

A Potential Efficacy of Rebamipide as Anti-gastric Cancer Drug

Do Sik Min*

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received August 19, 2016 / Revised September 22, 2016 / Accepted October 10, 2016

Rebamipide is a mucosal-protective antiulcer drug, but its mechanism of action in gastric cancer remains elusive. CagA, a major virulence factor of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), is associated with the risk of gastric cancer. CagA protein is injected into gastric epithelial cells and deregulates a variety of cellular signaling molecules. CagA from *H. pylori* induces phospholipase D1 (PLD1) expression through NF κ B activation in gastric epithelial cells, followed by invasion and proliferation of gastric epithelial cancer cells. Infection with cagA-positive *H. pylori* and expression of CagA enhances the binding of NF κ B to the PLD1 promoter. Rebamipide abolishes *H. pylori* cagA-induced PLD1 expression via inhibition of binding of NF κ B to the PLD1 promoter and also inhibits PLD activity. Moreover, rebamipide abolishes *H. pylori* CagA-induced β -catenin and the expression of a target cancer stem cell (CSC) marker gene via upregulation of miRNA-320a and -4496, followed by attenuation of self-renewal capacity of *H. pylori* CagA-infected gastric CSCs. In addition, rebamipide increases the chemosensitivity of CagA-expressed gastric CSCs and suppresses gastric carcinogenesis. Thus, it is speculated that rebamipide might show a potent efficacy as chemotherapeutic drug against gastric cancer cells. In this review, we summarize recent results regarding the novel insights for the efficacy of rebamipide in gastric cancer cells.

Key words : CagA, cancer stem cells, gastric cancer, *Helicobacter pylori*, rebamipide

서 론

Rebamipide는 위궤양과 위염치료에 쓰이는 위보호제로 사용되고 있으며 급성 및 만성염증을 억제하는 항염증 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있는 약물이다[2]. Rebamipide는 위점막의 투과성 억제, 점액분비를 촉진, prostaglandin 합성을 촉진시킴으로써 점막보호효과를 나타내고, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)의 위점막 부착을 억제, 염증성 사이토카인 및 호중구의 기능을 억제, 활성산소의 제거를 통하여 항염증 효과를 나타내며 손상 점막을 수복시키는 효과를 가지고 있다[1, 8, 15, 24, 27]. 게다가 rebamipide는 위암세포의 증식을 억제하고[9, 10, 20, 21], 마우스에서 ENNG와 MNNG에 의해 유도되는 암생성을 억제하는 것으로 알려져 있다[22, 23]. 또한 rebamipide는 두경부 암환자에서 화학방사선에 의해 유도되는 구강점막염을 보호하는 것을 보고되었다[25]. Rebamipide가 위암세포에서 화학보호성 약물로 보고되었지만, 위암에서 rebamipide의 분자기전에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. *H. pylori*에 의해 생기는 만성 위염증은 암으로의 진행될 수 있는

병변이다. *H. pylori*의 주요 독성인자인 CagA 단백질은 위암의 위험요소로서 역학조사결과 세균유래의 암 단백질로 간주되고 있다[16]. CagA는 줄기세포의 특성과 상피세포에서 간엽세포로의 이행(epithelial-mesenchymal transition)과 관련된 분자적 변화와 관련되어 있다[3-5, 26, 28]. 암줄기세포(cancer stem cells, CSC)는 위암을 포함한 다양한 암의 근원이 되는 것으로 간주되고 있으며, 무제한의 자가재생능력과 분화능력, 종양생성 및 세포증식능력의 증가 그리고 항암제 내성이 증가되는 특성을 보여준다[7]. 암줄기세포의 기능은 Wnt/ β -catenin과 NF κ B를 포함한 다양한 신호전달 경로들에 의해 조절된다[18]. Wnt/ β -catenin과 NF κ B의 활성화는 위암의 발생을 야기시키는데 관여하고 있다.

H. pylori CagA의 새로운 표적 단백질로서 Phospholipase D1 (PLD1)

CagA-positive *H. pylori*를 위암세포주에 감염시키거나 CagA 유전자를 과발현 시켰을 때, NF κ B 전사인자의 활성이 증가되었고 NF κ B가 세포질에서 핵내로의 이동이 증가되었다[9]. 그러나 cagA-negative *H. pylori*를 위암세포에 감염시에는 NF κ B활성과 NF κ B의 핵으로의 이동에는 영향을 미치지 않았다. 게다가 핵내에서의 NF κ B 단백질의 발현은 *H. pylori*가 감염되지 않은 위암조직과 정상조직에 비하여, *H. pylori*가 감염된 위암조직에서 증가되었다. 이러한 결과는 CagA가 *H. pylori*가 감염된 위암세포주와 위암조직에서 NF κ B를 활성화를 매개한다는 사실을 시사하고 있다. PLD1은 NF κ B의 세포막에

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-3682, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : minds@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

존재하는 인지질을 가수분해 하여 phosphatidic acid (PA)를 생성하는 효소로서 세포의 증식과 세포사멸을 조절하고 다양한 암세포와 암조직에서 발현이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다[19]. 그리고 NFκB가 세포증식인자에 의해 유도되는 PLD1의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다[10, 11]. CagA-positive *H. pylori*를 위암세포주에 감염시키거나 CagA 유전자를 과발현 시켰을 때, PLD1의 발현이 증가되었고, *H. pylori*가 감염된 위암조직에서 PLD1의 발현이, *H. pylori*가 감염되지 않은 위암조직과 정상조직에 비하여 증가되었다[9]. 이러한 결과는 CagA에 의한 NFκB활성화가 *H. pylori*에 의해 유도되는 PLD1 발현증가에 관련이 있음을 의미한다(Fig. 1).

Rebamipide가 *H. pylori*에 의해 유도되는 PLD1 발현을 저해함으로써 위암세포의 증식과 침윤을 억제함

Rebamipide는 cagA-positive *H. pylori*와 CagA 과발현에 의한 NFκB 활성화를 억제시킬뿐만 아니라 NFκB가 PLD1 promoter에 결합하는 것을 억제시킨다[9]. 또한 rebamipide는 cagA-positive *H. pylori*와 CagA 과발현에 의한 PLD1 효소활성을 억제시킴으로써 PLD1의 발현과 효소활성의 downregulation을 유도한다[19]. Matrix metalloprotease (MMP)는 암전이에 중요한 역할을 하고 IL-8은 종양의 성장과 신생혈관형성에서 중요한 기능을 수행하는데 이 두 인자는 위암조직에서

증가되어 있다[17, 29]. *H. pylori*는 위암세포에서 NFκB의 활성화를 통해 MMP-9과 IL-8의 발현을 증가시킨다[13, 14]. Rebamipide는 PLD1발현 억제를 통하여 MMP-9과 IL-8을 down-regulation시킴으로써 cagA-positive *H. pylori* 감염에 의한 위암세포의 침윤을 감소시킨다[9]. 또한 *H. pylori*에 의한 PLD1의 upregulation이 위암세포의 침윤을 증가시키는 것으로 나타났다[9]. 게다가 rebamipide는 PLD1의 발현을 downregulation시킴으로써 위암세포의 사멸을 증가 시킨다(Fig. 1).

Rebamipide가 microRNA-320a와 4496의 발현을 증가시켜 β-catenin 발현을 억제시킴

cagA-positive *H. pylori*를 위암세포에 감염시켰을 때 β-catenin과 암줄기세포의 표지 단백질들(CD44, CD166, Msi-1, EpCAM)의 발현이 증가되었고, rebamipide는 cagA-positive *H. pylori*에 의한 β-catenin과 암줄기세포의 표지 단백질의 발현을 억제시키는 것으로 나타났다[12]. 게다가 cagA-positive *H. pylori*를 감염시에 β-catenin이 암줄기세포의 표지 유전자 promoter상에 결합을 증가시키고 rebamipide가 이를 저해시킨다[12]. 이러한 암줄기세포의 표지 유전자들은 β-catenin의 표적 유전자들로 알려져 있다. cagA-positive *H. pylori*를 감염시키거나 CagA를 과발현시, β-catenin promoter활성에는 영향을 주지않고 β-catenin의 3' untranslated regions (3'UTR)의 luciferase 활성을 증가시키기 때문에 CagA는 microRNA (miRNA)를 통하여 β-catenin의 발현이 조절될 수 있다. MiR-320a와 miR-4496이 β-catenin의 3'-UTR에 결합하여 β-catenin의 발현을 전사이후 단계에서 발현을 억제하는 것으로 밝혔었다[12]. cagA-positive *H. pylori*를 위암세포주에 감염시켰을 때 miR-320a와 miR-4496의 발현을 감소시키며, rebamipide는 CagA에 의한 miR의 발현감소를 회복시켜 β-catenin의 발현을 억제시킨다(Fig. 1).

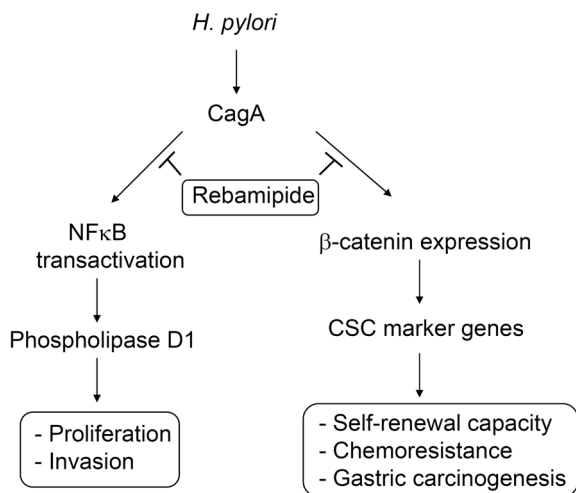


Fig. 1. A potential efficacy of rebamipide in *H. pylori* CagA-induced gastric carcinogenesis. Infection of cagA-positive *H. pylori* in gastric cancer cells injects cagA into gastric epithelial cells. CagA protein activates NFκB transcription factor and induces phospholipase D1 expression, followed by promotion of cell proliferation and invasion. CagA also increases expression of β-catenin and its target genes, cancer stem cells marker genes, followed by promotion of self-renewal capacity, chemoresistance, and gastric carcinogenesis. Rebamipide suppresses these signaling pathways and thus might show a potential efficacy against gastric carcinogenesis.

Rebamipide는 CagA에 의해 유도되는 암줄기세포의 sphere 형성 및 자가재생 능력을 억제시킴

CagA-positive *H. pylori*를 위암세포에 감염시에 CD44-positive EpCAM-positive 암줄기세포의 population이 증가하고, β-catenin을 과발현시에 rebamipide 처리에 의한 암줄기세포의 population 감소가 회복된다[12]. CagA는 암줄기세포의 특성중의 하나인 tumor sphere형성을 증가시키고 rebamipide는 CagA에 의해 증가된 tumor sphere 형성을 감소시킨다. 또한 β-catenin은 rebamipide에 의해 감소된 sphere 형성을 회복시키는 것으로 나타났다[12]. 게다가 CagA는 암줄기세포의 또 다른 특성중의 하나인 자가재생능력을 증가시키며, rebamipide는 CagA에 의해 유도되는 *in vitro*와 *in vivo* 자가재생능력을 억제시킨다(Fig. 1).

Rebamipide는 항암제 감수성을 증가시킴

암줄기세포는 항암제 내성을 나타내고 CagA는 암줄기세포의 특성을 유도시킨다. 임상에서 항암제로 사용되고 5-fluorouracil (5-FU), paclitaxel, irinotecan을 cagA-positive *H. pylori*가 감염된 암줄기세포에 처리시 약물저항성을 보여주었지만, rebamipide 단독 처리시 cagA-positive *H. pylori*가 감염된 암줄기세포의 사멸을 증가시켰으며, 이들 항암제와 rebamipide를 병용처리시 항암제에 대한 감수성을 의미있게 증가시키는 것으로 나타났다[12]. 이러한 결과는 CagA를 과발현시킨 암줄기세포를 이용한 경우에도 유사한 양상이 나타났다. 이러한 결과는, rebamipide가 CagA가 발현된 암줄기세포에서 화학감수성을 증가시킨다는 것을 의미한다. 게다가 면역결핍된 마우스의 위(stomach)에 사람 위암세포를 정위이식(orthotopic transplantation)을 수행하여 위암을 야기시켰을 때, rebamipide와 5-FU를 병용처리시에 단독 처리시보다 위암생성 부위이외의 장기로 전이가 감소되는 현상이 나타났으며, 세포 사멸은 병용처리에 의해 의미있게 증가되었다[12]. 이러한 결과는 rebamipide가 CagA에 의해 유도되는 암줄기세포의 성질을 억제시킴으로써 위암생성과 암전이능을 감소시킨다는 것을 시사한다.

결론

CagA는 *H. pylori*에 의해 유도되는 독성의 위험인자로서 PLD1의 발현을 증가시켜 위암세포의 증식을 증가시킬뿐만 아니라 miR-320a와 miR-4496의 발현을 감소시켜 β -catenin의 발현을 증가시킴으로써 암줄기세포의 특성인 sphere 형성, 항암제에 대한 내성, 자가재생능력을 촉진한다. 현재 위염과 위궤양치료제로 임상에서 사용되고 있는 rebamipide는, NF κ B의 활성을 억제시켜 PLD1의 발현을 감소시킴으로써 위암세포의 증식을 억제시킨다. 또한 rebamipide는 miR-320a와 miR-4496의 발현을 증가시켜 beta-catenin의 발현을 억제시킴으로써 CagA가 발현된 암 줄기세포의 특성을 억제시켜 화학감수성을 증가시킴으로써 위암생성을 감소시킬수 있는 위암치료효능의 잠재적 약물로서 가능성이 제시된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Aihara, M., Azuma, A., Takizawa, H., Tsuchimoto, D., Funakoshi, Y., Shindo, Y., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N. and Matsushima, K. 1998. Molecular analysis of suppression of interleukin-8 production by rebamipide in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric cancer cell lines. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 174S-180S.
- Arakawa, T., Kobayashi, K., Yoshikawa, T. and Tarnawski, A. 1998. Rebamipide: overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.* **43**, S5-13.
- Bagnoli, F., Buti, L., Tompkins, L., Covacci, A. and Amieva, M. R. 2005. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16339-16344.
- Baud, J., Varon, C., Chabas, S., Chambonnier, L., Darfeuille, F. and Staedel, C. *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. *PLoS One* **8**, e60315.
- Bessède, E., Staedel, C., Acuña Amador, L. A., Nguyen, P. H., Chambonnier, L., Hatakeyama, M., Belleannée G., Mégraud, F. and Varon, C. 2014. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial - mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* **33**, 4123-4131.
- Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Ginestier, C., Dontu, G., Birnbaum, D. and Wicha, M. S. 2008. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* **75**, 75-84.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Ishihara, K., Komuro, Y., Nishiyama, N., Yamasaki, K. and Hotta, K. 1992. Effect of rebamipide on mucus secretion by endogenous prostaglandin-independent mechanism in rat gastric mucosa. *Arzneimittelforschung* **2**, 1462-1466.
- Kang, D. W., Hwang, W. C., Park, M. H., Ko, G. H., Ha, W. S., Kim, K. S., Lee, Y. C., Choi, K. Y. and Min, D. S. 2013. Rebamipide abolishes *Helicobacter pylori* CagA-induced phospholipase D1 expression via inhibition of NF κ B and suppresses invasion of gastric cancer cells. *Oncogene* **32**, 3531-3542.
- Kang, D. W., Min, G., Park, D. Y., Hong, K. W. and Min, D. S. 2010. Rebamipide-induced downregulation of phospholipase D inhibits inflammation and proliferation in gastric cancer cells. *Exp. Mol. Med.* **42**, 555-564.
- Kang, D. W., Park, M. H., Lee, Y. J., Kim, H. S., Kwon, T. K., Park, W. S and Min, D. S. 2008. Phorbol ester up-regulates phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression through a PKC/Ras/ERK/NF κ B-dependent pathway and enhances matrix metalloproteinase-9 secretion in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 4094-4104.
- Kang, D. W., Noh, Y. N., Hwang, W. C., Choi, K. Y. and Min, D. S. 2016. Rebamipide attenuates *Helicobacter pylori* CagA-induced self-renewal capacity via modulation of β -catenin signaling axis in gastric cancer-initiating cells. *Biochem. Pharmacol.* **113**, 36-44.
- Lamb, A., Yang, X. D., Tsang, Y. H., Li, J. D., Higashi, H., Hatakeyama, M., Peek, R. M., Blanke, S. R. and Chen, L. F. 2009. *Helicobacter pylori* CagA activates NF κ B by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Rep.* **10**, 1242-1249.
- Mori, N., Sato, H., Hayashibara, T., Senba, M., Geleziunas,

- R., Wada, A., Hirayama, T. and Yamamoto, N. 2003. *Helicobacter pylori* induces matrix metalloproteinase-9 through activation of NF κ B. *Gastroenterology* **124**, 983-992.
15. Murakami, K., Okajima, K., Uchiba, M., Harada, N., Johno, M. Okabe, H. and Takarsuki, K. 1997. Rebamipide attenuates indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation by inhibiting activation of leukocytes in rats. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 319-325
 16. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. and Hatakeyama, M. 2008. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1003-1008.
 17. Sier, C. F., Kubben, F. J., Ganesh, S., Heerding, M. M., Griffioen, G., Hanemaaijer, R. van Krieken, J. H., Lamers, C. B. and Verspaget, H. W. 1996. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to overall survival of patients with gastric carcinomas. *Br. J. Cancer* **74**, 413-417.
 18. Styczynski, J. and Drewa, T. 2007. Leukemic stem cells: from metabolic pathways and signaling to a new concept of drug resistance targeting. *Acta. Biochim. Pol.* **54**, 717-726.
 19. Su, W., Chen, Q. and Frohman, M. A. 2009. Targeting phospholipase D with small molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol.* **5**, 1477-1486.
 20. Tanigawa, T., Pai, R., Arakawa, T. and Tarnawski, A. S. 2007. Rebamipide inhibits gastric cancer cell growth. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 240-247.
 21. Tarnawski, A., Pai, R., Chiou, S. K., Chai, J. and Chu, E. C. 2005. Rebamipide inhibits gastric cancer growth by targeting survivin and Aurora-B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 207-212.
 22. Tsukamoto, H., Mizoshita, T., Katano, T., Hayashi, N., Ozeki, K., Ebi, M. Shimura, T., Mori, Y., Tanida, S., Kataoka H., Tsukamoto, T., Tatematsu, M. and Joh, T. 2015. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* **67**, 271-277.
 23. Yamane, T., Nakatani, H., Matsumoto, H., Iwata, Y., Kikuoka, N. and Takahashi, T. 1998. Inhibitory effects of rebamipide on ENNG-induced duodenal carcinogenesis in mice: a possible strategy for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 115-207S.
 24. Yamasaki, K., Kanbe, T., Chijiwa, T., Ishiyama, H. and Morita, S. 1987. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **142**, 23-29.
 25. Yasuda, Y., Chiba, H., Satomi, T., Matsuo, A., Kaneko, T. and Chikazu, D. 2012. Preventive effect of rebamipide gargle on chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cancer: a pilot study. *J. Oral Maxillofac. Res.* **2**, 1-8.
 26. Yin, Y., Grabowska, A. M., Clarke, P. A., Whelband, E., Robinson, K., Argent, R. H., Tobias, A., Kumari, R., Atherton, J. C. and Watson, S. A. 2010. *Helicobacter pylori* potentiates epithelial:mesenchymal transition in gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7. *Gut* **59**, 1037-1045.
 27. Yoshikawa, T., Naito, Y. and Kondo, M. 1993. Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance. *Arzneimittelforschung* **43**, 363-366.
 28. Wroblewski, L. E., Piazuolo, M. B., Chaturvedi, R., Schumacher, M., Aihara, E., Feng, R. Noto, J. M., Delgado, A., Israel, D. A., Zavros, Y., Montrose, M. H., Shroyer N., Wilson, K. T. and Peek, R. M. Jr. 2015. *Helicobacter pylori* targets cancer-associated apical-junctional constituents in gastroids and gastric epithelial cells. *Gut* **64**, 720-730.
 29. Zhang, X. Y., Chan, W. Y., Whitney, B. M., Fan, D. M., Chow, J. H., Liu, Y., Ng, E. K. and Chung, S. C. 2002. Changes of interleukin expression correlate with *Helicobacter pylori* infection and lymph node metastases in gastric carcinoma. *Diagn. Mol. Pathol.* **11**, 135-139.

초록 : 위암치료제로서 rebamipide의 잠재적 효능

민도식*

(부산대학교 자연과학대학 분자생물학과)

Rebamipide는 위궤양과 위염치료에 쓰이는 위보호제로 임상에서 사용되고 있지만 위암에서의 역할에 대해서는 알려지바가 거의 없다. 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 주요독성인자인 CagA는 위암의 발생과 관련이 있다. CagA는 위암세포에서 NF κ B의 활성을 증가시켜 PLD1 단백질의 발현을 증가시킴으로써 위암세포의 증식과 침윤을 유도한다. Rebamipide는 NF κ B의 활성을 억제함으로써 *H. pylori*의 CagA에 의해 유도되는 PLD1의 발현을 저해하는것으로 규명되었다. 게다가, rebamipide는 *H. pylori*의 CagA에 의해 유도되는 β -catenin과 그 표적 유전자로서 인 암줄기세포 마커 단백질의 발현을 증가시킴으로써 위암줄기세포의 자가재생능력을 감소시킨다. 또한 rebamipide는 항암제 내성을 극복하는 화학감수성을 증가시켜서 위암생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 그래서 rebamipide는 위암치료제로서의 잠재적 효능을 가지고 있는 약물로서의 가능성이 제시되고 있다.