

대장암에서 EGFR 발현의 의의

¹이화여자대학교 의과대학 외과학교실, ²원자력의학원 원자력병원 외과, ³병리과

김현아¹ · 이령아¹ · 황대용² · 박선후³

The Significances of EGFR Overexpression in Colorectal Cancer

Hyun-Ah Kim, M.D.¹, Ryung-Ah Lee, M.D.¹, Dae-Yong Hwang, M.D.², Sun-Hoo Park, M.D.³,

¹Department of Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University, Departments of ²Surgery and ³Pathology, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Purpose: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane cell surface receptor which has tyrosine kinase activity stimulated upon EGF binding. EGFR was found to be up-regulated in various malignancies. Recently, chimeric monoclonal antibody (C225) to EGFR is under investigation as a targeted therapeutic agent for advanced colorectal cancer. Along with this advance, identification of EGFR expression in colorectal cancer became more important. **Methods:** To investigate the expression of EGFR in colorectal cancer, we carried out the immunohistochemical staining in surgical specimen of 46 consecutive enrolled colorectal cancer patients of Korea Cancer Center Hospital from August, 1998 to June, 1999. The stained slides were read by pathologist and scored as negative or positive. These results were analyzed according to clinical parameters. **Results:** Average age was 55 years old (32~73 yr) and sex ratio was 1.56 : 1. The expression rate of EGFR in colorectal cancer was 56.5% (26/46 cases). EGFR expression was not correlated with age, sex, Tie-1, Tie-2 expression, TNM stage, lymphatic invasion, presence of distant metastasis, serum VEGF level. We could not find out statistical difference of survival according to EGFR expression. **Conclusions:** EGFR overexpression was well characterized by immunochemical staining method, which could be applied easily as a basic pathologic step to decide additional therapy after resection for advanced colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol 2005;21:36-41*

Key Words: EGFR, Colorectal cancer, Immunohistochemical staining

EGFR, 대장암, 면역조직화학 염색법

서 론

대장암은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나로, 한국에서의 대장암의 발생도 전체 암 발생의 11.2%로 장기별 암 발생률과 사망률에서 각각 4위를 차지하고, 점차 증가 추세에 있다.¹ 지난 수 십 년간 대장암을 포함한 고형암 환자의 치료 성적을 향상시키기 위한 노력이 있었으며, 특히 지난 십 년 간은 종양의 유전적 성향, 특히 그 중에서도 성장 신호의 전달(growth signal transduction)과 종양 세포의 미세 환경을 목표로 하는 약제의 연구가 활발히 진행되었다.² 이러한 연구 대상의 중요한 부분을 차지하는 것이 human epidermal growth factor receptor (HER) family 중의 하나인 epidermal growth factor receptor (EGFR)를 목표로 하는 항암제의 개발이다. EGFR은 티로신 활성화소(tyrosine kinase)와 결합해 있는 세포막 내외에 걸쳐있는 세포표면 수용체(transmembrane cell surface receptor)로 170-kD의 크기이며 1186개의 아미노산 폴리펩티드 사슬(amino acid polypeptide chain)로 구성되어 있다.³ EGFR은 신경아교종, 두경부 악성 종양, 대장암, 전립선암, 췌장암 같은 다양한 악성 종양에서 발현이 증가되며,⁴ 이러한 EGFR의 발현은 종양의 분화, 세포사멸(apoptosis), 혈관 신생, 전이와 연관이 있다고 알려져

접수: 2004년 7월 28일, 승인: 2005년 2월 2일
책임저자: 이령아, 158-050, 서울시 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-2650-2759, Fax: 02-2644-7984
E-mail: ralee@ewha.ac.kr

본 연구의 요지는 2002년 28차 대한암학회 춘계학술대회에서 구연 발표하였음.

Received July 28, 2004, Accepted February 2, 2005
Correspondence to: Ryung-Ah Lee, Department of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine, Mok-dong Hospital 911-1, Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-050, Korea.
Tel: +82-2-2650-2759, Fax: +82-2-2644-7984
E-mail: ralee@ewha.ac.kr

있다.⁵ 이런 특성을 감안하여 지속적으로 EGFR을 대상으로 하는 단클론항체나 EGFR-tyrosine kinase inhibitor 등이 개발되어 왔으며,⁵ 이 중에서 조합 단클론항체(chimeric monoclonal antibody)인 IMC-C225 (Cetuximab)는 진행성 대장암을 대상으로 활발히 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 EGFR을 표적으로 하는 약물 치료는 이론적으로는 EGFR이 과발현되어 있는 암종에서 효과가 높을 것으로 예측되므로 새로운 치료제를 선택할 때 EGFR의 과발현도를 확인하는 것이 진행성 대장암의 치료 방향을 결정하는 데 중요한 요인으로 작용할 가능성이 크다.

이에 저자들은 한국의 대장암 환자에서의 EGFR 발현율을 면역조직화학적 염색을 통하여 알아보고 또한 EGFR의 발현의 특성이 기존의 임상병리학적 예후 인자와 관련이 있는지 알아보하고자 본 연구를 실시하였다.

방 법

1998년 8월부터 1999년 6월까지 원자력병원에서 대장암으로 진단받고 수술 받았던 환자들을 연속적으로 무작위 수집하여 이 중 46명의 수술 검체를 연구 대상으로 하였다. 각 환자들의 성별, 나이 등을 포함한 임상적 특징과 병변의 위치와 크기, 해부학적 병기, 분화도 등의 병리학적 특성, 그 외 수술명, 전이의 유무와 전이 장기 등의 특성을 원자력병원 대장암 database를 기초로 기록하였다.

EGFR에 대한 면역화학염색은 파라핀 포매조직을 사

용하여 일반적인 ABC방법으로 염색하였다. 즉, 포르말린에 고정된 조직의 왁스를 제거하고 탈수시킨 후 0.05 M Tris buffer (pH 7.5, 25°C)로 세척하였다. 30% H₂O₂로 처리하여 내인성 과산화 효소의 활성을 억제시킨 후, Tris buffer에서 세척하였다. EGFR에 대한 항체는 단클론항체(DAKO corp., CA)를 1 : 50의 배율로 사용하였다. 염색된 슬라이드는 해부병리학 전문가가 판독하였고, 세포막 및 세포질의 발색제 염색이 5% 이하로 염색되었을 경우는 음성, 5% 이상의 경우는 양성으로 판정되었다(Fig. 1). 이 결과를 환자들의 성별, 나이, 병변의 위치와 병기, 분화도, 병변의 크기, CEA, CA19-9, 전이장기, EGFR의 발현 유무, CD34, Tie1, Tie2, soluble vascular endothelial growth factor (sVEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), KDR, Flt-1, bFGF 등의 임상적 요인들과 같이 분석하였다.

통계는 SPSS 11.5 판을 사용하였으며, P값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있다고 해석하였다.

결 과

환자들의 평균 연령은 55세(32~73세)였고 성비는 1.56 : 1로 남자가 많았다. 평균 추적 기간은 21.22±6.70개월(3~30)이었다. 46명의 환자 중 26명에서 5% 이상의 양성 반응을 보여 EGFR 양성군으로 분류되었으며, 20명의 환자에서 5% 미만의 발현율을 보여 EGFR 음성군으로 판독되어 EGFR의 발현율은 56.5%였다.

EGFR 양성군의 평균 연령은 56.58±11.17세였으며,

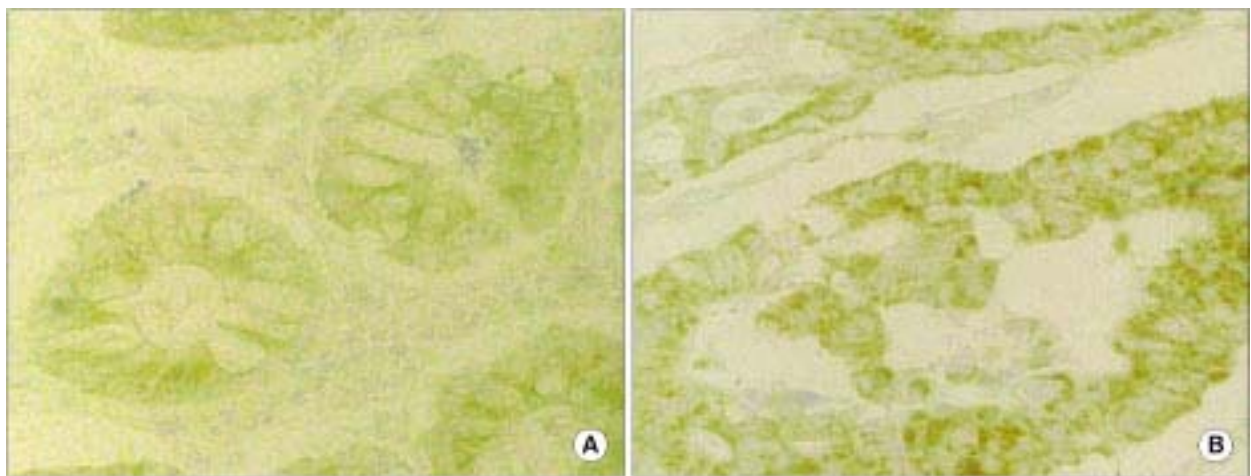


Fig. 1. Immunohistochemical staining of EGFR expression in colorectal cancer. (A) Immunohistochemistry in colonic normal epithelium is negative value. Original magnification: ×100. (B) Immunohistochemistry detecting the epidermal growth factor receptor (EGFR) in cancer is positive value. Original magnification: ×400.

Table 1. EGFR expression and clinical parameters patients characteristics I (n=46)

	EGFR positive	EGFR negative	P value
Age (mean±2SD)	56.58±11.17	54.05±8.32	0.402*
Sex (Male : Female)	1.22 : 1	1.89 : 1	0.512 [†]
Size (cm)	4.03±1.44	5.50±2.78	0.065*
CEA (mean±2SD)	37.27±109.99	274.85±795.88	0.619
CA19-9 (mean±2SD)	377.22±997.71	54855.37±16450.00	0.887
CD34 (mean±2SD)	49.32±19.56	43.55±19.55	0.331
Tumor location	Ascending colon	2 (50.0%)	0.622 [‡]
	Transverse colon	0 (0.0%)	
	Descending and sigmoid colon	3 (60.0%)	
	Rectum	19 (57.6%)	

*Student t-test; [†] Pearson Chi-Square test; [‡] Likelihood ratio.

Table 2. TNM stage and EGFR expression (n=46)

		EGFR positive	EGFR negative	P value
T stage	T1	2	2	0.815*
	T2	3	3	
	T3	11	7	
	T4	10	8	
N stage	N0	11	12	0.212*
	N1	5	3	
	N2	9	5	
	N3	1	0	
M stage	M0	20	16	0.802 [†]
	M1	6	4	
TNM stage	Stage I	6	5	0.573 [†]
	Stage II	5	7	
	Stage III	9	4	
	Stage IV	6	4	

*Linear-by-linear association; [†] Pearson Chi-Square test.

EGFR 음성군의 평균 연령은 54.05±8.32세로 두 군간의 유의한 차이는 없었다(P=0.402). EGFR 양성군의 성비는 1.22 : 1였으며, EGFR 음성군의 성비는 1.89 : 1로 역시 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.512) (Table 1).

종양의 크기는 EGFR 양성군이 평균 4.30±1.44cm이며, EGFR 음성군이 5.50±2.78cm로 두 군간의 통계학적 차이가 없었다. 종양의 위치를 상행결장과 횡행결장, 하행결장과 에스자 결장, 직장으로 나누었을 때 이

Table 3. Angiogenetic factors and EGFR expression

		EGFR positive	EGFR negative	P value
Soluble VEGF (mean±2SD)		472±354.11	435.15±208.77	0.690*
	bFGF (mean±2SD)	6.169±4.65	6.169±4.49	
Angiopoietin-1	Positive	5	4	0.880 [†]
	Negative	21	9	
Angiopoietin-2	Positive	24	11	0.001
	Negative	1	9	
VEGF	Positive	10	2	0.097
	Negative	16	18	
Tie-1	Positive	15	13	0.615
	Negative	11	7	
Tie-2	Positive	3	1	0.622
	Negative	23	19	
KDR	Positive	7	8	0.348
	Negative	19	12	
Flt-1	Positive	13	5	0.085
	Negative	13	15	

*Student t-test; [†] Pearson Chi-Square test.

에 따른 EGFR의 발현율의 차이도 관찰되지 않았다 (Table 1). 또한, 종양의 분화도와 EGFR 발현율과의 상관관계도 없었다(P=0.249). CEA나 CA19-9, CD 34와 같은 임상지표와의 상관 관계도 나타나지 않았다

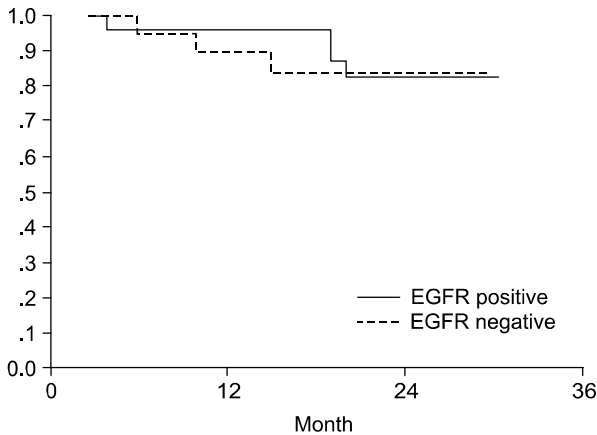


Fig. 2. Survival analysis by Kaplan-Meier method.

(Table 1).

T stage, N stage, M stage 각각에 있어서 EGFR 발현과의 연관성은 없어 종양의 침범 깊이나 임파절 침범, 원격 전이와도 관련이 없었으며 TNM stage와 EGFR 발현과의 연관성 역시 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2). Astler-Collar stage와의 연관성도 없었다(P=0.573).

혈관 신생과 관련이 있는 요소인 sVEGF, vFGF, Angiopoietin-1, VEGF, Tie-1, Tie-2의 발현과 연관이 없었다. Angiopoietin-2는 EGFR 양성 군에서 24예(96.0%)가 발현되었고, EGFR 음성군에서 11예(55%)가 발현되어 Angiopoietin-2의 발현만이 EGFR 발현과 통계적으로 유의하게 상관 관계가 있었다(P=0.001)(Table 3). EGFR 음성군에서 추적 기간 중 3명(15.0%)이 사망하였으며, EGFR 양성군에서 4명(15.4%)이 사망하였다. Kaplan-Meier 방법으로 구한 생존율도 EGFR 발현과 연관이 없었다(Fig. 2).

고 찰

대장암에 있어서 일차적 치료의 원칙은 수술 절제이지만 수술 절제 후에도 재발률이 40~60%에 이르기 때문에,⁶ 생존 기간을 연장시키며 증상을 완화시키고 삶의 질의 유지와 향상을 위해서 방사선 치료 혹은 항암화학요법 등의 보조 치료가 필요하다. 그러나 항암화학요법의 약물의 종류와 투여 경로에 대해서는 절대적 원칙은 없는 상태이며, 그 효과도 만족할 정도는 되지 못한다.⁷ 또한 같은 병기의 환자라고 하더라도 항암화학요법에 대한 반응률과 생존율의 차이가 크게 나타난다.⁸ 이러한 상황을 극복하기 위한 노력의 일환

으로 종양 세포의 유전자 형이나 신호 전달 과정 혹은 종양 세포의 미세 환경에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.² 이러한 연구 대상 중 대표적인 것 중의 하나가 EGFR을 대상으로 한 항암화학요법의 개발이다. 현재 진행성 대장암과 전이성 대장암을 대상으로 IMC-C225 (Cetuximab)와 같은 항 EGFR 키메라 단클론 항체를 사용한 약제나 ZD1839 (Iressa)같은 EGFR 티로신 활성효소 억제제들이 단독 혹은 다른 약물이나 방사선 치료 등과의 병합 요법의 형태로 임상실험 중이며, 일부에서는 긍정적인 효과를 예측하고 있다.^{4,9,10} 이러한 약제는 EGFR 고발현 종양을 그 대상으로 하기 때문에, 종양의 EGFR의 발현 정도를 조사하여 약제의 적용 범위를 결정하는 것은 대단히 중요한 일이다.

EGFR은 *c-erb-B* 원발암유전자(protooncogene)의 일종이다. 티로신 활성효소를 포함하는 세포막 내외에 걸쳐 있는 170-kD의 세포 표면 수용체이며 transforming growth factor- α 와 epidermal growth factor (EGF) 등의 배위자(ligand)의 결합으로 활성화된다.³ 활성화된 EGFR은 티로신 활성효소의 활성을 유도하고 세포분열의 신호 전달과정을 촉발하여 종양 세포의 증식, 세포자멸사의 억제, 혈관 신생, 침범, 전이 등의 종양의 자연사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{6,10} 실제로 여러 연구에서 유방암, 두경부 암, 위암, 대장암, 식도암, 전립선암, 방광암, 신장암, 췌장암, 난소암 등의 다양한 고형암에서 EGFR의 과발현을 보고하고 있다.¹¹

EGFR의 발현을 측정하는 방법으로는 면역화학염색법, Western 분석법, 효소 면역분석법, Northern 분석법, 역전사 중합효소연쇄반응 등이 사용되고 있다. 그 중 면역화학염색은 EGFR의 발현율을 보기 위해서 가장 흔하게 사용되는 방법으로 EGFR 발현 세포의 분포를 확인할 수 있다는 장점이 있다.¹¹ 면역화학염색법을 이용한 EGFR의 대장암에서의 발현율은 47.7~75.5% 정도로 보고되어 있으며,¹²⁻¹⁵ 본 연구의 EGFR 발현율은 54.5%로 다른 연구들의 결과와 유사하였다.

EGFR의 발현율과 환자의 예후와의 관계에 있어서는 여러 의견이 있다.

두경부, 난소, 방광, 식도에서 발생하는 암의 경우 EGFR 발현의 증가가 환자의 나쁜 예후와 생존율의 감소에 연관이 있음이 거의 확실한 것으로 알려져 있으나, 위암 혹은 대장암에서의 연관성은 명확하지 않다.¹⁶ 대부분의 보고들은 대장암에서 EGFR의 발현 정도와 종양의 grade와 관련이 없으며,^{13,14} 환자의 성별, 종양의 위치, 분화도, Dukes' stage, 연령, 림프절 전이

등의 임상적 지표들과도 관련이 없었다.¹³ 그러나 EGFR의 발현 정도가 대장암의 진행 정도, 조직학적 분화도, 임파절 전이 및 재발과 연관이 있다는 몇몇 보고들도 있으며, 종양의 수술 제거 후의 생존율과도 연관이 있다는 연구도 있다.^{9,17-19} 본 연구자들의 결과에서 EGFR의 발현은 연령, 성, 병기, 세포 분화도, 전이 소견, 혈청 CEA, CA19-9, 생존율 등의 임상적 지표들과 관련이 없었다.

위의 임상적 지표들과 더불어 종양 세포의 성장과 전파에 중요한 역할을 하는 혈관 신생은 EGFR, VEGF, Tie 수용체 등과 같은 수용기 티로신 활성화효소(receptor tyrosine kinase)로부터 주변 분비에 의해서 조절을 받게 된다.²⁰ 이러한 점에서 bFGF, VEGF, TGF- α 같은 다양한 성장 인자는 혈관 신생을 일으키며 주변 분비(paracrine mechanism)으로 정상 내피 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 보인다.¹⁵ 따라서, 본 연구자들은 종양에서 혈관 신생과 연관이 있다고 알려진 angiopoietin-1, sVEGF, Tie1, Tie2, VEGF, KDR, flt-1, bFGF의 발현과 EGFR의 발현의 연관성을 알아보려고 하였으나 통계학적인 의의를 찾을 수 없었다. 단지, angiopoietin-2 발현만이 EGFR 발현과 통계적으로 유의하게 관계가 있었다. Angiopoietin-2의 증가는 EGFR의 신호전달 과정의 활성화에 기인한다는 보고가 있으며,²⁰ 본 연구에서도 동일한 결과가 나타나 EGFR에 의한 혈관 신생이 angiopoietin-2의 발현과 연관이 있을 수 있음을 추정할 수 있었다.

결 론

EGFR의 발현은 예후 인자로서의 가치를 가지지 못하며, 단지 적절한 약물의 선택을 위한 독립적인 지표로서 간주되어야 한다. 항 EGFR 단항제 항암요법에 대한 대장암 환자의 임상적 반응으로 볼 때 EGFR의 명확한 발현은 이러한 약제를 사용하는 대상을 선별하는 중요한 지표이다. 면역혈청 염색을 사용한 EGFR 측정은 쉽게 시행할 수 있는 방법이며, 진행성 대장암의 치료를 위한 기본적 단계로 이용될 수 있다고 생각되지만, 객관적인 측정 척도의 결정과 어느 정도의 EGFR의 발현에서 임상적인 가치를 얻을 수 있을 것인가에 대해서 더 많은 연구가 필요하다.

REFERENCES

1. 한국 중앙 암 등록사업 연례보고서, 2002.
2. Rowinsky EK. The pursuit of optimal outcomes in cancer

therapy in a new age of rationally designed target-based anticancer agents. *Drugs* 2000;605:1-14.

3. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990;265:7709-12.
4. Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol* 2001;13: 506-13.
5. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002;7 suppl 4:2-8.
6. Reynolds NA, Wagstaff AJ. Cetuximab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2004;64:109-18.
7. Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Colorectal Cancer Collaborative Group. BMJ* 2000;321: 531-5.
8. McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J cancer* 1999;79:191-203.
9. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;8:994-1003.
10. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-70.
11. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 2002;(7 suppl 4):31-9.
12. Giralt J, Eraso A, Armengol M, Rossello J, Majo J, Ares C, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1460-5.
13. McKay JA, Murray LJ, Curran S, Ross VG, Clark C, Murray GI, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 2002;38:2258-64.
14. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with american joint committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer* 2001;92:1331-46.
15. Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Harris AL. Interleukin-4 receptor and epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1992; 66:712-6.
16. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37(suppl):9-15.
17. Kopp R, Rothbauer E, Mueller E, Schildberg FW, Jauch KW, Pfeiffer A. Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor

- receptor levels. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1391-9.
18. 이상혁, 박성일, 임현목, 박성준, 차성재, 박언섭. 대장 직장선암에서 EGFR 및 VEGF 발현에 대한 면역조직화학적 분석. *대한대장항문학회지* 1997;13:547-56.
 19. 이은숙, 배정원, 황정웅. 대장선암에서 DNA 배수성, p53 단백질 및 상피세포성장인자 수용체 발현양상과 수술후 조기재발과의 상관관계에 관한 연구. *대한대장항문학회지* 1993;9:309-22.
 20. Fujiyama, S, Matsubara, H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, et al. Angiotensin AT1 and AT2 receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 2001;88:22-9.
-