



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

다발골수종 세포에서 라도티닙에 의한

세포사 유도 기전연구

Radotinib induces multiple myeloma cell death

울산대학교 대학원

의학과

김정 이

다발골수종 세포에서 라도티닙에 의한  
세포사 유도 기전연구

지도교수 조재철

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2018년 12월

울산대학교 대학원

의학과

김정이

김정이의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 최 윤 숙 (인)

심사위원 허 숙 경 (인)

심사위원 조 재 철 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2018 년 12 월

## 국문요약

라도티닙은 만성 골수성 백혈병 환자를 치료하는 국산 신약으로서 작용 기전은 Bcr-Abl 타이로신 키나아제와 혈소판 유래 성장인자 수용체를 억제하는 것으로 알려져 있다. 다발골수종은 비정상적인 형질세포의 축적으로 인해 나타나는 혈액암으로 쉽게 재발하고 치료하기 어려운 질환이다. 현재 다발골수종의 치료 방법은 레날리도마이드 (lenalidomide), 볼테조밍 (bortezomib), 덱사메타손 (dexamethasone)과 같은 일반적으로 잘 알려진 항암제를 조합하여 치료하고 있다. 하지만, 재발의 위험이 높기 때문에 이를 대체할 새로운 약이 필요한 실정이다. 아직까지 다발골수종 세포에 대한 라도티닙의 효과에 대해선 알려진 바가 없다. 그렇기 때문에 본 연구에서는 다발골수종에 대한 라도티닙의 효과와 신호기전에 대해 연구하였다. 방법으로는 세포의 생존율을 확인하기 위해 MTS assay 를 진행하였고, Annexin V 염색을 통해 세포 사멸사를 확인하였다. 또한, 세포 사멸사의 경로를 확인하기 위해 caspase 활성화도 측정 및 미토콘드리아의 막전위를 측정하였다. 단백질 발현 정도를 확인하기 위해선 western blotting 을 진행하였고, *in vitro* 의 결과를 토대로 이종이식모델을 만들어 확인하였다. 그 결과, 라도티닙은 다발골수종 세포의 사멸을 유도하였다. 다발골수종 세포에서 라도티닙에 의해 Annexin V 양성 세포를 유도하고 caspase 경로를 활성화시킨다는 것을 확인하였다. 게다가, 라도티닙이 다발골수종 세포에서 미토콘드리아의 막 전위를 감소시키는 것을 확인하였고, 라도티닙을 처리한 다발골수종 세포의 세포질에 라도티닙 농도 의존적으로 싸이토크롬 C 가 축적되는 것을 확인하였다. 더욱이, *in vivo* 에서의 분자적 메커니즘을 확인하기 위해서 다발골수종 세포인 RPMI-8226 을 이용한 마우스 모델을 만들었다. 이종이식모델에서 라도티닙에 의해 종양의 크기가 감소하는 것을 확인하여 라도티닙의 다발골수종에 대한 항암 효과를 보여주었다. 종합적으로, 본 연구를 통해 라도티닙이 다발골수종의 치료제로 사용할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

# 목 차

국문요약.....	i
목 차.....	ii
List of Figures.....	iv
List of Table.....	v
I. 서 론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	3
1. 시약 & 항체.....	3
2. 세포 배양.....	3
3. 쥐.....	4
4. 세포 생존율 분석연구.....	4
5. 세포 표지자에 대한 유세포 분석기 분석 연구.....	4
6. 세포 사멸에 대한 유세포 분석기 분석 연구.....	4
7. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석기 분석 연구.....	4
8. 미토콘드리아 막전위에 대한 유세포 분석기 분석 연구.....	5
9. 사이토크롬 C에 대한 세포질 추출 준비.....	5
10. Western blot 분석 연구.....	5

11. 이종이식모델 연구.....	6
12. 통계처리.....	6
<b>III. 결과</b> .....	8
1. Radotinib induces cell death in multiple myeloma cell line.....	8
2. Radotinib-mediated multiple myeloma cytotoxicity is caspase-dependent. .....	12
3. Radotinib-induced cell death is affected by mitochondrial membrane potential.....	14
4. Radotinib induces anti-tumor activities in MM cells <i>in vivo</i> .....	17
<b>IV. 고 찰</b> .....	20
<b>V. 참고문헌</b> .....	22
<b>영문요약</b> .....	28

## List of Figures

Figure 1. The structure of radotinib. ....	9
Figure 2. Analysis of the expression of major surface marker in multiple myeloma cell line. ....	10
Figure 3. Radotinib induces cell death in multiple myeloma cell line. ....	11
Figure 4. Radotinib-mediated multiple myeloma cytotoxicity is caspase-dependent. ....	13
Figure 5. Radotinib-induced cell death is affected by Mitochondrial membrane potential. ....	15
Figure 6. Radotinib-induced cell death is affected by depending on Bcl-2 family. ....	16
Figure 7. Radotinib induces anti-tumor activities in MM cells <i>in vivo</i> . ....	18
Figure 8. Schematic representation of the effect which radotinib is expected to act on multiple myeloma cell. ....	19



## List of Table

Table 1. 세포주 정보.....	7
----------------------	---

## 서론

다발골수종은 2015 년 기준으로 혈액암 중 3 위 (13%)를 차지하며 발병률이 비교적 높은 혈액암에 속한다 [1]. 이는 환경적 요인이나, 방사선이나 화학물질의 노출이 다발골수종의 위험요인이 될 수도 있다고 알려져 있지만 아직까지 정확한 원인이 밝혀진 것은 없다. 다발골수종은 B 림프구의 성숙 단계 마지막인 형질세포가 비정상적으로 분화 및 증식되어 나타난다 [2-3]. 특징으로는 발병 시 과도한 면역글로불린이 분비되는 것으로, 이를 M-단백이라 명명한다. 그렇기에 비이상적인 M-단백의 분비는 다발골수종의 진단표지자로 사용될 수 있다. 또한, 다발골수종의 임상적 특성으로는 골병변, 빈혈, 신부전증, 고칼슘혈증 등으로 나타난다 [4-5]. 환자의 90%가 이미 다른 장기로 전이된 상태로 치료 예후가 좋지 않으며 재발의 빈도가 높은 편이다.

다발골수종은 약제에 대한 저항성때문에 치료를 하는 데에 큰 어려움이 있다. 현재 다발골수종은 레날리도마이드, 덱사메타손, 볼테조밍 등 과 같은 약물 치료에 의존하고 있다. 면역 조절 약물은 골수에서 다발골수종 세포가 새로운 혈관을 형성하는 것을 억제함으로써 종양세포를 공격하여 치료가 된다. 그 예로는 레날리도마이드 (Lenalidomide), 탈리도마이드 (Thalidomide), 포말리도마이드 (Pomalidomide) 등이 있다 [6]. 이때 코르티코스테로이드계 약물인 덱사메타손 (Dexamethasone)을 함께 투여하게 되면 조금 더 효과적으로 다발골수종을 치료할 수 있게 된다 [7]. 또한, proteasome 억제제인 볼테조밍 (Bortezomib), 칼피조밍 (Carfilzomib)은 종양세포의 성장을 늦추거나 멈추어 다발골수종을 극복할 수 있게 한다 [8]. 이 외에도 히스톤탈아세틸효소 (Histone deacetylase, HDAC) 억제제, 단클론항체 등을 사용하는 치료 방법이 있다 [9-12]. 다발골수종의 효율적인 치료를 위해서는 항암치료 이후 자가조혈모세포 이식이 시행되어야 한다. 이때 방사선 치료가 병행되기도 한다. 자가 조혈모세포 이식이 시행된 이후에도 재발하면 항암치료는 계속적으로 이어질 수 있다.

라도티닙은 이마티닙 (imatinib)과 닐로티닙 (nilotinib)의 구조와 매우 유사하며 BCR-Abl1 과 혈소판 유래 성장인자를 저해하는 타이로신 키나아제 억제제이다.

이는 2012 년에 만성 골수성 백혈병 (Chronic Myeloid Leukemia, CML)의 치료제로서 효과가 입증되어 국내에서 승인되었다. 또한, chronic phase 의 CML 치료제로서 승인되어 사용되고 있다 [13-17].

타이로신 키나아제는 B 세포에 많이 발현이 되어 있기에, 타이로신 키나아제 억제제를 이용한 다발골수종에 대한 연구는 현재 많이 진행되는 중이다 [18-21]. 하지만 다발골수종에서의 라도티닙에 대한 효과는 아직 연구된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 다발골수종 세포에 대한 라도티닙의 효능 및 기전을 조사하였다.

## 재료 및 연구방법

### 1. 시약 & 항체

Radotinib 은 (주)일양약품에서 지원을 받았고, dimethylsulfoxide (Wak-chemie Medical GmbH)에 녹여 -20°C에 보관하였다. 약물의 구조는 Figure. 1 에 나타내었다. Anti-procaspase-3, anti-cleaved caspase-3, anti-procaspase-7, anti-cleaved caspase-7, anti-procaspase-9, anti-cleaved caspase-9, anti-cleaved PARP, anti-Bcl-xL, anti-BAK, anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP, anti-Mouse IgG(H+L)-HRP 는 cell signaling technology (Beverly, MA, 미국)에서 구입하였다. Anti-β-actin, anti-cytochrome C, anti-Bcl-2 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하였다. Anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC 는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, 독일)에서 구입하였고, anti-human CD19-FITC, FITC Mouse IgG-isotype control, Annexin V-FITC 는 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. FITC-DEVD-FMK, FITC-LEHD-FMK 는 eBioscience (Atlanta, GA, 미국)에서 구입하였다. Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 는 promega (Madison, WI, 미국)에서 구입하였다. DiOC<sub>6</sub>(3) (3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Iodide)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고, Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 는 Thermo fisher (Waltham, MA, 미국)에서 구입하였다.

### 2. 세포 배양

본 연구에 사용한 세포는 다발골수종 세포주인 RPMI-8226, MM.1S 이다. 세포 정보는 Table. 1 에 나타내었고, 세포의 면역 표현형은 Figure 2 에 나타냈다. RPMI-8226 세포는 RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)에 소태아혈청 (GibcoBRL) 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 사용하였고, MM.1S 세포는 4.5g/L glucose, 2mM L-glutamine 이 포함된 RPMI1640 배지에 소태아혈청 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 사용하였다. 두 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 쥐

본 연구에 사용된 마우스는 무 특이 병원체 사육 환경의 5 주령 수컷 가슴샘 없는 생쥐를 오리엔트바이오에서 구매하여 사용하였다.

### 4. 세포 생존율 분석 연구

96 well plate 에 RPMI-8226 과 MM.1S 세포를  $2 \times 10^4$  cells/well 로 seeding 하고, 라도티닙을 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 각 well 마다 Celltiter 96® Aqueous One Solution 을 처리하여 4 시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 흡광도는 PowerWave XS2 Microplate 분광 광도계 (BioTek, Winooski, VT, 미국)를 사용하여 490 nm 에서 측정하였다.

### 5. 세포 표지자에 대한 유세포 분석기 분석 연구

RPMI-8226 과 MM.1S 세포를 각각 걷어내어 phosphate buffered saline (PBS)로 2 회 세척한다. 그 후, anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC, anti- human CD19-FITC, FITC Mouse IgG-isotype control 을 4°C에서 30 분 동안 염색한다. PBS 로 2 회 세척하고, 세포를 PBS 에 부유시켜 FACSCalibur 유세포 분석기 (BD Bioscience)를 사용하여 분석한다.

### 6. 세포 사멸에 대한 유세포 분석기 분석 연구

24 well plate 에 RPMI-8226 과 MM.1S 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 로 seeding 하였다. 그리고 라도티닙을 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 이 후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척한다. Annexin V (BD pharmingen)으로 실온에서 15 분 동안 염색하여 FACSCalibur 유세포 분석기를 사용하여 세포를 분석한다.

### 7. Caspase 활성도에 대한 유세포 분석기 분석 연구

24 well plate 에 RPMI-8226 과 MM.1S 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 로 seeding 하였다. 그리고 라도티닙을 처리하여 72 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에 배양하였다. 각 well 에 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 를 처리하고 빛을 차단하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 1 시간 염색하였다. 그 후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척하고, PBS 에 부유시켜 FACSCalibur 유세포 분석기를 사용하여 세포를 분석한다.

#### **8. 미토콘드리아 막전위에 대한 유세포 분석기 분석 연구**

24 well plate 에 RPMI-8226 과 MM.1S 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 로 seeding 하고, 라도티닙을 처리하여 72 시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에 배양하였다. 각 well 마다 DiOC<sub>6</sub>(3)를 처리하고 빛을 차단하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 30 분 염색하였다. DiOC<sub>6</sub>(3)는 세포 침투성 표지자로 미토콘드리아의 막 전위에 따라 미토콘드리아의 세포질에 축적된다. 그 후, 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척하고 PBS 에 부유시켜 FACSCalibur 유세포 분석기를 사용하여 세포를 분석한다.

#### **9. 사이토크롬 C에 대한 세포질 추출 준비**

라도티닙 농도 별로 72 시간 처리한 세포 샘플을 PBS 로 세척한다. 차가운 Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I 과 단백질분해효소 억제제를 처리하여 얼음에 10 분간 배양한다. 그리고 CER II 를 처리하여 얼음에 1 분간 배양한 후, 5 분동안 16,000g 원심분리를 하여 상등액만 분리해, gel loading 한다. 이를 anti-cytochrome C 로 immunoblotting 하여 확인한다.

#### **10. Western blot 분석 연구**

RPMI-8226, MM.1S 세포에 라도티닙을 농도 별로 처리한 후, RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1mM PMSF), 단백질분해효소 억제제 혼합제 (AEBSF 1mM, Arotinin 800mM, Bestatin 50 $\mu\text{M}$ , E64 15 $\mu\text{M}$ , Leupeptin 20 $\mu\text{M}$ , Pepstatin A 10 $\mu\text{M}$ )를 이용해 용해시킨다. 용해된 단백질은 Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약 (Thermo fisher, Waltham, MA, 미국)으로 정량 하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE 로 분리하여

Nitrocellulose membrane 으로 이동시켰다. 항체와 단백질의 비특이적인 결합을 막기 위해 5% 무지방 탈지유 (BD Difco, Bedford, MA, 미국) in Phosphate buffered saline with tween20 (PBST)로 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 1 차 항체를 5% 무지방 탈지유 in PBST 에 희석시켜 4°C에 하루 동안 반응시켰다. 시간을 두고 PBST 로 세척한 후, 2 차 항체를 PBST 에 희석하여 상온에서 1 시간 반응시켰다. 그 후, PBST 로 세척하여 western ECL blotting 기질 (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)로 탐지하였다.

### 11. 이종이식모델 연구

RPMI-8226 세포를 5 주령 수컷 가슴샘이 없는 생쥐에  $3 \times 10^7$  cells 주입하였고, 라도티닙을 주 5 일 intraperitoneal injection (IP)하였다. 종양 크기는 digital calipers로 측정하였고,  $V$  (부피) =  $(\text{length})^2 \times (\text{width})/2$  로 계산하였다. 라도티닙 투약 24 일 후, sacrifice 하여 종양의 크기를 확인하였다.

### 12. 통계 처리

GraphPad prism7.0 프로그램을 이용하여 분석하였고, 모든 결과는 세번 이상의 독립적인 실험에 의한 평균  $\pm$  표준 오차를 사용하여 통계처리 하였다. 또한, 모든 값은 Tukey's range test 에 따른 one way ANOVA 에 의해 분석되었다. 차이는  $p < 0.05$  로 유의함을 보여주었다.

Table 1. 세포주 정보

세포주	RPMI-8226	MM.1S
성별	남성	여성
연령	61	42
Ras 돌연변이	+	n. d
염색체 변이	t(14;16)	t(14;16)
세포적 생산물	lambda-light chain immunoglobulin	lambda-light chain immunoglobulin
조직	말초혈액	말초혈액
Comments	KRAS 돌연변이 검증	덱사메타손에 민감

축약어 : n.d, not described



## 결 과

### **1. Radotinib induces cell death in multiple myeloma cell line.**

라도티닙이 다발골수종 세포에서도 세포 독성을 일으킬 수 있는지 확인하기 위해 다발골수종 세포인 RPMI-8226 과 MM.1S 세포에 라도티닙을 처리하였다. 라도티닙 처리 후 RPMI-8226 과 MM.1S 세포의 생존율이 라도티닙 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A, 3B). 이러한 세포 죽음이 세포 사멸사 (apoptosis)에 의한 것인지를 Annexin V 염색하여 Flow cytometry 로 확인하였다. 그 결과, Annexin V 양성 세포가 라도티닙 농도 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3C, 3D). 위의 결과를 통해 라도티닙에 의한 다발골수종 세포 죽음은 세포 사멸사 경로의 활성화를 통해 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

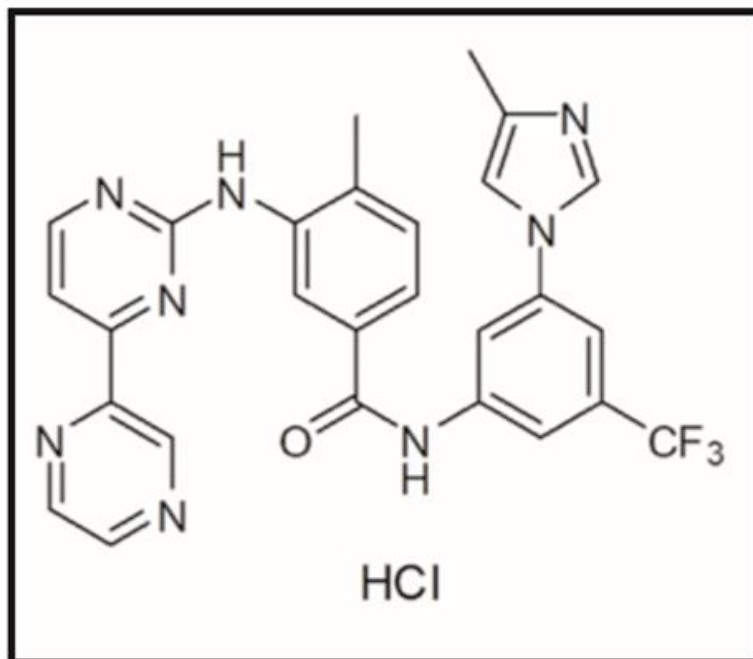
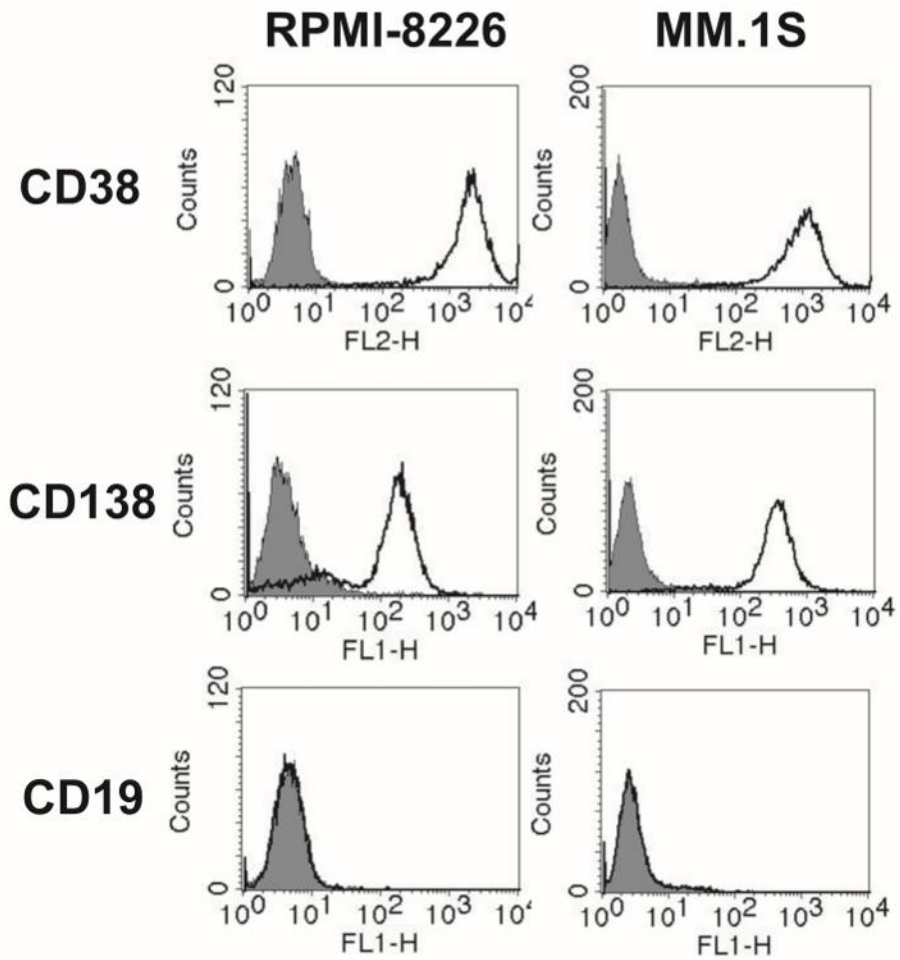
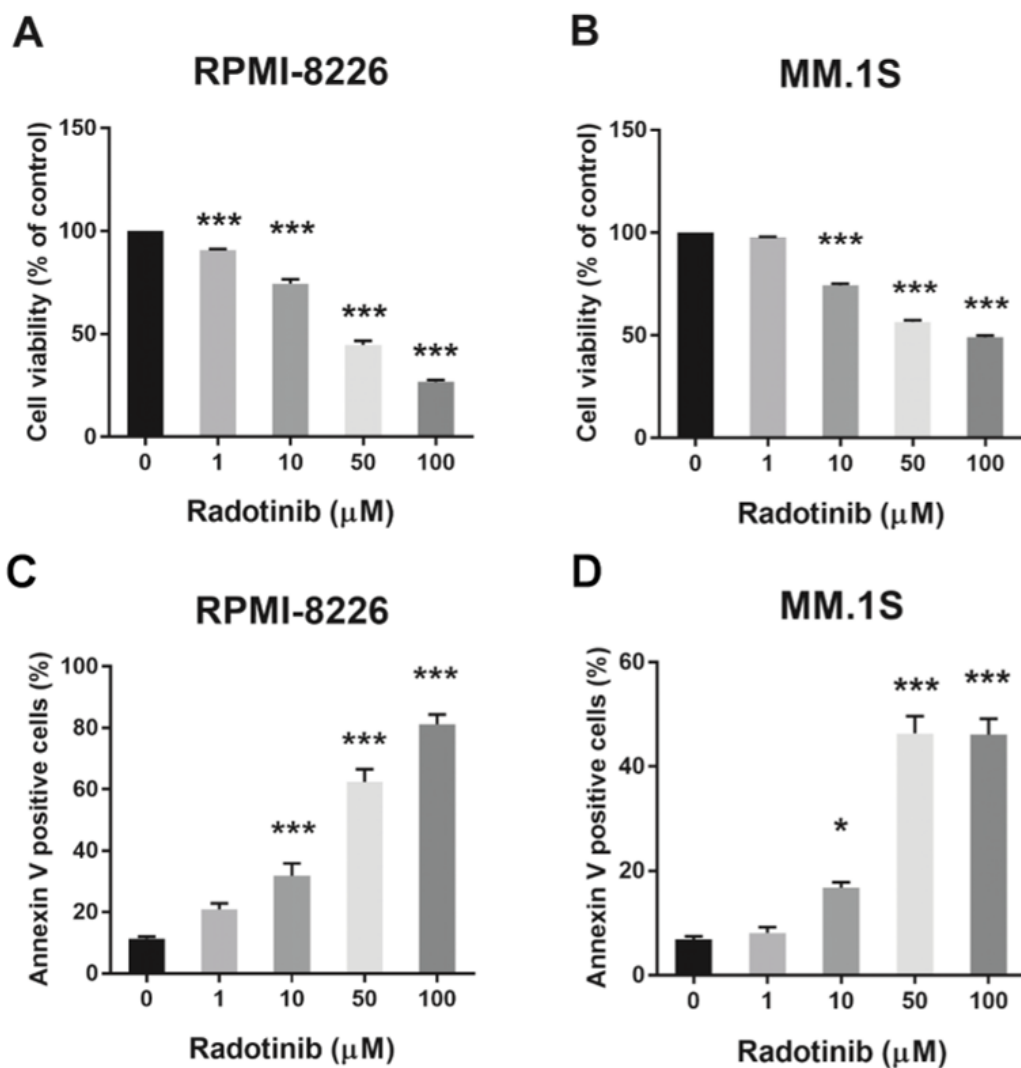


Figure 1. The structure of radotinib



**Figure 2. Analysis of the expression of major surface marker in multiple myeloma cell line.**

Positive marker (CD38, CD138), Negative marker (CD19); Filled histogram represents the isotype control; open histogram represents each antigen.

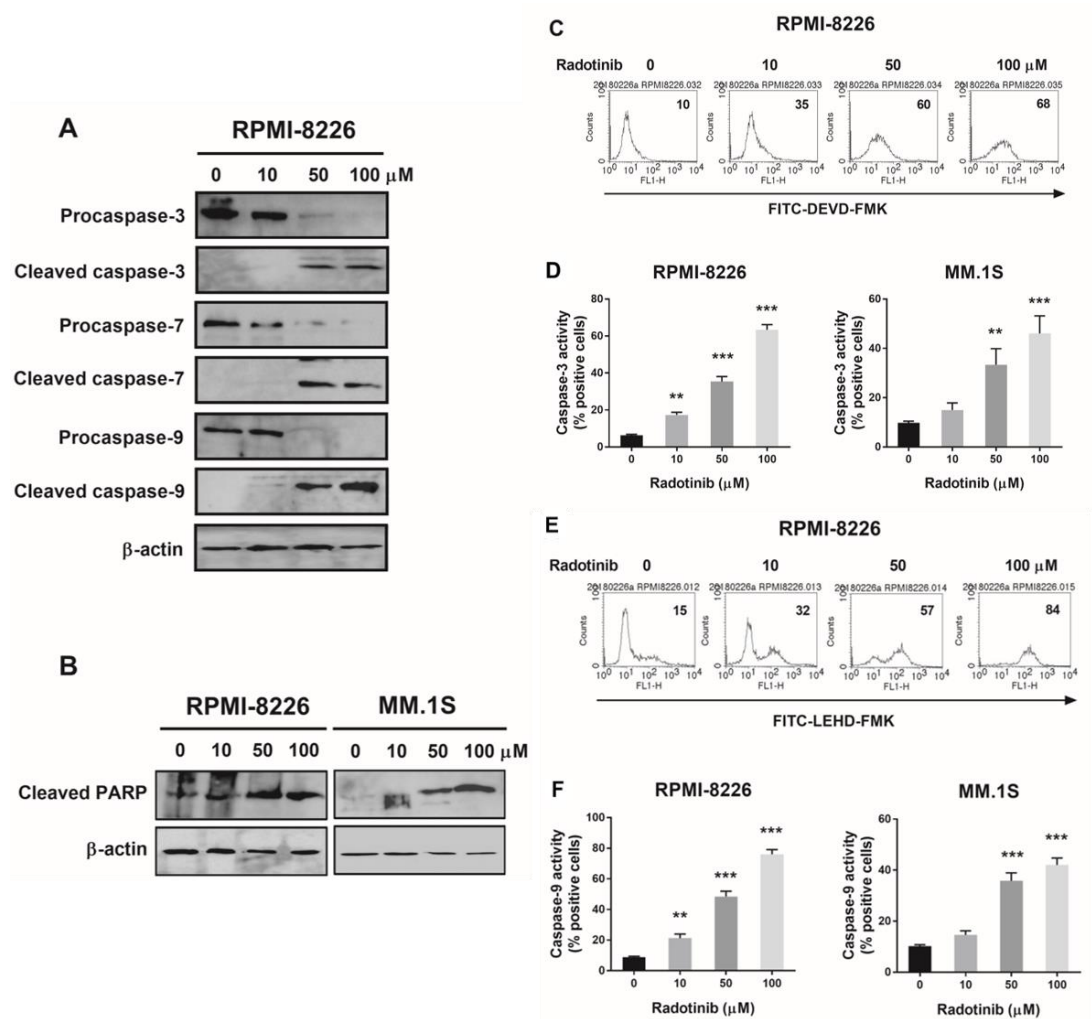


**Figure 3. Radotinib induces cell death in multiple myeloma cell line.**

(A, B) RPMI8226 and MM.1S cells were treated with radotinib 0, 1, 10, 50 and 100 μM for 72h, the cell viability was analyzed by MTS assay. (C, D) Flow cytometric analysis of the cell death after radotinib 0, 1, 10, 50, and 100 μM treatment for 72h. Data are represented mean ± SEM; \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*Significantly different from control cells.

## **2. Radotinib-mediated multiple myeloma cytotoxicity is caspase-dependent.**

다발골수종 세포에서 라도티닙의 농도가 높을수록 cleaved caspase-3, -7, -9 와 -PARP 가 증가되는 것을 확인하였다. 그 결과, 라도티닙에 의한 다발골수종 세포의 세포 독성이 세포 사멸사 경로를 경유하여 일어난다는 것을 단백질 분석을 통해서도 확인하였다 (Fig. 4A, 4B). 또한, FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 를 염색하였을 때도, 라도티닙 농도 의존적으로 형광이 증가하는 것을 확인하여 caspase 의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4C-4F). 이를 통해 라도티닙에 의한 세포 독성은 caspase 경로에 의존적인 것을 확인하였다.

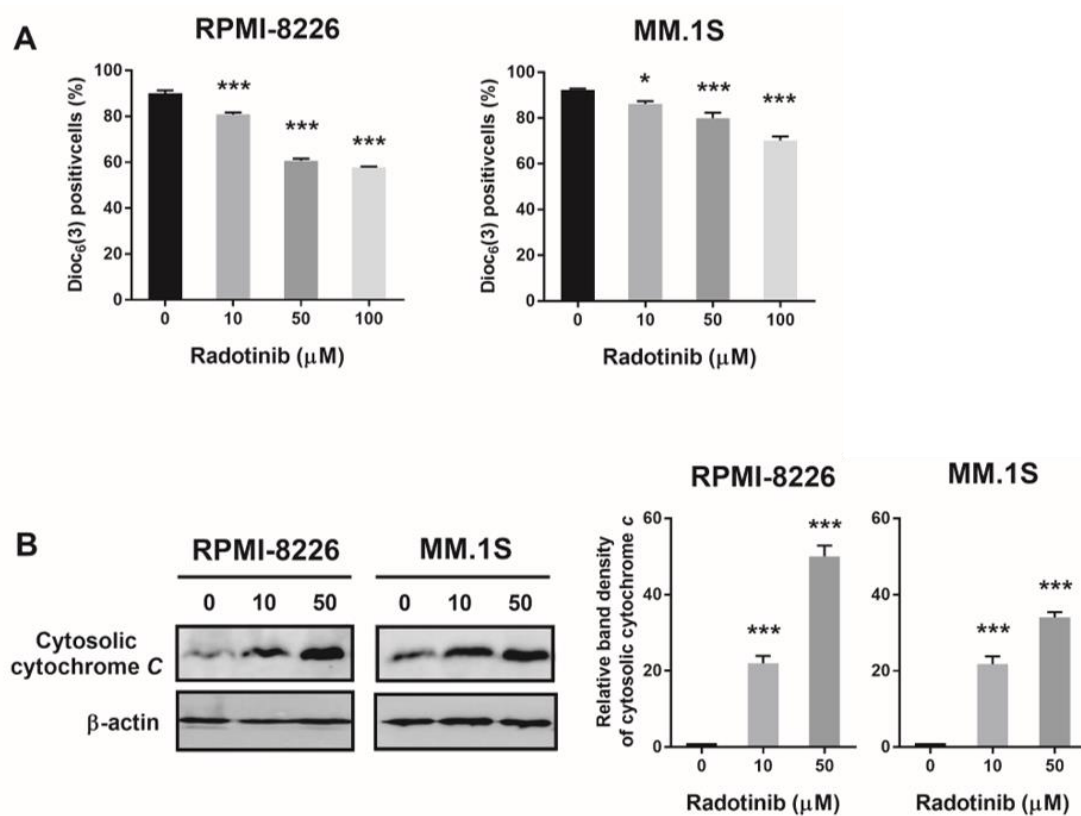


**Figure 4. Radotinib-mediated multiple myeloma cytotoxicity is caspase-dependent.**

(A, B) Whole cell extracts were probed by western blot for pro/cleaved caspase-3, -7, and -9.  $\beta$ -actin was shown as a loading control. (C-F) Caspase-3 and -9 enzymatic activity was measured in multiple myeloma cells by flow cytometry. The experiments were repeated three times and data are represented mean  $\pm$  SEM; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*Significantly different from control cells.

### **3. Radotinib-induced cell death is affected by mitochondrial membrane potential.**

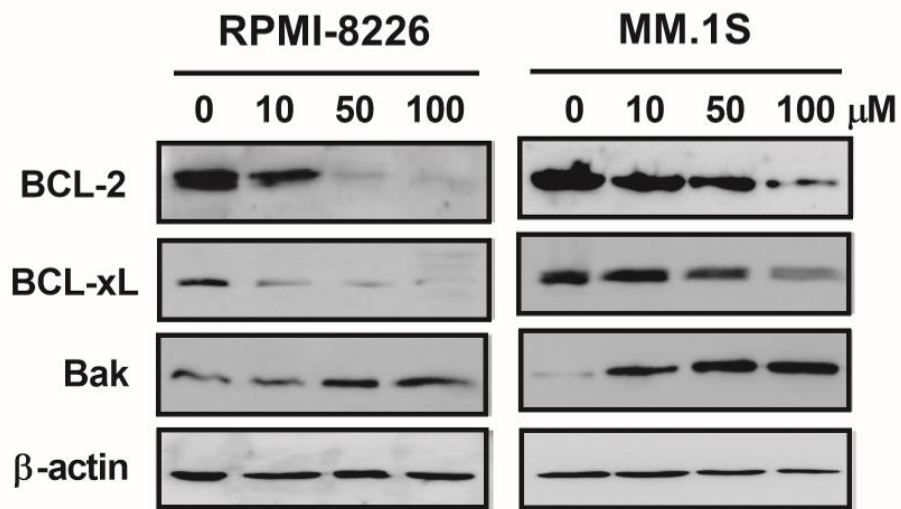
라도티닙에 의한 다발골수종의 세포사가 미토콘드리아와 어떤 관련이 있는지를 확인하기 위해 미토콘드리아의 막 전위를 측정하였다. 라도티닙을 농도 별로 처리한 다음, DiOC<sub>6</sub>(3)로 염색하였다. 이때, 라도티닙 농도 의존적으로 DiOC<sub>6</sub>(3) 양성 세포가 감소하는 것을 RPMI-8226 과 MM.1S 세포에서 확인하였다 (Fig. 5A). 또한, 세포질로 방출된 사이토크롬 C 를 단백질 발현 정도로 확인하였을 때도 두 세포 모두에서 라도티닙 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5B). 그리고 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 와 Bcl-xL 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고, pro-apoptotic 단백질인 Bak 이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6). 즉, 라도티닙에 의한 다발골수종 세포 사멸은 미토콘드리아 막 전위에 의해 영향을 받아 일어나는 것임을 알 수 있었다.



**Figure 5. Radotinib-induced cell death is affected by Mitochondrial membrane potential.**

(A) Decrease in the fluorescent intensity of DiOC<sub>6</sub>(3) is shown in cells with a loss of the mitochondrial membrane potential. Radotinib-treatment induced mitochondrial dysfunctions in multiple myeloma cell. (B) The cytochrome *C* release from the mitochondrion to the cytosol in MM cells after radotinib treatment for 72h. Bar graphs of MM cells treated with radotinib corresponding to each band density are shown as mean  $\pm$  SEM. The membrane was stripped and reprobed with anti- $\beta$ -actin mAb to confirm equal loading. Data are represented mean  $\pm$  SEM.; \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*Significantly different from control cells.



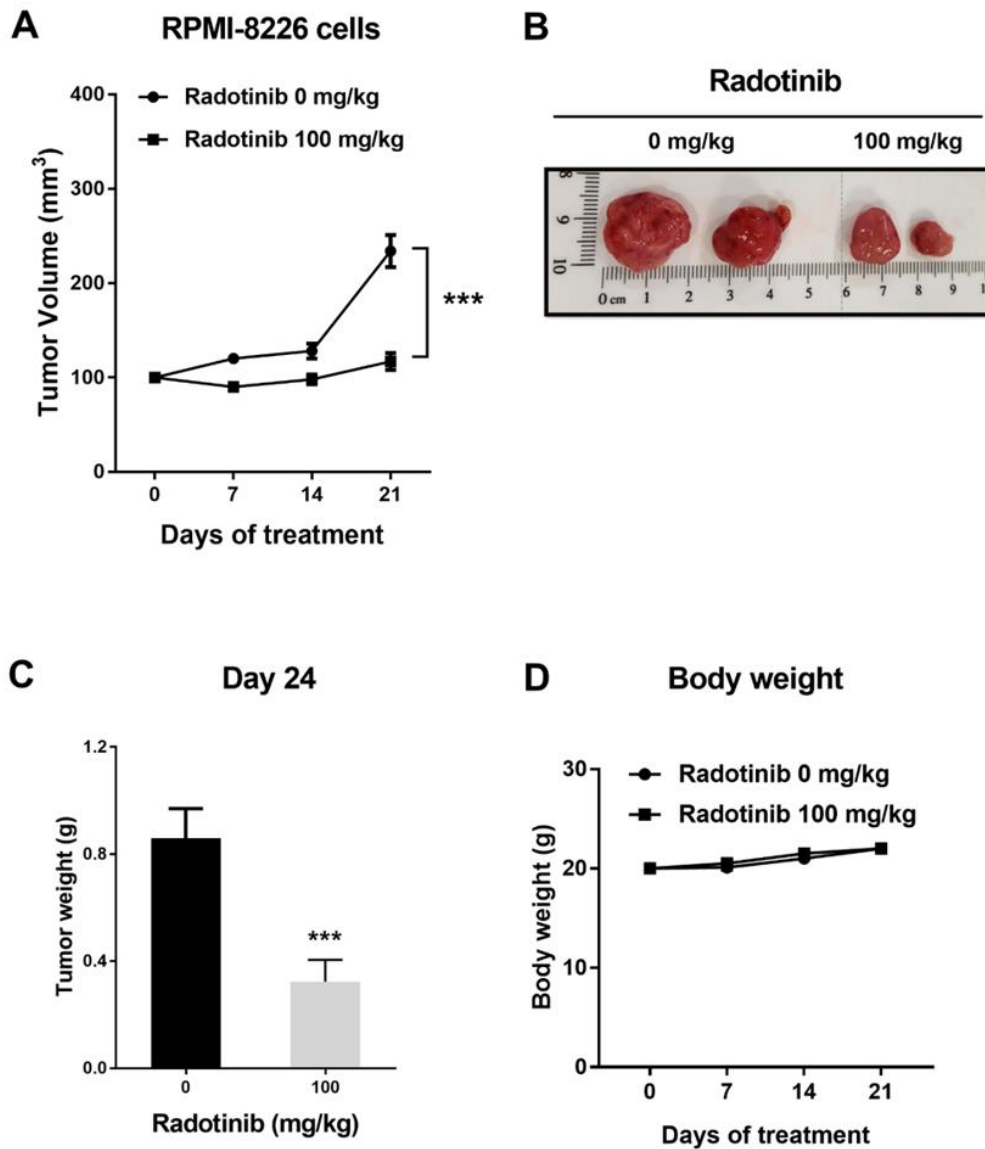


**Figure 6. Radotinib-induced cell death is affected by depending on Bcl-2 family.**

The anti-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bcl-xL were decreased and pro-apoptotic protein, Bak was increased dose-dependently. It evaluated by western blot. The membrane was stripped and reprobbed with anti-β-actin mAb to confirm equal loading. Data are represented mean ± SEM; \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*Significantly different from control cells.

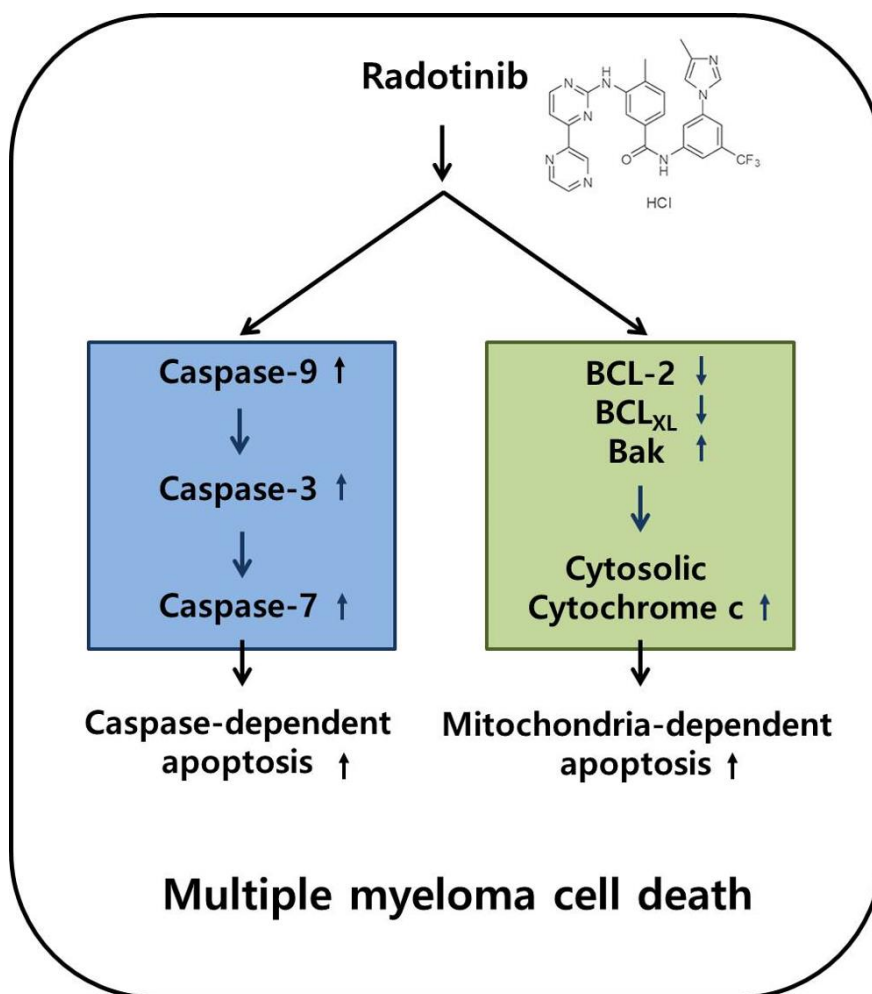
#### 4. Radotinib induces anti-tumor activities in MM cells *in vivo*.

*In vitro* 실험을 바탕으로 RPMI-8226 세포를 이용해 이종이식모델을 만들어 라도티닙의 효능을 확인하였다. 가슴샘이 없는 생쥐의 옆구리에 RPMI-8226 세포를  $3 \times 10^7$  씩 이식하였고, 라도티닙을 투여하지 않는 그룹 (라도티닙 0mg/kg)과 투여하는 그룹 (라도티닙 100mg/kg)으로 나누었다. 종양의 크기와 마우스의 무게는 1 주일에 한 번 측정하였다. 종양이 형성된 후, 라도티닙을 주 5 일 동안 투여하였고, 투여 24 일 후 종양을 분리해 내어 종양의 크기를 비교하였다 (Fig. 7A, 7B). 24 일 후, 종양의 크기는 라도티닙을 100mg/kg 투여한 그룹에서 현저하게 작아진 것을 확인하였고 (Fig. 7C), 이때 종양의 크기와 관계없이 마우스의 무게에는 변화가 없는 것을 확인하였다 (Fig. 7D). 이러한 결과들을 통해 다발골수종 세포를 이용한 이종이식모델에서도 라도티닙이 항 종양 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.



**Figure 7. Radotinib induces anti-tumor activities in MM cells *in vivo*.**

(A, B) Tumor volume according to treatment group (5 mice per group). (C) Tumor weight according to treatment group (5 mice per group). (D) Body weight according to treatment group (5 mice per group). Data are represented mean  $\pm$  SEM; \*\*\*,  $p < 0.001$ . \*Significantly different from control.



**Figure 8. Schematic representation of the effect which radotinib is expected to act on multiple myeloma cell.**

Treatment of radotinib on multiple myeloma cells affects caspase-dependent apoptosis by increasing caspase-9, -3, and -7. In addition, it induces mitochondria-dependent apoptosis through decreasing Bcl-2, Bcl-xL and increasing Bak. In sum, radotinib induces multiple myeloma cell death.

## 고찰

본 연구에서는 앞선 연구 결과를 바탕으로 라도티닙이 다발골수종에서 항암효과가 나타날 것을 기대하였다.

흥미롭게도, 라도티닙을 처리한 다발골수종 세포에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰하였고, 라도티닙의 농도가 높아질수록 세포사멸 정도가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 다발골수종 세포 중에서도 RPMI-8226 세포가 MM.1S 세포보다는 라도티닙의 낮은 농도에서도 더 많이 자극되는 것을 확인하였다. 더불어 라도티닙에 의한 다발골수종 세포의 세포사는 caspase 의존적으로 일어나는 것을 확인하였고, 미토콘드리아의 활성화도 관계가 있는 것을 확인하였다 (Fig. 3, 4, 5, 6).

*In vitro* 의 결과를 바탕으로 다발골수종 이종이식모델에서의 라도티닙 효능을 검증하였다. 이 때, 면역력이 저하된 가슴샘이 없는 생쥐에서 RPMI-8226 세포가 종양을 형성하는 것을 확인하였다. *In vivo* 에서도 마찬가지로 라도티닙의 농도가 높을수록 종양의 크기가 줄어드는 것을 관찰하였다. 이를 통해서 *in vitro* 의 결과가 *in vivo* 에서 재현되는 것을 확인하였다 (Fig. 7).

결론적으로 다발골수종 세포에 라도티닙을 처리하게 되면, caspase-9, -3, -7 의 활성이 증가하게 되어 caspase 의존적 세포 사멸사가 일어나게 된다. 동시에, anti-apoptotic protein 인 Bcl-2 와 Bcl-xL 이 감소하고, pro-apoptotic protein 인 Bak 은 증가하여 미토콘드리아 의존적 세포 사멸사가 발생하는 것을 확인하였다 (Fig. 8).

다발골수종은 일반적으로 다양한 세포독성 약물에 민감하지만 반응은 일시적이기에 현재 완치가 어렵다. 다발골수종의 치료 표적으로는 골수종 세포 주위의 환경, 골수종 세포와 주위세포와의 교신 작용, 뼈 질환을 차단 등이 있다 [22]. 현재 면역조절제, 프로테아좀 억제제, 단일 클론 항체 및 히스톤탈아세틸효소 (HDAC) 억제제, 타이로신 키나아제 억제제 등의 새로운 약물의 도입으로 치료가 빠르게 진화가 되고 있다 [23-27]. 그러나 다발골수종의 재발 위험도가 높기 때문에, 재발 시 치료할 대체 약물에 대한 연구와 발견이 필요하다. 본 연구에서는

라도티닙을 이용하여 기전 연구를 하였다면, 이와 같은 기전을 가진 또 다른 타이로신 키나아제 억제제인 다사티닙 (Dasatinib)을 이용한 연구도 다발골수종에서 진행되어 왔다. 이때, 다사티닙을 처리한 다발골수종 세포의 기전을 보면, 라도티닙보다는 낮은 농도 (다사티닙  $IC_{50}$  : 50nM)에서 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 [28-30]. 같은 기전의 다사티닙보다는 고농도로 사용되어야 하는 점이 라도티닙의 아쉬운 점이지만, 다발골수종에서의 세포 사멸사를 유도한다는 점에서 라도티닙의 효능은 높게 살 만하다. 다발골수종의 표적 치료를 하기 위해서는 다발골수종에 대한 스크리닝 연구가 진행되어야 하고, 스크리닝을 통해 얻은 결과를 바탕으로 타이로신 키나아제인 라도티닙과 또 다른 기전을 표적으로 하는 치료제와 병행을 한다면, 더 높은 효과를 볼 수 있을 것이라 기대한다. 본 연구의 결과는 라도티닙을 이용한 다발골수종의 치료 가능성을 보여주었으며, 이것은 차세대 치료 방법으로 떠오를 것이라 예상한다.

## 참고문헌

1. Mimura N, Hideshima T and Anderson KC. Novel therapeutic strategies for multiple myeloma. *Experimental hematology*. 2015; 43:732-741.
2. Stephanie Greenstein, Nancy L. Krett, Yoshihiro Kurosawa, Chunguang Ma, Dharminder Chauhan, Teru Hideshima, Kenneth C. Anderson, and Steven T. Rosen et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol*. 2003;31(4):271-82.
3. Addolorata Maria Luce Coluccia, Teresa Cirulli, Paola Neri, Domenica Mangieri, Maria Cristina Colanardi, Carlo Gambacorti-Passerini, and Angelo Vacca et al. Validation of PDGFR $\beta$  and c-Src tyrosine kinases as tumor/vessel targets in patients with multiple myeloma: preclinical efficacy of the novel, orally available inhibitor dasatinib. *Blood*. 2008;112(4):1346-56.
4. Jie Jin, Tao Wang, Yu Wang, Shidi Chen, Zheng Li, Xiang Li, Jiazhen Zhang and Jin Wang et al. SRC3 expressed in BMSCs promotes growth and migration of multiple myeloma cells by regulating the expression of Cx43. *Int J Oncol*. 2017;51(6):1694-1704.
5. Dimopoulos MA, Kastiris E, Rosinol L, Blade J and Ludwig H. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008; 22:1485-1493.

6. Sarah A. Holstein and Philip L. McCarthy et al. Immunomodulatory drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and clinical experience. *Drugs*. 2017 Apr; 77(5): 505–520.
7. Iqbal SM, Stecklein K, Sarow J, Krabak M, Hillengass J, McCarthy P et al. Elotuzumab in Combination with Lenalidomide and Dexamethasone for Treatment-resistant Immunoglobulin Light Chain Amyloidosis With Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;S2152-2650(18)30266-0.
8. Dimopoulos MA, Goldschmidt H, Niesvizky R, Joshua D, Chng WJ, Oriol A, Feng S, Zahlten-Kumeli A, Kimball AS, Moreau P et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1327-1337.
9. Cavenagh JD, Popat R et al. Optimal Management of Histone Deacetylase Inhibitor-Related Adverse Events in Patients With Multiple Myeloma: A Focus on Panobinostat. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(8):501-507.
10. Bae J, Hideshima T, Tai YT, Song Y, Richardson P, Raje N, Munshi NC, Anderson KC et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor ACY241 enhances anti-tumor activities of antigen-specific central memory cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma and solid tumors. *Leukemia*. 2018;32(9):1932-1947.



11. Nishida H, Hayashi M, Morimoto C, Sakamoto M, Yamada T et al. CD26 is a potential therapeutic target by humanized monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2018 Oct 22;8(11):99.
12. Niels W. C. J. van de Donk, Maarten L. Janmaat, Tuna Mutis, Jeroen J. Lammerts van Bueren, Henk M. Lokhorst, Paul W. H. I. Parren et.al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews Immunol Rev.* 2016;270(1):95-112.
13. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Dong-Joon Yoon, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Jae-Hoo Park, Young Joo Min, Hawk Kim et al. Radotinib Induces Apoptosis of CD11b+ Cells Differentiated from Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One.* 2015;10(6): e0129853.
14. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Gi-Dong Gwon, Jeong Yi Kim, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Young Joo Min, Hawk Kim et al. Radotinib inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation via induction of mitochondrial-dependent apoptosis and CDK inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2016;789:280-290.
15. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Jeong Yi Kim, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Young Joo Min, Hawk Kim et al. Radotinib induces high cytotoxicity in c-KIT positive acute myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2017;804:52-56.

16. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Jeong Yi Kim, Yoo Kyung Jeong, Jae-Cheol Jo, Yunsuk Choi, SuJin Koh, Jin Ho Baek, Young Joo Min & Hawk Kim et al. Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death. *Sci Rep.* 2017;7(1):15278.
17. Kim SH, Menon H, Jootar S, Saikia T, Kwak JY, Sohn SK, Park JS, Jeong SH, Kim HJ, Park HL, Lee GY, Cho DJ, Shin JS, Kim DW et al. Efficacy and safety of radotinib in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica.* 2014; 99(7): 1191–1196.
18. Hanley N. Abramson et al. Kinase inhibitors as potential agents in the treatment of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016;7(49): 81926–81968.
19. Katzel JA, Lee-Ma A, Vesole DH et al. Safety of a second-generation tyrosine kinase inhibitor and novel targeted therapy for the treatment of a patient with chronic myeloid leukemia and multiple myeloma. *Anticancer Drugs.* 2015;26(8):907-9.
20. Reinhold Munker, Cory Cordova, Paula Polk, Charles V. Wendling, Amanda W. Sun and James A. Cardelli et al. Activity of Tyrosine Kinase Inhibitors in Multiple Myeloma. *Blood.* 2007;110:4804.

21. Destinee Bushman, Jared J. Bearss, Venkataswamy Sorna, Hariprasad Vankayalapati, Sunil Sharma, Fenghuang Zhan, David Bearss. Targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK) in multiple myeloma with novel BTK inhibitors. [abstract].
22. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F and Dammacco F. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *British journal of haematology*. 1994; 87:503-508.
23. EM Ocio, PG Richardson, SV Rajkumar, A Palumbo, MV Mateos, R Orłowski et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG), *Leukemia*. 2014;28: 525–542.
24. Ajay K. Nooka, MD, Sagar Lonial, MD et al. Novel Combination Treatments in Multiple Myeloma. *Oncology (Williston Park)*. 2016;30(5):451-65.
25. Mina R, Cerrato C, Bernardini A, Aghemo E and Palumbo A. New pharmacotherapy options for multiple myeloma. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2016; 17:181-192.
26. Noll JE, Williams SA, Tong CM, Wang H, Quach JM, Purton LE, Pilkington K, To LB, Evdokiou A, Gronthos S and Zannettino AC. Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*. 2014; 99:163-171.

27. Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Gorgun GT, Roccaro AM, Anderson KC and Ghobrial IM. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological reviews*. 2015; 263:160-172.
  
28. Addolirata M.L Coluccia, Teresa Cirulli, Paola Neri, Franco Dammacco, Pierfrancesco Tassone, Carlo Gambacorti and Angelo Vacca et al. Dasatinib inhibits multiple myeloma growth by blocking PDGF-Rb and c-Src activity in patient-derived tumor and endothelial cells. *Blood*. 2007; 110:550.
  
29. Jungkuz-Stier I, Zekl M, Stuhmer T, Einsele H and Seggewiss-Bernhardt R. Modulation of natural killer cell effector functions through lenalidomide/dasatinib and their combined effects against multiple myeloma cells. *Leukemia & lymphoma*. 2014; 55:168-176.
  
30. Wildes TM, Procknow E, Gao F, Dipersio JF and Vij R. Dasatinib in relapsed or plateau-phase multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2009; 50:137-140.

## 영문요약

Radotinib (Supect™; C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>OHCl; IY5511HCL) is known as a novel anti-tumor drug, which is currently approved in Korea for the treatment of chronic myeloid leukemia patients. It has an anti-cancer effect for various cancer cells. Its mechanism of action includes inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase and platelet-derived growth factor receptor. Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer resulted from accumulated abnormal plasma cell. Even though MM is easily relapsed and incurable, the therapeutic method of MM is dependent on well-known drugs like lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone, so it needs new drugs for alternative medicine. Also, it has been little known the effects of radotinib on MM cells. In this paper, we researched on the effect of radotinib for multiple myeloma cell. Remarkably, radotinib caused the cell death in MM cells. Radotinib induced Annexin V positive cells and caspase pathway activation in MM cells. In addition, radotinib decreased mitochondrial membrane potential. We observed cytochrome C accumulated dose-dependently in cytosol of radotinib-treated RPMI-8226 and MM.1S cells. Moreover, to further validate the molecular mechanism *in vivo*, we established murine models of multiple myeloma. Radotinib has anti-tumor activities in the mouse bearing RPMI-8226 cells. Collectively, overall data highlight the therapeutic possibility of radotinib in MM cells.

**Key words** : Multiple myeloma, Radotinib, Tyrosine kinase inhibitor