

대장선암종에서 CD24의 역할

조선대학교 의과대학 ¹흉부외과학교실 ²병리학교실, ³외과학교실, ⁴내성세포연구센터

이 석 기¹ · 임 성 철^{2,4} · 김 경 종³

The Role of CD24 in Colonic Adenocarcinoma

Seog Ki Lee, M.D.¹, Sung Chul Lim, M.D.^{2,4}, Kyung Jong Kim, M.D.³

Departments of ¹Thoracic Surgery, ²Pathology and ³Surgery, ⁴Research Center for Resistant Cells, Chosun University College of Medicine, Gwangju, Korea

Purpose: CD24 is a small, heavily glycosylated glycosyl-phosphatidylinositol-linked cell surface protein that is expressed in hematologic malignancies and in a large variety of solid tumors. It appears to function as a ligand of P-selectin, an adhesion molecule that is present in activated platelets and endothelial cells. We aimed to evaluate CD24 protein expression in adenomas and adenocarcinomas of the colon and to correlate it to clinicopathological data. **Methods:** Adenomas and adenocarcinomas of the colon were stained for CD24 immunohistochemically. For statistical analysis, the staining was categorized according to stainability (negative, weakly, moderately, strongly positive) and staining patterns (membranous vs. intracytoplasmic). **Results:** The present study clearly demonstrated that CD24 was much more abundantly expressed for adenocarcinomas than for adenomas in the colon ($P < 0.05$). A higher significant association of cytoplasmic CD24 expression was observed with adenocarcinomas of the colon than with adenomas of the colon ($P < 0.05$) and with positive nodal status of the colonic adenocarcinoma than with negative nodal status of the colonic adenocarcinoma ($P < 0.001$). **Conclusions:** The stainability and the staining pattern of CD24 is an important molecular marker for colonic epithelial neoplasms and may help to define malignant transformation and to predict lymph-node metastasis. *J Korean Soc Coloproctol 2005;21:13-18*

Key Words: CD24, Adenocarcinoma, Adenoma, Colon, CD24, 선암종, 선종, 대장

서 론

CD24는 27개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로서 광범위하게 glycosylated 되어 있으며 phosphatidylinositol anchor에 의해 세포막에 붙어있다.¹ 이는 원래 B 림프구의 표지자로 동정되었으나 각종 혈액종양뿐만 아니라 몇몇 장기의 고형성 종양에서도 발현이 보고되었으며 최근에는 난소 및 유방의 종양에서도 발현된다고 보고된다.^{2,3} CD24는 활성화된 혈관내피세포 및 혈소관의 표면에 있는 결합수용체(adhesion receptor) P-selectin의 ligand이기 때문에 종양의 전이능력과 관련이 있을 것으로 여겨진다.^{4,5}

최근의 연구에 의하면 비소세포성 폐암, 유방암 그리고 전립선암에서 CD24의 발현은 종양의 전이능력, 환자의 생존율 또는 종양의 재발률 등과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다.^{3,6,7} CD24는 위장관 정상세포의 경우 상피세포증식을 담당하는 부위에만 제한적으로 발현되는데 이는 세포가 증식하여 성숙되어가는 상피에만 표면에 일과성으로 발현되는 것으로 여겨진다.⁸ 따라서 양성종양과 악성종양에서 CD24의 발현에 어떠한 차이가 있는지를 비교하여 선종-선암종의 단계를 거치는 전암병변인 대장 선종을 선암종과 비교하여 그 차이를 검토하는 것은 종양의 발생 및 진행은 물론 악성화에 CD24가 어떠한 역할을 수행하고 있는지 가

접수: 2004년 7월 1일, 승인: 2004년 10월 11일
책임저자: 임성철, 501-759, 광주광역시 동구 서석동 588
조선대학교병원 병리과
Tel: 062-230-6343, Fax: 062-234-4584
E-mail: sclim@mail.chosun.ac.kr

이 연구는 2004년도 조선대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

Received July 1, 2004, Accepted October 11, 2004
Correspondence to: Sung Chul Lim, Department of Pathology, Center for Resistant Cells, Chosun University College of Medicine, 375 Seosok-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel: +82-62-230-6343, Fax: +82-62-234-4584
E-mail: sclim@mail.chosun.ac.kr

높히는 좋은 척도가 될 것이다. 또한 악성의 경우 환자의 여러 가지 임상병리학적 인자에 따른 CD24 발현의 차이를 비교 검토함으로써 종양의 전이 등과 관련된 CD24의 역할을 추정할 수 있을 것이다.

이에 저자들은 대장의 상피성 종양을 대상으로 CD24의 발현강도 및 발현양상을 양성과 악성종양, 종양의 조직학적 등급, 림프절 전이 유무 및 종양의 조직학적 아형 등 환자의 각종 임상병리학적 인자들과 통계학적으로 비교분석하여 종양의 발생, 악성화 및 전이 등에 CD24가 어떠한 역할을 하고 있는지를 규명하고자 한다. 아울러 이런 결과를 토대로 CD24 발현의 평가가 악성 및 양성종양의 감별 및 종양의 예후를 가늠할 수 있는 표지자로서의 가치가 있는지를 평가하고자 한다.

방 법

1) 대상 환자

2002년부터 2003년까지 약 2년 동안 조선대학교 부속병원에서 조직검사로 확진된 대장 종양 중 조직의 고정과 보관상태가 양호한 35예(선암종: 22예, 선종: 13예)를 대상으로 하였다(Table 1). 종양의 조직학적

Table 1. Clinico-pathologic characteristics

Characteristic	Adenocarcinoma (%)	Adenoma (%)
No. of patients	22 (63)	13 (37)
Age (yrs.)		
Mean	52.3	62.8
Range	19~73	48~77
Gender		
Male	11 (50)	7 (54)
Female	11 (50)	6 (46)
Lymph node metastasis		
Yes	11 (50)	
No	11 (50)	
Histopathologic grade		
W/D	4 (18)	
M/D	14 (64)	
P/D	4 (18)	
Histologic type		
Tubular		9 (69)
Villous		2 (15)
Villotubular		2 (15)

W/D = well differentiated; M/D = moderately differentiated; P/D = poorly differentiated.

등급은 AJCC 분화도에 따라 고분화(저등급, grade 1), 중등도분화(중등급, grade 2) 및 저분화(고등급, grade 3)로 등급화하였다.⁹

2) 연구방법

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 화일을 후향적으로 분석하여 대장의 종양을 재검토하고 나이, 성별, 원발부위, 종양의 조직학적 형태 및 분화도, 림프절 전이 유무 등을 확인하여 연구목적에 부합되는 증례를 무작위로 선택하였다.

(1) 광학현미경적 검사: 관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 충분히 고정된 다음, 파라핀 포매에 의해 4~5µm 두께의 절편으로 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. 광학현미경으로 검정하여 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다.

(2) 면역조직화학적 검사: 면역 조직화학적 검사에 사용된 1차항체는 NeoMarkers (Fremont, CA, USA)의 mouse monoclonal antibody CD24 Ab-2 (clone 24C02)를 이용하였으며, 2차항체와 발색제는 각각 Dako (Carpinteria, CA, USA)의 LSAB Kit와 AEC (3-amino-9-ethyl carbazole) kit를 이용하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Research Genetics (Huntsville, AL, USA)의 Universal mount로 봉입하였다.

파라핀 포매 조직을 4µm 두께로 박절하여 X-traTM 슬라이드(Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨 후 LSAB 방법에 의해 염색을 시행하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자 오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편 내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 1차항체 CD24를 1시간씩 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 LSAB kit를 이용하여 비오틴이 함유된 2차항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고, peroxidase가 결합된 streptavidin용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척 후 AEC kit로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Universal mount로 봉입하였다.

양성 대조군으로는 염증이 초래된 육아조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 1차항체 대신 tris 완충

Table 2. The immunoreactivities of CD24 in colonic neoplasm

Immunoreactivity	Adenocarcinoma (%) [*]	Adenoma (%)
Negative	1 (4.6)	2 (15.4)
Weak	3 (13.6)	6 (46.2)
Moderate	9 (40.9) [†]	4 (30.8)
Strong	9 (40.9) [‡]	1 (7.7)
Total	22	13

*Comparison of immunoreactivity between adenocarcinoma group and adenoma group, P=0.045. [†] A case (no lymph node metastasis) showed cytoplasmic as well as membranous staining. [‡] Six cases (no lymph node metastasis: 1 case, lymph node metastasis: 5 cases) showed cytoplasmic as well as membranous staining.

액을 썼다.

(3) 면역조직화학적 염색의 판정: 염색의 결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과를 알지 못하는 병리전문의에 의해 시행되었다. CD24에 대한 염색 결과의 판정은 세포막과 세포질 내 염색을 구분하였으며 음성, 약한 양성반응, 중등도 양성반응, 강한 양성반응으로 반정량화하였다. 같은 종양에서 부위별로 값의 차이가 발생할 경우 높은 값을 대표값으로 취하였다.

(4) 통계학적 분석: 통계학적 분석은 SPSS (statistical package for the social sciences), Windows, version 7.5 (SPSS, Korea)로 Fisher's exact test를 이용하였다. 그리고, 이들의 통계학적 유의 수준은 P값 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1) 임상 및 조직학적 소견

선암종의 경우 연령분포는 19~73세(평균연령; 52.3세), 선종은 48~77세(평균연령; 62.8세)였으며, 성비는 선암종 및 선종 모두 남녀간 큰 차이가 없었다. 선암종의 경우 림프절 전이가 있는 증례 11예, 림프절 전이가 없는 증례 11예였으며, 이들의 조직학적 분화도는 고분화 4예, 중등도 분화 14예, 저분화 4예였다. 그리고, 선종의 조직학적 아형은 관상형 9예, 용모형 2예, 그리고 용모관상형 2예로 대부분 관상형이었다(Table 1).

2) CD24의 면역조직화학적 발현

종양 주변의 일부 정상 점막에서도 양성발현이 관

Table 3. Cytoplasmic staining of CD24 in colonic neoplasm

Cytoplasmic staining	Adenocarcinoma (%) [*]	Adenoma (%)
Positive	7 (31.8)	0
Negative	15 (68.2)	13 (100.0)
Total	22	13

*Comparison of cytoplasmic staining between adenocarcinoma group and adenoma group, P=0.031.

Table 4. Interrelation between cytoplasmic staining of CD24 and lymph node metastasis in colonic adenocarcinoma

Cytoplasmic staining	LN (+)(%) [*]	LN (-)(%)
Positive	6 (100.0)	1 (6.3)
Negative	0	15 (93.8)
Total	6	16

LN (+) = positive lymph node metastasis; LN (-) = negative lymph node metastasis. *Comparison of cytoplasmic staining between LN (+) group and LN (-) group. P<0.0001.

찰되었으나, 증식성 성장을 하는 일부에 국한되어 있었으며, 이는 세포질 내 염색은 보이지 않고 모두 세포막 염색을 보였는데 내강에 연해있는 세포막에만 국한되어 발견되었다. 양성발현을 및 발현강도는 양성종양보다는 악성종양의 경우 증가하였으며 이는 통계학적으로 유의하였다(P<0.05) (Table 2).

양성의 경우 모든 증례가 세포막에만 염색이 국한되어 있었다. 그러나, 악성의 경우는 7예 (32%)에서 세포막은 물론 세포질 내 염색이 관찰되었는데 이는 통계학적으로 유의하였다(P<0.05) (Table 3). 세포질 내 염색이 관찰된 5예(71%)는 림프절 전이가 있었으나, 나머지 2예 (29%)는 림프절 전이가 없었는데 CD24의 세포질 내 염색과 림프절 전이는 통계학적으로 매우 유의한 상관성을 보였다(P<0.001) (Table 4). 분화가 나쁜 선암종 증례의 경우 강한 세포질 내 염색이 미만성으로 관찰되기도 하였으나, 조직학적 분화도에 따른 발현양상 및 발현강도의 차이는 통계학적으로 유의성이 없었으며, 양성종양의 경우도 선종의 조직학적 아형과 무관하였다(Table 2, Fig. 1).

고 찰

CD24를 구성하는 아미노산의 반 정도가 Ser과 Thr

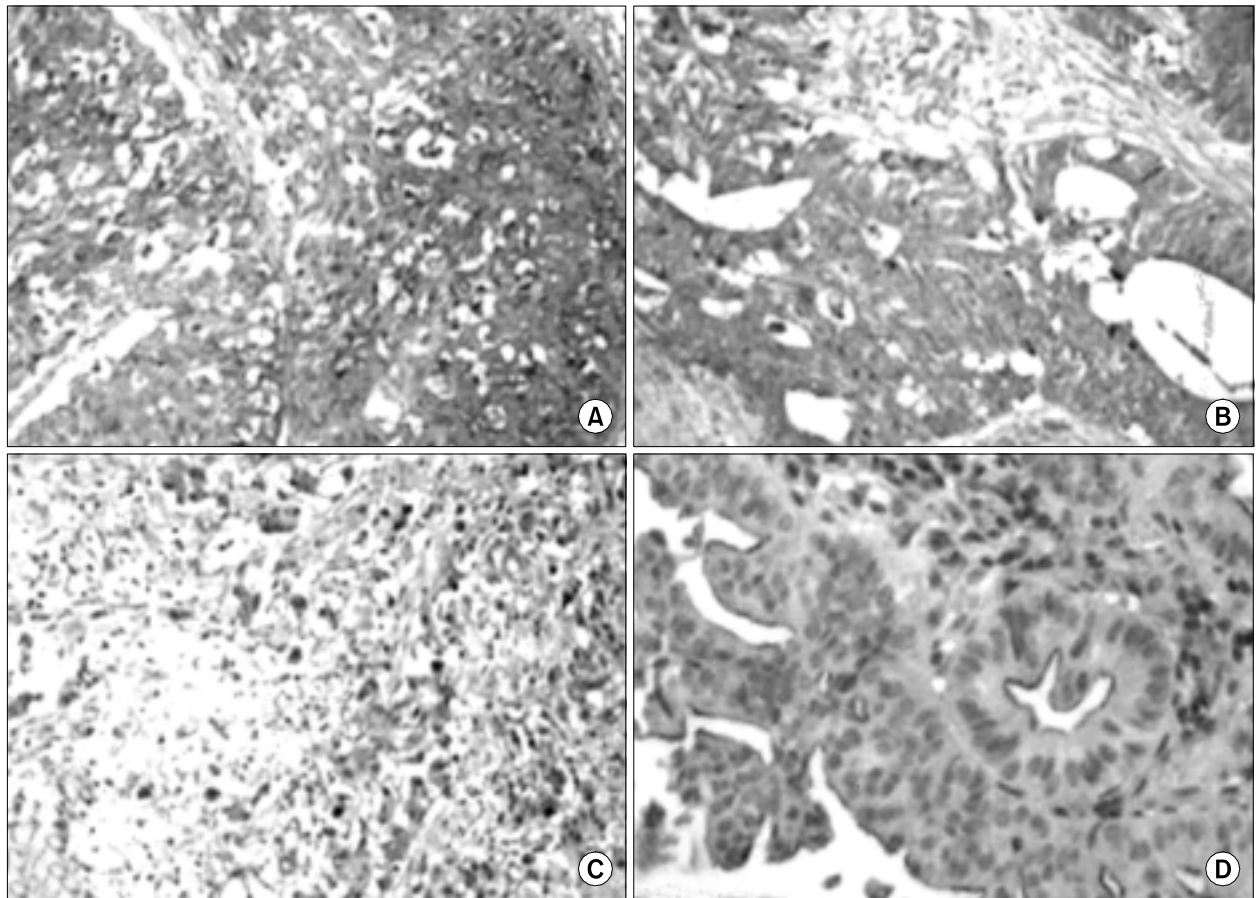


Fig. 1. Immunohistochemical staining of colonic neoplasm for CD24. (A) Poorly-differentiated adenocarcinoma, solid type. Cytoplasmic as well as membranous staining of tumor cells is demonstrated. (B) Moderately-differentiated adenocarcinoma, solid type. Cytoplasmic as well as membranous staining of tumor cells is demonstrated. (C) Poorly-differentiated adenocarcinoma, infiltrative growth. Cytoplasmic staining of tumor cells is demonstrated. (D) Adenoma. Membranous luminal border staining of tumor cells is demonstrated (LSAB method, counterstained with hematoxylin, $\times 200$).

잔기로 되어 있는데 여기는 점액형 단백(mucin-type protein)이 작용할 수 있는 부위이다. CD24는 원래 B세포 발달과정 중 초기에 발현되는 B세포 특이 표지자로 알려졌으나,¹ 호중구에 강하게 발현되지만 정상 T세포나 단핵구에서는 발현되지 않는다는 사실이 밝혀졌다. 또한 CD24는 폐암, 신경아세포종, 횡문근육종 및 신세포암 등과 같은 몇몇 고형성 종양에서도 발현된다고 보고되었다.^{8,10}

CD24는 활성화된 혈소판에 백혈구가 붙거나 활성화된 내피세포 위에서 백혈구가 처음 회전(initial rolling)을 하는데 중요한 역할을 하고 있는 P-selectin (CD62P)에 대한 특이 리간드(ligand)로서 작용한다.^{11,12} 백혈구 P-selectin의 주된 리간드는 cell surface mucin P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)이다. PSGL-1은 없으나 CD24가 있는 유방암 세포주를 통해 CD24

가 PSGL-1을 대신할 수 있으며, 결국 CD24는 P-selectin이 있는 곳에서 종양세포가 회전할 수 있게 함은 물론 활성화된 혈소판에 종양세포가 부착할 수 있게 도와준다는 사실을 알았다.^{5,12} 따라서 CD24는 P-selectin을 통하여 종양세포의 전이에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.

인간의 정상 위, 대장, 담낭 조직이나 위, 대장 또는 담낭 종양환자의 조직을 이용한 연구보고는 아직까지 없으나, 쥐의 정상조직과 인간의 위암, 대장암 세포주를 이용한 연구는 보고되어 있다.⁸ 이 연구에 따르면 CD24는 위장관 상피세포, 타액선의 관 및 선방 상피세포, 세기관지, 난관, 신세뇨관 등의 상피세포에 존재하였고, 위암 및 대장암 세포주에도 존재하였다.

Fogel 등¹³이 CD24가 인체 유방암의 표지가 될 수 있으며, CD24 발현 종양세포는 혈소판이나 혈관내피

세포와 상호작용을 통하여 종양세포의 전이에 중요한 역할을 한다고 처음 보고하였고, 그 후 *in vitro* 연구를 토대로 CD24 발현과 종양의 침습성간의 상관관계가 발표되었으며,¹⁴ 환자의 생존관련 자료를 토대로 유방암 환자의 새로운 예후적 표지자임이 발표되었다.³ Kristiansen 등⁶의 연구에 따르면 막성 염색 및 세포질 내 염색을 망라한 CD24 발현강도와 환자의 연령, 종양 아형, 종양 크기, 종양 등급, 그리고, 에스트로겐 수용체 및 c-erbB2 발현간에는 어떠한 유의성도 존재하지 않았으나 림프절 전이와는 유의한 관련성이 있었으며, CD24의 막성 발현강도와는 이들 임상병리학적 요소들은 유의한 상관관계가 없었다.

본 연구결과 대장선종 및 선암종에서 모두 CD24가 발현되었으나 양성에 비하여 악성의 경우 더욱 더 강하고 높은 빈도로 발현되어 유의한 차이를 보였다. 그리고, 발현양상의 특이성이 관찰되었는데 선종의 경우는 양성을 보이는 모든 증례가 세포막 염색을 보이는 반면 세포질 내 염색은 선암종군에서만 관찰되었다. 한편, CD24의 세포질 내 염색은 양성에서는 관찰할 수가 없었으나 악성의 경우 강하고 높은 빈도로 발현되었다. 그리고, CD24의 세포질 내 염색은 림프절 전이와도 통계적으로 유의한 상관성이 있어 림프절 비전 이군보다 림프절 전이군에서 세포질 염색이 높은 빈도로 관찰되었다. CD24의 발현강도 및 양상은 선암종의 조직학적 등급과는 무관하였으며, 선종의 조직학적 아형과도 무관하였다.

따라서, CD24는 선종-선암종 발생의 단계를 거치는 대장에서 양성 및 악성종양의 형성에 관여함은 물론 악성종양의 진행 및 림프절 전이에 기여하며 이의 세포질 내 발현은 악성종양에 유의하게 관찰된다. 그러므로, CD24는 종양의 악성 진행 및 전이에 기여하는 것으로 사료된다. 그러나, 본 연구에서는 악성의 경우 환자의 생존율 등과 같은 예후적 인자에 대한 분석이 이루어지지 않아서 CD24가 대장의 선암종에 예후적 인자로서 역할을 하는지에 대한 직접적인 설명은 할 수 없다.

결 론

대장종양의 경우 CD24는 선종 및 선암종 모두에서 발현되었는데, CD24의 양성률 및 발현강도는 악성에서 통계적으로 유의하게 증가하였고, 세포질 내 염색은 림프절 전이와도 상관관계가 있었다. 그리고, CD24의 세포질 내 염색은 악성에서 통계적으로 유의하게

높은 빈도로 관찰되었다.

이상과 같은 소견으로 CD24는 대장의 상피성 종양 형성과 이들 종양의 진행 및 악성화에도 관여하며, 림프절 전이에도 역할을 하는 것으로 여겨진다. 뿐만 아니라, CD24의 세포질 내 발현은 이들 장기에 발생한 종양이 악성일 가능성이 높은 종양임을 시사하는 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Pirruccello SJ, LeBien TW. The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol* 1986;136:3779-84.
2. Kristiansen G, Denkert C, Schluns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol* 2002;161:1215-21.
3. Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4906-13.
4. Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Stoeber Z, Butcher EC, et al. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol* 1995;7:1557-65.
5. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J* 1998;12: 1241-51.
6. Kristiansen G, Schluns K, Yonwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:231-6.
7. Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Sturzebecher B, Stephan C, Jung K, et al. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate* 2004;58:183-92.
8. Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch* 1994;425:399-406.
9. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ. Manual for staging for cancer, 4th ed. American Joint Committee on Cancer. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1992
10. Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J, Stahel RA. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1992;52:5264-70.
11. Sammar M, Aigner S, Hubbe M, Schirmacher V, Schachner M, Vestweber D, et al. Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int Immunol* 1994;6:1027-36.

12. Aigner S, Stoeber ZM, Fogel M, Weber E, Zam J, Ruppert M, et al. CD24, a mucin- type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997;89:3385-95.
 13. Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett* 1999;143:87-94.
 14. Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumor Biol* 2002;23:139-45.
-