

구강 편평상피세포암의 골전이 모델

박영욱 · 오유진 · 이희수¹

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강해부학교실¹

Abstract

BONE METASTASIS MODEL OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Young-Wook Park, Yu-Jin Oh, Hee Su Lee¹

Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Department of Oral Anatomy¹,
College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University

Background and Purpose: Bone metastases rarely occur in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC), so the molecular mechanisms of bone metastasis of OSCC remains unclear. Studies with animal models allow progresses in understanding the molecular events for bone metastasis and provide new targets for therapy. So we tried to establish a murine model for bone metastasis of oral squamous cell carcinoma.

Materials and Methods: Human OSCC cells (KB cell line) were xenografted to nude mice via direct inoculation into the tibial marrow. Mice with tibial tumors were sacrificed once a week, until seven weeks after the injection of human tumor cells. Growth of tibial tumors were observed by histology. Expression of TGF- β and CXCR-4 in bone OSCC (experimental) and subcutaneous tumor (control) was also evaluated by immunohistochemical staining.

Results: Bone OSCC was successfully induced by intra-tibial injection of KB cells. Tumor mass was developed in the marrow tissues of tibia and finally invade the endosteum of tibia. Immunohistochemical staining showed higher expression of TGF- β in bone tumors than in subcutaneous tumors.

Conclusion: A murine model of bone metastasis of OSCC was suggested that imitated the clinical findings of distant vascular metastasis. This bone tumor model should facilitate understanding of the molecular pathogenesis of OSCC bone metastasis, and aid in the development of treatment strategies against OSCC bone metastasis.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Bone metastasis, Animal model

I. 서 론

구강 편평상피세포암(oral mucosal squamous cell carcinoma, OSCC) 종양세포는 타 고형종양에서와 유사하게 주변 조직으로의 직접 침투(direct invasion), 림프절 전이, 그리고 드물지만 혈행을 통해 특정 부위로 파급된다.¹⁾ 두경부 편평상피세포암에 있어 원격 전이병소 발생율에 대한 임상보고를 살펴보면, 미국의 M.D. 앤더슨에서

25년 동안 치료한 5,019명의 환자에 대한 조사 결과 10.8%에서 원격 전이병소 발생이 보고되었고,²⁾ Calhoun 등의 연구에 의하면 두경부 편평상피세포암의 원격 전이병소 발생율이 4.2-23.8%라고 보고한 바 있다.³⁾ 또한 Shingaki 등은 원격 전이병소 발생의 예지인자(predicting factor)로 양성 림프절 전이를 우선적으로 거론하였다.⁴⁾ 발생 부위에 대한 연구에 의하면 대부분의 원격 전이병소가 폐에서 발생되었고, 그 다음으로는 골조직과 간, 그리고 드

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

물게 피부와 횡경막에서 원격 전이병소 발생이 보고되었 다.⁵⁾ 반복된 재발과 전이 끝에 척수에까지 구강암이 전이된 증례도 보고된 바 있다.⁶⁾

구강 편평상피세포암의 치료에서 임상적으로 문제가 되는 것은 원발성 병소 주위로의 침윤성 병소와 경부 림프절 전이병소, 그리고 원격 기관에의 전이병소의 발생이다. 특히 원격 전이병소가 발생될 경우에는 환자의 예후와 생존율이 급격히 감소되어 두경부 편평상피세포암에 대한 임상연구에 의하면 원격 전이병소 진단 후 median survival은 4.3 개월, 그리고 86.7%의 환자가 첫해에 사망한 것으로 보고되었다.²⁾ 따라서 구강 편평상피세포암 환자에 대한 치료와 관리 중 원격 전이병소가 진단되면 치료 목표와 치료 방식에 있어서도 변경이 불가피하다.

특히 골조직 전이병소가 발생하게 되면 동통 유발, 신체 운동성 저하, 고칼슘혈증, 골절과 척수 압박, 종물의 망상골 침윤에 의한 빈혈 등의 증상으로 환자의 상태와 삶의 질은 급격히 악화된다. 진행된 유방암이나 전립선암과 같이 빈번 하지는 않지만 구강 편평상피세포암에서도 원격 전이의 22%가 골조직에 발생되고⁷⁾ 있으나 그 분자생물학적 기전은 아직도 완전히 이해되지 못하고 있어 이에 대한 연구가 필요하다. 이에 본 연구진은 구강 편평상피세포암의 골조직 전이병소에 대한 연구와 치료에 유용한 동물모델을 제작하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

인간 구강 편평상피세포암종으로부터 확립된 KB (KCLB No. 10017) 세포주가 본 실험에 이용되었다. KB 세포주는 한국세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 구입하여 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 배양하였다. 세포들은 단일층으로 배양하였고, 55% 습도를 유지하면서 5% CO₂, 95% 공기 상태로 37°C에서 유지되었다.

2. 실험동물과 세포접종액 처리

생후 10주된 웅성 누드 마우스(BALB/cAnNCrj)를 업체 (Orient Bio, Seoul, Korea)로부터 구입하여 12주 시점에서 실험에 이용하였다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서 국립 강릉원주대학교 치과대학의 실험동물 관리원칙(Animal Care and Use Guidelines)에

의거하여 사육하였다.

생체내 이종이식을 위한 세포 부유액(cell suspension)을 만들기 위하여 95% 이상의 활성을 유지한 배양세포만을 이용하였으며 이는 트립판 블루 염색으로 확인하였다. 배지에 포화상태에 이르지 않은 암세포를 트립신 처리(0.25% 트립신 + 0.02% EDTA) 후 정해진 수만큼을 50 μl의 Ca²⁺과 Mg²⁺가 함유되지 않은 HBSS (Hanks' balanced salt solution)에 부유시켰다.

3. 경골과두부를 통한 종양세포 이식술

구강암 세포주를 누드 마우스의 골수조직에 이종이식 하였을 때 골조직 구강암이 발생되는지를 결정하기 위하여, KB 세포주를 실험동물의 경골에 직접 주입하였다. 세포밀도는 본 연구진의 선행연구에서⁸⁾ 이종이식시 누드 마우스에서 100% 종양발생능을 보인 최소 세포수로서 KB 세포의 경우 5×10^5 개였다. 마취 상태를 유도하기 위하여 zolazepam (Zoletil®, France) 1.5 mg/kg과 xylazine hydrochloride (Rumpun®, Bayer Korea, Korea) 3.5 mg/kg의 혼합액을 대퇴부에 근육주사 하였다. 10분 경과 후, 50 μl의 HBSS에 부유시킨 암세포 주입액을 30마리의 누드 마우스의 우측 경골 과두부 골수조직에 이종이식하였다. 즉 1 ml 시린지와 27게이지 주사침을 이용하고, 마우스가 엎드려 있는 자세에서 주사침을 외측 상부로부터 접근시켜 피부와 경골과두부의 피질골을 관통한 후 주사침의 베벨 전체가 골수강 내에 들어간 상태에서, 암세포 부유액이 골내강으로부터 새지 않도록 적절한 압력을 유지한 상태에서 서서히 주입하였다(Fig. 1-A,B).

4. 실험동물의 유지 및 부검

암세포 이종이식 후 실험동물은 종양결절이 인지될 때까지 매일 관찰되었고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 종양의 크기와 몸무게를 기록하였다. 종양의 크기는 캘리퍼를 이용하여 그 장경과 단경을 cephalad-to-caudad/left-to-right로 측정, 기록하였다. 종양의 부피는 다음의 공식으로 산출하였다⁹⁾: (장경) × (단경)² × π/6, π = 3.14.

실험동물은 골수강내 종양 증식양상을 조직학적으로 관찰하기 위하여 암세포 주입 후 1주 후부터 매주 5마리씩 일주 일마다, 암세포 주입 후 7주까지 희생하였다. CO₂를 이용하여 안락사시킨 후 원발성 종양을 경골 상단 1/2부위와 함께 절제하여 였다. 종물은 헤마톡실린-에오신 염색과 면역 조직화학염색을 위하여 포르말린 고정 후 탈회액(5% nitric acid in PBS) 처리하여 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 추후의 계속적인 연구를 위하여 OCT 화합물 (Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.)에 포매하여 액체질소

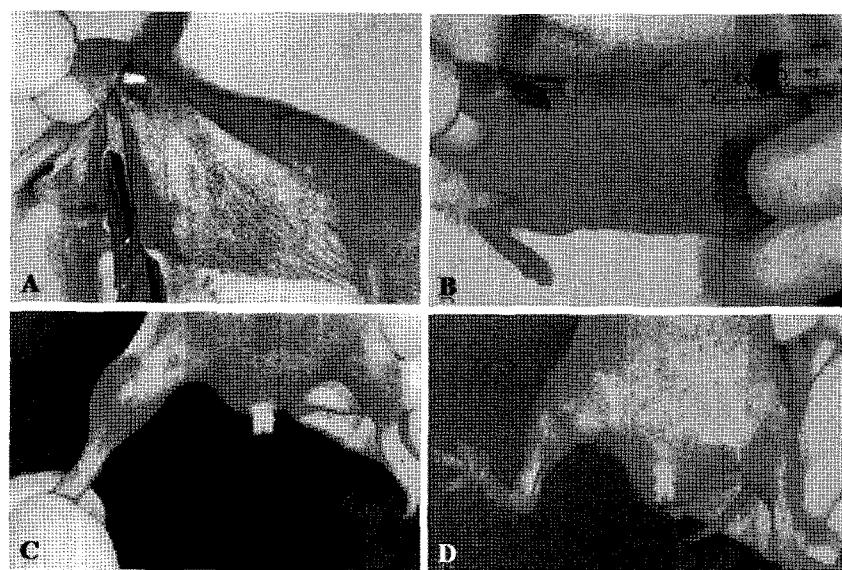


Fig. 1. A. An incision can be made for accurate injection. B. Inoculation of tumor cell suspension into the condylar head of tibia. C. Successfully induced intrabony tumor. D. Subcutaneous tumor may be induced due to leakage of tumor cell suspension.

로 금냉 후 -70°C에 보관하였다.

5. 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: rabbit polyclonal anti- CXCR4 (ab2074), anti-TGF- β (ab66043; abcam, U.S.A.). 이차항체로는 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, U.S.A.)가 적용되었으며, 발색을 위하여 DAB (3,3-diaminobenzidine, Research Genetics, Huntsville, U.S.A.)이 사용되었다.

6. 면역조직화학염색

CXCR4와 TGF- β 염색을 위해서는 파라핀 포매 조직을 이용하였으며, 항체 제조사의 지시대로 면역조직화학염색을 다음과 같이 시행하였다. 파라핀 포매 조직을 4-6 μm 로 세절하여 생긴 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고, 57-60°C정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스 성분의 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 TGF- β 염색의 경우 조직 슬라이드를 10 mM sodium citrate 완충액(pH 6.0)에 담근 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이

브를 이용하여 2분 30초간 강가열 후 7분 30초간 약가열하였다. CXCR4 염색의 경우 항원성 회복을 위한 특별한 처리는 시행하지 않았다. 이후 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 0.3% H₂O₂ 메탄올 용액에서 12분간 두었다. 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백의 결합을 차단 위하여 3% 염소혈청(normal goat serum)을 PBS에 섞은 단백 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백 차단액 제거 후 단백 차단액에 다음의 일차항체 CXCR4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 TGF- β (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 적용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 음성대조 표본은 이차항체만을 적용하였다. PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백 차단액을 10분간 적용한 후, 단백 차단액을 제거하고 단백 차단액에 1:500으로 흐석시킨 이차 항체인 goat anti-rabbit HRP를 상온에서 30분간 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 5분을 넘지 않도록 한다. 종류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액으로 린스하고, 헤마 톡실린(Harris hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 대조염색을 10초간 시행하였다. 흐르는 종류수로 대조염색을 중지시키고 세포핵을 푸른색으로 강조하기 위하여 PBS를 30-60초간 적용하였다. 종류수로 모든 염기 성분이 제거되도록 철저히 수세한 후 마운트를 2-3방울 적용하고 50-60°C의 열판에서 5-10분 정도 중합시켜 고정하였다.

7. 통계

면역조직화학 염색에 대한 양성반응의 강도, 즉 각 인자들의 발현 정도를 비교하기 위하여 대조염색을 시행하지 않은 슬라이드를 실험군과 대조군에서 각각 5개씩 제작하였다. $\times 100$ 현미경야에서 5개 슬라이드로부터 1개 슬라이드당 4부위씩 종양조직의 20부위(1부위는 0.156 mm^2)를 선택하였다. 선택된 화상을 CCD 카메라(Olympus DP70 digital microscope camera; Olympus Corporation., Tokyo, Japan)를 이용하여 컴퓨터에 입력하였다. Optimas 영상분석 소프트웨어에서 DAB에 의한 양성반응의 강도를 OD (optical density)값으로 수치화한 후, 비모수 검정(Wilcoxon's non-parametric method)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.

III. 연구 결과

1. 경골 골수에의 종양세포 이식소견

KB 세포주를 누드 마우스의 경골 골수조직에 이종이식한 후 2주간은 육안적으로 변화가 없었다. 개체에 따라 차이가 있었으나 종양세포 이식 후 2-3주 경에 경골 부위에 종창과 함께 종양 결절이 형성되어 성장을 시작하였고(Fig. 1-C,D), 4주 이후부터는 급격하게 종물이 증식하였다. 전체적으로 이식성공율(take rate)은 87%였으며 마우스의 보행장애는 이식 4주 후부터 관찰되었다. 이식 6주 후까지 실험동물의 체중은 유지되었으나, 6주가 지나면서 평균 체중이 감소하였고, 1마리의 실험동물은 극심한 체중감소와 함께 희생 전에 사망하였다.

조직학적 소견으로는 KB 종양세포 이식 2주 후까지는 경골 조직의 연속성이 잘 유지되었고, 골수에는 무과립성 백혈구와 다핵세포와 같은 조혈관련 세포(hematopoietic cell)들이, 골기질 부위에는 간혹 파골세포가 관찰되었다(Fig. 2-A,B). 대부분의 실험동물에서 3주 표본에서 상당히 증식된 종양세포군이 형성되어 있었으며, 이후 시간이 경과될수록 골소주의 파괴와 함께 종양세포가 골수조직을 대체해 가는 현상이 관찰되었다(Fig. 2-C,D,F).

2. 면역조직화학적 분석

인간 구강암 세포를 이식한 마우스의 골내 종양과 피하 종

양에서 골용해성 전이관련 인자인 TGF- β 와 골전이 특이 유전자인 CXCR4의 발현정도를 결정하였다. 그 결과 피하 종양에서보다 경골 종양에서 TGF- β 의 발현이 유의성 있게 높았다($P < 0.05$). 또한 CXCR4의 면역양성반응 정도는 경골 종양에서 강하였으나 피하 종양에서의 발현정도와의 사이에 유의성은 없었다(Fig. 3). 즉 정량적 면역조직화학염색 분석결과를 보면 TGF- β 의 경우 실험군(경골 종양)에서 $6,028 \pm 2,626 \text{ pixel}/0.156 \text{ mm}^2$, 대조군(피하 종양)에서 $3,183 \pm 2,134 \text{ pixel}/0.156 \text{ mm}^2$ 였고, CXCR4의 경우 실험군에서 $10,382 \pm 3,504 \text{ pixel}/0.156 \text{ mm}^2$, 대조군에서 $7,818 \pm 3,691 \text{ pixel}/0.156 \text{ mm}^2$ 였다.

IV. 총괄 및 고찰

타 고형성 암종에서와 같이 구강 편평상피세포암에서도 일단 종양세포가 골조직에 침투하거나 전이하게 되면 병기(stage)가 악화되고, 특히 골전이 병소는 치료가 불가능하다. 이에 본 연구진은 구강암에서 해부학적 특성상 조기에 발생하는 하악골 침투현상과 드물지만 치료에 문제가 되는 원격 골조직 병소에 대한 종양생물학적 기전을 이해하고 치료에 대한 새로운 표적물질을 탐색해 보고자, 이 현상들에 대한 동물모델을 제작하고자 하였다. 수종의 구강암 세포주를 누드 마우스의 구강저 부위의 점막하 조직에 이종이식한 선행실험에서^{8,10)} 구강저에 유도된 동위종양의 종양세포는 근육과 같은 연조직으로는 종양도(tumor island)를 형성하면서 침투하였으나, 하악골막을 비롯한 골조직에 침투하는 양상은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 따라서 침투성을 증가시키지 않은 구강암 세포주의 경우 누드 마우스에 이종이식하였을 때 유도된 종물 주변에 섬유성 막이 존재하여 주변 골조직으로의 침투양상은 모델링하지 못한 것으로 평가하였고, 본 연구를 통하여 골조직 전이모델을 누드 마우스에 실험적으로 유도하고자 하였다.

악성종양의 임상적 치료율을 높이기 위해서는 *in vitro* 연구와 환자에 대한 임상연구를 연결해 주는 동물모델의 개발은 필수적이다. 그러나 설치류(rodent)를 비롯하여 악성 신생물이 자연적으로 발생하는 실험동물들이 있는데도 불구하고 자발적 골전이에 대한 동물모델은 거의 개발되어 있지 않다. 래트(rat)는 마우스보다 골격이 크고 생체물질(biomaterial)이나 치료물질의 변화나 효과를 평가하기가 더 용이하여 골전이 동물모델로 개발되어 왔다.¹¹⁾ 또한 래트의 경우 가끔 자생적 종양발생이 이루어짐으로 골전이에 대한 동계모델(syngeneic model) 제작이 가능하다. 래트에 대한 동계(동종) 골전이 모델 제작방법으로는 종양세포를 직접 대퇴골(femur)과 같이 큰 골에 드릴링 후 이식하거나,¹²⁾ 심장의 좌심실이나 경동맥에 직접 종양세포를 이식하거나,¹³⁾ 혹은 하대정맥(lower caval vein)을 일시적으로 결찰

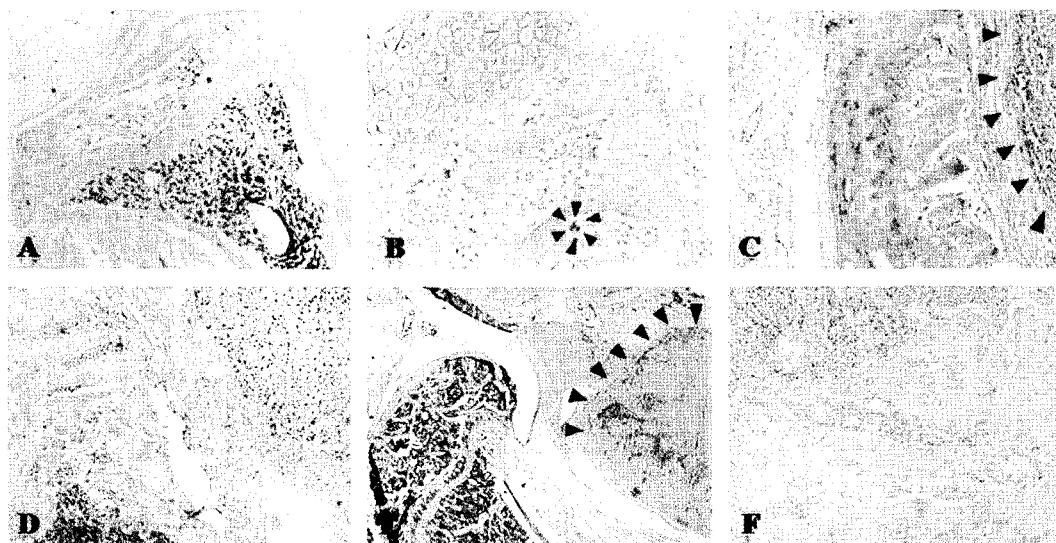


Fig. 2. Histological (H&E staining) findings of experimental (A,B,C,D,F) and control (E) group. Marrow stem cells and multinucleated hematopoietic cells are in the marrow of the tibia (A; post-xenograft 1-week view, $\times 40$). Osteoclasts (arrow heads) are activated in the post-xenograft 2-week view (B, $\times 200$), which means osteolysis. Tumor cells (arrow heads) are proliferating inside the condyle (C; post-xenograft 3-week view, $\times 100$), and invading bone matrix (D; post-xenograft 5-week view, $\times 100$). Tumor cells (arrow heads) are growing outside of the tibia (E; post-xenograft 5-week view, $\times 40$). Finally, bone matrices are resorbed, and replaced by the tumor cells (F; post-xenograft 6-week view, $\times 100$).

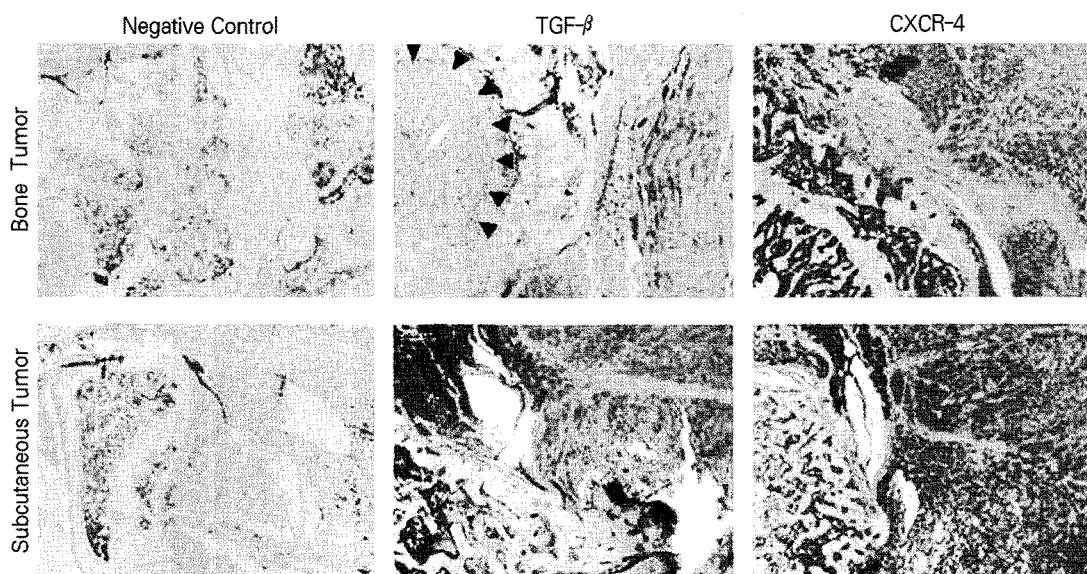


Fig. 3. Immunostaining for TGF- β and CXCR4 in murine tibial and subcutaneous tumors of oral squamous cell carcinoma. The immunoreactivity of TGF- β is up-regulated in tumor cells of bone tumor (arrow heads).



Fig. 4. Orthotopic tumor was induced in the mouth floor of athymic mice via xenotransplantation of cultured human tumor cells. A. Tumor islands (arrow head) invaded into muscular spaces. B. But, induced tumor had fibrous layer (arrow head), which separated the tumor from adjacent tissues (Original magnification $\times 40$).

한 상태에서 꼬리정맥에 종양세포를 이식하거나, 일시적 결찰상태에서 대퇴동맥(femoral artery)에 종양세포를 이식하기도 한다.¹⁴⁾

인간 암세포를 이종이식하고자 할 경우에는 면역결핍된 실험동물에서는 이식체가 배척되지 않으므로 T 림프구의 기능이 저하된 누드래트나 무흉선(athymic) 마우스를 이용하게 된다. 본 연구에서는 골격구조물이 작아 기피되어 왔으나, 전임상 종양치료제 연구에서 필수 실험동물인 마우스에서 구강 편평상피세포암에 대한 골전이 모델을 제작하고자 하였다. 저자의 구강암 마우스모델 제작에 대한 선행 연구결과들로부터^{8,10)} 전이와 침투능이 강화된 세포주를 적용하더라도 이종이식된 인간 구강암 종양세포가 마우스에서 원격 골전이 병소를 형성하지 못할 것이라 결론지었다. 폐암의 경우 인간 종양세포를 실험동물의 피하조직에 이종이식하여 유도된 인간암 세포와 동물의 기질과 혈관으로 구성된 잡종(hybrid) 이식체를 누드 래트의 폐에 동위이식하여 75%의 성공률(take rate)로, 골조직 전이모델을 제작하였음이 보고되기도 하였다.¹⁵⁾

다음으로 유용한 방법은 인간 암세포를 누드 마우스의 좌심실에 주입하는 방법이다. 이 방법은 특정 암세포가 골수조직이라는 특정 미세환경에서 어떤 성장 이점(advantage)이 있어 선택적으로 증식한다는 Paget의 “seed and soil” 가설에¹⁶⁾ 기초한 방법으로 그 기전이 아직은 과학적으로 입증되지 못하고 있다. 다만 종양세포가 골조직에 선택적인 이주를 하게 되는 요인으로는 종양 표현형에 따른 골조직 미세환경으로부터의 화학주성(chemotaxis), 골수 혈관의 내피표면에 대한 종양세포의 선택적 부착(adhesion), 그리고 골수 미세환경에서의 성장인자와 세포의 기질단백의 특성이 제시되고 있다.¹⁷⁾ 심장내 주입으로 성공된 실험은 임상적으로 골전이 성향이 강한 유방암 암세포 등을 실험동물의 좌심실에 주입하되, 혈행이 180° 회전함으로 종양세포 색전이 잘 생기는 해부학적 여건을 갖고 있는 어린 설치류(마우스)의 장골 골중간부(metaphysis)에서 골전이 병소가 발생되었음이 보고되었다.¹⁸⁾ 본 연구진의 예비실험에서 누드 마우스의 좌심실에 종양세포를 주입하는 과정은 절개를 할 경우 이식수술 후 합병증 이환율이 높고, 절개를 하지 않을 경우 기술적으로 어려움이 있었다. 게다가 구강암의 경우 유방암이나 전립선암과는 달리 골전이 성향이 약하기 때문에 양성 반응이 예상되지 않고, 실제 값비싼 영상기술을 동원하지 않으면 양성 반응을 체크하기에도 어려움이 있어 편리하고 재현성 있는 동물모델 제작 방법으로는 적합하지 않은 것으로 판단하였다.

따라서 본 연구에서처럼 골조직에 직접 종양세포를 이식하여 유도된 골종양은 원발성 종양세포의 혈관성 종양색전형성 후 골조직에 국소화되는 혈관성 전이라기 보다는 악성 종양 세포가 골조직에서 국소적으로 유도된 것을 의미한다.

는 단점이 있다. 그러나 마우스에서도 골조직 종양에 대한 치료효과 판정이 가능하고, 재현성이 우수하다는 장점에 착안하여 경골과두부에 구강암의 골전이를 모사한 골종양을 제작하는데 의미를 두었다. 그 결과 인간 구강암 세포주를 누드 마우스의 골수조직에 이종이식하였을 때 편평상피세포암의 조직학적 특성이 유지된 골종양이 유도되었다. 일반적으로 이종 모델은 숙주(host)와 종양(tumor)사이의 생리학적 상호작용이 부족하고, 특히 누드 마우스와 같이 면역체계가 손상된 동물모델에서는 인간에서 일어나는, 종양에 대한 면역감시로부터의 도피기전(escape mechanism)이 발생되지 않는다.¹⁹⁾ 그럼에도 불구하고 인간암의 조직학적 특징은 동물 모델에서도 잘 나타나는 것으로 관찰되었다.

골 전이병소는 골용해성(osteolytic)으로 혹은 골형성적(osteoblastic)으로 혹은 두가지 기전이 혼합된 양상으로 발생된다. 임상적으로 골용해성 전이는 유방암을 비롯한 대부분의 골전이 병소에서,²⁰⁾ 교직골(woven bone)을 형성하는 골형성적 전이는 전립선암에서 빈번히 발생하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 본 연구결과 OSCC 세포를 누드 마우스의 경골에 이식하였을 경우 골용해성 전이가 발생되었다. 즉 파골세포(osteoclast)가 실험 1-2주 표본에서 비교적 활성화되어 있었고, 3주 표본에서는 종양이 활발하게 증식하는 소견이 관찰되었다. 4-7주 표본에서는 조직학적으로 골소주의 파괴와 종양세포가 골수조직을 대체해 가는 현상이 확대되어 가는 소견이 관찰되었다. 본 동물모델은 테크닉을 요하지만 이식 성공률이 높고, 실험기간 후반부에 실험동물의 보행장애가 초래되었으나 대부분의 실험동물이 골소실 병소로 인한 악액질(cachexia)을 잘 견뎌냄으로, 재현성 있는 우수한 골전이 마우스 모델로 제시하고자 한다.

골전이 현상은 복잡한 다단계 과정으로 원발종양(primary tumor)과 혈행, 그리고 골조직이라는 미세환경에서의 고유 세포성분과 종양세포간의 상호작용을 통해 발생된다. 일단 골조직에 종양세포가 유입되면 골기질과 골수의 활발한 교체(turnover)는 종양세포가 자리잡고 증식하는데 필요한 성장인자와 싸이토카인이 풍부한 환경을 제공한다.²²⁾ 본 연구에서는 골수 미세환경과 종양세포와의 상호작용의 일부를 규명하기 위하여 TGF- β 와 CXCR4의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 검색하였다. 골전이에서 TGF- β 는 골조직의 리모델링 동안 종양세포의 집락화(colonization)와 초기증식을 촉진하고, 종양세포로 하여금 파골세포성 골흡수를 일으키는 PTHrP (parathyroid hormone-related protein)를 분비하도록 하여 골용해성 전이를 일으키는 것으로 알려져 있다.²³⁾ Deyama 등은 침투성을 증가시킨 구강암 세포주에서도 파골세포 분화를 촉진하는 PTHrP가 발현됨을 보고하기도 하였다.²⁴⁾ 본 연구결과 TGF- β 가 피하종양에서보다 경골 종양에서 과발현 되었는데, 이는 본 실

험에서 골종양이 유도되는 과정에서 활용해 현상이 동반되었음을 의미한다.

CXCR4는 다양한 세포의 선택적 이주를 조절하는 케모카인(chemokine)의 일종으로, 악성종양에서 SDF (stromal cell-derived factor)-1의 수용체로 작용하여 종양세포가 SDF-1이 발현되는 조직에 전이하는데 일정 역할을 하는 것으로 제시되었다.²⁵⁾ Delilibasi 등은 설암(tongue cancer)에 대한 면역조직화학적 연구를 통해 림프절 전이된 종양세포에서 CXCR4가 과발현됨을 보고하였고,²⁶⁾ Kaifi 등은 식도암(esophageal cancer)에 관한 면역조직화학적 연구에서 CXCR4 과발현이 임상적 예후불량과 관련이 있는 바, 이는 림프절과 골수에의 미세전이(micrometastasis) 때문이라고 보고하였다.²⁷⁾ 이 등도 OSCC 종양세포에서의 CXCR4의 발현이 환자의 불량한 생존율과 연관이 있고, MMP-9과 Ki-67 발현과도 상관관계가 있다고 하였다.²⁸⁾ 본 연구결과 CXCR4의 발현정도는 경골과 피하조직으로부터 유도된 종물의 종양세포 간에 차이가 없었다. 이는 본 실험에서 유도된 골종양이 원발성 종양으로부터 전이성 높은 세포군이 자발적으로 전이되어 발생된 종물이 아니고, 물리적으로 종양세포를 골조직에 이식하여 유도된 종물이기 때문인 것으로 결론지었다.

요약하면 본 연구결과를 통하여, 비록 자발적 원격전이가 재현된 동물모델은 아니지만, 구강암 골조직 전이병소에 대한 치료효과를 판정할 수 있는 마우스 모델을 제시하는 바이다. 어떤 동물모델도 그 자체가 임상상황에서 관찰되는 현상들을 재현하는 데는 충분하지 못함으로 본 구강암 경골 전이모델은 제작하기 쉽고, 재현성 있고, 치료실험을 위한 실험기간 확보에 필요조건을 갖춘 동물모델이 될 것이다. 다만 본 연구에서 제시된 동물 모델이 구강암의 골전이 병소에 대한 생체내 발생기전에 대한 연구와 임상전단계 치료약물 시험, 그리고 화학적 암예방(chemoprevention)이나 유전자 치료 연구를 위해 필수적이지만 인체와 실험동물과는 대사기전(metabolic pathways)과 병태생리, 그리고 종양생물학적 관련인자와 싸이토카인 네트워크가 다르다는 점이 고려되어야 한다. 또한 추후 연구를 통하여 복잡한 구강암 골전이 과정에서 치료 타겟이 될 수 있는 주요 유전자 가 제시되어야 할 것이다.

References

- Henson B, Li F, Coatney DD, Carey TE, Mitra RS, Kirkwood KL, D'Silva NJ. An orthotopic floor-of-mouth model for locoregional growth and spread of human squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2007;36:363-70.
- Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1977; 40(1):145-151.
- Calhoun KH, Fulmer P, Weiss R et al : Distant metastasis from head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 104 : 1199, 1994.
- Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T et al : Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control. *J Oral Maxillofac Surg* 54 : 853, 1996.
- Perlito A, Shaha AR, Rinaldo A et al : Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63(4) : 202, 2001.
- Tornwall J, Snaill J, Mesimaki K : A rare case of spinal cord metastases from oral SCC. *Br J Oral Macillofac Surg* 46 : 594, 2008.
- Zender CA, Petruzzelli GJ : Why do patients with head and neck squamous cell carcinoma experience distant metastases: can they be prevented? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13(2) : 101, 2005.
- Park YW, Lee JW, Kim SH : Expressions of metastasis-related factors in orthotopic tumor models of oral squamous cell carcinoma. *J Kor Acad Maxillofac Plast Reconstr Surg* 30 : 529, 2008.
- Park YW, Younes MN, Jasser SA et al : AEE788, a dual tyrosine kinase receptor inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 11 : 1963, 2005.
- Park YW, Kim SH : Targeting receptor tyrosine kinase on endothelial cells in an orthotopic tumor model of oral squamous cell carcinoma. *J Kor Acad Maxillofac Plast Reconstr Surg* 35 : 55, 2009.
- Blouin S, Basle MF, Chappard D : Rat models of bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 22 : 605, 2005.
- Liepe K, Geidel H, Haase M et al : New model for the induction of osteoblastic bone metastases in rat. *Anticancer Res* 25 : 1067, 2005.
- Rabbani SA, Gladu J, Harakidas P et al : Over-production of parathyroid hormone-related peptide results in increased osteolytic skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Int J Cancer* 80 : 257, 1999.
- Neudert M, Fischer C, Krempien B et al : Site-specific human breast cancer (MDA-MB-231) metastases in nude rats: model characterization and in vivo effects of ibandronate on tumour growth. *Int J Cancer* 107 : 468, 2003.
- Howard RB, Mullen JB, Pagura ME et al : Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat. *Clin Exp Metastasis* 17 : 157, 1999.
- Paget S : The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1 : 571, 1889.
- Loberg RD, Gayed BA, Olson KB et al : A paradigm for the treatment of prostate cancer bone metastases based on an understanding of tumor cell-microenvironment interactions. *J Cell Biochem* 96 : 439, 2005.
- Yoneda T : Cellular and molecular basis of preferential metastasis of breast cancer to bone. *J Orthop Sci* 5 : 75, 2000.
- Tang Q, Zhang J, Qi B et al : Downregulation of HLA class I molecules in primary oral squamous cell carcinomas and cell lines. *Arch Med Res* 40 : 256, 2009.
- Guice TA, Chirgwin JM : Transforming growth factor- β in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin Orthop Relat Res* 415 : S32, 2003.
- Corey E, Quinn JE, Bladou F et al : Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: intratibial injection of human prostate cancer cells. *Prostate* 52 : 20, 2002.
- Morrissey C, Vessella RL : The role of tumor microenvi-

- ronment in prostate cancer bone metastasis. *J Cell Biochem* 101 : 873, 2007.
23. Guise TA : Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Am Cancer Soc* 88(12) : 2892, 2000.
24. Deyama Y, Tei K, Yoshimura Y et al : Oral squamous cell carcinomas stimulate osteoclast differentiation. *Oncol Rep* 20(3) : 663, 2008.
25. Muller A, Homey B, Soto H et al : Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410 : 50, 2001.
26. Delilbası CB, Okura M, Iida S et al : Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 40 : 154, 2004.
27. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P et al : Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 97 : 1840, 2005.
28. Lee JI, Jin BH, Kim MA et al : Prognostic significance of CXCR4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 107 : 5, 2009.

저자 연락처

우편번호 210-702

강원도 강릉시 강릉대학로 120번지

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

박영욱

원고 접수일 2009년 12월 30일

개재 확정일 2010년 03월 22일

Reprint Requests**Young-Wook Park**

Department OMFS, College of Dentistry, Gangneung-Wonju

National University

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

South Korea

Tel: 82-33-640-3102 Fax: 82-33-640-3103

E-mail: ywpark@gwnu.ac.kr

Paper received 30 December 2009

Paper accepted 22 March 2010