

인간 유방암 세포 이식마우스에서 EGFR/HER2 복합 Tyrosine Kinase 억제제인 GW572016에 의한 방사선증진효과

가톨릭대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 을지대학병원 방사선종양학과†

김연실* · 노광원* · 채수민* · 문성권† · 윤세철* · 장홍석* · 정수미*

목적: EGFR, HER2 과발현 인간 유방암 세포를 이용한 종양이식 마우스에서 EGFR/HER2 복합 Tyrosine Kinase 억제제인 GW572016이 방사선반응성에 미치는 영향을 알아보고 종양조직의 EGFR/HER2 수용체 억제효과 및 EGFR down stream signal pathway 단백질인 ERK 1/2, PI3K/Akt 억제효과를 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법: SUM 102와 SUM 149 EGFR 과발현 세포와 SUM 185, SUM 225 HER2 과발현 세포를 우측 옆구리 피하에 접종하여 종양이식마우스를 만들었다. 이식마우스는 2군으로 나누어 한 군은 GW572016에 의한 EGFR/HER2 수용체 억제와 down stream signal 단백질의 활성변화를 Immunoprecipitation과 Western blot의 방법을 사용하여 관찰하였고 다른 한군은 GW572016에 의한 방사선감수성 변화를 알아보기 위해 1) 대조군, 2) GW572016 단독군, 3) 방사선단독군, 4) GW572016+방사선병용투여군으로 나누어 종양성장을 비교 관찰하였다.

결과: GW572016에 의해서 SUM 149, SUM 185 이식종양에서 EGFR 및 HER2 수용체의 활성이 억제되었으며 특히 SUM 185, HER2 과발현 이식종양에서는 ERK 1/2 down stream 단백질의 활성도 억제되었다. SUM 225 HER2 과발현 이식종양에서는 이전의 in vitro실험에서와 달리 GW572016에 의해 HER2수용체의 활성변화가 없었으나 ERK 1/2, Akt의 활성은 모두 억제되었다. GW572016에 의해 SUM 149와 SUM 185에서 종양성장억제효과가 관찰되었고 특히 SUM 149에서는 GW572016과 방사선치료병용군에서 종양성장억제효과가 좀더 뚜렷하여 방사선감수성을 증가시키는 것으로 생각되었다.

결론: GW572016은 EGFR 혹은 HER2 과발현 유방암세포에서 EGFR/HER2 수용체 억제와 down stream signal 단백질의 활성을 억제시켰으며 SUM 149에서는 방사선감수성을 증가시키는 것으로 생각된다. 향후 EGFR을 표적으로 하는 억제제치료에서 EGFR 수용체억제뿐 아니라 down stream 단백질의 활성억제 여부가 방사선 감수성 및 저항성의 극복과 관련이 있으리라는 근거를 설명할 수 있으며 향후 좀더 깊이 있는 연구가 필요하다.

핵심용어: EGFR, HER2, Dual tyrosine kinase inhibitor, 방사선감수성

서 론

EGFR (Epithelial growth factor receptor family)은 4개의 subunit로 구성된 transmembrane receptor tyrosin kinase의 일종으로 세포의 증식, 생존, 분화에 필수적인 신호를 세포내로 전달하는 중요한 수용체로 거의 대부분의 상피 근원의

악성종양에서 발현되고 있으며 종양의 악성도 뿐 아니라 치료 후 예후와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 즉 종양세포 표면에 EGFR이 과발현되거나, 여러 성장인자 (growth factors), 리간드(ligand)에 의해 paracrine, autocrine 기전으로 EGFR이 자극된 경우 종양세포의 증식을 촉진시킬 뿐 아니라, 아포프토시스를 억제시키며, 주위조직으로의 침윤, 전이를 증가시켜 악성종양을 진행시키는 핵심기전²⁾으로 알려지면서 EGFR 억제제들이 유망한 표적치료제로 최근 암연구 분야에 초점이 되고 있다. 특히 방사선 저항성을 유도하는 여러 가지 기전들이 속속 밝혀지면서 EGFR이 과발현된 종양세포의 경우 상대적으로 방사선 반응성이 떨어지며, 방사선 조사 그 자체에 의해서도 EGFR down stream pathway가 활성화되어 임상에서 암환자의 방

이 논문은 2007년 8월 2일 접수하여 2007년 10월 26일 채택되었음.

책임저자: 김연실, 강남성모병원 방사선종양학과

Tel: 02)590-1566, Fax: 02)3476-1365

E-mail: yeonkim7@catholic.ac.kr

이 논문은 2005년 가톨릭중앙의료원 정의장학 학술연구비에 의하여 이루어졌음.

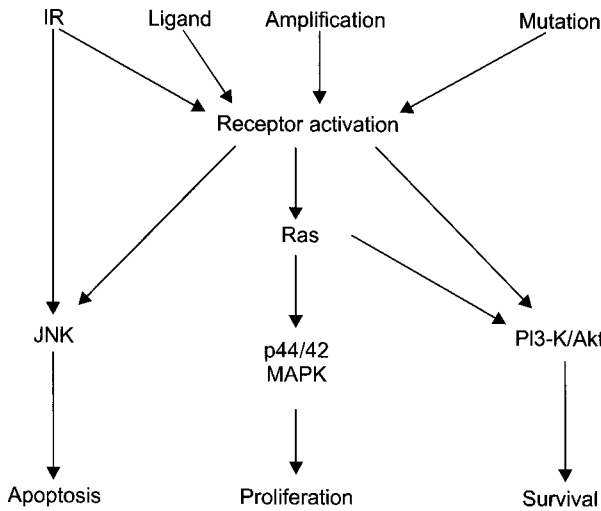


Fig. 1. Cross-communicability of cellular response to ionizing radiation and EGFR signal transduction pathway : ionizing radiation (IR) induce activation of EGFR signal pathway and EGFR receptor stimulation induce radioresistance. IR-induced JNK activation promotes apoptosis, but MAPK activation by EGFR dampens JNK activation and sends proliferation signals. PI3K/Akt activation by EGFR promotes survival.

사선치료 시 유도되는 대표적 방사선저항기전^{3~10}(Fig. 1) 임이 규명되면서 EGFR 억제제들을 방사선치료의 반응을 증가시키는 보조제로 사용하려는 전임상시험^{11~13} 및 임상시험^{1,14,15}들이 시도되고 있다. EGFR이 종양세포의 성장, 진행에 중요한 조절인자임이 밝혀진 것은 이미 1980년대이며 이후 EGFR을 표적으로 여러 종류의 억제제들이 개발되었고 현재는 이들 억제제들을 이용한 고무적인 전임상 혹은 임상시험 결과들이 축적되면서 cytostatic 제제로서 방사선치료, 항암제와 같은 기존의 cytotoxic한 치료방법들과 병합치료들이 시도되고 있다. 비소세포성 폐암에서 대표적인 EGFR Kinase Inhibitor인 Gefitinib (Iressa, ZD1839, Astra Zeneca)와 항암제병용치료, 또한 방사선 저항성이 치료 실패의 주된 원인인 두경부 종양환자에서 EGFR Antibody인 Cetuximab (Erbix, IM-C225, Imclone)와 방사선 병합치료의 시도, HER2 과발현 전이성 유방암 환자에 대한 Trastuzumab (Herceptin, Genentech)과 항암제 병합치료는 최근 매우 주목할 만한 EGFR 억제제들의 임상적용 예라고 할 수 있다.¹⁶ 그러나 이러한 억제제들은 주로 EGFR family 중 하나의 수용체만을 표적으로 한다. 최근의 연구들에 의하면 대부분의 종양은 병인론적으로 한 개 이상의 수용체의 coordinated dysregulation이 관찰된다.^{1,17} 그러므로 GW572016과 같은 EGFR/HER2 복합 억제제는 임상에서 좀더 광범위하게 응용할 수 있다. GW572016의 방사선감수성 증진효과를 확인하기 위한 in vitro 실험에서¹⁸ GW572016

은 EGFR 혹은 HER2 과발현 유방암 세포주에서 종양증식 억제효과(anti-proliferative effect)를 보였으며 이러한 효과는 EGFR down stream signal pathway인 ERK, PI3K/Akt 활성화 억제에 의한 것으로 생각되었다. 또한 EGFR과발현 세포주에서는 clonogenic survival assay에서 GW572016에 의한 방사선 감수성증진효과도 관찰되었다. 본 연구자들은 EGFR, HER2 과발현 유방암 세포주를 이용한 마우스 종양이식모델을 만들어 GW572016가 생체 내(in vivo)에서도 방사선반응을 증가시키는지 알아보고 종양조직내의 EGFR/HER2 수용체억제효과 및 EGFR down stream signal pathway단백인 ERK, PI3K/Akt 억제효과를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. Cell line 및 EGFR/HER2 복합 Tyrosine Kinase 억제제(GW572016)

EGFR/HER2 복합 Tyrosine Kinase 억제제인 GW572016은 GlaxoSmithKline에서 제공 받았다. SUM 149, SUM 102, SUM 185, SUM 225은 인간 유방암 세포주로 미국 미시간 대학의 유방암 세포주 은행으로부터 제공 받았다.

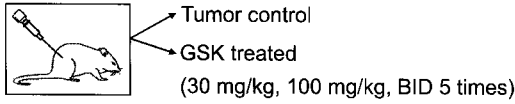
SUM 102와 SUM 149은 EGFR 과발현 유방암세포이며 SUM 185와 SUM 225는 HER2 과발현 유방암세포이다. 이들 종양세포들은 5% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO)과 1 µg/ml hydrocortisone (Sigma, St. Louis, MO), 0.1 mg/ml geneticin (Gibco, Gaithersburg, USA)을 첨가한 Ham's F-12 Nutrients (Gibco, Gaithersburg, USA) 사용하여 37°C, 10% CO₂ 환경에서 배양하였다.

2. 종양이식마우스

4~5주의 C.B-17 Fox-Chase SCID (Charles Liver Laboratories, Wilmington, MA) 마우스를 사용하였으며 filter-topped cage에 넣어 무균실에서 사육하였다. 마우스는 1~10일의 적응기간을 거친 후 5~10×10⁶의 종양세포를 200 µl PBS : Matrigel (1 : 1) 용액에 섞어 우측 옆구리 피하에 접종하였다. 종양세포 접종 후 약 1~2주에 SUM 102를 제외한 SUM 185, SUM 225, SUM 149의 인간 유방암 세포 이식종양이 형성되었다. SUM 102의 경우 접종 후 약 2주 경에 이식종양이 형성되었으나 1주일 후 형성된 이식종양이 자연 소실되어 실험을 진행하지 못하였다. 형성된 이식종양은 두 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 한 군은 GW572016에 의한 EGFR/HER2 수용체 억제와 down stream signal 단백질의 활성변화를 관찰하기 위한 실험군이며 다른 한군은 GW572016에 의한 방사선감수성 변화를 알아보기

Two series of xenograft

A) for determining inhibition EGFR/HER2 receptor, downstream signaling by GW572016 (GSK) : 3 mice per each group



B) for determining radiosensitization of GW572016 (GSK) : 6 mice per each group

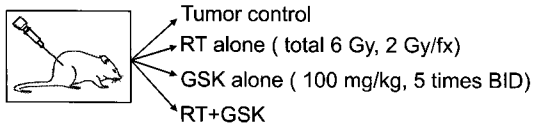


Fig. 2. Two series of xenograft were established. One series were for determining inhibition EGFR/HER2 receptor and down stream signaling activities by GW572016. And the other series were for determining radiosensitization of GW572016.

위한 실험군이다(Fig. 2).

3. 방사선치료 및 종양적출

1) GW572016에 의한 EGFR/HER2 수용체 억제와 down stream signal 단백질의 활성 변화를 관찰하기 위한 실험군에서는 GW572016의 농도에 따라 각각 3마리의 마우스로 실험군을 구성하였다. SUM 185, SUM 225, SUM 149 접종 후 종양직경이 약 1 cm에 도달했을 때 GW572016을 0 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg의 농도로 1일 2회 6시간 간격을 두고 경구 gavage로 총 5회/3일 투여 하였다. 마지막 투여 4시간 후에 CO₂ 가스를 흡입시켜 희생 시킨 후 종양을 적출하여 즉시 액체 질소에 넣어 동결 건조시킨 후 단백질 적출 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

2) GW572016에 의한 방사선감수성 변화를 알아보기 위한 실험군에서는 SUM 185, SUM 225, SUM 149 접종 후 종양세포의 부피가 100~200 mm³에 도달 했을 때 마우스를 1) 대조군, 2) GW572016 단독군, 3) 방사선단독군, 4) GW572016+방사선병용투여군 4개의 실험군으로 무작위 배정하였다. 각 실험군은 각각 6마리의 마우스로 구성하였다. GW572016은 100 mg/kg의 농도로 1일 2회 6시간 간격으로 경구 gavage로 총 5회/3일 투여 하였다. 대조군과 방사선치료 단독군은 GW572016을 희석하는데 사용한 부형제인 10% sulfo-butyl-ether-β-cyclodextrin 용액을 투여하였다. 방사선조사는 전신마취하에 선형가속기(Simen Premus, Concord, MA)를 이용하여 6 MeV 전자선으로 2 Gy씩 총 6 Gy를 우측 옆구리 종양형성부위에 3일 동안 조사하였다. 종양형성부위 이외에 방사선조사를 피하기 위해서 남창폐

물을 사용하였다.

4. 단백질적출

종양조직은 액체질소에서 막자로 갈아 분말을 만들어 2 ml의 RIPA⁺ lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.25% deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor (Roche)]로 옮긴 후 homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 후 lysate를 30분간 얼음속에 보관하였다가 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 사용하였다. 종양용해물(tumor lysate)의 단백질 농도는 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 정량하였다.

5. Immunoprecipitation 및 Western blot

EGFR, HER2 수용체는 1 mg의 tumor lysate에 anti-EGFR Antibody (Ab-22, polyclonal rabbit antisera) 혹은 anti-HER2 Antibody (mouse monoclonal Ab, Clone 9G6.10, NeoMark, Fremont, CA)를 첨가하여 immune complex를 형성한 후 protein A 혹은 protein A/G agarose beads (Santa Cruz, CA)를 첨가하여 immune precipitation시킨 후 RIPA⁺로 bead를 닦아낸 후 8% SDS-PAGE gel에 분리시켜 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 transfer하였다. Membrane은 3% cold fish gelatin (Sigma, St. Louis, MO) in TBST로 45분간 blocking 후 anti-phosphotyrosin antibody (RC 20, Transduction Laboratories), anti-EGFR Antibody (polyclonal rabbit antisera)와 anti-HER2 Antibody (21N Rabbit polyclonal Ab, NeoMark, Fremont, CA) 첨가 후 4°C에서 24시간 immunoblotting하였다. 다음날 membrane은 TBST로 3회 세척 후 horseradish-peroxydase conjugated anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로 1시간 상온에서 반응시킨 후 TBST로 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence (Amersham, UK) 방법으로 EGFR, HER2 수용체를 확인하였다.

EGFR/HER2의 down stream signal 단백질의 활성변화를 관찰하기 위하여 tumor lysate (8 μg of total protein)를 12% SDS-PAGE gel에 분리시켜 membrane에 transfer한 후 3% cold fish gelatin in TBST으로 blocking한 후 phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), p44/42 MAP kinase antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), phospho-Akt-Ser antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), Akt antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)로 immunoblotting

하였다. 세척, 2차 항체와의 반응, detection은 위와 같은 방법을 사용하였다.

6. Tumor growth delay assay

GW572016에 의한 방사선감수성 변화를 알아보기 위하여 재료 및 방법 3)의 b)로 구성한 4개의 실험군 1) 대조군, 2) GW572016 단독군, 3) 방사선단독군, 4) GW572016+방사선병용투여군)의 종양장경을 주 2회 버니어 자로 측정하여 종양의 용적을 아래 식으로 계산하였다(용적=장경²×길이/2).

각 실험군당 6마리의 마우스의 시간에 따른 종양용적의 평균을 계산하여 tumor growth delay curve를 작성하였다. 또한 각 실험군 간의 측정치를 표준화하기 위해서 fractional tumor volume을 산출하여 tumor growth delay curve를 작성해 보았다. Fractional tumor volume은 각 측정시점의 종양용적/초기 종양용적(V/V0)으로 산출하였다. 치료로 인한 독성 유무를 알아보기 위하여 마우스를 치료 중에는 매일, 치료 후에는 주 2회 관찰하였다.

7. 통계처리

각 실험군의 종양용적의 차이는 분산분석법(Repeated Measures Analysis of Variance)을 이용하여 통계처리 하였고 유의한 결과에 대해서는 Scheffee's test와 Duncan test로 다중 비교하였다. 유의수준은 5% 미만으로 하였다.

결 과

1. GW572016에 의한 EGFR/HER2 수용체 활성화 변화와 down stream signal 단백질의 활성화 변화

1) SUM 149 EGFR 과발현 유방암세포주

GW572016에 의해서 EGFR 과발현 유방암세포인 SUM 149의 EGFR 수용체의 인산화가 억제되었다. EGFR 수용체 인산화 억제는GW572016 농도 30 mg/kg과 100 mg/kg에서 차이 없이 동일하게 관찰되었다. 그러나 EGFR 수용체의 인산화는 억제되었어도 대표적인 EGFR down stream signal 단백질인 phosphor-p44/42 MAPK (Erk 1/2)와 phosphor-Akt 활성의 억제는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

2) SUM 185 HER2 과발현 세포주

GW572016에 의해서 HER2 과발현 유방암세포인 SUM 185의 HER2 수용체의 인산화가 억제되었다. HER2 수용체 억제 효과는 GW572016 농도 100 mg/kg에서 관찰되었으며 30 mg/kg 농도에서는 억제효과가 뚜렷하지 않았다. EGFR 수용체의 인산화 억제와 함께 EGFR down stream signal 단백질인 phosphor-p44/42 MAPK (Erk 1/2)의 활성억제효과도 관찰되었으며 이는 GW572016의 농도에 따라 차이를 보였다. Phosphor-Akt 활성의 억제는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이러한 결과는 이전에 보고하였던 in vitro 실험결과¹⁸⁾와 차이를 보여 주는 것으로 in vitro 실험에서는 SUM 185 세포

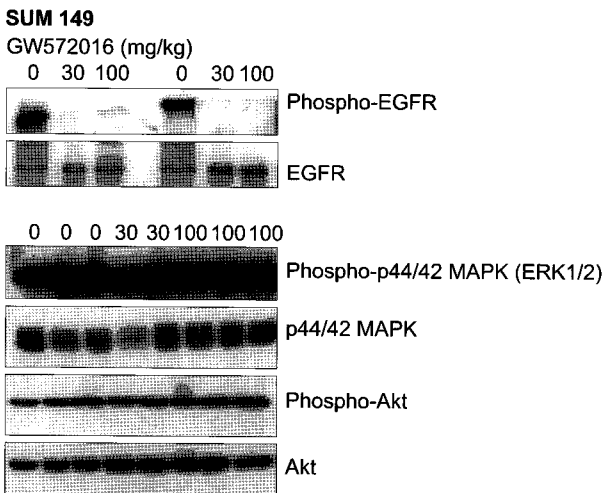


Fig. 3. The effects of GW572016 on the activation of EGFR and down stream p44/42 MAPK (Erk1/2) and Akt pathway in EGFR over-expressing SUM 149 cells. Concentration of 30 mg/kg and 100 mg/kg of GW572016 inhibited phosphorylation of EGFR. Despite EGFR inhibition, GW572016 did not inhibit either p44/42 MAPK (Erk1/2) or Akt pathway.

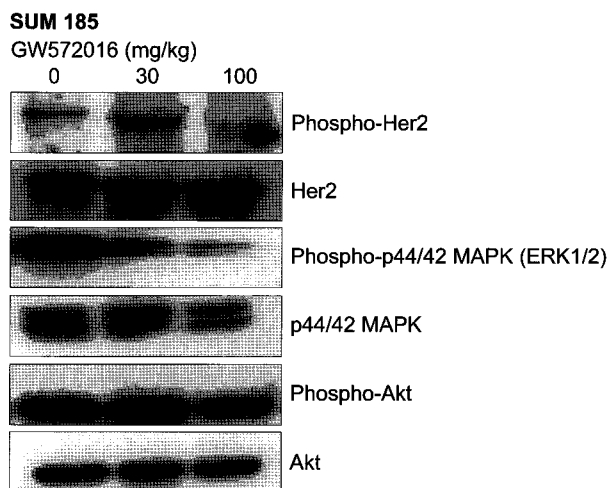


Fig. 4. The effects of GW572016 on the activation of HER2 and down stream p44/42 MAPK (Erk1/2) and Akt pathway in HER2 over-expressing SUM 185 cells. Concentration of 100 mg/kg of GW 572016 inhibited phosphorylation of Her2. In contrast to in vitro study, GW572016 inhibited Erk 1/2 down stream protein with dose dependent manner.

주에서 GW572016에 의해서 HER2 수용체의 인산화 억제는 관찰되었으나 down stream signal 단백질의 활성을 억제하지 못했고 다른 세포주들과는 달리 GW572016에 의해 암세포의 성장억제효과도 관찰되지 않았다.

3) SUM 225 HER2 과발현 세포주

특이할 만한 소견은 GW572016에 의해 SUM 225의 HER2 수용체 인산화 억제는 관찰되지 않았으나 down stream

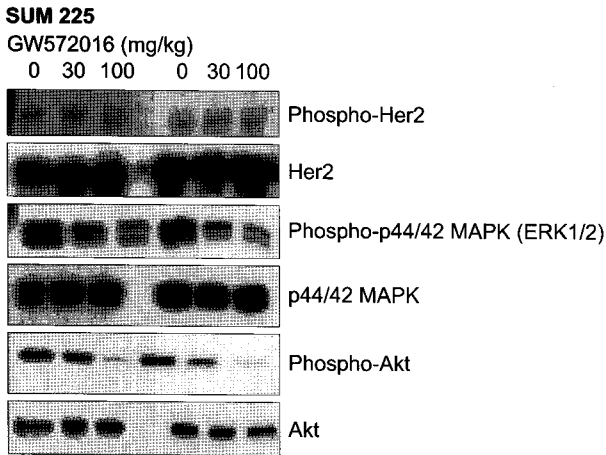


Fig. 5. The effects of GW572016 on the activation of HER2 and down stream p44/42 MAPK (Erk1/2) and Akt pathway in HER2 over-expressing SUM 225 cells. Even we could not observe inhibition of of HER2 receptor phosphorylation by GW572016, both of p44/42 MAPK (Erk1/2) and Akt down stream signal protein phosphorylation were inhibited by GW572016.

signal 단백질인 phosphor-p44/42 MAPK (Erk 1/2)와 phosphor-Akt의 활성은 모두 억제되었고 억제되는 정도는 모두 GW572016의 농도에 비례하였다(Fig. 5). SUM 225는 원래 in vitro에서는 constitutive하게 HER2 수용체가 활성화되어 있는 세포여서 HER2 수용체 활성화여부를 보기 위해 리간드에 의한 자극이 필요치 않다. GW572016에 의해 SUM 225의 HER2 수용체 인산화 억제가 관찰되지 않았던 것은 GW572016에 의한 수용체 활성화억제 효과가 없다라기보다는 생체 내 이식종양환경(in vivo xenograft)에서 이러한 HER2 수용체의 constitutive한 활성화에 변화가 생겼을 가능성이 있다. 종양적출 전에 다른 세포에서와 마찬가지로 Heregulin, TGF와 같은 리간드로 자극하였다면 GW572016에 의한 HER2 수용체의 억제를 관찰 할 수 있을 것으로 생각되며 향후 추가 실험에 의한 확인이 필요하다고 하겠다.

2. GW572016에 의한 방사선감수성 변화

1) SUM 149의 종양성장억제효과

SUM 149세포에서는 대조군에 비해 GW572016 단독군, 방사선치료 단독군, GW572016+방사선병용투여군 모두에서 방사선치료 후 3일부터 종양성장이 억제되는 소견을 보였고 GW572016+방사선병용투여군에서 종양성장억제 효과가 보다 뚜렷하였다. GW572016 단독군의 종양억제 효과는 6 Gy/3일의 방사선조사단독군의 효과와 유사한 정도였다(Fig. 6).

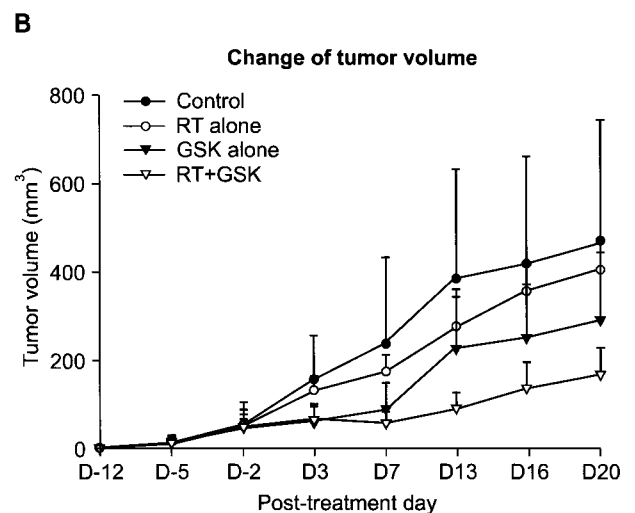
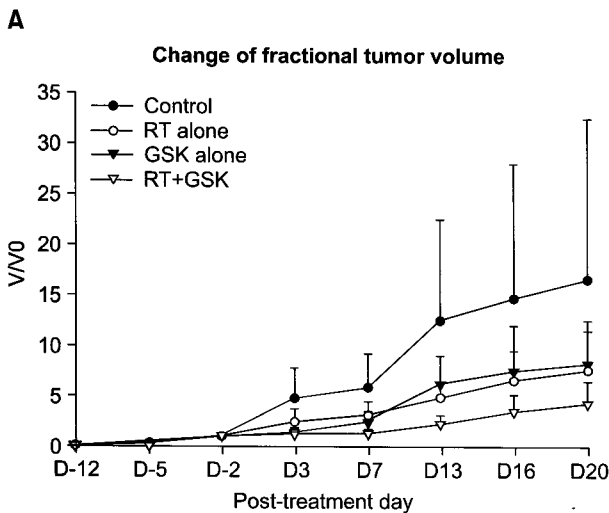


Fig. 6. The effect of GW572016 (GSK*) on SUM 149 tumor cell growth in xenograft. Significant growth inhibitory effect were seen following GSK treatment (100 mg/kg). These effects were similar to those observed following RT[†] alone (6 Gy/3 fx for 3 days). However, combination therapy (RT+GSK) resulted in greater tumor growth inhibition than either RT alone or GSK Treatment alone (p<0.05: Scheffee's test, Ducan's test). *GW572016, [†]radiation therapy.

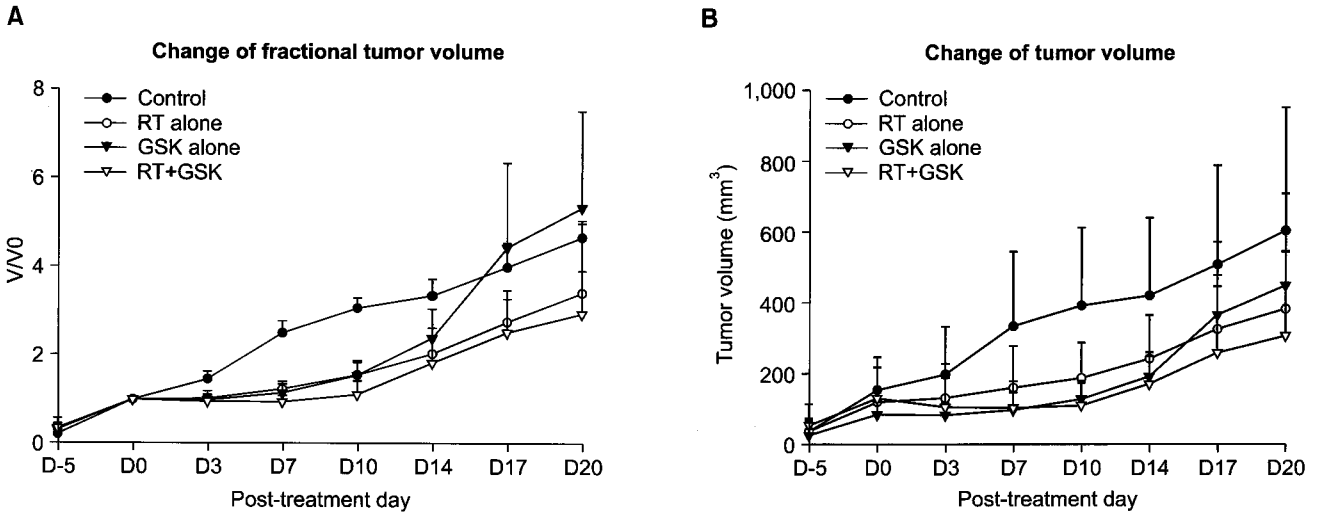


Fig. 7. The effect of GW572016 (GSK*) on SUM 185 tumor cell growth in xenograft. Tumor growth inhibitory effect were seen following GSK treatment (100 mg/kg). However, Those were not statistically significant. There were no greater growth inhibitory effect in combination therapy (RT[†]+GSK) than RT alone or GSK treatment alone. *GW572016, †radiation therapy.

2) SUM 185의 종양성장억제효과

SUM 185세포에서도 대조군에 비해 GW572016 단독군, 방사선치료 단독군, GW572016+방사선병용투여군에서 종양성장이 억제되는 경향을 보였으나 SUM 149 세포에 비하여 종양성장억제효과가 미미하였다. GW572016+방사선 병용투여군에서 GW572016 단독군 및 방사선치료 단독군에 비해 종양성장억제효과가 증가하지 않았다(Fig. 7).

3) SUM 225의 종양성장억제효과

이전 in vitro연구¹⁸⁾에서 SUM 225세포는 HER2 수용체억제 및 down stream signal 단백 활성화억제효과는 특이하였으나 방사선감수성증가를 보기 위한 clonogenic survival assay에서 colony형성을 하지 못하였다. 마우스 이식종양에서도 시간에 따른 종양성장이 미미하여 대조군과 비교하여 종양성장억제효과를 관찰하는데 어려움이 있었다. 방사선치료 후 3주 동안 관찰하였으나 종양용적이 100 mm³ 이상 자라지 못하여 실험군간 차이를 관찰 할 수 없었다.

고안 및 결론

종양 발생과정에 관여하고 있는 분자 생물학적 기전을 직접 공격해 보고자 하는 치료방침은 최근 암 치료에 있어서 아주 유망한 치료방법의 하나로 인정되고 있으며 이에 대한 연구가 매우 활발하다. EGFR이 활성화되면 암의 진행, 전이과정 뿐만아니라 방사선에 대한 저항성과 관련된 여러 가지 신호전달체계를 활성화 시켜 매우 불량한 예후를 나타내고 있다.¹⁾ 이러한 신호전달체계를 선택적으로 차단

시킬 수 있는 제재들을 이용한 표적치료의 수 많은 실험 결과들이 in vitro, in vivo에서 입증되어 현재 임상에 적용되고 있다.^{11~13)} 그러나 현재까지의 초기임상결과들은 전임상(preclinical study) 결과들에 비하여 팔목할 만한 항암효과를 보여주지 못하고 있다.¹⁶⁾ 최근 많은 연구자들은 어떤 환자군에서 EGFR 차단제가 도움이 될 것이며 환자 선정의 정확한 기준(reliable marker)이 무엇인지, 또한 기존의 표준치료인 항암제, 방사선치료와 어떻게 조합할 것인지 연구 중이다. 비소세포성폐암의 선암종에서 EGFR TKI인 Iressa (Gefitinib, ZD1839, Astra Zeneca)의 경우 임상적인 반응예측인자 및 EGFR 유전자변이 여부가 치료 반응을 예측할 수 있는 유용한 지표임이 밝혀졌지만 아직까지 많은 여타 종양의 경우 확실한 반응예측인자가 규명되지 않고 있다.^{19,20)} 본 연구의 목적은 암환자의 방사선치료시 방사선치료의 반응 변조제, 혹은 감수제로 EGFR/HER2 dual kinase inhibitor가 방사선 저항성을 극복하여 치료율을 향상시킬 수 있는지 향후 임상연구의 토대를 마련하고자 한다. 또한 EGFR/HER2 dual kinase inhibitor를 사용 할 때 방사선감수성을 예측할 수 있는 인자로 EGFR down stream pathway의 단백질활성여부가 유용한지를 규명하고자 하였다. 본 연구자들은 GlaxoSmithKline사에서 개발한 EGFR/HER2 dual tyrosine kinase inhibitor (GW572016)를 이용한 in vitro 실험에서 EGFR 과발현 유방암 세포주(SUM 102, SUM 149)와 HER2 과발현 유방암 세포주(SUM 185, SUM 225)에서 효과적으로 EGFR이 억제됨을 확인하였다.¹⁸⁾ 또한 이중 EGFR 과발현 유방암 세포주(SUM 102, SUM 149)에서

는 GW572016처치군이 대조군에 비해 방사선 감수성을 증가시키는 것을 관찰하였다. 특이할 만한 것은 SUM 185 세포주에서 GW572016에 의해 효과적으로 HER2 수용체는 억제되었지만 종양성장억제 효과(cell proliferation)가 관찰되지 않았고 ERK 1/2, Akt의 downstream 단백질이 억제되지 않았다. 반면 또 다른 HER2 과발현 유방암 세포주인 SUM 225에서는 GW572016에 의해 HER2수용체의 활성화와 downstream signal 단백질이 모두 억제되었고 현저한 종양성장억제 효과를 보였다.¹⁸⁾ 이는 EGFR 억제 자체보다는 어떤 downstream 단백질의 억제가 방사선 감수성 및 저항성의 극복과 관련이 있음을 시사하였다.^{21,22)} 이러한 in vitro 실험 결과를 토대로 종양이식 마우스를 만들어 in vivo 실험을 시행하여 유사한 결과를 얻었다. 즉 SUM 149, SUM 185 세포의 경우 이식종양에서도 GW572016에 의해 EGFR, HER2 수용체의 활성화가 억제되었다. In vitro에서 HER2 수용체의 활성화와 downstream signal protein이 모두 억제되었고 현저한 종양성장억제 효과를 보였던 SUM 225세포주의 경우 이식종양에서는 GW572016에 의한 HER2 수용체의 억제효과를 관찰할 수 없었는데 이는 생체 내에서 HER2 수용체의 constitutive한 활성화상태에 어떠한 변화가 유도될 수 있음을 시사하였다. 그러나 EGFR down stream 단백질인 phosphor-p44/42 (ERK 1/2), phospho-Akt는 모두 GW572016에 의해 억제되었다. SUM 225에서는 시간경과에 따른 이식종양의 성장을 관찰하는데 어려움이 있어 Tumor growth delay curve를 작성할 수 없었지만 정상적으로 종양이식편의 증식을 관찰할 수 있었다면 in vitro에서와 마찬가지로 현저한 종양성장억제효과 및 방사선반응감수성 증가효과를 보였을 것으로 예측된다. SUM 185의 경우 in vitro 실험에서 GW572016에 의해서 HER2 수용체는 억제되었어도 downstream signal 단백질의 활성화가 억제되지 않았으며 종양성장억제효과도 관찰되지 않았는데 이식종양에서는 HER2 수용체 억제뿐 아니라 phosphor-p44/42 (ERK 1/2) downstream 단백질의 활성화도 억제 되었으며 미미하지만 종양성장억제효과도 관찰되었다. 이는 EGFR을 표적으로 하는 암치료에서 EGFR 억제 자체보다는 downstream 단백질의 억제가 방사선 감수성 및 저항성의 극복과 관련이 있으리라는 근거를 설명할 수 있다.²¹⁾ 여러 종류의 유방암세포주를 이용한 Hedge들²²⁾의 최근 연구결과도 GW572016에 대한 반응성과 EGFR down stream 단백질인 Akt의 활성화와 관련이 있다고 보고하였다. EGFR이 활성화되면 ERK1/2 MAPK, PI3/Akt, Stat-3, P38 MAPK, JNK와 같은 다양한 down stream 단백질이 활성화 된다.¹⁾ 이러한 down stream signal 단백질의 활성화 여부 방사선과 EGFR 표적치료를 병합하는 병합

치료에 효과를 보일 수 있는 적절한 환자군 및 종양의 선택에 있어 중요한 guide line이 될 수 있다. 또한 EGFR 과발현 암세포이지만 EGFR 억제제에 의해 암세포의 성장이 억제되지 않는 EGFR 억제제 저항성 암세포가 존재한다. 이러한 저항성 암세포에서 선택적인 down stream signal 단백질의 억제는 또 다른 표적치료로 임상에 적용할 수 있어 매우 중요한 의미를 지닌다고 하겠다.

암세포에서 EGFR pathway에 의한 암세포의 성장은 4종류의 EGFR 수용체가 homodimer 혹은 heterodimer를 만들어 down stream signal pathway를 활성화 시키면서 나타난다. 대부분의 악성종양에서 EGFR family는 단독 발현되지 않고 둘 이상의 EGFR 수용체의 발현이 증가되어 있으며 매우 복잡하게 서로 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 HER2는 특이적인 리간드는 존재하지 않으나 다른 EGFR family와 Heterodimer를 만들어 매우 강력하게 EGFR pathway를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다.²³⁾ 그러므로 본 연구자들이 사용한 GW572016은 아직 대규모 2/3상 임상시험의 결과들이 부족하기는 하나 EGFR1/HER2 dual inhibitor로 다양한 종류의 악성 종양에서 HER2에 의한 signal pathway를 효과적으로 차단할 수 있으며 현재 가장 임상에서 널리 사용중인 EGFR monokinase inhibitor들에 비해 다양한 종류의 암세포에서 임상응용의 가능성이 높다고 하겠다. GW572016은 이미 HN5 (head neck), A-431 (vulva), BT474 (breast), CaLu-3 (lung), N87 (gastric) cell line에서 종양세포의 성장을 억제한다는 많은 전임상 결과들이 보고되었으며 현재 유방암 환자를 대상으로 3상 임상시험 중이며 폐암 및 다양한 종류의 고형암에서 항암제 감수성을 증가시키는지에 대한 연구를 진행 중이다.²²⁾

이러한 EGFR 억제제들이 방사선 혹은 항암제의 감수성을 증가시키는 병용치료제로서의 탁월한 in vivo, in vitro 전임상 결과들과는 달리 최근까지, 두경부 종양환자에서 EGFR Antibody인 Cetuximab (Erbix, IM-C225, Imclone)와 방사선 병합치료, HER2 과발현 전이성 유방암 환자에 대한 Trastuzumab (Herceptin, Genentech)과 항암제 병합치료 등 소수의 예를 제외하고는, 보고된 임상시험에서 뚜렷한 병용치료의 이득이 나타나지 않는 이유는 방사선, 혹은 항암제와 EGFR 억제제의 상호작용기전이 충분히 규명되지 못했고 EGFR 억제제로 종양성장을 억제할 수 있는 적절한 환자 및 종양이 선택되지 못했기 때문으로 분석되고 있다.¹⁶⁾ 이들 EGFR 억제제를 방사선 반응 변조제(radiation response modifier)로 효과적으로 암환자 치료에 사용하기 위해서는 방사선과 EGFR 억제제들의 상호작용기전이 충분히 규명되어야 하며 방사선감수성증진(radiosensitizing)

효과를 유발하기 위한 방사선과 EGFR억제제의 적절한 병합치료방법(치료순서, 치료기간 및 적정농도)에 대한 연구가 선행되어야 한다. 또한 최근까지의 대부분의 연구보고에 의하면 EGFR 발현 정도만으로는 EGFR 억제제의 치료 효과를 예측할 수 없으며 EGFR signal pathway는 매우 복잡하게 연관되어 있어 EGFR 억제제에 의해 EGFR 활성이 억제되더라도 down stream 단백들을 활성화 시킬 수 있는 기타 인자가 다른 pathway를 통해 활성화되어 있는 경우 즉 Insulin like growth factor receptor I, EGFR independent PI3K/Akt의 활성화, VEGFR의 활성화 등으로 항암효과 및 방사선감수성증진 효과가 나타나지 않을 수 있다. 앞서 기술한대로 EGFR down stream pathway와 방사선저항성 유도기전은 상호 연관되어 있어 EGFR억제제와 방사선의 병합치료는 additive 혹은 synergistic 병합치료효과를 기대할 수 있다.

저자들은 본 연구를 결과를 통하여 EGFR tyrosin kinase inhibitor를 임상에서 방사선치료와 병합 치료하여 암세포의 성장을 억제하고 방사선 저항성을 극복하여 치료율을 향상시킬 수 있을지 향후 임상연구의 토대를 마련하고자 하였다.

참 고 문 헌

- Sartor CI. Epidermal growth factor family receptors and inhibitors: radiation response modulators. *Seminars in Radiation Oncology* 2003;13:22-30
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signaling mechanism and therapeutic opportunities. *E J Cancer* 2001;4(suppl):S3-8
- Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8:885-892
- Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, et al. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 1997;5:180-186
- Balaban N, Moni J, Shannon M, et al. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-156
- Wollman R, Yahalom J, Maxy R, et al. Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:91-98
- Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991;64:251-254
- Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, et al. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:243-247
- Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15:1191-1197
- Todd DG, Mikkelsen RB, Rorrer WK, et al. Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:885-908
- Harari PM, Huang SM. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol* 2001;11:281-289
- Harari PM, Huang SM. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:427-433
- Nasu S, Ang KK, Fan Z, et al. C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:474-477
- Baselga J. Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* 2001;19:41S-44S
- Raben D, Helfrich BA, Chan D, et al. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2002;29:37-46
- Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 2007;14:295-304
- Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001;19:32S-40S
- Zhou H, Kim YS, Peletier A, McCall Wes, Earp HS, Sartor CI. Effects of the EGFR/HER2 kinase inhibitor GW572016 on EGFR and HER2 overexpressing breast cancer cell line proliferation, radiosensitization, and resistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:344-352
- Chang GC, Tsai CM, Chen KC, et al. Predictive factors of gefitinib antitumor activity in East Asian advanced non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2006;1:520-525
- Yoshida K, Yatabe Y, Park JY, et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:22-28
- Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:1630-1639
- Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, et al. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast

cancer cell lines using global gene expression profiles. Mol Cancer Ther 2007;6:1629-1640

23. Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, et al. Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. Curr Med Chem 2006;13:3483-3492
24. Dent P, Yacoub A, Contessa J, et al. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling path-

ways. Radiat Res 2003;159:283-300

25. Kedar D, Baker CH, Killion JJ, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling inhibits angiogenesis leading to regression of human renal cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. Clin Cancer Res 2002; 8:3592-3600

Abstract

Radiation Response Modulation of GW572016 (EGFR/HER2 Dual Tyrosine Kinase Inhibitor) in Human Breast Cancer Xenografts

Yeon Sil Kim, M.D.*, Kwang Won Roh, M.D.*, Soo Min Chae, M.D.*, Seong Kwon Mun, M.D.[†], Sei Chul Yoon, M.D.*, Hong Seok Jang, M.D.* and Su Mi Chung, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul,
[†]Department of Radiation Oncology, Eulji University Hospital, Daejeon, Korea

Purpose: We examined the effect of the dual EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor, GW572016, on EGFR/HER2 receptor phosphorylation, inhibition of downstream signaling and radiosensitization in either an EGFR or HER2 overexpressing human breast cancer xenograft.

Materials and Methods: We established SCID mice xenografts from 4 human breast cancer cell line that overexpressed EGFR or HER 2 (SUM 102, SUM 149, SUM 185, SUM 225). Two series of xenografts were established. One series was established for determining inhibition of the EGFR/HER2 receptor and downstream signaling activities by GW572016. The other series was established for determining the radiosensitization effect of GW572016. Inhibition of the receptor and downstream signaling proteins were measured by the use of immunoprecipitation and Western blotting. For determining the *in vivo* radiosensitization effect of GW572016, we compared tumor growth delay curves in the following four treatment arms: a) control; b) GW572016 alone; c) radiotherapy (RT) alone; d) GW572016 and RT.

Results: GW572016 inhibited EGFR, HER2 receptor phosphorylation in SUM 149 and SUM 185 xenografts. In addition, the p44/42 MAPK (ERK 1/2) downstream signaling pathway was inactivated by GW572016 in the SUM 185 xenograft. In the SUM 225 xenograft, we could not observe inhibition of HER2 receptor phosphorylation by GW572016; both p44/42 MAPK (Erk1/2) and Akt downstream signal protein phosphorylation were inhibited by GW572016. GW572016 inhibited growth of the tumor xenograft of SUM 149 and SUM 185. The combination of GW572016 and RT enhanced growth inhibition greater than that with GW572016 alone or with RT alone in the SUM 149 xenograft. GW572016 appears to act as an *in vivo* radiosensitizer.

Conclusion: GW572016 inhibited EGFR/HER2 receptor phosphorylation and downstream signaling pathway proteins. GW572016 modestly inhibited the growth of tumor in the SUM 185 xenograft and showed radiosensitization in the SUM 149 xenograft. Our results suggest that a better predictor of radiation response would be inhibition of a crucial signaling pathway than inhibition of a receptor.

Key Words: EGFR, HER2, Dual tyrosine kinase inhibitor, Radiosensitization