

골육종에서 CTGF의 발현과 발암기전에서의 역할

The Role of CTGF in Osteosarcoma Progression

한일규 • 이미라 • 김한수

서울대학교병원 정형외과

목적: 골육종에서 Connective Tissue Growth Factor (CTGF)의 발현 정도를 확인하고 발암기전에서의 역할을 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법: 환자에서 수립한 23개의 골육종 세포주에서 CTGF의 발현 정도를 관찰하였으며, siRNA를 이용하여 CTGF의 발현을 억제한 후 세포침습과 세포 증식에서 CTGF의 역할을 분석하였다.

결과: 17명(74%)의 세포주에서 control 세포인 정상 골모세포보다 CTGF의 발현이 증가되어 있었다. CTGF의 발암기전에서의 역할을 관찰하기 위해 분별화된 골육종 세포주 SaOS-2와 MG63에서 siRNA로 CTGF의 발현을 억제한 후 siRNA를 transfection한 세포에서 유의하게 세포 침습이 억제되고 세포 증식이 억제되는 것을 관찰하였다.

결론: 골육종 세포주에서 CTGF의 발현이 높았고 세포침습, 세포 성장에 관여하는 바 CTGF가 골육종의 발암기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

색인단어: 골육종, connective tissue growth factor, CCN, CTGF, 발암

서 론

원발성 골육종의 치료 결과는 항암약물요법의 도입과 cross-sectional imaging의 발전으로 크게 호전되어 5년 생존율은 65-80%에 이르렀지만, 최근 20여 년 동안은 생존율이 별로 향상되지 못하고 있는 정체가 되고 있는 실정이다.¹⁾ 골육종 환자의 생존율을 향상시키기 위한 방법으로 종양의 진행이나 전이에 관여하는 특이 물질을 찾아 표적 항암제를 개발해 내려는 연구가 많이 시행되고 있는 실정이다.²⁾

Connective tissue growth factor (CTGF)는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM) 단백질의 일종으로 이들은 세포 부착(cell adhesion), 세포 분열, 세포 이동(cell migration) 및 화학주성(chemotaxis), 세포 생존, 세포 분화(differentiation), 혈관생성(angiogenesis), 상처 치유(wound healing) 등의 기능적 pathway에 다양하게 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 최근 들어 정상 조직에 비

해 여러 암 조직에서 CTGF의 발현이 증가되어 있음이 밝혀지면서 CTGF가 암의 진행 과정에 관여할 것이라는 추측을 하게 되었다. Pan 등은 교아세포종(glioblastoma)에서 CTGF가 종양의 진행에 있어 혈관생성인자로서의 역할을 할 가능성이 있음을 보고하였고⁴⁾ Dhar 등은 유방암에서 CTGF의 과발현이 55%로 관찰된다고 보고하였으며,⁵⁾ Lin 등은 위암 세포의 조직침습에서 CTGF의 종양 촉진 기능을 보고하였다.⁶⁾ 이 밖에도 폐암, 난소암, 식도암 등 다양한 종양에서 CTGF의 역할이 밝혀지고 있으며, 다양한 결과가 보고되고 있다.⁷⁾

현재까지 CTGF의 근골격계 종양에서의 연구는 많지 않은데, Manara 등은 횡문근육종에서 CCN3 (Nov) protein의 발현이 종양의 분화와 관계가 있고, 유잉 육종(Ewing's sarcoma)에서는 발현이 전이의 발생 위험과 관련이 있다고 보고하였다.⁷⁾ 한편 Moritani 등은 연골육종 유래 세포에서 TGF- β 에 의해 Cyr61 및 CTGF의 mRNA가 일관되게 유도됨을 보고한 바 있다.⁸⁾ 그러나 아직 골육종에서 CTGF의 기능과 역할에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 CTGF의 골육종에서 발현 정도와 발암기전에서의 역할에 대한 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 골육종 세포주의 수립 및 배양

골육종 조직을 수술 후 즉시 무균적으로 모아서 잘게 자른 후

접수일 2014년 3월 31일 심사수정일 2014년 5월 29일

게재확정일 2014년 6월 4일

교신저자 김한수

서울시 종로구 대학로 101번지, 서울대학교병원 정형외과

TEL 02-2072-2362, FAX 02-764-2718

E-mail hankim@snu.ac.kr

* 본 연구는 서울대학교병원 일반연구과제 지원(0420100110)에 의하여 이루어진 결과임.

0.2% proteinase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 처리한 후 37°C에서 30분간 shaking하면서 incubation하였다. 그 후 0.2% collagenase (Sigma-Aldrich)로 바꿔 처리한 후 37°C에서 2-3시간 흔들면서 배양시켰다. 그런 다음 sterile filter를 통과시킨 다음, 원심 분리 후 media를 제거하고 새로운 media (D-MEM with 10% FBS, penicillin & streptomycin, Gibco, St. Louis, MO, USA)에서 배양하였다. 5-7일 간 배양한 후, 0.25% trypsin이 섞인 0.53 mM EDTA-4Na로 분리하여 subculture하였다. 골육종 세포주로는 SaOS-2와 MG63를 사용하였다. 정상 세포주로는 골모세포 세포주(hFOB 1.19)을 이용하였다.

2. RNA 추출 및 Quantitative Real Time RT-PCR

환자들의 조직으로부터 수립한 세포주와 정상 세포주에서 RNA를 분리한 후(RNeasy Mini kit, Qiagen, 74104, Valencia, CA, USA), SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase를 이용하여 cDNA를 생합성한다(RTase, Invitrogen, 18064-014).

Real Time Quantitative PCR은 Taqman probe mixture (Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA)를 이용하여 ABI 7000 SDS를 사용하였다. Primer는 Primer Express 2.0 프로그램을 이용하여 제작하여 사용하였다. (Hs00170014-m1, ABI) Probe의 5' 말단 부위에는 reporter dye인 6-FAM을 부착하고, 3' 말단부위에는 TAMRA를 부착하였다. GAPDH은 internal standard로 사용하여. 정량분석은 standard curve method를 이용하였다. 이 값은 정상 세포주 gene의 normalized expression에 상대적인 미확인 샘플의 target gene의 normalized expression을 의미하게 된다. 또한 이 data는 reference gene에 상대적인 target gene의 expression의 차이를 배수로 나타내게 된다.

ABI prism 7000 SDS software version 1.0을 이용하여 PCR을 시행하였고 CTGF 유전자의 증폭을 위해 50°C 2분, 95°C에서 10분간의 변성 후 95°C 15초, 60°C 1분의 45 cycles 조건으로 PCR을 시행하였다. Total 25 μ l의 혼합물에는 5 μ l의 cDNA, 2X Taqman probe mixture 12.5 μ l, probe(2.5 μ m) 2.5 μ l, 각각의 primer (9 μ m) 2.5 μ l가 포함되도록 하였다.

3. Western blot analysis

CTGF의 단백질 수준에서의 발현을 Western blot analysis를 통해 발현을 살펴보았다. 배양된 세포를 lysis한 후 Bio-Rad protein assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel상에서 전기영동 하여 단백질을 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane을 5% skin milk-TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 1시간 blocking한 후 1'ab antibody/5% skin milk-TBS-T로 4°C에서 O/N 동안 incubation 한다. TBS-T로 washing하여 secondary antibody로 1시간 더 incubation 하고 다시 TBS-T로

washing한 후 ECL Western blot detection system을 이용하여 단백질을 탐색하였다. 분자량은 미리 착색시킨 molecular weight standard와 비교하였다.

4. siRNA를 이용한 CTGF 발현 억제

Cell에 Transfection한 CTGF siRNA의 sequence는 5'-GAA AAG AUU CCC ACC CAA U(dTdT)-3'을 사용하였다. Control RNA (scramble RNA)로는 5'-GUG UCA ACC AUG AGA AGU A(dTdT)-3'가 사용하였다.

SaOS-2와 MG63세포주를 10% FBS가 포함된 배지로 100 mm dish (2×10^6 cells)에 plating하였다. 48시간 후에 세포를 Opti-MEM 배지로 wash하고, 다시 Opti-MEM 배지에 DNA 4 μ g과 lipofectamine 50 μ l의 mixture를 첨가하여 배양하였다. 24시간 후에 DNA와 lipofectamine mixture를 제거하고 FBS가 첨가된 배지로 incubation하였다.

5. Invasion assay

세포 침윤 분석은 BIOCOAT matrigel invasion chamber (Becton-Dickinson, Bedford, MA, USA)를 사용하여 사용설명서에 따라 분석하였다. 1×10^5 개의 세포 300 μ l를 각 chamber에 심고 24 시간 동안 matrigel에 침윤되도록 하였다. 막 위쪽에 있는 침윤되지 못한 세포는 닦아서 제거하며, 막 아래 쪽에 침윤된 세포는 Quick-Diff stain kit (Becton-Dickinson)로 염색하였다. Chamber 들을 dH₂O로 두 번 씻은 후 공기 중에 말린 후 세포의 수를 위상차 현미경하에서 계산하였다.

6. Cell proliferation assay

CTGF siRNA 를 각각 농도별로 transfection 24시간 뒤 cell을 2×10^3 cells/96well plate에 seeding 한다 cell seeding 뒤 각각 24시간 incubation 후 cell proliferation reagent (WST-1, Roche, Germany) 100 μ l 더한 뒤 4시간 후에 농도를 측정한다.

7. 통계 분석

통계 분석은 SPSS-statistical software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 한글판 version 12)를 사용하였다. 다른 군간의 평균 비교는 독립 t-test 검정법을 사용 하였고, p value가 0.05보다 작을 때 통계학적으로 유의 하다고 판정하였다.

결 과

1. 골육종에서 CTGF의 발현

동일한 23명의 항암 치료 전 환자 조직으로부터 분리 배양한 골육종 세포주에서 reverse transcription PCR로 CTGF의 발현 정도를 관찰하였다. 17명(74%)의 세포주에서 control 세포인 정상 골모세

포(normal osteoblast, hFOB 1.19)보다 발현이 증가되어 있었다(Fig. 1).

2. siRNA를 이용한 CTGF 발현 억제

CTGF의 발암기전에서의 역할을 관찰하기 위해 불멸화된 골육종 세포주 SaOS-2와 MG63에서 siRNA로 CTGF의 발현을 억제하였다. Western blot 분석 결과 siRNA를 transfection한 세포에서 유의

하게 발현이 억제되는 것을 관찰하였고 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

3. CTGF의 골육종 세포 invasion에서의 역할

CTGF의 cell invasion에서의 역할을 관찰하기 위해 Matrigel invasion assay를 시행하였다 siRNA를 transfection한 세포에서 유의하게 invasion이 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 3).

4. CTGF의 골육종 세포 proliferation에서의 역할

CTGF의 cell proliferation에서의 역할을 관찰하기 위해 WST-1 assay를 시행하였다 siRNA를 transfection한 세포에서 cell proliferation이 억제되는 것을 관찰하였고 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

원발성 골육종 환자에서 기존의 세포 독성 항암제만으로는 더 이상의 생존율 향상을 기대하기 어렵고 골육종 치료의 새로운 타겟을 찾는 것이 필요하다. 아직까지 골육종에서 생존율 감소와 직접적으로 연관되어 있는 분자생물학적 타겟도 확실하게 알려진 바 없다. 이런 현실에서 다른 여러 종류의 고형 암에서 종양의 침습이나 원격 전이 능력 등과 연관성이 밝혀지고 있는 CTGF에 대한 연구는 의미가 있는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과에 따르면

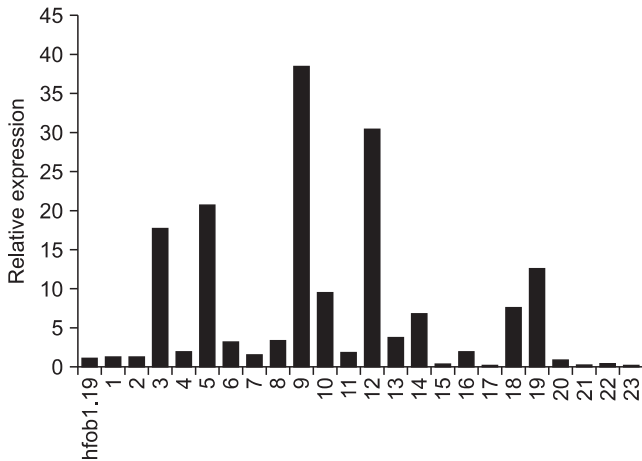


Figure 1. mRNA Expression of CTGF in 23 patient-derived osteosarcoma cell lines. Human osteoblast cell line (hFOB 1.19) was used as the control cell line.

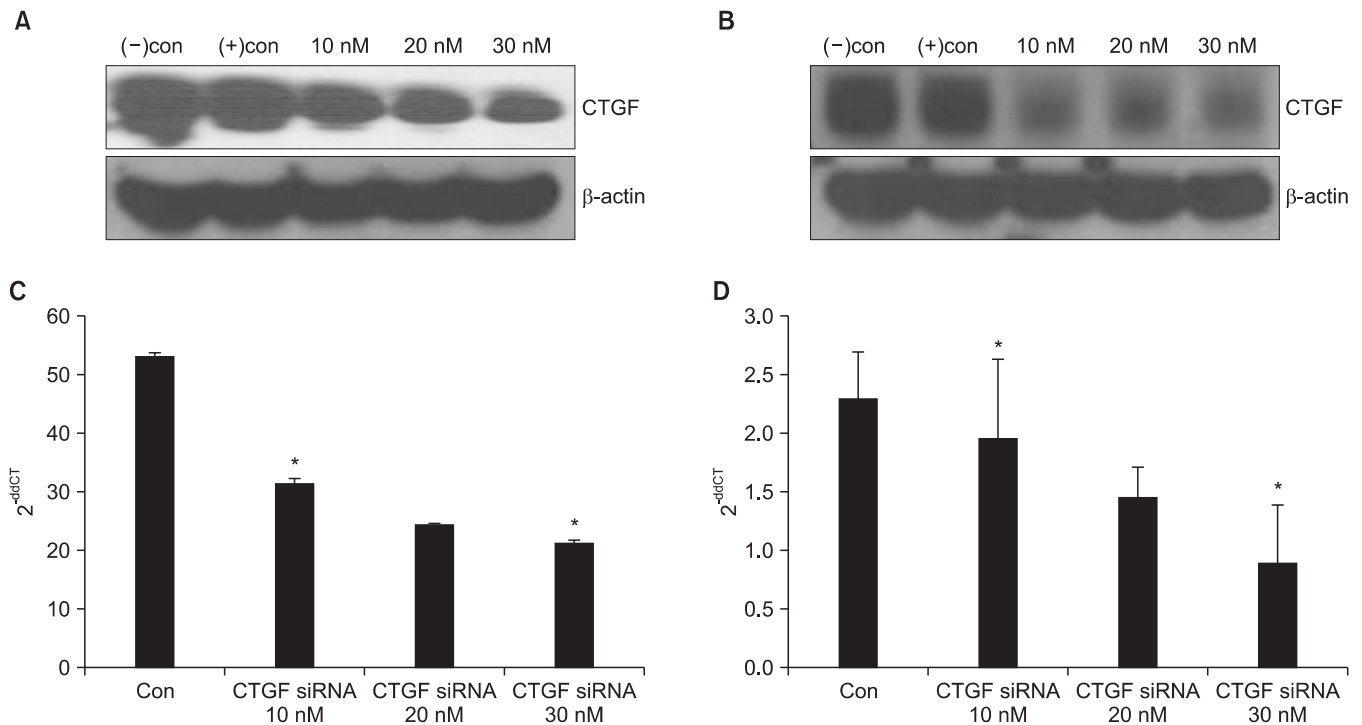


Figure 2. siRNA knockdown of CTGF in osteosarcoma cell lines. (A, B) Western blot analysis and (C, D) Real-time PCR. MG63 (A, C) and SaOS-2 (B, D) cell lines were used. * $p < 0.05$.

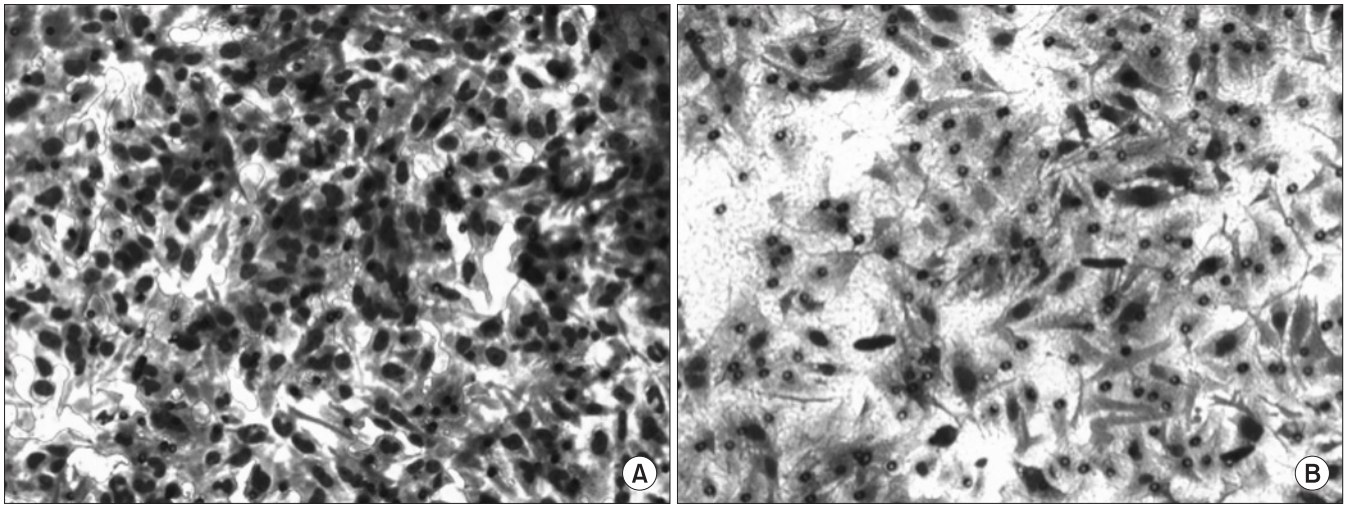


Figure 3. Representative microscopic image ($\times 100$) of Matrigel invasion assay. The number in the CTGF-siRNA transfected cells (B) is reduced compared to the control cells (A).

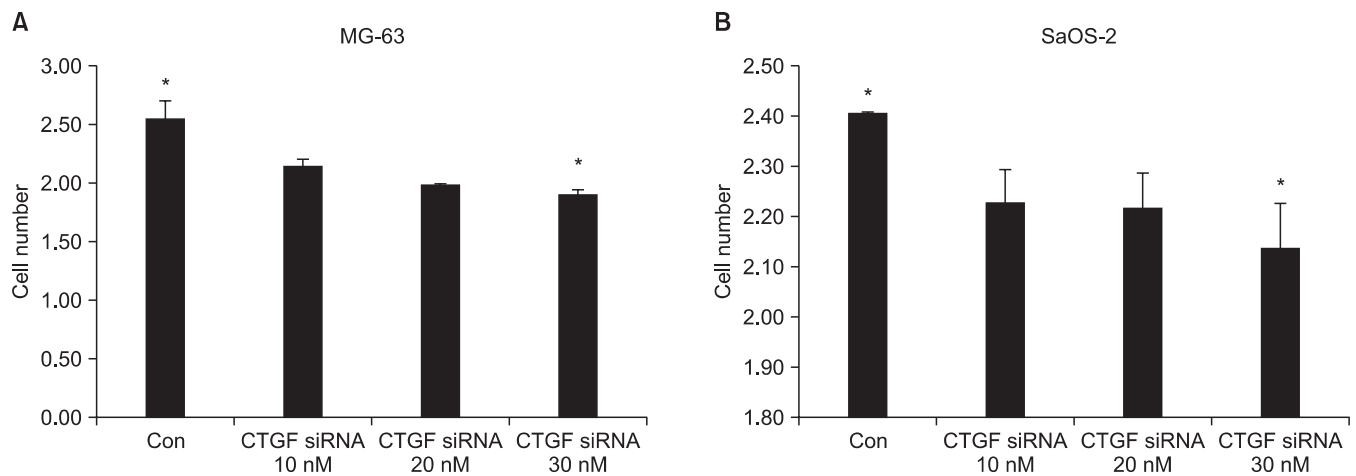


Figure 4. Effect of CTGF in osteosarcoma proliferation. The number of viable cells is reduced in the CTGF-siRNA transfected cells. MG63 (A) and SaOS-2 (B) cell lines were used. * $p < 0.05$.

골육종에서 CTGF의 발현이 정상 조직에 비해 증가되어 있었고 CTGF가 골육종 세포의 전이와 관련이 있는 세포 침습과 세포 증식을 증가시켰다. 이 결과는 CTGF가 골육종의 치료 타겟으로서 가능성을 나타내는 것으로 판단된다.

이와 같은 결과는 여러 다른 암에서 밝혀지고 있는 그 것과 크게 다르지 않는데, 유방암에서 CTGF의 발현이 55%에서 확인되었다.⁹⁾ Glioblastoma에서는 58%에서 CTGF의 과발현이 관찰되었고 조직학적 악성도와 CTGF의 발현과의 상관성이 높았다.¹⁰⁾ 식도암에서는 CTGF의 과발현이 대다수의 예에서 관찰되었고 특히, 예후가 안 좋았던 경우에 발현이 높았다.¹¹⁾ 횡문근육종의 경우에도 높은 발현을 보였으며 암세포의 생존과 밀접한 관련을 보였다.¹²⁾ 본 연구에서는 CTGF의 발현을 real-time PCR로 확인하였는데 보다 많은 수의 환자에서 면역조직화학염색을 시행하는 것이 필요

할 것으로 생각된다.

발암기전에 있어서 세포외기질(extracellular matrix)은 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. CCN family는 세포외기질 중에서 특히 여러 가지 중요한 기능적인 domain과 세포 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. CTGF는 CCN family의 6가지 중 하나로 세포 부착(adhesion), 세포 이동, 세포 생존, 분화, 혈관 생성 등 다양한 생리적인 pathway에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 발암 과정은 암 주변 세포외기질의 변화와 밀접한 관련을 가지고 있고 다양한 암종에서 CTGF의 발현이 증가되어 있다.¹³⁾ 특히 혈관 생성과 세포 생존에 있어서 CTGF는 밀접한 관련을 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

CTGF의 골육종에서 발암기전에서의 역할은 본 연구의 결과를 바탕으로 *in vivo* 동물실험을 통하여 보다 확립할 수 있을 것으로

판단된다. In vivo 실험을 통하여 CTGF가 전이에 관여하는지 여부를 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한, CTGF의 발현을 mRNA 수준에서 관찰한 바 단백질 수준에서도 관찰할 필요가 있을 것으로 판단된다. CTGF의 발현에 대한 조절 기전은 정확히 밝혀지지 않았으나 전사 단계(transcriptional level)에서 이루어 지는 것으로 생각되고 있는데, 이로 인해 CTGF단백의 발현은 CTGF mRNA의 발현 양상을 가깝게 따르는 경향이 있다고 보고되었다.³⁾ 향후 CTGF의 발현 정도와 골육종 환자들의 임상적 예후와의 연관성을 분석하는 것은 CTGF의 임상적 유용성을 수립하는데 도움을 줄 수 있는 방법이 될 수 있으리라 생각한다.

결 론

골육종 세포주에서 CTGF의 발현이 높았고 세포침습, 세포 성장에 관여하는 바 CTGF가 골육종의 발암기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 항암 치료 타겟으로서의 후보 물질로 추후 연구가 필요한 것으로 생각된다.

참고문헌

- Geller DS, Gorlick R. HER-2 targeted treatment of osteosarcoma: the challenges of developing targeted therapy and prognostic factors for rare malignancies. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11:51-61.
- Janeway KA, Barkauskas DA, Krailo MD, et al. Outcome for adolescent and young adult patients with osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2012;118:4597-605.
- Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:461-73.
- Pan LH, Beppu T, Kurose A, et al. Neoplastic cells and proliferating endothelial cells express connective tissue growth factor (CTGF) in glioblastoma. *Neurol Res*. 2002;24:677-83.
- Dhar A, Ray A. The CCN family proteins in carcinogenesis. *Exp Oncol*. 2010;32:2-9.
- Lin MT, Kuo IH, Chang CC, et al. Involvement of hypoxia-inducing factor-1alpha-dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion. *J Biol Chem*. 2008;283:15807-15.
- Manara MC, Perbal B, Benini S, et al. The expression of ccn3(nov) gene in musculoskeletal tumors. *Am J Pathol*. 2002;160:849-59.
- Moritani NH, Kubota S, Sugahara T, Takigawa M. Comparable response of ccn1 with ccn2 genes upon arthritis: An in vitro evaluation with a human chondrocytic cell line stimulated by a set of cytokines. *Cell Commun Signal*. 2005;3:6.
- Xie D, Nakachi K, Wang H, Elashoff R, Koeffler HP. Elevated levels of connective tissue growth factor, WISP-1, and CYR61 in primary breast cancers associated with more advanced features. *Cancer Res*. 2001;61:8917-23.
- Chen PP, Li WJ, Wang Y, et al. Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS One*. 2007;2:e534.
- Deng YZ, Chen PP, Wang Y, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling. *J Biol Chem*. 2007;282:36571-81.
- Clark JC, Akiyama T, Thomas DM, et al. RECK in osteosarcoma: a novel role in tumour vasculature and inhibition of tumorigenesis in an orthotopic model. *Cancer*. 2011;117:3517-28.
- Chen CC, Lau LF. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:771-83.
- Kubota S, Takigawa M. CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis*. 2007;10:1-11.

The Role of CTGF in Osteosarcoma Progression

Ilkyu Han, Mi Ra Lee, and Han-Soo Kim

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Purpose: To examine the expression of Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in osteosarcoma and to evaluate its role in osteosarcoma invasion and proliferation.

Materials and Methods: The mRNA expression of CTGF from 23 patient-derived osteosarcoma cell lines was examined, and the role of CTGF in cell invasion and proliferation was examined using siRNA transfection.

Results: The over-expression of CTGF mRNA was observed in 17 cell lines (74%). CTGF-specific siRNA transfection into SaOS-2 and MG63 cell lines resulted in efficient knockdown of CTGF expression on Western blot analysis. siRNA transfected cells showed decreased migration on Matrigel invasion assay and decreased cell proliferation on WST-1 assay.

Conclusion: These results indicated that the CTGF expression may play an important role in osteosarcoma progression, and may be a therapeutic target of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma, connective tissue growth factor, CCN, CTGF, cancer progression

Received March 31, 2014 **Revised** May 29, 2014 **Accepted** June 4, 2014

Correspondence to: Han-Soo Kim

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University Hospital, 101 Daehak-no, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

TEL: +82-2-2072-2362 **FAX:** +82-2-764-2718 **E-mail:** hankim@snu.ac.kr