

Anticancer Effects of Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 3 as a Novel Therapeutic Molecule in Lung Cancer and Lung Cancer-derived Stem Cell

Joong-Won Baek* and Pyung-Hwan Kim^{†,**}

Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University, Daejeon 35365, Korea

Lung cancer is one of the cancers with high mortality and incidence rates worldwide. Although, various anticancer research efforts are underway to completely treat cancer, the challenge against it remains in the inability to eliminate cancer stem cells (CSCs), leading to difficulties in curing the cancer and resulting in recurrence. As a result, there is a growing interest in the discovery of new biomarkers and therapeutic molecules that can simultaneously target both cancer cells and CSCs. From this point of view, we focused on fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3), one of the genes known to be present in human lung cells and the discovery from our previous cancer proteomic analysis study. This study aimed to evaluate the potential of FLRT3 as a specific therapeutic biomarker for lung cancer and Lung Cancer-derived-Stem Cells (LCSC). Also, to estimate the biological function of FLRT3 in cancer and LCSC, short hairpin RNA (shRNA) was generated and showed the ability of the decreased-cell migration and cell proliferation of lung cancer through ERK signaling pathway when FLRT3 was knock-downed. In conclusion, our study is the first to report that FLRT3 has the potential as therapeutic biomarker for the treatment of lung cancer and LCSC.

Key Words: Lung cancer, Cancer Stem Cells (CSCs), FLRT3, Biological function, ERK signaling pathway

서 론

폐암은 범세계적으로 많이 발생하고 있으며, 한국에서도 남성에서 발병률 1위, 여성에서 발병률 4위를 차지하고 있어 환자가 많은 질환이다(Barta et al., 2019; Jung et al., 2019). 폐암의 발생 원인에는 흡연, 노화 등 다양한 요인들이 있지만, 특히 최근의 코로나-19 이슈로 인해 코로나 바이러스 감염 환자의 폐암 발병 가능성에 대한 많은 연구 결과가 보고됨에 따라 앞으로의 폐암 발병률과 그로 인한 사망률 또한 더욱 증가할 것으로 사료된다(Calabrò et al., 2021). 때문에 폐암의 진단과 치료를 위한 다양한 연

구가 진행되고 있지만 conventional 치료 및 다양한 암 치료법 적용 후의 5년 내 낮은 생존율(Najafi et al., 2021) 및 암 재발의 원인으로 알려진 암줄기세포까지 완벽히 제거하지 못하기 때문에 항암 치료 후에도 재발이 빈번하다는 점과 폐암의 조기 진단을 위한 새로운 바이오마커 발굴의 부재로 인한 폐암 치료에 대한 한계가 있어 왔다(Eramo et al., 2010; Lundin and Driscoll, 2013).

암줄기세포는 종양을 형성할 수 있는 능력이 있는 줄기 세포로, 종양 내에 1~2% 정도 소수 존재하며 평상시에는 휴지기 상태로 존재하기 때문에 발견이 어렵다. 뿐만 아니라 항암제에 대한 저항성이 크기 때문에 항암제 투약 후에도 완전히 제거되지 않아 암의 재발과 전이의

Received: November 15, 2023 / Revised: December 6, 2023 / Accepted: December 7, 2023

* Graduate student, ** Professor.

† Corresponding author: Pyung-Hwan Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University, 158 Gwanjeodong-Ro, Seo-Gu, Daejeon 35365, Korea.

Tel: +82-42-600-8436, Fax: +82-42-600-8408, e-mail: kimph1010@konyang.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

Table 1. shRNA series sequence

shRNA name	shRNA sequence (5'-3')
shFLRT3 #1	UCAAGUAGCACCCUCAUCA UCUC UGAUAGAGGUGCUACUUGA UU
shFLRT3 #2	CAGAUAAACCACUGCAAUAC UCUC GUAUUGCAGUGGUUAUCUG UU
shFLRT3 #3	CAAUCGAGAGCAAGAGAAA UCUC UUUCUCUUGCUCUCGAUUG UU
shFLRT3 #4	GGAAAUACAGGGAAACUUCU UCUC AGAAGUUUCCUGAUUCC UU
shFLRT3 #5	CAGUGAAAGCAGUAGUAAAC UCUC GUUACUACUGCUUUCACUG UU
shScr	CCUCGUGCCGUUCCAUCAGGUAG UCUC CCUCGUGCCGUUCCAUCAGGUAG UU

주 원인으로 여겨진다(Hardavella et al., 2016; Cojoc et al., 2015; Suresh et al., 2016). 또한, 암의 조기 진단은 향후 환자의 5년 생존율을 70% 이상 증가시킬 수 있다는 보고가 있어 조기 진단의 역할에 대한 중요성이 더욱 대두되고 있으며, 조기 진단 물질을 발굴하는 연구를 통해 암의 조기 치료를 통한 완치 및 이를 이용한 응용연구가 진행되고 있다(Huang et al., 2022).

이에 우리는 우리의 이전 다중 암의 단백질 분석을 통해 동정된 다양한 단백질 중 폐암과 폐암으로부터 유래한 암줄기세포를 동시에 표적으로 하고 폐암의 진단 및 치료 물질로서 작용할 수 있는 새로운 바이오마커 유효 물질인 Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3)를 발굴함과 동시에 이 단백질이 치료 물질로서의 가능성이 있는지를 평가해 보았다.

재료 및 방법

세포 배양

암 세포는 사람 폐암 세포 A549, 사람 간암 세포 Huh7, 사람 유방암 세포 MCF7를, 암줄기세포로는 A549로부터 유래한 폐암 줄기세포 Lung Cancer Stem Cell (LCSC), Huh7로부터 유래한 간암 줄기세포 Liver Cancer Stem Cell (LiCSC), MCF7로부터 유래한 유방암 줄기세포 Breast Cancer Stem Cell (BCSC)를 이용하였다. A549, Huh7, MCF7은 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)로부터 구매하였다. 암 세포주를 배양하기 위한 배지는 1% penicillin-streptomycin (PS) (Hyclone, UT, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, UT, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone, UT, USA)를 이용하였다. 암줄기세포주는 DMEM/F-12 Nutrient Mixture Ham (DMEM/F-12) (Welgene, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea) 배지에 1% PS, 10% FBS, 5 µg/mL insulin (In-

vitrogen, CA, USA), 20 ng/mL EGF (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 20 ng/mL b-FGF (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 1% B27 (Invitrogen, CA, USA)를 첨가하여 6-well ultra-low attachment plates (Corning, NY, USA)에서 14일 동안 배양하였다. 암 세포를 처음 well 당 2×10^4 만큼 seeding 하여 7일 동안 배양한 뒤, sub-culture를 진행하여 총 14일 동안 배양하였다(Koh et al., 2022). 세포들은 모두 CO₂ 농도를 5%로, 온도를 37°C 유지하는 배양기에서 배양하였다.

Transfection

FLRT3의 발현을 조절하기 위해 linear short hairpin RNA (shRNA)와 scrambled shRNA (shScr) (Genolution, Seoul, Korea)을 제작하고, shRNA series를 A549와 LCSC에 transfection 하였다. 세포는 6-well plate에 2×10^5 만큼 배양한 뒤, Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 FBS가 없는 배지에 manufacturer's instructions 대로 수행하였다. 4시간 동안 transfection을 진행한 뒤, FBS가 포함된 배지로 교환해주고 24시간 동안 배양하여 세포 내에서 shRNA가 충분히 발현하도록 하였다. Transfection이 된 세포로부터 RNA를 추출하고 conventional PCR을 진행하여 FLRT3의 발현을 확인하였다. Transfection에 사용된 shRNA series sequence는 Table 1과 같다.

RNA 추출 및 conventional polymerase chain reaction (PCR)

24시간 동안 transfection을 수행한 세포로부터 TRIzol (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였다. Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 RNA 양을 정량하고 2X RT Pre-Mix (Solgent, Daejeon, South Korea)로 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다.

Table 2. Primer sequence

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA
FLRT3	GTAACAGGGGAACHCAGTGA	AAAGGTAACCAGGGCCACAG

그 다음, manufacturer's protocol에 따라 2X Taq PCR Pre-Mix (Solgent, Daejeon, South Korea)를 수행하였다. 합성이 끝난 샘플은 2% 아가로스 겔(Vivantis, Molecular Biology Grade, USA)로 분리한 뒤, chemiluminescence detection system (VilberLourmat, Everhardzell, Germany)으로 이미지를 촬영하였다. PCR을 수행하기 위해 사용한 primer sequence는 Table 2와 같다.

Wound healing scratch assay를 활용한 세포 이동능 확인

각각의 shRNA로 transfection이 된 세포를 24-well plate에 5×10^4 /well 만큼 seeding 하였다. 세포가 plate의 80% 정도 자라도록 배양한 뒤, 200 μ L 멸균된 파이펫 팁을 이용하여 일정하게 스크래치를 내었다. 스크래치를 낸 0시간 후와 12시간 후의 사진을 현미경(Nikon eclipse Ts2R)을 이용하여 촬영한 후, 0시간과 12시간에서의 세포 이동 정도를 Image J 프로그램(National Institute of Health, USA)으로 정량하여 분석하였다.

MTT assay를 활용한 세포 증식능 확인

앞선 내용과 동일하게 transfection을 진행한 후, 96-well plate에 8×10^3 /well 만큼 세포를 seeding 한 뒤, 시간 조건(0, 24, 48, 72시간)에 맞게 배양하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reagent; Sigma, UK)를 well 당 100 μ L (2 mg/mL)로 4시간 동안 처리한 뒤 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ L에 20분 동안 녹였다. 그 후 microplate reader (Versamax microplate reader, Associates of cape cod incorporated, MA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0시간의 흡광도 결과를 기준으로 세포 증식 정도를 비교하였다.

단백질 검출 Western Blot 분석

shRNA를 이용하여 FLRT3의 발현을 조절한 세포에서 EzRIPA Lysis Kit (RIPA buffer and inhibitors) (DAWINBIO Inc, Gyeonggido, Koera)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA protein assay reagent (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 20 μ g으로 정량한 뒤, 10% sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane (Milipore Co., NA, USA)으로 이동시킨 후, 5% 탈지 분유와 0.1% Tween 20을 함유한 TBS-T를 사용하여 1시간 동안 블로킹을 수행하였다. 이후, 1차 항체 p-ERK (1:1,000) (sc-7383, Santa Cruz., CA, USA)와 β -actin (1:1,000) (sc-4778, Santa Cruz., CA, USA)을 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. TBS-T로 membrane을 10분 동안 3번 세척한 후, horseradish peroxidase (HRP)와 결합한 2차 항체 (1:10,000) (31430, Invitrogen, CARLSBAD, CA)를 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 chemiluminescent ECL reagent (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질을 검출하였고 Image J 프로그램을 이용하여 농도를 분석하였다.

통계 분석

SPSS (SPSS Inc., IL, USA)를 이용한 one-way ANOVA를 실시하여 집단 간의 차이를 살펴보았다. 유의 수준은 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 로 하였다.

결 과

다양한 세포에서의 FLRT3의 발현 확인

폐에 존재한다고 알려진 FLRT3 (Chen et al., 2009)가 실제 폐암에서 특이적으로 발현하는지 확인하기 위해 여러 종류의 암 세포 및 그로부터 유래한 암줄기세포(LCSC)로부터 FLRT3의 발현을 비교하였다(Fig. 1). 사람 암 세포 A549, Huh7, MCF7과 각 암으로부터 유래된 암줄기세포 LCSC, LiCSC, BCSC로부터 RNA를 추출하고 conventional PCR을 수행하여 FLRT3의 발현을 확인한 결과, A549와 LCSC에서 다른 세포들에 비해 FLRT3가 높게 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며(Fig. 1A), 이의 정량 그래프(Fig. 1B)에서도 동일한 경향이 확인되었다. 이는 FLRT3가 실제 폐암을 위한 표적물질로서의 가능성이 있음을 시사한다.

FLRT3의 발현을 효과적으로 조절할 수 있는 shRNA 제작 및 선정

폐암 세포와 폐암유래 암줄기세포에서 FLRT3의 발현

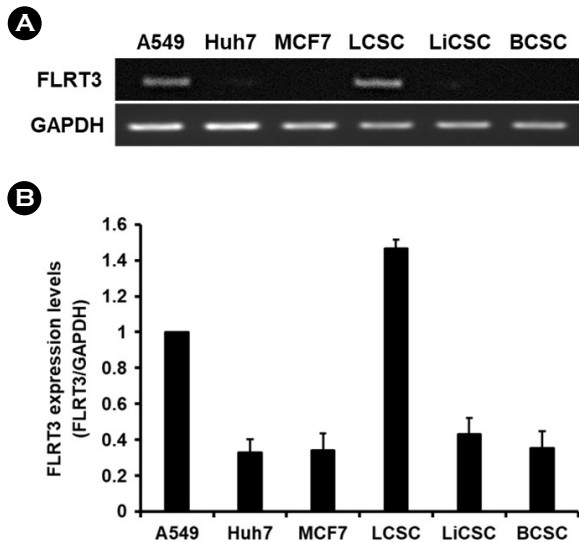


Fig. 1. The confirmation of FLRT3 expression in various cell lines and cancer stem cells. RNA was extracted from human cancer cell lines and cancer stem cell lines, followed by cDNA synthesis, and PCR was conducted to verify the expression of FLRT3. (A) The results of FLRT3 expression by PCR. (B) The quantified data of the expressed FLRT3. FLRT3 from each cell was quantified relative to GAPDH expression.

조절이 암의 생물학적 기능에 미치는 영향을 평가하기 위해 FLRT3의 발현을 하향 조절할 수 있는 shRNA series를 제작하였다. 제작된 shRNA series를 세포에 24시간 동안 transfection 시킨 후 FLRT3의 발현을 확인하였다(Fig. 2). 처리된 shRNA series 중 폐암세포인 A549에서는 shFLRT3 #3과 shFLRT3 #5가(Fig. 2A), 폐암유래 암줄기세포인 LCSC에서는 shFLRT3 #1과 shFLRT3 #3가 FLRT3 발현을 억제하는 효과가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 따라서, shFLRT3 #3(이하 shFLRT3)가 두 암세포에서 FLRT3의 발현을 억제하는 효과가 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었으며, 앞으로의 실험은 모두 이 shFLRT3을 처리하여 생물학적 기능 평가를 수행하였다.

폐암과 암줄기세포에서의 shRNA FLRT3에 의한 감소된 세포 이동능과 증식능의 변화

shFLRT3를 이용하여 A549와 LCSC에서 FLRT3 발현 감소를 유도한 뒤, 세포의 생물학적 기능 변화를 평가하였다. 암의 주요 생물학적 특징으로는 세포 이동능과 세포 증식능을 들 수 있다(Shiga et al., 2015). 암에서 세포 이동능은 암 세포의 다른 조직이나 장기로의 이동을 초래하여 다른 부위로의 전이를 가능하게 할 뿐만 아니라 (Krakhmal et al., 2015), 암 세포 증식은 다양한 세포주기 활성화에 관련된 단백질들의 생산을 유도하여 빠른 세포 성장을 유도함으로써 증가된 세포 증식을 나타낸다(Schilero

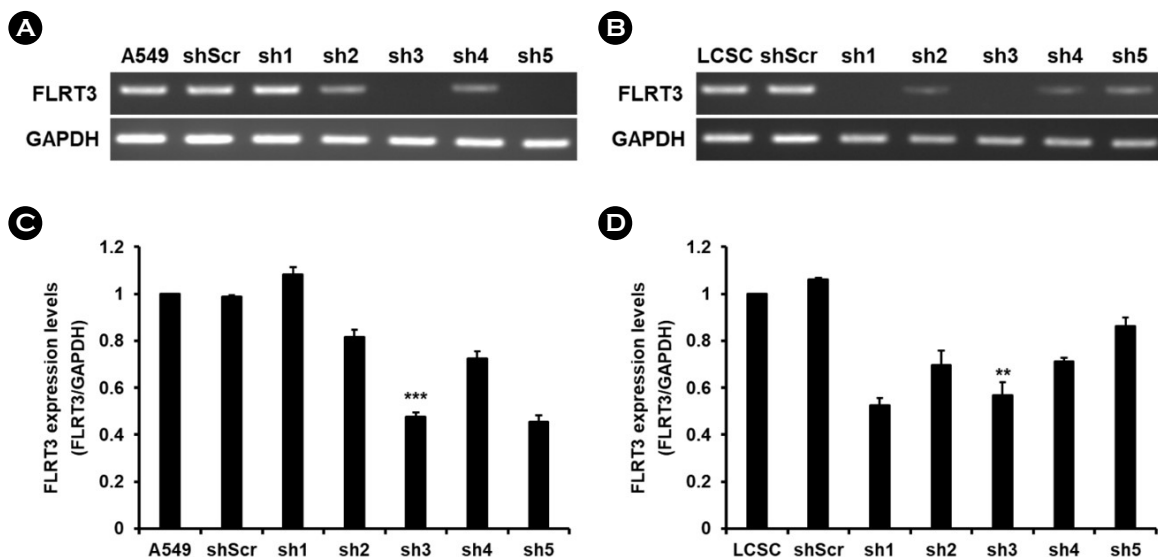


Fig. 2. Selection of the most effective shRNA for regulating FLRT3 expression. (A-B) Optimal shRNA decision for FLRT3 gene knockdown in transcriptomic level of cancer and cancer stem cells, respectively. (C-D) The quantitative analysis of FLRT3 expression in cancer and cancer stem cell. Data shown represent the mean \pm SD (n=3). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ compared with shScr.

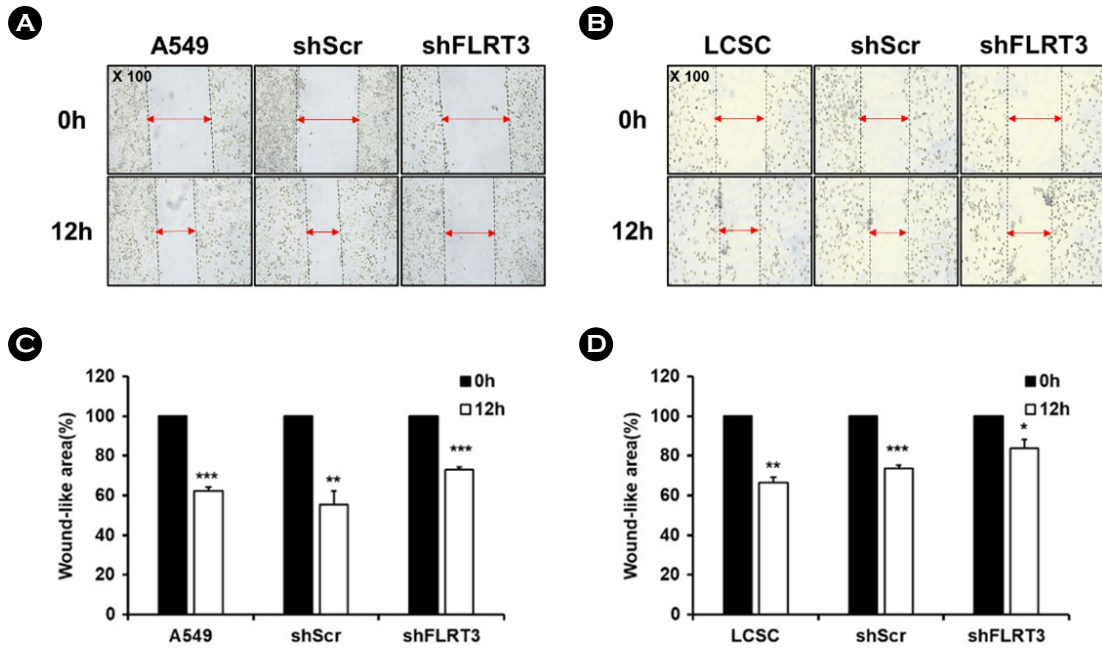


Fig. 3. Decreased cell migration ability by shFLRT3 treatment in cancer and cancer stem cell. To investigate the impact of reduced FLRT3 expression on cell migration ability, a wound healing assay was conducted. (A-B) Bright image of the migrated cell. (C-D) The calculated space by image J at 0 and 12 hrs. Data shown represent the mean \pm SD (n=3). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, and * $P < 0.05$ compared with 0 h.

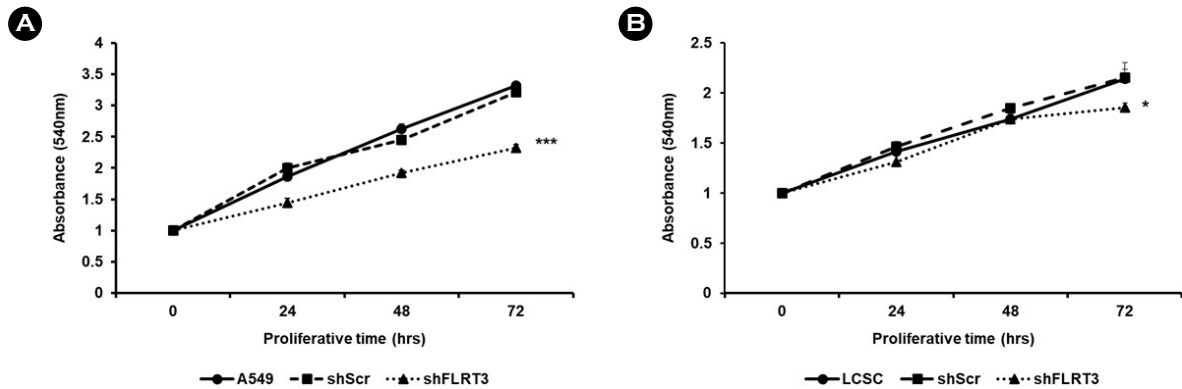


Fig. 4. Decreased cell proliferation ability by the downregulation of FLRT3. (A) Lung cancer and (B) Lung cancer-derived stem cell. Data shown represent the mean \pm SD (n=3). *** $P < 0.001$, and * $P < 0.05$ compared with 0 h.

and Firestein, 2021).

먼저, 우리는 shFLRT3가 처리되었을 때의 세포 이동능을 확인하기 위하여 wound healing assay를 진행하였다 (Fig. 3). Short hairpin FLRT3 (shFLRT3)가 처리된 세포를 24-well plate에 seeding 한 뒤, 200 μ L 멸균된 파이펫 팁을 이용하여 균일하게 스크래치를 내었다. 이후, 0시간과 12시간 뒤의 세포 이동 정도를 현미경으로 사진 촬영하였고 (Fig. 3A-B) Image J 프로그램을 이용하여 정량한 그래

프 (Fig. 3C-D)로 재차 확인하였다. Fig. 3의 결과에서 볼 수 있듯이, A549와 LCSC에서 모두 12시간째의 결과에서 각각의 세포에 shFLRT3가 처리되었을 때 0시간째의 결과에 비해 세포 이동 정도가 크게 감소한 것을 관찰할 수 있었다.

다음으로는, FLRT3가 세포들의 증식에 있어 어떠한 영향을 미치는지를 평가하기 위하여 shFLRT3가 처리된 각각의 세포를 96-well plate에 seeding 한 뒤, 정해진 시간

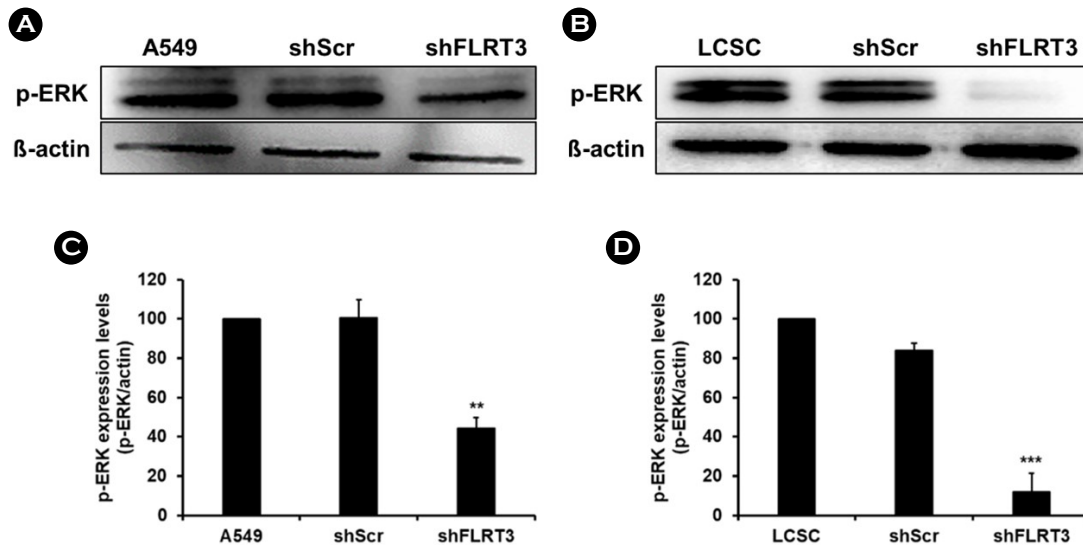


Fig. 5. The change of ERK signaling pathway by shFLRT3 treatment. (A-B) The expression of p-ERK protein in shFLRT3-treated cancer and cancer stem cell, respectively. (C-D) The quantification of p-ERK protein expression. Data shown represent the mean \pm SD (n=3). *** $P < 0.001$, and ** $P < 0.01$ compared with shScr.

조건에 맞춰 MTT assay를 진행하여 세포 증식능을 평가해 보았다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 것처럼, A549 only와 LCSC only는 시간 의존적으로 세포 증식이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고 이러한 경향은 shScr이 처리된 세포들에서도 유사한 결과를 보였다. 하지만, shRNA로 FLRT3의 발현을 감소시킨 A549와 LCSC에서 다른 그룹들에 비해 감소된 세포 증식능을 보임을 확인할 수 있었다.

이를 통해 FLRT3의 저발현 유도는 폐암과 폐암유래 줄기세포의 생물학적 기능을 감소시킨다는 사실을 확인하였다.

ERK signaling pathway를 통한 FLRT3의 생물학적 기능 조절 기전

다음으로는 앞선 FLRT3의 저발현 유도를 통한 생물학적 기능들이 세포의 어떤 신호기전에 영향을 받는지를 확인해 보고자 shRNA가 처리된 세포들에서의 세포 신호 전달 체계를 평가해 보았다.

암세포의 대표적 활성화된 신호 전달 경로인 extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway는 세포 간 또는 세포 내 신호 전달에 관여하며, 세포의 다양한 기능을 조절하는 중요한 신호 전달 체계로 알려져 있다(Ullah et al., 2022). 특히 ERK signaling pathway에 의한 세포 이동과 증식, 세포 사멸의 연관성에 대해서는 이미 많은 연구가 되어 있다(Degimenci et al., 2020; Ren et al.,

2019). 따라서, 우리는 앞선 생물학적 기능 평가에서 FLRT3의 발현 조절이 세포 이동과 증식에 영향을 줄 수 있음을 확인하였고, 이것이 ERK 신호 전달 기전을 통해 조절이 가능한지에 대해 western blot 분석을 이용하여 protein level에서 확인해 보았다.

Fig. 5에서 관찰할 수 있듯이, shFLRT3가 처리된 A549와 LCSC는 다른 그룹들과는 달리 p-ERK 단백질의 감소된 발현을 유도하였으며, 이는 FLRT3의 저발현은 낮은 ERK signaling pathway의 활성을 유도한다는 것을 의미하며, 이는 곧 세포의 감소된 세포 이동 및 증식능을 초래한다는 것을 의미하며, ERK 신호 전달 기전을 통해 생물학적 기능 변화를 초래한다는 것을 나타낸다.

고 찰

난치성 질병 중 암에 의한 사망률은 아직까지 1위로 나타나고 있으며, 이중 폐암은 초기 진단에 의한 치료효과가 높으나 3기로 접어들면서 치료제가 없고, 최근 코로나-19 감염병 이슈로 인해 앞으로의 폐질환을 포함한 폐암 환자는 꾸준히 증가할 것으로 예측된다(Barta et al., 2019). 따라서 폐암에 대한 관심이 높아지고 폐암 치료에 대한 다양한 전략적 접근으로 많은 치료연구 및 연구가 진행 중에 있다(Sharma et al., 2019). 그러나, 항암 치료 후 종양 내에 소수 잔재하는 암줄기세포까지 완전히 제거하

지 못하여 잔존하는 암줄기세포로 인해 암의 재발과 다른 장기나 조직으로의 전이를 해결하지 못하는 한계가 여전히 남아있다(Hardavella et al., 2016; Cojoc et al., 2015; Suresh et al., 2016). 또한, 폐암의 조기 진단은 초기 종양의 발견을 가능하게 하고, 적절한 치료를 실시할 수 있어 향후 환자의 5년 생존율을 크게 증가시킬 수 있다. 뿐만 아니라 조기 진단을 한 환자의 항암 치료 후 예후가 더 좋기 때문에 조기 진단은 중요성이 대두되고 있다(Huang et al., 2022). 본 연구는 이러한 기존의 항암 치료의 한계를 극복하고 항암 치료의 새로운 전략을 제시하기 위해 폐암 세포 특이적으로 존재하여 폐암의 조기 진단 물질로서의 가능성이 높으며, 폐암유래 암줄기세포까지 표적으로 할 수 있는 신규 바이오마커를 발굴하고자 하였다.

Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3)는 FLRT 단백질 계열의 구성 단백질로 알려져 있으며, 신장, 뇌, 척장, 폐에 존재하며 세포 접착 및 수용체에서 신호 전달과 관련한 기능을 하는 유전자로 알려져 있다. 같은 FLRT 단백질 계열의 구성 단백질인 FLRT2의 암에 대한 기능은 연구되어 있으나 FLRT3와 암에 대한 연구는 보고된 바가 없다(Chen et al., 2009; Lacy et al., 1999, Guo et al., 2020). 따라서 FLRT3의 실제 폐암 세포와 폐암유래 암줄기세포에서의 특이적 발현을 확인하고 폐암 진단 및 치료 물질로서 작용 가능성을 평가한 연구는 우리 연구가 최초이다.

여러 종의 암 세포와 그로부터 유래한 암줄기세포에서의 FLRT3의 발현 확인을 통해 본 FLRT3 단백질이 폐암 특이적으로 발현된다는 것을 입증하였고(Fig. 1), 이를 통해 FLRT3의 폐암에서의 생물학적 기능 검증 실험을 수행하였다. 이는 추후 임상 적용을 위한 폐암 특이적 진단 마커로서의 가능성이 높음을 시사한다. 더욱이, 폐암뿐만 아니라 폐암유래 암줄기세포에 대한 이전 연구들에서 보고가 없었던 암줄기세포에서의 생물학적 기능 평가를 통해 FLRT3가 실질적으로 폐암에서 작용될 수 있는 특이적 진단 물질이라는 것을 추가적으로 입증하였다. 제작된 shRNA FLRT3 처리 세포들의 생물학적 평가인 세포 이동능, 세포 증식능 결과를 보았을 때 이는 진단마커로서의 가능성뿐만 아니라 치료 후보 물질로서도 가능성 있음이 Fig. 3과 4를 통해 입증되었다. 이러한 결과를 나타내는 원인으로 FLRT3가 세포 증식에 관련되어 있는 ERK pathway를 활성화시키는지를 평가해 보았고, Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 FLRT3의 발현 변화가 암의 생물학적 기능과 관련이 깊은 ERK 신호 전달 체계를 타겟으로

p-ERK 단백질의 발현을 감소시킴으로써 생물학적 기능을 조절하는 기전으로 증명하였다.

본 연구 결과를 종합해 보았을 때, FLRT3는 폐암 특이적으로 발현하는 물질로 폐암의 조기 진단이 가능하며, 폐암유래 암줄기세포에서도 발현하여 암줄기세포를 표적으로 하지 못하는 기존의 항암 치료의 한계를 극복할 수 있는 표적 물질로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, FLRT3의 발현 조절이 폐암 세포와 폐암유래 암줄기세포의 이동능과 증식능을 ERK 신호 전달 체계를 통해 감소시킬 수 있음을 세계 최초로 연구하였으며, 이를 통해 FLRT3는 폐암 특이 표적 물질로서의 가능성뿐만 아니라 치료 물질로서도 작용할 수 있음을 의미한다. 따라서 FLRT3 바이오마커의 활용은 신규 항암 치료제의 개발 및 진단 물질로서의 가치를 입증하여 폐암 치료의 새로운 전략적 접근으로 활용될 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGEMENT

Following are results of a study on the "Leaders in Industry-university Cooperation 3.0" Project and Basic Science Research Program (2020R1F1A1053663) supported by the Ministry of Education and National Research Foundation of Korea.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*. 2019. 85.
- Calabrò L, Rossi G, Covre A, Morra A, Maio M. COVID and lung cancer. *Current Oncology Reports*. 2021. 23: 1-10.
- Chen X, Koh E, Yoder M, Gumbiner BM. A protocadherin-cadherin-FLRT3 complex controls cell adhesion and morphogenesis. *PloS One*. 2009. 4: e8411.
- Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. Paper presented at the Seminars in Cancer Biology. 2015. 31: 16-27.
- Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. *Cells*. 2020. 9: 198.
- Eramo A, Haas TL, De Maria R. Lung cancer stem cells: Tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene*. 2010. 29: 4625-4635.

- Guo X, Song C, Fang L, Li M, Yue L, Sun Q. FLRT2 functions as tumor suppressor gene inactivated by promoter methylation in colorectal cancer. *Journal of Cancer*. 2020. 11: 7329.
- Hardavella G, George R, Sethi T. Lung cancer stem cells—characteristics, phenotype. *Translational Lung Cancer Research*. 2016. 5: 272.
- Huang J, Ngai CH, Deng Y, Tin MS, Lok V, Zhang L, Yuan J, Xu W, Zheng Z-J, Wong MC. Cancer incidence and mortality in asian countries: A trend analysis. *Cancer Control*. 2022. 29: 10732748221095955.
- Jung K, Won Y, Kong H, Lee ES. Cancer statistics in korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2016. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*. 2019. 51: 417-430.
- Koh E, Kim K, Park H, Kim J, Kim P. Active targeting of versatile nanocomplex using the novel biomarker of breast cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 24: 685.
- Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM. Cancer invasion: Patterns and mechanisms. *Acta Naturae*. 2015. 7: 17-28.
- Lacy SE, Bönnemann CG, Buzney EA, Kunkel LM. Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: A novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins. *Genomics*. 1999. 62: 417-426.
- Lundin A, Driscoll B. Lung cancer stem cells: Progress and prospects. *Cancer Letters*. 2013. 338: 89-93.
- Najafi M, Majidpoor J, Toolee H, Mortezaee K. The current knowledge concerning solid cancer and therapy. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2021. 35: e22900.
- Ren M, Xu W, Xu T. Salidroside represses proliferation, migration and invasion of human lung cancer cells through AKT and MEK/ERK signal pathway. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019. 47: 1014-1021.
- Schiliro C, Firestein BL. Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells*. 2021. 10: 1056.
- Sharma P, Mehta M, Dhanjal DS, Kaur S, Gupta G, Singh H, Thangavelu L, Rajeshkumar S, Tambuwala M, Bakshi HA. Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2019. 309: 108720.
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*. 2015. 7: 2443-2458.
- Suresh R, Ali S, Ahmad A, Philip PA, Sarkar FH. The role of cancer stem cells in recurrent and drug-resistant lung cancer. *Lung Cancer and Personalized Medicine: Novel Therapies and Clinical Management*. 2016. 57-74.
- Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. Paper presented at the Seminars in Cancer Biology. 2022. 85: 123-154.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.4.336>

Cite this article as: Baek JW, Kim PH. Anticancer Effects of Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 3 as a Novel Therapeutic Molecule in Lung Cancer and Lung Cancer-derived Stem Cell. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 336-343.