



이학석사 학위논문

# 췌장암의 KRAS G12D 변이 특이적 유전자 ANPEP발굴 및 AKT 와의 기전 연구

Discovery of KRAS G12D mutation-specific gene ANPEP in pancreatic cancer and study of mechanism with AKT

> 울산대학교 대학원 의 과 학 과 김 어 진

# 췌장암의 KRAS G12D 변이 특이적 유전자 ANPEP발굴 및 AKT 와의 기전 연구

지도교수 김송철 지도교수 전은성

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원

의과학과

김어진

# 김어진의 이학석사학위 논문을 인준함

- 심사위원 성영훈 (인)
- 심사위원 김인기 (인)
- 심사위원 전은성 (인)

# 울산대학교 대학원

2022년 2월

### 국문요약

췌장암 환자의 5년 생존율은 약 11%밖에 되지 않은 암 종이며, 다른 암 종과 비교하여 생존 율이 가장 낮은 난치암 중의 하나이다. 췌장암은 발생 초기에 명확한 증상을 보이지 않기 때 문에, 진단 시 이미 진행되어 있는 경우가 많아 완치를 위한 적절한 치료를 받기 어려운 경우 가 많다.

또한 진단 후 외과적 수술을 통해서 절제하여도 췌장의 구조가 매우 복잡하고 주변에 신경조 직 등이 많이 분포해 있기 때문에 국소 재발 및 기타 장기 전이가 일어나는 경향이 높다.

췌장암의 조기 진단과 최적의 치료제를 개발하기 위해, 다양한 방면의 연구를 통해 췌장암 발 생 및 종양 환경에 대한 지식과 이해가 선행되어야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 종양의 발 생 및 미세 환경 구성에 가장 큰 영향을 미치는 유전자 변이를 중심으로 연구를 진행하게 되 었다. 췌장암 발생과 관련된 많은 유전자 변이들 중, 가장 일찍 발생하고, 가장 많이 보고되고 있는 KRAS변이와 그 subtype중, 현저히 낮은 생존율을 보이는 G12D을 중점으로 연구를 진행하였다.

가장 먼저 CCLE public site에서 KRAS type별 세포주의 mRNA 발현을 비교하여 G12D의 특이적 유전자를 찾는 과정을 진행하였고, ANPEP라는 G12D 항원을 찾게 되었다. 췌장암 세포주에서의 세포증식, 세포이동에서의 ANPEP의 기능을 확인하기 위해 si-RNA를 활용 하여 ANPEP의 발현을 낮추었다. 발현이 낮아진 그룹은 비교군 대비 세포 증식률과 세포 이 동률이 낮은 것을 확인하였다.

KRAS G12D변이 그룹에서 ANPEP의 종양학적 기능을 규명하기 위해, KRAS 변이가 없는 세포주를 기반으로 G12D와 G12V 변이를 유도한 세포주를 구축하였다. 기존의 세포주와 변 이 유도세포주들을 활용한 세포 실험을 통하여 세포의 성장, 사멸, 이동에 관여하는 AKT와

i

의 연결고리를 확인하였다. 그리고 ANPEP와 AKT의 연관성을 확인하기 위해 si-RNA를 활용하여 ANPEP의 발현을 줄이고 AKT의 발현의 변화도 같은 경향으로 줄어드는 것을 확 인하였다.

세포주를 활용하여 mouse 피하 이식 실험을 진행하였고 G12D그룹의 종양의 생성과 성장에 ANPEP와 AKT의 영향을 확인하였다.

본 연구에서는 ANPEP라는 KRAS G12D변이 특이적 유전자를 발굴하게 되었고, ANPEP의 세포증식, 세포이동과 관련된 종양학적 기능을 췌장암 세포주에서 확인하였으며 KRAS G12 변이, ANPEP 그리고 AKT 이 세가지 중심 주제들의 연결을 확인하게 되었다.

중심단어: 췌장암, KRAS, G12D, ANPEP, AKT

# 목차

국문요약 ·		• •	•••	•••	•••	 •••	•••	•••		••	•	•••	•	•	i
목차 •••				•••	•••	 •••					•	• •	•	•	iii
List of figures		••		•••		 ••	•••			••	•	•••	•	•	iv
서론 •••		•••	•••	•••	•••	 •••		•••	• • •	••	•	• •	•	•	1
연구재료 및 1	방법 · ·	• •		•••		 ••		•••	• • •	• •	•		•	•	3
결과 • • •		• •		•••		 •••			•••		•		•	•	8
고찰 •••						 •••					•		•	•	37
참고문헌 ·						 •••					•		•	•	39
영문 요약 ㆍ			•••	•••		 • •	•••	•••			•	• •	•	•	41

# List of figures

그림 1. KRAS G12D변이의 특이적 유전자 발굴 10
그림 2. 췌장암 세포주에서 KRAS변이 SUBTYPE에 따른 ANPEP발현 비교분석 12
그림 3. MOUSE종양, 혈액내에서의 KRAS변이 SUBTYPE에 따른 ANPEP발현 비교분석 14
그림 4. 췌장암 세포주에서 si-ANPEP의 발현 억제 확인 18
그림 5. 췌장암 세포주에서 si-ANPEP Transfection 후 세포증식, 이동 확인 19
그림 6. BxPC3_KRAS 변이세포주 구축과정 25
그림 7. BxPC3_KRAS 변이 세포주에서 ANPEP, PI3K/AKT 신호 발현 확인 27
그림 8.췌장암 세포주에서 ANPEP 발현억제와 PI3K/AKT 신호전달의 관계 28
그림 9. 췌장암 세포주에서의 ANPEP발현 억제와 P-AKT의 발현변화 PROTEIN LEVEL에서 확인 30
그림 10. 10.BxPC3_KRAS 변이 세포주를 활용 MOUSE 피하 이식 실험 31
그림 11.BxPC3_KRAS 변이 세포주 피하 이식 각 MOUSE 개체 종양에서의 ANPEP, AKT발현 확인33
그림 12. BxPC3_KRAS변이 세포주 피하 이식 MOUSE 종양의 무게와 ANPEP, AKT의 상관관계 35

## 서론

2018년에 발표한 국가 암 통계에 따르면 췌장암은 주요 10대 암에 속하며, 5년 생존율은 약 11%로 주요 10대암 중 생존율이 가장 낮다. 또한, 2018년 185개국에서 진행한 암 발생률 은 2.5%이나 사망률은 4.5%로 36개의 암 종 중 7번째로 사망률이 높은 것을 확인할 수 있 었다[1, 2]. 췌장암은 조기진단 또한 매우 어려우며, 췌장암의 진행이 매우 악화하여 있을 때, 진단을 받는 경우가 많다. 이러한 췌장암의 발생 및 진행과 연관된 여러 유전자 중 하나인 KRAS 변이는 세포의 성장, 성숙 및 사멸을 조절하는 세포 신호 전달 경로 RAS/MAPK의 일 부를 구성하는 인자를 암호화한다. KRAS변이는 KRAS를 암호화하는 유전자의 일부 염기서 열이 치환, 결실 또는 삽입되어 발생한다. KRAS 유전자의 codon12 및 13에서의 변이는 이 유전자의 산물인 p21-ras 단백질의 기능적 변화를 초래한다. 그 결과 세포핵에 필요 이상 의 성장 신호를 전달함으로써 세포의 성장과 분열을 촉진하고 발암 과정에 관여한다. KRAS 변이는 전체 췌장암 환자 중 약 90%에서 발견되고 있으며, 췌장의 정상 상피세포에서 KRAS 의 활성을 시작으로 수년에 걸친 단계적 유전자 변이 과정이 일어나면서 진행되는 췌장암에 서 KRAS변이는 가장 중요한 유전적 요인이다 [3-5].

췌장암에서 KRAS변이의 영향에 대해 많은 논문들이 보고되어 있다. KRAS의 codon12 및 13에서의 변이는 GTP의 가수분해를 방해하며 지속적으로 GTP결합 상태로 축적되고 GDP-GTP 교환을 방해하게 된다. 변이에 의해 방해가 일어나면 종양 세포 성장에 필요한 하위 신 호전달 경로 MAPK, PI3K를 활성화된다. 췌장암에서 많이 발견되고 있는 KRAS변이의 비 율을 보면 G12D는 약 45%, G12V 약 35% 그리고 G12R 약 15%비율로 확인된다. KRAS G12D변이는 G12V, G12R보다 내재적 가수분해가 상대적으로 적게 일어난다. 이는 KRAS G12D변이가 G12V, G12R보다 지속적으로 GTP결합 상태로 축적됨으로써 KRAS G12D면 이가 상대적으로 종양 세포 성장에 필요한 신호를 필요 이상으로 전달할 가능성이 크다는 것 이다[6, 7]. KRAS G12D면이는 codon12 위치의 아미노산 Glycine이 Aspartic acid으로

치환되었고 G12V는 아미노산 Glycine이 Valine으로 치환되었다. 또한 G12R은 아미노산 Glycine이 Cysteine으로 치환되었다. 이렇듯 아미노산 하나가 바뀌면서 여러 종류의 변이가 발생하며 아미노산 하나의 차이는 생존율의 차이까지 보인다. 췌장암 환자를 대상으로 KRAS subtype에 따라 생존율을 확인해 보았는데 G12D-G12V-G12R/G12D-G12V-Wild type 순으로 생존율이 낮음을 보고하였다. 또 다른 연구결과 G12D의 생존율은 G12V+G12R+Wild type보다도 낮은 것으로 보고하였다[8, 9].

본 연구에 앞서 서울아산병원(AMC) 간담도체외과 김송철교수팀에서 진행된 선행연구는 2000년 1월~ 2016년 4월 동안 서울아산병원에서 수술을 받은 PDAC(Pancreatic ductal adenocarcinoma) 환자 2029명을 대상으로 분석 연구하였다. 2000년과 2009년 사이에 746 명의 환자(그룹1)와 2010년과 2016년 사이에 1,283명의 환자(그룹2)의 예후 인자를 평가 하였다. 연구 결과 그룹2는 그룹1 보다 더 나은 생존율을 보였는데, 이는 조기 진단과 선행 화 학 요법 및 좀 더 확립된 환자 관리 시스템의 결과와 더불어 종양 생물학적, 유전적 요인이 환 자의 생존과 관련되어 있음을 보고하였다. 특히 KRAS 유전적 변이와 관련한 연구 부분을 보 면 KRAS유전자가 확인된 총568명의 환자 중 Wild type 40.5%, KRAS G12D변이가 28%, G12V변이가 20% 로 확인되었다. 본 선행연구에서도 G12D의 낮은 생존율을 확인할 수 있 었는데 G12D의 생존율은 15.4개월, G12V는 20.7개월, wild type은 25.6개월로 G12D의 생존율이 G12V, wild type 대비 현저히 낮은 것을 확인하였다.

이러한 결과를 바탕으로, 췌장암에서 KRAS G12D변이가 가지는 특징적인 종양학적 기전에 대한 연구적 필요성을 확인하였고, KRAS G12D변이와 관련한 특이적인 항원 및 관련 기전 에 대해 연구하였다.

## 연구재료 및 방법

#### 1) 세포주 배양

본 연구에서는 췌장암 세포주 BxPC3, ASPC1, HPAF2, PANC1, PANC10.05, SNU410, CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213을 사용하였고 한국세포주 은행과 ATCC 회사에 서 구입하여 사용하였다. 배양액은 RPMI-1640(GenDEPOT, Texas, 미국), DMEM(GenDEPOT, Texas, 미국)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco island, N.Y, U.S.A)와 1% antianti(gibco)를 포함하여 사용하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ Incubator에서 배양하였으며, 계대 배 양은 약 80% 정도 세포가 자랐을 때 계대 배양을 진행하였다.

KRAS wild type 세포주는 BxPC3 (총 1종), KRAS G12D변이 세포주는 ASPC1, HPAF2, PANC1, PANC10.05, SNU410 (총 5종), KRAS G12V변이 세포주는 CANPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213 (총 4종)이다.

#### 2) 유전자 발현분석

RNA를 확보하기 위해 배양해둔 세포주 plate에 phosphate buffered saline (PBS) 분주 후, cell scraper로 긁어 PBS에 섞인 세포를 확보한다. 원심분리기를 이용하여 상층액을 제거하 고 세포만 확보한다. 확보한 세포를 용해한다. 여과작용 통해 몇 번의 세정을 진행하고 RNase-free water로 RNA를 용출해준다. FavorPrep Blood/Culutred Cell Total RNA purification Mini Kit(FAVORGEN, Taiwan)의 지침서에 따라서 진행하였다[10]. cDNA 를 확보하기 위해 RNA와 amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (GenDEPOT, Texas, 미국) 를 섞어주고 지침서에 따라 annealing 5분, 25 /extend45분, 55 /RT Inactivation 1분, 85 /hold, 4 를 PCR cycler에 설정하였다[11]. CFX Connect RealTime PCR Detection System(Bio-RAD, California, 미국)를 사용하여 Real-time polymerase chain reaction(Real-time RCR, quantitative PCR, Q-PCR)을 진행하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 진행을 위해 앞선 방법으로 확보한 RNA와 HiPi Plus 5x PCR Master Mix(ecocell, 한국), 유전자 primer를 섞어 Denaturation 30초, 95 /annealing 30초, -4 /extend 1분, 72 (총 35 cycle)를 PCR cycler에 설정하여 sample을 확보하였다. 50X TAE buffer(GenDEPOT, Texas, 미국)를 1X TAE buffer로 희석하여 사용한다. Agarose, Sepro(GenDEPOT, Texas, 미국)를 희석한 1X TAE buffer 에 섞어 2% agarose gel을 만들어주었다. Gel의 홈에 sample과 Dyne Loadingstar (다인 바이오, 한국)를 1:5 비율로 넣어주고 15분~25분정도 gel을 내려주었다.

#### 3) western blot

배양해둔 세포주를 cell scraper 활용하여 확보하였다. RIPA lysis buffer를 이용해 용해한 다. 용해된 단백질은 BCA protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 미국)로 정량 하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분해 후, Polyvinylidene fluoride (PVDF) 0.45 μm으로 이동시켰다. anti-ANPEP, anti-AKT, Anti-Phospho-AKT1-Y315/AKT2-Y316/AKT3-Y312(rabbit, polyclonal) (Solarbio, Beijing, 중국), anti-β-actin (mouse, monoclonal) (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입, 2A peptide는 아 산생명과학연구원의 성영훈 교수팀에서 얻었으며 5% non-fat skim milk in PBST에 희석 하여 4℃에 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 15분씩 2번 PBST로 세척하였다. 2차항체 antirabbit HRP, anti-mouse HRP(Polyclonal) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, 미국) 또한 5% non-fat skim milk in PBST에 희석하여 한 시간 동안 상 온에서 반응시켰다. 그 후, 15분씩 4번 PBST로 세척한 후, Western blot substrates (BIOMAX, 서울, 한국)로 분석하였다.

#### 4) 췌장암 피하 종양 모델 구축

췌장암 세포주를 이식하기 위해 생후 6-8주령 된 수컷 BALB/c-nu mouse (오리엔트 바이 오, 성남, 대한민국)를 구매하였다. 배양해둔 1 x 10<sup>6</sup>개의 세포를 Matrigel과 phosphate buffered saline (PBS)에 1:1비율로 섞은 뒤 1 x 10<sup>6</sup> cell/100ul을 mouse의 옆구리 피하 에 주입한다. 주 2회 종양의 크기와 mouse의 무게를 측정하였고 종양의 크기가 1000~2000 때로 자랐을 때, CO<sub>2</sub>를 이용하여 희생시킨 뒤, 종양과 혈액을 채취하였다.

#### 5) ELISA

BALB/c-nu mouse 피하에 췌장암 세포주 PANC1, ASPC1, CFPAC1, SNU213(총 4종) 을 심고 종양의 크기가 1000~2000㎡ 자랐을 때, CO<sub>2</sub>를 이용하여 mouse를 희생시킨 뒤, mouse의 혈액을 BD Microtainer SST(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, 미국)에 담은 뒤 원심분리기에서 2000rpm/15분 돌린 후 serum을 확보한다. ELISA KIT(Solarbio, Beijing, 중국)의 지침서에 따라 필요한 시약과 sample을 실험 1시간전에 실온에 둔다. 세척을 진행한 뒤, blocking과 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ Incubator에 서 incubation, 시약 분주, 세척, incubation을 반복한다. 실험 파장 (Measurement wave length) 450mm 설정 후 흡광도 측정한다. 얻은 흡광도 값을 1차식으로 변환한다. X축은 비 교군으로 사용한 Human ANPEP (standard)의 농도 값을 넣고, Y축에는 OD 값의 평균을 넣어 계산한다.

#### 6) 세포 증식률 분석

췌장암 세포주를 96 well plate에 3x10<sup>3</sup>/well에 분주하였다. 실험에서 확인하고자 하는 시 간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 배양했다. 세포의 증식률을 분석하기 위해 EZ-Cytox (DoGenBio, 서울, 대한민국)와 serum free 배지를 9:1로 섞어 100ul/well에 분주해 준다. 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 incubation 90분 뒤 실험 파장(Measurement wave length) 450nm/기준 파장(Reference wave length) 600nm 설정 후 흡광도 측정해준 다. 측정값을 그룹별로 평균을 내고 비교군(control)을 100%로 잡아준다. 측정값을 비교군 값의 평균으로 나눠 계산한다.

#### 7) 세포 이동률 분석

세포 이동률 분석을 위해 transwell 시스템을 SPLInsert<sup>™</sup> Hanging(spl life sciences, 대 한민국)을 활용하였다. 먼저 serum free 배지를 사용하여 5x10<sup>4</sup>/well의 세포를 분주해 준 다. 24시간 동안 세포가 이동할 수 있게 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 세포를 배양해준 뒤 well의 하부표면으로 이동된 세포를 아산생명과학연구원의 김송철 교수팀에서 얻은 crystal violet으로 15분 염색한다. 현미경(200x)으로 확인 후, well당 사진을 찍고 무작위로 5개의 사진을 선정한 후 염색된 세포의 개수를 확인하여 정량 하였다.

또 다른 세포 이동률 분석 실험 wound Healing assay를 진행하기 위해 췌장암 세포주를 6 well plate에 95% 정도 차지할 정도의 세포 수 1x10<sup>6</sup>/well를 분주하였다. 다음 날 1000 T pipette를 이용하여 well의 중간 부분에 반듯하게 줄을 그어준다. 바로 현미경을 이용하여 그 어준 줄의 넓이를 측정하고 확인하고자 하는 시간별로 줄의 넓이를 측정해준다.

#### 8) 통계학적 분석

통계학적 분석은 student T test를 사용하여 시행하였고, 통계적 유의성은 (\*: p <0.05 \*\*: p <0.01 \*\*\*: p <0.001)p 값이 0.05 미만인 경우 인정하였다. GraphPad Prism을 이용하여 Pearson 상관계수로 correlation을 확인하였다. RNA seq을 분석하기 위해 CCLE site에서 췌장암의 조직학적 정보가 담긴 raw data를 얻은 뒤, 그룹화를 진행했다. 그리고 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)를 활용하여 두 유전자 그룹 간의 통계적으로 유의미하게 일 치하거나 차이가 나는지를 확인하였다.

#### 1. KRAS G12D변이의 특이적 유전자 ANPEP발굴 및 변이 특이적 발현 확인

KRAS G12D변이의 특이적 유전자를 찾기 위해 CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)site에서 KRAS G12D변이 세포주 (ASPC1, HPAF2, PANC1, PANC10.05, SNU410 총 5종)와 G12V 세포주 (CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213 총 4종)raw data를 확보하였고 전 체 분석을 진행하여 항원리스트를 얻었고 그 중에서 KRAS G12D변이 특이적 항원으로 ANPEP를 선정하였다. ANPEP의 개별적인 분석을 진행하기 위해 CCLE site의 raw data를 분석 진행하였다. (그림 1A) 비교 분석을 통하여 KRAS G12D변이 세포주 그룹과 G12V세 포주 그룹에서의 ANPEP 발현양의 차이를 확인하였는데 P value 0.001미만 값이 나오는 것 을 확인하였다. (그림 1B) KRAS G12D변이 세포주에서도 PANC1에서 발현양이 가장 높은 것을 확인하였다. (그림 1C)

자체 실험을 통해서 ANPEP의 발현을 확인해보았다. KRAS G12D변이 세포주(ASPC1, HPAF2, PANC1, PANC10.05, SNU410 총 5종), G12V세포주(CAPAN1, CAPAN2, CFPAC1, SNU213 총 4종) 그리고 wild type세포주 BxPC3에서 RNA와 단백질을 추출하 여 q-pcr과 western blot 실험을 통해 ANPEP의 발현을 확인하였다. mRNA에서 확인 결 과 전반적으로 KRAS G12D변이 세포주가 KRAS G12V변이 세포주보다 발현이 높았다. 특 히 PANC1에서는 그 다음으로 높은 ASPC1보다도 약 3배 높은 발현을 보였다. (그림2A) protein level에서는 KRAS G12D변이 세포주 PANC1, ASPC1, SNU410에서만 발현을 확 인할 수 있었다. (그림2B) 정량적으로 확인한 결과 PANC1의 발현은 ASPC1보다도 약 3배 높은 발현을 보였다. (그림2C)

KRAS G12D변이 세포주에서 발현양이 비교적 높은 PANC1, ASPC1 (총 2종)과 비교군으 로 KRAS G12V변이 세포주 CFPAC1, SNU213 (총 2종)을 활용하여 mouse의 피하에

1x10<sup>6</sup>개의 세포를 이식하였고 종양의 크기가 1000~2000㎡ 정도로 자랐을 때, 희생시킨 뒤 종양과 혈액을 확보하였다. 확보한 종양에서 단백질을 추출하였고 western blot 실험을 통 해 G12D 세포주를 심은 mouse의 종양에서의 ANPEP 발현양이 비교군 G12V 세포주보다 발현이 높은 것을 확인하였다. (그림 3A) 정량적으로 확인하였고 KRAS G12D변이 세포주 PANC1 과 KRAS G12V변이 세포주 CFPAC1의 발현 값의 비교는 P value 0.01미만으로 유의미한 차이가 있는 것으로 확인되었다. 또한 KRAS G12D면이 세포주 ASPC1과 KRAS G12V면이 세포주 CFPAC1의 발현 값의 비교는 P value 0.001미만으로 유의미한 차이가 있는 것으로 확인되었다. (그림3B) mouse의 혈액에서 혈청을 확보하고 ELISA KIT를 활용 하여 ANPEP발현을 확인하였을 때의 결과 또한 KRAS G12D면이 세포주를 심은 mouse그 룹이 비교군 KRAS G12V 세포주를 심은 mouse, 세포주를 이식하지 않은 정상 mouse 그룹 보다 발현양이 높은 것을 확인할 수 있었다. KRAS G12D면이 세포주 PANC1, ASPC1의 발 현양은 세포주를 이식하지 않은 정상 mouse 혈청과 P value 0.001미만으로 유의미한 차이 가 있음을 확인할 수 있었다. (그림 3C)



B)

						G2	G3					
					G12V							
	log2Fold Change	SYMBOL	P-value	ASPC1	HPAFII	PANC1	PANC10.05	SNU410	CAPANI	CAPAN2	CFPAC1	SNU213
G2>G3	7.8758095	ANPEP	0.00000005	8707.52	42.49	78913.31	16705.83	2455.98	62.02	42	112.4	52.06

C)





A)

### 그림 1. KRAS G12D변이의 특이적 유전자 발굴

(A)CCLE site의 KRAS G12D변이와 G12V 변이 세포주의 비교를 통해 ANPEP항원 발굴
(B)CCLE자료의 개별적인 데이터를 활용하여 KRAS G12D변이와 G12V변이 세포주의 발 현양 통계학적 비교 (P value <0.001\*\*\*)(C)CCLE자료의 개별적인 데이터를 활용하여</li>
ANPEP의 발현을 비교 확인









### 그림 2. 췌장암 세포주에서 KRAS변이 subtype에 따른 ANPEP발현 비교 분석

(A)KRAS wild type, G12D, G12V변이 세포주 (총 10종)mRNA level에서의 ANPEP 발 현 확인 (B) KRAS wild type, G12D, G12V변이 세포주 (총10종) 단백질 추출 후 western blot으로 protein level에서의 ANPEP발현 확인 (C)western blot으로 확인한 protein level 에서의 ANPEP발현 정량적 비교



B)

ANPEP



C)

ANPEP



그림 3. Mouse좋양, 혈액내에서의 KRAS변이 subtype에 따른 ANPEP발현 비교 분석 (A) KRAS G12D변이 세포주(PANC1, ASPC1 총2종), KRAS G12V변이 세포주(CFPAC1, SNU213 총 2종)를 mouse의 피하에 이식 후 종양확보. 종양에서 단백질 추출하여 western blot으로 protein level에서 ANPEP의 발현 비교 분석 (B) western blot으로 protein level 에서 ANPEP 발현 정량적 비교 분석 (C) KRAS G12D변이 세포주(PANC1, ASPC1 총 2 종), KRAS G12V변이 세포주(CFPAC1, SNU213 총 2종)를 피하에 이식한 그룹의 mouse 와 세포주를 심지 않은 정상 mouse 희생 후 혈액 확보. 혈액에서 혈청 확보하여 ELISA KIT 를 활용 ANPEP의 발현 비교 분석

#### 2.ANPEP의 종양학적 기능 확인

본 연구에서는 암의 다양한 특징 중 selective growth and proliferative advantage, invasion and metastasis의 특징을 중점으로 실험을 진행하기로 하였다[12].

가장 먼저, 췌장암에서의 ANPEP의 성장 및 증식 기능을 확인하기 전에 확인하기 전에 유전 자 발현양을 조절하여 세포주의 성장이 영향을 받는지를 확인해보고자 하였다.

si-ANPEP를 제작하였고 유전자 발현 억제 확인을 위해 KRAS G12D변이 세포주 PANC1 에 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10m/고농도,20m)그룹을 설정하고 발현 억제를 RNA level 에서 확인해 보았다. (그림4A) GAPDH대비 ANPEP의 발현양을 no treat 그룹을 비교군으 로 잡아 정량적으로 확인하였고 si-ANPEP처리 그룹이 no treat 그룹 대비 RNA level에서 40~60% 정도 억제된 것을 알 수 있었다. (그림4B) western blot실험을 통해 protein level 에서도 발현이 억제되는 것을 확인하였고 si-ANPEP그룹이 no treat 그룹 대비 protein level에서는 80~90% 정도 억제된 것을 알 수 있었다. (그림4C, D) 그러나 예상했던 것 과는 다르게 저 농도(10nm)와 고농도(20nm) 간의 발현양의 차이가 크지 않아 추후 실험에서도 계 속해서 저 농도(10nm) 고농도(20nm) 두 그룹으로 실험을 진행하기로 하였다.

종양 세포에서의 ANPEP의 세포성장 및 증식 기능을 확인하기 위해 ANPEP 발현양이 높은 PANC1세포주 와 ASPC1세포주를 활용하여 si-ANPEP transfection 후 72시간이 지난 뒤 세포의 증식률을 확인하였다. PANC1세포주에서는 si-ANPEP 처리 그룹이 처리하지 않은 비교군보다 si-ANPEP의 농도와 상관없이 약 50% 정도로 P value 0.001미만의 유의미하 게 증식률이 떨어지는 것을 확인하였다. ASPC1세포주에서는 비교군보다 si-ANPEP 그룹 이 저 농도(10nm) 그룹에서는 약 20%로 P value 0.001미만 값으로 유의미하게 떨어졌고 고 농도(20nm) 약 50%로 P value 0.001 미만으로 유의미하게 증식률이 떨어지는 것을 확인하 였다. 저 농도(10nm) 그룹과 고농도(20nm) 사이에도 P value 0.001 미만으로 유의미하게 고

농도 그룹의 증식률이 떨어졌다. (그림 5A)

다음으로, 췌장암에서 ANPEP의 세포 이동 및 전이 기능을 확인하기 위해 PANC1세포주에 si-ANPEP transfection 24시간이 지난 후 transwell migration assay를 진행하였다. (그 립5B) 세포의 이동률은 비교군보다 저 농도(10nm) 에서는 약 70%, 고농도(20nm) 에서는 약 90%의 유의미하게 이동률이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. (그림 5C) Wound Healing assay를 진행하여 ANPEP의 세포 이동 및 전이 기능을 한번 더 확인해 보았다. Scratch를 내어 세포의 시간 별 이동을 확인하기 위해 간격을 만들었고 si-ANPEP transfection 24시 간이 지난 후를 0시간으로 설정하고 시간 별(24, 48 시간)이동을 확인하였다. (그립5D) 24 시간 후 세포의 이동률은 비교군 보다 저 농도(10nm), 고농도(20nm)에서 약 10% 이동률이 유의미하게 떨어지는 것을 확인하였다. 48시간 후 세포의 이동률은 비교군 보다 저 농도(10 m), 고농도(20nm)에서 약 20% 정도 이동률이 유의미하게 떨어지는 것을 확인하였다. (그립 5E)



그림 4.췌장암 세포주에서 si- ANPEP의 발현 억제 확인

(A) PANC1 세포주에 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 그룹 RT-PCR 으로 RNA level에서 발현 억제 확인 (B)RT-PCR으로 RNA level에서의 ANPEP 발현 GAPDH대비 정량적 확인 (C)PANC1 세포주에 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농 도,20nm)처리 그룹 western blot으로 protein level에서 발현 억제 확인 (D) western blot 으로 protein level에서의 ANPEP 발현 ACTIN대비 정량적 확인



#### 그림 5. 췌장암 세포주에서 si - ANPEP Transfection 후 세포 증식, 이동 확인

(A) PANC1, ASPC1세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm) Transfection 72시간 후 세포 증식률(B) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농 도,20nm) Transfection 24시간 후 세포 이동 현미경 사진(200X) (C) 세포 이동 현미경 사 진(200X) 5장 무작위로 선정하여 세포 계수 정량화 그래프(D) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm) Transfection 24시간 후를 0시간으로 control 잡고 24시간, 48시간동안 세포 이동 확인 (빨간 박스 scratch 간격) (E) 빨간 박스 scratch 시간 별 간격의 변화를 통해 세포 이동 정량화 그래프

#### 3.KRAS G12D변이 와 ANPEP의 연결고리 AKT

KRAS G12D변이 세포주에서의 ANPEP의 세포 증식 및 이동 기능 확인 후, 본 연구진은 KRAS G12D변이 와 ANPEP의 연결기전을 찾기 위해 노력하였다. 이를 위해 기존의 논문들 을 확인해 본 결과, KRAS G12D변이에서 AKT activation이 높아진다는 결과를 보고한 연 구를 확인하였고 [13] 다른 연구에서는 흑색종 세포주에서의 ANPEP의 기능이 감소되면 AKT의 발현양이 줄어드는 것을 보고하였다[14].

이러한 연구들을 참고하여, 본 연구진은 KRAS G12D변이와 ANPEP관계에서의 AKT를 활 용하여 그 기전을 찾기 위한 실험을 진행하게 되었다. 우선으로 췌장암 세포주의 유전적 변 이의 유무가 다른 문제를 해결하기 위해 세포주를 구축하는 과정을 진행하였다. 아산생명과 학연구원의 성영훈 교수님 실험실의 도움을 받아 KRAS변이 wild type의 BxPC3세포주에 처리할 KRAS G12D, G12V변이 virus DNA 농축액을 얻었다. 구축할 세포주를 BxPC3\_KRAS 변이 세포주라고 명칭 하였다. BxPC3세포주는 control vector와 G12D, G12V를 처리하였 고 zsGreen으로 virus주입의 확인을 하기 쉽게 하였다. (그림6A) virus처리 후, 사용 배양 액에 0.5µg/ml의 puromycin을 넣어 세포 selection과정을 통해 계대를 진행하였다. Virus 처리 후, 72시간 뒤에 confocal로 zsgreen의 발현을 확인하였고 virus 처리 그룹에서 모두 zsgreen의 발현을 확인할 수 있었다. (그림6B) 세포주를 확보하여 단백질을 추출하였고 2A peptide의 발현을 western blot을 통해 protein level에서 확인하였다. (그림6C) 2A peptide의 발현양을 정량화 하여 확인하여 virus 처리 그룹에서 2A peptide 발현을 정확하 게 확인하였다. (그림6D) BxPC3\_KRAS변이 세포주에 KRAS발현을 확인하기 위해 KRAS\_ exogenous primer를 성영훈 교수님 실험실의 도움을 받아 제작하였다. KRAS\_exogenous 발현과 KRAS\_Total 발현을 mRNA에서 확인하였고, KRAS G12D, G12V변이 세포주에서 KRAS 발현이 비교군과 대비하여 높은 것을 확인하였다. (그림6D) BxPC3세포주에 KRAS 변이 virus가 최종적으로 처리되었는지 확인하기 위해 cDNA를 추출하여 회사에 의뢰하여

 $2 \ 1$ 

sanger sequencing을 확인해보았고 변이가 생긴 것을 확인하였다. (그림6E)

구축한 BxPC3\_KRAS세포주를 활용하여 ANPEP와 PI3K/AKT 신호의 발현을 mRNA에서 확인하였다. BxPC3\_KRAS변이세포주 그룹에서 ANPEP의 발현양은 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹에 서 가장 높았다. 비교군 그룹과 BxPC3\_KRAS\_G12V 그룹과도 P value가 0.001미만값의 유의미하 게 높은 발현양을 보였다. (그림7A) BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹에서 ANPEP의 발현양이 높은 것과 비슷한 경향으로 AKT의 발현도 높은 것을 확인하였다. AKT발현양 또한 다른 그룹과 의 P value가 0.001미만으로 유의미하게 높은 발현양을 보였다. (그림7B) AKT의 하부 signal인 mTOR의 발현은 비교군과 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹의 P value가 0.01미만으로 유의미하게 높았고, BxPC3\_KRAS\_G12D, BxPC3\_KRAS\_G12V그룹과의 P value는 0.05 미만의 값이 나왔다. (그림7C) AKT의 상위 signal인 PI3K의 발현은 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹의 발현이 비교군 대비 낮은 것을 확인하였다. (그림7D)

본 연구진은 ANPEP와 AKT의 관계확인을 위해 si-ANPEP Transfection으로 ANPEP의 발현을 억제해보았다. 앞서 활용하였던 PANC1, ASPC1세포주를 활용하여 ANPEP의 발현 을 억제하였고 mRNA에서 발현을 확인하였다. (그림8A, E) ANPEP가 억제되었을 때, AKT 의 발현은 ANPEP의 발현이 떨어지는 경향과 비슷하게 AKT의 발현도 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 저 농도 (10nm), 고농도 (20nm) 두 그룹에서 유의미하게 발현이 떨어지는 것 을 확인하였다. (그림8B, F)AKT의 하위 signal인 mTOR 또한 저 농도 (10nm), 고농도 (20 nm) 두 그룹에서 유의미하게 발현이 떨어지는 것을 확인하였다. (그림8C, G) 하지만 상위 signal인 PI3K는 PANC1세포주에서는 고농도 (20nm) 그룹에서 발현이 유의미하게 증가하 는 것을 확인하였다. (그림8D) 그러나 ASPC1세포주에서 si-ANPEP 그룹에서 PI3K의 발 현이 증가하는 것으로 보이나 P value값은 확인되지 않았다. (그림8H)

Protein level에서 ANPEP와 AKT의 관계를 확인하기 위해 PANC1세포주에 si-ANPEP

 $2 \ 2$ 

Transfection으로 ANPEP의발현을 억제하였고 단백질을 추출하여 ANPEP의 발현을 확인 하였다. (그림9A) 정량화 하여 정확하게 발현을 확인해 보았고 si-ANPEP 그룹의 ANPEP 발현이 저 농도 (10nm)에서는 약 50%, 고농도 (20nm)에서는 약 80% 발현이 줄어든 것을 확 인하였다. (그림9B) AKT의 phosphorylation의 변화와 Total AKT의 발현을 확인해보았 고 P-AKT의 발현을 Total AKT대비 확인하였을 때, 저 농도(10nm)에서는 약 80%발현이 줄었고, 고농도 (20nm)에서는 약 90% 발현이 줄어든 것을 확인하였다. (그림9C, D)

KRAS변이에 따른 기능 비교 실험을 진행하기 위해 BxPC3\_KRAS변이 세포주를 활용하여 mouse 피하 이식 실험을 진행하였다. 1x10<sup>6</sup>개의 세포를 mouse 옆구리 피하에 이식하였다. 시간에 따른 종양 성장의 비교를 위해 주 2회 종양 크기를 확인하였고 58일 차에 mouse를 희생시켰다. BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹의 mouse의 종양 생성이 가장 빨랐고, 크기 또한 가 장 큰 것을 확인하였다. (그림10A) 종양 확보 후 각 그룹별로 종양의 크기를 육안으로 확인 해보았고 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹의 종양이 큰 것을 알 수 있었다. (그림 10B) 58일 차 의 mouse 종양의 평균 크기는 BxPC3\_non mutant 그룹 366.5㎡, BxPC3\_KRAS\_Empty Vector 그룹 639mi, BxPC3\_KRAS\_G12V 그룹 477mi, BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹 1598 페으로 유의미하게 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹이 다른 그룹보다 종양의 크기가 유의미하게 큰 것을 확인하였다. (그림10C) 또한, 종양의 무게는 BxPC3\_non mutant 그룹 180mg, BxPC3 KRAS Empty Vector 그룹 283mg, BxPC3 KRAS G12V 그룹 298mg, BxPC3 KRAS G12D 그룹 933mg으로 종양의 무게 또한 BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹이 다른 그룹보다 유의미하게 무거 운 것을 확인하였다. (그림8D) 확보한 mouse의 종양에서 RNA를 추출하였고, 각 개체마다 ANPEP의 발현양을 확인하였다. BxPC3\_KRAS\_G12D 그룹의 개체들이 ANPEP의 발현양 이 다른 그룹 대비 높은 것을 보였고 특히 1번, 5번 개체의 ANPEP의 발현양이 눈에 띄게 높 은 것을 확인하였다. (그림11A) AKT의 발현양 또한 ANPEP의 발현양과 비슷한 경향을 보 였는데, 특히 BxPC3\_KRAS\_G12D의 1번, 5번 개체의 AKT의 발현양이 눈에 띄게 높은 것

을 확인하였다. (그림 11B) 중양의 무게 또한 BxPC3\_KRAS\_G12D의 1번, 5번 개체의 무 게가 가장 무거운 것을 확인하였다. (그림11C)종양의 무게와 ANPEP, AKT의 관계를 피어슨 상관관계로 확인해보았고, BxPC3\_KRAS\_G12D그룹의 ANPEP, AKT의 r값이 각각 0.889, 0.912인 것으로 보아 강한 양적(positive) 선형관계로 확인하였다. (그림 12C, G) 그와 반대로 BxPC3\_KRAS\_G12V그룹의 ANPEP, AKT의 r값이 각각 -0.883, -0.347로 음적(negative) 선 형관계로 확인하였다. (그림 12D, H)



#### 그림 6. BxPC3\_KRAS변이 세포주 구축과정

(A)KRAS wild type의 BxPC3 세포주에 처리한 virus의 vector map (B)구축한 BxPC3\_KRAS 변이세포주를 confocal로 Zsgreen발현 확인 (C)BxPC3\_KRAS변이 세포주의 protein level 에서 2A peptide의 발현 확인(D)western blot으로 확인한 protein level에서 2A peptide 발현 정량화 그래프 (F) BxPC3\_KRAS변이 세포주의 mRNA level에서 변이 유무에 따른 KRAS 발현 변화 확인 (E) BxPC3\_KRAS변이 세포주 sanger sequencing을 통해 변이 유 무 확인



(A)BxPC3\_KRAS변이 세포주의 mRNA에서 변이 유무에 따른 ANPEP발현 확인(B)BxPC3\_KRAS 변이 세포주의 mRNA에서 변이 유무에 따른 AKT발현 확인(C) BxPC3\_KRAS변이 세포주의 mRNA 에서 변이 유무에 따른 mTOR발현 확인(D) BxPC3\_KRAS변이 세포주의 mRNA에서 변이 유무에 따 른 PI3K발현 확인



#### 그림 8.췌장암 세포주에서 ANPEP 발현억제와 PI3K/AKT 신호전달의 관계

(A)PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 그룹에서의 ANPEP발현 억제 mRNA에서 확인 (B) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농 도,10nm/고농도,20nm)처리 후 mRNA에서 AKT의 발현 확인(C) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 후 mRNA에서 mTOR의 발현 확인 (D) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 후 mRNA에서 PI3K의 발현 확인 PI3K, mTOR RNA level 발현 확인 (E)ASPC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 그룹에서의 ANPEP발현 억제 mRNA에서 확인 (F)ASPC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 후 mRNA에 서 AKT의 발현 확인(G) ASPC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20 nm)처리 후 mRNA에서 mTOR의 발현 확인 (H) ASPC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 후 mRNA에서 PI3K의 발현 확인



그림 9. 췌장암 세포주에서의 ANPEP발현 억제와 P-AKT의 발현변화 protein level에서 확 인

(A) PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 그룹에서의 ANPEP발현 억제 western blot으로 protein level에서 확인 (B) western blot으로 protein level에서 ANPEP발현 ACTIN대비 정량화 그래프 (C)PANC1 세포주에서 si-ANPEP 농 도 별 (저 농도,10nm/고농도,20nm)처리 그룹에서의 P-AKT와 Total AKT 발현 western blot으로 protein level에서 확인 (D) western blot으로 protein level에서 P-AKT발현 Total AKT대비 정량화 그래프







#### 그림 10.BxPC3\_KRAS변이 세포주를 활용 mouse 피하 이식 실험

(A)BxPC3\_KRAS변이 세포주 이식 후 주 2회 종양 성장 확인 그래프 (B)58일차 종료 시점 종 양 확보 후 BxPC3\_KRAS변이 세포주 각 그룹 별 종양 사진 (C)BxPC3\_KRAS변이 세포주 각 그룹 종양 크기 비교 그래프 (D)BxPC3\_KRAS변이 세포주 58일차 종료 시점 종양 확보 후 종 양 무게 각 그룹 무게 비교 그래프



# 그림 11. BxPC3\_KRAS변이 세포주 피하 이식 각 mouse 개체 종양에서의 ANPEP, AKT발 현 확인

(A)BxPC3\_KRAS변이 세포주 이식 mouse 각 개체마다의 종양에서 ANPEP발현 mRNA에서 확

인 (B)BxPC3\_KRAS변이 세포주 이식 mouse 각 개체마다의 종양에서 AKT발현 mRNA에서 확

인 (C) BxPC3\_KRAS변이 세포주 이식 mouse 각 개체마다 58일차 종료 시점 종양 확보 후 종양

무게



그림 12. BxPC3\_KRAS변이 세포주 피하 이식 mouse 종양의 무게와 ANPEP, AKT의 상관 관계

(A) BxPC3\_KRAS 변이 세포주 전체 그룹의 mouse 좋양의 무게와 ANPEP의 상관관계 (B)
BxPC3\_non\_mutant 그룹의 mouse 좋양의 무게와 ANPEP의 상관관계(C) BxPC3\_KRAS\_G12D
그룹의mouse 좋양의 무게와 ANPEP 상관관계 (D) BxPC3\_KRAS\_G12V 그룹의 mouse 좋양의 무 게와 ANPEP의 상관관계(E) BxPC3\_KRAS 변이 세포주 전체 그룹의 mouse 좋양의 무게와 AKT
의상관관계 (F) BxPC3\_non mutant 그룹의 mouse 좋양의 무게와 AKT의 상관관계(G) BxPC3\_KRAS\_G12D
그룹의mouse 좋양의 무게와 AKT 상관관계 (H) BxPC3\_KRAS\_G12V 그룹의 mouse 좋양의 무게
와 AKT 상관관계

#### 고찰

본 연구진은 췌장암 환자의 생존과 관련된 요인 중 유전적 요인의 연구 필요성을 인식하고 연 구를 진행하였다. 췌장암 초기에는 명확한 증상이 보이지 않아 진단이 어려워 진단 시 이미 췌장암의 진행이 진행되어 있는 경우가 많다. 초기 진단의 어려움은 치료법의 어려움으로 나 타나고 있다. KRAS변이는 췌장암의 시작을 알리는 변이이며, 가장 많이 발견되는 변이이다 [3]. 또한 KRAS변이 subtype 중G12D의 발견율과 사망률이 높은 것을 토대로 본 연구가 진 행되었고 연구에서 ANPEP라는 중요한 유전자를 발굴하게 되었다. ANPEP (Alanine aminopeptidase)는 소장과 신장의 미세 융모 막 및 다른 원형질막에 존재하며, 소장에서는 위, 췌장의 프로테아제에 의한 단백질 가수분해로부터 생성된 펩타이드의 최종 소화 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 암세포에서의 세포 이동, 증식, 사멸 등에도 관여한다는 연구 결과 도 있으나 기타 세포에서의 기능은 명확하지는 않은 것으로 알려져 있다 [15]. 현재 ANPEP 는 다양한 분야에서의 연구되고 있다. 그러나 ANPEP와 KRAS G12D의 뚜렷한 연결고리로 연구한 선행연구는 찾을 수 없었다. 이는 본 연구가 ANPEP를 KRAS G12D의 바이오 마커 로써 활용 가능성을 찾은 것으로 보인다. 구축 세포주에서 다른 그룹세포주와 G12D세포주 와의 ANPEP 발현양 비교에서 G12D세포주의 높은ANPEP발현은 KRAS G12D의 바이오 마커로써 ANPEP 역할의 가능성이 높다는 것을 시사하는 것으로 보인다. 더 나아가 동물 실 험에서의 BxPC3\_KRAS\_G12D 세포주를 이식한 mouse의 빠른 종양 생성과 큰 크기의 종 양 생성은 세포실험의 한계를 보완해주었다. 또한 세포의 이동, 증식, 사멸과 같은 핵심 역할 에 기여하는 AKT와 ANPEP의 연관성을 밝히었다.

ANPEP의 종양학적 기능을 알아보기 위해 세포실험에서의 si-RNA를 활용하여 발현을 억 제하였고 ANPEP의 세포증식 및 성장기능, 세포의 이동 및 전이 기능을 확인한 의미 있는 연 구 결과였다. 나아가 동물실험에서 ANPEP를 Knock-down 혹은 Knock out 시킨 세포주 를 피하에 이식하여 종양의 생성과 성장 과정을 확인하는 실험도 추후 진행하여 세포실험 결

과를 보충할 수 있다고 보인다. 또한 ANPEP의 억제와 더불어 증가시켜 ANPEP의 종양학적 기능을 확인하면 본 연구의 결과를 보충할 수 있다고 보인다.

본 연구는 ANPEP의 발굴이라는 기초단계에서부터 시작하였다. KRAS G12D변이 와 ANPEP의 연관을 찾은 것에서 시사하는 바가 크다고 보인다. KRAS G12D변이, ANPEP 그 리고 AKT 간의 연결을 찾아 암세포에서의 ANPEP의 종양학적 기능을 밝힐 수 있었다. 이는 ANPEP의 기능을 더 밝힐 수 있는 가능성을 보여주었고, 췌장암발생 과 종양환경에 대한 연 구에 새로운 방향을 제시하였다.

## 참고문헌

- Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. 68(6): p. 394-424.
- Rawla, P., T. Sunkara, and V. Gaduputi, *Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*. World J Oncol, 2019. 10(1): p. 10-27.
- Waters, A.M. and C.J. Der, *KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. 8(9).
- 4. Liot, S., et al., *Stroma Involvement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview Focusing on Extracellular Matrix Proteins*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**(709).
- Vasan, N., J.L. Boyer, and R.S. Herbst, A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2014. 20(15): p. 3921-30.
- Moore, A.R., et al., *RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged?* Nat Rev Drug Discov, 2020. 19(8): p. 533-552.
- Windon, A.L., et al., STRUCTURAL DIFFERENCES BETWEEN VALINE-12 AND ASPARTATE-12 RAS PROTEINS MAY MODIFY CARCINOMA AGGRESSION. J Gastrointest Oncol, 1999. 9(1): p. 1-10.
- 8. Bournet, B., et al., *KRAS G12D Mutation Subtype Is A Prognostic Factor for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma*. Clin Transl Gastroenterol, 2016. **7**(3): p. e157.
- Haigis, K.M., *KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail.* Trends Cancer, 2017. 3(10): p. 686-697.
- 10. FavorPrep Blood/ Cultured Cell Total RNA Mini Kit, FAVORGEN, Editor.
- 11. amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix, GenDEPOT, Editor.
- Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011.
  144(5): p. 646-74.

- 13. Céspedes, M.V., et al., *K-ras Asp12 mutant neither interacts with Raf, nor signals through Erk and is less tumorigenic than K-ras Val12*. Carcinogenesis, 2006. **27**(11): p. 2190-200.
- Azimi, A., et al., Silencing FLI or targeting CD13/ANPEP lead to dephosphorylation of EPHA2, a mediator of BRAF inhibitor resistance, and induce growth arrest or apoptosis in melanoma cells. Cell Death Dis, 2017. 8(8): p. e3029.
- Mina-Osorio, P., *The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target.* Trends Mol Med, 2008. 14(8): p. 361-71.

## 영문요약

The 5-year survival rate of pancreatic cancer patients is only about 11%, and it is one of the refractory cancers with the lowest survival rate compared to other carcinomas. Since pancreatic cancer does not show clear symptoms in the early stages of its development, it is often difficult to receive appropriate treatment for a cure as it is often already advanced at the time of diagnosis.

Also, even after diagnosis and surgical resection, the pancreas has a very complex structure and a lot of nerve tissue is distributed around it, so local recurrence and metastasis to other organs is high.

In order to diagnose pancreatic cancer early and develop an optimal therapeutic agent, knowledge and understanding of pancreatic cancer occurrence and tumor environment must be preceded through research in various fields. The study was conducted focusing on genetic mutations that affect Among the many gene mutations related to pancreatic cancer, the study was conducted focusing on the earliest and most reported KRAS mutation and G12D, which shows a significantly lower survival rate among its subtypes.

First, the process of finding a specific gene for G12D by comparing the mRNA expression of cell lines for each KRAS type in the CCLE public site was followed, and the G12D antigen called ANPEP was found. To confirm the function of ANPEP in cell proliferation or cell migration in pancreatic cancer cell lines, si-RNA was used to lower the expression of ANPEP. It was confirmed that the cell proliferation rate and cell migration rate were lower in the group with lower expression compared to the control group.

To investigate the oncological function of ANPEP in the KRAS G12D mutation group, cell lines inducing G12D and G12V mutations were constructed based on cell lines without KRAS mutations. Through cell experiments using existing cell lines and mutation-inducing cell lines, the link with AKT involved in cell growth, death, and migration was confirmed. And to confirm the association between ANPEP and AKT, it was confirmed that the expression of ANPEP was reduced by using si-RNA, and

the change in the expression of AKT was also reduced in the same trend.

A mouse subcutaneous transplantation experiment was performed using a cell line, and the effects of ANPEP and AKT on the generation and growth of tumors in the G12D group were confirmed.

In this study, the KRAS G12D mutation-specific gene called ANPEP was discovered, the oncological function of ANPEP related to cell proliferation and cell migration was confirmed in pancreatic cancer cell lines, and the connection between KRAS G12D mutation, ANPEP and AKT was confirmed.

Key Words: pancreatic cancer, KRAS, G12D, ANPEP, AKT