

두경부편평세포암종에서 Gleevec의 효과

한림대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실,*
Department of Surgery, Division of Head and Neck Surgery, University of California,
San Diego, California, USA**

주형로* · Robert A. Weisman**

= Abstract =

Effect of Gleevec on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Hyung Ro Chu, M.D.,* Robert A. Weisman, M.D.**

Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery,* Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea,
Department of Surgery, Division of Head and Neck Surgery,** University of California, San Diego, California, USA

Purpose : The serine/threonine kinase Akt was described to inhibit apoptosis in cancer. This study was to examine the effect of Gleevec on head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) through the mechanism of Akt.

Experimental Design : Gleevec was introduced into the HNSCC cell lines UMSCC10B, HN12 and HN30 in a range of concentrations. Cell viability was assessed by clonogenic survival analysis. Targets of Gleevec (PDGFR, c-Kit, and c-Abl) were evaluated by Western blot. HNSCC tissue samples were stained for PDGFR, c-Kit and phosphorylated Akt. Akt phosphorylation following Gleevec treatment was assessed using Western blot. Akt siRNA was used to as the positive control.

Results : Colony forming efficiency decreased with an increase in concentration of Gleevec. Expressions of PDGFR, c-Kit, and c-Abl were observed in HNSCC cells. Immunohistochemistry confirmed high expression of PDGFR, c-Kit, and p-Akt in human HNSCC tissues. Akt kinase activity was significantly inhibited with increasing concentration of Gleevec in HNSCC cells, and near complete dephosphorylation of Akt was observed at 6 μ M of Gleevec in the UMSCC10B and HN30 cell lines.

Conclusions : Gleevec at clinically comparable concentrations caused a dose dependant decrease in HNSCC survival. The decreased cell survival was related to the inhibition of Akt kinase activity and dephosphorylation of Akt. Akt signaling pathway may be a relevant target for Gleevec in treating HNSCC.

KEY WORDS : Akt · Tyrosine kinase · Serine threonine kinase · Head and neck cancer.

서론

두경부편평세포암종은 발생 빈도로는 여섯번째에 해당하는 다빈도의 악성종양으로, 지난 30년간 수술기법의 발달과 약제의 개발 및 다양한 병합치료에도 불구하고 전체 5

년 생존율은 여전히 50% 정도에 머물고 있는 실정이다¹⁾. 이러한 한계는 종양의 생물학적 특성과 관련된 분자유전생물학적 연구에 더욱 관심을 갖게 하였다. 두경부암에서 밝혀진 분자생물학적 변이는 주로 세포증식에 관여하는 종양 유전자(oncogene)의 활성화와 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 비활성화에 관한 것으로, 분자생물학적 기전에 대한 다각적 이해는 치료 표적을 새로이 설정하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

세포에서 protein tyrosine kinase(PTK)는 세포분화, 성장과 세포간 신호전달에 중요한 역할을 한다. 정상 상태에서

교신저자 : 주형로, 150-950 서울 영등포구 대림1동 948-1
한림대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실
전화 : (02) 829-5217 · 전송 : (02) 842-5217
E-mail : hrchu@hallym.ac.kr

PTK의 활성은 엄격히 통제되고 조절되지만, 돌연변이나 다른 유전적 변형에 의하여 PTK의 신호전달과정에 혼란이 초래되면 kinase의 활성이 통제를 벗어나게 되고 악성변환이 발생할 수 있다²⁾. Protein kinase는 세포에 광범위하게 존재할 뿐만 아니라 많은 정상적인 생물학적과정에서 필수적이기 때문에 치료의 표적으로서는 적절하지 않은 것으로 여겨져 왔다. 그러나 Gleevec(STI-571, imatinib, CGP 57148 ; Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland)이 개발되고 몇몇 암종에서 효과를 확인함으로써, PTK가 암종에서 치료를 위한 표적 분자로 유용하다는 것이 증명되었다. Gleevec은 PTK 억제제로 c-Abl, Bcr-Abl, platelet derived growth factor (PDGF), c-Kit의 활성을 제한하는 효과를 가지고 있다³⁻⁵⁾. 이 약제는 염색체전위의 결과로 발생하는 Bcr-Abl이 원인이 되는 만성골수백혈병(chronic myelogenous leukemia)의 치료에 효과적으로 사용되고 있으며, c-Kit의 활성화와 관계가 깊은 위장관기질종양(gastrointestinal stromal tumor)과 소세포폐암에서 임상연구가 진행중에 있다⁵⁻⁸⁾. Gleevec은 장점은 경 구강 투여가 가능하며, 다른 항암제와 비교하여 합병증이 경미하다는데 있다. 가장 흔한 합병증으로는 약 10%에서 발생하는 정도의 피부 발적, 설사, 부종, 구역, 근육통 및 관절통 등이다. 이러한 PTK의 세포 내 활성은 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)을 유도하여 inositol phospholipid를 발생시키고, 궁극적으로는 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 Akt를 활성화시킨다^{9,10)}. Akt는 serine-threonine kinase의 일종으로 protein kinase B로 알려져 있으며 세포주기의 진행, 평활근육세포의 분화, 포도당 섭취의 촉진, 신혈관 생성, 세포자멸사의 억제와 세포성장의 촉진 등에 중요한 역할을 한다^{2,9,11)}.

저자들은 초기 실험에서 HNSCC 세포주에서 PDGFR, c-Kit과 c-Abl이 높게 발현되는 것은 Western blot으로 확인하였다. 이러한 결과를 기초로 하여 두경부암에서 Gleevec의 치료효과를 알아보고, PTK의 활성화에 의해 유발되는 PI3K을 매개로 하는 Akt의 활성을 측정하여 효과 경로를 밝히고자 하였다. 또한 인체 두경부편평세포암종의 조직에 대하여 PTK와 Akt 면역조직화학염색을 시행하여 그 존재 여부를 확인하였다.

대상 및 방법

1. 약 제

Gleevec(Novartis, Basel, Switzerland)은 Me₂SO₄에 용해하여(DMSO), 3mM 상태로 -20℃에서 보관하였다. 약제는 모든 실험단계에서 사용 직전에 필요한 농도로 희석하여 변성을 최소화하였다.

2. 세포주와 세포배양

세포주는 인체 HNSCC에서 확립한 UMSCC10B, HN12, HN30으로 명명된 세가지를 사용하였다. UMSCC10B는 University of Michigan, HN12와 HN30은 National Institute for Dental and Craniofacial Research에서 각각 제공된 것이다. 세포 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium에 10% fetal bovine serum, 10,000unit/ml penicillin G sodium, 10mg/dl streptomycin sulfate(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)와 L-glutamine(Invitrogen Co.)를 첨가하여 사용하였으며, 37℃ 5% CO₂ 상태를 유지하였다.

3. Gleevec 표적 검사를 위한 Western blot analysis

Gleevec의 표적으로 알려진 PTK(PDGFR, c-Kit, c-Abl)의 존재 여부를 확인하고, Gleevec의 효과를 확인하기 위하여, 3개의 세포주에 Gleevec 6μM을 가하고 24시간 배양하였다. 대조군은 DMSO만으로 처리하였으며, 각 배양용기의 세포들은 trypsin을 처리하여 세포를 모든 다음 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 원심분리(1,500g, 4℃, 4분)하여 세포를 얻었다. 분리된 세포는 20mM Tris (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄와 1μg/ml leupeptin 로 구성된 lysis buffer로 처리하였다. 세포 추출물은 10% Nu-PAGE® Novex Bis-Tris Gel(Invitrogen Co.)에서 전기영동 하여 분리한 다음, nitrocellulose membrane(0.45μm ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 전기적으로 전달(transfer) 시켰다. 일차항체를 결합시키기 전에 비특이적인 결합을 없애기 위하여 PBS 용액에 5% 무지방 건조유를 용해 시킨 차단 완충액(blocking buffer)에 두시간 처리하였다. 흡착된 단백질들은 일차항체 anti-PDGFR α 항체(1 : 200 희석), anti-PDGFR β 항체(1 : 200), anti-c-Kit 항체(1 : 200), anti-c-Abl 항체(1 : 100 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 이차 항체는 일차항체와 반응시킨 membrane을 PDGFR α, PDGFR β와 c-Kit는 1 : 2,000 희석한 anti-rabbit 항체에, c-Abl은 1 : 2000 희석한 anti-mouse 항체에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 화학발광 검출용액(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 방사선필름에 발색반응을 유도하였으며, 단백질의 크기는 표지자로 이용하기 위하여 사용한 SeeBlue Plus2®(Invitrogen Co.)를 기준으로 확인하였다.

4. Clonogenic survival analysis

각 세포주들은 50mm 직경의 배양용기에 용기 당 700개 세포의 농도로 분주하였으며, 세포주 마다 6개의 용기 3벌을 준비하였다. 분주 후 1일째, 세포들이 용기에 부착되

었다고 판단될 때, 6개의 배양 용기에 Gleevec을 다른 농도로 처리하였다(0, 0.5, 1, 3, 6, 10 μ M). 배양 8일째, 배양액을 제거하고 crystal violet으로 염색 후 흐르는 물에 세척하였다. 염색은 세포들이 모여서 이루어진 colony들이 점상으로 나타나며, 현미경으로 관찰하여 colony 내의 세포 수가 50개 이상 되는 colony를 최소 포함 기준으로 조절하여 AlphaImager 2200 & 1220 software(Alpha Innotech Co., San Leandro, CA)로 염색된 colony 수를 측정하였다.

5. 인체 HNSCC 조직의 면역조직화학염색

술 후 얻어진 HNSCC 조직에 대하여 PDGFR과 c-Kit은 토끼 다클론항체(Santa Cruz Biotechnology), phosphorylated Akt(p-Akt)는 쥐의 단클론항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 사용하여 염색하였다. 음성 대조군으로는 일차항체를 가하지 않은 동일 조직을 이용하였으며, 정상 대조군으로는 정상 편도, 구개수과 후두 점막을 각각 5예씩 같은 방법으로 염색하였다.

파라핀 포매 조직을 사용하였으며, xylene에서 탈파라핀 과정을 거친 후 ethanol에서 함수화를 유도하였다. 항원 복구를 위하여 1X DAKO Target Retrieval 용액에 담그고 70°C에서 10분간 가열하였다. 내인성 과산화효소의 활성의 제거를 위하여 3% H₂O₂에 처리하고, biotin과 avidin에 대한 비특이적인 반응을 차단하기 위하여 차단용액(Protein Block Serum-Free, DAKO, Carpinteria, CA)에서 30분간 반응시켰다. 배경 염색(background staining)을 줄이기 위하여 60분간 1 : 20 염소(goat) 혈청을 가하였다. 각각의 일차항체를 슬라이드에 도포한 후 PDGFR과 c-Kit은 상온에서 한시간, p-Akt는 상온에서 24시간 반응시켰다. 이차항체는 Streptavidine/HRP이 결합된 것(LSAB2, DAKO)을 사용하여, 슬라이드 세척 후 3,3'-diaminobenzidine (DAB, DAKO)로 발색반응을 유도하였다. 핵의 대조 염색으로 Gull's II hematoxylin을 사용하였으며, 조직의 면역반응 정도는 1,000개의 종양세포에서 염색된 세포의 수를 계산하여 20% 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

6. Akt kinase 활성의 측정

Akt kinase 활성을 측정하기 위하여 세가지 세포주에 대하여 각각 세개의 배양용기(100mm)에 같은 수의 세포를 분주하였다. 배양 용기에서 24시간 배양 후, Gleevec을 0, 5, 10 μ M의 농도로 처리하여 24시간 반응시킨 후 채취하였다. 채취한 세포들은 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)을 첨가한 0.5ml lysis buffer에 넣고 sonification, 얼음에서 5분간 반응, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하게 되는데, 이때 얻어진 상층액에 세포내의 단백질을 포함한 cell lysate가 된다. 각각의 세포주에서 얻어진 cell lysate의 단백질의 양은 BCA protein assay reagent

kit(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 표준화하였다. 각각의 cell lysate를 200 μ l씩 취한 후, immobilized Akt 일차항체 20 μ l를 첨가하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 이후 cell lysate/immobilized 항체를 14,000G로 30초간 4°C에서 원심분리를 하면 하층에 침전물이 나타나는데, 이것이 항체와 반응하여 생긴 pellet이다. 이때 상층액은 버리고 pellet을 취하여 500 μ l 1X lysis buffer로 두차례 세척한 후, 25 mM Tris(pH 7.5), 5mM β -glycerophosphate, 2mM DTT, 0.1mM Na₃VO₄, 10mM MgCl₄로 구성된 1X kinase buffer 500 μ l로 두차례 세척하였다. 세척한 pellet에 50 μ l 1X kinase buffer를 가하여 현탁액을 만들고, 10mM ATP와 1 μ g의 GSK-3 fusion 단백질을 가하여 30°C에서 20분간 반응시켰다. 반응은 25 μ l의 sodium dodecyl sulfate(SDS) sample buffer로 종료 시킨 후, 14,000G로 30초간 원심분리 하였다. 세포 추출물은 동일한 방법으로 전기영동 하여 membrane에 이동시켰다. 각 검체의 양은 BCA protein assay로 얻어진 측정치를 기준으로 동일한 양의 단백질을 가하였다. 차단 완충액에 2시간 반응시킨 membrane은 세척 후 1 : 1,000 phospho-GSK-3 α/β (Ser 21/9) 항체에서 4°C 24시간, 이후 1 : 2,000 HRP conjugated 이차항체와 1 : 1,000 HRP conjugated anti-biotin 항체를 실온 1시간 반응 시킨 다음 세척하였다. 화학발광검출용액(Pierce)을 이용하여 방사선편류에 발색반응을 유도하였으며, 단백질의 크기는 표지자로 이용하기 위하여 사용한 SeeBlue Plus2[®](Invitrogen Co.)를 기준으로 확인하였다.

7. Akt siRNA를 이용한 Gleevec 효과의 검증

두경부편평세포암종에 대한 Gleevec의 Akt와 연관된 작용기전을 검증하기 위하여 세개의 세포주에서 Gleevec 처리 후 Akt와 p-Akt의 발현 정도를 비교하였으며, 양성 대조군으로 UMSCC10B 세포주에 대하여 Akt siRNA(Signal Silence[™] siRNA kit ; Cell Signaling Technology) 처리 후의 Akt와 p-Akt의 발현 정도를 비교하였다. Akt siRNA는 RNA의 합성을 방해하여 선택적으로 Akt의 발현을 억제하는 작용을 한다. UMSCC10B 세포주를 각각 세개의 50mm 배양 용기에 동일 개수의 세포를 분주한 후 세포의 분포가 50% 이내 범위를 넘지 않는 시점까지 배양한 다음, 24시간 동안 6 μ M Gleevec 또는 Akt siRNA으로 처리하였다. 음성 대조군은 Transfectin 시약만을 첨가하였다. Akt siRNA와 음성 대조군 실험을 위하여 혈청을 첨가하지 않은 1ml 세포 배양액을 두벌의 microfuge 관에 준비한 후, 20 μ l의 Transfectin 시약을 가하고 실온에서 10분간 반응시켰다. 그 중 하나의 관에는 Akt siRNA를 100nM 첨가하여 실온에서 10분간 더 반응시켰다. 준비된 시약들은 구분된 배양용기에 각각 첨가하고 잘 섞일 수 있도록 30초간 가

법계 흔들어진 후 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포들은 trypsin 처리와 원심분리를 통하여 채취한 다음, lysis 완충액으로 단백질을 추출하였다. 동일한 방법으로 전기영동 한 후, 일차 항체로 anti-p-Akt 항체(1 : 100 ; Cell Signaling Technology), anti-Akt1 항체(1 : 100 ; Santa Cruz Biotechnology)와 anti- β -actin 항체(1 : 5,000 ; Sigma-Aldrich Inc.)를 사용하였다. 이차 항체로 p-Akt는 1 : 5,000 anti-mouse, Akt1은 1 : 10,000 anti-goat, actin은 1 : 2,000 anti-mouse를 사용하였다. 화학발색반응을 이용하여 발현 정도를 관찰하였다.

결 과

1. 두경부편평세포암종 세포주에서 protein tyrosine kinase의 발현

세개의 세포주 UMSCC10B, HN12와 HN30에서 PDGFR α , PDGFR β , c-Kit과 c-Abl이 높게 발현되었다(Fig. 1). 그러나 6 μ M의 Gleevec으로 처리한 세포주의 경우에도 이러한 PTK의 발현에 있어서 양적인 차이는 보이지 않았다.

2. 세포주에 대한 Gleevec의 효과

세포 증식에 대한 Gleevec의 효과는 Gleevec의 농도가 증가할수록 세포의 증식이 억제되었다. 배양 용기의 colony의 분포는 육안적으로 HN12와 HN30 세포주의 경우, 3 μ M

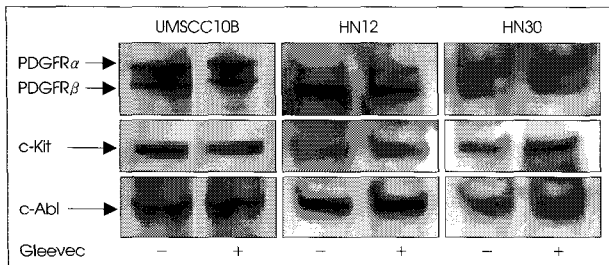


Fig. 1. Western blot analysis of PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit, and c-Abl in UMSCC10B, HN12, and HN30 cells. The protein tyrosine kinases were present in all three cell lines, but the expressions were not changed after 24 hours of Gleevec treatment at 6 μ M.

의 농도부터 급격히 감소하였으나 UMSCC10B 세포주에서는 3 μ M과 6 μ M의 농도에서도 상당수의 colony들이 관찰되었다(Fig. 2). AlphaImager를 이용하여 세포주 당 세벌의 배양 용기에서 50개 이상의 세포로 구성된 colony 수만을 측정된 결과에서도 육안적 소견과 동일하게 Gleevec에 의한 colony 형성능의 억제 정도를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3. 면역조직화학 염색

Gleevec의 표적으로 알려져 있는 PTK와 또 다른 표적으로 추정되는 Akt가 인체 종양세포에 실존하는지 알아보기 위하여, 수술 후 얻은 37예의 HNSCC 파라핀 포매 조직에 대하여 면역조직화학염색을 시행하였다. Fig. 4는 PDGFR, c-Kit 그리고 활성화된 형태인 p-Akt의 결과로, 양성 염색은 주로 세포질에 나타났다. 양성 염색율은 PDGFR이 37예 중 36예로 97.3%이었으며, c-Kit와 p-Akt는 각각 70.3%(26예)와 67.6%(25예)이었다.

4. Akt kinase 활성화에 대한 Gleevec의 효과

세포 내의 신호전달 경로에서 여러 가지 PTK 대한 Gleevec의 효과를 매개로 한 Akt의 억제 여부를 확인하기 위하여 Gleevec 처리 유무에 따른 Akt kinase의 활성화 정도를 측정하였다. Fig. 5에서 띠의 밀도는 활성화의 정도를

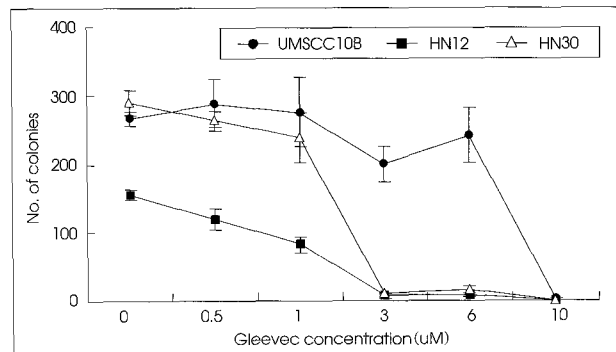


Fig. 3. Effect of Gleevec on tumor cell viability. Colony-forming efficiency was determined 8 days later. The colonies were counted if it had equal or greater than 50 cells. Each value represented the mean \pm standard deviation for three independent experiments.

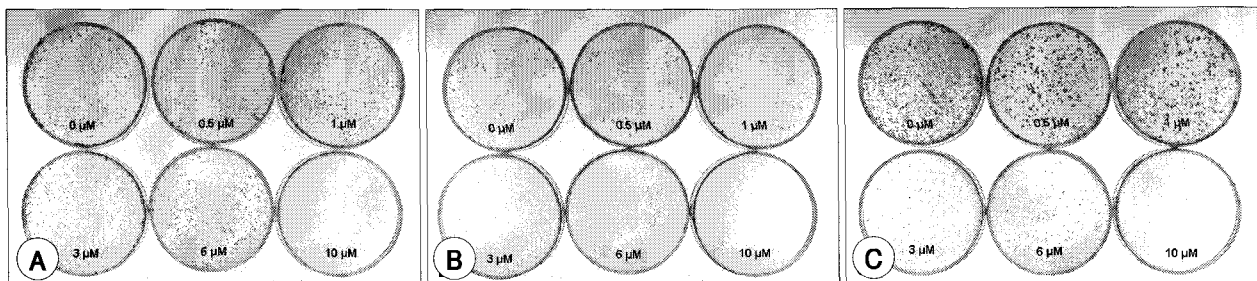


Fig. 2. Clonogenic assay in three head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) cell lines. Each cells line was exposed to control (DMSO) or increasing concentration of Gleevec(0, 0.5, 1, 3, 6, and 10 μ M) and stained eight days after seeding. The darker staining spots represented viable cells. The viability of UMSCC10B cell (A) was grossly inhibited only at the dose of 10 μ M Gleevec. Cell viability of HN12 cells(B) and HN30(C) cells were markedly inhibited at the dose of 3 μ M Gleevec. Each assay condition was performed in triplicate.

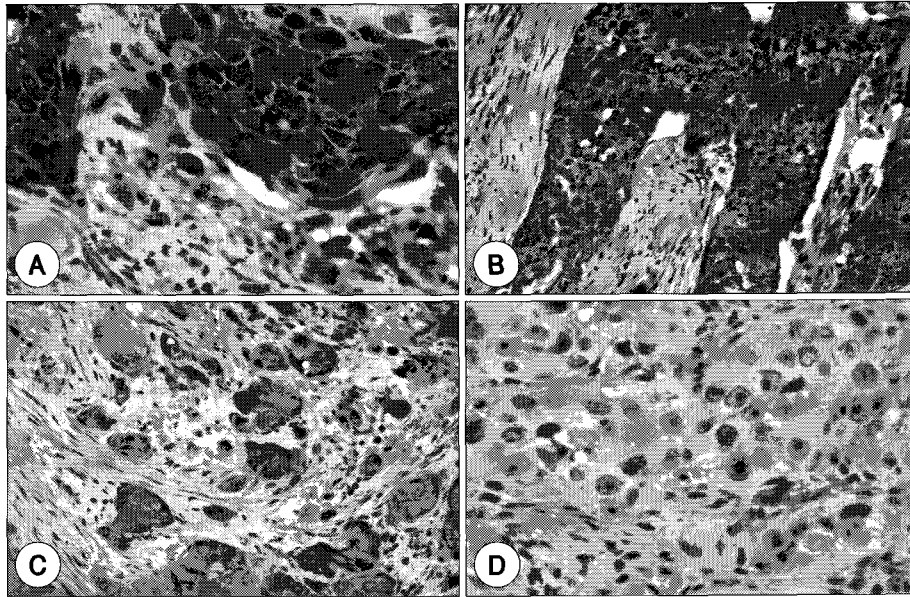


Fig. 4. Immunohistochemical detection for PDGFR (A), c-Kit (B), and phospho-Akt (C) and negative control (D). Positive staining indicated the presence of p-Akt. Positive staining was observed mainly in the cytoplasm and evenly distributed within the tumor. p-Akt is a phosphorylated form of Akt. The images were photographed at 400 \times (A, C, and D) and 200 \times (B) magnification.

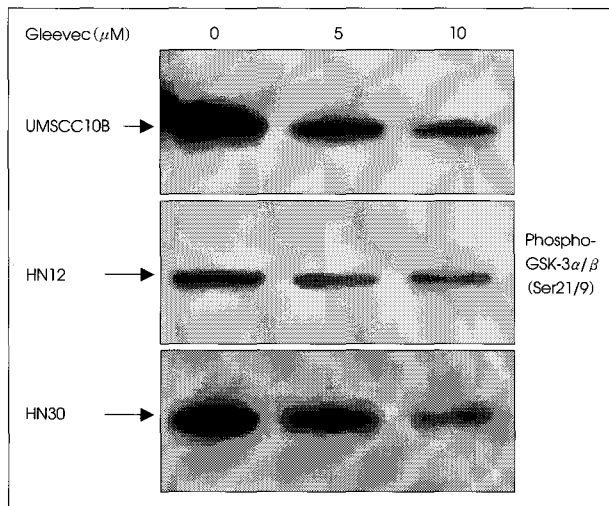


Fig. 5. Analysis of Akt kinase activity in Gleevec-treated head neck squamous cell carcinoma cell lines. Cells were exposed to 0, 5, and 10 μ M of Gleevec for 24 hours and lysed for immunoblot analysis. Kinase assay was performed using GSK-3 fusion protein as a substrate. The protein levels of phosphorylation of GSK reflect the Akt kinase activity. Akt kinase was reduced by approximately 50% at 5 μ M of Gleevec in all three cell lines, and approximately by 75% at 10 μ M in UMSCC10B and HN30 cells.

나타내는 것으로 밀도가 높을수록 활성화가 높다는 것을 의미한다. 세개의 세포주에서 Akt kinase의 활성화는 Gleevec의 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 5 μ M에서 약 50%의 활성화가 감소되었고 10 μ M에서는 감소 정도가 더 높게 나타났다(Fig. 5).

5. Akt에 대한 Gleevec과 Akt siRNA의 효과

세포주에 대한 Gleevec과 Akt siRNA의 효과는 Akt1의

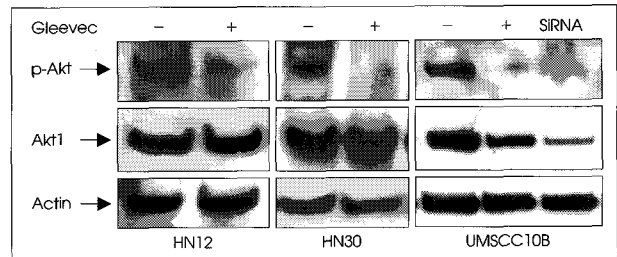


Fig. 6. Gleevec or Akt siRNA-dependent suppression in Akt expression. Western blots showed phosphorylated Akt (p-Akt), Akt1, and β -actin from three HNSCC cell lines. The three cell lines were treated with Gleevec at 6 μ M for 24 hours and separate UMSCC10B cells were treated with 100 nM Akt siRNA for 24 hours as positive control. The expressions of Akt1 were not significantly altered with Gleevec treatment, with the exception of UMSCC10B, that showed approximately 50% reduction in Akt1 expression. The presence of p-Akt was severely reduced at a level similar to the effect of Akt siRNA.

발현 정도에서 차이를 보였다. UMSCC10B 세포주에서 활성화 형태인 p-Akt는 Akt siRNA를 처리한 경우와 Gleevec을 처리한 경우 모두에서 발현이 거의 완전하게 억제되었으나, Akt1의 발현은 Gleevec을 처리한 경우 Akt siRNA 경우보다 상당히 높은 밀도로 발현되었다(Fig. 6). HN12와 HN30 군에서도 p-Akt의 발현은 미약하게 감지되었으나, Akt1의 발현은 음성 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

고 찰

실험 결과 두경부편평세포암종의 세포주에서, PTK 중 PDGFR, c-Kit과 c-Abl이 높게 발현되었다. 이러한 PTK들

은 Gleevec의 표적으로 알려져 있으며, 두경부편평세포암종의 세포주 뿐 아니라 술 후 얻어진 인체 암 조직에서도 높은 양성율을 보였다. 이 결과는 PTK 억제제로 임상에서 사용되고 있는 Gleevec이 두경부암에서도 효과를 나타낼 수 있다는 이론적 근거를 제시하고 있다. Clonogenic analysis에서는 3 μ M 농도의 Gleevec에서부터 HN12와 HN30 세포주에서 급격한 세포의 감소를 관찰 수 있으며, 이는 임상적으로 만성골수백혈병에서 Gleevec을 투여할 때의 혈중농도와 상응하는 농도에 해당한다³⁾. 대부분의 항암제들은 항종양 효과를 나타내는 농도에서 높은 독성을 가지고 있지만, Gleevec의 경우에는 치료용량에서 경미한 독성을 나타낸다는 장점을 가지고 있다.

그러나 세포주들을 Gleevec으로 처리했을 때 PDGFR, c-Kit, c-Abl의 발현 정도에는 차이를 보이지 않았다. PTK들이 세포에 직접적인 작용을 나타내기 위해서는 하부 신호전달체계의 단계적인 활성화가 이루어지게 되는데, 여기에 관여하는 중요한 단백질 중 하나가 Akt이다. 저자들은 Gleevec이 암세포의 증식을 억제하는 경로로 PI3K/Akt 또는 PI3K와 무관한 독립적인 Akt 경로의 가능성을 추정하였다. Akt는 57kD의 pleckstrin homology (PH) domain을 갖는 serine/threonine kinase의 일종으로, PH domain은 선택적으로 phosphatidylinositol(3, 4) biphosphate(PIP2)와 phosphatidylinositol(3, 4, 5) triphosphate(PIP3)에 결합하면서 인산화 되고 활성화된다⁹⁾¹⁰⁾. 이러한 PIP2와 PIP3의 생성은 세포에서 PTK의 활성화가 나타나면서 이루어지게 되므로, PTK활성은 PI3K/Akt 경로 활성화의 상위 단계에 해당한다. 최종적으로 인산화 과정을 거쳐 활성화된 Akt는 세포 성장을 자극하고 세포자멸사를 억제하여 암의 진행에 중요한 역할을 하며, 인산화된 Akt는 유방암, 췌장암 및 난소암 등과 연관성을 가지고 있다¹²⁻¹⁴⁾. Gleevec이 Akt에 미치는 직접 또는 간접적인 효과를 알아보기 위하여 GSK-3 융합 단백질(fusion protein)을 사용하여 Akt kinase 활성을 측정하였다. 이 실험에서는 GSK-3 α/β (Ser 21/9) 항체를 이용하여 GSK-3의 인산화를 검출하게 되는데, Western blot에서 나타나는 phospho-GSK-3 α/β (Ser 21/9)의 발현 정도는 Akt kinase 활성을 의미한다. HNSCC 세포주 세가지 모두에서 Gleevec의 농도가 증가함에 따라 Akt kinase 활성은 의미 있게 감소하였으며, 이는 Gleevec이 Akt의 인산화를 억제하기 때문인 것으로 판단된다.

인체 HNSCC과 Akt의 연관성은 여러 연구에서 제시되었다. Amornphimoltham 등¹¹⁾은 인체 HNSCC에서 병변의 진행과 관련된 활성 Akt의 발현을 검출하였으며, Grille 등¹⁵⁾은 Akt 경로의 활성이 HNSCC 세포의 침습과 epithelial-mesenchymal transition을 유도한다고 보고하였다. 저자들의 결과에서도 면역조직화학염색에서 활성 형태의 p-Akt

가 인체 HNSCC 조직의 67.6%에서 양성을 보였다. Akt는 세포의 생존과 성장 과정에 관여하는 여러가지 세포 단백질의 기능을 조절한다. 최근까지 적어도 7개의 Akt 하부 신호전달 과정이 밝혀져 있으며, kinase로서 작용하여 적절한 기질의 인산화에 관여하게 된다¹⁶⁾. Akt에 의해 인산화되는 첫번째 표적들로는 세포자멸사를 촉진하는 BAD, caspase-9과 세포사를 조절하는 IKK α , forkhead transcription factor, Mdm2와 YAP 등이 그것이다¹⁷⁾¹⁸⁾.

저자들은 세포주에서 Gleevec의 Akt에 대한 억제효과를 비교하기 위하여 Akt siRNA를 양성 대조군으로 사용하였다. Akt siRNA로 처리한 세포들은 Akt1의 발현이 90% 이상 차단된 반면, Gleevec 처리 군에서는 UMSSC10B 세포주에서 정도의 발현 억제를 보였을 뿐 HN12와 HN30에서는 음성 대조군과 동일하게 높게 발현되었다. 하지만 활성 형태인 p-Akt의 발현은 Gleevec과 Akt siRNA가 거의 유사하게 완전한 발현 차단 효과를 나타내었다. 이 결과는 Gleevec이 주로 Akt의 인산화 과정을 억제하여 Akt의 활성이 차단되고, 결과적으로 세포의 증식을 억제한다고 추정하게 한다. 이 기전의 중간 과정에서 PTK와의 관련 여부는 이미 알려진 Gleevec의 작용 기전에 연결하여볼 때 상당한 가능성이 있다. 그러나 현재까지 밝혀진 Akt와 연관된 여러 신호전달 과정에 대한 추가 정보나 실험적 확인 없이는 HNSCC에서 Gleevec의 정확한 작용 기전을 밝히기에는 한계가 있다. 저자들의 결과로 판단할 수 있는 중요한 점은, Gleevec에 의한 Akt 인산화 억제가 적어도 하나 이상의 단계에서 신호경로에 영향을 미쳐, 암세포의 증식을 방해하는 효과가 나타나는 것으로 예상할 수 있다.

하나의 유전자 변이에 의해 암이 발생하고 진행되는 만성골수백혈병과는 달리, 대부분의 고형성 암종들은 다수의 유전적 변이를 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾²⁰⁾. 저자들의 실험에서 인체 HNSCC 조직에서 PDGFR, c-Kit과 p-Akt가 높은 양성율을 보이고 있지만, 이 암종의 발생에는 이들 이외의 여러 유전자적 변화가 발병 원인으로 작용할 것으로 판단된다. 그러나 PTK을 표적으로 하고 또는 Akt의 활성을 억제한다고 생각되어지는 Gleevec의 경우 독성이 거의 없기 때문에, 이러한 표적 단백질들이 과발현 되는 종양에서는 유용한 보조 약제로 효과적일 수 있다.

결론

두경부편평세포암종 세포주에서 Gleevec의 표적인 PTK들이 높게 발현되었다. Gleevec이 HNSCC 세포주에서 세포 증식을 억제하였으며, 이 기전은 Akt kinase activity의 down-regulation의 영향으로 판단되었다. 또한 인체 HNSCC 조직에서도 Gleevec에서도 Gleevec의 표적인 PTK

와 Akt의 발현을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 HNSCC의 치료에서 Gleevec의 유용성을 시사하는 것으로, 앞으로 동물실험과 신선 종양조직을 이용한 여러 kinase의 발현 양상에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : Akt · 타이로신키나제 · 두경부악성종양.

References

- 1) Jemal A, Clegg LX, Ward E, et al: *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. Cancer. 2004;101:3-27*
- 2) Blume-Jensen P, Hunter T: *Oncogenic kinase signalling. Nature. 2001;411:355-365*
- 3) Roskoski R Jr: *STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun. 2003;309:709-717*
- 4) Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A: *Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. Nat Rev Drug Discov. 2002;1:493-502*
- 5) Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ: *Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. Blood. 2000;96:925-932*
- 6) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al: *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med. 1996;2:561-566*
- 7) Hibi K, Takahashi T, Sekido Y, et al: *Coexpression of the stem cell factor and the c-kit genes in small-cell lung cancer. Oncogene. 1991;6:2291-2296*
- 8) Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al: *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science. 1998;279:577-580*
- 9) Vanhaesebroeck B, Alessi DR: *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. Biochem J. 2000;346:561-576*
- 10) Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT: *Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate: a new intracellular signalling system? Biochim Biophys Acta. 1993;1179:27-75*
- 11) Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, et al: *Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. Clin Cancer Res. 2004;10:4029-4037*
- 12) Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, et al: *Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:3636-3641*
- 13) Ballacosa A, de Feo D, Godwin AK, et al: *Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. Int J Cancer. 1995;64:280-285*
- 14) Vivanco I, Sawyers CL: *The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. Nature Rev Cancer. 2002;2:489-501*
- 15) Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, et al: *The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. Cancer Res. 2003;63:2172-2178*
- 16) McCormick F: *Cancer: survival pathways meet their end. Nature. 2004;428:267-269*
- 17) Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J: *Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. Mol Cell. 2003;11:11-23*
- 18) Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al: *Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. Nature. 2004;428:332-337*
- 19) Sawyers CL: *Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999;340:1330-1340*
- 20) Hanahan D, Weinberg RA: *The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70*