



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

다발골수종세포에서 에리불린에 의한
세포 증식 억제 기전 연구

Study on the signaling mechanism of cell proliferation inhibition

by eribulin in multiple myeloma cells

울산대학교 대학원

의과학과

신예량

다발골수종세포에서 에리블린에 의한
세포 증식 억제 기전 연구

지도 교수 조재철

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 02월

울산대학교 대학원

의과학과

신예량

신예량의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 임 현 수



심사위원 조 재 철



심사위원 허 숙 경



울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 02 월

국문요약

배경: 다발골수종은 혈액암의 한 종류로 백혈구 중 B 림프구의 최종 성숙단계인 형질세포가 악성으로 전환되어 골수에서 비정상적으로 분화 및 증식하는 질환이다. 감염에 대하여 신체를 보호할 수 있는 항체를 생산하는 정상적인 형질세포와 달리 다발골수종은 단클론단백이라고 하는 M 단백을 생성하게 되고 혈액이나 소변에서 발견되는 것이 특징이다. 다발골수종을 치료하기 위해 화학항암요법과 면역치료법 등이 사용되고 있지만 다양한 부작용과 높은 재발율과 같은 이유로 여전히 완치가 어려운 질환이다. 에리블린은 halichondrin B 에서 얻어진 합성 케톤 유사체로 전이성 유방암이나 지방육종에 사용되고 있는 항암제이다. 그러나, 다발골수종에서 에리블린에 효과에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3)는 대부분의 암에서 종양 발생 및 진행에 기여하는 종양유전자로 다발골수종에서는 세포사멸을 억제하거나 골수유래억제세포를 활성화함으로써 다발골수종 진행에 관여한다. 따라서, 본 연구에서는 에리블린이 다발골수종 세포에서 STAT3 신호 전달 경로를 표적으로 하여 항종양효과가 있는지 확인하며 다발골수종의 치료제로서 어떤 효능을 보이는지에 대한 연구를 수행하였다.

방법: 다발골수종 세포주인 RPMI-8226, U266B1 에 에리블린을 72 시간 동안 처리한 후, MTS assay 와 BrdU assay 를 통해 세포 생존율과 세포 증식률을 확인하였다. Annexin V 염색을 통해 세포사를 확인하였고 caspase 활성도, Dioc₆(3) 염색과 이와 관련된 단백질 발현을 통해 세포 사멸 경로를 분석하였다. STAT3 신호 전달 경로와 그 하위 단백질 발현과 STAT3-siRNA 형질주입을 통해 이와 관련된 단백질의 발현을 Western blot 을 통해 분석하였다.

결과: 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 와 U266B1 에서 에리블린을 농도별로 72 시간 동안 처리한 후, 세포 생존율과 세포 증식률이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. RPMI-8226 세포에서 세포사 확인을 위해 Annexin V 양성 세포

비율을 유세포 분석을 통해 알아본 결과, 에리블린의 농도가 높아질수록 세포사가 발생하는 것을 확인하였다. Caspase 활성도와 관련 단백질인 Cleaved caspase -3, -7, -9 및 PARP-1 발현은 에리블린 농도가 높아짐에 따라 증가하는 것을 확인하였다. 또한, Dioc₆(3) 결과가 농도의존적으로 감소함에 따라 미토콘드리아 막 전위가 감소하는 것을 확인하였고 세포질 방향으로 Cytochrome C의 방출량이 증가하는 것을 확인하였다. 미토콘드리아 경로와 관련된 단백질인 Bcl-2의 발현은 감소하고, Bax와 Bak의 발현은 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 에리블린을 처리했을 때, p-STAT3와 STAT3의 발현이 감소했으며 이들의 하위 단백질인 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3의 발현 또한 감소하는 것을 확인하였다.

결론: 에리블린은 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 STAT3 신호 기전이 관여하여 세포증식을 억제하고 caspase의 활성화와 미토콘드리아의 막 전위 감소를 통해 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 에리블린이 다발골수종의 새로운 치료 약물로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

목 차

국문요약.....	i
목 차.....	iii
List of Figures	v
I. 서 론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	4
1. 시약 & 항체	4
2. 세포 배양.....	5
3. 세포 생존율 측정	5
4. 세포 증식률 측정	5
5. 세포사멸에 대한 유세포 분석	6
6. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석	6
7. 미토콘드리아 막전위에 대한 유세포 분석	6
8. Cytochrome C 방출량 분석.....	7
9. Western blot.....	7
10. STAT3 siRNA 형질주입	8
11. 통계 처리.....	8

III. 결과	9
1. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 세포 생존율과 세포 증식률 변화	9
2. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 Caspase family 활성화에 따른 세포사멸 기전.....	13
3. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 미토콘드리아 막 전위 변화와 세포사멸 기전.....	16
4. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 STAT3 와 하위 단백질 발현의 변화.....	18
IV. 고 찰	22
V. 참고문헌	26
영문요약	31

List of Figures

Figure 1. 에리블린의 화학구조	10
Figure 2. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 세포 생존율 변화	11
Figure 3. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 세포 증식률 변화	12
Figure 4. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리블린에 의한 세포사멸 변화.....	14
Figure 5. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리블린에 의한 Caspase family 활성화와 세포사멸 변화.....	15
Figure 6. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리블린에 의한 미토콘드 리아 탈분극화 현상으로 인한 세포사멸 유도.....	17
Figure 7. 다발골수종 세포인 RPMI-8226 세포에서 에리블린에 의한 STAT3 와 하위 단백질 발현의 변화.....	19
Figure 8. 다발골수종에서 에리블린에 의한 세포 증식 억제 기전 요약도	21

서론

다발골수종은 혈액암의 한 종류로 백혈구 중 B 림프구의 최종 성숙단계인 형질세포가 악성으로 전환되어 골수에서 비정상적으로 분화 및 증식하는 질환이다. 감염에 대항하여 신체를 보호할 수 있는 항체를 생산하는 정상적인 형질세포와 달리 다발골수종은 단클론단백이라고 하는 M 단백을 생성하게 되고 이 M 단백질이 혈액이나 소변에서 발견되는 것이 특징이다 [1-2]. 다발골수종은 비호지킨 림프종에 이어 두 번째로 흔한 악성종양으로 전체 암 중에서는 1%, 전체 혈액학적 악성종양 중에서는 10%를 차지한다. 2018 년에 전 세계적으로 발생한 다발골수종 환자는 약 160,000 명이며 사망한 환자는 106,000 명에 달하는 것으로 추정된다 [3-5]. 국내에서는 세번째로 흔한 혈액학적 악성종양으로 최근 몇 년 동안 신규 환자는 꾸준히 증가추세를 보이고 있다 [6-7]. 다발골수종에 치료하기 위해 사용되는 치료법 중 가장 기본적인 치료법은 화학요법으로 기존 치료법인 멜팔란 (melphalan)이나 시클로포스파미드 (cyclophosphamide)와 같은 알킬화제와 덱사메타손 (dexamethasone)이나 프레드니손 (prednisone)과 같은 코르티코스테로이드가 있으며 탈리도마이드 (thalidomide), 레날리도마이드 (lenalidomide), 포말리도마이드 (pomalidomide)와 같은 면역조절제가 있다. 또한, 다발골수종 치료에 있어서 1 차 치료제로 사용되는 프로테아좀 억제제인 보르테조밍 (bortezomi)이 있으며 익사조밍 (ixazomib), 마리조밍 (marizomib), 카르필조밍 (carfilzomib), 델란조밍 (delanzomib), 오포조밍 (oprozomib)과 같은 2 세대 프로테아좀 억제제는 치료효과를 향상시키고 약물 내성을 극복하며 부작용을 줄이기 위해 개발되었다. 다음으로 면역치료법인 CD38 과 signaling lymphocytic activation molecule F7 (SLAMF7)을 대상으로 하는 단일 클론 항체인 다라투맙 (daratumumab)과 엘로투주맙 (elotuzumab)이 표준 치료에 사용되었고 가장 최근에는 BCMA (B-cell maturation antigen)를 표적으로 하는 항체-약물 접합체 (antibody-drug conjugates), 이중 특이 항체 (bispecific antibodies) 및 키메라항원수용체(chimeric antigen receptor) T 세포치료제도 사용 중이다. 그러나

다발골수종을 치료하기 위한 다양한 치료옵션에도 불구하고 부작용과 높은 재발율 등과 같은 이유로 인해 여전히 완치가 어려운 질환으로 남아있다 [8-11].

Signal transducers and activators of transcription (STAT)은 리간드가 수용체에 결합하면 세포 내 신호전달을 활성화하여 세포증식, 분화 및 생존에 관여하는 잠재적인 전사인자이다. 포유류에서 STAT family 는 총 7 군으로 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6 를 포함하며 그 중 STAT3 와 STAT5 는 암 발병과 연관되어 있다 [12-13]. 특히, STAT3 는 유방암 [14], 폐암 [15], 흑색종 [16] 및 혈액암 [17-18]을 포함한 대부분의 암에서 종양 발생 및 진행에 기여하여 종양유전자로 여겨지고 있다. 다발골수종에서 STAT3 는 세포사멸을 억제함으로써 다발골수종의 진행에 직접적으로 관여하거나 골수에서 골수유래억제세포를 활성화함으로써 간접적으로 기여하는 것으로 알려져 있다 [18-19]. 이러한 STAT3 는 다발골수종 환자의 치료에 있어서 불리한 예후인자이다 [12]. 또한, 활성화된 STAT3 는 세포성장과 세포사멸 등에 관여하는 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 등의 하류유전자를 상향조절한다 [12, 20]. 이처럼 암의 조절장애에 과발현된 STAT3 의 역할이 중요해짐에 따라 STAT3 신호 전달 경로를 표적으로 하는 다양한 연구가 진행 중이며 [12, 20, 21] 다발골수종에서도 STAT3 신호 전달 경로는 효과적인 치료 표적으로서 이를 억제할 수 있는 연구가 진행되고 있다.

에리불린 (Eribulin)은 콜라겐으로 이루어진 검정 해변 해변에서 추출 및 분리한 halichondrin B 에서 얻어진 합성 케톤 유사체로 이전에 안트라사이클린이나 탁산을 투여받은 진행성 및 전이성 유방암이나 지방육종에 사용되고 있는 항암제이다 [22-24]. 에리불린은 미세소관 말단의 β -tubulin 에 결합하여 유사분열을 억제하고 G2/M 기의 세포주기 정지를 유도하여 세포사멸을 촉진한다. 이는 미세소관 단축을 억제하는 기존의 tubulin 표적 억제제와 달리 미세소관 중합을 중단시켜 중합체 형성을 억제한다 [25-27]. 현재 에리불린은 전임상과 임상 연구에서 유방암, 난소암, 폐암, 교모세포종 등의 고형암에서 항종양 효과를 나타낸다고 보고되었다 [22, 27, 28, 29]. 그러나 에리불린이 혈액암의 한 종류인 다발골수종에서 어떤 효과를 나타내는지 연구된 바가 없으므로 본 연구에서는 에리불린이 다발골수종 세포에서 STAT3 신호 전달 경로를 표적으로 하여

항증식을 유도할 수 있는지 증명하였다. 나아가 에리볼린이 항후 다발골수종의 치료제로써 역할을 할 수 있는지 연구하였다.

재료 및 연구방법

1. 시약 & 항체

본 연구에서 사용한 에리블린은 한국에자이주식회사에서 제공받아 필요한 농도를 만들어 사용하였다. 세포 생존율을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 를 Promega (Madison, WI, 미국)에서 구입해 사용했으며 세포 증식율을 측정하기 위해 Cell proliferation ELISA, Bromodeoxyuridine/5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (colorimetric) Kit 를 Roche Diagnostics (Mannheim, 독일)에서 구입해 사용했다. Caspase 활성도 측정에 필요한 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 는 eBioscience (Atlanta, GA, 미국)에서 구입하였다. 미토콘드리아 막 전위를 확인하기 위해 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide (Dioc₆(3)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)를 사용하였고 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)를 사용하였다. 세포사멸을 확인하기 위해 Annexin V-FITC 를 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입해 사용했으며 세포주기 변화를 분석하기 위해 Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer 를 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입해 사용했다. Western ECL substrates 는 Bio-Rad (Hercules, CA, 미국)에서 구입하였다. anti-STAT3, anti-Bcl-xL, anti-Mcl-1, anti-c-Myc, anti-CyclinD3, anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-9, anti-Bak, anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP, anti-Mouse IgG(H+L)-HRP 는 cell signaling technology (Beverly, MA, 미국)에서 구입하였다. anti-p-STAT3, anti-cleaved PARP-1, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cytochrome C, anti-Cyclin D1, anti-β-actin 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하였다. STAT3 억제 연구를 위해 Accell™ Control siRNA 와 Accell Human STAT3 siRNA 를 Dharmacon™ (Lafayette, CO, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

2. 세포 배양

본 연구에서 다발골수종 세포주 RPMI-8226 와 U266B1 이 사용되었다. RPMI-8226 세포를 배양하기 위해 소태아혈청 (GibcoBRL) 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%가 첨가된 L-glutamine, 25 mM HEPES, sodium bicarbonate 가 포함된 RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)가 사용되었다. U266B1 세포를 배양하기 위해 소태아혈청 (GibcoBRL) 15%가 사용되었고 페니실린-스트렙토마이신 1%가 첨가된 4.5 g/L D-glucose, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/L sodium bicarbonate 가 포함된 RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)가 사용되었다. 세포는 37°C와 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였고, 70~80%로 세포가 자랐을 때 계대배양 하였다.

3. 세포 생존율 측정

RPMI-8226 과 U266B1 세포를 24 well plate 에 5x10⁴ cells/well 로 seeding 하였다. 그리고 에리블린을 0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM 로 처리하고 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72 시간 후, 96 well plate 에 세포를 옮긴 후, 각 well 마다 CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, 미국)을 처리하여 빛을 차단한 뒤 약 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포 증식률 측정

세포 증식률 측정을 위해 Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, 독일)를 사용하였다. RPMI-8226 과 U266B1 세포를 24 well plate 에 5x10⁴ cells/well 로 seeding 하고, 에리블린을 0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM 로 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 수확하기 24 시간 전에 BrdU labeling reagent 를 전 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양했다. 24 시간이 지난 후, 수확하여 Washing buffer 로 세척하고 Fix Denat 을 넣고 30 분 동안 상온에 두었다. 30 분 후, α-BrdU-POD 를 첨가하고

2 시간 동안 상온에서 교반했다. Washing buffer 로 세척한 후, Substrate solution 을 넣어 96 well plate 에 옮기고 SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 370nm 에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포사멸에 대한 유세포 분석

RPMI-8226 세포를 24 well plate 에 5×10^4 cells/well 로 seeding 하고, 에리블린을 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM)로 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72 시간 후 세포를 수확하여 PBS 로 세척하고 Annexin V (BD Bioscience)를 15 분 동안 상온에서 염색한다. 그 다음 NovoCyte Quanteon (Agilent, Santa Clara, CA, 미국)를 사용하여 Annexin V 양성 세포를 분석했다.

6. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석

RPMI-8226 세포를 24 well plate 에 5×10^4 cells/well 로 seeding 하고, 에리블린을 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM)로 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72 시간 후 well 당 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 를 매뉴얼에 따라 처리하고 빛을 차단하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 염색한다. 시간이 지난 후, NovoCyte Quanteon (Agilent, Santa Clara, CA, 미국)를 사용하여 Caspase 활성도를 측정했다.

7. 미토콘드리아 막전위 (MMP)에 대한 유세포 분석

RPMI-8226 세포를 24 well plate 에 5×10^4 cells/well 로 seeding 하고 에리블린을 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM)로 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72 시간 후, 3,3-dihexyloxycarbocyanine iodide (Dioc₆(3)) (St. Louis, MO, 미국)를 5μM 처리하여 염색하고 빛을 차단하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 30 분 후, 세포를 수확하여 PBS 로 세척하고 재부유하여 NovoCyte Quanteon (Agilent, Santa Clara, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석했다.

8. Cytochrome C 방출량 측정

세포사멸 시 외부로 방출되는 인자인 Cytochrome C의 방출량을 측정하기 위해 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)를 사용했다. RPMI-8226 세포에 에리블린을 0, 0.5, 1, 2 nM 의 농도로 72 시간 동안 처리하고 수확한 후 PBS 로 세척한다. Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I 과 단백질분해효소 억제제를 처리하여 10 분 동안 4°C에서 유지한다. 그 후, CERII를 처리하여 1 분 동안 4°C에 유지시키고 5 분간 16,000g 원심분리를 하여 상등액만 분리해내고 gel loading 한다. 이를 anti-cytochrome C 로 immunoblotting 하여 확인한다.

9. Western blot

RPMI-8226 세포에 에리블린을 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2 nM)로 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 72 시간 후 수확한 세포에 RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1mM PMSF)와 단백질분해효소 억제제 혼합제 (AEBSF 1mM, Arotinin 800mM, Bestatin 50μM, E64 15μM, Leupeptin 20μM, Pepstatin A 10μM)를 넣고 용해시킨다. 용해된 단백질을 원심 분리하여 상층액을 얻어낸 뒤, Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약 (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)으로 정량하였다. 동일한 양의 용해된 단백질이 SDS-PAGE 에서 분리되었고 분리된 단백질을 Nitrocellulose membrane 으로 이동시켰다. 항체와 단백질의 비특이적인 결합을 방지하기 위해 Phosphate buffered saline with tween20 (PBST)에 녹인 5% 무지방 탈지유 (BD Difco, Bedford, MA, 미국)로 상온에서 1 시간 30 분 동안 교반했다. PBST 로 세척한 후, 1 차 항체를 4°C에 하루 동안 반응시켰고 2 차 항체를 PBST 에 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후, PBST 로 3 회 이상 세척하였고 Western ECL blotting substrates (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)를 처리하여 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)을 통해 발현된 단백질을 분석했다.

10. STAT3 siRNA 형질주입

STAT3 유전자 발현을 녹다운시키기 위해 RPMI-8226 세포에 Accell siRNA Delivery Media 를 이용해 Accell™ Control siRNA 와 Accell Human STAT3 siRNA 를 형질주입시키고 48 시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양했다. 48 시간 후 세포를 수확하여 전체 단백질을 얻어낸 후 Western blot 을 통해 다양한 단백질의 발현을 확인했다.

11. 통계 분석

통계분석에 사용된 데이터는 최소 세 번 이상 독립적으로 실행된 실험 결과이다. 결과 데이터 분석을 위해 GraphPad prism7.0 소프트웨어 (GraphPad, San Diego, CA, 미국)를 사용하여 평균 ± 표준 오차(SEM)를 포함하여 분석했다. 모든 데이터는 Tukey's range test 에 따른 one way ANOVA 에 의해 분석되었으며 차이는 $p < 0.05$ (95% confidence intervals)일 경우, 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

결 과

1. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 세포 생존율과 세포 증식률 변화

에리블린의 화학 구조는 Figure 1 에 나타났다. 에리블린에 의한 다발골수종 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해 MTS assay 를 진행했다. 다발골수종 세포주 RPMI-8226, U266B1 에 에리블린 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5nM 을 72 시간 동안 처리했을 때, 농도의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 2A-B). 또한, 세포 증식률을 측정하기 위해 다발골수종 세포주 RPMI-8226, U266B1 에 에리블린을 농도별로 처리한 후 BrdU assay 를 진행했을 때, 세포 증식률이 농도의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 3A-B). RPMI-8226 세포가 U266B1 세포보다 에리블린에 더 민감했으며 RPMI-8226 세포의 세포 생존율이 에리블린 2nM 을 처리했을 때부터 큰 차이가 없었으므로 앞으로의 실험에서 RPMI-8226 세포에 에리블린 0, 0.25, 0.5, 1, 2nM 또는 0, 0.5, 1, 2nM 를 처리하여 실험을 진행했다.

이 결과를 통해 에리블린은 다발골수종 세포 RPMI-8226, U266B1 에서 세포생존과 세포증식을 억제한다는 것을 확인했다.

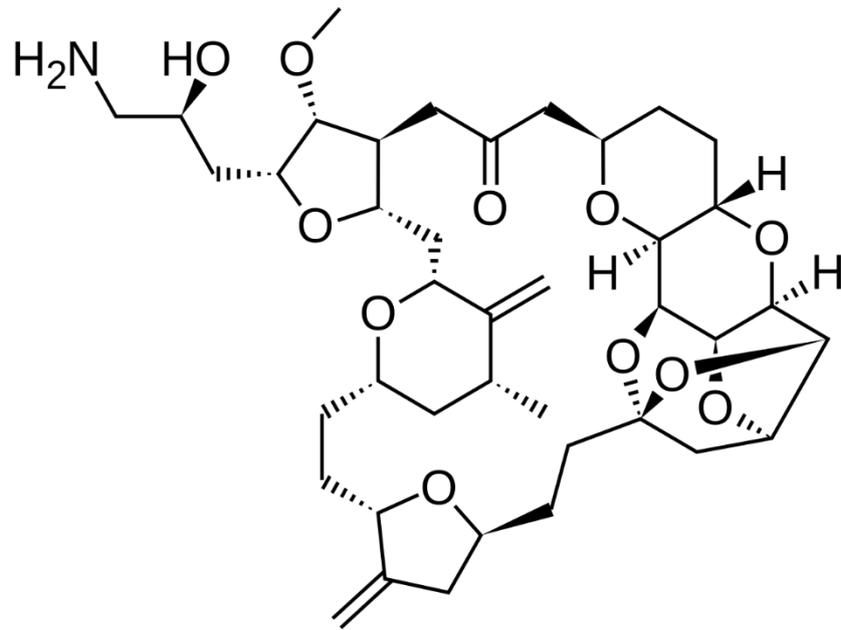


Figure 1. 에리블린의 화학구조

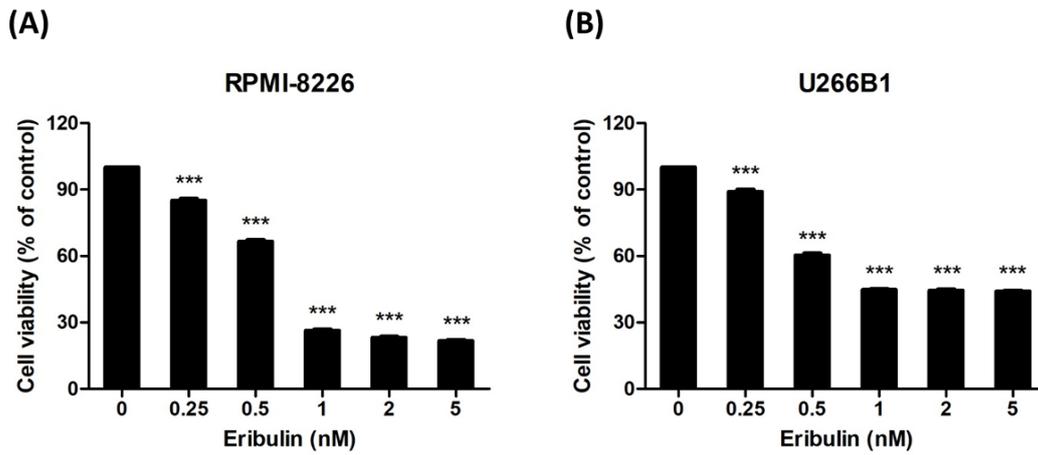


Figure 2. 다발골수종 세포주에서 에리불린에 의한 세포 생존율 변화

(A, B) 세포 생존율을 측정하기 위해 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 와 U266B1 에 에리불린을 72 시간 동안 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5nM 을 처리하여 MTS assay 를 수행했다. 각 결과는 막대그래프로 나타냈으며 평균값 \pm SEM 로 표시되었다. 대조군과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 를 나타낸다.

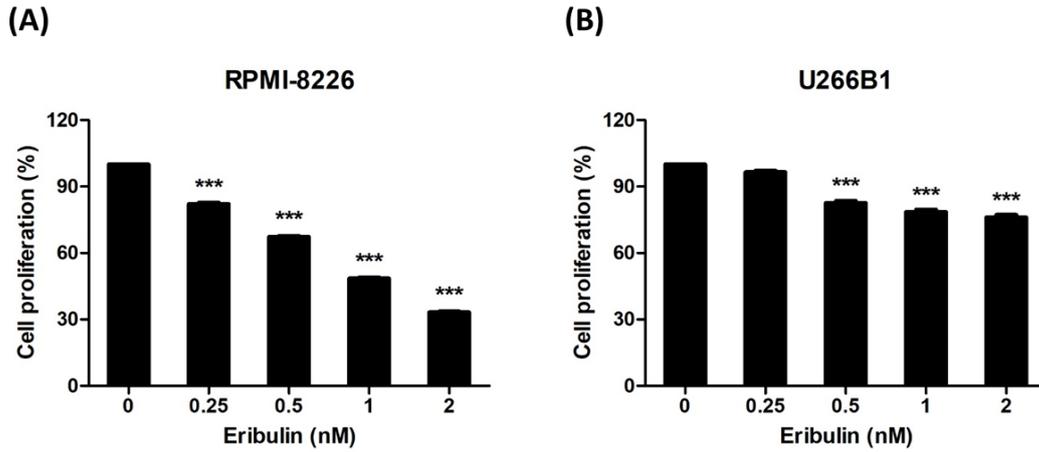


Figure 3. 다발골수종 세포주에서 에리불린에 의한 세포 증식률 변화

(A, B) 세포 증식률 측정을 위해 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 와 U266B1 에 에리불린을 72 시간 동안 0, 0.25, 0.5, 1, 2nM 을 처리하고 BrdU assay 를 진행하였다. 각 결과는 막대그래프로 나타냈으며 평균값 \pm SEM 로 표시되었다. 대조군과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 를 나타낸다.

2. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 Caspase family 활성화에 따른 세포사멸 기전

RPMI-8226 세포에 에리블린을 처리한 후 발생하는 세포사가 세포 자멸사에 의한 것인지 확인하기 위해 Annexin V 를 염색하여 Annexin V 양성세포 비율을 분석하였다. 그 결과, 에리블린의 농도가 높아질수록 Annexin V 양성세포의 비율이 유의하게 증가하는 것을 확인했다 (Fig. 4A-B). 또한, 이러한 세포 자멸사에 필수적인 Caspase family 를 단백질과 세포 수준에서 측정했다. 그 결과, 에리블린을 처리한 농도가 높아질수록 caspase family 인 Cleaved caspase-3, caspase-7, caspase-9, caspase PARP-1 의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인했다 (Fig 5A). 또한, Caspase 활성화도 결과 Caspase-3 와 Caspase-9 활성화도가 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인했다 (Fig. 5B-C).

이 결과를 통해 에리블린은 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 세포 자멸사를 유도하며 이는 caspase family 활성화를 통해 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다.

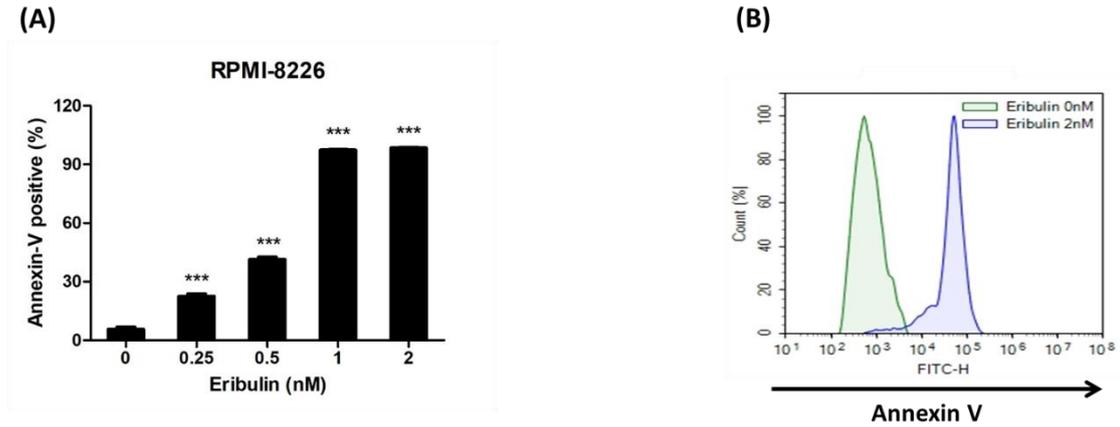


Figure 4. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리블린에 의한 세포사멸 변화

(A, B) RPMI-8226 세포에 에리블린을 0, 0.25, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 Annexin V 로 염색한 후 유세포 분석을 통해 세포사멸을 확인했다. Annexin V 양성 세포 측정을 통해 세포 사멸이 진행 중인 세포의 비율을 분석할 수 있다. 각 결과는 막대그래프로 나타냈으며 평균값 ± SEM 로 표시되었다. 대조군과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 를 나타낸다.

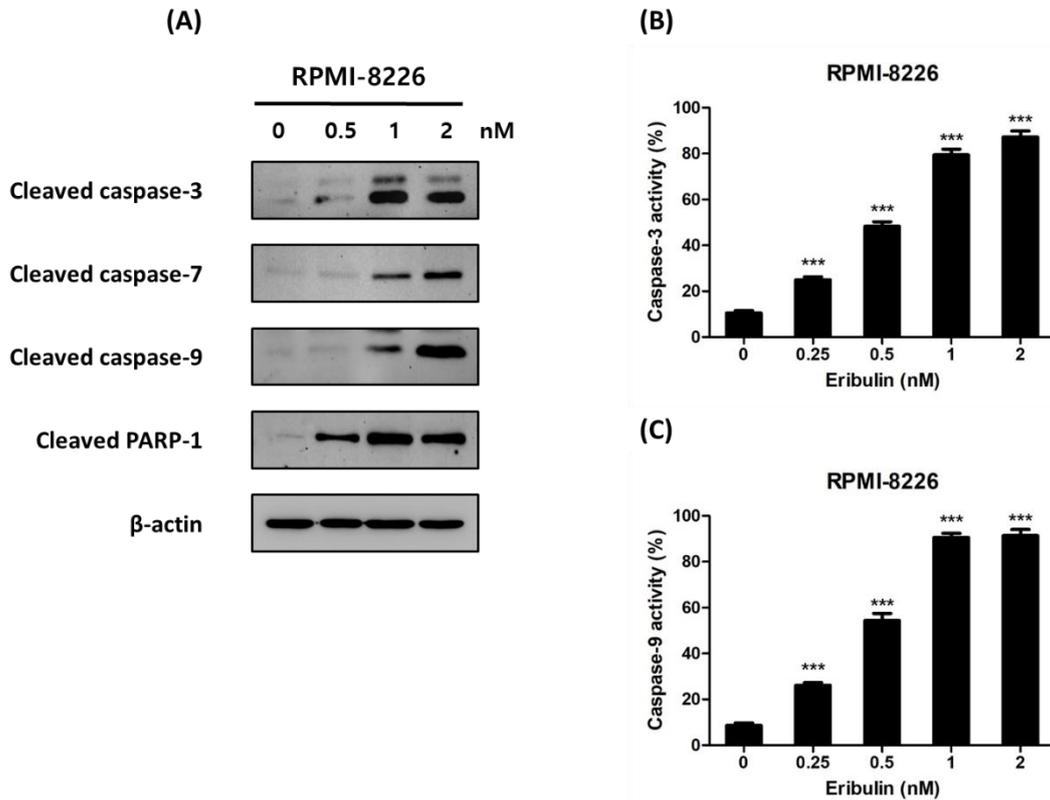


Figure 5. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리볼린에 의한 Caspase family 활성화와 세포사멸 변화

(A) RPMI-8226 세포에 에리볼린 0, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 단백질을 추출한 후, Caspase-3, -7, -9, PARP-1 의 단백질 발현을 Western blot analysis 통해 나타냈다. β -actin 은 각 농도별 동일양이 실험된 것을 나타냈다. (B, C) RPMI-8226 세포에 에리볼린 0, 0.25, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 을 매뉴얼에 따라 1 시간 동안 처리하여 Caspase-3 와 Caspase-9 활성도를 유세포 분석을 통해 나타냈다. 각 결과는 막대그래프로 나타냈으며 평균값 \pm SEM 로 표시되었다. 대조군과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 를 나타낸다.

3. 다발골수종 세포주에서 에리블린에 의한 미토콘드리아의 막 전위 변화와 세포사멸 기전

에리블린을 처리하여 RPMI-8226 세포에 발생하는 세포사멸사가 미토콘드리아의 막 전위 변화와 관련이 있는지 관찰하기 위해 실험을 진행하였다. 에리블린을 정해진 농도로 처리한 후 미토콘드리아의 막 전위에 따라 세포질로 투과해 축적되는 살아있는 세포의 침투성 표지자인 Dioc₆(3)로 염색했다. 그 결과, 에리블린의 농도가 높아짐에 따라 Dioc₆(3) 양성 세포가 감소되는 것을 확인했으며 이는 미토콘드리아 막의 탈분극을 유도했다는 것을 알 수 있다 (Fig. 6A). 또한, 세포사멸 시 세포질로 방출되는 인자인 Cytochrome C의 방출량을 단백질 수준으로 확인했을 때 에리블린의 농도 의존적으로 Cytochrome C의 발현량이 증가하는 것을 확인했다 (Fig. 6B). 이와 관련된 Bcl-2 family 단백질인 세포사멸 억제 단백질 (anti-apoptotic)인 Bcl-2, Bcl-xL 과 세포사멸 유도 단백질 (pro-apoptotic)인 Bak, Bax의 발현량을 확인했을 때 Bcl-2, Bcl-xL 발현량은 감소하고 Bak, Bax의 발현량은 증가하는 것을 확인했다 (Fig. 6C).

이 결과를 통해 에리블린은 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 미토콘드리아 막의 탈분극화를 유도하고 Bcl-2 family 단백질의 변화를 통해 세포사멸이 발생한다는 것을 확인하였다.

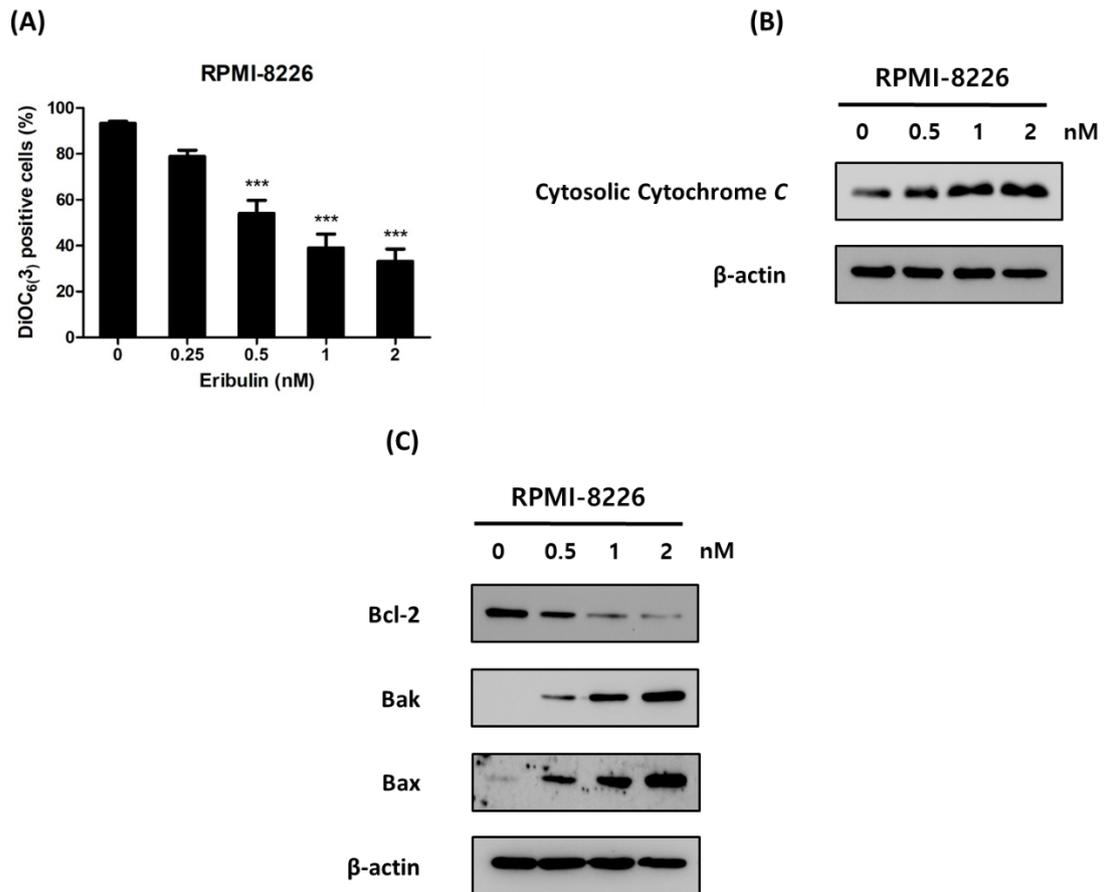


Figure 6. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리불린에 의한 미토콘드리아 막 탈분극화 현상으로 인한 세포사멸 유도

(A) RPMI-8226 세포에 에리불린 0, 0.25, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 Dioc₆(3) 5μM 을 30 분동안 처리하여 미토콘드리아 탈분극화 현상을 관찰했다. 각 결과는 막대그래프로 나타냈으며 평균값 ± SEM 로 표시되었다. 대조군과 비교하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 를 나타낸다. (B) RPMI-8226 세포에 에리불린 0, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 세포질에 방출된 Cytochrome C 양을 관찰하기 위해 세포질 단백질을 추출한 후, Cytochrome C 발현량을 Western blot analysis 통해 나타내었다. (C) 전체 단백질을 추출한 후, 세포사멸 억제 단백질 (anti-apoptotic)인 Bcl-2 와 세포사멸 유도 단백질 (pro-apoptotic)인 Bak, Bax 와 같은 Bcl-2 family 단백질의 발현을 Western blot analysis 통해 나타내었다. β-actin 은 각 농도별 동일양이 실험된 것을 나타냈다.

4. 다발골수종 세포주에서 에리블린의 의한 STAT3 와 하위 단백질 발현의 변화

다발골수종에 많이 발현되어 있다고 알려져 있는 STAT3 가 에리블린과 어떤 관련이 있는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과, RPMI-8226 세포에 에리블린을 처리하는 농도가 증가할수록 p-STAT3 와 STAT3 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 7A). 또한, STAT3 신호 기전과 관련된 하위 단백질인 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현도 에리블린의 농도의존적으로 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 7B). 이와 같은 결과가 실제로 STAT3 의 관여로 인해 발생하는지 확인하기 위해 STAT3-siRNA 형질주입을 통해 관련 단백질의 변화를 관찰하였다. 그 결과, Control-siRNA 를 형질주입한 세포와 비교하여 STAT3-siRNA 을 형질주입한 세포에서 p-STAT3 와 STAT3 의 발현이 감소하는 것을 확인했으며 (Fig. 7C), 이와 관련된 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현 또한 STAT3-siRNA 을 형질주입한 세포에서 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 7D).

이 결과는 RPMI-8226 세포는 에리블린에 의해 발생하는 세포 증식 억제와 세포사멸은 세포 생존과 관련된 단백질의 감소로 인해 발생하며 이는 STAT3 신호 기전이 관여한다는 것을 확인하였다.

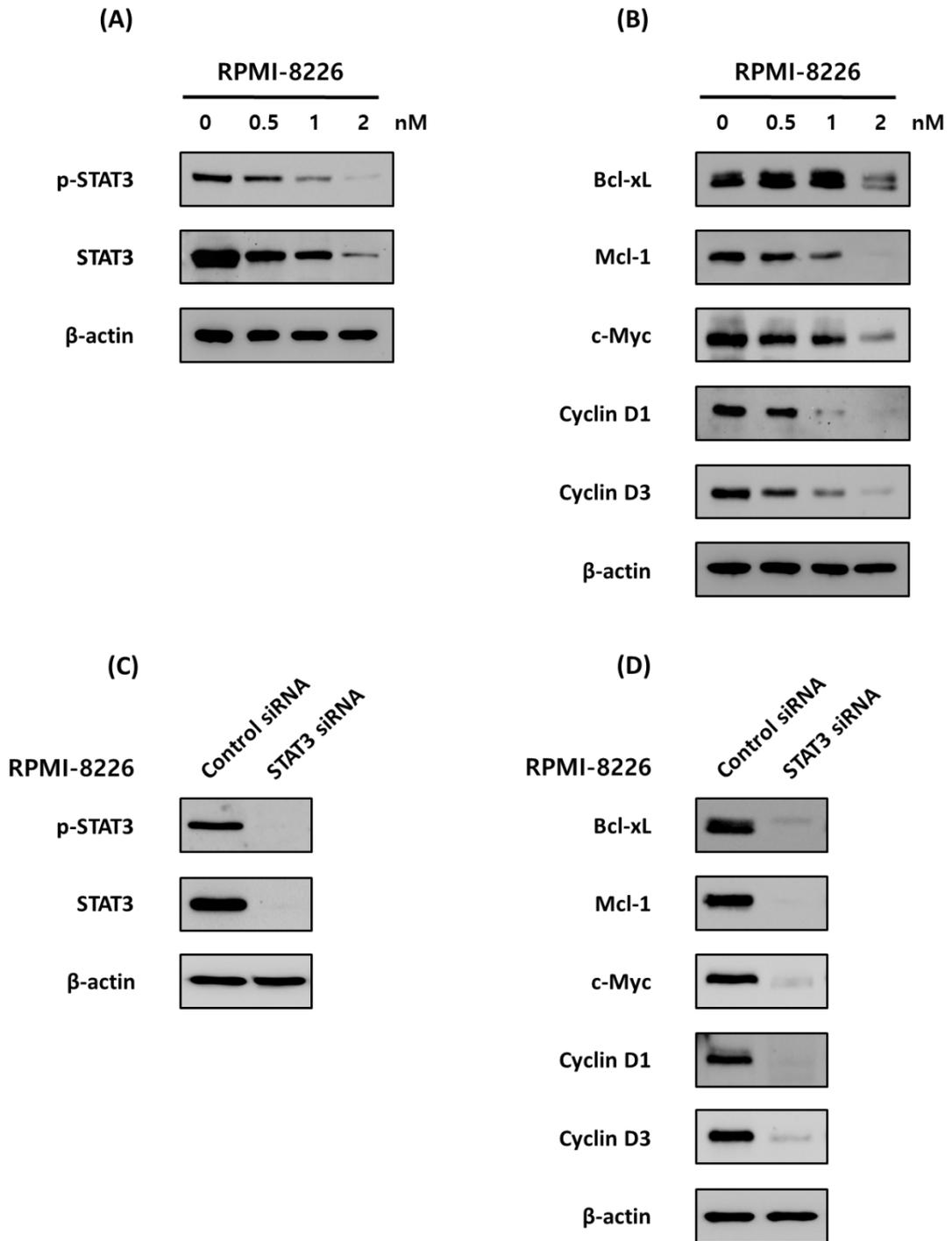


Figure 7. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 에리볼린에 의한 STAT3 와 하위 단백질 발현의 변화

(A, B) RPMI-8226 세포에 에리블린 0, 0.5, 1, 2nM 을 72 시간 동안 처리하고 전체 단백질을 추출한 후 p-STAT3, STAT3, Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현량을 Western blot analysis 통해 확인하였다. (C, D) RPMI-8226 세포에 48 시간 동안 Control siRNA 와 STAT3-siRNA 를 형질주입하였다. 그 다음 전체 단백질을 추출한 후 p-STAT3, STAT3, Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현량을 Western blot analysis 통해 확인하였다. β -actin 은 각 농도별 동일양이 실험된 것을 나타냈다.

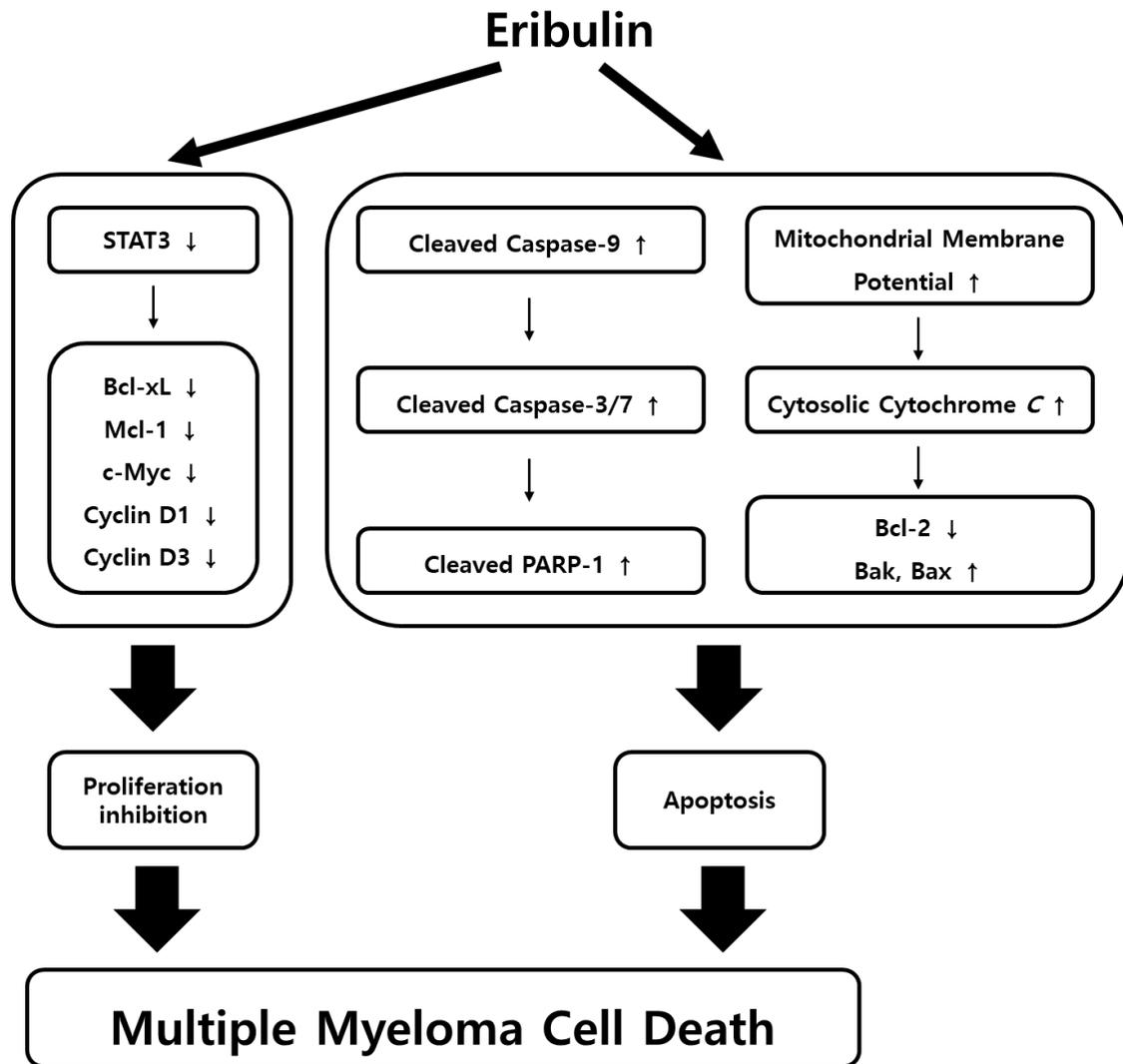


Figure 8. 다발골수종에서 에리불린에 의한 세포 증식 억제 기전 요약도

다발골수종 세포주인 RPMI-8226 에 에리불린을 처리했을 때 STAT3 와 그 하위 단백질인 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현이 감소함으로써 세포증식 억제가 발생한다. 또한 Cleaved caspase-9, -3/-7, PAPP-1 이 순차적으로 증가하고 미토콘드리아 막 전위가 증가로 인해 세포질로 Cytochrome C 가 증가하고 Bcl-2 는 감소하고 Bak 과 Bax 가 증가함으로써 세포사멸이 일어난다.

고 찰

다발골수종은 혈액암의 한 종류로 백혈구 중 B 림프구의 최종 성숙단계인 형질세포가 악성으로 전환되어 골수에서 비정상적으로 분화 및 증식하는 질환이다. 비정상적인 형질세포의 축적은 궁극적인 골수부전을 초래할 수 있으며 빈혈, 뼈 병변, 신부전, 고칼슘혈증 및 면역기능 저하 등 숙주에 유해한 영향을 미친다. 다발골수종은 임상적으로 무증상 전암성 상태인 의미불명의 단일 클론 감마글로불린병증 (monoclonal gammopathy of undetermined significance)과 무증상 다발골수종 (Smoldering multiple myeloma)을 거쳐 진행되는 것으로 보인다 [1-2, 21]. 다발골수종은 환자의 80%를 차지하는 4 가지 주요 아형이 있다. 삼염색체적 다발골수종, t(11;14), t(4;14), t(14;16) 또는 t(14;20)의 전좌를 포함하며, del(1p), del(17p), p53 돌연변이 등과 같은 이차 세포유전학적 이상은 앞의 일차 세포유전학적 유형에서 발생할 수 있다 [8-9]. 국내에서는 다발골수종을 포함한 혈액암의 발생률이 증가하고 있으며 그 중 1999년부터 2018년까지 다발골수종 환자의 증가율은 266.5%이다. 인구 고령화가 진행됨에 따라 다발골수종을 포함한 혈액암의 발생률은 계속해서 증가할 가능성이 높다 [7]. 지난 20년 동안 프로테아좀 억제제와 면역조절 약물을 다발골수종 치료에 사용함으로써 환자의 생존율이 크게 향상되었다. 또한, CD38 과 SLAMF7 을 표적으로 하는 다라투맙 (daratumumab)과 엘로투주맙 (elotuzumab)이나 디아세틸라제 억제제인 파노비노스타트 (Panobinostat) 등과 같은 신약을 사용하여 수많은 요법이 개발되었으며 매년 추가로 새로운 요법이 개발되고 있다 [9, 11]. 그러나 다발골수종 치료에 사용되는 약물에 부작용과 내성이 있으며 거의 모든 다발골수종 환자는 결국 재발한다. 실제로 다발골수종은 여러 번의 완화와 재발을 특징으로 하는 질병이다 [8, 30]. 그러므로 다발골수종 환자의 예후를 개선하기 위해서는 부작용을 줄이고 약물 내성을 완화할 수 있는 새로운 약물을 찾는 것이 다발골수종 치료에 필수적이다.

STAT 은 세포 생존 및 증식, 혈관 신생을 비롯한 다양한 세포기능에 중요한 전사인자로 포유류에서 STAT family 는 총 7 군으로 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4,

STAT5A, STAT5B, STAT6 를 포함한다 [12-13]. Janus Associated Kinases (JAK), Epidermal Growth Factor Receptor, Src 계열 구성원 및 Bcr-Abl 과 같은 성장 인자 수용체 또는 발암성 키나제가 STAT 단백질을 활성화시키는 것으로 보고되어 있으며, 다발골수종에서는 Interleukin-6 (IL-6)가 JAK-STAT 경로를 활성화하여 인산화된 STAT 단백질이 핵으로 이동해 하위 유전자 발현을 조절한다 [12, 31]. 최근 암의 시작과 진행에 STAT 계열 단백질, 특히 STAT3 가 종양 미세환경을 형성하는 데 중요한 역할을 할 것이라고 보고되었다 [12-13]. STAT3 에 의해 조절되는 전사인자는 세포사멸과 증식에 관여하는 Bcl-xL, Mcl-1 과 세포 성장 및 변형에 관여하는 c-Myc, 세포 주기에 관여하는 Cyclin D1, Cyclin D3 등을 포함하여 종양억제 단백질인 p53, 면역 억제, 전이, 혈관신생에 관여하는 많은 유전자의 mRNA 수준을 상향조절할 수 있다 [20, 32]. 또한, 다발골수종 환자의 조직샘플을 면역조직화학적 염색을 통해 p-STAT3 의 발현을 확인해 보았을 때, 무진행 생존기간과 전체 생존기간의 평균이 p-STAT3 양성환자가 음성환자보다 유의하게 짧은 것으로 나타났으며 [34], 전임상 데이터에서 STAT3 활성화가 약물 내성을 촉진할 수 있다는 연구결과가 보고되어 있다 [12]. 이처럼 다발골수종에서 환자를 치료하는데 STAT3 가 불리한 예후를 나타내는 인자 중 하나로 다발골수종에서 STAT3 를 치료 표적으로 하는 것은 다발골수종의 예후를 개선할 수 있을 것이다. 또한, STAT3 가 이러한 불치의 병에 대한 새로운 치료 표적으로서 잠재력을 증명할 것이다.

에리블린은 halichondrin B 에서 얻어진 합성 케톤 유사체로 전이성 유방암이나 지방육종에 사용되고 있는 항암제이다. 에리블린은 세포분열에 중요한 유사분열 방추를 형성하는 미세소관 말단의 β -tubulin 에 결합하여 유사분열을 억제한다. 미세소관 단축 및 성장을 억제하는 빈블라스틴 (vinblastine) 및 파클리탁셀 (paclitaxel)과 같은 기존의 tubulin 표적 억제제와 달리 에리블린은 미세소관 중합을 중단시켜 G2/M 기의 세포주기 정지를 유도하고 세포사멸을 유도한다 [27]. 에리블린은 8 개의 인간 암 세포주에서 강력한 항증식 효과를 나타냈으며 [22], 유방암 이종이식모델에서 Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor), Notch, Eph, Wnt 신호 전달 경로를 포함하여 저산소성 신호와 관련된 유전자를 억제한다는 연구 결과가 있다 [33]. 또한, 유방암, 난소암, 폐암,

교모세포종 등을 포함한 다양한 고형암에서 항종양 효과를 나타낸다는 연구 결과가 있다 [27-29]. 이러한 연구결과를 바탕으로 에리블린이 다발골수종에서도 항암효과를 나타내는지 연구를 진행하고자 했으며 다발골수종에 과발현되어 있는 STAT3 신호 전달 경로를 통하여 세포 증식을 억제하는지 연구하고자 했다.

본 연구에서는 다발골수종 세포주인 RPMI-8226, U266B1 에서 에리블린을 농도별로 처리하여 MTS assay 를 통해 세포 생존율을 보았을 때 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 다음으로 RPMI-8226 와 U266B1 세포에서 BrdU assay 를 통해 세포 증식률을 관찰했으며 그 결과 농도의존적으로 세포 증식률이 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 3). 두 결과를 통해 에리블린에 대한 민감도는 RPMI-8226 세포가 U266B1 세포보다 더 민감하다는 것을 확인했다. Annexin V 염색을 통해 Annexin V 양성세포 비율을 분석한 결과 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 유의하게 증가하는 것을 확인했다 (Fig. 4). 또한, 이러한 세포사멸에 필수적인 caspase family 를 세포와 단백질 수준에서 측정된 결과, 에리블린을 처리한 농도가 증가할수록 caspase-3, -9 의 활성도가 증가했으며 caspase-3, caspase-7, caspase-9, caspase PARP-1 단백질의 발현 또한 증가하는 것을 확인했다. (Fig. 5). 미토콘드리아 막 전위 변화를 나타내는 Dioc₆(3)를 유세포 분석기를 통해 분석하고 관련 단백질인 Cytochrome C와 Bcl-2, Bak, Bax 의 발현을 Western blot analysis 로 확인한 결과, 에리블린을 처리한 농도에 따라 미토콘드리아 관련 세포사멸이 발생하는 것을 확인했다 (Fig. 6). 즉, 에리블린에 의한 세포사멸은 caspase 경로와 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 일어난다는 것을 알 수 있다. 또한, 다발골수종에 과발현되어있는 STAT3 가 에리블린을 처리함에 따라 p-STAT3 와 STAT3 가 감소하는 것을 확인했으며 그 하위 단백질인 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현도 감소하는 것을 확인했다. 이러한 감소가 STAT3 에 의한 것인지 STAT3-siRNA 형질주입을 통해 확인하였으며 그 결과 p-STAT3 와 STAT3 의 발현뿐만 아니라 이와 관련된 Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, Cyclin D3 의 발현 또한 STAT3-siRNA 을 형질주입한 세포에서 감소하는 것을 확인했다 (Fig. 7). 즉, 에리블린은 다발골수종 세포에서 Caspase 와 미토콘드리아 경로를 통해 세포사멸을 유도하며 STAT3 신호 기전과 하류

단백질의 발현에 관여함으로써 다발골수종 세포의 증식을 억제한다는 것을 확인했다 (Fig. 8).

위의 연구결과를 바탕으로 알려진 것처럼 에리블린이 다발골수종에서도 G2/M 기의 세포주기 정지를 일으키는지 확인이 필요하다. 그리고 에리블린 처리로 인한 세포증식 억제가 mTOR/AKT 경로를 포함하여 어떤 세포증식 관련 하위 신호 전달 경로를 표적으로 하는지 관련 인자들의 발현을 통해 규명하는 것이 필요하다. 또한, 에리블린에 의해 발생하는 세포사멸과 STAT3 가 관여하는 세포증식 억제가 어떤 관련이 있는지 확인하기 위해 caspase 억제제 또는 과발현을 통해 두 경로의 연관성을 확인할 필요성이 있다. 추가적으로 현재 다발골수종 치료에 사용되고 있는 기존 치료제와의 병용 치료가 가능한지 확인하는 연구가 필요하며 더 나아가 in vivo 상에서 마우스 이종이식모델 실험을 통한 에리블린의 안전성과 유효성을 평가하여 임상적으로 사용이 가능한지 확인하는 연구가 필요하다. 마지막으로 다발골수종 두 개의 세포주에서 에리블린에 대한 민감도가 다른 이유에 대해 원인 인자를 확인하는 연구가 필요하다. 이를 위해 STAT3 신호 전달 경로의 활성화에 관여하는 JAK2 나 그 하위 단백질 등의 발현량을 확인하는 것이 요구된다.

결론적으로 본 연구는 에리블린은 다발골수종 세포에서 Caspase 의존적이며 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 세포사멸을 유도할 수 있다는 것을 확인했다. 또한, 에리블린이 STAT3 신호 기전 억제에 관여함으로써 다발골수종 세포의 증식을 억제한다는 것을 확인했다. 또한, 본 연구에서 에리블린이 다발골수종 치료에 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

참고문헌

1. Shaji K Kumar, Vincent Rajkumar, Robert A Kyle, Mark van Duin, Pieter Sonneveld, María-Victoria Mateos, Francesca Gay, Kenneth C Anderson. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jul 20;3:17046.
2. Abdul Hameed, Jamshed Ali, Kiran Munawar, Farah Arshad, Farhana Badar, Neelam Siddiqui. Characteristics and outcomes of patients with multiple myeloma : Data from a developing country. *Med J Islam Repub Iran*. 2018; 32: 1.
3. Muthu K. Shanmugam, Kwang S. Ahn, Jong H. Lee, Radhamani Kannaiyan, Nurulhuda Mustafa, Kanjoormana A. Manu, Kodappully S. Siveen, Gautam Sethi, Wee J. Chng, Alan P. Kumar. Celastrol Attenuates the Invasion and Migration and Augments the Anticancer Effects of Bortezomib in a Xenograft Mouse Model of Multiple Myeloma. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 365.
4. S. Vincent Rajkumar. Multiple Myeloma: 2022 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *Am J Hematol*. 2022 Aug;97(8):1086-1107.
5. Heinz Ludwig, Susie Novis Durie, Angela Meckl, Axel Hinke, Brian Durie. Multiple Myeloma Incidence and Mortality Around the Globe; Interrelations Between Health Access and Quality, Economic Resources, and Patient Empowerment. *Oncologist*. 2020 Sep; 25(9): e1406–e1413.
6. Jihyun Kwon, So Young Kim, Kyoung Eun Yeob, Hye Sook Han, Ki Hyeong Lee, Dong Wook Shin, Yeon-Yong Kim, Jong Heon Park, Jong Hyock Park. The Effect of Disability on the Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma in Korea: A National Cohort Study. *Cancer Res Treat*. 2020 Jan; 52(1): 1–9.

7. Won-Ju Park, Joo-Heon Park, Seunghyeon Cho, Myung Geun Shin. Twenty-year incidence trend of hematologic malignancies in the Republic of Korea: 1999–2018. *Blood Res.* 2021 Dec 31; 56(4): 301–314.
8. S. Vincent Rajkumar, Shaji Kumar. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J.* 2020 Sep; 10(9): 94.
9. S. Vincent Rajkumar. Multiple Myeloma: Every Year a New Standard?. *Hematol Oncol.* 2019 Jun; 37(Suppl 1): 62–65.
10. Yue-Ling Zhong, Gao-Jie Xu, Sheng Huang, Li Zhao, Yan Zeng, Xiao-Fan Xiao, Jing-Lin An, Jin Liu, Tai Yang. Celastrol induce apoptosis of human multiple myeloma cells involving inhibition of proteasome activity. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jun 15;853:184-192.
11. Xiang Zhou, Leo Rasche, K. Martin Kortüm, Julia Mersi, Hermann Einsele. BCMA loss in the epoch of novel immunotherapy for multiple myeloma: from biology to clinical practice. *Haematologica.* 2023 Apr 1; 108(4): 958–968.
12. Phyllis S. Y. Chong, Wee-Joo Chng, Sanjay de Mel. STAT3: A Promising Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2019 May; 11(5): 731.
13. Hua Yu, Drew Pardoll, Richard Jove. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009 Nov; 9(11): 798–809.

14. Jia-hui Ma, Li Qin, Xia Li. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal*. 2020; 18: 33.
15. Pranabananda Dutta, Nafiseh Sabri, Jinghong Li, Willis X Li. Role of STAT3 in lung cancer. *JAKSTAT*. 2014; 3(4): e999503.
16. Hui-Hui Cao, Dong-Yi Liu, Ye-Cai Lai, Yu-Yao Chen, Lin-Zhong Yu, Meng Shao, Jun-Shan Liu. Inhibition of the STAT3 Signaling Pathway Contributes to the Anti-Melanoma Activities of Shikonin. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 748.
17. Yin Shi, Zhen Zhang, Xintao Qu, Xiaoxiao Zhu, Lin Zhao, Ran Wei, Qiang Guo, Linlin Sun, Xunqiang Yin, Yunhong Zhang, Xia Li. Roles of STAT3 in leukemia (Review). *Int J Oncol*. 2018 Jul;53(1):7-20.
18. Loukik Arora, Alan Prem Kumar, Frank Arfuso, Wee Joo Chng, Gautam Sethi. The Role of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Its Targeted Inhibition in Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2018 Sep; 10(9): 327.
19. Xiaoyi Hu, Jing li, Maorong Fu, Xia Zhao, Wei Wang. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6: 402.
20. Manlio Tolomeo, Antonio Cascio. The Multifaced Role of STAT3 in Cancer and Its Implication for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan; 22(2): 603.
21. Jianbiao Zhou, Wee-Joo Chng. Biological Hallmarks and Emerging Strategies to Target STAT3 Signaling in Multiple Myeloma. *Cells*. 2022 Mar; 11(6): 941.

22. Nicholas F. Dybdal-Hargreaves, April L. Risinger, and Susan L. Mooberry. Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule Targeting Agent. *Clin Cancer Res.* 2015 Jun 1; 21(11): 2445–2452.
23. Joyce O'Shaughnessy, Virginia Kaklamani, Kevin Kalinsky. Perspectives on the mechanism of action and clinical application of eribulin for metastatic breast cancer. *Future Oncol.* 2019 May;15(14):1641-1653.
24. Hironari Tamiya, Hideaki Sabe, Katsunari Yamashita, Yoshinori Imura, Toru Wakamatsu, Satoshi Takenaka. Eribulin Provides a Remarkable Effect in Trabectedin-Resistant Myxoid Liposarcoma. *Case Rep Orthop.* 2020; 2020: 8873185.
25. Paula Christine Jimenez, Diego Veras Wilke, Leticia Veras Costa-Lotufo. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics (Sao Paulo).* 2018; 73(Suppl 1): e482s.
26. Javier Cortes, Patrick Schöffski, Bruce A Littlefield. Multiple modes of action of eribulin mesylate: Emerging data and clinical implications. *Cancer Treat Rev.* 2018 Nov;70:190-198.
27. Sarika Jain, Linda T. Vahdat. Eribulin Mesylate. *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6615–6622.
28. Murray J Towle, Kenichi Nomoto, Makoto Asano, Yoshito Kishi, Melvin J Yu, Bruce A Littlefield. Broad spectrum preclinical antitumor activity of eribulin (Halaven(R)): optimal effectiveness under intermittent dosing conditions. *Anticancer Res.* 2012 May;32(5):1611-9.

29. Umang Swami, Umang Shah, Sanjay Goel. Eribulin in Cancer Treatment. *Mar Drugs*. 2015 Aug; 13(8): 5016–5058.
30. Shaji K Kumar, Terry M Therneau, Morie A Gertz, Martha Q Lacy, Angela Dispenzieri, S Vincent Rajkumar, Rafael Fonseca, Thomas E Witzig, John A Lust, Dirk R Larson, Robert A Kyle, Philip R Greipp. Clinical course of patients with relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2004 Jul;79(7):867-74.
31. Daniel E. Johnson, Rachel A. O'Keefe, and Jennifer R. Grandis. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Apr;15(4):234-248.
32. Richard L. Carpenter, Hui-Wen Lo. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2014 Jun; 6(2): 897–925.
33. Yasuhiro Funahashi, Kiyoshi Okamoto, Yusuke Adachi, Taro Semba, Mai Uesugi, Yoichi Ozawa, Osamu Tohyama, Taisuke Uehara, Takayuki Kimura, Hideki Watanabe, Makoto Asano, Satoshi Kawano, Xavier Tizon, Paul J McCracken, Junji Matsui, Ken Aoshima, Kenichi Nomoto, Yoshiya Oda. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer Sci*. 2014 Oct; 105(10): 1334–1342.
34. Sung-Hoon Jung, Seo-Yeon Ahn, Hyun-Woo Choi, Myung-Geun Shin, Seung-Shin Lee, Deok-Hwan Yang, Jae-Sook Ahn, Yeo-Kyeong Kim, Hyeoung-Joon Kim, Je-Jung Lee. STAT3 expression is associated with poor survival in non-elderly adult patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood Res*. 2017 Dec;52(4):293-299.

영문요약

Background: Multiple myeloma is a type of blood cancer in which plasma cells, the final maturity stage of B lymphocytes among white blood cells, are converted to malignant, causing abnormal differentiation and proliferation in the bone marrow. Unlike normal plasma cells that produce antibodies that can protect the body against infection, multiple myeloma produces an M protein called a monoclonal protein and this M protein is found in blood or urine. Chemotherapy and immunotherapy are used to treat multiple myeloma, but it is still difficult to cure for various side effects and high recurrence rates. Eribulin is a synthetic macrocyclic ketone analog obtained from halichondrin B and is an anticancer drug used for metastatic breast cancer or adiposarcoma. However, no research has yet been conducted on the effect of eribulin in multiple myeloma. STAT3 is an oncogene that contributes to the development and progression of tumors in most cancers, and in multiple myeloma, it is involved in the progression of multiple myeloma by inhibiting apoptosis or activating bone marrow-derived inhibitory cells. Therefore, in this study, we investigated whether eribulin has anti-tumor effects by targeting the STAT3 signaling pathway in multiple myeloma cells and can serve as a therapeutic agent for multiple myeloma.

Method: Eribulin was treated with RPMI-8226 cells and U266B1 cells, a multiple myeloma cell line, cell survival and proliferation rates were confirmed through MTS assay and BrdU assay. Apoptosis was confirmed through Annexin V staining, and the path of apoptosis was analyzed through caspase activity, Dioc₆(3) staining, and related proteins expression. The expression of proteins related to STAT3 signaling pathway and its downstream and expression of related proteins through STAT3-siRNA transfection were confirmed through Western blot analysis.

Results: After Eribulin was treated with RPMI-8226 cells and U266B1 cells for 72 hours at each concentration, it was confirmed that cell survival and cell proliferation rates decreased in a concentration-dependent manner. As a result of confirming the proportion Annexin V-positive cells using flow cytometry, it was confirmed that apoptosis occurs as the concentration of eribulin increased. It was confirmed that caspase activity and the associated proteins cleaved caspase -3, -7, -9, and PARP-1 expression increased as the concentration of eribulin increased. In addition, it confirmed that as the Dioc₆(3) results decrease, the mitochondrial membrane potential was decreased in concentration-dependent and that the release of Cytochrome C was increased. When the expression of proteins related to the mitochondrial pathway was confirmed, the expression of Bcl-2 decreased, and the expression of Bax and Bak increased. In addition, the expression of p-STAT3 and STAT3 was reduced, and the expression of downstream proteins Bcl-xL, Mcl-1, c-Myc, Cyclin D1, and Cyclin D3 was also reduced.

Conclusion: In conclusion, its finding showed that eribulin inhibits cell proliferation and induces apoptosis through the activation of caspase and reduction of mitochondrial membrane potential by involving in STAT3 signaling mechanisms in RPMI-8226 cells. These results suggested that eribulin may be used as a new therapeutic drug for multiple myeloma.

Key word : Multiple myeloma (MM), Eribulin, Cell proliferation, Apoptosis, Caspase activation, Mitochondrial pathway, STAT3 signaling pathway.