구강암 세포주에 대한 CKD-602의 항암 효과

윤필영 · 옥용주 · 명 훈 · 이종호 · 김명진
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:7-12)

ANTICANCER EFFECT OF CKD-602(BELOTECAN, CAMTOBELL®) ON THE ORAL CANCER CELL LINES

Pil-Young Yun, Yong-Ju Ok, Hoon Myoung, Jong-Ho Lee, Myung-Jin Kim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Purpose: CKD-602, a newly developed water-soluble campthotecin analogue, is a anticancer agent which act as a DNA topoisomerase I inhibitor. CKD-602 is known as more potent and tolerable agent. The main purposes of this study were to measure the cytotoxic effect of CKD-602 on the oral cancer cell lines and to evaluate the apoptotic aspect of dead cells.

Materials and Methods: To determine the cytotoxic effect of CKD-602 on the oral cancer cell lines in comparison with various cell lines, such as lung cancer and colon cancer cell lines, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay was performed. And apoptosis was analyzed using fluorescence-activated cell sorting(FACS) system.

Results: CKD-602 decreased the viability of malignant cells in a dose dependent manner and in a time dependent manner. CKD-602 showed excellent cytotoxicity to the oral cancer cell lines. Also, apoptotic portion was increased in a dose dependent manner.

Conclusion: These findings indicated that CKD-602 induced apoptotic cell death in the various cell lines including oral cancer cell lines. From the results, it was suggested that CKD-602 would be a potential therapeutic agent for the oral cancer. More successive researches on the anticancer effect of CKD-602 should be performed.

Key words : CKD-602, Camptothecin, Topoisomerase-I inhibitor, Oral cancer, Apoptosis

Ⅰ. 서 론

구강악안면영역에 발생하는 암종은 전체 암종의 10% 이상을 차지하며 이중 20%에 해당하는 부분이 구강내에 발생한다. 구강내 발생하는 암종은 가장 호발하는 편평세포암종을 비롯하여 타액선에 발생하는 타액선 암종 등, 그 성상이 매우 다양하고 침습 및 전이가 심하여 예후가 좋지 않다. 특히 암종세포에서 분비되는 다양한 단백분해효소에 의해 기저막(basement membrane)을 녹이고 주위 조직으로 침습하여 원격 전이하는 성질이 강해 수술 등의 주 치료 후에도 미세침습에 의한 재발이 많은 실정이다.

이러한 구강암의 치료는 크게 수술요법, 방사선요법 및 약물요법 등으로 구분될 수 있으며, 이중 항암제를 이용한 약물요법은 구강악안면영역의 위치적 특성으로 인해 치료후 삶의 질 측면에서 유리한 점을 가지고 있는 치료이다. 하지만 다양한 항암제의 개발이 진행되고 있으나 아직까지도 약물요법에 의한 생존률의 증가는 이루어지지 않고 있으며 약제에 대한 내성의 발현, 약제의 독성 및 부작용 등으로 인해 임상적인 적용에 있어서 많은 문제점을 안고 있다.

캄토테신(campthothecin)은 선택적인 제1형 토포이소머라제(topoisomerase-1)라는 DNA의 복제 및 재조합 등에 관여하는 이성질화효소의 억제제로 이미 1966년 미국의 Wall 등에 의해 개발된 천연 항종양 알카로이드로서 탁월한 세포독성으로 개발초기에 상당한 기대를 모았으나 난용성이라는 한계로 인해 그와 관련된 골수억제 및 출혈성방광염 등의 다양한 부작용을 보임에 따라 연구가 활발히 진행되지 못하였다. 하지만 최근 이러한 난용성을 해결하려는 다양한 유도체 개발에 대한 시도를 통해 국내에서도 CKD-602(belotecan, Camtobell®)라는 신약을 개발하기에 이르렀으며 이미 폐암이나 대장암, 유방암 및 난소암 등에 대해서는 임상에서도 선택적으로 이용되고 있다.

현재 다양한 악성종양에 대한 CKD-602의 효과 등에 관한 연구가 진행되고 있지만 아직까지 구강암에서의 CKD-602에 대한 임상적인 항암 효과는 아직까지 연구된 바 없다. 더욱이

김 명 진
110-768, 서울시 종로구 연건동 28-3
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Myung-Jin Kim
Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, # 110-768, South Korea
Tel : 82-2-2072-3813, 2632 Fax : 82-2-766-4948
E-mail : myungkim@plaza.snu.ac.kr

구강암 세포주에 대한 제1형 토포이소머라제 억제제의 효과에 대한 실험실에서의 평가마저도 확실히 증명된 바가 없는 실정이다.

본연구의 목적은 구강암 세포주에서 최근 개발된 선택적 제1형 토포이소머라제 억제제인 CKD-602를 적용하여 세포살상능 및 세포사멸의 형태 등을 관찰함으로써 CKD-602의 구강암에 대한 치료제로서의 가능성을 평가하는데 있다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

(1) 세포주 및 세포배양

4×10^4cells/well의 다양한 암 세포주(KB, A253, HSC-3; 이하 구강암 세포주, A549; 폐암 세포주, HCT116;대장암 세포주, MCF-7, MDA-MB-231; 이하 유방암 세포주, Hela; 자궁경부암 세포주, SNU-719; 위암 세포주, SNU-899;두경부암 세포주, U87-MG; 신경교종 세포주, 한국세포주은행, 한국)를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco, 영국) 및 스트렙토마이신(streptomycin)/페니실린(penicillin)을 포함하는 RPMI 1640(JBI, 미국)와 10% 우태아혈청 및 L-글루타민(L-glutamine), 스트렙토마이신/페니실린을 포함하는 minimum essential medium(MEM, Gibco, 영국)으로 배양하였다.

(2) 세포증식능 검사

4×10^4cells/well의 KB, A253, HSC-3, A549, HCT116, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, SNU-719, SNU-899, U87-MG 세포주를 각각 96 멀티웰 플레이트(multi-well plate)에 분주하고 24시간 배양한 후, 덜베코 인산염 완충용액(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS)로 세포들을 2회 세척하고, 1%의 우태아혈청이 첨가되어 있는 배양액에 CKD-602(belotecan, Camtobell®, 종근당, 한국)를 0.01㎍/㎖-1㎍/㎖ 범위의 다양한 농도별로 만든 후 처리하였다. 각각 24시간, 48시간, 72시간째 세포의 성장곡선을 측정하기 위하여 배양한 배지는 제거한 후에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma, 미국) 시약을 5㎎/㎖ 농도로 각각 100㎕씩 첨가하였다. 1시간 배양 후 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO, Amresco, 미국) 100㎕ 첨가하여 ELISA 비색기(Bio-TEK Insruments Inc., Winooski, VT)에서 570㎚ 파장으로 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 각각의 측정마다 음성대조군을 100%로 하여 실험군의 측정치를 환산하였으며 이를 세포생존율로 표시하였다. 본 연구에 표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험 결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다.

(3) 세포사멸 측정

CKD-602를 농도별로 처리한 후 48시간째 Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (BD Bioscience Pharmingen, 미국)를 이용하여 측정하였다. 세포증식능검사에 이용된 세포주 중 A253, HSC-3, A549, HCT116 세포주를 선택하여 6×10^5cells/well의 96 멀티웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 덜베코 인산염 완충용액으로 세포들을 2회 세척하고, 1%의 우태아혈청이 첨가되어 있는 배양액에 CKD-602를 다양한 농도별로 만든 후 처리하였다. 농도별로 처리한 세포주를 48시간째 덜베코 인산염 완충용액으로 세포들을 2회 세척한 후 각 웰에 트립신(trypsin)-EDTA용액 (0.05% Trypsin - 0.53mM EDTA 4Na)을 1㎖ 넣고 3분 후, 피펫으로 세포를 수거하여 15㎖ 튜브에 첨가한 후 원심분리를 시행하였다. 세척을 하기 위하여 Annexin V 부착 완충용액을 각 1㎖씩을 원심분리된 세포들이 들어 있는 15㎖ 튜브에 넣고 혼합한 후, 다시 원심분리를 시행하였다. Propidium iodide 1㎕와 annexin V-FITC 항체 4㎕를 첨가하고 혼합한 후 암실, 실온에서 15분간 배양한다. 300㎕의 결합 완충용액을 각 반응액에 넣은 후 1시간 이내에 FACSCalibur System (Becton Diskinson, 미국)을 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결　　과

구강암 세포주에 대한 CKD-602의 효과를 관찰하기 위하여, 각각의 세포주를 CKD-602 0.01㎍/㎖, 0.05㎍/㎖, 0.1㎍/㎖, 0.5㎍/㎖, 1㎍/㎖ 등의 다양한 농도로 처리한 후 각각 24시간, 48시간, 72시간 경과후 세포생존율을 측정하여 세포독성을 비교 평가하였다. 얻어진 CKD-602처리 48시간 경과를 기준으로 비교한 농도별 세포생존율의 결과는 각각 다음과 같다. 구강암 세포주 중에서 타액선암 세포주인 A-253 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 41.90%, 0.1㎍/㎖에서 37.03%, 0.5㎍/㎖에서 26.99%의 세포생존율이 관찰되었다. 또한 설암 세포주인 HSC-3 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 48.93%, 0.5㎍/㎖에서 23.84% 등이 각각 관찰되었다. 이러한 측정치는 폐암 세포주인 A549 세포주의 0.05㎍/㎖에서 51.05%, 0.1㎍/㎖에서 49.59%와 대장암 세포주인 HCT116의 0.05㎍/㎖에서 81.01%, 0.5㎍/㎖에서 53.53% 등에 비해 적은 수치로, 이는 구강암 세포주에 대한 CKD-602의 우수한 세포독성을 의미한다고 할 수 있다(Table 1).

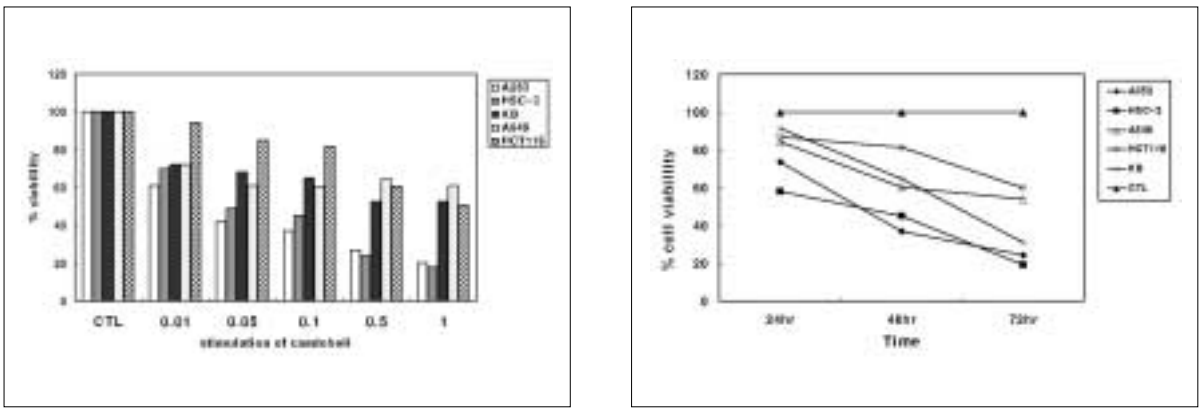
CKD-602의 세포독성을 약물 농도에 대해 그래프로서 나타낸 결과 각 세포주는 농도 대비 증식능의 음의 상관관계를 보이고 있었다. 농도가 증가할수록 세포사가 증가되었다. 따라서 구강암 세포주는 농도 의존적으로 세포사가 진행되는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 CKD-602는 구강암세포주의 생존율을 농도의존적으로 감소시킴을 의미하였다(Fig. 1A). 또한 시간에 따른 세포독성을 평가하기 위해 0.05㎍/㎖의 농도에서의 세포생존율을 측정한 결과, 역시 시간이 증가할수록 생존율이 감소하는 것이 관찰되었으며, 그래프 상에서 전체적으로 구강암 세포주에 대한 효과가 폐암 및 대장암 세포주에 비해 우수하게 관찰되었다(Fig. 1B).

설암 세포주인 HSC-3 세포주의 경우에 있어서는 CKD-602 처리 24시간 후에도 0.1㎍/㎖의 농도에서 58.14%로 A253 세포주의 73.85%, A549 세포주의 71.13%, HCT116 세포주의 82.74% 등에 비해서 효과적인 세포독성이 관찰되었다.

세포사멸의 양상을 관찰하기 위해서 propidium iodide 및

Table 1. Comparison of cytotoxicity of CKD-602 to the various cell lines in vitro study (% cell viability)

	Control	0.01㎍/㎖	0.05㎍/㎖	0.1㎍/㎖	0.5㎍/㎖	1㎍/㎖
MCF-7	99.97±6.30	83.74±5.39	77.49±4.20	77.65±2.45	23.53±1.77	21.89±1.67
MDA-MB-231	99.99±7.39	90.30±7.30	91.88±4.93	91.07±3.39	89.27±3.72	79.93±3.96
KB	100.0±7.39	72.23±9.23	68.10±5.42	64.91±6.40	52.59±5.63	52.52±7.88
A253	99.99±10.09	60.85±7.75	41.90±3.57	37.03±3.47	26.99±2.28	20.31±2.56
HSC-3	100.0±6.13	69.66±6.88	48.93±3.19	45.15±1.49	23.84±1.03	17.72±4.26
A549	100.0±9.52	59.98±3.54	51.05±3.54	49.59±2.56	52.25±2.47	50.42±3.10
HeLa	99.98±6.57	68.47±4.48	66.05±9.75	61.72±8.65	59.29±7.56	57.49±2.72
HCT116	99.99±10.41	89.86±11.21	81.01±9.19	76.29±5.53	54.53±5.79	46.47±4.58
SNU-719	100.0±5.80	70.76±3.77	64.15±5.07	53.93±5.38	17.56±1.86	10.89±1.33
SNU-899	99.97±9.69	94.20±6.85	86.84±2.40	73.54±5.22	42.31±2.81	41.30±4.04
U87-MG	100.0±3.73	88.25±4.08	78.20±3.47	75.09±5.56	66.97±3.72	62.04±4.60



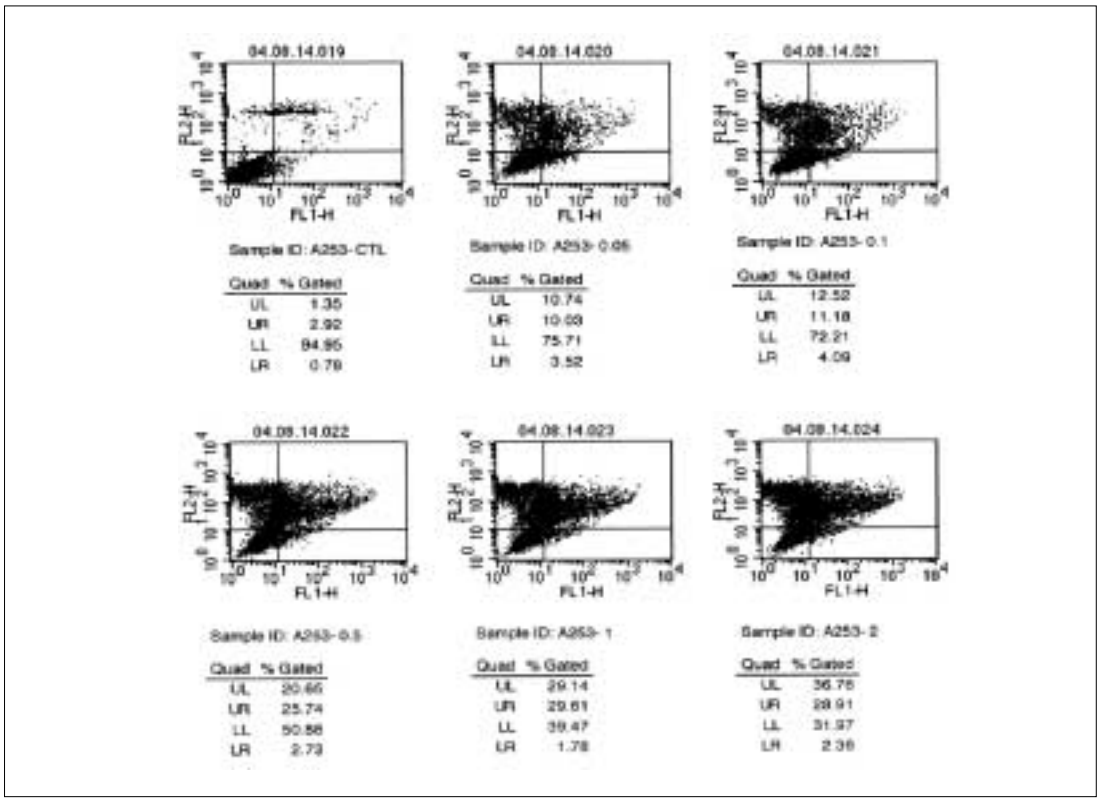
(A) (B)

Fig. 1. (A) CKD-602 decreased the viability of malignant cells in a dose dependent manner. Cells were treated with various doses (0.01㎍/㎖, 0.05㎍/㎖, 0.1㎍/㎖, 0.5㎍/㎖, 1㎍/㎖) of CKD-602 and cell viability was measured by MTT assay at 48 hrs after culture.
(B) CKD-602 decreased the viability of malignant cells in a time dependent manner. CKD-602 showed excellent cytotoxicity to the oral cancer cell lines. The data represent the mean of triplicate.

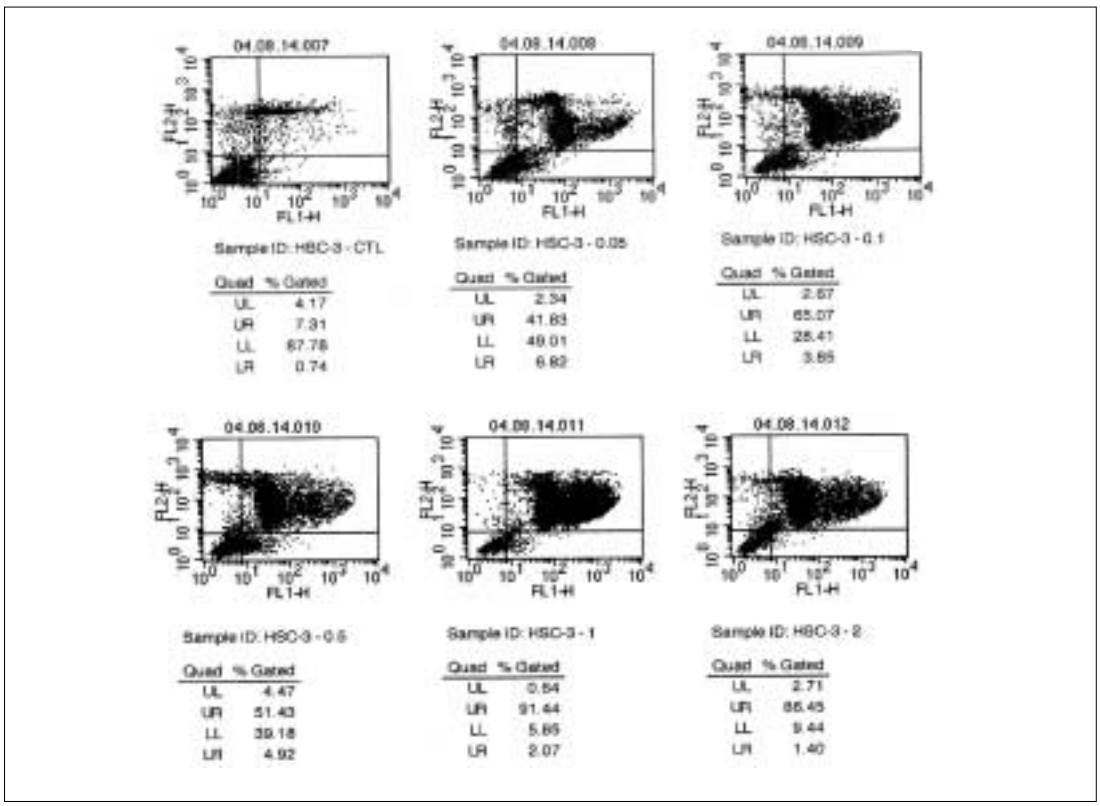
Table 2. Effect of CKD-602 on selected cells lines analysed by annexin V staining and FAC

	A253		HSC-3		A549		HCT116	
	% Live	% Apoptotic	% Live	% Apoptotic	% Live	% Apoptotic	% Live	% Apoptotic
Control	94.95	3.70	87.78	7.95	92.45	5.26	84.35	7.43
0.05㎍/㎖	75.71	13.55	49.01	48.65	30.21	45.34	51.90	37.45
0.1㎍/㎖	72.21	15.27	28.41	68.92	36.25	52.86	57.88	31.54
0.5㎍/㎖	50.88	28.47	39.18	56.35	51.61	35.56	39.70	42.05
1㎍/㎖	39.47	31.39	5.85	93.51	32.48	30.05	39.69	39.29

annexin-V를 염색한 후 유세포분석법을 통해 세포고사의 비율을 측정하였다. 세포주에 따라 정도의 차이는 있지만 전반적으로 농도가 증가함에 따라 세포고사의 비율이 증가하는 양상을 보였으며, 이러한 세포고사의 수준은 여타 다른 제재들과 비교하여 상당한 큰 비율로 관찰되었다. 이중 A-253 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 13.55%, 0.5㎍/㎖에서 28.47% 등이 관찰되었다. 또한 HSC-3 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 48.65%, 0.1㎍/㎖에서 68.92% 등이 관찰되었다(Fig. 2). A549 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 45.34%, 0.1㎍/㎖에서 52.86%, HCT116 세포주에서는 0.05㎍/㎖에서 37.45%, 0.5㎍/㎖에서 42.05% 등이 각각 관찰되었다(Table 2).



(A)



(B)

Fig. 2. Results of FACS of A253(A) and HSC-3(B); Apoptotic portion was increased in a dose dependent manner.

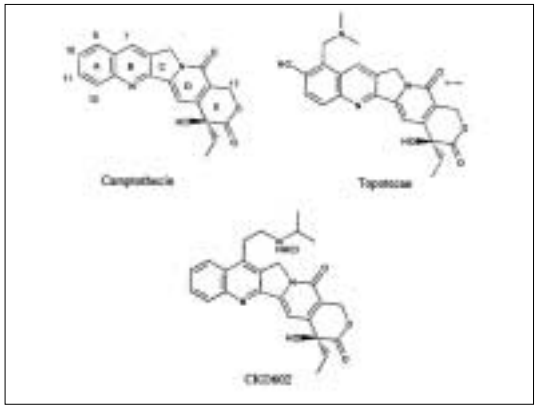


Fig. 3. Chemical structures of camptothecan, topotecan, CKD-602: At position 7 of B-ring, CKD-602 has water-solubilizing group.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

캄토테신은 1966년 미국의 Wall 등에 의해 중국 원산의 희수나무(Camptotheca acuminata)에서 단리된 천연 항종양 알카로이드로서 in vitro에서 강력한 세포독성(cytotoxicity)을 나타낸 것으로 판명된 이래 제2의 탁솔이라는 별칭과 함께 미국 암연구센터(NCI)등에서 임상시험을 통한 개발에 착수되었으나 극히 난용성이며, 그와 관련된 골수억제 및 출혈성 방광염으로 인한 독성으로 개발이 중단되었다. 그러나 1990년 이후, 캄토테신이 가지는 독특한 작용기전, 즉 DNA 제2형 토포이소머라제(topoisomerase-2) 저해기전과는 달리 DNA 제1형 토포이소머라제를 선택적으로 억제하여 항종양효과를 나타냄이 확인되었다[1].

DNA 토포이소머라제는 기라아제(gyrase) 효소군의 일원이다. 이들은 핵내의 효소들로서, 복제나 전사를 위해 세포가 유전 물질에 접근이 요구될 때 일시적으로 DNA의 절단하거나 이중 나선을 푸는 역할을 한다[2]. 이들은 또한 염색체 농축 및 재조합, DNA 수리 등 다양한 세포내 활동에 참여한다[3]. 토포이소머라제 효소의 유전암호는 종들간에 상당히 보존적이다. 캄토테신의 목표물인 제1형 토포이소머라제는 다양한 악성종양에서 그 수준이 증가하는 것이 관찰되었다[4]. 이 약재는 유리효소를 억제하지는 못하나 토포-DNA 복합체의 공유결합을 안정화시켜 절단된 DNA 조각들이 다시 연결되는 것을 방해한다[5]. 이들은 억제제로 작용하는 것이 아니라 독으로 작용한다고 할 수 있다. 따라서 이러한 토포-대상 약제에 대한 세포의 민감성은 핵내 존재하는 효소의 수준과 관련이 있다[6]. 이 약제는 DNA의 재결합을 방해함으로써 전사가 진행되는 것을 불가능하게 한다. 제1형 토포이소머라제의 양이 더 많을수록, 더 많은 절단가능한 복합체를 형성하며 이는 약제 감수성이 높음을 의미한다[7]. 이것은 중요한 임상적 관련성을 가지는데, 제1형 토포이소머라제 억제제는 제2형 토포이소머라제의 발현을 증가시키는데 사용되어 이는 제2형 토포이소머라제 억제제에 더욱 감수성을 가지게 한다. 이러한 결과는 제1형 토포이소머라제와 제2형 토포이소머라제 간의 대립 관계에 의해 지지된다. 이러한 제1형 토포이소머라제는 제2형 토포이소머라제와 달리 정상 조직에서는 증식과 밀접한 관련이 없으며, 임파종으로 포함한 대장암, 난소암, 식도암 등의 세포분열이 왕성한 "S"기의 고형암에 주변의 정상 조직에 비해 다량 존재하며, 실제적으로 세포주기상 "S"기에 종양세포 내에 유전자의 복제 및 전사를 차단함으로써 세포사를 유발할 수 있다고 알려져 있다[8]. 또한 기존의 고형암 치료에 사용되는 플래티늄 복합체(platinum complex, cisplatin) 및 아드리아마이신(adriamycin) 계열 등의 제2형 토포이소머라제 저해 항암제에서 발현된 약물 내성에 대해서 쉽게 교차 내성을 일으키지 않는 점으로 인해 많은 관심과 활발한 유도체 연구가 수행되었다. 그 결과, 일본의 Dallchi 및 Yakult에 의해 공동개발된 이리노테칸(irinotecan, CPT-11)이 1994년 세계 최초의 캄토테신계 항암제로서, 폐암(소세포, 비소세포성 폐암)에 유효성을 입증받아 유럽과 일본에서 발매되었으며, 1995년에는 대장암, 유암에 대한 유효성을 추가로 입증받은 바 있다. 또한, Glaxo Smith Kline사에서 개발된 토포테칸(topotecan)이 1995년 4월에 미국 FDA에서 전이성 난소암에 대한 유효성을 승인 받아 발매되었다. 최근 국내에서 개발된 새로운 캄토테신 유도체인 CKD-602(belotecan)는 강력한 제1형 토포이소머라제 억제제 효과와 더불어 수용성으로서 기존의 난용성으로 인한 독성을 성공적으로 극복하였다. 다각적인 화학구조에 대한 연구를 거듭하여 분자구조상 두개의 중요부위를 확인하였는데 바로 E-고리와 A-, B-고리 부위이다. 이중 E-고리의 20번 탄소에 위치한 락톤기와 알파수산화기는 제1형 토포이소머라제-DNA 부산물의 안정을 위해 중요하며, A 및 B-고리의 변형이 수용성과 활성도를 증가시킬 수 있다는 사실이 증명되었다. CKD-602 역시 수용성 및 항암효과의 증가를 위해 7번 탄소의 B-고리 부위의 치환을 시도하였다(Fig. 3). Lee 등은 CKD-602가 광범위한 암세포주에서 캄토테신(camptothecin)과 토포테칸(topotecan)에 비해 우수한 항암효과가 있다고 하였다. 또한 L1210 백혈병 누드마우스모델에서 최대내성용량(maximum tolerated dose, MTD)이 25mg/kg로 비교적 안전한 약재임을 확인하였다[9]. 일반적으로 알려진 캄토테신계 약물의 부작용은 크게 혈액학적 부작용과 비혈액학적 부작용으로 분류할 수 있다. 혈액학적 부작용으로는 발열을 동반한 호중구감소증, 패혈증, 출혈 등이 있으며, 비혈액학적 부작용으로는 구역, 구토, 탈모 등 피부계 부작용 및 위장관, 신장, 신경계에 대한 독성을 들 수 있다. Kim 등은 CKD-602의 동물연구에서 이러한 캄토테신계 약물의 부작용 중 임상적용이 가능한 용량보다 10배 이상의 고용량의 투여시에도 위액분비 증가를 제외한 이상약물반응은 발견되지 않았다고 보고하고 있다[10]. 또한 최근 국내 임상 연구들에서도 심각한 전신적인 독성보다는 호중구감소증 및 백혈구감소증의 가역적이며 조절가능한 수준의 부작용만이 보고되는 등 비교적 안정성이 입증되고 있다. 하지만 현재까지는 표준화학요법에 실패하거나 표준화학요법을 시행할 수 없는 환자, 즉 표준치료 후에 재발 또는 악화되어 더 이상의 항암화학요법, 수술로 효과를 보기 어려울 것으로 판단되는 저항성(refractory) 또는 재발성(recurrent) 난

소암 및 대장암의 치료, 1차화학요법에 실패한 저항성 또는 재발성 제한병기(limited disease) 소세포성 폐암의 치료, 진행병기(extensive disease) 소세포성 폐암의 치료에 주된 적응증을 두고 제한적으로 사용되고 있다.

본 연구에서는 구강암세포주인 HSC-3 세포주 및 A253 세포주에서 각각 폐암세포주인 A549 세포주 및 대장암 세포주인 HCT116 세포주보다 적은 농도에서 효과적으로 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과는 상당히 고무적인 것으로, 구강암 세포주에서의 세포독성이 현재 임상적인 적용이 가능한 폐암 세포주 및 대장암 세포주와 비교하여 우수한 결과가 관찰되었다는 사실은 CKD-602의 구강암에 대한 적용 가능성을 고려하는데 객관적 근거로 제시될 수 있을 것이다. 또한 각 세포주 간의 시간에 따른 증식능의 차이도 관찰되었는데 HSC-3의 경우에 있어서는 CKD-602 처리 24시간 후에도 효과적인 세포독성이 관찰되었다. 이는 구강내 세포주 각각의 세포 특성 및 위치적 특성, 다시 말해 타액선과 혀에 발생한 세포주 간에 차이 등을 반영하는 것이라 할 수 있다.

세포사멸은 조직의 항상성과 형태의 유지, 세포수의 조절, 손상된 혹은 비정상적인 세포의 제거, 감염에 대한 방어기작으로써 무척 중요한 역할을 하며, 생명체는 세포의 성장, 분화 및 사멸과정을 정확하게 조절함으로써 그 생명을 정상적으로 유지한다[11]. 세포사멸의 유형은 세포괴사(necrosis)와 세포고사(programmed cell death, apoptosis)로 분류할 수 있으며, 이중 세포고사는 최근에 매우 활발히 연구 보고되는 분야로 각종 유전자의 발현과 발현산물인 단백질의 활성화가 동반되어 세포의 사망을 유도하는 복잡한 과정으로 설명되고 있다[12]. 이러한 세포고사는 세포내 생리적, 능동적 자살기전으로 다세포 생명체의 발달 및 분화와 항상성을 유지하는데 필수불가결한 역할을 한다[13,14]. 세포고사는 많은 인자에 의해 다양한 종류의 세포에서 발생하며 세포괴사와는 달리 리소좀(lysosome) 효소의 유리가 없고 세포고사체(apoptotic body)가 발견되며 세포의 축소, 핵의 농축 및 특징적인 사다리형 DNA 분절 등이 발견된다[15]. 또한 최근 Kang 등의 보고에 의하면 DNA에서 제1형 토포이소머라제 분절 목표(cleavage target)가 텔로메어(telomere)와 관련이 있으며 텔로머라제(telomerase)의 활성에 의해 텔로메어가 줄어들지 않고 길게 반복된 텔로메어(telomeric repeat)를 가진 암세포들에 있어서 제1형 토포이소머라제 억제제들이 재결합을 방해함으로써 더욱 특이적으로 DNA 손상을 가할 수 있으므로, 결과적으로 세포고사를 유발할 수 있다고 하였다[16].

본 연구에서는 FACS 분석을 통해 CKD-602의 세포살상능의 세포사멸에 관여하는 양상을 관찰하였으며, 세포사멸 부분 중에 세포괴사 뿐 아니라, 다량의 세포고사 부분이 존재함을 통해 CKD-602의 세포독성 효과가 상당 부분 세포고사와 관련이 있음을 확인하였다.

Ⅴ. 결　　론

본연구를 통해 CKD-602의 구강암 세포주에 대한 우수한 세포살상능을 관찰하였으며, 이러한 세포살상능이 세포고사에 의한 효과임을 확인하였다. 이는 CKD-602의 구강암 치료제로서의 가능성을 확인하고, 향후 CKD-602에 대한 연구에 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다. 이를 뒷받침하기 위해 CKD-602의 구강암 분야에 대한 추가적인 전임상 및 임상 연구가 필요하다고 판단되며, 대표적으로는 본 연구에서 관찰되는 세포고사에 대한 기전을 분석하여 어떠한 중간 기질 및 인자들이 CKD-602에 의한 세포고사 유도에 민감화하게 하는 지를 평가하고 아울러 제2형 토포이소머라제 억제제인 타약제와의 병용요법 등에 대한 연구를 통해 DNA 재결합을 효과적으로 억제할 수 있을 지에 대한 연구도 중요할 것이다. 또한 제1형 토포이소머라제가 구강암 세포에 많은 지에 대한 기본적인 평가도 필수적일 것이다. 장차 상기한 내용들에 대한 CKD-602의 지속적인 연구를 통해 구강암 치료에 대한 적용가능성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Hsiang YH, Liu LF: Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. Cancer Res 1988;48:1722-1726.
2. Wang Z, Droge P: Differential control of transcription-induced and overall DNA supercoiling by eukaryotic topoisomerases in vitro. EMBO J 1996;15:581-589.
3. Husain I, Mohler JL, Seigler HF, Besterman JM: Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. Cancer Res 1994;54:539-546.
4. Takimoto CH, Wright J, Arbuck SG: Clinical applications of the camptothecins. Biochim Biophys Acta 1998;1400:107-119.
5. Rubin EH: DNA topoisomerase expression in tumors-a novel target for chemotherapy. Hum Pathol 2000;31:631-632.
6. Madden KR, Champoux JJ: Overexpression of human topoisomerase I in baby hamster kidney cells: hypersensitivity of clonal isolates to camptothecin. Cancer Res 1992;52:525-532.
7. Holden JA, Rahn MP, Jolles CJ, Vorobyev SV, Bronstein IB: Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase I in formalin fixed, paraffin wax embedded normal tissues and in ovarian carcinomas. Mol Pathol 1997;50:247-253.
8. Giovanella BC, Stehlin JS, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Liu LF et al: DNA topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. Science 1989;246:1046-1048.
9. Lee JH, Lee JM, Kim JK, Ahn SK, Lee SJ, Kim MY et al: Antitumor activity of 7-[2-(N-isopropylamino)ethyl]-(20S)-camptothecin, CKD602, as a potent DNA topoisomerase I inhibitor. Arch Pharm Res 1998;21:581-590.
10. Kim EJ, Lee RK, Suh JE, Han SS, Kim JK: Safety pharmacology of CKD-602, a novel anticancer agent. Arzneimittelforschung 2003; 53:272-279.
11. Evan G: Cancer-a matter of life and cell death. Int J Cancer 1997; 71:709-711.
12. Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995; 267:1445-1449.
13. Nagata S: Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-365.
14. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
15. Clarke PG, Clarke S: Historic apoptosis. Nature 1995;378:230.
16. Kang MR, Muller MT, Chung IK: Telomeric DNA damage by topoisomerase I. A possible mechanism for cell killing by camptothecin. J Biol Chem 2004;279:12535-12541.