

## 신세포암종에서 이형 CD44 단백질 발현의 의의

윤길숙 · 홍희연 · 김태숙

경북대학교 의과대학 병리학교실  
인하대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2005년 4월 13일  
게재승인 : 2005년 7월 12일

책임저자 : 김 태 숙  
우 400-103 인천시 중구 신흥동 3가 7-241  
인하대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 032-890-0943  
Fax: 032-890-0944  
E-mail: tskim@inha.ac.kr

\*본 논문은 인하대학교의 지원에 의해 이루어졌음(IHNA-22716).

신세포암종은 신장에서 발생하는 가장 흔한 원발성 악성 종양이다. 국립암센터에서 시행한 암 등록사업 보고에 따르면, 1999년 1.5%였던 신세포암종의 발생 빈도는 2002년 1.9%로 증가했다. 대부분의 구미 선진국에서 신세포암종의 발생 빈도가 전체 악성 종양 중 2% 내외인 점, 개발도상국보다는 선진국에서 신세포암종의 발생 빈도가 높다는 점 등<sup>1,2</sup>을 고려할 때, 우리나라에서의 신세포암종 발생 빈도는 계속 증가하리라 예측되므로, 신세포암종의 중요성 또한 계속 높아지리라 생각한다. 다른 악성 종양과 마찬가지로 진단 당시 신세포암종의 TNM 병기는 현재까지 알려진 가장 중요한 예후 인자이지만, 같은 TNM 병기에 해당하는 환자 군에서도 질병의 경과나 그 생존율에서 많은 개인차를 보인다. 이러한 점으로 미루어, TNM 병기 이외에 조직학적 유형, 핵 등급 등을 비롯한 여러 생물학적 인자들도 신세포암종 환자의 예후를 결정하는 데 중요한 역할을 담당하리라 생각한다.<sup>3</sup> 이러한 까닭에, 여러 생물학적 인자의 발현 양상에 관한 연구의 필요성 또한 계속 증가하고 있다.

### Expression of CD44 Isoforms and Its Significance in Renal Cell Carcinoma

Ghil Suk Yoon<sup>1</sup>, Hee Yeon Hong and Tae Sook Kim

<sup>1</sup>Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu;  
Department of Pathology, Inha University College of Medicine, Incheon, Korea

**Background :** CD44 is a transmembranous glycoprotein that participates in cell-cell and cell-matrix interactions, and it also contributes to cell migration. *In vitro* studies have suggested that the expression of CD44 isoforms is associated with tumor metastasis. Since it is not clear whether the CD44 isoforms play a role in the tumorigenesis, differentiation, progression or metastasis of renal cell carcinomas (RCCs). **Methods :** We performed immunohistochemistry with primary antibodies for the standard CD44 (CD44s) and the CD44 variant exon 6 (CD44v6) on the archival paraffin-embedded tissue microarray (TMA) specimens from 51 RCC patients. **Results :** In the normal kidney, the expressions of both CD44s and CD44v6 were negligible. The CD44s expression was increased in accordance with the tumor size ( $p < 0.01$ ), but it was not related to the microvessel density (MVD). No CD44v6 expression was observed in all RCC cases. Univariate analysis indicated that stage, tumor size, lymph node metastasis and distant organ metastasis were the statistically significant prognostic factors for disease free survival (DFS) ( $p < 0.01$ ), and the multivariate analysis proved that stage ( $p < 0.01$ ) and tumor size ( $p < 0.05$ ) were the independent prognostic factors for DFS. **Conclusions :** Our results suggest that CD44s, but not CD44v6, plays a role in tumor progression and it could be a potential prognostic factor for patients with RCCs.

**Key Words :** Antigens, CD44; Carcinoma, renal cell; Immunohistochemistry; Tissue microarray

CD44 단백질은 사람 조직에서 광범위하게 분포하는 세포 부착 단백질로, 그 유전자는 11번 염색체 단원 13번째 위치에 있으며 (11p13), 총 10개의 standard exon들과 10개의 variable exon들을 포함한다. Standard CD44 (CD44s) 단백질은, variable exon 없이 standard exon에서 발현되며, 사람의 혈구 및 상피세포 등에 널리 분포하여 이들 세포의 접착 및 이동에 관여한다.<sup>4</sup> 반면 5, 6번째 standard exon 사이에서 10개의 variable exon들이 선택적으로 재조합되어 다양한 CD44 이형 단백질들이 발현된다. 이들은 피부 및 구강 점막 상피세포, 유방 관 상피세포 기저부, 전립선 선 상피세포 등에서 발현될 뿐, 그 외 다른 세포에서는 거의 발현되지 않는다.<sup>5</sup> 특히 이 중 variable exon 6 및 7이 삽입되어 만들어진 CD44v6 및 v7 단백질의 발현은, 세포 배양 및 동물 실험 뿐 아니라 사람의 유방암, 전립선암을 이용한 연구에서도 종양의 발생, 진행 및 전이와 더욱 직접적인 관련이 있다고 알려졌다.<sup>6,7</sup> 최근 신세포암종 조직을 이용한 연구에서 CD44s 단백질 발현이 증가하고 이는 신세포암종 환자에서 의미 있는 예후

인자라는 연구 결과 뿐 아니라,<sup>8,9</sup> CD44 이형 단백질인 CD44v6 단백질 발현이 신세포암종의 진행 및 분화와 관련이 있다는 연구 결과도 보고되었다.<sup>10</sup> 따라서 CD44s 및 CD44v6 등 과연 어떤 CD44 이형 단백질 발현이 신세포암종의 진행 및 전이에 기여하는지 아직 확실치 않다.

저자들은 신세포암종 조직에서 면역조직화학 염색에 의한 CD44s 및 CD44v6 단백질 발현 양상을 관찰함으로써 이들 단백질의 발현이 신세포암종 환자의 임상 및 병리학적 소견과 어떤 관계가 있는지 알아내어, 이들 단백질의 발현이 신세포암종의 진행 및 전이에 어떤 역할을 하는지 밝혀내고 나아가 생물학적 예후 인자로서의 의의를 찾아내고자 했다.

## 재료와 방법

### 연구 재료

1999년 1월에서 2000년 12월까지 경북대학교병원 병리과에서 신 전 절제술 및 부분 절제술을 통해 신세포암종 진단을 받은 환자들 54예 중, 임상 자료를 찾을 수 없었던 1예와 불충분한 파라핀 조직으로 면역조직화학염색이 불가능했던 2예를 제외한 51명의 신세포암종 종양 및 정상 신 조직을 대상으로 삼았다. 환자의 연령, 성별, 종양 크기, 림프절 전이 유무, 원격 장기 전이 유무 및 5년 추적 관찰 결과 등을 조사했다. 환자의 평균 연령은 54.2세(범위 29-76세)로, 29명의 남성(56.9%)과 22명의 여성(43.1%)이 포함되었다. 36명(70.6%)의 환자는 일측성 광범위 신 전 절제술을, 14명(27.5%)은 일측성 단순 신 전 절제술을, 나머지 1명(2.0%)은 신 부분 절제술을 받았다. 이 연구에 포함된 환자들의 TNM 병기는 다음과 같아서, I기는 38명(74.5%), II기는 8명(15.7%), III기는 3명(5.9%), IV기는 2명(2.0%)이었다. Fuhrman의 기술에 따라 핵 등급을 분류하면, 6명은 핵 등급 1 (11.8%), 25명은 핵 등급 2 (49.0%), 18명은 핵 등급 3 (35.3%) 및 나머지 2명은 핵 등급 4 (3.9%)에 해당했다. 조직학적 유형별로는 투명세포형 신세포암종 40명(78.4%), 유두형 신세포암종 2명(3.9%) 및 혐색소형 신세포암종 9명(17.6%)이 포함되었다. 추적 관찰하여 수술받은 날짜에서 종양의 재발 및 전이가 확인된 날짜까지의 기간을 무병 생존 기간(disease free survival, DFS)이라 정의할 때, 평균 DFS는 34.2 (1-72)개월이었고 추적 관찰 종료 시점까지 신세포암종이 재발하거나 전이한 증거가 없었던 환자는 43명이었다(35.1개월, 1-72개월). 다른 8명(15.7%)의 환자들은 추적 관찰 기간 중 신세포암종이 재발하거나 전이되었으며, 이들의 평균 DFS는 21.4 (4-46)개월이었다. 또 전체 51명 중 한 명은 양측성 신세포암종을 진단 받았고, 다른 한 명은 1차 직계 혈족 내 신세포암종의 병력이 관찰되어 von Hippel Lindau disease를 의심했다(Table 1).

### 연구 방법

각 증례에서 헤마톡실린 에오신 염색을 시행한 대표적인 조직 절편을, 두 명의 경험 있는 병리 의사가 동시에 관찰하여 조직학적 유형 및 핵 등급 등을 정하고,<sup>11,12</sup> 1997년 개정된 TNM 병기 분류법에 따라 환자의 병기를 분류했다.<sup>13,14</sup> 또한, 괴사, 출혈, 섬유화 등 이차성 병변이 없는 부위만을 고르고 3 mm 지름으

**Table 1.** Relationship between CD44 expression and clinicopathological data of patients with renal cell carcinoma

Variables	No. (%) of Patients	CD44s		p-value
		(-)	(+)	
Age (years)	54.2±23.3			
Sex				
M	29 (56.9)	18 (62.1)	11 (37.9)	0.125
F	22 (43.1)	18 (81.8)	4 (18.2)	
Tumor size (cm)				
≤4	21 (41.2)	17 (81.0)	4 (19.0)	0.018*
>4, ≤7	19 (37.3)	15 (78.9)	4 (21.1)	
>7	11 (21.6)	4 (36.4)	7 (63.6)	
TNM stage				
I	38 (74.5)	34 (73.9)	12 (26.1)	0.144
II	8 (15.7)			
III	3 (5.9)	2 (40.0)	3 (60.0)	
IV	2 (3.9)			
T-Primary tumor				
T1	39 (76.5)	32 (82.1)	7 (17.9)	0.003*
T2	9 (17.6)	3 (33.3)	6 (66.7)	
T3	3 (5.9)	1 (33.3)	2 (66.7)	
N- Lymph nodes				
N0	48 (94.1)	35 (72.9)	13 (27.1)	0.144
N1	2 (3.9)	1 (40.0)	2 (60.0)	
N2	1 (2.0)			
M-Distant metastasis				
M0	50 (98.0)	35 (70.0)	15 (30.0)	0.706
M1	1 (2.0)	0 (0.0)	1 (100)	
Fuhrman' nuclear grade				
1	6 (11.8)	23 (74.2)	8 (25.8)	0.081
2	25 (49.0)			
3	18 (35.3)	13 (72.2)	5 (27.8)	
4	2 (3.9)	0 (0.0)	2 (100)	
Histological type				
Clear cell	40 (78.4)	30 (75.0)	10 (25.0)	0.124
Papillary	2 (3.9)	2 (100)	0 (0.0)	
Chromophobe	9 (17.6)	4 (44.4)	5 (55.6)	
MVD				
<25 (vessels/ HPF)	28 (54.9)	17 (60.7)	11 (39.3)	0.080
≥25 (vessels/ HPF)	23 (45.1)	19 (82.6)	4 (17.4)	
Recurrence				
No	43 (84.3)			
Yes	8 (15.7)			

MVD, microvessel density; CD44s, standard CD44; RCC, renal cell carcinoma; (-), negative; (+), positive; HPF, high power field; No, Number; Age was described by mean±SE, TNM Stage based on TNM Classification (1997); Fuhrman's Nuclear Grade grouped by Fuhrman's Nuclear Grading (1982);\* p<0.05; statistically significant.

로 각 증례마다 두 개의 중앙 조직을 정상 신조직과 함께 채취한 후, 6행 5열로 배열하여 tissue microarray (TMA) 파라핀 블록 네 개를 제작했다(Beecher Instruments, New Jersey, USA).<sup>15</sup>

### 면역조직화학 염색

TMA 파라핀 블록에서 3  $\mu\text{m}$  두께로 조직 절편을 박절하여 슬라이드에 부착한 후, 탈파라핀 및 합수 과정을 거쳐 증류수로 세척했다. 항원 노출 향상을 위해 미리 가열해 둔 citrate buffer (0.01 M, pH 6.0)에 조직 절편을 담가 5분씩 세 번 microwave를 처리한 후, 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에서 30분간 처리하여 내인성 과산화 효소 활성을 억제했다. 다음과 같이 생쥐에서 얻은 단클론성 일차 항체를 18시간 반응시키되, 그 항원은 사람 CD44s [1:100 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA)], CD44v6 [1:500 (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN)] 및 CD31 [1:20 (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark)]이었다. Biotin-streptavidin detection system (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)을 조직 절편에 반응시킨 후, 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 이용, 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 1초간 대조 염색했다. TBS-T [Tris-buffered saline (pH 7.4) with 0.1% Tween-20]로 세척했으며, 일차 항체 반응 과정(4°C)을 제외하고는 모두 상온에서 반응시켰다. 양성 대조를 위해 정상 신피질 및 편도 조직을 사용했고, 같은 조직에서 일차 항체 대신 TBS-T를 처리함으로써 음성 대조를 삼았다.

### 염색결과 판독

양성 대조 조직에서 확인한 대로 CD44s 및 CD44v6 단백질 발현은, 세포막을 따라 뚜렷한 적갈색 염색 반응을 보일 경우 각 예에서 100개의 중앙 세포를 400배 시야에서 다섯 번 계측하여 그 중 양성 반응을 보인 중앙 세포의 수가 10%를 초과하면 양성이라 판단했다. CD31은 혈관 내피 세포의 세포질에 적갈색으로 염색되면 양성으로 판단하되, 뚜렷한 내강의 유무와 무관하게 관찰되는 미세 혈관들을 모두 계측에 포함시켰다. 서로 합쳐지는 혈관들은 한 개로 간주하고, 400배 시야에서 다섯 번 계측한 후 그 평균을 미세혈관밀도(microvessel density, MVD)로 했다. MVD는 평균값을 구한 후 이를 기준으로 이하인 경우와 초과한 경우로 분류했다.

### 통계학적 분석

연속 변수의 값은 평균±표준오차로 표시했다. 비연속 변수로 이루어진 TNM 병기와 T, N, M 각각, 조직학적 유형, 핵 등급, MVD 평균값 이하와 평균값 초과 및 CD44 단백질 발현의 상관

관계는  $\chi^2$  test 및 Fischer's exact test를 이용해 분석했다. CD44s 및 CD44v6 단백질 발현에 따른 환자들의 DFS의 차이는 Kaplan-Meier test를 이용해 분석했으며 log-rank test로 유의성을 평가했다. 이 중 의미가 있었던 변수의 독립성을 평가하기 위해 multivariate Cox-regression analysis를 이용했다. 통계 분석에 사용된 프로그램은 version 10.0.7 SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)이며, p값이 0.05 미만일 경우 통계학적으로 의미 있다고 판단했다.

## 결 과

### CD44s 및 CD44v6 단백질 발현

양성 대조를 위한 편도 조직의 염색 결과, CD44s 단백질은 편도 소낭 점막 기저층 편평 세포의 세포막에서 적갈색의 강한 염색 반응을, 편도 소낭 하부 여포 사이 T 림프구에서도 양성 반응을 나타냈다(Fig. 1A). 그러나 정상 신피질 어느 세포에서도 CD44s 단백질에 대한 염색 반응은 관찰할 수 없었다(제시 자료 없음). CD44s 단백질은 투명세포형 신세포암종의 25.0% (Fig. 1B), 협색소형 신세포암종의 55.6%에서 양성으로 염색되었다. 또한 육종성 변화를 보인 2예의 신세포암종 조직에서 원래의 조직학적 유형과는 상관없이 모두 양성 반응을 나타냈다(Fig. 1C). CD44v6 단백질은 편도 소낭 점막 기저층 편평 세포의 세포막에 발현했으나(Fig. 1D), 정상 신피질에서는 혈관 평활근 세포를 제외하고는 어느 세포에서도 염색 반응을 관찰할 수 없었으며, 종양세포에서도 모두 음성이었다. 편도 및 신피질에서 각 CD44 단백질에 대한 일차 항체 대신 TBS-T를 처리함으로써 음성 대조로 했는데, 비특이 염색 반응 없이 모두 음성이었음도 확인했다.

### 임상 및 병리학적 특징과 MVD에 따른 CD44s 단백질 발현

신세포암종 환자들의 임상 및 병리학적 특징, 즉 환자의 나이, 성별, 중앙 크기, TNM 병기, 원발 병소의 성상, 림프절 및 원격 장기 전이, Fuhrman 핵 등급 및 조직학적 유형 및 MVD와 같은 생물학적 지표에 따른 CD44s 단백질 발현 양상을 요약하면 Table 1과 같다. CD44s 단백질은 전이 유무와 상관없이 중앙의 크기가 커질수록(분류 기준: 4 cm, 7 cm,  $p < 0.05$ ), 원발 병소가 진행할수록(T 병기,  $p < 0.01$ ) 발현이 증가했다. 핵 분화도가 나빠 Fuhrman 핵 등급이 높아질수록, 조직학적 유형별로는 유두형(0.0%), 투명세포형(25.0%) 및 협색소형(55.6%) 신세포암종의 순서로 CD44s 단백질 발현의 빈도가 증가했으나 통계학적 유의성은 없었다. 특히 이 중 유두형 신세포암종에서는 CD44s 단백질이 모두 음성이었다. TNM 병기, 림프절 및 원격 장기 전이 유무, MVD는 CD44s 단백질 발현 양상과 상관관계가 없었다.



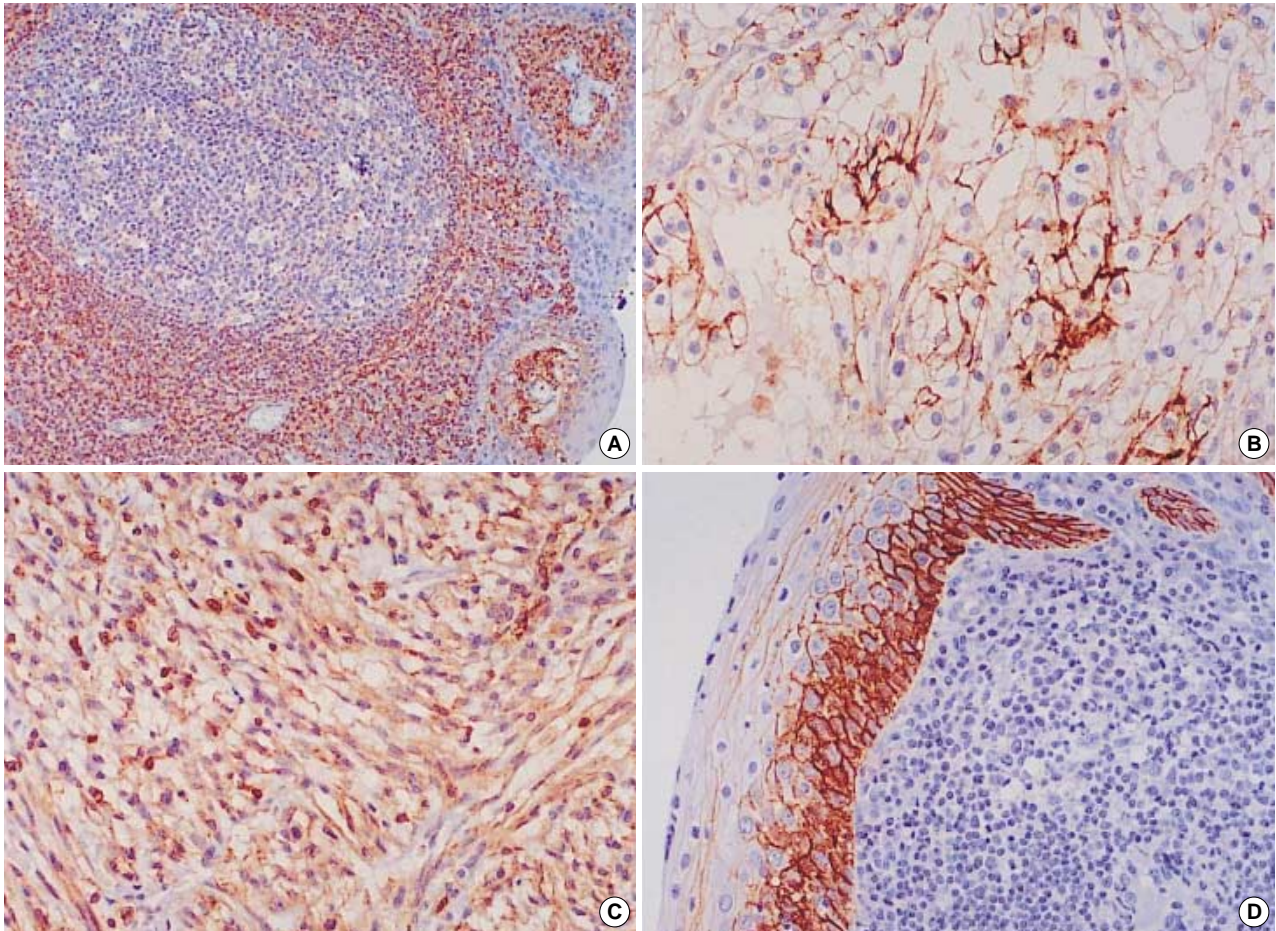


Fig. 1. Standard CD44 (CD44s) was expressed on the plasma membrane of interfollicular T lymphocytes and that of cryptic squamous epithelia in tonsils ( $\times 100$ , A). The strong CD44s expression was obtained in clear cell type RCC ( $\times 200$ , B), and in sarcomatoid area ( $\times 200$ , C). CD44v6 was expressed on the cytoplasmic membrane of cryptic squamous epithelia in tonsils ( $\times 200$ , D).

#### 임상 및 병리학적 특징, MVD 및 CD44s 단백질 발현에 따른 무병 생존 기간

Kaplan-Meier 검정 결과 이 연구에 포함된 전체 신세포암종 환자의 DFS는 평균 43 (1-72)개월이었다. TNM 병기를 I 및 II, III 및 IV 두 군으로 구분하면 환자들의 5년 무병 생존율은 평균 65개월(46명; 95% 신뢰 범위, 60-71개월) 및 30개월(5명; 95% 신뢰 범위, 13-48개월)로, TNM 병기가 진행된 환자의 DFS가 낮았다(Fig. 2A,  $p < 0.01$ ). 종양의 크기에 따른 DFS는 해당 환자 모두가 중도 탈락한 종양 크기가 4 cm 이하인 경우(21명; 모두 중도 탈락)를 제외하고, 종양 크기가 4 cm에서 7 cm 사이인 환자는 54개월(19명; 95% 신뢰 범위, 42-66개월), 종양 크기가 7 cm보다 컸던 환자는 50개월(11명; 95% 신뢰 범위, 33-67개월)로, 종양 크기가 커짐에 따라 생존 기간은 의미 있게 짧아졌다( $p < 0.05$ ). CD44s 단백질 발현 양상에 따라, 즉 CD44s 단백질 음성 환자의 DFS는 평균 65개월(36명; 95% 신뢰 범위, 60-71개월)로, CD44s 단백질 양성 환자의 평균 30개월(15명; 95%

신뢰 범위, 13-48개월)보다 높은 경향이 있었으나, 통계학적 의미는 없었다(Fig. 2B,  $p = 0.06$ ). 이 연구에서 Fuhrman 핵 등급, 조직학적 유형, MVD 등은 모두 환자의 DFS와 직접적인 상관관계가 없었다. 다변량 분석에서 TNM 병기( $p < 0.01$ )와 종양 크기( $p < 0.05$ )는 모두 의미가 있는 예후 인자로 밝혀졌다(Table 2).

#### 고찰

CD44 단백질들은 막성 당단백으로 hyaluronic acid (HA), osteopontin, collagen, laminin, fibronectin 등과 같은 세포 외 기질 단백질들과 결합함으로써, 세포-세포간 또는 세포-기질간 접촉, 세포 이동, 세포 성장 및 사멸 조절 등에 기여한다고 알려졌다.<sup>45</sup> CD44 단백질의 이러한 기능은 종양 세포에서도 동일하게 적용할 수 있어서, Gunthert 등<sup>16</sup>은 쥐의 췌장암 세포주에 CD44v6 유전자를 삽입하여 전이 능력이 획득되었음을 확인했고, 이는 다시 CD44에 대한 항체로 억제되었다고 보고했다. 최근 CD44 단백질은

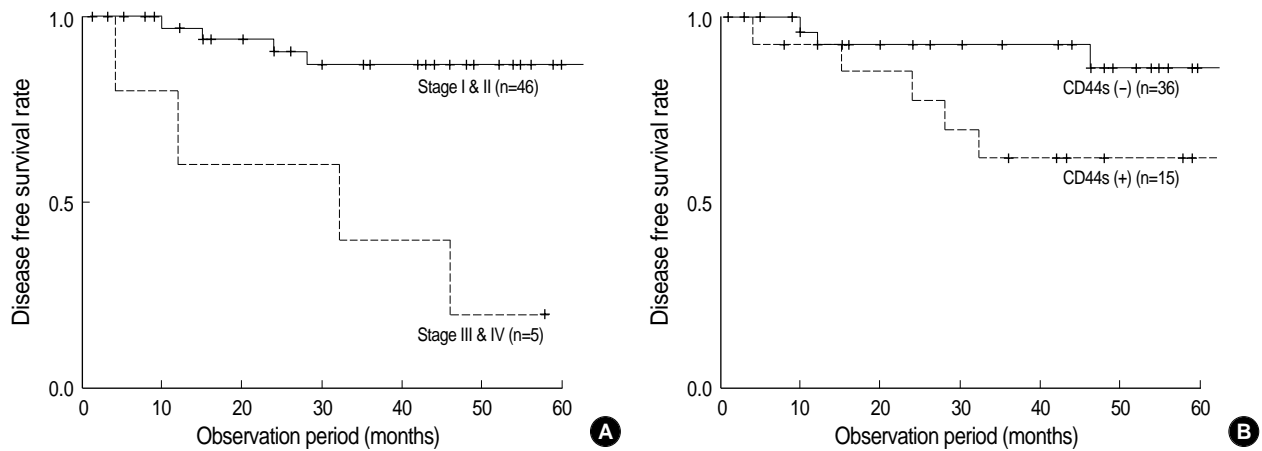


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves indicate prolonged disease free survival (DFS) in RCC patients with early stage (I and II) rather than advanced stage (III and IV) (log-rank test,  $p=0.0002$ ) (A), and CD44s (-) rather than CD44s (+) (log-rank test,  $p=0.0602$ ) (B).

Table 2. Independent prognostic values in renal cell carcinoma patients by multivariate analysis

Variables	RR	95% CI	p-value
TNM stage (I+II, III+IV)	6.623	1.606-27.316	0.009*
Tumor size	2.977	1.036-8.550	0.043*

RR, relative risk; CI, confidence interval. \* $p<0.05$ ; statistically significant.

신세포암종에서도 TNM 병기, 핵 등급, 조직학적 유형 등과 유의한 상관관계가 있을 뿐 아니라, 신세포암종 환자의 생존율을 예측할 수 있는 예후 인자로서 의미 있는 역할을 한다고 보고했다.<sup>8,9,17</sup> 그러나 CD44 단백질에 의한 일련의 과정은, 세포 외 기질 단백질 및 세포 내 신호 전달 체계에 관여하는 여러 분자가 모두 관여하는 복합적 반응이므로, CD44 단백질이 종양의 발생, 분화, 진행 및 전이에 이르는 각 단계에서 어떤 역할을 하는지는 충분히 밝혀지지 않았다.

Standard CD44 (CD44s)은 사람의 조직에서 가장 널리 분포하는 CD44 단백질로, 단핵구/탐식구 및 상피세포 등에서 발현된다.<sup>4</sup> 이에 대하여 CD44 유전자상에서 standard exon 외에 variant exon들이 선택적으로 재조합되어 만들어지는 variant CD44 단백질은 정상 표피 기저층 편평 세포 및 요로 상피세포 등에서 발현되며,<sup>18</sup> 드물게 유방 관 상피 세포, 전립선 선 상피세포 기관원주 상피세포 등에서도 발현된다고 알려졌다. 그러나 일부 세포, 즉 간 세포, 췌장 선방 세포 및 신 세뇨관 상피세포 등에서는 이들 단백질이 전혀 발현되지 않는다고 알려졌다.<sup>19</sup> 이 연구에서 CD44 단백질은 정상 요로 기저층, 편도 소낭 점막 및 표피 기저층 상피세포 등의 세포막에 염색되었으며, CD44s 단백질은 편도 소낭 하부 여포 간 림프구(T 림프구)에도 염색되었다. 특히 CD44v6 단백질이 혈관 벽을 구성하는 평활근 세포의 세포막에 염색된 점을 제외하고는, CD44s나 CD44v6 단백질 모두 신피질 어느 세포에서도 발현되지 않았다.

정상적으로 CD44 이형 단백질이 발현되지 않는 신 세뇨관 상

피세포에서 기원한 신세포암종에서 CD44 이형 단백질이 발현될 경우 이는 종양의 발생 및 진행과 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 이 연구에서 CD44s 단백질은 전체 51예 중 15예(29.4%)에서 양성이었으며, CD44v6 단백질은 모두 음성이었다. 또한 종양 크기 및 원발 병소의 범위가 커질수록 CD44s 단백질의 발현은 비례하여 증가했다. 이러한 결과로 보아 CD44s 단백질은 신세포암종의 발생 및 진행에서 중요한 역할을 담당하리라 생각한다. CD44s 단백질이 어떻게 신세포암종을 비롯한 종양의 발생 및 진행에 관여하는지는 정확히 알려지지 않았다. 그렇지만 최근 세포 배양 실험에서 종양의 발생, 혈관 신생, 침습 및 전이에 폭넓게 관여하는 Ras family mutant인 H-RasV12를 삽입하면 정상에서 종양 세포로 전환되는데, 이는 osteopontin-CD44-Rac 경로에 의해 조절받는다. 이는 점이 증명되었다.<sup>20</sup> 즉 이 연구 보고는 CD44 단백질이 직접적으로 종양의 발생에 관여함을 시사한다. 특히 증식이 활발하게 일어나고 있는 침습 선단부에서 종양 세포의 세포막뿐 아니라 간혹 세포질에도 CD44 단백질이 염색되는데, 이는 종양 세포 주변에서 분해된 HA와 결합한 CD44 단백질이 HA와 함께 종양 세포 안으로 흡수되었기 때문이라 알려졌다.<sup>21</sup> 즉 종양 세포 내에서 관찰되는 CD44 단백질은, 특히 HA가 풍부한 기질에서 활발한 종양의 성장 및 침습을 반영한다.<sup>4</sup> 이러한 가설들은 CD44s 단백질 발현이 종양의 국소 성장을 나타내는 종양 크기뿐 아니라, 원발 병소의 국소 침습 범위를 나타내는 T 병기와 밀접한 연관이 있다는 이 연구 결과를 잘 뒷받침한다.

이 연구에서 CD44s 단백질은 진단 당시 림프절 전이가 발견된 3예 중 2예(66.7%), 원격 전이가 있었던 1예 모두(100%)의 원발 병소에서 양성으로 염색되었다. 그리고 반대로 림프절 전이가 없던 48예 중 72.9%, 원격 전이가 없던 50예 중 70.0%에서 전혀 염색되지 않았다. 이러한 결과는 CD44s 단백질의 발현이 비록 통계학적 의미는 없었지만, 림프절 및 원격 장기로 전이됨에 따라 증가할 것이라는 점을 시사한다. 그러나 혈관 혹은 림프관으로 전이하는 종양 세포는 반드시 먼저 주변 세포 및 기질과의 접

착을 잃어야만 가능하다. 그러므로 종양의 진행에 따라 종양 세포에서 이전과는 다른 CD44, 예를 들어 CD44v6 단백질이 발현되거나, HA 분해 증가하는 등의 변화가 반드시 선행되리라 생각한다.<sup>22</sup> 다른 악성 종양과 마찬가지로 신세포암종에서도 진단 당시 TNM 병기, 종양 크기, 림프절 및 원격 장기 전이 유무 등은 매우 중요한 예후 인자로 알려졌으며,<sup>23</sup> 특히 이들 중 TNM 병기는 가장 의미 있는 독립적인 예후 인자로 알려졌다.<sup>3</sup> 이 연구에서 단변량 분석 결과, TNM 병기, 종양 크기, 림프절 및 원격 장기 전이 유무 등은 모두 DFS와 의미 있는 상관 관계를 나타냈다. 또한 다변량 분석 결과, TNM 병기 및 종양 크기 등은 독립적으로도 매우 의미 있는 예후 인자였다. 아울러 CD44s 단백질 발현 양상은 신세포암종 환자의 생존율과 직접적인 연관은 없었으나, TNM 병기의 진행, 종양 크기, 림프절 및 원격 장기로의 전이 등에 비례하여 증가했다. 따라서 이러한 연구 결과는 CD44s 단백질이 신세포암종 환자의 잠정적 예후 인자가 될 수 있다는 점을 시사한다.<sup>8,9</sup>

핵 등급은 TNM 병기와 더불어 중요한 신세포암종의 예후 인자로 알려졌는데, Fuhrman 등<sup>11</sup>이 제시한 1, 2등급을 하나로 묶어 세 등급 체계로 하면 1, 2등급간 주관적 오차를 줄일 수 있고, 이는 TNM 병기와 무관하게 신세포암종의 예후를 잘 반영한다고 알려졌다.<sup>13,24</sup> 이 연구에서 CD44s 단백질은 1, 2핵 등급의 25.8% 및 3핵 등급의 27.8%에서 양성이었다는 반해, 4핵 등급에서는 모두(100%) 양성이었지만 통계학적 의미는 없었다. 또한 신세포암종의 조직학적 유형 중 유두형이 협색소형보다 상대적으로 예후가 나쁘다고 알려졌는데,<sup>25</sup> Heider 등<sup>26</sup>은 CD44s 및 CD44v6 등 variant CD44 단백질이 크롬친화성 신세포암종에서 전혀 발현되지 않았다고 보고하여, CD44 단백질이 세포의 분화와도 관련이 있음을 제시했다. 이 연구 결과에서 CD44s 단백질은 유두형 신세포암종에서 전혀 발현되지 않았고 투명세포형 및 협색소형 신세포암종에서는 각각 25.0% 및 55.6%에서 발현되었는데, CD44s 단백질 및 조직학적 유형간에 통계학적으로 의미 있는 상관관계는 없었다. 이 외에 육종성 변화가 관찰된 2예에서 원래의 신세포암종의 조직학적 유형이나 CD44 단백질 발현 양상과는 상관없이 CD44s 단백질이 예외 없이 양성으로 염색되었다. 이러한 결과는 CD44 단백질이 신세포암종의 발생, 진행뿐 아니라 역분화에도 부분적으로 기여할 것이라 의심케 한다. 또한 이는, 사람의 신세포암종 조직에서 CD44 단백질이 신세포암종의 분화에 일부 관여한다고 보고한 연구 결과들에 부합한다.<sup>8,9,17,26</sup> 그러나 신세포암종 혹은 다른 악성 종양 세포주에 CD44 단백질 유전자를 삽입하여 이들 종양 세포에서 역분화 등의 형태학적 변화가 관찰되었다는 연구 보고는 아직 없으며, 사람의 육종성 신세포암종 조직에서 CD44 단백질 발현 양상에 관한 연구 보고도 아직 없다.

이 연구에서 CD44 단백질 발현 양상은 신세포암종 내 MVD와 상관관계가 없었다. 사람 신세포암종 조직에 대한 연구에 따르면, CD44 단백질 발현이 종양 내 MVD와 비례한다는 보고<sup>27</sup>뿐 아니라 반비례한다는 보고<sup>28</sup>도 있어 CD44 단백질 발현과 MVD 사이

에 어떤 상관관계가 있는지는 아직 확실하지 않다. 그러나 몇몇 세포 배양 실험에 따르면, CD44 단백질이 발현되는 간엽 줄기세포를 혈관 내피 성장 인자로 자극하여 성숙 혈관 내피 세포로의 분화를 유도하면 오히려 CD44 단백질이 발현되지 않았다.<sup>29</sup> 아울러 혈관 내피 세포에서 발현된 CD44 단백질은 세포 내 ezrin-radixin-moesin 등과 함께 세포골격 단백질의 구조적인 변화를 일으킴으로써 혈관 내피세포의 이동 및 정착에 기여한다고 알려졌다.<sup>30</sup> 이 연구에서 저자들은 신세포암종 종양세포에 CD44s 단백질이 염색되었을 경우만을 양성으로 판단했다. 즉 종양 내 미세혈관 내피 세포에 CD44s 단백질이 염색된 경우 이를 제외함으로써, 종양 세포에서 발현된 CD44 단백질이 주변 MVD에 과연 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 연구 결과로 보아, 신세포암종 종양 세포에서 발현한 CD44 단백질은 종양 내 미세혈관 내피 세포의 이동, 정착 및 분화 그리고 이에 따른 MVD의 증가에 직접 관여하지 않으리라 생각한다.

연구 결과 정상 신세뇨관 상피세포에서 발현되지 않던 CD44s 단백질이 신세포암종 크기에 비례하여 발현이 증가했으며, 이는 환자의 5년 무병 생존율과 반비례하는 경향을 보였다. 다변량 분석 결과, TNM 병기 및 종양 크기는 매우 의미 있는 예후 인자로 판명되었다. 이러한 점으로 미루어, CD44v6가 아닌 CD44s 단백질이야말로 신세포암종의 발생 및 진행에 관여하며 나아가 신세포암종 환자의 예후를 예측하는 데 도움이 될 것이라 생각한다.

## 감사의 글

통계학적 검사를 위해 노고를 아끼지 않은 인하대학교 의과대학 병리학교실 이향란 님께 감사드립니다.

## 참고문헌

- Godley P, Kim SW. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 280-5.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
- Gelb AB. Renal cell carcinoma: current prognostic factors. *Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. *Cancer* 1997; 80: 981-6.
- Goodison S, Urquidí V, Tarín D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999; 52: 189-96.
- Terpe HJ, Stark H, Prehm P, Gunthert U. CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* 1994; 101: 79-89.
- Marhaba R, Zoller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 2004; 35: 211-31.

7. Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, *et al.* CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999; 59: 219-26.
8. Paradis V, Ferlicot S, Ghannam E, *et al.* CD44 is an independent prognostic factor in conventional renal cell carcinomas. *J Urol* 1999; 161: 1984-7.
9. Daniel L, Lechevallier E, Giorgi R, *et al.* CD44s and CD44v6 expression in localized T1-T2 conventional renal cell carcinomas. *J Pathol* 2001; 193: 345-9.
10. de Alava E, Panizo A, Sola I, Rodriguez-Rubio FI, Pardo-Mindan FJ. CD44v6 expression is related to progression in renal epithelial tumours. *Histopathology* 1998; 33: 39-45.
11. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
12. Goldstein NS. The current state of renal cell carcinoma grading. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80: 977-80.
13. Guinan P, Sobin LH, Algaba F, *et al.* TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80: 992-3.
14. Elmore JM, Kadesky KT, Koeneman KS, Sagalowsky AI. Reassessment of the 1997 TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 2329-34.
15. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.
16. 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.
17. Terpe HJ, Storkel S, Zimmer U, *et al.* Expression of CD44 isoforms in renal cell tumors. Positive correlation to tumor differentiation. *Am J Pathol* 1996; 148: 453-63.
18. Masuda M, Takano Y, Iki M, Makiyama K, Noguchi S, Hosaka M. Expression and prognostic value of CD44 isoforms in transitional cell carcinoma of renal pelvis and ureter. *J Urol* 1999; 161: 805-9.
19. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 1994; 124: 71-82.
20. Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, *et al.* Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. *Oncogene* 2005; 24: 489-501.
21. Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* 1994; 160: 275-86.
22. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992; 103: 293-8.
23. Srigley JR, Hutter RV, Gelb AB, *et al.* Current prognostic factors--renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 1997; 80: 994-6.
24. Medeiros LJ, Gelb AB, Weiss LM. Renal cell carcinoma. Prognostic significance of morphologic parameters in 121 cases. *Cancer* 1988; 61: 1639-51.
25. Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 612-24.
26. Heider KH, Ratschek M, Zatloukal K, Adolf GR. Expression of CD44 isoforms in human renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 1996; 428: 267-73.
27. Yildiz E, Gokce G, Kilcarslan H, Ayan S, Goze OF, Gultekin EY. Prognostic value of the expression of Ki-67, CD44 and vascular endothelial growth factor, and microvessel invasion, in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2004; 93: 1087-93.
28. Rioux-Leclercq N, Epstein JI, Bansard JY, *et al.* Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 1209-15.
29. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004; 22: 377-84.
30. Jensen PV, Larsson LI. Actin microdomains on endothelial cells: association with CD44, ERM proteins, and signaling molecules during quiescence and wound healing. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 361-9.