

마우스에서 Interleukin-2가 RD-995 종양세포에 미치는 항암효과

권오덕¹

전북대학교 수의과대학
(접수 2002. 9. 20, 게재승인 2002. 9. 25)

Effect of interleukin-2 on antitumor response against intraperitoneal RD-995 tumor in mice

Oh-Deog Kwon¹

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea
(Received 20 September 2002, accepted in revised form 25 September 2002)

Abstract

Recombinant interleukin-2(IL-2) has demonstrated as an antineoplastic agent in mice and human, but the relatively low response rates observed in clinical trials. Therefore, the present study was undertaken in order to evaluate therapeutic activities of IL-2 for the establishment of therapeutic applications. At the onset of the experiment, normal C3H/HeN mice were injected with 5×10^6 RD-995 tumor cells, murine ultraviolet radiation-induced fibrosarcoma, intraperitoneally. Beginning on day 6, experimental groups were treated with a 5-day course of IL-2(subcutaneous injection of 30,000 IU every 12 hours for 5 days). The result of this experiment revealed that body weight gradually decreased from 20th day in control mice. Subcutaneous IL-2 therapy prevented partially decrease body weight, and prolonged survival of mice compared with control group.

Key words : Interleukin-2, RD-995 tumor, Antitumor effect, Mice

서론
종양의 치료법에는 수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법 등이 알려져 있으며, 이 중 수술요법과 방사선요법은 종양의 병기(stage)가 낮아 병소가 제한되어 있을 경우에 주로 사

이 논문은 2001년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음

¹Corresponding author

Phone : 063-270-3785, Fax : 063-270-3780

E-mail : odkwon@chonbuk.ac.kr

용되는 치료법이다¹⁾. 반면, 화학요법과 면역요법은 일반적으로 병기가 많이 진행된 종양의 치료에 사용되지만, 화학요법에 내성을 나타내는 진행된 종양의 경우에는 화학요법제 치료가 거의 도움이 되지 못한다^{1~3)}. 이러한 경우에는 암 치료의 접근방법 중 하나로서 면역반응을 자극하는 면역항암요법이 악성세포군을 제거하는데 단독으로 또는 표준치료 방법과 병용하여 효과적으로 사용할 수 있을 것이라는 전망을 갖고 시도되고 있다¹⁾. 이러한 면역요법 중의 하나인 interleukin-2(IL-2)는 항암효과를 가지는 cytokine으로 단독 투여하거나 lymphokine-activated killer 세포와 병용투여 하면, 진행된 신세포암과 악성흑색종과 같은 일반적인 항암요법이나 방사선요법으로는 거의 치료효과를 기대할 수 없는 환자에서 효과가 있을 수 있으며^{4~6)}, 실제로 5~10%에서는 완전반응을 나타내는 것으로 보고되고 있다^{1,2)}. 이와 같이 IL-2는 진행된 종양뿐만 아니라 다른 치료를 시행하여 이미 병소 확인이 불가능할 정도의 완전반응을 보인 환자에서 보조요법으로 사용하려는 임상적 시도가 확산되고 있으나, IL-2의 독성효과와 치료에 대한 지표가 적기 때문에 현재까지는 종양의 치료에 제한적으로만 사용되고 있다⁷⁾. 따라서 본 연구에서는 IL-2가 자외선 조사에 의해 유도된 종양세포^{8,9)}에 미치는 항암효과를 밝힘으로써 IL-2의 임상적 적용에 이용할 수 있는 기초적 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

6~8주령의 C3H/HeN 암컷 마우스를 각 군당 5마리씩 2개 군(아무런 처치를 하지 않은 대조군 및 IL-2 30,000 IU 투여군)으로 나누었다.

종양세포의 이식

C3H/HeN 마우스에서 자외선 조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포주^{8,9)}를 생체 종양조직

에서 신선 절제한 후 clean bench 하에서 약 1 mm 정도 크기의 조직편으로 만든 다음 0.1% collagenase와 0.1% neutral protease가 함유된 20ml의 Hank's balanced salt solution 속에 넣고 상온에서 3시간 동안 막대자석을 이용하여 교반하면서 single cell suspension을 만들었다¹⁰⁾. Single cell suspension은 medium을 사용하여 3회 세척 후 2.5×10^7 cells/ml의 농도로 만든 후, 이 종양세포를 1마리당 0.2ml(5×10^6 cells)씩 복강내에 이식하였다.

IL-2 투여

IL-2 투여군에는 RD-995 종양세포주를 마우스에 이식한 후 6일째부터 human rIL-2 (Chiron corporation(Emeryville, CA)) 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사하고, IL-2가 종양세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 체중의 변화를 2-3일 간격으로 측정하였으며, 또한 각 마우스의 생존기간을 측정하였다.

통계처리

마우스의 체중증가의 변화는 통계 프로그램 SPSS 8.0을 이용하여 one way Anova를 실시하였으며, 생존율은 Kaplan-Meier method¹¹⁾ 및 stratified Wilcoxon test¹²⁾를 이용하여 분석하였다.

결 과

IL-2 투여가 종양세포를 이식한 마우스의 체중에 미치는 영향

RD-995 종양세포주만을 이식한 대조군에서는 이식시의 체중이 평균 26.6g이던 것이 점차 증가하기 시작하여 이식 후 6일째에는 27.7g, 8일째에는 28.2g으로 증가하여 17일째에는 28.4g을 나타내었다. 그러나 이 이후에는 체중이 감소하기 시작하여 이식 후 20일째에는 27.3g, 22일째에는 26.5g, 34일째에는 26.2g을 나타내었다. 종양세포 이식 후 36일째부터는 한 마리만이 생존하였으나 체중은 오히려 다시 증가하기 시작하여 64일째에는 31.2g을 나타내었다. RD-

995 종양세포주를 마우스에 이식한 후 6일째부터 30,000 IU의 IL-2를 1일 2회씩 5일간 피하주사한 군에서는 종양세포 이식시의 체중이 평균 26.5g이었으나, 이후 점차 증가하기 시작하여 이식 후 6일째에는 27.2g, 10일째에는 28.8g까지 증가하였다. 반면, 종양세포 이식 후 6일째부터 10일째까지 5일간의 IL-2를 처치한 이후에는 27.3~28g의 체중을 종양세포 이식 후 43일째까지 유지하여 IL-2를 처치하지 않은 대조군에 비하여 높은 체중을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 종양세포 이식 후 45일째부터는 체중이 다시 29.8g으로 증가하여 64일째에는 29.7g을 나타내었다(Fig 1).

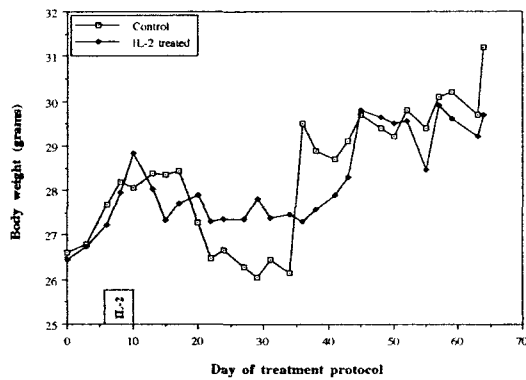


Fig 1. Evaluation of therapeutic effects of interleukin-2(IL-2) on intraperitoneal RD-995 tumor bearing mice. Two experimental groups(untreated control and 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five C3H/HeN mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 RD-995 tumor cells intraperitoneally on day 0. The duration of the IL-2 treatment is shown along the x axis. The results are expressed mean change in body weight.

IL-2 투여가 마우스의 생존률에 미치는 영향

아부런 처치를 하지 않은 대조군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 22일째에 80%, 27일째에 60%, 29일째에 40% 그리고 36일째에 20%의

생존율을 나타내었으며, 평균 생존기간은 27일이었다. 반면, 30,000 IU의 IL-2를 피하로 5일간 투여한 군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 31일째에 80%, 43일째에 60%, 45일째에 40% 그리고 57일째에 20%의 생존율을 나타내었으며, 평균 생존기간은 41일로서 대조군과 비교하여 유의한($p < 0.05$) 생존률의 증가를 나타내었다(Fig 2).

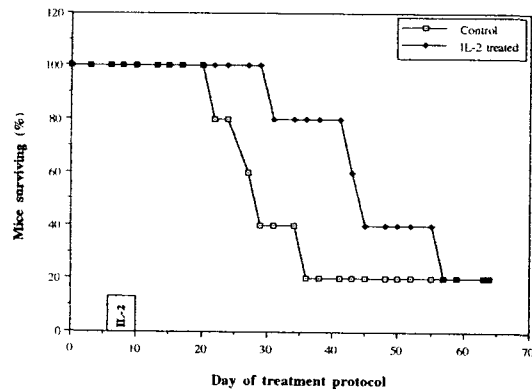


Fig 2. Survival of the mice was evaluated to establish therapeutic activity of interleukin-2(IL-2) against intraperitoneal RD-995 tumor bearing mice. Two experimental groups(untreated control and 30,000 IU IL-2 subcutaneous injection groups) of five C3H/HeN mice were established in mouse cages. All mice were injected with 5×10^6 RD-995 tumor cells intraperitoneally on day 0. The duration of the IL-2 treatment is shown along the x axis.

고 찰

IL-2는 활성화된 T 림프구에서 주로 생산되는 cytokine으로 1975년 골수유래의 T-세포 성장촉진인자로 발견된 이후¹³⁾ 그 생물학적 활성이 T-세포, B-림프구, natural killer 세포, lymphokine-activated killer 세포, 단구, 대식구 등의 성장과 분화에 중요한 역할을 할뿐만 아니라¹³⁻¹⁶⁾, 이들 면역세포를 활성화시켜 항암

효과를 나타낸다고 보고되고 있다^{2,3,9,13,16~28)}.

실제로 IL-2를 전이성 흑색종과 신세포암 환자에 사용할 경우 15-33%에서 치료반응이 증명되었으며^{4~6)}, 5-10%에서는 완전반응을 나타내는 것으로 보고되고 있으며^{1,2)}, 또한 다른 치료법에 대한 보조요법으로 사용하려는 임상적 시도가 확산되고 있으나, IL-2의 독성효과와 치료에 대한 지표가 적기 때문에 현재까지는 종양의 치료에 제한적으로만 사용되고 있다⁷⁾. 본 실험에서는 C3H/HeN 마우스에 자외선조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포^{8,9)}를 복강내에 이식한 후 6일째부터 human rIL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사 하고, IL-2가 종양세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 체중의 변화를 2~3일 간격으로 측정하여 본 결과, 대조군에서는 종양세포 이식시의 체중이 평균 26.6g이던 것이 점차 증가하기 시작하여 이식 후 6일째에는 27.7g, 8일째에는 28.2g으로 증가하여 17일째에는 28.4g을 나타내었다. 그러나 이 이후에는 체중이 감소하기 시작하여 이식 후 20일째에는 27.3g, 22일째에는 26.5g을 나타내었으며, 34일째에는 26.2g을 나타내었다. 이러한 결과는 종양세포가 점차 성장함에 따라 보다 중요하고도 특징적인 증상의 하나인 식욕부진에 따른 사료섭취량의 감소로 체중감소와 악액질을 초래한 것으로 생각되며, 이러한 식욕부진은 종양이 체내에 존재할 경우 미각과 후각의 이상, 위장관의 생리적 기능부진, 종양에 의한 과도한 에너지 소모, 에너지 소비량에 미치지 못하는 영양섭취 및 생화학적인 에너지 대사의 이상 등에 기인한 것으로 알려져 있다¹⁾. RD-995 종양세포주를 마우스에 이식한 후 6일째부터 30,000 IU의 IL-2를 1일 2회씩 5일간 피하주사한 군에서는 종양세포 이식시의 체중이 평균 26.5g이었으나, 이후 점차 증가하기 시작하여 이식 후 6일째에는 27.2g, 10일째에는 28.8g까지 증가하였다. 반면, 종양세포 이식 후 6일째부터 10일째까지 5일간의 IL-2를 처치한 이후에는 27.3~28g의 체중을 종양세포 이식 후 43일째까지 유지하여 체중의 변화가 거의 인정되지 않았으며, IL-2를 처치하지 않

은 대조군에 비하여 높은 체중을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 IL-2가 면역세포를 활성화시켜 종양세포에 세포독성효과를 나타냄으로써^{2,3,6,15,27,29,30)} 대조군에 비하여 종양세포의 성장이 억제되고 식욕부진이 덜하였기 때문으로 생각된다^{1,31,32)}. 그러나 종양세포 이식 후 45일째부터는 두 마리의 마우스만이 생존하여 체중이 다시 29.8g으로 증가하여 64일째에는 29.7g을 나타내었으며, 대조군 역시 36일째부터는 한 마리만이 생존하였으나 체중은 오히려 다시 증가하기 시작하여 64일째에는 31.2g을 나타낸 것은 살아남은 마우스의 수가 적은 관계로 본 실험결과 만으로 해석하기 곤란하며 정확한 기전은 앞으로 더욱 더 규명되어야 될 것으로 생각된다.

Yim 등³³⁾과 Kwon³¹⁾은 종양세포를 마우스에 이식한 후 IL-2를 투여할 경우 nitric oxide 산생을 증가시켜 마우스의 생존률을 증가시킨다고 보고하였다. 본 실험에서도 IL-2의 투여가 마우스의 생존률에 미치는 영향을 알아본 결과 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 22일째에 80%, 27일째에 60%, 29일째에 40% 그리고 36일째에 20%의 생존률을 나타내었으며, 평균 생존기간은 27일이었다. 반면, 30,000 IU의 IL-2를 피하로 5일간 투여한 군에서는 RD-995 종양세포 이식 후 31일째에 80%, 43일째에 60%, 45일째에 40% 그리고 57일째에 20%의 생존률을 나타내었으며, 평균 생존기간은 41일로서 대조군과 비교하여 유의한 생존률의 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 대조군의 경우 종양세포 자체가 체내에 미치는 영향뿐만 아니라^{31,32)}, 종양세포가 성장함에 따라 식욕부진에 따른 체중감소에 이어 극심한 소모는 악액질을 초래하여 생명을 단축시킨 것으로 생각된다¹⁾. 반면, IL-2 투여군이 대조군에 비해 유의한 생존률의 증가를 나타낸 것은 IL-2가 면역세포를 활성화시켜 종양세포에 세포독성효과를 나타냄으로써^{2,3,6,15,27,29~31,33)} 종양세포의 성장이 억제되고, 또한 이에 따른 사료섭취량의 차이에 따른 것으로 생각되지만 정확한 기전은 앞으로 더욱 규명되어야 될 것이다.

결 론

IL-2가 종양세포에 미치는 항암효과를 밝힘으로써 IL-2의 임상적 적용에 이용할 수 있는 기초적 자료를 제시하고자 C3H/HeN 마우스를 이용하여 자외선 조사에 의해 유도된 RD-995 종양세포를 복강내에 이식한 후 6일째부터 human rIL-2 30,000 IU를 1일 2회씩 5일간 피하주사 하면서 대조군과 비교하여 치료효과를 관찰하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 종양세포 이식 후 20일째부터 체중이 감소되었다. 반면, IL-2를 투여한 군에서는 대조군에 비하여 높은 체중을 나타내었다. 마우스의 생존률은 IL-2 투여군이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

참고문헌

1. 해리슨내과학편찬위원회. 1997. Harrison's 내과학. 서울. 도서출판 정담 : 1977~1993.
2. Rosenberg SA, Lotze MT, Mule JJ. 1988. New approach to the immunotherapy of cancer using interleukin-2. *Ann Int Med* 108 : 853~864.
3. Whittington R, Faulds D. 1993. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. *Drugs* 46 : 446~514.
4. Brandau S, Suttman H, Flad HD, et al. 2000. Killing of Fas ligand-resistant renal carcinoma cells by interleukin-2- and BCG-activated effector cells. *Cancer Immunol Immunother* 49 : 369~376.
5. Dutcher JP, Logan T, Gordon M, et al. 2000. Phase II trial of interleukin 2, interferon alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer : a cytokine working group study. *Clin Cancer Res* 6 : 3442~3450.
6. Margolin KA. 2000. Interleukin-2 in the treatment of renal cancer. *Semin Oncol* 27 : 194~203.
7. Anderson PM, Sorenson MA. 1994. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet* 27 : 19~31.
8. Kripke ML. 1977. Latency, histology, and antigenicity of tumors induced by ultraviolet light in three inbred mouse strains. *Cancer Res* 37 : 1395~1400.
9. Samlowski WE, Yim CY, McGregor JR, et al. 1995. Effectiveness and toxicity of protracted nitric oxide synthesis inhibition during IL-2 treatment of mice. *J Immunother* 18 : 166~178.
10. Papa MZ, Vetto JT, Ettinghausen SE, et al. 1986. Effect of corticosteroid on the antitumor activity of lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 in mice. *Cancer Res* 46 : 5618~5623.
11. Kaplan EL, Meier P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53 : 457.
12. Kalbfleisch JD, Prentice RL. 1980. *The statistical analysis of failure time data*. John Wiley & Sons. New York : 143.
13. Thomson A. 1991. Interleukin-2. In : *The cytokine handbook*. Academic Press. London : 83~102.
14. Lotze MT, Grimm EA, Mazumder A, et al. 1981. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by human lymphocytes cultured in T-cell growth factor. *Cancer Res* 41 : 4420~4425.
15. Mertelsmann R, Welte K. 1986. Human interleukin-2 molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunol* 172 : 400~419.
16. Paul WE. 1993. T-cell derived cytokines and their receptors. In : *Fundamental immunology*, 3rd ed. Raven Press. New York : 763~800.
17. Blay JY, Favrot MC, Negrier S, et al.

1990. Correlation between clinical response to interleukin-2 therapy and sustained production of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 50 : 2371~2374.
18. Cifone MG, D'Alo S, Parroni R, et al. 1999. Interleukin-2-activated rat natural killer cells express inducible nitric oxide synthase that contributes to cytotoxic function and interferon-gamma production. *Blood* 93 : 3876~3884.
 19. Gelmo BT, Palladino MA Jr, Jeffe HS, et al. 1988. Circulating cytokines in patients with metastatic cancer treated with recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 48 : 5864~5867.
 20. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. 1988. Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157 : 87~94.
 21. Hibbs JB Jr, Westenfelder C, Taintor RR, et al. 1992. Evidence for cytokine inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 89 : 867~877.
 22. Jansson OT, Morcos E, Brundin L, et al. 1998. Nitric oxide synthase activity in human renal cell carcinoma. *J Urol* 160 : 556~560.
 23. Jyothi MD, Khar A. 2000. Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappa B activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma. *Scand J Immunol* 52 : 148~155.
 24. Kasid A, Director EP, Rosenberg SA. 1989. Induction of endogenous cytokine mRNA in circulating peripheral blood mononuclear cells by IL-2 administration to cancer patients. *J Immunol* 143 : 736~739.
 25. Lee SG, Heo DS, Yoon SJ, et al. 2000. Effect of GM-CSF and IL-2 co-expression on the anti-tumor immune response. *Anticancer Res* 20 : 2681~2686.
 26. Mier JW, Vachino G, Van Der Meer JWM, et al. 1988. Induction of circulating tumor necrosis factor(TNF- α) as the mechanism for the febrile response to interleukin-2(IL-2) in cancer patients. *J Clin Immunol* 8 : 426~436.
 27. Robak T. 1995. Biological properties and therapeutic use of interleukin 2(IL-2). *Postepy Hig Med Dosw* 49 : 367~393.
 28. Yim CY, Lee CW, Choi SM, et al. 1996. Effects of nitric oxide(NO) synthesis inhibition on antitumor responses during interleukin-2(IL-2) treatment of mice. *Korean J Intern Med* 11 : 93~100.
 29. Boccoli G, Masciulli R, Ruggeri EM, et al. 1990. Adoptive immunotherapy of human cancer. The cytokine cascade and monocyte activation following high-dose interleukin-2 bolus treatment. *Cancer Res* 50 : 5795~5800.
 30. Yim CY, Bastian NR, Smith JC, et al. 1993. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light induced murine skin cancers. *Cancer Res* 55 : 5507~5511.
 31. Kwon OD. 2000. Effect of interleukin-2 on antitumor response against subcutaneous Meth-A tumor in mice. *Korean J Vet Clin Med* 17 : 305~310.
 32. Kwon OD. 2001. Effect of interleukin-2 on antitumor response against ultraviolet radiation-induced fibrosarcoma in mice. *J Vet Clin Med* 18 : 14~17.
 33. Yim CY, McGregor JR, Kwon OD, et al. 1995. Nitric oxide synthesis contributes to IL-2-induced antitumor response against intraperitoneal Meth A tumor. *J Immunol* 155 : 4382~4390.