

표적 다기능 나노입자를 이용한 전임상 동물 종양 모델에서 췌장암의 분자 영상

(Molecular Imaging of Pancreatic Cancer in a Preclinical Animal Tumor Model Using Targeted Multifunctional Nanoparticles.
Gastroenterology 2009;136:1514-1525)

요약: 췌장암은 예후가 매우 나쁜 암의 하나로 조기진단과 효과적인 치료가 중요하지만 아직 췌장암을 조기에 진단하기에는 많은 어려움이 있다. 최근 나노기술이 발전하면서 다기능 나노입자를 이용하여 암세포에 선택적으로 결합시켜 영상을 얻고 치료제를 전달하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 종양혈관의 비정상적인 구조로 인해 충분한 양의 나노입자가 종양 내로 들어갈 수 없으며, 혈관내피세포나 종양기질은 나노입자가 암세포에 도달할 때까지 장벽으로 작용한다. 이번 연구에서는 종양기질 분해, 암침윤과 신생혈관생성을 조절하는 serine protease system 중 대표적인 urokinase plasminogen activator (uPA)와 urokinase plasminogen activator receptor (uPAR)를 표적으로 uPA의 amino-terminal fragment (ATF, residues 1-135 amino acids)를 이용하였다. 면역조직화학염색으로 인체 췌장암 조직과 같은자리 췌장암 이종이식 모델(orthotopic human pancreatic cancer xenograft model)의 췌장암 조직에서 uPAR의 발현을 조사하였다. 정상 조직과 비교하여 uPAR는 췌장암 세포, 혈관내피세포, 대식 세포에서 높게 발현되었다. 재조합 ATF 웨타이드를 bacterial expression으로 대량 합성하여 산화철 자성나노입자(iron oxide magnetic nanoparticle, IO)에 공유결합을 이용하여 결합시킨 나노입자(ATF-IO)를 in vitro 실험으로 췌장암 세포에 처리하였다. ATF-IO를 처리한 군에서 IO만 처리한 군에 비해 세포 내에서 더 많은 나노입자가 관찰되었고, T2 영상에서 조영 감소를 나타내었다. 200-300 pmol의 ATF-IO를 같은자리 췌장암 이종이식 마우스의 꼬리정맥으로 투여한 후 MRI를 시행하였을 때, T2 영상에서 조영 감소를 관찰할 수 있었다. ATF에 Cy5.5를 먼저 결합시킨 후 IO에 결합시킨 형태의 나노입자(Cy5.5-ATF-IO)를 합성하여 꼬리정맥으로 투여한 후 근적외선 형광영상을 시행하였다. Cy5.5-ATF-IO군에서 Cy5.5-ATF 또는 Cy5.5-IO만 투여한 군과 비교하여 유의한 형광이 관찰되었고 이러한 효과는 96시간까지 지속되었다. Cy5.5-ATF-IO를 투여한 후 MRI와 형광영상을 시행하였을 때 두 영상검사에서 모두 조영 효과가 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 개복하여 종양을 육안으로 관찰하였을 때 크기가 0.5-100 mm³였다. 종양 내에서 나

노입자가 결합하는 세포의 종류를 확인하기 위하여 Prussian blue 염색과 면역조직화학염색을 시행하였다. ATF-IO는 uPAR 양성인 종양 세포에서 발견되었고, 종양에 인접한 기질, CD31 양성 종양 혈관과 CD68 양성 대식세포에서도 확인되었으나, 정상 췌장 조직에서는 관찰되지 않았다. 영상의 민감도를 측정하였을 때, 임상에서 사용되는 3T MRI에서는 1 mm³ 크기의 작은 병변까지 관찰되었고, 근적외선 형광영상으로는 0.5 mm³ 크기의 복강 내 전이 병변까지도 발견되었다. Cy5.5-ATF-IO로 처리한 MIA PaCa-2 췌장암 세포를 누드 마우스에 주입하여 종양 모델을 만든 후 영상의 민감도를 측정하였을 때, 형광영상으로는 1×10^4 개의 세포를 주입한 종양까지 확인된 반면, 자기공명영상으로는 1×10^5 개의 세포를 주입한 종양을 확인할 수 있었다. 한편 만성 췌장염 마우스 모델에서는 Cy5.5-ATF-IO 나노입자를 투여한 후 MRI와 형광영상에서 조영 효과를 관찰할 수 없었다.

해설: 췌장암은 환자의 80% 정도에서 진행된 상태에서 진단되거나 전이가 발견되어 수술 절제가 불가능한 경우가 많아 5년 생존율이 5% 이하로 예후가 매우 불량하다. 또한 수술로 절제한 경우에도 미세전이에 의해 생존율 향상이 높지 않고, 항암제와 방사선 치료에 대한 반응이 낮다.¹ 이에 조기 발견이 생존율을 향상시킬 수 있는 중요한 방법이다. 췌장암 진단에는 multi-detector CT가 가장 많이 이용되고 있으며, 이외에도 복부 초음파검사, EUS, MRI, MRCP, PET-CT, 내시경역행담췌관조영술(ERCP) 등의 방법이 이용되고 있다. 최근 췌장암 고위험군에서 CT와 EUS를 이용한 스크리닝으로 완치가 가능한 무증상의 췌장암 전구병변을 발견할 수 있다는 연구 결과들이 발표되었다.^{2,3} 그러나 CT는 반복되는 방사선 노출과 전구 병변 또는 1 cm 이하의 병변에서 민감도가 낮다. 또한 EUS 및 세침흡인검사로도 1 cm 이하의 병변이 종양, 비종양 낭종, 국소 췌장염인지를 감별하기는 어려워 불필요한 수술이 시행될 수도 있다. MRI는 CT와 비교하여 민감도와 특이도가 더 높지 않고, 고비용으로 일상적으로 사용하지는 않는다. 그러나 간 전이 여부는 CT와 비교하여 좀 더 발견율이 높고 다른 병변과의

감별에 유용하다. 또한 CT에서 종괴가 분명하지 않을 때와 췌장암과 염증성 췌장 종괴가 감별이 어려울 때 도움이 될 수 있으며, 신기능이 저하된 환자나 요오드 조영제가 금기일 때 유용하다.⁴

분자영상기술은 생체 내에서 일어나는 분자 수준의 변화를 영상화하는 기법으로 PET, MRI, single photon emission computed tomography (SPECT), 형광(fluorescence), 생물발광(bioluminescence) 등의 영상 기법을 이용하여 암 등 질병의 조기진단, 치료 약제 개발, 치료과정 추적에 활용되고 있다.⁵ 나노기술은 약 1에서 100 nm의 크기로 물질을 합성하여 나노 수준의 크기에서 나타나는 물질의 독특한 성질을 응용하는 기술이다. 이러한 나노기술을 분자영상에 접목하는 시도들이 활발히 이루어지고 있는데, 특히 나노입자에 초기 암화과정에서 발현되는 단백이나 종양 관련 특이 유전자를 측정할 수 있는 분자 생물학적인 표지자를 결합시켜 광학영상이나 MRI를 이용하여 종양의 조기 진단 뿐만 아니라 치료 효과 판정과 예후 예측에도 적용할 수 있다.⁶ 이번 연구에서는 표면에 COOH기를 갖는 IO 나노입자에 NH₂기를 갖는 uPA의 ATF 웹타이드를 공유결합을 이용하여 결합시켜 비침습적인 MRI 검사의 조영제로 이용하였다. 또한 ATF 웹타이드에 Cy5.5를 결합하여 형광영상 분석도 함께 시행하였다. uPA는 uPAR에 결합하여 기질 분해(matrix degradation), 세포 침범(cell invasion)과 신생혈관생성(angiogenesis)을 조절하는 대표적인 serine protease이다.⁷ uPAR는 86% 이상의 췌장암 조직에서 높게 발현되지만, 정상인이나 만성 췌장염 환자에서 얻어진 췌장 조직에서는 발현되지 않는다.^{8,9} 또한 췌장암 조직에서 높게 발현되는 27개의 유전자 중 uPAR는 췌장암과 만성 췌장염을 감별하는 데 정확도가 제일 높았다.⁸ uPA는 ATF를 통해 uPAR에 결합하며, ATF 웹타이드는 uPA와 상호 경쟁적으로 종양과 혈관 내피세포의 uPAR에 결합하여 종양 성장과 혈관생성을 억제한다.⁷ 이번 연구의 의의 중 하나는 주로 종양 세포에서만 발현되는 Her-2/neu 또는 MUC-1 등을 이용한 기존의 연구와 비교하여 종양 세포 외에도 혈관 내피세포와 기질에도 높게 발현되는 uPAR를 표적으로 하여 영상의 민감도를 향상시킨 점이다. 이 연구에서는 1 mm³ 크기의 작은 병변도 자기공명영상에서 관찰되었고 0.5 mm³ 크기의 복강내 전이 병변이 형광영상에서 발견되었다.

아직까지 췌장암의 조기 발견에 이상적인 생물학적인 표지자는 없으며 이를 위한 연구가 계속되고 있다. 혈청 표지자인 CA19-9는 위양성률이 높아 진단 면에서는 가치가 떨어지며, 주로 치료에 대한 반응 평가로 이용된다.¹⁰ 이외 mesothelin, macrophage inhibitory cytokine (MIC-1)과 osteopontin이 췌장암 환자의 혈청에서 상승되어 있어 혈청 표지자로 이용될 수 있지만 아직 추가 연구가 필요한 실정이다.

다.¹¹ 유전학적 표지자로 Mutant *K-ras*와 *TP53* 유전자 변이가 췌장암 조기 발견의 좋은 표지자로 생각되나 만성 췌장염, 양성 담관 질환의 췌장액에서도 나타나 특이도가 낮고 대변이나 혈액에서는 민감도가 낮다는 단점이 있다.¹² 한편 여러 유전자(*p16*, *ppENK*, *Cyclin D2*, *SOCS1*, *SPARC*, *TSLC1*)에 대한 DNA methylation의 변화, 그리고 최근에는 proteomics를 이용한 분석 방법들이 연구되고 있다.¹¹ 이러한 새로운 생물학적 표지자를 개발하여 나노 기술과의 접목을 통해 췌장암 조기 진단을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

만성 췌장염은 췌장암의 원인 인자이며 만성 췌장염 환자에서 췌장암이 발생할 가능성은 약 3% 내외로 알려져 있다. 만성 췌장염에서 췌장암이 동반되면 임상적으로나 검사 소견으로도 감별 진단이 어렵다. CT, EUS 및 세침흡인 세포 검사, PET 등의 검사도 민감도와 특이도가 90% 미만으로 결국 수술 후 감별되는 경우도 적지 않다.² 이 연구에서는 췌관을 결찰하여 만든 만성 췌장염 마우스 모델에서 Cy5.5-ATF-IO 나노입자의 조영 효과가 관찰되지 않아 이 나노입자가 만성 췌장염과 췌장암의 감별에 유용하다는 것을 보여주었다.

논문의 의의를 요약하자면 최근에 발전한 나노기술을 이용하여 비침습적인 MRI 검사에 이용될 수 있는 다기능 종양 표적 조영제로 췌장암의 조기 진단을 향상시킬 수 있고, 만성 췌장염과의 감별 진단에 도움을 줄 수 있는 분자영상 기술을 제시하였다.

(정리: 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 조영석)

참고문헌

- Yang GY, Wagner TD, Fuss M, Thomas CR Jr. Multimodality approaches for pancreatic cancer. CA Cancer J Clin 2005;55:352-367.
- Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, et al. Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. Clin Gastroenterol Hepatol 2004;2:606-621.
- Brentnall TA, Bronner MP, Byrd DR, Haggitt RC, Kimmey MB. Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. Ann Intern Med 1999;131:247-255.
- Wong JC, Lu DS. Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1301-1308.
- Weissleder R. Molecular imaging in cancer. Science 2006;312:1168-1171.
- Lee JH, Huh YM, Jun YW, et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging.

Nat Med 2007;13:95-99.

7. Li H, Soria C, Griselli F, et al. Amino-terminal fragment of urokinase inhibits tumor cell invasion *in vitro* and *in vivo*: respective contribution of the urokinase plasminogen activator receptor-dependent or -independent pathway. Hum Gene Ther 2005;16:1157-1167.
8. Chen Y, Zheng B, Robbins DH, et al. Accurate discrimination of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis using multimarker expression data and samples obtained by minimally invasive fine needle aspiration. Int J Cancer 2007;120:1511-1517.
9. Cantero D, Friess H, Deflorin J, et al. Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. Br J Cancer 1997;75:388-395.
10. DiMagno EP, Reber HA, Tempore MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. Gastroenterology 1999;117:1464-1484.
11. Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. J Clin Oncol 2005;23:4524-4531.
12. Sturm PD, Hruban RH, Ramsoekh TB, et al. The potential diagnostic use of *K-ras* codon 12 and *p53* alterations in brush cytology from the pancreatic head region. J Pathol 1998; 186:247-253.