



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 레이저티닙에 의한  
세포사 및 신호 기전 연구

Study on Cell Death and Signal Transduction by Lazertinib

in Multiple Myeloma Cells

울산대학교 대학원

의과학과

서혜진

다발골수종세포에서 레이저티닙에 의한  
세포사 및 신호 기전 연구

지도 교수 조재철

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함


2022년 02월


울산대학교 대학원


의과학과

서혜진

서혜진의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 최 윤 숙 

심사위원 조 재 철 

심사위원 허 숙 경 

울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 02 월

## 국문요약

**배경:** 다발골수종은 B 림프구의 성숙과정 중 마지막 단계인 형질세포의 비정상적인 분화 및 증식으로 인해 발생하는 질환으로, 정상적인 항체 대신 비정상적인 단클론항체인 M 단백질을 과도하게 분비하는 것이 특징이다. 대표적인 임상적 증상으로는 고칼슘혈증, 신부전, 빈혈, 뼈 병변 등이 있다. 이 질환은 현재 항암화학요법과 조혈모세포이식으로 치료되고 있지만, 완치가 어렵고 재발위험성이 높다. 레이저티닙 (Lazertinib)은 기존 치료제에 대해 돌연변이가 발생한 비소세포폐암에 사용되는 약물로서 좋은 효능을 가진 약물로 평가되고 있지만, 다발골수종에서의 효과는 아직 알려지지 않았다. 따라서, 본 연구에서 레이저티닙이 다발골수종 세포에 미치는 영향을 알아보고 약물의 효능을 평가하기 위해서 실험을 진행하였다.

**방법:** 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 72 시간 동안 처리한 후, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 를 이용해 세포생존율을 확인하고, BrdU assay 를 통해 세포증식률을 확인하였다. Annexin V 를 염색하여 세포사의 발생을 확인한 후, 세포자멸사 여부를 보기 위해 caspase 활성도와 Dioc<sub>6</sub>(3) 염색을 진행하고 유세포 분석기를 통해 분석하였다. Propidium iodide(PI)/RNase 염색으로 세포주기의 변화를 관찰하였고 세포자멸사와 세포주기 관련 단백질들의 발현을 Western blot 을 통해 확인하였다.

**결과:** RPMI-8226 세포의 양성 그리고 음성 표지분자를 확인하여 다발골수종 세포주임을 입증하였다. RPMI-8226 세포에서 레이저티닙을 처리했을 때, 농도가 높아질수록 세포생존율과 세포증식율이 감소하였다. 유세포 분석을 이용하여 세포사멸 정도를 확인한 결과, 세포사멸이 일어나는 세포의 비율은 레이저티닙의 농도 의존적으로 증가하였고, 세포자멸사 관련 단백질들인 Cleaved caspase -3, -7, -9 및 PARP-1 발현도 증가하는 것을 확인하였다. 세포자멸사의 경로를 확인하기 위해 실험을 진행한 결과 레이저티닙의 처리 농도가 높아짐에 따라

caspase 활성도가 증가하였다. 반면, 미토콘드리아 막전위는 감소하였고 그에 따라 세포질에 Cytochrome C 가 축적되는 것을 확인했다. 세포자멸사 관련 단백질들인 Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1의 발현은 감소하고, Bax와 Bak의 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 세포주기를 분석한 결과 레이저티닙에 의한 G0/G1 기의 정지를 확인하였고, 세포 주기 관련 단백질들인 Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6 와 p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip</sup>의 발현 정도의 변화도 확인할 수 있었다.

**결론:** 레이저티닙이 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 caspase 의 활성과 미토콘드리아의 막 전위 감소를 통해 세포사멸을 유도하며, 세포주기 정지를 일으켜 세포증식을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 레이저티닙이 다발골수종의 새로운 치료 약물로 사용될 가능성을 제시하였다.

# 목 차

국문요약.....	i
목 차.....	iii
List of Figures.....	v
I. 서 론.....	1
II. 실험재료 및 방법.....	3
1. 시약 & 항체.....	3
2. 세포 배양.....	4
3. 세포 표지분자에 대한 유세포 분석.....	4
4. 세포 생존율 측정.....	4
5. 세포 증식률 분석.....	5
6. 유세포 분석.....	5
7. 사이토크롬 C 방출량 분석.....	6
8. Western blot 분석 연구.....	6
9. 통계 분석.....	7

<b>III. 결과</b> .....	8
1. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 세포생존율과 세포증식률의 변화.....	8
2. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 caspase 의존적 세포사멸 기전.....	12
3. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화와 관련된 세포사멸 유도.....	15
4. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙이 세포주기 변화에 미치는 영향.....	17
<b>IV. 고 찰</b> .....	19
<b>V. 참고문헌</b> .....	22
<b>영문요약</b> .....	28



## List of Figures

Figure 1. 레이저티닙의 구조.....	9
Figure 2. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 주요 표면 마커의 발현.....	10
Figure 3. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 세포독성과 세포증식률의 변화.....	11
Figure 4. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 Annexin V 발현의 변화.....	13
Figure 5. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 caspase 기전 활성화의 변화.....	14
Figure 6. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 미토콘드리아 탈 분극화와 관련한 세포사멸 기전.....	16
Figure 7. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 세포주기의 변화.....	18

## 서론

다발골수종은 혈액암 중에서 두번째로 발병률이 높은 조혈 악성 종양으로, 모든 암의 1%를 차지하고 전체 혈액암 중에서는 10%를 차지한다. 전 세계적으로 매년 약 140,000 명의 새로운 환자가 진단되는데, 최근 여러가지 치료법이 등장했지만 10년 생존율은 17%에 불과하다 [1-3]. 다발골수종은 주로 65세에서 80세 사이의 노인에게 발병하며, 국내에서 새로 진단되는 다발골수종 환자는 1,000명으로 추정되고 시간이 지날수록 발병률은 꾸준히 증가하고 있다 [4-5]. 다발골수종은 B 림프구 성숙 과정 중 마지막 단계인 형질세포가 비정상적으로 분화 및 증식되어 나타나며, 형질세포가 정상적인 항체를 생산하지 못하고 비정상적인 단클론단백인 M 단백을 분비하는 것을 특징으로 한다. 가장 대표적인 증상으로는 고칼슘혈증, 신부전, 빈혈 및 뼈 병변 등의 증상이 있으며, 아직 정확한 발병 요인이 밝혀진 바가 없다 [6-7].

다발골수종의 치료법으로는 고전적인 치료법으로 사용되는 항암제인 알킬화제 멜팔란 (melphalan)과 코르티코스테로이드계열의 프레드니손 (prednisone), 덱사메타손 (dexamethasone) 같은 스테로이드제를 병용해서 사용하였다 [8]. 현재 21세기에는 종양세포의 새로운 혈관형성을 억제시키는 면역조절제인 탈리도마이드 (thalidomide), 포말리도마이드 (Pomalidomide), 레날리도마이드 (lenalidomide)와 종양세포의 성장을 늦추거나 멈추게 하는 프로테아좀 억제제인 보르테조미브 (bortezomib), 카필조미브 (carfilzomib)과 같은 약물들이 개발되어 다양한 조합 치료가 진행되고 있다 [9-10]. 또한 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제인 패노비노스타트 (panobinostat)와 단클론성 항체인 엘로투주맙 (elotuzumab)과 다라투무맙 (Daratumumab) 등의 약물도 개발되어 병용 치료에 쓰이고 있다 [11-12]. 그 외에도 방사선 치료나 조혈모세포 이식 [13] 등을 사용하여 다발골수종을 치료하고 있지만 약물에 의한 부작용이 흔하여 대부분의 환자에게서 재발이 일어나기 때문에 완치가 어렵다 [14].

레이저티닙은 국산 신약으로 1·2 세대 상피세포 성장인자 수용체 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 표적 치료제에 내성이 생긴 T790M 돌연변이 양성 비소세포폐암 치료제이다 [15]. 레이저티닙은 EGFR 돌연변이 선택성이 높은 비가역적 경구용 EGFR 타이로신 인산화효소 억제제 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI)로, 특히 뇌혈관장벽 (Blood Brain Barrier, BBB)을 통과할 수 있어 폐암이 뇌로 전이된 환자에게서 우수한 내약성과 효능성을 보였다. 이는 2015 년에 개발되어, 전임상·임상 시험을 거쳐 2021 년 1 월 국산 신약 31 호 '렉라자'라는 상품명으로 국내 식품의약품안전처의 허가를 받았다. 2021 년 현재는 또 다른 비소세포폐암 치료제인 EGFR-MET bispecific antibody 인 아미반타맵 (Amivantamab)과의 병용 요법으로 글로벌 3 상 임상 시험이 진행 중이다 [16-18].

현재 다발골수종 치료를 위한 기초 연구로서 radotinib [1], imatinib [19], dasatinib [20], sorafenib [21], anlotinib [22] 등을 포함한 타이로신 인산화효소 억제제를 이용한 연구가 진행되고 있는데, 아직 다발골수종에서는 새로운 타이로신 인산화효소 억제제 중 하나인 레이저티닙에 대한 효과는 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서 다발골수종 세포에 대한 레이저티닙의 효능과 기전을 조사하여 레이저티닙이 다발골수종에 대한 새로운 치료제로서 역할을 할 수 있는지 연구하였다.

## 재료 및 연구방법

### 1. 시약 & 항체

논문에서 사용한 Lazertinib (YH25448) (Selleckchem, Houston, TX, 미국)은 구입하여, Dimethyl Sulfoxide (Wak-chemie Medical GmbH, Steinbach, 독일)에 녹여 -20°C에 보관하였다. 세포 표면 마커를 확인하기 위한 항체들인 Anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC 는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, 독일)에서 구입하였고, anti-human CD19-FITC, anti-human CD20-PE, FITC Mouse IgG-isotype control, PE Mouse IgG-isotype control 과 Annexin V-FITC 는 BD Bioscience (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. 세포 생존율을 측정하는 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 는 promega (Madison, WI, 미국)에서 구입하였다. Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit 는 Roche Diagnostics (Mannheim, 독일)에서 구입하였다. Dioc6(3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고, Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 는 Thermo fisher (Waltham, MA, 미국)에서 구입하였다. Caspase 활성도 측정에 필요한 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 는 eBioscience (Atlanta, GA, 미국)에서 구입하였다. Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer 는 BD pharmingen (San Diego, CA, 미국)에서 구입하였고, Western ECL substrates 는 BIO-RAD (Hercules, CA, 미국)에서 구입하였다. anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-9, anti-cleaved PARP-1, anti-Bcl-xl, anti-Mcl-1, anti-Bak, anti-CyclinB1, anti-CyclinD3, anti-CDK4, anti-CDK6, anti-p21<sup>cip1</sup>, anti-p27<sup>kip</sup>, 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-Bcl-2, anti-Bax, anti-cytochrome C, anti-CyclinE, anti-CDK2 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하였다.

## 2. 세포 배양

본 연구에 사용된 세포는 다발골수종 세포주 RPMI-8226 이다. RPMI-8226 세포는 L-glutamine, 25mM HEPES, sodium bicarbonate 가 포함된 RPMI1640 배지 (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)에 소태아혈청 (GibcoBRL) 10%와 페니실린-스트렙토마이신 1%를 첨가하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였고, 세포가 70~80% 정도 자랐을 때 일주일에 3 번씩 계대배양 하였다.

## 3. 세포 표지분자에 대한 유세포 분석

RPMI-8226 세포를 걷어내어 phosphate buffered saline (PBS)으로 2 회 세척했다. 그 후, anti-human CD38-PE, anti-human CD138-FITC, anti-human CD19-FITC, anti-human CD20-PE, FITC Mouse IgG-isotype control, PE Mouse IgG-isotype control 을 4°C에서 30 분 동안 염색하였다. PBS 로 2 회 세척하고, 세포를 PBS 에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석하였다.

## 4. 세포 생존율 측정

24 well plate 에 RPMI-8226 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well 로 분주했다. 그리고 레이저티닙을 0, 1, 5, 10, 20  $\mu$ M 로 처리하고 72 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 96 well plate 에 세포를 옮겨서 seeding 한 후, 각 well 마다 CellTiter 96® AQueous One Solution(Promega, Madison, WI, 미국)을 처리하여 빛을 차단한 뒤 4 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 흡광도는 SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader (MOLECULAR DEVICES, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 490 nm 에서 측정하였다.

## 5. 세포 증식률 분석

RPMI-8226 세포를 24 well plate 에  $5 \times 10^4$  cells/well 로 분주하고, 레이저티닙을 농도에 따라 처리하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, 독일)를 구입하여 지침서에 따라 실험을 진행한다. 세포를 채취하기 24 시간 전에 BrdU labeling reagent 를 전 처리한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하고 24 시간 후 세포를 걷어냈다. 그 후, Washing buffer 로 2 회 세척하고 Fix Denat 을 1ml 씩 넣고 30 분 동안 상온에서 교반 하였다. 1ml 의  $\alpha$ -BrdU-POD 를 넣어준 후, 상온에서 2 시간 교반한다. Washing buffer 로 2 회 세척한 후, Substrate solution 을 넣어 주고 96 well plate 에 옮긴다. 흡광도는 SpectraMax® ABS Plus Microplate Reader (MOLECULAR DEVICES, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 370nm 에서 측정하였다.

## 6. 유세포 분석

레이저티닙 처리 농도에 따른 세포자멸사를 확인하기 위해 24 well plate 에 RPMI-8226 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well 로 분주하였다. 그 후, 레이저티닙을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다.

- 1) Annexin V 염색 – 배양 후 걷어낸 세포를 PBS 로 2 회 세척한다. Annexin V (BD pharmingen)를 실온에서 15 분 동안 염색하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 Annexin V 양성 세포를 분석한다.
- 2) Caspase 활성화도 측정 – 각 well 당 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 를 1 $\mu$ l 씩 처리하고 빛을 차단하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간동안 염색하였다. 시간이 지난 후, 세포를 걷어내어 PBS 를 이용해 2 번 세척하고, PBS 에 부유시켜 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포의 caspase 활성화도를 측정한다.

- 3) 미토콘드리아 막전위 (MMP) 측정 - 72 시간이 지난 후, 각 well 마다 Dioc<sub>6</sub>(3) (St. Louis, MO, 미국)를 5 $\mu$ M 처리하고 빛을 차단하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30 분 동안 염색하였다. 염색이 끝난 후, 세포를 걷어내어 PBS 를 이용해 2 회 세척하고 PBS 를 추가하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포를 분석한다.
- 4) 세포주기 분석을 위한 PI/RNase 염색 - 72 시간 후 세포를 걷어내어 PBS 로 2 회 세척하고, -20°C 75% 에탄올을 세포에 최대한 손상이 덜 가도록 천천히 처리하여 하룻밤 고정시킨다. 고정된 세포를 PBS 를 이용해 2 회 세척한 후, 세포에 Propidium iodide(PI)/RNase staining buffer (BD pharmingen, San Diego, CA, 미국) 시약을 처리하고 실온에서 15 분 동안 빛을 차단하여 염색하였다. 염색된 세포를 FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, 미국)를 사용하여 세포주기를 분석한다.

## 7. Cytochrome C 방출량 분석

외부로부터 사멸신호가 전달되면 배출되는 인자인 Cytochrome C 의 방출량을 확인하기 위해서 RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 농도 별로 72 시간 처리한 후, 걷어내어 PBS 로 세척한다. Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I 과 단백질분해효소 억제제를 처리하여 15 초동안 Vortex 한 후, 얼음에 10 분간 배양한다. 그리고 CER II 를 처리하여 얼음에 1 분간 배양한 후, 5 초동안 Vortex 해준다. 5 분간 16,000g 원심분리를 하여 상등액만 분리해내고 gel loading 한다. 이를 anti-cytochrome C 로 immunoblotting 하여 발현된 Cytochrome C 를 확인한다.

## 8. Western blot 분석 연구

RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 농도 별로 처리해 72 시간동안 배양한 후 걷어낸 세포를 원심분리하고 PBS 로 세척해준 후 얻어낸다. 얻어낸 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 50 $\mu$ M, E64 15 $\mu$ M, Leupeptin 20 $\mu$ M, Pepstatin A 10 $\mu$ M)를 넣고 파이펫팅 하여 용해시킨다. 용해된 단백질을 원심 분리하여 상층액을 얻어낸 뒤, 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 반 동안 shaker 위에 놓고 교반하였다. PBST 로 3 회 세척한 후, anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-9, anti-cleaved PARP-1, anti-Bcl-xl, anti-Mcl-1, anti-Bak, anti-CyclinB1, anti-CyclinD3, anti-CDK4, anti-CDK6, anti-p21<sup>cip1</sup>, anti-p27<sup>kip</sup>, Anti- $\beta$ -actin, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-cytochrome C, anti-CyclinE, anti-CDK2 등의 1 차 항체를 5% 무지방 탈지유 in PBST 에 희석시켜 4°C에 하루 동안 반응시켰다. PBST 로 세척한 후, anti-Rabbit IgG(H+L)-HRP 또는 anti-Mouse IgG(H+L)-HRP 인 2 차 항체를 PBST 에 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 후, PBST 로 3 회 이상 세척하여 western ECL blotting substrates (Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)로 발현하는 단백질을 탐지하였다.

## 9. 통계 분석

모든 결과 자료는 최소 세 번 이상 실행된 독립적인 실험 결과에 대한 평균  $\pm$  표준 오차(SEM)를 사용하여 처리하였다. 통계 처리된 결과 값들을 분석하기 위해 GraphPad prism7.0 소프트웨어 (GraphPad, San Diego, CA, 미국)를 사용하여 통계분석을 수행했다. 또한, 모든 값은 Tukey's range test 에 따른 one way ANOVA 에 의해 분석되었다. 차이는  $p < 0.05$  (95% confidence intervals)로 통계적으로 유의함을 보여주었다.



## 결 과

### 1. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 세포생존율과 세포증식률의 변화

레이저티닙의 구조는 Fig. 1 과 같다. RPMI-8226 세포가 다발골수종 세포주임을 증명하기 위해 양성 표지분자인 CD38, CD138 (Fig. 2A)과 음성 표지분자인 CD19, CD20 (Fig. 2B)를 유세포 분석기를 통해 확인하였다. RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 0, 1, 5, 10, 20 $\mu$ M 처리 후 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 를 이용해 세포 생존율을 확인한 결과, RPMI-8226 세포의 생존율이 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 이 때, 레이저티닙을 10  $\mu$ M 과 20  $\mu$ M 을 처리했을 때 세포생존율의 차이가 크지 않았으므로 앞으로의 실험부터는 레이저티닙의 처리농도를 0, 1, 5, 10  $\mu$ M 로 고정하여 실험을 진행하였다. 약물을 농도별로 처리하고 BrdU assay 를 진행하였을 때, 세포증식 또한 마찬가지로 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3B).

이를 통해서 레이저티닙이 다발골수종 세포주의 세포생존과 세포증식을 감소시키는 효과가 있다는 것을 보여주었다.

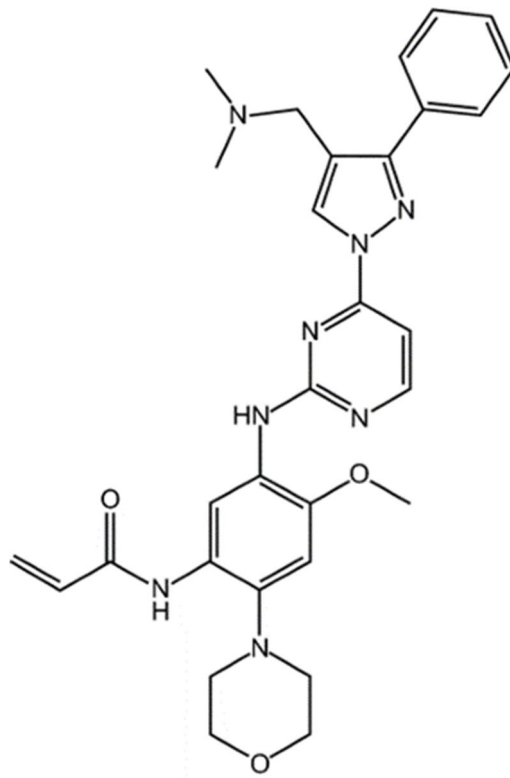
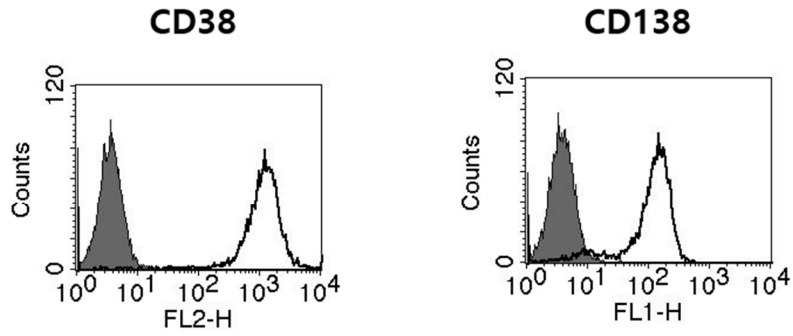


Figure 1. 레이저티닙의 구조

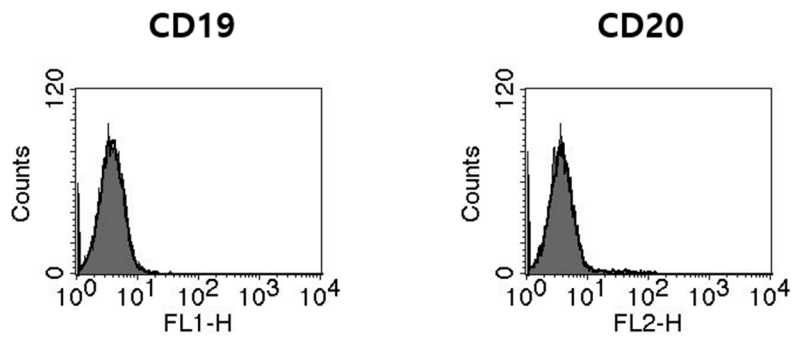
### (A) Positive markers

---

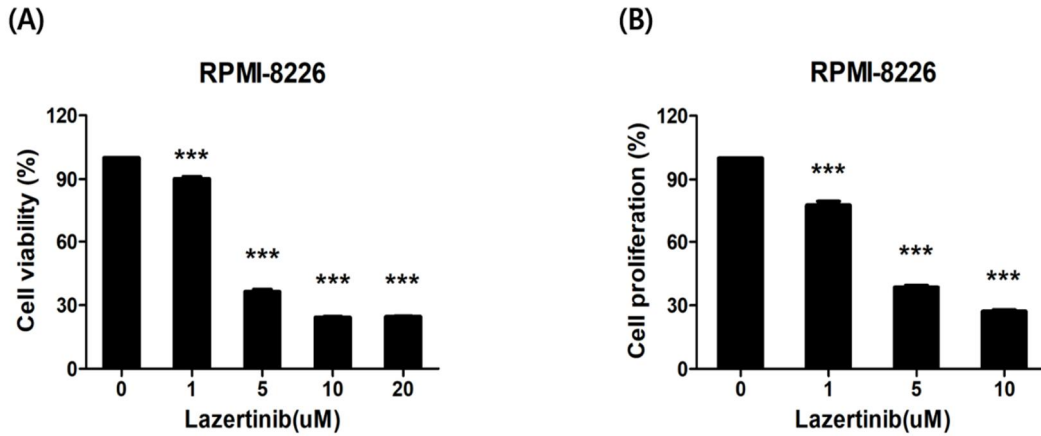


### (B) Negative markers

---



**Figure 2. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 주요 표면 마커의 발현**  
다발골수종 세포주의 세포표면 양성 표지분자인 CD38, CD138 과 음성 표지분자인 CD19, CD20 의 발현을 확인했다. 채워진 히스토그램은 isotype control mouse IgG1 를 나타내고, 비워진 히스토그램은 각 항원들의 발현을 나타낸다.



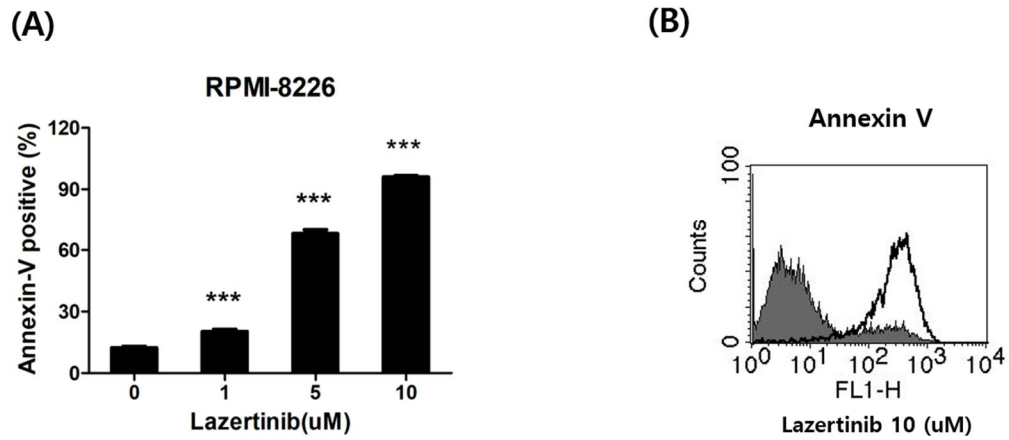
**Figure 3. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 세포독성과 세포증식률의 변화**

(A) RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 0, 1, 5, 10, 20 $\mu$ M 로 72 시간동안 처리하고, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 를 이용하여 분석하였다. 레이저티닙의 처리 농도에 따른 세포 생존율 결과를 막대그래프로 나타냈다. (B) 표시된 레이저티닙의 농도를 72 시간 동안 RPMI-8226 세포에 처리한 뒤, BrdU assay 를 통해 분석하여 세포 증식률 변화를 막대그래프로 나타냈다. 데이터는 평균값  $\pm$  SEM 으로 표시하였다.; \*\*\*,  $p < 0.001$ . \* 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

## 2. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 caspase 의존적 세포사멸 기전

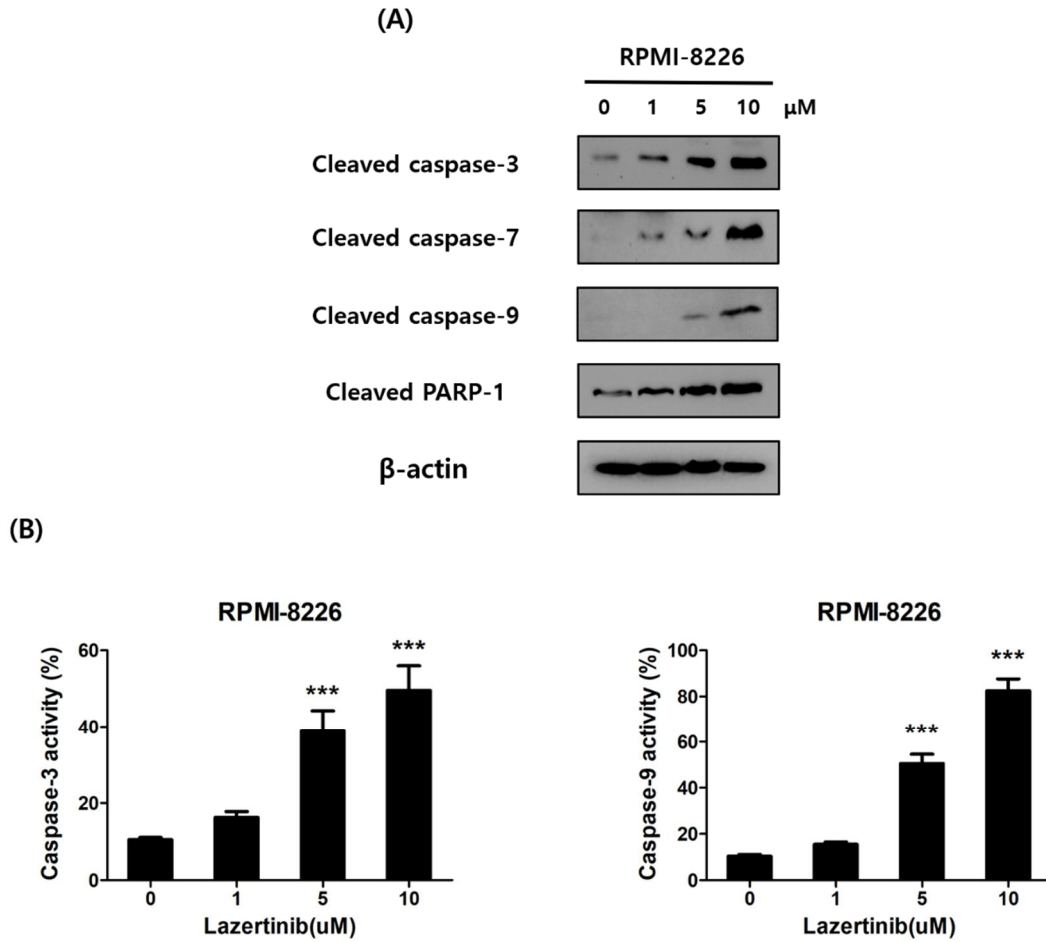
레이저티닙을 처리한 후 RPMI-8226 세포의 세포사가 세포자멸사에 의해 유발되는지 확인하기 위해 Annexin V 를 사용해 염색하여 유세포 분석기로 분석하였다. 그 결과, Annexin V 양성 세포의 비율이 레이저티닙의 처리 농도가 높아질수록 증가한 것을 확인하였다 (Fig 4A, 4B). Western blot Assay 에서 레이저티닙의 농도가 높을수록 cleaved caspase-3, -7, -9 와 PARP-1 의 단백질 발현이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 5A). 그 결과, 레이저티닙에 의한 RPMI-8226 세포의 세포독성이 세포자멸사 기전으로 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, caspase-3, -9 활성도를 측정하기 위해서 FITC-DEVD-FMK 와 FITC-LEHD-FMK 를 염색하였을 때도, 레이저티닙의 농도 의존적으로 caspase 의 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5B).

이를 통해 레이저티닙은 다발골수종 세포에 세포자멸사 기전에 의한 세포사를 일으키고 caspase 경로에 의존적으로 작용하는 것을 확인하였다.



**Figure 4. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 Annexin V 발현의 변화**

(A, B) RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 0, 1, 5, 10 $\mu$ M 로 처리하고 72 시간이 지난 후 유세포 분석을 통해 세포 사멸을 확인하였다. Annexin V 양성 세포의 비율로 세포 사멸이 일어난 세포의 비율을 측정할 수 있다. 채워진 히스토그램은 레이저티닙을 0 $\mu$ M 처리한 세포를 나타내고, 비워진 히스토그램은 레이저티닙 10 $\mu$ M 을 처리해 염색된 Annexin V 양성 세포를 나타낸다. 데이터는 평균값  $\pm$  SEM 으로 표시하였다.; \*\*\*,  $p < 0.001$ . \* 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.



**Figure 5. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 caspase 기전 활성화의 변화**

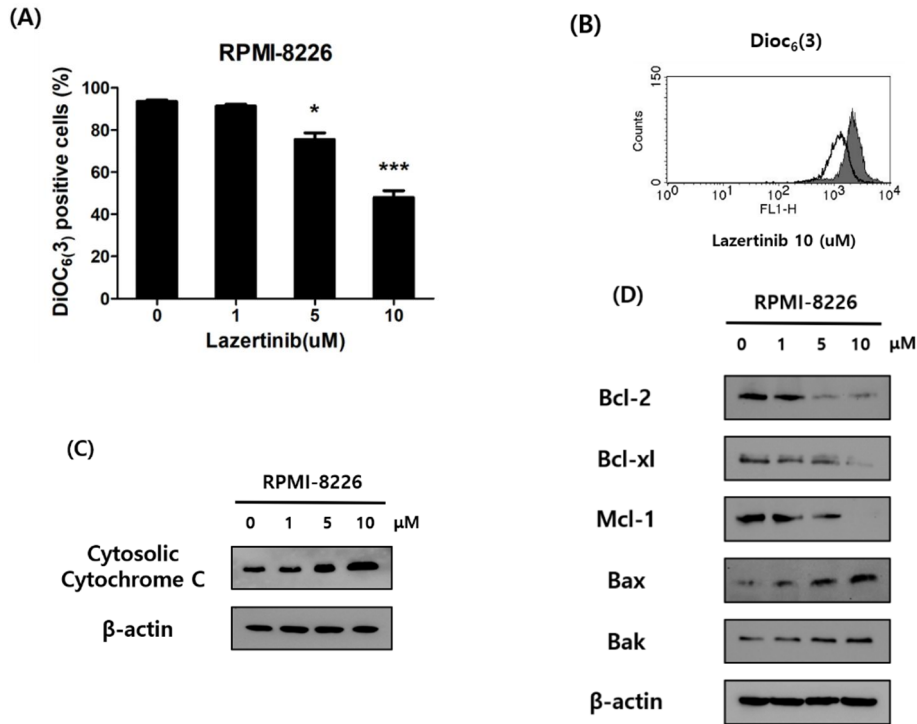
(A) 전체 세포 추출물을 이용하여 Cleaved caspase -3, -7, -9 및 PARP-1의 발현을 Western Blot 을 통해 확인하였다. 농도별로 포함된 단백질의 양이 같은 지 확인하기 위해 β-actin 를 대조군으로서 사용하였다. (B) 다발골수종 세포 RPMI-8226 에서 Caspase-3 및 -9 효소의 활성을 유세포 분석을 통해 측정하여 막대그래프로 나타냈다. 실험은 세 번 반복하였고 데이터는 평균값 ± SEM 으로 표시하였다; \*\*\*,  $p < 0.001$ . \* 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

### 3. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙에 의한 미토콘드리아 막의 탈 분극화와 관련된 세포사멸 유도

레이저티닙에 의한 다발골수종 세포의 세포사멸이 미토콘드리아의 막 전위와 관련이 있는지 확인하기 위해 막 전위의 변화를 측정하였다. 레이저티닙을 농도 별로 처리한 다음, 살아있는 세포에서 미토콘드리아 막 전위를 확인할 수 있는 Dioc<sub>6</sub>(3)로 염색하였을 때, RPMI-8226 세포에서 Dioc<sub>6</sub>(3) 양성 세포의 수가 레이저티닙의 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6A, 6B). 또한, 세포사멸 신호가 전달되면 세포질로 방출되는 Cytochrome C 의 발현 정도를 확인하였을 때 레이저티닙의 농도가 증가함에 따라 발현량이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6C). Western blot 을 통해 미토콘드리아의 세포사멸 신호전달의 upstream 에 작용하거나 미토콘드리아 막과 관련하여 작용하는 Bcl-2 계열 중 항-세포사멸사 (anti-apoptotic) 단백질인 Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 반대로 세포사멸사 유도 (pro-apoptotic) 단백질인 Bax 와 Bak 의 발현은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6D).

이를 통해, 레이저티닙에 의한 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포의 사멸은 미토콘드리아의 탈 분극화가 유발되고 세포사멸사 관련 단백질 발현의 변화로 인해 유도되는 것을 확인하였다.





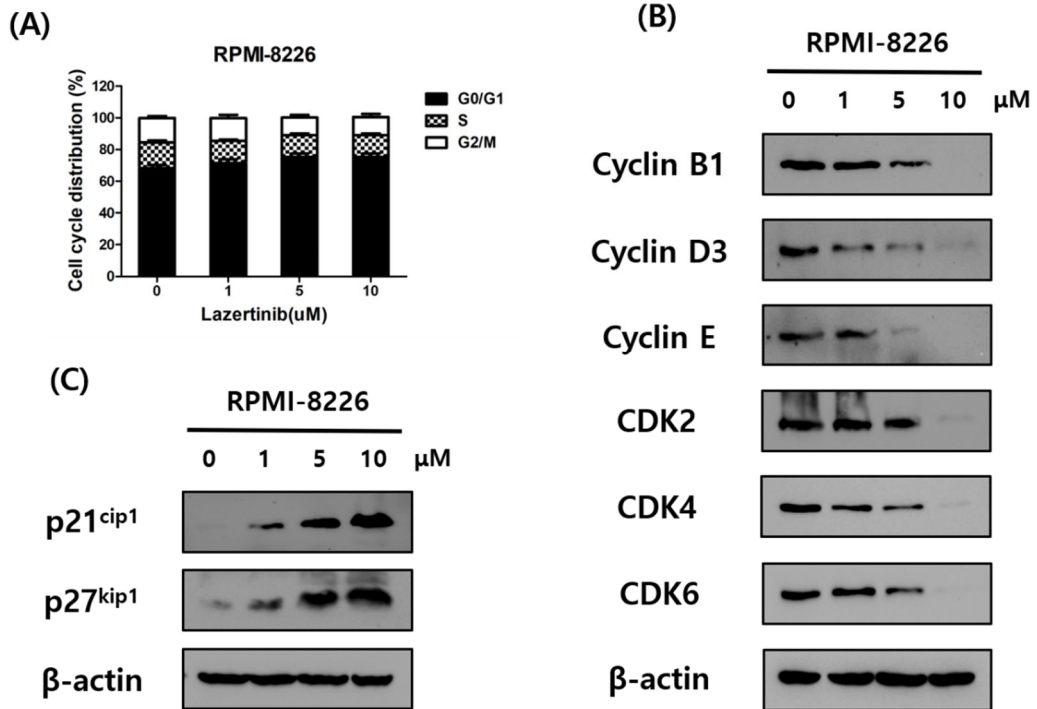
**Figure 6. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 미토콘드리아 탈 분극화와 관련한 세포사멸 기전**

(A) DiOC<sub>6</sub>(3)의 형광 강도 감소는 미토콘드리아 막 전위의 손실로 인해 세포에 표시된다. 레이저티닙을 농도별로 처리했을 때 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 미토콘드리아의 탈 분극화를 유도했다. (B) 채워진 히스토그램은 레이저티닙을 0μM 처리한 세포에 DiOC<sub>6</sub>(3)로 염색된 부분을 나타내고, 비워진 히스토그램은 10μM 의 레이저티닙을 처리한 세포에 염색된 부분을 나타낸다. (C) 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 처리하고 72 시간이 지난 후, 세포질로 방출된 cytochrome C 를 확인했다. Anti-cytochrome C mAb 를 떼어내고 Anti-β-actin mAb 를 붙여 동일한 양의 단백질이 들어있는지 확인했다. (D) Western blot 을 통해 확인한 결과, anti-apoptotic proteins 인 Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 은 농도의존적으로 감소하였고, pro-apoptotic protein 인 Bax 와 Bak 은 농도의존적으로 증가하였다. Anti-β-actin mAb 를 다시 반응시켜 동일한 양의 단백질이 들어있는지 확인했다. 데이터는 평균값 ± SEM 으로 표시하였다.; \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ . \* 실험군의 결과값은 대조군과 유의하게 다르다.

#### 4. 다발골수종 세포주에서 레이저티닙이 세포주기 변화에 미치는 영향

레이저티닙이 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포의 세포주기에는 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 레이저티닙을 농도별로 처리하였다. 72 시간 후, Propidium iodide(PI)/RNase 로 염색하여 유세포 분석기를 이용하여 세포 주기를 분석했을 때 레이저티닙의 처리 농도가 높을수록 G0/G1 단계에 머물러 있는 세포의 비율이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7A). 그리고, Western blot 을 통해 세포주기를 조절하는 단백질인 Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6 의 발현은 감소하고, 사이클린 의존성 인산화효소 억제제인 p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> 의 발현은 증가하는 것을 단백질 발현 수준에서 확인했다 (Fig. 7B, C).

이를 통해, 레이저티닙이 다발골수종 세포에서 세포주기의 G0/G1 단계를 정지시켜 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도한다는 것을 보여주었다.



**Figure 7. 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙 농도에 따른 세포주기의 변화**

(A) RPMI-8226 세포에 레이저티닙을 0, 1, 5, 10μM 의 농도로 72 시간 동안 처리하고, PI/RNase 염색을 한 후 유세포 분석기를 통해 세포주기를 분석하였다. (B) Western blot 을 통해 세포주기 관련 단백질인 Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6 의 발현 수준과 p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> 의 발현 수준을 확인했다. Anti-β-actin mAb 를 다시 반응시켜 동일한 양의 단백질이 들어있는지 확인했다.

## 고 찰

다발골수종은 혈액 세포 중 백혈구의 일종인 형질세포가 비정상적인 암세포로 변형되고 빠르게 증식되어 전신에 증상을 발생시키는 혈액암의 일종으로 주로 고령층에서 많이 발병하는 질환이다 [2, 23]. 최근 다발골수종은 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제, 항체 기반 면역치료제, CAR T 세포 치료와 같은 세포 기반 요법, 면역 체크포인트 억제제 등을 사용하는 치료법에 대한 연구가 계속 진행되고 있다 [24-26]. 하지만, 여전히 레날리도마이드, 보르테조밐, 텍사메타손과 같은 기존 약물들에 대한 의존도가 높고 그에 따라 내성이 발생하여 암세포가 약물에 반응하는 기간이 점차 짧아지기 때문에 지속적인 재발이 발생한다 [27]. 따라서, 부작용이 덜하고 치료 효과가 좋은 약물의 개발이 계속적으로 필요하기 때문에 본 연구에서 레이저티닙을 사용하여 새로운 치료제로서의 가능성을 확인했다.

레이저티닙은 유한양행과 안센바이오텍이 개발하여 활발하게 임상 연구를 진행중인 경구형 표피성장인자수용체 타이로신 인산화효소 억제제 (EGFR-TKI) 이다 [28]. 전임상 연구와 임상 1/2 상 연구 결과, 레이저티닙이 세포 생존과 증식에 중요한 역할을 하는 AKT와 ERK 신호전달 경로를 유의하게 억제하고 기존 EGFR-TKI 보다 더 우수한 항종양 효과를 보였다는 연구 결과가 있었다 [18, 29-30]. 타이로신 인산화효소 억제제는 표적치료제로서 독성의 제한된 범위 내에서 암세포를 타겟으로 하여 작용한다는 장점이 있어 여러 암들의 치료제로 사용되고 있다. 다발골수종에서 타이로신 인산화효소 억제제를 이용한 여러 연구가 진행된 바가 있었고 [31], 혈액암의 또 다른 종류인 만성 골수성 백혈병의 치료제로서 사용되는 라도티닙이 다발골수종에서 효과가 있다는 연구 결과가 있었다 [1]. 이를 바탕으로 레이저티닙이 다발골수종에서 특정 신호전달 경로에 관여하여 다발골수종 세포주인 RPMI-8226 세포의 세포 생존과 증식을 감소시킬 가능성이 있다고 생각했기 때문에 이 연구를 진행하였다.

본 연구에서, 먼저 다발골수종세포주인 RPMI-8226 세포, MM.1S 세포, U266B1 세포, IM-9 세포에서 레이저티닙을 농도 별로 처리했을 때 CellTiter 96® AQueous

One Solution Cell Proliferation Assay 를 통해 세포생존율의 감소를 확인하였다. 이 세포들 중 RPMI-8226 세포에서 레이저티닙에 대한 민감도가 가장 높았기 때문에, RPMI-8226 세포에서 그 후의 실험들을 진행하였다 (데이터는 나타내지 않음). 그 다음으로 BrdU assay 를 통한 농도 의존적인 세포증식률의 감소를 확인하였다 (Fig. 3). Annexin V 염색을 통해 레이저티닙을 처리함에 따라 농도 의존적으로 세포자멸사가 유도되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 그리고, caspase 활성화도와 Dioc<sub>6</sub>(3)를 유세포 분석기를 통해 분석하고 caspase -3, 7, -9, PARP-1 의 발현과 세포자멸사 관련 단백질들인 Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bax, Bak 의 발현을 Western blot 에서 확인한 결과, caspase 경로와 미토콘드리아 경로의 활성화를 통해 세포사멸이 유도되는 것을 알아낼 수 있었다 (Fig. 5와 Fig. 6). 또한, 세포주기 연관 단백질인 Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6 발현의 감소와 G0/G1 구간의 증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 이를 통해, 레이저티닙이 다발골수종 세포에서 세포생존율과 세포증식률을 억제하고 세포자멸사를 유도하는 것을 확인하였다.

위의 실험으로 레이저티닙이 세포증식을 억제하고, 세포사멸을 유발하는 것을 확인하였지만 정확한 target 인자가 무엇인지에 대해서는 좀 더 연구가 필요하다. 다발골수종에서 특징적으로 나타나는 현상으로 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT-3)의 과발현을 들 수 있는데 [32], 후에 레이저티닙을 처리함에 따라 STAT-3 가 농도 의존적으로 발현이 감소되는지 확인할 것이다. 그리고 또한 세포의 증식과 관련된 AKT/MAPK 경로의 인자들의 발현을 통해 다발골수종 세포에서 세포 증식의 감소가 AKT/MAPK 경로를 경유하는지 확인이 필요하다. In vitro 에서의 실험이 진행되고 난 후, 이의 결과를 바탕으로 in vivo 상에서 마우스 이종이식모델을 통한 레이저티닙의 안전성과 효능을 확인하기 위한 연구가 필요하며, 현재 다발골수종에서 쓰이고 있는 약물들과의 병용 조합을 통해 효과를 확인함으로써 임상에서도 레이저티닙이 충분히 사용될 가능성이 있는지 확인할 것이다. 현재 레이저티닙이 비소세포폐암 환자의 임상 시험에서 기존 치료제보다 심각한 부작용을 일으킬 확률이 더 낮다는 결과가 있었기 때문에 다발골수종 환자 치료에 있어서도 기존 항암화학제보다 안전성을 기대할 만하다 [18].

결론적으로, 레이저티닙은 다발골수종 세포에서 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도하기 때문에 다발골수종에서 새로운 치료제로 사용될 가능성이 있다.

## 참고문헌

1. Sook-Kyoung Heo, Eui-Kyu Noh, Jeong Yi Kim, Ho-Min Yu, Jun Young Sung, Lan Jeong Ju, Do Kyoung Kim, Hye Jin Seo, Yoo Jin Lee, Jaekyung Cheon, SuJin Koh, Young Joo Min, Yunsuk Choi, Jae-Cheol Jo. The c-Abl inhibitor, radotinib induces apoptosis in multiple myeloma cells via mitochondrial-dependent pathway. *Sci Rep.* 2021 Jun 24;11(1):13198.
2. S Vincent Rajkumar. Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol.* 2019 Jun;37 Suppl 1(Suppl 1):62-65.
3. Jae Hoon Lee, Dong Soon Lee, Je Jung Lee, Yoon Hwan Chang, Jong Youl Jin, Deog-Yeon Jo, Soo Mee Bang, Hyo Jung Kim, Jin Seok Kim, Kihyun Kim, Hyeon Seok Eom, Chang Ki Min, Sung Soo Yoon, Sun Hee Kim, Cheolwon Suh, Kyung Sam Cho, Korean Multiple Myeloma Working Party. Multiple myeloma in Korea: past, present, and future perspectives. Experience of the Korean Multiple Myeloma Working Party. *Int J Hematol.* 2010 Jul;92(1):52-7.
4. Junshik Hong, Jae Hoon Lee Recent advances in multiple myeloma: a Korean perspective Korean. *J Intern Med.* 2016 Sep;31(5):820-34.
5. Koeun Lee, Kyung Won Kim, Yousun Ko, Ho Young Park, Eun Jin Chae, Jeong Hyun Lee, Jin-Sook Ryu, Hye Won Chung. Comprehensive Updates in the Role of Imaging for Multiple Myeloma Management Based on Recent International Guidelines. *Korean J Radiol.* 2021 Sep;22(9):1497-1513.
6. Sandeep Anand Padala, Adam Barsouk, Alexander Barsouk, Prashanth Rawla, Anusha Vakiti, Ravindra Kolhe, Vamsi Kota, Germame Hailegiorgis

- Ajebo. *Epidemiology, Staging, and Management of Multiple Myeloma*. Med Sci (Basel). 2021 Jan 20;9(1):3.
7. Kirolos S Hanna, Samantha Larson, Jenny Nguyen, Sarah Tu, Jenna Boudreau, Sarah Rose. Updates in the management of relapsed/refractory multiple myeloma. *J Oncol Pharm Pract*. 2021 Sep;27(6):1477-1490.
  8. Fabrizio Esma, Marco Salvini, Rossella Troia, Mario Boccadoro, Alessandra Larocca, Chiara Pautasso. Melphalan hydrochloride for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Aug;18(11):1127-1136.
  9. Yuan Xiao Zhu, K Martin Kortuem, A Keith Stewart. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):683-7.
  10. Antonio Palumbo, Asher Chanan-Khan, Katja Weisel, Ajay K Nooka, Tamas Masszi, Meral Beksac, Ivan Spicka, Vania Hungria, Markus Munder, Maria V Mateos, Tomer M Mark, Ming Qi, Jordan Schecter, Himal Amin, Xiang Qin, William Deraedt, Tahamtan Ahmadi, Andrew Spencer, Pieter Sonneveld, CASTOR Investigators. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016 Aug 25;375(8):754-66.
  11. Evangelos Eleutherakis-Papaiakovou, Nikolaos Kanellias, Efstathios Kastritis, Maria Gavriatopoulou, Evangelos Terpos, Meletios Athanasios Dimopoulos. Efficacy of Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *J Oncol*. 2020 Jan 13;2020:7131802.
  12. Yufeng Wang, Yibo Zhang, Tiffany Hughes, Jianying Zhang, Michael A Caligiuri, Don M Benson, Jianhua Yu. Fratricide of NK Cells in



- Daratumumab Therapy for Multiple Myeloma Overcome by Ex Vivo-Expanded Autologous NK Cells Clin Cancer Res. 2018 Aug 15;24(16):4006-4017.
13. Benjamin A Derman, Yuanyuan Zha, Todd M Zimmerman, Rebecca Malloy, Andrzej Jakubowiak, Michael R Bishop, Justin Kline. Regulatory T-cell depletion in the setting of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma: pilot study. J Immunother Cancer. 2020 Jan;8(1):e000286.
  14. Roberto Ria, Angelo Vacca. Bone Marrow Stromal Cells-Induced Drug Resistance in Multiple Myeloma. Int J Mol Sci. 2020 Jan 17;21(2):613.
  15. Sohita Dhillon. Lazertinib: First Approval Drugs. 2021 Jun;81(9):1107-1113.
  16. Weimin Yin, Yuge Zhao, Xuejia Kang, Pengfei Zhao, Xuhong Fu, Xiaopeng Mo, Yakun Wang, Yongzhuo Huang. BBB-penetrating codelivery liposomes treat brain metastasis of non-small cell lung cancer with EGFR T790M mutation. Theranostics. 2020 May 15;10(14):6122-6135.
  17. Westover D, Zugazagoitia J, Cho BC, Lovly CM, Paz-Ares L. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. Ann Oncol. 2018 Jan 1;29(suppl\_1):i10-i19.
  18. Jiyeon Yun, Min Hee Hong, Seok-Young Kim, Chae-Won Park, Soyoung Kim, Mi Ran Yun, Han Na Kang, Kyoung-Ho Pyo, Sung Sook Lee, Jong Sung Koh, Ho-Juhn Song, Dong Kyun Kim, Young-Sung Lee, Se-Woong Oh, Soongyu Choi, Hye Ryun Kim, Byoung Chul Cho. YH25448, an Irreversible EGFR-TKI with Potent Intracranial Activity in EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Clin Cancer Res. 2019 Apr 15;25(8):2575-2587.

19. Atanasio Pandiella, Xonia Carvajal-Vergara, Soraya Tabera, Gema Mateo, Norma Gutiérrez, Jesús F San Miguel. Imatinib mesylate (STI571) inhibits multiple myeloma cell proliferation and potentiates the effect of common antimyeloma agents. *Br J Haematol.* 2003 Dec;123(5):858-68.
20. Keiji Mashimo, Masanobu Tsubaki, Tomoya Takeda, Ryota Asano, Minami Jinushi, Motohiro Imano, Takao Satou, Katsuhiko Sakaguchi, Shozo Nishida. RANKL-induced c-Src activation contributes to conventional anti-cancer drug resistance and dasatinib overcomes this resistance in RANK-expressing multiple myeloma cells. *Clin Exp Med.* 2019 Feb;19(1):133-141.
21. Pedram Kharaziha, Hendrik De Raeve, Charlotte Fristedt, Qiao Li, Astrid Gruber, Per Johnsson, Georgia Kokaraki, Maria Panzar, Edward Laane, Anders Osterborg, Boris Zhivotovsky, Helena Jernberg-Wiklund, Dan Grandér, Fredrik Celsing, Magnus Björkholm, Karin Vanderkerken, Theocharis Panaretakis. Sorafenib has potent antitumor activity against multiple myeloma in vitro, ex vivo, and in vivo in the 5T33MM mouse model. *Cancer Res.* 2012 Oct 15;72(20):5348-62.
22. Yang Cao, Huizhuang Shan, Meng Liu, Jia Liu, Zilu Zhang, Xiaoguang Xu, Yue Liu, Hanzhang Xu, Hu Lei, Miao Yu, Xingming Zhang, Wanting Liu, Zhilei Bu, Zhixiao Fang, Yanjie Ji, Hua Yan, Weiyong Gu, Yingli Wu. Directly targeting c-Myc contributes to the anti-multiple myeloma effect of anlotinib. *Cell Death Dis.* 2021 Apr 14;12(4):396.
23. S Vincent Rajkumar, Shaji Kumar. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J.* 2020 Sep 28;10(9):94.

24. Joeeun Bae, Teru Hideshima, Yu-Tzu Tai, Yan Song, Paul Richardson, Noopur Raje, Nikhil C Munshi, Kenneth C Anderson. 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 Sep;32(9):1932-1947.
25. Luis Gerardo Rodríguez-Lobato, Maya Ganzetti, Carlos Fernández de Larrea, Michael Hudecek, Hermann Einsele, Sophia Danhof. CAR T-Cells in Multiple Myeloma: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol*. 2020 Jul 28;10:1243.
26. Santino Caserta, Vanessa Innao, Caterina Musolino, Alessandro Allegra. Immune checkpoint inhibitors in multiple myeloma: A review of the literature. *Pathol Res Pract*. 2020 Oct;216(10):153114.
27. Wen-Chi Yang, Sheng-Fung Lin. Mechanisms of Drug Resistance in Relapse and Refractory Multiple Myeloma. *Biomed Res Int*. 2015;2015:341430.
28. Myung-Ju Ahn, Ji-Youn Han, Ki Hyeong Lee, Sang-We Kim, Dong-Wan Kim, Yun-Gyoo Lee, Eun Kyung Cho, Joo-Hang Kim, Gyeong-Won Lee, Jong-Seok Lee, Young Joo Min, Jin-Soo Kim, Sung Sook Lee, Hye Ryun Kim, Min Hee Hong, Jin Seok Ahn, Jong-Mu Sun, Heung Tae Kim, Dae Ho Lee, Sohee Kim, Byoung Chul Cho. Lazertinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: results from the dose escalation and dose expansion parts of a first-in-human, open-label, multicentre, phase 1-2 study. *Lancet Oncol*. 2019 Dec;20(12):1681-1690.
29. Misako Nagasaka, Viola W Zhu, Sun Min Lim, Michael Greco Fengying Wu, Sai-Hong Ignatius Ou. Beyond Osimertinib: The Development of Third-

Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors For Advanced EGFR+ NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021 May;16(5):740-763.

30. Seong Bok Jang, Kyeong Bae Kim, Sujin Sim, Byoung Chul Cho, Myung-Ju Ahn, Ji-Youn Han, Sang-We Kim, Ki Hyeong Lee, Eun Kyung Cho, Nahor Haddish-Berhane, Jaydeep Mehta, Se-Woong. Cardiac Safety Assessment of Lazertinib: Findings From Patients With EGFR Mutation-Positive Advanced NSCLC and Preclinical Studies. *JTO Clin Res Rep.* 2021 Sep 8;2(10):100224.
31. Hanley N Abramson. Kinase inhibitors as potential agents in the treatment of multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016 Dec 6;7(49):81926-81968.
32. Phyllis S Y Chong, Wee-Joo Chng, Sanjay de Mel. STAT3: A Promising Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel).* 2019 May 26;11(5):731.

## 영문요약

**Background:** Multiple myeloma is a disease caused by abnormal differentiation and proliferation of plasma cells, the last stage of the maturation process of B lymphocytes, and is characterized by excessive secretion of M protein, which is an abnormal monoclonal antibody, instead of a normal antibody. Common clinical symptoms include hypercalcemia, renal failure, anemia, and bone lesions. This disease is currently being treated with chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation, but it is difficult to cure and the risk of recurrence is high. Lazertinib is a drug used for non-small cell lung cancer that has mutated to existing treatments and is evaluated as a drug with good efficacy, but its effect in multiple myeloma is still unknown. Therefore, in this study, an experiment was conducted to investigate the effect of lazertinib on multiple myeloma cells and to evaluate the efficacy of the drug.

**Method:** Lazertinib was treated with RPMI-8226 cells, a multiple myeloma cell line, and cell viability was confirmed using CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, and cell proliferation was confirmed using BrdU assay. After confirming the occurrence of apoptosis by Annexin V staining, caspase activity and Dioc<sub>6</sub>(3) staining were performed to determine whether apoptosis occurred and then, analyzed by flow cytometry. Cell cycle changes were observed with propidium iodide (PI)/RNase staining, and the expression of apoptosis and cell cycle-related proteins was confirmed by Western blot.

**Results:** The positive and negative marker molecules of RPMI-8226 cells were confirmed to prove that it was a multiple myeloma cell line. When lazertinib was treated in RPMI-8226 cells, the cell viability and cell proliferation rate decreased as the concentration increased. As a result of confirming the degree of apoptosis using flow cytometry, the ratio of cells in which apoptosis occurs increased in a

concentration-dependent manner of lazertinib, and it was confirmed that the expression of apoptosis-related proteins, cleaved caspase -3, -7, -9 and PARP-1 was increased. As a result of the experiment to confirm the apoptosis pathway, the caspase activity increased as the concentration of lazertinib increased. On the other hand, it was confirmed that the mitochondrial membrane potential was decreased and Cytochrome C was accumulated in the cytoplasm accordingly. It was confirmed that the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bcl-xl, and Mcl-1 decreased, and the expression of Bax and Bak increased. As a result of cell cycle analysis, it was confirmed that the G0/G1 phase was stopped by lazertinib, and changes in the expression level of the cell cycle-related proteins Cyclin B1, Cyclin D3, Cyclin E, CDK2, CDK4, CDK6, p21<sup>cip1</sup> and p27<sup>kip</sup> were also confirmed.

**Conclusion:** In conclusion, it was confirmed that lazertinib induces apoptosis through caspase cascade activity and reduction of mitochondrial membrane potential in RPMI-8226 cells, a multiple myeloma cell line, and inhibits cell proliferation by causing cell cycle arrest. Based on these results, I suggested the possibility that lazertinib may be used as a new treatment for multiple myeloma.

**Key word :** Multiple myeloma (MM), Lazertinib, Cell death, Apoptosis, Caspase activation, Mitochondrial pathway.