



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](#)

2021년 8 월
박사학위논문

악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 역할

조선대학교 대학원

의 학 과

강 병 수

악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 역할

Role of Fascin and MST2 in melanoma

2021년 8월 27일

조선대학교 대학원

의 학 과

강 병 수

악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 역할

지도교수 임 성철

이 논문을 의학박사학위 신청논문으로 제출함

2021년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

강 병 수

강병수의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최철희 인

위 원 전남대학교 교수 장철호 인

위 원 조선대학교 교수 장석정 인

위 원 조선대학교 교수 신봉석 인

위 원 조선대학교 교수 임성철 인

2021년 6월

조선대학교 대학원

목 차

1. 도목차	i
2. 영문초록	ii
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	3
III. 결과	7
IV. 고찰	9
V. 결론	13
VI. 참고문헌	14

도목차

Figure 1. Schematic models of the Hippo pathway in <i>Drosophila</i> and mammals	24
Figure 2. Hippo signaling pathway	25
Figure 3. Immunohistochemical staining for Fascin	26
Figure 4. Immunohistochemical staining for MST2	27
Figure 5. Comparison of Fascin and MST2 immunoreactivity in each corresponding case	28
Figure 6. Immunoblotting for Fascin knock-down	29
Figure 7. Immunoblotting for MST2 knock-down	30
Figure 8. BALB/c mice xenograft experiment	31
Figure 9. Histopathologic findings of the xenograft experiment	32

Abstract

Role of Fascin and MST2 in melanoma

Byung-Soo Kang, MD

Advisor: Prof. Sung-Chul Lim, M.D., Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Background and Objectives: Fascin is an actin-bundling protein which is an essential element in cancer metastasis. Hippo pathway is a critical for carcinogenesis and cancer stem cell self-renewal. One of the core components of the Hippo pathway is mammalian ste20-like protein kinase (MST). The aim of this study was to investigate the roles and mechanisms of Fascin and MST2 on carcinogenesis in melanoma, which remains largely unknown.

Materials and Methods: Surgically excised 30 cases of primary skin melanoma with adjacent non-tumorous skin tissue were conducted immunohistochemical staining for Fascin and MST2. The melanoma cell line WM793 was employed for the Fascin and MST2 knock-down and then analyzed by the Western blot assay, and the melanoma xenograft followed by Fascin knock-down in BALB/c mice and then analyzed by tumor size measuring and histopathologic assessment.

Results: Immunohistochemical analysis showed increased expression of Fascin and decreased expression of MST2 in melanoma. Reverse correlation of Fascin and MST2 was statistically significant. Fascin siRNA oligonucleotides upregulated MST2 but MST2 siRNA oligonucleotides did not significantly change Fascin in the WM793 cell line. WM793 xenograft followed by Fascin knock-down inhibited tumor growth significantly in the animal study.

Conclusions: Fascin is a regulator in the Hippo pathway through MST2 and plays an important role in melanoma carcinogenesis. Knock-down of Fascin reduces melanoma carcinogenesis, so Fascin could be a potential therapeutic target for melanoma.

KEY WORDS: Fascin, MST2, Melanoma, WM793, Hippo pathway, siRNA, BALB/c mouse

I. 서론

Fascin (actin bundling protein fascin-1)은 세포골격을 이루는 actin을 다발(bundle) 짓는 것을 조절하여 세포의 이동(migration) 및 침습(invasion)에 중요한 역할을 담당하여 종양의 전이에 중요한 역할을 하는 단백질로(1, 2) actin을 다발짓는 능력(actin-bundling activity)에 따라 전이능이 결정되는 것으로 생각되어지고 있다(3~5).

Fascin은 췌장암(6), 대장암(7, 8) 그리고 유방암(9, 10) 등 상피성 암에서 예후 인자로서 많은 연구가 이루어졌지만, 악성흑색종(melanoma)을 토대로 된 연구는 많지 않아 악성흑색종에서 Fascin이 종양형성과 관련이 있다는 명확한 근거는 없는 실정이다.

Mammalian ste20-like protein kinase (MST)1과 MST2는 Drosophila Hippo kinase에 가장 가까운 포유류 상동체이다. Hippo pathway의 핵심은 serine - threonine kinases (STK), MST1/STK4와 MST2/STK3, large tumour suppressor kinase 1 (LATS1)과 LATS2, 그리고 scaffold protein Salvador (Sav1)과 cofactor Mob1이다(Figure 1).

Hippo 기능을 상실하게 되면 세포주기가 가속화되고, 발달과정에 일어나는 세포고사(apoptosis)가 일어나지 않기 때문에 기관의 크기가 매우 커지는 결과가 초래된다(11~13). MST2는 Hippo가 기능을 상실하게 되는데 역할을 한다(13). 그러나, Hippo kinase의 활성 조절 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다(Figure 2).

Graves 등(14)이 MST2 과발현이 여러 종류의 형질전환된 세포주에서 고사를 유발한다고 보고한 후, Zhou 등(15)은 MST1과 2가 Yap1을 불활성화시켜 간세포암종의 진행을 억제한다고 보고하였다. 그리고, Hippo pathway가 actin

cytoskeleton에 의하여 조절된다는 사실과 actin 중합(polymerization)으로 Hippo signaling이 차단된다는 사실이 밝혀졌다(16). MST2는 LATS1을 인산화시키는데 MST2 kinase 활성화에 MST2 homodimer가 필요하다(17).

포유류에서 transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)는 폐암, 유방암 및 간세포암 등의 암발생에 중요한 역할을 담당하며(18~21), 악성흑색종에서 높게 발현되고 이를 knock-down시키면 악성흑색종의 성장을 억제하여 악성흑색종의 형성에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다(22).

악성흑색종은 침윤성장 및 전이능이 잘 알려진 종양으로 획기적인 치료법 도입이 부진하여 매우 불량한 예후를 보인다. 우리나라에는 드문 종양이었으나 고령화, 야외활동 증가, 환경오염에 따른 오존층 파괴 등의 영향으로 최근 뚜렷한 증가추세에 있다(23~25). 하지만 악성흑색종의 병태생리에 대한 연구는 매우 제한적이고, Fascin과 Hippo pathway의 관련성에 대한 연구는 2종류의 악성흑색종 세포주를 이용한 Fascin-MST2-TAZ 신호전달계 확인 연구가 유일한 실정이다(26).

이에 악성흑색종의 발생 및 진행에 관여하는 인자를 발굴하여 이를 활용한 새로운 치료전략을 수립할 수 있는 기초자료를 제공하고자 MST2-LATS-TAZ 신호전달계의 새로운 조절자로 밝혀진 Fascin의 역할을 면역조직화학적 분석, Fascin 및 MST2 knock-down을 통한 in vitro 연구, 악성흑색종 세포주 WM793을 BALB/c mouse에 xenograft 한 후 Fascin knock-down을 시행하여 관찰한 종양변화의 연구를 통하여 알아보하고자 한다.

I. 연구재료 및 방법

1. 시약

면역조직화학적 염색을 위한 일차항체는 rabbit anti-fascin antibody (Sigma-Aldrich, MO, USA)와 rabbit anti-MST2 antibody (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하였다.

RNAi 실험을 위하여 Fascin siRNA (5' - 3' sense GCCUGAAGAAGAAGCAGAU) (Dharmacon, CO, USA), MST2 siRNA (5' - 3' sense CAAGAGUCAUGAAAAUUGUtt) (Invitrogen, CA, USA)를 사용하였다. Fascin siRNA는 in vivo delivery를 위하여 liposome에 봉입되도록 제작하였다.

Western immunoblotting을 위한 시약은 Anti- β -actin (Sigma-Aldrich, MO, USA), Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)를 사용하였다.

2. 임상 환자 검체

조선대학교병원에서 2010년부터 2019년까지 피부의 원발성 침윤흑색종으로 진단된 증례를 수집하여 원발종양과 주변의 비종양성 피부조직이 충분히 관찰되는 30례를 성별, 연령별, 부위별 특징을 고려하지 않고 무작위로 선택하였다.

3. 세포주 및 배양조건

원발성 흑색종 세포주 WM793 (ESTDAB Melanoma Cell Bank, Tübingen, Germany)를 10% (v/v) fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin (Calbiochem, CA, USA)이 포함된 RPMI 1640 medium (Invitrogen, CA, USA)에서 5% CO₂ 존재하에서 37°C로 배양하였다.

4. 실험동물

실험동물은 출생 후 6주되는 BALB/c mice (Samtako Bio Korea, 경기도, 대한민국) 암컷 6마리를 사용하였으며, 사료와 물은 자유롭게 공급되었다. 사육조건은 22°C~26°C, 습도는 50%, 1일 광 조건은 명기 12시간 및 암기 12시간이었다.

5. 면역조직화학적 염색

4 mm 두께의 파라핀절편을 제작하여 BenchMark XT 자동염색기(Ventana Medical Systems, AZ, USA)를 사용하여 염색하였으며, 일차항체의 희석비율은 fascin 1:200, MST2 1:2,000으로 진행하였다. 음성대조군은 1차 항체 대신 Tris-buffered saline을 사용하였고, 대조염색은 Mayer's hematoxylin으로 하였다.

염색결과는 Fascin과 MST2 모두 세포질내 갈색염색을 양성으로 판정하였는데, 그 정도에 따라 1+(약양성), 2+(중등도 양성), 3+(강양성)으로 구분하여 분석하였다.

6. 실험동물 처치

환경적응을 마친 BALB/c mouse 등쪽 피하에 WM793 세포주를 접종하고 2주간 자유로운 사육조건으로 사육하였다. 접종 14 일차에 3 마리는 꼬리정맥을 통해 1 mg/ml의 Fascin siRNA 용액을 10 μ l/g·체중으로, 대조군 3 마리는 Fascin siRNA 대신 동량의 생리식염수를 29 G 주사기로 투여하였다. 72 시간 경과후 동물을 희생하여 종양을 절제하고 크기를 측정한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다.

7. Western Blot 분석

WM793 세포주에 Fascin siRNA oligonucleotides 와 MST2 siRNA oligonucleotides를 AmaxaTM Transfection System (Lonza Bioscience, Basel, Switzzland)을 이용하여 설명서에 따라 각각 transfect시킨 후 pH 7에서 72 시간 배양하여 immunoblot 분석을 하였다.

NE-PER kit (Pierce, MA, USA)를 이용하여 설명서에 따라 배양세포의 핵과 세포질 분획을 얻었다. 10% SDS-PAGE gel로 total cell lysate를 분리하였다. Electro-transferring을 마친 후 membrane은 실온에서 30 분간 non-fat dry milk로 비특이 반응을 차단하였다. 3 번 세척 후 blots을 일차 항체와 peroxidase-linked anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)와 반응시켰다. 단백질 band는 ECL-plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences)으로 측정하였다.

8. 병리조직학적 검사

실험동물에서 적출한 종양조직에 대한 광학현미경 관찰을 위한 표본 제작과정은 적출해 낸 조직을 10% buffered formalin에서 24 시간 고정시킨 뒤, 흐르는 물로 씻어 조직 내에 남아있는 formalin을 제거하고 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% ethyl alcohol에서 각각 1 시간씩 탈수과정(dehydration)을 거쳤다. Xylene 치환과 paraffin 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 paraffin 블록을 회전형 박절기(microtome)를 사용하여 4 μ m 두께로 유리 슬라이드 시편을 제작하였다. Xylene으로 3~5 분씩 2 회 처리한 후 ethanol을 100%, 90%, 80%, 70%, 60% 및 50% 순으로 1 분씩 탈 파라핀 과정을 거친 후 수돗물에 10 분간 세척하였다. hematoxylin에서 5 분간 반응 후 수돗물에서 1 분간 세척한 후 1% acid alcohol에 4 회 침척 후 수돗물에 1 분간 세척한다. 이후 ammonia에 4 회 침척 하고 수돗물에 15 분간 세척하였다. Eosin에 3 분간 염색을 한 후 ethanol을 80%, 90% 및 100% 순으로 처리한 후 xylene을 3 분씩 2 회 처리한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 통계학적 분석

모든 검사값은 3 회 이상의 검사결과를 mean \pm SE로 표기하였다. 통계검사는 Student's t-test를 이용하였고, P<0.05 일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

III. 결과

1. 임상환자 검체에 대한 면역조직화학적 염색 분석

면역조직화학적 염색후 평가가 가능한 악성흑색종 주변의 비종양성 피부조직 21례에서 Fascin은 모든 증례가 약양성(1+)으로 염색되었고, MST2는 모든 증례가 강양성(3+)로 염색되었다.

하지만 흑색종 부위는 Fascin의 경우 약양성 1례, 중등도 양성 15례, 강양성 14례로 나타난 반면, MST2의 경우는 음성 2례, 약양성 17례, 중등도 양성 11례, 강양성 0례로 나타났다(Figure 3, 4). 그리고 Fascin과 MST2 발현 사이에는 음의 상관관계를 보였다($P=0.0001$) (Figure 5). 그러나, Fascin과 MST2 염색강도는 종양의 침습능과 관련성이 없었다.

2. Fascin knock-down 실험 결과

WM793 세포주에 Fascin siRNA oligonucleotides를 transfection시켜 Fascin을 knock-down시킨 후 Western immunoblotting 기법으로 MST2를 측정된 결과 대조군에 비하여 MST2의 유의한 증가소견이 관찰되었다 (Figure 6).

3. MST2 knock-down 실험 결과

WM793 세포주에 MST2 siRNA oligonucleotides를 transfection시켜 MST2를 knock-down시킨 후 Western immunoblotting 기법으로 Fascin을 측정된 결과

대조군에 비하여 Fascin의 유의한 증가소견은 관찰되지 않았다 (Figure 7).

4. Fascin siRNA 처리 동물실험

WM793 세포주 접종으로 xenograft 종양을 유도한 후 liposome에 봉입한 Fascin siRNA oligonucleotides를 transfection시켜 Fascin을 knock-down시켰다. 72시간 경과 후 BALB/c mice를 희생하여 종양을 적출하였다.

Fascin siRNA 처리군은 종양의 평균 장경이 1.33 cm인 반면 대조군은 1.93 cm로 그룹간 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$) (Figure 8).

5. 실험동물 병리조직학적 소견

Fascin siRNA 처리군은 1례에서 종양의 중심에 미소괴사(micro-focal necrosis)가 관찰되었지만, 대조군은 3례 모두 중심부의 심한 종양괴사가 관찰되었다 (Figure 9).

IV. 고 찰

피부에 발생하는 악성흑색종은 표피의 기저층에 산재해 있는 멜라닌 세포에서 발생한다. 하지만 악성흑색종이란 멜라닌세포의 악성종양으로 멜라닌세포가 존재하는 곳이면 어느 부위나 발생할 수 있으나 피부에 가장 많이 발생한다. 악성흑색종은 이 멜라닌세포 또는 기존에 존재하는 모반세포의 악성 형질변환으로 정의되는데 그 악성도가 매우 높다. 미국을 포함한 서양에서는 표재확장성 흑색종(superficial spreading melanoma)이 70%를 차지하지만, 한국을 포함한 동양에서는 선단 흑자성 흑색종(acral lentiginous melanoma)이 악성흑색종 중 가장 흔한 유형으로 우리나라에서는 악성흑색종 중 약 52~80%를 차지한다(24, 25).

중앙암등록본부 2019년도 발표자료에 따르면 2016년 우리나라에서는 232,255건의 암이 새로 발생하였는데, 그중 악성흑색종이 604건으로 전체의 0.3%를 차지하였다. 인구 10만명당 조발생률은 1.2건이고, 남녀의 성비는 1.04:1로 남자에 더 많이 발생하였다. 연령별 분포는 70대가 25.3%로 가장 많았고, 60대가 23.3% 그리고, 50대가 18.5% 순이었다(27).

악성흑색종은 침윤성장 및 전이능이 잘 알려진 종양으로 진행성 및 전이성인 경우 획기적인 치료법이 없어 예후가 매우 불량하다. 그간 동양에는 매우 드문 종양으로 서양에 비하여 그 관심도가 낮았으나 고령화, 야외활동 증가, 환경오염 등에 따른 오존층 파괴 등의 영향으로 최근 편평세포암, 기저세포암 등을 포함한 뚜렷한 피부암의 증가세와 함께 악성흑색종의 증가가 현저하다(28~30). 그러나, 이와 같은 국내 악성흑색종의 역학적 변화와 달리 이의 병태생리에 대한 연구는 매우 제한적이다.

최근 Kang 등(26)은 악성흑색종 세포주 WM793과 WM39를 이용한 연구에서 Fascin이 Hippo pathway를 통한 신호전달과정을 통하여 악성흑색종의 발생에 관여한다는 사실을 밝혔다. 그러나 이는 *in vitro* 연구로 관련 후속 연구가 없어 추가적인 연구가 요구되는 실정이다.

저자는 임상증례를 통하여 Fascin의 역할을 확인하고자 악성흑색종으로 절제된 임상 검체를 대상으로 Fascin의 면역조직화학적 발현양상을 관찰하였다. 그 결과 종양 주변에서 관찰되는 비종양성 피부조직의 표피에서는 주로 기저세포에 국한되어 약한 양성반응을 보이는 반면 악성흑색종의 경우는 종양 전반에 걸쳐 정상에 비하여 과발현(중등도 양성 및 강양성) 되는 소견이 관찰되었다. 또한 Fascin의 발현강도는 종양의 침윤도와 연관성이 없었다.

Ma 등(31)의 연구에 따르면 Fascin 발현 증가와 악성흑색종의 전이와는 상관관계가 있으나, 악성흑색종의 진행(progression) 및 생존율과는 관련이 없다는 연구결과와 유사하지만, 본 연구의 경우는 전이성 흑색종은 분석대상에 포함되지 않아 추후 추가적인 연구가 필요한 부분이다. 한편 구강편평세포암 환자의 검체를 이용한 면역조직화학적 Fascin 발현분석 연구결과에 따르면 Fascin 발현 정도와 환자의 임상-병리학적 요소들간에 상관관계가 있고, AKT 및 MAPK pathway 활성화에 관련되어 종양진행에 관련이 있다는 연구결과도 발표되었다(32). 따라서 Fascin의 면역조직화학적 발현정도과 악성흑색종의 진행, 전이, 환자의 생존율 등과의 관련성을 명확하게 평가하기 위해서는 추가적으로 더 많은 임상증례 및 다양한 임상-병리학적 요소들을 파악하여 분석하는 것이 필요하다.

Hippo pathway의 중추적 역할을 담당하고 있는 MST2와의 관련성을 파악하기 위하여 실시된 면역조직화학적 염색결과 종양 주변에서 관찰되는 비종양성 피

부조직의 표피에서는 각질층을 제외한 거의 전층에 걸쳐 강한 양성반응을 보이는 반면 악성흑색종의 경우는 정상에 비하여 발현이 없거나 감소(약양성 및 중등도 양성) 되는 소견이 관찰되었다. 종양내에서의 MST2의 발현은 모든 부위에서 동일하게 균질성으로 발현되지 않고 부위에 따라 다채롭게 염색되는 양상을 보이기도 하였다. 하지만 MST2의 발현강도는 Fascin에서와 마찬가지로 종양의 침윤도와 연관성이 없었다. 악성흑색종을 대상으로 실시된 MST2 연구는 거의 없지만 Hippo kinase (MST1/2)가 YAP/TAZ 전사능을 억제하여 간세포암종의 증식을 억제한다는 연구보고(33)와 간에서 MST1과 MST2를 제거하면 신속하게 간세포암종이 발생하는데, 이는 YAP/TAZ, STAT3, Wnt/ β -catenin 및 Notch signaling을 활성화시켜 초래되는 것으로 보고되었다(34).

본 연구결과에서도 MST2의 감소가 악성흑색종의 발생과 관련이 있는 것으로 나타났고, 악성흑색종의 발생에 Fascin과 MST2는 상호 역상관 관계가 있는 것으로 파악되었다.

또한 Fascin siRNA oligonucleotides 및 MST2 siRNA oligonucleotides를 이용한 WM793 악성흑색종 세포주 실험결과 Fascin knock-down은 MST2 발현을 증가시키지만, MST2 knock-down은 Fascin 발현에 유의한 변화를 일으키지 않아 신호전달계에서 MST2는 Fascin의 하류(downstream)에 있는 것으로 추정된다.

BALB/c mouse를 통한 동물실험에서 WM793 악성흑색종 세포주를 피하접종하여 악성흑색종을 xenograft한 2주 후 꼬리정맥을 통한 Fascin siRNA oligonucleotides 접종 실험을 통하여 유의한 종양크기 감소 결과가 확인되었다. 이는 앞서 기술된 임상검체를 이용한 Fascin에 대한 면역조직화학적 염색 결과 분석과 일치되는 소견이며, Fascin 및 MST2에 대한 면역조직화학적 염색

결과를 토대로 추정하면 Fascin siRNA oligonucleotides 접종 동물실험에서 Fascin knock-down실험의 결과 Hippo pathway의 MST2가 증가하여 종양의 크기가 감소하였을 것으로 추정된다. 실험동물 조직검체에 대한 병리조직학적 분석 결과 대조군은 종양 중심괴사가 현저하고, Fascin knock-down실험군은 종양 세포의 괴사가 관찰되지만 대조군에 비하여 심하지 않았다. 이와 같은 종양 세포의 괴사 현상이 그룹간 다른 현상이 Fascin에 따른 Hippo pathway의 역할에 의한 것인지, 단순한 종양의 크기에 따른 무혈성 중심괴사의 소견인지는 명확하지 않아 추가적인 연구가 필요하다.

V. 결론

Fascin은 세포골격 actin을 다발짓는 단백질로 각종 암의 침습 및 전이에 관여하는 것으로 알려져 있고, Hippo pathway는 각종 암의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에 저자는 Fascin과 Hippo pathway의 신호전달계에서 중추 역할을 담당하는 MST2를 악성흑색종 임상증례 30례에 대한 면역조직화학적 염색 분석, 악성흑색종 세포주 WM793를 이용한 Fascin과 MST2 knock-down 실험 분석, BALB/c mouse를 이용한 Fascin knock-down 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 악성흑색종의 발생과 Fascin의 면역조직화학적 과발현은 유의한 상관관계가 있었다.
2. 악성흑색종의 발생과 MST2의 면역조직화학적 발현감소는 유의한 상관관계가 있었다.
3. 악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 면역조직화학적 발현양상은 역상관관계가 있었다.
4. 악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 면역조직화학적 발현양상은 종양의 침습능과는 상관관계가 없었다.
5. Fascin의 knock-down 실험으로 MST2의 과발현이 유도되고 이는 종양크기의 감소를 초래하였다.

이상의 결과를 종합하면 Fascin의 하향 조절을 통한 Hippo pathway 활성화를 악성흑색종의 새로운 치료전략으로 고려할 수 있을 것으로 판단된다.

VI. 참고문헌

1. Sun J, He H, Xiong Y, Lu S, Shen J, Cheng A, Chang WC, Hou MF, Lancaster JM, Kim M, Yang S. Fascin protein is critical for transforming growth factor β protein-induced invasion and filopodia formation in spindle-shaped tumor cells. *J Biol Chem* 2011;286(45):38865-38875.
2. Jayo A, Parsons M. Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1614-1617. Erratum in: *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43(4):691.
3. Chen L, Yang S, Jakoncic J, Zhang JJ, Huang XY. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature* 2010;464(7291):1062-1066. doi: 10.1038/nature08978. Erratum in: *Nature*. 2011 Aug 11;476(7359):240.
4. Yang S, Huang FK, Huang J, Chen S, Jakoncic J, Leo-Macias A, Diaz-Avalos R, Chen L, Zhang JJ, Huang XY. Molecular mechanism of fascin function in filopodial formation. *J Biol Chem* 2013;288(1):274-284.
5. Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R. Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem* 2011;286(34):30087-30096.

6. Li A, Morton JP, Ma Y, Karim SA, Zhou Y, Faller WJ, Woodham EF, Morris HT, Stevenson RP, Juin A, Jamieson NB, MacKay CJ, Carter CR, Leung HY, Yamashiro S, Blyth K, Sansom OJ, Machesky LM. Fascin is regulated by slug, promotes progression of pancreatic cancer in mice, and is associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2014;146(5):1386-1396.e1-17.
7. Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:241. Erratum in: *BMC Cancer*. 2011;11:488.
8. Tsai WC, Chao YC, Sheu LF, Chang JL, Nieh S, Jin JS. Overexpression of fascin-1 in advanced colorectal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining scores with clinicopathological parameters. *Dis Markers* 2007;23(3):153-160.
9. Liang Z, Wang Y, Shen Z, Teng X, Li X, Li C, Wu W, Zhou Z, Wang Z. Fascin 1 promoted the growth and migration of non-small cell lung cancer cells by activating YAP/TEAD signaling. *Tumour Biol* 2016;37(8):10909-10915.
10. Ruiz de Garibay G, Herranz C, Llorente A, Boni J, Serra-Musach J, Mateo F, Aguilar H, Gómez-Baldó L, Petit A, Vidal A, Climent F, Hernández-Losa J, Cordero Á, González-Suárez E, Sánchez-Mut JV, Esteller M, Llatjós R, Varela

M, López JI, García N, Extremera AI, Gumà A, Ortega R, Plà MJ, Fernández A, Pernas S, Falo C, Morilla I, Campos M, Gil M, Román A, Molina-Molina M, Ussetti P, Laporta R, Valenzuela C, Ancochea J, Xaubet A, Casanova Á, Pujana MA. Lymphangioliomyomatosis Biomarkers Linked to Lung Metastatic Potential and Cell Stemness. *PLoS One* 2015;10(7):e0132546. Erratum in: *PLoS One* 2018;13(11):e0207586.

11. Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003;114(4):457-467.

12. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol* 2003;5(10):914-920.

13. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003;114(4):445-456.

14. Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, Ambrose D, Han DK, Wright M, Chernoff J, Clark EA, Krebs EG. Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J* 1998;17(8):2224-2234.

15. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J, Bardeesy N. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 2009;16(5):425-438.
16. Nallet-Staub F, Marsaud V, Li L, Gilbert C, Dodier S, Bataille V, Sudol M, Herlyn M, Mauviel A. Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2014;134(1):123-132.
17. Ni L, Zheng Y, Hara M, Pan D, Luo X. Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst-Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes Dev* 2015;29(13):1416-1431.
18. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Biciato S, Piccolo S. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011;147(4):759-772.
19. Bartucci M, Dattilo R, Moriconi C, Pagliuca A, Mottolese M, Federici G, Benedetto AD, Todaro M, Stassi G, Sperati F, Amabile MI, Piloizzi E, Patrizii M, Biffoni M, Maugeri-Saccà M, Piccolo S, De Maria R. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells.

Oncogene 2015;34(6):681-690.

20. Yu J, Alharbi A, Shan H, Hao Y, Snetsinger B, Rauh MJ, Yang X. TAZ induces lung cancer stem cell properties and tumorigenesis by up-regulating ALDH1A1. *Oncotarget* 2017;8(24):38426-38443.

21. Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H. An imbalance in TAZ and YAP expression in hepatocellular carcinoma confers cancer stem cell-like behaviors contributing to disease progression. *Cancer Res* 2015;75(22):4985-4997.

22. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 2005;309(5737):1074-1078.

23. Liu FC, Grimsrud TK, Veierød MB, Robsahm TE, Ghiasvand R, Babigumira R, Shala NK, Stenehjem JS. Ultraviolet radiation and risk of cutaneous melanoma and squamous cell carcinoma in males and females in the Norwegian offshore petroleum workers cohort. *Am J Ind Med* 2021 Mar 8. doi: 10.1002/ajim.23240. Epub ahead. PMID: 33682179.

24. Bolick NL, Geller AC. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2021;35(1):57-72.
25. World Cancer Report. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.14.
26. Kang J, Wang J, Yao Z, Hu Y, Ma S, Fan Q, Gao F, Sun Y, Sun J. Fascin induces melanoma tumorigenesis and stemness through regulating the Hippo pathway. *Cell Commun Signal* 2018;16(1):37.
27. Annual report of cancer statistics in Korea in 2018. National Cancer Information Center. <https://www.cancer.go.kr>
28. Basurto-Lozada P, Molina-Aguilar C, Castaneda-Garcia C, Vázquez-Cruz ME, Garcia-Salinas OI, Álvarez-Cano A, Martínez-Said H, Roldán-Marín R, Adams DJ, Possik PA, Robles-Espinoza CD. Acral lentiginous melanoma: Basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell Melanoma Res* 2021;34(1):59-71.
29. Thrift AP, Gudenkauf FJ. Melanoma incidence among non-Hispanic whites in all 50 US States from 2001 through 2015. *J Natl Cancer Inst* 2020;112(5):533-539.

30. Oh CM, Cho H, Won YJ, Kong HJ, Roh YH, Jeong KH, Jung KW. Nationwide trends in the incidence of melanoma and non-melanoma skin cancers from 1999 to 2014 in South Korea. *Cancer Res Treat* 2018;50(3):729-737.
31. Ma Y, Faller WJ, Sansom OJ, Brown ER, Doig TN, Melton DW, Machesky LM. Fascin expression is increased in metastatic lesions but does not correlate with progression nor outcome in melanoma. *Melanoma Res* 2015;25(2):169-172.
32. Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L, Dange PP, Chaukar DA, D'cruz AK, Kannanl S, Gude R, Kane S, Dalal SN, Vaidya MM. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:32.
33. Kim W, Khan SK, Liu Y, Xu R, Park O, He Y, Cha B, Gao B, Yang Y. Hepatic Hippo signaling inhibits protumoural microenvironment to suppress hepatocellular carcinoma. *Gut* 2018;67(9):1692-1703.
34. Kim W, Khan SK, Gvozdenovic-Jeremic J, Kim Y, Dahlman J, Kim H, Park O, Ishitani T, Jho EH, Gao B, Yang Y. Hippo signaling interactions with Wnt/ β -catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. *J Clin Invest* 2017;127(1):137-152.

Legend for figures

Figure 1. Schematic models of the Hippo pathway in *Drosophila* and mammals. Cells are shown with respective cellular junctions; adherens junction (AJ), tight junction (TJ), septate junction (SJ). Hippo pathway components in *Drosophila* and mammals are shown in various colors, with arrows and blunt lines indicating activation and inhibition, respectively. The yellow spheres indicate phosphorylation of target proteins by kinase. Continuous lines indicate known interactions, whereas dashed lines indicate unknown mechanisms. (Adopted from EMBO reports 15:642-656)

Figure 2. Hippo signaling pathway. Schematic diagram for the core components and signal transduction of Hippo pathway. (A) When Hippo signaling is Off (in low cell density): The kinases MST1/2 and LATS are inactive, which results in inhibition of phosphorylation of YAP and TAZ. The stabilized YAP/TAZ in nuclei interacts with TEAD and enhances the transcription of target genes related to anti-apoptosis and proliferation. (B) When Hippo signaling is On (in high cell density): Activation of KIBRA and NF2 via unknown upstream signaling leads to activation of MST1/2. Activated MST1/2 phosphorylate SAV1 which in turn phosphorylate LATS and MOB1. The activated LATS/MOB phosphorylates YAP/TAZ which results in cytoplasmic retention by 14-3-3 protein and proteasomal degradation of YAP/TAZ. As a result, TEAD interacts with VGL4 and suppresses the

expression of target genes. (Adopted from creative commons <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

Figure 3. Immunohistochemical staining for Fascin. A: Nests of early stage melanoma shows diffuse strong positive cytoplasmic immunoreactivity (arrow) in the tumor focus. However, the adjacent non-tumorous epidermis (asterisk) shows weakly positive immunoreactivity confined to the basal layer. B: Deeply invasive advanced melanoma shows diffuse strong positive immunoreactivity.

Figure 4. Immunohistochemical staining for MST2. A: Early stage melanoma shows weakly to moderately positive cytoplasmic immunoreactivity (arrows) in the tumor area. The adjacent non-tumorous area (asterisk) shows moderately positive immunoreactivity in the full-layer of the epidermis. B: More advanced melanoma shows weakly to moderately positive immunoreactivity (arrows) in the tumor area. However, the adjacent non-tumorous epidermis (asterisk) shows strong positive immunoreactivity in the full-layer of the epidermis.

Figure 5. Comparison of Fascin and MST2 immunoreactivity in each corresponding case. Histogram demonstrates statistically significant negative correlation between Fascin and MST2 immunoexpression.

Figure 6. Immunoblotting for Fascin knock-down. Fascin siRNA oligonucleotides transfection increases MST2 expression in WM793 melanoma cell line.

Figure 7. Immunoblotting for MST2 knock-down. MST2 siRNA oligonucleotides transfection does not increase Fascin expression in WM793 melanoma cell line.

Figure 8. BALB/c mice xenograft experiment. A: Excised tumor sizes of the liposome encapsulated Fascin siRNA injection group are smaller than those of the control group. B: Histogram shows statistically significant decrement of tumor size in the Fascin knock-down group ($P < 0.05$).

Figure 9. Histopathologic findings of the xenograft experiment. A: Fascin siRNA treated group shows micro-foci of tumor necrosis (asterisks) in the tumor center (left). Higher magnification shows malignant melanoma with melanin pigmentation (right). B: Control group shows massive tumor necrosis (asterisks) in the tumor center (left). Higher magnification shows malignant melanoma with melanin pigmentation (right). Hematoxylin-eosin staining.

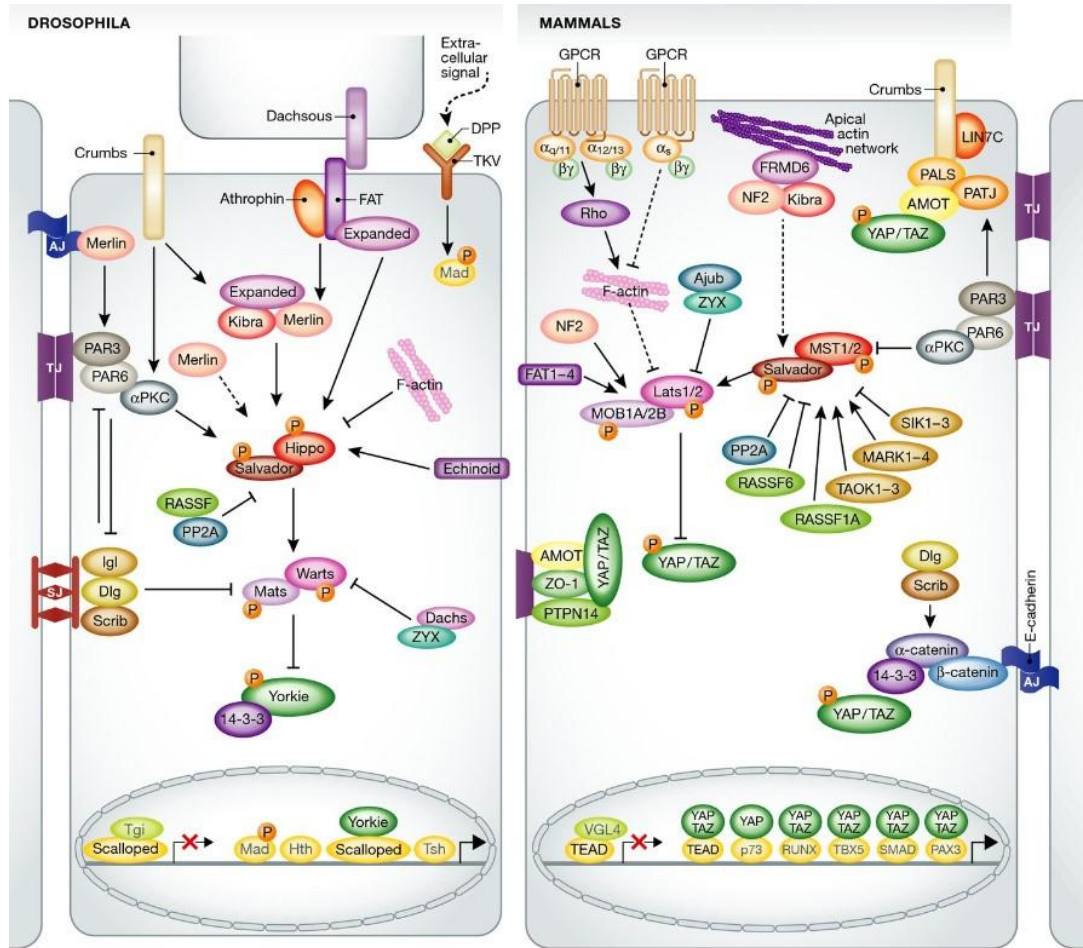


Figure 1

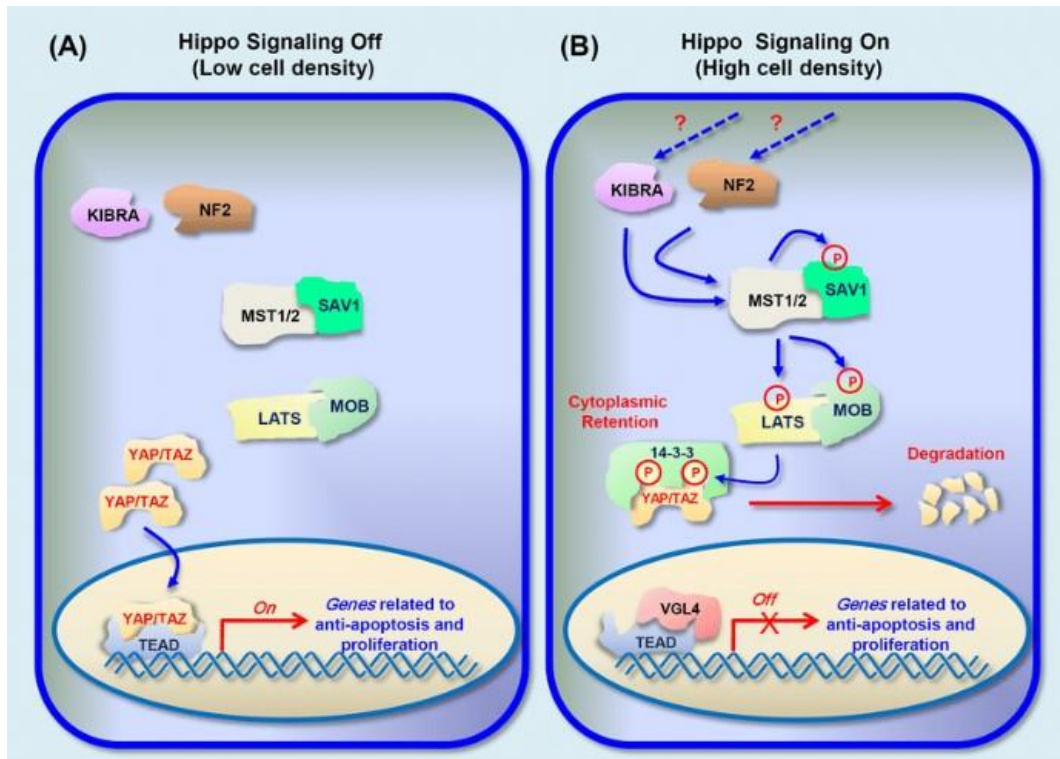


Figure 2

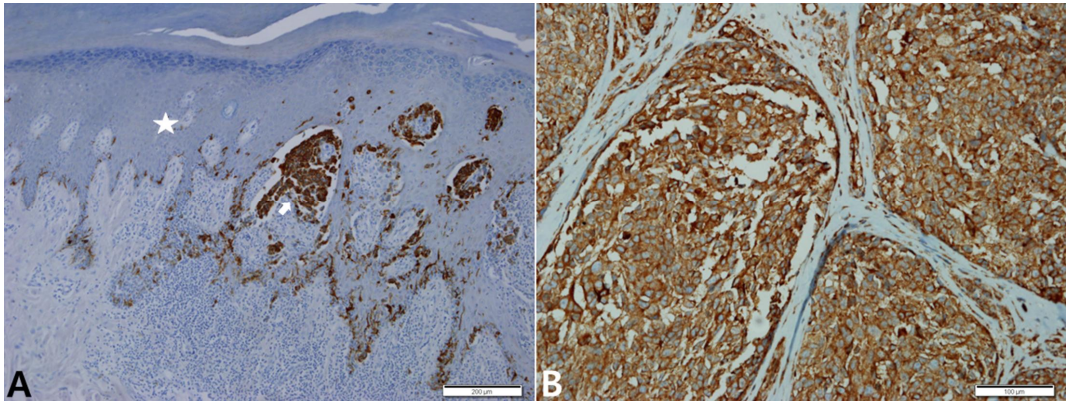


Figure 3

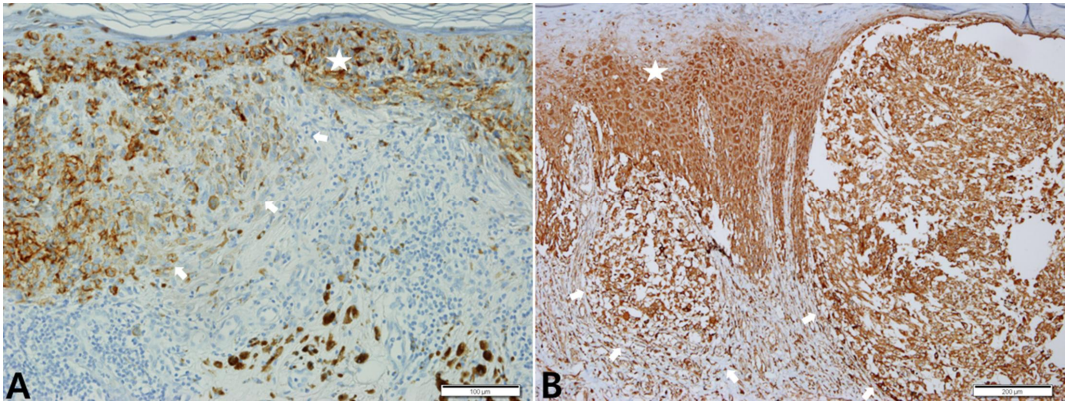


Figure 4



Figure 5

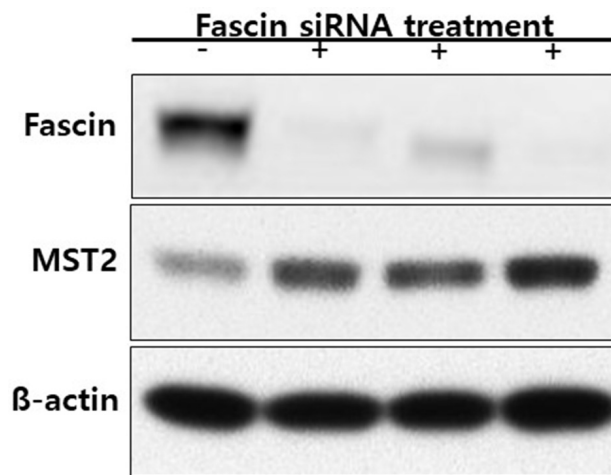


Figure 6

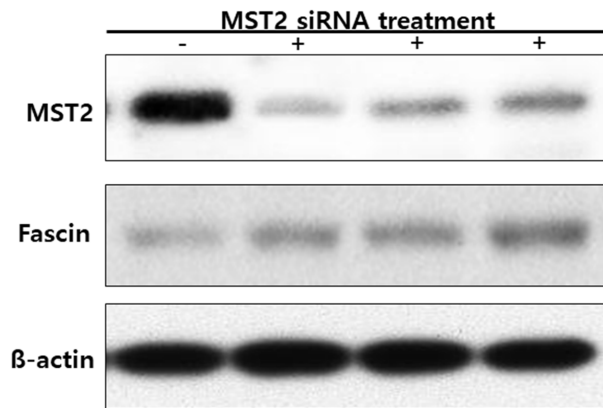


Figure 7

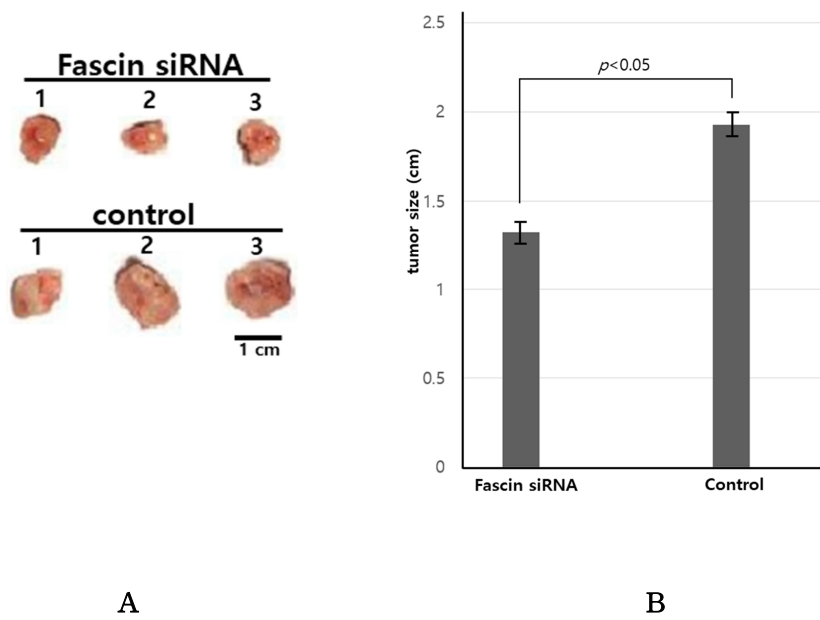


Figure 8

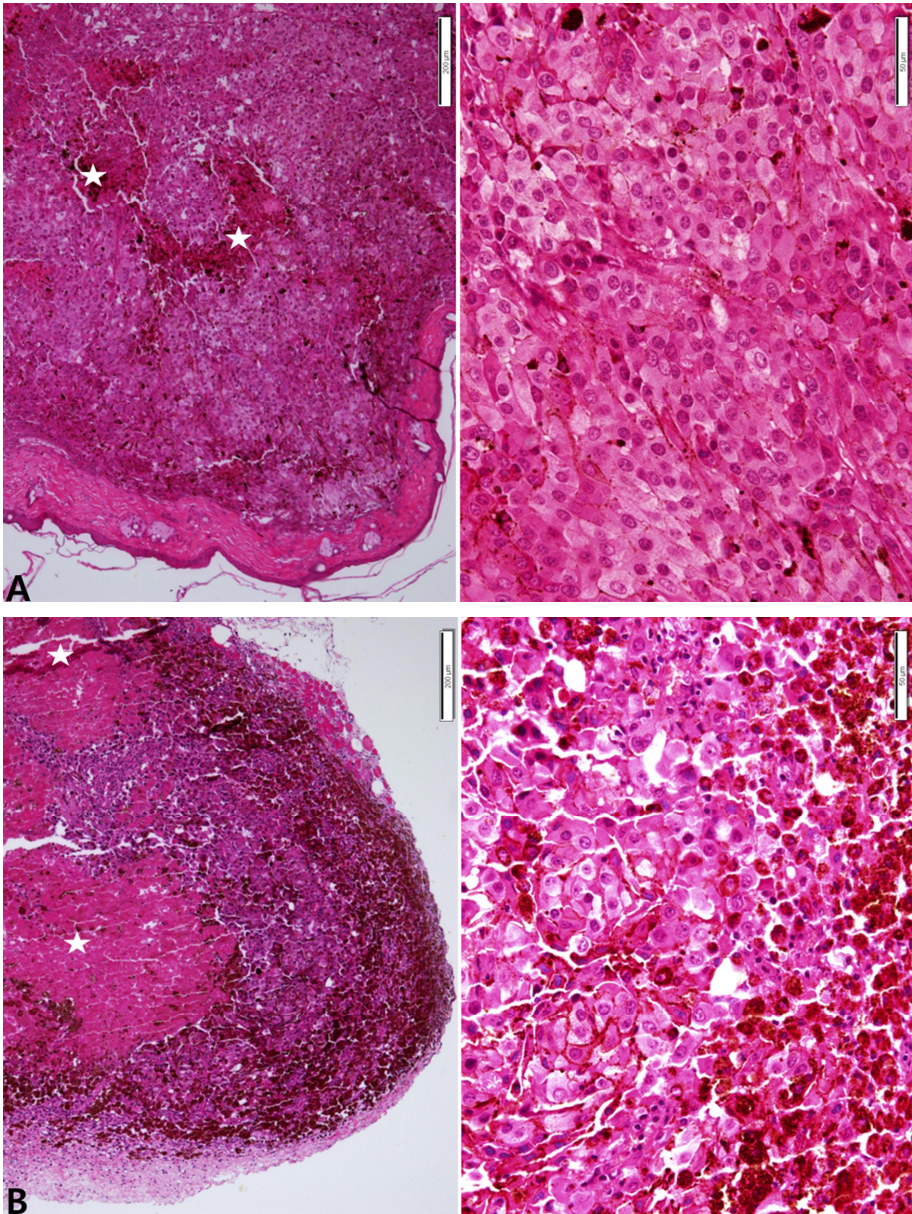


Figure 9

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20157462	과 정	박사학위과정
성 명	한글: 강병수 한문: 姜秉秀 영문: Byung-Soo Kang				
주 소	광주광역시 남구 제석로 72, 102동 802호				
연락처	E-MAIL: dahlia83x@naver.com				
논문제목	한글: 악성흑색종에서 Fascin과 MST2의 역할 영문: Role of Fascin and MST2 in melanoma				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2021년 4월 14일

저작자: 강병수 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하