

유방 침윤성 관암종의 CD44 발현도와 예후 인자들과의 관계

경북대학교 의과대학 병리학교실, 법의학교실*
경북대학교 치과대학 구강 미생물학교실**

이승철 · 손윤경 ·곽정식* · 정운복** · 김정완**

Prognostic Value of CD44v6 Isoform in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast

Seung Cheol Lee, M.D., Yoon Kyung Sohn, M.D., Jung Sik Kwak, M.D.*
Woon Bok Jung, M.D.** and Jung Wan Kim, M.D.**

Department of Pathology, and Department of Forensic Medicine,
Kyungpook National University, School of Medicine
Department of Dental Microbiology, Kyungpook National University, School of Dentistry**

CD44 is a family of transmembrane glycoproteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions. Expression of CD44 isoforms (splice variants) has been shown to be associated with poor prognosis in several human cancers. We evaluated the expression patterns of the CD44 isoform (CD 44 splice variant v6) in infiltrating ductal carcinoma of the breast by immunohistochemical and RT-PCR method. Paraffin embedded blocks from seventy-five cases of mastectomized samples were analyzed immunohistochemically using monoclonal antibody against CD44v6. CD44v6 was detected in fifty-seven cases (76%) of the tumor samples. Adjacent normal myoepithelial cells and ductal epithelial cells revealed focal positive reaction to CD44v6. Thirty-two cases (80.0%) with lymph nodal metastasis revealed overexpression of CD44v6 monoclonal antibody, but twenty-five cases (71.4%) without nodal metastasis also showed positive reaction to CD44v6 monoclonal antibody, and there is no statistically significant value. Other prognostic factors of infiltrating ductal carcinoma, such as tumor size, histologic grade and hormonal receptors did not show any significant correlation with CD44v6 expression. The RT-PCR studies for 9 cases of infiltrating ductal carcinoma showed the same band patterns both in the normal and tumor tissues. From the above results, it is concluded that the expression of CD44v6 is not a valuable prognostic marker of infiltrating ductal carcinoma of breast. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 635 ~ 643)

Key Words: CD44 v6, Infiltrating ductal carcinoma, Breast, Immunohistochemistry, RT-PCR,

접 수: 1997년 2월 19일, 게재승인: 1997년 4월 17일

주 소: 대구시 중구 삼덕동 2가 50, 우편번호 700-721

경북대학교 병원 해부병리과, 이승철

이 논문은 1994년도 경북대학교 병원 임상의학연구소 연구비의 지원으로 수행하였습니다.

서 론

유방암은 여성에 발생하는 가장 흔한 악성 종양의 하나로 최근의 조기 진단법의 개발과 치료방법의 개선에도 불구하고 종양의 재발이나 이로 인한 사망율은 여전히 높은 편이다. 임상적으로 진행된 유방암의 예후를 판정하기 위하여 종양의 크기, 세포의 조직학적 악성도, 림프절전이, 에스트로겐 및 프로게스테론 호르몬의 수용체의 면역조직화학적 검색등¹⁻⁵이 현재 이용되고 있으며 이를 토대로 치료방법을 결정하고 있다. 최근 분자생물학적 기법의 발달과 더불어 유방암을 위시한 각종 종양의 생태를 연구하고자 하는 노력이 이루어 지고 있으며 이들 중 일부는 조직에서 유의한 정도로 과표현된다. 유방암의 경우 c-erbB-2, bcl-2, cathepsin D, p53, Rb, c-myc, cyclin D 등 세포의 성장과 분열에 관계되는 유전자의 변이가 동반되거나 표현 단백질의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다⁶⁻¹⁰. 그러나 이들 물질은 악성 종양의 가장 큰 특징인 종양의 주변 조직 침윤과 원격장기의 전이와는 유의한 상관성이 입증되어 있지 않다. 최근 nm23의 발현의 감소와 종양의 전이가 유의한 상관관계가 있으며 이 물질이 종양의 전이 억제 인자로 작용할 것으로 보고 있으며¹¹ 세포 표면에 발현되는 CD44등이 일부의 악성 종양에서 예후와 상관관계가 있을 것으로 보고되는^{12,13} 등 악성 종양의 전이나 주위 조직의 침투와 직접적인 관련이 있을 것으로 추정되는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

악성종양의 예후를 결정하는 가장 중요한 인자인 종양세포의 주위 조직 침윤과 주위 림프절이나 원격장기로의 전이에서 종양세포들은 원발성종양에서부터 분리되어 기저막을 뚫고 인접한 림프계나 혈관계로 침범하여 다른 장기로 전이되거나 더욱 진행되는 것으로 알려져 있다. 이는 결국 종양세포표면의 변화로 인한 세포-세포간 혹은 세포-기질간의 접착력의 변화로 초래되며 따라서 이러한 종양의 전이 잠재력을 효율적으로 평가할 수 있는 방법의 개발이 암 연구의 일차적 목표의 하나로 생각된다. 이러한 점에서 구미각국에서는 cell adhesion molecule과 종양과의 관계규명에 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. CD44는 세포표면에 존재하는 transmembrane glycoprotein으로 유전자상에서 20개의 exon에 encode되어 있으며 이들 중 최소 10개의 exon은 다르게 splicing 하므로 15가지 이상의 다양한 단백

으로 표현된다^{14,15}. 일반적인 형태인 CD44s는 hyaluronate의 수용체로 작용하며 림프구등 혈구세포와 상피세포 등에 널리 분포하여 세포의 성장과 분화에 중요한 영향을 미친다. 그러나 정상세포에서 관찰되지 않는 변형된 CD44v형의 일부가 유방암, 대장암, 위암, 비호지킨씨 악성 림프종 및 자궁 경부암에서 그 발현이 증가되며 특히 exon 6번이 포함된 CD44 v6의 발현과 악성 종양의 전이에 유의한 관계가 있을 것으로 보고된 연구들이 최근 발표되고 있다^{12,13,16-22}. 이와 같은 각종의 악성종양에서 변형된 CD44의 비정상적인 발현에 대해 면역조직화학적 방법이나 PCR을 이용한 다수의 보고가 있으나 종양의 예후인자로서 CD44v의 정확한 의미에 대해선 많은 이론이 있으며 CD44 유전자의 비정상적인 배열과 종양과의 상관성에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구는 상기한 문헌적 고찰을 토대로 기존에 알려진 유방의 침윤성 관암종의 다양한 예후 인자들과 악성종양의 예후와 가장 관계가 있을 것으로 추정되는 CD44v6의 종양세포에서의 비정상적인 발현과의 연관성을 면역조직화학적 검색과 RT-PCR 방법을 이용하여 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. CD44 v6 단일 클론 항체에 대한 면역조직화학적 검색 및 기타 예후인자와의 비교

1) 재 료: 1992년부터 1994년 8월까지 경북대학교 병원에서 근치적 유방 절제술, 변형근치 유방 절제술 및 절제 생검을 통해 진단된 여성 유방암 중 침윤성 관암종 75예의 파라핀에 포매한 표본과 9예의 액체질소에 급속냉동한 조직을 연구대상으로 하였다. 연구 대상 환자의 나이는 21세부터 84세까지 분포되어 있었고 평균 연령은 48세였다.

2) 면역조직화학적 검색 방법: 면역 조직 화학적 검사를 위하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직중 주위 정상 조직을 포함한 종양 조직편을 선택하여 4 μ m 두께로 박절하였으며 이들을 organosilane으로 도포된 슬라이드(Probe On Plus, Fisher Sci, U.S.A.)에 부착하고 xylene에 탈파라핀한 후, 70% 알코올까지 점차로 낮은 농도 알코올에 함수하고 증류수로 세척하였다. 메탄올로 회색한 과산화수소수에 20분간 처리하여 내인성 과산화수소수를 제거하고, phosphate buffered saline(PBS, 0.01M, pH 7.4)으로 세 차례 세척하였다. 그 후 실온의 수조에서 차단 항체와 30분간 반응시켜 비특이성 항

원을 차단하고, 1:100으로 희석한 일차 항체인 CD44 v6(Anti-human mouse CD44 variant 6, monoclonal antibody, R&D system Europe Ltd)을 4°C의 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이어 PBS로 세 차례 세척하고, 이차 항체인 biotinylated antimouse Ig G(Vector Elite kit, Vector laboratories, U.S.A.)를 실온의 수조에서 30분간 반응시켰다. PBS로 세 차례 세척한 뒤 ABC reagent(Vector Laboratories, U.S.A.)를 가한 뒤 실온의 수조에서 45분간 반응시켰다. PBS로 두 차례 세척하고 tris buffer(0.05M, pH 7.6)에서 평형을 맞춘 뒤 0.05M tris buffer로 희석한 0.5 mg/ml 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemicals, U.S.A.) 용액(pH 7.6)에 0.03% H₂O₂를 혼합하여 조직과 반응시켰다. 3 내지 6분후 증류수로 세척하고 Harris 헤마톡실린으로 20초간 대조 염색한 후 Permount로 봉입하였다.

에스트로겐 수용체와 프로그스테론 수용체는 단클론 항체인 NCL-ER-LH1과 NCL-PGR(Novocastra Laboratories Ltd., United Kingdom)를 사용하여 동결 절편 조직을 이용하여 통상의 방법으로 염색하였다.

3) 판독 및 통계학적 분석: CD44 v6의 면역조직화학적 염색 결과는 종양세포의 세포질에서 항체의 발현 여부에 따라 양성과 음성으로 판독하였다. 종양세포의 조직분화도는 등급 Bloom and Richardson grading system²³에 따라 등급 I, II, III으로 나누었고 에스트로겐과 프로그스테론 수용체는 양성과 음성 반응으로 표기하였다. 종양의 크기는 1 cm, 1~5 cm, 5 cm 이상으로 세등급으로 나누었다. 상기한 예후인자들과 CD44 v6 염색의 상관관계를 보기 위하여 반응의 유무와 교차표를 만들어 빈도를 분석하

였고 Chi-Square법 및 Fisher's Exact Test를 이용하여 검정하였다.

2. RT-PCR을 이용한 조직내 CD44 mRNA 발현

면역조직화학적 검사 대상 75예 중 수술시 냉동 조직편의 채취가 가능한 9예의 침윤성 관암종(등급 I-5예, II-3예, III-1예)에서 수술 직후 직경 5×3×3 mm 정도의 조직을 정상 부위와 종양부위에서 각각 채취한 후 곧 바로 액체질소에 급속 냉동시켰으며 이어 mRNA를 분리하고 cDNA를 합성하였다. 대조군으로는 전립선암세포주인 LNCaP, FGC와 유방암 세포주인 MCF-7을 사용하였다.

1) CD44 mRNA의 RT-PCR 검색: mRNA 분리, cDNA 합성 및 Southern blot은 Sambrook등²⁴의 방법에 따라 시행하였다. mRNA의 분리는 Oligo(dT) cellulose(Invitrogen, U.S.A.)를 이용하였고 cDNA의 합성은 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase(Invitrogen, U.S.A.)를 사용하였다. mRNA 분리시 모든 소모품은 DEPC처리후 사용하였다. 탐침자는 [³²P] ATP를 T₄ polynucleotide kinase(POSCO Chem)로 5' end-label 하였다. Hybridization후 세척은 상온에서 2 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 10분간 2회, 55°C에서 1 × SSC, 0.1% SDS 용액으로 5분간 2회 실시하였다. 세척한 membrane은 -70°C에서 X-ray 필름에 노출 하였다.

2) Oligonucleotide-primer제작: CD44의 variant를 조사하기 위한 primer와 probe의 종류는 아래와 같다.

P1 5' GACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC
P2 5' TGGATCACCGACAGCACAGAC

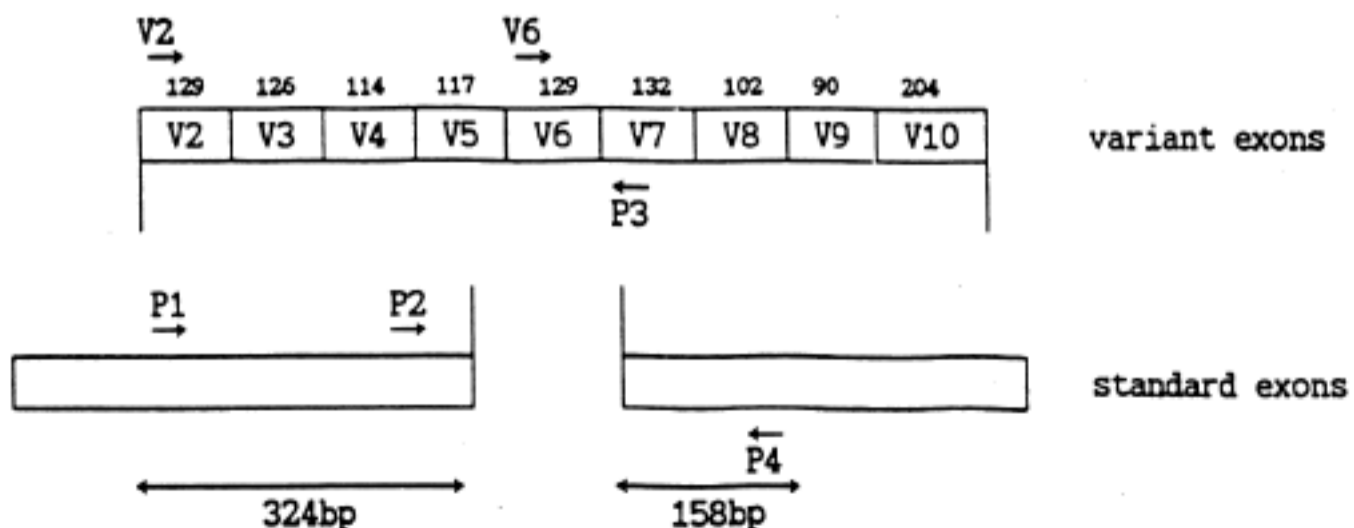


Fig. 1. Schematic representation of CD44 isoform and alternative exons as well as of the oligonucleotides used in the present study. The lengths of the variant exons are indicated above each box in bp.

P3 5' TGAGATTGGGTTGAAGAAATC
P4 5' GATGCCAAGATGATCAGCCATTCTGGAAT
V2 5' TTGATGAGCACTAGTGCTACAGCA
V6 5' TCCAGGCAACTCCTAGTAGT

이들의 유전자내 위치는 아래(Fig. 1)와 같다.

분리한 mRNA의 정량은 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 5' ATCTACCGCATTGACCACCT와 5' GAGTAGGACCTACAGAAGACACCC를 primer로 이용하여 RT-PCR하여 비교하였으며 사용한 모든 primer들은 바이오니아(주)에 의뢰하여 제작하였다.

결 과

1. CD44 v6의 면역조직화학적 검색 성적 및 기타 예후 인자들과의 비교

파라핀 포매조직 절편을 이용한 CD44 v6 염색은 75예 중에서 57(76%)예에서 양성으로 나타났고 18(24%)예에서 음성으로 나타났다. CD44 v6의 염색은 종양의 주변부의 기저막이 있는 부분에 강하게 염색되며 정상 관상피와 소엽상피에도 양성으로 반응하였다(Fig. 2, 3). 종양에 염색되는 선한 정도는 조직마다 다양하게 나타났다. 그러나, 선 예에서 정상 상피세포와 간질 세포보다 종양 세포에 강하게 염색되었다. 종양내에는 주로 세포질에 염색되었다. CD44 v6 발현과 알려진 예후 인자와 상관관계를 살

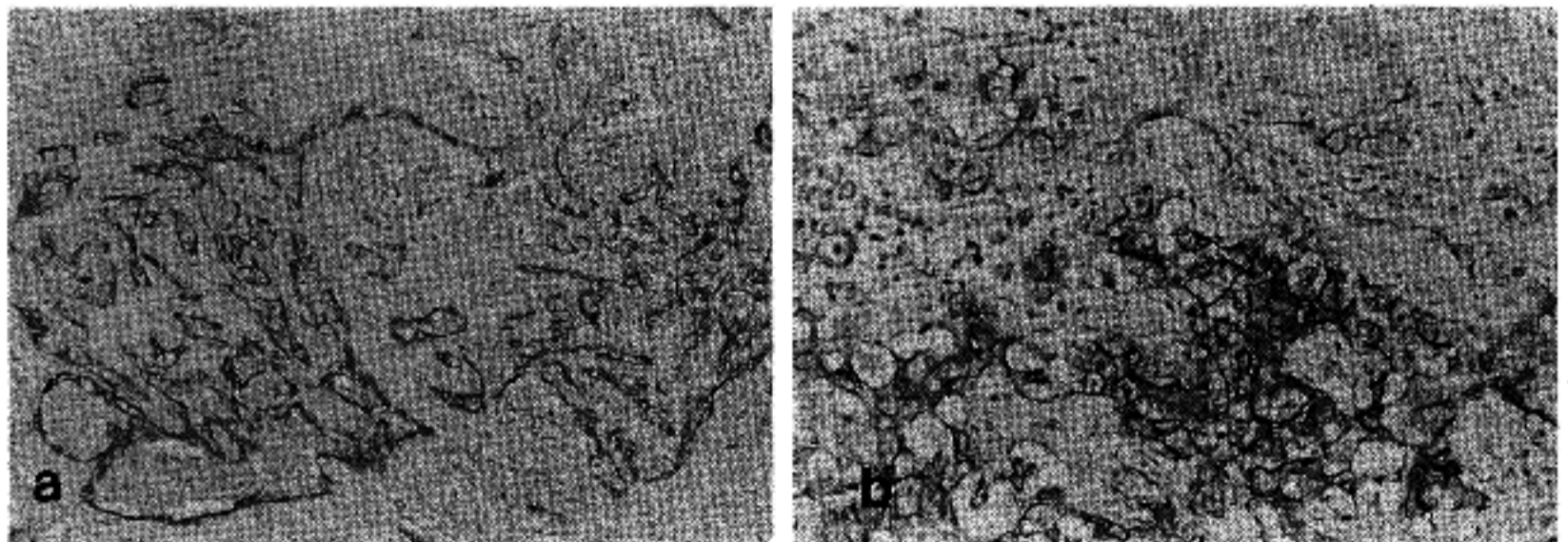


Fig. 2. Most of the tumor cells revealed strong positive reaction to CD44v6 monoclonal antibody. (a) $\times 100$, b) $\times 400$

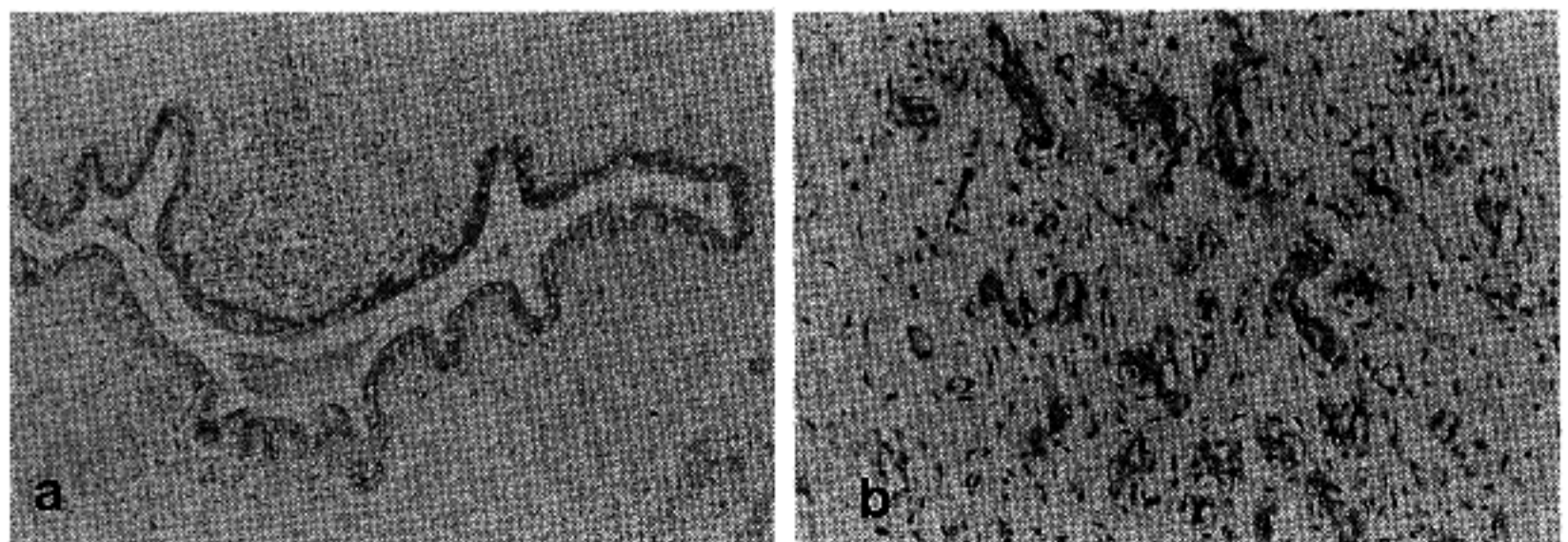


Fig. 3. Expression of the CD44 v6 is also expressed a) in the normal ductal epithelium and b) lobular epithelium of the breast.(a) $\times 100$, b) $\times 400$

해보면 다음과 같다.

림프절 전이에 따른 CD44 v6의 발현은 림프절 전이가 없는 경우 35예 중 25예(71.4%), 있는 경우 40예 중 32예(80%)이었다. 림프절 전이와 CD44 v6의 발현과는 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$).

조직학적 분화도에 따른 CD44 v6의 발현은 등급 I은 17예 중에 13예(76.5%), 등급 II는 45예 중 34예(75.5%), 등급 III은 13예 중 10예(76.9%)이었다. 조직학적 분화도와 CD44 v6의 발현과는 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$).

종양의 크기에 따른 CD44 v6의 발현은 종양이 1 cm 이하일 때 4예 중 4예(100%), 1 cm에서 5 cm 사이일 때 65예 중 48예(73.8%), 5 cm 이상일 때 6예 중 5예(83.3%)에서 양성을 보였다. 종양의 크기와 CD44 v6 발현과는 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$).

에스트로겐 수용체 유무와 CD44 v6의 발현은 수용체가 없을 때 17예 중 12예(70.6%)에, 있을 경우

19예 중 15예(78.9%)에서 양성을 보였다. 에스트로겐 수용체 유무와 CD44 v6의 발현과는 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$).

프로게스테론 수용체 유무와 CD44 v6의 발현은 수용체가 없을 때 7예 중 5예(71.4%)에, 있을 경우 29예 중 22예(75.9%)에서 양성을 보였다. 프로게스테론 수용체 유무와 CD44 v6의 발현과는 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$).

따라서, 유방의 침윤성 관암종의 중요한 예후 인자로 보았던 림프절 전이 유무, 조직 분화도, 종양의 크기, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체와 CD44의 발현 유무를 통계학적으로 분석해 보았을 때, 각각에서 유의한 관계가 발견되지 않았다(Table 1).

2. RT-PCR을 이용한 조직내 CD44 v6 mRNA의 발현

CD44표현형의 다양성을 관찰하기 위해서 림프절 전이가 이루어진 한 예를 포함한 9예를 임의로 정

Table 1. Correlation of CD44 v6 expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast with clinicopathologic parameters

Clinicopathologic parameter	Total number(%)	CD44 v6 expression(%)		P value
		negative	positive	
Nodal metastasis				
negative	35(46.7)	10(28.6)	25(71.4)	NS
positive	40(53.3)	8(20.0)	32(80.0)	
Histologic grade				
I	17(22.77)	4(23.5)	13(76.5)	NS
II	45(60.0)	11(24.4)	34(75.5)	
III	13(17.3)	3(23.1)	10(76.9)	
Tumor size(cm)				
< 1.0	4(5.3)	0(0.0)	4(100)	NS
1.0-5.0	65(86.7)	17(26.2)	48(73.8)	
≥ 5.0	6(8.0)	1(16.7)	5(83.3)	
ER				
negative	17(47.2)	5(29.4)	12(70.6)	NS
positive	19(52.8)	4(21.1)	15(78.9)	
PR				
negative	7(19.4)	2(28.6)	5(71.4)	NS
positive	29(80.6)	7(24.1)	22(75.9)	

NS: not significant ER: Estrogen receptor PR: Progesterone receptor

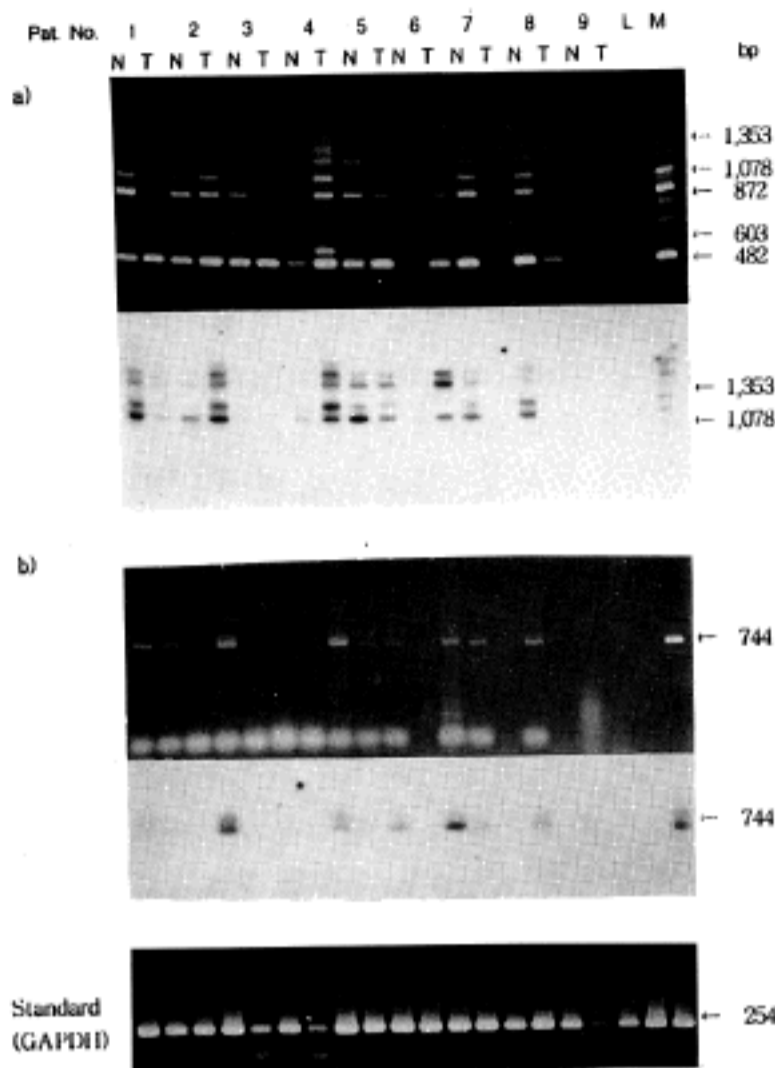


Fig. 4. CD44 expression by RT-PCR in breast carcinoma. The products were separated on 1.2% agarose gel, blotted, and hybridized with the indicated exon-specific probes. Autoradiographs of filters probed with a) oligonucleotide v6 after amplification with primers P1 and P4. b) probed with V2 after amplification with primers P2 and P3. L; negative control(LNCaP.FGC), M; positive control(MCF-7), N; normal breast tissue, T; tumor breast tissue. The amount of cDNA was equilibrated semiquantitatively for each sample to the expression of GAPDH.

하여 정상조직과 암조직에서 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. cDNA의 양은 house keeping gene인 GAPDH의 발현량과 비교하여 결정하였다. 4예에서 CD44 v6의 단일 클론 항체에 대한 면역조직화학적 검사에서 양성 반응을 나타내었는데 그중 3예는 CD44 v6 mRNA의 발현이 강하였고 1예는 발현이 없었다. 면역조직화학적 검사에서 음성 반응을 나타낸 나머지 5예중 1예에서 CD44 v6 mRNA의 발현이 강하게 나타나 면역조직화학적검사와 mRNA의 발현이 완전히 일치하지는 않았다. P1과 P4를 primer로 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과 variants exon이 포함되지 않은 482 염기쌍의 standard형을 포함하

여 다양한 band가 나타났다(Fig. 4). CD44 v6를 probe로 사용하여 RT-PCR산물중 v6 부위의 포함여부를 조사한 결과 1,078 bp 이상에서 4개의 band가 나타났으나 정상조직과 암조직사이에는 별다른 차이가 발견되지 않았다. P2와 P3사이를 RT-PCR한 결과 역시, 744 염기쌍의 band가 정상조직과 암조직에서 동시에 발견되어 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 5). 이상의 침윤성 관암종에 대한 CD44의 변이형 특이 probe를 이용한 RT-PCR 결과 정상조직과 암조직에서 CD44변이형 발현의 차이를 발견할 수 없었다.

고 찰

CD44는 세포막에 위치한 transmembrane glycoprotein으로 N-terminus는 세포 외의 hyaluronate의 수용체로 작용하며 세포내의 C-terminus는 ankyrin과 결합한다²⁵⁻²⁷. 또한 GTP-binding 단백질로 신호전달체계에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 물질은 세포-세포간, 세포-세포외 결합조직의 상호작용에 관계할 뿐만 아니라 세포의 활성이나 분화 및 증식에 관여 하며 아직 알려지지 않은 작용이 있을 것으로 추정되고 있다²⁸. CD44의 분포는 매우 광범위하여 T-, B-형 림프구, 대식구, 단핵구, 과립구, 적혈구 등 혈구세포외에도 각종 상피세포와 내피세포, 평활근 세포, 망막세포나 중추신경계의 교세포 등에 존재한다^{15,27,29,30}. CD44의 유전자는 약 20개의 exon으로 구성되어 있으며 이들 중 10개 가까이의 exon은 다양하게 splicing 되어 여러 가지의 표현형을 나타낼 수 있는데 현재까지 15 종류 이상의 CD44 isoform(CD44v)이 발견되어 있다^{31,32}. 최근 각종의 악성 종양에서 변형된 CD44v isoform의 발현이 증가된다는 보고가 있으며 특히 CD44 v6의 발현이 대장암이나 유방암등에서 증가되었다는 보고가 있다¹⁶⁻²².

본 연구는 면역조직화학적 검색과 RT-PCR방법을 이용하여 유방의 침윤성 관암종에서 CD44 v6 isoform의 발현양상과 기존의 예후인자들과의 관계를 비교하고 그 유의성정도를 판별하고자 하였다. 파라핀 포매조직 절편을 사용하여 CD44 v6의 단일 클론 항체의 면역조직화학적 검색에서 검색 대상의 76%에서 양성을 나타내었다. 염색양상은 정상 관상피 세포와 근상피세포에서도 약한 양성 반응을 보였으나 전반적으로 종양세포에서 강한 반응을 나타내었다. CD44 v6 염색상과 기타 예후 인자의 비교에서 림프절 전이와 CD44의 발현과 관계에서 림프절 전이가 없을 때 71.4%에서 양성 반응을 나타내었고

림프절 전이가 있을 때 80.0%의 양성률을 나타내어 액와 림프절 전이가 있는 경우 양성률이 다소 증가되었으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 그 외 세포 조직학적 분화도나 종양의 크기 혹은 스테로이드 호르몬 수용체와의 비교에서도 유의성이 인정되지 않았다. RT-PCR 방법에서 CD44의 변이형 특이 probe인 V2, V6를 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과 정상조직과 암조직에서 CD44 변이형 발현의 차이가 없었다. P1과 P4를 primer로 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과 variants exon이 포함되지 않은 482 염기쌍의 standard형을 포함하여 다양한 band가 나타났으며 oligonucleotide V6를 probe로 사용하여 RT-PCR산물 중 V6 부위의 포함여부를 조사한 결과 1,078 bp 이상에서 4개의 band가 나타났으나 정상조직과 암조직 사이에는 별다른 차이가 발견되지 않았다. 이들 네 개의 band는 그 길이로 봐서 probe인 V6를 포함하는 exon v6-v10, v5-v10, v4-v10, v3-v10 등의 CD44 변이형으로 추측된다. P2와 P3사이를 RT-PCR한 결과 역시, 744 염기쌍의 band가 정상조직과 암조직에서 동시에 발견되어 별다른 차이를 보이지 않았다. Matsumura³³은 P2와 P3사이를 RT-PCR로 증폭하여 744 염기쌍이 나타나면 암의 가능성이 아주 높다고 주장하였는데 본 실험에서는 정상조직과 암조직에서 동시에 744염기쌍의 band가 발현되었으며 종양세포의 진단에 근거가 희박한 것으로 관찰되었다. 그러나 이미 CD44 v6 isoform이 정상조직에서 발현될 수 있으며 유방의 경우 근상피세포나 관상피세포 혹은 분비선 세포등에서 발현된다는 보고들이 있으며³⁴⁻³⁶ 이는 본 연구의 성적과 일치하는 것이라 생각된다.

이상과 같은 본 연구 성적은 CD44 v6가 액와림프절의 전이가 동반된 침윤성 관암종에서 그 발현이 100% 양성률을 보이며 이는 CD44 v6가 침윤성 관암종의 악성도와 그 예후를 시사할 수 있는 좋은 표지가 될 것으로 보고한 Kaufmann¹²의 보고와 상반된다. Friedrichs³⁴의 연구에 따르면 CD44s와 CD44 v6, CD44 v9은 침윤성 관암종에서 종양의 전이나 진행에 유의한 표지가 되지 않으며 스테로이드 호르몬 수용체와 CD44 v6의 발현이 다소 상관관계가 있을 것으로 보았으며 이는 본 연구의 성적과 일치되는 것으로 생각된다. 본 연구에서 면역조직화학 검색상 종양주변의 정상 관상피세포와 근상피세포에서도 CD44 v6 항체에 양성 반응을 나타내었으며 이는 정상조직에서 전혀 발현되지 않는다는 Kauffman¹²의 보고와 상반되는 것이다. 일반적으로

유방암은 종말관상피세포와 분비선 상피세포의 관내암 시기를 거쳐 주위조직으로 침윤하여 침윤성 관암종으로 진행할 것으로 알려져 있다. 그러나 Fox^{36,37}에 따르면 CD44 v6는 침윤이 일어나기전 병변인 관내암조직에서 오히려 그 발현이 저하되어 CD44 v6의 발현을 세포 악성변화의 지표나 종양세포의 전파의 지표로 볼 수 없다고 하였다. 유방암 이외의 조직에서도 이와 유사한 결과가 보고되었는데 편평상피세포암의 경우 악성으로 변환되지 않은 세포나 분화가 좋은 암세포에서 그 발현이 관찰되는데 반하여 주위조직으로 침윤할 경우 그 발현이 저하되며³⁸, 신경아세포종의 경우 정상세포에서 발현되는 CD44 s형은 강하게 발현되나 변형된 CD44 v형의 발현이 오히려 저하되거나 거의 나타나지 않는다고 하였다^{39,40}.

이상과 같은 본 실험 성적과 문헌적 지견으로 보아 CD44는 악성 종양에서 그 발현이 정상 세포와 다르게 나타날 수 있으나 CD44 v6와 종양의 전이나 재발은 확실한 상관관계가 규명되지 않았으며 이를 종양의 예후인자로 간주할 수 없을 것으로 생각된다. 그러나 CD44는 다양한 아형을 나타낼 수 있으며 이들 중의 일부는 악성 종양의 성장이나 전이와 상관이 있을 가능성이 있으며 이에 대하여 앞으로 분자생물학적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

Transmembrane glycoprotein인 CD44는 정상세포의 표면에 존재하여 세포의 활성이나 분화, 성장 등에 관여하는 물질이다. 최근 위암, 대장암 등의 악성 종양에서 CD44의 isoform들이 발현되며 이들 중의 일부는 악성종양의 전이나 재발등 그 진행의 지표가 될 수 있을것으로 알려졌다. 본 연구는 유방의 침윤성 관암종에서 현재까지 가장 종양의 진행과 가장 유의한 관계가 있다고 알려진 CD44 v6 isoform의 발현양상을 RT-PCR방법과 면역조직화학적 방법을 통하여 관찰하고 다른 예후인자들과의 관련성에 대하여 조사하였다.

75예의 파라핀 포매조직 절편을 대상으로 CD44 v6의 단일 클론항체의 면역조직화학적 검색에서 57예(76%)에서 양성반응을 나타내었으나 이는 종양 세포 뿐 아니라 정상 관상피 세포와 근상피세포에서도 약한 양성 반응을 보였다. 다른 예후 인자의 비교에서 림프절 전이와 CD44 v6의 발현과 관계를 살펴보면 림프절 전이가 없을 때 25예 (71.4%)에서

양성 반응을 나타내었고 림프절 전이가 있을 때 32 예 (80%)의 양성율을 나타내어 액와 림프절 전이가 있는 경우 양성율이 다소 증가되었으나 통계학적 유의성은 인정되지 않았다. 그외 세포 조직학적 분화도나 종양의 크기 혹은 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체와의 비교에서도 유의성이 인정되지 않았다. RT-PCR 방법에서 CD44의 변이형 특이 probe를 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과 정상조직과 암조직에서 CD44변이형 발현의 차이가 없었고 P1과 P4를 primer로 사용하여 RT-PCR검색에서 CD44s(standard 형) 과 CD44 v6를 probe로 사용한 경우 모두에서 정상 조직과 종양조직 모두에서 동일한 band를 관찰하였다. 이상의 성적으로 보아 침윤성 관암종에서 CD44 v6의 발현과 종양의 전이나 진행은 유의한 상관관계가 없는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,720 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-7.
2. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsh A, et al. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986; 58: 2992-70.
3. Russo J, Frederick J, Ownby HE, et al. Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 123-31.
4. Aamdal S, Borner O, Jorgensen O, et al. Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 2525-9.
5. Hutter RVP. The influence of pathologic factors on breast cancer management. *Cancer* 1980; 46: 961-76.
6. Dawkins HJ, Robbins PD, Smith K: , Sarna M, Harvey JM, Sternett GF, Papadimitriou JM. What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erbB-2 in prognosis and disease. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 1233-52.
7. Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DLM. bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Archiv* 1995; 426: 163-8.
8. Armas OA, Gerald WL, Lesser ML, Arroyo CD, Norton L, Rosen PP. Immunohistochemical detection of cathepsin D in T2N0M0 breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 158-66.
9. Hurlimann J. Prognostic value of p53 protein expression in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 996-1003.
10. Porter-Jordan K, Lippman ME. Overview of the biologic markers of breast cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 1994; 8: 73-100.
11. Barnes R, Masood S, Barker E, et al. Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. *Am J Pathol* 1991; 139: 245-50.
12. Kauffmann M, Heider KH, Sinn HP, von Mickwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* 1995; 345: 615-9.
13. Iida N, Bourguignon LYW. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol* 1995; 162: 127-33.
14. Sreaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding in mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human and rat. *J Biol Chem* 1993; 268: 12235-8.
15. Lesley J, Hyman R, Kincaid PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335.
16. Dall p, Heider KH, Sinn HP, et al. Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 60: 471-7.
17. Herrlich P, Pals S, Ponta H. CD44 in colon cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1110-2.
18. Sleeman J, Moll J, Sherman L, et al. The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer. *Ciba Found Symp* 1995; 189: 142-51.
19. Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, Durtillaux B, Lefranc D, Theillet C. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* 1995; 64: 347-54.
20. Mayer B, Jauch KW, Günthert U, et al. De novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 342: 1019-22.
21. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 1995; 85: 2885-99.
22. Kainz C, Kohlberger P, Tempfer C, et al. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1706-9.
23. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading

- and prognosis in breast cancer. A case of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd edit. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 11.31-11.33.
 25. Underhill C. CD44. The hyaluronate receptor. *J Cell Sci* 1992; 103: 293-8.
 26. Bourguignon LYW, Lokeshwar VB, Chen X, Kerrick WGL. Hyaluronic acid (HA)-induced lymphocyte signal transduction and HA receptor (GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. *J Immunol* 1993; 151: 6634-44.
 27. Bourguignon LYW, Lokeshwar VB, He X, Chen X, Bourguignon GJ. CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4464-71.
 28. Kalomiris EL, Bourguignon LYW. Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrane glycoprotein, GP85, and may junction in GP85-ankyrin binding. *J Biol Chem* 1989; 264: 8113-9.
 29. Chaitin MH, Wortham HS, Brun-Zinkernagel AM. Immunocytochemical localization of CD44 in the mouse retina. *Exp Eye Res* 1994; 58: 359-65.
 30. Salmi M, Gron-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man. Down during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993; 122: 431-42.
 31. Arch R, Wirth K, Hofmann M, et al. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splicing variant of CD44. *Science* 1992; 257: 682-5.
 32. Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, et al. Genomic structure of DNA coding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
 33. Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D. Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *BJM* 1994; 308: 612-24.
 34. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, et al. CD44 isoform corellate with cellular differentiation but not with prognosis in Human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5424-33.
 35. Terpe HJ, Stark H, Prehm P, Günthert U. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 1994; 101: 79-89.
 36. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al. Normal human tissues, in additions to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994; 54: 4539-46.
 37. Fox SB, Gatter KC, Jackson DG, et al. CD44 and cancer screening. *Lancet* 1993; 342: 548-9.
 38. Salmi M, Grön-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expressin of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: down regulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993; 122: 431-42.
 39. Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 541-4.
 40. Combaret V, Lasset C, Frappaz D, et al. Evaluation of CD44 prognostic value in neuroblastoma: comparison with the other prognostic factors. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 545-9.
-