

골육종에서 표적치료제의
종양 억제 효과

연세대학교 대학원
의 과 학 과
권 보 람

골육종에서 표적치료제의
종양 억제 효과

지도교수 라 선 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011 년 12 월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

권 보 람

권보람의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 라 선영 권보람

심사위원 신주호 권보람

심사위원 정희철 Jagem

연세대학교 대학원

2011년 12월

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 세포와 세포 배양	7
2. 표적치료제	7
3. MTT assay	8
4. Western blot	9
5. 병합요법	10
6. Cell proliferation assay	11
7. Cell cycle analysis	12
8. 결과 분석과 통계적 처리	12
III. 결과	14
1. 골육종 세포주의 단백질 발현과 활성화	14
2. 골육종 세포주의 Akt2-1/2 와 rapamycin 에 대한 민감도	17
3. Akt2-1/2 와 rapamycin 의 병합요법에 따른 효과	20
4. Akt2-1/2 와 rapamycin 의 처리에 따른 표적단백질의 변화 ·	23
5. Akt2-1/2 와 rapamycin 의 처리에 따른 PI3K-Akt-TOR 신호전달 경로의 하위 단백질 변화	26

6. Akti2-1/2 와 rapamycin 의 병합요법 처리 방법에 따른 효과 비교	29
7. Akti2-1/2 와 rapamycin 의 병합요법에 따른 표적단백질의 변화	32
8. Akti2-1/2 와 rapamycin 의 병합요법에 따른 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 하위 단백질의 변화	34
9. Akti2-1/2 와 rapamycin 의 처리에 따른 cell cycle 변화	36
IV. 고찰	40
V. 결론	44
참고문헌.....	45
영문요약.....	51

그림 차례

Figure 1. Study scheme	13
Figure 2. Protein expression profiles of osteosarcoma cell lines	15
Figure 3. Sensitivity of osteosarcoma cell lines to the inhibitor targeting Akt or mTOR	18
Figure 4. Combination effect of Akti2-1/2 and rapamycin in osteosarcoma cell lines	21
Figure 5. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the target proteins	24
Figure 6. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the down-stream effectors of PI3K- Akt-mTOR signaling pathway	27
Figure 7. Comparison of concurrent versus sequential treatments in combination of Akti2-1/2 and rapamycin	30
Figure 8. Combination effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the target proteins	33

Figure 9. Combination effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the
down-stream effectors of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway
..... 35

Figure 10. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin on cell cycle 37

국문요약

골육종에서 표적치료제의 종양 억제 효과

골육종은 대부분 어린이와 청소년에서 높은 발병률을 보이며 치료를 위해 화학요법과 수술요법을 병행하여 시행하고 있으나 화학요법으로 인한 급성 독성 효과나 약제에 대한 내성 때문에 치료에 한계가 있다. 최근에는 암에서 활성화 되어 있는 다양한 신호전달 경로를 표적으로 하는 약제들이 연구되고 있다. 그중에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로는 세포의 성장, 세포 사멸과 세포 주기를 조절하는 데 있어 중요한 역할을 하기 때문에 효과적인 종양 억제 효과를 기대할 수 있는 약제의 표적이 되고 있다.

본 연구에서는 7 개의 골육종 세포주에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로에 관여하는 단백질의 발현과 활성을 확인하고 EGFR 와 같은 receptor tyrosine kinase (RTK)뿐 아니라 Extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 c-Jun N-terminal kinase (JNK)의 발현과 활성을 확인함으로써 골육종 세포의 다양한 신호전달 양상을 확인하였다. 또한, Akt 와 mTOR 각각 억제하는 약제들에 대한 민감도를 확인하였으며 이들 약제를 병합하여 사용하였을 때 상승효과가 있는지도 확인하였다. 골육종 세포주에서 Akt 와 mTOR 는 모두 발현하고 있었으나 각각의 활성은 세포주마다 다르게 나타났다. Akt 억제제인 Akti2-1/2 에 대한 민감도는 IC_{50} 가 1.01 - 4.72 μ 으로 모두 비슷하게 나타났으며 mTOR 억제제인 rapamycin 에 대한

민감도는 10 μ M 의 농도에서도 040 - 71 %의 높은 생존율을 보였다. 두 가지 약제를 동시에 병합하여 처리하였을 때 모든 세포주에서 상승효과가 나타났다.

Rapamycin 을 처리하고 30 분 이내에 Akt 가 활성화 되는 점을 확인하고 병합요법에 두 가지 방법을 비교하였다. 동시에 두 약제를 처리하는 방법과 rapamycin 에 의해 Akt 가 활성화되었을 때 Akti2-1/2 를 처리하는 방법으로 나누어 그 효과를 MTT assay, cell proliferation assay 와 cell cycle assay 를 통하여 비교하였다. MTT assay 를 통하여 두 병합요법 실험군 간에 유의한 차이가 있는 것을 확인하였으며 cell proliferation assay 를 통해 약제를 처리한 군이 대조군보다 세포 생장이 억제되었으며 대조군과 두 병합요법 실험군 간에 모두 유의한 차이를 확인하였다. 또한, Cell cycle assay 를 통해 병합요법으로 유도된 cell cycle 의 G1 arrest 를 확인하였다.

본 연구를 통해 골육종 세포에서 활성화된 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 확인하고 이를 표적으로 하는 약제에 대한 민감도를 확인하였다. 표적치료제의 항종양 효과를 높이기 위해 병합요법을 시행하였으며 이로 인한 상승효과를 확인하였다. 또한, 병합요법의 약제 처리 방법에 따라 골육종에서 표적치료제의 항종양 억제 효과를 증진 시키는 방법을 제시하였다.

핵심되는 말 : 골육종, Akt, mTOR, Akti2-1/2, rapamycin

골육종에서 표적치료제의 종양 억제 효과

<지도교수 라 선 영>

연세대학교 대학원 의과학과

권 보 람

I. 서론

골육종은 어린이와 청소년에게 가장 흔하게 발생하는 원발성 악성 골종양으로 골육종 환자의 50% 이상이 20 대 미만에서 발생한다¹. 침습적인 악성 종양인 골육종은 재발과 전이의 확률이 높으며 특히 골육종 환자의 30-40%는 폐 전이가 일어난다²⁻⁴. 골육종 치료를 위해 기본적으로 수술과 항암 약물 치료가 병행되고 있으며 방사선 치료뿐 아니라 methotrexate, doxorubicin, cisplatin, etoposide, cyclophosphamide 등을 이용한 다면적인 화학요법이 수술 전후로 사용되고 있다^{5,6}. 화학요법과 수술요법이 발달함에 따라 원발암의 치료에 효과적으로 작용하면서 환자의 5 년 생존율은 증가했지만 여전히 20-30% 환자에서 재발과 전이가 일어나고 있으며 이러한 환자들에게는 제한적인 병용 화학요법이 사용되고 있다³. 또한 빈번하게 발생하는 급성 독성 효과 및 장기 후유증을 동반하기 때문에 교차내성이 없는 약제가 필요하다^{3,6-9}. 골육종 환자의 치료에 이러한 한계를 해결하기 위해서 더욱 새롭고 효과적인 치료 방법의 개발이 매우 중요한 실정이다.

최근 수년간 분자 유전학의 발전으로 여러 악성 종양에서 다양한 표적치료제들이 연구, 개발되어 적용되고 있다. 특히 세포 내 다양한 receptor tyrosine kinase (RTK)나 다양한 신호전달 경로들을 표적으로 하는 약제들이 많이 개발되고 있는데 그 중에서도 phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K)-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway 는 다양한 종류의 종양에서 비정상적으로 조절되어 활성화 되어 있기 때문에 종양 치료에 있어서 유망한 표적이 되고 있다^{10,11}. PI3K 는 p85 조절소단위와 p110 촉매소단위의 이형이량체로 구성되어 있으며 다양한 성장인자 RTK 의 하위 신호전달 분자이다¹². PI3K 세포막에서 phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate (PIP2)를 인산화시켜 PIP2 를 PIP3 로 전환 시킨다¹³. 그 결과 PIP3 는 pleckstrin homology domain (PH domain)의 직접적인 상호작용을 통하여 Akt 와 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)을 원형질막으로 이동시키고 PDK1 에 의해 Akt 의 활성화고리에 존재하는 threonine 308 잔기의 인산화가 일어난 후 c 말단의 serine 473 잔기의 인산화로 활성화 된다¹⁴⁻¹⁷. 활성화 된 Akt 는 세포의 성장, apoptosis, cell cycle progression 등에 관여하는 다양한 하위 경로를 조절한다^{10,18}. PI3K 의 유전자적 돌연변이뿐 아니라 PI3K 와 Akt 유전자 증폭과 과발현은 다양한 종양에서 보고 되고 있다^{19,20}. PTEN 불활성화는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 지속적인 활성화를 유지하는데 중요하게 작용하여 결과적으로 mTOR 신호전달 경로가 활성화 된다¹¹ mTOR 는 mTORC1 과 mTORC2 의 두 가지의 복합체로 구성되어 있는데 mTORC1 은 rapamycin 에

의해 저해되는 복합체로 mRNA 전사에 관여하고 mTORC2 는 Akt 의 serine 잔기의 인산화를 통해 세포증식과 생존에 관여한다^{21,22}. mTOR 에 의해 매개 되는 하위 신호전달 경로는 다양한 종양에서 유전적 변이가 일어나거나 과발현되어 비정상적으로 활성화 되어 있어 세포 형질전환 과정뿐 아니라 억제내성에도 관련되어 있다¹¹. S6K1 과 eIF-4E 의 유전자 증폭이나 과발현은 종양 형성과 관련이 있으며 eIF-4E 의 과발현은 다양한 종양에서 발견되고 예후가 나쁠 뿐 아니라 재발과 전이에 관련이 있다²³⁻²⁵. eIF-4E 와 대조적으로 4E-BP1 의 발현은 종양의 진행과 역상관성을 보이며 wild type 의 4E-BP1 의 과발현은 종양의 크기를 감소시키며 4E-BP1 의 발현은 apoptosis 를 유도하였다²⁶⁻²⁹. 따라서 mTOR 는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 상위와 하위 모두에서 다양한 변화를 유도하며 신호전달을 활성화 시킨다^{11,30}.

예후가 나쁜 골육종 환자들은 급격한 세포 증식과 더불어 항 세포사멸 유전자의 높은 발현을 보이는데, 이러한 특징 때문에 기존 화학요법에 대하여 비정상적인 cell cycle progression 뿐 아니라 apoptosis-resistance 가 나타난다^{31,32}. Akt 의 과발현이 비정상적인 cell cycle progression 과 apoptosis-resistance 에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에^{10,18,32}, 골육종의 치료를 위해 Akt 는 유망한 표적이 될 수 있다.

종양진행과 mTOR 활성화의 관련성이 보고됨에 따라 mTOR 신호전달 경로 또한 항암제 개발을 위한 중요한 표적으로 대두되었으며 mTOR 를 표적으로 하는 다양한 억제제들이 개발되어 임상시험 중에 있다. 골육종 세포주에서도

mTOR 억제제인 rapamycin 을 처리 하였을 때, Akt/Map kinase 신호전달 경로와 mTOR 신호전달 경로의 탈인산화를 확인할 수 있었으며, cell cycle arrest 와 apoptosis 가 일어났다³³. 따라서 세포 성장과 apoptosis 에 영향을 미치는 mTOR 또한 골육종 치료에 있어 중요한 표적이 될 수 있다.

이를 종합해 볼 때, 골육종은 현재의 제한적인 화학요법에 충분한 효능을 보이지 못하며 약제 내성 유발의 문제점이 있기 때문에 새로운 치료 방법이 필요하다. 현재 다양한 종류의 표적치료제들이 연구, 개발되어 여러 종양에서 적용되고 있으나 골육종에서는 그 활용이 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 골육종 세포주에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 발현과 활성을 확인하고 Akt 와 mTOR 를 각각 표적으로 하는 억제제 대한 민감도를 확인하였다. 또한 두 표적 치료제의 병합요법에 의한 상승효과를 확인하고 병합요법의 방법에 따른 항 종양 효과의 차이를 확인함으로써 골육종 치료에 있어 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 표적으로 하는 효과적인 표적 치료의 가능성을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주와 세포 배양

본 연구에서는 7 개의 골육종 세포주를 사용하였다. 미국 세포주 은행 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입한 MG-63, HOS, KHOS/NP, SK-ES-1 와 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입한 U-2 OS, Saos-2, G-292 를 사용한다. 세포 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 MG-63, HOS, KHOS/NP 는 Eagle's minimal essential medium (EMEM, LONZA, Basel, Switzerland), SK-ES-1 은 McCoy's 5A medium (LONZA, Basel Switzerland) 를 U-2 OS, Saos-2 는 RPMI 1640 (LONZA, Basel, Switzerland)을 G-292 는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, LONZA, Basel, Switzerland) 배지에 56°C에서 30 분간 비활성화 시킨 10% 우태아 혈청 (FBS, Fetal Bovine Serum, Omega Scientific, Tarzana, CA, USA)과 penicillin 100 unit/ml 과 streptomycin 100µg/ml (Gibco, Grand island, NY, USA)을 첨가하여 만든 배양액으로 5% CO₂, 37°C의 배양기에서 배양하고, 배양액은 주 3 회 교체 하였다.

2. 표적치료제

실험에 사용된 표적치료제는 Akt 와 mTOR 를 각각 표적으로 하는 억제제를 사용하였다. Akt 의 억제제인 Akti2-1/2 (Calbiochem, Darmstadt,

Germany)와 mTOR 억제제인 rapamycin 은 (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) 에서 각각 구입하여 사용하였다.

3. MTT assay

각 표적치료제의 민감도 검사는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) assay 를 통하여 측정하였다. 세포주를 96-well microplate (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)의 각 well 당 100 ul 의 배양액 안에 5×10^3 개, 3×10^4 개 또는 3×10^4 개의 세포를 분주 하였다. 5% CO₂, 37°C의 배양기에서 24 시간 동안 배양한 후, 각 well 에 100 ul/well 의 농도로 약제를 처리하였다. 배양기에서 다시 72 시간 배양 후, 50 ul (400 ug/ml)의 MTT 용액을 넣고 4 시간 더 배양시키고 700 g 로 4°C에서 10 분간 원심분리하여 잔여 부유액을 제거하였다. 각 well 당 150 ul DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 첨가하여 MTT-formazan crystal 을 용해 시켜 10 분간 추가로 반응 시킨 후에 multi-well ELISA automatic Spectrometer recorder (Behring ELISA Processor II, Marburg, Germany)를 이용하여 570 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 다음의 공식에 근거하여 세포의 생존율을 계산하였고 Calcsyn software (Biosoft, Cambridge, UK)를 이용하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{검체의 평균 흡광도} - \text{표준 흡광도}}{\text{대조군의 평균 흡광도} - \text{표준 흡광도}} \times 100$$

4. Western Blot

세포가 70-80% 정도 자랐을 때, PBS 로 2 번 세척하여 여분의 배양액을 깨끗이 제거 하였다. Cell lysis buffer [50mM Tris (pH8.0), 10% glycerol, 2mM EDTA, 5mM NaF, 1% NP-40, 150mM NaCl, protease inhibitor]를 첨가한 후 scraper 로 긁어 수확하고 잘 섞어준 다음, 30 분 동안 얼음 위에서 반응 시킨다. 13,200rpm 으로 4℃에서 30 분간 원심분리하여 상층액만 분리한 뒤, 실험까지 -80℃에서 보관하였다.

Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)방법을 이용하여 정량한 동량의 단백질을 loading dye 와 섞어 95℃에서 10 분 동안 denaturation 시키고 SDS-PAGE gel 에 loading 한 후 전기영동 하였다. PVDF (Polyvinylidene difluoride) membrane (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) semi-dry transfer 한 후, 5% skim-milk 를 함유한 0.1% TBS-tween 20 buffer 를 이용하여 membrane 을 상온에서 1 시간 동안 반응 시켜 blocking 하였다. 5% BSA 를 함유한 0.1% TBS-tween-20 buffer 에 1 차 항체를 희석하여 4℃에서 12 시간 이상 반응 시킨 후, 0.1% TBS-tween-20 buffer 로 세척하였다. 2 차 항체는 5% skim-milk 를 함유한 0.1% TBS-tween 20 buffer 에 희석하여 상온에서 1 시간 동안 반응 시킨 후, TBS-tween 20-buffer 로 세척하였다. Membrane 에 ECL Western blotting reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 상온에서 반응시킨 후, X-ray film (Fugi, Tokyo, Japan)에 감광하였다. 본 실험에서 사용한 일차항체로는 PI3 Kinase p85, p-PI3K p85 (Tyr458)/p55

(Tyr199), Akt, p-Akt (Ser 473), mTOR, p-mTOR (Ser2448), p70 S6 Kinase, p-p70 S6 Kinase (Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46), 4E-BP1, p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), PTEN, p-EGFR (Tyr 1173), EGFR, p-ERK (Tyr204), ERK1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다. loading control 로 GAPDH (Abcam, Cambridge, UK) 또는 α -tubulin (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA)을 사용하였다. 이차항체는 Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG 또는 Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)를 사용하였다.

5. 병합 요법

병합 요법의 상승효과는 두 가지 표적치료제의 조합으로 한다. 각 표적치료제 병합 시, 두 약제의 molar 농도를 일정비율로 고정하여 위와 같은 방법으로 MTT assay 를 수행하였다. 병합 요법 후 Combination Index (CI) 값 계산은 Chou-Talalay 의 공식을 이용하였으며, 이 값은 $IC_{50}(D_m)$ 과 용량효능대비곡선 (the m value)으로 계산하였다. Isobologram (CI = 1)의 고전적인 공식은 아래와 같다.

$$CI = (D_1)/(D_x)_1 + (D_2)/(D_x)_2$$

분모인 (Dx)1 과 (Dx)2 는 약제 D1 (drug1)과 D2 (drug2)를 단독으로 처리하였을 때의 %세포독성이고, 분자 (D)1 과 (D)2 은 약제 D1 과 D2 를 병합 투여를 하였을 때의 % 세포 독성을 나타낸다.

$$D_x = D_m [f_a / (1 - f_a)]^m$$

Dm 은 median-effect dose (IC50)을 말하며 이것은 median-effect plot 의 X-intercept 의 antilog 로부터 아래의 공식으로 구하였다.

$$X = \log(D) \text{ versus } Y = \log [a / (1 - a)]$$

m 은 median-effect plot 의 기울기이며 Multiple drug effect 분석은 CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK)을 사용하여 m, Dm, Dx, and CI 값을 계산한다. (Dx)1 과 (Dx)2 는 Chou-Talalay 의 median-effect 공식으로부터 구하였다. 이러한 식으로부터 계산된 CI 값으로부터 CI<1, CI=1, CI>1 각각을 상승 (synergism), 유지 (summation), 길항 (antagonism) 효과라고 정의하였다.

6. Cell proliferation assay

24-well plate (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) 의 각 well 당 1 X 10⁴ 개의 세포를 분주하였다. 24 시간이 지난 후 각 약제를 농도에 따라 처리하고 대조군은 배양액만 처리하였다. 세포는 trypan blue 로 염색하여 살아있는 세포만 6 일 동안 24 시간 간격으로 계수하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C 의 배양기에서 배양하였다.

7. Cell cycle analysis

표적치료제 처리에 따른 세포 주기의 변화를 확인하고자 fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis 를 수행하였다. 세포를 6-well plate 에 분주한 후 각 약제를 농도별로 처리하여 24 시간 후에 수거하였다. Propidium iodidied (PI) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 로 세포를 염색하여 flow cytometry 를 이용하여 세포를 분석하였다. 세포 주기 분석에는 Cell Quest software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and Modfit LT(Verity Software House, Topsham, ME, USA)를 사용하였다.

8. 결과 분석과 통계적 처리

모든 실험은 세 번 이상 수행하여 평균 \pm 표준편차로 나타냈다. Student's t-test 를 사용하여 각 그룹 간의 통계학적 비교를 하여 표적치료제에 대한 효과를 평가하였으며 각 그룹 간의 차이가 p-value 0.05 이하일 때, 이를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

다음은 본 연구의 study scheme 이다 (Figure 1).

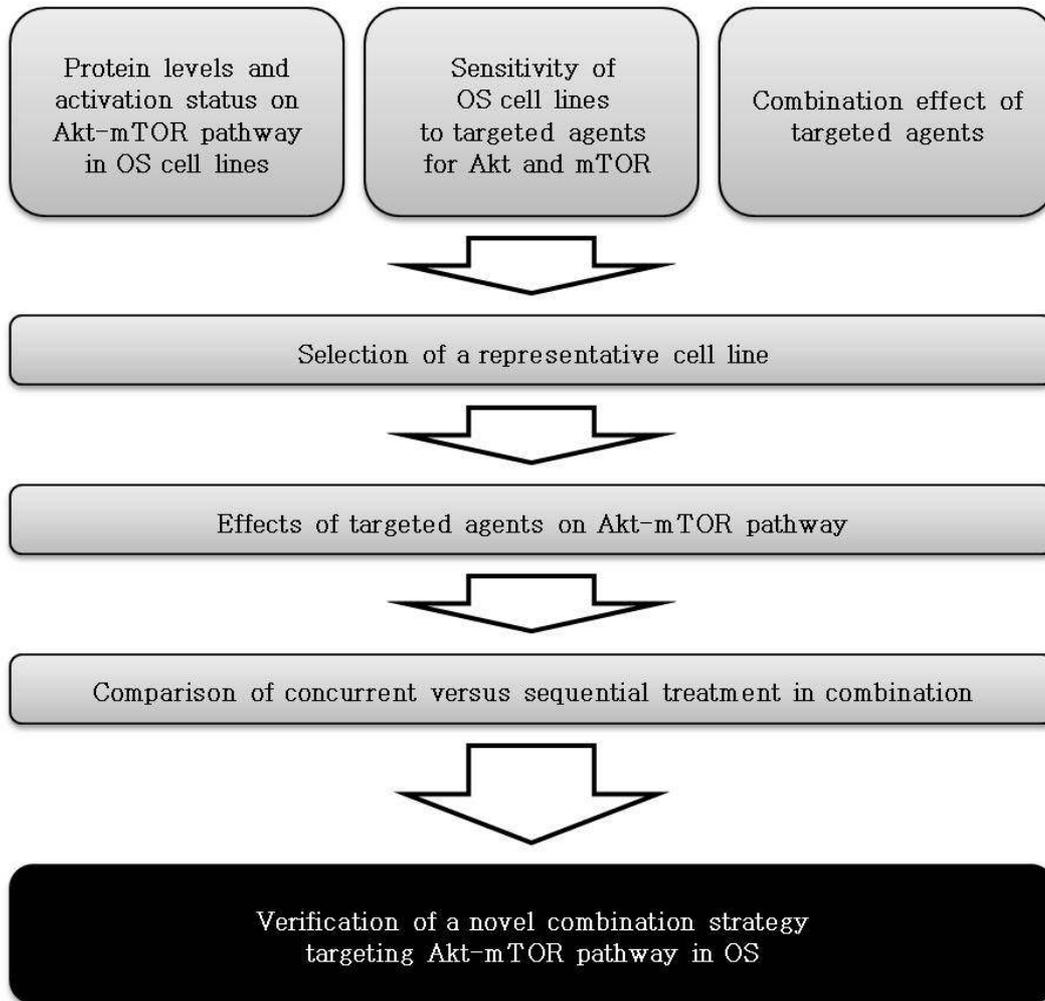


Figure 1. Study Scheme

III. 결과

1. 골육종 세포주의 단백질 발현과 활성화

PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로 관련 단백질 및 anti-apoptosis 경로 관련 단백질의 발현과 활성을 확인하고자 7개의 골육종 세포주에서 western blot을 수행하였다 (Figure 2). PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로에서 중요한 작용을 하는 단백질의 발현과 활성화의 양상은 세포주마다 다양하게 나타났다 (Figure 2A). 모든 골육종 세포주에서 PI3K, Akt, mTOR, p85 S6 kinase, p70 S6 Kinase와 4E-BP1뿐 아니라 이 신호전달 경로의 억제역할을 하는 PTEN 모두 발현되지만, 그 활성화는 세포주마다 다른 양상이 나타났다. MG-63와 HOS는 PI3K의 활성화는 낮지만, Akt, mTOR, p85 S6 Kinase, p70 S6 Kinase와 4E-BP1이 모두 활성화 되어 있다. 특히 HOS는 Akt와 4E-BP1의 활성화가 다른 세포주들에 비해서 상대적으로 높았다. KHOS/NP와 G-292는 PI3K와 Akt의 활성화가 거의 없지만, p85 S6 Kinase, p70 S6 Kinase와 4E-BP1의 활성화는 높게 나타났다. SK-ES-1는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 주요 단백질 모두가 활성화 되어 있었다. U-2 OS와 Saos-2는 PI3K의 활성화가 다른 세포주들에 비해 상대적으로 높지만, 4E-BP1의 활성화는 상대적으로 낮았다. EGFR의 발현은 SK-ES-1를 제외하고 모두 발현하고 있었으며, 그 활성화는 세포주마다 다르게 나타났다 (Figure 2B). 모든 골육종 세포주에서 ERK와 JNK가 발현하고 있었지만, 그 활성화는 달랐으며 특히 SK-ES-1는 ERK와 JNK의 활성화가 낮게 나타났다.

A

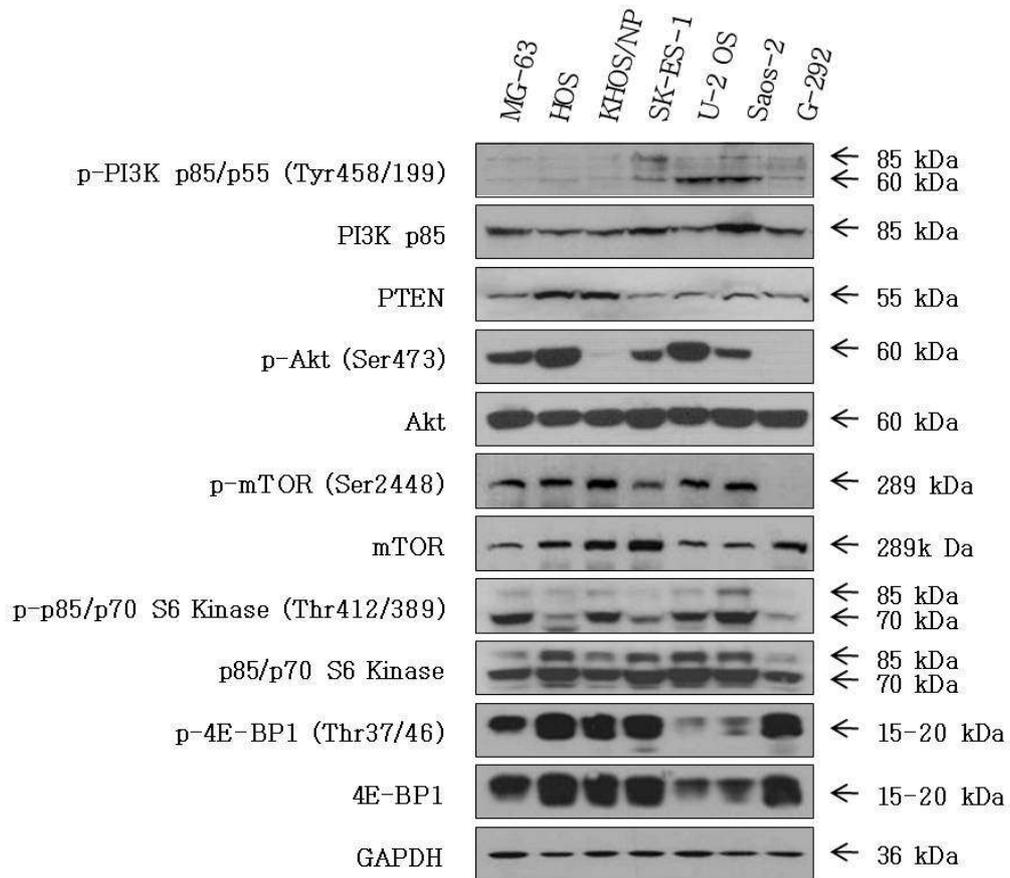


Figure 2. Protein expression profiles of osteosarcoma cell lines. Seven osteosarcoma cell lines were used for western blot analysis. (A) Expression and activation of effector molecules in PI3K-Akt-mTOR signaling pathway (B) Expression and activation of EGFR, ERK and JNK related to anti-apoptotic pathway

B

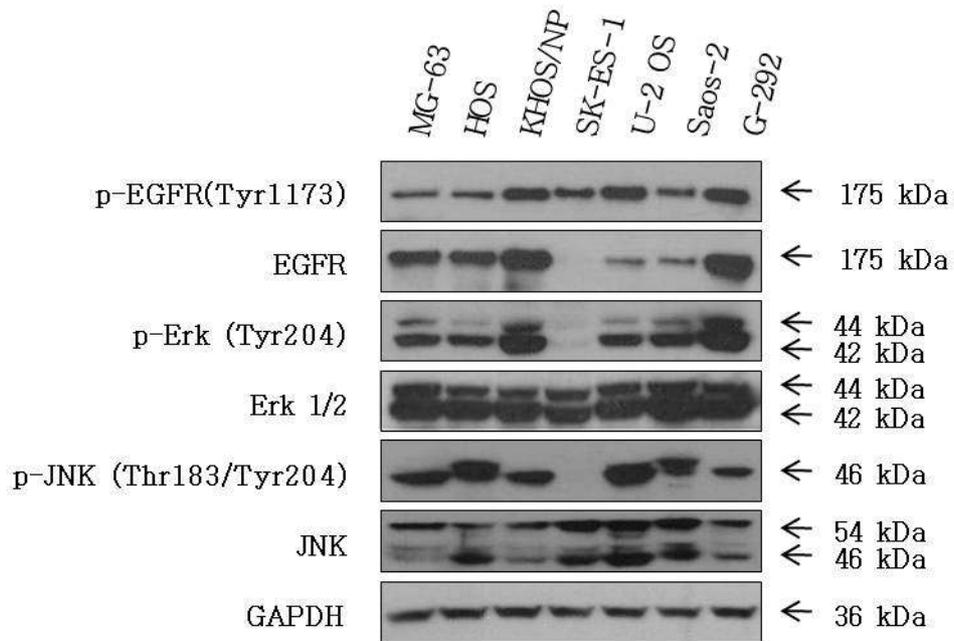
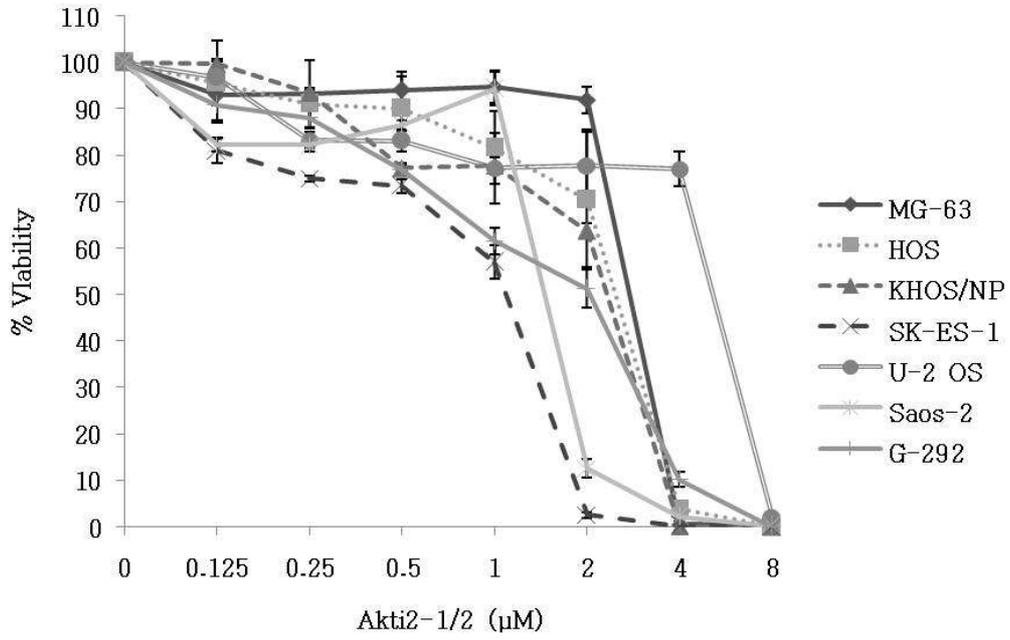


Figure 2. Continued

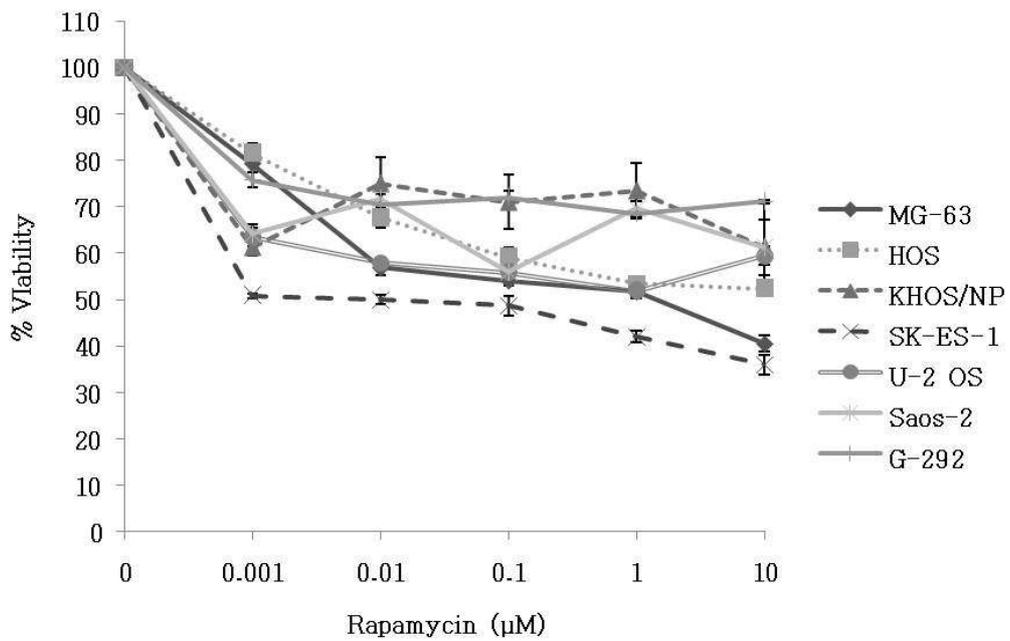
2. 골육종 세포주의 Akti2-1/2 와 rapamycin에 대한 민감도

골육종 세포에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 표적으로 하는 억제제에 대한 효과를 확인하고자 Akt와 mTOR에 대한 각각의 표적치료제를 이용하여 민감도를 확인하였다 (Figure 3). 각 억제제를 7개의 골육종 세포주에 처리하여 72시간 배양한 후, MTT assay를 수행하여 세포 생존율을 확인하였다. 선택적 Akt 억제제인 Akti2-1/2를 농도별로 (0.125 - 8 μM) 처리하여 세포 생존율을 비교하였을 때 대부분의 세포주는 1 μM 이하의 농도에서는 세포 생존율이 60 - 94% 로 높게 나타났으며 대부분 세포주가 2 μM 이상의 농도에서 생존율이 현격하게 감소하였다 (Figure 3A). mTOR 억제제인 rapamycin을 농도별로 (0.001 - 10 μM) 처리한 결과 대부분의 골육종 세포주가 비슷한 양상의 생존율을 보였으며 0.001 μM 의 낮은 농도에서도 19 - 25%의 생존율 감소를 보이지만 10 μM 의 높은 농도에서도 낮은 농도에서의 생존율과 비슷하게 나타났다 (Figure 3B). 특히 SK-ES-1을 제외한 나머지 세포주에서는 10 μM 농도에서도 50% 이상의 생존율을 보였다. MTT assay를 통하여 수치화시킨 생존율을 가지고 calcysyn software를 이용하여 IC_{50} 를 구하였다 (Figure 3C). U-2OS를 제외한 나머지 세포주들의 IC_{50} 는 1.01 - 2.49 μM 으로 비슷하게 나타났다.

A



B



C

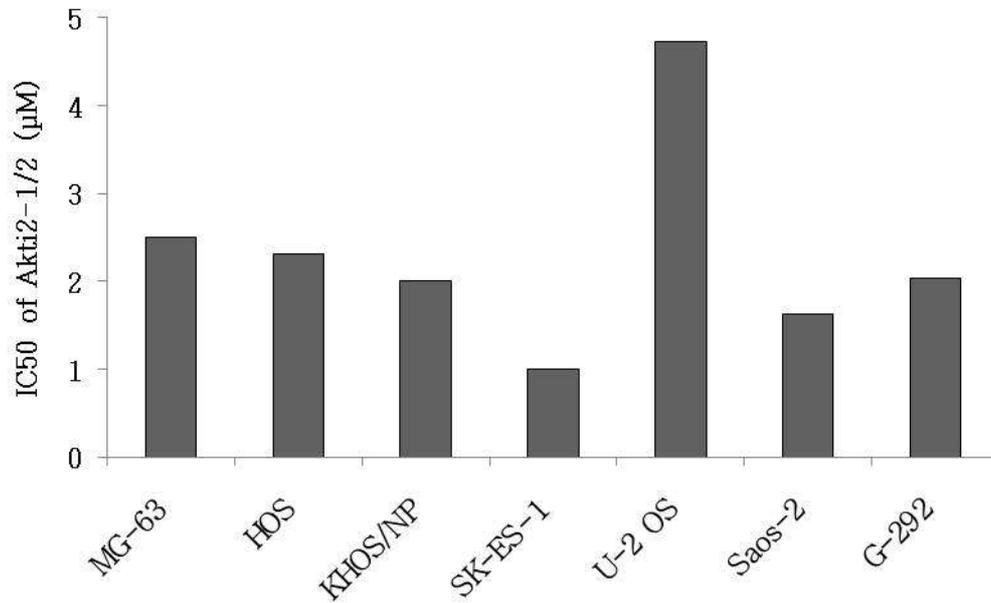


Figure 3. Sensitivity of osteosarcoma cell lines to the inhibitor targeting Akt or mTOR. The relative viability of osteosarcoma cell lines in response to different concentrations of AKi2-1/2 of rapamycin was determined after 72 hours (n = 3). (A) MTT assay of osteosarcoma cell lines treated with Akt inhibitor Akti2-1/2. (B) MTT assay of osteosarcoma cell lines treated with mTOR inhibitor rapamycin. (C) IC₅₀ of Akti2-1/2 in osteosarcoma cell lines.

3. Akti2-1/2와 rapamycin의 병합요법에 따른 효과

Akt의 표적치료제인 Akti2-1/2와 mTOR의 표적치료제인 rapamycin를 병합요법으로 골육종 세포주에 처리하였을 때 상승효과가 있는지를 확인하고자 두 약제를 일정한 농도로 (Akti2-1/2 : Rapamycin = IC₅₀ : 1 μM) 세포에 동시에 처리하여 72시간 배양한 후 MTT assay를 수행하였다 (Figure 4). 세포주 간에 Combination Index (CI) 값을 비교하였을 때 모든 세포주에서 CI값이 1 이하로 병합요법에 따른 상승효과가 나타났으며 (Figure 4A), 병합요법에 따른 ED₅₀에서의 농도를 비교하였을 때 Akti2-1/2는 20.68 - 44.87 nM으로 나타났으며 rapamycin은 8.28 - 20.95 nM으로 나타났다 (Figure 4B). 이로써 Akti2-1/2를 단독으로 처리했을 때의 IC₅₀의 농도보다 병합요법에서 ED₅₀의 농도가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 Akt와 mTOR의 발현과 활성이 높고 두 약제를 단독으로 처리했을 때 효과가 있으며 병합요법에 따른 상승효과도 높게 나타난 HOS를 다음 실험을 위한 세포주로 선정하였다.

A

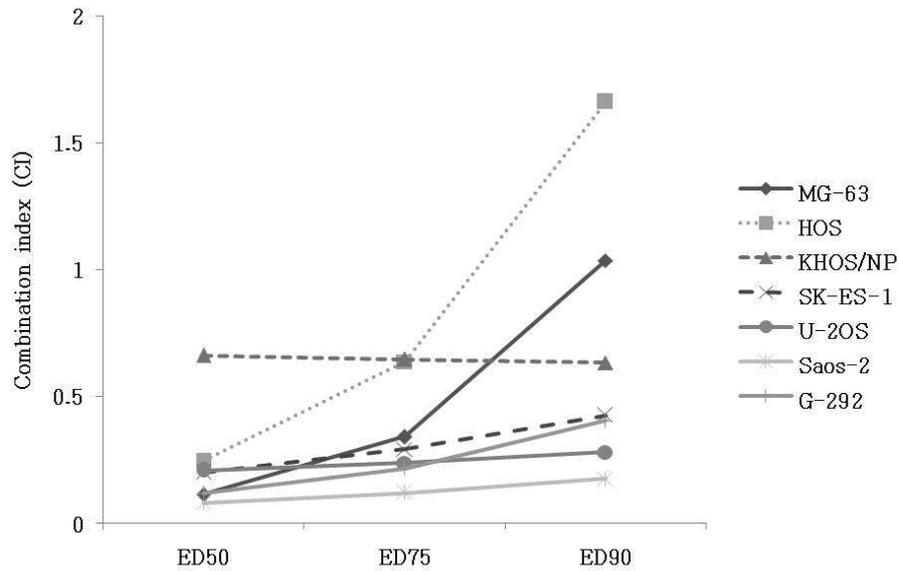


Figure 4. Combination effect of Akti2-1/2 and rapamycin in osteosarcoma cell lines. Osteosarcoma cells were simultaneously treated with the combination of Akti2-1/2 and rapamycin ($IC_{50} : 1 \mu M$) for 72 hours ($n = 3$). MTT assay was performed. (A) Combination index (CI) values of Akti2-1/2 and rapamycin in osteosarcoma cell lines. (B) Dose of Akti2-1/2 and rapamycin at ED_{50} .

B

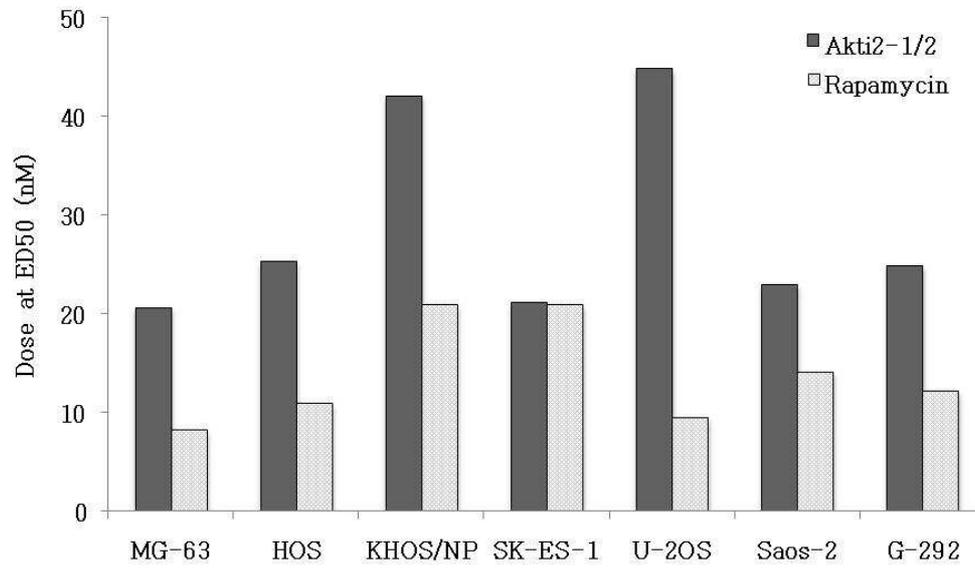


Figure 4. Continued.

4. Akt2-1/2와 rapamycin의 처리에 따른 표적단백질의 변화

Akti2-1/2와 rapamycin을 골육종 세포에 처리하였을 때 Akt와 mTOR의 발현과 활성의 변화를 확인하고자 각 약제를 HOS 세포에 4시간 동안 농도별로 단독 처리한 후 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다 (Figure 5). Akt2-1/2를 농도별 (0.05 - 5 μ M)로 처리하였을 때 5 μ M의 농도에서 표적단백질인 Akt의 활성이 감소하였으며 동시에 mTOR의 발현과 활성도 감소하였다 (Figure 5A). 또한, rapamycin을 농도별로 처리하였을 때 (0.01 - 10 μ M) mTOR의 발현과 활성은 농도 의존적으로 감소하였으나 10 μ M의 농도에서 Akt의 활성이 증가하였다 (Figure 5A). 따라서 Rapamycin에 의한 Akt 활성의 증가가 시간에 따른 변화가 있는지 알아보려고 실험을 수행하였다 (Figure 5B). 10 μ M의 rapamycin을 시간별로 처리하여 Akt의 활성 변화를 확인하였다. Akt의 활성은 15분부터 급격하게 증가하였으며 시간 의존적으로 감소하였다. 또한, Akt의 활성 증가와 반대로 Akt의 발현은 감소하였다가 증가하였다. mTOR의 발현은 변화가 없었지만 mTOR의 활성은 약간 증가하다가 감소하여 24시간째에는 대조군과 같은 정도의 활성을 보였다. Akt의 활성이 거의 없는 세포주에도 같은 현상이 일어나는지 알아보려고 KHOS/NP 세포주에 rapamycin을 처리하여 확인하였다 (Figure 5C). 그 결과는 HOS 세포주와 같았으며 1 μ M의 농도에서도 짧은 시간에 Akt의 활성을 유도하였다.

A

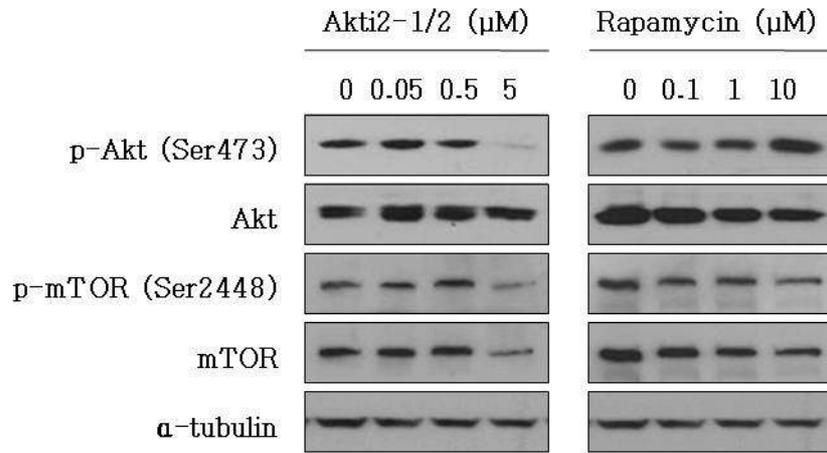
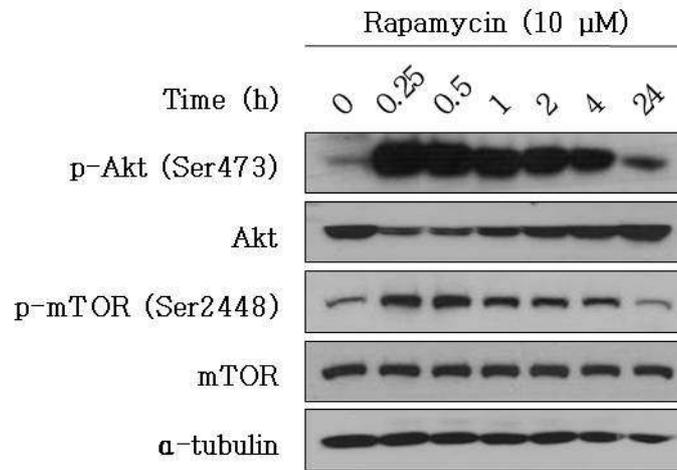


Figure 5. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the target proteins. (A) Dose-dependent effects of Akti2-1/2 or rapamycin. HOS cells were treated with Akti2-1/2 or rapamycin for 4 hours at the indicated concentrations. (B) Time-dependent effects of rapamycin. HOS cells were treated with 10 μM of rapamycin for the indicated time points. (C) Rapamycin-induced Akt activation in KHOS/NP cells. 10 μM rapamycin was treated to KHOS/NP cells for the indicated time points.

B



C

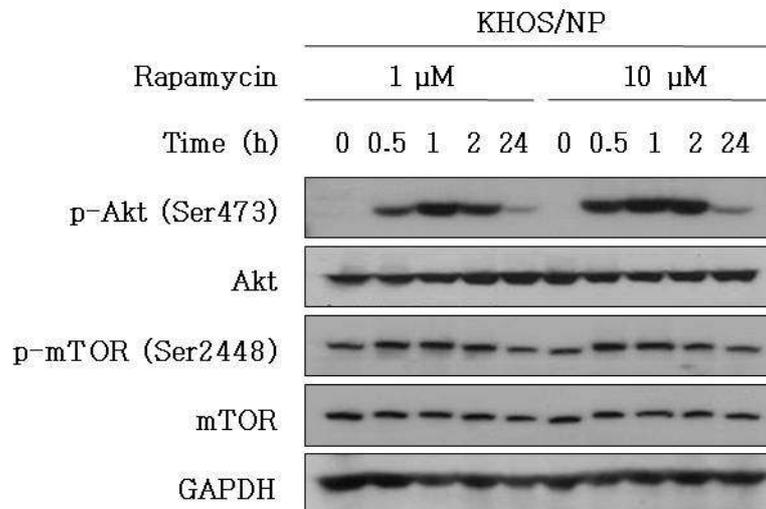


Figure 5. Continued.

5. Akti2-1/2와 rapamycin의 처리에 따른 PI3K-Akt-TOR 신호전달 경로의 하위 단백질의 변화

Akti2-1/2와 rapamycin을 골육종 세포에 처리하였을 때 PI3K-Akt-mTOR의 신호전달 경로의 하위 단백질의 발현과 활성의 변화를 확인하고자 각 약제를 HOS 세포에 4시간 동안 농도별로 단독 처리한 후 단백질을 추출하여 western blot을 수행하였다 (Figure 6). Akti2-1/2와 rapamycin 모두 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로 조절 단백질인 p85 S6 Kinase, p70 S6 Kinase와 4E-BP1의 활성을 감소시켰다 (Figure 6A). 특히 rapamycin은 p85 S6 Kinase와 p70 S6 Kinase를 0.1 μ M의 낮은 농도에서도 효과적으로 활성을 억제하였으며 4E-BP1의 발현도 감소시켰다. 10 μ M의 rapamycin은 짧은 시간에 p85 S6 Kinase와 p70 S6 Kinase의 활성을 감소시켰으며 24시간까지도 회복되지 않는 것을 확인하였다 (Figure 6B). 하지만 4E-BP1의 발현과 활성은 감소하였다가 다시 회복하였다.

A

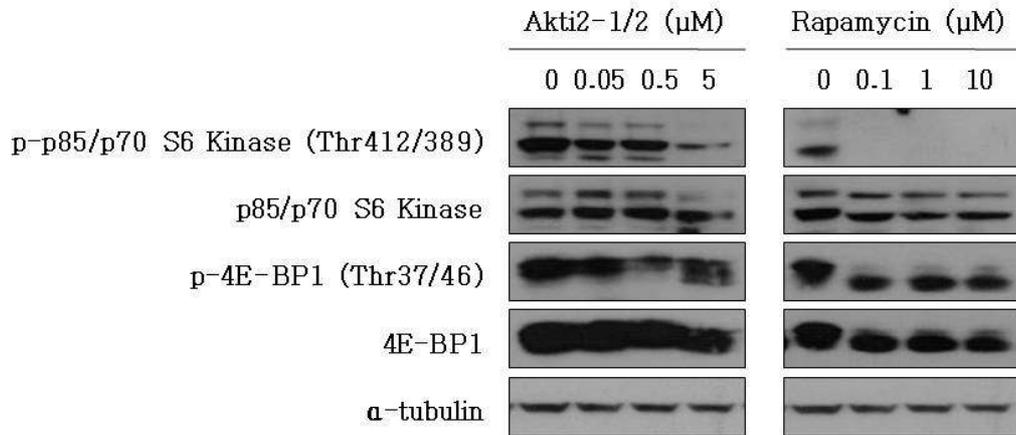


Figure 6. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the down-stream effectors of PI3K- Akt-mTOR signaling pathway (A) Dose-dependent effects of Akti2-1/2 or rapamycin. HOS cells were treated with Akti2-1/2 or rapamycin for 4 hours at the indicated concentrations. (B) Time-dependent effects of rapamycin. HOS cells were treated with 10 μM rapamycin for the indicated time points.

B

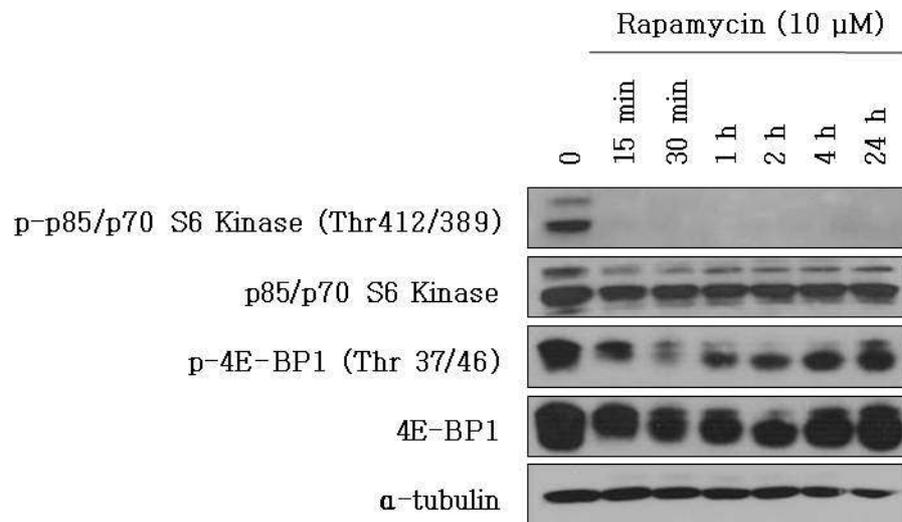


Figure 6. Continued.

6. Akti2-1/2와 rapamycin의 병합요법 처리 방법에 따른 효과 비교

Rapamycin이 Akt의 활성을 증가시키는 것을 확인하였기 때문에 이를 이용하여 병합요법의 상승효과를 증대시키기 위하여 병합요법 시 두 약제의 처리 방법을 다르게 하여 그 효과를 MTT assay와 cell proliferation assay를 통하여 비교하였다 (Figure 7). 병합요법은 두 약제를 동시에 처리하는 방법 (concurrent treatment)과 rapamycin은 30분 전처리 후 Akti2-1/2를 처리하는 방법 (sequential treatment)을 비교하였다. 먼저 각 약제를 단독 혹은 병합요법으로 총 72시간 동안 배양하여 MTT assay로 세포 생존율을 비교하였다 (Figure 7A). HOS 세포에 처리된 약제의 농도는 병합요법으로 계산된 ED₂₅ 농도와 ED₅₀ 농도로 처리하였다. 두 농도로 처리된 실험군 모두에서 sequential treatment 하였을 때 세포 생존율이 가장 많이 감소하였으며 이는 concurrent treatment와 비교하였을 때 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Figure 7A). 특히 ED₅₀의 농도에서 concurrent treatment 대비 sequential treatment의 세포 생존율 감소는 p-value가 0.001 이하로 통계적으로 가장 유의한 감소를 나타냈다. 병합요법의 처리 방법에 따른 효과가 세포 성장에도 차이를 나타내는 지 확인하고자 cell proliferation assay를 수행하였다 (Figure 7B). 병합요법은 ED₅₀의 농도로 처리하였으며, 두 병합요법 실험군 모두 대조군과 각 약제의 단독 처리군에 비해 세포 생장이 억제되었다. 이러한 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 또한, sequential treatment 하였을 때 다른 모든 실험군에 비해 세포 생장이 가장 억제되는 것을 확인하였다.

A

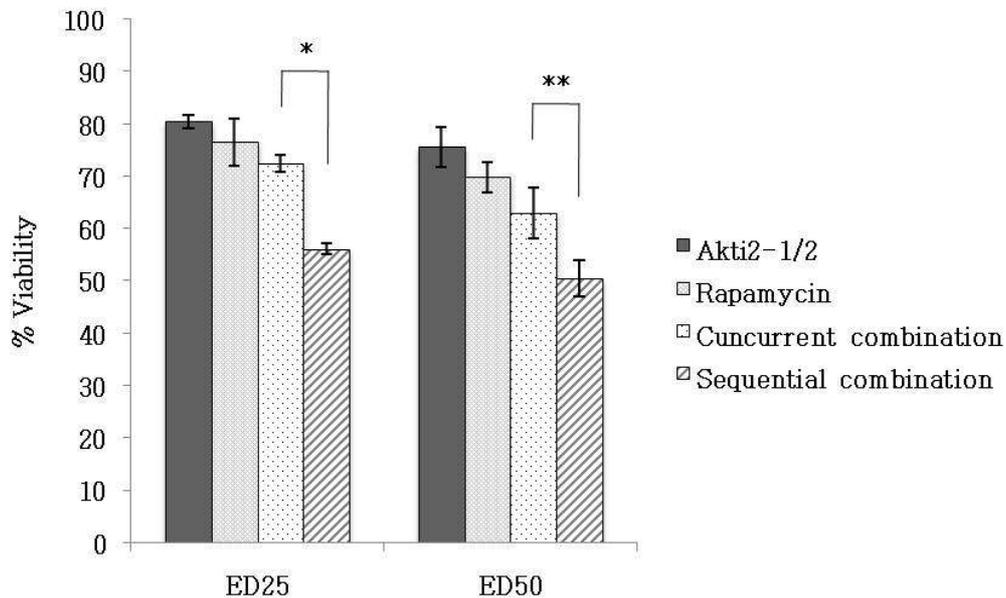


Figure 7. Comparison of concurrent versus sequential treatments in combination of Akti2-1/2 and rapamycin. (A) MTT assay of HOS cells treated with Akti2-1/2 alone, rapamycin alone or combination at the indicated concentrations for 72 hours. Akti2-1/2 was exposed to cells with 4.07 nM (ED₂₅) or 24.34 nM (ED₅₀) in single treatment or combination treatment. Rapamycin was exposed to cells with 1.76 nM (ED₂₅) or 10.97 nM (ED₅₀) in single treatment or combination treatment. In the sequential treatment, Cells were pre-treated with rapamycin for 30 min. (B) Cell proliferation assay of HOS cells. Cells were treated with single or combination of Akti2-1/2 and rapamycin with dose of ED₅₀. Cells were counted with trypan blue every 24 hours for 5 days after the treatment. *p<0.001, **p<0.05, Student's t-test.

B

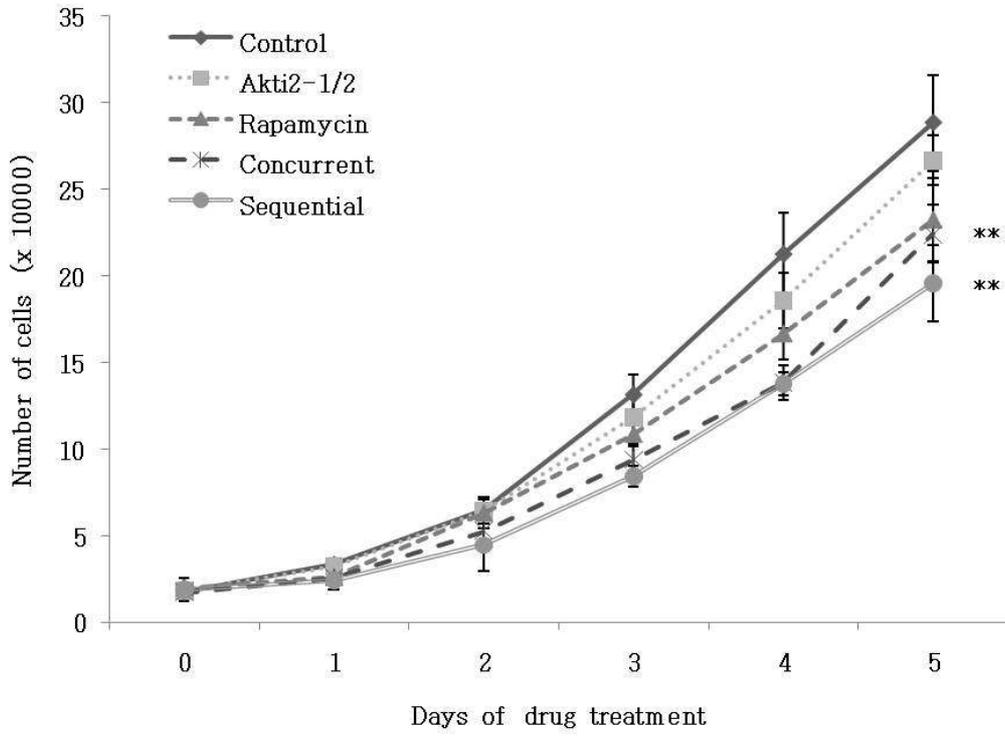
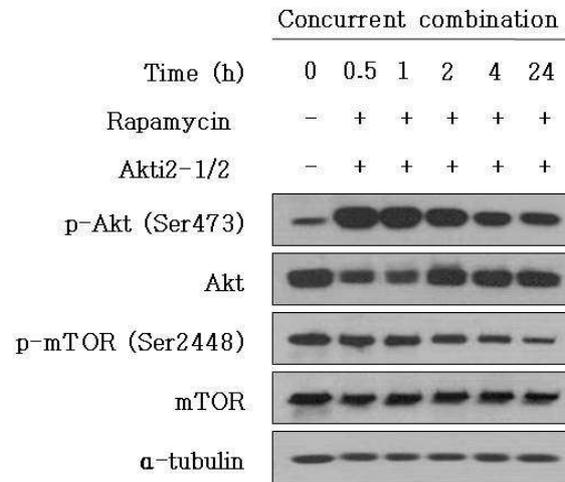


Figure 7. Continued.

7. Akti2-1/2와 rapamycin의 병합요법에 따른 표적 단백질의 변화

Akti2-1/2와 rapamycin을 병합요법으로 처리하였을 때 표적단백질의 변화를 확인하고자 HOS 세포에 두 약제를 병합요법으로 처리한 후 시간에 따른 단백질을 변화를 western blot으로 확인하였다 (Figure 8). 병합요법은 ED₅₀의 농도로 두 약제를 동시에 처리하거나 (concurrent treatment) rapamycin을 30분 전처리한 후 Akti2-1/2를 처리하였다 (sequential treatment). Akti2-1/2와 rapamycin의 concurrent treatment는 rapamycin 단독처리와 마찬가지로 30분의 짧은 시간에서 Akt의 활성을 증가시켰고 그 활성은 1시간까지 지속하다가 시간 의존적으로 감소하였다 (Figure 8A). 이러한 Akt 활성의 증가와 함께 Akt 단백질의 발현은 급속히 감소하였으며 Akt 활성이 감소함에 따라 다시 증가하였다. mTOR의 발현에는 변화가 없었지만 mTOR의 활성은 시간 의존적으로 감소하였다. Akti2-1/2와 rapamycin의 sequential treatment는 Akt의 활성을 30분의 짧은 시간에서 증가시켰지만 1시간이 지난 후부터 그 활성은 시간 의존적으로 감소하였으며 Akt 발현은 계속 유지되다가 24시간이 지나 증가하였다 (Figure 8B). mTOR의 발현은 약제의 처리에도 변화가 없었지만, 활성은 시간 의존적으로 감소하였다.

A



B

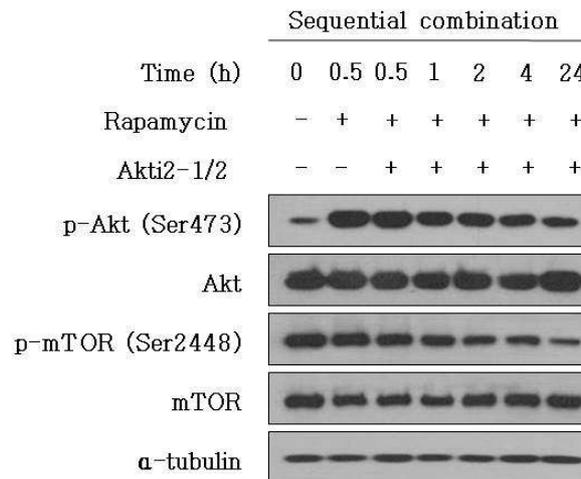
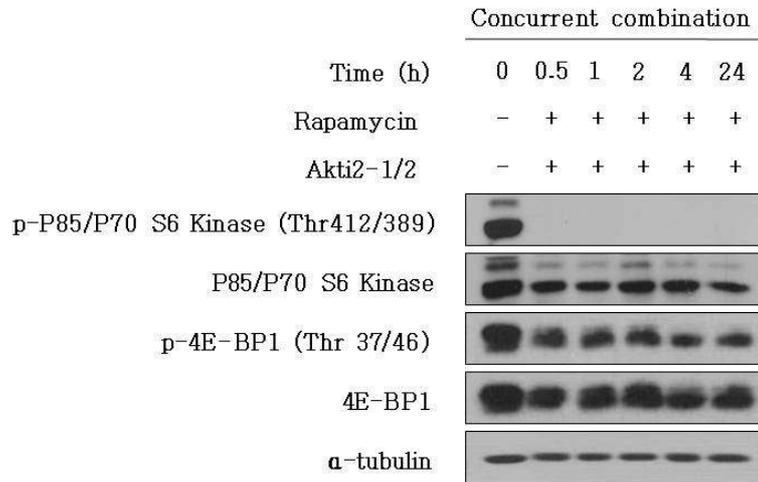


Figure 8. Combination effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the target proteins. HOS cells were treated Akti2-1/2 and rapamycin in combination with dose of ED₅₀ for the indicated time points. (A) Concurrent treatment to HOS cells. (B) Sequential treatment to HOS cells. Rapamycin was pre-treated for 30 min before the Akti2-1/2 treatment.

8. Akti2-1/2와 rapamycin의 병합요법에 따른 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 하위 단백질의 변화

Akti2-1/2와 rapamycin을 병합요법으로 처리하였을 때 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 하위 단백질들의 변화를 확인하고자 HOS 세포에 두 약제를 병합요법으로 처리한 후 시간에 따른 단백질의 변화를 western blot으로 확인하였다 (Figure 9). 병합요법은 ED₅₀의 농도로 두 약제를 동시에 처리하거나 (concurrent treatment) rapamycin을 30분 전처리한 후 Akti2-1/2를 처리하였다 (sequential treatment). Akti2-1/2와 rapamycin의 concurrent treatment와 sequential treatment 모두 30분 내의 짧은 시간에서 p85 S6 Kinase와 p70 S6 Kinase의 활성을 크게 억제했으며 발현도 조금 감소하였다. 또한, 4E-BP1의 발현과 활성도 시간 의존적으로 감소하였다. 그러나 concurrent treatment와 sequential treatment가 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 하위 단백질에 미치는 변화에는 그 차이점은 확인할 수 없었다.

A



B

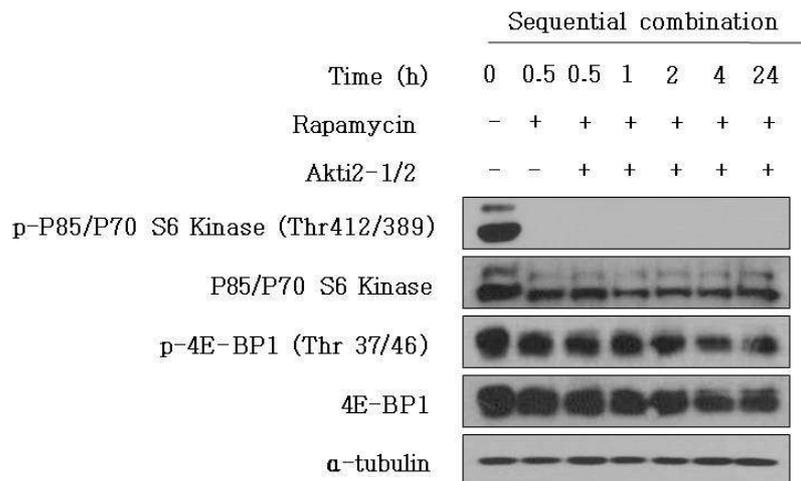


Figure 9. Combination effects of Akti2-1/2 and rapamycin in the downstream effectors of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. HOS cells were treated Akti2-1/2 and rapamycin in combination with dose of ED₅₀ for the indicated time points. (A) Concurrent treatment to HOS cells. (B) Sequential treatment to HOS cells. Rapamycin was pre-treated for 30 min before the Akti2-1/2 treatment.

9. Akti2-1/2와 rapamycin의 처리에 따른 cell cycle 변화

Akti2-1/2 와 rapamycin의 처리에 따른 cell cycle progression의 변화를 알아보려고 cell cycle analysis를 수행하였다 (Figure 10). HOS 세포의 각 약제를 단독으로 처리하거나 두 가지 병합요법으로 (concurrent treatment, sequential treatment) 24시간 처리하여 FACS를 통하여 cell cycle 변화를 확인하였다. 병합요법에는 Akti2-1/2에 대한 IC₅₀ 농도 (2.3 μM)와 0.01 μM rapamycin로 처리하였다. Akti2-1/2를 단독으로 처리하였을 때 대조군보다 G1 phase가 농도의존적으로 증가하였고 IC₅₀ 농도보다 낮은 농도에서는 S phase가 감소하고 M phase가 증가하였다 (Figure 10A). Rapamycin을 단독으로 처리하였을 때 10 μM의 높은 농도에서 G1 phase가 증가하고 S phase가 감소하였다 (Figure 10B). 하지만 낮은 농도에서 rapamycin에 의한 cell cycle 변화는 크게 나타나지 않았다. 두 약제를 병합하여 사용하였을 때 (Akti2-1/2 : Rapamycin = 2.3 μM : 0.1 μM) 각 약제의 단독 처리보다 G1 phase가 증가하였는데 이는 대조군과 비교했을 때, 약 8-10%의 증가를 했으며 G2-M phase가 크게 감소하였다 (Figure 10C). 따라서 Akti2-1/2에 저농도의 rapamycin과의 병합요법으로 cell cycle에 변화를 유도할 수 있음을 확인하였다. Concurrent treatment에서는 S phase가 조금 증가하였지만, sequential treatment에서는 S phase가 농도 의존적으로 감소하였다. 두 표적 치료제의 병합요법의 결과 각 약제의 단독 처리보다 cell cycle의 G1 arrest가 효과적으로 유도되었지만, 병합요법의 처리 방법에 따른 차이는 크게 보이지 않았다 (Figure 10C).

A

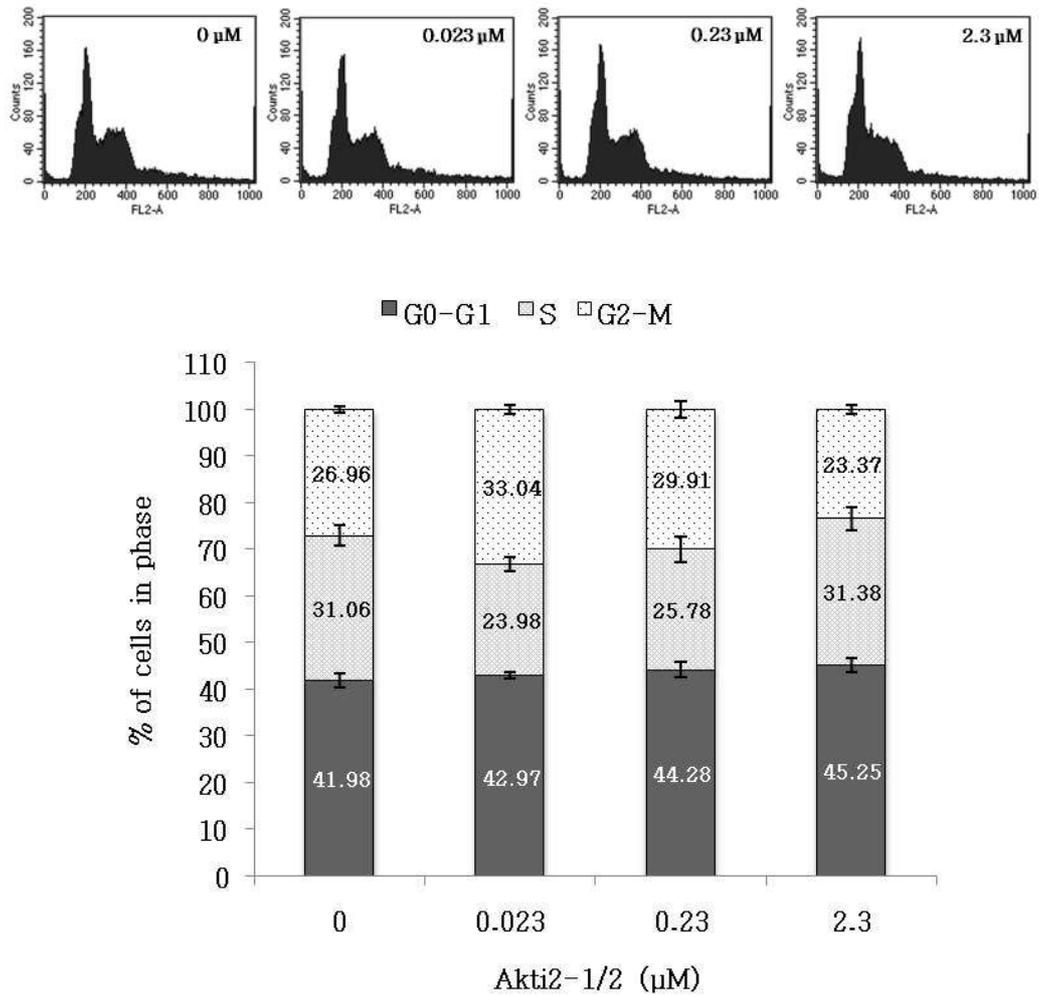


Figure 10. Effects of Akti2-1/2 and rapamycin on cell cycle HOS cells were treated Akti2-1/2 alone or combination of Akti2-1/2 and rapamycin with the indicated concentrations for 24 hours. In sequential treatment, rapamycin was pre-treated for 30 min before the Akti2-1/2 treatment. Cell quest software and Modfit LT were used for the cell cycle analysis.

B

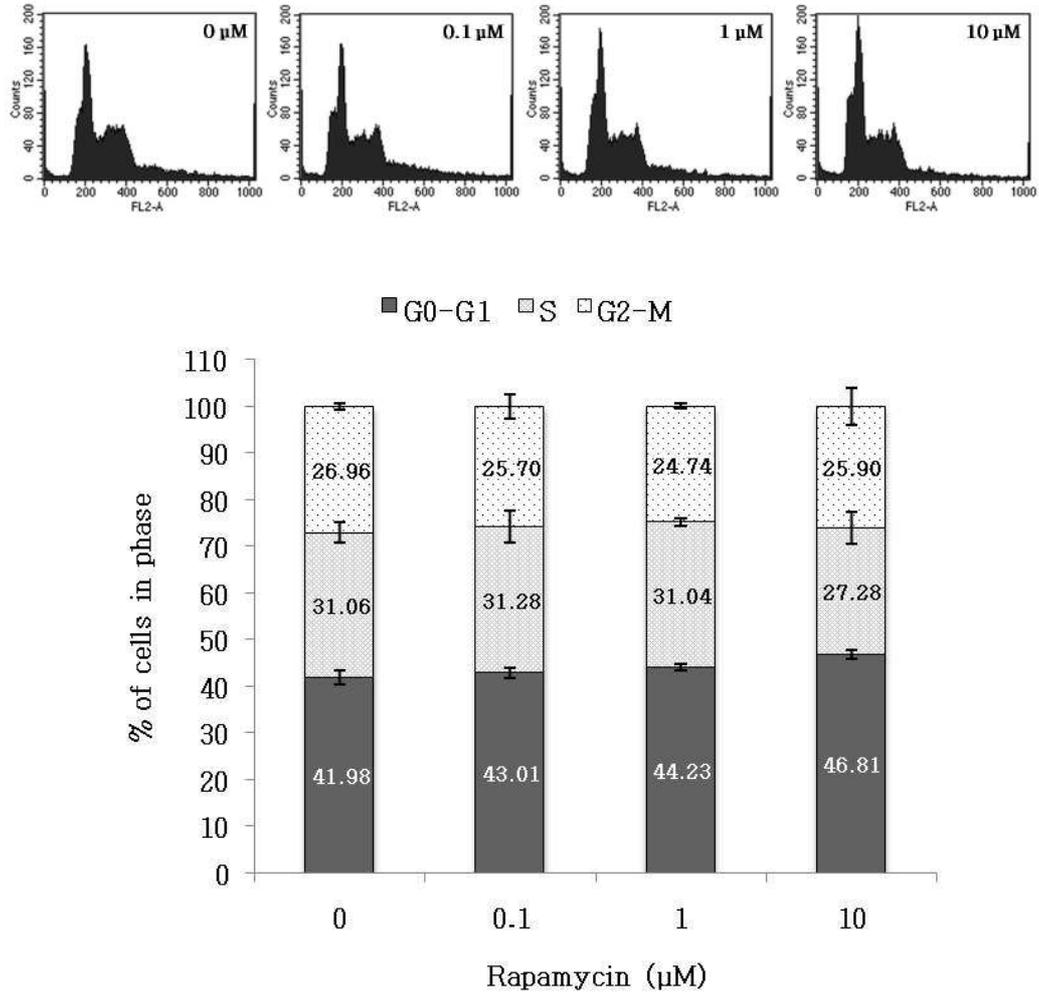


Figure 10. Continued.

C

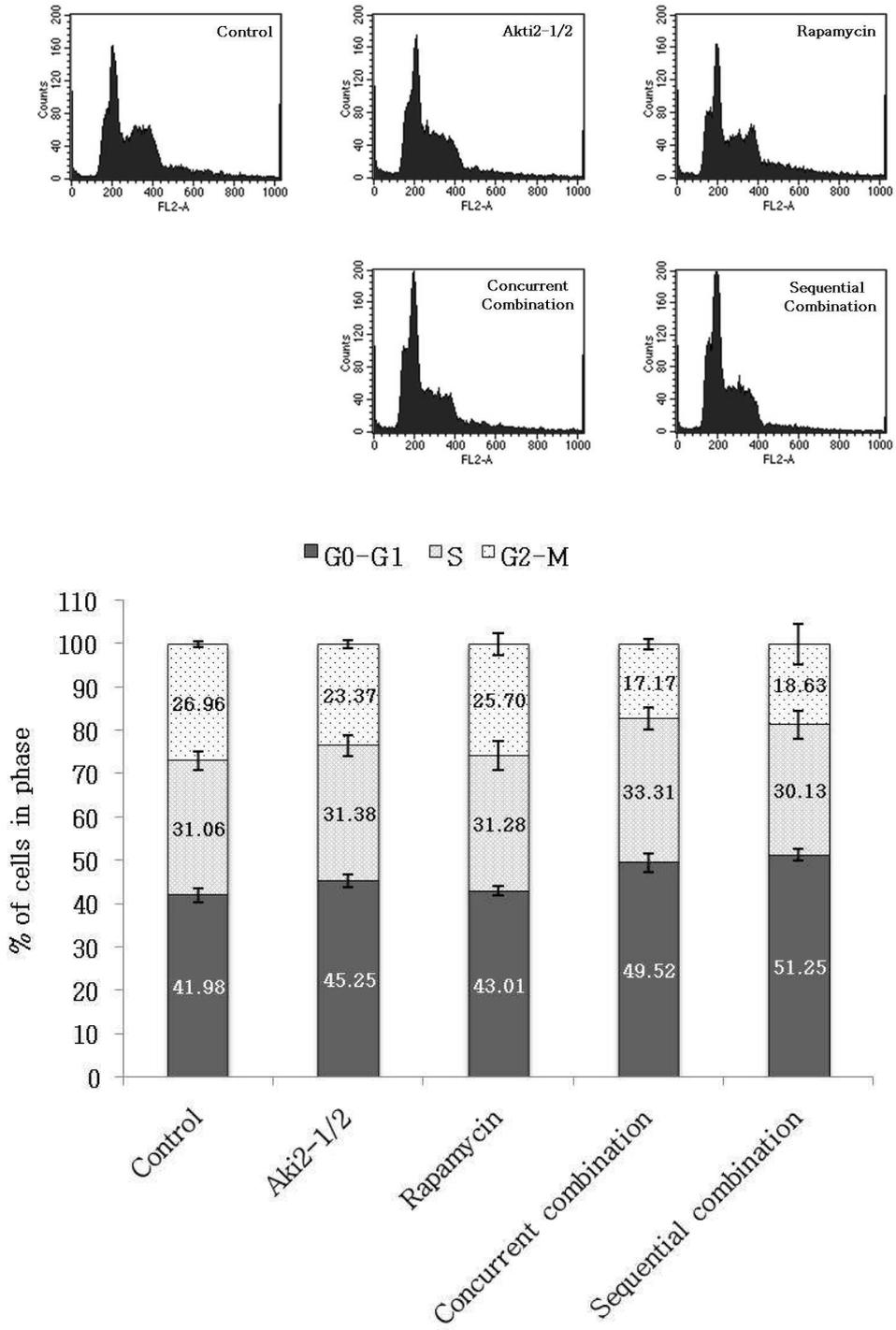


Figure 10. Continued.

IV. 고찰

골육종의 항종양 요법으로 다양한 방법이 시도되고 있으나 다른 종양에 비해 제한적이며 그 효과에도 한계가 있을 뿐 아니라 약제 내성에 따른 부작용이 큰 문제가 되고 있다^{3,5-9}. 따라서 골육종 환자에게 더욱 효과적인 치료 방법의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 골육종 세포주에서 세포 증식과 생존, apoptosis에 중요한 역할을 하는 단백질의 발현과 활성을 확인하였다 (Figure 2). 특히 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로는 골육종 세포주에서 활성화되어 있었으며 EGFR뿐 아니라 anti-apoptosis 경로에서 중요한 역할을 하는 ERK와 JNK가 대부분 활성화 되어 있었다. PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로가 골육종 환자들의 치료를 위한 가능성 있는 표적이 될 수 있는지 알아보기 위하여 Akt와 mTOR의 각각의 활성을 억제하는 두 표적치료제에 대한 민감도를 평가하였다 (Figure 3). 7개의 골육종 세포주에서 Akt 억제제인 Akti2-1/2에 대한 민감도는 세포주마다 다양한 경향성을 보였으며 IC₅₀는 1.01 - 4.72 μ M으로 나타났다 (Figure 3A). 그러나 rapamycin은 10 μ M의 높은 농도에서도 대부분의 세포주가 50% 이상의 생존율을 보였다 (Figure 3B). 두 표적치료제의 민감도는 각각의 표적 단백질의 발현이나 활성과 큰 연관성을 보이지 않았다. 하지만 골육종 세포주에서 활성화 되어 있는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 억제하는 표적치료제에 대한 가능성을 확인할 수 있었다. 두 표적치료제의 병합요법은 7개의 골육종 세포주에서 모두 상승효과가 있었으며 (Figure 4A) 단독으로 처리하였을 때보다 훨씬 낮은 농도의 조합으로도 골육종 세포의 생존을 효과적으로 억

제하였다 (Figure 4B). 따라서 병합요법은 저농도의 조합으로도 단독 처리에 따른 효과를 상승시켜 보다 효과적인 항종양 효과를 나타내는 방법임을 확인하였다.

Akt2-1/2는 매우 짧은 시간에 표적단백질인 Akt의 활성화뿐 아니라 mTOR의 활성을 동시에 감소시켰으며 (Figure 5) PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 하위 조절 단백질인 p85 S6 Kinase, p70 S6 Kinase와 4E-BP1의 활성을 조절하였다 (Figure 6). Rapamycin은 표적단백질인 mTOR를 농도 의존적으로 감소시켰으나 Akt의 활성을 증가시켰다 (Figure 5A). Rapamycin은 매우 짧은 시간에도 Akt를 활성화 시켰으며 이는 시간 의존적으로 감소하였다 (Figure 5B). Akt의 활성이 증가함에 따라 Akt의 발현이 감소하였으며 다시 시간의존적으로 증가하였다. Akt의 활성이 상대적으로 낮은 세포주인 KHOS/NP에서도 rapamycin을 처리하였을 때 Akt의 활성이 증가하였다 (Figure 5C). mTOR는 mTOR complex 1과 2 (mTORC1, mTORC2)로 이루어져 있는 kinase로 각각의 분자적 기능이 다른데^{21,22}, rapamycin은 FKBP12 (FK506 binding protein)와 mTORC1에 결합하여 mTOR의 활성을 억제하고 mTOR와 결합하고 있는 raptor의 상호작용을 약하게 하여 세포 생존과 성장에 영향을 준다³⁴⁻³⁶. 몇몇 암세포에서 rapamycin에 의해 mTORC1을 억제했을 때 Akt가 활성화되었으며 이러한 기전에 대해서는 아직 뚜렷하게 밝혀진 바가 없다³⁷. 하지만 rapamycin에 비민감성인 mTORC2가 rapamycin에 의해 활성화되어 다시 Akt를 활성화 시킬 수 있다는 몇몇 보고들이 있다^{21,37,38}. p85 S6 Kinase와 p70 S6 Kinase의 활성은 낮은 농도의 rapamycin으로도 효과적으로 감소하였

으며 4E-BP1은 그 활성과 발현이 함께 감소하였다 (Figure 6A).

PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로가 활성화 되어 있는 골육종 세포에서 rapamycin에 의해 유도된 Akt 활성화가 Akt2-1/2와의 병합요법으로 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 효과적으로 조절하여 항종양 효과가 증대될 것으로 기대하였다. 따라서 본 연구에서는 항종양 효과를 더욱 증대시키고자 병합요법을 약 처리 방법에 따라 비교하였다 (Figure 7). MTT assay를 통하여 세포 생존율을 비교하였을 때, 대조군과 단독 처리 군에 비해 두 병합요법 실험군 (concurrent treatment, sequential treatment) 의 세포 생존율이 유의하게 감소하였으며 rapamycin 전처리로 인해 Akt의 활성이 급격하게 증가하였을 때 Akt2-1/2를 처리하는 것 (sequential treatment) 이 더 효과적이었다 (Figure 7A). 병합요법에 사용된 두 약제의 농도는 각 약제의 단독 처리할 때 보다 훨씬 낮은 농도에서도 효과적으로 작용하였다. 세포 생존율뿐 아니라 암 세포가 성장하는데도 영향을 주는지 알아보려고 cell proliferation assay를 진행한 결과 두 병합요법 실험군이 현저하게 성장속도가 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 7B). 병합요법에 의한 PI3K-Akt- mTOR 신호전달 경로의 단백질은 단독 처리와 비교했을 때 훨씬 효과적으로 조절되었으며 특히 sequential treatment로 인한 Akt의 인산화가 상대적으로 낮게 증가하고 빨리 감소하였다. 하지만 Akt의 활성화는 많이 감소하지 않았다 (Figure 8-9) 이는 병합요법이 rapamycin으로 인해 인산화된 Akt의 감소에는 큰 효과를 주지 못했지만 Akt2-1/2와 rapamycin 두 약제가 병합요법으로 처리되었을 때 각각의 독립적인 메커니즘이 상승작용 하여 전체적인 세포의 생존과 성장에 영

향을 주어 효과적인 항종양 효과를 보이는 것으로 보인다.

Akt2-1/2과 rapamycin은 골육종 세포의 G1 arrest를 유도하였으며 낮은 농도에서 rapamycin의 효과는 미비하였다. (Figure 10A, B). 두 병합요법에서는 각 약제의 단독 처리에 비해 G1 arrest가 증가하였으나 약제 처리방법에 따른 cell cycle의 차이는 미비하였다 (Figure 10C).

이를 종합해 볼 때 본 연구에서는 골육종 세포주에서 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 활성화를 확인하였고 이 신호전달 경로를 억제할 수 있는 두 표적치료제의 효과를 확인하였다. 또한, 두 표적치료제의 저농도 병합요법으로 골육종 세포의 생존, 성장, cell cycle progression에 더 큰 영향을 미치며 항종양 효과를 극대화 시킬 수 있었으며 병합요법의 처리 방법에 따른 효과 증대를 확인하였다.

V. 결론

본 연구에서는 골육종 세포주에서 다양하게 발현하고 있는 단백질의 발현과 활성을 확인하여 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로가 골육종 치료에 가능성 있는 표적이 될 수 있음을 확인하였다.

또한, PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로를 억제하는 두 표적치료제 Akti2-1/2와 rapamycin이 골육종 세포의 신호전달 경로 내 단백질의 발현과 활성을 조절하여 세포의 생존, 성장과 cell progression에 영향을 미쳐 항 종양 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

항종양 효과를 증대시키기 위한 방법으로 병합요법을 실시하여 두 표적치료제의 저농도 조합으로 효과적인 항 종양 효과를 확인하였으며 이상적인 병합요법을 제시하였다.

VI. 참고문헌

1. Kim HJ, Chalmers PN, Morris CD. Pediatric osteogenic sarcoma. *Current opinion in pediatrics* 2010;22:61-6.
2. Fan D, Dai J, Tang J, Wu M, Sun S, Jiang J, et al. Silencing of calpain expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Cell biology international* 2009;33:1263-7.
3. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer treatment reviews* 2006;32:423-36.
4. Ek ET, Dass CR, Contreras KG, Choong PF. Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer gene therapy* 2007;14:616-26.
5. Ferrari S, Palmerini E. Adjuvant and neoadjuvant combination chemotherapy for osteogenic sarcoma. *Current opinion in oncology* 2007;19:341-6.
6. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The oncologist* 2004;9:422-41.
7. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *The New England journal of medicine* 1986;314:1600-6.

8. Eilber F, Giuliano A, Eckardt J, Patterson K, Moseley S, Goodnight J. Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a randomized prospective trial. *Journal of clinical oncology* 1987;5:21-6.
9. Goorin AM, Shuster JJ, Baker A, Horowitz ME, Meyer WH, Link MP. Changing pattern of pulmonary metastases with adjuvant chemotherapy in patients with osteosarcoma: results from the multiinstitutional osteosarcoma study. *Journal of clinical oncology* 1991;9:600-5.
10. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 2004;9:667-76.
11. Wan X, Helman LJ. The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *The oncologist* 2007;12:1007-18.
12. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-7.
13. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997;275:665-8.
14. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997;277:567-70.
15. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate

phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998;279:710-4.

16. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *Journal of biological chemistry* 2000;275:8271-4.

17. Huang BX, Kim H. Interdomain conformational changes in Akt activation revealed by chemical cross-linking and tandem mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics* 2006;5:1045-53.

18. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2002;2:489-501.

19. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* 2006;7:606-19.

20. Hill M, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* 2002;93:243-51.

21. Evangelisti C, Ricci F, Tazzari P, Tabellini G, Battistelli M, Falcieri E, et al. Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25:781-91.

22. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and

metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.

23. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 2006;25:6416-22.

24. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 2004;23:3172-9.

25. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004;23:3189-99.

26. Jiang H, Coleman J, Miskimins R, Miskimins WK. Expression of constitutively active 4EBP-1 enhances p27Kip1 expression and inhibits proliferation of MCF7 breast cancer cells. *Cancer cell international* 2003;3:2-.

27. Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M, Perlman DM, et al. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer cell* 2004;5:553-63.

28. Polunovsky VA, Gingras AC, Sonenberg N, Peterson M, Tan A, Rubins JB, et al. Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *Journal of biological chemistry* 2000;275:24776-80.

29. Herbert TP, Fhraeus R, Prescott A, Lane DP, Proud CG. Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E. *Current biology* 2000;10:793-6.

30. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006;25:6436-46.
31. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* 2005;4:988-1004.
32. Jin S, Pang R, Shen J, Huang G, Wang J, Zhou J. Grifolin induces apoptosis via inhibition of PI3K/AKT signalling pathway in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* 2007;12:1317-26.
33. Gazitt Y, Kolaparthi V, Moncada K, Thomas C, Freeman J. Targeted therapy of human osteosarcoma with 17AAG or rapamycin: characterization of induced apoptosis and inhibition of mTOR and Akt/MAPK/Wnt pathways. *International journal of oncology* 2009;34:551-61.
34. Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ. Characterization of the FKBP.rapamycin.FRB ternary complex. *Journal of the American Chemical Society* 2005;127:4715-21.
35. Leone M, Crowell KJ, Chen J, Jung D, Chiang G, Sareth S, et al. The FRB domain of mTOR: NMR solution structure and inhibitor design. *Biochemistry* 2006;45:10294-302.
36. Kim D, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek R, Erdjument Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive

complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163–75.

37. Werzowa J, Cejka D, Fuereder T, Dekrout B, Thallinger C, Pehamberger H, et al. Suppression of mTOR complex 2-dependent AKT phosphorylation in melanoma cells by combined treatment with rapamycin and LY294002. *British journal of dermatology* 2009;160:955–64.

38. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor–mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006;127:125–37.

ABSTRACT

The anti-tumor effect of targeted agents in osteosarcoma

Bo Ram Kwon

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sun Young Rha)

Osteosarcoma (OS) is the most common malignant bone cancer found in adolescents and young adults. OS is characterized by local invasion and distant metastasis. Treatment methods for OS have seen significantly advanced. With the use of multi-agent chemotherapy, there have been improvements in the overall survival. However, chemotherapy has been limited to OS patients and drug resistance still remains a problem resulting in poor outcome. Currently, targeted agents are being evaluated as a novel method for various cancers, but the efficacy of the agents in OS is not well known.

Here we report the activation of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in OS and efficacy of inhibitors of targeting Akt-mTOR signaling pathway. By using western blot protein profiles in PI3K-Akt-mTOR signaling pathway were established in seven OS cell lines (MG-63, HOS, KHOS/NP, SK-ES-1, U-2 OS, Saos-2, and G-292). High levels of the Akt were observed in all the cell lines, but the activation status of Akt varied. All the cell lines similarly expressed moderate levels of mTOR and all cell lines except G-292 observed activation of mTOR. Down-stream effector molecules of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway were observed moderate protein levels and activation status. To assess the feasibility and anti-tumor efficacy of targeted agents for Akt and mTOR in OS cells, Akti2-1/2 (Akt inhibitor) and rapamycin (mTOR inhibitor) were evaluated in OS cell lines using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Although the activation status of Akt in OS cell lines differed, Most of cell lines had moderate IC₅₀ values for Akti2-1/2 (from 1.01 to 2.49uM) except U-2 OS (4.72uM). Rapamycin inhibited cell growth showing similar patterns in sensitivity. However, Rapamycin induced activation of Akt. There were no significant correlation between target proteins and inhibitors. The sensitivity of inhibitors seemed to be related to multiple proteins in survival signaling pathway.

In combination of two targeted agents, there were observed significant inhibition of cell survival in low doses. To compare the efficacy of concurrent combination and sequential combination, MTT assay, cell proliferation assay and cell cycle assay were assessed. The anti-tumor efficacy was significantly increased in sequential combination which treated Akti2-1/2 when Akt was activated by rapamycin.

In this study, we presented OS had various protein levels in PI3K-Akt-mTOR signaling pathway and feasibility in application of targeted agents for Akt and mTOR. These targeted agents could be applicable in osteosarcoma by blocking the survival signaling pathway with single or combination treatment. We suggest more an effective regimen of combination targeting PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in osteosarcoma.

Key Words: Osteosarcoma, Akt, mTOR, Akti2-1/2, rapamycin