

표재성방광암에서 Survivin과 p53 발현의 임상적 의의

Clinical Implications of the Expression of Survivin and p53 in Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

Dong Yun Kwak, Ji Yong Ha, Hyuk Soo Chang, Mi Sun Choi¹,
Choal Hee Park, Chun Il Kim

From the Departments of Urology and ¹Pathology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: The prognostic value of p53 remains controversial in transitional cell carcinomas of the bladder. Survivin, an inhibitor of apoptosis, is expressed in many human cancers. Recent studies have reported increased expression of survivin in superficial transitional cell carcinomas of the bladder. We investigated the expression of survivin and p53 and the clinical implications of this expression in superficial transitional cell carcinomas of the bladder. **Materials and Methods:** Immunohistochemical staining of paraffin sections using a monoclonal antibody for survivin and p53 was performed in 82 cases of superficial transitional cell carcinomas of the bladder. Correlations between the expression of survivin and p53 and clinicopathological features, such as age, multiplicity of tumor, size, recurrence, and progression, were examined.

Results: Among 82 cases, positive survivin expression (greater than 20%) was observed in 59 cases. Positive p53 expression (greater than 20%) was observed in 46 cases. There were no significant differences in age, gender, multiplicity, tumor size, tumor grade, pT stage, recurrence, or progression-free survival between p53-positive and p53-negative groups ($p > 0.05$). Also, there were no significant differences in age, gender, multiplicity, tumor size, tumor grade, or pT stage between survivin-positive and survivin-negative groups ($p > 0.05$). However, recurrent-free and progression-free survivals were significantly lower in the survivin-positive group than in the survivin-negative group ($p < 0.05$).

Conclusions: The expression of survivin can be recommended as a useful marker for predicting disease recurrence and progression. Survivin may be superior to p53 as a prognostic factor in superficial transitional cell carcinoma of bladder. (Korean J Urol 2009;50:12-17)

Key Words: Urinary bladder neoplasms, Human BIRC5 protein, p53 genes

대한비뇨기과학회지
제 50 권 제 1 호 2009

계명대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹병리학교실

곽동윤 · 하지용 · 장혁수
최미선¹ · 박철희 · 김천일

접수일자 : 2008년 8월 25일
채택일자 : 2008년 9월 11일

교신저자: 박철희
계명대학교 동산의료원
비뇨기과
대구시 중구 동산동 194번지
☎ 700-712
TEL: 053-250-7642
FAX: 053-250-7643
E-mail: chp@dsmc.or.kr

서 론

표재성방광암은 방광암의 약 70%를 차지하고 약 50-70%에서 5년 내 재발하며 약 5-20%에서 침윤암으로 진행한다. 그래서 치료와 추적 검사를 계획할 때 재발과 진행의 가능성이 중요한 문제가 된다.^{1,2} 이러한 임상 경과의 차이를 결정하는 중요한 예후인자로는 종양 세포의 분화도, 조직학적 침윤정도, 상피내암의 동반 유무, 종양의 크기, 다발성

유무, 재발 빈도 등과 같은 임상적 예후인자가 보고된다.³

임상적 예후인자 외에도 p53, p21, pRb, Ki-67 등과 같은 분자 생물학적 지표의 연구가 활발히 진행되고 있으며 방광암의 예후에 대한 보충적 정보를 제공할 생물학적 표식자로 주목받고 있다.⁴ 현재까지 p53에 대한 보고는 많이 있었으나 예후 판정가치에서 의문시 되어 왔고, 나머지 생물학적 표식자들의 역할에 대한 보고는 소수에 불과하다.^{5,6}

최근 inhibitor of apoptosis proteins (IAP)군 중 survivin은 직장암, 유방암, 림프종, 폐암, 전립선암 등 여러 종양에서

발현되고 암의 재발과 진행이라는 측면에서 예후 판정가치를 가진다는 보고가 있다.⁷ 비정상적인 세포가 지속적으로 생존이 가능하게 되어 유전자 변형을 일으키게 되고 세포고사기전이 억제된 세포들이 면역계에 저항하면서 종양 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸ Survivin은 세포고사기전 중에서 마지막 단계인 caspase-3과 caspase-7의 활동을 직접적으로 억제하여 세포고사가 일어나지 않게 만든다.⁹ 그리고 방광암에서 초기 진단과 재발, 진행에 연관되어 있다는 보고가 있다.¹⁰

따라서 본 연구에서는 세포고사억제 유전자 survivin과 p53의 발현 정도를 표재성방광암 조직에서 측정하고 발현 차이가 방광암의 병기, 등급, 재발, 암의 진행 등의 임상 변수들과 관련이 있는지를 비교 분석하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

1998년 1월부터 2006년 8월까지 본원에서 경요도방광암 절제술 (transurethral resection of bladder; TURB)을 시행 받았으며 표재성방광암으로 확인되고 1년 이상 추적 관찰이 가능하였던 환자 82명을 대상으로 후향적 조사하였다. 대상 환자들의 나이, 성별, 종양 크기 (3cm 이상 혹은 미만)와 다발성 (단독 혹은 2개 이상), 종양의 병기 (Ta, T1), 종양세포의 분화도, 재발과 진행여부 등을 조사하였다. 재발은 표재성방광암이 추적 기간 중 방광경에서 종양이 발견되거나 세포검사 결과 양성이어서 시행한 방광의 생검에서 조직학적으로 악성이 증명된 경우 재발로 정의하였다. 암의 진행

은 재발암의 병리학적 병기가 경요도절제술 후 T2 이상이거나 림프절 혹은 원격전이가 발생한 경우로 정의 하였다.

2. 면역조직화학법

각 증례별로 병리의사가 슬라이드를 재검토하여 진단과 병리학적 소견을 확인 후 가장 대표적인 암병변 부위를 선정하였다. 신선한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법에 따라 만들어 보관된 파라핀 포매괴를 이용하여 조직미세배열 (tissue microarray)을 제작하였다. 각각의 증례에서 선정된 암병변 부위를 해당 파라핀 포매괴에서 지름 2mm의 크기로 두 번씩 천공한 뒤 이들을 수혜 (recipient) 파라핀 포매괴에 심었다. 제작된 조직미세배열을 이용하여 4 μm의 절편을 만들어 BenchMakr XT 자동 면역염색기 (Ventana Medical Systems Inc., Az, USA)로 면역염색을 하였다. Survivin에 대한 일차항체 (rabbit anti-survivin mAb, clone 71G4, Cell Signaling, USA)는 1:100으로 희석하였고 p53에 대한 일차항체 (mouse anti-p53 mAb, clone DO-7, Novocastra Lab, UK)는 1:1,000으로 희석하여 사용하였다.

염색된 조직의 판독은 광학현미경하에서 한 명의 병리학자가 survivin과 p53의 발현 여부와 발현 정도를 관찰하였다. Survivin 발현 암세포가 20% 이상을 차지하는 경우를 양성으로 판정하였고 p53의 경우도 암세포의 핵이 20% 이상 염색되었을 때 양성으로 판정하였다.

3. 통계

대상환자들의 나이, 성별, 크기, 다발성, 종양의 분화도, 재발과 진행 등의 인자들을 survivin과 p53의 발현여부에 따

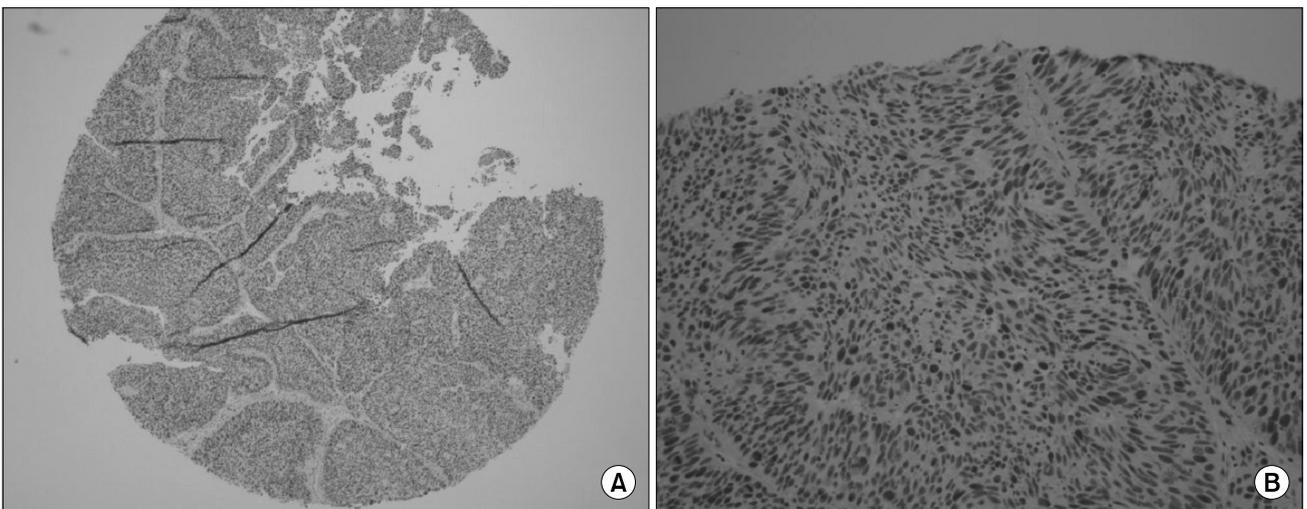


Fig. 1. Immunohistochemical staining of survivin in tissue sections obtained from superficial bladder tumor. (A) Survivin was observed diffusely in bladder tumor tissue. Reduced from x40 (brown staining). (B) Reduced from x200 (brown staining).

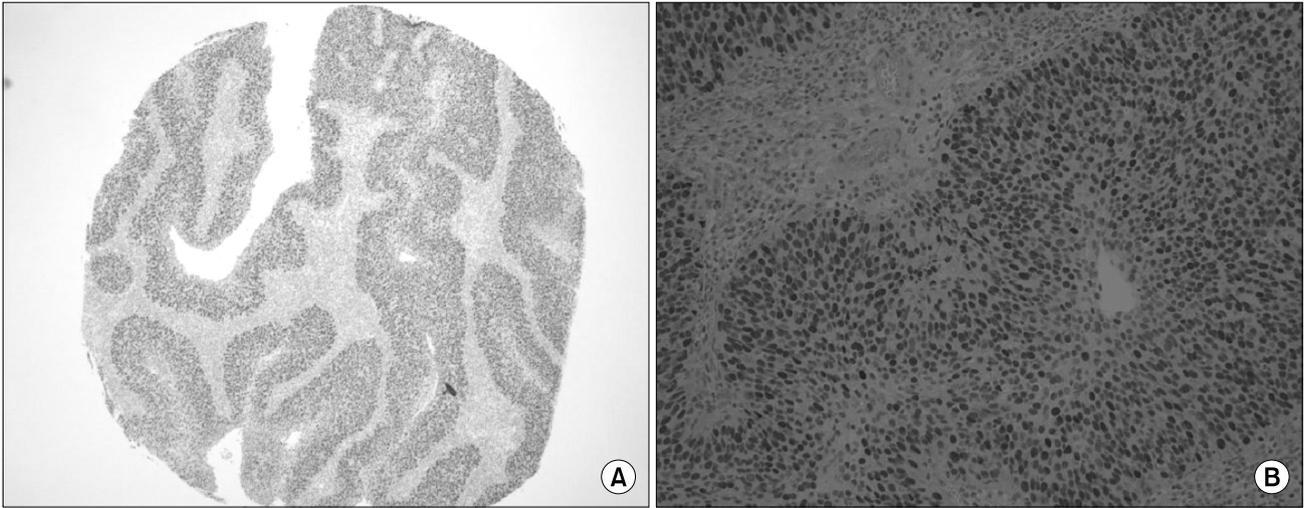


Fig. 2. Immunohistochemical staining of p53 in tissue sections obtained from superficial bladder tumor. (A) p53 was observed diffusely in bladder tumor tissue. Reduced from x40 (brown staining). (B) Reduced from x200 (brown staining).

Table 1. Clinicopathological characteristics according to survivin expression

Characteristics	Overall	Expression of survivin		p-value
		Positive	Negative	
No. of patients	82	59	23	
Age (years)	63.2	62.4	65.2	0.870
Gender				0.213
Male	67	46	21	
Female	15	13	2	
Tumor size (cm)				0.514
< 3	66	47	19	
≥ 3	16	12	4	
Multiplicity				0.326
Single	38	25	13	
Multiple	44	34	10	
Grade				0.277
3	17	12	5	
1 or 2	65	47	18	
pT class				0.216
Ta	46	36	10	
T1	36	23	13	
Recurrence	21	18	3	0.025*
Progression	10	10	0	0.011*

*: p < 0.05, statistical significance

라 unpaired t-test 또는 chi-square test로 비교하였고, survivin과 p53의 발현여부에 따른 무재발 생존율과 무진행 생존율은 Kaplan-Meier 방법으로 계산하여 log rank test로 비교하였다. 모든 분석은 p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

Table 2. Clinicopathological characteristics according to p53 expression

Characteristics	Overall	Expression of p53		p-value
		Positive	Negative	
No. of patients	82	46	36	
Age (years)	63.2	62.0	64.7	0.644
Gender				0.249
Male	67	40	27	
Female	15	6	9	
Tumor size (cm)				0.400
< 3	66	39	27	
≥ 3	16	7	9	
Multiplicity				0.657
Single	38	20	18	
Multiple	44	26	18	
Grade				0.227
3	17	10	7	
1 or 2	65	36	29	
pT class				0.634
Ta	46	25	17	
T1	36	21	19	
Recurrence	21	14	7	0.139
Progression	10	6	4	0.694

*: p < 0.05, statistical significance

결 과

방광암 환자들의 추적기간은 평균 63.1개월 (12-106)이었으며, 총 82례 중 survivin 양성인 경우는 59례 (72%), p53 양성인 경우는 46례 (56.1%)로 양 군 간에 유의한 차이가 있었

다 ($p=0.021$) (Fig. 1, 2).

나이, 성별, 종양의 크기, 다발성, T 병기, 종양등급에 따른 survivin이나 p53의 발현여부는 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$) (Table 1, 2). 그러나 survivin에 양성을 나타낸 환자들에서 암의 재발률과 진행률이 통계적으로 유의하게 높았다 ($p<0.05$) (Table 1).

무재발 및 무진행 생존율은 survivin 양성인 경우에서 그렇지 않은 경우보다 유의하게 낮았다 ($p<0.05$) (Fig. 3). 반면 p53 양성인 경우는 음성인 경우와 유의한 차이가 없었다 ($p>0.05$) (Fig. 4).

고 찰

세포고사 (apoptosis)는 유전적으로 계획된 세포 사망기전 (programmed cell death)으로 외부 혹은 환경의 신호변화가 유전적 프로그램을 활성화시켜 결국 세포사망을 일으키게 하는 정상적인 신체 변화 기전이다. 하지만 이러한 세포고사 기전에 이상이 발생하여 저발현된 경우에는 종양이 발생하고 과발현이 되었을 때는 치매와 같은 질환이 발생하게 된다. 최근 세포고사기전의 억제 (antiapoptosis)로 비정상적인 세포가 지속적으로 생존이 가능하게 되어 유전자 변

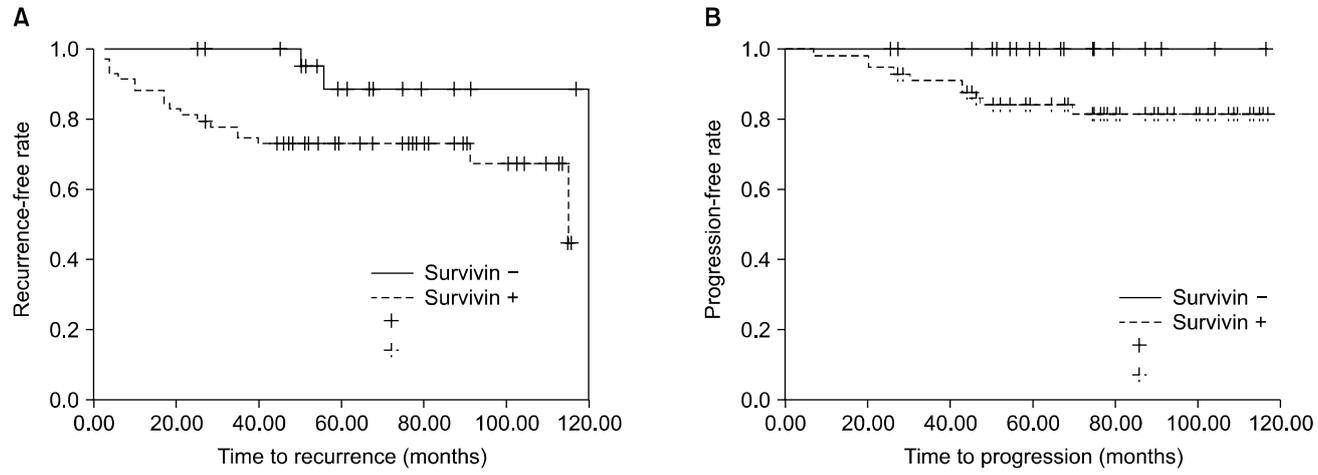


Fig. 3. Kaplan-Meier cumulative recurrence-free and progression-free curves of patients with superficial bladder tumor according to the survivin immunoreactivity. There were significant differences in recurrence-free ($p=0.015$) and progression-free survival ($p=0.046$) between the surviving-positive and survivin-negative groups.

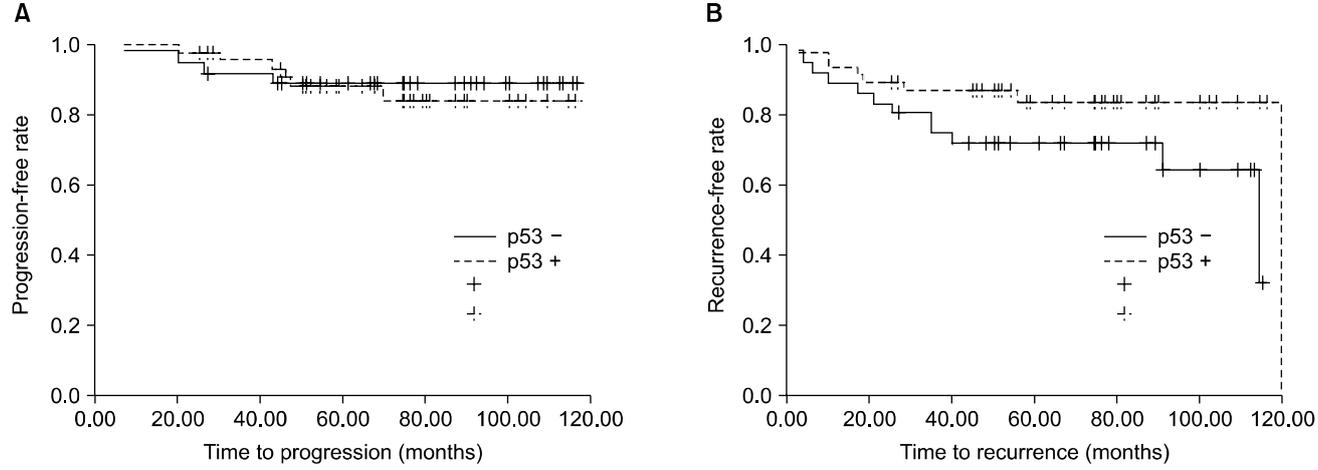


Fig. 4. Kaplan-Meier cumulative recurrence-free and progression-free curves of patients with superficial bladder tumor according to p53 immunoreactivity. There were no significant differences in recurrence-free ($p=0.081$) and progression-free survival ($p=0.793$) between the p53-positive and p53-negative groups.

형을 일으키게 되고 세포고사기전이 억제된 세포들이 면역 체계에 저항하면서 종양 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.⁸

인체 내에서 발생하는 다양한 종양들에서 세포고사의 억제가 발생하는 기전에 대해서 많은 연구들이 있다. 현재까지 잘 알려져 있는 세포고사와 관련된 유전자들은 bcl-2와 p53 등이 있으며,^{11,12} 근래에 새로 발견된 유전자들로는 baculovirus로부터 새로 발견된 linked inhibitors of apoptosis (IAP), CIAP1, CIAP2, survivin 등이 있다.¹³ 이들 중에서 survivin은 배아기와 태생기 시기에만 발현이 되고 정상적인 성인의 조직에서는 억제되어 발현되지 않았다가 대부분의 암에서 다시 발현한다는 독특한 특성이 있다. Survivin은 caspase-3, caspase-7 활동을 직접적으로 억제하고 또한 세포주기 중 G2/M에서 발현이 되는데 mitosis의 시작시기에 mitotic spindle의 microtubule의 기능을 억제하는 것과 연관되어 있다.⁹

그리고 p53 종양억제유전자는 인체종양에서 발견되는 가장 흔한 유전적 변화를 보이고,¹⁴ 17번 염색체의 단완에 위치하며 주된 역할은 다양한 기전에 의해 발생한 유전적 변이를 가진 세포의 복제, 증식을 억제하여 유전자를 보존하는 것이다.¹⁵ p53은 세포의 증식을 조절하는 cyclin-dependent kinase에 결합하여 세포주기의 진행을 저해하는 WAF1/Cip1의 발현을 촉진함으로써 세포주기를 G1 상태에 정지시켜 손상된 DNA를 복구할 시간을 벌어주고 세포고사를 유발시킨다.¹⁶ 그러므로 p53 유전자의 돌연변이로 인해 그 기능에 장애가 생기면 손상된 유전자를 정상적으로 복구하지 못하고 유전적 변이가 일어난 세포의 복제, 증식을 억제하지 못하게 되어 결국 암세포의 진행이 초래된다.

표재성방광암에서 생물학적 지표의 예후 판정의 가치에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다. 특히 p53이 방광암의 재발이나 진행에 있어 가장 중요한 예후인자라는 사실은 이미 많은 연구들에 의해 확립되어 있다.^{17,18} 그러나 p53과 표재성방광암의 진행과는 아무런 연관이 없다는 결과도 적지 않게 보고되고 있다.^{19,21} 그리고 경요도절제술과 방광 내 BCG요법으로 치료하고 재발과 진행의 위험이 높은 표재성 방광암 환자들을 대상으로 p53, MDM2, p21, Ki-6과 같은 다수의 종양억제유전자의 예후 판정의 가치를 분석한 연구 결과 의미 있는 정보를 독립적으로 제공하지 못했다.²² 저자들의 연구결과에서도 p53은 표재성방광암의 재발과 진행에 의미 있는 정보를 제공하지 못했다. 이러한 결과로 p53은 표재성방광암의 예후에 관한 유용한 정보를 제공하는지는 아직 의문시 되며 앞으로 새로운 평가에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

한편 IAP군 중 유방암, 위암, 직장암, 전립선암, 방광암

등에서 survivin 발현을 많이 보고하고 있다. 그 중 방광암에서 survivin 발현이 방광암의 재발, 진행 및 생존율을 예측할 수 있는 표지자로서 가치가 있는지에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. Swana 등²³은 방광암에서 survivin 발현율은 종양세포의 등급이 고등급으로 갈수록 높아진다고 보고하였으며 survivin 양성 발현군에서 음성 발현군에 비해 재발률이 높은 것으로 보고하였다. 그 외 Ku 등¹⁰은 survivin 과발현 (20% 이상 발현) 시 저발현인 경우와 비교하여 재발률과 진행률뿐만 아니라 생존율의 차이를 연구하였다. 연구결과 과발현군이 생존율에서 유의하게 낮은 결과를 나타냈고 survivin 과발현이 독립적인 예후인자의 하나가 될 수 있다고 보고하였다. Karam 등²⁴도 역시 survivin 발현 시 재발과 진행에 있어 고위험인자로 간주할 수 있다고 주장하였다. 이러한 연구 결과와 반대로 survivin 발현이 재발과 진행이라는 측면에서 예후인자가 될 수 없다는 연구도 있다. Nakanishi 등²⁵은 survivin의 양성 발현이 임상병리학적 측면에서 음성 발현군에 비해 유의한 차이가 없으므로 예후인자로서 가치가 없을 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 인체 방광의 표재성방광암에서 나이, 성별, 종양의 크기, 다발성, T 병기, 종양등급에 따른 survivin이나 p53의 발현여부는 유의한 차이가 없었다. 그러나 survivin에 양성을 나타낸 환자들에서 암의 재발률과 진행률이 통계적으로 유의하게 높았다. 그리고 무재발 및 무진행 생존율은 survivin 양성인 경우에서 그렇지 않은 경우보다 유의하게 낮았다. 반면 p53 양성인 경우는 음성인 경우와 유의한 차이가 없었다.

방광암에서 현재까지 널리 알려진 표지자인 p53이 재발과 진행에 연관성이 없었던 것에 비해 survivin은 표재성방광암의 재발과 진행을 예측할 수 있는 표지자로서 가치가 있을 것으로 생각한다.

결 론

인체 방광암 조직에서 p53 발현이 암의 재발과 진행에 관련이 없었던 것에 비해 survivin 발현 시 재발률과 진행률 그리고 무재발 및 무진행 생존율에서 유의한 차이를 나타냈다.

따라서 세포고사 억제인자인 survivin은 방광암의 재발과 진행을 예측할 수 있는 더 유용한 표지자로서 가치가 있을 것이다.

REFERENCES

1. Donat SM. Evaluation and follow-up strategies for superficial bladder cancer. Urol Clin North Am 2003;30:765-76

2. Lee ES, Lee CK, Lee C. Prognostic factors in superficial bladder tumor. *Korean J Urol* 1990;31:795-801
3. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, et al. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083-6
4. Fradet Y, Lacombe L. Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer? *Curr Opin Urol* 2000;10:441-5
5. Peyromaure M, Weibing S, Sebe P, Verpillat P, Toub Blanc M, Dauge MC, et al. Prognostic value of p53 overexpression in T1G3 bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin therapy. *Urology* 2002;59:409-13
6. Dalbagni G, Parekh DJ, Ben-Porat L, Potenzoni M, Herr HW, Reuter VE. Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2007;99:281-5
7. Akhtar M, Gallagher L, Rohan S. Survivin: role in diagnosis, prognosis, and treatment of bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 2006;13:122-6
8. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62
9. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20
10. Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, Lee SE. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004;171:631-5
11. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6
12. Bates S, Vousden KH. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:12-8
13. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:2168-74
14. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-27
15. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-67
16. Horowitz JM. Regulation of transcription by the retinoblastoma protein. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;6:124-31
17. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol* 1994;152:388-92
18. Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Fair WR, Herr HW, et al. Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guerin therapy: correlation to clinical outcomes. *J Clin Oncol* 1996;14:2646-52
19. Gardiner RA, Walsh MD, Allen V, Rahman S, Samarasinghe ML, Seymour GJ, et al. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *Br J Urol* 1994;73:526-32
20. Shiina H, Igawa M, Nagami H, Yagi H, Urakami S, Yoneda T, et al. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein, and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1996;78:1762-74
21. Pages F, Flam TA, Vieillefond A, Molinie V, Abeille X, Lazar V, et al. p53 status does not predict initial clinical response to bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in T1 bladder tumors. *J Urol* 1998;159:1079-84
22. Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Tetu B, et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res* 1999;5:4079-84
23. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-3
24. Karam JA, Lotan Y, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Shariat SF. Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2007;70:482-6
25. Nakanishi K, Tominaga S, Hiroi S, Kawai T, Aida S, Kasamatsu H, et al. Expression of survivin does not predict survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 2002;441:559-63