

췌장암 세포에서
Farnesyltransferase Inhibitor의
암 전이 억제 효과

연세대학교 대학원
의 학 과
홍 성 필

췈장암 세포에서
Farnesyltransferase Inhibitor의
암 전이 억제 효과

지도교수 송 시 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 성 필

홍성필의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

항상 저를 보살펴 주시는 하나님께 감사와 영광을 드립니다. 힘들어 좌절할 때마다 항상 따뜻한 격려와 조언으로 이끌어 주신 송시영 교수님께 감사 드립니다. 이 논문이 있기까지 따끔한 충고를 아끼지 않으신 최강열 교수님과 성진실 교수님께 감사드립니다. 처음 실험실로 이끌어 주신 박승우 교수님께도 감사의 마음을 드립니다. 바쁜 와중에도 실험을 지도해준 이지은 선생님과 항상 응원해준 강진구 선생님, 오태윤 선생님, 김선아 선생님, 박경화 선생님, 신을 선생님께 감사 드립니다. 힘이 들었던 만큼 값진 논문입니다. 무엇보다도 바쁜 저를 이해해주고 사랑해주는 아내 이재은과 부모님께 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	10
1. 세포주 배양	10
2. 사용약제	11
3. MTT assay	12
4. 세포주에서 단백질 추출	13
5. <i>In-vitro</i> invasion assay	14
6. Western Blotting	15
III. 결과	17
1. FTIs에 의한 세포의 형태학적 변화	17
2. FTIs에 의한 성장억제 효과	17
3. FTIs에 의한 <i>in vitro</i> invasion 억제 효과	19
4. FTIs에 의한 RhoB와 Rac-1 단백질의 발현변화	22
5. FTIs에 의한 nm23-H1, CD44v6와 VEGF 단백질의 발현 변화	22
IV. 고찰	27
V. 결론	35
참고문헌	36
영문요약	41

그림 차례

그림 1. Farnesyl transferase inhibitors (FTIs), LB42908 및 LB42708 구조식	11
그림 2. FTIs 투여 48시간 후 세포의 형태학적 변화	18
그림 3. LB42908의 인체 췌장암 세포 성장억제 효과	20
그림 4. LB42708의 인체 췌장암 세포 성장억제 효과	21
그림 5. 인체 췌장암 세포에서 FTIs의 <i>in vitro</i> invasion 억제 효과 (I)	23
그림 6. 인체 췌장암 세포에서 FTIs의 <i>in vitro</i> invasion 억제 효과 (II)	24
그림 7. FTIs 처리 후 RhoB와 Rac-1의 Western Blotting	25
그림 8. FTIs 처리 후 nm23-H1, CD44v6, VEGF의 Western Blotting	26

국문요약

췌장암 세포에서 Farnesyltransferase Inhibitor의 암 전이 억제 효과

Ras 암유전자의 farnesylation을 억제하여 항암효과를 나타내는 farnesyltransferase inhibitors (FTIs)가 개발된 이래로 그 항암기전에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 90% 이상에서 K-ras 돌연변이가 관찰되는 췌장암에서 FTIs의 암 전이 억제 효과와 그 기전에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 LG chemicals에서 개발한 FTIs인 LB42908과 LB42708이 인체 췌장암 세포인 Panc-1, Hpac과 BxPC-3에 미치는 암 전이 억제 효과를 연구하였다. 세포 성장억제 효과를 MTT assay로 측정한 결과 각 세포에서 FTIs 농도에 비례하여 성장이 억제되었으며 LB42708에서 더 강력한 성장억제 효과가 나타났다. *In vitro* invasion assay 결과 K-ras 돌연변이가 있는 Panc-1과 H-pac에서 대조군과 비교하여 *in vitro* 암 침윤 억제 효과가 나타났으나 K-ras 돌연변이가 없는 BxPC-3에서는 침윤 억제 효과가 없었다.

FTIs 처리 시에 Panc-1, Hpac, BxPC-3에서 prenylated 및 unprenylated 분획 모두의 RhoB와 Rac-1의 발현이 증가함을 보였으며, nm23-H1의 발현은 증가하였으나 CD44v6와 VEGF 발현에는 차이가 없었다. 결론적으로 *K-ras* 돌연변이가 있는 췌장암 세포에서 FTIs에 의해 현저한 성장 억제 효과와 암 침윤 억제 효과를 보였으며 이는 RhoB, Rac-1과 nm23-H1 발현 증가와 관계될 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : Ras, Farnesyltransferase inhibitor, 암 전이, RhoB, Rac-1, nm23-H1

췌장암 세포에서 Farnesyltransferase Inhibitor의 암 전이 억제 효과

<지도교수 송시영>

연세대학교 대학원 의학과

홍성필

I. 서론

종양에서 *ras* 유전자의 돌연변이가 처음 발견된 이래로¹, Ras 단백질의 기능에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 인체 암에서 가장 흔히 돌연변이가 관찰되는 암유전자의 하나로 알려져 있다. 인체 암의 약 30%에서 돌연변이 된 세가지 *ras* 유전자 (H-, N-, K-*ras*)가 발견되었으며 이는 발암과정에서 변이 된 Ras 단백질의 역할이 중요함을 대변한다².

H-*ras*가 처음 발견되었으며 이에 대해 많은 연구가 있었으나 인체 종양에서는 K-*ras*나 N-*ras*의 돌연변이 발견 빈도가 높게 나타난다.

K-*ras* 변이는 췌장암(90%), 폐암(40%), 대장암(50%)에서 높은 빈도로 관찰되며, N-*ras* 변이는 혈액암에서 흔히 발견된다^{3,4}. H-*ras*, N-*ras*와 K-*ras* (4A와 4B isoform) 암유전자에서 생성된 단백질은 90% 정도의 아미노산 서열의 일치율을 보이며 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 동등하게 강력한 종양성 형질전환을 야기하는 등 생화학적, 생물학적 특성이 동일하다고 생각되어 왔다⁵. 그러나 최근 이들 *ras* 암유전자 간의 차이점이 새롭게 조명되고 있으나 아직 확실하지는 않아 H-*ras*에서 발견되었던 기초적 연구들이 K-*ras*나 N-*ras*에 동등하게 적용되기는 어렵다.

Ras 단백질은 세포 내막에 삽입된 GTP 부착형 단백질로서, GDP 부착형으로 존재하다가 세포막에 존재하는 여러 가지 세포 외 리간드 (ligand)의 자극으로 Ras guanine nucleotide exchange factor (Ras GEF)에 의해 GTP 부착형으로 활성화된다⁶. GTP 부착형 Ras 단백질은 GTPase에 의해 탈인산화 과정이 일어나 GDP 부착형으로 전환됨으로써 비활성화 된다^{1,5}. Ras 유전자의 돌연변이는 제 1 엑손 (exon)의 12번째, 13번째, 또는 61번째 코돈 (codon)에서 흔히 발생하는데, 변이

된 Ras 단백질은 GTPase에 저항성을 가지게 되어 외부의 자극 없이도 지속적으로 GTP와 부착된 활성화된 상태를 유지함으로써 세포의 지속적인 성장을 유도하여 종양을 유발하게 된다⁷.

Ras 단백질이 생물학적 기능을 나타내기 위해서는 세포 내막에 삽입되는 lipid modification 과정이 필요하다. Ras 단백질은 세포질 내 비활성화 상태로 합성되어 수분 내에 farnesyltransferase (FTase)에 의해 Ras 단백질 C-terminal에 위치한 CAAX motif의 cysteine residue에 farnesyl pyrophosphate (FPP)로부터 farnesyl isoprenoid가 추가되고, 단백질분해효소에 의해 AAX 아미노산들이 제거된 후 farnesylated cysteine residue에 carboxymethylation 되어 세포 내막에 삽입이 가능하게 됨으로써 활성화된다⁷.

이와 같은 Ras 단백질의 활성화 과정을 거쳐 세포의 성장과 분화, 세포사멸 등에 관계되는 다양한 단백질들이 순차적으로 활성화된다. Serine/threonine kinase Raf, Ral-GDS, phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)가 Ras downstream의 대표적인 경로이다⁸⁻¹⁰. Raf 에 의

해 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade가 활성화 되며 세포 내 전사인자를 포함한 여러 가지 물질을 인산화 시킨다⁸. Ral-GDS는 phospholipase D를 조절하여 2차 신호전달 물질 생성에 중요한 역할을 한다^{8,11}. Ras나 receptor tyrosine kinase의 직접적인 작용에 의해 PI3K가 활성화되면 phosphatidyl inositol을 인산화시켜 2차 신호전달 물질을 생성해 Rac, protein kinase C (PKC), Akt/PKB를 활성화 시킨다¹⁰. Rho family도 Ras downstream의 한 축을 형성하고 있는데 c-Jun-N-terminal kinase (JNK)와 NF- κ B의 활성화뿐만 아니라 cytoskeleton의 형성도 조절한다¹².

최근에는 변이 된 Ras가 초기 세포 성장의 지속적 자극을 통한 세포의 형질전환뿐만 아니라 종양의 마지막 단계인 암 전이에도 관계한다는 연구에도 많은 관심이 기울여지고 있다. 전이는 종양의 가장 흔하고 위험한 합병증으로 암 진단 시 50% 이상에서 이미 전이된 종양이 존재한다. 암 전이는 크게 원발암 성장, 암세포 침습, 혈관 내 침범, 혈관이나 림프관을 통한 이동, 혈관 외 유출, 전이 후 환경에서의 새로운

암 형성 등의 다단계 과정으로 이루어진다¹³. Ras 암유전자에 의해 형질 전환된 세포들이 인공의 기저층을 침습하고 쥐의 정맥 내로 투여되었을 때 폐에 집락을 형성하는 등 *ras* 암유전자와 전이에 대한 연구가 진행되어 왔다^{14,15}. 전이성이 없는 백서의 유방과 전립선 암세포를 *ras* 암유전자로 형질전환 시켰을 때 항상 전이성 획득과는 상관관계를 이루지는 않았지만 *ras* 암유전자에 의해 유발된 염색체의 이상소견과는 상관관계를 보였다는 보고는¹⁶, *ras* 암유전자에 의해 유전자 불안정성이 유발됨으로써 간접적으로 전이성을 갖게 된다는 것을 의미한다. 또한 대장암¹⁷, 자궁경부암¹⁸, 유방암과¹⁹ 위암에서²⁰ Ras 단백질의 활성화가 전이와 상관관계를 보인다는 보고들은 *ras* 암유전자가 종양의 발생은 물론 암의 진행에도 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

따라서 farnesylation을 억제함으로써 돌연변이 된 Ras 의 활성화를 억제하여 항암 효과를 가지는 farnesyltransferase inhibitors (FTIs)에 대한 관심이 증가되어 왔다. FTIs의 초기 연구는 Rat-1이나 NIH3T3 세포에서 이루어졌으며 geranylgeranylation에는 영향이 거의 없으면

서 선택적인 Ras farnesylation 억제 효과가 증명되었다²¹. FTI는 H-*ras* transgenic mouse에서 종양 크기를 현저하게 감소시키나, 정상세포에는 거의 영향을 미치지 않는다고 보고되는 등 종양세포에 선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있다^{22,23}. Ras 형질 전환된 Rat-1 세포를 이용한 nude mouse xenograft model에서 세가지 종류의 돌연 변이된 *ras* 암유전자에 대한 FTI 효과가 달라 K-*ras* 종양보다 H-*ras* 종양에서 더 뚜렷한 억제 효과를 보였다²⁴. 이와 같은 K-*ras*의 FTI에 대한 저항성은 정상적으로 K-Ras4B는 FTase에 의해 활성화 되지만, FTI 투여 시에는 geranylgeranyltransferase I (GGTase I)에 의해서도 활성화 될 수 있기 때문으로 설명되고 있다²⁵. 초기 *ras* 암유전자에 대한 대부분의 연구가 주로 H-*ras*에서 행해져 췌장암에서와 같이 인체 암에서 높은 빈도로 발견되는 K-*ras*에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또한 FTI에 의한 암 전이 억제 효과와 그 기전에 대한 연구도 부족하다.

본 연구에서는 FTI로써 새롭게 개발된 LB42908, LB42708를 이용

하여 FTI 에 의한 인체 췌장암 세포들의 암 전이 억제 효과 및 그 기
전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 배양

인체 췌장 상피암에서 유래한 Panc-1, Hpac 및 BxPC-3 세포주를 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 에서 구입하여 사용하였다. Panc-1과 Hpac은 변이된 *K-ras* 유전자를 가지고 있으며 BxPC-3는 야생형 *ras* 유전자를 가지고 있다. Panc-1 은 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 에서 배양되었으며, Hpac은 DMEM/F12 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 에서, BxPC-3는 RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지에서 배양되었다. 모든 세포는 100 units/ml penicillin, 100 unis/ml streptomycin, 2.5 units/ml ampotericin B와 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA) 를 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 항온 · 항습 상태에서 배양되었다.

2. 사용 약제

FTIs로는 LB42908 (분자량=606)와 LB42708 (분자량=590) (LG chemicals, Taejon, Korea)를 사용하였다 (그림 1). LB42908과 LB42708을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 50 mM의 농도로 용해하여 냉동 보관하였다가 실험 시 다양한 농도로 희석하여 이용하였으며, 대조군에서는 희석에 사용된 농도의 DMSO를 사용하였다.

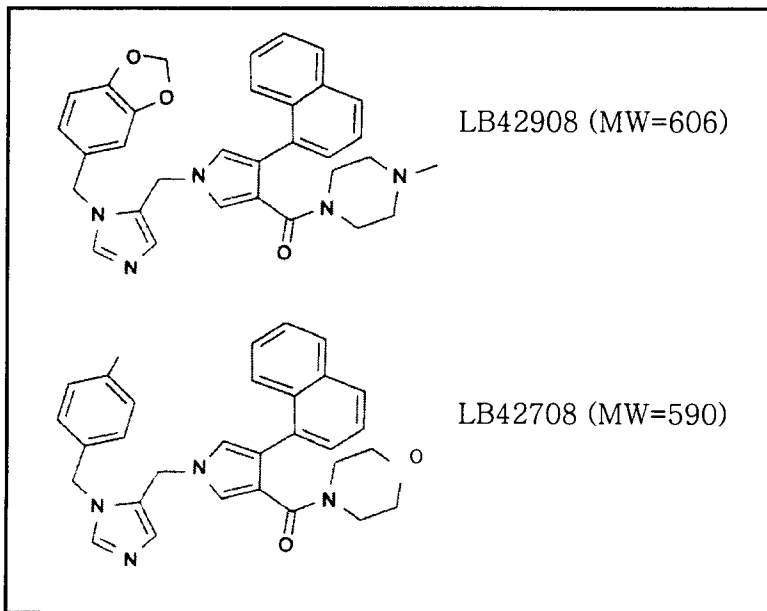


그림 1. Farnesyltransferase inhibitors (FTIs), LB42908 및 LB42708의 구조식

3. MTT assay

FTIs에 의한 세포의 성장억제 효과를 측정하기 위하여 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 시행하였다. 96 microculture well plate에 2×10^3 개의 세포를 넣고 12시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 다양한 농도의 FTIs를 첨가하여 배양하였다. FTIs 첨가 후 24시간, 48시간 및 72시간이 경과한 후 각각 MTT assay를 시행하여 FTIs의 세포 성장억제 효과를 측정하였다. MTT assay를 위해서는 phosphate buffer saline (PBS)로 2차례 플레이트를 세척한 후, 멸균된 PBS에 5 mg/ml로 용해된 MTT stock 용액 50 μ l씩을 각각의 well 에 첨가한 후 37 °C에서 4시간 배양하고 DMSO 100 μ l를 넣었다. Titer-Tech 96-well multiscanner (Beckton and Dickenson, Heidelberg, Germany)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

4. 세포주에서 단백질 추출

세포주를 플라스크에 배양하여 50%정도 성장하면 각각에 DMSO, LB42908, LB42708을 10 μ M씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. 배양 48시간 후 0.25% trypsin-EDTA (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 로 처리하고 15 ml Falcon tube에 모아 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. PBS로 2차례 세척 후 1.5 ml eppendorf tube에서 원심 분리하였다. 하층부에 1M β -glycerophosphate (pH 7.2), 50 mM sodium vanadate, 0.5 M $MgCl_2$, 0.2 M ethylene glycol-bis(-amino ethylether)-N,N,N',N;-tetraacetic acid (EGTA), 1 M DTT, 0.5 % triton \times 100, 100 mM phenylmethyyl sulfonyl fluoride (PMSF)와 protease inhibitor (cocktail solution with 5 mg/ml aprotinine, leupeptine, pepstatin, antipain)가 포함된 lysis 완충액에 녹여 얼음에서 1 시간 동안 반응 시킨 후 13000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 1.5 ml eppendorf tube에 담아 $-70^{\circ}C$ 에 보관하였다.

5. *In vitro* invasion assay

FTIs에 의한 *in vitro* 침윤 억제 효과를 평가하기 위하여 8 μm 의 구멍을 가지는 transwell Boyden chamber (Corning Costar Co., Cambridge, MA)를 사용하였다. Transwell chamber의 상층부에 matrigel (Collaborative Biomedical Products, MA, USA)을 70 μl (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 씩 넣어 상온에서 건조시키고 배양액 500 μl 를 상층부에 넣어 2시간 동안 재수화 시켰다. 24시간 배양한 NIH3T3 세포주의 배양액을 1500 rpm에서 5분간 원심분리 후 600 μl 씩 transwell chamber의 하층부에 넣었다. 세포를 플레이트에 배양한 후 50% 성장하였을 때 DMSO, LB42908, LB42708을 10 μM 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 항온·항습 상태에서 배양하고 0.25% trypsin-EDTA 처리하여 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 각각에서 10⁵개의 세포를 transwell chamber의 상층부에 넣고 DMSO, LB42908, LB42708을 10 μM 씩 넣었다 (총 200 μl). Transwell chamber를 37°C, 5% CO₂의 항온·항습 상태에서 24시간 배양한 후 100% methanol에 10분간 고정

하고 crystal violet으로 10분간 염색하였다. 염색액을 물로 씻어낸 후 상층부 막을 닦아내고 현미경 하에서 transwell membrane을 통과한 세포 수를 세어 비교하였다. 실험은 각각의 세포 당 2회씩 시행하였다.

6. Western Blotting

FTIs에 의한 RhoB, Rac-1, VEGF, CD44v6, 그리고 nm23-H1 단백질의 발현변화를 알아보기 위하여 Western Blotting을 시행하였다. 단백질 정량은 Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 시행하였으며 표준으로 bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St. Louis, MO)을 사용하였다. 단백질 50 μ g을 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 주입 후 전기영동 하였고, Immobilon-P PVDF membrane (Millipore Corporation, Bradford, MA, USA)에 전사하였다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 5% non fat dry milk로 blocking하였다. 사용한 일차 항체는 다음과 같다: RhoB (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), Rac-1

(rabbit polyclonal, Santa Cruz Biothechnology, California, USA),
CD44v6 (mouse monoclonal, R&D system, Minneapolice, USA),
VEGF (mouse monoclonal, Pharmingen, San Diego, USA). 일차 항체는 0.05 % tween-20가 포함된 Tris-buffered saline (TBST)로 1:1000으로 희석하여 1-3시간 동안 상온에서 반응시켰다. 2차 항체는 TBST로 1:5000으로 희석하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence solution (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 반응시켜 ECL hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 감광시켜 검출하였다.

III. 결과

1. FTIs에 의한 세포의 형태학적 변화

DMSO 및 10 μM 의 LB42908, LB42708를 각각 처리한 후 48시간 이 경과하였을 때 각 세포의 형태학적 변화는 그림 2와 같다. Panc-1 와 Hpac 에서 DMSO를 처리한 경우와 비교하여 FTIs를 처리한 세포 에서 세포 증식의 감소와 아울러 세포질이 감소하고 납작하고 각진 형태로 변화하였으며 집락 형성이 억제되었다. 세포의 형태학적 변화는 LB42708에서 더 뚜렷하였다. 그러나 BxPC-3 세포에서는 DMSO 와 LB42908, LB42708을 처리하였을 때 세포의 형태학적 변화는 적었다.

2. FTIs에 의한 성장억제 효과

LB42908과 LB42708의 농도에 비례하여 세포의 성장이 억제되었다. Panc-1, Hpac과 BxPC-3에 서 LB42908을 처리하였을 때 IC_{25} 는 각각 28.0 μM , 28.9 μM , 23.3 μM 이었다. Panc-1, Hpac과 BxPC-3에서

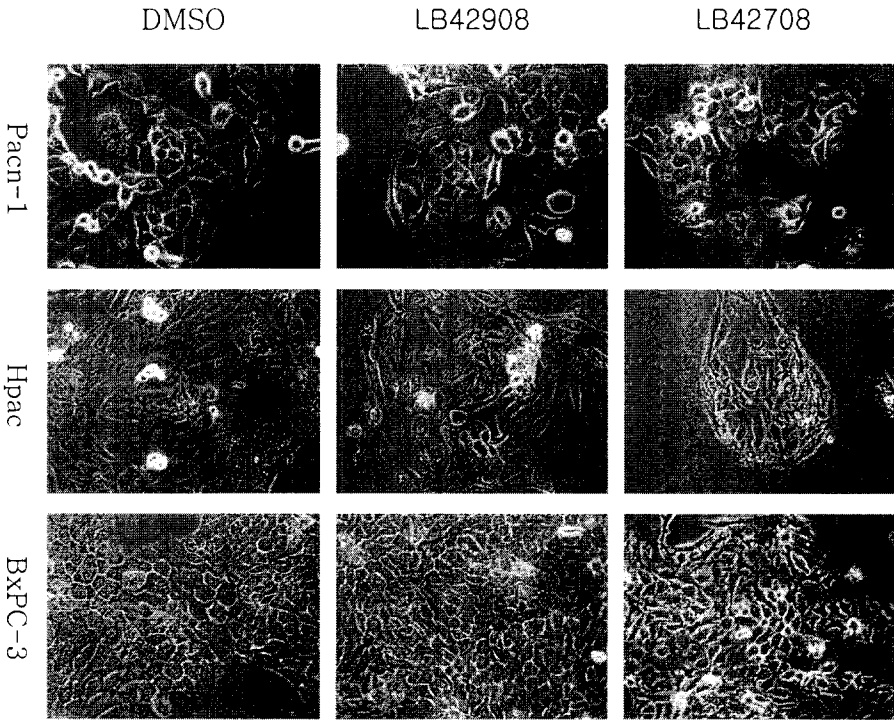


그림 2. FTI 투여 48시간 후 세포의 형태학적 변화. Panc-1, Hpac과 BxPC-3에 LB42908과 LB42708 10 μ M를 48시간 동안 처리하고 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. Panc-1와 Hpac에서 DMSO를 처리한 경우와 비교하여 FTIs를 처리한 세포에서 세포 증식의 감소와 아울러 세포질이 감소하고 납작하고 각진 형태로 변화하였으며 집락 형성이 억제되었다. 세포의 형태학적 변화는 LB42708에서 더 뚜렷하였다. 그러나 BxPC-3에서는 세포의 형태학적 변화는 적었다.

LB42708을 처리하였을 때 IC₂₅는 각각 5.67 μ M, 1.83 μ M, 7.43 μ M 이었으며 IC₅₀은 각각 17.85 μ M, 13.37 μ M, 20.32 μ M 이었다. LB42098에 비하여 LB42708에서 더 강력한 성장억제 효과를 보였다. FTIs에 의한 성장억제 효과가 Panc-1과 Hpac에서 더 뚜렷하였으나 BxPC-3에서도 성장억제 효과를 나타냈다 (그림 2, 3).

3. FTIs에 의한 *in vitro* invasion 억제 효과

Panc-1에서 DMSO, LB42908과 LB42708에 따라 침습한 세포의 퍼센트는 각각 $100 \pm 15.7\%$, $66.8 \pm 8.7\%$, $47 \pm 2.5\%$ 이었다. Hpac에서 DMSO, LB42908과 LB42708에 따라 침습한 세포의 퍼센트는 각각 $100 \pm 19.3\%$, $83.5 \pm 6\%$, $46.1 \pm 15.9\%$ 이었다. BxPC-3에서 DMSO, LB42908과 LB42708에 따라 침습한 세포의 퍼센트는 각각 $100 \% \pm 15.7 \%$, $135 \% \pm 8.7 \%$, $105 \% \pm 2.5 \%$ 이었다. Panc-1과 Hpac에서는 대조군과 비교하여 FTIs에 의해 *in vitro* 침윤이 억제되었으며 LB42708 에서 더 강력한 억제 효과를 보였다. 그러나 BxPC-3에서는

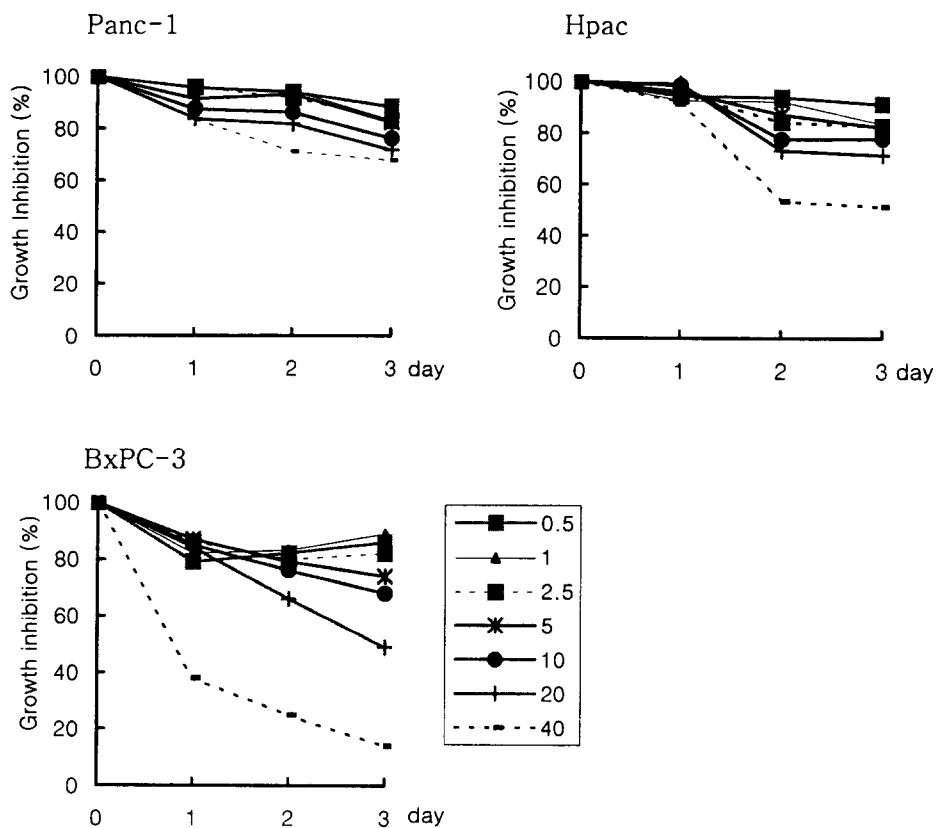


그림 3. LB42908의 인체 췌장암 세포 성장억제 효과. MTT assay로 측정하였으며 각 세포에서 FTI 농도에 비례하여 세포의 성장이 억제되었다. LB42908의 IC₂₅는 Panc-1, Hpac과 BxPC-3에서 각각 28.0 μM, 28.9 μM, 28.3 μM 이었다.

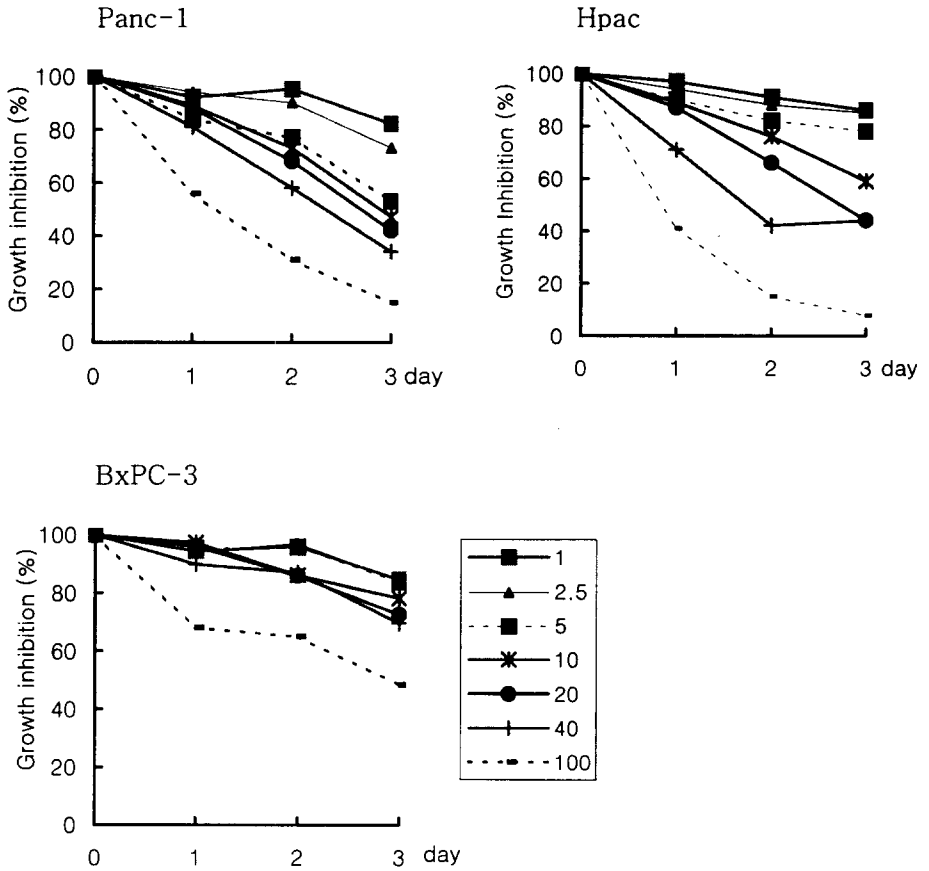


그림 4. LB42708의 인체 췌장암 세포 성장억제 효과. MTT assay로 측정하였으며 각 세포에서 FTI 농도에 비례하여 세포의 성장이 억제되었다. LB42708의 IC₂₅는 각각 5.67 μM, 1.83 μM, 43 μM 이었으며 IC₅₀은 각각 17.85 μM, 13.37 μM, 20.32 μM 이었다.

FTIs에 의한 *in vitro* 침윤 억제 효과가 없었다 (그림 5, 6).

4. FTIs에 의한 RhoB와 Rac-1 단백질의 발현변화

Cytoskeleton 형성에 관여하는 RhoB 와 Rac-1가 ras 암유전자의 암 전이에 미치는 영향을 평가하기 위하여 FTIs 처리 48시간 후 RhoB와 Rac-1의 Western Blotting을 시행하였다. Panc-1, Hpac과 BxPC-3에서 FTIs 처리 후 RhoB와 Rac-1의 발현이 증가하였으며, prenylated 및 unprenylated 분획 모두의 RhoB 및 Rac-1의 발현이 증가하였다 (그림 7).

5. FTIs에 의한 nm23-H1, CD44v6와 VEGF의 발현변화

각 세포에서 FTIs 처리 48시간 후 nm23-H1, CD44v6와 VEGF의 발현변화를 보았다. Panc-1, H-pac과 BxPC-3에서 FTIs 처리 후 nm23-H1의 발현이 증가 됨을 보였으며 LB42708에서 더 뚜렷하였다. 그러나 CD44v6와 VEGF의 발현에는 차이가 없었다 (그림 8).

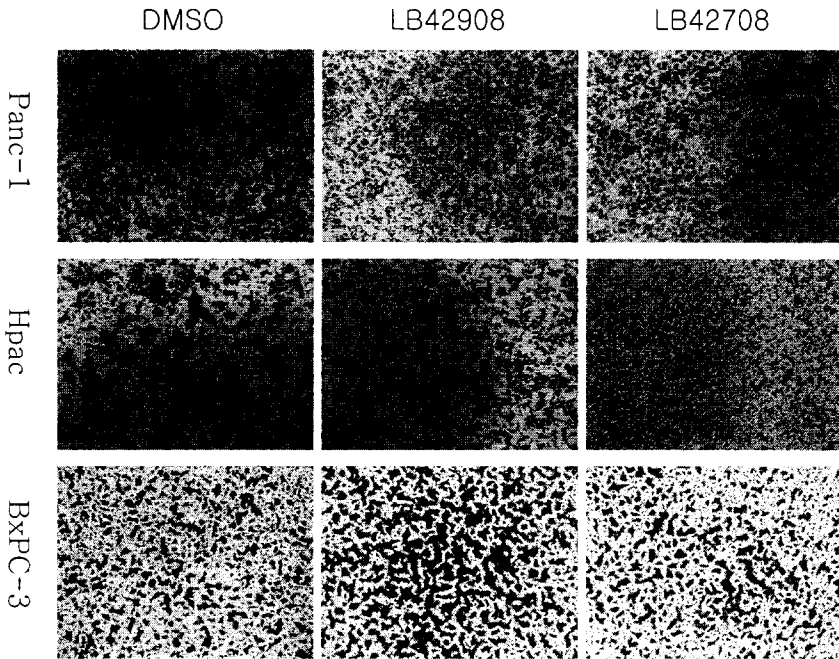


그림 5. 인체 췌장암 세포에서 FTI의 *in vitro* invasion 억제효과(I). Transwell Boyden chamber를 이용하여 *in vitro* invasion assay를 실험하였으며 각 세포에 LB42908과 LB42708 10 μ M 처리하여 48시간 후에 관찰하였다 (X40). Panc-1과 H-pac에서는 FTIs에 의해 *in vitro* 침윤이 현저히 억제되었으며 LB42708에서 더 강력한 억제 효과를 보였다. 그러나 BxPC-3에서는 FTIs에 의한 *in vitro* 침윤 억제 효과가 없었다.

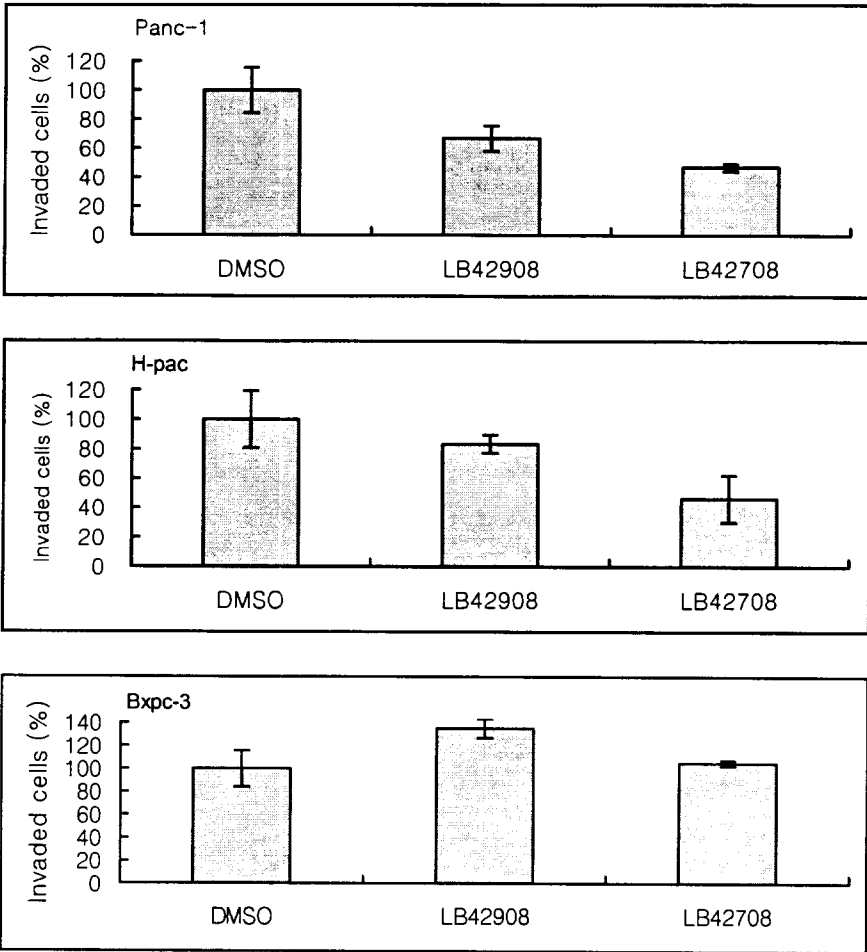


그림 6. 인체 췌장암 세포에서 FTI의 *in vitro* invasion 억제효과(II). DMSO, LB42908과 LB42708 10 μ M에 처리 후 48시간 뒤 침습한 세포의 퍼센트는 Panc-1에서 각각 100 \pm 15.7%, 66.8 \pm 8.7%, 47 \pm 2.5%, Hpac에서 각각 100 \pm 19.3%, 83.5 \pm 6%, 46.1 \pm 15.9% 이었고, Bxpc-3에서 각각 100 \pm 15.7%, 135 \pm 8.7%, 105 \pm 2.5% 이었다.

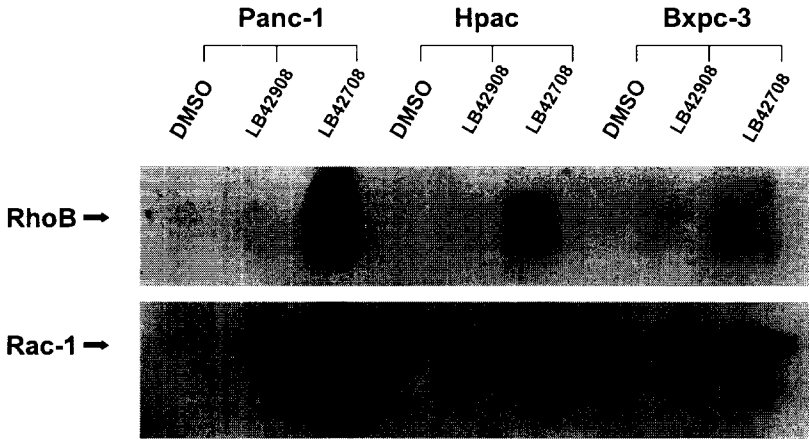


그림 7. FTI 처리 후 RhoB와 Rac-1의 Western Blotting. LB42908과 LB42708 10 μ M 처리 후 48시간 뒤에 Western Blotting을 시행하였으며 각 세포에서 prenylated 및 unprenylated 분획 모두의 RhoB 및 Rac-1의 발현이 증가하였다. 이는 FTIs에 의해 farnesylation이 억제됨에 따라 unprenylated 분획이 증가하고 일부에서는 geranylgeranylated 분획이 증가함에 기인한 것으로 생각된다.

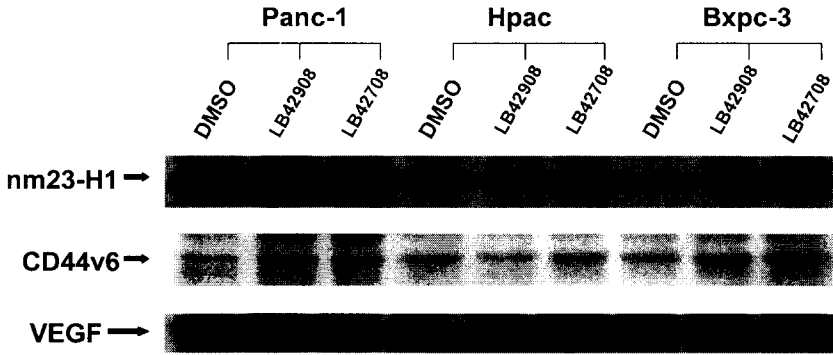


그림 8. FTI 처리 후 nm23-H1, CD44v6, VEGF의 Western Blotting. LB42908와 LB42708 10 μ M 처리 후 48시간 뒤에 Western Blotting을 시행하였으며 Panc-1, H-pac, BxPC-3에서 FTIs 처리 후 nm23-H1의 발현이 증가하였으나 CD44v6와 VEGF의 발현에는 차이가 없었다.

IV. 고찰

암 발생 및 전이에 관여하는 다양한 암유전자 및 억제암유전자에 대한 활발한 연구와 함께 이에 근거하여 새롭게 규명된 표적에 대한 새로운 항암약제의 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 인체 암에서 가장 흔히 돌연변이가 관찰되는 *ras* 암유전자와 이의 활성화 Ras 단백질이 중요한 표적으로 인식되고 있으며 Ras, Rho, lamin 등의 단백을 활성화시키는데 중요한 역할을 하는 효소로 알려진 farnesyltransferase 억제제에 대한 관심이 최근 들어 급증하고 있다. 초기 FTIs는 K-*ras* 4B 단백질 C-terminal의 CAAX sequence인 CVIM에 대한 peptidomimetic 화합물로 합성되어 farnesylation 및 geranylgeranylation의 isoprenylation 과정 중 geranylation에 관여하는 효소인 geranylgeranyltransferase I (GGTase I) 및 geranylgeranyltransferase II (GGTase II)에 비해 보다 선택적으로 farnesyltransferase를 억제하는 화합물로 개발되었다^{26,27}. 최근에는 non-peptide, non-thiol 함유 화합물 등 다양한 종류의 새로운 약제들이 합성되어 그 효과를 연구 중에 있으나 아

직 임상적으로 이용되기에는 항암효과에 대한 기전, 생체독성 등에 대한 연구가 부족하다.

본 연구에서는 LG chemicals에서 합성한 FTIs인 LB42908, LB42708을 사용하였다. LB42908과 LB42708은 nonpeptide, nonsulfhydryl 1-(1(3H-imidazole-5(4)-yl) methylpyrrole 유도체로서 *K-ras*와 *H-ras*로 형질 전환시킨 RIE-1 세포에 처리하였을 때 강력한 성장억제 효과와 Ras 형질전환 전 세포 형태로 전환시킴을 보고한바 있다²⁸. 본 연구에서 FTIs 처리 후 세포의 형태를 비교하여 보면 *ras* 암유전자의 돌연변이가 없는 BxPC-3는 FTIs 투여 전 형태를 유지하고 있는 반면, Panc-1과 Hpac은 FTIs 처리 시간이 진행될수록 점차 세포질이 적어지고 납작하고 각진 형태로 변화하였으며 집락 형성이 억제되었다. 이러한 형태학적 변화는 LB42908보다 LB42708에서 더 뚜렷하였다. Takai 등은 *ras* 형질전환된 세포에서 FTIs 처리 후 24-48시간 쯤 형질전환 시키기 전의 세포 형태로 전환됨을 보여주고 있으며, 이러한 형태학적 변화에는 cytoskeleton을 조절하는 Rho 단백질이

관여한다고 보고하였다¹².

본 연구에서 사용한 세가지 종류의 웨장암 세포주 모두에서 첨가한 LB42908과 LB42708 농도에 비례하여 세포 성장이 억제되었으며, BxPC-3 세포에 비해서 Panc-1과 Hpac 세포에서 세포 성장 억제 효과가 더 민감하였다. 이는 FTI가 *ras* 암유전자의 돌연변이가 동반된 Panc-1 및 Hpac 세포에서 *ras* 암유전자의 돌연변이가 동반되어 있지 않은 BxPC-3 세포에 비해 보다 효과적으로 성장을 억제할 수 있음을 보여주고 있다. 비록 Panc-1 및 Hpac 세포에 비해 민감도는 다소 낮으나 BxPC-3 세포에서도 성장 억제 효과가 있음은 FTI의 작용기전이 단순히 Ras 단백질에 대한 억제 작용만으로는 설명할 수 없음을 의미한다.

일반적으로 FTI는 활성화된 H-Ras 보다는 K-Ras 단백질에 대해 저항성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이는 H-Ras 단백질이 prenylation 되기 위해서는 farnesylation 만이 유일한 lipid modification 과정이라는 점과는 달리 K-Ras 단백질은 FTI의 존재 하에 GGTase I에 의해서

geranylgeranylation 과정으로 lipid modification 이 가능하기 때문으로 설명되고 있다²⁵. 김 등의 연구에서도 H-*ras*로 형질전환된 RIE-1 세포에서 LB42908 처리 시에 K-*ras*로 형질 전환한 세포보다 적은 농도에서 세포의 성장이 억제됨을 보이고 있다²⁸. 본 연구에서는 LB42908 및 LB42708 두 종류의 FTI 중에서 LB42708의 항암효과가 더 우수하였다 (그림 3, 4).

본 연구에서 암 전이의 여러 단계 중 침윤에 대한 FTIs의 효과를 관찰하기 위해서 *in vitro* invasion assay를 시행하였다. BxPC-3에서 침윤 억제 효과가 없었으나 Panc-1과 Hpac 세포에서는 뚜렷한 억제 효과가 관찰되었다. Panc-1 세포에서는 대조군에 비하여 LB42908과 LB4708를 처리하였을 때 각각 33.2% 및 53%의 침윤 억제 효과가 있었으며, Hpac에서는 각각 16.5% 및 53.9%의 침윤 억제 효과가 있었다 (그림 5,6). MTT assay 결과와 마찬가지로 LB42908보다 LB42708에서 더 강력한 침윤 억제 효과가 있었다. 비록 H-Ras와 비교하여 K-Ras가 FTIs에 대하여 저항성을 가진다고 알려 졌으나²⁵ 본 연구 결과

FTIs에 의해 활성화된 K-Ras를 가지는 췌장암 세포에서 뚜렷한 암세포 침윤 억제 효과가 있음은 췌장암 환자에서 *K-ras* 암유전자의 돌연변이가 빈발하며 진단 시 80-100%에서 전이가 동반된다는 점을 고려하면 FTIs가 췌장암의 치료에 매우 유용한 항암약물로 사용될 수 있을 가능성을 암시한다.

Rho GTPase는 세포 외 성장인자에 의해 cytoskeleton 형성을 조절하여 세포의 형태 유지와 세포 이동에 관여할 뿐만 아니라 membrane trafficking, 전사인자 조절, 세포성장과 진화 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{29,30}. Rho family에는 Rho, Rac, Cdc42가 속하며 Rho에 의해 actin stress fiber가 구성되며 Rac에 의해 lamellipodia가 형성된다³¹. Rho 단백질은 정상적으로 FTase에 의해 활성화되어 엔도솜 (endosome)에 위치하나 FTIs 처리 시에는 FTase가 억제되어 GGTase I에 의해 geranylgeranylated RhoB (RhoB-GG)가 과량 형성되고 세포 성장억제와 세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 본 연구에서 LB42908과 LB42708 투여 48시간 후 Western

blotting에서 Panc-1와 Hpac 세포에서 RhoB와 Rac-1의 발현이 증가하였는데 (그림 7), 비록 증가한 RhoB 및 Rac-1 단백질이 geranylgeranylated 단백임을 직접 확인하지는 못하였으나 FTIs에 의해 farnesylation이 억제됨으로 unprenylated RhoB 및 Rac-1이 증가하고 이차적으로 이들 두 단백질에 대한 geranylgeranylation 과정이 활성화되어 geranylgeranylated RhoB 및 Rac-1 단백질이 증가하였기 때문으로 생각된다. 따라서 Panc-1과 Hpac 뿐만 아니라 BxPC-3에서 FTIs에 의한 세포 성장억제 효과는 geranylgeranylated RhoB와 geranylgeranylated Rac-1 발현 증가와 상관관계가 있을 것으로 생각되며, *in vitro* invasion assay에서 Panc-1과 Hpac의 침습 억제 효과도 RhoB와 Rac-1의 geranylgeranylation 과정의 증가에 의한 cytoskeleton 형성 이상으로 세포 이동의 감소가 관여했을 것으로 생각된다.

세포의 전이에 adhesion molecule 등이 관여하는데, 특히 *ras* 암유전자와 관련되어 CD44의 발현이 증가되며 특히 췌장암 조직에서

CD44v6의 발현이 증가된다고 알려져 있으나 암 전이와 관련되어서는 명확한 역할이 규명 되어있지 않다^{34,35}. 혈관 형성 인자인 VEGF는 새로운 혈관 형성을 강력히 유도하여 암 세포의 성장과 전이에 영향을 미치는데 *ras* 암유전자에 의해 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다³⁶. 그러나 본 연구에서 FTIs 처리 48시간 후 Western Blotting에서 CD44v6와 VEGF의 발현에는 3가지 췌장암 세포 모두에서 대조군과 별다른 차이가 관찰되지 않았다 (그림 8).

Murine melanoma 세포에서 처음으로 nm23 유전자 (nm23-M1)가 암 전이 억제기능을 가진 유전자로 발견된 이래 인간에서 8종류의 nm23 유전자가 발견되었다³⁷. Nm23-H1로 인체 유방암 세포를 형질전환 시켰을 때 전이성 및 세포 이동이 억제된다고 밝혀졌으며³⁸, 세포의 분화와 성장에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다³⁹. 췌장암 조직에서 병기가 진행할수록 nm23-H1의 발현이 감소한다고 보고되고 있으나⁴⁰, *K-ras* 돌연변이나 전이와의 명확한 관련성은 알려져 있지 않다. 본 연구에서 FTIs 처리 48시간 후 시행한 Western Blotting에서

nm23-H1의 발현이 증가되는 결과를 보이고 있다. *In vitro* invasion assay에서 보았던 Panc-1과 Hpac의 침윤 억제 효과가 FTIs에 의한 nm23-H1의 발현 증가와 상관관계가 있음을 알 수 있다 (그림 8).

본 연구에서는 활성화된 *K-ras* 암유전자를 가지는 인간 췌장암 세포에서 FTIs인 LB42908과 LB42708가 세포성장 및 *in vitro* 암 침윤을 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 FTIs에 의한 Rho B, Rac-1, nm23-H1의 발현 증가와 관계가 있을 것으로 생각되었다. 따라서 *K-ras* 변이가 높은 췌장암에서 FTIs가 항암효과를 가지며 치료제로서 임상적 적용이 기대된다⁴¹.

V. 결론

췌장암 환자에서 *K-ras* 암유전자의 돌연변이가 빈발하며 진단 시 빈번히 원격전이가 동반된다는 점을 고려하여, 췌장암에서 FTIs에 대한 항암효과 및 암전이 억제 효과를 평가하고자 하였다. 인체 췌장암 세포주로서 *K-ras* 돌연변이가 동반된 Panc-1, Hpac과 *K-ras* 돌연변이가 동반되지 않은 BxPC-3를 사용하였으며 FTI로는 LG chemicals에서 새로이 합성한 LB42908과 LB42708을 이용하였다. 세 종류의 췌장암 세포 모두에서 LB42908과 LB42708에 의해 세포성장이 억제되었으며, Panc-1과 Hpac 세포에서 현저한 *in vitro* 암 침윤 억제가 관찰되었다. 이는 FTIs에 의해 prenylated 및 unprenylated 분획 모두의 RhoB 및 Rac-1의 발현 증가와 nm23-H1의 발현 증가가 관계가 있을 것으로 생각되었다. 따라서 *K-ras* 변이가 호발하는 췌장암에서 FTIs는 새로운 항암치료제로서 임상적 유용성이 기대된다.

참고문헌

1. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993;62:851-91.
2. Cerny WL, Mangold KA, Scarpelli DG. K-ras mutation is an early event in pancreatic duct carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer Res* 1992;52:4507-13.
3. BOS JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9.
4. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549-54.
5. Baribacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56:779-27.
6. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366:643-654.
7. Waldmann V, Rabes HM. What's new in ras genes? Physiological role of ras genes in signal transduction and significance of ras gene activation in tumorigenesis. *Pathol Res Pract* 1996;192:883-91.
8. Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras. GDP with Raf-1 and mitogen activated protein kinase kinase. *Science* 1993;260:1658-60.
9. Kikuchi A, Demo SD, Ye ZH, Chen YW, Williams LT. ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol Cell Biol* 1994;14:7483-91.
10. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994;370:527-32.
11. Jiang H, Luo JQ, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster DA, et al.

- Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. *Nature* 1995;378:409-12.
12. Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 1995;20:227-31.
 13. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997;80:1529-37.
 14. Bondy GP, Wilson S, Chambers AF. Experimental metastatic ability of H-ras-transformed NIH3T3 cells. *Cancer Res* 1985;45:6005-9.
 15. Muschel RJ, Williams JE, Lowy DR, Liotta LA. Harvey ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am J Pathol.* 1985;121:1-8.
 16. Ichikawa T, Kyprianou N, Isaacs JT. Genetic instability and the acquisition of metastatic ability by rat mammary cancer cells following v-H-ras oncogene transfection. *Cancer Res* 1990;50:6349-57.
 17. Suchy B, Zietz C, Rabes HM. K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 1992;52:30-3.
 18. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, Nictolis MD, Romanini C, et al. Ras p21 immunostaining in early stage squamous cervical carcinoma: relationship with lymph nodal involvement and 72 kDa-metalloproteinase index. *Anticancer Res* 1998;18:609-13.
 19. Lundy J, Grimson R, Mishriki Y, Chao S, Ovarez S, Fromowitz F, et al. Elevated ras oncogene expression correlates with lymph node metastases in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1986;4:1321-5.

20. Deng GR, Liu XH, Wang JR. Correlation of mutations of oncogene c-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. *Oncogene Res* 1991;6:33-8.
21. James GL, Goldstein JL, Brown MS, Rawson TE, Somers TC, McDowell RS, et al. Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. *Science* 1993;260:1937-42
22. Kohl NE, Omer CA, Conner MW, Anthony NJ, Davide JP, deSolms SJ, et al. Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinoma in ras transgenic mice. *Nature Med.* 1995;1:792-7.
23. Sepp-Lorenzino L, Ma Z, Rands E, Kohl NE, Gibbs JB, Oliff A, et al. A peptidomimetic inhibitor of farnesylprotein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1995;55:5302-9.
24. Garcia AM, Rowell C, Ackermann K, Kowalczyk JJ, Lewis MD. Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *J Biol Chem.* 1993;268:18415-8.
25. Trueblood CE, Ohya Y, Rine J. Genetic evidence for in vivo cross-specificity of the CaaX box protein prenyltransferases farnesyltransferases and geranylgeranyltransferase-I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993;13:4260-75.
26. Oliff A. Farnesyltransferase inhibitors: targeting the molecular basis of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1999;1423:C19-C30.
27. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999;17:3631-52.

28. Kim JW. Farnesyltransferase inhibitors: mechanism of action through regulation in cell cycle distribution and Ras effector molecules. Seoul: Yonsei Univ.; 2000.
29. Chant J, Stowers L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 1995;81:1-4.
30. Vojtek AB, Cooper JA. Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell* 1995;82:527-9.
31. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81:53-6.
32. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol* 1999;19:1831-40.
33. Lebowitz PF, Davide JP, Prendergast GC. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol* 1995;15:6613-22.
34. Hofmann M, Rudy W, Gunthert U, Zimmer SG, Zawadzki V, Zoller M, et al. A link between ras and metastatic behavior of tumor cells: ras induces CD44 promoter activity and leads to low-level expression of metastasis-specific variants of CD44 in CREB cells. *Cancer Res* 1993;53:1516-21.
35. Satoh K, Shimosegawa T, Koizumi M, Toyota T. Expression of CD44 in duct cell carcinomas and in intraductal neoplasia of the pancreas. *Anticancer Res* 1997;17:215-20.
36. Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin

- carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated *H-ras* expression levels. *Cancer Res* 1996;56:5391-6.
37. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200-4.
38. Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene* 1993;8:2325-33.
39. Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. nm23. unraveling its biological function in cell differentiation. *J Cell Physiol* 2000;182:144-9.
40. Fiess H, Guo XZ, Tempia-Caliera AA, Fukuda A, Martignoni ME, Zimmermann A, et al. Differential expression of metastasis-associated genes in papilla of vater and pancreatic cancer correlates with disease stage. *J Clin Oncol* 2001;19:2422-32.
41. Song SY, Meszoely IM, Coffey RJ, Pietenpol JA, Leach SD. K-Ras-independent effects of the farnesyl transferase inhibitor L-744,832 on cyclin B1/Cdc2 kinase activity, G2/M cell cycle progression and apoptosis in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Neoplasia* 2000;2:261-72.

Abstract

**Anti-metastatic effect of Farnesyltransferase Inhibitor in
human pancreatic cancer cell**

Sung Pil Hong

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Si Young Song)

Farnesyltransferase inhibitors (FTIs) are novel antitumor agents whose development is based upon the discovery that posttranslational farnesylation is required for the oncogenic Ras. However, the anti-metastatic effect of FTIs as anticancer drugs have not yet been well understood. Novel FTIs by LG chemicals, LB42908 and LB42708 were used in this study to elucidate the growth inhibitory effect and antimetastatic effect of FTIs in human pancreatic cancer cell lines, such as Panc-1, Hpac, and BxPC-3. FTIs suppressed the cell growth in a dose-dependent manner and

greater effect was seen in LB42708. *In vitro* invasion assay, the invasive activity was inhibited in Panc-1 and Hpac, which have K-*ras* mutation, while BxPC-3, which has wild type of K-*ras*, was not suppressed. These results suggest that the biological susceptibility to FTIs can be separated by the Ras status of pancreatic cancer cell line. In western blotting of RhoB and Rac-1, the total expression of prenylated and unprenylated RhoB and Rac-1 were increased by FTIs. The expression of nm23-H1 was increased by FTIs while those of the CD44v6 and VEGF were not changed. In conclusion, antiproliferative effect and antimetastatic effect of FTIs in Panc-1 and Hpac are supposed to be mediated by RhoB, Rac1, and nm23-H1.

Key Words : Ras, farnesyltransferase inhibitor, invasion, RhoB, Rac-1, nm23-H1