

구강 편평상피세포암에서 상피성장인자 수용체와 혈관내피성장인자 수용체 타이로신 활성화효소의 동시 억제

박영욱¹ · 이상신²

강릉대학교 치과대학 ¹구강악안면외과학교실, ²구강병리학교실

Abstract

CONCOMITANT INHIBITION OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR TYROSINE KINASES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Young-Wook Park¹, Sang-Shin Lee²

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University

Squamous cell carcinoma(SCC) of head and neck(SCCHN) is the sixth most common human malignant tumor. However, despite advances in prevention and treatment of SCC, the five-year survival rates for patients remain still low. To improve the outcome for patients with SCCHN, novel treatment strategies are needed. Overexpression of the epidermal growth factor(EGF) and activation of its receptor(EGFR) are associated with progressive growth of SCCHN. Vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling molecules are related with neoangiogenesis and vascular metastasis of SCC. In this study, we determined the therapeutic effect of AEE788(Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland), which is a dual inhibitor of EGFR/ErbB2 and VEGFR tyrosine kinases, on human oral SCC. At first, we screened the expression of EGFR, c-ErbB2(HER-2) and VEGFR-2 in a series of human oral SCC cell lines. And then we evaluated the effects of AEE788 on the phosphorylation of EGFR and VEGFR-2 in a oral SCC cell line expressing EGFR/HER-2 and VEGFR-2. We also evaluated the effects of AEE788 alone, or with paclitaxel(Taxol) on the oral SCC cell growth and apoptosis. As a result, all oral SCC cells expressed EGFR and VEGFR-2. Treatment of oral SCC cells with AEE788 led to dose-dependent inhibition of EGFR and VEGFR-2 phosphorylation, growth inhibition, and induction of apoptosis. Moreover, AEE788 sensitizes the cells to paclitaxel-mediated toxicity and apoptosis. These data mean EGFR and VEGFR-2 can be reliable targets for molecular therapy of oral SCC, and therefore warrant clinical use of EGFR/VEGFR inhibition in the treatment of patients with recurrent or metastatic oral SCC.

Key words : Oral squamous cell carcinoma, Epidermal growth factor receptor, Vascular endothelial growth factor receptor-2

I. 서 론

두경부 편평상피세포암종(squamous cell carcinoma)은 여섯 번째로 호발하는 악성종양으로 전세계적으로 매년 50

만 건의 증례가 발생되고 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 수많은 기법의 수술과 방사선 치료, 약물화학요법, 그리고 이들의 다양한 병합요법과 예방을 위한 처방들이 개발되어 왔으나 환자의 5년 생존율은 지난 30년간 50% 이하로 개선되

* 이 논문은 2005년도 강릉대학교 치과병원 협동임상연구비 지원에 의하여 수행되었음.

지 못하고 있다²⁾. 대부분의 치료 실패는 기존의 항암 요법으로 치료되지 않는 재발 혹은 전이 병소 때문인데, 이로부터의 불량한 예후는 결국 종양의 진행(progression)이나 전이와 연관된 기전에 대한 이해가 부족하기 때문이다. 따라서 구강 편평상피세포암종 환자에 대한 치료 효율을 증가시키기 위해 새로운 치료접근이 요구되며 이는 이 종양의 진행과 연관된 생물학적 인자들의 차단에 기초해야 할 것이다.

상피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; 이하 EGFR)는 erbB군 타이로신 인산화효소 수용체의 하나로(erbB1/HER-1) 두경부 편평상피세포암종을 비롯한 폐암, 유방암, 방광암, 전립선암 등 대부분의 상피성 악성종양에서 과발현된다³⁾. 이 인자는 세포막에 위치하여 상피성장인자(epidermal growth factor; 이하EGF)나 전환성장인자(transforming growth factor; 이하TGF- α)와 같은 특정 리간드가 결합됨으로써 이합중합(dimerization)되어 활성화되면 암세포의 증식과 생존에 결정적 역할을 수행할 뿐만 아니라 혈관형성이나 전이와 연관된 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 두경부 편평상피세포암종에서 EGFR의 과발현은 종물의 크기 증가⁵⁾, 병리학적 단계의 진전⁶⁾, 재발율의 증가⁷⁾, 생존율의 감소⁸⁾ 등 임상적으로 불량한 예후와 연관되어 있어 편평상피세포암에서 EGFR은 독립적인 예후인자로 여겨지고 있다. 이같은 연구결과들을 기초로 최근에는 PKI-166, ZD1839, C225와 같이 EGFR의 활성을 억제하는 물질들이 개발되어 두경부 편평상피세포암종의 치료에 실험적으로^{9,10)}, 또한 임상적으로¹¹⁻¹³⁾ 적용되어 그 결과들이 긍정적으로 보고되고 있다.

새로운 혈관의 형성을 의미하는 신생혈관형성(neoangiogenesis)을 위한 성장인자들 역시 종양세포의 증식과 혈관형성에 영향을 미쳐 종물의 성장과 전이에 중요한 역할을 수행한다. 즉 종물의 성장은 신생혈관을 요하고 혈관형성은 종물을 증식시키며, 다시 종양세포는 혈관내피세포의 생존과 이주, 그리고 증식을 일으키는 성장인자를 분비함으로써 자가분비 기전으로 혈관형성을 촉진한다. 강력한 혈관형성 촉진인자인 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하 VEGF)와 그 수용체인 혈관내피성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor; 이하 VEGFR) 또한 구강 편평상피세포암종 환자에서 질환의 진행과 연관되어 있는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 즉 구강 편평상피세포암종은 VEGF를 발현하여 혈관형성을 촉진하고 종양 내의 혈관내피세포에서 그 특정 수용체인 VEGFR-2/KDR/flk-1을 발현하는 것으로 밝혀졌다¹⁵⁾.

NVP-AEE788(AEE788; Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland)은 EGFR/ErbB2와 VEGFR 타이로신 인산화효소에 대한 억제제로 EGFR을 과발현하는 폐암,

두경부 편평상피세포암, 유방암, 진행된 위암, 결장직장암, 난소암, 전립선암, 그리고 뇌신경교종 세포의 증식을 억제하고, 마우스에 이종이식된 폐암과 전립선암 모델에서 항종양 효과를 보였다¹⁶⁾. 본 연구를 통하여 저자는 EGFR과 VEGF 신호전달 물질을 발현하는 편평상피세포암종에서도 EGFR/ErbB2와 VEGFR 타이로신 인산화효소 억제제가 항암 효과가 있을 것이라는 가설하에 구강 편평상피세포암종에서 AEE788의 실험실적 치료효과를 결정하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 세포주는 환자의 신선한 수술 조직으로부터 확립된 구강 편평상피세포암 세포주인 Tu212, Tu159, Tu167, JMAR, MDA1986, MDA1986LN, LN212으로 미국 텍사스주 MD Anderson 암센터 두경부 외과의 Jeffrey N. Myers 박사로부터 제공받았다. 또한 인간재대정맥 내피세포인 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)을 VEGFR-2의 양성대조 세포로 사용하였다. 본 연구에서 치료실험에 이용된 JMAR 세포주는, 구강 편평상피세포암으로부터 확립된 세포주인 Tu167을 연성 아가(soft agar)에서 연속적으로 계대배양 후 아노이키스(anoikis; 세포가 시험관이나 기질로부터에서 탈부착되었을 때 사멸하는 현상)에 저항성을 보이는 세포군으로부터 확립된, 침투성이 증가된 세포주이다¹⁷⁾. 세포들은 10% 우태아혈청, 글루타민, sodium pyruvate, 아미노산, 비타민(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA), 페니실린-스트렙토마이신(Flow Laboratories, Rockville, MD, USA)이 함유된 DMEM(Dulbeco modified Eagle medium; Gibco, USA)에 37°C, 5% CO₂, 95% 상대습도 하에서 미코플라스마와 병원성 바이러스 감염이 없는 상태로 배양된 후 실험에 이용되었다.

2. 화합물 및 시약, 항체

본 실험에 사용된 AEE788(분자량, 440.6)은 7H-pyrrolo[2,3-d] 피리미딘계 화합물로 경구 투여로 효과를 보이는 소분자 물질로 Novartis Pharma AG로부터 제공받았다. 생체내 투여를 위해 AEE788을 90% polyethylene glycol 300+10% 1-methyl-2-pyrrolidinone에 녹여 6.25 mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다. 탁솔제제인 paclitaxel과 propidium iodide(PI), 그리고 tetrazolium(MTT)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

3. Western Blotting

세포주에서 AEE788의 표적이 되는 EGFR(HER-1), ErbB2(HER-2), 그리고 VEGFR-2 발현 유무를 평가하기 위하여 용해완충액[1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 μ M leupeptin, 0.15 units/ml aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate]을 이용하여 각 세포주에서 총세포단백을 추출하였다. 시료를 샘플완충액 [0.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate, 1M dithiothreitol, 10% glycerol, 1% bromophenol blue]에 희석한 후 웨스턴 블롯팅을 위하여 50 μ g의 단백을 10%(VEGFR-2는 7.5%) SDS-PAGE에 전기영동 후, PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 옮겼다. 단백질 존재를 평가하기 위하여 블롯을 다음에 열거한 항체들을 이용하여 검색하였다: anti-EGFR(Upstate, Lake Placid, NY, USA), anti-cErbB2, 혹은 anti-VEGFR-2(Flk-1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibody. 양성반응은 chemiluminescence detection system (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL, USA)으로 가시화 하였으며 밴드 제거후 단백질 정량의 검증을 위하여 anti- β -actin(Sigma Chemical Co.)을 이용하였다.

4. Signaling Study

구강편평상피세포암 세포주에서 EGFR/VEGFR 억제자 수용체 타이로신 인산화효소의 인산화(phosphorylation)에 미치는 영향을 평가하기 위하여 EGFR/HER-2와 VEGFR-2를 모두 발현하는 세포주 중 하나를 선택하여 AEE788(0.1-4.0 μ M/L)로 1시간 치료하였다. 대조실험군은 AEE788의 용매인 DMSO만으로 치료하였으며 치료 후 40 ng/mL EGF에 15분 배양하였다. 배양 후 세포단백을 추출하여 다음의 항체를 이용하여 전술한 바와 같이 웨스턴 블롯팅을 시행하였다: anti-phospho-EGFR (Tyr1068; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phospho-VEGFR-2(Tyr1054; Biosource International, Camarillo, CA, USA), anti-phospho-Akt (Ser473), or anti-phospho-MAPK(Thr202/Tyr204; both from Cell Signaling Technology) antibody. 단백질 정량을 위하여 밴드 제거후 sheep polyclonal anti-EGFR(Upstate), rabbit polyclonal anti-Akt (Cell Signaling Technology), 혹은 anti- β -actin 항체로 재검색하였다.

5. 종양세포 증식 억제능

구강 편평상피세포암 세포에 대한 AEE788의 증식 억제능을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazal-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)의 비색정량 분석으로 결정하였다. 즉 1,000개의 종양세포(JMAR)를 96-well 플레이트에 분주 후 세포부착이 일어날 때까지 24시간 완전 배지로 배양하였다. 세척 후 2% 우태아혈청이 포함된 배지로 교체하고, 24시간 후 각기 다른 농도의 AEE788로 치료를 시작하였다(음성 대조군은 DMSO만을 첨가). 72시간 후 37°C에서 배지에 MTT를 2시간동안 적용한(0.42 mg/mL) 후 배지를 제거하고, well당 100 μ L의 DMSO로 세포들을 분해시켰다. 활성이 있는 세포들에 의한 MTT의 formazan으로의 변화 정도를 MR-5000 6-well 마이크로타이터 플레이트(Dynatech Inc., Chantilly, VA, USA)에서 570 nm 흡광도(optical density, OD)로 측정하였다. AEE788의 IC₅₀를 구한 후, AEE788의 noncytotoxic concentration을 적용하여 탁솔제제(paclitaxel, Sigma Chemical Co.)와의 동시치료 효과를 평가하였다.

6. 종양세포에서의 아포프토시스 유발

구강 편평상피세포암 세포에 대한 AEE788의 아포프토시스 유발 정도를 평가하기 위하여 종양세포(JMAR)를 6-well 플레이트(Costar, Cambridge, MA, USA)에 분주(2×10^5 /well) 하였다. 세포 부착 후 완전 배지를 2% 우태아혈청이 포함된 배지로 교체하고, 24시간 후 각기 다른 농도의 AEE788로 치료를 시작하였다(음성 대조군은 DMSO만을 첨가). 48시간 후 hypodiploid DNA를 PI로 염색하여 아포프토시스의 정도를 결정하였다. 즉 플레이트에 부착된 세포와 배지에 부유된 세포를 추출하여 PBS 세척 후 Nicoletti buffer(PI 50 mg/mL, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100 in PBS)에 20분간 부유시켰다. 세포들의 상태를 flow cytometry로 분석하여 sub-G₀/G₁ 분획을 Lysis 소프트웨어(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)로 측정하고, 이를 아포프토시스 비율로 간주하였다¹⁸⁾. 50%의 종양세포에서 아포프토시스를 야기하는 AEE788의 농도를 결정한 후, AEE788의 nonapoptotic concentration을 적용하여 paclitaxel과의 동시치료 효과를 평가하였다.

7. EGFR 변이의 평가

AEE788 치료실험에 사용된 인간 구강 편평상피세포암 세포에, EGFR 타이로신 인산화효소 억제제에 대한 감수성

을 높일 수 있는 EGFR 변이가 있는지를 결정하였다. 종양 세포(JMAR)로부터 분리된 genomic DNA를 사용하여 EGFR 유전자의 exon 18, 19, 21을 PCR로 증폭하였다. PCR 시발체의 염기서열은 문헌에 보고된 것과¹⁹⁾ 동일하게 하였고, PCR amplicon은 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, USA)를 사용하여 정제한 후 서열결정을 의뢰하였다. 결정된 염기서열은 Genbank로부터의 wild-type EGFR 서열과 비교, 분석하였다.

8. 통계적 분석

세포독성과 연관된 약물의 농도(IC₅₀)와 아포프토시스 비율은 Loess smoother를 이용하여 계산하고, 계산 시 parametric bootstrap 방법으로 95% 신뢰도를 적용하였다.

III. 연구결과

1. 구강 편평상피세포암 세포주에서 EGFR과 VEGFR-2의 발현

검색된 인간 구강 편평상피세포암 세포주는 모두 EGFR과 VEGFR-2를 발현하였다. EGFR은 모든 편평상피세포암 세포주에서 일관성 있게 발현되었으나, VEGFR-2의 경우 원발성 종양에서 수립된 세포주(Tu212, MDA1986)에서 보다는 임파절 병소로부터 수립된 세포주(LN212,

MDA1986LN)에서 그 발현정도가 높았다. 또한 HER-2는 7개 세포주 중 2개 세포주(JMAR, MDA1986)에서만 발현되었다(Fig. 1).

2. AEE788에 의한 EGFR/VEGFR-2 인산화 억제

EGFR/HER-2와 VEGFR-2를 발현하는 세포주(JMAR)를 선택하여 AEE788로 1시간 치료 후, EGF에 15분 배양한 결과 EGFR과 VEGFR-2의 인산화가 AEE788 농도에 비례하여 억제되었다. 뿐만 아니라 EGFR과 VEGFR-2의 하부조절 흐름인자인 Akt와 MAPK(mitosis activated protein kinase)의 인산화 역시 AEE788 농도에 비례하여 억제되었다. Phosphorylated VEGFR-2는 2.0 μM의 AEE788 농도에서 완전히 억제되었으며, 나머지 3개의 인자(phosphorylated EGFR, phosphorylated Akt, phosphorylated MAPK)는 1.0 μM의 AEE788 농도에서 그 활성이 완전히 억제되었다. 반면에 EGFR과 Akt의 발현정도는 AEE788 농도와 무관하게 일정하였다(Fig. 2).

3. 수용체 타이로신 인산화효소 억제에 의한 구강 편평상피세포암 세포의 증식 억제

EGFR/VEGFR 동시억제제가 EGFR/HER-2와 VEGFR-2를 발현하는 종양세포의 증식에 미치는 영향과 탁솔제제에 의해 유도된 세포독성에 미치는 영향을 MTT 분석

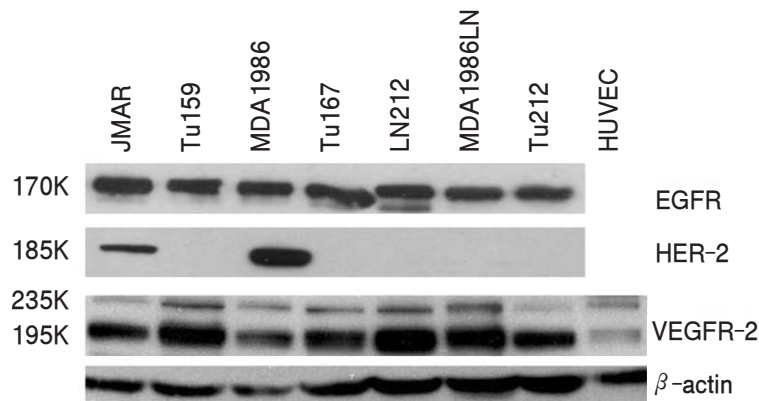


Fig. 1. EGFR, HER-2, and VEGFR-2 expression in human oral squamous cell carcinoma cell lines. Whole cell lysates were prepared from subconfluent SCC cells. Proteins were resolved on SDS-PAGE gels, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed by Western blotting using anti-EGFR, anti-HER-2, anti-VEGFR-2 antibody, or β-actin as a loading control. Each assay was performed in triplicate independently with similar results.

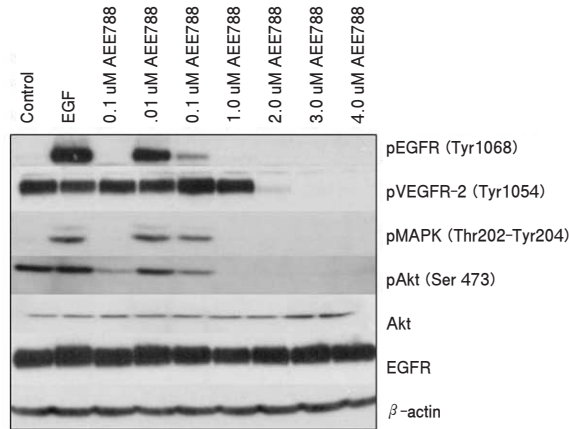


Fig. 2. Effect of EGFR/VEGFR tyrosine kinase inhibitor on the phosphorylation level in a human oral squamous cell carcinoma cell line, which express EGFR/HER-2 and VEGFR-2. Serum-starved JMAR cells were treated with AEE788(0.1-4.0 μ M/L) for 1 hour and then incubated with or without 40 ng/mL EGF for 15 min. After cell protein extracts were obtained, 50 μ g proteins were resolved on SDS-PAGE(10%) gels, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed by Western blotting using anti-phospho-EGFR(Tyr1068), anti-phospho-VEGFR-2(Tyr1054), anti-phospho-Akt(Ser473), or anti-phospho-MAPK(Thr202/Tyr204) antibody. Membranes were reprobed with anti-EGFR, anti-Akt, or β -actin as protein and loading controls. Each assay was performed in triplicate independently with similar results.

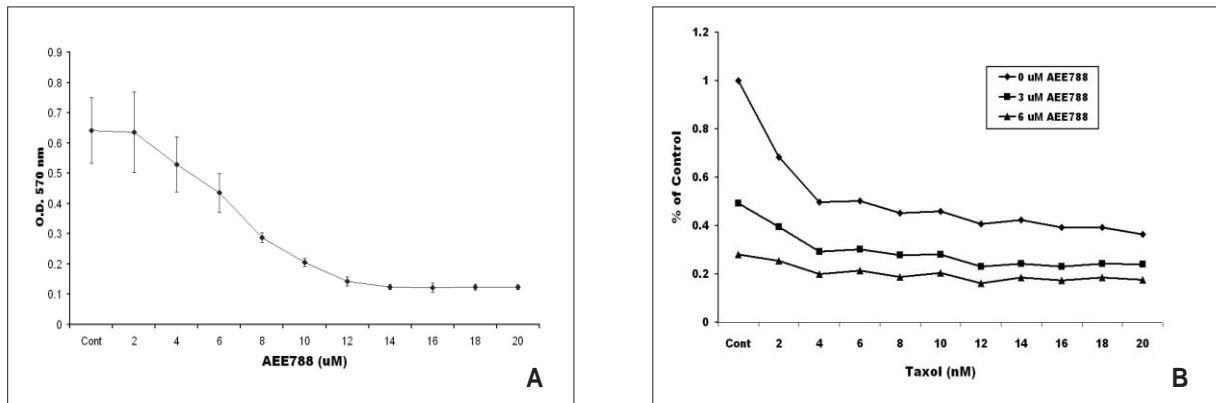


Fig. 3. *In vitro* effect of AEE788 on cell proliferation in human oral SCC cells which express EGFR/HER-2 and VEGFR-2. A : Cultured oral SCC cells were treated with AEE788(0-20 μ M). The effect on cell growth was measured by MTT assay. The data were calculated as the mean \pm SD of triplicate experiments. B : Effect of AEE788 on paclitaxel-induced cytotoxicity. Cultured oral SCC cells were treated with paclitaxel(0-20 nM) with or without AEE788 at noncytostatic concentrations for 72 h, and the effect on cell growth was measured by MTT assay.

을 통하여 평가하였다. AEE788은 JMAR 세포의 증식을 0-16 μ M까지 농도에 비례하여 억제하였으며, IC50는 2% 혈청에서 6.8 μ M이었다. 또한 paclitaxel의 IC50가 2.4 nM에서, 세포독성을 야기시키지 않는 농도의 AEE788 (3.0, 6.0 μ M)과 함께 치료했을 때, 2.1 nM과 1.8 nM로 감소하였다. 이는 EGFR/VEGFR 동시억제제에 의해

paclitaxel의 세포독성에 대한 감수성이 증가되었음을 의미한다. 뿐만 아니라 고농도의 paclitaxel에 의한 최대 성장억제 수준도 세포독성을 야기시키지 않는 농도의 AEE788에 의해 증가되어 두 제제 사이에는 상승작용이 있음을 보여주었다(Fig. 3).

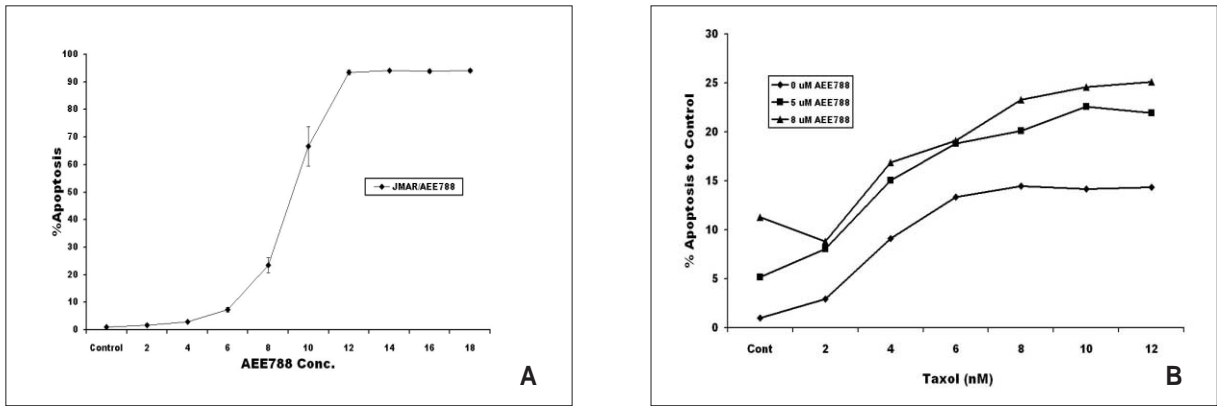


Fig. 4. *In vitro* effect of AEE788 on apoptosis induction in human oral SCC cells which express EGFR/HER-2 and VEGFR-2. A : Cultured oral SCC cells were treated with AEE788(0-18 μM). The effect on the proportion of apoptosis was determined by flow cytometric assay. The data were calculated as mean + SD of triplicate experiments. B : Effect of AEE788 on paclitaxel-induced apoptosis. Cultured oral SCC cells were treated with paclitaxel(0-12 nM) with or without AEE788(5, 8 μM) for 48 h, and the effect on the percentage of cells undergoing apoptosis was determined by propidium iodide and flow cytometric assay.

4. 수용체 타이로신 인산화효소 억제에 의한 구강 편평상피세포암 세포의 아포토시스 유발

EGFR/VEGFR 동시억제제가 EGFR/HER-2와 VEGFR-2를 발현하는 종양세포의 아포프토시스에 미치는 영향과 탁솔제에 의해 유도된 아포프토시스에 미치는 영향을 PI 염색과 flow cytometry 분석을 통하여 평가하였다. 2% 혈청을 포함한 배지에서 치료 48시간 후에 AEE788은 JMAR 세포의 아포프토시스를 농도에 비례하여 야기하였으며, 50%의 종양세포가 8.7 μM AEE788에서 아포프토시스 되었다. 또한 paclitaxel의 50%의 종양세포 아포프토시스 유도 농도가 3.9 nM에서, 저농도의 AEE788(5.0, 8.0 μM)과 함께 배양했을 때, 3.5 nM과 3.3 nM로 감소하였다. 이는 EGFR/VEGFR 동시억제제에 의해 paclitaxel의 아포프토시스 유도에 대한 감수성이 증가되었음을 의미한다. 뿐만 아니라 고농도의 paclitaxel에 의한 최대 아포프토시스 수준도 저농도의 AEE788에 의해 증가되어 두 제제 사이에는 종양세포의 아포프토시스 유도에 대한 상승작용이 있음을 보여주었다(Fig. 4).

5. EGFR 변이의 부재

염기서열 분석 결과 JMAR 세포에서 EGFR 유전자의 exon 18, 19, 21에서 변이의 소견은 관찰되지 않았다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

암치료 기법 개발의 궁극적 목표는 특히 두경부 영역에서

조직 상실로 인한 기능적, 심미적 악영향이 심각한 수술과 방사선 요법을 피할 수 있는 치료방법을 고안하는 것이다. 그러나 기존의 세포독성 화학요법은 혈행에서 종물로의 제한적인 약물의 접근성, 다약제 저항성(multidrug resistance), 정상세포에의 독성 등 많은 단점들이 지적되고 있을 뿐 아니라²⁰⁾ 두경부 편평상피세포암에서는 그 효과가 제한적이다²¹⁾. 본 연구에서 EGFR/VEGFR 동시억제제인 AEE788은 구강 편평상피세포암 세포의 증식을 억제하였을 뿐만 아니라 종양세포의 아포프토시스를 유발하였다. 또한 탁솔제와 동시 사용 시 탁솔제에의 세포증식 억제와 아포프토시스 유발 작용을 효과적으로 상승시킴으로써 EGFR/VEGFR 동시억제제는 구강 편평상피세포암종의 치료에 새로운 전략이 될 수 있음을 시사하였다.

종양세포의 성장과 증식은 미세환경으로부터의 자극에 의해 활성화되는 조절과정에 의해 진행된다. EGFR(ErbB1, HER-1)은 ErbB2(HER-2/Neu), ErbB3(HER-3), ErbB4(HER-4)를 포함하는 수용체 타이로신 인산화효소의 ErbB군의 일원으로, 과발현되는 종양세포에서 활성화되면, 종양세포의 증식을 유도하고 아포프토시스를 억제하며 주변조직에의 침투와 전이를 유발하는 강력한 종양유전자이다²²⁾. 세포표면에 존재하는 170-kDa 크기의 단백질인 EGFR은 세포의 리간드 결합부와 막영역, 그리고 타이로신 인산화효소 활성이 있는 세포내 영역으로 구성된다. 특정 리간드가 세포의 결합부에 결합하면 EGFR은 다른 EGFR 단백질이나 ErbB2와 이합체를 구성하고 이 반응으로 인하여 세포내 영역에서 타이로신 잔기의 자가인산화에 이은 하부 흐름 신호전달 물질들이 활성화된다. EGFR에 의해 활성화되는 두가지 중요한 경로는 Ras-Raf-MEK-ERK와 PI3K-

PDK1-Akt 인산화효소 경로로 이들의 활성화에 의해 세포의 증식과 생존, 그리고 유전자 발현이 완성된다²³⁾. 본 실험에서는 AEE788의 효과를 결정하기 위하여 그 표적단백인 EGFR과 VEGFR-2, 그리고 종양세포의 증식에 관여하는 Ras-Raf-MEK-ERK 경로의 관련인자인 MAPK와 종양세포의 생존과 밀접한 연관이 있는 PI3K-PDK1-Akt 경로의 주 인자인 Akt의 인산화 억제를 중요 지표로 삼았다.

지난 20여년간 축적된 연구에 의하면 두경부 편평상피세포암의 발암과 진전과정에 있어서도 EGFR과 그 리간드들의 역할이 중요함을 강조하고 있다^{24,25)}. 따라서 EGFR과 그 리간드는 두경부 편평상피세포암의 치료 목표물질이 될 수 있으며 혈관형성 과정 역시 타 상피성 고형암에 대한 연구결과에 의하면 중요한 잠재적 치료 목표물질로 여겨진다^{26,27)}. 실제 toxin-conjugated anti-EGFR antibody나 antisense oligonucleotide 등 EGFR을 치료목표로 한 많은 제제들이 개발되었으며, 이들 중 EGFR의 세포외 영역에 작용하는 단클론 항체와 세포내 영역에 작용하는 소분자 타이로신 인산화효소 억제제가 임상적용에 광범위하게 연구되었다^{28,29)}. 항혈관형성 제제로는 정상 혈관내피세포보다 빠르게 증식하거나 미성숙된 종양관련 혈관내피세포의 세포분열을 억제하기 위하여, 세포형태를 유지하는 데 필수요소인 microtubule에 작용하거나 항혈관 작용을 나타내는 싸이토키인을 유도하는 소분자 물질이나 종양관련 혈관을 폐색시킬 수 있는 성장인자나 펩티드, 혹은 항체를 이용하거나, 리간드에 기초한 제제들이 연구되고 있다³⁰⁻³²⁾. 최근에는 한가지 타이로신 인산화효소를 억제제의 효과를 증진하기 위해 두가지 타이로신 인산화효소를 억제하는 제제를 개발하거나 타이로신 인산화효소 억제제를 타 분자표적 치료제나 기존의 항암제, 혹은 방사선과 함께 사용하여 그 효율을 검증하고 있다³³⁻³⁶⁾. 본 연구에 사용된 AEE788은 구조적으로 EGFR 타이로신 인산화효소 억제제인 PKI166 (Novartis Pharma AG)을 변형하여 개발된 EGFR/VEGFR 타이로신 인산화효소 동시억제제로 EGFR 억제능은 PKI166과 유사하나 추가적으로 VEGFR로 유도된 혈관형성을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

본 연구를 시작하기 위하여 저자는 우선 인간의 구강저 등의 점막에서 기원한 편평상피세포암으로부터 확립된 세포주와 경부 임파절의 전이병소로부터 확립된 편평상피세포암 세포주에서 다양한 기전을 통해 암세포의 생존과 전이의 표현형을 나타내는 EGFR/HER-2와 VEGFR-2의 존재여부를 결정하였다. 웨스턴 블롯팅 결과 편평상피세포암 세포에 EGFR/VEGFR-2가 발현되었다. 특히 VEGFR-2는 임파절 전이 세포군에서 더 강하게 발현되는 경향을 보여 혈관형성을 위한 신호전달계가 구강 편평상피세포암의 국소 전이와도 연관성이 있음을 암시하였다. 다음 단계로 대

상이 된 세포주 중 AEE788의 표적단백인 EGFR/HER-2와 VEGFR-2를 모두 발현하는 JMAR 세포주에서 AEE788이 표적인자의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 AEE788은 마우스에 100 mg/kg를 경구 투여했을 때 달성할 수 있는 혈장농도인 $3.73 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ ¹⁶⁾보다 충분히 낮은 농도인 0.1-2.0 $\mu\text{mol/L}$ 에서 EGFR, VEGFR-2의 인산화를 억제하였을 뿐 아니라 같은 농도에서 EGF/VEGF 신호전달계의 하부흐름 효과인자이자 세포 생존과 증식에 연관된 인자인 Akt와 MAPK의 인산화를 성공적으로 억제하여 의미있는 결과를 보여주었다.

또한 본 연구결과 구강 편평상피세포암 세포에서 EGFR/VEGFR-2 동시억제는 종양세포의 증식을 억제하였을 뿐 아니라 종양세포의 아포프토시스를 유도하였다. 최근의 연구에 의하면 인간 폐암에서 EGFR 억제제에 대한 임상적 양성 반응이 EGFR 유전자 exon 18, 19, 21에서의 특정변이와 관계있다는 보고가 있었다. 즉 폐암 세포에서 EGFR 유전자의 특정변이로 인하여 성장인자 신호전달이 증가되고 그에 따라 gefitinib와 같은 타이로신 인산화효소 억제제에 대한 감수성이 증가했다는 것이다¹⁹⁾. 구강 편평상피세포암에 대한 본 연구에서는 EGFR 유전자에서의 그와 같은 변이소견이 관찰되지 않았다. 따라서 유전자 변이가 없는 구강 편평상피세포암에서 EGFR/VEGFR-2 동시억제는 항종양증식 효과와 함께 세포독성을 보여주어 유전자 변이가 없는 인간 고형암에서도 본 치료전략을 구사할 수 있다는 실험적 기초를 제공하는 바이다.

Paclitaxel은 서양 주목나무 목피로부터의 자연 추출물 성분으로 1980년대 임상적용이 시작되었고, 현재는 반합성 약물로 개발되어 유방암, 난소암, 폐암, 두경부암의 치료에 광범위하게 이용되고 있다³⁷⁾. Taxoid는 tubulin을 표적으로 하는 새로운 개념의 세포독성 물질로 tubulin축합 (polymerization)을 촉진하여 안정된 microtubule을 형성하는 작용을 하여 외부 자극을 가하여도 microtubule이 풀어지지 않게 한다. 이 작용은 정상적인 세포분열을 방해하여 DNA합성을 억제하고, 종양세포를 G₂-M기에 정지시켜 결국 아포프토시스에 이르게 한다. 또한 paclitaxel은 두경부암 세포주에서 종양단백인 Bcl-2의 발현을 감소시키고, Bcl-2와 경쟁적으로 작용함으로써 아포프토시스를 촉진하는 Bax 단백질의 발현을 유도하여 아포프토시스를 일으키는 것으로 보고되었다³⁸⁾. 본 실험에서 EGFR/VEGFR-2 동시억제는 paclitaxel의 편평상피세포암 세포에 대한 항종양효과와 아포프토시스 유도효과를 상승시켰다. 따라서 구강 편평상피세포암 환자의 치료에 paclitaxel과 함께 EGFR/VEGFR 표적치료를 병용할 수 있다는 실험적 기초를 제공하였다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 저자는 인간 구강 편평상피세포암 세포주에서 암세포 증식 및 혈관형성 관련인자인 EGFR/HER-2과 VEGFR-2이 발현됨을 보고하는 바이다. 또한 새로운 수용체 단백질-타이로신 인산화효소 억제제인 AEE788에 의한 상피성장인자와 혈관내피성장인자 신호전달계의 동시 차단이 구강 편평상피세포암 세포에서 항종양효과를 보임을 보여주었다. 뿐만 아니라 본 분자표적 치료가 paclitaxel 과 함께 적용 시 상승효과를 나타내어 이들 치료제의 임상 적용 개발에 대한 실험적 기초자료를 제공하였다. 향후 본 연구결과를 토대로 생체내에서도 확인된 인자들의 억제효과를 평가하는 치료연구가 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J : Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 49 : 33, 1999.
- Goepfert H : Squamous cell carcinoma of the head and neck: past progress and future promise. CA Cancer J Clin 48 : 195, 1998.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F et al : Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19 : 183, 1995.
- Rusch V : Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. Clin Cancer Res 3 : 515, 1997.
- Santini J : Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. Head Neck 13 : 132, 1991.
- O-charoenrat P, Phys-Evans PH, Archer DJ et al : C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. Oral Oncol 38 : 73, 2002.
- Werkmeister R, Brandt B, Joos U : Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. Oral Oncol 36 : 100, 2000.
- Rubin GJ : Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst 90 : 824, 1998.
- Magne N, Fischel JL, Dubreuil A : Sequence-dependent effects of ZD1839 ("Iressa") in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. Br J Cancer 86 : 819, 2002.
- Myers JN, Holsinger FC, Bekele BN : Targeted molecular therapy for oral cancer with epidermal growth factor receptor blockade. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 128 : 875, 2002.
- Baselga J, Rischin D, Ranson M : Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. J Clin Oncol 20 : 4292, 2002.
- Cohen EE, Rosen F, Stadler WM et al : Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol 21 : 1980, 2003.
- Herbst RS, Shin DM : Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors (a new paradigm for cancer therapy). Cancer 94 : 1593, 2002.
- Baillie R : Expression of vascular endothelial growth factor in normal and tumour oral tissues assessed with different antibodies. Histochem J 33 : 287, 2001.
- Michi Y : Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. Oral Oncol 36 : 81, 2000.
- Traxler P, Allegrini PR, Brandt R et al : AEE788 : A dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. Cancer Res 64 : 4931, 2004.
- Swan EA, Jasser SA, Holsinger FC et al : Acquisition of anoxic resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer. Oral Oncol 39 : 648, 2003.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC et al : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 139 : 271, 1991.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med 350 : 2129, 2004.
- Molena G, De Meijer DK, Leij LF : Tumor vasculature targeted therapies: getting the players organized. Biochem Pharmacol 55 : 1939, 1997.
- Jones AS : Neoplastic chemotherapy and head and neck cancer. J Laryngol Otol 111 : 607, 1997.
- Well SA : EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol 31 : 637, 1999.
- Yarden Y, Sliwkowski MX : Untangling the ErbB signaling network. Nat Rev Cell Biol 2 : 127, 2001.
- Ford AC, Grandis JR : Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. Head Neck 25 : 67, 2003.
- Huang SM, Bock JM, Harari PM : Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 59 : 1935, 1999.
- Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A et al : Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. The Laryngoscope 111 : 1834, 2001.
- Neuchrist C, Quint C, Pammer A et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. Acta Otolaryngol 119 : 732, 1999.
- Woodburn JR : The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther 82 : 241, 1999.
- Ciardiello F, Tortora G : A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 7 : 2958, 2001.
- Nihei Y, Suzuki M, Okano A et al : Evaluation of antivascular and antitumor effects of tubulin binding agents in solid tumor therapy. Jap J Cancer Res 90 : 1387, 1999.
- Kerr DJ, Maughan T, Newlands E et al : Phase II trials of

- flavone acetic acid in advanced malignant melanoma and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 60 : 104, 1989.
32. Matsuno F, Haruta Y, Kondo M et al : Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-*endoglin* monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 5 : 371, 1999.
 33. Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M et al : ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62 : 4645, 2002.
 34. Nelson JM, Fry DW : Akt, MAPK (Erk1/2), and p38 act in concert to promote apoptosis in response to ErbB receptor family inhibition. *J Biol Chem* 276 : 14842, 2001.
 35. Pollack VA, Savage DM, Baker DA et al : Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358, 774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 291 : 739, 1999.
 36. Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ et al : ZD1839 ("Iressa"), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 86 : 1157, 2002.
 37. Mekhail TM, Markam M : Paclitaxel in cancer therapy. *Exper Opin Pharmacother* 3 : 755, 2002.
 38. Kawakami K, Tsukuda M, Mizuno H et al : Alteration of the Bcl-2/bax status of head and neck cancer cell lines by chemotherapeutic agents. *Anticancer Res* 19 : 3927, 1999.

저자 연락처

우편번호 210-702
강원도 강릉시 강릉대학로 120번지
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
박영욱

원고 접수일 2006년 3월 18일
게재 확정일 2006년 5월 16일

Reprint Requests

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National Univ.
120 Gangneung Daehangno, Gangneung City Gangwon Province, 210-702, Korea
Tel: +82-33-640-3183 Fax: +82-33-642-6410
E-mail: ywpark@kangnung.ac.kr

Paper received 18 March 2006
Paper accepted 16 May 2006