간세포성장인자가 하인두 편평세포암 세포주의 증식, 분산과 이동에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 이비인후과교실,[1] 생화학교실,[2] 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실[3]
김철호[1] · 문성균[1] · 배준호[1] · 이재호[2] · 최은창[3]

Effect of HGF in Proliferation, Dispersion and Migration of Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Chul-Ho Kim, MD[1], Sung-Kyun Moon, MD[1], Joon-Ho Bae, MD[1], JaeHo Lee, MD[2] and Eun Chang Choi, MD[3]
[1]Department of Otolaryngology and [2]Biochemistry, Ajou University School of Medicine, Seoul; and [3]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Hepatocyte growth factor (HGF) is known to stimulate motility, invasiveness, proliferation, and morphogenesis of endothelial cells. Recent reports revealed that this growth factor is also related to tumor invasion and metastasis. We examined the role of HGF/c-Met on the proliferation, dispersion and migration of FaDu cell, a hypopharyngeal squamous cell carcinoma cell line. **Materials and Method** : We performed RT-PCR and Western blot in FaDu. Proliferation of the FaDu cells was assayed by counting the number of cells after treatment by HGF of different concentrations of 0, 10, 30 ng/mL. Dispersion of the cells was observed by measuring the separation and morphologic changes of cells after the colony of FaDu cells was formed in the media and then treated with HGF of 10 ng/mL or 30 ng/mL for 24 hours. Tumor cell migration was assessed by wound healing assay. Lastly, we examined the enhancement of HGF production in human fibroblast (MRC-5) by putative inducer secreted from FaDu cells. **Results** : The expresssion of c-Met mRNA and protein was detected in the hypopharyngeal cell line while that of HGF was not. Exogenous HGF significantly enhanced the growth of FaDu in a dose-dependent manner 30 ng/ml ($p<0.05$). HGF stimulated the dispersion and enhanced the migration of cancer cells in a dose-dependent manner ($p<0.05$). HGF produced by human stromal fibroblast (MRC-5) was increased by a certain inducer originated from FaDu cells ($p<0.05$). **Conclusion** : These results suggest that HGF may play an important role in the progression of hypopharyngeal cancer through the enhancement of proliferation, dispersion and migration. **(Korean J Otolaryngol 2005; 48:208-15)**

KEY WORDS : Hepatocyte growth factor · c-Met · Hypopharyngeal cancer · Proliferation · Migration.

서 론

암이 진행되어 전이되기까지 여러 과정을 거치게 되고, 이러한 과정에서 가장 초기에 발생하는 현상은 원발 병소에 존재하는 암세포간의 결합이 소실되는 과정이다. 상호 결합이 소실된 암세포는 이동을 하게 되고 주변조직으로의 침윤을 거쳐 원격전이를 하게 된다. 세포간의 결합이 소실된 암세포는 아무 방향으로나 이동하거나, 일정한 방향으로 이동하게 되는데 이때 관련된 인자로 autocrine motility factor, hepatocyte growth factor, tumor necrosis factor 등이 알려져 있다.[1)] 기질의 섬유아세포에서 분비되어 종양세포의 성장과 이동을 촉진하고 혈관형성에 관여하는 인자로 알려진[2)] 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, 이하 HGF)는 최초 발견시에는 간세포의 증식을 촉진하는 인자로 알려졌으나,[3)] 이후에는 간세포뿐만아니라 위장관 상피세포, 각질세포 등을 위시한 여러 상피세포의 증식을 촉진하는 능력이 있음이 알려졌으며, 일부 암세포에 있어서는 protease의 분비를 통해 종양의 활동(motility)과 침습(inva-

논문접수일 : 2004년 6월 7일 / 심사완료일 : 2004년 7월 12일
교신저자 : 최은창, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8481 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : eunchangmd@yumc.yonsei.ac.kr

siveness)를 일으키고 형질생성(morphogenesis)과 신생혈관의 생성(angiogenesis)에 관여한다고 알려지게 되었다.[4)5)] HGF에 대한 수용체인 c-Met는 c-met protooncogene의 산물이며 190 kDa의 receptor tyrosine kinase로서 170 kDa의 전구물질이 glycosylation과정을 거쳐 완성된 단백질로 세포외(extracellular)의 50 kDa α-subunit과 경세포막(transmembrane) 형태로 존재하여 tyrosine phosphorylation이 일어나는 145 kDa의 β-subunit로 구성되어 있다.[6)] 이 protooncogene은 위장관암, 폐암, 췌장암, 백혈병, 유방암 등 다양한 암종에서 과표현됨이 알려져 있다.[6)] 본 저자는 기존의 연구에서 하인두암에서의 HGF와 c-Met의 높은 발현을 확인하였고 이러한 발현은 하인두암의 전이와 병기가 증가됨에 따라 통계적으로 유의하게 증가됨을 보고한 바 있다. 본 연구는 이러한 연구결과를 in vitro에서 확인하기 위해 HGF가 하인두암 세포주(FaDu)에서 증식, 분산과 이동에 영향을 주는지를 확인하고 HGF와 c-Met이 paracrine 기전으로 상호작용하여 하인두암의 진행을 촉진하는지 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입한 하인두암 세포주 FaDu(HTB-43, ATCC)를 EMEM (10% FBS) 배지에서 5% CO2, 37℃에서 배양하였다. FaDu에서 분비되는 물질이 섬유아세포에서 HGF의 분비를 촉진하는지를 확인하기 위해 사람의 섬유아세포주인 MRC-5을 이용하였고 RPMI(10% FBS)에서 배양하여 실험전에는 MRC-5가 세포괴사에 빠지지 않는 최소농도인 FBS 0.5%가 포함된 RPMI배지를 이용하였다.

실험에 사용한 항체

HGF에 대한 일차항체는 human 항 HGF affinity purified polyclonal goat antibody(R & D systems, Inc, MN, USA)를 사용하였고 c-Met에 대한 일차 항체는 human 항 HGF receptor(c-Met) polyclonal goat antibody(R & D system)를 사용하였다.

RT-PCR에 의한 HGF와 c-Met의 mRNA 측정

하인두암 세포주 1 ml의 TRIzol®(GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA) 시약에 균질화시킨 후, 총 RNA를 추출하였다. 하인두암 세포주에서 추출된 총 RNA 2 μg을 각각 Omniscript Reverse Transcriptase kit(20511, Qiagen Germany)의 반응혼합물{10X Buffer RT 2.0 μl, dNTP Mix(5 mM each dNTP) 2.0 μl, Oligo-dT primer(10 μM) 2.0 μl, RNase inhibitor(10 units/μl) 1.0 μl, Omniscript Reverse Transcriptase 2 units, RNase-free water} 20 μl에 넣고 37℃에서 60분, 94℃에서 5분간 역전사하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Minicycler™(MJ research, USA)를 사용하였고 합성된 cDNA를 Taq DNA polymerase 1 unit(Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA)과 각각의 primer를 넣어 증폭시켰다. 이 실험에서 사용된 human HGF primer와 human c-Met primer의 염기배열 순서는 다음과 같다.

human HGF;
sense : 5'-ACA TCG TCA CTT CTG GC-3'
antisense : 5'-ATC CAT CCT ATG TTT GTT CG-3'
human c-Met;
sense : 5'-AGT AGC CTG ATT GTG CAT TT-3',
antisense : 5'-TCT TTC ATG ATG CCC TC-3'.
β-Actin;
sense : 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC TT-3',
antisense : 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'.

PCR과정은 초기 변성을 96℃에서 3분간 실시한 후, 96℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간을 총 30 cycles을 실시하고 신전(extension)은 72℃에서 5분간 시행하였다.

Western blotting을 이용한 c-Met의 발현 검색

하인두암 세포주를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음 단백질분해 억제제(100 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin)가 첨가된 RIPA(RadioImmunoPrecipitation) buffer 1 ml {150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% Deoxycholate}에 넣고 균질화 하였다. 이 균질액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였는데 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 측정하였다. Well 당 20 μg의 단백질을 분리하기 위해 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하여 분리한 후 nitrocellulose filter (Amersham, Arlington Heights, IL. USA)에 옮긴 다음 4℃에서 하루 밤 동안 항 c-Met항체를 반응시켰다. 다음

날 filter를 0.1% Tween - 20이 함유된 Tris buffered saline(TBS) 용액으로 세척한 후 peroxidase - conjugated donkey anti - rabbit antibody(Amersham)와 donkey anti - mouse antibody(Amersham)로 각각 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system(ECL, Ame-rsham)을 이용하여 X - ray film으로 확인하였다.

종양세포의 증식 분석(Proliferative assay)

HGF의 자극에 의한 세포의 증식도를 평가하기 위해 HGF 0, 10 ng/ml와 30 ng/ml로 처리한 FaDu 세포를 1×10^5/well의 수로 5일까지 배양하고 1, 3, 5일의 증식상태를 haemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였고 이때에 배지를 갈아주었다. 이를 5회 반복하여 HGF의 양에 따른 차이를 통계적으로 분석하였다.

HGF 투여 후 종양세포의 분산성(Colony dispersion)

HGF의 자극에 의한 세포의 분산성(scattering)을 평가하기 위해 12 well plate에 well당 3×10^5의 세포를 넣었다. 성장 인자와 혈청이 없는 배지에서 48시간 배양한 뒤 16세포 이상의 군락(colony)이 형성되었을 때 실험을 시행하였다. Mitomycin C(8 μg/ml)를 30분간 전처리 한 뒤 HGF를 0, 10, 30 ng/ml로 처리한 다음 시간대별(6시간, 12시간, 18시간, 24시간)로 세포의 분산성을 현미경을 통해 관찰하였다.

Wound healing assay을 통해 HGF 투여 후 종양세포의 이동성 분석

FaDu 세포를 24 well plate에 1×10^6개씩 접종한 후 성장 인자와 혈청이 없는 배지에서 48시간 동안 배양하여 세포가 plate에 포화된(90% 이상) 상태가 되도록 하였다. Blue tip을 이용하여 dish 바닥을 십자로 그어 균일한 너비로 injury line을 만들었다. PBS로 세포가 바닥에서 떨어지지 않도록 하면서 세척한 뒤 PBS를 제거한 후에 배지를 천천히 넣고 HGF 0, 10, 30 ng/ml의 농도로 처리하였다. 또한 HGF에 의한 효과를 확인하기 위해 다른 plate에 HGF 10 ng/ml과 30 ng/ml으로 처리한 뒤 HGF neutralizing Ab를 사용하여 HGF를 처리하지 않은 군과 HGF로 처리한 군과 비교하였다. Wound healing assay는 현미경 배율 × 100으로 시간대별(4, 8, 12, 24, 36, 48시간)로 사진을 찍어 비교하였고 현미경내에 내장된 컴퓨터 프로그램에 의해 측정된 두 양단간의 거리를 통계적으로 처리하였다.

종양세포에서 HGF의 분비를 촉진하는 유도물질 확인

FaDu에서 분비되는 물질이 섬유아세포에서 HGF의 분비를 촉진하는지를 확인하기 위해 사람의 섬유아세포주인 MRC - 5를 60φ dish에 10^6cells를 부착하였다. MRC - 5의 배지를 0.5% FBS media로 바꿔주어 24시간 배양한 후 MRC - 5에 성장인자와 혈청이 없는 배지에서 24시간 동안 배양한 FaDu의 media soup을 넣어주었다. 0, 2, 6, 12, 24, 48시간 후에 MRC - 5에서 배지의 상층액을 얻은 후 ELISA kit로 HGF의 농도의 변화를 측정하였고 MRC - 5에서 기본적으로 분비되는 HGF의 농도를 알기위해 0, 2, 6, 12, 24, 48시간 후에 MRC - 5 배지의 상층액을 얻어 ELISA kit로 HGF의 농도를 측정하였다.

통계적 분석

증식분석과 wound healing assay는 one - way ANOVA test를 이용하였고 사후검정은 Scheffe test를 이용하였다. 종양세포에서 HGF의 분비를 촉진하는 유도물질을 확인하는 실험에서는 Mann - Whitney test를 시행하였다. 통계는 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의의있는 것으로 판정하였다.

결 과

하인두암 세포주에서의 RT - PCR과 Western blotting

하인두암 세포주를 이용한 RT - PCR의 결과 HGF의 발현은 없었으나 c - Met의 발현은 강하게 나타났고 Western blotting상 c - Met의 강한 발현이 확인되었다(Fig. 1).

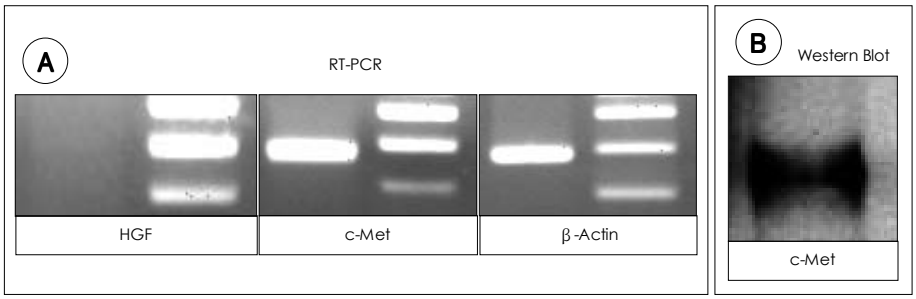

Fig. 1. Expression analysis of c-Met and HGF in FaDu cell line. A : The expression of c-Met mRNA on RT-PCR were detected in hypopharyngeal cancer line (FaDu cells) B : The protein of c-Met on Western blotting were detected in FaDu cells. However, HGF was not detected in the RT-PCR and Western blotting.

하인두암 세포주의 증식

Haemacytometer를 이용하여 증식도를 평가하여 본 결과 10 ng/ml 농도의 HGF로 자극을 준 경우 대조군에 비해 3일째 68.4%, 5일째 35.4%의 상승을 보여 모두 통계적으로 유의한 세포증식을 보였으며 30 ng/ml 농도의 HGF의 자극을 준 경우도 대조군에 비해 3일째 79.3%, 5일째 61.5%의 상승을 보여 모두 통계적으로 유의한 세포증식을 보였다($p<0.05$). 농도간의 비교에서는 5일째 30 ng/ml의 HGF 자극이 10 ng/ml의 HGF의 자극보다 세포증식에 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(Fig. 2).

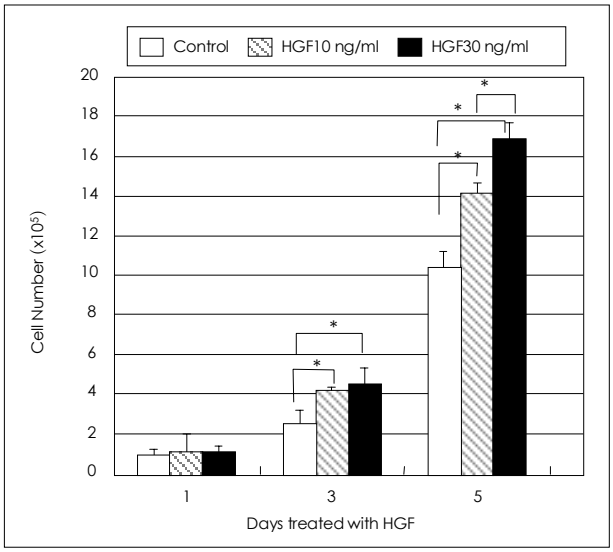

Fig. 2. Proliferative assay of FaDu cells after treatment with HGF for 5 days. Exogenous HGF significantly enhanced the growth of FaDu in a dose-dependent manner. *$p<0.05$. calculated by one-way ANOVA.

하인두암 세포주의 분산

HGF에 의한 하인두암의 군락의 분산성 실험에서 HGF를 처리하지 않은 군락에서는 시간대별로 뚜렷하게 분산되는 양상을 보이지 않았는데 HGF를 처리한 후 6시간마다 검사한 결과 시간에 따라 뚜렷한 분산 효과가 있었고(Fig. 3) 초기 관찰시점인 6시간에 HGF를 처리하지 않은 세포에 비해 actin microspikes(lamellipodia)나 membrane ruffling(filopodia)가 잘 관찰되었고 세포의 모양도 섬유아세포의 모양처럼 길쭉하게 변형된 세포가 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 HGF의 분산 효과에 대해 정량적으로 분석하지는 못했지만 24시간대에서 10 ng/ml의 HGF 자극보다

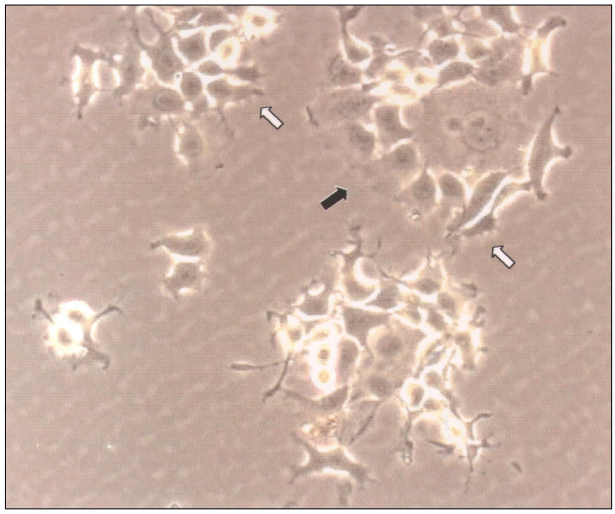

Fig. 4. Dispersion effects of HGF on FaDu cells. FaDu cells were maintained in serum-free medium containing 0.1% BSA for 48 hours prior to the treatment with HGF. HGF enhanced cell dispersion and induced lamellipodia (black arrow) and filopodia (white arrow) on microscopic examination (original magnification ×400).

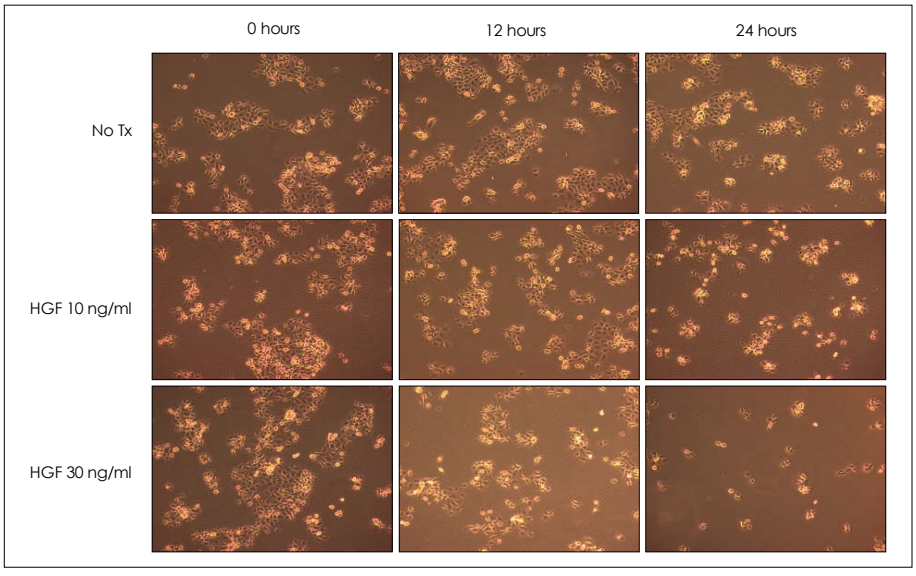

Fig. 3. Colony dispersion assay of FaDu cells after treatment of HGF. FaDu cells were maintained in serum-free medium containing 0.1% BSA for 48 hours prior to the treatment with HGF (10 ng/ml, 30 ng/ml) for 24hours. HGF stimulated dispersion of cancer cells.

는 30 ng/ml의 HGF 자극에서 분산현상이 좀더 뚜렷하게 나타내는 경향을 보였다(Fig. 3).

하인두암 세포주의 Wound healing assay

Wound healing test를 통해 확인한 세포의 이동과 증식에 관한 검사에서는 HGF로 처리한 군에서 가장 왕성한 이동과 증식이 확인되어 wound 양단간의 간격이 가장 좁았으며 아무런 처리를 하지 않은 대조군이 HGF neutralizing Antibody를 사용한 군보다 wound 양단간의 간격이 좁았다. 이러한 현상을 통계적으로 처리했을 때 24시간대에서는 대조군에 비해 HGF 30 ng/ml을 처리했을 때 통계적 유의성이 있었고 HGF 10 ng/ml과 HGF 30 ng/ml 사이에도 통계적 유의성이 있었다. 48시간대에는 대조군에 비해 HGF 10 ng/ml와 HGF 30 ng/ml을 처리한 군에서 통계적 유의성이 있게 양단간의 간격이 좁아진 양상을 보였으나 24시간대와는 달리 HGF 10 ng/ml과 HGF 30 ng/ml사이에는 통계적 유의성은 없었다($p<0.05$)(Fig. 5).

하인두암 세포주에서 분비된 유도체에 의한 섬유아세포의 HGF 분비

하인두암 세포주의 배양액에 함유되어 있을 HGF 분비유도물질에 의해 human MRC-5(섬유아세포)에서 HGF가 분비되는지를 ELISA 검사로 확인한 결과 하인두암 세포주의 배양액을 섬유아세포에 넣어 주었을 때와 넣지 않았을 경우 하인두암 세포주의 배양액을 넣어준 경우의 섬유아세포에서 분비하는 HGF의 분비양이 통계적으로 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었고($p<0.05$) HGF의 분비가 시작되는 시간에 있어서도 하인두암 세포주의 배양액을 넣어준 경우에는 최초관찰시점인 2시간대에도 확인이 되었지만 하인두암 세포주의 배양액을 넣지 않았던 경우에는 24시간이 지나서 HGF의 양이 측정되기 시작했다. 하인두암 세포주에서 분비된 유도물질에 의한 HGF의 분비는 처음 2시간까지

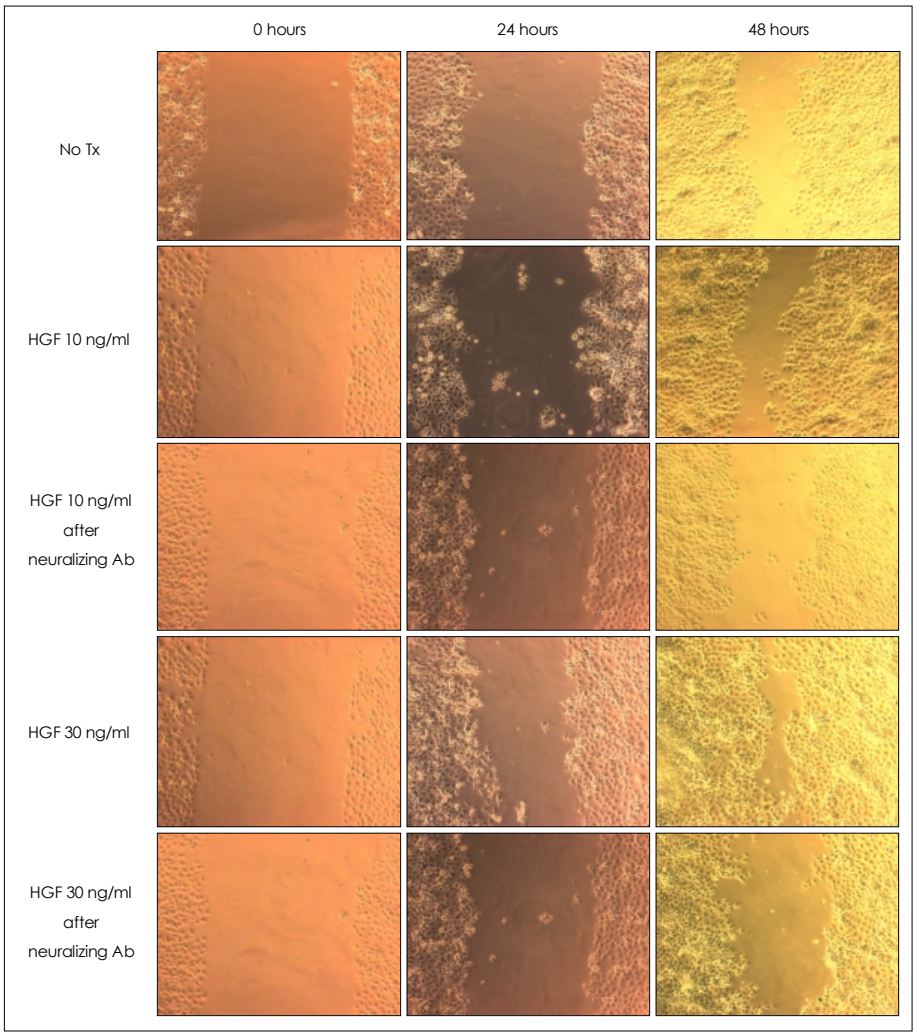

Fig. 5. Wound healing assay of FaDu cells after treatment of HGF. For assessing the contributions of HGF to both migratory and proliferative activities, we performed the *in vitro* wound healing assay using by HGF neutralizing antibody. Exogenous HGF enhanced the migration and proliferation of FaDu ($p<0.05$. calculated by one-way ANOVA).

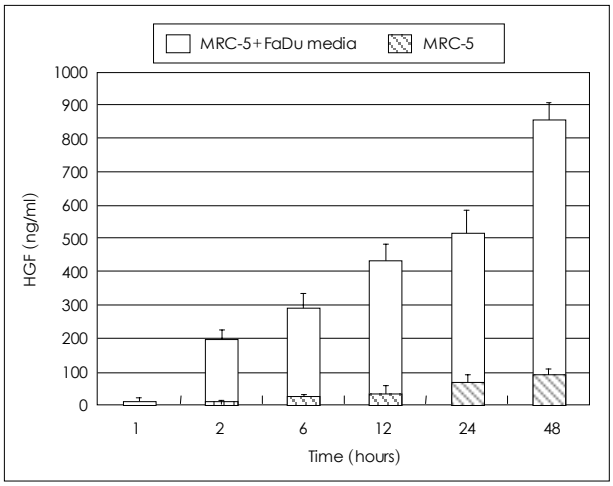

Fig. 6. ELISA assay of HGF production in MRC-5 fibroblasts by putative inducer secreted from FaDu cells. HGF produced by stromal fibroblast (MRC-5) was increased through certain inducer originated from FaDu cells ($p<0.05$. calculated by Mann-Whitney test).

증가폭이 가장 높았고 이후 시간대별로 분비양이 점차 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

인체의 각 조직의 발달 및 분화를 이루는 과정으로 상피와 중간엽간의 상호작용(epithelial - mesenchymal interaction)이 있다. 즉 신장, 폐, 사지, 치아, 유방 등은 모두 이러한 상피와 중간엽간의 상호작용에 의해 발달과 분화를 이루는데 이러한 상호작용에 있어서 중요한 역할을 하는 것이 HGF라는 것이 최근의 연구에서 증명되었다.[7] 실제로 인체에서 HGF가 하는 역할에 대해서는 아직 확실한 해답은 찾지 못했으나 내피세포의 증식, 세포유리의 촉진, 혈관 형성의 유발 등의 기능이 알려져 있다.[8] 이러한 HGF의 정상세포에서의 역할을 근거로 하여 종양세포의 성장, 침윤, 전이 과정에서도 HGF가 관여할 것이라는 추측을 할 수 있는데 실제 다음과 같은 많은 실험에서 이러한 추측이 증명되었다. Bellusci 등은 HGF 유전자를 암세포에 transfection 시켰을 때 암세포의 운동성과 침윤성을 증가시키는 현상을 관찰하였고 최근에는 간질 섬유아세포(stromal fibroblast)에서 분비하는 HGF를 유도하는 인자가 암세포에서 분비한다는 사실도 보고되었다.[9] 이는 HGF가 간질에서 분비되어 암세포의 침윤을 촉진시키는 작용을 하고 이 HGF의 분비를 유도하는 물질이 암세포에서 분비된다는 것을 의미한다. 즉 정상조직에서 뿐만 아니라 암조직에서도 위에서 말한 상피와 중간엽간의 상호작용이 성립한다는 것을 의미한다. 두경부암에서 침습과 전이를 잘하기로 알려진 종양이 하인두암이라고 할 수 있는데 HGF가 상피와 중간엽간의 상호작용에 의해 종양의 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 하인두암의 종양학적 특성을 이해하는데 HGF가 기여하리라고 생각하나 아직까지는 하인두암에서 HGF에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 하인두암에서 종양에 의한 어떠한 분비물에 의해 종양주변의 섬유아세포에서 HGF의 분비를 촉진하고 이렇게 분비된 HGF가 하인두암세포주에서 종양의 성장, 분산과 이동에 어떠한 역할을 하는지를 알아보는데 있다.

본 연구에서 사용한 하인두암 세포주인 FaDu의 경우 RT - PCR결과 HGF의 발현은 없고 c - Met의 발현만 확인되었으며 Western blotting상에서도 c - Met의 발현을 확인할 수 있어 FaDu가 paracrine 기전에 의해 영향을 받는 것으로 추측되어 이에 대한 실험을 진행하였다.

본 연구의 FaDu의 단층배양에서는 외인성 HGF가 FaDu의 증식에 통계적으로 유의하게 영향을 주었고 10 ng/ml에 비해 30 ng/ml을 사용하였을 때 증식이 증가되는 것을 보고하였고 Han 등[10]이 위암세포에서 시행한 연구에서도 외인성 HGF 10 ng/ml을 사용하였을 때 대조군에 비해 증식이 통계적으로 유의하게 증가된 결과를 보고하였으나 Uchida 등의 연구에서는 외인성 HGF는 구강암세포주의 성장을 자극하지는 않았고 오히려 50 ng/ml의 고농도 HGF는 세포성장을 억제하는 효과가 있었다고 보고하였다.[11] 이러한 상반된 결론에 대해서는 사용한 세포주에 따른 특성이 가장 큰 원인인 것으로 보인다.

원발세포에서 시작된 암세포가 원격전이에 이르기까지는 복잡한 단계를 거쳐야 하는데 암세포가 주변조직으로 침윤하기 위해서는 우선 세포간의 결합이 소실되어야 하고 암세포가 이동하기 위해서는 주변조직을 분해해야 하며 림프절이나 혈관으로 전이하기 위해서는 신생혈관이 필요하다. 이러한 과정에는 세포간 접촉(cell - cell contacts), 세포와 기질과의 상호작용(cell - substrate interactions), 세포외 기질의 분해(degradation of extracellular matrix)등이 관여된다.[12] HGF는 HGF 수용체를 갖고 있는 상피세포 혹은 내피세포의 강력한 세포증식과 운동능력을 유발하며 세포의 형태학적인 변형을 초래한다. 이러한 세포의 운동능력과 형태학적인 변형에 있어서 세포내 액틴과 같은 세포골격의 변형과 상피세포간의 해리현상이 중요하다.[13] Met에 의한 세포의 이동은 두 단계로 나누어진다. 초기 단계는 HGF 처리 후 6시간내에 이루어지는 것으로 세포내 골격의 신전(cytoskeletal extension), 퍼짐(spreading), 세포간의 유리(detachment of cell - cell contacts) 등의 현상이 나타나며 후기 단계는 HGF 처리후 16시간 혹은 24시간 이후에

나타나는 현상으로 세포가 분산(scattering)되는 현상이다.[14] HGF는 세포간극에 존재하는 주요 간극 단백질(major tight junction protein)인 zonula occludens-1를 크게 감소시키고[15] β-catenin을 인산화시켜 E-cadherin과 β-catenin에 의해 형성되는 세포간극을 소실시키는 것으로 알려져 있다.[16][17] Balkovetz 등[18]은 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포주를 HGF로 처리한 결과 세포의 극성(polarity)이 소실되면서 E-cadherin이 세포막에서 세포질로 이동하고 또한 E-cadherin의 생산 감소가 동반함을 관찰하였으며 이러한 변화는 cadherin과 관련된 단백질들의 tyrosine phosphorylation을 통해 발생한다고 하였다. 이러한 과정을 통해 떨어진 세포는 섬유아세포 형태로 변하면서 세포의 표면에 lamellae나 lamellipodia 등을 형성하는데 이러한 현상이 세포의 운동성을 증가시킨다.[19] 이러한 섬유아세포 형태의 변화는 다른 growth factor인 EGF나 TGF-α에서도 관찰할 수 있는데 EGF receptor가 자극되면 colony disruption을 자극하고 8시간내에 세포의 모양이 섬유아세포처럼 변형(fibroblastoid morphology)되며 24시간에 최대의 효과가 나타난다.[20]

본 연구에서 대상으로 한 하인두암 세포주인 FaDu에서도 HGF의 처리후에 세포의 분산이 증가되는 것으로 확인되었는데 HGF를 처리한 초기 6시간의 관찰에서 보면 HGF를 처리하지 않은 세포에 비해 lamellipodia나 filopodia가 잘 관찰되었고 세포의 모양도 섬유아세포의 모양처럼 길쭉하게 변형된 세포가 관찰되었다. 이러한 세포의 이동이나 침습에서 가장 중요한 현상은 액틴의 형성이 특정부위에서 일어나 방향성을 지닌 pseudopodia가 돌출하는 것으로 pseudopodia의 형성은 실험적으로 세포의 이동과 관련이 있음이 확인되었고 체내에서 종양세포의 이동과 관련이 있다고 알려져 있다.[21] 이러한 세포의 형태학적인 변화는 wound healing assay를 이용한 migration assay에서도 잘 관찰되었다. 종양세포의 이동과 침습에 대하여 Matsumoto 등[22]은 섬유아세포에서 유래한 HGF는 integrins, cytoskeletal proteins, p125FAK의 동원을 통해 편평세포암 세포의 이동을 촉진한다고 보고하였고 Slingerland 등[2]은 간암세포(hepatocellular carcinoma cell)을 HGF로 처리하면 세포의 이동능이 증가하고 액틴의 재배치가 일어나며 p27 cdk inhibitor protein이 안정화된다고 보고하였다. HGF에 의해 Ser-10이 인산화 되면서 p27이 세포질로 움직이면서 원래 G1 cell cycle arrest에 관여하는 N-terminal이 아닌 C-terminal의 scattering domain에서 액틴의 재배치와 이동에 관여한다. 따라서 C-terminal p27 scatter domain이 소실되거나 파괴되면 액틴의 재배치나 세포의 분산이 소실된다.[2]

앞서 말한 대로 상피와 중간엽간의 상호작용에 의해 종양세포의 성장, 침윤, 전이과정에서도 HGF가 관여할 것이라는 추측을 할 수 있는데 Matsumoto 등[22]은 암세포를 간질 섬유아세포와 같이 배양하였을 때 collagen matrix에로의 침윤이 증가함을 발견하였다. 또한 최근에는 간질 섬유아세포에서 분비하는 HGF를 유도하는 인자가 암세포에서 분비한다는 사실도 보고 되었다.[23][24] 이는 HGF가 간질에서 분비되어 암세포의 침윤을 촉진시키는 작용을 하고 이 HGF의 분비를 유도하는 물질이 암세포에서 분비된다는 것을 의미한다. 즉 정상조직에서 뿐만 아니라 암조직에서도 위에서 말한 상피와 중간엽간의 상호작용이 성립한다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 이러한 배경하에 하인두암 세포의 배양액에 섬유아세포로 하여금 HGF를 분비하게 하는 어떠한 유도물질이 있으리라 가정하고 하인두암 세포의 배양액을 섬유아세포의 배양액에 넣은 후 48시간에 측정한 HGF의 양이 하인두암 세포의 배양액을 넣지 않고 배양한 섬유아세포의 HGF의 생성양에 비해 9배이상 증가하여 HGF의 생성을 유도하는 인자가 하인두암세포주에서 분비하는 것으로 확인되었다. 이 유도물질에 대해서는 아직 연구가 진행중으로 Nakamura 등[25]은 종양세포에서 유래되는 인자 중 IL-1β, bFGF, platelet-derived growth factor등이 간질세포에서 HGF의 분비를 촉진한다고 보고한 바 있어 향후 이 유도물질에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

이 연구를 통하여 HGF가 하인두암 세포주(FaDu)의 증식, 분산과 이동을 증가시키는 것으로 확인되었고 FaDu에서 분비되는 HGF 분비유도물질에 의해 섬유아세포에서의 HGF 분비가 유의하게 증가됨을 알 수 있었다. 따라서 하인두암의 증식과 전이에 있어 종양주변의 섬유아세포에서 분비되는 HGF가 관여하는 것을 알 수 있었다.

중심 단어 : 간세포성장인자 · c-Met · 하인두암 · 증식 · 전이.

REFERENCES

1) Van Roy F, Mareel M. *Tumour invasion: Effects of cell adhesion and motility. Trends Cell Biol 1992;2:163-9.*
2) Slingerland J, Pagano M. *Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. J Cell Physiol 2000;183:10-7.*
3) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. *Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Commun 1984;122:1450-9.*
4) Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W. *Scatter*

factor: Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. J Cell Biol 1990;111:2097-108.

5) Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, *et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:1937-41.*
6) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, *et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science 1991;251:802-4.*
7) Matsumoto K, Nakamura T. *Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. J Biochem (Tokyo) 1996;119:591-600.*
8) Boros P, Miller CM. *Hepatocyte growth factor: A multifunctional cytokine. Lancet 1995;345:293-5.*
9) Bellusci S, Moens G, Gaudino G, Comoglio P, Nakamura T, Thiery JP, *et al. Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. Oncogene 1994;9:1091-9.*
10) Han SU, Lee JH, Kim WH, Cho YK, Kim MW. *Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma. World J Surg 1999;23:1176-80.*
11) Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Kimura-Yanagawa T, Hino S, *et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. Int J Cancer 2001;93:489-96.*
12) McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. *Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. J Cell Physiol 1998;176:255-65.*
13) Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Ando M, Bertotti A, Comoglio PM, *et al. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. FASEB J 2000;14:1629-40.*
14) Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A. *Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. Mol Cell Biol 1995;15:1110-22.*
15) Grisendi S, Arpin M, Crepaldi T. *Effect of hepatocyte growth factor on assembly of zonula occludens-1 protein at the plasma membrane. J Cell Physiol 1998;176:465-71.*
16) Potempa S, Ridley AJ. *Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. Mol Biol Cell 1998;9:2185-200.*
17) Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, *et al. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. Cell Adhes Commun 1994;1:295-305.*
18) Balkovetz DF, Pollack AL, Mostov KE. *Hepatocyte growth factor alters the polarity of Madin-Darby canine kidney cell monolayers. J Biol Chem 1997;272:3471-7.*
19) Warn R, Harvey P, Warn A, Foley-Comer A, Heldin P, Versnel M, *et al. HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways. Exp Cell Res 2001;267:258-66.*
20) Cha D, O'Brien P, O'Toole EA, Woodley DT, Hudson LG. *Enhanced modulation of keratinocyte motility by transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) relative to epidermal growth factor (EGF). J Invest Dermatol 1996;106:590-7.*
21) Vadnais J, Nault G, Daher Z, Amraei M, Dodier Y, Nabi IR, *et al. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. J Biol Chem 2002;277:48342-50.*
22) Matsumoto K, Horikoshi M, Rikimaru K, Enomoto S. *A study of an in vitro model for invasion of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1989;18:498-501.*
23) Rosen EM, Joseph A, Jin L, Rockwell S, Elias JA, Knesel J, *et al. Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. J Cell Biol 1994;127:225-34.*
24) Seslar SP, Nakamura T, Byers SW. *Regulation of fibroblast hepatocyte growth factor/scatter factor expression by human breast carcino-ma cell lines and peptide growth factors. Cancer Res 1993;53:1233-8.*
25) Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y. *Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: In vitro analysis of tumor-stromal interactions. Cancer Res 1997;57:3305-13.*