

## 이종이식된 고도의 악성 신경모세포종에서 Paclitaxel, Irinotecan과 Mitomycin C의 효과

연세대학교 의과대학 외과학교실

신윤석 · 최승훈 · 오정탁 · 한석주 · 황의호

= Abstract =

### Effects of Paclitaxel, Irinotecan, and Mitomycin C on a Highly Malignant Xeno-Transplanted Neuroblastoma

Yoon Suk Shin, M.D., Seung Hoon Choi, M.D., Jung Tak Oh, M.D.  
Seok Joo Han, M.D. and Eui Ho Hwang, M.D.

Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine

**Background:** The purpose of this study was to assess the efficacy of three chemotherapeutic agents both new and old, on a human neuroblastoma xenograft, designated TNB9, according to the standard Battelle Columbus Laboratories protocol. Cytogenetic and phenotypic analyses showed that TNB9 was one of the most malignant strains among human neuroblastoma xenografts.

**Methods:** When the estimated TNB9 tumor weight reached 100 to 200 mg, 28 nu/nu BALB/c tumor-bearing mice were randomly divided into 4 groups. One of three drugs was administered intraperitoneally in a total of three doses at four-day intervals to the mice in each experimental group while the control group received injections of normal saline. The doses of these agents at each injection were equivalent to one-third of the LD50. The results were evaluated on the basis of the maximum inhibition rate and also by the degree of tumor regression.

**Results:** Maximum inhibition rates were as follows: mitomycin C, 95.6%; irinotecan (CPT-11), 72.5%; paclitaxel, 46.4%. Mitomycin C was graded as having ++ effects, representing tumor regression. Irinotecan was also effective against TNB9, and none of the irinotecan treated mice lost weight, suggesting minimal toxicity.

**Conclusions:** Assessment of the chemotherapeutic sensitivity in vivo showed that irinotecan, mitomycin C were active agents whereas paclitaxel had minimal or marginal activity in the treatment of neuroblastoma.

---

**Key Words:** Neuroblastoma, Nude mouse, Paclitaxel, Irinotecan, Mitomycin C

---

책임저자 : 최승훈, 서울시 강남구 도곡동 146-92, ☎135-270, 영동세브란스병원 외과학교실

Tel: 02-3497-3370, Fax: 02-3462-5994

접수일 : 1998년 2월 27일, 게재승인일 : 1999년 5월 25일

서 론

최근 신경모세포종의 치료에 있어서 많은 발전이 있어 왔으나, 진행된 신경모세포종에 있어서는 환자의 예후가 아직 불량하고, 효과적인 치료 약제를 찾기 위해 지속적인 노력이 진행중이다. 또한 치료 protocol에서 효과가 없는 약제의 제거 또한 임상적으로 중요하다. 인체 종양 세포의 면역 결핍 생쥐에의 이식이 생물학적인 종양 진행의 연구에 있어서 실험적 모델을 제공한다. 실험 동물에 이식된 인체 종양 세포의 직접적인 연구가, 특정한 인체 종양의 연구에 초점을 맞출 수 있고, 여러 가지 단일 항암 치료제에 대한 반응의 차이를 결정하는데에 유용하다. 인체 신경모세포종의 면역 결핍 생쥐에의 이종이식은 새로운 항암제의 실험과 최선의 치료 계획 결정과 약물들의 병합 요법의 연구에 적합한 방법이다. 이 방법은 Helsen등<sup>1,2)</sup>이 처음 소개하였고, 본 연구팀이 인체 신경모세포종의 이종이식을 이용한 우리의 이전 연구에서 염색체 이상과 유전자 증폭이 종양의 증식이나 약물요법에 대한 감수성과의 연관성이 이미 연구되었고, 어느 정도의 상관 관계가 밝혀졌다.<sup>7,8)</sup> 세포 유전학적인 관점에서 악성도가 높은 신경모세포종 이종이식인 TNB9이 여러 항암 치료제의 치료 효과를 평가하기 위한 이번 연구에 채택되었다. 이 연구는 현재의 신경모세포종의 치료 protocol의 개선을 위해 진행된 신경모세포종을 면역 억제 생쥐에 이종이식하여 paclitaxel, irinotecan (CPT-11), mitomycin C 등 세 가지 항암치료제의 효과를 분석하였다. 그 중 paclitaxel, irinotecan은 최근에 소개되었고, mitomycin C는 인체 신경모세포종에 대한 효과에 대해 충분히 아직 연구되지 않았다. 이 약제들은 Battelle Columbus Laboratories protocol<sup>7)</sup>에 따라 TNB9에 대한 표준 용량으로 실험되었다. 이 실험에서 면역 결핍 생쥐에 대한 표준 용량은 LD50의 1/3 용량이었으며, 환자에 쓰인 용량에서도 거의 동등하였다.

대상 및 방법

1) 세포주(Cell Line)

인체 신경모세포종 이종이식인 TNB9이 사용되었다. 실험에 사용된 TNB9 세포주는 일본 동경대학

소아외과의 Tsuchida 교수로부터 공여 받았다. 이 종양은 제 4기로 진행된 15개월된 남아의 종양에서 추출되었고, 1983년 3월에 시작되어서 정기적으로 면역 결핍 생쥐의 피하 조직에 이식되었다(Table 1). 세포 유전학적으로 이 이종이식은 비정상적인 1번 염색체와 20번 염색체에 HSR을 보였고,<sup>8,9)</sup> HSR의 clone 8, G21, 그리고, N-myc DNA sequences에서 60배에서 100배 정도의 증폭률을 보였다.<sup>10)</sup> TNB9은 악성 인체 신경모세포종을 대표한다고 생각되어졌다. 세포 유전학적으로 HSR과 유전자 증폭을 가지고 있으며, 표현형적으로는 5.9일의 짧은 종양 배가 시간을 갖는다.<sup>8)</sup>

2) 실험 동물 (Animals)

암컷 BALB/C nu/nu 생쥐를 연세 임상의학 연구센터를 통하여 구입했고, 병원체가 없는 - 방사선 조사된 음식물, 멸균된 물과 배지 - 환경에서 보관되었다. 모든 실험은 7주된 동물을 가지고 수행되었다. 이식에 앞서서 종양 조직을 종양을 가진 생쥐에서 무균적으로 절제하여서 0.5에서 1.0 mm 정도의 조각으로 잘라졌다.

종양 성장 억제 실험(Study of Tumor Growth Inhibition) - 실험용 생쥐들은 무게를 재고, 그 등에 있는 종양의 크기를 매 4일마다 측정기로 측정했다. 전에 기술하였듯이,<sup>3)</sup> 종양 무게(W)는  $W=(a^2 \times b)/2$  (a=나비, b=길이, 단위: millimeters)의 공식으로 계산

Table 1. Characteristics of the human neuroblastoma xenograft TNB9

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Age of patients            | 15 months |
| Stage of disease           | IV        |
| Previous treatment         | -         |
| Chromosome:                |           |
| abnormal                   | +         |
| DMs                        | +         |
| HSRs                       | +         |
| DNA amplification:         |           |
| clone 8                    | 60 folds  |
| clone G21                  | 100 folds |
| N-myc                      | 80 folds  |
| Tumor doubling time (days) | 5.9       |

DMs: double minutes, HSRs: homogeneously staining regions

되어 mg으로 표시되었다.<sup>11)</sup> 측정된 종양 무게가 100에서 200 mg에 달했을 때, 이 종양 함유 생쥐들을 무작위로 4집단으로, 각각의 집단은 7마리의 생쥐로 구성되었다. 3 약제중의 하나씩을 각 실험군마다 각각 4일 간격으로 3번씩 복강내에 주입하였다. 그 동안에 대조 집단은 생리 식염수를 주입하였다. 사용된 약제는 paclitaxel, irinotecan (CPT-11), mitomycin C이었다. 각각의 주입시에 사용된 약제들의 용량은 data가 유용한 면역 결핍 생쥐들의 복강내 주입된 양에 있어서 LD50의 1/3에 해당하는 양이었거나, 비면역 결핍 생쥐들의 약제들의 생산자가 제공한 정보에 의거한 용량에 해당하는 양이었다(Table 2). 약제들은 식염수로 희석시켜서 각각의 주입시 0.01 ml/g mouse weight이 되게 하였다.

3) 평가(Evaluation)

결과는 다음의 공식에 의해서 계산된 최고 억제율(maximum inhibition rate)로 평가되었다.

$$I.R. = [1 - (T_n/T_0 \div C_n/C_0)] \times 100$$

T<sub>n</sub>/T<sub>0</sub>: 치료군의 치료 시작일(0)과 치료 시작후의 일(n)간의 상대 평균 종양 무게(TW)  
 C<sub>n</sub>/C<sub>0</sub>: 대조 집단의 값

각 군의 평균 종양 무게(TW)가 치료 시작 시기에서는 거의 일치하지만 이것을 위에서 기술한대로 T<sub>0</sub> 또는 C<sub>0</sub>로 나누어 1.0으로 표준화하고, 각 군에서 상대 평균 종양 무게(TW)를 계산했다. Student's t-test가 대조 집단과 치료 집단간의 무게를 비교하는 데에 사용되었다. 각각의 결과는 Geran등<sup>11)</sup>의 방법의 변형에 의해서 ++: 종양의 퇴행: T<sub>n</sub>/T<sub>0</sub><1.0, +: 종양의 증식 지연: I.R.>58%, -: 약제의 비활성: I.R.

Table 2. Doses of chemotherapeutic agents

| Drugs               | Dose at each injection (mg/kg *mW) | LD50 in the literature (mg/kg *mW) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Paclitaxel          | 16                                 | 50                                 |
| Irinotecan (CPT-11) | 59                                 | 177                                |
| Mitomycin C         | 2.8                                | 8.4                                |

\*mW: mouse weight

<58%으로 등급이 매겨졌다.<sup>3,4)</sup>

이 평가에서 종양의 퇴행은 오직 원래의 무게에 비해 상대 평균 종양 무게(TW)의 감소만을 의미하였고 종양이 완전히 사라지는 것을 의미하는 것은 아니었다. 약물 독성의 평가 방법에는 각 군간의 최대의 체중 감소가 이용되었다.

결 과

치료군의 치료시작일(0)과 치료 시작후의 일(n)간의 상대평균종양무게인 T<sub>n</sub>/T<sub>0</sub>는 16일째에는 대조군이 7.4, Paclitaxel 치료군 5.2, Irinotecan (CPT-11) 치료군 2.4, Mitomycin C 치료군이 0으로 Irinotecan 치료군과 Mitomycin C 치료군이 대조군에 비하여 종양억제가 현저함을 보였다(p<0.05). 28일째의 T<sub>n</sub>/T<sub>0</sub>는 대조군 25.1, Paclitaxel 치료군 16.5, Irinotecan (CPT-11) 치료군 11.6, Mitomycin C 치료군이 0.8로 역시 Irinotecan 치료군과 Mitomycin C 치료군이 대조군에 비하여 종양억제가 현저함을 보였다(p<0.05). Paclitaxel 치료군 보다는 Irinotecan (CPT-11) 치료군과 Mitomycin C 치료군이 종양억제효과가 높았다.

Mitomycin C가 TNB9 이종이식에 있어서 가장 효과적인 항암 치료 약제였다. 공식에 의해 계산된 각각의 최고 종양 억제율은 mitomycin C는 95.6%이었고(Table 3), ++의 종양퇴행을 보였다. 종양 무게 곡선은 이 약제들에 있어서 매우 긴 증식 지연 양상을 보였다(Fig. 1). 종양 무게 곡선에서 종양 증식 지연의 양상은 최고 종양 억제율과 약효의 정도에 잘

Table 3. Effects of the three experimental plus two other chemotherapeutic agents on TNB9; each group consisted of 7 mice. Data on cyclophosphamide and cisplatin are from our previous experimental work (4)

| Drug             | Maximum inhibition rate (%) | Grade of effects | Maximum weight loss (%) |
|------------------|-----------------------------|------------------|-------------------------|
| Mitomycin C      | 95.6                        | ++               | 16.3                    |
| CPT-11           | 72.5                        | +                | 0                       |
| Paclitaxel       | 46.4                        | -                | 1                       |
| Cyclophosphamide | 100                         | ++               | 5.5                     |
| Cisplatin        | 97.5                        | ++               | 6.2                     |

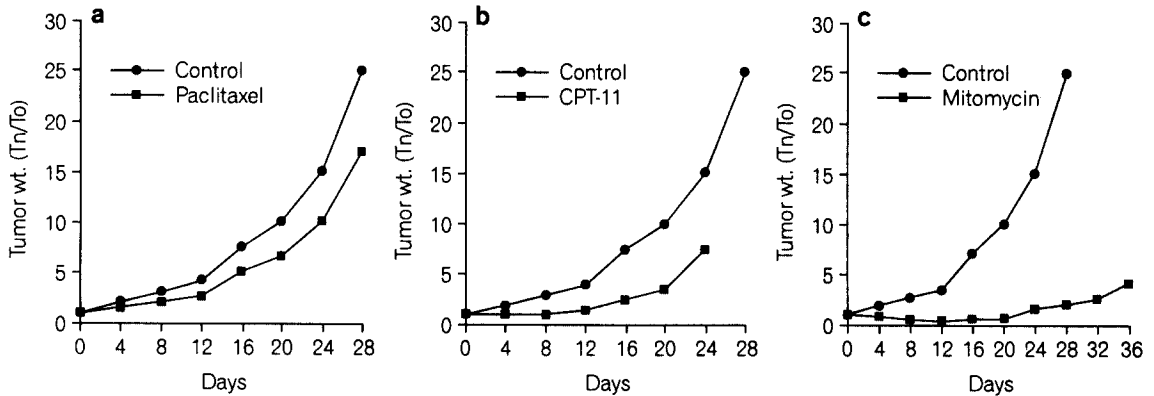


Fig. 1. TW curve for groups of mice treated with three different chemotherapeutic agents (closed squares), shown in comparison with controls (closed circles). a: TW curve for group of mice treated with paclitaxel, b: TW curve for group of mice treated with CPT-11, c: TW curve for group of mice treated with mitomycin C

대응하였다. 최고 체중 손실은 15.9%에서 16.3%로 관찰되어서, 이 약제가 중등도의 독성을 가지고 있음을 나타냈다.

Irinotecan (CPT-II)도 TNB9에 대해서 효과가 있었다. 이 약제는 종양 증식 지연을 보였다. 이 약제의 최고 종양 억제율은 72.5%였고, 이 약제를 투여받은 생쥐에서는 체중 손실이 없었다. Paclitaxel의 최고 종양 억제율은 46.4%였고, 체중 감소는 경미했다.

## 고 찰

최근 발전하고 있는 병합 요법과 고용량 항암 치료 그리고, 자가 골수 이식의 사용으로 병기가 진행된 신경모세포종의 생존율에 있어서 상당한 진전이 있었다.<sup>13)</sup> 하지만, 더 약효가 있고, 독성이 적은 항암 치료제의 발견이 이 병의 예후 향상에 매우 중요하다. 병기가 진행된 신경모세포종 환자의 예후를 증진하기 위한 제제와 방법에 대한 연구의 시도로 paclitaxel, irinotecan (CPT-11) 등의 새로운 약제의 효과를 검사하였다. Mitomycin C는 그 효과가 이미 증명되어 있었으므로 치료의 효율성을 비교하기 위해서 이 실험에 포함하였다.

생체 또는 시험관 실험에서 인체 종양에 대한 항암 치료제의 효과를 평가하는 이상적인 방법은 없다. 면역 결핍 생쥐의 이종이식은 3가지 단점이 있다. ① 부피의 배가 시간이 환자에 비해 더 짧고, ② 혈

관계와 지지하는 간질 요소가 숙주로부터 공급되고, ③ 숙주의 방어 기전은 이종 이식체에 대해 활동적이다.<sup>14)</sup> 인체 종양 이종이식에서 처음 3대에서 5대의 이식에서는 부피 증식률이 여러 차례 증가되고, 가능한 새로운 환경에 적응된다. 그 뒤의 이식에서는 상대적으로 일정한 증식률이 수 년간 지속되는 것을 알 수 있었다. 이종이식체와 임상 종양 검체사이의 모든 변수에 대한 연구에서 종양세포의 내인적 성질은 일반적으로 이종이식시에는 유지되고, 갑상선 제거 생쥐에서는 영구적인 이종이식체가 형성된다.

Battelle Columbus Laboratories protocol에 따라 LD50의 1/3을 실험 동물에게 4일 간격으로 3차례 주입하는 것은, 서로 다른 항암 치료제의 약리작용을 고려할 경우에 하나의 절충안이라고 할 수 있다. 예를들어 어떤 약물들은 지속적 주입이 효과적이고, 어떤 약물들은 일시적 주입이 효과적이다. 실험 모델로써 이러한 결함이 있지만, 이번 실험에 사용된 이종이식 모델은 새로운 약물을 검증하는 데에 있어서 하나의 유용한 체계라고 생각된다. 왜냐하면 생쥐에게 사용된 용량은 환자에게 사용된 용량에 거의 수평적으로 대응하고, 동시에 같은 종양에 대해서 각기 새로운 여러 약물의 약효를 검증하는 것은 임상적으로 어렵기 때문이다.<sup>5)</sup> Tn/To에 대한 신뢰도를 높이기 위해서 많은 control group을 갖는 것 등이 신중히 고려되었으나, 면역 억제 생쥐의 가격 때문에 불가능하였다. 그러나 이 실험에 사용된 이종이식 모델

은 새로운 약물 실험에 유용하며, cyclophosphamide, cisplatin, melphelan 등의 약물의 효능은 이미 지난 실험에서 입증되었다.<sup>3,4)</sup>

Paclitaxel은 태평양 주목(Pacific yew), *Taxus brevifolia*에서 분리된 천연 생산물이다. 이 약제는 tubulin을 모이게 하는 촉진 약물로써 작용하는 그 특이한 기전으로 유방암, 폐암, 두경부암, 그리고 병기가 진행된 난소암 환자에 있어서 상당히 뛰어난 항암 효과를 보인다.<sup>15-18)</sup> 신경모세포종양 세포주에서 paclitaxel의 실험관 세포 독성 효과는 그리 의미가 없었다.<sup>19)</sup> 그리고, 가장 저항성이 있었던 세포계는 여러 개의 약물 저항성 유전인자(multi-drug-resistant gene)를 높은 정도로 가지고 있던 것이 특징적이었다. 이런 세포계의 약물 저항성은 cyclosporin-A, dipyridamole, 그리고 cremophor-EL를 사용할 경우 역전될 수 있었다.<sup>20)</sup> 그러나 paclitaxel의 생체 감수성 검사에서는 좋지 않은 결과가 나왔다. Irinotecan (CPT-11)은 중국이 원산지인 *Camptotheca acuminata* 나무 껍질의 이차적 대사산물이다. 이것은 전구 약물로써 간에 있는 carboxylesterase와 같은 효소에 의해 생체 내에서 SN-38이라는 활성 대사 물질로 변환된다. Irinotecan (CPT-11)은 DNA 복제에 관여된 효소인 topoisomerase I이라는 효소를 특이하게 억제한다. 또 다른 topoisomerase I 억제제인 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin (topotecan)은 소아기 횡문근육종과 골육종에서 얻어진 이종이식체에 약효가 있었고, 병기가 진행된 신경모세포종 환자에서 6개월 이상의 기간동안 골과 골수의 질환에 있어서 완전 관해를 유발시켰다.<sup>21,22)</sup> Kaneko등<sup>23)</sup>은 CPT-II이 TNB9 뿐만 아니라, 또 다른 인체 신경모세포종인 TS-N-2에게도 약효가 있다는 것을 알아냈다. 본 결과에서는 CPT-II가 인체 신경모세포종 이종 이식체인 TNB9에 대해서 높은 약효가 있었다. 이번 실험에서 CPT-II가 투여된 면역 결핍 생쥐에서 한 마리도 체중 감소가 없었다. 이번 검사 결과는 CPT-II가 고위험도 신경모세포종 환자의 치료에 있어서 허용된 범위내의 독성을 갖는다고 생각된다. Mitomycin C는 일본에서 항암, 항생목적으로 개발되었고 알킬화 약물(alkylating agent)로 작용한다.<sup>24,25)</sup> 이 약물의 종양 증식 억제는 주목할 만하고, 임상 적용이 가능하다. 화학 치료 약제의 감수성 검사에서 신경모세포종의 치료에 CPT-II, mitomycin C는 활성 약제였고, pacli-

taxel은 약효가 미미하거나, 제한적인 효과만 있었다. 그러나 paclitaxel은 면역 결핍 생쥐의 체중 감소가 경미하여, 비록 실험 용량은 제조사에서의 정보에 의하여 조심스럽게 계산된 용량을 사용하였지만, 고 용량을 주입할 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Helson L, Das DK, Hajdu SI: Human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 35: 2595, 1975
- 2) Helson L: The nude mouse model for rational therapy (AE Evans ed); *Advances in Neuroblastoma research*, Raven Press, New York, 1980, p309
- 3) Tsuchida Y, Yokomori K, Iwanaka T: Nude mouse xenograft study for treatment of neuroblastoma; effects of chemotherapeutic agents and surgery on tumor growth and cell kinetics. *J Pediatr Surg* 19: 72, 1984
- 4) Makino S, Tsuchida Y, Nakajo T: Effects of cyclophosphamide, cisplatin, nitrosourea (ACNU), melphalan, and dacarbazine on a cytogenetically highly malignant neuroblastoma xenograft. *Med Pediatr Oncol* 14: 36, 1986
- 5) Makino S, Kashii A, Kanazawa K: Effects of newly introduced chemotherapeutic agents on a cytogenetically highly malignant neuroblastoma, xenotransplanted in nude mice. *J Pediatr Surg* 28: 612, 1993
- 6) Komuro H, Li P, Tsuchida Y: Effects of CPT-11 (a unique DNA topoisomerase I inhibitor) on a highly malignant xeno-transplanted neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 23: 487, 1994
- 7) Tsuchida Y, Kaneko Y, Kanda N: Possible relationship of chromosome abnormalities and gene amplification with effects of chemotherapy: a neuroblastoma xenograft study (AE Evans ed); *Advances in Neuroblastoma Research*. Alan R. Liss, New York, 1985, p17
- 8) Tsuchida Y, Kanda N, Shimatake H: Clinical significance of gene amplification studied in human neuroblastoma xenografts: relationship with tumor growth rate, chemotherapeutic sensitivities and levels of neuron specific enolase. *Exp Cell Biol* 56: 277, 1988
- 9) Kaneko Y, Tsuchida Y, Maseki M: Chromosome findings of human neuroblastomas xenografted in nude mice. *Jpn J Gann* 76: 359, 1985
- 10) Kanda N, Tsuchida Y, Hata J: Amplification of IMR 32 clone 8, G21, and N-myc in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res* 47: 3291, 1987
- 11) Ovejera AA, Houchens DP, Baker AD: Chemotherapy

- of human xenograft in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* 8: 50, 1978
- 12) Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MM: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 3: 1, 1972 (vraiment 103 pages ?)
  - 13) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M: Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma: an analysis of patients who were pre-treated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. *Med Pediatr Oncol* 24: 181, 1995
  - 14) Taghian A, Huangl P: The nude and SCID mice as a tumor model in experimental cancer biology. *Cancer J* 8: 75, 1995
  - 15) Seidman AD: Single agent use of Taxol (paclitaxel) in breast cancer. *Ann Oncol* 5 (suppl 6): S17, 1994
  - 16) Ettinger DS, Finkelstein DM, Sarma RP: Phase II study of paclitaxel in patients with extensive-disease small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 13: 1430, 1995
  - 17) Forastiere AA: Current and future trials of Taxol (paclitaxel) in head and neck cancer. *Ann Oncol* 5 (suppl 6): S51, 1994
  - 18) Gore ME, Levy V, Rustin G: Paclitaxel in relapsed and refractory ovarian cancer: the UK and Eire experience. *Br J Cancer* 72: 1016, 1995
  - 19) Helson L, Helson C, Malik S: A saturation threshold for Taxol cytotoxicity in human glial and neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 4: 487, 1993
  - 20) Chervinsky DS, Brecher ML, Hoelcle MJ: Cremophor-EL enhances Taxol efficacy in a multi-drug resistant C1300 neuroblastoma cell line. *Anticancer Res* 13: 93, 1993
  - 21) Houghton PJ, Cheshire PJ, Nyers L: Evaluation of 9-dimethyo-aminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 31: 229, 1992
  - 22) Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JD: Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 36: 393, 1995
  - 23) Kaneko M, kaneko S, Ohkawa H: Evaluation of anti-tumor activity of topoisomerase inhibitors against neuroblastoma: in-vivo study. *Igaku-no-Ayumi* 165: 875, 1993 (in Japanese)
  - 24) Wise GR, Kuhn IN, Godfrey RE: Mitomycin C in large infrequent doses in breast cancer. *Med Pediatr Oncol* 2: 55, 1976
  - 25) Baker LH, Izbicki RM, Zaitkevicius VK: Phase II study of profirromycin vs mitomycin C utilizing acute intermittent schedules. *Med Pediatr Oncol* 2: 207, 1976
-