대한병리학회지 1997; 31: 326~331

위선암종에서 CD44H와 CD44v6 이형의 발현양상

전주예수병원 해부병리과, 전주예수병원 부설 기독의학 연구원*

주명진 · 이혜경 · 이광민 · 정동규 · 박주홍*

The Expression of CD44H and CD44v6 in Gastric Adenocarcinoma

Myoung-Jin Ju, M.D., **Hae-Kyung Lee,** M.D., **Kwang-Min Lee,** M.D.
Dong-Kyu Chung, M.D. and **Choo-Hong Park,** M.D.*

Department of Anatomic Pathology and Christian Medical Research Center*
Presbyterian Medical Center

CD44, also known as the Hermes antigen, H-CAM, pgp-1 antigen, and extracellular matrix receptor ECM-III, is a widely distributed integral membrane protein that exists in a variety of forms with different molecular sizes ranging from 85kd to 160kd. A number of evidence implicates CD44 as a cell adhesion molecule with a possible role in tumor progression. To evaluate the possible roles of CD44 in the metastatic process of gastric carcinoma to the regional lymph nodes, we applicated immunohistochemical stains with the CD44H and CD44v6 primary antibodies onto the 2 groups of gastric adenocarcinomas. Each group was comprised of 22 primary tumors extending to the subserosa, and one group showed nodal metastasis, while the other group did not. Seventeen primary tumors (77%) out of the 22 cases with the nodal metastasis demonstrated positivity to the CD44v6, while only 9 primary tumors (41%) out of the 22 cases without nodal metastasis did. However CD44H immunoreactivity was demonstrated in tumor cells of all cases (100%) of both groups as well as in the normal cell components. These results suggest that CD44H form is not related to the metastasis to the regional lymph nodes of gastric carcinoma. However, the expression of CD44v6 seems to play a certain role in the metastatic process of the gastric carcinoma. **(Korean J Pathol 1997; 31: 326~331)**

Key Words: Gastric adenocarcinoma, CD44H, CD44v6, Metastasis

서 론

일반적으로 종양은 성장하면서 그중 어느 세포군이 전이성을 획득하게되는데 이것은 아마도 유전적 변이의 결과로 일어나는 것으로 생각된다[1,2]. 전이성을 획득하게 된 세포군은 원발종양으로부터 떨어져 나와 기저막을 뚫고 결합조직과 결합한 후 혈관 또는 림프관을 뚫고 들어가 목표 조직으로 이동한다. 목표조직의 세포 또는 세포외 기질과 결합한 종양세포는 기저막을 뚫고 들어가 성장함으로써 전이가 이루어지게된다. 이러한 일련의 과정에서 중요한 것 중 하나가 세포 또는 세포외 기질과 결합하는 새로운 결합기능분자의 획득 및 소실이다.

접 수: 1996년 10월 22일, 게재승인: 1997년 1월 22일
주 소: 전주시 중화산동 1가 300, 우편번호 560-750
전주예수병원 해부병리과, 주명진

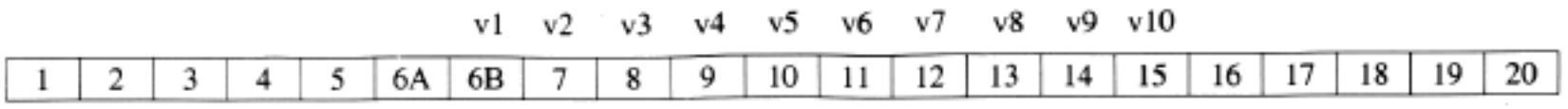

Fig. 1. Schematic presentation of CD44.

CD44는 세포 또는 세포외 기질과 결합하는 세포 결합기능 분자로서 Hermes 항원[3], H-CAM[4], pgp-1항원[5] 그리고 ECM-III[6]등으로 불리워지고 있으며 분자량 85 kd에서 160 kd의 범위에서 다양한 형태를 갖는 물질이다. 이중 90 kd분자량은 주로 백혈구에서 발현하며 림프절의 고내피정맥(high endothelial venule)에 결합하여 림프구의 회귀성(homing)에 중요한 역활을하고[3], 150~160 kd의 분자량을 갖는 이형은 주로 상피세포 및 간엽세포에서 발현하며 hyaluronic acid의 결합부로서의 기능을 수행한다[7].

CD44는 20개의 exon으로 구성되어 있으며[8] RNA의 접합과정중 6번부터 14번의 exon이 삽입되어 여러 가지의 이형이 만들어진다[8,9,10]. 이러한 삽입되는 exon이 없는 형태를 기본형(CD44H 혹은 CD44S)이라고 부르며 그 분자량은 85 kd~90 kd이다.[11,12] 인간에서는 9개의 다양한 exon이 삽입되어 9개의 이형(v2-v10)이 만들어지고 쥐에서는 10개의 이형이 만들어진다(v1-v10)(Fig. 1).

CD44가 종양성장에 있어서 결합기능분자로서의 어떠한 기능을 수행하는 것으로 생각되는 여러 연구들이 비 호지킨 림프종[13], 악성 흑색종[14], 대장 선암종[15]등에서 보고되고 있다. 특히 이와같은 종양중에서도 높은 전이력을 갖는 종양에서 CD44의 발현이 높은 것으로 보고되고있으며 그중 CD44v6 이형의 발현이 높을수록 전이력과 예후에 관계가 있다[13,15].

이에 저자들은 위암종에서 침습정도가 같음에도 불구하고 주위의 림프절에 전이된 군과 전이되지 않은 군에서 CD44H와 CD44v6의 발현양상을 비교관찰한후 위암종의 림프절 전이에 있어서 CD44H와 CD44v6의 역할을 알아보기위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

연구재료는 1991년에서 1995년까지 전주 예수병원에서 위암으로 진단받고 위 전아적축술 또는 전적축술을 받은 838예중 조직학적으로 선암종으로 진단되고 장막하층까지 침습하였으며[16] 림프절 전이가 없었던 경우 22예를 대상으로 하였고 대조군으로 같은 침습정도이면서 림프절전이가 있었던 경우 200예중 무작위 선택에의한 22예의 원발종양과 림프절 전이종양을 대상으로 하였다.

2. 방 법

10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 통상적으로 제작된 파라핀 포매괴를 4 μm두께로 박절하고 poly-L-lysin으로 처리된 slide에 부착시켜 56°C 온장고에서 48시간 건조한후 LSAB kit(DAKO K0680)를 이용하여 염색하였다.

항원 회복(antigen retrieval)의 방법으로 전자렌지용 플라스틱 용기(coplin jar)에 10 mM citrate buffer(pH 6.0)를 100 cc 넣은후 slide를 3~4장 넣고 microwave oven에서 5분씩 3회 가열하였다[17]. 매 5분마다 coplin jar의 citrate buffer를 보충하여 조직이 건조되는 것을 막아주었다. 세척액으로 trizma base(Sigma T-8524) 6.1 gm, Nacl 8.5 gm, Hcl 3.75 ml에 증류수 1000 cc를 넣어만든 tris buffer saline(pH 7.6)을 사용하였으며 1차항원으로 기본형인 CD44H(BBA 10, R&D system)와 이형으로 CD44v6(BBA 13, R&D system)을 사용하여 습윤 판에서 24시간 항온반응 하였다. Biotin이 부착된 이차항체를 반응시킨후 streptoavidin-alkaline phosphatase를 이용하여 AEC chromogen으로 발색한후 hematoxylin으로 대조염색하였다.

통계처리는 SPSS를 이용하여 통계처리하였다.

결 과

전주예수병원에서 5년간(1991~1995년) 위선암으로 장막하층까지 침습하였으며 림프절 전이가 없었던 군(비 전이군)의 경우는 22예로서 위암으로 진단받고 위절제술을 받았던 총 838 예중 2.6 %이었으며 림프절 전이가 있었던 군(전이군)의 경우는 200예로서 24%를 차지하였다.

비 전이군의 나이는 26세에서 73세(평균 56세) 이었으며, 전이군의 경우는 37세에서 69세(평균 58세)이었다. 각각의 성비는 남자 : 여자가 10 : 12와 16 : 6로 전이군에서 남자가 많았다. 수술시 절제된 림

Table 1. Correlation of tumor differentiation and frequency of CD44H, CD44v6 reactivity in gastric adenocarcinoma with lymph nodes metastatic group

Differentiation	CD44v6 positivity(%)		CD44H positivity(%)	
	Primary tumor	Tumor of LN	Primary tumor	Tumor of LN
PDA	13/15(81%)	9/15(60%)	15/15(100%)	15/15(100%)
MDA	3/6(50%)	2/6(33%)	6/6(100%)	6/6(100%)
WDA	1/1(100%)	1/1(100%)	1/1(100%)	1/1(100%)
Total	17/22(77%)	12/22(55%)	22/22(100%)	22/22(100%)

PDA: poorly differentiated adenocarcinoma
MDA: moderatly differentiated adenocarcinoma
WDA: well differentiated adenocarcinoma
LN: lymph node

Table 2. Corelation of tumor differntiation and frequency of CD44H, CD44v6 reactivity in gastric adenocarcinoma without lymph node metastatic group

Differntiation	CD44v6 positivity(%)	CD44H positivity(%)
	Primary tumor	
PDA	6/12(50%)	12/12(100%)
MDA	3/10(30%)	10/10(100%)
Total	9/22(41%)	22/22(100%)

PDA: poorly differentiated adenocarcinoma
MDA: moderatly differentiated adenocarcinoma

프절 수는 비 전이군의 경우가 9개에서 69개(평균 31개), 전이군의 경우가 10개에서 56개(평균 32개)였다.

조직학적으로 선암의 분화정도는 전이군 22예중 저분화 15예 중등도 분화 6예 고분화 1예로 저분화암의 경우가 압도적으로 많았으며 림프관 또는 혈관내에 종양이 침범된 경우는 3예가 있었다. 비 전이군에서는 저분화 12예 중등도 분화 10예이었으며, 림프관 또는 혈관내 종양이 있었던 경우는 없었다. (Table 1, 2)

CD44H는 림프절 전이의 유무에 관계없이 모든 종양세포 및 정상 선 상피세포, 평활 근육세포,그리고 림프구에서 미만성 양성으로 염색되었다(Fig. 2A). 또한 림프절에 전이된 종양세포에서도 모두 미만성 양성으로 염색되었다(Fig. 2B).

CD44v6는 원발종양세포와 림프절에 전이된 종양세포이외의 정상 선 상피세포, 평활 근육세포, 그리고 림프구에서는 염색되지 않았다(Fig. 3A, B). CD44H와 CD44v6 모두 세포막을 따라 염색되었다. 조직학적인 분화정도와 CD44v6의 발현과의 관계는 각각의 조직학적인 분화도에 따른 수가 너무 적어 통계학적으로 의의를 찾기가 어려웠다. 전이군 22예중 원발성 종양은 17예에서 염색되었고(77%) 그중 12예(71%)는 림프절에 전이된 종양세포에서도 염색되었다. 나머지 원발성 종양에서 염색되지 않은 5예 모두는 림프절에 전이된 종양세포에서도 염색되지 않았다. 비 전이군 22예중 9예(41%)에서 원발성종양이 CD44v6에 염색되었다. 전이군과 비전이군의 원발성 종양에서의 CD44v6의 발현양상은 통계학적으로 의의가 있게 전이군에서 발현이 높았다($p<0.05$).

고 찰

CD44는 대장 선암종[15], 악성 림프종[13],등 종양에서 전이에 깊이 관여하는 분자로 생각 되고 있다. 종양이 주위 조직으로의 전이되기 위해서는 정상적인 이물질 감시 체계망을 속이는 과정이 필요하다. 이러한 감시망을 피하기 위해 종양세포는 정상적인 세포로 위장이 필요한데 이러한 위장물질의 하나로 CD44를 이용하는 것으로 알려져 있다[18].

Steven등[18]은 종양세포에서 이러한 CD44의 이형의 발현이 림프절에서 종양세포가 정상적인 림프구로

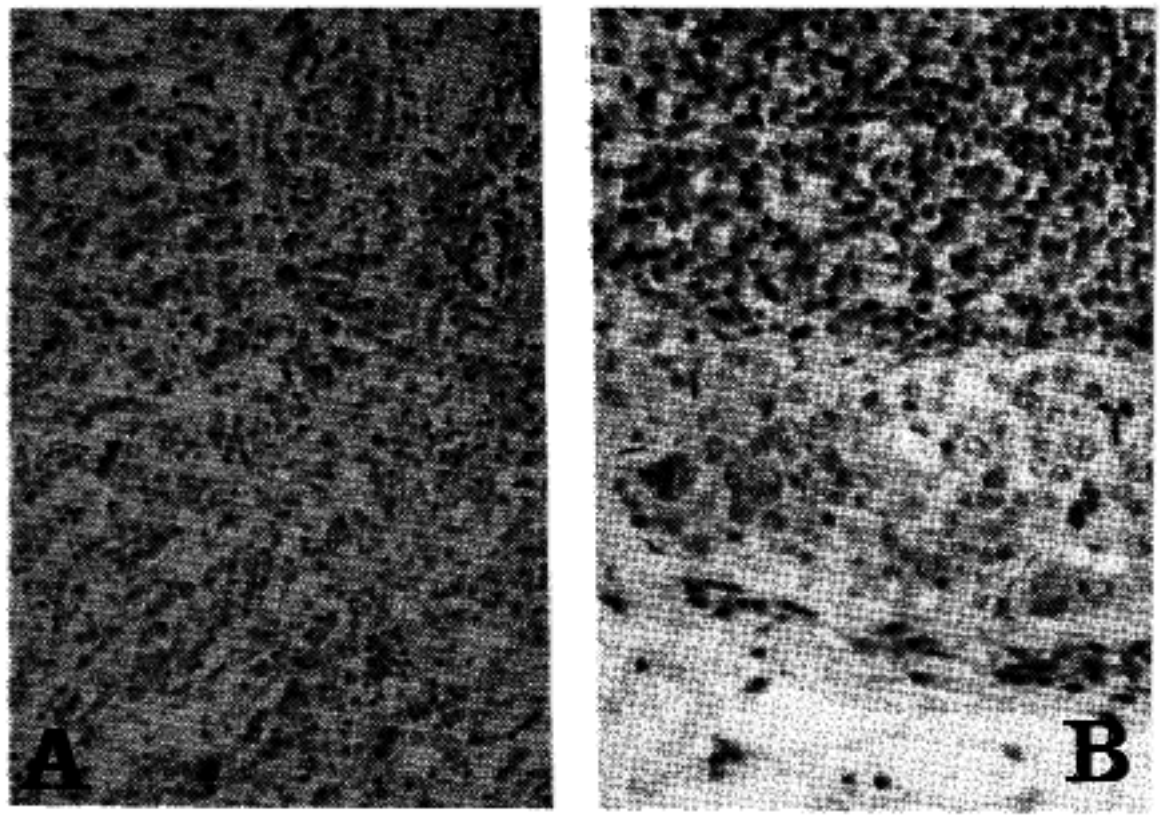

Fig. 2. Positive immunostaining for CD44H in the carcinoma cells (A) and in the nodal metastatic carcinoma cells(B).

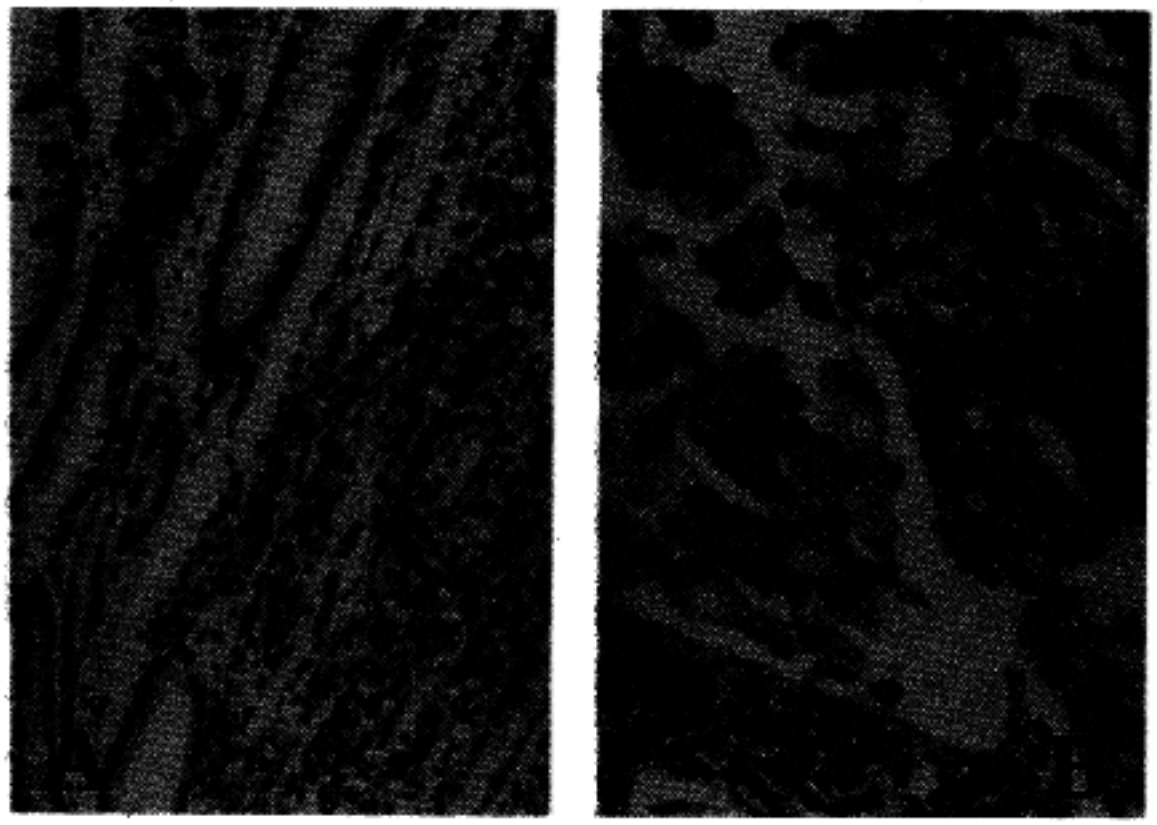

Fig. 3. Positive immunostaining for CD44v6 in the carcinoma cells (A) and in the nodal metastatic carcinoma cells(B).

위장하는 분자로서 작용하여 림프절에 종양세포가 전이하는데있어서 큰 저항없이 이루어질 수 있도록 하는 것 같다고 하였다. 또한 Gunthert등[19]의 보고에 의하면 쥐의 췌장암중 전이된 종양세포에서만 RNA의 새로운 접합으로(alternative splicing)생기는 CD44 이형이 발현한다는 사실이다. 특히 분자량이 높은 CD44이형이 hyaluronic acid에 더욱 강하게 부착하여 종양의 전이에 관여한다고 하였다. 최근에는 전이된 쥐의 종양세포에서 발현된 CD44이형이 활성화된 T 림프구에서도 발견되어져 림프절로 림프구의 이동에있어서 이러한 CD44이형의 발현이 중요한 것으로 생각되어지고있다[20]. CD44는 정상적으로 림프구뿐만 아니라 적혈구, 단핵 탐식세포, 각질형성세포, 갑상선의 상피세포, 섬유이세포 및 평활근 세포에서도 발현된다[15].

CD44는 분자량 85 kd에서 160 kd까지의 범위를 갖는 세포접합기능을 갖는 분자로서 mRNA의 splicing을 통해 세포외영역의 아미노산기의 변화에 의하여

10개의 이형이 만들어지는 물질이다. 그중 분자량이 낮은(85~90 kd) 이형은 림프구의 회귀성에 주로 작용하며[3] 분자량이 높은(150~160 kd)이형은 주로hyaluronic acid에 부착하는 물질로 알려지고 있다[21]. 이중 CD44v6는 대장 선암종 및 악성 림프종등에서 그들의 전이와 악성도에 깊이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 즉 CD44v6가 발현되는 대장의 선암종이 발현되지 않는 선암종보다 주위의 림프절로 더 많이 전이가 되어 있었으며[15], 악성 림프종에서는 악성도가 높을수록 CD44v6의 발현률이 높았으며, 비록 H-E염색상 악성도가 높은 림프종이라 할지라도 CD44v6의 발현이 높지않은 림프종은 예후가 악성도가 낮은 림프종과 비슷하여 환자에게 무리한 화학요법을 시행하지 않아도 된다고 하였다[13]. Kay등[22]은 위염과 궤양성 병변 및 위선암에서 CD44의 발현을 비교하였는데 위염과 궤양성 병변등에서는 CD44가 발현되지 않았으나 위선암종 특히 침습성이 높을수록 CD44의 발현률이 높았으며 예후에도 좋지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 CD44H는 전이군과 비 전이군의 원발성종양 및 위의 정상 상피세포 및 림프구에서도 미만성 양성으로 발현하였다. 또한 림프절에 전이된 종양세포에서도 모두 미만성 양성으로 발현하였다. 따라서 CD44H 이형은 종양세포의 림프절전이에 있어서 두 군간의 차이를 찾을 수 없었고 다른 보고자들과 같이 여러세포 즉 림프구, 평활근 세포에서도 발현하였다[15]. 또한 위의 정상 상피세포에서도 CD44H가 발현하였다. 반면에 CD44v6이형은 선택적으로 종양세포에만 염색되었고 림프절 전이군에서 림프절에 전이되지 않은 군과 달리 통계학적으로 의의가 있게 높은 발현률을 보였다. CD44이형이 활성화된 림프구에서도 발견된다는 점은 종양세포가 마치 정상 림프구인양 위장하여 감시체계망을 벗어나 무사히 림프절에 도달하여 림프절에 전이가 이루어진다는 보고가 있으나[18,20] 본 연구에서는 CD44v6이형이 림프절 또는 종양세포 주위의 림프구에서 발현되지 않아 위의 가설은 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 흥미로운 것은 림프절 전이가 있었던 군에서 원발종양이 CD44v6에 염색되지 않은 5예 모두 림프절에 전이된 종양세포에서도 CD44v6가 염색되지 않았다. 이는 위선암종 세포에서 CD44v6가 발현되지 않아도 림프절에 전이가 일어난다는 것을 의미한다. 또한 전이가 없었던 군에서 9예가 CD44v6를 발현한 것은 종양의 림프절 전이에는 CD44v6이외의 또 다른 물질이 필요하다는 것을 시사한다. 이는 또 다른 결합기능분자에 대한 연구가 위선암종에서 이루어져야 하며 림프절로의 전이는 하나의 결합기능분자에 의해서가 아니라 여러 가지 결합기능 분자들이 협력하여 이루어 질 가능성을 시사한다. 또한 림프절 전이군에서 원발종양에서 CD44v6를 발현하였으나 림프절에 전이된 종양에서 발현하지 않았던 5예의 경우는 원발종양이 림프절에 전이된 후에 CD44v6이형을 소실하기 때문인 것 같다[23]. 이는 종양의 결합기능분자는 한 번 발현하면 그 종양의 수명이 다 할 때까지 계속 유지되는 것이 아니고 자기의 기능을 수행한 후에는 소실된다는 것을 의미하는 것으로 생각된다.

결 론

위선암종으로 종양세포의 침윤이 장막하층까지이며 주위의 림프절에 전이가 있었던 군 22예와 침윤정도는 같으나 주위의 림프절에 전이가 없었던 군 22예에서 CD44H와 CD44v6의 발현 여부를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) CD44H는 림프절 전이유무에 관계없이 모든 종양세포에서 강하게 염색되어 두 군간의 차이를 발견할 수 없었다.

2) CD44H는 주위의 정상 선조직 및 림프구, 평활근 세포에서도 발현되었다.

3) CD44v6는 림프절 전이군에서 22예중 17예(77%)에서 양성을 보였으며 림프절 전이가 없었던 군에서는 22예중 9예(41%)에서 양성을 보여 통계학적으로 의의있게($p<0.05$) 림프절 전이군에서 높게 나타났다.

이상의 결과로 CD44v6가 위선암종의 림프절 전이에 관여하는 세포결합기능 물질의 하나임을 시사한다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Nicolson, GL. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogen to oncofetal expression. Cancer Res 1987; 47: 1473-87.
2. Hart, IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. Biochim Biophys Acta 1989; 989: 65-84.
3. Jalkanen S, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC. A lymphoid cell surface protein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. Eur

J Immunol 1986; 16: 1195-202.
4. Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adehesion molecules on diverse cell types. J Cell Biol 1989; 109: 927-37.
5. Hughes EN, Mengod G, August JT. Murine cell surface glycoproteins: characterization of a major component of 80,000 daltons as a polymorphic differentiation antigen of mesenchymal cells. J Biol Chem 1981; 256: 7023-7.
6. Carter WG, Wayner EA. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, trasmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. J Biol Chem 1988; 263: 4193-201.
7. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. EMBO J 1991; 10: 343- 8.
8. Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor Cd44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc Nat Acad Sci (Wash.), 1992; 89: 12160-4.
9. Hoffman M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, Gunthert U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. Cancer Res 1991; 51: 5292-7.
10. Jackson DG, Buckley J, Bell JI. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. J Biol Chem 1992; 267: 4732-9.
11. Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, Minty CN, Bagatze RF, Ding JF, Butchetr DC. A human lymphocye homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link protein. Cell 1989; 56: 1063-72.
12. Stamenkovic I, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell 1989; 56: 1057-62.
13. Jalkanen S, Joensuu H, Soderstrom KO, Klemi P. Lymphocyte homing and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Invest 1991; 87: 1835-40.
14. Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and charaterization of human melanoma cell variants expressing hign and low levels of CD44. Cancer Res 1991; 51: 6660-7.
15. Heider KH, Hoffman M, Rudy W, Reber M, Zoller S, Haussman I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H. A human homologue of rat-metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J Cell Biol 1993; 120: 227-33.
16. 대한병리학회 소화기병리학 연구회, 위암의 병리학적 취급규정 시안. 대한병리학회지 1992; 26: 154-63.
17. Giorgio C, Albert JH, Suurmeijer. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissue using microwaves: a review. Advances in Anatomic Pathology 1995; 2: 2-9.
18. Steven M, Albelda. Biology of disease: role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. Lab Invest 1993; 68: 4-16.
19. Gunthert U, Hoffman M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 1991; 65: 13-24.
20. Arch R, Wirth K, Hoffman M. Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zoller M. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. Science(Washington) 1992; 257: 682-5.
21. Culty M, Miyake K, Kincade PW, Silorski E, Butcher EC, Underhill C. The hyaluronate receptor is a member of the CD44(H-CAM)family of cell-surface glycoproteins. J Cell Biol 1990; 111: 2765-74.
22. Kay W, Marcia RG, Marilyn JT. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma. Hum Pathol 1994; 25: 1043-9.
23. Stefan NWD, Thomas Z, Corina C, et al. CD44v6 is a marker for sytemic spread in cutaneous T-cell lymphomas. J Cutan Pathol 1995; 22: 407-12.