

상피세포 성장인자 수용체의 Tyrosine
인산화 억제제에 의한 구강 편평세포
암종의 증식 및 침윤 억제 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

황 진 하

상피세포 성장인자 수용체의 Tyrosine
인산화 억제제에 의한 구강 편평세포
암종의 증식 및 침윤 억제 효과

지도교수 김 진

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 7월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

황 진 하

황진하의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 7월 일

감사의 글

무엇이 되려고 시작한 것은 아니었습니다. 뒤늦게 시작해서 힘들 거라고 생각했지만 의미 있는 나날이었고 뿌듯한 보람을 느낍니다. 인생의 새로운 이정표를 만들어 전환기에 서 있는 기분입니다. 새로운 도전이 기다리고 있겠지요.

처음 구강 병리학 교실에 들어와 석, 박사 과정 전부와 본 논문이 완성 될 때까지 항상 자상한 배려를 아끼지 않으시고 끊임없이 지도해 주신 김진 교수님께 정말 감사를 드립니다. 선생님 덕분에 이 과정을 큰 어려움 없이 지낸 것 같습니다. 제가 구강 병리학을 시작하게 된 동기를 부여해주고 늘 관심을 가져준 육종인 교수님, 논문을 위해 시종일관 신경을 써 주신 이은주 교수님, 바쁘신 중에도 논문을 위해 깊은 관심과 조언을 해주신 이상휘 교수님과 정원윤 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다.

이 실험을 위해 바쁜 일정 속에서도 아낌없이 조언해 주시고 도와주신 김현실 선생님, 차충민 선생님, 김은정 선생님, 류주경 선생님, 김남희 선생님, 차소영 선생님, 지원주 선생님 이하 모든 구강병리학 교실원 분들에게 감사드리며, 자기 일처럼 실험을 도와주신 광영은 선생님, 전남경 선생님께 특별한 감사의 말씀을 전합니다.

언제나 변함없이 후원해 주는 아내 완숙에게 사랑과 고마운 마음을 전하며 기쁨을 함께 하고 싶습니다. 또 두 아들 규환, 규홍 에게 사랑을 전합니다. 언제나 자식 걱정하시는 어머니, 장모님 감사합니다. 이미 고인이 되신 아버지, 장인께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 지금 제 모습을 가장 자랑스러워하실, 그러나 계시지 않아 더욱 안타까운 돌아가신 아버지께 이 논문을 올립니다.

2005년 6월

황진하

목 차

Tables & Figures

국문요약

I. 서 론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
1. 연구 재료	5
가. 세포주	5
나. ZD1839	6
2. 연구 방법	7
가. 세포배양	7
나. Cell Viability Assay	7
다. 세포 주기 분석	7
라. 역전사-중합효소 연쇄반응	8
마. Western Blot Analysis	9
바. Gelatin Zymography	10
사. Transwell Assay	8
아. 통계처리	11
III. 연구 결과	11
1. EGFR의 발현	12
2. ZD1839가 세포 성장에 미치는 효과	13
3. ZD1839가 세포 주기 분포에 미치는 효과	15

4. ZD1839가 세포 주기 중지에 관여하는 단백질에 미치는 영향	17
5. ZD1839 처리에 따른 MMP 활성화도 변화	19
6. ZD1839 처리에 따른 MMP-9 와 MMP-2의 mRNA 발현	21
7. ZD1839 처리에 따른 세포의 침윤능 변화	24
IV. 총괄 및 고찰	26
V. 결 론	33
참고문헌	34
영문요약	42

Tables and Figures

Table 1. Pathologic characteristic of YD-10B cell line	5
Table 2. Used primer pairs and cycling condition	9
Figure 1. Microscopic features of established YD-10B cell lines	5
Figure 2. Expression level of EGFR and p-EGFR in YD-10B cells	12
Figure 3. The growth of YD-10B cells measured by MTT assay	14
Figure 4. Effect of ZD1839 on cell cycle distribution in YD-10B cells	16
Figure 5. Western blot analysis of p21 ^{CIP1/WAF1} , p27 ^{KIP1} and hnRNP C1/C2 protein expression in YD-10B cells	18
Figure 6. Activity of MMP-2 and -9 in the ZD1839-treated cells using gelatin zymography	19
Figure 7. Effects of ZD1839 on the transcriptional level of MMP-2 and MMP-9	21
Figure 8. Effects of ZD1839 on the transcriptional levels of uPA, uPAR and uPAI	22
Figure 9. Effects of ZD1839 on the invasion of YD-10B cell line	24

국문요약

상피세포 성장인자 수용체의 Tyrosine 산화 억제에 한 구강 편평 암종 증식 및 침윤 효과

상피세포 성장인자와 억제인자간의 불균형과 조절 이상은 상피 암종을 유발할 수 있다. 상피세포 성장인자 수용체는 구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정에서 발현이 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있다.

따라서 상피세포 성장인자 수용체의 발현을 억제함으로써 암을 치료하고자 하는 방법이 많이 개발되고 있는데, 암세포의 성장 활성화 인자인 tyrosine의 인산화 억제를 통해 항암 효과를 나타내는 분자 표적 치료제로 최근에 ZD1839가 개발되었다. 본 연구에서는 인간의 구강 편평세포암종 세포주에서 증식과 침윤에 대한 ZD1839의 효과를 조사하기 위하여 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 확립된 암종 세포주 YD-10B를 대상으로 세포의 생존능 측정, 세포 주기 분석, 역전사-중합효소 연쇄반응, Western Blot Analysis 및 Gelatin zymography를 시행하였다. 그 결과 ZD1839가 생체 외에서 구강 암종 세포의 증식과 침윤성 성장에 대한 억제 효과를 확인하고, 그에 대한 분자생물학적 기전을 밝히고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ZD1839 처리 후 세포 증식은 억제되었으며 통계적으로 유효한 성장억제 효과를 나타내는 최소 투여량은 0.1 μM 이었다. IC_{50} 은 10 μM 으로 관찰되었다
2. ZD1839 처리 후 0.1 μM 에서는 48시간, 1 μM 에서는 24시간 후에 G0/G1에서 S 주기로의 세포 주기 진행의 지연이 유도되었다.
3. 세포 주기를 조절하는 CDK 억제제 중 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1/WAF1} 발현은 ZD1839

처리 농도에 의존적으로 발현이 증가하였다.

4. ZD1839 0.1 μ M 처리 후에 hnRNP C의 발현은 3배 증가하였고 ZD1839의 농도를 높여도 hnRNP C의 발현은 그대로 유지되었다.

5. 활성화 된 MMP-2와 -9은 0.1 μ M ZD1839 처리 후 25~40% 낮아지고 ZD1839 투여 농도에 의존하여 감소하였다.

6. MMP-2와 -9 mRNA의 발현은 ZD1839의 농도에 의존적으로 감소하였고 0.1 μ M 농도의 ZD1839에서 50~70% 감소하였다

7. ZD1839 0.1 μ M 처리 후 uPAR mRNA 발현이 60% 이상 감소하였으며 uPAR의 발현 수준은 ZD1839의 농도에 의존적으로 감소하였다.

이상의 결과로 구강 편평세포암종의 세포주에서 ZD1839에 의해 증식이 억제되었는데 이는 ZD1839 처리 후 24시간 후부터 세포 주기의 G1 주기에서의 억제에 의하며, 이러한 세포주기 억제는 CDK 억제제인 p21^{CIP1/WAF1}와 p27^{KIP1}에 의해 조절되었다. 구강 편평세포암종의 세포주에서 침윤 억제의 효과는 uPAR의 발현이 억제되고 MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가하여 ZD1839가 전이를 억제하는데 유용할 것으로 생각되었다.

핵심되는 말: 편평상피세포암종, ZD1839, 세포 주기 변화, p27^{KIP1}, p21^{CIP1/WAF1}, hnRNP C, MMP-2, MMP-9, uPAR,

상피세포 성장인자 수용체의 Tyrosine 인산화 억제제에 의한 구강 편평세포암종의 증식 및 침윤 억제 효과

(지도교수 김 진)

연세대학교 대학원 치의학과

황 진 하

1. 서 론

구강 및 두경부 암은 전체 암종의 3~5%이며 구강 점막에서 발생하는 종양을 포함하여 두경부에 발생하는 악성 종양의 90% 이상은 편평세포암종이다 (Paterson 등, 2001). 질병의 초기 단계에서 진단을 받은 경우는 오랜 기간 생존하기도 하지만 재발이 되거나 원거리 전이가 있는 환자의 경우는 평균적으로 6~8개월 정도 생존하게 된다(Rhee 등, 2004; Vokes 등, 1993). 장기간의 생존을 위협하는 이차 원발성 종양은 매년 3~10%의 비율로 일어난다고 추정된다(Sturgis 등, 1995; Mohan 등, 2003). 화학요법, 방사선 치료, 항호르몬 modalities 혹은 단클론 항체의 사용 등 다양한 종양 치료 방법들이 개발되고 있으나 구강암 환자의 생존은 개선되지 못하고 있는 실정이다.

구강 점막의 편평세포 암종의 발생은 field cancerization과 다단계 발암 과

정으로 설명할 수 있다(Slaughter 등, 1953). 발암 요인에 의한 유전적 손상이 불멸화(immortalization)를 유도하고, 정상 상피의 이형성과 상피 내암(carcinoma in situ)단계를 거쳐 침윤성 암종으로 발전하게 된다.

구강 점막을 구성하는 중층 편평상피는 외부 자극으로 탈락되며 기저층에서 세포 분열을 지속하여 각화 세포로 분화하는 일을 반복하는 조직으로, 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자들, 즉 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 그 수용체, 억제인자(transforming growth factor, TGF- β)와 그 수용체 등에 의해 항상성을 유지한다. 따라서 이들 상피세포 성장인자와 억제인자 간의 불균형과 조절이상은 구강 점막의 다단계 발암과정을 이해하는 중요한 요소라 할 수 있다(Sporn과 Roberts, 1985; Shirasuna 등, 1991).

EGF는 상피세포의 강력한 세포 성장인자로 그 수용체인 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)는 대부분의 상피성 종양에서 높은 빈도로 발현된다(Grandis 등, 1998). 구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정에서도 전암병소 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 EGFR 발현은 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있으며, 특히 암종 주위의 정상 조직에서도 높은 빈도로 과발현되어 두경부 점막의 발암과정에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다(Sporn과 Roberts, 1985; 김태연 등, 1997).

EGFR는 170 kDa의 membrane-spanning 당단백질로 세포 외의 ligand-binding 영역, transmembrane 영역과 tyrosine 인산화 활동을 하는 세포질내의 단백질 영역으로 구성된다. EGFR은 EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin, heparin-binding EGF(HB-EGF)와 epiregulin 등 이미 알려진 6개의 ligands가 있고, 그 중 어느 것과 결합하여 수용체가 활성화되면 수용체의 dimerization과 tyrosine residues에 trans-autophosphorylation을 유도한다. 그

러면 수용체의 인산화된 tyrosine residues는 결합 부위로 작용하여 하류의 신호 전달 체계를 활성화하여 세포 증식과 침윤과 전이의 과정을 조절하게 된다 (Chang 등, 2004).

EGFR은 구강 편평세포암종에서 과발현이 일어나며 생존율의 저하 및 전이의 증가와 관련이 있음을 보여주었다(O-charoenrat 등, 2000).따라서 EGFR의 발현을 억제함으로써 암을 치료하려는 방법들이 개발되고 있다. 현재 개발되거나 개발 중인 분자 표적 치료제는 암세포의 성장 활성화 인자인 tyrosine의 인산화를 억제하는 것과 암세포 성장에 관련된 유전자에 직접 작용해 신호 전달을 차단함으로써 항암 효과를 나타내는 항체를 이용한 방법이 있다. EGFR의 tyrosine 인산화 억제를 통해 항암 효과를 나타내는 분자 표적 치료제로 최근에 ZD1839(Iressa; AstraZenca, London, UK)가 개발되었고 암 환자 치료를 위한 임상 실험이 진행되었다(Laskin 등, 2004). ZD1839는 암세포의 증식과 암의 성장을 촉진하는 숙주 반응에 대해 뚜렷한 항 증식성 효과를 보여주었다 (Ciardiello 등, 2000).

EGFR은 세포의 증식 외에 암세포의 침윤에도 중요한 역할을 한다. 기저막은 주로 제 4형 collagen, laminin 그리고 단백 다당류로 구성되어 있으며 종양 침윤 시 일차 방어막의 역할을 한다. 종양세포에서 생성되어 세포외 기질 분해에 필수적인 기질 단백질분해효소는 serine 단백질분해효소, cysteine 단백질분해효소와 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases; MMPs)가 있다. EGFR은 MMPs와 plasminogen activator 수용체(uPAR)의 활성화에 관여하며 기저막을 통한 이동을 조절한다고 발표되었다(Mahabeleshwar 등, 2004; Guerrerro 등, 2004; Keena 등, 2003).

암의 성장을 막기 위해 사용된 ZD1839의 효과는 말기 폐암을 포함한 일부

암종에서 세포 증식의 억제, 혈관 형성의 억제와 세포 사멸의 효과가 있다고 알려져 있다(Campiglio 등, 2004; Chang 등, 2004; Sgambato 등, 2004; Di Gennaro 등, 2003). 그러나 구강 편평세포암종에 대한 ZD1839의 침윤 억제 효과에 대해서는 알려져 있지 않다(Bonaccorsi 등, 2004; Li 등, 2004; Nutt 등, 2004; Yang 등, 2004). 따라서 본 연구에서는 구강 편평세포암종에서 ZD1839의 암 억제 효과를 알아보기 위해 생체 외에서 구강 암종세포의 증식과 침윤성 성장 억제 효과를 확인하고 분자 기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료

가. 세포주

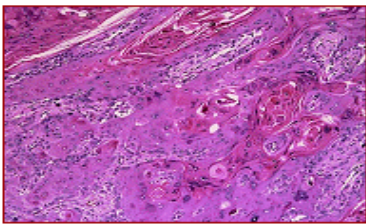
이 연구는 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 구강 편평세포암종 환자로부터 확립된 암종세포주 YD-10B를 대상으로 하였으며 이 세포주의 특성은 다음과 같다(전용찬 등, 2002)(Table 1, Figure 1).

Table 1. Pathologic characteristic of YD-10B cell line

Age/Sex	Primary site	histologic Diagnosis	p53 mutation
67 M	T	C, MD	→ (→) d 2

SCC; squamous cell carcinoma MD; moderately differentiated

A



B

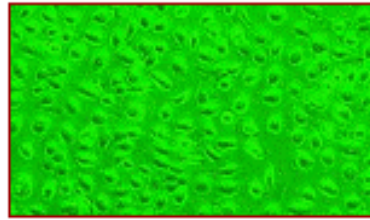


Figure 1. Microscopic features of established YD-10B cell line.

A. Surgical specimen showing cellular pleomorphism and invasive growth of the tumor.(Hematoxylin-eosin, X100)

B. YD-10B cells showing round to oval-shaped culture cells.(X200)

나. ZD 1839

AstraZenca(London, UK)에서 기증받은 EGFR-tyrosine 인산화 억제제인 ZD1839(Iressa)를 사용하였다. ZD1839는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 용해하여 사용하였다. DMSO는 각화세포의 분화와 증식을 조절하기 때문에, 100 μ M 농도까지 DMSO의 사용된 농도는 0.1% (v/v) 이하로 조절하였다.

2. 연구 방법

가. 세포 배양

본 연구실에서 확립한 YD-10B 세포와 EGFR의 양성 대조군인 A431, p21과 p27의 양성 대조군인 MCF-7, hnRNP C의 양성 대조군인 Hela, MMPs의 양성 대조군인 HT1080 세포는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL, Grand island, NY, USA)이 첨가된 high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium(1g-DMEM; glucose 1g/L, Gibco BRL, Grand island, NY, USA)배지를 이용하여 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 배양하였다.

나. Cell Viability Assay

세포의 생존능을 측정하기 위한 N-methylthiotetrazole(MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA)검사를 통해 ZD1839의 성장 억제 효과를 보았다. 96 well plate에 각 3.0×10^3 개의 세포를 넣어 24시간동안 배양한 후 0.01~100 μ M 농도의 ZD1839를 처리하여 37℃에서 2일간 배양하였다. 그 후 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 100 μ l를 첨가하고 4~6시간 추가 배양하였다. 배양액을 버리고 100 μ l의 DMSO로 침전물을 녹여내어 ELX800 reader(Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 세포 주기 분석

6 well-plates에 well당 1.5×10^5 개의 세포를 넣어 37℃에서 24시간 배양하고, 0.1~10 μ M 농도의 ZD1839를 첨가한 후 2일간 추가 배양하였다. 그 후 세포는

70% ethanol로 고정 한 후 세척하여 100 µg/ml의 RNase A와 50 µg/ml의 propidium iodide(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 PBS에 넣어 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포는 flow cytometry(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였고 세포 주기의 분포는 Modfit software(Verity Software House, Topsham, ME, USA)를 사용하여 결정하였다.

라. 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

YD-10B 세포에서 TRI reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 260 nM에서 흡광도를 측정하여 추출한 RNA를 정량화하였다. 1 µg의 RNA를 Reverse Transcription System(Promega, Midson., WI, USA)으로 cDNA를 합성한 후 Gene Amp PCR System 2700(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용한 중합효소 연쇄반응으로 30주기 증폭하였다. MMP-2, -9, uPA, uPAR, PAI-I, PAI-II, EGFR과 reference gene인 GAPDH은 one reaction으로 증폭하였으며 사용된 primer는 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Used primer pairs and cycling condition

	Z
- ' G	90b
	4
	1
R	
I	8

중합 효소 연쇄반응은 94°C에서 1분간 둔 후 uPA, uPAR, PAI-I과 PAI-II는 55°C, MMP-2와 MMP-9은 58°C에서 30초의 변성 반응 후, 72°C에서 1분, 94°C에서 1분간 30주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 한 후 4°C에서 유지하였다. 반응 산물은 ethidium bromide(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색한 1.5% agarose gels(Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Rockland, ME, USA)에서 분리하여 자외선 하에서 관찰하였다.

마. Western Blot Analysis

ZD1839로 처리한 cell pellets에서 단백질을 추출하기 위해 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate: Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% NP40, 그리고 1x protease inhibitors(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)를 포함한 완충용액을 사용하였다. 40 µg의 단백질을 12%와 8% SDS polyacrylamide gel을 통해 전기 영동하여 분리하였고, nitrocellulose membrane(Pall Corporation, Northern Boulevard East Hills, NY, USA)으로 이동시켰다. 이 membrane은 5% skim milk로 2시간 blocking 한 후 20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20을

포함한 phosphate buffer saline tween-20(PBST)과, EGFR은 1:500에서 goat polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA), p-EGFR은 1:1000에서 mouse monoclonal antibody(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 넣어 반응시켰다. p21^{CIP1/WAF1} (Deta Biolabs, Gilroy, CA, USA)는 1:1000에서 mouse monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA)로, p27^{KIP1}(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA)은 rabbit 혹은 goat polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA)를 사용하여 관찰하였다. HnRNP C1/C2는 1:1000에서 goat monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA)를 사용하여 검출하였다. Membrane은 horseradish peroxidase(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 conjugate된 anti-rabbit antibody(1:2000 dilution: Cell Signaling Technology, Inc. Chicago, IL, USA)를 넣어 반응시켰고, 단백질을 화학형광법으로 관찰하였다. 같은 membrane에서 monoclonal anti- β -actin antibody(1:2000 dilution; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 β -actin을 관찰하였다.

바. Gelatin zymography

Gelatin zymography는 ZD1839 0.01~10 μ M 농도를 사용하여 FBS가 없는 무혈청 배지에서 24시간 처리한 후 YD-10B 세포주에서 얻어진 Conditional medium(CM)을 사용하여 시행하였다. CM은 VIVASPIN 2 ml concentrator(VIVA SCIENCE, Hannover, Germany)로 농축하고, 1 mg/ml gelatin과 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate; SDS, polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)로 gel 혼합물을 만들었다. 상온에서 120V로 2시간 전기영동하고 gel은 SDS를 제거하기 위해 washing buffer(2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5)에 잠기게 한 후 H₂O x 3회 씻어내고, incubation

buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl)로 옮겨 37°C에서 밤새 놓아두었다. Gel은 Coomassie brilliant blue(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 1시간 염색하고 10% methanol과 10% acetic acid로 탈색하였다.

사. Transwell assay

ZD 1839의 처리에 따른 MMP의 발현의 감소가 세포의 침윤 억제 효과를 나타내는 것을 확인하기 Transwell assay를 시행하였다. 제 1형 collagen과 100% ethanol을 1:1로 희석하여 transwell(Corning Inc. MA, USA)에 넣고 밤새 건조 시켰다. 각 transwell에 1×10^4 개의 세포를 넣고 0.01~10 μ M의 ZD1839를 처리한 후 24시간 배양하였다. PBS로 수세한 후 세포 상단의 막을 제거한 후 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하였다. 0.25%의 crystal violet(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 1~2분간 염색한 후 현미경에서 네 부위를 선정하여 세포를 계수하였다.

아. 통계처리

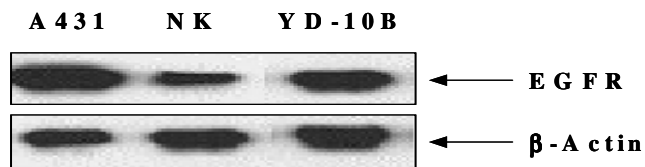
여러 농도의 ZD1839에서 Western blot과 gelatin zymography bands의 농도 값과 세포 성장과 침윤/이동을 비교하기 위해 Student's t-tests를 사용하였고 $p < 0.05$ 에서 유의성을 결정하였다.

III. 연구 결과

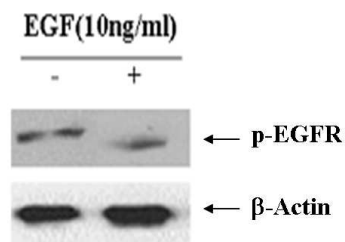
1. EGFR의 발현

구강암의 YD-10B 세포주에서 EGFR의 발현을 조사하기 위해 Western blotting을 시행하였다. YD-10B 세포주에서 EGFR의 발현은 정상 구강 점막의 각화세포(NK)에 비하여 과발현되었다(Figure 2A). EGF에 의한 YD-10B 세포주의 p-EGFR 발현의 효과를 보기 위하여 10 ng와 50 ng의 EGF를 10분, 1시간, 24시간과 48시간 처리하여 인산화 발현을 비교하였으나 차이는 없었다(Figure 2B). ZD1839에 의한 EGFR과 p-EGFR의 발현을 조사한 결과 0.1 μ M의 ZD1839를 24시간 처리한 후부터 EGFR과 p-EGFR의 발현이 감소하였다(Figure 2C).

A.



B.



C.

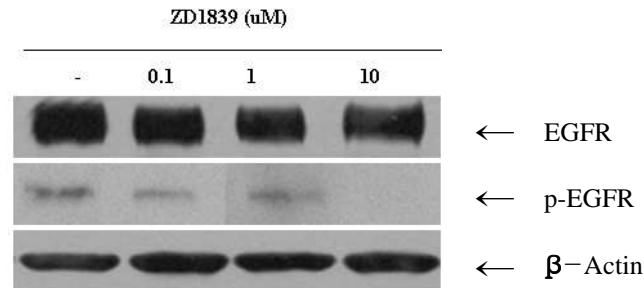


Figure 2. Expression level of EGFR and p-EGFR in YD-10B cells.

- A. Western blot analysis using an anti-EGFR antibody.
- B. Western blot analysis of cell lysates from YD-10B cells grown with and without 48h treatment of 10 ng/ml EGF
- C. Effect of ZD1839 on tyrosine phosphorylation of EGFR.
Phosphorylated EGFR (p-EGFR) was detected with a Tyr992 antibody.
A431: positive control cell, NK: normal keratinocytes

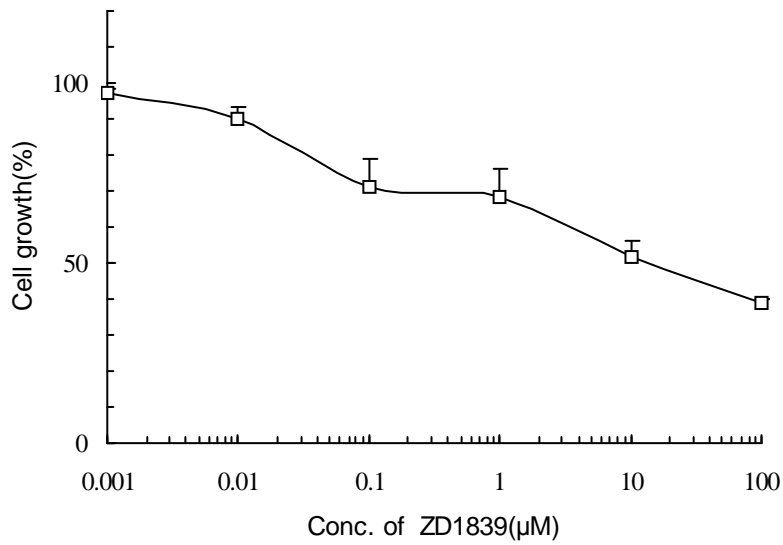
2. ZD1839가 세포 성장에 미치는 효과

ZD1839의 구강 암세포 성장 억제를 확인하기 위해, YD-10B 세포주를 유혈청(10%)과 무혈청 배지에서 0~100 μM 농도로 처리하였다. 유혈청 배지의 경우 통계적으로 유효한 성장 억제 효과를 나타내는 ZD1839의 최소의 투여량은 0.1 μM이었으며(Figure 3A) IC₅₀은 10 μM으로 관찰되었다.

EGF가 ZD1839의 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해 무혈청 배지에서 EGF를 10 ng/ml과 50 ng/ml로 처리하여 성장을 자극시킨 후 ZD1839를 0.01~10 μM 농도로 24시간과 48시간 처리하여 YD-10B 세포주의 증식 억제능을 비교하였다. EGF로 자극된 세포 성장의 ZD1839의 처리 결과는 Figure 3. B에 나타내었다. YD-10B 세포주에 ZD1839와 10 ng/ml EGF를 동시에 24시

간과 48시간 처리 하였을 때의 성장 억제 효과는 EGF를 처리하지 않고 ZD1839만을 처리한 경우의 성장 억제 효과와 비슷한 양상을 나타내었다. 50 ng/ml EGF를 처리한 경우도 성장 억제 효과는 비슷하였다(data not shown).

A.



B.

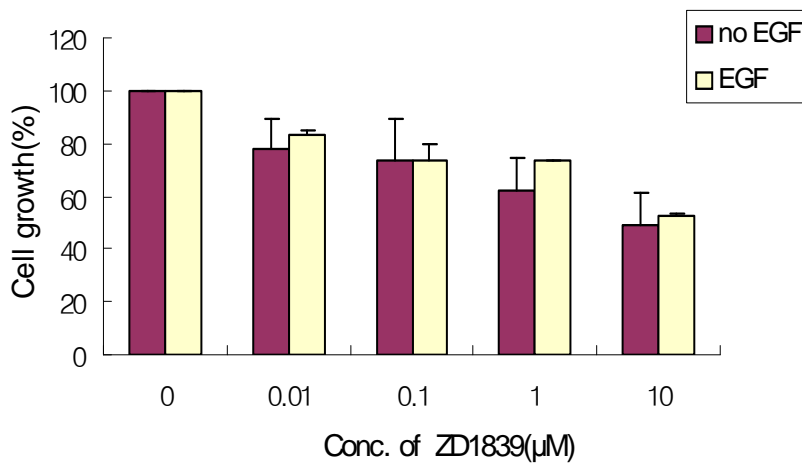
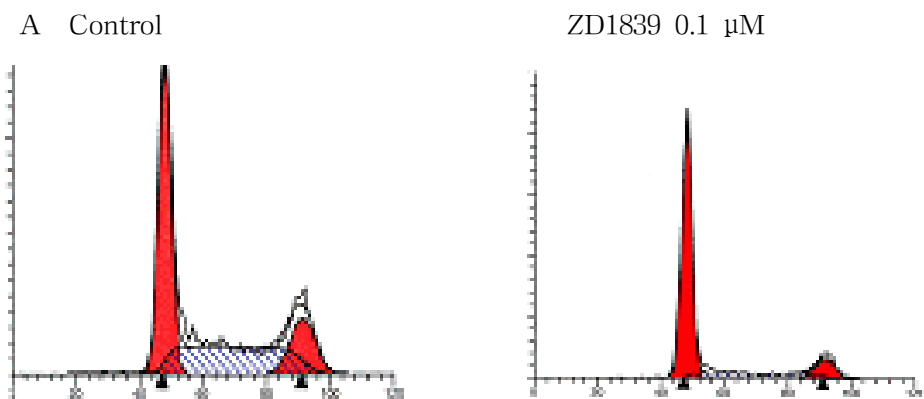


Figure 3. The growth of YD-10B cells measured by MTT assay.

- A. YD-10B cell line in the medium containing 10% FBS with increasing concentrations of ZD1839.
- B. Effect of EGF(10 ng/ml) and ZD1839 on the cell growth of YD-10B cells in the serum-free medium after 24h treatment.

3. ZD1839가 세포주기 분포에 미치는 효과

ZD1839로 유도된 YD-10B 세포 증식의 억제가 세포 주기와 관련이 있는가를 확인하기 위해 YD-10B 세포를 24시간과 48시간동안 ZD1839를 처리하여 flow cytometric analysis에 의해 분석하였다. YD-10B 세포는 0.1 μ M, 1 μ M 과 10 μ M의 ZD1839로 처리하고, 24시간과 48시간 후에 ZD1839를 처리한 것과 처리하지 않은 것의 세포 분포 양상을 비교 분석하였다(Figure 4). ZD1839 1 μ M과 10 μ M의 처리는 세포 주기 분포에 뚜렷한 영향을 나타내었다. 가장 두드러진 효과는 S 주기 감소와 G0/G1 주기 세포의 분포 백분율이 증가한 것이다. ZD1839 0.1 μ M의 처리가 24시간 후에는 뚜렷한 변화를 나타내지 않았지만 48시간 후에 세포 주기 진행의 지연을 유도하였다. 1 μ M의 처리는 24시간 후에 세포 주기 진행을 억제하였다. ZD1839를 처리하지 않은 경우 G1 주기에 있는 세포의 백분율은 52.7이고, 0.1, 1 μ M 그리고 10 μ M의 ZD1839 처리 후에는 53.7, 93.8 그리고 98.5%로 증가하였다. 반면에 S 주기에 있는 세포의 백분율은 23.3에서 37.9, 5.7 그리고 1.4%로 감소하였다(Figure 4).



B.

Z			
μ	μ	μ	μ

Figure 4. Effect of ZD1839 on cell cycle distribution in YD-10B cells.

- A. Cell cycle distribution of YD-10B cells that were incubated in the presence or absence of ZD1839(0.1 μ M) for 48h.
- B. The values in each row represent the percentage of cell population in each phase of the cell-cycle by the different concentration of ZD1839.

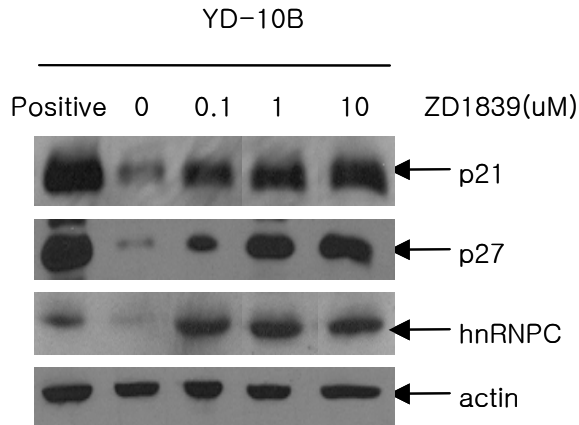
4. ZD1839가 세포주기증지에 관여하는 단백질에 미치는 영향

ZD1839의 세포 증식 억제 효과를 평가하기 위해 Western blot hybridization을 사용하여 p21^{CIP1/WAF1}와 p27^{KIP1}의 발현 수준을 측정하였다.

ZD1839의 처리는 YD-10B 세포주에서 p27^{KIP1}의 발현의 증가를 유도하고, p21^{CIP1/WAF1} 발현 또한 증가를 유도하였다(Figure 5). YD-10B 세포주에서 p27^{KIP1}은 초기에는 발현되지 않았고, 0.1, 1과 10 μ M의 ZD1839를 처리 한 후에 p27^{KIP1} 발현이 증가하였다. YD-10B 세포에서 p27^{KIP1}의 발현은 24시간에 시작되어(0.1 μ M에서 ~5.0 배 증가) 시간에 따라 증가되었다(48시간에서 ~10 배 증가가 관찰됨). YD-10B 세포주에서 p21^{CIP1/WAF1}의 기본 발현은 거의 없었으나, ZD1839 처리 후에는 p21^{CIP1/WAF1}(10 μ M에서 2 배 이상)발현의 증가가 관찰되었다. 반면에 p16^{INK4c}(다른 G1 cdk 억제제)와 p53의 발현은 ZD1839처리 후에도 변하지 않았다(data not shown). 이런 결과는 YD-10B 세포에서 ZD1839에 의한 성장 억제에 p21^{CIP1/WAF1} 과 p27^{KIP1}이 연관이 있음을 의미한다.

세포 주기와 성장 억제 동안 p27^{KIP1} 및 p21^{CIP1/WAF1}의 전사 조절과 역할을 알아보기 위해 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C1/C2 단백질의 발현을 조사하였다. YD-10B 세포주에서 hnRNP C의 기본 발현은 검출할 수 없었고, 0.1, 1과 10 μ M의 ZD1839 처리 후에 hnRNP C의 발현은 증가하였다. YD-10B 세포에서 hnRNP C의 유도는 0.1 μ M로 24시간 처리 후에 3 배 증가되어 ZD1839의 농도가 증가하여도 그대로 유지되었다.

A.



B.

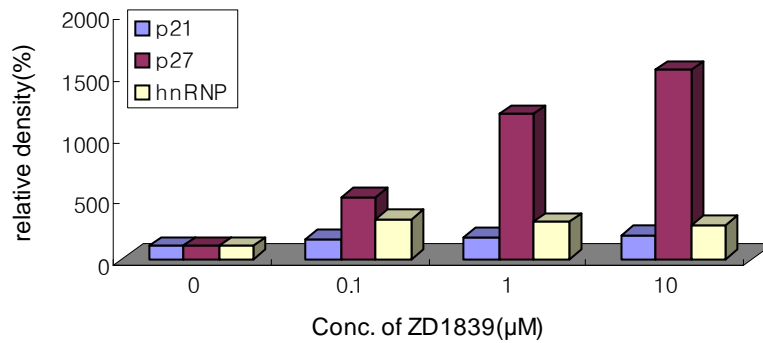


Figure 5. Western blot analysis of p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} and hnRNP C1/C2 protein expression in YD-10B cells.

A. Western blot of p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} and hnRNP C

B. Relative density of p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} and hnRNP C protein expression. The densities were normalized with that of actin and normalized value were represented to % of control.

Positive control for p21^{CIP1/WAF1} and p27^{KIP1} :MCF7 cell

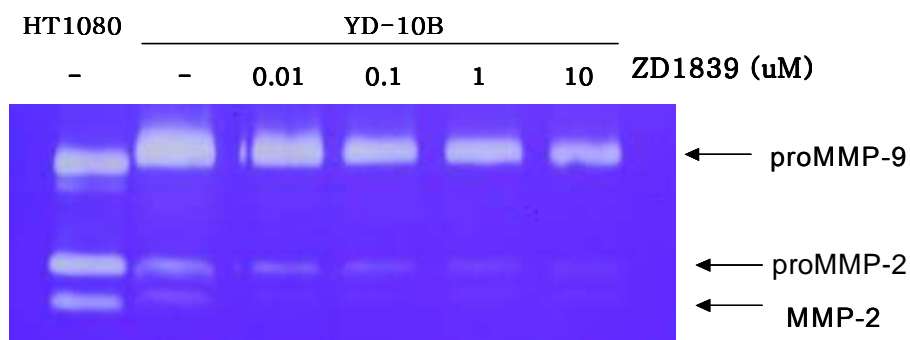
Positive control of hnRNP C : Hela cell

5. ZD1839처리에 따른 MMP 활성화도 변화

구강 편평세포 암종 세포주의 침윤능에 대한 ZD1839의 억제 효과의 분자 기전을 알아보기 위해 Matrix metalloproteinase(MMP)의 농도를 측정하였다. 0.01, 0.1, 1 그리고 10 μ M의 ZD1839로 처리한 conditioned media를 사용하여 zymogram 분석하였다. 세 개로 분리한 세포 배양 실험에서 zymogram의 결과는 Figure 6에 나타내었다. HT 1080 세포의 medium은 control로 MMP-9과 MMP-2의 activity bands가 사용되었다. YD-10B 세포의 모든 배지에서 MMP-2와 -9이 검출되었다. 활성화된 MMP-2와 -9은 ZD1839 처리에 따라 감소하였다. 24시간의 ZD1839 처리 후 세포 수는 감소하지 않아서(Figure 2), ZD1839의 억제 효과는 실제 세포 수의 감소에 의한다기 보다는 세포의 감소된 침윤능에 의한 것으로 생각된다.

Figure 6에서 보면 ZD1839를 0.1 μ M로 처리했을 때 24시간 배양한 후 MMP-2와 MMP-9 효소의 효소 활성도가 25~40% 낮아졌으며($P < 0.05$), 투여량에 의존하여 감소하였다. MMP-2 전구 단백질(72kDa)의 합성과, MMP-2 전구 단백질의 active form(66kDa)으로 진행되는 것이 ZD1839 처리에 의해 억제되었다.

A.



B.

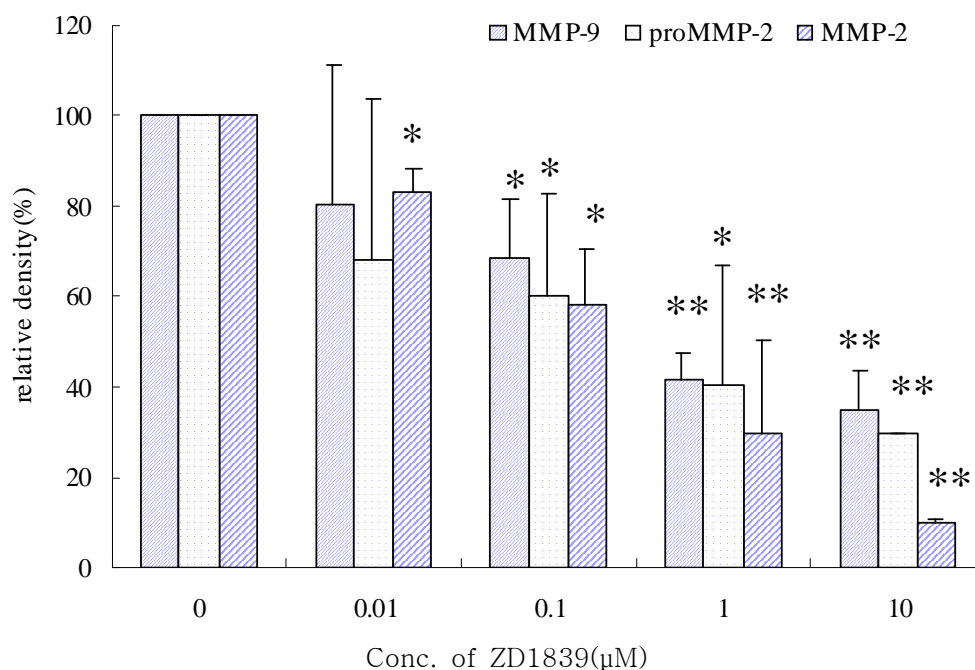


Figure 6. Activity of MMP-2 and -9 in the ZD1839-treated cells using gelatin zymography.

A. Zymogram of the serum-free conditioned medium from YD-10B cells treated with ZD1839 for 24h. The conditioned medium from the ZD1839 untreated YD-10B cells was used as a control to show bands of MMP-9 and MMP-2 activity.

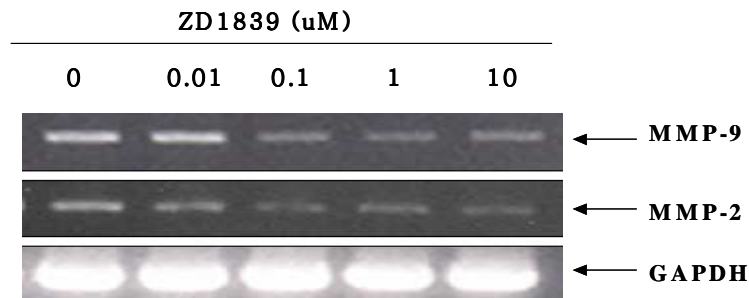
B. MMP-2 and 9 activity as a percentage, measured by the densitometry of zymograms. Columns are the mean of three separate experiments. The densities were represented to % of control sd of three experiments.

* P < 0.05 respect to control and ** p < 0.005 respect to control.

6. ZD1839처리에 따른 MMP-9와 MMP-2의 mRNA 발현

YD-10B 세포에서 MMP-2와 -9 mRNA의 발현은 ZD1839의 처리 농도에 의존적으로 감소하였다(Figure 7). ZD1839 0.1 μ M 농도에서 MMP-2와 -9의 발현은 50~70% 감소하였다. YD-10B 세포의 침윤에서 plasminogen의 활성화 체계의 관여를 확인하기 위해, uPA, uPAR과 plasminogen activator 억제제 (PAI)의 분포를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. 0.1 μ M의 ZD1839에서 uPAR mRNA 발현이(60% 이상) 감소하였다. uPAR의 발현은 ZD1839로 24시간 배양한 세포에서 투여량에 따라 감소하였다(Figure 8).

A



B.

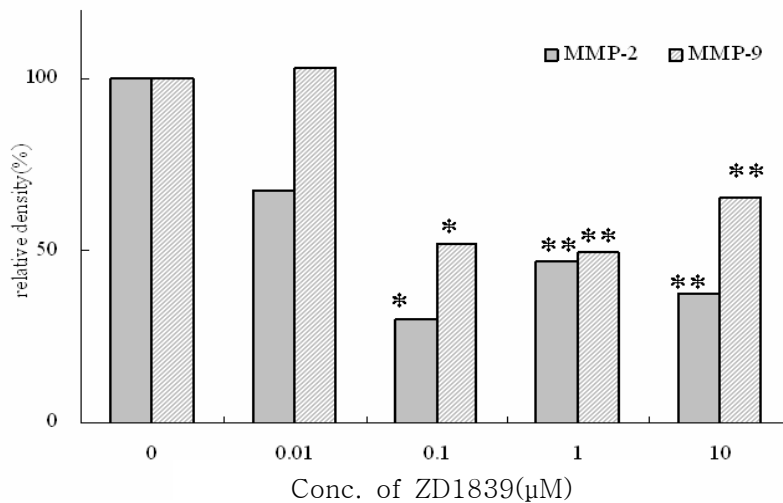


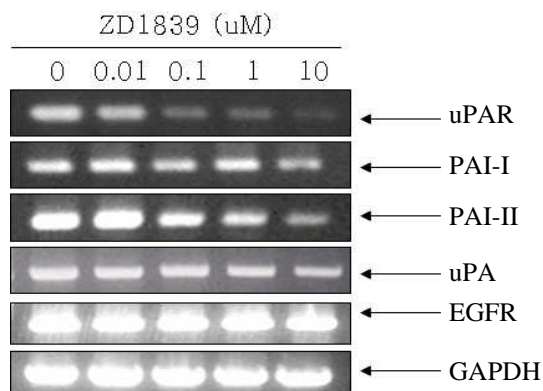
Figure 7. Effects of ZD1839 on the transcriptional level of MMP-2 and MMP-9.

A. YD-10B cells were treated with ZD1839 at the concentration of 0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M for 24h, then RNA samples were extracted and subjected RT-PCR for MMP-2 and MMP-9 with GAPDH being an internal control

B. The final RT-PCR products were quantified by densitometric analysis with a control being 100%. Data represents the mean s.d. of at least three independent experiments. Results were statistically analyzed with student's t-test. The densities were normalized with that of GAPDH and normalized value were represented to % of control.

* P <0.05 respect to control and ** p < 0.005 respect to control.

A.



B

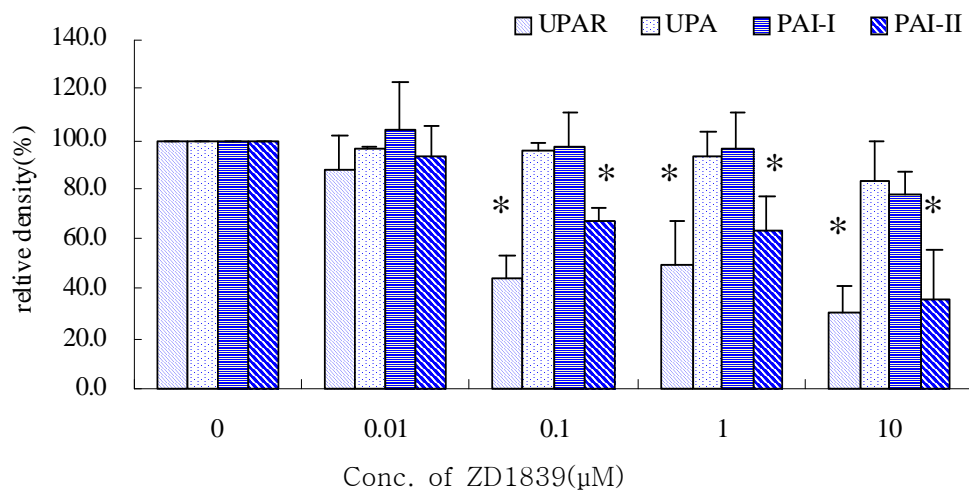


Figure 8. Effects of ZD1839 on the transcriptional levels of uPA, uPAR and PAI.

A. YD-10B cells were treated with ZD1839 at the concentration of 0, 0.01, 0.1, 1, and 10 μM for 24h and then RNA samples were extracted and subjected RT-PCR for uPA, uPAR and PAI with GAPDH being an internal control

B. The final PCR products were quantified by densitometric analysis with the control being 100%. Data represents the mean s.d. of at least three independent experiments. Results were statistically analyzed with a student's t-test.

The densities were normalized with that of GAPDH and normalized values were represented to % of control.

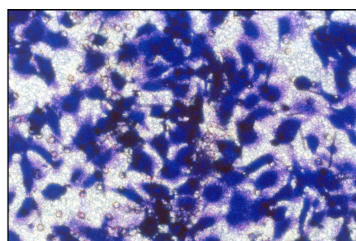
* $P < 0.05$ respect to control.

7. ZD1839처리에 따른 세포의 침윤능 변화

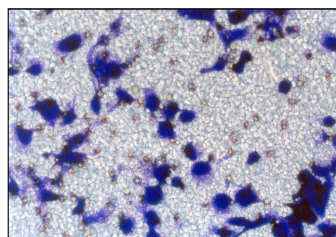
구강 편평세포 암종 세포주의 침윤능에 대한 ZD1839의 억제 효과를 확인하기 위해 Transwell assay를 시행하였다. ZD1839처리에 따른 MMP의 발현 감소가 세포의 침윤에 영향을 주는가를 확인하기 위해 transwell에 0.01, 0.1, 1 그리고 10 μ M의 ZD1839를 처리하여 분석하였다. 24시간의 ZD1839 처리 후 세포 수가 감소하여 ZD1839가 세포의 침윤을 억제하는 것을 확인하였다.

Figure 9에서 보면 ZD1839를 0.1과 1 μ M 처리 후 세포의 침윤은 20~40 % 낮아지고 투여량에 의존하여 감소하였다.

A.



control



ZD1839 0.1 μ M

B.

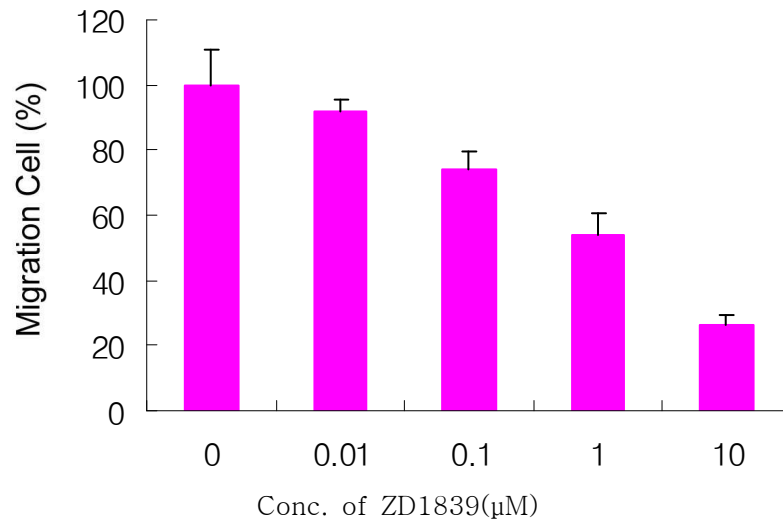


Figure 9. Effects of ZD1839 on the invasion of YD-10B cell line.

A. Microscopic feature of transwell assay of YD-10B cell line.(x200)

B. Number of migration cells affected by ZD1839 on the cell invasion of YD-10B cell line in the transwell after 24h treatment.

IV. 총괄 및 고찰

두경부 편평세포암종은 전 세계적으로 매년 약 500,000명의 환자가 존재하며 그 치료법이 다양해지고 점점 발전하고 있다고는 하지만 진행된 암의 경우 예후는 5년 생존율이 약 40% 정도로 매우 좋지 않다(Hall 등 1999; Landis 등 1999). 따라서 예방과 조기 진단, 치료방법의 선택과 예후 평가를 위해서는 암 발생 기전에 대한 이해가 매우 중요하다. 최근의 분자 생물학 및 암 유전자 연구의 발달은 암 발생 및 전이 기전의 이해를 돕고 치료 방법의 개발에 기여해 오고 있다. 현재 임상에서 사용되는 대부분의 항암제는 암세포의 염색체나 미세 기관에 작용해 세포 독성을 나타내는 것이 보통이다. 이 같은 세포 독성은 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 손상을 주기 때문에 심한 부작용이 뒤따른다. 따라서 정상 세포에는 손상을 주지 않고 암세포에 존재하는 물질이나 기전만을 '표적'으로 삼아 항암 효과를 나타내는 약제가 있다면 최상의 항암 치료제라고 할 수 있을 것이다. 최근 이처럼 암세포만을 골라 공격하는 '타깃(target) 치료제'들이 개발돼 임상에 활용되고 있다. 현재 개발됐거나 개발 중인 분자 표적 치료제는 암세포의 성장 활성화 인자인 tyrosine 인산화 억제제와 암세포 성장에 관련된 유전자에 직접 작용해 신호 전달을 차단함으로써 항암 효과를 나타내는 항체를 이용한 방법이 있다. tyrosine 인산화 억제제는 유전자가 암세포의 세포막에 있는 tyrosine 인산화 작용을 촉진시키는 것을 방해함으로써 암세포의 증식을 억제한다. 이러한 tyrosine 인산화 억제제중 하나인 ZD1839는 암세포의 성장을 촉진하는 EGFR에 의해 활성화되는 tyrosine 인산화를 억제해 치료 효과를 나타낸다. 임상결과 기존의 항암제에 반응하지 않는 폐암 환자에서 20%의 반응을 보이는 것으로 나타났다. EGFR은 폐암 외에 위암 대장암 등에도 활성화되어 있는 것으로 알려져 이런 종양에서의 효과에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다(Laskin 등,2004).

EGF는 상피세포의 강력한 세포 성장 인자로 EGFR은 대부분의 상피성 종양에서 높은 빈도로 발현된다(Grandis 등, 1998). 구강을 포함하는 두경부에 발생하는 편평세포암종의 발생 과정에서도 전암 병소 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에서 EGFR 발현은 점진적으로 증가하는 것이 알려져 있으며, 특히 암종 주위의 정상 조직에서도 높은 빈도로 과발현되어 두경부 점막의 발암 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다(Sporn과 Roberts, 1985; 김태연 등, 1997).

본 연구에서는 두경부 편평세포암종에서 EGFR의 tyrosine 인산화 과정을 억제하는 ZD1839의 역할에 대해 in vitro에서 조사하였다. YD-10B 세포주의 성장과 증식에 EGF가 미치는 영향을 알아보기 위하여, 10 ng/ml과 50 ng/ml 농도의 EGF를 24시간, 48시간 투여하였으나 세포 증식에 뚜렷한 효과를 나타내지 않았으며 또한 EGF와 ZD1839를 동시에 처리한 경우에도 EGF 처리를 안 한 경우와 차이가 없었다. 이는 EGF 처리가 ZD1839 세포 증식 억제 효과에 중요한 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다. EGF 처리에 따라서 인산화된 EGFR발현을 관찰한 결과에서도 인산화 된 EGFR은 EGF 처리 유무와 관계없이 발현의 변화가 없었다. 즉 EGF의 수용체는 이미 세포 배양 배지 내에서 세포에 의해 생성된 EGF 존재에 의해 완전히 포화되었다는 것을 의미한다(Sgambato 등,2004). 또한 구강 편평세포 암종의 세포 성장에서 autocrine factors의 중요성은 YD-10B 세포주가 무혈청 조건에서 생존하고 증식할 수 있는 능력으로도 증명되었으며, 무혈청 조건에서도 YD-10B 세포는 ZD1839 투여량과 시간에 의존하여 성장은 억제되었다.

세포가 증식하기 위해서 G1 주기를 거쳐 DNA 복제(S 주기), 그리고 G2 주기를 거쳐 세포분열(M 주기)을 하는 일련의 단계를 거치는데 이를 세포주기(Cell Cycle)라 한다. G1과 G2 주기는 세포 주기를 조절하는 checkpoint라고

일컫는데 checkpoint는 세포가 비정상적으로 증식하지 않기 위해서 중요하다. Checkpoint에서 세포 주기의 다음 단계로 넘어가기 위한 조건이 충족되었는지를 확인한 후, 모든 조건이 만족되면 S 또는 M 주기가 진행된다. Checkpoint에서 세포 증식 조절이 제대로 이루어지지 않으면 암과 같은 비정상적인 세포 증식을 유발한다. 세포 증식 조절이라는 관점에서 볼 때 증식을 시작할 것인가 말 것인가를 결정하는 것이 중요한데, 이것은 G1 checkpoint에서 일어나며 이를 Restriction point(제한점)라 한다. 증식하지 않는 세포는 G0 주기에 머물러 있다. G1 checkpoint를 지나서 DNA 복제, G2 checkpoint를 지나서 유사분열을 하기 위해서는 CDK(Cyclin-dependent kinase)단백질의 활성이 필요하다. CDK는 단독으로 활성화될 수 없으며 Cyclin이라는 단백질과 결합되어 kinase 활성을 갖게 되고 Cyclin-CDK 복합체는 세포 증식에 관련된 단백질들을 인산화 시켜서 세포 분열을 유도한다(Pines, 1999). 세포 주기 조절을 위해 Cyclin-CDK 복합체의 활성을 조절하는 많은 인자들이 존재한다(Swanton, 2004; Sandor 등, 2000; Chen 등, 1999; Patel 등, 2002). 대표적인 것으로는 G1 checkpoint에서 DNA가 손상되었을 때 작용하는 p21 단백질이 있다(Coqueret, 2003; Albrecht 등, 1998; Alpan 등, 1996). DNA가 손상되었을 때에 활성화되는 암 억제 유전자인 p53에 의해 p21 유전자가 발현된다. 세포 증식의 조절에 있어서 p53의 작용은 p21 유전자를 발현시켜 세포 증식을 일시적으로 정지시키는 것 또는 p53-binding protein인 ASPP와 결합한 p53이 Bax gene을 발현시켜 세포 사멸 유발하는 것 두 가지로 볼 수 있다(Vogelsteine 등, 2000).

본 연구에 사용한 YD-10B 세포는 p53 암 억제 유전자의 codon 236의 exon7에서 정상 TAC 배열이 TAA로 바뀌는 non-sense 돌연변이를 나타내었다. 즉 p53단백질이 역할을 할 수 없는 세포주이다. ZD1839의 항 증식성 효과는 주로 세포 분열 억제에 의하며, 24시간 후부터 G0/G1 주기에서 세포 주기는 억제되었다. 이러한 세포 주기 억제는 CDK 억제제인 p21^{CIP1/WAF1}와 p27^{KIP1}

에 의해 조절된다. p21^{CIP1/WAF1} 단백질은 종양 억제 단백질인 p53에 의해 직접 조절되는 유전자로 알려져 있지만(Zhang 등, 2004; Li 등, 2004) 일부는 p53 비활성 세포에서도 p21^{CIP1/WAF1} 발현을 유도하므로 p21^{CIP1/WAF1} 발현이 반드시 p53 단백질에 의한 것은 아니다(Zhang 등, 2004; Li 등, 2004). 본 연구에서 ZD1839로 처리한 YD-10B 세포에서 p21^{CIP1/WAF1}의 up-regulation은 p53 비 의존성 pathway로 조절된 것으로 생각되며 아직 p21의 발현을 조절하는 p53 비 의존성 신호 체계에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다.

본 연구에서 YD-10B 세포에서 성장의 억제는 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1/WAF1} mRNA의 전사의 증가에 따른 것으로 생각된다(Giles 등, 2003). p27^{KIP1} mRNA의 전사는 S 주기로 계속되지만 단백질의 단백질 분해가 p27의 축적을 막는다. 단백질 분해는 cdk2 활동과 skp2에 의존하기 때문에, 초기 G1 세포에서 cdk2와 skp2는 증식과 성장억제 사이를 결정하는 요소인 p27^{KIP1}의 축적을 효과적으로 조절할 수 없는 것으로 보인다. 따라서 p27 발현이 시작되면 합성 비율의 변화가 단백질 분해보다 빠를 것이며 p27^{KIP1}은 축적될 것이다(Millard 등, 2000; Gopfert 등, 2003). p27^{KIP1} mRNA 전사가 효율적으로 되기 위해서는 p27^{KIP1} mRNA의 5' untranslated 된 부위(5'UTR)에 U-rich 배열이 필요하며, 이 배열에 HuR과 hnRNP C1/C2가 결합한다. HnRNP C1/C2와 결합된 5'UTR은 p27 전사의 유도과 관련되어 있다(Giles 등, 2003).

세포의 cytosolic 추출물 내에 p33과 p40/41이라고 명명된 2개의 단백질이 있는데 이는 5'UTR에 교차 결합될 수 있다. 기존 연구에서 p33을 다른 단백질의 U-rich 요소에 독립적으로 결합하는 HuR로, p40/41은 hnRNP C1/C2로 보고하였다(Gopfert 등, 2003). HnRNP는 핵에 존재하는 요소로 mRNA 가공에 관여하고, hnRNP C1/C2 단백질은 또한 분화된 세포에서 유도된 internal ribosome entry sites를 포함한 c-sis mRNA의 전사 조절과도 연관이 있다고

발표되었다(Danehoit, 1997; Hood 등, 1999; Nakielny 등, 1999). 최근의 연구에 의하면 이 단백질의 세포질에서의 역할은 분화된 세포의 세포질 내에서 platelet-derived growth factor(PDGF) mRNA를 변환 유도하는 것이라고 알려졌다. 그러므로 이 hnRNP C1/C2 단백질이 세포질 내에 있을 때 전사를 조절할 수 있다는 것이 가능하다.

현재 ZD1839에 의한 p27^{KIP1}의 전사 조절은 보고 되어 있지 않다. 본 연구에서는 YD-10B 세포 주기와 성장 억제동안 p27^{KIP1} 및 p21의 전사 조절과 hnRNP C1/C2 역할을 알아보기 위해 hnRNP C1/C2 단백질의 발현을 조사하였다. ZD1839 처리 후 hnRNP C1/C2 발현 양상은 증가하였으며, hnRNP C1/C2 발현 양상의 증가에 의해 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1/WAF1} 전사 조절에 영향을 주는 것으로 생각되나 ZD1839에 의한 p27^{KIP1}과 p21^{CIP1/WAF1} 조절의 정확한 기전을 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

악성 종양에 의한 높은 사망률은 많은 경우 주변 조직에로의 침윤 및 먼 장기로의 전이가 결정적인 원인이 된다. 전이는 암 세포가 혈액 혹은 임파관을 침범하고 다른 조직이나 기관으로 확산을 허용하는 세포외 기질(Extracellular Matrix ECM)의 분해와 관련된 여러 생리적 변성을 따라 발견된다. 즉 암세포의 침윤, 전이는 암세포 표면에 단백질을 분해할 수 있는 여건을 만드는 것으로부터 시작한다. 높은 침윤력, 전이능을 보이는 암세포들에서는 특정 단백질 분해효소의 생산, 분비가 항진되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구결과 암의 전이에 대한 기전이 제안되었고, 많은 신호 전달 체계가 서로 관련되어 있음이 제안되었다. 암전이의 공통적인 점은 변형된 세포에서 과발현되는 세포 표면의 수용체들에 의해 중재된다는 것이다(Jo 등, 2003; O-Charoenrat 등, 2004). 암세포에서 가장 일반적으로 과발현되는 것은 EGFR이며 암세포의 전사 profile을 변형시킬 뿐만 아니라 세포의 de-adhesion과 세포 구조의 재구성

으로 암으로 진행시킨다. 침윤성이 높은 세포에서 과발현되는 또 다른 성장 수용체는 urokinase type plasminogen activator receptor(uPAR)이다. uPAR은 urokinase type plasminogen activator(uPA)와 결합을 함으로서 활성화되고 그 효과가 증폭된다고 알려져 있다(Duffy 등, 2004). 암세포의 침윤과 전이에 관련된 단백질 분해 효소로는 plasminogen activator와 collagenase, stromelysin 등 여러 효소들이 거론되고 있다. 이중 uPA는 이 효소가 간질을 구성하는 다양한 단백질을 분해 할 수 있는 강력한 효소인 plasmin을 생성하게 한다는 것 외에 단백 분해 효소인 이 plasmin 으로 하여금 비활성형으로 분비되는 다른 단백 분해 효소들을 활성화 시킬 수 있는 능력이 있다. 그러므로 plasminogen의 활성화 과정에 uPAR이 중추적 역할을 할 것으로 생각된다. 이러한 과정에서 생성된 plasmin은 비활성으로 생산, 분비되는 MMP를 활성화시킨다. 이렇게 활성화된 MMP는 ECM의 주요 성분인 collagen을 분해하여 암세포의 국소적 침윤이 가능하게 하고, 특히 MMP-9, -2는 기저막의 주요 성분인 제 4형 collagen을 분해함으로써 국소 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

세포와 기질의 상호 작용은 세포의 이동, 증식 그리고 ECM의 분해를 촉진시키므로 세포 부착에 대한 억제 약물이 종양 세포의 침윤성과 전이 능을 감소시킬 수 있다(Nutt 등, 2004; Yang 등, 2004; Li 등, 2004). 또한 부착과 이동을 촉진하는 세포와 ECM간의 상호 작용은 종양의 침윤과 이동 및 전이에 중요하다고 믿어진다. 그러므로 본 연구에서는 ECM 분해와 관련된 여러 단백질 분해 효소와 uPAR에 대해 ZD1839가 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 세포 독성을 유도하지 않는 농도의 ZD1839를 24시간 동안 투여한 결과 투여농도에 의존하여 YD-10B 세포의 침윤, 이동 및 부착에 억제 효과를 발휘하는 것을 발견하였으며, 역전사-중합효소 연쇄반응 분석의 결과는 ZD1839에 의한 MMP-2와 -9의 억제는 전사에 의한 것임을 알 수 있었다.

uPAR과 EGFR과의 관계는 uPAR이 EGFR 등의 수용체를 통해서 migration signaling을 세포로 전달한다고 보고 되었지만 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않다(Huang 등, 2000; Jo 등, 2003; Javier 등, 2004; Guerrero 등, 2004). uPAR로부터의 세포내 신호 전달은 부분적으로는 EGFR의 transactivation에 의해서 발생된다. EGFR 인산화 활동의 억제제 ERK, MAP 인산화 효소의 활성화를 방해함으로써 uPAR에 의해 야기되는 세포 증식과 운동성을 방해하게 된다. 따라서 EGFR은 uPAR이 매개하는 종양의 진행에 필수적인 요소이다. EGFR은 uPAR를 과발현하는 고도의 악성 세포에서 세포의 증식을 조절하는 역할을 하는 것으로 최근에 보고되었다(Huang 등, 2000; Jo 등, 2003; Mahabeleshwar 등, 2004; Javier 등, 2004; Mamoune 등, 2004). 본 연구에서는 침윤과 관련된 MMPs의 upstream 효소인 uPA의 발현이 ZD1839의 투여량에 따라 억제되는 것을 보여주지는 못했지만, uPAR와 PAI의 발현은 ZD1839 처치의 투여량에 따라 감소하였다. 이런 결과들은 uPAR 활동 상태에 따르는 다양한 세포 반응에 대한 EGFR의 복잡한 조절 기능을 나타내는 것이다. ZD1839는 전사 발현 수준에서 MMP-2, -9과 uPAR의 발현을 뚜렷이 감소시키고, 이런 단백질 분해 효소의 발현에 있어 ZD1839의 억제 효과는 침윤의 억제에 대한 납득할만한 설명이 될 것이다. 이런 결과를 일괄하여 생각하면 YD-10B세포의 침윤과 이동 및 부착에 대한 ZD1839의 억제 효과는 EGFR-uPAR 체계를 통한 것이라고 추측된다. ZD1839로 처리된 구강 편평상피세포 암종의 세포주에서 침윤과 이동은 다수의 세포 분자 기전을 통해 항암 효과를 가지며 ZD1839가 전이를 억제하거나 혹은 막는데 유용하다고 생각된다.

V. 결론

인간의 구강 편평세포암종 세포주에서 증식과 침윤에 대한 ZD1839의 효과를 조사하기 위하여 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 확립된 암종세포주 YD-10B를 대상으로 세포의 생존능 측정, 세포 주기 분석, 역전사-중합효소 연쇄반응, Western Blot Analysis 및 Gelatin zymography를 시행하였다.

그 결과 ZD1839가 생체 외에서 구강 암종 세포의 증식과 침윤성 성장에 대한 억제 효과를 확인하고, 그에 대한 분자생물학적 기전을 밝히고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

구강 편평세포암종의 세포주에서 ZD1839에 의해 증식이 억제 되었는데 이는 ZD1839 처리 후 24시간 후부터 세포 주기의 G1 주기에서의 억제에 의하며, 이러한 세포주기 억제는 CDK 억제제인 p21^{CIP1/WAF1}와 p27^{KIP1}에 의해 조절되었다. 구강 편평세포암종의 세포주에서 침윤 억제의 효과는 uPAR의 발현이 억제되고 MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가하여 ZD1839가 전이를 억제하는데 유용할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. 김태연, 육종인, 김진: 구강점막의 백반증과 편평세포암종에서 Epidermal Growth Factor Receptor 및 Transforming Growth Factor- β 1 수용체의 발현. 대한 구강병리학회지 31: 1247-1255, 1997
2. 전용찬, 이승애, 금영삼, 윤정훈, 육종인, 김진: 구강암세포주의 확립과 생물학적 특징. 대한구강악안면병리학회지 26(1): 1-19, 2002
3. Albrecht JH, Poon RV, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, Cray GS: Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* 16: 2141-2150, 1998
4. Alban RS, Pardee AB: P21^{waf1/CIP1/SDI1} is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ* 7(7): 893-901, 1996
5. Bonaccorsi L, Marchiani SM, Forti G, Baldi E: Gefitinib (IRESSA, ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3 activation. *J cancer Res Clin Oncol* 130: 604-614, 2004
5. Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Viganò L, Fumagalli M, Menard S, Gianni L: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in Breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor(EGFR) tyrosin kinase inhibitor ZD1839('Iressa') is independent of EGF Expression level. *J cell Physio* 198: 259-268, 2004

6. Chang G, Hsu S, Tsai J, Liang F, Lin S, Sheu G, Chen C: Molecular mechanism of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem. Pharm* 68: 1453-1464, 2004
8. Chen X, Lowe M, Keyomarsi K: UCN-01 mediated G1 arrest in normal but not tumor breast cells is pRb-dependent and p-53 independent. *Oncogene* 18: 5691-5702, 1999
9. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatigo G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G: Antitumor effect and proliferation of cytotoxic drugs activity in human cancer cell by ZD1839(Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 6: 2053-2063, 2000
10. Chu S, Chiou H, Chen P, Yang S, Hsieh Y: Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Mol Carcino* 40: 143-149, 2004
11. Coqueret O: New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trend Cell Biol* Feb 13(2): 65-70, 2003
12. Danehoit B: A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88: 585-588, 1997

13. Duffy MJ, Dugan C: The urokinase plasminogen activator system; a rich source of tumour markers for the individualized management of patients with cancer. *Clinical Biochemistry* 37: 541-548, 2004
14. Gennaro ED, Barbarino M, Bruzzese F, Lorenzo SD, Caraglia M, Abbruzzese A, Avallone A, Comella P, Caponigro F, Pepe S, Budillon A: Critical role of both p27^{KIP1} and p21^{CIP1/WAF1} in the antiproliferative effect of ZD1839('Iressa'), an epidermal growth factor receptor tyrosin kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physio* 195: 139-150, 2003
15. Giles KM, Daly JM, Beveridge DJ, Thomson AM, Voon DC, Fureneaux HM, Juzuyeri LA, Leedman PJ: The 3'-untranslated region of p21 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(c)-binding protein. *J Biol Chem* 287: 2937-2946, 2003
16. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ: Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90: 824-832, 1998
17. Gopfert, U, Kullmann, M, Hengst, L: Cell cycle-dependent translation of p27^{KIP1} involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF. *Hum Mol Genet* 12: 1767-1779, 2003

18. Guerrero J, Santibaez JF, Gonzalez A, Martinez J: EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases. *Exp Cell Res* 292: 201-208, 2004
19. Hall SF, Groome PA, Rothwell D: The impact of comorbidity on the survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 22: 317-322, 1999
20. Hood JK, Silver PA: In or out? Regulating nuclear transport. *Current opinion in Cell Biology* 11: 241-247, 1999
21. Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM: Dual-Agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. *Cancer Res* 64: 5355-5362, 2004
22. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thum MJ: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 53: 5-26, 2003
23. Jo M, Thomas KS, Wu L, Gonias SL: Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits cancer cell growth and invasion by direct urokinase-independent effects on cell signaling. *J Biol Chem* 279(47): 46692-46698, 2003
24. Jo M, Thomas KS, O'Donnell DM, Gonias SL: Epidermal Growth

Factor Receptor-dependent and -independent Cell-signaling Pathways Originating from the Urokinase Receptor. *J Biol Chem* 278: 1642-1646, 2003

25. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49: 8-31, 1999

26. Laskin JJ, Sandler AB : Epidermal growth factor receptor:a promising target in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* 30: 1-17, 2004

27. Li J, Kleeff J, Giese N, Bhler MW, Korc M, Friess H, (Heidelberg, Germany; Lebanon, NH, USA) inter.: Gefitinib ('Iressa', ZD1839), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth, invasion, and colony formation. *J Oncol* 25: 203-210, 2004

28. Mahabeleshwar GH, Das R, Kundu GC:Tyrosine Kinase, p56/ck-induced Cell Motility, and Urokinase-type Plasminogen Activator Secretion Involve Activation of Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular Signal Regulated Kinase Pathways. *J Biol Chem* 279: 9733-9742, 2004

29. Mamoune A, Kassis J, Kharait S, Kloeker S, Manos E, Jones DA, Wells A: DU145 human prostate carcinoma invasiveness is modulated by urokinase receptor (uPAR) downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. *Exp Cell Res* 299: 91-100, 2004

30. Millard SS, Vidal A, Markus M, Koff A: A U-rich element in the 5'

untranslated region is necessary for the translation of p27^{KIP1} mRNA. *Mol Cell Biol* 20(16): 5947–59, 2000

31. Mohan S, Epstein JB: Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncology* 39: 537–546, 2003

32. Nakielny S, Dreyfuss G: Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677–690, 1999

33. Nutt JE, Lazarowicz HP, Mellon JK, Lunec J: Gefitinib('Iressa', ZD1839) inhibits the growth response of bladder tumour cell lines to epidermal growth factor and induces TIMP2. *Br J Cancer* 90: 1679–1685, 2004

34. O-charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA: Epidermal Growth Factor-like Ligands Differentially Up-Regulate Matrix Metalloproteinase 9 in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res* 60: 1121–1128, 2000

35. O-charoenrat P, Wongajornsilp A, Rhys-Evans PA, Eccles SA: Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*: 174–183, 2004

36. Patel V, Lahusen T, Leethanakul C, Igishi T, kremer M, Quintanilla-Martinez L, Enseley JF, Sausville EA, Gutkind JS, Senderowicz

AM: Antitumor activity of UCN-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin D3 and p27(kip1). *Clin Cancer Res* 8: 3549-3560, 2002

37. Paterson IC, Matthews JB, Huntly S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, Prime SS: Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 193: 458-467, 2001

38. Pines J: Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature Cell Biology* 1: 73-79, 1999

39. Rhee JC, Khuri FR, Shin DM: Advances in Chemoprevention of Head and Neck cancer. *Oncologist* 9: 302-311, 2004

40. Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, Bates SE: P21-dependent G(1) arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* 83: 817-825, 2000

41. Sgambato A, Camerini A, Faraglia B, Ardito R, Bianchino G, Spada D, Boninsegna A, Vincenzo V, Cittadini A: Targeted inhibition of the epidermal growth factor receptor-tyrosin kinase by ZD1839('Iressa') induces cell-cycle arrest and inhibits proliferation in prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 201: 97-105, 2004

42. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: "field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*: 963-968, 1953
43. Sporn MB, Roberts AB: Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313(28): 745-747, 1985
44. Sturgis EM, Miller RH: Second primary malignancies in the head and neck cancer patient. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 946-954, 1995
45. Swanton C: Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* 5(1): 27-36, 2004
46. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408(16): 307-310, 2000
47. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM: Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328: 184-194, 1993
48. Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Wang R, Adam L, Papadimitrakopoulou V, Clayman G, El-Naggar A, Lotan R, Barnes CJ, Hong WK, Kumar R: The Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) Suppresses c-Src and Pak1 Pathways and Invasiveness of Human Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 10: 658-667, 2004

ABSTRACT

A tyrosine kinase inhibitor(ZD1839) for epidermal growth factor receptor suppresses the proliferation and invasion of human oral squamous cell carcinoma

Jinha Whang

*Departments of Oral Pathology,
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Prof. Jin Kim D.D.S., Ph.D.)

It is well known that the imbalance between epithelial cell growth and inhibitor factors may cause human epithelial cancer. Over-expression of the epidermal growth factor receptor(EGFR) has been implicated in the development of oral squamous cell carcinoma. Oral squamous cell carcinomas(OSCCs) are characterized by a marked propensity for local invasion and dissemination to cervical lymph nodes. ZD1839 inhibits selectively the EGFR tyrosine kinase activity and is clinically used for cancer patients. However the mechanisms by which it exerts its anti-tumor activity remains unclear. This study attempted to determine the mechanisms underlying the effects of ZD1839 on the cellular level and to characterize the effects of ZD1839 with regard to human oral

squamous cell carcinoma(OSCC) cell growth and invasion/migration. The YD-10B cell line established from OSCC in the department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry and ZD1839(Iressa) were used for this study.

The results were as follows;

1. The inhibition of cell proliferation induced by ZD1839 was reversible and the lowest dose of ZD1839 that produced statistically significant growth inhibition in YD-10B cells was 0.1 μ M. IC 50 as observed in 10 μ M.
2. The delay in cell cycle progression was induced by 0.1 μ M of ZD1839 treatment after 48 hr or 1 μ M of ZD1839 treatment after 24 hr.
3. The increases in the levels of p27^{KIP1} and p21^{CIP1/WAF1} was induced by 0.1 μ M of ZD1839 treatment.
4. The expression of hnRNP C was significantly increased by ZD1838 treatment.
5. The active MMP-2 and MMP-9 were decreased following ZD1839 treatment and enzyme activity of MMP-2 and MMP-9 were approximately 25~40% lower and decreased in a dose-dependant manner.
6. The mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 were gradually

decreased 50~70% by 0.1 μ M of ZD1839 treatment.

7. The mRNA expression of uPAR was significantly lowered up to 60% by 0.1 μ M of ZD1839 treatment and this level of uPAR decreased in a dose-dependant manner.

The current *in vitro* study indicates that the inhibition of proliferation and invasion/migration in YD-10B cell lines by ZD1839 results in an anticancer effect via multiple cellular and molecular mechanisms, and suggests that ZD1839 may be useful in inhibiting and/or preventing metastasis.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, ZD1839, cell cycle arrest, p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, hnRNPC1/C2, MMP-2, MMP-9, uPAR