

( 과제번호 : NCC-0910150 )

위암의 전이에 미치는 갈렉틴-3의 역할

Effect of galectin-3 on gastric cancer metastasis

과제책임자 : 전 경 희

국 립 암 셴 터

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

# 제 출 문

# 목 차

국립암센터 원장 귀하

## < 요약 문 >

이 보고서를 기관고유연구사업 “위암의 전이에 미치는 갈렉틴-3의 역할”  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

(한글) -----	2
(영문) -----	4

2011. 12. 30

국 립 암 센터

과 제 책 임 자 : 전 경 희  
 연 구 원 : 류 근 원  
 연 구 원 : 이 준 호  
 연 구 원 : 박 숙 린  
 연 구 원 : 신 지 영  
 연 구 원 : 김 석 준  
 연 구 원 : 이 강 덕

1. 연구의 최종목표 -----	6
2. 연구의 내용 및 결과 -----	6
3. 연구결과 고찰 및 결론 -----	30
4. 연구성과 및 목표달성도 -----	32
5. 연구결과의 활용계획 -----	36
6. 참고문헌 -----	37
7. 첨부서류 -----	38

## < 요약 문 >

연구분야(코드)	T-2	과제번호	0910150	
과제명	위암의 전이에 미치는 갈렉틴-3의 역할			
연구기간/ 연구비(천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	390,000	
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	130,000	
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	130,000	
	3차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	130,000	
과제책임자	성명	전경희	소속	위암연구과
	전화번호	031-920-2281	전자우편	khchun@ncc.re.kr
색인단어	국문	위암, 전이, 갈렉틴-3		
	영문	Gastric cancer, Metastasis, Galectin-3		

### ◆ 연구목표

<최종목표>

위암의 전이 과정 중에서 galectin-3의 발현 및 역할을 연구하여 위암의 전이과정을 규명하고 위암의 전이를 예측할 수 있는 예후인자를 발굴함

### ◆ 연구내용 및 방법

#### 1. 갈렉틴-3에 의해 발현이 조절되는 전이 관련 인자에 관한 연구

- ① galectin-3 siRNA를 위암세포주 AGS 및 MKN-28에 처리한 후 발현의 변화를 보이는 인자를 탐색하여 Fascin1, PARI, HMMR, Neogenin을 얻음. ② 이들 인자 각각의 siRNA를 위암세포주에 처리하여 위암세포주의 migration 및 invasion 여부를 확인함. ③ 각각 인자들의 발현변화에 의한 Immunocytochemistry를 통하여 위암세포주의 morphological changes 확인. ④ 이들 인자 각각의 프로모터에 galectin-3에 의해 활성이 조절되는 전사인자 interaction하는 부위가 있는지 ChIP assay를 통하여 확인함. ⑤ galectin-3가 각각의 전사조절인자와 interaction하는지 Immunoprecipitation으로 확인. ⑥ galectin-3의 발현 변화에 의한 전사인자의 localization 변화 확인. ⑦ galectin-3를 과발현하거나 발현하지 않는 세포주를 만들어 위암동물모델 실험 실시. ⑧ 이 같은 변화를 위암 환자의 조직에서 양상을 관찰

#### 2. 위암전이 동물 모델 확립

- 마우스의 동소이식을 이용한 위암의 동물 모델

① 5주령된 BALB/C 누드 마우스를 들여와서 1주일 적응 후에 5X10<sup>6</sup> AGS 위암세포주를 0.2 ml의 PBS에 넣어 등에 피하주사함. ② 마우스 등위의 종양이 1 cm 정도 자라면 RJ내서 3 mm의 크기로 자름. ③ 자른 종양덩어리를 7주된 BALB/C 누드 마우스의 위벽 장막하층에 이식함. ④ 9주후, 종양을 심은 마우스의 위에 종양이 생긴 것을 확인. (1st passage) ⑤ 1세대에서 얻어진 종양을 다시 7주된 마우스의 위벽 장막하층에 다시 이식 후 7-12주 간격으로 마우스를 sacrifice하여 위에 생긴 것을 확인 한 후, 간 복막 등 전이된 것을 확인함. ⑥ 위암의 전이모델이 확립되면 위에서 얻은 유전자의 발현을 변화시킨 위암세포를 이식하여 전이 여부를 판별하여 위의 유전자들이 in vivo에서 위암의 전이에 얼마나 영향을 미치는지 알아봄

### 3. 위암환자 조직에서 전이 관련 인자 발현 변화 확인 및 예후에 관한 연구

- ① 대상환자와 조직의 보관 - 1년간 위암센터에서 치료받는 모든 진행성 위암환자를 대상으로 동의서에 동의한 환자를 대상으로 확보한 조직은 즉시 동결보관함. ② Laser microdissection, RNA추출과 quantitative RT-PCR을 실시. background를 줄이기 위해 동결한 조직을 LM을 통해 원발암 조직만 분리하고 분리한 조직에서 RNA를 추출 2iCycler iQ Realtime PCR detection System을 이용하여 정량 ③ 각기 다른 2부위에서 채취한 조직과 전이암 조직들의 galectin-3, Fascin1, PARI, Neogenin, HMMR을 함께 정량함. ④ 면역화학염색-원발암 조직을 고정한 뒤 위 인자들의 항체로 염색함. ⑤ 관독은 환자의 임상양상을 모르는 병리의사가 함. ⑥ 환자의 추적관찰과 분석 - 위암센터의 추적관찰은 정해진 프로토콜에 따라 행하고 추적관찰은 매 3개월마다 함. ⑦ 통계적인 분석은 SPSS를 이용하여 시행하고 마지막 환자 enroll 3년 후 중간분석을 하며 5년 후 최종분석 함.

### ◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	4 / 6	67%
IF 합	24 / 20	12%
기타 성과	국내 및 국외 특허 출원	200%

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- Galectin-3의 전이관련 기작을 규명하여 galectin-3를 위암전이진단 및 치료제로서의 사용 가능성 기반을 마련함.
- 위암 전이 동물 모델을 확립함으로써 위암의 전이 기전을 in vivo 에서도 가능하게 할 수 있는 기틀을 다짐.

### ◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

	성	명	류근원, 이준호, 박숙련, 신지영, 김석준, 이강덕
--	---	---	------------------------------

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	<b>Effect of galectin-3 on gastric cancer metastasis</b>
<b>Key Words</b>	Gastric cancer, Metastasis, Galectin-3
<b>Project Leader</b>	Kyung-Hee Chun
<b>Associated Company</b>	
<p>Galectin-3, a member of the <math>\beta</math>-galactoside-binding proteins, is secreted to extracellular space and is also abundantly present in the cytoplasm, the nucleus and the subcellular structures, such as mitochondria and phagosomes. It has been shown to play important roles in some biological responses through its intracellular actions, galectin-3 modulates a number of cellular processes such as cell growth, apoptosis, adhesion and invasion. Even though it was reported that galectin-3 is highly expressed in human gastric cancer cells, the mechanism(s) of these functions in cellular galectin-3 are not well elucidated. Gastric cancer is the most commonly incident and the second leading by cancer related death in Northeast Asia including Korea. The mortality of gastric cancer is caused by metastatic spread of gastric cancer cells to peritoneum and liver. However, the mechanism(s) of metastasis in gastric cancer cells are still unclear. In this study, to determine the effect on functions of galectin-3 in human gastric cancers metastasis, we silenced the expression of galectin-3 by siRNA in AGS cell lines. After treatment of siRNA of galectin-3, AGS cell numbers decreased and cell shapes also changed in round. To demonstrate mechanism(s), the gene expression in galectin-3 siRNA treated cells was detected by microarray analysis.</p> <p>we demonstrated the important roles of galectin-3 on the metastasis of gastric cancer cells. To demonstrate the function of galectin-3 on cell migration, we have knock-downed galectin-3 mRNA and protein expression with synthetic double-stranded small interfering RNA (siRNA) in AGS and MKN-28 gastric cancer cells. After treatment of siRNA of galectin-3, two kinds of gastric cancer cells were inhibited the migration by detecting migration assay and cell shapes also changed in round. To clarify the motility related molecules which were modulated by galectin-3, the gene expression in galectin-3 siRNA treated cells was detected by DNA microarray analysis. Several genes were selected by these results, as fascin-1, PAR-1, MMP-1, NEOL, HMMR and the changes of mRNA expression by galectin-3 siRNA treatment were confirmed by RT-PCR.</p>	

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

Firstly, among of them, we got a fascin1 is a 55 kDa monomeric which a globular cross-linking and actin bundling protein that provides mechanical support to cellular protrusions and cell motility. The expression of fascin1 in epithelial neoplasms has been recently reported, but its exact mechanism in cancer is unknown. Fascin1 has an influence on migration through modulate F-actin. Expression of mRNA and protein Fascin1 was reduced by galectin-3 siRNA treatment. Also we demonstrated that changes in F-actin according to fascin1 reduction through ICC when we treated galectin-3 siRNA in MKN-28. In conclusion, we proposed that galectin-3 regulate in cell migration through modulation with fascin1 into f-actin in human gastric cancer.

Secondly, we studied about galectin-3, PAR-1 and MMP-1. PAR-1 was up-regulated by galectin-3 over-expression was observed in association with promotion of gastric cancer cell motility. Whereas, silenced PAR-1, used by galectin-3 siRNA, prevented this increase. Interestingly, galectin-3 directly interacted with the AP-1 transcriptional factor, to drive PAR-1 transcription and regulate expression of MMP-1, as a PAR-1 activator. Also, silenced galectin-3 reduced cell migration into vessels in the zebrafish embryo. Moreover, we determine galectin-3, PAR-1 and MMP-1 were highly expressed and co-localized in gastric patient tissues. These data establish a galectin-3 up-regulates both expression and activation of PAR-1, and also, galectin-3 up-regulating MMP-1 expression to activate PAR-1.

lastly, Mutation of galectin-3 at position 191 (rs4644) substituting proline to histidine (gal-3H<sup>64</sup>) resulted in the acquisition of resistance to drug-induced apoptosis by breast cancer cells. Therefore, this study employed gastric cancer cells and patient tissues in attempts to elucidate how and why this mutation in galectin-3 (gal-3H<sup>64</sup>) enhances cancer progression, compared to wild type galectin-3 (gal-3P<sup>64</sup>). We found that gal-3H<sup>64</sup> over-expression increases gastric cancer cell growth more than gal-3P<sup>64</sup> or LacZ over-expression. Also, gal-3H<sup>64</sup> over-expression conferred more resistance to cisplatin nor 5-FU induced cytotoxicity than gal-3P<sup>64</sup>. Gal-3H<sup>64</sup> also enhanced nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin as well as increased expression of TCF-4 target genes, such as fascin-1 and c-Myc through the augmented promoter binding activity of TCF-4, than gal-3P<sup>64</sup>. We also demonstrated stronger staining of  $\beta$ -catenin and galectin-3 in malignant tissues from gastric cancer patients with mutated galectin-3 at position 191 (gal-3 191) (A/A) (H<sup>64</sup>) and greater localization in the nucleus than in gal-3 191 A/C (P<sup>64</sup>) cancer patients. Taken together, we elucidated in this study that germline variant of gal-3H<sup>64</sup> increases nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin and promotes TCF transcriptional activity and enhances more the galectin-3's role in gastric cancer progression.

In conclusion, we suggest that galectin-3 involves in gastric cancer metastasis and malignancy by modulating the gene expressions. we were studied about a piece of multi-functional of galectin-3, However it need to further studies.

## 1. 연구의 최종목표

위암의 전이 과정 중에서 galectin-3의 발현 및 역할을 연구하여 위암의 전이과정을 규명하고 위암의 전이를 예측할 수 있는 예후인자를 발굴함.

- 위암은 우리나라에서 발병률이 1위임에도 불구하고, 아직까지 잘 알려져 있지 않는 위암의 전이 과정에 미치는 다양한 기전연구가 활발히 이루어 지지 않고 있음. 이에 따라, 전이과정을 연구함으로써 위암의 전이과정에 대한 분자 생물학적인 이해 및 신진식 창조를 목표로 함.
- 특히, 위암의 경우 조기 발견시 생존율이 높으나 다른 장기로의 전이가 발견되면 현저히 생존율이 감소하는 암종으로 위암에서 과발현 되어 있는 galectin-3와 위암의 전이 기전 연구는 임상적으로도 큰 가치가 있다고 사료됨.
- Galectin-3에 의한 세포반응의 신호전달체계 및 단백질 간의 긴밀한 상호작용을 이해함으로써, 위암의 전이를 예측할 수 있는 예후 인자를 발굴함에 도움을 줄 것이라 생각되며, 이는 또한 새로운 개념의 항암제 개발에의 기초 자료로서 활용될 수 있다고 사료됨.

## 2. 연구의 내용 및 결과

### 2.1. 연구수행 방법

1) 갈렉틴-3에 의해 발현이 조절되는 전이 관련 인자에 관한 연구

- Galectin-3 siRNA를 위암세포주 AGS 및 MKN-28에 처리한 후 발현의 변화를 보이는 인자를 탐색하여 Fascin1, PAR1, HMMR, Neogenin을 얻음.
- 이들 인자 각각의 siRNA를 위암세포주에 처리하여 위암세포주의 migration 및 invasion 여부를 확인함.
- 각각 인자들의 발현변화에 의한 Immunocytochemistry를 통하여 위암세포주의 morphological changes 확인.
- 이들 인자 각각의 프로모터에 galectin-3에 의해 활성이 조절되는 전사인자 가 interaction하는 부위가 있는지 ChIP assay를 통하여 확인함.
- Galectin-3가 각각의 전사조절인자와 interaction하는지 Immunoprecipitation으로 확인 및

galectin-3의 발현 변화에 의한 전사인자의 localization 변화 확인.

- galectin-3를 과발현하거나 발현하지 않는 세포주를 만들어 위암동물모델 실험 실시.
- 이 같은 변화를 위암 환자의 조직에서 양상을 관찰

2) 위암전이 동물 모델 확립 - 마우스의 동소이식을 이용한 위암의 동물 모델

- 5주령된 BALB/C 누드 마우스를 들여와서 1주일 적응 후에  $5 \times 10^6$  AGS 위암세포주를 0.2 ml의 PBS에 넣어 등에 피하주사함.
- 마우스 등위의 종양이 1 cm 정도 자라면 RJ내서 3 mm의 크기로 자름.
- 자른 종양덩어리를 7주된 BALB/C 누드 마우스의 위벽 장막하층에 이식함.
- 9주후, 종양을 심은 마우스의 위에 종양이 생긴 것을 확인. (1st passage)
- 1세대에서 얻어진 종양을 다시 7주된 마우스의 위벽 장막하층에 다시 이식 후 7-12주 간격으로 마우스를 sacrifice하여 위에 생긴 것을 확인 한 후, 간 복막 등 전이된 것을 확인함.

3) 위암환자 조직에서 전이 관련 인자 발현 변화 확인 및 예후에 관한 연구

- 대상환자와 조직의 보관 - 1년간 위암센터에서 치료받는 모든 진행성 위암환자를 대상으로 동의서에 동의한 환자를 대상으로 확보한 조직은 즉시 동결보관함.
- Laser microdissection, RNA추출과 quantitative RT-PCR을 실시. background를 줄이기 위해 동결한 조직을 LM을 통해 원발암 조직만 분리하고 분리한 조직에서 RNA를 추출 2iCycler iQ Realtime PCR detection System을 이용하여 정량.
- 각기 다른 2부위에서 채취한 조직과 전이암 조직들의 galectin-3, Fascin1, PAR1, Neogenin, HMMR을 함께 정량함.
- 면역화학염색-원발암 조직을 수술 후 6시간 이내에 고정한 뒤 위 인자들의 항체로 염색함.
- 판독은 환자의 임상양상을 모르는 병리의사가 함.
- 환자의 추적관찰과 분석을 실시하며 통계적인 분석은 SPSS를 이용하여 시행하고 마지막 환자 enroll 3년 후 중간분석을 하며 5년 후 최종분석 함.

## 2.2. 연구의 내용 및 결과

### 2.2.1. Galectin-3의 위암 전이 조절 기전 연구 (fascin-1, PAR-1 and MMP-1)

- 위암의 경우, 위암환자들에게서는 galectin-3의 발현의 증가 및 림프관으로 전이 된 환자에서 발현이 증가되었다는 보고 (miyazaki J et al., Oncol. Rep. 2002) 는 있으나 그러나 많은 기작들이 제대로 알려진 것이 없는 것이 현실임.
- 본 연구팀은 galectin-3의 경우, 분비되어 세포와 세포사이의 상호관계에 의한 신호전달에도 중요하지만 세포안에서 세포질과 핵을 이동하면서 세포내의 신호전달에 영향을 미치는 것이 galectin-3의 중요한 역할이라 예상함.
- 본 연구팀은 먼저 12개의 위암세포주에서 galectin-3의 발현 정도를 알아보았음. Figure 1-1 에서 보여지는 것처럼 대부분의 위암세포주에서는 galectin-3의 발현이 관찰되었고 그중 SNU-1 과 SNU-638은 발현이 없는 것을 확인하였음. (Fig. 1-1).

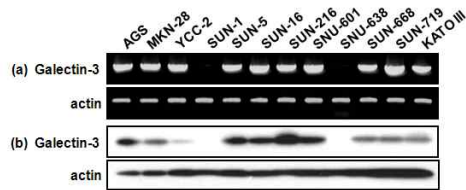


Fig. 1-1. 위암세포주 내의 galectin-3의 (a)mRNA (b) protein 발현

- 이에 본 연구팀은 galectin-3의 위암세포내에서의 역할을 확실히 하기 위해 먼저 위암 세포주 중 galectin-3 과발현 세포주인 AGS에 galectin-3 특이적인 siRNA를 제작하여 transfection 시켜서 galectin-3의 발현량을 감소시킴(Fig. 1-2).

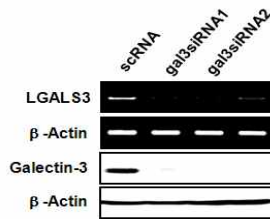


Fig. 1-2. galectin-3 siRNA에 따른 galectin-3의 발현량 확인

- 기존 여러 보고를 통해(Liu FT and Rabinovich G. Nature reviews 2005), galectin-3 가 세포내 다양한 역할을 담당하고 있음을 알고 있었기 때문에, AGS에 galectin-3 특이적인 siRNA를 처리하고, Affymetrix array 방법으로 gene expression 변화를 관찰하였음 (Chung et al, 2010, cancer sci). Affymetrix array 분석 결과 galectin-3의 siRNA 처리에

의해 많은 수의 mRNA발현에 변화를 보였는데, 본 연구팀은 cell motility에 관련된 gene의 발현 변화에 주목하였음 (Fig 1-3).

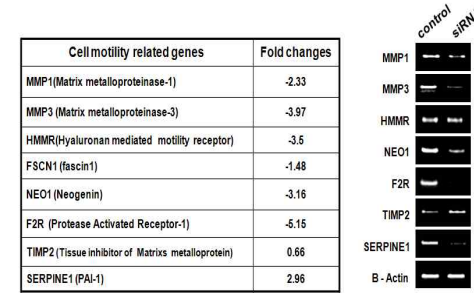


Fig.1-3. galectin-3의 발현 변화에 따른 cell motility gene의 발현 변화

- 위의 그림처럼 galectin-3의 발현 감소로 인하여 전이관련 인자들의 감소를 발견할 수 있었고, 이중 FSCN1(fascin-1), PAR-1 and MMP-1 을 선택하여 실험을 진행하였음.

### (Galectin-3 and Fascin-1)

- Fascin-1은 actin bundle protein으로 actin을 정렬시켜 세포가 앞으로 protrusion하는데 필요한 단백질이다. 위암환자에서의 Fascin-1의 발현은 증가되어 있으며 poor diagnosis과 연관되어 있다는 보고가 있음. (Hashimoto Y., et al Oncology 2004 and Tsai WC, J histochem cytochem 2007) 그러나 위암에서의 발현이 어떤 기작에서 이루어진 것인지에 대해서는 아직 원인에 대한 보고가 없으므로 다음과 같이 연구를 진행하였음 (Kim et al., 2010 Gastroenterology).

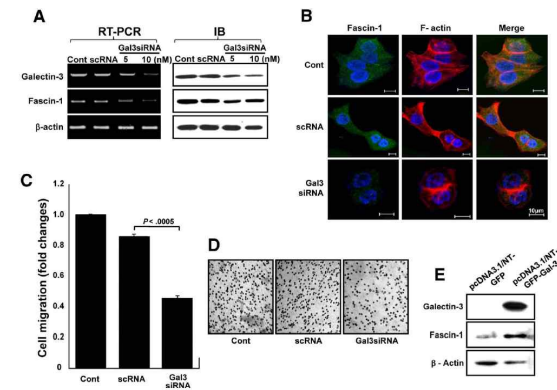


Fig. 1-4. Galectin-3를 억제시켰을 때 fascin-1의 변화 및 cell migration에 미치는 영향

- 먼저 본 연구팀은, Fig. 1-3의 데이터를 confirm 하기 위하여 위암세포주인 MKN-28 에 galectin-3 siRNA를 처리하여 galectin-3 와 fascin-1의 발현량을 RT-PCR과 western blot 를 통하여 확인하였고, 이때, cell migration을 확인해 보았음. 위 데이터를 통하여 galectin-3 를 Knock-down 시켰을때, MKN-28 cell 의 migration ratio 가 현저하게 줄어드는 것을 확인하였고, 이때, fascin-1의 세포 내 주요기능인 F-actin의 변화를 보았을때, galectin-3가 줄어들면, fascin-1의 발현량의 감소와 더불어 F-actin의 발현이 세포 내에 길게 뻗어있던 양상이 round 형태로 바뀌는 것을 볼 수 있다. 또한 galectin-3가 없는 SNU-638에 galectin-3 를 과발현 시키면, fascin-1의 양도 함께 증가함을 토대로 galectin-3가 fascin-1의 발현을 조절함을 예측할 수 있었음(Fig. 1-4).

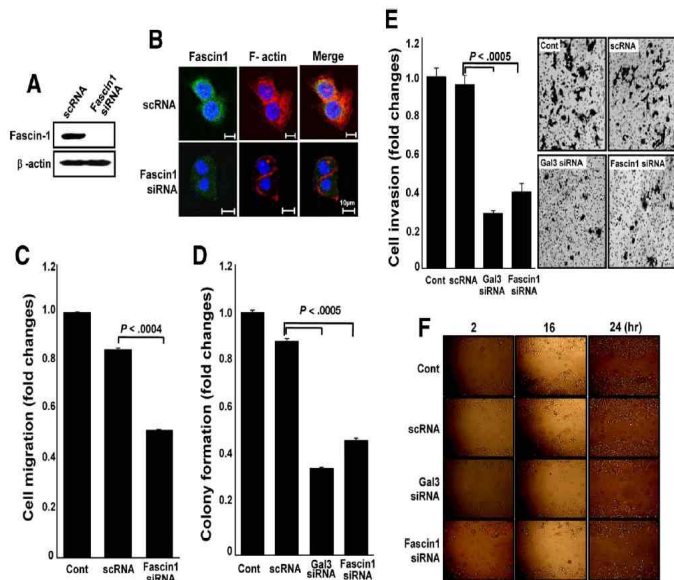


Fig. 1-5. 위암에서 fascin-1을 억제 시켰을 때 F-actin 과 cell migration 에 미치는 영향

- Fig. 1-4. 의 결과를 토대로 galectin-3가 fascin-1을 조절함을 확인하였고, 이때 fascin-1을 Knock-out 시켰을 때, 동일한 양상을 나타나는지 확인하기 위하여, fascin-1 특이적인 siRNA을 MKN-28을 처리하고, cell migration을 확인하였을 때, galectin-3의 발현을 억제하였을 때 처럼, cell migration ratio가 감소함을 확인할 수 있었음. 또한 Fig 1-4의 데이터 처럼 F-actin의 양상이 변화함을 확인하였음. 또한 galectin-3와 fascin-1의 siRNA을 처리하고 invasion assay를 실시하였을 때, 동일하게 감소함을 확인하였음. 또한 이를 confirm 하기 위하여 colony formation assay와 wound-healing assay를 실시하여 동일하게 galectin-3와 fascin-1이 knock down 되면 동일하게 cell motility가 감소함을 확인하였음(Fig.1-5).

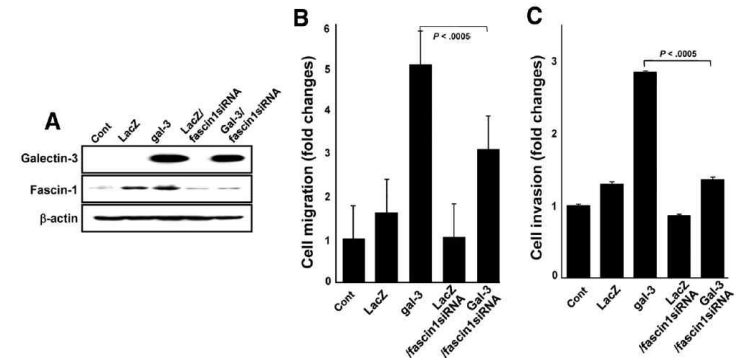


Fig. 1-6. Galectin-3 가 fascin-1을 조절함으로써 cell migratin 과 invasion 을 조절함

- 이러한 cell motility의 감소가 galectin-3가 fascin-1을 통한 regulation 인지 확인해 보기 위해, galectin-3가 null cell 인 SNU-638 에 galectin-3를 과 발현 시켜서 cell migration 과 invasion에 어떠한 역할을 담당하게 하는지 알아보기 위해서 galectin-3를 과 발현 시킨 다음, fascin-1 siRNA을 처리하여 cell migration과 cell invasion을 실시하였음(Fig. 1-6).

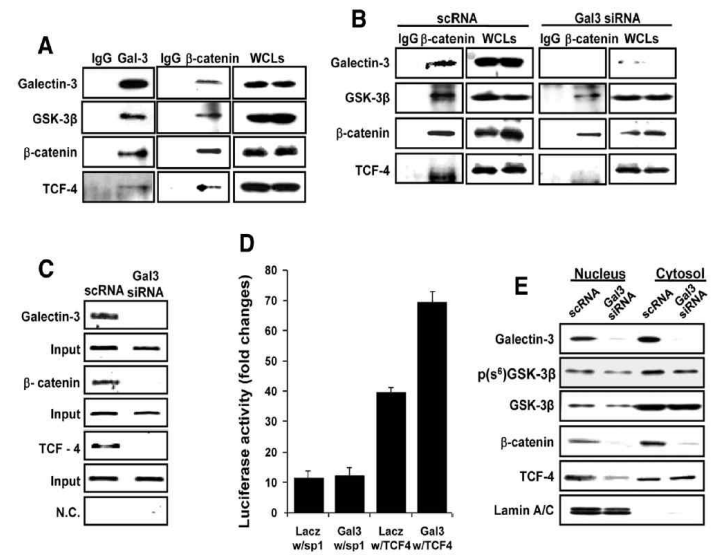


Fig. 1-7 Galectin-3와 Wnt signaling factor 인 GSK-3 $\beta$  와  $\beta$ -catenin의 interaction 확인

- 그럼 어떻게 galectin-3가 fascin-1의 발현을 조절하는지 확인해 보기 위하여, 둘 간의 어떠한 관계가 성립되는지 확인해 보고자 하였음. 이전의 보고를 통해 galectin-3는 wnt signaling에 관여하는  $\beta$ -catenin과 direct interaction하여 tumor growth에 관여한다는 보고가 있었고, 또한 fascin-1은  $\beta$ -catenin의 target gene임이 보고되어 있기 때문에 galectin-3가 fascin-1을 wnt signaling pathway가 주요하게 관여할 것이라 생각하였고, 또한 이때  $\beta$ -catenin이 key molecule의 역할을 담당할 것이라 생각하였음. 이를 증명하기 위하여, wnt signaling pathway molecule과 galectin-3의 interaction을 확인하여 보았음. 또한 galectin-3가 knock down 되면 이러한 wnt signaling pathway molecule의 결합이 약해지는 것 또한 확인하였음. 이 후, fascin-1의 프로모터에 이러한 wnt 관련된 protein과 이때 galectin-3의 역할을 확인해 보기 위하여 MKN-28 cell에 galectin-3 siRNA 처리하여 ChIP을 실시하여 galectin-3가  $\beta$ -catenin/TCF-4/LEF-1 complex의 fascin-1 promoter interaction을 조절함을 확인하였음. 이를 또한 luciferase assay를 통하여 confirm 하였음. 또한, galectin-3를 knock down 시켰을 때, cellula localization을 확인하기 위하여 cell fractionation을 확인하였는데, galectin-3의 발현 억제시  $\beta$ -catenin/TCF-4/LEF-1 complex의 핵 내 발현이 줄어드는 것을 확인함으로써, 이전의 ChIP data와 luciferase assay data를 뒷받침 하였음(Fig. 1-7)

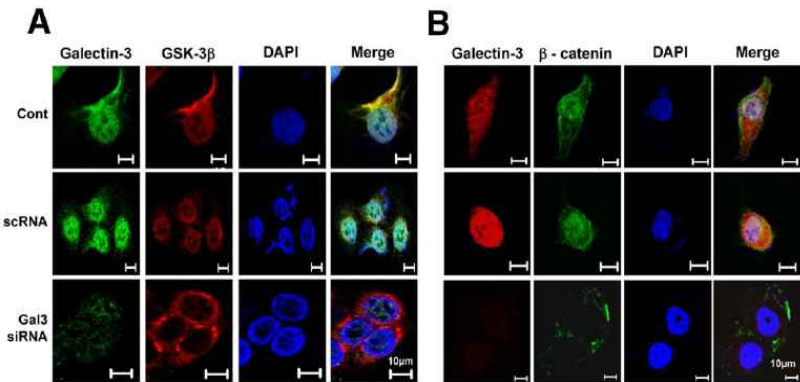


Fig. 1-8. Galectin-3의 siRNA 처리 후 galectin-3 발현 유무에 따른 GSK-3 $\beta$

- Fig 1-7의 cell fractionation data에서 galectin-3의 발현이 억제되면, wnt signaling pathway 관련 molecule이 억제되는 것을 다시 ICC 를 통해서 확인해 보았는데(Fig.1-8), galectin-3의 발현이 억제되면 gsk-3 $\beta$  와  $\beta$ -catenin 의 핵내 발현이 줄어들고 특히  $\beta$ -catenin 의 경우에는 galectin-3가 줄어들면 세포질의 발현량도 현저하게 줄어드는 것을 확인하였음(Fig. 1-8). 이는 결국 기존에 알려진 canonical pathway에 따라 galectin-3의 발현이 억제되면, gsk-3 $\beta$ 가  $\beta$ -catenin의 인산화를 촉진시켜 degradation 시키는 way로 감을 생각해 볼 수 있었음.

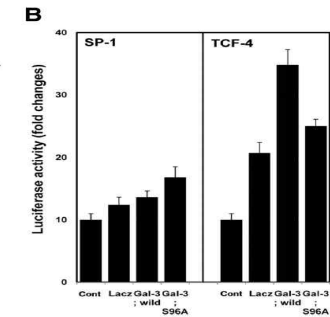


Fig. 1-8. GSK-3 $\beta$ 에 의해 인산화 되는 Galectin-3 S96을 point mutation 후 변화 양상 확인.

- 특히, galectin-3 아미노산을 확인한 결과 gsk-3 $\beta$ 는 galectin-3의 92-96번 사이의 아미노산에 바인딩 하여 인산화를 유도할 것이라는 예측을 인산화를 예측하는 프로그램을 통하여 확인하고, galectin-3의 96번 아미노산인 serin을 alanine으로 치환하여 기전연구를 실시한 결과, galectin-3의 96번이 변이를 일으키면, fascin-1의 발현량 뿐만 아니라, gsk-3 $\beta$  인산화,  $\beta$ -catenin의 발현량에도 주요하게 영향을 미치는 것을 확인 하였음. 이를 또한 luciferase assay를 통하여 확인하였음(Fig.1-8) 이러한 결과는 galectin-3의 96번의 아미노산의 modification이 wnt signaling에 관련된 molecule의 발현량과 그의 target gene에도 주요하게 관련되어 있음을 예측할 수 있었음.

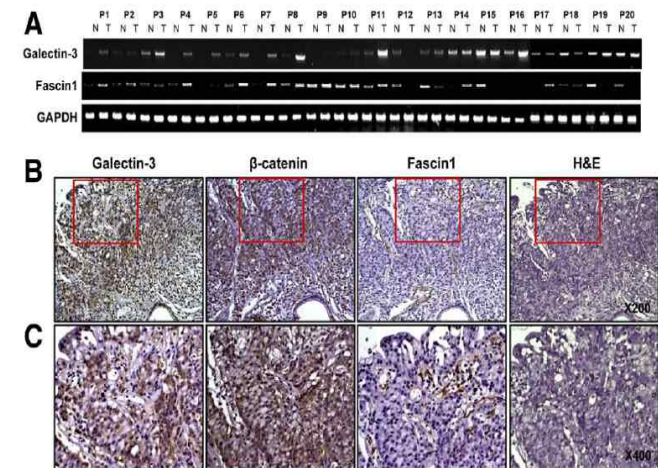


Fig. 1-9. 위암환자 조직에서의 galectin-3, fascin-1 and  $\beta$ -catenin 발현 확인



- 이러한 위암세포의 cell motility를 조절하는 galectin-3의 발현이 20명의 위암환자의 조직 내에서는 어떠한 양상을 이루는지와 특히, galectin-3가 cell motility에 영향을 미치는 데 주요한 역할을 담당하는 fascin-1의 발현을 먼저 RT-PCR을 통해 확인하였음(Fig. 1-9). 이 결과를 통하여 암조직에서 발현되는 galectin-3와 fascin-1의 발현량이 정상조직보다 늘어 있음을 확인하였고, 특히, 위암 조직 염색을 통해 확인한 결과, galectin-3, fascin-1 그리고  $\beta$ -catenin이 동일한 위치에 존재함을 밝힘으로써 in vivo에서도 galectin-3와 fascin-1의 영향이 위암의 전이에 미칠 것이라는 예측이 가능하게 하였음(Fig. 1-9).

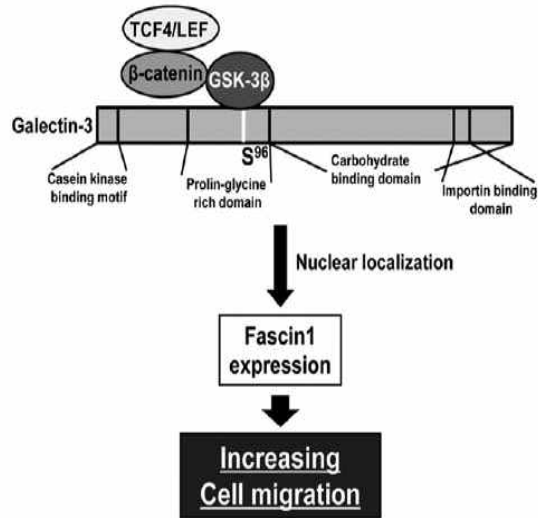


Fig. 1-10. Galectin-3에 의한 fascin-1의 조절 및 이에 의한 위암의 전이 조절 기전의 모식도.

- 위의 그림에서 보여주듯이 galectin-3가 GSK-3 $\beta$ 와의 interaction에 의해  $\beta$ -catenin 및 TCF-4의 핵 내의 이동을 유도, TCF-4의 fascin-1 promoter에서의 DNA binding activity를 증가시켜서 fascin-1의 발현을 유도하여 결국 위암세포의 전이를 촉진한다는 결과를 도출함.
- 이처럼, 핵내에 존재하는 galectin-3가 위암의 전이를 조절함을 보고하였고, 이를 통해 galectin-3를 조절하면 위암의 전이를 조절할 수 있으리라 예상됨을 보고하였음 (Kim et al., 2010 Gastroenterology).

(Galectin-3, PAR-1 & MMP-1)

- 또 다른 galectin-3 silencing 시 변화되는 cell motility 관련된 gene인 PAR-1은 GPCR family에 속한 단백질로써, PAR-1의 activation에 의해 다양한 암종에서 cell motility를 조절함 보고 되었음. 특히 PAR-1을 activation 시키는 것으로는 thrombin이 알려져 있고, 최근 MMP-1 또한, 이를 activation 시키는 것이 보고 되어 지고 있음. 이에 이들의 관계성에 대해 연구를 진행하였음. (Kim et al, 2011, PLoS ONE)

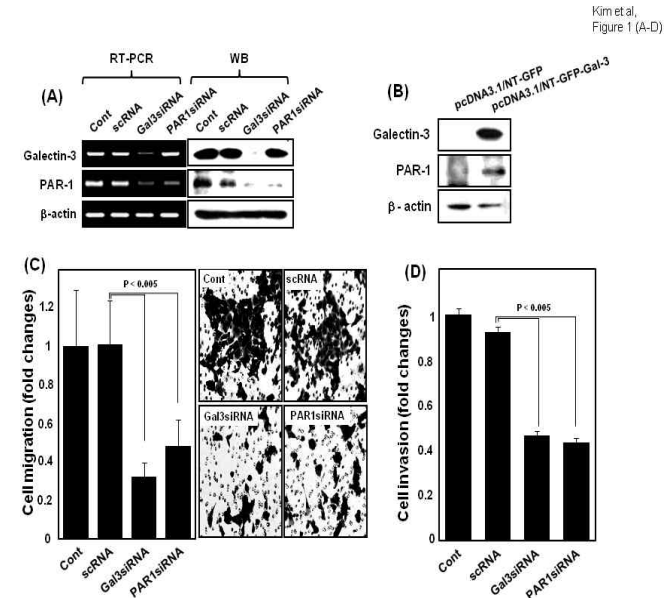


Fig. 1-11. Galectin-3 변화 시 PAR-1의 발현 변화 및 위암세포주의 cell motility에 관련성 확인.

- 먼저, galectin-3 발현 억제시, 변화되는 PAR-1의 발현량을 먼저 확인해 보았음. galectin-3 억제시 PAR-1의 발현량은 함께 감소되지만, 반대로 PAR-1을 PAR-1 특이적인 siRNA를 처리한뒤 galectin-3와 PAR-1을 확인 하였을때, PAR-1은 galectin-3의 발현에 영향을 미치지 못함을 확인하였음. 또한 galectin-3 null cell 인 SNU-638 cell 에 galectin-3를 인위적으로 과 발현 시켰을때, PAR-1의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 특히, 기존의 연구 결과들을 통해 galectin-3와 PAR-1이 동일 하게 cell motility에 관여하고 있는 부분을 인지하고 있었기 때문에 galectin-3와 PAR-1 특이적인 siRNA를 위암세포주에 처리하여 cell migration 그리고 cell invasion assay를 실시 하였는데, 동일하게 galectin-3, PAR-1 Knock-down 되어 있는 양상을 확인 할 수 있었음 (Fig. 1-11).

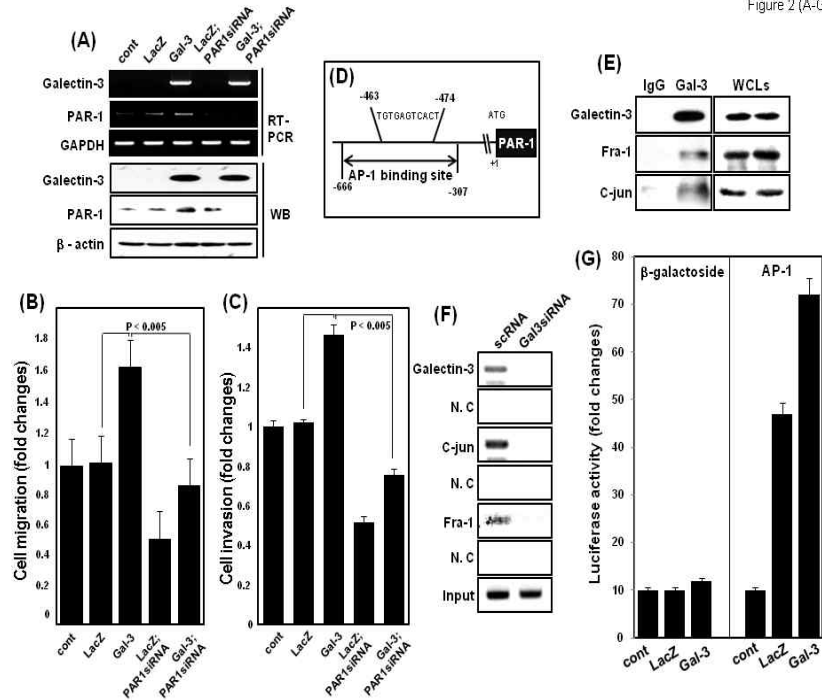


Fig. 1-12. PAR-1의 발현을 조절하는 galectin-3와 AP-1 complex.

- 이러한 cell motility의 감소가 galectin-3가 PAR-1을 통한 regulation 인지 확인해 보기 위해, galectin-3가 null cell 인 SNU-638 에 galectin-3를 과 발현 시켜서 cell migration 과 invasion에 어떠한 역할을 담당하게 하는지 알아보기 위해서 galectin-3를 과 발현 시킨 다음, PAR-1 siRNA를 처리하여 cell migration과 cell invasion을 실시하였음. 이 결과를 통해 galectin-3가 PAR-1을 통한 위암 세포주 조절에 긴밀한 영향을 미치는 것을 확인하였음. (Fig. 1-12). 또한 이러한 PAR-1의 발현량을 galectin-3가 어떻게 조절하는지를 확인하기 위하여 PAR-1 promoter에 galectin-3와 interaction 하는 transcription factor를 확인한 결과 AP-1 complex 가 PAR-1 promoter에 위치하는 것을 확인하였음. 최근 galectin-3가 MUC2를 AP-1 complex와 binding 하여 조절하는 것을 확인 하였음. 이에 따라 galectin-3와 AP-1 complex의 interaction을 먼저 IP를 통하여 확인하였고, 이를 ChIP assay를 통하여 galectin-3의 유무에 따라 PAR-1의 발현을 조절하는 것을 확인한 뒤 luciferase assay를 통하여 confirm 하였음 (Fig. 1-12).

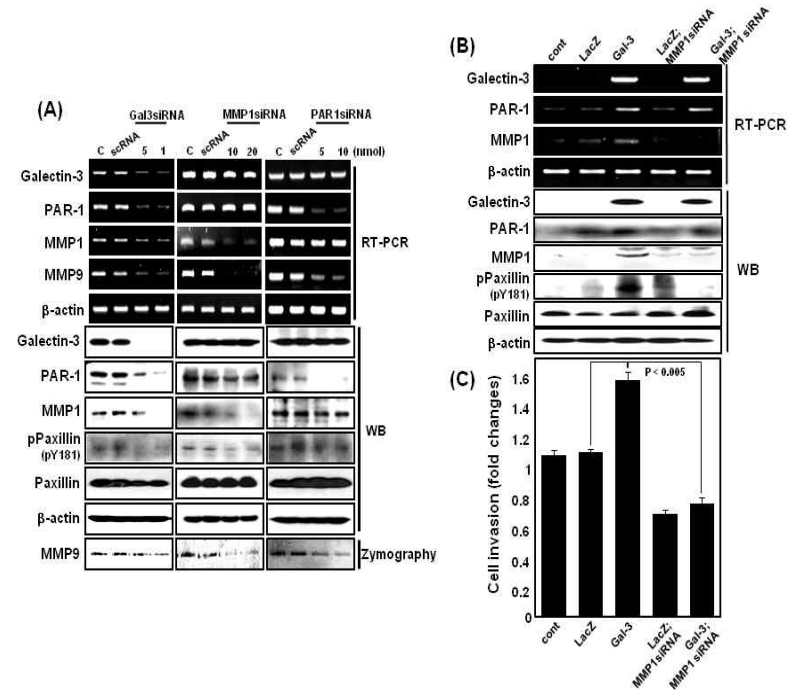
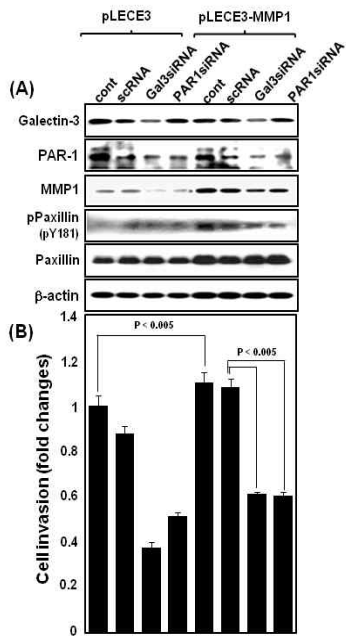


Fig. 1-13. PAR-1의 활성화에 영향을 미치는 MMP-1과 galectin-3.

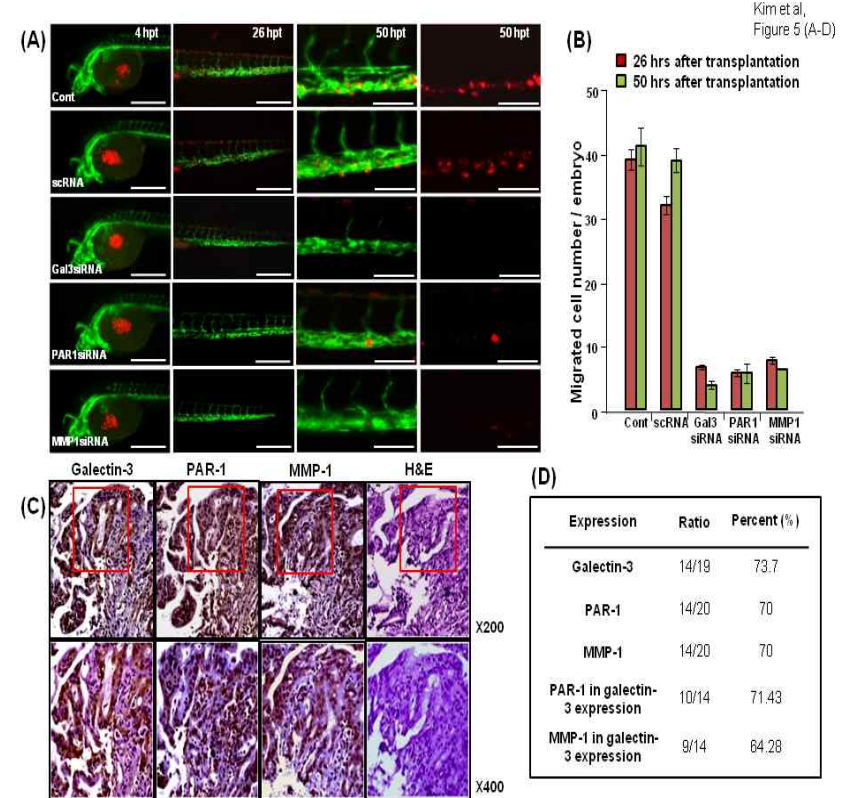
- 특히, cell motility를 조절하는 PAR-1은 발현량 조절 뿐만 아니라 PAR-1의 활성화도 주요하게 영향을 미치기 때문에, galectin-3가 이러한 PAR-1의 활성화에 영향을 끼치는지에 대하여 확인해 보고자 함. 이에 galectin-3 특이적인 siRNA를 이용하여, PAR-1의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 확인해 보았음. PAR-1이 활성화하게 되면, Paxillin의 인산화가 일어나는 것을 통해 galectin-3를 knock-down 시킨뒤 Paxillin의 인산화를 확인하였음. 이를 통해, galectin-3가 PAR-1의 인산화에 주요하게 관여함을 알 수 있었음. 특히, MMP-1은 이러한 PAR-1의 활성화에 주요한 영향을 미치는 것을 기존의 보고를 통해 알 수 있었고, 이러한 MMP-1의 발현을 galectin-3가 조절함을 본 연구팀에서 gene array를 통해 알 수 있었기 때문에, MMP-1의 발현 억제를 통한 PAR-1의 활성화에 영향을 미침을 알 수 있었음. 이를 통해, galectin-3를 과 발현 시키면 MMP-1, PAR-1의 발현이 조절되고 특히 PAR-1의 활성화에 주요하게 영향을 끼침을 확인하였음. 이는 결국 위암 세포주의 invasion에도 주요하게 영향을 미치는 것을 확인하였음 (Fig. 1-13)



Kim et al, Figure 4 (A-C)

Fig. 1-14. MMP-1의 과발현을 통한 cell motility의 양상과 전반적인 galectin-3의 PAR-1과 MMP-1을 조절하는 기전을 모식화함.

• Fig. 1-13 data 를 통해 MMP-1이 PAR-1의 cell motility에 주요하게 관여함을 알게 되었고, 이를 조절하는 것이 galectin-3임을 확인하게 되었음. 이를 바탕으로 MMP-1이 발현 억제 뿐만 아니라 과발현 시에 PAR-1의 발현 및 cell motility에 미치는 영향을 확인해 보기 위하여 MMP-1을 과발현 시킨 뒤 galectin-3와 PAR-1의 siRNA를 이용하여 발현을 억제 한 다음 PAR-1의 활성화와 cell invasion에 미치는 영향을 확인하였음. MMP-1의 발현이 과발현 되면 PAR-1의 활성화를 유도하지만, invasion cell의 모습은 과 발현 시키지 않았을 때와 크게 차이가 나지 않음을 알 수 있었음. 하지만 유의성 있게 조금은 증가하는 모습을 볼 수 있었음. 이를 통해, galectin-3, PAR-1, MMP-1의 조절 기전을 모식화하여 본 결과 galectin-3은 직접적으로 PAR-1과 MMP-1의 발현을 transcription factor와 interaction을 통하여 조절하였으며, 이는 또한 MMP-1의 PAR-1의 활성화에 미치는 영향도 조절하였음. 특히 MMP-1의 경우는 기존에 알려진 cell motility에 관련된 기전과 더불어 galectin-3에 영향을 받아 이를 통해 PAR-1의 활성화를 조절함으로써 위암 세포주의 cell motility에 주요하게 관여함을 보고 하였음 (Fig. 1-14).



Kim et al, Figure 5 (A-D)

Fig. 1-15. in vivo study를 통한 galectin-3, PAR-1, MMP-1의 발현 양상과 cell motility에 미치는 영향 규명

• Fig. (1-11)~(1-14) data 를 통해 in vitro 상태에서 galectin-3가 MMP-1과 PAR-1을 조절하여 위암 세포주의 cell motility에 관여함을 확인하였음. 이를 바탕으로 암 실험 자원 연구과 배영기 선생님의 도움으로 zebra fish의 embryo를 이용한 in vivo cell migration 실험을 진행하였음. 이 실험은 AGS 위암세포주에 RFP를 태깅하여, 기존에 EGFP 발현을 보이도록 제작한 zebra fish의 embryo에 cell을 40-50여개를 주입하여 시간의 지속 여부에 따른 세포의 이동 여부를 확인하였음. 이때 이 cell line에 galectin-3, PAR-1, MMP-1 특이적인 siRNA를 처리하여 galectin-3, PAR-1, MMP-1 gene의 발현 양상에 따른 세포 이동 여부를 확인하였음. 이를 토대로 galectin-3, PAR-1, MMP-1 gene의 발현이 세포의 이동에 미치는 영향을 in vivo 실험을 통하여 확인하였음. 또한 위암 환자 20명을 대상으로 하여 암 조직과

정상조직 사이에서 galectin-3, PAR-1, MMP-1 의 발현을 확인한 결과 70%이상의 암조직에서 정상조직 보다 galectin-3, PAR-1, MMP-1의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, galectin-3가 정상조직보다 암조직에서 증가한 환자에서 PAR-1, MMP-1의 발현이 증가하는 percent가 64%이상임을 RT-PCR을 통하여 확인하였음. 또한 이들의 발현 위치또한 IHC를 통하여 염색하여 galectin-3, PAR-1, MMP-1 발현 위치가 유사함을 확인하였음.

- 이러한 실험을 통해 **galectin-3가 PAR-1과 MMP-1의 발현량을 조절하여 위암의 전이를 조절하며, 특히 MMP-1의 발현량 조절은 PAR-1의 activation에 관여한다**는 결과를 도출함 (Kim et al, 2011, PLoS ONE).

(Galectin-3 & MMP-1 in mouse melanoma cell line)

- 위의 PLoS ONE data를 통하여 galectin-3가 MMP-1도 조절함을 확인하였으므로, 어떠한 기전을 통한 조절인지를 확인하기 위하여 실험을 진행하였음. 특히 이 실험은 mouse에서 실제적인 metastasis를 일으키는지를 확인해 보기 위하여 human cell 이 아닌 mouse cell line을 이용하였음.

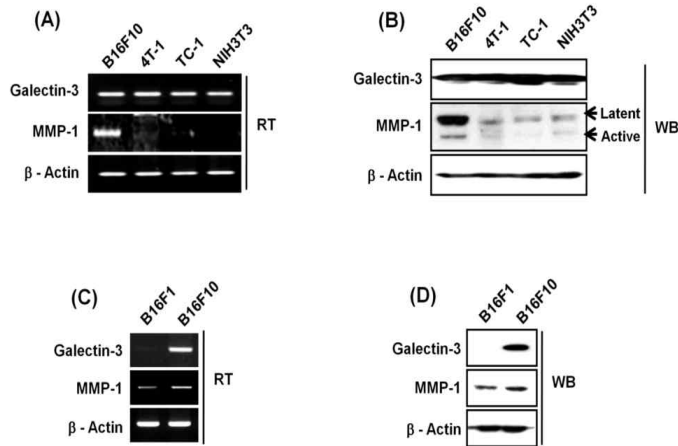


Fig. 1-16. mouse cell line에서 galectin-3 와 MMP-1의 발현량을 확인

- 먼저 4개의 mouse cell line에서 galectin-3와 MMP-1의 발현량을 확인하였음. 이때 MMP-1의 발현량이 다른 cell line 보다 B16F10 melanoma에서 발현이 많이 되는것을 확인

하고, 이를 활용하고자 하였음. 특히, B16F10은 metastatic melanoma cell line으로 다른 melanoma cell line에서 galectin-3와 MMP-1의 발현량을 비교해 보고자 하였는데, metastatic 한 B16F10이 non-metastatic 한 B16F1 cell에서 galectin-3의 발현이 높게 발현되어 B16F10에 집중하여 실험을 진행하였음(Fig. 1-16).

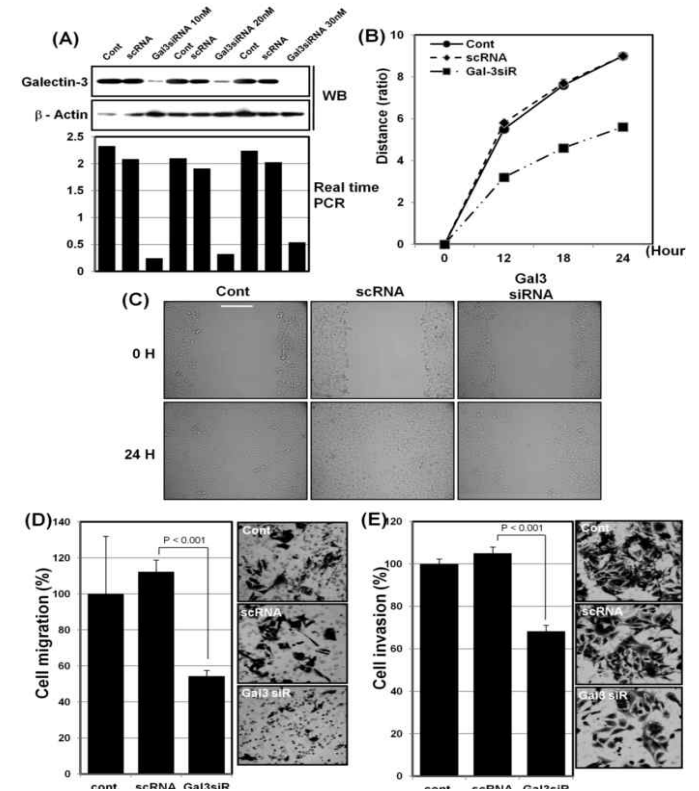


Fig. 1-17. Galectin-3 발현 억제시 B16F10 cell motility에 미치는 영향.

- B16F10 cell 에 먼저 기 제작한 galectin-3 특이적인 siRNA를 농도 구배 별로 처리하여 galectin-3 의 발현량에 영향을 미치는 농도를 정리하였음. 이에 따라 galectin-3를 knock-down 시킨 다음 wound-healing assay 및 cell migration and invasion assay를 실시하여 cell motility에 미치는 galectin-3의 영향력을 B16F10 mouse melanoma cell line에서도 동일하게 이루어짐을 확인하였음 (Fig 1-17).

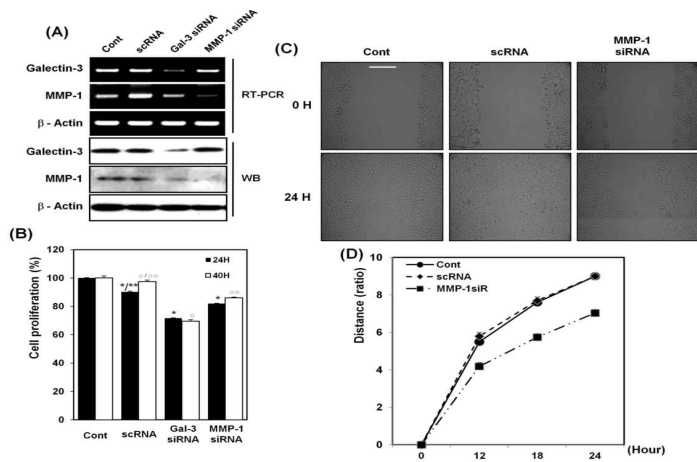


Fig. 1-18. MMP-1 발현 억제시 B16F10 cell motility에 미치는 영향 및 galectin-3와 MMP-1의 상관관계 규명.

- B16F10 cell line에서 동일하게 MMP-1의 발현을 억제한 다음 Fig. 1-16에서 처럼 galectin-3의 발현을 억제 하였을 때와 비슷하게 cell migration에 억제되는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 cell motility에 galectin-3와 MMP-1이 관여하는데, 둘 간의 상관관계에 어떻게 관여하였는지 알아보기 위하여 galectin-3, MMP-1의 특이적인 siRNA를 처리하여 둘 간의 발현량을 비교해 보았을때, galectin-3가 발현이 억제 되었을때는 MMP-1의 발현이 억제 됨을 확인 하였고, 이와는 반대로 MMP-1의 발현 억제시 galectin-3의 발현에는 변화 없음을 확인 할 수 있었음 (Fig. 1-18).

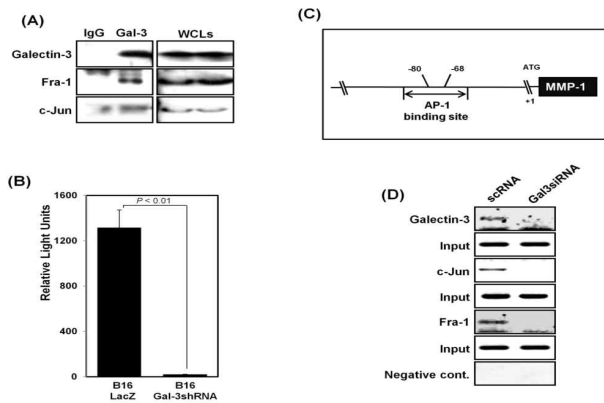


Fig. 1-19. MMP-1의 발현을 조절하는 galectin-3 와 AP-1 complex.

- 이러한 MMP-1의 발현량을 galectin-3가 어떻게 조절하는지를 확인하기 위하여 MMP-1 promoter에 galectin-3와 interaction 하는 transcription factor를 확인한 결과 AP-1 complex 가 MMP-1 promoter에 위치하는 것을 확인하였음. 최근 galectin-3가 MUC2를 AP-1 complex와 binding 하여 조절하는 것을 확인 하였음. 이에 따라 galectin-3와 AP-1 complex의 interaction을 먼저 IP를 통하여 확인하였고, 이를 ChIP assay를 통하여 galectin-3의 유무에 따라 MMP-1의 발현을 조절하는 것을 확인한 뒤 luciferase assay를 통하여 confirm 하였음 (Fig. 1-19).

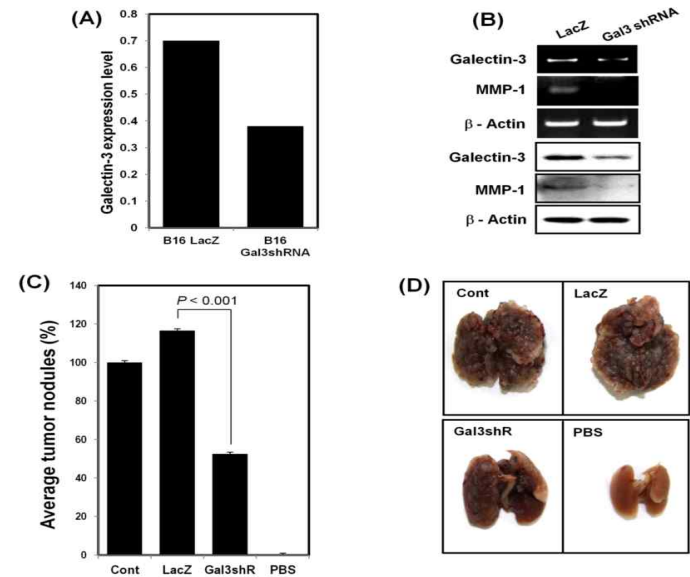


Fig. 1-20. Galectin-3 발현 억제시 B16F10 cell motility에 미치는 영향

- Mouse에서 B16F10 cell을 이용한 metastatic effect를 알아보기 위하여, lenti-virus를 이용한 galectin-3를 knock-down 시킨 뒤, tail vein injection 실험을 통한 lung meta 실험을 실시한 결과 galectin-3의 발현이 억제되면, lung meta nodule 수가 줄어드는 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 1-18).
- 실험을 통해 galectin-3가 MMP-1의 발현량을 조절하여 mouse melanoma cell line의 cell motility를 조절함 (Wang et al, submitted, *Experimental and Molecular Medicine*).

## 2.2.2. Galectin-3 의 point mutation으로 인한 기전 연구.

- Galectin-3는 총 250개의 아미노산으로 이루어져 있는데, 알려진 바에 의하면, 총 270여 개의 SNP 및 point mutation이 발견됨. 이들 중, 최근 *Cancer Res 2008;68:10045-10050* 논문을 통하여 galectin-3의 point mutation 중 rs4644인 64번 아미노산의 연구가 유방암에서 이루어졌음. 특히, 이 연구를 통해 이 부위가 point mutation 되면, 유방암에서 apoptosis 저항성을 보이는 것이 확인되었음. 본 연구팀 또한 위암에서 이러한 galectin-3의 point mutation 이 어떠한 역할을 담당하는지 확인해 보고자 함.

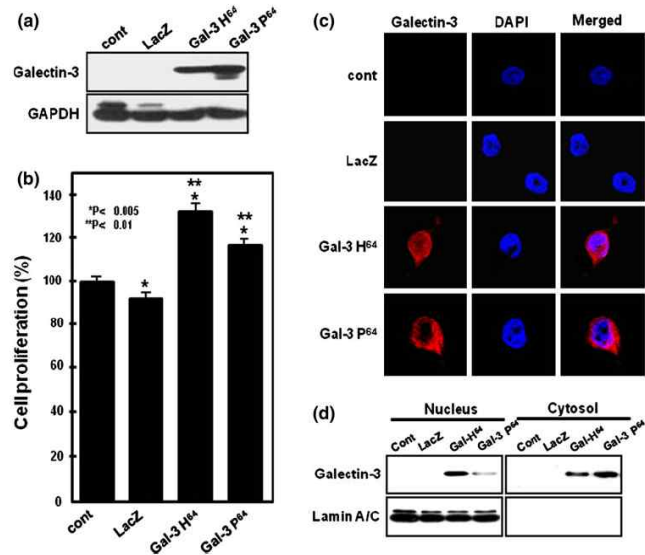


Fig. 2-1. Gal-3H64의 과 발현은 핵내의 galectin-3의 축적을 유도하고, 이는 위암 세포주의 성장에 관여함.

- 먼저, galectin-3의 64번 아미노산인 proline을 histidine으로 치환한 뒤 galectin-3 null cell 인 SNU-638 cell에서 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 확인함. 먼저 protein의 발현을 확인해 보고 이러한 point mutation이 위암 세포주의 성장에 미치는 영향을 확인한 결과 galectin-3의 64번 아미노산이 histidine (Gal-3H64)으로 치환되면, 세포의 성장을 촉진하는 것을 확인 하였음. 특히, ICC를 통하여 gal-3 H64이 과발현 되면 galectin-3의 핵내 발현이 현저하게 촉진 되고 wild type (Gal-3P64) 인 경우에는 핵내의 galectin-3 의 발현이 감소함을 확인하였음. 이를 또한 cell fractionation study를 통하여 confirm 하였음 (Fig. 2-1).

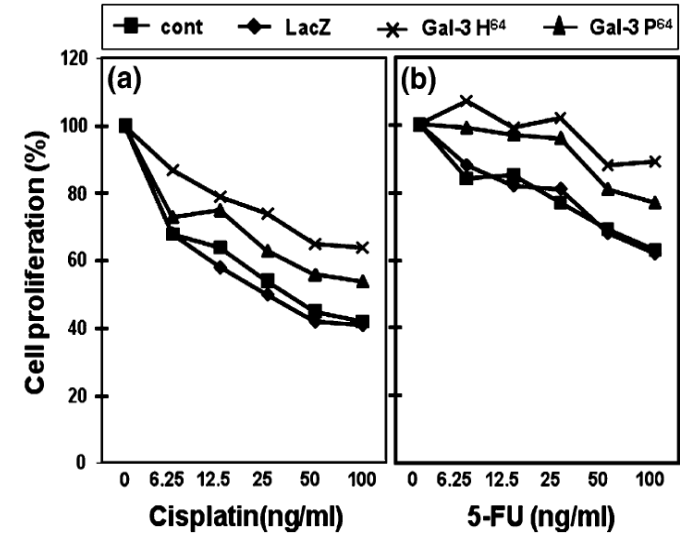


Fig. 2-2. Gal-3H64의 과 발현이 미치는 항암제의 내성과의 상관관계.

- 기존의 보고를 통해, galectin-3의 point mutation이 항암제의 내성을 유도하는 것을 확인하였으므로, 위암에서도 동일한 영향을 확인해 보고자함. 이에, 위의 Fig 2-1을 통하여, 구축된 galectin-3의 H64 type와 P64 type에 각각 위암에서 항암제로 쓰이는 cisplatin, 5-FU를 처리하여 각각의 cell line에서 세포 성장을 확인해 보았음. 이 결과를 통하여 gal-3 H64 type의 cell 들의 gal-3 P64 type의 cell line 보다 항암제에 대한 저항성이 높게 나타나는 것을 확인 하였음 (Fig. 2-2).

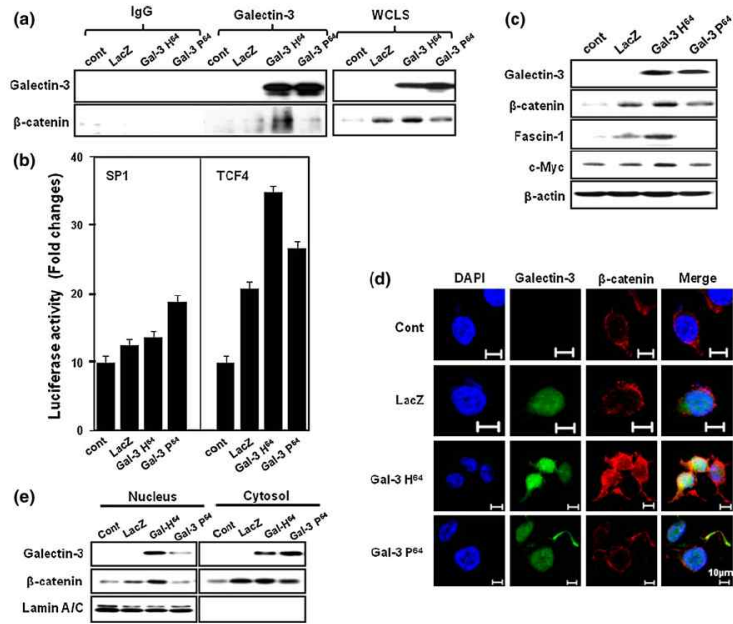


Fig. 2-3. Gal-3H64이 β-catenin 과 강하게 결합하여 β-catenin target gene을 조절.

- 그러면, 어떠한 영향으로 galectin-3의 64번 아미노산의 point mutation이 다음과 같은 영향력이 보여지는지 확인 하기 위하여, 이러한 point mutation이 세포 증식과 관여를 하고 있고, 핵내 유입에 주요하게 관여함으로 기존에 보고하였던 (Kim et al., 2010 Gastroenterology), 을 토대로 galectin-3와 wnt signaling이 관여하고 있을 거라고 예측하여 실험을 진행하였음. 먼저 각각의 gal-3 H64 type 과 gal-3 P64 type의 과 발현 상태에서 β-catenin과의 binding을 확인하였음. 이를 통해, gal-3 H64 type이 gal-3 P64 type보다 강한 결합을 형성하고 있는 것을 확인하였고, 이는 또한 β-catenin의 target gene의 발현에도 주요하게 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 특히 gal-3 P64 type은 핵내 galectin-3의 유입이 gal-3 H64 type보다 높지 않았으며 이는 또한 핵내 β-catenin의 발현에도 주요하게 관여함을 알 수 있었음. 마지막으로 이를 cell fractionation study를 통해 확인하고, TCF-4의 luciferase activity를 확인함으로써 gal-3 H64 type이 gal-3 P64 type 보다 확연하게 wnt signaling에 관여하여 결국은 세포 증식과 target gene의 발현을 조절함을 확인함 (Fig. 2-3).

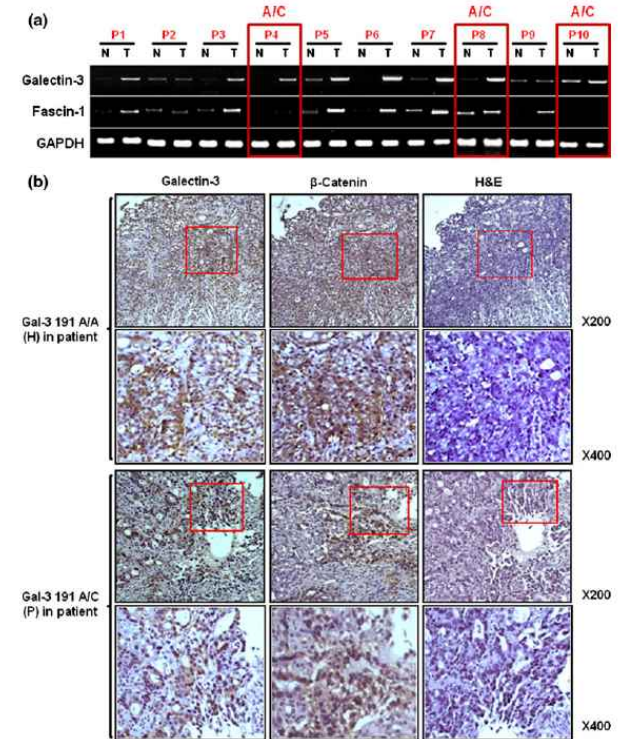


Fig. 2-4. 위암 환자에서 gal-3 H64 type의 발현과 β-catenin의 발현의 상관관계 확인.

- 기 확보하고 있던, 위암 환자 10 명을 대상으로 galectin-3의 sequencing을 실시한 결과, 총 3명의 환자에서 gal-3 H64 type을 발견하였고, 이 gal-3 H64 type 와 gal-3 P64 type 환자의 조직염색을 통해 비교하여 보았을 때, gal-3 P64 type 보다 gal-3 H64 type의 조직에서 galectin-3의 핵 내 발현 및 조직 내 발현이 훨씬 더 강하게 발현 되는 것을 확인함(Fig. 2-4).
- 이러한 결과를 토대로 본 연구팀은 위암에서 galectin-3 의 point mutation이 가지는 중요한 사실을 검증하였으며, 이를 토대로 생각해 볼 때, galectin-3의 역할이 전이에만 미치는 것이 아니고 다양한 signaling에서 여러 transcription factor와 의 긴밀한 연관관계를 통하여 위암의 좋지 않은 예후를 가져오는 중요한 molecule임을 확인함 (Kim et al, 2011, Clinical and Experiment Metastasis)

### 2.2.3. 위암의 orthotopic model 확립.

- 위암의 전이 마우스 모델을 확립하기 위하여 다음과 같은 model을 만들어서 실제적인 위암의 전이 모델이 가능하게 하였음.

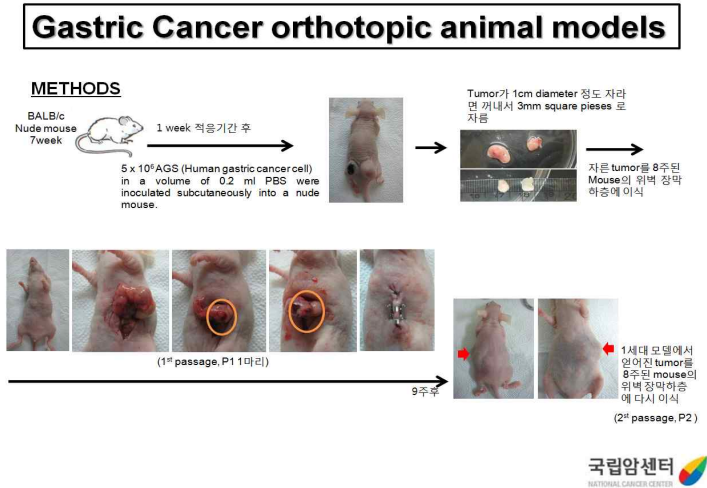


Fig. 3-1. 위암 전이 마우스 모델 모식도

- 이러한 mouse model을 이용하여, 위암의 전이에 미치는 galectin-3의 역할 뿐만 아니라, 다양한 전이인자들을 이용하여, 위암의 전이를 조절하는 기전을 in vivo 실험을 통하여 확인할 수 있는 하나의 방법을 제시함.

### 2.2.4. 위암환자 조직에서 전이 관련 인자 발현 변화 확인 및 예후에 관한 연구

- 본 연구팀은 획득한 위암환자의 위암조직과 위 정상조직을 이용하여 galectin-3 및 fascin-1 뿐만 아니라, PAR-1, MMP-1 등 기 확인된 cell motility 관련 gene의 발현을 RT-PCR을 통하여 확인하여 보았음. N은 정상조직을, T는 위암조직을 의미함. 이때, fascin-1, PAR-1 그리고 MMP-1의 mRNA 발현이 정상조직 시료에서 보다 위암조직 시료에서 증가한다면 이 증가 양상이 galectin-3의 증가 양상과 일치하는 지도 알아보았음 (Fig. 4-1, 4-2).

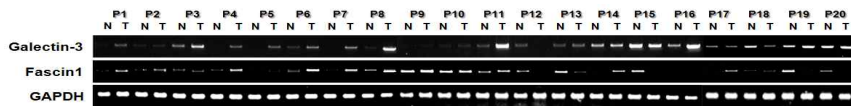


Fig. 4-1. 위암 환자 조직에서 galectin-3 와 fascin-1 발현 확인

Expression	Ratio	Percent (%)
Galectin-3	14/19	73.7
Fascin1	12/18	66.7
Fascin 1 in galectin-3 expression	10/14	71.4

Table. 4-1. 위암 환자 조직에서 galectin-3 와 fascin-1 발현 양상 확인

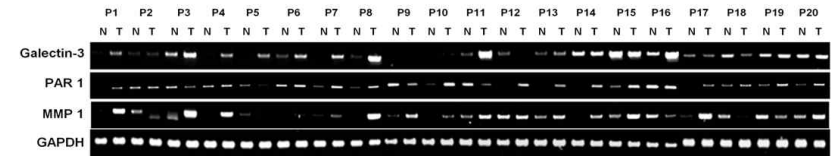


Fig. 4-2. 위암 환자 조직에서 galectin-3 와 PAR-1 and MMP-1 발현 확인

Expression	Ratio	Percent (%)
Galectin-3	14/19	73.7
PAR-1	14/20	70
MMP-1	14/20	70
PAR-1 in galectin-3 expression	10/14	71.43
MMP-1 in galectin-3 expression	9/14	64.28

Table. 4-2. 위암 환자 조직에서 galectin-3 와 PAR-1 and MMP-1 발현 양상 확인.

- 위 Fig. (4-1), (4-2)의 data는 이미 2010, 2011 년에 *Gastroenterology; PLoS ONE* 저널들을 통하여 publish 된 data 이다. 이러한 data 가 가지는 의미는 여러 가지로 생각해 볼 수 있는데, 결국 이러한 환자 data를 기반으로 in vitro에서 진행되는 실험을 in vivo에서 좀 더 상세한 기전 연구를 할 수 있다는 것과 이러한 위암 조직을 가지는 위암환자의 예후를 좀 더 면밀히 살펴 좋지 않은 예후에 미치는 전이 인자들의 역할을 후향적 방법을 통하여 예측 가능하다는 것임.



### 3. 연구결과 고찰 및 결론

- Galectin 은 동물 렉틴(lectins)의 한 종류로 렉틴은 당 분자(sugar molecules)를 인식하고 세포 표면에 결합시키는 기능을 담당하고, 그 중 갈락틴은 베타-갈락토사이드(b-galactoside)를 인식하는 것으로 알려져 있음. 총 15개의 subfamily로 존재하는 galectin family 중에서 galectin-3 는 chimera type으로 구조적인 특징과 다양한 역할로 인해 많은 연구팀에서 중점적으로 연구를 진행하는 molecule 임.
- 위암의 경우 우리나라에서 통계적으로 발병률이 가장 높은 호발암 중임에도 불구하고 위암의 발암원인 및 전이등과 관련된 연구의 진척이 상당히 미흡한 실정임. 따라서, 본 연구팀은 위암발암 및 전이에 관련된 연구를 위하여 galectin을 선택하여 위암의 전이조절에 관련성 및 구체적인 기전을 연구하였음.
- 먼저, galectin-3의 세포내에서의 역할을 알아보기 위해 먼저 위암세포주 중 galectin-3 과 발현 세포주인 AGS에 galectin-3 siRNA를 transfection시켜 galectin-3의 발현을 감소시켰음. 결과적으로 galectin-3 siRNA 처리하여 발현을 감소시키면 control 세포에 비해 세포의 성장이 감소하고 모양 또한 등글게 변하는 것을 알 수 있었음. 또한, 이를 바탕으로 한 DNA microarray 결과에 따르면 galectin-3의 siRNA 처리에 의해 많은 수의 mRNA발현에 변화를 보였는데, 우리는 그 중 특히 cell motility에 관련된 gene을 선택하여 이를 중점적으로 연구해 보고자 하였음.
- 특히 cell motility에 관련된 gene과 galectin-3와의 상관관계를 연구한 이유는 galectin-3가 암세포의 전이에 영향을 준다는 보고는 많이 되어 있고, 세포밖으로 발현된 soluble galectin-3가 integrin에 binding 하여 integrin의 내부 신호 전달체계에 영향을 미쳐 이동에 영향을 준다는 보고가 있음. 그러나 그 이외에 암세포의 invasion이나 migration에 영향을 미친다는 구체적인 연구는 아직 보고되어 있지 않음. 그래서 우리는 세포내에서 발현되는 galectin-3가 세포의 invasion 및 migration에 어떻게 영향을 미치는지 또 그 mechanism에 대해 연구하였음.
- 먼저 galectin-3의 발현을 siRNA로 감소시킨 후 위암세포주의 migration을 측정하였음. 위암 세포주 중 두 가지 AGS와 MKN-28을 선택, galectin-3의 siRNA로 발현을 감소시킨 결과 control 세포에 비해 migration이 떨어지는 것을 관찰하였음. 그래서 affimatrix array 방법으로 얻은 데이터를 바탕으로 galectin-3 siRNA 처리 후 변화된 migration 관련 유전자들을 정리해 보았음. 이 결과, 암세포의 invasion에 관련이 있는 mmp-1과 mmp-3, HMMR, NEO-1, F2R, FSCN1등이 galectin-3의 발현 감소에 의해 크게 감소됨을 알 수 있었음.
- 우리는 이중 FACN1에 관심을 가지게 되었는데, Fascin1은 세포의 migration을 유도하는 새로운 단백질로 actin의 assembly에 관여 actin filament의 움직임을 조절하여 세포를 이동하게 만드는 molecule임. 다양한 실험을 통해 galectin-3가 beta-catenin과 interaction하여 beta-catenin 및 TCF-4의 활성을 조절하여 fascin-1의 발현을 조절하는 것을 보고하였음

(Kim et al, 2010, Gastroenterology).

- 이와 더불어 galectin-3와 PAR-1, MMP-1 사이의 관계도 함께 증명하였음. galectin-3가 PAR-1과 MMP-1의 발현량을 조절하는데, 이때 PAR-1과 MMP-1의 promoter에 AP-1 complex가 주요하게 발현을 조절하는 것을 확인하였음. 또한 MMP-1은 그 발현 여부에 따라 PAR-1의 활성화를 효과적으로 조절하여 결과적으로 위암의 전이에 관여하는 것을 알 수 있었음. 이러한 결과들을 바탕으로 하면 galectin-3는 다양한 transcription factor와 binding하여 cell motility에 관련된 gene의 발현량을 조절함으로써 cell motility에 주요하게 관여함을 알 수 있었음 (Kim et al, 2011, PLoS ONE).
- 또한 galectin-3의 point mutation으로 인한 암세포의 증식과 항암제의 내성에 대한 연구도 함께 진행하였는데, galectin-3의 64번 아미노산의 point mutation이 일어 났을때 암세포의 증식이 좀더 유도되며, 항암제에 대한 내성 또한 증가됨을 알 수 있었음 (Kim et al, 2011 Clinical & Experimental Metastasis).
- 이와 같은 연구 결과를 토대로 생각해 보면 galectin-3의 위암 내에서의 역할은 무궁무진할 것이라 생각됨. 이와 같은 여러 가지 기능들을 효과적으로 기전연구를 통해서 밝히고 이러한 기전 연구를 함께 네트워크를 형성하여 효과적으로 galectin-3를 조절하는 것 또한 필요할 것이라 생각됨. 뿐만 아니라 이는 결국, 다른 암종에서도 전이 기전을 연구할 수 있는 단초를 제공할 수 있으리라 생각됨.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Galectin-3 Facilitates Cell Motility in Gastric Cancer by Up-Regulating Protease-Activated Receptor-1(PAR-1) and Matrix Metalloproteinase-1(MMP-1).	전 경 회 (교신)	PLoS ONE ( 4.411 )	2011; 6(9):e25103.	국외 SCIE	0910150
Galectin-3 germline variant at position 191 enhances nuclear accumulation and activation of $\beta$ -catenin in gastric cancer	전 경 회 (교신)	Clinical & Experimental Metastasis ( 4.113 )	2011; 28(7):743 - 750	국외 SCI	0910150
Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer	전 경 회 (교신)	Journal of controlled release ( 7.164 )	2011; 155(3):427-34.	국외 SCI	0910150
Reversible SUMOylation of TBL1-TBLR1 regulates $\beta$ -catenin-mediated Wnt signaling	전 경 회 (공동)	Molecular cell ( 14.194 )	2011; 43(2):203-16.	국외 SCI	없음
Blocking the immunosuppressive axis with small interfering RNA targeting interleukin (IL)-10 receptor enhances dendritic cell-based vaccine potency	전 경 회 (공동)	Clinical and experimental immunology ( 3.134 )	2011; 165(2):180-9.	국외 SCI	없음
Galectin-3 Enhances Gastric Cancer Cell Motility by Up-Regulating Fascin-1 Expression	전 경 회 (교신)	Gastroenterology ( 12.032 )	2010; 138: 1035-1045	국외 SCI	0910150
Silencing of Galectin-3 Changes the Gene Expressions and Augments the Sensitivity of Gastric Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents	전 경 회 (교신)	Cancer Science ( 3.846 )	2010;101(1) 94-102	국외 SCI	0910150
CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP	전 경 회 (제1)	Int. Immunopharmacol (2.325)	2010; 10(1): 98-106.	국외 SCI	0910150
Cytotoxic effects of novel phytosphingosine derivatives, including N,N-dimethylphytosphingosine and N-monomethylphytosphingosine, in human leukemia cell line HL60	전 경 회 (공동)	Leukemia and Lymphoma ( 2.492 )	2010; 51: 132-145	국외 SCI	없음

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
  - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호
Galectin-3 Increases the Motility of Mouse Melanoma Cells by Regulating MMP-1 Expression	Yuan-Guo Wang and Kyung-hee Chun	한국분자세포생물학회 추계학회	국내	0910150
Role of galectin-3 on gastric cancer metastasis	Kyung-hee Chun	한국 분자세포생물학회 동계모임 (Blue ribbon)	국내	0910150
Role of galectin-3 on gastric cancer metastasis	Kyung-hee Chun	Japanese Cancer Association 2010	국외	0910150
Development of metastasis inhibitors using gastrointestinal cancer metastatic animal models	Kyung-hee Chun	한국올리고핵산치료학회 (K-OTS)하계워크샵	국내	0910150
Modulation in Expression of Fascin-1 by Galectin-3 Effects on the Motility of Human Gastric Cancer Cells	Seok-Jun Kim and Kyung-Hee Chun	대한분자암연구학회	국내	0910150
up-regulation of protease-activated receptor-1 (PAR-1) by galectin-3 via AP-1 activation in human gastric cancer	Seok-Jun Kim, and Kyung-Hee Chun	International conference on tumor microenvironment:progression, therapy & prevention	국외	0910150

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	Method for Screening Cancer Therapeutic Agent Using Galectin-3, GSK-3 $\beta$ and Fascin-1	전경회/ 김석준/ 정택진/ 최일주/ 이상진/ 이연수	PCT (미국, 캐나다, 호주)	12/901,337
발명특허	갈렉틴-3, GSK-3 $\beta$ 및 파신-1을 이용한 암 치료제의 및 그의 스크리닝 방법(Method for screening cancer therapeutic agent using Galectin-3, GSK-3 $\beta$ and fascin-1)	전경회/ 김석준/ 정택진/ 최일주/ 이상진/ 이연수	대한민국	10-2010-00319 85

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
Galectin-3에 의해 발현이 조절되는 전이관련 인자에 관한 연구	1차년도 (2009)	galectin-3에 의한 전이 관련인자의 발현 변화 및 기작 확인	이전의 기관 고유 과제를 통한 galectin-3의 발현 변화에 따른 전이 관련인자의 candidate 으로 fascin-1, PAR-1, MMP-1, Neo1, HMMR 선정	90	100
		위암 전이 동물 모델 조건 탐색	위암 전이 동물 모델에 적합한 모델을 확립하기 위해 기본적인 정보조사 및 이를 토대로 orthotopic 동물 모델을 확립함		
		위암환자 조직 수집	위암 센터 최일주 선생님의 도움을 받아 위암 환자의 조직을 획득함		
	2차년도 (2010)	galectin-3에 의한 전이 관련인자의 발현 변화 및 기작 확인	galectin-3에 의하여 전이관련인자인 fascin-1의 지속적인 연구를 통하여 연구 논문으로 발표함	90	100
		위암 전이 동물모델 확립 및 동물 실험	기 확립한 위암 전이 동물 모델을 이용하여 전이 인자의 발현 여부에 따른 변화 양상을 실험을 통해 확인함		
	위암환자 조직 수집 및 realtime RT-PCR 조건 확립	galectin-3 및 다양한 전이 관련 인자들의 발현 여부를 real-time PCR 그리고 RT-PCR을 통해 확인함			
3차년도 (2011)	galectin-3에 의한 전이 관련인자의 발현 변화 및 기작 확인	galectin-3에 의해 조절되는 전이 관련인자 PAR-1, MMP-1 등의 상호 관계 및 기전 연구를 통하여 연구 논문으로 발표함	85	80	
	위암환자 조직에서 galectin-3의 발현 및 전이 관련 인자 발현 변화 확인	galectin-3 및 다양한 전이 관련 인자들의 발현 여부를 확인하여 galectin-3와 실제적인 전이에 관련을 미치는지에 대한 여부와 이 전이 인자들의 예후에 대한 연구를 실시함			

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
연구 수행 3년 동안 얻은 결과들을 효과적으로 정리 및 publish 하였으며, 이를 통해 차후 연구 과제를 진행하는데 어떤 점에 주안을 둘 것인가?	<ul style="list-style-type: none"> <li>다양한 전이인자와 galectin-3 사이에 상호관계 및 regulation이 존재하는 것을 여러 가지 실험을 통하여 증명하였으며, 이를 다양한 저널에 published 하였음. 하지만 아직도 하지 못한 실험들과 주제 들이 많기 때문에 향후 계속 적인 실험을 통하여 galectin-3와 다양한 전이 인자와의 관계를 지속적으로 규명하여야 함.</li> <li>현재까지는 단순히 galectin-3에 의해 발현이 조절되는 부분만 초점을 맞추었음. 하지만 다양한 역할을 galectin-3가 위암에서 하고 있다는 부분들이 여러 실험을 통해 증명 되어 지고 있기 때문에 다방면의 study를 실시하여 효과적인 galectin-3의 기능을 규명하고 이를 조절하기 위한 방법들에 대한 연구가 필요함.</li> </ul>
Galectin-3를 regulation 함으로써 효과적으로 위암 치료가 가능할 것인가?	<ul style="list-style-type: none"> <li>galectin-3는 우리가 중점으로 보고한 전이 뿐만 아니라, 항암제의 내성을 유발하는 부분에서도 주요하게 관여하며, apoptosis, cell proliferation 등 다양하게 영향을 미치는 것을 확인 되었고, 이는 다양한 journal에서 보고하였음. 이에 그 중심에 galectin-3이 존재하는 것은 가능성이 있지만, 확실하게 증명하지는 못하였음. 이는 환자 데이터들과 여러 임상 연구를 통하여 향후 계속적으로 지속시켜 나가야 할 속제라 생각됨.</li> <li>galectin-3에 의해 암세포의 전이가 감소된다는 것은 이미 알려진 통설이었으나 구체적으로 전이 및 혈관신생에 관한 인자들이 galectin-3에 의해 영향을 받는다는 것은 거의 알려져 있는 것이 없음. 그렇기에, 이와 관련 인자들과 galectin-3의 상호관계 및 작용을 연구하여 어떠한 인자들이 어떤 mechanism으로 작용하는지 구체적으로 연구를 지속하여, 어느 부분에서 galectin-3가 관여하며 어떤 route를 통하여 이를 target 해야 효과적인 위암 치료가 가능한지도 계속적으로 증명해 나가야 할 것이라 생각됨.</li> <li>또한, 과제 통해 본 연구팀은 기초적인 galectin-3의 전이 조절 기전을 보고하였다 생각하며, 이를 바탕으로 한 향후 전반적인 전이기전 연구와 in vivo 상태에서의 galectin-3에 대한 연구를 지속해 나갈 수 있으리라 생각됨.</li> </ul>

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	3	Cancer research (8.234) International journal of cancer (4.926) EMM (2.403)
산업재산권 등록		
기타		

### (2) 연구성과의 활용계획

- 위암은 우리나라에서 발병률이 1위임에도 불구하고, 아직까지 잘 알려져 있지 않는 위암의 전이 과정에 미치는 다양한 기전연구가 활발히 이루어 지지 않고 있는 것이 사실임. 이에 따라, 전이과정을 연구함으로써 위암의 전이과정에 대한 분자 생물학적인 이해 및 신진식 창조를 목표로 하였으며 향후 이 연구를 통해 기초적인 위암의 전이기전에 대한 자료가 될 수 있으리라 생각됨.
- 특히, 위암의 경우 조기 발견시 생존율이 높으나 다른 장기로의 전이가 발견되면 현저히 생존율이 감소하는 암종으로 위암에서 과발현 되어 있는 galectin-3와 위암의 전이 기전 연구는 임상적으로도 큰 가치가 있다고 사료됨.
- 그렇기 때문에, 본 연구는 위암의 전이 과정 중에서 galectin-3의 발현 및 역할을 연구하여 위암의 전이과정을 규명하고 위암의 전이를 예측할 수 있는 예후인자를 발굴하는 것을 목표로 하여 실험을 진행하였으며 이를 통해 많은 부분에서는 galectin-3와 다양한 전이 인자와의 기전을 규명하였다 사료됨.
- 더불어, galectin-3에 의한 세포반응의 신호전달체계 및 단백질 간의 긴밀한 상호작용을 이해함으로써, 위암의 전이를 예측할 수 있는 예후 인자를 발굴함에 도움을 줄 것이라 생각되며, 이는 또한 새로운 개념의 항암제 개발에의 기초 자료로서 활용될 수 있다고 사료됨.

## 6. 참고문헌

- Kim SJ, Choi IJ, Cheong TC, et al. Galectin-3 Increases Gastric Cancer Cell Motility by Up-Regulating Fascin-1 Expression. *Gastroenterology* 2010;138:1035 - 045
- Cheong TC, Shin JY, Chun KH. Silencing of galectin-3 changes the gene expression and augments the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Sci* 2010; 101: 94 - 02
- Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:29-41.
- Miyazaki J, Hokari R, Kato S, et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep* 2002;9:1307-1312.
- Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 2004;19:527-535.
- Kureishy N, Sapountzi V, Prag S, et al. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* 2002;24:350-361.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 616-35.
- Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 305-28.
- Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., Liu, F.T., 2000. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156, 1073 - 1083.
- Lee SE, Lee JH, Ryu KW, Cho SJ, Lee JY, Kim CG, Choi IJ, Kook MC, Nam BH, Park SR, Lee JS, Kim YW. Sentinel node mapping and skip metastases in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009 Mar;16(3):603-8. Epub 2009 Jan 6.
- Choi HK, Choi KC, Yoo JY, Song M, Ko SJ, Kim CH, Ahn JH, Chun KH, Yook JI, Yoon HG. Reversible SUMOylation of TBL1-TBLR1 regulates  $\beta$ -catenin-mediated Wnt signaling. *Mol. Cell.* 2011 July 22 Vol 42 (8), In press
- Kim, J. H., Choi, H. J., Kim, B., Kim, M. H., Lee, J. M., Kim, I. S., Lee, M. H., Choi, S. J., Kim, K. I., Kim, S. -I., Chung, C. H., and Baek, S. H. (2006) Roles of SUMOylation of a Reptin Chromatin Remodeling Complex in Cancer Metastasis. *Nature Cell Biol.* 8, 631-639.
- Kim, J. H., Kim, B., Ling, C., Choi, H. J., Ohgi, K. A., Tran, C, Chen, C., Chung, C. H., Huber, O., Rose, D. W., Sawyers, C. L., Rosenfeld, M. G., and Baek, S. H. (2005) Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and  $\beta$ -Catenin Complexes. *Nature* 434, 921-926.

## 7. 첨부서류

(1) 연구과제와 관련된 과제책임자의 대표적 논문 4편의 초록페이지 사본

GASTROENTEROLOGY 2010;138:1035-1045

### Galectin-3 Increases Gastric Cancer Cell Motility by Up-regulating Fascin-1 Expression

SEOK-JUN KIM,<sup>1,4</sup> IL-JU CHOI,\* TEAK-CHIN CHEONG,\* SANG-JIN LEE,<sup>5</sup> REUBEN LOTAN,<sup>1</sup> SEOK HEE PARK,<sup>2</sup> and KYUNG-HEE CHUN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gastric Cancer Branch, Division of Translational and Clinical Research I, <sup>2</sup>Genitourinary Cancer Branch, Division of Translational and Clinical Research II, National Cancer Center Research Institute and Hospital, Jungbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea; <sup>3</sup>Department of Biological Science, Sungkyunkwan University, Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea; and <sup>4</sup>Department of Thoracic/Head and Neck Medical Oncology, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas

See related article, Singal AG et al, on page 280 in CGH.

**BACKGROUND & AIMS:** Galectin-3 is a  $\beta$ -galactoside-binding protein that increases gastric cancer cell motility in response to integrin signaling and is highly expressed in gastric tumor cells. Galectin-3 induces cytoskeletal remodeling to increase cell motility, but the mechanisms of this process are not understood. We investigated the effects of galectin-3 on fascin-1, an actin-bundling protein. **METHODS:** We collected malignant and normal tissues from gastric cancer patients and examined the expression levels of galectin-3 and fascin-1. We silenced galectin-3 expression in human gastric cancer cell lines using small interfering RNA and lentiviral constructs and determined the effects on fascin-1 expression, cell motility, and invasion. **RESULTS:** Malignant gastric tissues expressed high levels of galectin-3 and fascin-1, compared with normal gastric tissues. Silencing of galectin-3 resulted in altered cancer cell morphology, reduced fascin-1 expression, decreased cell motility, and reduced malignant cell invasion. Galectin-3 overexpression reversed these effects. Silencing of fascin-1 also reduced cell motility and caused changes in cell shape, as did silencing of galectin-3. Furthermore, galectin-3 silencing inhibited the interaction between glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, and T-cell factor (TCF) 4, and the binding of  $\beta$ -catenin/TCF-4 to the *fascin-1* promoter. Nuclear localization of GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin were not detected when galectin-3 was silenced. Overexpression of mutated galectin-3 (with mutations in the GSK-3 $\beta$  binding and phosphorylation motifs) did not increase fascin-1 levels, in contrast to overexpression of wild-type galectin-3. **CONCLUSIONS:** Galectin-3 increases cell motility by up-regulating fascin-1 expression. Galectin-3 might be a potential therapeutic target for the prevention and treatment of gastric cancer progression.

**Keywords:** Galectin-3; Fascin-1; Metastasis; Gastric Cancer.

High expression of galectin-3, a 31-kilodalton member of carbohydrate-binding proteins, correlates with poor prognosis and/or metastasis in gastric cancer patients.<sup>1-3</sup> Galectin-3 shows pleiotropic biological functions, in cell growth, apoptosis induction, tumor progression, and pre-messenger RNA (mRNA) splicing among others.<sup>4-6</sup> Galectin-3 is reported to regulate metastasis by binding to cell adhesion-related molecules and inhibiting cell-cell and cell-matrix interactions,<sup>7</sup> thereby augmenting the detachment of cancer cells, and promoting metastasis.<sup>8,9</sup> Also, galectin-3 clusters at cell-cell contact sites by interaction with integrins  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, involved in endothelial cell adhesion.<sup>10</sup> Highly metastatic human breast cancer cells also show higher levels of expression of galectin-3 and significantly increase adhesion to endothelial cells.<sup>11</sup> Moreover, overexpression of galectin-3 enhances cell motility and invasiveness in vitro in lung cancer cells,<sup>12</sup> suggesting that endogenous galectin-3 regulates cell metastasis in a variety of cancers.<sup>4,13</sup> Recently, it was shown that the functions of galectin-3 depend on its subcellular localization. For example, strong nuclear immunoreactivity of galectin-3 was detected in malignant regions of gastric cancer patients, whereas little or no nuclear immunoreactivity was seen in adjacent epithelial cells.<sup>14</sup> However, the exact role played by galectin-3 in influencing metastasis is still undefined. To understand how galectin-3 regulates gastric cancer metastasis, we knocked-down the expression of galectin-3 in gastric cancer cells with small interfering RNA (siRNA), and monitored changes in gene expression using DNA microarray analysis (unpublished data). We found that the expression of several genes changed after galectin-3 silencing. For example, matrix metalloproteinase (MMP)-3, hyaluronan-mediated motility receptor, MMP-1, and fascin-1 were down-regulated and serine protease in-

**Abbreviations used in this paper:** siRNA, small interfering RNA; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3 beta; MMP, matrix metalloproteinase; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; TCF, T-cell factor.

© 2010 by the AGA Institute  
0016-5085/10/\$36.00  
doi:10.1053/j.gastro.2009.09.061

BASIC-ALIMENTARY TRACT

Cancer Science

The official journal of the Japanese Cancer Association JCA

## Silencing of galectin-3 changes the gene expression and augments the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic agents

Teak-Chin Cheong,<sup>1,2</sup> Ji-Young Shin<sup>1</sup> and Kyung-Hee Chun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Gastric Cancer Branch, Division of Translational and Clinical Research I, National Cancer Center Research Institute and Hospital, Madu1-dong, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do; <sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

(Received July 2, 2009/Revised August 5, 2009; August 30, 2009/Accepted September 2, 2009/Online publication October 14, 2009)

Galectin-3 is known to modulate cell proliferation and apoptosis and is highly expressed in human cancers, but its function in gastric cancer is still controversial. Here, we examined the role of galectin-3 in gastric cancer cells by silencing it with synthetic double-stranded siRNA. After silencing of galectin-3, cell numbers decreased and cell shape changed. Galectin-3 siRNA treatment also induced G<sub>1</sub> arrest. DNA microarray analysis was used to assess changes in gene expression following galectin-3 silencing. We found that silencing of galectin-3 caused changes in gene expression. RT-PCR and real-time PCR were utilized for validation of the changes found in microarray studies. Western blot analysis confirmed changes in the expression of proteins of interest: cyclin D1, survivin, XIAP, XAF, PUMA, and GADD45 $\alpha$ . Generally, it tended to increase the expression of several pro-apoptotic genes, and to decrease the expression of cell cycle progressive genes. We also confirmed that changes in the expression of these genes were caused by galectin-3 overexpression. Finally, we demonstrated that silencing of galectin-3 enhanced apoptosis induction with chemotherapeutic agents by further reducing the expression of anti-apoptotic and/or cell survival molecules such as survivin, cyclin D1, and XIAP, and increasing the expression of pro-apoptotic XAF-1. We conclude that galectin-3 is involved in cancer progression and malignancy by modulating the expression of several relevant genes, and inhibition of galectin-3 may be an approach to improve chemotherapy of gastric cancers. (*Cancer Sci* 2010; 101: 94-102)

Galectin-3 is a member of the carbohydrate-binding protein family, which are characterized by their affinity for  $\beta$ -galactosides.<sup>(1)</sup> It is the only chimera-type galectin, containing one CRD connected to an N-terminal proline- and glycine-rich domain. Galectin-3 is known to modulate a large number of cellular processes, especially inhibition of apoptosis and promotion of cell proliferation.<sup>(2,3)</sup> Galectin-3 contains an Asp-Trp-Gly-Arg (NWGR) motif in its C-terminal domain. The NWGR motif is also found in the BH-1 domain of Bcl-2 protein.<sup>(3)</sup> The NWGR motif in galectin-3 functions in the mitochondria, and exerts its anti-apoptotic activity by interacting with other apoptosis regulators and is thus crucial for its apoptotic function. Galectin-3 is also found in the nucleus as a nuclear matrix protein involved in pre-mRNA splicing, the Hedgehog or WNT signal-transduction pathway, mainly interacting with gemin4 and sufu.<sup>(4-7)</sup> These findings suggest that galectin-3 could be one of the essential factors for normal cell proliferation and/or development in the nucleus.

In previous studies, a high level of cellular expression of galectin-3 was detected in many cancer types, including gastric cancer.<sup>(8-11)</sup> For example, knocked-down galectin-3 in human prostate cancer PC3 cells showed G<sub>1</sub> phase arrest, p21 upregulation, and hypophosphorylation of Rb, without influence on

cyclin D1 or p27 protein expression levels.<sup>(12)</sup> Overexpressed galectin-3 inhibited ROS generation by 4HPR to block inhibit apoptosis induction in breast BT549 cancer cells.<sup>(13)</sup> In addition, tumors in which galectin-3 was cleaved by MMP showed more aggressive tumor progression.<sup>(14)</sup>

In gastric cancer, galectin-3 was detected in both primary gastric cancer tissue and the metastatic lymph nodes.<sup>(15,16)</sup> In particular, strong nuclear immunoreactivity of galectin-3 was observed in cells of cancerous lesions, whereas adjacent epithelial cells showed little or weak nuclear immunoreactivity.<sup>(16)</sup> However, whether galectin-3 is involved in gastric cancer tumorigenesis is unclear and the role of galectin-3 in gastric cancer remains controversial.<sup>(17)</sup>

In order to define the role of galectin-3 in gastric cancer cells, we silenced galectin-3 in AGS cells with synthetic double-stranded siRNA, and using microarray analysis, attempted to map the changes in gene expression. We also examined how the silencing of galectin-3 influences classical chemotherapeutic approaches to gastric cancer.

### Materials and Methods

**Cell culture and siRNA transfection.** The AGS and SNU638 human gastric cancer cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA) containing 5% FBS (Gibco Invitrogen) and 1% antibiotic solution (Gibco Invitrogen) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were trypsinized with Trypsin/EDTA solution (Gibco Invitrogen), washed with PBS, and counted with a hemocytometer through the exclusion of trypan blue. Three types of galectin-3 siRNA duplex (type I, 5'-UCCAGACCCAGAUAAACGCAUCCUGG-3'; type II, 5'-UAAGUGGAAGGCAUCAUCAUCC-3'; and type III, 5'-AUAUGAAGCACUGGUGAGGCUAUG-3') and a stealth RNAi as a negative control, were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). AGS cells were cultured in complete medium without antibiotic solution 1 day before transfection, and were then transfected with the oligonucleotide duplexes 100 nM (final concentration in a transfection mixture) premixed with RNAiMAX reagent (Invitrogen) in Opti-MEM for 20 min. The inhibition efficiency was determined by collecting cells after 48 h and analyzing the levels of galectin-3 mRNA and protein expression.

**RNA preparation and Affymetrix genechip hybridization.** Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed in eight cell lines on a high-density oligonucleotide microarray (HG-U133 Plus 2.0; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) containing 54 675 transcripts. Target preparation and microarray processing procedures

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: khchun@ncc.re.kr

Cancer Sci | January 2010 | vol. 101 | no. 1 | 94-102

doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01364.x  
© 2009 Japanese Cancer Association

## Galectin-3 germline variant at position 191 enhances nuclear accumulation and activation of $\beta$ -catenin in gastric cancer

Seok-Jun Kim · Ji-Young Shin · Teak-Chin Cheong ·  
Il-Ju Choi · Yeon Su Lee · Seok Hee Park ·  
Kyung-Hee Chun

Received: 26 November 2010 / Accepted: 29 June 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** Mutation of galectin-3 at position 191 (rs4644) substituting proline to histidine (gal-3H<sup>64</sup>) resulted in the acquisition of resistance to drug-induced apoptosis by breast cancer cells. This study employed gastric cancer cells and patient tissues in attempts to elucidate how and why this mutation in galectin-3 (gal-3H<sup>64</sup>) enhances cancer progression, compared to wild type galectin-3 (gal-3P<sup>64</sup>). First, we prepared lenti-virus constructs containing gal-3P<sup>64</sup>, gal-3H<sup>64</sup> and LacZ, and used them to infect galectin-3 null SNU-638 cells. We found that gal-3H<sup>64</sup> over-expression increases gastric cancer cell growth more than gal-3P<sup>64</sup> or LacZ over-expression. Also, gal-3H<sup>64</sup> over-expression conferred more resistance to cisplatin or 5-FU induced cytotoxicity than gal-3P<sup>64</sup>. Gal-3H<sup>64</sup> also enhanced nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin as well as increased expression of TCF-4 target genes, such as fascin-1 and c-Myc through the augmented promoter binding activity of TCF-4, than gal-3P<sup>64</sup>. We also demonstrated stronger staining of  $\beta$ -catenin and galectin-3 in malignant

tissues from gastric cancer patients with mutated galectin-3 at position 191 (gal-3 191) (A/A) (H<sup>64</sup>) and greater localization in the nucleus than in gal-3 191 A/C (P<sup>64</sup>) cancer patients. Taken together, we elucidated in this study that germline variant of gal-3H<sup>64</sup> increases nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin and promotes TCF transcriptional activity and enhances more the galectin-3's role in gastric cancer progression.

**Keywords** Galectin-3P<sup>64</sup> · Galectin-3H<sup>64</sup> ·  $\beta$ -Catenin · Tumor progression · Gastric cancer

### Abbreviations

Gal-3P <sup>64</sup>	Galectin-3 with proline at amino acid 64
Gal-3H <sup>64</sup>	Galectin-3 with histidine at amino acid 64
Gal-3 191	Galectin-3 at nucleotide position 191
TCF	T-cell factor
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
MMP	Matrix metalloproteinase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
WCLS	Whole cell lysates
FBS	Fetal bovine serum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
IP	Immunoprecipitation

### Introduction

Galectin-3 is a member of carbohydrate-binding proteins which are characterized by conserved amino acid sequences in their carbohydrate-binding domains and affinity for  $\beta$ -galactoside-containing glycoconjugates [1]. Galectin-3

Seok-Jun Kim and Ji-Young Shin contributed equally to this manuscript.

S.-J. Kim · J.-Y. Shin · T.-C. Cheong · I.-J. Choi ·  
K.-H. Chun (✉)  
Gastric Cancer Branch, Division of Translational & Clinical  
Research I, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu,  
Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea  
e-mail: khchun@ncc.re.kr

Y. S. Lee  
Functional Genomics Branch, Division of Fusion Technology,  
National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si,  
Gyeonggi-do, Republic of Korea

S.-J. Kim · S. H. Park  
Department of Biological Science, Sungkyunkwan University,  
Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Published online: 13 July 2011



## Galectin-3 Facilitates Cell Motility in Gastric Cancer by Up-Regulating Protease-Activated Receptor-1(PAR-1) and Matrix Metalloproteinase-1(MMP-1)

Seok-Jun Kim<sup>1,3</sup>, Ji-Young Shin<sup>1</sup>, Kang-Duck Lee<sup>1</sup>, Young-Ki Bae<sup>2</sup>, Il-Ju Choi<sup>1</sup>, Seok Hee Park<sup>3</sup>, Kyung-Hee Chun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Gastric Cancer Branch, Division of Translational and Clinical Research I, National Cancer Center Research Institute and Hospital, Jungbalsan-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea, <sup>2</sup> Cancer Experimental Recourses Branch, Division of Cancer Biology, National Cancer Center, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea, <sup>3</sup> Department of Biological Science, Sungkyunkwan University, Jangnan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

### Abstract

**Background:** Galectin-3 is known to regulate cancer metastasis. However, the underlying mechanism has not been defined. Through the DNA microarray studies after galectin-3 silencing, we demonstrated here that galectin-3 plays a key role in up-regulating the expressions of protease-activated receptor-1(PAR-1) and matrix metalloproteinase-1(MMP-1) PAR-1 thereby promoting gastric cancer metastasis.

**Methodology/Principal Findings:** We examined the expression levels of Galectin-3, PAR-1, and MMP-1 in gastric cancer patient tissues and also the effects of silencing these proteins with specific siRNAs and of over-expressing them using specific lenti-viral constructs. We also employed zebrafish embryo model for analysis of *in vivo* gastric cancer cell invasion. These studies demonstrated that: a) galectin-3 silencing decreases the expression of PAR-1. b) galectin-3 over-expression increases cell migration and invasion and this increase can be reversed by PAR-1 silencing, indicating that galectin-3 increases cell migration and invasion via PAR-1 up-regulation. c) galectin-3 directly interacts with AP-1 transcriptional factor, and this complex binds to PAR-1 promoter and drives PAR-1 transcription. d) galectin-3 also amplifies phospho-paxillin, a PAR-1 downstream target, by increasing MMP-1 expression. MMP-1 silencing blocks phospho-paxillin amplification and cell invasion caused by galectin-3 over-expression. e) Silencing of either galectin-3, PAR-1 or MMP-1 significantly reduced cell migration into the vessels in zebrafish embryo model. f) Galectin-3, PAR-1, and MMP-1 are highly expressed and co-localized in malignant tissues from gastric cancer patients.

**Conclusions/Significance:** Galectin-3 plays the key role of activating cell surface receptor through production of protease and boosts gastric cancer metastasis. Galectin-3 has the potential to serve as a useful pharmacological target for prevention of gastric cancer metastasis.

**Citation:** Kim S-J, Shin J-Y, Lee K-D, Bae Y-K, Choi I-J, et al. (2011) Galectin-3 Facilitates Cell Motility in Gastric Cancer by Up-Regulating Protease-Activated Receptor-1(PAR-1) and Matrix Metalloproteinase-1(MMP-1). PLoS ONE 6(9): e25103. doi:10.1371/journal.pone.0025103

**Editor:** Jean-Marc Vanacker, Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon, France

**Received:** May 18, 2011; **Accepted:** August 23, 2011; **Published:** September 22, 2011

**Copyright:** © 2011 Kim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by National Cancer Center (NCC) of Republic of Korea grant (NCC-0910150 and NCC-0810060), Innovative Research Institute for Cell Therapy, Republic of Korea (A062260) and this research was supported by the Basic442 Science Research Program through the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (1031790-1), Republic of Korea. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: khchun@ncc.re.kr

### Introduction

Cancers that spread (metastasize) from their original site to another area of the body, are called metastatic cancers. Metastatic cancers have poor prognosis and high mortality [1]. A full understanding of the biological mechanism(s) involved in metastasis and rational approaches to preventing or controlling metastasis can lead to practical approaches for improving survival rate of patients afflicted with metastatic cancers. In previous studies, we found that galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1, an actin-bundling cytoskeletal protein [2]. Galectin-3 is a 31 kDa carbohydrate-recognition protein, involved in tumorigenesis, cancer cell growth and metastasis [3,4,5] and its high expression in several human cancers has been found to correlate with the poor prognosis of metastatic cancers.

To clarify the role of galectin-3 in cancer metastasis, we knocked-down its expression in gastric cancer cells using its siRNA and examined the results in gene expression by DNA microarray analysis [6]. Among previous results, we found significant reduction in the level of protease-activated receptor-1 (PAR-1), a member of the family of transmembrane G-protein-coupled receptors [7], and its activator, matrix metalloproteinase-1(MMP-1) (Figure S1). Cleaved PAR-1 is auto-phosphorylated and transduced by extracellular signal(s) through various pathways, and plays a critical role in tumor metastasis [7,8,9]. Over-expression of PAR-1 has been reported in several cancers, including melanomas, breast and gastric cancers. MMP-1 is also up-regulated in a wide variety of advanced cancers, and a significant negative correlation has been observed between its