대한외과학회지 : 제 65 권 제 5 호
Vol. 65, No. 5, November, 2003

□ 원 저 □

신경모세포종에서 CD44, *Bcl-2*, PCNA의 발현 및 세포고사와 Shimada 조직소견과의 상관관계

전남대학교 의과대학 외과학교실

최 수진나

Correlation between Expression of CD44, *Bcl-2*, PCNA, and Apoptosis in Neuroblastoma According to Shimada Histology

Soo Jin Na Choi, M.D.

Purpose: This study evaluated the correlation between expression level of CD44, *bcl-2* and PCNA and the extent of apoptosis in a neuroblastoma according to the Shimada histology.
Methods: Using the neuroblastoma tissue, which was kept at the Chonnam National University Hospital, this study investigated the effect of the CD44, *bcl-2*, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression levels and apoptosis according to the Shimada histology.
Results: There was significant correlation between the Shimada histology and the CD44 expression level (P= 0.004). There was also a correlation between the Shimada histology and the PCNA expression level (P=0.004). The correlations between the PCNA and CD44 expression levels showed a negative correlation (P＜0.01). There was also a significant correlation between the occurrence of apoptosis and the *bcl-2* expression level.
Conclusion: The CD44 and PCNA expression level and the Shimada histology were correlated. Therefore, the Shimada histology, as well as the CD44, and PCNA expression levels are prognostic factors in neuroblastoma. However, a further multicenter study is recommended in order to demonstrate the value of using the Shimada histology, along with the CD44, and PCNA level as prognostic factors in neuroblastoma. **(J Korean Surg Soc 2003;65:369-376)**

Key Words: Neuroblastoma, CD44, *bcl-2*, PCNA, Apoptosis, Shimada histology
중심 단어: 신경모세포종, CD44, *bcl-2*, PCNA, 세포고사, Shimada 조직소견

책임저자 : 최수진나, 광주광역시 동구 학1동 8번지
㉾ 501-757, 전남대학교병원 외과
Tel: 062-220-6472, Fax: 062-227-1635
E-mail: sycpvts@chonnam.ac.kr
접수일 : 2003년 7월 5일, 게재승인일 : 2003년 11월 7일

Departments of Surgery Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

서 론

신경모세포종은 최근 소아종양 치료의 획기적인 발전에도 불구하고 아직도 완전 치료가 안 되는 질환이며, 신경모세포종 환아의 예후를 예측하는 것은 쉬운 일이 아니다. 자연적 암 소멸이 일어나는 경우는 대부분 stage IV-S 환자에서 일어나며, stage I, II의 경우에서도 자발적 암 소멸이 이루어지고 있다.(*1*) 또한 국소적인 병변만 있는 경우와 전이된 경우에 있어서 그 특징이 심하게 차이가 나고 있다. 이와 같이 같은 병기에서도 자연 치유가 되는가 하면, 치료에 반응을 하지 않아 고용량의 항암요법 및 자가조혈모세포 이식이 필요한 경우도 있다. 현재까지 보고된 신경모세포종의 예후인자에는 진단 당시 연령, 병기 등이 가장 중요하며, 그 외에 원발성 암의 위치,(*2*) 혈중 ferritin, LDH, Shimada tumor histology,(*3*) N-*myc* 증폭(*4,5*) 진단 시 영양 상태,(*6*) *trk*의 발현,(*7*) 유세포 검사법(*2,8*) 등으로 알려져 있고, 최근에는 PCNA,(*2*) CD44,(*1*) *bcl-2*, 세포고사,(*9,10*) p53(*11*) 등이 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 하지만 이들은 모두 서로 병기에 의존적이기 때문에 독립적인 예후인자로 인정받지 못했다. 신경모세포종에서 stage IVs의 경우 특별한 치료 없이 자발적 퇴화가 자주 발생하는데,(*9*) 그 원인에 세포고사가 관여하고 있으며, 세포고사를 억제하는 *bcl-2* 유전자의 발현 여부에 대한 연구 결과 *bcl-2* 유전자의 발현증가는 세포고사를 억제하여 좋지 않은 예후를 나타낸다고 한다.(*10*) 최근 보고되고 있는 CD44는 부재 여부가 예후의 불량함을 나타낸다.(*12*) 또한 세포의 증식 정도를 나타내는 PCNA는 그 표지자인 PCNA 지수의 증가가 좋지 않은 예후와 관련 있음이 보고 되고 있다.(*13*)

본 연구는 예후인자로 알려진 Shimada 조직소견 분류상 stroma rich 군과 stroma poor 군으로 나누어 각각 블록 상에서 인자끼리의 발현 여부에 대해 검토해 보았으며 CD44, *bcl-2*, PCNA, 세포고사와의 상관관계를 조사하였다.

방 법

1) 대상

1995년 1월부터 2002년 12월까지 8년 동안 전남대학교병원 병리학교실에서 보관중인 55개의 신경모세포종 병리조직을 대상으로 하였다.

2) 방법

(1) Shimada 조직소견 분류: 5μm 두께의 절편을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 한 명의 해부병리 의사에 의해 분류하였다.

(2) CD44: 면역조직화학적 검사를 위하여 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직 중 주위 정상 조직을 포함한 종양 조직편을 선택하여 4μm 두께로 박절하였으며 이들을 organosilicane으로 도포된 슬라이드(Probe on Plus, Fisher, USA)에 부착하고 xylene에 탈파라핀한 후, 70% 알코올까지 점차로 낮은 농도 알코올에 함수하고 증류수로 세척하였다. 메탄올로 희석한 과산화수소에 20분간 처리하여 내인성 과산화수소수를 제거하고, phosphate buffered-saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4)으로 세 차례 세척하였다. 그 후 실온의 수조에서 차단 항체와 30분간 반응시켜 비특이성 항원을 차단하고, 1 : 100으로 희석한 일차 항체인 CD44를 4°C의 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이어 PBS로 세 차례 세척하고, 이차 항체인 biotinylated antimouse IgG (Vector Laboratories, USA)를 실온의 수조에서 30분간 반응시켰다. PBS로 세 차례 세척한 뒤 ABC reagent (Vector Laboratories, USA)를 가한 뒤 실온의 수조에서 45분간 반응시켰다. PBS로 두 차례 세척하고 Tris buffer (0.05 M, pH 7.6)에서 평형을 맞춘 뒤 0.05 M Tris buffer로 희석한 0.5 mg/ml 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA) 용액(pH 7.6)에 0.03% 과산화수소를 혼합하여 조직과 반응시켰다. 3분 내지 6분 후 증류수로 세척하고 Harris hematoxylin으로 20초간 대조 염색한 후 봉입하였다.

(3) *Bcl-2*: *Bcl-2* 단백에 대한 조직화학적 검색은 파라핀 포매 조직을 5μm 두께로 자른 후 L-lysine으로 처리된 슬라이드에 붙인 후 61°C 오븐에 1시간 가열하여 고정시킨 후 100% xylene으로 탈파라핀하였다. 100%, 95%, 80%, 70% 알코올에 순차적으로 탈수 후 0.3% 과산화수소로 처리하였다. 일차 항체는 monoclonal mouse antihuman *bcl-2* oncoprotein (Dako, Denmark)을 1 : 50의 희석비율로 4°C에서 다음날 아침까지 반응시킨 후 Tris buffer solution에 씻고 biontin이 결합된 이차항체에 30분 반응시키고 Tris buffer solution에 수세하고 streptavidin과 peroxidase의 결합체에 30분간 반응시키고 증류수에 수세한 후 diamicroheazidin 용액에서 발색시키고 hematoxylin으로 대조 염색한 후 봉입하였다. 염색판정은 광학현미경하에서 각 병변을 저배율로 관찰하여 양성으로 염색된 부분이 전 절편에서 몇 %가 염색

Table 1. Shimada histology

Shimada histology		Number (%)
Stroma rich :	Well differentiating	7 (12.7)
	Intermixed	5 (9.0)
	Nodular	4 (7.3)
Stroma poor :	Differentiating	
	Low MKI	17 (30.9)
	Intermediate MKI	6 (10.7)
	High MKI	8 (14.5)
	Undifferentiating	
	Low MKI	2 (3.6)
	Intermediate MKI	0 (0.0)
	High MKI	6 (10.9)
Total		55 (100.0)

*MKI = mitosis-karyorrhexis index (number of mitosis and karyorrhexis per 5,000 cells); Low = ＜100; Intermediate = 100～200; High = ＞200.

Table 2. Expression of CD44

CD44	Number (%)
Negative	10 (18.2)
Positive	45 (81.8)
Total	55 (100.0)

Negative = immunostained tumor cell/HPF ＜10%; Positive = immunostained tumor cell/HPF ＞10%.

Table 3. Expression of *bcl-2*

Bcl-2	Number (%)
Negative	10 (18.2)
Positive	
1+	4 (7.3)
2+	14 (25.4)
3+	12 (21.8)
4+	15 (27.3)
Total	55 (100.0)

Negative = no immunostained tumor cell/HPF; Positive = immunostained tumor cell/HPF (1+ = ～25%; 2+ = 26～50%; 3+ = 51～75%, 4+ = 76～100%).

되는지를 관찰한 다음 고배율에서 세포질의 염색정도를 관찰하여 양성으로 염색된 면적에 백분율이 10% 이상인 경우를 양성으로 10% 미만인 경우를 음성으로 판정하였다. 이들은 더욱 세분하여 점수를 매겨 0점(10% 미만), 1점(10～25%), 2점(25～50%), 3점 (51～75%), 4점(76～100%)으로 하였다.

(4) PCNA: 면역조직학적 염색방법은 종양이 세포증식에 대한 PCNA의 검출을 면역화학적 염색방법으로 시행하였다. 염색은 avidin과 biotin 사이의 강한 결합력을 이용하여 PCNA 단클론 항체를 1차 항체로 사용했다. 파라핀 포매를 5μm 두께로 잘라 xylene에서 탈 파라핀한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 순서대로 1분씩 방치시키어 탈수시키고 증류수에 씻어낸 후 PBS로 세척하였다. 1 : 50으로 희석한 PC10 (Dako. Denmark)로 1차 항체를 도포해 실온에서 2시간 동안 방치시킨 후 PBS로 세척하고 avidin-biotin-peroxi dase로 도포하여 실온에서 30분간 방치시켰다가 PBS로 세척한 후 발색제로 도포하였다.

Mayer hematoxylin에 3분간 대조염색 후 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 결과의 판정은 염색된 각 종양조직을 광학 현미경 400배 시야에서 관찰하여 핵에 적갈색의 과립이 있을 때 PCNA 발현 세포로 판독하였으며, 반응의 강도가 가장 낮은 부위에서부터 가장 높은 부위까지 4장의 사진을 찍어 각 부위에서 종양세포 수를 각각 250개씩 헤아리고 이 중에 반응의 강도에 관계없이 양성으로 나타난 종양세포 수를 헤아려 이들을 합산하여 총 1000개의 종양세포 중 PCNA 양성 세포 수를 구하여 다음과 같이 PCNA 지수(%)를 구하였다.

$$\text{PCNA 지수(\%)} = \frac{\text{양성으로 나타난 종양세포수}}{\text{전체 종양 세포수}} \times 100$$

Table 4. Expression of PCNA

PCNA grading	Number (%)
I	45 (81.8)
II	3 (5.5)
III	6 (10.9)
IV	1 (1.8)
Total	55 (100.0)

PCNA grading = immunostained tumor cell/HPF (I = 0～25%; II = 26～50%; III = 51～75%; IV = 76～100%). Randomly selected for cell counting, counting a minumun of 1,000 tumor cell.

Table 5. Association between shimada histology and *Bcl-2*, CD44, PCNA

Variables	Shimada histology		P value
	Unfavorable No (%)	Favorable No (%)	
Bcl-2			
Negative	5 (50.0%)	5 (50.0%)	1.000
Positive	21 (46.7%)	24 (53.3%)	
CD44			
Negative	9 (90.0%)	1 (10.0%)	0.004*
Positive	17 (37.8%)	28 (62.6%)	
PCNA			
Grade 1	17 (37.8%)	28 (62.6%)	0.004**
Grade＞I	9 (90.0%)	1 (10.0%)	

Table 6. Correlation between *Bcl-2,* CD44 and PCNA

Variables	CD44	PCNA
Bcl-2	0.214	0.142
CD-44	--	-0.425*

*Significantly negative correlation (Spearrman's correlation: r_s = -0.425, P＜0.01). CD44 Negative = Immunostained tumor cell /HPE ＜10%; Positive = immunostained tumor cell/HPE ＞10%; PCNA grading = immunostained tumor cell/HPE (I = 0～25%; II = 26～50%; III = 51～75%; IV = 76～100%).

Table 7. Occurrence of apoptosis

Apoptosis	Number (%)
Negative	21 (41.2)
Positive 1+	15 (29.4)
2+	11 (21.6)
3+	4 (7.8)
4+	0 (0.0)
Total	51 (100.0)

Negative = no apoptotic cell or body/HPF; Positive = percentage of apoptotic cell or body/HPF (1+ = 0～25%; 2+ = 26～50%; 3+ = 51～75%; 4+ = 76～100%).

Table 8. Correlation between apoptosis, *Bcl-2* and PCNA

Variables	Apoptosis	PCNA
Bcl-2	-0.482*	0.018
Apoptosis	--	0.021

*Significant negative correlation (Spearman's correlation: r_s = -0.425, P＜0.01).

(5) 세포고사: TUNEL (modified TdT-mediated dUTP nick end-labeling) method를 이용하여 세포고사를 검색하였다. 파라핀 포매를 3μm 두께로 자른 후 phosphate-buffered saline에 15분간 섭씨 25도에서 proteinase K (20μm/mL)와 함께 배양하였다. Endogenous peroxidase를 중화시키기 위하여, 0.01% 과산화수소수를 포함한 PBS를 이용하였다. 각각의 절편들은 digoxinegin-d-UTP의 존재하에 TdT enzyme과 함께 배양되었다. PBS에서 수세한 후에 peroxidase에 결합된 antidigoxigenin antibody와 함께 배양되었다. Di-aminobenzidine-hydrogen peroxidase를 이용하여 peroxidase의 존재여부를 알아내었고, 여기에 light Mayer's hematoxylin을 이용하여 대조염색을 시행하였다. 400배 시야에서 양성으로 염색된 세포들의 퍼센트를 계산하였다. 각각의 슬라이드당 임의로 10~20개의 field에서 최소한 1,000개의 세포를 헤아린 후 세포고사 지수를 구하여 평균값을 구하였다.

(6) 통계처리: *Bcl-2*와 CD44, PCNA와 Shimada tumor histology와의 상관관계를 chi-square of Fisher's exact test에 의하여 통계 분석하였다.

결 과

1) Shimada 조직소견 분류

Shimada 조직소견 분류는 1984년 Shimada 등(*3*)이 제안한 방법으로 진단 당시 연령, 성숙 정도, 핵의 병리적 소견에 따라 분류하였다. 이 중 stroma rich인 경우 16예(29%)였고, stroma poor인 경우가 39 (71%)예였다(Table 1).

2) CD44의 발현

병리조직 절편을 이용한 CD44의 발현 결과 전체 조직 중 45예(81.8%)에서 양성반응을 보였으며, 10예(18.2%)에서 음

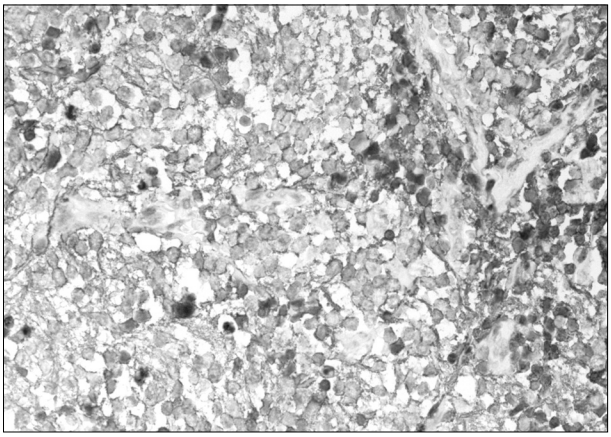

Fig. 1. Most of the cells are CD44 (+) in stroma poor, undifferentiated, high MKI (Mitosis-karyorrhexis index, ×200).

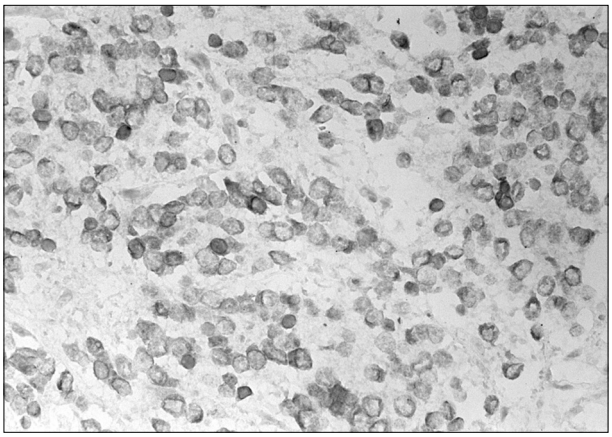

Fig. 3. All of the neuroblasts are PCNA (+) and intermidiate MKI (Mitosis-karyorrhexis index) in stroma poor, undifferentiated type (×200).

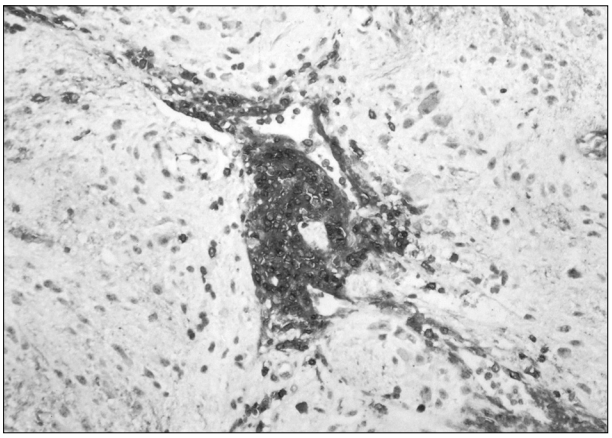

Fig. 2. The clusters of neuroblasts are CD44 (+) in stroma rich, intermixed (×100).

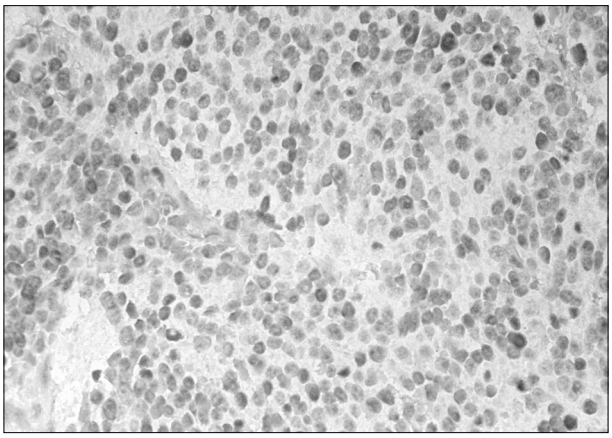

Fig. 4. Most of the neuroblasts are PCNA (+) and high MKI (Mitosis-karyorrhexis index) in stroma poor, undifferentiated type (×200).

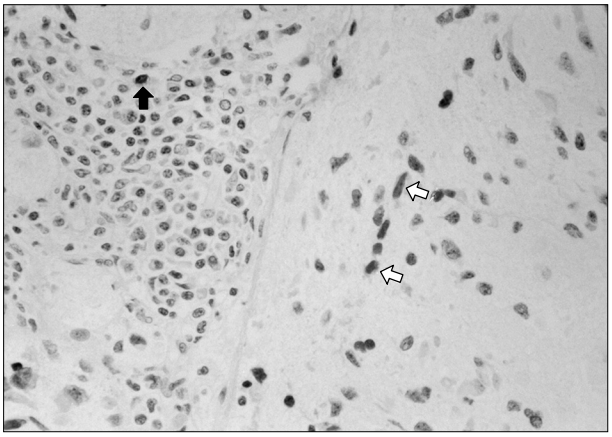

Fig. 5. Only a neuroblast (Dark arrow) is positive (+) for TUNNEL stain. Some of the differentiated cells(White arrows) in the stroma are positive (+) of TUNNEL stain (Stroma rich, intermixed type) (×200).

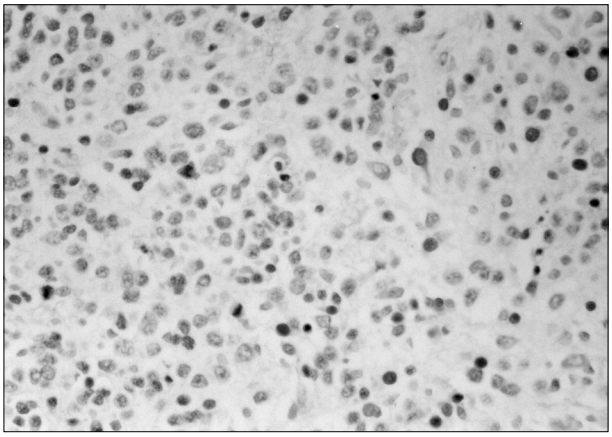

Fig. 6. Some of the neuroblasts are positive (+) for TUNNEL stain and intermediate MKI (Mitosis-karyorrhexis index) in stroma poor, undifferentiated type (×200).

성으로 나타났다. Shimada histology에 따른 CD44의 발현을 보면, 음성반응을 보인 경우 10예 중 9예가(90%) unfavorable한 군이었으며, 양성반응을 보인 경우 45예 중 28예(62.6%) 가 favorable한 군이었다. Shimada histology에 따른 CD44의 발현은 통계학적 유의성이 있었다(P=0.004). CD44와 타 인자와의 관계를 비교해 보았을 때 CD44와 PCNA는 Spearman correlation에서 r_s=-0.425로 음의 상관관계가 있었다. 그러나 *bcl-2*와는 통계학적 유의성은 없었다(Table 2, 5, 6).

3) *Bcl-2*의 발현

병리조직 절편을 이용한 *bcl-2*의 면역조직화학적 검색 결과 전체 조직 중 45예(81.8%)에서 양성반응을 보였으며, 10예(18.2%)에서 음성으로 나타났다. Shimada histology에 따른 *bcl-2*의 발현을 보면, 음성반응을 보인 경우 10예 중 5예(50%)가 unfavorable한 경우였으며, 양성반응을 보인 경우 45예 중 24예(53.2%)가 favorable한 군이었다. Shimada histology에 따른 *bcl-2*의 발현은 통계학적 유의성이 없었다(P=1.000). *Bcl-2*와 타 인자와의 관계를 비교해 보았을 때, CD44와 PCNA 등과는 통계학적 유의성은 없었다. 그리고 apoptosis와의 통계학적 상관관계에서 Spearman correlation에서 r_s=-0.482, P＜0.01로 음의 상관관계가 있었다(Table 3, 5, 6).

4) PCNA의 발현

PCNA 지수 퍼센트를 4등급으로 분류하였다. 0～25%은 1등급으로, 26～50%은 2등급으로, 51～75%은 3등급으로, 76～100%은 4등급으로 분류하였다. 1등급인 경우 45예(81.8%)로 가장 많았다. Shimada histology에 따른 PCNA 발현을 비교하여 보았을 때, 1등급에서 45명 중 28예(62.6%)가 favorable한 군이었고, 2등급 이상인 경우 10예 중 9예가 unfavorable한 군으로 나왔다.

Shimada histology와 PCNA발현의 통계학적 상관관계는 P값이 0.004로 유의성이 있었다. PCNA와 타 인자와의 관계를 비교해 보았을 때 CD44와 PCNA는 Spearman correlation에서 r_s=-0.425로 음의 상관관계가 있었다. 그러나 PCNA와는 통계학적 유의성은 없었다(Table 4, 5, 6).

5) 세포고사 관찰

세포고사와 *bcl-2*의 상관관계를 Spearman correlation으로 분석하여 의미있는 음의 상관관계(r_s=-0.425, P＜0.01)를 보였다(Table 8).

고 찰

저자는 최근 신경모세포종의 예후인자로서 작용되어진다고 보고 된 *bcl-2*와 CD44의 발현과 PCNA 및 세포고사와 Shimada 조직소견 분류와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 신경모세포종은 특히 stage Ⅳ-S의 경우 자발적 퇴화가 발생하기도 한다고 보고되고 있다. 일본에서는 1985년부터 소변에서 VMA (Vanillymandelic acid)와 HVA (Homovanillic acid)를 이용하여 생후 6개월 이전의 영아들에서 집단검사 프로그램에 의해 신경모세포종의 발견 빈도가 더욱 증가하고 있으며, 더불어 자발적 퇴화되는 신경모세포종도 많이 발견되고 있다.(*9*) 여기서 자발적 퇴화와 세포고사에 대한 연구가 이루어지면서 *bcl-2* 유전자의 발현과의 관계에 대해 연구되고 있다. 세포고사를 조절하는 유전자로는 암유전자(C-*myc*, C-*fos*),(*14,15*) 암 억제 유전자(p53),(*11*) 세포주기 조절 인자, *bcl-2* 유전자 등이 알려져 있는데, 특히 *bcl-2* 유전자는 기존의 암유전자가 성장인자의 존재하에 세포의 증식을 유발하는 것과는 달리 세포의 고사를 억제하여 세포 수명을 연장시켜, 다른 암유전자의 영향을 받을 수

있는 기회를 증가시키는 새로운 암유전자로 분류되고 있다.(*16*) *Bcl-2* 유전자는 26 KD에 해당하는 단백질을 생성하며, 3개의 exon과 230 K 염기쌍으로 구성되어 있고 정상적으로 염색체 18번의 장완(18q21)에 위치한다. 이 유전자의 원래 위치인 18q21에서 근접 위치한 14q32로 전위가 일어나면, *bcl-2* 전령 RNA의 전사가 증가하고 결국 *bcl-2* 단백의 과발현을 유발하게 된다.

Chen 등(*15*)은 간세포와 신경모세포종 세포를 같이 배양하여 간세포가 *bcl-2*의 과발현을 유도하여 고사를 억제시켜 신경모세포종이 더욱 성장하였고, 그 역으로 신경모세포종은 주변 간 조직에 있어서 *bcl-2*의 발현을 증가시켜 고사를 유발하여 간조직의 축소를 가져왔음을 보여주었다. 이 실험을 통하여 *bcl-2*에 의한 세포고사의 억제능력을 다시 한번 밝혔으며, *bcl-2*의 발현과 unfavorable histology 사이의 상관관계를 보여주었다. 또한 신경모세포종에서 *bcl-2*가 발현되는 경우 예후가 좋지 않은 조직학적 분류와 일치되는 임상적 결과를 보였다.(*17,18*) Akira 등(*19*)은 TUNEL method로 고사를 조사하고 면역화학적 분석을 통해 *bcl-2* 발현을 조사하여 1세 이하의 환자나 favorable clinical stage에 있는 경우 세포고사의 빈도가 높았으며, N-*myc* 증폭이 동반된 *bcl-2* 발현과 Shimada 분류가 연관 있음을 밝혔다. 또한 1세 이전에 cellularity가 감소했을 때 *bcl-2* 발현이 감소하면서 세포고사가 관찰되고, 세포고사와 *bcl-2* 발현에 음의 상관관계가 있음을 밝혔다. Dole 등(*20*)은 *bcl-2*가 unfavorable histology와 N-*myc* 유전자 증폭에 밀접하게 관련이 있다고 하였고, *bcl-2* 유전자는 항암제에도 내성을 갖게 하여 신경모세포종의 악성도를 높이는 것으로 보고하였다.

PCNA는 세포 주기 중 G0 phase에는 존재하지 않으며, G1 phase 동안에 증가하기 시작해서 S phase에 가장 많이 합성되고 G2 phase에 감소되는, 36 KD의 세포 내 polymerase delta accessory protein으로, 세포의 DNA 합성과 세포의 증식에 필수적인 것으로 알려져 있다.(*21*) PCNA 발현은 각질세포의 증식상태, 신경교증, 착색된 피부 병변, 폐의 비소세포성암의 조직 병리학적 등급과 관련 있다고 알려져 왔다.(*22*) Miyagawa 등(*21*)은 PCNA가 세포의 증식능력을 나타내고 있으며, 신경모세포종에서 PCNA 발현과 Shimada 분류상 MKI (Mitosis-karyorrhexis index)와 비교하여 MKI 증가되는 경우 즉, unfavorable한 경우에 PCI (PCNA index)가 상승되고, 종양의 무게가 증가함에 따라 PCI의 상승 소견을 보였다고 하였으며, 임상적 병기에서 stage III, IV인 경우 증가하였고, 국소적 침습, 임파선 전이, 간 전이 있는 경우에 PCI가 증가되는 것을 보였다고 하였으며, 또한 PCI가 30% 이상일 때 10% 이하인 경우에 비해 생존율이 떨어진 것으로 보아, 분화된 세포에서는 낮은 수치를 보이는 PCNA가 독립된 예후인자로서 의미 있다고 보고하였다.

CD44는 세포막에 위치한 transmembrane glycoprotein으로 N-terminal은 세포 외의 hyaluronate의 수용체로 작용하며 세포내의 C-terminal은 ankyrin과 결합한다.(*23-25*) 또한 GTP-binding 단백으로 신호전달체계에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 물질은 세포-세포간, 세포-세포외 결체조직의 상호작용에 관계할 뿐만 아니라 세포의 활성이나 분화 및 증식에 관여하며, 또한 아직 알려지지 않은 작용이 있을 것으로 추정되고 있다.(*26*) CD44의 분포는 매우 광범위하여 T형 림프구, B형 림프구, 대식구, 단핵구, 과립구, 적혈구 등 혈구세포 외에도 각종 상피세포와 내피세포, 평활근 세포, 망막세포나 중추신경계의 교세포 등에 존재한다.(*27,28*) CD44의 유전자는 약 20개의 exon으로 구성되어 있으며 이들 중 10개 가까이의 exon은 다양하게 splicing되어 여러 가지의 표현형을 나타낼 수 있는데 현재까지 15종류 이상의 CD44 isoform (CD44v)이 발견되어 있다. 최근 각종의 악성 종양에서 변형된 CD44v isoform의 발현이 증가된다는 보고가 있으며, 특히 CD44 v6의 발현이 대장암이나 유방암 등에서 증가되었다는 보고가 있다.(*29*) 반면에 신경모세포종에서는 N-*myc* 증폭과 함께 악성도의 표지자로 사용되어왔다. CD44는 대부분의 유방암이나 대장암 또는 임파종 중에서 과발현에 의해 전이나 악성변화를 보이는데, 신경모세포종에서는 CD44의 발현억제가 좋지 않은 예후의 원인이 되었다. Favrot 등(*12*)은 stage I, II, IV S에서는 CD44가 100% 발현되고, stage III, IV에서는 50%만이 발현됨을 보이며, CD44의 과발현보다는 발현 억제가 좋지 않은 예후의 의미 있는 표지자가 됨을 보였다. Cohen 등(*29*)은 N-*myc* 증폭과 CD44 발현사이의 역관계를 분석해 냈으며, CD44 발현의 억제가 낮은 생존율과 밀접히 관계가 있음을 발표했다. Favrot 등(*12*)은 CD44는 favorable tumor histology, young age, 정상 N-*myc* copy에서 강하게 발현되었으며, CD44 발현과 정상 N-*myc*은 favorable clinical outcome의 가장 강력한 표지자라고 주장하였다.

이에 저자는 CD44와 PCNA, *bcl-2* 그리고 세포고사 정도와 Shimada 조직소견과 어떠한 상관관계가 있는가를 관찰한 결과 CD44와 PCNA가 Shimada 조직소견과 통계학적으로 의미있는 상관관계를 보였다. 그러나 Shimada 조직소견이나 CD44와 PCNA가 신경모세포종의 예후인자로 고려되기 위해서는 다기관 공동연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

병리조직 절편을 이용하여 CD44, *bcl-2*, PCNA 및 세포고사와 Shimada 조직소견과의 상관관계를 조사한 결과, Shimada 조직소견은 CD44의 발현과 PCNA의 발현에 각각 통계학적 유의성이 있었다. PCNA와 CD44의 발현 사이에는 음의 상관관계가 있었고, 세포고사와 *bcl-2* 발현 사이에도 음의 상관관계가 있었다. 그러나, CD44와 PCNA 발현률, Shimada 조직소견이 신경모세포종의 예후인자로 고려되어질 수 있기 위해서는 다기관 공동연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz D, Beretta-Brognara C, Philip T. Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-*myc* gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas. J Clin Oncol 1996;14:25-34.
2) Christiansen H, Lampert F. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. Br J Cancer 1988;57:121-6.
3) Shimada H, Chatten J, Newton WQ, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastomas: Definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst 1984;73:405-16.
4) Combaret V, Wang Q, Favrot MC, Thiesse P, Philip J, Bouffet E, et al. Clinical value of N-*myc* oncogene amplification in 52 patients with neuroblastoma included in recent therapeutic protocols. Eur J Cancer Clin Oncol 1989;24:1607-12.
5) Fong C-T, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, et al. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: Correlation with N-*myc* amplification. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86: 3753-7.
6) Ladenstein R, Favrot MC, Lasset C, Bouffet E, PhilipI, Comboret V, et al. Indication and limits of megatherapy and bone marrow transplantation in high-risk neuroblastoma: A single center analysis of prognostic factors. Eur J Cancer 1993;29:947-56.
7) Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, CantorAB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the *trk* gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med 1993;328:847-54.
8) Bourhis J, De Vathaire F, Wilson GD, Hartmann O, Terrier-Lacombe MJ, Boccon-Gibod L. Combined analysis of DNA ploidy index and N-*myc* genomic content in neuroblastoma. Cancer Res 1991;51:33-6.
9) Carlsen NLT. Neuroblastoma: Epidemiology and pattern of regression. Problems in interpreting results of mass screening. Am J Pediatr Hematol Oncol 1992;14:103-10.
10) Bissonnette RP, Exheverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by N-*myc is* inhibited by *bcl-2*. Nature 1992;359:552-4.
11) Shao ZM, Dawson MI, LiXS, Rishi AK, Sheikh MS, Han QX. P53 dependent GO/GI arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. Oncegene 1995;11: 493-504.
12) Favrot MC, Lasset C, Combaret V. CD44: A new prognositc marker for neuroblastoma. N Engle J Med 1993;329:1965.
13) Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 1986;166:209-19.
14) Kerr JFR, Winterford CD, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013-26.
15) Chen M, Strande L, Kain M, Walen T, Doolin E. Induction of apoptosis in a neuroblastoma and hepatocyte coculture model. J Surg Res 1998;78:123-30.
16) Oue T, Fukuzawa M, Kusaflika T, Kohmoto Y, Imura K, Magahara S, et al. In site detection of DNA fragmentation and expression of *bcl-2* in human neuroblastoma: Relation to apoptosis and spontaneous regression. J Pediatr Surg 1996;31: 251-7.
17) Hoehner J, Hedborg F, Wiklund H, Olsen L, Pahlman S. Cellular death in neuroblastoma: In situ correlation of apoptosis and *bcl-2* expression. Int J Cancer 1995;62:19-24.
18) Ikeda H, Hirato J, Akami M, Matsuyama S, Suuuki N, Takayashi A, et al. *Bcl-2* oncoprotein expression and apoptosis in neuroblastoma. J Pediatr Surg 1995;30:805-8.
19) Akira, Takaharu O, Masahiro F, Takeshi K, Yosuke K, kenji I, et al. In situ detection of DNA fragmentation and expression of *bcl-2* in human neuroblastoma: Relation to apoptosis and spontaneous regression. J Pediatr Surg 1996;31:251-7.
20) Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, et al. *Bcl-2* inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. Cancer Res 1994;54:3253-9.
21) Miyagawa S, Okada N, Takasaki Y, Iida T, Kitano Y, Yoshigawa K, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocyts. J Invest Dematol 1989; 93:678-81.
22) Underhill C. CD44. The hyaluronate receptor. J Cell Sci 1992;103:293-8.
23) Bourgignon LYW, Lokeshwar VB, Chen X, Kerrick WG. Hyaluronic acid (HA)-induced lymphocyte signal transduction and HA-(GP85/CD44)-cytoskeleton interaction. J Immunol 1993;151:6634-44.
24) Bourgignon LYW, Lokeshwar VB, He X, Chen X, Bourgignon GJ. CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116)interacts with extracellular matrix and ankyrin. Mol Cell Biol 1992;12:4464-71.
25) Kalomiris EL, Bourguignon LYW. Lymphoma protein kinase C is associated with the transmembrnae glycoprotein, GP85, and may junction in GP85-ankyrin binding. J Biol Chem 1989; 264:8113-9.
26) Chaitin MH, Wortham HS, Brun-Zinkernagel AM. Immunocytochemical localization of CD44 in the mouse retina. Exp Eye Res 1994;58:359-65.
27) Salmi M, Gron-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalknen S. Reculated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man. Down during malignant transformation of tumors of squamo-cellular origin. J Cell Biol 1993; 122:431-42.
28) Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Gunthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent

prognostic factor. Blood 1995;85:2885-99.
29) Cohen M, Comito M, Savel V. CD44 expression in neuroblastoma and related tumors. J Pediat Hematol/Ocol 1997;19: 292-6.
30) Fukuzawa M, Kamata S, Okata A. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in human neuroblastoma. J Pediatr Surg 1995;30:528-33.