

상피성 난소암 세포에서 MEK 억제제 AZD6244의 세포증식 저해 효과

부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실

유신애 · 김승철 · 조무성 · 서동수 · 김기형 · 윤만수

Anti-proliferative effect in epithelial ovarian cancer cells by MEK Inhibitor AZD6244

Shin Ae Yu, M.D., Seung Chul Kim, M.D., Moo Sung Jo, M.D.,
Dong Soo Suh, M.D., Ki Hyung Kim, M.D., Man Soo Yoon, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology,
Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

Objective: The objectives of this study were to determine the efficacy of AZD6244, a potent, selective MEK inhibitor, in epithelial ovarian cancer (EOC) cells and to determine the enhanced cell death by combined treatment of paclitaxel and AZD6244.

Methods: EOC cells were treated with tenfold dilutions of AZD6244 (0.1 to 10 μ M) for 24, 48 and 72 hours. Cell viability was determined by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. The apoptotic cascade was assessed by Caspase-Glo assays. ERK activation was evaluated by Western blot analyses. Cytokine profiling was performed from culture supernatants using the Luminex 200 system.

Results: In vitro cell viability showed that ovarian cancer cells with high p-ERK activities (A2780, R454, O1-28) exhibited significant growth inhibition. Cells with low p-ERK activities (R182, CP70), however, were resistant to AZD6244. Caspase-3 was not activated during AZD6244-induced growth inhibition. AZD6244 significantly inhibited p-ERK1/2 in both cell types regardless of constitutive levels of p-ERK. Proinflammatory cytokines including IL-6, IL-8, MCP-1 and GM-CSF were significantly decreased. Paclitaxel activated the p-ERK levels in paclitaxel-resistant R182 cells with low basal p-ERK level. MEK inhibition by AZD6244 enhanced paclitaxel-induced apoptosis significantly in R182 cells.

Conclusion: These results demonstrate that AZD6244 has a potent growth inhibitory effect in ovarian cancer cells with high p-ERK activities. In addition, targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway with AZD6244 can enhance the anti-tumor efficacy of the cytotoxic paclitaxel.

Key Words: Ovarian cancer, MEK inhibitor, AZD6244, Paclitaxel

상피성 난소암은 우리나라에서 자궁경부암에 이어 두 번째로 흔하나 치명도는 가장 높은 대표적인 부인암이다.

효과적인 선별검사법이나 특이 증상이 없어 60% 이상은 진행된 병기에서 발견이 되며, 현재의 표준치료법은 종양 감축술을 시행하고 파클리탁셀과 플래티늄 (platinum)의 병합요법을 시행하는 것이다.¹ 이러한 치료법으로 80~90%는 초기에 양호한 반응을 보이거나 최종적으로 10~15%만이 완전관해에 이르며, 진행된 병기에서 5년 생존율은

접 수 일 : 2010. 1. 6.
채 택 일 : 2010. 2. 1.
교신저자 : 김기형
E-mail : ghkim@pusan.ac.kr

* 이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었음.

30% 정도로 불량하다.² 재발암에서는 신속히 항암제내성을 보여 65~75%가 이러한 약제에 반응을 보이지 않는다. 난소암은 최근 20여 년 동안 수술기법과 항암제의 진보로 무진행 생존율 (progression free survival)과 전반적인 생존율의 향상이 있어 왔으나 여전히 높은 사망률을 보이고 있어 새로운 약제개발이 필요하다. 향후 난소암 치료의 성공은 항암제 내성의 분자기전을 규명하고 또 여러 세포 내 신호전달 과정을 표적으로 하는 약제의 개발에 달려있으며, 특히 항암제 의존도가 높은 난소암에서 분자표적치료는 더욱 관심이 되고 있다.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 세포증식, 세포주기 조절, 세포생존, 혈관신생, 세포의 이동 등에 관여하는 세포내 신호전달경로이다. 포유류의 MAPK 경로 중 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 경로가 가장 중요하며 많이 알려져 있다. 이 RAS-RAF-MEK-ERK 경로는 여러 세포유형에서 다양한 세포외적 자극에 의해 활성화되어 세포막 수용체에서 핵까지를 연결해주는 경로로 세포의 증식과 생존에 관여하는 대표적인 경로이다. 사람의 암종에서 ERK 경로의 활성화에 관여하는 요인으로 RAF 혹은 RAS의 돌연변이가 잘 알려져 있다.³ RAS의 돌연변이는 사람의 암종에서 30%까지 보고되었으며, 특히 췌장암에서는 90%, 대장암에서 50% 정도로 높게 보고되었다.⁴ BRAF 돌연변이는 악성 흑색종의 60~80%, 유두상 갑상선암의 35~70%, 저등급 장액성 난소암의 36~60%에서 보고되었다.^{5,6}

RAS-RAF-MEK-ERK 신호경로의 이상이 사람의 암종에서 흔하게 보고되어 항암치료의 표적으로 관심이 되고 있다. 이러한 배경에는 ERK 경로의 활성화가 암화과정에 관여하며 또한 종양의 진행, 항암제내성, 임상 예후 등과도 밀접한 관련이 있다고 한다.⁷⁻⁹ ERK 경로를 효과적으로 차단하면 세포의 증식, 종양세포의 전이, 혈관신생을 억제한다고 하며,¹⁰ 이 경로를 차단할 수 있는 약제로 RAF 억제제, 또는 MEK1/2 억제제가 개발되었다. RAF 억제제는 아직 초기 단계이며 BAY 43-90069 (sorafenib), RAF 265, PLX4032, XL281 등이 임상시험 중에 있다. MEK1/2 억제제로는 1세대 약물로 PD098059, U0126가 있으며 임상시험에 까지 이르지 못했으나 실험실 연구에 유용하게 이용되고 있다. CI-1040 (PD 184352)이 처음으로 임상시험에 이용되었고, 만족할만한 임상적 효용성이 도출되지

않아 현재에는 임상시험이 진행되고 있지 않다. 2세대 MEK 억제제로 PD0325901와 AZD6244가 개발되었고, 이 두 약제는 약효가 강력하고 경구용 제제이며 전임상 연구에서 우수한 항종양효과를 보여 표적치료 후보약물로 주목받고 있다. 특히 AZD6244는 BRAF나 RAS의 돌연변이를 가진 대장암, 췌장암, 유방암, 폐암, 흑색종 등의 동물실험에서 우수한 항암효과가 보고되어 현재 2상 연구가 진행 중이다.⁵

본 연구에서 저자들은 상피성 난소암 세포에서 p-ERK의 기초 활성도에 따라 MEK 억제제인 AZD6244가 MEK 활성을 효과적으로 억제하는 지, 세포의 증식과 염증성 사이토카인의 생성에 어떤 영향을 미치는 지, 또한 파클리탁셀과 AZD6244의 병합효과는 어떠한 지를 알아보하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주와 약제

기존의 확립되어진 인간 상피성 난소암 세포주 (A2780, CP70)와 난소암 환자의 복수에서 분리한 일차세포 (R182, R454, 01-28)를 실험에 이용하였다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 증식시켰고, 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. AZD6244 (AstraZeneca)는 10 mM 원액을 희석하여 0.1, 1, 10 uM 농도로 치료하였고, 파클리탁셀 (Sigma Chemical Co.)은 2.342 mM을 희석하여 0.2, 2, 20 uM 농도로 치료하였다.

2. Cell Viability Assay

5×10³개의 세포를 각 well당 100 µL으로 96-well plate에 심었다. 세포가 70% 정도로 차게 되면 Opti-MEM medium (Gibco)으로 교체하여 4시간 동안 두었다가 약물치료를 시행하였다. AZD6244는 0.1, 1, 10 µM 농도로, 파클리탁셀은 0.2, 2, 20 uM의 농도로 치료하였고, 각각 24, 48, 72시간 치료한 후에 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)를 통해 cell viability를 측정하였다. 각 샘플의 흡광도는 au-

tomatic microplate reader (Model 550; Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 측정 값은 치료를 하지 않은 대조군과 비교하였고, percent viability로 나타내었다.

3. Caspase 활성도 측정

Caspase-3/7 활성도는 Caspase-Glo 3/7 assay를 이용하였고, 10 µg의 단백질을 넣어 물과 함께 50 µL의 부피로 만든 다음 50 µL의 Caspase-Glo 반응액 (Promega)을 혼합하였다. 실온에서 1시간 반응시킨 후에 발광도를 TD 20/20 Luminometer를 이용해 측정하였다. 활성도는 치료하지 않은 대조군을 기준으로 하여 몇 배 정도 증가하는지를 상대적으로 표시하였다.

4. 싸이토카인 측정

세포배양 후 상층의 배양액을 채취하여 싸이토카인을 측정하였다. 50 µL씩의 샘플을 96-well plate에 각각 넣은 후 25 µL씩의 microparticle mixture를 첨가하였다. 검사용 plate를 orbital shaker (500 rpm) 위에서 실온에서 2시간 방치하였다. 다시 plate를 Beadlyte cell signaling assay buffer로 3차례 세척하였고, microparti-

cles를 75 µL의 assay buffer안에서 다시 현탁을 시켰다. 이후 각 well에 25 µL의 biotinylated detection antibody를 첨가하였다. 실온에서 90분간 방치한 후 plate를 다시 assay buffer로 3차례 세척한 후 microparticle을 75 µL의 assay buffer안에서 다시 현탁을 시켰다. 1:20 Streptavidin-PE:assay buffer mixture를 준비하였다가 25 µL씩을 각 well에 첨가하였다. 실온에서 30분 방치 후 plate를 assay buffer로 3차례 세척한 후 125 µL assay buffer로 다시 현탁을 시켰다. 최종적으로 검사용 plate는 Luminex 200 multiplex analyzer로 그 값을 측정하였다.

5. Western Blot

각각의 단백질 20 µg씩을 sample buffer (2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.15 M Tris-HCl [pH 6.8], 0.01% bromophenol blue)로 변성시킨 후 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 단백질을 100 V에서 105분 동안에 PVDF 막으로 이동시킨 후, 1시간 동안 5% milk를 포함한 PBS와 0.5% Tween-20 (PBS-T)으로 차단한 후 4°C에서 하룻밤 동안 1차 항체를 부착하였다: rabbit anti-cyclin D1 (Santa Cruz, 1:1,000), mouse anti-phosphorylated ERK1/2 (Santa Cruz, 1:1,000), rabbit anti-total ERK1/2 (Upstate

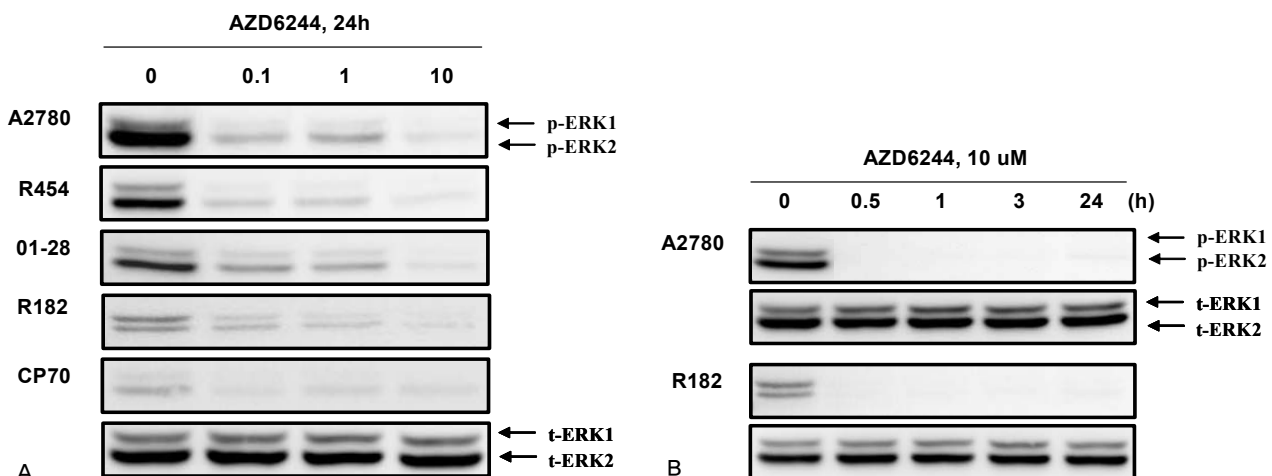


Fig. 1. AZD6244 effectively inhibited MAPK/ERK pathway signaling in epithelial ovarian cancer cells. (A) EOC cells were treated with increasing concentrations of AZD6244 (0.1 to 10 µM) for 24 hours. MEK activity was determined by western blot for p-ERK1/2. Total ERK and β-actin were used for quantity control of proteins. (B) EOC cells were treated with with AZD6244 (10 µM) for different time points (0, 0.5, 1, 3, 24 hrs).

Biotechnology, 1:500). 다음 날 PBS-T로 3차례 세척한 후 2차 항체를 부착하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다: 1:10,000 horse anti-mouse antibody, goat anti-rabbit antibody. 마지막으로 단백질을 enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnology)를 이용하여 영상화하였다.

6. FACS cell cycle analysis

난소암 세포 (1×10^6 cells/well)를 10% FBS를 포함한 6-well plates에서 배양한다. 10 μ M AZD6244로 48시간 동안 치료한 후 세포를 수확하여 ice-cold PBS로 씻은 후에 70% ethanol/PBS에 4°C에서 고정한다. 고정된 세포는 20 μ g/ml RNase A를 포함한 0.5 mL PBS와 함께 37°C에서 30분간 배양한다. 그런 다음 실온 암실에서 50 μ g/ml PI를 넣어 30분간 염색한다. 마지막으로 세포를 FACS-Calibur™ flow cytometer로 분석한다 (Becton Dickinson, San Jose, CA). 최소 샘플당 1×10^4 cells을 평가하

여 각 세포주기별로 세포분포의 분율을 CellQuest & ModFit software를 이용하여 계산한다.

7. 통계분석

결과는 mean \pm SD로 표시하였고, 통계분석은 one-way ANOVA를 이용하였으며, $P < 0.05$ 일 때를 통계학적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. AZD6244의 MEK 활성 억제 효과

2종류의 난소암 세포주 (A2780, CP70)와 난소암 복수에서 분리배양한 3종류의 일차세포 (R182, R454, 01-28)에서 p-ERK의 기초 발현도를 조사하였다. p-ERK 활성도가 높은 세포는 A2780, R454, 01-28이었고, 활성도가 낮은 세포는 R182, CP70이었다 (Fig. 1A). 먼저 AZD

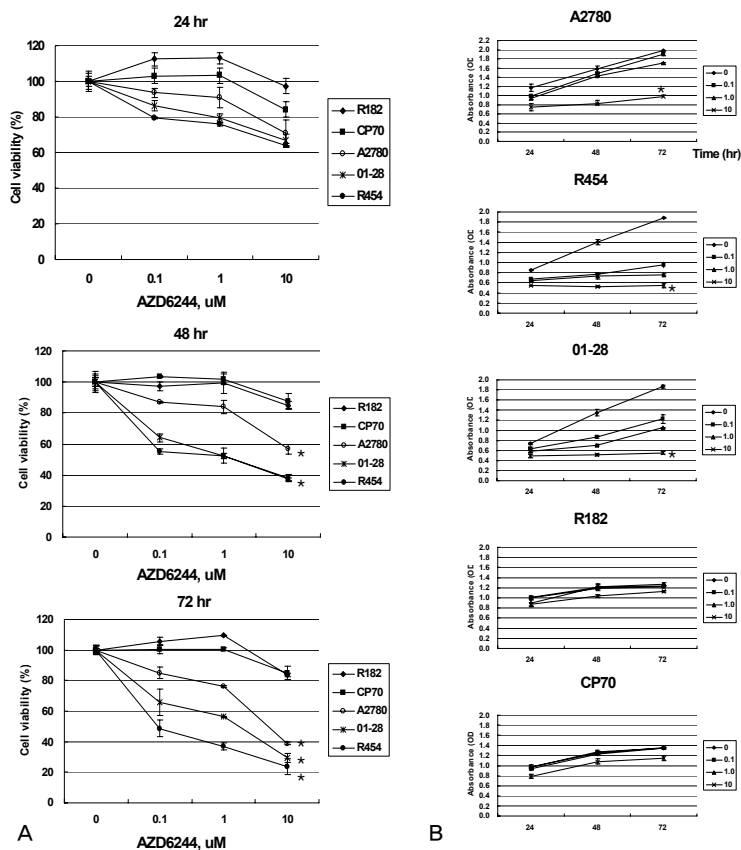


Fig. 2. (A) AZD6244 inhibited the proliferation of EOC cells. Cells were exposed to increasing concentrations of AZD6244 (0.1 to 10 μ M) for 24, 48 and 72 hours and the viability (in percentage, normalized to untreated cells) was measured. (B) Absorbance at 490 nm after AZD6244 for 24, 48 and 72 hours. Data were compiled from at least three independent experiments, each done in triplicate.

* $P < 0.05$.

6244가 난소암 세포에서 ERK 경로 차단효과를 조사하기 위해 AZD6244를 0.1, 1, 10 μ M의 농도로 24시간 동안 치료하였고, 또한 시간에 따른 반응을 보고자 AZD6244 10 μ M의 농도로 0, 0.5, 1, 3, 24시간 후에 p-ERK의 활성을 조사하였다. AZD6244는 total ERK1과 ERK2는 변화가 없이 p-ERK 활성을 치료농도에 비례하여 억제하였고 특히 10 μ M에서 가장 뚜렷한 억제효과를 보였다. 이러한 반응은 기초 p-ERK 활성도가 높은 세포 (A2780, R454, 01-28)나 낮은 세포 (R182, CP70) 모두에서 나타났다 (Fig. 1A). 또한 AZD6244 치료 후 30분 후부터 신속하고 강한 억제 반응을 나타내어 24시간까지 지속되는 것을 관찰하였다 (Fig. 1B).

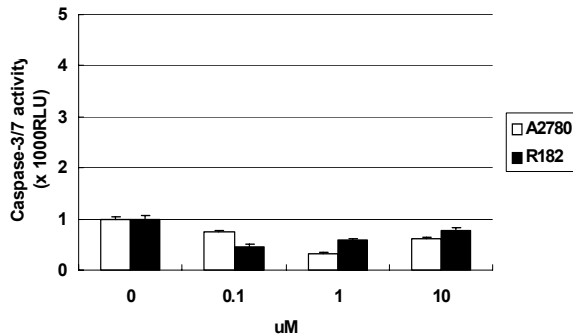


Fig. 3. Relative caspase-3/7 activity in A2780 and R182 cells. Cells were exposed to AZD6244 for 24 hours. Caspase activity was measured as described in Materials and Methods. Y axis: caspase activity fold increase from control. The data were compiled from at least three independent experiments.

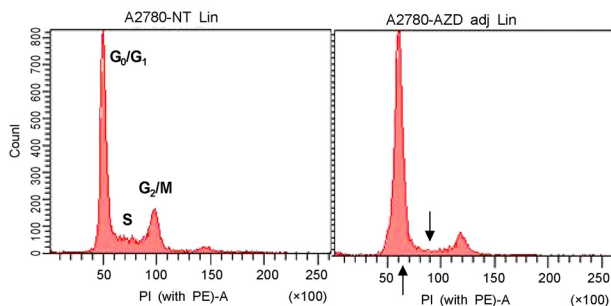


Fig. 4. Cell cycle analysis in EOC cells. Cells were treated with AZD6244 (10 μ M) for 48 hours. The cells stained with propidium iodide (PI) solution were subjected to flow cytometric analysis to determine the cell distribution at each phase of the cell cycle. The EOC cells treated with AZD6244 were found to undergo G₀/G₁-phase cell cycle arrest.

2. AZD6244의 세포성장 억제 효과

AZD6244가 MEK 활성을 효과적으로 억제함을 확인한 후 AZD6244가 난소암 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 세포를 AZD6244 0.1, 1, 10 μ M 농도로 치료한 후 각각 24, 48, 72시간 후에 cell viability를 조사하였다. AZD6244는 p-ERK의 고발현 세포에서 (A2780, R454, 01-28) 치료농도에 비례하여, 치료기간에 비례하여 효과적으로 증식억제효과를 보였으며, 특히 10 μ M AZD6244에서 가장 뚜렷한 효과를 보였다. 하지만 p-ERK의 저발현 세포 (R182, CP70)에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로 AZD6244는 p-ERK의 고발현 세포에서 선택적으로 성장억제 효과를 보인다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

이러한 세포증식 억제효과가 세포고사 경로의 활성화와 관련이 있는 지를 알아보기 위해 caspase-3/7 활성도를 측정하였다. AZD6244에 민감하게 세포증식의 억제반응을 보인 A2780 세포에서도 caspase-3/7 활성도는 유의한 증가가 관찰되지 않아 AZD6244는 세포고사 효과는 미약하고 세포증식 억제효과가 (cytostatic) 주된 작용임을 알 수 있었다 (Fig. 3).

3. 세포주기에 미치는 AZD6244의 영향

AZD6244 치료 후 난소암 세포에서 세포주기의 진행과

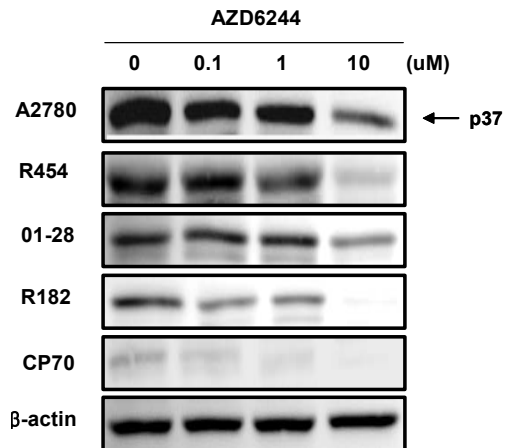


Fig. 5. AZD6244 induced down-regulation of cyclin D1 in EOC cells. Cells were lysed for Western blot analyses after AZD6244 (0.1 to 10 μ M) for 48 hours.

정지에 미치는 영향을 조사하였다. AZD6244에 감수성을 보인 A2780 세포를 10 μ M 농도로 48시간 치료한 후에 flow cytometry를 이용해 각 세포주기별 세포분포의 분율을 분석하였다. G_0/G_1 fraction의 증가와 S 기의 감소를 보여 AZD6244는 상피성 난소암 세포에서 G_0/G_1 기의 세포주기 정지를 유도함을 알 수 있었다 (Fig. 4).

4. Cyclin D1 발현에 미치는 AZD6244의 영향

다음으로 난소암 세포에서 AZD6244를 0.1, 1, 10 μ M의 농도로 48시간 치료한 후 MEK-ERK 신호경로에 의해 조절되는 세포주기 조절분자인 cyclin D1의 발현을 분석하였다. A2780, R454, O1-28 세포에서 치료농도에 비례하여 cyclin D1의 발현이 효과적으로 감소하였고 (Fig. 5), 특히 AZD6244 10 μ M에서 가장 뚜렷한 감소를 보였다. p-ERK

저발현 세포인 R182, CP70에서도 cyclin D1의 발현감소를 보였다. 이러한 결과는 AZD6244가 ERK 경로를 효과적으로 차단하며 G_1 기에서 세포정지를 통해 세포증식을 억제함을 보여준다.

5. 염증성 사이토카인 생성에 미치는 AZD6244의 영향

Myeloid differentiation protein 88 (MyD88) 발현을 보이는 난소암 세포가 파클리탁셀에 저항성을 보인다고 보고되었다. 파클리탁셀은 TLR-4에 부착하여 TLR-4/MyD88 경로를 통해 NF- κ B를 활성화하여 염증성 사이토카인을 생성하여 세포증식과 항암제 내성에 관여한다고 한다. AZD6244를 48시간 동안 치료한 후 MyD88 양성이며 p-ERK 저발현 세포인 R182에서 사이토카인의 변화를 관찰하였다. 파클리탁셀이 IL-6, IL-8를 증가시킨 반면,

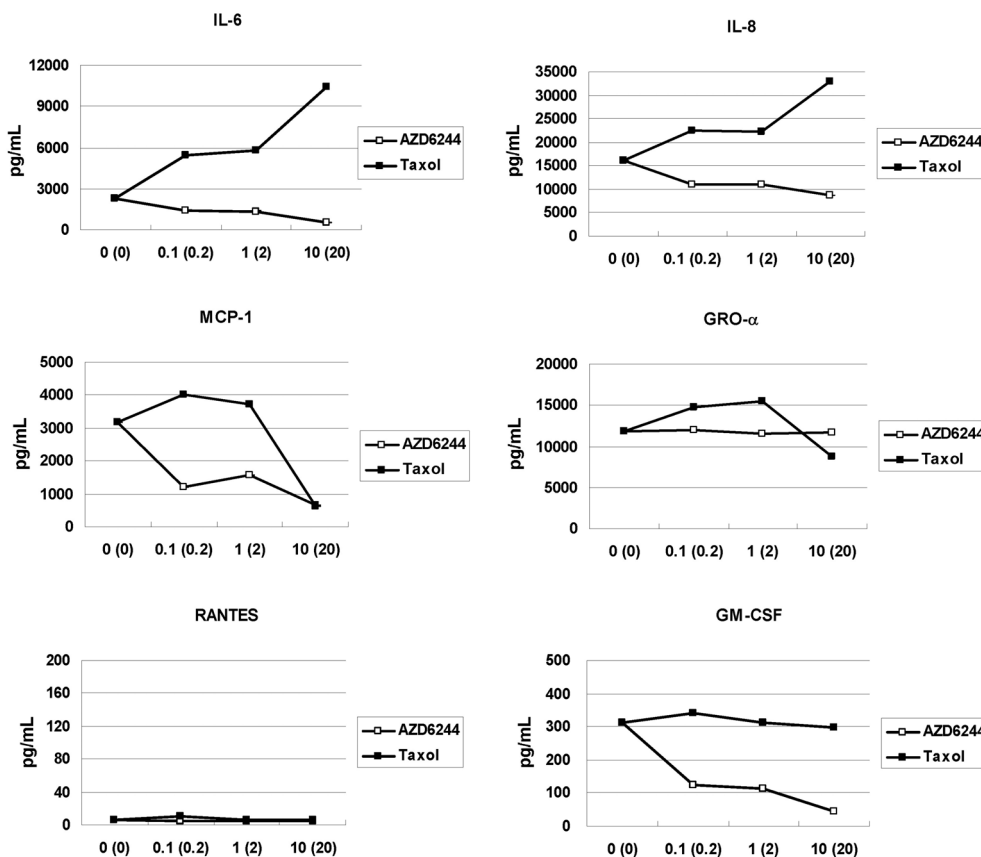


Fig. 6. Expression of cytokines in MyD88-positive, low basal p-ERK R182 cells. Cells were treated with AZD6244 or paclitaxel for 48hrs, and the levels of cytokines /chemokines secreted were determined in the supernatants from EOC cells. Significant levels of pro-inflammatory cytokines were expressed in response to paclitaxel treatment. AZD6244 decreased pro-inflammatory cytokines in EOC cells. X-axis: AZD 6244(Taxol) dose.

AZD6244는 IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF를 감소시켰다 (Fig. 6).

6. 난소암 세포에서 AZD6244 + Paclitaxel 병합요법

p-ERK의 고발현과 저발현 세포를 대표하는 A2780, R182를 선택하여 파클리탁셀과 AZD6244의 병합효과를 알아보았다. 먼저 각 세포에서 파클리탁셀이 p-ERK 활성화

화에 미치는 영향을 조사하였다. 파클리탁셀에 저항성을 가지는 R182 세포에서 p-ERK의 발현이 뚜렷하게 증가하였고, 파클리탁셀에 감수성을 가지는 A2780 세포에서는 p-ERK의 발현이 농도에 비례하여 감소하다가 (0.2-2 μ M) 고농도인 20 μ M에서는 저농도에 비해 상대적으로 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 7A). AZD6244와 병합요법시 두 세포 모두에서 파클리탁셀에 의한 ERK 경로의 활성화는 AZD6244에 의해 효과적으로 상쇄되어 거의 발현되지

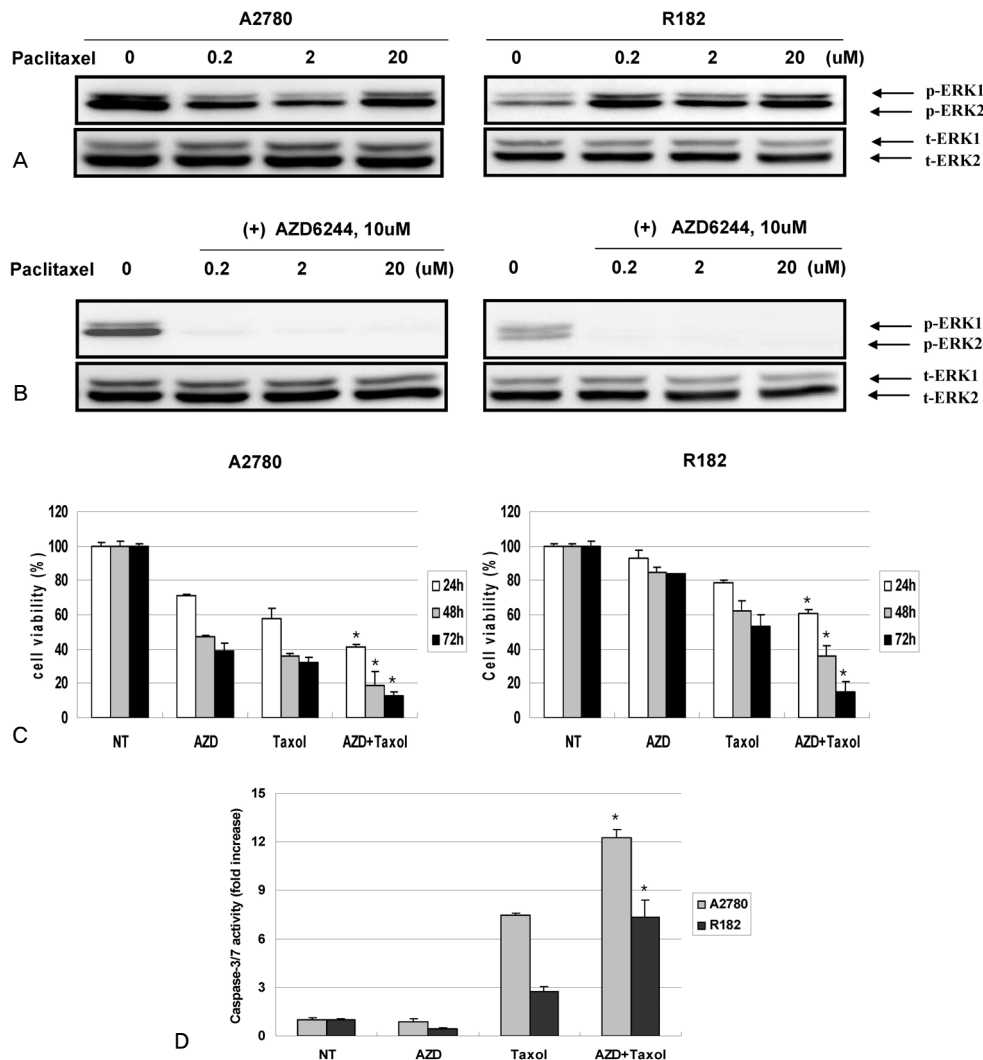


Fig. 7. Combination treatment of paclitaxel and AZD6244. (A) Effect of paclitaxel on the activation of p-ERK1/2 in epithelial ovarian cancer cells (A2780, R182). Cells were exposed to the indicated concentrations of paclitaxel for 24 hours. (B) Cells were treated with AZD6244 (10 μ M) and increasing concentrations of paclitaxel (0.2 to 20 μ M) for 24 hours and activation status of p-ERK1/2. (C) Cells were treated with AZD6244 (10 μ M) and paclitaxel (20 μ M) for 24, 48, and 72 hours and cell viability was determined (A2780, R182). (D) Cells were treated with AZD6244 (10 μ M) and paclitaxel (20 μ M) for 24 hours and activity of caspase-3 was measured. NT: non-treated. * P <0.05.

않았다 (Fig. 7B). AZD6244 10 μ M와 파클리탁셀의 각 치료 농도 0.2, 2, 20 μ M를 병합투여하여 각각 24, 48, 72 시간 후에 cell viability를 측정하였다. A2780 세포에서는 치료기간에 비례하여 유의한 항종양효과의 증강을 보였다 (Fig. 7C). R182 세포에서도 유의한 세포독성 효과의 증강이 나타났다. 파클리탁셀 단독요법에서 24, 48, 72시간 후에 세포생존율이 각각 21%, 38%, 47% 씩 감소하였으나 병합요법시에 각각 39%, 64%, 85%의 뚜렷한 감소를 보였다. Caspase-3 활성도는 두 세포 모두에서 유의한 증가소견을 보였다 (Fig. 7D).

고 찰

본 연구는 상피성 난소암 세포에서 세포증식과 생존에 관여하는 ERK 경로의 기초 활성도를 조사하고, MEK 억제제인 AZD6244가 난소암 세포의 증식과 세포주기, 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보고, 또한 AZD6244를 파클리탁셀과 병합치료를 하였을 때 세포독성 효과의 증강이 있는 지를 알아보고자 하였다.

저자들은 이 연구에서 MEK 억제제인 AZD6244가 기초 p-ERK의 발현이 높은 세포에서 선택적으로 성장억제 효과를 보임을 관찰하였고, 파클리탁셀에 저항성을 보이는 세포에서도 파클리탁셀과 AZD6244의 병합요법이 세포독성 효과를 뚜렷하게 증강시킴을 관찰하였다.

RAS-RAF-MEK-ERK 경로는 가장 많이 연구되어진 MAPK 경로로 리간드가 세포 표면의 tyrosine kinase 수용체에 부착한 후에 개시된다. 성장인자가 세포막의 수용체에 부착하면 MAPK 경로 활성화의 첫 단계인 RAS 단백질을 활성화시킨다. RAS는 serine/threonine kinase인 RAF (ARAF, BRAF, RAF-1)를 세포막으로 이동시켜 인산화시키고 MEK1/MEK2를 직접적으로 활성화시킨다. 활성화된 MEK은 다시 ERK1과 ERK2를 활성화시키고 ERK1과 ERK2는 이합체화 (dimerize)되어 핵으로 이동하여 여러 전사인자를 활성화시켜 최종적으로 유전자 발현을 통해 세포증식과 생존, 유사분열, 세포이동 등과 같은 다양한 반응을 유도한다.¹¹

난소암에서 가장 흔한 유전적 이상은 KRAS, BRAF, p53의 돌연변이이다. ERK 경로의 기초 활성화에는 여러 인자가 관여하며 MEK 의존성, 또는 비의존성 기전이 있

다. 대개는 KRAS나 BRAF의 돌연변이가 ERK의 기초 활성화에 관여한다고 알려져 있다.^{9,12} 저등급 장액성 난소암에서 BRAF 돌연변이는 36~60%에서 보고되었고,^{6,13} 한 국내 연구에서는 KRAS와 BRAF의 돌연변이가 각각 30%, 10%에서 보고되었다.¹⁴ MEK 억제제에 의해 p-ERK의 활성이 감소하는 것은 MEK 의존성 기전을 시사하며 본 연구에서도 MEK 억제제인 AZD6244에 의해 p-ERK의 활성이 감소되어짐을 보여 MEK 의존성 기전을 보여준다.

AZD6244는 경구용 제제로 benzimidazole 유도체이며 MEK1과 MEK2를 아주 강력하게 억제한다고 보고된 2세대 MEK 억제제이다.⁵ 대장암, 췌장암, 유방암, 폐암, 흑색종 암세포를 이용한 동물실험에서 우수한 항암효과가 보고되었으며, 결과가 우수하여 여러 고형암에서 현재 2상 임상시험이 진행 중이다. 본 연구에서 AZD6244는 기초 p-ERK 활성도가 높은 세포나 낮은 세포 모두에서 p-ERK를 치료농도에 비례하여 억제하였고, 치료 후 30분 후부터 아주 신속하고 강한 억제 반응을 나타내었다. 하지만 세포증식의 억제는 p-ERK의 고발현세포에서 AZD6244에 예민하게 반응하여 선택적인 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

MAPK 경로의 신호전달은 첫 단계로 RAS가 활성화된 후 차례로 RAF를 이동시키고 MEK1/MEK2를 활성화시킨 다음 ERK1/ERK2를 활성화시키고 ERK1/ERK2는 핵으로 이동하여 cyclin D1의 활성화와 p27의 억제를 통해 세포증식을 유도한다. Solit 등¹⁵은 MEK 억제제인 CI-1040을 치료하였을 때 MEK 활성 억제 후에 G₁ 기에서 세포주기의 정지가 일어났으며 cyclin D1의 발현감소와 잘 비례한다고 하였다. 본 연구에서도 AZD6244는 G₀/G₁ fraction의 증가와 S 기의 감소를 보여 G₀/G₁ 기에서 세포주기의 정지를 유도함을 알 수 있었고, ERK 경로의 세포주기 조절분자인 cyclin D1의 발현이 치료농도에 비례하여 감소함을 알 수 있었다.

ERK는 몇 가지 기전을 통해 세포고사를 방해할 수 있다. Caspase의 활성을 방해하고 항세포고사 단백질의 발현을 유도하고 전사인자인 NF- κ B를 활성화시킬 수 있다.^{16,17} MyD88의 고발현을 보이는 난소암 세포에서 TLR-4의 리간드인 파클리탁셀이 TLR-4/MyD88 경로를 통해 NF- κ B를 활성화하고 IL-6, IL-8 등의 염증성 사이토카인을 생성하여 세포증식과 항암제 내성을 유도한다고

하였다.¹⁸ 본 연구에서 MyD88 양성이며 p-ERK 저발현을 보인 R182 세포에 AZD6244를 치료하였을 때 IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF의 감소가 나타났다. 이러한 파클리탁셀에 상반된 효과는 결국 NF- κ B의 억제에 따른 변화로 생각된다.

ERK 경로를 차단하는 약제는 'cytostatic' agent로 분류되는데, 이는 암세포의 성장을 억제하지만 그 자체로 세포고사를 유도하는 효과는 미미하다. 항암요법에서 병합요법은 표준접근법이며 MEK 억제제를 병합하면 ara-C, cisplatin, paclitaxel/taxotere, vinblastine/ vincristine 등의 세포독성 약제의 효과를 증강시킬 수 있다.¹⁹ MEK 억제제가 기존 항암제의 효과를 증강시키는 기전은 명확하지는 않다. 세포독성 항암제는 ERK 경로를 활성화시켜 세포생존을 유도하고 항암효과를 감소시키므로 병합투여된 MEK 억제제가 이 경로를 차단함으로써 효과를 증강시키는 것으로 이해된다.¹⁰ 파클리탁셀은 아주 효과적으로 세포독성을 유도하는 항암제이지만 또한 세포생존 경로인 ERK 경로를 활성화시켜 세포의 증식과 생존을 조장하여 세포독성 효과를 약화시키는 효과도 가진다. 또한 ERK가 caspase, Bim-EL, IEX1, Bad 등의 여러 세포고사 유도 단백질의 활성을 억제하는데 MEK 억제제는 ERK를 효과적으로 차단함으로써 이러한 세포고사 유도 단백질의 활성화로 세포독성 효과를 증강시킬 수 있다.²⁰ 폐암과 난소암 세포에서 U0126, PD098059를 파클리탁셀에 병합하였을 때 세포고사 효과를 4배 이상 증강시켰다.²¹ 본 연구에서 난소암 세포에서는 AZD6244를 파클리탁셀과 병합하였을 때 파클리탁셀에 의한 ERK 경로의 활성화를 효과적으로 상쇄하였고, caspase의 활성도를 유의하게 증가시켰다. 특히 파클리탁셀에 저항성을 보이며 MyD88 고발현을 보이고 p-ERK의 기초 활성도는 낮은 R182 세포에서 파클리탁셀에 의해서는 ERK 경로의 활성화가 뚜렷하게 나타나지만 AZD6244를 병합하였을 때 ERK의 감소와 함께 유의한 세포독성 효과의 증강이 나타났다.

AZD6244는 암세포가 여러 항암제에 감수성을 가지도록 한다. 그 예로 AZD6244는 대장암 세포를 이용한 동물 실험에서 docetaxel과 irinotecan의 세포독성 효과를 증강시켜 시너지 (synergy) 효과를 나타내었다.²⁰ MEK 억제제와 함께 사용하여 시너지 효과나 부가 효과를 보이는 약제들로는 EGFR inhibitor, tamoxifen, PI3K inhibitor,

histone deacetylase inhibitor 등이 보고되었다.⁴

ERK 경로를 차단하는 표적약제 개발에서 중요한 것은 약제에 예민하게 반응할 환자의 선별을 위해 유전적 혹은 생화학적 표지자를 발견하는 것이다. BRAF 돌연변이를 가진 흑색종과 갑상선암 세포가 PD0325901에 민감하게 반응하였으며,^{15,22} AZD6244의 경우도 NRAS, BRAF 돌연변이가 있는 종양에서 민감하게 반응하여 BRAF 돌연변이가 유용한 표지자가 될 수 있다. 사람의 여러 암세포에서 BRAF나 RAS 돌연변이를 가진 세포가 AZD6244에 보다 예민하게 반응하는 뚜렷한 경향을 보였으나 일부 KRAS 돌연변이를 가진 세포는 저항성을 보여 이러한 경향은 절대적인 것은 아님을 보여준다.²⁰ Davies 등²⁰은 동물실험의 종양조직에서 면역조직화학염색과 western blot 분석으로 p-ERK가 AZD6244 치료 시에 치료반응을 예측할 수 있는 유용한 표지자라고 하였고, Kohno 등¹⁰은 수술시 채취된 조직에서 p-ERK의 면역염색을 제안하였다. 반면 p-ERK가 MEK 활성 억제의 좋은 표지자이긴 하지만 p-ERK의 기초 활성도나 p-ERK의 억제 정도가 약제의 임상적 효용성과 꼭 비례하는 것은 아니어서 한 가지 표지자만으로 환자선택에 유용한 지표로 삼기에는 충분치 않아 많은 추가연구가 필요하리라 생각된다.^{4,5}

이상의 연구에서 MEK 억제제인 AZD6244이 파클리탁셀의 세포독성 효과를 증강시키는 효과를 가짐으로 난소암의 항암요법 시 병합요법을 시행하게 되면 재발률을 낮추고 생존율을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. AZD6244에 민감하게 반응하여 세포증식을 억제할 수 있는 것은 p-ERK의 기초 활성도가 높은 난소암 세포들이며, 또한 파클리탁셀에 의해 ERK 경로가 활성화되는 MyD88 양성, p-ERK의 저발현 세포에서는 AZD6244를 병합함으로써 유의한 세포독성 효과의 증강을 기대할 수 있음을 알 수 있었다. 현재의 항암요법은 대부분 조직학적 유형에 따라 결정하고 있지만 ERK 경로가 활성화된 난소암 환자에서 MEK 억제제의 병합요법으로 생존율을 향상시킬 것으로 기대되며 ERK는 유용한 치료표적이 될 것으로 사료된다. 향후 BRAF 돌연변이나 p-ERK 외에도 MyD88과 같은 분자 표지자들이 p-ERK 발현과 함께 환자 선택에 유용한 표지자가 될 수 있는 지 추가연구가 필요하다. 또한 많은 임상시험이 MEK 억제제의 단독효과에 대한 보고여서 MEK 억제제가 실제 임상에서의 유용성을 가지기 위해서

는 기존의 세포독성 항암제와 병합요법에서 유용성을 가져 생각된다.
야 하므로 이에 대한 기초연구와 임상시험이 필요하리라

참고문헌

1. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoti A, Hartmann LC. Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 751-70.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
3. Pouyssegur J, Lenormand P. Fidelity and Spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *Eur J Biochem* 2003; 270: 3291-9.
4. Friday BB, Yu C, Dy GK, Smith PD, Wang L, Thibodeau SN, et al. BRAF V600E disrupts AZD6244-induced abrogation of negative feedback pathways between extracellular signal-regulated kinase and Raf proteins. *Cancer Res* 2008; 68: 6145-53.
5. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 2009; 283: 125-34.
6. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6771-90.
7. Allen LF, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* 2003; 30 (5 Suppl 16): 105-16.
8. Zeng P, Wagoner HA, Pescovitz OH, Steinmetz R. RNA interference (RNAi) for extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) alone is sufficient to suppress cell viability in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 961-7.
9. Hsu CY, Bristow R, Cha MS, Wang BG, Ho CL, Kurman RJ, et al. Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6432-6.
10. Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 2006; 38: 200-11.
11. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006; 24: 21-44.
12. Nakayama N, Nakayama K, Yeasmin S, Ishibashi M, Katagiri A, Iida K, et al. KRAS or BRAF mutation status is a useful predictor of sensitivity to MEK inhibition in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 2020-8.
13. Sieben NL, Macropoulos P, Roemen GM, Kolkman-Uljee SM, Jan Fleuren G, Houmadi R, et al. In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* 2004; 202: 336-40.
14. Cho YH, Kim DY, Kim JH, Kim YM, Kim KR, Nam JH, et al. Mutational analysis of KRAS, BRAF, and TP53 genes of ovarian serous carcinomas in Korean women. *Yonsei Med J* 2009; 50: 266-72.
15. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358-62.
16. Mayo MW, Norris JL, Baldwin AS. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 2001; 333: 73-87.
17. Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 2001; 276: 16484-90.
18. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3859-68.
19. Dent P, Grant S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 775-83.
20. Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, Steele S, Jenkins R, et al. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2209-19.
21. MacKeigan JP, Collins TS, Ting JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 38953-6.
22. Leboeuf R, Baumgartner JE, Benezra M, Malaguarnera R, Solit D, Pratilas CA, et al. BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2194-201.

= 국문초록 =

목적: 상피성 난소암 세포에서 세포증식과 생존에 관여하는 ERK 경로의 기초 활성도를 조사하고, MEK 억제제인 AZD6244가 난소암 세포의 증식과 세포주기, 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향과 AZD6244를 파클리탁셀과 병합치료를 하였을 때 세포독성 효과의 증강이 있는 지를 알아보려고 하였다.

연구 방법: 난소암 환자의 복수에서 분리한 일차세포와 확립되어진 난소암 세포주를 각각 AZD6244 (0.1-10 μ M)를 24, 48, 72시간 동안 치료하였다. Cell viability는 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay를 통해서, caspase 활성도는 Caspase-Glo assay를 이용하였다. 사이토카인의 분석은 세포배양 후 배양액의 상층액을 채취하여 Luminex 200 system을 이용하여 측정하였고, flow cytometry를 이용해 세포주기를 분석하였으며, p-ERK와 cyclin D1은 western blot 분석을 하였다.

결과: AZD6244는 기초 p-ERK 활성도가 높은 세포나 낮은 세포 모두에서 p-ERK를 억제하였다. AZD6244는 p-ERK의 고발현 세포 (A2780, O1-28, R454)에서 치료농도와 치료기간에 비례하여 효과적으로 증식억제를 보였다. 하지만 p-ERK의 저발현 세포 (CP70, R182)에서는 큰 차이를 보이지 않았다. AZD6244에 민감하게 세포증식의 억제반응을 보인 A2780 세포에서도 caspase-3/7 활성도는 유의한 증가가 관찰되지 않았다. AZD6244는 IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF를 감소시켰다. 파클리탁셀과 AZD6244의 병합요법은 파클리탁셀에 의한 ERK 경로의 활성화를 AZD6244에 의해 효과적으로 상쇄시키며, 세포독성 효과의 유의한 증강이 나타났다.

결론: AZD6244는 p-ERK의 고발현 세포에서 효과적으로 세포증식 억제효과를 보이며, 파클리탁셀과 AZD6244의 병합요법은 난소암 세포에서 유의한 세포고사를 유도하며 AZD6244에 의한 ERK 경로의 억제가 파클리탁셀의 세포독성 효과를 증강시키는 데에 관여함을 보여준다.

중심단어: 난소암, MEK 억제제, AZD6244, 파클리탁셀
