

자궁경부암에서 pAKT 발현양상과 방사선요법 저항성과의 관계

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 산부인과¹, 병리과²김태중¹ · 이정원¹ · 송상용² · 최정주¹ · 최철훈¹ · 김병기¹ · 이제호¹ · 배덕수¹

목적 : 본 연구의 목적은 경부암에서 인산화 AKT (pAKT)의 발현양상과 방사선 저항성과의 관련성을 조사하는 것이다.

연구 방법 : 국소진행된 FIGO 병기 IIB-IVA 경부암으로 본원에서 일차 방사선요법 치료를 받은 25명 환자들의 임상 정보를 후향적으로 분석하였다. 그 중 국소재발을 한 9명을 '방사선요법 저항군'으로 분류하였으며, 이들의 정중 무병 생존기간은 10개월이었다. 나머지 16명은 '방사선요법 민감군'으로 국소재발을 보이지 않았다. 방사선요법 치료 전에 확보한 파라핀 블록을 사용하여, 면역조직화학염색법으로 pAKT 발현양상을 조사하였다.

결과 : pAKT 면역조직화학염색 정도가 '방사선요법 저항군'에서 통계적으로 유의하게 높게 발현되었다($p=0.007$). 정중 무병생존기간은 'pAKT 음성군'(17예)에서 84개월, 'pAKT 양성군'(8예)에서 44개월로 pAKT 발현 강도에 따라 의미 있는 차이가 있었다($p=0.015$).

결론 : 이와 같은 결과는 국소진행된 자궁경부암에서 PI3K/pAKT 신호전달기전이 방사선 저항성에 관여함을 시사한다.

중심단어 : 자궁경부암, 방사선요법, 국소재발, pAKT, 면역조직화학염색법

서 론

효과적인 선별검사에도 불구하고, 자궁경부암(이하 경부암)은 여전히 세계에서 두번째로 흔한 여성암이다.¹ 방사선요법은 모든 병기의 경부암 치료에 이용되며, 수술 후 보조적 방사선요법을 포함한다면, 가장 널리 쓰이는 치료법으로 경부암 환자의 60% 이상에서 이용되고 있다.² 최근 동시 항암화학방사선요법이 국소진행된 경부암의 표준요법으로 등장하여 치료율과 생존율 향상이 이루어졌지만, 암세포의 방사선 저항성은 중요한 해결 과제로 남아있다.³⁻⁶ 종양의 크기와 FIGO 병기가 방사선요법 반응성을 예측하는 주요 지표로 알려져 있지만, 이들만으로 다양한 치료결과를 설명하기에는 매우 부족하

다. 따라서, 환자 개개인의 방사선요법 반응성을 정확히 예측할 수 있는 새로운 지표의 개발이 필요한 실정이다.

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT 신호체계는 암세포의 주요 생존 신호로 알려져 있다. PI3K/AKT 신호체계는 epidermal growth factor receptor (EGFR)와 insulin-like growth factor (IGF)를 상위로 두고, RAS/MAP kinase 신호체계와 서로 연결되어 있다. 종양과 관련된 이 신호체계의 역할에 대하여 광범위한 연구가 있어왔는데, 주로 여러 요소들의 발현양상과 돌연변이 연구가 대부분이었다.⁷ 활성화된 인산화 AKT (pAKT)는 BAD, BAX, caspase 9와 같은 사멸유도 단백질을 불활성화 시키며, BCL2, BCLXL, FLIP, cIAP2, XIAP, survivins과 같은 항사멸 단백질의 발현은 오히려 촉진시켜 결국 암세포 사멸을 억제한다.⁸ 최근에는 PI3K/AKT 생존 신호 체계가 방사선 또는 자외선 조사 후에 활성화되며, 이 체계가 암세포가 방사선에 저항하여 사멸되지 않는 과정에 관여한다고 보고되었다.⁹ 인간 암조직 연구에서는, 최근에 pAKT가 두경부암의 방사선요법 국소치료 결과에 관련되었다고 보고되었다.¹⁰ 따라서, 경부암에서도 AKT의 활성화 상태가 방사선요법 치료 결과를 예측하는 인

논문접수일 : 2006년 1월 10일 채택일 : 2006년 1월 26일

교신저자 : 배덕수, 135-710 서울시 강남구 일원동 50

삼성서울병원 산부인과

전화 : 02) 3410-3511 · 전송 : 02) 3410-0630

E-mail : ds123.bae@samsung.com

본 연구는 삼성생명과학연구소(SBRI)의 연구비 지원으로 시행됨 (#SBRI C-A6-I01-3).

본 논문은 제20차 대한부인종양·골프스코피학회 학술대회에서 우수논문상을 수상한 논문임.

자로서 작용할 가능성이 있다고 여겨진다.

경부암에서 PI3K/AKT 및 관련 신호체계에 관한 기존 연구는 주로 EGFR에 관한 것이었다. 상피내종양 및 경부암에서 정상조직과 비교하여 EGFR이 높게 발현되었으며, EGFR의 과발현이 나쁜 예후와 관련된다고 보고되었다.^{11,12} 또한, 방사선요법에 EGFR 항체를 병합하여 국소치료를 향상시켰다는 전임상실험 결과도 보고되었다.^{13,14} 일반적으로 EGFR 신호체계는 AKT의 활성화를 통해 그 효과가 나타난다고 알려져 있는데, 경부암에서 이러한 AKT에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 국소진행된 경부암 환자들을 대상으로 면역조직화학염색법을 사용하여 pAKT 발현양상을 조사하고, 그 결과와 방사선요법 후의 골반 내 국소재발과의 관련성을 알아보려고 하였다.

연구 대상 및 방법

1994년에서 2001년까지 총 119명의 병기 IIB-IVA의 국소진행된 경부암 환자가 본원 방사선 종양학과에서 일차 방사선요법을 받았으며, 이들 중 19예(15.9%)가 골반 내 국소재발을 하였다. 방사선 치료 전의 경부암 조직이 확보되고 이용 가능한 25예를 연구 대상으로 삼고, 이들의 파라핀 블록으로부터 면역조직화학염색을 위한 슬라이드를 제작하였다. 모든 연구 대상자들의 방사선요법은 5,040 Gy 외부조사와 2,400 Gy의 강내조사로 이루어졌으며, 이들의 임상정보는 기관 윤리위원회의 지침에 따라 분석되었다. 연구 대상을 방사선 치료 후 골반 내 국소재발 여부에 따라 방사선요법 저항군과 민감군으로 구분하였는데, 각각 9예와 16예가 이에 해당되었다. 민감군에 속한 16예 중 15예는 적어도 3년 이상 국소재발을 보이지 않고 무병생존 상태였으며, 나머지 1예는 골반 내 국소재발없이 부대동맥 림프절 재발을 보이고 결국 경부암으로 사망하였다.

1. 면역조직화학염색

면역조직화학 염색은 포르말린으로 고정된 파라핀 조직 절편을 이용한 avidin-biotin complex peroxidase method (DakoCytomation, Denmark)를 이용하였다. 4μm 두께의 조직 절편을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드 유리에 올려놓고 37.8°C에서 밤사이 건조하였다. 이 절편들

을 xylene에서 탈 파라핀화시키고 graded 에탄올과 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 차례로 씻어내었다. 항체 결합의 정확성을 높이기 위해서 절편들을 마이크로파를 이용하여 20분간 citrate buffer (pH 6.0, S 2367; DakoCytomation, Denmark)로 전 처리하였다. 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 활성도는 3% 과산화수소에 15분간 처리하여 차단되었으며 단백 차단 용액에 10분간 전 배양하였다. 절편들은 IHC-specific phosphorylated Ser 473 Akt antibody (1 : 40 dilution, Cell Signaling TECHNOLOGY®, Inc., Beverly, MA)를 이용하여 Zhou 등이 기술한 대로 밤사이 4°C humid chamber에서 염색하였다.¹⁵ 슬라이드는 PBS에서 3회 세척 후 biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody와 함께 30분간 실온에서 배양하였다. 항원-항체 복합체는 avidin biotin-peroxidase method로 검출하였으며 제조 프로토콜에 따라 색소 기질 (Vectastain ABC-kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)은 diaminobenzidine을 사용하였다. 조직 절편들은 hematoxylin으로 역 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 한 명의 숙련된 병리학자와 또 한 명의 경험있는 부인종양 학자가 맹검법으로 슬라이드를 검토하고 염색결과를 평가하였다. 염색은 0에서 3+까지 점수로 산정하여 다음과 같이 기록하였다: 0, 염색되지 않은 경우; 1+, 50% 미만의 약한 염색 강도를 보인 경우; 2+, 50% 이상의 약한 또는 중등도 염색 강도를 보인 경우; 3+, 50% 이상의 강한 염색 강도를 보인 경우이다. 또한 생존율 분석을 위해, pAKT 염색정도를 음성군(0, 1+)과 양성군(2+, 3+)으로 분류하였다. 각질화된 종양세포와 keratin pearl은 위양성염색이 되므로, 분석에서 제외하였다.¹⁰

2. 통계적 분석

통계학적 계산은 SPSS 13.0을 사용하였다. 상관 관계 분석을 위해 연속 변수는 Mann-Whitney U test 를, 범주형 변수는 linear by linear association을 이용하였으며, 생존율 분석을 위해서 Kaplan-Meier curves in conjunction with the log-rank test를 계산하였다. p<0.05인 경우 통계적 의미가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

연구 대상의 특성은 Table 1에 기술하였다. 정중 추적

Table 1. Patient characteristics

Characteristics	Radiation-sensitive (n=16)	Radiation-resistant (n=9)	p-value
Median age, years (range)	65 (38-80)	59 (36-73)	0.452
Stage			0.727
IIB	10 (62.5%)	5 (55.6%)	
IIIB	6 (37.5%)	3 (33.3%)	
IVA		1 (11.1%)	
Mean tumor volume, cm ³ (range)	57.8 (1.5-171.2)	63.7 (15-156.2)	0.514
Cell type			1.00
Squamous cell	16 (100%)	9 (100%)	
Median PFS, months (range)	72.5 (10-104)	9.0 (5-62)	<0.001
Recurrence			
Local	0	9	
Distant	1	1*	
Current status			
NED	14	0	
AWD	0	3	
DOD	1	6	
DWOD	1	0	

PFS; progression free survival, NED; no evidence of disease, AWD; alive with disease, DOD; dead of disease, DWOD; dead without disease

*One patient had local and paraaortic lymph node recurrence at the same time

관찰 기간은 54개월로 분석 당시 8예가 이미 사망하였다. 그 중 1예는 치료 후 96개월이 지난 후 경부암과 관련없는 질환으로 사망하였다. 방사선요법 민감군 중 1예는 치료 후 10개월만에 부대동맥 림프절 전이가 발견되고, 그로부터 4개월 뒤 사망하였다. 환자들의 연령, 조직 형태, 종양의 크기, FIGO 병기는 두 군 간에 의미있는 차이가 없었다.

pAKT의 면역조직화학염색 결과는 Table 2에 요약하였다. 방사선요법 민감군에는 3+의 강한 염색을 보인 예가 없으며, 저항군에는 pAKT가 염색되지 않은 예가 없었다. pAKT 발현은 방사선요법 저항군에서 민감군과 비교하여 유의하게 증가되어 있다($p=0.007$). 대표적인 pAKT 염색사진을 Fig. 1에 제시하였다.

연구 대상 환자들의 무병생존기간을 pAKT 발현정도에 따라 비교 분석하였는데, pAKT 음성군의 평균 무병생

Table 2. Results of immunohistochemical analysis for pAKT in radiation-sensitive and radiation-resistant cervical cancer tissues. The expression of pAKT was significantly more frequent in radiation-resistant tissues than radiation-sensitive tissues ($p=0.007$)

	pAKT staining*				Total (n=25)
	Negative (n=17)		Positive (n=8)		
	0	1+	2+	3+	
Radiation-sensitive	6	7	3	0	16
Radiation-resistant	0	4	2	3	9

존기간은 84개월이며(95% 신뢰구간: 66-101개월; 17예), pAKT 양성군은 평균 44개월로(95% 신뢰구간: 12-76개월; 8예) 의미있는 차이를 보였다($p=0.015$)(Fig. 2).

고 찰

본 연구는 치료 전 경부암 조직에서의 pAKT 발현정도가 방사선요법 후 골반 내 국소재발과 연관됨을 면역조직화학염색법을 통해 확인하였다.

암세포 내 pAKT의 증가가 방사선 저항성을 유발하는 명확한 기전은 아직 규명되어 있지 않고, 다만 방사선에 의한 암세포 손상과 이에 관련된 pAKT의 작용기전이 광범위하게 알려져 있다. 방사선을 조사하면, 세포 내에 활성산소와 같은 free radical이 생성되고, 이들이 DNA와 반응하여 결국 DNA가 깨지고 세포의 복제 능력이 소실된다. 또한 free radical은 세포 내 전령물질로 작용하여 여러 cytokine과 성장 인자의 생산, 유전자 전사 및 세포사멸화에 관여한다.^{16,17} 활성화된 pAKT는 방사선에 의해 유도될 수 있으며, 방사선 손상으로부터 세포의 사멸을 저해하는 쪽으로 작용할 수 있는데, PI3K/AKT 신호체계가 방사선 반응에서 작동하는 기전은 광범위하여 미토콘드리아 단백질 조절, 전사 및 번역 과정 조절, 세포 주기 조절 모두가 포함될 수 있다.^{9,18}

사람에서는 세 종류의 AKT (AKT-1, -2, -3)가 발견되었는데, 경부암에서 각각의 역할에 대해서 알려진 바는 없다. 본 연구에서는 모든 AKT 활성도를 같이 측정할 수 있는 인산화 pan-AKT serine 473 항체를 사용하여 면역조직화학염색법으로 AKT-1, -2, -3 활성도를 같이 측정하였다.¹⁹

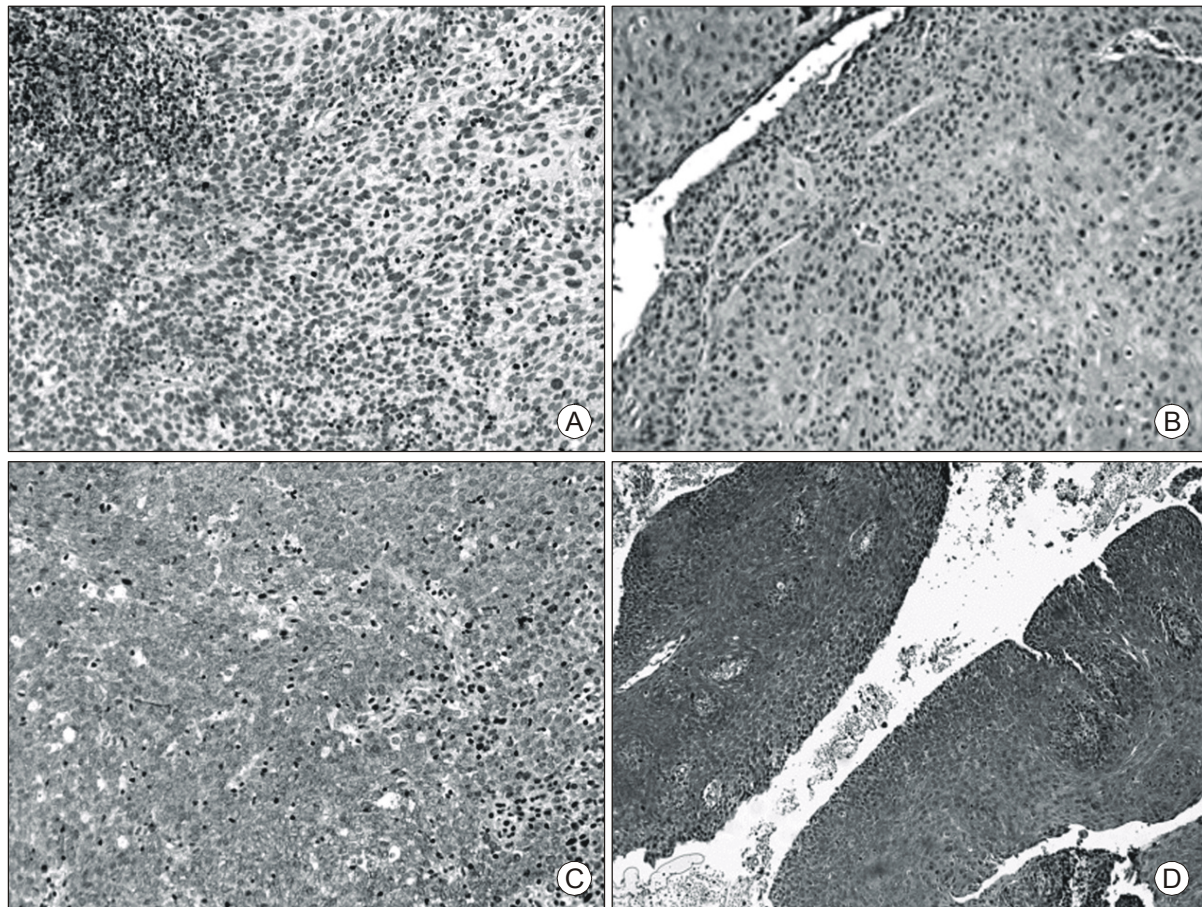


Fig. 1. Representative examples of pAKT staining in cervical cancer. (A) No staining, (B) less than 50% with weak intensity (1+), (C) more than 50% with weak or moderate intensity (2+), (D) More than 50% with strong intensity (3+) (A-C, $\times 200$; D, $\times 100$).

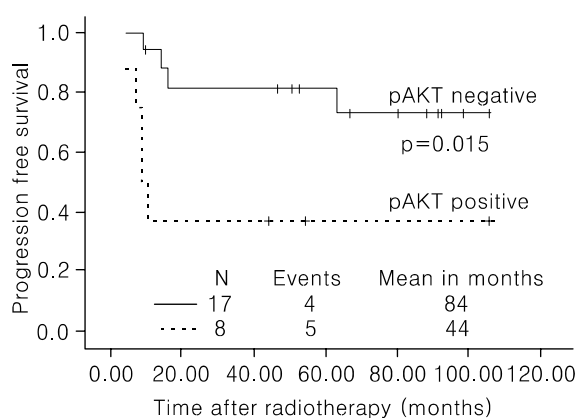


Fig. 2. Univariate progression free survival (PFS) analysis of pAKT expression in 25 cases of locally advanced cervical cancer. The "pAKT positive" expression in pre-treatment biopsies is a poor prognostic factor for PFS ($p=0.015$).

무병생존기간을 비교하기 위해, pAKT 염색정도에 따라 음성군과 양성군으로 연구 대상을 분류하게 되었는데, 정상 자궁경부상피에서 종종 pAKT가 약하게 염색되므로, 염색정도 0과 1+를 'pAKT 음성'군으로 묶어 분류한 것은 적절하다고 판단된다.

일반적으로 진단 당시 경부암 병기 IIB 환자들의 약 17%, 병기 III 환자들의 약 29%에서 이미 부대동맥 림프절 전이가 있다고 알려져 있는데, 이런 상태의 환자에게 표준 방사선 영역을 설정하고 치료하면 'geographic' 한 치료 실패를 겪게 된다.²⁰ 본원에서는 경부암 환자를 대상으로 의례적인 부대동맥 조직검사나 extended-field 방사선조사를 시행하지 않기 때문에 원격재발이 아니라 국소재발을 보인 환자들만을 방사선요법 저항군으로 분류하는 것이 적절하다고 생각한다.

본 후향적 연구는 다음과 같은 제한점을 지니고 있다.

방사선요법 후 골반 내 국소재발하는 경부암 환자가 드물었고, 치료 전의 상태가 좋은 암조직을 확보하고 있는 경우가 많지 않았으므로, 연구 대상수가 상당히 적었다. 특히 119명의 환자들에서 국소재발한 19예 중 9예(47%)와, 국소재발하지 않은 100예 중 16예(16%)가 연구에 포함되었으므로 모집단에서 연구대상으로 포함된 환자의 비율이 양 군 간에 많이 차이가 났다. 따라서, 선택 비뮴림(bias)이 강력하게 작용하여, 본 연구에서 도출된 결과를 일반화하기에 상당한 어려움이 있다. 또한, 본 연구에서는 활성화된 pAKT만 조사했지만, 이의 방사선요법 관련성을 뒷받침하기 위해서 신호전달체계에서 AKT의 하부에 위치하는 mTOR 또는 FOXO 같은 단백질들의 활성화 상태도 같이 조사하는 것이 필요하리라 생각된다.

AKT는 여러 악성 종양에서 활성화되고 이것이 방사선요법 또는 항암화학요법의 저항성에 기여한다고 알려져 있으며, PI3K/AKT 신호체계의 요소들을 목표로 신약 개발 연구가 이루어져 왔다. 하지만, 이 신호체계는 당대사와 같은 정상 생리과정에도 관여하므로,²¹ 이 신호체계가 변형되었을 때 일어날 수 있는 부작용에 대한 연구도 필요하리라 생각된다.

결론적으로 본 저자들은 국소진행된 경부암의 치료 전 pAKT 발현양상이 방사선요법의 국소치료 효과와 유의하게 관련되어 있음을 제시하였으며, 향후 많은 환자수를 대상으로 한 심층 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

- Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361: 2217-25.
- Chung YM, Kim BG, Park CS, Huh SJ, Kim J, Park JK, et al. Increased expression of ICAM-3 is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Int J Cancer* 2005; 117: 194-201.
- Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL 3rd, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 1154-61.
- Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340: 1137-43.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340: 1144-53.
- Lee JW, Jung KL, Nam SH, Lee SJ, Park CS, Son YS, et al. Efficacy and safety of concurrent chemoradiation as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage carcinoma of the uterine cervix. *Korean J Gynecol Oncol* 2004; 15: 179-85.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501.
- Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002; 21: 5673-83.
- Zhan M, Han ZC. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histol Histopathol* 2004; 19: 915-23.
- Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 885-92.
- Mathur SP, Mathur RS, Young RC. Cervical epidermal growth factor-receptor (EGF-R) and serum insulin-like growth factor II (IGF-II) levels are potential markers for cervical cancer. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 222-30.
- Kersemackers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, Van den Broek LJ, Uljee SM, Hermans J, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: Overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 577-86.
- Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 456-61.
- Nasu S, Ang KK, Fan Z, Milas L. C225 antiepidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51: 474-7.
- Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 8027-31.
- Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 1997; 11: 118-24.
- Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 1996; 10: 709-20.
- Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10983-5.
- Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, et al. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1168-71.
- Hacker NF. Clinical and operative staging of cervical cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1988; 2: 747-59.
- Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: There is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005; 24: 7435-42.

Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer

Tae-Joong Kim¹, Jeong-Won Lee¹, Sang Yong Song², Jung-Joo Choi¹,
Chel Hun Choi¹, Byoung-Gie Kim¹, Je-Ho Lee¹, Duk-Soo Bae¹
*Departments of Obstetrics and Gynecology¹, Pathology² Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Objective : The aim of this study was to investigate the association of phosphorylated AKT (pAKT) expression and radiation resistance in cervical cancer.

Methods : A retrospective review was made of the records of 25 women who received primary radiation therapy due to locally advanced cervical cancer (LACC) with FIGO stage IIB-IVA. Nine patients regarded as radiation resistant developed local recurrences with a median progression free interval of 10 months. Sixteen patients did not show local recurrences, and were regarded as a radiation sensitive group. Using pretreatment paraffin-embedded tissues, we evaluated pAKT expression by immunohistochemistry.

Results : A significant association was found between the level of pAKT expression and local recurrence. Immunohistochemical staining for pAKT was significantly more frequent in the radiation resistant than in the radiation sensitive group ($p=0.007$). The mean progression free survival (PFS) was 84 months for patients with pAKT negative staining (17 cases) and 44 months for patients with pAKT positive expression (8 cases)($p=0.015$).

Conclusion : These results suggest that signaling from PI3K/pAKT can lead to radiation resistance in LACC.

Key Words : Cervical neoplasms, Radiation resistance, Local recurrence, pAKT, Immunohistochemistry
