대한대장항문학회지 제 18권 제 1호
J Korean Soc Coloproctol Vol. 18, No. 1, 2002

□ 원 저 □

인체 대장종양에서의 새로운 Heat Shock Protein의 발현

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 외과학교실, [1]내과학교실, [2]진단병리과학교실, [3]생명과학부

최대화 · 조홍래 · 고병균 · 나양원 · 남창우 · 김규열 · 임영철 · 박건춘 · 김도하[1] · 박재후[1] · 민영주[1] 서재희[2] · 박정우[3]

Expression of a Novel 90 kDa Heat Shock Protein in Colorectal Tumor

Dae Hwa Choi, MD., **Hong Rae Cho,** MD., **Byung Kyun Ko,** MD., **Yang Won Nah,** MD., **Chang Woo Nam,** MD., **Gyu Yeol Kim,** MD., **Young Cheol Im,** MD., **Kun Choon Park,** MD., **Do Ha Kim,** MD.[1], **Jae Hoo Park,** MD. **Young Joo Min,** MD.[1], **Jae Hee Suh,** MD.[2], **Jeong Woo Park**[3]

Departments of Surgery, [1]Internal Medicine and [2]Pathology, of Medicine, Ulsan University, Ulsan University Hospital, ment of Life Science, Ulsan University, Ulsan, Korea

Purpose: When cells are subjected to a wide varie stressful stimuli, they respond by increasing the sy specific stress proteins. Stresses include heat shoc deprivation, oxygen radicals, toxic metal and viral Major stress proteins are Hsp 27, Hsp 60, Hsp 70 (9), 90 (3) and Hsp 100 (1). Previously a novel 90 kDa s protein has been reported to be induced in fish ce virus infection. The novel 90 kDa stress protein is from well-known major stress protein in size, antig cellular localization. The novel 90 kDa stress pro found to be present in various kinds of cells in human cells and its expression was increased in h carcinomas. The purpose of this study is to evalua expression of the novel 90 kDa stress protein in h colonic mucosa of normal tissue, adenoma & adenoc cinoma using immunohistochemical method.
Methods: 85 colon tissues were screened for the exp sion of the novel 90 kDa stress protein; 85 normal c mucosa, 20 colonic adenoma and 65 colonic adenocarci ma. The tissues were stained with monoclonal anti against the novel 90 kDa stress protein. In scoring tissue sections with immunostained area above 10 %w decided to be positive and, among the positive, the sections were divided into three score, 1, 2, and 3 on the staining intensity and positive area proport tissue sections with immunostained area below 10%w decided to be negative and grouped into 0 score. Cor- relation of immunohistochemical expression was analysed by using SPSS version 10.0 statistically.
Results: The expression of the 90 kDa stress protei significantly different among normal colonic mucosa, adenoma, and colonic adenocarcinoma and the percent of positive samples were 14.1%, 80.5%, and 95.4% r spectively. This result suggests that the expressio the novel 90 kDa stress protein was extremely lo normal tissue but increased significantly in aden matous tissues.
Conclusions: The expression of the novel 90 kDa s protein was increased significantly with transform the normal colon tissue to malignancy. This sugges possibility that this novel 90 kDa stress protein p role in cancerous transformation of colon tissue. J **Soc Coloproctol 2002;18:1-6**

Key Words: Heat shock protein, Colorectal adeno Colorectal adenocarcinoma
열쇽단백, 결직장 선종, 결직장 선암종

책임저자: 최대화, 울산광역시 동구 전하동 290번지
울산대학교병원 외과학교실(우편번호: 682-714)
Tel: 052-250-7100, Fax: 052-236-5417
E-mail: dhchoi@uuh.ulsan.kr

이 논문은 2001년 대한대장항문학회 추계 학술대회에서 구연하였음.

서 론

열자극, 외상, 중금속, 출혈, 저산소증과 같은 자극이 세포 내 Heat Shock Protein (Hsps)의 생산을 유도시킨다. 이들 단백질은 유독한 영향으로부터 세포를 보호할 것이라고 추정하고 있다.[1] 또한 종양세포에서도 중요한 역할을 할 것으로 추정하고 있다.[1] 이미 알려진 stress protein은 Hsp27, Hsp 60, Hsp70, Hsp90, Grp78, Grp94이 있는데 울산대학교에서는 stress를 받은 어류세포인 CHSE-214(연어) cell에서 유도된 단백질로 stress를 받았을 때 발현이 증가되며 이미 알려진 stress protein과는 분자량 및 항원성에 있어 특성이 다른 새로운 90 kDa 단백질을 발견하였고 또한 어류세포뿐만 아니라 여러 종류의 인간 암 조직을 대상으로 한 연구에서도 선암의 경우 이 새로운 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였다.[6] 본 연구에서는 인간의 대장조직을 대상으로 하여 이 새로운 단백질의 발현여부를 파라

핀 포매 조직절편에 면역조직화학 염색법으로 대장의 정상조직, 양성종양, 암 조직의 병기에 따른 발현의 차이가 있는지를 확인하였다.

방 법

1) 연구 재료

1999년 7월부터 2000년 6월까지 울산대학교병원 외과에서 수술 받은 대장암 환자와 내과에서 내시경하 양성종양 절제술을 시행한 환자 총 85명과 각 조직의 정상점막을 대상으로 하여 새로운 Heat shock protein에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다.

2) 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 파라핀에 포매된 조직을 Xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀과 함수화를 시켰다. 비특이적인 단백질의 결합을 막기 위해 10%의 염소혈청으로 20분간 반응시키고 조직 내 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3% hydrogenoxide에 15분간 반응 시켰다. 그 후 증류수로 2번 세척하고 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)로 5분간 방치한 후 1：50의 희석된 비율로 일차항체를 각각 실온에서 2 시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직절편을 PBS로 5분간 3회씩 세척한 후 DAKO사의 LSAB (labelled streptavidine biotin) Kit를 사용하여 면역조직화학염색을 하였다. Biotin이 결합된 link antibody를 20분간 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. 발색반응은 AEC (3 amino-9-ethyl carbazole)를 이용하여 반응을 일으키고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 수성 메디아로 포매하고 현미경으로 검색하였다.

3) 면역조직화학적 염색의 결과 판정

결과는 광학현미경으로 관찰하였으며, 암과 양성종양의 인접 정상조직에서는 10% 이상 염색이 되는 경우를 양성으로 판정하였고 종양조직에서는 조직의 염색강도(staining intensity)를 4단계로 하고 염색이 적갈색으로 진한 경우를 3으로 하고 염색이 안 되는 경우를 0로 하고 중간을 1, 2로 판정하는 반 정량적 방법으로 하였고 종양세포의 염색정도(positive cell proportion)를 10% 이하; 1, 10% 1/3; 2, 3/1 2/3; 3, 2/3 이상; 4로 하였고 점수는 각각을 합하여 0; 0, 1 (+); 1 3, 2 (++); 4 5, 3 (+++); 6 7로 하였다.

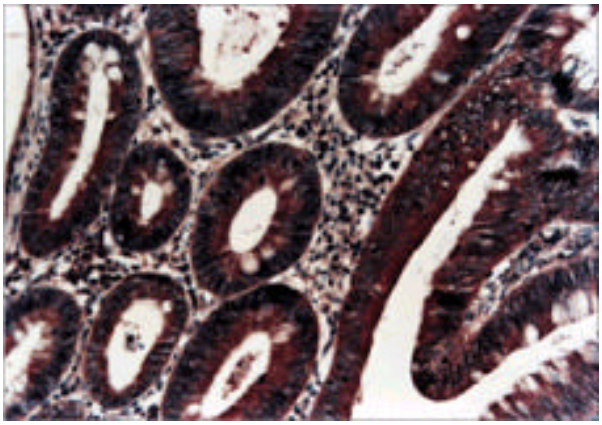

Fig. 2. Colonic adenoma and a novel 90 kDa heat shock protein expression. Positive staining (2+) cells are detected in some parts of adenoma (×200).

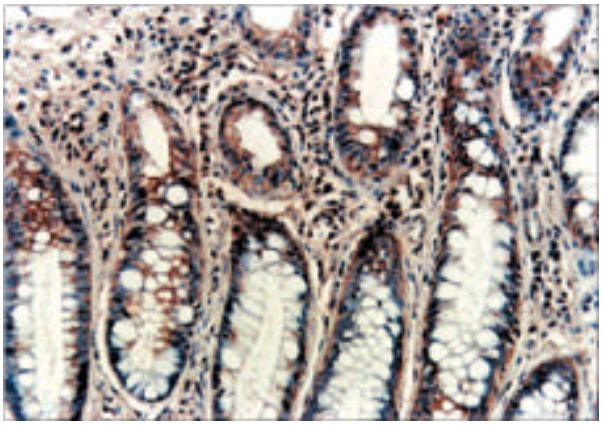

Fig. 1 Normal colon and a novel 90 kDa heat shock protein expression. A novel 90 kDa Hsp protein immunoreactivity are not detected in normal colonic mucosa (×200).

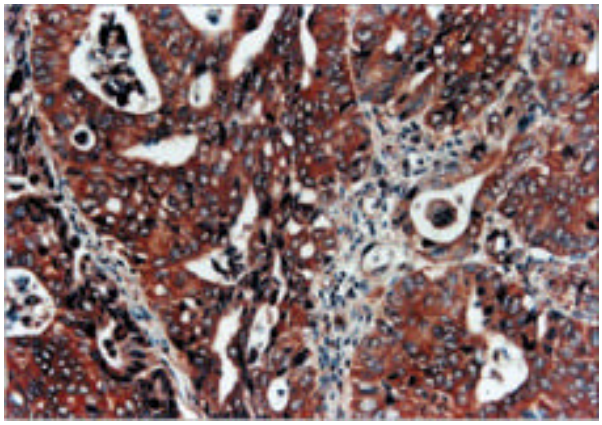

Fig. 3. Colonic adenocarcinoma and a novel 90 kDa heat shock protein expression. Strong positve staining (3+) patterns are detected in cancer cells (×200).

4) 통계학적 분석

새로운 Heat shock protein에 대한 대장의 정상조직, 양성종양, 암 조직의 병기, 혈관 침투여부, 조직의 분화도, 성별에 따른 발현의 차이의 유의성이 있는지 Chi-squre test를 SPSS version 10.0을 이용하였다.

결 과

1) 새로운 90 kDa heat shock 단백 발현과 대장조직

각 조직의 정상점막에서는 85예 중 12예(14.1%)에서만 양성으로 나와 각 암종과 선종 간의 통계학적인 유의성이 있었다(P=0.001)(Fig. 1). 85명의 대장악성종양과 양성종양 환자 중 선종의 경우 20명 중 16예에서 양성이었고(80%)(Fig. 2), 악성종양은 65명 중 62예가 면역조직화학염색에서 양성이어서(95.4%)(Fig. 3). 2개 조직 간의 유의성은 0.05로 통계학적인 상관관계가 있었고, 면역조직화학염색상 조직의 염색 강도와 종양세포의 염색정도의 합을 이용한 염색에서의 통계적 유의성이 2군 간에 있었다(P=0.039).

2) 새로운 90 kDa heat shock 단백 발현과 성비

대장암 환자의 성비로는 여자 : 남자는 각기 34명 : 31명으로 면역조직화학염색의 발현상 유의성이 없었다(P=0.07)(Table 1).

3) 조직의 분화도와 새로운 90 kDa heat shock 단백 발현

조직의 분화도로는 잘 분화된 조직과 분화가 나쁜 조직 간의 면역조직화학염색 발현상 유의성이 없었다(P=0.42)(Table 1).

4) 병기에 따른 새로운 90 kDa heat shock 단백 발현

병기의 분류에서는 65명 중 Dukes씨 분류로 A가 7명, B가 24명, C가 27명, D가 7명이었으며 각 병기 간 면역조직화학염색 발현상 유의성이 없었다(P=0.15)(Table 1).

5) 혈관 또는 림프관 전이와 새로운 90 kDa heat shock 단백 발현

대장암 환자의 절제된 종양조직에서의 혈관 또는 임파관 전이의 경우 Duke B의 경우 24예 중 10예이었

Table 1. Relations between a novel hsp 90 immunohistochemical expression

Variable	No. of patients	A novel hsp 90 expression score				P value concering a novel 90 expression
		0	1+	2+	3+	
Sex (cancer)						
Male	31	1	8	16	6	
Female	34	2	10	16	6	P=0.07
Histology						
Nomal tissue	85 (14.1%)	73	12	0	0	P=0.001
Adenoma	20 (80.0%)	4	5	11	0	P=0.039
AdenoCa	65 (95.4%)	3	19	31	12	P=0.05
Degree of differentiation						
Well differetiated	19	2	6	9	2	
Moderately diff.	34	1	7	19	7	P=0.42
Poorly diff.	3	0	1	2	0	
Mucinous	2	0	1	0	1	
Dukes' stage						
A	7	0	4	1	2	
B	24	0	8	11	5	P=0.15
C	27	3	5	15	4	
D	7	0	2	4	1	
Vessel &						
Lymphatic +	33	2	6	16	5	P=0.46
Invasion −	32	1	6	16	9	

고 C의 경우 27명 중 14예를 차지하였으나, 면역조직화학염색 발현상 유의성이 없었다(P=0.46)(Table 1).

고 찰

환경적인 요소가 직접적으로 돌연변이의 원인이 되거나 혹은 DNA손상의 원인이 되는 산소라디칼(oxide radical)을 발생시켜 간접적으로 세포반응을 변화시킨다. 환경적 요인이 세포의 분열과 대사를 자극하여 대장상피세포가 돌연변이가 발생되기 쉬운 조건을 제공한다.[2]

암유전자와 억제유전자의 발현빈도를 보면 30 65 %만을 차지하고 있어[3] 단일 종양 표지자로 쓰기에는 미흡하여 다발성 종양 표지자로 대장암의 발견에 이용하고자 많은 노력을 하고 있는 반면에 새로운 90 kDa stress protein의 경우 본원에서는 수술 시 경막하 동통조절을 한 후에 얻은 대장암조직에서 면역조직화학염색결과 95.4%에서 발현이 되어 기존에 알려진 stress protein보다는 발현이 많이 되었으며 적절한 단백질의 양의 분자생물학적 추정시 종양 표지자로서의 가능성이 있다고 판단하였다. 또한 양성 대장종양의 경우에도 80%가 발현되며 악성종양에 비해 발현 염색도가 미약하나 악성종양의 경우 발현이 강하게 나타나 통계학적으로 의의가 있게 대장의 종양형성에 강력히 관여할 것이라 추정된다. 이미 알려진 stress protein은 lower molecular hsp, hsp 60, hsp 70, hsp 90, grp (glucose regulated protein) 78, grp 94가 있는데 울산대학교 생명공학부에서는 infectious hematopietic necrosis virus (IHNV) 감염으로 인하여 stress를 받은 어류세포인 CHSE-214 (연어) 세포주에서 유도된 단백질로 단백질 감염, 열속 2-mercaptopurine, cooper sulfate, cadmium sulfate와 같은 stress를 받았을 때 발현이 증가되며,[4] 기존에 알려진 Hsp 90과는 western blotting에서 단백질의 크기가 다르게 발현하였으며, 이미 알려진 stress protein과는 분자량 및 항원성에 있어 특성이 다른 새로운 90 kDa 단백질을 발견하였고 이 단백질의 유전자는 2,750 bp로 확인되었고 730개의 아미노산으로 구성됨을 알 수 있었다.[5] 또한 어류세포뿐만 아닌 쥐 등 설치류 등과 같은 동물과 사람의 세포에도 존재하고 있는 것으로 밝혀졌으며 여러 종류의 인간 암조직을 대상으로 한 연구에서도(본 교실 논문) 선암의 경우 이 새로운 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였다.[6] 따라서 본 연구에서는 인간의 대장 점막조직을 대상으로 하여 이 새로운 단백질의 발현여부를 울산대학교 생명공학부에서 제작한 novel 90 kDa stress protein에 대한 단일 클론항체를 이용하여 파라핀 포매 조직절편에 면역조직화학 염색법으로 대장의 정상조직, 양성종양, 악성종양의 병기에 따른 발현의 차이가 있는지를 확인을 하였다. 이는 기존에 알려진 대장암의 병인론에 의하면 암으로 발전하기까지 각 단계에서 염색체의 이상에 의한 변이로 발생한다고 하나 각 염색체에 대해 충분한 발현이 안 되는 것으로 보고하고 있다.[7,8] 또한 Heat shock protein이 종양세포형성에 중요한 역할을 할 것으로 보고되고 있으나 모든 암 조직과 양성종양에서 발현이 안 되는 것으로 보고되고 있다. Hsps가 비록 중요한 세포 내 효과이나 손상에 대한 인간의 반응에 대한 관련성은 잘 알려져 있지 않아 동물실험에서 추론하고 있다. 알려진 Heat shock proteins (Hasp)의 역할의 경우 세포의 주기와 종양형성에 관여하며 이미 알려진 바로는 세포 내 단백질의 3, 4차 구조를 이루는 데 주요한 샤프론의 역할을 하게 된다.[9]

또한 종양세포에서도 중요한 역할을 할 것으로 추정하고 있다. Hsp90 α와 cyclin D1의 mRNA의 레벨이 암이 아닌 조직에서보다 암조직에서 의미심장하게 높다. Hsp90 α는 인간의 유방암의 증식과 관계가 있고 Hsp90 β는 암조직에서 발현되나 세포의 증식과는 관련성이 없다. Hsps는 세포주기의 조절에 관계가 되며, 전사된 유전자 생성물의 고유의 형태를 유지시키는 역할을 한다. 또한 종양형성으로 이끄는 다단계과정의 필수적인 역할을 한다. Hsp90의 면역조직화학염색에서 진행성 유방암의 경우 89.5%에서 양성으로 나왔으며 암세포에서는 핵과 세포질에서 Hsp90이 많이 염색되었다. 새로운 90 kDa Hsp의 경우 대장암조직의 경우 95.4%에서 발현이 되어 상대적으로 높게 발현이 됨을 알 수 있었다. Hsp90은 본질적으로 정상세포에서는 낮은 수치로 발현이 되며 특히 초기 S-phase 동안에 Hsp90이 필요로 하게 된다.[9]

대장암 조직의 77.3%에서 Hsp70의 면역조직화학염색이 되며 Hsp70 양성발현은 조직의 분화도가 나쁘거나 고위병기, 전체적인 나쁜 생존율과 관계가 있다. 새로운 90 kDa Hsp의 경우 고위병기와는 통계학적으로는 유의성이 없어 Hsp70과는 대조를 보였다.[10]

면역조직화학염색의 발전이 대장암의 생물학적 이해를 위한 가치 있는 정보를 주나 이런 종류의 암에 대한 면역반응의 효능성에 대해 잘 모르고 있다. 최근의 연구에서 Hsp는 암의 병인론에서 조절기능과 종양면역에 관여한다고 알려지고 있다. Hsp70에 있어서는 암세포의 미세 과립 세포질 염색 양상을 보이고 있다.

정상, 비이형성, 인접점막에는 전혀 염색이 되어 있지 않다. 반면에 새로운 90 kDa Hsp의 경우 정상, 양성종양에서도 발현이 되어 좋은 대조를 이뤄 이 새로운 90 kDa Hsp의 경우 종양형성에 관여하는 바가 더 큼을 시사하였다.

주된 Hsp (Hsp 70)는 세포독성에 주된 역할을 하는 phospholipase A2의 신호전달체계의 간섭에 의한 암괘사인자(tumor necrosis factor)로부터 암세포를 억제한다. 또한 스트레스 원인인 국소적인 저산소혈증의 경우 생화학적으로 Hsp 70이 증가하게 된다.

면역조직화학염색을 이용하여 고분자량의 Heat shock protein의 강한 발현이 증명되어 왔다. Hsp-60, Hsp-70 발현과 생존율, 조직분화도, 암의 정도와는 상관관계가 없다. 세포의 활성, 세포의 보존 이외에 세포분할에 Hsp의 역할이 있다.[11] 저분자량의 Hsp는 암의 변형과 관계가 있다.

스트레스와 관련된 단백질은 개개의 종양의 특이적 항원과의 관계는 수수께끼이며 9 type의 Hsp 70, 3가지 type의 Hsp 90, 1가지 type의 Hsp 100이 있다. 또 다른 가능성은 스트레스와 관련된 단백질은 그 자체가 종양항원은 아니며 다른 면역체를 위한 매개자로서 역할을 한다.[12]

이들 단백질의 역할은 세포단백질의 폴딩(folding)의 보조와 비특이적인 단백질 응집과 같은 비가역적인 부적절한 반응을 방지하는 데 관여하는 분자 샤프론이다. 또한 스트레스하에서 이 분자 샤프론은 생리학적인 조건하에서 중요한 역할을 담당한다.[13]

asHsp 70 유발궤사는 이미 알려진 caspases와 p53 종양억제유전자와는 독립적이다. 더 나아가 아포프토시드의 대부분의 형태로부터 종양세포를 보존하는 Bcl-2와 Bcl-XL이 asHsp 70 유도궤사로부터 유방암세포를 구하는 데 실패하였다. 이런 결과로 유방암세포는 형질변경과 관련된 사망프로그램을 억제하는 Hsp 70의 본질적인 높은 발현에 달려 있다.

Hsp 70의 중성화는 크래식한 아포프토시드를 활성화시키는 치료의 후천적인 저항성을 가지는 암의 치료에 새로운 가능성을 가지고 있다. 손상된 아포프토시드 신호전달이 암세포에서 일반적이며 종양의 촉발과 전개에 중요한 역할을 한다. 아포프토시스의 잘 연구된 매개체로는 caspases가 있다.[14]

Heat shock protein의 치료에 이용하고자 하는 많은 노력이 있는데 Hsp에 기초한 백신은 예방과 치료면에서 암과 전염성 질환에 대해 면역을 보여주고 있다. gp 96, Hsp 90 (Hsp 86, Hsp 84), Hsp 70 (Hsc 70, hsp 70)과 calreticulin은 성공적으로 사용되고 있다. 죽은 암세포가 살아 있는 종양에 대해 특이한 면역을 가지고 있다는 관찰이 종양의 면역학적인 원칙을 탐구하게 된다. 생체 내에서의 암거부 연구에서 heat shock protein의 암백신으로서의 역할이 알려졌다.[15]

Heat shock proteins의 유도 시 항암치료와 고열치료시와 같이 암치료의 저항성을 증가시키는 데 관여를 한다. Hsp 70 단백질의 유도는 doxorubicin, teniposide, actinomycin D, Camptothecin, ectoposide와 같은 약제에 저항성이 증가한다.[16]

위와 같은 문헌 고찰을 통해 새로운 90 kDa 단백질의 기능적 연구와 더불어 항암 치료의 병행에 관한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결 론

대장암의 병인론에 의하면 암으로 발전하기까지 각 단계에서 염색체의 이상에 의한 변이가 발생한다고 하나 각 염색체에 대해 충분히 발현되지 않는 것으로 보고하고 있다. 또한 Heat shock protein이 종양세포형성에 중요한 역할을 할 것으로 보고되고 있으나 모든 암 조직과 양성종양에서 발현이 되지 않는 것으로 보고되고 있다. 그러나 면역조직화학염색이 정상보다 과발현을 한다는 단점이 있으나 이 새로운 90 kDa 단백질의 경우 대장암에서 95.4%가 발현이 되고 양성선종의 경우 80%을 차지하며 정상 점막에서는 14.1%만 양성으로 나왔고 각 군 간에 유의성이 검증되어 이 단백질이 대장암의 병인론에 중요한 역할을 할 것으로 추정이 되며 정상, 양성, 악성 환자 간의 양적인 단백질의 발현정도에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Edward L, Stephen F, Lowry, Steve EC. The systemic response to injury, In: Swartz SI, editor. Principles of surgery: Basic Consideration 7th Ed. McGraw-Hill Companies; 1999. p. 3-24.
2. Brian A, Bradley B, Mark E. Molecular advances in the etiology and treatment of colorectal cancer. J Surg Oncol 1997;6:143-56.
3. Jen J, Kim H, Piantadosi S. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med 1994;331:213-21.
4. Lee JY, Cho WJ, Do JW. Monoclonal antibodies raised against infectious hematopoieitic necrosis virus. J Gen

Virol 1996;77:1731-7.
5. Cho WJ, Cha WS. A novel 90 kDa stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection. Biochem Biophys Res Comun 1997;233:316-9.
6. Cho HR, Kim GY, Park CJ, Ko BK, Nam CW, Choi DH, et al. The expression of a novel 90 kDa stress protein in human maligmant neoplasms. J Korean Cancer Assoc 1999;31:793-801.
7. Servoman K, Kiuru A, Kosma VM. p53 and K-ras mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. Mol Pathol 2000;53:24-30.
8. Hall PA, Land DP. p53 in tumor pathology can we trust immunohistochemistry? -revisted. J Pathol 2000;172:1-4.
9. Masao Y, Zenya N, Munenori Y. Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. Cancer Letters 1999;137:45-51.
10. Andreas Ch, George ET, Panayotis SD, Lydia N, Chritos K, Basil CG. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Dis Colon Rectum 1995;38:739-45.
11. Alain M, Myriam R, Valerie ZB, Viviane DM, Danielle J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. Lung Cancer 2001;33:59-67.
12. Srisvastava PK, Maki RG. Stress induced proteins in immune. Response to cancers. Curr Top Microbiol Immunol 1991;167:109-23.
13. Thomas S, Johannes B. The hsp 90 complex-a super-chaperone machine as a novel drug target. Biochem Pharmacol 1998;56:675-82.
14. Jesper N, Mikkel R, Karsten B, Lone B, Folmer E, Marja J. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activateds a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. PNAS 2000;97:7871-6.
15. Antoine M, Guillian B. Purification of multiple heat shock proteins from a single tumor sample. J Immunol Methods 2000;237:119-30.
16. Tetsuya A, Sadao G, Ken H. Higher induction of heat shock protein 72 by heat stress in cisplatin-resistant than in cisplatin-sensitive cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta 1999;1445.123-33.