

화학요법에 의한 설암조직의 CD44의 변화

김종식 · 길영기

고신대학교 의과대학 해부학교실

Alteration of CD44 Expression in Tongue Cancer Tissue by Chemotherapy

Jong-Sik Kim · Young-Gi Gil

Department of Anatomy, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Despite enormous progress in current chemotherapeutic approaches for cancer, there is no advances of prognosis in malignant tumor of head and neck. Especially the prognosis in tongue cancer in which vessels are well developed is bad. Therefore, it is very important to distinguish the patient with infiltrating tumor and to find tumor marker which can play a key role in effective strategy for cancer treatment. Because there is little report about CD44 as prognostic marker in tongue cancer, this study was performed to investigate the alteration of CD44 expression in tumor specimens from eleven patients with tongue cancers before and after chemotherapy.

In this study, CD44 was expressed strongly in spinous layer of specimen before chemotherapy and the expression of CD44 decreased significantly after chemotherapy, suggesting that the expression of CD44 is related with metastasis of tongue cancer.

Taking above, the alteration of CD44 expression in tongue cancer tissue by chemotherapy suggests that CD44 are potentially expected to use in tongue cancer as prognostic factors.

Key words : CD44, Tongue cancer, chemotherapy,

서 론

CD44는 hyaluronic acid에 대한 수용체를 가지고 있는 세포표면에 부착된 분자물로서 주요 세포막 기질 구성 요소들 중 하나이다.¹⁾ 그리고 I형 교원질과 fibronectin에 결합하는 다기능의 부착분자이며,²⁾ integral membrane glycoprotein의 polymorphic family로서 다양하게 세포에 국재해 있다. 생화학적이거나 세포생물학적으로 CD44는 부착세포막 당단백이며, 교원질 혹은 hyaluronic acid와 같은 세포외기질과 세포내 골격을 연결하는 역할을 하며, 동형 혹은 이형의 세포 간 부착에도 기여한다. 세포내 골격과의 결합은 ankyrin과 같은 단백질을 통해서 액틴세사와 관계있는 것으로 알려져 있으며, 세포외기질과

세포내 골격과 transmembrane signaling을 매개한다.³⁻⁴⁾

특정한 CD44 아형의 발현이 암의 전이능 획득과 관련이 있는 것으로 보고되었으며, 특히 위암,⁵⁾ 대장암,⁶⁾ 유방암⁷⁾ 그리고 non-Hodgkin's lymphoma⁸⁾ 등의 면역조직화학염색법에 의한 연구에서 특정 CD44 아형의 발현과 생존기간이 관련 있다고 보고되었다.

지금까지 종양에 대한 진단과 치료의 많은 발전에도 불구하고 두경부 영역의 악성종양의 예후는 큰 변화가 없으며 특히 잘 발달된 혈관분포를 가지는 설암에서는 그 치료 및 예후가 불량한 것이 사실이다. 최소한의 침윤양상을 보이는 편평상피세포암일지라도 혀에 존재할 경우 대부분 근치적 절제술로 치료를 하지만 국소적인 재발 혹은 원격전이 등으로 생명에 위협을 초래할 수 있다. 따라서 생물학적으로 침윤 종양을 가진 환자를 구분하고 효과적인 치료전략에 중요한 요소로 작용할 수 있는 종양 표지인자에 대한 연구가 계속적으로 진행되고 있다. 그리고 병리학적 예후인자들은 개개 환자에서의 재발 및

교신저자 : 길 영 기
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 해부학교실
TEL : 051-990-6412 FAX : 051-990-3081
E-mail : tomy88@ns.kosinmed.or.kr

예후를 예측하는데 한계가 있어 분자생물학적 수준의 새로운 예후인자들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구는 CD44 발현이 설암의 예후와 연관이 있음을 설명하고 설암환자들이 화학요법치료를 받기 전과 받은 후의 표본을 이용하여 면역조직화학염색법으로 CD44의 발현을 조사하였다.

연구대상과 방법

연구대상

설암을 가진 환자들에서 파라핀 절편을 획득하였다. 모든 환자들은 1998년 11월부터 2008년 9월까지 부산대학교 구강악안면외과에서 조직검사를 통하여 설암으로 진단받고 최소한 1회 이상의 항암제 치료를 실시한 후 근치적 절제술을 시행 받은 11명의 환자를 대상으로 하였다. 환자들은 조직검사시기에 인지할 만한 원격전이 없었으며 어떠한 환자도 이전에 방사선 치료 등의 치료를 받은 과거력은 없었다. 항암제 치료는 cisplatin과 5-fluorouracil을 이용하여 근치적 절제술전에 신부가화학요법으로 실시하였다. Cisplatin은 70 mg/m² 용량으로 하루에 주입하였고 5-fluorouracil은 1000 mg/m² 용량으로 4일 연속으로 주입하였으며 2회 이상 실시할 경우 이러한 일정은 매 3주 다시 실시되었다. 추적기간 중 2명의 환자들에게서 국소적 재발 및 폐 원격전이가 나타나 사망하였다.

연구방법

술 전 조직검사 표본을 통한 악성도의 평가

구강편평상피세포암에 대한 Anneroth 등⁹⁾의 분석방법을 응용하여 환자에 대한 임상적 정보가 없는 2명의 병리학자를 통하여 술 전 조직검사 표본에서 다음의 세 가지 항목을 조사하였다. 각화도(Keratinization), 핵 다형성(Nuclear pleomorphism), 고배율상의 유사분열 수(Number of mitoses)를 조사하였으며 이들 3개 항목에 대하여 400배의 고배율로 관찰하여 3등급으로 나누어 1등급은 악성도가 가장 낮은 것으로, 3등급은 가장 악성도가 높은 것으로 표현하였다. 세포의 각화도, 그리고 핵다형성은 핵의 수, 크기, 형태의 변화, 핵-세포질 비율, 다염색성핵 및 다핵의 존재로 평가하였고 유사분열 수는 기저세포층 상방에서 유사분열 수를 평가하였다.

면역조직화학염색

상기 조직절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 알코올 농도를 단계별로 낮추어 최종 물로 수세한 후 내인성 과산화효소를 제거하기 위해 메틸알코올에 0.3% 과산화수소를 첨가시킨 용액에서 20분간 처리한 다음, PBS에서 10분간 3회 세척하고 5% normal horse serum에서 30분간 두었다. 그 후 조직절편을 세척하지 않고 부드럽게 blotting한 후, 1:400으로 희석된 1차 항체인 mouse anti-human CD44 (Pharmingen, Becton Dickinson)를 4℃에서 16시간 동안 적용시켰다. 그리고 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체인 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab.)을 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 적용하였다. 그리고 나서 조직절편을 10분씩 3회 수세한 다음, 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)를 조직절편에 실온에서 1시간 동안 적용시켰다. 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 세척한 후, 0.05 M Tris-HCl buffer [pH 7.6]에 0.05% DAB (diaminobenzidine, Sigma)와 0.01% hydrogen peroxide 혼합용액에서 약 10분 동안 실온에서 발색반응을 시켰다. 그 후 Tris buffer, PBS 및 증류수에서 각각 10분간 순서대로 세척한 후, Harris hematoxylin으로 대조염색을 하고 통상적인 방법으로 그 이후의 과정을 거쳐 Permount (Polysciences, USA)로 봉입한 후 저배율에서 면역양성을 보이는 조직의 세 영역을 선택하여 200배 배율에서 현미경카메라 (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Germany)로 관찰하고, 사진 촬영한 후 영상분석장치 (AxioVision 4.3, Carl Zeiss, Germany)로 면역양성을 띠는 조직의 면적과 밀도를 계산하고 평균치를 구하였다.

결 과

술 전 조직검사표본에서 악성도 검사

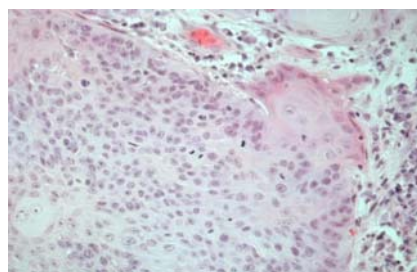
각화도, 핵 다형성, 그리고 유사분열 수를 통한 설암에서의 종양세포 특성을 고배율로 관찰하여 술 전 조직검사 표본에서 악성도를 평가하였다. 1등급의 암 조직에서는 규칙적인 층을 형성하고, 명확한 세포사이다리와 각화되는 양상을 보였으며, 3등급의 암 조직에서는 각화현상이나 세포사이다리를 보이는 층관 구조를 보이지 않았으나, 상당히 많은 세포들이 거대세포를 형성하면서 핵다형성과 세포분열 모습을 나타내었다. 2등급의 암 조직

에서는 1 등급과 3 등급 사이의 중간 형태를 나타내었다(Table 1). 400배 배율의 현미경 사진이 등급에 따른 암 조직의 형태를 보여 주고 있다(Fig. 1).

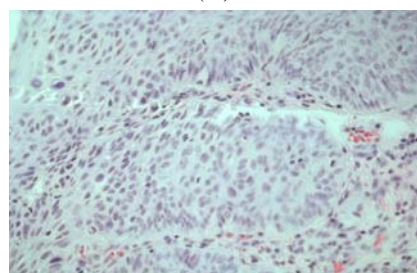
Table 1. Malignancy Grading System of Tongue Squamous Cell Carcinoma

	Grade		
	G1	G2	G3
Keratinization	7	4	0
Nuclear pleomorphism	1	3	7
Number of mitosis	1	4	6

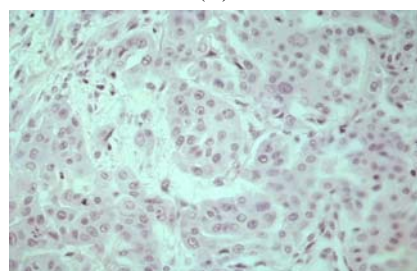
According to the grade [G] of the tumor cell differentiation, following the criteria of WHO, eleven cases were selected. G1: well differentiated tumor, G2: moderately differentiated tumor, G3: poorly differentiated tumor.



(A)



(B)



(C)

Fig. 1. Micrographs showing histological differences at each tumor grade(G) of tongue squamous cell carcinoma. (A) G1 shows orderly stratification, obvious intercellular bridges, and keratinization. (B) G2 have intermediate features between former types. (C) G3 are composed of sheets of undifferentiated cells without obvious keratinization and show a high mitotic rate. x 400.

술 전 조직검사와 근치적 절제술 후 표본의 CD44 발현 변화

술 전 조직검사표본과 신부가화학요법 후 근치적 절제술을 실시한 표본에서 CD44 발현 변화를 평가하였다. 본 실험에 이용된 설암에서 발생한 술 전 구강편평상피암종의 경우 등급에 관계없이 모든 표본에서 CD44가 관찰되었다. CD44 발현이 관찰되는 암종에서는 반응의 정도 차이는 있으나, 거의 모든 암세포가 CD44 항체에 대해 양성 반응을 보였고, 양성 반응이 비교적 약하게 관찰되는 표본에서도 최소한 절반 이상의 암세포가 양성으로 관찰되어, 구강편평상피암종 세포는 CD44가 다량 발현되었다. 등급에 따른 CD44의 발현 정도가 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았고 등급에 따라 분포 부위가 구분된다는 등의 특징 역시 나타나지 않았다. 낮은 등급의 암종인 경우 강한 양성을 보이는 표본이 비교적 많았던 반면, 높은 등급의 암종들은 낮은 등급에 비해 상대적으로 약한 양성을 보였다. CD44의 발현은 기저세포층 보다는 가시층에서 강하게 발현되었으며, 대부분의 암종에서 세포막에서 CD44가 뚜렷하게 발현되었으며 세포질에서도 발현을 관찰할 수 있었다. 근치적 절제술을 실시한 표본에서 CD44의 발현은 모든 경우에서 약하게 발현되었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. The density [pixel] of CD44 expression level in biopsy and radical excision specimens

Specimen number	Biopsy	Radical excision
1	122.45	119.83
2	124.22	120.78
3	129.33	119.33
4	118.10	115.33
5	121.55	105.51
6	120.44	109.24
7	130.48	105.27
8	129.89	108.50
9	124.29	105.84
10	117.67	101.11
11	131.81	107.91

Three parts of each specimen were analysed by image analysis (AxioVision 4.3, Zeiss)

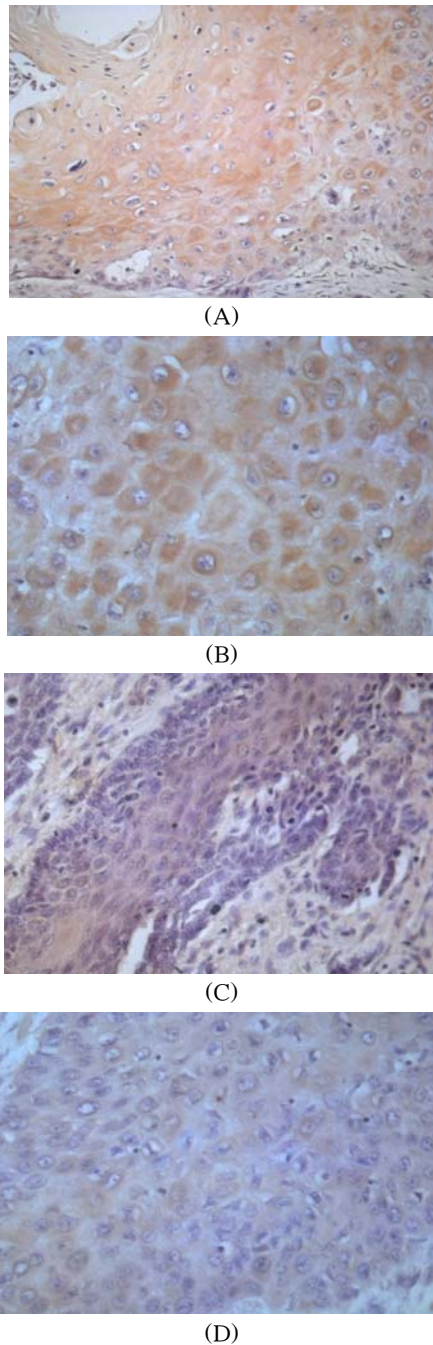


Fig. 2. Representative photomicrographs of staining for CD44 in biopsy (A and B) and radical excision specimen (C and D). A and C : $\times 200$, B and D : $\times 400$.

고 찰

암세포는 종양이 원래 발생한 부위에서 떨어져 나와 주변조직으로 침윤해 갈 수 있는 능력을 가지고 있다. 암세포가 증식되어 원발성 부위로부터 떨어져 나오고 침윤하는 과정에서 주변의 숙주세포나 세포외기질 성분과 지

속적으로 접촉하면서 상호작용하게 된다.¹⁰⁻¹²⁾ 상호작용 시 암세포들은 세포 접합분자를 이용하여 숙주세포나 세포외기질 등의 주변 환경과 접하게 된다. 이러한 상호작용에 관련된 접합분자는 여러 가지가 밝혀져 있고 다양한 생물학적 과정에서의 중요성이 연구되고 강조되어 왔다.¹³⁻¹⁴⁾ 아울러 암세포의 생물학적 특성과 연관된 다양한 예후인자들에 관한 연구가 진행되고 있는데 크게 나누어 보면 암세포관련 단백질분해효소 및 그 억제제, 세포 부착물질, 암유전자 및 암억제유전자 등이다.¹⁵⁾ 이 중 세포 부착물질은 암세포의 생성에서 전이에 이르는 일련의 과정에 관련된 생물학적 기능을 갖는 중요한 예후인자로 인식되고 있으며, CD44가 활발히 연구가 되고 있다.¹⁶⁾

CD44는 세포와 세포사이 그리고 세포와 기질 사이의 부착 기능을 가지는 transmembrane proteoglycan으로 hyaluronic acid, I형 교원질, 그리고 fibronectin에 결합하는 다기능성 결합분자이며, 다양한 세포에서 생물학적 활성을 나타낸다.¹⁷⁻¹⁸⁾ Huet 등,¹⁹⁾ Shimizu 등,²⁰⁾ 그리고 Koopman 등²¹⁾은 CD44가 세정맥 혈관내피세포에 임파구를 응집시키는 물질이며, T 세포에 신호를 주어 세포의 활성화에 관계하는 것을 입증하였다. Alho와 Underhill²²⁾ 그리고 Brown 등³⁾은 피부 상피세포의 증식과정에서 CD44가 glycosylation과 core protein 사멸의 변화 시 세포막의 proteoglycans와 당단백에 관계하며 많은 상피조직에 국재하고 있다고 보고했다. CD44는 파골 세포, 골세포, 조골골수세포 그리고 결합조직의 섬유모세포 등에서 발현되고,²³⁾ 더 나아가서 대식세포, 상피세포, 그리고 얼마간의 신경세포를 포함한 다양한 세포에서도 발현된다. 이러한 CD44의 기능은 세포내 골격과의 상호작용, lymphocyte homing, 교원질, laminin 그리고 fibronectin과

같은 단백질과의 결합, 암전이 등 다양하다.²⁴⁾ 이것은 T 세포를 염증부위로 혈관을 빠져나가게 하는데 필수적이며, 정상적인 백혈구의 순환에는 필요치 않다. CD44는 10개의 exon들이 세포외부의 막근위영역 정보를 지배하는데 이들 상이의 교대성 접합절단 [alternative splicing]으로 다양한 아형이 만들어진다. 아형들의 기능은 아직도 많이 밝혀지지 않았지만 여러 가지 암에서 관찰되어 암의 성장과 전이에 관여하는 것으로 생각되고 있다.²⁵⁻²⁶⁾ 쥐의 체장암 모델에서는 전이능이 강한 세포주에서 발현된 CD44의 특정 아형이 전이능이 약한 세포주에서도 전이능을 갖게 해 주는 것으로 확인되었다.²⁷⁾ 사람의 대장과 유방암에서도 CD44 아형의 전사체가 정상 점막에 비하여 높게 나타나고, 특히 전이가 있는 경우에 더 높게

나타난다고 보고되었다.²⁸⁾

본 연구에서 화학요법치료 전의 조직에서 CD44의 분포는 가시층에서 강한 양성반응을 볼 수 있었으며, 이러한 발현은 화학요법치료 후의 조직에서 상당히 억제되는 것으로 보아 CD44 발현은 설암의 전이와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

이상의 연구결과로 미루어 볼 때, CD44의 발현이 화학요법치료 전과 후에 현저하게 차이나는 것으로 보아 설암의 예후인자로 유용하게 사용될 수 있는 잠재성이 있음으로 더 많은 증례와 연구를 통해 CD44의 분포와 종양전이 유무, 예후 등을 관련지어 보는 것이 필요하다.

결 론

지금까지 종양에 대한 진단과 치료의 많은 발전에도 불구하고 두경부 영역의 악성종양의 예후는 큰 변화가 없으며 특히 잘 발달된 혈관분포를 가지는 설암에서는 그 치료 및 예후가 나쁜 것이 사실이다. 따라서 생물학적으로 침윤성 종양을 가진 환자를 구분하고 효과적인 치료전략에 중요한 요소로 작용할 수 있는 종양 표지인자를 찾아내는 일은 매우 중요하다. 본 연구는 설암조직에서 CD44의 발현으로 예후의 중요성을 설명하고자 설암 환자들이 화학요법치료를 받기 전과 받은 후의 표본을 이용하여 면역조직화학염색법으로 CD44의 발현을 조사하였다.

본 연구에서 화학요법치료 전의 조직에서 CD44의 분포는 가시층에서 강한 양성반응을 볼 수 있었으며, 이러한 발현은 화학요법치료 후의 조직에서 상당히 억제되는 것으로 보아 CD44 발현은 설암의 전이와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

이상의 연구결과로 미루어 볼 때, CD44 항체의 발현이 화학요법치료 전과 후에 현저하게 차이는 것으로 보아 설암의 잠재적인 예후인자로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1) Mochimaru H, Takahashi E, Tsukamoto N, Miyazaki J, Yaguchi T, Koto T, Kurihara T, Noda K, Ozawa Y, Ishimoto T, Kawakami Y, Tanihara H, Saya H, Ishida S, Tsubot K : Involvement of Hyaluronan and its Receptor CD44 with

- Choroidal Neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50:4410-4415, 2009
- 2) Nakamura H, Kenmotsu S, Sakai H, Ozawa H : Localization of CD44, the hyaluronate receptor, on the plasma membrane of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. Cell Tissue Res 280:225-233, 1995
- 3) Brown TA, Bouchard T, St John T, Wayner E, Carter WG : Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. J Cell Biol 113:207-210, 1991
- 4) Hay ED : Cell Biology of Extracellular Matrix, 2nd ed, New York and London, Plenum press, 1991, 305-311
- 5) Mayer B, Jauch KW, Gunthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP : De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. Lancet 23:1019-1022, 1993
- 6) Mulder JW, Kruij PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJ, Pals ST : Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. Lancet 26:1470-1472, 1994
- 7) Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P : CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. Lancet 11:615-619, 1995
- 8) Maenpaa H, Ristamaki R, Virtamo J, Franssila K, Albanes D, Joensuu H : Serum CD44 levels preceding the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 37:585-592, 2000
- 9) Anneroth G, Batsakis J, Luna M : Review of the literature and a recommended system of malignancy grading oral squamous cell carcinoma. Scand J Dent Res 95:229-249, 1987
- 10) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH : Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab Invest 49:636-649, 1983
- 11) Liotta LA, Rao CN : Tumor invasion and metastasis. Monogr Pathol 1: 183-192, 1986
- 12) Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA : Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. Cancer 15:1368-1383, 1993
- 13) Albelda SM, Buck CA : Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J 4: 2868-2880, 1990
- 14) Springer TA : Adhesion receptors of the immune system. Nature 2: 425-434, 1990
- 15) Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW : Prognostic factors in gastric cancer. Br J Surg 84:1651-1664, 1997
- 16) Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y, Sneige N, Sahin A, Gilcrease MZ : CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 1:3309-3314, 2005
- 17) Nakamura H, Kimura S, Kenmotsu S, Sakai H, Saku T, Ozawa H : Immunolocalization of CD44 and heparan sulfate chains on the stratum intermedium and papillary layer in the rat enamel organ. Arch Histol Cytol 58:323-334, 1995
- 18) Hughes DE, Salter DM, Simpson R : CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation. J Bone Miner Res 9:39-44, 1994
- 19) Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Priour AM, Bernard A : CD44 contributes to T cell activation. J Immunol 1:798-801, 1989
- 20) Shimizu Y, Van Seventer GA, Siraganian R, Wahl L, Shaw S : Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and

- activation. J Immunol 15:2457-2463, 1989
- 21) Koopman G, van Kooyk Y, de Graaff M, Meyer CJ, Figdor CG, Pals ST : Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. J Immunol 135:3589-3593, 1990
 - 22) Alho AM, Underhill CB : The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. J Cell Biol 108:1557-1565, 1989
 - 23) Noonan KJ, Reiter RS, Kurriger GL, Martin JA, Maynard JA, Stevens JW : Spatial and temporal expression of CD44 isoforms in the developing and growing joints of the rat limb. J Orthop Res 16:100-103, 1998
 - 24) 최갑림, 김종렬, 박봉수, 성일용 : 부신 제거 백서에 티타늄 임플란트 매식 후 주위 골형성에 관한 연구. 대한악안면성형재건외과학회지 22:274-287, 2000
 - 25) Heider KH, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST : A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J Cell Biol 120:227-233, 1993
 - 26) Koopman G, Heider KH, Horst E, Adolf GR, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST : Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. J Exp Med 178:897-904, 1993
 - 27) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P : A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 64:13-24, 1991
 - 28) Matsumura Y, Tarin D : Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. Lancet 341:1053-1058, 1992