creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

육종 세포주에서 방사선 민감제 타겟으로 NUP62의 이용 가능성에 대한 탐색 연구

An *in vitro* study on NUP62 as a potential target for radiosensitization in sarcoma

2021년 2월

서울대학교 대학원
의학과 정형외과학 전공
김 완 림

육종 세포주에서 방사선 민감제 타겟으로 NUP62의 이용 가능성에 대한 탐색 연구

지도교수 김 한 수

이 논문을 의학과 박사 학위논문으로 제출함

2020년 10월

서울대학교 대학원

의학과 정형외과학 전공

김 완 림

김완림의 의학박사 학위논문을 인준함

2021년 1월

위원장	유 원 준	(인)
부위원장	김 한 수	(인)
위원	한 일 규	(인)
위원	김 학 재	(인)
위원	송 시 열	송시열

An *in vitro* study on NUP62 as a potential target for radiosensitization in sarcoma

by

KIM Wanlim

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Medicine (Orthopedics) at the Seoul National University, College of Medicine

January 2021

Approved by thesis committee:

Professor	Won Joon Yoo	Chairman
Professor	Han-Soo Kim	Vice chairman
Professor	Ilkyu Han	
Professor	Hak Jae Kim	
Professor	Si Yeol Song	

육종 세포주에서 방사선 민감제 타겟으로 NUP62의 이용 가능성에 대한 탐색 연구

서울대학교 대학원
의학과 정형외과학 전공
김 완 림

국문초록

배경: 육종의 수술적 절제가 어려운 경우 방사선 치료의 역할이 중요하나, 방사선에 반응성이 낮아 치료효과가 제한적이며 예후가 불량하다. 방사선 치료의 효과를 증가시킬 수 있는 민감제에 대한 연구는 일부 상피성 암종을 대상으로 진행된 바 있으나, 육종에서의 연구는 매우 드문 실정이다. NUP62는 Nuclear pore complex를 이루는 구성체 중 하나로, 상피성 암종의 세포주를 이용한 연구에서 방사선 민감제(radiosensitizer)의 가능성에 대한 보고가 있으나 육종에서는 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 육종에서 방사선 민감제의 잠재적 타겟으로 NUP62의 역할을 탐색하고자 한다.

방법: 5개의 육종 세포주 (활액막 육종 [SW982], 섬유 육종 [HT-1080], 횡문근 육종 [RH30], 유잉 육종 [A673], 골육종 [KHOS/NP])

와 1개의 정상 섬유아세포주(HDF)를 이용하였다. NUP62의 발현 및 NUP62의 siRNA를 이용한 역형질 주입 방식으로 유전자 발현 억제를 유도하였고 NUP62의 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. 방사선 민감도의 증가를 확인하기 위하여 NUP62의 siRNA와 대조군 siRNA를 이용하여 각각의 세포주에 형질 주입시킨 후 전리 방사선 조사를 시행하고 세포 사멸과 증식에 대한 평가를 CCK-8 assay와 colony formation assay를 통하여 각각 시행하였다. NUP62의 억제가 방사선 민감도를 증가시키는 기전을 확인하기 위하여 세포 자멸사와 DNA 손상에 대한 평가를 Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometry assay, 세포 자멸사 관련 물질 western blot, gamma H2AX assay를 통해 확인하였다.

결과: 5개의 육종 세포주와 1개의 섬유아세포주 모두에서 NUP62의 발현과 siRNA를 이용한 유전자 발현 억제를 확인하였다. 전리 방사선 조사 없는 NUP62의 단독 발현 억제는 SW982 세포주에서 세포 사멸과 증식에 유의미한 영향을 주지 않았다. 활액막 육종, 섬유 육종 세포주에서 NUP62의 발현 억제는 방사선 조사 후 세포사 억제 단백질인 BCL-2의 발현을 조절함으로써 세포 자멸사를 증가시키고 colony formation assay에서 세포 증식을 떨어뜨림을 확인하였다. NUP62 발현 억제 후 방사선 민감도가 증가했던 세포주 중 CCK-8 assay와 colony formation assay에서 유의미한 차이를 보인 활액막 육종과 섬유 육종 세포주에서 gamma H2AX assay를 시행하였으며 gamma H2AX의 발

현이 대조군에 비하여 증가되어, DNA 이중 나선 손상이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 손상된 DNA 이중 나선의 회복이 대조군보다 지연되어 DNA 이중 나선의 손상 및 회복 기전에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

결론: 본 연구에서 NUP62는 방사선 치료에 저항성을 보이는 것으로 알려진 활액막 육종, 섬유 육종과 같은 육종 세포주에서 세포 자멸사를 유도하고, DNA 이중 나선 손상 회복 기전에 영향을 줌으로써, 방사선 민감제의 타겟으로 잠재적인 가능성을 확인할 수 있었다. 세포주를 이용한 본 예비 연구의 결과를 바탕으로 추후에 후속 연구를 통하여 육종의 방사선 민감제의 스크리닝과 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 육종; 방사선 치료; 방사선 민감제; NUP62

학 번: 2015-30576

목차

국문 초록 1

목차표 4

그림 목차 5

서론 6

연구 대상 및 방법 8

결과 15

고찰 32

결론 39

참고 문헌 40

참고 그림 44

영문 초록 (Abstract in English) 46

그림 목차

Figure 1 9

Figure 2A. 16

Figure 2B, C 17

Figure 3 18

Figure 4A, B 19

Figure 4C, D 20

Figure 5 21

Figure 6 21

Figure 7 22

Figure 8 24

Figure 9 26

Figure 10 28

Figure 11 29

Figure 12A, B 31

Supplementary figure1A, B 44

Supplementary figure1C 45

1. 서론

육종(sarcoma)은 전체 암 종의 1% 내외를 차지하여 발생 빈도가 낮은 희귀암이지만, 수십 개의 조직학적 아형이 있어 매우 이질적인 악성종양이다.[1] 육종은 횡문근육종 (Rhabdomyosarcoma)이나 유잉 육종 (Ewing sarcoma)과 같은 일부 아형을 제외하고는 방사선 치료 (radiation therapy)에 잘 반응하지 않아 수술적 절제가 제일 중요한 치료이지만 수술 후에도 10-15%가량의 환자에서 국소 재발을 하고, 20-30%가량에서 원격 전이가 발생한다. 이 경우 수술적 절제가 어려운 경우가 많으며, 방사선 치료에도 반응이 좋지 않아, 전이 발생시 5년 생존율이 2-30%에 이르는 예후가 불량한 암종이다.[1-4].

불량한 예후의 주요한 원인은 치료의 기초가 되는 근거 (evidence)가 부족하기 때문으로 생각되며, 미충족 수요 (unmet needs)가 아주 큰 상황이다. 특정 육종에서 유전적 변이와 관련된 보고들이 있으며, 이를 바탕으로 표적 치료제의 사용도 시도되고 있으나, Gastrointestinal stromal tumor (GIST)에서 KIT돌연변이 외에 특정 육종에 일관적으로 나타나는 치료 표적이 있는 경우가 많지 않으며 복잡한 유전자적 변이가 많이 일어나는 특성 상, 치료 결과 역시 현재까지는 제한적이다.[3,5] 수술적 절제가 어려운 진행성 육종의 경우, 항암 및 방사선 치료에 의존할 수 밖에 없는 상황이 있으나, 대부분의 육종이 항암 및 방사선 치료에 반응이 좋지 않아 암의 진행을 크게 늦추지 못하는 경

우가 많다. 방사선 치료의 효과를 증대시키기 위하여 일부 항암 약물을 방사선 치료 시에 병용하여 방사선 민감제로 사용한 결과 보고가 있으나, 그 치료효과가 병용 치료 독성 대비 뚜렷하지 못하여 실제 임상 현장에 많이 사용되지 못하고 제한적인 상태이다.[6-10]

Nucleoporin (NUP)은 Nuclear pore complex (NPC)의 단백질 중 하나로, 게놈의 안정성과 DNA 이중 나선을 손상시키는 전리방사선 등에 대한 민감도에 영향을 줄 수 있는 후보 물질로 떠오르고 있다.[11-13] NUP54를 비롯한 NUP 계열 단백 중 일부의 발현 억제 (knockdown)가 상피성 암종에서 시행한 in-vitro연구에서 방사선 민감도를 증가시킨다는 결과가 최근 있으나 육종에 대하여는 그 연구 결과가 없는 상태이다.[13] 본 연구에서는 육종 세포주들을 이용하여 방사선 민감제의 타겟으로 NUP62의 역할과 기전을 *in vitro*에서 확인하고자 한다. 본 연구의 결과를 바탕으로 추후 환자 대상의 육종 치료에서 방사선 민감제의 타겟으로 NUP62의 잠재적 이용가능성에 대하여 탐색해보고자 한다.

2. 연구 대상 및 방법

2.1. 연구 대상

5개의 사람 육종 세포주 (활액막 육종 [SW982], 섬유육종 [HT-1080], 횡문근육종 [RH30], 유잉육종 [A673], 골육종 [KHOS/NP])와 1개의 섬유아세포주(HDF)를 ATCC (Manassas, Virginia, USA)에서 구입하였다. 세포 배양 미디어로 SW982는 DMEM/F12 (Hyclone)을 사용하였고 HT1080, A673, KHOS/NP, HDF는 DMEM (Gibco), RH30은 RPMI1640 (Gibco)를 사용하였다. 모든 세포주의 세포 배양 미디어에 10% FBS (Gibco)와 1% penicillin/steroptomycin (Gibco)을 첨가하여 배양하였다.

2.2. 후보 물질 스크리닝

721개의 human kinase에 대한 siRNA libarary (Dharmacon)를 이용하였다. 96well 플레이트에 각각의 siRNA를 50nM을 넣고 0.1uL Lipofectamine RNAiMAX, 20uL Opti-MEM을 넣고 섞은 뒤 A549 세포주를 이용하여 역형질 주입을 시행하였다. A549세포주는 $0.5x10^4$ /well로 넣어주었으며 6-MV photon beam linear accelerator (CL/1800, Varian Medical System Inc.)로 8Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선 조사 72시간 후 세포사멸 결과를 CCK-8 assay를 통해 확인하였다. CCK-8 assay에서 viable cell이 방사선 조사 하지 않은 대

조군의 50% 밑으로 감소하는 siRNA를 먼저 확인하였다.

2.3. NUP62, 54에 대한 siRNA 시퀀스 및 형질 주입

NUP62와 NUP54의 siRNA 시퀀스는 Rodriguez등이 2018년 문헌에 보고한 시퀀스를 참고하여 제작하였고 (Figure 1), negative control siRNA (siControl) (Bioneer)를 비교를 위하여 이용하였다[13]. 세포는 역형질주입 (reverse transfection) 방식으로 24well 플레이트에 100 µL opti-MEM (Gibco), 1µL Lipofectamin (Invitrogen)을 먼저 넣은 뒤 각각의 실험군에 NUP62의 siRNA (siNUP62)와 NUP54의 siRNA (siNUP54), siControl을 20nM을 넣어주었다. 6well 플레이트의 경우 500µL opti-MEM, 5µL Lipofectamin, 20nM의 siRNA를 넣어주었고, 제조사의 프로토콜에 따라 나머지 역형질 주입 과정을 시행하였다.

Figure 1 실험에 사용된 siRNA 시퀀스

siNUP62	#1	GGGCUUCAGCUUAAAGGCA
	#2	GAGCGCAGCUUCCGGAUCA
siNUP54	#1	CGAUUCAGGGUGAACUAAA
	#2	UUUAUGCAAUGAUUCUACC

2.4. Western blot 분석

NUP62, BCL-2, BAX, PARP, MCL-1, γH2AX, ß-actin 등의 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. 세포 용해물 (lysate)와 동량의 단백질 loading buffer [1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 50% glycerol, 증류수]와 섞어 10% SDS-PAGE acrylamide gel에 전압이 100 V로 2시간 동안 전기 영동을 시행한 후 PVDF membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 4℃, 100 V에서 1시간 동안 transfer하였다. Transfer된 membrane은 TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Tween20)에 5% skim milk (Becton Dickinson, Detroit, MI, U.S.A)가 포함된 용액을 이용하여 4℃에서 하루 동안 blocking한 후, TBS-T로 5분씩 두 번 세척하고 일차 항체(Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, U.S.A)를 5% skim milk가 첨가된 TBS-T로 1 : 1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 10분씩 세 번 세척한 후 이차 항체 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin, anti-rabbit 을 5% skim milk가 첨가된 TBS-T로3,000배로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBS-T로 10분씩 세번 세척하고 ECL Western detection kit (Amersham)로 반응시켜 LAS (BIO-RAD)에 감광 후 비교 분석하였다.

2.5. 방사선 조사

배양된 세포를 siRNA와 control siRNA를 이용하여 형질 주입 시킨 후 48시간 경과 한 뒤 정해진 용량에 따라 6-MV photon beam linear accelerator (CL/1800, Varian Medical System Inc.)를 이용하여 방사선 조사를 시행하였다. 방사선 조사량이 0Gy인 plate의 경우 동일 조건을 유지하기 위하여 배양기에서 꺼내어 벤치에 넣어두었고, 세포군의 방사선 조사가 끝난 후에는 다시 모든 실험, 대조군 세포주들을 배양기 안에 넣어두었다.

2.6. 세포사멸 및 세포 자멸사 (apoptosis)분석

2.6.1. CCK-8 assay

세포 성장과 사멸을 보기 위하여 CCK-8 assay (Dojindo)를 시행하였다. 24well 플레이트에 배양한 세포주들에 다양한 방사선 조사량 (0, 5, 10 Gy)를 처치하였고, 48시간 배양 후 CCK-8 시약을 각각의 well에 20uL씩 넣고 2시간 배양하였다. 450nm의 파장에서 spectrophotometer 이용하여 흡수 값을 측정하였다.

2.6.2. 세포 자멸사 관련 물질 western blot.

siRNA를 이용한 형질 주입 후 48시간에 방사선 조사를 시행하였다.

방사선 조사 48시간 후에 세포 용해물에서 BCL-2, BAX, PARP, MCL-1, ß-actin에 대한 western blot을 시행하였다.

2.6.3. Annexin V-FITC/Propidium (PI) flow cytometry

배양된 세포를 꺼내고 배양액를 걷어서 15mL 튜브에 넣고서 trypsin-EDTA 이용하여 세포를 모은다. 원심분리후에 상층액을 걷어내고서 PBS 이용하여 가볍게 cell pellet을 재현탁 (resuspending) 시킨다. 1.5ml tube로 세포를 옮겨준 후에 PBS로 washing하고 상층액을 버리고 500ul FACS 용binding buffer 를 넣는다. 1.25uL annexin V (세포가 FITC 자가형광을 가진 경우 annexin V-APC)를 각각의 튜브에 넣고 15분 배양한 뒤 원심 분리 후, 상층액을 버리고 500uL FACS 용 binding buffer 를 이때 FACS용 튜브로 옮긴다. PI 용액을 10uL 넣어주고 FACS canto (Bio-rad)에 분석한다.

2.7. 세포 증식 분석

2.7.1. 집락 형성 분석 (colony formation assay)

집락 형성 분석은 형질 주입 후 48시간 경과하면, PBS washing후 0.25% trypsin-EDTA 3mL 처리한 뒤 3분간 CO2 배양기에 넣어준다. 세포가 바닥에 붙은 것을 확인 후 혈청 (serum)이 포함된 배양액 5mL를 넣어준다. 15mL 튜브에 siNUP62와 siControl을 넣고 세포를 넣어

준 뒤 원심분리 하고 상층액을 제거 후 5mL PBS를 넣고 다시 원심분리 하고 cell counter를 이용하여 모인 세포 수를 확인한다. 6 well 플레이트에 세포를 넣어주고 2시간 동안 안정화 시킨 후 방사선을 0, 2, 5, 10 Gy를 조사하였고 10-14일간 배양 후 집락 형성을 확인한다. 집락 형성이 확인 되면 배양액을 제거 한 후 0.5% crystal violet 용액, 20% 메탄올을 각각 2mL씩 넣어 주고 15분간 rotator위에서 올려둔 뒤 염색 용액을 제거 한다. 증류수로 여분의 염색 용액을 씻어 낸 후 상온에서 건조 시킨 후 염색된 집락의 수를 센다.

2.8. DNA 이중나선 손상 분석

2.8.1. γH2AX assay

2.2에서 기술한 형질 주입 및 2.4에 기술한 방사선 조사 방식에 따라 방사선 조사 48시간 후 각각의 실험군에 해당되는 세포군을 시간 (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 시간)에 따라 단백질을 추출한다. Cell scarper로 조심스럽게 세포를 모아 원심 분리 후에 cell lysis buffer (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA USA)를 이용하여 재현탁 시키고 상층액만 얻어낸다. 단백질의 정량은 Bradford assay방법으로 시행하였다. 이후에 토끼 γH2AX 항체 (Bethyl)를 이용하여 2.3에 기술한 방법에 따라 γH2AX에 대한 Western blot을 시행하였다.

2.9. 통계분석

비모수적 데이터는 평균±표준 편차 (standard deviation)로 제시하였으며, Student's t test를 사용하여 수치적 차이의 유의성을 검정하였다. 통계적 유의 수준은 P값이 0.05보다 작을 때로 정하였다.

3. 결과

3.1. siRNA library 이용한 후보물질 스크리닝 결과

725개의 siRNA 중 방사선 조사하지 않은 대조군에 비하여 50%이하로 세포 생존이 감소한 siRNA를 10개를 확인하였다 (Figure 2A, B). 이 중 기존에 방사선 민감도 증가 효과가 잘 알려지지 않은 NUP62와 LMTK3를 선택하였다. 추가로, 기존 문헌에서 NUP family 중 방사선 민감도 증가 효과가 보고된 NUP54를 포함하여 총 3개의 후보물질을 5개의 육종 세포주에서 확인하였다 (Figure 2C). LMTK3는 SW982에 발현이 거의 없어 제외하고 5개의 세포주에서 발현이 모두 확인되는 NUP54와 NUP62를 선정하였다.

Figure 2. siRNA library에서 A549 세포주를 이용한 후보 siRNA 스크리닝. A, 전체 725 후보 siRNA에서 CCK-8 assay의 결과. 방사선 조사하지 않은 대조군에 비하여 50% 이상 세포사멸 증가한 siRNA를 일차 후보 물질로 확인함.

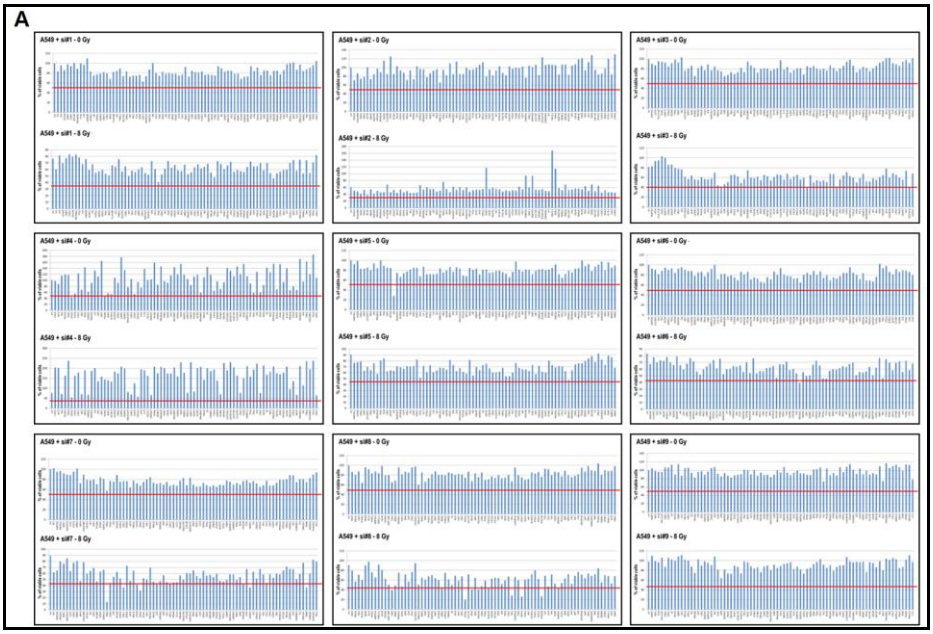


Figure 2B. 10개의 1차 후보군 중 기존에 잘 알려지지 않은 NUP62와 LMTK3를 선정함.

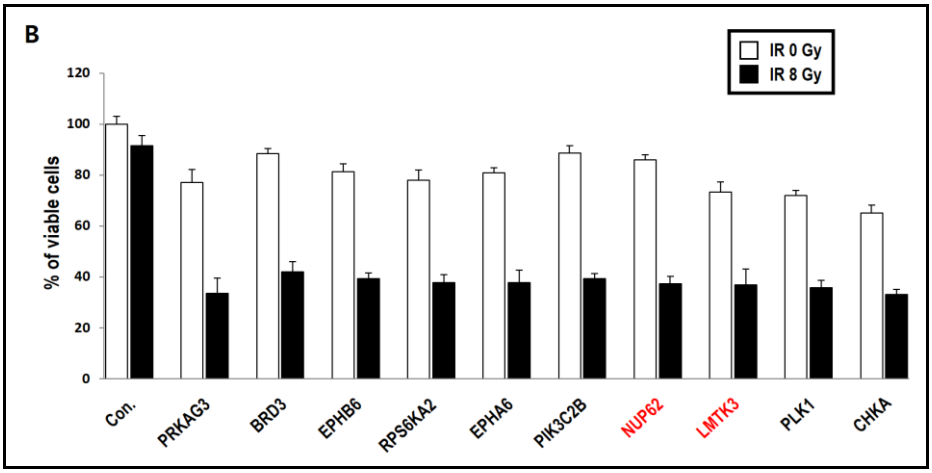
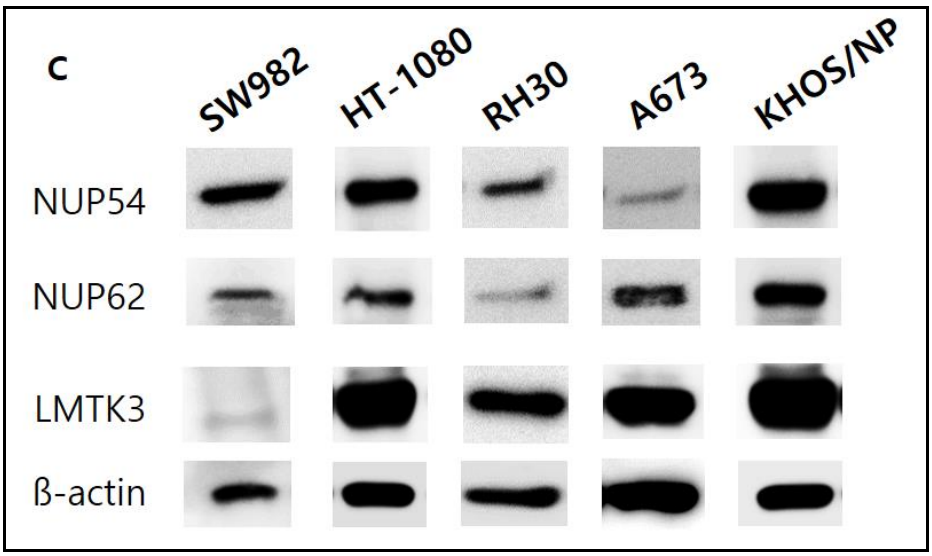


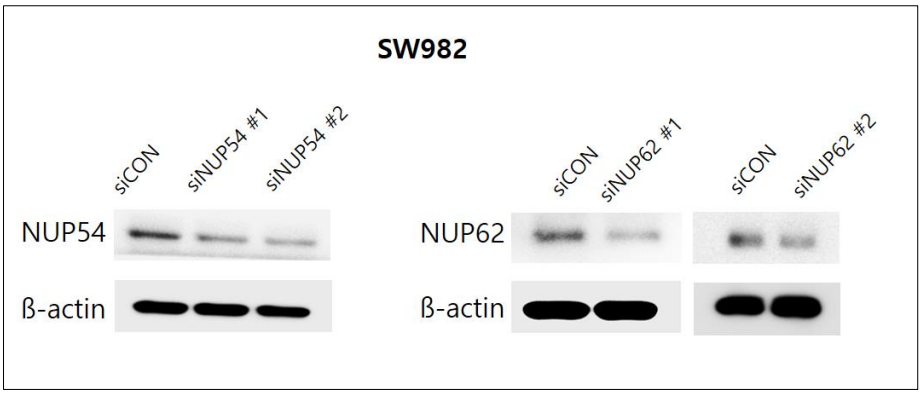
Figure 2C. NUP54, NUP62, LMTK3의 5개 육종 세포주에서 발현을 western blot에서 확인함. LMTK3는 SW982에서 발현이 없어서 후보에서 제외하고 NUP62와 NUP54를 선택함.



3.2. NUP62의 발현 및 유전자 발현 억제

우선, 대표적 방사선 저항성 육종인 활액막 육종 세포주 (SW982)에서 siNUP62의 두개의 시퀀스와 siNUP54의 두개의 시퀀스를 이용하여 유전자 발현 억제를 확인하였다 (Figure 3.)

Figure 3. NUP62, NUP54의 두개의 siRNA 시퀀스에 대하여 발현억제를 확인함.



siNUP62의 2가지 시퀀스를 이용한 CCK-8 assay와 colony formation assay의 결과 (Figure 4 A, B)에서 siNUP2가지가 대조군에 비하여 세포사를 증가시키고, 군집 형성을 억제하는 경향을 확인할 수 있었다. SW982에서 siNUP54#1, #2와 siNUP62 #1을 이용한 CCK-8 assay와 Colony formation assay의 결과 (Figure 4. C, D) 전반적으로 방사선 저항성 육종인 SW982 세포주에서 siNUP62가 siNUP54처리에 비하여 방사선 세포사가 증가하고 군집 형성이 억제됨을 확인하였

다. 이를 바탕으로 NUP62를 방사선 저항성 육종의 방사선 민감제 타겟으로 정하고 하나의 시퀀스 (#1)를 이용하여 총 5개의 육종 세포주와 1개의 정상 대조군 세포주에서 후속 실험을 진행하였다.

Figure 4. siNUP62, 54를 이용한 CCK-8, colony formation assay 결과. A, SW982에서 siNUP62의 두개 시퀀스로 CCK-8 assay를 한 결과 대조군에 비하여 세포 사멸이 증가하는 경향을 확인함. ** P<0.001.

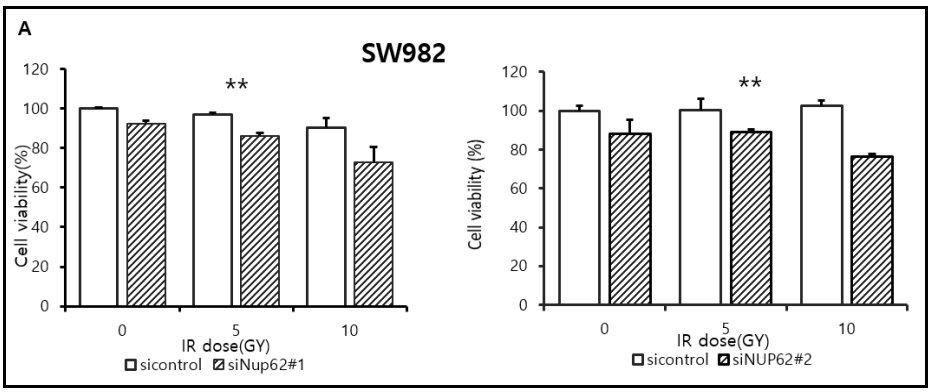


Figure 4B. colony formation assay에서도 비슷하게 군집 형성이 떨어짐을 확인함.

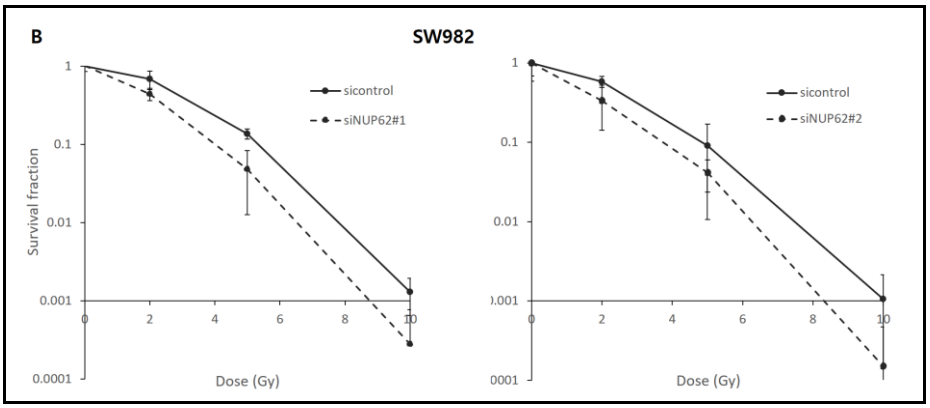


Figure 4C. 3개의 세포주에서 siNUP62, siNUP54로 발현 억제 후에 방사선 조사하고 CCK-8 assay결과. 전체적으로 NUP62 발현 억제의 경우가 세포 사멸이 더 많이 일어나는 경향.

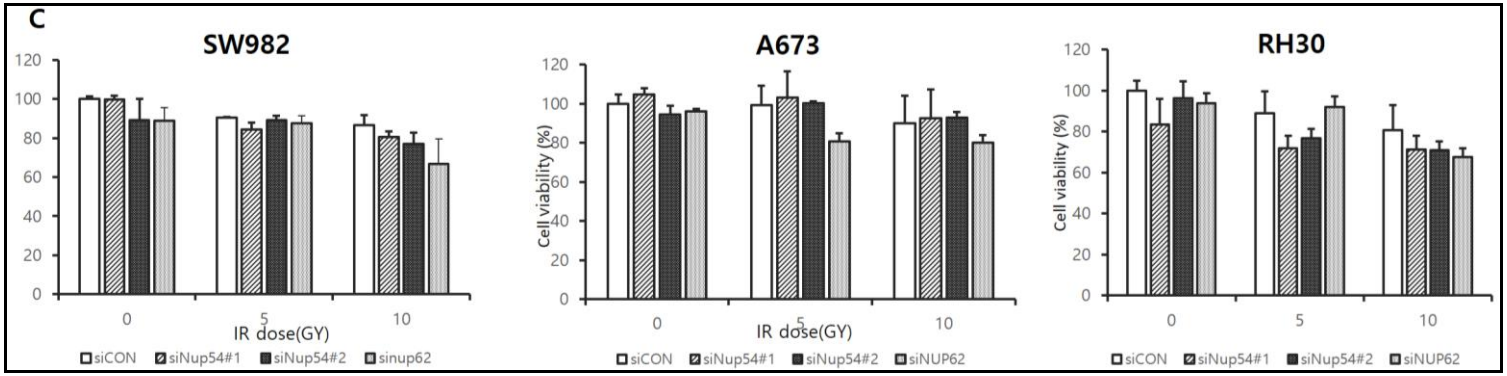
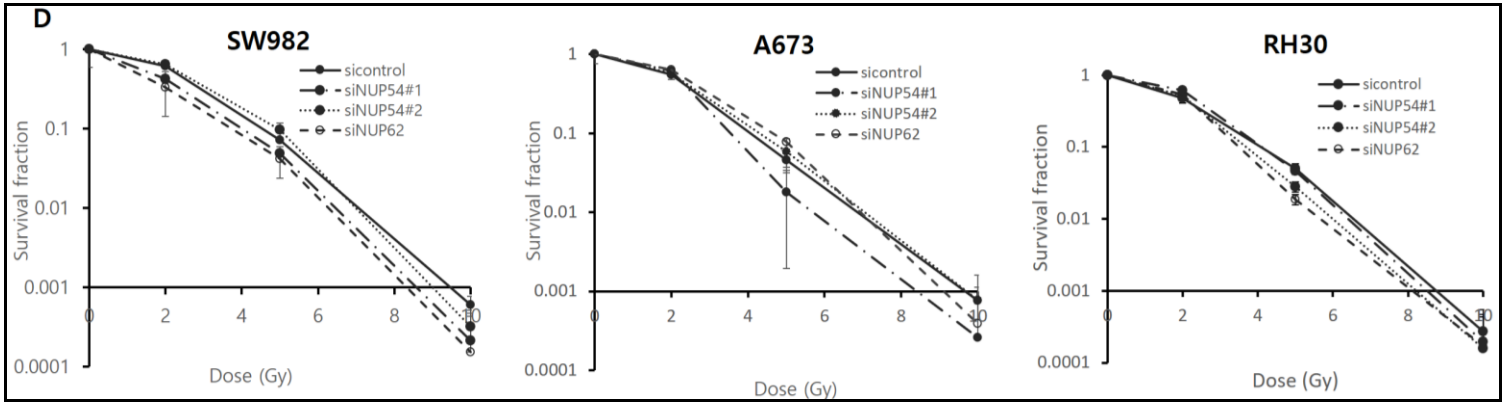


Figure 4D. Colony formation assay결과 NUP62가 54에 비하여 전반적인 군집 형성이 감소하는 경향.



모든 세포주에 방사선 조사 후 NUP62의 발현을 보았을 때, 조사량을 늘려감에 따라 NUP62 발현의 정도가 SW982에서 약간 증가하는 경향을 보였고 그 외 다른 세포주에서는 방사선 조사에 직접적인 영향을 받지 않았다 (Figure 5). 실험에 사용한 모든 세포주에서 siRNA를 이용한 NUP62의 발현 억제를 확인할 수 있었다 (Figure 6).

Figure 5. 전체 세포주에서 방사선 조사에 따른 NUP62발현의 변화.

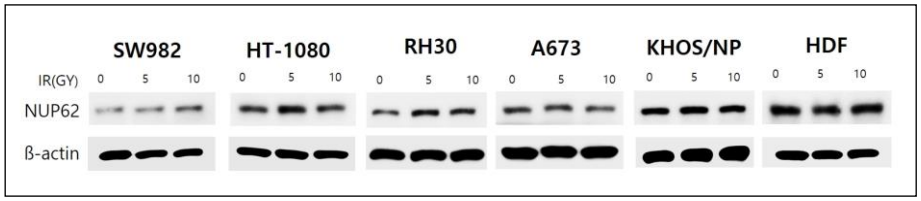
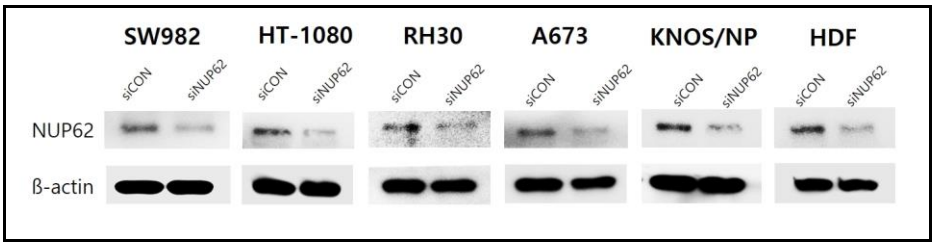


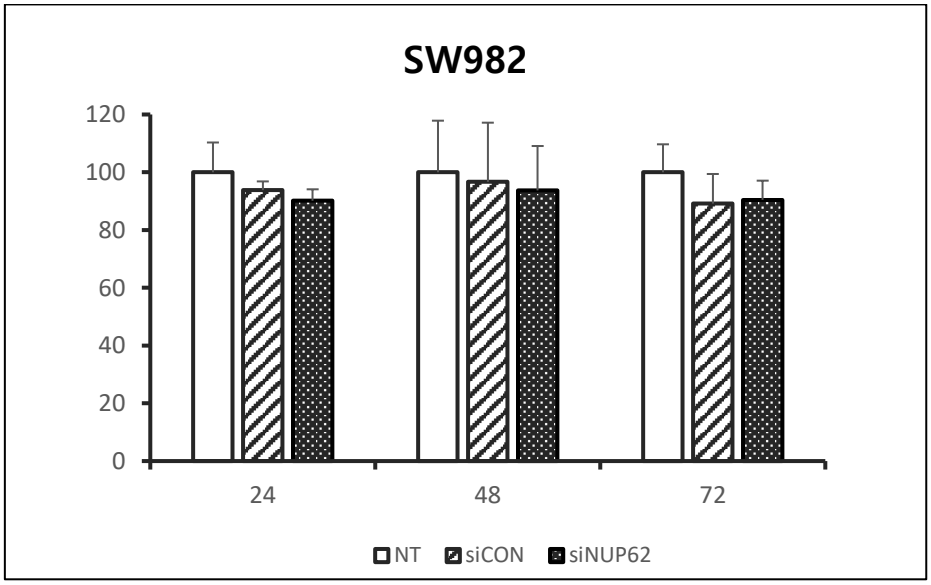
Figure 6. 5개의 실험세포군과 1개의 대조군 세포에서 siNUP62를 이용한 발현억제를 확인하였음.



3.3. NUP62의 발현 억제가 세포사멸에 미치는 영향

SW982 세포주에서 CCK-8 assay의 결과, 방사선 조사 없이 siNUP62를 이용한 NUP62의 발현 억제는 대조군 siRNA에 비하여 유의한 세포사멸의 증가를 보이지 않았다 (Figure 7).

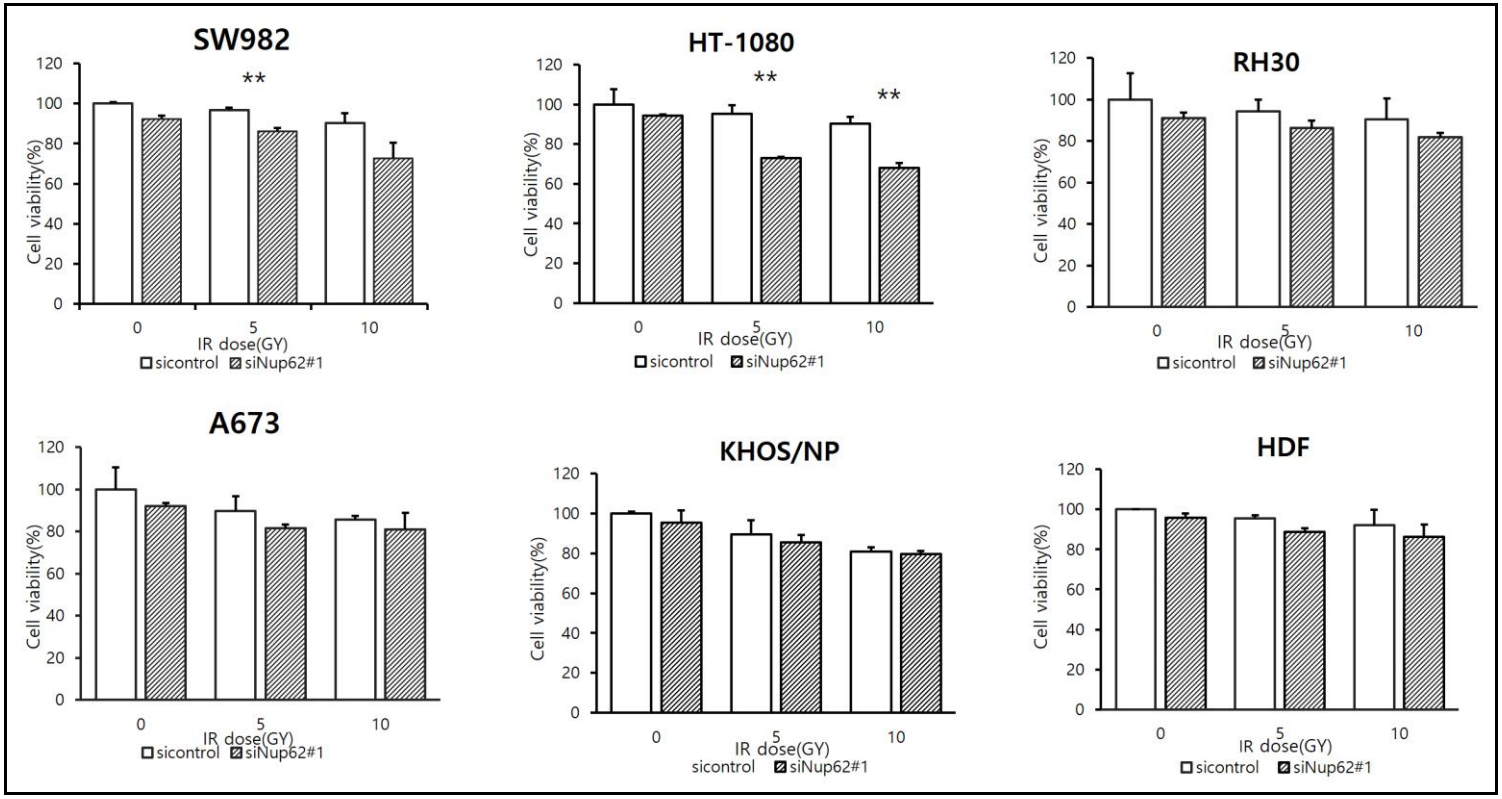
Figure 7. NUP62 발현 억제 시에 SW982세포주에서 CCK-8 assay 결과.



siNUP62로 NUP62 발현 억제 후 방사선 조사를 시행하였을 경우, SW982 (IR 5Gy에서 P=0.013), HT-1080 (IR 5Gy에서 P=0.025, IR 10Gy에서 P=0.016)의 경우에 CCK-8 assay 상 유의미한 세포 사멸의 증가를 보였다 (Figure 8). 전반적으로 세포사멸을 대조군에 비하여 증가시키는 경향을 보였으나 나머지 육종 세포주 (RH30, A673,

KHOS/NP)와 정상 세포 대조군 (HDF)에서는 NUP62의 발현 억제가 방사선 치료에 대하여 추가적으로 유의미한 세포 사멸은 관찰되지 않았다.

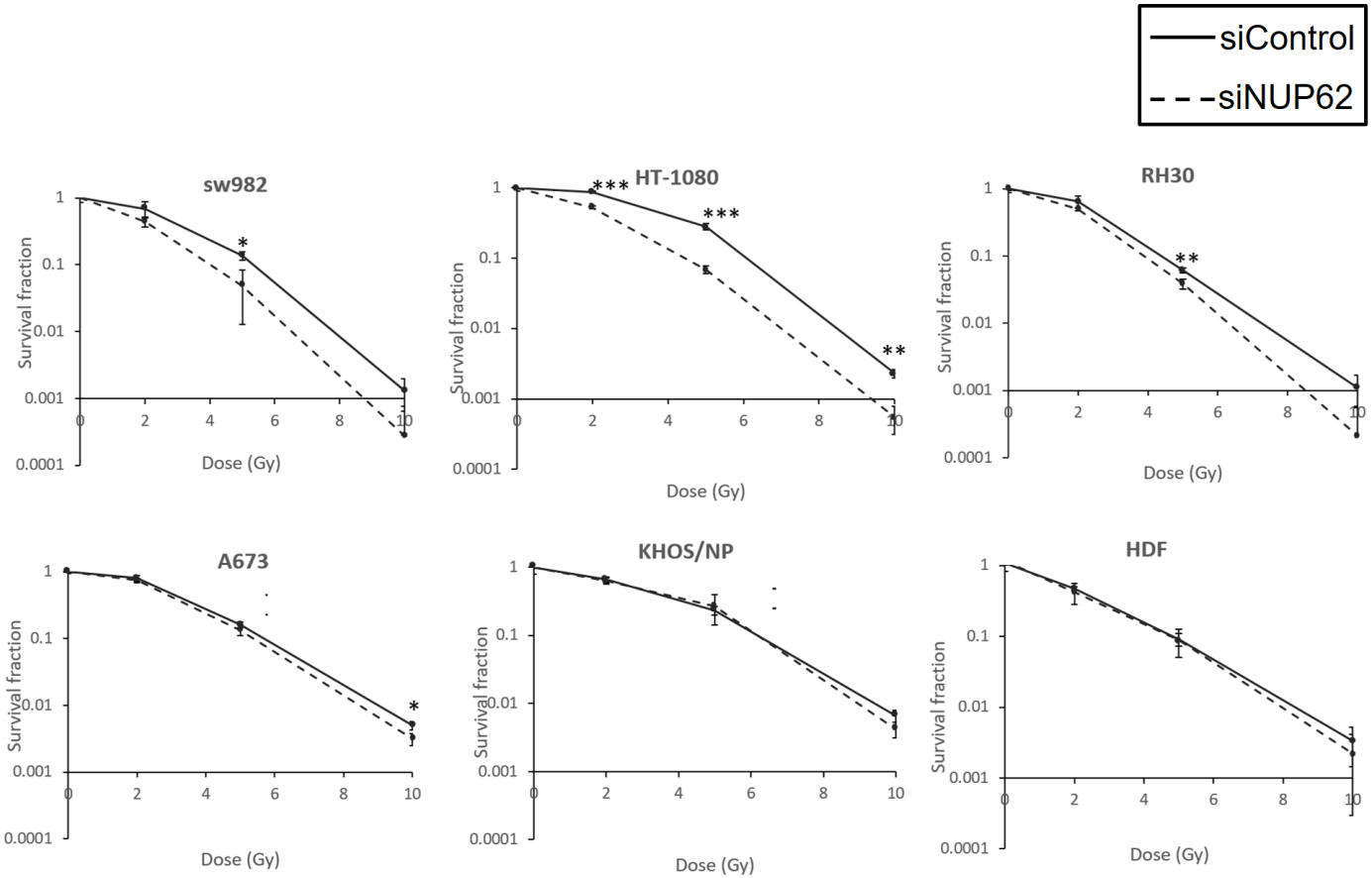
Figure 8. 세포주에 따라 siNUP62 처리에 따른 CCK-8 assay. 세포 사멸의 유의미한 증가가 SW982, HT-1080에서 확인됨. ** P<0.001.



3.4. Colony formation assay를 이용한 세포 증식 평가

NUP62의 발현 억제는 방사선 조사 후 전체적으로 세포주 증식을 억제하는 경향을 확인할 수 있었다 (Figure 9). 이 중, CCK-8 assay 결과와 유사하게 SW982 (IR 5Gy에서 P=0.0186), HT-1080 (IR 2Gy에서 P=0.0004, IR 5Gy에서 P=0.0003, IR 10Gy에서 P=0.0015)에서 주로 유의미한 차이가 나타남을 볼 수 있었다. RH30 (IR 5Gy에서 P=0.0098), A673 (IR 10Gy에서 P=0.0285)에서도 일부 방사선량에서 유의미한 차이를 확인할 수 있었다. 반면, KHOS/NP와 정상 대조군인 HDF 세포주에서는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 이를 바탕으로 방사선 저항성 육종으로 알려진 SW982, HT-1080에서 방사선 민감성 육종인 RH30, A673에 비하여 NUP62가 방사선 민감제로서의 역할을 조금 더 기대해 볼 수 있음을 확인하였다. 정상 세포주에는 NUP62 발현을 억제하여도 방사선 치료의 효과를 더 증가시키는 결과는 확인되지 않았다.

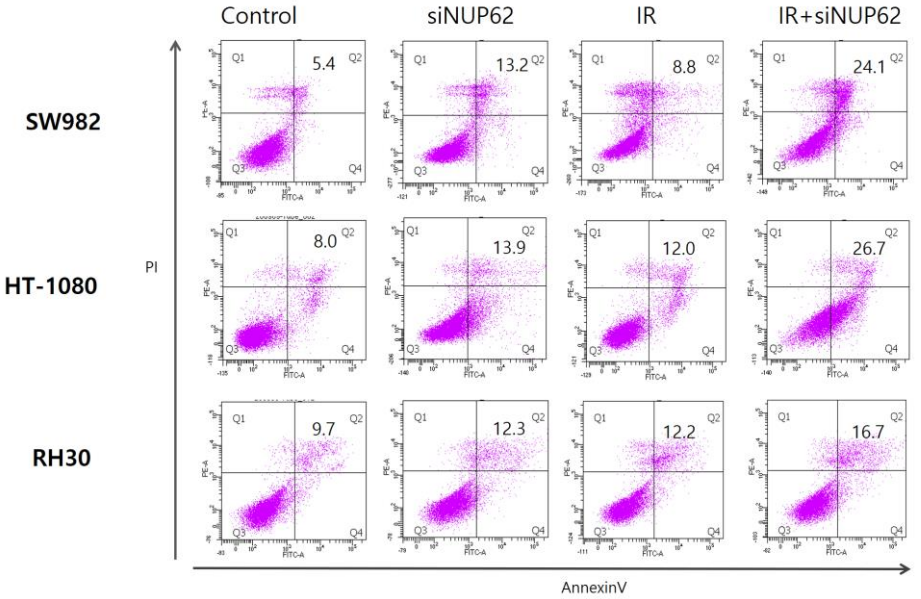
Figure 9. Colony formation assay결과. SW982, HT1080에서 RH30, A673등에 비하여 증식이 떨어지는 효과가 더 나타남. 반면 정상 세포는큰 영향을 받지 않았음. *P<0.05, ** P<0.001, *** P<0.001.

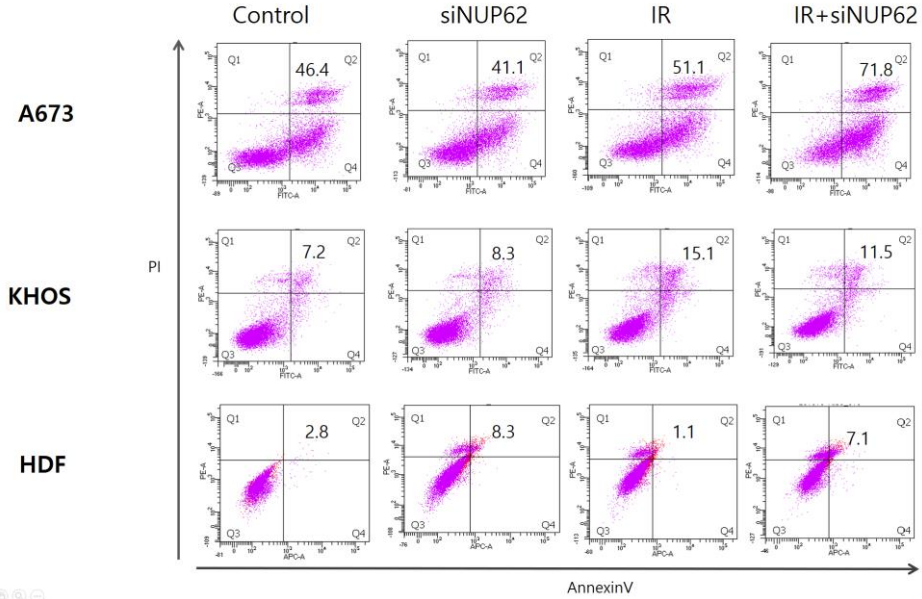


3.5. 세포자멸사에 대한 결과.

NUP62 발현 억제 후 방사선 조사한 뒤 세포자멸사의 비율을 FACS로 확인하였으며 세포 자멸사의 비율이 SW982, HT-1080, RH30, A673에서 대조군에 비하여 증가하는 경향을 확인할 수 있었다 (Figure 10). KHOS/NP, HDF에서는 siNUP단독 처치나, 방사선 조사 단독 처치에 비하여 세포 자멸사의 비율이 증가하지 않았다.

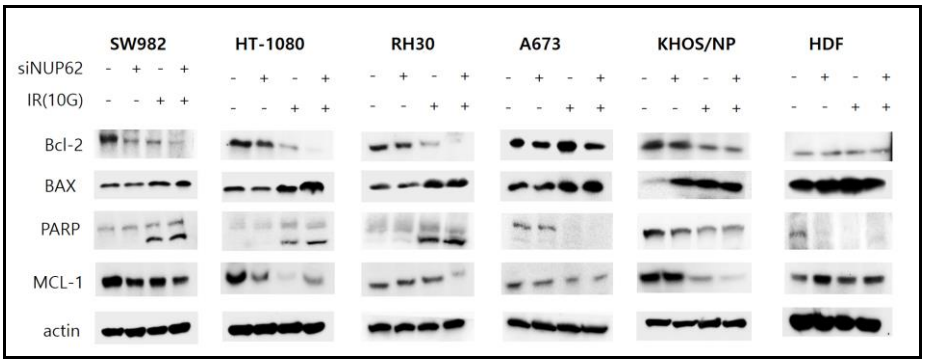
Figure 10. 세포 자멸사 FACS 결과. HDF의 경우 FITC에 자가 발광이 있어 APC를 사용한 FACS를 시행함.





세포자멸사과 관련된 단백의 western blot의 결과, CCK-8, colony formation assay, FACS에 확인된 경향과 비슷하게 SW982, HT-1080, RH30에서 BCL-2가 감소하고, BAX가 증가하며, cleaved PARP 발현이 확인이 되어 세포 자멸사가 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 11.).

Figure 11. 방사선 조사 및 siNUP62 처리에 따른 세포 자멸사 관련 물질 western blot 결과. SW982, HT-1080, RH30에서 NUP62 발현 억제와 방사선 조사한 처치군에서 Bcl-2가 감소하고 BAX, cleaved PARP가 증가하는 세포 자멸사 소견이 확인됨.



3.6. 방사선 치료 후 DNA 손상 조절 변화 확인

CCK-8 assay, colony formation assay, 세포 자멸사 물질 western blot 등에서 NUP62의 발현 억제가 방사선 민감도를 가장 증가시키는 경향을 보여주었던 SW982와 HT-1080에서 γH2AX의 발현을 확인하였다 (Figure 12.). 대조군에 비하여 siNUP62를 처리한 실험군에서 γH2AX의 발현이 증가하는 것을 western blot에서 확인할 수 있었다. 또한 시간의 경과에 따라 SW982의 대조군에서는 발현된 γH2AX가 빠르게 발현이 감소되나 siNUP62 처리한 실험군에서는 발현이 48시간까지 지속되는 것을 확인할 수 있었고, HT-1080에서도 48시간까지 대조군에 비하여 γH2AX의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 NUP62의 발현 억제는 전리 방사선 후 발생하는 DNA 이중 나선의 손상을 더 많이 일으키고, 회복 기전을 더디게 하여 방사선 민감도를 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

Figure 12. γH2AX assay결과. A, SW982에서 대조군에 비하여 γH2AX의 발현이 더 많고 시간이 지나고 대조군이 빠르게 소실되는 것에 비하여 오랫동안 발현됨을 확인.

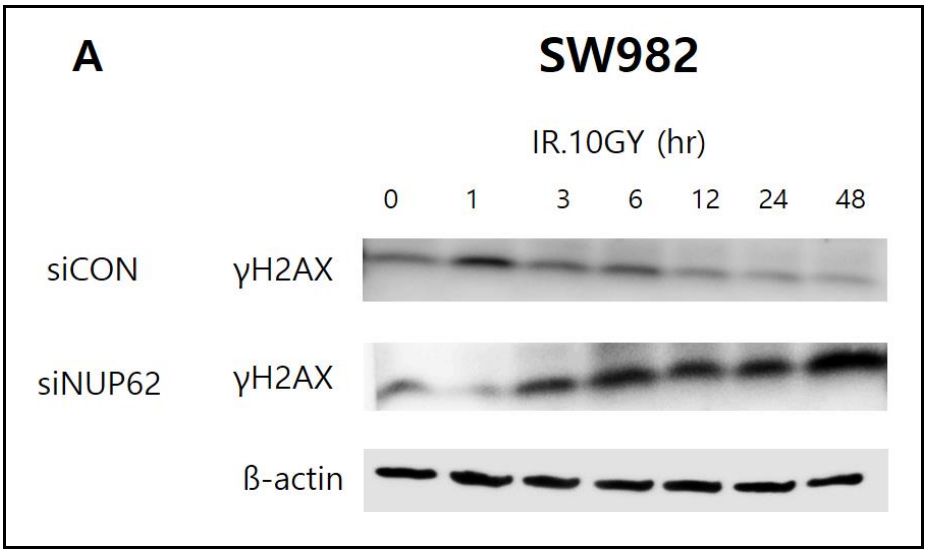
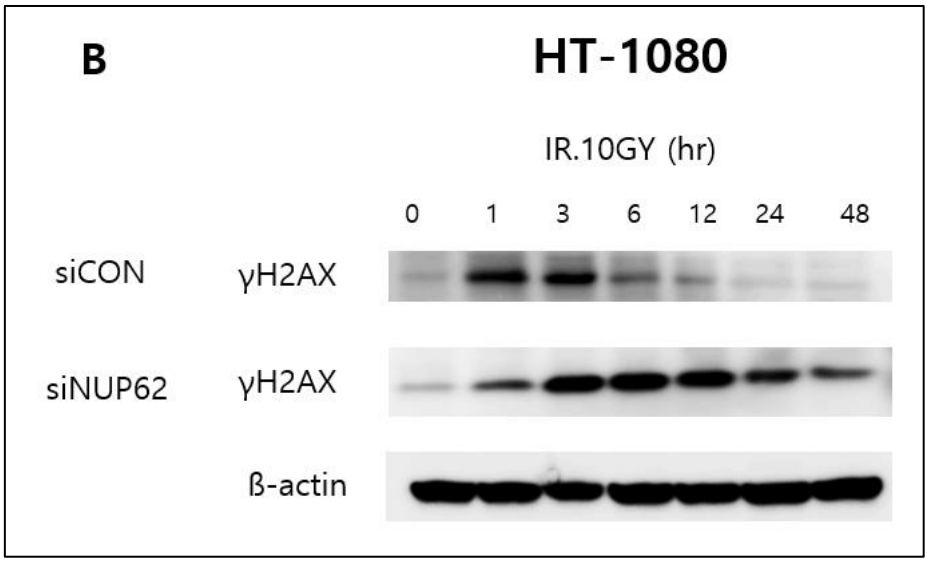


Figure 12B. HT-1080에서도 대조군에 비하여 γH2AX의 발현이 더 많이 되고 오래 지속됨을 확인.



4. 고찰

본 연구에서 NUP62는 활액막 육종, 섬유 육종과 같은 기존의 방사선 저항성 육종의 치료에서 방사선 민감제의 타겟으로써 잠재적 가능성을 확인하였다. siRNA를 이용한 NUP62의 발현 억제 단독으로는 세포 성장 및 증식을 억제하지 않으나, 방사선 조사 후에는 세포 성장 및 증식을 억제하였고, BCL-2 발현을 억제하는 기전으로 세포자멸사에도 영향을 주었다. 또한 전리 방사선 치료 후 발생하는 DNA 이중 나선의 손상을 증가시키고 그 회복 기전을 더디게 만들어 방사선 치료의 민감성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

NUP62는 Nuclear pore complex (NPC)를 구성하는 nucleoporin 중 하나로, NPC는 게놈의 안정성 유지와 전리 방사선 치료 후 발생하는 DNA 이중나선 손상의 민감도에 영향을 주는 것으로 최근 보고되고 있다.[11-16] Hashisume 등은 NUP62의 siRNA로 발현을 억제시킨 HeLA 세포주에서 다핵 세포(multinucleated cell)가 증가함을 발견하였는데 이는 G2/M phase arrest와 세포사가 증가한 것과 연관이 있다고 보고하였다.[14] 이를 통해 NUP62가 중심체 분리 (centrosome segregation), 중심 소체 성숙(centriole maturation) 및 방추사 방향 (spindle orientation)을 조절하여 유사 분열 세포주기 진행 조절에 관여한다고 보고하였다. Rodriguez 등은 상피성 암종 세포주에서 NUP54의 발현 억제가 방사선 치료 후 세포사를 증가시키는데, 그 기전 중 하나로 DNA

이중 나선 손상의 homologous recombination 회복 과정을 더디게 함을 보고하였다.[13]

NUP62 발현 억제와 방사선 조사는 BCL-2 발현 억제를 통하여 활액막 육종, 섬유 육종, 횡문근육종 세포주에서 세포자멸사를 증가시키는 것을 확인하였다. BCL-2의 발현 억제의 경우, 세포주 별로 패턴의 차이가 있었는데, SW982의 경우 방사선 조사 없이 NUP62 발현 억제만으로도 BCL-2의 발현 억제를 보여주었고, 방사선 조사 시에는 그 효과가 더 커지는 것을 보여주었다. 반면 NUP62의 단독 발현 억제에서는 cleaved PARP는 발현되지 않고, 방사선 치료와 같이 처리하였을 경우 cleaved PARP의 발현이 더 커지면서 세포자멸사를 유도하였다. HT-1080, RH30의 경우는 NUP62의 발현억제와 방사선 조사를 같이 했을 때 BLC-2의 발현 억제와 cleaved PARP의 발현이 증가됨을 보여주었다. RH30의 경우는 MCL-1의 발현이 NUP62 발현 억제와 방사선 조사를 같이 했을 때만 떨어지는 패턴을 보이나 SW982와 HT-1080에서는 특별한 경향성이 없다. BCL-2와 MCL-1이 세포자멸사를 억제하는 비슷한 기능을 하고, 이를 각각 표적으로 하는 억제제들이 소아 육종이나 흑색종 실험 연구에서 세포 자멸사를 빨리 유도하는 효과가 있을 수 있다고 알려져 있다.[17,18] NUP62의 발현 억제와 방사선 조사는 일부의 세포에서는 BCL-2에 발현 억제 경로에 주로 작용하고, RH30과 같은 경우는 두가지의 경로에 모두 작용하는 것으로 보이며, 이는 육종의 아형에 따라 NUP62의 발현 억제가 세포 자멸사에 미치는 하위 경로가 다

를 수 있음을 시사한다. 반면 정상 세포주에서는 NUP62의 발현 억제와 방사선 치료의 처치에도 세포 자멸사를 유도 하지 않는 것을 확인할 수 있어 방사선 민감제의 표적으로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

방사선 민감도가 증가한 SW982, HT-1080에서 NUP62의 발현 억제와 방사선조사는 DNA 이중 나선 손상의 증가를 증가시킴을 확인하였다. DNA 이중 나선의 손상은 전리 방사선 치료 후 세포에서 나타나는 직접적 효과 중의대표적인 기전이고, 손상된 DNA 이중 나선 부위에 γH2AX가 생겼다가 정상의 경우에는 빠르게 여러가지 회복 기전을 통해 회복 된다.[19-21] NUP54의 상피암종에서 방사선 민감제 효과를 보여준 문헌에서는 homologous repair 기전에 작용함으로써 DNA 이중 나선 손상의 회복을 더디게 하여 방사선 민감도를 증가한다고 보고 하였다.[13] 본 연구의 소견도 기존의 보고와 비슷한 경향을 보였다. 특히 SW982 세포주에서는 증가된 γH2AX가 대조군에서는 발현의 양도 적었으며, 빠른 시간 안에 회복되는 반면, NUP62를 발현 억제시킨 처치군에서는 발현의 증가가 48시간까지도 지속되어 NUP62가 세포 자멸사뿐 아니라 DNA 이중 나선 손상의 회복 기전에도 관여함을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 siRNA 스크리닝을 통해 얻은 후보군인 NUP62와 기존에 보고된 NUP54의 siRNA를 이용하여 일부 육종 세포주에서 먼저 방사선 민감도의 증가 여부를 확인하였고, 그 결과 상피성 암종의 경향과는 다르게 NUP62의 방사선 민감제로서의 가능성을 확인하였으며,

NUP54는 육종에서의 방사선 민감제의 역할이 떨어지는 것을 확인하였다. [13] 임상적으로 RH30, A673은 기존의 방사선 치료에 잘 듣는 횡문근 육종과 유잉 육종의 세포주인데, 이들에서는 NUP62의 방사선 민감제로서의 추가적인 역할을 SW982나 HT1080에 비하여 크게 확인할 수 없었다. 육종안에는 수많은 조직학적 아형이 있으며, 같은 조직학적 아형 안에도 아직 밝혀지지 않은 유전적 차이들이 존재하여, 일반화 하기 어렵겠으나, 본 연구에서는 방사선 저항성 육종 세포주에서 NUP62의 발현 억제로 방사선 치료의 민감성을 향상시킬 수 있음을 확인한 것에 의미가 있을 것으로 생각된다. 또한 기존의 문헌에서 NUP54가 제일 효과적이었던 것에 비하여 NUP family를 이용한 방사선 민감제의 실험에서 상피성 암종과는 다른 특성을 보임을 확인하였다.[13] 이는 상피성 암종의 방사선 민감제의 연구가 육종에서 그대로 적용되지 못할 수 있음을 시사한다.

육종에서 종양 세포의 방사선 민감도를 증가시킬 수 있는 표적 물질(molecular target)에 대한 미충족 수요가 매우 크지만, 육종 전반에 방사선 민감제로 작용할 수 있는 후보 물질을 탐색하는 기존 선행연구는 거의 없는 상태이다. 상피성 암종에서는 여러가지 방사성 민감제에 대한 임상 시험도 진행 중이고, 김 등은 최근 FES가 상피성 암종에서 새로운 방사선 민감제의 타겟이 될 수 있음을 보고하였다.[21,22] 반면 육종의 방사선 민감제 연구에서는 Ifosfamide, Gemcitabine 등일 비롯한 기존의 항암제나 PDGF α 단클론 항체(Olartumumab), mTOR inhibitor

(Rapamycin) 등을 이용하여 항암 방사선 요법(chemoradiation)에서 방사선 치료의 민감제로 사용하였던 일부의 임상 연구와 동물 실험들의 보고가 있으나, 대부분은 2-3개의 육종 세포주를 이용한 연구이고 아직은 임상에 광범위하게 적용되지 못하고 있다.[7-10] 발생 빈도가 매우 드물지만, 수십 개의 조직학적 아형을 가지고 있어 이질성이 매우 큰 육종의 특성상, 한 개의 조직학적 아형에 대한 표적 물질을 스크리닝 하는 것은 매우 오랜 시간과 노력이 소요될 것으로 보인다. 그러므로, 암세포에 방사선 치료 시에 일어나는 병리 기전에 공통적으로 작용할 수 있는 후보 물질에 대하여 탐색하고 검증해보는 것이 빠른 임상 적용의 가능성을 높일 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다. 예컨데, 활액막 육종에서 과발현되는 TLE1을 siRNA를 이용하여 발현 억제 시켰을 때, 항암제 민감성은 증가하나 방사선 민감도는 증가하지 않았던 예비 실험 결과를 고려하면, 특정 세포에서 과발현 되는 물질 타겟보다는 초기단계에서는 공통 기전에 작용하는 후보 물질을 찾는 것이 더 효과적일 수 있을 것이다 (Supplementary figure 1.). NUP62는 정상 세포에서도 발현되며, 본 연구의 결과처럼 NUP62의 발현 억제가 육종 세포의 성장 및 사멸에 유의미한 악영향을 주지 않으면서, 방사선 치료 후에 민감도가 증가하는 결과는 임상 적용 시 방사선 치료의 독성에 대한 염려를 줄일 수 있는 가능성을 시사한다. [14-16]

siRNA를 이용한 치료는 암을 비롯한 다양한 질병에서 시도되고 있으나, 효과적으로 안전하게 siRNA를 전달하는 전달체 (carrier)에 대

한 미충족 수요가 여전히 매우 크다. Viral vector, non-viral vector 등의 다양한 방식의 전달체 연구가 있으나 현재까지는 효과 및 생체 안정성 문제로 실제 임상에 적용되는 경우가 많지 않다.[23-26] 다만, 현재 제한점들을 극복하기 위한 여러가지 방식의 siRNA 전달체에 대한 많은 연구가 진행되고 있기 때문에, 안정적 전달체의 확보가 된 후에는 지금까지 밝혀진 많은 siRNA 치료 후보군들을 빠른 임상으로 진입하게 해줄 가능성이 있다. 따라서 육종에 대한 후보 물질 스크리닝의 결과는 후속 연구 개발 및 안정적 전달체가 이용 가능 할 때 빠른 임상 적용 가능성을 높일 수 있을 것으로 예상할 수 있어, 본 연구가 비록 예비 연구의 성격이 있으나 그 의의가 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 제한점은, 첫째로 국내에서 상업적으로 구매 가능한 육종 세포주 중 집락 형성이 가능하였던 육종 세포주 5개를 대상으로 하였으므로 전체 육종의 방사선 민감도의 결과를 대표하지 못하는 측면이 있다. 또한 세포주의 실험으로 실제 임상의 결과를 예측하는 것의 제한점도 있다. 육종이 수십 가지의 조직학적 아형이 있는 것과 모든 육종 세포주가 갖춰져 있지 않은 점을 고려하면, 현실적인 수준에서 피할 수 없는 제한점이 되겠다. 두번째로, 본 연구에서 후보물질의 스크리닝 과정에서 육종 세포주가 아닌 폐암 세포주 (A549) 를 사용하였다. 상업적으로 구매가능한 siRNA library를 이용하여 후보 물질을 발굴하는 것은 여러 방사선 민감제 연구에서 사용하는 방법론 중 하나이며 특히 kinase library를 사용하는 것은 추후 druggable target을 찾는데 더 유

리하기 때문이다[13,22]. 육종에서 방사선 민감제의 타겟을 발굴하는 연구로서 후보물질 발굴부터 육종 세포주로 하면 더 의미가 있을 수 있겠으나, 육종도 그 안에 수많은 아형이 있고 굉장히 이질적이기 때문에 한가지의 육종에서 발현이 증가한 것이 다른 육종에도 꼭 발현이 있을 것으로 기대하기 어려운 점이 있다. 더욱이, 대상 육종 세포주들의 성장은 carcinoma 세포주에 비하여 성장이 매우 느려, library 안의 수백개의 후보물질을 빠른 시간에 스크리닝 하기에는 부적절한 점도 고려되었다. 위의 사항과 세포의 공통 기전에 작용하는 물질을 찾는 연구의 목적을 고려하면, 세포주 성장이 빠르고 후보물질 발굴에 가장 많이 사용되는 A549 세포주를 사용한 것은 제한점이 될 수 있으나, 현실적인 방법일 것으로 생각된다.

본 연구에서, 상피성 암종과 다른 NUP family의 방사선 민감도 감작 효과를 확인하였는데, 이는 후속 연구에서 다양한 육종 세포주, 환자 유래 육종 세포주, stable cell line을 이용한 동물 육종 모델 등에서 검증하는 것이 필요할 것이다. 또한 본 연구에서는 세포 자멸의 증가 및 DNA 이중나선 손상 회복 기전을 저해하는 결과를 확인하였는데, 방사선 민감도가 증가하지 않았던 나머지 세포주들과의 차이를 하위 신호전달 체계 등을 분석하여 비교해볼 필요가 있을 것으로 보인다.

5. 결론

본 연구에서 NUP62의 발현 억제는 방사선 저항성 육종에서 BCL-2발현을 억제하여 세포 자멸사를 증가시키고, 세포 증식은 억제하며, DNA 2중 나선 손상 기전에 영향을 주어 방사선 민감제 타겟으로서 잠재적 가능성을 확인하는 예비 결과를 in-vitro에서 얻었다. 본 연구의 발견을 바탕으로 NUP62를 기반으로 하는 후속 실험실 및 임상 연구의 기초 근거가 될 수 있을 것으로 기대되며, 이는 장기적으로 효과적인 siRNA 전달체의 개발이 진행된다면 수술적 절제가 불가능한 육종 환자의 치료 성적 향상에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Fletcher CDM, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone.* 4th ed. Lyon: IARC Press; 2013.
2. Kang S, Kim HS, Kim S, Kim W, Han I. Post-metastasis survival in extremity soft tissue sarcoma: a recursive partitioning analysis of prognostic factors. *European journal of cancer.* 2014;50(9):1649-1656.
3. Hoang NT, Acevedo LA, Mann MJ, Tolani B. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1089-1114.
4. Kim W, Han I, Lee JS, Cho HS, Park JW, Kim HS. Postmetastasis survival in high-grade extremity osteosarcoma: A retrospective analysis of prognostic factors in 126 patients. *Journal of surgical oncology.* 2018.
5. de Silva CM, Reid R. Gastrointestinal stromal tumors (GIST): C-kit mutations, CD117 expression, differential diagnosis and targeted cancer therapy with Imatinib. *Pathology oncology research : POR.* 2003;9(1):13-19.
6. Pisters PW, Ballo MT, Patel SR. Preoperative chemoradiation treatment strategies for localized sarcoma. *Annals of surgical oncology.* 2002;9(6):535-542.
7. Murphy JD, Lucas DR, Somnay YR, Hamstra DA, Ray ME. Gemcitabine-mediated radiosensitization of human soft tissue sarcoma.

Translational oncology. 2008;1(1):50-56.

8. Murphy JD, Spalding AC, Somnay YR, Markwart S, Ray ME, Hamstra DA. Inhibition of mTOR radiosensitizes soft tissue sarcoma and tumor vasculature. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(2):589-596.

9. Eckert F, Matuschek C, Mueller AC, et al. Definitive radiotherapy and single-agent radiosensitizing ifosfamide in patients with localized, irresectable soft tissue sarcoma: a retrospective analysis. *Radiation oncology.* 2010;5:55.

10. Song EJ, Ashcraft KA, Lowery CD, et al. Investigating a chimeric anti-mouse PDGFRalpha antibody as a radiosensitizer in primary mouse sarcomas. *EBioMedicine.* 2019;40:224-230.

11. Duheron V, Nilles N, Pecenko S, Martinelli V, Fahrenkrog B. Localisation of Nup153 and SENP1 to nuclear pore complexes is required for 53BP1-mediated DNA double-strand break repair. *J Cell Sci.* 2017;130(14):2306-2316.

12. Mackay DR, Howa AC, Werner TL, Ullman KS. Nup153 and Nup50 promote recruitment of 53BP1 to DNA repair foci by antagonizing BRCA1-dependent events. *J Cell Sci.* 2017;130(19):3347-3359.

13. Rodriguez-Berriguete G, Granata G, Puliyadi R, et al. Nucleoporin 54 contributes to homologous recombination repair and post-replicative DNA integrity. *Nucleic acids research.* 2018;46(15):7731-7746.

14. Hashizume C, Moyori A, Kobayashi A, Yamakoshi N, Endo A, Wong

RW. Nucleoporin Nup62 maintains centrosome homeostasis. *Cell cycle.* 2013;12(24):3804-3816.

15. Borlido J, D'Angelo MA. Nup62: a novel regulator of centrosome integrity and function. *Cell cycle.* 2014;13(1):14.

16. Wu Z, Jin Z, Zhang X, et al. Nup62, associated with spindle microtubule rather than spindle matrix, is involved in chromosome alignment and spindle assembly during mitosis. *Cell Biol Int.* 2016;40(9):968-975.

17. Kehr S, Haydn T, Bierbrauer A, Irmer B, Vogler M, Fulda S. Targeting BCL-2 proteins in pediatric cancer: Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 leads to rapid induction of intrinsic apoptosis. *Cancer letters.* 2020;482:19-32.

18. Lee EF, Harris TJ, Tran S, et al. BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival. *Cell Death Dis.* 2019;10(5):342.

19. Rothkamm K, Horn S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita.* 2009;45(3):265-271.

20. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia.* 2010;24(4):679-686.

21. Wang H, Mu X, He H, Zhang XD. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol Sci.* 2018;39(1):24-48.

22. Kim BH, Kim YJ, Kim MH, et al. Identification of FES as a Novel

Radiosensitizing Target in Human Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2020;26(1):265-273.

23. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JL. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J.* 2010;12(4):492-503.

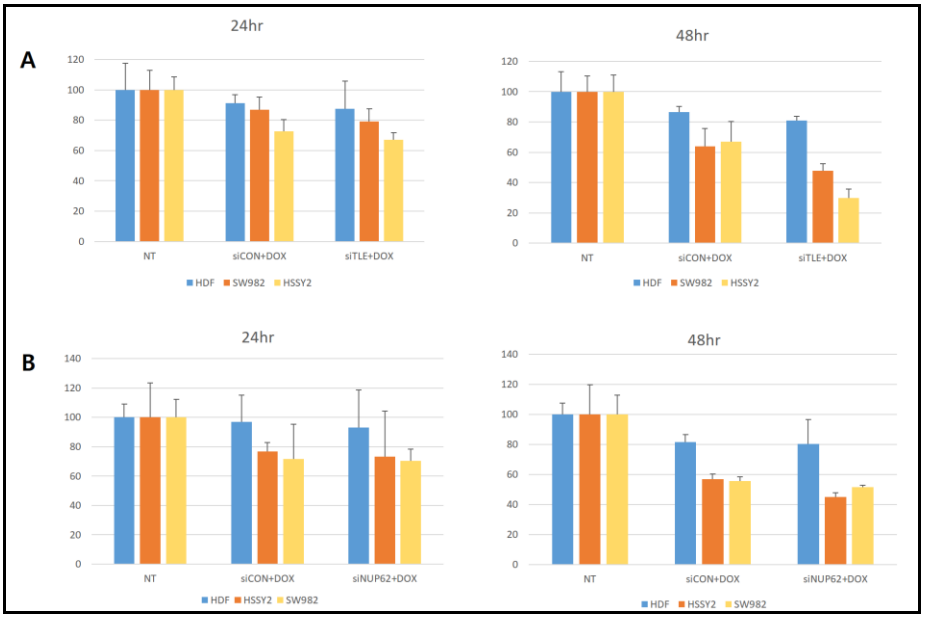
24. Karunaratne DN, Jafari M, Ranatunga RJ, Siriwardhana A. Natural Carriers for siRNA Delivery. *Curr Pharm Des.* 2015;21(31):4529-4540.

25. Liu H, Chang H, Lv J, et al. Screening of efficient siRNA carriers in a library of surface-engineered dendrimers. *Sci Rep.* 2016;6:25069.

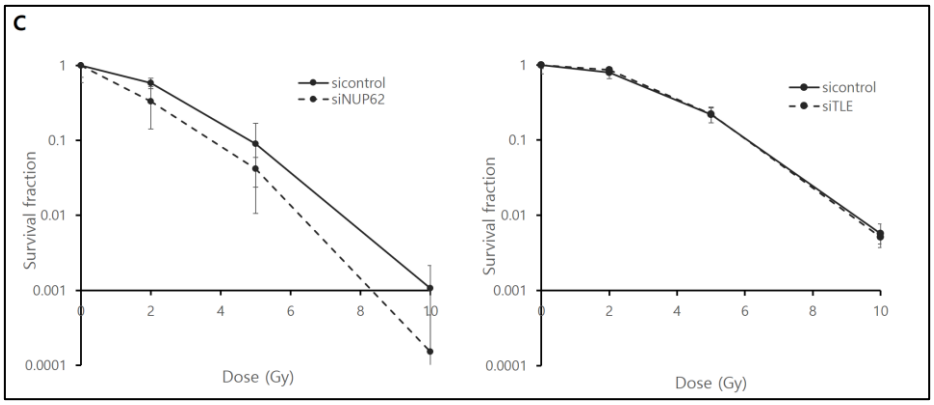
26. Choi CKK, Zhang L, Choi CHJ. Efficient siRNA delivery with non-cationic carriers. *Nat Biomed Eng.* 2018;2(5):275-276.

참고 그림

Supplementary figure 1. 활액막 육종 세포주 (SW982, HSSY2), 섬유아 세포주 (HDF)에서 시행한 CCK-8 assay. A, 활액막 육종에서 과발현 되는 TLE-1에 대한 siRNA를 이용하여 발현 억제 시킨 후 Doxorubicin 처리하고 CCK-8 assay시행하였을 때 control에 비하여 세포사가 증가함을 확인. B, NUP62를 발현 억제 시킨후 Doxorubicin 처리하였을 때 대조군에 비하여 항암 민감도 증가 효과가 크지 않음.



Supplementary figure 1C. SW982에서 NUP62와 TLE1에 대한 siRNA를 이용하여 발현 억제 후, 방사선 조사하고 colony formation assay 결과. NUP62의 경우 대조군에 비하여 세포 증식이 떨어짐을 확인할 수 있으나, TLE1의 경우 대조군에 비하여 방사선 조사 후 세포 증식이 감소하지 않음을 보여줌.



Abstract

An *in vitro* study on NUP62 as a potential target for radiosensitization in sarcoma

KIM Wanlim

Orthopedics

The Graduate School

Seoul National University

Background: Patients with unresectable sarcoma are often refractory to radiotherapy, leading to a poor prognosis. Outcomes of those patients can be improved if effective radiosensitizers are available. NUP62, a constituent of the nuclear pore complex, is known to have radiosensitizing effects in carcinoma cells; however, its effect in sarcoma has never been tested. In this *in vitro* study, we aimed to investigate the role of NUP62 as a potential molecular target for radiosensitization in human sarcoma cells.

Materials and methods: To test cell viability, we used a colony formation assay; NUP62 was silenced and exposed to ionizing radiation (IR) in 5 sarcoma cell lines and 1 fibroblast cell line. Apoptotic cell death and DNA

double-strand breaks were then evaluated with fluorescence-activated cell sorting analyses, western blots, and gamma-H2AX assays.

Results: We identified the expression and silencing of NUP62 in 5 sarcoma cell lines and 1 fibroblast cell line. NUP62 depletion alone without IR did not affect cell viability and proliferation. We identified an increased rate of cell death by apoptosis, and decreased cell proliferation after NUP62 depletion following IR in synovial sarcoma and fibrosarcoma cell lines. Increased DNA damage was also observed in synovial sarcoma and fibrosarcoma cell lines after NUP62 depletion and IR. However, we noted that NUP62 depletion did not radiosensitize Ewing sarcoma, osteosarcoma, and normal human fibroblast cells.

Conclusions: We identified the feasibility of NUP62 as a potential target for radiosensitization in certain sarcoma cells, which have been considered radio-resistant tumors. Our preliminary results can be utilized as a basis for future screening and development of radiosensitizers in sarcoma.

Keywords: sarcoma; radiation; radiosensitizer; NUP62

Student Number: 2015-30576