



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

타목시펜 저항성 유방암의 전이에서

P2X7 수용체의 역할

:엑소좀 분비에 미치는 영향

Involvement of P2X7 receptor in metastasis of

tamoxifen-resistant breast cancer

:effects on exosome secretion

2017년 2월

서울대학교 대학원

약학대학 약물학 전공

김 지 은

타목시펜 저항성 유방암의 전이에서 P2X7

수용체의 역할

:엑소좀 분비에 미치는 영향

Involvement of P2X7 receptor in metastasis of  
tamoxifen-resistant breast cancer  
:effects on exosome secretion

지도교수 강 건 욱

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함

2017년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

김 지 은

김지은의 석사학위논문을 인준함

2016년 12월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 김 상 건 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 이 승 희 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 강 건 욱 \_\_\_\_\_ (인)

## 초 록

### 타목시펜 저항성 유방암의 전이에서 P2X7 수용체의 역할 :엑소좀 분비에 미치는 영향

유방암은 여성에게서 특히 발병률이 높은 암으로, 항호르몬치료에 대표적으로 쓰이는 약은 타목시펜(tamoxifen)이 있다. 조기 유방암이 확진된 여성의 경우에는 타목시펜(tamoxifen)으로 5년간 치료를 받았을 경우 치료를 받지 않은 대조군에 비하여 유방암 재발률, 사망률이 유의미하게 감소될 수 있다. 하지만 타목시펜을 장기적으로 사용할 경우 이에 대한 내성을 가질 우려가 존재하며 이러한 경우에 대한 치료법은 아직 확립되지 않은 실정이다.

본 논문에서는 에스트로겐 수용체 양성 유방암세포(MCF-7)에 비해 타목시펜 저항성을 획득한 유방암세포(TAMR-MCF-7)에 있어서 Purinergic 수용체 중의 하나인 P2X7의 발현이 더 높은 것을 규명하였으며, 이러한 P2X7의 발현이 타목시펜 저항성 유방암세포의 증식, 이동능 및 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 생성에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

연구 결과, 타목시펜 저항성 유방암세포에서 P2X7의 높은 발현은 타목시펜 저항성 유방암세포의 높은 이동능에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. P2X7의 작용제(agonist)인 ATP를 처리하였을 경우, TAMR-MCF-7의 이동성이 증가하였으며, P2X7의 길항제(antagonist)인 KN62를 처리하였을 경우, TAMR-MCF-7의 이동성이 감소되는 것을 세포 이동능 평가 시험(Transwell migration assay)과 상처 치유 시험(Wound healing assay)에서 확인하였다. 또한 간-비장 전이 동물 실험(liver-spleen metastasis)에서도 P2X7의 길항제인 KN62를 복강 내 투여하였을 경우 투여하지 않은 대조군에 비하여 비장에서 간의로의 전이(metastasis)가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 생체 외(in vitro)와 생체 내(in vivo)에서 모두 P2X7이 타목시펜 저항성 유방암세포의 이동능에 관련되어 있다는 사실을 시사한다.

하지만 암의 전이에 관여한다고 알려진 MMP-2(Matrix metalloproteinase-2)와 MMP-9(Matrix metalloproteinase-9)은 ATP나 KN62에 따른 발현양의 변화를 보이지 않았으며, 상피간엽이행(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)에 관여하는 인자들 또한 변화가 없는 것으로 나타났다.

본 논문에서는 P2X7의 세포 이동능 조절에 관여하는 하위인자로 엑소좀(Exosome)을 제시한다. 엑소좀은 다포성 소체(Multivesicular body)로 내부에는 단백질, DNA, RNA 및 non-coding RNA 등이 들어있으며 세포와 세포간의 상호작용을 매개하는 인자로 알려져 있다. P2X7의 길항제인 KN62에 의해 세포당 생성되는 엑소좀의 수가 감소하며 엑소좀의 방출에 관여하는 CD63의 발현이 줄어든다는 사실을 통해 P2X7이 엑소좀의 방출에 관여한다는 사실을 밝혔다. 또한 타목시펜 저항성 유방암세포의 배양배지에서 엑소좀을 제거하였더니 세포의 이동능이 완벽하게 억제되었으며, 엑소좀이 제거된 배양배지에 인공적으로 분리한 암세포의 엑소좀을 다시 넣어주었을 경우, 부분적으로 세포의 이동능이 증가하는 것을 세포 이동능 평가 시험을 통해 확인하였다. 이는 엑소좀이 타목시펜 저항성 유방암세포의 이동능에 관여하고 있음을 시사한다.

종합하면, 본 연구에서는 에스트로겐 수용체 양성 유방암세포와 비교해서 타목시펜 저항성 유방암세포의 높은 이동능이 P2X7 수용체의 활성화 또는 억제에 따라 영향을 받을 수 있어 P2X7이 전이를 억제하는 타겟이 될 수 있으며, 이러한 암세포의 이동능에 영향을 끼치는 P2X7의 하위인자로 엑소좀이 관여하고 있음을 제시한다.

주요어: Tamoxifen-resistant breast cancer(TAMR-MCF-7), P2X7, Metastasis, Exosome

학번: 2015-21871

# 목차

국문요약 .....	1
목차 .....	3
List of Abbreviations .....	4
List of Figures .....	5
I. 서론 .....	6
II. 실험 재료 및 방법 .....	9
1. 시약 및 재료 .....	9
2. 세포주 배양 .....	9
3. 실험 동물 및 간-비장 전이 모델 동물 실험 .....	10
4. 면역화학적 분석 (Western Blot analysis) .....	10
5. Total RNA의 분리 및 Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	11
6. 형광염색 (Immunocytochemistry) .....	13
7. 세포 성장 분석 .....	13
8. Transwell Migration assay .....	14
9. Wound healing assay .....	14
10. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA analysis) .....	15
11. 조직병리학적 분석 (Histopathological analysis) .....	15
12. Exosome Isolation .....	15
13. Proteomics analysis .....	16
14. Nanoparticle Tracking Analysis .....	16
15. Nano Particle size measurement .....	17
16. Ca <sup>2+</sup> 실시간 정량 .....	17
17. 통계처리 방법 (Statistical analysis) .....	17
III. 실험 결과 .....	18
IV. 고찰 및 결론 .....	46
V. 참고 문헌 .....	51
VI. 영문요약 .....	56

## List of Abbreviations

ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosine triphosphate
$\beta$ -actin	Beta actin
E-cad	E-cadherin
EMT	Epithelial mesenchymal transition
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glycealdehyde 3-phosphate dehydrogenase
IL-18	Interleukin-18
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
I.P.	Intraperitoneal
MMP-2	Matrix metalloproteinase -2
MMP-9	Matrix metalloproteinase -9
N-cad	N-cadherin
N.D.	Not detected
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
N.S.	Not significant
P2X7	P2X purinoceptor 7
TAMR	Tamoxifen-resistant
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## List of Figures

- Figure 1** Enhanced expression of P2X7 Receptor in TAMR-MCF-7
- Figure 2** Effects of P2X7 on proliferation and VEGF secretion in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells
- Figure 3** P2X7 is involved in migration of TAMR-MCF-7 cells
- Figure 4** P2X7 antagonists suppress migration of TAMR-MCF-7 cells in vivo
- Figure 5** P2X7-mediated cell migration is not dependent on EMT or MMP
- Figure 6** Role of P2X7 in exosome secretion in TAMR-MCF-7 cells
- Figure 7** Critical role of exosome in cell migration of TAMR-MCF-7 cells, but not in cell proliferation
- Figure 8** Proteomics analysis of MCF-7 and TAMR-MCF-7 exosomes



## I. 서론

유방암은 유방에 발생한 암 세포로 이루어진 종괴를 의미하며, 일반적으로 유방의 유관과 유엽에서 발생하는 암을 일컫는다(1). 유방암은 한국에서는 여성에게 발생하는 전체암 중 갑상선암에 이어 두 번째로 흔한 암으로, 한국은 북미, 서유럽과 함께 고소득 국가로 분류되어 암발생률이 높은 국가로 분류되고 있다(2, 3). 한국에서의 여성 유방암의 연도별 발병 추이는 지속적으로 십여 년간 증가해왔으며, 그 원인을 확실히 규명할 수는 없으나 고지방, 고칼로리 섭취와 같은 서구화된 식생활과 그로 인한 비만, 늦은 결혼과 출산을 저하, 수유 감소, 빠른 초경과 늦은 폐경 등으로 인한 에스트로겐 노출 기간 감소 등이 요인으로 생각되고 있다(1).

유방암의 치료방법으로는 크게 수술적 치료, 방사선 치료, 항호르몬 치료, 항암화학요법 치료, 표적 치료 등이 있으며, 이 중 항호르몬 요법은 에스트로겐 수용체 양성 유방암의 경우 사용될 수 있다. 유방암의 약 70% 정도가 에스트로겐 수용체 양성으로 여성 호르몬의 영향으로 암세포가 성장하는 양상을 보인다. 항호르몬 요법은 다른 보조 치료 방법에 비해 약제에 의한 합병증이 적고 효과적으로 유방암을 치료할 수 있는 방법이라는 장점이 있으며, 이 경우 사용되는 약제로 타목시펜(Tamoxifen)이 있다. 하지만 타목시펜을 장기간 사용할 경우 이에 대한 내성이 나타날 우려가 있으며, 내성을 획득한 경우 타목시펜에 반응하지 않거나 타목시펜에 의존적, 심지어 더 증가된 성장 양상을 보인다는 연구 결과도 보고되었다. 또한 타목시펜 내성을 획득한 경우 암세포는 더 증가된 이동능과 침윤성을 보이며 전이능이 증가된다는 보고가 있다(4, 5). 유방암의 진단 후 5년 생존률은 89.2%로 다른 암에 비해 상대적으로 높은 편에 속하지만, 전이된 이후의 5년 생존률은 25.0%로 급격하게 떨어진다(6). 하지만 이러한 경우에 대한 치료법은 아직 확립되지 않은 실정이다.

최근에, 암세포의 미세환경은 암의 진행과 항암제 내성에 있어 중요한 요소로 점

차 주목받고 있으며(7), 이에 따라 본 연구에서는 암세포의 미세환경에 풍부하게 존재하고 있는 퓨린 염기와 이를 통해 작동하는 신호체계에 대해 주목하게 되었다.

퓨린 염기는 Purinergic receptor(퓨린 수용체)를 통해서 Purinergic signaling(퓨린 신호전달체계) 작동을 매개하며 이를 통해 숙주와 암 사이의 상호작용에 중요한 역할을 한다. (8, 9) Purinergic receptor에는 P1 Receptor와 P2 Receptor가 있으며 P2 Receptor는 다시 G-Protein coupled receptor인 P2Y Receptor와 ligand-gated ion Channel인 P2X Receptor로 나뉜다. (10)

P2X7 수용체는 ATP를 ligand(리간드)로 하여 작동되는 수용체로 대식세포, 면역세포, 미소교세포, 췌장, 피부, 내분비 기관에 분포한다고 알려져 있으며, 암에서는 유방암, 상피세포암, 갑상선암, 전립선암, 폐암 등 다양한 종류의 암에 과발현되어 있다. P2X7수용체가 활성화되면 칼륨 세포 외 배출, 칼슘 세포 내 유입과 같은 신호를 일으키며, NLRP3, ASC, Pro-caspase-1 으로 구성된 inflammasome을 활성화 시켜 염증반응, 세포 사멸을 일으킨다고 알려져 있다. 또한, 암세포에서는 암세포의 성장, 사멸, 전이와도 관련되어 있다고 알려져 있으며 P2X7를 발현하는 대부분의 암세포는 더 증가된 성장, 침윤, 전이를 보인다는 연구결과가 보고되어 있다(10, 11). 하지만 유방암세포와 타목시펜 저항성 유방암세포에서 P2X7 수용체의 역할에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 유방암세포와 타목시펜 저항성 유방암세포에서 P2X7 수용체의 역할에 대해 규명하고자 하였다.

한편, 암세포의 미세환경에 존재한다고 알려진 Exosome(엑소좀)은 크기가 30-100nm의 작은 지질 이중층으로 이루어진 “컵” 또는 “쟁반” 모양의 소포로 밀도는 (1.13-1.19g/ml)이다(12). 1980년대에 처음으로 reticulocyte(망상적혈구) 성숙 과정에서 발견되었으며(13), 다양한 포유동물의 세포의 plasma membrane(원형질막)에서 multivesicular body(다소포체)의 융합될 때 방출된다(13).

엑소좀의 지질 이중층 내부에는 엑소좀이 기원한 원세포의 단백질, 지질, 핵산 등이

포함되어 있으며(14), 피, 오줌, 복수, 양수와 같은 체액에 광범위하게 존재한다고 알려져 있다(15). 엑소좀은 다양한 종류의 세포에서 분비되며 엑소좀에 포함된 핵산, 단백질과 같은 물질들은 세포 간 또는 세포 내부의 상호작용에 있어서 중요한 역할을 한다(16, 17). 또한, 암세포에서 엑소좀은 암 촉진자 또는 억제자 물질의 방출을 통해 세포의 신호전달에 영향을 끼치거나 암의 미세환경의 형성을 촉진하여 암의 진행, 혈관신생, 전이, 면역반응 회피에 영향을 끼친다(18, 19, 20).

본 연구에서는 타목시펜 저항성을 획득한 유방암세포에서 P2X7 수용체의 발현이 유의적으로 높음을 확인하고, 이와 타목시펜 저항성 유방암의 높은 이동능과 전이에 대한 기능적 역할을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 P2X7의 작용제 및 길항제 약물을 사용하여 타목시펜 저항성 유방암의 이동능 및 전이를 평가하였으며, P2X7가 타목시펜 저항성 유방암의 전이를 억제하는 타겟이 될 수 있음을 제시하고자 하였다.

나아가 P2X7이 타목시펜 저항성 유방암의 이동능 및 전이에 영향을 끼치는 세부 기전을 규명하고자 하였으며, 그 기전으로 암의 미세환경에 존재하고 있으며 세포와 세포의 상호작용에 관여하는 엑소좀을 제시하고자 한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

Zeb-1 항체, Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG 항체, Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG 항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)에서 구입하였다. E-caderin 항체, N-caderin 항체는 BD bioscience (NJ, USA)에서 구입하였다. NLRP3 항체, ASC 항체는 Adipogen (Liestal, Switzerland)에서 구입하였다.  $\beta$ -actin 항체, Adenosine triphosphate (ATP), Hematoxylin과 Eosin은 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 4-hydroxytamoxifen은 Tocris Bioscience (Bristol, UK)에서 구입하였다. Snail 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. anti-goat IgG 항체, CD63 항체, Rab5 항체, Vimentin 항체, P2X7 항체, pro-Caspase-1 항체는 Santa Cruz biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다. KN62는 광주과학기술원 (Gwangju, Korea)에서 제공받았다. Exosome-depleted FBS Media Supplement는 systembio science (CA, USA)에서 구입하였다. Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 546 Phalloidin 항체는 Life technologies (CA, USA)에서 구입하였다.

### 2. 세포주 배양

실험에 사용한 세포주는 유방암세포인 MCF-7과 타목시펜 저항성 유방암 세포인 TAMR-MCF-7 (tamoxifen-resistant MCF-7) 이다. TAMR-MCF-7은 MCF-7에 항암제인 Tamoxifen을 장기간 처리하여서 만들었다. (Phuong et al., 2011; Knowden et al., 2003; Choi et al., 2007) MCF-7 세포주는 10% Fetal Bovine Serum (FBS)와 100 units/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을

첨가한 High glucose Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)에서 배양하였다. TAMR-MCF-7 세포주는 10% charcoal stripped FBS (Gemini bioproduct, CA, USA)와 100 units/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 3  $\mu$ M의 4-hydroxytamoxifen (Sigma-aldrich, MO, USA) 가 첨가된 High glucose Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)에서 배양하였다. 5%의 CO<sub>2</sub> 가 포함된 37°C 인큐베이터에서 배양하였다.

### 3. 실험 동물 및 간-비장 전이 모델 동물 실험

5주령 BALB/c-nu 쥐는 라온바이오 (Raon Bio Inc., Seoul, Korea)에서 구입하였다. 1주일간의 순화 기간을 거친 후, 쥐의 왼쪽 측면을 절개한 후 spleen을 찾아 수술용 봉합사를 이용하여 절반을 묶었다. TAMR-MCF-7 세포를 100 units/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 함유한 PBS에  $1 \times 10^7$  cells/mL 로 준비한 후, 묶은 spleen 아랫부분에 0.1ml 씩 천천히 주입하였다. 절개한 부분을 수술용 봉합사로 잘 봉합한 후 1주일 간 상처가 아물게 두었다. 1주일 후 무작위로 군을 나누었고, polyethylene glycol (PEG) 400과 생리식염수를 2:3 비율로 섞어 만든 vehicle과 vehicle에 KN62를 녹인 것을 1주일에 3번씩 6주 간 각각 일정한 시간에 복강 내 투여(i.p.) 하였다. 6주 후 투여가 끝난 후에는 조직학적 분석을 위해 간조직을 formalin(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)에 고정하였다.

### 4. 면역화학적 분석 (Western Blot analysis)

세포의 배양 배지를 제거한 후 세포에 phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)와 proteinase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)를 첨가한 세포 용해 완충액 (50mM Tris-Cl, pH7.6, 120mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 50mM NaF, 200mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))을

가하여 1시간 동안 얼음 위에서 세포를 용해하였다. 이후 13000g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 전세포 추출액으로 사용하여 Bradford 정량법을 이용하여 단백질 농도를 정량하였다. 이후 각각의 단백질 샘플을 8-12%사이의 젤을 이용해서 SDS-PAGE ( sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)법으로 분리하였다. 이후 전기영동이 끝난 겔을 nitrocellulose membrane 0.45  $\mu$ m filter(GE healthcare Life Sciences, Chalfont, Buckinghamshire, UK)로 전이완충용액(25mM Tris, 192mM glycine, 20% v/v methanol, pH 8.3)을 이용하여 40V, 190분간 transfer 시켰다. 이후 transfer시킨 나이트로셀룰로오즈막을 5% skim milk (BD Biosciences, San Jose, CA)로 1시간 동안 인큐베이션 한 후, 1차 항체로 4°C overnight, HRP-conjugated anti-IgG를 2차 항체로 사용하였다. 이를 enhanced chemiluminescence(ECL) system reagent(EMD Milipore, Billerica, MA, USA)로 발색하여 LAS3000-mini(Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

## 5. Total RNA의 분리 및 Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

6well에 MCF-7과 TAMR-MCF-7 세포를  $6 \times 10^5$  cells/well로 seeding 한 후 TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY)를 이용하여 제조사의 Protocol에 따라 total RNA(1  $\mu$ g)를 추출하였다. 이후 얻은 RNA를 Maxime RT PreMix Kit (intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 얻은 cDNA를 Maxime PCR PreMix Kit (intron biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 원하는 타겟을 PCR로 증폭시킨 후 2% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 다음과 같다. hP2X1 Forward: 5'-TTTCATCGTGACCCCGAAGCAG-3', Reverse:

5`-TCAAAGCGAATCCCAAACACC-3`.	hP2X2	Forward:
5`-ACCTGCCCCGAGAGCATAAG-3` ,		Reverse:
5`-AATGACCCCGATGACACCACCC-3` ,	hP2X3	Forward:
5`-CACCTCGGTCTTTGTCATCATCAC-3` ,		Reverse:
5`-TGTTGAACTTGCCAGCATTCC-3`.	hP2X4	Forward:
5`-ACAGCAACGGAGTCTCAACAGG-3` ,		Reverse:
5`-CCTTCCCAAACACAATGATGTCG-3`.	hP2X5	Forward:
5`-AACCTGATTGTGACCCCAACC-3` ,		Reverse:
5`-TCGCAGAAGAAAGCACCCCTTGC-3`.	hP2X6	Forward:
5`-GGTGACCAACTTCCTTGTGACG-3` ,		Reverse:
5`-CCCAGTGA ACTCTGATGCCTACAG-3`.	hP2X7	Forward :
5`-TGCGATGGACTTCACAGATTTG-3` ,	Reverse	:
5`-TGCCCTTCACTCTTCGGAAAC-3`.	hP2Y1	Forward:
5`-CCGGCTGTCTACATCTTGGT-3` ,		Reverse:
5`-GGCAGAGTCAGCACGTACAA-3`.	hP2Y2	Forward:
5`-CCACCTGCCTTCTCACTAGC-3` ,		Reverse:
5`-TGGGAAATCTCAAGGACTGG-3`.	hP2Y4	Forward:
5`-TGCCTGGTCACTCTTGTTTG-3` ,		Reverse:
5`-GTACTCGGCAGTCAGCTTCC-3`.	hP2Y6	Forward:
5`-CGACCACATGAGCTCCTACA-3` ,		Reverse:
5`-GAGCTTCTGGGTCCTGTGAG-3`.	hP2Y11	Forward:
5`-AGGGCAAAGTGATGTTCCAC-3` ,		Reverse;
5`-CCCTCCAGGCTCTTCTTTCT-3`.	hP2Y12	Forward:
5`-AACTGGGAACAGGACCACTG-3` ,		Reverse:
5`-ACATGAATGCCCAGATGACA-3`.	hP2Y13	Forward:
5`-TCGTGGCTGTCTTCTTTGTG-3` ,		Reverse:

5`-TTTCTTGGCTTGATGCTGTG-3`.	hP2Y14	Forward:
5`-TTAAAAGGCCTCTGCCTTCA-3`.		Reverse:
5`-AGAGCTGGGCACGTAAAAGA-3`.	hGAPDH	Forward:
5`-CATCAGAAGTATGACAACAGCC-3`.		Reverse:
5`-AGTCCTTCCACGATACCAAAG-3`.	s16r	Forward:
5`-TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC	-3`.	Reverse:
5`-CGTTCACCTTGATGAGCCCA-3`.		

## 6. 형광염색 (Immunocytochemistry)

24-well plate에 70% 에탄올로 멸균한 coverglass를 올려놓고  $1 \times 10^5$  cells/well 이 되도록 250  $\mu$ L씩 시딩한 후 50~70% cell confluency가 되게끔 overnight 동안 배양하였다. 이후 FBS가 없는 High glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지로 갈아주고 약물을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 PBS로 washing을 2번 실시한 후, 4% paraformaldehyde 로 상온에서 20분간 고정한 후, 0.1% Triton X-100 로 상온에서 15분간 세포의 투과성을 높여주었다. PBS로 3번 washing 한 후, 10% horse serum으로 상온에서 1시간 동안 cell을 배양, 선택한 1차 항체로 4°C overnight, fluorophore-conjugated antibody를 2차 항체로 사용하였다. 이후 coverglass를 slideglass위에 올려놓고 mounting gel (Biomedex, CA, USA)로 고정한후, iRIS™ Digital Cell Imaging System(Logos Biosystems, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 측정하였다.

## 7. 세포 성장 분석

96-well plate에  $3 \times 10^3$  cells/well 로 100  $\mu$ L씩 시딩한 후 overnight동안 배양하였다. 이후 실험 조건에 맞는 미디어를 100  $\mu$ L씩 첨가한 후, Incucyte



Zoom(Essen bioscience, MI, USA)을 이용하여 4시간 간격으로 well을 사진으로 찍어 cell confluence를 면적 비율로 계산, 시간에 따라 비율의 증가정도를 분석하여 세포 성장 양상을 관찰하였다.

## 8. Transwell Migration assay

polycarbonate 막으로 구성된 24-well transwell unit (Corning, MA, USA)를 이용하여 실험을 수행하였다. transwell unit의 아랫부분에 Type I Collagen (Collaborative Research, KY, USA)를 코팅한 후 1시간 동안 상온에서 말리는 과정을 수행하였다. 이후 FBS가 없는 조건의 High glucose Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) 배지에  $5 \times 10^5$  cells/mL로 준비한 후, 약물을 함께 처리한 실험군 또는 대조군을 100 $\mu$ L씩 transwell unit 안쪽 부분에 시딩하였다. transwell unit 바깥쪽에는 10% FBS를 포함한 High glucose Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) 배지를 600 $\mu$ L씩 넣어주어 FBS를 화학유인 물질(Chemoattractant)로 사용하여 18시간 배양하였다. 배양한 후에는 4% Formalin으로 20분, methanol로 1분간 고정하는 과정을 거쳤으며, Hematoxylin으로 10분, Eosin으로 4분간 고정한 세포를 염색하였다. 이후에 transwell unit 안쪽에 이동하지 못한 세포는 제거한 후, transwell unit 바깥쪽으로 이동한 세포만 polycarbonate 막을 떼내어 슬라이드 글라스 위에 mounting gel(Biomedex, California, USA)을 이용하여 고정하였다. 400X magnification을 이용하여 8부분을 찍고 각 부분의 세포 수를 측정하여 세포의 이동능을 분석하였다.

## 9. Wound healing assay

96-well WoundMaker (Essen bioscience, MI, USA)를 이용하여 실험을 수행하였다. 96-well ImageLock plate (Essen bioscience, MI, USA)를 이용하여  $4 \times 10^4$  cells/well 로 100  $\mu$ L씩 시딩한 후, cell confluency가 100%가 되도록

overnight로 배양한 후, 96-well WoundMaker를 이용하여 Scratch를 만들어주었다. 이후 실험 조건에 맞는 미디어를 100  $\mu$ L씩 첨가한 후, Incucyte Zoom(Essen bioscience, MI, USA)을 이용하여 4시간 간격으로 Wound Scratch를 사진으로 찍어 그 변화양상을 분석하였다.

## 10. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA analysis)

VEGF(human) ELISA Kit는 Enzo life sciences 에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양 배지를 이용하여 제공된 Kit의 Protocol에 따라 실험을 수행하였다.

IL-18(human) ELISA Kit는 Medical & Biological Laboratories에서 구입, IL-1  $\beta$  (human) ELISA Kit는 Lifetechnologies에서 구입하여 사용하였다. IL-18(human)과 IL-1  $\beta$  (human) 는 Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Merck milipore, Darmstadt, Germany)를 이용하여 세포의 배양 배지를 80배 농축한 후 Kit의 Protocol에 따라 실험을 수행하였다.

## 11. 조직병리학적 분석 (Histopathological analysis)

간-비장 전이 모델 동물 실험을 통해 얻은 쥐의 간조직 샘플을 4% 포르말린에 고정시킨 후, 이에 대한 조직병리학적 분석을 조선대학교 의과대학 임성철 교수 연구팀에 의뢰, metastasis 정도 및 metastasis area를 분석하였다.

## 12. Exosome Isolation

세포주를 150mm-dish에 confluency가 90~100%정도 되도록 seeding 한 후에, phosphate-buffered saline (PBS)로 washing을 2회 실시하였다. 이후 FBS가 첨가되지 않은 High glucose Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)로 24시간 incubation 시켜 배양 배지를 얻었다. 얻은 배양 배지를 죽은 세포, debris 제거를 위해 단계별로 centrifugation 하였다. (300g \* 10min, 2500g \*

20min, 10000g \* 30min) Exosome 크기보다 큰 vesicles, contaminants 제거를 위해 200nm filtration을 수행하였다. (45mm Neck. 0.22  $\mu$ m PES, sterilizing, low binding, corning) 이후 얻은 상층액을 Ultracentrifugation 하였다. (120000g \* 90min, Optima XE -100, Type 32Ti rotor, Beckman Coulter) 다음으로 contaminating protein 제거를 위해 상층액을 모두 다 버린 후 PBS로 채워 한번 더 120000g \* 90min 조건에서 Ultracentrifugation 한 후, 상층액을 버리고 소량의 PBS 혹은 실험을 위한 solution에 녹인 후 실험에 사용하였다.

### 13. Proteomics analysis

경북대학교 의과대학 백문창 교수 연구팀(Daegu, Korea)에 시료분석을 의뢰하였다. Exosome isolation을 통해 얻은 Exosome solution을 100mM triethylammonium bicarbonate (TEABC, pH 8.0)에 재현탁시킨후, 60° C에서 20분간 10mM dithiothreitol (DTT)처리, 이후 상온에서 30분간 55mM iodoacetamide (IAA)처리, 이후 Trypsin을 처리하였다. Trypsin에 의해 분해된 펩타이드들은 hydrophilic lipophilic balanced (HLB) cartridge (Waters Oasis)를 통해 분리된 후, nano-ultra performance liquid chromatography (UPLC) (Waters, Milford, USA)와 질량분석기로 quadrupole-timeof-flight (Q-Tof) Premier (Waters, Milford, USA)를 이용하여 분석되었다. 이후 데이터 분석은 Mascot server 2.2 (Matrix Science, London, UK)를 이용하여 수행하였다.

### 14. Nanoparticle Tracking Analysis

경북대학교 의과대학 백문창 교수 연구팀(Daegu, Korea)에 시료분석을 의뢰하였다. 세포가 분비하는 엑소좀의 수를 측정하기 위해 Nanosight LM10, version 3.0 (Malvern Instruments, Malvern, UK)를 사용하였다. 측정조건은 다음과 같다.

Sample dilution : HPLC grade water (Thermo 1Fisher scientific)

Camera level: 7

Detection threshold: 5

Detection time: 30s

## 15. Nano Particle size measurement

ELSZ-1000 (Photal Otsuka Electronics, Osaka, Japan)을 이용하여 분리한 exosome의 Intensity, Volume, Numver Distribution을 측정하였다.

## 16. Ca<sup>2+</sup> + 실시간 정량

세포의 칼슘 농도 측정은 FlexStation scanning fluorimeter with integrated fluid transfer workstation (Molecular Devices, CA, USA)을 사용하여 실시하였다. 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well 로 시딩한 후 overnight동안 배양하였다. 이후 FLIPR Ca<sup>2+</sup> + assay kit (Molecular Devices, CA, USA)의 assay buffer를 사용하여 최종 부피가 200  $\mu$ L가 되게 한 후, 37°C에 1시간 동안 배양하였다. FlexStation을 사용하여 3분 동안 2.5초 간격으로 Excitation, emission, and cut-off를 485, 525, 515 nm로 설정한 후 세포 내 칼슘 농도를 측정하였다. Test solution (5  $\times$  concentration, 50  $\mu$ L)은 측정 후 30초 이후부터 78  $\mu$ L/s의 속도로 처리하였다.

## 17. 통계처리 방법 (Statistical analysis)

Densitometry scanning은 Multi gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 수행하였다. Student`s t-test를 이용하여 그룹 간의 유의성을 평가하였다. 통계학적 유의성은  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ 을 기준으로 표기하였다.

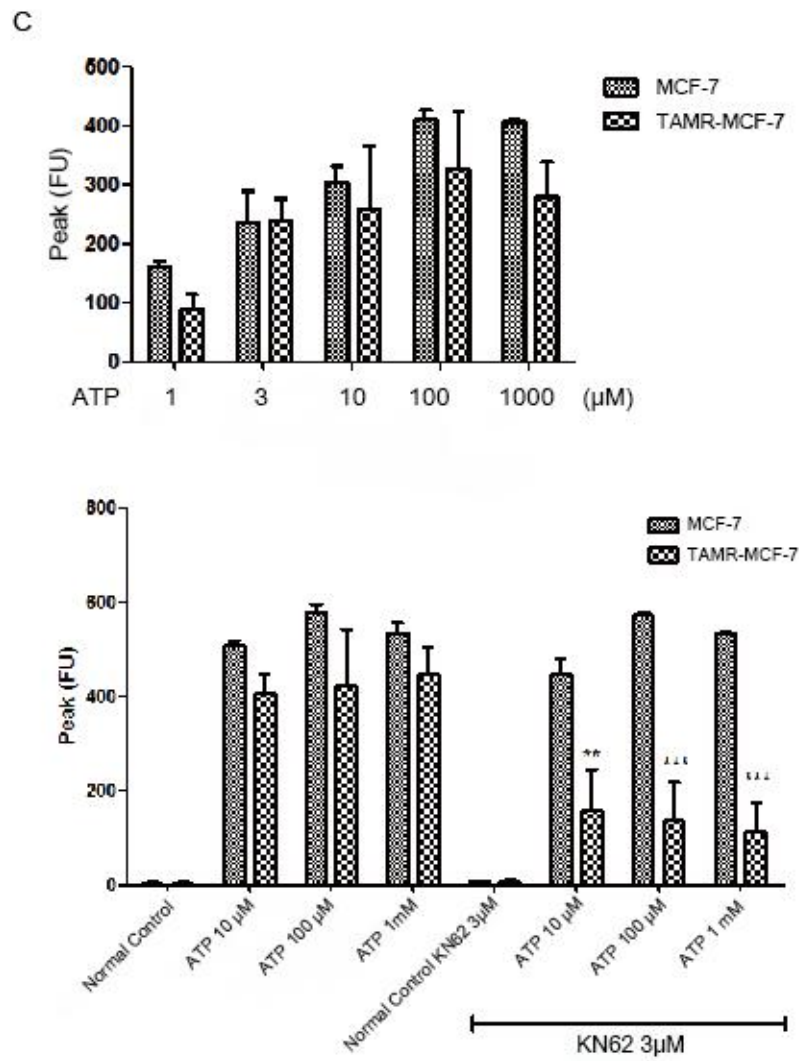
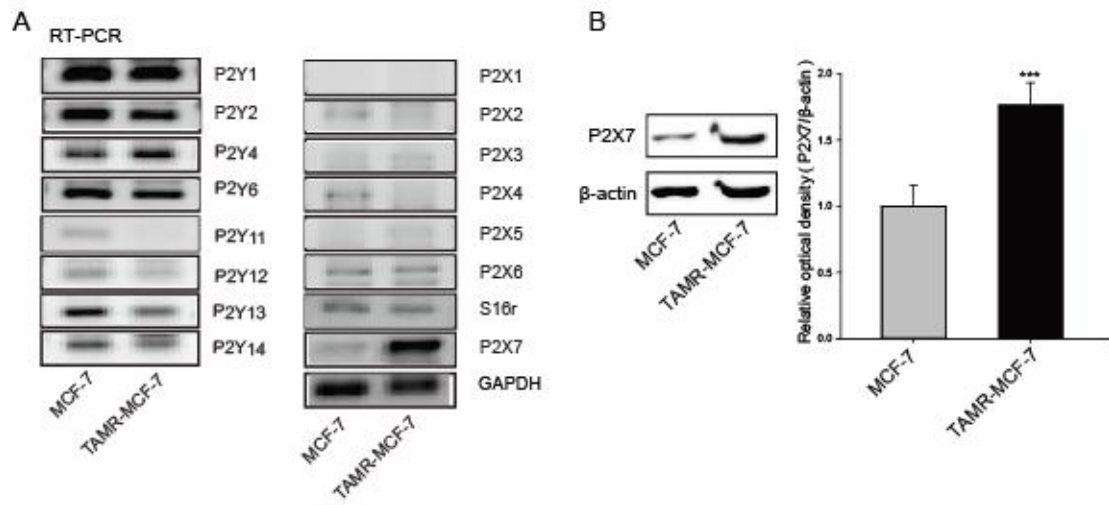
### Ⅲ. 실험 결과

#### 1. 타목시펜 저항성 유방암세포에서 P2X7 발현 증가

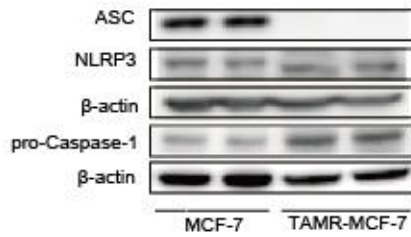
Purine 염기에 의해 Purinergic Receptor를 활성화시켜 작동하는 신호를 Purinergic Signaling이라고 한다(10). 이러한 Purinergic 수용체의 발현을 RT-PCR을 통해 유방암 세포인 MCF-7과 타목시펜 저항성 유방암 세포인 TAMR-MCF-7에서 확인해본 결과, TAMR-MCF-7에서 P2X7 수용체의 발현이 MCF-7에 비해 유의미하게 높음을 관찰할 수 있었다(Figure 1A). 또한 Western blot을 통해서도 P2X7 수용체의 발현이 TAMR-MCF-7에서 MCF-7에 비해 유의미하게 높음을 확인할 수 있었다(Figure 1B). 이것은 MCF-7과 비교하여 TAMR-MCF-7에서 P2X7 수용체의 mRNA, Protein 발현이 높다는 것을 의미한다(Figures 1A and 1B).

다음으로 고전적으로 알려진 P2X7 수용체의 활성화 기전에 관하여 MCF-7과 TAMR-MCF-7에서 평가하였다. 먼저 P2X7 수용체가 활성화되는 경우 유도된다고 알려진 세포 내 칼슘농도의 증가양상을 평가하였다. 그 결과, 저농도의 ATP(3, 10  $\mu$ M)에서도 MCF-7과 TAMR-MCF-7에서 칼슘 농도의 증가가 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, P2X7의 antagonist로 알려진 KN62를 전처리하였을 경우, TAMR-MCF-7에서만 칼슘농도의 증가가 유의미하게 억제되었다(Figure 1C). 이를 통해 TAMR-MCF-7에서의 세포 내 칼슘농도 증가에 있어서는 P2X7이 주요하게 작용한다는 사실을 알 수 있었다.

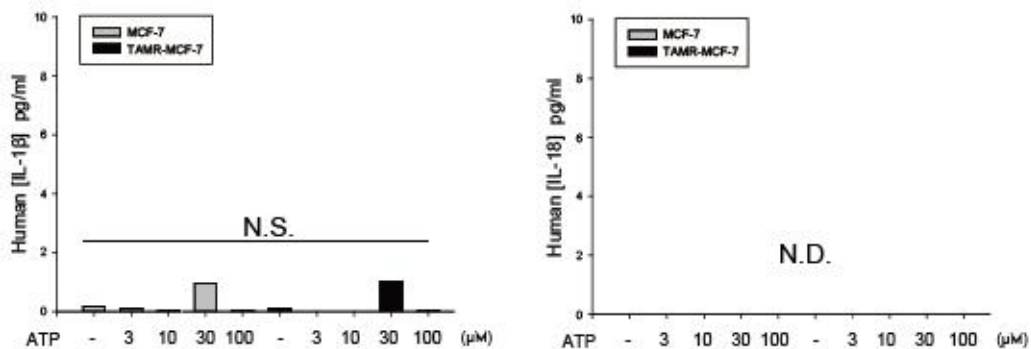
하지만, 역시 기존에 활성화된다고 알려진 Inflammasome은 TAMR-MCF-7에서 구성요소 중 하나인 ASC가 결손되어 있다는 사실 확인을 통해 활성화되지 못한다는 것을 알 수 있었으며(Figure 1D), Inflammasome의 활성화 결과 방출되는 하위 인자인 인터루킨 1 베타, 인터루킨 18의 방출 또한 유의미하게 이루어지지 않음을 알 수 있었다(Figure 1E).



D



E



### Figure1. Enhanced expression of P2X7 Receptor in TAMR-MCF-7

(A) mRNA Expression of P2Y Receptors (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14 Receptors) and P2X Receptors (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6, P2X7 Receptors) in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells

(B) Protein Expression of P2X7 Receptor in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells. \*\*\*  $P < 0.005$

(C)  $[Ca^{2+}]_i$  were determined using monolayers of MCF-7 or TAMR cells.

$[Ca^{2+}]_i$  were measured after treating ATP 1, 3, 10, 100, 1000  $\mu$ M. Each group was normalized by control groups. (upper)

KN62 3  $\mu$ M was pretreated for 1hrs before treating ATP 10, 100  $\mu$ M, 1mM. Each group was normalized by ATP non-treated groups. n=4, error bar SEM, \*\*  $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  (lower)

(D) Protein Expression of ASC, NLRP3, pro-Caspase-1 in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells.

(E) ELISA of human IL-1 $\beta$  and human IL-18 in 80 times concentrated supernatants of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treating ATP 3, 10, 30, 100  $\mu$ M for 24hr. supernatants were concentrated by using Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Merck milipore, Darmstadt, Germany).

N.S., not significant. N.D., not detected.



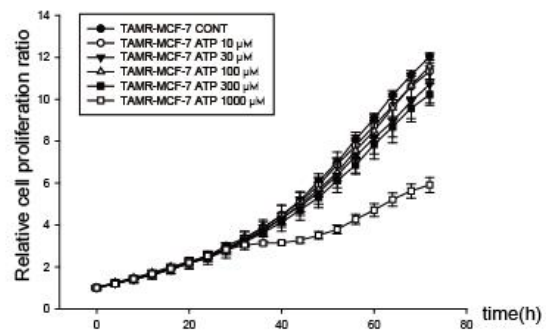
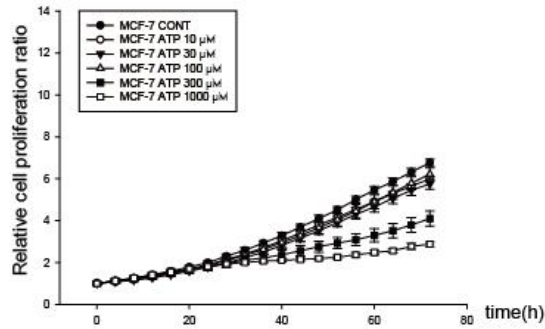
## 2. P2X7 수용체 활성화에 따른 타목시펜 저항성 유방암세포의 성장 및 VEGF 발현 평가

P2X7이 타목시펜 저항성 유방암세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 P2X7의 작용제인 ATP와 길항제인 KN62를 이용하여 타목시펜 저항성 유방암세포의 성장 및 VEGF의 발현양상을 평가하였다. P2X7이 암세포의 성장과 VEGF 발현을 촉진시키며(21, 22) 침윤을 촉진시킨다는 기존 연구 결과가 있다(23, 24, 25).

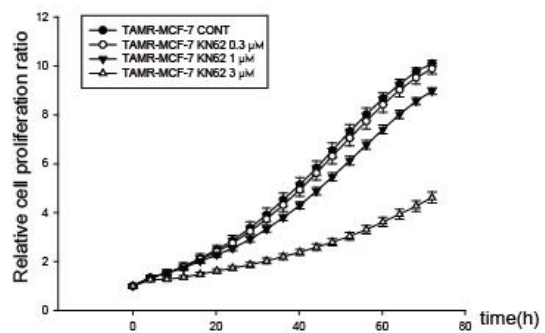
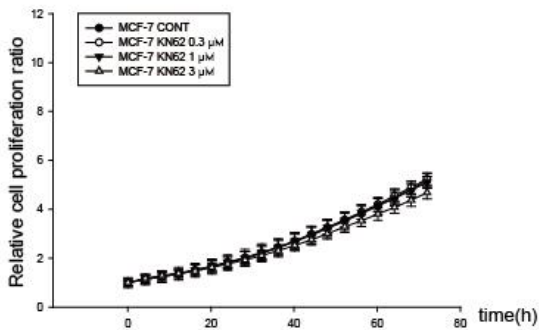
MCF-7과 TAMR-MCF-7세포에서의 세포 성장 및 VEGF 발현 양상을 비교하였다. 그 결과, MCF-7에 비해 TAMR-MCF-7은 유의성 있는 빠른 증식 양상을 보였으며, P2X7의 작용제인 ATP 처리시 유의미한 증식 속도의 변화는 보이지 않았다(Figure 2A). 또한, P2X7의 길항제인 KN62를 단독으로 처리하였을 경우, TAMR-MCF-7에서만 고농도의 경우 유의적인 성장 억제가 관찰되었다(Figure 2B). KN62에 의해 감소한 TAMR-MCF-7의 증식 양상이 ATP와 KN62를 함께 처리한 경우에 다시 증가하지는 않았다(Figure 2C). 이를 통해 P2X7가 억제될 경우 TAMR-MCF-7의 성장 억제가 일어나지만, ATP의 작용이 이를 상쇄시킬 수 없다는 사실을 확인하였다.

다음으로, P2X7이 VEGF 발현에 미치는 양상을 평가하였다. MCF-7에 비해 TAMR-MCF-7의 VEGF 발현이 높다는 사실을 확인하였으며, ATP에 의해 TAMR-MCF-7의 VEGF 발현이 유의적으로 증가하는 사실 또한 확인하였다. KN62에 의해 TAMR-MCF-7에서의 VEGF 발현이 감소하였으며, KN62와 ATP를 같이 처리한 경우, 감소된 VEGF 발현이 다시 증가하는 현상은 확인할 수 없었다(Figure 2D).

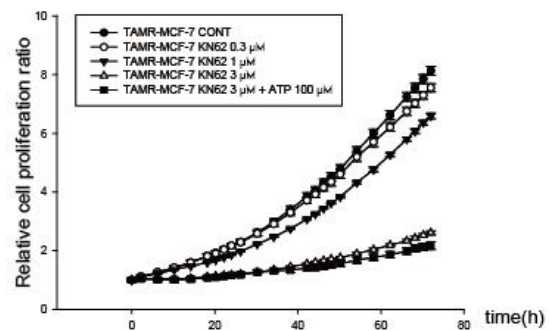
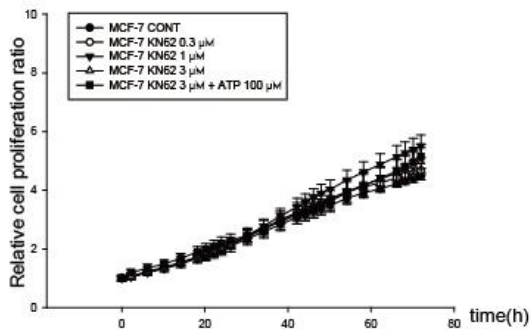
A

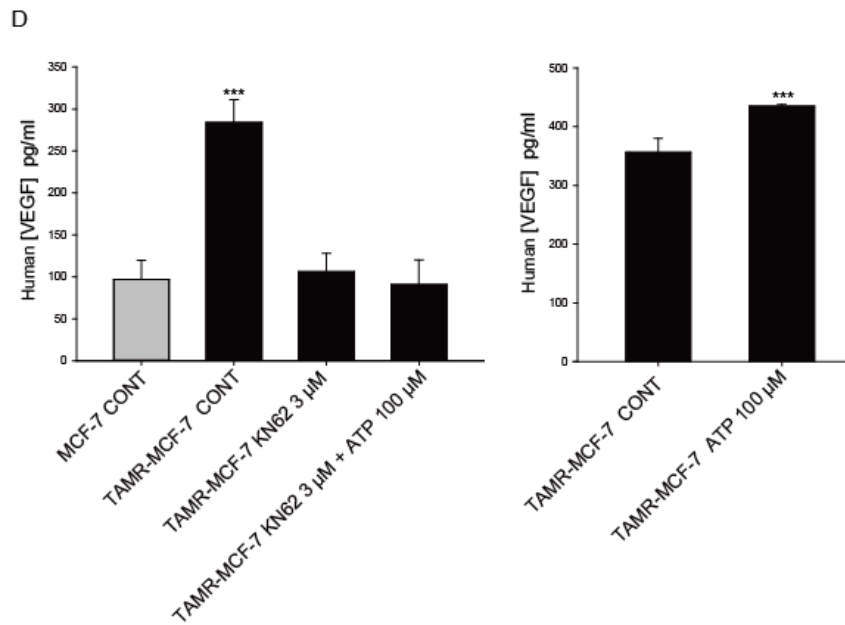


B



C





**Figure 2. Effects of P2X7 on proliferation and VEGF secretion in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells**

(A) MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells proliferation ratio relative to the initial cell plating number after treatment of ATP 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu$ M for 72h.

(B) MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells proliferation ratio relative to the initial cell plating number after treatment of KN62 0.3, 1, 3  $\mu$ M for 72h.

(C) MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells proliferation ratio relative to the initial cell plating number after treatment of KN62 0.3, 1, 3  $\mu$ M for 72h.

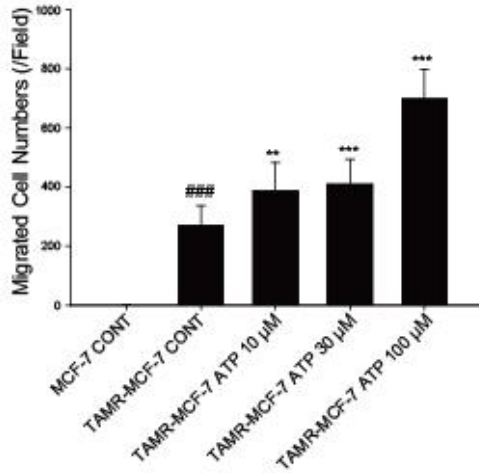
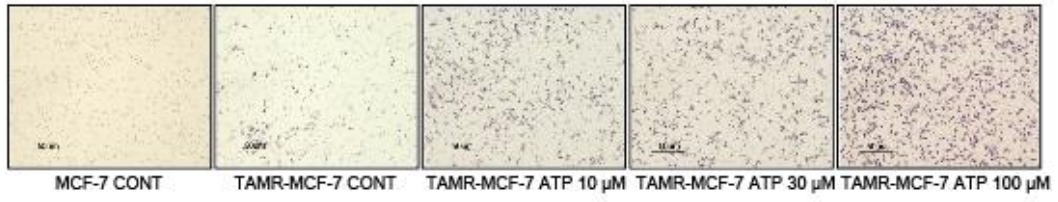
(D) MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells proliferation ratio relative to the initial cell plating number after treatment of KN62 0.3, 1, 3 and ATP 100  $\mu$ M for 72h.

### 3. P2X7 수용체 활성화에 따른 타목시펜 저항성 유방암세포의 이동능 변화

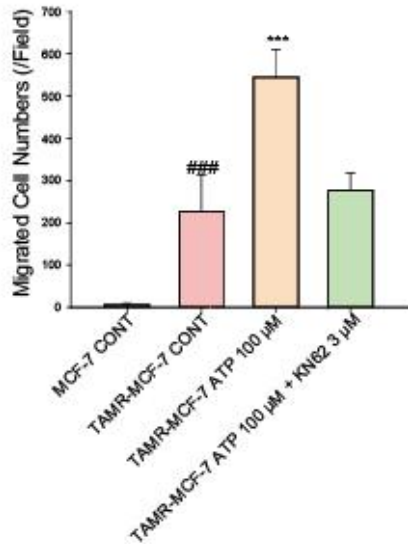
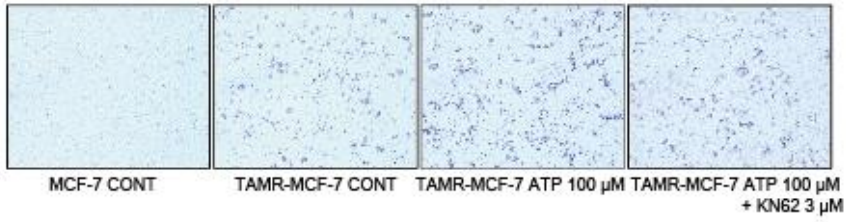
P2X7 수용체는 유방암, 상피세포암, 갑상선암, 전립선암, 폐암을 비롯한 다양한 암세포에 높게 발현되어 있으며 P2X7을 발현하는 암세포는 더 증가된 성장, 전이, 침윤을 보인다는 사실도 보고되어 있다(11, 26, 27). 따라서 타목시펜 저항성 유방암세포에서 더 증가된 P2X7 수용체의 발현이 타목시펜 저항성 유방암세포의 높은 이동능에 영향을 미치는 정도를 평가하였다.

그 결과, 유방암세포 MCF-7에 비해 타목시펜 저항성 유방암세포 TAMR-MCF-7의 이동능이 유의미하게 높다는 사실을 확인할 수 있었으며, 또한 P2X7의 작용제인 ATP를 처리한 경우, 타목시펜 저항성 유방암세포의 이동능이 유의적으로 증가하는 사실을 확인하였다(Figure 3A). ATP에 의해 증가한 타목시펜 저항성 유방암세포의 이동능은 P2X7의 길항제인 KN62를 ATP와 함께 처리한 경우 대조군과 유의미한 차이가 없는 수준으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3B). 나아가 KN62를 단독으로 타목시펜 저항성 유방암세포에 처리한 경우에도 TAMR-MCF-7의 이동능이 대조군에 비해 유의미하게 감소한 것을 transwell migration assay를 통해서 확인하였다(Figure 3C). Wound healing assay를 통해서도 같은 결과를 확인하였다(Figure 4D). 상기 결과는 타목시펜 저항성 유방암세포 TAMR-MCF-7의 이동능이 P2X7의 작용제 또는 길항제에 의해 영향을 받음을 시사한다.

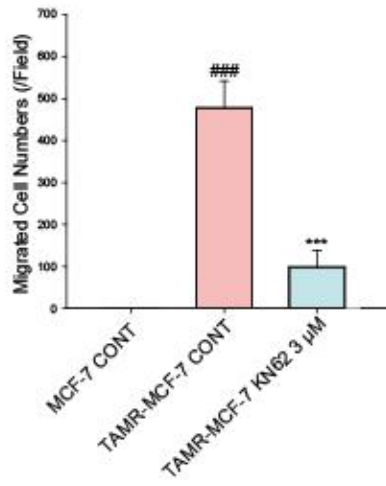
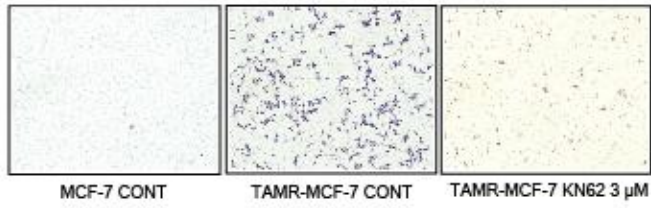
A



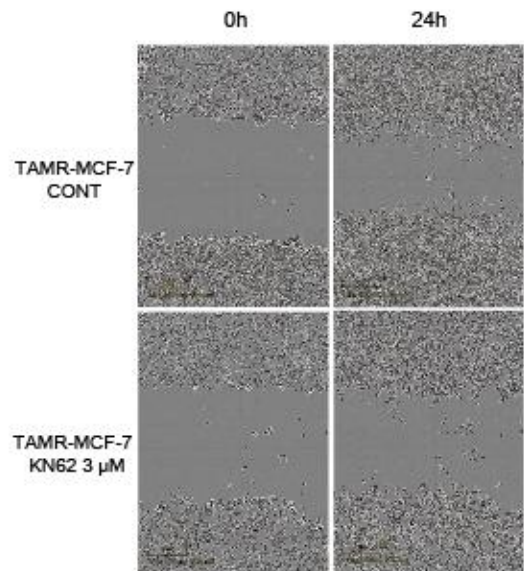
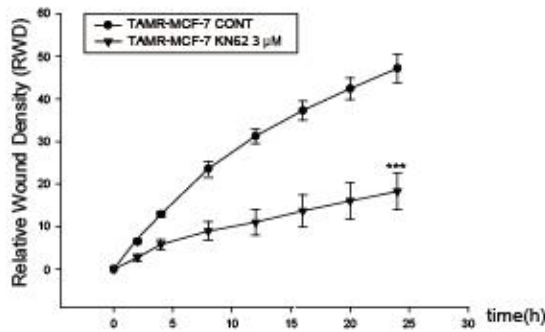
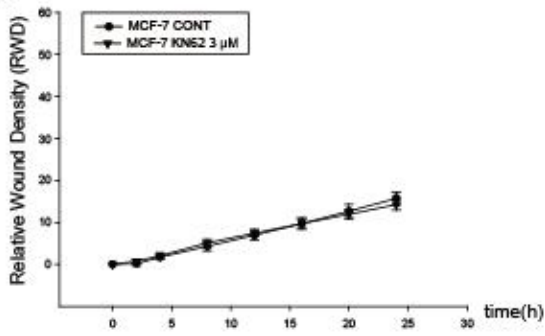
B



C



D



**Figure 3. Involvement of P2X7 in migration of TAMR-MCF-7 cells**

(A) migration of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of ATP 10, 30, 100  $\mu$ M for 18hr. Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus MCF-7 control, ### P<0.005;

Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.005;

(B) migration of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of ATP 100  $\mu$ M, KN62 3  $\mu$ M for 18hr. Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus MCF-7 control, ### P<0.005;

Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*\*\* P<0.005;

(C) migration of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of KN62 3  $\mu$ M for 18hr. Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus MCF-7 control, ### P<0.005;

Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*\*\* P<0.005;

(D) migration of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of KN62 3  $\mu$ M for 24hr. cell migration was evaluated by wound healing assay

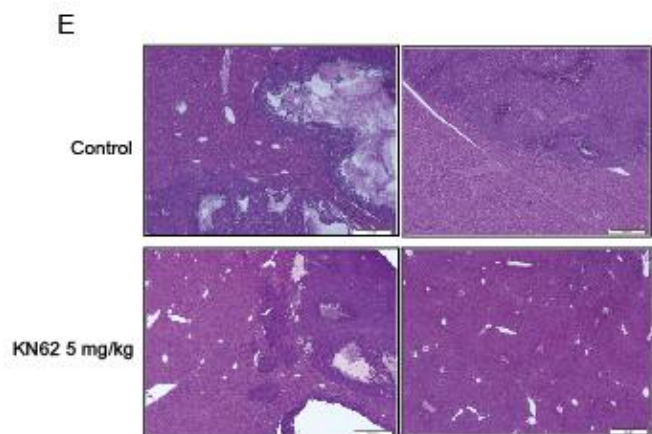
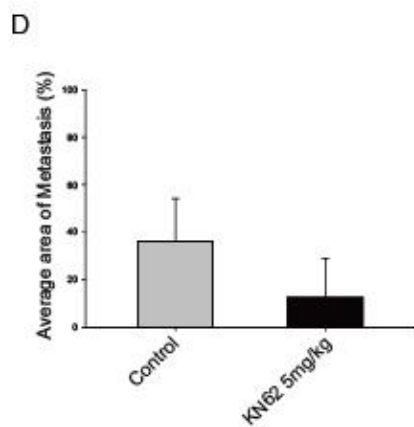
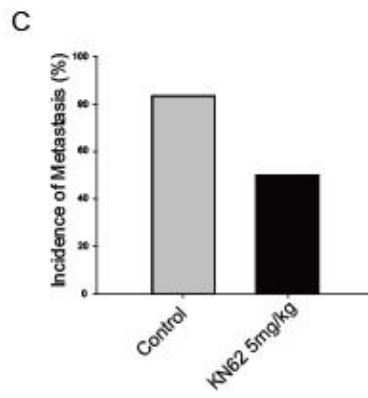
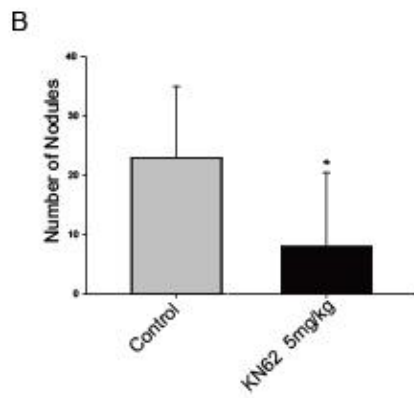
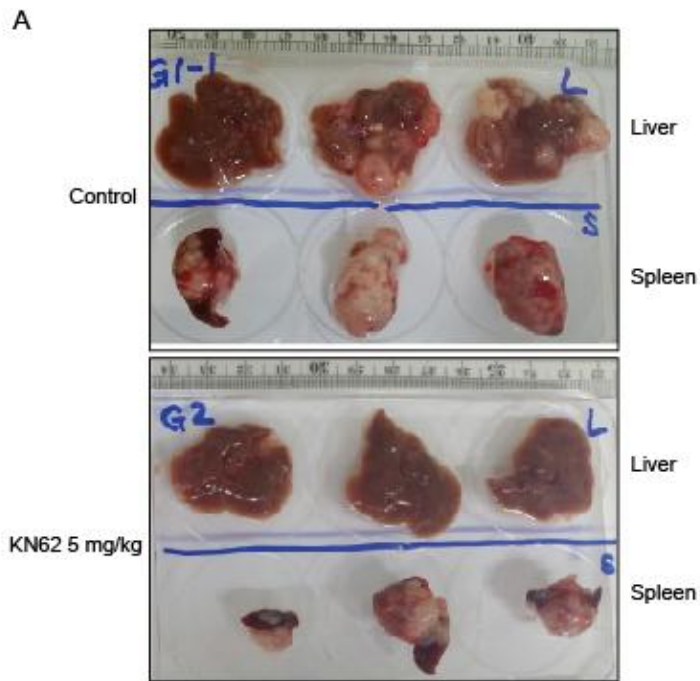
Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*\*\* P<0.005; (lower left)

Images were taken by Incucyte Zoom (lower right)

#### 4. 동물모델에서 P2X7 길항제의 타목시펜 저항성 유방암 세포 전이 억제 효과

타목시펜 저항성 유방암의 전이에 있어서 P2X7 길항제의 역할을 간-비장 전이 동물모델(Liver-Spleen metastasis)을 통해 생체 내에서 평가하였다. 5주령 BALB/c-nu 마우스의 비장에 타목시펜 저항성 유방암 세포를 주사한 후, 6주간 P2X7 길항제인 KN62를 일주일에 3번씩 복강 내 주사로 5mg/kg씩 투여하였다. 이후 비장에서 간으로의 타목시펜 저항성 유방암 세포의 전이 정도를 간에 생긴 암세포 결절, 전이 발생 빈도, 전이된 면적 비율 등을 통해 평가하였다. 그 결과, 대조군에 비해 KN62 투여군에서 비장에서 간으로의 타목시펜 저항성 유방암세포의 전이가 적게 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4A). 또한 간에 생긴 암세포 결절, 전이 발생 빈도, 전이된 면적 비율도 대조군에 비해 투여군에서 더 낮음을 관찰할 수 있었다(Figures 4B, 4C and 4D). H&E staining을 통한 간 조직의 염색 결과, 대조군에 비해 KN62 투여군에서 전이병소의 면적이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figure 4E). 이는 P2X7의 길항제를 통한 P2X7 수용체의 활성 억제가 비장에서 간으로의 타목시펜 저항성 유방암의 전이를 억제할 수 있으며, P2X7이 타목시펜 저항성 유방암의 전이를 억제하는 타겟이 될 수 있음을 시사한다.





**Figure 4. Effects of P2X7 antagonists in migration of TAMR-MCF-7 cells in vivo**

(A) BALB/c-nu mice were injected intrasplenically with TAMR-MCF-7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mouse). After 1 week, Control animals (control) was intraperitoneally treated with vehicle (40% polyethylene glycol (PEG) 400 in normal saline). Treated animals received KN62 5mg/kg three times a week. mice were sacrificed after 6 weeks. Images of livers (upper) and spleens (lower) harvested at the end of the study from each group are shown.

(B) Number of metastatic liver nodules per mouse. Significant versus control, \*  $P < 0.05$ ;

(C) Incidence of liver metastasis in control group ( $n=6$ ) and treated group ( $n=6$ ).

(D) Average area of liver occupied by TAMR-MCF-7 was analyzed according to H&E staining result.

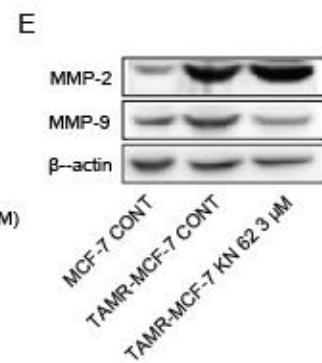
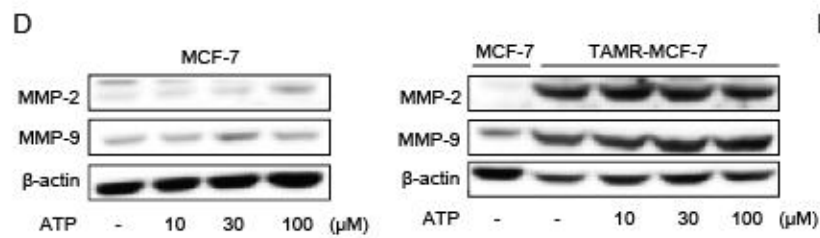
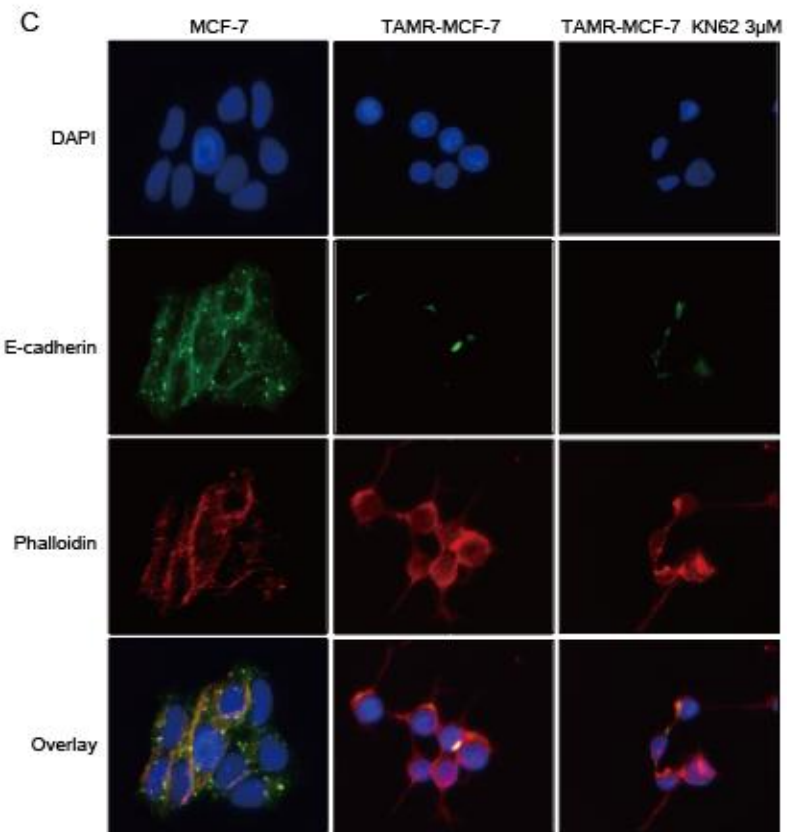
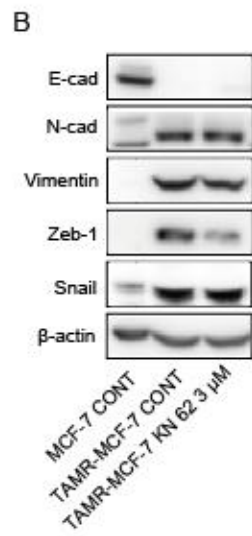
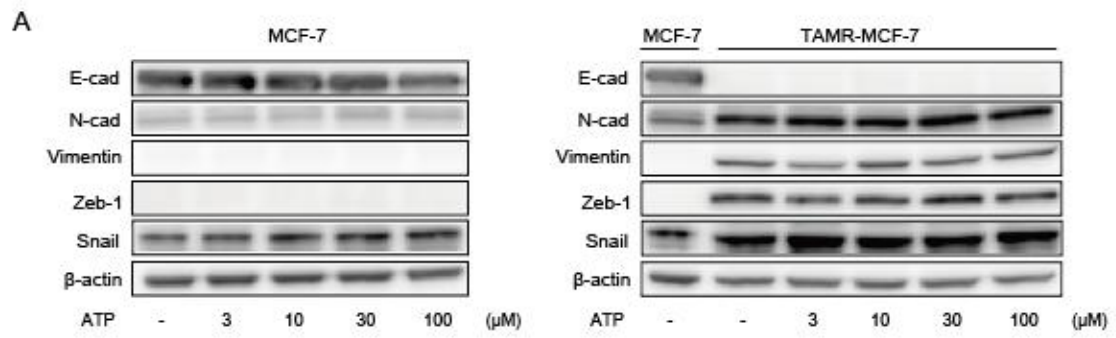
(E) Representative H&E staining result in liver from control and treated groups. metastasis regions were stained more darker than normal tissue regions.

## 5. P2X7 수용체 활성화에 따른 EMT와 MMP 발현 변화 분석

P2X7 수용체 활성화에 따른 타목시펜 저항성 유방암세포의 전이 양상 변화의 세부 기전을 규명하기 위해 EMT marker의 변화, MMP의 변화를 확인하였다. EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)는 상피세포가 mesenchymal 세포(간엽세포) 또는 섬유아세포와 같은 특징;세포간의 결합력 감소와 증가된 이동능을 획득하는 과정으로 정상 발달 또는 암세포의 전이에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(28). 또한, 그 과정에서 암의 전이를 촉진하며 EMT를 유지하는 여러 인자들 중 하나인 MMPs(matrix metalloproteinases)는 세포 표면 단백질을 분해하며 이동하는 세포들이 주변 조직을 침투하여 기저막을 뚫고 이동할 수 있게끔 돕는 역할을 한다(29, 30). 따라서 암의 전이에 중요한 역할을 한다고 알려진 EMT와 MMP의 발현 변화를 P2X7의 작용제, 길항제 처리에 따라 분석하였다.

그 결과, ATP처리에 의한 EMT marker의 유의적인 발현 변화는 MCF-7, TAMR-MCF-7 모두에서 관찰할 수 없었으며(Figure 5A), KN62에 의한 EMT marker의 발현 변화도 타목시펜 저항성 유방암세포에서 Zeb-1의 감소를 제외하고는 확인할 수 없었다(Figure 5B). Immunofluorescence 염색 결과에서도 EMT marker 중 하나인 E-cadherin의 발현 변화는 없었다(Figure 5C).

나아가, MMP-2와 MMP-9의 발현 양상 또한 ATP에 의해서 MCF-7, TAMR-MCF-7에서 관찰되지 않았으며(Figure 5D), KN62에 의해서도 MMP-9의 감소양상이 관찰되었으나 통계학적으로 유의적인 결과를 얻을 수는 없었다(Figure 5E).



**Figure 5. P2X7-mediated cell migration is not dependent on EMT or MMP**

(A) Expression of EMT markers (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Zeb-1, and Snail) in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of ATP for 48h.

(B) Expression of EMT markers (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Zeb-1, and Snail) in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of KN62 for 48h.

(C) Immunofluorescence staining of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells with DAPI, E-cadherin and Phalloidin antibodies(x20).

(D) Expression of MMP-2 and MMP-9 in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of ATP for 48h.

(E) Expression of MMP-2 and MMP-9 in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of KN62 for 48h.

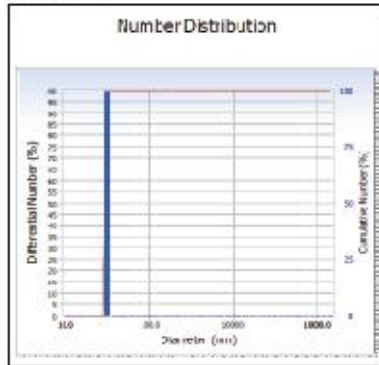
## 6. 타목시펜 저항성 유방암 세포의 엑소솜 분비에서 P2X7의 역할

세포에서 엑소솜이 분비되기 위해서는 이차 신호전달자로 세포 내 칼슘이 관여하며 세포 내 칼슘증가가 엑소솜의 분비를 일으킨다는 사실이 알려져 있다(31). 또한 쥐의 면역세포, 수지상세포, 신경모세포종에서는 ATP에 의한 P2X7의 활성화가 세포 내 칼슘농도 증가를 일으키고, 그 결과 엑소솜의 분비가 일어난다는 연구 결과도 보고되었다(31).

이에 유방암세포 MCF-7과 타목시펜 저항성 유방암세포 TAMR-MCF-7에서의 엑소솜 분비와 P2X7 활성화의 관계를 규명하고자 하였다. 먼저, 엑소솜 분리 실험방법에 따라 MCF-7과 TAMR-MCF-7의 엑소솜을 분리한 후, 얻은 용액 속에 들어 있는 입자의 크기를 확인하였다. 그 결과, 가장 많은 수를 차지한 입자의 크기가 엑소솜의 입자 크기 범위임을 확인하였고, MCF-7과 TAMR-MCF-7의 엑소솜의 입자 크기는 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Figure 6A). 또한 MCF-7과 TAMR-MCF-7 세포당 분비하는 엑소솜의 수를 측정하였을 때도 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 6B). 하지만, 세포 전체에서 엑소솜의 방출 및 생성에 관여하는 인자의 발현 양상에서는 차이를 보였으며, MCF-7에서는 엑소솜의 생성에 관여하는 Rab5의 발현이, TAMR-MCF-7에서는 엑소솜의 분비에 관여하는 CD63의 발현이 각각 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다(Figure 6C). 나아가, TAMR-MCF-7의 높은 CD63의 발현은 P2X7의 길항제인 KN62에 의해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며 실제로도 세포당 분비하는 엑소솜의 수가 TAMR-MCF-7에 KN62를 처리한 경우 감소하는 현상도 확인하였다(Figures 6D and 6B). 상기 결과는 P2X7의 길항제에 의해 엑소솜의 분비가 감소하는 현상을 통해 P2X7의 활성화 억제가 타목시펜 저항성 유방암의 엑소솜 방출에 영향을 준다는 사실을 시사한다.

A

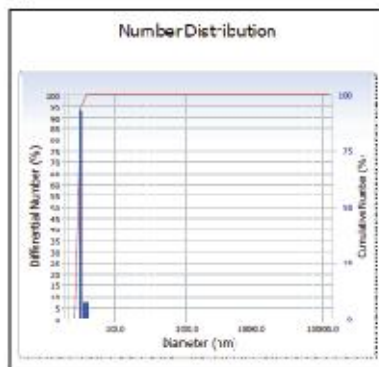
1) MCF-7



Number Distribution

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	32.0	0.0
2	168.4	28.2
3	11,595.6	1,331.4
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
<b>Average</b>		<b>41.6</b>
		<b>323.0</b>

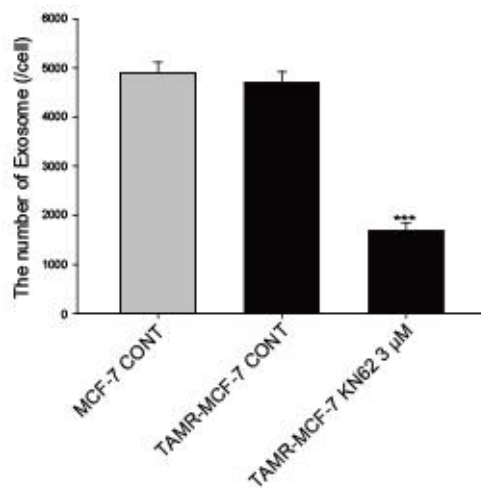
2) TAMR-MCF-7



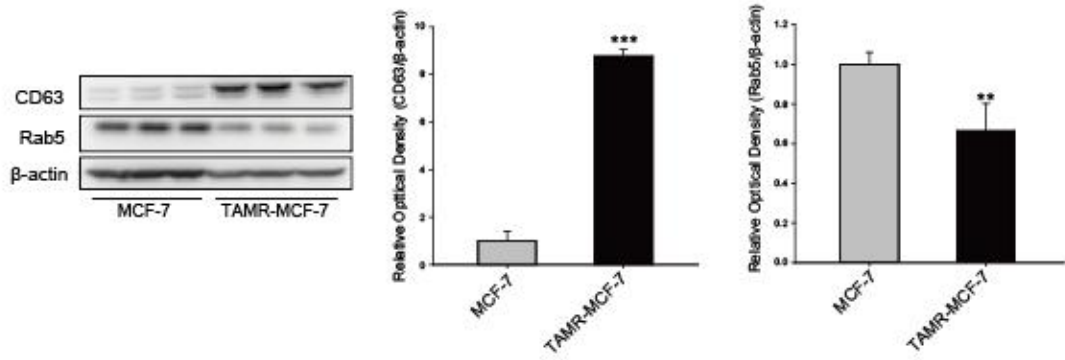
Number Distribution

Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.
1	30.4	1.7
2	835.8	129.1
3	42,375.7	10.8
4	75,981.7	16,118.6
5	0.0	0.0
<b>Average</b>		<b>62.8</b>
		<b>1,601.2</b>

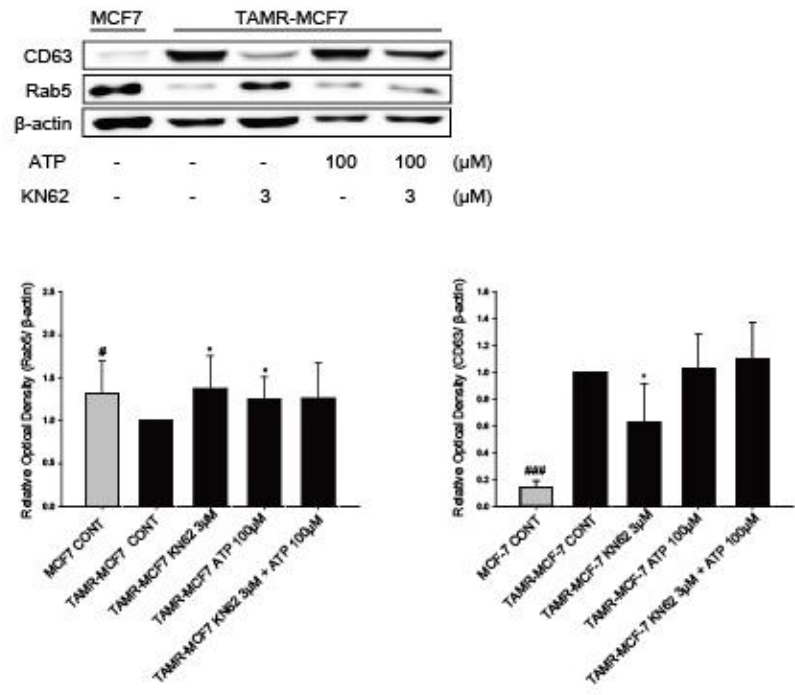
B



C



D





**Figure 6. Role of P2X7 in exosome secretion in TAMR-MCF-7 cells**

(A) Measurement of exosome number distribution in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells. average diameter was analyzed by Each peak.

(B) Number of Exosome was measured by Nanoparticle Tracking Analysis after treatment of KN62 3  $\mu$ M for 24h. (normalized by initial cell plating number of cells)

(C) Protein expression of CD63 and Rab5 in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells. Significant versus MCF-7 control, \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.005$ ;

(D) Protein expression of CD63 and Rab5 in MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells after treatment of ATP 100  $\mu$ M, KN62 3  $\mu$ M for 48h.

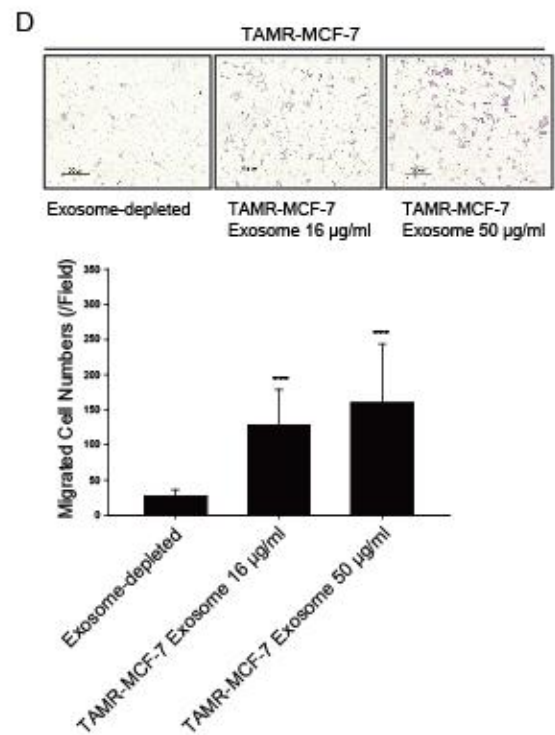
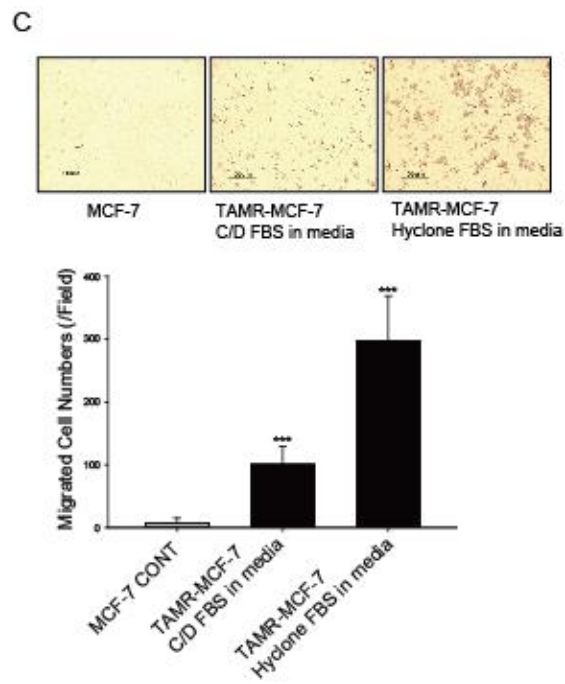
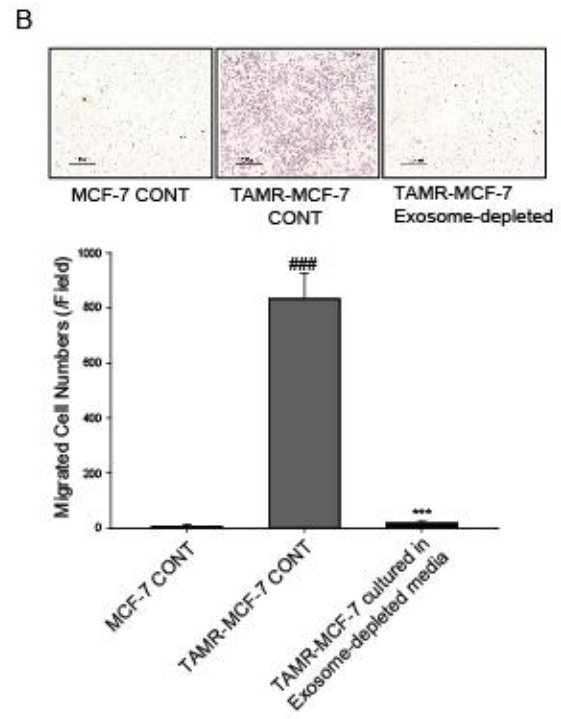
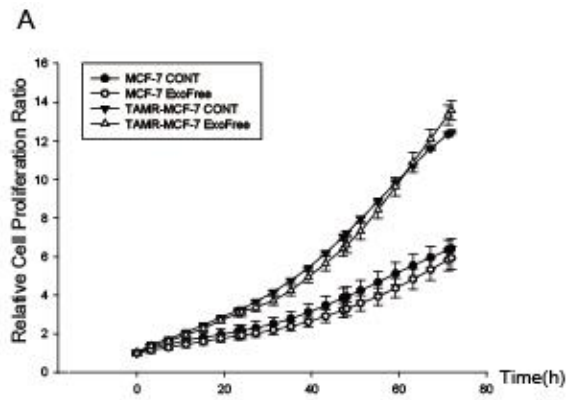
Significant versus TAMR-MCF-7 control, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$ ; (MCF-7 cells)

Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*  $P < 0.05$ ; (TAMR-MCF-7 cells)

## 7. 타목시펜 저항성 유방암 세포의 전이에서 엑소좀의 역할

암세포에 있어서 엑소좀은 종양 형성 단백질 또는 핵산을 주변 세포에 전달함으로써 암세포의 이동 및 침윤을 증가시키고, premetastatic niche를 형성하여 암의 전이 중요한 역할을 한다(12, 18). 타목시펜 저항성 유방암 세포의 전이에 엑소좀이 미치는 영향에 대해 평가하였다. 그 결과, 세포의 배양배지에 엑소좀이 포함된 정상 FBS를 사용한 경우와, 엑소좀을 제거한 FBS를 사용한 경우 세포의 성장에 있어서는 큰 변화가 없는 것을 확인하였다(Figure 7A). 하지만, 세포의 이동능을 평가하는 실험에서는 세포의 배양배지에 엑소좀이 포함된 정상 FBS를 사용한 경우에 비해서 엑소좀을 제거한 FBS를 사용한 경우 세포의 이동이 현저히 억제되는 것을 확인하였다(Figure 7B). 실험에 사용한 엑소좀을 제거한 FBS는 Hyclone FBS에서 엑소좀을 제거한 것으로, 일반적으로 TAMR-MCF-7을 배양하는데 사용하는 charcoal stripped FBS와는 구성성분이 다르다. 따라서 FBS의 다른 구성성분이 타목시펜 저항성 유방암 세포의 이동능에 영향을 미치는지 평가하였다. charcoal stripped FBS를 배양배지에 첨가한 경우와 Hyclone FBS를 배양배지에 첨가한 경우 비교 시, Hyclone FBS를 첨가한 경우가 세포의 이동능이 더 높다는 사실을 확인을 통해(Figure 7C), FBS의 구성성분 차이가 아닌 엑소좀의 유무가 타목시펜 저항성 유방암 세포의 이동능에 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다.

나아가, 엑소좀을 제거한 FBS를 사용해서 타목시펜 저항성 유방암 세포의 이동능을 억제시킨 환경에서 인공적으로 유방암세포 MCF-7 또는 타목시펜 저항성 유방암세포 TAMR-MCF-7의 엑소좀을 분리해서 넣어주었을 경우 이동능을 평가하였다. 그 결과 인공적으로 분리해서 넣어준 엑소좀의 농도가 높을수록 TAMR-MCF-7의 이동능이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 7D). 또한, 같은 농도의 엑소좀을 처리하였을 경우에는 MCF-7 보다 TAMR-MCF-7에서 분리한 엑소좀을 처리한 경우 TAMR-MCF-7의 이동능이 더 증가한 것을 확인하였다(Figure 7E). 하지만 MCF-7과 같이 이동능이 원래 낮은 경우에는 엑소좀을 따로 처리한다고 해서 유의적으로 이동능이 증가가 나타나지는 않았다(Figure 7F).



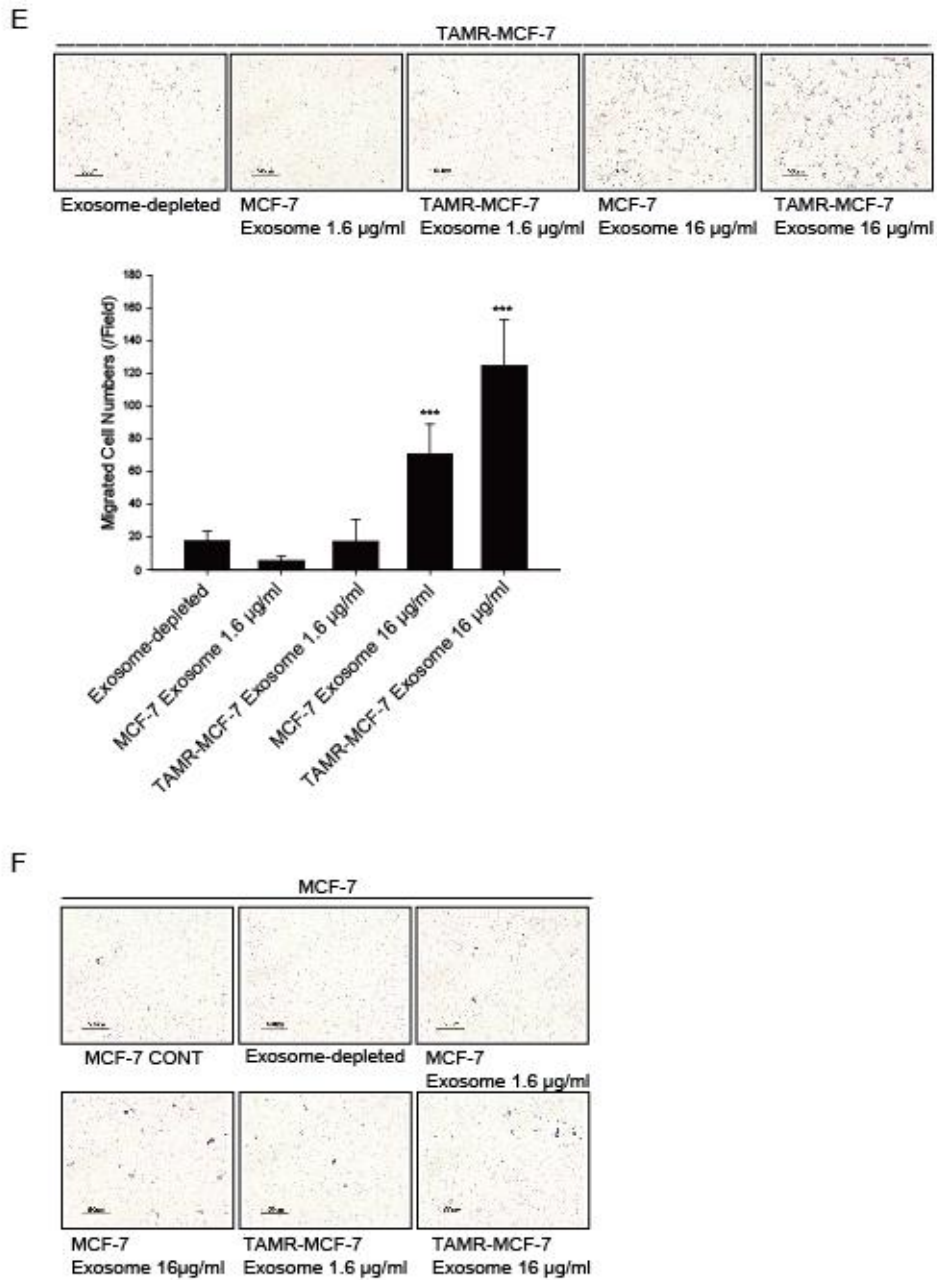


Figure 7. Critical role of exosome in cell migration of TAMR–MCF–7 cells, not cell proliferation

(A) MCF–7 and TAMR–MCF–7 cells proliferation ratio relative to the initial cell plating number for 72h.

(B) migration of MCF–7 and TAMR–MCF–7 cells for 18hr. control group was cultured in charcoal stripped FBS media and Exosome depleted group

was cultured in exosome-depleted hyclone FBS media.

Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus MCF-7 control, ### P<0.005;

Significant versus TAMR-MCF-7 control, \*\*\* P<0.005;

(C)migration of MCF-7 and TAMR-MCF-7 cells for 18hr. TAMR-MCF-7 cells were cultured in charcoal stripped FBS media and hyclone FBS media.

Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus MCF-7 control, \*\*\* P<0.005;

(D)migration of TAMR-MCF-7 cells after treatment of TAMR-MCF-7 exosome 16, 50  $\mu$ M for 18hr. TAMR-MCF-7 cells were cultured in exosome-depleted hyclone FBS media.

Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus Exosome depleted control, \*\*\* P<0.005;

(E)migration of TAMR-MCF-7 cells for 18hr. TAMR-MCF-7 cells were cultured in exosome-depleted hyclone FBS media.

Cells were stained with hematoxylin and eosin.

cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

Significant versus Exosome depleted control, \*\*\* P<0.005;

(F)migration of MCF-7 cells for 18hr. MCF-7 cells were cultured in exosome-depleted hyclone FBS media.

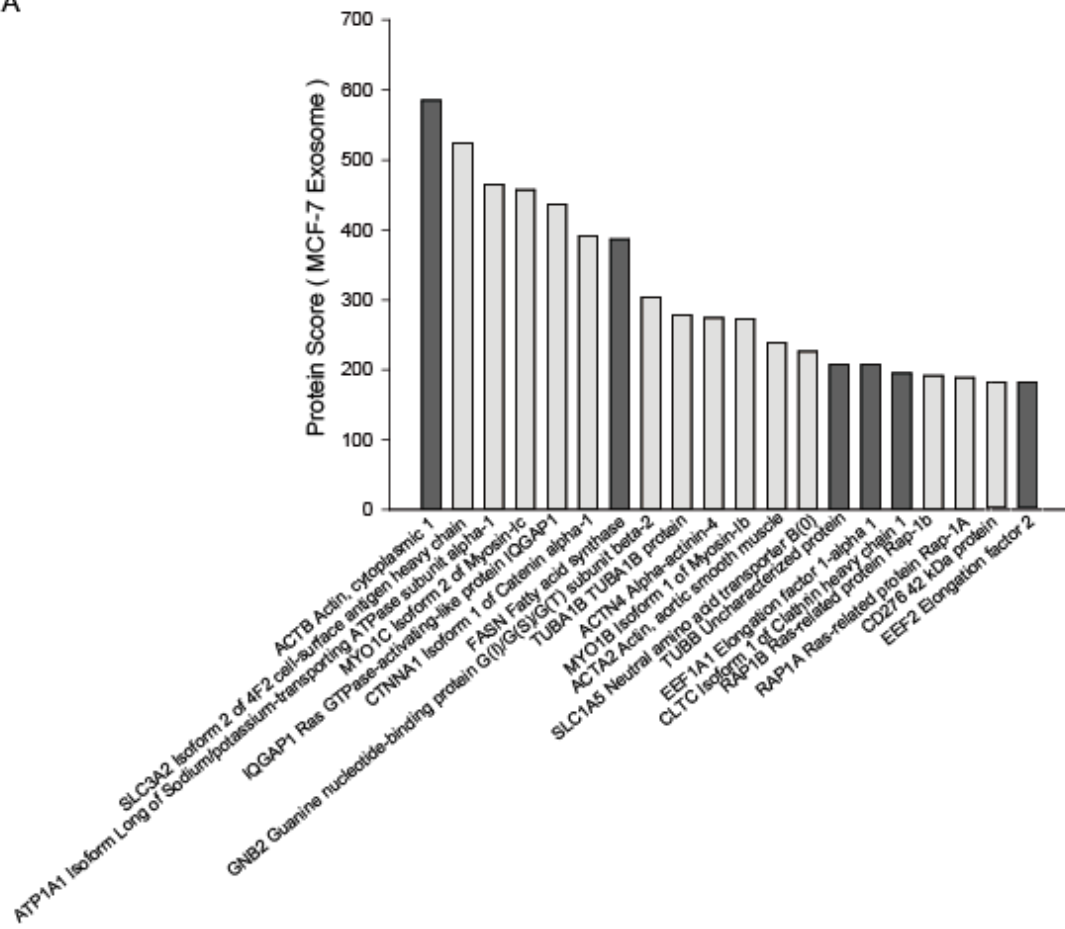
Cells were stained with hematoxylin and eosin.

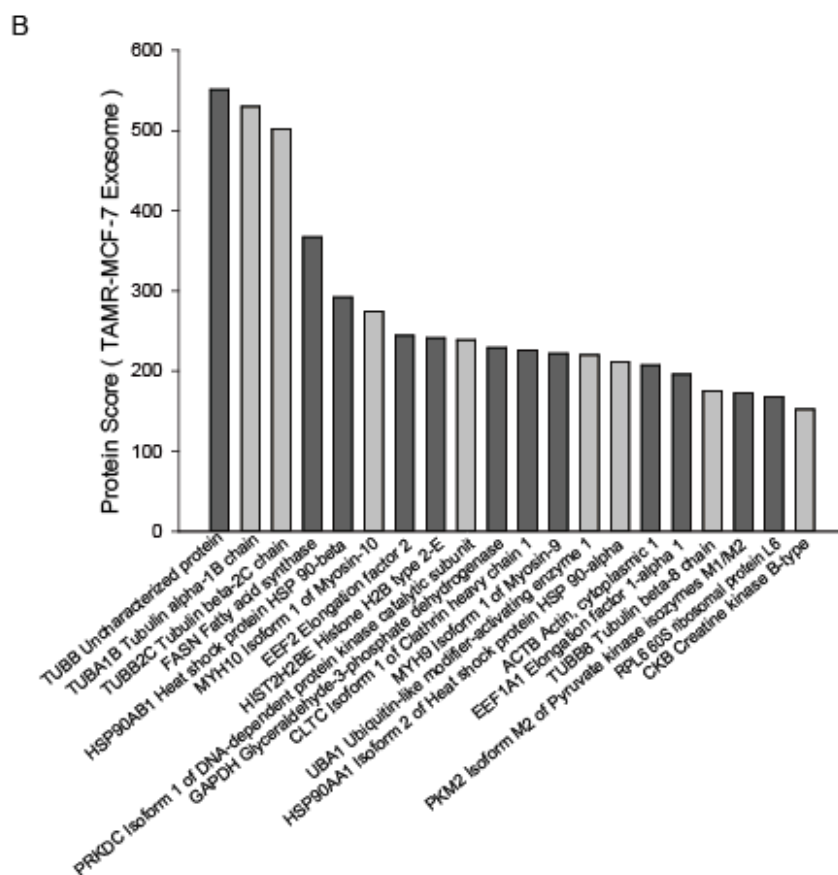
cell migration was evaluated by Transwell migration assay.

## 8. 타목시펜 저항성 유방암 세포의 엑소솜 단백질 발현 분석

엑소솜 내부에는 엑소솜이 기원한 원세포의 단백질, 지질, 핵산 등이 포함되어 있으며(14), 이에 따라 어떤 세포에서 엑소솜이 기원했는지에 따라 엑소솜이 미치는 영향이 달라질 수 있다. 유방암세포에서도 전이능이 낮은 유방암세포 MCF-7의 엑소솜보다 전이능이 높은 MDA-MB-231의 엑소솜을 처리한 경우 유방암세포의 이동능이 더 증가되었다는 연구결과가 있다(18). Figure 7E에서 같은 농도의 엑소솜을 처리하였을 경우, MCF-7 보다 TAMR-MCF-7에서 분리한 엑소솜을 처리한 경우 TAMR-MCF-7의 이동능이 더 증가한 것을 확인한 바 있다. 따라서 MCF-7과 TAMR-MCF-7의 엑소솜을 각각 분리, mass analysis를 통해 엑소솜의 단백질 발현을 분석하여 전이에 영향을 미치는 엑소솜의 구성성분을 규명하고자 하였다. mass analysis를 통해 MCF-7, TAMR-MCF-7의 엑소솜을 분리하여 단백질 발현을 분석, 상위 20개 protein score가 높은 인자를 확인하였다(Figures 8A and 8B).

A





**Figure 8. Proteomics analysis of MCF-7 and TAMR-MCF-7 exosomes**

(A) Proteomics analysis of MCF-7 exosomes. The name of protein that has top 20 Protein score is listed. Dark gray part is overlapped with TAMR-MCF-7 exosome analysis.

(B) Proteomics analysis of TAMR-MCF-7 exosomes. The name of protein that has top 20 Protein score is listed. Dark gray part is overlapped with MCF-7 exosome analysis.



## IV. 고찰 및 결론

세포와 그의 미세환경 사이의 양방향의 상호작용의 중요성은 그동안 많이 제시되어 왔다. 이 상호작용은 정상 조직의 항상성 유지와 암세포 성장에 중요하다(32). 특히 암은 복잡한 조직 환경에서 발달하며, 이러한 환경에 의존하여 성장, 침윤, 전이 양상을 보인다. 암과 그와 관련된 조직의 강력한 상호작용은 암의 개시, 진행, 환자의 예후에 영향을 미친다(33).

타목시펜 내성은 유방암 환자의 치료에 있어서 중요한 문제이다. 초기에 유방암 환자는 타목시펜 치료에 대해 효과를 보이지만, 일부 환자들의 경우 다시 타목시펜 내성을 획득, 유방암이 재발하여 질병이 진행되게 된다(34, 35). 기존에 보고된 바에 따르면, 유방암세포인 MCF-7에 비해 타목시펜 저항성 유방암 TAMR-MCF-7의 경우 더 증가된 이동능 및 전이능을 보이며(36, 37), 더 감소된 세포간 결합력과 증가된 EMT marker 발현 양상을 보인다고 한다(36). 이것은 타목시펜 내성이 더 증가된 이동능과 관련이 있다는 사실을 시사하며, 이전에 항에스트로겐이 유방암의 이동과 침윤, 전이를 촉진시킨다는 연구결과와 일치한다(5, 38, 39). 암환자의 사망 원인의 대략 90%는 전이로 인한 것인 만큼(40), 타목시펜 내성 획득으로 인한 유방암세포의 이동능 및 전이능 증가는 유방암 환자의 치료 및 예후에 있어서 중요한 문제이다.

본 논문에서는 최근 암의 진행, 발달에 있어서 중요하게 작용하는 암의 미세환경에 풍부하게 존재하는 퓨린 염기와 이에 의해 작동하는 Purinergic Signaling에 주목하였다. 유방암세포와 타목시펜 저항성 유방암세포 모델을 사용하여 두 가지 모델에서 Purinergic Signaling의 역할을 규명하고 타목시펜 저항성 암의 성장, 전이, 침윤에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

그 결과, Purinergic receptor 중의 하나인 P2X7의 발현이 두 가지 모델에서 유의미한 차이를 보임을 확인하였다. 또한, P2X7 활성화시 일어나는  $Ca^{2+}$  influx 분석을 통해 P2X7의 발현이 타목시펜 저항성 유방암 세포에 높으며, 활성화시

Ca<sup>2+</sup> + influx가 일어난다는 사실 또한 확인하였다. 하지만 P2X7 활성화시 고전적으로 알려진 inflammasome 경로의 활성화가 일어나지 않음을 확인, P2X7의 활성화가 타목시펜 저항성 유방암에서는 다른 기전을 통해 타목시펜 저항성 유방암에 영향을 준다는 사실을 추측할 수 있었다.

다음으로, P2X7의 활성화 또는 억제 시 유방암세포 MCF-7 및 타목시펜 저항성 유방암세포 TAMR-MCF-7의 암의 성장, VEGF 발현, 이동 및 전이에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과, 암의 성장, VEGF 발현에서는 P2X7의 활성화 또는 억제에만 의존적으로 변화하는 양상을 관찰할 수는 없었다. 그 이유는 실험에 사용한 P2X7의 agonist인 ATP에 의해 다른 Purinergic receptor인 P2X1-P2X6 또한 활성화될 수 있으며(41), 이러한 다른 Purinergic receptor가 암의 성장, VEGF 발현에 P2X7과는 다른 작용을 수행할 수 있기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 P2X7이 암의 성장과 VEGF 발현에 미치는 영향을 정확히 평가하기 위해서는 유방암과 타목시펜 저항성 유방암에 대한 P2X1-P2X6 수용체의 역할 평가 연구와 P2X7의 selective agonist인 BzATP와 같은 물질을 사용한 후속 연구가 진행되어야 할 것이다.

하지만, 타목시펜 저항성 유방암의 전이는 P2X7의 활성화 또는 억제에 따른 영향을 받는다는 사실을 확인하였다. 이는 ATP에 의해 활성화되는 다른 Purinergic receptor들도 타목시펜 저항성 유방암에 P2X7과 똑같은 기능을 하거나, P2X7에 의해서만 타목시펜 저항성 유방암의 이동능 및 전이가 영향을 받기 때문일 것으로 사료된다. P2X7의 agonist인 ATP와 antagonist인 KN62를 이용해서 P2X7의 활성화, 억제에 따라 타목시펜 저항성 유방암의 이동능 및 전이가 증가 또는 감소하는 현상을 in vitro와 in vivo 상에서 확인하였다.

다음으로 P2X7이 타목시펜 저항성 유방암의 전이에 영향을 미치는 세부기전에 대한 연구를 진행하였다. 암세포의 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 EMT marker의 발현과 이를 유지하는 MMPs의 발현양상을 확인하였다. E-cadherin의 소실은 EMT의 처음 단계에 일어나는 과정으로, 전이능이 높은 세포의 중요한 특

징이다(42). 이러한 E-cadherin의 소실은 TAMR-MCF-7에서 관찰할 수 있었다. Zeb-1, Snail은 E-cadherin repressor로써, hypermethylation과 histone deacetylation을 통해 E-cadherin 프로모터의 epigenetic silencing을 유도한다(43). Zeb-1, Snail의 발현 역시 TAMR-MCF-7에서 높게 나타났다. N-cadherin, Vimentin은 mesenchymal phenotype이고, 세포 이동의 중요한 인자로 세포 이동능이 높은 세포에서 높게 발현된다(44). 또한 N-cadherin, Vimentin의 발현 또한 TAMR-MCF-7에서 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 전이에 중요한 역할을 한다고 알려진 MMP-2, MMP-9의 발현 역시 TAMR-MCF-7에서 높게 나타났다. 상기 결과들을 종합하여 MCF-7에서는 epithelial marker인 E-cadherin의 발현이 높게 나타나며 TAMR-MCF-7에서는 mesenchymal marker인 Zeb-1, Snail, N-cadherin, Vimentin의 발현이 높게 나타난다는 사실과, 전이에 관여하는 MMP-2, MMP-9의 발현이 높게 나타나는 사실을 확인하였다. 이를 통해 타목시펜 저항성 유방암 TAMR-MCF-7이 유방암세포 MCF-7에 비해 이동 및 전이능에 관여하는 인자들의 발현이 높으며 실제로도 이동 및 전이능이 높다는 사실을 확인할 수 있었다. 하지만 P2X7의 agonist와 antagonist 처리 시 이러한 EMT marker 및 MMPs의 변화는 관찰할 수 없었다. P2X7의 antagonist를 처리한 경우 통계학적으로 유의적인 변화는 ZEB-1의 감소 밖에 없었다. Zeb-1은 E-cadherin repressor로 기능을 하는데(43), KN62에 의한 TAMR-MCF-7의 Zeb-1의 감소가 E-cadherin의 증가로 나타나지는 않았다. 이를 통해 P2X7이 타목시펜 저항성 유방암의 이동 및 전이에 영향을 주는 기전은 기존에 전이에 역할을 한다고 알려진 EMT marker의 변화, MMPs의 변화가 아닌 다른 기전을 통한 것임을 확인할 수 있었다.

Pre-metastatic niche란, 전이를 촉진시켜 원발암에서 이동해 온 암세포가 성장하게끔 하는 암 미세환경을 설명하는 개념으로(17) VEGF, 암 유래 엑소좀 및 엑소좀의 성분 등이 Pre-metastatic niche의 형성을 촉진시키는 인자들로 알려져 있다(45, 46, 47, 48, 49, 50).

최근에, 엑소좀은 세포와 세포 간 신호에 관여하는 물질로 주목 받아왔으며(32), 유방암세포에서 엑소좀은 암세포의 침윤, 전이에 역할을 한다고 알려져 있다(15). 본 논문에서는 타목시펜 저항성 유방암의 전이를 조절하는 기전으로 P2X7에 대해 주목하였고, 세포에서 엑소좀이 분비되기 위해서는 이차 신호전달자로 세포 내 칼슘이 필요하며 세포 내 칼슘증가가 엑소좀의 분비를 일으킨다는 연구 결과(31)와, P2X7의 활성화 시 세포 내 칼슘농도가 증가한다는 실험 결과를 토대로 P2X7이 exosome의 분비를 조절하는 지 확인하였다. 그 결과 P2X7의 antagonist인 KN62 처리 시 타목시펜 저항성 유방암에서 엑소좀의 방출에 영향을 주는 인자인 CD63의 발현이 유의적으로 감소하였으며, 엑소좀의 방출량 또한 줄어드는 것을 확인, 타목시펜 저항성 유방암에서 P2X7 수용체의 활성 억제가 엑소좀의 방출에 관여하는 인자의 발현 감소와 실제 방출량 감소에 영향을 준다는 사실을 알 수 있었다.

나아가, 세포의 배양배지에 첨가하는 FBS에 풍부하게 존재하는 Exosome을 제거한 Exosome-depleted FBS를 배양배지에 첨가한 경우, 타목시펜 저항성 유방암의 이동이 유의미하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, 다시 인공적으로 분리한 암세포의 Exosome을 넣어주었을 경우 이동이 부분적으로 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통해 P2X7의 억제가 엑소좀 방출량에 영향을 줄 수 있으며, 엑소좀이 타목시펜 저항성 유방암의 전이에 영향을 준다는 사실을 규명하였다. 또한 같은 농도의 엑소좀을 처리하였을 경우, MCF-7에 비해 TAMR-MCF-7의 엑소좀을 처리한 경우의 타목시펜 저항성 유방암의 이동이 더 증가하는 것을 확인하였다.

하지만, MCF-7과 TAMR-MCF-7의 엑소좀을 각각 분리하여 분석한 결과, 엑소좀의 수 및 그 크기는 큰 차이가 없는 것을 확인하였다. 같은 농도의 엑소좀을 처리하였을 때, 엑소좀이 기원한 유방암세포의 이동능 및 전이능 정도에 따라 엑소좀을 공급받은 원래 세포의 이동능이 다르게 나타난다는 결과는 이전에도 보고된 바 있다(18). 이전에 보고된 결과는 본 논문에서 제시하는 실험 결과와 일치하며, 이러한 사실을 토대로 엑소좀이 기원한 암세포의 성격에 따라 엑소좀의 구성성분의

차이가 나타나며, 이것이 엑소좀이 처리된 세포의 이동능에 다르게 영향을 주는 원인이라는 가설을 세울 수 있었다. 따라서, MCF-7에 비해 TAMR-MCF-7에 더 많이 분포하는 엑소좀의 구성요소 중 타목시펜 저항성 유방암의 전이에 영향을 주는 구성요소에 대한 이후 연구를 진행하기 위해 엑소좀을 분리하여 엑소좀을 구성하는 단백질을 분석, Proteomics analysis를 수행하였다. 수행 결과를 토대로 타목시펜 저항성 유방암의 엑소좀에 많이 분포하면서 세포의 이동에 영향을 줄 수 있는 인자에 대한 추후 연구가 이루어져야 할 것이다.

종합하면, 본 논문에서는 유방암세포 MCF-7에 비해 타목시펜 저항성 유방암 세포 TAMR-MCF-7에서 P2X7의 발현이 통계적으로 유의미하게 높게 발현되어 있으며, P2X7의 agonist인 ATP와 antagonist인 KN62를 통한 P2X7의 활성화 또는 억제가 타목시펜 저항성 유방암의 이동 및 전이에 영향을 미친다는 사실을 in vitro 와 in vivo 상에서 규명하였다. 또한 이러한 이동 및 전이의 세부 기전으로 기존에 전이에 영향을 미친다고 알려진 EMT marker 또는 MMP-2, MMP-9가 아닌 암 세포의 미세환경에 풍부하게 존재하며, pre-metastatic niche의 형성을 촉진하는 Exosome을 제시하고자 한다.

세포간극에 존재하는 ATP의 농도는 정상 신체 조직보다 암세포에서 훨씬 높다. 암세포에서는 100단위  $\mu\text{M}$  농도로 존재하지만, 정상 조직에서는 세포간극의 ATP는 거의 검출되지 않는다(51). 이를 통해 유방암이 타목시펜에 대한 내성을 획득하게 되는 경우, 암의 미세환경에 풍부하게 존재하는 ATP에 의해 P2X7이 활성화되고 그 결과 타목시펜 저항성 유방암세포의 전이가 더 빠르게 일어날 가능성을 유추할 수 있다. 따라서 상기 결과들을 통해 ATP에 의해 작동하는 P2X7의 억제가 타목시펜 저항성 유방암의 전이를 억제하는 효과적인 타겟이 될 수 있음을 본 논문을 통해 제시하고자 한다.

## V. 참고문헌

1. Korean Breast Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2016. Seoul : Korean Breast Cancer Society, (2016).
2. World Cancer Report 2014 : International Agency for Research on Cancer. Lyon: (2014).
3. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Accessed September 1st, (2016).
4. Minsun Chang, Tamoxifen Resistance in Breast Cancer, *Biomol Ther* 20(3), 256–267 (2012).
5. Hiscox S, Morgan L, Barrow D, Dutkowskil C, Wakeling A, Nicholson RI: Tamoxifen resistance in breast cancer cells is accompanied by an enhanced motile and invasive phenotype: inhibition by gefitinib ( ' Iressa' ', ZD1839). *Clin Exp Metastasis*, 21:201–212, (2004).
6. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program SEER\*Stat Database: Incidence. SEER 18 Regs Research Data + Hurricane Katrina Impacted Louisiana Cases, Sub, Vintage 2009 Pops (2000--2009) (2011).
7. E. L.Heinrich, T. C.Walser, K. Krysan et al., “The inflammatory tumor microenvironment, epithelial mesenchymal transition and lung carcinogenesis,” *Cancer Microenvironment*, vol. 5, no.1, pp. 5-8, (2012).
8. Di Virgilio F1, Purines, Purinergic Receptors, and Cancer, *Cancer Res*, 1;72(21):5441–7, (2012).
9. Choi HK1, Yang JW, Roh SH, Han CY, Kang KW. Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells, *Endocr Relat Cancer*, 14(2):293–303. (2007).
10. Lara Rossi, Valentina Salvestrini, Davide Ferrari, Francesco Di Virgilio, and Roberto M. Lemoli, The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling, *Blood*: 120(12):2365–75, (2012).
11. Xia J, Yu X, Tang L, Li G, He T. P2X7 receptor stimulates breast

- cancer cell invasion and migration via the AKT pathway, *Oncol Rep.* 34(1):103–10 (2015).
12. Xu Zhang, Xiao Yuan, Hui Shi, Lijun Wu, Hui Qian, Wenrong Xu. Exosomes in cancer: small particle, big player, *Journal of Hematology & Oncology*, 8:83 (2015).
13. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J.Cell Sci.* ; 113(Pt 19):3365–374, (2000).
14. van den Boorn JG, Daßler J, Coch C, Schlee M, Hartmann G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* ; 65: 331–335, (2013).
15. Dan–dan Yu, Ying Wu, Hong–yu Shen, Meng–meng Lv, Wei–xian Chen, Xiao–hui Zhang, Shan–liang, Zhong, Jin–hai Tang, and Jian–hua Zhao, Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer, *Cancer Sci* 106 959–964, (2015).
16. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De LG, Alessandro R. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int.J.Mol.Sci.* ; 14:5338–366, (2013).
17. Yun Zhang and Xiao–Fan Wang. A niche role for cancer exosomes in metastasis, *Nature cell biology*, 709–711, (2015).
18. Harris DA, Patel SH, Gucek M, Hendrix A, Westbroek W, Taraska JW. Exosomes Released from Breast Cancer Carcinomas Stimulate Cell Movement, 10(3):e0117495, *PLoS One*, (2015).
19. Gonzalez–Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, Yates JR. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J.Proteome.Res.* 8:1304–31, (2009).
20. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review, *Cancer*

Metastasis Rev, 32(3-4):623-42, (2013).

21. Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, et al. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 274:33206-8, (1999).

22. Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, et al. A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem.* 99:745-58, (2006).

23. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2:897-909, (2002).

24. Partensky C. Toward a better understanding of pancreatic ductal adenocarcinoma: glimmers of hope? *Pancreas.* 42:729-39, (2013).

25. Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev.* 63:641-83, (2011).

26. Jelassi B, Chantome A, Alcaraz-Perez F, Baroja-Mazo A, Cayuela ML, et al. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene* 30: 2108-2122, (2011).

27. Ghalali A, Wiklund F, Zheng H, Stenius U, Hogberg J Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 35(7):1547-55, (2014).

28. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3` kinase/AKT pathways, Lionel Larue, *Oncogene*, 24(50):7443-54, (2005).

29. Chaffer C, Weinberg R. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 331(6024):1559--64, (2011).

30. Brinckerhoff C, Matrisian L. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:207--14, (2002).

31. Maria A. Lopez-Verrilli, Felipe A. Court. Exosomes: mediators of



- communication in eukaryotes, *Biol Res* 46: 5–11, (2013).
32. DF Quail and JA Joyce, Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis, *Nat Med*, 19(11):1423–37, (2013).
33. Joyce JA, Pollard Jw., Microenvironmental regulation of metastasis, *Nature reviews. Cancer*, 9(4):239–52, (2009).
34. Ali S, Coombes RC. Endocrine–responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Rev Cancer*, 2:101–12, (2002).
35. Osborne CK, Fuqua SA. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 32:49–55, (1994).
36. Stephen Hiscox et al. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT–like behaviour and involves modulation of b–catenin phosphorylation, *Int. J. Cancer*: 118, 290–301 (2006).
37. Changhua Zhou et al. Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF–7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration, *Breast Cancer Research*, 14:14(2), (2012).
38. Borley AC, Hiscox S, Gee J, Smith C, Shaw V, Barrett–Lee P, Nicholson RI: Anti–oestrogens but not oestrogen deprivation promote cellular invasion in intercellular adhesion–deficient breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 10:R103. (2008).
39. Hiscox S, Morgan L, Green TP, Barrow D, Gee J, Nicholson RI: Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 97:263–274, (2006).
40. Lindsey A. Torre, MSPH Freddie Bray, PhD Rebecca L. Siegel, MPH Jacques Ferlay, ME Joannie Lortet–Tieulent, MSc Ahmedin Jemal, DVM, PhD., *Global Cancer Statistics, 2012., CA CANCER J CLIN*, ;65:87–108, (2015).
41. Burnstock G, Williams M., P2 Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function and Therapeutic Potential, *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, 295(3):862–9, (2000).

42. Sarah Heerboth, Genevieve Housman, Meghan Leary, Mckenna Longacre, Shannon Byler, Karolina Lapinska, Amber Willbanks, and Sibaji Sarkar corresponding author, EMT and tumor metastasis, *Clinical and Translational Medicine*, 4:6, (2015).
43. Herranz N, Pasini D, Dłas V, Francł C, Gutierrez A, Dave N, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol Cell Biol*. 28(15):4772--81, (2008).
44. Zhu W, Leber B, Andrews D. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J*. 20(21):5999--6007, (2001).
45. Peinado, H., Lavotshkin, S. & Lyden, D. The secreted factors responsible for premetastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol*. 21, 139--146 (2011).
46. Kaplan, R. N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820--827 (2005).
47. Sceneay, J., Smyth, M. J. & Moller, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*. 32, 449--464 (2013).
48. Peinado, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med*. 18, 883--891 (2012).
49. Hood, J. L., San, R. S. & Wickline, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*. 71, 3792--3801 (2011).
50. Yang Liul and Xuetao Cao, Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche, *Cancer Cell* 30, November 14, 668-681, (2016).
51. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, et al. Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLoS ONE* 3(7): e2599, (2008).

## VI. Abstract

# Involvement of P2X7 receptor in metastasis of tamoxifen-resistant breast cancer : effects on exosome secretion

Kim, ji eun  
College of Pharmacy  
Seoul National University

Breast Cancer is one of the most frequent cancers in women. Tamoxifen is the standard antihormonal therapy for ER-positive breast cancer. The women who are diagnosed to early stage breast cancer show the decreased breast cancer recurrence and mortality rates if they take tamoxifen for 5 years. However, there is a problem about acquisition of tamoxifen resistance and there are still no solutions to treat tamoxifen-resistant breast cancer.

In this research, we show that the expression of P2X7 is higher in tamoxifen-resistant breast cancer (TAMR-MCF-7) than in parent ER-positive breast cancer (MCF-7). we tried to assess the effect of P2X7 in TAMR-MCF-7 proliferation, migration, and VEGF (vascular endothelial growth factor) production.

We found that high expression of P2X7 in TAMR-MCF-7 affected the migration of TAMR-MCF-7. ATP, an endogenous agonist of P2X7, enhanced migration of TAMR-MCF-7, vice versa KN62, an antagonist of

P2X7, inhibited migration of TAMR-MCF-7 in trans-well migration studies. KN62 also inhibited the metastasis of TAMR-MCF-7 from spleen to liver in mouse model experiment.

However, the enhanced expression of MMP which is well known to stimulate metastasis in TAMR-MCF-7 cells was not changed by treatment of agonist or antagonist of P2X7. Moreover, agonist and antagonist of P2X7 did not affect the protein expression of EMT markers.

Exosome is multivesicular body that includes protein, DNA and RNA and mediates cellular interaction. We found that exosomes released from TAMR-MCF-7 cells dominated the migration of TAMR-MCF-7 cells. Number of exosome production and expression of CD63 were decreased by P2X7 antagonist in TAMR-MCF-7 cells, suggesting that P2X7 influences the secretion of exosome. The migration of TAMR-MCF-7 was completely suppressed by the depletion of exosome in culture media, and it was partially recovered after exposure of TAMR-MCF-7 cells to exogenous exosome.

Taken together, our results reveal that the migration of TAMR-MCF-7 is controlled by P2X7 activation and suggest P2X7 as a potential target for the suppression of TAM-resistant breast cancer metastasis. We further demonstrate that P2X7-induced exosome secretion is involved in the process of cell migration and metastasis.

Keywords: Tamoxifen-resistant breast cancer (TAMR-MCF-7), P2X7, Metastasis, Exosome

Student Number: 2015-21871