

자궁경부암에서 CD44v6 단백질의 발현

아주대학교 의과대학 산부인과학교실, 해부병리학교실*
정태영 · 유희석 · 주희재* · 양현원 · 장기홍 · 오기석

= Abstract =

Expression of CD44v6 in Cervical Cancer

Tae-Young Chung, M.D., Hee-Sug Ryu, M.D., Hee-Jae Joo, M.D.,
Hyun-Won Yang, Ph.D., Ki-Hong Chang, M.D., Kie Suk Oh, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology,
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

CD44 is a cell-surface glycoprotein postulated to play a role in tumor cell metastasis. Aberrant expression of the cell adhesion molecule CD44 has been detected in human tumors and the expression of specific isoforms(splice variants) has been shown to be associated with metastasis and poor prognosis in human malignancies. We used variant exon sequence-specific monoclonal antibody to epitope encoded by exon v6 of human variant CD44 to study the expression of CD44 splice variant by immunochemistry in fifty nine samples of human cervical cancer. twenty seven tissue samples of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and normal cervix were included in this study. CD44v6 was stained positive in the basal and parabasal layer of normal epithelial cells homogenously but was absent in the stromal cells. The intensity of CD44v6 staining was the strongest in invasive squamous cell carcinoma followed by normal cervical epithelium, CIN, adenocarcinoma. In the malignant samples, heterogeneity in staining intensity among different clusters of tumor cells was observed. Furthermore the intensity of staining was stronger in proportion to stage, depth of invasion, lymphovascular invasion($p < 0.05$), and lymph node metastasis($p = NS$). This study suggest that the expression of CD44v6 adhesion molecule may be useful value in predict the high stage, depth of invasion, lymphovascular invasion and lymph node metastasis probably.

Keyword: CD44v6, Adhesion molecule, Immunohistochemistry, Cervical cancer

* 이 논문은 1997년도 아주대학교 의과대학 교수연구비 지원으로 이루어졌음.

* 이 논문의 요지는 1997년 대한부인종양·콜포스코피학회 추계학술대회에서 구연되었음.

I. 서 론

종양의 전이는 암환자에 있어 주요 사망원인으로서 전이에는 성장인자(growth factor), 단백분해효소(proteolytic enzyme), 접착분자(adhesion molecule), 혈관생성인자(angiogenesis factor) 등 여러 가지 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이러한 종양의 전이 과정은 종양세포가 세포주변의 기저막과 기질을 뚫고 혈관 또는 임파관을 침범하여 전이부위로 이동한 후 미세혈관 내에서 종양색전의 정지와 증식이 필수적인 것은 주지의 사실이다. 이와 같은 종양의 침윤과 전이과정에서 세포간, 세포와 기질간의 교신이 중요한 과정이며 이러한 일련의 과정에는 접착분자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 접착분자는 일종의 세포막 당단백으로서 조직의 형태유지, 염증과 면역 반응, 창상 치유, 암세포의 침윤과 전이 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 접착분자의 일종인 CD44는 염색체 11에 위치한 단일 유전자(single gene)에서 유래되며 임파구의 회귀, 조혈작용, 세포이동, 종양의 침윤과 전이 등을 포함하는 세포간, 세포기질간의 상호작용에서 세포접착분자로 작용하는 세포표면 당단백으로서 hyaluronate 및 collagen과 결합하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ CD44의 분자량은 80-300kD으로 크기가 다양하고 그 유전자는 최대 20개의 exon으로 구성되며, exon 5에서 15까지 10개 exon의 교대접합(alternative splicing)에 의해 형성되는 CD44 변종(CD44v)과 5에서 15까지의 exon을 갖지 않은 가장 작은 형태인 CD44 표준형(CD44s)이 존재한다.⁶⁾ CD44 변종 중에서도 CD44v6가 대장암,⁷⁾ 유방암,⁸⁾ 위암⁹⁾ 및 뇌종양 등¹⁰⁾의 전이된 종양에서 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 특히 임파관 침윤, 임파절 전이와 가장 밀접한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 또한 난소암,^{14,15)} 자궁내막암¹⁶⁾ 및 자궁경부암¹⁷⁾에서도 CD44v6가 발현된다는 몇몇 보고가 있기는 하지만 부인과 종양에서 CD44v6의 발현이 어떠한 임상적 의미를 갖는지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 자궁경부암 환자의 조직에서

CD44v6의 발현양상을 면역조직화학 염색을 하여 알아보고 또한 CD44v6와 자궁경부암의 병기, 종양의 침윤깊이, 임파혈관 침윤과 임파절 전이 여부와의 상관관계 및 예후인자로서의 유용성을 알아보고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 대상환자

1994년 11월부터 1997년 8월까지 아주대학교병원 산부인과에 내원하여 수술적 치료를 받은 자궁경부암 환자중에서 무작위로 추출한 59예를 대상으로 하였다. FIGO 병기별로는 0기 1예, Ia기 19예, Ib기 36예, II기 3예 이었으며, 이 중 상피내 종양과 정상조직이 포함된 예는 각각 27예 이었다. 세포형태별로는 편평상피암이 46예, 선암이 7예, 선편평상피암이 6예 이었으며, 임파혈관침윤이 있는 경우는 36예, 임파절 전이가 있는 경우는 8예이었다.

2. 방법

포르말린용액에 고정 후 파라핀으로 포매된 자궁경부 조직을 5 μ m 두께의 조직절편을 만들어 Vectabond(Vecta laboratories)를 입힌 슬라이드 위에 부착시킨 후 단일 클론성 항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다. 염색의 강도를 높이기 위해 High temperature antigen unmasking technique을 이용하였으며 염색방법은 다음과 같다.

xylene 용액으로 조직표본에서 파라핀을 제거하고 알코올로 함수시킨 후 수세한 다음, 0.1M sodium citrate 완충액(pH 6.0)에 담귀 microwave oven에서 20분간 끓였다. TBS(Tris buffered solution) 완충액(pH 7.6)으로 10분간 세척한 후 비특이적 면역염색을 차단하기 위해 정상 혈청에 20분간 반응시켰다. 차단용액을 제거한 후 일차항체로서 CD44v6(R&D systems, 2 F10)을 1:1000으로 희석하여 90분동안 반응시켰다. 다시 TBS로 10분간 세척한 후 LSAB kit(DACO corporation)를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였으며 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)로 발색시킨 후 Meyer's hematoxylin으로 대조염색하였다. 병리전문의가 광

학현미경으로 검색하여 세포막을 따라 분명하게 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였으며 정상상피세포에서 염색되는 것을 기준(+)으로 이보다 약하게 즉 중양세포의 50% 미만이 발현되는 것을 약양성(±), 강하게 즉 50% 이상에서 발현되는 것을 강양성(++)으로 정하였다.

통계처리는 SPSS(version 7.0) 프로그램을 이용하여 Chi-square test 로 검증을 하였으며 P<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

면역조직화학적 염색에 의한 CD44v6의 발현은 자궁경부 정상상피세포에서는 기저층과 기저변층을 따라 균일(homogenous)하게 염색이 되었다(Fig. 1, 2). 자궁경부상피내종양은 대부분 염색이 안되거나 약하게 염색이 되었으나(Fig. 1) 간혹 강하게 염색이 되는 특이한 양상을 보였다(Fig. 2). 자궁경부 편평상피암은 대부분 이질적(heterogenous)으로 암세포가 침윤된 부위를 중심으로 강하게 염색이 되었다(Fig. 3). 선암은 대부분 염색이 안되거나 약하게 염색이 되었으나 1예의 villoglandular adenocarcinoma는 부분적으로 양성반응을 보였고(Fig. 4) 2예의 minimal deviation adenocarcinoma(adenoma malignum)은 강하게 양성반응을 보였으며 특히 중양침윤 최저층에서 더욱 강하게

발현되는 양상을 보였다(Fig. 5). 그리고 선편평상피암은 편평상피 부위를 중심으로 이질적으로 강하게 염색이 되었다(Table 1)

편평상피암의 침윤깊이별 CD44v6의 발현양상은 침윤깊이가 3mm 이하인 미세침윤암에서는 18예 중 8예(44%)에서 강양성으로 염색이 되었으나 3mm보다 깊은 경우는 28예 중 23예(82%)에서 강양성 반응을 보여 침윤깊이가 깊을수록 강하게 발현되는 양상을 보였다.(p<0.05, Table 2)

FIGO 병기별 CD44v6의 발현양상은 Ia 이하에서는 19예 중 8예(42%), Ib 이상은 27예 중 23예(85%)에서 강하게 염색이 되어 병기가 진행될수록 보다 강하게 발현되는 양상을 보였다.(p<0.05, Table 2)

편평상피암의 임파혈관 침윤 여부에 따른 CD44v6의 발현양상은 임파혈관 침윤이 없는 경우는 16예 중 5예(31%), 임파혈관 침윤이 있는 경우는 30예 중 26예(87%)에서 강하게 염색이 되어 임파혈관 침윤이 있을수록 보다 강하게 발현이 되는 양상을 보였다.(p<0.05, Fig. 6, Table 3)

편평상피암의 임파절 전이 여부에 따른 CD44v6의 발현양상은 임파절 전이가 없는 경우는 39예 중 25예(64%), 임파절 전이가 있는 경우는 7예 중 6예(86%)에서 강하게 염색이 되어 임파절 전이가 있을수록 보다 강하게 발현이 되는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.(p=NS, Table 3)

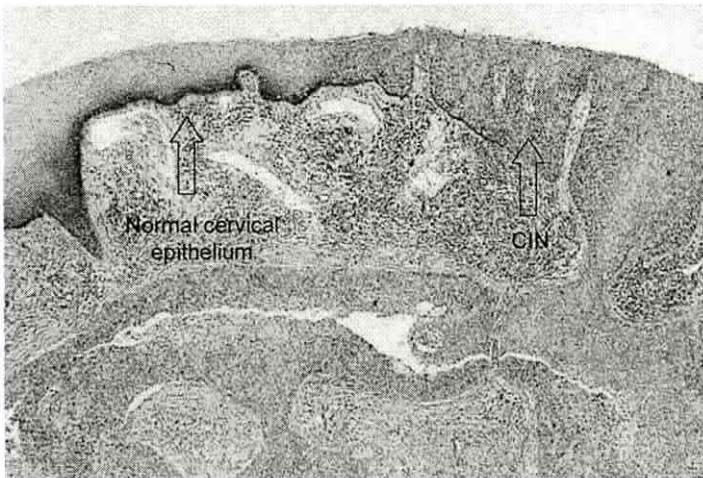


Fig. 1. Homogenous expression of CD44v6 in basal & parabasal layer of normal cervical epithelium showing and negative expression on CIN(×100)

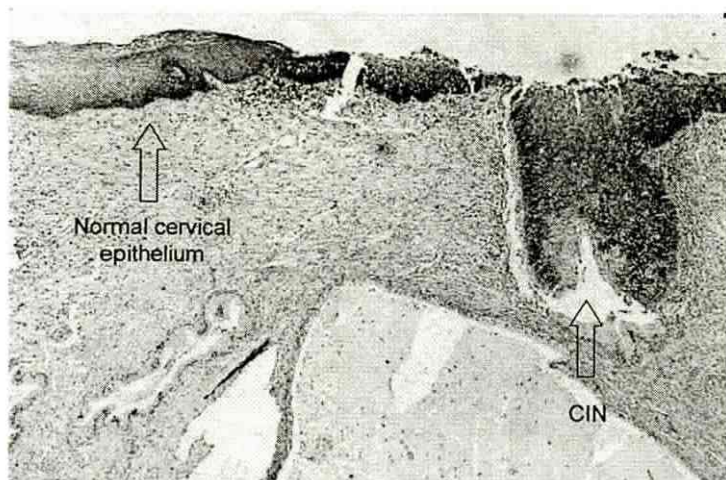


Fig. 2. Homogenous expression of CD44v6 in basal & parabasal layer of normal cervical epithelium and strong expression in CIN($\times 100$)

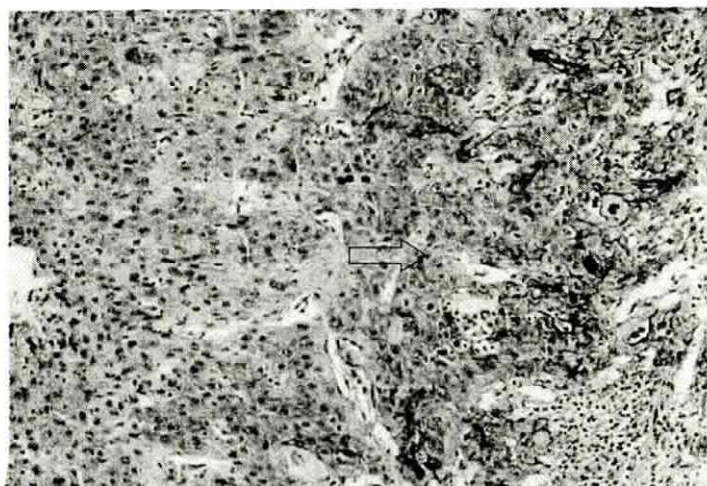


Fig. 3. Heterogenous strong expression of CD44v6 in invasion site of invasive squamous cell carcinoma ($\times 200$)



Fig. 4. Partially strong expression of CD44v6 in villoglandular adenocarcinoma($\times 100$)

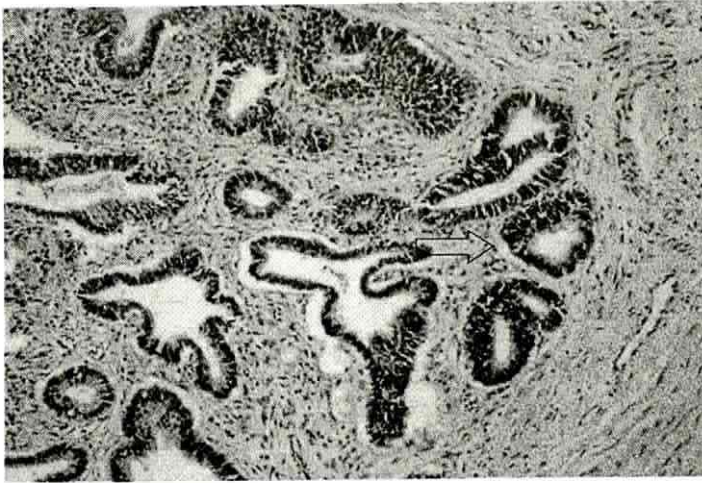


Fig. 5. Strong expression of CD 44v6 in deep layer of adenoma malignum(×200)



Fig. 6. Strong expression of CD 44v6 in lymphatic vessel and tumor emboli(×200)

Table 1. CD44v6 expression in cervical tissues

Cervical tissue	Expression
Normal epithelium	staining in basal layer & parabasal layer
CIN	- / ± / ++
Carcinoma	
Squamous	++, heterogenous
Adeno	- / ±
Adenosquamous	++, heterogenous

Table 2. CD44v6 expression according to invasion depth & stage of squamous cell carcinoma

		-	+	++
Invasion depth	≤ 3mm	2(12%)	8(44%)	8(44%)
	< 3mm		5(18%)	23(82%)
Stage	≤ Ia	2(11%)	9(47%)	8(42%)
	≥ Ib		4(15%)	23(85%)

SCC = Squamous cell carcinoma

χ^2 test : p<0.05 for invasion depth & stage

Table 3. CD44v6 expression according to lympho-vascular space invasion & lymph nodes metastasis of squamous cell carcinoma

		-	+	++
LVI	negative	2(13%)	9(56%)	5(31%)
	positive		4(13%)	26(87%)
LN	negative	2(5%)	12(31%)	25(64%)
	positive		1(14%)	6(86%)

LVI=lymphovascular invasion, LN=lymph node

 χ^2 test : $p < 0.05$ for lymphovascular invasion

p=NS for lymph node positive

IV. 고 찰

세포접착분자에 의한 세포와 세포, 세포와 기질 간의 교신은 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하며 이 과정에 세포접착분자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 세포접착분자는 크게 integrin, immunoglobulin superfamily, cadherin, selectin, 그리고 CD44 등 크게 5종류로 구분되며 이들은 종양의 침윤, 전이, 신호전달체계 등에서 고유의 기능을 수행하고 있다.⁴⁾ CD44는 세포접착분자의 일종으로서 구조적으로 3개의 영역(domain) 즉, 외측의 aminoterminal 영역, 막(transmembrane) 영역 그리고 alkylin과 같은 cytoskeleton 성분과 직접적으로 상호작용을 하는 세포질영역으로 구분된다. 세포질 영역은 신호전달, 세포이동, 세포분화를 조절하기 위한 cytoskeleton과의 상호작용에 관여하며 막 영역은 세포의 외부와 내부간의 신호전달에 필요한 부분으로 알려져 있다. CD44는 임파구에서 발견되는 90kD의 표준형(CD44s)과 세포의 영역에 있는 적어도 10개의 다른 exon들의 교대접합(alternative splicing)에 의해 형성되는 여러 종류의 변종(CD44v)이 존재하며 이러한 복합적인 구조에 의해 다양한 기능을 수행하는 것으로 생각된다.⁶⁾ 최근 많은 전이암에서 세포접착분자의 하나인 CD44 접합변종의 표현이 증가되어 있다는 사실이 알려져 있으나 전이와의 관련에 대해서는 CD44 표준형이 중요한 역할을

하는지 아니면 변종에 의해 전이가 촉발되는지에 대해서는 논란이 많다. Birch 등(1991)은 인간의 악성흑색종 배양세포주에서 그리고 Sy 등(1991)은 임파종에서 CD44 표준형이 종양의 이동, 즉 침윤과 관련이 있다고 하였다. 한편 Gunthert 등(1991)은 비전이성세포에 변종인 c-DNA encoding을 transfection시킴으로써 전이력을 가지게 된다는 것을 알게 되어 CD44 변종이 종양의 전이와 관련이 있다고 보고하였으나 Sy 등(1991)은 많은 암종에서 CD44 단백질이 증가할수록 암의 침윤과 전이를 촉진한다고 하였다. 이후 많은 임상적, 병리학적인 연구에 의해 CD44 변종이 종양의 빠른 진행, 전이 및 생존율의 감소와 관련이 있다고 보고하였다.^{12,18)} 그러나 CD44 표준형과 CD44 변종의 발현이 면역반응의 감소와 관련이 있다는 보고도 있는 등, CD44 변종의 발현이 종양의 침윤과 전이에 있어 어떠한 임상적 중요성을 갖는지는 아직 확실히 정립되어 있지 않은 실정이다.^{16,19)}

한국여성의 가장 흔한 악성종양의 하나인 자궁경부암에 대한 CD44 발현에 대한 연구는 비교적 최근에 시작되었으며 암종에서 주로 CD44의 변종들이 발현되는 것으로 알려져 있다.

자궁경부 정상상피세포에서 CD44 변종은 상피세포의 기저층에서 발현이 되나 표면층에서는 소실된다고 하였으며 이와는 달리 자궁경부의 암화과정에서는 CD44 변종의 발현율이 높다고 하였다.¹⁷⁾ Koji 등(1997)은 CD44v6, v7이 자궁경부 정상상피세포에서는 양성으로 염색되었으나 기질(stroma)에서는 염색이 되지 않았으며 염색강도는 정상자궁경부상피조직, 상피내종양, 침윤성 편평상피세포암, 선상피세포암의 순으로 강하게 염색이 되었으며 악성종양조직에서는 이질성(heterogeneity)을 나타낸다고 보고하였다. Athanassios 등(1996)은 CD44v6가 정상상피세포에 비해 전암병변조직에서 약하게 발현되며 자궁경부암화과정에서 이러한 현상이 관찰되는 것은 세포간, 세포기질간 상호작용의 소실을 초래하여 암세포의 기저막을 통한 기질, 임파혈관 침윤, 전이를 촉진하는 것이라 하였으나 반면 침윤성 자궁경부암의 CD44v6의 강한 발현은 전이 등의 예후와 관련이 있다고 하였다. 본 연구에서는 자궁경부 정상상피세포에서는 기저층과 기저변부를 따라 균일(homo-

genous)하게 발현이 되었고 자궁경부상피내종양 부위에서는 대부분 발현이 안되거나 약하게 되었으나 드물게 강하게 발현이 되는 이질적인 양상을 보였다. 침윤성 자궁경부 편평상피세포암에서는 이질적(heterogenous)으로 강하게 발현이 되었고, 선상피세포암에서는 대부분 발현이 되지 않았으나 villoglandular type에서는 부분적으로 발현이 되었다. Kaintz 등(1995)은 CD44v6 변종이 임파혈관 침윤과 가장 관련이 있으며 이의 발현은 수술적으로 치유된 자궁경부암 환자의 중요한 예후인자가 될 수 있다고 보고하였다.

Han 등(1995)은 CD44의 표현이 종양의 전이 및 치사율과 관련이 있다고 보고하였고 Kaintz 등(1995)은 자궁경부암에서 CD44v5, v6가 v7-8보다 더욱 강하게 발현이 되었으며, CD44v6가 CD44v5, v7-8보다 임파혈관 침윤 및 골반임파절 전이와 연관이 있다고 하였다.

본 연구에서는 현재까지 알려진 여러 가지 CD44 변종 중에서 임파혈관 침윤 및 임파절 전이와 가장 밀접한 관련이 있다고 알려진 CD44v6의 발현양상을 자궁경부암에서 알아본 결과 종양세포 침윤깊이가 깊을수록, 그리고 임파혈관 침윤이 있는 경우가 없는 경우보다 더욱 강하게 발현이 되었으며(P<0.05), 임파절 전이의 경우에는 전이가 있는 경우가 없는 경우보다 더욱 강하게 발현이 되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.(P=NS) 따라서 CD44v6는 자궁경부암의 진행과 침윤, 전이과정에서 중요한 역할을 하며, 또한 자궁경부암 환자의 치료 후 예후 예측인자로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

자궁경부암 환자의 CD44v6 단백질의 발현은 다음과 같다.

1. 자궁경부 정상상피세포에서는 기저층과 기저변층을 따라 균일하게 발현이 되었으며 자궁경부상피내종양은 대부분 발현이 안되거나 약하게 발현이 되었으며 침윤성 편평상피암에서는 침윤 부위를 중심으로 이질적(heterogenous)으로 강하게 발현되는 양상을 보였으나 선암에서는 대부분 발

현이 안되거나 약하게 발현이 되는 특이한 양상을 보였다.

2. FIGO 병기별로는 미세침윤암보다 진행암일수록 강하게 발현되는 양상을 보였다.(p<0.05)

3. 종양세포의 침윤깊이가 깊을수록 강하게 발현되는 양상을 보였다.(p<0.05)

4. 임파혈관 침윤이 없는 경우보다 임파혈관 침윤이 있는 경우에 보다 강하게 발현되는 양상을 보였다.(p<0.05)

5. 임파절 전이가 없는 경우보다 임파절 전이가 있는 경우에 보다 강하게 발현되는 양상을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.(p=NS)

따라서 자궁경부암 조직에서 CD44v6의 면역조직화학적 발현은 수술적 치료를 한 자궁경부암 환자의 병기, 침윤의 깊이, 임파혈관 침윤 등과 상관관계가 있으며 치료 후 예후 예측인자로서 유용하리라 사료되나 그 효용성을 확인하기 위해서는 보다 많은 환자를 대상으로 다양한 CD44 변종 및 표준형의 면역조직화학적, RT-PCR에 의한 분석이 필요하리라 사료된다.

- References -

1. Frost P, Levin B: Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 1992;339:1459-1461.
2. Azanovoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG et al.: Molecular aspects of tumor invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71:1368-1383.
3. Athanassios D, Elisabeth S, Alfonso CA et al.: Expression of CD44 and variant isoforms in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1996;62: 218-225.
4. Frenette PS, Wagner DD: Molecular medicine. *The New Eng J of medicine* 1996;335(1):43-45, 1526-1529.
5. Lesley J: Cd44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993;54:271-335.
6. 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.
7. Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus JA et al.: Expression of CD44 variant proteins in human

- colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;53:4754-4756.
8. 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;60:471-477.
 9. Harn HJ, Ho LI, Chang JI et al.: Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *cancer* 1995;75: 1065-1071.
 10. Kuppner M, Van Meir E, Gauthier T et al.: Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumors. *Int J Cancer* 1992;50:572-577.
 11. Koji S, Noriko TS, Yoshikazu O et al.: The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1997;64:26-34.
 12. Kaintz C, Kohlberger P, Sliutz G et al.: Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995;57(3):383-387.
 13. Tarin D, Bolodeoku J, Hatfill SJ et al.: The clinical significance of malfunction of the CD44 locus in malignancy. *J of Neuro-Oncol* 1995;26: 209-219.
 14. Cannistra SA, DeFranzo B, Niloff J et al.: Functional heterogeneity of CD44 molecules in ovarian cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1995;1:333-342.
 15. Cannistra SA, Abu-Jawdeh G, Niloff J et al.: CD44 variant expression is a common feature of epithelial ovarian cancer: Lack of association with standard prognostic factors. *J Clin Oncol* 1995; 13:1912-1921.
 16. Fujita N, Yaegashi N, Ide Y et al.: Expression of CD44 in normal human versus tumor endometrial tissues: Possible implication of reduced expression of CD44 in lymph-vascular space involvement of cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:3922-3928.
 17. Dall P, Heider KH, Hekele A et al.: Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 1994;54:3337-3341.
 18. Kaintz C, Tempfer C, Kohlberger P et al.: Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastasis of cervical cancer. *Int J Cancer* 1996;69:170-173.
 19. Sami M, Gron-Vita K, Sointu P et al.: Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: Downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993;122:431-442.
 20. Dall P, Hekele A, Ikenberg H et al.: Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinosis. *Int J cancer* 1996; 69:79-85.
 21. Matsumura Y, Tarin D.: Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992;340:1053-1058.
 22. Birch M, Mitchell S, Hart IR: Isolation and characterization of human melanoma cell variant expressing high and low level of CD44. *Cancer Res* 1991;51:6660-6667.
 23. Sy MS, Guo Y-J, Stamenkovic I: Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* 1991;174:859-866.