

대장암에서의 nm23과 CD44 단백질 발현에 대한 면역조직학적 분석

신동일 · 이기형 · 윤 충 · 이주희*

경희대학교 의과대학 외과학교실 및 해부병리학교실*

= Abstract =

Immunohistochemical Study of Expression of nm23 and CD44 Protein in Colorectal cancer

Dong-Il Shin, M.D., Kee-Hyung Lee, M.D., Choong Yoon, M.D.
and Ju-Hie Lee, M.D.*

Department of Surgery and Pathology, Kyung-Hee University Hospital, Seoul, Korea*

Gene expression of the nm23 and CD44 has been investigated in number of tumors, including colorectal cancer, breast cancer, and hepatocellular carcinoma. This study was conducted to clarify the association between nm23 and CD44 protein expression and metastatic potential in human colorectal cancer. To elucidate the role of the nm23 and CD44 in human colorectal cancer, sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from 59 primary colorectal cancer were stained immunohistochemically against nm23 and CD44 proteins. Expression of the nm23 protein is not significantly correlate with Dukes' stage and recurrence. However, the expression of the CD44 protein is significantly higher in Dukes stage C as comparing with stage B.

Key Words: Colorectal cancer, nm23, CD44, Recurrence

서 론

악성 종양에 있어서 임상적으로 가장 문제가 되는 것이 전이와 재발이다. 전이는 여러 단계를 거쳐 이루어진다¹⁾. 먼저 원발 종양에서 떨어져 나온 세포가 세포외 간질에서 림프계, 혹은 혈관계를 침입하여 이것을 통해 다른 기관의 모세혈관에 침윤하여 그 기관에서 증식함으로써 전이된다.

nm23 유전자는 유방암, 위암 등에서 그 발현이 감소 되었을때 전이가 증가 된다는 사실 때문에 전이억제 유전자로 알려져 있다^{10,19)}. 그러나, 대장암에서는 논

란이 있는 상태로, 암전이 억제기능이 있다는 보고와²⁵⁾, 이를 부정하는 보고가 있어⁹⁾ nm23 유전자의 단백질 발현에 대해 명확히 밝혀지지 않은 상태이다. nm23은 17번째 유전자의 장완에(17q22) 위치하고, 분자량 17 kDa의 152 아미노산으로 구성된 핵단백질과 세포질단백을 생성한다²⁵⁾.

CD44는 임파구의 수용체로 기능하는 세포막 당단백질로서 hyaluroate와 collagen에 결합하고, 종양 세포에서도 발견 된다고 한다²⁰⁾. 세포와 세포, 세포와 간질 사이의 결합에 관여하여 종양세포의 전이에 관계할 것이라는 보고가 있다¹³⁾. 정상 대장 점막에서는 CD44의 발현이 감소하고 종양세포에서는 CD44의 발현이

증가한다는 보고가 있다²⁶⁾. 위암, 대장암, 방광암과 혈액종양 등에서 증가한다고 한다^{7,13,17)}.

대상 및 방법

1) 연구대상

1985년 1월 부터 1993년 12월까지 경희대학교 의과대학 외과학교실에서 대장암으로 수술받은 환자중 파라핀 포매조직의 이용이 가능한 듀크씨 분류법 B, C 인 환자 59예를 대상으로 재발한 군과 재발하지 않은 군으로 나누어서 연구를 시행하였다. 재발하지 않은 환자들은 5년 이상 생존하였으며, 마지막 외래 추적관찰시 임상적으로 재발의 증상 및 징후가 없고, 흉부 X선 촬영과 복부 초음파 검사상 재발의 소견이 없는 환자들이었으며, 수술전 항암요법 및 방사선 치료를 받은 환자는 연구대상에서 제외하였다. 병기 B인 32예중 재발은 16예, 재발하지 않은 군은 16예였고, 병기 C인 27예중 재발은 18예, 재발하지않은 군은 9예였다(Table 1). 환자의 평균 연령은 51세였고 26세부터 82세까지 분포하였으며, 남성은 38예이고 여성은 21예였다(M:F=1.8:1). 전체 평균 추적 일수는 47개월이었고 재발하지 않은 군의 평균 추적 일수는 약 88개월이었다.

2) 면역조직학적 염색방법

파라핀 포매된 조직을 4 um 두께의 조직 절편으로 만들어 Xylene 과 알코올에 처리한후 증류수로 흡수시킨후 내재성 과산화수소의 활성을 제거하기 위하여 3%과산화수소에 30분간 처리한후 0.1 M의 tris buffered saline(이하 TBS로 약함. pH 7.6)으로 5분간 2회씩 세척하였다. 1차 및 2차 항체에 대한 결합을 억제시키기 위해 protein blocking agent (LSAB kit, DAKO)에 20분 작용시켜 여분의 용액을 제거하였다. 일차 항체로는 nm23에서 nm23-H1

(NM301) mouse monoclonal IgG2a, Santa Cruz Biotechnology을 사용하고, CD44는 CD44 mouse monoclonal IgG2a, Novocastra Lab.사용하였다. 이 일차항체를 TBS로 50배 희석하여 humidity chamber내에 있는 각각의 조직절편에 가하여 1시간 동안 반응시켰다. 그 후에 TBS로 5분간 2회에 걸쳐 세척한후 DAB chromogen(DAKO)을 acetate buffer(0.1 M, pH7.4)와 혼합한 후 다시 3%과산화수소를 첨가하여 기질용액을 만들어 조직절편에 가하고 염색여부를 판단한 다음 증류수로 세척하고 hematoxyline으로 대조 염색하여 polymount로 봉입한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

3) 평가 방법

면역조직화학적 염색의 평가는 종양 조직에서 염색된 범위를 기준으로 하였다. nm23에서는 0~30%: grade 1, 30~60%: grade 2, 60~100%: grade 3로 분류하였으며, CD44에서는 0~10%: grade 1, 10~30%: grade 2, 30~60%: grade 3, 60~100%: grade 4로 분류하였다. chi-square test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1) 병소의 위치와 수술 방법

병소의 위치는 직장암이 25예, 에스상 결장암이 17예, 하행결장암이 1예, 간곡암이 5예, 상행결장암이 9예, 맹장암이 2예였다. 각 병소에 대해 복회음 절제술을 10예, 저위 전방 절제술을 20예, 전방 절제술을 12예, 좌반 결장 절제술을 1예, 우반 결장 절제술을 16예 시행하였다.

2) nm23단백 발현과 병기, 재발 및 종양의 크기와의 관계

nm23 단백질발현은 듀크씨 분류법 B 32예중 grade 1, 2가 15예(47%), grade 3가 17예이고(53%, Fig. 1), 병기 C 27예에서 grade 1, 2가 18예(67%, Fig. 2), grade 3가 9예로(33%) 병기 B에서 발현율이 높게 나타났지만, 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p<0.25, Table 2). 재발하지 않은 군 25예에서 grade 1, 2가 11예(44%), grade 3가 14예(56%),

Table 1. Relationship between stage & recurrence

	No recurrence	Recurrence
Stage B	16	16
Stage C	9	18

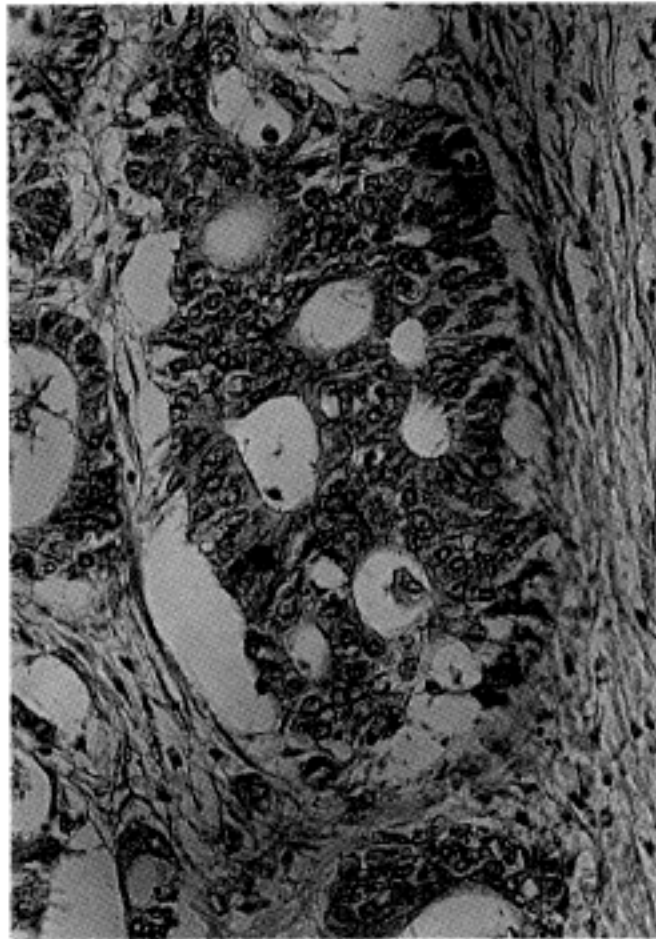


Fig. 1. Immunohistochemical stain of nm23 in colorectal cancer.
Grade 3 immunoreactivity in stage B, no-recurrence group.

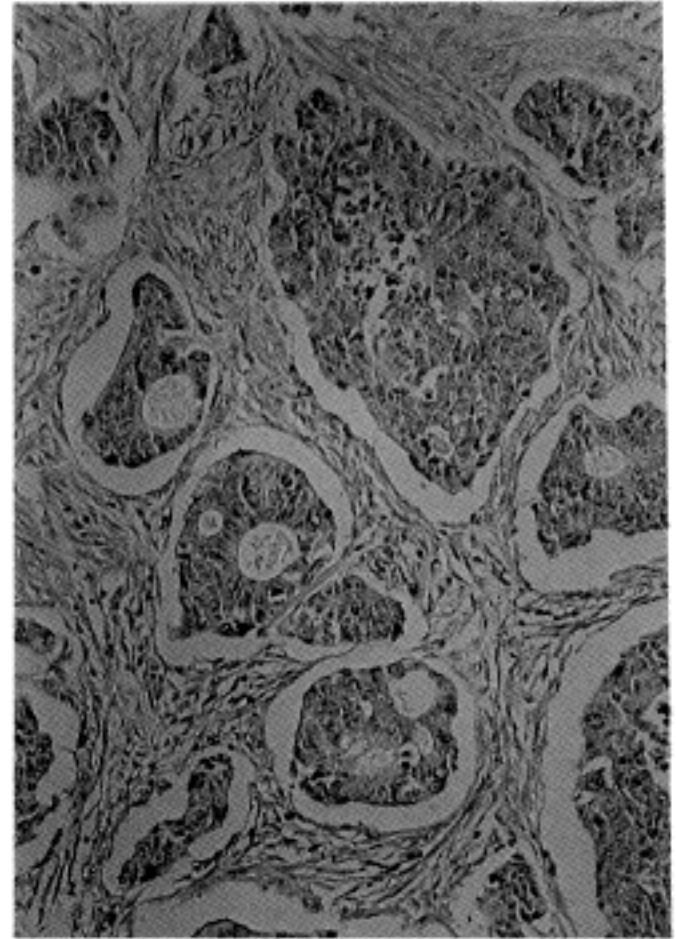


Fig. 2. Immunohistochemical stain of nm23 in colorectal cancer.
Grade 1 immunoreactivity in stage C, recurrence group.

Table 2. Result of nm23 immunohistochemical stain

	Immunoreactivity		p-value
	Grade 1, 2	Grade 3	
Stage			<0.25
B	15	17	
C	18	9	
Recurrence			<0.25
No	11	14	
Yes	22	12	
Size			<0.01
≤5 cm	16	19	
>5 cm	17	7	

재발한 34예중 grade 1, 2가 22예(65%), grade 3가 12예로(35%) 재발하지 않은 군에서 발현율이 높게 나타났지만, 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p < 0.25$, Table 2). 그리고, mucinous와 poor-

ly differentiated type 6예중 grade 1가 3예, grade 2가 3예로서 nm23단백에 대한 염색 발현이 낮았다. 또한, 종양의 크기가 5 cm 이하에서는 grade 1, 2가 16예(46%), grade 3가 19예고(54%), 5 cm 보다 클 때는 grade 1, 2가 17예(71%), grade 3가 7예로(29%) 종양의 크기가 5 cm 이하일 때 발현율이 높게 나타났지만 통계학적 유의성은 없었다($p < 0.01$, Table 2).

3) CD44단백 발현과 병기, 재발 및 종양의 크기와 의 관계

CD44단백 발현은 듀크씨 분류법 B 32예에서 grade 1, 2가 27예(Fig. 3), grade 3, 4가 5예고, stage C 27예에서 grade 1, 2가 16예, grade 3, 4가(Fig. 4) 11예로서 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다($p < 0.05$, Table 3). 재발하지 않은 25예에서는 grade 1, 2가 16예, grade 3, 4가 9예이고, 재발한 34예에서는 grade 1, 2가 27예, grade 3, 4가 7예로서 동

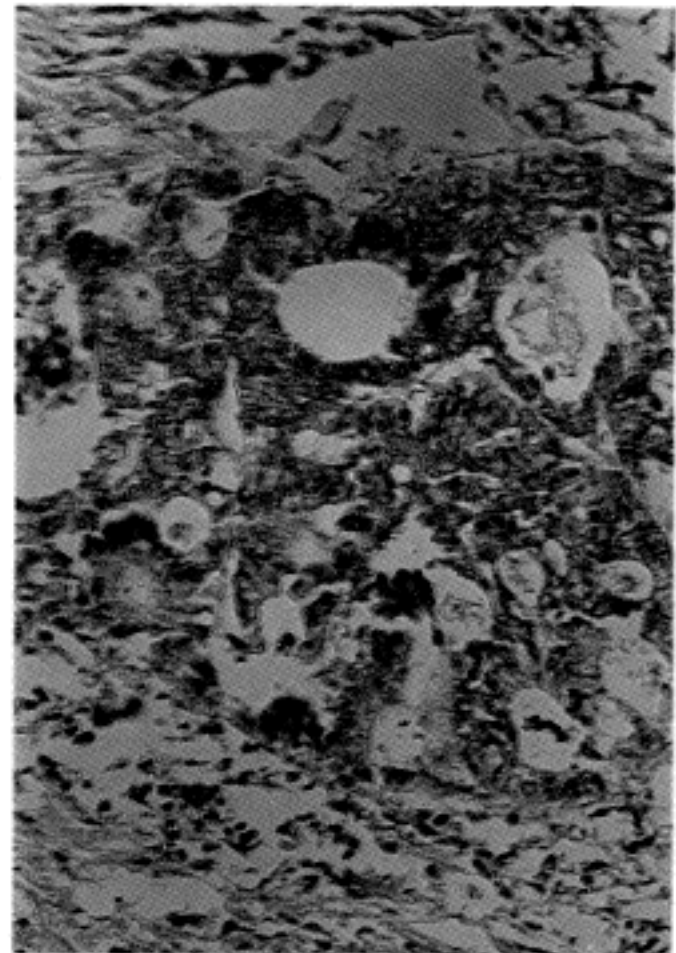
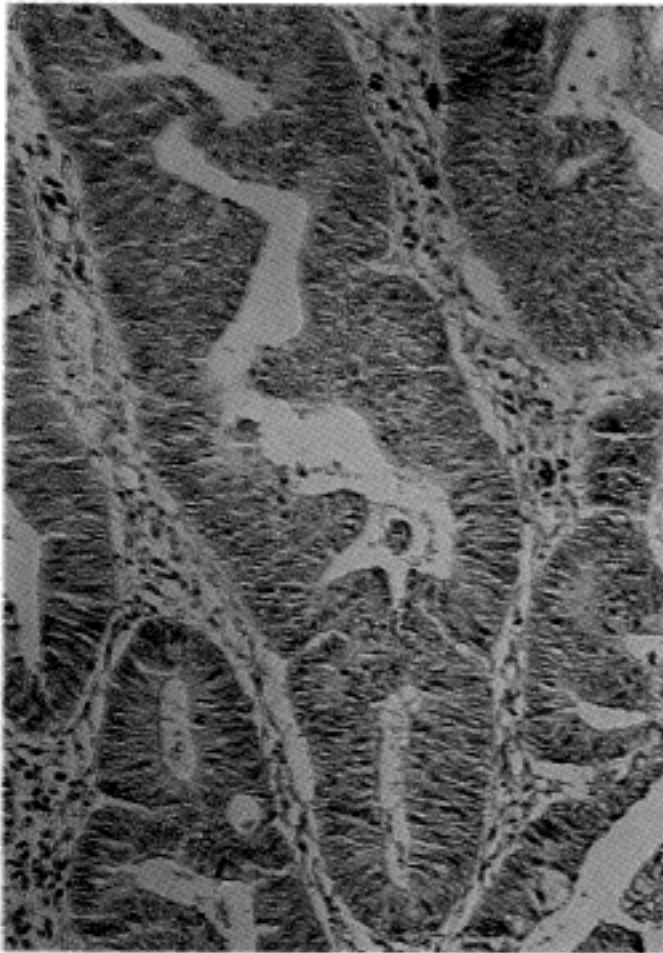


Fig. 3. Immunohistochemical stain of CD44 in colorectal cancer.
Grade 1 negative immunoreactivity in Stage B, no-recurrence group.

Fig. 4. Immunohistochemical stain of CD44 in colorectal cancer.
Grade 3 immunoreactivity in stage C, recurrence group.

Table 3. Result of CD44 immunohistochemical stain

	Immunoreactivity		p-value
	Grade 1, 2	Grade 3, 4	
Stage			<0.05
B	27	5	
C	16	11	
Recurrence			<0.25
No	16	9	
Yes	27	7	
Size			<0.25
≤5 cm	28	8	
>5 cm	14	9	

%) 통계학적 의미는 없었다($p < 0.25$, Table 3).

고 찰

악성 종양 환자에 있어서 전이 및 재발은 예후와 밀접한 관계를 가지고 있다. 종양 조직에서 재발과 전이에 대한 정보를 정확히 얻을 수 있다면 환자의 치료에 유익하리라 생각된다. 전이는 몇가지 단계를 거치면서 일어나는 것으로 알려졌다. 일련의 단계중 한 단계에 서라도 실패한다면 전이는 일어나지 않는다. 그러므로 전이는 숙주와 종양세포 사이의 계속되는 상호 작용속에서 살아남은 종양세포가 일으키는 것이다. 첫 단계로 종양에서 숙주기질로 종양세포의 침입이 일어나야 한다. 둘째로 혈관계나 림프계로의 침입후에 계속 증식하고 떨어져 나와 숙주의 면역체계를 피한후에 순환계를 떠다닌다. 셋째로, 다른 기관의 모세혈관의 내피세포나 기초막과 결합하여 그 기관의 기질로 빠져 나와 종양으로 증식하는 과정이 필요하다⁵⁾. 이런 복잡한

계학적 의미가 없었다($p < 0.25$, Table 3). 종양의 크기가 5 cm 이하에서는 grade 1, 2가 28예(78%), grade 3, 4가 8예이고(22%), 5cm 보다 클때는 grade 1, 2가 14예(61%), grade 3, 4가 9예로서(39

전이의 과정에 관여하는 여러 유전자가 알려져 있는데 어떤 유전자는 활성화를 통하여, 어떤 유전자는 정상 성장을 제어하는 기능을 비활성화 시킴으로써 이러한 암전이에 관여하게 된다.

암전이억제유전자로 알려진 nm23은 쥐의 흑색종 세포에서 암전이의 정도가 서로 다른 cell line을 연구하다가 K 1735 melanoma cell line에서 동정 분리되었다²¹. 이 유전자는 17번째 유전자의 장완에 위치하고 17 kDa의 152 아미노산으로 구성된 핵단백질과 세포질단백질을 생성한다. 이 단백질의 기능은 정확하게 알려져 있지 않지만, 이 단백질이 세포의 신호 전달, 증식과 분화의 조절과정에 중요한 역할을 할 것이라고 추측되고 있다^{11,16}. 이 유전자는 유방암, 위암²²을 포함한 여러 종양에서 발현이 감소되었을 때 전이가 증가된다고 보고되어 전이억제유전자라고 알려져 있다. 대장암과 nm23과의 관계는 여러 연구 결과가 차이를 있는데 Haut와 Steeg등⁹은 전이된 대장암에서도 nm23의 발현이 증가되어서 전이억제유전자로서의 기능이 없다고 하였고, 윤등¹¹은 대장암의 전이에서 단백질 발현이 관찰되어 국소 침윤과 원격전이에 관련된 의미 있는 상관관계를 발견할 수 없었다고 하며, Tannapfel과 Kockerling등은 병기와 임파절 전이에 따른 면역조직화학적 분석에서 그 발현이 차이가 있어 임상적으로 유의하다고 보고하였다²⁴. 저자들의 연구에서는 그 발현과 전이, 재발과의 통계학적 유의성의 관계를 발견할 수 없었지만, 그 수는 적으나 mucinous와 poorly difference type 6에 모두에서 nm23의 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 비특위암에서이기는 하지만 이등²¹도 조직학적 분화정도가 고분화일수록 nm23의 발현은 높게 나타났다고 보고하였다.

이에 대장암에서의 병기 및 재발과 관련된 nm23과의 상관관계를 알아보려고 한 본 실험에서는 암세포의 병기 재발 여부에 따른 nm23단백 발현의 의미있는 상관관계는 발견할 수 없었으나 60% 이상 염색되는 grade3의 경우 병기B(53%)에서 병기C(33%)보다 발현율이 다소 증가하는 경향이었고 재발안한 군(56%)에서도 재발한 군(35%)보다 발현율이 다소 증가하는 경향이었으나 통계적 의미는 없었다. 그러므로 nm23은 대장암에서 재발과 전이와는 상관관계가 없는 것으로 사료된다.

CD44는 임파구가 임파계의 내피세포와 결합하여 임파구를 재순환이나 활성화시키는 기전^{3,20}에 관여하는 귀소성 수용체로인 세포막 당단백질(Mr 80000~215000)로 cell adhesion molecule의 일종으로 알려져 있으며 조혈 세포, 적혈구, 내피 세포와 신경 세포등에서 발견된다¹⁴. hyaluronate, fibronectin과 collagen에도 결합하며, hyaluronate와 결합하여 세포의 성장을 촉진시키고 종양의 발육을 조절할 것이라고도 알려져 있다⁴. 종양세포에서도 발견되어 종양 세포의 세포와 세포, 세포와 간질사이의 상호작용에 관계하여 종양세포의 전이에 영향을 미칠 것으로 보고되고 있다¹⁵.

Wielenga등은 정상 대장 점막과 대장암에 대한 면역조직화학적 분석에서 정상 대장 점막보다 종양세포에서 CD44에 대한 발현이 증가한다고 보고하였다²⁰. Mulder등은 CD44의 여러 epitope 중 v6에 대한 연구에서 듀크씨 분류법과는 독립적인 예후인자로서 전이와 관련되어 있음을 밝히고 이런 환자에 있어서는 보조 요법을 시행 해야할 것으로 보고하였다¹⁸. Li등은 원발성 뇌종양과 전이성 뇌종양간의 면역세포화학적 연구에서 CD44의 발현이 전이성 뇌종양에서 의미있게 증가함을 발표하였고¹⁵, Kaufmann등은 유방암에서 v6 exon에 의해 encoding된 CD44단백이 의미있게 발현됨으로 예후추정인자로 유용하다고 주장하였다¹². 그러나, Friedrichs등은 유방암에서 CD44s나 CD44-6v등이 종양의 성장에는 관계가 없으면서 세포의 분화와 관계있다고 보고하였다⁶. 또한, Takeuchi등은 CD44v8-10이 간전을 동반한 대장암에서 의미있게 증가됨을 보고하였다²². 저자들의 연구에서 듀크씨 분류법에 따른 CD44의 발현은 병기 C에서 의미있게 증가되었지만, 재발여부에 따른 CD44의 발현은 통계학적으로 의미가 없었다.

이상의 결과로 대장암에서 듀크씨 분류법과의 관계를 밝히고, 재발과 전이정도를 예측하려 했던 본 연구에서 nm23은 병기 B, C와의 상관 관계는 통계학적으로 유의성은 검증되지 못하였고, 재발과의 관계도 유의성은 없는 것으로 밝혀졌다. CD44는 병기 B에서 병기 C에서 발현이 의미있게 증가되어 통계학적으로 의미있는 결과를 나타내었지만, 재발과는 관련이 없었다. 그러므로, 대장암에서 nm23의 예후인자로서의 기능은 의문시되며, CD44에서는 많은 variant에

대한 연구 및 유전자 수준에서의 연구등 다각적인 비교분석을 통하여 예후지표로서의 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

경희대학교 의과대학 외과학교실에서 1985년 1월에서 1993년 12월 사이에 대장암으로 수술을 시행받은 후 병리조직학적으로 확진된 환자중 파라핀 포매조직의 이용이 가능하고 외래추적관찰이 되었던 59예를 대상으로 nm23과 CD44단백질 발현과 전이 및 재발과의 상관 관계를 알아보기 위해 시행한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

nm23과 병기에 따른 관계는 듀크씨 분류법 B에서 grade 1, 2가 15예, grade 3가 17예이고, 병기 C에서는 grade 1, 2가 18예, grade 3가 9예로 유의한 차이를 보이지 않았다($p < 0.25$). nm23과 재발유무에 따른 관계는 재발하지 않은 군에서 grade 1, 2가 11예, grade 3가 14예이고, 재발한 군에서 grade 1, 2가 22예, grade 3가 12예로 유의한 차이를 보이지 않았다($p < 0.25$). 종양의 크기와 nm23단백 발현과의 관계는 종양의 크기가 5 cm 이하에서는 grade 1, 2가 16예, grade 3가 19예이고, 종양이 5 cm 보다 클 때는 grade 1, 2가 17예, grade 3가 7예로 유의한 차이를 보이지 않았다($p < 0.01$).

CD44와 듀크씨 분류법과의 관계는 병기 B에서 grade 1, 2가 27예, grade 3, 4가 5예이고, 병기 C에서 grade 1, 2가 16예, grade 3, 4가 11예로서 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다($p < 0.05$). CD44와 재발과의 비교에서는 재발하지 않은 군에서 grade 1, 2가 16예, grade 3, 4가 9예이고, 재발한 군에서 grade 1, 2가 27예, grade 3, 4가 7예로서 통계학적으로 의미있는 차이를 발견하지 못하였다($p < 0.25$). CD44와 종양의 크기에 따른 발현율의 차이를 비교하였을 때 5 cm 이하에서는 grade 1, 2가 28예, grade 3, 4가 8예고, 5 cm보다 클 때는 grade 1, 2가 14예, grade 3, 4가 9예로서 통계학적 의미는 없었다($p < 0.25$).

이상의 결과로 대장암 환자에서 nm23은 전이와 재발과의 상관관계는 없는 것으로 사료되며, CD44단백은 듀크씨 분류법 B, C에서 유의한 차이를 보이지만,

재발과는 관련이 없는 것으로 판단된다. 그러므로 CD44단백에서 독립적인 대장암 예후인자로서의 기능을 확인하기 위해서는 향후 표본을 증가시키고, 분자생물학적 기법을 이용한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) 윤성진, 윤완희: 대장직장암에서의 *P-glycoprotein*과 *nm23-H1 Protein*의 발현. 대한항문병학회지 10: 379, 1994
- 2) 이용진, 박성일, 임현목 등: 위선암에서의 nm23발현에 대한 면역조직화학적 분석. 외과학회지 49: 183, 1995
- 3) Arch R, Wirth K, Hofmann M, et al: *Participation in normal responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44*. Science 257: 682, 1992
- 4) Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A, et al: *Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in regulation of tumor development*. J Exp Med 180: 53, 1994
- 5) Fidler IF, Hart IR: *Biological diversity in metastatic neoplasm: Origin and implications*. Science 217: 998, 1982
- 6) Friedrichs K, Fanke F, Lisboa BW, et al: *CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer*. Cancer Reseach 55: 5424, 1995
- 7) Guo YJ, Liu G, Wang X, et al: *Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and netastasis in patient with gastric or colon cancer*. Cancer Res 54: 422 1994
- 8) Hart IR, Goode NT, Wilson RE: *Molecular aspects of the metastatic cascade*. Biochim Biophys Acta 989: 65, 1989
- 9) Haut M, Steeg PS, Willson JKV, et al: *Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential*. Journal of the National Cancer Institute 83: 712, 1991
- 10) Hirayama R, Sawai S, Takagi Y, et al: *Positive relation between expression of anti-metastatic factor(nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute 83: 1249, 1991

- 11) Kado O, Kasukabe J, Honma T, et al: *Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with nm23/nucleoside diphosphate kinase. Biochem Biophys Res Commun* 182: 987, 1992
- 12) Kaufman M, Heider K, Sinn HP, et al: *CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. Lancet* 345: 615, 1995
- 13) Koopman G, Heider KH, Horst E, et al: *Activated human lymphocytes and aggressive non-hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of cD44. J Exp Med* 177: 897, 1993
- 14) Leslie A, Goldstein, Eugene C, et al: *Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM(CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. Immunogenetics* 32: 389, 1990
- 15) Li H, Liu J, Hoffman M, et al: *Differential CD44 expression patterns in primary tumors and brain metastasis. British Journal of Cancer* 72: 160, 1995
- 16) Liotta LA, Steeg PS: *Clues to the function of nm23 and awd proteins in development, signal transduction and tumor metastasis provided by studies of dictyostelium discoideum. J Natl Cancer Inst* 82: 1170, 1990
- 17) Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, et al: *Non-invasive detection of malignant by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. BMJ* 308: 619, 1994
- 18) Mulder JWR, Kruyt P, Sewnath M, et al: *Colorectal cancer prognosis and expression of exon-6-containing CD44 proteins. Lancet* 344: 1470, 1994
- 19) Nakayama H, Yashui W, Yokozaki H, et al: *Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinoma. Jpn J Cancer* 84: 184, 1993
- 20) Seiter S, Arch R, Reber S, et al: *Prevention of tumor formation by anti-variant CD44. J Exp Med* 177: 443, 1993
- 21) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al: *Evidence of for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Inst* 80: 200, 1988
- 22) Takeuchi K, Yamaguchi A, Urano T, et al: *Expression of CD44 variant exon 8~10 in colorectal cancer and its relationship to metastasis. Jpn J Cancer Res* 86: 292, 1995
- 23) Tanabe K, Ellis LM, Saya H: *Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinoma and metastases. Lancet* 341: 725, 1993
- 24) Tannapfel A, Kockerling F, Katalinic A, et al: *Expression of nm23-H1 predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum* 38: 651, 1995
- 25) Wang L, Patel U, Ghosh L, et al: *Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. Cancer Research* 53: 717, 1993
- 26) Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJH, et al: *Expression of CD44 variant protein in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Research* 53: 4754, 1993
- 27) Yoshida K, Bolodeoku J, Sugino T, et al: *Abnormal retention of intron 9 in CD44 gene transcripts in human gastrointestinal tumors. Cancer Research* 55: 4273, 1995