

상피성 난소암 세포에서 MyD88 발현과 paclitaxel의 항세포고사 신호

부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실

서동수 · 조무성 · 유신애 · 김기형 · 윤만수

MyD88 expression and anti-apoptotic signals of paclitaxel in epithelial ovarian cancer cells

Dong Soo Suh, M.D., Moo Sung Jo, M.D., Shin Ae Yu, 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 was to evaluate the correlation between myeloid differentiation protein 88 (MyD88) expression and paclitaxel effects on epithelial ovarian cancer cells and to evaluate whether paclitaxel had anti-apoptotic signals.

Methods: Epithelial ovarian cancer cells isolated from ascites and established cell lines were treated with increasing concentrations of paclitaxel (0.2 to 20 μ M) for 24 and 48 hours and cell viability was determined using the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Cytokine profiling was performed from culture supernatants using the Luminex 200 system. Nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activity was determined using a Luciferase reporter system. Levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) were measured by Western blot analysis.

Results: A strong signal for MyD88 expression was observed in R182, O1-19b and SKOV3 cells (MyD88-positive). A2780, R454 and O1-28 cells showed low levels of MyD88 (MyD88-negative). Paclitaxel effectively decreased cell viability in MyD88-negative A2780, R454, O1-28 cells after 24 and 48 hours (57%, 49%, 42% and 35%, 28%, 29%, respectively). MyD88-positive cells were resistant to paclitaxel. There was a significant increase in caspase-3/7 activity following paclitaxel treatment in MyD88-negative cells. No significant change in caspase-3/7 activity was detected in MyD88-positive cells. Paclitaxel induced NF- κ B activation and enhanced the secretion of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 in a dose dependent manner and induced ERK phosphorylation on MyD88-positive cells.

Conclusion: Paclitaxel treatment for MyD88-positive ovarian cancer could have detrimental effects due to the paclitaxel-induced enhancement of NF- κ B, ERK activities and pro-inflammatory cytokine production, which promote chemoresistance and tumor progression.

Key Words: Paclitaxel, Myeloid differentiation factor 88, Ovarian neoplasms, Anti-apoptotic

난소암은 우리나라에서 자궁경부암에 이어 두 번째로 흔한 부인암이나 발생 빈도의 순위에 비해 치명도가 높은

대표적인 부인암이다. 상피성 난소암은 효과적인 선별검사 법이나 특이적인 증상이 없어 60% 이상은 진행된 병기에 서 발견이 되며, 현재의 표준치료법은 병기설정 수술과 함께 종양감축술을 시행하고 paclitaxel과 platinum을 근간 으로서 하는 항암요법을 시행하는 것이다.¹ 현재의 치료법으 로 80~90%는 초기에 양호한 반응을 보이나 최종적으로

접 수 일 : 2009. 12. 11.
채 택 일 : 2010. 3. 25.
교신저자 : 김기형
E-mail : ghkim@pusan.ac.kr

* 이 연구는 2008년도 부산대학교병원 임상연구비 지원으로 이루어졌음.

10~15%만이 완전관해에 이르며, 또 재발된 암에서는 65~75%가 이러한 약제에 반응을 보이지 않는다고 한다.²

Paclitaxel은 난소암, 유방암, 폐의 비소세포암, 식도암 등에서 아주 유용하게 사용되는 항암제로, 다양한 암세포 유형에서 세포독성을 유도하는 것으로 알려져 있으나 항암 작용의 기전은 아직까지 확실하지 않다.³ 일차적인 작용기전은 미세소관 (microtubule)에 부착하여 이를 안정화시키고 G₂/M기에서 세포정지를 일으켜서 세포분열을 차단함으로써 세포독성을 나타낸다. Paclitaxel은 아주 효과적으로 세포독성을 유도하는 항암제이지만 또한 세포독성 효과를 약화시키는 항세포고사 효과도 가진다고 알려져 있다. Paclitaxel의 항세포고사 효과는 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 경로를 활성화하여 염증성 사이토카인을 생성하고,^{4,5} extracellular signal-regulated kinase (ERK) 경로를 활성화하여 세포의 증식과 생존을 조장하여 항암제 내성에 관여한다고 한다.⁶ 난소암은 최근 20여 년 동안 수술법과 항암제의 진보로 무진행 생존율 (progression free survival)과 전반적인 생존율 (overall survival)의 향상이 있어 왔으나 여전히 높은 사망률을 보이고 있어 새로운 약제 개발이 필요하다. 항암제의 항세포고사 신호를 규명하여 이를 차단하는 약제를 함께 사용하면 치료효과를 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

만성염증과 암과의 관련성은 오래 전부터 관심이 되어 왔으며, 여러 역학연구에서부터 분자학적 연구를 통해 많은 증거들이 축적되었다. 염증성 질환이 여러 암을 유발하고, 비스테로이드성 항염증약물이 종양의 발생을 줄이며, 염증세포와 사이토카인들이 종양 미세환경에 나타나고, 염증매개인자를 표적으로 약물치료 시 종양의 발생 빈도와 파급을 감소시킨다고 한다.⁷ 난소암에서 paclitaxel의 항세포고사 신호는 만성염증이나 염증전달 신호경로의 활성화로 나타난다고 한다.

만성염증이 종양의 발생 (carcinogenesis)이나 진행 (tumor progression) 등에 중요한 역할을 하지만 박테리나 바이러스 감염 없이 암 조직과 세포에서 염증반응의 원인은 분명하게 밝혀지지 않았다. 최근 난소암에서 toll like receptor-4 (TLR-4)/MyD88/NF- κ B 경로가 기능적으로 존재함이 보고되었으며 그 결과로 염증성 사이토카인을 생성한다고 한다. 염증성 사이토카인은 백혈구를 유인하여 염증성 미세환경을 조장하고 또한 주변 간질세포나

종양세포에 직접적으로 작용하여 암화과정과 종양의 진행에 영향을 미친다. 선천면역계에 관여하는 TLR은 침입해 들어오는 병원균에 대한 숙주의 방어기전에 중요한 역할을 하는 수용체이다. TLR-4는 모든 난소암 세포와 조직에 광범위하게 발현된다고 한다.⁸ Myeloid differentiation protein 88 (MyD88)는 TLR 신호전달경로에 필요한 adaptor protein으로 난소암에서는 MyD88 발현정도에 따라 초래되는 염증반응에 뚜렷한 차이를 나타낸다. 전사인자인 NF- κ B는 암화과정, 면역반응, 염증반응에 관여하며 다양한 유전자의 발현을 유도하여 세포의 증식, 세포고사의 조절, 혈관신생, 침습과 전이과정에 관여한다. 많은 종양세포들이 약물치료 전 NF- κ B가 활성화되어 있어 항암치료나 방사선치료에 저항성을 나타내거나, 혹은 paclitaxel과 같은 항암제에 노출 후에 NF- κ B의 활성화가 유도되어 세포고사에 저항성을 보인다.

또 다른 항세포고사 신호로는 taxane, vinca alkaloid 등의 항암제에 의한 mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로의 활성화이다. 포유류에서 알려진 MAPK 경로 가운데 ERK 경로가 가장 중요하며 잘 알려져 있다. ERK 경로의 활성화는 암화과정에 관여하며 또 종양의 진행, 항암제 내성, 임상 예후 등과도 관련이 있다고 한다.⁹⁻¹¹

본 연구에서는 상피성 난소암 세포를 MyD88 발현에 따라 구별하고 이들 각각에서 paclitaxel 치료 시에 세포독성 효과가 어떻게 다르게 나타나는지, 또한 paclitaxel이 난소암 세포에서 어떠한 경로로 항세포고사 효과를 유도하는지 알아보려고 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주와 배양조건

이미 확립되어진 인간 상피성 난소암 세포주 (A2780, SKOV3)와 난소암 환자의 복수에서 분리한 일차세포 (01-28, R454, R182, 01-19b, R1140, R821)를 실험에 이용하였다. 모든 인체 유래의 검체는 부산대학교병원의 임상시험심사위원회의 승인을 얻어 이용하였다 (부산대학교 병원 IRB #2008021). 모든 세포는 10% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 증식시켰고, 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 세포 생존율의 측정

5×10^3 개의 세포를 각 well당 100 μ L으로 96-well plate에 심었다. 세포가 70% 정도로 차게 되면 Opti-MEM medium (Gibco-BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 교체하여 4시간동안 두었다가 약물치료를 시행하였다. Paclitaxel은 0.2, 2, 20 μ M의 농도로 치료하였고, 각각 24시간, 48시간 치료한 후에 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)을 통해 세포 생존율을 측정하였다. 각 샘플의 흡광도는 automatic microplate reader (Model 550; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 측정값은 치료를 하지 않은 대조군과 비교하였고, 생존율의 백분율로 나타내었다.

3. Caspase 활성도 측정

Caspase-3/7 활성도는 Caspase-Glo 3/7 assay를 이용하였고, 10 μ g의 단백질을 넣어 물과 함께 50 μ L의 부피로 만든 다음 50 μ L의 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. NF- κ B 활성도 측정

NF- κ B 활성도 측정을 위해 세포는 일시적으로 FuGENE 6 Transfection 반응액 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)을 이용하여 pBII-LUC를 transfection시켰다. 발광효소의 활성도는 luciferase assay system를 통하여 측정하였다. 10 μ g의 단백질을 20 μ L로 만들어 100 μ L의 luciferase assay 반응액과 혼합한 후 발광도를 TD 20/20 Luminometer를 이용하여 판독하였다. NF- κ B 활성도는 치료를 하지 않은 군과 비교한 상대적 활성도를 계산하였다.

5. 사이토카인 측정

세포배양 후 상층의 배양액을 채취하여 사이토카인을 측정하였다. 50 μ L씩의 샘플을 96-well plate에 각각 넣은 후 25 μ L씩의 microparticle mixture를 첨가하였다. 검사용 plate를 orbital shaker (500 rpm) 위에서 실온에서 2시간 방치하였다. 다시 plate를 Beadlyte cell signaling assay buffer로 3차례 세척하였고, microparticles를 75 μ L의 assay buffer안에서 다시 현탁을 시켰다. 이후 각 well에 25 μ L의 biotinylated detection antibody를 첨가하였다. 실온에서 90분간 방치한 후 plate를 assay buffer로 3차례 세척한 후 microparticle을 75 μ L의 assay buffer안에서 다시 현탁을 시켰다. 1:20 Streptavidin-PE:assay buffer mixture를 준비하였다가 25 μ L씩을 각 well에 첨가하였다. 실온에서 30분 방치 후 plate를 assay buffer로 3차례 세척한 후 125 μ L assay buffer로 다시 현탁을 시켰다. 최종적으로 검사용 plate는 Luminex 200 multiplex analyzer로 그 값을 측정하였다.

6. Western blot

각각의 단백질 20 μ g씩을 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-MyD88 (1:1,000; eBiosciences, San Diego, CA, USA), mouse anti-phosphorylated ERK1/2 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-total ERK1/2 (1:500; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). 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, Rockford, IL, USA)를 이용하여 영상화하였다.

7. 통계분석

각각의 실험은 여섯 차례 반복 시행하였으며, 결과의 통계학적 처리는 SPSS (version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 일반선형모델 (general linear model)의 반복 측정법 (repeated measures)을 사용하였고, 사후분석은 Turkey법을 사용하였으며, $P < 0.05$ 일 때를 통계적 의미가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 상피성 난소암 세포에서 MyD88 발현

확립된 인간 난소암 세포주와 난소암 환자의 복수에서 분리배양한 일차세포를 Western blot을 통해 MyD88 발현을 조사하였다. MyD88 발현에 따라 A2780, R454, 01-28는 저발현군 (MyD88 음성), R182, 01-19b, SKOV3, R1140, R821는 고발현군 (MyD88 양성)으로 나누었다 (Fig. 1).

2. Paclitaxel의 세포독성 효과

MyD88 발현에 따른 난소암 세포의 paclitaxel에 대한 반응의 차이를 알아보기 위해 paclitaxel을 0.2, 2, 20 μM 의 농도로 각각 24시간, 48시간 치료한 후 세포의 생존율을 측정하였다. MyD88 양성세포 (R182, 01-19b, SKOV3)에서는 24시간 치료 후 20 μM 의 농도에서 세포의 생존율이 각각 79%, 86%, 81%이었고, 48시간 치료 후에는 각각 62%, 83%, 59%를 보여 paclitaxel에 저항성을 보였다. 반면 MyD88 음성세포 (A2780, R454, 01-28)에서는 24시간 치료 후 세포의 생존율이 각각 57%, 49%, 42%이었고, 48시간 치료 후에는 각각 35%, 28%, 29%를 보여 paclitaxel에 의해 세포생존율이 감소하였다 ($P=0.000$, Fig. 2). 특히 paclitaxel에 예민한 MyD88 음성세포에서 24시간 치료 후에 세포독성 효과는 paclitaxel의 농도에 의존적이기 보다는 저농도에서도 고농도에서와 유사하게 높은 세포독성 반응을 보였다. 흥미롭게도 48시간 후에는 A2780, R454, 01-28 세 가지 세포 모두에서 고용량인 20 μM 농도에서 오히려 저용량인 0.2 μM , 2 μM 에서보다 세포독성 효과가 적게 일어났다 ($P=0.000$, Fig. 2B).

Paclitaxel에 의한 세포독성 효과가 세포고사에 의한 것

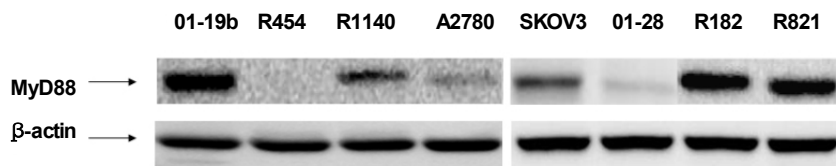


Fig. 1. Western blot analysis for MyD88 protein expression from epithelial ovarian cancer cells.

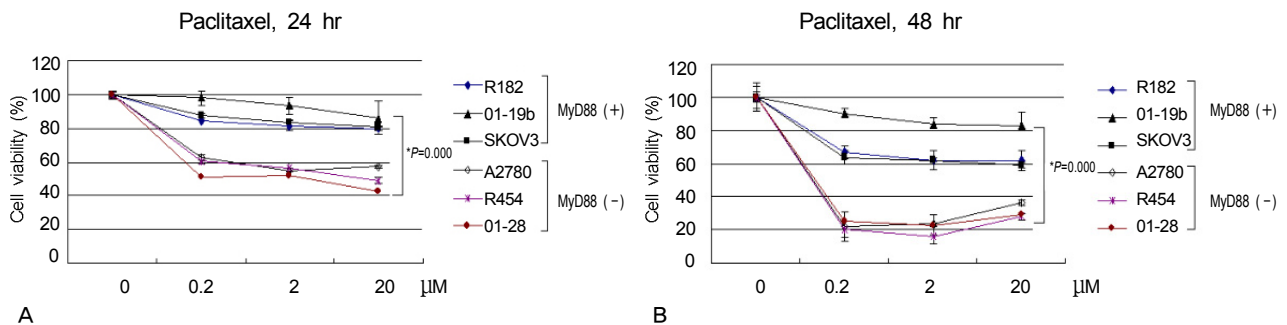


Fig. 2. Paclitaxel significantly decreases the number of viable MyD88-negative ovarian cancer cells ($*P=0.000$; General linear model repeated measures followed by Turkey method). The viability (in percentage, normalized to untreated cells) of MyD88-positive (R182, 01-19b, SKOV3) and -negative (A2780, R454, 01-28) cell lines after treatment with increasing concentrations of paclitaxel (0.2, 2, 20 μM) for 24 (A) and 48 (B) hours ($P=0.000$; General linear model repeated measures followed by Turkey method).

인지를 알아보기 위해 MyD88 양성인 R182, 음성인 A2780 세포에서 각각 caspase-3/7 활성을 측정하였다. Paclitaxel에 저항성을 보인 R182 세포에서는 caspase-3/7의 증가가 거의 없었으나 paclitaxel에 예민한 A2780 세포에서는 caspase-3/7의 뚜렷한 증가를 보여 세포고사에 의한 세포 독성 효과임을 알 수 있었다 ($P=0.000$, Fig. 3).

3. Paclitaxel 치료 후의 NF- κ B 활성도

난소암 세포에서 MyD88의 발현에 따른 paclitaxel의

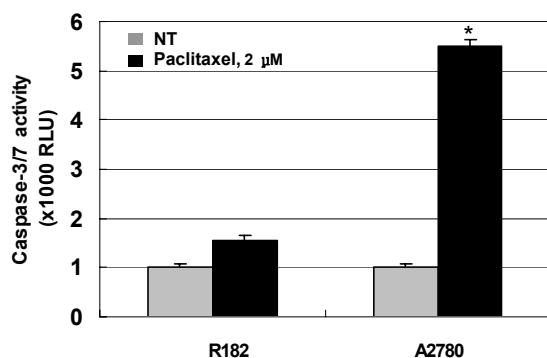


Fig. 3. Paclitaxel significantly induces apoptosis in MyD88-negative A2780 cells. Cells were treated with 2 μ M paclitaxel for 24 hours. Activity of caspase-3/7 was measured using Caspase-Glo assay (* $P=0.000$; General linear model repeated measures followed by Turkey method).

세포독성 효과의 차이는 어디에서 비롯된 것인지를 알아보기 위해 TLR 신호전달과정의 다음 경로를 조사하였다. MyD88 양성인 R182, 음성인 A2780을 선택하여 이들 세포에서 paclitaxel 치료 후의 TLR4-MyD88 신호전달경로의 하위 전사인자인 NF- κ B의 활성도를 조사하였다. MyD88 음성세포에서는 paclitaxel (2 μ M) 치료 후 시간경과에 따라 NF- κ B 활성도가 감소하였으나 MyD88 양성세포에서는 NF- κ B 활성도가 시간경과에 따라 증가하였다 ($P=0.000$, Fig. 4).

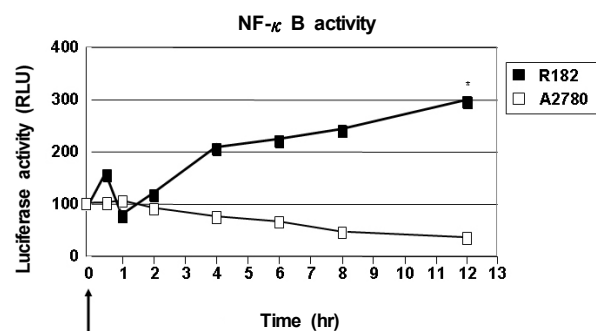


Fig. 4. Differential effects of paclitaxel on nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation in MyD88-positive R182 cells and -negative A2780 cells. Cells were transfected with a luciferase reporter plasmid activated by NF- κ B and treated with 2 μ M paclitaxel. NF- κ B activity was measured as luminescence. Arrow indicates paclitaxel treatment.

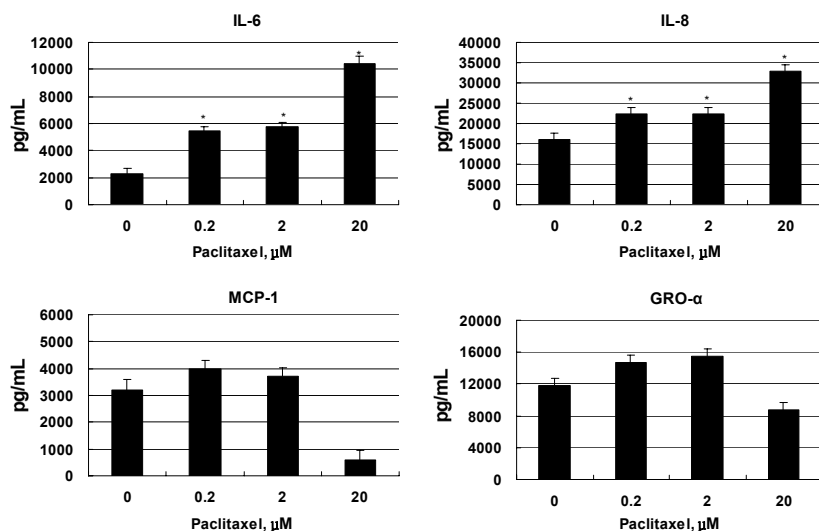


Fig. 5. Cytokine profiles after paclitaxel treatment in MyD88-positive R182 cells. Cells were treated with paclitaxel (0.2, 2, 20 μ M) for 48 hours and the levels of secreted cytokines were determined using Luminex 200 system ($P=0.000$; General linear model repeated measures followed by Turkey method).

4. Paclitaxel 치료 후의 염증성 사이토카인의 생성

다음으로 NF- κ B 활성화에 따른 염증신호전달의 결과로 사이토카인의 생성 여부를 알아보기 위해 MyD88 양성인 R182 세포에서 paclitaxel 2 μ M 농도로 48시간 치료 후 배양액의 상층액을 모아 Luminex 200 system을 이용해 사이토카인의 농도를 측정하였다. Interleukin-6 (IL-6)와 IL-8은 paclitaxel의 치료 농도에 비례하여 유의한 증가양상을 보였고 ($P=0.000$), MCP-1과 GRO- α 는 0.2 μ M, 2 μ M에서 증가양상을 보였으며 고농도인 20 μ M에서는 오히려 감소하였다 ($P=0.000$, Fig. 5). 하지만 MyD88 음성인 A2780 세포에서는 이와 같은 사이토카인을 거의 생성하지 않았으며 치료 전후에 변화도 없었다.

5. Paclitaxel 치료 후의 ERK 경로의 활성화

ERK 경로는 세포증식, 세포분화, 세포생존 등에 관련되며 paclitaxel이 암세포에서 ERK를 유도함이 보고된 바 있다.^{4,6} MyD88 양성인 R182와 음성인 A2780 세포에서 paclitaxel을 24시간 치료 후에 phospho-ERK (p-ERK)의 변화를 관찰하였다. Paclitaxel에 저항성을 가지는

MyD88 양성 R182 세포에서는 약물치료 전 p-ERK의 기초 발현은 약하지만 paclitaxel 치료 후 p-ERK의 발현이 뚜렷하게 증가하였다. Paclitaxel에 감수성을 가지는 MyD88 음성인 A2780 세포에서는 p-ERK의 기초 발현은 매우 강하였으며, 치료 후에는 p-ERK의 발현이 농도에 비례하여 감소하다가 (0.2~2 μ M) 고농도인 20 μ M에서는 저농도에 비해 상대적으로 증가하는 양상을 보였다 ($P=0.000$, Fig. 6A). 이러한 양상은 세포 생존율 그래프에서 20 μ M의 고농도에서 세포독성 효과가 더 적게 일어나며 저항을 보이는 현상과 일치하였다 (Fig. 2B). 이러한 ERK와 세포생존과의 연관성을 더 확인하기 위해 A2780 세포를 paclitaxel로 치료한 후 시간대별로 세포 생존율을 측정하였다. 치료 24시간 후에 20 μ M 농도에서 p-ERK의 상대적인 활성도가 일어난 후 (Fig. 6A), 이후 6시간째인 30시간부터 세포독성 효과의 둔화가 나타나 (Fig. 6B) 난소암 세포에서 ERK 경로의 활성화는 세포생존과 관련됨을 알 수 있었다.

고 찰

저자들은 이 연구에서 염증신호 전달경로인 TLR-4/

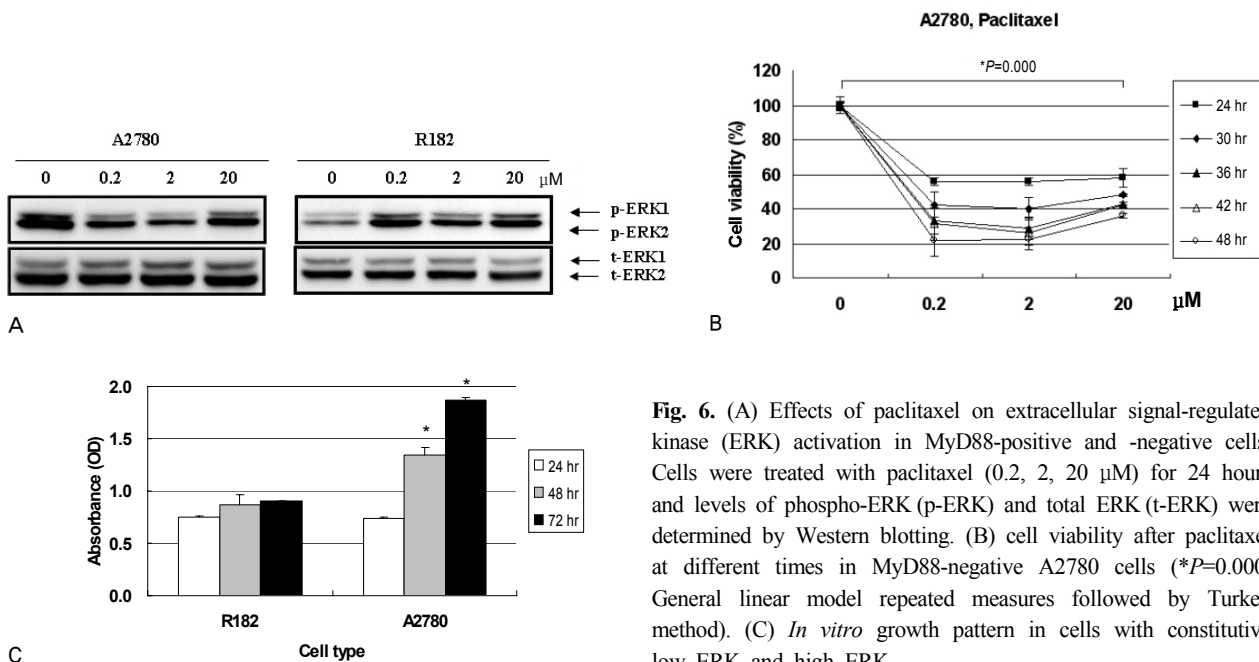


Fig. 6. (A) Effects of paclitaxel on extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation in MyD88-positive and -negative cells. Cells were treated with paclitaxel (0.2, 2, 20 μ M) for 24 hours and levels of phospho-ERK (p-ERK) and total ERK (t-ERK) were determined by Western blotting. (B) cell viability after paclitaxel at different times in MyD88-negative A2780 cells (* $P=0.000$; General linear model repeated measures followed by Turkey method). (C) *In vitro* growth pattern in cells with constitutive low ERK and high ERK.

MyD88/NF- κ B가 난소암 세포에서도 기능적으로 존재하여 paclitaxel 치료 시에 뚜렷한 분자염증 반응이 일어나고, 항암제에 내성을 보이며 종양의 증식과 진행에 관련되는 결과를 얻을 수 있었다. 만성염증이 종양의 발생이나 종양의 진행에 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려져 있지만, 어느 신호전달경로를 통해서 일어나는지, NF- κ B의 상위 분자경로는 무엇인지, 박테리나 바이러스의 감염없이 암 조직/세포에서의 만성염증의 원인은 무엇인지 등은 분명하게 알려지지 않았었다. 최근 난소암에서 TLR-4/MyD88/NF- κ B의 신호경로가 보고된 후 이를 표적으로 하는 치료제 연구가 활발하게 연구되고 있다 (Fig. 7).^{8,12-15}

TLR은 선천면역반응의 중추적인 조절자로서 박테리나 바이러스 등의 병원균을 각각의 TLR 수용체 특이적으로 인지하며 주로 위나 호흡기계 점막에서 외부 병원균에 대한 숙주의 방어반응에 중요한 역할을 한다. TLR은 현재 포유류에서 1번에서 11번까지가 밝혀졌으며, 면역세포와 점막상피나 영양막세포 등의 비면역세포에서도 발현된다. 특히 박테리아의 lipopolysaccharide (LPS)는 중요한 염증관련 물질로 TLR-4를 통해 면역반응을 유도한다. 이러한 병원균에 대한 작용 외에도 paclitaxel이 TLR-4의 잘 알려진 리간드이므로 종양세포에서 독특한 작용을 가져 TLR-4가 종양세포의 증식과 항암제내성, 면역세포의 침윤을 통한 종양의 진행에 관여한다고 한다.¹² Wang 등¹⁴의

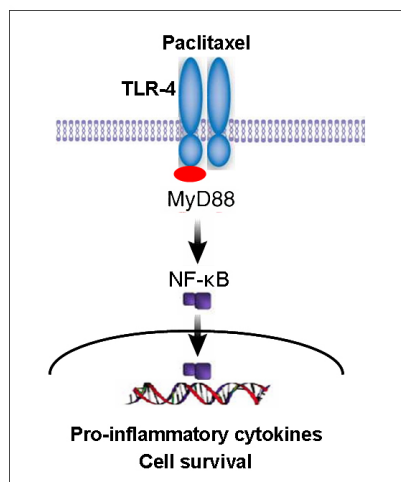


Fig. 7. Simplified model of MyD88-mediated toll like receptor (TLR) signaling in epithelial ovarian cancer cells. NF- κ B: nuclear factor-kappaB.

연구에서는 paclitaxel에 저항을 보이는 MyD88 양성인 세포에서 TLR-4를 knockdown 시킨 후에 세포성장의 억제와 paclitaxel에 대한 세포독성 증강효과가 나타났다.

TLR-4의 발현은 난소암조직이나 세포주에서 모두 발현되며 정상 난소세포나 난소암 주변 조직에서는 발현되지 않는다.⁸ TLR-4의 신호전달경로는 MyD88 의존성 경로와 비의존성 경로로 구별되며 대개는 MyD88 의존성 경로를 통해 염증반응을 야기하는데, NF- κ B를 조기에 활성화시켜서 염증성 사이토카인을 생성하게 한다.¹⁶ MyD88은 TLR-4를 통한 NF- κ B 활성화에 필요한 하위 경로의 단백질이다. 이는 TLR-4의 발현과는 달리 모든 암조직이나 세포에서 발현되는 것은 아니며 종양조직이나 세포주마다 특이적으로 발현의 차이를 가진다. 이러한 이유로 난소암 세포마다 MyD88 발현에 따른 염증반응의 차이가 나타난다. 본 연구에서 이미 확립되어진 난소암 세포주와 환자의 복수에서 분리배양한 일차세포에서 발현의 차이를 확인하고 MyD88 발현에 따라 MyD88 음성과 MyD88 양성으로 나눌 수 있었다.

MyD88 양성인 난소암 세포는 자극이 없어도 염증성 사이토카인을 분비하고 특히 TLR-4의 대표적인 리간드인 LPS의 자극이 주어지면 NF- κ B 활성화를 야기하고 높은 농도의 염증성 사이토카인을 분비한다. 반면 MyD88을 knockdown한 후에는 이러한 염증반응이 소실된다.^{8,13} 마찬가지로 paclitaxel도 TLR-4 리간드이므로 유사한 반응이 유도되어 paclitaxel의 세포독성 효과를 저해시킨다. TLR-4의 다른 내인성 리간드인 HMGB1, heparan sulfate, hyaluronan의 polysaccharide fragment 등은 손상된 조직이나 괴사된 세포에서 분비되며 이들 역시 동일한 신호전달경로를 통해 종양의 진행이나 paclitaxel의 저항성에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁷ MyD88이 난소암의 임상 경과에 미치는 영향에 관한 연구에서 MyD88 발현은 임상 경과와 잘 비례하였다. 즉, MyD88 양성인 종양에서 paclitaxel에 저항성을 보였으며 무진행기 (progression free interval)와 전반적 생존율에서 불량한 예후를 보여 MyD88이 예후를 예측할 수 있는 분자표지자로 제안된 바 있다.¹³

Paclitaxel의 보고된 또 다른 항세포괴사 신호는 MAPK 경로의 활성화이다. 포유류에서 알려진 MAPK 경로 가운데 ERK 경로가 가장 중요하며 잘 알려져 있다. ERK는 RAS와 RAF의 하위단계의 분자로서 성장인자, 사이토카

인, 종양유전자의 자극에 의해서 세포성장에 관련된 신호를 전달하며 세포증식, 세포분화, 세포생존, 세포고사, 세포이동, 종양의 침습과 전이 등과 같은 다양한 세포 반응의 주된 조절인자이다.¹⁸

ERK 경로의 활성화는 종양세포에서 암화과정, 종양의 진행, 항암제 내성, 임상적 예후 등과 관련이 있다고 한다.⁹⁻¹¹ 난소암의 암화과정에 관여하는 유전적 이상으로 잘 알려진 것은 KRAS나 BRAF의 돌연변이다.¹⁹ KRAS나 BRAF의 돌연변이는 하위단계의 MAPK/ERK의 기초(constitutive) 활성화에 관여하며 MAPK의 활성화는 하위 단계의 단백질이나제, 핵단백질, 전사인자를 활성화시켜 종양 발생에 기여한다.^{9,19} BRAF의 돌연변이의 빈도는 악성 흑색종에서 27~70%, 유두상 갑상선암에서 36~53%, 대장암의 5~22%, 난소암의 30%에서 보고되었다. 이 외에도 ERK의 기초 활성화는 식도암, 위암, 유방암, 신장암 등 여러 장기의 암에서 암화 과정에도 관련이 된다.²⁰

ERK의 기초 활성화와 임상적 예후와의 관련성에 대해서는 종양의 유형이나 발생 장기에 따라 서로 다른 보고가 있다. 직장-대장암, 폐의 비소세포암, 갑상선암에서는 임상적으로 보다 공격성향을 보여 예후가 불량하고,¹⁹ 반면 유방암과 장액성 난소암에서는 오히려 양호한 예후와 관련이 있다고 한다.^{11,21} 이렇게 암종마다 임상 예후에 미치는 영향의 차이는 KRAS/BRAF의 역할이 조직이나 장기마다 서로 다른 특이성을 가지기 때문으로 이해되고 있다.¹⁹

암세포에서 ERK 경로의 기초 활성화뿐만 아니라 taxane, vinca alkaloid, cisplatin 등의 항암제에 의해서도 ERK 경로가 활성화되어 암세포의 성장과 생존에 관여하고 항암작용을 둔화시킨다고 알려져 있다. 이러한 이유로 MAPK modulator들이 항암보조제로 관심이 되고 있다.²² MEK/ERK inhibitor를 paclitaxel과 병합하여 난소암, 유방암, 폐암 등에서 세포고사를 증강시켰다.²³ 또 다른 연구에서 난소암 세포에서 MEK inhibitor인 PD98059

를 병합하였을 때 ERK 경로의 억제를 통해 paclitaxel의 세포독성 효과를 증강시킴으로 ERK 경로가 난소암 세포의 증식과 생존에 필수적임을 보여 주었다.²⁴ 본 연구에서 ERK의 기초 활성도가 높은 A2780 세포에서는 증식활성이 높아 체외배양 조건에서 매우 빠르게 자라는 특징이 있다. Paclitaxel 치료에는 매우 민감하게 반응하여 뚜렷한 세포고사가 일어나 그 결과 ERK 활성이 감소하였다. 반면 기초 활성도가 낮은 R182 세포는 증식활성이 낮아 체외배양 조건에서 매우 느리게 자란다. Paclitaxel 치료 후에 ERK 활성이 뚜렷하게 증가하는 양상을 보여 이는 paclitaxel의 세포독성 효과를 둔화시키는 것과 관련이 된다 (Fig. 6). MyD88 발현과 ERK 발현이 서로 역비례하는 양상을 보였는데, 모든 난소암 세포에서 공통적인 특징인지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다. 흥미로운 것은 paclitaxel에 예민한 MyD88 음성인 A2780 세포에서도 치료 후 고농도 (20 μ M)에서 ERK의 상대적인 활성화가 일어나고, 이후 6시간 후에 세포독성 효과의 둔화가 나타나 난소암 세포에서 ERK의 활성화는 세포를 세포사로부터 보호하여 생존케 하는 것과 관련됨을 알 수 있다. 이처럼 paclitaxel 치료 후 ERK의 활성화는 MyD88 발현, 약물의 농도에 따라서도 다르게 나타남을 알 수 있다.

이상의 연구에서 난소암 세포에서 paclitaxel이 TLR-4를 통한 염증신호 전달경로를 활성화하여 항세포고사 신호를 나타내어 약제에 내성을 가짐을 알 수 있었고 이러한 신호는 MyD88 발현에 의존한다는 것을 알 수 있었다. 현재의 항암요법은 대부분 조직학적 유형에 따라 결정하는 것이 고전적인 방법이다. 하지만 난소암 환자의 분자표지자의 규명을 통해 조기에 항암제내성을 예측할 수 있다면 효과적인 약제의 병합요법이나 항암제 선택에 도움을 주어 개별화된 치료접근법이 생존율을 향상시킬 것으로 기대된다. MyD88의 발현은 항암제 감수성과 내성을 예측할 수 있는 좋은 표지자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

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. Crown J, O'Leary M. The taxanes: an update. *Lancet* 2000; 355: 1176-8.
4. Okano J, Rustgi AK. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* 2001; 276: 19555-64.
5. Lee M, Jeon YJ. Paclitaxel-induced immune suppression is associated with NF-kappaB activation via conventional PKC isotypes in lipopolysaccharide-stimulated 70Z/3 pre-B lymphocyte tumor cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 248-53.

6. Taxman DJ, MacKeigan JP, Clements C, Bergstralh DT, Ting JP. Transcriptional profiling of targets for combination therapy of lung carcinoma with paclitaxel and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor. *Cancer Res* 2003; 63: 5095-104.
7. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-44.
8. 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.
9. Allen LF, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* 2003; 30: 105-16.
10. 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.
11. 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.
12. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 225-33.
13. Silasi DA, Alvero AB, Illuzzi J, Kelly M, Chen R, Fu HH, et al. MyD88 predicts chemoresistance to paclitaxel in epithelial ovarian cancer. *Yale J Biol Med* 2006; 79: 153-63.
14. Wang AC, Su QB, Wu FX, Zhang XL, Liu PS. Role of TLR4 for paclitaxel chemotherapy in human epithelial ovarian cancer cells. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 157-64.
15. Kim KH, Xie Y, Tytler EM, Woessner R, Mor G, Alvero AB. KSP inhibitor ARRY-520 as a substitute for Paclitaxel in Type I ovarian cancer cells. *J Transl Med* 2009; 7: 63.
16. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105-8.
17. Tsan MF. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 32-7.
18. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49-139.
19. 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.
20. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18: 813-22.
21. Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Alakus H, Bohr J, Stauder MA, Worm K, et al. Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) but not AKT predicts poor prognosis in colorectal carcinoma and is associated with k-ras mutations. *Virchows Arch* 2007; 450: 151-9.
22. Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 253-67.
23. MacKeigan JP, Collins TS, Ting JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 38953-6.
24. Seidman R, Gitelman I, Sagi O, Horwitz SB, Wolfson M. The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001; 268: 84-92.

= 국문초록 =

목적: 상피성 난소암 세포를 Myeloid differentiation protein 88 (MyD88) 발현에 따라 구별하고 MyD88 발현이 paclitaxel의 항종양 효과에 어떤 영향을 미치는지, 또 paclitaxel이 난소암 세포에서 어떤 항세포고사 신호를 유도하는지를 알아보고자 하였다.

연구 방법: 난소암 환자의 복수에서 분리한 일차세포와 확립되어진 난소암 세포주를 각각 paclitaxel (0.2~20 μ M)로 24시간, 48 시간동안 치료하였다. 세포 생존율은 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay를 통해서, 사이토카인은 세포 배양 후 배양액의 상층액을 채취하여 Luminex 200 system을 이용하여 측정하였고, nuclear factor-kappaB (NF- κ B) 활성도는 Luciferase reporter system을 이용하였고, phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)는 Western blot 분석을 하였다.

결과: MyD88 발현에 따라 A2780, R454, 01-28는 음성, R182, 01-19b, SKOV3는 양성으로 나누었다. MyD88 음성세포 (A2780, R454, 01-28)에서는 24시간 paclitaxel 치료 후 세포의 생존율이 각각 57%, 49%, 42%이었고, 48시간 치료 후에는 각각 35%, 28%, 29%를 보여 paclitaxel에 감수성을 나타내었다 ($P=0.000$). MyD88 양성세포 (R182, 01-19b, SKOV3)에서는 paclitaxel에 저항성을 나타내었다. Paclitaxel에 저항성을 보인 R182 세포에서는 caspase-3/7의 증가가 거의 없었으나 paclitaxel에 예민한 A2780 세포에서는 caspase-3/7의 뚜렷한 증가를 보였다 ($P=0.000$). MyD88 음성세포에서는 paclitaxel 치료 후 시간 경과에 따라 NF- κ B 활성도가 감소하였으나 MyD88 양성세포에서는 NF- κ B 활성도가 시간 경과에 따라 증가하였다. MyD88 양성인 R182 세포에서 interleukin-6 (IL-6)와 IL-8은 paclitaxel의 치료 농도에 비례하여 유의한 증가양상을 보였고, p-ERK의 기초 발현은 약하지만 paclitaxel 치료 후 p-ERK의 발현이 뚜렷하게 증가하였다 ($P=0.000$).

결론: Paclitaxel은 MyD88 양성인 난소암 세포에서 NF- κ B를 활성화시키고, ERK 경로를 활성화시키며 염증성 사이토카인을 생성하는 항세포고사 신호를 나타내어 종양의 진행과 항암제내성에 관여하는 것으로 사료된다.

중심단어: 난소암, Paclitaxel, MyD88, 항세포고사