

## 다제내성 조절제의 탐색

김세은 · 이정준  
KIST 생명공학연구소

화학요법은 외과적 수술 및 방사선 요법과 함께 암 치료의 주요 방법으로 자리잡고 있다. 그러나, 화학요법은 백혈병, sarcoma, choriocarcinoma, testicular cancer 등에 대하여는 우수한 치료효과를 보이거나 대부분의 전이암과 재발한 암에 대하여서는 항암제에 대한 암세포의 내성 발현으로 실패하는 경우가 많다. 특히 다제내성(Multidrug-resistance, MDR)은 암세포가 구조와 작용기전이 상이한 여러 항암제에 대하여 교차내성을 나타내는 것으로 화학요법의 가장 큰 장애가 되고 있다. 다제내성은 화학요법 중에 암세포가 항암제에 대하여 내성을 획득하여 생기기도 하지만 (acquired resistance), 대장암, 간암 및 폐암과 같은 특정 조직 유래의 암은 항암제에 대한 노출이 없어도 암 초기부터 다제내성을 발현하기도 한다 (intrinsic resistance). 다제내성은 anthracyclines (doxorubicin, daunorubicin), Vinca alkaloids (vinblastine, vincristine), etoposide 및 taxol 등 주로 천연물 유래의 지용성 항암제에 대하여 나타나며, alkylating agents (cyclophosphamide), antimetabolites (5-fluorouracil, methotrexate) 및 cisplatin 등 수용성 항암제에 대하여서는 나타나지 않는다. 다제내성 약물 (MDR drug)은 구조와 기능면에서 다양하나 모두 지용성이 강한 amphipathic compound라는 공통점이 있다(1).

### 다제내성의 기전

다제내성 세포 (MDR cell)는 세포내 항암제의 농도가 감소되어 있고 세포막에서 감수성 친세포주에서는 발현되지 않는 고분자량의 당단백질 (P-glycoprotein, P-gp)이 과잉발현되어 있는 것이 발견되었다(2). 이 P-gp의 발현 정도와 세포내 항암제 농도 감소 및 내성도는 직접 비례하는 것으로 알려져 있다 (3). Mouse, hamster 및 인체로부터 P-gp의 유전자인 *mdr* cDNA가 cloning되었으며, 감수성 세포에 *mdr* cDNA를 transfection 시켜 얻은 transfectant는 MDR phenotype을 나타내며 항암제의 배출이 증가되는 것이 밝혀졌다(4,5). P-gp는 분자량 170 kDa 정도이고 12 transmembrane domain을 가진 막단백질로 2개의 ATP 결합부위를 갖고 있는 ABC (ATP binding cassette) 단백질로 분석되었다 (Fig. 1). P-gp는 그 자체가 ATPase 활성을 갖고 있으며 ATP 에너지를 이용하여 약

물을 세포밖으로 배출하는 efflux pump로서 작용하며 그 결과 세포내 항암제 농도가 감소하여 내성을 나타내게 된다. 최근에는 P-gp가 약물을 세포밖으로 배출할 뿐만 아니라 세포막에서 수동확산에 의하여 흡수되는 약물을 직접 제거함으로써 약물의 흡수도 감소시킨다는 hydrophobic vacuum cleaner로서의 작용 model이 제안되었다(6, Fig. 2).

P-gp의 과잉발현 이외에도 감수성 세포와는 다른 많은 생화학적 변화들이 다제내성 세포로부터 발견되었다. 이러한 변화는 P-gp를 발현하는 세포에서 동시에 발견되는 경우가 많으므로 독립적인 내성의 기전으로 규명하기에는 문제점이 있는 경우가 많다. 대표적인 nonP-gp 다제내성 기전으로 topoisomerase II의 변화와 glutathione-S-transferase(특히  $\pi$  type)의 과잉발현이 각각 alkylating agents와 DNA intercalating agents를 포함한 많은 항암제에 대하여 낮은 내성도를 나타내는 것으로 알려져 있다(7,8). 최근에는 또 다른 transport protein (MRP) 이 다제내성 세포에서 과잉발현되며 P-gp와 마찬가지로 efflux pump로서 작용하는 것이 보고되었다(9).

### 다제내성 조절 활성 측정법

다제내성의 기전 및 다제내성 조절 활성에 대한 연구는 주로 mouse, hamster 및 인체 암세포를 특정 항암제의 농도를 점차 증가시키면서 배양하여 얻은 다제내성 세포주 (MDR cell line)를 이용하여 이루어지고 있다. 다제내성 세포주는 형태와 물리화학적 특징에 있어서 감수성 세포주와는 구별되며 선별

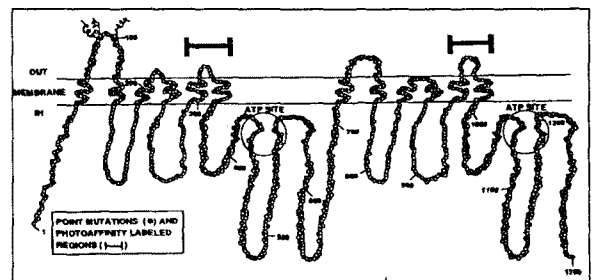


Fig. 1. A model of structure of human P-gp derived from sequence analysis.

항암제와 관계없이 앞에서 열거된 다제내성 약물들에 대하여 수배에서 수천배까지의 내성을 나타낸다. 이와 같은 방법으로 얻어진 다제내성 세포주는 주로 P-gp이 과잉 발현되어 있으며 glutathione-S-transferase의 발현 등이 동시에 변화되어 있는 경우도 있다(10). 한편 P-gp 유전자인 *mdr1* 유전자 또는 glutathione-S-transferase 유전자를 암세포에 transfection 시킨 세포주를 이용할 수도 있다. 실험실에서 많이 사용되고 있는 다제내성 세포주 및 그 특징은 Table 1과 같다.

다제내성 세포의 내성도 (relative resistance, R.R.)는 내성 세포와 감수성 세포에 대하여 각 항암제의 세포독성을 측정하여 다음 식으로부터 구할 수 있다.

$$R.R. = \frac{IC_{50} \text{ of MDR cells}}{IC_{50} \text{ of sensitive cells}}$$

다제내성 조절 활성은 시료에 의하여 다제내성 세포에 대한 항암제의 독성이 증가하는 것을 측정함으로써 검색할 수 있다. 세포독성은 SRB (sulforhodamine B) assay 또는 tetrazolium (MTT 또는 XTT) assay를 사용하고 있다(11,12). 몇 단위로 희석한 시료에 대하여 시료 자체의 세포독성을 측정하고 동시에 내성을 나타내는 일정 농도의 항암제를 함께 처리하였을 때의 세포독성과 비교하여, 시료 자체의 독성은 나타내지 않는 농도에서 항암제의 세포독성을 증가시키는 것으로부터

활성을 판정할 수 있다.

순수한 화합물의 다제내성 조절 효과는 세포를 단계적으로 희석한 각 항암제와 IC<sub>10</sub> 이하의 농도의 화합물을 함께 처리한 후 각 항암제에 대한 IC<sub>50</sub>를 대조군과 비교함으로써 얻을 수 있다(10). 다제내성 조절제의 내성극복도 (fold reversal, F.R.)는 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$F.R. = \frac{IC_{50} \text{ of (anticancerdrug + compound)}}{IC_{50} \text{ of anticancer drug}}$$

다제내성 조절제의 *in vivo* 효과는 *in vitro*에서 유도된 내성 암을 마우스 복강내 이식하여 내성을 나타내는 농도의 항암제와 화합물을 동시에 처리하였을 때의 생존률의 증가 정도로 측정할 수 있다(1). 최근에는 *mdr1* 유전자를 이식한 골수세포를 가진 transgenic 마우스를 이용한 모델도 이용되고 있다(13).

### 다제내성조절제

다제내성 조절제 (MDR reversing agents, chemosensitizers)는 그 자체는 항암활성이 없지만, 항암제와 함께 처리하였을 때 감수성 세포에 대한 각 항암제의 세포독성에는 거의 영향을 미치지 않고 내성 세포에 대하여는 각 항암제의 세포독성을 현저히 증가시켜서 다제내성을 부분적으로 또는 완전히 극복하는 물질을 말한다. Table 2는 *in vitro*와 *in vivo*에서 다제내성 조절 활성을 나타내는 대표적인 화합물을 몇 개의 그룹으로 분류하여 나타낸 것이다. 이들은 대부분 다른 용도로 쓰이고 있는 기존의 약물들로서 다제내성 조절 활성과 원래의 용도와 관련된 약리학 효과(calcium channel 억제, 면역 억제 등)와는 관련 없는 것으로 밝혀졌다(14,15). 이 약물들은 주로 P-gp에 결합하여 P-gp에 의한 항암제 배출을 경쟁적으로 차단하여 세포내 항암제 농도를 증가시킨다고 알려졌다(16). 구조와 활성에 관한 연구로부터 cyclosporin을 제외한 대부분의 화합물에 있어서 cationic charge, 3급 amine group, 지용성의 conjugated ring 등의 구조가 활성에 중요한 것으로 제안되었다(16).

Verapamil을 비롯한 calcium channel 억제제는 그 효과와 작용

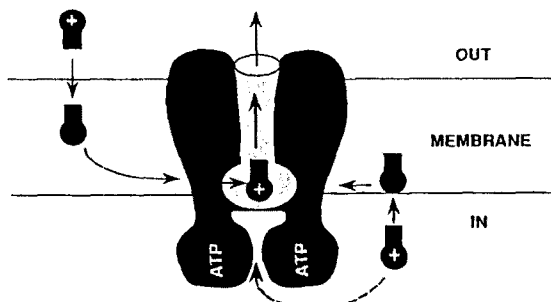


Fig. 2. A possible mechanism of action for P-gp as drug transporter.

Table 1. MDR cell lines in laboratory use

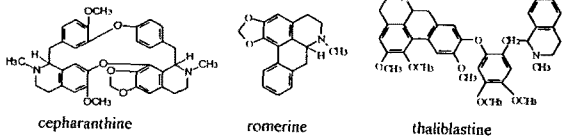
Parent sensitive cell	MDR cell	Characteristics
P-388(murine leukemia cell)	P-388/ADR, P-388/VCR P-388/VMDRC.04	selected with dioxorubicin selected with vincristine transfected with <i>mdr1</i> cDNA
KB(human oral epidermoid cell)	KB-V1 KB-C4	selected with vinblastine selected with colchicine
MCF7(human breast cancer)	MCF7/ADR	selected with adriamycin, overexpressed with P-gp and GST $\pi$
HT29(human colon cancer)	HT-29R	transfected with <i>mdr1</i> gene
K-562(human myeloblastoma)	K-562/ADM	selected with adriamycin
SKOV3(human ovarian carcinoma)	SKVLB1	selected with vinblastine
DC-3F(Chinese hamster lung cell)	DC-3F/VCRd-5L	selected with vincristine

**Table 2.** Drugs with ability to reverse MDR *in vitro*<sup>a</sup>

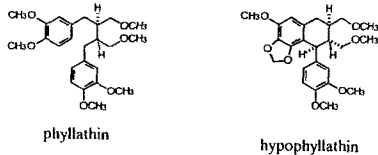
Calcium channel blockers	Calmodium inhibitors	Steroids	Hydrophobic cationic compounds	Cyclosporins
Verapamil (6.6~10.0 $\mu$ M)	Fluphenazine (3.0 $\mu$ M)	Tamoxifene (10 $\mu$ M)	Reserpine	Cyclosporine (1 $\mu$ g/ml)
Diltiazem (20~35 $\mu$ M)	Trifluoperazine (3.3~4 $\mu$ M)	Toremifene (10 $\mu$ M)	Dipyridamole	SDZ PSC-833
Nifedipine (3.0 $\mu$ M)	Transflupenthixol (5 $\mu$ M)	Megasterol acetate (5 $\mu$ M)	quinine	(0.02~0.03 $\mu$ M)
Nicardipine (3.0 $\mu$ M)				
Bepridil (4 $\mu$ M)				

<sup>a</sup>Number in parentheses indicate the concentration shown significantly to reverse MDR in the cell lines used in the referenced experiments.

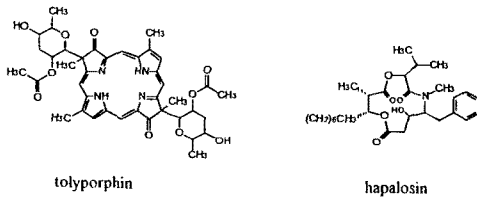
## Alkaloids:



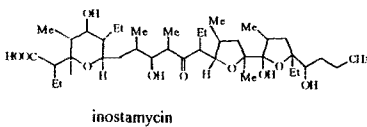
## Lignans:



## Cyclic peptides:



## Polyether compounds

**Fig. 3.** Compounds derived from natural products with MDR reversing activity.

기전에 관하여 가장 광범위하게 연구된 화합물이다. 그러나 verapamil은 임상 시험에서 다제내성 극복에 필요한 혈장 농도에서 저혈압, 부정맥 등 심혈관계에 심각한 독성을 일으키는 것이 보고되어 임상적으로 사용할 수 없는 문제점이 제기되었다(17). 면역 억제제로 잘 알려진 cyclosporin은 *in vivo* 시험 및 임상 시험에서 가장 성공적인 다제내성 조절 작용을 나타내었다(18). 그러나 정상세포에서도 항암제의 독성을 증가시키는 작용을 나타내는 점과 장기적 투여시 신독성이 문제가 되고 있다(19).

## 천연물로부터 분리된 다제내성 조절제

생물산업

다제내성 조절 작용을 갖는 기존의 약물들은 대부분 효과가 부분적이거나 인체에 대한 독성때문에 사용에 있어서는 많은 제한이 따르고 있다. 따라서 독성이 적고 효과가 강력한 새로운 타입의 다제내성 조절제 개발의 필요성이 제기되었으며, 천연물은 새로운 구조의 약물 및 lead compound를 제공하는 중요한 자원으로 인식되고 있다. 식물로부터 유래된 indole alkaloids (reserpine, yohimbine, physostigmine) 및 quinoline alkaloids (quinine, quinine, cinchonidine)가 내성 세포에 대한 항암제의 독성을 증가시키는 것이 밝혀진 이래 많은 alkaloid들이 식물로부터 분리되었으며 그 유도체가 합성되었다. 최근에는 식물, 미생물 및 해양생물로부터 위에서 열거된 전형적인 다제내성 조절제와는 다른 다양한 구조의 다제내성 조절 물질이 분리 보고되고 있으며 이들의 활성화와 작용기전에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Fig. 3은 천연물로부터 다제내성 조절 활성의 탐색 방법에 의하여 분리된 대표적인 화합물들의 구조를 보여주고 있다.

## 새로운 탐색 접근법

지금까지의 다제내성의 기전 및 다제내성 조절제에 대한 연구는 주로 P-gp에 중점을 두었으며 세포 수준에서 내성 조절 활성을 측정하는 것이 중심이 되어 왔다. 최근에 순수 분리된 P-gp에 대한 연구로부터 P-gp ATPase 활성 촉진제는 P-gp에 의해 세포 밖으로 배출되는 기질로서 작용하며 세포막에서 항암제의 수송을 억제하는 것이 밝혀졌다(20). 한편 P-gp의 작용기전과 활성 조절 과정에 대한 생화학적 및 분자생물학적 연구 결과로부터 각 단계에 특이적으로 작용하는 물질을 검색할 수 있는 기반이 마련되었다. 예를 들면 P-gp의 활성을 조절하는 protein kinase A 및 C와 mdr RNA level을 유지하는데 필요한 cAMP-dependent protein kinase는 좋은 target이 되고 있다(21,22).

## 참고문헌

- Lum, B. L., M. P. Gosland, S. Kaubisch, and B. I. Sikic. 1993. Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* 13, 88-109.
- Kartner, N., J. R. Riordan, and V. Ling. 1983. Cell surface

- P-glycoprotein is associated with multidrug resistance in mammalian cell lines *Science (Washington DC)* **221**, 1285-1288.
3. Riordan, J. R. and V. Ling. 1985. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance *Pharmacol. Ther.* **28**, 51-75.
  4. Gros, P., B. Y. Neriah, J. M. Croop. and D. E. Housman. 1986. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature (Lond.)* **323**, 728-731.
  5. Gros, P., J. Croop. and D. Housman. 1986. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins *Cell* **47**, 371-380.
  5. Gottesman, M. M. and I. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385-425.
  7. Saburi, Y., M. Nakagawa, M. Ono, M. Sakai, M. Muramatsu, K. Kohno. and M. Kuwanl. 1989. Increased expression of glutathione S-transferase gene in *cis*-diamminedichloro-platinum (II)-resistant variants of a Chinese hamster ovary cell line *Cancer Res.* **49**, 7020-7025.
  3. Charcosset, J. Y., J. M. Saucier. and S. A. Jacquemin. 1988. A reduced DNA topoisomerase II activity and drug-stimulated DNA cleavage in (-)-hydroxyellepticine resistant cells. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 2145-2149.
  9. Zaman, G. J. R., M. J. Flens, M. R. Leusden, M. De Hass, H. S. Mulder, J. Lankelma, H. M. Pinedo, R. J. Schper, F. Bass, H. J. Broxterman. and P. Borst, P. 1994. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acade. Sci. USA.* **91**, 8822-8826
  10. Fairchild, C. R., S. P. Ivy, C. Kao-Sham, P. J. Whang, M. Rosen, M. A. Israel, P. W. Melera, K. H. Cowan. and M. M. Gottesman, 1987. Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from Adriamycin-resistant human breast cancer cells *Cancer Res.* **47**, 5141-5148.
  11. Skeham, P., R. Streng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, H. Kenny. and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **82**, 1107-1102.
  12. Alley, M., D. A. Scudiero, A. Monks. and M. R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601.
  13. Mickisch, G. H., T. Licht, G. T. Merlino, M. M. Gottesman. and I. Pastan. 1991. Chemotherapy and chemosensitization of transgenic mice which express the human multidrug resistance gene in bone marrow: efficacy, potency and toxicity. *Cancer Res.* **51**, 5417-5424.
  14. Kessel, D. and C. Wilberding, C. 1985. Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists. *Cancer Res.* **45**, 1687-1691.
  15. Ford, J. M., E. P. Bruggeman, I. Pastan, I., M. M. Gottesman. and W. N. Hait. 1990. Cellular and biochemical characterization of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Res.* **50**, 1748-1756.
  16. Ford, J. M. and W. N. Hait. 1989. Buthionine sulfoximine supersensitizes multidrug resistant cells to verapamil. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **30**, 2268-2274.
  17. Dalton, W. S., T. M. Grocan, P. S. Meltzer, R. J. Scheper, B. G. M. Durie, C. W. Taylor, T. P. Miller. and S. E. Salmon. 1989. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkins lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **7**, 415-424.
  18. Slater, I. M., P. Sweet, M. Srupecky, M. W. Wetzel. and S. Gupta, 1986. Cyclosporin A corrects daunorubicin resistance in Ehrlich ascite carcinoma. *Br. J. Cancer* **54**, 235-238.
  19. Speeg, K. V., A. L. Maldonado. and J. Liaci. 1992. Effect of cyclosporine on colchicine secretion by the kidney multidrug transporter studied *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 50.
  20. Urbatsch, I. L., M. K. Al-Shawi. and A. E. Senior. 1994. Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* **33**, 7069-7076.
  21. Chambers, T. C., I. Chaliknda. and G. Eilon. 1990. Correlation of protein kinase C translocation, P-glycoprotein phosphorylation and reduced drug accumulation in multidrug resistant human KB cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 253-259.