

## 자궁경부암종에서 암 전이의 조기 발견을 위한 면역조직화학 연구

박관규 · 권선영 · 제갈문영 · 한상미  
장은숙 · 차순도<sup>1</sup> · 한인숙<sup>2</sup>

계명대 병리학교실, 산부인과학교실  
경북대 면역학교실

접 수 : 2001년 4월 20일  
게재승인 : 2001년 7월 27일

책임저자 : 박 관 규  
우 700-712 대구시 중구 동산동 194  
계명대 병리학교실  
전화 : 053-250-7465  
Fax : 053-250-7852  
E-mail : park1234@dsmc.or.kr

\*이 연구는 학술진흥재단의 '98 중점기초연구  
구비로 이루어졌음.

### Early Detection of Metastasis by Immunohistochemistry in Uterine Cervical Carcinoma

Kwan Kyu Park, Sun Young Kwon, Eun Sook Chang, Moon Young Jegal  
Sang Mi Han, Soon Do Cha<sup>1</sup> and In Sook Han<sup>2</sup>

Departments of Pathology, <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, Keimyung University School of Medicine; <sup>2</sup>Department of Immunology, Kyungpook National University, Daegu, Korea

**Background :** Adhesion molecules are important in the maintenance of normal epithelial structure, and altered expression of these molecules may be important in epithelial tumors, particularly in the processes of invasion and metastasis. **Methods :** We have examined the expression of E-cadherin, cathepsin-D, CD44, CD44v6, nm23 and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) proteins in the cervical squamous cell carcinoma to evaluate the prognostic significance of these molecules. **Results :** Immunostain for E-cadherin was highly expressed in the majority of cases of cervical carcinomatous lesions (85.7-100%), but cathepsin-D was very low (7.1-32%). Immunostain for CD44 showed a lower expression in invasive carcinoma with and without metastasis (50.4 and 52.2%) than in carcinoma in situ (68.0%). CD44v6 protein showed some controversy of expression between invasive carcinoma with metastasis (35.7%) without metastasis (56.5%). Staining for nm23 was observed in the high expression of invasive lesions (85.7%). TGF- $\beta$ 1 and C-erbB-2 protein were highly expressed, especially in the microinvasive carcinoma (81.8%, 42.8%, respectively). **Conclusions :** These results suggest that CD44 and CD44v6 were not highly expressed in the invasive squamous carcinoma of the uterine cervix. However, it is notable that TGF- $\beta$ 1 and c-erbB-2 in the microinvasive carcinoma and nm23 in invasive carcinoma were highly expressed compared to these of the other lesions of the uterine cervix.

**Key Words :** Metastasis, Cervix uteri, Squamous cell carcinoma, Immunohistochemistry

최근 자궁경부암종은 세포학의 발달과 세포검진으로 인해 조기 발견되는 비율이 높아져 사망률이 많이 감소되고 있지만, 아직도 우리나라 여성 암의 가장 높은 빈도를 차지한다.<sup>1</sup> 자궁경부암종으로 인한 사망의 가장 큰 원인은 암 세포의 주위 조직 혹은 혈관 내 침윤에 따른 다른 장기로의 전이 때문이다.<sup>2</sup> 따라서 어떤 종양이 생물학적으로 전이할 수 있다는 것을 미리 예견할 수 있다면, 환자의 예후를 개선할 수 있는 조치를 취할 수 있을 것이다. 이러한 이유로 지금까지 암 전이와 관련된 표지인자를 찾기 위한 많은 연구가 시도되고 있다. 현재까지 알려진 예후 관련 인자들은 종양의 종류, 크기, 병기, 주위 실질조직으로의 침윤 정도, 조직학적 분화도 등이며, 특히 최근 면역조직화학적 방법을 통하여 예후에 영향을 미치는 인자를 찾기 위한 노력이 시도되고 있다.<sup>1,2</sup> 특히 종양 세포에서 성장 및 억제인자,

단백질분해효소, 부착분자(adhesion molecule), 맥관형성인자 등의 다양한 요소가 종양의 진행이나 분화도 혹은 전이에 영향을 미칠 수 있다고 생각한다.<sup>2</sup> 지금까지 개개의 인자에 대한 연구들을 종합해 보면 대체로 어느 한 인자가 예후 등에 역할을 미치는 것이 아니고 여러 인자들이 복합적으로 관여할 것으로 추측된다. 이 중에서 현재까지 전이와 관련하여 연구하고 있는 대상 분자로는 c-erbB-2, nm23, E-cadherin, cathepsin D, CD44 등이 있다.<sup>2</sup> 그러나 연구자에 따라 혹은 종양이 발생하는 장기에 따라 서로 상이한 연구결과가 발표되고 있는 바, 아직도 어느 분자가 전이에 관여하는지 뚜렷이 밝혀져 있지 않다.

최근 종양의 성장과 전이에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되고 있는 CD44는 세포의 기질 및 세포 사이의 상호작용에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 혈구형성, 림프구 및 세포의 이주

와 전이에도 관여하는 세포표면 당단백이며, 구조적으로 최대 20 exon으로 구성된다.<sup>3</sup> Exon 5-15 사이에 구성되는 10개의 exon은 변이(variant) exon으로 불려지고 교대성 짜집기(alternative splicing)에 의해 형성된다. 최근 CD44 변이체 중 하나인 CD44v6는 비전이성 암 세포가 전이능력을 가지게 하는 데 관여하고, 결장암, 위암, 유방암, 뇌암 등의 전이성 종양에서 발현된다고 알려져 있다.<sup>4-6</sup> 따라서 부인과 중앙질환에서의 CD44의 발현도 전이성 암종에서 그 발현이 증가할 것으로 추측된다.

본 연구의 목적은 표준형 및 변이형의 CD44 발현 양상이 악성 종양 및 전이 여부에 따라 어떻게 나타나는지를 관찰하고, 또한 면역조직화학 방법을 통한 세포부착분자들의 발현 및 발현 양상과 조직학적 변화, 분화도, 침윤 정도, 전이 등과의 상호 비교를 통해 어떤 관계가 있는지를 규명하는 데 있다. 또한 CD44 분자에 대한 정보를 바탕으로 종양의 조기 면역조직화학적 진단과 치료에 CD44v6 항체와 그것의 항체분절들이 실제 응용될 수 있는지를 조사하고, 이를 위하여 CD44v6의 단클론항체의 IgG, Fab 및 scFv (single chain Fv fragment) 항체분자들을 생산하고 정제하여 각각의 특이성을 자궁경부암종 조직에 대한 면역검색으로 조사하였다.

## 재료와 방법

### 재료

1996년부터 1998년까지 계명대학교 동산의료원에서 시행한 자궁절제술 및 원뿔절제술 중 침습암종 37예, 미세침습암종 14예, 그리고 상피내암종 25예를 대상으로 하였다. 침습암종 37예 중 림프절 전이를 동반한 경우는 23예였다. 이들 76예 모두는 항암치료 혹은 방사선 치료를 시행 받기 전에 절제된 것들이다. 이들을 대상으로 통상적인 HE 염색을 하였고 전이에서 면역조직화학 염색을 시행하였다.

### 방법

#### CD44v6의 단세포군 항체 생산

복수액 생산을 위해 14-15주째 Balb/C mouse에 먼저 300  $\mu$ L의 incomplete adjuvants 용액을 복강내 주사하였다. 3일 후 CD44v6 hybridoma 세포(ATCC HB-256)를  $4 \times 10^6$  cells/mouse 농도로 복강내 주사하였다. 주사 7-10일 사이에 생성된 복수를 주사기로 뽑아내어 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다.

세포배양은 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 dulbecco's modified eagle media (DMEM) 배양액(Life Technologies, Grand Island, U.S.A.)에 CD44v6 hybridoma 세포(농도  $\times 10^6$  cells/mL)를 넣고 약

20일간 low stirring 용기에서 배양하였다. 상층이 거의 노란색에 가까워졌을 때 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상층액만 수거한 뒤 25 kDa 영역의 투석봉지에 넣고 phosphate buffered saline (PBS)로 투석하였다.

#### CD44v6-IgG 분리 및 -Fab, -scFv 생산

CD44v6 단세포군 항체 중 IgG를 분리하기 위하여 Affi-gel protein A agarose 컬럼(Bio-Rad, Hercules, U.S.A.)을 사용하였다. 1 mL agarose를 컬럼에 넣고 10 mL binding buffer (10 mM sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 8.2)로 평형을 유지하였다. 분리할 항체는 10 mL binding buffer에 희석하고 컬럼에 실었다. 10 mL binding buffer로 컬럼을 더 씻은 다음, 5 mL의 0.1 M sodium citrate (pH 3.0)로 전개하였다. 전개용액은 곧바로 200  $\mu$ L의 2 M Tris-HCl (pH 8.5)을 첨가해 중화시키고, PBS에 바로 투석하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 IgG 분리를 확인하였다.

Immobilized Ficin과 10 mM cysteine (Pierce, Rockford, U.S.A.)을 이용하여 IgG로부터 CD44v6-Fab를 제조하였다. IgG와 Ficin 비율을 11:1로 위에 언급된 컬럼과 조건으로 37°C에서 5시간 배양하였다. 배양 후 protein A에 결합되지 않은 fraction을 수거하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

CD44v6 hybridoma 세포의 total RNA를 RNAzolB (TEL-TEST, Friendswood, U.S.A.)를 이용하여 추출하고, UV Spec (Beckman, Urbana, U.S.A.)으로 RNA의 순도와 정제된 양을 계산하였다. Recombinant Phage Antibody System (Pharmacia, Peapack, U.S.A.)중 Mouse scFv Module을 이용하여 역전사 증합효소연쇄반응을 시행하고 연이어 CD44v6-scFv 재조합항체 유전자의 cDNA를 합성하였다. scFv 분자의 중사슬과 경사슬의 길잡이 키트를 각각 첨가하고 증합효소연쇄반응을 시행하였다. 증폭된 DNA를 각각 회수하여 4개 glycine과 1개 serine이 한 단위로 3번 반복된(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> linker DNA를 이용하여 중사슬과 경사슬의 가변영역을 서로 연결시켰다. 최종 증폭된 DNA는 제한효소 Sfi I과 Not I으로 처리한 후 pRsetA 벡터에 넣어 클로닝하였다. 클로닝이 확인된 DNA는 isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG)를 처리하고 scFv 재조합 항체 생산을 유도하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 재조합된 단백질의 확인을 위해 anti-His-tag (Promega, Madison, U.S.A.) 단세포군 항체로 western-blotting을 실시하고, His-tag (Promega, Madison, U.S.A.) 컬럼을 사용해서 분리 정제하였다.

#### 항체분절들(IgG, Fab, scFv)의 특이성 검색

CD44v6의 각종 항체분절의 특이성은 재조합 CD44v6 단백질에 대한 상대적 친화도로 결정하고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하였다. Microtiter plate (Dynex

Technologies, Chantilly, U.S.A.)의 각 well당 50  $\mu$ L의 CD44v6 단백질 용액(1  $\mu$ g/mL)으로 12시간 동안 피복하였다. 각 농도별로 희석된 단백질에 동량의 항체분절들을 가한 다음, 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 PBS로 세척 후 anti-mouse IgG-HRP (DAKO, Carpinteria, U.S.A.) 이차 항체로 다시 실온에서 1시간 반응시킨 후 orthophenylenediamine (OPD) 기질로 발색하고, ELISA reader로 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 친화도를 비교하였다.

**면역조직화학 염색**

파라핀에 포매된 조직으로부터 5  $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 유리슬라이드에 부착한 후 100% 크실렌에서 탈파라핀하고, 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수 과정을 거쳐서 증류수에 5분간 수세하였다. 내인성 과산화효소의 억제를 위하여 100% 메탄올에 과산화수소수 0.3%를 혼합하여 30분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 10 mM citrate (pH 6.0) 완충액에 담가 5분간 두차례 극초단파 처리 후 실온에서 냉각시키고 PBS로 수세하였다. 일차 항체인 E-cadherin (Zymed, South San Francisco, U.S.A.), cathepsin-D (Zymed, South San Francisco, U.S.A.), C-erbB-2 (Zymed, South San Francisco, U.S.A.), Laminin (DAKO, Carpinteria, U.S.A.), nm23 (DAKO, Carpinteria, U.S.A.), TGF- $\beta$  (DAKO, Carpinteria, U.S.A.), VCAM (DAKO, Carpinteria, U.S.A.), CD44 (Zymed, South San Francisco, U.S.A.),

CD44v6 (Zymed, South San Francisco, U.S.A.) 및 자체 제작한 CD44v6-Fas, CD44v6-scFv를 각각 1:100으로 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 이차 항체인 biotinylated link antibody (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)로 37°C에서 15분간 반응시켜 PBS로 수세하고 streptavidin biotin complex (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)으로 37°C에서 15분간 반응시켰다. Imidazole buffer와 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) chromogen (DAKO, Carpinteria, U.S.A.)을 1:1로 혼합하여 발색시킨 후 수세하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

**결과 판정 및 분석**

면역조직화학 염색의 판독은 광학현미경으로 관찰하여 핵 혹은 세포질에서 갈색의 발색이 있으면 양성으로 판정하였다. 400배 배율로 관찰하여 적어도 500개의 중양 세포에서 확실히 양성으로 관찰되는 세포수의 백분율로 점수를 매겨서 중양 세포수 대비 양성 세포수로 계산을 하였으며, 양성과 음성으로 판정하는 데 있어서 5%를 기준으로 사용하였다. 항체분절들(IgG, Fab, scFv)간의 친화도 차이를 알아보는 데는 Duncan's multiple range test를 이용하였으며, *p*값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

**결 과**

**CD44v6-IgG, -Fab, -scFv의 생산 및 분리정제**

CD44v6-IgG의 양은 Balb/C mouse에 CD44v6 hybridoma 세포를 주입하고 얻은 복수액 1 mL와 세포배양액 10 mL에 내재된 양과 비슷하였고 수율은 1 mg/mL 세포배양액 정도였다. Affi-gel protein A agarose 컬럼을 통해 150 kDa의 IgG를 분리하였고, Ficin 컬럼을 이용해서 CD44v6-Fab를 생산하고 50 kDa의 Fab를 분리 정제하였다(Fig. 1). IgG에서 Fab의 생산수율은 대략 30-40% 정도였다. CD44v6에 대한 생쥐 단세포군 항체를 생산하는 hybridoma 세포로부터 750 bp의 scFv cDNA를 얻어 재조합항체 CD44v6-scFv를 유도하고 27-31 kDa 영역의 CD44v6 항체분절 scFv를 분리 정제하였다(Fig. 2).

**항체분절들(IgG, Fab, scFv)의 특이성 비교**

자연 상태 하에서 분리된 가용성 CD44v6 재조합 단백질에 대한 IgG, Fab 및 scFv의 상대적 친화도는 Fig. 3과 같다. ELISA 결과에서, 항원 즉 CD44v6 재조합 단백질의 농도에 상관없이 CD44v6-IgG가 -Fab와 -scFv들 보다 더 큰 친화도를 나타내었으며, -Fab와 -scFv들 간의 친화도는 차이가 없었다.

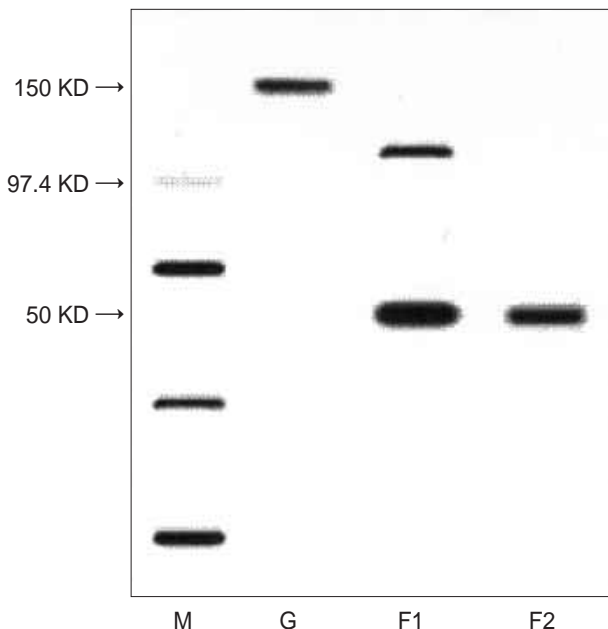


Fig. 1. Purification of IgG and Fab antibody molecules. M: size marker, G: purification of IgG by protein A affinity chromatography, F1: mixed fragments of Fab, F (ab) and IgG, F2: purified Fab fragment by Ficin and protein A column chromatography.

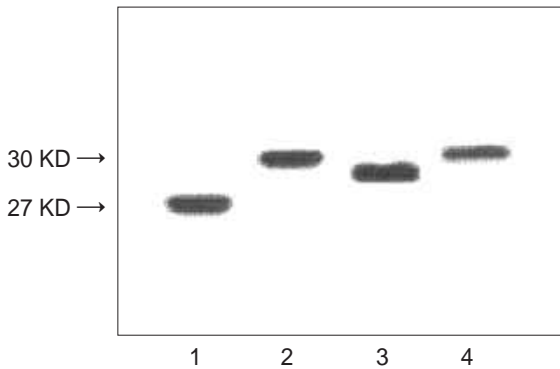


Fig. 2. Identification of four scFvs with anti-His tag antibody.

Table 1. Immunohistochemical results of positive staining in cervical carcinoma

Antibody	Invasive SCC with metastasis N=14 (%)	Invasive SCC without metastasis N=23 (%)	Microinvasive carcinoma N=14 (%)	Carcinoma <i>in situ</i> N=25 (%)
E-cadherin	12 (85.7)	23 (100)	13 (92.8)	23 (92.0)
Cathepsin-D	1 (7.1)	3 (13.1)	3 (21.4)	8 (32.0)
CD44	7 (50.4)	12 (52.2)	9 (64.2)	17 (68.0)
CD44v6	5 (35.7)	13 (56.5)	7 (50.0)	10 (40.0)
C-erbB-2	2 (14.3)	2 (8.7)	6 (42.8)	5 (20.0)
Nm23	12 (85.7)	19 (82.6)	7 (50.0)	11 (44.0)
TGF-β1	7 (50.0)	6 (26.1)	11 (78.5)	7 (28.0)

SCC: squamous cell carcinoma, N: number of cases done, TGF β1: transforming growth factor-β1.

면역조직화학 염색

자궁경부암종조직에 대한 E-cadherin의 발현은 전이성 침습암종, 미세침습암종 그리고 상피내암종에서 모두 85% 이상의 높은 발현율을 보였으며, 특히 비전이성 침습암종에 대해서는 100%의 발현율을 나타내었다(Table 1). E-cadherin의 발현양상은 세포막을 따라 염색되었고(Fig. 4), 정상 외자궁경부 편평상피세포의 중간 및 기저 세포층에서 발현되었으며, 표층 세포층에서는 발현이 감소되었다. 또한 종양의 분화도에 따른 발현의 차이는 관찰되지 않았다.

Cathepsin D와 c-erbB-2의 경우는 암종과 관계없이 전반적으로 낮은 발현율을 보였다. 특히 침습암종에서는 10% 이하의 발현율을 보였다(Table 1). C-erbB-2의 발현부위는 주로 세포막을 따라 나타났으며(Fig. 5), 외자궁경부의 세포에서는 대체로 음성이었다. Nm23은 전이성 및 비전이성 침습암종 모두에서 80% 이상의 높은 발현율을 보였으며(Table 1), 주로 세포질내 염색이 되는 양상을 보였다(Fig. 6).

TGF-β1은 비전이성 침습암종에서의 발현율이 26.1%에 지나지 않았으나, 전이된 경우에는 50%로 증가하였다. 또한 미세

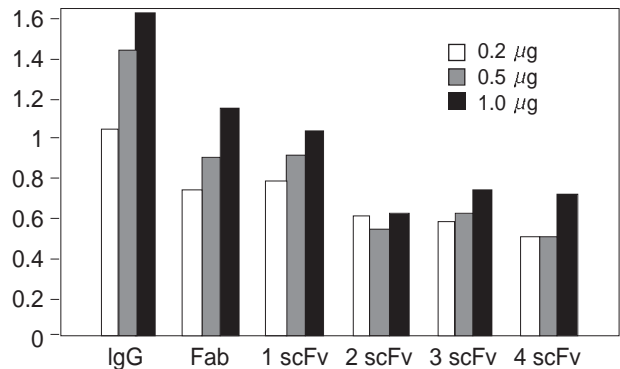


Fig. 3. Specificity of various CD44v6 antibody fragments (IgG, Fab, and scFvs). Absorbance at 490 nm of control is 0.2-0.3±0.02, 0.2, 0.5 and 1.0 g; Amounts of CD44v6 proteins used in ELISA assay. There is no significant difference according to the Fab and scFvs antibody fragment by using Duncan's multiple range test.

침습암종에서는 80%의 높은 발현율을 나타내었으나, 상피내암종에서는 비전이성 침습암종과 비슷하게 낮은 발현율을 보였으며, 암 조직 주위의 기질 부위에서 발현 비율이 높았다. 정상 세포에서는 경관내막세포에서 발현되었다(Fig. 7).

CD44에 대한 전이성과 비전이성 침습암종의 발현율에 있어서는 차이가 없었으나, 침습암종에 비하여 미세침습암종과 상피내암종에 대한 발현율은 높았다(Table 1). 정상 자궁경부 상피에서는 기저 세포층 및 상기저 세포층에서도 모두 양성으로 발현되었으며, 주로 세포막을 따라 염색이 되었다(Fig. 8A). 암 세포에서의 발현은 비각질 부위에서 주로 발현이 되었으며, 각질 진주에서는 발현되지 않았다(Fig. 8C).

CD44의 변이체인 CD44v6는 주로 세포질내에서 발현이 되었으며(Fig. 9) 간혹 세포막을 따라 염색이 되기도 하였다. 정상 경관내막 세포에서는 대체로 음성이었다. 비전이성 침습암종일 경우에는 상피내암종 혹은 미세침습암종과 발현의 차이를 보이지 않았고 50% 내외의 발현율을 보였으나, 오히려 전이성 침습암종에서는 발현율이 20% 가량 감소되는 경향을 보였다(Table 1). CD44v6-IgG, -Fab 및 scFv를 사용한 면역조직화학 결과에서는 IgG에 비하여 Fab와 scFv는 매우 낮은 발현율을 보였으며, 분절들간의 차이나 전이성 유무에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

고찰

악성 종양의 경우 전이에 관여하는 기전을 이해하고 전이능을 예측할 수 있다면 환자의 치료와 예후 판정에 크게 기여할 수 있을 것이다. 종양의 전이는 여러 단계를 거쳐 일어나는데, 상피 세포암종의 경우 원발 종양에서 종양 세포가 기저막을 넘어서

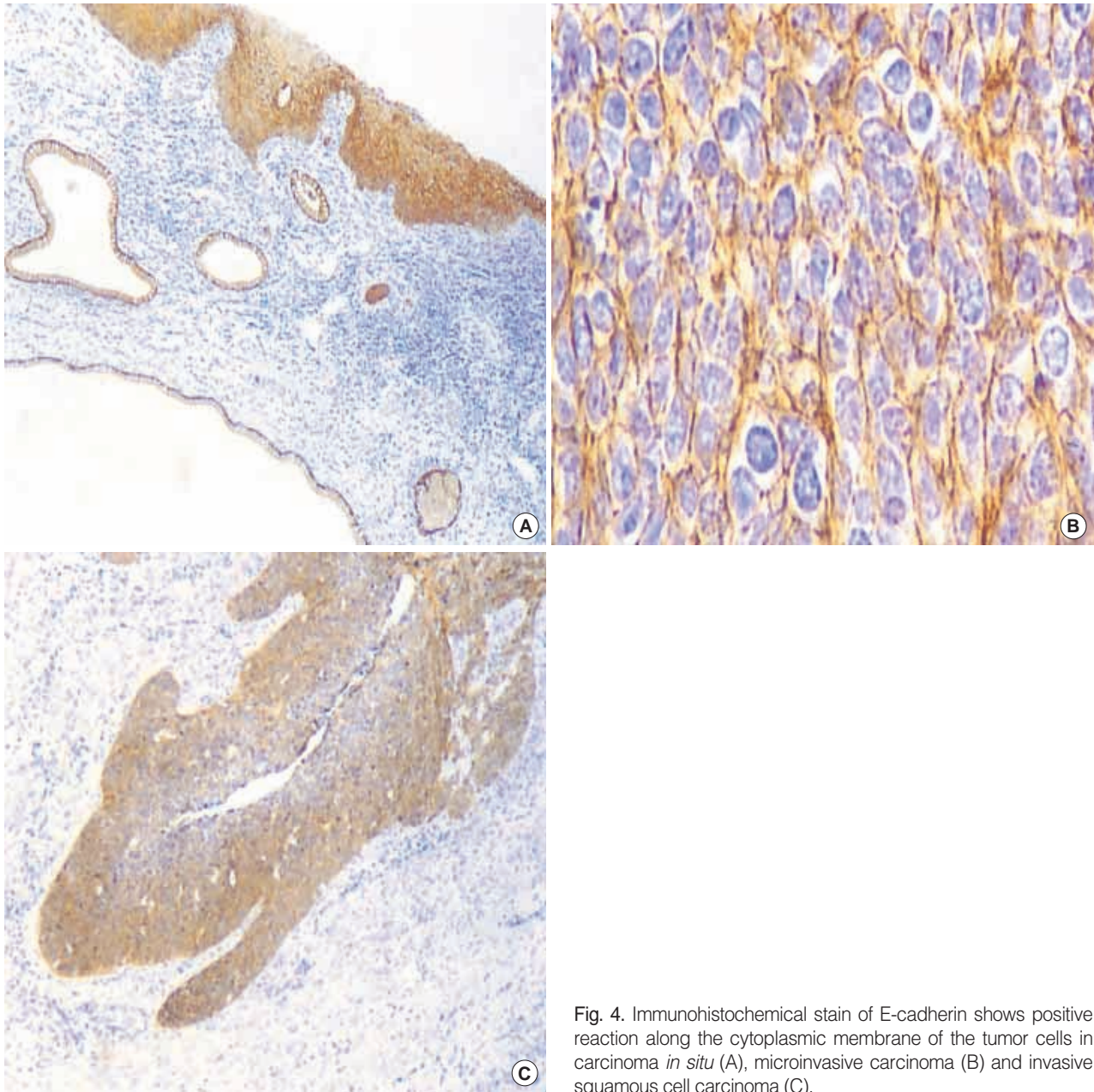


Fig. 4. Immunohistochemical stain of E-cadherin shows positive reaction along the cytoplasmic membrane of the tumor cells in carcinoma *in situ* (A), microinvasive carcinoma (B) and invasive squamous cell carcinoma (C).

탈락하여 세포의 기질로 이동한 후 림프관이나 혈관을 통해 인접 장기로 이동한다. 혈관내 종양세포는 각 장기의 혈관벽에 부착한 후 혈관 밖으로 나가 전이한 장기에서 증식하게 된다. 이러한 일련의 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 세포간 또는 세포와 기질간의 상호작용에 관여하는 부착분자에 대한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다.

특히 이러한 부착분자 중에서 CD44와 그 변이형에 대한 관심이 집중되고 있다. 히알루론산의 수용체인 CD44는 종양과 혈관 내피세포 사이의 상호작용과 림프구의 내피세포로의 침투과정에 관여하지만, CD44의 변이형인 CD44v6는 전이에는 관여하지만

히알루론산의 수용체는 아니어서, 전이에 관여하는 또 다른 기전을 갖고 있는 것으로 생각된다.<sup>5</sup>

자궁경부암증에 있어서 CD44v6는 림프절 전이와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있지만,<sup>7</sup> Woerner 등<sup>8</sup>은 자궁경부암증에서 CD44 변이형의 발현이 암의 진행이나 주위 림프절로의 진행과 관련이 없다고 보고하였다. 또 한편으로는 CD44 표준형과 변이형은 발현 양상이 개인에 따라 혹은 종양에 따라 다양하기 때문에 예후 혹은 전이에 미치는 영향을 일률적으로 판단하기에 곤란한 점이 있다는 보고도 있다.<sup>9</sup> 최근 면역조직화학적 연구에서는 CD44v6의 발현과 전이와는 큰 차이가 없으며,<sup>10</sup> 임상 증상과

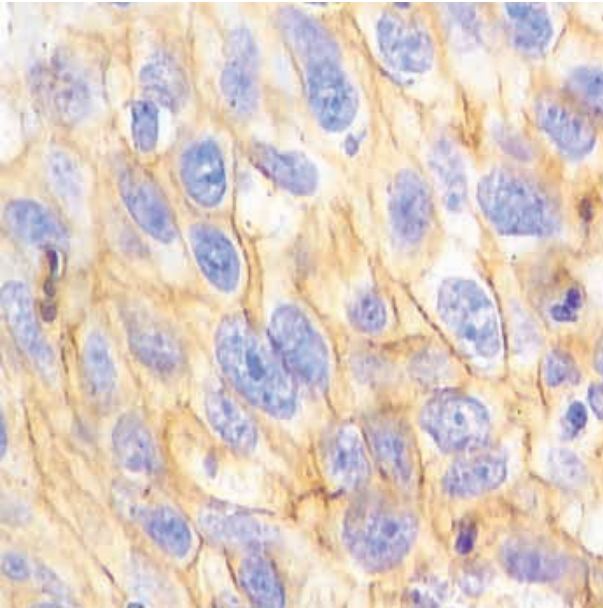


Fig. 5. Immunohistochemical stain of c-erbB-2 shows positive reaction along the cytoplasmic membrane of tumor cells in squamous cell carcinoma.

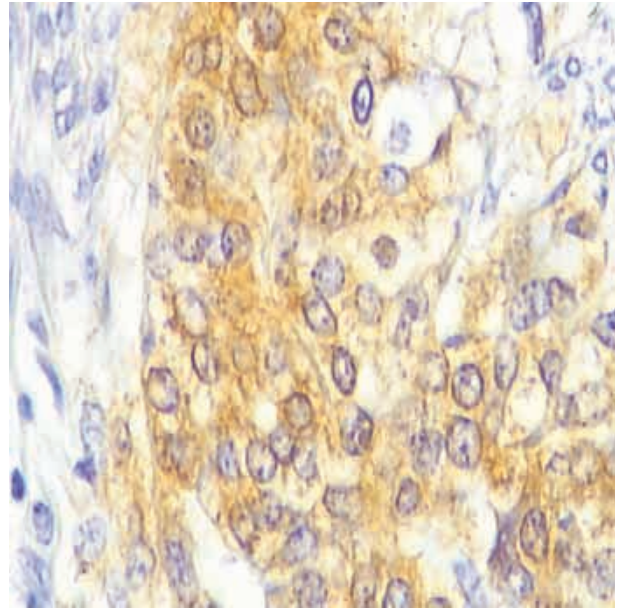


Fig. 6. Immunohistochemical stain of nm23 in the tumor cells of squamous cell carcinoma.

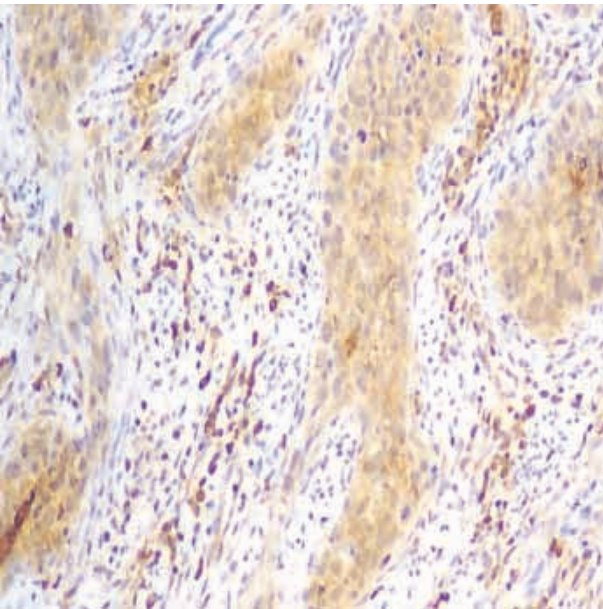


Fig. 7. Immunohistochemical stain of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) shows positive reaction in the cytoplasm of tumor cells in invasive squamous cell carcinoma.

의 관련 연구에 의해서도 암의 진행 혹은 예후와도 밀접한 관계가 없다고 보고되고 있다.<sup>11</sup>

본 연구에서는 CD44 표준형은 자궁경부암중에서의 발현과 전이에 차이를 보이지 않았다. 이는 지금까지 추측해 온 결과와 상반되는 것이다. 지금까지 보고된 바에 의하면 자궁경부암중

서 CD44 표준형의 발현이 증가된다고 했으나, 본 연구의 결과를 보면 정상 자궁경부세포, 상피내암종, 침윤성 및 전이성 병변에서 CD44의 발현의 차이가 없었다. 변이형인 CD44v6의 발현은 전이성 침윤성암에서의 발현율이 비전이성보다 20% 가량 떨어졌고, 비전이성 침습암종과 미세침윤암종, 상피내암종의 발현율에 있어서는 차이를 보이지 않았다. 따라서 자궁경부암중에 있어 CD44v6은 종양의 전이에는 관여하지 않으며, CD44와는 종양의 전이에 있어 또 다른 기전을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

또한 본 연구에서는 CD44v6 변이종의 단세포군 항체를 생산하고, 또한 다양한 항체분절인 CD44v6-IgG, Fab 및 scFv를 생산하여 이들을 종양의 조기 진단 및 치료의 표적 인자로서의 타당성을 진단하고자 하였다. 이를 위해 CD44v6의 항체분자 IgG, Fab 및 scFv를 생산하고 각각의 특이성과 친화력을 검색하였다. 먼저 CD44v6에 대한 western-blotting과 ELISA를 실시해 특이성을 고찰한 결과 이들 항체분절들 간에는 차이가 거의 없었으며, 이들을 이용한 자궁경부암종 조직의 면역조직화학 결과에서도 IgG만 양성 반응을 보여줄 뿐 Fab와 scFv들 간의 차이는 볼 수 없었다. 그 이유로 일가의 scFv나 Fab보다 이가의 IgG가 더 유효한 결과를 가져왔다고 볼 수도 있으나, 결합가의 차이만으로 설명하는 데는 한계가 있을 듯하다. 또 다른 이유는 Fab나 scFv를 생산 정제할 때 변성 상태에서 실시하여 CD44v6의 항원결정인자(epitope)를 인지하는 능력이 떨어진 변성 항체 분자를 생산한 결과가 아닌가 생각된다. 더 나아가, 발색에 중요한 역할을 하는 발색단이 접합된 이차 항체가 IgG와의 항원-항체 반응에는 아무런 문제가 없으나, Fab와 scFv의

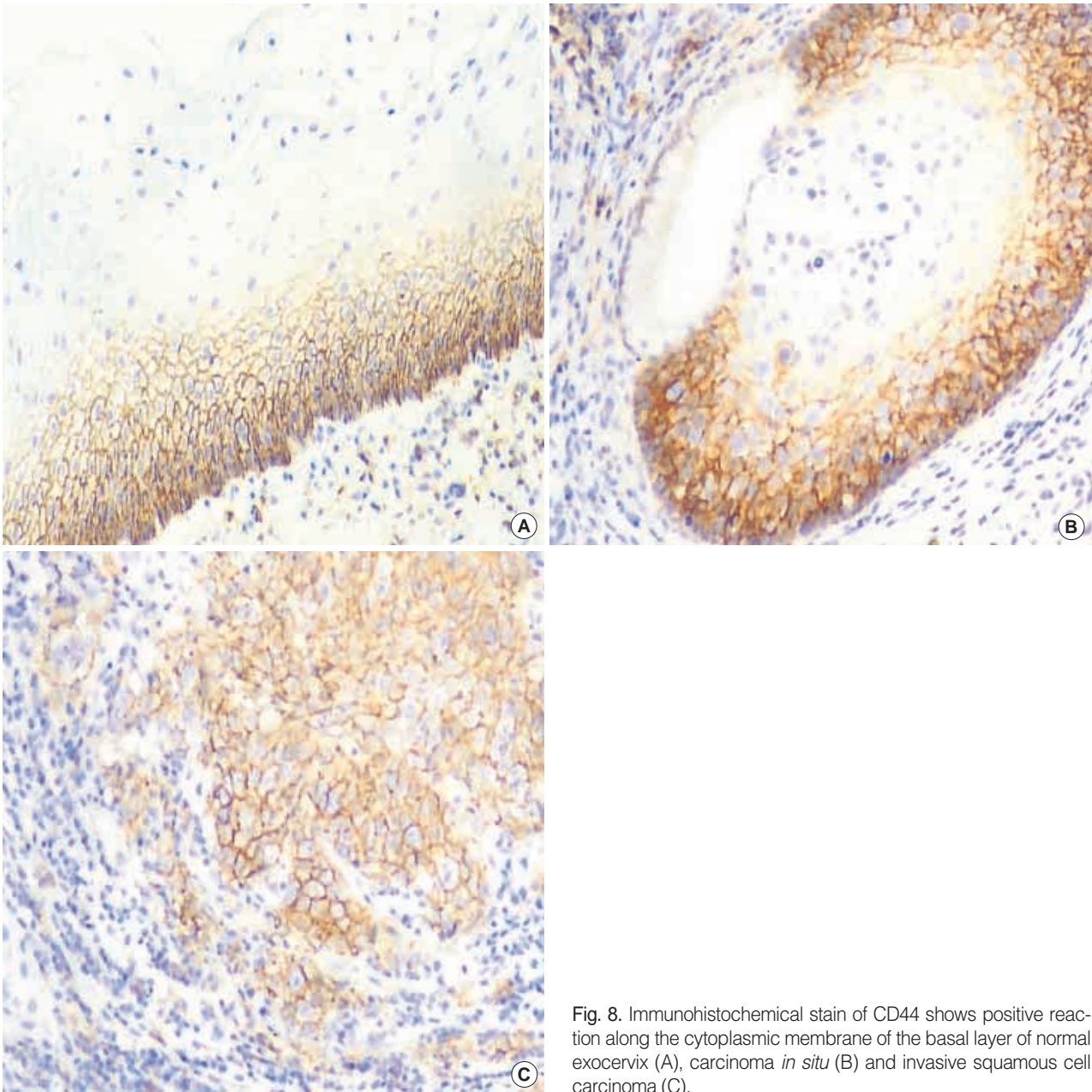


Fig. 8. Immunohistochemical stain of CD44 shows positive reaction along the cytoplasmic membrane of the basal layer of normal exocervix (A), carcinoma *in situ* (B) and invasive squamous cell carcinoma (C).

항원-항체 반응에 문제가 있어 전체적으로 인지도가 낮은 결과를 초래하는 것으로 생각된다. 그러므로 Fab나 scFv를 잘 인지하는 이차 항체의 개발이 요구된다.

변이형 CD44의 발현과 비슷한 소견은 cadherin의 발현에서도 관찰된다. Cadherin은 세포표면의 부착 분자로서 위암 및 췌장암에서 발견된다.<sup>12,13</sup> 분화가 나쁜 종양에서 cadherin의 발현 감소 혹은 소실은 흔히 관찰되는 소견이고, 이러한 종양에서 나쁜 예후와 관련이 있으며, 이것은 자궁경부암증에서도 마찬가지인 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup> Cadherin은 기본 구조와 분자적 특성에 따라 E-cadherin, N-cadherin, P-cadherin, M-cadherin,

R-cadherin 등으로 분류되는데, E-cadherin은 식도암, 위장관 종양, 방광암, 전립선암, 두경부 종양 등에서 분화가 나쁠수록 발현이 감소된다고 보고되고 있다.<sup>15</sup> 그러나, Kinsella 등<sup>16</sup>은 대장암에서 E-cadherin은 종양의 분화나 Duke 병기와는 상관관계가 없으며 종양의 전이를 예측할 수 있는 인자로서의 가치는 없다고 하였고, Shimoyama 등<sup>17</sup>도 E-cadherin의 발현과 종양의 침습 정도는 상관관계가 없다고 하였다. 본 연구에서 E-cadherin의 발현은 전이와 종양의 침습 정도 간의 상관관계가 없이 상피내암증부터 전이암종까지 거의 전 예에서 세포막을 따라 염색이 되어서 예후인자로서의 역할은 없는 것으

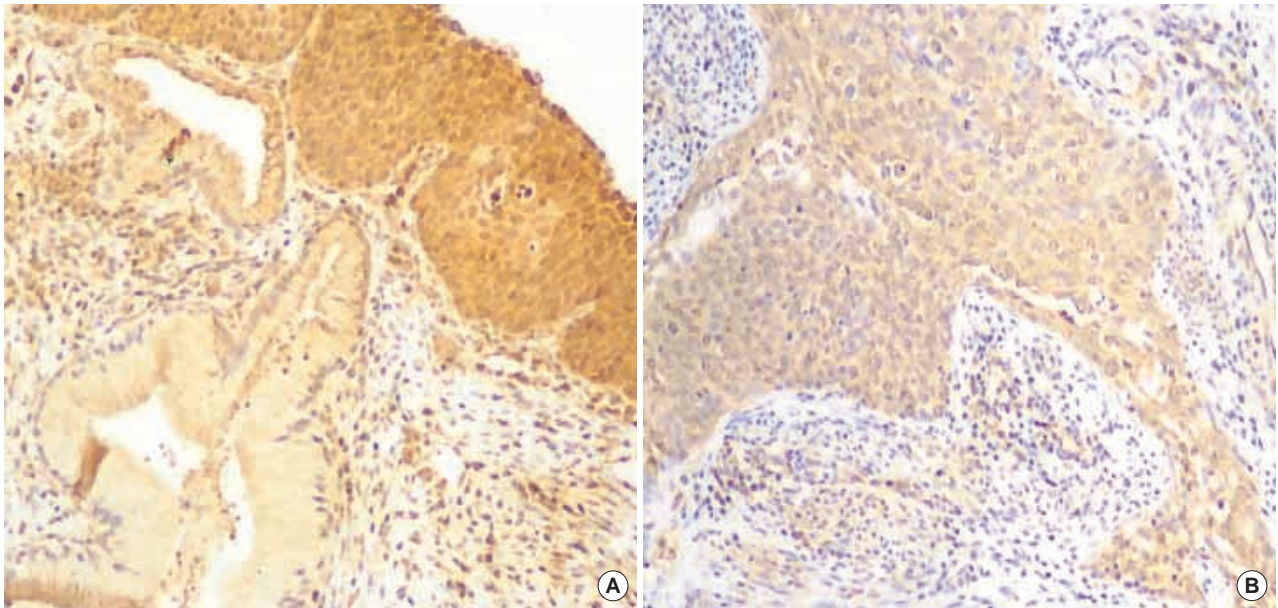


Fig. 9. Immunohistochemical stain of CD44v6 shows positive reaction along the cytoplasmic membrane of the tumor cells in carcinoma *in situ* (A) and invasive squamous cell carcinoma (B).

로 추측된다.

Cathepsin D는 정상적으로 인체 및 동물 조직의 거의 모든 세포에서 낮은 농도로 존재하고 있으나, 유방암에서 가장 잘 규명된 단백질분해효소이다. 이것은 1980년 Westley와 Rochfortref<sup>19</sup>에 의해 에스트로겐에 반응하는 MCF-7 유방세포에서 52 kD의 당단백 형태로 처음 발견되었다. 이후 이것은 cathepsin D의 전구체로서 중간 형태인 42 kD 단백을 거쳐 34 kD의 lysosomal aspartic endoprotease cathepsin D로 최종 활성화된다는 것이 밝혀졌다.<sup>18</sup> Cathepsin D의 작용이 산성 환경에서 자가활성되어 단백질분해과정을 촉발시키고 기저막과 세포외기질, 결합조직을 분해할 뿐만 아니라, nude mouse에 cathepsin D cDNA를 핵산전달감염시켰을 때 종양 세포의 전이 성향이 증가하는 점 등으로 보아 cathepsin D는 종양 세포의 이주, 침윤 및 전이에 관여하는 한 요인일 가능성이 제시되었다. 또한 이것의 과발현은 나쁜 예후와 관련이 있을 것으로 보고되었다.<sup>19</sup> 그러나 유방암에 있어서 cathepsin D가 가지는 예후인자로서의 의의에 대해서는 많은 연구들에서 서로 상반된 결과들을 보여 주어 아직 확실히 규명되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서도 자궁경부암 종에 대한 발현율이 매우 저조했기 때문에, 전이와 침습 정도 간의 차이를 규명하고 예후인자로 사용하기에는 부적합하였다.

C-erbB-2 종양유전자는 신경모세포종에서 점 돌연변이에 의해서 생성된 종양유전자와 같은 것으로 17번 염색체에 위치한다. 이 유전자는 epidermal growth factor receptor (EGFR, c-erbB-1)과는 구조적으로 유사하지만 생물학적으로 뚜렷하게 구분되는 티로신키나아제 P의 당단백을 생성하는 것으로 알려져 있다.<sup>20</sup> 정상 성장이나 종양의 분화에 있어서의 이 유전자가

가지는 기능은 아직까지 확실하지는 않지만 여러 장기의 암 세포들에서 그 증폭이 증명되고 있으며, 특히 유방암, 위암과 난소암에서 유전자의 증폭과 환자 예후와의 상관성이 크다고 보고되었다.<sup>21</sup> 본 연구에서 c-erbB-2는 종양유전자 산물에 대한 양성 반응은 세포막을 따라 강한 적색의 과립으로 관찰되었는데, 이는 종양유전자 산물이 세포막에 존재하는 것으로 이 유전자 산물이 아직 밝혀지지 않은 성장인자에 대한 막전이 수용체일 것이라는 Coussens 등<sup>20</sup>의 주장과 일치한다. 일부 세포들에서는 세포막뿐만 아니라 세포질내에서도 양성 반응을 보였는데, 이 결과는 Natall 등<sup>22</sup>의 연구에서도 양성 반응의 30% 정도는 세포질내에서 관찰되었다는 보고와도 유사한 것으로, 이것은 종양유전자 산물과 결합하는 성장인자 리간드의 세포내 이주 또는 생성 운반 중에 있는 소견으로 생각된다. 본 연구 결과, c-erbB-2는 미세침윤암종에서의 발현율이 상피내암종에서보다 2배 가량 높게 나타났으나, 전이암종과 비전이암종에서의 발현율은 매우 저조했기 때문에 전이의 차이를 규명하기에는 부적합하였다.

Nm23 단백질은 염색체 17q22에 위치하고 있는 전이억제 산물로 알려져 있다.<sup>23</sup> Nm23 단백질은 정상 상피세포와 종양 세포 모두에서 발현되지만 종양 세포에서 좀 더 광범위하고 강하게 발현되며, 종양의 분화가 좋을수록 nm23 유전자의 발현이 증가된다고 보고되어 있다.<sup>24</sup> 그리고 이 분자는 위암, 결장암 등에서 암의 진행이나 림프절 전이와 관계가 있다고 보고된 바 있지만, 그렇지 않다는 보고도 있어<sup>25</sup> 이 분자의 역할에 대해서는 아직 논란의 여지가 많다. Gunnar 등<sup>26</sup>은 파라핀 포매조직을 이용한 면역조직화학 염색에 의한 연구에서 nm23이 자궁경부암종의



예후인자로서 가치가 없다고 보고하였다. 또한 비록 다른 종양을 대상으로 한 연구 결과이지만 최근까지 보고된 nm23의 예후인자로서의 의의는 종양 발생 부위와 연구자에 따라 상당한 차이를 보이고 있다. 즉, 결장암의 경우 Cohan 등<sup>27</sup>은 nm23의 발현이 있는 환자에게서 원격 전이가 빈번하고 생존 기간이 짧았다고 보고하였으나, Haut 등<sup>28</sup>은 nm23 유전자와 전이 능력과는 무관하다고 보고하였다. 유방암을 대상으로 한 보고에서도 이와 유사한 다양한 보고들이 있다.<sup>29</sup> 본 연구에서는 침윤성 종양에서는 발현율이 증가하여 nm23이 종양의 침윤성과 연관이 있는 것으로 나타났으나, 전이와 비전이성에서는 차이를 보이지 않는 것으로 보아 전이와의 연관성은 없는 것으로 확인되었다. 그러나 nm23의 예후인자로서 가지는 의의는 보다 많은 연구가 진행된 후 신중히 결론을 내려야 한다고 생각된다.

TGF- $\beta$ 1은 조직 cytokine의 한 종류로 콜라겐이나 세포외기질의 침착에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>30</sup> 본 연구 결과에서 자궁경부암증에 대한 TGF- $\beta$ 1은 침습암증에서의 발현율이 상피내암증에서보다 2배 가량 높게 나타났고, 또한 50%의 발현율을 보이는 전이암증에 비하여 비전이암증은 26%로 낮게 나타났다. 그러나 미세침윤암증에서 78%의 높은 발현율을 보이는 것으로 보아, TGF- $\beta$ 1은 자궁경부암증에서의 전이 혹은 침윤성과 연관이 있는 것으로 생각되었다.

이상의 연구에서 최근 많은 장기에서 종양의 성장과 전이에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되던 CD44와 CD44v6는, 본 연구의 자궁경부암증에서는 그 발현과 전이에 큰 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 그러나 c-erbB-2의 경우는 미세침윤암증에서, TGF- $\beta$ 1은 미세침윤암증과 전이성침윤암증에서 그 발현이 크게 증가하였고, nm23도 침습암증에서 발현이 크게 증가되어 전이 혹은 침윤성과 연관이 있는 인자라고 보이며, 자궁경부암증의 조기 진단 예후인자로서 이후 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. John J, Reinartz MD, Evan George MD, *et al.* Expression of p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in endometrial carcinoma and correlation with survival and known predictors of survival. *Hum Pathol* 1994; 25: 1075-83.
2. Azanovoorian S, Murphy AN, Liotta LA. Molecular aspects of tumor invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368-83.
3. Screton GR, Bell MV, Jackson DG, *et al.* Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD-44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12160-4.
4. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; 340: 1053-8.
5. Ham HJ, Ho LI, Chang JL, *et al.* Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995; 75: 1065-71.
6. Dall P, Heider KH, Sinn HP, *et al.* Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v expression a new prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 60: 471-7.
7. Kainz C, Kohlberger P, Tempfer C, *et al.* Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1706-9.
8. Woerner SM, Givehchain M, Durst M, *et al.* Expression of CD44 splice variants in normal dysplastic, and neoplastic cervical epithelium. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1125-32.
9. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, *et al.* CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5424-33.
10. Yokumo K, Kodama J, Seki N, *et al.* CD44 exon v6 correlates with cellular differentiation but not progression and metastasis of cervical cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 2107-111.
11. Dall P, Heider KH, Hekele A, *et al.* Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 1994; 54: 3337-41.
12. Mayer B, Johnson JP, Leitl F, *et al.* E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down regulation correlates with cellular differentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 1993; 53: 1690-5.
13. Pignattelli M, Ansari TW, Gunter P, *et al.* Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994; 174: 243-8.
14. Imachi M, Tsukamoto M, Matsuyama T, Nakano H. Pulmonary metastasis from carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1989; 33: 189-92.
15. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, *et al.* Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23.
16. Kinsella AR, Green B, Lepts GC, Hill CL, Bowie G, Taylor BA. The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* 1993; 67: 904-9.
17. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, *et al.* Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissue and carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 2128-33.
18. Cardiff RD. Cathepsin D and breast cancer: useful? *Hum Pathol* 1994; 25: 847-8.
19. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, *et al.* Cathepsin D expression detected

- by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11: 36-43.
20. Coussens L, Yang-Feng TL, Lino YC, *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with new oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-9.
  21. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al.* Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
  22. Natall PG, Nicotra MR, Bigotti A, *et al.* Expression of the p185 encoded by HER-2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 1990; 45: 457-61.
  23. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51: 445-9.
  24. Yamaguchi A, Urano T, Fushida K, *et al.* Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 1993; 68: 1020-4.
  25. Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H, *et al.* Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 533-6.
  26. Gunnar B, Kristensen MD, Ruth H, *et al.* Evaluation of the prognostic significance of nm23/NDP kinase protein expression in cervical carcinoma: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 378-83.
  27. Cohan KH, Wang F, Desoto-Lapaix F, *et al.* Association of nm23-H1 allelic deletion with distant metastases in colorectal carcinoma. *Lancet* 1991; 338: 722-4.
  28. Haut M, Steeg PS, Wilson JK, Merkowitiz SD. Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasm and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 712-6.
  29. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, *et al.* Node negative breast carcinoma. *J Surg Oncol* 1996; 62: 86-92.
  30. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor- $\beta$  in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 1992; 90: 1-7.