

담도암 암줄기세포의  
생체표지자로서 TAGLN2 의  
동정 및 특성 분석

연세대학교 대학원  
의 학 과  
박 병 규

담도암 암줄기세포의  
생체표지자로서 TAGLN2 의  
동정 및 특성 분석

지도교수 송 시 영

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2012 년 12 월

연세대학교 대학원  
의 학 과  
박 병 규

# 박병규의 박사학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2012 년 12 월

## 감사의 글

박사과정 연구를 진행하며 여러 번의 시행착오 끝에 연구를 마치게 되었습니다. 그간 많은 분들로부터 영원히 잊지 못할 도움을 받았습니다. 본 논문이 완성되도록 많은 관심과 격려를 아끼지 않으셨던 지도 교수님이신 송시영 교수님께 깊은 감사의 인사를 드립니다. 논문의 기획에서부터 논문의 마무리까지 본 연구에 가장 큰 도움을 주셨고 이 논문이 완성될 수 있도록 저에게 커다란 힘이 되어 주셨습니다. 그리고 좋은 논문의 작성을 위해 귀한 시간을 내주시고 조언을 해주신 이우정, 박영년, 김용태 그리고 오승환 교수님께도 감사를 드립니다. 연구의 실험과 데이터 정리에 큰 역할을 해주신 박수빈 선생님께도 특별한 감사의 마음을 전합니다.

항상 사랑으로 이끌어 주시는 부모님, 장인장모님, 제게 가장 소중한 두 딸 지민, 서영이 그리고 끊임없는 사랑으로 저에게 힘이 되어준 아내 혜원에게 이 논문을 드립니다.

저자 씀

## <차례>

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 국문 요약 .....                               | 1  |
| I. 서론 .....                               | 3  |
| II. 재료 및 방법 .....                         | 7  |
| 1. Sphere 배양 .....                        | 7  |
| 2. 유세포 분석 .....                           | 7  |
| 3. 군락형성 분석 .....                          | 8  |
| 4. 생체내 암화과정 .....                         | 8  |
| 5. 줄기세포 관련 유전자의 RT-PCR .....              | 9  |
| 6. cDNA microarray 분석 .....               | 10 |
| 7. TAGLN2의 RT-PCR .....                   | 12 |
| 8. TAGLN2의 western blot .....             | 12 |
| 9. TAGLN2의 면역조직화학염색 .....                 | 13 |
| 10. TAGLN2 억제 하에서 sphere 배양 .....         | 14 |
| 11. TAGLN2 siRNA의 형질주입 .....              | 14 |
| 12. 암세포 전이분석 .....                        | 14 |
| 13. Gemcitabine에 대한 항암제 감수성 검사 .....      | 15 |
| 14. c-Met와 관련 유전자의 western blot .....     | 15 |
| 15. 통계 .....                              | 16 |
| III. 결과 .....                             | 17 |
| 1. 담도암 세포에서 sphere 배양 .....               | 17 |
| 2. 유세포 분석을 통한 암줄기세포 표지자의 발현 .....         | 18 |
| 3. Tumorsphere 세포에서 집락형성 능력 증가 .....      | 20 |
| 4. Tumorsphere 세포의 생체내 암화능력 .....         | 21 |
| 5. Tumorsphere 세포에서 줄기세포 관련 유전자 발현 .....  | 22 |
| 6. cDNA microarray를 통한 tumorsphere와 담도암에서 |    |

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 특이적으로 발현하는 유전자 발굴 .....                          | 24 |
| 7. 담도암 세포와 tumorsphere에서 TAGLN2 유전자 발현 ....      | 26 |
| 8. TAGLN2 억제 시 담도암 세포에서 sphere 형성 억제 .....       | 27 |
| 9. 담도암 조직에서 TAGLN2의 발현 .....                     | 28 |
| 10. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA의 형질주입 후 특성 분석 ·         | 31 |
| 가. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA의 형질주입 확인.....            | 31 |
| 나. 전이능력 및 항암제 감수성 .....                          | 32 |
| 다. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 유전자 발현<br>분석 ..... | 34 |
| IV. 고찰 .....                                     | 36 |
| V. 결론 .....                                      | 42 |
| 참고문헌 .....                                       | 43 |
| ABSTRACT.....                                    | 49 |

## 그림 차례

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 그림 1. 담도암 세포에서 sphere 배양.....                                     | 17 |
| 그림 2. 담도암 세포의 암줄기세포 표지자 발현 ....                                   | 19 |
| 그림 3. Tumorsphere 세포의 집락형성 분석 .....                               | 20 |
| 그림 4. Tumorsphere 세포의 생체내 암화능력.....                               | 22 |
| 그림 5. Tumorsphere 세포에서 줄기세포 관련 유전자<br>발현 .....                    | 24 |
| 그림 6. cDNA microarray 분석.....                                     | 25 |
| 그림 7. 담도암 세포에서 TAGLN2의 발현.....                                    | 27 |
| 그림 8. Tumorsphere에서 TAGLN2 단백질의 발현.....                           | 27 |
| 그림 9. TAGLN2 억제 시 담도암 세포에서 sphere 형성<br>억제 .....                  | 28 |
| 그림 10. 담도암 조직에서 TAGLN2 면역조직화학 염색<br>.....                         | 29 |
| 그림 11. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA형질주입 후<br>TAGLN2의 mRNA와 단백질 발현 억제..... | 31 |
| 그림 12. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 전이<br>능력 분석.....                | 32 |
| 그림 13. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의                                 |    |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| gemcitabine 에 대한 항암제 감수성 .....                         | 33 |
| 그림 14. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의<br>유전자 단백 발현 분석..... | 35 |

## 표 차례

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 표 1. RT-PCR에 이용된 줄기세포 관련 유전자의 시발체<br>.....          | 10 |
| 표 2. TAGLN2 유전자의 시발체.....                           | 12 |
| 표 3. Tumorsphere와 담도암에서 공통적으로 발현 이<br>증가된 유전자 ..... | 26 |
| 표 4. 임상병리적 인자에 따른 TAGLN2의 발현 .....                  | 30 |



## 국문요약

### 담도암 암줄기세포의 생체표지자로서 TAGLN2의 동정 및 특성 분석

**배경:** 암줄기세포는 종양내의 소수로 존재하며 암의 발생, 진행 그리고 재발에서 중요한 역할을 하며, 자가재생력, 항암제내성, 암화능력을 특징적으로 가지고 있다고 알려져 있다. 여러 고형암에서 암줄기세포가 존재하며 그 역할이 조금씩 밝혀지고 있으나 현재까지 담도암의 암줄기세포에 대한 연구는 매우 미약한 실정이다.

**목적:** 본 연구에서는 담도암 세포주에서 sphere 배양법을 이용하여 암줄기세포의 존재를 입증하고, tumorsphere 와 담도암의 cDNA microarray를 통하여 암줄기세포와 관련된 생체표지자를 동정한 후 담도암의 암화과정에서 새로운 생체표지자의 역할과 특성을 알아보하고자 하였다.

**방법:** 담도암 세포주 (SNU245, SNU1196)를 sphere 배양조건에서 배양하였다. 배양된 tumorsphere에서 암줄기세포의 특성을 확인하기 위해 집락형성 분석과 마우스에서 생체내 종양형성 실험을 시행하였고, tumorsphere에서 줄기세포 관련 유전자 발현을 알아보았다. cDNA microarray를 이용하여 tumorsphere 와 담도암 조직에서 공통적으로 증가된 새로운 유전자 군을 획득하였다. 이중 선택된 유전자의 담도암 암화과정에서 역할을 알아보기 위해 담도암 조직에서 면역조직화학염색과 유전자 억제 후 전이능력 및 항암제 감수성 검사를 시행하였으며

유전자 분석을 통하여 연관된 신호전달체계를 알아보았다.

**결과:** Sphere 배양법을 이용하여 담도암 세포를 배양한 결과, 자가재생에 의해 tumorsphere가 형성되었다. Tumorsphere 세포는 집락형성 능력이 증가되어 있으며 생체내 종양형성 능력이 높게 나타났다. 또한 줄기세포와 관련된 유전자 발현이 tumorsphere 세포에서 증가되어 있어 tumorsphere는 암줄기 세포의 특성을 포함하고 있었다. cDNA microarray를 이용하여 tumorsphere와 담도암 조직에서 공통적으로 증가한 61개의 유전자 군을 획득하였으며 이중 transgelin-2 (TAGLN2)를 후보 유전자로 선택하였다. TAGLN2는 담도암 조직과 tumorsphere에서 발현이 증가되었다. TAGLN2의 억제 시에 암세포 전이가 감소하며 gemcitabine에 대한 항암제 내성이 감소하였다. 또한 c-Met 유전자 발현이 뚜렷이 감소하였으며 c-Met의 하위 신호전달체계도 함께 억제되었다.

**결론:** 본 연구를 통하여 담도암의 암줄기세포 동정은 담도암의 암화과정에 대한 새로운 이해와 치료법을 제시할 수 있음을 보여주었다. 담도암 세포주에서 형성된 tumorsphere는 암줄기세포의 특성을 가지고 있었고, 담도암 암줄기세포의 유전자 분석을 통하여 동정한 TAGLN2는 담도암의 암화과정에서 중요한 역할을 하며 c-Met 신호전달체계와 연관되어 있었다. 따라서 TAGLN2는 암줄기세포와 관련된 신규 유전자로서 담도암 치료의 새로운 생체표지자로 기대되며 이에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

-----  
핵심되는 말 : 암줄기세포, 담도암, TAGLN2, c-Met

# 담도암 암줄기세포의 생체표지자로서

## TAGLN2 의 동정 및 특성 분석

<지도교수 송 시 영>

연세대학교 대학원 의학과

박 병 규

### I . 서론

담도암(biliary tract cancer)은 전체 종양의 1-2%를 차지하는 비교적 드문 종양이나<sup>1</sup>, 국내의 경우 서구에 비하여 발생이 비교적 높아 전체 종양 중 약 4%를 차지한다<sup>2</sup>. 담도암은 담도 상피세포에서 기원하는 종양으로 해부학적인 위치에 따라 간내담관암, 간외담관암으로 나뉜다. 담도암은 근치적 절제술만이 완치를 기대할 수 유일한 치료법이다. 그러나 80% 이상의 환자는 진단 당시에 수술이 불가능한 상태에서 발견되며, 근치적 수술이 가능한 환자도 50-80%에서 국소 재발과 원격전이가 흔하기 때문에 5 년 이상 생존율은 5% 이하로 예후는 매우 불량하다<sup>3</sup>. 항암화학요법과 방사선 치료가 시도되고 있지만 현재까지는 뚜렷하게 환자의 생존율을 높이는 데에는 기여하지 못하고 있다. 또한 담도암의 명확한 위험군이나 조기에 발견할 수 있는 방법은 알려져 있지 않고, 담도암

발암과정에 대한 많은 연구가 진행되어 분자생물학적인 단계에서 종양의 발생에 관여하는 여러 인자에 대해 알려진 바가 있으나 담도암의 발암과정이 명확히 밝혀지지 않았다<sup>4</sup>.

최근 들어 줄기세포 연구가 활발히 진행되면서 새로이 암줄기세포(cancer stem cell)란 개념이 도입되었다. 정상 줄기세포가 다양한 생체 조직에 존재하며 각 장기를 보존하기 위해 끊임없이 분열과 분화과정을 지속적으로 하는 것과 마찬가지로, 자가복제, 다양한 표현형으로 분화, 그리고 지속적 증식의 줄기세포 특징을 갖는 암줄기세포가 종양 내에 존재하여 암의 발생에서 매우 중요한 역할을 한다는 것이다<sup>5-7</sup>. 암줄기세포는 정상 줄기세포의 돌연변이 등과 같은 복잡한 과정을 거쳐 발생하는 것으로 이해되고 있으며 암의 발생과정뿐 아니라 종양의 이질성, 악성화 정도, 항암치료에 대한 내성, 종양의 재발 등에 중요한 역할을 한다. 종양의 악성화 정도는 암줄기세포를 얼마나 포함하고 있느냐에 따라 다른데 암줄기세포를 많이 포함하고 있는 암이 악성화가 더 심하다고 알려졌다<sup>8</sup>. 항암치료의 관점에서 보면 기존의 항암치료로 많은 종양들이 초기에는 크기가 감소하나 결국에는 내성을 획득하여 재발과 전이를 하며 지속적으로 성장하여 치료의 효과가 없어지게 된다. 이는 항암치료가 빠르게 분화하는 종양세포를 표적으로 하고 있으나 약제에 내성을 갖고 있는 암줄기세포를 제거하지 못하기 때문이다. 또한 종양의 재발도 남아 있던 암줄기세포가 분화하면서 일어나는 현상이다. 따라서 소수의 암줄기세포를 표적으로 해야 만족할 만한 암치료 효과를 기대할 수 있으며 암줄기세포를 표적으로 하는 치료법의 개발은 암의 근치적 치료를 위해 필요하다<sup>9, 10</sup>.

고형암에서 암줄기세포가 존재한다는 것을 밝히기는 몇 가지 어려움이 있다. 고형암내의 세포는 얻기가 어려우며, 조직에 있는

정상 줄기세포를 발견하고 검출해내는 기능적 검증법이 아직은 초기단계에 있기 때문이다. 따라서 암줄기세포를 분리하기 위한 세포표면 표지자 (cell surface marker)에 대한 연구가 최근 진행 중이며 여러 암에서 밝혀진 바가 있다. 2003년에 Al-Hajj 등은 표현형으로 뚜렷한  $CD44^+CD24^-$ epithelial specific antigen (ESA)<sup>+</sup> tumor-initiating cell을 NOD/SCID mice에 주입 후 전이성 유방암이 증식하는 것을 보고하여 암줄기세포의 존재를 제시하였다<sup>11</sup>. Singh 등은 소아 neuroblastoma와 astrocytoma에서 분리한 neural stem cell antigen  $CD133^+$  세포가 암줄기세포이며 이 세포들은 실험실 환경에서 neurosphere를 형성하고 NOD/SCID에 주입 시에 종양을 형성하고 자가복제, 분화와 같은 정상 줄기세포와 같은 특징을 가지고 있다고 하였다<sup>12</sup>. 이후 유방암<sup>13</sup>, 췌장암<sup>14, 15</sup>, 폐암<sup>16</sup>, 간암<sup>17</sup>, 전립선암<sup>18, 19</sup> 및 대장암<sup>20</sup> 등 다양한 고형암에서 암줄기세포의 특성으로 간주될 수 있는 표지자들이 발표되고 있다. 담도암의 경우 최근에 간외담도암에서는  $CD24^+CD44^+EpCAM^{high}$  세포가 암줄기세포의 특성을 나타낸다고 보고되었고<sup>21</sup>, 담낭암에서는  $CD44^+CD133^+$ 가 암줄기세포의 표지자라고 보고되었지만<sup>22</sup>, 다른 종양에 비해 암줄기세포에 대해 밝혀진 바가 거의 없다.

종양 조직은 정상 줄기세포와 암줄기세포를 함께 포함하고 있어 종양 조직에서 암줄기세포를 분리하는 것은 어렵다. 반면에 암 세포주에는 정상 줄기세포가 없고 암줄기세포만을 포함하고 있어 암줄기세포 연구에 좋은 연구법이 되고 있다<sup>23</sup>. 암줄기세포를 분리하기 위해서는 종양 특이적인 세포 표면 표지자를 바탕으로 하여 FACS 나 MACS 를 이용하여 분리하는 법이 있으며, ATP-binding cassette membrane 을 통한 Hoechst 33342 dye efflux 특성을 이용하여 side population fraction 으로 암세포에서 암줄기세포를 분리할 수

있다. 또한 특수한 배양조건에서 암줄기세포가 sphere 를 형성하는 특징을 이용하여 암줄기세포를 동정할 수 있다<sup>23</sup>. Sphere 배양법은 다양한 조직에서 체세포 줄기세포와 암줄기세포를 분리하여 증식시키는 데에 많이 이용되는 방법이다<sup>24-27</sup>.

본 연구에서는 담도암 세포주에서 암줄기세포를 동정하기 위하여 sphere 배양법으로 형성된 tumorsphere 에서 이들 세포의 자가재생, 분화능력과 생체내 종양형성능력을 입증하고 줄기세포 유전자의 발현을 확인하여 암줄기세포의 존재와 특징을 규명하고자 하였다. 다음 단계로 입증된 암줄기세포에서 cDNA microarray 법을 이용한 유전자 분석을 통해 담도암 암줄기세포의 가능성 있는 새로운 생체표지자(biomarker)를 동정하고 특성을 분석하여 담도암 발암과정의 이해와 치료법 개발에 기여하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Sphere 배양

인체 담도암 세포주인 SNU245 (common bile duct cancer), SNU478 (ampulla of Vater cancer), SNU869 (ampulla of Vater cancer), SNU308 (gallbladder cancer), SNU1196 (hilar cancer), SNU1079 (intrahepatic cancer)를 한국 세포주 은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. Sphere 배양을 위하여 각 세포주들은 1000 cells/ml 로 ultra low attachment surface 로 코팅된 6 well plat(Corning Inc, Tewksbury, MA, USA)에 sphere 배지와 함께 배양하였다. Sphere 배지는 serum free media 에 10 ng/ml EGF(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA), 10 ng/ml bFGF(R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA.), ITS (insulin transferring selenium)(Invitrogen Gibco, Grand Island, NY, USA), 그리고 0.5% BSA(Invitrogen Gibco, Grand Island, NY, USA) 를 첨가하여 사용하였다. Sphere 배지는 새 것으로 3 일마다 교환하며 7-10 일 동안 배양하였고, 같은 배양액으로 배양접시에 부착시켜 집합(adherent) 상태에서 키운 세포를 대조군으로 하였다.

### 2. 유세포 분석

SNU245 및 SNU1196에 accutase (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 동일한 수의 단일세포 현탁액을 제조하였다. 그 다음 기존에 암줄기세포 표지자로 알려진 항체인 PE-CD24(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA), APC-CD44(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA), FITC-ESA(BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA) 및 PE-CD133(BD

Biosciences PharMingen, San Diego, CA, USA)등으로 염색하였다. 같은 제조사의 anti-mouse IgG isotype을 대조군으로 사용하였다. 유세포 분석은 BD LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 실시하였으며, BD FACSDiva software(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 통하여 분석하였다.

### 3. 군락형성 분석

반고형 한천 군락형성 분석(soft agar colony forming assay)은 표준 프로토콜을 변형하여 수행하였다<sup>28</sup>. Difco agar noble(Becton, Dickinson company, Sparks, MD, USA)을 사용하였으며, sphere 배양액과 1:1의 비율로 0.6%의 하층 아가를 24 well plat에 넣은 후 실온에서 고체화하였다. SNU245 및 SNU1196으로부터 배양된 접착세포와 tumorsphere 세포를 0.25% trypsin EDTA (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)로 처리하여 동일한 수의 단일 세포 현탁액을 제조하였다. Sphere 배양액에 현탁 시킨 접착세포 및 tumorsphere 세포와 아가를 혼합시켜 0.3%의 상층 아가를 만들어서 하층 아가 위에 분주하였다. 성장인자가 포함된 sphere 배양액은 2-3일마다 교체하였다. 2-3주간 37℃ CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양한 후 crystal-violet 용액으로 염색하였고 세포 군집을 세어 자가재생 및 비부착증식(anchorage independent growth)을 비교 분석하였다.

### 4. 생체내 암화과정

6 주령의 암컷 nude mice 2 마리를 Orientbio(Seoul, Korea)에서 구입하여 무균상태에서 사육하였다. SNU1196 으로부터 배양된 접착세포와 tumorsphere 세포를 분리하여 동일한 세포 수(1,000 세포)를 200  $\mu$ l HBSS에 담아 23 gauge 로 2마리의 mice의 복부측면의



피하조직에 각각 주입하였다. 종양의 형성여부를 매주 관찰하고, mice 는 12 주째에 희생시켜, 장경 x 단경  $\times 0.5$  계산법으로 종양의 크기를 측정하고 4% PFA 에 고정하고 조직학적 검사를 시행하였다.

## 5. 줄기세포 관련 유전자의 RT-PCR

Tumorsphere 가 자가재생, 분화와 증식에 관여하는 유전자를 발현하여 줄기세포의 특징을 가지고 있는지를 알아보기 위해 암의 발생과 분화에 관여하는 것으로 알려진 대표적인 줄기세포 관련 유전자 (stemness gene)에 대해 RT-PCR 시행하였다. 이들 유전자로는 Notch, Hedgehog, Wnt/ $\beta$ -catenin, Oct3/4 신호전달체계의 유전자들이다. RT-PCR 은 RNeasy Mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 접착세포와 tumorsphere 에서 총 RNA 를 추출 한 후, Superscript II(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)의 반응을 통하여 42℃에서 한 시간 동안 추출된 각각의 RNA 2  $\mu$ g 을 first-strand cDNA synthesis system 을 이용하여 역전사시켰다. 확인하고자 하는 유전자는 Taq DNA polymerase 를 이용하여 증폭하여 발현을 분석하였다. 줄기세포 관련 유전자들의 시발체(primer)는 표 1 에 나타내었다.

표 1. RT-PCR 에 이용된 줄기세포 관련 유전자의 시발체

| Gene             | Forward primer(5' -3' )                    | Reverse primer(5' - 3' )                   |
|------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Notch3           | ATGGTGGGAATAAACACAGCT                      | ATGACCCCTGGAGGAAGCACA                      |
| Hes1             | GTGCTGTCTGGATGCGGAGT                       | GAACACTCACACTCAAAGCCC                      |
| Ihh              | CCTGAACTCGCTGGCTATCT                       | AATACACCCAGTCAAAGCCG                       |
| Gli1             | AGAGTCCAGGGGTTACATA                        | AGAGTCCAGGGGTTACATA                        |
| Nanog            | ACTGTCTCTCCTCTTCCTTCCT                     | AGAGTAAAGGCTGGGGTAGGTA                     |
| Oct4             | GTGGAGGAAGCTGACAACAA                       | AGCAGCCTCAAATCCTCTC                        |
| PTEN             | GGACGAACTGGTGAATGAT                        | CAGACCACAACTGAGGATT                        |
| FZD7             | CCAACGGCCTGATGTACTTT                       | GCCATGCCGAAGAAGTAGAG                       |
| $\beta$ -catenin | GTATGAGTGGGAACAGGGATTT                     | CCTGGTCCTCGTCATTTAGC                       |
| C-met            | CAATGTGAGATGTCTCCAGC                       | CCTGTAGATTGCAGGCAGA                        |
| Snail            | AAGCTTCCATGGCGCGCTCTTTCCTCGTCAGG<br>AAGCCC | GGATCCTCAGCGGGACATCCTGAGCAGCCGGACTC<br>TTG |
| Vimentin         | GAGAACTTTGCCGTTGAAGC                       | GCTTCCTGTAGGTGGCAATC                       |
| CD90             | GACCCGTGAGACAAAGAAGC                       | ACTGTGACGTTCTGGGAGGA                       |
| CEACAM1          | ATACCTGCCACGCCAATAAC                       | TTATGCTGAGGGTGGTGTG                        |
| $\beta$ -actin   | GGCATCCTCACCTGAAGTA                        | GGGGTGTGAAGGTCTCAAA                        |

## 6. cDNA microarray 분석

대조군인 접착세포에 비해 tumorsphere에서 발현이 증가된 유전자 군을 획득하기 위해 cDNA microarray를 시행하였다. 담도암 세포주의 접착세포와 tumorsphere 세포에서 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출하고 RNA의 quality는 A260/A280 ratio와 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. Microarray 실험 절차는 제조사 프로토콜에 따라 시행하였다. 디지털 제노믹스(Seoul, Korea)에서 cDNA microarray 분석을 수행하였다. 간략히 정리하면, 각각의 총 RNA 6  $\mu$ g 분량을 사용하여 double-stranded cDNA를 준비하고 biotin-labelling(IVT labeling

kit) (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)을 하여 증폭하였다. 상기 표지된 cDNA를 조각내어 Affymetrix GeneChip Human Genome U133 플러스 2.0 고농도 oligonucleotide array(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)에 혼성화시켰다. 그 다음 microarray를 Affymetrix Genechip Fluidics station 450로 세척하고, Genechip array scanner 3000 7G(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 스캔하였다. Affymetrix 발현 Console software version 1.1을 사용하여 발현 데이터를 생성시키고, 이를 MAS5 알고리즘 표준화하였다. 적어도 하나의 샘플 군 내 50%가 넘는 샘플에서 MAS5 탐지 call에 의할 때 present call이 아닌 probe set는 걸러내었다. 두 그룹 간에 다르게 발현하는 유전자를 결정하기 위하여 MASS 발현 값에 대하여 짝지은 t-test를 수행하였고, 1.2배가 넘는 차이를 보이는 유전자를 고려하였다. 모든 개별적인 칩 분석은 독립적인 총 RNA 샘플에 대하여 2회 반복 수행하였다. 본 실험실에서는 인체 담낭암 조직 5예와 정상 담낭의 상피조직 5예에서 Affymetrix사의 Human Genome GeneChip U133을 이용하여 22,000 유전자에 대한 microarray hybridization을 시행한 자료를 보유하고 있었다. 이 자료를 이용하여 인체 담낭암에서 정상 담낭상피조직보다 유전자 발현이 2배 이상 차이가 나고  $p$  값이 0.01 이하이며, 발생(development)에 연관된 유전자로서 세포막에 위치하고 분비형의 특징을 갖은 유전자 군을 선별하였다. 이 유전자 군과 본 실험의 microarray 결과를 통합 분석하여 SNU245 및 SNU 1196의 tumorsphere와 인체 담낭암에서 공통적으로 발현이 증가된 유전자 군을 최종적으로 도출하였으며, 이 중에서 transgelin 2 (TAGLN2) 유전자를 가능성 있는 후보 생체표지자로 선택하여 후속 실험을 진행하였다.

## 7. TAGLN2의 RT-PCR

RNeasy Mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 총 6개의 담도암 세포주(SNU245, SNU308, SNU478, SNU869, SNU1079 및 SNU1196)로부터 총 RNA를 추출하였다. 앞에서 기술한 같은 방법으로 6개의 담도암 세포주에서 TAGLN2 에 대한 RT-PCR을 시행하였으며, Beta-actin 유전자의 발현을 대조군으로 하였다. TAGLN2 유전자의 시발체 염기 서열은 표 2에 나타내었다.

표 2. TAGLN2 유전자의 시발체

| Gene   | Forward primer(5' -3') | Reverse primer(5' - 3') |
|--------|------------------------|-------------------------|
| TAGLN2 | TATGGCATTAAACACCACTGA  | GGATTCTCCTTGGATTTCTT    |

## 8. TAGLN2의 western blot

SNU245 와 SNU1196 의 tumorsphere 세포와 접착세포에서 accutase(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 세포를 수거하였으며 PBS 로 세포를 씻어준 후 단백질을 추출하였고, SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane(Millipore corporation, Billerica, MA, USA)에 단백질을 이동시켰다. 그 후 membrane 을 5% 탈지분유가 함유된 TBS-T(Tris-buffered saline/0.05% Tween-20)로 1 시간 동안 차단하였다. 그 다음 membrane 을 1 차 항체와 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 1 차 항체는 rabbit polyclonal anti-TAGLN2

(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 1 차 항체와 반응한 membrane 을 TBS-T buffer 에 세척시킨 후, HRP(horseradish peroxidase)이 결합된 2 차 항체(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA)와 1 시간 동안 반응시켰다. 단백질을 Enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 검출하였다.

## 9. TAGLN2의 면역조직화학염색

1998 년 8 월부터 2002 년 12 월까지 세브란스병원에서 간내담관암 (intrahepatic cholangiocarcinoma)으로 진단받고 수술적 치료를 받은 총 31 명의 환자를 대상으로 이들 환자의 정상 간조직과 간내담관암 조직에 대해 조직 microarray 를 제작하였다. Core 는 종양조직과 정상조직을 각각 2 개로 하여 1mm 의 크기와 0.3  $\mu$ m 의 두께로 제작하였다. 조직 슬라이드를 xylene 으로 파라핀을 제거하고 알코올로 함수시킨 후 20 분간 0.3% 과산화수소로 처리하여 내인성 과산화수소를 차단하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate buffer(0.01M, pH 6.0)에 담근 채 마이크로파 압력 용기를 이용하여 5 분간 가열하였다. 그 다음으로 슬라이드를 10% normal horse serum 으로 1 시간 동안 배양시켜서 비특이적인 배경 염색을 감소시켰다. 1:500 으로 희석된 rabbit polyclonal anti-TAGLN2 antibody (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)와 슬라이드를 4°C에서 하룻밤 배양시켰다. 그 이후의 반응은 Envision kit(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)에 포함된 권장 과정을 이용하여 실시하였다. 마지막으로 슬라이드를 3,3-diaminobenzidine(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)로 배양시키고, Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO,

USA) 용액으로 대조 염색하였다. 현미경하에서 면역염색된 세포수가 모두 없으면 grade 0, 10% 이하이면 grade 1, 10%-50% 이면 grade 2, 그리고 50% 이상이면 grade 3 로 판독하였다. Grade 0 와 grade 1 은 면역반응 음성으로, grade 2 와 grade 3 는 면역반응 양성으로 정의하였다.

## 10. TAGLN2 억제하에서 sphere 배양

Sphere 배지에 rabbit polyclonal anti-TAGLN2 antibody (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, USA)를 1  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 후 앞에서 기술한 같은 방법으로 SNU245와 SNU1196의 sphere 배양을 시행하였다. Anti-TAGLN2를 첨가하지 않고 sphere 배양한 경우를 대조군으로 하여 sphere 형성을 비교하였다.

## 11. TAGLN2 siRNA의 형질주입

TAGLN2에 대한 siRNA는 Santa cruz사의 sc-106633(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA)을 사용하였다. SNU1196 세포주 9 X 10<sup>4</sup> 개당 siRNA 30 nM을 lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 형질주입하고, 30시간, 48시간, 72시간 그리고 96시간 후에 TAGLN2의 발현양을 확인하였다. 음성 대조군 siRNA로 Santa cruz사의 sc-37007(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA)를 도입한 세포를 대조군으로 사용하였다.

## 12. 암세포 전이분석

TAGLN2 siRNA 와 대조군 siRNA 를 형질주입한 담도암 세포에서 암세포 전이분석(migration assay)을 transwell(Corning Inc, Tewksbury, MA, USA)에서 시행하였다. 상부 well 에는 무혈청 배지에

현탁 시킨 세포를  $1.0 \times 10^4$  개씩, 하부 well 에는 NIH3T3 섬유아 세포의 배양액을 500  $\mu$ l 씩 분주한 후 24 시간 배양하였고, 필터를 통과하여 필터 아래쪽에 부착된 세포를 고정 및 염색한 후 현미경 관찰을 통하여 전이된 세포수를 측정하였다.

### 13. Gemcitabine에 대한 항암제 감수성 검사

TAGLN2 siRNA 와 대조군 siRNA 를 형질주입한 SNU1196 의 각 세포를  $10^3$  개씩 96 well plat 에 부착시킨 후, 다음날 gemcitabine (Lilly France, St-Cloud, France)을 0, 20, 200, 2000 nM 의 농도로 처리하고 72 시간 배양하였다. MTT 용액(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA)을 넣고 4 시간 반응시킨 후 DMSO(Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) 처리하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하여 감수성을 분석하였다.

### 14. c-Met 와 관련 유전자의 western blot

TAGLN2 siRNA 와 대조군 siRNA 를 형질주입한 SNU1196 에서 앞에서 기술한 방법으로 c-Met 와 c-Met 관련 유전자의 western blot 을 시행하였다. 사용한 1 차 항체는 c-Met(Cell Signaling Technology Inc, Danver, MA, USA), phospho-GSK3(Cell Signaling Technology Inc, Danver, MA, USA),  $\beta$ -catenin(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA), phospho-AKT(Cell Signaling Technology Inc, Danver, MA, USA), AKT(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA), p21RAS (BD transduction laboratories, San Diego, CA, USA), phospho-MEK(Cell Signaling Technology Inc, Danver, MA, USA), MEK(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA), phospho-ERK(Cell Signaling Technology Inc, Danver, MA, USA),

ERK(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA), BAX(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA), BCLxL(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA) 및 GAPDH(Santa cruz biotechnology Inc, Santa cruz, CA, USA) 등이다.

## 15. 통계

통계분석으로 각 실험값은 비모수 검증(nonparametric test)인 Wilcoxon Ranks Sum Test 로 분석하였고, 면역조직화학염색에 따른 각 인자들의 상관관계는 chi-square 로 분석하였다. 통계는 SPSS version 14.0 통계 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하였고 통계적 유의성은 0.05 미만으로 정의하였다.



### Ⅲ. 결과

#### 1. 담도암 세포주에서 sphere 배양

Sphere 배양을 6개의 담도암 세포주에서 시행하였다. 이중 sphere 배양 10일째에 SNU245와 SNU1196에서 tumorsphere가 형성되었다. 이 두 세포주를 선택하여 후속실험을 진행하였다(그림 1). 이 tumorsphere는 10여 차례 세포분리와 sphere 배양을 반복하였으며 이 과정 동안 tumorsphere 형성능력과 자가재생능력은 지속적으로 유지되었다.

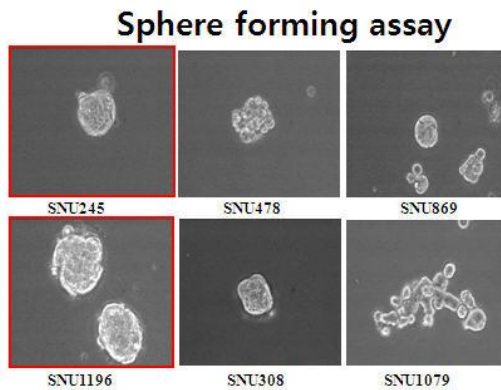


그림 1. 담도암 세포주에서 sphere 배양. SNU245와 SNU1196에서 sphere 배양법을 통해 tumorsphere가 형성되었다.

## 2. 유세포 분석을 통한 암줄기세포 표지자의 발현

SNU245 와 SNU1196 에서 암줄기세포 표지자로 알려진 CD24, CD44, ESA 및 CD133 의 발현을 알아보하고자 유세포 분석을 시행하였다. SNU245 에서는 CD44(62.9%)와, ESA(55.2%)가 발현이 증가되었으며 SNU1196 에서는 CD24(96.0%), CD44(91.2%), ESA(94.1%)의 발현이 매우 증가되어 있었다. 반면 CD133 은 두 세포주에서 매우 적은 수의 세포에서만 발현되었다(그림 2). 두 세포주 간의 발현의 차이는 있지만 담도암 세포주에서 CD24, CD44, ESA 등의 암줄기세포 표지자가 발현되었다(그림 2).

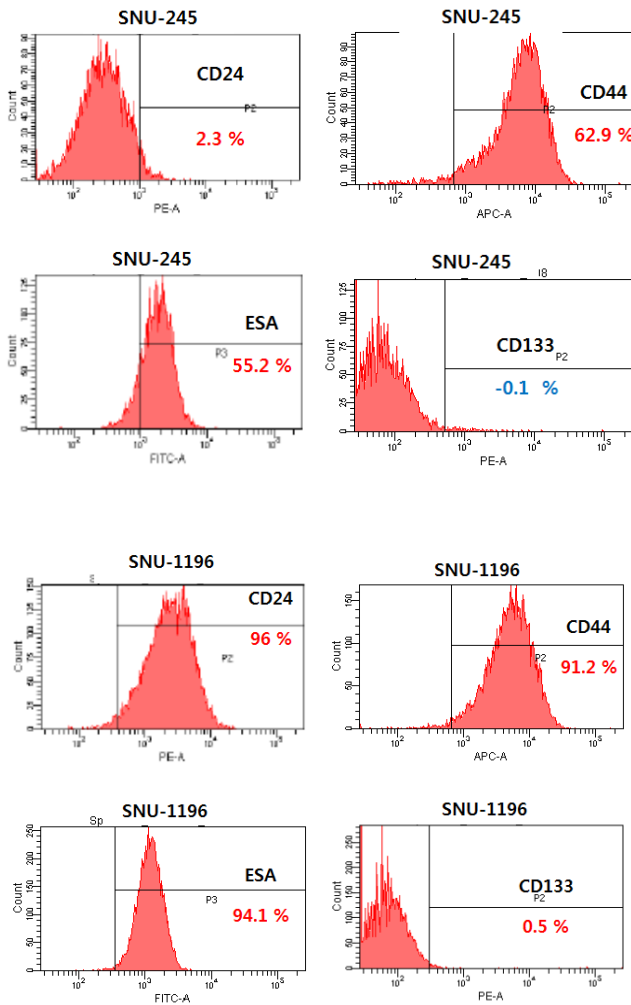


그림 2. 담도암 세포주의 암줄기세포 표지자 발현. SNU 245에서는 CD44와 ESA가 양성인 세포가 많았으며 SNU1196에서는 CD24, CD44, ESA가 양성인 세포가 많았다. (ESA - epithelial specific antigen)

### 3. Tumorsphere 세포에서 집락형성 능력 증가

집락형성 분석법을 통하여 SNU245와 SNU1196에서 배양한 tumorsphere 세포와 대조군으로 접착세포의 집락형성을 비교하였다. 접착세포와 tumorsphere에서 형성된 집락의 수는 SNU245의 경우 각각  $54.0 \pm 6.0$ ,  $88.0 \pm 11.1$  ( $p < 0.05$ )이며, SNU1196의 경우 각각  $80.3 \pm 2.1$ ,  $149.7 \pm 4.9$  ( $p < 0.05$ )이었다. SNU245와 SNU1196 모두에서 접착세포에 비해 tumorsphere 세포에서 집락형성이 많이 증가하여, tumorsphere 세포에서 줄기세포의 특징인 자가재생력이 높게 나타났다(그림 3).

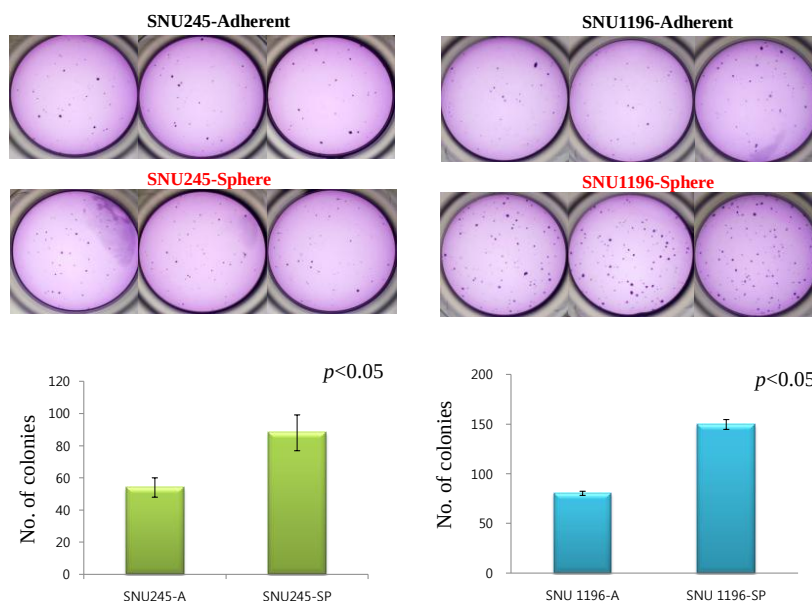


그림 3. Tumorsphere 세포의 집락형성 분석. SNU245 와 SNU1196 모두에서 접착세포에 비해 tumorsphere 세포에서 집락형성이 증가하였다( $p < 0.05$ ).

#### 4. Tumorsphere 세포의 생체내 암화능력

Tumorsphere 세포의 생체내 암화능력을 확인하기 위해 누드 마우스에 SNU1196 접착세포와 tumorsphere 세포를 각각 1,000 세포수를 피하주입 후 12주 후에 해부하여 종양의 크기를 비교하였다. 12주 후 발생한 종양의 크기는 대조군인 접착세포 주입 시는 88 mm<sup>3</sup>이며, tumorsphere 세포 주입 시는 1,440 mm<sup>3</sup> 로 tumorsphere 세포 주입 시에 종양이 더욱 크게 형성되었다. 조직검사에서 분화도가 나쁘며 다양한 세포로 구성되어 있고 조직 궤사가 심하게 나타났다. 따라서 tumorsphere 세포의 생체내 종양형성능력과 여러 세포로 분화하는 능력이 접착세포에 비해 높게 나타났다(그림 4).

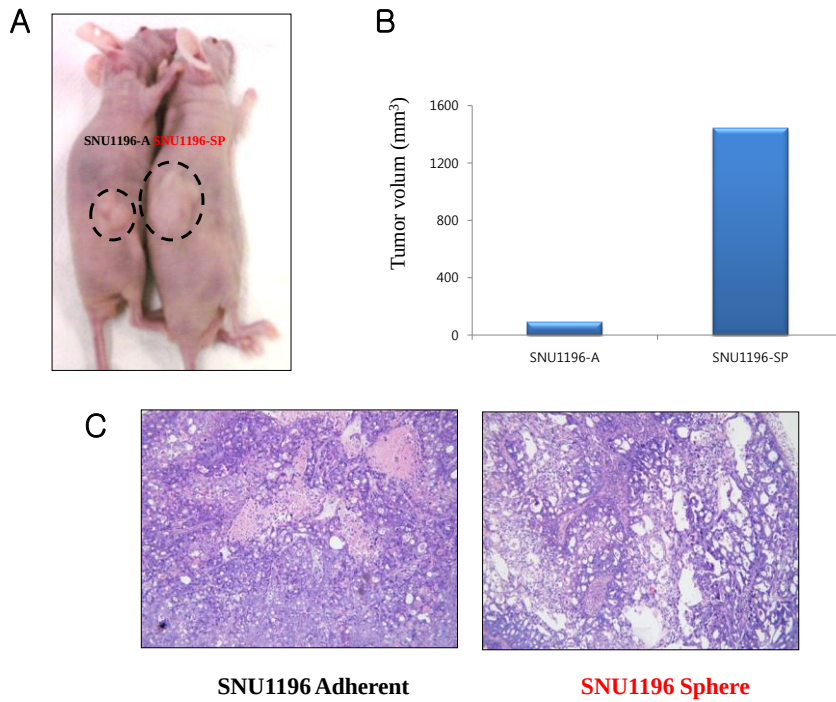


그림 4. Tumorsphere 세포의 생체내 암화능력. SNU1196의 접착세포와 tumorsphere 세포 1,000 세포 수를 nude 마우스에 주입하고 12주 후 sphere 세포에서 접착세포에 비해 종양이 크게 형성되었다(A, B). 각 종양의 조직은 tumorsphere 세포에서 형성된 종양이 분화도가 나쁜 세포로 구성되었다(H & E, x200)(C).

## 5. Tumorsphere 세포에서 줄기세포 관련 유전자 발현

Tumorsphere 세포가 줄기세포의 특성을 가지고 있는지를 평가하기 위해 줄기세포의 성장, 자가재생, 분화에 중요한 역할을 하는 Wnt, Notch 와 Hedgehog 전달체계의 줄기세포 관련 유전자 발현을 알아보았다. SNU245 와 SNU1196 에서 접착세포에 비해

tumorsphere 세포에서 Notch3 와 Hes1 의 발현이 증가되어 Notch 신호전달체계가, Ihh 와 Gli1 의 발현이 증가되어 Hedgehog 신호전달체계가, FZD7 과  $\beta$ -catenin 의 발현이 증가하여 Wnt 신호전달체계가 각각 활성화 되어 있었다. 또한 암줄기세포의 침윤과 전이에 관련하는 것으로 알려진 epithelial to mesenchymal transition 의 표지자 c-Met 및 vimentin 과 최근 간암 줄기세포 표지자로 알려진 CD90 의 발현 또한 증가되어 있었다<sup>29, 30</sup>(그림 5).

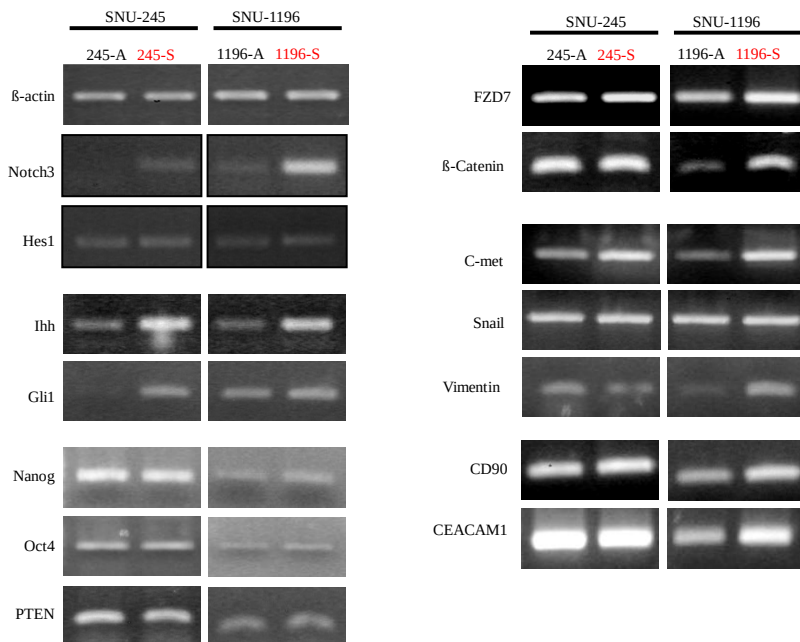


그림 5. Tumorsphere 세포에서 줄기세포 관련 유전자 발현. SNU 245 와 SNU1195 의 접착세포에 비해 tumorsphere 세포에서 Notch 신호전달체계의 notch 3 와 Hes1, hedgehog 신호전달체계의 Ihh 와 Gli, Wnt 신호전달체계의 FZD7 과  $\beta$ -catenin, 그리고 c-Met, vimentin, CD90 등의 줄기세포 연관 유전자 발현이 증가되었다.

## 6. cDNA microarray를 통한 tumorsphere와 담도암에서 특이적으로 발현하는 유전자 발굴

cDNA microarray를 수행하여 SNU245 및 SNU1196의 접착세포에 비해 tumorsphere 세포에서 발현이 증가된 유전자군을 획득하였으며, 다시 본 실험실에서 보유하고 있는 인체 담낭암과 정상 담도세포



사이의 cDNA chip 자료와 함께 분석하여 tumorsphere와 담낭암에서 공통적으로 발현이 증가한 유전자 군을 얻을 수 있었다. SNU245의 tumorsphere 세포와 담낭암과 공통되게 증가된 유전자는 416개이었으며, SNU1196의 tumorsphere 세포와 담낭암과 공통되게 증가한 유전자는 255개이었다. 그리고 SNU245, SNU1196의 tumorsphere 세포와 담낭암 모두에서 공통적으로 증가된 유전자 61개를 얻을 수 있었다(그림 6). 이중에서 transgelin-2 (TAGLN2) 유전자를 선택하여 담도암 암줄기세포의 새로운 생체표지자로서의 가능성을 확인하기 위해 후속실험을 진행하였다(표 3).

**Tumorsphere chip data & Gallbladder Cancer chip data**

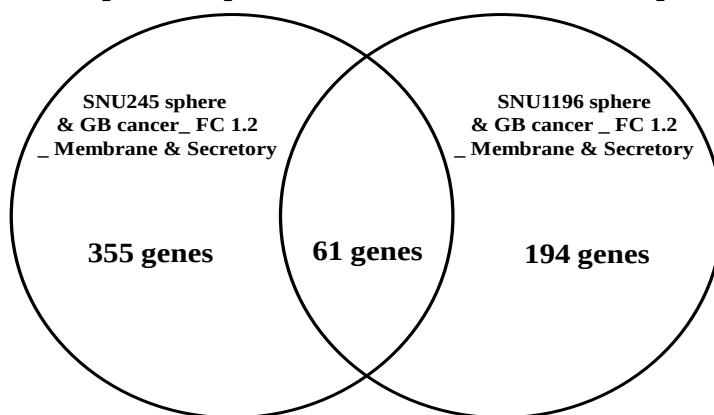


그림 6. cDNA microarray 분석. SNU 245의 tumorsphere와 담낭암에서 공통적으로 발현이 증가한 416개의 유전자와 SNU1196의 tumorsphere와 담낭암에서 공통적으로 발현이 증가한 255개 유전자를 획득하였으며, SNU 254, SNU1196 각각의 tumorsphere와 담낭암 모두에서 공통적으로 발현이 증가한 유전자는 61개이었다.

표 3. Tumorsphere와 담도암에서 공통적으로 발현이 증가된 유전자.

| Probe Set<br>ID | SNU245<br>SP_FC | SNU1196<br>SP_FC | GB cancer<br>_FC | Gene Title                                                                                                              | Gene<br>Symbol |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 210978_s_at     | 1.7             | 1.5              | 6.6              | transgelin 2                                                                                                            | TAGLN2         |
| 205623_at       | 1.6             | 2.4              | 1.7              | aldehyde dehydrogenase 3 family,<br>member A1                                                                           | ALDH3A1        |
| 211237_s_at     | 1.5             | 1.5              | 1.6              | fibroblast growth factor receptor 4                                                                                     | FGFR4          |
| 205098_at       | 1.2             | 1.2              | 1.4              | chemokine (C-C motif) receptor 1                                                                                        | CCR1           |
| 203505_at       | 1.7             | 1.4              | 1.4              | ATP-binding cassette, sub-family A<br>(ABC1), member 1                                                                  | ABCA1          |
| 210930_s_at     | 1.3             | 1.4              | 1.3              | v-erb-b2 erythroblastic leukemia<br>viral oncogene homolog 2,<br>neuro/glioblastoma derived<br>oncogene homolog (avian) | ERBB2          |
| 203722_at       | 1.4             | 1.2              | 1.2              | aldehyde dehydrogenase 4 family,<br>member A1                                                                           | ALDH4A1        |

## 7. 담도암 세포와 tumorsphere에서 TAGLN2 유전자 발현

6개의 담도암 세포주에서 TAGLN2의 RT-PCR 결과 모든 세포주에서 TAGLN2가 강하게 발현되고 있었다(그림 7). Tumorsphere와 접착세포에서 TAGLN2 단백 발현을 western blot으로 확인하였으며 접착세포에 비해 tumorsphere에서 TAGLN2 단백질 발현이 뚜렷이 증가하였다(그림 8).

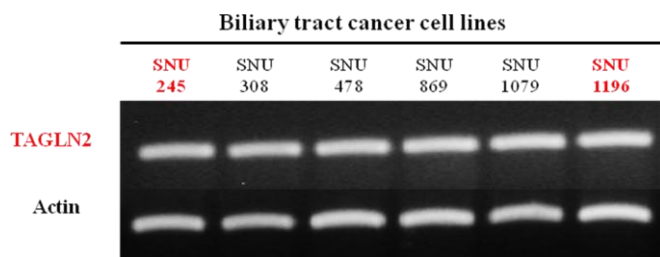


그림 7. 담도암 세포주에서 TAGLN2의 발현. 6개의 담도암 세포주 모두에서 TAGLN2가 강하게 발현되고 있다.

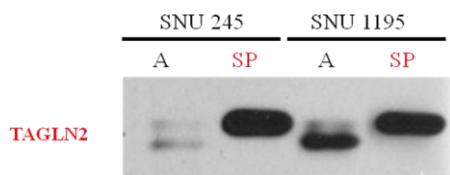


그림 8. Tumorsphere에서 TAGLN2 단백질의 발현. 점착세포에 비해 SNU254와 SNU1196의 tumorsphere에서 TAGLN2 단백질의 발현이 뚜렷이 증가하였다.

## 8. TAGLN2 억제 시 담도암 세포에서 sphere 형성 억제

담도암 세포에 anti-TAGLN2 항체를 첨가하여 sphere 배양을 하여 anti-TAGLN2에 의한 tumorsphere 형성 억제를 알아보았다. SNU245와 SNU1196 모두에서 대조군에 비하여 TAGLN2 항체를 첨가하고 sphere 배양을 한 경우에서 tumorsphere 형성이 감소되었다(그림 9).

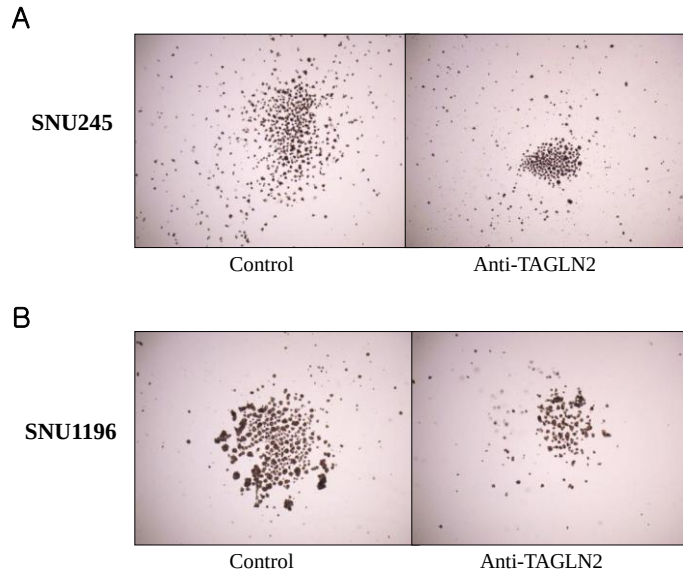


그림 9. TAGLN2 억제제가 sphere 형성에 미치는 영향. 대조군에 비해 anti-TAGLN2를 첨가하여 sphere 배양한 경우에 tumorsphere 형성이 감소하였다. (A: SNU245, B: SNU1196)

## 9. 담도암 조직에서 TAGLN2의 발현

31명의 간내담관암 환자의 암조직에서 TAGLN2의 면역조직화학 염색을 시행하여 조직 내에서의 발현을 알아보았다. 정상 담도세포에서는 TAGLN2의 발현이 없거나 약하게 있는 반면에, 31개의 암조직 중 27예(87.1%)에서 TAGLN2의 발현이 양성이었으며 이중 18예에서는 전체 암세포의 50%이상에서 면역염색되어 강한 양성을 보였다(그림 10). 그러나 TAGLN2의 발현 정도가 담도암의 병기, 림프절 전이 및 환자의 생존기간과는 통계적 차이를 보이지 못했다(표 4).

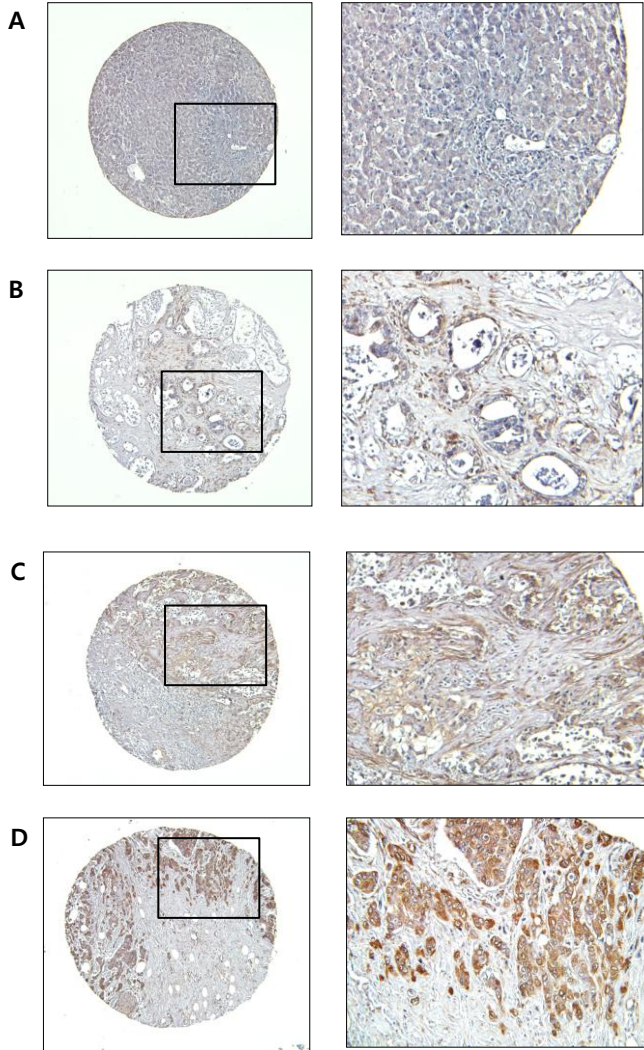


그림 10. 담도암 조직에서 TAGLN2 면역조직화학염색. 정상 간내담관 세포에는 면역염색이 되지 않았으며, 간내담관암 조직에는 세포질에 강하게 염색되었다(x200). (A: normal tissue, grade 0, B: cholangiocarcinoma, grade 1, C: cholangiocarcinoma, grade 2, D: cholangiocarcinoma, grade 3)

표 4. 임상병리적 인자에 따른 TAGLN2의 발현

| Characteristics   |    | TAGLN2 expression |   |    | <i>p</i> -value |
|-------------------|----|-------------------|---|----|-----------------|
|                   |    | 0 or 1            | 2 | 3  |                 |
| Sex               |    |                   |   |    |                 |
| Male              | 25 | 4                 | 6 | 15 | 0.338           |
| Female            | 6  | 0                 | 3 | 3  |                 |
| Age               |    |                   |   |    |                 |
| ≥60years          | 9  | 3                 | 1 | 5  | 0.063           |
| <60 years         | 22 | 1                 | 8 | 13 |                 |
| T stage           |    |                   |   |    |                 |
| T1                | 20 | 4                 | 6 | 10 | 0.501           |
| T2-T4             | 11 | 0                 | 3 | 8  |                 |
| N stage           |    |                   |   |    |                 |
| No                | 21 | 3                 | 6 | 12 | 0.946           |
| Ni                | 10 | 1                 | 3 | 6  |                 |
| Stage             |    |                   |   |    |                 |
| I                 | 14 | 3                 | 4 | 7  | 0.547           |
| II                | 2  | 0                 | 0 | 2  |                 |
| III               | 12 | 1                 | 3 | 8  |                 |
| IV                | 3  | 0                 | 2 | 1  |                 |
| Differentiation   |    |                   |   |    |                 |
| Well              | 2  | 0                 | 1 | 1  | 0.951           |
| Moderate          | 9  | 2                 | 2 | 5  |                 |
| Poorly            | 11 | 1                 | 3 | 7  |                 |
| Undifferentiation | 9  | 1                 | 3 | 5  |                 |

## 10. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA의 형질주입 후 특성 분석

### 가. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA 의 형질주입 확인

SNU1196 에 TAGLN2 siRNA 를 형질주입 하였으며 TAGLN2 의 RT-PCR 결과에서 30 시간과 96 시간에 TAGLN2 의 RNA 가 감소하였다. Western blot 결과에서, TAGLN2 단백질은 48 시간, 72 시간 96 시간에서 발현이 억제되었다(그림 11).

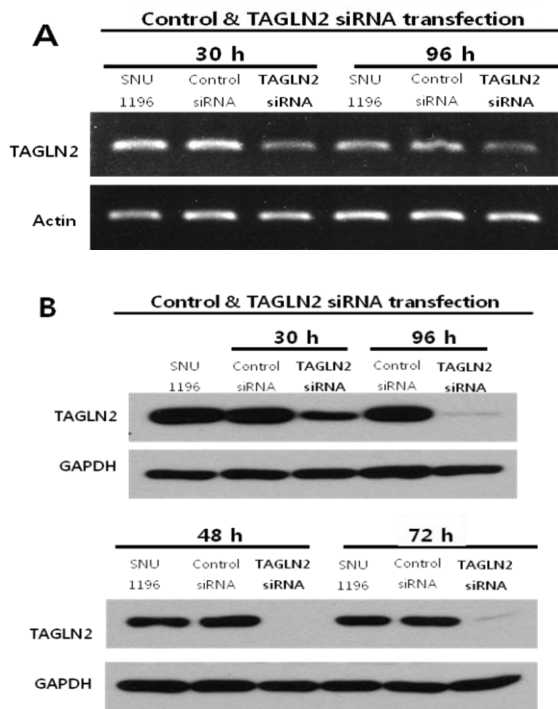


그림 11. 담도암 세포에 TAGLN2 siRNA 형질주입 후 TAGLN2 의 mRNA 와 단백질 발현 억제. TAGLN2 의 mRNA 발현이 30 시간과 96 시간 뒤에 감소하였다(A), TAGLN2 단백질의 발현은 30 시간 뒤에 감소하였으며 48, 72, 96 시간 뒤에는 강하게 억제되었다(B).

## 나. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 전이능력 및 항암제 감수성

TAGLN2 siRNA 형질주입 후 단백발현이 억제된 48시간이 되었을 때에 암세포 전이능력 및 항암제 감수성을 분석하였다. 실험 결과, 전이된 세포 수는 각각 대조군 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 경우에  $49 \pm 9.8$ , TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 경우에  $14.5 \pm 2.1$ 로 TAGLN2가 억제되었을 때 암세포의 전이는 뚜렷하게 감소되었다 (그림 12). Gemcitabine에 대한 항암제 내성은 TAGLN2가 억제되었을 때 감소하여 gemcitabine의 농도가 증가할수록 TAGLN2가 억제된 담도암 세포에서 세포수가 보다 많이 감소하였다( $p < 0.05$ ) (그림 13).

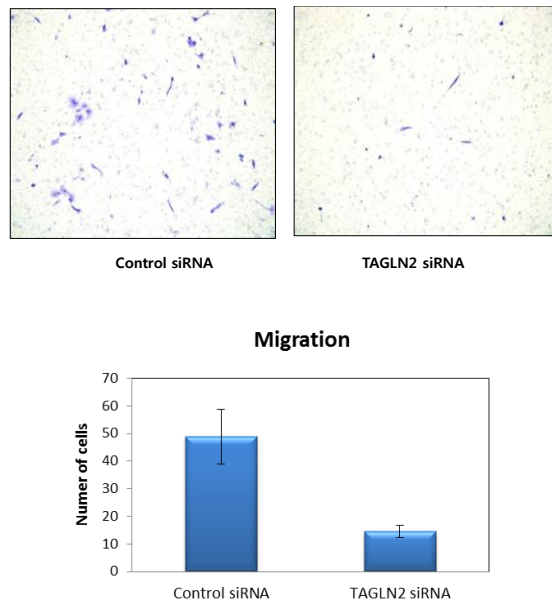


그림 12. TAGLN2 siRNA 형질주입 담도암 세포의 전이능력 분석. TAGLN2가 억제된 세포에서 전이 능력이 감소하였다.



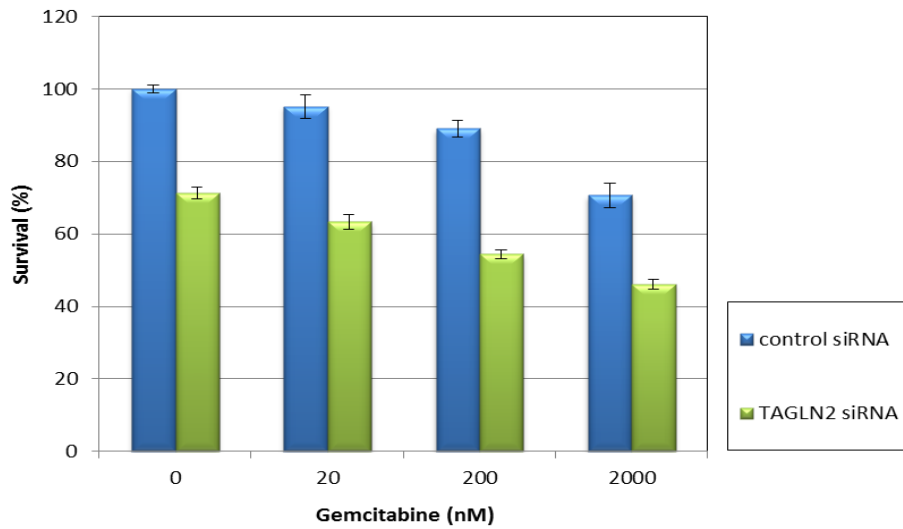


그림 13. TAGLN2 siRNA 형질주입 담도암 세포의 gemcitabine 에 대한 항암제 감수성. TAGLN2가 억제된 담도암 세포에서 gemcitabine에 대한 내성이 감소하였다( $p < 0.05$ ).

#### 다. TAGLN2 siRNA 형질주입한 담도암 세포의 유전자 단백질 발현 분석

TAGLN2 siRNA 형질주입 후 72 시간 되었을 때에 다양한 단백질들의 발현 변화를 western blot 으로 확인하였다. Tumorsphere 세포에서 발현이 증가하였던 침윤성장(invasive growth) 유전자로 알려진 c-Met 의 발현을 알아보았다. TAGLN2 가 억제된 경우 c-Met 의 단백질 발현이 뚜렷이 감소된 것을 확인하여 TAGLN2 는 c-Met 유전자의 신호전달체계와 연관되어 있음을 시사하였다. 다음 단계로 c-Met 의 하부 신호전달체계에 관여하는 유전자 발현을 확인한 결과, 암줄기세포와 관련하여 Wnt 신호전달체계의  $\beta$ -catenin 이 감소, PI3K 신호전달체계의  $\beta$ -GSK3 와 p-AKT 발현이 감소, 그리고 MARK 신호전달체계의 p-MEK 와 p-ERK 의 발현이 각각 감소하였다. 세포사멸 유발인자인 BAX 의 증가와 세포사멸 억제인자인 BCLxL 의 발현이 감소되어 TAGLN2 가 세포사멸과도 연관이 있음을 보여주었다(그림 14).

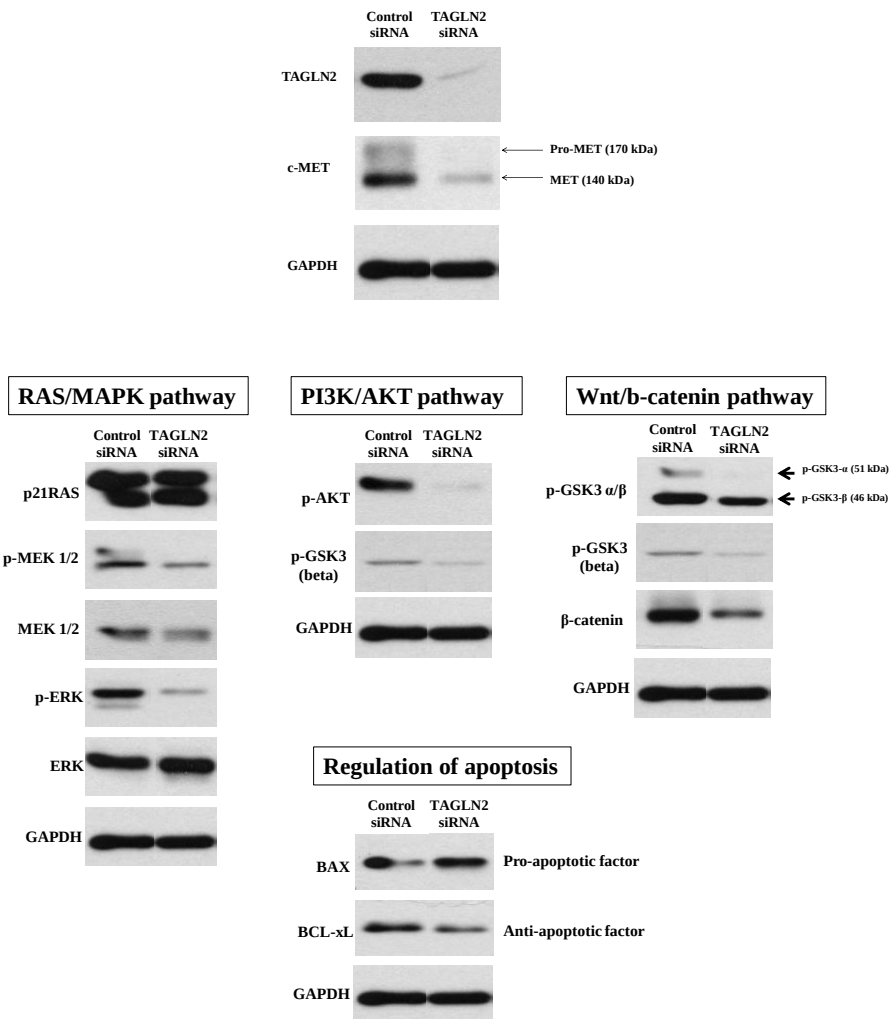


그림 14. TAGLN2 siRNA 형질주입 담도암 세포의 유전자 단백질 발현 분석. TAGLN2 의 억제로 c-Met 의 발현이 뚜렷이 감소하였다. 또한 RAS-MARK, PI3K, Wnt 신호전달체계 및 세포사멸이 억제되었다.

#### IV. 고찰

암줄기세포는 종양의 성장을 유발하고, 자가재생력, 항암제내성 그리고 종양형성능력을 가진 종양내의 소수의 동질 세포 군으로 정의된다<sup>4</sup>. 암줄기세포의 발견은 종양 형성과정에 새로운 이해와 시각을 가져왔고 새로운 치료법 도입을 기대할 수 있게 되었다<sup>7</sup>. 암줄기세포는 항암치료나 방사선치료에 분화된 암세포보다 내성이 있어 제거되지 않는다. 항암치료에 의해 효과적으로 분화된 암세포가 모두 제거되었다고 하여도 내성을 가진 소수의 암줄기세포는 남아있게 되었다가 나중에 매우 암화능력이 높은 암줄기세포가 성장하여 암이 다시 재발하게 된다. 따라서 성공적인 치료를 위해서는 암줄기세포가 표적이 되어야 한다<sup>9, 10, 31</sup>.

암줄기세포는 공통된 표지자가 없어 동정하는 것이 어렵다. 소수의 세포들이 암줄기세포라는 것을 입증하는 방법은 종양형성 능력, 자가재생력, 그리고 다양한 세포로의 분화 능력을 증명하는 것이다<sup>17</sup>. 비부착상태로 sphere를 배양하는 방법은 암줄기세포가 부착과 무관하게 성장하는 특징을 이용하는 방법으로 암줄기세포를 성장시키고 동정하는데 유용한 방법이다<sup>24</sup>. 특히 담도암처럼 암줄기세포의 특이 세포 표면 표지자가 알려지지 않은 종양에서는 그 유용성이 더 크다고 할 수 있다. Sphere 배양 환경에서는 암줄기세포는 미분화상태로 유지될 수 있으며 성장 인자 등에 의해 성장하여 동종의 결집체를 형성하게 되며 이를 tumorsphere 라 부른다<sup>25, 32</sup>. Sphere 배양법은 이미 신경암, 유방암, 전립선암, 두경부암, 신장암 그리고 대장암 암줄기세포의 확장과 동정에 이용되어 보고된 바가 있다<sup>24-27, 32, 33</sup>. 이전 연구에서 tumorsphere는 다시 분리 후 세포를 부양하여 배양했을 때 분화된 세포와

tumorsphere를 형성하여 자가재생력과 분화능력이 있고 항암제 내성이 증가되어 있어 암줄기세포의 특징을 가지고 있음이 증명되었다<sup>27, 34</sup>.

본 연구는 담도암 세포주인 SNU245와 SNU1196에서 sphere 형성방법을 이용하여 암줄기세포 연구를 진행하였다. SNU245는 총담관암환자에서, SNU1196은 간문부담도암 환자에서 확립된 세포주이다. 각 세포주에서 형성된 tumorsphere 세포가 sphere를 형성하는 능력이 있고 집락형성 측정방법에서 집락형성능력이 증가하여 자가재생력이 있음을 입증하였다. 이와 같은 tumorsphere 세포의 높은 증식력은 담도암의 비정상적 성장과 악성화 진행에 기여하는 것으로 생각된다. 암줄기세포의 존재를 입증하는 다른 방법은 생체내 종양형성 능력을 보여주는 것이다. 본 연구에서 tumorsphere 세포는 접착세포에 비해 마우스에서 분화도가 나쁘며 크기가 훨씬 큰 종양을 형성하여 생체내 종양형성 능력이 높게 나타났다.

암줄기세포에서는 정상 줄기세포에서 자가재생에 관여하는 Wnt, Notch, Hedgehog와 같은 특정 신호전달체계가 활성화되어 있으며 이를 ‘stemness’ 유전자라 한다<sup>35</sup>. Stemness 유전자의 비정상적 활성화가 암줄기세포에서 암화과정이 진행되는 것과 연관된다고 알려져 있다<sup>31</sup>. 암줄기세포에서 이런 신호전달체계의 활성화가 종양 클론에서 미성숙세포를 증가시키고 침윤과 치료 내성을 유발한다고 생각되고 있다<sup>9</sup>. 본 연구에서는 유전자 분석을 통해 암줄기세포 관련 유전자들 중 특히 Wnt, Notch, Hedgehog 신호전달체계가 tumorsphere 세포에서 뚜렷이 활성화되어 있었다. 이상의 결과로 tumorsphere 내에 암줄기세포의 특성을 가진 세포가 다량 있음을 확인하였으며 tumorsphere 세포에서 특이적으로 발현하는 유전자 및 단백질 연구를

통해 담도암 암줄기세포의 특징을 밝히고 연관된 새로운 유전자를 발굴할 수 있을 것으로 기대하였다.

이상의 결과를 바탕으로 담도암 암줄기세포와 관련된 새로운 생체표지자를 발굴하기 위해 cDNA microarray를 이용하여 SNU245와 SNU1196의 tumorsphere 세포와 인체 담낭암의 유전자 발현을 비교 분석하여 공통적으로 증가한 61개의 유전자 군을 획득할 수 있었다. 이 유전자 군에는 aldehyde dehydrogenase (ALDH)의 isoform인 ALDH3A1, ALDH4A1이 포함되어 있는데, ALDH는 이미 여러 암에서 암줄기세포의 표지자로 알려져 있는 유전자이다<sup>36</sup>. 본 실험에서 이 유전자 군 중에서 선택한 TAGLN2는 현재까지 거의 알려지지 않았으며, cDNA microarray 결과에서 tumorsphere에서는 집착세포보다 1.6-1.7배, 담낭암에서는 정상 담도세포보다 6.6배로 증가한 유전자이다(표 3). 따라서 다른 유전자에 비해 tumorsphere와 담낭암에서 높은 발현증가를 나타내어 담도암의 암줄기세포와 관련된 새로운 생체표지자로서 가능성이 있을 것으로 기대되었다.

TAGLN2는 calponin homolog로 알려진 actin-binding domain을 가지고 있으며 세포골격 구성에 관여하는 유전자로 알려져 있다<sup>37</sup>. TAGLN2의 과발현은 위암<sup>38</sup>, 간암<sup>39</sup>, 대장암<sup>40</sup>, 식도암<sup>41</sup>, 방광암<sup>42</sup> 그리고 췌장암<sup>43</sup> 등에서 보고되었으며 TAGLN2의 기능은 아직 알려지지 않았지만 TAGLN2의 발현이 암화과정과 연관되어 있다고 보고되었다. 두경부암 세포주에서 si-TAGLN2로 억제 시에 암세포의 전이와 침윤이 감소하였고<sup>44</sup>, 대장암의 경우에는 TAGLN2의 발현이 림프절 전이, 원격 전이와 연관되어 있다고 알려졌다<sup>40</sup>.

본 연구에서 TAGLN2 유전자는 6 개의 담도암 세포주에서 강하게 발현하고 있었다. 또한 TAGLN2 단백질은 대조군인 집착세포보다 tumorsphere에서 발현이 뚜렷이 증가되어, 암줄기세포에 의해 발현이

증가되는 것으로 추정할 수 있었다. 간내담관암 조직에서도 TAGLN2는 강하게 발현하여 담도암의 진단 표지자로서 가능성을 보여 주었다. 간내담관암에서 TAGLN2의 발현에 따른 임상병리적인 차이를 보이지 못하였으나 이는 TAGLN2가 강하게 염색되는 조직이 많고 의미를 부여하기에는 대상 환자수가 적은 것이 한 원인으로 생각된다. 그리고 TAGLN2를 억제 시에 담도암 세포에서 tumorsphere 형성이 억제되어 TAGLN2가 암줄기세포의 분화와 성장을 억제하는 것으로 추정된다. 또한 TAGLN2 siRNA 형질주입에 의한 인위적인 TAGLN2 억제로 암의 전이능력이 감소하고, gemcitabine에 대한 내성이 감소하여 표적치료로써 유용성이 있을 것으로 생각된다. 항암제에 대해 높은 내성을 보이는 것은 암줄기세포의 특징 중의 하나이다. 따라서 gemcitabine에 대한 내성이 감소한 것은 TAGLN2 억제가 담도암 세포 내 암줄기세포의 분화와 성장을 저해함으로써 항암제 내성을 낮춘 것으로 생각된다.

TAGLN2의 기능은 현재 거의 알려진 바가 없고, 연관된 신호전달체계에 대한 연구결과는 없다. 본 연구에서는 담도암 세포의 tumorsphere 세포에서 c-Met 유전자의 발현이 증가된 결과를 바탕으로 TAGLN2가 억제된 담도암 세포에서 c-Met 유전자의 발현을 알아보았다. c-Met는 hepatocyte growth factor(HGF)에 대한 receptor tyrosine kinase로서 활성화되면 특징적으로 침윤 성장(invasive growth)을 촉진한다. 종양 세포내에서는 c-Met가 활성화되면 여러 신호전달체계를 통해 세포성장, 분화, 침윤, 그리고 세포사멸에 내성 등의 결과를 나타낸다<sup>29</sup>. c-Met의 하위 신호전달체계로는 Ras-MAPK, PI3K-AKT, STAT 등이 있으며<sup>29, 45</sup>, Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계는 HGF/c-Met에 의해서 활성화된다고 알려져 있다<sup>46</sup>. c-Met 유전자의 과발현은 여러 암에서 불량한 예후와

연관된다고 밝혀져 있다<sup>45</sup>. 최근 c-Met 이 정상 마우스 췌장의 줄기세포 표지자로 알려져 있으며<sup>47</sup>, 췌장암의 경우 c-Met 가 암줄기세포의 표지자이며 표적치료의 대상이 될 것으로 기대되고 있다<sup>48</sup>. c-Met 과발현 혹은 c-Met/HGF 비정상적 활성화는 담관 상피세포의 양성 증식이나 종양병변에서 나타나며, c-Met/HGF 는 담관 상피세포의 증식뿐 아니라 담도암의 발생에 관여할 것이라 하며<sup>49-51</sup>, 담도암에서 c-Met 의 과발현이 EGFR 발현과 연관되며 불량한 예후인자가 된다는 보고가 있다<sup>52</sup>.

본 연구에서는 TAGLN2의 억제 시에 c-Met 유전자의 발현이 뚜렷이 감소되었다. 또한 c-Met 유전자의 하위 신호전달체계의 유전자 단백질분석에서 Wnt, PI3K, MARK 신호전달체계가 억제되어 있었으며 세포사멸에 대한 내성이 감소하였다. 그러므로 TAGLN2는 c-Met 을 활성화하여 암줄기세포의 성장, 암세포의 분화, 침윤, 전이 및 세포사멸에 내성 등의 기전으로 담도암에서 암화과정에 관여하며, Wnt, PI3K, MARK 신호전달체계가 TAGLN2의 작용과 연관된다고 생각된다. TAGLN2의 작용기전과 연관된 신호전달체계는 본 연구를 통하여 처음으로 밝혀진 것으로 판단된다. 이 결과를 바탕으로 TAGLN2는 담도암 치료의 새로운 생체표지자가 될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

결론적으로 본 연구를 통하여 담도암 암줄기세포의 동정은 담도암의 암화과정에 대한 새로운 이해와 치료법을 제시할 수 있음을 보여주었다. 담도암 세포에서 형성된 tumorsphere는 암줄기세포의 특성을 가지고 있었고, 담도암 암줄기세포의 유전자 분석을 통하여 동정한 TAGLN2는 담도암의 암화과정에서 중요한 역할을 하며 c-Met 신호전달체계와 연관되어 있었다. 따라서 TAGLN2는 암줄기세포와 관련된 신규 유전자로서 담도암 치료의 새로운 생체표지자로



기대되며 이에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

## V. 결론

암줄기세포는 암의 발생과 진행 및 치료에 대한 내성에서 매우 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 담도암 세포주에서 sphere 배양법을 이용하여 암줄기세포의 존재를 입증하고 특성을 분석하고자 하였으며, cDNA microarray를 이용하여 담도암 암줄기세포의 생체표지자를 동정하고 특성 분석을 하고자 하였다.

연구결과로 담도암 세포주에서 sphere 배양법을 이용하여 암줄기세포를 동정하였으며 암줄기세포의 자가재생, 분화, 암화능력을 입증하였고 줄기세포 관련 유전자 발현이 증가되어, tumorsphere 세포에 다량의 암줄기세포가 포함되어 있음을 보여주었다. 이 결과를 바탕으로 cDNA microarray를 시행하여 인체 담낭암과 담도암 세포의 tumorsphere 에서 공통적으로 의미 있게 증가한 61개의 유전자 군을 도출하였다. 이 유전자 군 중에서 TAGLN2 유전자를 발굴하였다. TAGLN2는 tumorsphere와 담도암 조직에서 발현이 증가되어 있으며, TAGLN2의 억제 시에 암세포의 전이와 항암제 내성이 감소하였고, c-Met 억제와 이와 관련된 신호전달체계가 함께 억제되었다. 결론적으로 담도암 암줄기세포의 동정은 담도암의 암화과정에 대한 새로운 이해와 치료법을 제시할 수 있음을 보여주었다. 담도암 암줄기세포의 연구를 통해 동정한 TAGLN2는 암줄기세포와 관련된 신규 유전자로서 담도암 치료의 새로운 생체표지자로 기대되며 이에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

## 참고문헌

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2007. CA: a cancer journal for clinicians 2007;57:43-66.
2. Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG. 2002 annual report of the Korea central cancer registry: based on registered data from 139 hospitals. Cancer Res 2004;36:103-14.
3. Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. N Engl J Med 1999; 341:1368-78.
4. Fava G, Marzioni M, Benedetti A, Glaser S, Demorrow S, Francis H, et al. Molecular pathology of biliary tract cancers. Cancer Letters 2007;250:155-67.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001;414(6859):105-11.
6. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. N Engl J Med 2006;355(12):1253-61.
7. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. Cancer Res 2006;66:9339-44.
8. Hajj MA, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene 2004;23:7274-82.
9. Vermeulen L, Melo FDS, Richel D, Mederma JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. Lancet Oncol 2012;13:e83-9.
10. Zhou BBS, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. Natue Rev Drug Discov 2009;8:806-23.

11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3983-8.
12. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
13. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66(12):6063-71.
14. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67(3):1030-7.
15. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell stem cell* 2007;1:313-23.
16. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Virgilio AD, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008;15:504-14.
17. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007;132(7):2542-56.
18. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004;117:3539-45.
19. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate

- epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* 2007;67(7):3153-61.
20. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wanh X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10158-63.
  21. Wang M, Xiao J, Shen M, Yahong Y, Tian R, Zhu F, et al. Isolation and characterization of tumorigenic extrahepatic cholangiocarcinoma cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer* 2011;128:72-81.
  22. Shi C, Tuan R, Wang M, Wang X, Jiang J, Zjang Z, et al. CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma. *Cancer Bio Tech* 2010;10:1182-90.
  23. Kondo T, Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Bio* 2007;3:245-50.
  24. Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: Implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;10:75-86.
  25. Marshall GP 2nd, Reynolds BA, Laywell ED. Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Curr Pharm Biotechnol* 2007;8(3):141-45.
  26. Dubrovska A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maria S, Garcia-Echeverria C, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:268-73.
  27. Zhang L, Jiao M, Li L, Wu D, Wu K, Ki X, et al. Tumorsphere derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:675-86.
  28. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2009;4:440-52.

29. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a *MET*-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6:637-45.
30. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008;13:153-66.
31. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res* 2012;2(3):340-56.
32. Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W, et al. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010;299:150-60.
33. Krishnamurthy S, Nör JE. Orosphere assay: A method for propagation of head and neck cancer stem cells. *Head Neck* 2012 Jul 13. doi: 10.1002/hed.23076. (in press)
34. Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li Tao, Guan L, et al. Sonic Hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS One* 2011;6(3):e17687.
35. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:97-106.
36. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PWK. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 2011;10(9):1378-84.
37. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, et al. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D237-40.
38. Huang Q, Huang Q, Chen W, Wang L, Lin W, Lin J, et al. Identification of transgelin as a potential novel biomarker for gastric adenocarcinoma based on proteomics technology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:1219-27.

39. Leung WKC, Ching AKK, Chan AWH, Poon TCW, Mian H, Wong AST, et al. A novel interplay between oncogenic *PFTK1* protein kinase and tumor suppressor *TAGLN2* in the control of liver cancer cell motility. *Oncogene* 2011;30:4464-75.
40. Zhang Y, Ye Y, Shen D, Jiang K, Zhang H, Sun W, et al. Identification of transgelin-2 as a biomarker of colorectal cancer by laser capture microdissection and quantitative proteome analysis. *Cancer Sci* 2010;101(2):523-9.
41. Qi Y, Ch JF, Wang L, Kwong DK, He QY. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics* 2005;5:2960-71.
42. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K. The tumour-suppressive function of *miR-1* and *miR-133a* targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Bri J Cancer* 2011;104:808-18.
43. Chen R, Yi EC, Donohoe S, Pan S, Eng J, Cooke K, et al. Pancreatic cancer proteome: the proteins that underlie invasion, metastasis, metastasis, and immunologic escape. *Gastroenterology* 2005;129:1187-97.
44. Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, Fuse M, Kikkawa N, Yoshino H, et al. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2011;2:29-42.
45. Eder JP, Wounde GFV, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of c-MET signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(7):2207-14.
46. Huang FI, Chen YL, Channg CN, Yuan RH, Jeng YM. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. *Carcinogenesis* 2012;33(6):1142-1148.
47. Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, Taniguchi H. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 2007;132:720-32.

48. Li C, Wu JJ, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, et al. c-MET is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology* 2011;141:2218-27.
49. Varnholt H, Asayama Y, Aishima S, Tagucji K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. c-Met and hepatocyte growth factor expression in combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:35-41.
50. Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. *Hum Pathol* 1998;29:175-80.
51. Sanada Y, Osada S, Tokuyama Y, Tanaka Y, Takahashi T, Yamaguchi K. Critical role of c-Met and Ki67 in progress of biliary carcinoma. *Am Surg* 2010;76(4):372-9.
52. Miyamoto M, Ojima H, Iwasaki M, Shimizu H, Kokubu A, Hiraoka N, et al. Prognostic significance of overexpression of c-MET oncoprotein in cholangiocarcinoma. *Bri J Cancer* 2011;105:131-8.



## ABSTRACT

### **Identification and characterization of TAGLN2 as a novel biomarker for cancer stem cells in biliary tract cancers**

Byung Kyu Park

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Si Young Song)

**Background:** Cancer stem cells (CSCs) play an important role in cancer development, this subpopulation within tumor possesses the characteristics of self-renewing capacity, chemoresistance and tumorigenic capacity thus may play a crucial role in the initiation, progression and recurrence of cancer. Emerging evidence strongly supports the existence of CSCs in various solid tumors. However characteristics of CSCs in biliary tract cancers (BTCs) have been poorly investigated.

**Aim:** The aims of this study are to identify and characterize the CSCs that drives from tumorsphere of BTC cell lines and to select a candidate novel gene through cDNA microarray analysis between tumorsphere and human BTC, and furthermore to analyze the functional role of the selected candidate novel gene in BTCs.

**Methods:** Human BTC cell lines (SNU245, SNU1196) were plated in serum-free suspension culture system allowed for tumorsphere forming. To evaluate the CSC characteristics of tumorsphere, the colony-forming assay, tumorigenicity in vivo were assessed. And the expression of stemness gene in the tumorsphere was evaluated. To identify a new

molecular gene in CSCs of BTCs, cDNA microarray was used between tumorsphere cells and human BTC. And to define the role of carcinogenesis and signal pathways of selected gene, migration assay and chemosensitivity were analyzed in condition of silencing of the gene and related signal pathways were evaluated.

**Results:** CSCs were identified from human BTC cell lines using tumorsphere culturing method. Tumorsphere cells displayed a greater colony-forming efficiency, higher proliferative output, and greater tumorigenic capacity in vivo when compared the adherent cells. The expression of 'stemness gene' was increased in tumorsphere cells. cDNA microarray analysis showed that transgelin-2(TAGLN2) was highly expressed in tumorsphere and human BTC. TAGLN2 was overexpressed in human cholangiocarcinoma tissues. The expression of TAGLN2 was highly increased in tumorsphere cells compared with adherent cells. Inhibition of TAGLN2 diminished tumorsphere formation. Silencing of TAGLN2 showed significant inhibition of cell proliferation, cell migration and chemoresistance. Together with inhibition of TAGLN2, the expression of c-Met gene was highly suppressed. And also, the downstream signal pathways of c-Met were downregulated.

**Conclusions:** This study suggests that the identification of CSCs in BTCs could provide new insight into the carcinogenesis and therapeutic implications. Tumorsphere cells derived from BTC cell lines posses CSC properties. TAGLN2, newly detected gene from CSCs gene analysis, has potential oncogenic functions associated with c-Met signal pathways. Therefore, TAGLN2 may be a candidate gene for therapeutic target of BTCs.

---

Key Words : cancer stem cell, biliary tract cancer, TAGLN2, c-Met