

## 전이성 대장암종에서 Osteopontin 및 MMP-1의 유전자 발현 변화 및 연관 임상 소견 검증

최준정<sup>1,4</sup> · 김상겸<sup>1</sup> · 박전한<sup>2,4</sup> · 김남규<sup>3,4</sup>  
김호근<sup>1,4</sup>

연세대학교 의과대학 병리학교실,  
<sup>2</sup>외과학교실 및 <sup>3</sup>미생물학교실  
<sup>4</sup>연세대학교 BK21의과학 사업단

접수 : 2009년 10월 14일  
제재승인 : 2009년 11월 12일

책임저자 : 김 호 근  
우 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 02-2228-1761  
Fax: 02-362-0860  
E-mail: hkyonsei@yuhs.ac

\*본 연구는 보건복지부가족부 보건의료  
기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진  
것임(A084877).

### Validation of Gene Expression Changes of Osteopontin and MMP-1 in Primary and Metastatic Colorectal Carcinomas

Junjeong Choi<sup>1,4</sup> · Sangkyum Kim<sup>1</sup> · Jeon Han Park<sup>2,4</sup> · Nam Kyu Kim<sup>3,4</sup> · Hoguen Kim<sup>1,4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pathology, <sup>2</sup>Microbiology, and <sup>3</sup>Surgery, Yonsei University College of Medicine;  
<sup>4</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Seoul, Korea

**Background :** Metastasis is one of the most important characteristics of cancer in terms of its impact on patient survival. Unfortunately, identification of altered genes during tumor metastasis is limited. **Methods :** Using high-throughput microarrays containing 19K spotted human oligonucleotides, gene expression of primary and matched metastatic colon cancer were compared in previous study. Although DNA microarray analysis did not demonstrate complete classification of primary and metastatic carcinoma, 80 differentially expressed genes were identified. Among these, expression of osteopontin, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and serpin A1 was assessed using immunohistochemistry in a validation set containing 43 pairs from tissue microarrays. **Results :** The expression of osteopontin was significantly higher in metastatic carcinoma than in primary carcinoma, as indicated by mRNA expression. The expression of MMP-1 was significantly lower in metastatic carcinoma. Expression of serpin A1 was not correlated with the microarray results. **Conclusions :** Osteopontin and MMP-1 expression successfully classified primary and metastatic colorectal carcinomas and further studies on their clinical application is encouraged.

**Key Words :** Neoplasm metastasis; Colorectal neoplasms; Immunohistochemistry; Osteopontin; Matrix metalloproteinase 1

전이(metastasis)는 원발암과 떨어져 있는 종양 임플란트로, 종양을 악성 종양으로 구분짓게 하는 가장 중요한 성질 중 하나로 알려져 있다. 기본적으로 몇 가지 경우(중추신경계의 신경외교종과 괴부의 기저세포암종)를 제외하고 모든 악성 종양은 전이한다.<sup>1</sup> 종양의 국소 침습(local tissue invasion)과 전이는 개별적인 성상이지만, 분자생물학적 수준에서 두 가지는 연속선상에 있다고 생각된다. 일반적으로 원발 종양이 나쁜 생물학적 행태를 보일 때 전이가 동반된다고 생각되나, 원발 종양의 크기가 작고 분화가 좋은 경우에서도 전이는 이루어질 수 있으며, 반대로 원발 종양이 매우 나쁜 생물학적 행태를 보일지라도 전이가 이루어지지 않는 경우도 있다.<sup>1</sup>

악성 고형암으로 진단을 받은 환자의 약 30%에서 전이가 동반되고 있으며, 종양의 전이는 완치를 어렵게 하는 가장 중요한 요인이 되고 있다.<sup>1</sup> 특히, 대장암의 약 25-35%에서 synchronous,

또는 metachronous hematogenous metastasis를 보이며, 이들 중 60-80%가 간으로의 전이를 보이고 있는데 이들 환자 군의 5년 생존율은 유의하게 낮은 것으로 알려져 있다.<sup>2</sup>

현재까지 전이 발생에 대해서는 두 가지 이론이 널리 알려져 있다. 첫째, 유전 결정적 모델로, 이는 다단계적 종양 발생 과정 중 비교적 후기 단계에 종양을 이루는 세포의 일부가 전이 가능 형질을 얻게 되어 전이하게 된다는 이론이다. 또 한 축을 이루는 모델은 비교적 초기 단계 혹은 종양 발생 때부터 전이 형질을 가지고 있다는 이론이다. 이 두 가지 모델을 지지하는 몇 가지 증거들이 제시되고는 있으나, 전이의 임상적 중요성을 미루어 볼 때 전이성 종양에 대한 분자유전학적 기전과 이와 동반된 병태생리학에 대한 이해는 미흡한 상태라고 할 수 있다.<sup>3,4</sup>

최근의 high-throughput technique을 이용한 일련의 연구들은 유전자들의 발현에 따른 종양 아형의 분류가 예후를 예측할

수 있는 인자로서의 사용 가능성을 보이고 있다. 또한, 특정 표현형(임상적으로는 재발 여부나 치료 반응 정도)에 관여하는 유전자들의 발현 조합 즉 분자 유전학적 표지자의 조합이 개별 유전자에 대한 연구를 진행하는 것보다 효과적으로 예후를 예측하는 데 도움을 줄 수 있다고 알려져 있다.<sup>3-6</sup> 최근에 발전한 기능성 유전체학은 한번의 검사로 많은 유전자의 발현 정도를 알아볼 수 있게 하여, 일반적으로 병태생리학적으로 복잡다단한 분자유전학적 변화를 보이는 질환, 특히 암이나 자가면역질환 등의 이해를 연구하는 데 주요한 방법론으로 제시되고 있으며, 대장암과 같이 다단계적이며 복합적인 종양 발생 단계를 거친다고 생각되는 종양의 발생 기전은 물론, 전이와 같이 악성 종양의 특성을 이해하는 데 매우 유용한 수단이라고 제시되고 있다.

연구자들은 최근에 oligonucleotide microarray 실험을 통하여 전이성 대장암종에서 원발 종양과 다르게 발현되는 80여 개의 유전자들을 발굴하였다.<sup>7</sup> 이 연구에서는 12세트의 동일한 환자에게서 발생한 정상-원발성 대장 종양-전이성 암종의 유전자 발현 양상을 19,000개 유전자의 human oligonucleotide microarray를 통해 two-way hierarchical clustering하여 분석하였는데, 이 분석에서 molecular profiling에 따라 원발 종양과 정상 대장 조직은 구분이 되었으나, 원발 종양과 전이 종양이 혼연히 구분되지는 않는 것으로 나타났다. 그러나 multi-dimensional scaling을 시행하였을 때는 원발 종양과 전이 종양에서 다른 유전자 발현 양상을 보이고, 이에 따라 원발-전이 종양 간에 다르게 발현되고 조절되는 유전자들을 발굴하였다. 이 연구에서 정상 대장 점막 조직과 다르게 발현되는 유전자는 원발성 종양과 전이성 종양에서 각각 1,222개와 1,079개였는데, 이들 중 약 60%를 차지하는 767개는 두 그룹에서 공통적으로 발현되었다.

또한 이 연구에서 Mann-Whiney rank-sum test의 supervised analysis를 통하여 원발 및 전이 종양에서 공통적으로 발현되는 767개의 유전자 중 전이 종양에서 다르게 발현되는 유전자 80여 개를 선별하였다.<sup>7</sup> 이 결과는 기본적으로는 원발 종양과 전이 종양에서 유사한 유전자 발현 양상을 보이지만 다르게 발현, 조절되는 유전자들이 종양의 전이에 관여할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 이들 전이 특이 유전자들의 분자생물학적, 조직학적 표현형을 이해하는 것은 악성 종양의 전이와 예후 인자의 이해에 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구에서는 이들 80여 개의 유전자 중 특히, 최근까지 이루어진 연구를 통하여 대장암 발생 관련 혹은 대장암의 진행 및 전이 관련 행태와 밀접하게 관련이 있다고 생각되는 osteopontin, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)과 serpin A1 등 3개의 유전자 산물의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 검사하였다. 연구 대상으로는 검증용 자료로서 새로 수집한 43명 환자군의 원발 종양-전이 종양 조직을 관찰하여, 이들이 종양의 전이 과정 이해 및 전이 예측에 도움이 될 수 있는가를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 환자군 설정 및 임상 정보 수집

2000년부터 2007년까지 연세대학교 의과대학 부속 신촌 세브란스병원에서 원발성 대장암종 및 전이성 대장암종을 진단 받아 원발암 및 전이암 모두를 치료한 환자를 대상으로 하였다. 연구는 각 예마다 짹지는 두 종양의 파라핀포매 조직을 사용할 수 있는 총 43명의 환자를 대상으로 진행하였는데 환자의 임상 기록지를 참고하여 진단 당시의 나이, 성별, 원발성 종양과 전이성 종양의 진단 시기, 치료 여부 등을 검색하였다. 전체 43예 중 원발 종양과 전이 종양이 함께 발견된 예는 26예였으며, 원발 종양 절제 후 전이 종양이 발견되어 수술한 예는 17예였고, 원발 종양 진단 후 전이 종양 진단까지의 시간은 평균 18개월이었다(범위, 6-43개월). 환자의 임상 자료는 Table 1에 요약하였으며, 각 환자 조직의 실험적 사용을 위한 피험자 동의와 임상 윤리 위원회의 허가를 얻었다.

### Tissue microarray의 제작

10%의 중성 포르말린에 12시간 이상 고정 후 일련의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 보관된 조직을 이용하였으며, 각 종례의 대표적인 파라핀 블록의 종양 조직에서 조직 심(tissue core)을 취하여 tissue microarray를 제작하였다. 조직 심의 직경은 2.0 mm로 하고 하나의 파라핀 블록에 최대 48개의 조직 심이 포함되도록 제작하였다. 추출 오차를 최소화하기 위해 한 종례당 2개 이상의 조직 심을 취하였다.

### 면역조직화학염색

Tissue microarray slide는 4-5 μm의 연속 절편으로 박절하여 오븐에서 파라핀을 녹인 후 자일렌으로 파라핀을 완전히 제거하였다. 그 다음 에틸 알코올로 단계적으로 힘수하고 조직 절편을 0.3% 과산화수소수에 10분간 담근 후 pH 6.0의 구연산 완충액에 담가 극 초단파에서 15분간 처리한 다음 실온에서 식혔다. 그리고 회색된 일차 항체인 항 MMP-1 (1:200, Calbiochem, La Jolla, CA, USA), serpin A1 (1:200, AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, USA), osteopontin (1:200, Abcam Plc., Cambridge, UK) 항체를 상온에서 약 30분간 반응시킨 후 냉장고에서 12시간 배양하였다. EnVision kit (Dako, Tokyo, Japan)를 이용한 EnVision 항체 복합체 방법으로 면역과산화효소염색을 시행하고, 3,3-diaminobenzidine tetrachloride chromogen으로 발색한 후 Meyer's Hemalum solution (hematoxylin)으로 대조 염색하였다. 면역조직화학염색의 판독은 cut-off value를 30%로 잡아 30% 이상의 종양 세포에서 세포막 혹은 세포질에 염색되는 것을 양성으로 판독하였으며, 정상 대장 조

Table 1. Clinicopathologic profiles of 43 colon cancer patients

Case ID	Sex	Age (yr)	Site		Differentiation		Tumor size (maximal dimension in cm )		Relapse interval (mo)	Type of metastasis	Node metastasis
			Primary	Metastatic	Primary	Metastatic	Primary	Metastatic			
Met-1	F	56	Rectum	Lung	Moderate	Moderate	4.8	4	21	Metachronous	0/18
Met-2	M	60	Rectosigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.4	6	14	Metachronous	8/14
Met-3	F	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.1	5.5	8	Metachronous	8/19
Met-4	F	41	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.0	2.0	25	Metachronous	5/32
Met-5	F	68	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	4.0	5.5	43	Metachronous	0/6
Met-6	M	62	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	2.0	2.2	11	Metachronous	1/12
Met-7	M	52	Sigmoid	Lung	Moderate	Moderate	4.8	3.0	38	Metachronous	1/8
Met-8	M	70	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.8	1.2	26	Metachronous	3/6
Met-9	F	67	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	13.4	1.6	6	Metachronous	6/43
Met-10	F	61	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate to poor	4.7	6.0	6	Metachronous	0/6
Met-11	M	55	Ascending	Liver	Well	Moderate	5.3	8.0	15	Metachronous	4/46
Met-12	F	44	Ascending	Liver	Moderate	Poor	Not available		4.5	8	Metachronous
Met-13	M	61	Ascending	Liver	Well	Moderate	1.7	2.0	24	Metachronous	2/19
Met-14	F	57	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	2.2	16	Metachronous	6/28
Met-15	F	53	Sigmoid	Lung	Moderate	Moderate	4.0	2.5	25	Metachronous	2/12
Met-16	F	57	Ascending	Lung	Moderate	Moderate	5.5	0.7	12	Metachronous	2/21
Met-17	M	45	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	2.5	14	Metachronous	6/19
Met-19	F	56	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	3.5	3.0		Synchronous	0/9
Met-20	M	60	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.0	1.8		Synchronous	0/8
Met-22	M	69	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.2	2.0		Synchronous	7/20
Met-23	M	51	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	6.5	1.5		Synchronous	0/21
Met-24	F	62	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.0	3.7		Synchronous	1/10
Met-25	M	70	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	3.3	4.0		Synchronous	2/11
Met-26	M	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.3	6.0		Synchronous	51/61
Met-27	M	72	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.5	3.0		Synchronous	0/6
Met-28	F	48	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	3.5	2.3		Synchronous	8/52
Met-29	M	46	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	2.5	2.4		Synchronous	4/12
Met-31	M	62	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	4.0	1.3		Synchronous	1/31
Met-32	F	65	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.5	1.3		Synchronous	6/19
Met-33	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	1.6		Synchronous	0/32
Met-34	F	54	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	6.0	1.3		Synchronous	6/54
Met-35	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.5	2.5		Synchronous	12/33
Met-36	F	72	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	7.5	2.2		Synchronous	0/12
Met-37	M	53	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	6.0	1.5		Synchronous	2/35
Met-38	M	52	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.0	5.0		Synchronous	2/38
Met-39	F	40	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	5.4	3.0		Synchronous	1/22
Met-40	M	61	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	5.3	1.6		Synchronous	0/20
Met-41	M	53	Cecum	Liver	Moderate	Moderate	4.2	1.5		Synchronous	6/17
Met-42	M	69	Ascending	Liver	Well	Well	6.0	0.7		Synchronous	2/41
Met-43	F	48	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	4.3	3.0		Synchronous	9/33
Met-44	M	57	Ascending	Liver	Moderate	Moderate	8.4	1.7		Synchronous	0/20
Met-45	F	60	Sigmoid	Liver	Moderate	Moderate	7.0	7.5		Synchronous	4/32
Met-46	M	67	Rectum	Liver	Moderate	Moderate	3.5	4.5		Synchronous	3/19

F, female; M, male.

직에 발현되는 정도를 mild로 잡았을 때, mild, moderate, strong expression을 각각 1+, 2+, 3+ 그리고 음성을 0으로 판독하였다. 면역조직화학염색은 각 2회 이상 실시하였으며, 총 관찰 수의 평균값을 대표 값으로 사용하였다.

### 통계학적 분석

SPSS ver. 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용, 원

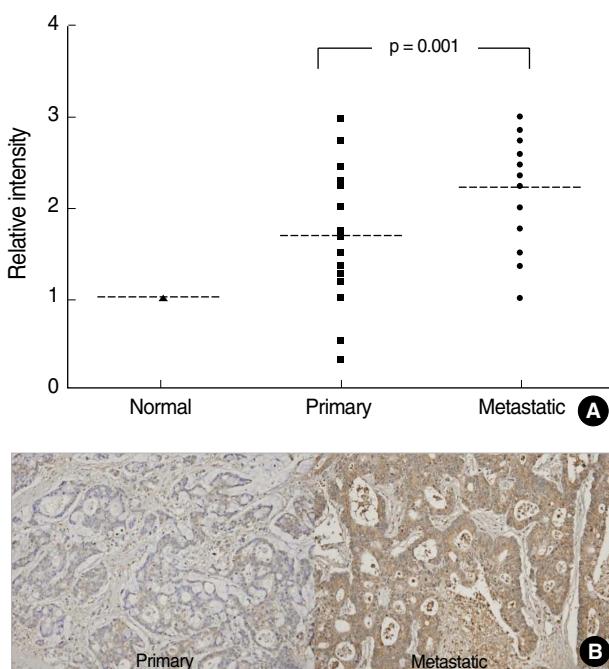
발 종양과 전이 종양의 osteopontin, MMP-1, serpin A1의 발현의 차이를 Wilcoxon signed rank test를 통해 검정하였으며, osteopontin과 MMP-1의 발현 그리고 혈관 침습과 림프절 전이와의 관계를 Fisher's exact test를 이용, 교차 분석하였다. 원발 종양 절제 후 발생한 전이 종양 환자군에서 osteopontin의 발현 증가가 있는 환자군과 증가가 없는 환자군에서 재발하기까지 시간의 비교는 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 검정하였다. Osteopontin의 발현과 생존율과의 분석을 위해서는 Kaplan-Meier

method와 log-rank 검정을 이용하여 단변량 분석하였다. 생존 기간은 진단 당시 날짜로부터 대장암으로 인한 사망일까지를 개월로 계산하였다. 유의성 판정은  $p$ 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 결 과

### Osteopontin의 원발성 대장암종 조직, 전이성 대장암종 조직에서의 발현 양상

총 43예의 원발성 대장암종 조직-전이성 대장암종 조직에서 osteopontin의 발현을 관찰하였다. 이 중 27예에서는 전이성 대장암종 조직에서의 osteopontin의 발현이 원발 종양보다 높게 나타났고, 8예에서는 전이성 대장암종 조직에서의 osteopontin의 발현이 원발 종양보다 낮게 나타났으며, 8예에서는 두 조직 간 발현의 차이가 없었다. 평균적으로 osteopontin은 원발성 대장암종보다 전이성 대장암종 조직에서 더 많이 발현되는 것으로 나타났으며, 이러한 차이는 통계적으로 유의하였다( $2.2 \pm 0.8$  vs  $1.7 \pm 0.8$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 1).



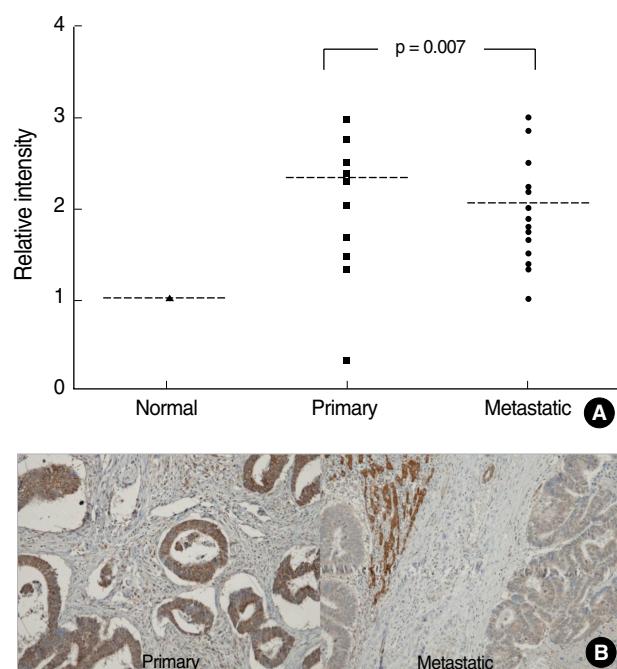
**Fig. 1.** Osteopontin expression in primary and metastatic colorectal carcinomas. (A) Osteopontin expression is increased in metastatic carcinoma ( $p = 0.001$ ). (B) An example of immunohistochemical staining of osteopontin expression in matched primary and metastatic carcinomas. More intense expression is noted in metastatic carcinoma cells.

### MMP-1의 원발성 대장암종 조직, 전이성 대장암종 조직에서의 발현 양상

총 43예의 원발성 대장암종 조직-전이성 대장암종 조직에서 MMP-1의 발현을 관찰하였다. 이 중 26예에서는 전이성 대장암종 조직에서 원발성 대장암종 조직보다 적은 MMP-1 발현이 나타났으며, 13예에서는 전이성 대장암종 조직에서 원발성 대장암종 조직보다 많은 MMP-1의 발현을 보였고, 4예에서는 두 조직 간 발현의 차이가 없었다. 평균적으로 MMP-1의 발현은 원발성 대장암종보다 전이성 대장암종 조직에서 감소했으며, 이러한 차이는 통계적으로 유의하였다( $2.0 \pm 0.5$  vs  $2.3 \pm 0.6$ ,  $p=0.007$ ) (Fig. 2).

### Serpin A1의 원발성 대장암종 조직, 전이성 대장암종 조직에서의 발현 양상

총 39예의 원발성 대장암종 조직-전이성 대장암종 조직에서 serpin A1의 발현을 관찰하였다. 총 8예의 전이성 대장암종에서 serpin A1의 발현이 원발암보다 증가한 것으로 나타났으나, 5예에서는 감소한 것으로 나타났으며, 대다수인 26예에서는 두 군 간에 serpin A1의 발현 차이가 없었고, 두 군 간 발현의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다( $1.7 \pm 0.6$  vs  $1.7 \pm 0.5$ ,  $p=0.739$ ) (Fig. 3).



**Fig. 2.** Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in primary and metastatic colorectal carcinomas. (A) MMP-1 expression is decreased in metastatic carcinoma ( $p = 0.007$ ). (B) An example of immunohistochemical staining of MMP-1 expression in matched primary and metastatic carcinomas. More intense expression is noted in primary carcinoma cells.

Table 2. Lymphovascular permeation and nodal metastasis with regards to osteopontin and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression

	Osteopontin expression				MMP-1 expression				
	Increased	Not increased	Total	p-value	Decreased	Not decreased	Total	p-value	
Lymphovascular permeation	Present	12	5	17	0.523	16	10	26	0.859
	Absent	15	11	26		10	7	17	
Lymph node metastasis	Present	20	11	31	0.737	8	18	26	0.48
	Absent	7	5	12		3	14	17	

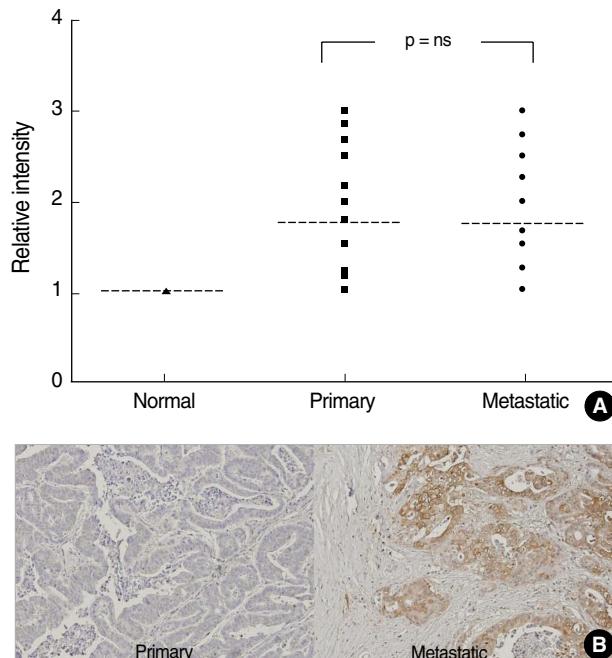


Fig. 3. Serpin A1 expression in primary and metastatic colorectal carcinomas. (A) There is no difference in Serpin A1 expression between the two groups ( $p = 0.739$ ). (B) An example of immunohistochemical staining of Serpin A1 in matched primary and metastatic carcinomas. Only a small numbers of cases ( $n = 8$ ) show more intense serpin A1 expression in metastatic carcinoma cells as expected from the microarray data.

#### Osteopontin의 발현과 혈관 침습 및 림프절 전이와의 관계

Osteopontin의 발현이 전이암에서 증가한 것으로 나타났는데, 이것이 분비성 당단백인 점을 고려, osteopontin의 발현이 조직학적 표지자로서 적절한지를 판별하기 위해 osteopontin의 발현이 증가한 군과 그렇지 않은 군을 나누어 이들의 원발 종양에서의 혈관 침습 및 림프절 전이 양상을 분석하였다.

분석 결과 혈관 침습이 있는 종례는 총 17예였는데, 이 중 osteopontin의 발현이 증가한 집단에 속한 종례는 12예였고, 그렇지 않은 집단에 속한 종례는 5예로, osteopontin 발현이 증가한 집단이 더 많은 혈관 침습을 보였다. 그러나 이러한 차이는 Fisher's exact 검정을 시행하였을 때 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.523$ ) (Table 2).

림프절 전이가 있는 종례는 총 31예였는데, 이 중 osteopontin

의 발현이 증가한 집단에 속한 종례는 20예였고, 그렇지 않은 집단에 속한 종례는 11예로 림프절 전이가 있는 종례 중 osteopontin의 발현이 증가한 종례의 수가 더 많았다. 그러나 이러한 차이는 Fisher's exact 검정을 시행하였을 때 통계적으로 유의하지는 않았다( $p=0.737$ ) (Table 2).

또 metachronous 전이 종양 환자군에서 osteopontin 발현이 증가한 군과 발현이 감소, 혹은 변화가 없던 환자군에서 전이 종양 발생의 interval의 차이가 있는지를 분석하였다. 총 18예가 metachronous 전이 종양을 나타냈으며, 전체 평균 18개월 후 종양의 재발로 전이 종양이 나타났다. 이들 중 osteopontin 발현의 증가가 있던 군은 평균 20.9개월 후 재발성 전이암이 발생하였으며, osteopontin 발현의 증가가 나타나지 않은 집단은 평균 16.3개월 후 재발성 전이암이 발생한 것으로 나타났으나, 두 집단 간의 차이에 대한 교차 분석을 시행하였을 때 이러한 차이는 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.388$ ).

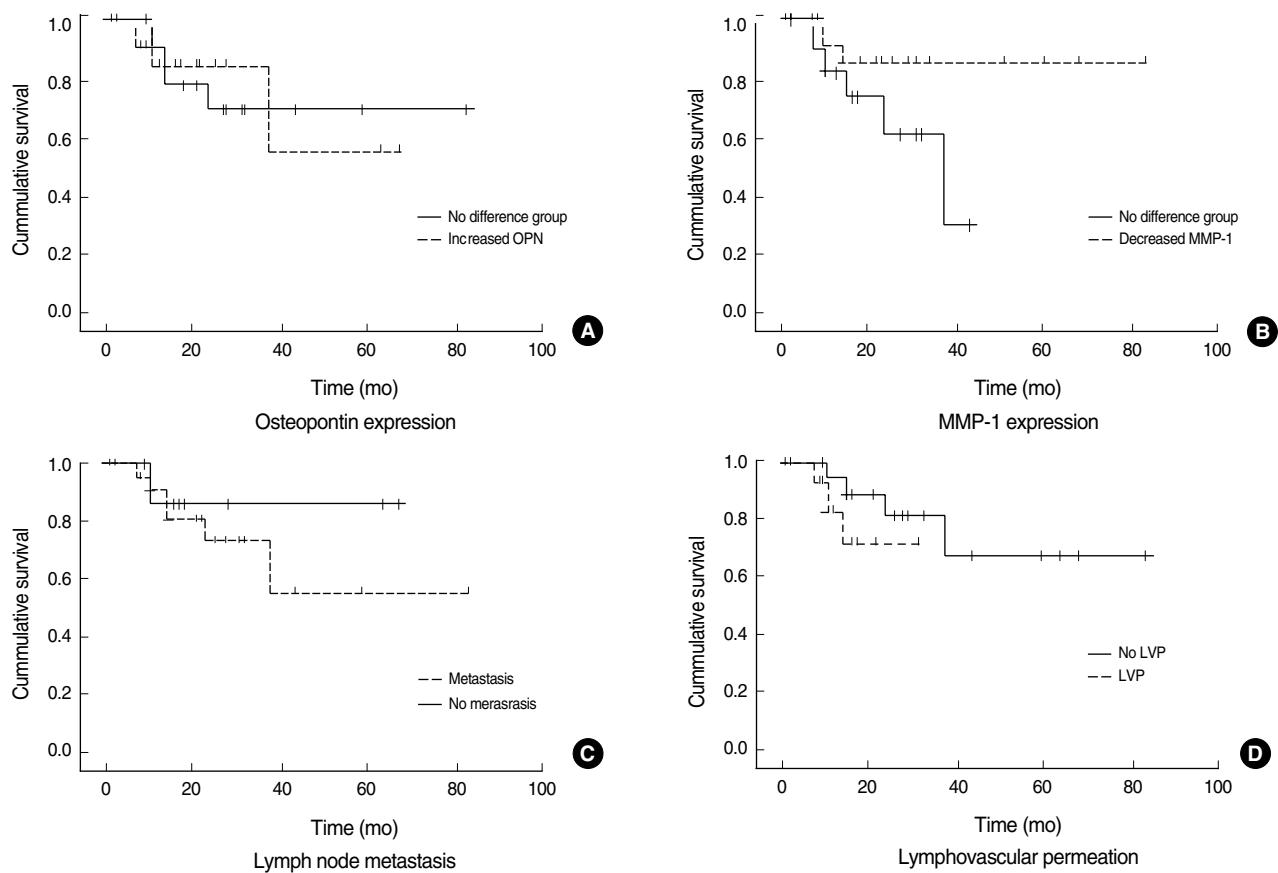
#### MMP-1의 발현과 혈관 침습 및 림프절 전이와의 관계

MMP-1의 발현이 원발 종양보다 전이 종양에서 더 낮은 것으로 나타났으므로, 이러한 양상이 혈관 침습 및 림프절 전이 여부와 관련이 있는지를 분석하였다. 혈관 침습이 있던 종례는 총 26예였는데 이 중 MMP-1의 발현이 원발 종양보다 전이 종양에서 감소한 예는 16예로, MMP-1의 발현이 감소하지 않은 예보다 많았다. 그러나 이러한 결과는 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.859$ ) (Table 2).

또한 림프절 전이가 있던 종례는 총 26예였는데, 이 중 MMP-1의 발현이 원발 종양보다 전이 종양에서 감소한 예는 8예로, MMP-1의 발현이 감소하지 않은 예보다 적었다. 그러나 이러한 결과는 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.480$ ) (Table 2).

#### Osteopontin 및 MMP-1의 발현 변화, 원발 종양의 혈관 침습과 림프절 전이 그리고 생존율과의 관계

Osteopontin의 발현 증가가 있는 집단과 증가가 없는 집단 간 생존율의 차이가 있는가의 여부를 Kaplan Meier method와 log-rank 검정으로 단변량 분석하였다. 추적 기간 중 osteopontin의 발현 증가가 있는 집단의 생존율이 낮은 경향을 보였지만, 이는 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.980$ ) (Fig. 4A).



**Fig. 4.** Survival analysis of 43 patients according to osteopontin, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression, lymph node metastasis status, and lymphovascular permeation. No significant differences in survival are noted in association with different levels of expression of osteopontin and MMP-1 in metastatic carcinoma cells ( $p = 0.980$  and  $p = 0.079$ ). In addition, the presence of lymph node metastasis and lymphovascular permeation is not associated with a significant difference in survival ( $p = 0.459$  and  $p = 0.301$ ). OPN, osteopontin; LVP, lymphovascular permeation.

또한 MMP-1의 발현 감소가 있는 집단과 증가가 없는 집단 간 생존율의 차이가 있는가의 여부를 Kaplan Meier method와 log-rank 검정으로 단변량 분석한 결과, 추적 기간 중 MMP-1의 발현 감소가 있는 집단의 생존율이 높은 경향을 보였지만, 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.079$ ) (Fig. 4B).

대상 환자군의 림프절 전이 여부 및 혈관 침습과 생존을 간의 관계를 Kaplan Meier method와 log-rank 검정으로 단변량 분석한 결과, 림프절 전이가 있는 환자의 경우 전이가 없는 환자보다 생존율이 더 낮은 것으로 관찰되었으나, 이러한 결과는 통계적으로 유의하지는 않았다( $p=0.459$ ) (Fig. 4C). 또한 혈관 침습이 있는 환자의 경우가 없는 환자보다 생존율이 더 낮은 것으로 관찰되었으나, 이 또한 통계적으로 유의하지 않았다( $p=0.301$ ) (Fig. 4D).

## 고 찰

전이는 악성 종양의 주요한 특징으로, 종양의 악성도를 결정

하는 데 가장 중요한 요소 중 하나이며, 환자의 생존율과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 고형암에서 전이가 이루어지는 과정은 원발암에서 종양 세포가 혈관으로 침투한 후 혈류에서 생존하여 표적 장기에 도달, 성장하는 단단계를 거쳐 진행된다. 이러한 과정은 원발 종양에 내재된 형질로, 단계적인 유전자 발현 과정에 따라 이루어지거나 혹은 종양의 분화 과정에서 유전적 변이로 형질을 획득한 종양 세포군들이 선택된 결과일 수 있다.<sup>3</sup> 따라서 이들 과정에서 이루어지는 복잡다단한 유전자 발현의 변화와 조절을 이해하는 것은 종양 발생 과정과 진행 과정의 이해와 및 종양 치료를 위한 연구의 근간이 된다. 그러나 개별 종양에서 나타나는 유전자 발현의 조절 과정을 연구하는 것에는 많은 제약이 따르고, 종양 발생에 관련하는 각종 교란 변수들에 의한 영향을 배제하기 힘들기 때문에 대규모 환자 집단에게서 관찰되는 유전자 발현의 행태를 관찰하고 유전자 산물의 생물학적 기능을 이해하는 것은 종양 발생과 악성 종양의 행태 연구에 필수적이다. 최근 microarray 기술과 bioinformatics의 발전으로 개별적인 유전자 변화의 차이에 국한하지 않고 유전체 발현 연구의 시스템적 접근이 가능하게 되었고, 이에 따라 비교적 유

사한 임상 양상 혹은 예후를 보이는 환자 집단에서 유의미하게 관찰되는 유전자 발현 양상을 이해하여 종양의 분자유전학적 표지자를 이해하는 근간을 마련하였다. 본 연구에서는 선행 실험을 통하여 원발성 대장암과 전이성 대장암에서 차이를 보이는 유전자 산물들의 발현을 검증 세트(validation set)를 대상으로 관찰하였다.

이전의 연구에서는 원발성 대장암종과 전이성 대장암종에서 유사한 분자유전학적 표지자를 다수 보였기 때문에 종양 발생 과정에서 상대적으로 초기에 전이 관련 형질이 결정될 것으로 해석하였다. 그러나, 이 연구에서 원발성 대장암종과 전이성 대장암종에서 80여 개의 유전자가 다르게 조절된다는 것이 나타났고, 이에 저자들은 이들의 발현 차이가 종양의 전이 관련 행태에 관여할 것임을 제시하였다. 이들 80여 개의 유전자들에는 기존의 연구를 통하여 밝혀진 세포 성장과 증식에 관여하는 역할을 하는 유전자(growth arrest-specific 1, intelectin 1, *LIIB*) 군, 세포 외 단백 효소(*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP13*), 세포 접착(collagen type XII, alpha 1, *PAP*)과 세포 운동성(vasoactive intestinal peptide, wingless-type MMTV integration site family, member 5A)과 관련된 군 등이 포함되어 있다. 이들 유전자의 발현은 전이 관련 특이 유전자일 가능성과 함께 전이를 포함한 종양 진행에 대한 인체의 방어 및 종양 면역과 관련된 반응물로서 발현되는 것일 가능성 역시 존재한다. 따라서 이들이 종양 발생 및 전이 과정에서 발현, 조절되는 양상의 패턴을 이해하는 것은 전이 발생의 예측에 도움이 될 수 있으며, 원발성 종양 절제 후 재발 및 전이 발생에 대한 추적 관찰의 적절한 지표로서 사용될 수 있다. 특히 대장암에서 재발 혹은 전이를 조기에 발견하여 systemic therapy를 하는 것은 환자의 생존에 매우 중요한 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로<sup>8</sup> 이러한 생물학적 지표의 개발과 이용은 임상적으로 큰 의의를 가지는 일이다. 주목할 만한 점은 이전의 연구에서 밝혀진 80여 개의 유전자 중 35개의 유전자 산물은 세포 외로 분비되는 분비성 단백으로<sup>7</sup> 이들의 조직 및 혈중에서의 정량적/정성적 분석은 의의있는 과제라 할 수 있다.

Osteopontin은 분비성 인당단백질(phosphoglycoprotein)로서 secreted phosphoprotein I, 2ap, early T-lymphocyte activation 1 등으로 알려져 있으며, bone sialoprotein, dentin matrix protein 1, dentin sialoprotein, matrix extracellular phosphoglycoprotein 등이 포함되어 있는 small integrin binding ligand and N-linked glycoprotein family에 속한다.<sup>9</sup> Osteopontin은 각종 integrin receptor 및 CD 44와 결합하고 이를 통하여 cell-matrix interaction과 세포 신호 전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 정상적으로 T 림프구, 혈관 내피 세포, 대식세포, 뼈 세포와 피부 세포를 포함, 많은 암종에서 발현 및 분비되는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 특히, 최근 암 전이 조절과 관련된 osteopontin의 역할에 대한 연구가 진행되고 있는데, 현재까지 유방암,<sup>11</sup> 위암,<sup>12</sup> 폐암,<sup>13</sup> 전립선암,<sup>14</sup> 간암<sup>15</sup>과 대장암<sup>16</sup>에서 osteo-

pontin의 발현 증가가 암 침습(invasion), 진행(progression) 및 전이와 관련이 있다는 연구가 보고되었다. 특히, 12,000개 인간 유전자의 스크리닝 pooled sample expression profiling의 결과로 osteopontin이 대장암 진행의 주요 표지자로 밝혀진 것은 주목할 만하다.<sup>16</sup>

Osteopontin의 전이 관련 역할은 여러가지 실험적인 증거를 통하여 연구되었다. Yoneda 등<sup>17</sup>은 MDA-MB-231 세포주에서 osteopontin의 발현 증가가 세포의 전이성을 유도한다는 것을 밝혔다. 형질 획득 연구로서, 비전이성 RAMA37 세포주에 osteopontin의 expression vector를 이입시킨 후 이를 Furth-Wistar rat의 유선 지방세포에 접종시켰을 때, 실험군 55%에서 폐 전이를 보였다.<sup>18</sup> 또한 loss of function 연구로서 Wu 등<sup>19</sup>은 Osteopontin 결손 마우스가 ras 형질 전환 이후에도 느린 종양 성장을 보임을 관찰하였다.

Koh 등<sup>7</sup>의 연구에서 osteopontin 유전자는 원발암보다 전이암에서 과발현되는 것으로 관찰되어 osteopontin 유전자 산물이 원발암과 다르게 전이암에서 발현될 것으로 추정되므로 이를 대장암 진행 혹은 전이의 표지자로 검증하는 것은 의의있는 일로 사료된다. 본 연구에서 조직에서의 osteopontin 표현이 원발성 대장암종보다 전이성 대장암종에서 높게 나타난 것은 주목할 만하다. 그러나, 제한된 증례 수에서 osteopontin 발현의 변화와 환자의 생존율과의 관계를 규명하지 못하였고, 특히 종양 절제 후 재발로 발생한 전이 종양 발생과의 관계를 규명하는 데 한계를 나타내었다. 종양 절제 후 재발한 적절한 규모의 전이 종양 환자군을 대상으로 osteopontin을 원발 종양 절제 후 추적 관찰에 사용할 수 있을지를 규명하는 것은 의의가 있을 것이다.

한편 osteopontin이 분비성 단백이라는 점에서 조직에서의 발현이 혈중 osteopontin 수준으로 반영되는지 여부 역시 밝혀지지 않았으므로 대상 환자군의 혈청 osteopontin 수준을 enzyme-linked immunosorbent assay 등의 방법으로 측정하여 정량화하는 것은 osteopontin이 대장암에서 예후 추정을 위한 혈청 생물학적 표지자로 사용될 수 있을지를 판별하는 것에 있어 필수적인 단계일 것이다.

현재까지는 osteopontin의 발현이 정상 조직-선종-원발 선암-전이 종양의 순서로 증가하는 것으로 알려져 있는데,<sup>9</sup> 이러한 증가가 osteopontin의 tumor burden을 반영하여 나타난 현상인지 아니면 전이 관련 특정 물리화학적 변화를 반영하는 것인지 불투명하므로 osteopontin의 생화학 및 생물학적 메커니즘을 이해하는 것은 필수적이라 하겠다. 또 osteopontin은 대장암에서 널리 알려져 있는 Wnt pathway의 표적 유전자로 알려진 바 있으며,<sup>20</sup> 종양 억제유전자 adenomatous polyposis coli (APC) gene의 돌연변이가 osteopontin 유전자의 과발현과 관련있다는 보고가 있으므로<sup>21</sup> 현재까지 알려진 osteopontin의 발현 양상이 소위 APC pathway가 아닌 혈미부수체 불안정성 대장암 환자군에서도 유사하게 나타나는지 관찰하는 것 역시 흥미로운 연구가 될 것이다.

MMP는 세포 외 기질의 분해를 통하여 암세포의 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 이들이 종양 전이에 관여하는 기전으로는 신생혈관생성, 침습, 전이 장기에 전이점 (metastatic foci)을 생성하는 것 등이 알려져 있다.<sup>22</sup> MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14 등에서 종양 혹은 전이암에서의 발현은 종양의 나쁜 분화도, 침습도, 나쁜 예후 및 생존율 감소와 연관이 있다고 알려져 있는데,<sup>22</sup> 예외적으로 MMP-8의 발현이 전이 형질을 획득한 사람 유방암 세포에서 감소하는 것이 관찰되었으나, 일반적으로는 MMP의 발현 혹은 활성을 췌장암, 대장암, 유방암, 자궁경부암 및 흑색종 등에서 병의 진행과 상관관계를 보이는 것으로 밝혀져 있다.<sup>22</sup>

한편 MMP의 조직 내 발현과 함께 혈중 MMP의 농도 또한 병의 진행도를 알 수 있는 인자라는 연구 역시 이루어지고 있는데, 혈중의 soluble gelatinase 특히 MMP-9과 MMP-1이 흑색종에서 전이 빈도의 증가와 상관관계가 있다는 것이 밝혀져 이들이 중요한 예후 인자라는 보고가 발표되었다.<sup>23</sup> 또한 MMP-1의 발현은 대장암의 나쁜 예후와 관련 있다고 알려져 있는데, MMP-1 특이 억제제 사용 시 대장암 유발 누드마우스의 종양 유발이 억제되었다.<sup>24</sup>

Koh 등<sup>7</sup>의 연구에서 MMP-1은 원발 종양보다 전이 종양에서 낮은 발현 양상을 나타냈으며, 현재까지 알려진 MMP-1 발현과 전이 행태의 상관관계를 고려할 때, 이의 조직 혹은 혈청에서의 발현 양상을 대규모의 대장암 환자에서 연구하는 것은 의의가 있을 것이다.

본 연구에서 MMP-1의 발현은 원발 종양보다 전이 종양에서 감소된 것으로 나타났다. 현재까지 알려져 있는 연구 결과에 따르면, MMP-1의 과발현이 종양의 침습과 성장을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로, MMP-1의 과발현이 비교적 종양 성장 초기에 이루어졌다가 turn off될 가능성성이 존재한다.

Serpin은 분비형 당단백으로 간에서 생성되어 여러 장기, 특히 폐에서 단백질 분해 효소를 억제하는 기능을 하는 것으로 알려져 있는데, 생물학적으로 폐에서의  $\alpha 1$ -antitrypsin으로 알려져 있는 serpin A1의 기능은 말초 호흡기계의 백혈구에서 분비되는 elastase를 분해하여, 폐 손상을 막는 기능을 한다.

정상적으로 혈장 혹은 혈청 serpin A1의 농도는 1,200~2,000 mg/L이나 여러 가지 염증성 질환, 감염, 종양, 간질환 및 임신 등에서 증가하는 것이 관찰되었는데,<sup>25</sup> 이러한 serpin A1이 종양의 악성도, 혹은 종양 진단의 생물학적 표지자가 될 수 있다는 연구 역시 진행되고 있다. 최근, 악성 인슐린종의 표지자로서 serpin A1이 제시된 바 있으며<sup>26</sup> anaplastic large cell lymphoma kinase 양성 역형성대세포림프종의 림프절 외 침습과 serpin A1의 발현이 연관되어 있다는 보고도 있다.<sup>27</sup> 또한 프로테오ーム 연구를 통하여 serpin A1이 폐암<sup>28</sup>과 대장암<sup>8</sup>의 진단적 표지자로서 제시되기도 하였다. Koh 등<sup>7</sup>의 연구에서 serpin A1은 원발성 종양보다 전이성 종양에서 up-regulation되는 것으로 나타났으며, 각종 암에서 혈중 농도를 통하여 암발생 표지자로 연구되

는 점은 serpin A1의 악성 종양의 진행과 침습, 전이에서의 역할 규명이 필요함을 시사한다.

본 연구에서 serpin A1 ( $\alpha 1$ -antitrypsin)의 발현이 전이 종양에서 높게 나타나지 않았다는 점은 앞서 언급한 바와 같은 원인들의 분석 즉, 분비성 단백질인 점에서 조직 내 serpin A1의 수준이 실제 종양 조직에서의 생성 정도를 반영할 수 있는가의 검증이 필요할 것임을 시사한다. 실험적으로는, 우선 혈청으로 분비되는 serpin A1의 정도를 검색하는 것 역시 추후에 진행되어야 할 것이다.

종합적으로 본 연구에서는 원발 종양과 전이 종양에서 osteopontin과 MMP-1의 발현이 차이를 보였으며, 이와 연관된 병태 생리학적 의미를 연구하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
2. Sunami E, Tsuno N, Osada T, et al. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. Oncologist 2000; 5: 108-14.
3. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nat Genet 2003; 33: 49-54.
4. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002; 415: 530-6.
5. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchini D, Viens P, Birnbaum D. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. OMICS 2006; 10: 429-43.
6. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. Oncogene 2004; 23: 1377-91.
7. Koh KH, Rhee H, Kang HJ, et al. Differential gene expression profiles of metastases in paired primary and metastatic colorectal carcinomas. Oncology 2008; 75: 92-101.
8. Ward DG, Suggett N, Cheng Y, et al. Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. Br J Cancer 2006; 94: 1898-905.
9. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev 2008; 27: 103-18.
10. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. Mol Biol Cell 1994; 5: 565-74.
11. Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP, et al. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of

- human mammary epithelial cells. *Oncogene* 1999; 18: 4237-46.
- 12. Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, et al. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 127-32.
  - 13. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 1996; 15: 311-23.
  - 14. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2271-7.
  - 15. Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 119-27.
  - 16. Agrawal D, Chen T, Irby R, et al. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 513-21.
  - 17. Yoneda T, Williams PJ, Niewolna M. Promotion of angiogenesis and enhancement of breast cancer metastasis to bone. *Bone* 1998; 23: 201.
  - 18. Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS. The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model. *Oncogene* 1996; 13: 97-104.
  - 19. Wu Y, Denhardt DT, Rittling SR. Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br J Cancer* 2000; 83: 156-63.
  - 20. El-Tanani MK, Barraclough R, Wilkinson MC, Rudland PS. Regulatory region of metastasis-inducing DNA is the binding site for T cell factor-4. *Oncogene* 2001; 20: 1793-7.
  - 21. Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, et al. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 1717-23.
  - 22. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34.
  - 23. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5158-66.
  - 24. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996; 2: 461-2.
  - 25. Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet* 1989; 5: 411-7.
  - 26. de Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado MC, et al. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 as a potential marker for malignancy in insulinomas. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5322-30.
  - 27. Duplantier MM, Lamant L, Sabourdy F, de Reynies A, Delsol G, Espinosa E. Serpin A1 is overexpressed in ALK+ anaplastic large cell lymphoma and its expression correlates with extranodal dissemination. *Leukemia* 2006; 20: 1848-54.
  - 28. Patz EF Jr, Campa MJ, Gottilin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE 2nd. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5578-83.