

특집: 생리활성물질의 최근 연구동향(VI)

암의 전이 억제를 위한 Matrix Metalloproteinase(MMP) 저해제

이호재 · 고영희

생명공학연구소 효소저해 R.U.

암의 치료에 있어서 가장 큰 장벽이고 암 환자의 주된 사망 요인이 되는 것은 초기종양에 의한 것이 아니라 암세포의 전이(metastasis)에 의한 것이다. 따라서 암 치료를 위한 새로운 전략의 고안과 효과적인 전이 억제제의 개발을 위해 암세포의 침윤(invasion)과 전이의 분자적인 기작에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 암세포의 침윤과 전이에 있어서 중요한 부분은 암세포가 정상적으로 통과할 수 없는 지지구조체인 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)에 있는 단백질 중합체의 분해이다. 암세포는 이러한 장벽을 분해하기 위하여 많은 종류의 단백분해효소를 분비하는데, 특히 기저막과 ECM의 주성분을 분해하는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)가 중요한 역할을 한다[6, 38]. 따라서 MMP 저해제는 암의 침윤과 전이를 효과적으로 막을 수 있는 새로운 표적으로 기대되어 많은 연구자들이 저해제 개발에 연구를 집중하고 있다. 최근 미생물을 비롯한 천연물로부터 MMP의 선택적 저해제를 탐색하려는 노력과 더불어 이미 개발된 몇 개의 합성 저해제가 임상실험에서 암의 성장 및 전이억제에 우수한 결과를 나타내고 있다.

본 총설에서는 암의 전이에 있어서 MMP의 발현과 활성화 및 MMP의 내인성 저해제인 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)에 의한 활성조절 등에 관해 고찰하고, MMP 저해물질의 연구개발 동향 및 임상적 연구와 저자 등이 수행하고 있는 미생물로부터 저분자의 MMP 저해제의 탐색연구에 관하여 고찰하고자 한다.

암전이 과정의 개관

전이는 초기종양으로부터 암세포가 신체의 다른 부위로 퍼지는 과정으로 악성 암의 가장 큰 특징이다. 성공적인 전이의 형성을 위해서는 일련의 연속적인 과정을 거치게 된다. 먼저 초기종양으로부터 전이성 암세포가 떨어져 나와 정상조직의 간질성 기질(interstitial stroma)과 기저막과 같은 주위의 ECM을 분해, 침윤하여 혈관이나 림프관으로 들어간다(intravasation). 혈관내에서의 면역작용과 혈류 등의 물리적 작용을 피해 살아남은 암세포는 다른 목표 조직의 모세관 혈관벽에 부착하고 기저막과 ECM을 통과하여 모세관으로부터 침출(extravasation)한

후 새로운 조직에서 증식하여 2차 종양을 형성하게 된다[28, 34].

전이 형성의 여러 단계에서 암세포는 세포와 세포간 또는 세포와 ECM과의 특정한 상호작용을 요구하고 이러한 상호작용은 전이과정의 각 단계에 따라 변하게 된다. 초기종양으로부터 암세포가 떨어져 나오기 위해서는 세포와 세포간 또는 세포와 ECM 간의 부착성(adhesiveness)이 감소되어야 한다. 특히 전이가 활발한 암세포에 있어서는 세포와 세포간의 부착에 관여하는 E-cadherin의 발현이 낮은 것으로 보고되었고[2], 고침윤성 암세포주에 E-cadherin을 과다 발현시켰을 때 침윤능을 상실하는 것으로 나타났다[41]. 초기종양에서 떨어져 나온 암세포가 주위의 조직을 침윤하거나 모세혈관에서 목표 조직에 침투할 때에는 암세포와 혈관내의 내피세포(endothelial cell) 및 암세포와 ECM 성분과의 상호작용이 중요하다[32]. 특히 암세포와 기저막과의 상호작용은 전이 단계를 시작하게 하는 신호로서 암세포 침윤의 중요한 과정이다[27]. 암세포 표면에 존재하는 ECM 수용체인 integrin이 기저막의 구성 단백질의 특정 ligand에 부착하여 단백질을 분해하는 효소를 분비, 기저막을 포함한 ECM 성분을 파괴하여 다른 조직으로 이동하게 된다. 또한 전이과정을 성공적으로 수행하기 위해서 초기종양이나 전이성 종양은 증식에 따른 영양의 공급을 위해 새로운 혈관의 형성(angiogenesis)이 필요하고 면역계에 의한 종양의 파괴를 피해야만 한다.

암의 진행에 있어서 ECM의 분해

전이의 여러 단계에서 기저막을 포함하는 ECM은 암세포 침윤의 물리적 장벽으로 작용하고 있고 이러한 ECM의 분해는 암세포의 전이에 있어서 가장 중요한 과정이다. 기저막은 type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan 등으로 이루어진 조밀한 그물망 구조로 pore가 없기 때문에 암세포가 수동적인 이동을 할 수가 없다. 암세포의 기저막 장벽의 통과를 기저막과의 부착, 단백질 분해, 이동의 결과로서 암세포가 성공적인 전이를 위해서는 이 3단계 과정을 반복하게 된다. 암세포는 이러한 ECM 성분을 분해하기 위하여 많은 종류의 단백질 분해효소를 분비하는데, 이는 plasminogen activator, plasmin, elastase와 같은 serine protease, cathepsin B와 cathepsin L 등

의 cystein protease, cathepsin D와 같은 aspartyl protease 그리고 collagenase, gelatinase, stromelysin과 같은 metalloproteinase 등이다[7, 11]. 이러한 단백분해효소의 활성은 암의 악성화와 밀접한 상관관계를 보여주고 있다.

지난 20년에 걸쳐 암의 전이에 있어서 단백분해효소의 역할에 관한 연구가 많이 이루어졌고 특히 침윤과정에 있어서 단백분해효소의 기능에 대한 연구 결과로 몇가지 특정한 단백분해효소가 암치료를 위한 새로운 표적으로 인식되어 왔다[44]. 1977년 미국 NIH의 Liotta 등은 T241 mouse fibrosarcoma model을 통해 혈류로부터 빠져나온 전이성 암세포의 경우 기저막과 type I collagen 분해 활성이 초기 종양에 비해 매우 높음을 확인하였다[24]. 또한 Kuettner 등에 의해 human osteocarcinoma와 mammary carcinoma 세포주에 있어서 collagenase 활성의 증가와 함께 이러한 활성이 연골 유래의 저분자 단백질에 의해 저해되는 것을 보고하였다[20]. 연골은 종양에 의해 쉽게 침윤되지 않기 때문에 연구자들은 collagenase의 활성과 이에 대한 연골 유래 저해제에 의한 조절이 암의 침윤에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 고찰하였다. 이러한 두 연구 결과는 암의 진행에 있어서 단백분해효소의 역할에 대한 연구의 전환점이 되어 ECM의 특정 성분의 분해활성이 암 세포의 악성화와 깊이 연관되어 있음을 알았고, collagenase의 활성 저해가 암 세포의 확산을 방지하는 유용한 치료 전략이 됨을 시사하였다.

Liotta 등은 앞선 연구결과에 기초하여 암세포에 의한 기저막 성분의 분해가 침윤과 관련된다는 가정을 제시하였다[25]. 암전이의 첫번째 장벽인 기저막의 주요 구조적 성분인 type IV collagen을 분해하는 type IV collagenase의 활성이 암세포의 전이능과 가장 깊은 관련이 있음을 보고하였다[26]. 이후 type IV collagenase와 함께 fibrillar collagen을 분해하는 interstitial collagenase 등의 아미노산 서열과 구조적 domain의 연구는 현재 MMP로 크게 분류되는 family를 이루게 되었다[3, 29].

Matrix metalloproteinase(MMP)와 그 저해제

MMP는 생리적 조건에서 ECM과 기저막 성분의 분해에 관여하는 분비형 또는 막통과형 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 기저막의 fibrillar collagen을 분해하는 collagenase와 proteoglycan, glycoprotein 등을 분해하는 stromelysin, 기저막 collagen과 gelatin을 분해하는 gelatinase, 그리고 membrane-type MMP(MT-MMP) 등 크게 4개의 subfamily로 나눌 수 있고, 최근 collagenase-3 및 4개의 MT-MMP를 포함하여 현재까지 17 종류가 분리 확인되었다[18](Table 1).

MMP의 구조 및 활성조절

MMP의 기본적인 1차 구조는 signal peptide, 전효소(zymogen)

Table 1. Matrix metalloproteinases (MMPs) family members

MMP number	E.C. Nomenclature	Protein (kDa)		Major substrate
		Latent	Active	
Collagenases				
MP-1	Interstitial collagenase	55	45	Fibrillar collagens
MMP-8	Neutrophil collagenase	75	58	Fibrillar collagens
MMP-13	Collagenase-3	0	48	Fibrillar collagens
MMP-18	Collagenase-4 (<i>Xenopus</i>)	55	?	
Gelatinases				
MMP-2	Gelatinase A	72	66	Gelatins, collagen IV, collagen I
MMP-9	Gelatinase B	92	86	Gelatins, collagen IV, collagen V
Stromelysins				
MMP-3	Stromelysin-1	57	45	Proteoglycans, glycoproteins
MMP-10	Stromelysin-2	57	44	Proteoglycans, glycoproteins
MMP-11	Stromelysin-3	51	44	Laminin, fibronectin, α -1 antitrypsin
Membrane-type MMPs				
MMP-14	MT1-MMP	66	56	Progelatinase A, fibrillar collagens
MMP-15	MT2-MMP	72	?	Progelatinase A, gelatin, fibronectin
MMP-16	MT3-MMP	64	52	Progelatinase A
MMP-17	MT4-MMP	?	?	
Others				
MMP-7	Matrilysin	28	19	Proteoglycans, glycoproteins, elastin
MMP-12	Metalloelastase	54	45/22	Elastin
MMP-19	(Unnamed)	?	?	
MMP-20	Enamelysin	?	?	Amelogenin

로서의 잠재성을 유지시키는 prodomain, 활성 중심부에서 zinc를 가지는 catalytic domain, hinge 및 hemopexin-like domain으로 구성되어 있다[29]. MMP-2와 MMP-9는 catalytic domain내에 gelatin과 collagen에 대해 친화성이 있는 fibronectin-like domain이 삽입되어 있고, MMP-7(matrilysin)은 C-terminal의 hemopexin-like domain이 없어 분자량이 가장 작은 MMP이다. Membrane-type MMP는 hemopexin-like domain 뒤에 소수성의 아미노산으로 구성된 transmembrane domain을 가지고 있어 세포막 표면에서 발현된다[35]. 모든 MMP의 prodomain에는 PRCG(V/N)PD 배열이 존재하며 이 배열내의 cystein 잔기의 SH가 활성부위의 Zn²⁺와 ligation하여 효소를 proenzyme 상태를 유지시켜주고 있다. 또한 4종류의 MT-MMP와 MMP-11 (stromelysin-3)은 prodomain 말단에 furin protease에 의해 인식되는 RXKR 배열을 가지며 다른 MMP와는 다른 기작에 의해 활성화가 이루어진다[30].

각각의 MMP는 특징적인 기질 특이성을 가지고 있으며 각종 collagen, glycoprotein, proteoglycan 등을 분해한다. MMP-1, MMP-8, MMP-13 등의 collagenase는 fibrillar collagen을 가수분해하고, MMP-2와 MMP-9는 기저막의 주성분인 type IV collagen을 분해한다. 또한 MMP-3, MMP-10, MMP-11 등의 stromelysin은 laminin, fibronectin 등의 glycoprotein과 proteoglycan 등을 분해한다.

일반적으로 세포내의 MMP 활성화는 잠재형 효소(proMMP)의 생산, 잠재형 효소의 활성화, 내인성 저해제에 의한 활성형 효소의 저해 등의 3단계에 의해 활성이 조절된다. 이러한 MMP의 정교한 활성조절은 발생, 배란, 수정란의 자궁내막으로의 착상, 상처치료 등의 다양한 생리기능에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 류마티스성 관절염, 폐기종(pulmonary emphysema), 암세포의 증식, 침윤(invasion), 전이(metastasis), 종양혈관신생(tumor angiogenesis) 등의 병리 과정에서는 MMP의 발현이나 활성화가 과도하게 일어난다[43]. 따라서 MMP의 활성조절과 관련하여 cytokine에 의한 MMP의 합성, 분비, 조절에 대한 연구와 잠재성 전효소의 활성화 기작, 그리고 MMP와 함께 분비되는 내인성 저해제인 TIMP에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대부분의 MMP는 전사 단계에서 cytokine, 성장인자(growth factor), 호르몬, 종양유전자 산물

(oncogene product), 종양 촉진제(tumor promoter) 등에 의해 조절을 받는다[33]. MMP-2의 경우 TGF-β에 의해 유도되고, MMP-9는 TPA, IL-1, TNF-α, TNF-β, TGF-β 등에 의해서는 유도되지만 IL-4, TNF-γ 등에 의해서는 유도가 저해되는 것으로 알려지고 있다.

잠재형 효소의 활성화는 prodomain의 제거에 의해 이루어지며 이의 활성화 기작은 현재까지 3가지의 경로가 제시되고 있다. 첫째로 prodomain에 RXKR 배열을 가지고 있지 않는 MMP의 경우 모두 proenzyme 형태로 분비되어 세포밖에서 다른 protease나 MMP에 의해 prodomain의 일부가 가수분해되어 중간 활성형으로 되고, 이어 MMP 또는 autoproteolysis에 의해 활성형이 된다[30]. Prodomain에 RXKR 배열을 가지는 MMP-11과 4종류의 MT-MMP는 세포내에서 다양한 hormone이나 활성 peptide의 processing에 관여하는 furin protease에 의해 세포내에서 활성화되어 활성형으로 세포로부터 분비된다. 또한 잠재형 MMP-2의 경우는 세포막에서 발현되는 MT-MMP에 의해 활성화되는 것으로 알려졌다[35].

MMP 저해제

활성화된 MMP는 내인성 저해제인 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)와 혈청 유래의 α₂-macroglobulin에 의해 저해된다. TIMP는 현재까지 4종류가 밝혀져 있다(Table 2). 이들은 아미노산 배열에서 40-50%의 homology를 가지며 분자량은 21-28.5 kDa 정도이다. 모든 TIMP는 MMP와 비공유 결합의 1:1 복합체를 형성하여 저해한다[12]. TIMP-1은 28.5 kDa의 당단백질(glycoprotein)로 활성화된 interstitial collagenase, stromelysin-1, 그리고 비활성형과 활성형의 MMP-9과 1:1의 복합체를 형성하여 저해하고, TIMP-2는 21-kDa의 단백질로 비활성형 또는 활성형의 MMP-2를 선택적으로 저해하는 것으로 알려졌다. TIMP-4의 경우도 pro MMP-2와 복합체를 형성하는 것으로 보고되었다. TIMP-3는 SV-40 transformed chick embryo fibroblast로부터 분리되었는데, 다른 TIMP들이 분비되어 용해된 형태로 존재하는데 비해 TIMP-3는 ECM에 분포되어 있는 것으로 알려졌다. 최근에 MMP-3와 TIMP-1과의 복합체의 결정구조의 해석에 의해 N-terminal의 disulphide-linked segment 부위의 Cys 1이 zinc 이온과 결합하며

Table 2. Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) family

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Messenger RNA	0.9 kb	1.1/3.5 kb	4.5-5.0 kb	1.4 kb
Molecular mass	28.5 kDa	21 kDa	24 kDa	22 kDa
Glycosylation	+	-	-	-
Associated proteins	pro MMP-9	pro MMP-2	ECM	?
Growth promoting activity	+	+	?	?
Major sites of expression	ovary, bone	placenta	kidney, brain	heart

Table 3. Expression of MMPs in human tumor tissues

Tumor type	MMP -1	MMP -2	MMP -3	MMP -7	MMP -9	MMP -12	MMP -14
Breast		+			+	+	
Prostate		+		+	+		
Ovary		+					
Lung	+	+				+	+
Colorectal	+	+		+	+	+	
Gastric		+		+			
Thyroid		+					
Oral(squamous)	+	+	+	+			
Salivary gland		+					
Stomach							+

Thr 2가 MMP-3의 specificity pocket에 들어가는 것으로 밝혀져 새로운 합성 저해제의 design에 중요한 단서를 제공하고 있다[15].

암조직에서 발현되는 MMP

1980년 Liotta 등에 의해 기저막내의 type IV collagen 분해 활성이 높은 암세포주에 있어서 자발적 전이 빈도가 높다는 사실을 보고한[26] 이후 암세포의 침윤과 전이에 있어서 MMP의 역할에 대한 연구가 매우 활발하여 쥐, 인간 암세포주로부터 MMP의 발현, 생산 및 분비에 관한 연구가 진행되어 왔다. 암의 침윤능과 MMP의 발현과의 직접적인 상관관계는 유방, 전립선, 난소, 폐, 대장, 위, 갑상선, 간 및 구강 편평세포 등의 암세포에서 나타나고 있다[8](Table 3). 다양한 암 조직에서의 유전자 발현(in situ hybridization)과 면역 염색법(immunohistochemistry)으로부터 암의 침윤과 전이에 관여하는 MMP로서 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-12, 그리고 MT1-MMP 등이 보고되었다. 그 중에서 MMP-7은 정상 fibroblast에는 발현되지 않지만, 대장암이나 위암의 fibrocarcinoma에서 특이적으로 발현이 항진된다. 한편, MMP-2, MMP-3 및 MMP-11 등은 암세포에서는 분비하지 않고 암세포 주위의 간질세포(tumor fibroblast)에서 발현되고 있다. MT-MMP는 암세포 뿐만 아니라 암 주위의 간질세포에서도 발현되고 있다. 이러한 보고 중에서 흥미로운 것은 MMP-2의 경우 유전자 발현과 단백질의 존재 위치에 차이가 난다는 것이다. MMP-2의 유전자는 암세포 보다는 주위의 fibroblast에서 강력히 발현되고 있지만 MMP의 단백질은 암세포에도 존재하고 있어 결국 암세포가 주위의 정상세포로 하여금 MMP-2를 만들게 하여 암세포 주위로 끌어들이고 있다. 또한 MMP-2는 유방암 세포주인 MCF 7, MDA MB231 세포의 막 표면에 결합한다는 것이 보고되어[45] 암세포는 MMP-2를 자기의 세포막에 끌어들이는 수용체와 같은 것을 가진다는 것이 시사되었다.

생물산업

합성 MMP 저해제의 연구개발 동향 및 임상연구

최근 암세포의 생육이나 전이의 동물실험 모델에 있어서 MMP가 전이 억제에 표적 효소로서의 중요성이 평가됨에 따라 MMP의 저해제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 동물 실험에서 재조합 TIMP-1의 복강투여로서 B16F10 흑색종(melanoma)의 폐 전이증식(lung colonization)을 감소시키고[36], TIMP-1 유전자의 발현이 *in vitro*에서 B16F10 세포의 생육과 실험적 전이(experimental metastasis)를 저해하였다[19]. 또한 TIMP-2의 발현이 c-Ha-ras 쥐 배세포의 전이를 억제하였다[10]. MMP의 내인성 저해제인 TIMP는 효과적으로 암의 침윤 및 전이를 억제하나 이러한 TIMP의 치료 목적으로의 사용은 고분자의 단백질 특성으로 인한 짧은 half-life와 antigenicity로 인해 치료제와 같은 약제로의 개발에는 한계가 있다고 할 수 있다[5].

저분자의 MMP 저해제에 관한 연구로는 세계 유수의 제약 회사들이 초기에는 류마티스성 관절염에서 연골의 분해를 막으려는 목적으로 진행되었으나 암의 진행 또는 전이에 있어서 MMP의 중요성이 밝혀짐에 따라 최근 암 전이 억제제로의 개발에 연구를 집중하고 있다. 화학합성에 의한 저해제의 대부분은 collagen binding 부위의 아미노산 배열을 기초로 한 peptide 골격에 hydroxamic acid나 thiol 등의 zinc chelating ligand를 붙인 peptide 유도체들이다[1](Fig. 1). 영국의 British Biotech사가 합성한 batimastat(BB-94)는 MMP-2와 MMP-9에 대한 IC₅₀ 값이 각각 4 nM, 10 nM이었고 대부분의 MMP에 대해 저해양상을 나타낸다고 보고하였다. Batimastat는 nude mouse 실험에서 결장암, 난소암의 중앙하중을 감소시키고 동시에 생존율을 증가시켰다고 보고하였다[9, 42]. 또한 최근에 경구투여에 효과를 갖는 2세대 저해제인 marimastat(BB-2516)를 합성하여 현재 임상 3단계 실험 중이다[5]. 또한 미국의 Glycomed사는 1994년에 각막 궤양의 국부적인 치료로서 peptide hydroxamate 저해제인 galardin(GM-6001)의 임상 2/3 단계 실험을 수행하였다. 그러나 낮은 생체 이용성으로 인해 이 저해제의 다른 용도로의 이용은 제한되었다[14]. Batimastat가 다양한 MMP에 대해 저해활성을 가지는데 반하여 Celltech사의 전략은 특정 MMP에 선택적인 저해제의 개발을 시도하고 있다. 예를 들어 gelatinase는 암 전이에 중요한데 반하여, stromelysin은 류마티스성 관절염, 골관절염 등에 있어서의 연골과피에 중요하다고 한다. Celltech 사가 합성한 CT1166의 IC₅₀ 값은 MMP-2와 MMP-9에 대해 각각 0.01 nM, 0.026 nM로 보고하였다[17].

현재까지 암의 전이 억제를 위한 MMP 저해제의 임상적 개발에 가장 선도적인 연구는 British Biotech사의 marimastat(BB-2516)와 Agouron사의 AG3340이다. 미국의 임상종양학

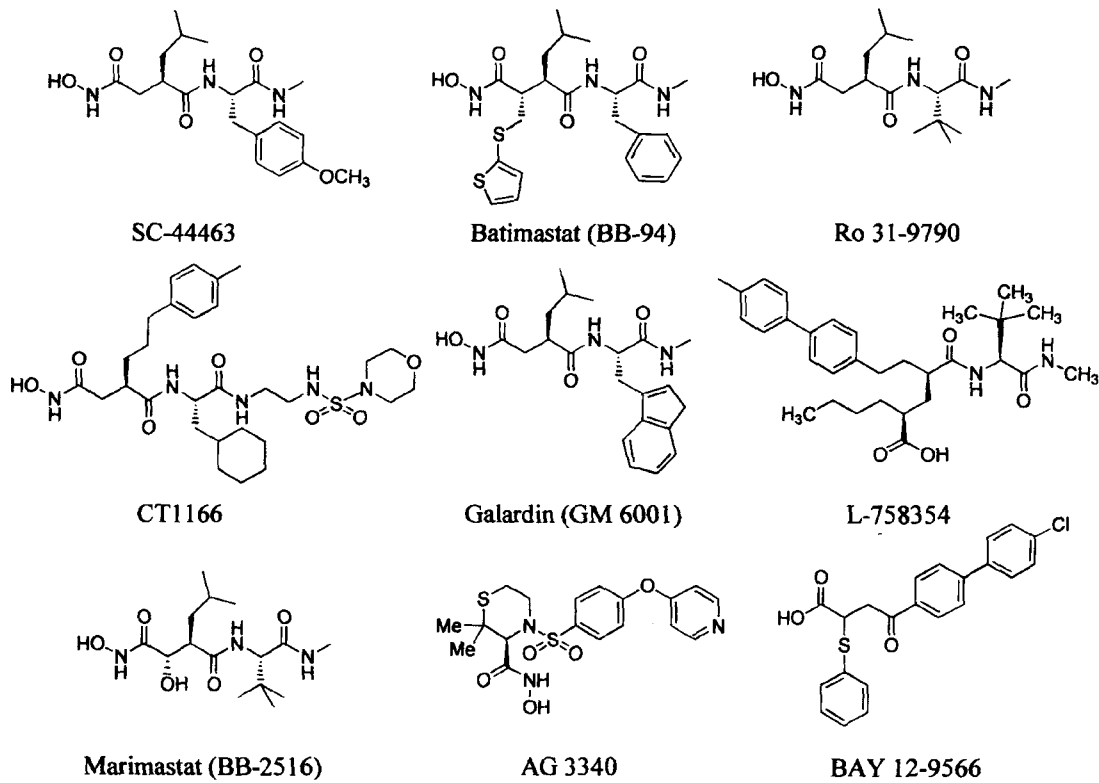


Fig. 1. MMP inhibitors from chemical synthesis.

회의 임상보고에 의하면 marimastat pill을 복용한 88명의 prostate cancer 환자에 있어서 혈중의 prostate specific antigen (PSA) level의 상승을 억제하는 것으로 나타났고, 말기의 암 환자에 있어서도 생존기간을 연장시켰다고 한다. 또한 381명의 진단된 난소암, 췌장암, 전립선암, 결직장암 환자에 있어서도 하루 10 mg의 dose로 4부류의 환자에 있어서 cancer antigen인 CA 125, CEA, PSA, CA 19-9 등이 급격히 감소하였고, 최근 nonresectable pancreatic cancer나 non-small cell lung cancer 같은 진단 속도가 빠른 암에 대해 임상 3단계가 진행되고 있다[4, 37]. Agouron사의 AG3340은 악성 폐암과 전립선암에 있어서 임상 2/3단계 실험이 진행 중이다. Agouron사의 임상실험은 British Biotech사와는 달리 MMP 저해제와 함께 세포독성 항암제의 병행투여로 시행하고 있다. 또한 Bayer사의 BAY 12-9566은 골관절염에, Roche사의 Ro 32-3555는 류마티스 관절염에 있어서 임상실험을 진행 중이다[18].

천연물로부터 MMP 저해제의 탐색

MMP 저해제 개발의 다른 시도는 미생물 대사산물을 포함한 천연물질로부터의 탐색이다. 미생물은 지난 수십 년간 항생제를 포함한 여러 의약품 개발에 있어서 중요한 자원이었다. 암의 침윤과 전이에 있어서 MMP의 역할이 밝혀짐에 따라 MMP 저해제를 탐색하는 연구들이 진행되어 왔다. 특히 침윤

과정에서 가장 큰 역할을 하는 gelatinase를 표적효소로 하여 방선균, 곰팡이 등의 다양한 미생물의 대사산물로부터 저분자의 저해제가 탐색되었다(Fig. 2). 이러한 탐색 연구는 MMP 저해제 개발의 새로운 선도물질을 창출할 수 있다. Actinonin은 초기에 방선균으로부터 항생물질로 분리되었으나 이후 collagenase 저해제로서 다시 탐색된 물질이다[13]. Actinonin은 금속이온을 강력하게 chelation하는 hydroxamic acid기를 가지는 최초의 미생물 대사산물로 합성 저해제 개발의 선도물질로 이용되었다. 일본의 Sankyo사는 방선균으로부터 저해제를 탐색한 결과, 5 종류의 matlystatin을 분리하였고, 이중 MMP-2와 MMP-9에 저해활성이 강한 matlystatin A는 matrigel을 이용한 *in vitro* 침윤실험에서 HT 1080 섬유육종 세포주의 침윤을 저해하는 것으로 보고하였다[40]. 또한 저해물질의 전합성을 통해 구조와 활성 간의 관계(SAR)를 검토한 바 있다. 또한 Banyu사는 방선균으로부터 MMP-3에 대한 저해제를 탐색하여 BE 16627B라는 peptide성 저해제를 분리하여 보고한 바 있고, 탐색된 BE16627B로부터 MMP-2와 MMP-9에 대해 저해활성이 우수한 SI-27을 합성하여 실험적 전이와 암세포 증식억제 효과를 확인 한 바 있다[31]. 이외에 곰팡이 *Phorma* 균주로부터 분리된 pycnidione[16]과 방선균에서 분리된 nicotianamine[39], 그리고 후추나무에서 분리된 futoenone 유도체 등이 있다[46].

저자 등은 T98G 인간 신경교아세포종(glioblastoma)으로부터 TIMP-2 free proMMP-2를 분리하여 다양한 미생물 대사산

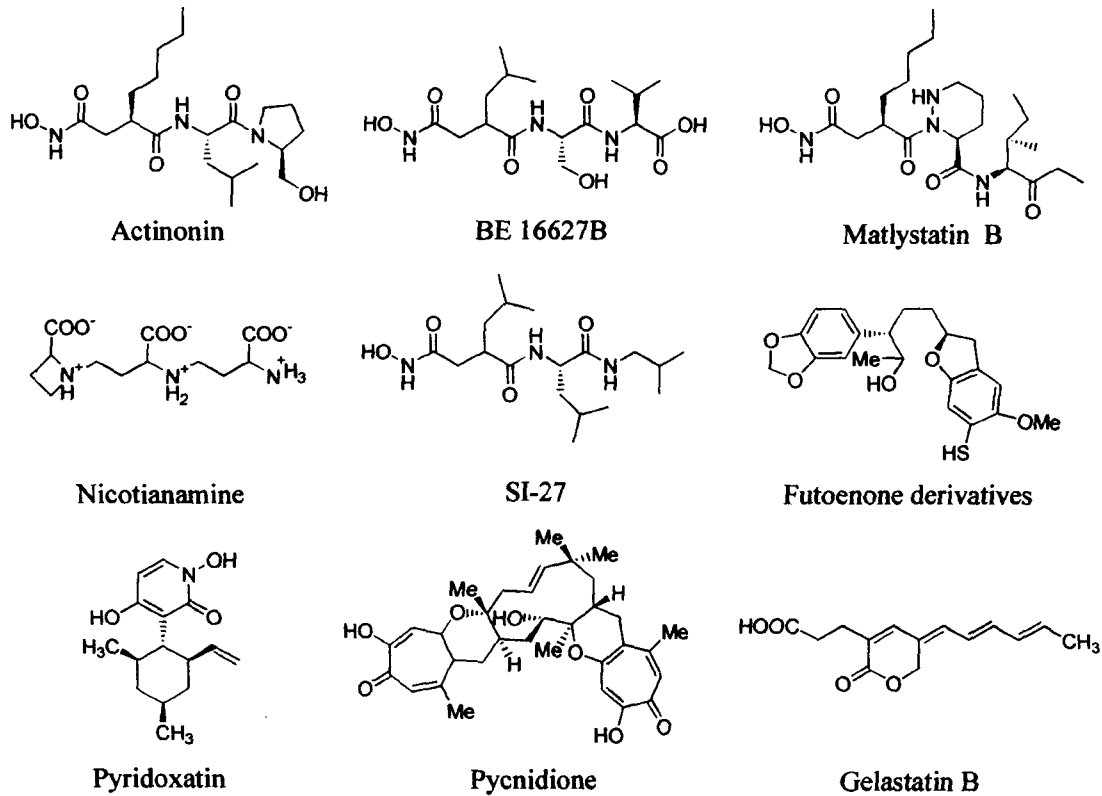


Fig. 2. MMP inhibitors from natural products.

물로부터 저해제를 탐색한 결과, 곰팡이 *Chaunopycnis alba* 균주에서 cyclic hydroxamic acid 기를 가지는 pyridoxatin을 분리하였다. Pyridoxatin은 non-peptide성 저해제로 활성화된 MMP-2에 대한 IC₅₀ 값은 4 µg/ml(15 µM)이었으며, 인간 암세포주에 대해 *in vitro*에서 강한 생육저해를 나타내었고, PC-3 전립선 암세포주의 DNA 합성을 강하게 저해하였다[21]. 또한 *Westerdykella multispora* 균주로부터 새로운 구조를 가지는 MMP 저해제를 분리하여 gelastatin으로 명명하여 보고한 바 있다[22]. Gelastatin A와 B는 E와 Z의 이성체이며 δ-lactone과 carboxyl기를 가지는 polyketide 계열의 물질로 MMP-2, MMP-9 그리고 MT1-MMP에 대해 강한 저해활성을 나타냈으며 matrigel을 이용한 *in vitro* 침윤실험에서도 B16F10 melanoma의 침윤을 효과적으로 저해함을 확인하였다[23]. Gelastatin A, B는 새로운 골격의 저해제로 기존의 MMP 저해제들이 대부분 peptide 유사성 물질인데 반하여 락톤환을 가지는 nonpeptide성 저해제이다. 따라서 이 물질을 기초로 하여 구조와 활성간의 관계 연구를 통해 약리적으로 우수한 MMP 저해제로 개발할 경우 새로운 암전이 치료제로 이용될 수 있다.

결론 및 전망

암의 침윤, 전이 및 혈관신생 등의 과정에서 MMP와 MMP 생물산입

저해제가 중요한 역할을 함이 밝혀져 MMP 활성의 조절이 암의 진행을 억제할 수 있는 새로운 치료의 표적으로 주목받고 있다. 현재 많은 연구자들에 의해 MMP에 대한 저분자의 선택적 저해제의 탐색 및 합성 design의 연구가 활발히 진행되고 있으며 화학적으로 합성된 저해제의 전임상 또는 임상 실험의 결과는 MMP 저해제가 암의 치료에 있어서 새롭고 유망한 치료제가 될 수 있음을 보여주고 있다.

기존의 항암 치료법이 방사선이나 세포독성 항암제에 의해 암세포를 직접 죽이는 것에 비해 MMP 저해제에 의한 치료는 암의 침윤, 전이, 암세포의 혈관신생 등을 방지하여 세포증식을 억제하는 방법이라 할 수 있고 이러한 cytostatic therapy는 기존의 cytotoxic therapy를 보완할 수 있는 대체 치료법의 본보기가 될 수 있다. 특히 고형암 환자에 있어서 cytostatic therapy는 암 전이의 휴지상태를 유지할 수 있고, 세포독성 항암제 치료후의 재발을 지연시킬 수 있는 장점이 있다. 아울러 MMP 저해제와 같은 cytostatic agent의 임상적 독성과 약리 특성의 보완은 이러한 치료의 시도에 있어서 중요한 전략 중의 하나라 할 수 있다.

한편 MMP 저해제의 개발에 있어서 제한된 생체이용성(bioavailability)과 효소 선택성의 결여는 앞으로 해결해야 할 과제이다. MMP의 중요한 생리적 활성에 비추어 볼 때 특정 MMP에 대해 선택성이 떨어지는 강력한 저해제의 지속적인

투여는 심각한 부작용을 야기할 것으로 예상할 수 있다. Marimastat의 임상 2단계 실험 결과, 현저한 부작용으로서 관절의 통증과 경직과 같은 건염(tendinitis)이 나타났고 이러한 부작용은 선택성이 낮은 대부분의 저해제에서도 비슷하게 나타났다. 따라서 선택적 저해제의 개발이 요구된다. 또한 최근 10년간에 걸쳐 MMP 저해제의 design과 합성에 대한 특허와 보고가 많이 나오고 있는데 대부분 기존의 peptide 구조의 부분적인 변형에 관한 것으로 합성 저해제의 경우 포화된 상태라 할 수 있다. 따라서 NMR이나 X-ray 결정구조에 따른 구조와 활성 관계의 연구, combinatorial 화학합성, 천연물이나 chemical library를 통한 면밀한 탐색과정과 같은 다른 전략을 이용하여야 새로운 선도물질을 창출할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Beckett, R. P., A. H. Davison, A. H. Drummond, P. Huxley, and M. Whittaker. 1996. Recent advances in matrix metalloproteinase inhibitor research. *Drug Discovery Today*. **1**: 16-26.
2. Behren, J., M. M. Marcel, F. M. Van Roy, and W. Birchmeier. 1989. Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorun-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* **108**: 2435-2447.
3. Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J. A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 197-250.
4. Bramhall, S. R. 1997. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Int. J. Pancrea.*, **21**: 1-12.
5. Brown, P. E. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Angiogenesis*. **1**: 142-154.
6. Chambers, A. F. and L. M. Matrisian. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **89**: 1260-1270.
7. Chen, W. T. 1992. Membrane proteases: roles in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 802-809.
8. Corcoran, M. L., R. E. Hewitt, D. E. Kleiner, and W. G. Stetler-Stevenson. 1996. MMP-2: expression, activation and inhibitor. *Enzyme Protein.* **49**: 7-19.
9. Davies, B., P. D. Brown, N. East, M. J. Crimmin, and F. R. Baikwill. 1993. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res.* **53**: 2087-2091.
10. DeClerck, Y. A., N. Perez, H. Shimada, T. C. Boone, K. E. Langley, and S. M. Tayler. 1992. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res.* **52**: 701-708.
11. DeClerck, Y. A., S. Imren, A. P. Montgomery, B. M. Mueller, R. A. Reisfeld, and W. E. Laug. 1997. Proteases and protease inhibitors in tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **425**: 89-97.
12. Douglas, D. A., Y. E. Shi, and Q. A. Sang. 1997. Computational sequence analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J. Prot. Chem.* **16**: 237-255.
13. Faucher, D. C., Y. Lelievre, and T. Cartwright. 1987. An inhibitor of mammalian collagenase active at micromolar concentrations from an actinomycete culture broth. *J. Antibiot.* **40**: 357-359.
14. Galardy, R. E., D. Grobelny, H. G. Foellmer, and L. A. Fernandez. 1994. Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloproteinase inhibitor N-[2R-2-(hydroxamido-carbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res.* **54**: 4715-4718.
15. Gomis-Ruth, F., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, and W. Bode. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* **389**: 77-81.
16. Harris, G. H., K. C. Silverman, G. F. Bills, H. W. Dougherty, and F. Pelaez. 1993. Isolation and structure determination of pycnidione, a novel bistropolone stromelysin inhibitor from a *Phoma* sp. *Tetrahedron.* **49**: 2139-2144.
17. Hill, P. A., A. J. P. Docherty, K. M. K. Bottomley, J. P. O'Connell, J. R. Morphy, J. J. Reynolds, and M. C. Meikle. 1995. Inhibition of bone resorption in vitro by selective inhibitors of gelatinase and collagenase. *Biochem J.* **308**: 167-175.
18. Johnson, L. L., R. Dyer, and D. J. Hupe. 1998. Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 466-471.
19. Khokha, R. 1994. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells *in vivo* by the overexpression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 299-304.
20. Kuetter, K. E., L. Soble, R. L. Croxen, B. Marczyńska, J. Hiti, and E. Harper. 1977. Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage-derived protease inhibitor. *Science.* **196**: 653-654.
21. Lee, H. J., M. C. Chung, C. H. Lee, H. K. Chun, H. M. Kim, and Y. H. Kho. 1996. Pyridoxatin, an inhibitor of gelatinase A with cytotoxic activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 445-450.
22. Lee, H. J., M. C. Chung, C. H. Lee, B. S. Yun, H. K. Chun, and Y. H. Kho. 1997. Gelastatin A and B, new inhibitors of gelatinase A from *Westerdykella multisporea* F 50733. *J. Antibiot.*, **50**: 357-359.
23. Lee, H. J., M. C. Chung, C. H. Lee, H. K. Chun, J. S. Rhee, and Y. H. Kho. 1999. Gelastatins, new inhibitors of matrix metalloproteinases from *Westerdykella multisporea* F 50733. *Ann. NY Acad. Sci.* (in press).
24. Liotta, L. A., J. Kleinerman, P. Catanzaro, and D. Rynbrandt.

1977. Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 1427–1431.
25. Liotta, L. A., S. Abe, P. G. Robey, and G. R. Martin. 1979. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 2268–2272.
26. Liotta, L. A., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C. M. Foltz, and S. Shafie. 1980. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement collagen. *Nature.* **280**: 67–68.
27. Liotta, L. A., P. S. Steeg, and W. G. Stetler-Stevenson. 1991. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**: 327–336.
28. Liotta, L. A. 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am.* **266**: 34–41.
29. Nagase, J., A. J. Barrett, and J. F. Woessner. 1992. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix. Suppl no 1*: 421–424.
30. Nagase, H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* **378**: 151–160.
31. Okuyama, A., K. Naito, H. Morishima, H. Suda, S. Nishimura, and N. Tanaka. 1994. Inhibition of growth of human tumor cells in nude mice by a metalloproteinase inhibitor. *Ann. NY Acad. Sci.* **732**: 408–410.
32. Pauli, B. U., H. G. Augustin-Voss, M. E. E. I. Sabban, R. C. Johnson, and D. A. Hammer. 1990. Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev.* **9**: 175–189.
33. Ries, C. and P. E. Petrides. 1995. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **376**: 345–355.
34. Rouslahti, E. 1996. How cancer spreads. *Sci. Am.* **275**: 72–77.
35. Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto, and M. Seiki. 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cell. *Nature.* **370**: 61–65.
36. Schultz, R. M., S. Silberman, B. Persky, A. S. Bajowski, and D. F. Carmichael. 1988. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res.* **48**: 5539–5545.
37. Slawomir, M., Wojtowicz-praga, R. B. Dickson, and M. J. Hawkins. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs*, **15**: 61–75.
38. Stetler-Stevenson, W. G., S. Aznavoorian, and L. A. Liotta. 1993. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**: 541–573.
39. Suzuki, K., K. Shimada, S. Nozoe, K. Tanzawa, and T. Okita. 1996. Isolation of nicotianamine as a gelatinase inhibitor. *J. Antibiot.*, **49**: 1284–1285.
40. Tanzawa, K., M. Ishii, T. Ogita, and K. Shimada. 1992. Matlystatins, new inhibitors of type IV collagenases from *Actinomadura altramantaria*. II. Biological activities. *J. Antibiot.* **45**: 1733–1737.
41. Uleminckx, K., L. Vackat, M. Mareel, W. Fiers, and F. V. Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* **66**: 107–119.
42. Wang, X., X. Fu, P. D. brown, M. J. Crimmin, and R. M. Hoffman. 1994. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (Batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res.* **54**: 4726–4728.
43. Woessner, J. F. Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**: 2145–2154.
44. Wojtowicz-Praga, S. M., R. B. Dickson, and M. J. Hawkins. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs.* **15**: 61–75.
45. Yamamoto, M., S. Mohanam, R. Sawaya, G. N. Fuller, M. Seiki, H. Sato, Z.L. Gokaslan, L.A. Liotta, G. L. Nicolson, and J.S. Rao. 1996. Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* **56**: 384–392.
46. Yeh, L. A., J. Chen, F. Baculí, D. E. Gingrich, and T. Y. Shen. 1995. Inhibition of metalloproteinase by futoenone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**: 1637–1642.