

결직장암종에서의 세포부착분자 CD44H와 CD44v6 단백질 발현에 관한 연구

동아대학교 의과대학 병리학교실

김대철 · 나서희 · 정진숙 · 홍숙희

Expression of Cell Adhesion Molecules — CD44H and CD44v6 — in Colorectal Carcinoma

Dae Cheol Kim, Seo Hee Rha, Jin Sook Jeong, and Sook Hee Hong

Department of Pathology, Dong-A University College of Medicine,
Pusan 604-715, Korea

During tumor progression, a subset of cells acquires metastatic properties, presumably through a series of genetic alterations. As the result, cells detach from the primary tumor, penetrate the basement membrane and invade the adjacent structures including lymph and blood vessels. Loss of adhesive functions and gain of new adhesive functions are thought to play a crucial role in this metastatic cascade. Since tumor metastasis is the principle cause of death for cancer patients including colon cancer, there is a consensus that a search for tools that allow effective assessment of the metastatic potential of tumors is a prime goal for cancer research. An immunohistochemical study of cell adhesion molecules, CD44H and its variant CD44v6, was done to evaluate their relationship with known prognostic factors related to the progression and metastasis of colorectal carcinoma in 94 cases of colorectal carcinoma tissues. The results were as follows. The CD44H expression was detected in 90 (95.7%) and CD44v6 in 53 (56.4%) out of 94 cases of colorectal carcinoma, and the CD44H was overexpressed in tumor tissue more than in normal mucosa in 62% of the cases. The expression rates of both protein were not significantly correlated with age and sex of the patients, invasion depth, lymph node metastasis, tumor differentiation, and tumor site. The coexpression of CD44H and CD44v6 in tumor was significant ($p < 0.05$). The above results suggest that overexpression of CD44H and loss of function to control the alternative splicing of CD44 mRNA resulting in CD44v6 expression and alteration of adhesive function are closely associated with tumorigenesis of the colorectum. (*Korean J Pathol* 1998; 32: 655-662)

Key Words: Colorectal carcinoma, Cell adhesion molecule, CD44H, CD44v6, Prognosis

서 론

암의 침윤과 전이는 암의 치료에 있어서 중요한 장애 요소 중의 하나이며 또한 이는 암환자를 사망에 이르게

하는 주원인이다. 이 때문에 종양조직에서 암의 침윤이나 전이와 연관된 인자를 규명하고 이들 물질들의 발현 양상의 변화를 관찰하는 것은 환자의 예후 추정에 중요한 의미를 가진다.

인간에 있어서 결직장암종은 정상세포로부터 세포가 증식하면서 K-ras 원종양유전자의 활성화와 APC, DCC, 그리고 p53 같은 종양 억제 유전자의 불활성화를 포함한 여러 종양유전자와 종양 억제 유전자의 변화가 축적되어 다단계 과정을 거쳐 선암종이 발생한다.¹⁻⁴ 이런 유전자 변화는 발암의 단계에 따라 다르며 암이 진행

접 수: 1998년 6월 9일, 게재승인: 1998년 7월 16일
주 소: 부산광역시 서구 동대신동 3가 1번지, 우편번호 604-715, E-mail: freehand@chollian.net, 동아대학교병원 해부병리과, 김대철

ISSN : 0379-1149

는 동안 종양 세포들은 일련의 유전자 변화를 통해 침윤성과 전이 능력을 얻게 되고, 원발 종양에서 탈락한 종양 세포는 결체조직과 기저막을 뚫고 림프절이나 혈관에 들어가 인접 장기를 침범하거나 원격 전이를 일으킨다.⁵

최근 세포간 부착 현상과 세포의 부착, 이동, 이주, 성장, 분화 등을 조절하는 세포 부착물질들 즉 cadherin family, immunoglobulin superfamily, integrin, selectin family 등과 종양세포의 전이와의 연관성에 대해 활발히 연구가 되고 있다. 이러한 세포의 부착 능력의 소실이나 획득은 전이의 여러 단계에서 일어나게 된다.⁶ 세포-세포간의 부착력 그리고 세포외 기질과의 상호작용을 통해 침윤 및 전이에 관계하는 것으로 알려져 있는데,⁷ 전이 능력이 높은 종양 세포들은 이런 세포 부착물질들을 통해서 라미닌, 파이브로넥틴, 제 4형 콜라겐 같은 기저막의 구성물질과 내피세포에 강하게 결합하는 것으로 보인다.⁸

이들 외에 CD44 세포 표면 물질은 림프구 귀소 수용체로서의 기능을 가지고 있어 림프구가 림프절의 모세혈관후 세정맥 (post-capillary venule)에 있는 내피세포와 결합하는데 관여하는 세포 부착 물질이다.⁹ CD44는 또한 히알루론산, 파이브로넥틴, 콜라겐과도 결합하여 세포외 기질과의 결합에도 중요한 물질이다.¹⁰ mRNA의 교대접합 (alternative splicing)에 의해서 만들어진 많은 CD44 이형이 분리되었고^{11,12} 여러 종류의 CD44 이형은 여러 가지의 종양세포주와 암조직에서 검출되고 있다. 비록 CD44 이형의 기능은 아직 확실히 다 밝혀져 있지는 않지만 암의 성장과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.^{13,14}

본 연구자는 원발성 결직장암 조직에서 CD44의 표준형인 CD44H와 그 이형 중 하나인 CD44v6 단백질의 발현 양상을 면역조직화학적 염색을 실시하여 이 두분자의 발현 빈도를 환자의 임상 및 병리학적 소견과 비교하여 결직장암의 발생과 진행에 CD44가 어떤 역할을 하는지를 알아보려고 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

1990년 1월부터 1994년 12월까지 5년간 동아대학교 병원에서 원발성 결직장암으로 진단 받아 근치적 또는 비근치적 절제술로 얻어진 결직장암 조직 중 선암종으로 진단된 예로 중 파라핀 포매 블록의 보관 상태가 양호하고 임상 기록의 재검토가 가능했던 94예를 대상으로 하였다. 모든 예의 hematoxylin-eosin 염색표본을 재검색하고 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매 블록 하나를 선택하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

2. 연구 방법

1) 임상 기록: 환자의 임상기록지로 부터 나이, 성별, 병리소견, 림프절 전이 및 원격 전이 유무를 조사하였다. 임상병기는 Astler-Coller 분류법에 따라 분류하였다.¹⁵

2) 병리조직학적 검색: 병리조직 검사를 위해 의뢰되었던 조직의 육안 및 현미경 소견을 기록하였다. 결직장암종의 조직학적 분류는 WHO 분류를 기준으로 하였다.¹⁶

3) 면역조직화학적 염색 방법: CD44단백질 검출을 위해서 anti-human CD44H monoclonal antibody (R&D systems, USA)와 anti-human CD44v6 monoclonal antibody (R&D systems, USA)를 각각 300배 희석하여 사용하였다.

이들 단백질에 대한 염색 방법은 아래와 같다.

파라핀 조직 절편을 4 μm 두께로 잘라서 크실렌 용액에서 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 1분씩 담구어 합수시키고 증류수로 씻어 내었다. 3% 과산화수소를 조직절편 위에 떨어뜨려 30분간 실온에 방치하여 내인성 peroxidase를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 citrate buffer (PH 6.0)용액에 15분간 microwave방법으로 전처리하여 1 : 300으로 희석된 단클론 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 PBS로 세척한 뒤, 다시 1 : 100으로 희석된 비오틴과 결합된 2차 항체 (biotinylated anti-mouse anti-rabbit and anti-goat monoclonal antibody)를 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 씻었다. Streptavidin peroxidase complex를 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 씻은 후 발색제인 AEC를 첨가하였다. Mayer hematoxylin에서 3분간 대조염색 후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경하였다.

3. 면역조직화학적 염색의 판독

염색된 결직장암 조직을 현미경에서 관찰하여 CD44H는 세포질내 적갈색 과립으로 혹은 세포막을 따라 적갈색으로 염색되면 양성반응으로 판독하였고, CD44v6는 세포막을 따라 적갈색 과립으로 염색되면 양성반응으로 판독하였다.

종양조직에서 염색되는 종양세포 수를 반정량적인 방법으로 네 등급으로 나누었는데, 종양세포 전부가 염색이 안되거나 종양세포의 1% 미만에서 염색된 경우는 음성 (0)으로 판독하였고, 종양세포중 1%에서 10%에서 양성 반응을 보이면 +1, 11%에서 50%까지 양성 반응을 보이면 +2, 51% 이상의 종양세포가 양성 반응을 보이면 +3으로 하였다. 또 양성 반응의 강도를 정상 점막 상피세포와 비슷한 강도로 약양성반응을 보이면 +1, 강양성일 때 +3, 그 중간을 +2로 하여 세 등급으로 나누었다.

양성 발현의 최종 등급은 양성 반응을 보이는 각 예의 종양조직에서 반정량적 등급과 양성 강도를 곱하여 나오는 1점부터 9점까지 수치를 다시 세 등급으로 나누

어 1, 2점은 + (약양성 발현), 3, 4점은 ++ (중등도 양성 발현), 6, 9점은 +++ (강양성 발현)으로 정하였다.

4. 통계처리

각 염색에서 양성 반응의 빈도의 비교 분석은 IBM-PC의 SAS system을 이용하여 Spearman 상관 계수를 구하여 상관 관계를 알아보고, chi-square 혹은 Mantel-Haenszel chi-square test를 이용하여 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

연구 결과

1. 임상자료의 분석

총 94예의 결직장암 환자의 연령분포는 24세에서 78세이였으며 평균연령은 54.9세이였다. 그 중 20대가 5예 (5.3%), 30대가 9예 (9.6%), 40대가 19예 (20.2%), 50대가 23예 (24.5%), 60대가 25예 (26.6%), 70대 이상이 13예 (13.8%)로 50대와 60대 군이 반 이상을 차지하였다. 남자는 59예 (62.8%), 여자는 35예 (37.2%)으로 남녀 비는 약 1.7 : 1이였다.

2. 병리조직학적 소견

종양의 위치는 회장 5예 (5.4%), 상행결장이 15예 (16.1%), 횡행결장이 3예 (3.2%) 하행결장이 5예 (5.4%), 결장이 16예 (17.2%), 직장이 49예 (52.7%)로 직장이 가장 많아 반 이상을 차지하였다. 1예는 임상 및 방사

선 소견에서도 병변의 정확한 위치를 알 수 없어 제외하였다.

종양의 침윤정도를 관찰한 결과 전막하층까지 침윤한 경우가 1예 (1.2%), 고유근층을 침윤한 예는 14예 (16.1%), 상막층 이상을 침윤한 예가 72예 (82.8%)로

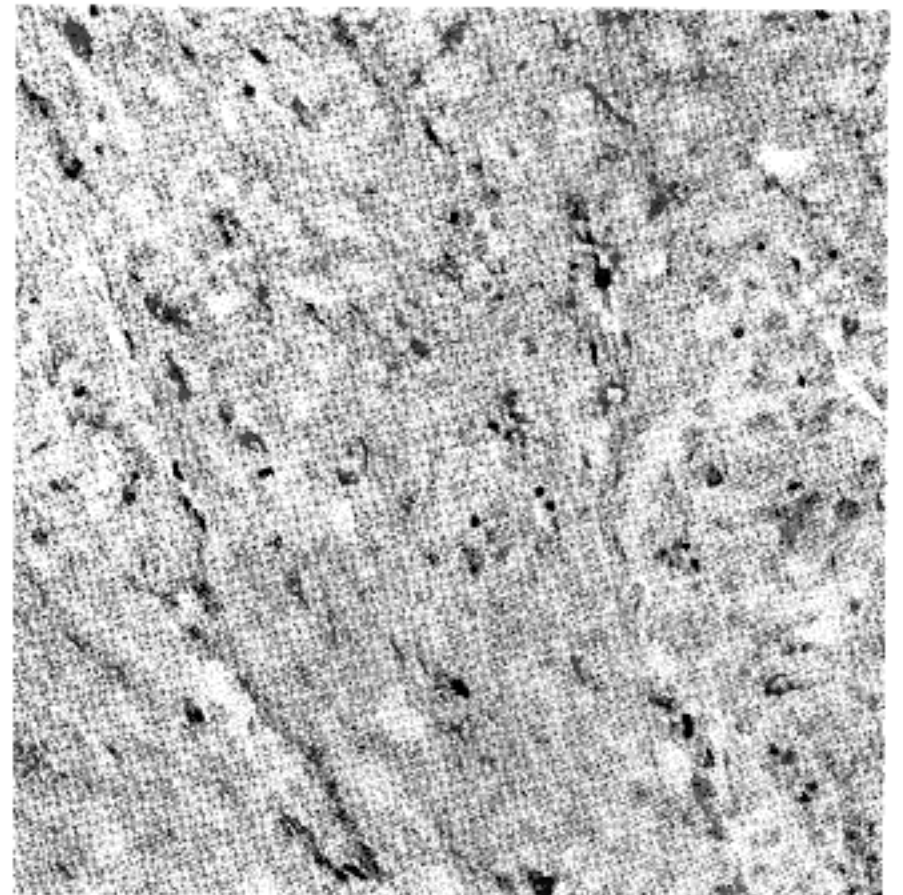


Fig. 2. Diffuse membranous expression of CD44H is noted in a poorly differentiated adenocarcinoma of the colorectum.

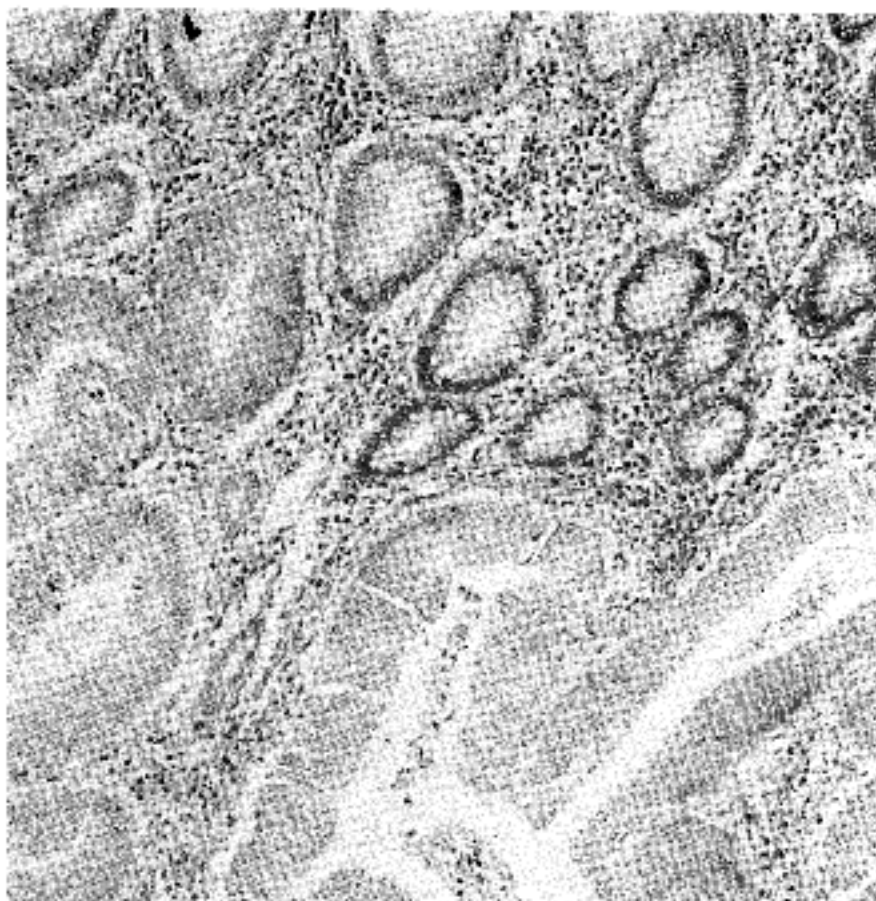


Fig. 1. Some normal colonic glands and dysplastic glands are positive for CD44H immunohistochemical stain.



Fig. 3. Strong positive membranous expression of CD44v6 is noted in a colorectal carcinoma is seen, but normal colonic mucosa shows negative expression.

결직장암의 대부분은 장막층을 침범한 Astler-Coller 분류법의 B2 이상의 병기이었다.

종양의 조직학적 분류에서는 고분화성 선암종은 42예 (44.7%), 중분화성 선암종은 36예 (38.2%), 저분화성 선암종은 4예 (4.3%), 종양세포내 및 간질에 점액 생산이 우세한 인환세포암종 및 점액선암종은 각각 7예 (7.4%)와 5예 (5.3%)이었으며 고분화성 선암종이 가장 많았다.

3. 림프절 및 원격 전이

국소 림프절은 각 군별로 분리하여 보내진 예가 별로 없어 림프절 전이가 없는 n (-)과 림프절 전이가 있는 n (+)으로 나누었다. n (-)는 51예 (54.3%), n (+)은 43예 (45.7%)였다. 원격 전이는 7예로 간, 난소, 요관, 위장, 방광 등으로 전이를 일으켰다.

4. 환자의 병기

각 환자의 병력지를 검토하여 림프절 전이 및 원격전이 여부를 조사하고 기타 수술소견, 방사선학적 소견, 동위원소 검사 소견을 종합하여 병기를 살펴본다. Astler-Coller 병기 A는 1예 (1.1%), B1은 12예 (12.8%), B2는 36예 (38.3%), C1은 2예 (2.1%), C2는 36예 (38.3%), D는 7예 (7.4%)로 병기 A는 아주 드물었으며, 병기 B2와 C2를 합친 경우가 72예 (76.6%)로 근육층을 뚫은 경우가 대부분이었다.

5. 면역조직화학적 염색 양상과 발현빈도 (Fig. 1~3, Table 1)

1) **CD44H:** CD44H는 종양주위의 정상 점막 선세포의 세포질 또는 세포막을 따라 대부분은 약양성 발현을 보였고, 소수에서 중등도 양성을 보이는 예도 있었다 (Fig. 1). 종양세포에서는 세포막을 따라 염색되는 것과 세포질내에 과립상으로 강한 양성으로 염색되는 등 다양한 형태를 보였다 (Fig. 2). 총 94예의 결직장암 중 90예 (95.7%)에서 양성반응을 보였고 이중 10예 (10.6%)는 중등도, 48예 (51.1%)에서는 강양성의 과발현을 보

Table 1. Immunohistochemical staining pattern of CD44H and CD44v6 in colorectal carcinoma

	No. of case (%)	
	CD44H	CD44v6
Negative	4 (4.3)	41 (43.6)
Positive	90 (95.7)	53 (56.4)
+	32 (34.0)	23 (24.5)
++	10 (10.6)	13 (13.8)
+++	48 (51.1)	17 (18.1)
Total	94 (100)	94 (100)

였다.

2) **CD44v6:** CD44v6은 종양주위 정상 점막 선상피에서는 거의 발현을 보이지 않았으나 가끔 세포막을 따라 약하게 발현하였다. 종양조직에서는 국소부위 또는 많은 종양세포에서 세포막을 따라 다양한 강도의 발현을 보였다 (Fig. 3). 총 94예의 결직장암 중 53예 (56.4%)에서 발현을 보였고 이중 13예 (13.8%)는 중등도, 17예 (18.1%)는 강양성의 과발현을 보였다.

6. 단백 발현빈도와 임상병리학적 소견과의 비교

1) **CD44H:** CD44H는 전체 94예의 결직장암의 90예 (95.7%)에서 발현을 보였으며 약양성 발현을 보이는 주위 정상 점막상피보다 높은 중등도 및 강양성의 과발현을 보인 예는 58예 (61.7%)이었다. 이 단백질의 발현은 환자의 나이, 성별에 따른 유의한 차이는 보이지 않았으며, 종양의 위치에 따라서도 발현 빈도는 별 차이가 없었다 ($p > 0.05$) (Table 2). Astler-Coller 분류에 따른 임상병기 분류에서 병기 A는 1예 중 1예 (100%)에서, B1은 12예 중 12예 (100%)에서, B2는 36예 중 33예 (91.7%)에서, C1은 2예 중 2예 (100%)에서, C2는 36예 중 36예 (100%)에서, D는 7예 중 6예 (85.7%)에서 발현을 보여 병기에 따른 발현 빈도는 유의한 차이가 없었다 ($p = 0.362$) (Table 3). 근육층의 침윤 깊이에 따라 근육층을 뚫지 않은 B1과 C1, 그리고 근육층을 뚫고 나간 B2와 C2로 나누었을 때 CD44H의 발현은 각각 14예 중 14예 (100%)와 72예 중 69예 (95.8%)로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 ($p = 0.723$) (Table 3). 림프절

Table 2. Incidence of CD44H and CD44v6 expression according to tumor site

Tumor site	Total No. of cases (%)	No. of positive immunoreactivity (%)	
		CD44H	CD44v6
Cecum	5	5 (100)	3 (60.0)
Ascending	15	15 (100)	9 (60.0)
Transverse	3	3 (100)	1 (33.3)
Descending	5	5 (100)	3 (60.0)
Sigmoid	16	16 (100)	9 (56.3)
Rectum	49	45 (91.8)	27 (55.1)
<i>p value</i>		0.585	0.977
Right ^a	23	23 (100)	13 (56.5)
Left ^b	70	66 (94.3)	39 (56.7)
<i>p value</i>		0.340	0.241
Total ^c	93	89	52

^aRight: Cecum, ascending and transverse colon, ^bLeft: Descending, sigmoid colon and rectum, ^cTotal: one case is excluded because of no statement of the tumor site in the clinical and radiological studies

Table 3. Incidence of CD44H and CD44v6 expression according to stage and depth of the tumor

	Total No. of cases(%)	No. of positive immunoreactivity (%)	
		CD44H	CD44v6
Stage			
A	1	1 (100)	1 (100)
B1	12	12 (100)	6 (50.0)
B2	36	33 (91.7)	23 (63.9)
C1	2	2 (100)	1 (50.0)
C2	36	36 (100)	18 (50.0)
D	7	6 (85.7)	4 (57.1)
<i>p value</i>		0.362	0.847
Invasion depth			
A	1	1 (100)	1 (100)
B1 & C1	14	14 (100)	7 (50.0)
B2 & C2	72	69 (95.8)	41 (56.9)
D	7	6 (85.7)	4 (57.1)
<i>p value</i>		0.723	0.602
Total	94	90	53

전이 없는 51예 중 48예 (94.1%)에서, 림프절 전이가 있는 43예 중 42예 (97.7%)에서 발현을 보여 림프절 전이 유무에 따른 발현빈도의 차이는 보이지 않았다 ($p=0.395$) (Table 4). 조직학적 분화등급에 따른 CD44H의 발현빈도는 42예의 고분화형중 42예 (100%)에서, 36예의 중분화형중 33예 (91.7%)에서, 4예의 저분화형중 4예 (100%)에서, 12예의 점액선형 및 인환세포형중 11예 (91.7%)에서 발현을 보여 조직학적 분화에 따른 발현 빈도는 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p=0.081$) (Table 5).

2) CD44v6: CD44v6 단백질은 전체 94예 중 53예 (56.4%)에서 발현을 보였다. CD44H와 마찬가지로 환자의 나이, 성별, 종양의 위치에 따른 CD44v6의 발현은 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$) (Table 2). 임상병기에 따른 발현빈도를 보면 병기 A는 1예중 1예 (100%), B1은 12예 중 6예 (50%), B2는 36예 중 23예 (63.9%), C1은 2예 중 1예 (50%), C2는 36예 중 18예 (50%), D에서는 7예 중 4예 (57.1%)에서 발현을 보여 유의한 차이는 보이지 않았으나, 근육층의 침윤 깊이에 따라 근육층을 뚫지 않은 B1과 C1, 그리고 근육층을 뚫고 나간 B2와 C2에서 각각 14예 중 7예 (50%), 72예 중 41예 (56.9%)에서 발현을 보여 근육층을 뚫은 경우에 발현 빈도가 약간 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p=0.602$) (Table 3). 림프절 전이의 유무에 따라 나누었을 때 림프절 전이가 없는 51예 중 31예 (60.8%)

Table 4. Incidence of CD44H and CD44v6 expression in positive and negative lymph node metastasis

Node metastasis	Total No. of cases(%)	No. of positive immunoreactivity (%)	
		CD44H	CD44v6
Negative	51	48 (94.1)	31 (60.8)
Positive	43	42 (97.7)	22 (51.2)
<i>p value</i>		0.395	0.349
Total	94	90	53

Table 5. Incidence of CD44H and CD44v6 expression according to histologic grade

Histologic grade	Total No. of cases(%)	No. of positive immunoreactivity (%)	
		CD44H	CD44v6
Well ^a	42	42 (100)	30 (71.4)
Mod ^b	36	33 (91.7)	14 (38.9)
Poor ^c	4	4 (100)	3 (75.0)
Mucin ^d	12	11 (91.7)	6 (50.0)
<i>p value</i>		0.081	0.137 ^e
Total	94	90	53

^aWell: well differentiated adenocarcinoma, ^bMod: moderately differentiated adenocarcinoma, ^cPoor: poorly differentiated adenocarcinoma, ^dMucin: Mucinous adenocarcinoma + signet ring cell adenocarcinoma, ^e0.137: Mentel-Haenszel chi-square test

에서, 림프절 전이가 있는 43예 중 22예 (51.2%)에서 발현을 보였으며 통계학적으로 유의한 차이는 아니었다 ($p=0.349$) (Table 4). 조직학적 분화등급에 따른 발현 빈도는 고분화형에서 42예 중 30예 (71.4%), 중분화형에서는 36예 중 14예 (38.9%), 저분화형에서 4예 중 3예 (75%), 점액선암종 및 인환 세포에서는 12예 중 6예 (50%)에서 발현을 보여 통계수치상 chi-square test에서는 p 값이 0.028로 분화가 좋을수록 CD44v6의 발현율이 유의하게 증가하는 것처럼 보이긴 하였으나 Mentel-Haenszel chi-Square에서는 p 값이 0.137로 큰 의미는 없는 것으로 생각된다 (Table 5).

결직장암종에서 CD44H와 CD44v6 두 단백질의 동시 발현은 상관계수가 0.263 ($p<0.01$)으로 상당히 높은 상관관계를 보였다.

고 찰

결직장암종은 북서부 유럽, 북 아메리카 그리고 다른

앵글로색슨계 사람들에 흔하게 발생하나 아프리카, 아시아 그리고 남아메리카 등에서는 비교적 발생 빈도가 낮은 종양이다.^{17,18} 하지만 최근 아시아 권에서도 식생활 및 문화의 서구화가 진행되면서 결직장암종의 발생 빈도도 증가하고 있는 추세이며 위암과 함께 이에 대한 관심도 높아지고 있다.

결직장암종의 발생기전과 원인은 환경적, 유전자적인 원인이 동시에 연관되어 있다. 유전자적 요인은 그 자체만으로도 다양한 현상을 일으킨다. 이미 몇가지 종양에서 성장인자, 성장인자 수용체와 같은 종양유전자들의 이상 혹은 과발현이 종양세포의 DNA배수성과 증식 능력을 포함한 종양의 성장과 관련된 생물학적 양상에 영향을 준다는 보고가 있으며,¹⁹ 특히 대장암은 정상세포가 연속적인 조직학적 변화를 거치면서 용종을 거쳐 암세포로 형질변환을 일으키고 그 동안 몇가지의 종양유전자 활성화와 종양억제유전자의 비활성이 동반된다는 것이 1990년 Fearon과 Vogelstein¹에 의해 제시되었다. 이들은 세포가 악성으로 발현이 되기 위해서는 ras 종양유전자의 돌연변이, p53 유전자의 변이,² DCC 유전자의 소실,³ 그리고 MCC 유전자의 변이⁴ 등 적어도 4개 내지 5개의 유전자 변이가 필요하다고 주장하고 있다. 현재 생체내에서 암발생 과정 동안에 암의 조기 발견, 종양의 침윤 및 전이 정도 및 종괴 절제후 추적 관찰 등의 목적으로 다양한 유전자 변이 및 그의 유전자 산물에 대한 검출이 시도되고 있다.

대부분의 종양에서 종양을 절제한 후 전이 및 재발이 환자의 치료에 있어서 가장 중요한 문제 중의 하나이며 이런 전이 및 재발 등의 위험도를 예측하는 예후 인자로 여러 가지 다양한 병기 분류법을 사용하고 있다. 대개 종양의 전이 과정은 분자 유전학적인 단계에서 여러 과정을 거쳐 일어나는 것으로 알려져 있다.²⁰ 먼저 원발 종양에서 종양세포가 탈락하여 세포외 기질의 이동 후 림프절이나 혈관을 통해 인접 장기로 이동하게 되고 그 장기의 혈관에 부착해서 혈관 밖으로의 침범 후 장기에서의 증식의 과정을 거친다. 이런 전이 과정 동안에 종양세포는 침윤과 전이 능력과 관련된 일련의 유전자 변화가 동반되고 전이의 전 과정을 완수하는데 필요한 완전한 유전자 산물을 갖게 되면 이 세포는 전이 능력을 가지는 악성 세포로 전환된다. 다세포로 구성된 개체에서 세포와 세포 그리고 세포와 기질간의 상호작용이 세포의 조직적인 성장 분화, 세포 이동을 조정하는데 매우 중요하다.^{21,22} 이러한 점에서 최근 종양세포의 침윤과 전이에 관련된 세포표면의 부착 단백질이 종양세포의 이동에 중요한 역할을 할 것으로 추측되며²³ 아마도 이런 물질이 종양의 진행 및 전이를 미리 예측할 수 있는 물질로서 사용될 수 있지 않을까 하는 연구 보고들이 많다.^{24,25}

본 연구에 사용된 CD44단백질은 정상적으로 결직장 상피의 음와 세포에서만 발현되는 막통과 당단백으로²⁴ 세포-세포 그리고 세포-기질간의 상호작용에 관계하며

림프구의 재순환과 활성을 촉진하는데 관여한다. 이는 표준형인 CD44H와 다양한 교대접합으로 생긴 이형인 CD44v로서 발현이 되며 현재 CD44 이형은 적어도 약 12가지가 있는 것으로 알려져 있다.¹³ CD44는 Ki 67 활동이 있는 부위에서도 보여 이것이 아마도 종양세포의 증식에 한 역할을 하고 있는 것으로 생각한다.²⁵ CD44의 기능은 림프구 귀소, 림프구 활성화 그리고 세포외 물질의 부착과 같은 다양한 과정에 관여하는 것으로 보고되고 있으나 교대접합에 의해 생긴 CD44 이형의 정확한 기능은 아직 확실치 않거나 알려져 있지 않다. 종양에서 CD44의 발현은 발암 및 전이 능력과 연관이 있다고 보고되었으며,²⁶⁻²⁸ 본 연구에서도 CD44H가 종양의 61.7%에서 중등도 이상의 과발현을 보여 결직장암종에서 CD44H의 과발현이 암발생과 관련이 있는 것으로 생각이 된다.

Mulder등²⁹의 보고에 따르면 CD44 이형 단백질 중 CD44v6은 결직장암에서 1 cm 이하의 초기 선종과 1 cm 이상의 후기 선종에서 17%와 25%에서 각각 발현되었고, Dukes A와 B의 67%, Dukes C와 D의 82%에서 발현이 되어 병기가 진행될수록 발현빈도가 높아진다고 보고하면서, 종양억제유전자인 p53과 함께 CD44의 이형인 CD44v6을 결직장암종의 생태를 예측하는 지표로 삼을 것을 제안하였다. 또한 이들은 CD44v6의 발현은 암종이 진행되면서 발현이 증가하며 또한 종양내 CD44v6의 과발현은 종양과 관련된 사망과 연관성이 있음을 보고하여 CD44v6의 발현을 전이 예측 인자로 삼을 수 있다고 주장하면서 완치를 위한 수술 후에 보조 치료가 필요한 환자로 분류할 것으로 제안하였다.³⁰ 하지만 Koretz등³¹은 이들의 주장과는 반대로 분화가 좋지 않은 선암종에서 발현 빈도가 높지만 Dukes 병기, 조직형 그리고 종양의 위치와는 연관성이 없는 것으로 보고하였고 더구나 생존율 및 재발 없이 생존한 기간 (recurrence-free survival)과의 비교에서도 연관성이 없어 CD44v6가 결직장암에서 독립적인 예후 추정인자로서 가치가 없는 것으로 평가하였다. 본 연구에서는 CD44v6의 발현은 전체 암종의 56.4%에서 발현되었으나 Astler-Coller 분류에 따른 병기별 발현 빈도의 증가는 통계적인 의미가 없었다. 더구나 본원에서 절제된 결직장암종의 대부분이 병기 B2와 C2이며, 병기 A는 대상 기간 동안 1예, 그리고 병기 C1은 2예로 각 집단 간의 변수에 현격한 차이를 보여 적절한 통계적 처리를 할 수 없었다. 또한 림프절 전이 유무, 종양의 조직학적 유형에 따른 CD44H와 CD44v6의 발현 빈도는 통계적인 유의한 차이가 없었다.

근위부 및 원위부의 결직장암종은 역학적, 임상병리학적, 분자유전학적 연구 결과 생물학적으로 서로 다른 것으로 추정하고 있다. 이는 아마도 발생학적으로 중간 장관과 뒤 장관으로 다름에 근거하고 있다. Mulder등³²에 따르면 근위부와 원위부에서 CD44 이형 발현이 다소 차이가 있으며, 또한 근위부 종양에서 CD44v5와

CD44v6의 발현이 현저하게 많은 것으로 보고하였다. 표현형으로만 볼 때 근위부 종양에서 점액선이거나 저분화형 암종이 더 많으나^{33,34} 근위부의 암종이 원위부 암종에 비해 좀더 압전한 임상 양상을 보인다고 한다. 일반적으로 CD44v5와 CD44v6의 과발현은 암종의 진행과 활동적인 양상을 암시하므로 임상 양상이 압전한 근위부 암종보다 분화가 좋은 원위부 암종에서 이들의 발현이 더 높은 것은 일반적인 개념과 잘 맞지 않았다고 보고하였다. 앞서 Koretz 등³¹이 언급한 내용에서도 종양의 위치에 따른 CD44v6의 발현양상도 통계적 의미가 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 근위부 암종 23예 중 13예 (56.5%)에서, 원위부 암종 70예 중 39 (56.7%)에서 CD44v6 발현을 보여 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 연구의 대상이 된 94예의 결직장암종 중 52.7%가 직장암이었는데 이 부위는 대부분 증상이 빨리 나타나며 쉽게 진단할 수 있는 암이므로 수술 예수가 상대적으로 많았었다.

CD44 발현은 여러 단계에서 통제되는데 그 첫 단계는 성장자극에 의해서 촉진인자의 활성화도 (promoter activity)가 조절된다.³⁵ 그래서 결직장 상피 특히 음와의 기저부위에 있는 증식세포는 촉진인자의 활성화도를 나타내 보인다. 다음 단계의 조절은 재접합 과정에서 일어난다. 아직 확실히 밝혀진 바는 없지만 어떤 조절인자들이 재접합 과정에 영향을 주어서 성숙된 RNA와 그 유전자 산물을 만들 수 있는 엑손 배열 (exon-encoded sequence)에 영향을 주고 이어 CD44 단백질은 전사후 수정 (post-translational modification)을 거쳐 발암이나 전이를 일으키게 하는 특별한 기능을 가지게 된다고 한다. 이로서 일련의 정상적인 생물학적 조절 능력이 점차 소실되어 유전자적인 변화가 점점 증가하게 되고 종양화 과정에서 선택적 이득 (selective advantage)으로 일정한 발현 형태를 가지는 클론이 증폭된다. 본 연구에서 결직장암 조직에서 CD44H와 CD44v6 두 물질의 발현은 상호간 상당한 연관성이 있음을 보여 주었다. 이는 아마도 결직장암의 발생때 위에서 기술한 일련의 과정을 거쳐 CD44H의 과발현과 함께 재접합 과정에도 이상이 동반되어 CD44H와 CD44v6가 동시에 발현되고 세포부착기능의 변화가 나타나는 것으로 추측된다.

결 론

1990년 1월부터 1994년 12월까지 동아의료원에서 원발성 결직장암종으로 수술 받은 94예의 선암종 환자를 대상으로 세포표면 부착 물질의 하나인 CD44H와 그 이형종의 하나인 CD44v6 단백을 면역조직화학적 염색으로 검출하고 이 두 단백질의 발현 빈도와 결직장암종의 임상-병리학적 소견과 상관관계를 살펴본 바 아래와 같은 소견을 얻었다.

1) 전체 94예의 결직장암종 중 CD44H는 90예 (95.7%)

에서 CD44v6은 53예 (56.4%)에서 양성 반응을 보였고, CD44H는 종양의 약 62%에서 정상 점막보다 과발현을 보였다.

2) 이 두가지 단백질은 환자의 나이, 성별, 종양의 위치, 침윤 깊이, 림프절 전이 유무, 조직학적 분화도에 따른 발현빈도의 차이는 보이지 않았다.

3) 한 종양에서 CD44H와 CD44v6의 동시 발현은 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다 ($p < 0.05$).

이상의 결과를 종합하면 CD44H와 CD44v6의 발현은 기존의 결직장암종의 예후인자로 잘 알려진 종양의 분화도, 침윤 깊이, 림프절 전이 등과 통계학적으로 유의한 상관관계는 보이지 않았지만 CD44H의 과발현과 이와 연관된 CD44 mRNA의 교대접합에 의한 CD44v6의 발현과 세포부착 기능의 변화가 결직장암종의 발생과 연관이 있을 것으로 사료된다. 앞으로 각 병기의 환자들의 증례를 좀 더 축적하여 연구해 보면 이 두 단백질이 결직장암의 진행 및 종양의 전이과정에 미치는 영향에 대해 보다 명확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
2. Baker SJ, Fearon ER, Nogro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 50: 217-21.
3. Fearon ER, Cho KR, Nogro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 34, 247: 49-56.
4. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991; 251: 1366-70.
5. Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* 1989; 989: 65-84.
6. Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* 1989; 989: 65-84.
7. Liotta LA, Stetler-Stevenon WG. Metalloproteinase and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 99-106.
8. MacCarthy JB, Basara ML, Palm SL, Sas DF, Furcht LT. The role of cell-adhesion proteins - laminin and fibronectin - in the movement of malignant and metastatic cells. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 4: 99-106.
9. Jalkanen S, Nakache M, Butcher EC. Homing receptor and the control of lymphocyte migration. *Immunol Rev* 1986; 91: 39-60.
10. Wayner EA, Carter WG, Piotrowicz RS, Kunicki TJ. The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: Pre-

- paration of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J Cell Biol* 1988; 107: 1881-91.
11. Hofmann M, Rudy W, Zoller M, et al. CD44 splice variant confer metastatic behavior in rats: Homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 5292-97.
 12. Gunthert U, Hofman M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
 13. Sreaton 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 Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
 14. Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R, et al. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: Each on individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993; 149: 249-57.
 15. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846-51.
 16. Jass JR, Sobin LH. World health organization histological typing of intestinal tumors. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag, 1989.
 17. Berg JW, Howell MA. The geographic pathology of bowel cancer. *Cancer* 1974; 34: 807-14.
 18. Boyle P, Zaridze DG, Smans M. Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer* 1985; 36: 9-18.
 19. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64: 271-80.
 20. Hart IR, Saini A. Biology of tumor metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-7.
 21. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451-5.
 22. Dorudi S, Sheffield JP, Poulson R. E-Cadherin expression in colorectal cancer *Am J Pathol* 1993; 142: 981-6.
 23. Pignatelli M, Vessey CJ. Adhesion molecules: Novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol* 1994; 25: 849-56.
 24. Fox SB, Gatter KC, Jackson DG, Scerion GR, Bell MV. CD44 and cancer screening. *Lancet* 1993; 341: 725-6.
 25. Abasi AM, Chester KA, Talbot IC, Macpherson AS, Boxer G, Forbes A. CD44 is associated with proliferation in normal and neoplastic human colorectal epithelial cells. *Eur J Cancer* 1993; 294: 1995-2002.
 26. Birch M, Mitchell S, Hart IR. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 1991; 51: 6660-7.
 27. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
 28. Reber S, Matzku S, Gunthert U, Ponta H, Herrlich P, Zoller M. Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1990; 46: 919-27.
 29. Mulder JWR, Wielenga VJM, Polak MM, et al. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. *Gut* 1995; 36: 76-80.
 30. Mulder JWR, Kruyt PM, Miguel, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 344: 1470-2.
 31. Koretz K, Moller P, Lehnert T, et al. Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* 1995; 345: 327-8.
 32. Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, et al. Difference in expression of CD44 splice variants between proximal and distal adenocarcinoma of the large bowel. *Br J Surg* 1995; 82: 1468-70.
 33. Haenszel W, Correa P. Cancer of the large intestine: epidemiologic findings. *Dis Colon Rectum* 1973; 16: 371-7.
 34. Offerhaus GJ, Giardiello FM, Tersmette KWF. Ethnic differences in the anatomical location of colorectal adenomatous polyps. *Int J Cancer* 1991; 49: 641-4.
 35. Herrlich P, Rudy P, Hofmann M, et al. CD44 and splice variants of CD44 in normal differentiation and tumor progression. In: Martin EH, Enrico M eds. *Adhesion Molecules*. Vol. 4, New York: Plenum Press, 1993; 265-88.
-