

## 피부 편평세포암종의 악성화 과정에서 G1/S 세포주기 조절 단백질의 이상 발현

임소영 · 유창영 · 정지한 · 최현주  
유진영 · 강석진 · 이교영

가톨릭대학교 의과대학 병원병리학교실

### Alteration of G1/S Cell Cycle Regulatory Proteins in Carcinogenesis of Cutaneous Squamous Cell Carcinomas

Soyoung Im, Changyoung Yoo, Ji Han Jung, Hyun Joo Choi, Jinyoung Yoo, Seok Jin Kang and Kyo Young Lee

Department of Hospital Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background :** Aberration of the cell cycle regulatory proteins has been reported to contribute to the development and progression of human malignancy. We studied the expression of G1/S cell cycle regulatory proteins to investigate the carcinogenesis in cutaneous squamous cell lesions. **Methods :** We evaluated the expressions of p16, pRb, cyclin D1 and Ki-67 protein by immunohistochemistry in cases of normal skin (n=15), seborrheic keratosis (SK; n=26), actinic keratosis (AK; n=30), Bowen's disease (BD; n=37), keratoacanthoma (KA; n=23), and squamous cell carcinoma (SCC; n=22). **Results :** The Ki-67 expression gradually increased from SK, through AK, to BD. The expression of p16 was more increased in BD than that in AK. The decreased expressions of p16 and Rb, and the increased expression of cyclin D1 were observed to a greater degree in SCC than those in BD. The expressions of cyclin D1 and Ki-67 were higher in SCC than those in KA. **Conclusions :** The altered expressions of p16, Rb, and cyclin D1 were considered to be related to the carcinogenesis in the cutaneous squamous cell lesions. Therefore, immunohistochemical studies of the cell cycle regulatory proteins and a combined analysis may be helpful as an adjunct to the histomorphology in the diagnosis of cutaneous squamous cell lesions.

**Key Words :** Skin; Carcinoma; Squamous cell; Cell cycle

접 수 : 2009년 4월 14일  
게재승인 : 2009년 8월 10일

책임저자 : 정 지 한  
우 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93  
성빈센트병원 병원병리학교실  
전화: 031-249-7646  
Fax: 031-244-6786  
E-mail: apjh225@catholic.ac.kr

\*본 연구는 2007년도 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학연구소 연구비를 지원받아 이루어졌음.

편평세포암종(squamous cell carcinoma)은 기저세포암종(basal cell carcinoma)과 함께 피부에 발생하는 비 흑색종성 악성 피부 종양의 대표적인 종양으로 천천히 자라나, 때로는 침윤성 성장 및 재발을 하고, 특히 전이율이 12.5%까지 보고되어 임상적으로는 기저세포암종보다 더 공격적인 양상을 보인다.<sup>1</sup> 다른 악성 종양들이 전구 병변에서 발생하는 것과 마찬가지로, 편평세포암종도 햇빛에 노출되어 손상받은 피부에서 발생하는 광선 각화증(actinic keratosis)의 1-10% 정도가 보웬병(Bowen's disease)으로 발전하고 여기서 침윤성 암이 발생하는 다단계 과정을 거치는 것으로 알려져 있으나,<sup>2-4</sup> 아직 그 과정에 관여하는 분자생물학적인 인자, 특히 세포주기 조절 인자에 대해서 확실히 밝혀진 것은 없다. 그러나 광선각화증의 경우 수술적 치료와 함께 지속적인 추적 관찰을 해야 하는 보웬병이나 편평세포암종과는 달리 국소적으로 5-fluorouracil을 투여하거나 냉동요법 등의 덜 침습적인 치료만으로도 충분하기 때문에 임상적으로 이 질

환들의 감별이 중요하지만, 얇게 생김된 피부 검체에서 정확한 감별은 제한점이 많다.<sup>3</sup>

세포주기는 cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK), CDK 억제인자(CDKI)의 상호작용에 의해 조절되는데, 여기에 종양 억제 유전자인 Rb가 관여한다. 세포의 휴지기 때는 저인산화 상태의 Rb가 전사 인자인 E2F를 붙잡아 G1에서 S기로의 진행을 억제하는 역할을 한다. 그러나 세포분열 신호에 의해 G1기에 cyclin D가 발현되면 이는 CDK4/6과 복합체를 형성하여 Rb를 인산화시키며, 인산화된 Rb는 그 기능이 불활성화됨으로써 E2F를 유리시켜 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하게 된다.<sup>5</sup> 또 p16은 CDKI로서 CDK4, CDK6과 결합하여 Rb의 인산화 과정을 억제, 그 기능을 활성화시켜 S기로의 진행을 억제한다.<sup>6</sup> 그러므로 세포주기에서 cyclin D/p16/Rb 경로는 중요한 요소로서, cyclin D1의 과발현, p16 유전자의 결손이나 변이 및 Rb 유전자의 기능 소실은 세포주기를 비정상적으로 활성화시켜

조절되지 않는 세포 증식을 초래함으로써 종양 발생에 관여한다고 알려져 있다.<sup>6-8</sup>

피부의 편평세포암종 발생에도 이러한 세포주기 관련 단백질의 비정상적인 발현에 대한 연구가 보고되어져 있는데, p16 단백질의 경우 편평세포암종에서 p16 유전자의 소실이나 변이에 의해 p16 단백질 발현이 감소한다는 보고가 있는 반면,<sup>4,9,10</sup> 또 다른 연구자들은 양성 병변 및 전구 병변에 비해 편평세포암종에서 p16 단백질이 오히려 과발현되는 것을 관찰하였다.<sup>2,3,11,12</sup> 또 몇몇 쥐를 이용한 실험 모델의 편평세포암종에서 pRb의 소실과<sup>13</sup> cyclin D1의 과발현을 관찰하였지만,<sup>14,15</sup> 사람 피부를 대상으로 한 연구는 드문 실정이다.<sup>16,17</sup>

이에 따라 본 연구에서는 정상 피부 조직, 양성 병변인 지루 각화증(seborrheic keratosis), 전암 병변인 광선각화증, 상피내 암인 Bowen병 및 침윤성 편평세포암종에서 p16, Rb, cyclin D1 단백질의 발현 양상 및 Ki-67 증식 지수(proliferation index, PI)를 관찰하여, 각각의 단백질이 피부 편평세포암종의 발생과정에 있어 어떠한 역할을 하는지를 알아보고, 이 단백질들이 생검 조직에서 조직학적 소견만으로 감별이 어려운 질환에 도움을 줄 수 있는 표지자로서 유용한지도 살펴보았다.

또한 최근에 편평세포암종의 고분화 변종으로 생각하고 있는 각화증세포종(keratoacanthoma)에서 위 단백질들의 발현을 관찰함으로써 감별 진단이 어려운 경우 보조적인 수단으로 활용할 수 있는지 살펴보았다.

## 재료와 방법

### 연구 재료

본 연구에 사용한 조직 표본은 1998년 1월부터 2007년 12월 까지 가톨릭대학교 성빈센트병원에서 생검한 조직 중 파라핀 블록 상태가 양호한 정상 피부 조직 15예, 지루각화증 26예, 광선 각화증 30예, Bowen병 37예, 편평세포암종 22예, 각화극세포종 23예 등 총 153예를 대상으로 하였다. 연구는 대상의 병리진단 보고서에 참조하여 나이, 성별 등의 임상 양상을 조사하였고, 보관된 조직 슬라이드를 재검토하여 진단을 확인하였다.

### 면역조직화학염색 및 판독

파라핀에 포매된 조직에서 5  $\mu$ m 두께의 절편을 얻어 다음과 같이 면역조직화학염색을 시행하였다. 특수 처리한 슬라이드(Poly-L-lysine coated, Probe on plus slides, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 조직절편을 부착한 후 80°C 오븐에 15분간 넣었다. 그런 다음 실온에서 2분간 4회 자일렌으로 반복 처리하여 파라핀을 제거하였다. 그 후 100% 알코올로 10초간 3회 처리한 다음, 10% citrate buffer (Zymed, San Fran-

cisco, CA, USA)에 담갔다가 121°C의 고압 멸균기에 넣어 15분간 방치한 다음 다시 실온에서 20분간 방치하였다. 그리고 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위해 3% 과산화수소 용액에 담가 실온에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 씻어낸 후 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위해 실온에서 비면역 염소혈청(Zymed, San Francisco)에 10분간 작용시켰다. 일차 항체로 p16 (clone 16PO7, NeoMarkers, Fremont, CA, USA), Rb (polyclonal, NeoMarkers), cyclin D1 (clone SP4, NeoMarkers), Ki-67 (clone SP6, NeoMarkers), 항체를 각각 1:100으로 희석한 후 실온에서 90분간 반응시킨 다음 biotin이 부착된 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako Co., Ltd., Kyoto, Japan)를 30분간 반응시켰다. 그리고 세척 완충액으로 3분씩 3회 씻어낸 후 streptavidin peroxidase detection system (Zymed, San Francisco)으로 실온에서 10분간 방치하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 그런 다음 다시 세척 완충액으로 수세한 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution, Research Genetics, USA)로 10분간 발색하였다. 다음 단계로 증류수로 세척하고 Mayer's hematoxylin (Zymed, San Francisco)으로 대조 염색하였다.

이때 두 명의 병리 의사가 독립적으로 각 종류의 면역화학염색 반응을 판독하였는데, p16 단백질은 종양 세포의 핵과 세포질에, Rb, cyclin D1 및 Ki-67 단백질은 종양 세포의 핵에 갈색으로 강하게 발현되는 경우를 양성으로 판독하였다. p16, Rb 및 cyclin D1 단백질의 경우 발현 정도를 염색이 된 종양 세포의 비율에 따라 5% 미만에서 염색되는 경우를 0으로, 5% 이상 10% 미만에서 염색되는 경우를 1+로, 10% 이상 25% 미만에서 염색되는 경우를 2+로, 25% 이상 50% 미만에서 염색되는 경우를 3+로, 그리고 50% 이상에서 염색되는 경우를 4+로 판독하였으며, 통계적 처리를 위해 그 중 염색 점수가 2+ 이상인 경우를 높은 발현으로 재분류하였다. Ki-67 단백질은 광학현미경 저배율 관찰에서 Ki-67에 양성인 종양 세포가 가장 많이 분포하는 위치를 선택한 후, 400배 현미경 시야에서 관찰되는 세포 중 Ki-67에 양성인 세포의 백분율을 측정하여 종양의 증식 지수로 판정하였다.

### 통계 분석

통계 분석은 SPSS 13.0K for Windows 프로그램(SPSS, Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다. p16, Rb 및 cyclin D1 단백질 발현은 비 모수적인 분석 방법인 Chi-square를 시행하여 p값(p-value)을 구하였고, Ki-67 증식지수는 모수적인 분석 방법인 ANOVA를 시행하여 p값을 구하였다. 이때 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 평가하였다.

## 결 과

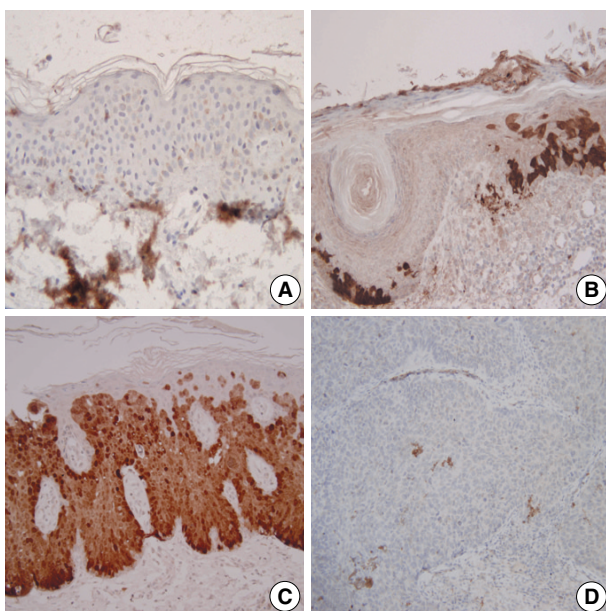
### 증례 분석

정상 피부 조직 15예를 제외한 138예 환자의 연령은 33세에서 90세(평균 연령 68세)로 이 중 남자는 59명, 여자는 79명(남자:여자=1:1.3)이었다. 병변의 장소는 두경부가 96예, 몸통이 21예, 사지가 19예, 회음부가 2예였는데, 특히 편평세포암종의 병변 장소는 두경부가 19예, 몸통이 2예, 사지가 1예였다(Table 1).

**Table 1.** Clinical characteristics of cutaneous squamous cell lesions

	SK	AK	BD	SCC	KA
No. of cases	26	30	37	22	23
Mean age, yr	58	75	69	71	63
Sex					
Men	17	2	15	13	12
Women	9	28	22	9	11
Site					
Head & neck	13	30	12	19	20
Trunk	9		9	2	1
Extremity	4		12	1	2
Vulva			2		

SK, seborrheic keratosis; AK, actinic keratosis; BD, Bowen's disease; SCC, squamous cell carcinoma; KA, keratoacanthoma.



**Fig. 1.** Immunohistochemistry for p16. (A) Expression of p16 protein is absent in normal skin. (B) Low expression of p16 protein is present in lower third to lower half of epidermis of actinic keratosis. (C) High expression of p16 protein is present in full-thickness epidermis of Bowen's disease. (D) Expression of p16 protein in squamous cell carcinoma is absent.

### 면역조직화학염색 결과

정상 피부 조직 및 편평세포암종의 악성화 과정에 따른 발현 양상

p16 단백질은 정상 피부 조직 15예 모두에서 음성 반응을 보였으며(Fig. 1), 지루각화증 26예 중 8예(30.8%), 광선각화증 30예 중 10예(33.3%), 보웬병 37예 중 31예(83.8%), 편평세포암종 22예 중 9예(40.9%)에서 높은 발현을 보였다(Table 2, Fig. 1). 또한 지루각화증과 광선각화증에서 발현의 차이는 없었으나 광선각화증에 비해 보웬병에서 높은 발현을 보였으며( $p<0.000$ ) (Table 3), 보웬병에 비해 편평세포암종에서는 오히려 발현이 감소하였다( $p<0.001$ ) (Table 4). 양성인 증례들의 반응양상을 살펴보면 광선각화증은 대부분의 증례에서 상피 내 아래 1/2에서 1/3의 세포들에서 양성 반응을 보였고, 보웬병은 전 층의 세

**Table 2.** Expression score of p16, Rb and cyclin D1 proteins in cutaneous squamous cell lesions

	Score	No. of expression (%)				
		SK (n=26)	AK (n=30)	BD (n=37)	SCC (n=22)	KA (n=23)
p16	0	14 (53.8)	16 (53.3)	4 (10.8)	14 (50.0)	11 (47.8%)
	1	4 (15.4)	4 (13.3)	2 (5.4)	4 (14.3)	2 (8.7%)
	2	3 (11.5)	1 (3.3)	2 (5.4)	3 (10.7)	1 (4.3)
	3	2 (7.7)	2 (6.7)	2 (5.4)	3 (10.7)	3 (13.0)
	4	3 (11.5)	7 (23.3)	27 (73.0)	4 (14.3)	6 (26.1)
Rb	0	3 (11.5)	1 (3.3)	4 (10.8)	8 (36.4)	11 (47.8)
	1	1 (3.9)	7 (23.3)	3 (8.1)	5 (22.7)	7 (30.4)
	2	2 (7.7)	4 (13.3)	6 (16.2)	1 (4.5)	4 (17.4)
	3	2 (7.7)	8 (26.7)	5 (13.5)	3 (13.6)	1 (4.3)
	4	18 (69.2)	10 (33.3)	19 (51.4)	5 (22.7)	0 (0)
Cyclin D1	0	10 (38.5)	3 (10.0)	15 (40.5)	5 (22.7)	8 (34.8)
	1	9 (34.6)	16 (53.3)	8 (21.6)	1 (4.5)	5 (21.7)
	2	2 (7.7)	6 (20.0)	9 (24.3)	1 (4.5)	5 (21.7)
	3	3 (11.5)	5 (16.7)	3 (8.1)	2 (9.1)	4 (17.4)
	4	2 (7.7)	0 (0)	2 (5.4)	13 (59.1)	1 (4.3)

SK, seborrheic keratosis; AK, actinic keratosis; BD, Bowen's disease; SCC, squamous cell carcinoma; KA, keratoacanthoma.

**Table 3.** Expression of p16, Rb and cyclin D1 proteins between AK and BD

	Expression	No. of expression (%)		
		AK (n=30)	BD (n=37)	p-value
p16	Low	20 (66.7)	6 (16.2)	<0.000 <sup>a</sup>
	High	10 (33.3)	1 (83.8)	
Rb	Low	8 (26.7)	7 (18.9)	0.449
	High	22 (73.3)	30 (81.1)	
Cyclin D1	Low	19 (63.3)	23 (62.2)	0.921
	High	11 (36.7)	14 (37.8)	

<sup>a</sup>Statistically significant.

AK, actinic keratosis; BD, Bowen's disease; low expression, score 0, 1; high expression, score 2, 3, 4.



포들이 양성이었으나, 지루각화증과 편평세포암종은 일관성 없이 염색되는 양상이었다.

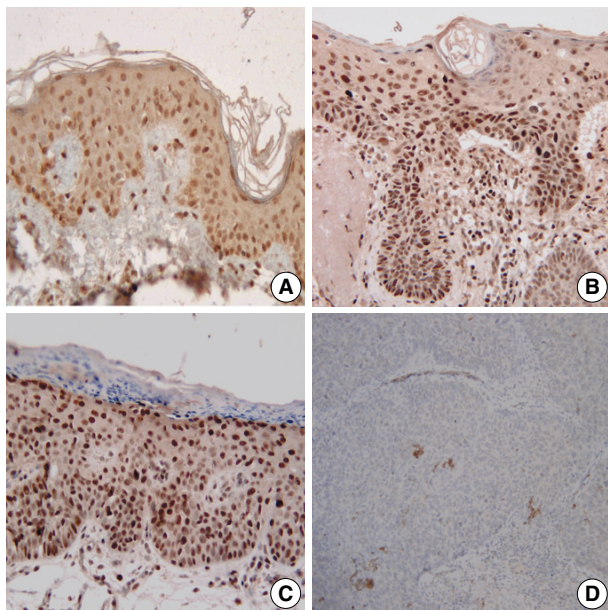
Rb 단백질은 정상 피부 조직 15예 모두에서 미만적 양성을 보였다(Fig. 2). 그러나 지루각화증 26예 중 22예(84.6%), 광선각화증 30예 중 22예(73.3%), 보웬병 37예 중 30예(81.1%), 편평세포암종 22예 중 9예(40.9%)에서 높은 발현을 보였다(Table 2, Fig. 2). 또한 지루각화증, 광선각화증, 보웬병에서 발현의 차이는 없었으나, 보웬병에 비해 편평세포암종에서 유의한 발현 감소가 보였다( $p=0.002$ )(Table 4). 양성인 증례들의 반응 양상은 지루각화증, 광선각화증, 보웬병에서 전 층에 걸쳐 양성 반응을 보였고, 편평세포암종은 일관성 없이 염색되는 양

**Table 4.** Expression of p16, Rb and cyclin D1 proteins between BD and SCC

Expression		No. of expression (%)		p-value
		BD (n=37)	SCC (n=22)	
p16	Low	6 (16.2)	13 (59.1)	0.001 <sup>a</sup>
	High	1 (83.8)	9 (40.9)	
Rb	Low	7 (18.9)	13 (59.1)	0.002 <sup>a</sup>
	High	30 (81.1)	9 (40.9)	
Cyclin D1	Low	23 (62.2)	6 (27.3)	0.010 <sup>a</sup>
	High	14 (37.8)	16 (72.7)	

<sup>a</sup>Statistically significant.

BD, Bowen's disease; SCC, squamous cell carcinoma; low expression, score 0, 1; high expression, score 2, 3, 4.



**Fig. 2.** Immunohistochemistry for Rb. (A) Expression of pRb protein is present in whole layers of epidermis of normal skin. (B) High expression of pRb protein is present in actinic keratosis. (C) High expression of pRb protein is present in Bowen's disease. (D) Expression of pRb protein in squamous cell carcinoma is absent.

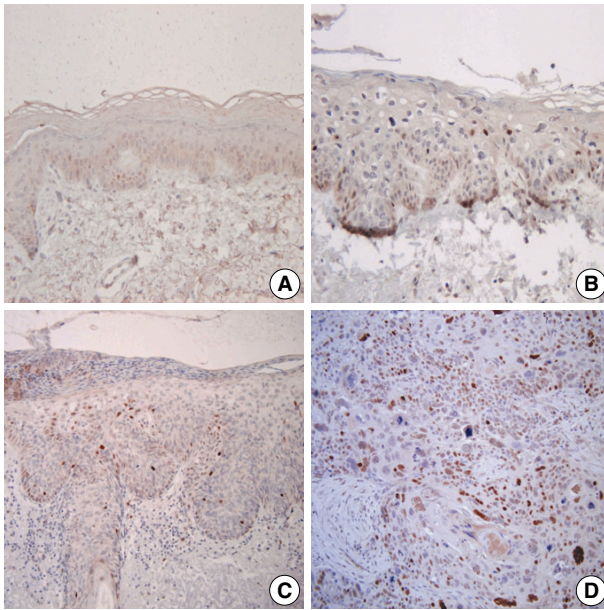
상이었다.

Cyclin D1 단백질은 정상 피부 조직 15예 모두에서 음성 반응을 보였으며(Fig. 3) 지루각화증 26예 중 7예(26.9%), 광선각화증 30예 중 11예(36.7%), 보웬병 37예 중 14예(37.8%), 편평세포암종 22예 중 16예(72.7%)에서 높은 발현을 보였다(Table 2, Fig. 3). Rb 단백질과 마찬가지로 지루각화증, 광선각화증, 보웬병에서는 발현의 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 보웬병보다는 편평세포암종에서 발현 증가가 관찰되었고, 이는 통계적으로 유의하였다( $p=0.010$ )(Table 4). 또한 양성인 증례들에게서는 특별한 발현 양상은 없었다.

Ki-67 단백질은 정상 피부 조직 15예 모두 기저층 세포에서 양성 반응을 보였(Fig. 4). Ki-67 증식 지수는 지루각화증은  $10.4 \pm 9.5\%$ , 광선각화증은  $30.8 \pm 31.5\%$ , 보웬병은  $75.7 \pm 20.5\%$ , 편평세포암종은  $60.35 \pm 26.0\%$ 로 지루각화증, 광선각화증, 보웬병으로 갈수록 증식 지수가 증가하였다(각각  $p=0.007$ ,  $p<0.000$ ). 그러나 보웬병과 편평세포암종에서는 차이가 없었다(Fig. 4, 5). 양성인 증례들의 반응 양상을 보면 지루각화증의 경우 기저층과 상기저층에서 양성 있었고, 광선각화증은 광학현미경 소견에서 비전형성을 띠고 있는 세포층까지 양성 있었으며, 보웬병과 편평세포암종에서는 전층에 걸쳐 거의 모든 세포가 양성 반응을 보였다.

#### 각화극세포종과 편평세포암종의 비교

각화극세포종 23예 중 p16, Rb, cyclin D1 단백질들은 각각 5예(21.7%), 10예(43.5%), 10예(43.5%)에서 높게 발현되었는데, p16과 pRb 단백질은 편평세포암종과 차이가 없었으나, cyclin



**Fig. 3.** Immunohistochemistry for cyclin D1. (A) There is no expression of cyclin D1 in normal skin. (B) Low expression of cyclin D1 protein is present in actinic keratosis. (C) Low expression of cyclin D1 protein is present in Bowen's disease. (D) High expression of cyclin D1 protein is present in squamous cell carcinoma.

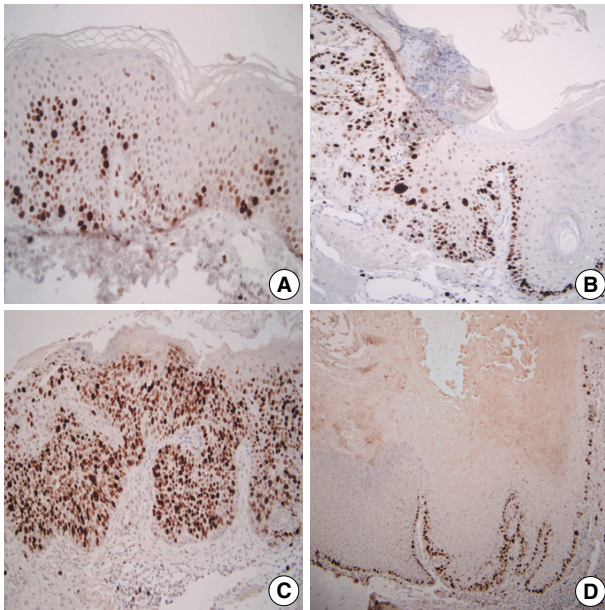


Fig. 4. Immunohistochemistry for Ki-67. (A) Expression of Ki-67 protein is present in basal layers of epidermis of normal skin. (B) High expression of Ki-67 protein is present in lower third to lower half of epidermis of actinic keratosis. (C) High expression of Ki-67 protein is present in full-thickness epidermis of Bowen's disease. (D) Low expression of Ki-67 protein is present in basal layer of epidermis of keratoacanthoma.

Table 5. Expression of p16, Rb and cyclin D1 proteins between KA and SCC

Expression		No. of expression (%)		p-value
		KA (n=23)	SCC (n=22)	
p16	Low	13 (56.5)	13 (59.1)	0.862
	High	10 (43.5)	9 (40.9)	
Rb	Low	18 (78.3)	13 (59.1)	0.165
	High	5 (21.7)	9 (40.9)	
Cyclin D1	Low	13 (56.5)	6 (27.3)	0.047*
	High	10 (43.5)	16 (72.7)	

\*Statistically significant.

KA, keratoacanthoma; SCC, squamous cell carcinoma; low expression, score 0, 1; high expression, score 2, 3, 4.

D1 단백질은 편평세포암종보다 발현이 더 적었으며 이는 통계적으로 유의하였다( $p=0.047$ ) (Table 5). 또 Ki-67 증식 지수는  $10.8 \pm 15.2\%$ 로 편평세포암종보다 낮았다( $p<0.000$ ) (Fig. 5).

## 고 찰

피부의 편평세포암종 발생에서 세포주기를 조절하는 인자들의 비정상적인 변화가 관찰되었다. 즉 p16INK4a 유전자 변이

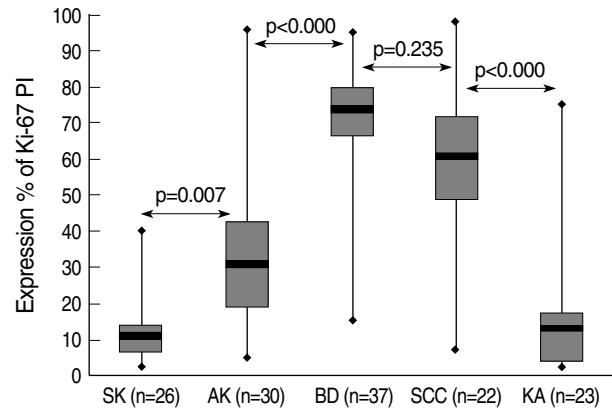


Fig. 5. Expression of Ki-67 PI in cutaneous squamous cell lesions. The box plot shows median (thick solid line in the box), 95% confidence interval for mean (box), maximum (upper diamond) and minimum (lower diamond).

가 24%까지 발견되고,<sup>2,11</sup> 9p21 대립유전자의 소실로 인한 p16 기능의 불활성화가 보고되었으나,<sup>9,10</sup> 편평세포암종과 그 전구병변에서 면역조직화학염색으로 관찰한 p16 단백질 발현에 관해서는 연구자들마다 의견의 차이가 있었다. Mortier 등<sup>9</sup>은 면역조직화학염색을 통해 p16이 광선각화증 66%에서 발현되었으나 편평세포암종에서는 10%만 발현됨을 관찰하여 광선각화증이 편평세포암종으로 진행되는 데 있어서 p16의 비활성화가 관여할 것이라고 하였다. 또 Brown 등<sup>10</sup>도 편평세포암종에서 변이, 대립 유전자의 소실, 촉진화 과메틸화 분석 등의 방법을 이용하여 관찰한 결과, p16의 이상을 53%에서 발견하였고, 면역조직화학염색에서는 p16이 소실되어 있음을 증명하였다.

그러나, 반대로 면역조직화학염색에서 p16 단백질의 과발현이 악성의 정도와 연관성을 보인 연구들도 있었다.<sup>2,3,11,12</sup> Hodges와 Smoller<sup>11</sup>는 정상 피부에서는 p16이 발현되지 않았지만 광선각화증에서 p16이 상피 아래 1/3이나 1/2에서 약하거나 중간 정도의 강도로 발현되었고, 상피내암인 보웬병의 70% 예에서 전 층에 걸쳐 p16이 강하게 발현하는 것을 관찰하여 p16의 과발현이 편평세포암종의 진행에 관여한다고 보고하였다. 또 그와 유사하게 Salama 등<sup>3</sup>은 양성 병변에서는 p16 발현이 없었으나 광선각화증의 6.8%, 보웬병의 84.1%에서 p16이 발현되어 면역조직화학 염색을 이용한 p16의 발현 양상으로 보웬병을 광선각화증이나 다른 양성 병변과 감별할 수 있다고 주장하였다.

본 연구에서 사용한 면역조직화학염색 방법에서도 정상 피부 조직 15예에서는 p16이 발현되지 않았고, 지루각화증의 30.8%, 광선각화증의 33.3%에서 p16 발현이 관찰되어 양성 병변에 비해 전암 병변에서 p16 발현이 증가되었지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 보웬병에서는 83.8%에서 발현하여, p16이 보웬병과 광선각화증을 감별할 수 있는 표지자로서의 가능성이 있다고 생각한다. 또 상피의 1/3이나 1/2에 국한되어 발현하는 광선각화증과 달리, 보웬병의 경우 전 층에 걸쳐 p16이 발현되

었는데, 이와 같은 양상은 알게 생김되어 방향이 흐트러진 피부 조직에 비 전형성을 보이는 편평세포 병변이 있을 때, p16 염색이 미만성으로 염색된 경우 보웬병일 가능성이 더 많다는 것을 시사한다.<sup>3</sup>

본 연구에서도 보웬병에 비해 편평세포암종에서 p16의 발현이 의미있게 감소하였다. Conscience 등<sup>12</sup>은 p16이 보웬병에서 58%, 편평세포암종에서 60%, 기저세포암종에서 50% 발현되는 것을 관찰하여 p16 발현이 악성의 정도나 조직학적 형태와는 관련이 없다고 하였으나, Nilson 등<sup>2</sup>은 p16이 편평세포암종의 중심부보다 침윤하고 있는 전방에서 또는 분화가 나쁜 부분에서 더 강한 발현을 보여 p16의 과발현이 편평세포암종의 공격적 행동양식과 연관성이 있음을 주장하였다. 그러나 본 연구에서 p16이 광선각화증보다는 보웬병에서 발현의 증가를 보이다가 편평세포암종에서 오히려 발현 감소가 있는 것은 전암 병변에서 상피내암으로 진행될 때 손상으로 발생한 비정상적인 세포의 전파를 막기 위한 방어기전으로 p16이 증가했다가 다른 인자들의 변화에 의해 p16의 기능이 소실되면서 침윤성 악성 병변으로 진행하였다고 해석할 수 있다.

한편 Rb 유전자는 염색체 13q14에 위치하는 종양 억제 유전자로 돌연변이나 결손이 있을 경우 Rb 단백질이 불활성화되어 세포 증식을 일으켜 종양이 발생한다고 알려져 있는데, 피부 편평세포암종 발생에 있어 Rb의 역할에 관한 연구는 매우 드물다. Ruiz 등<sup>13</sup>은 Rb+/+인 쥐와 Rb-/-인 쥐에게 동시에 유두종을 유발시켰는데, 두 군 사이의 유두종의 수는 차이가 없다고 보고하였다. 그러나 Rb+/+인 쥐에서 생긴 유두종보다 Rb-/-인 쥐에서 생긴 유두종에서 편평세포암종으로 진행되는 비율이 두 배 이상으로 높은 것이 관찰되어 Rb는 피부 종양형성을 촉진하지는 않으나 악성으로의 진행에는 관여한다고 주장하였다. 또한 Edwards 등<sup>16</sup>은 비정상적인 Rb 발현이 분화도가 나쁜 편평세포암종과 연관성이 있음을 관찰하였으나, 아직까지 전암 병변과 편평세포암종의 단계별 Rb 발현에 대한 연구결과는 보고된 것이 없다.

본 연구에서 Rb는 지루각화증, 광선각화증, 보웬병에서 발현의 차이를 보이지 않았으나, 편평세포암종에서 Rb의 소실이 유의 있게 관찰되었다. 이 사실은 Ruiz 등<sup>13</sup>의 결과와 마찬가지로 Rb가 초기 편평세포암종 형성에는 관여하지 않으나 상피내암에서 침윤성 편평세포암종으로 진행되는 데 Rb의 소실이 관여한다고 볼 수 있는 소견이다.

한편, 피부의 편평세포암종 발생에 세포주기의 대표적인 양 조절 인자인 cyclin D1의 발현에 대한 연구도 소수 있었다. 연구에 의하면 실험 동물 모델의 연구에서 정상이나 과증식된 피부에서는 cyclin D1이 발현되지 않았으나, 유두종과 편평세포암종에서는 과발현이 관찰되었다.<sup>14,15</sup> 사람 피부에서도 정상에서는 cyclin D1이 발현되지 않았으나, 보웬병, 편평세포암종, 기저세포암종 그리고 그 주위의 이형성 병변에서 과발현이 관찰되어 cyclin D1 과발현이 피부암 발생의 초기 과정에서 역할을 한다

고 생각하였다.<sup>17</sup> 그러나 본 연구에서는 지루각화증, 광선각화증, 보웬병에서 발현의 차이를 보이지 않았고, 오히려 편평세포암종에서 cyclin D1의 과발현이 관찰됨으로써 cyclin D1이 편평세포암종 악성화 과정의 초기보다는 후기 단계에 관여하는 것으로 생각되는데, 이 또한 추후 더 많은 증례들을 통한 연구가 필요하리라 생각한다. 단 조직학적 소견상 보웬병과 편평세포암종의 감별이 어려운 증례의 경우 p16, Rb와 더불어 cyclin D1에 대한 면역조직화학염색이 감별에 도움을 줄 수도 있을 것이다.

Ki-67 항원은 세포주기의 G0과 초기 G1기를 제외한 모든 세포의 핵 내에 존재하며, Ki-67 증식 지수는 인체의 여러 악성 종양에서 생물학적 행동의 연관성과 함께 연구되고 있다.<sup>18</sup> Kani-takis 등<sup>19</sup>은 피부 편평세포암종의 재발과 전이가 Ki-67의 발현과 연관성이 없다고 하였고, Scurry 등<sup>20</sup>은 편평세포암종과 연관성이 있는 태선경화증 환자군과 편평세포암종과 연관성이 없는 태선경화증 환자군에서 Ki-67의 발현에 차이가 없음을 보고하였다. 그러나 다른 연구자들은 Ki-67의 발현이 편평세포암종과 보웬병에서 재발과 연관성을 보인다고 하였고,<sup>21,22</sup> 광선각화증과 보웬병, 광선각화증과 편평세포암종에서 각각 Ki-67 발현의 차이를 관찰하였다.<sup>23</sup> 본 연구에서 지루각화증, 광선각화증, 보웬병으로 갈수록 Ki-67 증식 지수가 증가하는 것으로 보아 피부 편평세포암종 발생 과정에서 악성으로 진행될수록 세포의 증식력이 높아진다는 것을 알 수 있다. 그러나 보웬병과 편평세포암종에서의 차이는 없었다.

각화극세포종은 조직학적으로 중앙부에 각질로 차 있는 컵 모양의 표피 함입이 있고 그 주위에 가상괴종성, 유두종성 증식을 보이는 각질 세포가 존재하는 것을 특징으로 한다.<sup>24</sup> 임상적으로 이 종양은 전구 병변 없이 6주에서 8주 이내에 빨리 성장하고 치료 없이도 6개월 이내에 소실되므로 편평세포암종과는 다른 양성 질환으로 생각하였다.<sup>25</sup> 그러나 최근 각화극세포종에서 편평세포암종과 유사한 세포의 이형성이 관찰되고, 혈관 및 신경 주위 침습과 함께 전이 소견까지 관찰되어, 이를 분화가 좋은 편평세포암종의 아형으로 간주하자는 의견이 대두하였다.<sup>25</sup> 그러한 관점에서 각화극세포종과 편평세포암종 두 질환이 다른 기전으로 형성된 독립체인지 또는 같은 기전으로 형성된 한 종양의 연속체인지를 알기 위해 두 질환에서 여러 가지 분자생물학적인 인자들의 발현과 유전학적인 연구들이 있었지만 연구자들마다 차이가 있었다. Clausen 등<sup>25</sup>은 두 질환에서 게놈 변이를 연구한 결과 편평세포암종에서 더 자주 변이가 있음을 관찰하여 두 질환은 다른 기전에 의해 형성된 다른 질환임을 주장하였다. 또한 다른 연구들에서도 각화극세포종에서는 p16이 발현한 반면 편평세포암종에서는 p16의 소실이 관찰되었고,<sup>26</sup> 각화극세포종에서는 Ki-67 발현이 적은 반면, 편평세포암종에서는 Ki-67 발현이 높음을 관찰하였다.<sup>27</sup> 그러나 이와 달리 Kaabipour 등<sup>28</sup>은 이 두 질환에서 p16의 발현이 차이가 없음을 관찰하였고, Burnworth 등<sup>4</sup>도 두 질환 모두에서 cyclin D1의 과발현을 관찰하였다. 본 연구에서는 각화극세포종에서의 p16의 발현은 편평세포



암종과 차이를 보이지 않았다. 한편 Rb의 발현은 21.7%로 지루 각화증과 광선각화증, 보웬병에 비해 발현이 적어 각화극세포종의 형성에 편평세포암종과 마찬가지로 Rb의 소실이 관여함을 알 수 있었다. 그러나 편평세포암종에서 cyclin D1의 과발현을 관찰한 반면 각화극세포종에서는 관찰되지 않았고, Ki-67 발현 또한 편평세포암종에 비해 낮게 관찰된 점은 두 질환의 형성에 다른 기전이 존재하며, 이는 두 질환의 증식력의 차이를 보이는 것을 의미하지만 추후에 더 연구가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 피부 편평세포 병변의 양성 질환에 있어 전구 병변을 거쳐 악성으로 진행되는 과정에서 p16, Rb, cyclin D1의 비정상적인 발현이 연관되어 있음을 알 수 있었고, 종양 세포 증식 지수의 증가도 관찰하였다. 위의 결과로 피부 생검 조직에서 조직학적 소견만으로 감별이 어려운 경우 p16, Rb, cyclin D1, Ki-67 단백질에 대한 면역조직화학염색을 이용하여 감별 진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Zheng Z, Kye Y, Zhang X, Kim A, Kim I. Expression of p63, bcl-2, bcl-6 and p16 in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Korean J Pathol* 2005; 39: 91-8.
- Nilsson K, Svensson S, Landberg G. Retinoblastoma protein function and p16INK4a expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16INK4a expression and infiltrative behavior. *Mod Pathol* 2003; 17: 1464-74.
- Salama ME, Mahmood MN, Qureshi HS, Ma C, Zarbo RJ, Ormsby AH. p16INKa expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1006-12.
- Burnworth B, Arendt S, Muffler S, *et al.* The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1. *Eur J Cell Biol* 2007; 86: 763-80.
- Hur HK, Roh MS, Jeong JS, Rha SH, Huh GY, Hong SH. Expression of pRb, p16, cyclin D1 and cyclin E in infiltrating duct carcinoma of the breast. *Korean J Pathol* 2001; 35: 416-23.
- Han SH, Lee JH, Kim SH, An J, Lee ES, Kim YS. Expression of p16, Rb and FHIT proteins in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Korean J Pathol* 2008; 10: 294-8.
- Kim JY, Kim HW, Choi KU, *et al.* Alteration of G1/S cell cycle regulatory proteins in ovarian epithelial tumors. *Korean J Pathol* 2006; 40: 274-81.
- Lee JS, Shin JG, Ko GH, Lee JH, Kim HW. Studies on the expression of the p16 (INK4A), p53, and Ki-67 labeling index in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. *Korean J Pathol* 2004; 38: 238-43.
- Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, *et al.* Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16 (INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett* 2002; 176: 205-14.
- Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM. p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1284-92.
- Hodges A, Smoller BR. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol* 2002; 15: 1121-5.
- Conscience I, Jovenin N, Coissard C, *et al.* P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *Eur J Dermatol* 2006; 16: 518-22.
- Ruiz S, Santos M, Lara MF, Segrelles C, Ballestin C, Paramio JM. Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 9678-86.
- Robles AI, Conti CJ. Early overexpression of cyclin D1 protein in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1995; 16: 781-6.
- Bianchi AB, Fischer SM, Robles AI, Rinchik EM, Conti CJ. Overexpression of cyclin D1 in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 1993; 8: 1127-33.
- Edwards MJ, Thomas RC, Wong YL. Retinoblastoma gene expression in human non-melanoma skin cancer. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 479-85.
- Liang SB, Furihata M, Takeuchi T, *et al.* Overexpression of cyclin D1 in nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch* 2000; 436: 370-6.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
- Kanitakis J, Narvaez D, Euvrard S, Faure M, Claudy A. Proliferation markers Ki67 and PCNA in cutaneous squamous cell carcinomas: lack of prognostic value. *Br J Dermatol* 1997; 136: 643-4.
- Scurry J, Beshay V, Cohen C, Allen D. Ki67 expression in lichen sclerosis of vulva in patients with and without associated squamous cell carcinoma. *Histopathology* 1998; 32: 399-404.
- Shimizu T, Murakami T, Oga A, Furumoto H, Nakano J, Muto M. Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 antigen in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol* 1999; 26: 837-40.
- Baum HP, Meurer I, Unteregger G. Expression of proliferation-associated proteins (proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen) in Bowen's disease. *Br J Dermatol* 1994; 131: 231-6.
- Chen S, Takahara M, Kido M, *et al.* Increased expression of an epidermal stem cell marker, cytokeratin 19, in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2008; 159: 952-5.
- Kim L, Hann SK, Lee KG. Histological and immunohistochemical

- characteristics of keratoacanthoma and well differentiated squamous cell carcinoma. *Korean J Pathol* 2000; 34: 145-53.
25. Clausen OP, Aass HC, Beigi M, *et al.* Are keratoacanthomas variants of squamous cell carcinomas? A comparison of chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2308-15.
26. Beham A, Regauer S, Soyer HP, Beham-Schmid C. Keratoacanthoma: a clinically distinct variant of well differentiated squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol* 1998; 5: 269-80.
27. Connolly M, Narayan S, Oxley J, de Berker DA. Immunohistochemical staining for the differentiation of subungual keratoacanthoma from subungual squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol* 2008; 33: 625-8.
28. Kaabipour E, Haupt HM, Stern JB, Kanetsky PA, Podolski VF, Martin AM. p16 expression in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 69-73.