

## 히스톤 탈아세틸효소 억제제 SK-7041의 RIF-1 세포주에 대한 생체내 방사선 감수성 증진 효과

서울대학교 의과대학 방사선종양학교실\*, 서울대학교의학연구원 방사선의학연구소†

지의규\* · 신진희\* · 김인아\* · 김일한\*<sup>†</sup>

**목적:** 국내에서 합성된 히스톤 탈아세틸 효소 억제제인 SK-7041의 생체내 방사선 감수성 증진 효과를 확인하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 6주령의 웅형 C3H 마우스에 RIF-1 세포를 주입한 후 대조군, 약물군, 방사선군, 방사선 및 약물군으로 분류하였다. 약물군과 방사선 및 약물군에는 SK-7041 4 mg/kg을 12시간 간격으로, 6회에 걸쳐 복강 내 투여하였다. 대조군 및 방사선군에는 동일 용량의 phosphate buffered saline (PBS)를 같은 방법으로 투여하였다. 방사선군과 방사선 및 약물군에는 4번째 투약 후 6시간 후에 5 Gy를 1회 조사하였다. 이후 2~3일 간격으로 종양의 크기를 측정하여 종양 성장 연기 곡선을 산출하였다.

**결과:** 접종된 종양이 1,500 mm<sup>3</sup>까지 자라는 데 소요된 기간은 대조군, 약물군, 방사선군, 방사선 및 약물군에서 각각 10일, 9일, 9일, 12일이고, 14일째의 체적은 각각 276.7 mm<sup>3</sup>, 279.9 mm<sup>3</sup>, 292.5 mm<sup>3</sup>, 185.5 mm<sup>3</sup>로, 각 군간의 차이는 통계학적으로 유의하였다(p=0.0004). 아울러, 대조군과 약물군의 차이와 방사선군과 방사선 및 약물군의 차이를 비교하였을 때, 통계학적으로 유의한 경향을 보였다(p=0.0650).

**결론:** 히스톤 탈아세틸 효소 억제제인 SK-7041의 RIF-1 세포주에 대한 마우스내 방사선 감수성 증진 효과를 저능도에서 확인할 수 있었으며, 방사선과 SK-7041의 상호작용은 상승 작용일 가능성을 시사하였다. 향후 환자에서의 적용 가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

**핵심용어:** 방사선, 히스톤 탈아세틸 효소 억제제, SK-7041, 생체 내

### 서 론

히스톤 탈아세틸 효소 억제제는 유전외적(epigenetic) 요인 조절을 통한 항암 효과가 확인된 물질로,<sup>1)</sup> 다양한 히스톤 탈아세틸 효소 억제제의 방사선 치료 증강 효과는 국내외 여러 기관에서 다양한 세포 실험을 통하여 증명된 바 있다.<sup>2~5)</sup> 히스톤 탈아세틸 효소 억제제의 종류에 따라서는 독성으로 인하여 생체내 활용이 가능하지 못한 경우도 있으나, 생체 활용이 가능한 일부 제제의 경우 동물 실험에서 효과가 확인되어 초기 임상 연구가 시행되고 있기도 하

다.<sup>6)</sup>

SK-7041은 신규 합성된 Class I에 대한 선택적인 히스톤 탈아세틸 효소 억제제로 약제의 의한 종양 성장 억제 효과가 설치류를 대상으로한 동물 실험에서 확인되었고,<sup>7,8)</sup> 방사선 민감제로서의 역할에 대한 연구도 시행되어 일부 세포주에 대해서 방사선 민감제로 작용함이 확인되었다.<sup>9)</sup> 이에 본 연구에서는 마우스를 대상으로 생체내 방사선 민감성을 확인하고자 하였다.

### 대상 및 방법

실험동물의 면역 억제 필요성을 배제하기 위하여 단일 층으로 배양된 동계 육종 세포주인 RIF-1 종양 세포 2×10<sup>5</sup> 개를 15% fetal calf serum과 0.05 mL Waymouth' media에 준비하였다. 준비된 종양세포를 10주령의 20~25 g의 C3H 마우스(Orient, Seoul, Korea)의 등에 마취 및 제모 작업 후 피내 접종하였다(Fig. 1). 실험동물의 마취는 ketamine hy-

이 논문은 2010년 8월 25일 접수하여 2010년 12월 13일 채택되었음.  
책임저자: 김일한, 서울대학교 의과대학 방사선종양학교실  
Tel: 02)2072-2528, Fax: 02)765-3317  
E-mail: ihkim@snu.ac.kr

본 연구는 서울대학교병원 일반연구과제(과제번호 04-2006-020-0) 및 한국연구재단 2008년도 원자력연구개발사업(과제번호 M20-70202001-07N0202-00111)의 지원으로 수행되었음.

drochloride (Ketara; Yuhan Yanghang, Seoul, Korea)과 xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea)을 5:1 비율로 혼합한 후 생리식염수로 3:7 비율로 희석한 혼합액을 체중 10 g 당 0.1 mL씩 복강 내 주사하여 시행하였다. 종양 크기는 (장경×단경×단경)/2 공식을 이용하여 추정하였다. 종양 추정 크기가 400~500 mm<sup>3</sup>에 도달한 실험 동물을 대조군, 약물군, 방사선군, 방사선 및 약물군으로 각 군에 3마리씩 배치하였다. 약물군과 방사선 및 약물군에는 SK-7041 4 mg/kg을 12시간 간격으로 하루 2회씩, 총 6회 복강 내 투약하였고, 대조군과 방사선군에는 동일량의 PBS를 같은 일정으로 복강 내 투여하였다. 실험에 사용한 약물인 SK-7041은 서울대학교 의과대학 방영주 교수로부터 회사받아 사용하였다.

방사선군과 방사선 및 약물군의 실험동물에는 4번째 투약 후 6시간이 경과한 시점에 선형가속기(Clinac 4/100; Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 1회 5 Gy를 조사하였다(Fig. 2). 종양 집중 시와 동일한 방법으로 실험동물을 마취하고 실험동물용 차폐장치에 위치시켜 종양부위에만 방사선이 조사되도록 하였다. 방사선 조사 이전 및 조사 중에 열형광선량계를 이용하여 방사선량을 확인하였다. 대조군 및 약물군은 동일한 방법으로 마취 후 실험동물용 차폐장치에 위치하고 방사선 조사 시간 동안 경과시켰다.

처치된 실험동물을 사육하여, 제20일째 일산화탄소를 이용하여 안락사 시켰다. 종양 크기는 사육 기간 동안에는 2~3일 간격으로 디지털 측정기(Digimatic caliper CD-15CPX; Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Kanagawa, Japan)를 이용하여 측정하였다. 실험의 재현성을 확인하기 위하여 2회 반복 실험하였고, 전체 동물 실험 과정은 기관 동물실험윤리

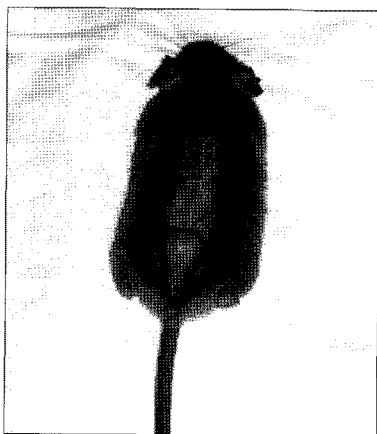


Fig. 1. Tumor bearing C3H mouse.

위원회의 승인하에 시행되었다(IACUC No. 06003).

각 처치군의 자료는 개체수가 적어 정균 분포를 만족하지 못하여, log 변환 후 통계적인 검정을 시행하였다. 각 군간의 차이는 type 3 tests for fixed effects를 이용하여 시간에 따른 부피 감소 기울기로 분석하였다. 대조군과 약물군, 방사선군과 방사선 및 약물군의 차이는 solutions for fixed effect를 이용하여 분석하였다.

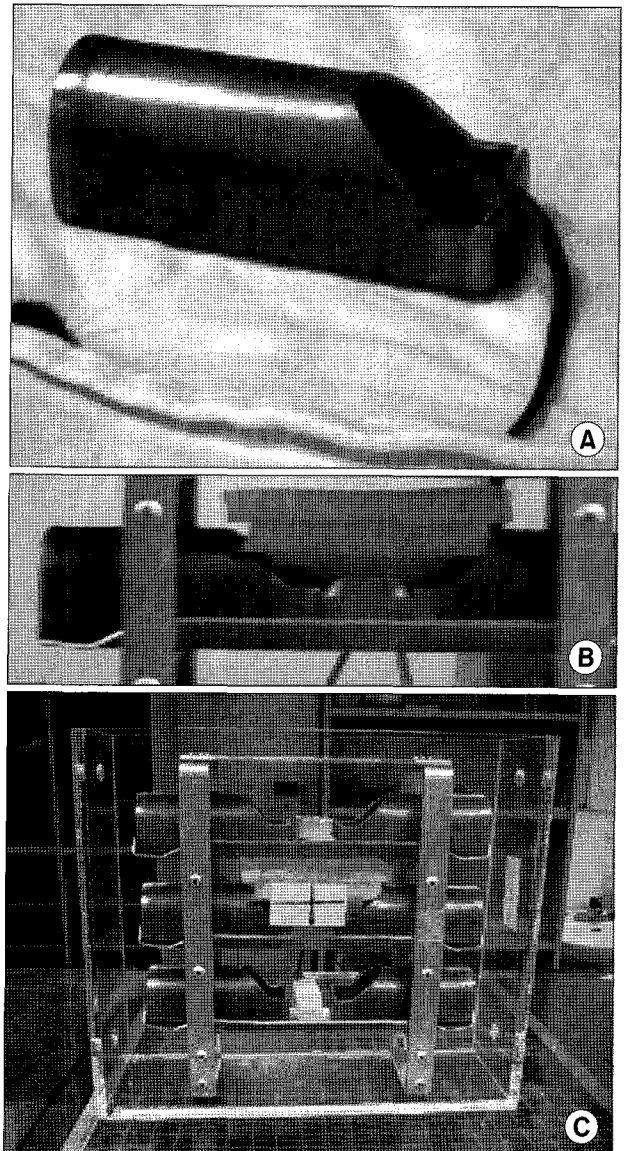


Fig. 2. Radiation set-up for C3H mouse. (A) Tumor bearing mouse in cage. (B) Two opposing mouse holding cages with bolus covering implanted tumor. (C) Two opposing cages placed for radiation.

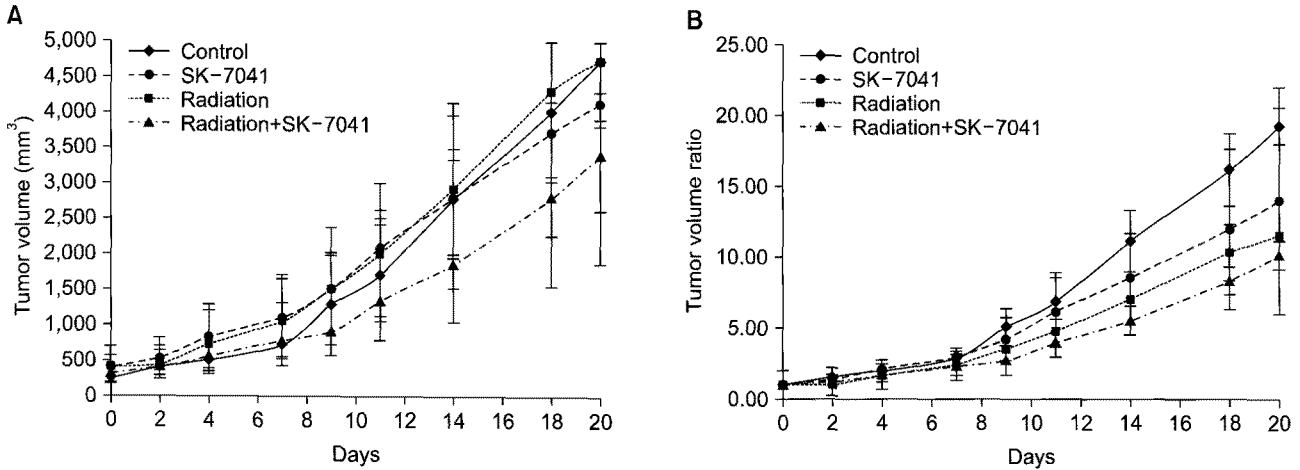


Fig. 3. Tumor growth delay by SK-7041, radiation (RT), and RT+SK-7041 in RIF-1 cell line. (A) Absolute volume. (B) Volume ratio.

Table 1. Measured Tumor Volume of Experimented Mice

ID	Group	Tumor volume (mm <sup>3</sup> )								
		D0	D2	D4	D7	D9	D11	D14	D18	D20
1	Control	231	352	400	550	930	1,049	1,995	3,091	4,147
2	Control	309	530	776	1,036	2,022	2,496	3,960	5,695	6,348
3	Control	196	298	345	575	922	1,563	2,346	3,276	3,802
4	SK-7041	176	249	317	525	725	1,121	1,934	3,014	3,901
5	SK-7041	309	520	877	1,119	1,798	2,613	2,976	3,979	4,286
6	SK-7041	699	815	1,289	1,643	1,982	2,503	3,485	4,151	4,221
7	RT*	384	397	638	1,019	1,437	1,966	3,129	4,603	5,460
8	RT	560	702	1,202	1,708	2,369	2,996	4,133	6,083	6,111
9	RT	276	243	340	437	711	1,051	1,514	2,242	2,618
10	RT+SK-7041	383	634	810	1,308	1,539	2,409	3,335	5,081	6,100
11	RT+SK-7041	262	289	389	423	566	787	1,194	1,765	2,229
12	RT+SK-7041	309	296	468	603	610	819	1,037	1,544	1,850

\*radiation.

### 결 과

접종된 종양이 1,500 mm<sup>3</sup>까지 자라는 데 소요된 기간은 대조군, 약물군, 방사선군, 방사선 및 약물군에서 각각 10일, 9일, 9일, 12일이고, 14일째의 체적은 각각 2,767 mm<sup>3</sup>, 2,799 mm<sup>3</sup>, 2,925 mm<sup>3</sup>, 1,855 mm<sup>3</sup>이었다(Fig. 3, Table 1). 각각 군의 기울기의 차이는 통계적으로 유의하였다(p=0.0004). 대조군과 약물군, 방사선군과 방사선 및 약물군의 기울기 차이를 분석하였을 때, 방사선군과 방사선 및 약물군의 차이가 통계적으로 더 큰 경향을 보였다(p=0.0650).

### 고안 및 결론

기존의 유전자 서열의 변화 없이 유전외적 요소에 의하

여도 암종이 발생할 수 있다는 사실이 알려지면서 이러한 기전을 대상으로 할 수 있는 물질에 대한 관심이 높아졌다.<sup>10)</sup> 히스톤 탈아세틸 효소 억제제는 DNA 메틸화 억제제와 함께 가장 중요한 유전외적 제재로 손꼽히고 있으며,<sup>11)</sup> 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제의 항암 작용 기전은 약물 농도에 따라 다른 것으로 알려져 있고, 자체 항암 작용은 뚜렷하지 않지만, 방사선 민감제로는 작용하는 저용량의 경우에는 작용 기전이 아직 불분명하기는 하지만, DNA 이중사슬 절단 형성 및 회복과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 아울러, 종양 세포에 특이적으로 작용하는 장점으로 방사선 민감제 역할에 대한 기대 또한 매우 커서 임상 적용에 앞서 생체 내에서의 방사선 효과 증진 작용을 확인할 필요성이 대두되었다. 그러나, 히스톤 탈아세틸 효소 억제제의 효과가 가장 강력한 Trichostatin A의 경우 생체 내

활용이 곤란한 것으로 알려져 있다. 일부 제재의 경우 단일 제재 혹은 기타 화학제재와 병용하는 임상 연구가 진행되고 있으며, valproic acid처럼 다른 용도로 기존 임상에서 활용되었던 제재의 경우 뇌종양을 대상으로 하는 방사선 병용 연구가 진행 중이다.<sup>6)</sup>

SK-7041 (4-Dimethylamino-N-[4-(2-hydroxycarbamoyl-vinyl)benzyl] benzamide)은 Trichostatin A와 MS-275를 기반으로 국내에서 신규 합성된 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제로 Class I에 특이적인 특징을 갖고 있다.<sup>7)</sup> 다양한 세포주를 대상으로 한 실험에서 항암 효과가 확인되었고,<sup>8,12,13)</sup> 위암 세포주인 SNU-16과 폐암 세포주인 A549를 대상으로 시행한 동물 실험에서도 항암 작용이 확인되었다.<sup>8)</sup> 방사선 감작 효과의 경우 A549, U87MG, HN9 등에서 세포 실험을 통하여 확인된 바 있었으나,<sup>9)</sup> 생체 내 실험에서는 방사선 감작 효과가 확인된 바 없었다.

본 실험에서는 SK-7041을 이용하여 RIF-1 세포주를 대상으로 하여 동물 실험에서 방사선 민감제로 작용함을 확인하였고, 방사선과 상승 작용을 일으키는 경향을 확인할 수 있었다. 기존에 SK-7041 단독 효과를 확인한 동물 실험에서, 30 mg/kg를 사용한 것과는 달리,<sup>8)</sup> 본 실험에서는 4 mg/kg를 사용하였다. 이는 기존에 단독 효과와 방사선 민감 효과를 확인한 MS-275를 사용한 실험에서 각각 45 mg/kg와 6 mg/kg가 이용된 것과 같은 비율로 선택적 히스톤 탈아세틸 효소 억제제가 저농도에서 방사선 민감제로 역할로 작용하는 것을 확인할 수 있었다.<sup>8,14)</sup> 다만, 이 연구에서 실험에 사용된 각 군의 개체 수가 적어서 통계적 유의성의 검증이나 결과의 해석에는 주의를 요한다. 14일째 용적의 경우 대조군에서 크기가 약물군이나 방사선군에 비해 적게 측정되었다. 그러나, 이는 반복 실험에서는 관찰되지 않아, 실험 초기 선택된 개체의 크기의 차이에서 기인한 것으로 추정된다. 측정일별로 종양의 체적의 비를 이용하여 분석할 경우에는 이러한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3B).

앞서 언급한 것처럼 다양한 비특이적 제재의 경우 세포 실험에서 효과가 입증되었음에도 불구하고, 자체 독성으로 인하여 임상은 물론 동물 실험도 시행하지 못하는 경우가 있다. 아울러, 기존의 비특이적 제재에서의 경우 세포 보호 효과가 보고된 경우도 있으나,<sup>15,16)</sup> 이와는 반대로 정상 조직의 방사선 감수성을 증진 시키고,<sup>17)</sup> 나아가 일부 종양 발생에 기여할 수 있음이 보고된 바도 있다.<sup>18)</sup> 선택적 억제제의 경우 이러한 부작용 없을 것으로 기대하고 있으나, 방사선 치료 증강 효과에 대해서는 연구가 미미한 상황이다. 임상에서 수술이나 화학요법의 병행이 곤란하며 방사선

치료 효과의 제한 및 주변 주요 장기에 대한 선량 제한으로 효율적 치료가 도모되기 힘든 종양에서 치료 효과를 증진시킬 수 있는 대안으로 선택적 히스톤 탈아세틸 효소 억제제는 주목받고 있으며, 매우 낮은 농도에서도 동물 실험에서 방사선 감수성을 확인한 이번 실험 결과를 토대로 임상에서의 적용 가능성을 타진할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. De Schutter H, Nuyts S. Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:99-108
2. Kim JH, Shin JH, Chie EK, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, potentiated cytotoxic effect of ionizing radiation in human head and neck cancer cell lines. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2004;22:138-144
3. Kim JH, Shin JH, Kim IH. Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:1174-1180
4. Kim IA, Kim JH, Shin JH, et al. A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, enhances radiosensitivity by abrogating G2/M arrest in human carcinoma cells. *Cancer Res Treat* 2005;37:122-128
5. Kim IA, Kim JH, Shin JH, et al. Leptomycin B increases radiosensitization by trichostatin A in HeLa cells. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2005;23:116-122
6. Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. *J Clin Oncol* 2007;25:4051-4056
7. Kim DK, Lee JY, Kim JS, et al. Synthesis and biological evaluation of 3-(4-substituted-phenyl)-N-hydroxy-2-propenamides, a new class of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46:5745-5751
8. Park JH, Jung Y, Kim TY, et al. Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potently inhibit human tumor proliferation. *Clin Cancer Res* 2004;10:5271-5281
9. Kim BK. Radiosensitizing effect and mechanisms of action of a novel HDAC inhibitor, SK-7041 [dissertation]. Seoul: Seoul National University, 2007
10. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107-116
11. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006;94:179-183
12. Lee KW, Kim JH, Park JH, et al. Antitumor activity of SK-7041, a novel histone deacetylase inhibitor, in human lung and breast cancer cells. *Anticancer Res* 2006;26:3429-3438
13. Ryu JK, Lee WJ, Lee KH, et al. SK-7041, a new histone deacetylase inhibitor, induces G2-M cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Lett* 2006;237:

- 143-154
14. **Camphausen K, Scott T, Sproull M, Tofilon PJ.** Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation. *Clin Cancer Res* 2004;10:6066-6071
  15. **Chung YL, Wang AJ, Yao LF.** Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004;3:317-325
  16. **Paoluzzi L, Figg WD.** Histone deacetylase inhibitors are potent radiation protectants. *Cancer Biol Ther* 2004;3:612-613
  17. **Purrucker JC, Fricke A, Ong MF, Rube C, Rube CE, Mahlknecht U.** HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA Double-Strand Break repair capacity. *Oncol Rep* 2010;23:263-269
  18. **Coyle TE, Bair AK, Stein C, Vajpayee N, Mehdi S, Wright J.** Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis? *Am J Hematol* 2005;78:256-260

---

**Abstract**

***In vivo* Radiosensitization Effect of HDAC Inhibitor, SK-7041 on RIF-1 Cell Line**

Eui Kyu Chie, M.D.\*, Jin Hee Shin, B.S.\*, In Ah Kim, M.D.\* and Il Han Kim, M.D.\*<sup>†</sup>

\*Department of Radiation Oncology, Seoul National University College of Medicine, <sup>†</sup>Institute of Radiation Medicine, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

**Purpose:** To test the radiosensitizing effect of the newly synthesized novel histone deacetylase inhibitor, SK-7041 *in vivo*.

**Materials and Methods:** The RIF-1 cell line was implanted into the back of a 6-week-old female C3H mouse, intradermally. The mice were grouped into control, drug, radiation (RT), and RT+drug group. SK-7041, 4 mg/kg was administered intraperitoneally for six cycles every 12 hours for mice in the drug and RT+drug group. An identical volume of phosphate buffered saline (PBS) was administered at the same frequency to mice in the control and RT groups. A single 5 Gy fraction was delivered to mice in RT and RT+drug group 6 hours after the fourth delivery. The volume of the implanted tumor was measured every 2~3 days to formulate the growth delay curve.

**Results:** For the control, drug, RT, and RT+drug groups, the average duration for implanted tumor to reach a volume of 1,500 mm<sup>3</sup> was 10 days, 10 days, 9 days, and 12 days, respectively. Moreover, the tumor volume on D14 was 276.7 mm<sup>3</sup>, 279.9 mm<sup>3</sup>, 292.5 mm<sup>3</sup>, and 185.5 mm<sup>3</sup>, respectively (p=0.0004). The difference for the change in slope for the control and drug versus the RT and RT+drug groups were borderline significant (p=0.0650).

**Conclusion:** The results of this study indicate that SK-7041 has a radiosensitizing effect for the RIF-1 cell line *in vivo* at a low concentration and this effect may be synergistic. Implementing this result to clinical trial is warranted.

---

**Key Words:** Radiation, Histone deacetylase inhibitor, SK-7041, *In vivo*