

## 기능적 영상술을 이용한 다약제 내성의 체내 진단

경북대학교 의과대학 핵의학교실

이 재 태

**Functional Imaging of the Multidrug Resistance In Vivo.**

**Jaetae Lee, MD.**

*Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, Taegu, Korea.*

### Abstract

Although diverse mechanisms are involved in multidrug resistance for chemotherapeutic drugs, the development of cellular P-glycoprotein(Pgp) and multidrug-resistance associated protein (MRP) are important factors in the chemotherapy failure to cancer. Various detection assays provide information about the presence of drug efflux pumps at the mRNA and protein levels. However these methods do not yield information about dynamic function of Pgp and MRP in vivo. Single photon emission tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) are available for the detection of Pgp and MRP-mediated transport.  $^{99m}\text{Tc}$ -sestaMIBI and other  $^{99m}\text{Tc}$ -radiopharmaceuticals are substrates for Pgp and MRP, and have been used in clinical studies for tumor imaging, and to visualize blockade of Pgp-mediated transport after modulation of Pgp pump. Colchicine, verapamil and daunorubicin labeled with  $^{11}\text{C}$  have been evaluated for the quantification of Pgp-mediated transport with PET in vivo and reported to be feasible substrates with which to image Pgp function in tumors. Leukotrienes are specific substrates for MRP and  $\text{N}^{-[11}\text{C}]\text{acetyl-leukotriene E4}$  provides an opportunity to study MRP function non-invasively in vivo. Results obtained from recent publications are reviewed to confirm the feasibility of using SPECT and PET to study the functionality of MDR transporters in vivo.

### 다약제 내성(Multidrug Resistance, MDR)

항암제 치료에 내성이 발생한 암조직은 한가지 약제뿐만 아니라, 식물이나 진균에서 추출된 알칼로이드나 여러 종류의 항암제에도 교차내성을 가지므로 항암화학요법 실패의 주요 원인이 되고 있

다.<sup>1,2)</sup> 이러한 다약제내성 (multidrug resistance, MDR)은 항암제를 세포바깥으로 배출시켜 세포내 약제의 저류를 감소시키는 P-당단백(Pgp)과 multidrug-resistance associated protein (MRP)의 과도한 생성과 연관되어 있다.<sup>2,4)</sup> 다약제 내성의 발생 기전은 Pgp과 MRP 외에도 110-kDa 크기의 lung resistant related protein(LRP)의 생성, 많은 항암제의 표적이 되는 세포내 DNA효소인 topoisomerase II의 변이 및 감소, 세포질내의 glutathione의 증가, pyruvate kinase 효소치의 변화와도 관련이 있는 복합적인 현상이다.<sup>2,4)</sup> 그러나 Pgp과 MRP의 과다생성이 항암치료 실패의 가장 중요한 원인으로 밝혀진 후, MDR 극복제의 합성과 새로운 극복방법의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

Received Apr. 16, 2001; accepted Apr. 19, 2001

Corresponding Author: Jaetae Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Kyungpook National University Hospital,

Samduk 2-Ga 50, Taegu 700-721, Korea.

Tel: 82-53-420-5586, Fax: 82-53-422-0864

E-mail: jaetae@knu.ac.kr

ATP-binding cassette transporter군 중의 하나인 Pgp은 6개의 transmembrane domains과 2개의 세포내 ATP-binding 부위를 가지는 에너지 의존성 배출펌프로서 인체의 정상조직에도 존재하여 부신피질, 장점막 세포, 신 근위부 세뇨관세포, 췌장관, 임신중 자궁, 위장관 상피세포, 뇌의 미세혈관, 고환, CD34<sup>+</sup> 골수모세포에 존재하여, 독성물질을 소변, 담도 및 장관강으로 배설시킴으로서 신체를 방어하며, 뇌, 고환등 중요기관의 항상성 유지와 방어작용에도 관여한다.<sup>5)</sup> 인체종양에서는 신세포암, 간암, 갈색종, 대장암에 특히 Pgp이 많이 존재한다. Pgp는 ATP를 가수분해하여 생성되는 에너지를 MDR 약제의 배출에 이용하며, ATP 통로로도 이용이 되며 volume-regulated chloride통로에도 관여한다. MRP는 6번 유전자에 위치한 *mrl1* 유전자에 발현에 의하여 생성되는 190-kDa의 단백질이며 인체내 대부분의 세포에 존재하며, Pgp가 측정되지 않는 MDR세포에서 과발현된 것이 알려져 있고 세포질내의 골기체나 endoplasmic reticulum에 주로 존재한다. MRP의 작용기전은 Pgp와는 다르게 glutathione S-conjugate efflux pump로 작용하여 글루타치온에 접합한 약제를 배출시키거나 글루타치온과 같이 배출시킨다.<sup>2)</sup> 특히 vincristine 등의 빈카알카로이드계 항암제 배출에 연관된 약제내성의 발생원인이 되고, leukotrienes의 이동에도 작용한다. 그러나 간에는 MRP<sub>1</sub> 발현이 적고 비특이적 음이온의 배설에 관여하는 MRP<sub>2</sub>가 간세포의 미세담관 면으로 발현되어 있으며, 담즙배설의 이상이 나타나는 Dubin-Johnson증후군에서는 MRP<sub>2</sub>가 결핍되어 있었다고 보고되었다.<sup>2)</sup> 동물실험에서 buthionine sulfoximine(BSO)으로 세포내 glutathione농도를 고갈시키는 경우 MRP에 의한 약제내성은 소실된다고 한다. Benderra 등<sup>6)</sup>은 Pgp는 세포막을 통한 약물의 배출에 관련되고, 세포질내의 소낭(vesicle)을 통한 약제의 세포 바깥으로의 이동은 MRP만이 관여한다고 보고하였다.

다약제 내성의 극복은 항암치료의 성공여부를 결정하는 요인이라는 점은 공감되고있으나 아직도 임상적으로 다약제내성의 극복은 성공적이지 못하

다.<sup>7)</sup> 다약제 내성의 극복방법 중 Pgp에 작용하여 다약제 내성을 역전시킬 수 있는 약제들로는 verapamil로 대표되는 칼슘통로 차단제, cyclosporin과 유도체인 PSC833, quinine유사체, calmodulin길항제, quinolone 항생제, reserpine 유사체, acridone-carboxamides, triazinoaminopiperidines 등이 있다.<sup>8,9)</sup> 이들은 항암요법제의 세포외로의 유출을 막아, 종양세포내 약제의 농도를 증가시키게 된다.

약제 내성 암세포는 Ca<sup>++</sup>농도가 정상보다 높다는 사실에 착안하여 세포막의 Ca<sup>++</sup> 통로차단제이며 지용성 side-chain을 가진 verapamil을 사용하면 내성이 억제된다는 사실이 알려진 이후, 최대 6~10 uM/L의 혈중 농도에서 임상실험이 시행된 바 있다.<sup>9,10)</sup> Verapamil의 Pgp 길항작용의 기전은 Pgp에 대한 경쟁적인 억제작용 (competitive inhibition)이라고 알려져 있으나, Lampidis 등<sup>11)</sup>의 연구에 의하면 칼슘통로 호환제도 유사한 효능이 있으므로 세포내 칼슘농도의 증가가 다약제내성의 극복 기전은 아니라고 믿어지고 있다. 임상실험에서는 verapamil이 1~2 uM/L의 혈장농도에서 심각한 심장독성과 저혈압을 유발하므로<sup>10)</sup> 다약제내성을 역전시킬 수 있는 고용량을 투여하기 어렵고, Pgp이 생성된 환자에서 고용량을 투여하여도 항암 치료에 반응이 없는 경우가 있다. 그 이유는 칼슘의 축적이 세포투과성에 영향을 미쳐서 일어난다는 설과, Pgp 이외에 다른 내성 기전의 존재, 변형된 Pgp이나 이종(異種)의 Pgp 집단의 존재, 치료효과를 증가하기에는 부적절한 혈중 verapamil농도, verapamil에 대한 암세포 사이의 감수성 차이 등도 원인으로 제시된 바 있다.<sup>9,11)</sup> 그러므로 다약제 내성을 극복하는 능력은 향상되면서 심혈관계 독성을 줄이기 위하여 verapamil의 구조를 변형시킨 여러 가지 유도체들이 합성이 연구되어왔고 실제 몇몇 제품은 임상적인 응용도 되었다.<sup>12,13)</sup> Dexverapamil은 임상적으로 가장 많이 이용된 verapamil 유도체중의 하나이다. MDR 극복제를 투여하는 경우에는 장기에 대한 독성이 증가할 수 있으나, 일반적으로 항암치료의 실패는 정상 장기에 대한 독성보다는 부적절한 치료 반응에 의한 경우가 대부분인 만큼 큰 문제가 되지는 않는다.<sup>14)</sup> 면역억제제인 Cyclosporin A도 다약

제 내성인자를 역전시킬 수 있으나 고용량이 필요하며, 이 때 심한 신독성이 문제가 된다고 임상연구에서 보고되었다.<sup>5)</sup> 따라서, 인체 독성은 적고 MDR의 역전효과는 큰 제제의 개발이 시도되어 PSC833과 같은 약제가 합성되었다. 이러한 약제들은 Pgp에 경쟁적으로 작용하여 항암제의 세포외 배출을 억제함으로써 세포내 약물의 농도를 높여준다. 다약제내성 길항제들은 다양한 화학적 특성을 지니고 있으나, 양전하를 띠고 소수성인 공통 특성을 가진다.<sup>8-9)</sup> 길항제들의 작용기전으로는 MDR 배출기전에 의한 기질물질의 이동에 관여하는 공통적인 결합부위에 대한 경쟁적 결합, 또는 단백질 내의 인식도메인(recognition domain)과의 친화성 변화 등이 알려져 있고,<sup>9)</sup> 내성극복제중 일부는 세포고사(apoptosis)를 촉진하여 내성을 극복하는데 기여한다는 보고도 있다.<sup>24)</sup>

### 다약제 내성의 탐색법

*mdr1* 유전자, Pgp과 MRP발현을 측정하는 방법으로는 압조직에서 RT-PCR에 의한 *mdr1* mRNA의 측정과 Northern blotting에 의한 Pgp의 측정, Pgp와 MRP에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학적염색 및 유세포분석법(flow cytometry)등의 체외 검사법과 동축점(confocal) 현미경을 이용하여 세포내 약제의 분포를 관찰하는 방법 등이 이용되고 있다.<sup>14-17)</sup> 실제로 아주 적은 정도의 *mdr1* 유전자도 다약제내성을 유발할 수 있으므로 RT-PCR같은 민감한 방법으로 적은 양의 mRNA도 찾을 수 있다. 다약제 내성에서 가장 중요한 Pgp나 MRP는 세포막에서 생성이 되므로, 생검이나 수술에서 얻은 압조직의 면역화학적 염색법, 분자생물학적 분석법으로 체외(in-vitro)에서 증명을 할 수 있다.<sup>14-16)</sup> 악성종양에서 화학요법이 실패한 환자의 상당수에서 암세포나 조직절편에서 *mdr1* mRNA의 과다발현과 면역화학염색상 암세포의 P-gp와 MRP의 생성이 증가되어 있음이 보고된 바 있다.<sup>2,7)</sup> Pgp나 MRP에 의한 암세포의 약제 배출능을 평가하는데는 조직절편이나 분리한 암세포에서 rhodamine-123나 doxorubicin, daunorubicin 등 형광을 발산하

는 약제의 암세포내 저류정도를 유세포분석기로 측정하거나 Tween-80로 Pgp억제한 후 rhodamine-123의 저류증가를 평가한다. 그러나 이러한 방법들의 검사기술이 간단하지는 않고, 매번 암세포나 종양조직을 얻어 체외에서 시행하는 검사이므로 종양세포의 채취가 비교적 간단한 백혈병과 같은 혈액질환이외에는 실질적으로 이용하기 어렵다.<sup>14-17)</sup> 한편 Pgp가 세포막에 발현된 종양에서도 항암제치료에 반응을 보이는 경우가 있고 그 반대의 경우도 있을 수 있어, 체외검사의 결과만으로 판단하는 경우에는 치료방침의 선택에 혼선이 발생할 수도 있다. 골수성 백혈병 세포에서 성숙된 세포주는 Pgp 발현이 많으나 약제의 배출은 일어나지 않은 반면, 미성숙 골수성백혈병 세포의 일부는 Pgp 발현이 적으나 Pgp 운반기질의 배출은 활발하게 일어난다. 특히 고형종양의 치료에서 다약제 극복제제 사용시에 Pgp의 존재여부와 치료결과가 별다른 연관성을 보이지 못한 경우가 많고, 그 원인은 극복제제의 농도가 Pgp을 차단할 만큼 충분한 정도로 도달하지 못하거나 암세포에 존재하는 Pgp가 비활동형이기 때문이라고 추측된다.<sup>17,18)</sup> 또한 Oda 등<sup>18)</sup>은 같은 검체에서 RT-PCR로 측정한 *mdr1* RNA 발현과 조직화학염색에서 단백질 발현 정도, dot blot소견이 일치하는 정도는 47%였고 대부분은 Pgp이 불균등하거나 낮은 농도로 분포하여 유전자 수준의 변화가 반드시 단백질 생성과 연관되어 있지는 않아, 한 가지 방법으로 정확하게 평가할 수 없다는 문제점이 있다고 하였다. 그러므로 체내에서 다약제내성의 발현을 비침습적으로 진단하고, Pgp와 MRP의 동적인 약제배출능을 객관적으로 평가할 수 있어야 적절한 극복제를 선택할 수 있거나 불필요한 극복제의 사용을 피할 수가 있다.

### SPECT용 추적자를 이용한 이용한 연구

<sup>99m</sup>Tc-MIBI, <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin, <sup>99m</sup>Tc-furifosmin, <sup>99m</sup>Tc-Q58, <sup>99m</sup>Tc-Q63 등의 화합물을 이용한 SPECT영상법으로 Pgp과 MRP의 운반성능을 체내에서 평가할 수 있다.<sup>20)</sup> 심장관류의 평가에 사용중인 방사성의약품인 <sup>99m</sup>Tc-MIBI(methoxyisobutyl-

sonitrile)는 화학적으로 Tc(I)의 중심에 6개의 MIBI가 둘러싼 모양을 하고 있는 안정된 단가의 지용성 양이온화합물로서 체내에서 유의한 대사가 일어나지 않고 이온화시킬 수 있는 화학기를 가지고 있다.<sup>19)</sup> <sup>99m</sup>Tc MIBI는 분자구조가 다약제 내성과 연관된 항암제들과는 상이하나, 세포막을 자유롭게 통과하는 저 분자량의 물질로서 암세포내로의 섭취는 항암약제와 유사한 기전을 가지고 있다. Piwnica-Worms 등<sup>20)</sup>, Rao 등<sup>21)</sup>은 다약제 내성유전자의 과다발현과 연관된 Pgp 생성이 증가된 인체암세포에서는 <sup>99m</sup>Tc-MIBI가 항암제와 유사한 기전으로 세포 바깥으로 배출되어 세포내 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 저류가 감소된다고 보고하였다. 천 등<sup>22)</sup>은 백혈병세포 L1210에 adriamycin과 vincristine으로 다약제 내성을 유도하고, 다약제 내성에 관련된 유전자의 발현을 RT-PCR로 *mdr1* m-RNA를 측정할 수 있었고, Tc-99m MIBI용액에서 1시간 배양시킨 후 검사한 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취는 다약제 내성이 유도된 세포주에서 다약제 내성이 없는 세포보다 통계적으로 유의하게 낮았음을 보고한 바가 있다. <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취율이 악성종양세포에서 다약제 내성인자의 발현에 의한 Pgp와 음의 상관관계를 가진다고 하나,<sup>23)</sup> 각각의 세포주에서 유전자의 발현정도가 전사후 단백질 생성 과정으로 반드시 일치하는 것은 아니므로 세포의 조직면역염색법이나 유세포분석법으로 연구한 결과와는 차이가 있을 수 있다.

Pgp에 의한 약제의 내성이 발생한 악성종양에서 약제 배출능을 비침습적인 방법으로 체내에서 진단할 수 있는 추적제는 3가지의 조건을 충족하여야 한다.<sup>24)</sup> 첫째, 세포막과 세포의 생물학적 제재에 대한 비특이 결합이 없어야 한다. 둘째, 약제 감수성 세포와 Pgp 발현세포 사이에 섭취정도가 명확한 구별이 되어야 한다. 셋째, 약제내성 극복제의 투여시 내성세포에서 섭취정도가 현저하게 증가하여야 한다. <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 세포내 섭취기전은 8~10 kDa의 세포질 단백질에 결합, 단순한 지방질로 용해, 확산과 수동적 막투과 등의 세포막 투과 기전 등에 의한다고 알려져 있고 섭취정도는 대부분의 지용성 양이온들과 유사하게 세포막의 높은 음전위압을 가지고 사립체가 풍부한 심장, 간, 신장, 근육 등의 장

기에 많이 분포한다.<sup>25,26)</sup> 특히 종양세포에서는 대사 요구량의 증가로 음성 막전위가 증가되어 있고, 사립체 수도 증가되어 있어 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취가 증가되므로, 폐암, 유방암, 림프종, 갑상선암의 전이, 골 및 연조직 육종의 영상진단에 이용되어 왔다.<sup>19)</sup> <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 종양내 섭취정도는 종양의 혈류량, 암세포의 생존능과 Pgp의 발현의 정도에 의해 영향을 받는다.<sup>19)</sup> <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취는 Pgp의 발현시 운반물질로 알려진 항암약제들의 세포내 섭취기전과 유사하여, 세포막에 높은 농도의 Pgp이 존재하는 경우에는 종양에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI이 섭취되더라도 저류되지 못하고 바로 배출된다.<sup>21,23)</sup> 다약제 내성이 발현된 종양에서는 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취가 감소되므로, 핵의학영상에서 암조직의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취를 정량적으로 측정하면 다약제 내성 유전자의 과발현을 예측할 수 있다.<sup>21,23)</sup> 최근의 보고들은 실제 환자에서 암세포의 다약제 내성의 발현유무와 종양 병변의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취정도 사이에 음의 상관성이 있고, Pgp 없는 종양이 발현종양에 비하여 2~3배 높다고 보고되었다.<sup>23,27)</sup> 실제 환자의 유방암 조직에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취정도는 Pgp의 발현정도와 역상관 관계가 있다고 보고된 바 있으나, 종양조직내 Pgp 분포의 불균등하게 분포하여 일치 정도가 다르게 나타나는 경우도 있다.<sup>28)</sup> Del Vecchio 등<sup>29)</sup>은 유방암환자에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 스캔 결과와 Pgp의 분포를 비교한 결과 Pgp 발현이 높은 경우가 낮은 경우에 비하여 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 배출율이 2.7배 높다고 하였고, Bom 등<sup>30)</sup>은 소세포 폐암에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취정도가 낮은 경우 항암제치료에 대한 관해율이 낮았다고 보고한 바가 있다. Vergote 등<sup>31)</sup>은 MRP, Pgp는 유사한 다약제내성 표현형이며 <sup>99m</sup>Tc-MIBI는 두가지 단백질의 운반기질(transport substrate)이고, Pgp, MRP가 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 배출에 관련된 정도는 비슷하다고 하였다. 그러나 평균 능동배출 상수(ka)로 나타낸 효능이 daunorubicin이나 다른 anthracycline계 약제보다 50~100배 낮아 배출 작용이 낮다고 보고하였다. 이러한 보고로 미루어 보아 <sup>99m</sup>Tc-MIBI로 평가한 Pgp이나 MRP의 발현정도는 실제보다 낮게 평가될 수 있다고 추측할 수 있으나, 이들은 암세포를 체외에서 평가하였으므로 체내에

서 이러한 차이가 반드시 관찰될 것인지는 알 수가 없다. Hendrikse 등<sup>24)</sup>은 MRP<sub>1</sub> 과발현세포에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취가 감소되고, 세포내 glutathione을 고갈시키면 MRP가 없는 세포의 섭취정도로 증가된다고 하였으나, glutathione 고갈의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취에 미치는 영향은 없다는 보고도 있다. <sup>99m</sup>Tc-MIBI는 Pgp나 MRP 모두에 의하여 영향을 받으므로 Pgp에 특이적인 방사성의약품은 아니나, 두가지 약제내성 인자의 전반적인 추적자로 사용될 수 있으므로 실제 환자진료에서는 더욱 도움이 될 수 있다. 또한 Yokogami 등<sup>32)</sup>은 신경교종 환자에서는 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취정도가 항암제내성을 평가하는데는 별로 좋은 평가기준이 되지 못하였고, 오히려 활동성 있는 종양 병변을 영상화하는데 도움이 되었다고 하였다. Pgp 발현정도와 종양의 악성정도 사이에는 역상관계가 관찰되었으나, 조직검사상 *mdr1* 유전자의 발현과 Pgp의 생성은 종양세포와 증식하는 내피세포에는 없었고 정상 혈관내피세포에만 관찰되었다고 하였다. 정상적으로 Pgp이 존재하는 장기에 발생한 종양에는 이러한 점을 고려하여야 할 것이다.

MDR 극복제제의 효능 평가에도 <sup>99m</sup>Tc-MIBI가 이용될 수 있다. Barbaris 등<sup>33)</sup>은 유방암세포와 Pgp를 발현시켜 paclitaxel에 200~300배 정도 내성이 증가된 유방암 세포를 이식한 누드마우스에서 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 체내분포를 연구한 결과 Pgp 음성 종양의 섭취정도가 Pgp이 발현된 종양의 2.2~2.5배 높았다고 하였다. 그러나 Pgp 차단제인 PSC833을 투여한 경우 Pgp 양성 암에서는 약물의 농도에 비례하여 섭취정도가 증가하였으나, Pgp 음성인 경우에는 증가가 없었다고 하였다. 그러므로 이러한 차이는 PSC833이 혈관계작용이 없는데 비하여 verapamil 유도체가 혈관확장 작용으로 종양조직 혈류를 증가시키고, 암세포의 세포막 전위차를 증가시켜 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취 증가가 야기되었으리라 추측해 하는 것이다.<sup>34)</sup> Piwnica-Worms 등<sup>18,19)</sup>은 각각의 종양의 혈류상태와 생존도가 다약제내성에 의한 섭취의 차이보다 더 클 수 있으므로 <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 섭취율에서 <sup>201</sup>Tl-섭취율을 나누어 준 값으로 보정한 값이 중요하다고 하였다. 정상인에서 <sup>99m</sup>Tc-

MIBI를 주사하면 Pgp가 풍부한 장기인 간과 신장에서는 배출이 빠르나, Pgp가 상대적으로 적은 심장에서는 오래 저류된다. Luker 등<sup>35)</sup>은 PSC833을 투여한 후에는 간과 신장의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 저류가 증가된다고 보고하였다. 그러나 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취율로 Pgp의 발현과 극복제의 기능을 평가하는데는 몇가지의 문제점도 있다. Piwnica-Worms 등<sup>36)</sup>은 <sup>99m</sup>Tc-MIBI가 Pgp의 기능에 반비례하여 빠르게 세포내에 섭취되어(T<sub>1/2</sub>=약 6분) 평형상태에 도달하고, <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 세포내 저류를 증가시키는 다약제내성 극복제들의 상대적인 효능을 나타내는 약제의 평균유효농도(Median effective concentration, EC50; uM)는 PSC833이 0.08, cyclosporin이 1.3, verapamil이 4.1, quinidine이 6.4였고, prazosin은 300 이상이었다고 하였다. 그러나 세포막 양면의 지질흡착제인 tetraphenyl borate 와 phloretin은 <sup>99m</sup>Tc-MIBI섭취를 증가시키고 그 정도도 대표적인 MDR 극복제제보다 2배 정도로 증가시켰다고 하였다. Cayre 등<sup>37)</sup>의 연구에서는 KB-3-1에 비하여 약제내성을 발현시킨 KB-A1 세포의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI와 <sup>3</sup>H-daunomycin uptake가 31%와 36%정도로 유사하게 증가하였고, 약제 감수성 세포인 KB-3-1에서는 verapamil (10uM)과 PSC833 (1uM)가 115~140%의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취를 증가시켰으나 S9788 (5uM)은 증가시키지 않았다. 그러나 KB-A1세포에서는 세가지 약제 모두가 최고 311%까지 [<sup>3</sup>H]-daunomycin섭취를 증가시켰으나 S9788 만이 (138%) MIBI 섭취를 증가시켰다. 그러므로 <sup>99m</sup>Tc-MIBI는 MDR 발현형을 예측할 수 있으나, 다약제내성 극복제에 대한 반응은 [<sup>3</sup>H]-daunomycin와 달랐다. 그 기전은 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취는 Pgp 뿐만 아니라 세포막 전위차에 따라 결정되므로 탈분극제인 S9788에서는 심근섭취가 감소되었을 것이다. 즉 S9788는 Pgp에 의한 영향만을 나타내는 [<sup>3</sup>H]-daunomycin 섭취에만 영향을 미치므로 섭취율의 차이가 나타날 수 있으므로 주의를 기울여야 한다. 그러나, MDR Pgp이나 MRP의 발현 여부와 약제내성 극복제의 효능을 암세포의 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 섭취율로 평가하는 방법은 비침습적이고 기능적인 영상을 통하여 체내에서 직접 시행할 수 있는 방법이며

서 검사방법의 표준화를 통하여 정량적 기준을 설정하면 임상적으로도 유용한 지표로 사용될 수 있을 것이다. MIBI나 tetrafosmin, Q-complex 등을 직접 비교한 보고는 없으나, Utsumia 등<sup>38)</sup>은 <sup>99m</sup>Tc-MIBI가 <sup>99m</sup>Tc-tetrafosmin보다 종양내 방사성의약품 섭취정도가 높다고 하였으나, 세포의 종류에 따라 다르고, P-gp나 MRP를 억제하는 GG918, PSC833, verapamil, cyclosporin A, buthionine sulfoximine(BSO) 등에 의한 배출 억제 정도는 tetrafosmin이 오히려 2배 가량 높았다고 하였다.

### PET추적자를 이용한 연구

<sup>11</sup>C-표지 colchicine이나 doxorubicin 등의 항암 화합물이나 <sup>11</sup>C-verapamil을 직접 투여하여 Pgp와 MRP의 발현여부를 평가하고, 암세포에서 항암제의 배출정도를 비침습적으로 평가하고자 하는 연구도 이루어지고 있다.<sup>39-41)</sup> Hendrikse 등<sup>42)</sup>은 난소암 세포주(A2780)에서 Pgp를 과발현시킨 후 민감세포와 내성세포(A2780AD)에서 C-11 daunorubicin과 <sup>11</sup>C-verapamil의 섭취정도를 비교하였다. 세포 배양 실험에서 A2780가 A2780AD보다 섭취가 높았는데, <sup>11</sup>C-daunorubicin 섭취비는 16 이었고, <sup>11</sup>C-verapamil의 섭취비는 4~5로서 내성발현세포의 섭취가 낮았다. Verapamil 투여시 내성세포의 <sup>11</sup>C-daunorubicin 섭취가 증가되었으므로 <sup>11</sup>C-daunorubicin은 Pgp발현 암조직을 찾는 데 이용할 수 있을 것으로 생각되나, 실제 임상연구 결과는 문헌에서 찾아볼 수 없다. 이들은 verapamil의 섭취비가 daunorubicin보다 4~5배 적은 이유는 명확하게 알 수는 없었으나, 세포막이 verapamil에 대한 수동적 투과성을 보이므로 원심분리과정이나 완충액으로 세척하는 동안 소실되는 기술적인 문제라고 추측하였다. <sup>11</sup>C-daunorubicin은 직접 항암치료에 이용되는 의약품에 표지 하였으므로 약제의 체내동태를 가장 잘 반영할 수 있는 약제라는 예상할 수 있으나, anthracyclin은 약한 염기성이어서 체내분포는 세포와 mitochondria 막전하와 저항 세포내의 DNA에 대한 affinity에도 관련되어 Pgp에 의한 약제내성만의 효

과로 추측하는데는 문제점이 있다. 이들은 SCLC 폐암세포를 이식한 쥐실험에서도 감수성세포가 내성세포에 비하여 2배 높게 섭취되었고, 50 mg cyclosporin를 투여한 경우 이러한 차이가 소실됨을 보고하였다.<sup>24)</sup>

Colchicine은 carbon 원자에 쉽게 표지할 수 있고, 체내에서 대사가 적으며 세포내 tubulin이라는 알려진 목표(target)이 있으므로 매력적인 다약제내성 추적방사성의약품이 될 수 있다. Mehta 등<sup>39)</sup>은 <sup>14</sup>C-colchicine을 주사 후 60분에 시행한 자가방사 검사상 내성이 없는 종양이 내성 종양에 비하여 섭취가 2배 높았고, <sup>11</sup>C-colchicine은 주사 후 전하를 띠지 않아 체내분포를 쉽게 분석할 수 있다고 하였다. 또한 colchicine은 내성세포에서 중성전하를 띤 paclitaxel과 유사하게 작용하므로 colchicine저항이 있는 세포는 paclitaxel에도 저항을 나타내어 paclitaxel 내성 발현을 추정할 수 있는 추적자로 사용할 수 있다.<sup>43)</sup> 그러나 colchicine의 해독작용은 간에서 일어나고 대사물이 담도로 배설되므로, 복부종양에서는 <sup>11</sup>C-colchicine을 이용하는 데는 어려움이 있을 수 있고, 흉부의 배후방사능치도 높다고 한다. Lewis 등<sup>44)</sup>은 tetrafosmin과 구조가 유사한 bis-diphospine을 합성하고 양전자방출핵종인 Cu를 표지하여 MDR이 발현된 암을 세포배양실험을 시행하고 향후 임상에서 응용할 수 있을 것으로 전망하였다.

한편 MRP의 운반체 기질물질로 알려진 leukotrienes 중 LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>와 LTE<sub>4</sub>는 염증이나, 과민 반응, 속 등에 관련이 있고 LTE<sub>4</sub>는 아세틸화되어 대사되고 간을 통해 담즙으로 배설되므로 N-[<sup>11</sup>C]acetyl-LTE<sub>4</sub>는 간에서 일시적으로 축적된 후 소장으로 배설되므로 담즙정체성 황달에서는 간내 N-[<sup>11</sup>C]acetyl-LTE<sub>4</sub>의 축적이 늦어지고 배설도 지연되므로 Dubin-Johnson증후군을 비침습적으로 진단할 수 있을 것으로 보고된 바<sup>45)</sup>가 있으나, 악성종양의 평가에 이용이 될 수 있을지 향후 평가하여야 한다.

## 문제점 및 전망

다약제내성이 발현된 암세포에서 세포내의 항암제를 세포외로 배출시키는 기전을 체내에서 비침습적인 방법으로 기능적으로 영상화 할 수 있는 SPECT와 PET 영상술은 악성종양의 진단과 평가에 중요한 역할을 할 것으로 판단되나, 지금까지의 연구결과는 Pgp와 MRP의 운반능을 적절하게 평가하는 핵의학적 영상방법을 정립하는데는 극복해야 할 문제점들이 많다.<sup>24)</sup> 첫째 MDR의 기전은 복잡하므로 각각의 배출펌프 기전을 특이하게 탐색할 수 있는 방사성추적자가 개발되어야 한다. 두 번째로는 혈액내 방사능 치가 높으면 약제의 펌프기능을 정확하게 평가하기 어렵기 때문에 혈액 내에서 빠르게 제거되며, 세포막으로 원활하게 투과되기 위하여 지질용해도가 적당히 높은 추적자가 개발되어야 한다. 지질용해도가 낮으면 세포내 섭취가 안 될 것이며 높으면 빠르게 배출되어 펌프기능을 평가하기가 어렵다. MDR의 정량적 측정과 영상 획득방법의 객관화도 마련되어야 한다. 대부분의 임상연구들은 종양-대-배후방사능 비를 비교하거나, 조기영상과 지연영상을 얻어 배출율/저류율을 구하거나, 종양부위의 동적영상을 시간-방사능 곡선의 면적으로 비교하는 방법 등을 이용하고 있으나, 재현성이 뛰어난 표준화된 방법이 없다. 특히 종양에 생물학적 성상의 차이를 쉽게 보정하여 객관화할 수 있는 방법의 개발이 절실하다. 이러한 점들의 극복이 향후 MDR 발현의 체내진단과 극복제의 효능 평가에 필수적이다.

지금까지의 MDR영상에 관한 연구들은 대부분이 <sup>99m</sup>Tc-표지 방사성의약품을 이용한 연구였으나, PET의 임상 응용이 증가함에 따라 보다 특이적이고 쉽게 응용될 수 있는 PET용 방사성 추적자의 개발도 이루어져야 할 것이다. <sup>99m</sup>Tc-MIBI의 암 세포내 일방향(unidirectional) 섭취는 열역학적으로 음성인 세포막 전하와 세포내 소립체 기질 전하에 의하여 결정되므로, MIBI의 섭취는 다른 지용성 양전하를 띤 막전위 추적자들과 유사하게 작용한다. 그러나 MIBI, tetrofosmin, furifosmin 등의 <sup>99m</sup>Tc-

표지 방사성의약품은 암조직의 혈류 증가나 소립체 용적이나 활성도가 증가하면 섭취가 증가할 수 있어 보다 특이적인 MDR추적제의 개발이 필요한 것이다. 최근 Lorke 등<sup>46)</sup>은 인체 대장암세포인 HT-29<sup>MDR</sup>세포를 이용한 연구에서 MDR이 발현된 세포와 종양에서 <sup>18</sup>F-FDG 섭취가 감소되었으나, MIBI는 MDR이 없는 모세포에서도 섭취되지 않은 결과를 보고한 바 있다. 이 세포는 전자현미경 검사에서 mitochondria가 풍부한 세포였다. 그러므로 이러한 결과로 보아 <sup>99m</sup>Tc-MIBI 영상에서 종양이 보이지 않거나 섭취가 미약하다면 MDR이 발현되었다고 단정할 수는 없게 된다. 즉 MDR의 발현유무를 정확하게 감별할 수 있기 위하여는 저항이 없는 세포에 MIBI가 충분히 섭취되어야 한다는 것이 필수적인 요건이며, 종류에 따라서는 FDG가 MDR의 marker가 될 수 있다는 것이다. Pgp drug transporter는 ATP의존성 drug efflux pump이므로 MDR세포는 에너지가 많이 필요하다. MDR은 당분해율(rate of glycolysis)이 증가되어 있고 HT-29 mdr1 종양세포에서는 포도당 이동과정의 변화로 FDG 섭취가 감소되었다. 또한 Pgp가 점차 증가됨과 함께 plasma membrane transporter인 GLUT-1 level이 감소된다. 이러한 결과는 향후 다약제내성의 영상화가 지금까지의 예상보다 보다 복잡적이고 다양하므로 보다 많은 연구가 필요할 것이라는 점을 시사하며, 향후 <sup>18</sup>F-FDG PET 소견과의 연관성도 규명되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 1988;263:12163-6.
- 2) Breuninger LM, Paul S, Gaughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA, Kruh GD. Expression of multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res* 1995;55:5342-47.
- 3) Hollo Z, Homolya L, Hegedus T, Muller M, Szakacs G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. Parallel functional and immunologic detection of multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and

- MRP1. *Anticancer Res* 1998;18:2981-7.
- 4) Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 1989;58:137-71.
  - 5) Tew KD, Houghton PJ, Houghton JA. Modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. In: M. A. Hollinger (ed.), *Preclinical and clinical modulation of anti-cancer drugs*, pp125-197, Boca Raton, FL: CRC Press. 1993.
  - 6) Benderra Z, Morjani H, Trussardi A, Manfait M. Role of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in daunorubicin distribution in etoposide-resistant MCF7 cells overexpressing the multidrug-resistance associated protein. *Int J Oncol* 1998;12:711-5.
  - 7) Gottesman MM, Pastan I. Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1989;7:409-11.
  - 8) Boesch D, Gavériaux C, Jachez B, Pourtier Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC833. *Cancer Res* 1991;51:4226-33.
  - 9) Sikic BI. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997;34:40-7.
  - 10) Benson AB, Trump DL, Koeller JM, Egorin MI, Olman EA, Witte RS. Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent i.v. infusion. *Cancer Treat Rep* 1985;69:795-99.
  - 11) Lampidis TJ, Shi YF, Calderon CL, Kolonias D, Tapiero H, Savaraj N. Accumulation of simple organic cations correlates with differential cytotoxicity in multidrug-resistance and -sensitive human and rodent cells. *Leukemia* 1997;11:1156-9.
  - 12) Choi SU, Lee BH, Kim KH, Choi EJ, Park SH, Shin HS, Yoo SE, Jung NP, Lee CO. Novel multidrug resistance modulators, KR-30026 and KR-30031, in cancer cells. *Anticancer Res* 1997;17:4577-92.
  - 13) Bissett D, Kerr DJ, Cassidy J, Meredith P, Traugott U, Kaye SB. Phase I and pharmacokinetic study of D-verapamil and doxorubicin. *Br J Cancer* 1991;64:1168-1171.
  - 14) Pujol JL, Simony J, Gautier V, Marty Ane C, Pujol H, Michel FB. Immunohistochemical study of p-glycoprotein distribution in lung cancer. *Lung Cancer* 1993;10:1-12.
  - 15) Georges E, Bradley G, Garipey J, Ling V. Detection of p-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:152-6.
  - 16) Kessel D, Beck WT, Kukuruga D, Schulz V. Characterization of multidrug resistance by fluorochrome dyes. *Cancer Res* 1991;51:4665-70.
  - 17) Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991;9:17-24.
  - 18) Oda Y, Schneider-Stock R, Rys J, Gruchala A, Niezabitowska A, Rocssner A. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of MDR1 gene expression in adult soft tissue sarcoma. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:98-106.
  - 19) Piwnica-Worms D, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis(alkylisonitrile) technetium-99m complexes [comment] *J Nucl Med* 1990;31:1166-7.
  - 20) Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Krounige JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistance p-glycoprotein with an organotechnetium complex. *Cancer Res* 1993;53:977-84.
  - 21) Rao VV, Chiu ML, Krounige JF, Piwnica-Worms D. Expression of recombinant human multidrug resistance p-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of technetium-99m sestamibi. *J Nucl Med* 1994;35:510-5.
  - 22) Chun KA, Lee J, Lee SW, Kang DY, Sohn SK, Lee JK, Chung JK, Jun SH, Lee KB. Effect of multidrug resistance gene-1(mdr1) overexpression in in vitro uptake of Tc-99m sestaMIBI in murine L1210 leukemia cells. *Korean J Nucl Med* 1999;33:152-62.
  - 23) Cordobes MD, Starzec A, Delmon-Moingeon L, Blanchot C, Kouyoumdjian J-C, Prevest G, et al. Technetium-99m-sestamibi uptake by human benign and malignant breast tumor cells: Correlation with mdr gene expression. *J Nucl Med* 1996;37:286-9.
  - 24) Hendrikse NH, Franssen EJJ, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur J Nucl Med* 1999;26:283-93.
  - 25) Chiu ML, Krounige JF, Piwnica-Worms D.



- Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)technetium(I) in cultured mouse fibroblasts. *J Nucl Med* 1990;31:1646-53.
- 26) Delmon-Moigeon LI, Piwnica-Worms D, Van den Abbeele AD, Holman BL, Davison A, Jones AG. Uptake of the cation hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m by human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Res* 1990;50:2198-202.
- 27) Kostakoglu L, Kiratli P, Ruacan S, Hayran M, Emri H, Ergun EL, et al. Association of tumor washout rates and accumulation of technetium-99m-MIBI with expression of P-glycoprotein in lung cancer. *J Nucl Med* 1998;39:228-34.
- 28) Kostakoglu L, Ruacan S, Ergun EL, Sayek I, Elahi N, Bekdik CF. Influence of the heterogeneity of P-glycoprotein on technetium-99m MIBI uptake in breast cancer. *J Nucl Med* 1998;39:1021-26.
- 29) Del Vecchio S, Ciarmiello A, Pace L, Potena MI, Carriero MV, Mainolfi C, Thomas R, D'Aiuto G, Tsuruo T, Salvatore M. Fractional retention of technetium-99m sestamibi as an index of P-glycoprotein expression in untreated breast cancer patients. *J Nucl Med* 1997;38:1348-51.
- 30) Bom HS, Kim YC, Song HC, Min JJ, Kim JY, Park KO. Technetium-99m uptake in small cell lung cancer. *J Nucl Med* 1998;39:91-4.
- 31) Vergote J, Moretti JL, de Vries EG, Garnier Suillerot A. Comparison of the kinetics of active efflux of <sup>99m</sup>Tc-MIBI in cells with P-glycoprotein mediated and multi-drug resistance protein associated multidrug resistance phenotype. *Eur J Biochem* 1998;252:140-6.
- 32) Yokogami K, Kawano H, Moriyama T, Uehara H, Sameshima T, Oku T, Goya T, Wakisaka S, Nagamachi S, Jinnouchi S, Tamura S. Application of SPET using technetium-99m sestamibi in brain tumours and comparison with expression of the MDR-1 gene: is it possible to predict the response to chemotherapy in patients with gliomas by means of <sup>99m</sup>Tc-sestamibi SPET? *Eur J Nucl Med* 1998;25:401-409.
- 33) Barbaris E, Kronauge JF, Kohen D, Davison A, Jones AG, Croop JM. Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition in vivo. *Cancer Res* 1998;58:276-82.
- 34) Bae KT, Piwnica-Worms D. Pharmacokinetic modeling of multidrug resistance P-glycoprotein transport of gamma-emitting substrates. *Q J Nucl Med* 1997;41:101-110.
- 35) Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J, Piwnica-Worms D. Modulation of the multidrug resistance P-glycoprotein: detection with <sup>99m</sup>Tc-sestamibi in vivo. *J Nucl Med* 1997;38:369-72.
- 36) Piwnica-Worms D, Rao VV, Kronauge JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
- 37) Cayre A, Moins N, Finat-Duclos F, Maublant J, Verelle P. Comparative Tc-99m sestamibi and [<sup>3</sup>H]-daunomycin uptake in human carcinoma cells: Relation to the MDR phenotype and effects of reversing agents. *J Nucl Med* 1999;40:672-76.
- 38) Utsunomia K, Ballinger JR, Piquette-Miller M, Rauth AM, Tang W, Su ZF, Ichise M. Comparison of the accumulation and efflux kinetics of technetium-99m sestamibi and technetium-99m tetrafosmin in an MRP-expressing tumor cell line. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1786-92.
- 39) Mehta BM, Rosa E, Biedler JL, Larson SM. In vivo uptake of <sup>14</sup>C-colchicine for identification of tumor multidrug resistance. *J Nucl Med* 1994;35:1179-84.
- 40) Mehta BM, Levchenko A, Rosa E, Kim SW, Winnick S, Zhang JJ, Kalaigian H, Larson SM. Evaluation of <sup>14</sup>C-colchicine biodistribution with whole body quantitative autoradiography autoradiography in colchicine-sensitive and -resistant xenografts. *J Nucl Med* 1996;37:312-4.
- 41) Elsinga PH, Franssen EJJ, Hendrikse NH, Fluks L, Weemaes AA, van der Graaf WTA, de Vries EGE, Visser GM, Vaalburg W. Carbon-11 labeled daunorubicin and verapamil for proving P-glycoprotein in tumors with PET. *J Nucl Med* 1996;37:1571-5.
- 42) Hendrikse NH, de Vries EGE, Fluks L, van der Graaf WTA, Vaalburg W, Franssen EJJ. P-glycoprotein mediated kinetics in tumor bearing rats with <sup>11</sup>C-daunorubicin and positron emission tomography. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998;39:488.

- 43) Levchenko A, Mehta BM, Lee JB, Humm JL, Augensen F, Squire O, Kothari PJ, Finn RD, Leonard EF, Larson SM. Evaluation of <sup>14</sup>C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance. *J Nucl Med* 2000;41:493-501.
- 44) Lewis JS, Dearing JLJ, Sosabowski JK, Zweit J, Carnochan P, Kelland LR, Coley HM, Blower PJ. Copper bis(diphospine) complexes: radiopharmaceuticals for the detection of multi-drug resistance in tumors by PET. *Eur J Nucl Med* 27:638-46, 2000.
- 45) Guhlman A, Krauss K, Oberdorfer F, Soiegel T, Scheuber PH, Muller J, Csuk-Glanzer B, Ziegler S, Ostertag H, Keppler D. Noninvasive assessment of helatobiliary and renal elimination of cysteinyl leukotriens by positron emission tomography. *Hepatology* 1995;21:1568-75.
- 46) Lorke DE, Kruger M, Buchert R, Bohuslavizki KH, Clausen M, Schumacer U. In vitro and in vivo tracer characteristics of an established multidrug resistant human colon cancer cell line. *J Nucl Med* 42:646-54, 2001.
-