



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](#)

2021 년 8월

석사 학위 논문

# H0XC6 유도 miR-188-5p에 의한 종양 억제 유전자 FOXN2 조절 기전

조선대학교 대학원

치 의 생 명 공 학 과

정 세 호

# H0XC6 유도 miR-188-5p에 의한 종양 억제 유전자 FOXN2 조절 기전

H0XC6 mediated miR-188-5p suppresses a FOXN2 tumor  
suppressor

2021년 8월 27일

조선대학교 대학원

치 의 생 명 공 학 과

정 세 호

# H0XC6 유도 miR-188-5p에 의한 종양 억제 유전자 FOXN2 조절 기전

지도교수

안 상 건

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2021년 4월

조선대학교 대학원

치 의 생 명 공 학 과

정 세 호

## 정세호의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 상 호



위 원 조선대학교 교수 유 지 원



위 원 조선대학교 교수 안 상 건



2021년 5월

조선대학교 대학원

## 목 차

목 차	.....	i
LIST OF FIGURES	.....	iii
ABBREVIATIONS	.....	iv
ABSTRACT	.....	v
I. INTRODUCTION	.....	1
II. MATERIAL AND METHODS	.....	4
2.1. Cell culture	.....	4
2.2. Cell transfection	.....	4
2.3. Micro array analysis	.....	4
2.4. RNA extraction, reverse transcription, and quantitative real-time polymerase chain reaction	.....	5
2.5. Western blot analysis	.....	5
2.6. The Kaplan–Meier plotter	.....	6
2.7. Plasmid construction	.....	6
2.8. Dual-luciferase reporter assay	.....	6
2.9. Wound healing Assay	.....	7
2.10. Statistical analysis	.....	7
III. RESULTS	.....	8
3.1. HOXC6 과발현 세포에서의 micro RNA expression microarray analysis	.....	8

3.2. HOXC6 유도에 따른 4개 후보군의 quantitative RT-qPCR.....	10
3.3. HOCX6 와 mir-188-5p 의 암 발생 위험성과의 상관관계.....	12
3.4. FaDu cell에서 HOXC6과 mir-188-5p 유도에 따른 FOXN2의 발현 변화.....	14
3.5. HEK293 에서 HOXC6과 mir-188-5p 유도에 따른 FOXN2의 발현 변화.....	16
3.6. mir-188-5p의 과발현과 FOXN2 3'-UTR과 상호작용.....	18
3.7. mir-188-5p와 FOXN2의 발현에 따른 세포의 이동성 변화.....	20
IV. DISCUSSION.....	22
V. REFERENCES .....	26

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Comparison of miRNA profiles. FaDu cells were transfected with HOXC6 expression plasmid for 48 hours before subjected for human miRNA microarray. ....	9
Figure2. Overexpression of HOXC6 induces the expression of several miRNAs in FaDu cells . (A–B) Overexpression of HOXC6 in FaDu cells. ....	11
Figure 3. The prognostic value of HOXC6 and mir-188-5p in head and neck squamous cell carcinomas patients. ....	13
Figure 4. HOXC6-induced mir-188-5p upregulation inhibits FOXN2 expression in FaDu cells. ....	15
Figure 5. HOXC6-induced mir-188-5p upregulation inhibits FOXN2 expression in HEK293 cells. ....	17
Figure 6. miR-188-5 targets the 3'UTR region of FOXN2. ....	19
Figure 7. Inhibition of FOXN2 reduces the migration in FaDu cells. ....	21



## ABBREVIATIONS

FBS	Fetal bovine serum
MTT	3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
RT	Room temperature
PBST	PBS/0.05% Tween 20
BSAS	Bosley-Salih-Alorainy syndrome
Meis	Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
qRT-PCR	quantitative realtime PCR
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
PVDF	Polyvinylidene fluoride

## ABSTRACT

### **HOXC6 mediated miR-188-5p suppresses a FOXN2 tumor suppressor**

SEHO-JEONG

Advisor : Prof.SANG-GUN AHN, Ph.D.

Department of Biomedical Engineering

Graduate School of Chosun University

Homeobox C6 (HOXC6) is a transcription factor that plays a part in malignant progression of various cancers. However, the roles of HOXC6 and its regulatory mechanism remains unclear. In this study, we identified key regulatory interactions responsible for HOXC6 mediated-cancer progression by miRNA regulatory networks. In microarray profiling of miRNA, miRNAs, such as hsa-miR-188-5p, hsa-miR-8063, and hsa-miR-8064 were significantly increased in HOXC6 overexpressed cells. Higher positive expression rate of HOXC6 and mir-188-5p was observed in malignant cancer. We also found that HOXC6 significantly up-regulated mir-188-5p expression. The underlying function of HOXC6 mediated mir-188-5p was predicted through TargetsScan and MiRNA Database. The overexpressing mir-188-5p downregulates the expression of FOXN2, a tumor suppressor gene. Furthermore, in luciferase assay, mir-188-5p bind to the 3'-UTR of FOXN2 and is mainly responsible for the dysregulation of FOXN2. Silencing FOXN2 induced cell migration and the effect of FOXN2 silencing was enhanced when the HOXC6/mir-188-5p signaling pathway was increased. These results suggest that HOXC6/mir-188-5p may induce malignant progression in cancer through the inhibition of the activation of FOXN2 signaling pathway.

## I. INTRODUCTION

HOX 유전자는 homeo box 유전자를 암호화하며 1990년 초파리의 배아 발생에서 처음 발견되었다[1]. HOX 유전자는 배아의 성장, 세포의 형태발생과 분화뿐만 아니라 apoptosis, differentiation, motility, angiogenesis, 등의 다양한 signaling을 regulating 하는 데 작용한다[2]. 인간의 HOX gene Family는 4개의 cluster로 나뉘어 39개의 유전자가 속해있으며 각 cluster 당 9-11개의 유전자로 나뉜다. HOX 유전자의 기능은 초기 초파리의 배아 발생 및 조직의 형성과정에 영향을 주는 것으로 확인되었다[3]. 발달 중인 폐에서 HOXA와 HOXB군의 유전자 발현이 증가하며 HOXB5의 경우 폐와 기도에 발현하며 HOXB9은 기낭에서 발현된다. 또한, HOXA9은 상완골 이나 대퇴골 에서 발현되며 HOXA9-11의 경우 요골 및 경골 부위에서 발현되었다. HOXB1는 중추신경으로 발달하는 주엽 배아 영역에서 증가하며 조혈모 발달에 HOXA10의 발현이 영향을 주는 것으로 알려져 있다[4]. 이들의 결핍은 여러 유전적 질병과 연관된다. HOXA1는 감각신경성 난청 내이 이상과 BSAS (Bosley-Salih-Alorainy syndrome)를 일으키며 HOXB1는 신경 무형성증, 선천성 안면 마비, 사시 등의 질병과 연관이 있다. HOXC13의 경우 외배엽의 돌연변이를 유발해 모발 및 손톱에 이형성증을 유발한다. HOXD4는 마우스에서 경추의 변형을 유발한다. 이처럼 HOX 유전자들은 인간의 질병에 관여한다[5].

최근에 HOX 유전자는 암에서 과발현되며 하류 표적의 발현을 조절하여 암에 특성을 부여한다고 알려졌다. HOX 유전자와 암의 상관관계는 대장암, 유방암, 전립선암, 등 많은 암에서 확인되었다. 대장암 세포에서는 HOXB6, HOXB8 HOXC8, HOXC9의 과발현이 보고되었으며 이들의 발현은 대장암세포의 다양한 stage에서 cancer의 development에 관여한다. HOXB7는 *in vitro* 나 *in vivo*에서 대장암세포의 proliferation과 tumorigenesis에 관여하며, cyclin D1을 upregulation 하거나 p21<sup>Kip1</sup>의 downregulation을 유도하여 MAPK pathway와 PI3K pathway를 활성화 한다. 또한, 유방암 세포군에서는 HOXA5에 의해 apoptosis가 유도되어 proliferation이 억제된다. HOXB13는 유방암에서 과발현되며 estrogen receptor의 발현억제와 IL-6의 발현유도를 통하여 세포의 침입능력을 증가시킨다. 마지막으로 전립선암에서는 주로 HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8가 속한 HOXC 유전자가 과발현되며, HOXC8은 과발현되어 전립선암의 Invasiveness 나 Metastasis에 작용한다[5]. 이처럼 HOX 유전자군은 암에서 특정 target의 발현을 조절하여 cancer의 development에 관여한다.

특히, HOXC6는 전립선암, 유방암, 비인두암, 신경세포종, 식도암, 비소세포 폐암

등에서 과다 발현은 환자의 불량한 예후와 연관 관계가 있다는 것이 보고되었다 [6-16]. 최근 연구결과에 따르면 HOXC6의 발현은 자궁경부암, 신경교모세포종, 전립선암, 비소세포 폐암, 구강암 등에서 암의 증식을 유도하며, 전립선암의 경우 HOXC6의 발현 감소는 암의 apoptosis를 유도한다[15,16]. 신경 교종에서의 HOXC6의 저해는 WIF-1을 표적으로 세포주기를 억제해 암세포의 사멸을 유도하며, 정상세포종에서는 MAPK pathway를 통하여 세포의 증식에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다[6, 11]. 비인두암에서 HOXC6의 과발현은 Ki-67의 발현을 조절하며 위장간 신생물에서는 junD과의 상호작용으로 암발생을 조절하는 역할을 한다. [8] 자궁경부암과 구강암에서 HOXC6와 단백질간 상호작용 분석 기법을 통하여 HOXC6가 Bcl-2의 발현을 조절하여 암세포의 apoptosis를 막는다는 연구결과가 보고되었다[9]. 결과적으로 이들 연구에서 HOXC6의 발현 변화는 여러 암종에서 관찰되며 proliferation, apoptosis, progression, mobility, multidrug resistant에 영향을 주는 것으로 알려져 있지만, HOXC6와 micro RNA 간의 세포내 상호작용 신호전달기전에 관한 연구가 필요하다.

miRNA는 19~25nt 내외의 염기서열로 구성되어있으며 생체 내에서 분화조절, 세포의 성장, 암의 전이 유도, 세포의 사멸 조절 등 여러 가지 생물학적 기능을 수행한다고 알려져 있다. 이러한 특성 때문에 다양한 암종에서 miRNA의 발현 변화가 조사되었다[17]. 만성 림프 백혈병에서는 mir-15a, mir-223, mir-229, mir-181의 발현이 특이적 target에 작용하여 암의 성장을 조절하며, 호지킨 림프종의 경우 발현이 변화된 mir-135a 가 JAK-2 signaling에 영향을 주어 Bcl-XL을 발현시켜 apoptosis를 억제한다 [17]. 유방암의 경우 micro array analysis를 통하여 확인된 mir-145가 TP53의 발현을 조절해 유방암의 apoptosis를 유도하며, 최근 발견된 mir-9의 경우 E-cadherin과 b-catenin 의 네트워크에 관여해 유방암의 metastasis를 유도한다[19]. 간암의 경우 mir-21, mir-221/222, mir-34a, 등과 같은 12개의 miRNA가 cancer의 progression과의 상관관계를 가진다[20]. 또한, mir-221/222는 가장 높은 발현을 보이며 CDK inhibitor 인 p27에 작용하여 세포의 progression을 조절하는 것으로 알려졌다[17]. 두경부암에서는 mir-423, mir-106b, mir-20의 발현이 증가하며 이와는 반대로 mir-10a의 경우 발현이 감소한다. 구강암에서 mir-375의 발현증가나 mir-106b-25 클러스터 군의 발현 저하는 proliferation의 감소를 유도한다[21, 25]. HOXA9는 Meis와 함께 작용하여 mir-146a의 발현을 억제하여 Syk signaling을 유도해 급성 조혈 세포성 백혈병의 증세를 가속화 한다[22]. 흑색종에서의 HOXB7/PBX2 complex의 붕괴는 mir-221 & mir-222의 발현의 감소를 유도하여 c-fos pathway 통한 자가사멸을 유도한다[23]. 또한, 구강암

에서 HOXC6에 의해 유도된 mir-4708이 MDR1의 발현을 조절하여 암세포의 다제내성을 조절한다.

위와 같은 연구결과를 기반으로 하여 본 연구에는 구강암 세포주인 FaDu 세포를 이용하여 HOXC6에 의한 mir-RNA 188-5p의 발현 변화를 확인하였고, 또한, mir-RNA 188-5p의 새로운 target 유전자로 종양억제유전자인 FOXN2를 확인하였다. 결론적으로 본 연구는 HOXC6 유도 mir-RNA 188-5p가 종양억제 유전자인 FOXN2의 발현을 억제하여, 구강암의 migration을 유도하는 새로운 기전을 규명하였다.

## II. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Cell culture

FaDu, HEK-293 모든 세포주는 DMEM 10% FBS 와 100 ug/ml 페니실린 스트렙토마이신 이 함유된 배지에서 배양되었으며, 배양기의 환경은 37°C 및 5%의 조성에서 배양되었다. 80~90 %의 density에서 세포를 사용하였으며 세포배양은 1mL의 트립신을 이용하여 2 mL의 Complete DMEM으로 중화시켰으며 1000 rpm, 2분동안 원심분리하여 가라앉은 세포를 다시 Fresh DMEM으로 resuspension 하여 배양하였다.

### 2.2 Cell transfection

FaDu cell 및 HEK 293 cell을 seeding 후 24시간 뒤에 새 배지로 갈아준 후 시행하였으며 각각의 실험에 따라 1) 대조군과 HOXC6 vector, 2) 대조군과 siFOXN2, 3) 대조군 과 mir-188-5p vector 4) 대조군, mir-188-5p mimic, 과 mir-188-5p inhibitor로 시행하였다. 화학적으로 합성된 mir-188-5p mimic(5'CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG3'), mir-188-5p inhibitor(5'CCCUCCACCAUGAAGGGAUG) (genepharma), siFOXN2(GAGAUGAUGUGCCAUCUU) (bioneer), pCDNA4.1-hoxc6-his-Myc, psuper-mir-188-5p( mimic vector), psuper control vector가 사용하였다. plasmid의 경우 optiMEM (gibco) 배지와 transfection reagent로 Fugene 6 (promega)를 사용하였으며 표준 프로토콜을 따라 실험 후 48시간 후 세포를 수확하여 확인하였다. 또한, siRNA의 경우 lipofectamin RNAimax (thermofisher)를 사용하였으며 lipofectamin RNAimax 표준 프로토콜에 따라 형질감염을 시행하였다.

### 2.3 Micro array analysis

HOXC6의 발현에 따른 miRNA의 변화를 평가하기 위하여 FaDu cell에 HOXC6의 과발현을 유도하였으며 control 군과 HOXC6 과발현 벡터에 의한 miRNA 발현을 affmertrix miRNA Expression Microarray Analysis를 시행하여 확인하였다. 그 후 데이터를 Cluster analysis-Hierarchical clustering heat map, Scatter plot of expression level, Bar plot-significant의 방식으로 그래프로 변환하였다. 이 데이터를 기반으로 특정 miRNA를 선정하였으며 targetscan, mirwalk, mirDB를 이용하여 miRNA target을 확인하였다.

## 2.4 RNA extraction, reverse transcription, and quantitative real-time polymerase chain reaction

FaDu 및 HEK293 세포는 PBS로 washing 후 RNA isoplus (Takaka)을 통하여 수확되었으며 chloroform을 통한 분리 후 isopropanol 추출 및 70 % ethanol을 통해 mRNA를 추출하였다. quantitative real-time polymerase chain reaction은 analyjena사의 q tower 2.2를 사용하여 수행하였으며, 각 유전자의 발현수준은 GoTaq® 1-Step RT-qPCR System kit를 사용하여 표준 프로토콜에 의해 평가되었다. mRNA 발현확인인 경우 M-MLV Reverse Transcriptase (promega), oligo dT (promega)를 사용하여 만든 cDNA를 이용하여 확인하였다. 각각의 primer는 GAPDH (5' CCAAGGTCATCCATGACACTTTG, 3' GCATTGCTGATGATCTTGAGGCTG) FOXN2(5' CCAGGTCTAGCGTGTCTTCC, 3' AGCCACTGTCTCCAAGAGGA ) HOXC6(5' CAGATCTACTCGCGGTACCAG, 3' TCCTCTTCTGTCTCTTCCCGC) mir-188-5p (5GCAGCATCCCTTGCATGGTG, 3' GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCCCTCCAC)가 사용되었다. 95 °C, 5min -95 °C, 30sec - 58 °C, 30sec - 72 °C, 30sec -32 cycle, 72 °C, 5 min 조건으로 PCR 하였다.

## 2.5 Western blot analysis

세포들은 PBS washing 후 harvest 하였다. 세포 침전물은 RIPA buffer 에 용해되어, bio-rad protein assay dye reagent 를 이용한 단백질 정량법에 따라 정량을 확인했다. 10 well 10 % SDS-PAGE (20ug/well)에 sample 을 loading 후 전기영동을 시행하였으며 이후 PVDF membrane 을 사용하여 transfer 하였다. 5% skim milk 에 2 시간 blocking 후 TBST 로 3 번 washing 하였다. 4c 에서 1 차 항체(HOXC6, FOXN2, b-actin ) (santacruz) O.N 하여 부착 후 3 회 TBST 로 washing 하였다. 2 차 항체를 RT 에서 1 시간 부착 후 3 회 TBST 로 washing 후 LAS-1000 plus(Fuji film) 기기를 이용하여 형광을 측정하였다.

## 2.6 The Kaplan-Meier plotter

HNSCC에서 mRNA 및 miRNA의 위험성 평가는 발현데이터 및 임상데이터를 포함하는 Kaplan-Meier plotter ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com))을 사용하여 평가하였다. 특정 유전자의 예후 가치 평가를 위해 환자 표본을 유전자의 발현에 따라 두 개의

코호트로 나누었다. Kaplan–Meier plotter 생존 곡선을 사용하여 HOXC6 및 mir-188-5p의 예후를 평가하였으며 생존 플롯을 얻었으며, 여기서 위험 수는 메인 플롯 아래에 표시되었다. 95 % 신뢰 구간의 로그 순위 p- 값 및 위험 비율 (HR)이 계산되어 그래프에 표시되었다.

## 2.7 Plasmid vector construction

miRNA expression vector 인 pSUPER plasmid 에 hsa-mir-188-5p 를 cloning 하기 위해 hsa-mir-188-5p primer 을 합성하였다. Forward: GATCCCCCATCCCTTGCATGGTGGAGGGTTCAAGAGACCCTCCACCATGCAAGGG ATGTTTTTA.hsa-mir-188-5p primer  
Reverse:AGCTTTAAAAACATCCCTTGCATGGTGGAGGGTCTCTTGAACCCTCCACC ATGCAAGGGATGGGGG. (Macrogen, Korea). PCR 조건은 95℃에서 3 분간 denaturation, 95 °C 20 초, 35~55 °C 20 초, 72 °C 20 초, 35 cycle, 72 °C에서 5 분간 extension 을 통해 얻은 PCR 생산물을 BgIII 와 HindIII 로 digestion 하여 pSUPER basic vector 에 ligation 하였다. FOXN2 3'-UTR 는 pMIR luciferase report vector 에 cloning 하기 위해 FOXN2 3'-UTR wild type 을 합성하여 사용하였다. FOXN2 3'-UTR,Forward: CCCAAGCTTGGGCAGGCATGATCCTAACAGCAATTG,  
Reverse:ACTAGTTCCACCTTGCTGGAATTCGT 를 이용하여 95 °C, 5 min, 95 °C, 30 sec - 56 °C, 30 sec - 72 °C, 1 min -30 cycle, 72 °C, 5 min 조건으로 PCR 하였다. FOXN2 3'-UTR wild type 을 luciferase vector (Ambion)에 cloning 하여 plasmid 를 제작하였다.

## 2.8 Dual-Luciferase reporter assay

12 well plate 에  $2.5 \times 10^5$  cell/well 로 seeding 한 FaDu 및 HEK293 세포에 pMIR-REPORT™ Luciferase (ambion)에 FOXN2 3'UTR 41-55 위치를 포함하는 254 bp 단편을 삽입한 vector 를 mir-188-5p 와 FOXN2 mRNA 3'UTR 부위와의 결합을 확인하기 위해서 4 개의( 대조군, vector , vector + mir-188-5p inhibitor, vector+ mir-188-5p mimic) 실험군을 나누었으며 48 시간이 지난 후 dual-luciferase reporter assay kit (promega) 의 protocol 을 이용하여 DTX 880 기기로 450 nm 형광을 측정하여 activity 를 측정하였으며 값을 단백질 정량값으로 나누어 normalization 하였다.



## 2.9 Wound healing Assay

세포는 6 Well dish 에 각 well 당  $6 \times 10^5$  개의 세포를 seeding 24 시간 배양 후 control 군과 siFOXN2, control 군과 mir-188-5p mimic 군, mir-188-5p inhibitor 군으로 나누어 transfection 을 한 뒤 24 시간 배양 후 200 UL 피펫 팁으로 Wound 를 생성하였다. PBS 로 2 번 washing 후 배지를 교체하였다. 직후 바로 현미경으로 상처 부위의 사진을 촬영하였으며 24 시간이 지난 후 재촬영하여 두 사진 간의 상처 회복률 확인하였다. 상처의 회복률은 image j 를 통하여 측정 후 두 표본 간격 차를 백분율로 나타내었다.

## 2.10 Statistical analysis

통계적 데이터는 EXCEL 의 평균과 표준편차를 구한 후 두 그룹 간의 변화는 student t. test 검정을 통하여 검정 되었으며 이연 구의 통계학적 유의 수준은 \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .이며 이는 통계적으로 유의하다.

### III. RESULTS

#### 3.1. HOXC6 과발현 세포에서의 micro RNA expression microarray analysis

본연구에서는 HOXC6의 발현유도가 miRNA 발현을 어떻게 변화시키는지 확인하기 위해 FaDu 세포주에 pcDNA 4.1-HOXC6, 와 pcDNA 4.1를 형질전환 하여 Affymetrix miRNA Expression Microarray Analysis 을 통하여 miRNA 발현변화를 확인하였다. 그 후 결과를 Cluster analysis-Hierarchical clustering heat map으로 변환하였다. (Fig. 1A) Scatter plot of expression level 데이터를 나뉘었으며 (Fig. 1B) 2 배 이상의 유의성 있는 발현 변화는 129개가 확인되었다. Bar plot-significant 그래프를 이용하여 분류하였고, 이들 중 발현의 변화량이 2배 이상 증가한 경우는 38개이며 대조군 대비 절반 이상의 발현량이 감소하는 군은 91개였다. (Fig. 1C). 우리는 다음 실험을 위해서 38개 군과 91개 군에서 발현의 변화와 유의성을 확인하여 mir-188-5p, mir-1281, mir-8063, mir-8064 총 4개의 후보군을 선정하였다.

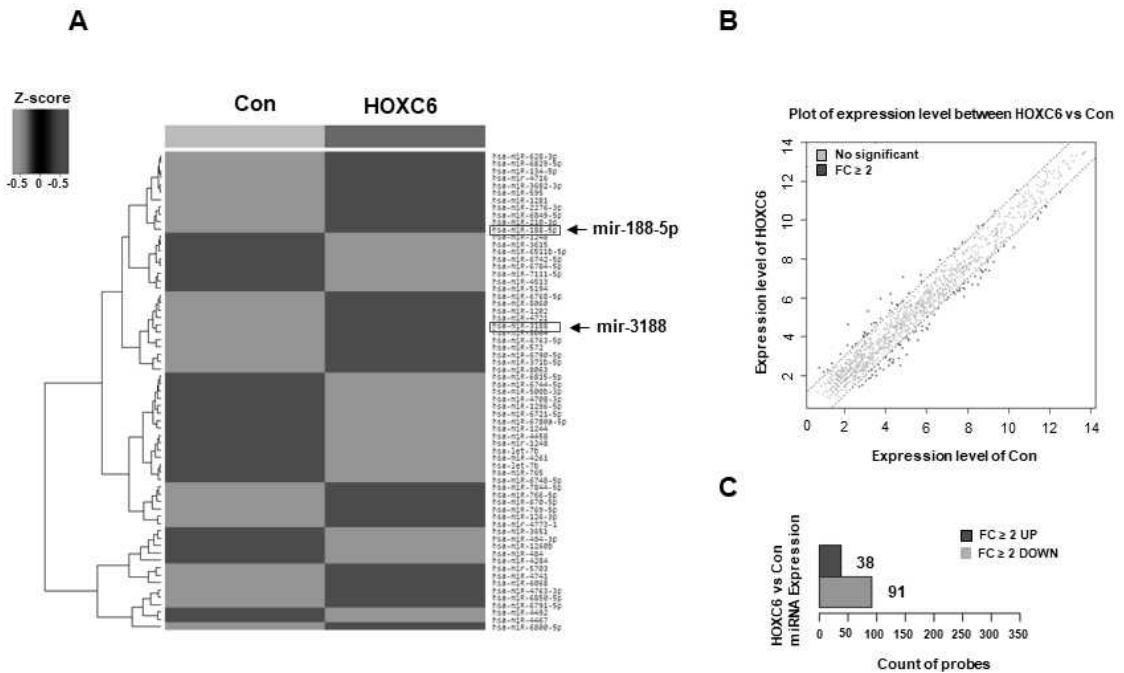


Figure 1. Comparison of miRNA profiles. FaDu cells were transfected with HOXC6 expression plasmid for 48 hours before subjected for human miRNA Microarray. (A) Heat map of differential expressed miRNA between control and HOXC6 transfected FaDu cells. Differential expression were demonstrated by the color. Red: up-regulated; Green: down regulated (B) Scatter plot version of the heat map from (A), highlighting the statistical significant difference between control and HOXC6-overexpressed cell (fold change > 2). (C). Number of significant differentially expressed miRNAs in HOXC6-overexpressed FaDu cells.

### 3.2. HOXC6 유도에 따른 4개 후보군의 quantitative RT-qPCR

micro array 분석을 통해서 4개의 miRNA 후보군 (mir-188-5, mir-1281, mir-8063, mir-8064) 을 선정하였다. 이전의 micro array 데이터가 in vitro 내에서도 동일한 발현이 유도되는지 확인하기 위해 FaDu cell에 pcDNA-3.1 HOXC6를 transfection 하였고 48시간 후 harvest 하여 HOXC6의 발현을 확인하였다. HOXC6의 발현은 RT-PCR과 WB 통하여 확인되었으며, 4개의 miRNA의 발현은 Quantitative Real-Time PCR로 확인하였다. 그 결과 HOXC6의 발현은 형질전환 한 FaDu 세포에서 대조군 대비 약 3배의 mRNA의 발현이 증가하였다. (Fig. 2A) 단백질 발현은 정상 세포군 대비 크게 증가했다. (Fig. 2B) HOXC6 유도에 따른 miRNA의 발현량 변화를 확인하기 위해 Quantitative-realtime PCR을 사용하여 선정된 4개의 miRNA의 발현을 확인하였으며 (Fig. 2C) mir-188-5p는 대조군 대비 약 15배 증가를 보였고 mir-1281의 경우 절반 이하로 감소 mir-8063은 3배 mir-8064는 약 2배 정도의 증가를 보였다. 이에 따라 micro array 분석결과와 같은 증가 추세를 보이며 유의성이 높은 mir-188-5p를 중심으로 암의 특성을 파악하기로 하였다. 따라서 실험을 통해 유도된 HOXC6의 발현은 mir-188-5p의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

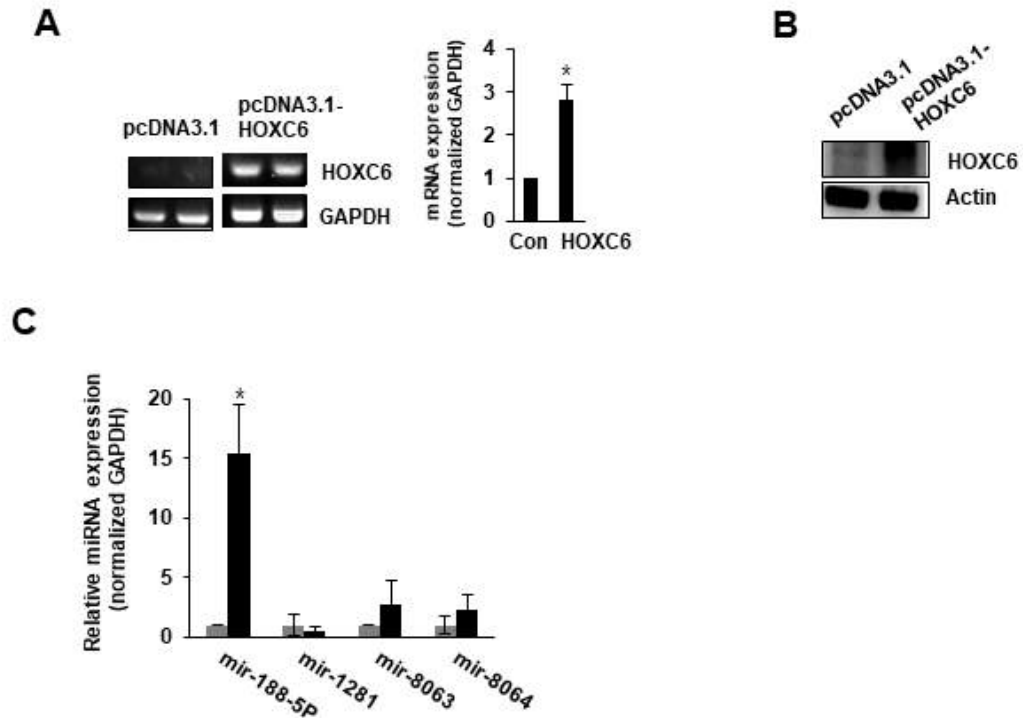
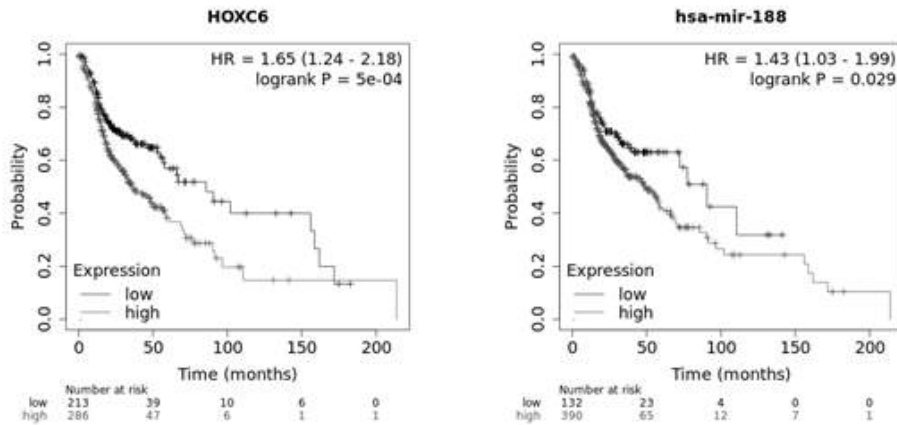


Figure 2. Overexpression of HOXC6 induces the expression of several miRNAs in FaDu cells. (A–B) Overexpression of HOXC6 in FaDu cells. FaDu cells were transfected with HOXC6 overexpression vector for 48 hours prior isolation of total mRNA and protein. HOXC6 mRNA expression were measured by RT-PCR and qRT-PCR. HOXC6 protein expression were measured by Western Blot. (C) Expression of several miRNAs were measured by qRT-PCR. \*  $p < 0.05$

### 3.3 HOXC6 와 mir-188-5p 의 암 발생 위험성과의 상관관계.

miRNA의 가능성을 평가하기 위해 두경부암에서 mir-188-5p 발현대비 사망률을 public database를 이용하여 평가하였다. 환자의 사망률 데이터는 Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/>)의 데이터를 이용하여 확인하였으며 두경부암에서의 mir-188-5p와 HOXC6가 가지는 위험성을 조사하였다. 그 결과 HOXC6는 HR:1.65, long rank p= 5e-04이며 1 이상의 HR을 가지며 HOXC6가 낮게 발현되는 것 대비 높게 발현되는 군에서 예후가 좋지 않은 것을 확인하였다. 또한, mir-188-5p의 경우 HR:1.43 long rank p= 0.029 mir-188-5도 마찬가지로 1보다 높은 HR를 가져 높은 발현율을 가진 군에서 낮은 발현율을 가진 군보다 예후가 좋지 않은 것을 확인하였다. 이 데이터를 바탕으로 HOXC6에 의한 mir-188-5p의 발현이 구강암의 높은 사망률과 연관 관계를 가정하였으며 mir-188-5p의 기능과 관련된 후속연구를 시행하였다.



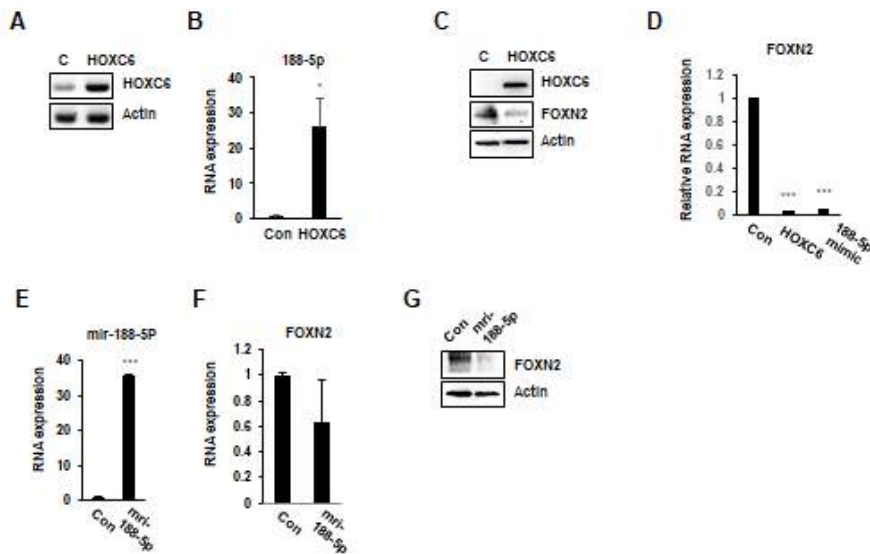
**Figure 3** The prognostic value of HOXC6 and mir-188-5p in head and neck squamous cell carcinomas patients.

Kaplan-Meier survival curves illustrate the survival probability of Head and neck squamous cell carcinomas patients (n=523). Figures were generated from the Kaplan-Meier plotter database (<http://kmplot.com/analysis/>)

### 3.4 FaDu cell에서 HOXC6과 mir-188-5p 유도에 따른 FOXN2의 발현 변화.

HOXC6와 mir-188-5p가 어떠한 작용을 통해 암세포의 특성에 영향을 끼치는지 확인하기 위해서 mir-188-5p의 target을 확인하였다. 먼저 mir-188-5p의 target을 찾기 위해 public database(mirDB, mirwalk, targetscan)를 이용하여 각각 데이터베이스의 상위 200개 군 중 중복되는 target을 분류하였고 수많은 중복유전자 중 항암 유전자로 알려진 유전자 5종을(FOXN2, RASA1, CTNNBIP1, NF2, DPYSL3) 선택하였고 각 유전자의 발현은 HOXC6가 유도된 상태에서 확인하였다. target 유전자의 발현은 target의 UTR sequence와 mir-188-5p와의 결합이 발생하였을 때 감소하며 후보군 중 FOXN2의 발현만이 감소하였다. 따라서 HOXC6 및 HOXC6에 의해 유도된 mir-188-5p가 FOXN2의 발현에 영향을 주는지 확인하기 위해 FaDu cell에 HOXC6 및 mir-188-5p의 발현을 유도하여 FOXN2의 발현을 확인하였다. 먼저 FaDu cell에 HOXC6 유전자를 유도하였으며 48시간 후 HOXC6의 발현은 WB, RT-PCR로 확인하였다. mir-188-5의 발현은 quantitative real time PCR을 통해 발현을 확인하였다. transfection을 통해 확인된 HOXC6의 단백질 발현은 크게 증가 되었다. (Fig. 4A) HOXC6 유도에 따른 mir-188-5p의 발현은 약 24배 수준의 유의성 있는 변화가 확인되었다. (Fig. 4B). 또한, mir-188-5p의 증가는 target 단백질인 FOXN2의 발현을 억제하는 역할을 한다고 가정하였고, 가설의 검증은 위해 HOXC6를 유도한 단백질 sample에서 FOXN2 발현을 확인하였다. 그 결과 HOXC6가 과발현된 군에서도 FOXN2의 발현은 크게 감소하는 것으로 확인되었다. (Fig. 4C) 또한 단백질 발현 결과 뿐만 아니라 mRNA의 레벨에서의 변화를 확인하기 위해 HOXC6 및 mir-188-5를 각각 유도하였고 두 결과 모두 FOXN2의 대조군 대비 10% 수준의 발현율로 크게 감소하는 것으로 확인되었다. (Fig. 4D) 또한 HOXC6의 부과 효과가 아닌 mir-188-5p에 의한 효과인지 확인하기 위해 우리는 mir-188-5p mimic을 이용하여 mir-188-5p의 과발현을 유도하였으며 이때 mir-188-5p의 발현은 약 30배 가까이 증가하였으며 (Fig. 4E) 그에 따른 FOXN2의 발현은 50%가량 감소하였다. (Fig. 4F) 단백질 발현 또한 크게 감소하였다. (Fig. 4G) 이에 따라서 FaDu cell에서 HOXC6의 발현은 mir-188-5p의 과발현을 통한 FOXN2의 감소를 추정할 수 있었다.



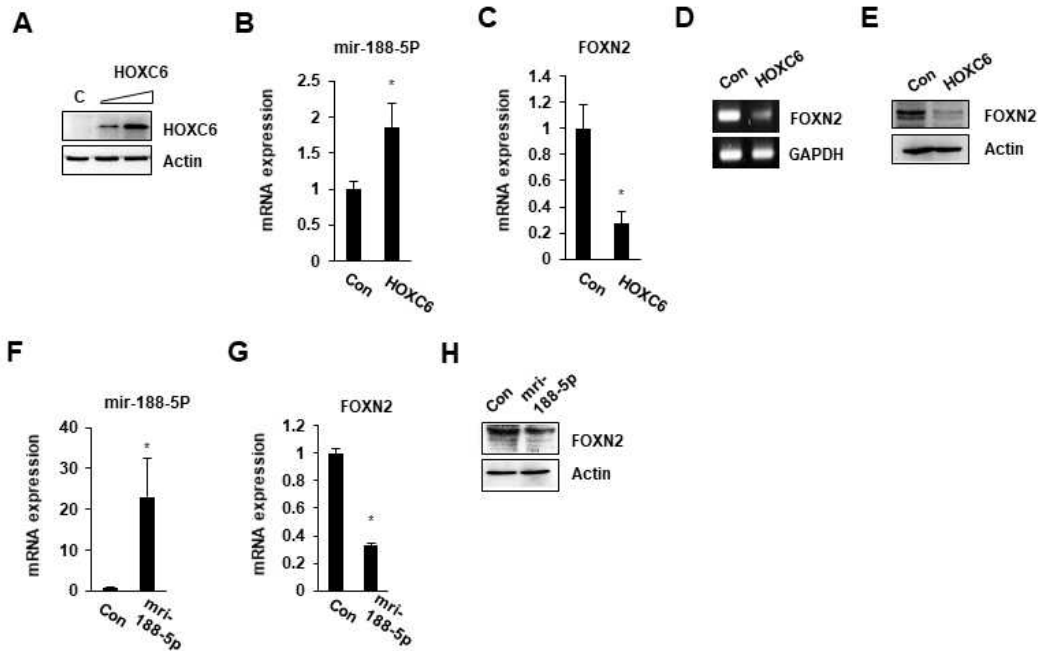


**Figure 4. HOXC6-induced mir-188-5p upregulation inhibits FOXN2 expression in FaDu cells. (A–D) Overexpression of HOXC6 induce the downregulation of FOXN2.** FaDu cells were transfected with HOXC6 overexpression vector for 48 hours prior isolation of total mRNA and protein. (A) HOXC6 protein expression were confirmed by Western Blot. (B) Mir-188-5p expression were confirmed by qRT-PCR. (C–D) Western Blot and qRT-PCR were conducted to analyze the protein and mRNA expression of FOXN2. (E–G) **mir-188-5p mimics inhibits FOXN2 expression.** FaDu cells were transfected with miR-188-5p mimic for 48 hours prior isolation of total mRNA and protein. (E) Mir-188-5p expression were confirmed by qRT-PCR. (F–G). Western Blot and qRT-PCR were conducted to analyze the protein and mRNA expression of FOXN2. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.5 HEK293 에서 HOXC6과 mir-188-5p 유도에 따른 FOXN2의 발현 변화.

구강암뿐만 아니라 다른 암종에서도 같은 mechanism으로 작용하는지 확인하기 위해 HEK293 세포에 동일한 실험을 시행하였다. 먼저 HEK293 cell에 HOXC6의 과발현을 유도하기 위해 HOXC6를 transfection 하였다. 48시간 후 HOXC6의 발현은 WB 과 RT-PCR로 mir-188-5p의 발현은 quantitative realtime PCR로 발현을 확인하였다 그 결과 HOXC6의 단백질 상 발현은 크게 증가한 것으로 확인되었으며 (Fig. 5A) , HOXC6 유도에 따른 mir-188-5p의 발현은 약 2배 수준의 유의성 있는 변화가 확인되었다. (Fig. 5B) 또한 우리의 이론에 의하면 mir-188-5p의 증가는 target 유전자인 FOXN2의 발현을 억제하는 역할을 한다. 우리의 가정을 확인하기 위해 HEK293 세포에 HOXC6를 유도한 sample을 가지고 발현을 확인하였다. 그 결과 HOXC6가 과발현된 군에서의 FOXN2의 발현은 30% 수준으로 크게 감소하였다. (Fig. 5C) 또한 단백질 결과만이 아니라 mRNA의 레벨에서의 발현을 확인한 결과, HOXC6 유도는 FOXN2의 발현을 크게 감소시켰다. 단백질 발현 또한 quantitative realtime PCR의 결과와 유사하게 HOXC6 유도하에 크게 감소하는 모습을 보였다. (Fig. 5D,E) 또한 이 결과가 단순 HOXC6의 부가효과가 아닌 mir-188-5p에 의해 일어나는 일인지 확인하기 위해 우리는 mir-188-5p mimic (inducer)를 이용하여 mir-188-5p의 과발현을 유도하였다. 그 결과 mir-188-5p의 발현은 약 20배 가까이 증가하였고 (Fig. 5F) FOXN2의 발현은 50%가량 감소하였으며 (Fig. 5G) 단백질 발현 또한 크게 감소하였다. (Fig. 5H). 이를 통하여 우리는 HOXC6와 mir-188-5p가 다른 세포주에서도 같이 FOXN2의 발현을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

293 cells



**Figure 5. HOXC6-induced mir-188-5p upregulation inhibits FOXN2 expression in HEK293 cells. (A–E) Overexpression of HOXC6 induce the downregulation of FOXN2.** HEK293 cells were transfected with HONC6 overexpression vector for 48 hours prior isolation of total mRNA and protein. (A). HOXC6 overexpression was confirmed by Western Blot. (B). HOXC6-induced miR-188-5p upregulation was confirmed by qRT-PCR. (C–E). RT-PCR, qRT-PCR and Western Blot was conducted to evaluate the mRNA and protein expression of FOXN2. (F–H) **miR-188-5p mics inhibits FOXN2 expression.** HEK293 cells were transfected with miR-188-5p mimic for 48 hours prior isolation of total mRNA and protein. (F) Mir-188-5p expression were confirmed by qRT-PCR. (G–H). Western Blot and qRT-PCR were conducted to analyze the protein and mRNA expression of FOXN2. \*  $p < 0.05$

### 3.6 mir-188-5p의 과발현과 FOXN2 3' -UTR과 상호작용

miRNA는 주로 대상 mRNA의 3prime-UTR sequence에 결합하여 발현을 억제한다고 알려져 있다. target gene과 결합 부위에 대한 예측은 여러 public database를 통하여 확인하였다. mir-188-5p가 FOXN2 에 직접 결합하여 발현을 저해하는지 확인하기 위해 targetscan, miwalk, mirDB를 이용하여 예측되는 결합 부위를 확인하였다. (Fig. 6 schematic) 이를 통해 FOXN2 mRNA의 3' UTR 44-51bp 부위를 포함하는 254bp 단편을 pMIR-reporter vector에 subcloning 하여 dual luciferase assay를 위한 준비 하였다. 각 실험은 FaDu cell과 HEK293 cell에 CONTROL, reporter vector, reporter vector와 mir-188-5p의 발현을 조절한 조건을 가지고 실험을 진행하였다. 그 결과 luciferase activity는 벡터만 처리한 군 대비 mir-188-5p 억제제를 처리한 군에서 luciferase activity가 대조군 대비 10배로 증가하는 것이 확인되었으며, 이는 luciferase에 삽입된 FOXN2 3'UTR 부위가 mir-188-5p의 저해로 인해 UTR 부위와의 결합이 감소 되어 luciferase의 발현이 증가하는 것을 가정할 수 있었다. mir-188-5p의 회복을 유도한 경우 저해 처리대비 약 40%까지로 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 구강암 세포주에서 mir-188-5p가 FOXN2의 3'UTR 부위와 결합하여 발현에 영향을 주는 것을 확인하였다(Fig. 6A). 이는 mir-188-5p가 FOXN2의 3'UTR 부분과 결합하여 luciferase의 발현을 저해 했으므로 해석된다. 또한, HEK293 cell에도 같은 결과가 도출되는지 실험을 하였으며, 이전의 FaDu 실험과 유사하게 대조군, reporter vector, 억제제처리, mir-188-5p의 회복을 유도한 총 4개의 군을 실험하였으며 그 결과 FaDu 세포군과 유사하게 미처리 군에선 luciferase activity가 현저히 낮았으며, mir-188-5p inhibitor에 의해 저해된 세포군에선 정상 발현대비 약 18배의 가까운 증가 확인하였다. mir-188-5p inducer도 함께 처리하여 mir-188-5p의 발현을 회복시킨 경우 저해제에 의해 mir-188-5p가 저해된 세포 대비 5배의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 위와 같은 실험으로 mir-188-5p가 FOXN2의 mRNA UTR 부위에 직접 작용하여 FOXN2의 발현을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

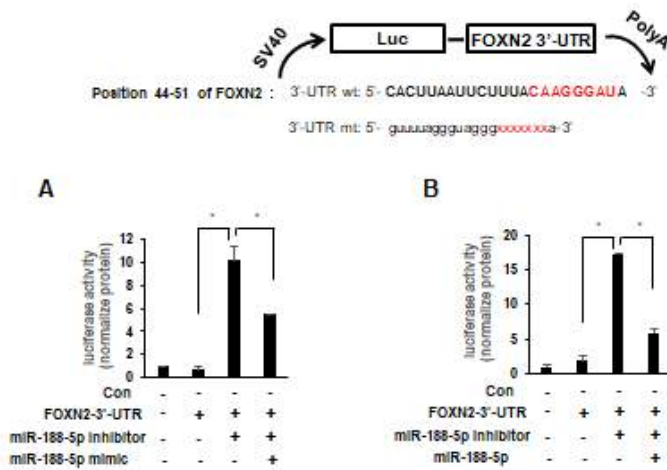


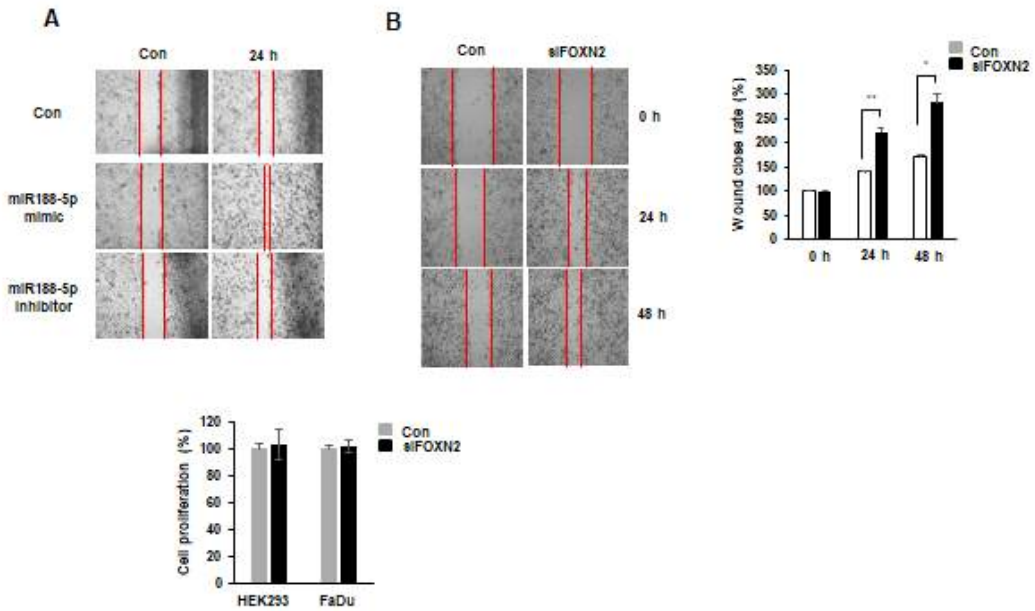
Figure 6. miR-188-5 targets the 3'UTR of FOXN2.

Schematic of FOXN2 3'-UTR-luciferase reporter vector and the predicted binding site of mir-188-5p on FOXN2 3'UTR.

(A) HEK293 was co transfected with FOXN2 3'-UTR-luciferase reporter vector and mir-188-5p inhibitor, or mir-188-5p mimics, or combination of both; then the luciferase activity were measured. (B) FaDu was co transfected with FOXN2 3'-UTR-luciferase reporter vector and mir-188-5p inhibitor, or mir-188-5p mimics, or combination of both; then the luciferase activity were measured. \* p < 0.05.

### 3.7 mir-188-5p와 FOXN2의 발현에 따른 세포의 이동성 변화

이전의 실험에서 우리는 mir-188-5p의 과발현이 구강암 환자의 발현이 사망률과 연관 있는 것을 확인하였다. 또한, HOXC6에 의해 mir-188-5p가 유도되는 것을 확인하였다. HOXC6에 의해 유도된 mir-188-5p는 여러 암종에서 tumor의 특성을 부여하지만, 아직 구강암에서의 기능은 확인되지 않았다. 또한, FOXN2의 경우 mir-188-5p의 target이며 mir-188-5p나 HOXC6 유도 시 감소하는 것이 본 실험을 통하여 확인되었다. 하지만 구강암에서의 기능은 잘 알려지지 않은 상태이다. 우리는 mir-188-5p가 구강암에서 어떠한 기능을 하는지 확인하기 위해 구강암세포에 mir-188-5p를 발현을 조절하여 mir-188-5p의 구강암에서의 기능을 wound scratch assay 통해 FaDu 세포의 이동성을 평가하였다. wound scratch assay는 control, mimic, inhibitor 3개의 군으로 나뉘어 실행되었으며 형질전환 24시간 후 상처를 낸 후 3회 PBS로 washing 하여 배지를 교체해준 후 특정 시간마다 현미경을 이용하여 사진을 촬영하였다. 그 결과 mir-188-5p mimic(induce)군에서 정상 세포 대비 크게 이동성이 증가하였으며 inhibitor 처리 군의 경우 대조군 대비 크게 회복률이 감소하였다. 따라서 우리는 mir-188-5p의 발현이 FaDu 세포의 이동성에 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 7A) mir-188-5p의 target인 FOXN2 또한 암의 특성을 부여한다. 우리는 FOXN2의 구강암에서의 기능을 확인하기 위해 FOXN2의 발현을 조절하여 기능을 평가하였다. siFOXN2를 이용하여 FOXN2의 저해에 따른 이동성을 확인하였다. siFOXN2 (200pmol)하에 24시간 배양 후 상처를 낸 뒤 3회 washing 후 배지를 교체하여 현미경으로 일정 시간마다 사진을 촬영한 후 회복률을 평가하였다. 그 결과 FOXN2 감소에 의한 이동성의 변화는 정상 세포 대비 증가하였고 약 2배의 상처 넓이 감소를 확인할 수 있었다. (Fig. 7B) 이로써 우리는 HOXC6에 의해 과발현된 mir-188-5p가 FOXN2의 발현감소를 통해 암의 이동성에 영향을 준다는 사실을 확인할 수 있었다.



**Figure 7. Inhibition of FOXN2 reduces the migration in FaDu cells.** (A). FaDu cells were treated with either mir-188-5p mimics or inhibitor for 24 hours, before scratching the cell monolayer by a P200 pipette. Picture were taken at 24 hour post-scratching to monitor the wound closure rate. (B). FaDu cells were treated with siRNA for 24 hours, before scratching the cell monolayer by a P200 pipette. Picture were taken at 24 hours and 48 hours post-scratching to monitor the wound closure rate. Wound closure rate were graphed. \*  $p < 0.05$ .; \*\*  $p < 0.005$ .

## IV. DISCUSSION

HOXC6는 전사 인자로 작용하며, 식도암, 폐암, 신경세포종, 구강암, 등 여러 암에서 암을 특성을 부여하는 유전자로 작용한다. [6-16] 하지만 HOXC6의 역할과 규제 메커니즘은 명확하지 않다. 따라서 HOXC6 유도 기전을 알아내는 것이 HOXC6 매개 암 연구의 목표다. 최근 진단기법의 발달로 인하여 non coding RNA인 miRNA에 관해서 연구가 진행되고 있다. miRNA는 생체 내에서 여러 bio process에 역할을 하며, 최근 연구는 비정상적으로 발현된 miRNA와 여러 암과의 연관성이 밝혀지고 있다. 비호지킨성 림프종에서 mir-29가 CDK6 UTR에 결합하여 발현 저해하여 예후를 악화시키며[26], mir-155는 MAPk를 억제하여 악성 예후와 상관관계를 지닌다. 급성 조혈모세포 성 백혈병에서는 mir-17-92가 MLL의 발현을 조절하여 예후를 악화시킨다[27]. 위와 같은 혈액암뿐만 아니라 solid tumor에서도 이들의 비정상적인 발현은 암과의 연관성이 있다. 유방암의 경우 mir-221/222가 oestrogen-receptor의 발현을 조절하고[17], mir-145는 TP53을 저해하며, mir-9는 cadherin의 발현을 조절함으로써 암의 이동성에 영향을 끼친다[19]. 폐암에서 mir-31의 발현은 LATS2나 PPP2R2A를 target으로 하여 작용하여 암을 유도하며 간암 세포에서는 DDIT4 나 mTOR를 표적으로 mir-221 이 작용한다[20]. 자궁암에서는 mir-16 나 mir-15가 과발현되며 BMI-1을 target으로 하여 세포의 proliferation과 growth를 저해한다[29]. 흑색종의 경우 HOXB7나 BMP4를 target으로 하는 mir-196a가 작용한다[30]. 두경부암의 경우 mir-3750, mir-423, mir-106b-25[21, 25]가, 췌장암의 경우 mir-21이 MMP의 작용을 조절하여 암의 성장을 조절하며[34]. 구강암에서 HOXC6에 의해 유도된 mir-4708이 MDR1의 발현을 조절하여 암세포의 다제내성을 조절한다.

HOXC6와 miRNA 간의 연관성을 찾기 위해 구강암세포인 FaDu cell에 HOXC6의 과발현을 유도하여 micro array analysis로 miRNA의 발현 변화를 확인하였다. miRNA의 발현 변화는 clustering heat map, scatter plot of expression level, bar plot-significant의 방식으로 평가하였고 scatter plot analysis를 통해 FC> 2 이상의 변화를 기준으로 나눈 결과 129개의 후보군을 선정했다. 이 중 38개는 경우 발현이 증가하며 91개의 경우는 감소한다(Fig. 1). 이들을 유의성과 발현량을 기준으로 분류하였고 상위 4개를 선택하여 mir-188-5p, mir-1281, mir-8064, mir-8063, 4개의 후보군을 확정했다.

선정된 4개의 후보군의 기능은 다음과 같다. mir-188-5p는 방광암, 위암, 대장암,



담낭암, 전립선암, 간암, retinoblastoma, 유방암 등의 여러 암종에서 발현하며 이들의 특성과 연관이 있다. 위암에서의 비정상적인 mir-188-5p의 발현은 PTEN의 억제를 통한 이동성의 증가세를 보이며, retinoblastoma 에선 ID4의 억제를 통한 이동성의 증가를 유도한다[37]. 대장암에서는 RASA1을 target으로 하여 항암제 저항성을 보였다 [38]. 또한, 방광에서나 급성백혈병에서는 높은 발현이 좋지 못한 예후와 관련 있다 [39, 40]. mir-1281은 골육종, 위암, 동맥 근육세포, 당뇨병 등에서의 예후와 상관이 있다. 골육종에서 mir-1281의 발현은 저해되며 USP39의 발현을 통한 TP53을 조절하여 세포의 apoptosis를 억제한다[47]. 위암에서 또한 발현이 억제되어 GHCG를 표적으로 한 세포의 사멸유도 억제제로 작용한다[48]. 당뇨 망막병증에서 세포의 이동성에 관여 하며[49] 동맥 근육세포의 HDAC4을 억제하여 이동성을 조절한다[50]. mir-8064의 경우 종양 줄기세포의 self renewal을 유도하는 OCT4B1의 발현에 mir-8064/PLK1의 균형이 연관 있다[51]. 다만 mir-8063의 기능에 관한 연구는 아직 밝혀지지 않았다. 이들 후보군이 암과의 연관성을 가지고 있지만 후보군을 선정하기 위해 HOXC6의 발현을 유도 하여 miRNA의 발현을 quantitative real time PCR 재확인하였다. HOXC6의 과발현에 따라 mir-188-5p의 발현이 크게 증가하였고, HOXC6의 발현과 mir-188-5p 발현 간의 상호연관성이 있음을 보였다. (Fig. 2) 하지만 mir-1281과 mir-8064, mir-8063의 경우 micro array data와는 달리 유의성이 없는 발현을 보였다.

HOXC6 와 mir-188-5p의 발현이 암 발생기전과 구강암에서의 위험성을 평가하기 위해 public database인 kmpplot.com 이용하여 HOXC6에 의해 유도되는 mir-188-5p와 암 발생 및 사망률을 검색하였다. kmpplot.com 통하여 mir-188-5p의 위험분석을 평가하기로 하였고, 유전자의 발현량과의 생존율을 분석하였다. Kaplan -Meier curve 분석결과 HOXC6 와 mir-188-5p의 발현이 증가하였을 때 증가한 사망률과 암 발생의 상호연관성을 보였다. (Fig. 3)

miRNA는 생체 내 여러 bio process에 작용하며 표적 유전자의 mRNA UTR sequence에 결합해 발현저해를 유도한다. 앞선 실험을 통하여 선정된 mir-188-5p의 경우 발현이 증가하여 PTEN이나 RAP2C와 결합하여 암의 특성을 조절한다. [36, 44] 우리는 암 발생 과정에서의 mir-188-5p가 어떤 유전자를 target으로 하여 발현을 조절하는지 확인하기 위해 miRNA database (mirwalk, targetscan, mirDB)를 이용하여 has-mir-188-5p의 예상 target을 조사한 결과 FOXN2, CTNNBIP1, RASA1 과의 3' -UTR sequence에 결합할 수 있음을 확인했다. 또한, 이들의 발현은 HOXC6를 유도한 상태의 mRNA에서 발현을 확인했다. 그 결과 FOXN2를 제외한 유전자의 발현은 증가한 발현을

보였고 FOXN2만 감소하는 결과를 확인하였다.

FOXN2는 성장, 증식, 등과 연계되어있는 Fork head 단백질 중 하나이다. FOX 유전자의 경우 FOXA1, FOXD1, 등이 알려져 있으며 이들의 비정상적인 발현이 암의 특성을 부여한다[52]. FOXN2의 경우 최근 폐암, 유방암, 간암, 췌장암, 등의 연구가 되었다. 췌장암의 경우 FOXN2의 저해가 세포의 이동성을 저해시키며 간암에서는 증식과 이동성을 억제한다[53, 54]. 폐암에서는 RSK 매개 FOXN2의 감소가 항암제 내성이나 발암을 촉진하며, 유방암에서는 SLUG의 발현조절을 통하여 세포의 이동성 및 EMT를 억제하는 연구결과가 있다[55, 56]. 이처럼 FOXN2는 이동성을 조절하는 항암 유전자로 연구되어 왔다. 하지만 구강암과 HOXC6 및 mir-188-5p의 연관성은 아직 연구되지 않았다. HOXC6 및 mir-188-5p 유도하에서 FaDu cell이나 HEK293 cell에서 이들의 연관성을 확인하기 위해 HOXC6와 mir-188-5p의 발현을 각각 유도하였고 HOXC6의 증가에 mir-188-5p가 증가하였고 mir-188-5p의 발현증가에 따라 FOXN2의 발현이 감소한다. (Fig. 4, 5)

이전의 실험에서 우리는 FOXN2의 발현이 mir-188-5p의 발현으로 인해 감소하는 것을 quantitative-realtime PCR을 통하여 확인했다. miRNA의 경우 target의 UTR부위에 FOXN2와 has-mir-188-5p와의 결합을 확인하기 위해 targetscan을 이용하여 결합 부위를 확인한 후 FOXN2 3' UTR을 luciferase vector에 sub cloning 하여 mir-188-5p 발현에 따른 FOXN2의 변화량을 확인했다. 그 결과 정상 세포 대비 mir-188-5p가 감소한 군에서 luciferase의 활성이 증가하며 회복을 유도한 군에서는 luciferase의 활성이 50% 내외로 감소했다. 이를 통하여 mir-188-5p가 FOXN2의 3' UTR 부위에 결합하여 FOXN2의 발현을 조절함을 확인했다(Fig. 6).

mir-188-5p는 위암과 retinoblastoma 에서 과발현되며 암의 이동성과 연관이 있다. 위암에서는 PTEN을 표적으로 하여 위암 세포의 metastasis를 promote 한다[36]. 또한, retinoblastoma는 ID4와 결합하여 WNT/b-catenin signaling을 통해 retinoblastoma의 EMT를 유도한다[37]. FOXN2의 경우 간암의 proliferation과 invasion에 영향을 준다고 보고되었으며 유방암 또한, FOXN2의 감소가 SLUG의 발현조절을 통해 migration, invasion, EMT 유도한다고 보고되었다[54, 56]. 이처럼 위의 유전자들은 암세포의 이동성과 관련이 있다. 이들의 기능이 구강암 세포주에서도 동일하게 작동하는지 확인하기 위해 wound healing assay를 통해 FOXN2, mir-188-5p의 발현에 따른 세포의 운동성 변화를 확인했다. mir-188-5p의 증가에 따라 FaDu세포의 이동은 증가하였고 발현 감소에는 FaDu의 이동이 감소했다. 또한, siFOXN2 형질감염을 통한 결과는 FOXN2의 발현 감소는 세포의 이동성을 증가시킨다는 것을 확인했다. (Fig.

7)

요약하자면 본연구결과는 구강암을 포함한 여러 암세포의 이동성에 HOXC6에 의해 유도된 mir-188-5p가 FOXN2을 저해하여 암의 이동성을 감소시킨다는 증거를 보여준다. 본 연구를 통해 우리는 암에서의 HOXC6에 의해 유도된 mir-188-5p의 발현과 그 하위 mechanism의 탐구는 이들이 이동성에 관여한다는 것을 확인했다. 따라서 HOXC6의 발현이 높은 암종이나 높은 전이성을 갖는 암종에 대하여 miRNA의 발현이나 FOXN2와의 연관성을 확인할 수 있는 insight를 제공한다.

## V. REFERENCES

1. Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet.* 2006;22(2):67-9.
2. Morgan BA. Hox genes and embryonic development. *Poult Sci.* 1997;76(1):96-104.
3. Murthi P. Review: placental homeobox genes and their role in regulating human fetal growth. *Placenta.* 2014;35 Suppl:S46-50.
4. Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Mol Genet Metab.* 2014;111(1):4-15.
5. Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol.* 2005;205(2):154-71.
6. Yan TF, Wu MJ, Xiao B, Hu Q, Fan YH, Zhu XG. Knockdown of HOXC6 inhibits glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting WIF-1 in vitro and vivo. *Pathol Res Pract.* 2018;214(11):1818-24.
7. Chang SL, Chan TC, Chen TJ, Lee SW, Lin LC, Win KT. HOXC6 Overexpression Is Associated With Ki-67 Expression and Poor Survival in NPC Patients. *J Cancer.* 2017;8(9):1647-54.
8. Fujiki K, Duerr EM, Kikuchi H, Ng A, Xavier RJ, Mizukami Y, et al. Hoxc6 is overexpressed in gastrointestinal carcinoids and interacts with JunD to regulate tumor growth. *Gastroenterology.* 2008;135(3):907-16, 16 e1-2.
9. Wang Y, Wang C, Liu N, Hou J, Xiao W, Wang H. HOXC6 promotes cervical cancer progression via regulation of Bcl-2. *FASEB J.* 2019;33(3):3901-11.
10. Zhang F, Ren CC, Liu L, Chen YN, Yang L, Zhang XA. HOXC6 gene silencing inhibits epithelial-mesenchymal transition and cell viability through the TGF-beta/smad signaling pathway in cervical carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 2018;18:204.
11. Yang P, Kang W, Pan Y, Zhao X, Duan L. Overexpression of HOXC6 promotes cell proliferation and migration via MAPK signaling and predicts a poor prognosis in glioblastoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:8167-79.
12. Jung J, Jeong S, Jeong H, Oh HE, Choi JW, Lee ES, et al. Increased HOXC6

mRNA expression is a novel biomarker of gastric cancer. *PLoS One*. 2020;15(8):e0236811.

13. Chen SW, Zhang Q, Xu ZF, Wang HP, Shi Y, Xu F, et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9. *Mol Med Rep*. 2016;14(4):3261-8.

14. Kim KJ, Moon SM, Kim SA, Kang KW, Yoon JH, Ahn SG. Transcriptional regulation of MDR-1 by HOXC6 in multidrug-resistant cells. *Oncogene*. 2013;32(28):3339-49.

15. Hamid AR, Hoogland AM, Smit F, Jannink S, van Rijt-van de Westerloo C, Jansen CF, et al. The role of HOXC6 in prostate cancer development. *Prostate*. 2015;75(16):1868-76.

16. Ramachandran S, Liu P, Young AN, Yin-Goen Q, Lim SD, Laycock N, et al. Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(1):188-98.

17. Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(4):141-58.

18. Van Vlierberghe P, De Weer A, Mestdagh P, Feys T, De Preter K, De Paepe P, et al. Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. *Br J Haematol*. 2009;147(5):686-90.

19. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MYC-microRNA-9-metastasis connection in breast cancer. *Cell Res*. 2010;20(6):603-4.

20. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Minguez B, et al. MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology*. 2011;140(5):1618-28 e16.

21. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2010;16(4):1129-39.

22. Mohr S, Doebele C, Comoglio F, Berg T, Beck J, Bohnenberger H, et al. Hoxa9 and Meis1 Cooperatively Induce Addiction to Syk Signaling by Suppressing miR-146a in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;31(4):549-62 e11.

23. Errico MC, Felicetti F, Bottero L, Mattia G, Boe A, Felli N, et al. The abrogation of the HOXB7/PBX2 complex induces apoptosis in melanoma through the miR-221&222-c-FOS pathway. *Int J Cancer*. 2013;133(4):879-92.
24. Choi J-Y, Ryu J-w, Ahn S-G. miR-4708 Enhances Paclitaxel Sensitivity through Modulating Expression of Multidrug Resistance Protein-1. *The Korean Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2017;41(2):55-62.
25. Patricia Severino<sup>1\*</sup> HB. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation<28.pdf>. *BMC Cancer*. 2013.
26. Zhao JJ, Lin J, Lwin T, Yang H, Guo J, Kong W, et al. microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(13):2630-9.
27. Mi S, Li Z, Chen P, He C, Cao D, Elkahloun A, et al. Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3710-5.
28. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, Scagliotti GV, Papotti M, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2010;8(9):1207-16.
29. Lin Zhanga b, c, Stefano Voliniad, Tomas Bonomee, . Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *PNAS*. 2008.
30. Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(20):3535-48.
31. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*. 2009;113(26):6669-80.
32. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2008;68(19):8164-72.
33. Cortez MA, Nicoloso MS, Shimizu M, Rossi S, Gopisetty G, Molina JR, et al.

- miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(11):981-90.
34. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*. 2010;126(1):73-80.
35. Szczyrba J, Loprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res*. 2010;8(4):529-38.
36. Li Y, Yan X, Shi J, He Y, Xu J, Lin L, et al. Aberrantly expressed miR-188-5p promotes gastric cancer metastasis by activating Wnt/beta-catenin signaling. *BMC Cancer*. 2019;19(1):505.
37. Yang M, Li Y, Wei W. MicroRNA-188-5p Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting ID4 Through Wnt/betacatenin Signaling in Retinoblastoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:10251-62.
38. Zhu X, Luo X, Song Z, Jiang S, Long X, Gao X, et al. miR-188 promotes Oxaliplatin resistances through targeting RASA1 in colon cancer cells. *Research square*. 2019.
39. Yang X, Wang P. MiR-188-5p and MiR-141-3p influence prognosis of bladder cancer and promote bladder cancer synergistically. *Pathol Res Pract*. 2019;215(11):152598.
40. Jinlong S, Lin F, Yonghui L, Li Y, Weidong W. Identification of let-7a-2-3p or/and miR-188-5p as prognostic biomarkers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118099.
41. Peng Y, Shen X, Jiang H, Chen Z, Wu J, Zhu Y, et al. miR-188-5p Suppresses Gastric Cancer Cell Proliferation and Invasion via Targeting ZFP91. *Oncol Res*. 2018;27(1):65-71.
42. Hongtuan Zhang1, 3, SQ. miR-188-5p inhibits tumour growth and metastasis in prostate cancer by repressing LAPT4B expression. *Oncotarget*. 2015.
43. Fang F, Chang RM, Yu L, Lei X, Xiao S, Yang H, et al. MicroRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2015;63(4):874-85.

44. Zhu X, Qiu J, Zhang T, Yang Y, Guo S, Li T, et al. MicroRNA-188-5p promotes apoptosis and inhibits cell proliferation of breast cancer cells via the MAPK signaling pathway by targeting Rap2c. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):2389-402.
45. Li XL, Li SZ, Wu CX, Xing XH. miR-188-5p inhibits proliferation, migration, and invasion in gallbladder carcinoma by targeting Wnt2b and Smad2. *Kaohsiung J Med Sci.* 2021;37(4):294-304.
46. Wu J, Chen Z, Liu W, Zhang Y, Feng W, Yuan Y, et al. MicroRNA-188-5p targeting Forkhead Box L1 promotes colorectal cancer progression via activating Wnt/beta-catenin signaling. *Oncol Res.* 2020.
47. Jian Jiang1\* BM. MiR-1281, a p53-responsive microRNA, impairs the survival of human osteosarcoma cells upon ER stress via targeting USP39. *Am J Cancer Res.* 2018.
48. Liu G, Jiang Z, Qiao M, Wang F. Lnc-GIHCG promotes cell proliferation and migration in gastric cancer through miR- 1281 adsorption. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(6):e711.
49. Li Y, Li L, Qian Z, Lin B, Chen J, Luo Y, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase-DNA Methyltransferase 1-miR-1281-Histone Deacetylase 4 Regulatory Axis Mediates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Proliferation and Migration of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(6).
50. Greco M, Chiefari E, Accattato F, Corigliano DM, Arcidiacono B, Mirabelli M, et al. MicroRNA-1281 as a Novel Circulating Biomarker in Patients With Diabetic Retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:528.
51. Zhou JM, Hu SQ, Jiang H, Chen YL, Feng JH, Chen ZQ, et al. OCT4B1 Promoted EMT and Regulated the Self-Renewal of CSCs in CRC: Effects Associated with the Balance of miR-8064/PLK1. *Mol Ther Oncolytics.* 2019;15:7-20.
52. Jia Z, Wan F, Zhu Y, Shi G, Zhang H, Dai B, et al. Forkhead-box series expression network is associated with outcome of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8669-80.
53. Blanca Santibanez SO. Knockdown of FOXN2 enhances adhesion and reduces migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Research.* 2019.
54. X.-H. LIU1 L-PL, X.-M. XU. FOXN2 suppresses the proliferation and invasion



of human hepatocellular carcinoma cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2021.

55. Ma J, Lu Y, Zhang S, Li Y, Huang J, Yin Z, et al. beta-Trcp ubiquitin ligase and RSK2 kinase-mediated degradation of FOXN2 promotes tumorigenesis and radioresistance in lung cancer. *Cell Death Differ*. 2018;25(8):1473-85.

56. Ye H, Duan M. FOXN2 is downregulated in breast cancer and regulates migration, invasion, and epithelial- mesenchymal transition through regulation of SLUG. *Cancer Manag Res*. 2019;11:525-35.