

# 항-표피성장인자수용체 단클론항체와 DNA 토포이소머라제 억제제에 의한 마우스 모델에서의 타액선 선낭암종 성장 억제

박영욱<sup>1</sup> · 이희수<sup>2</sup>

강릉원주대학교 치과대학<sup>1</sup> 구강악안면외과학교실, <sup>2</sup> 구강해부학교실

**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:177-85)

## Anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody and DNA topoisomerase inhibitor reduce growth of salivary adenoid cystic carcinoma in a murine model

Young-Wook Park<sup>1</sup>, Hee Su Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Oral and Maxillofacial Surgery and <sup>2</sup>Oral Anatomy, College of Dentistry,  
Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea

**Introduction:** Epidermal growth factor receptor (EGFR) is expressed in human epithelial tumors including salivary cancers, and known to be correlated with tumor progression and poor clinical courses in some epithelial tumors. In this study, we determined the therapeutic effect of the anti-EGFR monoclonal antibody Erbitux (C225, cetuximab) in combination with the DNA topoisomerase I inhibitor irinotecan (CPT-11) on human salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) cells growing in nude mice.

**Materials and Methods:** At first, immunocytochemical analysis for the expression of EGFR and phosphorylated EGFR (pEGFR) on a human salivary ACC cell line (ACC3). To determine the *in vivo* effects of Erbitux and CPT-11, nude mice with orthotopic parotid tumors were randomized to receive intraperitoneal Erbitux (1 mg) two times per week, intraperitoneal Irinotecan (50 mg/kg) once per week, Erbitux plus CPT-11, or placebo. (control) Tumor volume and weight were measured. And mechanisms of *in vivo* activity of Erbitux and/or CPT-11 were determined by immunohistochemical/immunofluorescent analyses.

**Results:** Immunocytochemical staining of ACC3 demonstrated that EGFR was expressed and phosphorylated. CPT-11 inhibited ACC tumor growth in nude mice. Tumors of mice treated with CPT-11 and CPT-11 plus Erbitux exhibited increased tumor cell apoptosis and decreased microvessel density, which correlated with a decrease in the tumor volume in nude mice. But, CPT-11 seems not to be synergistic with Erbitux in our ACC3 model system.

**Conclusion:** These results suggest that anti-EGFR monoclonal antibody and the DNA topoisomerase I inhibitor will be effective in the treatment of recurrent or metastatic lesions of salivary ACC.

**Key words:** Monoclonal antibodies, Epidermal growth factor receptor, DNA topoisomerases type I, Adenoid cystic carcinoma, Salivary gland neoplasms, Parotid neoplasms

(원고접수일 2010.5.20 / 1차수정일 2010.5.31 / 2차수정일 2010.6.1 / 게재확정일 2010.6.10)

## I. 서 론

타액선 종양은 전체 두경부 종양의 3% 정도의 빈도로 발생하고, 타액선 악성종양은 구강악안면 영역에 발생하는 악성종양 중 편평상피세포암 다음으로 자주 발생한다<sup>1</sup>. 특히 타액선 선낭암종(salivary adenoid cystic carcinoma,

SACC)은 소타액선과 이하선에 호발하는 악성종양으로 신경조직 침투와 혈관성 폐전이를 특징으로 한다<sup>2</sup>. 이와 같은 특성으로 인하여, 현재의 주된 치료방식인 수술과 방사선 치료 후 드물게 재발하는 국소 재발인 경우에는 재수술을 시행할 수 있으나 원격 폐전이 병소에 대해서는 항암약물 치료를 시행한다<sup>3</sup>. 그러나 타액선 암종의 경우 종양세포의 증식이 약하여 기존의 항암약물치료의 효과가 제한적이므로<sup>4</sup> 새로운 치료전략이 필요한 실정이다.

최근 분자표적치료(molecular targeted therapy)의 개념, 즉 악성종양이 악성 표현형을 유지하는데 필수적인 분자물질들을 찾아내어 이를 차단하거나 억제하는 개념에 근거한 치료전략들이 소개되고 있다. 일반적으로 암종의 발생과 진행 과정에서 Epidermal growth factor receptor (EGFR)는

### 박영욱

210-702 강원도 강릉시 강릉대학로 120번지

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,

Gangneung-Wonju National University

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

TEL: +82-33-640-3102 FAX: +82-33-640-3103

E-mail: ywpark@gwnu.ac.kr

\* 이 논문은 2009년 강릉원주대학교 치과병원 협동임상연구비(2009-0249) 지원에 의하여 수행되었음.

중요한 역할하고 있다<sup>5,6</sup>. 이에 근거하여 저자 등은 인간 선낭암 표본에 대한 면역조직화학염색을 통하여 검색한 표본의 61%와 83%에서 EGFR과 human epidermal growth factor receptor (HER2) (ErbB2)가 정상 타액선 조직과 비교하여 과발현됨을 보고하였고<sup>7</sup>, 타액선암 동물모델에서 EGFR/vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 타이로신 키나제 동시 억제제가 실험적으로 유도된 종양의 증식을 억제하고 혈관성 폐전이율을 감소시킴을 보고하였다<sup>8</sup>. 그러나 Agulnik 등<sup>9</sup>은 EGFR/HER2 타이로신 키나제 동시 억제제에 대한 임상 II상 시험결과 반응이 뚜렷하지 않았음을 보고하였다. Dahse 등<sup>10</sup>은 타액선 암종의 EGFR 타이로신 키나제 도메인에는, 비소세포폐암(non-small cell lung cancer)에서 우수한 치료효과를 보이는 EGFR 돌연변이는 드물지만, EGFR 하부흐름 효과물질인 KRAS가 충분히 존재하여 EGFR 치료전략은 여전히 유효한 것으로 제시한 바 있다<sup>11</sup>.

DNA의 초나선(superhelical) 또는 위상(topology)을 변화시키는 효소인 토포이소머라제(topoisomerase) 중 기질 DNA의 단일가닥을 일시적으로 끊어서 DNA의 공간위치와 형태 즉 위상을 바꾸는 역할을 하는 I형 토포이소머라제(type I topoisomerase) 억제제인 irinotecan (CPT-11)은 원래 중국의 나무인 Camptotheca acuminata로부터 추출한 알칼로이드인 camptothecin의 수용성, 반합성 유도체이다<sup>12</sup>. CPT-11의 대사물질인 SN-38은 핵효소인 I형 토포이소머라제와 2중가닥 DNA 사이의 3중 복합체를 안정화시킴으로써 복제분기점(replication fork)이나 전사과정의 결점을 초래하여<sup>13</sup> 궁극적으로 세포사(cell death)를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>. 따라서 CPT-11은 임상 전단계 동물모델이나 임상시험에서 수종의 악성종양 치료에 효과적이라고 보고되었다<sup>15,16</sup>.

임상에서 CPT-11은 주로 5-fluorouracil (5-FU) 등의 치료에 효과가 없는 결장직장암 환자의 2차 치료제로 선택하고 있다<sup>17</sup>. 재발된 타액선 암종의 관리에서도 타 구강암에 대한 항암제 선택에서와 같이 5-FU가 적용된다<sup>18</sup>. 이와 같은 배경에서 본 연구에서는 기존의 화학요법에 반응이 없는 재발된 타액선 암종에 대한 새로운 복합약물요법을 모색해 보고자 타액선 선낭암종에 대한 누드 마우스 모델에서 CPT-11과 EGFR 치료전략의 복합적용 효과를 결정하고자 하였다.

## II. 연구대상 및 연구방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 연구에서 사용한 타액선 선낭암 세포주는 adenoid cystic carcinoma cell line (ACC3)으로 미국 MD Anderson 암센터의 Myers 박사가 제공하였다. ACC3는 15% 우태혈청, L-glutamine, 비타민(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY,

USA), 페니실린-스트렙토마이신(Flow Laboratories, Rockville, MD, USA)이 함유된 RPMI-1640 배양액에서 유지하였다. 세포들은 단일층으로 배양하였고, 55% 습도를 유지하면서 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기 상태로 37°C에서 유지하였다.

### 2. 시약

Irinotecan HCl인 Camtecan (Yuhan, Seoul, Korea)와 EGFR 표적 약물로는 EGFR의 세포외 결합부위에 결합하는 단클론항체(monoclonal antibodies, mAbs)인 Erbitux (C225, cetuximab) (Shinwon chemical, Seoul, Korea)을 사용하였다.

면역조직화학/면역형광 염색에는 다음의 1차 항체들을 사용하였다. Polyclonal rabbit anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-phosphorylated EGFR (pEGFR) (Try1173, Biosource International, Camarillo, CA, USA), mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) clone PC-10 (DAKO, Carpinteria, CA, USA), 그리고 rat anti-mouse CD31-PECAM-1 (PharMingen, San Diego, CA, USA). 2차 항체로는 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA), peroxidase-conjugated rat anti-mouse IgG2a (Serotec, Harlan Bioproducts for Science, Inc., Indianapolis, IN, USA), 그리고 Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 적용하였으며 면역조직화학염색을 위한 발색 시 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Research Genetics, Huntsville, USA)을 사용하였다.

### 3. 면역세포화학적 분석

배양된 ACC3 세포를 chamber 슬라이드에서 차가운 아세톤에 5분, 아세톤/클로로포름(v/v, 1:1) 용액에 5분, 다시 아세톤에 5분 고정 후 phosphate buffered solution (PBS)로 수세하였다. 슬라이드를 습기가 유지된 상태에서 5% 말혈청과 1% 양혈청이 포함된 PBS 용액으로 20분간 상온에서 비특이 단백질 결합을 차단한 후, 4°C에서 EGFR (1:200), pEGFR (1:500) 1차 항체를 밤새 결합시켰다. PBS 수세 후 2차 항체로 상온에서 1시간 배양하고 DAB으로 5-10분간 발색시켰다. 음성 대조군은 1차 항체 대신 단백질 차단 용액만을 적용하였고, 발현된 양성반응의 결과는 CCD 칼라 비디오 카메라(Model DXC 990, Sony Corp., Tokyo, Japan)가 장착된 Nikon Microphot-FX (Nikon Inc., Garden City, NY, USA) 현미경으로 검사 후 Optiamps 영상분석 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 사용하여 그 발현정도를 평가하였다.

#### 4. 실험동물과 종위증양의 유도

생후 6주된 웅성 누드 마우스(BALB/cAnNCrj, Orient Bio, Seoul, Korea)를 8주 시점에서 실험에 이용하였다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서 국립강릉원주대학교 치과대학의 실험동물 관리원칙(Animal Care and Use Guidelines)에 의거하여 사육하였다.

생체 내 이종이식을 위한 세포 부유액(cell suspension)을 만들기 위하여 95% 이상의 활성을 유지한 배양세포만을 이용하였으며 이는 트립산 블루 염색으로 확인하였다. 배지에 포화상태에 이르지 않은 종양세포를 트립신 처리(0.25% 트립신+0.02% EDTA) 후  $5 \times 10^5$ 개를<sup>19</sup> 30 mL의  $Ca^{2+}$ 과  $Mg^{2+}$ 가 함유되지 않은 Hanks' balanced salt solution (HBSS)에 부유시켰다.

쏘디움 펜토바비탈 복강 내 마취(50 mg/kg/body weight) 후 협부를 알코올솜으로 소독하였다. 미세가위로 전이개 부위에 절개선을 가하고 절개부의 하방에 위치하는 이하선에 손가락으로 가벼운 압력을 가하여 이하선 조직을 절개 부위로 노출시킨 후, 30개이치의 피하주사침을 이용하여 암세포 부유액 30 mL를 새지 않도록 조심스럽게 주입하였다. 암세포 부유액 주입 후 절개부는 1개의 금속 클립을 이용하여 봉합하였다. 총 40마리의 누드 마우스에 종양세포를 이종이식하였다.

#### 5. 실험동물의 치료 및 부검

암세포 이종이식 후 실험동물은 종양결절이 인지될 때까지 매일 관찰하였고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 종양의 크기와 몸무게를 기록하였다. 종양의 크기는 캘리퍼를 이용하여 그 장경과 단경을 cephalad-to-caudad/left-to-right 로 측정, 기록하였다. 종양의 부피는 (장경)×(단경)<sup>2</sup>× $\pi/6$ ,  $\pi = 3.14$ . 공식으로 산출하였다.<sup>8</sup>

40마리의 실험동물을 무작위로 4군(n=10)으로 분류하여 1군은 대조군, 2군은 Erbitux 치료군, 3군은 CPT-11 치료군, 그리고 4군은 CPT-11+Erbitux 복합치료군으로 설정하였다. 즉 종양세포 이종이식 후 7일 후부터 1군은 플라시보 치료만을 시행하였으며 2군의 경우 실험동물 1마리 당 1회에 Erbitux 1 mg의 복강 내 주사를 주 2회(월, 목) 시행하였다<sup>20</sup>. 3군의 경우 50 mg/kg의 CPT-11을 1주에 1회 복강 내 주사하였고, 4군은 2군과 3군의 처방을 복합 적용하였으며 모든 군은 5주간 치료하였다.

치료 5주 후 모든 실험동물을 안락사시킨 후 원발성 종양을 절제하여 종양 무게를 측정하고 2등분하여 반은 헤마톡실린-에오신 염색과 면역조직화학염색을 위하여 포르말린 고정 후 탈회액(5% nitric acid in PBS) 처리하여 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 면역형광염색을 위하여 액체질소로 급냉 후 -70℃에 보관하였다.

#### 6. 면역조직화학염색/면역형광

PCNA와 CD31 염색을 위해서는 파라핀 포매 조직을 이용하였으며, 면역형광염색을 위한 EGFR, pEGFR 염색을 위해서는 냉동 조직을 이용하여 면역조직화학염색과 면역형광염색을 다음과 같이 시행하였다.

파라핀 포매된 조직을 4-6  $\mu\text{m}$ 로 세절하여 생긴 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60℃ 정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 계열 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복(antigen recovery)을 위하여 PCNA 염색의 경우 조직 슬라이드를 물에 담가 전자렌지에서 마이크로 웨이브를 이용하여 5분간 강가열 하였다.

냉동조직의 경우 8-10  $\mu\text{m}$ 로 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%  $H_2O_2$  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 1차 항체를 희석하여 4℃에서 밤새 결합시켰다.(EGFR: 1:200, pEGFR: 1:100, PCNA: 1:200, CD31: 1:400)

PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백질 차단액을 10분간 적용한 후, 단백질 차단액을 제거하고 단백질 차단액에 1:500으로 희석시킨 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 브리지 용액(50 mL PBS에 brij용액 1방울을 떨군 후 pH를 7.6으로 맞춤)으로 린스하고, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 10분을 넘지 않도록 한다. 증류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액으로 린스하고, 헤마톡실린(Gill's hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 대조염색을 10-20초간 시행하였다.

EGFR/pEGFR 면역형광염색 시 녹색 형광의 적용은 조직절편을 실온에서 1시간 Alexa Fluor 488-conjugated IgG (1:400)에 반응시킨 후 90% glycerol과 10% PBS 혼합액으로 fluorescent bleaching 하였다.

#### 7. 아포프토시스 분석

아포프토시스(apoptosis) 분석을 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) (TdT FragEL DNA Fragmentation Detection Kit, EMD Bioscience Inc., San Diego, CA, USA) 키트를 이용하여 다음과 같이 염색을 시행하였다. 즉 조직표본을 4%

paraformaldehyde에서 10분 고정 후 PBS로 5분간 2회 수세 하고 0.2% Triton X-100에 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 5분간 2회 수세 후 평형완충액(equilibration buffer)에서 10 분간 배양하였다. 평형완충액을 흘려버리고 44  $\mu\text{L}$  평형완 충액과 44  $\mu\text{L}$  nucleotide mix, 그리고 1  $\mu\text{L}$  terminal deoxynu- cleotidyl transferase가 함유된 반응완충액을 적용하여 빛을 차단하고 37°C, 습윤 상태에서 1시간 반응시켰다. 조직절 편을 2×SSC에 15분간 담가 반응을 중지시키고, 여분의 fluorescein-dUTP를 제거하기 위하여 PBS로 수세하였다.

### 8. CD31/TUNEL 이중 형광

종양 내피세포에 대한 아포프토시스 분석을 위하여 다음 과 같이 CD31/TUNEL 이중 면역형광염색을 시행하였다. 즉 냉동 조직을 이용하여 위에서와 같이 CD31 1차 항체 적 용 후, 적색형광 적용을 위하여 빛을 차단한 상태에서 Alexa Fluor 594-conjugated IgG (1:600)에 1시간 반응시키고 PBS 수세 후 전술한 TUNEL 염색과정을 시행하였다.

### 9. 정량분석 및 통계

희생 시 치료의 종류에 따른 종양 부피의 비교는 Wilcoxon rank-sum test로 검정하여 유의수준 0.05 이하에서 그 차이를 인정하였다.

PCNA 발현과 TUNEL 염색된 종양세포의 정량화를 위해 서는 군당 10개의 슬라이드를 무작위로 선택하여 ×100 현 미경야에서 조직 표본 1당 주변부의 종양세포가 괴사되지 않은 부위에서 무작위로 0.159 mm<sup>2</sup> 영역을 1군데씩 선택하 여 양성반응을 보인 세포 수와 전체 세포 수를 계수한 후 그 비율을 백분율로 표시하였다. 각 군간의 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 0.05 이하의 two-tailed P 값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

미세혈관밀도(microvessel density)를 제시하기 위하여 내 피세포 표지자인 CD31에 의해 염색된 표본에서 종양관련 내피세포의 농도를 구하였다. 먼저 ×40 현미경야에서 종 물의 주변부에서 종양관련 신생혈관이 집중적으로 분포된 부위를 확인한 후, 그 부위에서 100배의 배율로 렌즈를 바 꾸었다. 각 군별 10 표본에서 조직 슬라이드 1개당 1부위씩 가장 밀도가 높다고 여겨지는 부위를 택하여 0.159 mm<sup>2</sup> 영 역에서 CD31 항체에 의해 주변부가 완전히 염색된 혈관의 수를 결정한 후<sup>20</sup>, 역시 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 군간 비교를 시행하였다.

CD31/TUNEL 이중염색에 양성반응을 보인 세포의 정량 화를 위해서는 각 군별 10개 영역에서 양성반응을 보인 세 포의 수를 계수하였다. 즉 ×200 현미경야에서 0.039 mm<sup>2</sup> 영역을 택하여 CD31 양성반응인 적색형광과 TUNEL 염색 인 녹색형광이 혼재된 노란색 세포의 수를 계수하여 군간 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 시행하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 종양세포에서 EGFR/pEGFR의 발현

종양세포를 chamber 슬라이드에 고정하여 직접 세포염 색을 시행한 결과 ACC3 종양세포는 EGFR을 발현하였으 며, EGFR은 활성화되어 있었다.(Fig. 1)

### 2. 동위종양 모델에서 Erbitux와 CPT-11의 치료효과

#### 1) 종양 증식에 미치는 효과

CPT-11의 생체 내 항종양 효과를 평가하기 위하여 인간 타액선암 세포주 중 EGFR이 발현되고 활성화되어 있는 ACC3 세포를 누드 마우스의 이하선에 이종이식하여 타액 선 동위종양을 유도한 후 CPT-11과 Erbitux로 치료하였다. 종양세포 이종이식 1주 후 치료를 시작하고, 치료시작 5주 후 모든 실험동물을 희생하였다. 치료기간 내에 실험동물 의 체중은 급격한 감소없이 잘 유지되었다. 각 실험군의 종 물 증식 속도는 종양의 부피로 표현한 종양성장곡선에서 와(Fig. 2) 같았다. 즉 종양세포 이식 후 2주 이후부터 CPT- 11 치료군과 CPT-11과 Erbitux 복합치료군에서의 종양 부 피는 대조군이나 Erbitux 치료군과 비교하여 유의하게 감 소하였다. 치료 4주 이후부터는 Erbitux 치료군의 종양 부 피도 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 희생시점 에서 원발성 종양의 무게는 1군에서 4군까지 각각 1.13± 0.61, 0.80±0.24 0.34±0.22, 0.29±0.10 g이었다. 즉 평균 종 양무게 기준으로 대조군과 비교하여 종양세포 이종이식 후 6주 시점에서 Erbitux 치료군에서는 22%, CPT-11 치료 군에서는 70%, 그리고 CPT-11과 Erbitux 복합치료군에서 는 74%의 원발성 종양증식 억제가 관찰되었다.(Fig. 3)

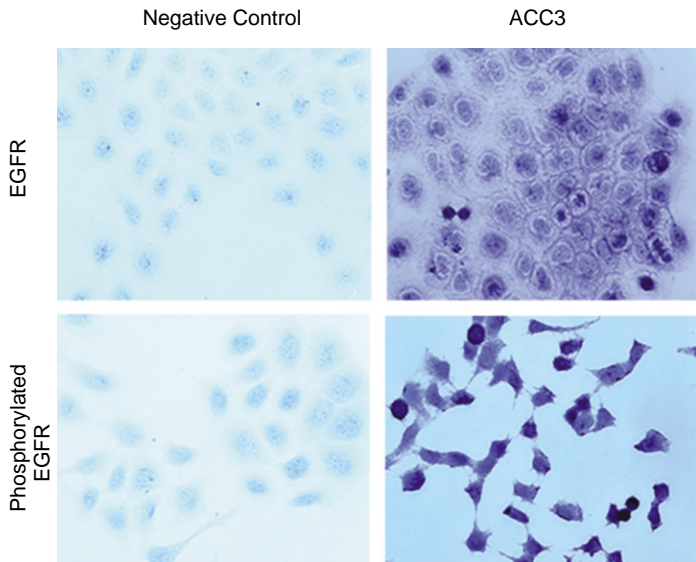
종양세포의 증식성을 대표하는 PCNA에 관한 면역조직 화학염색에서도 CPT-11/Erbitux 치료가 이루어진 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 PCNA 양성세포의 비율이 유 의하게 감소하였다.(Fig. 4, Table 1)

#### 2) EGFR에 미치는 효과

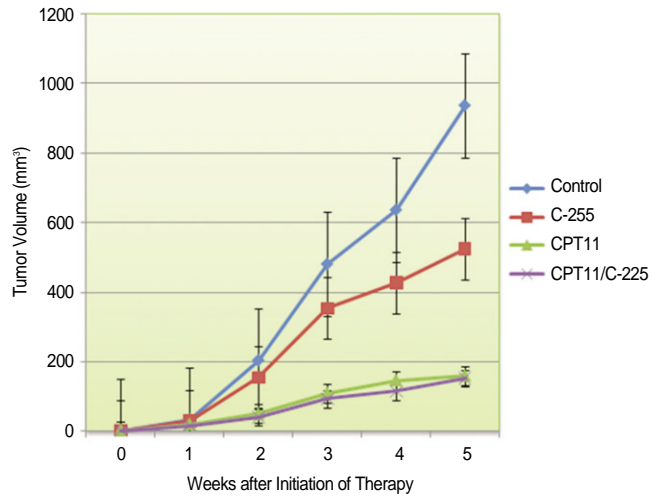
CPT-11/Erbitux 치료가 인간 타액선암 이종이식체인 마 우스 종물의 종양세포에서 종양관련 신호전달계에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대조군과 각 치료군의 종물 조직 에서 EGFR과 pEGFR의 발현정도를 파악하였다. 그 결과 CPT-11는 EGFR과 pEGFR의 발현정도에 영향을 미치지 못 하였으나, Erbitux에 의하여 활성화된 EGFR의 발현이 감소 하였다.(Fig. 4)

#### 3) 종양세포에 미치는 효과

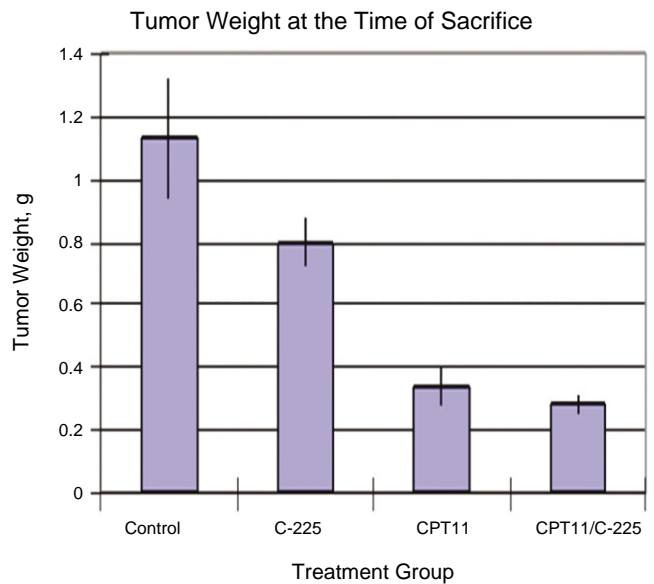
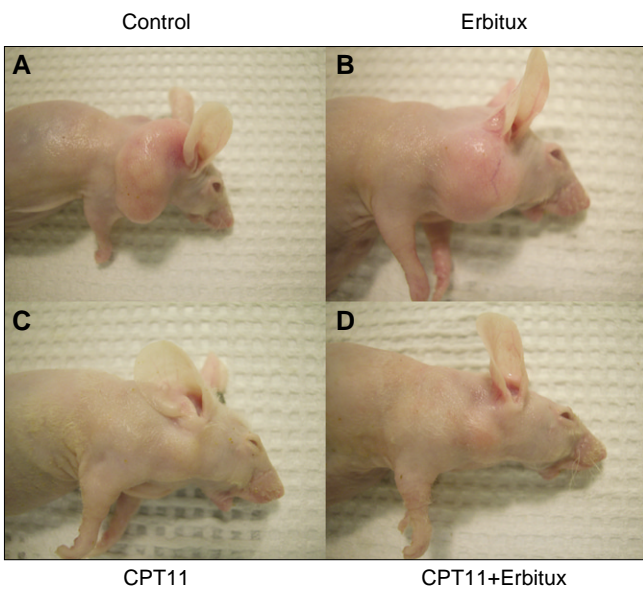
CPT-11/Erbitux 치료가 종양세포의 아포프토시스를 유도 하는지 결정하기 위하여 TUNEL 염색을 시행한 결과 종물 내에서 아포프토시스된 종양세포의 비율은 대조군과 비교



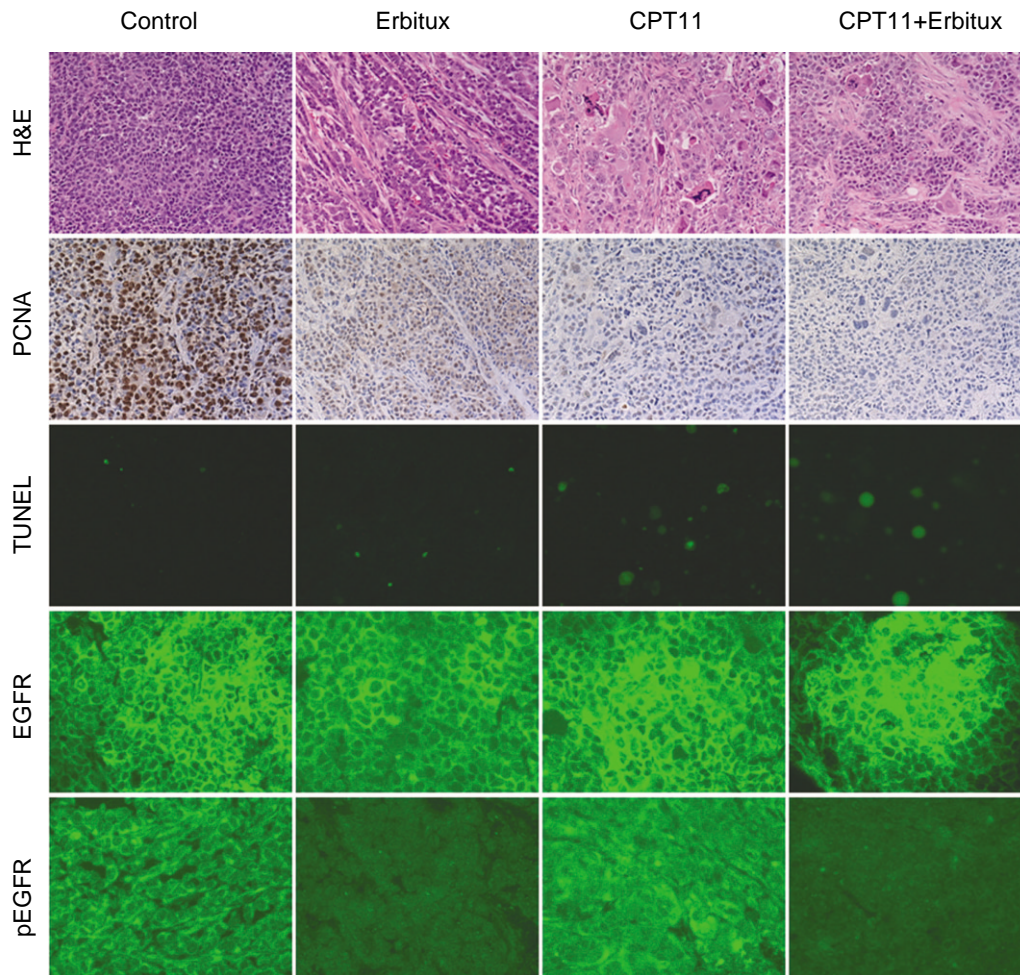
**Fig. 1.** Immunocytochemical analysis of the chamber slides in salivary adenoid cystic carcinoma cells. ACC3 cells were immunostained for the expression of EGFR and phosphorylated EGFR. Representative results are shown. (original magnification  $\times 200$ ) (ACC3: adenoid cystic carcinoma cell line, EGFR: epidermal growth factor receptor)



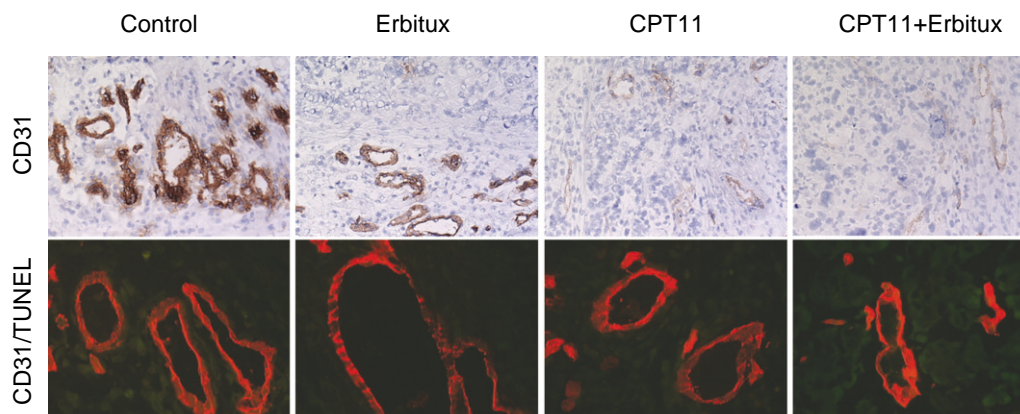
**Fig. 2.** A. CPT-11 inhibits the growth of salivary ACC xenografts in nude mice. ACC cells ( $5 \times 10^5$ ) were injected into the parotid gland of nude mice. Seven days after the injection of the tumor cell suspension, the mice ( $n=10$ ) were treated with intraperitoneal injection of Erbitux at 1 mg/injection twice weekly, CPT-11 given via intraperitoneal injection at 50 mg/kg once a week, or both Erbitux and CPT-11. Ponits, mean tumor volume measured twice per week and expressed once per week. (bars: SE) B. Tumor weights of each group at the time of sacrifice. Results are means  $\pm$  SE. (ACC: adenoid cystic carcinoma)



**Fig. 3.** Representative gross features of the tumors of each group at the time of sacrifice. A. Control B. Erbitux 1 mg/injection, twice weekly. C. CPT-11 50 mg/kg, once a week. D. CPT-11 + Erbitux.



**Fig. 4.** Histological (H&E staining), immunohistochemical/immunofluorescent and TUNEL analyses for degree of EGFR tyrosine kinase phosphorylation, cell proliferation, and apoptosis. After 5 weeks of treatment with Erbitux, CPT-11, or Erbitux+CPT11, ACC3 orthotopic tumors were sectioned and immunostained for EGFR, pEGFR, PCNA, and stained with TUNEL. Treatment with Erbitux alone or in combination with CPT-11, inhibited the degree of phosphorylation of EGFR. Note that all the treatment group showed decreased number of PCNA-positive tumor cells. And Some of CPT11-treated tumor cells demonstrated apoptosis. Representative features are shown. (original magnification  $\times 100$ , in panel of TUNEL  $\times 200$ ) (EGFR: epidermal growth factor receptor, pEGFR: phosphorylated EGFR, ACC3: adenoid cystic carcinoma cell line, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)



**Fig. 5.** Immunohistochemical and immunofluorescent double staining for tumor-associated endothelial cells in Erbitux/CPT-11-treated orthotopic tumors of ACC3. Microvessel density was decreased in CPT-11-treated tumors, but there was no apoptosis of the tumor-associated endothelial cells. (original magnification  $\times 100$ , in panel of CD31  $\times 200$ , in panel of CD31/TUNEL  $\times 200$ ) (ACC3: adenoid cystic carcinoma cell line)

**Table 1.** Quantitative immunohistochemical analysis of ACC3 tumors in parotid glands of nude mice

Parameter	Treatment group <sup>1</sup>			
	Control	Erbixux	CPT11	CPT11 + Erbixux
Tumor cells, mean ± SD				
PCNA (%) <sup>2</sup>	63.8 ± 6.1	33.7 ± 5.5 <sup>3</sup>	14.1 ± 5.7 <sup>3</sup>	12.3 ± 6.6 <sup>3</sup>
TUNEL (%) <sup>2</sup>	2.7 ± 1.0	2.8 ± 1.8	10.4 ± 4.9 <sup>3</sup>	9.1 ± 3.8 <sup>3</sup>
Endothelial cells, mean ± SD				
Microvessel density <sup>4</sup>	14.2 ± 4.4	13.3 ± 3.2	7.7 ± 3.1 <sup>3</sup>	6.5 ± 2.4 <sup>3</sup>
CD31/TUNEL <sup>5</sup>	0	0	0	0

(1: ACC3 cells ( $5 \times 10^5$ ) were injected into the parotid glands of nude mice. Seven days later, mice were randomized for treatment with twice-weekly intraperitoneal injections of Erbixux (1 mg/mouse), once-weekly intraperitoneal injections of CPT-11 (50 mg/kg), a combination of both drugs, or placebo as a control. Specimens were processed for immunohistochemical analyses 5 weeks after initiation of therapy, 2: PCNA and TUNEL positivity was quantitated as the ratio of positively stained cells/total cells  $\times 100$  per field in 10 random 0.159-mm<sup>2</sup> fields at  $\times 100$  magnification and 0.039-mm<sup>2</sup> fields at  $\times 200$  magnification, 3:  $P < 0.05$  as compared with controls (Wilcoxon rank-sum test), 4: Microvessel density was determined by measuring the number of completely stained blood vessels in 10 random 0.159-mm<sup>2</sup> fields at  $\times 100$  magnification, 5: CD31/TUNEL positivity was quantitated by measuring the number of CD31/TUNEL-positive cells in each of 10 random 0.039-mm<sup>2</sup> fields at by measuring the number  $\times 200$  magnification)

(ACC3: adenoid cystic carcinoma cell line, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

하여 CPT-11 치료군과 CPT-11/Erbixux 복합치료군에서 유의하게 증가하였다.(Fig. 4, Table 1)

#### 4) 미세혈관밀도에 미치는 효과

CPT-11/Erbixux 치료가 종양관련 미세혈관밀도에 미치는 효과를 알아보기 위하여 CD31 염색을 시행한 결과 CD31에 의하여 염색된 미세혈관/림프관의 수는 대조군과 비교하여 CPT-11 치료군과 CPT-11/Erbixux의 복합치료군에서 유의하게 감소하였다.(Fig. 5, Table 1)

#### 5) 종양관련 내피세포에 미치는 효과

CPT-11/Erbixux 치료가 종양관련 내피세포에 미치는 효과를 알아보기 위하여 CD31/TUNEL 이중염색을 시행한 결과 이중염색되어 노란색을 양성반응으로 보인 아포프토시스된 종양관련 내피세포는 관찰되지 않았다.(Fig. 5, Table 1)

## IV. 총괄 및 고찰

CPT-11은 I형 토포이소머라제 억제제의 일종이다. 일반적으로 I형 토포이소머라제는 DNA 복제와 RNA 전사과정 중에 이중가닥 DNA와의 공유결합을 통하여 꼬여있는 DNA를 풀음으로써 단일가닥 DNA의 절단을 유도하고, 복제과정 중의 DNA의 뒤틀림을 완화시키는 역할을 한다. CPT-11은 DNA-I형 토포이소머라제 복합체와 공유결합하여 복제과정 중에 풀어진 DNA의 재결합을 방해하고, 진행되던 복제 단일쇄 구조와 DNA-I형 토포이소머라제 복합체의 충돌을 유도하여 세포의 구조를 파괴시키고 궁극적으로

로 아포프토시스를 일으킨다<sup>21</sup>. 지금까지의 연구결과에 의하면 대장암, 자궁경부암, 유방암, 두경부암, 비소세포폐암 등에서 의미있는 효과가 보고되었다<sup>22-26</sup>. 본 연구에서는 타액선암 동물모델을 통하여 처음으로 CPT-11을 타액선암 생체 내 치료에 적용한 결과 종양 증식이 억제되는 의미있는 결과를 도출하였다.

본 실험에서 인간 타액선암 세포주를 마우스에 이종이식하여 유도된 실험적 종양에 대한 5주간의 CPT-11 치료결과 원발성 종양 증식이 종양 무게 비율로 70%가 억제되었고, 조직학적 소견으로도 종양세포의 증식성을 나타내는 인자인 PCNA 양성세포의 비율이 감소하고, 아포프토시스된 종양세포의 비율이 증가하였으며 종양관련 미세혈관밀도가 감소하는 현상이 관찰되었다. 즉 CPT-11 치료는 단순한 세포분열 억제(cytostatic)뿐 아니라 ACC 종양의 증식과 생존에도 강한 영향을 미쳤다. 본 실험결과에서 제시된 것처럼 CPT-11 치료한 종물의 조직소견에서는 핵질이 확장되고 기능하지 못하는 염색질이 분절화되는, 종양세포 아포프토시스의 특징적인 소견(Fig. 4, H&E staining)이 다수 관찰되었고, 핵질이 확장된 종양세포는 TUNEL 분석에서 양성으로 감지되었다.

Erbixux (C225, cetuximab)는 EGFR에 대한 인간-마우스 키메라(chimeric) 항체로 임상 전단계 연구에서 결장암, 두경부암, 그리고 췌장암 모델에서 종양 증식을 억제한다고 보고하였고<sup>27-29</sup>, 방사선치료와 병합요법 시 두경부암 환자의 생존율을 증가시켰다고 보고하였다<sup>30</sup>. 본 연구에서 사용한 세포주는 면역세포화학적 분석 결과 EGFR을 발현하는 것으로 판명되어 Erbixux 치료를 적용하였다. Erbixux 치료결과 EGFR 타이로신 인산화효소의 활성이 억제되었고, 종

양세포의 증식성이 유의하게 감소하여 무게비로 22%의 종양 증식 억제효과가 관찰되었다. 많은 연구에서 EGFR 경로를 억제할 경우 세포주기 조절이나 세포생존 경로, 종양 세포 침투능, 신생혈관형성 과정 등에 영향을 미쳐 세포독성(cytotoxic) 반응이 초래되는 것으로 보고하였다<sup>31,32</sup>.

그러나 본 실험에서는 TUNEL에 양성반응한 핵분절화된 종양세포나 TUNEL/CD31에 이중으로 양성반응한 아포프토시스된 종양관련 내피세포의 수는 유의하게 증가되지 않았다. 본 연구진의 구강암 세포주에 대한 Erbitux 치료실험에서도 미세혈관밀도의 감소나 세포독성 반응 없이 원발성 종양부하만 52% 감소된 바 있다<sup>20</sup>. 이는 본 실험에서와 유사한 결과이며, 결국 종양 세포주의 특성에 따른 차이 때문으로 추론된다. 또한 본 연구에서 관찰된, 종양관련 내피세포가 아포프토시스 없이 미세혈관밀도가 감소된 소견은 추후 종양관련 내피세포의 증식과 기능, 그리고 관련인자에 관한 정밀한 연구를 통하여 규명해야 할 것이다. 본 연구결과만으로 결론짓기는 어렵지만 CPT-11 치료에 의하여 종양관련 내피세포의 증식성이 감소되었기 때문인 것으로 추정된다.

임상적용 시 CPT-11 치료만으로는 반응성이 제한적인 경우나 치료내성의 발생 등에 대비하여 다양한 방식의 복합치료 기법이 연구되고 시도되고 있다. 2002년 Prewett 등<sup>33</sup>은 결장직장암 마우스 모델에서 IMC-C225 (Erbitux)와 CPT-11을 복합적용하여 단일제제로 치료하였을 때보다 증가된 종양 성장억제 효과와 특히 CPT-11 치료에 저항성이 있는 종양의 치료에 CPT-11/IMC-C225 복합치료가 효과적임을 보고하였다. 또한 CPT-11 단일제제를 적용했을 때보다 IMC-C225와 복합으로 적용했을 때 종양세포의 아포프토시스가 증가하고, 종양혈관이 감소됨을 보고하고, 그 기전은 IMC-C225가 종양세포의 생존경로와 DNA 복구기전을 억제하여 DNA 손상을 야기하는 화학제제나 방사선의 아포프토시스 유도능을 증가시키기 때문이라고 하였다. 그러나 본 실험에서는 Erbitux가 ACC3 종양세포나 ACC 종양관련 혈관내피세포의 아포프토시스를 유도하지 못하였고, CPT-11의 종양세포 아포프토시스 유도능을 증가시키지도 못하였다. 이는 ACC3 세포계의 종양 증식과 생존에 EGFR외의 다른 인자들이 강하게 작용함을 추론케 하였다.

또한 2004년 Koizumi 등<sup>34</sup>은 결장직장암 종양세포에서 EGFR 타이로신 인산화효소 억제제인 gefitinib (iressa)와 CPT-11이 상승작용이 있었고, 그 기전은 CPT-11이 종양세포의 EGFR 인산화 정도를 시간과 농도에 따라 증가시키기 때문이라고 보고하였다. 즉 적절한 농도의 CPT-11이 순간적으로 종양세포의 EGFR을 활성화시켜 gefitinib에 대한 감수성이 증가하였기 때문이라고 해석되는데 본 연구에서도 시험약제가 종양세포의 EGFR 인산화 정도에 미치는 효과를 결정하기 위한 면역조직화학염색을 시행하였다. 그 결과 정량적 분석은 시행하지 않았으나 CPT-11 치료에 의

해 ACC3 세포의 인산화 정도가 증가되었다고는 육안적으로 판단되지 않았다. 이는 본 실험에서 적용된 EGFR 억제제인 Erbitux은 종양세포의 세포 외 도메인에 리간드와 경쟁적으로 작용하는 항체의 특성을 갖고 있어, 종양세포의 인산화 정도에 영향을 크게 받는 타이로신 인산화효소 억제제인 gefitinib와 달리 CPT-11 치료에 의해 종양세포의 EGFR 억제제에 대한 감수성이 증가되지 않았기 때문인 것으로 추정된다. 그 결과 본 실험에서 기대하였던 CPT-11과 Erbitux의 상승효과(synergistic effect)는 관찰되지 않은 것으로 고찰하였다. 따라서 수술이 불가능한, 진행된 또는 재발된 타액선 선낭암종의 치료와 관리에 CPT-11이 효과적일 것으로 여겨지는 바이다.

2006년 Kim 등<sup>35</sup>은 cetuximab (Erbitux)과 CPT-11이 갑상선 암세포와 동물모델에서의 갑상선 암종의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 특히 갑상선 암세포에서는 cetuximab 단독치료로는 증식억제 효과가 전혀 나타나지 않았으나 CPT-11과 복합치료 시 CPT-11의 항종양 증식 효과와 전세포사 효과(proapoptotic effect)가 Erbitux에 의하여 증폭되었을 뿐만 아니라 림프절 전이능과 종양의 미세혈관밀도도 역시 감소됨을 보고하였다. 본 연구진은 타액선 선낭암종의 폐전이 모델을 보고한 바 있다<sup>19</sup>. 본 실험에서 같은 세포주인 ACC3를 사용하였으나 치료기간이 5주로 ACC3 세포주의 특성상 혈관성 폐전이 발생하기에는 충분한 시간이 확보되지 않아 CPT-11과 Erbitux의 복합치료가 폐전이 발생률에 미치는 영향에 대해서는 검색하지 못하였다.

## V. 요약

EGFR을 발현하는 인간 타액선 선낭암 세포주를 면역결핍 마우스에 이종이식한 후 Erbitux와 CPT-11을 적용하여 단독치료 또는 복합치료를 5주간 시행하였다. 실험동물 희생 후 부검(necropsy)을 통하여 조직학적 관찰을 시행하고, 마우스 종물에 대한 면역조직화학염색과 TUNEL 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. Erbitux, CPT-11, Erbitux/CPT-11 치료군은 대조군과 비교하여 종양 증식이 각각 22, 70, 74 % 감소하였다.
2. CPT-11 치료에 의하여 종양세포의 아포프토시스가 유도되었으며, 동시에 종물의 미세혈관밀도가 감소되었다.( $P<0.05$ )
3. CPT-11에 의한 종양 증식 억제와 종양세포의 아포프토시스 유도 효과는 Erbitux에 의하여 상승되지 않았다.
4. CPT-11 치료나 Erbitux/CPT-11 치료에 의하여 종양관련 내피세포의 아포프토시스는 유도되지 않았다.( $P<0.05$ )

## References

1. Licitra L, Locati LD, Bossi P, Cantù G. Head and neck tumors other than squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2004;16:236-41.



2. Jones AS, Hamilton JW, Rowley H, Husband D, Helliwell TR. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 1997;22:434-43.
3. Laurie SA, Licitra L. Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J Clin Oncol* 2006; 24:2673-8.
4. Airoldi M, Cortesina G, Giordano C, Pedani F, Cavalot A, Marcato P, *et al.* Update and perspectives on non-surgical treatment of salivary gland malignancies. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2003;23:368-76.
5. Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kim SJ, Fan D, Villares GJ, *et al.* Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2008;10:489-500.
6. Herbst RS, Hong WK. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Semin Oncol* 2002; 29(5 Suppl 14):18-30.
7. Park YW, Kim JH. Immunohistochemical assays for the expression of epidermal growth factor-signaling proteins in adenoid cystic carcinoma of human salivary glands. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2006;28:499-510.
8. Younes MN, Park YW, Yazici YD, Gu M, Santillan AA, Nong X, *et al.* Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2696-705.
9. Agulnik M, Cohen EW, Cohen RB, Chen EX, Vokes EE, Hotte SJ, *et al.* Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands. *J Clin Oncol* 2007;25:3978-84.
10. Dahse R, Driemel O, Schwarz S, Dahse J, Kromeyer-Hauschild K, Berndt A, *et al.* Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations are rare in salivary gland carcinomas. *Br J Cancer* 2009;100:623-5.
11. Dahse R, Driemel O, Schwarz S, Kromeyer-Hauschild K, Berndt A, Kosmehl H, *et al.* KRAS status and epidermal growth factor receptor expression as determinants for anti-EGFR therapies in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol* 2009;45:826-9.
12. Rothenberg ML. Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* 1997;8:837-55.
13. Rivory LP. Irinotecan (CPT-11): a brief overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:1000-4.
14. Larsen AK, Gobert C. DNA topoisomerase I in oncology: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Pathol Oncol Res* 1999;5:171-8.
15. Saijo N. Preclinical and clinical trials of topoisomerase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 2000;922:92-9.
16. Friedman HS, Keir ST, Houghton PJ. The emerging role of irinotecan (CPT-11) in the treatment of malignant glioma in brain tumors. *Cancer* 2003;97(9 Suppl):2359-62.
17. Rothenberg ML, Cox JV, DeVore RF, Hainsworth JD, Pazdur R, Rivkin SE, *et al.* A multicenter, phase II trial of weekly irinotecan (CPT-11) in patients with previously treated colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;85:786-95.
18. Ross PJ, Teoh EM, A' hern RP, Rhys-Evans PH, Harrington KJ, Nutting CM, *et al.* Epirubicin, cisplatin and protracted venous infusion 5-Fluorouracil chemotherapy for advanced salivary adenoid cystic carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2009;21(4): 311-4.
19. Park YW, Chung SH. An experimental study for establishment of orthotopic salivary tumor models in mice. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2007;33:81-93.
20. Park YW. Targeted molecular therapy in a murine model of oral squamous cell carcinoma with an epidermal growth factor receptor inhibitor. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2009;31:8-17.
21. Raynal C, Pascussi JM, Leguelinel G, Breuker C, Kantar J, Lallemand B, *et al.* Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation. *Mol Cancer* 2010; 9:46.
22. Louvet C, André T, Gamelin E, Garcia ML, Saavedra A, Lenaers G, *et al.* A phase I-II, dose-escalating trial of ZD9331 in combination with irinotecan (CPT-11) in previously pretreated metastatic colorectal cancer patients. *Bull Cancer* 2004;91:279-84.
23. Kokawa K, Nishimura R, Fujii T, Umesaki N. Neoadjuvant chemotherapy with irinotecan and mitomycin-C for locally advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anticancer Res* 2007;27:2721-7.
24. Mrozek E, Kolesar J, Young D, Allen J, Villalona-Calero M, Shapiro CL. Phase II study of sequentially administered low-dose mitomycin-C (MMC) and irinotecan (CPT-11) in women with metastatic breast cancer (MBC). *Ann Oncol* 2008;19:1417-22.
25. Argiris A, Buchanan A, Brockstein B, Kolesar J, Ghebremichael M, Pins M, *et al.* Docetaxel and irinotecan in recurrent or metastatic head and neck cancer: a phase 2 trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 2009;115:4504-13.
26. Bastos BR, Hatoum GF, Walker GR, Tolba K, Takita C, Gomez J, *et al.* Efficacy and toxicity of chemoradiotherapy with carboplatin and irinotecan followed by consolidation docetaxel for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(4):533-9.
27. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, de Lorenzo S, Pepe S, de Placido S, *et al.* Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 1999;5:909-16.
28. 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* 1999;59:1935-40.
29. Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, Stackhouse MA, Carpenter M, Hicklin DJ, *et al.* Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54:1180-93.
30. Bonner JA, Giral J, Harari PM, Cohen R, Jones C, Sur RK, *et al.* Prolongs survival in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: a phase III study of high dose radiation therapy with and without cetuximab. *J Clin Oncol* 2004;22:5507.
31. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:689-708.
32. Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, *et al.* Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 1984;259:7755-60.
33. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8:994-1003.
34. Koizumi F, Kanzawa F, Ueda Y, Koh Y, Tsukiyama S, Taguchi F, *et al.* Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2004;108:464-72.
35. Kim S, Prichard CN, Younes MN, Yazici YD, Jasser SA, Bekele BN, *et al.* Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2006;12:600-7.