

상피성 난소암에서 Hypoxia Inducible Factor-1 α 발현의 예후적 의의

김원규

고신대학교 의과대학 산부인과학교실

The Prognostic Value of Hypoxia Inducible Factor-1 α Expression in Epithelial Ovarian Cancer

Won Gyu Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: Epithelial ovarian cancer is the most lethal gynecologic malignancy. The poor prognosis is related to early metastatic progression and advanced stage at initial diagnosis but there is limited information regarding the mechanisms of tumor progression in epithelial ovarian cancer. Hypoxia inducible factor(HIF)-1 α may increase O₂ availability or metabolic adaptation to O₂ deprivation by influencing a number of genes which play a role in tumor progression. Furthermore, HIF-1 α protein may also influence cell cycle progression /proliferation and the rate of apoptosis, thus influencing tumor progression. Proteolytic enzymes involved in basement membrane and extracellular matrix degradation may affect tumor invasiveness and metastatic potential. Expression of hypoxia inducible factor(HIF)-1 α is involved in the progression of cancer.

The aim of this study was to analyze the prognostic value of immunohistochemically detected HIF-1 α in epithelial ovarian cancer and the correlation with survival of epithelial ovarian cancer.

Material & Method: We analyzed clinicopathologic prognostic parameters and overall survival of 66 epithelial ovarian cancer patients who were diagnosed and operated at Kosin university, Gospel Hospital, from January 1995 to December 2001, and investigated the expression of HIF-1 α by using immunohistochemistry(33 case), then compared this data with the established prognostic parameters and overall survival of epithelial ovarian cancer.

Results: The median age at the time of diagnosis was 52 years (range, 21-74 years). There were 13 patients with stage I disease, 5 with stage II, 31 with stage III, 16 with stage IV. The 5 year overall survival rate of 66 epithelial ovarian cancer patients was 40.8%(I, 84.6%; II, 60%; III, 35.9%; IV, 6.3%). Clinicopathologic parameters, predictive of overall survival included age($p=0.0252$), FIGO stage($p=0.0000$) and preop CA-125 level($p=0.0392$) in univariate analysis and in multi-variate analysis FIGO stage($p=0.002$) was proved as the only predictive factor. There was no difference in expression of HIF-1 α in ovarian tumor (benign-50%, borderline 63.6%, invasive 42.4%) but in case of invasive cancer, degree of expression is stronger over control specimens(benign, borderline) and it has borderline statistical significance($p=0.057$) and also there was no significant correlation between expression of HIF-1 α and overall survival, but strong expression of HIF-1 α was related to poor prognostic tendency($p=0.074$).

Conclusion: In this study, clinicopathologic parameters, predictive overall survival of epithelial ovarian cancer include age($p=0.0252$), FIGO stage($p=0.0000$) and preop CA-125 level($p=0.0392$) in univariate analysis and FIGO stage($p=0.002$) in multivariate analysis. There was no difference in expression of HIF-1 α in ovarian tumor (benign-50%, borderline 63.6%, invasive 42.4%) but in case of invasive cancer, degree of expression is stronger over control specimens(benign, borderline) and it has borderline statistical significance($p=0.057$) and there was no significant correlation between expression of HIF-1 α and overall survival, but there was poor prognostic tendency in strong HIF-1 α expression patient($p=0.074$), it was regarded that there need further study with more cases in the future.

Key words : Epithelial ovarian cancer, Overall survival rate, Hypoxia inducible factor(HIF)-1 α

교신저자 : 김 원 규

주소: 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 산부인과학교실
TEL. 051-990-6227 FAX. 051-244-6939
E-mail: kwg@kosinmed.or.kr

서론

상피성 난소암은 진단 당시 이미 진행된 상태에서 발

본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

견되는 경우가 많아 부인암 중 예후가 나쁜 대표적인 암으로 치료 후 생존율을 높이기 위한 많은 연구가 진행 중이다.¹⁻⁶⁾ 종양의 침윤과 전이에 대한 유전학적, 분자생물학적인 연구가 이루어지면서 이 과정에 관여하는 여러 인자가 밝혀지게 되었고 이들 중에서 나쁜 예후나 재발을 예측할 수 있는 새로운 인자들을 찾으려는 노력이 있어왔다.⁷⁻¹⁴⁾

HIF-1 α 는 저산소증 하에서 세포생존에 필요한 유전자 발현을 활성화 시키는 것으로 알려져 있으며 종양조직내의 저산소증은 HIF-1 α 와 이에 연관된 유전자들을 활성화 시키며 이들은 종양의 진행, 성장 과정에 중대한 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다.⁷⁻¹¹⁾

최근 인체의 여러 가지 악성종양의 침윤, 전이, 예후와 관련하여 HIF-1 α 단백질 발현에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다.⁷⁻¹⁴⁾

이 논문의 목적은 난소종양에 있어서의 HIF-1 α 의 발현을 조사하고 또 이들과 난소암 생존율과의 관계를 분석하여 새로운 예후인자로써의 가치를 조사하여 보는 것이다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 1월부터 2001년 12월까지 고신대학교 복음병원에서 수술을 시행한 상피성 난소암 66명의 환자를 대상으로 예후와 관련된 임상병리학적 특성에 따른 전체 생존율을 분석하였고 또 이 환자들 중 병리학적 재검토가 가능하였던 33례의 난소암 환자 그리고 대조군으로 양성 종양 10례, 경계성종양 11례를 대상으로 HIF-1 α 를 면역조직화학염색법으로 조사하여 이들의 발현과 난소암의 예후인자들 및 생존율과의 관련성을 조사하였다.

2. 연구방법

A. 면역조직화학 검색

각 실험군의 종양 조직에서 HIF-1 α (NOVUS, 1:100) 단클론 항체를 사용하여 면역조직화학 염색을 하였다. 면역조직화학 검색을 위한 자료 제작 과정은 다음과 같다.

파라핀 포매 조직을 사용하여 5 μ m 두께의 절편을 만들어 silane을 도포한 유리 슬라이드에 부착한 후 크실렌을 사용하여 탈파라핀을 하고, 100%, 95% 및 70% 알코올에서 함수과정을 거쳐서 증류수에서 5분간 수세하였다. 내인성 과산화효소의 억제를 위하여 0.3% 과산화수소수와 100% 메탄올의 혼합액에서 30분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(0.01 M, pH 6.0)에 담가 microwave로 5분간 두 차례 열을 가하여 실온에서 냉각시킨 후 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 수세하였다. 일차 항체인 HIF-1 α (NOVUS, 1:100)으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. LSAB kit peroxidase (DAKO, USA)를 사용하여 이차항체인 biotinylated link anti-mouse antibody로 37°C에서 10분간 반응시켜 PBS로 수세하고, streptavidin biotic 합성체로 37°C에서 20분간 반응시키고 PBS로 수세하였다. Immidazol 완충용액과 3, 3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) 색소원 (DAKO, USA)을 1:1로 혼합하여 발색시킨 후 증류수로 수세하고, 메이어 헤마톡실린으로 대조염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰하였다.

B. 면역조직화학 염색판정

종양세포의 5%이상이 적갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하였고, 양성으로 판정된 경우 약(weak 5-25%), 중간(moderate 26-49%), 강(strong $\geq$ 50%)으로 분류하였다.

C. 통계분석

통계분석은 SPSS 10.0을 이용하여 생존율 검증은 Kaplan-Meier 방법과 Log-rank 방법을 이용하였고 환자군 간의 유의한 생존율의 차이가 있는 지표들은 Cox-proportional hazard model을 이용한 다변량 분석을 하였다. p-value 0.05 이하를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 상피성 난소암 환자의 임상병리학적 특성

본 연구대상 환자 66명의 환자들의 연령은 21세부터 74 세까지로, 평균연령은 52.2세였고, 50세 미만 27례(40.9%), 50세 이상 39례(59.1%)였다. 조직학적 유형은 장액성 난소암이 28례(43.8%), 점액성 난소암이 16례(25.0%), 자궁내막성 난소암이 5례(7.8%), 그 외 유형이 15례(20.0%)였다. 종양의 분화도는 Grade 1이 8례(22.9%), Grade 2가 20례(57.0%), Grade 3가 7례(19.4%)였다. FIGO 임상병기는 1기 13례(19.3%), 2기 5례(8.8%), 3기 31례(49.1%), 4기 16례(22.8%)였다. 진단시 CA-125 측정치는 35U/ml 미만 7례(11.9%), 35~200U/ml 15례(25.4%), 200U/ml 이상 37례(62.7%)였다. 첫 항암화학 약제로는 C-C(Cisplatin-Cyclophosphamide) or PAC(Cisplatin-Adriamycin-Cyclophosphamide)을 사용한 군이 46례(80.7%), Taxol을 사용한 군이 11례(19.3%)였다. 이차추시술 결과는 음성 13례(56.5%), 양성 10례(43.5%)였다. P53 발현에서는 음성 22례(66.7%), 양성 11례(33.3%)였다. (Table 1)

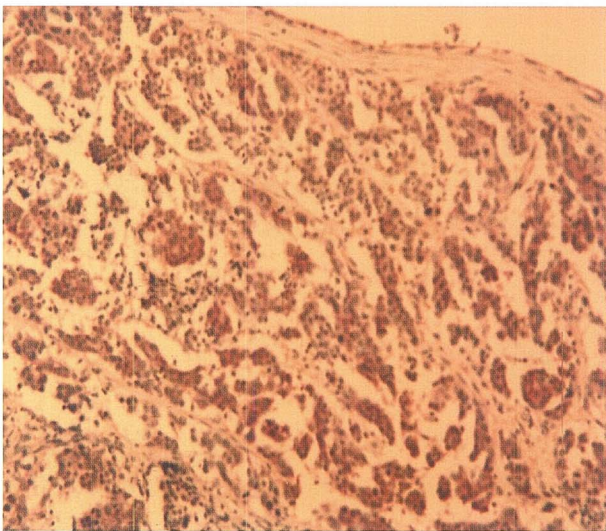


Figure 1. The positive reaction for HIF-1 α in ovarian carcinoma($\times 100$, HIF-1 α)

Table 1. Clinicopathologic parameters of 66 patients with epithelial ovarian cancer.

Clinicopathologic parameters	No of patients (%)
Age (n=66)	
<50	27 (40.9)
≥ 50	39 (59.1)
Histology (n=64)	
Serous	28 (43.8)
Mucinos	16 (25.0)
Endometrioid	5 (7.8)
Others	15 (23.4)
Grade (n=35)	
grade 1	8 (22.9)
grade 2	20 (57.0)
grade 3	7 (20.0)
FIGO* Stage (n=65)	
stage I	13 (19.3)
stage II	5 (8.8)
stage III	31 (49.1)
stage IV	16 (22.8)
CA-125 level (n=59)	
< 35	7 (11.9)
35~200	15 (25.4)
≥ 200	37 (62.7)
Initial CTx** regimen (n=57)	
C-C*** or PAC****	46 (80.7)
Taxol	11 (19.3)
SLO***** result (n=23)	
(-)	13 (56.5)
(+)	10 (43.5)
P53 overexpression(n=33)	
(-)	22 (66.7)
(+)	11 (33.3)

* FIGO ; International Federation of Gynecology and Obstetrics

** CTx ; Chemotherapy

*** C-C ; Cisplatin-cyclophosphamide

**** PAC ; Cisplatin-adriamycin-cyclophosphamide

***** SLO ; Second look operation

2. 상피성 난소암 환자의 임상병리학적 예후인자에 따른 생존율

66례 상피성 난소암 환자의 전체 5년 생존율은 40.8%이었다. 상피성 난소암 환자들을 연령, 조직학적 분류, 분화도, FIGO 임상병기, 진단시 CA-125 수치, 첫 항암 약제, 이차추시술 결과, P53 발현유무에 따라서 전체 5년 생존율을 구하였다.

연령에 따른 전체 5년 생존율은 연령 50세미만인 군

59.3%, 50세이상인 군 26.5%였다($p=0.0252$). 조직학적 유형에 따른 전체 5년 생존율은 장액성 난소암 40.8%, 점액성 난소암 50.0%, 자궁내막성 난소암 40.0%, 그 외 유형은 26.7%였다($p=0.8832$). 종양의 분화도에 따른 전체 5년 생존율은 분화도가 좋은 경우 50.0%, 분화도가 중등도인 경우 42.9%, 분화도가 나쁜 경우 38.1%였다($p=0.8832$). FIGO 임상병기에 따른 전체 5년 생존율은 병기 1기 84.6%, 병기 2기 60.0%, 병기 3기 35.9%, 병기 4기 6.3%였다($p=0.0000$).

진단시 CA-125 수치에 따른 전체 5년 생존율은 35U/ml 미만은 85.7%, 35~200U/ml 사이는 53.3%, 200U/ml 이상은 27.7%였다($p=0.0392$). 첫 항암약제에 따른 전체 5년 생존율은 C-C or PAC 사용군 38.0%, Taxol 사용군 54.6%였다($p=0.3951$). 이차추시술 결과에 따른 전체 5년 생존율은 결과 음성군 61.5%, 결과 양성군 20.0%였다($p=0.0822$). P53 발현 유무에 따른 전체 5년 생존율은 발현 음성군 44.3 %, 발현 양성군 36.7%였다($p=0.27507$). 임상병리학적 예후인자들 중 나이($p=0.0252$), FIGO 임상병기($p=0.0000$), 진단시 CA-125 수치($p=0.0592$)는 통계학적으로 유의성이 있었으며 이차추시술 결과에 따른 생존율은 양성군에서 낮았으나 통계학적인 유의성은 없었다($p=0.0822$)(Table 2)(Figure 2-10).

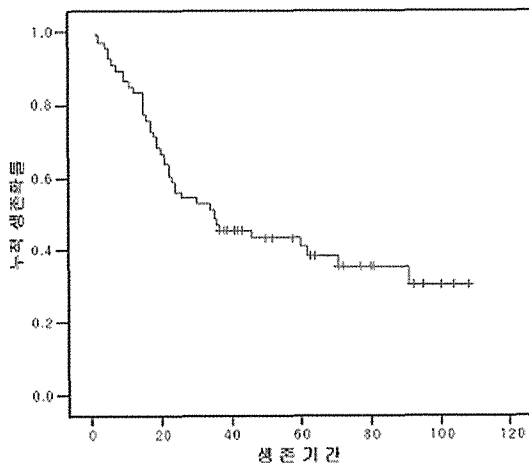


Figure 2. Overall survival of 66 epithelial ovarian cancer patients treated in 1995-2001.

Table 2. Overall survival according to clinicopathologic parameters in 66 patients with epithelial ovarian cancer.

Clinicopathologic parameters	Number of patients (%)	Overall 5-years survival rate (%)	P value
Age (n=66)			0.0252
<50	27 (40.9)	59.3	
≥50	39 (59.1)	26.5	
Histologic type (n=64)			0.1723
Serous	28 (43.8)	40.8	
Mucinos	16 (25.0)	50.0	
Endometrioid	5 (7.8)	40.0	
Others	15 (23.4)	26.7	
Grade (n=35)			0.8832
grade 1	8 (22.9)	50.0	
grade 2	20 (57.0)	42.9	
grade 3	7 (20.0)	38.1	
FIGO* Stage (n=65)			0.0000
stage I	13 (19.3)	84.6	
stage II	5 (8.8)	60.0	
stage III	31 (49.1)	35.9	
stage IV	16 (22.8)	6.3	
CA-125 level (n=59)			0.0392
< 35	7 (11.9)	85.7	
35 ~ 200	15 (25.4)	53.3	
≥ 200	37 (62.7)	27.7	
Initial CTx** regimen (n=57)			0.3951
C-C*** or PAC****	46 (80.7)	38.0	
Taxol	11 (19.3)	54.6	
SLO***** result (n=23)			0.0822
(-)	13 (56.5)	61.5	
(+)	10 (43.5)	20.0	
P53 overexpression(n=33)			0.7507
(-)	22 (66.7)	44.3	
(+)	11 (33.3)	36.7	
Total Patient (n=70)		40.8	

* FIGO ; International Federation of Gynecology and Obstetrics

** CTx ; Chemotherapy

*** C-C ; Cisplatin-cyclophosphamide

**** PAC ; Cisplatin-adriamycin-cyclophosphamide

***** SLO ; Second look operation

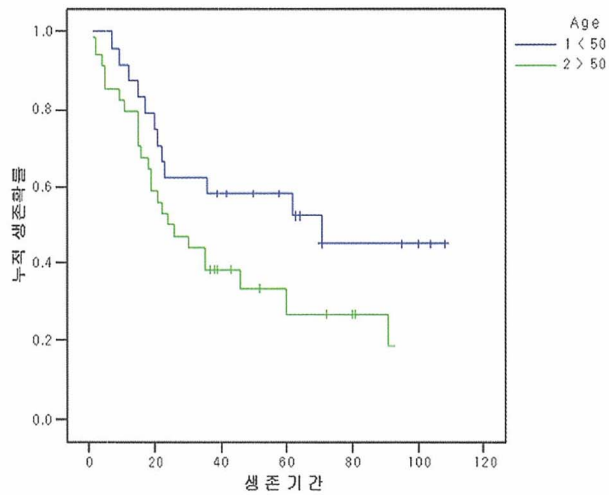


Figure 3. Survival by age.

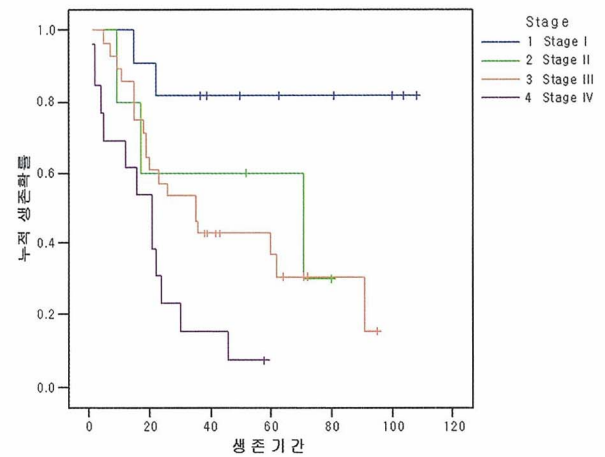


Figure 6. Survival by FIGO surgical stage.

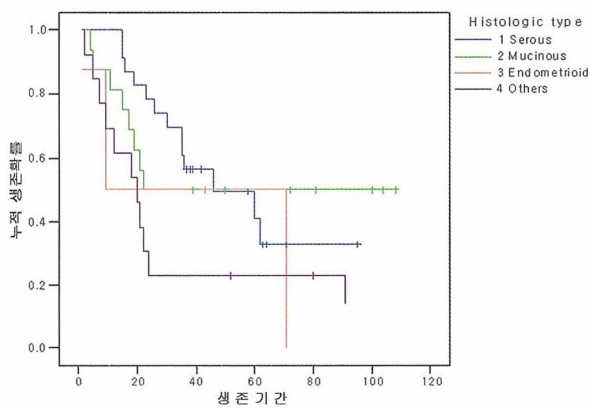


Figure 4. Survival by histologic type.

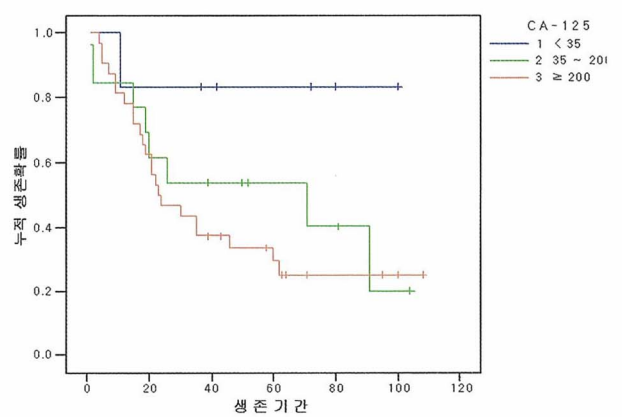


Figure 7. Survival by preop CA-125 level.

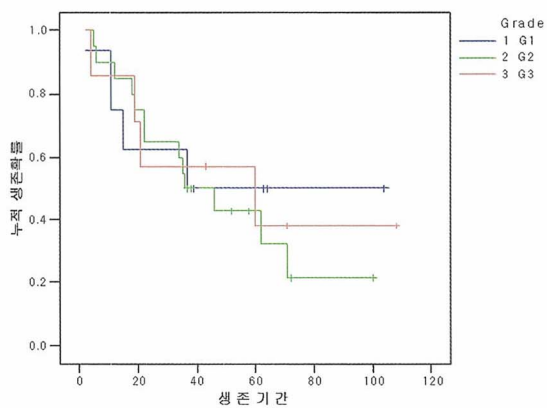


Figure 5. Survival by grade.

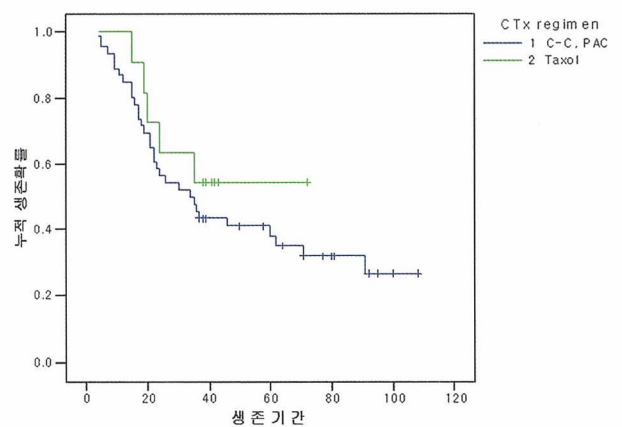


Figure 8. Survival by initial chemotherapy regimen.

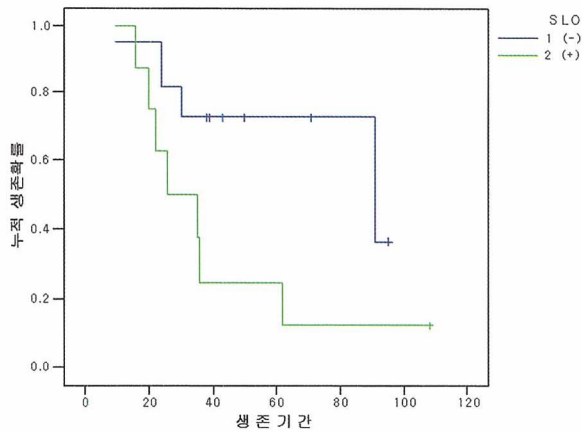


Figure 9. Survival by result of second look operation.

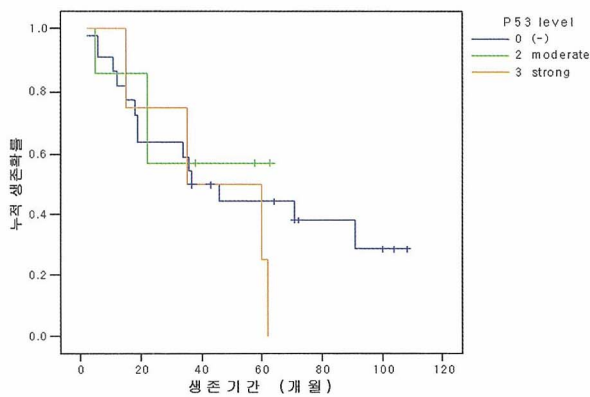


Figure 10. Survival by overexpression of P53.

3. 상피성 난소종양 (양성, 경계성, 악성)에서 HIF-1 α 발현율

난소종양에서 HIF-1 α 발현율은 양성종양에서 발현 음성, 양성인 각각 5례(50%), 5례(50%)였고, 경계성종양은 음성, 양성인 각각 4례(36.4%), 7례(63.6%)였고, 악성종양은 음성, 양성인 각각 19례(57.6%), 14례(42.4%)였다. HIF-1 α 의 양성, 경계성, 악성종양에서의 발현율은 통계학적으로 유의성이 없었으며 악성종양에서는 발현시 정도가 더 강하게 나타나는 경향이 있었다($p=0.057$). (Table 3).

Table 3. Expression of HIF-1 α in epithelial ovarian tumors (benign, borderline, malignant).

	Benign tumor (%)	Borderline malign. (%)	Invasive Cancer (%)	P value
HIF-1 α *	N=10	N=11	N=33	0.057
negative	5 (50.0)	4 (36.4)	19 (57.6)	
positive	5 (50.0)	7 (63.6)	14 (42.4)	
weak	4	7	5	
moderate	0	0	5	
strong	1	0	4	

* HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α

4. 임상병리학적 인자들과 HIF-1 α 발현 간의 상관관계

상피성 난소암 66례에서 임상병리학적 예후인자들과 HIF-1 α 발현 간에 어떠한 상관관계가 있는지 교차분석을 통하여 알아보았다. HIF-1 α 와 임상병리학적 예후인자들 (연령, 조직학적 유형, 종양의 분화도, FIGO 임상병기, 진단시 CA-125 수치, 첫 항암 약제, 이차추시술 결과, P53 발현)과의 상관관계에는 통계학적으로 유의성이 존재하지 않았다.(Table 4).

5. 상피성 난소암의 HIF-1 α 발현 유무 및 정도에 따른 생존율

HIF-1 α 발현 음성 19례(57.6%)의 전체 5년 생존율은 45.0%였고, 발현 양성 14례(42.4%)의 전체 5년 생존율은 42.3%였으며, 발현 유무에 따라 통계학적으로 유의한 생존율 차이는 없었다 ($p=0.7867$). HIF-1 α 발현 양성군을 정도에 따라 세분하였을 때, 약한 발현군 5례(15.2%), 중간 발현군 5례(15.2%), 강한 발현군 4례(12.1%)의 전체 5년 생존율은 각각 77.8%, 40.0%, 0.0%으로 나타났으며 발현 정도가 강할수록 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. ($p=0.0744$). (Table 5)(Figure 11).

Table 4. Correlation between HIF-1 α expression and clinicopathologic parameters of epithelial ovarian cancer.

Clinicopathologic parameters	Total Number(%)	HIF-1 α ****		P value
		(+)	(-)	
Age (n=33)				0.966
<50	14 (42.4)	6	8	
≥50	19 (57.6)	8	11	
Histologic type (n=33)				0.264
Serous	16 (48.5)	8	8	
Mucinos	8 (24.2)	1	7	
Endometrioid	2 (6.1)	1	1	
Others	7 (21.2)	4	3	
Grade (n=31)				0.248
grade 1	7 (22.6)	2	5	
grade 2	19 (61.3)	11	8	
grade 3	5 (16.1)	1	4	
FIGO* Stage (n=33)				0.221
stage I	6 (18.2)	3	4	
stage II	1 (3.0)	1	0	
stage III	18 (54.5)	5	13	
stage IV	8 (24.2)	5	2	
CA-125 level (n=29)				0.659
< 35	3(10.3)	1	2	
35~200	7(24.1)	2	5	
≥ 200	19(65.5)	9	10	
Initial CTx** regimen (n=27)				0.528
C-C or PAC	21(77.8)	9	12	
Taxol	6(22.2)	2	4	
SLO*** result (n=12)				0.121
(+)	6(50)	5	1	
(-)	6(50)	2	4	
P53 overexpression (n=33)				0.266
(+)	11(33.3)	6	5	
(-)	22(66.7)	8	14	

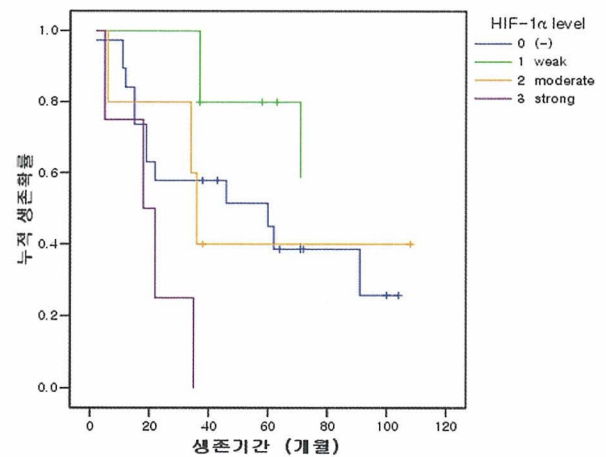
* FIGO ; International Federation of Gynecology and Obstetrics

** CTx ; Chemotherapy

*** SLO ; Second look operation

**** HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α Table 5. Overall survival according to expression of HIF-1 α in epithelial ovarian cancer.

HIF-1 α *	Number of patients		P value
	(%)	overall 5-years survival rate (%)	
(-) (n=33)			0.7867
(+)	19 (57.6)	45.0	(유무)
weak	5 (15.2)	77.8	0.0744
moderate	5 (15.2)	40.0	(정도)
strong	4 (12.1)	0.0	

* HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α Figure 11. Survival by expression of HIF-1 α .

6. 상피성 난소암 환자의 생존을 분석

상피성 난소암 환자 66예의 임상병리학적 예후인자 중 단변량 분석에서는 나이($p=0.0252$), FIGO 병기 ($p=0.0000$), 진단시 CA-25치($p=0.0392$)가 통계학적으로 유의성을 나타내었으며 다변량분석에서는 FIGO병기 ($p=0.002$)만이 유의성을 나타내었다. HIF-1 α , P53 발현 유무 및 정도는 생존을 분석에서 유의성을 보이지 않았다(Table 6).

Table 6. Survival analysis of 66 patients with epithelial ovarian cancer.

	Univariate analysis	Multivariate analysis	
	P value	RR (95% CI)*	P value
Age	0.0252	1.857 (0.860 ~ 4.007)	0.115
FIGO** Stage	0.0000	2.142 (1.328 ~ 3.455)	0.002
CA-125 level	0.0392	1.458 (0.773 ~ 2.752)	0.244
HIF-1 α ***	0.0744	-	-
P53	0.5610	-	-

* RR (95% CI): estimated relative risk (95% confidence interval)

** FIGO ; International Federation of Gynecology and Obstetrics

*** HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α

고찰

난소암은 부인암에서 가장 사망률이 높은 암으로 미국에서는 연간 약 23,000명이 새롭게 발병되며 14,000명 정도가 사망하는 것으로 보고하고 있다.¹⁾ 국내에서는 한국암등록사업 연례보고서 (2002년 2월)에 의하면 난소암의 발생빈도는 2000년도에 연간 약 1,480명으로 보고되고 있어 국내 여성의 생식기 악성종양 중 자궁경부암에 이어 2위의 발생율을 보이고 있으며 국내 사망률은 2002년 9월 통계청의 연간 사망원인 통계 결과에 따르면 2001년 623명 (2.4명/10만명)이 사망한 것으로 보고되었다.^{2,3)} 현재 한국에서 발생 빈도가 증가 추세에 있으나 병자체가 조기진단이 어려워 진단 당시 이미 복강 내 전이가 흔하기 때문에 예후가 아주 불량한 여성암으로 알려져 있다. 현재 적절한 종양감축수술 후 platinum 제제, paclitaxel, cyclophosphamide 등의 항암제의 병합사용으로 환자들의 생존율의 향상을 위해 노력하고 있는 중이나 난소암에 대한 수술 기법과 항암약제의 개발과 발전에도 불구하고 아직까지 생존율의 향상은 미미한 실정이다.^{4,6)}

한편 종양의 침윤과 전이의 기전에 대한 유전학적, 분자생물학적 연구가 이루어지면서 이 과정에 관여하는 여러 인자들이 밝혀지게 되었고, 이들 중에서 나쁜 예후나 재발을 예측할 수 있는 새로운 인자를 찾으려는 노력들이 있어 왔다. 왜냐하면 이러한 지표들을 사용하여 위험군의 환자들을 선별하여 적극적인 치료를 함으로써 생존율

을 높일수 있기 때문이다. 이러한 관점에서 최근 인체의 여러 가지 악성 종양에서 종양의 증식, 전이, 예후와 관련하여 HIF-1 α 단백질의 발현에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.⁷⁻¹¹⁾

많은 종양 조직의 내부에는 저산소증의 부위가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 종양내 저산소증의 범위는 예후에도 영향을 줄 수 있다. 저산소증에 대한 세포의 적응과정과 맥관형성은 종양의 성장에 있어서 중요한 과정이며, 이 과정에 Hypoxia inducible factor(HIF)-1단백은 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. HIF-1단백은 HIF-1 α 와 HIF-1 β 의 두 아단위로 구성되어 있는 이질이량체 복합체(heterodimeric complex)로 이 두 아단위 중 HIF-1 α 아단위가 HIF-1 단백질의 산소조절 활성화를 결정하는 주 단위로 밝혀졌다.^{12,13)} HIF-1 β 단백질은 세포내에서 정상적으로 존재하는 단백질인 데 반해, HIF-1 α 단백질은 세포가 저산소증에 노출되었을 때만 핵내에 급속히 축적되는 단백질로 핵내에 축적된 HIF-1 α 단백질은 일단 세포의 재산소화가 이루어지면 세포내 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 신속히 분해되므로, HIF-1단백의 활성화는 HIF-1 α 에 의해 결정된다고 볼 수 있다.^{13,14)} HIF-1 α 단백질은 저산소증 하에서 종양의 진행에 중요한 역할을 하는 인자들 즉 vascular endothelial growth factor, erythropoietin, transferrin, endothelin-1, inducible nitric oxide synthetase, hemoxygenase 1, insulin-like factor-2, insulin-like growth factor binding proteins, glucose transporters, glycolytic enzymes등을 활성화 시키는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 종양조직내 저산소증은 HIF-1 α 단백질 및 HIF-1 α 의존성 유전자들을 활성화시킬 수 있으며, 그러나 다른 한편으로 HIF-1 α 단백질은 종양억제유전자인 P53 단백질과 결합하여 P53 의존성 종양 세포자연사를 촉진시킬 수도 있어 종양의 진행과정에서 발생할 수 있는 저산소증 상황에서 HIF-1 α 단백질은 두 가지 상반된 기능을 보일 것으로 추정된다. 즉, VEGF 유전자등의 활성화를 통해 맥관형성을 촉진시키기도 하지만, 다른 한편으로 P53 단백질과 결합하여 이 단백질의 안정성을 증가시키므로 종양 세포의 세포자연사를 유발시킬 수도 있다.²²⁻²⁵⁾ HIF-1 α 는 종양의 진행 촉진 조절자 혹은 억제 조절자 양자로 다 작용 할 수 있으나, 여러 고형종양들의 연구, 즉 조기 식도암, 수술 가능한 비소세포암, 조기 침윤성

자궁경부암, 구강인후암, 그리고 두경부암에서 HIF-1 α 과발현경우는 나쁜 전체 생존율과 연관되어 있다고 보고 되고 있어 종양의 진행에 있어 대체로 촉진 조절자로 작용할 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.^{8,10,16-24)}

난소암의 경우 Peter 등의 연구에 의하면, HIF-1 단백질의 난소종양에서의 발현은, 양성종양 10%, 경계성 종양 88%, 난소암은 68.6%에서 발현이 관찰되어 경계성 종양에서 난소암보다 더 높은 발현율을 보였으나 통계학적으로는 의미가 없었다.²⁵⁾ 본 연구에서의 난소종양에서 HIF-1 α 발현율은 양성종양에서 50%, 경계성종양은 63.6%였고, 악성종양에서는 42.4%로 경계성 종양에서 가장 높게 나타났으나, 통계학적으로 유의성은 없었으며 악성종양에서는 발현시 발현정도가 더 강하게 나타나는 경향이 있었다($p=0.057$). (Table 3) 역시 Peter 등은 HIF-1 α 와 상피성 난소종양에서의 예후 및 생존율과의 상관관계 연구에서 HIF-1 α 발현 단독으로는 난소암의 예후와 무관한 것으로 나타났으나 strong HIF-1 α expression과 P53 overexpression이 동시에 나타난 11명(10.8%)의 환자에서 전체 생존율이 다른 환자들 보다 의미 있게 낮게 나타나(median survival time : 251days vs 2129 days) 이 두 요소가 동시에 상존하는 경우 아주 나쁜 예후를 보였으며 다변량 예측 분석상에서도 생존율과 의미있는 상관관계를 보인 것으로 보고하였다.²⁵⁾ 본 연구에서의 HIF-1 α 발현유무 및 정도에 따른 난소암 66예 환자의 생존율을 보면, HIF-1 α 발현 음성 19례(57.6%)의 전체 5년 생존율은 45.0%였고, 발현 양성 14례(42.4%)의 전체 5년 생존율은 42.3%였는데, 발현 유무에 따라 통계학적으로 유의한 생존율 차이는 없었다 ($p=0.7867$). HIF-1 α 발현 양성군을 정도에 따라 세분하였을 때, 약한 발현군 5례(15.2%), 중간 발현군 5례(15.2례), 강한 발현군 4례(12.1%)의 전체 5년 생존율은 각각 77.8%, 40.0%, 0.0%으로 발현 정도가 강할수록 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다 ($p=0.0744$). (Table 5)(Figure 11) 그리고 HIF-1 α 단백질과 P53 과발현이 동시에 존재하는 경우는 6예(18%)였으며 HIF-1 α 는 2예는 강, 2예는 중간, 2예는 약하게 발현되었으며, 6예 전체 생존율은 50%였으나 이중 HIF-1 α 가 강하게 발현된 2예는 모두 사망하였으며 평균생존기간은 13.5개월로 나타나 Peter 등의 연구와 일치되는 결과가 나타났으나 사례수가 적어 좀 더 많은 증례를 대상으로

한 조사가 요구된다고 사료된다. 본 연구에서 HIF-1 α 과 임상병리학적 예후인자들 (연령, 조직학적 유형, 종양의 분화도, FIGO 임상병기, 진단시 CA-125 수치, 첫 항암 약제, 이차추시술 결과, P53 발현)과의 상관관계에는 모두 통계학적으로 유의성이 존재하지 않았다.(Table 6)

결론적으로 상피성 난소암 환자 66예의 전체 5년 생존율은 40.8%였다. 임상병리학적 예후인자와 생존율과의 분석에서는 단변량 분석에서 나이($p=0.0252$), FIGO 병기($p=0.0000$), 진단시 CA-25치($p=0.0392$)가 통계학적으로 유의성을 나타내었으며 다변량분석에서는 FIGO병기($p=0.002$)만이 유의성을 나타내었다. HIF-1 α 의 발현은 양성종양 10예, 경계성종양 11예, 난소암 33예에서 면역조직화학염색을 시행하였으며 HIF-1 α 단백질의 발현율은 양성, 경계성, 악성에서 각각 50%, 63.6%, 42.4%로 나타나 통계학적으로 의미는 없으나 경계성에서 가장 높게 나타났다. 전체 생존율에 있어서는 HIF-1 α 단백질의 발현 유무는 통계학적으로 연관성을 보이지 않았으나 HIF-1 α 발현의 정도가 강할수록 생존율이 감소하는 경향을 보여 ($p=0.0744$) 향후 좀 더 많은 증례를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

상피성 난소암 66례의 전체 5년 생존율은 40.8%이었으며 임상병리학적 예후인자 중 단변량 분석에서는 나이($p=0.0252$), 병기($p=0.0000$), 술전 CA-125치($p=0.392$)였으며 다변량분석에서는 병기($p=0.002$)만이 통계학적으로 유의성이 있었다.

HIF-1 α 는 상피성 난소종양 (양성, 경계성, 악성)에서 발현율 차이는 통계학적으로 유의성이 없었으나 악성종양에서는 발현시 정도가 강하게 나타나는 경향이 있었다 ($p=0.057$). 발현 유무 및 정도에 따른 생존율은 모두 통계학적 유의성이 없었으나, HIF-1 α 발현 정도가 강할수록 예후가 나쁜 경향을 나타내어($p=0.0744$) 향후 더 많은 증례를 통한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

국문요약

상피성 난소암에서 Hypoxia inducible factor(HIF)-1 α 발현의 예후적 의의

연구배경 및 목적 : 상피성 난소암은 부인암 중 예후가 나쁜 대표적인 암으로 치료 후 생존율을 높이기 위한 많은 연구가 진행 중이다. 종양의 침윤과 전이에 대한 유전학적, 분자생물학적인 연구가 이루어지면서 이 과정에 관여하는 여러 인자가 밝혀지게 되었고 이들 중에서 나쁜 예후나 재발을 예측할 수 있는 새로운 인자들을 찾으려는 노력이 있어왔다.

HIF-1 α 는 저산소증 하에서 활성화되어 세포생존에 필요한 유전자 발현을 자극시키는 것으로 알려져 있으며 종양조직내의 저산소증은 HIF-1 α 와 이에 의존성 유전자들을 활성화 시킬 수 있어 종양의 진행, 성장 과정에 중대한 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다.

이 논문의 목적은 난소암에 있어서 HIF-1 α 의 발현을 조사하고, 이 결과들과 난소암의 생존율과의 상관관계를 분석하여 이들의 새로운 예후인자로서의 가치를 조사하여 보는 것이다.

연구대상 및 방법 :

1) 연구대상

1995년 1월부터 2001년 12월까지 고신대학교 복음병원에서 수술을 시행한 상피성 난소암 66명의 환자를 대상으로 예후와 관련된 임상병리학적 인자들에 따른 전체 생존율을 분석하였고 또 이 환자들 중 병리학적 재검토가 가능하였던 난소암 33례 그리고 대조군으로 양성종양 10례, 경계성종양 11례를 대상으로 조직학적 표본으로 HIF-1 α 의 발현을 면역조직화학염색법으로 조사하였다.

2) 연구방법

A. 면역조직화학 검색

각 실험군의 종양 조직에서 HIF-1 α (NOVUS, 1:100) 단클론 항체를 사용하여 HIF-1 α 의 발현을 면역조직화학 염색으로 검색하였다.

B. 면역조직화학 염색판정

종양세포의 5%이상이 적갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하였고, 양성으로 판정된 경우 weak (5-25%), moderate(26-49%), strong($\geq 50\%$)으로 분류하였다.

C. 통계분석

통계분석은 SPSS 10.0을 이용하여 생존율 검증은 Kaplan-Meier 방법과 Log-rank 방법을 이용하였고 환자군 간의 유의한 생존율의 차이가 있는 지표들은 cox-proportional hazard model을 이용한 다변량 분석을 하였다. p-value 0.05 이하를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결과 : 상피성 난소암 66례의 전체 5년 생존율은 40.8%이었다. 임상병리학적 예후인자들 중 통계학적 유의성이 있는 인자들은 단변량 분석에서는 나이(p=0.0252), FIGO 수술병기(p=0.0000), 수술전 CA-125치(p=0.0392)이었고 다변량 분석에서는 FIGO 수술병기 (p=0.002)였다. 수술후 잔류종양의 크기는 조사 당시 누락된 기록들이 많아 예후인자들 중에서 제외되었다. HIF-1 α 의 상피성 난소종양 (양성, 경계성, 악성)에서 발현율은 통계학적 유의하지는 않았으나 악성종양일 경우 발현시 강하게 나타나는 경향이였다(p=0.057). 발현 유무 및 정도에 따른 생존율은 모두 통계학적 유의성이 없었으나, HIF-1 α 발현 정도가 강할수록 예후가 나쁜 경향을 나타내었다(p=0.0744). 임상병리학적 인자들과 HIF-1 α 발현 간의 상관관계는 통계학적 유의성이 없었다.

결론 : 난소암의 예후인자들에 따른 생존율을 분석한 결과 단변량 분석에서는 나이(p=0.0252), FIGO수술병기 (p=0.0000), 술전 CA-125치(p=0.0392)가 예후인자로서 통계학상으로 유의성을 보였으며 다변량 분석에는 FIGO 수술병기(p=0.002)만이 통계학적으로 유의성을 보였다. HIF-1 α 단백질의 발현율은 양성, 경계성, 악성에서 각각 50%, 63.6%, 42.4%로 나타나 통계학적으로 의미는 없으나 양성종양 경우 발현시 더 강하게 나타나는 경향이 있었다.(p=0.057) 전체 생존율에 있어서는 HIF-1 α 단백질

발현 유무는 통계학적으로 연관성을 보이지 않았으나 HIF-1 α 발현의 정도가 강할수록 생존율이 감소하는 경향을 보여 ($p=0.0744$) 향후 좀 더 많은 증례에 의한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어 : 상피성 난소암, 생존율, Hypoxia inducible factor(HIF)-1 α

참고문헌

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 50: 7-33, 2000
- 보건복지부: 한국인 중앙 암등록사업 연례보고서 (2000.1.-2000.12.). 대한민국 보건복지부, 2002
- 통계청: 연간 사망원인 통계(2001.1-2001.12.). 대한민국 통계청, 2002.9
- Westhoff C, Randal MD: Ovarian cancer screening. Potential effect on mortality, 502-505, 1991
- Ozol RF, Rubin SC, Dembe AJ, Perez CA, Young RC: Principles and practice of gynecologic oncology. Philadelphia, JB Lippincott, 1992; 731-781
- 김원규, 김영환: 지속성 혹은 재발성 난소암에서 IV Etoposide-Carboplatin-cyclophosphamide 병합요법의 임상적 시도. 대한산부회지 46:22-30, 2003
- Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P: Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. Int J Cancer 79:365-369, 1998
- Stadler P, Becker A, Feldmann HJ: Influence of the hypoxic condition on the survival of patients with head and neck cancer. Int Radiat Oncol Biol Phys 44:749-754, 1999
- Dachs GU, Patterson AV, Firth JD: Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. Nat Med 3:515-520, 1997
- Graeber TG, Osmaninam C, Jacks T: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. Nature 379:88-91, 1996
- Russo CA, Weber TK, Volpe CM: An anoxia inducible endonuclease and enhanced DNA breakage as contributors to genomic instability in cancer. Cancer Res 55:1122-1128, 1995
- Peter B, Monika S, Andreas O, Gexhard B, Georg B: Expression of Hypoxia-inducible factor-1 α in epithelial ovarian tumors-it impact on prognosis and on response to chemotherapy. Clinical Cancer Res 7:1661-1668, 2001
- Westley B, Rochefort H: Estradiol induced proteins in the MCF7 human breast cancer cell line. Biochem Biophys Res Commun 90:410-416, 1979
- Morissert M, Capony F, Rochefort H: The 52-kDa estrogen induced protein secreted by MCH-7 cells is a lysosomal acidic protease. Biophys Res Commun 138:102-109, 1986
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH: Hypoxia-inducible factor-1 levels are exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. Am J Physiol, 1172-1180, 1996
- Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor-1 alpha protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic condition. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. J Biol Chem 272:642-647, 1997
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor-1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci USA 92:5510-5514, 1995
- Semenza GL: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1. Annu Rev Cell Dev Biol, 15:511-578, 1999.
- Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL: Hypoxia-inducible factors (HIF)-1 alpha and 2 alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. Cancer Res 62:2493-2497, 2002
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL: Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumors and survival. Br J Cancer 85:881-890, 2001
- Birner P, Schin M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G: unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. Cancer Res 60:4693-4696, 2000
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL: Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. Cancer Res 61:1830-1832, 2001
- Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P: Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. Cancer Res 56:4509-4515, 1996
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. Cancer Res 56:941-943, 1996
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC, Harris AL: Hypoxia-inducible factor(HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 53:1192-1202, 2002
- Ahn MJ, Jang SJ, Park YW, Choi JH, Oh HS, Lee CB, Paik HK, Park CK: Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and P53 expression in esophageal carcinomas. J Korean Med Sci 17:201-207, 2002
- Shimada H, Hoshino T, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Nabeya Y, Hayashi H, Takeda A, Shiratori T, Uno T, Ito H, Ochiai T: Expression of angiogenic factors predicts response to chemoradiotherapy and prognosis of oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 86:552-557, 2002

28. 서동수, 이창문, 성강석, 윤만수: 자궁목의 병기 I 과II 편평 상피암중에서 Hypoxia-inducible factor-1 α 단백질 발현: P53단백 및 VEGF발현과의 연관성. 대한병리학회지 37:79-86, 2003
29. Rochefort H, Capony F, Garcia M: Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis? J Cell Biochem 35:17-29, 1987
30. Halperin R, Zehavi S, Dar P, Habler L, Hadas E, Bukovsky I: Clinical and molecular comparison between borderline serous ovarian tumors and advanced serous papillary ovarian carcinomas. Eur J Gynecol Oncol 22:292-296, 2001