



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

## 국문 초록

**서론:** EGFR (epidermal growth factor receptor) 돌연변이는 주로 비흡연자, 여성, 그리고 동양인 폐암에서 많이 발견된다. 최근 대규모 임상 시험을 통해 EGFR 돌연변이 진행성 폐암에서는 이레사나 타쎌바 같은 EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI)가 표준 치료 약제가 되었다. 그러나 진행성 폐암과 달리 EGFR 돌연변이 초기 폐암은 연구자에 따라 상이한 임상경과를 보고하고 있다. 또한 TKI 보조요법 치료의 유용성도 확립되지 않았다. 따라서 초기 폐암에서 EGFR 돌연변이 유무의 임상적 의미는 불분명하다.

IGF-1 (insulin like growth factor-1)은 IGF-1R (insulin like growth factor 1 receptor)와 결합하여 신체 성장과 발달뿐 아니라 암세포의 증식과 apoptosis 억제에도 중요한 역할을 한다. IGF-1은 주로 간에서 생성되나, 최근 폐암에서 측분비 방식 분비(paracrine secretion)이 관찰되었다. 또한 IGF-1은 암의 분화와 전이에 중요한 역할을 하는 상피-간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)과 연관되어 있다.

IGF-1으로 인한 신호전달 체계는 EGFR과 crosstalk이 존재하며, EGFR 돌연변이 폐암에서는 wild type에 비해 증가된 IGF-1 발현이 보고되었다. 뿐만 아니라 IGF 신호계의 활성화는 TKI 내성에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, EGFR 돌연변이 폐암에서 활성화된 IGF 신호계의 역할은 밝혀지지 않았다.

본 연구는 동양인 여성에서 많이 발견되는 EGFR 돌연변이 폐암 세포주 실험과 대상군의 임상양상을 분석하여 IGF-1 발현이 갖는 의미를 알아보고자 하였다.

**방법:** 1) 세포주 연구: EGFR 돌연변이 세포주인 H1650, HCC827/HCC827 (GR), PC-9 HCC4006을 사용하였다. IGF-1과 EGF 처리 후 EMT 표지자(E-cadherin,  $\beta$ -catenin, vimentin) 발현을 웨스턴블롯분석(Western blot)으로 평가하였고, MTT 측정법으로 IGF-1과 EGF 처리에 따른 세포 증식을 고찰하였다. IGF-1이 gefitinib 감수성에 미치는 영향을 평가하기 위해 gefitinib 반응성 세포주와 불응성 세포주로 분류하여 gefitinib 노출 후 세포 증식을 비교하였다.

2) 임상양상 분석: 2005년 1월부터 2011년 3월까지 수술 받은 EGFR

돌연변이 초기 폐암 중 여성을 대상으로 하였다. 남성에 비해 여성 폐암은 EGFR 돌연변이가 많을 뿐 아니라 대부분 비흡연자이고 선암이라는 균일한 특징 때문에 가설 검증에 적합하다. 보관된 해당 환자의 조직미세배열법(tissue microarray)을 이용하여 IGF-1과 IGF-1R 발현을 면역조직화학염색을 통해 확인하였다. 이후 IGF-1과 IGF-1R의 염색 강도 기준에 따라 양성 여부를 판단 후 예후 및 병기 등 임상양상과 연관성을 분석하였다. 또한 재발 후 TKI 치료를 받은 환자의 종양 반응과 IGF-1/IGF-1R 발현의 연관성을 고찰하였다.

**결과:** 1) 세포주 연구: IGF-1의 EMT 유도 여부를 평가하였을 때 세포주마다 다양한 EMT 표지자의 발현이 관찰되었다. H1650 세포주는  $\beta$ -catenin과 vimentin의 발현이 증가하고 E-cadherin은 감소하는 경향을 보여 EMT에 합당한 소견을 보였으나, 다른 세포주에서는 동일한 현상이 관찰되지 않았다. IGF-1 처리에 따른 세포 증식을 평가하였을 때, EGF 단독 보다 IGF-1 병용 처리시 세포 증식이 뚜렷해지는 경향을 보였다. 각 세포주에서 gefitinib 감수성을 확인 후 IGF-1의 영향을 평가하였으며, IGF-1 병용 처리시 gefitinib 불응성 세포주의 세포 증식 소견과 gefitinib 반응성 세포주의 감수성 소실을 관찰하였다.

2) 임상양상 분석: EGFR 돌연변이 여성 폐암 42명의 IGF-1과 IGF-1R 발현과 임상상을 고찰하였다. 38% (n=16)에서 IGF-1 양성 소견을 보였으며, IGF-1R 양성에서 더 많은 빈도를 보였다(7% [IGF-1R-] vs. 56% [IGF-1R+],  $p=0.002$ ). IGF-1 양성 환자의 불량한 예후가 관찰되었으나(보정 HR=10.1,  $p=0.012$ ), IGF-1R 양성은 예후와 연관을 보이지 않았다( $p=0.798$ , 로그순위검정). 재발된 환자의 TKI 반응을 고찰하였을 때 IGF-1 양성의 TKI 반응률이 IGF-1 음성일 경우보다 낮게 관찰되었다(43% vs. 91%,  $p=0.026$ ). 반면 IGF-1R 양성의 TKI 반응률은 IGF-1R 음성과 비교하여 통계적 차이를 보이지 못했다(64% vs. 86%,  $p=0.308$ ).

**결론:** 세포주 실험과 임상상을 분석한 본 연구를 통해 EGFR 돌연변이 폐암에서 IGF-1 발현에 따라 증가된 세포 증식과 불량한 예후, 낮은 TKI 반응률을 확인하였다. IGF-1 발현에 따른 불량한 치료 성적은 새로운 치료 전략의 근거가 될 수 있을 것으로 기대된다.

---

**Keywords:** 폐암, IGF-1, EGFR 돌연변이

**학 번:** 2007-30972

# 목 차

국문 초록.....	i
목차 .....	v
표 및 그림 목록 .....	vii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 세포주 및 세포배양 .....	5
2. MTT 측정법 .....	6
3. 웨스턴블롯분석.....	7
4. 사용 약제 .....	8
5. 대상군 및 면역조직화학염색.....	9
6. 통계 처리 .....	11
III. 결과.....	12
1. In vitro study.....	12
1) IGF-1 농도에 따른 EMT 표지자 발현.....	12

2) IGF-1의 세포 증식 효과.....	14
3) 세포주에 따른 gefitinib 감수성.....	16
4) IGF-1과 gefitinib 감수성 .....	19
2. 종양에서 발현된 IGF-1 및 IGF-1R.....	22
3. 대상군의 임상양상 분석 .....	28
1) 대상군의 임상적 특성 .....	28
2) IGF-1 양성 여부에 따른 임상양상.....	30
3) IGF-1 양성 여부에 따른 예후 .....	31
4) IGF-1 양성 여부에 따른 TKI 반응 .....	35
IV. 고찰.....	36
V. 참고 문헌.....	44
VI. 영문 초록.....	51

## 표 및 그림 목록

표 1. 대상군의 임상병리학적 특성

표 2. IGF-1/IGF-1R 발현 양상과 임상 소견의 연관 관계

표 3. 생존분석 결과

표 4. 재발 환자에서 IGF-1/IGF-1R 발현 양상과 TKI 반응의  
상관 관계

그림 1) H1650 의 EMT 표지자 발현

그림 2) PC9, HCC827, HCC4006 세포주에서 EMT 표지자 발현.

그림3) IGF-1의 세포 증식 효과

그림4) gefitinib 불응성 세포주에서 gefitinib 감수성

그림5) gefitinib 반응성 세포주에서 gefitinib 감수성

그림6) gefitinib 불응성 세포주에서 IGF-1과 gefitinib 감수성

그림7) gefitinib 반응성 세포주에서 IGF-1과 gefitinib 감수성

그림8) IGF-1의 발현

그림9) IGF-1R 의 발현

그림10) 다양하게 발현된 IGF-1R

그림11) IGF-1과 IGF-1R 발현의 상관관계

그림12) 임상병리학적 요인에 따른 생존 곡선



# I. 서 론

폐암은 한국을 비롯하여 전세계적으로 가장 사망률이 높은 암중의 하나이다. 기존 독성이 높은 항암제와 달리, 이레사나 타제바 같은 TKI (tyrosine kinase inhibitor) 치료제의 도입은 폐암 치료에 큰 변화를 가져왔다. 나아가 최근의 연구들은 EGFR 유전자의 돌연변이 유무에 따라 표적치료제의 현저한 반응 차이를 보고하고 있다 [1].

EGFR 돌연변이는 동양인, 선암, 여성 폐암에서 상대적으로 많이 발견되며 대부분의 돌연변이는 엑손 19과 21번에서 관찰된다 [2]. EGFR 돌연변이의 임상적 의미는 주로 TKI 치료를 받는 진행암에서 정립되었다. 대부분의 연구는 EGFR 돌연변이가 있는 경우, 표적치료제의 반응률을 70% 정도로 높게 보고하고 있다. 실제로 최근 3상 임상 시험은 TKI 치료 받은 EGFR 돌연변이 양성 환자에서 36개월이 넘는 중앙 생존기간을 보고하며 양호한 치료 성적을 보이고 있다 [3]. 동일한 돌연변이 양성 환자 중에서도 일부는 치료에 반응하지 않는데 이를 유전자형(엑손 19 vs. 엑손 21)에 따라 해석하는 시도가 있었지만, 연구자마다 상이한 결과를 보고 하고 있다 [4, 5]. 현재까지 유전자형(19del과 L858R)에 따른 다른 임상상은 확립되지 않았으며 진행성 폐암에서는 단순히 EGFR 돌연변이 유무에 따라 TKI 치료가 표준치료로 확립되었다.

수술이 가능한 초기 병변에서 EGFR 돌연변이의 임상적 의미는 아

직 불확실하다. 초기 폐암에서 EGFR 돌연변이에 따른 예후도 연구자마다 다른 결과를 보고하고 있다 [6, 7]. 진행성 폐암과 달리 초기 폐암에서 TKI 치료의 역할 또한 불분명하다. 최근 보고된 후향적 연구에서 수술 후 TKI 보조요법시 향상된 치료 결과를 보고하였다 (HR=0.51,  $p<0.001$ ) [8]. 그러나 초기 폐암에 대한 전향적 연구에서는 TKI 투여군이 오히려 불량한 예후를 보였다(HR=1.28,  $p=0.14$ ) [9]. 따라서 초기 폐암에서는 EGFR 돌연변이에 따른 TKI 투여가 표준 치료로 인정되지 않고 있으며, EGFR 돌연변이의 임상적 의미도 정립되지 않았다.

폐암은 다양한 분자생물학적 특성을 보이는 종양이다 [10, 11]. 또한 병기뿐 아니라 인종별, 성별, 흡연력 등에 따라 서로 다른 임상상을 보이는 이질적인 질환으로 구성되어 있다 [12]. EGFR 돌연변이 폐암 환자에서 TKI 보조요법이 표준 치료로 정립되기 위해서는 EGFR 돌연변이 폐암의 임상상과 분자생물학적 특성을 충분히 이해해야 한다. 분자생물학적 특성에 따른 임상상이 밝혀진다면 보조 항암요법이 시행되는 초기 폐암환자에게 새로운 치료방법을 시도하는 이론적 근거가 될 수 있다. 예를 들어, 동일한 EGFR 돌연변이 환자 중에서도 양호한 예후가 예상되는 경우 TKI 치료를 통해 세포독성 항암치료(cytotoxic chemotherapy)로 인한 부작용을 줄이는 맞춤형 치료가 가능할 것이다.

IGF (insulin like growth factor: IGF-1, IGF-2)는 신체 조직의 성장과 발달에 중요한 역할을 한다. 또한 암세포의 증식과 세포자멸사 (apoptosis) 억제에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 폐암

관련 동물실험에서도 IGF 신호계 활성화로 인한 폐암 발생이 증명되었다 [13]. IGF-1의 혈중 농도와 폐암의 발생 위험은 불분명하나, 최근 연구에 따르면 혈중 IGF-1의 농도에 따라 대장암 뿐 아니라 전립선암, 유방암의 발생 위험이 증가된다 [14, 15].

IGF-1R은 각각 2개의 alpha와 beta 사슬로 이루어져 있다, alpha 사슬은 ligand binding 영역을 구성하며, beta 사슬은 kinase 영역을 구성한다. IGF-1은 IGF-1R의 alpha 사슬 구조와 결합 후 신호전달체계를 통해 세포 증식과 생존을 강화시킨다. 이러한 신호전달체계는 Ras와 AKT 경로를 통해서 이루어지며 cyclin D1, CDK4 등을 상향조절(up regulation) 시키고, p27, p57, PTEN 같은 세포주기 억제인자(cell cycle suppressor)를 하향조절(down regulation) 시킨다 [16].

IGF-1은 주로 간에서 생성되나 표적 장기에서도 측분비 방식으로 분비될 수 있다. 최근 면역조직화학 염색을 이용한 폐암 연구에서도 종양에서 발현된 IGF-1이 관찰되며, 진행된 병기와 연관성이 보고되었다(n=57, p=0.025) [17]. IGF-1은 폐암의 조직형마다 차이가 있을 수 있는데, 선암의 경우 편평상피세포암 보다 IGF-1의 혈중 농도가 높을 뿐 아니라(76.7% vs. 23.4%, p=0.0019) [18], 종양 조직에서 발현도 증가된 것으로 보고 되었다(n=352, p = 0.00034) [19].

IGF-1R과 EGFR을 통한 신호전달(signal transduction)은 crosstalk이 생길 수 있는데 공통된 매개체나 두 수용체 사이의 이질이합체(heterodimer) 형성에 기인한다 [20, 21]. 특히 Kim 등의 보고에 따르면 야생형(wild type)에 비해 EGFR 돌연변이 종양에서 IGF-1 발현이

증가되어 있다( $p = 0.00098$ ) [19]. 이러한 crosstalk의 존재는 이론적으로 EGFR 신호전달체계에 작용하는 약제에 대한 내성 가능성을 시사한다. 실제로 세포주를 이용한 in vitro 연구에 의하면 gefitinib 약제 내성에 IGF 신호계 활성화가 관련되어 있다 [22].

최근 연구들에 의하면 IGF-1와 EGF는 암의 분화와 전이에 중요한 역할을 하는 상피-간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)와 관련되어 있다 [23, 24]. EMT는 상피세포가 극성을 잃으며 세포 형태의 변화가 생긴다. 또한 E-cadherin 같은 상피세포 표지자가 감소하고  $\beta$ -catenin, vimentin 같은 간엽세포 표지자가 증가한다. 그러나 실제 종양에서는 완전히 다른 세포로 바뀌기 보다, 상피세포와 간엽세포의 특성이 함께 나타나는 중간 특성을 보이는 경우가 많아 EMT-like 표현형이란 표현을 선호하기도 한다 [25]. 암의 전이는 일차암에서 떨어져 나온 세포가 기질로 침습하여 혈관이나 림프관을 통해 일어난다. 이후 혈관내피세포에 부착하여 새로운 장소에 침습하여 성장하는데 이러한 과정에 EMT가 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 [26], 종양줄기세포(cancer stem cell)의 생성과 작용에도 관여할 것으로 알려져 있다 [27]. 또한 EMT는 유방암, 간암을 비롯한 일부 고형암에서 전이와 같은 불량한 예후인자와 연관되는데, 특히 폐암에서는 EGFR TKI 내성에 기여한다고 알려져 있다 [28-31]. EMT는 TGF- $\beta$ , EGF과 같은 다양한 signal factor로 유도될 수 있으며 [32], 유방암, 전립선암 세포주에서 IGF-1은 EMT 유도에 관여하는 것으로 보고 되었다 [23, 24].

본 연구는 EGFR 돌연변이가 있는 폐암에서 IGF-1의 역할을 확인해

보고자 하였다. In vitro 연구에서는 EGFR 돌연변이 세포주를 이용해 IGF-1 노출에 따른 세포증식 및 EMT 현상을 고찰하였다. 또한 IGF-1 처리 후 gefitinib 감수성에 변화가 생기는지 살펴보았다. In vivo study에서는 수술적 치료를 받은 EGFR 돌연변이 초기 폐암 환자를 대상으로 IGF-1 발현에 따른 임상 차이를 고찰하였다. 본 연구에서 목표로 하는 IGF-1 관련 가설 검정을 위해 여성 폐암으로 제한하여 임상양상을 분석하였다. 이는 서양과 달리 한국을 비롯한 동양 여성 폐암이 대부분 비흡연자이고 선암으로 구성되어 임상적으로 균일한 대상군을 이루어 [33], IGF-1의 영향을 고찰하는 본 연구에 적절할 것으로 판단했기 때문이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

HCC827과 H1650 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 공급받아 사용하였다. HCC827 (GR, gefitinib resistant) 세포주와 PC9, HCC4006은 타연구자(Jae Cheol Lee, Tae Min Kim)로부터 각각 제공받았다. 각 세포주의 EGFR 돌연변이 유전자형은 다음과 같다.

- (1) H1650: E746-A750 del

- (2) HCC827/HCC827 (GR): E746-A750 del
- (3) PC9: E746-A750 del
- (4) HCC 4006: E746-A750 del

세포주는 각 10% FBS, 2mM L-글루타민, 100units/ml 페니실린 그리고 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute Medium)를 사용하여 37C, 5% CO2배양기에서 계대 배양하였다.

## 2. MTT 측정법

실험에서는 배양 용기 내에서 지수적 성장시기에 있는 세포들을 수확하여 분석하였다. 수확된 세포는 세포 부유액을 혈구계산판을 이용하여 단위 부피당 세포 개수를 측정하였고 일정 수의 세포를 다채널 피펫(multi-channel pipette)을 이용하여 96 well plate에 접종하였다. IGF와 EGF에 대한 세포주의 반응성을 관찰하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 시행하였는데 그 절차는 다음과 같다. 96 well plate에 세포  $2.0 \times 10^4$  cells/well을 넣고 하룻밤 배양하였다. 이후 50nM EGF 또는 5nM IGF-1와 동시에 처리 후 24시간이 지난 뒤 MTT 시약(2mg/mL, Sigma)을 넣고 3시간 후 중지 완충액(dimethylsulfoxide[DMSO], Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA)를 넣어 주었다. Gefitinib 감수성을 평가하는 MTT 분석에서는 200nM gefitinib 단독 처리하거나 동일한 조건의 IGF-1/EGF를 추가하였다. 이후 10분간 배양 뒤 96 well plate 용 ELISA reader (Spectra Classic, Tecan Co., Austria)로 595nm에서 관독하여 결과를 분석하였다. IGF-1/EGF의 조건에 따라 6개의 well을 한 군으로 만들어 실험을 수행하였고, 같은 실험을 독립적으로 3회 시행하였으며 평균과 표준편차를 산출하였다.

### 3. 웨스턴블롯분석

EMT 표지자의 발현을 확인하기 위하여 웨스턴블롯분석을 이용하였다. H1650, PC9, HCC827, H4006 세포주에 50nM EGF 단독 처리하거나, 추가로 5nM, 10nM IGF-1을 24시간 동안 처리하였다. 세포 추출(cell harvest) 이후 용해 완충액(20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM b-glycerophosphate, 1mM sodium vanadate, 1ug/ml leupeptin, 1mM PMSF)을 이용하여 세포들을 파쇄하고 10분 동안 13,000RPM으로 원심분리하여 세포 파쇄물을 제거한 후 10%SDS-PAGE를 시행하였다. SDS-PAGE가 완료된 겔은 PVDF 전달막(transfer membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)에 옮겨 5%

nonfat skim milk가 포함된 PBS-T (137mM Sodium Chloride, 2.7mM Potassium Chloride, 10mM Phosphate Buffer 0.01% Tween-20) 용액에 담귀 실온에서 1시간 동안 차단 후 일차 항체로 하룻밤 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 전달막은 PBS-T로 10분간 3회 수세한 후 이차 항체로 약 한 시간 동안 반응시키고 다시 PBS-T로 10분간 3회 수세하였다. 이후 ECL kit (DOGEN Co, Ltd) 으로 형광처리를 한 뒤 ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare Life Science)에 노출시켜 밴드를 확인하였다. 사용된 성장인자와 EMT 표지 인자 단백질은 다음과 같다; EGF (Sigma), IGF-1 (BioVision Inc, Mountain View, CA), vimentin (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), b-catenin (Cell Signaling), E-cadherin (Cell Signaling)

#### 4. 사용 약제

Gefitinib은 Selleckchem (Houston, TX, USA)에서 구매하였으며 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여서 100mM으로 만든 후 -80도에서 냉동 보관하여 사용하였다.



## 5. 대상군 및 면역조직화학 염색(in vivo study)

2005년 1월부터 2011년 3월까지 서울대학교병원에서 비소세포폐암으로 진단 후 수술 받은 환자 중 EGFR 유전자검사를 통해 돌연변이가 확인된 여성을 대상으로 하였다. 후향적으로 의무기록을 조사하였으며 원격전이가 확인된 1명의 환자는 제외되었다. 또한 EGFR 돌연변이 중 임상적 의의가 불확실한 엑손 20의 돌연변이는 야생형으로 분류하였다.

EGFR 돌연변이 검사를 위해 QIA mp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 해당 환자의 파라핀 조직으로부터 통상적인 방법으로 DNA를 추출하였다 [7]. EGFR 유전자의 엑손 18, 19, 20, 21 증폭에 사용된 시발체(primer)는 기존 기술된 방법을 따랐다 [7]. 구체적으로, 10× buffer (Roche, Mannheim, Germany) 2  $\mu$ L와 MgCl<sub>2</sub> 1.7–2.5mM/L, 각 EGFR primer pair 0.3 $\mu$ M, 그리고 250 $\mu$ M의 deoxynucleoside triphosphate와 2.5units의 DNA polymerase (Roche)가 혼합된 용액 20 $\mu$ L에서 100ng DNA로부터 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭하였다. 증폭은 95°C에서 15분간 변성시키고 이어서 94°C, 55°C에서 각각 30초, 72°C에서 45초씩 30주기를 순환시킨 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 처리하는 과정을 거쳤다. PCR 산물은 QIAGEN gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 2% 한천겔(agarose gel)로부터 정제하였으며 DNA 염기서열분석을 위한

주형(template)으로 사용하였다. 염기서열분석을 위해 20ng의 PCR산물을 BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster, CA) 8 $\mu$ L와 0.1 $\mu$ M의 PCR가 포함된 20 $\mu$ L의 분석 반응 용액에서 ABI-PRISM 3100 DNA analyzer를 사용하여 진행하였으며. 96°C에서 2분간 변성 후 94°C, 50 °C, 60 °C 에서 각각 10초, 15초, 3분 동안 25주기를 순환시켜 실행하였다. 데이터는 Sequencer 3.1.1.software (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

보관된 해당 환자의 검체를 이용해 조직미세배열법(tissue microarray,TMA)을 이용하여 IGF-1와 IGF-1R (Rabbit polyclonal antibodies; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)에 대한 면역조직화학염색을 시행할 조직절편을 얻었다. 유리슬라이드에 부착된 조직절편은 탈파라핀과 함수 과정 후 pH8.4의 CC1 (Cell conditioning 1; Ventana Medical Systems, AZ, USA) solution을 이용하여 100°C 오븐에서 항원 부활(antigen retrieval) 과정을 거쳤으며, 이때 IGF-1을 염색할 절편은 60분간, IGF-1R을 염색할 절편은 30분간 반응시켰다. IGF-1 항체는 1:15, IGF1R 항체는 1:30로 희석한 뒤 37°C에서 60분간 반응시켰다. 이차항체로는 ultraView Universal DAB detection kit (Ventana Medical Systems, AZ, USA)을 사용하였으며, 각 절편은 수세 후 hematoxylin으로 8분간, Bluing reagent (Ventana Medical Systems, AZ, USA)로 4분간 대조염색하였다. 각 과정은 Ventana BenchMark XT Staining system (Ventana Medical Systems, AZ, USA)에서

진행되었다.

IGF-1과 IGF1R 모두 세포질 염색성(cytoplasmic staining)을 보였으며, 면역염색의 강도(intensity)에 따라 4단계로 판독하였다. 종양세포에서 염색성이 관찰되지 않거나 주변 조직과 염색성에 차이가 없는 경우를 0, 종양세포가 약하게 염색되면서 주변 조직보다 염색성이 강한 경우를 1+, 종양세포에서의 염색성이 비교적 강하고 균일한 경우를 2+로 판단하였으며 이보다 염색성이 강해 과립성으로 관찰되는 경우(granular pigmentation)를 3+로 보았다.

## 6. 통계 처리

IGF-1과 IGF-1R의 발현 상관관계는 스피어만 순위상관검정 (ordinary variables)과 카이제곱검정(categorical variables)을 사용하였다, IGF-1과 IGF-1R 발현 정도(양성, 음성)와 임상상(병기, 연령, 유전형)의 연관 관계는 카이제곱검정을 사용하여 분석하였고 단변량 생존분석은 로그순위 검정을 사용하였으며, 생존곡선은 Kaplan Meier 방법을 통해 구하였다. 다변량 생존분석은 Cox proportional hazard model을 사용하였다. p-value 0.05 이하를 통계적으로 유의하다고 판단하였고, 통계 프로그램은 STATA 11.0을 이용하였다.

### III. 결 과

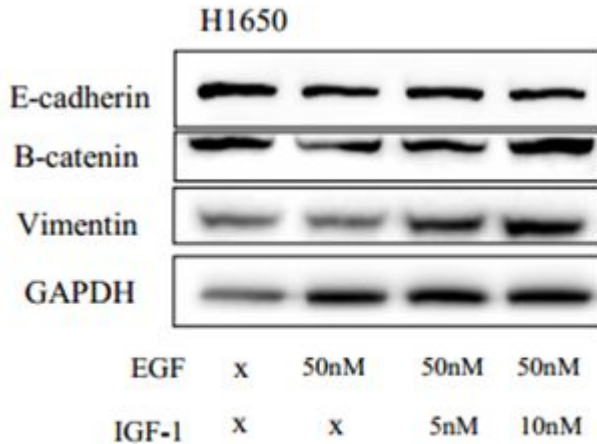
#### 1. In vitro study

##### 1) IGF-1 농도에 따른 EMT 표지자 발현

H1650 세포주에서 EGF와 함께 고농도(10nM)의 IGF에 노출될수록 간엽세포 표지자(mesenchymal marker)인  $\beta$ -catenin, vimentin의 발현은 증가하고 상피세포 표지자(epithelial marker)인 E-cadherin는 감소하는 경향을 보여 EMT에 합당한 소견을 보였다.

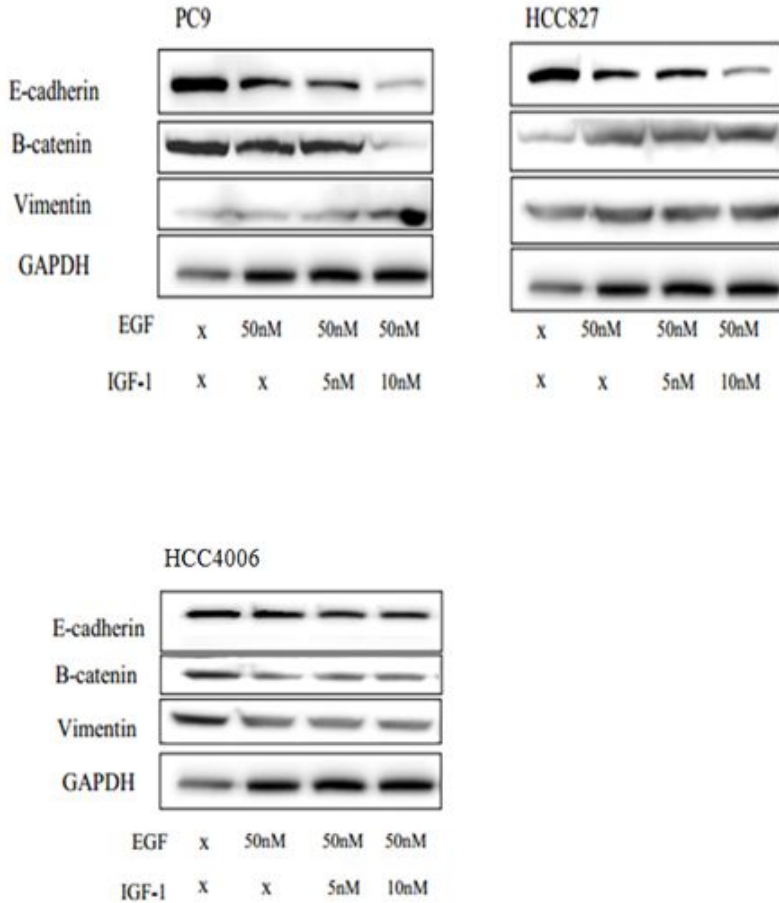
그림 1) H1650의 EMT 표지자 발현.

10nM IGF-1과 50nM의 EGF 병용 처리시 E-cadherin이 감소되고  $\beta$ -catenin, vimentin이 증가되는 경향을 보였다.



반면, H1650을 제외한 다른 세포주에서 EMT관련 표지자는 다양한 발현 양상을 보였다. PC-9 세포주는 고농도(10nM) IGF-1 노출시 E-cadherin 발현이 감소하고 vimentin 발현은 증가하였지만,  $\beta$ -catenin 발현은 오히려 감소하였다. HCC827는 E-cadherin 발현만이 감소하였고, H4006은 고농도 IGF-1 노출에 따른 EMT 표지자의 발현 변화를 보이지 않았다.

그림 2) PC9, HCC827, HCC4006 세포주에서 EMT 표지자 발현.  
 세포주에 따라 EMT 표지자(E-cadherin,  $\beta$ -catenin, vimentin)가 발현이  
 다양하였다.

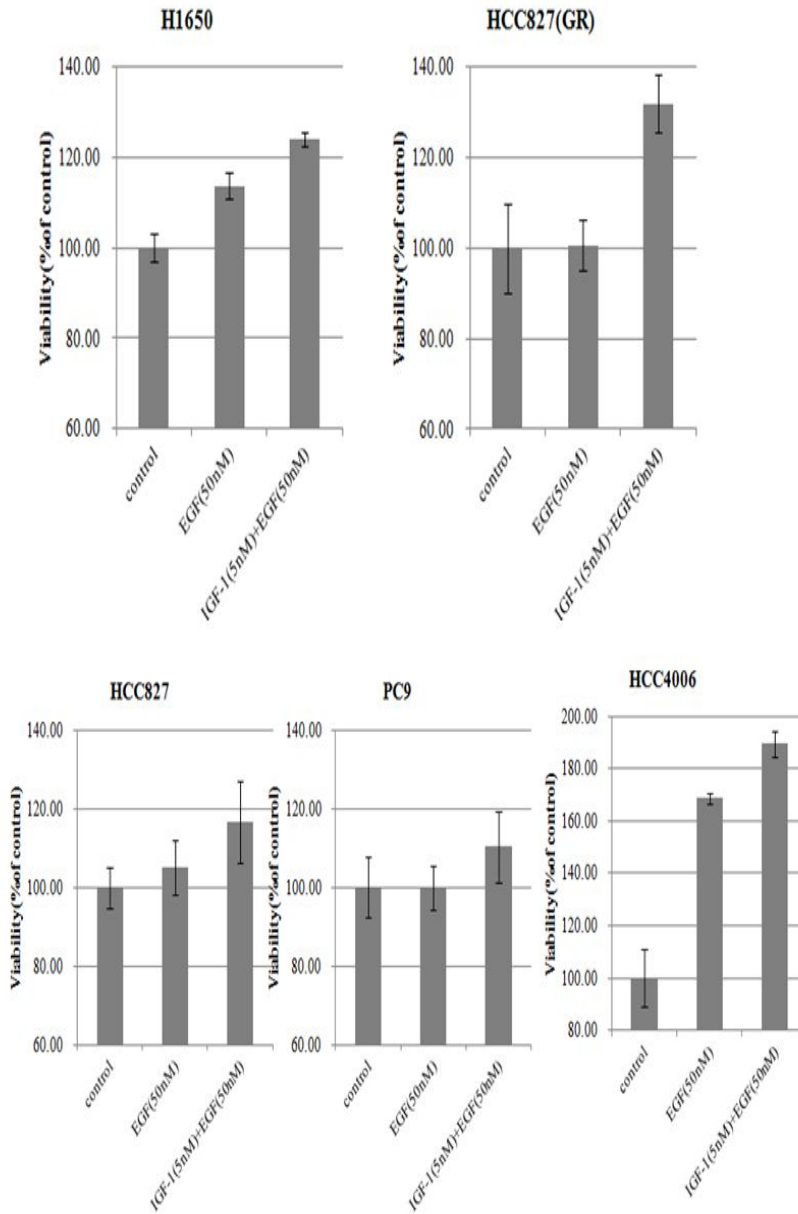


## 2) IGF-1의 세포 증식 효과

IGF-1의 세포 증식 효과를 확인하기 위해 EGF와 IGF-1 노출 후 MTT 측정법을 시행하였다. EGF에 IGF-1을 추가 처리 하였을 때 EGF 단독 처리 보다 세포 증식 효과가 현저해지는 경향을 보였다.

그림 3) IGF-1의 세포 증식 효과.

EGF 단독 처리에 비해 IGF-1 병용 처리 24시간 후 세포 증식 소견이 보였다.



### 3) 세포주에 따른 gefitinib 감수성

IGF-1이 gefitinib 감수성에 미치는 영향을 평가하기 전 세포주에 따른 gefitinib 감수성을 MTT 측정법으로 확인하였다. 예상대로, gefitinib 불응성 세포주인 H1650과 HCC827 (GR)은 gefitinib 200nM 처리시 70% 이상의 세포 증식을 보여 저항성을 보였다. 반면 gefitinib 반응성 세포주인 HCC827, PC9, HCC4006은 gefitinib 처리시 감수성을 보였다.



그림 4) Gefitinib 불응성 세포주에서 gefitinib 감수성.

Gefitinib 불응성 세포주에서는 gefitinib (200nM) 처리 24시간 후 뚜렷한 감수성이 관찰되지 않았다.

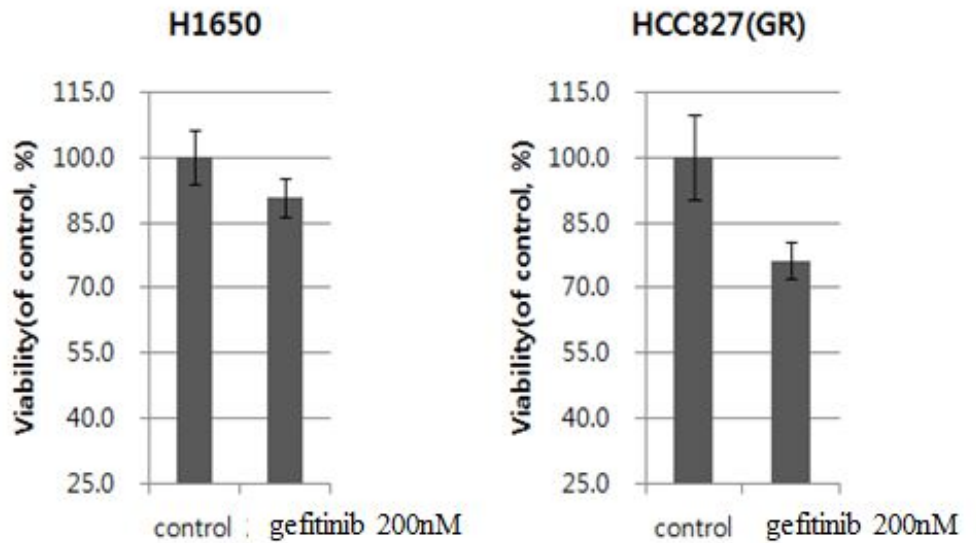
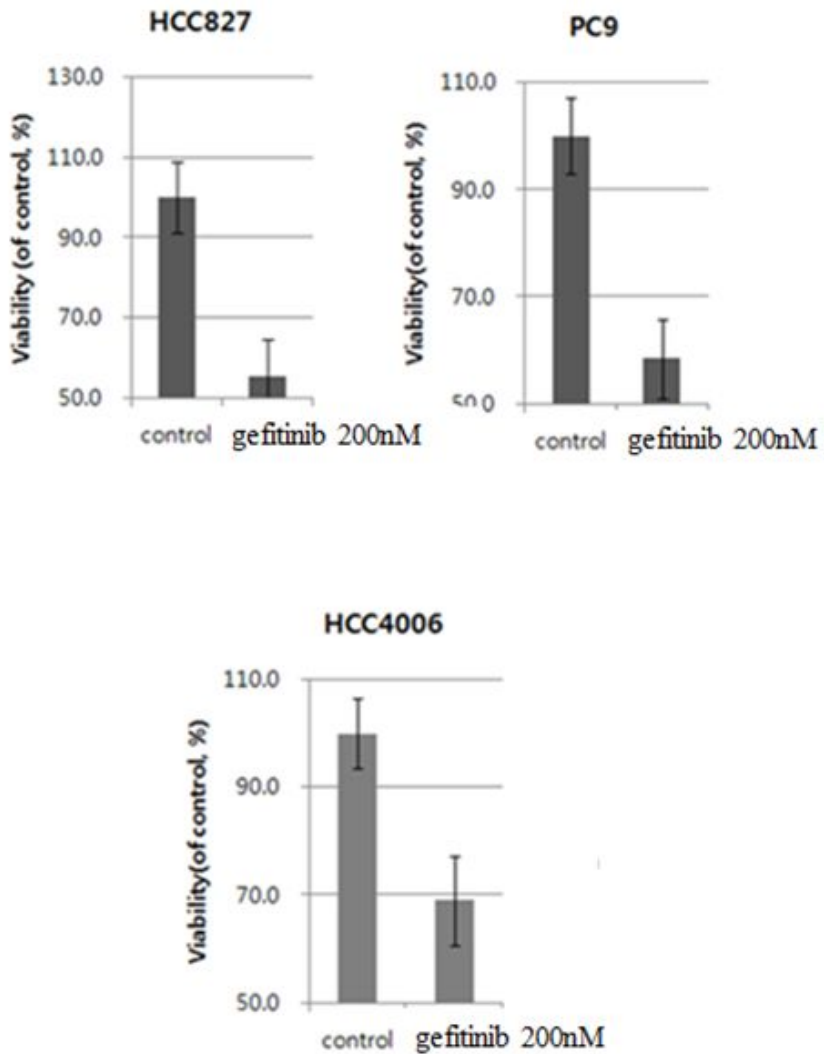


그림 5) gefitinib 반응성 세포주에서 gefitinib 감수성.

Gefitinib 반응성 세포주에서 gefitinib (200nM) 처리 24시간 후 감수성을 보였다.



#### 4) IGF-1과 gefitinib 감수성

세포주마다 gefitinib 감수성을 확인 후 다음 단계로 IGF-1이 gefitinib 감수성에 어떤 영향을 미치는지 MTT 측정법으로 세포 증식을 고찰하였다. Gefitinib (200nM) 처리시 50nM EGF 또는 EGF (50nM) /IGF-1 (5nM)을 동시에 처리하였으며 24시간 뒤 세포 증식을 확인하였다. Gefitinib 불응성 세포주에서 IGF-1/EGF 병용 투여시 gefitinib 투여보다 세포 증식 소견을 보였고, 특히 H1650의 세포증식은 EGF 단독 처리보다 증가하는 경향을 보였다. 모든 gefitinib 반응성 세포주에서 IGF-1/EGF 병용 처리시 세포 증식 소견을 보여 gefitinib 감수성이 소실되었다..

그림 6) gefitinib 불응성 세포주에서 IGF-1과 gefitinib 감수성.

IGF-1 (5nM) /EGF (50nM) 병용 처리시 gefitinib 단독 처리에 비해 세포증식 소견이 관찰되었다.

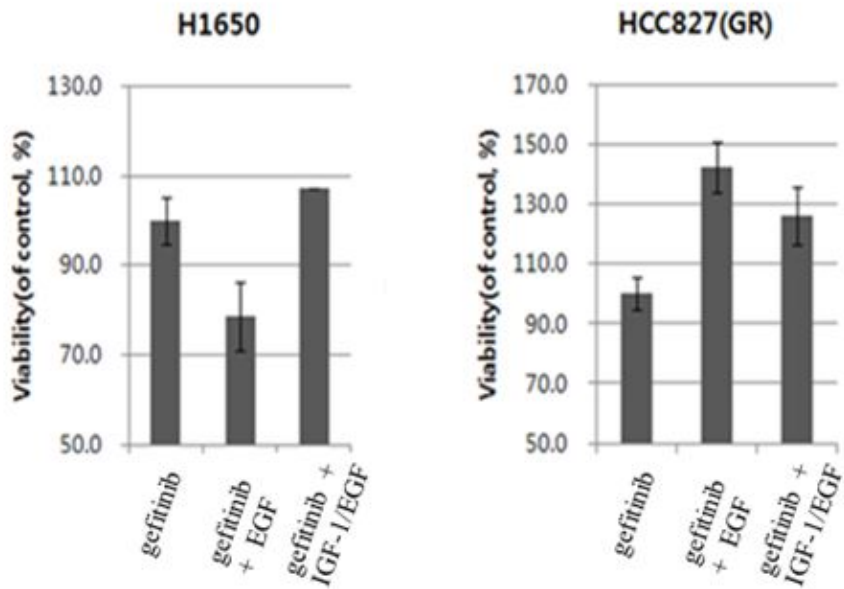
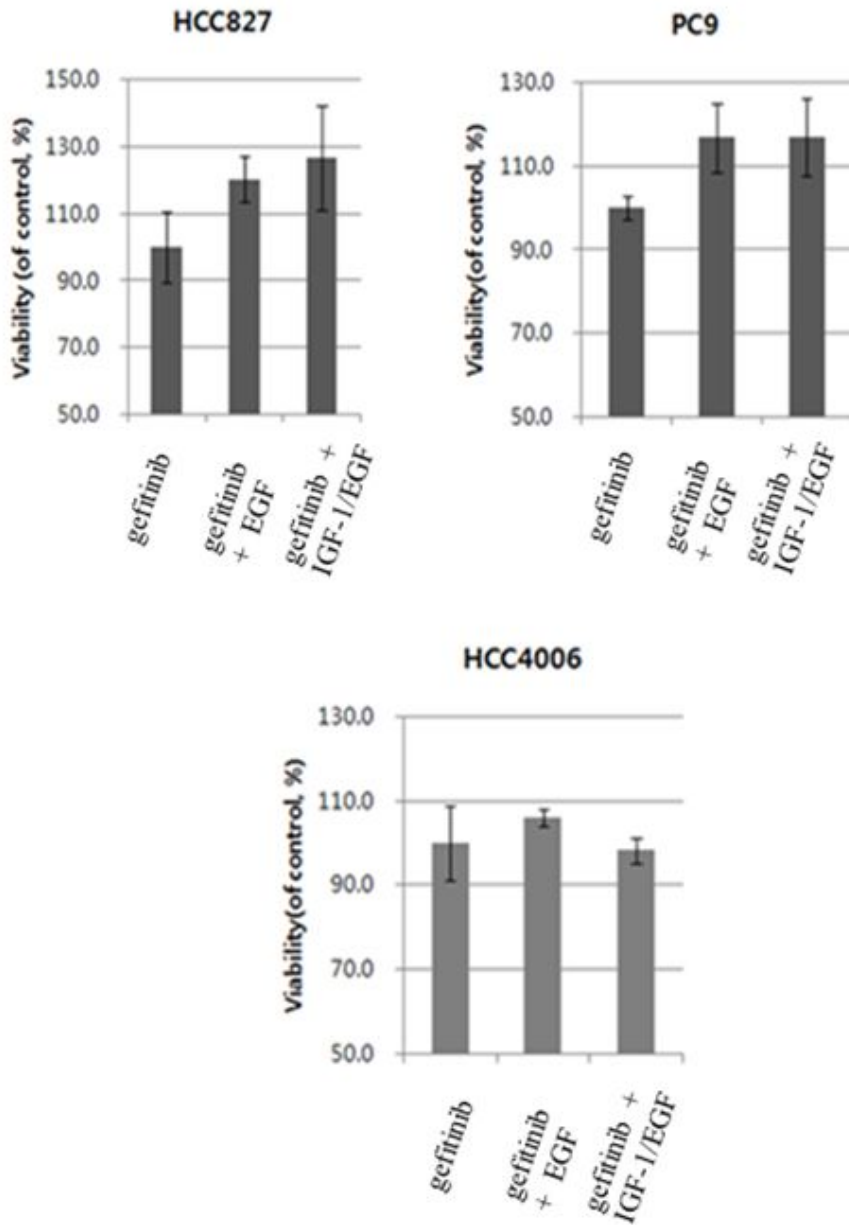


그림 7) gefitinib 반응성 세포주에서 IGF-1과 gefitinib 감수성.

IGF-1/EGF 병용 처리시 gefitinib 감수성이 관찰되지 않았다



## 2. 종양에서 발현된 IGF-1과 IGF1-R

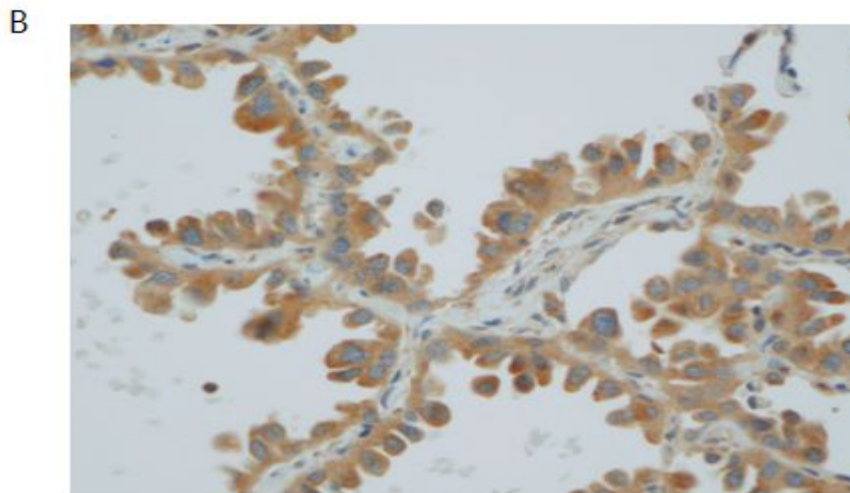
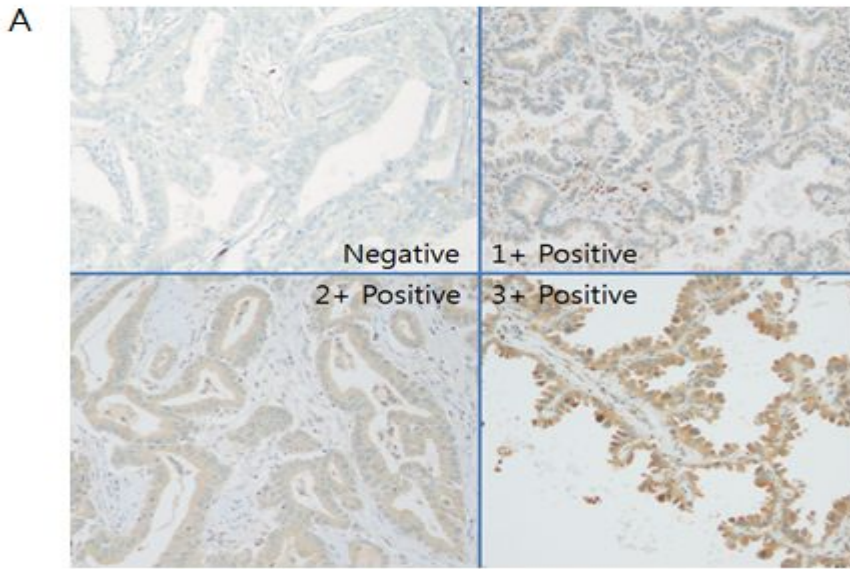
IGF-1의 발현은 세포질 염색(cytoplasmic staining)으로 평가되었고, 염색 강도(staining intensity)에 따라 0-3+로 분류하였다. 적절한 분석을 위해 0-2+(n=26)은 음성, 3+(n=16)은 양성으로 재분류하였다.

그림8) IGF-1의 발현.

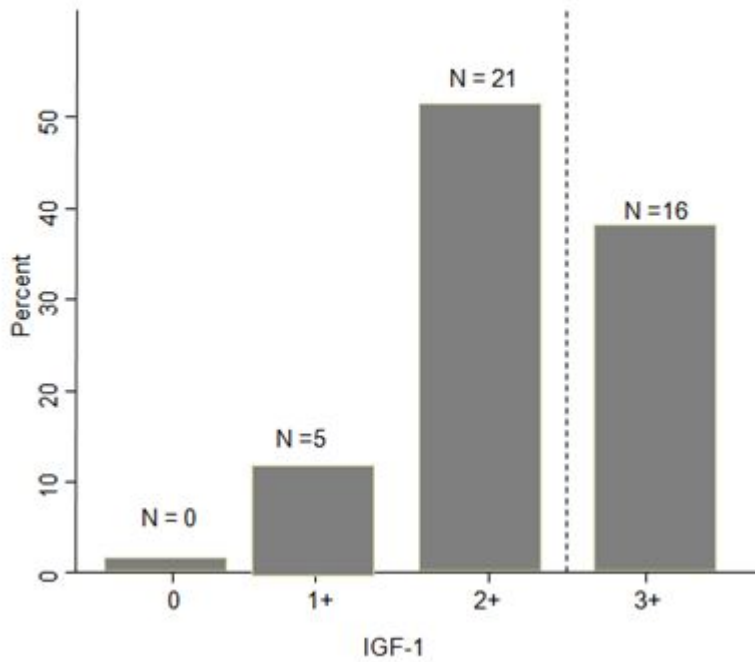
A) IGF-1 발현 강도에 따른 분류(저배율)

B) 3+ 강도의 IGF-1 발현(고배율)

C) IGF-1 발현의 분포(점선: 양성, 음성 기준)



C



IGF-1R 발현 또한 IGF-1의 세포질 염색으로 평가되었으며 염색 강도에 따라 0-3+로 분류하였다. 통계적 분석을 위해 0-1+(n=13)은 음성, 2-3+ (n= 29)은 양성으로 재분류하였다.

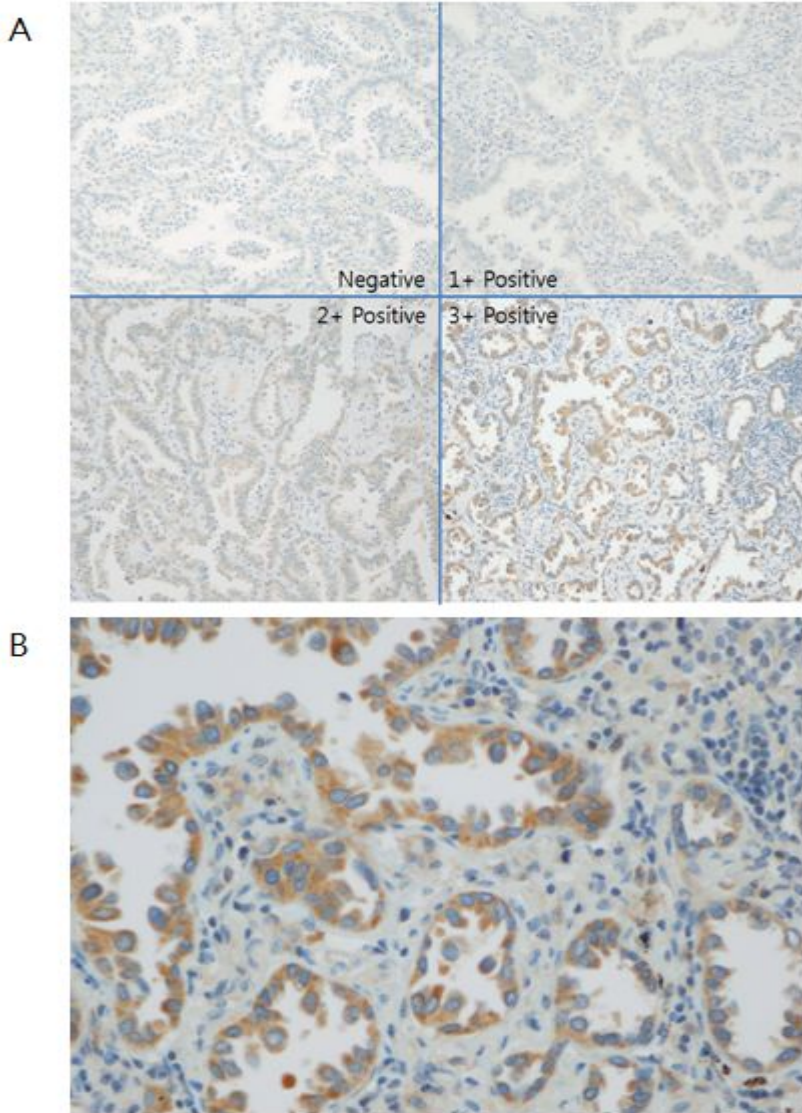


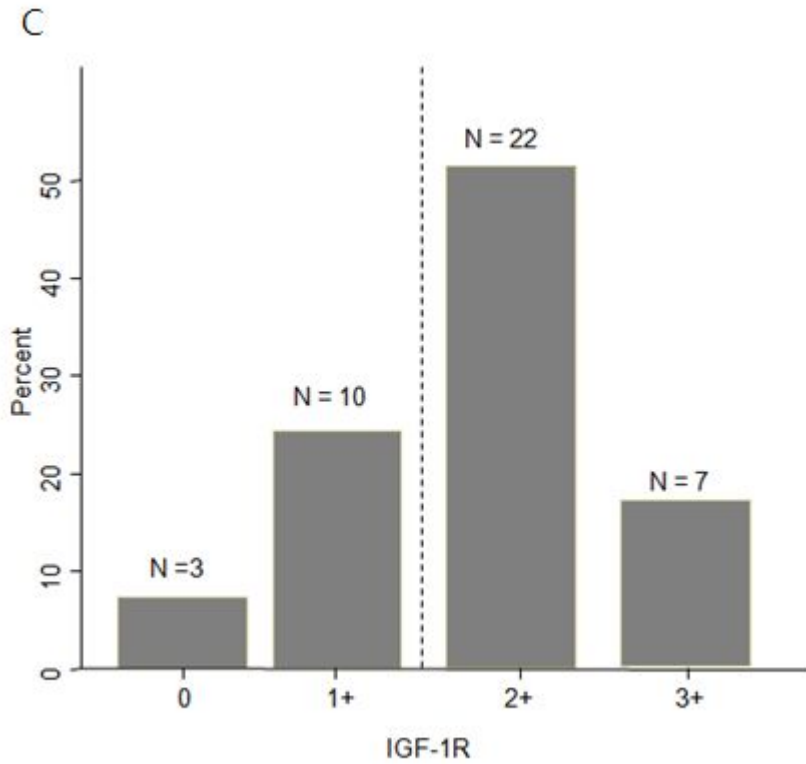
그림9) IGF-1R 의 발현.

A) IGF-1R 발현 강도에 따른 분류(저배율)

B) 3+ 강도의 IGF-1R 발현(고배율)

C) IGF-1R 발현의 분포(점선: 양성, 음성 기준)

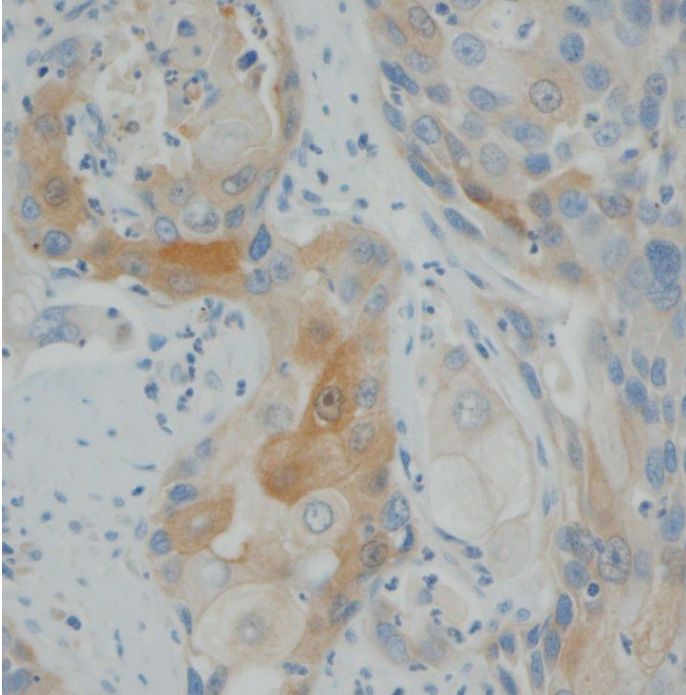




IGF-1R 발현 된 일부 환자 조직에서(n=3) 단일 코어 안에서 1+에서 3+까지 다양한 면역염색성을 보이는 중앙세포가 혼재되어 있는 양상을 보였다 (그림 10).

**그림10) 다양하게 발현된 IGF-1R.**

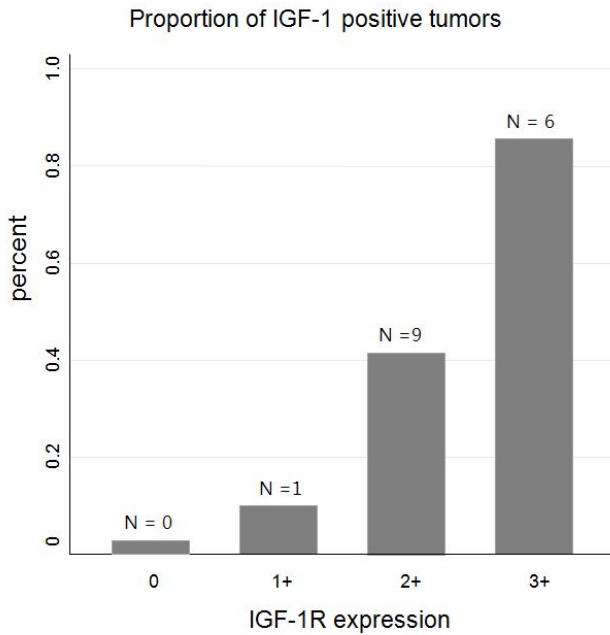
종양 부위에 따라 다양한 강도 (1+~ 3+)의 IGF-1R 발현이 관찰된다.



IGF-1과 IGF-1R의 발현은 통계적으로 강한 양의 상관관계를 보였으며( $r=0.63$ ,  $p<0.001$ ), IGF-1R의 발현(0-3+)에 따라 IGF-1 양성(3+) 비율을 분석하였을 때도 강한 통계적 상관관계가 관찰되었다 ( $p<0.001$ ).

### 그림11) IGF-1과 IGF-1R 발현의 상관관계.

IGF-1R의 발현이 증가할수록 IGF-1 양성 비율이 높아졌다.



### 3. 대상군의 임상 양상 분석

#### 1) 대상군의 임상적 특성

총 42명의 여성이 포함되었으며 중위 연령(median age)은 61세였다.

조직형은 모두 선암으로 29%가 stage III로 진단되었다. IGF-1 양성

(3+)과 IGF-1R 양성(2-3+)은 각각 38%와 64%에서 관찰되었다 (표1).

표 1. 대상군의 임상병리학적 특성

Characteristics		N (%)
연령 (median)		61 세
조직형	선암	42 (100)
병기	I-II	30 (71)
	III	12(29)
T 병기	1-2	37(88)
	3-4	5(12)
N 병기	0-1	32(76)
	2	10(24)
IGF-1	Negative	26(62)
	Positive	16(38)
IGF-1R	Negative	15(36)
	Positive	27(64)
돌연변이 부위	엑손 18	1(2)
	엑손 19	21(50)
	엑손 21	20(48)

2) IGF-1 양성 여부에 따른 임상양상

IGF-1 양성(3+)은 IGF-1R 양성(2-3+)에서 보다 빈번하게 관찰되었다 (7% [IGF-1R-] vs. 56% [IGF-1R+], p=0.002). 반면 IGF-1 양성과 병기 (stage) 간 연관성은 관찰되지 않았다 (25% [stage III] vs. 31% [stage I-II], p=0.688). 다른 임상 요인과 IGF-1/IGF-1R 양성 여부의 상관관계는 표2에 요약하였다.

**표2. IGF-1/IGF-1R 발현 양상과 임상 요인의 연관 관계**

	IGF-1+	p value	IGF-1R +	p value
연령		1.000		0.747
≤61	38% (n=8)		62% (n=13)	
>61	38% (n=8)		67% (n=6)	
병기		0.688		0.222
I-II	40%(n=12)		70%(n=21)	
III	33%(n=4)		50%(n=6)	
유전형		0.275		0.031
19 del	29%(n=6)		48% (n=10)	
L858R	45%(n=9)		80% (n=16)	

3) IGF-1 양성 여부에 따른 예후

생존분석시 stage III는 불량한 예후와 연관되었고(p=0.026), IGF-1 양성 또한 통계적으로 유의한 생존률의 차이를 보였다(p=0.013, 그림 12). 반면 IGF-1R 발현에 따른 생존률 차이는 관찰되지 않았다 (p = 0.798). 다른 임상 요인에 따른 생존분석은 표3에 요약하였다.

**표3. 생존분석 결과**

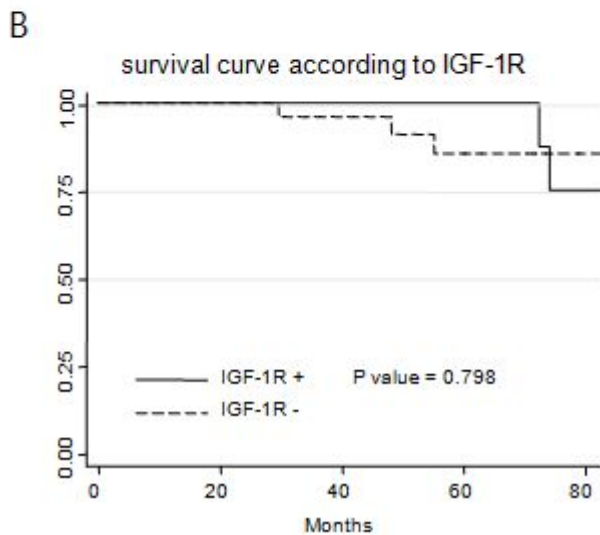
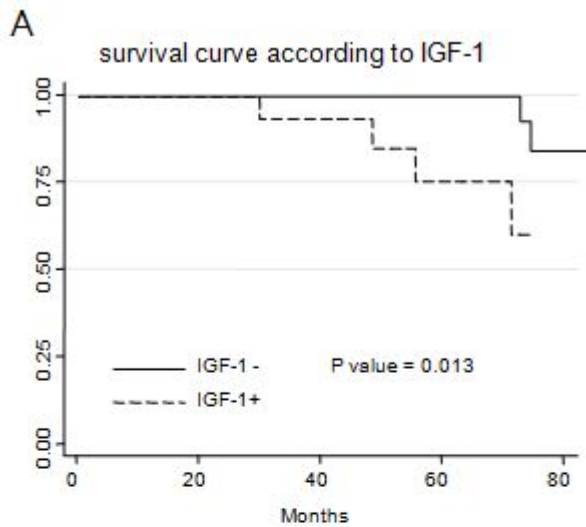
Variable	단변량 분석		다변량 분석	
	7 년 생존률	p value	HR (95% CI)	p value
연령 (≤61 vs. >61)	83% vs. 63%	0.205	Not included	
IGF-1 (- vs. +)*	93% vs. 61%	0.013	10.1 (1.7-62.1)	0.012
IGF-1R (- vs. +)	75% vs. 79%	0.798	Not included	
병기(I-II vs. III)	95% vs. 42%	0.026	17.5 (2.0- 152.4)	0.009
유전형 (del19 vs. L858R)	62% vs. 95%	0.243	Not included	

\* 6년 생존률

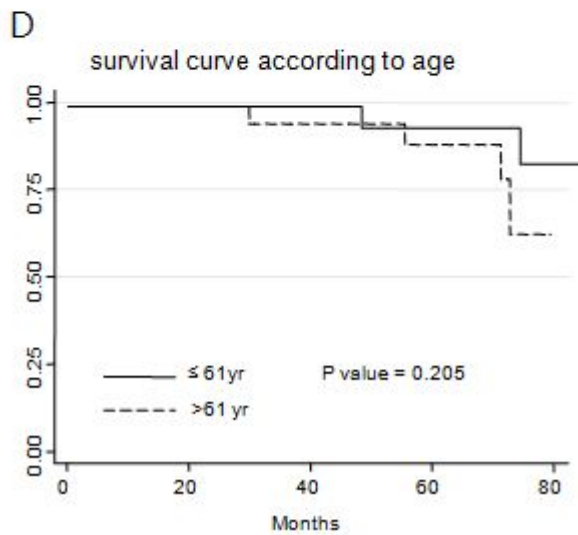
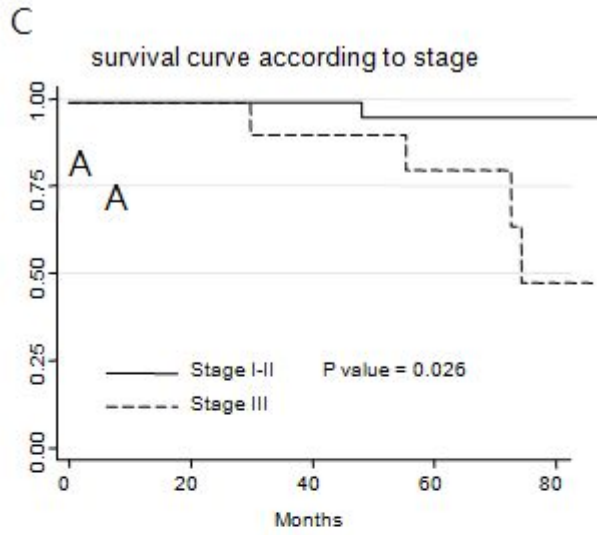
그림12) 임상 병리학적 요인에 따른 생존 곡선.

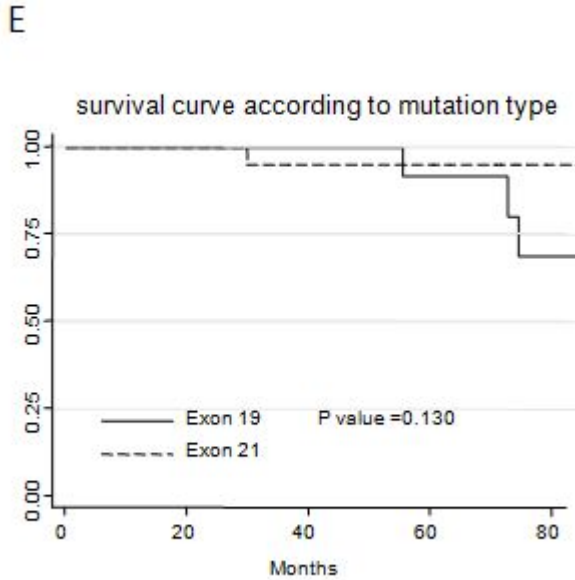
A) IGF-1 발현(양성 vs. 음성), B)IGF-1R 발현(양성 vs. 음성) C) stage

(I-II vs. III), D) 연령, E) 유전자형에 따른 생존 곡선









무병생존(Disease-free survival, DFS)에 대한 단변량 분석시 진행된 병기(stage III)의 환자가 불량한 예후를 보였다(5년 무병생존률; 88%[stage I-II] vs. 46%[stage III],  $p=0.001$ ). IGF-1R 양성 여부에 따른 생존률 차이는 관찰되지 않았고(5년 무병생존률; 78% [IGF-1R+] vs. 71% [IGF-1R-],  $p=0.835$ ), IGF-1 양성 환자는 낮은 생존률을 보였지만 통계적 차이를 보이지 못했다 (5년 무병생존률; 67% [IGF-1+] vs. 81% [IGF-1-],  $p=0.270$ ). 하지만, 병기를 고려한 다변량 분석시(stage adjusted Cox model) IGF-1 양성 종양의 예후가 나빠지는 경향을 보였다(HR =4.16 [95% CI, 0.85-20.5],  $p=0.079$ )

### 3) IGF-1 양성 여부에 따른 TKI 반응

20명의 환자가 재발하여 TKI로 치료 받았으며 18명의 환자에서 종양평가가 가능했다. 표4에 IGF-1과 IGF-1R 발현 양상과 TKI 반응의 상관관계를 요약 정리하였다. IGF-1 양성의 경우 낮은 반응률을 보였으나( $p=0.026$ ), IGF-1R 양성과 종양 반응은 통계적 상관관계가 관찰되지 않았다( $p=0.308$ ). 유전형에 따른 종양 반응률(response rate) 또한 통계적 차이가 없었다( $p=0.312$ ). 특히, IGF-1 양성 환자의 1년 무진행생존률(progression free survival rate)은 24%로 그렇지 않은 경우 73%와 비교하여 통계적으로 유의하게 차이가 있었다( $p = 0.016$ ).

**표4. 재발 환자에서 IGF-1/IGF-1R 발현 양상과 TKI 반응의 상관관계**

Variable	반응률	p value	1년 무진행생존률	p value
IGF-1 (- vs. +)	91% vs. 43%	0.026	73% vs. 24%	0.016
IGF-1R (- vs. +)	86% vs. 64%	0.308	57% vs. 58%	0.235
유전형(19 del vs. L858R)	67% vs. 88%	0.312	52% vs. 71%	0.766

## IV. 고찰

본 연구는 EGFR 돌연변이 폐암 세포주에서 IGF-1 노출에 따른 세포 증식 소견을 확인하였다. 또한 EGFR 돌연변이 폐암에서 IGF-1 발현시 불량한 예후를 관찰하였다. Gefitinib 감수성에 대한 IGF-1의 영향을 평가하는 세포주 실험에서는 IGF-1 단독 또는 EGF 병용처리시 gefitinib 감수성이 소실되거나, 세포 증식 소견이 관찰하였다. 재발되어 TKI 치료를 받았던 재발 환자의 임상상을 분석하였을 때도 IGF-1 발현 양상에 따라 서로 다른 TKI 반응을 고찰하였다. IGF-1 노출에 따른 EMT 표지자 발현은 일부 세포주 (H1650)에서만 관찰되었다.

EGFR 돌연변이 세포주에서 EGF와 IGF-1를 동시 처리 후 고찰한 EMT 표지자의 발현은 각 세포주마다 다른 소견을 보였다. H1650 세포주에서는 고농도(10nM)의 IGF-1 처리시 E-cadherin 상피세포 표지자 발현이 감소되고  $\beta$ -catenin, vimentin 같은 간엽 세포 표지자 발현이 증가되어 EMT에 합당한 소견을 보였다. H1650 세포주는 PC9이나 HCC827과 달리 IGF-1R이 발현되고 이와 관련된 gefitinib 저항성을 가진다고 보고되었다 [34]. 상대적으로 활성화된 IGF

신호계가 H1650에서 EMT를 용이하게 유도했다고 추정되나 추가적인 연구로 확인이 필요하다. IGF 신호계를 활성화하기 위해 IGF-1 처리시 EGF도 동시에 노출 시켰는데, IGF-1 단독 처리만으로 EMT가 관찰되지 않았다(data not shown). 이는 EMT 유도를 위해 IGF-1 뿐 아니라 TGF- $\beta$  등과 같은 유도물질을 필요로 했던 유방암의 세포주 실험과 부합된다 [23]. 최근 폐암 세포주 실험에서도 TGF- $\beta$ 가 EMT를 유도한다고 보고하였는데 IGF-1R 발현 억제는 이러한 소견을 소멸시켰다 [35]. 이러한 소견들은 EMT 유도에 IGF 신호계가 중요한 역할을 하나, 종양 유형에 따라서 TGF- $\beta$ 와 같은 다른 유도물질과 상호작용이 필요함을 암시한다.

IGF-1 노출에 따른 세포 증식 증가 소견과 in vivo study에서 관찰된 IGF-1 양성 종양의 불량한 예후는 EGF 돌연변이 폐암이 IGF 신호계의 활성화에 따라 추가로 분류될 수 있음을 암시한다. 그러나, IGF-1 양성 환자의 짧은 TKI 무진행생존기간이 전체 생존률에 영향을 주었다고 해석될 수 있다. 그러나 다음과 같은 이유로 생존분석 모델에서 IGF-1 발현 여부가 예후에 더 큰 영향을 주었을 것으로 판단된다. 첫째, 무병생존 분석에서 IGF-1 양성 종양의 예후가 불량해지는 경향을 보였는데 이는 전체 생존분석과

일부 부합된다(보정 p value = 0.079). 둘째, IGF-1 양성군에서 재발시 TKI 치료 받은 환자의 비율은 IGF-1 음성군과 차이가 없었다 (54% [IGF+] vs. 55% [IGF-], p=0.948). 셋째, IGF-1 처리시 모든 세포주에서 gefitinib 감수성이 소실되어 gefitinib 비처리시 세포증식 소견과 큰 차이가 없었다 (그림 6,7).

EGFR 돌연변이 초기 폐암을 대상으로 IGF 신호계를 평가한 연구는 드물다. 수술적 치료를 받은 환자에서 IGF-1R 발현은 연구자마다 상이한 결과를 보고하였고, 대부분 EGFR 돌연변이 유무를 고려하지 않았다. 초기 폐암을 대상으로 한 후향적 연구에서, IGF-1R 발현은 불량한 예후(DFS)와 연관이 있었지만, 선암 환자에서만 통계적 차이를 보였다(n=182, p=0.040) [36]. 또 다른 연구에서는 IGF-1R 발현은 예후와 연관이 없었고(n=282, p=0.99), 소수의 EGFR 돌연변이 환자에서도 IGF-1R 발현에 따른 생존률의 차이는 관찰되지 않았다(n=12, p=0.39) [37]. 이는 본 연구의 IGF-1R 발현에 따른 생존 분석 결과와 일치하는 소견이다. 연구자마다 일관되지 못한 결과는 IGF-1R의 염색이나 판독 기준, 항체의 선택, 그리고 이질적인 대상군으로 일부 설명할 수도 있으나, 초기 폐암에서 IGF-1R 발현은 임상적 의미가 불분명하다고 판단된다.

최근 EGFR 돌연변이 진행성 폐암에서 IGF axis에 따른 임상 차이를 구분하려는 시도가 있으나 소규모 환자에서 후향적으로 진행된 관찰 연구라는 단점이 있다. 뇌전이 동반된 선암을 대상으로 시행된 후향적 연구에서는 phosphorylated IGF-1R (pIGF-1R)의 발현에 따라 불량한 예후를 보고하였다 [38]. EGFR 돌연변이군에서 pIGF-1R 발현에 따라 통계적으로 의미있는 생존률 차이가 관찰되었지만 (n=40, 13.5 vs. 34.8 months, p=0.012). 뇌전이된 일부 환자만 대상으로 하였다. EGFR 돌연변이 환자를 대상으로 시행된 또 다른 연구에서 IGF-1R 양성군이 음성군보다 더 높은 TKI 반응률(54% vs. 30%)을 보고하였지만 통계적 의미가 없었고(p>0.05) 약 30명 내외의 소규모 자료였다 [39]. 따라서 EGFR 돌연변이 진행성 폐암에서 IGF-1R 발현의 임상적 의미는 불분명하며 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구는 EGFR 돌연변이 폐암에서 IGF-1 발현뿐 아니라, IGF-1R 발현도 함께 평가하였다. IGF-1/IGF-1R 발현이 병기, 조직학적 소견 등과 연관된 점을 감안하였기 때문에 기존 연구와 달리 수술적 절제가 가능한 초기 여성 환자를 대상으로 하였다 [19, 37]. 종양에서 관찰된 IGF-1과 IGF-1R 발현은 대부분 세포질 염색으로 확인할 수 있었고, 상호 높은 상관관계를 보였다. 그럼에도 불구하고 IGF-1R

발현은 IGF-1 발현과 달리 예후와 연관이 없었다. 이는 IGF-1R 발현의 복잡한 세포내 양상을 현재 방법론으로 정확히 구별하기 어려운 점으로 일부 설명할 수 있다. IGF-1R은 insulin receptor, EGFR 등과 hybrid receptor를 형성할 뿐만 아니라 estrogen이나 insulin 등에 의해 발현되고 [16, 40], nucleus translocation 후 gene expression과 관여하는 등 복잡한 세포내 기전이 보고되고 있다 [41]. 그러나 현재의 면역조직화학 염색으로 IGF-1R이 발현된 위치를 정확하게 구별하기 어렵다고 판단된다. 또한, 본 연구의 사례처럼 IGF-1R은 동일 종양 내에서도 다양하게 발현하는 heterogeneity 소견이 있으나 이에 대한 임상적 의의가 밝혀지지 않았다. 마지막으로 IGF-1R 항체의 종류에 따라 염색 양상이 다를 수 있는데, 최근 두경부암 연구에서는 IGF-1R beta가 주로 세포질에서 발현되는 반면 IGF-1 alpha는 세포막 발현이 동반되었다 [42]. 본 연구에서는 IGF-1 발현 양상이 주로 세포질 내에서 균일하게 관찰되어 양성 여부 판단이 용이하였는데, 이로 인해 IGF-1R에 비해 IGF axis에 대한 높은 특이도(specificity)를 보였을 가능성이 있다.

본 연구를 통해 EGFR 야생형 폐암에서 IGF-1 발현의 역할이 평가되지 않았으나, 부가적으로 12명의 EGFR 야생형 환자의



임상상을 분석할 수 있었다. 전체 생존분석(overall survival analysis)시, 병기에 따라 예후가 다른 경향을 보였으나( $p=0.13$ ), IGF-1 양성( $p=0.54$ ) 그리고 IGF-1R 양성( $p=0.54$ )은 예후와 연관을 보이지 않았다. EGFR과 IGF-1R의 crosstalk이 존재하며 [20, 21], EGFR 돌연변이에 따라 IGF-1R 발현에 차이가 있다는 *in vivo* 연구 결과를 고려할 때 [19], 통계 분석상의 한계가 있지만 IGF 신호계 활성화는 EGFR 야생형보다는 돌연변이 종양에서 임상적 의미를 가질 것으로 추정된다.

본 연구에서 관찰된 소견은 EGFR 돌연변이 폐암이 IGF-1 발현에 따라 각기 다른 군으로 분류될 수 있음을 시사한다. 이는 임상적으로 중요한 소견으로 불량한 예후를 가진 환자에게 다른 치료적 접근을 고려할 수 있다. 특히 재발된 IGF-1 양성 EGFR 돌연변이 폐암의 낮은 TKI 반응률과 짧은 생존기간은 이레사나 타세바와 같은 기존 TKI 투여 외에 다른 치료 전략이 필요할 것으로 보인다. 예후가 불량한 EGFR 돌연변이 폐암의 치료 전략으로 최근 개발된 3세대 EGFR TKI 투여를 고려할 수 있다. 이러한 약제는 돌연변이 유전자에 결합하여 비가역적인 EGFR kinase 억제를 보인다 [43]. IGF 신호계 활성화로 인해 이레사에 내성을

보이는 H1650도 3세대 EGFR TKI 감수성을 보여 [34, 43], IGF-1 양성 EGFR 돌연변이 폐암에 효과적일 가능성이 있다. 그러나 IGF 신호계 활성화 상태에서 3세대 TKI의 효과 여부에 관해선 임상연구가 부족하다. 다음으로 불량한 치료 경과를 보이는 IGF-1 양성 종양에 대해 IGF-1R을 표적으로 하는 약제와 기존 TKI를 병용 투여하는 전략도 고려할 수 있다. IGF-1R에 대한 단클론항체(monoclonal antibody)인 figitumumab은 최근 3상 비교연구에 세포독성 항암치료와 병합시 효과를 입증하지 못했으며(HR=1.18, p=0.06), 대조군에 비해 심각한 부작용의 빈도가 높았다(p<0.01).[44] 그러나 대상군이 EGFR 돌연변이 빈도가 낮은 비선암을 대상으로 하였으며 독성이 많은 세포독성 항암제와 병용 투여하였다. 따라서 IGF-1 양성 EGFR 돌연변이 환자에서 부작용이 상대적으로 경미한 EGFR TKI와 IGF-1R 억제제를 병용 투여하는 전략이 가능하다.

본 연구에 존재하는 몇 가지 단점은 다음과 같다. 우선 IGF-1 발현에 따른 불량한 예후를 설명하기 위해 구체적인 downstream 경로의 활성화를 확인하는 과정이 없었다. 또한 제한된 수의 세포주가 사용되어 IGF-1 발현에 따른 EMT 일반화 확인에 한계가 있었다. 특히 일부 세포주에서만 관찰된 EMT 표지자 발현은

웨스턴블로팅을 통해 확인되었을 뿐 단백질의 세포내 변화는 확인하지 못하였다. 그러나 기존 연구와 달리 분자생물학적으로 균일한 성격의 EGFR 돌연변이 폐암에서 IGF-1 발현의 의의를 검증한 본 연구 결과는 폐암의 다양한 임상상을 이해하는데 기여할 뿐 아니라 추후 연구를 거쳐 새로운 치료법에 대한 근거가 될 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011; 29: 2866-2874.
2. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 339-346.
3. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121-128.
4. Choi CM, Kim MY, Lee JC, Kim HJ. Advanced Lung Adenocarcinoma Harboring a Mutation of the Epidermal Growth Factor Receptor: CT Findings after Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. *Radiology* 2014; 270: 574-582.
5. Sugio K, Uramoto H, Onitsuka T et al. Prospective phase II study of gefitinib in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *Lung Cancer* 2009; 64: 314-318.
6. Sasaki H, Shimizu S, Endo K et al. EGFR and erbB2 mutation status in

Japanese lung cancer patients. *Int J Cancer* 2006; 118: 180-184.

7. Kim YT, Kim TY, Lee DS et al. Molecular changes of epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS and their impact on the clinical outcomes in surgically resected adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2008; 59: 111-118.

8. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1815-1822.

9. Goss GD, O'Callaghan C, Lorimer I et al. Gefitinib versus placebo in completely resected non-small-cell lung cancer: results of the NCIC CTG BR19 study. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3320-3326.

10. Ahn MJ, Lee J, Park YH et al. Korean ethnicity as compared with white ethnicity is an independent favorable prognostic factor for overall survival in non-small cell lung cancer before and after the oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor era. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1185-1196.

11. Bauml J, Mick R, Zhang Y et al. Determinants of survival in advanced non-small-cell lung cancer in the era of targeted therapies. *Clin Lung Cancer* 2013; 14: 581-591.

12. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 535-546.

13. Kim WY, Jin Q, Oh SH et al. Elevated epithelial insulin-like growth factor

expression is a risk factor for lung cancer development. *Cancer Res* 2009; 69: 7439-7448.

14. Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4985-4995.

15. Jenkins PJ, Frajese V, Jones AM et al. Insulin-like growth factor I and the development of colorectal neoplasia in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3218-3221.

16. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 591-602.

17. Wang Z, Wang Z, Liang Z et al. Expression and clinical significance of IGF-1, IGFBP-3, and IGFBP-7 in serum and lung cancer tissues from patients with non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1437-1444.

18. Vlachostergios PJ, Gioulbasanis I, Kamposioras K et al. Baseline insulin-like growth factor-I plasma levels, systemic inflammation, weight loss and clinical outcome in metastatic non-small cell lung cancer patients. *Oncology* 2011; 81: 113-118.

19. Kim JS, Kim ES, Liu D et al. Prognostic implications of tumoral expression of insulin like growth factors 1 and 2 in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2014; 15: 213-221.

20. Morgillo F, Woo JK, Kim ES et al. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 2006; 66: 10100-10111.
21. van der Veeken J, Oliveira S, Schiffelers RM et al. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9: 748-760.
22. Morgillo F, Kim WY, Kim ES et al. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2795-2803.
23. Walsh LA, Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-beta1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 10.
24. Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA et al. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2479-2488.
25. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009; 174: 1588-1593.
26. Thompson EW, Williams ED. EMT and MET in carcinoma--clinical observations, regulatory pathways and new models. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:

591-592.

27. Mani SA, Guo W, Liao MJ et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715.

28. Hugo H, Ackland ML, Blick T et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 2007; 213: 374-383.

29. Lee TK, Poon RT, Yuen AP et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5369-5376.

30. Rho JK, Choi YJ, Lee JK et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer* 2009; 63: 219-226.

31. Zhau HE, Odero-Marah V, Lue HW et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 601-610.

32. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981.

33. Choi YH, Lee JK, Kang HJ et al. Association between age at diagnosis and the presence of EGFR mutations in female patients with resected non-small cell lung



cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1949-1952.

34. Choi YJ, Rho JK, Jeon BS et al. Combined inhibition of IGFR enhances the effects of gefitinib in H1650: a lung cancer cell line with EGFR mutation and primary resistance to EGFR-TK inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 381-388.

35. Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraros C et al. IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations. *Sci Rep* 2013; 3: 2560.

36. Nakagawa M, Uramoto H, Oka S et al. Clinical significance of IGF1R expression in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2012; 13: 136-142.

37. Cappuzzo F, Tallini G, Finocchiaro G et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Ann Oncol* 2010; 21: 562-567.

38. Wu PF, Huang WC, Yang JC et al. Phosphorylated insulin-like growth factor-1 receptor (pIGF1R) is a poor prognostic factor in brain metastases from lung adenocarcinomas. *J Neurooncol* 2013; 115: 61-70.

39. Chen B, Xiao F, Li B et al. The role of epithelial-mesenchymal transition and IGF-1R expression in prediction of gefitinib activity as the second-line treatment for advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer Invest* 2013; 31: 454-460.

40. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M et al. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 18447-18453.

41. Sarfstein R, Pasmanik-Chor M, Yeheskel A et al. Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 2766-2776.
42. Mountzios G, Kostopoulos I, Kotoula V et al. Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) expression and survival in operable squamous-cell laryngeal cancer. *PLoS One* 2013; 8: e54048.
43. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014; 4: 1046-1061.
44. Langer CJ, Novello S, Park K et al. Randomized, phase III trial of first-line figitumumab in combination with paclitaxel and carboplatin versus paclitaxel and carboplatin alone in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2059-2066.

# Abstract

Significance of insulin-like growth factor-1  
expression in epidermal growth factor receptor  
mutant lung cancer

Im Il Na

Department of Medicine

Seoul National University College of Medicine

**Background:** EGFR (epidermal growth factor) mutations are predominantly found in female, adenocarcinoma, and never smokers. Recently, clinical benefits of treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as Iressa and Tarceva has been established in EGFR mutated lung cancer with advanced stage. However, in early staged lung cancer, clinical significance of EGFR mutation has been unknown.

IGF-1 plays an important role in cancer proliferation and inhibition of apoptosis. IGF-1 that can be produced by tumor cells is also associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), one of potential mechanisms of

drug resistance. Although higher expression of IGF-1 has been reported in EGFR mutated tumors than wild type, its significance remains uncertain.

The aim of this study is to investigate the significance of IGF-1 expression in EGFR mutant lung cancer using cell lines and analyzing clinicopathological data.

**Methods:** 1) in vitro study: EGFR mutated lung cancer cell lines (H1650, PC9, HCC827/HCC827 (GR), HCC4006) were used and cells were treated with EGF and IGF-1. Western blotting was employed to investigate the expression of EMT markers including E-cadherin,  $\beta$ -catenin, vimentin. MTT assay was applied to evaluate cell proliferation after EGF and IGF-1 exposure. Effect of IGF-1 on gefitinib sensitivity was analyzed in two groups of gefitinib sensitive and refractory cell lines.

2) in vivo study: female patients with EGFR mutated lung cancers who received surgical resection between January 2005 and March 2011 were included. Female patients were selected to construct the homogeneous population in terms of smoking history and histology. Immunohistochemical staining of IGF-1 and IGF-1R using tissue microarray were performed and

their intensity was used to determine positivity. Clinical findings and their associations with IGF-1 and IGF-1R expression were evaluated. Additionally, TKI responsiveness was analyzed according to IGF-1 and IGF-1R expression.

**Results:** Heterogeneous patterns of EMT marker expression were observed in cell lines. Consistent features with EMT were observed only in H1650 cell line showing decreased E-cadherin expression along with increased expression of  $\beta$ -catenin and vimentin. MTT assay in each cell line suggested additional effect of IGF-1 on cell proliferation. When effect of IGF-1 on gefitinib sensitivity was assessed after confirmation of gefitinib sensitivity in each cell line, cell proliferation in gefitinib refractory cells and decreased sensitivity in gefitinib sensitive cells were observed with combined treatment of IGF-1 and EGF.

Analysis of clinicopathological data of 42 female patients was performed. Positive IGF-1 were observed in 38% (n=16) and its expression were more frequent in IGF-1R positive tumors than IGF-1R negative tumors (56% vs. 7%, p=0.012). IGF-1 positivity was associated with poor prognosis (adjusted HR=10.1, p=0.012). However, survival outcome was not different according to IGF-1R positivity (p=0.798, log-rank test). Analysis of TKI response in

recurred patients revealed inverse correlation of IGF-1 positivity and TKI response rates (43% [IGF-1+] vs. 91% [IGF-1-],  $p=0.026$ ). In contrast, TKI response rates were not different according to IGF-1R positivity (64% [IGF-1R+] vs. 86% [IGF-1R-],  $p=0.308$ ).

**Conclusion:** Different cell proliferation, survival, and TKI response were suggested in IGF-1 expressed EGFR mutated lung cancer. New treatment strategy to overcome poor outcome in IGF-1 positive tumors may be needed through further studies.

---

**Keywords:** lung cancer, IGF-1, EGFR mutation

**Student number:** 2007-30972