



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)



CD44가 췌장암 세포주의
gemcitabine 저항성 획득 과정에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 민 서

CD44가 췌장암 세포주의 gemcitabine 저항성 획득 과정에 미치는 영향

지도교수 송 재 진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2025년 6월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 민 서

CD44 가 췌장암 세포주의
gemcitabine 저항성 획득 과정에 미치는 영향

김민서의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원장 서 준 영

심사위원 송 재 진

심사위원 최 혜 진

연세대학교 대학원
의 과 학 과

2025년 6월

감사의 글

가장 먼저 약 2년 6개월이라는 시간 동안 생물학적 사고가 많이 부족했던 저를 석사과정까지 지도해주신 송재진 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 전합니다. 학위를 진행하는 동안 힘든 순간도 많았지만 그때마다 제가 길을 잃지 않도록 항상 방향을 잡아주셔서 포기하지 않을 수 있었고, 또 많은 것을 배우며 성장할 수 있었습니다.

학위를 진행하는 동안 바쁘신 일정에도 시간내서 연구에 대해 조언해주신 최혜진 교수님과 심사를 맡아주신 서준영 교수님께도 감사드립니다.

연구를 진행하면서 의문이 생기고 어려움이 있을 때마다 꼭 필요한 해결책을 제시해주셨던 김희경박사님, 실험실에 처음 들어와서부터 졸업까지 실험과 연구에 필요한 많은 지식과 도움을 줄 뿐만 아니라 정서적으로 든든한 버팀목이었던 성희쌤, 바쁜데도 불구하고 시간내서 실험 도와주고 굳은 일 맡아서 해준 승균쌤, 꼼꼼하게 실험 프로토콜 정리해준 혜지쌤, 웨스턴 블랏의 노하우를 아낌없이 공유해준 근혁쌤까지 모두에게 진심으로 감사드립니다.

무엇보다도 언제나 제 결정을 믿고 지지해주시며 학업에 만

몰두 할 수 있도록 아낌없이 지원해주신 부모님과 오빠 너무 사랑하고 감사합니다.

마지막으로 학위과정을 하며 힘든 순간마다 옆에서 듣든한 베풀목이 되어준 관희오빠에게 감사의 말을 전하며 글을 마치겠습니다. 감사합니다.

김민서

차례

그림 차례	ii
국문 요약	iii
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	7
2.1 세포배양	7
2.2. 바이러스의 제작 및 정제	7
2.3. Real-time PCR	10
2.4 Cell surface protein Biotinylation 과 Avidin Pulldown	10
2.5 Western blot	11
2.6 면역침강법 (Immunoprecipitation)	12
2.7 Cell viability	13
2.8 Clonogenic assay	14
2.9 동물실험	14
3. 결과	16
3.1 Gemcitabine 처리 시 짧은 시간 내에 세포 생존 신호의 변화 확인	16
3.2 짧은 시간 내에 CD44 를 cell surface 로 이동시키는 요인 확인	20
3.3 CD44 의 발현 감소가 췌장암 세포에서 gemcitabine 저항성 획득에 미치는 역할	26
3.4 췌장암 세포에서 shTGF β 1 과 shCD44 그리고 두가지 서열을 모두 가지는 아데노바이러스 처리에 따른 세포 생존능력 비교	30
3.5 동물모델에서 shTGF β 1 및 shCD44 단독 및 동시 억제 아데노바이러스 처리가 gemcitabine 에 대한 췌장암 세포 감수성 및 항종양 효과에 미치는 영향	38
4 고찰	42
5 결론	47
참고문헌	48
ABSTRACT	51



그림 차례

<그림 1> Gemcitabine 처리 시 짧은 시간 내에 세포 생존 신호의 변화 확인	16
<그림 2> 짧은 시간 내에 CD44를 Cell surface로 이동시키는 요인 확인	20
<그림 3> 췌장암 세포에서 gemcitabine에 대한 저항성을 획득하는데 있어서 CD44의 역할 확인	26
<그림 4> 췌장암 세포에서 shTGF shTGF β 1과 shCD44 그리고 두가지 서열을 모두 가지는 아데노바이러스 처리에 따른 세포 생존능력 비교	30
<그림 5> MiaPaCa-2 Xenograft 모델에서의 동물실험 결과	38

국 문 요 약

CD44 가 췌장암 세포주의 gemcitabine 저항성 획득 과정에 미치는 역할

췌장암은 매우 공격적인 암으로, 한국에서는 2021년 기준 5년 생존율이 약 15.9%에 불과하며 주요 암종 중 가장 낮은 생존율을 보이고 있다. 특히 췌장선암은 췌장암의 가장 흔한 형태로, 완치를 위해서는 수술적 절제가 필요하지만, 대부분의 환자가 증상 없이 암이 많이 진행된 상태에서 발견되어 수술할 수 없어 화학요법을 받게 된다. Gemcitabine은 췌장암 치료에 주로 사용되는 1 차 치료제로, 빠르게 증식하는 암세포의 세포 자멸사(apoptosis)를 유도하지만, 반감기가 짧고 저항성을 유발해 고용량 반복 투여 시 많은 부작용을 초래한다. 또한, 췌장암은 암세포 주변의 조밀한 섬유성 기질로 둘러싸여 있어 약물의 침투가 제한적이고, 다양한 돌연변이와 발암성 경로가 관여하여 치료 효력을 정의하기 어렵다. 이 때문에 췌장암의 효과적인 치료를 해서는 새로운 치료전략을 통해서 약물에 대한 민감도를 높여줄 필요성이 존재한다.

본 연구에서는 RTK들의 co-receptor로서 약물 저항성에 관여하는 것으로 알려진 CD44가 gemcitabine 저항성 획득 과정에서 어떠한 역할을 수행하는지 확인하고, CD44의 발현 조절이 췌장암 세포주가 gemcitabine에 대한 민감도를 향상시킬 수 있는지를 확인하였다. 췌장암 세포주인 MiaPaCa-2 와 PANC-1에 gemcitabine을 처리한 결과, 두 세포주 모두 시간의 흐름에 따라 세포 생존과 관련된 분자의 발현이 증가를 확인하였다. 이와 동시에

gemcitabine 처리 2 시간 이후부터 CD44 의 발현량이 일부 증가하는 것을 확인하였다. 두 세포주에 CD44 에 대한 shRNA 바이러스를 처리한 결과, MiaPaCa-2 는 다른 생존신호가 활성화되어 효과가 제한적이었으나, PANC-1 에서는 CD44 발현 감소만으로도 phospho-Akt 발현을 감소시켜 세포의 생존신호 경로가 쉽게 무너지는 것을 확인할 수 있었다.

MiaPaCa-2 세포주에서 CD44 에 대한 shRNA 를 단독으로 탑재한 바이러스는 gemcitabine 에 대한 민감도를 일부 향상시켜주었지만 단독으로는 그 효과가 충분하지 않았다. 이에 췌장암에서 발현량이 높고 암의 성장과 전이 그리고 침윤에도 관여되어 있다고 알려진 TGF β 1 을 동시에 타겟하였을 때 CD44 를 단독으로 타겟하는 것보다 gemcitabine 에 대한 민감도를 더욱 향상시켜 줄 수 있다는 결과를 얻었다. 이는 MiaPaCa-2 xenograft 동물 모델에서도 동일한 결과를 나타내었다. PANC-1 세포주에서는 TGF β 1 과 CD44 모두 효과적인 분자 표적임을 확인하였다. 따라서 췌장암 세포주에서 TGF β 1 과 CD44 를 동시에 타겟팅하는 것은 췌장암 세포주의 약물에 대한 감수성을 높여주며, 이는 항암제를 단독으로 사용하는 것보다 더욱 효과적인 항암효과를 보일 수 있을 것이다.

핵심되는 말: 췌장암, TGF β 1, CD44, 켐시타빈, 아데노바이러스, 약물저항성

1. 서론

췌장암은 2021년 기준 8번째로 많이 발생하는 암으로 국가암정보센터에서 조사한 내용에 따르면 암과 관련된 사망으로는 5번째로 사망률이 높은 암종으로 여겨지고 있다.¹ 췌장선암은 췌장암의 가장 흔한 형태이며 위험인자로는 당뇨, 나이, 가족력, 흡연, 비만 등 여러 가지가 존재하고 있다. 췌장암 환자들이 장기 생존을 기대하기 위해서는 수술적인 절제가 반드시 필요하지만, 실제로 수술이 가능한 환자는 20% 미만으로 알려져 있다. 췌장암의 가장 큰 문제점은 보통 증상이 뚜렷하지 않아 암이 많이 진행된 상태에서 발견된다는 것이다. 이 때문에 수술이 불가능한 국소 진행성 혹은 전이성 췌장암 환자들은 대부분이 화학요법으로 치료를 받게 된다.^{2, 3}

췌장암에 대해 FDA에서 승인한 여러가지 약물 및 약물 조합이 있으며, 5-Flourouracil, albumin 이 결합된 paclitaxel, gemcitabine 그리고 FOLFIRINOX 요법이 가장 일반적으로 사용된다. 이 중 gemcitabine은 췌장암 치료의 1차 치료 항암제 (First-line chemotherapy)로 사용되고 있으며, 췌장암뿐만 아니라 난소암, 그리고 비소세포폐암 등의 치료에도 사용되고 있다. Gemcitabine은 DNA 합성이 빠르게 진행되는 악성 세포의 세포 사멸을 촉진하여 항종양 효과를 내는 뉴클레오사이드 대사체로 작용한다. Gemcitabine은 반감기가 짧아 일반적으로 더 높은 용량과 반복 용량으로 투여되어 많은 부작용이 발생하고 있다. 또, 다양하지만 분명하지 않은 메커니ズム을 통해 암세포의 저항성을 빠르게 유도하는 것으로 나타났다.⁴ 이러한 단점을 가지고 있음에도 췌장암에 대한 효과적인 치료법 혹은 약물이 개발되지 못해 gemcitabine은 여전히 췌장암의 치료에 사용되고 있다.

췌장암의 치료가 어려운 또 다른 이유는 암세포가 항암제에 대한 선천적 또는 후천적 저항성을 나타내는 것과 함께 종양 세포 주변의 비정상적인 섬유조직 형성(Desmoplasia)을 꼽을 수 있다. 췌장암 주변에 생성된 비정상적인 섬유조직은 암세포 주변에 견고한 물리적 장벽을 형성하고 이 장벽은 약물이 암세포에 도달하지 못하도록 방해하며, 혈관 형성을 억제해 암 조직 내부로 약물과 산소의 전달을 어렵게 만든다. 또한, 췌장암의 미세환경은 fibronectin, laminin 그리고 hyaluronan(HA)과 같은 다양한 세포 외 기질 단백질로 구성되어 있으며, 이러한 세포외 기질 단백질들은 종양 세포의 증식을 강화하고 세포 사멸을 억제하는 단백질의 발현 증가를 통해 약물에 대한 민감도를 변경시키기도 한다.^{5, 6}

CD44는 대장암, 난소암, 위암 그리고 췌장암 등 여러 가지 암종에서 높은 수준으로 발현되는 암 줄기세포(cancer stem cell)의 세포 표면 분자로 잘 알려져 있다. CD44는 non-kinase, single span transmembrane glycoprotein으로 인간에서는 총 19개의 exon으로 구성되어 있으며, 여러 alternative splicing을 거쳐 CD44 standard (CD44s) 그리고 CD44 variant (CD44v)의 형태를 형성한다.⁷ 이러한 CD44는 다기능성 단백질으로 여러가지 방식을 통해 다양한 생리적 병리학적 과정에 관여한다. 첫 번째로, CD44는 hyaluronan이나 collagen, osteopontin 그리고 matrix metalloproteinase와 같은 다양한 세포 외 기질 구성요소들의 핵심적인 adhesion receptor로 작용한다. 특히, CD44의 주요 리간드로 알려진 hyaluronan과의 상호작용은 암의 전이나 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{8, 9} Hyaluronan은 CD44와 상호작용하여 세포막 내의 signaling domain을 유도하거나 안정화할 수 있는데, 이러한 signaling domain에는 receptor tyrosine kinase (ErbB2 and EGFR), 다른 signaling receptors (TGF β R1) 그리고 nonreceptor kinases (Src

family)가 포함되어 있으며, 이러한 신호는 발암성 경로인 MAPK 및 PI3K/Akt 세포 생존 경로를 촉진하며, 항암제 내성과도 관련되어 있다.^{8, 10}

두 번째는, CD44 가 protein kinase pathway 를 활성화하는 역할을 수행한다는 것이다. CD44 자체에는 kinase 활성이 없지만, CD44 가 protein kinase 를 활성화할 수 있는 몇 가지 메커니즘이 존재한다. 그 중 하나가 바로 CD44 가 세포 표면에서 growth factor 와 결합하여 co-receptor 로 작용하며, tyrosine kinase receptor (RTK)를 안정화하는데 도움을 준다는 것이다.¹¹ 예를 들어, CD44v6 에는 c-Met 의 리간드인 HGF 와 결합하는 extracellular peptide domain 을 가지고 있어, CD44v6 에 결합한 HGF 는 c-MET 과 결합하여 Met 을 활성화한다. 실제로 CD44v6 에 특이적인 항체를 처리했을 때, Met 의 활성화가 폐지되는 것이 확인되었다. 또, 폐암 세포주 모델에서 CD44 가 MAPK 경로를 통해 KRAS 매개 신호 전달의 활성화에 기여한다는 연구 결과가 존재한다.¹² CD44 의 knockdown 은 폐에서 KRAS G12D 를 발현하는 mouse model 에서 생존 능력을 향상시켰으며, ERK 1/2 의 활성화가 억제되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 ERK 가 CD44 의 downstream target 일 수 있음을 의미한다.¹³ 종합적으로 CD44 는 adhesion receptor 로의 역할과 더불어 protein kinase 및 그 리간드의 발현 조절에도 간접적으로 작용하는 다기능 단백질임을 알 수 있다. PDAC 에서 CD44 의 과발현은 환자들의 나쁜 예후와도 연관되어 있을 뿐만 아니라, Chemotherapy 에 대한 내성 발생 및 재발과도 관련이 있다고 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁷ 췌장암 세포가 gemcitabine 에 대한 저항성을 획득하는 기전에 있어서 CD44 의 역할은 아직 정확하게 알려진 바가 없지만 앞선 선행 연구 결과들을 종합해보았을 때 췌장암의 gemcitabine 에 대한 저항성 획득 과정에서 중요한 역할을 할 것이라고 예상할 수 있다.

또, TGF β 1(Transforming Growth Factor Beta 1)은 췌장암의 발달 및 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. TGF β 1은 암의 발생 초기에는 세포 주기 억제와 세포 증식 억제를 통해 암 발생을 억제하고 SMAD 신호 전달 경로를 통해 p15, p21 등의 세포 주기 억제 단백질을 유도하여 세포 분열을 차단하는 것으로 알려져 있다. 하지만 췌장암의 약 60%가 SMAD4 돌연변이를 가지고 있고 이러한 돌연변이는 TGF β 1이 원래 가지고 있던 종양 억제 기능을 상실하게 하여 이후에는 종양 촉진자로 작용하게 된다. 특히 TGF β 1의 과발현은 EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)를 유도하여 암세포의 침습성과 전이능을 증대시키며, 종양 미세환경에서 면역 억제 세포와 섬유아세포를 활성화하여 면역 회피를 돋는다. 또한, 혈관 신생을 촉진하여 암세포의 생존과 성장에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 기능적 특징은 TGF β 1의 발현량이 높은 췌장암 환자에서 좋지 않은 예후와도 연관되어 있음을 시사한다.¹⁸⁻²⁰ 이러한 역할을 수행하는 TGF β 1의 발현저하는 p38이나 JNK와 같은 다양한 SAPK의 인산화를 증가시키며 ROS의 생성 증가를 통해 Akt의 활성화를 억제해 암세포를 세포 사멸 쪽으로 유도하는 것으로 알려져 있다.²¹ 따라서 SAPK 단백질의 인산화를 빠르고 강하게 증가시켜 acute cell death를 유도할 수 있는 TGF β 1을 CD44와 함께 치료 표적으로 사용한다면 췌장암의 치료 효율을 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

현재 췌장암의 치료에는 앞서 언급한 다양한 항암제 조합들이 사용되고 있다. 하지만 췌장암은 암세포 주변의 섬유성 기질로 약물의 침투가 어렵고 치료가 반복되는 과정에서 암세포가 약물 저항성을 획득하기가 쉽다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 췌장암을 효과적으로 치료하기 위해서는 항암제에 대한 반응성을 높이는 동시에 췌장암 세포가 항암제 처리에 반응하여 살아남기 위해 활성화하는 생존 경로를 차단할 필요가 있을 것이다.

종양 살상 바이러스(oncolytic virus, OV)는 살아있는 바이러스의 유전자를 조작해 정상세포에서는 작용하지 않으며, 암세포에서만 특이적으로 증식하여 암세포를 파괴하는 특징을 가지고 있다. 이는 암세포만을 직접적으로 공격하는 것 외에도 oncolytic virus에 의해 유발된 면역원성 세포사멸에 이어 pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMP), 그리고 종양 관련 항원 (TAA) 등이 방출되어 급속한 면역반응을 유발한다.²²,²³ 이러한 반응은 Dendritic Cell에 의한 종양 및 바이러스 항원 제시를 강화하여 T cell priming 및 activation을 유도하고 궁극적으로 면역 자극성 미세환경을 형성한다. 또 숙주 면역 세포를 자극하여 종양 관련 EC 및 angiogenesis factor를 직접 표적으로 삼아 anti-angiogenesis factor를 생성하여 종양 혈관계를 재구성함으로써 anti-angiogenic agent로도 역할을 할 수 있다.²⁴,²⁵ 이렇듯 oncolytic virus는 종양 미세환경을 변화시켜 cold tumor를 hot tumor로 전환해주는 역할을 한다. Oncolytic virus는 자체적인 항종양 효과도 가지고 있지만 추가로 항암 작용에 유용한 유전자들을 탑재하여 항암력을 극대화할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

따라서 본 연구는 췌장암이 gemcitabine에 대한 저항성을 획득하는 과정에서 CD44가 어떠한 역할을 하는지 확인하고, 췌장암 세포주에서 CD44를 감소시켜주는 것이 gemcitabine에 대한 민감도를 향상시켜 gemcitabine 단독요법보다 우수한 항종양 효과를 보여줄 수 있는지를 확인하고자 하였다. 추가로 췌장암 세포에서 CD44의 발현을 감소시켜주는 것이 다른 RTK 와의 상호작용이나 hyaluronan 과의 상호작용을 약화시켜 장기적으로 암세포의 생존이나 전이를 억제할 수 있다고 예상되지만 acute 한 cell death를 유도하지는 못해 단독으로 감소시키는 것은 그 효과가 충분히 발휘되지 못할 것이라고 예상하였다. 따라서 gemcitabine에 대한 감수성을 높이고 항종양효과를 극대화하기 위해 CD44와 종양을 빠른 시간 내에 세포 사멸로



유도할 수 있는 TGF β 1에 대한 shRNA를 발현하는 oncolytic virus를 함께 사용하여 효과적으로 종양의 성장을 억제할 수 있는지 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포배양

인간 췌장암 세포주 MiaPaCa-2 (ATCC, Manassas, VA, USA), PANC-1(한국세포주은행, Seoul, Korea), 293A(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였고, 293A는 DMEM(Hyclone, Logan, Utah, USA)에 8% FBS 와 10unit/ml 의 Penicillin-Streptomycin 을 사용하여 배양하였고, MiaPaCa-2 와 PANC-1은 DMEM(Hyclone, Logan, Utah, USA)에 10% FBS 와 10unit/ml 의 Penicillin-Streptomycin 을 사용하여 배양하였다.

2.2. 바이러스 제작 및 정제

2.2.1 증식불능 아데노바이러스 제작

2.2.1.1 Human CD44 mRNA 발현을 특이적으로 감소시키는 증식불능 아데노바이러스 제작

Human CD44 mRNA 발현을 특이적으로 감소시키는 shRNA 를 발현하는 아데노바이러스를 제작하기 위해 논문에서 발췌하여 사람에서 특이적으로 CD44 의 mRNA 발현을 감소시키는 shRNA 를 선정하였다.²⁶ 선정된 shRNA 는 BamH I 과 HindIII (New Englands Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소로 처리한 pSP72-ΔE3-U6 셔틀벡터에 각각 삽입하여 d1324-IX 아데노 바이러스 genomic DNA 와 상동재조합을 하여 증식 불능한 d1324-IX-human shCD44 를 제작하였다.

2.2.1.2 TGF β 1 과 CD44 의 mRNA 발현을 동시에 감소시키는 증식 불능 아데노바이러스 제작

pSP72- Δ E3-U6-shTGF β 1 를 먼저 HindIII로 자르고 blunt 한 뒤 Kpn I 으로 잘랐다. pSP72- Δ E3-H1-shDaxx 를 BamH I 과 HindIII로 잘라 shDaxx 를 제거한 뒤, CD44s mRNA 발현을 감소시키는 shRNA 를 발현하도록 고안된 두가닥의 DNA 서열을 ligation 하여 pSP72- Δ E3-H1-shCD44 를 제작하였다. 이후 이 벡터를 Sph I 으로 자르고 blunt 한 뒤 Kpn I 으로 잘라 ligation 진행하였다. 제작된 pSP72- Δ E3-U6-shTGF β 1-H1-shCD44 셔틀벡터를 d1324-IX 아데노 바이러스 genomic DNA 와 상동재조합을 하여 증식 불능한 d1324-IX-U6-shTGF β 1-H1-shCD44 를 제작하였다.

2.2.2 종양살상 아데노바이러스 제작

2.2.2.1 Human CD44 mRNA 발현을 특이적으로 감소시키는 종양살상 아데노바이러스 제작

앞서 제작한 pSP72- Δ E3-U6-shCD44 셔틀벡터를 d1324-BstB I 아데노바이러스 genomic DNA 와 E3 부분에 상동재조합을 하였다. E1B55kDa 가 제거되고 E1A 를 발현하는 pVax1-3484 셔틀벡터와 d1324-BstB I - Δ E3-shCD44s 아데노바이러스의 E1 부분에 상동 재조합을 통해 종양을 선택적으로 제거하면서 CD44 의 발현을 감소시키는 d1324-BstB I -3484- Δ E3-H1-shCD44 를 제작하였다.

2.2.2.2 TGF β 1 과 CD44 의 mRNA 발현을 동시에 감소시키는 종양살상 아데노바이러스 제작

앞서 제작한 pSP72- Δ E3-U6-shTGF β 1-H1-shCD44 셔틀벡터를 d1324-BstB I 아데노바이러스 genomic DNA 와 E3 부분에 상동재조합을 하였다. E1B55kDa 가 제거되고 E1A를 발현하는 pVax1-3484 셔틀벡터와 d1324-BstB I - Δ E3-U6-shTGF β 1-H1-shCD44 아데노바이러스의 E1 부분에 상동 재조합을 통해 종양을 선택적으로 제거하면서 TGF β 1 과 CD44s 의 발현을 동시에 감소시키는 d1324-BstB I -3484- Δ E3-U6-shTGF β 1-H1-shCD44 를 제작하였다.

2.2.3 바이러스의 생산 및 농도 측정

d1324-IX 혹은 d1324-BstB I 의 아데노바이러스 유전자를 통해 제작된 모든 바이러스 벡터는 293A 세포에 Pac I (New Englands Biolabs, Ipswich, MA, USA) 제한효소로 자른 뒤 jetPRIME (Polyplus-transfection S.A, Illkirch, France)를 이용하여 transfection 한 후 바이러스 생산에 의해 생긴 세포독성효과(CPE)가 생성될 때까지 기다렸다. CPE 가 생성이 되면 모든 바이러스들은 293A 세포에서 증식, 배양한 후 CsCl 밀도 구배에 따른 바이러스 정제 및 농축을 한 후 10mM Tris-HCl (pH 8.0)을 통해 1시간 동안 투석을 총 2회 실시한 후에 저장완충액 (10mM Tris-HCl, 4% sucrose, 2mM MgCl₂)에서 1시간 동안 투석시킨 후에 -80°C 냉동고에 저장하였다. 각 바이러스의 농도는 endpoint dilution assay 를 이용하여 각 well 에서 생성되는 세포독성효과(CPE)를 측정한 후 계산하였다. 293A 세포를 96well plate 각 well 에 1.0×10^4 으로 각각 분주하여 배양한 후에 다음날 5% FBS 를 함유한 DMEM 배지를 사용하여 10^{-3} 부터 10^{-12} 까지 희석시킨 바이러스를 각 농도 별로 10 개의 well 씩 감염을 시키고 7-10 일간 세포를

용해시키며 형성되는 CPE의 개수를 센 후에 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\text{Titer} = 1 \times 10^{(\text{CPE가 형성된 well의 개수} / 10^{0.5})+0.3} \times 20 \text{ Plaque Forming Unit/ml}$$

2.3. Real-time PCR

제작된 바이러스가 표적 RNA를 감소시키는지 확인하기 위하여 Real-time PCR 을 이용하여 cycle threshold(Ct) 값을 측정하여 비교한다. 세포를 6well에 각각 2×10^5 cell/well로 분주하여 배양한 후, 다음날 제작한 바이러스들을 각각 0에서 100 까지 다양한 multiplicity of infection(MOI) 별로 감염시킨 후, 이를 후에 TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출한 RNA를 cDNA로 합성 후 power SYBR Green PCR Master Mix (Thermofisher, FL, USA) 이용하여 Real-time PCR 을 수행하였다.

2.4. Cell surface protein biotinylation과 avidin pulldown

세포를 150Φ 세포배양접시에 총량 25mL 메디아 기준으로 2×10^6 으로 분주하여 24 시간동안 배양하였다. 다음날 약물을 처리한 이후 PBS로 세척 후 0.25% Trypsin (Hyclone; Cytiva) 처리 후 세포를 수확한 뒤 원심분리하였다. 이후 ice-cold PBS로 3 번 세척해주었다. 이후, PBS ml 당 EZ-Link sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, Waltham, MA) 1.0mg 녹인 뒤 세척이 끝난 세포 침전물을 2ml biotin solution으로 풀어준 후

상온에서 30 분 rotor로 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후 원심분리로 세포 침전물을 모아준 후 100mM Glycine+PBS로 3 번 세척을 진행하였다. 세척이 끝난 세포침전물을 RIPA buffer(25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) 500 μ l로 용해시켰다. Microtube에 NeutrAvidin agarose resin (Thermo Scientific, Waltham, MA) 50 μ l 분주 후 500xg 1 분동안 원심분리 진행 후 저장 용액을 제거해주었다. Resin이 들어있는 microtube에 RIPA buffer로 세포 용해 진행 한 시료를 모두 넣은 후 상온에서 rotor로 1 시간 동안 반응시켜주었다. 이후 3000xg에 1 분간 원심분리 진행 후 시료를 제거하였다. RIPA buffer 200 μ l로 resin 세척 후 3000xg에 1 분동안 원심분리 진행하여 RIPA buffer를 제거하는 세척 과정을 총 6번 반복한다. 6 번 세척 이후 2x sample buffer를 60 μ l 넣은 후 95°C에서 5 분간 끓여준다. 이후 6000xg에 5 분 원심분리 진행 한 후 resin을 제외하고 시료만 얻어 새로운 microtube에 옮겨낸다.

2.5. Western blot

1X Sample buffer(4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125M Tris-HCl pH 6.8)로 용해시킨 다음 95 도에서 10 분간 가열하여 식힌 뒤 정량하여 SDS-polyacrylamide gel (4% stacking gel과 10% running gel)에 전기영동하였다. 이후 transfer buffer (2.5nM Tris, 200mM Glycine, 20% Methanol)를 이용하여 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)로 transfer하고 상온에서 1 시간동안 TBST에 녹인 5% skim milk 혹은 5% bovine serum albumin (BSA)로 블로킹 진행하였다. 1 차 항체를 1:500~1:2000 까지 각 항체에 맞게 TBST에 녹인 5% BSA에

희석하여 4도에서 12시간~16시간 동안 반응시킨 후 상온에서 TBST로 10분간 3번씩 세척하였다. 이후 2차 항체를 5% BSA 용액에 1:2000으로 희석한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고 다시 TBST로 10분간 3번 세척하였다. 이후 항체가 붙어있는 membrane 을 ECL 용액 (Pierce, Rockford, IL, US)를 이용하여 반응시킨 뒤 chemiluminescence (Syngene, Frederick, MD, USA)을 이용하여 단백질 발현양을 확인하였다. 이 과정에서 사용된 항체는 EGFR, Akt, ERK, JNK, p38, phospho-EGFR, phospho-Akt, phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38, phospho-c-jun (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), GAPDH, IGF1R, phospho-IGF1R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), CD44s, GRP78, c-MET, FUT1 (Proteintech Group, Rosemont, USA)이다.

2.6. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

GRP78 이 CD44 와 결합하는지 확인하기 위하여 면역침강법을 시행하였다. MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포주를 각각 3.0×10^6 과 1.0×10^6 으로 150mm dish 에 분주하였다. 다음날 10% FBS 를 함유한 DMEM 배지에 gemcitabine 을 각각 $6 \mu M$ 와 $1 \mu M$ 로 희석하여 2시간 처리 후 $400 \mu l$ 의 IP Lysis/Wash buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 용해시킨 후 10분 동안 얼음에 두고 13000xg 에 10분동안 원심분리하여 상층액만 분리하였다. 이후 1차항체와 bead 그리고 각 시료를 column 에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 다음 날 1000xg로 1분동안 침전시킨 뒤 IP lysis/wash buffer 로 3번 씻어내고 column 을 새 microtube 에 옮겨주었다. Column 에 $10 \mu l$ 의 elution buffer 를 넣고 1000xg 에 1분 원심분리 시킨 뒤, $50 \mu l$ 의 elution buffer 를 추가하여 상온에서 5분간

인큐베이션하였다. 이후 1000xg에서 5분간 원심분리 진행한 이후, 2x sample buffer(4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125M Tris-HCl)을 동량으로 넣어 섞어준 뒤, 95°C에서 10분간 변성시킨 뒤 위에 서술한 Western blot을 진행하였다.

2.7. Cell viability

바이러스 단독 처리와 바이러스와 gemcitabine의 병용투여에 따른 세포 생존능을 측정하기 위한 실험을 진행하였다. MiaPaCa-2와 PANC-1을 48well plate에 well 당 1×10^4 세포를 분주하고 20~24시간 뒤 증식불능 아데노바이러스 NC, shTGF β 1, shCD44s, shTGF β 1-shCD44s를 각각 100MOI와 25MOI로 처리하였다. 증식불능 아데노바이러스만을 단독으로 처리한 시료는 24시간 뒤 PBS로 처음 세척 후 0.25% Trypsin (Hyclone; Cytiva)을 처리하여 세포를 수확하였다. 이후 메디아를 제거하고 새로운 5% FBS가 함유된 DMEM 100 μl 를 추가하여 세포침전물을 잘 풀어준 다음 96well plate에 옮겼다. 이 때 5% FBS가 함유된 DMEM 100 μl 도 Blank로 함께 96well plate에 옮겨준다. 바이러스를 처리한 뒤 gemcitabine을 처리한 시료는 바이러스 처리 24시간 뒤 메디아를 제거하고 gemcitabine을 추가로 24시간 처리한 후 위에서 기술한 대로 96well plate로 옮겨주었다. 이후 MTS 시약 20 μl 를 추가한 뒤 호일로 감싸 빛을 차단하고 2~4시간 정도 인큐베이션하였다. 이후 microplate reader (Molecular devices corporation, Sunnyvale, CA, US)를 이용하여 흡광도 값을 측정하였다. 흡광도는 490nm에서 측정하며 측정된 값에서 blank의 값을 제거하고 계산하였다.

2.8. Clonogenic assay

MiaPaCa-2 와 PANC-1 을 6well plate에 well 당 1×10^5 세포를 분주 20~24 시간 후 oncolytic adenovirus 를 각각 100MOI/well 과 15MOI/well 처리 24 시간 후 PBS 로 세척하였다. 이후 0.25% Trypsin (Hyclone, Logan, Utah, USA) 을 처리하여 세포를 수확 한 뒤, 세포를 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 으로 희석하여 새로운 6well plate에 분주한다. 7~10 일 뒤 세포들이 콜로니 형성 시, crystal violet (Thermofisher, FL, USA) 으로 염색하여 관찰하였다. 또, 바이러스와 gemcitabine 를 같이 처리하는 경우, oncolytic adenovirus 를 먼저 24 시간 처리 한 후 미디어를 제거하고, 5% FBS 를 함유하는 DMEM 을 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 gemcitabine 을 각각 $6 \mu M$ 와 $1 \mu M$ 로 희석하여 2시간 처리 후 위에 서술한 방법과 같이 새로운 6well plate에 희석 후 분주하여 콜로니 형성을 확인하였다.

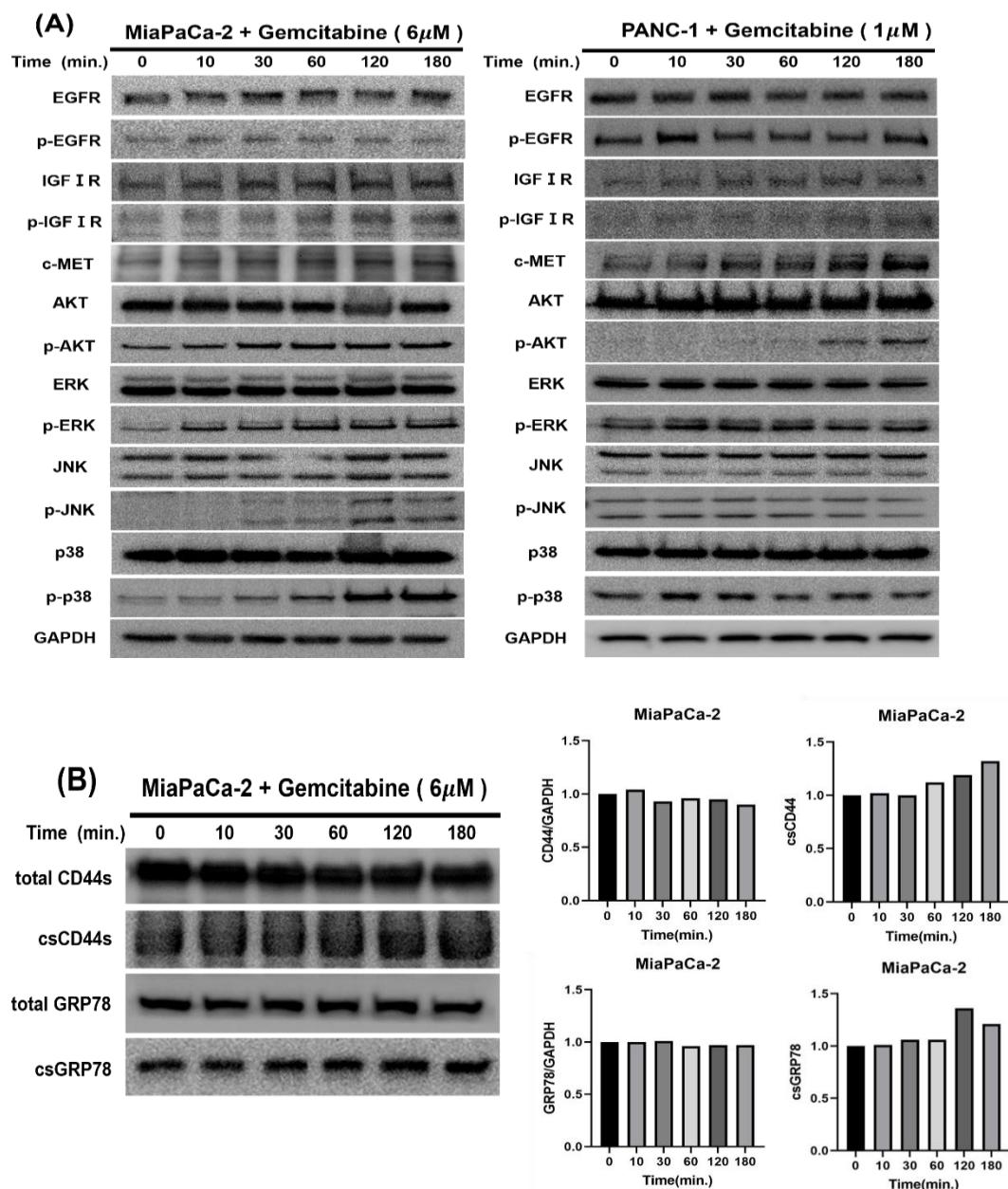
2.9. 동물실험

MiaPaCa-2 를 50% matrigel matrix 와 1:1 비율로 섞어 4~6 주 정도의 BALB/c male nude mice 의 왼쪽 옆구리에 마리 당 1×10^6 개수의 세포를 퍼하주사하였다. 종양의 크기가 80~110 mm^3 에 도달하였을 때, oncolytic NC (Negative control) virus, oncolytic shTGF β 1 virus, oncolytic shTGF β 1 virus, oncolytic shTGF β 1-shCD44s virus 를 각각 $50 \mu l$ PBS 에 1.3×10^8 PFU 로 희석하여 tumor 내에 주사하였다. 바이러스 주사 24 시간 후 PBS 에 녹인 gemcitabine (Merck, Darmstadt, Germany) 을 mouse 당 50mg/kg 으로 복강에 주사하였다. 바이러스와 gemcitabine 첫번째 투여 후 마우스들의 체중을 모니터링하여 체중 및 식욕 감소와 같은 증상이 없는지 2~3 일 정도 관찰한다. 마우스들의 체중과 식이에 큰 변화를

보이지 않으면 위에 기술한 방식대로 동일하게 바이러스와 gemcitabine을 주사하고 이를 간격으로 종양의 크기를 측정한다. 종양의 크기는 종양의 최장경(width)과 최장경에 수직한 최단경(length)를 각각 측정하여 $width \times (length)^2 \times 0.52 = \text{mm}^3$ 으로 계산하였다. 종양의 괴사가 오기 전 실험을 종료하였으며, 이후 모든 마우스를 CO₂ 가스를 이용해 안락사 시킨 뒤 종양만을 분리하여 크기를 비교하였다.

3. 결과

3.1. Gemcitabine 처리 시 짧은 시간 내에 세포 생존 신호의 변화 확인



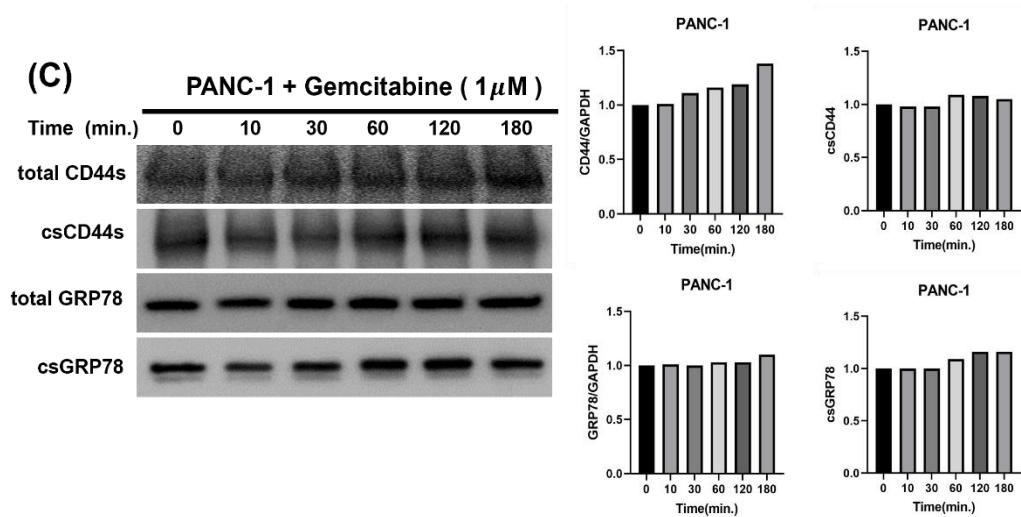


그림 1. Gemcitabine 처리 시 짧은 시간 내에 세포 생존 신호의 변화 확인.

(A) MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 gemcitabine 을 IC50 농도로 처리하여 세포 생존 신호와 관련된 분자들의 발현량 변화 확인. (B) MiaPaCa-2 세포주에서 gemcitabine 처리 시간에 따른 CD44 와 GRP78 그리고 cell surface 의 CD44 와 GRP78 발현량 변화 확인. (C) PANC-1 세포주에서 gemcitabine 처리 시간에 따른 CD44 와 GRP78 그리고 cell surface 의 CD44 와 GRP78 발현량 변화 확인.

췌장암의 치료에 사용되는 gemcitabine 은 일반적으로 연속 7 주 동안 일주일에 한 번씩 반복투여하는 것으로 알려져 있다. 하지만 췌장암은 두꺼운 섬유성 기질로 둘러싸여 있어 종양 부위에 약물이 잘 전달되지 않고, 치료 과정 중 평균 6 개월 이내에 약제에 대한 내성이 생겨 치료에 어려움이 존재한다. 항암제 치료 초기 단계에서 일부 세포들은 항암제에 반응하여 세포 사멸로 이어지지만, 일부 세포들은 항암제 처리에 반응하여 세포 생존 신호를 활성화하고 살아남기 위한 반응을 보여줄 것이다. 또 이렇게 살아남은

세포들이 초반에 활성화한 생존신호를 통해 항암제에 대한 내성 기전을 강화하여 항암제에 대한 저항성을 보일 것이다. 이러한 관점에서 MiaPaCa-2 와 PANC-1 췌장암 세포주에서 gemcitabine 을 처리하였을 때 세포들이 gemcitabine 처리 초반에 어떠한 신호전달 변화를 일으키는지 확인하였다. 처리한 gemcitabine 의 농도는 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 gemcitabine 을 처리하였을 때 48 시간 동안 세포가 절반 정도로 죽는 IC50 인 $6 \mu M$ 와 $1 \mu M$ 이다. 완전히 저항성을 획득한 세포가 아닌, 항암제 처리 초기 단계에서 살아남기 위한 세포들이 생존 신호를 어떻게 변조하는지 혹은 생존 신호를 어떻게 활성화하는지 여부를 확인하기 위해서 gemcitabine 을 IC50 농도로 세포 대부분이 살아있는 180 분까지 처리하였다. MiaPaCa-2 세포주에서는 phospho-EGFR, phospho-IGF1R, phospho-Akt, phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-p38 의 발현량이 gemcitabine 처리 10 분 정도부터 계속해서 증가하는 것을 확인할 수 있었고 (그림 1A 왼쪽), 이때 total EGFR, IGF1R, Akt, ERK, JNK, p38 의 발현량은 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그에 반해 PANC-1 세포주에서는 phospho-IGF1R 과 phospho-Akt 만이 약하게 gemcitabine 처리 후반에 증가하는 것이 확인되었고, phospho-EGFR, phospho-ERK, phospho-p38 은 gemcitabine 처리 초기인 10 분 정도에서만 약간 증가하며, phospho-JNK 에는 큰 변화가 없음을 확인할 수 있었다.(그림 1A 오른쪽) Gemcitabine 처리에 의한 세포 내 신호전달 변화는 MiaPaCa-2 가 더 빠르고 강하게 일어나는 것을 확인하였으며, 두 가지 췌장암 세포주 모두 암의 증식과 생존 그리고 약물 저항성에 관련된 신호들이 gemcitabine 처리 시 점점 증가하는 것을 확인하였다.

이러한 세포 생존에 관련된 신호들의 증가가 앞서 실험실에서 투고한 논문인 Combinatory downregulation of TGF β 1 and GRP78 is responsible for overcoming acquired sorafenib-resistance which is initiated with rewiring

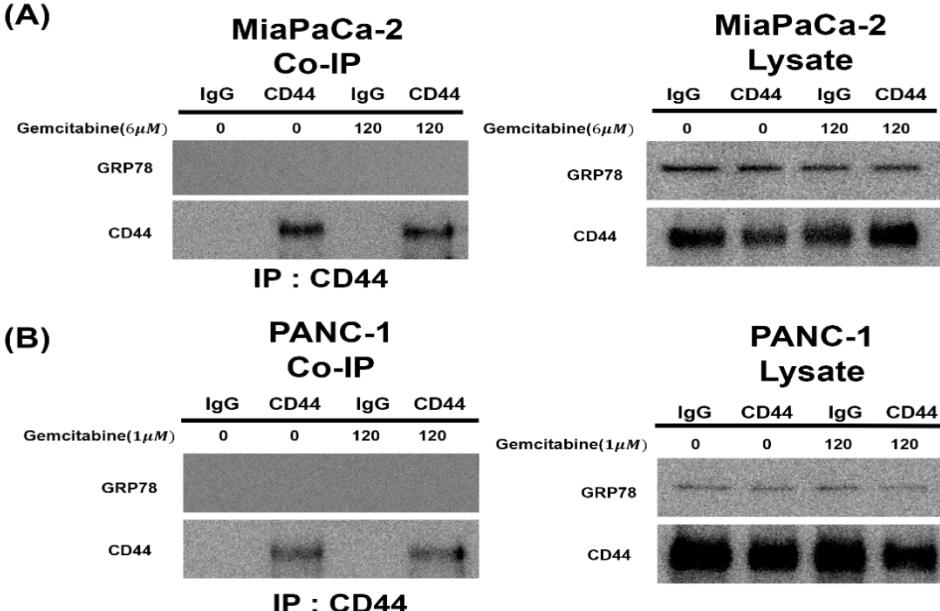
cell surface CD44-GRP78-IGF1R signaling circuit에서 sorafenib 저항성의 획득에 중요한 역할을 한 GRP78과 CD44의 발현량의 증가와 이어지는지를 확인하고자 cell surface protein만을 분리하여 CD44와 GRP78의 발현량을 확인해보았다. 동시에 두 단백질의 total level도 확인하였다.

MiaPaCa-2에서는 gemcitabine 처리 시간에 따라서 total CD44와 cell surface에 위치한 CD44와 GRP78의 발현량이 60분 이후부터 약간씩 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1B). Gemcitabine을 처리한 지 180분 이후에 cell surface CD44의 발현량은 0분과 비교하였을 때 1.3배 증가한 것을 확인할 수 있었다. PANC-1에서도 MiaPaCa-2와 유사하게 total CD44와 cell surface에 위치한 CD44 그리고 GRP78의 발현량이 60분 이후부터 증가한 것을 확인할 수 있었다 (그림 1C). PANC-1의 경우 total CD44는 gemcitabine 처리 0분과 180분을 비교하였을 때 1.3배가량 증가하였지만, cell surface CD44의 증가량은 약 1.1배 정도로 MiaPaCa-2에 비해 cell surface CD44의 증가량은 많지 않았다. GRP78은 whole cell lysate 수준에서는 두 세포주 모두 발현량에 큰 차이를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다.

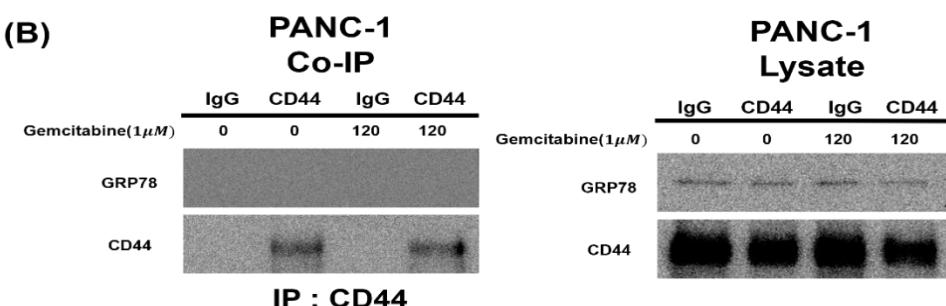
위 실험을 통해 gemcitabine 처리에 의해 CD44가 whole cell lysate와 cell surface에서 발현량이 일부 증가하며, cell surface로의 CD44 양의 증가는 MiaPaCa-2가 PANC-1에 비해 조금 더 큰 것을 확인할 수 있었다. 또 gemcitabine 처리에 의한 세포 생존에 관련된 신호들의 증가 이후 CD44의 발현량이 차례로 증가하는 것을 확인하였는데, 이는 두 세포주 모두 gemcitabine 처리 이후 세포들이 생존을 위한 방식으로 세포 생존 신호 경로들을 변조하여 CD44의 발현을 증가시킬 수 있음을 의미한다.

3.2. 짧은 시간 내에 CD44 를 Cell surface 로 이동시키는 요인 확인

(A)

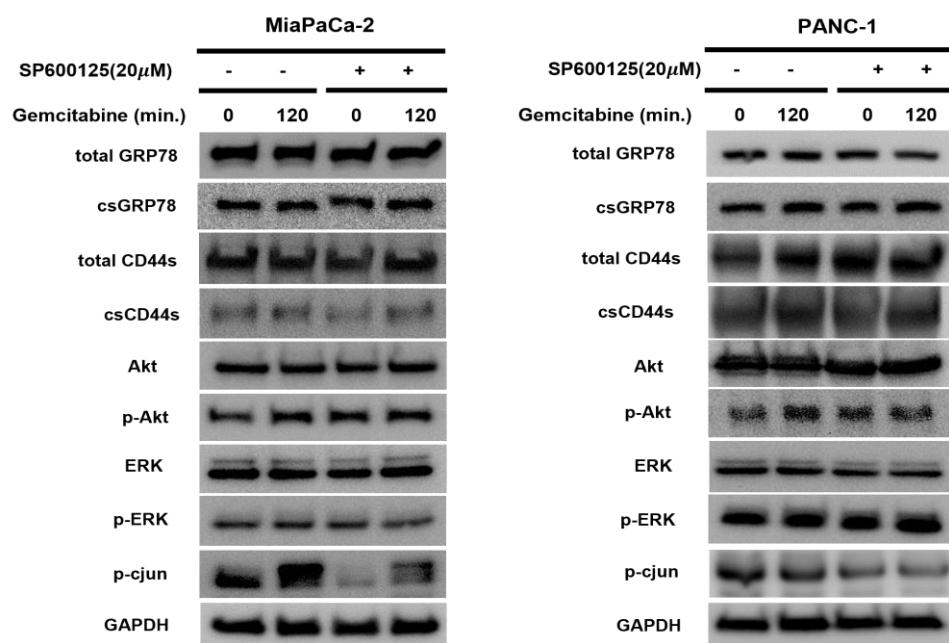


(B)



(C)

JNK inhibitor



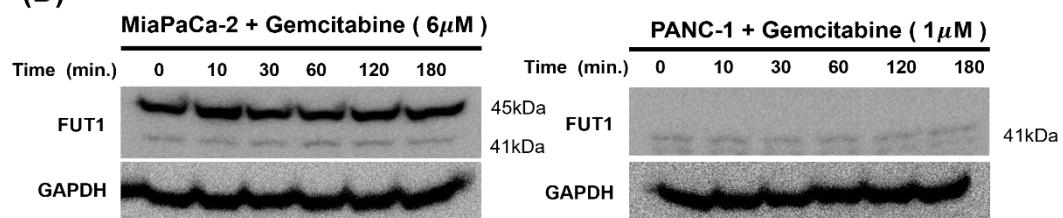
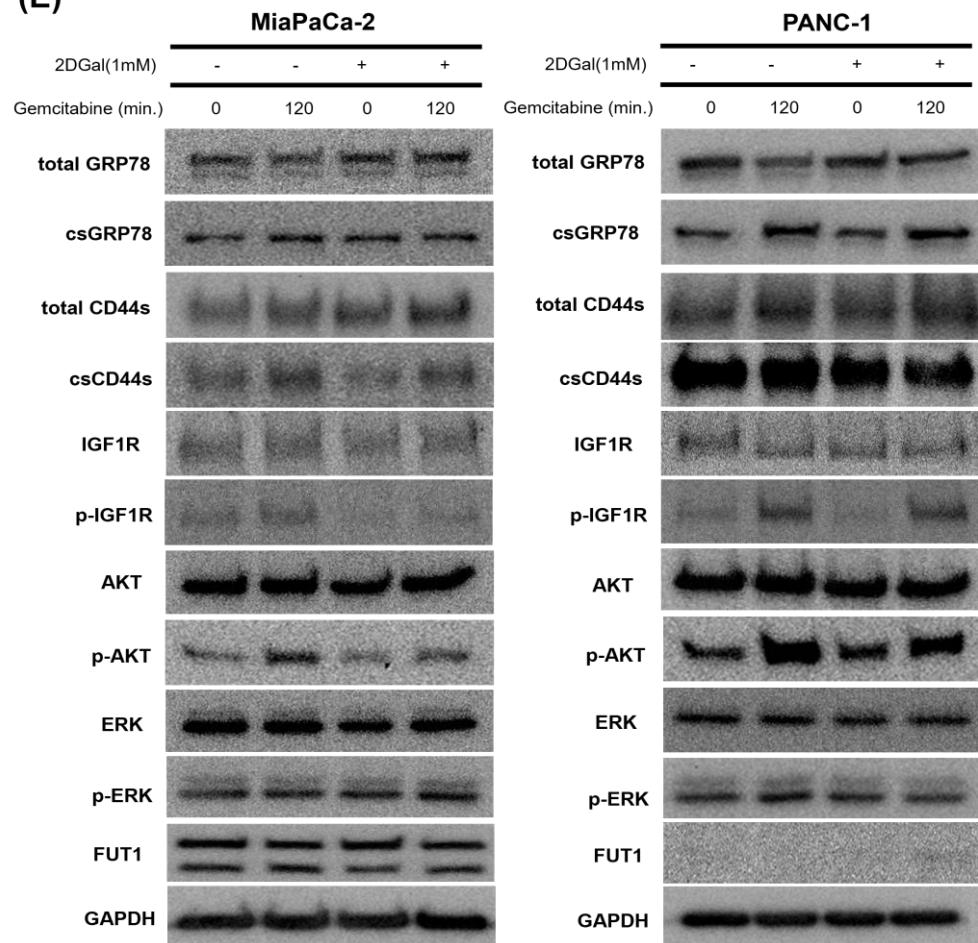
(D)

(E)


그림 2. CD44 가 gemcitabine 처리에 의해 세포 표면으로 이동하는 방식 확인.

(A) MiaPaCa-2 세포 및 (B) PANC-1 세포에서 gemcitabine 을 각각 6 μ M 와 1 μ M 로

2 시간 처리하였을 때 CD44 와 GRP78 이 결합을 이루게 되는지 여부를 면역침강법을 시행하여 확인 (왼쪽), 각 샘플을 함께 western blot 하여 항체에 이상이 없음을 확인 (오른쪽). (C) MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 JNK inhibitor 인 SP600125 를 $20\mu\text{M}$, 2 시간 먼저 처리한 뒤 gemcitabine 을 추가로 2 시간 더 처리하여 cell surface CD44 의 발현량 변화를 확인. (D) MiaPaCa-2 와 PANC-1 에서 gemcitabine 처리에 따른 FUT1 발현량 변화 비교. (E) MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 α (1-2) fucosyltransferase inhibitor 인 2-Deoxy-D-Galactose 를 1mM 6 시간 처리 후 gemcitabine 을 2 시간 더 처리하여 cell surface CD44 의 발현량 변화를 확인.

앞서 gemcitabine 처리에 의해 시간이 흐름에 따라 cell surface 에서 발현되는 CD44 의 양이 일부 증가하는 것을 확인하였다 (그림 1). 이 때 gemcitabine 처리에 의해 세포가 생존하기 위해 cell surface CD44 의 발현을 어떠한 방식으로 빠르게 증가시키는지 세 가지 측면에서 확인하고자 하였다. 먼저 gemcitabine 의 처리가 GRP78 과 CD44 의 결합력을 증가시켜 cell surface 로의 이동이 용이해지는지 여부를 확인하고자 하였다. GRP78 은 주요 ER 샤퍼론 단백질로 주로 단백질의 folding 과 unfolded protein response 를 조절하는 것으로 알려졌는데, 이러한 GRP78 의 과발현은 암세포의 생존, 침습 그리고 약물 저항성과도 관련되어 있다고 알려져 있다. 앞서 실험실에서 투고한 논문인 Combinatory downregulation of TGF β 1 and GRP78 is responsible for overcoming acquired sorafenib-resistance which is initiated with rewiring cell surface CD44-GRP78-IGF1R signaling circuit 에서 HCC 의 치료에 사용되는 항암제인 sorafenib 을 처리하였을 때, GRP78 이 CD44 와 결합하여 CD44 를 세포 표면으로의 이동을 용이하게 도와주고

이렇게 이동한 cell surface CD44 가 sorafenib 에 대한 저항성을 형성하는 것을 확인하였다.

또, 선행 연구 결과에 따르면 tamoxifen 저항성을 가지는 MCF7 세포에서 CD44v 가 GRP78 과 결합하여 cell surface 로의 이동이 용이해진다는 것이 확인되었다. 이러한 결과들을 바탕으로 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 gemcitabine 을 2 시간 처리하게 되면 GRP78 과 CD44 의 결합이 증가하고 이 때문에 CD44 가 안정화되어 세포 표면으로의 이동이 용이해지는지 여부를 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위해 MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포에 각각 $6\mu\text{M}$ 와 $1\mu\text{M}$ 의 gemcitabine 을 120 분 처리하였다. 이때 gemcitabine 처리 시간은 앞서 gemcitabine 을 180 분까지 처리하였을 때 cell surface 에 존재하는 CD44 와 GRP78 의 양이 일부 증가한 것이 확인되는 120 분으로 설정하였다 (그림 1B). 이후, gemcitabine 을 처리한 시료와 처리하지 않은 세포를 이용하여 면역 침강법을 수행한 뒤 western blot 으로 GRP78 과 CD44 의 결합 여부를 확인하였다. 그 결과 MiaPaCa-2 와 PANC-1 두 가지 세포주에서는 CD44 와 GRP78 이 gemcitabine 처리에 반응하여 결합한 뒤 CD44 가 GRP78 의 도움을 받아 cell surface 로 이동하는 것은 아님을 확인하였다 (그림 2A,B).

두 번째로는 HCC 세포주가 sorafenib 에 대한 저항성을 획득하는 과정에서 sorafenib 처리 시 JNK 나 ERK 가 cell surface 로 이동하는 분자의 phosphorylation 을 유도하여 세포가 cell surface 로 이동하는 데에 도움을 준다는 것이 확인되었다. 앞서 각각의 췌장암 세포주에 gemcitabine 을 처리하였을 때, MiaPaCa-2 에서는 JNK 와 p38 의 phosphorylation 이 시간이 흐름에 따라 증가하였고, PANC-1 에서는 p38 은 초반에 약간 활성화되며 JNK 의 활성화에는 큰 변화가 확인되지 않았다. 이러한 측면에서 CD44 의 cell surface 로의 이동이 용이한 MiaPaCa-2 에서는 JNK 가 이러한 역할을 수행할

것으로 예상하고 두 가지 세포주에 JNK inhibitor 를 각각 $20\mu\text{M}$ 로 2시간 먼저 처리한 뒤, gemcitabine 을 2시간 더 처리하여 cell surface 의 CD44 의 발현량을 비교하였다. 그 결과, MiaPaCa-2 에서 cytosol 의 CD44 의 발현량에는 큰 변화가 없지만, cell surface 의 CD44 의 발현량은 약간 감소한 것을 확인 할 수 있었다 (그림 2C). 이때, phospho-cjun 은 SP600125 의 활성을 확인하는 지표로 사용되었다. 하지만 PANC-1 에서는 JNK inhibitor 처리 시 cell surface 의 CD44 를 포함하여 확인한 모든 세포 생존과 관련된 분자들의 발현에 큰 변화를 보이지 않았다 (그림 2C). 따라서 이 결과를 통해 JNK 가 MiaPaCa-2 에서 아직 밝혀지지 않은 기작을 통해 CD44 를 안정화시켜 cell surface 로의 이동에 일부 도움을 준다는 것을 확인하였다.

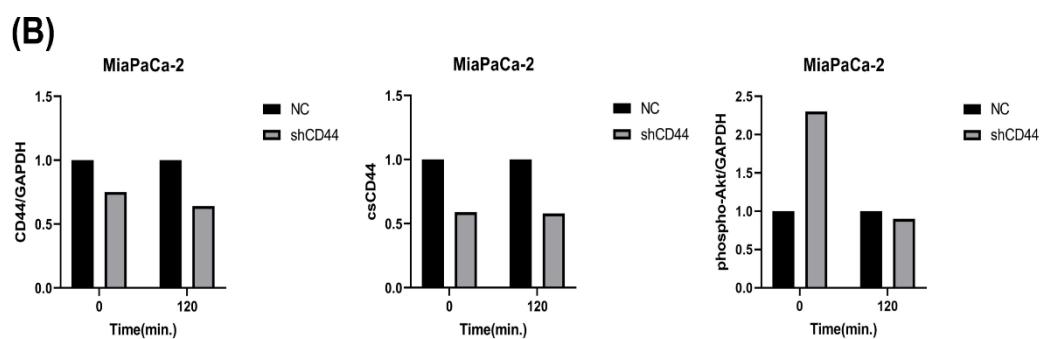
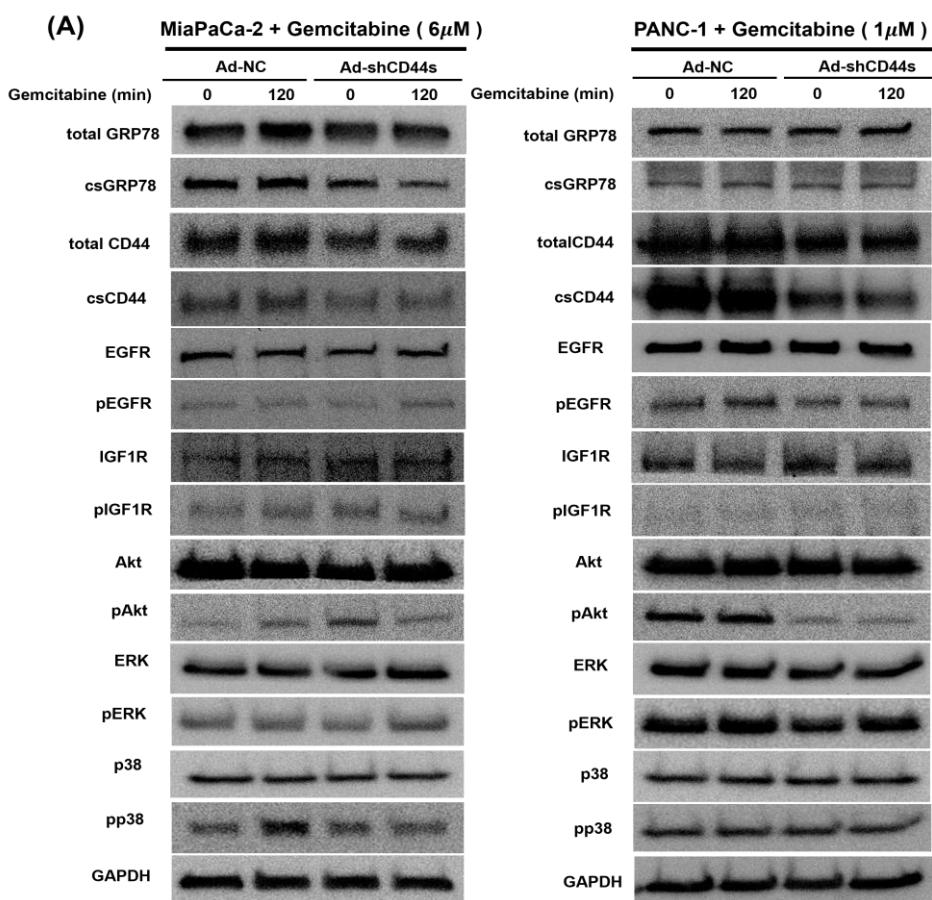
선행 연구를 통해 CD44 가 cell surface 로 빠른 시간 안에 이동하기 위해서는 fucosylation 이라는 번역 후 변형 (Post-translational modification) 과정이 필수적임을 확인하였다. 이때 CD44 의 fucosylation 을 유도하는 것의 후보는 FUT1 으로 $\alpha(1-2)$ fucosyltransferase 에 속한다. 따라서 우선 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에서 gemcitabine 을 처리하였을 때 FUT1 의 발현이 변화하는지를 확인해보았다 (그림 2D).

Gemcitabine 의 처리는 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에서 FUT1 의 발현량에 변화를 주지는 않았으며, 두 가지 세포주가 가지는 차이로는 MiaPaCa-2 에서는 41kDa, 45kDa 의 FUT1 이 발현되며 PANC-1 에서는 41kDa 의 FUT1 만 발현되는 것이었다. Gemcitabine 처리 시 MiaPaCa-2 에서는 cell surface 로의 CD44 이동량이 증가하지만 PANC-1 에서는 cell surface 의 CD44 발현량에 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 차이가 FUT1 의 발현에서 비롯되는지 확인하고자 두 가지 세포주에 $\alpha(1-2)$ fucosyltransferase inhibitor 인 2-Deoxy-D-Galactose(2DGa1)를 1mM 6시간 처리 후 gemcitabine 을 2시간 더 처리하여

cell surface CD44 의 발현량 변화를 확인하였다. 2DGa1 의 활성 여부를 확인하고자 FUT1 의 발현량 변화를 확인해보았을 때, FUT1 의 발현 자체에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 이는 2DGa1 이 작용하는 방식이 FUT1 의 발현을 감소시키는 것이 아닌 2DGa1 자체가 Leloir 경로에 의해 UDP-2-D-gal 로 전환되고 이렇게 전환된 UDP-2-D-gal 이 D-galactose 대신 당사슬에 합성되어 α (1-2) fucosyltransferase 의 기질로 작용하지 못하게 하는 것이기 때문으로 해석된다.²⁷ 2DGa1 의 처리는 MiaPaCa-2 세포에서 cell surface CD44 의 발현량을 확연히 감소시켰으며 이와 동시에 phospho-IGF1R 과 phospho-Akt 의 발현량도 함께 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2E).

하지만 PANC-1에서는 2DGa1 의 처리에도 cell surface 의 CD44 의 발현량에 큰 차이가 없었으며 phospho-IGF1R 과 phospho-Akt 의 발현량에도 큰 차이를 보이지 않았다 (그림 2E). 이는 초반에 gemcitabine 처리에 따른 cell surface 의 CD44 의 변화량이 MiaPaCa-2 가 조금 더 큰 결과 와도 일치하며 MiaPaCa-2 에서는 JNK에 의한 CD44 의 phosphorylation 과 FUT1에 의한 CD44 의 fucosylation 으로 CD44 가 cell surface 로 이동하는 것이 조금 더 용이하지만, PANC-1 은 두 가지가 모두 부족해 cell surface 로 쉽게 이동하지 못하는 것으로 여겨진다. 또, MiaPaCa-2 에서 gemcitabine 처리를 통해 cell surface 로 이동한 fucosylated CD44 는 IGF1R 과 직•간접적으로 상호작용하여 Akt 를 활성화하는 것으로 예상한다. 이러한 측면에서 PANC-1 세포주보다 MiaPaCa-2 세포주가 gemcitabine 을 처리에 강하고 빠르게 반응하고, CD44 의 매개를 통해 다른 RTK 경로와 상호작용하여 살아남기 위한 생존 전략을 강화시키는 능력을 갖춘 것으로 예상한다.

3.3. 췌장암 세포에서 CD44 의 발현감소가 gemcitabine 저항성 획득에 미치는 영향



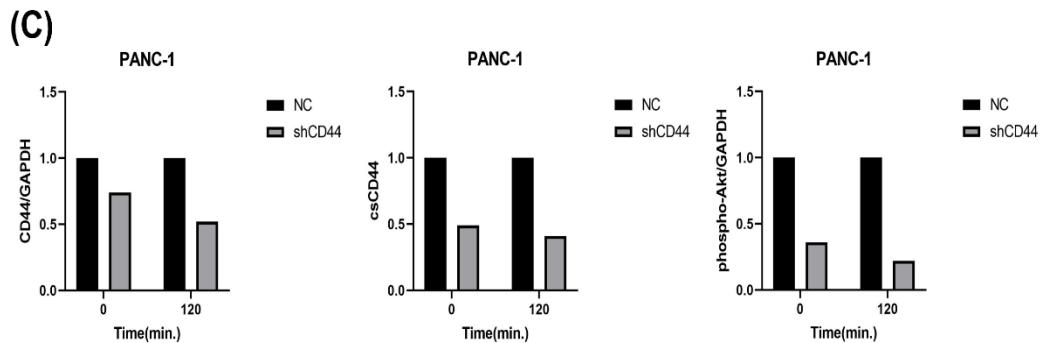


그림 3. 췌장암 세포에서 gemcitabine에 대한 저항성을 획득하는데 있어서 CD44의 역할 확인. (A) MiaPaCa-2와 PANC-1 세포에 NC (Negative control) 증식불능 아데노 바이러스와 CD44 shRNA 증식불능 아데노바이러스를 각각 감염시킨 후, gemcitabine을 처리하지 않은 것과 gemcitabine을 2시간 처리한 시료들 간 세포 내 신호전달 변화 비교. (B) MiaPaCa-2에서 NC와 shCD44 증식불능 아데노바이러스를 100MOI로 처리 시 CD44, csCD44 그리고 phospho-Akt의 발현량 변화 비교. (C) PANC-1에서 NC와 shCD44 증식불능 아데노바이러스를 50MOI로 처리 시 CD44, csCD44 그리고 phospho-Akt의 발현량 변화 비교.

앞선 실험을 통해 gemcitabine의 처리는 시간이 흐름에 따라 MiaPaCa-2와 PANC-1에서 total 그리고 cell surface CD44의 발현량을 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 CD44의 발현량 증가가 췌장암 세포주가 gemcitabine에 대한 저항성을 획득하는 데 있어서 중요한 역할을 수행할 것이라고 판단하여 CD44에 대한 shRNA를 탑재한 증식불능 아데노 바이러스를 MiaPaCa-2와 PANC-1에 각각 100MOI와 50MOI로 36시간 처리하여 CD44의 발현량을 감소시켰다. 앞선 gemcitabine 처리를 통해 MiaPaCa-2와 PANC-1 모두 gemcitabine 처리 시간에 따라 phospho-Akt의 증가를 확인하였고, CD44

발현량의 감소가 gemcitabine 처리에 의한 세포 생존 신호의 활성화를 폐지하는지 여부를 확인하고자 NC (negative control) 증식불능 아데노바이러스 처리한 세포와 shCD44 증식불능 아데노바이러스를 처리한 세포 모두에 gemcitabine 을 IC50 농도로 2 시간 더 처리하여 세포 생존신호의 변화를 확인하였다 (그림 3A). 이 과정에서 CD44 의 발현량 감소는 MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포주에서 상이한 결과를 나타냈다.

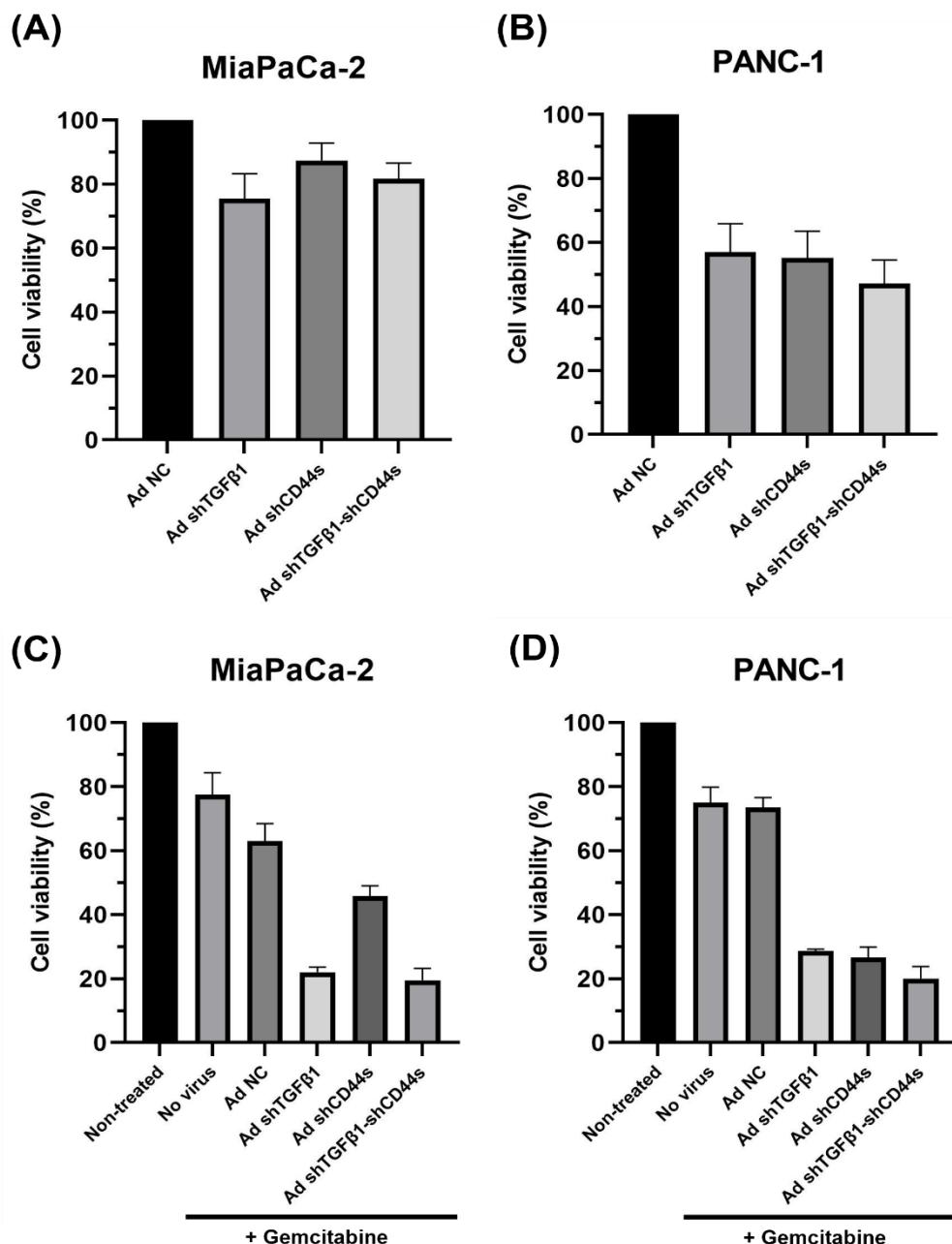
우선 MiaPaCa-2 에서 shCD44 증식불능 아데노바이러스의 100MOI 처리는 gemcitabine 처리에도 불구하고 CD44 의 발현량을 약 30%가량 감소시켰고 cell surface 의 protein 양은 약 50%가량 감소하였다. 그러나 MiaPaCa-2 에서 CD44 의 발현량 감소는 오히려 phospho-Akt 와 phospho-IGF1R 의 증가를 유도하였다 (그림 3B). CD44 의 발현량 감소 이후 gemcitabine 의 처리는 gemcitabine 처리 전과 비교하면 phospho-Akt 발현이 낮추었고 이를 통해 CD44 의 발현 감소가 단독으로 이루어질 때에는 다른 세포 생존 신호를 통해 phospho-Akt 를 활성화하지만, gemcitabine 을 같이 처리하게 되면 shCD44 바이러스 단독처리보다 세포 생존 신호의 활성화를 어느 정도 억제할 수 있음을 확인하였다.

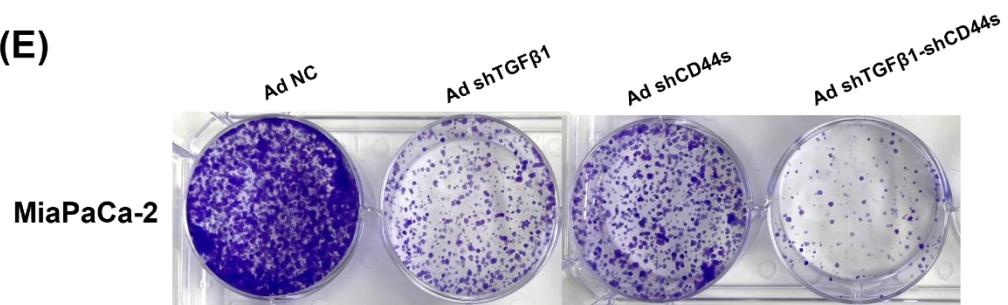
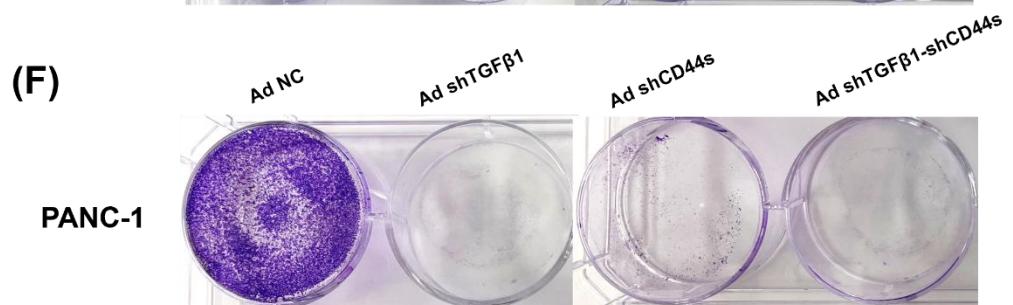
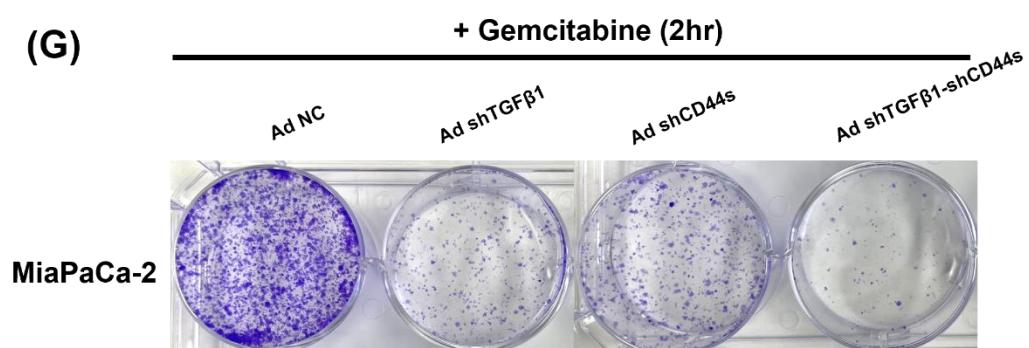
PANC-1 에서도 MiaPaCa-2 에서와 같은 시간 조건으로 shCD44 증식불능 아데노바이러스를 50MOI 처리하였다. 이는 total CD44 의 발현량은 약 40%까지 cell surface 에서는 약 50%까지 CD44 발현량을 감소시켰다. 이 CD44 의 발현량의 감소는 PANC-1에서 phospho-EGFR 신호의 증가를 억제하고, phospho-Akt 발현은 약 70% 감소를 유도하였다. 특히 gemcitabine 의 처리 시에는 NC 바이러스와 gemcitabine 을 함께 처리한 것과 비교하였을 때 phospho-Akt 발현을 약 80%가량 감소시킨 것을 확인할 수 있었다 (그림 3C).



이를 통해 MiaPaCa-2 에서는 CD44 발현량 감소만으로는 아직 확인되지 않은 방식을 통해 다른 세포 생존신호를 활성화하며 CD44 발현량 감소 이후에 gemcitabine 의 처리가 이루어져야만 phospho-Akt level 의 증가가 일정 수준 억제됨을 확인하였다. 반면, PANC-1 에서는 CD44 의 발현량 감소만으로도 phospho-Akt level 을 떨어트리며 이렇게 감소한 phospho-Akt 는 gemcitabine 을 처리해도 다시 증가하지 않음을 확인할 수 있었다.

3.4. 췌장암 세포에서 shTGF β 1 과 shCD44 그리고 두가지 서열을 모두 가지는 아데노바이러스 처리에 따른 세포 생존 능력 비교



(E)**(F)****(G)**

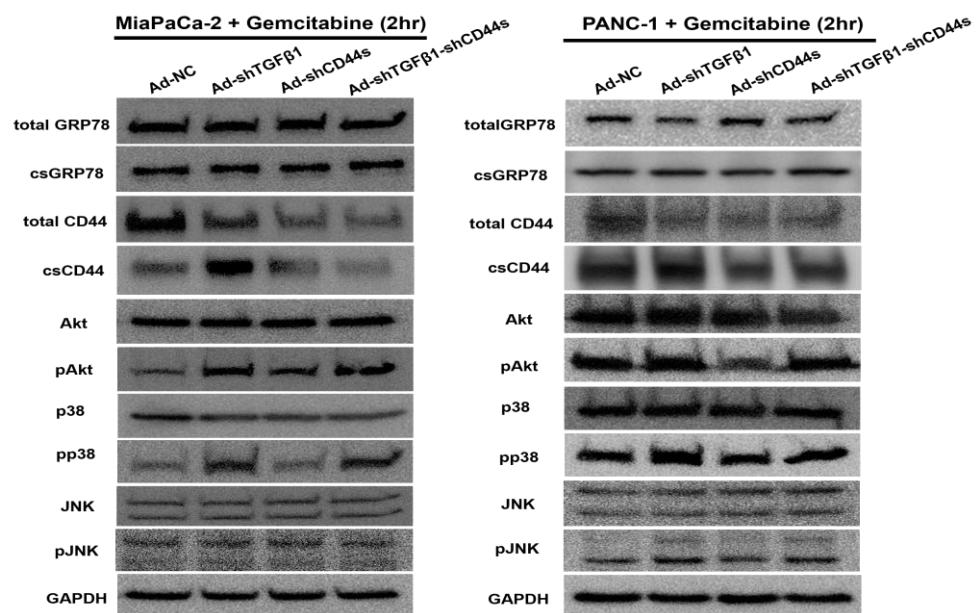
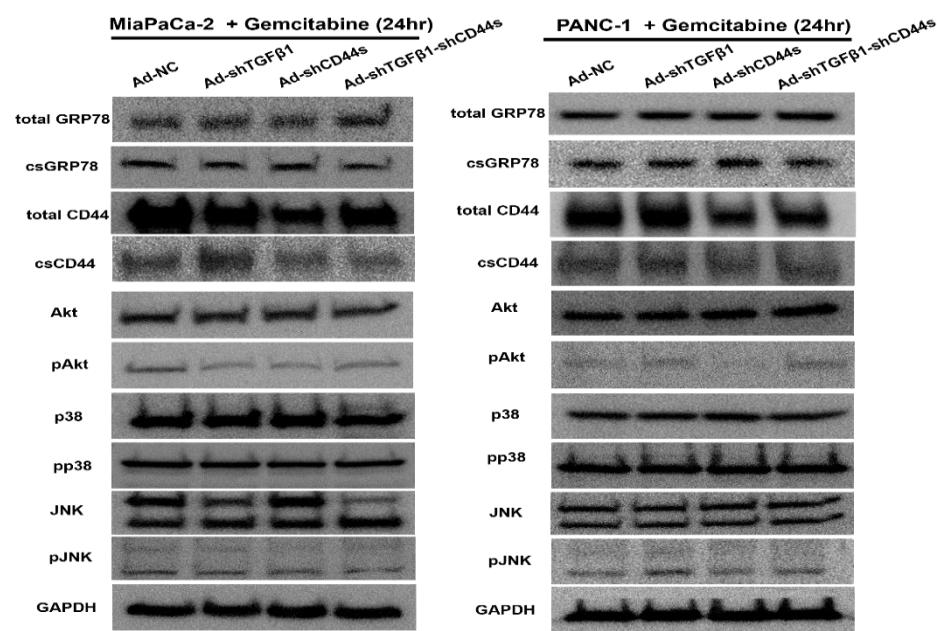
(H)

(I)


그림 4. 췌장암 세포에서 shTGF β 1 과 shCD44 그리고 두가지 서열을 모두 가지는 아데노바이러스 처리에 따른 세포 생존능력 비교. (A) MiaPaCa-2 및 (B) PANC-1 세포주에서 대조군 NC/ shTGF β 1/ shCD44/ shTGF β 1-shCD44 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 24 시간 처리 뒤 cell viability assay 진행. (C) MiaPaCa-2 및 (D) PANC-1 세포주에서 대조군 NC/ shTGF β 1/ shCD44/ shTGF β 1-shCD44 동시에 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 24 시간 먼저 처리한 뒤 gemcitabine 을 24 시간 추가로 처리하여 cell viability assay 진행. (E) MiaPaCa-2 및 (F) PANC-1 세포주에서 대조군 NC/ shTGF β 1/ shCD44/ shTGF β 1-shCD44 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 24 시간 처리 뒤 Clonogenic assay 진행. (G) MiaPaCa-2 세포주에서 대조군 NC/ TGF β 1 / CD44/ TGF β 1-CD44 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 24 시간 먼저 처리한 뒤 gemcitabine 을 2 시간 추가로 처리하여 Clonogenic assay 진행. (H) MiaPaCa-2 및 PANC-1 세포주에서 NC/ shTGF β 1/ shCD44/ shTGF β 1-shCD44 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 처리 후 gemcitabine 을 2 시간 처리하였을 때 세포 생존과 관련된 단백질 발현량 확인. (I) MiaPaCa-2 및 PANC-1 세포주에서 대조군 NC/ shTGF β 1/ shCD44/ shTGF β 1-shCD44 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 처리 후 gemcitabine 을 24 시간 처리하였을 때 세포 생존과 관련된 단백질 발현량 확인.

앞선 실험을 통해 gemcitabine 을 세포에 처리하게 되면 세포가 생존을 위한 반응으로 cytosol 과 cell surface 에 CD44 의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 CD44 를 약물저항성 획득을 극복하기 위한 표적으로 선정하였다. 하지만 CD44 만을 단독으로 타겟하는 것은 PANC-1 에서는 Akt 의 활성화를 충분히 억제하였지만, MiaPaCa-2 에서는 오히려

Akt 가 활성화되는 것을 확인하였다. 따라서 MiaPaCa-2 에서는 CD44 만을 단독으로 발현을 조절하는 것이 충분하지 않을 것으로 예상하여 추가로 기존의 실험실에서 연구된 Sorafenib 저항성 HCC 에서 좋은 효능을 보였을 뿐 아니라, 췌장암에서 암세포의 침습성과 전이성을 촉진하고 면역 억제적 종양 미세환경을 조성하는 주요인자로 알려져 있는 TGF β 1 또한 표적으로 선정하였다. 앞선 선행연구에 따르면 TGF β 1의 발현 저하는 p38이나 JNK 와 같은 다양한 SAPK 의 인산화를 증가시키고 암세포를 세포 사멸 쪽으로 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 TGF β 1의 발현 억제는 SAPK 단백질의 인산화를 빠르고 강하게 증가시켜 acute cell death 를 유도할 수 있다. 이와 동시에 CD44 의 발현 억제는 암 줄기세포의 특성을 억제하며 약물 저항성을 줄여 췌장암 치료에서 강력한 시너지 효과를 기대할 수 있을 것이다. 따라서 이 효과를 확인하기 위하여 TGF β 1 과 CD44 shRNA 를 동시에 탑재한 증식불능 아데노바이러스도 제작하여 각각의 바이러스와 그 효과를 비교하였다.

먼저 MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포에 대조군 증식불능 NC 아데노바이러스, TGF β 1 shRNA 를 탑재한 증식불능 아데노바이러스, CD44 shRNA 를 발현하는 증식불능 아데노바이러스 그리고 TGF β 1 shRNA 와 CD44 shRNA 를 동시에 발현하는 증식불능 아데노바이러스를 24 시간 처리하고 MTS assay 를 통해 cell viability 를 측정하였다. 그 결과 MiaPaCa-2 에서는 바이러스 단독사용 시 CD44 < TGF β 1-CD44 < TGF β 1 순으로 효과를 보였다. PANC-1 에서는 바이러스 단독사용 시 CD44 와 TGF β 1 을 각각 단독으로 발현을 감소시켰을 때에는 비슷한 효과를 보여주었으며, TGF β 1 과 CD44 의 발현을 동시에 감소시킨 것이 가장 큰 효과를 보여주었다 (그림 4A,B).

앞선 실험을 통해 TGF β 1, CD44, 그리고 TGF β 1-CD44 의 발현을 감소시켰을 때 세포 생존 능력을 감소시킨 것을 확인하였으나 MiaPaCa-2

세포에서의 감소는 약 20~30% 수준으로 충분한 효과를 보이지 못하였다. 이에 따라 NC / TGF β 1 / CD44 / TGF β 1-CD44에 대한 shRNA를 탑재한 아데노바이러스를 먼저 처리하는 것이 TGF β 1의 세포 사멸 경로 활성화와 CD44의 암 줄기세포 특성 억제 및 화학 저항성 감소 등의 효과를 통해 gemcitabine에 대한 감수성을 높여 췌장암 세포의 세포 생존능을 감소시킬 수 있는지 확인하였다. 먼저 NC/ TGF β 1/ CD44/ TGF β 1-CD44에 대한 shRNA를 탑재한 아데노바이러스를 MiaPaCa-2와 PANC-1 세포에 24시간 처리한 후 gemcitabine을 24시간 더 처리하고 세포 생존능을 측정하였다 (그림 4C,D).

그 결과 MiaPaCa-2에서는 gemcitabine 단독 처리에 비해 바이러스 처리 후 gemcitabine을 처리한 세포들에서 세포생존 능력이 약 2~4배 가량 더 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 TGF β 1과 CD44를 동시에 감소시켜 주는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다. PANC-1 세포에서 또한 gemcitabine의 단독 처리보다 바이러스 처리 후 gemcitabine을 처리하는 것이 약 4배 가량 더 세포 생존 능력을 감소시켜주는 것을 확인할 수 있었고, PANC-1 세포주에서는 TGF β 1과 CD44 모두 좋은 치료 표적이 될 수 있음을 확인하였다. 이를 통해 MiaPaCa-2 세포주에서는 CD44의 발현량 감소만으로는 종양의 증식을 충분히 억제하지 못하며, TGF β 1과 함께 발현을 감소시키는 것이 종양의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

Clonogenic assay를 통해서도 동일한 효과를 확인하였다. MiaPaCa-2 세포에서 바이러스만 단독으로 사용할 때는 NC < CD44 < TGF β 1 < TGF β 1-CD44 shRNA 순으로 효과를 보였으며 특히 바이러스와 gemcitabine을 동시에 사용할 때는 TGF β 1과 CD44의 발현을 동시에 억제하는 것이 가장 효과적인 것을 확인 할 수 있었다 (그림 4E,G). PANC-1 세포는 MiaPaCa-2 세포보다 바이러스에 대한 감염능이 좋은 세포로 virus를 25MOI로만 감염시켰을

때에도 바이러스 탑재된 유전자에 의해 세포의 증식이 효과적으로 억제되었다 (그림 4F). PANC-1 세포에서는 NC를 제외하고 TGF β 1, CD44 그리고 TGF β 1-CD44 shRNA를 동시에 발현하는 바이러스에서 모두 콜로니를 형성하지 못하는 것을 확인할 수 있었다.

이후, 동일한 4 가지의 증식불능 아데노바이러스를 먼저 처리한 다음 gemcitabine 을 처리하여 세포 생존과 관련된 단백질 발현량 변화를 확인하였다. 먼저, MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포에 각각 100MOI 와 25MOI 의 증식불능 아데노바이러스를 감염시킨 후 24 시간 뒤, gemcitabine 을 IC50 농도로 2 시간 처리하였다. 이 때, MiaPaCa-2 에서 TGF β 1 shRNA 와 CD44 shRNA 그리고 두가지를 동시에 발현하는 바이러스를 처리하였을 때 phospho-Akt 의 발현량 증가가 관찰되었다 (그림 4H). 동시에 세포 스트레스 반응이나 염증 반응에 관여하는 phospho-p38 의 활성화도 함께 관찰되었는데 일반적으로 p38 의 활성화는 다양한 세포반응을 유도하며, 세포 생존과 apoptosis 사이에서 균형적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. p38은 세포 외부의 신호와 스트레스의 종류, 세포의 상태에 따라 세포 생존 또는 apoptosis 를 촉진하는 방향으로 달라질 수 있는데, 저강도의 스트레스에서는 p38 이 세포 보호 기작을 활성화하여 세포 생존을 촉진할 수 있지만, 고강도의 스트레스에서는 apoptosis 경로를 활성화하여 손상된 세포를 제거하는 데 기여할 수 있는 것으로 알려져 있다. 바이러스 처리 후 gemcitabine 을 2 시간 처리하였을 때에는 phospho-Akt 의 증가와 phospho-p38 의 활성화가 함께 일어나는 것이 확인되었다 (그림 4H). 일반적으로 p38 이 apoptosis 경로를 활성화하는 역할로 작용하게 되면 Akt 의 활성화는 억제되는 것으로 알려져 있는데 이때에는 짧은 시간 내의 gemcitabine 처리로 apoptosis 를 선택하는 세포와 apoptosis 대신 생존을 선택하는 세포가

공존하기 때문에 이러한 현상이 보이는 것으로 생각된다. 이러한 현상은 PANC-1에서도 동일하게 관찰되었다.

따라서 바이러스 처리의 선행 이후 gemcitabine 을 처리하였을 때 증가하는 phospho-p38 이 세포 생존을 위한 것인지 혹은 세포 사멸을 유도하는지를 확인하기 위해 증식불능 아데노 바이러스를 24 시간 처리한 이후 gemcitabine 을 24 시간 처리하여 세포 생존과 관련된 단백질 변화를 확인하였다. Gemcitabine 처리 시간의 증가는 MiaPaCa-2 세포에서 바이러스 종류와 관계없이 phospho-Akt 발현량을 확인하게 감소시키는 것이 확인되었다 (그림 4I). 증식불능 아데노 바이러스 처리 이후 gemcitabine 의 24 시간 처리에도 p38 은 여전히 활성화되어 있었는데, 이를 통해 바이러스 처리 이후 gemcitabine 의 처리는 초반에 p38 을 과도하게 활성화해 apoptosis 경로를 촉진하며, 초반에는 일부 세포가 생존하기 위해 동시에 Akt 도 함께 활성화하지만 결국에는 apoptosis 경로의 촉진이 우세해지는 것을 알 수 있다. 이는 PANC-1에서도 동일한 것을 확인할 수 있다 (그림 4I).

따라서, 앞선 실험을 통해 MiaPaCa-2 에서는 약물 저항성의 형성에 연관되는 것으로 보이는 CD44 만을 단독으로 감소시키는 것보다 TGF β 1 을 함께 감소함으로써 초기에는 p38 의 활성화를 통해 세포를 apoptosis 경로로 유도하는 것이 효과적임을 확인하였다. 반면, PANC-1 에서는 모든 바이러스가 gemcitabine 에 대한 감수성을 높여주어 세포 생존능을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였으며, 그중에서도 CD44 의 감소가 phospho-Akt 와 같은 세포 생존 신호를 가장 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

3.5 동물모델에서 shTGF β 1 및 shCD44 단독 및 동시 억제 아데노바이러스 처리가 gemcitabine에 대한 췌장암 세포 감수성 및 항종양 효과에 미치는 영향

(A)

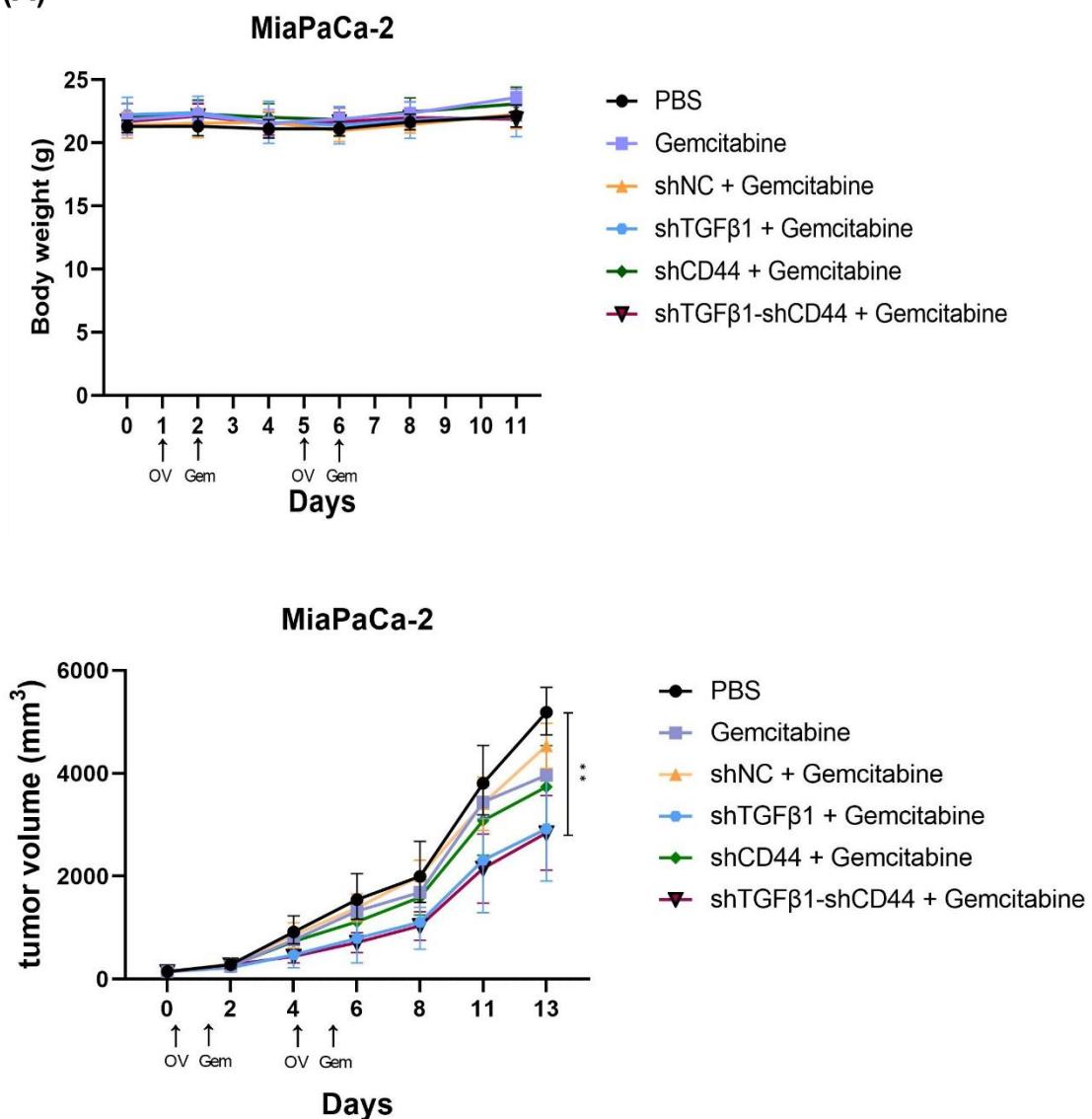




그림 5. MiaPaCa-2 xenograft 모델에서의 동물실험 결과. (A) 각 그룹 내 Balb/c nude mouse 의 치료 기간 내의 체중 변화 확인. (B) Balb/c nude mouse 에 MiaPaCa-2 를 주사하여 종양 형성 후 종양 크기가 약 80~110mm³ 일 때, PBS / NC / shTGF β 1 / shCD44 / shTGF β 1-shCD44 를 발현하는 종양 살상 아데노바이러스를 사흘 간격으로 종양 내에 2 번 주사하고 바이러스 주사 다음날 gemcitabine 을 50mg/kg 으로 사흘 간격으로 복강 내에 2 번 주사 후 이를 간격으로 종양 크기 측정. (C) 각 그룹 간 종양 크기 비교.

이전에 수행한 *in vitro* 실험 결과를 토대로 shTGF β 1 을 단독으로 발현하는 종양 살상 아데노 바이러스와 shCD44 를 단독으로 발현하는 종양 살상 아데노 바이러스 그리고 shTGF β 1 과 shCD44 를 동시에 발현하는 종양 살상 아데노 바이러스를 사용하여 동물 실험을 진행하였다. MiaPaCa-2 를 1.0×10^6 으로 누드마우스에 이식한 다음 4~5 일 후 일정 크기의 종양이 형성된 것을 확인하였다. 바이러스 주사 하루 전 종양의 크기를 측정하여 각 그룹간

종양 크기의 편차가 크지 않도록 군분리를 진행하였고 다음날 바이러스를 1.3×10^8 PFU로 $50 \mu\ell$ 의 PBS에 희석시켜 종양에 직접 주사하였다. 바이러스를 주사한 다음날에는 gemcitabine을 고압 멸균시킨 중류수에 50mg/kg 으로 녹인 gemcitabine을 복강에 주사한 후 종양의 크기 변화를 확인하였다.

예비 실험에서 각각의 유전자에 대한 shRNA를 탑재한 바이러스와 gemcitabine을 이틀간격으로 연속적으로 주사하였을 때, 마우스들이 항암제 처리로 인한 부작용으로 체중 및 식욕 감소 등을 보여주었다. 이러한 이유로 종양 자체가 성장하지 않아 제대로 된 항종양 효능을 확인할 수 없었기 때문에 본 실험에서는 종양 살상 아데노 바이러스와 gemcitabine 주사 이후 마우스의 체중 변화와 식이 패턴 등을 계속 관찰하며 다음 치료물질 투여 일정을 결정하였다. 첫 번째 종양 살상 바이러스와 gemcitabine의 투여는 확연하게 shTGF β 1을 단독으로 발현하는 종양 살상 아데노 바이러스와 shTGF β 1과 shCD44를 동시에 발현하는 종양 살상 아데노 바이러스를 투여한 군에서 종양의 성장이 억제되는 경향이 확인되었다. 첫 치료물질 투여 이후 3일의 휴식기를 거친 다음 두 번째 치료물질을 주사하였고, 그 결과 PBS, gemcitabine 단독투여, 그리고 NC 종양 살상 아데노 바이러스와 gemcitabine 투여 그룹과 비교하면 shCD44 + gemcitabine / shTGF β 1 + gemcitabine / shTGF β 1-shCD44 + gemcitabine 투여 그룹 순으로 더 뛰어난 항종양 효능을 보여주었다 (그림 5B). 이러한 경향성은 앞서 수행한 clonogenic assay와도 동일한 결과를 보여주었으며 CD44의 발현을 단독으로 감소시키는 것보다 TGF β 1과 CD44을 동시에 감소시킨 뒤 gemcitabine을 투여하는 것이 gemcitabine을 단독으로 투여하는 기존의 치료법보다 훨씬 더 효과적임을 확인하였다. 또한, 치료물질 투여기간 동안 마우스들의 체중변화가 크지 않고 식욕부진과 같은 부작용을 보이지 않아 이러한 치료 방식이 마우스에 큰 부작용을 주지 않는 것도 확인하였다 (그림 5A). 종양 크기를 마지막으로

측정한 13 일차에 각 그룹의 마우스에서 종양만을 분리하여 항종양 효과를 비교해보았다 (그림 5C). 13 일차에 gemcitabine 투여 그룹의 3 마리와 NC 와 gemcitabine 을 투여한 그룹의 1 마리가 종양의 괴사로 인해 폐사하여 데이터에는 나타내지 않았다. 종양의 크기만을 비교하였을 때, shTGF β 1 과 shTGF β 1-shCD44 를 탑재한 종양 살상 아데노 바이러스와 gemcitabine 을 처리한 4 번과 6 번 그룹에서 가장 좋은 항종양 효과가 나타났다. 하지만 4 번 그룹은 개체 간 종양 크기의 편차가 존재하는 것을 확인할 수 있었고, shTGF β 1-shCD44 를 탑재한 종양 살상 아데노 바이러스의 처리가 가장 안정적이고 편차 없이 항종양 효능을 보여줌을 확인하였다.

4. 고찰

췌장암은 초기에는 증상이 없어 대부분 진행된 상태에서 진단되며, 5년 생존율이 약 10%에 불과할 정도로 매우 공격적인 암이다. 암이 많이 진행된 상태에서 주요 치료법인 수술과 화학요법은 효과가 제한적이며, 특히 약물 저항성 형성과 다양한 돌연변이와 발암성 경로의 관여 때문에 치료 효과가 저하된다. 또한, 다른 암에 비해 췌장암에서는 면역 요법의 반응률이 낮아 거의 사용되지 않는다.²⁸

현재 췌장암의 1차 치료제로는 gemcitabine 단독 요법과 Nab-paclitaxel + gemcitabine 및 FOLFIRINOX 와 같은 복합 요법이 주로 사용된다. gemcitabine 은 초기 췌장암 치료의 표준이지만 일반적으로 치료 시작 후 3~6 개월 이내에 암세포가 저항성을 나타내는 경우가 많다. 이렇게 췌장암 세포가 화학요법에 대해 저항성을 가지게 되는 기작들에 대해서 여러 가지 메커니즘이 제시되고 있지만, 확실히 정의되는 기작은 아직 없다.

본 실험에서는 췌장암 세포에 gemcitabine 을 처리하였을 때 세포가 살아남기 위해서 어떠한 생존 반응을 보여주는지 확인하고, 이러한 생존신호가 CD44 의 발현과 어떠한 관계가 있는지 확인하고자 하였다. 췌장암의 치료가 어려운 이유 중 하나로 종양 세포 주변의 비정상적인 섬유조직 형성을 꼽을 수 있는데 이는 조밀하고 섬유질이 있는 결합조직을 의미한다. 이는 fibronectin, laminin 그리고 hyaluronan 과 같은 다양한 ECM protein 으로 구성되어 있고, 이러한 ECM protein 들은 종양 세포의 증식을 강화하고 약물 침투를 감소시킬 뿐 아니라 anti-apoptotic protein 의 발현 증가를 통해 약물에 대한 민감도를 변경시키기도 한다. 이러한 ECM

protein 들에 대한 주요 리간드로 알려진 CD44 는 특히 hyaluronan 과의 상호작용을 통해 암의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다. Hyaluronan 과 CD44 의 상호작용은 plasma membrane 내의 signaling domain 을 유도하거나 안정화할 수 있는데, 이러한 signaling domain 에는 receptor tyrosine kinases (ErbB2 and EGFR), 다른 signaling receptors (TGF β R) 그리고 non receptor kinases (Src family)가 포함되어 있으며, 이러한 신호는 oncogenic pathway 인 MAPK 및 PI3K/Akt 세포 생존 및 생존 경로를 촉진하며, 항암제 내성과도 관련되어 있다.^{8, 10} 이러한 이유로 MiaPaCa-2 세포와 PANC-1 세포에서 gemcitabine 처리에 의해 세포 생존과 관련된 phospho-IGF I R, phospho-EGFR, phospho-Akt 등이 증가를 CD44 의 발현과 연관 지어 확인해보았다. 세포 생존 신호들에 대한 증가와 더불어 cytosol 의 CD44 혹은 cell surface 의 CD44 의 발현량이 MiaPaCa-2 와 PANC-1에서 확인되었고, 이를 통해 CD44 가 췌장암 세포가 gemcitabine 에 대한 저항성 획득 초기 단계에 어느 정도 관여하고 있음을 유추할 수 있었다.

또한 gemcitabine 처리 시 짧은 시간 안에 cell surface 로 CD44 가 이동하는 방식을 확인하는 과정에서 JNK 와 fucosyltransferase 가 관여하고 있음을 확인하였다. Western blot 을 통해 gemcitabine 처리 시 MiaPaCa-2 보다 cell surface CD44 의 발현량이 증가함을 확인하였는데, MiaPaCa-2 에서는 JNK inhibition 과 fucosylation inhibition 시 cell surface 로 이동하는 CD44 의 양이 감소하며 이와 동시에 p-IGF1R 과 p-Akt 의 감소도 일어나는 것을 확인하였다. 이를 통해 MiaPaCa-2 는 gemcitabine 의 처리에 의해 빠르게 JNK phosphorylation 과 fucosylation 을 통해 CD44 를 modification 시키고 fucosylation 된 CD44 가 cell surface 로 이동하여 IGF1R 과 상호작용하여 세포 생존 신호를 활성화 시킬 수 있음을 유추하였다. 이 때, MiaPaCa-2 에서 JNK 가 실제로 GRP78 의 phosphorylation 을 유도하는지

그리고 실제로 cell surface 로 이동하는 CD44 는 fucosylation 이 된 형태인지를 mass spectrometry 로 명확하게 확인할 필요가 있으며, gemcitabine 에 대한 저항성을 완전히 확보한 MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포주에서도 저항성 획득에 CD44 의 역할을 확인할 필요가 있을 것이다.

이후, CD44 가 체장암 세포에서 gemcitabine 에 대한 저항성 극복에서 좋은 후보물질이 될 수 있는지를 확인하고자 CD44 shRNA 를 탑재한 증식불능 아데노바이러스를 MiaPaCa-2 와 PANC-1 에 처리하였다. 이때, MiaPaCa-2 에서 CD44 의 발현량 감소는 오히려 phospho-IGF1R 과 phospho-Akt 의 증가를 유도하였는데, 이는 MiaPaCa-2 에서 CD44 는 일부 세포 생존에 관여하고 있지만, 발현량이 감소하게 되면 오히려 다른 세포생존 신호를 활성화해 세포의 생존을 유도하게 되기 때문이라고 생각한다. CD44 의 발현량 감소 이후 gemcitabine 의 처리는 CD44 의 발현만을 감소시켰을 때보다 phospho-Akt level 을 감소시키는 것을 확인할 수 있었고, 이는 CD44 의 감소가 gemcitabine 에 대한 감수성 향상에는 도움이 된다는 것을 의미한다. PANC-1 에서는 CD44 에 대한 shRNA 를 탑재한 증식불능 아데노바이러스의 처리는 즉각적인 phospho-Akt 발현량 감소를 유도하였는데 이는 MiaPaCa-2 와 비교하여 상대적으로 CD44 의 발현량이 많은 PANC-1 에서는 CD44 가 세포 생존과 관련된 경로로 훨씬 더 addiction 되어 있고 이러한 CD44 의 발현을 감소시키는 것이 세포가 죽는 쪽으로 유도하는데 훨씬 효과적인 것으로 생각된다.

앞선 실험을 통해서 MiaPaCa-2 에서는 CD44 shRNA 바이러스의 단독 사용만으로는 세포 생존 신호의 억제가 충분하지 않음을 확인하였다. 그럼에도 CD44 에 대한 shRNA 를 탑재한 아데노 바이러스 처리의 선행은 세포가 gemcitabine 에 대한 감수성을 일부 향상할 수 있음을 확인하였다.

이는 CD44 가 항암제 내성에 어느 정도 관여하고 있음을 의미한다. CD44 만을 억제하였을 때에는 세포 생존 신호 억제에 큰 효과를 보이지 못해 췌장암의 발달 및 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 TGF β 1 을 동시에 타겟팅하였다. TGF β 1 을 또 다른 표적으로 선정한 이유는 다음과 같다. 췌장암 세포는 약 60%가 SMAD4 돌연변이 때문에 TGF β 1 신호가 비정형적(non-canonical) 경로에 크게 의존하는 경우가 많은데, 이는 암의 생존과 성장 그리고 전이를 촉진하는 핵심 기전으로 작용한다. 이는 PI3K/Akt 와 MAPK 경로를 통해 세포 증식을 촉진하고 항암제 저항성을 강화시키는 것으로 알려져 있다.^{18, 19} 또한, 앞선 선행 연구에 따르면 TGF β 1 의 발현 저하는 p38이나 JNK 와 같은 다양한 SAPK 의 인산화를 증가시키고 암세포를 세포 사멸 쪽으로 유도하는 것으로 알려져 있다.²¹ 따라서 TGF β 1 매개 생존 신호를 차단함으로써 항암제 감수성을 증가시킬 뿐 아니라 SAPK 단백질의 인산화를 빠르고 강하게 증가시켜 acute cell death 를 유도할 수 있는 TGF β 1 을 CD44 와 함께 치료 표적으로 사용한다면 췌장암의 치료 효율을 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 예상하였다.

따라서 TGF β 1 / CD44 / TGF β 1-CD44 에 대한 shRNA 를 탑재한 아데노바이러스를 모두 후보물질로 사용하여 gemcitabine 과 함께 처리하였다. 그 결과 상대적으로 세포 성장이 빠르고 바이러스 감염능이 낮은 MiaPaCa-2 에서도 TGF β 1 과 CD44 의 발현을 동시에 감소시키고 gemcitabine 을 처리한 경우 콜로니 형성능이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. PANC-1 은 MiaPaCa-2 보다 세포 성장이 느리고 이 논문의 데이터에는 포함되어 있지 않지만, 증식불능 GFP 아데노 바이러스를 MOI 별로 감염시켰을 때, 10MOI 로 22 시간 감염에도 90% 이상 감염된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 바이러스에 포함된 shRNA 의 효과가 더욱 극대화되어 NC 를 제외한 3 가지 바이러스 모두에서 콜로니가 거의 형성되지 않는 것을 확인하였다.

In vitro에서는 MiaPaCa-2 와 PANC-1 세포를 사용하여 CD44 의 역할과 바이러스별 효과 확인 실험을 진행하였으나 in vivo에서는 PANC-1 세포주가 피하주사(subcutaneous injection)로는 종양 형성이 원활하지 않아, MiaPaCa-2 세포주만을 사용하였다. Gemcitabine (50mg/kg)의 처리 농도는 앞서 실험실에서 선행되었던 in vivo 연구에서 참조하여 실험을 진행하였다. In vitro 실험 결과와 동일하게 MiaPaCa-2 xenograft model 에서도 PBS, gemcitabine 단독 투여 그리고 NC + gemcitabine 그룹과 비교하여 shCD44 + gemcitabine < shTGF β 1 + gemcitabine < shTGF β 1-shCD44 + gemcitabine 그룹 순으로 항종양 효과를 보여주었으며 실제로 TGF β 1 과 CD44 의 발현 감소가 췌장암 세포주의 gemcitabine 감수성을 향상시켜 효과적인 치료법으로 작용함을 확인하였다. 하지만 CD44 만을 단독으로 감소시켜주었을 때에는 shTGF β 1 를 탑재한 바이러스들에 비해서 비교적 항종양 효과가 덜한 것으로 나타났다. 이는 CD44 가 세포의 증식보다는 일반적으로 암 줄기세포의 마커이자 hyaluronic acid 와 결합하여 암세포가 주변 세포 외 기질(ECM)을 분해하고 이동성을 강화하도록 하는 등의 전이와 침습에 더 관련되어 있다는 점에서 해석할 수 있다. 따라서 CD44 의 단독으로 억제는 원발 종양에서 세포 분열 속도를 낮추는 것보다 암세포가 새로운 부위로 퍼지는 전이형 모델에서 더 효과적일 수 있을 것이며, 추가로 전이형 마우스 모델에서 효과를 확인하는 것이 필요할 것이다.

5. 결론

본 연구는 췌장암 세포주에서 CD44 가 gemcitabine 저항성 획득 과정에 미치는 영향을 확인하고, CD44 발현 억제를 통한 저항성 극복 가능성을 탐색하였다. Gemcitabine은 췌장암의 1차 치료제로 사용되지만, 약물 저항성 때문에 치료 효과가 제한적이다. 췌장암 세포주인 MiaPaCa-2 와 PANC-1에 대한 실험 결과, gemcitabine 처리 후 세포 생존 신호가 증가하였으며, 특히 CD44 의 cell surface 로의 이동하는 것이 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

같은 췌장암 세포주 내에서도 CD44 의 역할은 조금씩 차이를 보였는데, MiaPaCa-2 세포에서는 CD44 의 단독 억제만으로는 세포 생존 신호를 충분히 억제하지 못하였으며 오히려 다른 생존 신호 경로를 활성화하는 것으로 나타났다. 반면 PANC-1 세포에서는 CD44 억제가 phospho-Akt 수준의 즉각적인 감소를 유도하며 더 효과적으로 세포 사멸을 유도하였다. 이는 PANC-1 세포가 CD44 의 생존 신호 경로에 더 크게 의존하기 때문으로 해석된다.

또한, *in vitro* 와 *in vivo* 실험을 통해 CD44를 단독으로 억제하는 것보다 TGF β 1과 CD44의 동시 억제가 gemcitabine과의 병용 치료에서 췌장암 세포의 생존능을 더욱 효과적으로 감소시킨다는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 CD44 와 TGF β 1 의 발현 조절이 췌장암 치료에서 gemcitabine 의 효과를 증대시키는 중요한 전략이 될 수 있음을 시사한다. 향후 연구에서는 전이형 동물 모델에서 CD44 억제의 효과를 평가하고, 다른 생존 신호 경로와의 상호작용을 규명하여 치료 효율을 극대화하는 전략을 모색해야 할 것이다.

참고 문헌

1. Park EH, Jung KW, Park NJ, Kang MJ, Yun EH, Kim HJ, et al. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2021. *Cancer Res Treat.* 2024;56(2):357-371.
2. Kolbeinsson HM, Chandana S, Wright GP, Chung M. Pancreatic Cancer: A Review of Current Treatment and Novel Therapies. *J Invest Surg.* 2023;36(1):2129884.
3. Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, Maitra A. Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell.* 2023;186(8):1729-1754.
4. Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, Ullah W, Hussain I, Hasan B, et al. Gemcitabine: A Review of Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Crit Rev Oncog.* 2019;24(2):199-212.
5. Whatcott CJ, Posner RG, Von Hoff DD, Han H. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. In Grippo PJ, Munshi HG, (Eds). *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment.* Trivandrum (India) 2012.
6. Schober M, Jesenofsky R, Faissner R, Weidenauer C, Hagmann W, Michl P, et al. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 2014;6(4):2137-2154.
7. Orian-Rousseau V, Sleeman J. CD44 is a Multidomain Signaling Platform that Integrates Extracellular Matrix Cues with Growth Factor and Cytokine Signals. *Adv Cancer Res.* 2014;123:231-254.
8. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):64.
9. Chaudhry GE, Akim A, Naveed Zafar M, Safdar N, Sung YY, Muhammad TST. Understanding Hyaluronan Receptor (CD44) Interaction, HA-CD44 Activated Potential Targets in Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2021;11(3):426-438.
10. Yaghobi Z, Movassaghpoor A, Talebi M, Abdoli Shabdar M, Hajiasgharzadeh K, Pourvahdani S, et al. The role of CD44 in cancer chemoresistance: A concise review. *Eur J Pharmacol.* 2021;903:174147.
11. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling

- regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):33–45.
12. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* 2002;16(23):3074–3086.
13. Zhao P, Damerow MS, Stern P, Liu AH, Sweet-Cordero A, Siziopikou K, et al. CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma. *Oncogene.* 2013;32(43):5186–5190.
14. Lin Y, Zhong Y, Guan H, Zhang X, Sun Q. CD44+/CD24– phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):59.
15. Durko L, Włodarski W, Stasikowska-Kanicka O, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Hogendorf P, et al. Expression and Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD24, CD44, and CD133 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. *Dis Markers.* 2017;2017:3276806.
16. Li XP, Zhang XW, Zheng LZ, Guo WJ. Expression of CD44 in pancreatic cancer and its significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):6724–6731.
17. Zhao S, Chen C, Chang K, Karnad A, Jagirdar J, Kumar AP, et al. CD44 Expression Level and Isoform Contributes to Pancreatic Cancer Cell Plasticity, Invasiveness, and Response to Therapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(22):5592–5604.
18. Shen W, Tao GQ, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian ZQ. TGF-beta in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci.* 2017;7:39.
19. Luo Q, Hu Z, Zhao H, Fan Y, Tu X, Wang Y, et al. The role of TGF-beta in the tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Genes Dis.* 2023;10(4):1513–1524.
20. Gough NR, Xiang X, Mishra L. TGF-beta Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. *Gastroenterology.* 2021;161(2):434–452 e415.
21. Han Z, Kang D, Joo Y, Lee J, Oh GH, Choi S, et al. TGF-beta downregulation-induced cancer cell death is finely regulated by the SAPK signaling cascade. *Exp Mol Med.* 2018;50(12):1–19.
22. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.*

- 2012;12(12):860-875.
23. Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med.* 2019;23(8):4854-4865.
24. Zhang Y, Li Y, Chen K, Qian L, Wang P. Oncolytic virotherapy reverses the immunosuppressive tumor microenvironment and its potential in combination with immunotherapy. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):262.
25. Achard C, Surendran A, Wedge ME, Ungerechts G, Bell J, Ilkow CS. Lighting a Fire in the Tumor Microenvironment Using Oncolytic Immunotherapy. *EBioMedicine.* 2018;31:17-24.
26. Hu B, Ma Y, Yang Y, Zhang L, Han H, Chen J. CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5627-5633.
27. Li J, Hsu HC, Mountz JD, Allen JG. Unmasking Fucosylation: from Cell Adhesion to Immune System Regulation and Diseases. *Cell Chem Biol.* 2018;25(5):499-512.
28. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16022.

ABSTRACT

The role of CD44 in the acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines.

Pancreatic cancer is an extremely aggressive malignancy with a 5-year survival rate of only 15.9% as of 2021 in Korea, making it the lowest among major cancers. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common form of pancreatic cancer, requires surgical resection for a cure. However, most patients are diagnosed at an advanced stage due to asymptomatic progression, making them ineligible for surgery and reliant on chemotherapy. Gemcitabine is a first-line chemotherapeutic agent for pancreatic cancer that induces apoptosis in rapidly proliferating cancer cells. Despite its efficacy, gemcitabine has a short half-life, leads to the development of drug resistance, and causes significant side effects with repeated high-dose administration. Furthermore, the dense fibrotic stroma surrounding pancreatic tumors limits drug penetration, and the involvement of diverse mutations and oncogenic pathways complicates the identification of therapeutic targets. Therefore, there is a pressing need to enhance drug sensitivity through novel therapeutic strategies for effective pancreatic cancer treatment.

This study investigated the role of CD44, a known co-receptor of receptor tyrosine kinases (RTKs) implicated in drug resistance, in the acquisition of gemcitabine resistance. It also examined whether modulating CD44 expression could enhance the sensitivity of pancreatic cancer cell lines to gemcitabine. Treatment of the pancreatic cancer cell lines MiaPaCa-2 and PANC-1 with

gemcitabine revealed an increase in the expression of molecules associated with cell survival over time. Concurrently, CD44 expression showed a modest increase as early as 2 hours after gemcitabine treatment. Knockdown of CD44 using shRNA viruses showed limited effects in MiaPaCa-2 due to the activation of alternative survival signals but significantly reduced phospho-Akt expression in PANC-1, disrupting survival signaling pathways.

In MiaPaCa-2, shRNA targeting CD44 alone slightly enhanced gemcitabine sensitivity but was insufficient to produce substantial effects. Targeting TGF β 1, a molecule highly expressed in pancreatic cancer and involved in tumor growth, metastasis, and invasion, alongside CD44 further improved gemcitabine sensitivity compared to targeting CD44 alone. These findings were corroborated in MiaPaCa-2 xenograft mouse models. In PANC-1 cells, both CD44 and TGF β 1 were effective molecular targets for enhancing drug sensitivity.

In conclusion, targeting CD44 in pancreatic cancer cell lines can improve drug sensitivity, and the combined targeting of CD44 and other key molecules like TGF β 1 may offer a more effective therapeutic strategy compared to monotherapy with chemotherapeutic agents.

Key words: PDAC, TGF β 1, CD44, gemcitabine, adenovirus, drug resistance