였다. 차등 발현 데이터의 통계적 유의성은 정규화된 카운트와 함께 DESeq2 nbinomWaldTest (Love. et al., 2014) 를 사용하여 결정하였다. False Discovery Rate (FDR)은 Benjamini-Hochberg algorithm 을 사용하여 *p*-값을 조정함으로써 제어되었다. 상이한 발현 유전자에 대해 fold change 는 |fold change| ≥2 및 raw *p* 에 만족한다.

2. 5. Protein-Protein Interaction (PPI) network analysis

PPI 네트워크 분석 (Wimalagunasekara et al., 2022)은 알려진 PPI 와 예측된 PPI 를 모두 통합하는 상호작용 유전자 (STRING) (https://string-db.org) 데이터 베이스를 검색하기 위한 검색 도구로, 단백질의 기능적 상호작용을 예측하는 데 적용할 수 있다. 상이한 조건에 따른 DEG 간의 잠재적 상호작용을 찾기 위해, STRING 도구가 사용되었다.

2. 6. Western blot analysis

세포의 단백질 추출물은 5× sample loading buffer [250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol (80%, v/v), 8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2% β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, 100 mM Dithiothreitol (1M)]에 준비되었다. 샘플의 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 정량하였다 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 동일한 양의 단백질 (20-30 µg)을 6-13% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 전기영동 하였고, polyvinylidene fluoride membranes (PVDF 멤브레인)으로 옮긴 후에 (Millipore, Bedford, MA, USA), 5% bovine serum albumin (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 블락킹하고, 세번 워싱 후, 다음의 일차 antibody 를 붙였다; Anti-ACTN-4, anti-α-tubulin, anti-β-Actin, anti-vinculin, anti-FAK, anti-Rac, anti-Slug, anti-Snail, anti-CDK2, anti-CDK4, anti-cyclin E, anti-cyclin D, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-cleavedcaspase 3, anti-caspase 3, anti-MMP2, 및 anti-cytochrome c 등의 antibody 는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. anti-N-cadherin 은 BD Biosciences (San Jose, CA, USA) 로부터 구입하였다. 각기 일차 antibody 는 4°C 에서 오버나잇하여 붙였다.3 번 워싱한 이후에 과산화효소가 부착된 2 차 antibody 를 실온에서 4 시간 붙인 후, 증강 화학발광법 (ECL) (Thermo Fisher, USA)을 사용하여 단백질 밴드를 확인하였다.

2. 7. Cell cycle analysis

세포 주기 분석은 유세포분석에 의해 측정되었다. 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포를 60 mm dish 에 5 × 10⁵ cell/dish 로 키우고, 최대 24 시간 동안 0, 1, 2 및 5 µM piceamycin 을 처리한 후 배양하였다. 모든 부착성 및 부유 세포를 트립신을 처리하여 수집하고 배지로 중화시킨 후, PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 2 회 세척하였다. 세포는 4 ℃ 에서 최소 30 분 동안 70% (v/v) 에탄올로 고정되었다. 다시 세포를 PBS 로 세척한 후, 실온에서 30 분 동안 50 µg/mL RNase A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함유하는 5 µL 의 PI (1 mg/mL)로 염색하였다. 형광 강도는 FACSCalibur 유세포분석기 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다. 각 분석에 대해 총 10,000 개의 세포를 계수하고, 세포 주기의 각 단계 (G₀/G₁, S, G₂ 및 M)에서의 세포 분포를 히스토그램으로 표시하였다.

2. 8. Caspase 3/7 activity assay

Caspase 3/7 활성 분석은 caspase 3/7 활성을 측정하는 균질 발광 분석이다. 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포를 10,000 cell/well 밀도로 96 well plate 에서 48 시간 동안 배양하고, 10 µM piceamycin을 처리하였다. 약물 음성 대조군 세포 또는 약물 처리된 세포를 포함하는 white wall 96 well plate 의 각 well 에 100 µl 의 Caspase-Glo® 3/7 시약을 첨가하고, 실온에서 30 분 내지 3 시간 동안 배양한다. 플레이트 판독 발광측정기에서 각 샘플의 발광을 측정한 후, 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

2. 9. Colony formation assay

젬시타빈 내성 AsPC-1 세포를 6 well plate (500 cell/well)에 심는다. 밤새 부착한 세포를 다양한 농도 (0, 1, 5 및 10 μM)의 piceamycin 으로 처리하고, 배지를 3 일마다 교체하였다. colony 형성이 보일 때, 배지는 제거되었다. colony 를 차가운 PBS 로 부드럽게 세척하고, 4% paraformaldehyde (PFA)에 15 분 동안 고정한 다음, 0.5% crystal violet (ddH₂O 중 0.5% methanol, 0.5% crystal violet 및 1% PFA)으로 30 분 동안 염색하였다. 여분의 crystal violet 을 증류수로 씻어 내고 건조시킨 후, colony 를 현미경 (inverted microscope; Olympus CKX41, Shibuya, Tokyo, Japan), 40x 배율로 사진을 찍었다. 각 실험은 삼반복으로 수행하였다.

2. 10. Annexin V-fluorescein isothiocyanate and PI double staining

Annexin V/PI 염색을 수행하여 전체 세포 집단에서 세포사멸의 %를 측정하였다. 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포를 각 well당 1×10⁵ 세포로 6-well plate 에서 12시간 이상 배양하였다. 세포를 부착시킨 다음, 48 시간 동안 piceamycin (PBS 에 희석된 0, 0.1, 1, 2, 5 및 10 µM piceamycin)으로 처리하였다. 처리 종료시에, 세포를 트립신을 사용하여 거두고, 배지로 중화시킨 다음, PBS 로 세척하고, 원심분리 후에 수집하였다. 세포 사멸 분석을 위해, 세포를 300-500 µl 의 아넥신 결합 완충액에 현탁시키고, 5 µL 의 PI (1 mg/mL) 및 5 µL 의 Annexin V fluorescein 염료로 처리하고, 15 분 동안 염색하였다. 이 단계는 어두운 곳과 실온에서 수행하였다. Single cell 을 얻기 위하여 필터처리 한 후에 BD FACSAriaIII 유세포분석기 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 의해 분석하였다. 세포사멸 세포의 백분율을 정량적으로 결정하였다. 각 실험은 삼반복으로 수행하였다.

2. 11. Wound healing assay (cell migration assay)

Scratch wound healing assay 를 통하여 세포의 이동을 분석하였다. 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포를 6 well plate (500 cell/well)에 seeding 하였다. 밤새 부착한 후 부착된 세포가 ~ 70% 면적에 도달한 후에 200 μL 멸균 피펫팁을 사용하여 세포층에 직선으로 wound 를 긁어내었다. 그 후, 각 well 을 배지로 2 회 부드럽게 세척하여 부유하는 세포를 제거하였다. 세포를 0, 1, 2 및 10 μM 의 piceamycin 으로 처리하고 RPMI (10% FBS)배지에서 배양하였다. 48 h 동안 배양 후, 세포를 1× PBS 로 2 회 세척하였고, 현미경 상에서 단층에 대한 사진을 촬영하였다. 세포 이동은 100× 배율의 도립 현미경으로 0 시간 및 48 시간에 측정되었다.

2. 12. Transwell cell invasion assay

24 well transwell membrane insert (직경: 6.5 mm, 기공 크기: 8 μm; Corning, Tewksbury, MA, USA)를 각각 10 μl 의 I 형 collagen (0.5 mg/mL, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)과 20 μl 의 Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)과 PBS 를 1:20 의 비율로)의 혼합물로 코팅하였다. 48 시간 동안 상이한 농도의 piceamycin (0, 1, 2 및 5 μM)으로 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에 처리한 후, 수확하고, 무혈청 배지에 현탁시키고, 메트리겔이

코팅된 Trasnwell 상부 챔버에서 도말 (2 × 10 ⁵ cell/chamber) 하였다. 30% FBS 를 함유하는 배지는 하부 chamber 에서 화학유인제로서 사용되었다. 48 시간 배양 후, 하부 chamber 의 외부 표면으로 이동한 세포를 고정하고, 0.5% crystal violet (ddH₂O 중 0.5% methanol, 0.5% crystal violet 및 1% PFA)으로 30 분 동안 염색하였다. 여분의 crystal violet 을 증류수로 씻어 내고 건조시킨 후, 표면으로 이동한 세포를 현미경 (inverted microscope; Olympus CKX41, Shibuya, Tokyo, Japan), 40x 배율로 사진 촬영하였다. 각 실험은 삼반복으로 수행하였다.

2. 13. Organoid culture medium and 3D culture viability assay

한국 세포주 은행에서 제공받아 37°, 5% CO₂/95 % 공기 중에서 배양한 환자 유래 췌장암 오가노이드 (PDPCO)는 Wnt-3A, R-spondin 1 및 m-Noggin 이 함유된 배지에 hEGF 50 ng/mL, hFGF10 100 ng/mL, nicotinamide 10 mM, 500 nM A83-01, 1× B27 supplement, N-acetylcysteine 1.25 mM 및 hGastrin 1 0.01 μM 을 50% + DMEM (FBS 10 % + 1 % penicillin/streptomycin) 50%(v/v)로 넣어서 만들었다. Wnt-3A, m-Noggin, 및 R-spondin 1 은 L-WRN (ATCC® CRL-3276TM) 세포주를 키운 상층액을 거두어 모은 뒤, 필터 후 배지로 사용하였다. PDPCOs 는 seeding 후 72 시간 키우고, 약물처리 72 시간 후 제조업체 지침에 따라 Cell Titer-Glo 3D 시약(Promega Corporation[®], Madison, Wisconsin, United States)에 의해 생존성을 평가하였다.

2. 14. Data analysis

모든 데이터는 3 개의 독립적인 실험으로부터의 평균 ± 표준편차로 계산하였다. 통계적 유의성 (*p <0.05, **p <0.01, 및 ***p <0.001)은 스튜던트 t-검정을 사용하여 평가하였다. IC₅₀ 추정은 GraphPad Prism (version 7.01; GraphPad Software, Inc.)을 사용하여 계산하였다.

3. Results

3. 1. The clinical significance of ACTN4 expression in patients with pancreatic cancer

ACTN4 는 많은 논문에서 여러가지 암의 진행과 전이에 관련이 있다고 밝혀져 있다 (Gao et al., 2015; Wang et al., 2017; Tentler et al., 2019; Huang et al., 2020). ACTN4 의 발현과 췌장암 환자 생존률과의 연관성을 확인하기 위해, 췌장암 환자에서 ACTN4 발현의 영향을 Kaplan-Meier 방법을 통하여 확인하였다 (전체 생존률(OS) 과 무진행 생존률 (RFS)). 그림 1 에서 나타난 바와 같이 췌장암 환자에서 ACTN4 의 높은 발현은 전체 생존률과 무진행 생존률 모두를 감소시키며, ACTN4 의 낮은 발현은 오히려 상대적으로 생존률을 높인다는 것을 확인할 수 있다. 이것은 ACTN4 가 췌장암 환자의 생존률에 부정적 영향을 나타낸다는 것을 보여주므로 췌장암에서 ACTN4를 하나의 치료 타겟으로 제시할 수 있다.

Pancreatic ductal adenocarcinoma



Overall Survival (OS)





Figure 1. The Kaplan-Meier survival curve according to the *ACTN4* expression level.

The Kaplan-Meier survival curve represents the overall survival (OS) and relapse-free survival

(RFS) of pancreatic cancer patient according to the ACTN4 expression level.

3. 2. Antiproliferative activity of piceamycin (PCM) in pancreatic cancer cells

Piceamycin 은 표 1 에서의 결과와 같이 실험에 사용된 모든 췌장암세포의 생장을 효과적으로 저해함을 확인할 수 있었다 (AsPC-1, Panc-1 및 MiaPaCa-2)(표 1).

점시타빈은 췌장암 환자의 치료를 위해 first line 치료법으로 널리 사용되는 약물이다. 그러므로 췌장암 환자에서 젬시타빈의 저항성이 있는 경우 대게 화학 요법이 실패로 연결된다 (Xu et al., 2018; Koltai et al., 2022). 따라서 젬시타빈 내성이 있는 세포에서의 piceamycin 에 대한 효과를 연구하기 위하여 먼저 실험 환경에서 췌장암 세포에서의 젬시타빈 감수성이 있는지 확인하는 것을 진행하였다 (Hu et al., 2012). AsPC-1 세포가 실험에 사용된 췌장암세포들 중에서 가장 젬시타빈에 저항성이 있으므로 (참고 문헌), AsPC-1 세포를 가지고 piceamycin (그림 2)의 생장 저해 효과와 *ACTN4* 관련 신호 전달을 조절하는 것에 대한 심화연구를 진행하였다.



Figure 2. The chemical structure of piceamycin.

Table 1. Antiproliferative activities of piceamycin against human pancreatic

cancer cell lines.

Cell line	IC ₅₀ (µM)
AsPC-1	2.08
MiaPaCa-2	1.13
Panc-1	1.20

Results are expressed as the calculated half maximal inhibitory concentration (IC $_{50}$)

of piceamycin (µM) treated for 48h.

3. 3. The effects of piceamycin on gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells

Piceamycin 의 젬시타빈 내성 췌장암 세포에서의 영향을 확인하기 위해 AsPC-1 에 gemcitabine 을 처리하였을 때, 100 μM 이상의 고농도에서도 살아남는 세포를 가지고 실험을 진행하였다. 이 젬시타빈 내성의 AsPC-1 세포는 세포를 50 % 사멸시키는 농도가 원 AsPC-1 세포 보다 30 배 이상 높은 것으로 확인할 수 있었다 (표 2). 그러나 Piceamycin 에 대한 약물 반응도는 원 AsPC-1 세포와 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포 모두에서 비슷한 수준을 보임을 확인할 수 있다 (표 2). 이 데이터들을 종합해 볼 때 Piceamycin 이 췌장암 세포에서 젬시타빈 내성을 극복할 수 있는 기전이 있을 것으로 예상할 수 있다.

IC ₅₀ ^a (µM) AsPC-1		Gemcitabine- resistant AsPC-1	Fold difference ^b
Piceamycin	2.08	1.37	0.66
Gemcitabine	3.23	>100	>30

 Table 2. Drug resistant profiles of AsPC-1 cells with resistance to gemcitabine.

^a Results are expressed as the calculated half maximal inhibitory concentration (IC50) of piceamycin (μ M) and Gemcitabine (μ M).

^b The fold difference was calculated as the ratio of IC50 values between gemcitabine-resistant AsPC-1 and parent AsPC-1 cells.

3. 4. The effects of Piceamycin on the ACTN4 expression in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

점시타빈 내성의 췌장암세포에서 piceamycin 의 세포 생장 저해 효과가 어떤 유전자 산물과 연관이 있는지 확인하기 위하여 점시타빈 내성 AsPC-1 세포에 piceamycin 을 IC₅₀ 에 해당하는 농도 (1.25 μM)를 처리하고, 48 시간 이후에 샘플링을 하여 RNA 시퀀싱을 하고, 결과 데이터를 분석하였다. Piceamycin 처리시 무처리군과 대비하여 차이가 나는 pathway 및 유전자를 확인할 수 있었다 (그림 3 과 그림 4), 특히 Biological Process (BP), Molecular Function (MF) 및 Cellular Component (CC)에서 actin polymerization, focal adhesion 및 epithelial mesenchymal transition (EMT) 관련된 유전자들이 piceamycin 을 처리하였을 때 무처리군 (control 군) 보다도 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다 (그림 3 과 4). 그 중에서 piceamycin 을 처리시 *ACTN4* 유전자의 전사산물 및 단백질이 변화하는지 확인하기 위하여, RNA 시퀸싱 뿐만 아니라, 단백질의 발현 또한 웨스턴 블랏 실험을 통해 확인하였다. 그림 5 와 6에서 확인할 수 있듯이 piceamycin 은 점시타빈 내성 췌장암세포에서 *ACTN4* 의 mRNA 와 단백질의 발현 양을 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5; 히트맵 (heatmap) 과 전사체 발현 양 비교 그래프, 그림 6; 웨스턴 블랏).

20


Figure 3. Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score.

RNA-sequencing data (gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with piceamycin (1.25 μ M) for 48h. Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score (-2 \leq z \leq 2) for normalized value (log₂ based) (4,347 genes satisfying with fc 2 & raw. *p*)

(*GO functional analysis: BP; Biological Function, CC; Cellular Component, MF; Molecular Function) All data represent at least three independent experiments.



Figure 4. Top 20 terms of GO (Gene Ontology) functional analysis.

RNA-seq assay was performed in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells treated with piceamycin (1.25 μ M) compared with control (PBS with DMSO-treated). The dot color represents the *p*-values. The scale of the spots indicates the number of genes involved.



Figure 5. Effect of PCM on ACTN4 mRNA expression.

RNA-seq assay was performed in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells treated with piceamycin (1.25 μ M) compared with control (PBS with DMSO-treated). (A) Heatmap shows *ACTN4* mRNA expression according to z-score (-2 \leq z \leq 2). The color represents z-score (yellow; positive score; upregulation, blue; negative score; downregulation). (B) Normalized value of *ACTN4* mRNA expression from RNA-seq analysis. Data are presented as mean \pm SD (n=3).

23



Figure 6. Effect of PCM on ACTN4 protein expression in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with the indicated concentrations of piceamycin for 48 h, and the protein expression level of ACTN4 was determined by western blotting. α -Tubulin was used as an internal control.

3. 5. Piceamycin suppressed actin polymerization signaling pathway in gemcitabineresistant AsPC-1 cells.

ACTN4 와 인접하게 상호작용하는 단백질들을 확인하기 위하여 온라인 데이터 베이스 기반의 STRING 을 통해 연관된 단백질을 확인하고, mRNA 시퀀싱을 통해 얻어진 heatmap 그리고 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 를 통해 ACTN4 가 액틴 중합 (actin polymerization) 신호전달경로와 관련이 있음을 확인하였다 (그림 7; Protein-Protein Interaction, 그림 8; heatmap of actin polymerization, 그림 9; normalized mRNA level, 그림 10; modified KEGG pathway).

또한 젬시타빈 내성 췌장암 세포에서 piceamycin 을 처리하였을 때 ACTN4 관련 생체분자들의 전사체 발현 정도를 그림 9 에서와 같이 확인하였다. 그림 8 과 9 에서처럼 piceamycin 을 젬시타빈 내성 췌장암 세포에 처리하였을 때 piceamycin 무처리군보다 alpha-actinin-4 (ACTN4), actin beta (ACTB), actin gammal (ACTG1) 및 viniculin (VCN) 등이 더 적게 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8과 9; heatmap, heatmap z-score, and normalized value of mRNA). 전사체의 발현정도 뿐만 아니라, 단백체의 발현 정도도 piceamycin 의 농도가 증가함에 따라 감소한다는 것을 웨스턴 블랏을 통해 확인할 수 있었다 (그림 6 과 그림 11). 이 모든 데이터들을 종합해 볼 때 piceamycin 의 생장 저해 효과가 젬시타빈 내성 췌장암 세포에서의 ACTN4 (alpha actinin-4) - VCN (vinculin) - ACTB (actinin-beta) - F-actin 선상의 액틴 중합 (actin polymerization)의 저해와 연관이 있음을 확인할 수 있다 (그림 10 와 11).

25



Figure 7. Protein-Protein Interaction (PPI) for ACTN4 from the search tool (STRING) database.

(A) Interacting proteins for VCN (Vinculin) Gene: ACTN4 (Actinin alpha 4) - VCL (Vinculin)
ACTN (Actin) (B) Interacting proteins for ACTB (Actin beta) Gene: ACTB (Actin beta)ACTG1 (Actin gamma1) (C) Interacting proteins for ACTN4 (Actinin alpha 4) Gene: ACTN4
VCL (Vinculin)

26



В

РСМ			CON	
AVE	STD		AVE	STD
-0.978	0.112343	ACTG1	0.978	0.339731
-0.99763	0.01002	ACTB	0.997567	0.110405
-0.958	0.024576	Vinculin	0.958	0.492232
-0.94433	0.182856	ACTN4	0.944333	0.536353

Z-score of actin polymerization

Figure 8. Effect of PCM on mRNA expression of actin polymerization related genes.

(A) The heatmap was visualized from the RNA-seq data (according to z-score of actin polymerization related genes) and (B) displayed on the bottom column (z-score; $-2 \le z \le 2$, AVE; average of z-score, STD; standard deviation of z-score, n=3).



Figure 9. Normalized value (mRNA level) of ACTB and ACTG1.

Normalized value of *ACTB* and *ACTG1* mRNA expression from RNA-seq analysis treated with piceamycin (1.25 μ M) versus control (PBS with DMSO-treated) in gencitabine-resistant AsPC-1 cells. Data are presented as mean \pm SD (n=3).



Figure 10. Modified KEGG pathway of the genes related to actin polymerization signaling pathway.

Modified KEGG pathway from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Modified KEGG pathway treated with piceamycin (1.25 μ M) for 48 h compared with control (PBS with DMSO-treated) in gencitabine-resistant AsPC-1 cells. The box colors of modified KEGG pathway represent fold change.



Figure 11. Effect of Piceamycin (PCM) on the proteins related to actin polymerization (VCN and ACTB)

The protein expression related to actin polymerization biomarkers were analyzed by western blotting. Piceamycin was treated on the gemcitabine-resistant AsPC-1 cells with indicated concentrations. α -tubulin was used as an internal control.

3. 6. The combination of gemcitabine and Piceamycin is effective in the gemcitabineresistant AsPC-1 cells.

점시타빈 내성 췌장암 세포에서 piceamycin 을 처리함으로써 점시타빈에 대한 약물 반응도를 회복할 수 있는지 확인하기 위해서, 각기 다양한 농도의 piceamycin 과 점시타빈을 병합하여 점시타빈 내성 췌장암 세포에 48 시간동안 처리하였고, 세포 독성 (MTT) 실험과 병합효과에 대한 평가 (CI; Chou-Talalay method; Chou, 2010)를 통하여 점시타빈과 piceamycin 을 병합하였을 때 각 약물을 사용할 때 보다 세포 생장 저해 효과가 더 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (표 3). 이를 통해, 점시타빈 저항성의 췌장암 세포에서 점시타빈과 piceamycin 의 병합요법이 효과적이라는 것을 확인할 수 있다.

Concentration (µM)		Combination index (CL values)	
Gemcitabine	Combination index (Crivalues)		
12.5	0.53138804	Synergism	
25	0.54395158	Synergism	
50	1.093662394	Nearly additive	
100	2.283837682	Antagonism	
	tion (µM) Gemcitabine 12.5 25 50 100	tion (μM) Gemcitabine 12.5 25 50 1.093662394 100 2.283837682	

Table 3. The effect of drug combination on gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

Combination index: antagonism (CI >1), additivity (CI=1) and synergism (CI<1).

Cell viability was measured after combined piceamycin and gemcitabine treatment for 48 h in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

Based on cell viability results, CI values were calculated to demonstrate the effect of drug combination on gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

3. 7. The effects of Piceamycin on the expressions of focal adhesion biomarkers in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

ACTN4 유전자가 암의 전이에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있기 때문에 (Honda, 2015), 젭시타빈 저항성 췌장암 세포에서 piceamycin 을 처리시 ACTN4 의 발현이 감소됨과 동시에 focal adhesion 과 상피 간엽 이행 (EMT) 관련 바이오 마커가 어떻게 변화하는지 확인하였다. 젭시타빈 내성 췌장암 세포에 piceamycin 을 처리시 focal adhesion 과 관련된 유전자 (ACTN4, VCN, ACTB, ACTG, 및 Rac)의 전사체 발현이 감소됨을 확인할 수 있다 (그림 12; heatmap 과 heatmap z-score). KEGG pathway 에서 확인하고자 하는 유전자들 만을 모아서 modified KEGG pathway 를 만들었고, 이 KEGG pathway 에서도 역시나 동일한 focal adhesion 관련 유전자의 발현이 감소된다는 결과를 확인할 수 있었다 (그림 13). 전사체의 발현 감소가 단백질의 발현감소에까지 영향을 미치는지 확인하기 위하여 젭시타빈 내성 췌장암 세포에 piceamycin 을 농도별로 처리하여 웨스턴 블랏을 통해 focal adhesion (ACTN4, VCN, FAK, Rac1, ACTB) 관련 단백질의 발현을 확인하였고 동일한 경향을 확인할 수 있었다 (그림 6, 11, 14).



в

РСМ			CON	
AVE	STD		AVE	STD
-0.978	0.112343	ACTG1	0.978	0.339731
-0.96643	0.401919	RAC2	0.966933	0.171905
-0.98673	0.217934	RAC3	0.986633	0.171179
-0.99763	0.01002	ACTB	0.997567	0.110405
-0.958	0.024576	Vinculin	0.958	0.492232
-0.94433	0.182856	ACTN4	0.944333	0.536353

Z-score of focal adhesion

Figure 12. Heatmap of mRNA expression related to the focal adhesion signaling pathway in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with piceamycin (1.25 μ M) versus control (PBS with DMSO-treated) for 48 h. (A) The heatmap color represents mRNA level using z-score (yellow; positive score; upregulation, blue; negative score; downregulation) and (B) displayed on the bottom column (z-score; $-2 \le z \le 2$, AVE; average of z-score, STD; standard deviation of z-score, n=3).



Figure 13. Modified KEGG pathway of the genes related to focal adhesion signaling pathway from RNA-sequencing data.

Modified KEGG pathway from Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Modified KEGG pathway treated with piceamycin (1.25 μ M) for 48 h compared with control (PBS with DMSO-treated) in gencitabine-resistant AsPC-1 cells. The box colors of modified KEGG pathway represent fold change.



Figure 14. The protein expressions of focal adhesion-related biomarkers (FAK and Rac).

The protein expressions were analyzed by western blotting in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. Piceamycin was treated in the gemcitabine-resistant AsPC-1 cells with indicated concentrations. α -tubulin was used as an internal control.

3. 8. The effects of Piceamycin on the expressions of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

Piceamycin 이 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서 mesenchymal 바이오 마커들을 (Ncadherin, Slug, Snail) 감소시키는 것 또한 확인할 수 있었다 (그림 15). piceamycin 의 젬시타빈 내성 암세포 전이에의 영향을 연구하기 위하여 세포이동 (wound healing)과 침윤 (transwell) 실험을 진행하였다. piceamycin 은 그림 16 과 17 에서 보이는 바와 같이 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포의 이동과 침윤을 통계적으로 유의미하게 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있다. 이 모든 것을 고려할 때, piceamycin 은 젬시타빈 저항성 AsPC-1 세포에서 focal adhesion 과 EMT 바이오 마커를 조절함으로써, 세포의 침윤과 이동을 억제하는 효과를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있다.



Figure 15. The protein expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related biomarkers

The protein expressions (N-cadherin, Slug, and Snail) were analyzed by western blotting in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. Piceamycin was treated on the gemcitabine-resistant AsPC-1 cells with indicated concentrations. α -tubulin was used as an internal control.



Figure 16. The effect of piceamycin on gemcitabine-resistant AsPC-1 cells migration

Monolayers of gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were scratched mechanically and treated with piceamycin (PCM; indicated concentrations) for 48 h. Representative images of wound closure obtained under a light microscope. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, **p < 0.01).



Figure 17. The effect of Piceamycin (PCM) on gemcitabine-resistant AsPC-1 cell invasion.

Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were pretreated with indicated concentrations of piceamycin for 24 h, reseeded into the upper chamber of transwell inserts, and incubated for 24 h. The cells that invaded to lower chambers were than fixed, stained, imaged, and counted. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05).

3. 9. The effect of piceamycin on the cell cycle regulation in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

Piceamycin 의 세포생장 저해 효과가 세포주기 조절과 연관이 있는지 확인하기 위하여, 젬시타빈 내성 AsPC-1 에 24 시간 동안 piceamycin 을 처리한 후 세포주기 분포를 확인하는 flow cytometry 실험을 진행하였다. 그림 18 에서 확인할 수 있듯이, G₀/G₁ 의 분포가 58.3 % (piceamycin 무처리군)에서 74.4 % (1 μM, piceamycin 처리군) 증가하는 것을 확인할 수 있다. RNA 시퀸싱을 통하여 얻어낸 데이터를 바탕으로 세포주기 관련 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인한 히트맵을 통해서도 piceamycin 을 처리한 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서 G₀/G₁ 단계의 mRNA 발현이 (*cyclin E, cyclin A, cyclin D, CDK2*) 무처리군에서보다 증가함을 확인할 수 있다 (그림 19; heatmap analysis 와 z-score of cell cycle related genes, 그림 20; normalized value of mRNA). 또한 전사체에서 보이는 경향이 단백질 발현에서도 나타나는지 확인하기 위해서 웨스턴을 진행하였고 동일한 경향을 확인할 수 있었다 (그림 21; western blot analysis). 이 결과들은 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서 piceamycin 의 세포 생장 저해가 G₀/G₁단계의 arrest 와도 관련이 있음을 시사해 주고 있다.



Figure 18. Piceamycin induced G_0/G_1 cell cycle arrest in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were stained with PI, and cell cycle arrest was detected by flow cytometry. Treatment with piceamycin (at 0, 1, 2, and 5 μ M) for 24 h. All data are presented

as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).



В

PCM			CON	
AVE	STD		AVE	STD
-1.03066667	0.198505	CCNA2 (Cyclin A2)	0.991333	0.172062
-0.99533333	0.147548	CDK2	0.995333	0.057839
-0.992	0.154561	CCNE2 (Cyclin E2)	0.992333	0.142423
-0.6623	0.5286	CCND1 (Cyclin D1)	0.9893	0.07544

Z-score of cell cycle related genes

Figure 19. Heatmap of the genes related to the cell cycle signaling pathway.

Z-score comes from RNA-sequencing data treated with piceamycin (1.25 μ M) for 48 h in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. (A) The color represents z-score (yellow; positive score; upregulation, blue; negative score; downregulation). (B) The bottom column indicates z-score (- $2 \le z \le 2$) related with cell cycle signaling pathway.



Figure 20. Normalized value (mRNA level) of CDK2, Cyclin E2, and Cyclin D1

Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with piceamycin (1.25 μ M) versus control (PBS with DMSO-treated). Data are presented as mean \pm SD (n=3).



Figure 21. The effect of piceamycin on the cell cycle regulatory proteins

The effect of piceamycin on the G_0/G_1 phase cell cycle arrest was confirmed by observing the cell cycle regulatory proteins by western blotting. Piceamycin was treated with indicated concentrations in the gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. α -tubulin was used as an internal control.

3. 10. The effect of Piceamycin on apoptosis in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

최근에 ACTN4 와 관련된 세포 신호전달이 암세포의 사멸을 조절하는 것과도 연관이 있다는 연구결과들이 발표되고 있다 (Lomert et al., 2018; Zhao et al., 2019). 이에 따라서 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서도 piceamycin 을 처리시 ACTN4 의 발현이 저해됨과 동시에 세포사멸을 유도하는지 확인하기 위한 실험을 flow cytometry (Annexin V-FITC 와 propidium iodide (PI) 염색)를 통하여 진행하였다. 그 결과 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에 piceamycin (10 μM)을 처리시 세포사멸을 35.5 % 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 22). 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서의 piceamycin 에 의한 세포사멸의 분자 생물학적 기전을 살펴보기 위하여 piceamycin 처리 시의 caspase 활성도와 세포사멸 관련 단백질을 각각 caspasse 3/7 어세이와 웨스턴 블랏을 통하여 확인하였다. 그림 23 에서 piceamycin (10 μM)을 처리시 컨트롤에 대비하여 caspase-3 와 caspase-7 의 활성이 증가함을 확인할 수 있었고 웨스턴을 통하여도 caspase-3 의 활성화된 형태인 cleaved caspase-3 가 piceamycin 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 세포 생존과 관련 있는 단백질인 Bcl-2 단백질의 발현이 piceamycin 농도가 증가함에 따라 감소하고 MMP2 단백질도 발현이 감소하지만 세포 사멸과 관련 있는 Bax 단백질은 그 발현이 piceamycin 농도가 증가함에 따라 같이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 뿐만 아니라, cytochrome c 또한 발현이 증대되었다, 이를 통하여 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서 piceamycin 이 미토콘드리아 세포사멸을 일으키는 것을 확인할 수 있다 (그림 24). 이 모든 것을 종합해 볼 때, 젬시타빈 내성 AsPC-1 세포에서 piceamycin 을 48 시간 처리하였을 때 cleaved-caspase 와 Bax 의 발현을 증대시키고 Bcl-2 발현을 감소시킴으로써 세포 사멸을 일으킴을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 현상을 Colony 형성 실험을 통하여 piceamycin 처리시 colony 가 현저히 감소하는 것을 통하여도 확인할 수 있었다 (Figure 25).

46



Figure 22. Induction of apoptosis by piceamycin in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells

(A) Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with piceamycin at different concentrations (0.1, 1, 2, 5, and 10 μ M) for 48 h. Cell apoptosis was measured by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining. Representative images of Annexin V-FITC/PI staining. (B) Statistical analysis of the cell apoptosis rate at 48 h. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, **p < 0.01).





Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells (80% confluent) were treated with piceamycin (10 μ M) for 48h and treated with caspase 3/7 reagents. The enzymatic activity of PCM-treated AsPC-1 cells were evaluated. All data are presented as mean \pm SD (n=3, **p < 0.01).





The cells were treated with piceamycin versus control (PBS with DMSO-treated) for 48 h and the expression level of the mitochondrial apoptosis regulatory proteins were detected by western blotting. α -tubulin was used as an internal control.



Figure 25. The effect of piceamycin (PCM) on colony formation in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells.

Gemcitabine-resistant AsPC-1 cells were treated with various concentrations of piceamycin (1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M). When colony formation was visible, the medium was removed, stained, and imaged. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05).

3. 11. Antiproliferation activity of piceamycin in patient-derived pancreatic cancer organoids

췌장암 환자 유래 오가노이드는 서울대병원의 췌담도 내과에서 초음파 내시경 세침 흡입술로 획득된 환자 검체로부터 확립하였고 (Lee et al., 2021), 이 연구는 서울대학교 세포주 은행과 협업을 통해 진행되었다. 생체를 모사한 3D 모델에서의 piceamycin 의 효과를 확인하기 위하여, 췌장암 환자 유래 오가노이드에서 piceamycin 의 효과를 확인하는 실험을 진행하였다. 첫번째로, 췌장암 환자 유래의 오가노이드에서의 젬시타빈의 반응성을 조사하였고, 그림 6A 의 그림에서 SNU-4340-TO 가 테스트한 오가노이드들 중에서 가장 젬시타빈에 저항성이 있다는 것을 (젬시타빈에 대한 약물반응 AUC 를 통하여) 확인할 수 있었다 (AUC; area under curve, 붉은색; 저항성이 있음, 파란색; 약물에 민감함) (그림 26). Piceamycin 은 모든 테스트한 오가노이드에서 농도가 증가함에 따라 그 생장을 저해시키는 효과를 보여주었다 (그림 27). 더구나, 사전 실험에서 젬시타빈에 가장 저항성이 있는, 그래서 젬시타빈에 거의 반응하지 않는 오가노이드였던 SNU-4340-TO 도 piceamycin 을 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 그 생장이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 flow cytometry 를 통하여도 확인할 수 있다. Piceamycin 처리시 Annexin V-positive 와 PI-positive 한 셀의 수가 증가함을 그림 28 에서 확인할 수 있다. 이 결과들은 piceamycin 이 젬시타빈 저항성이 있는 췌장암 환자 유래의 오가노이드에서도 그 세포 성장을 효과적으로 억제시킬 수 있다는 것을 보여준다.



Figure 26. Drug response (AUC) heatmap based on gemcitabine treatment.

PDPCOs (SNU-4206, SNU-4305-TO, SNU-4425-TO, and SNU-4340-TO) treated with gemcitabine (0.01 μ M – 100 μ M) for 72h and the response sensitivity was measured using cell-titer glow, 3D reagent. Drug response heatmap (red; resistant, blue; sensitive)



Figure 27. Antiproliferative effect of piceamycin on PDPCOs.

PDPCOs (SNU-4206, SNU-4305-TO, SNU-4425-TO, and SNU-4340-TO) were treated with various concentrations of piceamycin and detected by 3D cell titer-glow assay after 72 h. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, **p < 0.01).



Figure 28. The level of cell apoptosis by flow cytometry.

The level of cell apoptosis was determined by flow cytometry using Annexin V-FITC/ propidium iodide (PI) staining in PDPCO (SNU-4340-TO).

4. Discussion

췌장암은 가장 다루기 힘든 암중의 하나로 분류되고 있다 (Park et al., 2021). 최근의 췌장암 치료법이 발전되고 있음에도 불구하고, 췌장암 환자의 생존률은 아직까지 매우 낮다 (Zhao and Liu, 2020; Park et al., 2021). 그 주된 이유는 암의 초기진단에 한계가 있고 따라서 수술가능한 환자가 거의 존재하지 않기 때문이다.

점시타빈은 암세포의 DNA 합성을 방해하는 약물로 수술 불가능한 진행성 혹은 전이가 있는 췌장암 환자를 위한 표준 first-line chemotherapy 로 널리 사용된다 (Pereira and Corrêa, 2018). 그러나 젬시타빈에 오랜 사용은 결국에는 췌장암환자에서 젬시타빈 저항성을 보이게 한다. 그러므로 젬시타빈 저항성이 있는 췌장암 환자에서 그 저항성을 극복할 수 있는 약물 및 기전을 발견하는 것은 췌장암환자의 치료를 위하여 매우 중요한 일이라고 할 수 있다.

이 연구에서는 췌장암 셀라인 (AsPC-1)에 젬시타빈을 처리하여 젬시타빈에 대한 IC50 가 기존보다 30 배이상 저항성이 있는 AsPC-1 세포에서 젬시타빈 저항성을 극복할 수 있는 약물 및 기전에 대한 연구를 진행하였다. 젬시타빈 저항성이 있는 췌장암 세포에 piceamycin 을 처리하였을 때 그 효과를 확인하였으며, 특히나 젬시타빈 내성의 AsPC-1 세포에 piceamycin 을 처리하여 RNA 시퀀싱을 하였을 때, 세포의 이동에 관련된 유전자군이 piceamycin 무처리군에 대비하여 유의미한 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 actin polymerization 관련 유전자군의 mRNA 발현이 piceamycin 을 처리시 감소하는 것을 수 있었다. Actin 확인할 polymerization 관련 유전자 중에서 ACTN4의 mRNA의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 전사체의 발현뿐만 아니라, 웨스턴 블랏을 통하여도 단백체 또한 piceamycin 처리시 농도 의존적으로 그 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. ACTN4 유전자는 암의 전이 및 진행에 많은 관련이 있다고 알려져 있으므로 젬시타빈 저항성이 있는 췌장암세포에 chemical compound 를 처리함으로 ACTN4 를 조절하는 것이 젬시타빈의 저항성을 극복하는 하나의 효과적인 방법이 될 수 있을 것이라는 것을 시사한다.

55

Piceamycin (PCM)은 미생물 스트렙토미세스 속 균주들(*Streptomyces sp.* SD53 and *Streptomyces sp.* GB4-2) 로부터 분리된 마크로락탐 계열의 단일 물질로 이전의 연구에서 여러가지 암세포에서 항박테리아와 세포 생장 저해 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 췌장암세포에서의 성장 저해효과와 그 기전에 대해서는 연구된 바가 없다. (Schulz et al., 2009; Shin et al., 2020).

0] 연구에서는 췌장암 세포 AsPC-1 과 젞시타빈 저항성 AsPC-1 세포에서 piceamycin 이 생장을 저해하는 효과가 있음을 밝혀내었다. 또한 젬시타빈 저항성 AsPC-1 세포에 piceamycin 을 처리시 ACTN4 의 mRNA 와 단백질의 발현이 감소한다는 것을 확인하였다. 췌장암 환자에서 ACTN4 의 높은 발현이 췌장암 환자의 생존률을 낮추므로, piceamycin 에 의한 ACTN4 의 발현을 억제하는 것은 췌장암세포에서의 ACTN4 연관의 세포생장과 전이를 억제하는 것에 도움을 줄 수 있다. ACTN4 는 특히나 actin polymerization 기전에서 중요한 역할을 담당하므로 이 연구에서는 piceamycin 을 젬시타빈 저항성 췌장암세포에 처리하였을 때 ACTN4 (alpha actinin-4) - VCN (vinculin) - ACTB (actinin-beta) - F-actin 선상의 actin polymerization 을 억제할 수 있음을 밝혀내었다.

최근의 연구에서 ACTN4 가 암의 전이와 침윤과 연관이 있다고 제시되고 있다 (Peng et al., 2019; Huang et al., 2020; Tozuka et al., 2022). 세포의 이동과 침윤은 원발 부위부터 먼곳의 장기까지로 이동하는 암세포의 전이에 주요한 과정이다 (Bravo-Cordero et al., 2012). 그러므로 ACTN4 를 저해함으로써 암세포의 전이를 조절하는 것은 하나의 전도유망한 접근이 될 수 있을 것이다. 더구나 이 연구에서는 RNAseq 을 통한 Gene ontology 분석을 통하여 (extracellular matrix organization, microtubule, cell leading edge, and collagen-containing extracellular matrix 와 같은 세포의 이동 및 침윤과 관련된 기전이 젬시타빈 저항성 AsPC-1 세포에 piceamycin 처리시 저해된다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히나 focal adhesion 과 metastasis 관련된 있었다. 젬시타빈 저항성 기전이 저해됨을 확인할 수 AsPC-1 세포에서 piceamycin 처리시 focal adhesion- 과 metastasis-관련 단백질의 발현을 조절함으로써 anti-migration 와 anti-invasion 의 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

56
환자 유래 췌장암 오가노이드는 생물학적 event 를 평가할 수 있는 3D 형태의 장기를 모사한 유용한 하나의 도구로 여겨진다. Piceamycin 은 젬시타빈 내성의 오가노이드를 포함하여 여러 환자 유래 췌장암 오가노이드의 생장을 저해하였다. 이결과에 기초하여, piceamycin 은 젬시타빈 내성의 췌장암세포에 항암 효과를 나타낸다고 이야기할 수 있다. 우리가 아는 한에서 PDPCO 에서 piceamycin 의 효과를 평가한 처음 연구이다

요약하면, 이 연구에서는 젬시타빈 저항성 AsPC-1 세포에 piceamycin 을 처리시 세포 생장 저해효과를 나타내었으며, 특히나 ACTN4 의 발현과 또 관련 기전을 저해시킴으로 그 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다, Piceamycin (PCM)은 자연에서 유래한 macrolactam compound 로 젬시타빈 저항성의 췌장암세포에서 효과적으로 ACTN4 의 발현을 저해시켰으며, 그와 관련된 actin-polymerization 및 focal adhesion 및 metastasis 관련한 기전을 억제하였다. 또한 gemcitabine-resistant AsPC-1 세포에서 piceamycin 의 G₀/G₁ 세포주기 억제와 미토콘드리아 세포사멸 기전을 통하여 세포 성장 저해를 확인할 수 있었다. 젬시타빈 저항성의 AsPC-1 세포에서 piceamycin 과 젬시타빈의 병합요법을 하였을 때 시너지 효과를 확인할 수 있었다. 또한 piceamycin 은 췌장암환자 유래 오가노이드의 성장을 저해하였으며, 특히나 젬시타빈 내성 오가노이드에서도 효과를 나타내었다. 이 연구들을 통해 piceamycin 이 젬시타빈 내성 암세포를 효과적으로 저해할 수 있는 하나의 가능성 있는 항암제로 쓰일 수도 있을 것이라고 제시할 수 있다. 또한 piceamycin 은 젬시타빈 내성의 췌장암 환자의 병합요법에 사용될 수 있는 하나의 후보 물질로도 쓰일 수도 있을 것이라고 기대할 수 있다. 앞으로의 활용을 위해 췌장암 환자 유래 오가노이드에서 piceamycin 과 젬시타빈의 병합요법의 메커니즘을 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각한다.

57



Part II

Antiproliferative Activity of Krukovine by Regulating of Transmembrane protein 139 (TMEM139) in Oxaliplatin-resistant Pancreatic Cancer Cells

옥살리플라틴 내성 췌장암 세포에서 막횡단단백질139 조절을 통한 Krukovine의 성장 억제 효능 연구

1. Introduction

췌장암은 평균 생존 기간이 6개월에 불과한 악성 종양이다 (Iovanna, 2012). 화학 요법, 방사선 요법, 및 외과 수술은 초기 암 치료를 위한 가장 일반적이고 효과적인 전략으로 간주된다 (Miller et al., 2019). 그러나 대부분의 췌장암은 진행된 단계에서 진단되므로 (Rawla et al., 2019), 췌장암 환자의 15-20 %만이 외과적 치료를 받을 수 있으며, 환자의 대부분인 80% 이상이 의약 치료를 받는다 (Li et al., 2022).

폴피리녹스 (leucovorin + 5-fluorouracil + oxaliplatin + irinotecan) 와 납파클리탁셀 + 젬시타빈은 췌장암 치료를 위하여 가장 널리 사용되는 요법이다 (Otsu et al., 2022). 폴피리녹스의 옥살리플라틴은 췌장암 환자의 1 차 화학 요법으로 널리 사용되지만 (Santucci et al., 2022), 옥살리플라틴에 대한 내성은 점점 문제가 되고 있다. 따라서, 췌장암 환자에서 옥살리플라틴 내성을 극복하기 위한 새로운 치료 전략이 절실히 요구되고 있다.

췌장관 선암은 전이 가능성이 높은 매우 공격적인 질병이다. 사망하는 대부분의 췌장암 환자는 전이성 질환으로 진단된다 (Mizrahi et al., 2020). 상피-중간엽 전이 (EMT)는 세포가 상피 특성을 잃고 중간엽 특성을 획득하는 전형적인 과정이다 (Shibue and Weinberg, 2017). 췌장암 전이 치료를 위한 효과적인 제제를 개발하려는 여러 시도가 있었지만 현재의 치료 옵션은 낮은 선택성으로 인해 제한적이다 (Yuan et al., 2022). 따라서 전이성 췌장암 환자의 효율적인 치료를 위해서는 새로운 전략이 절실히 요구되고 있다.

막횡단 (TMEM) 단백질 패밀리는 전이의 형성 또는 이동 및 세포 외 기질 리모델링과 같은 암세포 전파로 이어지는 메커니즘과 관련이 있다 (Marx et al., 2020). 비록 막횡단 (TMEM) 단백질의 기능에 대하여 아직까지 잘 알려져 있지 않지만 최근 떠오르는 증거들은 암의 발생과 진행과 관련이 있다고 여겨지고 있다 (Marx et al., 2020). 최근 연구에 따르면 TMEM은 세포 증식, 침습, 전이 및 화학 저항성의 조절에 관여한다고 알려져 있다 (Schmit and Michiels, 2018). 또한, 여러 TMEM은 환자의 전체 생존과 상관 관계가 있으며 여러 종양에서 예후 바이오 마커로

60

작용하는 것으로 밝혀졌다 (Schmit and Michiels, 2018). 이러한 발견은 TMEM 억제제가 항종양제로서 전이성 췌장암에 효과적일 수 있음을 강력하게 시사한다.

대부분의 췌장암 환자에서는 *KRAS* (Kirsten rat 육종 바이러스 종양유전자 상동체)와 같은 원발암 유전자가 활성화되어 통제되지 않은 세포 증식, 세포사멸 내성 및 기타 발암성 cascade를 유발한다 (Chen et al., 2021, Lai et al., 2018). 따라서 *KRAS* 신호전달 경로는 췌장암 치료를 위한 새로운 제제 개발을 위한 가장 중요한 표적 중에 하나로 간주되었다 (Waters and Der, 2018).

독성이 낮고 효과가 높기 때문에 천연 물질은 잠재적인 항암제로 전 세계적으로 연구되고 사용되었다 (Cragg and Pezzuto, 2016, Atanasov et al., 2021, Chavda et al., 2021, Newman and Cragg, 2020, Tilaoui and Zyad, 2021). 그 중에서도, krukovine (KV) 은 *Abuta* grandifolia (Mart.) Sandw. (Menispermaceae)라는 식물로부터 유래한 bisbenzylisoquinoline alkaloid로서 (Lai et al., 2018, Saa et al., 1976), bisbenzylisoquinoline alkaloid 함유 천연물은 항염, 항종양, 항바이러스 활성 등 다양한 약리효과를 나타낸다고 알려져 있다 (Weber and Opatz, 2019). 이전 연구에서 KV는 PI3K-AKT-mTOR 및 RAF-ERK 신호 전달경로 억제를 통해 *KRAS* 돌연변이가 있는 폐암에서 항암 효과를 보인다고 연구된 바 있다 (Lai et al., 2018). 따라서 이러한 선행 연구들을 바탕으로 천연물 유래 KV을 사용하여 *KRAS* 돌연변이 췌장암을 표적으로 연구하고자 한다.

오가노이드는 인간의 장기를 닮은 줄기세포 유래 3D 모델 시스템이다. 오가노이드는 인간 장기의 구조를 자세하게 모방하는 것이 가능하다. 따라서 최근에는 약물 반응 예측, 암 치료 표적 찾기, 암환자 검출에 유용한 모델로 떠오르고 있다 (Nagle et al., 2018, Kim et al., 2020, Vivarelli et al., 2020, Liu et al., 2021, Kondo and Inoue, 2019). 따라서, 환자 유래 췌장암 오가노이드를 사용하는 것은 췌장암 환자에 대한 약물 반응을 예측하는데 유용할 것이다.

이 연구에서는 비스벤질이소퀴놀린 알칼로이드인 KV의 항증식 및 항전이 활성을 옥살리플라틴 내성 및 *KRAS* 돌연변이 췌장암 세포에서 평가하였다. 특히, 옥살리플라틴 내성 인간 췌장암 세포에 대한 분자 메커니즘은 *in vitro* 세포 배양 분석과 3D 오가노이드 모델을 모두 사용하여 연구하였다.

61

2. Materials and Methods

2. 1. Cell cultures and reagents

KRAS 돌연변이 췌장암 세포주, AsPC-1 (c.35G>A), Panc-1 (c.35G>A) 및 MiaPaCa-2 (c.34G>T)는 ATCC 로부터 수득하였다 (American Type Culture Collection). 세포를 RPMI (또는 DMEM, Gibco, USA, 10% FBS 및 1% 스트렙토마이신/페니실린)배지에서 5% CO2, 37℃ 습윤 인큐베이터 환경 하에 배양하였다. KV 는 Specs (Bleiswijkseweg, Netherlands)로부터 구입하여, 디메틸설폭사이드 (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해시켰다. 옥살리플라틴은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. KV 와 옥살리플라틴을 디메틸설폭사이드 (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 첨가하고, 인산완충식염수(PBS)를 첨가하여, 저장액으로 사용하였다. DMSO 의 최종 농도는 모든 실험에서 <0.1% (v/v)였다. Annexin V/PI 염색 키트는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 2 MTT assay (cell viability assay)

5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 분석을 수행하여 2D 세포주에서 세포 증식을 측정하였다. 췌장암 세포 (2 × 10⁴ cell/mL)를 96 well plate 에서 배양하였다. 또한, 세포를 KV 및 또는 옥살리플라틴 (0 - 100 µM)으로 처리하여 곡선을 생성하고, IC₅₀ 값을 계산하였다. 약물 처리 후, 0.5 mg/mL MTT 를 24 시간 및 48 시간에 각 well 에 첨가하고 세포를 실온에서 4 시간 동안 추가로 배양하였다. 그후 상층액을 버리고 formazin 결정을 150 µL/well 의 DMSO 로 용해시켰다. 570 nm 에서 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 사용하여 OD 값을 분석하였다.

2. 3. RNA preparation, library preparation, and RNA-seq

KV (25 μM)로 처리된 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포를 무작위로 선택된 3 개의 플레이트로부터 수집하였다. 총 RNA 는 제조자의 지시에 따라 TRIzol 시약 (Invitrogen Life Technologies, NY, USA)을 사용하여 KV 처리된 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포 플레이트로부터 추출하였다. cDNA 라이브러리를 합성한 후 agilent 2100 bioanalyzer (agilent, california, USA)를 사용하여 품질을 평가하였다. cDNA 라이브러리를 KAPA 라이브러리 정량 키트 (Kapa Biosystems, Boston, MA, USA)를 사용하여 정량하였다. 변성된 템플릿의 클러스터 증폭 후, 유동 세포의 샘플을 Illumina HiSeq2500 을 사용하여 쌍을 이루는 말단 폴리머(2 × 100bp)로 시퀀싱하였다. (Illumina, San Diego, CA, USA).

2. 3. 1. Preprocessing of the RNA-seq data

건너뛴 염기(N으로 표시됨)의 >10%를 포함하는 reads, 품질 점수가 <20 인 염기의 >40%를 포함하는 reads, 평균 품질 점수가 <20 인 reads 를 포함하는 reads 기준에 따라 저품질 reads 가 필터링 되었다. 필터링 프로세스는 사내 스크립트를 사용하여 수행되었다. 나머지 판독은 얼라이너 소프트웨어 STAR 버전 2.3.0e 를 사용하여 마우스 참조 게놈 (Ensembl, 릴리스 72) 상에 매핑되었다. 유전자 발현 수준은 Cufflinks 버전 2.1.1 을 사용하여, Ensembl, 릴리스 72 의 유전자 주석 데이터베이스를 사용하여 측정하였다. 비코딩 유전자 영역은 마스크 옵션에 의해 제거되었다. 측정의 정확도를 향상시키기 위해 "다중 reads 보정" 및 "파편성 바이어스 수정" 옵션이 사용되었다. 다른 모든 옵션은 기본값으로 설정되었다.

2. 3. 2. Differential transcriptome and functional analysis

차등 발현 분석을 위해, 유전자 수준 카운트에 대한 데이터는 HTSeq-count 버전 0.5.4p3을 사용하여 생성하였다. 생성된 판독 횟수 데이터를 사용하여, R 소프트웨어 패키지인 TCC (Bioconductor open-source project)를 사용하여 차등적으로 발현된 유전자 (DEG)를 식별하였다. 정규화 계수는 반복적인 DEGES/edgeR 방법을 사용하여 계산되었다. q-값은 R 패키지의 p.adjust 함수와 기본 설정을 사용하여 p-값에서 계산되었다. DEG는 0.05 미만의 q-값 임계값에 기초하여 식별되었다. K-평균 클러스터링은 MATLAB R2009a 의 생물정보학 툴박스에서 수행되었다.

2. 3. 3. Molecular pathway and functional analysis

DEG 리스트는 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 소프트웨어 (IPA, Ingenuity[®] systems, Qiagen, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. IPA 를 사용하면 출판된 유전자 상호 작용에 대한 수동으로 선별된 광범위한 데이터베이스를 기반으로 유전자 간의 네트워크 상호 작용 및 경로 상호 작용을 식별할 수 있다. *q*-값 역치가 0.05 미만이고 HFD 후 GT 보충 유무에 관계없이 발현의 변화가 1.5 이상인 유전자와 RNA-seq 데이터의 관련 발현 값을 IPA 에 업로드했습니다. GO 농축 분석을 수행하기 위해 DAVID 데이터베이스를 사용하여 수행하였고, 유의하게 농축된 GO 결과를 얻었다 (*p* <0.05).

2. 4. Kaplan-Meier Plotter analysis

Kaplan-Meier Plotter (http://kmplot.com/analysis/) 분석은 췌장암 환자의 전체 생존율 (OS) 및 무진행 생존율 (RFS)을 평가하는 데 사용되었다. 95% 신뢰 구간(CI)과 로그 순위 *p*-값을 사용한 위험 비율 (HR)도 계산되었다.

2. 5. Protein-Protein Interaction (PPI) network analysis

PPI 네트워크 분석 (Wimalagunasekara et al., 2022)은 알려진 PPI 와 예측된 PPI 를 모두 통합하는 상호작용 유전자 (STRING) (https://string-db.org) 데이터베이스를 검색하기 위한 검색 도구로, 단백질의 기능적 상호 작용을 예측하는 데 적용할 수 있다. 상이한 조건에 따른 DEG 간의 잠재적 상호작용을 찾기 위해, STRING 도구가 사용되었다.

2. 6. Western blot analysis

세포 및 오가노이드를 protease inhibitor 및 phosphatase inhibitor 를 함유하는 RIPA 완충액으로 용해시켰다 (Sigma Aldrich, St Louis, MO). 모든 세포 용해물은 5× sample 로딩 버퍼[250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol (80%, v/v), 8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2% β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, 100 mM Dithiothreitol (1M)]에 준비되었다. 샘플의 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 정량화되었다. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 각기 동일한 양의 단백질을 (20-30 μg) 6-13% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 전기영동 하였고, polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)에 옮겼다. 멤브레인은 5% bovine serum albumin (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 블락킹 하였다. 웨스턴 블랏에 사용한 antibody는 다음과 같다. 일차 antibody는 phospho-ERK (Thr202-Thy204), total-ERK, TMEM139, RPS6K, phospho-AKT (Ser473), phospho-PI3K, total-PI3K (p110α), phospho-mTOR (Ser2448), total-mTOR, 및 α-tubulin 등으로 CST (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. total-AKT 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Fluorescein-conjugated goat antirabbit 그리고 anti-mouse 이차 antibody 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 멤브레인은 chemiluminescence detection kit (Pierce ECL western blotting substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 통해 단백질 밴드를 확인하였다.

2. 7. Wound healing assay (cell migration assay)

Scratch wound healing 분석을 사용하여 세포 이동을 확인하였다. 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포를 6 well plate 에 배양하고 0, 12.5, 25 또는 50 μM 의 KV 로 처리하였다. 200 μL 피펫팁을 사용하여 세포층에 상처를 내고, 세포를 10% FBS 와 1% penicillin/streptomycin 을 넣은 RPMI 배지에서 배양하였다. 세포 이동은 0 및 48 시간에 100×배율의 도립 현미경으로 측정하였다.

2.8. Transwell cell invasion assay

24 well transwell membrane insert (직경: 6.5 mm, 기공 크기: 8 μm; Corning, Tewksbury, MA, USA)를 각각 10 μl 의 I 형 collagen (0.5 mg/mL, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)과 20 μl 의 혼합물 (Matrigel (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)과 PBS 를 1:20 의 비율로) 로 코팅하였다. 48 시간 동안 0, 12.5, 25 또는 50μM 의 KV을 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 처리한 후, 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포를 수확하고, 무혈청 배지에 재현탁시키고, Matrigel 이 코팅된 transwell 의 상부 chamber 에서 씨딩 (1× 10⁵ cells/chamber)하였다. 30% FBS 를 함유하는 배지는 하부 chamber 에서 화학유인제로서 사용되었다. 48 시간 배양 후, 하부 chamber 의 외부 표면으로 이동한 세포를 고정하고, 0.5% crystal violet (ddH₂O 중 0.5% methanol, 0.5% crystal violet 및 1% PFA)으로 30 분 동안 염색하였다. 여분의 crystal violet 을 증류수로 씻어 내고 건조시킨 후, 이동한 세포를 현미경 (inverted microscope; Olympus CKX41, Shibuya, Tokyo, Japan) 40x 배율을 사용하여 사진을 찍었다. 각 실험은 삼반복으로 수행하였다.

2.9. Organoid medium

모든 실험에 사용한 오가노이드는 5% CO₂/95% 공기 중 습윤 37°C 인큐베이터에서 배양되었다. 50%의 DMEM 배양 배지와 Wnt-3A, R-spondin 1 및 Noggin 이 들어있는 배지에 다음과 같은 물질을 넣어서 만든 배지 50% (50 ng/mL; hEGF, 100 ng/mL; hFGF 10, 10 mM; nicotinamide, 500 nM; A83-01, 1× B27 supplement, 1.25 mM; N-acetylsysteine, 0.01µM; hGastrin 1, 10% FBS, 및 1% penicillin and streptomycin)를 합하여 배지를 제조하였다. 재조합 Wnt-3A, Noggin, 또는 R-spondin 1 은 L-WRN (ATCC^(R) CRL-3276TM) 세포주를 DMEM (10% FBS 와 1% penicillin and streptomycin)에서 배양하여 상층액 배지 모아서 필터 처리하여 사용하였다.

2. 10. Organoid viability assay

66

Cell Titer-Glo® 3D 세포 생존율 분석은 대사 활성 세포의 존재에 대한 마커인 ATP 존재의 정량을 기반으로 3D 세포 배양에서 생존 가능한 세포의 수를 결정하는 균질한 방법이다. 환자 유래 췌장암 오가노이드는 seeding 후에 72 시간 배양하였고, 그 다음 72 시간 동안 약물 처리 후에 3D Cell Titer-Glo® 100 μl 를 추가하고 30 분 동안 배양한 후 발광도를 측정하여 생존도를 측정하였다. 세포의 생장을 50% 억제하는 농도 (IC₅₀)는 처리되지 않은 대조군에 비해 세포 성장을 50% 억제하는 약물의 농도로 계산하였다.

2. 11. Mutation profile of PDPCOs

쌍을 이루는 말단 서열은 HiSeq Instrument 에 의해 인간 게놈에 처음 매핑되었다. 여기서 참조 시퀀스는 매핑 프로그램 BWA (버전 0.7.12)를 사용하여 UCSC 어셈블리 hg19 (NCBI 로부터의 원본 GRCh37, 2009 년 2 월)이고, 매핑 결과 파일은 BWA-MEM 을 사용하여 BAM 형식으로 생성되었다. 이어서, Picard-tool (ver.1.130)을 적용하여, 중합효소 연쇄 반응 중복을 제거하였다. 로컬 다시 맞춤 프로세스는 읽기를 BAM 파일로 로컬로 다시 정렬하기 위해 수행되었다. 게놈 분석 도구 키트를 사용하여 기본 품질 점수 재보정 및 indels 주변의 국소 재정렬을 수행했다. GATK 의 일배체형 호출자는 이전에 생성된 BAM 파일을 기반으로 각 샘플에 대한 변이체 유전형 분석에 사용되었다 (SNP 및 짧은 인델스 후보가 검출됨). 이러한 변형은 SnpEff v4.1g 에 의해 vcf 파일 형식으로 주석이 달렸으며, 142 버전에 대해 dbSNP로 필터링되었다.SnpEff를 적용하여 ESP6500, ClinVar 및 dbNSFP 2.9를 포함한 추가 데이터베이스를 필터링했다.

2.12. Data analysis

IC₅₀ 값을 피팅 라인을 사용하여 추정하였다. Y = a X + b, Y = 0.5b 일 때, IC₅₀ = X =
-0.5b/a. 모든 데이터는 적어도 3 개의 독립적인 실험으로부터의 평균 ± 표준편차로

나타내었다. 두 그룹 간의 유의미한 차이를 식별하기 위해 스튜던트 t-검정이 사용되었다 (*p <0.05, **p <0.01, 및 ***p <0.001).

3. Results

3. 1. Krukovine shows an antiproliferative effect toward *KRAS*-mutated pancreatic cancer cells.

*KRAS*는 췌장암에서 가장 빈번하게 발견되는 돌연변이이다 (>90%). AsPC-1, Panc-1, 와 MiaPaCa-2 cell lines 은 각각 *KRAS* 돌연변이를 가지고 있고, 이 셀라인에 KV (그림 29)을 각각 (0,12.5,25,50 μM)로 48h시간동안 처리하였다. KV는 모든 테스트한 췌장암 셀라인 (AsPC-1, Panc-1, MiaPaCa-2)을 농도 의존적으로 그 생장을 저해함을 그림 30 에서와 같이 확인할 수 있다 (그림 29, IC₅₀).



Figure 29. The structure of Krukovine



Figure 30. Cell viability assay of KV on KRAS-mutated pancreatic cancer cell lines.

KV inhibits the viability of oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells. The viability of oxaliplatinresistant AsPC-1 cells were measured using the MTT assay following treatment with indicated concentration of KV for 48 h. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, ***p < 0.001).

3. 2. Antiproliferative activity of KV in oxaliplatin-resistant pancreatic cancer cells

KV 의 옥살리플라틴 저항성의 췌장암 세포에서의 효과를 평가하기 위하여, AsPC-1 에 옥살리플라틴을 처리하여 옥살리플라틴에 저항성을 보이는 세포로 심화된 실험을 진행하였다 (IC₅₀ > 100 μM) (그림 31). KV 은 옥살리플라틴 저항성이 있는 AsPC-1 에서도 KV 에 대하여 세포생장 저해 효과를 보였다 (그림 31). 이 결과는 KV 이 췌장암세포에서 옥살리플라틴 저항성을 극복할 수 있는 기전이 있는 가능성을 나타낸다.







KV inhibits the viability of oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells. The viability of oxaliplatinresistant AsPC-1 cells were measured using the MTT assay following treatment with indicated concentration of KV for 48 h. Data are presented as the mean \pm SD (n=3, * p < 0.05, ***p < 0.001).

3. 3. RNA levels of KV-treated pancreatic cancer cell show major metabolic pathway.

KV의 항암효과를 연구하기 위하여 옥살리플라틴에 저항성을 보이는 췌장암세포 (AsPC-1)에 KV 을 IC₅₀ 에 해당하는 농도를 처리한 후 무처리군과 함께 각각 3 반복식 RNA-sequencing 을 진행하였다다 (그림 32 와 33). 그림 32 은 KV 을 처리하였을 때의 무처리군과 대비하여 변화되는 유전자군의 heatmap 의 전체적인 모식도를 보여주고, 그림 33 은 PI3K-Akt signaling, MAPK, multicellular organism, 와 metabolism in cancer pathway 와 같은 top KEGG pathway 를 보여준다.



Figure 32. Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score.

RNA-sequencing data in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were treated with KV (25 μ M) for 48h. Heatmap of one-way hierarchical clustering using z-score (-2 $\leq z \leq 2$) for normalized value (log₂ based) (4,347 genes satisfying with fc 2 & raw. *p*).

(*GO functional analysis: BP; Biological Function, CC; Cellular Component, MF; Molecular Function) All data represent at least three independent experiments.



Figure 33. Top 19 terms of KEGG pathway.

RNA-seq assay was performed in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells treated with KV (25 μ M) compared with control (PBS with DMSO-treated). The dot color represents the *p*-values. The scale of the spots indicates the number of genes involved.

76

3. 4. The clinical significance of *TMEM139* expression in patients with pancreatic cancer

몇몇 연구들에서 trans membrane 139 (TMEM139)의 발현이 암의 진행과 전이와 관련이 있다고 보고되었다 (Marx et al., 2020, Tan et al., 2022). 따라서 췌장암 환자에서의 TMEM139 의 발현의 영향을 알아보기 위하여, the Kaplan-Meier method 의 생존률 평가를 통하여 췌장암 환자에서 TMEM139 의 발현의 임상적 중요성을 평가하였다. 그림 34 에서와 같이, 췌장암 환자에서의 TMEM139 의 높은 발현은 환자의 전체 생존률 (OS; Overall Survival) 과 무진행 생존를 (RFS; Relapse Free Survival) 모두를 감소시켰고, TMEM139 의 낮은 발현은 오히려 전체 생존률과 무진행 생존률 모두를 증가시켰다. 이 결과는 TMEM139 의 발현이 췌장암환자의 생존률과 반대로 작용함을 나타낸다. 따라서 TMEM139 는 췌장암 환자의 치료를 위한 하나의 치료 타겟으로 쓰일 수도 있음을 보여준다.

Pancreatic ductal adenocarcinoma



Pancreatic ductal adenocarcinoma



Figure 34. The Kaplan-Meier survival curve according to the TMEM139 expression level.

The Kaplan-Meier survival curve represents the overall survival (OS) and relapse-free survival

(RFS) of patient with pancreatic cancer according to the TMEM139 expression level.

3. 5. The effects of KV on the *TMEM139* expression in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells

옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 KV 을 처리하였을 때 *TMEM139* 발현이 어떻게 변하는지 확인하기 위하여, 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 KV 을 25 µM, 48 h 동안 처리한 후 RNA-sequencing 을 통하여 전사체 발현을, 웨스턴 블랏을 통하여 단백체 변화를 확인하였다 (그림 32). KV 은 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에서 TMEM139 전사체와 단백체의 발현을 감소시켰다. (표 4, mRNA fold change, 그림 35; western blot analysis).

Table 4.	TMEM	family	mRNA	expression	(fold	change)	and	p-value	in	oxaliplatin-
resistant	AsPC-1	cells tre	ated KV	•						

Gene Symbol	Description	kruko/con.fc	kruko/con.raw.pval
TMEM139	transmembrane protein 139	-20.08857481	0.000184391
TMEM160	transmembrane protein 160	-10.07644718	0.0002668
TMEM102	transmembrane protein 102	-9.08294669	0.000505557
TMEM187	transmembrane protein 187	-7.717754905	0.001085602
TMEM221	transmembrane protein 221	-7.22073532	0.019434951
TMEM249	transmembrane protein 249	-6.628590914	0.006072763
TMEM177	transmembrane protein 177	-5.850793145	0.004004917
TMEM92	transmembrane protein 92	-5.793088235	0.005077808
TMEM121	transmembrane protein 121	-5.624075595	0.005226063
TMEM203	transmembrane protein 203	-4.929095646	0.008670705
TMEM223	transmembrane protein 223	-4.591863583	0.011703338
TMEM238	transmembrane protein 238	-4.352286379	0.028704807
TMEM191B	transmembrane protein 191B	-3.783402356	0.034476139
TMEM191A	transmembrane protein 191A	-3.7829524	0.031869069
TMEM53	transmembrane protein 53	-3.782392019	0.027051
TMEM191C	transmembrane protein 191C	-3.556386263	0.043266828
TMEM141	transmembrane protein 141	-3.384076799	0.040373276
TMEM115	transmembrane protein 115	-3.287999353	0.045333404
TMEM186	transmembrane protein 186	-3.242921449	0.049370419



Figure 35. The effect of KV on TMEM139 protein expression in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells.

Oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were treated with the indicated concentrations of KV for 48 h, and the protein expression level of TMEM139 was determined by western blotting. α -tubulin was used as an internal control.

3. 6. The effects of KV on the TMEM139-associated signaling pathway in Oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells.

Protein-protein interaction online database search tool (STRING)을 통하여 TMEM139 단백질이 RPS6K 와 MAPK3/1 (Erk1/2) 단백질과 상호작용한다는 것을 확인할 수 있다 (그림 36; Protein-Protein Interaction). 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에서의 KV 을 처리하였을 때 TMEM139 mRNA 발현이 감소된다는 것을 표 4 에서 확인할 수 있다. 옥살리플라틴 저항성이 있는 AsPC-1 세포에서 TMEM139 와 관련 있는 단백질들의 KV 처리시의 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 통하여 단백질의 발현을 확인하였다. 이를 통하여 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에서 p-Erk 1, 2 (Thr202/Thy204), RPS6K, TMEM139 단백질이 KV 처리시 농도의존적으로 감소한다는 것을 그림 35, 37 에서와 같이 확인할 수 있었다. 이 데이터를 통하여 KV 의 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포 생장 저해 효과가 Erk - RPS6K - TMEM139 선상의 MAPK (Erk1/2) 기전의 억제와도 연관이 있음을 확인할 수 있다 (그림 35-37).





Figure 36. Protein-Protein Interaction (PPI) for TMEM139 from the search tool (STRING) database.

Interacting proteins for *TMEM139* (*Transmembrane 139*) Gene: MAPK3/1 (Mitogen-Activated Protein Kinase 3/1; Erk1/2) - RPS6KA3 (Ribosomal Protein S6 Kinase A3) - TMEM139



Figure 37. Effects of KV on the TMEM139-associated signaling pathway in Oxaliplatinresistant AsPC-1 cells.

Oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were treated with the indicated concentrations of KV for 48 h, and the protein expression level was determined by western blotting. α -tubulin was used as an internal control.

3. 7. KV inhibits the PI3K-Akt-mTOR pathway in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells.

KV 을 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 처리하였을 때 MAPK 기전뿐만이 아니라, PI3K-Akt-mTOR (그림 38; Protein-Protein Interaction; PI3K- Akt 와 PI3K- AktmTOR) 기전의 변화가 있는지 확인하였다. 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 KV 을 처리 후, RNA 시퀸싱 하였을 때 MAPK 와 PI3K-Akt 기전이 KV 무처리군과 대비해 유의미한 차이가 있다는 것을 확인하였으므로 (그림 33), 웨스턴 블랏을 통하여 phospho-PI3K, phospho-AKT (Ser473), phospho-mTOR 를 각각의 total form 인 total-PI3K, total-AKT, total-mTOR 에 대비하여 단백질의 발현양 변화를 확인하였다 (그림 39). 웨스턴블랏의 결과로 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에 KV 을 처리하였을 때 PI3K -AKT -mTOR 기전이 억제됨을 확인할 수 있다 (Figure 39).





Figure 38. Protein-Protein Interaction (PPI) for PI3K-Akt and PI3K-Akt-mTOR signaling pathway from the search tool (STRING) database.

Interacting proteins for Akt1 (AKT Serine/ Threonine Kinase) gene: PI3K -Akt and PI3K – Akt - mTOR.



Figure 39. Effects of KV on the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells.

Oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were treated with the indicated concentrations of KV for 48 h, and the protein expression level was determined by western blotting. α -tubulin was used as an internal control.

3. 8. KV inhibits migration and invasion in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells.

KV 의 옥살리플라틴 저항성 AsPC-1 세포에서의 전이 및 이동에의 영향을 확인하기 위하여 RNA-seq, scratch-wound healing assay, transwell analysis 및 웨스턴 블랏을 하였고, KV 처리시 세포의 침윤과 이동을 농도 의존적으로 감소시킴을 그림 40 과 41 에서와 같이 확인할 수 있었다. RNA 시퀀싱 데이터 또한 KV 을 처리시 세포의 이동과 침윤과 관련된 기전이 무처리군과 대비하여 유의미한 차이가 있음을 보여주었다 (Figure 42).



Figure 40. The effect of KV on oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells migration.

Monolayers of oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were scratched mechanically and treated with KV (indicated concentrations) for 48 h. Representative images of wound closure obtained under a light microscope. All data are presented as mean \pm SD (n=3, ***p < 0.001).





Figure 41. The effect of KV on oxaliplatin-resistant AsPC-1 cell invasion.

Oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were pretreated with indicated concentrations of KV for 24 h, reseeded into the upper chamber of transwell inserts, and incubated for 24 h. The cells that invaded to lower chambers were than fixed, stained, imaged, and counted. All data are presented as mean \pm SD (n=3, ***p < 0.001).



Figure 42. Top 20 terms of GO (Gene Ontology) functional analysis.

RNA-seq assay was perform in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells treated with KV (25 μ M) compared with control (PBS with DMSO-treated). The dot color represents the *p*-values. The scale of the spots indicates the number of genes involved.

3. 9. KV showed an antiproliferative effect toward *KRAS*-mutated patient-derived pancreatic cancer organoids.

모든 오가노이드들은 *KRAS* 돌연변이를 확인하였다 (NGS; Next Generation Sequencing) (그림 43). 오가노이드 중에서 상대적으로 다약제 내성이 있는 오가노이드 3 개와 약물에 상대적으로 sensitive 한 오가노이드 2 개를 선정하여 KV(0,6.25,12.5,25, and 50 µM, 72 h 약물처리)에 대한 약물 반응도를 확인하였다 (relatively resistant; SNU-4425-TO, SNU-4340-TO, SNU-3947-TO, relatively sensitive; SNU-4305-TO and SNU-4206-TO) (그림 44 와 46). KV 이 환자 유래 췌장암 오가노이드를 농도의존적으로 그 생장을 저해시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 45 과 46).


Figure 43. Mutation profile of PDPCOs.

The main representative mutations (*KRAS* and *TP53*) in PDPCOs (patient-derived pancreatic cancer organoids) were analyzed whole exome sequencing analysis.



Figure 44. Multi-drug response heatmap on PDPCOs.

PDPCOs treated with multi-drugs (0.01 μ M - 100 μ M) for 72h and the drug sensitivity was measured using cell-titer glow, 3D reagent. Drug response heatmap (red; resistant, blue; sensitive) according to the AUC (area under curve).



Figure 45. Antiproliferative effect of KV on PDPCOs.

PDPCOs (SNU-4206, SNU-4305-TO, SNU-4425-TO, SNU-3947-TO, and SNU-4340-TO) were treated with various concentrations of KV and detected by 3D cell titer-glow assay after 72 h. All data are presented as mean \pm SD (n=3, * p < 0.05).



Figure 46. KV inhibited the growth of the tested PDPCO (SNU-4340-TO) in a dosedependent manner.

Representative images of the organoid treated with KV obtained under a light microscope.

3. 10. KV enhanced the anticancer effects of oxaliplatin in *KRAS*-mutated patientderived pancreatic cancer organoids.

옥살리플라틴과 KV을 병합하였을 때 *KRAS* 돌연변이가 있는 오가노이드에서 약물 각각을 처리했을 때보다 더 효과가 있음을 그림 47-49 에서 확인할 수 있었다 (그림 47-49). *KRAS* mutation 이 있는 오가노이드에서의 KV 과 옥살리플라틴의 병합효과를 CI (Combination Index)를 통하여 확인해 보았다. SNU-4425-TO 오가노이드는 상대적으로 KV 에 비하여 옥살리플라틴에 대하여 내성을 보이지만 옥살리플라틴과 KV을 병합하였을 때 시너지 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다 (CI range, 0.3 - 0.7, Synergism) [combination index (CI)>1], additivity (CI=1) and synergism (CI<1)]. 더구나 옥살리플라틴과 KV 의 병합요법의 항암효과의 분자적 기전을 알아보기 위하여 웨스턴 블랏을 진행하였을 때, 두 약물을 병합하였을 때 cleaved PARP (poly ADP ribose polymerase)의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 49).



Figure 47. Cell viability assay for combination effect of KV with oxaliplatin.

The multi-drug resistant organoid (SNU-4425-TO) was treated with KV and/ or oxaliplatin for 72 h with indicated concentration (con; control, K 11.1; krukovine 11.1 μ M, O 33.3; oxaliplatin 33.3 μ M, K 11.1 + O 33.3; krukovine 11.1 μ M + oxaliplatin 33.3 μ M) and detected by 3D cell titer-glow assay. All data are presented as mean ± SD (n=3). All data are presented as mean ± SD (n=3, **p < 0.01, ***p < 0.001).



Figure 48. Combination effect of KV with oxaliplatin on the growth of multi-drug resistant PDPCO (SNU-4425-TO).

Representative images of the organoid treated with KV and/ or oxaliplatin for 72 h with indicated concentration (Con; control, K 11.1; krukovine 11.1 μ M, O 33.3; oxaliplatin 33.3 μ M, K 11.1 + O 33.3; krukovine 11.1 μ M + oxaliplatin 33.3 μ M). Images were obtained under a light microscope.



Figure 49. Effects of KV on the cleaved-PARP expression in multi-drug resistant organoid (SNU-4425-TO).

SNU-4425-TO were treated with the indicated concentrations of KV for 72 h, and the protein expression level was determined by western blotting. α -tubulin was used as an internal control.

4. Discussion

옥살리플라틴은 폴피리녹스 요법(leucovorin + 5-fluorouracil + oxaliplatin + irinotecan)의 한 구성 성분으로 췌장암 치료에서 일선으로 쓰이는 약물이다. 그러므로, 췌장암 환자가 옥살리플라틴에 내성이 있을 경우 화학치료법의 실패와 연결이 된다. 따라서 췌장암에서 옥살리플라틴의 내성을 극복할 수 있는 부작용이 적은 약물을 개발하는 것은 전세계적인 목표가 될 수 있다. 오랜기간 동안 천연물은 새롭고 안전한 약물을 개발하기 위한 중요한 원천으로 여겨져 왔다. (Newman and Cragg, 2020). 이 연구에서는 옥살리플라틴 내성의 췌장암 세포를 사용하여 천연물 Krukovine의 옥살리플라틴 내성 췌장암 세포에서의 항암 활성을 확인하였다.

대부분의 췌장암환자는 진행성 전이 단계인 3,4 단계에서 발견이 된다. (Rawla et al., 2019). 그러나 전이성 췌장암 관리에서 현재 이용 가능한 치료 옵션은 매우 제한적이어서 약물 반응 실패로 이어진다 (Wang et al., 2021). 이 연구에서 KV는 암 전이와 관련된 TMEM139 발현 억제를 통한 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포의 이동 및 침윤 능력을 억제하여 췌장암 세포 전이를 억제했다.

RAF-ERK 및 PI3K-AKT 경로는 *KRAS* 돌연변이가 있는 암에서 두 가지 주요 하이퍼 활성화 다운스트림 경로이다. 이러한 경로는 암 환자의 암세포의 통제되지 않은 증식과 전이를 유도한다 (McCubrey et al., 2012, Ning et al., 2022). 따라서 이러한 신호 전달 경로는 암 치료에서 유망한 표적이 될 수 있다 (He et al., 2021). KV는 *KRAS* 돌연변이 폐암 세포에서 AKT 신호 전달을 비활성화하고, RAF-ERK 신호 전달 경로를 억제하여 항암/항암 효과를 나타내는 식물 추출물의 단일 물질이다 (Lai et al., 2018). 이 연구에서 KV는 옥살리플라틴 내성 췌장암 세포에서 PI3K-Akt-mTOR 및 Erk-RPS6K-TMEM139 신호 전달 경로를 억제했다. 따라서 KV는 *KRAS* 돌연변이 옥살리플라틴 내성 췌장암 세포를 조절하여 항암작용을 나타낼 수 있었다.

이 연구에서는 3D 모델 시스템인 환자 유래 췌장암 오가노이드(PDPCO)를 KV 항암 활성 평가에 사용했다. PDPCO의 *KRAS* 돌연변이를 탐색하고, 다약제내성 오가노이드를 선택하기 위해 PDPCO에서 다중 항암제를 테스트하여 최종 선정된

101

KRAS 돌연변이가 있는 다약제 내성 오가노이드에서 KV의 항암 가능성을 확인하였다. 이를 통해 환자 유래 췌장암 오가노이드에서 KV의 효능을 확인할 수 있었고 또한 이것은 오가노이드에서 KV의 활성을 연구한 첫번째 연구이기도 하다. 최근에 췌장암 환자의 치료에서 단일 제제보다 약물의 조합이 점점 더 선호되고 있다 (Heinemann, 2002, Lei et al., 2019, Kroep et al., 1999). 이 연구에서는 KV와 옥살리플라틴의 조합 효과를 평가하고, 시너지 효과를 발견했다. 시너지 효과의 분자적 경로를 확인하였을 때, 옥살리플라틴과 조합하여 사용된 KV가 cleaved-PARP 발현을 증가시킨다는 것을 보여주었고, 이는 옥살리플라틴과 조합된 KV가 PDCPO의 세포사멸에 기여한다는 것을 나타낸다.KV와 옥살리플라틴의 조합 효과에 기초하여 이 화합물은 췌장암 치료를 위한 잠재적인 치료제로 쓰일 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

본 연구에서는 *KRAS* 돌연변이 췌장암 세포주 (AsPC-1, Panc-1 및 MiaPaCa-2)와 옥살리플라틴 내성 췌장암 세포 (옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포)의 성장과 증식을 억제하는 KV의 효과를 조사했다. KV는 옥살리플라틴 내성 AsPC-1 세포에서 PI3K/Akt/mTOR 및 Erk-RPS6K-TMEM139 경로를 통해 TMEM139 발현 및 증식을 효과적으로 억제했다. 또한, KV는 *KRAS* 돌연변이 PDPCO에 대한 성장 억제 효과 및 PDPCO에서 옥살리플라틴과 병합하였을 때 시너지 효과를 나타내었다.

종합하면, KV는 KRAS 돌연변이 및 옥살리플라틴 내성 전이성 췌장암 세포에서 Erk-RPS6K-TMEM139의 억제 활성을 기반으로 KRAS 돌연변이 및 옥살리플라틴 내성 췌장암 환자의 향후 사용을 위한 새로운 치료제로서 큰 잠재력을 가지고 있다고 결론지을 수 있다.



102

References

Part I

Bravo-Cordero, J.J., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2012). Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current opinion in cell biology* 24 (2), 277-283.

Chou, T.-C. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay MethodSynergy Quantification Method. *Cancer research* 70 (2), 440-446.

Gao, Y., Li, G., Sun, L., He, Y., Li, X., Sun, Z., et al. (2015). ACTN4 and the pathways associated with cell motility and adhesion contribute to the process of lung cancer metastasis to the brain. BMC Cancer 15, 277

Hu, G., Li, F., Ouyang, K., Xie, F., Tang, X., Wang, K., et al. (2012). Intrinsic gemcitabine resistance in a novel pancreatic cancer cell line is associated with cancer stem cell-like phenotype. *International journal of oncology* 40 (3), 798-806.

Huang, Q., Li, X., Huang, Z., Yu, F., Wang, X., Wang, S., et al. (2020). ACTN4 promotes the proliferation, migration, metastasis of osteosarcoma and enhances its invasive ability through the NF-κB pathway. *Pathology & Oncology Research* 26 (2), 893-904.

Kim, J., Koo, B.-K., and Knoblich, J.A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (10), 571-584.

Koltai, T., Reshkin, S.J., Carvalho, T.M., Di Molfetta, D., Greco, M.R., Alfarouk, K.O., et al. (2022). Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers* 14 (10), 2486.

Kondo, J. and Inoue, M. (2019). Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy. *Cells* 8 (5), 470.

Lee, J.H., Kim, H., Lee, S.H., Ku, J.-L., Chun, J.W., Seo, H.Y., et al (2022). Establishment of Patient-Derived Pancreatic Cancer Organoids from Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsies. *Gut and Liver* 16 (4), 625-636.

Lichota, A. and Gwozdzinski, K. (2018). Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *International journal of molecular sciences* 19 (11), 3533.

Liu, L., Yu, L., Li, Z., Li, W., and Huang, W. (2021). Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making. *Journal of Translational Medicine* 19 (1), 1-9.

Lomert, E., Turoverova, L., Kriger, D., Aksenov, N.D., Nikotina, A.D., Petukhov, A., et al. (2018). Co-expression of RelA/p65 and ACTN4 induces apoptosis in non-small lung carcinoma cells. *Cell Cycle* 17 (5), 616-626.

Nagle, P.W., Plukker, J.T.M., Muijs, C.T., van Luijk, P., and Coppes, R.P. (2018). Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Seminars in Cancer Biology*, 258-264.

Park, W., Chawla, A., and O'Reilly, E.M. (2021). Pancreatic cancer: a review. *The Journal of the American Medical Association*, 326 (9), 851-862.

Peng, W., Tong, C., Li, L., Huang, C., Ran, Y., Chen, X., et al. (2019). Trophoblastic proliferation and invasion regulated by ACTN4 is impaired in early onset preeclampsia. *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33 (5), 6327-6338. Pereira, N.P. and Corrêa, J.R. (2018). Pancreatic cancer: Treatment approaches and trends. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 4, 30.

Schulz, D., Nachtigall, J., Riedlinger, J., Schneider, K., Poralla, K., Imhoff, J.F., et al. (2009). Piceamycin and its N-acetylcysteine adduct is produced by Streptomyces sp. GB 4-2. *The Journal of Antibiotics* 62 (9), 513-518.

Shin, Y.-H., Kang, S., Byun, W.S., Jeon, C.-W., Chung, B., Beom, J.Y., et al. (2020). Absolute configuration and antibiotic activity of piceamycin. *Journal of Natural Products* 83 (2), 277-285.

Siegel, R., Miller, K., Fuchs, H., and Jemal, A. (2021). Cancer statistics. vol. 71, issue 1. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 7-33.

Tentler, D., Lomert, E., Novitskaya, K., and Barlev, N. (2019). Role of ACTN4 in Tumorigenesis, Metastasis, and EMT. *Cells* 8 (11).

Tozuka, T., Noro, R., Seike, M., and Honda, K. (2022). Benefits from Adjuvant Chemotherapy in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Possibility of Stratification by Gene Amplification of ACTN4 According to Evaluation of Metastatic Ability. *Cancers* 14 (18), 4363.

Vivarelli, S., Candido, S., Caruso, G., Falzone, L., and Libra, M. (2020). Patient-derived tumor organoids for drug repositioning in cancer care: A promising approach in the era of tailored treatment. *Cancers* 12 (12), 3636.

Wang, N., Wang, Q., Tang, H., Zhang, F., Zheng, Y., Wang, S., et al. (2017). Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of β-catenin stabilization in cancer stem cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 36 (1), 1-19.

Watanabe, T., Ueno, H., Watabe, Y., Hiraoka, N., Morizane, C., Itami, J., et al. (2015). ACTN4 copy number increase as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 112 (4).

Xu, C., Yu, Y., and Ding, F. (2018). Microarray analysis of circular RNA expression profiles associated with gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Oncology reports* 40 (1), 395-404.

Yu, X. and Sun, D. (2013). Macrocyclic drugs and synthetic methodologies toward macrocycles. *Molecules* 18 (6), 6230-6268.

Zhao, J., Peng, W., Ran, Y., Ge, H., Zhang, C., Zou, H., et al. (2019). Dysregulated expression of ACTN4 contributes to endothelial cell injury via the activation of the p38-MAPK/p53 apoptosis pathway in preeclampsia. *Journal of physiology and biochemistry* 75 (4), 475-487.

Zhao, Z. and Liu, W. (2020). Pancreatic cancer: a review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment* 19, 1533033820962117.

- Atanaov, A. G., Zotche, S. B., Dirsch, V. M., and Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 200-216.
- Chavda, V. P., Ertas, Y. N., Walhekar, V., Modh, D., Doshi, A., Shah, N., Anand, K., and Chhabria, M. (2021). Advanced Computational Methodologies Used in the Discovery of New Natural Anticancer Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Chen, K., Zhang, Y., Qian, L., and Wang, P. (2021). Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 1-23.
- Cragg, G. M. and Pezzuto, J. M. (2016). Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25, 41-59.
- He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., and Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 6, 1-17.
- Heinemann, V. (2002). Gemcitabine-based combination treatment of pancreatic cancer. Seminars in Oncology, 25-35.
- Kim, J., Koo, B.-K., and Knoblch, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 571-584.

Kondo, J. and Inoue, M. (2019). Application of cancer organoid model for drug screening and

personalized therapy. Cells, 8, 470.

- Kroep, J., Pinedo, H., Van Groeningen, C., and Peters, G. (1999). Experimental drugs and drug combinations in pancreatic cancer. *Annals of oncology*, 10, S234-S238.
- Lai, H., Wang, Y., Duan, F., Li, Y., Jiang, Z., Luo, L., Liu, L., Leung, E. L., and Yao, X. (2018). Krukovine suppresses KRAS-mutated lung Cancer cell growth and proliferation by inhibiting the RAF-ERK pathway and inactivating AKT pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 958.
- Lei, F., Xi, X., Batra, S. K., and Bronich, T. K. (2019). Combination therapies and drug delivery platforms in combating pancreatic cancer. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370, 682-694.
- Li, Q., Feng, Z., Miao, R., Liu, X., Liu, C., and Liu, Z. (2022). Prognosis and survival analysis of patients with pancreatic cancer: retrospective experience of a single institution. *World Journal of Surgical Oncology*, 20, 1-16.
- Liu, L., Yu, L., Li, Z., Li, W., and Huang, W. (2021). Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making. *Journal of Translational Medicine*, 19, 1-9.
- Marx, S., Dalmaso, T., Chen, J.-W., Bury, M., Wouters, J., Michiels, C., and Le Calvë, B. (2020). Transmembrane (TMEM) protein family members: Poorly characterized even if essential for the metastatic process. *Seminars in Cancer Biology*, 96-106.
- Mccubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., et al. (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*, 3, 954.

- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., et al. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69, 363-385.
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., and Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395, 2008-2020.
- Nagle, P. W., Plukker, J. T. M., Muijs, C. T., Vanluijk, P., and Coppes, R. P. (2018). Patientderived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Seminars in Cancer Biology*, 258-264.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83, 770-803.
- Ning, W., Yang, Z., Kocher, G. J., Dorn, P., and Peng, R.-W. (2022). A Breakthrough Brought about by Targeting KRASG12C: Nonconformity Is Punished. *Cancers*, 14, 390.
- Otsu, T., Inokawa, Y., Takami, H., Hayashi, M., Kurimoto, K., Tanaka, N., et al. (2022). Comparison Between FOLFIRINOX and nal-IRI/FL as Second-line Treatment After Gemcitabine Plus Nab-paclitaxel for Pancreatic Cancer. *Anticancer Research*, 42, 3889-3894.
- Rawla, P., Sunkara, T., and Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World Journal of Oncology*, 10, 10.
- Saa, J. M., Lakshmikantham, M., Michell, M. J., and Cava, M. P. (1976). Krukovine, a new bis (benzylisoquinoline) alkaloid from Abuta splendida. *The Journal of Organic Chemistry*,

- Santucci, J., Tacey, M., Thomson, B., Michael, M., Wong, R., Shapiro, J., et al. (2022). Impact of first-line FOLFIRINOX versus Gemcitabine/Nab-Paclitaxel chemotherapy on survival in advanced pancreatic cancer: Evidence from the prospective international multicentre PURPLE pancreatic cancer registry. *European Journal of Cancer*, 174, 102-112.
- Schmit, K. and Michiels, C. (2018). TMEM proteins in cancer: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1345.
- Shibue, T. and Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 611-629.
- Tan, C., Wang, X., Wang, X., Weng, W., Ni, S.-J., Zhang, M., et al. (2022). Molecular signatures of tumor progression in pancreatic adenocarcinoma identified by energy metabolism characteristics. *BMC cancer*, 22, 1-16.
- Tilaoui, M. and Zyad, A. (2021. Update and New Insights on Future Cancer Drug Candidates From Plant-Based Alkaloids. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 719694-719694.
- VivarelliI, S., Candido, S., Caruso, G., Falzone, L., and Libra, M. (2020). Patient-derived tumor organoids for drug repositioning in cancer care: A promising approach in the era of tailored treatment. *Cancers*, 12, 3636.
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X.-Q., Wang, Z.-F., et al. (2021) The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: Translational challenges and clinical perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 1-23.

- Waters, A. M. and Der, C. J. (2018). KRAS: the critical driver and therapeutic target for pancreatic cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8, a031435.
- Weber, C. and Opratz, T. (2019). Bisbenzylisoquinoline alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 81, 1-114.
- Yuan, F., Sun, M., Liu, Z., Liu, H., Kong, W., Wang, R., et al. (2022). Macropinocytic dextran facilitates KRAS-targeted delivery while reducing drug-induced tumor immunity depletion in pancreatic cancer. *Theranostics*, 12, 1061.

Abstract

Antiproliferative Activity of Piceamycin and Krukovine in Anticancer Drug-resistant Pancreatic Cancer Cells

Jee Hyung Lee Natural Products Science Major College of Pharmacy The Graduate School Seoul National University

Cancer is a major cause of human death, with incidence rates continuing to rise globally. Common causes of cancer include exposure to environmental risk factors, such as certain dietary habits and cancer-related genetic changes. Pancreatic cancer is one of the most difficult types of cancer to detect and cure. While surgery is considered the most effective strategy to treat earlystage pancreatic cancer patients, most pancreatic cancer patients are diagnosed at advanced stages. Only 15-20% of patients are eligible for surgical treatment, and over 80% undergo medicinal treatment. In the case of advanced pancreatic cancer, palliative systemic chemotherapy with supportive care is considered the only viable therapeutic option. Gemcitabine with nab-paclitaxel and FOLFIRINOX are commonly used as the first-line chemotherapy. However, the frequent development of drug resistance to conventional cytotoxic agents contributes to the aggressive progression of the disease, which greatly undermines the efficacy of the therapy. Therefore, the discovery of novel agents to complement conventional cytotoxic agents is needed for the effective treatment of acquired drug-resistant pancreatic cancers.

The first part describes that piceamycin, a silkworm-derived natural product, can be effectively applicable for gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. Although gemcitabine-based

regimens are widely used as an effective treatment for pancreatic cancer, acquired resistance to gemcitabine has become an increasingly common problem. Therefore, there is an urgent need for the development of a novel therapeutic strategy to treat gemcitabine-resistant pancreatic cancer patients. Alpha-actinin-4 (ACTN4) plays a pivotal role in tumorigenesis and metastasis of numerous cancers, and ACTN4 signaling is aberrantly activated in malignant tumors. Piceamycin (PCM) is a secondary metabolite produced by a *Streptomyces sp.* SD53 strain isolated from the gut of the silkworm, Bombyx mori, and was reported to exhibit an antiproliferative activity against various cancer cells. In the present study, the antiproliferative activity of PCM was investigated in a gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell line (gemcitabine-resistant AsPC-1 cells) and gemcitabine-resistant patient-derived pancreatic cancer organoid (PDPCO). PCM effectively inhibited the proliferation of the gemcitabine-resistant cell lines and suppressed the expression of ACTN4 in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. Furthermore, PCM effectively inhibited the invasion and migration of gemcitabine-resistant AsPC-1 cells through the modulation of actin polymerization, focal adhesion, and epithelial-mesenchymal transition biomarkers. PCM also induced the G₀/G₁ cell cycle arrest and the long-term exposure of PCM induced apoptosis in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. The combination of PCM and gemcitabine exhibited a synergistic antiproliferative activity in gemcitabine-resistant AsPC-1 cells. Taken together, these findings indicate that PCM may be an effective agent for overcoming gemcitabine resistance in pancreatic cancer.

The second part describes that krukovine (KV), a bisbenzylisoquinoline alkaloid derived from *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandw. (Menispermaceae). KV can effectively inhibit the growth and metastasis of oxaliplatin-resistant pancreatic cancer cells. While the oxaliplatin-based FOLFIRINOX regimen is widely used as the first-line chemotherapy for pancreatic cancer, acquired resistance to oxaliplatin poses a major challenge to the success of the chemotherapy. Therefore, a novel therapeutic strategy is needed to treat oxaliplatin-resistant pancreatic cancer. In the present study, oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells were used to evaluate the effect of KV on the proliferation in the cells. KV showed antiproliferative activity in oxaliplatin-resistant

pancreatic cancer cells and suppressed the expression of the transmembrane protein, TMEM139. TMEM139 is known as inducer of tumor invasion and metastasis. KV effectively inhibited the PI3K-Akt-mTOR and Erk-RPS6K-TMEM139 signaling pathways in oxaliplatin-resistant AsPC-1 cells. In this study, KV also exhibited antiproliferative activity of patient-derived pancreatic cancer organoids (PDPCOs). Furthermore, KV showed a synergistic combinatory effect with oxaliplatin in patient-derived pancreatic cancer organoids (PDPCOs). Taken together, these findings indicate that KV may be an effective agent for overcoming oxaliplatin-resistance in pancreatic cancer.

Keywords: pancreatic cancer, natural products, *Alpha-actinin-4* (*ACTN4*), piceamycin (PCM), gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells, epithelial mesenchymal transition (EMT), apoptosis, krukovine (KV), oxaliplatin-resistant pancreatic cancer cells, patient-derived pancreatic cancer organoids (PDPCOs), *Transmembrane 139* (*TMEM139*)

Student number: 2015-31193

감사의 글

박사과정을 진행하면서 저의 학위논문이 잘 마무리될 수 있게 많은 분들의 도움 이 있었습니다. 이글을 통해 감사의 인사를 드리고자 합니다.

시시 때때로 필요한 말씀을 해주시고, 큰 줄기 및 방향을 제시해주신 지도교수님 이상국 교수님 감사합니다. 교수님 덕분에 박사과정 논문을 마무리할 수 있었습니 다. 또한 늘 학생 쪽에서 생각해주시고, 여러모로 큰 도움을 주신 서울대학교 병원 이상협 교수님 감사합니다. 늘 진료로 바쁘신 와중에도 많은 신경을 써주셔서 감사 드립니다. 또한 약대에서 논문 심사 및 논문을 마무리하는 과정에서 여러가지 좋은 말씀해주시고, 마인드 컨트롤을 잘 하라고 늘 격려해주신 약대 박헌주 박사님 감사 합니다. 또한 논문을 완성하는 과정에서 여러가지 조언을 아끼지 않으신 삼성 서울 병원 임용철 교수님 감사합니다. 그리고 제 학위논문의 심사를 해주신 노민수 교수 님, 오동찬 교수님, 김기대 교수님 감사합니다.

박사과정을 진행하면서, 병원에서의 업무와 저의 논문이 일치되는 부분도 많았지 만, 그렇지 않고 여러가지 바쁠 때도 있었고, 또한 생각지도 못한 여러가지 힘든 일 들도 많았는데, 그때마다 응원과 격려해주시고, 늘 기도로 또한 물심 양면으로 큰 느티나무처럼 사랑을 베풀어 주신 어머니와 아버지께 감사드리고 또 사랑합니다. 사랑하는 부모님께 이 박사학위 취득의 영광을 돌리고 싶습니다. 그리고 늘 따뜻하 게 또 센스있게 보살펴준 언니에게도 감사드립니다.

연구를 진행할 때 바쁘고 힘든 와중에도 도움을 주신 병원과 약대 실험실의 여러 동료분들께 감사드립니다. 또한 외롭고 고된 시간 동안에 함께 해주고 격려해준 혜 원언니, 정민자매, 혜경, 연영, 그리고 흰둥이와 감자에게 감사의 마음을 전합니다.

지면으로 미처 언급하지 못한 저를 아껴주시고 격려해주셨던 많은 분들께도 진심 으로 감사하다는 말씀을 드립니다. 또한 부족한 저의 좌충우돌의 성장과정에서 성 숙하지 못한 저의 모습으로 혹여나 마음이 아프셨거나 상처를 드린 분이 있다면 이 글을 보지 못하시더라도 마음 깊이 미안함과 감내해주신 것에 감사의 마음을 전합

115

니다.

앞으로 꼭 하고 싶었던 일에 더욱 정진하여 난치성 질환을 위한 천연물 약물의 개발과 연구에 꼭 필요한 사람이 되도록 노력하겠습니다.

마지막으로 늘 부족한 자녀이기에 죄송스러운 마음이 가득한데, 하늘에 계신 우 리 아버지, 하나님 아버지께 이 모든 것 감사드립니다.

2023년 8월

이지형 올림