

## YM155 Induces Apoptosis through Downregulation of Anti-apoptotic Proteins in Head and Neck AMC-HN4 Cells

Ho Joon Chang<sup>1</sup>, Taeg Kyu Kwon<sup>2</sup> and Dong Eun Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received February 7, 2019 / Revised February 12, 2019 / Accepted February 12, 2019

Squamous cell carcinoma is the primary tumor type in head and neck cancers, the fifth most common malignant neoplasm world-wide. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is highly expressed in head and neck carcinoma patients and correlated with more aggressive forms. In this study, we investigated whether YM155, a specific survivin inhibitor, could induce apoptosis in head and neck AMC-HN4 cells. YM155 was found to markedly induce apoptosis and cleavage of PARP, a marker of apoptosis. Furthermore, YM155 promoted apoptosis in other cancer cells, such as glioma (U251MG) and renal carcinoma (Caki) cells. In contrast, YM155 had no effect on apoptosis in normal mesangial cells. YM155 significantly induced caspase activation, and pan caspase inhibitor z-VAD-fmk markedly blocked apoptosis, PARP cleavage, and caspase-3 cleavage. Therefore, YM155 was seen to instigate caspase-dependent apoptosis in head and neck AMC-HN4 cells, inducing downregulation of survivin as well as other apoptotic proteins such as c-FLIP and Mcl-1. In addition, the induction of apoptosis and PARP cleavage by YM155 treatment was effectively inhibited in survivin-, c-FLIP- and Mcl-1-over-expressing head and neck AMC-HN4 cells. In conclusion, YM155 is a potent candidate for inducing cell death in head and neck AMC-HN4 cells.

**Key words** : Apoptosis, apoptotic proteins, head and neck carcinoma, survivin, YM155

### 서 론

두경부암은 전세계에서 연간 60만명이 진단되며 발병률이 여섯 번째로 높은 암이다[24, 25]. 한국에서 10만명당 50.9명의 유병률이 2013년에 보고되었다[8]. 일차적인 치료로 그 동안 수술적 치료를 선호하였으나 광범위 절제에 따른 음성장애, 연하장애와 같은 기능적 장애로 인해 항암치료에 대한 관심이 높아지고 있다[19]. 두경부암의 생존율은 수술, 방사선, 항암 치료 기술의 발전에도 불구하고 지난 30년간 의미 있는 향상은 없었으며, 수술이 불가능할 정도로 진행된 병기의 두경부암의 경우는 5년 생존율이 20%로 매우 낮은 실정이다[9]. 두경부암에서 cisplatin이 가장 많이 사용되는 항암제이나 많은 환자들이 cisplatin 내성으로 인해 치료에 어려움을 겪고 있다[14]. 정상세포에 대한 독성을 낮춰 항암제 부작용은 줄이고, 약제내성 기전에 대해 이해하여 암세포의 사멸을 증대시키는 새로운 항암제의 개발이 필요하다.

Survivin은 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family

중 하나로 배아기, 태아기 동안 발현 되나 다른 IAPs family와는 달리 정상 성인 조직에서는 발현되지 않으며 유방, 폐, 대장, 췌장, 두경부 영역의 악성종양에서 과발현되어 있다[1, 7, 27]. Survivin은 세포분열에도 중요한 역할을 할 뿐 아니라 암 세포의 다양한 caspase의 활성화를 제한함으로써 apoptosis의 과정 또한 억제한다[24, 28]. Survivin은 종양의 진행과 양의 상관관계를, 항암치료 후의 환자의 생존기간과는 역의 상관관계를 가져 survivin의 과발현은 악성종양의 나쁜 예후와 연관 있음이 보고되고 있다[22, 33]. 한편 survivin의 발현이 암세포와 암 관련 내피세포에서의 항암제 내성과 연관이 있음에 대한 연구가 진행되고 있다[3, 5, 16, 20, 29, 31].

YM155는 anti-apoptotic protein인 survivin을 억제하는 분자로 현존하는 항암제와 비교하여 항암 효과가 더 크고, 혈장보다 종양 내에 더 높은 농도로 존재하는 것으로 알려져 있다[17]. 기존의 연구를 통해 YM155의 *in vitro*에서의 항암효과 및 비소세포폐암, 비호지킨림프종, 흑색종, 호르몬 비의존성 전립선암에서 종양의 퇴행을 유도함이 확인 되었다[10, 17, 18, 30].

본 연구를 통해 YM155의 처리가 두경부 암세포에서도 세포사멸을 유도하는지 확인하고 그 기전의 규명을 통해 새로운 치료제의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포 배양 및 시약

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-580-3882, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : entde@dsmc.or.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.

본 연구에 사용한 두경부암 세포인 AMC-HN4 세포는 Korean Type Culture Collection에서 구입하였다. 세포주 배양을 위한 배지는 10% 태아우혈청(fetal bovine serum, Hyclone laboratories, Waltham, MA, USA)과 1% antibiotics, 0.2% gentamicin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (WelGENE Inc.)을 사용하였으며 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub>배양기를 이용하여 배양하였다. 실험에 사용된 약제인 YM155는 Selleck Chemicals (USA)에서 구입하였고, z-VAD-fmk (z-VAD)는 Calbiochem(USA)에서 구입하였다. PARP, Mcl-1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서, c-FLIP항체는 Enzo Biochem (USA)에서, survivin 항체는 R&D (USA)에서, actin 항체는 Sigma (USA)에서 각각 구매하였다.

### Flow cytometry 분석

AMC-HN4세포 1×10<sup>6</sup>개에 100 µl의 PBS를 넣어 잘 풀어준 후, 200 µl의 95% ethanol을 진탕 혼합하면서 조심스럽게 넣어 주었다. 세포를 4°C에서 1시간 동안 고정한 후, PBS로 씻어 주었다. 세포에 250 µl의 1.12% sodium citrate buffer (pH 8.4)에 12.5 µg RNase가 녹아있는 용액을 넣어 37°C에서 30분간 배양 하였다. 30분이 지난 후 그 용액에 250 µl propidium iodide (50 µg/ml)를 넣어 30분간 실온에서 DNA를 염색하였다. 염색된 세포를 FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Baltimore, MD, USA)를 이용하여 측정하였다.

### Western blot 분석

세포(0.4×10<sup>6</sup> cells/well)를 12시간 배양 후에, FBS를 첨가하지 않은 무 혈청 배지로 교체하여 시약을 처리하여 배양 후, 세포를 모아 32 µl lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TritonX-100, 25 mM OPS, 100 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, and 20 mM leupeptin, pH 7.2)를 첨가하고 5분 간격으로 15 동안 3번 진탕 혼합하여 세포를 파쇄한 후 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 15분)하여 시료를 준비하였다. 시료의 단백질을 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 단백질을 분리한 후, immobilon membrane으로 전달하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCL, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 넣어 실온에서 1시간 유지시킨 후, 항체를 희석한 5% milk/TBST에 넣어 실온에서 12시간 반응시켰다. Anti-mouse는 rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST로 1시간 반응시킨 후 Enhanced Chemiluminescence 용액을 가하여 발색 시켜서 단백질을 확인하였다.

### DNA fragmentation 분석

DNA fragmentation은 The cell death detection ELISA plus kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를

이용하여 조사하였다. 준비된 세포에 200 µl의 lysis buffer를 첨가하여 상온에서 10분 동안 반응하여 용해시킨 후, 200 rpm에서 10분간 원심분리하여 시료를 준비하였다. 회수된 상층액을 immobilized anti-histon antibody와 2시간 반응시킨 후, peroxidase substrate로 5분간 반응시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 분절을 정량화하였다.

### Caspase 활성화 측정

Caspase 활성화를 측정하기 위하여, 세포의 20 µg lysate를 caspase substrate[Asp-Glu-Val-Asp-chromophore-p-nitroanilide (DVAD-pNA)]가 들어있는 100 µl의 reaction buffer (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol)를 넣어, 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그 이후 405 nm 흡광도에서 spectrophotometer를 이용하여 확인하였다.

## 결 과

### YM155 처리에 의한 세포 사멸 유도

AMC-HN4 세포에서 YM155 처리에 의한 세포사멸을 알아보기 위하여 각각의 세포에 YM155 10 nM, 20 nM, 40 nM 처리 후 현미경을 통한 관찰 결과 40 nM에서 세포가 파괴되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1A). 이러한 세포 사멸이 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 FACS를 이용하여 확인한 결과 YM155 농도 의존적으로 sub-G1기의 세포 증가 및 PARP cleaved form의 증가를 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). 또한 YM155 농도 의존적으로 apoptosis marker 중 하나인 DNA 분절이 증가하는 것을 oligonucleosome associated histone kit을 이용하여 확인 할 수 있었다(Fig. 1C).

### YM155 매개 세포 사멸에 caspase 활성화 영향

YM155에 의해 증가하는 apoptosis에 caspase의 활성화가 관여하는지 확인하기 위해 DEVDase activity를 이용하여 YM155 처리 시 caspase 활성화가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 caspase의 활성화가 YM155에 의한 apoptosis에 중요한 역할을 하는지 확인하기 위하여 pan-caspase inhibitor인 z-VAD를 전처리하여 caspase의 활성을 억제하자 세포사멸이 억제되는 것을 FACS를 통해 확인 할 수 있었다. 또한 Western blot에서도 pro-caspase-3가 활성화되면 나타나는 cleaved form의 caspase-3 역시 z-VAD에 의해 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 이를 통해 YM155에 의한 세포사멸이 caspase 의존적인 apoptosis인 것을 확인 할 수 있었다.

### AMC-HN4 세포에서 apoptosis 조절 단백질의 발현에 미치는 YM155의 영향

YM155에 의한 AMC-HN4 세포의 apoptosis의 기전을 확인하기 위해 다양한 apoptosis 관련 단백질의 발현 변화를 확인

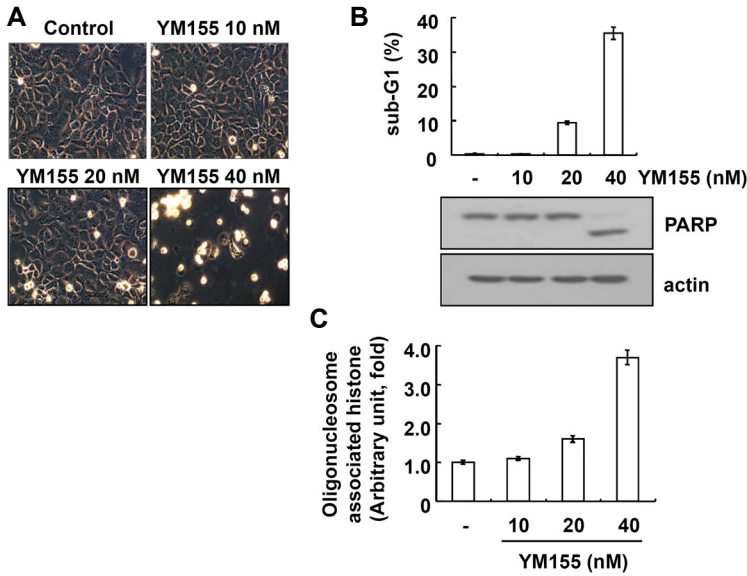


Fig. 1. AMC-HN4 cells were treated with different doses of YM155. (A) The cell morphology was examined using interference light microscopy. (B) Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The protein expression levels of PARP and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control. (C) Fragmented DNA was determined by the DNA fragmentation detection kit.

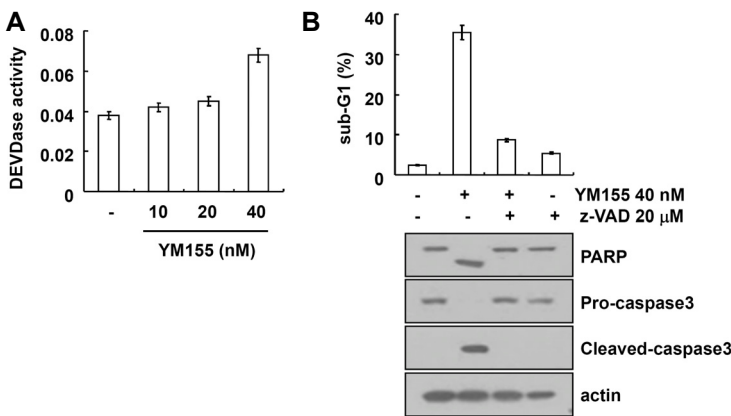


Fig. 2. YM155-induced apoptosis is dependent on caspase activation in AMC-HN4 cells. (A) AMC-HN4 cells were treated with different doses of YM155. Caspase activities were measured with a spectrophotometer using DEVDase assay kits. (B) AMC-HN4 cells were treated with 40 nM YM155 in the presence or absence of 20 μM z-VAD-fmk (z-VAD). The sub-G1 fraction was measured by flow cytometry. The protein expression levels of PARP, pro-caspase3, cleaved-caspase3 and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control.

하였을 때 caspase-8의 활성화를 방해하는 c-FLIP의 발현이 감소하였고, anti-apoptotic Bcl-2 단백질 중 하나로 알려진 Mcl-1의 발현이 감소하였다. 또한 inhibitor of apoptotic protein (IAP) family이자 caspase 활성화를 억제하여 세포사멸을 억제하는 survivin의 발현도 감소하였다(Fig. 3A). 이러한 anti-apoptotic protein이 YM155 처리 시 농도, 시간 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3A, Fig. 3B).

**YM155에 의한 apoptosis에 c-FLIP, Mcl-1, survivin 단백질의 과발현의 영향**

c-FLIP, Mcl-1, survivin의 발현 감소가 YM155에 의한 apoptosis에 중요한 인자임을 확인하기 위해 각각의 유전자를 과발현 시킨 상태에서 apoptosis가 억제되고 PARP의 cleaved form의 형성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 4A - Fig. 4C). 이를 통해 YM155에 의한 AMC-HN4 세포의 apoptosis에 c-FLIP, Mcl-1, survivin이 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

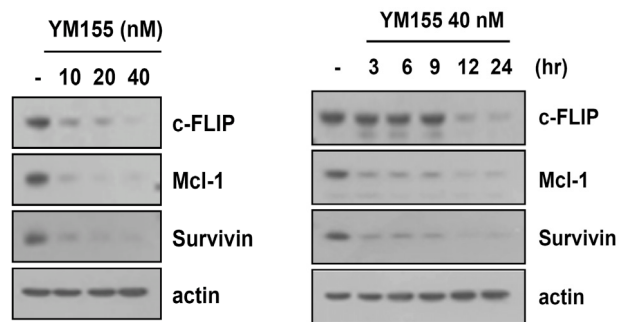


Fig. 3. The effects of treatment with YM155 on expression of apoptosis related proteins. (A) AMC-HN4 cells were treated with different doses of YM155. The protein expression levels of c-FLIP, Mcl-1, survivin and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control. (B) AMC-HN4 cells were treated with 40 nM YM155 for the indicated time periods. The protein expression levels of c-FLIP, Mcl-1, survivin and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control.

**다양한 암세포에서 YM155에 의한 apoptosis 유도**

YM155에 의한 유도되는 apoptosis가 두경부 암세포에서 특이적으로 나타나는 현상인지 아니면 다른 암 세포에서도 동일하게 나타나는지를 확인하기 위하여 뇌암(U251MG) 세포와 신장암 세포인 Caki 세포에 YM155를 처리하여 확인해 본

결과, U251MG 및 Caki 세포에서도 농도 의존적으로 apoptosis가 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5A, Fig. 5B). 정상 세포에서 YM155가 apoptosis를 유도하는지 확인하기 위해 쥐의 mesangial cell에 YM155를 처리하였으나 AMC-HN4 세포와는 달리 현미경 관찰에서 세포 사멸을 일으키지 않는 것을

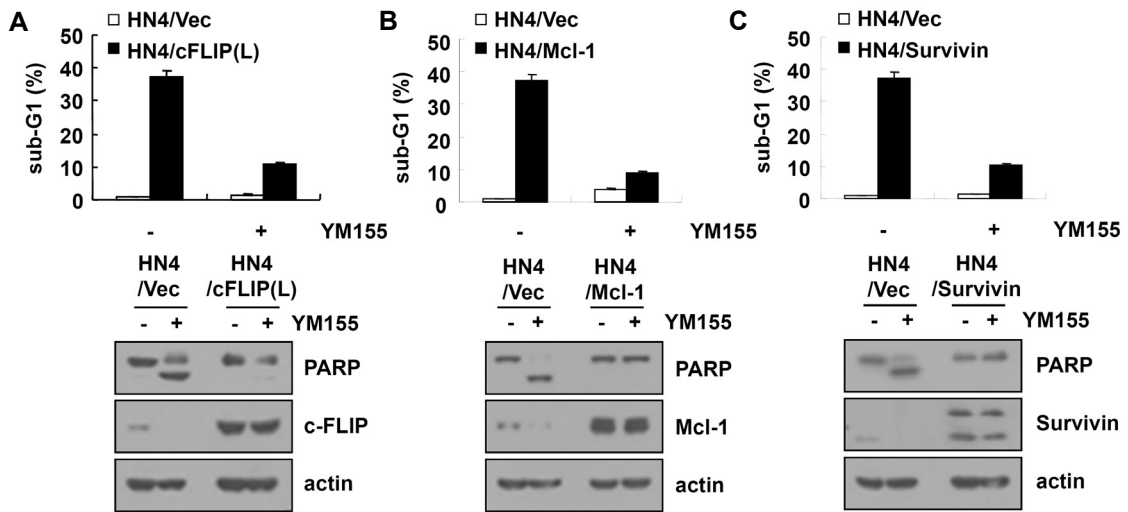


Fig. 4. Down-regulation of c-FLIP, Mcl-1 and survivin contributes to YM155-mediated apoptosis. (A) AMC-HN4 cells were transiently transfected with c-FLIP. After transfection, cells were treated with YM155. (B) AMC-HN4 cells were transiently transfected with Mcl-1. After transfection, cells were treated with YM155. (C) AMC-HN4 cells were transiently transfected with survivin. After transfection, cells were treated with YM155. The sub-G1 fraction was measured by flow cytometry. The protein expression levels of PARP, c-FLIP, Mcl-1, survivin and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control.

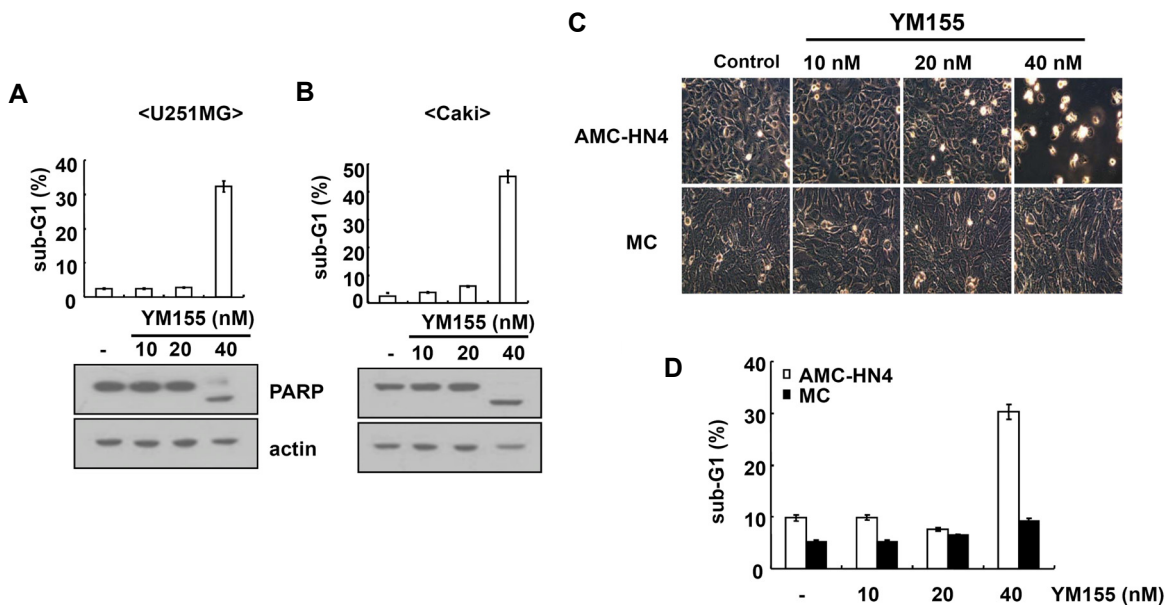


Fig. 5. The effects of YM155 on apoptosis in other carcinoma cell lines and normal cells. (A and B) U251MG cells (A) and Caki cells (B) were treated with different doses of YM155. The sub-G1 fraction was measured by flow cytometry. The protein expression levels of PARP and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control. (C and D) AMC-HN4 cells and MC cells were treated with different doses of YM155. The cell morphology was examined using interference light microscopy (C). The sub-G1 population was measured by flow cytometry (D).

확인하였다(Fig. 5C). 또한 FACS를 이용한 sub-G1을 통해서도 정상세포에서는 apoptosis가 증가하지 않음을 확인하였다(Fig. 5D). 따라서 YM155에 의한 apoptosis는 암세포 특이적으로 일어나며 정상세포에는 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

두경부 암의 치료 방법으로는 수술, 항암 치료, 방사선 치료 등이 있으며 암의 병기나 환자의 건강상태를 고려하여 치료 방법을 결정하게 된다. 그동안 수술적 치료가 선호되었으나 연하장애, 음성장애와 같은 수술 후 나타나는 기능 장애와 합병증으로 인해 최근 두경부암의 치료에서 항암 치료에 대한 관심이 높아지고 있다[4].

Cisplatin은 두경부 암 치료에서 가장 흔히 사용되는 항암제이다[14]. 하지만 일부 종양세포는 cisplatin에 약제내성을 나타내게 되어 cisplatin의 활용성을 감소시킨다. 따라서 기존의 항암제보다 약제내성이 적어 효과가 좋으며 부작용은 적은 새로운 항암제에 대한 연구가 필요하다. 최근에 anti-apoptotic protein인 survivin을 억제하는 YM155가 high throughput screening에 의한 survivin 유전자 promoter 분석에서 발견되었다[17]. 비소세포폐암, 비호지킨림프종, 흑색종 등에서 YM155의 항암 효과가 *in vitro*에서 밝혀졌다[10, 17, 18, 30]. Survivin은 정상조직에서는 발견되지 않거나 적게 발현되며 [1] 유방암, 폐암, 대장암 등의 악성종양에서는 과발현 되어 있다[7, 27]. 두경부 암에서 역시 survivin이 과발현 되어 있으며 이는 예후와도 관련이 있음이 밝혀졌다[12, 13, 21].

본 연구를 통하여 두경부 암세포인 AMC-HN4세포에서 YM155를 처리하였을 때 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였으며, PARP의 cleaved form 증가를 통해 이 세포사멸이 apoptosis임을 알 수 있었다(Fig. 1A, Fig. 1B). YM155 처리에 의해 유도하는 apoptosis에 caspase 활성화가 관여하는 것을 DEVDase activity의 증가와 pan-caspase inhibitor를 이용하여 caspase 활성화 차단시 apoptosis가 억제되는 결과를 통해 확인할 수 있었다(Fig. 2).

YM155 처리시 나타나는 apoptosis 기전을 확인하기 위하여 apoptosis 관련 단백질의 발현 변화를 본 결과 extrinsic apoptosis pathway에 관여하는 단백질로 caspase-8의 활성화를 방해하는 c-FLIP [11, 32]의 발현이 감소하였고, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 family 중 하나로 알려진 Mcl-1 [23]의 발현이 감소하였다. 또한 IAP family로 mitosis를 조절하고 caspase 활성화를 억제하여 apoptosis를 억제하는 survivin [2, 6, 24, 28]의 발현도 감소함으로써 AMC-HN4세포에서 YM155 처리 시 apoptosis가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 농도 의존성, 시간 의존성으로 나타났다(Fig. 3). YM155에 의해 유도되는 AMC-HN4세포의 apoptosis가 c-FLIP, Mcl-1,

survivin의 발현 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 각각의 단백질을 과발현 시켰을 때 apoptosis가 억제되었다 (Fig. 4).

다양한 암세포에서도 약물 처치에 의한 항암 효과가 확인되면 더 넓은 영역의 악성 종양의 치료에서 효과를 기대할 수 있다[15]. YM155에 의한 apoptosis가 두경부 암세포에서 특이적으로 나타나는 현상인지 아니면 다른 암세포에서도 동일하게 나타나는지를 확인하기 위하여 뇌암 세포인 U251MG와 신장암세포주인 Caki에 YM155를 처리하였다. 두경부 암세포 뿐만 아니라 다른 암세포에서도 apoptosis가 증가하는 것을 통해 YM155가 다양한 암세포에서도 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 5A, Fig. 5B).

항암제는 암세포에만 세포사멸을 유도하고 정상 세포에는 영향을 미치지 않아야 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있다. 본 실험에서는 정상세포에서 YM155가 apoptosis를 일으키는 지 여부를 확인하기 위해 쥐의 mesangial cell에 YM155를 처리하였으나 AMC-HN4세포와는 달리 세포 사멸을 일으키지 않는 것을 통해 YM155에 의한 apoptosis는 암세포 특이적으로 일어나며 정상세포에는 영향을 주지 않음을 확인하였다(Fig. 5C, Fig. 5D).

본 연구에서 우수한 항암 효과를 보인 YM155는 정상 세포에는 영향을 주지 않으면서 암세포에 특이적으로 작용하여 부작용을 줄일 수 있으며, 현재 두경부 암에서 주로 쓰이는 regimen인 cisplatin의 약물 저항성에 영향을 주는 survivin의 발현을 저해함으로써 약물 저항성을 극복할 수 있기에 두경부 뿐만 아니라 다른 장기의 악성종양 치료법의 개발에 활용 될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2017년도 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2017R1D1A1B03028366) 결과입니다.

## References

- Altieri, D. C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 46-54.
- Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D. C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917-921.
- Asechi, H., Hatano, E., Nitta, T., Tada, M., Iwaisako, K., Tamaki, N., Nagata, H., Narita, M., Yanagida, A., Ikai, I. and Uemoto, S. 2010. Resistance to cisplatin-induced apoptosis via PI3K-dependent survivin expression in a rat hepatoma cell line. *Int. J. Oncol.* **37**, 89-96.
- Burri, R. J. and Lee, N. Y. 2009. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **9**, 293-302.
- Chandele, A., Prasad, V., Jagtap, J. C., Shukla, R. and Shastry, P. R. 2004. Upregulation of survivin in G2/M cells

- and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* **6**, 29-40.
6. Colnaghi, R., Connell, C. M., Barrett, R. M. and Wheatley, S. P. 2006. Separating the antiapoptotic and mitotic roles of survivin. *J. Biol. Chem.* **281**, 33450-33456.
  7. Duffy, M. J., O'Donovan, N., Brennan, D. J., Gallagher, W. M. and Ryan, B. M. 2007. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett.* **249**, 49-60.
  8. Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Cho, H., Lee, D. H. and Lee, K. H. 2015. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2012. *Cancer Res. Treat.* **47**, 127-141.
  9. Kalavrezos, N. and Bhandari, R. 2010. Current trends and future perspectives in the surgical management of oral cancer. *Oral Oncol.* **46**, 429-432.
  10. Kita, A., Nakahara, T., Yamanaka, K., Nakano, K., Nakata, M., Mori, M., Kaneko, N., Koutoku, H., Izumisawa, N. and Sasamata, M. 2011. Antitumor effects of YM155, a novel survivin suppressant, against human aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Res.* **35**, 787-792.
  11. Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C. T., Bröcker, E. B., Krammer, P. H. and Walczak, H. 2000. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.* **60**, 553-559.
  12. Lo Muzio, L., Pannone, G., Staibano, S., Mignogna, M. D., Rubini, C., Mariggò, M. A., Procaccini, M., Ferrari, F., De Rosa, G. and Altieri, D. C. 2003. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **89**, 2244-2248.
  13. Marioni, G., Bertolin, A., Giacomelli, L., Marchese-Ragona, R., Savastano, M., Calgaro, N., Marino, F., De Filippis, C. and Staffieri, A. 2006. Expression of the apoptosis inhibitor protein survivin in primary laryngeal carcinoma and cervical lymph node metastasis. *Anticancer Res.* **26**, 3813-3817.
  14. Marur, S. and Forastiere, A. A. 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 489-501.
  15. Molin, Y. and Fayette, J. 2011. Current chemotherapies for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Anticancer Drugs* **22**, 621-625.
  16. Morgillo, F., Martinelli, E., Troiani, T., Orditura, M., De Vita, F. and Ciardiello, F. 2011. Antitumor activity of Sorafenib in human cancer cell lines with acquired resistance to EGFR and VEGFR tyrosine. Kinase Inhibitors. *PLoS One* **6**, e28841.
  17. Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M., Tominaga, F., Hatakeyama, S., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Kudoh, M. and Sasamata, M. 2007. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* **67**, 8014-8021.
  18. Nakahara, T., Yamanaka, K., Hatakeyama, S., Kita, A., Takeuchi, M., Kinoyama, I., Matsuhisa, A., Nakano, K., Shishido, T., Koutoku, H. and Sasamata, M. 2011. YM155, a novel Survivin suppressant, enhances taxane-induced apoptosis and tumor regression in a human Calu 6 lung cancer xenograft model. *Anticancer Drugs* **22**, 454-462.
  19. Nwizu, T., Ghi, M. G., Cohen, E. E. and Paccagnella, A. 2012. The role of chemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Semin. Radiat. Oncol.* **22**, 198-206.
  20. Peng, X. H., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B. H., Zhou, M. and Yang, L. 2006. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 25903-25914.
  21. Pizem, J., Cör, A. and Gale, N. 2004. Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation. *Histopathology* **45**, 180-186.
  22. Sarela, A. I., Macadam, R. C., Farmery, S. M., Markham, A. F. and Guillou, P. J. 2000. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* **46**, 645-650.
  23. Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R. D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P. and Korsmeyer, S. J. 1988. Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.* **7**, 123-131.
  24. Shin, S., Sung, B. J., Cho, Y. S., Kim, H. J., Ha, N. C., Hwang, J. I., Chung, C. W., Jung, Y. K. and Oh, B. H. 2001. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* **40**, 1117-1123.
  25. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. 2012. Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **62**, 10-29.
  26. Simard, E. P., Torre, L. A. and Jemal, A. 2014. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* **50**, 387-403.
  27. Su, L., Wang, Y., Xiao, M., Lin, Y. and Yu, L. 2010. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **110**, 484-491.
  28. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T. and Reed, J. C. 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* **58**, 5315-5320.
  29. Tirrò, E., Consoli, M. L., Massimino, M., Manzella, L., Frasca, F., Sciacca, L., Vicari, L., Stassi, G., Messina, L., Messina, A. and Vigneri, P. 2006. Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 4263-4272.
  30. Yamanaka, K., Nakahara, T., Yamauchi, T., Kita, A., Takeuchi, M., Kiyonaga, F., Kaneko, N. and Sasamata, M. 2011. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5423-5431.
  31. Zaffaroni, N., Pennati, M., Colella, G., Perego, P., Supino, R., Gatti, L., Pilotti, S., Zunino, F. and Daidone, M. G. 2002. Expression of the antiapoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1406-1412.
  32. Zhong, Q., Gao, W., Du, F. and Wang, X. 2005. Mule/ARF-

BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the poly-ubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**, 1085-1095.

33. Zhu, L., Fukuda, S., Cordis, G., Das, D. K. and Maulik, N.

2001. Anti-apoptotic protein survivin plays a significant role in tubular morphogenesis of human coronary arteriolar endothelial cells by hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* **508**, 369-374.

---

### 초록 : YM155 처리에 의한 두경부 암 AMC-HN4 세포 세포자멸사 유도 효과

장호준<sup>1</sup> · 권택규<sup>2</sup> · 김동은<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>계명대학교 의과대학 이비인후과, <sup>2</sup>계명대학교 의과대학 면역학교실)

두경부암은 전세계에서 발병률이 여섯 번째로 높은 암으로 그동안 수술적 치료를 선호하였으나 광범위한 절제에 따른 기능적 장애로 인해 항암치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 두경부암에서 cisplatin이 가장 많이 사용되는 항암제이나 cisplatin 내성이 문제가 되고 있다. 따라서 부작용은 줄이고, 약제내성 기전에 대해 이해하여 암세포의 사멸을 증대시키는 새로운 항암제의 개발이 필요하다. Survivin은 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family 중 하나로 두경부암에서 과발현되어 있다. YM155는 survivin을 억제하는 분자로 본 연구를 통해 YM155의 처리 후 두경부 암세포의 세포자멸사가 유도되며, 뇌암 세포와 신장암 세포에서도 세포자멸사가 유도됨을 확인할 수 있었다. 반면에 정상세포인 mesangial cells에는 YM155가 세포자멸사에 영향을 주지 않았다. YM155는 caspase의 활성화를 통해 세포자멸사를 촉진하며, anti-apoptotic protein인 c-FLIP, Mcl-1, survivin의 발현을 저해하는 것으로 확인되었다. YM155는 두경부 뿐만 아니라 다른 장기의 악성종양 치료법의 개발에 활용 될 수 있을 것으로 생각된다.