

곧창자 샘암종에서 EGFR 과발현과 수술 전 방사선회학 치료 반응

유진영 · 정주원 · 정지한 · 최현주
강석진 · 이교영

가톨릭대학교 의과대학 병원병리학교실

접 수 : 2007년 7월 12일
게재승인 : 2007년 9월 14일

책임저자 : 강 석 진
우 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93
가톨릭대 성빈센트병원 병리과
전화: 031-249-7591
Fax: 031-244-6786
E-mail: sjkang@vincent.cuk.ac.kr

*본 논문은 성빈센트병원 임상의학연구소
2006년 연구지원비로 이루어졌음.

Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression and the Tumor Response to Preoperative Radiochemotherapy for Patients with Advanced Rectal Cancer

Jinyoung Yoo, Ju Won Chyung, Ji Han Jung, Hyun Joo Choi, Seok Jin Kang and Kyo Young Lee

Department of Pathology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background : An association between the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway and the response of cancer cells to ionizing radiation has been previously described. Preoperative radiochemotherapy (PRCT) has been administered for treating locally advanced rectal cancer to improve the outcomes, and to preserve the sphincter from low-lying tumor. However, the responses of tumors to PRCT are variable and there are currently no reliable markers that predict the therapeutic benefits. We studied the association between EGFR overexpression and the tumor response to PRCT in rectal cancer. **Methods :** The EGFR protein expression, as determined by immunohistochemistry, was analyzed in the pretreatment biopsy specimens from 120 patients with advanced rectal cancer. The tumor response was graded in the surgically resected specimens by using a three-scale grading system: no response (NR), partial remission (PR) and complete remission (CR). **Results :** NR was identified in 70 cases (58.3%). Fifty patients (41.7%) responded to PRCT; 27 (22.5%) achieved a PR and 23 (19.2%) achieved a CR. EGFR overexpression was detected in 78 (65%) cases. Seventy-eight percent (39/50) of the tumors with a CR/PR revealed EGFR reactivity, whereas 55.7% (39/70) of the tumors with NR showed an EGFR expression ($p=0.048$). **Conclusions :** The EGFR protein expression might be a valuable marker for identifying those patients who are most likely to benefit from PRCT.

Key Words : Rectal neoplasms; Gene, epidermal growth factor receptor

대장암종은 세계적으로 흔한 악성 종양으로 폐암 다음으로 발생률이 높은 암종으로, 국내에서도 최근 식생활이 서구화되면서 점차 증가하는 추세로 전체 악성 종양의 장기별 발생 빈도에서 폐암, 위암, 간암에 이어 4위(9.9%)를 차지한다.¹

대장암종 중 특히 진행성 하부 곧창자 샘암종은 병기에 따라서 경항문을 국소 절제하거나 전이된 암을 병합 절제하는데, 외과적 절제술만 시행할 경우 국소 재발률이 20-40%, 원격 전이율이 57%에 이른다.² 그러나 수술 전에 방사선회학 요법(preoperative radiochemotherapy, PRCT)을 시행한 후 근치적 절제술을 시행하면, 항문 괄약근도 보존할 수 있을 뿐 아니라 종양의 크기와 병기가 감소하여 예후가 좋아진다.³ 그리하여 최근에는 항문연에서 8-10 cm 안쪽에 위치하고 컴퓨터 전산화단층촬영 결과 병기가 T3나 N1 이상이면 조직 생검으로 진단이

확인된 곧창자 샘암종에 한하여 외과적 절제 전에 보조 항암 약물 치료와 방사선 치료를 단독 또는 병행하여 시행한 다음 절제술을 시행하고 있다. 그러나 병기가 동일한 환자라도 PRCT에 반응하는 정도가 무반응에서 부분 관해, 완전 관해에 이르기까지 다양하다. 따라서 PRCT 전에 미리 그 결과를 예측할 수 있다면 불필요한 수술 전 치료를 피하고 근치적 수술이 늦어지지 않도록 해서 수술 후 사망이나 합병증 발생률을 줄일 수 있을 것이다. 지금까지 이와 관련된 연구는 매우 제한적으로 이루어진 데다가 뚜렷한 연관성을 보이는 표지자 또한 밝혀진 바 없다. 이전에 저자들은 무반응군과 반응군 사이에 분자생물학적으로 어떤 차이가 있는지, 또 그런 분자생물학적 특성이 PRCT에 대한 반응 여부를 판단하는 예측 표지자로서 유용한지를 규명하기 위해 세포주기 조절 단백질과 세포 증식 및 세포자멸사 관련 단백질

에 대해 연구한 바 있다. 그 결과, p16 단백질 환자의 생존 기간과 유의한 상관 관계를 보이고 p21 단백질이 원격전이와 유의 수준에 근접하는 상관 관계를 보였다. 그러나 이들을 포함하여 연구 대상이었던 인자들 모두 PRCT에 대한 종양의 반응과는 직접적인 연관을 보이지 않았다.^{4,5}

Epidermal growth factor receptor (EGFR)는 인체 내 상피성 수용체 티로신 키나아제에 속하는 170 kd의 세포막 투과 당단백으로서, ligand와 결합하는 세포 외 영역, lipophilic 세포막 영역, 티로신 키나아제 활성이 있는 세포 내 영역으로 구성되어 있다. 자체 티로신 키나아제 활성이 있어서 EGF, TGF- α 와 결합하여 이합체를 형성하면, 자동 인산화에 의한 티로신 키나아제 활성을 유도하여 신호전달 체계가 활성화되므로 DNA 합성이 증가하고 세포의 증식과 분화를 초래한다. 결국 유전자 발현, 세포 증식, 세포자멸사 억제, 혈관 신생 등의 효과를 유발한다.⁶ 이러한 과정을 조절하는 데 이상이 생기면 종양이 발생하거나 기왕의 종양이 더 진행하는 것으로 보인다. EGFR은 인체 편평세포암종 세포주에서 처음 추출된 이래, 다양한 인체 고형종양, 특히 대장암종을 비롯하여 위암, 폐암, 유방암, 방광암, 두경부 종양 등의 면역화학조직 염색상 세포막에서 발현이 관찰되었다.⁶⁻⁸ EGFR 단백질 발현과 임상병리학적 인자나 환자의 생존 사이에 상관 관계가 있는지 밝히기 위한 연구들은 서로 상반되는 결과를 보이고 있다. 그리하여 일부 연구자는 EGFR 단백질 과발현을 보이는 환자의 생존 기간이 더 길다⁹고 보고하기도 하고 다른 연구자는 더 짧다¹⁰고 보고한 바 있다. 방사선 조사와 관련해서도 저항성과 관련이 있다는 보고도 있는 반면,⁸ 방사선 민감도와 상관 관계를 보인다는 보고도 있다.¹¹⁻¹⁵

이에 저자들은 조직 검사상 곧창자 샘암종 진단을 받고 PRCT를 받은 후 수술을 받은 환자들 중 완전 또는 부분 관해를 보이는 반응군과 변화가 없거나 오히려 더 진행된 무반응군 사이에 EGFR 단백질 발현에 차이가 있는지, 차이가 있다면 PRCT에 대한 반응 여부를 예측할 수 있는 표지자로서 의의가 있는지를 밝혀서 환자의 치료 방침을 결정하는 데 유용한 정보를 제공하고자 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

재료

가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원 병리과에서 1998년 1월부터 2004년 12월까지 조직학적으로 곧창자 샘암종 진단을 받아 PRCT 후 외과적 근치술을 받은 환자 중에서 조직의 고정이나 파라핀 포매 블록의 보존 상태가 양호하고 최근까지 추적 관찰을 해온 환자 120예를 대상으로 하였다.

방사선 치료는 전체 곧창강과 전이가 의심되는 원발 림프절군에 회당 180 cGy의 방사선을 주 5회, 5주간 총 4,500 cGy를

조사한 후 추가로 원발 종양부에 540 cGy를 조사하여 모두 5,040 cGy를 조사하였다. 항암 약물 치료는 매일 5-FU를 425 mg/m², Leucovorin을 20 mg/m²씩 5일간 수술 전 2회, 수술 후 4회 정맥 투여하였다. PRCT 종료 후 4-8주 사이에 곧창자 초음파와 곧창자 MRI를 시행하여 병기가 감소한 정도 및 종양의 반응 정도를 평가하고 외과적 절제술을 시행하였다.

임상 소견 및 병리 조직학적 검색

10% 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매괴를 제작해서 헤마톡실린-에오신 염색을 시행한 곧창자 샘암종 생검 및 수술 조직의 슬라이드를 재검토하여 진단과 병리학적 소견들을 확인하였다. 특히 수술 조직에서는, PRCT에 대한 반응 여부를 조사하였다. PRCT에 대한 반응은 WHO 기준¹⁶에 따라 다음과 같이 분류하였다. 수술 후 병리조직 검사에서 종양 세포가 전혀 관찰되지 않은 경우 완전 관해(complete remission, CR)로 정의하였고, PRCT 전과 비교해서 종양의 직경이 50% 이상 감소한 경우 부분 관해(partial remission, PR)로 분류하였다. 완전 또는 부분 관해를 보이는 예는 반응군으로 인정하였고, 종양의 크기 감소가 50% 미만이거나 크기 증가가 25% 미만인 안정군(no change, NC)과 종양이 25% 이상 더 커진 진행군(progressive disease, PD)을 무반응군(no response, NR)으로 간주하였다. 추적 조사를 위해 수술 후 외래에서 대장 내시경, 컴퓨터 전산화단층촬영, 암태아성 항원(carcinoembryonic antigen) 검사 등을 정기적으로 시행하였다. 환자의 임상 기록을 검토하여 현재 생존 여부 및 경과를 추적 조사하였으며 추적 기간은 생존한 환자의 경우 수술일로부터 2007년 3월까지, 사망한 환자의 경우에는 사망일까지로 하였으며, 평균 추적 기간은 67 (25-110)개월이었다.

면역조직화학염색

면역조직화학염색을 위해 모든 증례의 생검 조직으로 만든 파라핀 고정 파라핀 포매괴에서 3 μ m 두께로 절편 잘라냈다. 그런 다음 각각의 절편을 poly-L-lysine 도포한 슬라이드에 부착하여 37°C 오븐에서 하룻밤 건조시킨 후 실온에서 자일렌으로 2분간 4회 탈파라핀하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 다음 실온에서 20분간 방치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 45°C에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세한 후 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 1:100으로 희석한 비면역 염소혈청에 45°C에서 60분간 반응시켰다.

일차 항체는 EGFR (BP53.12, Zymed, San Francisco, USA)에 대한 단클론 항체로서, 1:100으로 희석하여 4°C에서

하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako, Kyoto, Japan)를 10분간 반응시킨 후, 세척 완충액으로 3분씩 3회 씻어내고 streptavidin peroxidase detection system (Zymed, San Francisco, USA)을 이용하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 그런 다음 다음 다시 세척 완충액으로 씻어낸 후 DAB를 이용해서 10분간 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 양성 내부 대조군으로 슬라이드 내의 perineurium에서 양성 반응을 확인하였고, 음성 대조군은 일차 항체 대신 정상 면양 혈청을 첨가해 주고 나머지 모든 과정은 동일하게 하였다.

판독과 통계학적 분석

면역화학염색 결과는 병리 의사 두 명이 독립적으로 판정하되, 판정이 일치하지 않을 때는 이중 광학현미경으로 재검하였다.

본 연구에서 사용한 일차 항체는 수용체의 세포외부위(extracellular domain)를 인지하기 때문에 세포막을 따라서 염색되는 경우를 양성으로 판독하되, 네 군(0, 염색이 전혀 되지 않는 군; 1, 면역 염색이 세포질에서 약하게 또는 세포막에서 부분적으로만 관찰되는 군; 2, 10% 이상의 종양 세포에서 세포막을 싸는 염색이 약하게나마 관찰되는 군; 3, 10% 이상의 종양 세포에서 강한 세포막 염색을 보이는 군)으로 분류한 다음, 2와 3에 해당하는 군, 즉 10% 이상의 종양 세포에서 면역 반응이 세포막에 갈색으로 나타나는 경우를 과발현으로 간주하였다.¹⁷

한편, 본 연구에서는 EGFR 양성을 판정하는 데 지금까지 주로 이용해온 세가지 점수 체계를 본 연구에서 비교 분석하였다: 1) 0, 1+, 2+, 3+: 음성(0), 세포질에 반응이 있고 세포막에는 불명확한 반응(1+), 세포막에 명확한 중등도의 반응(2+), 세포막 전체에 강한 양성 반응(3+).¹⁸ 2) 음성/양성: 염색이 전혀 관찰되지 않는 경우(음성), 세포막 염색이 약간이라도 관

Table 1. Relationship between clinicopathologic variables and tumor response to PRCT

Variables	No. (%)	NR (%)	PR (%)	CR (%)	p-value
Age (years)					0.603
Mean (SD)	60.6±11.5				
<60	46 (38.3)	23 (50)	12 (26.1)	11 (23.9)	
≥60	74 (61.7)	47 (63.5)	15 (20.3)	12 (16.2)	
Gender					0.287
Male	65 (54.2)	40 (61.5)	12 (18.5)	13 (20)	
Female	55 (45.8)	30 (54.5)	15 (27.3)	10 (18.2)	
Tumor size					0.513
<5 cm	55 (45.8)	33 (60)	14 (25.5)	8 (14.5)	
≥5 cm	65 (54.2)	37 (56.9)	13 (20)	15 (23.1)	
cT classification					0.263
T2	19 (15.8)	11 (57.9)	1 (5.3)	7 (36.8)	
T3	81 (67.5)	48 (59.2)	25 (30.9)	8 (9.9)	
T4	20 (16.7)	11 (55)	1 (5)	8 (40)	
cN classification					0.574
-	59 (49.2)	34 (57.7)	14 (23.7)	11 (18.6)	
+	61 (50.8)	36 (59)	13 (21.3)	12 (19.7)	
cM classification					0.631
-	114 (95)	67 (58.8)	25 (21.9)	22 (19.3)	
+	6 (5)	3 (50)	2 (33.3)	1 (16.7)	
Differentiation					0.001
Well	26 (21.7)	8 (30.7)	10 (38.5)	8 (30.8)	
Moderate	79 (65.8)	52 (65.8)	14 (17.8)	13 (16.4)	
Poor	15 (12.5)	10 (66.7)	3 (20)	2 (13.3)	
Downstaging after PRCT					0.002
No	22 (18.3)	20 (90.9)	2 (9.1)	0	
Yes	98 (81.7)	50 (51)	23 (23.5)	25 (25.5)	
Recurrence					0.186
No	112 (93.3)	64 (57.1)	25 (22.3)	23 (20.5)	
Yes	8 (6.7)	6 (75)	2 (25)	0	
Distant metastasis					0.028
No	94 (78.3)	51 (54.3)	21 (22.3)	22 (23.4)	
Yes	26 (21.7)	19 (73.1)	6 (23.1)	1 (3.8)	
Total	120	70 (58.3)	27 (22.5)	23 (19.2)	

PRCT, preoperative radiochemotherapy; NR, no response; PR, partial remission; CR, complete remission; TNM, by the American Joint Committee on Cancer staging method; Differentiation, before PRCT; Distant metastasis, during follow up.

찰되는 경우(양성).¹⁹ 3) 10% cutoff: 10% 이상에서 세포막의 전체 또는 일부에 염색이 관찰되는 경우만 양성으로 판정.^{17,20}

통계처리는 SPSS version 13.5 (Chicago, USA)를 이용하여 Spearman으로 분석하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 의미가 있다고 판정하였다.

결 과

곧창자 샘암종 환자 120명의 연령은 31세부터 81세까지로 평균 연령은 60세였고, 남자가 65명(54.2%), 여자가 55명(45.8%)이었다(Table 1). 종양의 크기는 장경 5 cm 미만인 55예(45.8%), 5 cm 이상은 65예(54.2%)였다. 전산화단층촬영영상 침윤 깊이는 T2가 19예(15.8%), T3 81예(67.5%), T4 20예(16.7%)였고, 림프절 전이가 의심되는 경우는 61예(50.8%)였다. 조직학적 분화도에 따라 분류하면 PRCT 이전의 생검 조직에서 고분화 26예(21.7%), 중분화 79예(65.8%), 저분화 15예(12.5%)였다. 추적 기간 동안 국소 재발과 원격 전이는 각각 8예(6.7%), 26예(21.7%)에서 관찰되었다. 추적 기간 동안 평균 생존 기간은 64개월(2-91개월)이었고, 사망한 환자가 12명(10%)이었는데 이 중 3명은 사망 원인과 질병 사이에 관련이 없었다.

PRCT에 대한 반응을 평가하기 위해 수술 표본의 종양 조직으로 적어도 세 블록을 제작하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 종양 샘들이 아교질 섬유화 조직으로 대체되고 만성 염증 세포가 침윤되거나 괴사가 있을 때 치료 효과가 있는 것으로 확인하였다. 병리학적 완전 관해는 23예(19.2%), 부분 관해는 27예(22.5%)로 PRCT에 대한 반응군은 50예(41.7%)였고, 무반응군은 70예(58.3%)였다(Table 1). 임상병리학적 표지자 중 PRCT 이전의 생검 조직에서 조직학적 분화도가 좋은 군에서 종양 반응이 좋았다(p=0.001). 수술 후 국소 재발은 반응군의 4% (2/50), 무반응군의 8.6% (6/70)에서 관찰되어 반응군에서 재발률이 낮았으나 통계적으로 유의하지는 않았다(p=0.186). 반면, 수술 후 추적 기간 동안 발생한 원격 전이는 반응군의 14% (7/50), 무반응군의 27.1% (19/70)에서 일어났으며 이는 유의한 상관 관계를 보였다(p=0.028).

한편, PRCT 이전에 시행한 생검 조직에서 EGFR에 대한 면역조직화학염색의 발현 양상을 세 가지 점수 체계에 따라 판독한 결과, 10% cutoff 체계만이 EGFR 과발현과 종양 반응 사이에 통계적으로 유의한 상관 관계를 보였다(Data not shown). 따라서 본 연구에서는 10% cutoff 체계를 이용하여 결과를 분석하였다.

총 120예 중 78예(65%)에서 EGFR 단백질이 발현되었고, 42예(35%)에서는 발현되지 않았다(Fig. 1, Table 2). EGFR 단백질 발현은 PRCT 이전의 방사선 소견상의 병기, 림프절 전이 여부, 그리고 추적 기간 동안 발생한 국소 재발이나 원격 전이와 유의한 상관 관계를 보이지 않았다. 그러나 종양의 분화도에 따라

고등도 분화를 보이는 종양의 88.5% (vs 11.5%), 중등도 분화 종양의 63.3% (vs 36.7%)에서 EGFR 과발현을 보였고, 저분화 종양은 33.3% (vs 66.7%)에서만 EGFR이 발현되었다. 이러한 차이는 통계적으로 유의하였다(p=0.006). PRCT 후 종양 반응과의 연관성을 살펴보면, 무반응군(55.7%, 39/70)보다 반응군(78%, 39/50)에서 EGFR의 발현율이 높았고 이는 통계적으로 유의하였다(p=0.048). 한편, 환자의 생존 기간은 무반응군보다 반응군이 길었고(69개월 vs 56.5개월; p=0.118), EGFR 발현율이 높은 군에서 길었다(70.5개월 vs 61.5개월; p=0.476). 그러나 이러한 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

고 찰

종양 치료 시 방사선 조사와 5-fluorouracil의 항암 작용이 상승 효과를 일으킨다는 사실은 동물 실험에서 이미 증명되었다. 최근에는 방사선 및 항암 약물 병합 치료로 원격 전이율을 줄이고 국소 재발을 억제하려는 시도가 늘고 있고, 그 치료 효과에 대한 보고들이 발표되고 있다. 곧창자 샘암종의 경우, 보고자에

Table 2. Relationship between clinicopathologic variables and EGFR expression

Variables	EGFR		p-value
	Negative (%)	Positive (%)	
cT classification			0.96
T2 (n=19)	9 (47.4)	10 (52.6)	
T3 (n=81)	27 (33.3)	54 (66.7)	
T4 (n=20)	6 (30)	14 (70)	
cN classification			0.649
- (n=59)	20 (33.9)	39 (66.1)	
+ (n=61)	22 (36.1)	39 (63.9)	
Differentiation			0.006
Well (n=26)	3 (11.5)	23 (88.5)	
Moderate (n=79)	29 (36.7)	50 (63.3)	
Poor (n=15)	10 (66.7)	5 (33.3)	
Downstaging after PRCT			0.311
No (n=22)	8 (36.4)	14 (63.6)	
Yes (n=98)	34 (34.7)	64 (65.3)	
Tumor response to PRCT			0.048
NR (n=70)	31 (44.3)	39 (55.7)	
PR (n=27)	6 (22.2)	21 (77.8)	
CR (n=23)	5 (21.7)	18 (78.3)	
Recurrence			0.34
No (n=112)	41 (36.6)	71 (63.4)	
Yes (n=8)	1 (12.5)	7 (87.5)	
Distant metastasis			0.733
No (n=94)	33 (35.1)	61 (64.9)	
Yes (n=26)	9 (34.6)	17 (65.4)	
Total			
120	42 (35)	78 (65)	

Differentiation, before PRCT; PRCT, preoperative radiochemotherapy; NR, no response; PR, partial remission; CR, complete remission; Distant metastasis, during follow up.

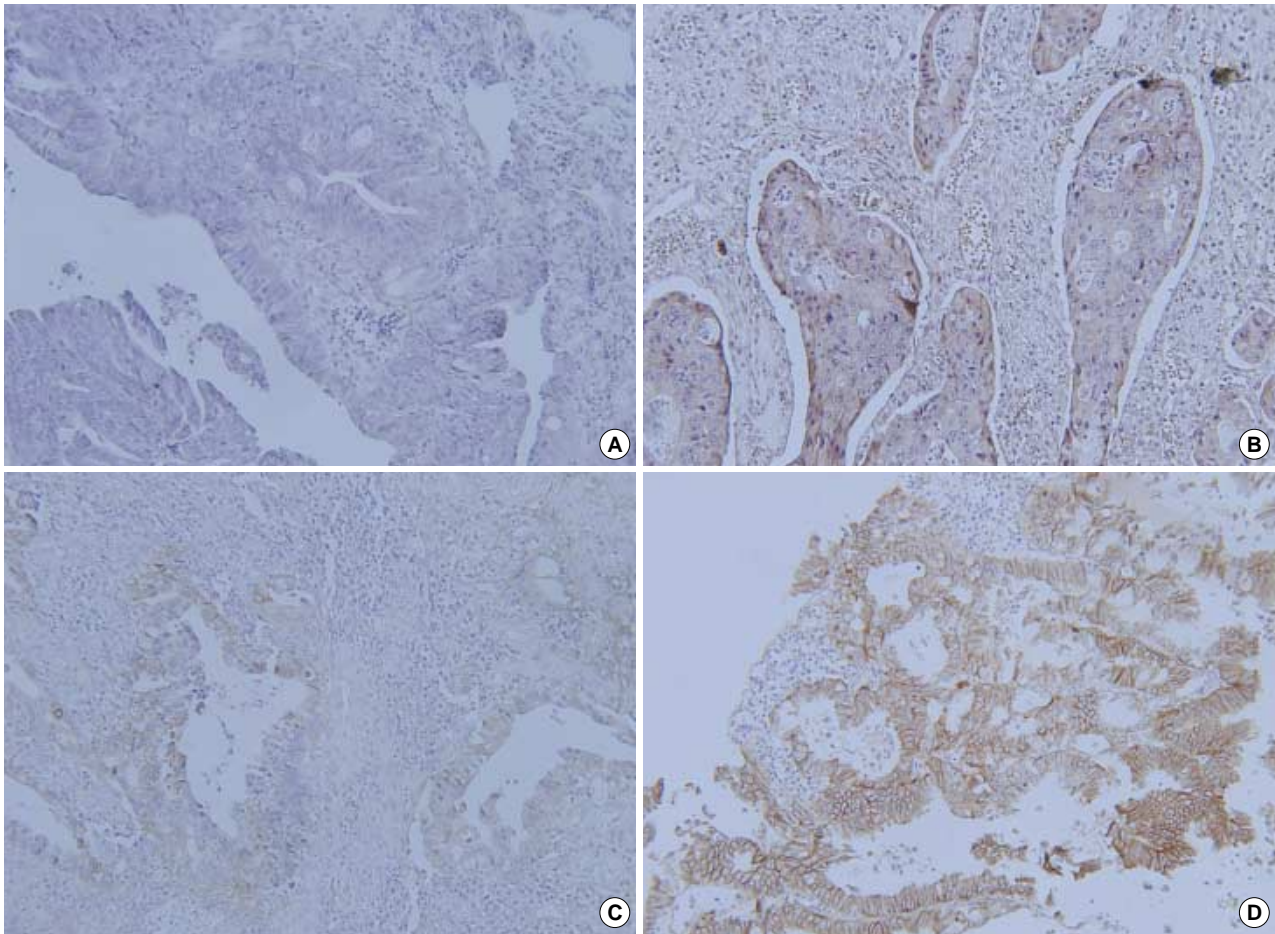


Fig. 1. EGFR protein expression by immunohistochemistry. (A) 0, no membrane staining; (B) 1+, cytoplasmic staining; (C) 2+, faint but distinct membrane staining in >10% of tumor cells; (D) 3+, intense membrane staining in >10% of tumor cells. Tumors with 0-1+ staining were interpreted as negative for overexpression.

따라 방사선 조사량이나 항암제 종류에 다소 차이가 있는데, 문헌에 따르면 PRCT 후 병기 하향률이 60-79%, 완전 관해율이 5-31%에 이른다고 한다.²¹⁻²⁴ 수술 전 방사선 조사와 동시에 5-fluorouracil을 주사한 Chen 등²²은 74%의 병기 하향률과 9.7%의 완전 관해율을 얻었고, Burke 등²³은 방사선 조사(4,030-6,040 cGy)와 함께 5-fluorouracil과 mitomycin을, Chari 등²⁴은 mitomycin 대신 cisplatin을 정맥 주사해서 각각 병리학적 완전 관해율 20%와 27%를 얻었다고 보고하였다. 수술 전 방사선 조사(5,040 cGy)와 5-fluorouracil, Leucovorin을 주사한 Minsky 등²¹은 9%의 완전 관해를 보고하였는데, 그들의 치료 방법과 유사한 치료 방법을 적용한 저자들의 연구에서는 중앙 반응률이 41.7%, 완전 관해율이 19.2%로 좀 더 좋은 결과를 얻어 PRCT의 효과를 확인하였다.

본 연구에서 EGFR 단백질 발현율은 65%였는데, 연구자에 따라 25-82%의 EGFR 과발현을 보고하였다.²⁵ EGFR 단백질 발현에 대한 연구에서 이처럼 다양한 결과가 나타나는 것은, 각 연구에서 이용한 검색 방법이나 시약, 항체 종류, 대상 증례, 그

리고 판독 기준과 판독자 간의 차이 때문인 것으로 보인다. 특히 과발현 판독 기준은 1%, 5%, 10%, 20%로 다양하였는데, Tsutsui 등¹⁹은 확실한 염색이 관찰되면 양성으로 간주하였고, 다른 연구자들은 1% 이상,²⁶ 혹은 5% 이상⁶을 양성으로 판정하였다. Bhagava 등¹⁷과 Onn 등²⁰은 서로 다른 기준을 적용하여 0-3의 네 군으로 구분한 다음, 0과 1은 음성, 2와 3은 양성으로 인정하여 결국 본 연구에서와 마찬가지로 10% 이상의 중앙 세포에서 면역반응이 세포막을 따라 관찰되는 경우를 과발현으로 간주하였다. EGFR 면역조직화학염색 결과를 판독할 때 지금까지 주로 이용해온 세 가지 다른 점수 체계에 의한 결과와 PRCT 후 중앙 반응과의 상관 관계를 살펴보았을 때, 10% cutoff 체계만이 유의한 상관 관계를 보였다. 향후 통일된 판정 기준을 정하는 것이 매우 시급하다 하겠다.

한편, 조직학적 등급에 따라 나누어 관찰한 결과, 분화가 좋을수록 중앙 반응도 좋았고 EGFR 발현도 높았다. 이러한 결과는 골창자 샘암종 환자의 여러 임상병리학적 인자들 가운데 조직학적 등급이 EGFR 발현과 함께 PRCT 후 중앙 세포의 반

응을 예측하는 좋은 지표가 될 수 있음을 시사해주는 소견이라 생각하며, 향후 조직학적 등급을 판정하는 좀 더 객관적인 구분점이 제시되고 더 많은 예에 대한 조사가 이루어진다면 도움이 될 것으로 예상된다.

EGFR이 PRCT 후 종양 세포의 반응과 관련이 있는지에 대한 연구는 지금까지 매우 미미할 뿐만 아니라 아직 논란의 여지가 많다. 방사선 감수성과 상관 관계가 없다는 보고도 있지만, 이온화 방사선의 세포 독성을 억제한다(radioreistant)고도 하고 반대로 촉진한다(radiosensitive)고도 한다.^{8,11-15}

EGFR 신호전달 체계의 자극이 시험관과 생체 내에서 방사선 저항을 유도한다는 연구 결과들이 발표되었다. Wollman 등¹¹은 MCF-7 종양 세포 배양 시 EGF를 넣어준 후 방사선 조사를 하였더니 방사선에 대한 저항이 높아졌는데 이러한 효과는 EGFR 특이 항체에 의해 없어졌다고 하였으며, Balaban 등¹²은 A431 종양 세포에서 방사선 조사 도중과 조사 후에 EGF가 있으면 방사선에 대한 민감도가 떨어진 반면 EGFR에 대한 단클론 항체에 노출된 세포들은 방사선에 의해 유발된 세포자멸사로 인해 민감도가 증가하는 점을 들었다. EGFR이 방사선 저항을 유도하는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 EGFR 신호전달 체계의 활성화 때문인 것으로 추측하는데, 이온화 방사선이 EGFR을 활성화시켜서 Raf-1, mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3' kinase, Akt 경로 등과 같은 세포 생존에 연관된 하부 기질의 인산 수치를 증가시키기 때문으로 본다.⁷ 또한 변종 EGFR (HER-1 497K)은 방사선화학 치료 후 국소 실패율을 감소시켰는데, 그 기전은 확실하지는 않지만 중국 햄스터의 난소 세포를 이용한 연구에서 EGF와 TGF- α 에 대한 성장 반응이 약화되고 원발암유전자인 fos, jun, myc의 유도가 감소된 점으로 미루어 세포 외 영역의 아미노산이 대체되어 ligand binding이나 세포 내 영역으로 가는 세포막 투과 신호가 조정되었기 때문으로 추정한다. 따라서 변종 EGFR은 그 기능이 덜 효율적이면서 원발암유전자 유도나 성장 자극이 낮은 또 다른 신호 체계를 활성화시켜서 결국 방사선 조사에 덜 저항하는 것으로 보인다. 이러한 상관 관계는 유방암, 난소암, 편평세포암, 간암의 이종이식에서 기술되었고 곧창자 샘암종 등 종양에 대한 임상 연구에서도 관찰되었다.^{8,10}

그러나 저자들의 연구 결과 EGFR 발현이 높은 증례에서 PRCT에 좋은 반응을 보였고 이러한 상관 관계는 통계적으로 유의하였으며, 이는 Bonner 등¹³이나 Magne 등¹⁴의 결과와 일치한다. 인체 종양 세포주나 두경부 편평세포암종 세포주를 이용한 연구에서 EGFR의 발현율이 높은 세포주에서 성장이 현저하게 억제되고 발현이 낮은 세포주는 방사선 저항이 심했다. EGFR 함량이 높을수록 방사선 민감도가 증가하여 방사선 IC50 (50%의 세포가 생존하는 농도)과 EGFR 함량 사이에 유의한 역상관 관계도 관찰되었다. EGF 관련 방사선 민감성에 대한 시험관 내 연구도 있는데, Kwok과 Sutherland¹⁵는 EGF 관련 방사선 민감성이 EGFR 밀도에 의존한다고 하였다. 이러한 연구 결과들

은 저자들의 연구 결과와 함께, 방사선 민감성에 대한 EGFR의 역할이 매우 중요함을 확인시켜 주었으며, 면역조직화학염색을 통한 EGFR 발현 양상을 PRCT 후 종양 반응을 예측하는 인자로서 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

한편, Sauter 등²⁷은 혀의 편평세포암종에서 낮은 TGF- α 수치가 방사선 저항과 관련이 있다고 하고, Wen 등²⁸은 조기 후두암 재발이 EGFR과 상관없이 TGF- α 와 상관이 있다고 보고하였다. 원래 이온화 방사선이 세포에 끼치는 영향을 보면, Raf-MEK-Erk kinase 연속단계를 포함해서 분열을 촉진하는 세포 내 신호전달 체계들을 활성화하는 것 이외에 초기에 DNA 손상을 유도한다. 이러한 손상은 DNA 복구 과정에 의해 조절되는데, Bandyopadhyay 등²⁹은 EGFR 관련 신호가 DNA 손상을 복구하는 데 직접 영향을 미치는 DNA-PK 효소에 의해 통제된다고 밝혔다. 더욱이 EGFR 과발현이 그 신호를 높게 유지시켜서 DNA 복구 능력이 높게 유지된다고 하였다.

PRCT에 대한 종양 세포의 반응은 매우 복잡한 여러 가지 인자가 복합적으로 작용하는 것으로 보이며, 특히 종양 세포 내의 ligand 함량의 역할도 크다. EGF 관련 방사선 효과 상승이 각 종양 세포에 내재된 방사선 민감성에 기인하기 때문에 좀 더 방사선에 민감한 종양 세포의 경우 그 효과가 크다는 주장도 있다.³⁰ 따라서 곧창자 샘암종뿐 아니라 다양한 종양에서 EGFR 및 관련 인자들에 대한 좀 더 광범위한 연구를 진행해야 그 기전을 이해하고 예후 예측 인자로서 가능성을 확인하는 데 도움이 되리라 생각하여 현재 저자들의 실험실에서 연구 진행 중이다.

결론적으로, 곧창자 샘암종으로 진단받고 PRCT 후 수술 절제된 120예를 대상으로 PRCT 이전의 생검 조직에서 EGFR에 대한 면역조직화학염색을 시행하고 그 발현 정도와 PRCT에 대한 종양 반응과의 상관 관계를 분석한 결과, 65%의 환자에서 EGFR 단백질이 높게 발현되었고 반응군과 무반응군(78% vs 55.7%) 사이에 유의한 차이가 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아, 곧창자 샘암종에서 치료 전 EGFR 발현 평가가 PRCT에 대한 종양 반응을 예측해서 환자를 선별하는 데 도움이 될 것으로 기대되는 바 앞으로 증례 누적을 통해 검증할 필요가 있다.

참고문헌

1. Ministry of Health and Welfare. Annual Report of Tumor Registry in Korea (2002.1-2002.12). Seoul 2003.
2. Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG, *et al.* Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 174: 27-32.
3. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, *et al.* T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum* 2002;

- 45: 895-903.
4. Yoo J, Kim SZ, Cho HM, *et al.* An analysis of p53, bcl-2, Ki-67 expression, and apoptosis in rectal cancer: their correlation with the tumor response after preoperative radiochemotherapy. *Korean J Pathol* 2005; 39: 222-8.
 5. Yoo J, Shin JH, Jung JH, *et al.* Expression of cell cycle-regulatory proteins in rectal cancer: significance of the tumor response to preoperative radiochemotherapy and for the prognosis. *Korean J Pathol* 2006; 40: 217-24.
 6. Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* 2005; 103: 1265-73.
 7. Zhang W, Park DJ, Lu B, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 600-5.
 8. Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 246-54.
 9. Barker FG 2nd, Simmons ML, Chang SM, *et al.* EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51: 410-8.
 10. Ang KK, Berkey BA, Tu X, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7350-6.
 11. Wollman R, Yahalom J, Maxy R, Pinto J, Fuks Z. Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 91-8.
 12. Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1314: 147-56.
 13. Bonner JA, De Los Santos J, Waksal HW, Needle MN, Trummel HQ, Raisch KP. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12: 11-20.
 14. Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, *et al.* Sequence-dependent effects of ZD1839 ('Iressa') in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 819-27.
 15. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitization of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991; 64: 251-4.
 16. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-14.
 17. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, *et al.* EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol* 2005; 18: 1027-33.
 18. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1843-8.
 19. Tsutsui S, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3454-60.
 20. Onn A, Correa AM, Gilcrease M, *et al.* Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 136-43.
 21. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, *et al.* Pre-operative combined 5-FU, low dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 821-7.
 22. Chen ET, Mohiuddin M, Brodovsky H, Fishbein G, Marks G. Downstaging of advanced rectal cancer following combined preoperative chemotherapy and high dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 169-75.
 23. Burke SJ, Percarpio BA, Knight DC, Kwasnik EM. Combined preoperative radiation and mitomycin/5-fluorouracil treatment for locally advanced rectal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 164-70.
 24. Chari RS, Tyler DS, Anscher MS, *et al.* Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1995; 221: 778-86; discussion 786-7.
 25. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-45.
 26. Azria D, Bibeau F, Barbier N, *et al.* Prognostic impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on loco-regional recurrence after preoperative radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 2005; 5: 62.
 27. Sauter ER, Coia LR, Eisenberg BL, Ridge JA. Radiation treatment decreases transforming growth factor alpha expression in squamous carcinoma of the tongue. *Cancer Lett* 1994; 78: 159-62.
 28. Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima H. Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1996; 106: 884-8.
 29. Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 1568-73.

30. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head

and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 243-7.