



## 두경부암 전이와 nm23-H1/NDP Kinase A와 CD44v8-10 유전자 발현과의 관계

Correlation of the Expression of nm23-H1/NDP Kinase A and CD44v8-10 with Head and Neck Cancer Metastasis

---

|                    |                                                                                                                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 저자<br>(Authors)    | 정현수, 송달원, 김영한, 안재현, 이인환<br>Hyun Soo Jeong, Dal Won Song, Young Han Kim, Jae Hyun Ahn, In Hwan Leel                                                       |
| 출처<br>(Source)     | <a href="#">대한체질인류학회지 13(1)</a> , 2000.3, 79-86 (8 pages)<br><a href="#">The Korean Journal of Physical Anthropology 13(1)</a> , 2000.3, 79-86 (8 pages) |
| 발행처<br>(Publisher) | <a href="#">대한체질인류학회</a><br>Korean Association of Physical Anthropologists                                                                               |
| URL                | <a href="http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE00556062">http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE00556062</a>                                                    |
| APA Style          | 정현수, 송달원, 김영한, 안재현, 이인환 (2000). 두경부암 전이와 nm23-H1/NDP Kinase A와 CD44v8-10 유전자 발현과의 관계. <a href="#">대한체질인류학회지</a> , 13(1), 79-86.                          |
| 이용정보<br>(Accessed) | 계명대학교<br>114.71.5.***<br>2016/09/22 14:49 (KST)                                                                                                          |

---

### 저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

### Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

## 두경부암 전이와 nm23-H1/NDP Kinase A와 CD44v8-10 유전자 발현과의 관계

정현수, 송달원, 김영한, 안재현, 이인환<sup>\*</sup>

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실, <sup>\*</sup>해부학교실

**간추림** : 두경부암 10례에서 증식과 전이에 관련된 유전자인 nm23-H1/NDP kinase와 CD44 두 유전자의 발현 양상을 nm23-H1/NDP kinase 단크론 항체 H1-203과 CD44variant 단크론 항체인 CD44v8-10을 이용하여 면역조직화학기법으로 실험하고 종양의 전이여부와 유전자 발현과의 관계를 조사하였다. 두경부암의 10례중 8례가 편평상피세포암 이었으며 이를 피부의 정상 상피 및 편평상피세포암과 비교하였다. nm23-H1/NDP kinase의 발현은 정상 상피에 비해 전반적으로 감소하였으며 원격전이가 있는 경우 더욱 낮은 발현을 보였다. CD44v8-10의 발현은 전이 유무에 따라 현격한 차이를 보여, 원격 전이가 있는 경우에는 거의 발현이 없었고 원격전이 및 림프절 전이가 없는 경우에는 강한 발현을 보였다. 전이가 전혀 없는 경우는 피부의 편평상피세포암의 성적과 일치하였으며 종양 자체내의 발현은 분화가 진행될수록 낮은 발현을 보였다. 결론적으로 두경부 종양에서 두 유전자는 항전이 유전자로서의 역할이 뚜렷하였다.

**찾아보기 낱말** : nm23-H1, CD44, 면역조직화학기법, 두경부암

### 서 론

nm23/NDP kinase 유전자는 전이성이 높은 피부 흑색종 K-1735 세포주에서 그 발현이 낮은 것에서 유래되어 발견된 유전자이며 반대로 전이성이 낮은 경우에 그 발현이 높았다(Steeg 등 1988). 두가지의 동형상(isotype)이 보고되어 있으며 사람의 형은 nm23-H1과 nm23-H2, 쥐의 형은 nm23-M1과 nm23-M2로 명명되어 있다(Stahl 등 1991, Urano 등 1992). 사람의 두 동형상에는 높은 상동성을 보이고 있으며 염색체 17q21-22 자리에 나란히 위치하고 있다(Chandrasekharappa 등 1993, Backer 등 1993). 이 두 동형상은 아미노산의 배열 뿐만 아니라 DNA염기서열, NDP kinase의 활성화에 이르기까지 아주 유사하나(82~89%), 세포의 종류에 따른 성장 및 분화의 정도에 따라 각기 독립적으

로 발현하고 있다(Okada 등 1996). 이중 nm23-H1은 다섯 개의 exon으로 구성되며 효소에 의한 절단 자리는 그림 1과 같다.

CD44 유전자는 selectin제의 당단백질로서 세포 바깥 부위, 세포막 부위 그리고 세포질 부위로 나뉘어지며, 세포바깥 부위(extracellular region)에서 변이가 형성되어 10가지의 이형상이 발현된다(Ruoslahti와 Yamaguchi, 1991). 이 변이는 RNA splicing variant로 지금까지 10가지의 변주가 알려져 있다. 이것은 세포의 유착, 인지, 이동 및 귀소성(homing)을 매개하며(Springer와 Lasky 1991) 증식 중인 세포에서 발현이 높아지며 세포막에서 세포내로의 물질 전달에도 관여하고 있다(Alho와 Underhill 1989).

이 두 유전자에 의한 단백질은 nm23-H1의 경우는 주로 세포질에, CD44 단백질의 경우는 주로 세포막에 분포하여 상이한 분포 양태를 보이고 있으나 다기능의 많은 부분에서 중첩되어있다(Keim 등 1992). 특히 종양에서는 세포의 증식과 전이에

<sup>\*</sup> 본 연구는 1996년도 아주대학교 의료원 정책연구비에 의하여 수행되었음.

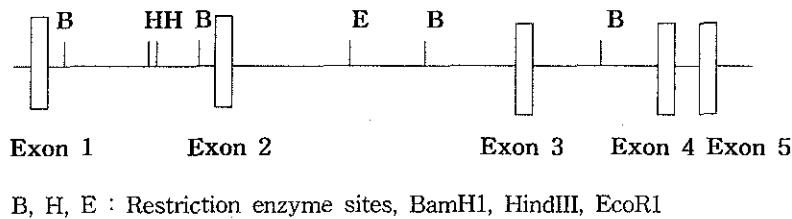


Fig. 1. nm23-H1 genomic organization.

동시에 관여하고 있어 그 관련성을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

생검 및 절제술로 얻은 두경부 암조직 10례를 이용하였으며 이중 편평상피세포암이 8례였다(표 1). 대조군으로는 정상 상피조직과 피부의 편평상피세포암 조직을 이용하였다.

Table 1. Material Distribution

| Cell Type                   | No |
|-----------------------------|----|
| Squamous cell carcinoma     | 8  |
| Undifferentiated carcinoma  | 1  |
| Thyroid papillary carcinoma | 1  |

### 1. 면역조직화학적기법

암조직은 고정과 탈수를 거쳐 파라핀으로 포매하고 5 $\mu$ m의 절편을 만들어 면역조직화학적기법에 사용하였으며 사용된 일차항체는 일본 나가사키의대 종양의학교실로부터 구입한 단클론항체인 antinm23-H1/NDPkinaseA (H1-203)과 anti CD44 splicing variants8-10 (CD44v8-10)을 사용하였다. 각 암조직의 절편을 슬라이드에 붙이고 실렌에 10분씩 두 번 처리하여 파라핀을 제거하고 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 든 methanol에 옮겨, 실온에서 20분간 방치한 후 phosphate buffer saline (PBS)에 5분씩 3회 수세하였다. 3% 정상 염소 혈청으로 20분간 처리하여 내재한 페루시다제의 활성을 차단하였다. 0.1% BSA/PBS로 1,000배 희석한 일차항체를 실온에서 3시간 작

용시킨후 PBS로 5분씩 3회 수세하였다. 사람의 nm23-H1과 CD44v8-10 단백질을 검출하기 위해 biotin conjugated goat anti-rat IgG를 이차항체로 하여 30분간 작용시킨후 3-3' diaminobenzidine tetra-chloride (DAB)로 발색하고 Harris hematoxylin으로 대조염색하고 탈수하여 봉입하고 Nikon 현미경에서 100배, 400배로 검경하였다.

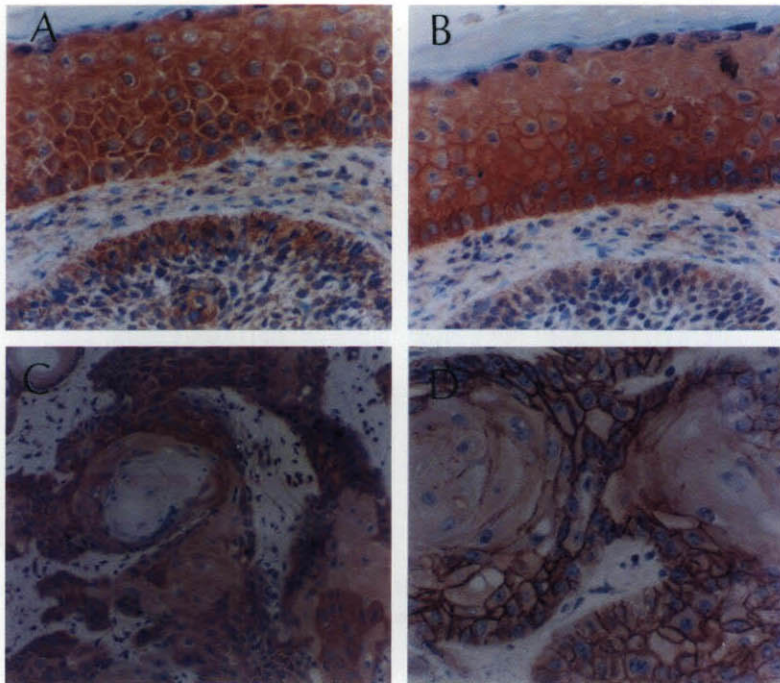
## 결 과

대조군으로 사용한 정상 상피의 nm23-H1과 CD44v8-10 발현 강도를 임의적으로 [++]로 하고 더 강하면 [+++], 약하면 [+], 구역에 따라 약하게 발현하거나 없을 경우 [±]로 하였다(그림 2A, 2B).

피부 편평상피세포암을 또 다른 대조군으로 하였을 경우 nm23-H1 발현은 +/- (그림 2C), CD44v8-10의 발현은 +++/++++였다(그림 2D). 두경부 종양중 원격 전이된 경우(case 9, 10)에서는, nm23-H1 및 CD44v8-10 모두 아주 낮거나 발현이 되지 않았다(그림 3, 4). 원격 전이 및 림프절 전이도 없는 경우(case 6, 7)에서는 nm23-H1의 발현은 정상 대조군인 정상 상피에서보다 낮은 발현을 보였으며 CD44v8-10의 발현은 정상 대조군 정도이거나 강하여 피부의 편평상피세포암의 경우와 유사하였다(그림 5, 6).

암 종괴내에서도 분화가 진행된 중심부에서 nm23-H1과 CD44의 발현이 빠른 성장을 보인 주변부위보다 아주 낮은 발현을 보였다(그림 5).

편평상피세포암외에 미분화암종과 감상샘 유두암종에서는 nm23-H1의 발현이 다소 낮아졌으며



**Fig. 2.** Immunohistochemical stainings for expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in control A: nm23-H1 in normal epidermis, B: CD44v8-10 in normal epidermis, C: nm23-H1 in skin squamous cell carcinoma, D: CD44v8-10 in skin squamous cell carcinoma  $\times 100$ .

**Table 2.** Relative expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in head and neck cancers

| Case      | nm23     | CD44   | Metastasis | Cell type             |
|-----------|----------|--------|------------|-----------------------|
| 1         | +        | +/++   | N1         | Squamous cell ca.     |
| 2         | -/ $\pm$ | ++/-   | M(+)       | Squamous cell ca.     |
| 3         | +        | +/++   | N2         | Squamous cell ca.     |
| 4         | +/++     | +/++   | N0         | Squamous cell ca.     |
| 5         | +        | -      | N3         | Undifferentiated ca.  |
| 6         | +        | +/++++ | N0         | Squamous cell ca.     |
| 7         | +/+      | +/++++ | N0         | Squamous cell ca.     |
| 8         | $\pm$    | -      | M(+)       | Thyroid papillary ca. |
| 9         | -/ $\pm$ | -      | M(+)       | Squamous cell ca.     |
| 10        | -/ $\pm$ | -/+    | M(+)       | Squamous cell ca.     |
| Control 1 | ++       | ++     |            | Normal skin epidermis |
| Control 2 | +/+      | +/++++ |            | Squamous cell ca.     |

- : negative expression  
 $\pm$  : weak or negative expression  
+ : weak expression  
++ : standard expression level in normal epidermis  
+++ : strong expression  
N : regional lymph node metastasis  
M : distant metastasis  
ca. : cancer

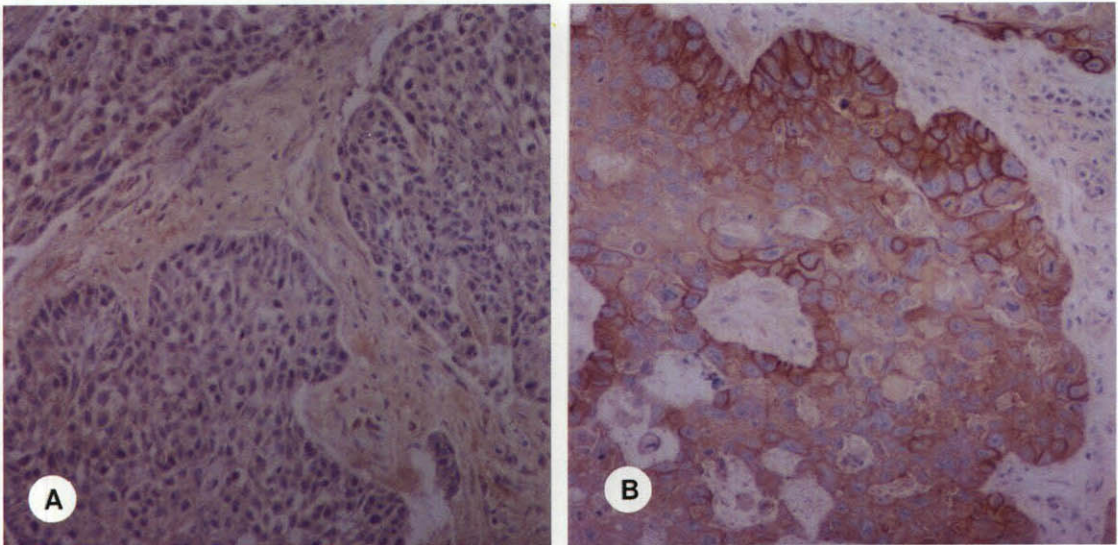
CD44v8-10의 경우에는 거의 발현되지 않았다 (표 2).

## 고 찰

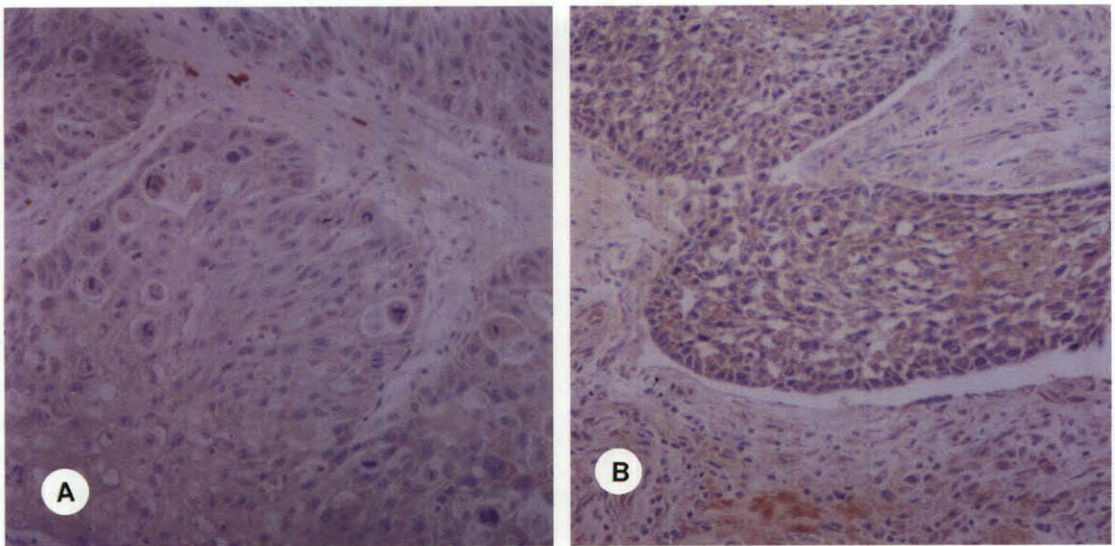
악성종양에 있어서 전이와 관련된 유전자를 알아내어 병의 치료에 적용시키려는 연구들이 활발하게 진행되어 오고 있고 이 중 특히 nm23/NDP kinase와 CD44 유전자에 대한 분자생물학적 구조가 밝혀지면서 이들의 생물학적 기능에 대한 연구도 활발해지고 있다.

nm23/NDP kinase의 동형상중 하나인 nm23-H1 유전자는 쥐의 흑색종 세포주인 K-1735의 비전이주에서 발현되는 유전자와 동일한 성상을 가지며 NDP kinase A의 활성화와 유사하다 (Urano 등 1992). 그러나 이런 유전자 발현은 모든 종양에서 일정하지 않으며, 다른 동형상인 nm23-H2와 더불어 몇





**Fig. 3.** Immunohistochemical stainings for expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in metastatic squamous cell cancer. (case 9) The expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 were decreased in metastatic squamous cell cancer. A: nm23-H1, B: CD44v8-10  $\times$  100.



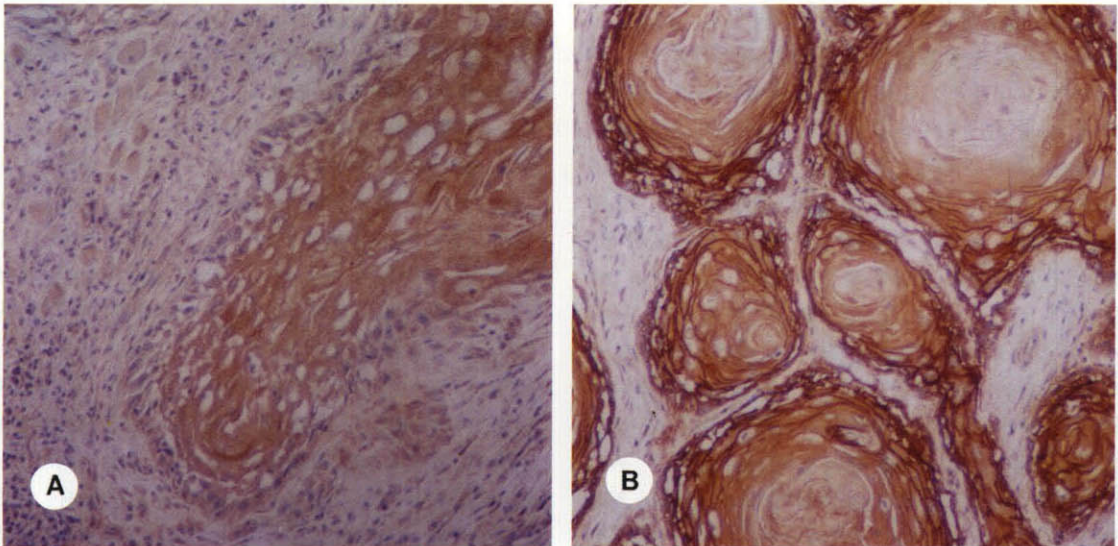
**Fig. 4.** Immunohistochemical stainings for expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in metastatic squamous cell cancer. (case 10) The expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 were decreased in metastatic squamous cell cancer. A: nm23-H1, B: CD44v8-10  $\times$  100.

몇 종양에서 종양세포의 전이에 관련하여 전혀 별개의 발현을 보이고 있다(Okada 등 1996). 세포 증

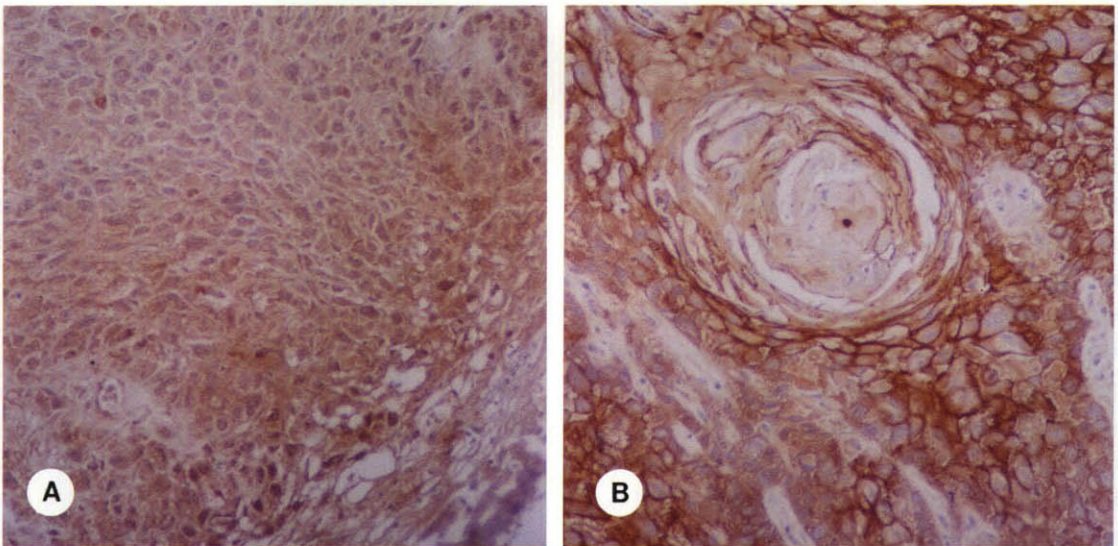
식과 관련된 nm23-H1의 발현은 대개 일치하며 증식이 왕성할 때 높은 발현을 보이다가 분화가



— 두경부 암조직에서 nm23과 CD44의 발현 —



**Fig. 5.** Immunohistochemical stainings for expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in non-metastatic squamous cell cancer. (case 6)  
The expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 were increased in non-metastatic squamous cell cancer. A: nm23-H1, B: CD44v8-10  $\times 100$ .



**Fig. 6.** Immunohistochemical stainings for expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 in non-metastatic squamous cell cancer. (case 7)  
The expressions of nm23-H1 and CD44v8-10 were increased in non-metastatic squamous cell cancer. A: nm23-H1, B: CD44v8-10  $\times 100$ .

진행되면 발현이 아주 감소한다(Keim 등 1992). 이런 성적은 백혈병 세포주를 인위적으로 분화를 유

도하였을 경우도 단백질 및 mRNA 모두 발현이 저하되었다(Yamashiro 등 1994).

두경부 편평상피암의 nm23-H1의 발현 양상은 정상 상피의 발현에 비해 전반적으로 감소하였으며 전이가 있는 경우 그 감소가 더욱 두드러졌다. nm23-H1에 대한 연구는 유방암세포에서 많이 행해졌는데 Yamashita(1993)는 비침습성 유방암에서 nm23-H1의 발현이 림프절 전이와 관련되는데 반해 nm23-H2의 발현은 림프절전이 보다 암세포의 성장과 관련된다고 주장하였으며 그의 유방암에 대한 다른 연구에서도 nm23-H1이 유방암의 전이 억제유전자로서의 기능을 한다는 것은 현재 일반적으로 인정되어지고 있다. 그러나 nm23의 발현이 림프절 전이와 아무런 관련이 없다는 연구도 있다 (Sastre-Garau 등 1992). 저자들의 연구에서는 두경부 편평상피세포암의 nm23-H1/NDP kinase A의 발현양상은 정상 상피세포에서의 발현에 비해 감소했으며 전이가 있는 경우 그 감소가 두드러져 항전이 유전자로서의 역할을 하는 것으로 생각된다.

CD44 발현으로 형성되는 막투과 당단백질은 hyaluronan, 세포의 기질, 성장 인자 등과 결합하며 10가지 exon에 대한 교대접합 (alternative splicing)으로 여러 가지 이형상이 발현된다 (Ruoslahti 등 1991). 이런 이형상은 정상 피부에서도 발현된다 (그림 4B). 이 유전자의 발현은 분화와 역으로 일어나며 구강상피의 종말분화된 편평상피암의 경우 현저한 발현 감소를 보인다 (Hudson 등 1995). 전이의 관점에서, CD44v8-10 양성인 종양은 음성에 비해 혈행성 전이를 잘 일으키며 이런 발현은 위암에서 특징적이다 (Yamaguchi 등 1995). 두경부 암에서는 이와는 상반된 결과로 전이가 진행될수록 낮은 발현을 보였다. CD44 유전자의 종양성장과 전이에 관련된 보고로, Stamenkovic 등 (1991)은 CD44 단백질에 대한 항체를 전립샘 암세포에 투여하여 세포의 증식을 억제시키고 기저막의 세포침투를 억제시켜 CD44 단백질이 암세포의 성장능과 전이능에 직접적으로 관여함을 증명하였다 (Lokeshwar 등 1995). 신장암에서도 CD44v10의 발현이 암의 성장에 관여하며 분화와 반대되는 결과를 보여 두경부암에서와 같은 성적을 보였다 (Kan 등 1995). CD44가 어떤 기전으로 종양의 악성표현형에 역할을 하는지는 확실하지 않지만 CD44의 큰분자량

때문에 세포가 hyaluronic acid에 강하게 부착하게 하여 종양의 착상에 도움을 주게되어 전이의 가능성을 높이게 한다고 생각하고 있다. Birch 등 (1991)은 흑색종에서 CD44의 발현이 높은 세포는 응집력이 증가하고 hyaluronic acid 기질에 부착력이 강하였으며 이 때 CD44가 중요한 역할을 한다고 하였다. Guo 등 (1994)은 위암세포 및 대장암세포에서 혈청 중 CD44의 농도는 전이 정도와 비례한다고 하였고 Yamaguchi 등 (1995)은 위암세포 중 그 농도와 전이정도가 역시 비례한다는 것을 밝혔다. 그리고 Li 등 (1995)은 뇌종양세포 연구에서 CD44가 전이촉진인자라는 것을 증명한 바 있다. 그러나 저자들의 연구에서는 CD44의 발현이 대조군과 비교하여 전이를 한 두경부 편평상피세포암에서 오히려 현저히 감소하였다. Case 6, 7에서와 같이 전이를 하지 않은 경우에서 정상 대조군에 비해 강한 발현을 보인 반면 case 9, 10에서와 같이 전이가 있는 경우 현저히 감소된 발현을 보였다.

두경부 편평상피세포암에 대한 저자들의 연구는 nm23, CD44 모두 전이가 있는 경우 발현이 감소하였으며 이는 이전의 다른 종양에서의 연구결과와 nm23에서는 일치하였으나 CD44의 경우는 상반되는 결과로 두경부암에서 특이적이다 (Brich 등 1991, Leone 등 1991, Yamaguchi 등 1995). 이것은 향후 두경부종양의 증식 및 분화 정도, 종양의 전이정도에 따른 특이적 유전자의 발현에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Alho AM, Underhill CB : The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J Cell Biol* 108: 1557-1565, 1989.
- Backer JM, Mendola CE, Kovacs I, Fairhurst JL, O'Hara B, Eddy Jr RL, *et al.* : Chromosomal location and nucleoside diphosphate kinase activity of human metastasis-suppressor gene NM23-1 and NM23-2. *Oncogene* 8: 497-501, 1993.
- Birch M, Mitchell S, Hart IR : Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res* 51: 6660-6665, 1991.

- Chandrasekharappa SC, Gross LA, King SE, Collins FS : The human NME2 gene lies within 18 kb of NME1 in chromosome 17. *Gene Chromosomes Cancer* 6 : 245-248, 1993.
- Guo YJ, Liu G, Wang X, Jin D, Mengchao W, Jing M, *et al.* : Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 54 : 422-426, 1994.
- Hudson DL, Speight PM, Watt FM : Altered expression of CD44 isoforms in squamous cell carcinoma and cell lines derived from them. *Oncol Rep* 66 : 457-463, 1995.
- Kan M, Aki M, Akiyama K, Naruo S, Kanayama H, Kagawa S : High level expression of the CD44 variant sharing exon v10 in renal cancer. *Jpn J Cancer Res* 72 : 847-853, 1995.
- Keim D, Hailat N, Melhem R, Zhu X, Lascu I, Veron M, *et al.* : Proliferation-related expression of p19/NM23 nucleotide phosphate kinase. *J Clin Invest* 89 : 919-924, 1992.
- Leone A, Flatow U, King C, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA, *et al.* : Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of NM23-transfected melanoma cells. *Cell* 65 : 25-33, 1991.
- Li H, Liu J, Hoffman M : Differential CD44 expression patterns in primary tumors and brain metastasis. *Brit J Cancer* 72 : 160-164, 1995.
- Lokeshwar BL, Lokeshwar VB, Block NL : Expression of CD44 in prostate cancer cells : association with cell proliferation and invasive potential. *Anticancer Res* 15 : 1191-1198, 1995.
- Okada K, Urano T, Goi T, Baba H, Yamaguchi A, Furukawa K, *et al.* : Isolation of human NM23 genomes and analysis of loss of heterozygosity in primary colorectal carcinomas using a specific genomic probe. *Cancer Res* 54 : 3939-3842, 1996.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y : Proteoglycans as modulators of growth factor activity. *Cell* 64 : 867-870, 1991.
- Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M, Vevon M, Magdelen H : Nucleoside diphosphate kinase/nm23 expression in breast cancer. Lack of correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 50 : 533-537, 1992.
- Springer TA, Lasky LA : Sticky sugars for selectins. *Nature* 349 : 196-197, 1991.
- Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS : Identification of a second human NM23 gene, NM23-H2. *Cancer Res* 51 : 445-449, 1991.
- Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B : The hematopoietic and epithelial forms of CD44 and distinct polypeptides with different adhesion potential for hyaluronate bearing cells. *EMBO J* 10 : 343-348, 1991.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, *et al.* : Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 80 : 200-204, 1988.
- Urano T, Takamiya K, Furukawa K, Shiku H : Molecular cloning and functional expression of the second mouse NM23/NDP kinase gene, NM23-M2. *FEBS Lett* 309 : 358-362, 1992.
- Yamashiro S, Urano T, Shiku H, Furukawa K : Alteration of nm23 gene expression during the induced differentiation of human leukemia cell lines. *Oncogene* 9 : 2461-2468, 1994.
- Yamaguchi A, Saito M, Goi T, Iida A, Takeuchi K, Hirose K : Expression of CD44 variant exons 8-10 in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 86 : 1166-1171, 1995.
- Yamashita H : Analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 84 : 871-875, 1993.



**Abstract**

**Correlation of the Expression of nm23-H1/NDP Kinase A and CD44v8-10 with Head and Neck Cancer Metastasis**

Hyun Soo Jeong, Dal Won Song, Young Han Kim, Jae Hyun Ahn, In Hwan Lee<sup>1</sup>

*Department of Otolaryngology & <sup>1</sup>Anatomy, School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*

The expressions of nm23-H1/NDP kinase and CD44 genes which are associated with tumor proliferation and metastasis, in 10 cases of head and neck cancer were studied by immunohistochemistry using monoclonal antibody H1-203 and CD44v8-10. And the relationship between the expressions of two genes and cancer metastasis was studied. Eight cases out of 10 head and neck cancers were squamous cell carcinomas. Normal skin epidermis and squamous cell carcinoma of the skin were used as control.

The expression of nm23-H1/NDP kinase A was decreased generally in head and neck cancer comparing with normal epidermis, and more decreased in metastatic head and neck cancer. CD44v8-10 was shown strong expression in non-metastatic head and neck cancer but weak or no expression in metastatic head and neck cancer. With differentiation of tumor tissue, the expression of CD44v8-10 gene decreased. These results suggest that nm23-H1/NDP kinase and CD44 genes play a role as inhibitor to metastasis in head and neck cancer.

**Key words :** nm23-H1, CD44, Immunohistochemistry, Head and neck cancer