

전립선암종에서 Cathepsin D, MMP-2, TIMP의 발현에 관한 연구

한림대학교 병리학교실, 이화여자대학교 병리학교실* 및 한효과학기술원 생화학부*

심정원 · 김순란 · 김운정 · 안혜경
박영의 · 김성숙* · 김민영*

Immunohistochemical Evaluation of Cathepsin D, MMP-2, and TIMP in Prostate Carcinoma

Jung-Weon Shim, M.D., Soon-Ran Kim, M.D., Yun-Jung Kim, M.D.
Hye-Kyung Ahn, M.D., Young-Euy Park, M.D.
Sung-Sook Kim, M.D.* and Min-Young Kim, M.D.*

Department of Pathology, Hallym University,
Department of Pathology, Ewha Womans University*,
Han-Hyo Institute of Technology*

Twenty six cases of primary adenocarcinoma of the prostate, ranging from 4 to 9 according to Gleason's summing score, were studied. Immunoreactivity was evaluated using the rabbit polyclonal anti-Cathepsin D antibody (CD), a mouse monoclonal MMP-2 antibody (MMP-2), and a tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP) in formalin-fixed, paraffin-embedded prostatic tissue. Immunohistochemical staining was scored by summing the intensity of staining (0 to 3+) weighted by the percentage of tumor staining at each intensity (H score, theoretical range 0 to 300). For CD, the tumor cells showed diffuse cytoplasmic immunoreactivity in all 26 cases (100%). For MMP-2 the tumor cells showed cytoplasmic immunoreactivity in 17 of 26 cases (65.38%). As the Gleason grade increased the expression of CD increased ($P=0.0027$). The reactivity of CD was significantly correlated with the Gleason's score ($R=0.65637$), but, the reactivity of MMP-2 was not correlated. There were no significant correlations between each of the CD and the MMP-2 scores, and stage. TIMP expression was predominantly localized in the stroma rather than in the cancer cells themselves. We believe that 1) CD and MMP-2, both immunohistochemically detectable in a majority of prostate adenocarcinoma, may play a role in determination of the invasive or metastatic property, 2) the enhanced TIMP expression in the stroma may be associated with the response to cancer invasion. (**Korean J Pathol 1997; 31: 342 ~ 350**)

Key Words: Prostate carcinoma, Cathepsin D, MMP-2, TIMP

접 수: 1996년 12월 16일, 게재승인: 1997년 2월 17일
주 소: 서울시 영등포구 대림1동 948-1, 우편번호 152-070
강남성심병원 해부병리과, 심정원

서 론

암환자의 예후를 결정하는 것은 암종의 침윤과 전이이다. 종양의 조직학적 등급, 병기, 종양의 부피 등도 환자의 예후에 유용한 지표가 될 수 있으나, 암종의 침윤과 전이에 관하여는 의존할 만한 생화학적 또는 분자생물학적 기준은 거의 드물었다. 고형성 종양의 예후 인자로서 최근 대두된 두 가지 단백질, 성장인자와 단백분해효소¹중, 후자와 종양 침윤과의 관계에 대한 논의가 활발하다.

한 곳에서 발생한 종양이 다른 곳으로 전이하게 되는 기전은 매우 복잡한 생화학적, 세포생리학적 과정을 거치게 된다. Liotta등²은 종양 침윤의 단계를 3단계로 제안한 바 있다: 1. 종양세포가 인접한 기저막에 부착하는 단계, 2. 종양세포와 유관한 단백분해효소에 의한 세포외 기질의 용해 및 분해, 3. 변화된 주변 기질로의 종양세포 이동이다. 침윤하는 종양세포가 단백분해효소를 분비시켜 기저막을 분해하는 것이 종양 침윤에서 중요한 것은, 일단 기저막을 통과한 종양세포는 인접 혈관의 기저막을 다시 분해하여 혈류를 타게 되기 때문이다. 전이소에서 정지한 종양세포는 다시 혈관 기저막을 뚫고 나가 전이소의 기질로 들어가 새로운 조직구조를 형성하게 된다³. 따라서 기저막 또는 세포외 기질 등의 단백질을 분해하게 되는 것은 종양이 침윤하고 전이하는 능력을 결정짓는 중요한 요소이다. 이러한 단백분해효소는 cathepsin, serine protease, metalloproteinase 등으로 분류할 수 있다⁴.

Cathepsin D는 리소솜에 위치하는 단백분해효소이자 자가분비성 유사분열물질로서 침윤과 전이의 표지자로서의 연구가 최근 활발하다. Cathepsin D의 활성도는 특히 유방암에서 임파절 전이여부와 무관하게 재발과 사망의 지표임이 이미 널리 알려져 있으며, 자궁내막암⁵, 폐암⁶, 난소암, 악성 흑색종, 간세포암종 등⁷에서의 연구도 보고되고 있다. 전립선암에서도 임상실험에서 Cathepsin D 발현과 종양 병기와 연관성이 주장되고 있으며⁸, 양성 증식증 환자와 비교해 볼 때, 전립선암에서는 Cathepsin D가 비정상적으로 발현된다는 보고가 잇따르고 있다¹⁸. 거세된 쥐를 대상으로 한 동물실험에서 아파프토시스를 일으킨 전립선에서 Cathepsin D가 발현된다는 보고가 있다¹.

제4형 콜라겐 분해효소(또는 MMP-2)는 금속의존성 기질분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 하

나로 기저막의 주된 구성원인 제4형 콜라겐을 선택적으로 분해시키며 기저막의 대사에도 관여한다. 제4형 콜라겐 분해효소의 활성도의 증가가 전이와 비례함이 실험동물에서 이미 보고되었고⁴, Stearns등⁹은 Northern and Southern blotting 방법으로 제4형 콜라겐분해효소가 전립선 암종의 Gleason 등급과 비례하여 증가한다고 보고한 바 있다.

MMP에 의한 단백분해는 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase)로 알려진 내인성 단백분해억제인자의 조절을 받게 된다. 정상세포와 종양세포 모두 MMP를 분비하는데도 종양세포만이 침윤성을 갖는다는 점을 고려해 볼 때, MMP의 종양내에서의 활동에 TIMP와 같은 억제인자의 역할이 결정적인 영향을 미칠 수 있다. 세포 군주 연구에서 TIMP의 과발현과 침윤 또는 전이의 억제와 유관하다는 보고도 있었고¹⁰, 전립선 암세포 군주의 연구에서는 TIMP의 생산이 저하되면, MMP의 분비가 조절을 벗어나거나 과다하게 활성화됨이 보고된 바 있다³. 이로 미루어 볼 때, TIMP는 암세포의 침윤과 전이를 조종하리라 생각된다.

전립선암의 경우 전이여부를 예측하는데 있어 종양세포의 조직학적 분화도, 기저막 분해 정도, 주변 기질로의 침윤 정도가 믿을 만한 지표가 될 수 있다고 가정하고, 저자들은 전립선 암종에서 면역조직화학적 방법으로 단백분해효소인 cathepsin D, MMP-2, 그리고 TIMP의 발현과 Gleason 등급, 즉 조직학적 분화도간의 상관관계를 고찰해 보고자 본 연구를 시도하였다.

연구 방법

대상조직은 한림대 부속 강남성심병원에서 1987년 부터 1996년까지 적출된 전립선암 26 증례와 전립선 양성 병변 10증례를 대상으로 하였다. 26증례 암종 중에서 2예가 전립선 전적출술 조직이었고 나머지는 모두 경요도 침생검조직이었다. 모든 조직이 포르말린 고정 후에 파라핀에 포매되어 있는 상태였다. 각 증례에 대하여 환자의 연령 및 임상병기를 파악하였다.

1. 광학현미경적 관찰

광학현미경을 이용하여 병리조직학적으로 검색하여 진단명을 확정된 후 암종에서는 복합 Gleason 점수 체계를 재적용시켰다.

2. 면역조직화학적 관찰

파라핀에 포매된 조직을 5 mm 두께로 절편하여 37°C에서 밤새 건조시켰다. xylene에서 10분간 두 번 탈파라핀 시킨 뒤 100%와 95% alcohol을 이용하여 각각 3분씩 재함수를 시켰다. 항원성의 회복을 위하여 pH 6.0의 citrate 완충액에 침수시킨 후 650와트에서 5 분간 2번 전자렌지에서 가열 처리한 후 실온에서 식히고 증류수에 수세하였다. 실온에서 10분간 PBS에 배양 후 조직내 내인성 peroxidase 활성을 차단하기 위하여 3% hydrogen peroxide에 10분간 반응시켰고 비특이적인 단백질과의 결합을 방지하기 위하여 10% goat serum으로 10분간 반응시킨 후 따라버렸다. 그 후 증류수로 수세하고 phosphate buffered saline(PBS)에 5 분간 담근 후 아래에 서술한 단백질 분해효소 등의 1차 항체들을 37°C에서 30분 반응시켰다. PBS에 2분간 3번씩 수세한 후 2차항체를 37°C에서 30분간 반응시키고 PBS로 수세하였고 streptavidin-biotin peroxidase complex로 실온에서 5분간 반응시킨 후 다시 PBS로 수세하고, 3-aminoethyl 9-carbasol(AEC)로 실온에서 15분간 발색시키고 증류수로 2분씩 3번 씻고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색한 뒤 crystal mount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 음성 대조로는 1차 항체를 생략한 채 위의 과정을 반복하여 그 면역 양상을 확인하였다.

1) **Cathepsin D:** 인체 비장에서 추출한 cathepsin D에 대한 토끼의 다클론성 항체(Signet, MA)를 1:100으로 희석하여 사용하였다. 편도선 수술조직의 슬라이드를 염색하여 탐식세포에서의 반응을 양성대조로 하였다.

2) **MMP-2:** 인체 MMP-2의 524번에서 539까지의 잔기에 해당하는 VTPRDKPMGPLLVA TF 올리고펩타이드로 마우스를 면역시켜 얻은 단클론성 항체(Calbiochem, MA)로서 1:5로 희석하여 사용하였다.

3) **TIMP:** 한효과학기술원의 김 민영 박사가 합성한 TIMP-2(tissue inhibitor of metalloproteinase) 항체를 제공받아 1:500으로 희석하여 사용하였다.

3. 결과 판독 및 분석

면역염색의 판독은 광학현미경을 이용하여 전체 조직에서 양성으로 발현되는 세포가 75%이상일 때 3등급, 50에서 75%, 25에서 50%, 25%이하일때 각각 2등급, 1등급, 0등급으로 나누었다. 0등급에서 3등급까지 나누어 점수를 매긴 후 각 등급의 면적 percentage를 곱하고 이를 모두 더하는 H-scoring sys-

tem(이론적 한계는 0에서 300점)을 적용하여 정량적인 평가를 시도하였다¹¹.

$$H\text{-score} = \sum (P_i \times i) \quad (P: \text{percentage}, i: \text{intensity})$$

통계학적 분석은 다음과 같이 시행하였다. 복합 Gleason 점수체계에서의 점수 4를 제1군, 점수 5,6을 제 2군, 점수 7, 8, 9를 제 3군으로 나누고 1군에서 3군으로 올라갈수록 Cathepsin D, MMP-2의 발현이 증가하는지를 Kruskal-Wallis 방식에 따라 검정하였다. 또한 신빙성을 더하기 위해 TIMP의 양성 염색 반응과 복합 Gleason 점수체계의 각 점수가 증가와 Cathepsin D, MMP-2의 발현과의 상관관계, 즉, 점수의 증감에 따라 양성반응이 증감하는지의 유의성과

Table 1. Clinical data and results of cathepsin D and MMP-2 expression in prostatic carcinoma

Case	Age	Gleason score	Cathepsin D (H-score)	MMP-2 (H-score)	Stage
1	77	7(4+3)	160	unstained	A2
2	62	4(2+2)	70	70	D2
3	62	7(4+3)	210	unstained	D2
4	76	7(4+3)	180	120	B2
5	68	7(3+4)	180	120	B1
6	80	4(2+2)	130	210	D2
7	70	6(2+4)	140	140	A
8	80	6(3+3)	110	30	D1
9	72	6(3+3)	120	unstained	D2
10	70	9(5+4)	270	unstained	A1
11	71	9(5+4)	230	unstained	D2
12	60	7(4+3)	90	unstained	D
13	60	8(3+5)	150	60	D2
14	83	6(3+3)	80	40	C1
15	66	7(4+3)	200	100	A1
16	78	4(2+2)	70	190	D2
17	86	7(5+2)	160	40	D2
18	88	5(2+3)	110	180	D2
19	32	5(2+3)	130	50	D2
20	73	5(3+2)	180	unstained	D2
21	70	4(2+2)	100	unstained	D2
22	63	4(2+2)	140	80	D2
23	82	5(2+3)	110	50	D2
24	80	5(3+2)	100	10	D2
25	78	4(2+2)	120	80	A2
26	51	6(2+4)	100	unstained	D

상관성을 Spearman 상관방식에 따라 검정하였다.

연구 결과

26 증례의 전립선암에 대한 각 환자의 연령과 병기, 면역염색 발현 결과를 Table 1에 요약하였다 (Table 1).

26증례 모두 주변영역 암종이었다.

1. Cathepsin D

종양의 cathepsin D에 대한 면역염색반응은 26증례 모두에서 양성반응을 보였다(100%). H-score의 범위는 70에서 270까지였다. 양성 반응은 주로 종양의 선상피세포에 위치하였으며 악성세포의 세포질에서 균일하게 염색되었다(Fig. 1). 종양 외부의 간질조직에서는 조직구 외에는 종양의 특정 형태에 따라 관찰되는 특별히 증가된 양성반응은 보이지 않았다. 복합 Gleason 점수 체계를 세 군으로 나누었을 때 점수가 증가함에 따라 cathepsin D의 양성반응이 유의있게 증가되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다($p=0.0027$). 상관 분석에서 복합 Gleason 점수 체계와 cathepsin D의 양성발현의 증가는 서로 상관성이 있었다($p=0.0027$, $R=0.65637$). 종양 병기와 cathepsin D의 상관분석에서는 통계학적으로 의의가 없었다($p=0.6443$).

종양 근처의 정상으로 보이는 선의 상피세포나 양성증식증의 상피세포에서는 음성이거나 부분적으

로 미약하게 관찰되었다. 정상 기저세포에서도 음성이었다. 그러나 기저세포 증식증이 일어난 곳에서는 증식이 일어난 기저세포에서 강하게 양성반응을 보였다. 요관의 이행상피세포나 주변 간질의 탐식구 등에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다. 편평상피화생세포에서도 양성반응을 관찰할 수 있었다.

2. MMP-2

종양의 MMP-2에 대한 면역염색반응의 26증례 중에서 17예에서 양성반응을 보였으며(65.38%) H-score의 범위는 10에서 210까지였다. 양성 반응은 주로 종양의 선이나 관을 피복하는 상피세포의 세포질에 위치하였다(Fig. 2). 종양을 둘러싸는 간질에서 양성반응이 보이기도 하였으나 특별히 양성반응이 관찰되는 특정 구조는 없었다. 분화가 나쁜, 복합 Gleason 점수가 9점인 종양 2예에서는 전혀 발현이 없었다(Fig. 3). 전립선 주변 조직을 침윤하는 종양세포에서의 발현양상은 전립선 내의 종양과 유사하였다. 복합 Gleason 점수 체계를 세 군으로 나누었을 때 복합 Gleason 점수와 MMP-2의 발현($p=0.1027$), 종양 병기와 MMP-2의 발현($p=0.525$, $R=-0.165$) 등은 통계학적으로 의의가 없었다.

양성증식증 병변에서 정상 기저상피세포는 중등도의 양성반응을 보이는 반면, 선이나 관상피세포는 아주 미약한 양성 반응이나 음성반응을 보였으며 위축되어보이는 세포는 전혀 양성반응을 보이지 않았다. 혈관내피세포에서 음성이었으며 요관이나 말

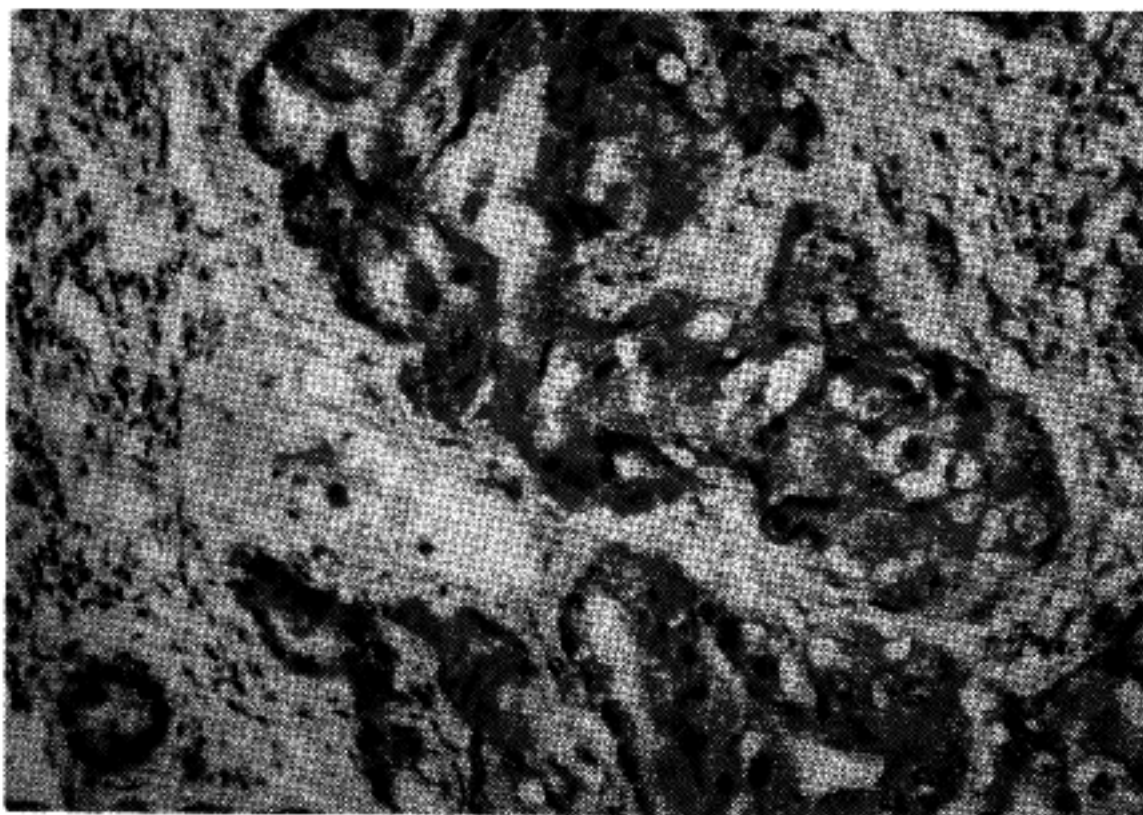


Fig. 1. Prostatic adenocarcinoma revealed strong cytoplasmic immunoreactivity with anti-cathepsin D antibody.

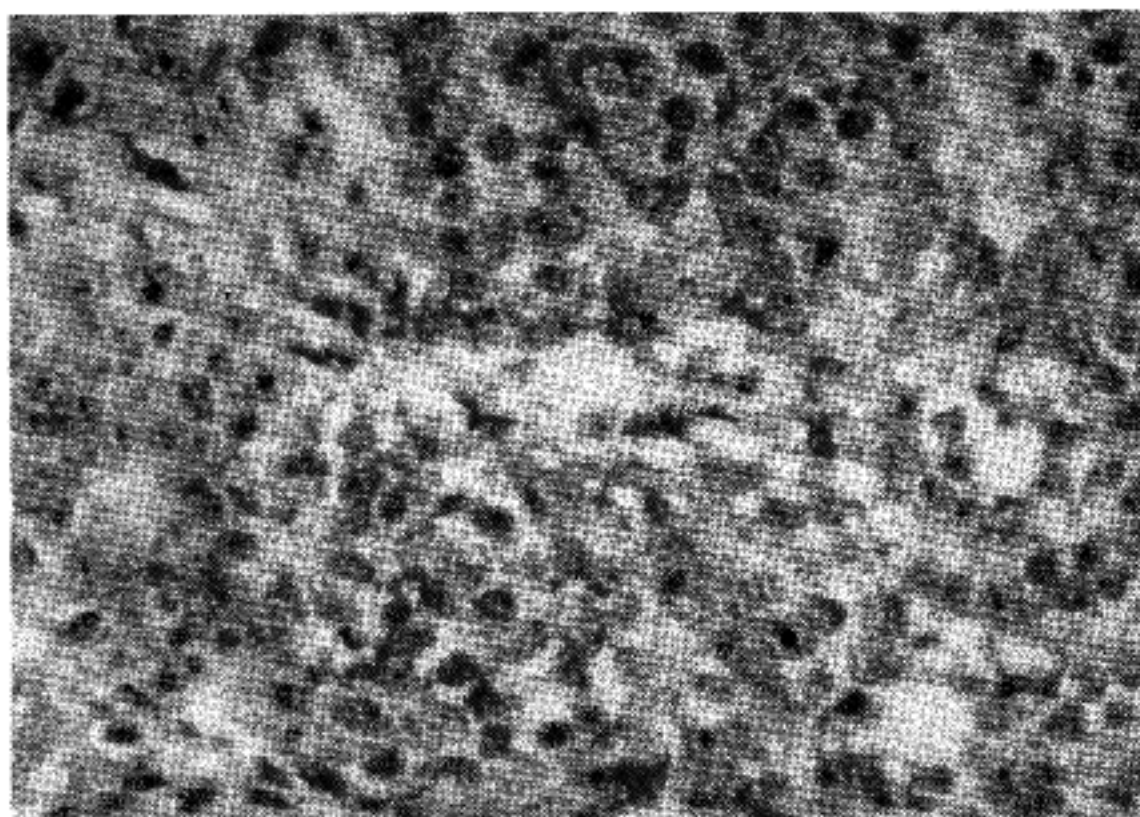


Fig. 2. Prostatic adenocarcinoma demonstrated diffuse cytoplasmic immunoreactivity for anti-MMP-2 antibody in malignant epithelial cells.

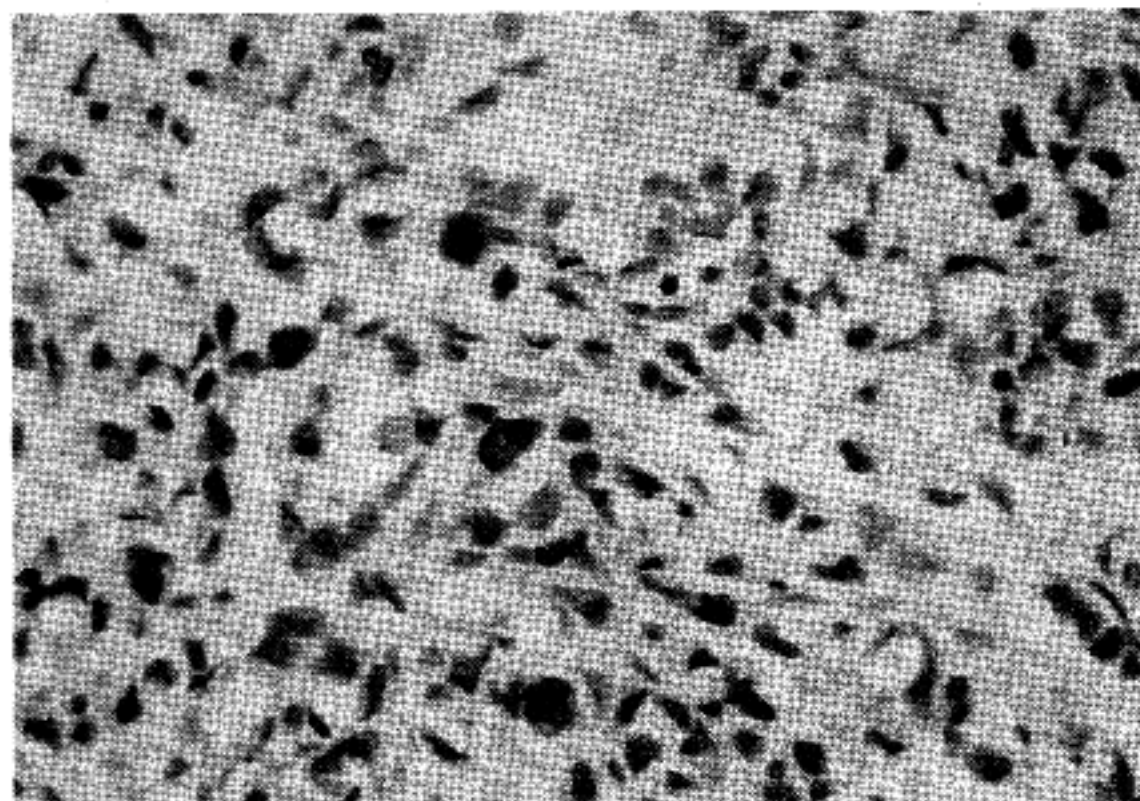


Fig. 3. A high grade prostatic carcinoma(Gleason score 9) did not demonstrate immunoreactivity with anti-MMP-2 antibody.

단 전립선 관의 이행상피는 중등도의 양성반응을 보였다. 양성 증식증의 10%에서 세포질에 중등도의 양성반응을 보이는 간질조직세포를 관찰할 수 있었다.

3. TIMP-2

TIMP-2는 26증례 모두에서 종양세포에서는 음성이었으며 종양 바로 인접 부위의 간질 조직에서 양

성 반응을 보였는데 이는 주로 섬유아세포와 혈관의 내피세포였다(Fig. 4). 양성 증식증 병변에서도 간질조직에서 양성반응이 관찰되었으나 암종 조직과 비교하여 볼 때 그 발현이 상대적으로 미약하였다.

고 찰

혈청 PSA 검사로 인해 표재성 전립선암의 발견이

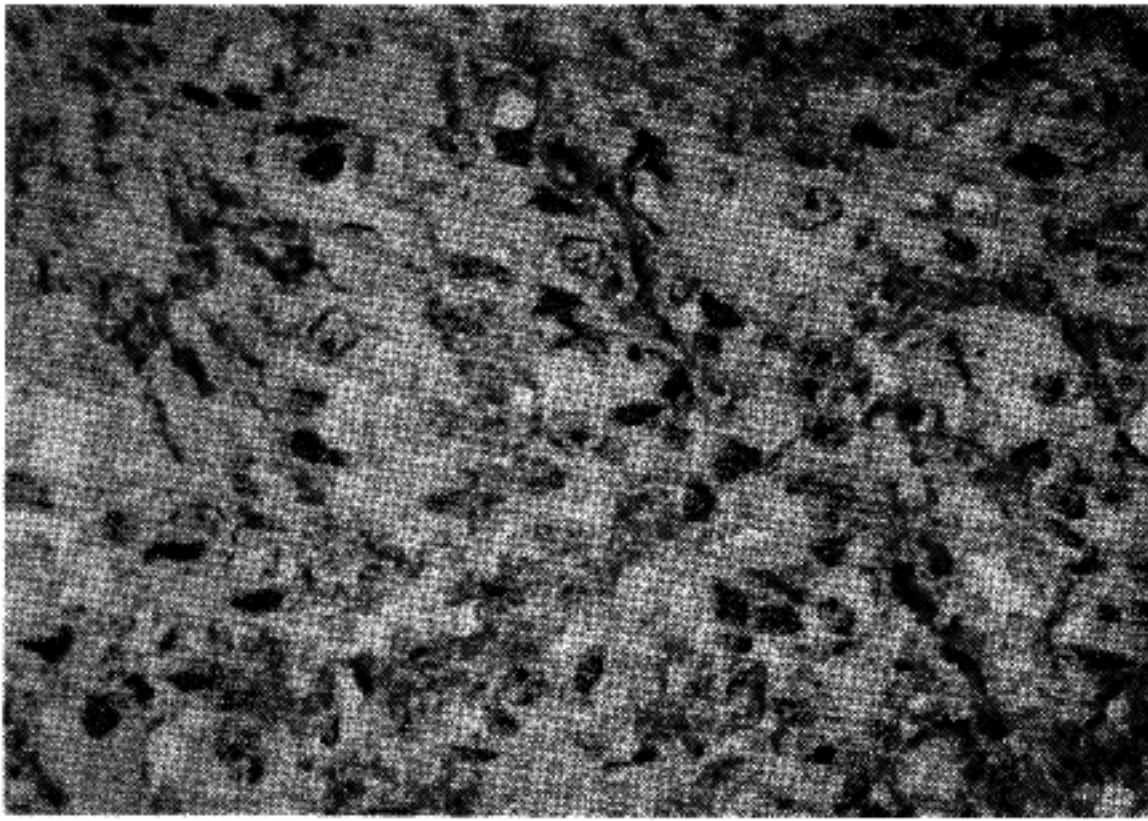


Fig. 4. TIMP-2 immunoreactivity was found exclusively in the peritumoral stroma.

늘어남에 따라 조기 전립선암의 치료에 대한 기준 설정이 활발히 논의되고 있다. 현재 범위가 국한되어 있는 암종이 전이할 것인지 아니면 천천히 진행될 것인지 여부를 결정하는 것이 임상적으로 중요하다. 이와 같은 면에서 종양의 침윤에 관여하는 여러 단백질분해효소에 대한 연구가 전립선암 환자의 치료에 중요성을 가질 수 있다. 본 연구자들은 단백질분해효소의 연구에서 전립선암의 조직학적 분화와 단백질분해효소가 상관성이 있다면 단백질분해효소가 환자의 예후 예측에 의미를 가질 수 있으리라는 가정 하에 연구를 하게 되었다.

Cathepsin D는 정상적으로 인체 및 동물조직의 거의 모든 세포에서 낮은 농도로 존재하고 있으며 52-kd, 48-kd, 34kd 세 가지 형태의 cathepsin D가 있다¹². cathepsin D는 기저막과 세포외기질 등을 분해시킴으로써 종양 침윤에 관여하게 되는데 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 리소솜내에 위치하면서 직접적으로 외부 단백을 분해시키거나 procollagenase를 collagenase로 활성화시키는 등의 다른 단백질분해효소의 활성화에도 관여하는 것으로 추측된다⁶.

종양 진행 인자로서의 cathepsin D의 역할은 유방암에서 널리 알려져 있다. 이는 유방암의 무질병 기간, 전체 생존율과 cathepsin D 혈청치의 증가는 역비례관계라는 보고가 많기 때문이다¹².

이 cathepsin D를 전립선 병변에서 연구한 보고도 잇따르고 있다. 최근 Makar등⁸과 Maygarden등¹은 전

립선 암에서의 cathepsin D의 면역조직화학적 발현이 양성 증식증에서보다 강하게 나타난다고 하였다. Makar등⁸은 cathepsin D의 면역조직화학적 발현의 증가가 종양의 병기와는 상관성이 있으나 종양의 Gleason 등급과는 의미있는 상관성이 없고, Gleason 등급이 증가할수록 cathepsin D가 증가하는 경향이 있지만 통계학적 의미를 발견하지는 못했다고 보고하였다. 이들은 면역조직화학적 염색의 관독에서 본 연구에서의 H-scoring와 달리 양성 또는 음성 반응만으로 관독하였다⁸. 위프질에 전이된 암종에서도 cathepsin D가 발현되는 것으로 볼 때 cathepsin D가 전립선 종양의 침윤성에 역할을 한다고 주장하였다. 한편, Maygarden등¹은 102예의 전립선 암을 대상으로 한 연구에서 94%의 양성 발현율과 176.5의 평균 H-score 점수를 보고하였으며, cathepsin D 발현의 증가가 조직학적 등급과 상관이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 100%의 양성 발현율을 보였고 cathepsin D의 발현이 증가할 수록 Gleason 점수도 증가하였다. Maygarden등¹의 연구와 본 연구의 결과를 비교하여 볼 때 cathepsin D의 증가와 암종의 조직학적 분화가 역상관관계에 있으며 따라서 암종의 침윤성의 결정에 cathepsin D가 관여할 가능성을 제시할 수 있겠다.

Matrixin이라고도 알려진 MMP는 Zn^{2+} 에 의존하는 내인성 캐터나제로 전환상태 뿐 아니라 정상 간질 조직의 대사에도 관여하며 제4형 콜라겐, laminin,

fibronectin 등으로 주로 구성되는 기저막의 분해를 일으킨다³. 정상세포에 의해 분비되는 MMP는 pro-enzyme 형태로 불활성 상태이다. 여기에는 분해 대상에 따라 gelatinase, stromelysin, interstitial collagenase 3가지 집단이 있다. Gelatinase, 또는 제4형 콜라겐 분해효소로 불리는 MMP-2는 분자량 72kd로 콜라겐 제IV형, 제V형, 제VII형, 제X형, elastin, fibronectin, gelatin 등을 분해한다¹³.

Boag와 Young⁴은 전립선 정상조직, 양성 증식증, 악성 종양에서 제4형 콜라겐 분해효소의 발현을 비교하여 이 효소가 암종에서 과발현됨을 보고한 바 있다. 또한, 이들이 117예의 양성 및 악성 전립선 조직을 대상으로 한 연구에서 제4형 콜라겐 분해효소의 단백질과 mRNA가 모두 증가해 있고, 이형성 상피세포나 암종에서 서로 거의 유사하게 제4형 콜라겐 분해효소가 과발현되고 있으므로 제4형 콜라겐 분해효소가 침윤성의 결정에 어떤 역할을 맡고 있다고 주장하였다¹⁴. 이들은 제4형 콜라겐 분해효소의 발현과 종양의 병기나 조직학적 등급사이에는 상관성이 없다고 보고하였다. 본 연구에서도 전립선 암 26례중에서 21예에서 제4형 콜라겐 분해효소가 발현되었으나 Gleason 점수와는 상관성을 발견하지 못했다. 본 연구에서도 Boag와 Young의 연구에서와 같이 종양에서 발현되는 이 효소의 대부분은 악성종양세포에서 발현되었으며 종양 주변의 간질에서는 효소의 발현을 알아보기 힘들었다. 항체의 희석배율을 변화시켜도 마찬가지로 전립선 암의 경우, 세포외기질의 단백분해효소의 발현은 인지할 수 있는 기준이하로 생각된다. 유방암, 대장암, 간세포암종 등에서는 제4형 콜라겐 분해효소의 발현은 주로 악성세포에 국한되어 발현되나^{15,16,17} 피부암, 폐암, 직장암 등에서는 인시투 보합으로 보니 제4형 콜라겐 분해효소의 전사체가 주로 간질세포에 분포하는 것으로 나타나¹ 이들 종양에서는 제4형 콜라겐 분해효소가 주로 간질세포에서 만들어지는 것으로 생각된다. 위암조직에서 진행위암의 42%에서 MMP-2의 양성 발현을 보고한 Nomura 등²¹은 이들이 주로 세포막을 따라 발현된다고 하였다. 또한 조기위암과 비교해볼 때 진행위암에서 전적으로 발현되므로 종양이 진행될 수록 MMP-2가 과발현된다고 주장하였다. 그러나 본 전립선 연구에서는 종양의 분화가 나쁜 2예(Gleason 점수 9점)에서는 MMP-2의 발현을 관찰할 수 없었다.

한편, 양성 병변에서의 선과 관의 상피세포에서는 제 4형 콜라겐 분해효소의 면역조직화학염색적 발

현은 악성세포와 비교해 볼 때 매우 다양하게 나타났으며 이는 Stearns와 Wang⁹의 연구와 유사한 결과이다. 암종의 전구 단계인 고등급의 PIN(prostatic intraepithelial neoplasia)에서도 제4형 콜라겐 분해효소의 면역조직화학적 발현이 크게 증가되어 있음이 보고되었다⁹. 전립선에서의 PIN 병변은 유방의 비정형성 상피세포증식증과 상피내암종에 해당하는 병변으로 이들 유방의 병변들에서의 제4형 콜라겐 분해효소의 증가는 널리 알려져 있다. 전립선을 포함한 여러 기관에서 제4형 콜라겐 분해효소의 증가가 암종의 전구병변에서 발견된다는 것은 제4형 콜라겐 분해효소가 침윤성의 결정에 관여할 가능성이 매우 높다는 것을 의미하므로 이 분야에서의 연구도 필요할 것이다. 그리고 본 연구와 최근의 연구결과를 종합해 볼 때, 전립선의 암 전구병변과 암 세포에서 제4형 콜라겐 분해효소가 과발현되는 것은 침윤성과 연관이 있으며 예후인자로서의 가능성을 제시한다고 생각된다.

활성상태의 금속성 단백분해효소(MMP)의 분비는 종양에서만 일어나는 것은 아닌데 이는 동물 실험 결과 사춘기 이전의 전립선 세포도 활성상태의 MMP-2를 분비함이 밝혀졌기 때문이다⁹. 따라서 MMP-2의 분비만으로는 종양에서의 기저막의 분해를 전부 설명하기가 어렵다. 게다가, 비금속성 단백분해효소, 예를 들면 urokinase 같은 단백분해효소도 기저막 분해와 같은 병리기전에 참여할 것이므로 전립선의 악성종양일 때 기저막의 분해에는 많은 인자가 관여할 것이다. 그러므로 Liotta등²이 제안한 대로 기저막의 분해는 조절인자와 억제인자간의 불균형의 결과로 해석할 수 있다. 이들 억제인자 중의 하나가 바로 TIMP이다. 정상세포는 아마도 TIMP와 MMP의 분비가 균형을 이루어 기저막의 분해 대사가 조절이 될 것이다. 그러나 악성 종양의 경우, 이들간의 불균형이 암종의 침윤과 전이를 조장할 수 있다². 따라서 잠재상태의 MMP를 활성화시키거나, TIMP를 공급해주거나, TIMP의 분비를 활성화시키면 침윤과 전이 가능성을 억제할 수 있을 것이다. Lokeswar 등³은 정상, 양성 증식증, 악성 종양 등에서 MMP와 TIMP의 분비양상을 측정함으로써 이 이론의 증명을 시도하였는데 상피세포의 성장을 유도하는 무혈청 배지에서 정상과 양성 증식증의 여러 전립선 조직의 상피세포를 배양하여 전립선에서 양성과 악성종양사이에서 뚜렷이 구분되는 것은 TIMP의 분비양상뿐이며 MMP-2와 MMP-9의 분비에는 큰 차이가 없었다고 보고하였다.

현재까지 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 세 가지의 TIMP 유전자가 확인되었다²². Visscher 등²³은 TIMP-1, TIMP-2 양자 모두 암조직에서는 주로 간질세포에서 발현되는 경향이 있으며 이는 암종의 침윤에 대한 생체 반응으로 이 암종의 나쁜 예후를 나타낼 수 있다고 주장하였다. Zeng 등²⁴의 보고에서도 인시투 보화 연구에서 TIMP-1의 mRNA는 주로 종양의 악성세포보다는 간질조직에서 섬유아세포 유사세포에서 주로 발현되었다. Nomura 등²⁵의 위암 연구에서는 TIMP-1은 암세포에서는 발현되지 않았고 주변 간질에서만 발현되었고 TIMP-2는 약 43%에서 암세포의 세포질에서 발현되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 종양 주변의 간질조직에서 발현되는율이 26종례(100%)였으며 종양세포에서의 발현은 관찰할 수 없었다.

결 론

전립선 암종 26종례와 양성 증식종 10 종례를 대상으로 면역조직화학 염색을 통하여 cathepsin D, MMP-2, TIMP의 발현을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Cathepsin D의 발현은 26종례(100%) 모두 종양 세포에서 발현되었고 양성 발현과 Gleason 등급 체계의 증가와는 통계학적 의의의 상관성이 있었다(P=0.0027, R=0.65637).

2) MMP-2의 발현은 17종례(65.38%)의 종양세포에서 발현되었고 양성발현과 Gleason 등급 체계의 증가와는 통계학적 의의의 상관성이 없었다(P=0.1027, R=-0.165).

3) TIMP-2는 26종례(100%) 모두에서 암종 주변 간질조직에서 발현되었다.

이상으로 종양의 침윤과 전이에 중요한 cathepsin D와 MMP-2가 전립선 암종에서도 역할을 맡고 있으며, 특히 cathepsin D는 예후인자로서의 가능성이 있다고 생각된다. 그리고 전립선 간질 조직세포들이 암종의 침윤에 대응하는 방법의 하나로 TIMP를 분비시킬 가능성이 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Maygarden SJ, Novotny DB, Moul JW, Bae VI., Ware JL. Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 930-6.
 2. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevensonh WG. *Cancer*

metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-36.
 3. Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, Gunja-Smith Z. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors(Tissue Inhibitor of Metalloproctcinases) by human prostate in explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinases secretion by malignant tissue. *Cancer Res* 1993; 53: 4493-8.
 4. Boag AH, Young ID. Immunohistochemical analysis of Type IV collagenase expression in prostatic hyperplasia and adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1993; 6: 65-8.
 5. Nazeer T, Church K, Amato C, et al. Comparative quantitative immunohistochemical and immunoradiometric determination of cathepsin D in endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 469-74.
 6. Suhoh N, Abe S, Ogura S, et al. Immunohistochemical study of cathepsin B: prognostic significance in human lung cancer. *Cancer* 1994; 74: 46-51.
 7. Lcto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic disease. *Cancer Res* 1992; 12: 235-40.
 8. Makar R, Mason A, kettelson JM, Bowden GT, Cress AE, Nagle RB. Immunohistochemical analysis of cathepsin D in prostate carcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 747-51.
 9. Stearns ME, Wang M. Type IV collagnenase(Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 1993; 53: 878-83.
 10. Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP-2): a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989; 264: 17374-8.
 11. Budwit-Novotny DA, Mccarty KS, Cox EB, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986; 46: 5419-26.
 12. Ross JS, Nazeer T, Figgc HL, Fisher HAG, Rifkin MD. Quantitative immunohistochemical determination of Cathepsin D levels in prostatic carcinoma biopsies: correlation with tumor grade, stage, PSA level, and DNA ploidy status. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 36-41.
 13. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-5.
 14. Boag AH, Young ID. Increased expression of the 72-kd Type IV collagenase in prostate adenocarcinoma: demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol* 1994; 144: 585-91.
 15. Monteagudo C, Merino JM, San-Juann J, Liotta LA,

- Stetler-Stevenson WG. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1991; 136: 585-92.
16. Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisa S, et al. Increased expression of the Mr 72,000 type-IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 439-44.
 17. Grigioni WF, Garbisa S, D'Errico A, et al. Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens. *Am J Pathol* 1991; 138: 647-54.
 18. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, et al. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type-IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992; 52: 1336-41.
 19. Poulson R, Pignatelli M, Stetler-Stevenson WG, et al. Stromal expression of 72 kDa type-IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 messenger RNAs in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1992; 141: 389-96.
 20. Soini Y, Paakko P, Autio-Harjainen H. Genes of Laminin B1 chain, $\alpha 1(IV)$ chain of type IV collagen, and 72-kd type IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 142: 1622-30.
 21. Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y. Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69(1): 9-16.
 22. Pavloff N, Staskus PW, Kishnanai NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinase from chicken. *J Biol Chem* 1992; 267: 17321-6.
 23. Visscher DW, Hoyhtya M, Ottosen SK, et al. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 1994; 59: 339-44.
 24. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillen JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 899-906.
-