



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

USP14의 억제를 통한 위암 세포 사멸유  
도 및 5-FU에 대한 내성 감소 연구

Inhibition of USP14 induces gastric  
cancer apoptosis and reduces  
resistance to 5-FU

울 산 대 학 교 대 학 원  
의 과 학 과  
이 미 예

USP14의 억제를 통한 위암 세포 사멸유  
도 및 5-FU에 대한 내성 감소 연구

지도교수 이창환

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2023년 08월

울산대학교 대학원  
의과학과  
이미예

이 미 예 의 이 학 석 사 학 위 논 문 을 인 준 함

심사위원 최 순 철 (인)

심사위원 이 창 환 (인)

심사위원 진 준 오 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2023년 8월

## 국문요약

Deubiquitinating enzymes (DUBs)는 ubiquitin-proteasome system (UPS)의 필수 구성 요소로 기질 단백질에서 유비퀴틴을 잘라내어 해당 단백질의 분해를 억제하거나 활성도를 조절하는 등 다양한 기능을 가지고 있다. Ubiquitin-specific protease14 (USP14)는 DUB 중 하나로, 위암을 포함한 다양한 암의 형성 과정에서 그 역할에 대한 연구들이 진행중에 있다. 이번 연구에서 USP14의 단백질 발현량이 인접한 정상 조직에 비해 위암 조직에서 현저하게 더 높다는 것을 발견했으며 IU1 (USP14 inhibitor) 또는 USP14 특이적 siRNA에 의한 USP14의 억제가 위암 세포의 생존력과 세포 이동 능력을 상당히 감소시킨다는 것을 확인했다. 또한 Caspase-3 및 PARP의 증가를 통해 USP14의 억제가 위암 세포사멸을 유도함을 확인했다. IU1의 처리는 5-FU (5-Fluorouracil) 저항성을 가진 위암 세포의 항암제 내성을 완화시키는 것으로 나타났다. 종합적으로, 이러한 발견은 위암의 진행과정 및 항암제 내성에서 USP14의 중요한 역할을 나타내며 암 치료 표적으로서의 새로운 가능성을 제시한다.

Keywords: ubiquitin-specific protease 14; deubiquitinating enzyme; gastric cancer; apoptosis

## 목차

국문요약 .....	I
목차 .....	II
서론 .....	1
재료 및 실험 방법 .....	3
연구 결과 .....	7
고찰 및 결론 .....	32
참고문헌 .....	35
영문요약 .....	39

## I. 서론

위암은 5번째로 흔한 암이며 3번째로 높은 사망 원인이다<sup>1</sup>. 위암 치료는 수술과 전신 요법이 주로 이루어지고 있으며, 국소적인 병변 부위만 보유한 환자의 경우 외과적 절제를 통한 치료로 완치가 가능하다<sup>2</sup>. 그러나 수술이 불가능한 나머지 위암 환자 또는 전이성 위암 환자의 경우, 3상 시험 결과에 따라 병용 화학요법 (5-FU 기반요법 포함)이 1차 전신 치료에 사용이 된다<sup>3-5</sup>. 하지만 대부분의 진행성 위암 환자의 경우 기존의 화학 요법에 내성이 있으며, 5년 상대 생존율이 6%로 예후가 좋지 않다<sup>6</sup>. 이러한 이유로 진행성 위암 환자의 생존 기간을 늘리기 위해 화학 요법 내성을 극복한 새로운 표적 약물의 개발이 필요하다.

Ubiquitin-proteasome system (UPS)은 진핵 세포에서 대부분의 단백질을 분해하는 중요한 시스템이며 이러한 기능은 E1-E2-E3의 효소 연쇄반응을 통해 기질 단백질에 유비퀴틴을 결합시키는 반응으로 시작된다<sup>7,8</sup>. UPS에는 유비퀴틴을 떼어내는 기작도 포함된다. deubiquitinating enzymes (DUBs)에 의해 표적 단백질로부터 단일 유비퀴틴 또는 전체 유비퀴틴 사슬을 절단한다<sup>9-11</sup>. DUB는 신경 퇴행성 질환을 포함한 병리학 과정 및 세포사멸, 자가포식, 세포 주기와 같은 광범위한 생리학적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>7,12-15</sup>. 현재 약 100개의 DUB가 확인되었으며 일부는 다양한 암 발생과 관련이 있다. DUB 중 하나인 USP14도 위암을 포함한 다양한 암의 진행과 관련이 있다<sup>16-18</sup>. USP14의 억제제는 항증식 효과와 세포사멸을 초래하였다<sup>19</sup>. 위암에서 USP14의 정확한 기능은 아직 불분명하지만, 위암에서 USP14의 발현이 증가되어 있으므로 위암에서 새로운 바이오마커 역할을 할 수 있다<sup>20-24</sup>.

세포사멸 (apoptosis)은 여러 생리학적, 병리학적 조건에서 발생하는, 잘 프로그램 된 세포의 자살 과정이다. 수포화 (blebbing), 세포 수축, 핵 단편화, 염색질 응축, 핵산 분해 등 다양한 생화학적 과정을 동반하게 된다<sup>25,26</sup>. 괴사 (necrosis)와 달리 세포사멸은 면역반응을 적게 일으키는 것이 특징이다. 이는 괴사 과정에서는 세포 내에 강력한 면역원성을 가지는 다양한 단백질이나 핵산 등이 세포 외로 무분별하게 방출되지만, 세포사멸은 그렇지 않기 때문이다. 세포사멸 과정에서는 수포화를 통해 세포 내 구성성분들이 원형질막에 쌓여서 존재하게 되고 이를 대식세포가 efferocytosis라는 과정을 통해 처리하게 된다<sup>27,28</sup>.

본 연구는 위암 세포에 대한 USP14 선택적 억제제인 IU1의 항암 기전을 규명하고자 하였고, 특히 IU1의 위암 형성 억제 효과를 확인하였다. 또한 IU1이 5-FU 화학 요법에 대한 위암 세포의 민감도를 향상시킬 수 있는지 조사하였다. 이를 통해 위암에서

USP14의 역할을 확인하고 IU1을 이용한 USP14 억제제의 항암 기전을 탐구하였다. 위암 세포를 이용한 western blot 및 세포 분석 실험들을 통해 IU1이 위암 세포의 성장을 감소시키며, 이는 USP14의 발현 억제를 통해서도 가능하다는 것을 확인했다. 또한 IU1의 사용은 5-FU의 민감도를 향상시키고 5-FU 내성 위암 세포의 내성을 극복하였다. 이러한 결과는 USP14이 위암 치료 또는 진단을 위한 새로운 표적이 될 수 있음을 보여주었다.

## II. 재료 및 실험방법

### 환자 조직 샘플.

이 연구에 참여한 모든 위암 환자로부터 서면 동의서를 받았다. 모든 실험 프로토콜은 서울아산병원 임상 심사위원회와 울산대학교 의과대학 (2016-1275)의 승인을 받았다. 인체 위 조직은 Asan Bio Resource Center (2014-20(89))를 통해 확보했다.

### 세포 배양 및 시약 처리.

이 실험에 사용한 MKN74 세포는 ATCC로부터 입수하여 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)에서 성장시켰고, SNU216, SNU620, 5-FU resistance SNU620 세포는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)에서 성장시켰다. DMEM, RPMI 는 10% FBS (Fetal Bovine Serum)와 1% P/S (Penicillin-Streptomycin)가 첨가되었다. 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 유지되었다. 5-FU resistance SNU620 세포의 경우 배지에 10 µM 농도의 5-FU를 유지시켰다. USP14 inhibitor는 IU1을 사용하였으며 50 µM, 100 µM이 세포에 48시간 처리했다.

### Transfection.

제조사에 설명서에 따라 iNfect (Intron, Seoungnam, South Korea)를 사용하여 세포를 플라스미드로 형질감염시키고, 형질감염된 세포의 분석을 위해 48시간 후에 수확했다. Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen)는 제조업체의 설명서에 따라 siRNA 형질감염에 사용했다. siRNA design 표2. 참조

### Immunoblotting.

세포를 1% SDS-용해 버퍼 (40mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 1% SDS, 1mM EDTA)로 용해하고 용해물을 수집하여 BCA 단백질 분석 키트 (Pierce, Thermo Fisher, Cat No.23228)을 이용해 단백질 농도를 측정했다. 98°C에서 7분간 끓여준 다음 SDS-PAGE로 분리하고 전기영동을 하였고 다음 항체들을 이용해 blotting 하였다. anti-USP14 (Novus, Centennial, CO, USA), anti-LC3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) anti-Beclin-1 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA),

anti-PARP (Cell Signaling), anti-Bcl-2 (Santa Cruz, Dallas, MA, USA), anti-Caspase-3 (Cell signaling), anti-cleaved Caspase-3 (Cell Signaling), anti-c-MYC (Santa Cruz) 및 anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz)을 primary antibody로 사용하였다. HRP-conjugated secondary antibody (BETHYL)를 이용하여 확인하였다.

#### RT-PCR.

RNA는 easy-BLUE™를 통해 조직에서 추출되었으며 총 RNA 농도는 260 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. cDNA 합성 키트 (iNTRON)를 이용하여 1  $\mu$ g의 RNA로 cDNA를 합성하였다. Real-Time PCR 2x Master Mix (SYBR green, EBT-1801, Elpis biotech)와 인간 USP14, GAPDH primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분 동안 변성 1주기, 95°C에서 30초/58°C에서 30초/72°C에서 90초를 30주기, 이후 최종 연장 72°C에서 5분으로 사용하였다. primer design

#### 표1. 참조

#### Immunohistochemistry (IHC).

포르말린 고정, 파라핀 embedded 샘플에 대해 면역조직화학적 분석을 수행하였다. 섹션을 통해 각 샘플에서 암종과 비암종 부위가 포함된 파라핀 블록을 선택하여 세장의 slides를 얻었으며 Xylene (10분, 2회)으로 탈파라핀 처리한 후 에탄올 (100%에서 2회, 95%, 85% 및 70%)을 사용하여 재수화하고 5분 동안 세척했다. 각 anti-USP14 (1:250 희석, Novus, Centennial, CO, USA)을 조직에 첨가하여 하룻밤 동안 반응시켰으며, 이후에 TBST (Tween20 0.1%) 용액으로 3차례 수세한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 실온에서 8분간 처리하여 조직 내 존재하는 내재성 peroxidase를 제거하였다. TBST 용액으로 수세 후 biotin이 부착된 2차 항체를 실온에서 30분간 반응시켰다. Streptavidin-horseradish peroxidase와 30분 반응시킨 후에 수세하였다. 부착된 horseradish peroxidase는 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)를 이용하여 발색하였으며, hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### Apoptosis 관찰을 위한 Prothodum Iodide (PI) staining 및 Annexin-V staining.

USP14 억제제 세포 사멸을 확인하기 위해 제조업체의 사용법에 따라 Prothodum

Iodide (PI), FITC annexin-V apoptosis detection kit (BD Bioscience)를 사용하였고 염색된 세포를 FACS (Fluorescence-activated cell sorting)로 분석하였다.

### **Cell Viability.**

Cell Viability를 평가하기 위해 세포를 96-well 세포 배양 플레이트에  $1 \times 10^3$ cell/well의 밀도로 세포를 배양하고 0-3일에 분석하였다. 각 분석 지점에서 Cell Titer-Glo 시약 (Promega, Madison, WI, USA)을 첨가하고 20분이 지난 후에 측정했다.

### **Wound Healing.**

Wound Healing 분석을 위해 세포를 6well 세포 배양 플레이트에  $8 \times 10^5$ cell/well 밀도로 배양했다. 그런 다음 세포를 200  $\mu$ L pipet tip으로 긁고 PBS로 두 번 세척 후 complete media를 첨가하여 0-2일에 현미경으로 분석했다.

### **Colony Formation.**

Colony Formation 분석을 위해 세포를 6well 세포 배양 플레이트에  $1 \times 10^3$ cell/well의 밀도로 1-2주 동안 배양하였다. 이후 PBS로 세척하고 4% Paraformaldehyde를 사용하여 20분 동안 고정하고 세척했다. PBS로 2회 세척한 후 0.5% crystal violet으로 20분간 염색하였다.

### **Migration Assays.**

Transwell Invasion 분석을 위해 세포를 24well 세포 배양 플레이트에 놓여진 8  $\mu$ m Transwell 삽입물의 상부 chamber에  $3 \times 10^5$ cell/well 밀도로 세포를 배양했다. 하부 chamber는 10% FBS 및 1% penicillin/Streptomycin 보충된 DMEM으로 채우고 36시간 동안 배양했다. Transwell insert에 침투한 세포를 PBS로 세척하고 4% paraformaldehyde로 20분 동안 고정한 후 PBS로 세척하고 0.5% crystal violet으로 20분 동안 염색했다. Transwell 상부 chamber에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고 현미경으로 분석했다.

## 통계

데이터는 평균  $\pm$ SEM으로 표시된다. USP14 억제의 결과를 확인하는 세포실험 및 USP14 발현을 분석하기 위한 실험은 실험군과 대조군의 변화 등은 Student's *t*-test 를 통해 검증하였으며,  $p < 0.05$ 이 됐을 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

### Ⅲ. 연구 결과

#### 1. 위암에서의 USP14 발현 수준

USP14의 발현 수준을 기반으로 생존 분석을 수행했으며 Kaplan-Meier 곡선에서 USP14 발현 수준이 높은 위암 환자가 생존률이 더 낮게 나타남을 확인하였으며 이는 USP14의 발현양이 불량한 예후와 양의 상관관계가 있음을 나타내었다 (그림 1). 또한 위암 환자에서 USP14 mRNA의 발현 수준이 위암 환자의 종양 조직과 인접한 비종양 조직에서 차이를 나타내는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다 (그림 2). IHC 분석과 western blotting을 이용하여 48쌍의 환자 유래 위암 조직과 인접한 비종양 조직에서 USP14의 단백질 수준을 분석하였다. USP14 발현은 인접한 비종양 조직보다 종양 조직에서 유의하게 더 높은 것으로 나타났다 (그림 3, 4). 이러한 결과는 USP14 과발현이 위암에서 종양 형성 및 예후와 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

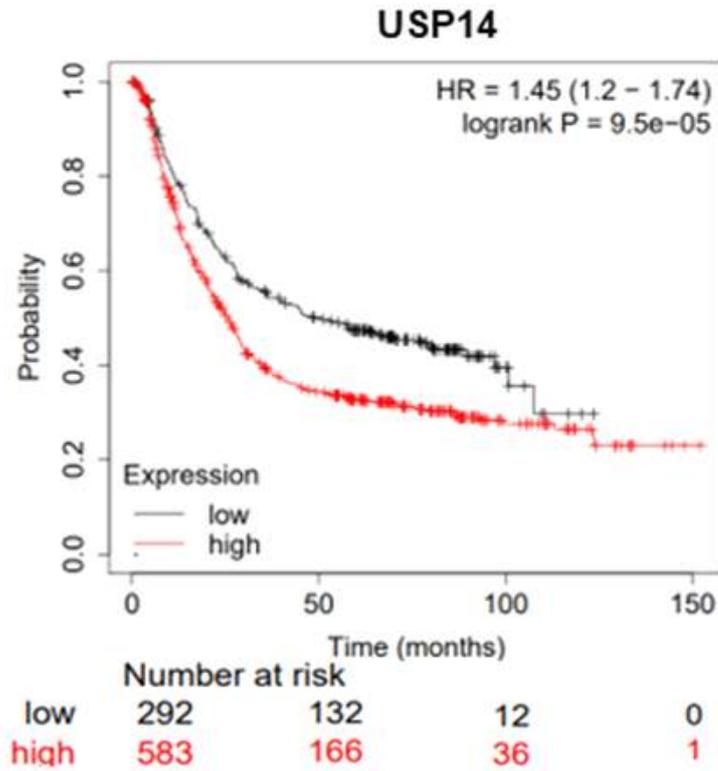


그림 1. 위암 환자의 USP14 발현 수준. USP14 발현이 높은 (빨간색 선) 및 낮은 (검은색 선) 환자의 두 그룹 사이의 전체 생존에 대한 Kaplan-Meier 곡선이다. USP14 발현이 높은 환자의 생존률이 더 낮은 것을 확인 할 수 있다 ( $P < 0.0001$ ).

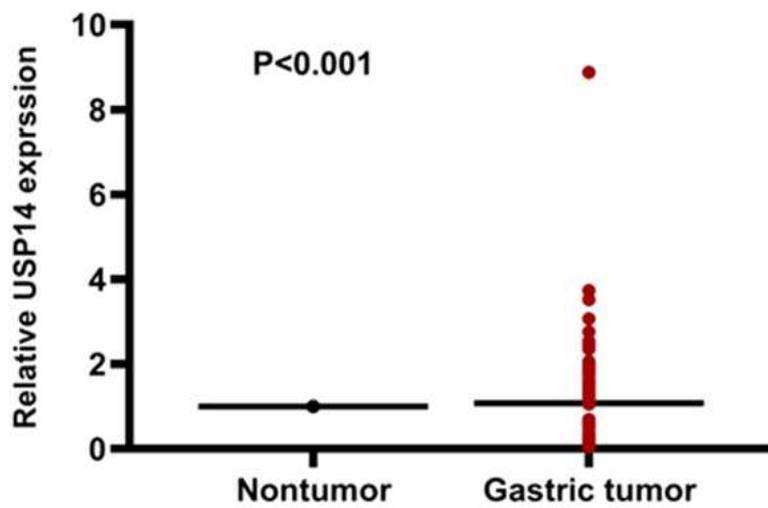


그림 2. 위암 환자의 조직에서 확인한 USP14 mRNA level. 위암 환자의 종양 조직 (빨간색 선) 및 인접한 비종양 조직 (검은색 선) 사이의 USP14 mRNA 발현 정도를 비교하였으며 종양 조직에서 USP14의 발현양이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다 ( $P < 0.001$ ).

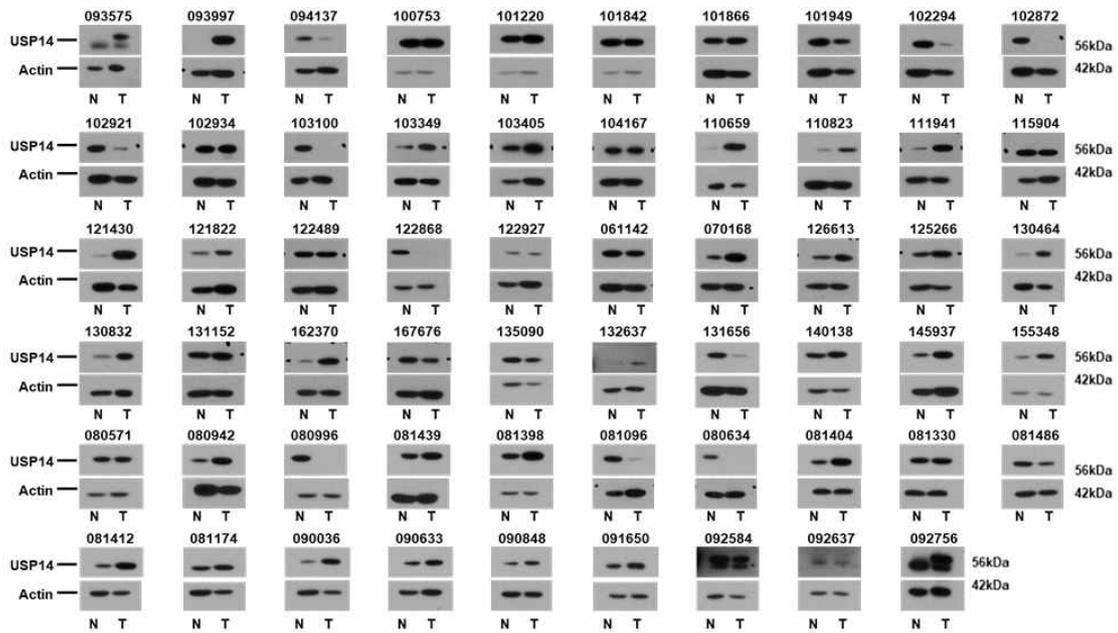


그림 3. 위암 환자의 조직에서 확인한 USP14 protein level. 59명의 위암 환자의 종양 조직 및 인접한 비종양 조직 사이의 USP14 단백질의 차이를 Immunoblotting으로 비교하였으며 종양 조직에서 USP14이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다.

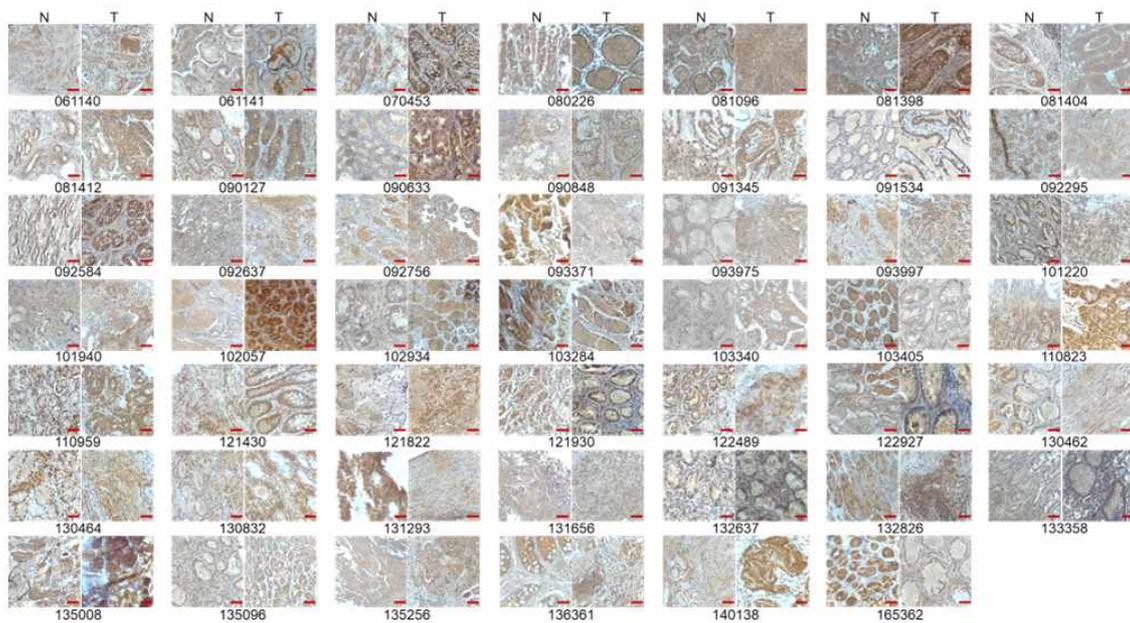


그림 4. 위암 환자의 조직에서 확인한 USP14 protein level. 48명의 위암 환자의 종양 조직 및 인접한 비종양 조직 사이의 USP14 단백질의 차이를 Immunohistochemistry (IHC)를 통해 비교하였으며 종양 조직에서 USP14이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다. Scale bar = 100  $\mu$ m

## 2. USP14 억제제 IU1이 위암 세포 성장에 미치는 영향

종양 형성에서 USP14의 역할을 확인하기 위해 위암 세포주 MKN74 및 SNU216의 세포에서 종양 세포 증식에 대한 IU1의 USP14 억제 효과를 평가했다. IU1 처리는 DMSO가 처리된 대조군 세포와 비교하여 세포 증식에서 상당한 감소를 초래했다 (그림 5A). 100  $\mu$ M 농도의 IU1은 위암 세포주에서 급격한 세포 증식 억제를 보여주었기 때문에 colony 형성 분석 시에 동일한 농도를 처리하였다. IU1의 처리는 MKN74, SNU216 두 세포의 colony 형성을 억제하였다 (그림 5B). 또한, Transwell migration 분석 및 Wound healing 분석을 사용하여 위암 세포의 이동 억제 효과를 조사하였다. IU1이 처리된 세포가 대조군 세포에 비해 이동을 현저히 감소시켰음을 보여주었다 (그림 6A, B). Transwell invasion 분석에서도 IU1의 처리는 세포의 침습을 감소시켰다 (그림 7) 따라서 IU1에 의한 USP14의 저해는 위암 세포의 증식, 이동 및 상처 치유를 효과적으로 억제함을 확인하였다.

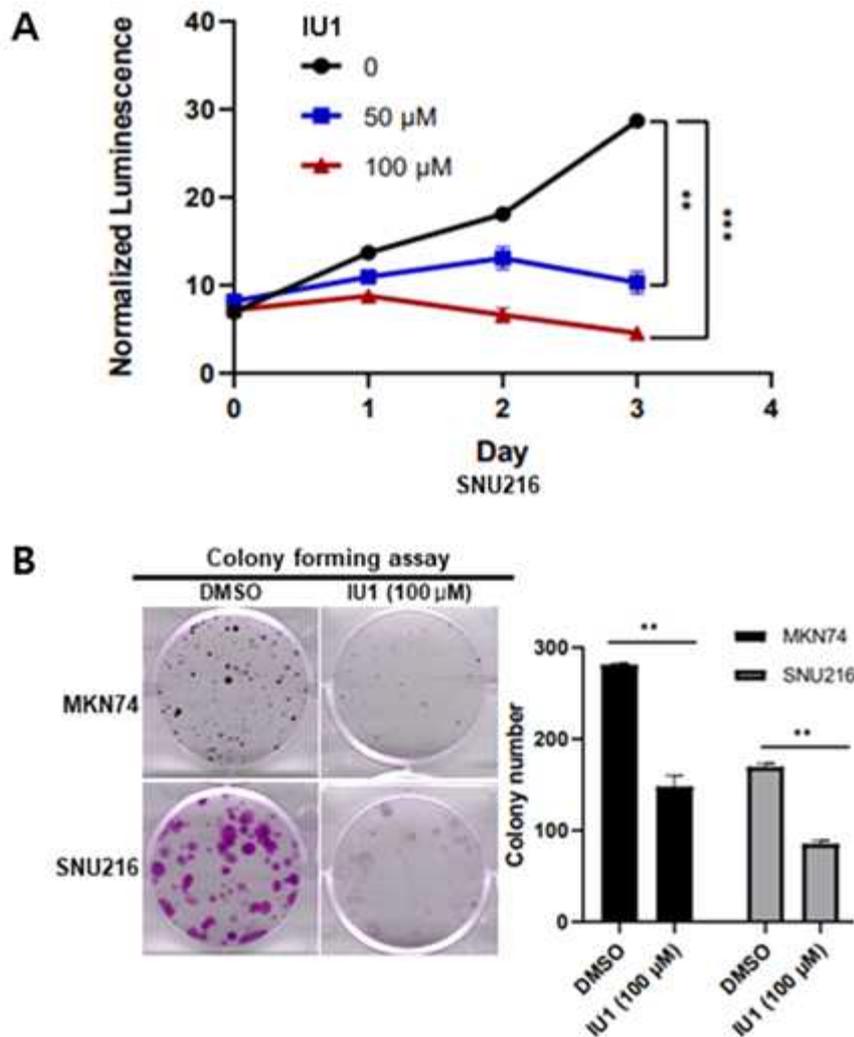


그림 5. IU1을 사용한 USP14 억제제가 위암세포의 성장에 미치는 영향. (A) SNU216 세포에 IU1 (50  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M)처리 후 세포 증식을 확인하였다. 세포 성장은 IU1의 농도에 따라 감소하였다. (B) MKN74 및 SNU216 세포에 DMSO 또는 IU1 (100  $\mu$ M) 처리한 후에 10일 배양하고 crystal violet에 의해 염색되었다. IU1 처리하였을 때 colony 형성이 감소하여 IU1이 장기적인 세포 증식에도 영향을 줄을 확인하였다. IU1에 의한 USP14 억제 효과를 확인하였다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

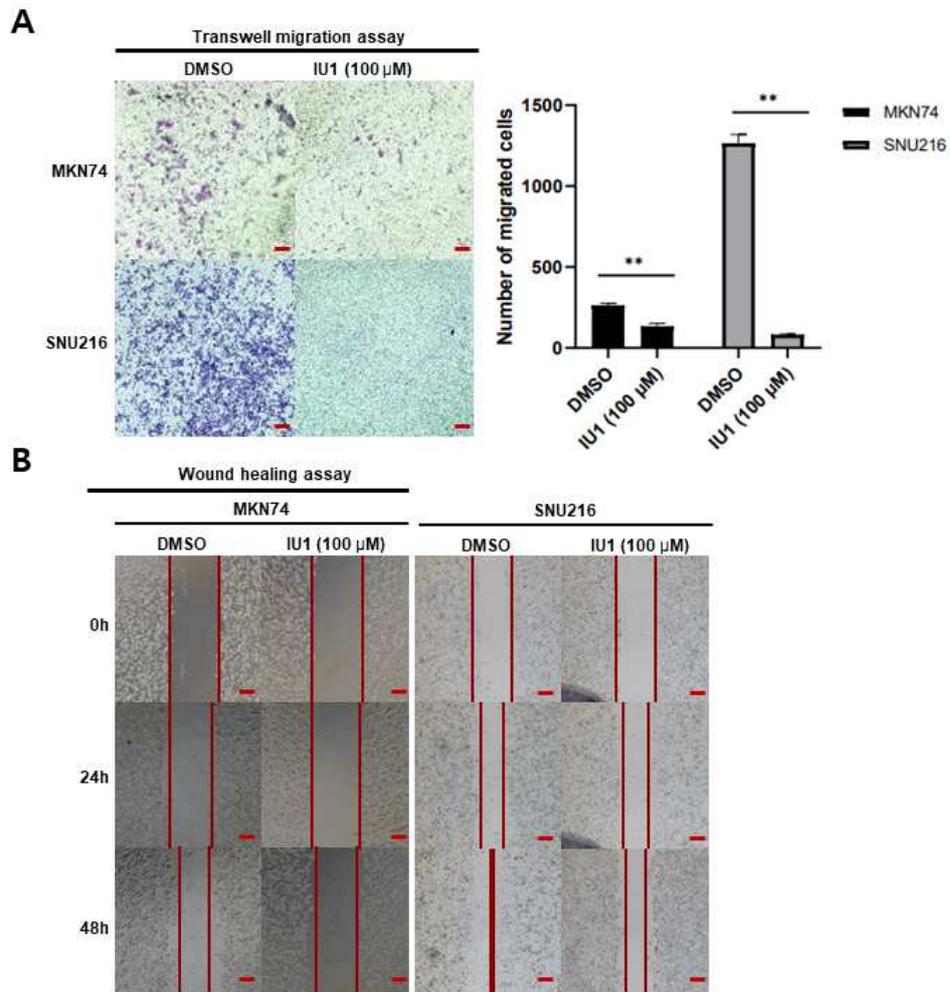


그림 6. IU1을 사용한 USP14 억제제가 위암세포의 이동에 미치는 영향. (A) MKN74 및 SNU216 세포에 IU1 (100  $\mu$ M)처리 후 48시간 지난 후에 Transwell에서 세포의 이동을 확인하였다. 세포 이동이 IU1 (100  $\mu$ M) 처리시에 감소하였다. (B) MKN74 및 SNU216 세포에 Wound를 형성하고 DMSO 또는 IU1 (100  $\mu$ M) 처리하였고 세포의 이동 정도를 시간에 따라 측정하였다. IU1을 처리하였을 때 세포 이동이 감소하였다. IU1에 의한 위암 세포의 이동 억제 효과를 확인하였다. Scale bar = 100  $\mu$ m,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , and  $***P < 0.001$ .

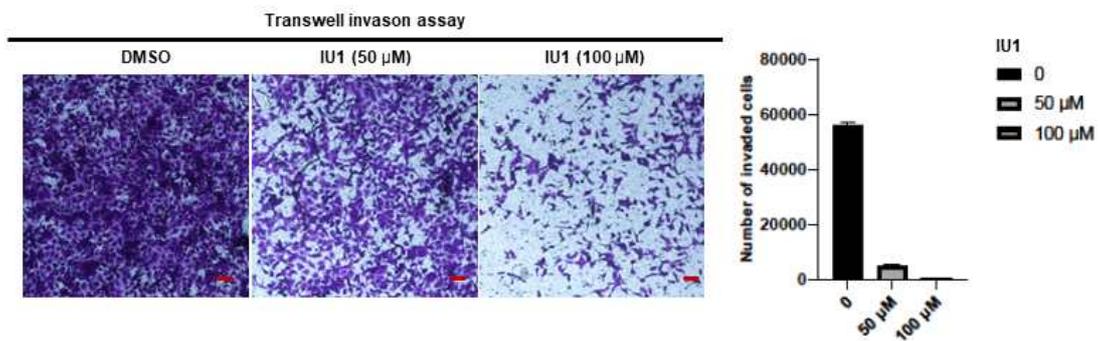


그림 7. IU1을 사용한 USP14 억제제가 위암 세포의 침습에 미치는 영향. 위암 세포의 침습을 확인하기 위해 Transwell에 matrigel을 처리한 후에 SNU216 세포를 배양하였으며 IU1이 농도별로 처리되었다. SNU216 세포의 침습은 IU1의 처리 농도에 따라 감소함을 확인하였다.

### 3. siRNA를 이용한 USP14 억제가 위암 세포 성장에 미치는 영향

위암에서 세포 증식, colony 형성, 이동 및 상처 치유에 대한 USP14의 역할을 추가로 입증하기 위해 MKN74 및 SNU216 세포에서 siRNA를 사용하여 USP14 발현을 억제하였다. MKN74 및 SNU216 세포를 두 개의 USP14 siRNA로 형질 감염시킨 후 USP14 발현이 효과적으로 감소하는 것을 확인하였다 (그림 8). SNU216 세포에서 USP14의 Knock down은 세포 성장을 현저히 감소시켰다 (그림 9A, B). 뿐만 아니라 USP14 Knock down은 colony 형성, Transwell migration 분석 및 Wound healing 분석에서 이동 및 상처 치유 능력을 상당히 감소시키는 것으로 확인되었으며 (그림 10A, B), 이러한 결과는 USP14의 발현 억제가 위암 형성을 억제할 수 있음을 보여주었다.

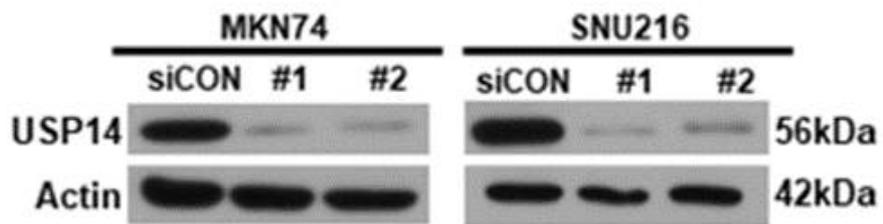


그림 8. siRNA를 통한 USP14 knockdown. MKN74 및 SNU216 세포에서 두 가지 siRNA를 이용하여 USP14을 knockdown 시켰으며 동일한 세포로 Cell Viability, Wound Healing, Colony Formation, and Invasion Assays 진행하였다.

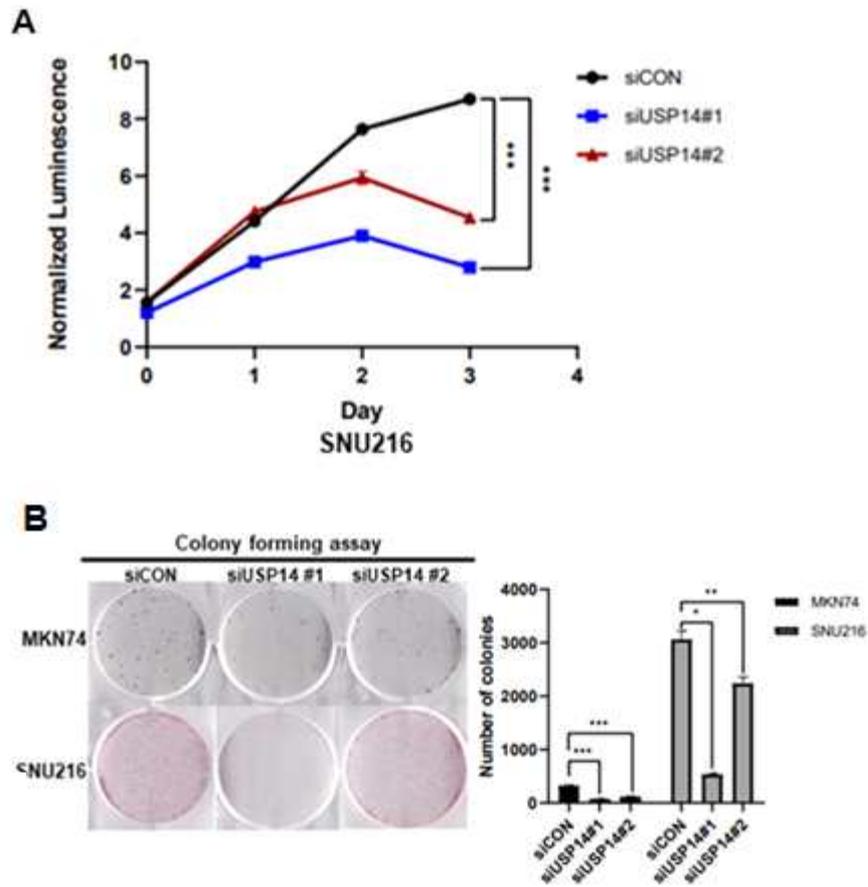


그림 9. siRNA를 사용한 USP14 knockdown이 위암세포의 성장에 미치는 영향. (A) SNU216 세포에 USP14 knockdown 시키고 세포 증식을 확인하였다. 세포 성장은 USP14 knockdown 되었을 때 유의하게 감소하였다. (B) MKN74 및 SNU216 세포에 USP14 knockdown 시킨 후에 10일 배양하고 crystal violet에 의해 염색되었다. USP14 knockdown 하였을 때 colony 형성이 감소하여 siUSP14이 장기적인 세포 증식에도 영향을 줄을 확인하였다. siUSP14에 의한 USP14 억제 효과를 확인하였다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

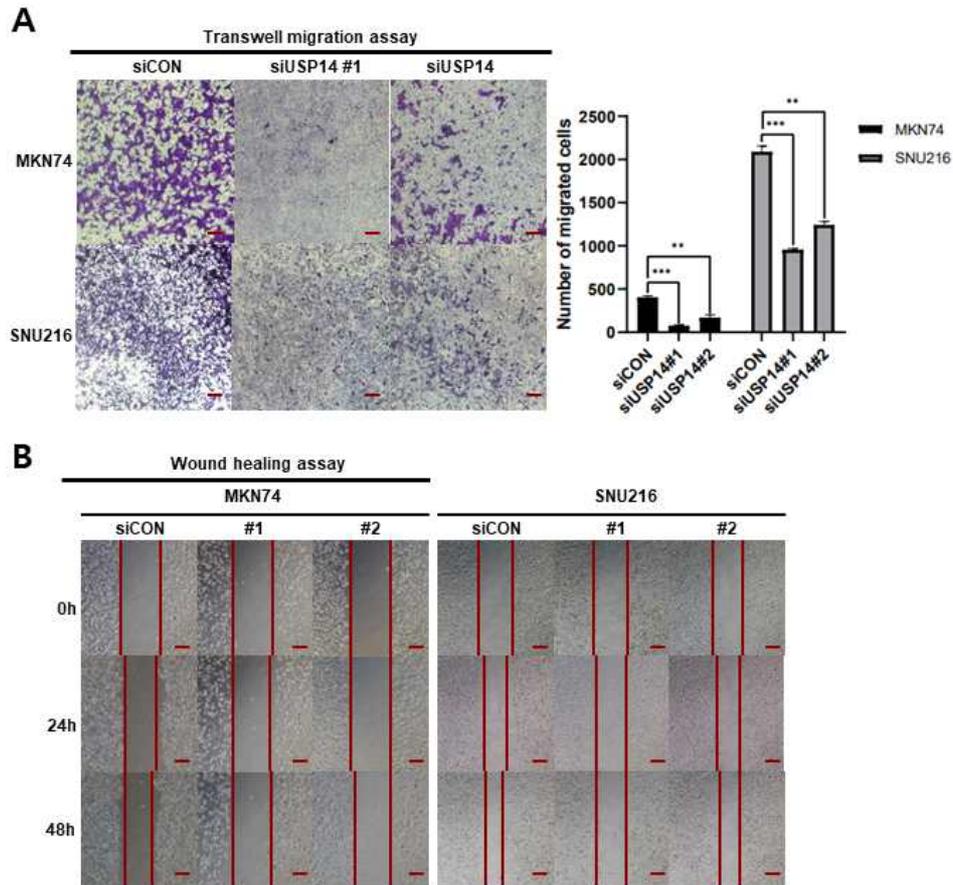


그림 10. siRNA를 사용한 USP14 knockdown이 이동에 미치는 영향. (A) MKN74 및 SNU216 세포에 USP14 knockdown 후 48시간 지난 후에 Transwell에서 세포의 이동을 확인하였다. 세포 이동이 USP14 knockdown 처리시에 감소하였다. (B) MKN74 및 SNU216 세포에 Wound를 형성하고 siControl 또는 siUSP14 처리하였고 세포의 이동 정도를 시간에 따라 측정하였다. siUSP14 처리하였을 때 세포 이동이 감소하였다. USP14 knockdown에 의한 위암 세포의 이동 억제 효과를 확인하였다. Scale bar = 100  $\mu$ m \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001.

#### 4. USP14 억제를 통한 위암 세포의 사멸

암 세포 증식 억제에서 IU1 및 USP14 Knock down의 하위 신호전달 메커니즘을 검증하기 위해 MKN74 및 SNU216 세포에서 세포사멸 및 자가포식 관련 단백질의 발현을 확인했다. IU1을 처리한 두 세포주에서 PARP, Caspase3 및 p21과 같은 세포사멸 관련 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (그림 11). autophagy 관련 단백질인 LC3 I 및 II와 Beclin-1의 발현 수준은 IU1 처리 후에도 변하지 않았다 (그림 12). 또한 절단된 PARP 단백질에 의한 세포사멸 유도는 IU1 처리에 따라 시간 의존적으로 증가하였다 (그림 13). IU1 처리는 AKT 신호전달 경로를 불활성화 시킴을 확인하였다 (그림 14). IU1 처리를 통해 확인된 결과들이 USP14 발현 억제에 의해서도 발생하는지 확인하기 위해 USP14 Knock down된 세포에서 PARP, Caspase3 및 p21과 같은 세포사멸 관련 단백질의 변화를 확인하였다 (그림 15). IU1 사용과 마찬가지로 USP14 Knock down은 autophagy 관련 단백질인 LC3 I 및 II와 Beclin-1의 발현 수준은 변화시키지 않았다 (그림 16). 이후 MKN74 및 SNU216 세포에서 annexin-V에 대해 양성으로 염색된 세포사멸 세포를 검출하여 USP14 단백질과 관련된 세포사멸 메커니즘을 확인하였다. FACS 분석은 IU1이 처리되거나 USP14 발현이 억제된 세포가 세포사멸을 유도함을 추가로 확인하였다 (그림 17). MKN74 세포에 USP14이 과발현되고 IU1로 처리되었을 때, PARP의 수준은 USP14에 의해 조절되었다 (그림 18). 종합하면, 이러한 결과는 IU1 또는 USP14 녹다운에 의한 USP14 억제가 세포사멸 메커니즘을 통해 위암 성장을 감소시킨다는 것을 보여준다.

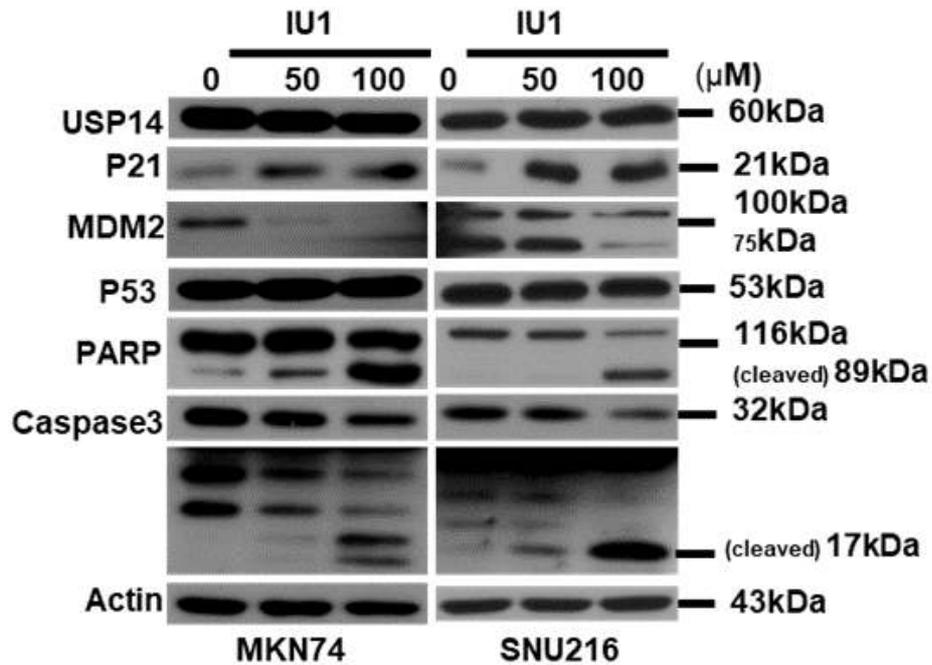


그림 11. IU1이 위암 세포의 세포사멸에 미치는 영향. MKN74 및 SNU216 세포에 USP14 inhibitor인 IU1 처리 후 48시간 지난 후에 세포사멸이 진행되는 과정에서 확인 할 수 있는 PARP, Caspase, P21, MDM2의 발현양을 확인하였다. IU1의 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가함을 확인할 수 있다.

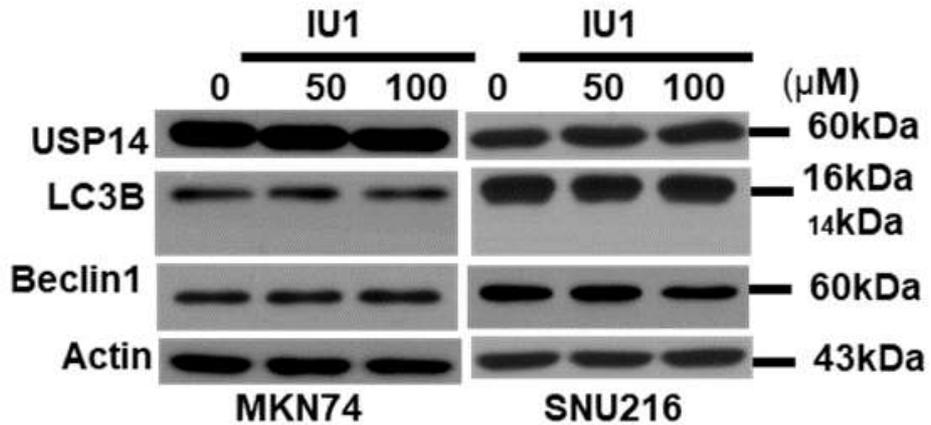


그림 12. IU1이 위암 세포의 자가포식에 미치는 영향. MKN74 및 SNU216 세포에 USP14 inhibitor인 IU1 처리 후 48시간 지난 후에 자가포식이 진행되는 과정에서 확인 할 수 있는 LC3B 및 Beclin1의 발현양을 확인하였다. IU1의 농도가 증가했음에도 불구하고 위암 세포의 자가포식은 변함이 없는 것을 확인할 수 있다.

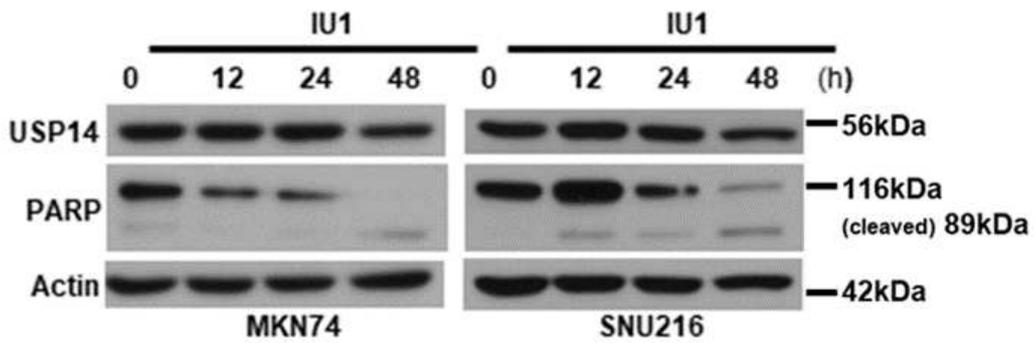


그림 13. IU1이 위암 세포의 세포사멸에 미치는 영향. MKN74 및 SNU216 세포에 USP14 inhibitor인 IU1 처리 후에 시간별로 세포사멸이 진행되는 것을 확인하였다.

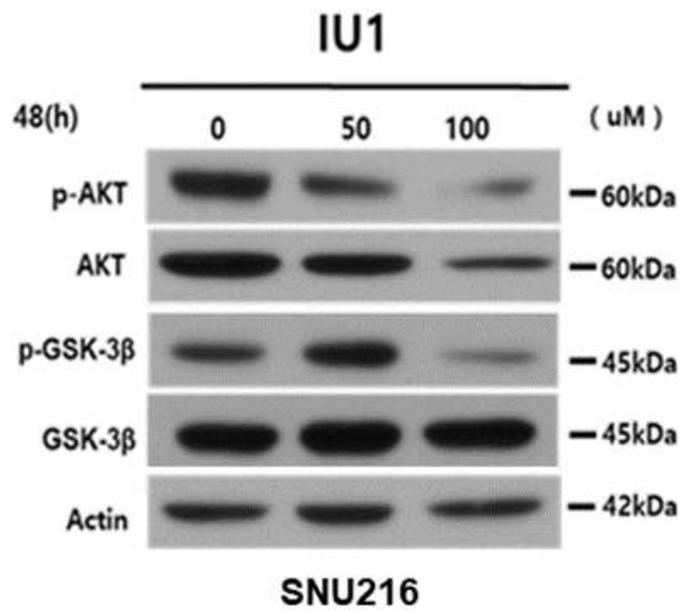


그림 14. IU1이 AKT 신호경로에 미치는 영향. SNU216 세포에서 USP14 inhibitor 인 IU1을 농도별로 처리하였고 48시간 뒤에 p-AKT, AKT, p-GSK3B, GSK3를 확인하였고 IU1의 처리는 AKT 신호전달 경로를 불활성화 시킴을 확인하였다.

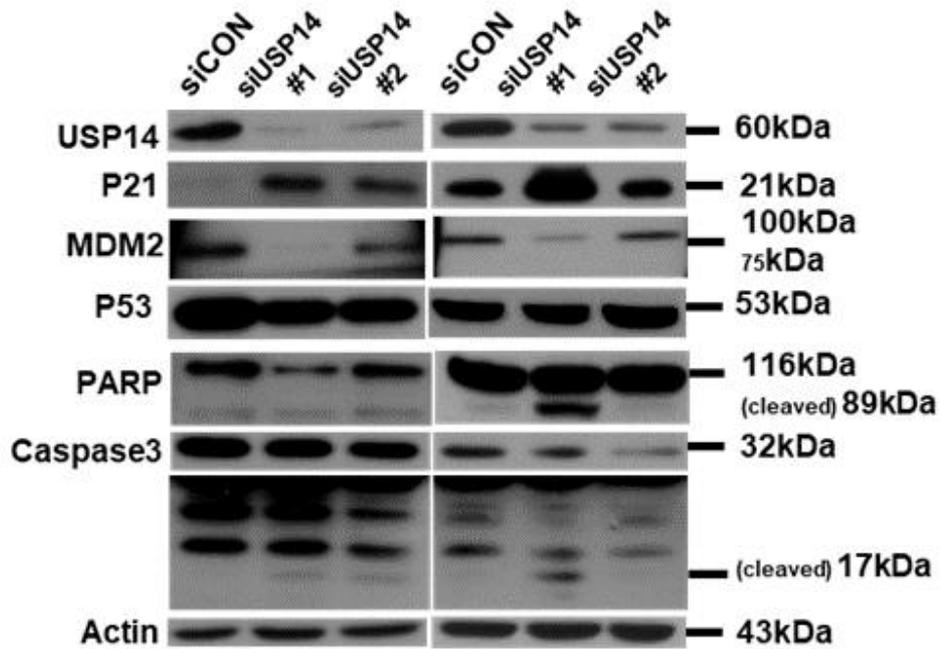


그림 15. siUSP14이 위암 세포의 세포사멸에 미치는 영향. MKN74 및 SNU216 세포에 siUSP14 처리 후 48시간 지난 후에 세포사멸이 진행되는 과정에서 확인 할 수 있는 PARP, Caspase3, P21, MDM2의 발현양을 확인하였다. IU1의 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가함을 확인할 수 있다.

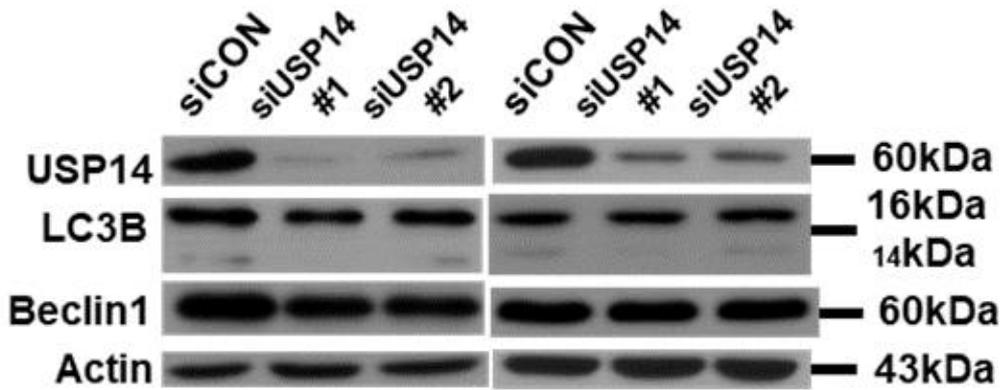


그림 16. siUSP14이 위암 세포의 자가포식에 미치는 영향. MKN74 및 SNU216 세포에 siUSP14 처리 후 48시간 지난 후에 자가포식이 진행되는 과정에서 확인 할 수 있는 LC3B 및 Beclin1의 발현양을 확인하였다. USP14이 knockdown 되었음에도 불구하고 위암 세포의 자가포식은 변함이 없는 것을 확인할 수 있다.

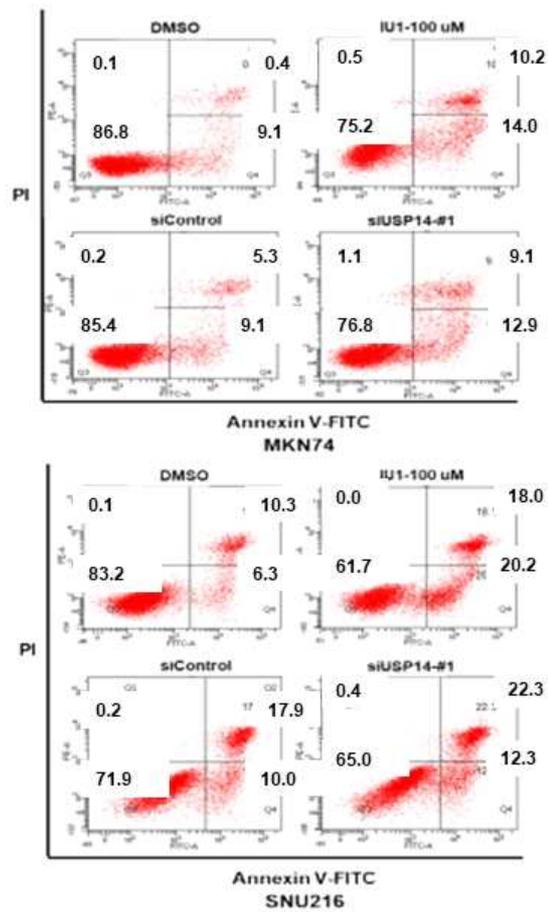


그림 17. IU1 처리 혹은 siUSP14 인한 세포 사멸을 유세포 분석기를 통해 검증 (A) MKN74세포에 IU1 100  $\mu$ M 혹은 siUSP14 처리하고 48시간 배양 후, 세포를 떼어내고 Cold PBS로 washing 후 FACS buffer에서 PI와 Annexin V-FITC로 staining을 진행하였다. 유세포 분석기를 통해 분석한 결과 IU1 및 siUSP14 처리 세포군의 세포 사멸 정도가 대조군에 비해 증가한 것을 확인함. (B) SNU216 세포에 IU1 100  $\mu$ M 혹은 siUSP14 처리하고 48시간 배양 후, 세포를 떼어내고 Cold PBS로 washing 후 FACS buffer에서 PI와 Annexin V-FITC로 staining을 진행하였다. 유세포 분석기를 통해 분석한 결과 IU1 및 siUSP14 처리 세포군의 세포사멸 정도가 대조군에 비해 증가한 것을 확인함.

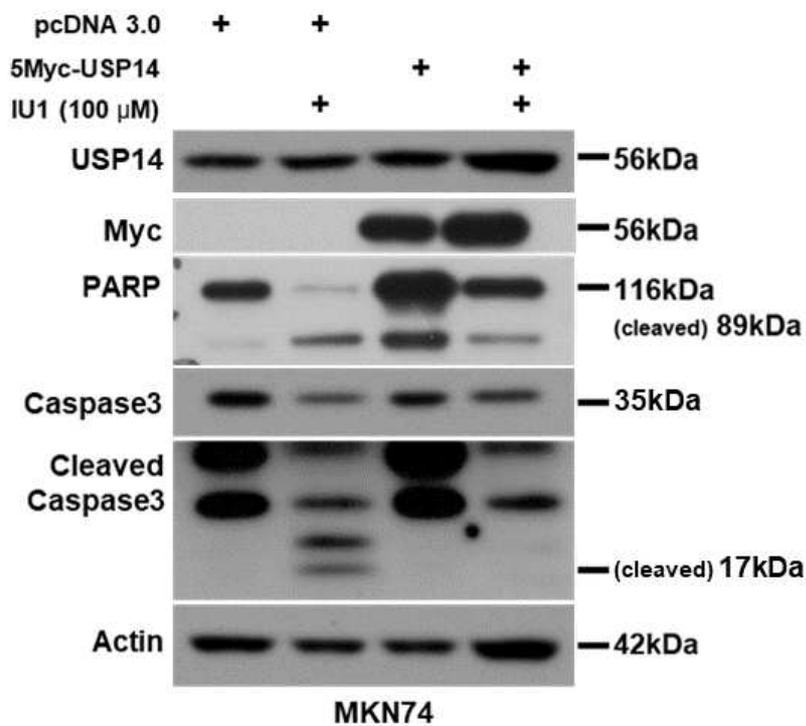


그림 18. IU1으로 인한 세포사멸 관련 단백질의 증가를 USP14 과발현으로 억제할 수 있음. MKN74 세포에 100  $\mu$ M 혹은 5MYC-USP14 처리함. 48시간 배양 후, 세포를 수거하여 명시한 항체들로 Western blot 분석한 결과 IU1을 단독으로 처리한 세포에서 증가했던 PARP cleaved form과 cleaved Caspase3가 USP14 과발현을 통해 다시 감소하는 것을 확인함.

## 5. USP14 억제제가 5-FU 내성 위암 세포에 미치는 영향

위암 치료에서 항암제 내성은 문제가 되고 있기 때문에 5-FU 내성 위암 세포에서 IU1이나 siUSP14의 처리가 5-FU에 대한 민감도를 증가시킬 수 있는지 확인하였다. 그 결과 SNU620 세포에 IU1과 5-FU를 함께 적용하면 5-FU 단독 적용에 비해 SNU620의 세포사멸이 증가하는 것으로 나타났으며 (그림 19A, B), 세포 성장 억제와 관련하여 동일한 효과가 나타났다. 5-FU 저항성 SNU620 세포에서 5-FU 단독 처리 시 세포사멸이 일어나지 않았으나 IU1과 5-FU를 함께 처리하였을 때 세포사멸이 증가하였고 (그림 20A, B), 세포 성장 억제에 대해서도 동일한 효과를 보였다. 이러한 결과는 IU1이 5-FU 내성을 극복하는데 효과적이라는 것을 보여준다.

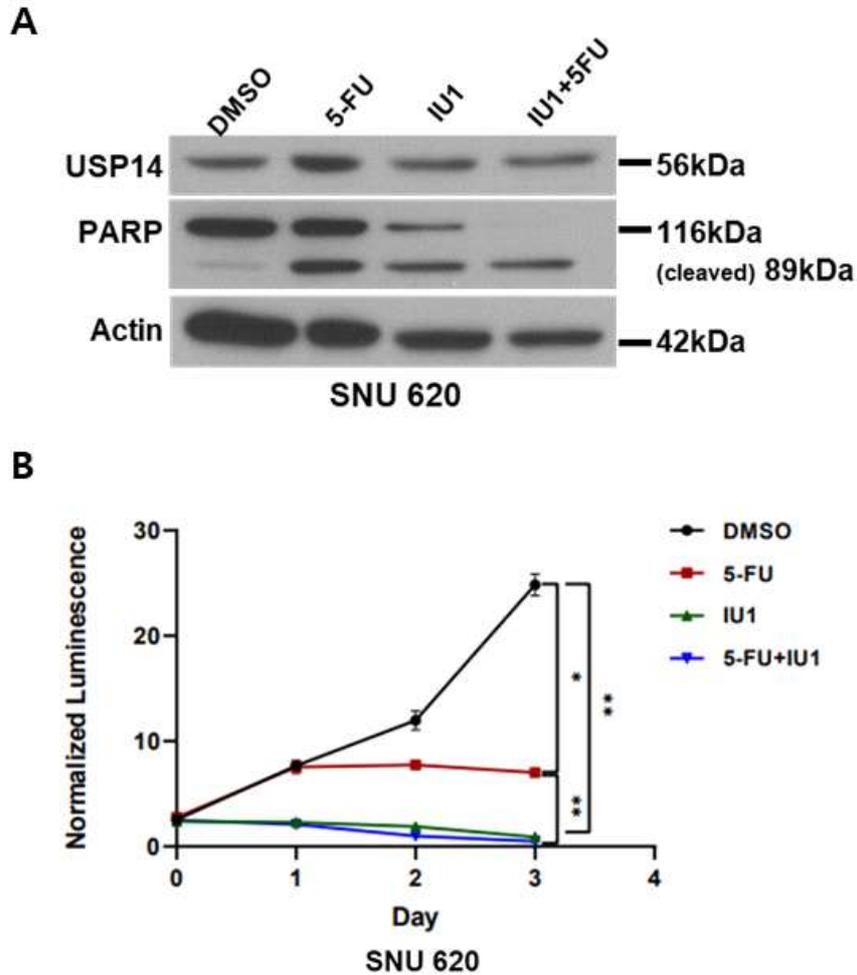


그림 19. IU1 처리가 SNU620 세포의 5-FU 항암제에 대한 민감도를 증가시킴. (A) SNU620 세포에 5-FU 100  $\mu$ M 혹은 IU1 100  $\mu$ M을 처리함. 48시간 배양 후, 세포를 수거하여 명시한 항체들도 western blot을 시행함. 그 결과, 5-FU와 IU1을 처리한 실험군에서 PARP cleaved form이 대조군에 비해 증가한 것을 확인함. (B) SNU620 세포를 96-well white bottom dish에 깔고 5-FU 100  $\mu$ M 혹은 IU1 100  $\mu$ M을 처리함. 이후 0시간부터 시작하여 24시간 간격으로 72시간까지 Cell Titer-Glo 발광 분석법으로 세포 성장 정도를 측정함. 0시간 값을 기준으로 각각의 측정값을 상대적으로 분석한 결과, 5-FU를 단독으로 처리했을 때보다 IU1을 같이 처리했을 때 세포 성장 정도가 크게 감소하는 것을 확인함. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

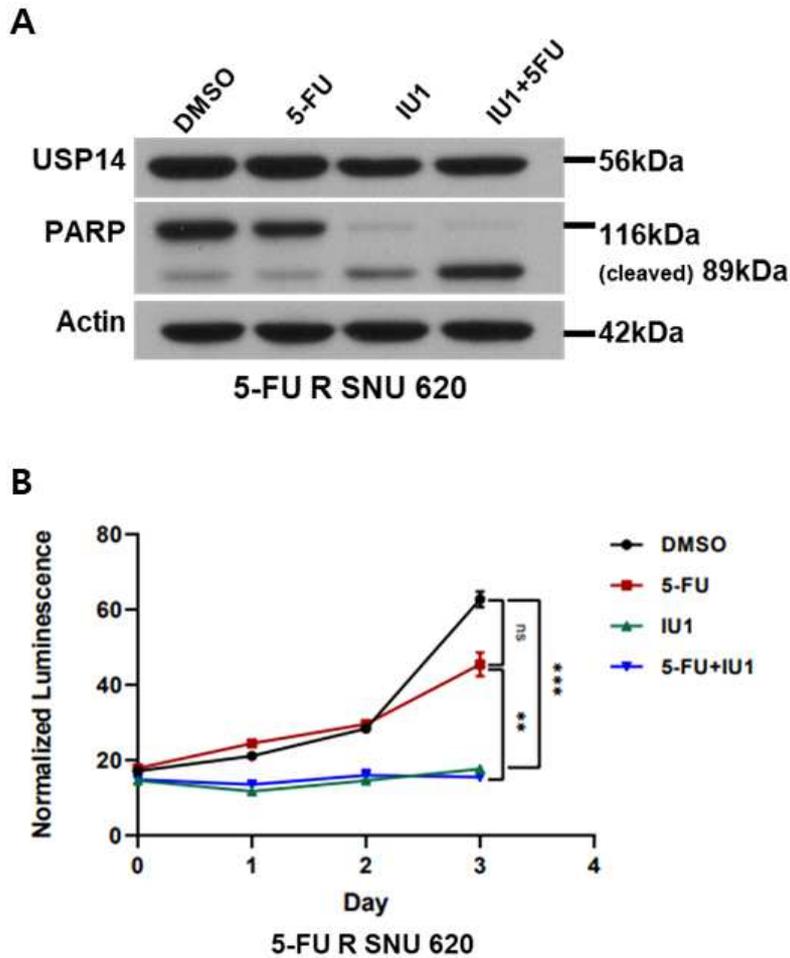


그림 20. IU1 처리가 5-FU 내성 SNU620 세포의 5-FU 저항성을 감소시킴. (A) 5-FU 내성 SNU620 세포에 5-FU 100  $\mu$ M 혹은 IU1 100  $\mu$ M을 처리함. 48시간 배양 후, 세포를 수거하여 명시한 항체들도 western blot을 시행함. 그 결과, 5-FU 단독 처리군과 대조군의 PARP cleaved form은 차이가 없지만, IU1을 동시에 처리한 실험군에서는 PARP cleaved form이 증가하는 것을 확인함. (B) 5FU-내성 SNU620 세포를 96-well white bottom dish에 깔고 5-FU 100  $\mu$ M 혹은 IU1 100  $\mu$ M을 처리함. 이후 0시간부터 시작하여 24시간 간격으로 72시간까지 Cell Titer-Glo 발광 분석법으로 세포 성장 정도를 측정함. 0시간 값을 기준으로 각각의 측정값을 상대적으로 분석한 결과 5-FU 단독 처리군과 대조군의 세포 성장 정도는 거의 차이가 없었지만, IU1을 같이 처리한 실험군에서 크게 감소하는 것을 확인함.

## V. 고찰 및 결론

위암은 사망률이 높으며 진행성 질환 환자에서는 표적 치료가 제한적이다<sup>30,31</sup>. 5-FU를 포함한 화학 요법은 진행성 위암의 표준 치료법이지만 많은 환자들이 이 약물에 내성을 갖게 되어 그 효과가 제한된다<sup>32,33</sup>. 본 연구는 위암 종양 형성에서 USP14의 역할을 규명하고, 진행성 위암에서 USP14를 새로운 치료 표적으로 사용할 가능성을 입증하는 것을 목적으로 하였다.

다양한 DUB 중에서 USP14는 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) 및 Wnt/ $\beta$  카테닌 신호 전달 경로를 비롯한 다양한 정규 세포 신호 전달 경로에 광범위하게 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>29</sup>. USP14의 조절 장애는 여러 병리학적 상태와 관련이 있으며 다양한 암 (두경부암, 유방암, 폐암 및 위암 조직 포함)<sup>34</sup>에서 높게 발현되며 불량한 예후와 관련이 있다<sup>35</sup>. USP14 발현이 위암에서 증가되어 있음을 확인하였고 USP14 억제제 IU1 또는 siRNA를 통한 USP14 표적 억제가 위암 세포 성장을 감소시키는 것을 확인했다. 이러한 결과는 USP14가 위암의 바이오마커 및 치료 표적으로 사용될 수 있음을 시사한다.

이전 연구에서 USP14 억제제가 폐암에서 세포 증식을 조절하지만 세포사멸이 아닌 자가포식을 통해 조절한다는 것을 확인하였고 위암에서 USP14 억제는 Akt 및 ERK 신호 경로의 불활성화를 통해 세포사멸을 유도하는 것으로 밝혀졌다<sup>21</sup>. 앞서 언급한 바와 같이 진행성 위암은 5-FU 내성으로 인해 5-FU 기반 화학요법의 반응률이 32% 미만이며, 그로 인해 5-FU 내성을 극복하는 치료법의 개발이 절실한 상황이다. dihydropyrimidine dehydrogenase에 의한 5-FU의 분해, deoxyuridine triphosphatase 활성 증가, thymidylate synthase의 과발현, BCL2, BCL-XL 및 BCL2 family MCL1는 5-FU 저항성과 관련된 메커니즘으로 확인되고 있다<sup>36,37</sup>. 본 연구에서 IU1 및 USP14 녹다운을 이용한 USP14의 억제는 5-FU 저항성 위암 세포의 5-FU 민감도를 증가시켰고, 결과적으로 두 약물의 병행 사용이 5-FU 저항성 위암 치료에 대한 새로운 전략이 될 수 있음을 보여주었다.

결론적으로, USP14는 세포사멸 경로를 통해 위암 세포 성장을 조절하며 세포사멸을 일으킨다. 뿐만 아니라 USP14 억제는 5-FU 내성을 극복한다. 본 연구는 USP14가 위암 진단 및 치료에 유용한 바이오마커이자 진행성 위암에 대한 가치 있는 치료 표적임을 시사한다. 그러나 USP14 inhibitor가 5-FU 내성을 극복하는 명확한 기전을 규명하고 진행성 위암 환자에서 USP14 inhibitor 사용의 유효성을 검증하기 위한 추가 연구가 필요할 것이다.

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>USP14</b>	5'-GCAGAGAAGGGCGAACAAAG-3'	5'-TGTTGCAGGACTCTCATCATTG-3'
<b>GAPDH</b>	5'-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3'	5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3'

⌘ 1. RT-RCR primer sequence.

siUSP14 #1	5'- GUU GAG AGC UUC AGG AGA A - 3'
siUSP14 #2	5'- GGA UAC AAA UGA UGA GAG U - 3'

⌘ 2. siRNA sequence.

## VI. 참고문헌

- 1 Thrift, A. P. & Nguyen, T. H. Gastric Cancer Epidemiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am***31**, 425-439 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.giec.2021.03.001>
- 2 Alsina, M., Arrazubi, V., Diez, M. & Tabernero, J. Current developments in gastric cancer: from molecular profiling to treatment strategy. *Nat Rev Gastroenterol Hepato*(2022). <https://doi.org:10.1038/s41575-022-00703-w>
- 3 Al-Batran, S. E. *et al.* Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet***393**, 1948-1957 (2019). [https://doi.org:10.1016/S0140-6736\(18\)32557-1](https://doi.org:10.1016/S0140-6736(18)32557-1)
- 4 Di Martino, M. *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable colorectal liver metastases: an international multicentre propensity score matched analysis on long-term outcomes according to established prognostic risk scores. *HPB (Oxford)***23**, 1873-1885 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.hpb.2021.04.026>
- 5 Smyth, E. C. *et al.* Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Onco***27**, v38-v49 (2016). <https://doi.org:10.1093/annonc/mdw350>
- 6 Viale, P. H. The American Cancer Society's Facts & Figures: 2020 Edition. *J Adv Pract Onco***11**, 135-136 (2020). <https://doi.org:10.6004/jadpro.2020.11.2.1>
- 7 Harrigan, J. A., Jacq, X., Martin, N. M. & Jackson, S. P. Deubiquitylating enzymes and drug discovery: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov***17**, 57-78 (2018). <https://doi.org:10.1038/nrd.2017.152>
- 8 Peth, A., Besche, H. C. & Goldberg, A. L. Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S

- gate opening. *Mol Cell***36**, 794-804 (2009).  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.015>
- 9 Komander, D., Clague, M. J. & Urbe, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol***10**, 550-563 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2731>
- 10 Kwon, O. H.*et al.* Aberrant upregulation of ASCL2 by promoter demethylation promotes the growth and resistance to 5-fluorouracil of gastric cancer cells. *Cancer Sci***104**, 391-397 (2013). <https://doi.org/10.1111/cas.12076>
- 11 Kwon, Y. T. & Ciechanover, A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci***42**, 873-886 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.09.002>
- 12 Sun, T., Liu, Z. & Yang, Q. The role of ubiquitination and deubiquitination in cancer metabolism. *Mol Cancer***19**, 146 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01262-x>
- 13 Han, S.*et al.* The role of ubiquitination and deubiquitination in tumor invasion and metastasis. *Int J Biol Sci***18**, 2292-2303 (2022). <https://doi.org/10.7150/ijbs.69411>
- 14 Lee, C. S., Kim, S., Hwang, G. & Song, J. Deubiquitinases: Modulators of Different Types of Regulated Cell Death. *Int J Mol Sci***22**(2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22094352>
- 15 Jolly, L. A., Kumar, R., Penzes, P., Piper, M. & Gecz, J. The DUB Club: Deubiquitinating Enzymes and Neurodevelopmental Disorders. *Biol Psychiatry***92**, 614-625 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.03.022>
- 16 Li, Y.*et al.* Cerebellum abnormalities in idiopathic generalized epilepsy with generalized tonic-clonic seizures revealed by diffusion tensor imaging. *PLoS One***5**, e15219 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015219>
- 17 Schwertman, P., Bekker-Jensen, S. & Mailand, N. Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol***17**, 379-394 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.58>

- 18 An, T.*et al.*Research Progress for Targeting Deubiquitinases in Gastric Cancers. *Cancers (Basel)***14**(2022).  
<https://doi.org:10.3390/cancers14235831>
- 19 Zhu, Y.*et al.*USP14 de-ubiquitinates vimentin and miR-320a modulates USP14 and vimentin to contribute to malignancy in gastric cancer cells. *Oncotarget***8**, 48725-48736 (2017).  
<https://doi.org:10.18632/oncotarget.10706>
- 20 Liu, Y.*et al.*USP14 regulates cell cycle progression through deubiquitinating CDK1 in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)***54**, 1610-1618 (2022). <https://doi.org:10.3724/abbs.2022160>
- 21 Han, K. H.*et al.*USP14 Inhibition Regulates Tumorigenesis by Inducing Autophagy in Lung Cancer In Vitro. *Int J Mol Sci***20**(2019).  
<https://doi.org:10.3390/ijms20215300>
- 22 Yang, J. S.*et al.*USP14 Regulates Cancer Cell Growth in a Fatty Acid Synthase-Independent Manner. *Int J Mol Sci***22**(2021).  
<https://doi.org:10.3390/ijms222413437>
- 23 Fu, Y.*et al.*USP14 as a novel prognostic marker promotes cisplatin resistance via Akt/ERK signaling pathways in gastric cancer. *Cancer Med***7**, 5577-5588 (2018). <https://doi.org:10.1002/cam4.1770>
- 24 Chen, X. Y.*et al.*The m(6)A Reader YTHDF1 Facilitates the Tumorigenesis and Metastasis of Gastric Cancer via USP14 Translation in an m(6)A-Dependent Manner. *Front Cell Dev Bio***9**, 647702 (2021). <https://doi.org:10.3389/fcell.2021.647702>
- 25 Jang, B.*et al.*Fucoidan-coated CuS nanoparticles for chemo-and photothermal therapy against cancer. *Oncotarget***9**(2018).
- 26 Bhat, A. A.*et al.*The pyroptotic role of Caspase-3/GSDME signalling pathway among various cancer: A Review. *Int J Biol Macromol***242**, 124832 (2023). <https://doi.org:10.1016/j.ijbiomac.2023.124832>
- 27 Wang, D.*et al.*The molecular mechanisms of cuproptosis and its relevance to cardiovascular disease. *Biomed Pharmacother***163**, 114830 (2023). <https://doi.org:10.1016/j.biopha.2023.114830>
- 28 Demirtas, L.*et al.*Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian J Med Res***144**, 515-524 (2016).

- <https://doi.org/10.4103/0971-5916.200887>
- 29 Jung, H.*et al.*Deubiquitination of Dishevelled by Usp14 is required for Wnt signaling. *Oncogenesis***2**, e64 (2013).  
<https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.28>
- 30 Petryszyn, P., Chapelle, N. & Matysiak-Budnik, T. Gastric Cancer: Where Are We Heading? *Dig Dis***38**, 280-285 (2020).  
<https://doi.org/10.1159/000506509>
- 31 Pasechnikov, V., Chukov, S., Fedorov, E., Kikuste, I. & Leja, M. Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis. *World J Gastroentero***20**, 13842-13862 (2014).  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13842>
- 32 Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D. & Fang, X. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. *Tumour Bio***39**, 1010428317714626 (2017). <https://doi.org/10.1177/1010428317714626>
- 33 Chen, V. C., Huang, J. Y., Tzang, B. S., Hsu, T. C. & McIntyre, R. S. Synergistic Effects of the Combinational Use of Escitalopram Oxalate and 5-Fluorouracil on the Inhibition of Gastric Cancer SNU-1 Cells. *Int J Mol Sci***23**(2022). <https://doi.org/10.3390/ijms232416179>
- 34 Wang, F., Ning, S., Yu, B. & Wang, Y. USP14: Structure, Function, and Target Inhibition. *Front Pharmacol***12**, 801328 (2021).  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.801328>
- 35 Liu, B., Chen, J. & Zhang, S. Emerging role of ubiquitin-specific protease 14 in oncogenesis and development of tumor: Therapeutic implication. *Life Sci***239**, 116875 (2019).  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116875>
- 36 Kang, B. W., Kim, J. G., Kwon, O. K., Chung, H. Y. & Yu, W. Non-platinum-based chemotherapy for treatment of advanced gastric cancer: 5-fluorouracil, taxanes, and irinotecan. *World J Gastroentero***20**, 5396-5402 (2014).  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5396>
- 37 Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer***3**, 330-338 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrc1074>

## VIII. Abstract

Deubiquitinase enzymes (DUBs) are an essential component of the ubiquitin-proteasome system (UPS). They trim ubiquitin from substrate proteins thereby preventing them from degradation while modulating different cellular processes. Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) is a DUB that has mainly been studied for its role in the tumorigenesis of several cancers. In the pre-sent study, we found that the protein levels of USP14 were remarkably higher in gastric cancer tissues compared to adjacent normal tissues. We also demonstrated that inhibition of USP14 by IU1 (an USP14 inhibitor) or USP14-specific siRNA significantly reduced cell viability and the migratory and invasive capabilities of gastric cancer cells. Diminished cell proliferation was a result of increased apoptotic cells as seen from the higher expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP levels. Furthermore, an experiment using the USP14 inhibitor IU1 revealed that USP14 inhibition overcame 5-fluorouracil (5-FU) resistance in GC cells. Collectively, these findings indicate the critical roles of USP14 in gastric tumor progression and suggest its potential as a novel cancer therapeutic target.

**Keywords:** ubiquitin-specific protease 14; deubiquitinating enzyme; gastric cancer; apoptosis