

생쥐 신세포암 동소 이식 모델에서 선택적 표피 성장 인자 수용체 Tyrosine Kinase Inhibitor (ZD1839)의 항혈관신생 효과

Anti-angiogenic Effect of Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor (ZD1839) against Murine Renal Cell Carcinoma Orthotopic Model

Hea Young Oh, Soo Mee Kwon, Sun Il Kim, Sung Joon Hong

From the Department of Urology, Urological Science Institute and Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: ZD1839 (Iressa™) is a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) known to block the cell signaling pathway. However, the effect of ZD1839 in relation to renal cell carcinoma, which is highly angiogenic, has not been reported. Using an orthotopic model of murine renal cell carcinoma (Renca), we evaluated the inhibitory effect of ZD1839 on tumor growth and angiogenesis.

Materials and Methods: Renca cells (1×10^4 cells/10 μ l) were first adsorbed in Gelfoam and were implanted into the balb/cj mouse kidney followed by obturation with the agarose bar. Then, tumor formation was assessed every week for 4 weeks. IC₅₀ was obtained for ZD1839 and genistein *in vitro*. 7 days after the implantation, the mice were divided into three groups, and normal saline, ZD1839 (40mg/kg/day), and genistein (80mg/kg/day) were subcutaneously injected for 14 days. 21 days after the implantation, the mice were sacrificed, and tumor volume measurement and analysis of microvessel density (MVD) were performed using the factor VIII-related antigen and vascular endothelial growth factor (VEGF).

Results: Renca tumors, which formed in the renal parenchyme and had a circular shape, reached the peak growth velocity between 14 and 21 days. MVD was the highest at 14 days of implantation. IC₅₀ for ZD1839 and genistein were 4.68 μ M and 5.43 μ M, respectively. Tumor growth after the treatment with ZD1839 and genistein was inhibited by 86% ($p < 0.01$) and 49% ($p < 0.05$), respectively, compared to the control. MVD of ZD1839 and genistein-treated groups were 50% ($p < 0.01$) and 29% ($p < 0.05$) lower, respectively, and VEGF levels were 24% ($p < 0.05$) and 27% ($p < 0.05$) lower, respectively, compared to the control.

Conclusions: This orthotopic implantation method of the Renca cell is an effective model for demonstrating the effect of an angiogenesis inhibitor. Our results suggest that the anti-angiogenesis effect of ZD1839 in the Renca orthotopic implantation model partially contributes to the tumor growth inhibition, and that ZD1839 may be more effective than genistein in the tumor growth regulation through the inhibition of angiogenesis. (Korean J Urol 2004;45:255-262)

Key Words: Renal cell carcinoma, Pathologic neovascularization, ZD1839, Genistein

대한비뇨기과학회지
제 45 권 제 3 호 2004

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실
비뇨의과학연구소 BK21 의과학사업단

오혜영 · 권수미 · 김선일 · 홍성준

접수일자 : 2003년 8월 12일
채택일자 : 2003년 10월 2일

교신저자: 홍성준
연세대학교 의과대학
비뇨기과학교실
서울 서대문구 신촌동 134번지
☎ 120-749
TEL: 02-361-5806
FAX: 02-312-2538
E-mail: sjhong346@yumc.
yonsei.ac.kr

본 연구는 2002년도 보건복지부 보건
과학기술연구개발사업 연구비 (과제번호:
01-PJ1-PG1-01CH04-0005) 지원에
의하여 작성되었음.

서 론

신세포암은 전체 악성 종양의 2-3%, 신종물의 85%를 차지하며 환자의 20-30%가 초기 진단 시 이미 전이 소견을 보인다.¹ 또한 전이 시 기존의 어떠한 치료에도 저항을 보이므로 새로운 치료법의 개발이 절실하다. 진행성 신세포암에서는 혈관신생과 혈관신생물질들이 증가하며² 특히 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 mRNA 발현양이 증가한다.³ 따라서 혈관신생의 억제는 신세포암의 성장과 전이를 차단할 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있다. 기존에 알려진 tyrosine kinase inhibitor의 일종인 genistein은 신세포암 세포의 VEGF mRNA와 basic fibroblast growth factor (bFGF) mRNA 발현을 억제한다는 보고가 있으며⁴ 대표적인 혈관신생 억제 물질인 TNP-470은 murine renal cell carcinoma (Renca)와 인체 신세포암 세포 이식 모델의 종양 성장과 전이 억제를 보여주고 있다.^{5,6} ZD1839 (Iressa)는 specific epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)로 EGFR kinase 효소의 인산화 반응을 억제하여 EGFR, ras, raf, mitogen-activated protein kinase (MAPK)로 이어지는 신호 전달 회로를 차단하여 세포증식 억제, 세포주기 차단, 세포고사를 유도한다.⁷ EGFR의 활성화 차단은 VEGF, transforming growth factor- α (TGF- α), bFGF, Interleukin-8 (IL-8)의 생산 감소를 유도하여 혈관신생이 감소되는데,⁸⁻¹⁰ 최근 ZD1839는 선택적으로 EGFR의 이러한 기전이 있는 것으로 밝혀졌다.^{8,11,12} 현재 ZD1839는 비소세포폐암, 방광암, 전립선암, 유방암, 대장암 세포의 증식을 억제하고 전립선암, 유방암, 대장암 모델에서 종양 성장을 저해한다는 보고가 있으나,⁷ 아직까지 신세포암에 대한 종양성장 억제 효과는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 신장암 세포에서 혈관신생물질을 억제하는 것으로 알려진 genistein을⁴ 비교 약물로 이용하여 Gelfoam을 이용한 Renca 동소 이식 모델에서 ZD1839가 종양 성장 및 혈관신생에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

Renca 세포주는 한국 세포주 은행 (Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세포는 10% 우태아혈청과 penicillin-streptomycin이 포함된 eagle's minimum essential medium에 37°C, 95% air, 5% carbon dioxide 조건에서 배양하여 90%까지 자란 세포를 얻어 다음 실험에 이용하였다.

2. Renca 동소 이식모델 개발

기존의 이식 방법과는 달리 Gelfoam과 아가로오즈를 이용하여 아래와 같은 방법을 고안하였다. 방법은 1.5x1.5x3mm, 3.5% 아가로오즈 (BMA, Maine, USA)와 1.5x1.5x2mm, Gelfoam을 소독 상태에서 만든 후 Gelfoam에 흡수시킬 Renca 세포를 비혈청배지로 0.1x10⁴cells/ μ l가 되도록 희석하였다. 희석된 세포액 10 μ l를 준비된 Gelfoam에 흡수시켜 마리당 1x10⁴개의 세포가 삽입되도록 하였다. 주사기는 지름 1.5mm의 내경 (14 gauge)과 밀대가 장착된 형태로 실험 전에 살균 및 가스 소독을 하였다. 주사기 안쪽에서부터 아가로오즈, 세포주가 흡수된 Gelfoam 순서로 넣고 삽입 전까지 얼음 위에 보관하였다. 실험동물은 8주령 balb/c 암컷 마우스 (Jackson Laboratory, USA)를 이용하였고 140mg/kg 케타민 (Yuhan, Seoul, Korea)과 1.3mg/kg 자일라진 (Bayer Korea, Seoul, Korea)을 혼합 근육 마취하였다.⁸ 좌측 요부를 절개하여 노출된 좌측 신장의 피질 하단에 주사기를 삽입하여 Gelfoam을 밀어 넣고, 이어 아가로오즈로 봉쇄한 후 봉합사 (Ethicon, Edinburgh, UK)로 절개 부위를 봉합하였다. 이식 7, 14, 21, 25일 후에 7, 11, 7, 5마리씩 희생시켜 좌·우측 신장을 절제하여 포르말린액과 액체질소에 각각 보관하였다.

3. Renca 세포의 IC₅₀ 측정

96 well plate에 100 μ l Renca 세포액 (1x10⁴cell/ml)을 분주하여 24시간 동안 37°C, 95% air, 5% CO₂ 조건에서 배양 후, 여러 농도의 ZD1839 (AstraZeneca, Cheshire, UK)와 genistein (Sigma, Steinheim, Germany)을 100 μ l씩 투여하였다. 5일 동안 배양 후, 20 μ l CellTiter 96[®] AQueous One solution reagent (Promega, USA)를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Tetrazolium compound가 발색물질인 formazan으로 전환되면 흡광도 측정기 (Molecular Devices Spectra Max 340, GMI, USA)에 연결된 SOFTmax Pro 4.0을 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀은 다음과 같은 공식을 이용, 세포 생존곡선에서 50% 억제농도로 지정하였다. %Inhibition = {(Mean absorbance of wells containing drugs - Mean absorbance of background) / (Mean absorbance of wells containing only medium - Mean absorbance of background)} x 100

4. 생체내 약물 억제 실험

Balb/cj 마우스를 위와 동일한 방법으로 이식 수술 후, 대조군 (3마리), ZD1839 투여군 (5마리), genistein 투여군 (5마리)으로 분류하였다. ZD1839와 genistein은 dimethyl sulphoxide (Sigma, Irvine, UK)에 용해하여 최종농도의 10%가 초

과되지 않게 0.9% NaCl로 희석하였다. 수술 7일 후부터 ZD1839 (40mg/kg/day),¹³ genistein (80mg/kg/day)¹⁴을 매일 한 차례, 1주일에 5번, 14일 동안 각각 0.1ml, 0.2ml씩 피하로 투여하였고 대조군에게는 0.2ml normal saline을 투여하였다. 마우스는 약물 치료 후, 좌·우측 신장을 적출하여 사진 촬영 후, 횡단 절개하여 포르말린액과 액체질소에 보관하였다. 종양의 부피는 다음과 같이 계산되었고, 포르말린액에 담긴 조직은 파라핀 블록 제작 후, hematoxyline & eosine (H&E) 염색하였다.

$$\text{Tumor Volume (mm}^3\text{)} = \{\text{Length (mm)} \times \text{Width (mm)}^2\} / 2$$

5. Microvessel density (MVD) 측정

조직 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀하고 에탄올로 재수화하였다. 면역조직화학염색은 immunohistochemistry detection kit (InnogenexTM, USA)를 사용하였다. 37°C에서 5분 동안 펄신으로 처리하고, PBS와 흐르는 물에 씻어낸 후, 실온에서 5분 동안 3% 과산화수소로 처리하였다. 다시 세척하고 실온에서 5분 동안 카제인으로 처리한 후, 4°C에서 24시간 동안 1:100으로 희석된 1st Ab (polyclonal-rabbit, anti-Factor VIII-related antigen antibody, InnogenexTM)로 처리하였다. PBS-0.1% Tween 20로 씻고 37°C에서 5분 동안 biotinylated goat-anti rabbit antibody로 처리하였다. 세척하고 37°C에서 5분 동안 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate로

처리하였다. PBS-0.1% Tween 20로 씻어내고 AEC substrate 용액을 15분 동안 처리하였다. Hematoxylin 대조 염색 후, 마운트 (Lab Vision, USA)로 고정하였다. 한 슬라이드에서 (x200) 붉은 혈점이 관찰된 5지역에서 microvessels의 %threshold area (%Th area)를 MVD로 측정하였다. %Th area는 각 지역의 일정 크기 면적에 대한 microvessels의 면적 비율로 Meta Morpho (Universal Imaging, USA) 프로그램의 integrated morphometry analysis 방법을 이용하여 측정하였다. 5지역의 %Th area의 평균을 구하고, 이러한 과정을 3번 반복하여 세 값에 대한 평균을 구하였다.

6. Vascular endothelial growth factor 측정

1/2 신장 조직에 500µl RIPA lysis buffer; 50mM HEPES (USB, USA) [pH7.6], 150mM NaCl (Sigma, St. Louis, USA), 1% NP-40 (Amresco, USA), 10µl/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (Amresco, USA), 10µl/ml aprotinin (Sigma, St. Louis, USA)를 넣고 균질화시켰다. -20°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 초음파 처리하였다 (Ultrasonicator, Misonix, USA). 원심 분리 후, 상층액은 BCA protein assay kit (Bio Rad, USA)로 단백질량을 측정하였다. 신장 조직의 VEGF 단백질 농도를 측정하기 위해서 ELISA kit (Quantikine[®] Murine, Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여, 상업적으로 제공되는 실험 방법대로 전처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하

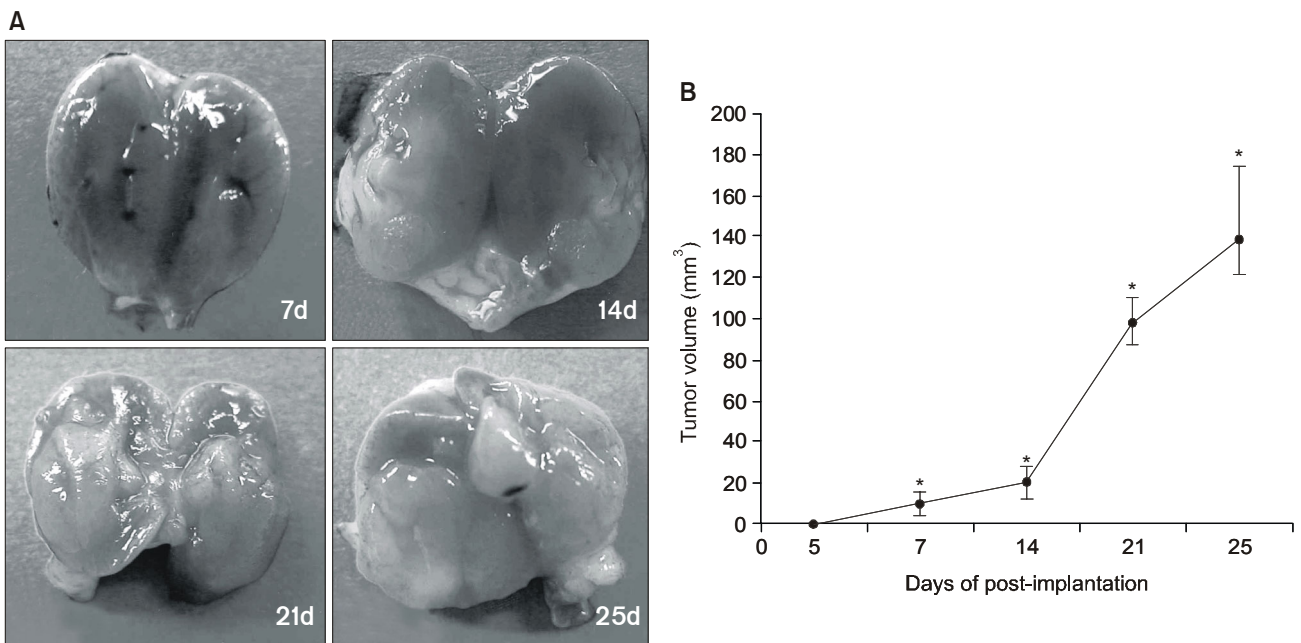


Fig. 1. A: Photographs of sliced mouse kidney tissues at each time points. 7, 14, 21 and 25 days of post-implantation of murine renal carcinoma (Renca) cell. B: Plot of mean tumor volume at 7, 14, 21 and 25 days of post-implantation. Value is mean±SD. *: Significantly different compared with value of previous day at p<0.01.

였다 (Molecular Devices Spectra Max 340, GMI, USA).

7. 통계분석

실험 결과는 평균과 표준 편차로 나타냈고, 대조군과 약물 투여군 간의 비교는 SPSS 프로그램의 Student's t-test 방법을 이용하였고 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

1. Renca 세포 동소 이식 모델의 특징

Renca 세포가 이식된 총 30마리 중 28마리에게서 좌측 신장에 육안으로 신세포암의 생성이 확인되어 약 93%의 종양 유도 성공률을 보였다. 종양은 피질 하단에 생성되었고 종양과 정상 세포 사이의 경계선이 뚜렷한 구형 혹은 타원형이었다 (Fig. 1A). 이식 5일 후에는 Gelfoam 주변 조직이 투명하게 변화되기 시작하며 7일 후의 종양 부피는 평균 10.1mm^3 이었고, 14일 후에는 평균 20.7mm^3 이었다. 14일 이후에는 종양의 성장이 가속화되어 21일 후의 종양 부피는 97.6mm^3 이었다 (Fig. 1B). 이 시기에 현미경적으로는 암 세포가 신정맥이나 신 주변조직으로 침투하는 소견을 보였으나 육안적 또는 현미경적으로는 타 장기로의 전이는 없었다. H&E 염색 결과, 7일과 14일 후에는 세포가 크고 불규칙적이며 염색체가 진하게 염색되었고 21일 후에는 세포가 매우 크고 다형태성을 보이고 극도로 불규칙한 경계선을 보였다. Factor VIII 관련 항원에 대한 면역 염색 결과, 붉은 혈점은 종양 주변 내피세포를 따라 분포하고 있었다 (Fig. 2). 21일 후부터는 종양의 부피가 매우 커지고 괴사성 무혈관성 지역이 증가하여 붉은 혈점 지역이 줄어들었다. MVD 측정 결과, 7일 후에는 $3.9 \pm 0.5\%$ Th area이고 14일 후에는 $6.5 \pm 1.5\%$ Th area로 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 이식 후 시간이 지날수록 혈관밀도가 증가하고 이식 21일째에는 $4.6 \pm 1.4\%$ Th area로 유의적이지 않지만 오히려 감소하는 경향을 보였다.

2. ZD1839에 의한 Renca 성장억제효과 판정

1) Renca 세포증식억제 효과: ZD1839는 Renca 세포에 대하여 $1\text{-}50\mu\text{M}$ 범위에서 농도 비례적으로 Renca 세포 증식을 억제하였고, IC_{50} 은 $4.68\mu\text{M}$ 이었다. Genistein은 $5\text{-}100\mu\text{M}$ 범위에서 농도 비례적으로 Renca 세포 증식을 억제하였고 IC_{50} 은 $5.43\mu\text{M}$ 이었다 (Fig. 3).

2) Renca 세포 동소 이식 모델의 종양성장억제 효과: 실험 동물들은 약물 투여 기간 동안 ZD1839와 genistein에 대한 특별한 거부감을 보이지 않았고 대조군과 투여군 사이의 몸무게 변화 차이는 유의적이지 않았다. ZD1839 투여군의

평균 종양 부피는 대조군에 대비하여 86% 감소한 9.1mm^3 이었고 ($p < 0.01$) (Fig. 4), ZD1839 투여군 5마리 중 2마리의 종양 부피는 각각 2.3mm^3 , 2.6mm^3 로 매우 작은 것으로 관찰되었다. ZD1839 투여군 5마리 모두에서 Renca 세포가 이식되지 않은 우측 신장과 비교하여 이식된 좌측 신장 크기가 전체적으로 감소하는 양상을 보였다. Genistein 투여군의 평균 종양 부피는 대조군에 대비하여 49.2% 감소한 33.2mm^3 이었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

3) 조직학적 관찰 및 factor VIII 관련 항원 염색을 이용한 microvessel density 측정: 조직학적 관찰 결과, 대조군에서는 암세포들이 밀집된 커다란 종양 덩어리를 형성하고 있었다. ZD1839 투여군 중 뚜렷한 치료 효과를 보인 마우스의 종양은 덩어리가 아닌 작은 군집을 이루고 있고 전체적으로 암 덩어리가 신장 내 차지하는 비율이 뚜렷이 줄어들었다. MVD 측정 결과, 대조군은 $3.1 \pm 2.0\%$ Th area이고 ZD1839 투여군은 $1.5 \pm 0.9\%$ Th area로 매우 유의적으로 낮았고 ($p < 0.01$), genistein 투여군은 $2.2 \pm 1.0\%$ Th area였다 ($p < 0.05$) (Fig. 5A).

4) Vascular endothelial growth factor 농도 측정: 정상 마우스 신장 조직의 평균 VEGF의 수준은 96.2pg/ml 이고 대조군은 166.8pg/ml 로 정상 조직의 1.7배로 정도로 높았다 ($p < 0.05$). ZD1839 투여군의 평균 VEGF 수준은 126.6pg/ml 이고 대조군의 0.76배 정도로 낮았다 ($p < 0.05$). Genistein 투여군의 평균 VEGF 수준은 121.4pg/ml 이고 대조군의 0.73배 정도로 낮았으나 유의수준은 ZD1839 투여군에 비하여 낮았다 ($p < 0.05$) (Fig. 5B).

고 찰

이소 이식 모델은 종양 기원 환경의 변화가 혈관신생, 세포분화, 유전자전사특성 등의 세포 생리학적 특성을 변화시킬 수 있어 혈관신생물질들에 대한 연구에 부적합하다.^{15,16} 기존의 이식 방법과 달리 Gelfoam을 이용한 본 연구 모델은 Renca 세포가 신장에 직접 이식되기 때문에 종양 기원 환경이 가장 유사하다고 할 수 있다. 신장 피막하 동소 이식 모델은^{17,18} 세포가 피막 밑에 이식되고 고도의 기술을 요하며 암세포가 유출되기 쉽다.¹⁹ 그러나 본 모델은 수술이 간단하고 세포 유출 가능성이 희박하기 때문에 다른 모델들보다 재생력이 있고 사용이 용이하다고 판단된다. 또한 종양의 부피 성장과 동시에 짧은 기간에 일정 시기까지 신생혈관밀도가 증가하는 양상을 보여 혈관신생 연구에 적합할 것으로 판단된다.

고형성 종양은 일정 크기 이상이 되면 산소와 영양분을 확산 공급 받을 수 없기 때문에 국소 저산소증이 발생하고

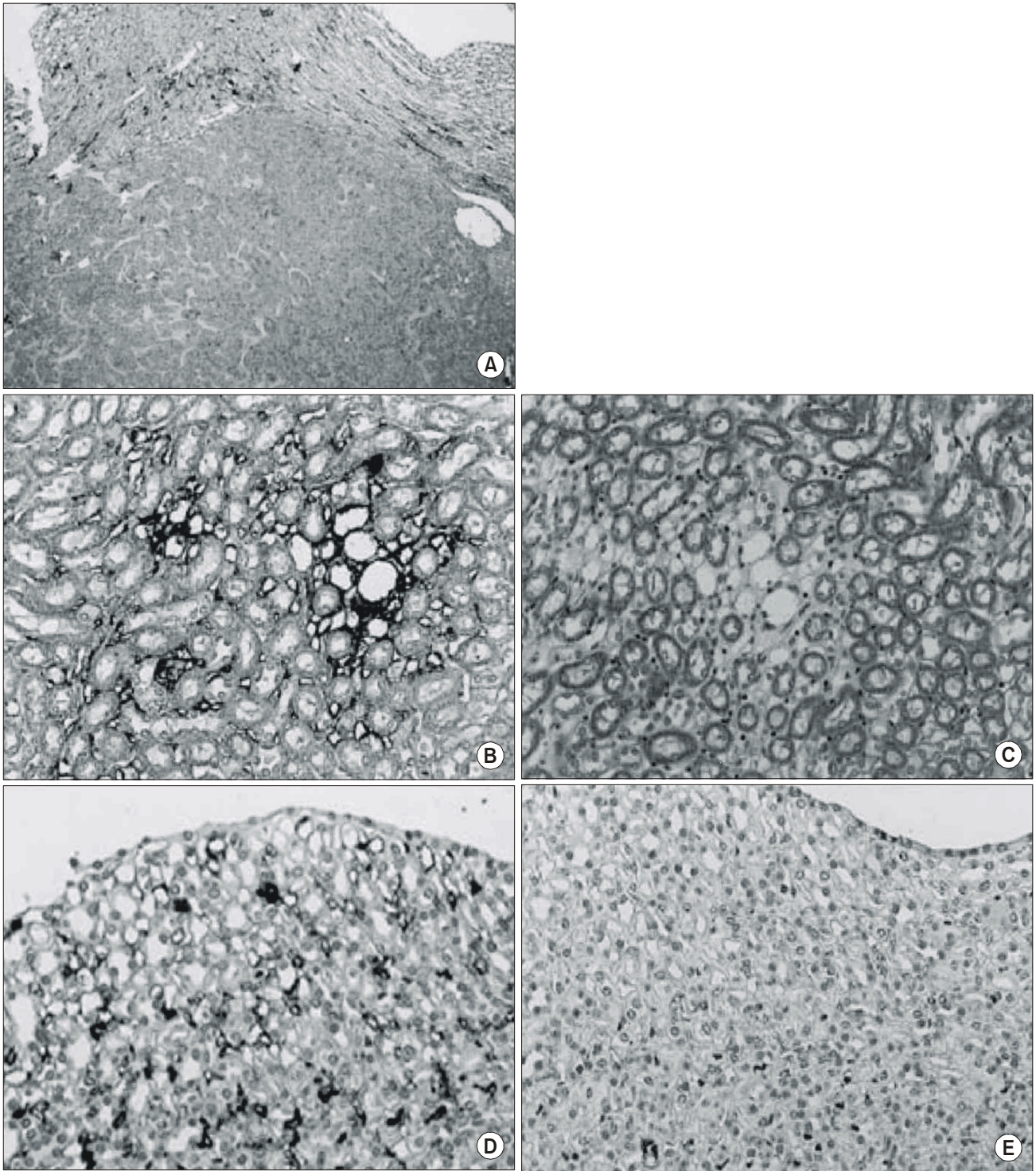


Fig. 2. Factor VIII-related antigen immunostain in implanted left kidney with high microvessel density. A: Microvessels are found around tumor (x40), B and D: Hot spots are located in epithelial cells (x200), C and E: Negative control (x200).

생존 조건 필요에 의해 혈관신생을 유도하게 된다. 종양의 새로운 혈관 생성은 암세포 자체에서 또는 세포의 기질에서 분비된 혈관신생물질들의 내피 세포 촉진에 의해 증식

(proliferation), 이동 (migration), 형태형성 (morphogenesis)을 통해 형성되며, 혈관신생은 전이와도 밀접한 관련이 있다.²⁰ TGF- α 와 같은 EGF계 유전자는 신장, 전립선, 폐, 유방, 대

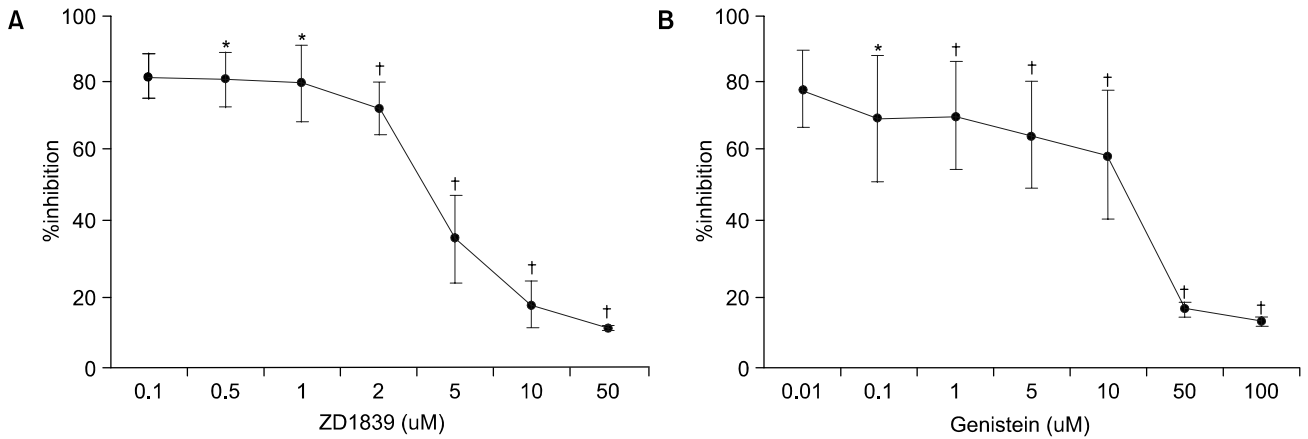


Fig. 3. Growth inhibition by ZD1839 (A) and genistein (B) with various concentrates in murine renal cell carcinoma (Renca) cells. %Inhibition is percentage dividing mean absorbance of wells containing drugs by mean absorbance of wells containing only medium. Each point is mean of two experiments performed in eleven replicates. *: Significantly different compared with %inhibition of control at $p < 0.05$. †: Significantly different compared with % inhibition of control at $p < 0.01$.

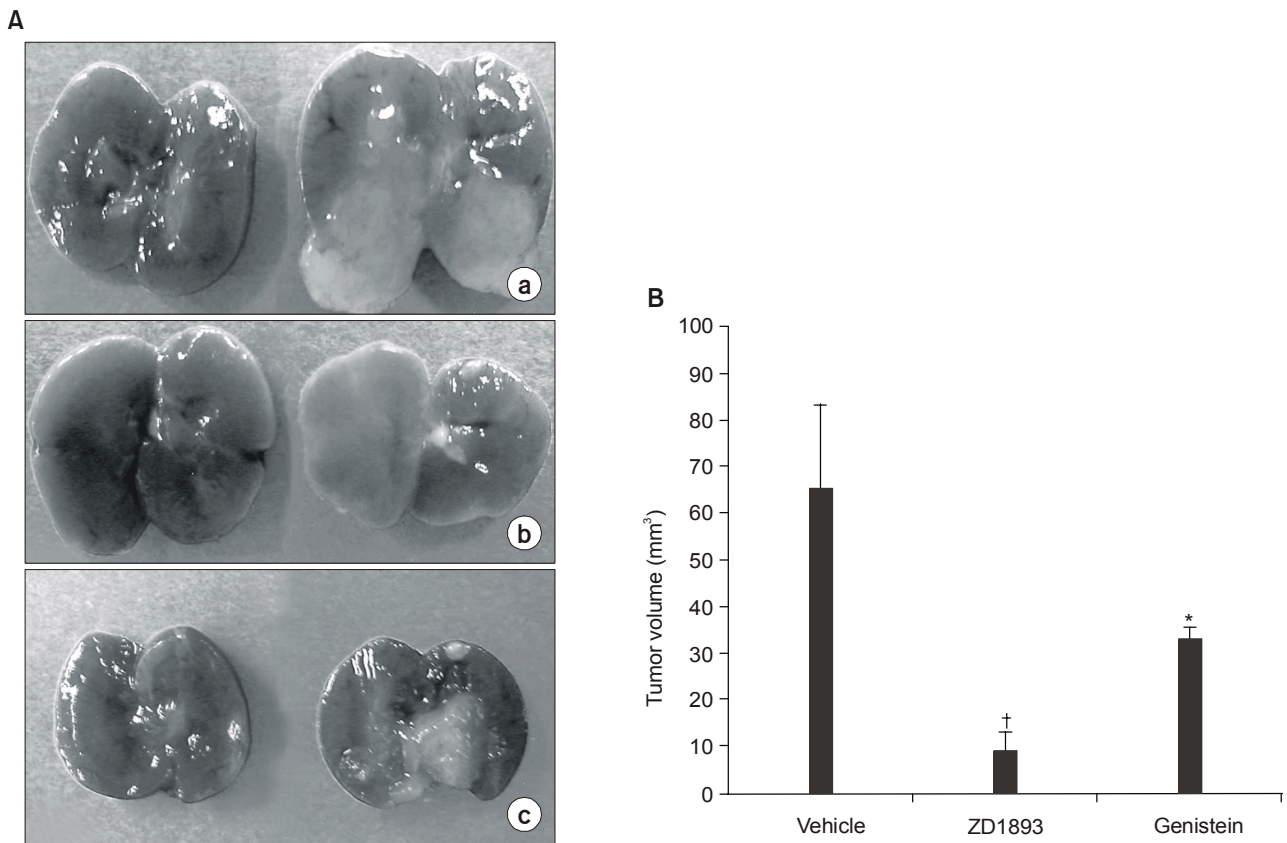


Fig. 4. Effect of ZD1839 and genistein on tumor in murine renal cell carcinoma (Renca). A: Macroscopic dissections of non-implanted right and implanted left kidneys of balb/cj mice treated by normal saline (a), ZD1839 (b) and genistein (c) for 14 days. B: Tumor volume of ZD1839 and genistein in murine renal cell carcinoma (Renca) orthotopic model. ZD1839 and genistein are administrated from 7 days post-implantation of Renca cells and continued for 2 weeks at subcutaneous dosage of 40mg/kg/day and 80mg/ kg/day, respectively. Mice are sacrificed at 21 days post-implantation and tumor volumes are measured. Value is mean and SD. Ps are calculated by comparing means of the each drug treated group and the vehicle treated group using the Student's t-test. *: Significantly different by $p < 0.05$. †: Significantly different by $p < 0.01$

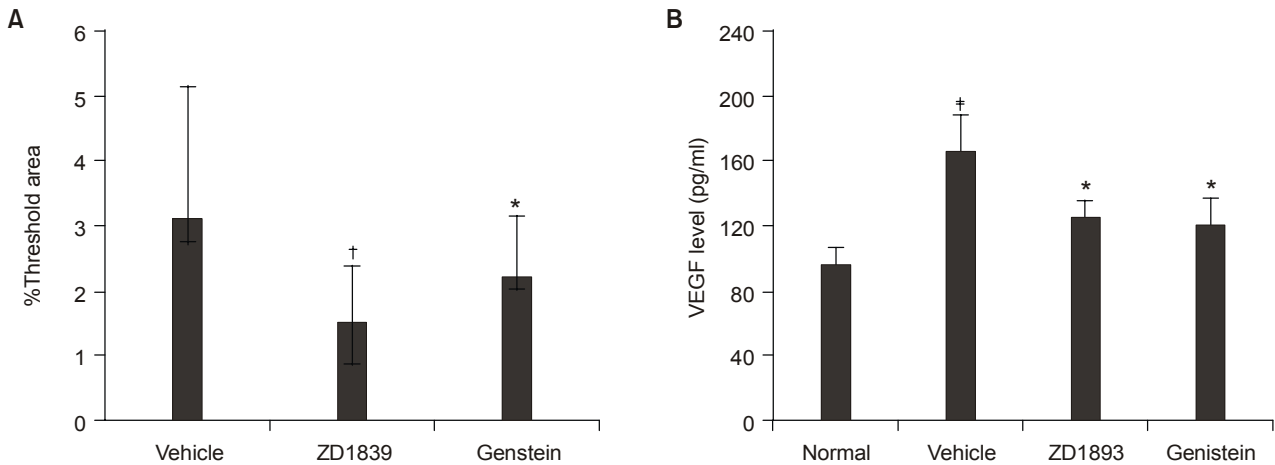


Fig. 5. Microvessel density (A) and vascular endothelial growth factor (B) level in implanted left kidney of mice treated by vehicle, ZD1839 and genistein. %Threshold area is (microvessel area/background area)x100 in one image of factor VIII-related antigen immunostain. Value is mean and SD. Ps are calculated by comparing mean of drug-treated group and vehicle-treated group using the Student's t-test. *: Significantly different compared with vehicle at $p < 0.05$. †: Significantly different compared with vehicle at $p < 0.01$. ‡: Significantly different compared with normal at $p < 0.05$. p-Values of ZD1839 and genistein in B are 0.03 and 0.05, respectively.

장 등의 상피 세포 유형들의 분열을 유도하여 세포 증식과 종양 성장을 유도하는 물질이다. EGFR 대상의 단일 항체 C225와²¹ 저분자 tyrosine kinase inhibitors를^{8,22} 이용한 연구들에 따르면 EGFR 신호 전달 봉쇄는 암세포 증식뿐만 아니라 VEGF, TGF- α , bFGF, IL8과 같은 혈관신생물질의 생산 억제도 유도하는 것으로 보여지고 있다. 실제로 악성 신세포암에서 EGFR m-RNA 수준은 정상보다 2-3배 높으며²³ VEGF의 m-RNA 발현도 동시에 증가하는 것으로 보고되고 있다. 또한 고혈관성 신세포암 일수록 종양 성장이 가속화되고 전이 발생률도 증가되는 것으로 나타난다.³ 최근에 개발된 선택적 EGFR tyrosine kinase 억제 물질인 ZD1839는 인체 폐암, 전립선암, 대장암, 신장암 세포의 증식 억제 효과를 보이고 다른 항암제와 병용 투여한 in vivo 연구에서 유효한 종양 성장 억제 효과가 확인된 항암제이다.⁷

Renca 세포 동소 이식 모델을 이용한 본 연구에서 ZD1839는 유도된 신종양의 부피를 86%까지 억제하였고 동시에 VEGF 생산이 유의적으로 감소되는 양상을 보여주었다. 인체 대장암 세포 이소 이식 모델에서도 EGFR 단일 항체 C225 투여가 EGF, TGF- α , Amphiregulin과 혈관신생물질인 VEGF, bFGF의 생산을 억제하는 것으로 관찰되었고 더불어 MVC (microvessel counts) 평가에 의해서 혈관신생 감소가 동반된다는 사실을 입증하였다.^{8,21} 본 연구에서도 ZD1839의 투여로 Renca 종양의 부피와 VEGF 농도가 감소된 동물에서 MVD가 유의적으로 저하되는 결과를 확인하였다. 편평세포암 (squamous cell carcinomas; SCCs) 이소 이식 모델에서도 ZD1839는 종양 성장 억제와 VEGF, bFGF, TGF- α 의

생산이 동시에 감소되어 본 연구와 유사한 결과를 보였다.¹² 따라서 ZD1839는 Renca에 대한 종양 성장 억제 효과가 있으며 이러한 효과는 부분적으로 혈관신생억제 기능이 관여하기 때문일 것으로 판단된다. 본 연구에서는 TKI의 일종인 genistein을 동일한 조건에서 ZD1839에 대한 비교 약물로 이용하였다. Genistein은 인체 신세포암 세포에 대한 혈관신생억제 효과가 보고된 물질로⁴ 본 Renca 모델에서 종양 성장과 혈관신생을 억제하는 것으로 관찰되었으나 육안 관찰과 통계 수치를 비교해 볼 때, Renca 종양 성장 조절에는 ZD1839가 더 효과적일 것으로 평가된다.

지금까지 조사된 ZD1839의 IC₅₀은 0.05-30 μ M,^{7,14}이며 본 연구에서 보여준 Renca 세포에 대한 IC₅₀은 4.68 μ M로 세포 증식 억제 실험 결과가 생체내 실험의 종양 억제 효과에 미치지 못하였다. 본 연구에서 비교 약물로 이용한 genistein의 Renca 세포에 대한 IC₅₀이 ZD1839와 유사한 결과를 보여 주었지만 생체 내 실험에서는 ZD1839의 종양 성장 조절 기능이 더 효과적인 것으로 관찰되어 실험상의 모순이 발견되었다. 암 세포에 대한 IC₅₀은 종양 성장 억제와 밀접한 관련이 있기 때문에 Renca 세포에 대한 ZD1839의 증식 억제 보완 실험이 필요할 것으로 생각된다.

인체 대장암 모델을 이용한 동물 실험에서 항혈관신생 효과가 있는 paclitaxel과 ZD1839를 병용 투여 시 완벽한 종양 억제 및 혈관신생물질 생산 감소 효과를 보인 바 있으며⁸ threonine/serine protein kinase A (PKA) inhibitor와 병용 투여는 두 가지 종류의 kinase receptors 차단하기 때문에 항종양 효과가 더 높은 것으로 조사되었다.²¹

본 연구는 신장암 환자의 임상 치료 발전에 기여할 과학적인 기본 자료가 될 것이라고 생각되며 앞으로는 ZD1839를 paclitaxel과 같은 기본 항암제들 및 COX-2 inhibitor, PKA inhibitor 등과 병용 투여 시 신장암 치료에 미치는 효과를 살펴보는 것이 필요하리라 생각된다.

결 론

본 연구의 Renca 세포 동소 이식 모델은 재생력이 높고 사용이 용이하며 종양의 급격한 혈관밀도 증가를 보여 혈관신생 연구에 적합할 것으로 판단된다. Renca 동소 이식 모델에서 ZD1839에 의한 MVD와 VEGF 수준 감소가 부분적으로 종양 성장 억제에 기여하고 있는 것으로 생각된다. 또한 Renca 동소 이식 모델에서 ZD1839가 genistein 비해 혈관신생 억제를 통한 종양 성장 조절 기능에 더 효과적인 것으로 관찰되었다.

REFERENCES

- Vogelzang NJ, Stadler WM. Kidney cancer. *Lancet* 1998;352:1691-6
- Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997;158:1663-74
- Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4233-7
- Sasamura H, Takahashi A, Miyao N, Yanase M, Masumori N, Kitamura H, et al. Inhibitory effect on expression of angiogenic factors by antiangiogenic agents in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:768-73
- Morita T, Shinohara N, Tokue A. Antitumor effect of a synthetic analogue of fumagillin on murine renal carcinoma. *Br J Urol* 1994;74:416-21
- Fujioka T, Hasegawa M, Ogiu K, Matsushita Y, Sato M, Kubo T. Antitumor effects of angiogenesis inhibitor 0-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470) against murine renal cell carcinoma. *J Urol* 1996;155:1775-8
- Ranson M. ZD1839 (Iressa): for more than just non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2002;7 Suppl 4:16-24
- Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2001;7:1459-65
- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo; angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-30
- Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:257-65
- Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 2002;62:2554-60
- Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 2002;62:4300-6
- Naruse I, Ohmori T, Ao Y, Fukumoto H, Kuroki T, Mori M, et al. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa® (ZD 1839) in an EGFR-expression multidrug-resistant cell in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2002;98:310-5
- Wietrzyk J, Boratynski J, Gryniewicz G, Ryczynski A, Radzikowski C, Opolski A. Antiangiogenic and antitumor effects in vivo of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide. *Anticancer Res* 2001;21:3893-6
- Fabra A, Nakajima M, Bucana CD, Fidler IJ. Modulation of the invasive phenotype of human colon carcinoma cells by organ specific fibroblasts of nude mice. *Differentiation* 1992;52:101-10
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6
- Killion IJ, Fidler IJ. The biology of tumor metastasis. *Semin Oncol* 1989;16:106-15
- Fidler IJ. The biology of renal cell cancer metastasis. *Semin Urol* 1992;10:3-11
- Fidler IJ. Critical determinants of melanoma metastasis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;1:203-8
- Hanaban D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64
- Ciardello F, Damiano V, Bianco R, Bianco C, Fontanini G, De Laurentis M, et al. Antitumor activity of combined blockade of epidermal growth factor receptor and protein kinase A. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1770-6
- Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2926-35
- Stumm G, Eberwein S, Rostock-Wolf S, Stein H, Pomer S, Schlegel J, et al. Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis. *Int J Cancer* 1996;69:17-22