

폐암세포주에서 IGF-1R 억제를 이용한 TRAIL 및 gefitinib에 대한 감수성 증가를 위한 연구

서울대학교 의과대학 내과, 의학연구원 폐연구소, 분당서울대학교병원 내과, 폐센터
이윤진, 박미영, 강영애, 권성연, 윤호일, 이재호, 이춘택

Enhancement of Sensitivity of Human Lung Cancer Cell Line to TRAIL and Gefitinib by IGF-1R Blockade

Yoon-Jin Lee, M.S., Mi-Young Park, M.S., Young Ae Kang, M.D., Sung-Youn Kwon, M.D., Ho-Il Yoon, M.D.,
Jae-Ho Lee, M.D., Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea, Department of Medicine, Respiratory Center, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Background: TRAIL is a cytokine that selectively induces apoptosis in various cancer cell lines. Gefitinib is new targeted drug applied in lung cancer that selectively inhibits EGFR tyrosine kinase. However, lung cancers have shown an initial or acquired resistance to these drugs. This study examined the effect of IGF-1R and its blockade on enhancing the sensitivity of lung cancer cell lines to TRAIL and gefitinib.

Methods: Two lung cancer cell lines were used in this study. NCI H460 is very sensitive to TRAIL and gefitinib. On the other hand, A549 shows moderate resistance to TRAIL and gefitinib. The IGF-1R blockade was performed using adenoviruses expressing the dominant negative IGF-1R and shRNA to IGF-1R and AG1024 (IGF-1R tyrosine kinase inhibitor).

Results: The adenovirus expressing dominant negative IGF-1R(950st) induced the increased expression of defective IGF-1R on the lung cancer cell surface, and the adenovirus-shIGF-1R effectively decreased the level of IGF-1R expression on cell surface. The genetic blockade of IGF-1R by the adenovirus-dnIGF-1R and AG1024 increased the sensitivity of A549 cells to TRAIL. The reduction of IGF-1R by transduction with ad-shIGF-1R also increased the sensitivity of the A549 cells to gefitinib.

Conclusion: The blockade of IGF-1R through various mechanisms increased the sensitivity of the lung cancer cell line that was resistant to TRAIL and gefitinib. However, further studies using other cell lines showing acquired resistance as well as in vivo animal experiments will be needed. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 42-51)

Key Words: TRAIL, Gefitinib, IGF-1R, Lung cancer.

서론

Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand(이하 TRAIL)은 TNF family에 속하는 사이토카인으로 정상세포에는 영향을 주지 않고 암세포를 포함한 형질변형세포에만 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다¹.

이러한 특성으로 TRAIL을 암의 치료에 사용하려는 연구가 많이 있어 왔다. 그러나 TRAIL을 임상에 사용하기에는 많은 양이 필요하고 또한 주사 후 5시간 이내에 대부분이 배설되는 단점이 있다. 이 외에 TRAIL에 대한 문제점으로 많은 암세포가 TRAIL에 대한 저항성을 보인다는 점이다. TRAIL의 작용기전은 세포막에 있는 death receptor 4, 5(이하 DR4, DR5)와 결합하여 일어난다. 현재까지 알려진 TRAIL에 대한 저항성의 기전으로는 여러 기전이 제시되고 있다². Decoy receptor의 발현³, DR의 변이 또는 발현 감소⁴, caspase의 소실⁵, 및 억제제(cFLIP 등)⁶ 등이 제시되고 있다. 본 연구자는 단백질 형태로 투여하는 TRAIL(soluble form: sTRAIL) 대신에 TRAIL(full length)을 발현하는 유전자재조합 아데노바이러스(ad-TRAIL)를 이용하여 sTRAIL에 저항성을 보이

이 연구는 2004년 서울대학교 신입교수 정착연구비(800-2004-62) 보조로 이루어 졌음.

Address for correspondence: **Choon-Taek Lee, M.D.**
Department of Medicine, Respiratory Center, Seoul National University Bundang Hospital, 300 Gumi-dong, Bandang-gu, Seongnam 463-707, Korea
Phone: 82-31-787-7002, Fax: 82-31-787-4052
E-mail: ctlee@snu.ac.kr
Received: Apr. 20. 2007
Accepted: Jul. 9. 2007

는 암세포주(A549, SKOV3, HT-29, LNCap)에 apoptosis를 유발할 수 있음을 증명하여 TRAIL에 세포 내에서 발현 될 때는 저항성을 극복할 수 있음을 보고한 바 있다⁷.

Gefitinib(Iressa®)은 epidermal growth factor I receptor(EGFR)의 tyrosine kinase를 억제하는 물질로 최근 비소세포폐암 환자에 새로운 표적치료제로 많이 사용되고 있다⁸. 초기의 기대와는 달리 대규모 임상 연구에서 폐암환자의 생존기간을 유의하게 증가시키는 데는 실패하였으나⁹ 일부의 환자 군에서 획기적인 효과를 보이고 있다. 즉 비흡연자, 선암(특히 기관지폐포세포암), 여성 및 아시아 인종에서는 높은 치료효과 및 생존기간의 연장을 보이고 있다¹⁰. 그러나 gefitinib에 초기부터 저항성을 보이거나 혹은 초기에는 반응을 보이다가 저항성을 보이는 경우가 많아지고 있다. 많은 연구에 의해 gefitinib에 대한 폐암세포의 감수성이 특정 exon의 변이에 기인한다는 사실이 알려졌다^{11,12}. 그러나 저항성 발현의 기전은 아직 확립되고 있지 않다. 새로운 EGFR의 변이가 저항성을 유발한다는 연구가 있으나 전부를 설명하지는 못하고 있다.

TRAIL 및 gefitinib은 모두 폐암에 사용될 수 있는 새로운 표적치료제로 세포막의 수용체에 작용하여 apoptosis를 유발한다는 유사점이 있다.

최근 TRAIL, gefitinib 등의 항암물질에 대한 저항성의 기전으로 antiapoptotic growth factor receptor들의 역할이 주목을 받고 있다. 즉 암세포의 성장 및 형질유지에 중요 역할을 하는 성장인자 및 그 수용체로 epidermal growth factor receptor(EGFR), HER2/neu 및 insulin-like growth factor-1 receptor(IGF-1R) 등이 항암제, 방사선치료 및 여러 항암 cytokine의 효과를 억제하며 이를 억제하면 그 효과를 증강시킬 수 있다.

IGF-1 및 그 수용체인 IGF-1R는 대표적인 성장인자의 하나로 암세포의 성장 및 악성형질변화에 중요한 역할을 하며 세포에 대한 apoptosis를 유도하는 자극(항암치료, 방사선치료 및 그 외에 항암 cytokine)에 대한 세포 내의 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt kinase의 활성화, BAD의 인산화 및

cFLIP을 유도 등을 통해 antiapoptosis를 유도한다고 알려져 있다¹³⁻¹⁵.

갑상선암세포를 IGF-1로 자극하면 TRAIL에 대한 감수성이 저하되고 이는 DR의 발현에 대한 영향없이 apoptosis의 억제물질인 cFLIP, cIAP2 등을 증가시킴에 기인한다는 보고가 있다¹⁶. TRAIL은 다발성골수종 세포에서 NFκB의 활성화와 IGF-1/Akt pathway의 활성화를 이용하여 antiapoptotic protein을 상승시켜 저항성을 유도한다는 보고가 있다¹⁷.

또한 IGF-1R의 signaling을 억제하면 유방암, 전립선암에서 gefitinib에 대한 de novo 또는 획득내성을 억제한다는 연구^{18,19}들이 보고 되고 있다. 또한 간암세포에서도 gefitinib에 대한 내성에서도 IGF-1/Akt pathway가 관여함이 보고 되었다²⁰.

본 연구에서는 TRAIL에 대한 중등도의 저항성을 보이는 폐암세포주(A549)를 대상으로 불완전 형태의 IGF-1R을 발현하는 adenovirus-IGF-1R/950과 soluble 형태의 482 aminoacid 크기의 IGF-1R을 세포 밖으로 분비하여 IGF-1과 결합하여 IGF-1 pathway를 억제하는 adenovirus-IGF-1R/482²¹ 및 IGF-1R의 tyrosine kinase의 억제제로 알려진 AG1024를 이용하여 IGF-1 pathway를 차단한 후 TRAIL에 대한 감수성의 변화를 관찰하고 그 기전을 연구하였다.

또한 gefitinib에 중등도의 저항성을 보이는 A549를 대상으로 IGF-1R을 RNA 간섭(interference)²²을 이용하여 IGF-1R의 발현을 억제하는 adenovirus-short hairpin(sh)IGF-1R을 이용하여 IGF-1 pathway를 차단 후 gefitinib에 대한 폐암세포주의 감수성의 변화를 관찰하였다²³.

연구재료 및 방법

1. 폐암세포주

TRAIL, gefitinib에 대해 중등도의 저항성을 보이는 사람기관지폐포세포암주(A549) 및 TRAIL에 감수성이 높은 사람폐대세포암주(NCI H460)을 대상으로 하였다. 위의 세포주는 한국세포주은행(서울)를 통해 구입하였으며 10% 우태혈청을 보충한 RPMI-1640

배양액에서 배양하였다.

2. 연구재료

1) TRAIL (soluble TRAIL:Apo2L; human)은 전 TRAIL의 114-281번 aminoacid를 가진 유전자재조합을 통해 생산된 soluble form의 TRAIL로 Biomol (Plymouth, PA, USA)에서 구입하였다. Gefitinib은 한국 Astra Zeneka사를 통해 제공받았다.

2) Adenovirus-IGF-1R/950 및 adenovirus-IGF-1R/482은 본 연구실에서 제작하였다. 세포막에 발현은 할 수 있으나 세포 내 domain의 tyrosine kinase domain이 없는 불완전한 형태의 IGF-1R(950 amino acid 크기)를 발현하는 adenovirus-IGF-1R/950은 불완전한 형태의 IGF-1R을 세포막에 발현하여 IGF-1과 결합하여 정상적인 IGF-1의 자극 전달을 차단한다. Adenovirus-IGF-1R/482은 soluble 형태의 482 아미노산 크기의 IGF-1R(soluble IGF-1R)을 세포 밖으로 분비하여 IGF-1과 결합하여 IGF-1 pathway를 억제한다. 즉 위 두 종류의 recombinant adenovirus는 dominant negative 기전으로 IGF-1 pathway를 억제하게 된다²¹.

3) Adenovirus-shIGF-1R은 IGF-1R을 RNA 간섭 현상을 이용하여 전사단계에서 IGF-1R의 발현을 억제한다. 즉 IGF-1R mRNA 염기서열(NM_000875)에서 Genscript corporation(Scotch Plains, NJ, USA)의 target finder program 및 pBLAST filtering 시행하여 10개의 가능성이 있는 siRNA 염기서열을 결정하였다. 이에 대한 dsRNA를 제작한 다음(Genscript), 폐암세포주(NCI H358)에 FuGENE6를 이용하여 transfection 한 후 48시간 후 IGF-1R에 대한 Western blot을 시행하여 가장 억제가 강한 siRNA를 결정하였다. 위 결과로부터 3425번부터의 19bp(ACG CCAATAAGTTCGTCCA)을 siRNA 염기서열로 선정하였다. Adenovirus-shIGF-1R을 제작하기 위해 3425번부터 19bp의 DNA sequence(sense) 및 loop sequence와 이어서 19bp의 antisense를 가진 72bp의 oligonucleotide를 제작하고 이에 대해 상보적인 oligonucleotide를 제작하였다(Genscript). 위의 2 strand

의 64-bp DNA를 ligation 한 후 H1 RNA promotor가진 adenoviral shuttle vector(pShuttle with H1 RNA promotor)에 cloning한 후 BD Adeno-X expression system(BD science)을 이용하여 E-coli에 transformation 한 후 recombination이 일어난 ad-shIGF-1R의 DNA를 293cell에 transfection 한 후 adenovirus를 생산하였다. Ad-shIGF-1R은 세포 내에 감염된 후 IGF-1R에 대한 sense-loop-antisense로 이루어진 72bp의 RNA를 전사한다. 이 RNA는 sense와 anti-sense 간의 결합이 일어나고 한 쪽에 loop 염기서열을 가진 short hairpin형태의 ds RNA를 형성하고 이는 DICER에 의해 loop부위가 제거되어 ds siRNA가 되어 RNA interference현상을 보이게 된다^{23,24}.

4) AG1024(Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA)은 tyrphostin 유도체로 IGF-1R와 결합하여 autophosphorylation을 억제하는 IGF-1R의 tyrosine kinase inhibitor(TKI) 물질이다²⁵.

3. Adenovirus-IGF-1R/950의 감염에 의한 세포막에 IGF-1R의 발현의 변화 확인

Dominant negative 기전에 의한 IGF-1 pathway의 억제를 증명하기 위해 두 종류의 adenovirus-IGF-1R(950, 482)를 20 moi로 A549세포에 transduction 시킨 후 48시간 후 IGF-1R α chain(N20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 항체로 염색 후 FACS를 이용하여 암세포의 세포막에 발현되는 IGF-1R의 변화를 관찰하였다.

4. Adenovirus-shIGF-1R에 의한 IGF-1R의 발현 억제

IGF-1R을 억제하는 siRNA를 발현하는 ad-shIGF-1R의 효과를 확인하기 위해 A549세포에 ad-shIGF-1R을 5, 10, 20 moi로 transduction 후 48시간 후 IGF-1R β chain항체(H-60, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 Western blot을 시행하여 IGF-1R의 발현의 변화를 확인하였다²³.

5. Adenovirus-IGF-1R(950, 482)의 전처치가 TRAIL에 대한 폐암세포주의 감수성에 미치는 영향

TRAIL에 대한 중등도의 저항성을 보이는 A549와 감수성을 보이는 NCI H460을 ad-IGF-1R(950, 482)를 20 moi로 transduction 하였다. 음성대조군으로 ad-null(target 유전자가 없는 backbone만 가진 adenovirus) 및 양성대조군으로 NF κ B의 활성화를 억제하여 TRAIL의 감수성을 높일 수 있음이 증명된 NF κ B의 활성화를 억제하기 위해^{26,27} adenovirus-I κ B α 를 사용하였다. Transduction 후 24시간 후 TRAIL을 0, 100, 200, 400 nM로 처리하였다. 72시간 후 세포 수를 측정하고 각군의 TRAIL을 처리하지 않은 군에 대한 % 생존율을 계산하였다.

6. IGF-1R의 tyrosine kinase inhibitor (AG1024)가 TRAIL 감수성에 미치는 영향

TRAIL에 중등도 저항성을 보이는 A549 세포에 AG 1024(20 μ M)를 24시간 투여 후 (대조군은 동량의 DMSO투여) TRAIL을 0, 200 및 400 ng/ml로 처리하

고 72시간 후 세포 수를 측정하고 각군의 TRAIL을 처리하지 않은 well의 세포에 대한 % 생존율을 계산하였다.

7. Adenovirus-shIGF-1R에 의한 IGF-1R의 억제가 폐암세포주의 Gefitinib에 대한 감수성에 미치는 영향

Gefitinib에 대해 중등도의 내성을 보이는 A549 세포를 0, 10, 50, 100 및 200 moi의 ad-shIGF-1R로 transduction시키고 24시간 후 gefitinib을 0, 0.2, 2, 20 및 50 μ M로 처리하고 72시간 후 세포 수를 측정하고 각군의 gefitinib을 처리하지 않은 well의 세포에 대한 % 생존율을 계산하였다.

8. 통계학적 분석

약제 감수성 비교는 one way analysis of variance (ANOVA)로 검증하였고 p<0.05를 유의한 차이로 정의하였다(SPSS version 12.0K, Chicago, IL, USA).

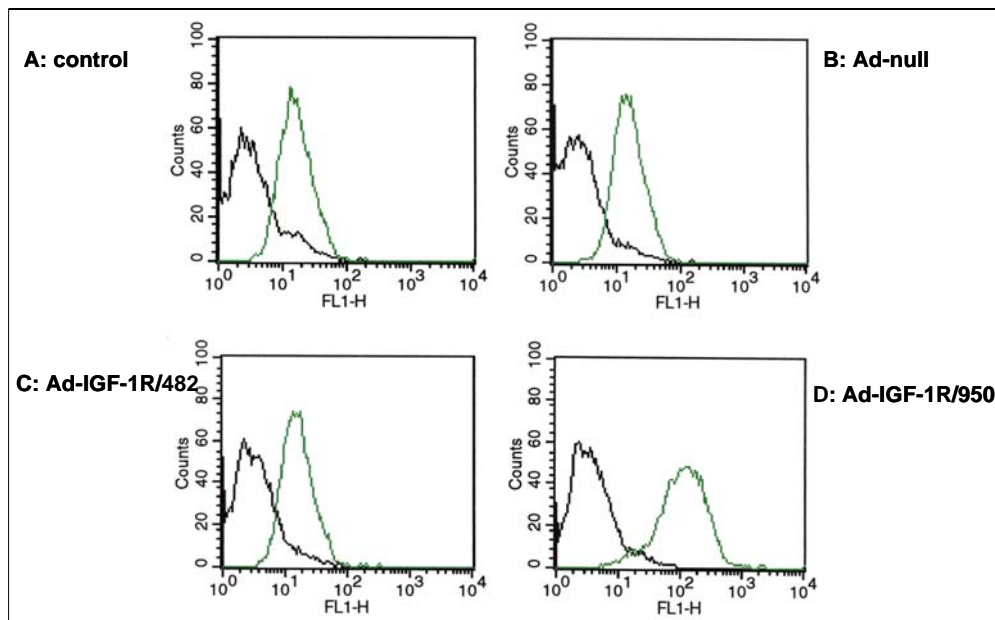


Figure 1. Changes of IGF-1R expression on the cell surface of lung cancer cell lines after transduction with ad-IGF-1R/482 and 950. (mean value of IGF-1R; Control: 20.6, ad-null: 18.7, ad-IGF-1R/482: 17.8, ad-IGF-1R/950: 138.5)

결 과

1. Ad-IGF-1R950 및 ad-IGF-1R/482 처리 후 세포막의 IGF-1R의 발현의 변화

불완전 형태의 IGF-1R를 발현하는 ad-IGF-1R (950, 482)를 폐암세포주 (A549)에 감염 후 세포막에 발현되는 IGF-1R을 측정한 결과 ad-IGF-1R/950으로 감염시킨 세포에서는 평균치가 138.5로 대조군 20.6, ad-null 18.7 및 ad-IGF-1R/482의 17.8에 비해 현저히 증가하여 세포막에 불완전 형태의 IGF-1R가 발현하는 것을 확인할 수 있었다. Ad-IGF-1R/482은 482 aminoacid 크기의 IGF-1R을 발현하나 이는 세포막에 발현되지 못하고 soluble form으로 세포 밖으로 배출되어 세포막의 IGF-1R의 발현에는 영향이 없었다(Figure 1).

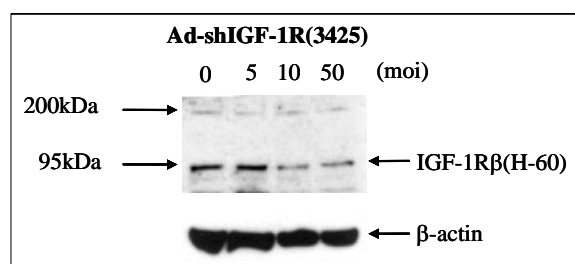


Figure 2. Suppression of IGF-1R expression by transduction with adenovirus-shIGF-1R

2. Adenovirus-shIGF-1R에 의한 IGF-1R의 발현 억제

ad-shIGF-1R에 의한 IGF-1R의 발현의 변화를 western blot으로 확인한 결과 10, 50 moi의 ad-shIGF-1R로 감염시킨 폐암세포주에서 IGF-1R의 β chain의 발현이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 2). FACS에 의한 IGF-1R의 변화는 본 연구진의 이전 논문에서 이미 확인하였다²³.

3. Adenovirus-IGF-1R/482, 950에 의한 IGF-1R의 dominant negative억제가 TRAIL에 대한 감수성의 변화

TRAIL에 저항성을 보이는 A549 세포에 ad-IGF-1R/482, 950으로 IGF-1R를 억제한 결과 TRAIL에 대한 감수성이 현저히 증가하였다. 이 현상은 ad-IGF-1R/950에서 더 강력하였다. Ad-IGF-1R/950이 ad-IGF-1R/482보다 강력한 이유는 ad-IGF-1R/950은 세포막에 불완전한 형태의 IGF-1R를 발현하여 IGF-1에 대해 강력하게 경쟁적으로 결합하여 차단하나 ad-IGF-1R/482는 soluble form의 inhibitor를 media 내로 분비하여 media에서 IGF-1과 결합하여 억제하므로 상대적으로 억제 능력이 약하다. 이는 이전의 연구자의 논문에서도 확인된바 있다²¹. 또한 이는

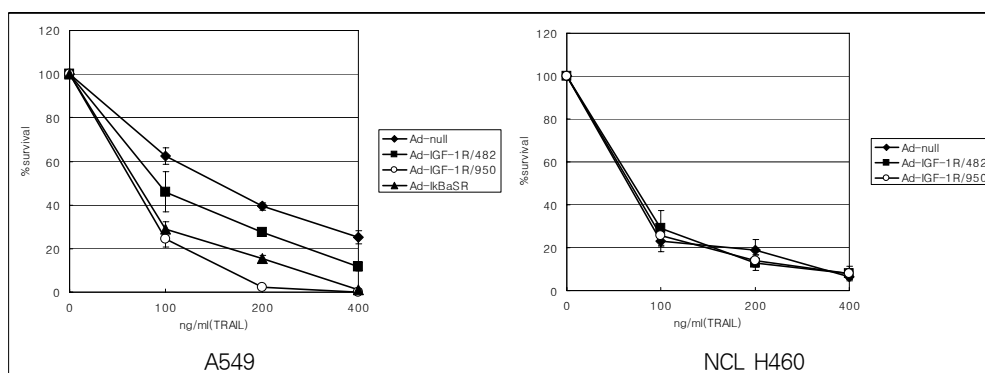


Figure 3. Enhancement of sensitivity of A549(resistant cell line to TRAIL) to TRAIL after transduction with ad-IGF-1R/482 and 950($p < 0.01$ compared with ad-null). No significant enhancement was found in NCI H460 (sensitive cell line to TRAIL). (Y-axis: relative survival)

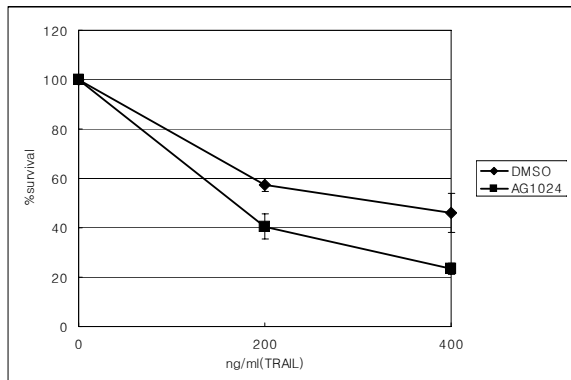


Figure 4. Enhancement of sensitivity of A549(resistant cell line to TRAIL) to TRAIL after treatment with AG1024 (IGF-1R tyrosine kinase inhibitor). ($p < 0.05$). (Y-axis: relative survival)

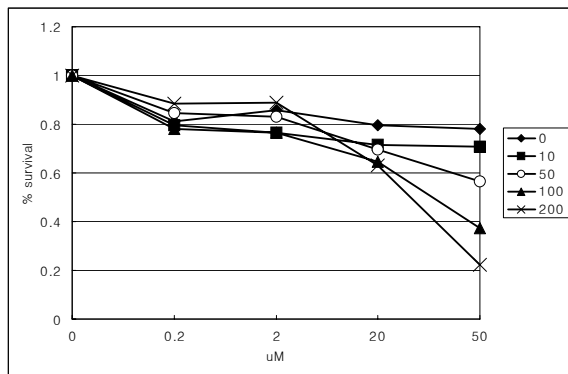


Figure 5. Enhancement of sensitivity of A549(resistant cell line to gefitinib) to gefitinib after transduction with ad-shIGF-1R. Significant enhancement was found at transduction with ad-shIGF-1R over 50 moi ($p < 0.05$). (Y-axis: relative survival)

TRAIL에 의한 NF κ B의 활성화를 억제하여 감수성을 증가시킨다²⁸고 알려진 ad-I κ B α 보다도 강력하였다. 그러나 TRAIL에 대한 감수성이 높은 NCI H460에서는 이 현상을 확인할 수 없었다(Figure 3).

4. IGF-1R tyrosine kinase inhibitor (AG1024)에 의한 IGF-1R의 억제에 의한 A549의 TRAIL에 대한 감수성 변화

AG1024의 투여로 IGF-1R의 tyrosine kinase를 억제한 결과 A549의 TRAIL에 대한 감수성이 증가하였다(Figure 4). 이상의 결과로 여러 형태의 IGF-1R의

억제가 TRAIL에 대한 저항성을 보이는 폐암세포주에서 TRAIL의 항암효과를 높임을 확인할 수 있었다.

5. Adenovirus-shIGF-1R을 이용한 IGF-1R의 억제가 폐암세포주의 gefitinib에 대한 감수성에 미치는 영향

Gefitinib에 중등도의 저항성이 있는 A549에 ad-shIGF-1R을 투여하여 IGF-1R의 발현을 억제한 결과 gefitinib에 대한 감수성이 증가하였다. 이는 50 moi 이상의 감염에서 현저하였다(Figure 5).

고 찰

IGF-1R는 대표적인 antiapoptosis 역할을 하는 수용체로 알려져 있다. 즉 암세포 외부에서의 독성 자극에 저항하는 중요 기전이라 알려져 있다. IGF-1R를 억제하여 암세포를 사멸시키거나 다른 항암제 또는 방사선에 대한 감수성을 높이려는 연구가 많이 시도되고 있으나 아직 임상에는 적용되지 않고 있다^{13,29}.

IGF-1R를 억제하는 방법에는 유전자적인 방법과 비유전자적인 방법으로 구분할 수 있다. 유전자적인 억제방법으로는 antisense, ribozyme 및 siRNA를 이용한 RNA interference 등으로 mRNA를 억제하여 IGF-1R의 발현을 억제하는 방법과 dominant negative 방식으로 truncated form의 IGF-1R과 또는 soluble form의 IGF-1R를 세포 밖으로 배출하여 IGF-1과 결합하여 IGF-1R pathway를 차단하는 방법이 있다. 비유전자적인 방법에는 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor(TKI)를 사용하는 방법과 IGF-1R에 대한 monoclonal antibody를 사용하는 방법이 있다(Figure 6)^{13,24}.

본 연구진은 이미 IGF-1R에 대한 antisense를 발현하는 adenovirus(ad-asIGF-1R)³⁰와 truncated form의 IGF-1R을 발현하는 ad-IGF-1R/950 및 soluble form의 IGF-1R를 발현하는 ad-IGF-1R/482를 제작하여 폐암세포주²¹ 및 여러 암세포주에서 항암효과를 보이고 또한 항암제에 대한 감수성을 증가시킴을 보고한 바 있다^{31,32}. 또한 최근 IGF-1R에 대한 siRNA를

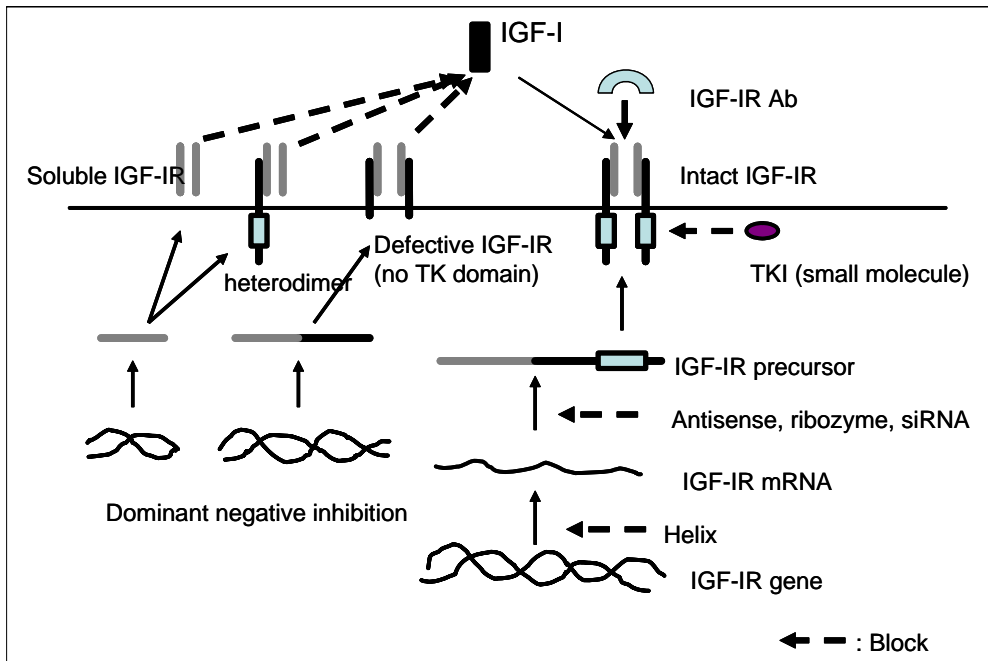


Figure 6. Blockade of dominant-acting genes such as IGF-1R using genetic and non-genetic inhibition (adopted from Lee CT and Carbone DP. Chapter 52 Gene Therapy in 'Lung Cancer' 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins with permission).

발현할 수 있는 ad-shIGF-1R을 제작하여 폐암세포주에서 항암제에 대한 감수성을 증가시킴을 보고하였다²³.

본 연구에서 dominant negative inhibition 및 RNA interference를 이용한 유전학적 IGF-1R 억제와 IGF-1R TKI인 AG1024를 이용하여 IGF-1R를 억제하고 TRAIL 및 gefitinib에 대해서 중등도의 저항성을 보이는 폐암세포주에서 감수성의 변화를 관찰하였다.

TRAIL에 대해 저항성을 보이는 폐암세포주(A549)에서는 IGF-1R를 억제하면 TRAIL에 대한 감수성이 회복되었으나 이미 TRAIL에 대한 감수성이 높은 NCI H460에서는 변화가 없었다. 이로 폐암세포의 TRAIL에 대한 저항성에 IGF-1R가 관여함을 알 수 있었다. 특히 TRAIL에 대한 저항성의 한 기전으로 TRAIL자극에 대해 NF κ B가 활성화가 증명되어 있다²⁸. 이번 실험에서는 저항성 극복의 양성 기준으로 NF κ B의 활성화를 비가역적으로 억제하는 ad-I κ B α 를 사용하였다. Ad-IGF-1R/482, 950과 ad-I κ B α 에 전처치에 의한 A549의 TRAIL에 대한 감수성의 변화를 비

교한 결과 ad-IGF-1R/950을 이용한 IGF-1R의 억제가 ad-I κ B α 에 의한 NF κ B의 활성화 억제보다 강력함을 확인하였다.

EGFR tyrosine kinase inhibitor인 gefitinib에 대한 저항성이 최근 문제가 되고 있다. 일부에서는 처음부터 저항성을 보이기도 하고 일부에서는 초기에는 감수성을 보이다가 치료 중 획득내성을 보이기도 한다. EGFR의 점돌연변이 및 deletion이 그 기전으로 일부 밝혀지고 있으나 전체를 설명하지는 못 하고 있다. 최근 EGFR과 IGF-1R사이에 cross-talk의 중요성이 확인되면서^{20,33} 암의 대표적인 성장인자인 EGFR의 억제와 대표적인 antiapoptosis 인자인 IGF-1R의 이중 억제가 연구되고 있다.

최근 EGFR tyrosine kinase inhibitor인 gefitinib과 erlotinib에 저항성을 보이는 폐암세포주에서 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor(AG1024)로 IGF-1R pathway를 억제한 결과 gefitinib에 의한 폐암성장억제효과가 증가된다는 본 연구와 비슷한 연구결과가 보고되었다³³. 같은 연구³³에서 EGFR과 IGF-1R간의 cross-talk의 기전으로 1) 폐암세포주의 IGF-1R과

pIGF-1R의 발현 정도와 gefitinib에 대한 감수성과 반비례하였고 2) IGF-1R의 발현이 높은 폐암세포에 gefitinib을 처리하면 IGF-1R 및 downstream mediator의 인산화를 유도하고 3) gefitinib은 EGFR과 IGF-1R의 heterodimerization을 유도하며 survivin의 발현을 유도하여 저항성을 보임을 보고하였다. 그러나 erlotinib에서는 위의 현상이 발견되지 않았다.

본 연구에서는 일부의 폐암세포 및 체외실험의 결과이지만 EGFR 억제와 IGF-1R의 억제를 동시에 시행하는 새로운 치료전략의 기초자료가 될 수 있으리라 기대된다.

결론적으로 여러 기전을 이용한 IGF-1R의 억제는 TRAIL 또는 gefitinib에 대해 저항성을 보이던 폐암세포주의 감수성을 향상시킴을 확인하였으며 이는 폐암의 임상치료의 한계를 극복할 수 있는 하나의 단초를 제공하였다. 향후 여러 종류의 암세포주에서의 검증 및 체내실험이 필요하리라 생각된다.

요 약

배 경: 폐암의 새로운 치료제로 각광을 받고 있는 TRAIL은 암에 선택적으로 apoptosis를 일으킨다고 알려진 cytokine으로 알려져 있다. 또한 gefitinib (Iressa)는 폐암의 적용된 최초의 표적치료제로 각광을 받고 있다. 그러나 일부의 암세포에서는 이에 대한 저항성을 보이고 있다. 본 연구에서는 암세포에서 외부의 apoptotic 자극에 저항성을 보이는 IGF-1R를 억제함으로써 TRAIL 및 gefitinib의 항암작용을 증가시키고자 실험을 시행하였다.

방 법: 암세포주는 TRAIL 및 gefitinib에 민감한 NCI H460와 두 약제에 중등도의 저항성을 보이는 A549의 폐암세포주로 시행하였으며 IGF-1R의 억제는 본 연구자가 개발하였던 IGF-1 pathway를 dominant negative inhibition을 할 수 있는 adenovirus-IGF1R(482 ST, 950ST) 및 IGF-1R tyrosine kinase inhibitor인 Tyrphostin AG1024를 사용하였고 gefitinib에 대한 실험에서는 RNA interference를 이용하여 IGF-1R의 발현을 억제하는 adenovirus-shIGF-1R을 이용하였다.

결 과: TRAIL에 저항성을 보이는 폐암세포주(A549)에서 adenovirus-IGF1R(482ST, 950ST) 및 AG1024로 IGF-1R를 억제한 후 TRAIL을 투여한 경우 항암효과가 증대되었다. A549에 adenovirus-shIGF-1R을 감염시켜 IGF-1R의 발현을 억제한 결과 gefitinib에 대한 감수성이 증가되었다.

결 론: 여러 기전을 이용한 IGF-1R의 억제는 TRAIL 및 gefitinib에 대해 저항성을 보이던 폐암세포주의 감수성을 향상시킴을 확인하였으며 이는 폐암의 임상치료의 한계를 극복할 수 있는 하나의 단초를 제공하였다. 향후 여러 종류의 암세포주에서의 검증 및 in vivo 실험이 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998;10:559-63.
2. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 2005;12:228-37.
3. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-8.
4. Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1999;59:5683-6.
5. Cheng J, Hylander BL, Baer MR, Chen X, Repasky EA. Multiple mechanisms underlie resistance of leukemia cells to Apo2 Ligand/TRAIL. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1844-53.
6. Brooks AD, Sayers TJ. Reduction of the antiapoptotic protein cFLIP enhances the susceptibility of human renal cancer cells to TRAIL apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:499-505.
7. Seol JY, Park KH, Hwang CI, Park WY, Yoo CG, Kim YW, et al. Adenovirus-TRAIL can overcome TRAIL resistance and induce a bystander effect. *Cancer Gene Ther* 2003;10:540-8.
8. Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, Small EJ, Rubin EH, Baselga J, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20:

- 3815-25.
9. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-94.
10. Lee DH, Han JY, Kim HT, Lee JS. Gefitinib is of more benefit in chemotherapy-naïve patients with good performance status and adenocarcinoma histology: retrospective analysis of 575 Korean patients. *Lung Cancer* 2006;53:339-45.
11. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
12. Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 2005;23:2493-501.
13. Lee CT, Adachi Y, Carbone DP. IGF-1R blockade strategies in human cancers. *Gene Ther Mol Biol* 2005;9:77-88.
14. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997;17:1595-606.
15. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.
16. Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Koutras DA, et al. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002;161:643-54.
17. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21:5673-83.
18. Jones HE, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:793-814.
19. Camirand A, Zakikhani M, Young F, Pollak M. Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R570-9.
20. Desbois-Mouthon C, Cacheux W, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Barbu V, Fartoux L, Poupon R, et al. Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer* 2006;119:2557-66.
21. Lee CT, Park KH, Adachi Y, Seol JY, Yoo CG, Kim YW, et al. Recombinant adenoviruses expressing dominant negative insulin-like growth factor-I receptor demonstrate antitumor effects on lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2003;10:57-63.
22. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
23. Lee YJ, Imsumran A, Park MY, Kwon SY, Yoon HI, Lee JH, et al. Adenovirus expressing shRNA to IGF-1R enhances the chemosensitivity of lung cancer cell lines by blocking IGF-1 pathway. *Lung Cancer* 2007;55:279-86.
24. Lee CT, Carbone DP. Chapter 52. Gene Therapy. In: Pass HI, Carbone DP, Johnson DH, Minna JD, Turrisi AT, editors. *Lung Cancer*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.734-53.
25. Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, LeRoith D. Specific inhibition of insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins. *Endocrinology* 1997;138:1427-33.
26. Karacay B, Sanlioglu S, Griffith TS, Sandler A, Bonthius DJ. Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11:681-90.
27. Franco AV, Zhang XD, Van Berkel E, Sanders JE, Zhang XY, Thomas WD, et al. The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* 2001;166:5337-45.
28. Karacay B, Sanlioglu S, Griffith TS, Sandler A, Bonthius DJ. Inhibition of the NF-kB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11:681-90.
29. Adachi Y, Lee CT, Carbone DP. Genetic blockade of the insulin-like growth factor 1 receptor for human malignancy. *Novartis Found Symp* 2004;262:177-89.
30. Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, et al. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:3038-41.
31. Adachi Y, Lee CT, Coffee K, Yamagata N, Ohm JE, Park KH, et al. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon

- cancer cell lines. *Gastroenterology* 2002;123:1191-204.
32. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Ito H, Itoh F, Lee CT, et al. Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2003;63:6432-41.
33. Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee HY. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 2007;13:2795-803.
-