

## 갑상선 유두암종에서 CD44 항원의 특이적 발현 양상

김정연 · 유진예 · 조혜제

인제대학교 상계백병원 진단병리과

접 수 : 2001년 3월 22일  
게재승인 : 2001년 7월 16일

책임저자 : 김 정 연  
우 139-707 서울시 노원구 상계7동 761-1  
인제대학교 상계백병원 진단병리과  
전화 : 02-950-1270  
Fax : 02-950-1266  
E-mail : pck2973@unitel.co.kr

### Preferential Expression of CD44 in Thyroid Papillary Carcinoma

Jung Yeon Kim, Jinye Yoo and Hyejae Cho

Department of Diagnostic Pathology, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

**Background :** Papillary carcinoma is one of the most common malignant thyroid tumors and an important prognostic factor is the lymph node status. CD44 is a cell adhesion molecule and is associated with metastasis. The purpose of this study was to discover whether CD44 is valuable in the diagnosis of the papillary carcinoma, and whether Ki-67 and p53 are correlated with CD44 in the papillary carcinoma. **Methods :** We studied CD44, Ki-67 and p53 expressions in 34 cases of formalin-fixed paraffin embedded papillary thyroid carcinomas, and 20 cases of the follicular neoplasm using mouse anti-CD44 (H-CAM), Ki-67 and p53 monoclonal antibodies. **Results :** Most of the papillary carcinomas expressed diffuse and intense membrane staining of CD44 (32/34 cases, 94.1%). Focal scattered immunoreactivity was observed in the follicular neoplasm (8/20 cases, 40.0%). The staining patterns of CD44 were similar in both follicular adenoma and carcinoma. Both groups with or without lymph node metastasis showed similar expression patterns for CD44. There were no differences in Ki-67 and p53 staining between papillary carcinomas and follicular neoplasms. **Conclusions :** The result shows that papillary carcinomas preferentially display the CD44 antigen, and it is a useful diagnostic tool in the equivocal cases. There is no correlation among CD44, Ki-67 and p53 expressions in the papillary carcinoma.

**Key Words :** Thyroid, Carcinoma, Papillary, Follicular, CD44 antigen

유두암종은 갑상선에 생기는 흔한 종양으로 유두 모양의 세포 군집, 핵 주름, 핵내 봉입체 등의 특징적인 소견을 보이지만, 이런 소견은 유두암종 외의 다른 갑상선 종양에서도 관찰될 수 있는 소견이다. 최근에는 면역조직화학 염색과 분자생물학적 기법이 종양의 정확한 진단에 많은 도움을 주고 있다. 이 중 CD44 항원은 잘 알려진 세포 부착 분자로 세포와 세포, 세포와 기질의 부착, 림프구의 귀향, 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 한다.<sup>1-4</sup> 인간의 CD44 유전자는 60 Kb의 길이에 최소 20 exon이 분포하는 것으로 알려져 있는데, RNA 접합 과정 중 exon 5에서 exon 10 (variant exon v1-v10) 사이에 선택적인 재조합이 이루어져 적어도 10개의 exon이 존재한다. 일반적 형태인 CD44s형은 히알루론산염(hyaluronate)의 수용체로 작용하여 혈구 세포와 상피 세포 등에 널리 분포한다. 그러나 정상 세포에서 관찰되지 않는 변형된 CD44v형은 유방암, 대장암, 위암, 악성 림프종 및 자궁경부암종에서 발현이 증가하고, 특히 exon 6번이 포함된 CD44v6의 발현과 악성 종양의 전이는 서로 연관성이 있다.<sup>5-7</sup> 갑상선 종양 중 유두암종에서 CD44의 발현이 현

저하여 다른 종양과의 감별에 이용할 수 있다는 보고가 있는 반면,<sup>1</sup> 소포 종양에서도 CD44의 발현이 높아 둘을 감별하는 데 도움이 되지 않는다는 보고도 있다.<sup>8</sup>

p53 단백질의 발현은 분화가 좋은 갑상선 종양보다는 분화가 나쁜 종양에서 그 발현이 증가하는 것으로 되어 있다.<sup>9-11</sup> 그러나 일부 보고에서는 분화가 좋은 갑상선 종양에서는 p53이 발현되지 않고 미분화 종양과 분화가 나쁜 종양에서만 발현되는 것으로 보고되어 관찰자마다 그 발현율에 차이가 있다.<sup>12-14</sup> p53은 세포사를 유도하거나 세포 증식에 관여하므로 Ki-67 등의 종양 증식 지수와 관계가 있을 것으로 여겨진다.<sup>15</sup>

Ki-67은 G<sub>1</sub> 후기, S, G<sub>2</sub>, M기에 걸쳐 발현되는 핵 항원으로, Ki-67 표지지수는 종양의 증식, 전이 및 예후와 관련 있다.<sup>16,17</sup> Ki-67은 유두암종, 역형성 암종에서 정상 갑상선 조직에 비해 발현이 증가한다.<sup>18</sup> 그러나 Ki-67 발현과 종양의 분화도가 연관이 있어 분화가 나쁜 종양일수록 Ki-67의 발현이 증가한다는 보고도 있어 일관된 결과를 얻을 수 없다.<sup>9-11</sup>

갑상선 유두암종에서 CD44, p53 및 Ki-67 상호간의 역할은

아직 확실히 알려지지 않은 바, 본 연구는 유두암종에서 CD44, p53, Ki-67에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 이들의 발현 양상을 관찰하고, 이들의 발현을 소포 종양과 비교하여 상기 면역 염색이 갑상선 유두암종의 진단에 유용한 지를 알아보려고 하였다.

### 재료와 방법

#### 연구 대상

1993년 1월부터 2000년 8월까지 인제대학교 상계백병원 진단 병리과에서 조직 검사를 통해 진단되고 보관 상태가 양호한 유두암종 34예와 소포 종양 20예를 대상으로 하였다. 소포 종양은 혈관이나 피막 침범이 있어 소포암종으로 진단한 16예와 소포선종 4예를 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 유두암종에서 43.7±15.3세, 소포 종양에서 33.2±10.7세로 유두암종 환자의 연령이 의미 있게 높았다(p<0.05). 남녀의 비는 유두암종과 소포 종양에서 각각 7:27, 1:19로 두 군 모두 여자가 현저하게 높았다(Table 1).

#### 방법

각 증례의 나이, 성별, 임상적 증상 등을 조사하고 종양의 크기, 림프절 전이 유무 및 전이된 림프절의 수, 갑상선 주위 조직의 침윤 여부, 림프관 및 혈관의 침범 유무 등을 조사하였다.

10% 중성 포르말린 고정 후 파라핀에 포매된 조직 중 주위 정상 조직을 포함한 종양 조직편을 선택하여 4 µm 두께로 박절하여 coating slide에 부착하고 크실렌에 탈파라핀한 후, 70% 알코올까지 점차로 낮은 농도의 알코올에 함수하고 증류수로 세척한 후 희석된 과산화수소수에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였다. Ki-67 및 p53 염색은 citrate 완충액에 침수시킨 채로 15분간 고압멸균기로 항원 재회복 과정을 거친 후 일차 항체를 반응시켰다. 그 후 실온에서 차단 항체와 30분간 반응시켜 비특이적 항원을 차단하고, 일차 항체인 CD44 (mouse anti-CD44, H-CAM, Zymed, San Francisco,

**Table 1.** Clinical and pathological characteristics of the patients with papillary carcinoma and follicular neoplasm

	Papillary carcinoma (n=34)	Follicular neoplasm (n=20)
Mean age (years)*	43.7±15.3	33.2±10.7
Sex (Male: Female)	7:27	1:19
Tumor size (cm)*	2.39±1.38	3.28±0.96
Expression of CD44†	32 (94.1%)	8 (40.0%)
Ki-67 (%)	0.78±1.54	1.33±2.76
p53 (%)	1±1.8	0.7±1.4

\*: p<0.05, †: p<0.005.

U.S.A.), Ki-67 (1:100, Dako, Carpinteria, U.S.A.) 및 p53 (1:100, Dako, Carpinteria, U.S.A.)을 이용하여 실온에서 1시간 내지 2시간 반응시켰다. 일차 항체 반응 후 결합이 안 된 항체를 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4로 3회 세척하고 biotin이 결합된 이차 항체로 20분간 반응시킨 후 수세하고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색한 후 증류수로 세척, Harris 헤마톡실린으로 대조염색한 후 봉입하였다.

#### 결과 판독

CD44는 종양 세포의 10% 이상에서 세포막을 따라 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 간주하였다. 발현 정도에 따라 강하게 세포막을 따라 염색되는 경우, 중등도로 세포막을 따라 염색되는 경우, 약하게 염색되는 경우로 나누고, 종양 세포의 세포질에 과립상으로 염색된 경우는 따로 판독하였다.

Ki-67과 p53은 종양 세포의 핵에서 갈색으로 발현되었을 때를 양성으로 간주하고, 염색이 잘된 부위를 선택하여 고배율 시야에서 총 1,000개의 종양 세포 중 핵이 양성인 세포의 수를 백분율로 환산하였다. 염색된 모든 예에서 백분율을 기록하고 p53은 5% 이상의 종양 세포에서 발현될 경우를 양성으로 간주하였다.

#### 통계학적 분석

값은 평균±표준편차로 표시하였다. 환자의 나이, 림프절 전이 유무, 종양의 크기, Ki-67 증식 지수, p53 발현 유무 사이의 상관성을 Chi-square test 및 student t-test를 이용하여 비교하였으며 p<0.05인 때를 유의하다고 하였다.

### 결 과

종양의 크기는 유두암종이 2.39±1.38 cm, 소포 종양이 3.28±0.96 cm로 소포 종양이 의미 있게 컸다(p<0.05, Table 1). 유두암종에서 림프관 침범, 혈관 침범, 주변 조직으로의 침범이 각 10예에서 관찰된 반면, 소포 종양에서는 각각 1예, 9예, 0예로 혈관 침범이 있는 예는 모두 소포암종으로 진단된 예였다.

CD44는 34예의 유두암종 중 32예(94.1%)에서, 20예의 소포 종양 중 8예(40.0%)에서 염색되어 유두암종에서 의미 있게 발현이 높았다(p<0.005). 발현 정도를 비교해 보면 대부분의 유두암종은 종양의 50% 이상에서 세포막을 따라 강하게 염색된 반면, 소포 종양은 종양 세포의 약 10-15%에서 중등도로 염색되었고(5/8예), 3예에서는 약 10%의 종양 세포에서 약하게 염색되어 두 종양 군의 염색 정도 및 범위가 현저하게 달랐다(Fig. 1). 유두암종 16예와 소포 종양 1예에서 주변 림프절로의 전이

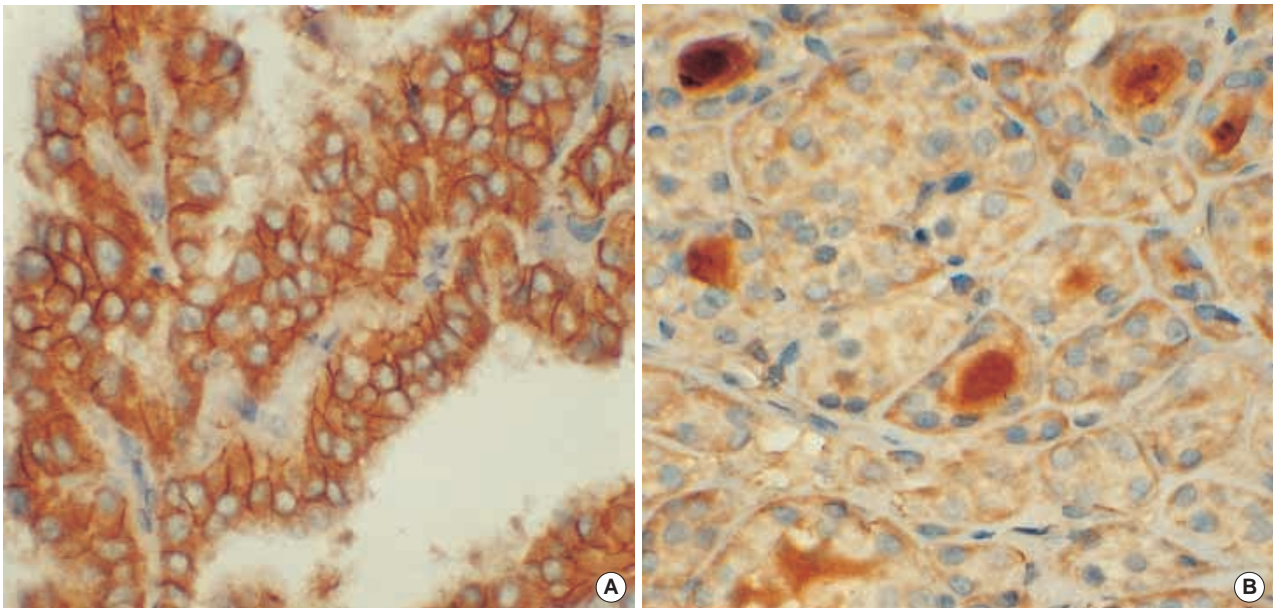


Fig. 1. Immunoreactivity pattern of papillary carcinoma (A) and follicular neoplasm (B) for CD44. Papillary carcinoma shows strong and diffuse membranous staining, but follicular neoplasm shows focal and weak immunostaining.

가 있었는데, 이때 원발성 종양과 전이된 종양의 CD44 염색 차이는 없었다. 또한 소포암종과 선종을 나누어 비교해 보았을 때에도 두 군 간의 뚜렷한 차이는 없었다. 유두암종과 소포 종양 각각에서 연령과 종양의 크기에 따른 CD44 염색의 차이는 없었으며, 림프관 침범, 혈관 침범, 주변 조직 침범과 CD44 발현은 상관성이 없었다.

Ki-67은 유두암종 34예 중 10예(29.4%)에서, 소포 종양 20예 중 6예(30.0%)에서 핵에 양성으로 염색되었고, Ki-67 증식지수는 유두암종에서 평균  $0.78 \pm 1.54\%$ , 소포 종양에서  $1.33 \pm 2.76\%$ 로 모두 낮았다. p53 단백질은 34예의 유두암종 중 3예(8.8%), 소포 종양 20예 중 1예(5%)에서 5% 이상의 종양 세포에 염색되었고, 평균 발현율은 유두암종에서  $1 \pm 1.8\%$ , 소포 종양에서  $0.7 \pm 1.4\%$ 이었다. Ki-67 증식지수나 p53 단백질의 발현은 소포선종과 암종을 나누어 비교했을 때에도 뚜렷한 차이가 없었다. Ki-67과 p53 발현 모두 환자의 나이, 종양의 크기, 림프관 침범, 혈관 침범, 주위 조직으로의 침범 등과 상관관계가 없었다. CD44 발현 정도와 Ki-67 증식지수 및 p53 단백질 발현과도 서로 상관관계가 없었다.

## 고찰

CD44는 세포와 기질의 유착, 림프구의 활성화, 종양의 성장 및 전이에 관여하는 인자로, 본 연구에서 유두암종은 소포 종양에 비해 CD44 발현이 현저하였다. 이는 기존의 보고와 일치하는 소견이나,<sup>19</sup> 본 연구는 좀 더 많은 예의 갑상선 종양을 대상으로

CD44의 발현 유무를 관찰한 바, 유두암종에서 유의하게 발현이 증가한다는 것을 알 수 있었다. Southern blot 방법으로 유두암종에서 CD44의 발현 증가를 확인하기도 하지만,<sup>20</sup> 면역조직화학 염색을 이용하면 간편하게 단백질의 발현을 비교할 수 있다는 장점이 있다. 또한 세침흡인도말 검사에서도 CD44 당단백에 대한 면역조직화학 염색으로 유두암종을 다른 종양과 감별할 수 있었다.<sup>1</sup> Gu 등<sup>8</sup>은 소포암종에서 CD44의 발현이 유두암종과 유사하게 높다고 하였으나, 본 연구에서는 소포 종양에서 CD44의 발현이 미약하였고, 소포암종과 선종 사이에 차이가 없는 것으로 나타나 기존의 보고와 차이가 있었다.

CD44가 어떻게 갑상선 종양의 생성에 영향을 미치는지, 유두암종 형성의 어느 단계에서 어떻게 작용하는지에 대해서는 뚜렷이 밝혀진 바가 없다. 이소체 발현의 장애가 갑상선 소포 세포의 성장 장애를 초래하여 종양을 유도한다는 주장도 있고,<sup>20</sup> CD44 mRNA 공정(processing) 장애가 유두암종의 발생에 관여할 것이라는 주장도 있다.<sup>12</sup> CD44는 대장 및 유방 종양에서 종양의 진행 및 림프관 전이에 관여하는 것으로 알려져 있으나,<sup>5-7</sup> 본 연구에서는 림프관 전이 유무에 관계없이 발현에 차이가 없어 갑상선 질환에서는 종양의 전이보다는 분화와 관계가 있을 것으로 추측된다. 따라서 CD44는 조직학적 소견이 모호한 갑상선 종양에서 유두암종을 진단하는 데 도움을 줄 수 있는 면역 염색으로 간주된다.

p53 단백질은 갑상선 종양의 분화 정도에 따라 그 발현 정도가 달라, 분화가 좋은 종양의 10-18%,<sup>9,10</sup> 분화가 나쁜 종양의 40-80%에서 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>9-11</sup> 그러나 p53 단백질은 분화가 좋은 종양에서는 발현되지 않고, 분화가 나쁜 종양과 미

분화 종양에서만 발현된다는 연구도 있다.<sup>12-14</sup> 본 연구에 포함된 유두암종과 소포 종양은 모두 p53이 거의 발현되지 않았는데, 이는 두 종양이 모두 분화가 좋은 종양이기 때문으로 생각된다. 유두암종 환자를 이전의 방사선 노출 유무에 따라 비교해 보았을 때, p53이 양 군에서 큰 차이가 없고 발현이 아주 낮아 유두암종과 p53은 상관성이 없다는 주장도 있다.<sup>21</sup> 그러나 분화가 나쁜 종양의 침습성 성장 부위에서 p53에 양성인 세포가 관찰되어, p53이 종양의 진행 상태와 관계가 있다는 주장도 있다.<sup>10</sup> 그러나 본 연구에서는 종양에 염색되는 p53의 빈도가 극히 낮아 갑상선 종양에서 p53의 발현은 종양의 생성보다는 종양의 진행, 역형성 및 악성도와 관계가 있을 것으로 여겨진다.<sup>18,22</sup>

Ki-67 발현은 p53 축적과 긴밀하게 연관되고<sup>15</sup> 전이가 있는 종양에서 발현이 더 높은 것으로 알려져 있다.<sup>23</sup> 하시모토 갑상선염, 유두암종, 역형성 암종, 림프구성 갑상선염에서 Ki-67의 발현이 의미 있게 증가한다는 보고가 있으나,<sup>18</sup> 본 연구에서는 유두암종 및 소포 종양 모두 Ki-67 발현 빈도가 높지 않고, 전이가 있는 유두암종과 전이가 없는 종양 사이에서도 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 본 연구에서는 대부분의 증례가 분화가 좋은 종양인 관계로 p53과 Ki-67의 발현 빈도가 낮은 것으로 추측된다. Ki-67 및 p53 각각의 발현 빈도가 너무 낮아 둘 사이의 연관성을 비교할 수 없었다. 또한 림프절 전이, 림프관 및 혈관 침범, 주변 조직으로의 침범 등도 Ki-67 증식지수나 p53 단백질 발현과 상관관계가 없었다.

갑상선의 유두암종은 소포 종양에 비해 CD44를 두드러지게 많이 발현하여, CD44는 진단이 어려운 갑상선 조직의 정확한 진단에 도움을 얻을 수 있는 유용한 면역조직화학 염색 방법으로 간주된다. 그러나 CD44의 발현 정도와 Ki-67 증식 지수 및 p53 단백질의 발현은 상관관계가 없었고 여러 병리학적 인자들과 상관성이 없어, CD44를 종양의 형성과 관련된 전반기에 주로 관여하는 인자로 규명하기 위한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

### 참고문헌

1. Chhieng DC, Ross JS, McKenna BJ. CD44 immunostaining of thyroid fine-needle aspirates differentiates thyroid papillary carcinoma from other lesions with nuclear grooves and inclusions. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 1997; 81: 157-62.
2. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene product for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; 340: 1053-8.
3. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993; 54: 271-335.
4. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44-A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10: 423-8.

5. Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, *et al.* Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53: 4654-6.
6. Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G, *et al.* Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 383-7.
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* 1995; 345: 615-9.
8. Gu J, Daa T, Kashima K, Yokoyama S, Nakayama I, Noguchi S. Expression of splice variants of CD44 in thyroid neoplasm derived from follicular cells. *Pathol Int* 1998; 48: 184-90.
9. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, *et al.* Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 375-81.
10. Pilotti S, Collini P, del Bo R, Cattoretto G, Pierotti MA, Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1054-64.
11. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* 1994; 24: 205-10.
12. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Keoffler HP. High prevalence of p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91: 179-84.
13. Ito T, Seyama T, Mizuno T, *et al.* Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992; 52: 1369-71.
14. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993; 91: 1753-60.
15. Resnick M, Lester S, Tate JE, *et al.* Viral and histopathologic correlates of MN and MIB-1 expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 1996; 27: 234-9.
16. Ohoyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. Proliferative activity and malignancy in human gastric cancer: significance of the proliferation rate and its clinical application. *Cancer* 1992; 69: 314-21.
17. Yonemura Y, Kimura H, Ohoyama S, *et al.* Immunohistochemical staining of proliferating cells in endoscopically biopsied tissues of gastric carcinomas with monoclonal antibody Ki-67. *Oncology* 1991; 48: 589-93.
18. Okayasu I, Osakabe T, Onozawa M, Mikami T, Fusiwara M. p53 and p21<sup>WAF1</sup> expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88: 183-91.
19. Figge J, del Rosario AD, Gerasimov G, *et al.* Preferential expression

- of the cell adhesion molecule CD44 in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 1994; 61: 203-11.
20. Ermak G, Gerasimov G, Troshina K, *et al.* Deregulated alternative splicing of CD44 messenger RNA transcripts in neoplastic and nonneoplastic lesions of the human thyroid. *Cancer Res* 1995; 55: 4594-8.
21. Karlsson MG, Hardell L, Hallquist A. No association between immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, Ki-67, estrogen and progesterone receptors in female papillary thyroid cancer and ionizing radiation. *Cancer Lett* 1997; 120: 173-7.
22. Muller-Hocker J. Immunoreactivity of p53, Ki-67 and bcl-2 in oncocyctic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol* 1999; 30: 926-33.
23. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, *et al.* Expression of p27<sup>kip1</sup> and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998; 11: 169-74.