

구강 편평상피세포암 마우스 모델에서 상피성장인자 수용체 억제제를 적용한 분자표적치료

박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

TARGETED MOLECULAR THERAPY IN A MURINE MODEL OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA WITH AN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR INHIBITOR

Young-Wook Park

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

Purpose: We determined the therapeutic effect of an epidermal growth factor receptor (EGFR)-specific monoclonal antibody (mAb), cetuximab (Erbix) on the growth of oral squamous cell carcinoma (OSCC) xenografted in athymic nude mice.

Experimental Design: We induced subcutaneous tumors by inoculating human tumor cell suspension into the right flank of nude mice. Nude mice with subcutaneous tumors were randomized to receive cetuximab alone, paclitaxel alone, cetuximab plus paclitaxel, or a placebo (control). Antitumor mechanisms of cetuximab were determined by immunohistochemical and apoptosis assays.

Results: Cetuximab, paclitaxel, and cetuximab/paclitaxel combined therapy resulted in 50%, 52%, 67% *in vivo* inhibition of tumor proliferation, respectively. Tumors of mice treated with cetuximab plus paclitaxel demonstrated decreased PCNA-positive tumor cells and increased apoptotic tumor cells, which slowed growth of the murine tumors.

Conclusion: These data show that EGFR can be a molecular target for the treatment of OSCC. And combination therapy with cetuximab and paclitaxel warrants further clinical study.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Epidermal growth factor receptor, Cetuximab, Molecular target

I. 서 론

구강 편평상피세포암은 인간 생명을 위협하고 환자의 삶을 저하시키는 악성종양으로 2006년 전세계적으로 약 274,000명에서 이환되었고, 미국에서는 매년 약 12,000명이 발병되어 5000명 이상이 사망하며, 서유럽의 경우 보고된 치사율은 100,000명 당 29-40명이다.¹⁾ 외과적 수술, 방사선 치료나 화학 요법의 눈부신 발전에서 불구하고 환자의 5년 생존율은 50%정도²⁾ 팔목할만한 향상이 없는 실정이다. 치료실패의 원인은 치료 후 종물의 재발과 전이병

소의 출현에 의한 것으로 치료 성공률을 높이고 구강암을 효과적으로 관리하기 위한 새로운 치료전략이 필요한 시점이다.

수용체 타이로신 키나제 (receptor tyrosine kinase: RTK)는 수많은 성장인자나 싸이토카인, 그리고 호르몬의 기능을 위한 세포표면 수용체이다. 인간 게놈에서 지금까지 90가지 타이로신 인산화효소 유전자가 확인되었고, 그 중 58 유전자가 RTK 단백을 관장하는 것으로 알려져 있다.³⁾ RTK는 정상세포의 활동과 대사과정을 조절할 뿐만 아니라 많은 악성종양에서 발암과 진행과정에서 핵심적인 역할을

*This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (A080293)

한다. 인간암의 암화와 전이과정을 조절할 것으로 연구, 확인된 대표적인 RTK는 상피성장인자 (epidermal growth factor: EGF) 수용체군 (receptor family: RTK class I) 과 PDGF (platelet-derived growth factor) 수용체군 (RTK class III), 그리고 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 수용체군 (RTK class V)이다.⁴⁾

EGF 수용체군은 EGFR (HER1 or erbB1), erbB2 (HER2), erbB3 (HER3), erbB4 (HER4)로 구성되며 세포의 증식, 분열, 생존과 연관된 반응을 매개하는 역할을 하여⁵⁾ 정상세포 뿐 아니라 종양세포의 생물학적 주인자로 여겨지고 있다. 특히 EGFR은 Cohen에 의하여 그 리간드인 EGF, 전환성장인자 (transforming growth factor: TGF- α)와 함께 동정된⁶⁾ 후, 상피성 조직에서 기원한 고형 종양에서 가장 빈번하게 과발현됨이 관찰되어 종양치료를 위한 표적물질로 제시되었고, 지금까지 악성종양에 대한 표적치료의 전형적 모델로서 연구되어 왔다. 두경부암과 EGFR과의 관계에 대한 축적된 연구결과에서도 EGFR과 그 리간드들은 두경부 편평상피세포암에서도 역시 과발현되어 두경부암의 발생과 진행에서 중요한 역할을 할⁷⁾ 뿐만 아니라 치료에 대한 불량한 반응과 예후, 그리고 환자의 생존율과도 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다.⁸⁾

EGFR은 EGF, TGF- α 와 다른 성장 인자들이 결합하는 세포의 결합부위 (domain), 짧은 막전위 (transmembrane) 부위, 세포내 타이로신 키나제 결합부위로 구성된다. 키나제 (kinase)는 인산기 (phosphate group)를 ATP와 같은 고에너지 분자로부터 끌어오는 역할을 하며 특히 타이로신 아미노산을 인산화하는 키나제를 타이로신 키나제라 명명한다. EGF나 TGF- α 와 같은 리간드가 세포외 도메인에 결합하면 EGFR의 조성변화 (conformational change)로 이합체 (dimer)가 형성됨으로써 세포내 타이로신 키나제의 활성화에 의한 단백질 인산화, 그리고 종양관련 유전자 전사와 세포주기 진행을 관장하는 신호전달계가 발현된다.⁹⁾ EGFR 표적 약물은 그 작용 방식에 따라 EGFR의 세포외 결합부위에 결합하는 단일클론성 항체 (monoclonal antibodies: mAbs)와 세포내 타이로신 인산화효소 결합부위에 결합하는 소분자 (small molecule) 타이로신 인산화효소 억제제 (tyrosin kinase inhibitors: TKIs)의 두 종류로 대별된다. 전자의 경우 cetuximab (Erbix), panitumumab (ABX-EGF), matuzumab (EMD 72000) 등이, 후자의 경우 gefitinib (Iressa), erlotinib (Tarceva), NVP-AEE788 (AEE788) 등이 개발되어 현재 전임상 혹은 임상연구에 적용되고 있다.

위와 같은 배경에서 본 연구진은 인간 구강 편평상피세포

암종을 누드 마우스에서 모델링하고, 동물모델에서 악성종양의 진행에 주 역할을 하는 상피성장인자 수용체 타이로신 인산화효소를 억제하는 것이 치료효과가 있을 것이라는 가설을 설정하여 치료실험을 통하여 이를 검증하고자 하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 세포주 및 세포배양

편평상피세포암종 세포주는 인간 구강점막 편평상피세포암으로부터 확립되었고, 누드 마우스에서 종양발생능이 확인된 KB (KCLB No. 10017) 세포주로 한국세포주 은행 (Seoul, Korea)을 통해 분주받았다. KB 세포주는 10% 우태혈청 (fetal bovine albumin, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 100 units/ml penicillin (Invitrogen) 및 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen)을 사용하여 단일층으로 배양하였다. 또한 세포들은 55% 습도를 유지하면서 5% CO₂, 95%공기 상태로 37°C에서 배양하였다.

2. 시약

탁솔제제인 paclitaxel (팍셀주)은 (주)한미약품에서 제공받아 정주용 생리식염수에 5배로 희석하여 사용하였으며, Erbitux[®]는 (주)신원약품에서 구입하였다.

3. 실험동물

생후 5주된 웅성 누드 마우스 (BALB/cAnNCrj)를 업체 (Orient Bio, Seoul, Korea)로부터 구입하여 6주 시점에서 실험에 이용하였다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서 국립 강릉대학교 치과대학의 실험동물 관리원칙 (Animal Care and Use Guidelines)에 의거하여 사육하였다.

4. 종양세포 이종이식술

생체내 이종이식을 위한 세포 부유액 (cell suspension)을 만들기 위하여 배지에 포화상태에 이르지 않은 종양세포를 트립신 처리 (0.25% 트립신+0.02% EDTA) 후 정해진 수만큼을 70 μ l의 Ca²⁺ 과 Mg²⁺가 함유되지 않은 HBSS (Hanks' balanced salt solution)에 부유시켰다. 세포밀

도는 본 연구진의 예비실험 결과상 이종이식시 누드 마우스에서 100% 종양발생능을 보인, 최소 세포수인 5×10^5 개였다.¹⁰⁾ 누드 마우스의 옆구리 부위 피하조직에 종양세포 이식 시에는 마취는 필요치 않다. 5×10^5 개의 종양세포를 70 μ l의 HBSS에 부유시켜 1ml 시린지와 27게이지 주사침을 이용하여 40마리의 누드 마우스의 우측 옆구리 부위의 피하조직층 내에 주입하였다.

5. 실험동물의 치료

40마리의 실험동물을 무작위로 4군 (n=10)으로 분류하여 1군 대조군, 2군은 paclitaxel 치료군, 3군은 cetuximab 치료군, 그리고 4군은 paclitaxel+cetuximab 복합치료군으로 설정하였다. 즉 1군은 플라시보 치료만을 시행하였으며 2군의 경우 종양세포 이식 3일 후부터 paclitaxel을 1마리당 1회에 100g을 생리식염수에 희석하여 0.2mg/dose로 주 2회 (월, 목) 복강내에 주사하였다. 3군은 실험동물 1마리당 1회에 cetuximab 1mg의 복강내 주사를 종양세포 이식 3일 후부터 주 2회 (월, 목) 시행하였다.¹¹⁾ 4군은 2군과 3군의 처방을 복합 적용하였으며 모든 군은 8주간 치료하였다.

6. 부검

종양세포 이종이식 후 실험동물은 종양이 인지될 때까지 매일 관찰되었고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 (월, 목요일) 종양의 증식을 기록하였다. 종물의 크기는 캘리퍼를 이용하여 그 장경과 단경을 cephalad-to-caudad/left-to-right 로 측정, 기록한 후 종양의 부피를 다음의 공식으로 산출하였다¹²⁾: (장경) \times (단경)² $\times \pi/6$, $\pi=3.14$. 실험동물의 체중 역시 1주에 2회 동일 시점에서 측정, 기록하였다. 안락사 후, 원발성 종양 부위를 절제하여 그 무게를 측정 한 후 종물을 이등분하여 반은 헤마톡실린-에오신 염색과 면역조직화학염색을 위하여 포르말린 고정 후 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 신선도를 유지하기 위하여 냉동고 (-70 $^{\circ}$ C)에 보관하였다. 원발성 종양외에도 서혜부 림프절과 폐조직, 그리고 간조직을 절제하여 전이병소 발생 여부에 대한 조직학적 검사를 시행하였다.

7. 면역조직화학염색을 위한 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: polyclonal rabbit anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), anti-phos-

pho-EGFR (pEGFR, Tyr 1173; Biosource International, Camarillo, CA, U.S.A.), mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) clone PC-10 (DAKO), 그리고 rat anti-mouse CD31-PECAM-1 (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.). 이차항체로는 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, U.S.A.), peroxidase-conjugated rat anti-mouse IgG2a (Serotec, Harlan Bioproducts for Science, Inc., Indianapolis, IN, U.S.A.), 가 적용되었으며, 발색을 위하여 DAB (3,3-diaminobenzine, Research Genetics, Huntsville, U.S.A)을 사용하였다.

8. 면역조직화학염색

EGFR, pEGFR, PCNA 염색을 위해서는 파라핀 포매조직을 이용하였으며, 항체 제조사의 지시대로 CD31 염색을 위해서는 냉동조직을 이용하여 면역조직화학염색을 다음과 같이 시행하였다.

파라핀 포매된 조직을 4-6 μ m로 세절하여 생인 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60 $^{\circ}$ C 정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 계열 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS (phosphate buffered solution)를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복 (antigen recovery)을 위하여 PCNA 염색의 경우 조직 슬라이드를 물에 담그어 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 5분간 강가열 하였으며, pEGFR 염색의 경우 조직 슬라이드를 10mM sodium citrate 완충액 (pH6.0)에 담긴 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 2분 30초간 강가열 후 7분 30초간 약가열 하였다¹²⁾. EGFR 염색의 경우 항원성 회복을 위한 특별한 처리는 시행하지 않았다.

냉동조직의 경우 8-10 μ m로 세절하여 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올리고 30분간 건조시킨 후 차가운 아세톤에 5분, 아세톤/클로로포름 (1:1) 용액에 5분, 그리고 아세톤에 5분간 고정하고 PBS로 수세하였다.

이후 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 메탄올 용액에서 12분간 두었다. 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백질의 결합을 차단하기 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백질 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 다음과 같이 일차항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 결합시켰다:

EGFR (1:50), pEGFR (1:25), PCNA (1:200), CD31 (1:400). 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였다.

PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백 차단액을 10분간 적용한 후, 단백 차단액을 제거하고 단백 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 브리지 용액 (50ml PBS에 brij용액 1방울을 떨군 후 pH를 7.6으로 맞추)으로 린스하고, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 10분을 넘지 않도록 하였다. 증류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액으로 린스하고, 헤마톡실린 (Gill's hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 대조염색을 10-20초간 시행하였다.

9. 아포프토시스

아포프토시스 분석을 위하여 TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) 키트 (TdT FragEL DNA Fragmentation Detection Kit, EMD Bioscience Inc., San Diego, CA, U.S.A.)를 이용하여 다음과 같이 염색을 시행하였다. 즉 조직표본을 4% paraformaldehyde에서 10분 고정 후 PBS로 5분간 2회 수세하고 0.2% Triton X-100에 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 5분간 2회 수세 후 평형완충액 (equilibration buffer)에서 10분간 배양하였다. 평형완충액을 흘려 버리고 44 μ L 평형완충액과 44 μ L nucleotide mix, 그리고 1 μ L terminal deoxynucleotidyl transferase가 함유된 반응완충액을 적용하여 빛을 차단하고 37 $^{\circ}$ C, 습윤상태에서 1시간 반응시켰다. 조직절편을 2 \times SSC에 15분간 담그어 반응을 중지시키고, 여분의 fluorescein-dUTP를 제거하기 위하여 PBS로 수세하였다.

10. 정량분석 및 통계

실험동물에서 치료의 종류에 따른 주변 림프절, 그리고 폐전이병소 발생에의 영향을 평가하기 위하여 Fisher's exact test을 이용하여 분석하였으며 유의수준 0.05이하에서 그 차이를 인정하였다.¹³⁾

또한 희생시 치료의 종류에 따른 종양 부피의 비교는 Wilcoxon rank-sum test로 검정하여 역시 유의수준 0.05이하에서 그 차이를 인정하였다.

면역조직화학염색에 대한 양성반응의 강도, 즉 EGFR과 pEGFR의 발현 정도를 비교하기 위하여 대조염색을 시행하지 않은 슬라이드를 각 실험군에서 5개씩 제작하였다. \times

200 현미경야에서 5개 슬라이드로부터 1개 슬라이드당 2부위씩 종양조직의 10부위 (1부위는 0.039mm²)를 선택하였다. 선택된 화상을 CCD 카메라 (Olympus DP70 digital microscope camera; Olympus Corporation., Tokyo, Japan)를 이용하여 컴퓨터에 입력하였다. Optimas 영상분석 소프트웨어에서 양성반응의 강도를 OD (optical density) 값으로 수치화한 후, 비모수 검정 (Wilcoxon's rank-sum test) 으로 비교하였다. OD값 측정시에는 실험내용을 모르는 계측자에 의해 대표적인 염색이 시행되었다고 생각되는 부위를 무작위적으로 설정 후, 목표지점에서의 수치를 측정하고 해당 슬라이드에서의 배경 염색 (background staining)된 수치를 빼서 데이터로 이용하였다. 통계 분석시 0.05 이하의 P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

PCNA 발현과 TUNEL 양성반응의 정량화를 위해서는 군당 10개의 슬라이드를 무작위로 선택하여 \times 100 현미경야에서 조직 표본 1당 주변부의 종양세포가 괴사되지 않은 부위에서 무작위로 0.159 mm² 영역을 1군데씩 선택하여 양성 반응을 보인 세포수와 전체 세포수를 계수한 후 그 비율을 백분율로 표시하였다. 각 군간의 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 0.05 이하의 two-tailed P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

미세혈관밀도 (microvessel density)를 제시하기 위하여 내피세포 표지자인 CD31에 의해 염색된 표본에서 종양관련 내피세포의 밀도를 구하였다. 먼저 \times 40 현미경야에서 종물의 주변부에서 종양관련 신생혈관이 집중적으로 분포된 부위를 확인한 후, 그 부위에서 100배의 배율로 렌즈를 바꾸었다. 각군별 10 표본에서 조직 슬라이드 1개당 1부위씩 가장 밀도가 높다고 여겨지는 부위를 택하여 0.159 mm² 영역에서 CD31 항체에 의해 주변부가 완전히 염색된 혈관의 수를 결정한 후¹⁴⁾, 역시 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 군간 비교를 시행하였다.

III. 연구결과

1. Cetuximab/paclitaxel에 의한 종양증식 억제

Cetuximab의 생체내 항종양 효과를 평가하기 위하여 KB 세포를 누드 마우스의 옆구리 피하조직에 이종이식한 후 cetuximab와 paclitaxel로 치료하였다. 종양세포 이식 후 7-8주 시점에서 대조군 종물의 크기가 20 mm를 초과하여 종양세포 이종이식 후 8주째에 치료를 종결하고 모든 실험동물을 희생하였다. 각 실험군의 종물증식 속도는 종양의 부피로 표현한 종양성장곡선에서 (Fig. 1)과 같았다. 즉 종

양세포 이식 후 7주 이후부터 cetuximab 치료군과 paclitaxel 치료군, 그리고 cetuximab와 paclitaxel 복합치료군의 종양 부피는 치료를 시행하지 않은 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$). 또한 복합치료군의 종양 부피도 cetuximab 치료군이나 paclitaxel 치료군과 비교시 유의하게 감소하였으나, cetuximab 치료군과 paclitaxel 치료군 사이에서는 종양 부피의 유의한 차이가 없었다. 희생시점에서 종양의 무게는 1군에서 4군까지 각각 3.1 ± 0.2 , 2.2 ± 0.3 , 2.1 ± 0.2 , 1.5 ± 0.4 g이었다 (Fig. 2). 즉 평균 종양부피 기준으로 대조군과 비교하여 종양세포 이종 이식 후 8주 시점에서 paclitaxel 치료군에서는 50%, cetuximab 치료군에서는 52%, 그리고 cetuximab와 paclitaxel 복합치료군에서는 67%의 종양증식 억제가 관찰되었다.

본 실험에서 유도된 옆구리 부위의 피하종양은 주변 림프

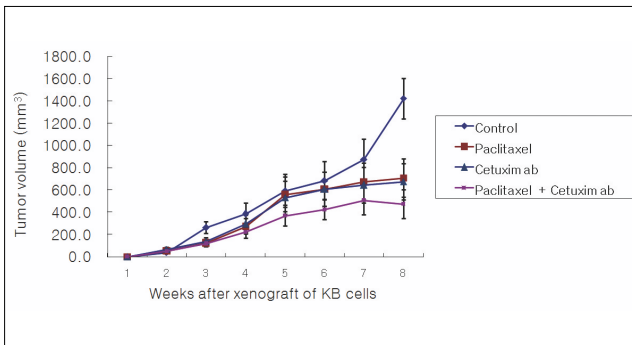
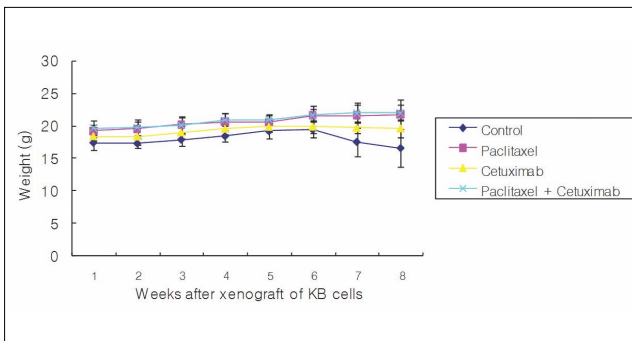


Fig. 1. Cetuximab inhibits the growth of OSCC xenografts in nude mice. KB cells (5×10^5) were injected into the flank of nude mice. After the injection of the tumor cell suspension, the mice ($n=10$) were treated with intraperitoneal injection of cetuximab at 1mg/injection twice weekly, paclitaxel given via intraperitoneal injection at $100 \mu\text{g}$ /injection twice weekly, or both Cetuximab and paclitaxel. *Ponits*, mean tumor volume measured twice per week and expressed once per week ; bars, SD.



절이나 원격 기관으로의 전이소견을 보이지 않았으며, 치료 기간 중 실험동물의 체중은 급격한 감소 없이 건강한 상태로 유지되었다 (Fig. 3).

2. Cetuximab이 상피성장인자 수용체에 미치는 효과

Cetuximab이 EGFR에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대조군과 각 치료군의 종물 조직에서 EGFR과 pEGFR의 단백 발현정도를 파악한 결과 pEGFR은 cetuximab 치료가 된 3군과 4군의 종양세포에서 그 발현이 감소하였다 (Fig. 4).

3. Cetuximab이 PCNA 발현에 미치는 효과

Cetuximab이 실험 종물의 종양세포의 증식성에 미치는

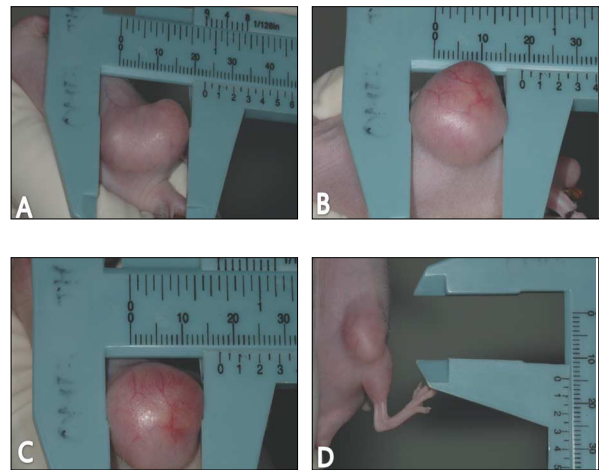


Fig. 2. Representative gross features of the tumors of each group at the time of sacrifice.

- A : Control
- B : Paclitaxel $100 \mu\text{g}$ /injection, twice weekly
- C : Cetuximab 1mg/injection, twice weekly
- D : Paclitaxel + Cetuximab

Fig. 3. Body weight changes of each group. *Ponits*, mean body weight measured twice per week and expressed once per week ; bars, SD.

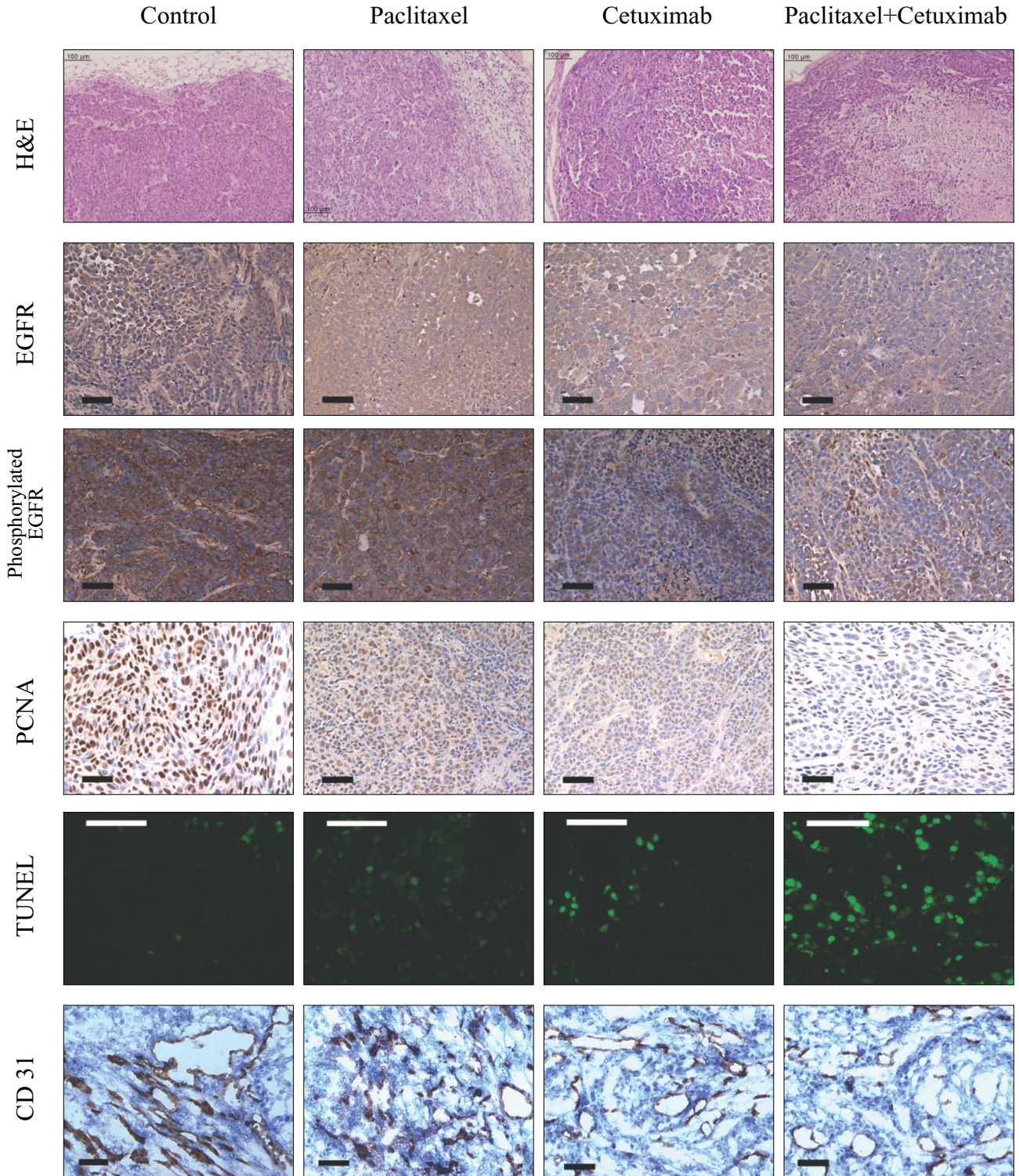


Fig. 4. Immunohistochemical and TUNEL analyses for degree of tyrosine kinase phosphorylation, cell proliferation, microvessel density, and apoptosis. After 8 weeks of treatment with cetuximab, paclitaxel, or paclitaxel + cetuximab, KB subcutaneous tumors were sectioned and immunostained for EGFR, pEGFR, PCNA, CD31, and stained with TUNEL. Treatment with cetuximab inhibited the phosphorylation of EGFR. Note that treatment with paclitaxel + cetuximab decreased the number of PCNA-positive tumor cells and increased apoptotic tumor cells. Representative features are shown. Bars : 100 μ m

Table 1. Quantitative immunohistochemical and TUNEL analyses of subcutaneous tumors growing in the flank of nude mice

Treatment group	EGFR	PCNA	TUNEL	MVD
Control	0.53±0.13	75.3±8.9	3.3±2.1	11±3
Paclitaxel (100µg/injection, twice weekly)	0.56±0.08	62.5±11.4	6.9±4.5	10±4
Cetuximab (1mg/injection, twice weekly)	0.49±0.14	61.3±10.2	7.7±6.2	10±5
Paclitaxel + Cetuximab	0.47±0.18	[†] 43.7±12.8	[†] 11.7±5.2	9±5

Oral squamous cell carcinoma cells (KB cell line) were xenografted into the flank of nude mice. Specimens were processed for immunohistochemical and TUNEL analyses 8 weeks after injection of the tumor cells.

Mean ± SD labeling index, described in "Materials and Methods"

[†]P < 0.05 compared with control group (Wilcoxon rank-sum test)

영향을 평가하기 위하여 대조군과 각 치료군의 종물 조직에서 PCNA의 발현정도를 파악한 결과 cetuximab와 paclitaxel 복합치료군은 대조군에 비교하여 유의하게 그 발현이 감소되었다(P<0.05, Table 1).

4. 아프토포시스

Cetuximab이 실험 종물의 종양세포의 아프토포시스에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대조군과 각 치료군의 종물 조직에서 종양세포의 DNA 분절화 정도를 파악한 결과 cetuximab와 paclitaxel 복합치료군은 대조군에 비교하여 유의하게 증가되었다 (P<0.05, Table 1).

5. 미세혈관밀도

인간 편평상피세포암 세포주에 의해 유도된 마우스 종양에서 치료에 따른 미세혈관밀도의 차이를 결정하기 위하여 CD31 염색을 시행하였다. CD31에 반응성을 보인 내피세포를 연구방법에서 기술한 대로 계산한 결과인 미세혈관밀도는 각 군간에 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

지난 수십년간 고형종양의 치료를 위한 새로운 약물의 개발에 관심이 있어왔지만 기존의 세포독성 약제들은 종양세포와 숙주세포 (host cell)를 구분하지 못하였다. 따라서 이들 약물은 빠르게 성장하는 신생물에서는 효과적이거나 고형종양에서의 효과는 제한적이었다. 기존 약물의 특이성 부족과 제한적 효과로 악성세포와 비악성세포를 구분하여 치료하고자 하는 새로운 치료접근 방식이 개발되어 왔다. 즉 분

자표적치료 (targeted molecular therapy)란 종양생물학에 근거하여 종양의 성장에 중요한 역할을 하는 표적물질만을 무력화시킴으로써 종양 특이성을 증가시킬 수 있다는 점에서 기존의 화학요법이나 방사선 치료와는 구별되는 새로운 치료방법이다.

EGFR은 많은 상피성 암종에서 과발현되거나 이상조절 (dysregulation) 또는 돌연변이를 보임으로써 악성종양의 성장과 진행과정에 중요한 역할을 할¹⁵⁾ 뿐만 아니라 EGFR의 과발현은 임상적으로 불량한 예후와 치료 저항성과 연관됨으로¹⁶⁾ EGFR은 새로운 항종양치료의 주 표적물질로 간주된다. 구강점막 편평상피세포암종은 대표적인 상피조직 기원의 악성 종양으로 타 상피성 종양과 마찬가지로 EGFR 신호전달계를 통하여 종양세포의 증식과 침투, 그리고 전이가 이루어지는 것으로 여겨진다.¹⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 구강 편평상피세포암의 성장과 전이에 가장 중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 EGFR을 치료표적으로 하여 EGFR에 대한 억제효과를 동물실험을 통하여 제시하고자 하였다.

Cetuximab (Erbix)은 EGFR의 세포외 도메인에 리간드와 경쟁적으로 결합하는 chimeric 인간-마우스 단일클론 항체이다. Cetuximab은 EGFR의 세포외 도메인에 결합 후 세포내로 유입됨으로써 EGFR 발현을 저하시킴으로써 세포증식 억제, 아프토포시스 증가, 혈관형성과 침투능, 전이능을 감소시킨다고 보고되었다.¹⁸⁾ 본 연구결과 인간 구강암의 이중이식체를 유도한 누드 마우스에서 8주간 cetuximab을 투여한 결과 대조군 종양과 비교시 평균 종양 부피에서 52%의 감소가 관찰되었다. 이는 paclitaxel의 종양증식 억제 정도와 비슷한 수준으로 나타났으며, paclitaxel과 cetuximab를 동시에 투여했을 경우 종양증식 억제 정도는 최고였다. 또한 투여된 용량의 paclitaxel과 cetuximab은 실험동물의 체중 변화로부터 독성작용이 없었음을

알수 있었다.

Cetuximab의 생체내 작용기전을 결정하기 위하여 면역조직화학 분석을 시행한 결과 먼저 인간 구강암 세포주를 이종이식하여 유도된 본 실험적 종물의 종양세포는 대조군의 염색결과에서 볼 수 있듯이 EGFR을 발현하였다. 상대적인 과발현 정도는 비교군이 설정되지 않아 결정할 수 없었지만 cetuximab 치료에 반응성을 보인 것으로 미루어 대부분의 구강암 세포주와 마찬가지로 EGFR을 발현하는 것으로 고찰하였다. 그러나 본 연구결과에서 cetuximab 치료에 의해 EGFR 단백질 발현 정도가 차이가 없는 것으로 나타났는데 이는 예상과는 상반된 결과이다. Cunningham 등은 결장직장암 세포주를 이용한 연구에서 anti-EGFR mAb가 EGFR의 발현과 pEGFR의 기저 발현수준을 감소시켰다고 보고하였고¹⁹⁾, Karashima 등은 전립선암 세포주에 대한 연구에서 anti-EGFR mAb인 C225가 EGFR의 autophosphorylation을 감소시켰다고 하였다.²⁰⁾ 본 연구에서도 pEGFR의 발현수준은 cetuximab 치료에 의하여 감소되었으나 EGFR에 대하여는 추후 *in vitro* 연구를 통하여 검증해 보아야 할 것이다.

또한 본 연구에서는 본 연구진의 선행연구에 의하여 KB 세포의 누드 마우스에서의 종양발생능과 발생시기를 인지하고 있었기에 기존의 문헌들과는 달리 종양세포 이종이식 직후부터 치료를 개시하였다. 이는 EGFR이 구강 편평상피세포암의 발생 초기단계에서 중요한 역할을 한다는⁷⁾ 점에 착안한 것이었으나 종양성장곡선에서 볼 수 있듯이 치료시기가 각 치료군의 종양발생 시점을 늦추지는 못하였다. 그러나 치료기간 내의 종양 증식 억제 정도는 육안으로 종양이 감지된 후 치료를 시작했을 경우보다 더 강하였을 것으로 추정하였다.

탁솔제제는 세포의 tubulin 중합반응을 촉진시켜 안정화된 microtubule을 형성시킴으로써 정상적인 세포분열 과정에 영향을 미쳐 결국 세포사 (cell death)를 야기시킨다.²¹⁾ 두경부 편평상피세포암에서 탁솔은 단일제제로 혹은 타 세포독성 약제나 방사선과 복합 적용되어 20-40%의 치료반응율이 보고되고 있다.²²⁾ 본 연구에서는 EGFR 표적치료제와 탁솔제제의 복합치료 효과를 결정하기 위하여 cetuximab/paclitaxel의 항종양 효과를 각각의 약제를 단독으로 적용하였을 때와 비교, 분석하였다. 그 결과 피하종양에서 8주간 치료한 cetuximab과의 복합치료시 부가적인 종양증식 억제능이 관찰되어 두 약제간의 상승효과 (synergistic effect)가 있는 것으로 여겨진다. 종양세포의 증식성에 대한 표지자인 PCNA에 대한 정량적 면역조직화학염색 분석에서도 cetuximab 단독치료군은 대조군과 비교하여 그 발현

의 감소는 관찰되었으나 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 그러나 paclitaxel과 복합치료시 PCNA를 발현하는 종양세포의 비율이 유의하게 감소하였다.

타 암종에서의 유사한 동물실험 결과들을 보면 EGFR 표적치료제와 탁솔의 생체내 상승효과가 보고되었고,^{23,24)} 가능한 기전은 EGFR 표적치료제가 탁솔에 의하여 유도된 종양세포의 아포프토시스를 촉진하기 때문이라고 하였다.²⁵⁾ 본 연구에서도 cetuximab/paclitaxel 복합치료군에서 대조군과 비교하여 DNA 분절화된 종양세포의 비율이 유의하게 증가하여 실험동물에 대한 생체치료시 관찰된 종물의 부피와 무게의 감소는 cetuximab/paclitaxel 복합치료에 의한 종양세포의 증식성 감소와 아포프토시스 유도 때문인 것으로 결론지었다. 본 연구에서 cetuximab 단독치료시 대조군과 비교하여 종양세포의 증식성과 아포프토시스 정도에 있어 유의성있는 변화가 관찰되지 않았는데 이는 본 실험에 적용된 세포주의 특성, 즉 EGFR 과발현 정도 혹은 데이터 분석 오차로 생각되었다.

Küttner 등은 두경부 편평상피세포암의 이종이식 마우스 모델에서 paclitaxel이 혈관생성억제 효과가 있다고 보고하였으며²⁶⁾ Kim 등은 갑상선 암종 마우스 모델에 대한 치료 실험에서 cetuximab이 종물의 MVD를 감소시켰다고 보고하였다.²⁷⁾ EGFR은 일반적으로 상피성 악성종양의 암화와 증식 외에도 혈관형성과 전이과정도 조절함으로²⁸⁾ 가능한 기전이나 본 연구결과에서 미세혈관밀도로 계산된 수치에서 paclitaxel이나 cetuximab에 의한 유의성 있는 변화는 감지되지 않았다. 그러나 유의성 유무 여부는 종양세포나 종양관련 내피세포의 EGFR 발현 정도와 기능 정도에 의해 결정되기도 하고, 미세혈관밀도를 정의하는 방식에 의해서도 영향을 받을 수 있을 것으로 고찰하였다. 실제 CD31은 혈관/림프관 관련 내피세포 표지자로 조직상을 세밀히 관찰해 보면 cetuximab 치료에 의해 종양관련 미세혈관이나 림프관을 둘러싸고 있는 내피세포의 변화가 관찰되기도 하였다 (Fig. 3). 이 변화에 대한 객관적 결과는 추후 연구를 통하여 제시할 수 있을 것이다.

V. 요약 및 결론

마우스에서 종양발생능이 확인된 인간 구강점막 편평상피세포암 세포주를 면역결핍 마우스에 이종이식한 후 paclitaxel과 cetuximab을 적용하여 단독으로 혹은 복합치료를 8주간 시행하였다. 실험동물 희생 후 부검(necropsy)을 통하여 조직학적 관찰을 시행하고, 마우스 종물에 대한 면역조직화학염색과 TUNEL 분석을 통하여 다음과 같은 결과

를 도출하였다.

1. Paclitaxel, cetuximab, paclitaxel/cetuximab 치료군은 대조군과 비교하여 종양 증식이 각각 50, 52, 67% 감소하였다.
2. Cetuximab에 의한 종양 증식 억제제는 paclitaxel에 의하여 상승되었다.
3. 대조군과 비교하여 cetuximab 단독치료시보다 paclitaxel과 복합치료시 PCNA 양성 종양세포의 비율이 감소하였다 ($P < 0.05$).
4. 대조군과 비교하여 cetuximab 단독치료시보다 paclitaxel과 복합치료시 아포프토시스된 종양세포의 비율이 증가하였다 ($P < 0.05$).
5. 본 실험에서 paclitaxel 혹은 cetuximab 치료는 종양 관련 신생혈관 형성을 유의하게 억제하지 못하였다.

위의 결과와 문헌고찰을 종합해 보면 EGFR 표적 치료의 효과의 감수성은 대상 종물 종양세포나 종양관련 내피세포의 EGFR 과발현 정도와 그 기능에 의하여 결정될 것으로 결론지었다. 그러나 본 연구결과는 구강암 환자치료에서도 EGFR 표적 치료가 보조적으로 적용될 수 있음을 시사한다.

References

1. Kupferman ME, Myers JN : Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 39(2) : 229, 2006.
2. Ries LA, Miller BA, Hartman AM *et al* : Cancer statistics review 1973-1988. National Cancer Institute, NIH Publications no 91-2789.
3. Pawson T : Protein modules and signalling networks. *Nature* 373(6515) : 573, 1995.
4. Robinson DR, Wu YM, Lin SF : The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19(49) : 5548, 2000.
5. Ullrich A, Schlessinger J : Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 : 203, 1990.
6. Cohen S, Carpenter G, King L Jr : Epidermal growth factor receptor-kinase interactions: co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255 : 1555, 1980.
7. Choi S, Myers JN : Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 87(2) : 191, 2008.
8. Dassonville O, Formento JL, Francoual M *et al* : Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 11 : 1873, 1993.
9. Zwick E, Bange Z, Ullrich A : Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8(3) : 161, 2001.
10. Park YW, Lee JW, Kim SH : Expressions of metastasis-related factors in orthotopic tumor models of oral squamous cell carcinoma. *J Kor Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surgeons* 30(6) : 529, 2008.
11. Mamot C, Drummond DC, Noble CO *et al* : Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res* 65(24) : 11631, 2005.
12. Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D *et al* : Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 64 : 7977, 2004.
13. Younes MN, Yigitbasi OG, Park YW *et al* : Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 65 : 4716, 2005.
14. Park YW, Younes MN, Jasser SA *et al* : AEE788, a dual tyrosine kinase inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 11 : 1963, 2005.
15. Harari PM : Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endoc Rel Cancer* : 11 689, 2004.
16. Marshall J : Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 107 : 1207, 2006.
17. Sano D, Myers JN : Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* 26 : 645, 2007.
18. Harding J, Burtneess B : Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today* 41(2) : 107, 2005.
19. Cunningham MP, Thomas H, Fan Z *et al* : Responses of human colorectal tumor cells to treatment with the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ICR62 used alone and in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor Gefitinib. *Cancer Res* 66(15) : 7708, 2006.
20. Karashima T, Sweeney P, Slaton JW *et al* : Inhibition of angiogenesis by the anti-epidermal growth factor receptor antibody ImClone C225 in androgen-independent prostate cancer growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 8 : 1253, 2002.
21. Eisenhauser EA, Vermorken JB : The taxoids. Comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* 55 : 5, 1998.
22. Schrijvers D, Vermorken JB : Role of taxoid in head and neck cancer. *Oncologist* 5 : 199, 2005.
23. Thaker PH, Yazici S, Nilsson MB *et al* : Antivascular therapy for orthotopic human ovarian carcinoma through blockade of the vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 11(13) : 4923, 2005.
24. Yazici S, Kim SJ, Busby JE *et al* : Dual inhibition of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor phosphorylation for antivascular therapy of human prostate cancer in the prostate of nude mice. *Prostate* 65(3) : 203, 2005.
25. Sumitomo M, Asano T, Asakuma J *et al* : ZD1839 modulates paclitaxel response in renal cancer by blocking paclitaxel-induced activation of the epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase pathway.

- Clin Cancer Res 10(2) : 794, 2004.26. K?ttner C : Paclitaxel administration along with antiangiogenic therapy in head and neck squamous cell carcinoma xenograft model. Int Poster J Dent Oral Med 3(4) : poster93, 2001.
27. Kim S, Prichard CN, Younes MN *et al* : Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. Cancer Ther 12(2) : 600, 2006.
28. Kuwai T, Nakamura T, Sasaki *et al* : Phosphorylatd epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. Neoplasia 10(5) : 489, 2008.

저자 연락처

우편번호 210-702

강원도 강릉시 강릉대학로 120번지

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

박영욱

원고 접수일 2008년 12월 22일

게재 확정일 2009년 01월 23일

Reprint Requests

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University

Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702

Tel : 82-33-640-3183, 3100 Fax : 82-33-640-3103

E-mail : ywpark@kangnung.ac.kr

Paper received 22 December 2008

Paper accepted 23 January 2009