

위암에서 CD44s와 CD44v6 발현과 임상병리학적 상관관계에 관한 연구

이주호 · 임정화 · 전호중

조선대학교 의과대학 병리학교실
고려대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2003년 7월 21일
게재승인 : 2003년 10월 6일

책임저자 : 이 주 호
우 501-759 광주광역시 동구 서석동 375
조선대학교 의과대학 병리학교실
전화: 062-230-6348
Fax: 062-234-4584
E-mail: lizhucl@hanmail.net

Studies of CD44s and CD44v6 Expressions and Correlation with Clinicopathologic Parameters in Gastric Carcinoma

Zhuhu Li, Zhenhua Lim¹ and Hojong Jeon

Department of Pathology, Chosun University Medical College; Gwangju;
¹Department of Pathology, Korea University Medical College, Seoul, Korea

Background : The aim of this study is to elucidate the relationship between the CD44s and CD44v6 expression level and the biological characteristics of a gastric carcinoma. **Methods :** CD44s and CD44v6 expression was investigated in 56 gastric carcinomas, 18 dysplasias, and 22 normal mucosae by immunohistochemical staining. **Results :** The CD44s and CD44v6 expression rates in gastric carcinomas, dysplasia, and normal mucosae were 80.3% and 83.9%, 72.2% and 77.8%, and 13.6% and 4.5%, respectively. Statistical analysis showed significant difference after comparing a gastric carcinomas and dysplasia to the normal mucosae ($p < 0.001$). The CD44s and CD44v6 expression rates in the cases with invasion to the muscle proper and serosa were 60.7% and 57.1%, and 82.4% and 88.2%, respectively. Both showed a significant statistical difference compared to the expression rates in the cases with invasion to the mucosae and submucosae. The CD44s and CD44v6 expression rates in gastric carcinomas with a lymph node metastasis showed a statistically significant difference compared to those without a lymph node metastasis ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). CD44s and CD44v6 were also expressed in the normal basal cells around gastric carcinomas. **Conclusions :** The CD44s and CD44v6 expression showed a significant relationship with gastric carcinogenesis, toward an aggressive biologic behavior.

Key Words : Gastric Carcinoma-Dysplasia-CD44s-CD44v6

위암은 각종 암종에서 발생률과 사망률이 가장 높은 악성종양이다. 위암의 예후는 위암의 분화도, 침윤정도, 전이와 아주 밀접한 관계를 가지고 있다. 위암의 수술 예후를 정확히 판단하고 적절한 치료방법을 사용하는 것은 환자의 생존율을 높이는 데 아주 중요한 작용을 한다. 위암의 발생, 진단, 전이과정에는 여러가지 환경요인과 유전자의 변화가 복잡하게 연결되어 있다. 현재 암유전자(oncogene)와 암억제유전자(tumor suppressor gene)에 관한 연구가 활발히 전개 되어 있으며 아주 큰 진전을 가져 왔다. 또한 암의 전이와 밀접한 관계가 있는 세포부착인자에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는 중이다.

CD44 항원은 잘 알려진 세포 부착 분자로 세포와 세포, 세포와 기질의 부착, 림프구의 귀향, 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 한다.¹⁻⁴ 인간의 CD44 유전자는 chromosome 11 (11p13)에 존재하는 60 Kb의 길이에 최소 20 exon이 분포 되어 있는 것으로

알려져 있는데, RNA 접합 과정 중 exon 5에서 exon 10 사이에 선택적인 재조합이 이루어져 적어도 10개의 exon이 존재한다. 표준형 CD44s는 히알루론산염(hyaluronate)의 수용체로 작용하여 혈구 세포와 상피 세포 등에 널리 분포한다. 그러나 정상세포에서 관찰되지 않는 변이된 CD44v 형은 대장암, 위암, 유방암, 악성 림프종, 자궁경부암종 및 폐암 등에서 발현이 증가하고, 특히 exon 6번이 포함된 CD44v6의 발현과 악성 종양의 전이는 서로 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다.⁵⁻¹⁰ 현재 위암에서 CD44s와 CD44v6에 관한 연구는 활발히 전개되고 있으나, 그 연구결과는 다양하다.¹¹⁻¹⁴ 본 연구는 면역조직화학 방법을 이용하여 CD44s와 CD44v6의 위암, 이형성, 정상 위점막에서의 발현과 위암의 분화도, 침윤정도, 림프절전이 그리고 원격전이 등의 임상병리학적 특성과의 상관관계를 분석하여, CD44s와 CD44v6이 위암에서 가지는 역할을 규명하고자 하였다.

재료와 방법

재료

1994년부터 2000년까지 중국 연변대학 의학원 부속병원 병리과에서 조직검사를 통해 진단되고 보관상태가 양호한 각종 위암 56예, 이형성 18예, 위암주위의 정상위점막조직 22예 등 모두 96예를 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 남자는 47.3세이고 여자는 46.8세이다. 위암종의 조직학적 분류는 WHO에 근거하였다.

면역조직화학 염색방법

10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 4 μm 두께로 박절하여 코팅 슬라이드에 부착하고 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 증류수로 세척하고 10 mM citrate buffer (PH 6.0)로 Microwave에서 12분간 끓여 항원성 회복을 실행하였다. 3% H₂O₂에 15분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제하였다. 단클론성 CD44s (1:100, Zymed Laboratories, CA, U.S.A)와 CD44v6 (1:50, NeoMarkers, CA, U.S.A) 일차 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 후 세척하고 이차 항체를 조직 위에 30분 부치하였다. 세척 후 Streptavidin-peroxidase를 30분간 부치한 후 세척하고 발색제 3,3-Diaminobenzidine를 10분간 부치한 후 Hematoxylin으로 대조 염색을 진행하였다. 염색의 전 과정에서 0.1 M의 Tris buffer (PH 7.6)를 사용하였다. 음성 대조는 일차 항체 대신에 Tris buffer를 이용하여 같은 염색을 하였으며 양성 대조는 이미 알려진 양성 대장암조직으로 하였다.

결과 판독

CD44s와 CD44v6이 양성인 경우 세포막에 적갈색의 염색이 나타난다. 일부본은 세포질에 얼은 갈색으로 나타난다. 판정표준은 Tomomi Ishida¹⁵의 표준에 근거하여 40×10배 고배율 시야에서 총 1,000개의 중앙세포 중 세포막이 양성인 세포의 수를 백분율로 환산하였다. 양성 세포수가 20% 이내로 나타나면 음성(-), 80% 이상이면 강양성(++), 20-80% 사이인 경우 양성(+)으로 판정하였다.

Table 1. Expression of CD44s and CD44v6 in gastric carcinoma, dysplasia and normal mucosa

| | n | CD44v6 | | % | CD44v6 | | % |
|-------------------|----|--------|-------|---------|--------|------|---------|
| | | ++ | + - | | ++ | + - | |
| Gastric carcinoma | 56 | 33 | 12 11 | 80.3*** | 32 | 15 9 | 83.9*** |
| Dysplasia | 18 | 7 | 7 5 | 72.2*** | 8 | 6 4 | 77.8*** |
| Normal mucosae | 22 | 0 | 3 19 | 13.6 | 0 | 1 21 | 4.5 |

***p<0.001 vs normal mucosae.

통계 분석

Chi-square test를 이용하였고 p value는 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과

위암 56예 중 CD44s는 33예가 강양성(++), 12예가 양성(+)으로 모두 45예(80.3%)가 양성 소견을 보였고, CD44v6은 32예가 강양성(++), 15예가 양성(+)으로 모두 47예(83.9%)가 양성소견을 보였다. 이형성 18예 중 CD44s는 7예가 강양성(++), 6예가 양성(+)으로 모두 13예(72.2%)가 양성소견을 보였고, CD44v6은 8예가 강양성(++), 6예가 양성(+)으로 모두 14예(77.8%)가 양성소견을 보여, 정상 위점막 22예 중 CD44s는 3예(13.9%), CD44v6은 1예(4.5%)가 양성소견을 보인 데 비해 모두 아주 유의한 차이를 보였다(p<0.001) (Fig. 1) (Table 1).

CD44s와 CD44v6의 과발현과 위암의 생물학적 특징과의 관계를 보면, 분화정도에서 CD44s는 고분화형에서 22예 중 13예(59.1%), 중등도분화형에서 18예 중 12예(66.7%), 저분화형에서 16예 중 8예(50.0%)가 강양성으로 발현되어, 고분화형과 중등도분화형에서 저분화형에 비해 높게 발현되었지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05). CD44v6는 고분화형에서 22예 중 15예(68.2%), 중등도분화형에서 18예 중 11예(61.1%), 저분화형에서 16예 중 6예(37.5%)가 강양성으로 발현되어, 분화가 낮을수록 발현이 낮아졌지만 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p>0.05). 종양의 침윤정도를 보면, 고유근층 침윤에서 CD44s는 28예 중 17예(60.7%)가 강양성으로 점막과 점막하층 침윤 11예 중 2예(18.2%)가 강양성으로 발현된 데 비해 유의한

Table 2. Expression of CD44s & CD44v6 and clinicopathologic parameters in gastric carcinoma

| Variable | n | CD44s (++)/% | CD44v6 (++)/% |
|--|-------|--------------|---------------|
| Differentiation grade | | | |
| Well | 22 | 13/59.1 | 15/68.2 |
| Moderate | 18 | 12/66.7 | 11/61.1 |
| Poor | 16 | 8/50.0 | 6/37.5 |
| Depth of invasion | | | |
| Mucosa and submucosa | 11 | 2/18.2 | 1/9.1 |
| Muscle proper | 28 | 17/60.7 | 16/57.1 |
| Serosa exposed and serosa17 infiltrative | 14/82 | 4/28.6 | 15/88.2 |
| Lymph node metastasis | | | |
| (+) | 21 | 19/90.5 | 18/85.7 |
| (-) | 35 | 14/40.0 | 14/40.0 |
| Distant metastasis | | | |
| (+) | 11 | 8/72.7 | 7/63.6 |
| (-) | 45 | 25/55.5 | 25/55.5 |

▲p<0.05, ▲▲p<0.01, ▲▲▲p<0.001.

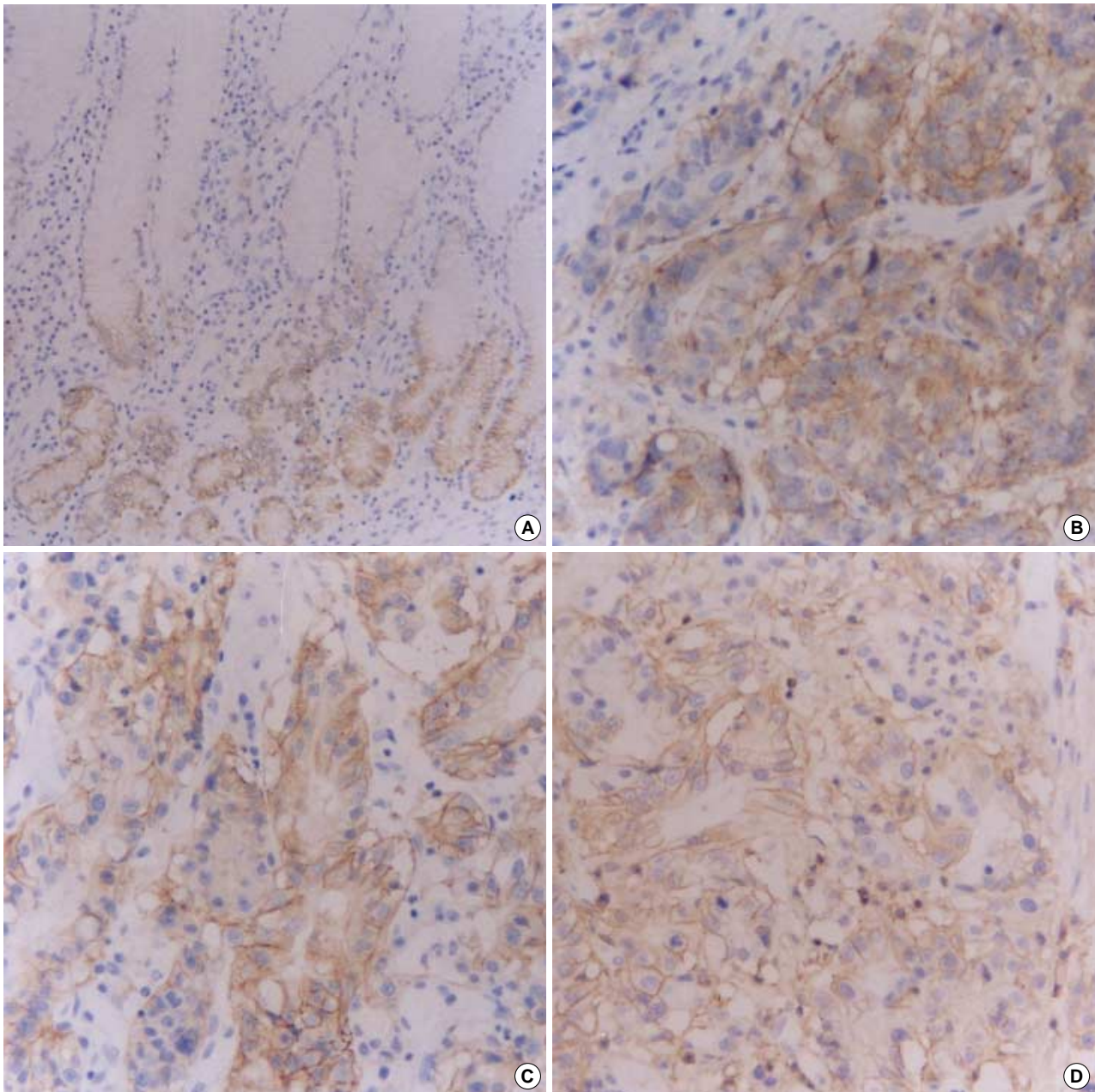


Fig. 1. CD44s and CD44v6 immunohistochemical stainings in normal gastric mucosa and carcinoma. (A) The proper glands of the normal mucosa show positivity for CD44v6. (B) A case of gastric carcinoma shows strong positivity for CD44s. (C, D) Cases of gastric carcinoma show positivity for CD44v6.

차이를 보였다($p < 0.05$). CD44v6은 고유근층 침윤 28예 중 16예(57.1%)가 강양성으로, 점막과 점막하층 침윤 11예 중 1예(9.1%)가 강양성으로 발현된 데 비해 아주 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$). 장막층까지 침윤 17예에서 CD44s는 14예(82.4%), CD44v6은 15예(88.2%)가 강양성으로 발현되어, 점막과 점막하층 침윤에 비해 모두 아주 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$). 림프절 전이와의 관계에서는, 전이가 있는 21예 중 CD44s는 19예가

강양성으로 90.5%가 발현되었고, CD44v6은 18예가 강양성으로 85.7%가 발현되었다. 이것은 림프절전이가 없는 35예 중 각각 14예가 강양성으로 40.0%가 발현된 데 비해 아주 유의한 차이를 보인 것이다($p < 0.001$, $p < 0.01$). 원격전이에서는 전이가 있는 예와 없는 예가 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$) (Table 2).

고찰

표준형 CD44s는 히알루론산염(hyaluronate)의 수용체로 작용하여 혈구 세포와 상피 세포 등에 널리 분포한다. CD44의 변이형의 기능에 대해 아직 완전히 알려지지 않고 있다. Gunthert 등¹⁶은 전이능력이 없는 쥐의 췌장암주에 CD44v6을 transfection하여 전이능력을 획득하게 하였고 또 CD44v6에 대한 항체를 주입하여 전이능력을 상실하게 하였다고 보고하였다. CD44v6은 많은 악성 종양에서 발현이 증가되고 림프절전이와 밀접한 관계가 있다고 보고되어 있다^{7,8,11,17}. Tomomi Ishida¹⁵는 대장암 연구에서 CD44v6는 정상세포와 증식세포에서 발현되지 않았고, CD44s는 일부분에서 발현 되어 CD44v6이 CD44s에 비해 대장암 진단에서 더욱 믿음직한 기준이 될 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 CD44v6이 정상 위점막 세포에서 1예가 양성으로 나타나 위 보고와 차이가 있었다. 본 연구에서 위암과 이형성에서 CD44s와 CD44v6의 발현이 정상 위점막에 비해 모두 유의한 차이를 보였다. 이 결과에서 CD44s와 CD44v6는 위암과 전암병변인 이형성의 발생에 참여한다는 것을 알 수 있다. 또한 CD44s와 CD44v6의 발현을 통하여 전암병변을 조기에 발견하고 적당한 치료를 통하여 위암 방지에 중요한 작용을 할 수 있다.

위암에서 CD44에 관한 연구는 활발히 진행되고 있으나 그 연구 결과가 다양하고 반대되는 보고도 있다. Heider 등¹⁸의 연구 결과에 의하면 장형위암과 Hyperplasia에서 v5와 v6이 과발현되지만 미만형에서는 v5만 주로 과발현 된다고 하였다. Hong 등¹²은 CD44s와 CD44v6은 장형에서 발현율이 높고, CD44v6은 장형에서는 여러 병리학적 인자들과 연관성이 없으나 미만형에서는 침윤 깊이, 림프절전이, 원격전이, 성장유형 등과 유의한 인과관계를 보여 미만형 위선암에서 CD44v6이 갖는 역할을 보고하였다. Dammrich, Castella 등^{13,14}은 CD44v6이 장형의 위선암에서 림프절전이와 유의한 관계가 있는 반면, 미만형의 위선암에는 영향을 주지 못한다고 보고하였다. 본 연구결과에서 CD44s와 CD44v6은 분화도가 높을수록 발현이 높았지만 통계학적 의미는 없었다. 종양의 침윤이 깊으면 깊을수록 양성률이 더 높았고 고유근층 침윤과 장막층 침윤에서 CD44s는 각각 60.7%와 82.4%가 강양성으로 발현 되었으며, CD44v6은 각각 57.1%와 88.2%가 강양성으로 발현되어 점막과 점막하층 침윤의 CD44s 18.2%와 CD44v6 9.1%에 비해 아주 유의한 차이를 보였다. 이것은 CD44s와 CD44v6이 위암의 분화도와 연관성이 없고 침윤 깊이와 연관성이 있다는 것을 설명한다. 림프절전이의 관계에서 전이가 있는 위암에서 CD44s와 CD44v6이 모두 과발현되어 림프절전이가 없는 위암에 비해 아주 유의한 차이를 보였다. 그러나 원격전이에서는 유의한 차이가 없는것으로 나타났다. 이 결과에서 CD44s와 CD44v6이 림프절 전이와 밀접한 연관성이 있고 원격 전이와는 연관성이 없는 것으로 나타나 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

참고문헌

1. Chieng 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* 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. Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, *et al.* Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6 containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 344: 1470-2.
6. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 301-9.
7. Mirecka J, Marx D, Schauer A. Immunohistochemical localization of CD44 variants 5 and 6 in human gastric mucosa and gastric cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 1459-65.
8. 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.
9. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14: 395-9.
10. Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G, *et al.* Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage I B to II B. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 383-7.
11. Kurozumi K, Nishida T, Nakao K, Nakahara M, Tsujimoto M. Expression of CD44 variants 6 and lymphatic invasion: importance to lymph node metastasis in gastric cancer. *World J Surg* 1998; 22: 853-7.
12. Hong RL, Lee WJ, Shun CT, Chu JS, Chenn YC. Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse-type and intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Oncology* 1995; 52: 334-9.
13. Dammrich J, Vollmers HP, Heider KH, Muller-Hermelink HK. Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *Mol Med* 1995; 73: 395-401.
14. Castell EM, Ariza A, Pellicer I, Fernandez-Vasalo A, Ojanguren I. Differential expression of CD44v6 in metastasis of intestinal and diffuse type of gastric carcinoma. *Clin Pathol* 1998; 51: 134-7.
15. Ishida T. Immunohistochemical Expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg today* 2000; 30: 28-32.
16. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, *et al.* A new variant of glycopro-

- tein CD44 confers metastasis potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
17. Ham HJ, Ho LI, Chang JY, *et al.* Differential expression of human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995; 75: 1065-71.
18. Heider KH, Dammich J, Skroch-Angel P, *et al.* Differential expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse-type human gastric carcinomas and normal mucosa. *Cancer Res* 1993; 53: 4197-203.