

# 기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1010840 )

## 연구과제명 (국문)

소아골육종의 성장과 전이 조절기전 연구 및 전이관련 표적분자 발굴

## 연구과제명 (영문)

Study on the regulatory mechanism of growth and metastasis in pediatric osteosarcoma and the discovery of target molecule for metastasis

과제책임자 : 박병규

# 국립암센터

(뒷면)

(측면)

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

(14 pont, 고딕체)

↑  
6cm ↓

↑  
5cm  
↓

과  
제  
명

국  
립  
암  
센  
터

↑  
3cm  
↓

# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “소아골육종의 성장과 전이 조절기전 연구 및 전이관련 표적분자 발굴” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 12. 4

국립암센터

과제책임자 : 박병규

연구원 : 김용연, 강현귀, 김준혁, 박석연, 성지영,  
권미미

# 목 차

## < 요약 문 >

(한글) 소아골육종의 성장과 전이 조절기전 연구 및 전이관련 표적분자 발굴

(영문) Study on the regulatory mechanism of growth and metastasis in pediatric osteosarcoma and the discovery of target molecule for metastasis

- 1. 연구의 최종목표 ----- 5
- 2. 연구의 내용 및 결과 ----- 6
- 3. 연구결과 고찰 및 결론 ----- 24
- 4. 연구성과 및 목표달성도 ----- 28
- 5. 연구결과의 활용계획 ----- 32
- 6. 참고문헌 ----- 33
- 7. 첨부서류 ----- 34

## < 요약문 >

연구분야(코드)	T-2		과제번호	1010840
과제명	소아골육종의 성장과 전이 조절기전 연구 및 전이관련 표적분자 발굴			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년 3월 1일 ~ 2012년 12월 31일	255,000,000	
	1차년도	2010년 3월 1일 ~ 2010년 12월 31일	80,000,000	
	2차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	80,000,000	
	3차년도	2012년 1월 1일 ~ 2012년 12월 31일	95,000,000	
과제책임자	성명	박병규	주민등록번호	
	전화번호		전자우편	
책임단어	국문	골육종, 전이, ICSBP, TGF- $\beta$ , Snail		
	영문	osteosarcoma, metastasis, ICSBP, TGF- $\beta$ , Snail		
<b>◆ 연구목표</b> <최종목표> 소아골육종의 성장 및 전이 조절기전을 연구하고 전이와 관련된 표적분자를 발굴  <2012년도 목표> ▶ 마우스 모델에서 interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)의 골육종 전이 유도물질로서의 역할을 구명 ▶ 인체 골육종조직에서 ICSBP와 Snail의 전이유도물질로서의 역할 확인				
<b>◆ 연구내용 및 방법</b> ▶ 골육종세포에서 ICSBP의 성장 및 전이 조절기능을 연구 - 인체골육종조직과 세포주에서 ICSBP 발현을 조사; immunoblotting, RT-PCR - ICSBP가 과발현된 골육종세포주의 확립 - ICSBP가 골육종세포의 성장속도, 부착성, 이동성, 운동성, 침윤성, epithelial to mesenchymal transition (EMT)에 미치는 효과 분석; cell counting, live cell imaging, transwell migration assay, wound healing assay, confocal microscopy ▶ 골육종세포에서 ICSBP에 의해 유발되는 transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) 수용체와 하부신호전달물질의 변화를 조사 - ICSBP에 의한 TGF- $\beta$ 수용체의 발현 조사: immunoblotting, RT-PCR - ICSBP에 의한 신호전달물질 (Smad, ERK, p38, AKT 등)의 활성 변화를 조사: immunoblotting ▶ 골육종 전이에 중요한 역할을 하는 표적분자 발굴 - ICSBP 과발현 골육종세포주의 mRNA와 protein의 expression profiling; cDNA microarray, proteomic analysis - ICSBP 과발현 골육종세포주에서 위에서 발굴된 물질의 발현 및 기능 연구				

▶ ICSBP에 의한 TGF- $\beta$  수용체 전사조절기전을 규명  
 - ICSBP에 의한 TGF- $\beta$  수용체 promoter 활성화에 대한 영향 분석; luciferase assay  
 - TGF- $\beta$  수용체 promoter 내 ICSBP의 결합 부위 탐색; site-directed mutagenesis, EMSA  
 - ICSBP와 결합하는 타 전사인자의 탐색 및 이들 단백질들 간의 상호작용 조사; yeast two hybrid assay, immunoprecipitation assay  
 ▶ 마우스모델을 이용하여 골육종 전이에서 ICSBP의 기능적 중요성을 검증  
 - ICSBP, Mock 또는 ICSBP의 siRNA로 형질전환 된 골육종세포를 마우스에 피하집종 후 종양의 성장속도를 평가  
 - 위 세포를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging과 적출된 폐조직에서 전이의 정도를 조사  
 - 마우스 수명 및 독성에 대한 영향 평가

### ◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	11/3	366%
IF 합	19/12	158%
기타 성과	국외 5건+국내 4건/학회발표3건	300%

-정성적 성과

- 골육종 성장 및 전이에서 ICSBP의 novel role 발견
- ICSBP에 의한 TGF- $\beta$  수용체 발현 조절기전의 최초 규명
- ICSBP에 의해 유도되는 골육종의 전이관련 표적분자를 발굴하고 이들의 생물학적 기능을 파악

### ◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

성명	박병규, 김용연, 강현귀, 김준혁, 박석연, 성지영, 권미미
----	-----------------------------------

## Project

## summary

<b>Title of Project</b>	Study on the regulatory mechanism of growth and metastasis in pediatric osteosarcoma and the discovery of target molecule for metastasis
<b>Key Words</b>	Osteosarcoma, ICSBP, metastasis, TGF- $\beta$ , Snail
<b>Project Leader</b>	Byung-Kiu Park
<b>Associated Company</b>	
<p><b>Background and Objective</b> Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP), a transcription factor induced by interferon gamma (IFN-<math>\gamma</math>), is a member of interferon regulatory factor (IRF) family. ICSBP is mainly expressed in hematopoietic cells and regulates immune response and cell differentiation, but little is known of its functions in non-hematopoietic cells. The objective of this study is to investigate the role for ICSBP in the regulation of growth and metastasis in the pediatric osteosarcoma and the discovery of target molecule for metastasis.</p> <p><b>Methods and Results</b> <b>Effect of ICSBP on cell growth, morphology, adhesiveness, motility, and migration in U2OS cells</b> - ICSBP expression was weak in the human U2OS osteosarcoma cells, but it was high in tumor tissues obtained from osteosarcoma patients. (RT-PCR, Immunoblotting) - Stable clones of ICSBP-overexpressing U2OS cells (ICSBP cells) were established. (lipofectamine transfection) - ICSBP cells showed increased growth, fibroblast-like morphology, decreased E-cadherin and ZO1 but increased vimentin expression, increased adhesiveness and motility indicating that EMT occurred in the ICSBP cells (cell counting, immunoblotting, wound healing assay, live cell image) <b>Induction of TGF-<math>\beta</math> receptor and activation of its signal pathways by ICSBP</b> - Both TGF-<math>\beta</math> type I receptor (RI) and type II receptor (RII) were up-regulated, and Smad as well as non-Smad pathway were activated. (immunoblotting)</p>	

**TGF- $\beta$  receptor mediated Snail induction by ICSBP**

- E-cadherin repressors such as Snail, Slug, and Twist were up-regulated in the ICSBP cells. (cDNA microarray)
- Only Snail induction was mediated by TGF- $\beta$  receptor activation driven by ICSBP. (RT-PCR, immunoblotting, immunoblotting after incorporation of si-TGF- $\beta$  RI or treatment with TGF- $\beta$  receptor inhibitor)

**Effect of Snail on adhesiveness, motility, migration, and invasion**

- Snail incorporation led to increased adhesiveness, motility, migration, and invasion in the ICSBP cells. (electrical cell-substrate impedance sensing (ECIS) system, wound healing, transwell migration assay, migration through human umbilical vascular endothelial cell (HUVEC))

**Essential role of TGF- $\beta$  RI promoter nt (-220/-210) for ICSBP binding**

- nt (-220/-210) in the TGF- $\beta$  RI promoter was found to be a critical domain for ICSBP binding. (preparation of serial deletion mutants and luciferase assay, EMSA with supershift assay)

**Enhanced fluorescence in Balb-C mice injected with ICSBP cells through tail vein**

- Greater intensity and area of fluorescence in ICSBP cell-injected mice as compared to Mock-injected mice was noted, suggesting occurrence of metastasis in ICSBP cell-injected animals (preparation of GFP tagged ICSBP or Mock constructs)
- Lower survival rates for ICSBP cell-injected mice

**Summary and Conclusions**

we established the stable U2OS cell line that over-expresses ICSBP. ICSBP expression led U2OS cells to have fibroblast-like morphology and increased vimentin expression. ICSBP expression also promoted adhesiveness, motility, and invasion of U2OS cells. ICSBP up-regulated TGF- $\beta$  receptors and activated TGF- $\beta$  signaling cascades, which are responsible for EMT and increased cell motility and invasion. In addition, ICSBP-induced TGF- $\beta$  receptor activation resulted in the up-regulation of Snail. Knock-down of Snail attenuated the ICSBP-induced augmentation of cell motility and invasion. Altogether, these data demonstrate a novel function for ICSBP in the induction of EMT and the augmentation of cell motility and invasion through TGF- $\beta$  and Snail pathways. Experiments to confirm the metastatic role of ICSBP using *in vivo* model are still ongoing.

## 1. 연구의 최종목표

### 연구의 최종목표

-소아골육종의 성장 및 전이 조절기전을 연구하고 전이와 관련된 표적분자를 발굴

구분	목표	내용 및 범위
1차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 골육종세포에서 ICSBP의 성장 및 전이 조절기능을 연구</li> <li>• 골육종세포에서 ICSBP에 의해 유발되는 TGF-<math>\beta</math> 수용체와 하부신호전달물질의 변화를 조사</li> <li>• 골육종 전이에 중요한 역할을 하는 표적분자 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 인체골육종조직과 세포주에서 ICSBP 발현 조사</li> <li>- ICSBP가 과발현된 골육종세포주의 확립</li> <li>- ICSBP에 의한 골육종세포의 성장속도, 세포주기, 운동성, 침윤성, EMT에 대한 영향 분석</li> <li>- ICSBP에 의한 TGF-<math>\beta</math> 수용체의 발현 조사</li> <li>- ICSBP에 의한 신호전달물질의 활성 변화를 조사</li> <li>- ICSBP 과발현 골육종세포주와 종양조직에서 mRNA와 protein의 expression profile 분석</li> </ul>
2차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICSBP에 의한 TGF-<math>\beta</math> 수용체 전사조절기전을 규명</li> <li>• 1차년도에서 발굴한 전이관련 표적분자의 생물학적 기능 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICSBP에 의한 TGF-<math>\beta</math> 수용체 promoter 활성화에 대한 영향 분석</li> <li>- TGF-<math>\beta</math> 수용체 promoter 내 ICSBP의 결합 부위 탐색</li> <li>- 전이관련 표적분자의 세포성장, 이동성, 침윤성, EMT 현상에서 역할 탐구</li> </ul>
3차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 마우스모델에서 ICSBP의 골육종 전이유도물질로서의 역할을 규명</li> <li>• 인체 골육종조직에서 ICSBP와 Snail의 전이유도물질로서의 역할 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICSBP/표적물질 또는 ICSBP/표적물질의 siRNA로 형질전환된 골육종세포를 마우스에 피하접종 후 종양의 성장속도를 평가</li> <li>- 위 세포를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging과 적출된 폐조직에서 전이의 정도를 조사</li> <li>- 마우스 수명 및 독성에 대한 영향 평가</li> <li>- 10종의 인체골육종조직에서 ICSBP와 Snail의 발현을 조사하고, 전이를 비롯한 임상양상과의 상관관계를 분석</li> </ul>

## 2. 연구의 내용 및 결과

### (1) 연구수행방법

- ▶ 골육종세포에서 ICSBP의 성장 및 전이 조절 기능을 연구
  - 인체골육종조직과 골육종세포주에서 ICSBP 발현 조사: immunoblotting, RT-PCR
  - ICSBP가 과발현된 골육종세포주의 확립: U2OS, SaOS2 human osteosarcoma cell line 사용
  - ICSBP에 의한 골육종세포의 성장속도, 이동성, 운동성, 침윤성, EMT에 대한 영향 분석: cell counting, MTT assay, live cell imaging, wound healing assay, confocal microscopy, immunoblotting
- ▶ 골육종세포에서 ICSBP에 의해 유발되는 TGF- $\beta$  수용체와 하부신호전달물질의 변화를 조사
  - ICSBP에 의한 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 수용체의 발현 조사: immunoblotting, RT-PCR
  - ICSBP에 의한 신호전달물질 (Smad, ERK, p38, AKT 등)의 활성 변화를 조사: immunoblotting
- ▶ ICSBP에 의한 TGF- $\beta$  수용체 신호전달계의 활성화가 골육종세포의 성장 및 전이와 관련됨을 검증
  - ICSBP 또는 TGF- $\beta$  receptor knock down에 의해 골육종세포에 대한 ICSBP의 성장 및 전이 조절 기능이 억제되는지를 조사: cell counting, MTT assay, wound healing assay
- ▶ 골육종 전이에 중요한 역할을 하는 표적분자 발굴
  - ICSBP 과발현 골육종세포주에서 mRNA와 protein의 expression profiling: cDNA microarray, proteomic analysis
  - ICSBP 과발현 골육종세포주에서 발굴된 전이관련 표적분자의 발현과 기능을 연구: RT-PCR, immunoblotting, gene knock down을 이용한 functional assay
- ▶ ICSBP에 의한 TGF- $\beta$  수용체 promoter 활성화에 대한 영향 분석
  - TGF- $\beta$  수용체 promoter와 serial deletion mutants를 제작
  - Full promoter와 deletion mutants를 ICSBP 과발현 U2OS 세포에 도입
  - Full promoter와 deletion mutants에 의한 TGF- $\beta$  수용체의 발현을 조사하기 위하여 luciferase 발현 벡터를 도입한 후 luciferase 활성을 측정

▶ TGF- $\beta$  수용체 promoter 내 ICSBP의 결합 부위 탐색

• Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)를 이용하여 ICSBP 과발현 U2OS 세포에서 ICSBP와 TGF- $\beta$  수용체 promoter 내의 결합부위를 탐색

• 탐색된 TGF- $\beta$  수용체 promoter의 특정 부분에 대한 site-directed mutagenesis 기법으로 다양한 oligonucleotides를 제작하고, 이 oligonucleotides를 이용한 EMSA 분석법으로 ICSBP가 결합하는 regulatory element를 발굴

▶ 전이관련 표적분자의 세포성장, 이동성, 침윤성, EMT 현상에 대한 역할 탐구

• 발굴한 전이관련 표적분자의 기능을 조사하기 위해 ICSBP-U2OS 세포에서 표적분자를 siRNA로 knock down 한 후 세포성장, 이동성, 침윤성, EMT 현상의 저해 여부를 조사: cell counting, live cell imaging, transwell migration assay, wound healing assay, confocal microscopy

▶ ICSBP 또는 ICSBP의 siRNA로 형질전환된 골육종세포를 마우스에 피하접종 후 종양의 성장 속도를 평가

• ICSBP-U2OS, Mock-U2OS 세포와 si-ICSBP를 ICSBP-U2OS에 도입한 세포를 마우스에 피하접종한 후 종양의 발생여부와 종양체적의 변화를 조사

▶ ICSBP 또는 ICSBP의 siRNA로 형질전환된 골육종세포를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging과 적출된 폐조직에서 전이의 정도를 조사

• ICSBP-U2OS, Mock-U2OS 세포와 si-ICSBP를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging으로 전이 부위를 luminometer로 visualization 하고, imaging에서 폐전이 확인되면 마우스의 폐를 적출해서 앞에서 기술된 세포 종류별로 전이의 정도를 육안 및 현미경으로 관찰하고 비교 분석

▶ 마우스 수명 및 독성에 대한 영향 평가

• ICSBP-U2OS, Mock-U2OS 세포와 si-ICSBP를 ICSBP-U2OS에 도입한 세포를 마우스에 피하접종하거나 꼬리정맥에 주사한 후 마우스의 체중이나 activity, 수명을 세포 종류별로 평가하고 비교 분석

## (2) 연구수행 내용 및 결과

▶ ICSBP에 의한 U2OS 골육종세포의 성장 촉진 및 전이세포 특성 획득

• 인체 골육종세포주인 U2OS 세포의 ICSBP 발현은 매우 낮았으나 인체골육종조직의 ICSBP 발현은 높았음 (그림 1, 2).

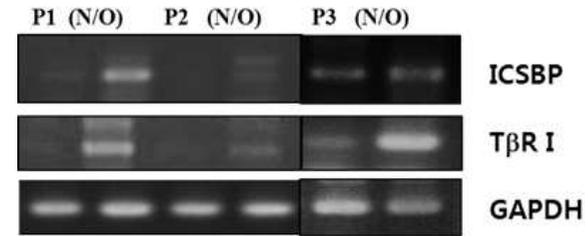


그림 1. 세 환자에서 얻은 골육종조직의 ICSBP와 TGF- $\beta$  RI 발현 (N, normal bone; O, tumor)

• 이에 U2OS 세포에 ICSBP를 형질도입한 stable cell (U2OS-ICSBP)을 제조하여 ICSBP의 기능을 파악하고자 하였음. U2OS-ICSBP 세포 (ICSBP cell)는 ICSBP를 잘 발현하였고, ICSBP가 핵 내에 위치함을 관찰할 수 있었음 (그림 2).

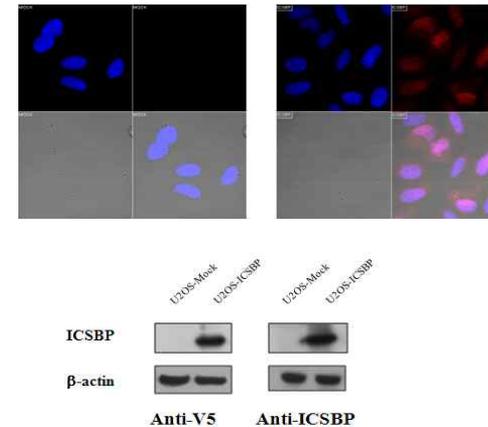


그림 2. ICSBP가 과발현된 U2OS 골육종 세포 (U2OS-ICSBP)

• ICSBP 세포는 성장이 촉진되고, 세포가 fibroblast와 유사한 형태로 변하고, 부착성이 증가하였음 (그림 3, 4). ICSBP에 의한 성장촉진은 다른 인체골육종세포인 SaOS-2에 ICSBP를 도입한 SaOS-2-ICSBP에서도 관찰됨.

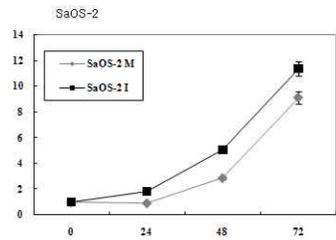
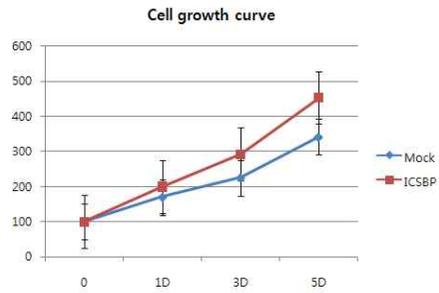


그림 3. U2OS-ICSBP (upper panel)와 SaOS-2-ICSBP 세포 (lower panel)의 성장 속도 증가



그림 4. U2OS-ICSBP 세포의 형태변화와 부착성 증가

• 또한 ICSBP 세포는 전이세포의 특성인 부착성과 이동성이 증가하고, wound healing이 촉진되었음 (그림 5, 6).

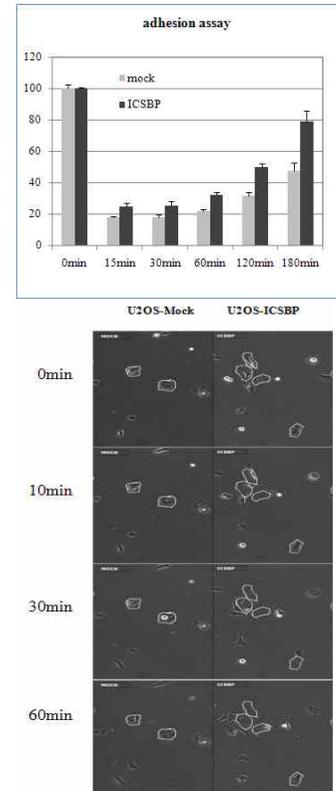


그림 5. ICSBP 세포의 부착성 (upper panel) 증가와 live cell image로 관찰한 이동성 (lower panel) 증가

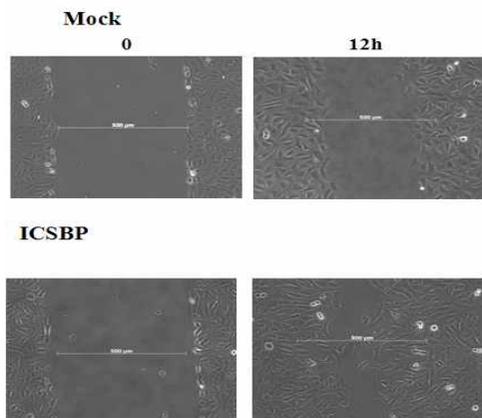


그림 6. ICSBP 세포의 wound healing 향진

• Epithelial to mesenchymal transition (EMT)은 종양 세포의 침윤 및 전이 시에 나타나는 중요한 현상으로 ICSBP 세포에서 EMT 현상의 지표 단백질인 E-cadherin, pFAK, Zo-1의 발현이 감소하고 vimentin 발현은 증가하였음 (그림 7). 또한 confocal microscopy에서 이들 cell junctional protein의 붕괴 및 소실이 관찰되어 (그림 8) ICSBP 세포에서 EMT 현상이 일어났음을 알 수 있었음.

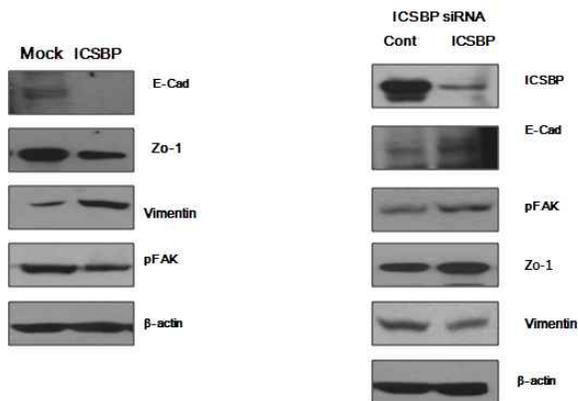


그림 7. ICSBP에 의한 EMT 지표물질 (E-cadherin, vimentin, pFAK, ZO-1)의 발현 조절과 si-ICSBP에 의한 역변화

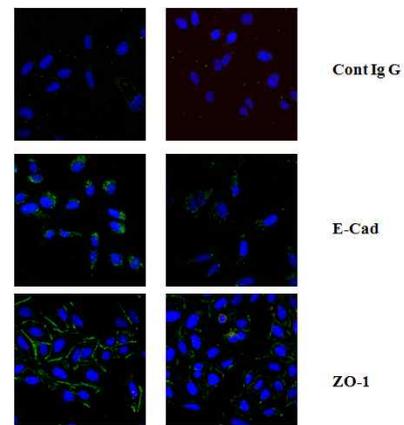


그림 8. ICSBP 세포에서 confocal microscopy로 관찰된 E-cadherin, ZO-1 단백질의 붕괴 및 소실

• 그림 1-8의 결과를 종합하면 ICSBP-U2OS 세포는 성장이 촉진되고, 세포의 부착성, 운동성 (wound healing), 이동성이 증가되고, EMT 현상을 보여 전이세포의 특성을 나타내었음.

▶ 골육종세포에서 ICSBP에 의한 TGF-β 수용체 유도과 하부신호전달물질의 변화

• ICSBP-U2OS 세포에서 TGF-β type I (TGF-β RI) 및 type II receptor (TGF-β RII)의 발현이 유도되고, pSmad2, pSmad3 단백질의 발현이 증가하였음 (그림 9)

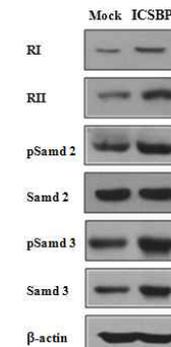


그림 9. ICSBP에 의한 TGF-β receptor 발현 유도과 Smad pathway의 활성화

• 또한 ICSBP에 의해 pERK, pAKT, pP38의 발현도 증가하였음 (그림 10).

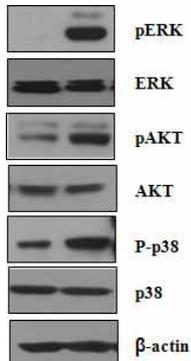


그림 10. ICSBP에 의한 non-Smad pathway의 활성화

▶ ICSBP에 의한 U2OS 세포의 성장 촉진과 전이세포 특성 (부착성, 이동성 증가, EMT 현상) 획득이 TGF-β 수용체와 TGF-β signal 활성화에 의한 것인지를 검증

• ICSBP 세포에 TGF-β 수용체의 선택적 억제제 (SB431542)를 처리하였더니 ICSBP 세포의 wound healing이 둔화되고 pSmad2의 발현이 감소하였음 (그림 11)

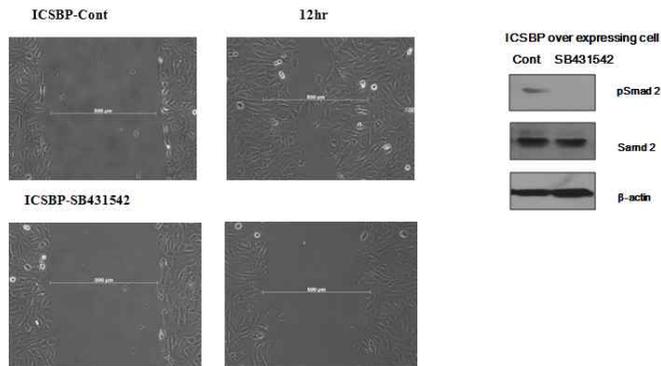


그림 11. TGF-β 수용체 억제제 (SB431542) 처리에 의한 ICSBP 세포의 wound healing 둔화와 Smad2 활성 억제

• 또한 ICSBP와 TGF-β RI에 대한 siRNA를 처리하였을 때 ICSBP에 의한 세포의 성장속도 증가와 부착성 및 이동성 향진효과가 억제되었음 (그림 12, 13)

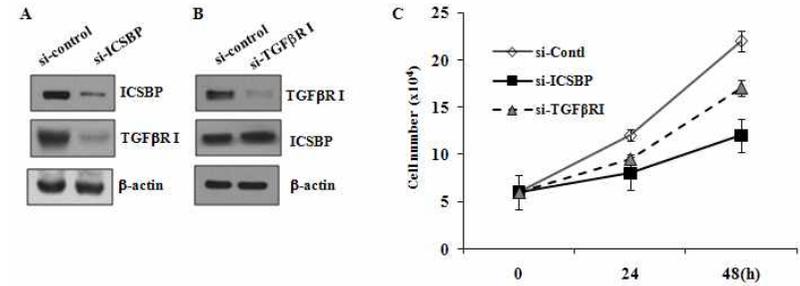


그림 12. si-ICSBP와 si-TGF-β RI에 의한 ICSBP 세포의 성장 둔화

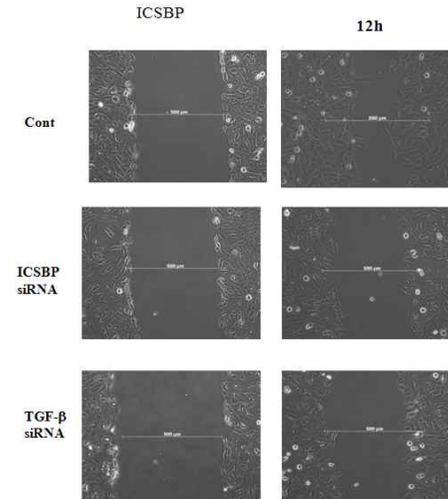


그림 13. si-ICSBP와 si-TGF-β RI에 의한 ICSBP 세포의 wound healing 둔화

• 그림 9-13의 결과를 종합하면 ICSBP 세포의 성장 촉진과 전이세포의 특성 획득이 ICSBP에 의한 TGF-β 수용체를 통한 신호 전달 활성화를 통해서 일어남을 알 수 있었음.

▶ 골육종 전이에 중요한 역할을 하는 표적분자 발굴

• ICSBP에 의한 U2OS 세포의 성장 촉진 및 전이특성 획득에 관여하는 표적분자를 발굴하기 위해 RNA expression array 분석법으로 두배 이상의 발현 변화를 보인 수십종의 단백질을 screening 하였음 (그림 14).

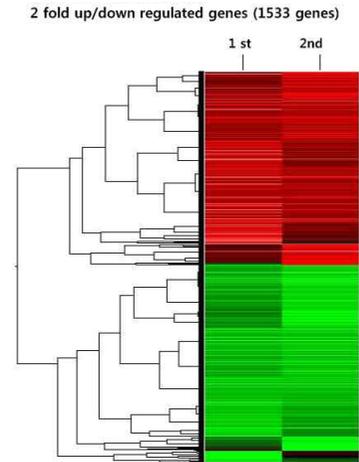


그림 14. ICSBP 세포에서 나타나는 gene expression의 변화 (RNA expression array)

- ICSBP 세포 (ICSBP-U2OS cell)에서 전이관련 표적분자 후보로 E-cadherin repressor인 Snail, Slug, Twist를 발굴하였고, ICSBP 세포에서 이들의 mRNA와 단백질의 발현이 증가함을 확인함 (그림 15).

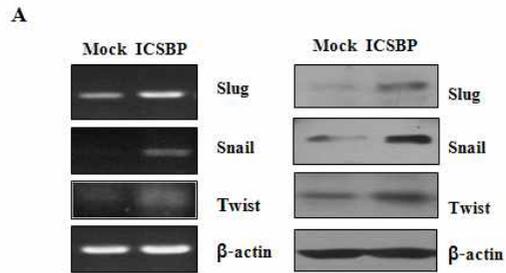


그림 15. ICSBP 세포에서 관찰되는 Snail, Slug, Twist의 발현 향진

- si-ICSBP를 ICSBP 세포에 처리했을 때 Snail 발현 감소가 가장 뚜렷하였고, TGF- $\beta$  receptor inhibitor인 SB431542를 처리하면 Snail만 감소하였던 반면 Slug, Twist의 발현은 변하지 않았고, si-TGF- $\beta$  RI에 의해서도 Slug와 Twist의 발현은 별로 감소하지 않았음 (그림 16).

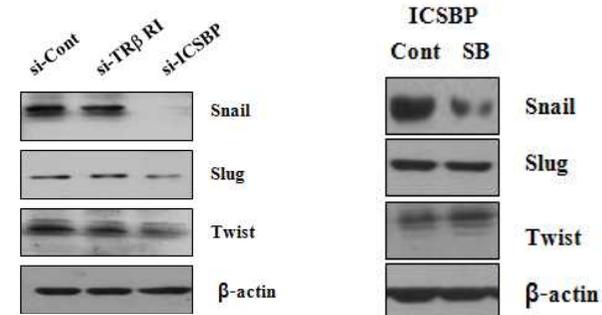


그림 16. si-ICSBP, SB431542처리에 의한 ICSBP 세포의 Snail 발현 저하

- ICSBP 세포에서 Snail의 기능을 조사하기 위해 세포의 부착성 (adhesiveness)을 ECIS (electrical cell-substrate impedance sensing) 기기를 이용하여 평가하였음. ICSBP 세포는 부착성이 증가하여 저항 (impedance)이 높게 측정되었음 (그림 17). si-ICSBP로 ICSBP를 knockdown 하면 부착성 감소와 함께 저항이 낮아졌음. ICSBP 세포에 si-Snail을 처리하면 저항이 감소하였고, si-ICSBP와 Snail을 co-transfection하면 (si-ICSBP+Snail) si-ICSBP를 단독으로 처리한 것보다 저항이 증가하였음.

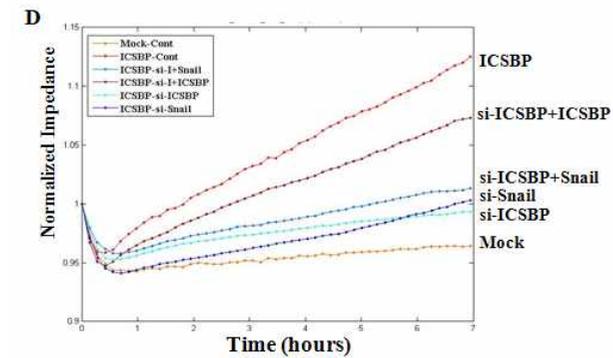


그림 17. ICSBP와 Snail에 의한 U2OS 세포의 부착성 증가와 si-ICSBP 또는 si-Snail 처리에 의한 부착성 감소

- ICSBP 세포에서 보이는 향진된 wound healing은 si-ICSBP에 의해 억제되었으나 Snail을 처리하면 wound healing이 부분적으로 회복되어 Snail이 세포의 운동성 (motility)에 관여함을 확인하였음 (그림 18).

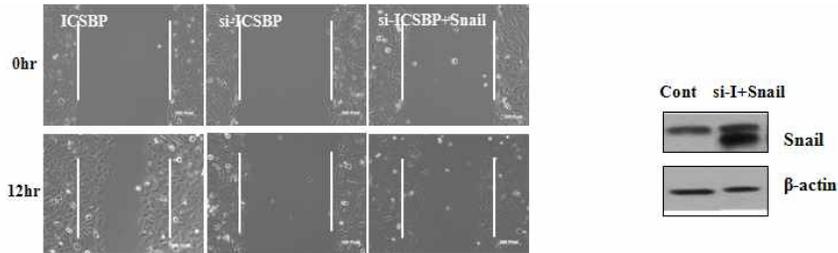


그림 18. Snail에 의한 wound healing 촉진 효과

• trans-well migration assay를 이용해 세포의 이동성과 침윤성을 조사하였을 때 ICSBP 세포는 lower chamber로 잘 이동하였음 (그림 19). si-ICSBP를 처리하면 이동이 억제되었으나 si-ICSBP와 Snail을 co-transfection 하면 이동성과 침윤성이 부분적으로 회복되었음.

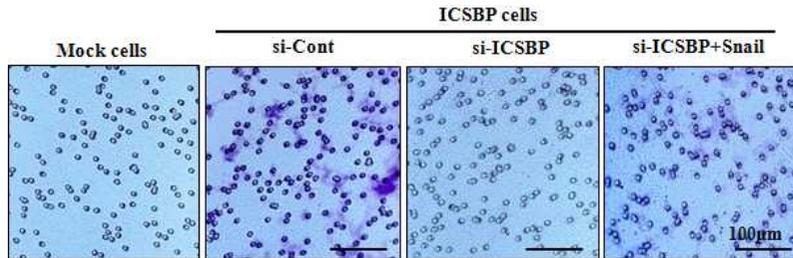


그림 19. ICSBP와 Snail에 의한 ICSBP 세포의 침윤성 증가

• 다음으로 인체 제대정맥내피세포 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) monolayer를 투과하는 침윤성을 ECIS system을 이용하여 조사하였음. 배양기에 HUVEC 만 배양하면 저항이 높게 측정되었으나 ICSBP-U2OS 세포를 첨가하면 ICSBP 세포가 HUVEC을 침윤함으로써 저항이 감소하였음 (그림 20). si-ICSBP를 처리하면 침윤성 저하로 저항이 높아졌으나 Snail을 si-ICSBP와 co-transfection 하면 저항이 다시 감소하였음.

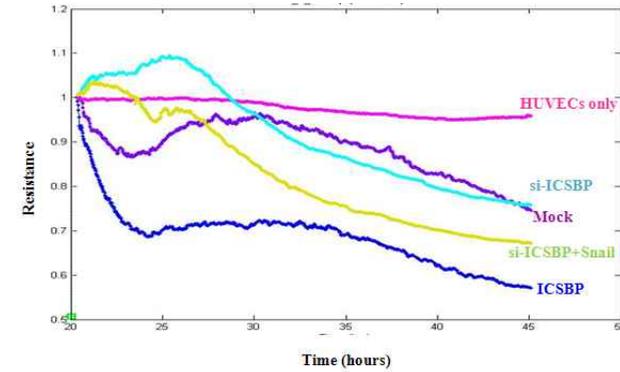


그림 20. ICSBP와 Snail에 의한 U2OS 세포의 HUVEC 침윤성

• 그림 14-20의 결과를 종합하면 ICSBP는 Snail, Slug와 Twist의 발현, 특히 Snail의 발현을 유도하고, Snail은 U2OS 세포의 부착성, 이동성, 침윤성 증가에 관여하였음. ICSBP에 의한 U2OS 세포의 전이특성 획득은 부분적으로 Snail에 의해 증대되었음.

▶ ICSBP에 의한 TGF-β 수용체 promoter 활성화에 대한 영향 분석

• ICSBP에 의해 TGF-β RI 발현이 유도되는 기전을 파악하기 위해 TGF-β RI full promoter와 deletion mutants를 제작하여 (그림 21) luciferase 벡터 (pGL3)에 삽입함.

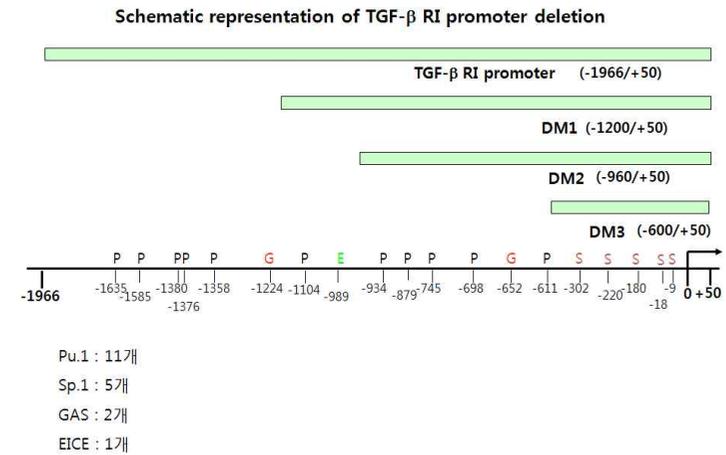


그림 21. TGF-β RI full promoter와 deletion mutants의 모형도와 putative ICSBP binding sites (Pu.1, Sp.1, GAS, EICE)

• U2OS-ICSBP 세포에 TGF-β RI full promoter와 deletion mutants를 도입한 후 luciferase 활성도를 측정 한 결과 DM3 (-600/+50)에 의한 luciferase 활성도가 매우 높게 측정된 반면 DM1, DM2의 활성도는 미미한 수준이었음 (그림 22).

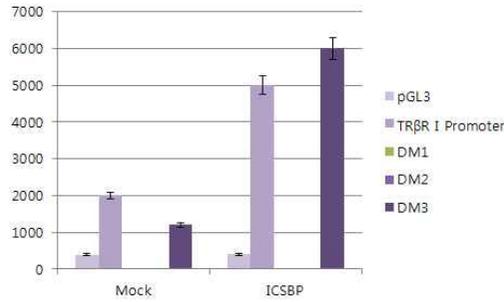


그림 22. ICSBP 세포에서 TGF-β RI full promoter와 deletion mutants에 의한 luciferase 활성도

• DM3 domain 내 ICSBP가 결합하는 regulatory element를 찾기 위해 DM3를 세분한 deletion mutants를 제작한 후 각각에 의한 luciferase 활성을 측정함. DM3 (-300/-1)에 의한 luciferase 활성도는 DM3의 4.5배 이었고 DM3 (-200/-1) 보다 높았음. 반면 DM3 (-600/-300)은 DM3 (-300/-1)의 1/10도 안되어 nt -300/-200이 TGF-β RI promoter activity에 중요한 sequence임을 알 수 있었음 (그림 23).

DM3 partial cloning

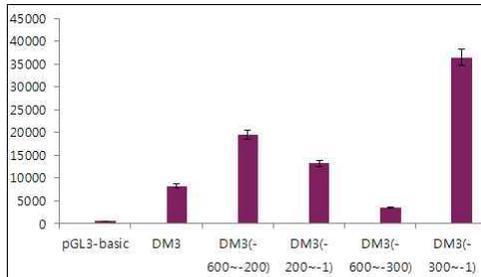
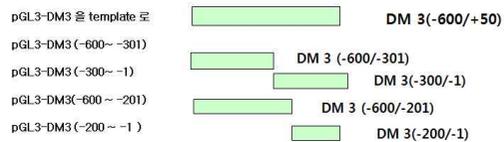


그림 23. DM3와 DM3의 deletion mutants에 의한 luciferase 활성도

• nt (-300/-200)이 TGF-β RI promoter activity에 중요하였으므로 (그림 23), nt (-300/-200)를 10 nt 크기로 세분한 mutants를 제작하였음. TGF-β RI promoter activity와 비교해 보았을 때 DM3 (-210/+50)에서 luciferase activity가 현저히 감소하는 것으로 보아 DM3(-220/-210)가 TGF-β RI promoter activity에 중요한 sequence임을 알게되었음 (그림 24).

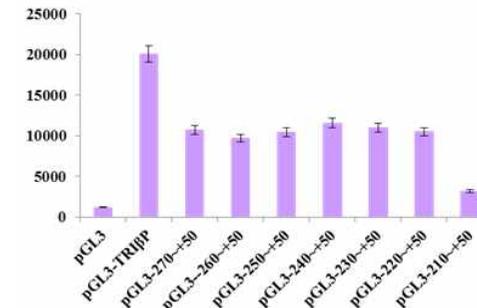


그림 24. DM3 (-270/-210)의 serial deletion mutants 도입에 의한 luciferase 활성도

• TGF β RI promoter nt (-220/-210)를 포함하는 probe를 제작하여 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 수행하였음. ICSBP 세포에서 probe와 결합한 두 개의 band가 관찰됨 (그림 25 arrowhead).

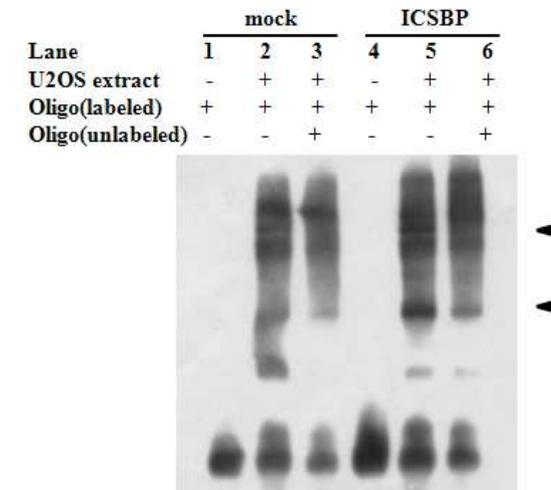


그림 25. ICSBP 세포에서 관찰되는 TGF β RI promoter nt (-220/-210)을 포함하는 oligonucleotide probe와 결합한 두 개의 band

• 그림 25에서 관찰된 band가 ICSBP 단백질임을 확인하기 위해 supershift assay를 시행함. ICSBP 항체 (ICSBP AB)를 처리한 후 EMSA를 시행한 결과 두 개의 band가 현저하게 줄어들어 ICSBP band임을 알 수 있었음. (그림 26).

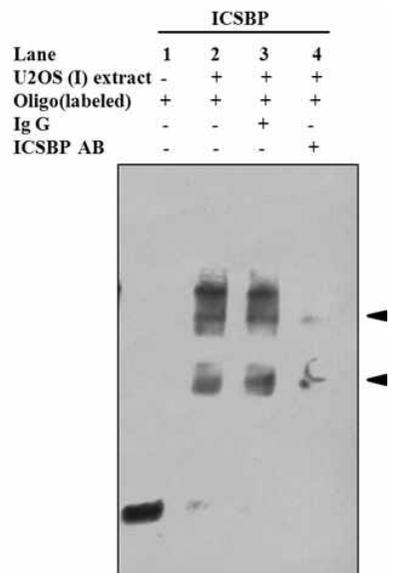


그림 26. ICSBP 항체를 이용한 supershift assay

• TGF-β RI promoter nt (-220) 중심으로 주변의 sequence를 조사해 보았을 때 ICSBP가 직접 결합하는 것으로 보고된 site는 없었으나 Specificity Protein1 (SP1)의 binding site가 많이 존재하였음 (그림 21). ICSBP가 TGF-β RI promoter에 결합하는데 SP1이 ICSBP와 complex를 형성할 가능성을 조사하기 위해 ICSBP와 SP1의 immunoprecipitation assay를 수행하여 SP1이 ICSBP와 직접 결합함을 알 수 있었음 (그림 27). 다음으로 SP1이 ICSBP의 TGF-β RI promoter 결합에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 si-SP1으로 SP1을 knock-down 한 후 EMSA를 수행하였을 때 ICSBP와 TGF-β RI promoter의 결합이 더 강하게 일어났음 (그림 28). 이는 ICSBP 단백질과 SP1이 TGF-β RI promoter의 -220 부근의 sequence에 경쟁적으로 결합하며, SP1이 ICSBP의 TGF-β RI 발현 유도를 negative regulation 할 가능성을 시사함.

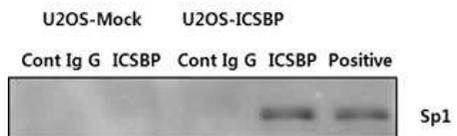


그림 27. 면역침전법으로 조사한 ICSBP와 SP1의 결합

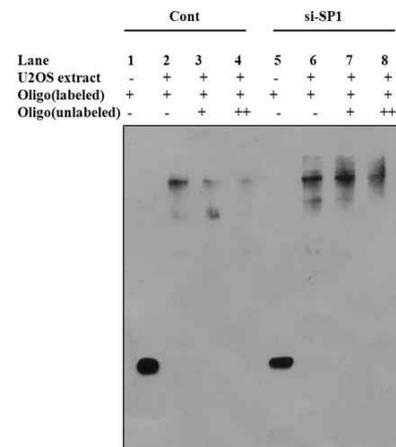


그림 28. SP1을 knock-down 한 후 수행한 EMSA

• 그림 21-28의 결과를 종합하면 TGF-β RI promoter nt (-220/-210)에 ICSBP가 결합하는 positive regulatory element가 있으며, SP1은 ICSBP와 결합하여 ICSBP의 RI promoter binding을 억제하였음.

▶ 마우스모델에서 ICSBP의 골육종 전이유도물질로서의 역할을 규명

• 마우스에 피하집종 후 종양의 생성 여부와 성장속도를 평가하였는데 ICSBP 세포를 피하집종 한 마우스는 5마리 중 3마리, Mock은 3마리 중 1마리에서 종양이 생성됨 (그림 29).

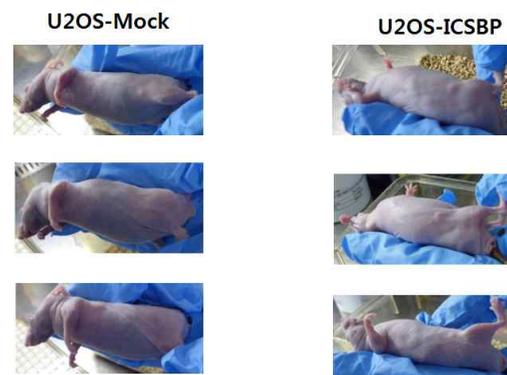


그림 29. ICSBP 또는 Mock 세포를 피하주사 후 생성된 종양 결절

- Green fluorescence protein (GFP)을 도입한 U2OS-ICSBP와 U2OS-Mock 세포를 꼬리정맥에 주사한 후 4주 후에 형광을 측정하였음. ICSBP 세포를 주사한 마우스가 Mock을 주사한 마우스보다 형광이 넓은 범위에 걸쳐서 더 밝게 검출되었음 (그림 30).

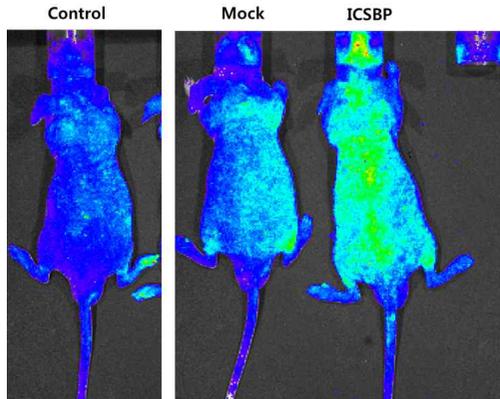


Fig 30. GFP 유전자를 도입한 U2OS-Mock, U2OS-ICSBP 세포의 마우스 꼬리정맥 주사 후 형광 촬영한 모습

- ICSBP-U2OS와 Mock-U2OS 세포를 마우스 꼬리정맥에 주사한 후 마우스의 수명을 비교하였음. ICSBP 세포를 주사한 마우스는 Mock을 주사한 마우스보다 일찍부터 폐사하기 시작하여 150일이 경과되었을 때 10마리 중 3마리만이 생존하였던 반면 Mock 세포를 주사한 마우스는 10마리 중 7마리가 생존하였음 (그림 31).

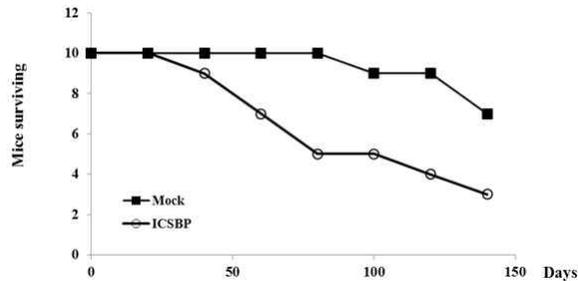


그림 31. Mock과 ICSBP 세포를 주사한 마우스의 생존률

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

골육종은 소아와 청소년기의 원발성 골암 중 가장 흔한 종양이다. 지난 30년간 복합항암화학요법의 도입으로 골육종의 치료성적은 괄목할만한 성장을 보여 5년 생존율이 불과 20%에서 65%로 높아졌으나 원격전이가 있거나 재발한 경우는 생존율이 20%에 불과하고 지난 20년간 생존율이 답보 상태이다.

골육종은 침윤성이 매우 강해 진단시에 폐 CT에서 보이는 전이병변이 없더라도 약 80%의 환자에서 이미 미세전이 (micrometastasis)가 일어나므로 팔다리의 원발부위를 수술로 완전히 제거 하더라도 대부분 재발하고 사망에 이르게 된다. 수술전화학요법은 전이를 억제하고 종양제거술을 용이하게 하는 역할을 하여 골육종의 표준치료로 인정되고 있으나, 화학요법 중이나 후에도 여전히 전이가 일어나거나 병이 재발하고 이런 경우는 거의 완치를 기대하기 어려워 항암화학요법만으로는 치료에 한계가 있다. 전이가 되었거나 재발한 경우 조절호르몬이식이나 samarium 같은 방사선동위원소를 사용하는 치료법이 시도되었으나 생존율을 높이지 못하였다.

최근 다양한 표적치료제가 개발되어 다양한 암종에서 단독으로 사용되거나 화학요법과 병행 투여하여 치료성적이 개선되고 화학요법의 독성을 줄이는 성과가 나오고 있다. 골육종의 성장이나 전이를 저해하는 표적물질로 dasatinib, IFN- $\alpha$ , IGF-IR 항체, trastuzumab, erlotinib 등이 임상시험에서 사용되고 있으나 아직은 만족스러운 결과가 나오지 않고 있다. 따라서 골육종의 전이기전을 연구하고, 전이에서 핵심적인 역할을 하는 분자를 발굴하고, 이를 target으로 하는 표적치료제의 개발은 시급한 연구과제라고 하겠다.

골육종의 강한 침윤성과 높은 미세전이율이라는 특성은 암전이 연구영역에서 골육종이 좋은 모델이 될 수 있음을 의미한다. 또한 다양한 암종에서 사망의 90%가 전이에 의한 것으로 알려져 있으므로 골육종 전이에 관한 연구결과가 타 암종에 적용될 수도 있다.

암의 전이는 다단계과정을 걸쳐서 발생한다. 즉, 1) 암세포의 기저막 붕괴와 세포외기질 침윤, 2) 혈관내침입 (intravasation), 3) 혈류 내에서 생존, 4) 면역감시체계의 공격 회피, 5) 혈관외침윤 (extravasation), 6) 원격장기에서 생존하고 신생혈관을 생성하여 증식하는 과정을 거쳐 전이가 일어난다. 단계별로 다양한 물질이 관여한다. 세포외기질내 이동과 침윤에는 MMPs, Wnt, Src, Notch 등이 관여한다. 고 전이성 골육종세포주에서 Notch1, 2 receptor와 Notch에 의해 유도되는 Hes1 유전자 발현이 항진되었다는 보고가 있다 (Zhang P et al, Clin Cancer Res, 2008). 혈류내에서 생존하는 능력은 anoikis 내성과 세포사멸에 대한 내성에 의해 발휘되는데 anoikis 내성은 PI3K/AKT, NF- $\kappa$ B, Wnt/ $\beta$ -catenin, Bcl family가 관여하고, 세포사멸에 대한 내성은 Src (Gorlick R et al, Clin Cancer Res, 2003), NF- $\kappa$ B, Wnt/ $\beta$ -catenin, Fas/FasL가 관여한다. 혈류내 circulating tumor cell이나 전이된 곳의 암세포는 숙주의 면역감시체계를 회피하기 위해 종양세포의 HLA-1 (Schuetze S et al, J Clin Oncol, 2010)이나 Fas의 발현을 억제하며, IL-10을 분비하여 면역세포의 공격을 회피한다. 전이될 장소에 가서 정지하고 혈관외침윤을 하는데는 CXCR4 (Kim SY et al, Clin Exp Metastasis, 2008), CXCR3가 관여한다. 전이되는 장소에 부착하기 위해서는 종양세포와 전이장기의 미세환경과의 상호작용이 필요한데 여기에 ezrin/MAPK, ezrin/ $\beta$ 4-integrin/PI3K (Wan X et al, Oncogene, 2009)이 작용한다. 전이된 장기에서 신생혈관생성과 종양세포의 증식은 EGFR, PDGFR, VEGF, IGFR, TGF- $\beta$ , Src, Integrin, Wnt/ $\beta$ -catenin이 관여한다.

그러나 전이의 초기단계에서 핵심적인 역할을 하는 것이 근래 주목을 끌고 있는 epithelial to mesenchymal transition (EMT)이라는 현상이다 (Thiery JP, Nature Rev Cancer, 2002). EMT는

조각손상 복구, 장기의 섬유화 또는 암의 전이에 관여한다 (Iwano M et al, J Clin Invest, 2002). EMT가 일어나는 동안 junction protein인 E-cadherin이나 ZO-1의 재배치나 발현감소가 일어나고, 간엽조직의 marker인 vimentin이 발현된다. 이러한 분자변화는 세포가 fibroblast 같은 간엽세포의 모양을 띠는 형태의 변화와 함께 세포-세포간 결합을 약화시키고, 세포의 부착성, 운동성, 침윤성을 높인다 (Thiery JP, Nature Rev Cancer, 2002). EMT는 다양한 cytokine이나 TGF- $\beta$ 와 같은 성장인자에 의해 유도된다 (Massague J, Cell, 2008). TGF- $\beta$ 는 Snail, Slug, Zeb1, Zeb2와 같은 zinc finger protein의 발현 뿐 아니라 Twist, E47 같은 basic helix loop helix factor의 발현을 증가시킨다 (Peinado H et al, Nature Rev Cancer, 2007). 이 단백질들은 E-cadherin promoter에 결합하여 E-cadherin의 발현을 억제한다. EMT 현상이 일어나면 상피세포에서 유래한 암종이 간엽세포화되고, 세포의 부착성, 운동성, 침윤성이 증가한다.

Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )는 암발생 초기 단계에서는 암의 진행을 억제하는 tumor suppressor로 작용하지만, 암이 진행되면 tumor promoter로 작용하여 EMT, 암의 운동성, 침윤성, apoptosis 저항, 면역감시체계의 억제, 신생혈관생성을 일으킨다 (Roberts AB, Proc Natl Acad Sci USA, 2003).

Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)은 inteferon regulatory factor-8 (IRF-8)이라고도 하며, 면역계에서 interferon- $\gamma$ 에 의해 유도된다. ICSBP는 혈구세포에서 발현되어 대식세포 성숙과 T 세포 발달에 중요한 역할을 한다 (Tamura T et al, Immunity, 2003). 또한 혈구세포의 분화, 대식세포의 분화, 면역반응 등에 관여하고, ICSBP knock-out 마우스는 인체의 만성골수성백혈병과 유사한 질병에 걸리며, 바이러스 감염에 취약하다 (Holtshcke T et al, Cell, 1996). 또한 ICSBP knock-out mice에서 채취한 골수계 세포는 세포사멸에 내성을 보인다 (Gabriele L et al, J Exp Med, 1999). 이처럼 대부분의 연구는 혈구세포에서 ICSBP의 역할에 주목하였으나 최근의 연구에서 비인두암, 식도암, 대장암 같은 고형암에서 ICSBP의 발현 저하를 보고하면서 ICSBP가 이들 종양에서 tumor suppressor로 작용할 수 있음을 제시하였다 (Lee KY et al, Oncogene, 2008). 그러나 본 연구진은 최근 HL-60 백혈병세포에서 ICSBP가 TGF- $\beta$  receptor-TAK signaling pathway를 통해 세포의 증식을 촉진함을 보고하였다 (Sung JY et al, Laboratory Invest, 2011). 이는 ICSBP가 tumor suppressor일 뿐 아니라 tumor promoter로 작용할 수도 있음을 시사한다. 또한 백혈병세포의 ICSBP mRNA 발현을 조사한 연구에서도 34명의 CML 환자 중 27명, 32명의 AML 환자 중 21명에서 ICSBP mRNA의 발현 이상이 있어 ICSBP가 tumor suppressor 역할을 하였으나, 일부 AML 환자는 ICSBP mRNA가 높았다는 사실은 ICSBP가 tumor promoter가 될 수도 있음을 뒷받침한다 (Schmidt M et al, Blood, 1998).

본 연구에서는 혈구세포가 아닌 골육종에서 ICSBP가 발현되는지를 조사하였고, ICSBP가 골육종의 전이와 관련해 어떤 역할을 하는지 파악하고자 하였다.

골육종환자의 암조직은 ICSBP가 높게 발현되었던 반면 정상 뼈나 골육종세포주인 U2OS나 SaOS-2에서는 ICSBP 발현이 매우 낮았다. 이에 ICSBP 발현이 낮은 골육종세포주에 ICSBP를 과발현시켜 어떤 변화가 오는지를 조사하였다. ICSBP를 인체골육종세포주인 U2OS 세포에 과발현시킨 U2OS-ICSBP 세포 (앞으로 ICSBP 세포로 약칭)에서는 세포의 형태가 fibroblast와 유사한 형태로 바뀌고, 세포의 부착성, 운동성, 이동성, 침윤성 증가와 같은 전이세포의 특성을 나타냈다 (그림 4-6).

본 연구진이 HL-60를 대상으로 한 연구에서 ICSBP가 TGF- $\beta$  receptor의 발현을 유도하였으므로 ICSBP 세포에서 TGF- $\beta$  receptor가 유도되는지를 조사하였다. 그 결과 ICSBP는 TGF- $\beta$  RI 과 RII의 발현을 유도하였고, Smad pathway뿐 아니라 non-Smad pathway (ERK, AKT, p38)도

활성화였다 (그림 9, 10). 이 non-Smad pathway와 관련된 물질은 골육종의 항암제내성이나 전이와 관련이 있는 물질로 보고된 바 있다 (PosthumaDeBoer J et al, Clin Exp Metastasis, 2011). ICSBP 세포에 si-ICSBP를 처리하면 TGF- $\beta$  RI의 발현이 줄어든다 si-TGF- $\beta$  RI을 처리하면 ICSBP 발현이 감소하지 않아 (그림 12) ICSBP가 TGF- $\beta$  RI의 upstream에 있음을 알 수 있었다.

다음으로 골육종의 전이관련 표적물질을 탐색하기 위해 U2OS-ICSBP 세포에서 발현되는 전이관련 물질로서 Mock-ICSBP 세포에서보다 두배 이상 발현이 높은 물질을 mRNA expression microarray로 조사하였다. 그 결과 TGF- $\beta$ 에 의해 발현이 조절되는 E-cadherin repressor인 Snail, Slug, Twist를 발굴하였다. ICSBP에 의해서 이들 단백질의 발현은 모두 증가하였으나 Snail의 발현 증가가 가장 뚜렷하였다. 또한 TGF- $\beta$  receptor inhibitor나 si-TGF- $\beta$  RI을 ICSBP 세포에 처리하면 Snail의 발현은 감소하였으나 Slug, Twist의 발현은 큰 변화가 없어 (그림 16), ICSBP에 의한 Slug, Twist의 발현 유도는 TGF- $\beta$  signal이 아닌 다른 pathway를 통해 조절받음을 알 수 있었다. si-ICSBP로 ICSBP를 knock-down 한 세포에 Snail을 도입하면 둔화된 세포의 부착성, 이동성, 침윤성이 부분적으로 회복되는 것으로 보아 (그림 17-20) ICSBP에 의한 골육종세포의 EMT 현상이나 전이세포 특성 획득은 Snail이 부분적으로 증대함을 알 수 있었다.

다음으로 ICSBP가 TGF- $\beta$  RI을 유도하는 기전을 조사하였다. Serial RI promoter의 deletion mutants를 이용해 luciferase assay를 수행한 결과 RI nt (-220/-210)이 RI promoter activity에 중요하다는 것을 발견하였다 (그림 24). RI nt (-220/-210)을 포함하는 probe를 제작하고 EMSA를 수행했을 때 ICSBP가 probe와 결합함을 확인할 수 있었다. 현재 ICSBP가 결합하는 정확한 regulatory element를 site-directed mutagenesis를 이용해 확인중이다.

다음으로 ICSBP와 Mock 세포를 피하 및 꼬리정맥에 주사한 후 마우스의 종양 형성 여부, 체중 및 activity의 변화를 조사하였다. ICSBP 세포를 꼬리정맥에 주사한 마우스의 형광이 Mock 세포보다 광범위하고 밝게 측정되어 ICSBP 세포가 광범위한 전이를 일으켰을 것으로 추정되었다. 이는 조직학적 염색을 통해 확인할 예정이다. 또한 ICSBP를 꼬리정맥에 주사한 마우스는 Mock 세포를 주사한 마우스보다 일찍 폐사가 일어났고 150일에 조사한 생존율도 3/10으로 30%에 불과했던 반면 Mock 세포 주사군은 10마리 중 7마리가 살아있어 70%의 생존율을 보였다. ICSBP 세포를 꼬리정맥뿐 아니라 mice의 뼈에 동소이식 (orthotopic transplantation) 한 후에 폐전을 조사하는 연구가 현재 진행되고 있으며, 여기서 얻어지는 결과로 *in vivo*에서 ICSBP의 metastatic role을 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 ICSBP는 인체골육종세포주인 U2OS 세포의 성장을 촉진하고, EMT 현상 및 세포의 부착성, 운동성, 이동성, 침윤성을 높여 전이세포의 특성을 획득하게 하였다. ICSBP 세포의 이러한 metastatic phenotype는 ICSBP에 의해 유도된 TGF- $\beta$  receptor와 Snail에 의해 증대되었다. 또한 ICSBP에 의한 U2OS 세포의 변화는 TGF- $\beta$  receptor를 통하지 않는 unidentified pathway를 통해서도 일어나는 것으로 사료되었다. 이 결과를 토대로 ICSBP에 의해 U2OS 세포가 EMT 현상, 전이세포 특성을 보이는 기전을 다음과 같이 제시하였다 (그림 32). ICSBP에 의한 전이특성 획득은 마우스모델을 이용한 실험에서도 이를 뒷받침하는 소견을 보였고, ICSBP 발현은 마우스의 생존율을 저하시켰다.

본 연구를 통해 ICSBP와 Snail이 TGF- $\beta$  pathway를 통해 골육종세포주인 U2OS의 EMT 현상을 일으킨다는 사실을 처음으로 확인하였기에 이를 보고하는 바이다.

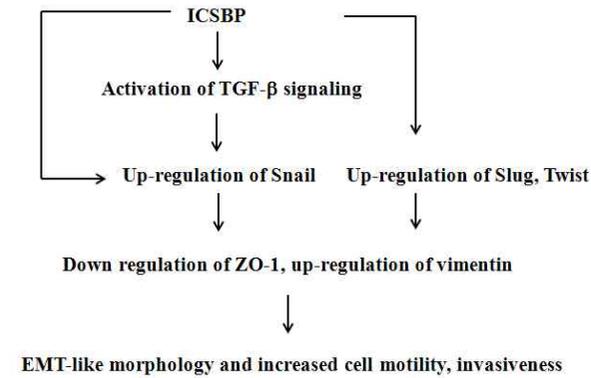


그림 32. U2OS 세포에서 ICSBP에 의해 유도된 EMT 현상에 대한 molecular pathway

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Prediction of tumour necrosis fractions using metabolic and volumetric (18)F-FDG PET/CT indices, after one course and at the completion of neoadjuvant chemotherapy, in children and young adults with osteosarcoma.	박병규 (교신)	European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging(5.036)	2012 39:39-49	국외 SCI	0710090
Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)-induced cell proliferation is mediated by TGF-β signaling and p38 MAPK activation.	박병규 (교신)	Laboratory Investigation (4.405)	2011 91:1304-1313	국외 SCI	1010840
Induction of apoptosis by ginsenoside Rh2 by internalization of lipid rafts and caveolae and inactivation of Akt	박병규 (공동)	British Journal of Pharmacology (5.204)	2010 160:1212-1223	국외 SCI	0910050
HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid raft/caveolae-disrupting stress	박병규 (공동)	Carcinogenesis (4.93)	2009 30:1997-2004	국외 SCI	0910050
Follicular thyroid carcinoma arising after hematopoietic stem cell transplantation in a child with pleuropulmonary blastoma	박병규 (교신)	Thyroid (4.792)	2012 22:547-551	국외 SCI	
Craniospinal irradiation techniques: A dosimetric comparison of proton beams with standard and advanced photon radiotherapy.	박병규 (공동)	International Journal of Radiation Oncology Biology Physics (4.503)	2011 81:637-646	국외 SCI	
Current status of pediatric umbilical cord blood transplantation in Korea: A multicenter retrospective analysis of 236 cases.	박병규 (공동)	American Journal of Hematology (3.576)	2011 86:12-17	국외 SCI	
Current status of pediatric umbilical cord blood transplantation in Korea: A multicenter retrospective analysis of 236 cases.	박병규 (공동)	American Journal of Hematology (3.576)	2011 86(1):12-17	국외 SCI	
Hemophagocytic lymphohistiocytosis can mimic the superior vena cava syndrome.	박병규 (공동)	J Pediatric Hematol Oncol (1.159)	2012 34:e152-154	국외 SCI	
Efficacy of high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in patients with relapsed medulloblastoma: A report on the Korean Society for Pediatric Neuro-oncology (KSPNO)-S-053	박병규 (공동)	J Korean Med Sci (0.83)	2010 25(8): 1160-1166	국내 SCI	

study.					
Proton Magnetic resonance spectroscopy of musculoskeletal lesions at 3 T with metabolite quantification.	박병규 (공동)	Clinical Imaging (0.725)	2010 34(1):47-52	국외 SCI	

Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology			Oct 2011 서울		
Strategies to improve the outcome of rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma in Korea	박병규 (교신)	대한소아혈액종양학회 추계학술대회	Oct 2011 서울	국내	

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호
Interferon Consensus Sequence-Binding Protein (ICSBP) regulates the transforming growth factor-beta type I receptor expression in osteosarcoma cells	박병규 (교신)	AACR Apr 2012 Chicago, USA	국외	1010840
Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)-mediated proliferation and epithelial to mesenchymal transition in human osteosarcoma cells	박병규 (교신)	AACR Apr 2011 Orlando, USA	국외	1010840
Prediction of tumour necrosis fraction using volumetric and metabolic FDG PET indices in osteosarcoma patients following one course of neoadjuvant chemotherapy	박병규 (교신)	International Society for Paediatric Oncology (SIOP) Oct 2011 Auckland, New Zealand	국외	0710090
A phase II trial of docetaxel and irinotecan (DI) in children and young adults with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumor (ESFT)	박병규 (교신)	American Society for Clinical Oncology (ASCO) May 2012 Chicago, USA	국외	
Usefulness of plasma transforming growth factor-beta 1 levels in predicting chemotherapy-induced necrosis rates in osteosarcoma	박병규 (교신)	SIOP Asia Apr 2012 Jogjakarta, Indonesia	국외	0710090
Clinical features of 345 children and young adults with the rhabdomyosarcoma: A report from the Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology	박병규 (교신)	대한소아혈액종양학회 추계학술대회 Oct 2011 서울	국내	
Risk factors related to the relapse and the post-relapse outcomes in children and young adults with the rhabdomyosarcoma: A report from the Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology	박병규 (교신)	대한소아혈액종양학회 추계학술대회 Oct 2011 서울	국내	
Ewing sarcoma family of tumors in Korean children and adolescents: A report from the	박병규 (교신)	대한소아혈액종양학회 추계학술대회	국내	

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)
소아청소년암 완치자의 관리	공저	대한소아혈액종양학회, 대한민국 (2011)	151-172	9장 근골격계
혈액학 2판	공저	대한혈액학회, 대한민국 (2011)	499-505	41장 자가조혈모세포이식

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)		
			연차	최종	
소아골육종의 성장 및 전이 조절기전을 연구하고 전이와 관련된 표적분자를 발굴	1차년도	골육종세포에서 ICSBP의 성장 및 전이 조절기전을 연구	- 인체골육종조직과 세포주에서 ICSBP 발현 조사 - ICSBP가 과발현된 골육종 세포주의 확립 - ICSBP에 의한 골육종세포의 성장속도, 운동성, 침윤성에 대한 영향 분석	100	100
		골육종세포에서 ICSBP에 의해 유발되는 TGF-β 수용체와 하부신호전달물질의 변화를 조사	- ICSBP에 의한 TGF-β 수용체의 발현 조사 - ICSBP에 의한 신호전달물질의 활성 변화를 조사	100	100
		골육종 전이에 중요한 역할을 하는 표적분자 발굴	- ICSBP 과발현 골육종세포주에서 mRNA와 protein의 expression profile 분석	100	100
	2차년도	ICSBP에 의한 TGF-β 수용체 전사조절기전 규명	- ICSBP에 의한 TGF-β 수용체 promoter 활성에 대한 영향 분석 - TGF-β 수용체 promoter 내 ICSBP의 결합 부위 탐색 - ICSBP와 결합하는 타 전사인자의 탐색 및 이 단백질들 간의 상호작용 조사	100	100
		3차년도	• 마우스모델을	- ICSBP 또는 ICSBP의	80

		이용하여 골육종 전이에서 ICSBP와 전이 관련 표적물질의 기능적 중요성을 검증	siRNA로 형질전환된 골육종 세포를 마우스에 피하접종 후 종양의 성장속도를 평가 - 위 세포를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging과 적출된 폐조직에서 전이의 정도를 조사 - 마우스 수명 및 독성에 대한 영향 평가		
--	--	--	---	--	--

마우스 수명 및 독성에 대한 영향을 보았나?	
--------------------------	--

5. 연구결과와 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	2	PLOS ONE (4.092), Clin Exp Metastasis (3.524)
산업재산권 등록		
기타		

(2) 연구성과의 활용계획

(1) 활용방안

- 골육종환자의 암조직에서 ICSBP와 TGF-β RI, Snail의 발현 수준을 토대로 환자를 risk group으로 나누어 맞춤치료를 할 수 있겠음.

(2) 후속연구의 필요성

- 골육종환자의 암조직에서 ICSBP와 TGF-β RI, Snail의 발현과 전이여부와 항암제에 대한 반응, 예후와의 상관관계를 분석하는 것은 환자의 예후를 진단시에 예측하고, 예후에 따라 맞춤치료를 하기 위한 필수자료임. 이를 위한 환자수 확보와 생존율분석을 위해 후속연구가 반드시 이루어져야함.

- 전이세포는 흔히 항암제나 방사선에 대한 내성을 보이므로 ICSBP와 항암제 내성간의 연관성을 분석할 필요가 있겠음.

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
ICSBP가 과발현된 골육종세포주를 확립 하였는가? ICSBP에 의한 골육종세포의 성장속도, 세포주기, 운동성, 침윤성에 대한 영향 분석은 이루어 졌는가? ICSBP에 의한 TGF-β 수용체의 발현 조사하였나? ICSBP에 의한 신호전달물질의 활성 변화를 조사하였나? ICSBP 과발현 골육종세포주와 종양조직에서 mRNA와 protein의 expression profile 분석을 해보았나?	ICSBP가 과 발현 된 세포주를 확립하여 ICSBP에 의한 골육종 세포의 성장 증가, 운동성 증가, 침윤성의 증가함을 알아냄. ICSBP에 의한 TGF-β 수용체의 발현 증가와 그 하부 신호전달 과정이 활성화됨을 알아냄. ICSBP 과발현 시켰을 때 활성화 되는 전이 관련 단백질의 expression profile을 조사하였음.
ICSBP에 의한 TGF-β 수용체 promoter 활성에 대한 영향 분석은 어떠한가? TGF-β 수용체 promoter 내 ICSBP의 결합 부위를 탐색하였나? ICSBP와 결합하는 타 전사인자의 탐색 및 이 단백질들 간의 상호작용을 조사하였나?	ICSBP에 의해 TGF-β 수용체 promoter 활성화가 일어남을 Luciferase 활성도로 측정하였으며 실제로 결합하여 활성화 되는 부위를 찾아내었음. ICSBP와 결합하는 전사인자인 SPI1과의 결합을 확인함.
ICSBP 또는 ICSBP의 siRNA로 형질전환 된 골육종세포를 마우스에 피하접종 후 종양의 성장속도를 조사하였나? 위 세포를 꼬리정맥에 주사한 후 in vivo imaging과 적출된 폐조직에서 전이의 정도를 조사하였나?	GFP 단백질이 표지된 U2OS-Mock, ICSBP 세포주를 확립하여 피하 및 꼬리 정맥 주사를 통해 종양의 성장 및 전이 정도를 조사하였음. U2OS-Mock, ICSBP 세포주를 꼬리정맥에 주사한 마우스를 그룹별로 나누어 생존율을 조사하였음.

## 6. 참고문헌

- Zhang P, Yang Y, Zweidler-McKay PA et al (2008) Critical role of notch signaling I osteosarcoma invasion and metastasis. *Clin Cancer Res* 14:2962-2969.
- Gorlick R, Anderson P, Andrulis I et al (2003) Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res* 9:5442-5453.
- Schuetze S, Wathen K, Choy E et al (2010) Results of Sarcoma Alliance for Research through Collaboration (SARC) phase II trial of dasatinib in previously treated, high grade, advanced sarcoma. *J Clin Oncol* 28:1009.
- Kim SY, Lee CH, Midura BV et al (2008) Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis* 25: 201-2011.
- Wan X, Lim SY, Guenther LM (2009) Beta4 integrin promotes osteosarcoma metastasis and interacts with ezrin. *Oncogene* 28:3401-3411.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2:442-454.
- Iwano M et al (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110:341-350.
- Massague J (2008) Tgfbeta in Cancer. *Cell* 134:215-230.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A et al (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Rev Cancer* 7:415-428.
- Roberts AB, Wakefield LM. (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8621-8623.
- Tamura T et al (2000) ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 13:155-165.
- Holtshcke T et al (1996) Immunodeficiency and chronic myelogenousleukemia-like syndromw in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 87:307-317.
- Gabriele L et al (1999) Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence -binding protein. *J Exp Med* 190:411-421
- Lee KY et al (2008) ERpigenetic disruption of interferon-gamma response through silencing the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas. *Oncogene* 27:5267-5276.
- Sung JY, Kim H, Kim Y-N et al (2011) Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)-induced cell proliferation is mediated by TGF- $\beta$  signaling and p38 MAPK activation in HL60 cells. *Laboratory Invest* 91:1304-1311.

Schmidt M, Nagel S, Proba J et al (1998) Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood* 91:22-29.

PosthumaDeBoer J, Witlox MA, Kaspers G et al (2011) Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature *Clin Exp Metastasis* 28:493-503.

## 7. 첨부서류

## Interferon consensus sequence binding protein-induced cell proliferation is mediated by TGF- $\beta$ signaling and p38 MAPK activation

Jee Young Sung<sup>\*</sup>, Heejung Kim<sup>\*</sup>, Yong-Nyun Kim<sup>\*</sup>, Yoon Sook Na and Byung-Kiu Park

Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP), also known as interferon regulatory factor (IRF)-8, is a member of the interferon (IFN)- $\gamma$  regulatory transcription factors. Studies have suggested a connection between TGF- $\beta$  signaling and IRFs. Thus, we investigated the effect of ICSBP on transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in HL-60, an acute promyelocytic leukemia cell line. Stable expression of ICSBP in HL-60 cells resulted in strong induction of TGF- $\beta$  receptor expression and activation of non-Smad as well as Smad pathways. ICSBP expression also augmented cell growth. ICSBP knockdown with small interfering RNA (siRNA) attenuated cell growth and decreased TGF- $\beta$  receptor I (TGF- $\beta$ RI) expression. In addition, reduction of TGF- $\beta$ RI using siRNA or pharmacological inhibitor reduced growth of ICSBP-expressing cells. ICSBP expression also led to increased phosphorylation and activation of Akt and p38 MAPK. However, p38 MAPK, but not PI3K-Akt, inhibition abrogated ICSBP-mediated proliferation. Furthermore, siRNA knockdown of either ICSBP or TGF- $\beta$ RI resulted in decreased p38 activation. Intriguingly, TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK-1), which phosphorylates p38, was activated in ICSBP-expressing cells and its activity was reduced by TGF- $\beta$ RI inhibition. Finally, siRNA knockdown of ICSBP or TGF- $\beta$ RI reduced TAK-1 phosphorylation. This study identifies a novel role for ICSBP in regulating cell growth via TGF- $\beta$  receptor upregulation and subsequent activation of the TGF- $\beta$  receptor/TAK-1/p38 pathway.

*Laboratory Investigation* (2011) 91, 1304–1313; doi:10.1038/labinvest.2011.90; published online 30 May 2011

**KEYWORDS:** cell proliferation; ICSBP; p38; TAK-1; TGF- $\beta$ R

The transforming growth factor (TGF)- $\beta$  family is comprised of numerous factors, including TGF- $\beta$ , bone morphogenetic proteins, activin, inhibin, and nodal.<sup>1</sup> TGF- $\beta$  regulates many cellular functions, such as cell growth, migration, differentiation, and apoptosis.<sup>2</sup> Although this cytokine exerts tumor suppressive activity, it also promotes tumorigenesis on deregulation of TGF- $\beta$  signaling. For example, during the early stages of cancer, TGF- $\beta$  inhibits epithelial cell growth.<sup>3</sup> However, in later stages, TGF- $\beta$  potentiates tumor progression by reprogramming epithelial cells to become mesenchymal cells (also known as the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)), which is important for tumor metastasis and invasion.<sup>4</sup> Moreover, TGF- $\beta$ 1 overexpression has been associated with breast, lung, pancreatic, gastric, and liver cancer.<sup>5</sup> High level of TGF- $\beta$  in infiltrating breast carcinoma has been associated with metastasis, indicating a link between TGF- $\beta$  levels and metastatic disease.<sup>2</sup>

TGF- $\beta$  binds to the TGF- $\beta$  receptor II (TGF- $\beta$ RII), resulting in the recruitment of TGF- $\beta$  receptor I (TGF- $\beta$ RI) and formation of active signaling complexes. TGF- $\beta$ RII, a constitutively active Ser/Thr kinase, activates TGF- $\beta$ RI via phosphorylation, resulting in subsequent activation of the receptor-regulated Smads, such as Smad2 and Smad3, by phosphorylation. Once activated, Smad2 and Smad3 form a complex with Smad4, and these complexes translocate into the nucleus to regulate gene expression.<sup>1,6–8</sup> Inhibitory Smads (eg, Smad6 and Smad7) antagonize TGF- $\beta$  signaling by blocking receptor-regulated Smad activation or mediating TGF- $\beta$ R degradation. In addition to Smad-dependent pathways, non-canonical TGF- $\beta$  signaling pathways have been proposed. For example, TGF- $\beta$ R can interact with interleukin-1 receptor/TRAF6/TAK1 and activate JNK and p38.<sup>9</sup> TGF- $\beta$  can also stimulate the ERK/MAPK pathway by activating Ras, which is important for EMT.<sup>10</sup> Finally, TGF- $\beta$  has

Pediatric Oncology Branch, National Cancer Center, Gyeonggi-do, Korea

Correspondence: Dr B-K Park, MD, PhD, Pediatric Oncology Branch, National Cancer Center, 323 Ilsan-ro, Ilsandong-gu, Gyeonggi-si, Gyeonggi-do 410-769, Korea.  
E-mail: bkpark@ncc.re.kr

<sup>\*</sup>These authors contributed equally to this work

Received 17 November 2010; revised 18 April 2011; accepted 18 April 2011

1304

*Laboratory Investigation* | Volume 91 | September 2011 | www.laboratoryinvestigation.org