

비소세포폐암종에서 c-kit와 세포주기 조절인자의 발현

장선희^{1,2} · 주 미^{1,2} · 김한성¹

인제대학교 일산백병원 병리과
임상연구센터

접 수 : 2006년 7월 26일
게재승인 : 2006년 11월 10일

책임저자 : 장 선희
우 411-706 경기도 고양시 일산서구 대화동
2240
인제대학교 일산백병원 병리과
전화: 031-910-7138
Fax: 031-910-7139
E-mail: changsh@ilsanpaik.ac.kr

*본 연구는 2005년 인제대학교 신입교수연
구비 지원을 받아 이루어졌음.

Expression of c-kit and Cell Cycle Regulators in Non-small Cell Lung Carcinoma

Sun Hee Chang^{1,2}, Mee Joo^{1,2} and Hanseong Kim¹

Department of Pathology¹ and Clinical Research Center², InJe University Ilsan Paik Hospital,
Goyang, Korea

Background : The abnormal expression of c-kit is implicated in the pathogenesis of a variety of solid tumors. The Rb pathway and p53 act as cell cycle regulators. The purpose of this study was to assess the expression of c-kit, Rb, p53, p16 and cyclin D1 and their relationship to clinical and pathological parameters in patients with non-small cell lung carcinomas (NSCLCs).

Methods : Tissue microarrays consisting of 2 mm cores from the corresponding blocks were constructed from 54 NSCLCs. Immunohistochemical staining for c-kit, Rb, p53, p16 and cyclin D1 was performed. C-kit immunostaining was considered positive if $\geq 10\%$ of tumor cells were immunoreactive along the membrane and/or in cytoplasm. For Rb, p53, p16 and cyclin D1, tumor cells showing a nuclear staining pattern were interpreted as positive. **Results :** We found that c-kit was expressed in 13 (24%) cases, Rb was lost in 39 (72%) cases, p53 was expressed in 28 (52%) cases, p16 was lost in 42 (78%) cases and cyclin D1 was expressed in 33 (61%) cases. The c-kit expression was significantly higher in adenocarcinoma (39%) than in squamous cell carcinoma (8%). We did not find any correlation between c-kit, Rb, p53, p16 and cyclin D1 expression and clinicopathological parameters such as: age, tumor size, lymph node involvement, disease stage and distant metastasis. There was a direct correlation between p53 expression and Rb loss. **Conclusions :** These results suggest that c-kit may be a useful therapeutic target for patients with c-kit positive tumors, and that the disruption of Rb and p53 pathways may play an important role in the development and progression of NSCLCs.

Key Words : Non small cell lung carcinoma; c-kit; Rb; p53; Cell cycle proteins

C-kit는 염색체 14번의 단원에 위치하는 원발암유전자로서 표면 타이로신 키나아제 수용체를 코드화한다.¹⁻³ 그 리간드는 줄기세포인자로도 알려져 있는데, 줄기세포인자에 의해 c-kit가 활성화되면 표면 타이로신 키나아제 수용체의 이합체화가 일어나고, 인산화 반응과 세포 내 신호변환경로의 개시반응을 초래하여 세포의 증식과 분화를 포함한 각종 세포분열 과정의 규제가 유도된다. C-kit는 잘 알려진 위장관기질종양과 골수성 백혈병 외에도 악성 흑색종, 아교모세포종, 생식세포 종양, 유방암의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.

폐의 소세포암종에서도 c-kit의 발현이 높은 빈도로 보고되고 있어, 소세포암종의 빠른 성장과 c-kit 사이에 관련성이 있을 것으로 보인다.⁴ 또 타이로신 키나아제 억제제인 STI-571 (imatinib mesylate)이 소세포암종을 치료하는 데 효과가 있다는 보고도 있다.^{5,6} 그러나 비소세포폐암종에서 c-kit 발현에 관한

연구는 미미한 실정이며, 보고자에 따라 다른 결과를 기술하고 있다. 그러나, Zhang 등⁷은 imatinib이 폐선암종 세포주의 성장을 억제하고, cisplatin의 치료 효과를 높여주었다고 보고하였다.

p16/cyclin D1/Rb 경로는 암 발생과 관련하여 유전자가 변화할 때 세포주기 조절에서 단일 표적으로 작용하는 중요한 요소다. Cyclin D1 유전자는 염색체 11q13에 위치하며 G1/S 이행 단계에 관여한다. Cyclin D1 유전자는 유방암종, 두경부와 식도의 편평세포암종, 간세포암종 등에서 재배열 및 증폭에 의한 과발현이 관찰되었다.⁸ Cyclin D1이 CDK4/6와 복합체를 형성하여 활성화되면서 Rb 단백을 인산화하여 불활성화하고 E2F 전사인자를 유리시킨다. 그러면 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하여 세포 증식을 초래함으로써 궁극적으로 암을 유발하는데, 이러한 과정은 p16과 같은 억제 단백질로 조절할 수 있다. Cyclin D1의 발현은 Rb와 p53에 의해 상향조절되고, Rb와 p53을 불활성화

시키는 것으로 알려진 인유두종바이러스의 발암단백에 의해 하향 조절되는 것으로 보고되었다. p16은 선택적으로 CDK4와 cyclin D1 복합체의 활성도를 억제한다. Rb의 인산화로 유리된 E2F는 p16 유전자의 전사를 활성화하여 세포주기를 억제하는 것으로 알려져 있다. Rb, p53, p16, cyclin D1은 폐암종의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있으나, 이들 사이의 상관성을 분석한 연구는 많지 않다.

이에 저자들은 면역조직화학 염색을 통해 비소세포폐암종에서 c-kit와 Rb, p53, p16, cyclin D1 단백질의 발현 정도를 관찰하고 상호 비교함으로써 비소세포폐암종이 발생하는 과정에서 이들이 하는 역할을 알아보려 하였다. 더불어 이들의 발현과 폐암종의 임상병리학적 예후인자 사이의 상관성을 평가하고자 하였다.

재료와 방법

연구 재료

2000년 1월부터 2005년 12월까지 일산백병원에서 비소세포폐암종 진단을 받아 수술받은 54명의 환자에게서 얻은 조직을 대상으로 하였다. 신선한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매체를 제작해서 헤마톡실린-에오신 염색을 하여 진단에 사용하였다. 연구 대상 환자들의 임상기록과 병리보고서를 재검토하여 병리 소견 및 관련인자들을 조사하였다. 종양은 WHO 분류에 따라 분류하였다. 종양의 병기분류는 미국암위원회 암병기 지침서에 따라 TNM 병기로 분류하였다.

연구 방법

Tissue microarray 제작

Tissue microarray 블록 제작 기구를 이용하여 선정된 부위에 2 mm 크기로 구멍을 뚫었다. '2000년 1월에서 2004년 12월 증례'를 위해 미리 준비한 두 개의 recipient 블록에 구멍을 6열 8행으로 45개 뚫었고, '2005년 1월에서 2005년 12월 증례'를 위해 두 개의 recipient 블록에 구멍을 6열 2행으로 9개 뚫었다. 각 증례 블록에서 펀치한 조직 조각을 각각의 구멍에 심었다. 단면을 고르게 하기 위해서 제작한 tissue microarray 블록을 50°C 보온기에서 20분간 방치하였다.

면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위하여 tissue microarray 블록에서 4 μ m 두께의 절편을 박절하여 59°C 보온기에 60분간 처리한 후 자이렌으로 파라핀을 제거하였다. 100%, 95%, 75% 알코올에 각각 3분간 순서대로 처리하고 증류수로 씻어냈다. 5분간 미리 가운한 10 mM citrate 완충용액(pH 6.0)으로 23분을 끓인 다음 20분간 냉각한 후, 이차 증류수로 씻어냈다. 내인성 페록시다

아제의 활성을 억제하기 위해 3%의 과산화수소로 처리한 후, 다시 인산완충용액에 10분간 수세하였다. 일차 항체는 c-kit (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, SC-168), Rb (1:100, Novocastra, Newcastle, UK, NCL-L-RB-358), p53 (1:100, Novocastra, Newcastle, UK, NCL-L-P53-DO7), p16 (1:20, Dakocytomation, Carpinteria, USA, K-5334), cyclin D1 (1:100, Lab vision, Fremont, CA, RM-9104-S1)을 사용하였으며, 자동 염색기(Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA, NEXES IHC)로 염색하였다. 이차 항체로는 iView DAB Detection kit (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA, 760-091)를 사용하였고 Hematoxylin II (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA, 790-2208)와 Bluing Reagent (Ventana Medical Systems, Inc., Arizona, USA, 760-2037)로 대조염색 후 봉입하였다.

면역조직화학 염색 결과 판정

C-kit는 종양세포의 세포막과 세포질에 염색되고 전체 종양 세포의 10% 이상일 때 양성으로 판정하였다. Rb, p53, p16, cyclin D1은 종양 세포의 10% 이상에서 핵이 적갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다.

통계방법

통계처리는 Window용 SPSS 10.0 프로그램(SPSS, Chica-

Table 1. Clinicopathologic data and the results of immunohistochemical studies of the patients with non-small cell carcinoma

	c-kit + (%)	Rb - (%)	p53 + (%)	p16 - (%)	cyclin D1 + (%)
Age					
<60 (n=10)	3 (30)	7 (70)	5 (50)	7 (70)	6 (60)
≥60 (n=44)	10 (23)	32 (73)	23 (52)	35 (80)	27 (61)
Histologic type					
AC (n=28)	11 (39)*	22 (79)	13 (46)	22 (79)	21 (75)
SCC (n=26)	2 (8)	17 (65)	15 (58)	20 (78)	12 (46)
Tumor extent					
T1 (n=18)	7 (39)	13 (72)	9 (50)	14 (78)	12 (67)
T2 (n=26)	4 (15)	20 (77)	14 (54)	20 (77)	16 (62)
T3 (n=8)	1 (13)	4 (50)	3 (38)	7 (88)	5 (63)
T4 (n=2)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	0 (0)
LN involvement					
N0 (n=33)	7 (21)	24 (73)	17 (52)	24 (73)	20 (61)
N1 (n=11)	3 (27)	8 (73)	7 (64)	8 (73)	8 (73)
N2 (n=10)	3 (30)	7 (70)	4 (40)	10 (100)	5 (50)
Stage					
1 (n=29)	8 (28)	21 (72)	15 (52)	20 (69)	19 (66)
2 (n=11)	1 (9)	8 (73)	4 (36)	10 (91)	7 (64)
3 (n=14)	4 (29)	10 (71)	9 (64)	12 (86)	7 (50)
Distant metastasis (n=12)	3 (25)	9 (75)	7 (58)	10 (83)	6 (50)

AC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma. *p<0.05.

go, USA)을 사용하여, χ^2 test를 시행하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

자의 나이는 40세에서 81세까지 분포(중앙값 65세)하였다. 중앙 유형은 샘암종 28예, 편평세포암종 26예였다. 임상병기에 따라 분류하면 병기 1이 29예(54%), 병기 2가 11예(20%), 병기 3이 14예(26%)였다.

결 과

임상 및 병리조직학적 소견 (Table 1)

C-kit, Rb, p53, p16과 cyclin D1 발현과 임상병리학적 인자들의 상관관계 (Table 1)

총 54예 중 남자가 37명(69%), 여자가 17명(31%)이었다. 환

비소세포폐암종 54예 중 c-kit는 13예(24%), p53은 28예(52

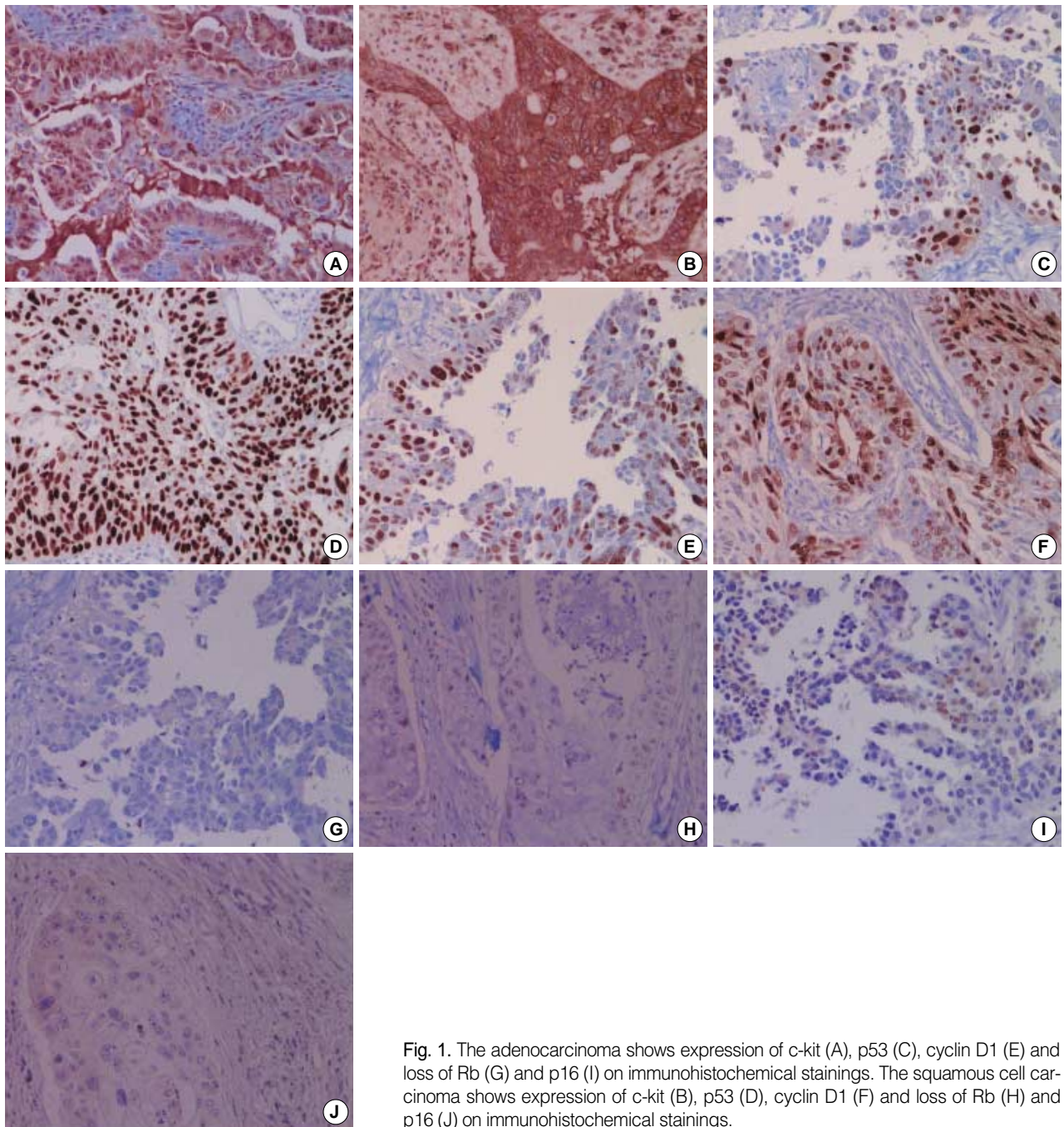


Fig. 1. The adenocarcinoma shows expression of c-kit (A), p53 (C), cyclin D1 (E) and loss of Rb (G) and p16 (I) on immunohistochemical stainings. The squamous cell carcinoma shows expression of c-kit (B), p53 (D), cyclin D1 (F) and loss of Rb (H) and p16 (J) on immunohistochemical stainings.

%), cyclin D1은 33예(61%)에서 양성으로 발현하였다(Fig. 1A-F). Rb는 39예(72%), p16은 42예(78%)에서 발현이 소실되었다(Fig. 1G-J). C-kit는 편평세포암종(8%)보다 샘암종(39%)에서 더 높게 발현하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 림프절 전이가 없는 군에서 c-kit는 7예(21%), p53은 17예(52%), cyclin D1은 20예(61%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 24예(73%), p16은 27예(73%)에서 발현이 소실되었다. N1에서 c-kit는 3예(27%), p53은 7예(64%), cyclin D1은 8예(73%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 8예(73%), p16은 8예(73%)에서 발현이 소실되었다. N2에서 c-kit는 3예(30%), p53은 4예(40%), cyclin D1은 5예(50%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 7예(70%), p16은 10예(100%)에서 발현이 소실되었다. 병기 1의 29예 중 c-kit는 8예(28%), p53은 15예(52%), cyclin D1은 19예(66%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 21예(72%), p16은 20예(69%)에서 발현이 소실되었다. 병기 2의 11예 중 c-kit는 1예(9%), p53은 4예(36%), cyclin D1은 7예(64%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 8예(73%), p16은 10예(91%)에서 발현이 소실되었다. 병기 3의 14예 중 c-kit는 4예(29%), p53은 9예(64%), cyclin D1은 7예(50%)에서 양성으로 발현하였고, Rb는 10예(71%), p16은 12예(86%)에서 발현이 소실되었다. 나이, T 병기, 림프절 전이, 임상병기, 원격전이는 c-kit, p53, cyclin D1 발현 및 Rb와 p16 발현 소실과 통계적인 유의성이 없었다. p53과 cyclin D1 발현 및 Rb와 p16 발현 소실은 종양의 조직학적 유형과 통계적인 유의성이 없었다.

C-kit, Rb, p53, p16과 cyclin D1 발현의 관계

Rb가 음성인 39예 중 p53이 음성인 경우는 15예, 양성인 경우는 24예였으며, Rb가 양성인 15예 중 p53이 음성인 경우는 11예, 양성인 경우는 4예였다. 이처럼 Rb 발현이 소실될 때 p53 발현이 유의하게 증가했다($p < 0.05$). C-kit, p16, cyclin D1 발현 사이에 통계학적 유의성은 없었다.

고 찰

C-kit 발현은 소세포암종의 70%에서 관찰된다.⁴⁻⁶ 그러나 비소세포암종에서 c-kit 발현은 0%에서 27%로 다양하게 보고되었다.⁹⁻¹¹ 이는 비소세포암종 내 아형에 따른 c-kit 발현율의 차이 때문일 수 있다. 본 연구에서 c-kit 발현율은 24%였으며 편평세포암종(8%)보다 샘암종(39%)에서 더 높게 발현하는 경향을 보였다. 이전 보고에서 c-kit 발현율은 편평세포암종에서 0-30%, 샘암종에서 0-64%였다. 그러나 c-kit 발현이 높게 나타난 아형은 연구자에 따라 달라서 좀 더 많은 검체를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

비소세포암종에서 c-kit 발현과 임상병리학적 예후인자들

사이의 상관관계에 대해서는 거의 연구된 바가 없는 실정이다. 그 중 Yoo 등¹⁰은 c-kit 발현과 T 병기가 관련이 있다고 보고하였다. 그러나 Yaren 등¹¹은 본 연구에서처럼 c-kit 발현과 임상병리학적 예후인자들 사이에 아무런 상관관계도 없다고 보고하였다. 비소세포암종에서 c-kit 발현이 중요한 예후예측인자가 될 수는 없으나, 수술할 수 없거나 재발한 c-kit 양성 종양에서 STI-571이 효과적인 치료제로 사용할 수 있을 것이다.

본 연구에서 Rb 소실은 이전 연구에서 보고한 6.5-60%보다 높은 72%였다.¹²⁻¹⁷ Rb 소실이 샘암종에서 생존을 단축시키는 경향이 있다는 보고가 있으나, 본 연구에서 Rb 소실과 예후인자의 상관관계는 확인되지 않았다.

비소세포암종에서 p53 발현율은 40-80%로 보고되었으며, 본 연구에서는 52%였다.^{10,16-19} p53 발현과 예후인자의 상관관계를 둘러싸고 많은 논란이 벌어지고 있는데, Yoo 등¹⁰은 p53 발현이 T 병기와 역상관계가 있다고 보고하였다. 본 연구에서 p53은 예후인자와 상관관계가 없었다. p53 변이가 편평상피 형성 이상이나 비정형 샘종 과다형성에서도 나타나는 것으로 미루어 p53 변이가 폐종양 초기에 일어나기 때문에 종양 진행과 상관관계가 없을 수도 있다.

본 연구에서 p16 소실률은 이전에 보고된 30-58%보다 높은 78%였다.^{17,19} 본 연구에서 p16 소실률은 예후인자와 상관관계가 없었다. p16 발현과 생존율의 상관관계를 분석한 이전의 연구에서도 p16 발현 종양에서 생존율이 증가했다는 보고도 있었고 감소했다는 보고도 있었다. p16의 불활성화는 종양 개시와 클론 확장에 중요한 단계로 종양 발생 초기에 일어나는 현상이기 때문에 예후와 밀접한 관련이 없을 수도 있다. p16과 예후인자의 상관관계는 좀 더 많은 사례를 대상으로 확인해야 할 것이다.

이전 연구에서 cyclin D1 발현율은 12-57%였으며, 예후와 상관관계를 보이지 않는 것으로 보고되었다.^{13,14,17,18} 본 연구에서 cyclin D1은 61%에서 발현되었으며, 예후인자와 상관관계가 없었다.

Rb 경로 이상 중 본 연구에서 가장 흔히 관찰된 것은 p16과 Rb 소실이었으며, 20예(37%)에서만 Rb 소실, p16 소실, cyclin D1 발현이 동시에 일어났다. p53 발현과 Rb 소실 사이에는 상관관계가 있었으나, c-kit, p16, cyclin D1 사이에는 상관관계가 없었다. 이러한 결과는 종양 개시와 진행에 관여하는 유전자의 다양성과 복잡한 상호작용을 시사하는 것이다. CDK 억제자인 p15, p18, p19가 Rb를 불활성화시킬 수 있다. 또한 Rb 또는 p16에서 단일염기치환에 의해 면역반응력에 영향을 주지 않으면서 기능을 하지 않을 수도 있다. 이러한 현상은 Rb의 경우 비소세포암종 세포주의 4%에서, p16의 경우 8%에서 보고되었다.^{20,21}

이상으로 비소세포암종의 일부에서 c-kit 발현, p53 발현, Rb 경로 이상이 일어난다는 사실을 확인하였다. 그리고 이상의 결과로 미루어 다양한 유전자 변이가 비소세포암종 발생에 관여한다는 사실을 확인하였다. Rb 경로의 이상이 비교적 높고, p53 발현과 Rb 소실 사이에 연관이 있어 이들이 비소세포암

중 발생이나 진행에 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한 c-kit 발현은 향후 비소세포폐암증을 치료하는 과정에서 표적화 치료 요법을 사용할 수 있는 가능성을 시사하였다.

참고문헌

1. Fausone-Pellegrini MS, Thuneberg L. Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 248-66.
2. Seidal T, Edvardsson H. Expression of c-kit (CD117) and Ki67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 1999; 34: 416-24.
3. Tian Q, Frierson HF Jr, Krystal GW, Moskaluk CA. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999; 154: 1643-7.
4. Krystal GW, Honsawek S, Kiewlich D, *et al.* Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3660-8.
5. Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3319-26.
6. Rossi G, Cavazza A, Marchioni A, *et al.* Kit expression in small cell carcinomas of the lung: effects of chemotherapy. *Mod Pathol* 2003; 16: 1041-7.
7. Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Mol cancer* 2003; 2: 1.
8. Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-60.
9. Butnor KJ, Burchette JL, Sporn TA, Hammar SP, Roggli VL. The spectrum of Kit (CD117) immunoreactivity in and pleural tumors: a study of 96 cases using a single-source antibody with a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 538-43.
10. Yoo J, Kim CH, Song SH, *et al.* Expression of c-kit and p53 in non-small cell lung cancers. *Cancer Res Treat* 2004; 36: 167-72.
11. Yaren A, Oztop I, Kargi A, *et al.* Bax, bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 675-82.
12. Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, *et al.* Altered p16INK4 and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res* 1996; 56: 5557-62.
13. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999; 188: 351-60.
14. Jin M, Inoue S, Umemura T, *et al.* Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer* 2001; 34: 207-18.
15. Saitoh G, Sugio K, Ishida T, Sugimachi K. Prognostic significance of p21waf1, cyclin D1 and retinoblastoma expression detected by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 737-43.
16. Burke L, Flieder DB, Guinee DG, *et al.* Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 232-41.
17. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, *et al.* Prognostic value of cyclin D1 overexpression in correlation with pRb and p53 status in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 479-85.
18. Nguyen VN, Mirejovsky P, Mirejovsky T, Melinova L, Mandys V. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem* 2000; 102: 323-38.
19. Tan DF, Li Q, Rammath N, *et al.* Prognostic significance of expression of p53 oncoprotein in primary (stage I-IIIa) non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 1665-72.
20. Shimizu E, Coxon A, Otterson GA, *et al.* RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene* 1994; 9: 2441-8.
21. Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 16: 497-504.