

BBN으로 유발된 생쥐의 표재성 방광암에서 Glyceryl Monooleate (GMO)-Paclitaxel 제형의 방광 내 주입의 항암효과

Anticancer Activity of Intravesical Glyceryl Monooleate (GMO)-Paclitaxel Therapy in Murine Superficial Transitional Cell Carcinoma Model Induced by BBN

Hyun Sop Choe, Sae Woong Kim, Yong-Hyun Cho

From the Department of Urology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: Paclitaxel, on systemic administration, is widely known to be effective in the treatment of bladder cancer. However, the intravesical use of paclitaxel has not been attempted because of its liposolubility and direct toxicity to the bladder mucosa. The purpose of this study was to evaluate the efficacy and toxicity of paclitaxel-loaded glyceryl monooleate (GMO) in the intravesical treatment of superficial bladder cancer, by enhancing its bioadhesiveness and bioavailability.

Materials and Methods: 12 mice were divided into two groups, and bladder carcinomas induced by the addition of 0.05% BBN to their drinking water for 12 weeks. Group 1 received an intravesical instillation of 0.1ml GMO-paclitaxel-free buffer and Group 2 an intravesical instillation of 0.1ml GMO-paclitaxel. On day 21, the tumor incidence, bladder weight and toxicity were evaluated.

Results: The incidence of cancer in groups 1 and 2 were 83 and 17%, respectively. The incidence of cancer was significantly reduced in group 2 compared to group 1 ($p < 0.05$). There was a tendency for the average bladder weight in group 1 to be heavier than that in group 2, but there was no significant difference ($p = 0.375$). There were no liver, kidney or bone marrow toxicities in either group.

Conclusions: Intravesical GMO-paclitaxel therapy may have an inhibitory effect on the growth of superficial bladder cancer in a BBN-induced bladder cancer model; therefore, it could potentially be used in those patients showing little to no response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) or other anticancer drug therapies. (Korean J Urol 2006; 47:1155-1160)

Key Words: Paclitaxel, Intravesical administration, Bladder cancer

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 11 호 2006

가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실

최현섭 · 김세웅 · 조용현

접수일자 : 2006년 6월 5일
채택일자 : 2006년 7월 25일

교신저자: 김세웅
가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실
서울시 영등포구 여의도동
62번지
☎ 150-713
TEL: 02-3779-1227
FAX: 02-761-1626
E-mail: ksw1227@catholic.ac.kr

서론

이행세포 방광암 중 표재성 방광암이 약 70%를 차지하며 이것의 표준 치료는 경요도절제술 후 방광 내 면역 혹은 화학요법을 시행하는 것이다. 이러한 표재성 방광암의 치료에는 경요도절제술로 많은 수가 치료되지만 재발의 가능성이 높다는 문제점이 있다. 병변의 다발성과 병기 등에 따라 차이는 있지만 표재성 방광암은 초기 치료 후 5년 이내에 2/3가 재발한다고 알려져 있다. 이러한 종양의 재발을

막기 위해 현재 Bacillus Calmette-Guerin (BCG)의 방광 내 단독면역치료나 다른 여러 항암제의 방광 내 주입이 사용된다.¹⁻³ 방광 내 약제 주입은 약제와 종양의 직접적인 접촉이 가능하고 전신적인 독성이 최소화된 상태에서 매우 높은 약물농도를 유지할 수 있는 장점이 있다.

표재성 방광암의 치료와 예방 면에서 BCG를 이용한 방광 내 면역치료가 가장 효과적인 것으로 알려져 있으나^{4,5} 치료 후 재발률이 30-50% 정도이며 발열, 육아종성 전립선염, 혈뇨, 폐렴, 패혈증, 과민반응 등의 부작용이 발생할 수 있는 문제점이 있다.⁶ 따라서 다른 여러 약제의 방광 내 주

입 요법이 시도되고 있는 실정이다.

최근 많이 사용되고 있으며 광범위 항암작용을 가지고 있는 paclitaxel은 diterpene 합성물로 pacific yew tree, *Taxus brevifolia*의 껍질로부터 분리되며 수많은 paclitaxel의 유사체가 반 합성 방법으로 만들어졌다. 이것은 암세포의 DNA와 RNA의 합성에는 영향을 주지 않고 DNA 분자 자체에도 손상을 주지 않으면서 선택적으로 microtubule에 작용하여 중합되었던 microtubule이 탈중합되는 것을 방해함으로써 암세포를 세포분열 중기에 멈추게 한다. 그러나 paclitaxel은 물에 잘 녹지 않아 충분한 항암효과를 나타낼 용량의 방광 내 주입이 힘들고, FDA승인을 받은 polyoxyethylated castor oil (Cremophor[®])과 ethanol 혼합체인 Taxol[®]은 방광 내 침투에 어려움이 있으며, 방광 점막에 독성이 있는 것으로 보고되고 있다.

최근 생체흡착력 (bioadhesiveness) 또는 생체이용률 (bioavailability)이 높은 고효율의 약물전달체계를 가진 제형들이 소개되고 있는데, 그중 주목받는 물질이 glyceryl monooleate (GMO)이다. GMO는 올레인산의 혼합물로 수분을 많이 포함하면 입방체를 이루는데, 특히 생체의 점막에 대한 흡착력이 뛰어나다.⁷ 이를 이용하여 paclitaxel의 요로상피 흡수율을 높인 paclitaxel-loaded lipid nanoparticle (GMO-paclitaxel) 제형이 표재성 방광암의 치료와 예방에 응용되기 위한 연구가 활발한 실정이다.⁸⁻¹⁰

이에 본 연구에서는 GMO-paclitaxel 제형의 방광 내 주입 효과를 평가하고자 종전의 화학약제 또는 소작법으로 유발시킨 방광암 모델에 비해 내분비적, 면역학적 관점에서 볼 때 실제 임상적 상태와 가장 유사하여 종양의 증식이나 치료효과 판별에 용이한 BBN 경구 투여로 유발된 생쥐의 표재성 방광암 모델을 준비하였다. 이를 통해 표재성 방광암에 대한 GMO-paclitaxel 제형의 효과 및 독성을 평가하여 향후 임상에서 표재성 방광암의 재발방지를 위한 방광 내 약제 주입술의 기초자료로 활용하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 생후 6-8주된 암컷 Balb-c 생쥐 12마리를 사용하였다. 실험동물의 적응을 위해 1주일간 동일한 조건으로 사육한 후 무작위로 2개 집단으로 나누었고 각 집단은 6마리씩 구성하였다.

2. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticle (GMO-paclitaxel) 제조

지질친화성이 있는 paclitaxel을 가용화하여 방광에 잘 흡

수될 수 있도록 하는 새로운 제형을 만들기 위해 모노글리세라이드 계통의 monoolein 1g과 기름성분인 tricaprylin (oil containing saturated medium-chain fatty acids) 0.5g, 유화제인 Tween[®] 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) 0.3g을 40°C로 가열하여 완전히 혼합하여 점성의 유성용액 (glyceryl monooleate; GMO)을 만든 후 paclitaxel 18mg을 첨가하고 bath형 sonicator에서 초음파처리하여 완전히 용해시켰다.

3. 종양 발생

생후 6-8주 된 Balb-c 생쥐에게 12주간 0.05%의 BBN [(N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan)을 0.05%의 농도로 식수에 희석하여 자유롭게 먹도록 하였다. BBN은 햇빛에 장기간 노출되면 폭발의 위험성이 있으므로 식수 병은 빛을 차단하였고 BBN을 투여하는 기간 동안 상기 식수 이외의 물은 공급하지 않았다. BBN 투여 12주 후에 모든 생쥐에게서 육안적 혈뇨가 발생함을 확인하였다.

4. 실험약물

실험대상 동물의 무게는 20gm으로 체표면적은 0.0066m²이며 Km factor는 3.0이다. 사람에서 정맥으로 투여할 때의 paclitaxel의 용량 175mg/m²을 참고로 대상 실험동물에 적용될 용량을 계산하여 혈중 목표 용량을 1.15mg으로 결정하였다. 기존 Lee 등⁸의 실험결과를 토대로 GMO-paclitaxel의 요상피 내 흡수되는 농도와 소변 내 약물농도의 비가 0.56 정도임을 감안하여, 본 실험에서는 방광 내 한 차례의 주입을 위한 GMO-paclitaxel의 최종 용량을 2.0mg/0.1ml로 결정하였다.

5. 방광 내 약물주입 protocol

BBN 경구 투여를 시작한 후 12주 뒤에 12마리를 대조군과 실험군으로 6마리씩 나누었다. 24 gauge Teflon 정맥 내 카테터 (Insyte-W[®], Becton Dickinson, Germany)를 윤활제 (Instilla Gel[®], Farco-Pharma, Germany)를 바른 상태에서 경요도로 카테터를 방광 내로 진입시킨 후 대조군 (Group I)에서는 0.1ml의 phosphate buffered saline (PBS)를 방광 내에 주입하고, 실험군 (Group II)에서는 0.1ml의 GMO-paclitaxel을 방광 내에 주입하였다. 약제가 방광 내에 오랫동안 머물러 있게 하기 위해서 주입 직후에 clamp를 시행하고 쥐가 깨어날 때까지 1시간 동안 유지하였다. 대조군 및 실험군에서 실험 시작 21일째에 종양발생률, 방광무게 측정, 그리고 독성을 관찰하기 위해 실험동물을 해부하였다.

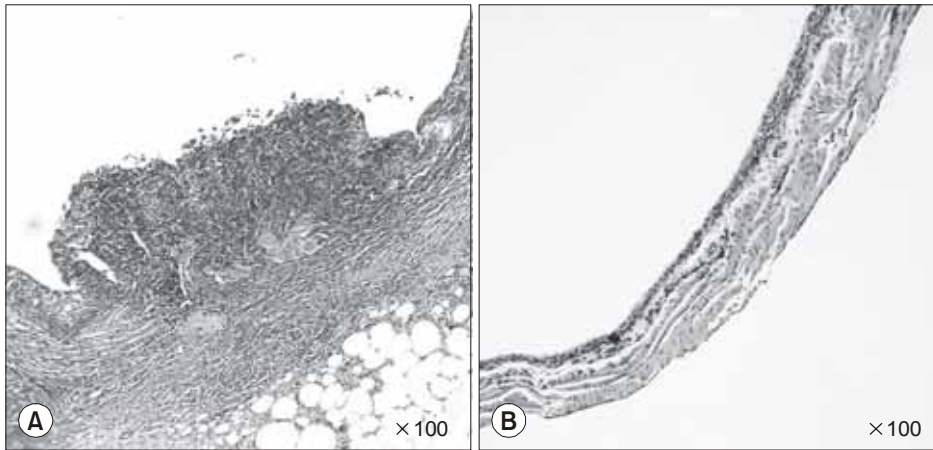


Fig. 1. Histological aspects of bladders from mice on day 21 after intravesical instillation therapy (A). The tumor growth in group I shows disrupted epithelium (H&E, x100). (B) No tumor growth is found in group II (H&E, x100).

Table 1. Effects of intravesical chemotherapy with glyceryl monooleate (GMO)-paclitaxel on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)-induced bladder cancer

	Tumor growth (%)	Ta or lower stage (%)	Tumor weight (mg)
Group I	5/6 (83)	4/5 (80)	89.2±21.5
Group II	1/6 (17)*	1/1 (100) [†]	82.6±9.1 [‡]

* $p < 0.05$, chi-square test, [†] $p > 0.05$, chi-square test, [‡] $p = 0.375$, Mann-Whitney-U-test

6. 통계처리

방광무게는 Mann-Whitney-U-test를 이용한 통계분석을 시행하였다. 종양의 증식과 병기는 chi-square test를 이용하여 분석하였다. 통계학적 의의는 $p < 0.05$ 인 경우 유의하다고 판정하였다. 통계분석을 위해서 SPSS[®] for Microsoft Windows[®]를 사용하였다.

결 과

1. 방광 내 종양 발생

대조군 (Group I)에서는 현미경검사상 83% (5/6)에서 방광암이 관찰되었으며, 17% (1/6)에서 이행상피의 형성이상 (dysplasia)이 확인되었다. 실험군 (Group II)에서는 17% (1/6)에서만 방광암이 관찰되어 통계학적 차이를 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

2. 종양 병기

대조군 (Group I)에서는 80% (4/5)에서 Ta 또는 더 낮은 병

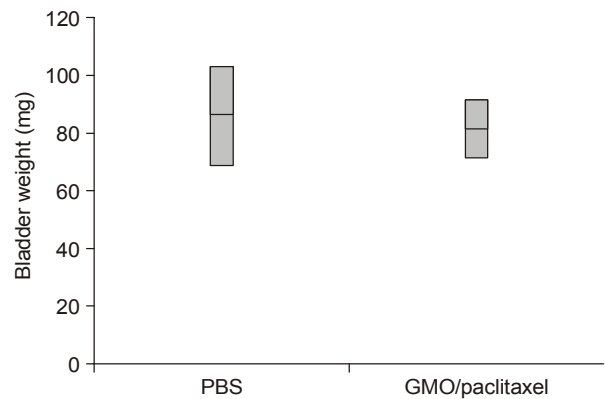


Fig. 2. Effect of intravesical glyceryl monooleate (GMO)-paclitaxel on the urinary bladder weight. The bladder weight distribution is presented. The black line inside the box identifies the group median. The glyceryl monooleate (GMO)-paclitaxel treatment group shows a lower mean value, but there are no significant differences between the two groups ($p = 0.375$, Mann-Whitney-U-test). PBS: phosphate buffered saline.

기가 관찰되었고 20% (1/5)에서 T1 이상의 병기가 나타났다. 종양 중 방광 외로 진행된 경우는 없었다. 실험군 (Group II)에서는 100% (1/1)에서 Ta 또는 더 낮은 병기가 관찰되었고 T1 이상의 병기는 관찰되지 않았다. 두 군 간의 유의한 통계학적 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

3. 방광무게

대조군의 평균 방광무게는 89.2±21.5mg이었고 실험군의 평균 방광무게는 82.6±9.1mg이었다. 비록 대조군의 평균 방광무게가 실험군에 비해 무겁게 측정되었지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 ($p = 0.375$) (Table 1) (Fig. 2).

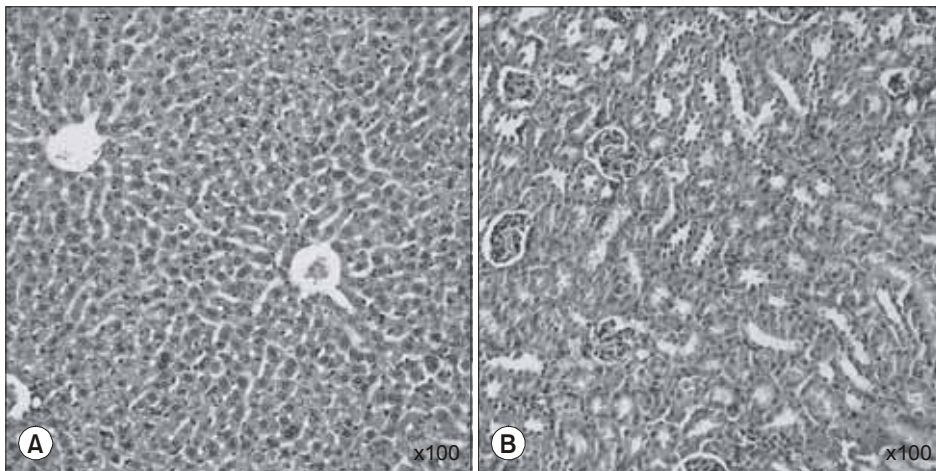


Fig. 3. Histological findings of the liver (A) and kidney (B) from a mouse after intravesical instillation of glyceryl monooleate (GMO)-paclitaxel show neither abnormality nor toxicity (H&E, x100).

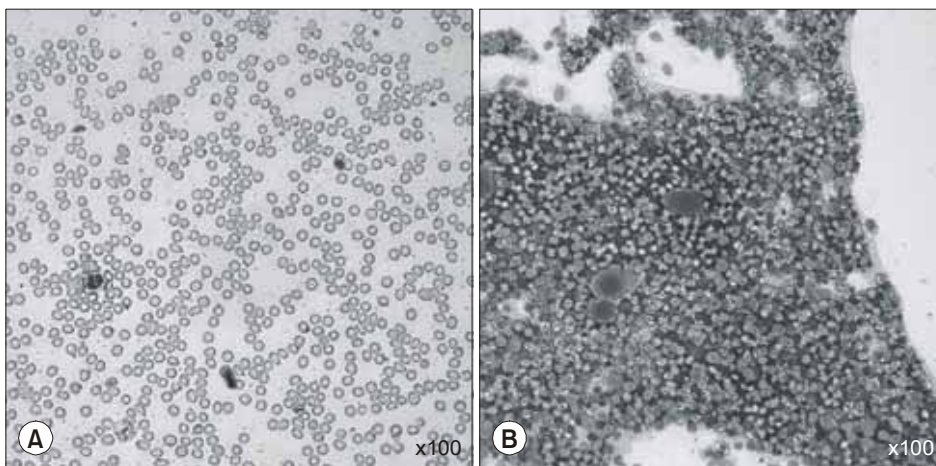


Fig. 4. Peripheral blood (A) and bone marrow (B) from a mouse after intravesical instillation of glyceryl monooleate (GMO)-paclitaxel show neither abnormality nor toxicity (H&E, x100).

4. 조직학적 소견 및 약물독성 관찰

해부된 쥐의 간 및 신장의 조직학적 검사 결과 대조군과 비교하여 방광 내 GMO-paclitaxel을 주입한 군에서 유의한 형태학적 변화는 관찰되지 않았으며 (Fig. 3), 말초혈액 및 대퇴부에서 추출한 골수 검사에서도 정상적인 세포충실도와 정상 myeloid:erythroid 비율을 보였다 (Fig. 4).

고 찰

방광암은 한국에서 비뇨기계 암 중 가장 흔하게 발생한다.¹³ 방광암에 대한 전통적인 치료방법은 경요도적 방광종양절제술이다. 그러나 field cancerization으로 인하여 치료 후 50-70%에서 재발하기 때문에 주기적인 추적조사가 필수적이며, 재발 방지를 위한 여러 보조적 치료제가 동물모델에서 많이 연구되어 왔다.¹⁴ 동물 모델에는 암세포주의 동소

성 생쥐방광암모델과 화학약제 유발 방광암 모델이 있으며 화학약제 유발 방광암 모델에 쓰이는 화학약제에는 주로 경구로 투여되는 N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT)와 BBN, 그리고 방광 내로 주입하는 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 등이 사용된다.^{15,16} 그 중에서 BBN은 1960년대에 소개된 것으로 설치류와 개의 요로상피에만 선택적으로 방광암을 유발하는 것으로 알려져서 현재까지 요로상피계 종양연구에 많이 사용되고 있다. BBN에 의한 이행세포암 발생은 실제 임상과 유사한 진행을 보이며 침윤성 방광암으로 진행하는 데 수개월이 필요하여 표재성 방광암을 연구하는 데 유용하다는 장점이 있다. 그러나 암 발생률이 떨어지며 암 발생까지 오랜 기간이 필요하고 방광 내 여러 장소에서 증식과 종양이 동시에 발생하여 비교하기 어렵다는 단점이 있다.¹⁷ 하지만 BBN의 농도가 진하고 투여기간이 길수록 방광암의 발생률이 높아지고 암 유발기간이 짧아지며 실험동물의 종류와 크기에 따라서도 발생률

과 유발기간에 차이를 나타내는 특성이 있다.^{18,19} 본 연구에서 0.05%로 희석된 BBN을 평균 무게 20gm인 흰쥐에 12주간 경구 투여하여 실험 15주에 80%에서 이행세포암이 발생됨을 확인하였다. 따라서, BBN 유도 방광암 모델에서 BBN의 농도를 높이고 적절한 실험동물을 선택한다면 암 발생률을 높이고 암 발생까지의 기간을 단축할 수 있을 것으로 생각되며 방광암 특히 표재성 방광암과 관련된 연구에 있어 동소성 생쥐방광모델보다 효용 가치가 높을 것으로 생각한다.

임상적으로 표재성 방광암의 치료와 예방 면에서 BCG를 이용한 방광 내 면역치료가 가장 효과적인 치료이나^{4,5} 장기간의 추적관찰 결과 BCG치료를 받은 고위험군의 표재성 방광암에서 종양의 진행과 전이의 위험을 보이며,⁶ 또한 방광 내 BCG 주입치료는 심각한 이환율과 사망률이 보고되고 있다.⁵ 이에 따라 BCG를 대체할 만한 방광 내 주입 항암제로 thiotepa, doxorubicin, mitomycin-C, epirubicin 등이 시도되고 있으나,^{1,3} 단기적으로 종양의 재발을 감소시킬 뿐이며 종양의 재발을 억제하거나 생존율을 향상시키지는 못하는 것으로 알려져 있다.

최근 많이 사용되고 있으며 광범위 항암작용을 가지고 있어 방광암의 전신적 치료에도 이용되고 있는 paclitaxel은 물에 잘 녹지 않아 방광 주입 약제로서의 한계가 지적되었으나 생체흡착력을 높인 GMO와의 결합체가 소개되어 이에 대한 연구가 활발하다. GMO는 그 뛰어난 생체점착성 때문에 이미 효과적이면서 조절 가능한 약물전달체제로 피부나 장관점막에서 이용되고 있다.^{9,10} 또한 최근 전립선암, 방광암 등의 실험모델에서도 GMO가 경구용 항암제의 효과를 증대시킨다는 보고가 있으며,^{11,12} 방광 내 주입 시 기존의 Taxol[®] 제형보다 방광점막에 점착력이 우수해 방광조직 내로의 약물흡수가 더 뛰어난 것으로 보고되었다.⁸ GMO는 oleic acid의 glycerides와 다른 지방산들의 혼합물로, 주로 monooleate를 이루며, 물을 포함하는 함량에 따라 여러 가지 다른 양상의 액상 결정체를 이룬다.⁷ GMO는 체온에서 물과 접촉하면 결정모양이 입방체로 변하게 되는데, 이러한 입방체의 GMO는 수분을 함유하지 않을 때의 층형 결정체보다 점착력이 증가하여 특히 장관이나 방광과 같은 항상 수분을 함유하고 있는 기관에서 큰 효과를 기대할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 약물역동학을 바탕으로, 생쥐에게 실제 임상적 상태와 유사하도록 BBN을 경구 투여함으로써 표재성 방광암을 유발시킨 후 GMO-paclitaxel의 방광 내 주입요법을 적용하였는데, 그 결과 방광암의 발생이 실제로 억제됨을 확인할 수 있었다. 또한 전신적인 독성이나 부작용 여부를 판단하기 위해 간, 신장, 혈액, 골수의 검체를 확

인하였으나 특별한 이상을 발견할 수 없었다. 이는 GMO/paclitaxel의 방광 내 주입요법이 약제와 종양의 직접적인 접촉이 가능하고 전신적인 독성이 최소화된 상태에서 매우 높은 약물농도를 유지할 수 있는 가능성을 확인하는 결과라고 생각한다.

결 론

GMO-paclitaxel은 BBN으로 유발된 생쥐의 표재성 방광암에서 독성이나 부작용 없이 뚜렷한 항암효과를 나타냈다. 본 실험의 결과를 토대로 향후 표재성 방광암에 있어서 paclitaxel 이외의 다른 항암제들과도 GMO와 같은 lipid-nanoparticle을 결합시켜 이를 방광 내로 주입함으로써 항암 효과 및 재발억제 효과를 증대시킬 수 있으리라는 가설이 가능하며 본 실험이 향후 이에 대한 연구들의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 덧붙여 임상적으로 이러한 chemo-therapeutic agent-loaded lipid-nanoparticle 제제가 기존의 방광 내 주입 치료의 대체제로 사용될 수 있도록 하기 위해 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Lamm DL. Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1992;19:573-80
2. Traynelis CL, Lamm DL. Current status of intravesical therapy for bladder cancer. In : Rous SN, editor. *Urology annual*. East Norwalk: Appleton & Lange; 1994;113-43
3. Badalament RA, Farah RN. Treatment of superficial bladder cancer with intravesical chemotherapy. *Semin Surg Oncol* 1997;13:335-41
4. Nadler RB, Catalona WJ, Hudson MA, Ratliff TL. Durability of the tumor free response for intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol* 1994;152:367-73
5. Nseyo UO, Lamm DL. Immunotherapy of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* 1997;13:342-9
6. Herr HW. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15-year outcome. *Br J Urol* 1997;80:762-5
7. Engstrom S, Norden TP, Nyquist H. Cubic phases for studies of drug partition into lipid bilayers. *Eur J Pharm Sci* 1999;8:243-54
8. Lee SJ, Chung CE, Kim SE, Lee CB, Kang SH, Cho YH, et al. Efficacy of paclitaxel-loaded bioadhesive drug delivery system based on glyceryl monooleate nanoparticle in an orthotopic murine bladder cancer model. *Korean J Urol* 2004;45:817-22
9. Helledi LS, Schubert L. Release kinetics of acyclovir from a suspension of acyclovir incorporated in a cubic phase delivery

- system. *Drug Dev Ind Pharm* 2001;27:1073-81
 10. Longer M, Tyle P, Mauger J. A cubic-phase oral drug delivery system for controlled release of AG337. *Drug Dev Ind Pharm* 1996;22:603-8
 11. Lee CH, Sohn DW, Kim HS, Lee SJ, Cho YH, Yoon MS, et al. The anticancer efficacy and toxicity of oral paclitaxel-loaded lipid nanoparticle in a C3H2 bladder cancer mice. *Korean J Urol* 2005;46:854-60
 12. Kim DB, Jang J, Cho YH, Yoon MS, Chung HS, Park YT, et al. Anticancer efficacy and toxicity of oral GMO-paclitaxel in a hormone refractory prostate cancer model. *Korean J Urol* 2006;47:143-9
 13. Lee C, Lee ES, Choi H, Koh SK, Lee JM, Chai SE, et al. Incidence estimation of genitourinary cancer in Korea. *J Korean Med Sci* 1992;7:154-61
 14. Lee SC. Intravesical therapy for superficial bladder cancer: advances and future. *Korean J Urol* 2000;41:467-79
 15. Steinberg GD, Brendler CB, Squire RA, Isaacs JT. Experimental intravesical therapy for superficial transitional cell carcinoma in a rat bladder tumor model. *J Urol* 1991;145:647-53
 16. Fukushima S, Murasaki G, Hirose M, Nakanishi K, Hasegawa R, Ito N. Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol Jpn* 1982;32:243-50
 17. Bisson JF, Parache RM, Droulle P, Notter D, Vigneron C, Guillemin F. A new method of implanting orthotopic rat bladder tumor for experimental therapies. *Int J Cancer* 2002;102:280-5
 18. Ito N, Matayoshi M, Arai M, Yoshioka Y, Kamamoto Y. Effect of various factors on induction of urinary bladder tumors in animals by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 1973;64:151-9
 19. Kim HG, Park IA, Yeon WG, Yoon SJ, Byun SS, Lee ES, et al. Apoptosis and expressions of apoptosis-related proteins in rat bladder carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Korean Urol Oncol Soc* 2003;1:106-11
-