

신세포암 동물모델에서 전신적 면역치료와 동반한 국소 냉동요법의 항암 효과

Antitumor Effect of in Situ Cryoablation with Systemic Immunotherapy on Murine Renal Cell Tumor

Dong Sik Shin, Young Hwii Ko, Hoon Choi, Seok Ho Kang,
Jae Hyun Bae, Hong Seok Park, Du Geun Moon, Jun Cheon,
Duck Ki Yoon

From the Department of Urology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Purpose: To investigate synergistic effect of local cryoablation with systemic immunotherapy, the tumor control ability and immunologic responses of combining these two modalities was compared with that of cryoablation, surgical excision, and immunotherapy only group in a tumor re-challenge model.

Materials and Methods: Preliminary experiments were performed in two stages. The first stage consisted of 36 Balb/c mice with Renca bearing tumors imbedded in the right thigh, and was treated with interleukin-2 (IL-2) and interferon-alpha (IFN- α) to evaluate the efficacy of immunotherapy and to determine the adequate dosage. The second stage was performed on 10 mice, to evaluate histological changes and efficacy after cryoablation. The main experiment was performed on 48 mice, divided into 6 groups of control with tumor implantation, excision of tumor, excision combined with immunotherapy, cryoablation of tumor, cryoablation with immunotherapy and control without tumor. After treatment, tumor re-challenge was performed with Renca cell, then the growth pattern was evaluated with physical measurements, and immune response was investigated with fluorescent activated cell sorter and cytotoxicity assay.

Results: Preliminary studies on immunologic efficacy revealed that IL-2 and IFN- α have a dose dependent inhibition of tumor growth. The main experiment evaluating the efficacy of combination treatment revealed that cryoablation with immunotherapy proved to be most effective in terms of tumor recurrence and tumor growth inhibition, yet the difference was not statistically significant from monotherapy with cryoablation. However, cytotoxicity was significantly increased cryoablation with immunotherapy compared with other groups.

Conclusions: Cryoablation on tumor re-challenge mice model showed advantages with immunotherapy most prominently in cytotoxicity. (Korean J Urol 2008;49:965-973)

Key Words: Cryoablation, Immunotherapy, Renal cell carcinoma

대한비뇨기과학회지
제 49 권 제 11 호 2008

고려대학교 의과대학 비뇨기과학교실

신동식 · 고영희 · 최 훈
강석호 · 배재현 · 박홍석
문두건 · 천 준 · 윤덕기

접수일자 : 2008년 7월 1일
채택일자 : 2008년 9월 22일

교신저자: 윤덕기
고려대학교 의과대학
구로병원 비뇨기과
서울시 구로구 구로동 80번지
☎ 152-703
TEL: 02-2626-1310
FAX: 02-2626-1321
E-mail: dkyoon@korea.ac.kr

서 론

의학 발전에 따른 진단 기술의 향상으로 크기가 작은 저병기 신세포암의 발견이 많아지고 있으나, 진단 당시 이미

신세포암이 다른 부위로 원격 전이되어 있는 경우가 적게는 20%, 많게는 50%에 달한다.¹ 신장 내에 국한된 4cm 미만의 소신종물의 경우 부분 신절제술이 현재 표준적인 치료법으로 인정되고 있으나, 치료 후 1.4-10%에 달하는 재발률을 가지는 것으로 보고되고 있다.²⁻⁵ 이 경우 국소 재발은

대부분 절제된 원발 병소 주변이 아닌 신장 내 다른 부위에서 발생하는데, 이는 처음 진단 당시 인식하지 못한 종양의 다발성 (multicentricity)이나 새로운 종양의 발생 (de novo occurrence)에 의한 것이라 생각한다.⁶ 한편, 근치적 신절제술의 경우 재발률은 2-4%로 다소 낮게 보고되고 있으나, 임상적으로 신장 내에 국한된 신세포암이라 할지라도 신절제술 후 20-40%에서는 국소 또는 원격 전이로 재발된다.⁷ 이러한 전이성 신세포암은 방사선요법뿐 아니라 항암 화학요법에도 반응하지 않으며, 현재 임상적으로 사용되는 사이토카인 기반 면역요법의 반응률도 20% 미만에 불과하고, 그나마도 원발 병소에 대해서는 거의 반응하지 않는다.⁸

신세포암에 대한 냉동수술은 1974년 동물 실험을 통해 처음 보고된 후 1995년부터 임상적으로 적용되고 있다.⁹ 이 치료법은 장비의 발전과 더불어 현재는 소신종물의 치료에서 부분신절제술과 유사한 종양 치료 효과를 보여주면서도 출혈량과 수술시간을 단축시켜 신보존술식의 또 다른 대안으로 부상하고 있다.¹⁰ 냉동수술은 삼투성 탈수와 세포 내 얼음 결정 형성, 그리고 국소 허혈에 의한 중심부의 세포괴사 (necrosis)와 더불어 주변부에서는 세포자연사 (apoptosis)를 일으킨다는 점 외에도,¹¹ 원발 병소에서 멀리 떨어진 병소의 종양 퇴화를 유발할 수 있다는 점에서 면역학적인 작용 기전을 가지고 있을 것으로 추정되는데,¹² 항암 화학요법이나 방사선치료에 저항하는 특징을 가진 신세포암에서 인터루킨-2 (interleukin-2; IL-2)나 인터페론-알파 (interferon-alpha; IFN- α)를 이용한 면역치료가 일정한 임상적 성과를 거두고 있다는 점을 고려할 때, 면역학적 측면에서의 이들 간의 병합요법은 치료 효과의 상승 작용이 있을 것으로 기대된다.

이에 본 연구자는 동물 실험을 통해 전신적 면역치료와 동반한 국소적 냉동요법의 항암 효과를 평가하고, 이와 관련된 면역학적 작용 기전을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

생후 6주령의 수컷 마우스 Balb/c Cr Slc (중앙동물실험, 한국)를 이용하였다. 본 연구에서 시행된 모든 동물 실험은 미국 NIH의 동물 실험 원칙 (NIH Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals, USA)과 본교 동물 사육 및 실험 규정에 의하여 시행되었다.

2. Renca 세포주의 배양

Renca 세포는 실험쥐인 Balb/c종에서 자연적으로 유발된 면역성이 강한 신세포암 세포주이다. Renca 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하여 실험 전까지 10% DMSO+90%

FCS의 보관액 처리 하에 액화질소 내에서 냉동 보관하였다. 세포의 배양에는 도포되지 않은 6-well plate 및 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, USA)을 포함한 RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) 배양액을 사용했고, 세포는 37°C, 5% CO₂ 환경의 배양기에서 배양했다. 배양된 세포를 typan blue 색소배제법으로 생존세포수와 생존율을 측정하여 95% 이상의 단세포율과 90% 이상의 생존율을 확인하였고, 이를 10% 우태아 혈청과 혼합하여 단세포 부유액 0.1ml당 1×10^6 의 세포농도로 농축하여 실험동물의 대퇴부 피하에 주입하여 종양을 유발하였다.

3. 냉동수술

5% halothane을 이용한 실험쥐용 호흡기를 이용하여 마취 하에 종양부위에 1-2mm의 절개창을 만들었다. 종양의 크기에 맞춘 아크릴 판을 덮고 냉동기 (Cryo-Surg Frigotronics, USA)를 이용하여 -196°C로 10초간 급냉각시킨 후 다시 백열등 밑에서 60초간 천천히 해동시켰고, 이러한 냉동-해동 주기를 2회 반복하였다.

4. 조직학적 결과

냉동수술 시행 후 종양 제거의 효과를 파악하기 위하여 종양 부위를 피부와 근육층을 포함하여 절제한 후 10% 중성 포르말린에서 고정시키고 파라핀에 포매하여 절편을 얻었고, H&E 염색하여 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

5. 형광-활성 세포분류기 검사

각 실험군에서 면역 세포 활성화 및 항암성 사이토카인 생성 능력 증가를 확인하기 위하여 비장세포를 회수하여 형광-활성 세포분류기 검사를 시행하였다. 분석을 위한 단일항체 (monoclonal antibody)로는 쥐에 대한 CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1을 사용하였다. 비장 세포에서 분리한 림프구와 단일 항체를 각각 섞은 후 CD3, CD4, CD8은 30분간, CD19와 NK1.1은 1시간 동안 암실에서 반응시킨 다음, lysing solution (Optilyse C, Beckman Coulter, USA)을 500ul씩 각 tube에 섞고 다시 10분간 안정시킨 후 phosphate buffered saline (PBS) 3ml씩 섞었다. 5분간 원심분리 후 상층액을 다 버리고, 다시 PBS 500ul씩 섞은 후 형광-활성 세포분류기 (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, USA) 분석을 시행하였다.

6. Thymidine incorporation assay를 이용한 세포독성 검사

완전 배지에서 비장림프구는 5×10^6 세포/ml로 재부유시켜 작동 세포 (effector cell)로 사용하였다. 세포매개성 살해능

을 관찰하기 위해 Renca 세포를 표적 세포 (target cell)로 사용했다. 준비된 작동 세포와 표적 세포의 비율을 100:1, 33:1, 11:1, 3.7:1, 1.2:1, 0.4:1, 0.13:1이 되게 하고 배양했다. 5-24시간 후 세포의 분해 시에 DNA를 Vacusafe IH-280 harvester를 이용하여 유리섬유필터로 이식시키고, 방사선 활성의 상실도를 Wallac MicroBeta Liquid Scintillation Counter (1450 MicroBeta; Wallac Oy, Finland)를 이용하여 측정했다. 이후 아래의 공식에 따라 세포독성능을 계산하였다.

$$\% \text{ cytotoxicity} = [\text{CPM (counts per minute) spontaneous} - \text{CPM experiment} / \text{CPM spontaneous}] \times 100$$

7. 실험설계

1) Balb/c 실험쥐에서 Renca 세포주로 유발된 종양에 대한 면역치료의 항암 효과 및 적정 용량 확인: 면역치료와 냉동수술의 병합요법의 효과를 확인하기 위한 본 연구에서, 먼저 적절한 면역치료제의 용법과 용량을 결정하기 위한 실험을 실시하였다. Balb/c 실험쥐에서 유발된 신세포암인 Renca 세포주에 대한 면역치료로는 인체의 신세포암에 대한 치료로 가장 광범위하게 사용하는 IFN- α 와 IL-2를 이용했다. 기존의 문헌보고에서 Balb/c 실험쥐에 대한 면역치료로 사용된 IFN- α 와 IL-2의 용량을 참조하여,^{13,14} 총 36마리의 Balb/c 실험쥐를 6군으로 분류하고 농도별로 희석하여 0.1ml의 용량으로 만든 후 다음과 같이 투여하였다.

- 1군 - IL-2 1×10^4 units/day 투여
- 2군 - IL-2 5×10^4 units/day 투여
- 3군 - IL-2 1×10^5 units/day 투여
- 4군 - IFN- α 1×10^4 units/day 투여
- 5군 - IFN- α 5×10^4 units/day 투여
- 6군 - IFN- α 1×10^5 units/day 투여

모든 Balb/c 실험쥐에서 좌측 대퇴부에 10% 우태아 혈청 0.1ml에 농축된 1×10^6 의 Renca 세포주를 주입하여 종양을 유발하고, 유발된 종양이 3x3mm의 크기에 이르렀을 때 4일간 연속하여 복막 내 주입으로 각 면역치료 물질을 주입한 후, 21일간 종양의 성장과 체중의 변화 및 사망률을 확인하였다. 종양의 성장이 가장 적으면서도 체중의 변화가 적은 용량을 냉동수술과의 병합 요법을 위한 최종적인 용량으로 선정했다.

2) 냉동수술의 종양제거 효과의 확인: 수술장 내 초음파 및 수술 부위의 온도 측정을 통해 반응의 정도를 실시간으로 확인할 수 있는 임상적 냉동수술과는 달리, 동물 실험에서는 냉동수술의 효과를 즉시 확인할 수 없고, 잔존 종양이

있을 시 동반된 면역치료에 영향을 줄 수 있으므로 실험동물에 대한 냉동수술의 적절성을 확인해보기 위한 실험을 먼저 진행하였다. 10마리의 실험쥐에서 Renca 세포주를 이용하여 3x3mm 크기의 종양을 좌측 대퇴부에 생성시킨 다음, 냉동수술을 시행하고 각 5마리씩을 각각 술 후 2일째와 7일째에 희생시켜 조직 검사를 시행하였다.

3) 종양재주입 모델에서 냉동수술과 면역치료와의 병합요법의 효과에 대한 대조 실험 및 분자생물학적 분석: 총 48마리의 실험동물을 6군으로 분류하고 각 군당 8마리를 할당했다. 1군은 종양 유발 후 치료받지 않은 대조군, 2군은 종양 유발 후 수술적 제거군, 3군은 종양 유발 후 수술적 제거와 면역치료의 병합요법군, 4군은 종양 유발 후 냉동치료군, 5군은 종양 유발 후 냉동치료와 면역치료의 병합요법군, 6군은 종양을 유발하지 않은 대조군으로 구분하였다. 6군을 제외한 모든 군에서 좌측 대퇴부에 준비된 Renca 세포주를 피하로 주입하고 종양의 최장경이 3x3mm 크기로 성장했을 때, 각 군별로 치료를 시행하였다. 병합요법군인 3군과 5군에서 면역치료는 앞서의 예비 실험에서 결정된 용량의 IL-2와 IFN- α 를 모두 투입하였다. 치료가 끝나고 14일이 경과한 후에 6군을 제외한 모든 군에서 우측 대퇴부에 Renca 세포주를 동일한 용량으로 피하 주입하였고 이후 각 군에서 양측의 종양의 크기를 vernier calipers를 사용하여 매일 측정하였다. 종양의 크기는 장경x단경x두께x0.5236의 공식을 이용해 산출했다. 종양의 재주입 후 15일이 경과했을 때 모든 실험동물을 희생하였고, 비장을 적출하여 형광-활성 세포분류기 검사와 thymidine incorporation assay를 이용한 세포독성검사를 시행하였다.

8. 통계 처리

면역제제의 치료 효과와 용량 결정을 위한 실험에서는 IL-2와 IFN- α 투여군에서 각각의 용량에 따른 종양 성장의 차이를 Kruskal-Wallis test로 검정하고 다시 Mann-Whitney U test로 각 군들을 비교하였다. 종양재주입 모델에서 각 치료법에 따른 재발률의 차이는 chi-square test로, 종양성장률의 차이는 Kruskal-Wallis test로 유의성을 확인 후 Mann-Whitney U test로 병합요법군과 단독요법군의 결과를 비교하였는데, 형광-활성 세포분류기 검사와 세포독성검사에서도 종양성장률과 동일한 분석을 시행하였다. 통계 분석을 위한 프로그램으로는 SPSS for Windows (Ver. 12)를 사용하였고, 모든 검정에서 p값이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Balb/c 실험쥐에서 Renca 세포주로 유발된 종양에 대한 면역치료의 항암 효과 및 적정 용량 확인

21일간 상이한 용량의 면역치료를 시행했을 때, IL-2 투여군과 IFN- α 투여군 모두 용량 의존적으로 유의한 종양 성장의 차이를 보였다 ($p < 0.05$, by Kruskal-Wallis test). 특히 IL-2 투여그룹은 실험 10일째부터 1×10^5 units를 사용한 3군은 1×10^4 units를 사용한 1군에 비해, IFN- α 투여군에서는 실험 19일째에 1×10^5 units를 사용한 6군은 1×10^4 units를 사용한 4군에 비해 유의한 종양성장의 차이를 나타냈다 ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) (Fig. 1). 체중에 있어서는 IL-2를 사용한 군과 IFN- α 를 사용한 군 모두 세 용량 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test). 21일간의 실험 기간 동안 3군을 제외한 모든 군에서 각 한 마리씩의 실험동물이 사망하였는데, 각 군에 따른 사망률에 있어서 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$, chi-square test). 이상의 결과를 통해 실험동물에서 향후 각 면역치료제제의 적절한 효과 용량은 IL-2에서는 1×10^5 units로, IFN- α 의 경우도 1×10^5 units로 결정할 수 있었다.

2. 냉동수술의 종양 제거 효과의 확인

냉동수술 후 2일째에 종양을 포함한 연변 절제 부위에 대해 조직검사를 시행하였다. 중심부에서 응고성 괴사 (coagulative necrosis) 소견을 보였고 (Fig. 2A), 중심 주변 부

위에서는 세포고사 (apoptosis)가 관찰되었으며 (Fig. 2B), 외측 주변부에서는 정상적인 Renca 세포가 관찰되었다 (Fig. 2C). 또한 모든 검체의 주변부에서 살아있는 종양 세포들을 관찰할 수 있었다.

술 후 7일째에 시행한 조직검사에서 중심부에서 응고성 괴사가, 주변부에서는 다형핵을 가진 중성구 (polymorphic neutrophils)에 의한 침윤이 관찰되었고 (Fig. 2D, E, F), 한 마리를 제외한 모든 검체에서 살아있는 종양 세포를 관찰할 수 없었다.

3. 종양재주입 모델에서 냉동수술과 면역치료와의 병합요법 효과에 대한 대조실험 및 분자생물학적 분석

각 실험군에서 종양의 성장이 $3 \times 3 \text{ mm}$ 에 이르러 치료를 시작한 후, 14일째에 처음 주입한 원발 종양의 재발률은 수술적 제거군인 2군에서는 37.5% (3/8), 수술적 제거와 면역치료를 병합한 3군에서는 25% (2/8)를 보인데 비해, 냉동수술 단독치료군인 4군과 냉동수술과 면역치료를 병합한 5군에서는 각각 12.5% (1/8)로, 냉동수술을 시행한 군에서의 재발률이 낮았으나 통계적 의미는 없었다 ($p = 0.57$, chi-square test). 원발 종양이 재발하지 않은 개체에 한하여 반대측 대퇴부에 종양 세포를 재주입하였고, 발생된 종양의 성장은 종양 세포 주입 후 15일째까지 조사하였다. 특별한 치료를 시행하지 않은 군과 냉동요법을 시행한 군, 수술적 제거를 시행한 군, 수술과 면역치료를 같이 시행한 군, 냉동요법을 시행한 군, 냉동요법과 면역치료를 같이 시행한 군의 종양의 성장을 종양재주입 15일째에 비교하였을 때 유의한 차

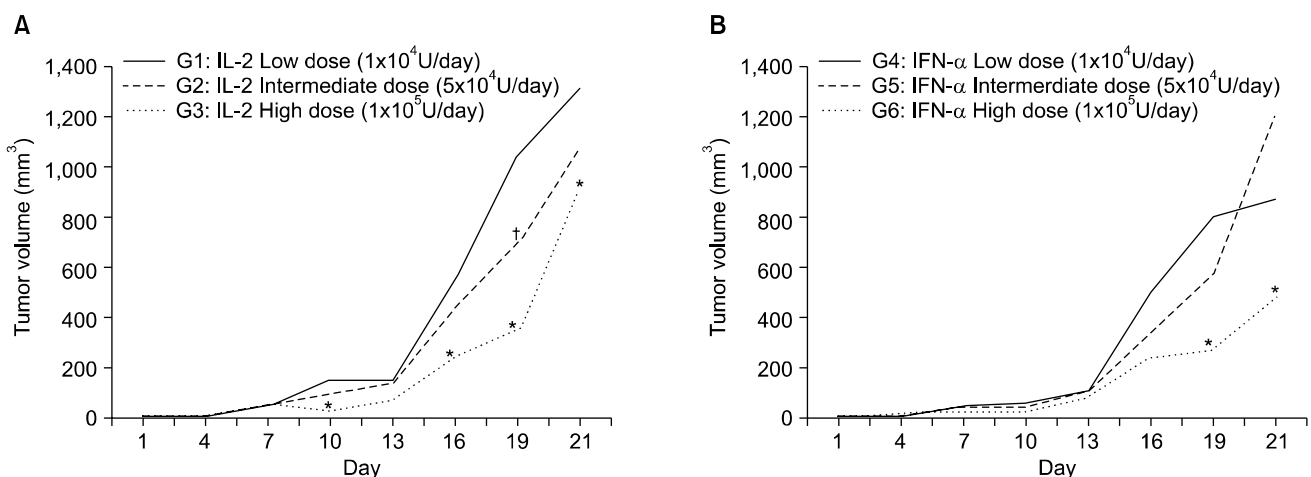


Fig. 1. Changes of the tumor volume in the preliminary studies to evaluate an adequate dose of the immunologic agents. (A) Changes of tumor volume in the IL-2 treated groups. (B) Changes of tumor volume in the IFN- α treated groups. *: significant difference of the tumor volume in the high dose administration group for each agent, as compared to the low dose administered group ($p < 0.05$ by the Mann-Whitney U test). †: significant difference of the tumor volume of the intermediate dose administered group for each agent, as compared to the low dose administered group ($p < 0.05$ by the Mann-Whitney U test). IL-2: interleukin-2, IFN- α : interferon-alpha.

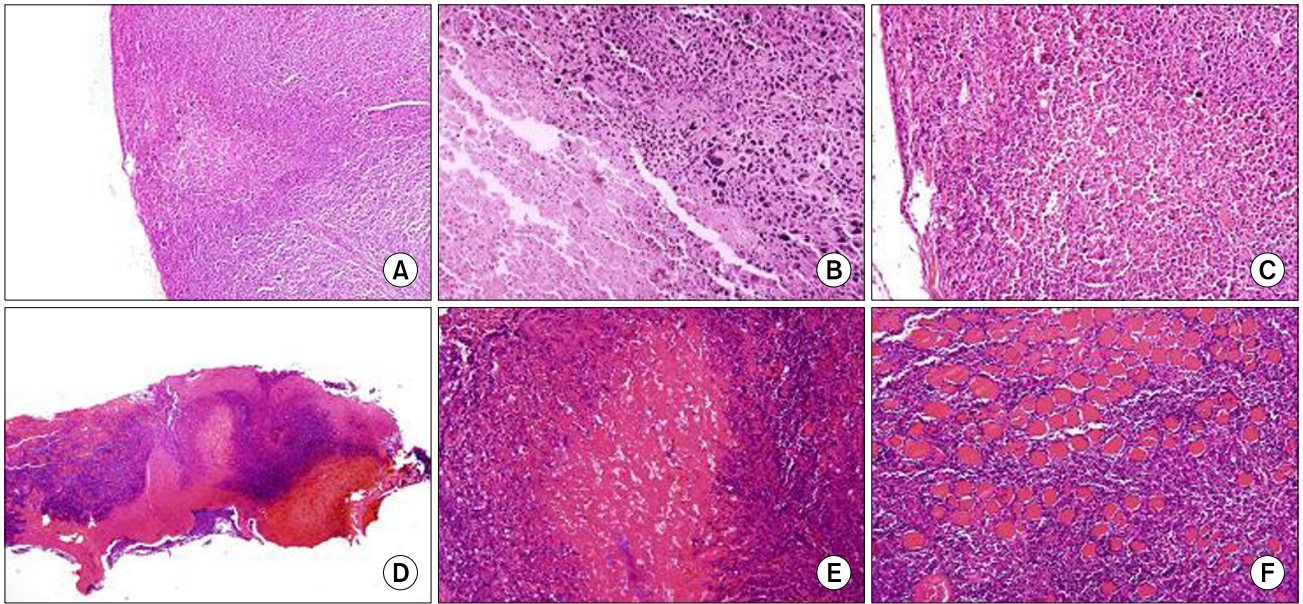


Fig. 2. Results of the histologic examination, and the samples were taken at 2 days and 7 days after cryosurgery. Histologic change at (A-C) 2 days after cryoablation and (D-F) 7 days after cryoablation. (A) Central coagulative necrosis caused by cryoablation (H&E, x100). (B) At high magnification, shrunken and condensed cells with compact nuclei and pyknotic chromatin was found in the periphery of this zone, which are typical features of apoptosis (H&E, x200). (C) The areas of necrosis and apoptosis were surrounded by intact tumor cells, which were larger and they had slack chromatin (H&E, x200). (D) 7 days after the cryoablation was conducted, there was a wide area of necrosis without viable tumor cells (H&E, x40). (E) At high magnification, the central necrotic area was characterized by ghost cells and no apparent nuclei (H&E, x200). (F) This infiltration of neutrophils was a prominent finding at the peripheral muscular tissue, which was located below the previous injection site (H&E, x200).

이를 보였다 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test) (Fig. 3). 단독요법을 시행한 군에서는 냉동요법을 시행한 4군이 수술적 제거를 시행한 2군보다 종양의 성장이 종양재주입 15일째에 유의하게 낮았고 ($p = 0.02$, Mann-Whitney U test), 병합요법을 시행 받은 군에서도 냉동요법을 시행 받은 3군은 수술적 제거를 시행 받은 5군보다 종양의 성장이 종양재주입 15일째에 역시 유의하게 낮았다 ($p = 0.04$, Mann-Whitney U test) (Fig. 3). 단독요법과 병합요법의 비교에서, 수술적 제거와 면역치료를 시행 받은 3군은 수술적 제거만 시행 받은 2군보다 종양의 성장이 적었으나 유의한 차이는 없었고 ($p = 0.62$, Mann-Whitney U test), 냉동수술과 면역치료를 시행 받은 5군은 모든 치료군 중 종양성장억제효과가 가장 우수하였으나, 냉동수술만을 시행 받은 4군 및 다른 치료군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이에는 이르지 못했다 ($p = 0.22$, Mann-Whitney U test).

종양재주입 후 15일째까지의 사망률은 각 군당 8마리 중 1군, 3군에서 각 3마리 (37.5%), 2군과 5군에서 각 1마리 (12.5%), 4군에서 두 마리 (25%)였으나 사망률에서 각 군 간의 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$, chi-square test). 종양재주입 15일째에 실험동물을 희생시키고 비장에서 채취된 백혈

구로 시행한 형광-활성 세포분류기 분석에서, 5개 군의 CD4-T 세포, CD8-T 세포 및 CD19 세포는 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

CD19를 제외한 모든 세포들은 냉동수술군에서 수술적 제거군에 비해 산술적으로 증가되어 있었다. 면역치료와 냉동수술을 병합한 5군에서는 대상군 중 CD4-T 세포, CD8-T 세포 및 NK 세포가 가장 증가되어 있었으나 냉동수술만을 시행 받은 4군과의 비교에서 유의한 증가는 없었다. 수술적 제거군에서는 병합요법을 시행 받은 경우에 수술적 제거만을 시행한 경우보다 CD4-T 세포와 CD8-T 세포가 유의하게 증가되어 있었다 ($p = 0.021$, $p = 0.047$, Mann-Whitney U test) (Fig. 4).

세포독성검사에서는 33:1에서 1.2:1까지 범위에서 5개 군의 세포독성이 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). 냉동수술만 시행한 4군과 수술적 치료만 시행한 2군 간의 비교에서는 33:1에서부터 1.2:1까지 구간에서 냉동수술 단독 치료군이 유의하게 세포독성이 증가되어 있었다 (Fig. 5A). 수술치료와 면역치료를 병합한 3군은 수술적 치료만을 시행 받은 2군에 비해 33:1에서 3.7:1까지의 구간에서 유의한 세포독성의 증가가 있었고 (Fig. 5B), 냉동수

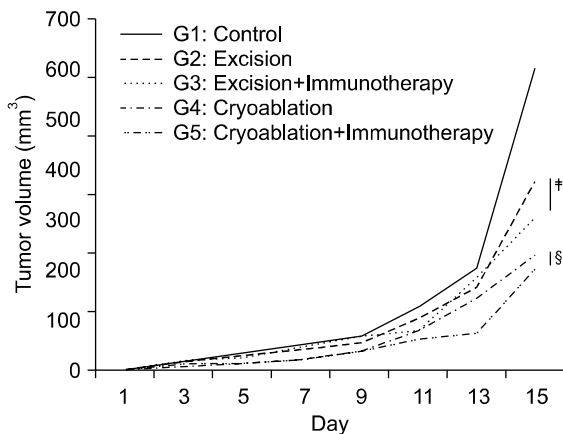


Fig. 3. The tumor growth pattern for each treatment after tumor re-challenge. At day 15, the tumor volume was significantly lower in the cryoablated group (G4, G5) than that in the surgical excised group of G2 and G3, respectively. *: significant decrease of the tumor volume in the cryoablation only group (G4), as compared to the excision only group (G2) ($p=0.02$, by the Mann-Whitney U test), †: significant decrease of tumor volume in the cryoablation with immunotherapy group (G5), as compared to the excision group plus immunotherapy group (G3) ($p=0.04$ by the Mann-Whitney U test), ‡: the difference of tumor volume in the excision with immunotherapy group (G3), as compared to the excision only group (G2), did not reach statistic significance ($p=0.62$ by the Mann-Whitney U test). §: the difference of tumor volume in the cryoablation with immunotherapy group (G5), as compared to the cryoablation group (G4) did not reach statistic significance ($p=0.9$ by the Mann-Whitney U test).

술과 면역치료의 병합요법을 시행 받은 5군은 작동 세포: 표적 세포의 비가 11.1:1에서 1.2:1까지 범위에서 냉동치료만을 시행한 4군보다 유의한 세포독성의 증가가 있었다 (Fig. 5C).

고 찰

신세포암에 대한 1차적인 치료로는 근치적 신적출술이 표준 치료로 받아들여져 왔으나,¹⁵ 이미 전이된 환자에서는 수술적 치료를 통하여 환자의 완치를 기대하기는 한계가 있다. 제한된 환자에서 근치적 신적출술 및 전이 병소의 수술적 제거와 동반된 면역치료가 시도되고 있으나, 이 방법의 치료 효과와 임상적 유용성에 대해서는 아직 많은 논란이 있다. 그럼에도, 현재까지 수술과 아울러 시행할 수 있는 보조적 치료 (adjuvant therapy) 중 어떤 것도 수술 단독 치료에 비해 임상적인 우수성이 증명된 바는 없다.

최근 들어 악성 종양에 대한 최소 침습적 수술들이 다양하게 개발되어 임상에서 사용되고 있는데, 그 중 냉동수술

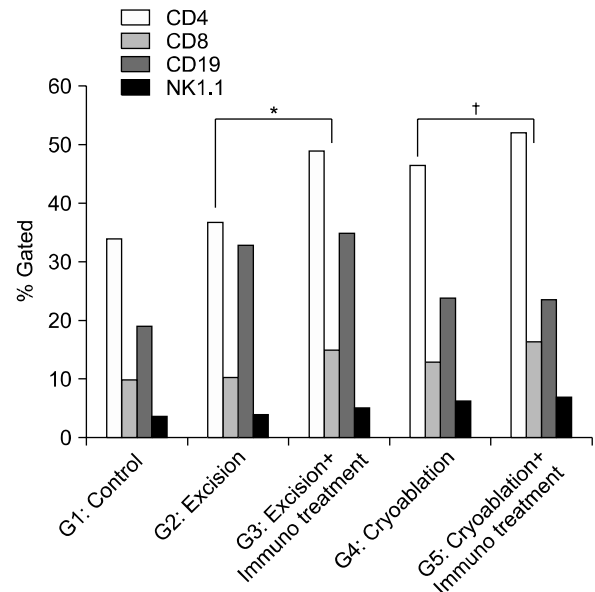


Fig. 4. Fluorescent activated cell sorter (FACS) results after tumor re-challenge. On comparison with the excision group, the percentages of gated CD4 and CD8 T cells of group 3, which was treated with surgical excision with immunotherapy, were significantly increased (*: $p=0.021$ and 0.047 by the Mann-Whitney U test for the CD4 and CD8 cells, respectively). However, the difference between the cryoablation group and the combination group of cryoablation with immunotherapy did not reach a significant value (†: $p=0.19$ for CD4, below 0.05 for the other cytokines).

요법은 현재 간, 전립선, 신장, 유방 등에 생긴 종양에서 성공적으로 사용되고 있다.¹⁶⁻¹⁸ 특히 냉동수술에서는 열을 이용하는 다른 최소 침습적 수술과는 달리 종양의 단백질이나 종양특이항원 (tumor-specific antigen)의 일부분을 변형시키지 않고 손상되지 않은 상태로 남게 되는데, 이렇게 남아 있는 종양 항원은 염증성 환경에서 종양에 대응하는 면역 반응을 자극하게 된다.¹⁹ 신세포암의 경우 carbonic anhydrase IX를 비롯하여 비교적 높은 민감도를 가지는 다양한 종류의 종양특이항원을 가지는데, 비록 이러한 종양특이항원의 임상적 이용에 대해서는 더 많은 연구가 필요하나, 냉동수술이 면역 반응을 자극하는 특성은 신세포암에서 고열을 이용한 다른 치료 방법에 비해 비교적 우수한 임상 성적을 보여주는 근거가 될 수 있다.

Ablin 등²⁰을 필두로 다른 연구자들에 의해서도 지속적으로 보고된 바 있는 원발 병소에 대한 냉동치료 후 전이 병소의 자연 소실도, 냉동수술 후 면역관련 표지자의 증가와 종양특이면역의 발생, 특정 면역 매개체의 사용에 의한 병합효과 등의 연장선상에서 종양면역에 의한 것으로 이해되고 있으며,^{21,22} 신세포암 쥐 모델에 대한 최근의 실험에서도

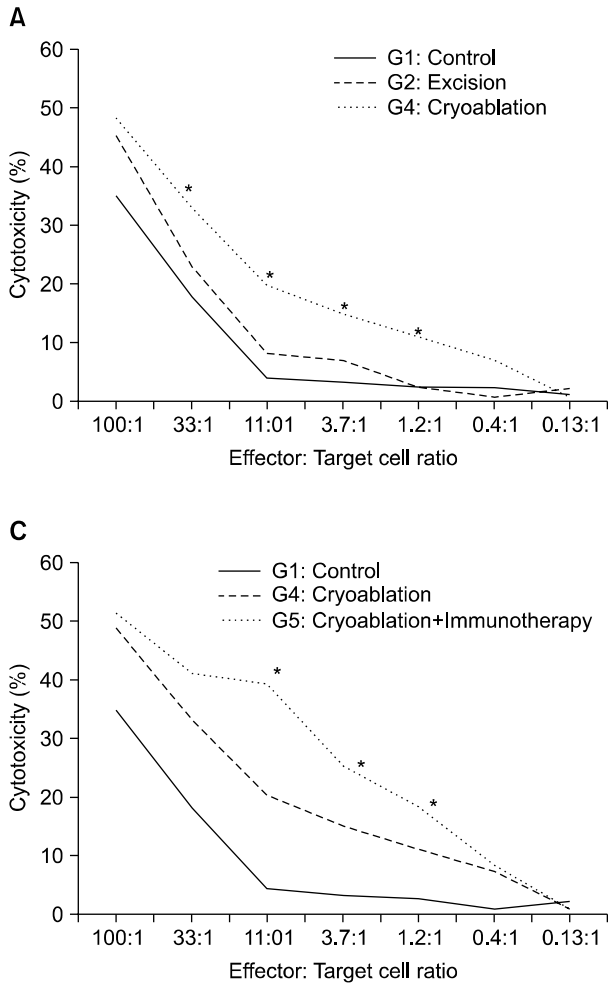


Fig. 5. Result of the cytotoxicity assay, after tumor re-challenge. (A) The cryoablation group showed increased cytotoxicity at effector: the target cell ratios were 33:1, 11:1, 3.7:1 and 1.2:1, respectively. *: significantly increased compared to the excision group ($p < 0.05$, by the Mann-Whitney U test). (B) The excision with immunotherapy group showed increased cytotoxicity at effector: the target cell ratios were 33:1, 11:1 and 3.7:1, respectively *: significant increased compared to the excision only group ($p < 0.05$, by the Mann-Whitney U test). (C) The cryoablation group with immunotherapy group showed increased cytotoxicity at effector: the target cell ratios were 11:1, 3.7:1 and 1.2:1, respectively. *: significant increased compared with the cryoablation only group ($p < 0.05$, by the Mann-Whitney U test).

냉동수술을 시행한 경우 냉동수술 과정에서 유발되는 전신 면역 반응에 의해 신종양을 절제한 경우보다 종양특이 면역 반응 (tumor specific immune responses)이 잘 유발된다고 보고되었는데,²³ 이는 앞으로 신종양 치료에 있어 냉동수술의 면역학적 역할에 대해서도 많은 기대를 가지게 한다. 즉, 이러한 냉동수술의 항종양면역반응으로 국소 종양뿐 아니라 미세 전이 병소를 포함한 전이 병소까지 억제한다면 이는 다른 종류의 최소 침습적 수술법보다 훨씬 효과적인 치료법이 될 수 있을 것이다.

그럼에도, 현재 임상적으로 적용되는 신냉동수술의 적응증은 4cm 미만의 소신종물에 국한되고 있고 신냉동수술이 인체에서 종양특이 면역을 유발시킨다는 임상적 증거는 아직 보고되지 않고 있다. 여러 동물 실험에서 냉동수술의 종양특이 면역반응이 보고되고 있으나, 원발 종양의 크기가 너무 크거나 전이 종양을 동반한 경우 냉동수술만으로 유발되는 종양 면역은 임상적인 효과에 이르기에는 충분치 않을 수 있다. 이에 저자들은 국소적인 냉동수술에 의해 유

도되는 종양특이 면역반응이 전신적인 면역증강제제와 동시에 투여 시에 병합효과를 가질 것이라는 가정 하에 본 실험을 진행하였다. 실험 결과, 형광-활성 세포분류기 검사에서 두 치료의 병합요법군에서 각 면역 세포의 수가 가장 증가되어 있었지만 냉동수술 단독요법에 비해 유의한 차이를 보이지 못하였다. 그러나 비장에서 채취된 백혈구의 종양 세포에 대한 세포독성은 냉동수술 단독요법군에 비해 면역 치료와의 병합요법군에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 즉, 냉동수술과 면역치료의 병합요법은 면역세포의 수를 냉동수술에 비해 유의하게 증가시키지는 않았으나 면역 세포의 세포독성을 강화시키는 쪽으로 작동하였다. 이러한 현상은 원발 종양의 치료 후 종양을 재주입하면서 체내의 면역 세포가 이미 일정한 증가가 일어난 결과일 수도 있고, 비교적 짧은 실험 설계의 한계상 점차 증가하고 있는 추세 가 일찍 감지되어 통계적 의미를 갖지 못한 결과일 수도 있어 이러한 차이의 기전을 확인하기 위해서는 냉동 면역에서 각 면역 세포의 작동 방식에 대한 확인 및 시계열적인

시포 채취가 필요하나, 냉동수술에 의해 노출된 종양특이 항원이 전신적 면역치료제제로 선택된 IL-2 및 IFN- α 와 더불어 우선적으로는 면역 세포의 종양 세포에 대한 기능적 세포독성을 증가시키는 쪽으로 작용하고, 면역 세포의 조직학적 분화 및 증식에는 이에 비해 상대적으로 더 많은 시간이 걸리기 때문으로 추정한다.

이상의 결과들은 현재까지 소신종물에 대한 국소 치료로만 적용되고 있는 신냉동수술을 면역치료와의 병합요법을 통해 재발성 암종이나 전이성 암종에 대한 치료로 확대시킬 수 있는 실험적 근거를 마련했다는 의의를 가지는 것으로 생각하나 그 해석에 있어서는 다소 주의가 필요한 것으로 보이는데, 우선적으로 고려되어야 할 부분은 종양의 재주입이라는 실험모델 자체가 가지는 한계이다. 본 연구의 목적은 냉동수술과 면역치료 병합요법의 효용성과 그 정도를 확인하는 것이었는데, 여기서 치료의 목표로 설정된 것은 신장에 국한되어 있지 않고 타부위에 전이되었거나 재발된 암이었다. 이를 실험에서 재연하기 위해서는 원발 종양에 대한 치료가 가능하면서도 원발 종양 이외이면서 성장의 확인이 가능한 부위에 전이 종양을 가지는 실험 모델이 필요했는데, 이를 위해서는 두 군데 이상의 종양 성장의 확인이 가능한 부위에 종양 세포주를 동시에 주입하고 유발된 종양 각각을 원발 종양과 전이 종양으로 설정하는 모델이나, 원발 종양을 유발시킨 후 치료하고 이후 동일한 종양을 재주입하는 모델이 적절할 것으로 판단되었다. 그런데, 두 군데 이상의 종양을 동시에 유발한 모델은 종양의 성장이 실험동물의 체내에서 급격히 진행된 상태에서는 세포들의 면역학적인 활성이 저하되어 이를 이용한 치료법이 충분한 효과를 발휘하기 어렵고, 종양을 재주입하는 모델에서는 원발 종양이 치료된 이후에 동일한 종양이 재주입되기 때문에 실험기간이 길어지게 되며, 공격적이고 여러 장기에 동시다발적으로 침윤하는 임상적인 전이암과는 그 특성에 있어서 다소 상이하다는 단점이 있다. 본 연구에서는 면역학적인 활성이 중요한 치료의 기전이었으므로 후자의 모델을 선택하였고, 또한 냉동수술에서 T 세포의 활성의 증가가 수술 후 2주 이내에 나타나기 시작하여 술 후 4주에 최대에 이른다는 기존의 보고를 근거로 원발 종양에 대한 치료 후 29일째에 세포독성검사와 형광-활성 세포분류기 검사가 시행되었으나,²⁴ 연구 결과에서 확인된 바대로 병합요법군에서 유의하게 증가된 암세포에 대한 세포독성을 감안한다면 실험 기간을 더 연장했을 경우 재주입하여 발생한 종양의 성장률에 있어서도 유의한 차이가 발생했을 가능성이 컸을 것으로 생각한다. 한편, 임상적인 신세포암은 신생혈관 형성과 더불어 림프선보다는 혈액을 통한 전이가 활발하다는 특성이 있는데, 본 연구에서는 신장 이외 부위

의 피하에서 종양 세포를 재주입하여 발생된 종양의 치료 효과를 확인하는 방법을 선택하였으므로 신장 내에서 발생한 신세포암의 양상과는 그 치료 효과나 종양의 자연사에 있어 일정한 차이점을 가질 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서 확인된 면역 세포의 활성이라는 측면에서의 냉동수술과 면역치료의 병합요법의 효과가 재발암이나 전이암에 대한 성장 억제라는 측면에서 확인되기 위해서는 실험동물의 장기간 생존이 가능하면서도 인체 내에서의 전이성 신세포암과 유사한 행동양태를 가지는 동물모델에서의 실험이 필요할 것으로 생각한다.

결 론

이식된 신세포암의 재이식 모델에서 냉동수술과 면역치료의 병합요법의 효과에 대한 본 연구에서, 병합요법은 재주입 종양의 성장 억제와 면역 세포의 증가에서는 산술적인 증가를, 면역 세포의 세포사멸능의 증가에 있어서는 냉동요법 단독에 비해 통계적으로 유의한 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 임상적으로 새로운 치료 모델을 개발하는데 있어 실험적인 근거를 마련한 것으로 보이나, 병합요법의 장점을 확인하기 위해서는 향후 임상적인 전이성 신세포암과 더 유사한 실험 모델에서의 연구가 필요할 것으로 보인다.

REFERENCES

1. Flanigan RC. Debulking nephrectomy in metastatic renal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:S6335-41
2. Jacobs SC, Berg SI, Lawson RK. Synchronous bilateral renal cell carcinoma: total surgical excision. *Cancer* 1980;46:2341-5
3. Moll V, Becht E, Ziegler M. Kidney preserving surgery in renal cell tumors: indications, techniques and results in 152 patients. *J Urol* 1993;150:319-23
4. Belldegrun A, Tsui KH, deKernion JB, Smith RB. Efficacy of nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma: analysis based on the new 1997 tumor-node-metastasis staging system. *J Clin Oncol* 1999;17:2868-75
5. Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol* 2004;22:3316-22
6. Campbell SC, Novick AC, Bukowski RM. Renal tumors. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, Wein AJ, editors. *Campbell's urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007;1567-637
7. Colimbu M, Joshi P, Sperber A, Tessler A, Al-Askari S,

- Morales P. Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology* 1986;27:291-301
8. Hafez KS, Montie JE. Indication and limitations of cytoreductive nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma. *AUA Update Series* 2004;lesson 31
9. O'Malley RL, Berger AD, Kanofsky JA, Phillips CK, Stifelman M, Taneja SS. A matched-cohort comparison of laparoscopic cryoablation and laparoscopic partial nephrectomy for treating renal masses. *BJU Int* 2007;99:395-8
10. Hruby G, Reisiger K, Venkatesh R, Yan Y, Landman J. Comparison of laparoscopic partial nephrectomy and laparoscopic cryoablation for renal hilar tumors. *Urology* 2006;67:50-4
11. Ablin RJ. An appreciation and realization of the concept of cryoimmunology. In: Ablin RJ, editor. *Percutaneous prostate cryoablation*. 1st ed. St. Louis: Quality Medical Publishing; 1995;136-54
12. Suzuki Y. Cryosurgical treatment of advanced breast cancer and cryoimmunological responses. *Skin Cancer* 1995;10:19-26
13. Hornung RL, Back TC, Zaharko DS, Urba WJ, Longo DL, Wilttrout RH. Augmentation of natural killer activity, induction of IFN and development tumor immunity during the successful treatment of established murine renal cancer using flavone acetic acid and IL-2. *J Immunol* 1988;141:3671-9
14. Sayers TJ, Wilttrout TA, McCormick K, Husted C, Wilttrout RH. Antitumor effects of alpha-interferon and gamma-interferon on a murine renal cancer (Renca) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1990;50:5414-20
15. Fergany AF, Hafez KS, Novick AC. Long-term results of nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: 10-year follow up. *J Urol* 2000;163:442-5
16. Gage AA, Huben R. Cryosurgical ablation of the prostate. *Urol Oncol* 2000;5:19-24
17. Sabel MS, Edge SB. In-situ ablation of breast cancer. *Breast Dis* 2001;12:131-40
18. Johnson JP. Immunologic aspects of cryosurgery: potential modulation of immune recognition and effector cell maturation. *Clin Dermatol* 1990;8:39-47
19. Sabel M, Arora A, Su G, Chang AE. Adoptive immunotherapy of breast cancer with lymph node cells primed by cryoablation of the primary tumor. *Cryobiology* 2006;53:360-6
20. Ablin RJ, Jagodzinski RV, Prox C, Williams RW, Gonder MJ, Soanes WA. Cryosurgery of the monkey (macaque) prostate. I. Humoral immunologic responsiveness following cryostimulation. *Cryobiology* 1976;13:47-53
21. Airolidi M, Fazio M, Gandolfo S, Ozzello F, Pedani F, Brando V, et al. Combined chemotherapy, cryosurgery, and radiotherapy/surgery for oral cancer. *Int J Clin Pharmacol Res* 1985;5:357-62
22. Fujikawa S, Suzuki T, Ishikawa T, Sakurai S, Hasegawa Y. Continuous observation of frozen biological materials with cryo-scanning electron microscope and freeze-replica by a new cryo-system. *J Electron Microsc* 1988;37:315-22
23. Kang SH, Bae JH, Shim KS. The development of tumour-specific immunity induced by cryosurgery in murine renal cell carcinoma animal model. *Eur Urol* 2006;5(Suppl):29
24. Kaouk JH, Aron M, Rewcastle JC, Gill IS. Cryotherapy: clinical end points and their experimental foundations. *Urology* 2006;68(1 Suppl):38-44