

방광암에서 E2F3 발현의 예후인자로서의 의미

Prognostic Significance of E2F3 Expression in Bladder Cancer

Hong Sang Moon, Ki-Seok Jang¹, Seung Sam Paik¹, Haeng Nam Lee, Sung Yul Park, Gi Young Kim, Sul Il Kim, Hong Yong Choi, Hae Young Park, Tchon Yong Lee, Young Nam Woo

From the Departments of Urology and ¹Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Purpose: E2F3 is important for cell cycle regulation and DNA replication. Recent studies have reported that members of the E2F family can play specific and diverse roles in the tumorigenesis of human malignancies, and the E2F3 expression appears to provide a growth advantage to tumor cells by activating cell proliferation in bladder tumors. We studied the prognostic significance of E2F3 expression in bladder cancer.

Materials and Methods: We examined the expression of E2F3 with using immunohistochemical staining in the tumor samples from 109 patients suffering with bladder cancer, and we analyzed the prognostic significance of E2F3 according to the grade, stage, recurrence and progression of bladder cancer.

Results: We found positive staining for E2F3 in 23 cases (21.1%). The E2F3 expression was correlated with the tumor stage (superficial vs. invasive, $p < 0.001$) and the tumor grade ($p = 0.001$). The E2F3 expression was not correlated with the recurrence and progression of superficial bladder cancer.

Conclusions: In this study, our results showed that the E2F3 expression was observed in a portion of the bladder cancer specimens. These results suggest that E2F3 may contribute to the development of bladder cancer, but it may not play a role as a prognostic factor of bladder cancer. (Korean J Urol 2006;47:75-79)

Key Words: E2F3 transcription factor, Bladder cancer

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 1 호 2006

한양대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹병리학교실

문홍상 · 장기석¹ · 백승삼¹ · 이행남
박성열 · 김기영 · 김선일 · 최홍용
박해영 · 이춘용 · 우영남

접수일자 : 2005년 9월 27일
채택일자 : 2005년 10월 25일

교신저자: 최홍용
한양대학교 의과대학 구리병원
비뇨기과
경기도 구리시 교문동 249-1
☎ 471-701
TEL: 031-560-2374
FAX: 031-560-2372
E-mail: hychoi1@yahoo.co.kr

본 논문은 한양대학교 비뇨기과 동문회(한비회)의 기금지원으로 연구되었음.

서론

방광암은 현재 국내에서 발생빈도가 가장 높은 비뇨기계 종양으로 방광암의 발생기전 및 진행은 여러 가지 원인 및 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있으며, 최근 염색체나 유전자이상에 대한 연구 및 방광암의 발생 및 재발, 진행을 예측할 수 있는 예후인자에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 유전자이상에 대한 연구결과로 방광암에서 1q21-24, 3p24, 6p22, 8q21-22, 10q22-23, 12q15-21, 17q11-21, 17q22 등의 유전자 증폭이 자주 발견되며, 이는 종양의 분화도 및 병기의 변화와 연관이 있다고 생각한다.¹⁻⁴ 이들 중 흔히 유전자의 증폭이 발생하는 부위는 6p22으로, 이 부위

는 SOX4, PRL, E2F3 유전자와 밀접한 연관을 갖고 있는 것으로 보고되었다.^{5,6}

E2F3는 세포주기의 조절 및 DNA 복제에 중요한 역할을 하는 E2F Family 중 하나인 전사인자이다.^{7,8} E2F Family의 일부 인자들은 종양생성의 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며 E2F3가 방광종양의 발생 및 진행에서 일부 역할을 담당하고 있으며, 암 유전자로서의 가능성이 있다는 연구들이 발표되었다.⁹⁻¹¹ 최근 보고된 연구결과로 방광암에서 분화도가 높거나 근 침윤이 있는 경우에서 E2F3의 과발현 빈도가 높다는 결과와, 전립선암에서 E2F3가 과발현이 되었던 경우에서 예후가 좋지 못하다는 결과들이 발표되었다.¹²⁻¹⁴

아직 E2F3와 비뇨기계 종양과의 연관성에 대한 연구보고가 많지 않고, 국내에서는 연구결과가 발표된 바가 없다. 본

연구에서는 E2F3가 방광암에서 나타나는 발현빈도 및 E2F3 발현 시 종양의 분화도, 근침윤도와와의 관계, 재발 및 진행과의 연관성을 분석하여 방광암에서 E2F3의 발현이 갖는 임상적 의의를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1991년 1월부터 1998년 10월까지 본원에서 방광암으로 진단받고 경요도절제술이나 방광적출술을 시행받았던 환자 109례에서 채취하여 파라핀에 포매되었던 종양조직을 이용하였다. 종양의 병기결정은 Union Internationale Centre le Cancer (UICC)에 의한 TNM 분류법을 사용하였으며 대상 조직 중 Ta가 31례, T1이 53례, T2가 16례, T3가 5례, T4가 4례로, 표재성 암이 84례, 침윤성 암이 25례였다. 종양의 조직학적 분화도는 WHO 분류법에 따라 분류하여 Grade I이 62례, Grade II가 30례, Grade III가 17례였다. 환자들의 성별은 남자가 86명, 여자가 23명이었으며 평균 연령은 61.1세 (29-84)였다. 환자들의 추적관찰기간은 평균 44개월 (11-56)이었다.

2. 염색방법

방광암 표본을 10%의 중성 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매하여 표본을 4 μ m 두께로 박절하여 poly-L-lysine (Sigma Co, St. Louis, USA)으로 처리한 유리 슬라이드에 부착시켜 50°C 부란기에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. Xylene을 이용하여 탈파라핀 과정을 거친 후, graded alcohol을 이용하여 흡수과정을 거치고 흐르는 물로 세척하였다. 3%과

산화수소로 5분간 처리하여 내재성 과산화효소를 제거한 후 증류수로 5분간 세척하였다. Tris 완충액 (pH 7.6)에 5분간 중화시킨 후, 구연산 완충액 (citrate buffer, pH 7.6)에 넣어 전자오븐에서 5분간 3회 전처리한 후 실온에서 20분간 냉각시키고 증류수로 세척하였다. Tris 완충액으로 5분간 2회 세척한 후 차단혈청으로 10분간 작용시키고 1:50으로 희석한 E2F3 Ab-4의 일차항체 (Lab Vision Corporation, USA)를 사용하여 1시간 동안 습윤 상자 안에서 반응시킨 후 Tris 완충액으로 5분간 3회 세척하였다. 이차항체로 biotinylated rabbit anti-mouse IgG link antibody (DAKO, Carpinteria, USA)를 가한 후 실온에서 20분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 5분간 3회 중화시킨 후 streptavidin-biotin complex (DAKO, Carpinteria, USA)에 약 20분간 작용시키고 다시 Tris 완충액으로 5분간 3회 세척하였다. 발색제로 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)을 이용하였고 Mayer's hematoxylin에 10초간 대조 염색하여 탈수한 후 Canada balsam으로 봉입하여 검경하였다.

3. 결과분석 및 통계

조직의 판독은 1명의 병리의사가 시행하였으며 면역염색의 판정은 종양세포가 전혀 염색이 안 되거나 5% 미만으로 염색될 때 (-), 종양세포가 5% 이상으로 염색될 때 (+)로 판정하였다. 종양의 병기와 분화도에 따른 E2F3의 발현양상 및 E2F3의 발현과 표재성 방광암에서 재발과 침윤암으로의 진행과의 연관성을 비교 분석하였으며 이의 통계학적 검정은 chi-square test를 이용하였고 p값은 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

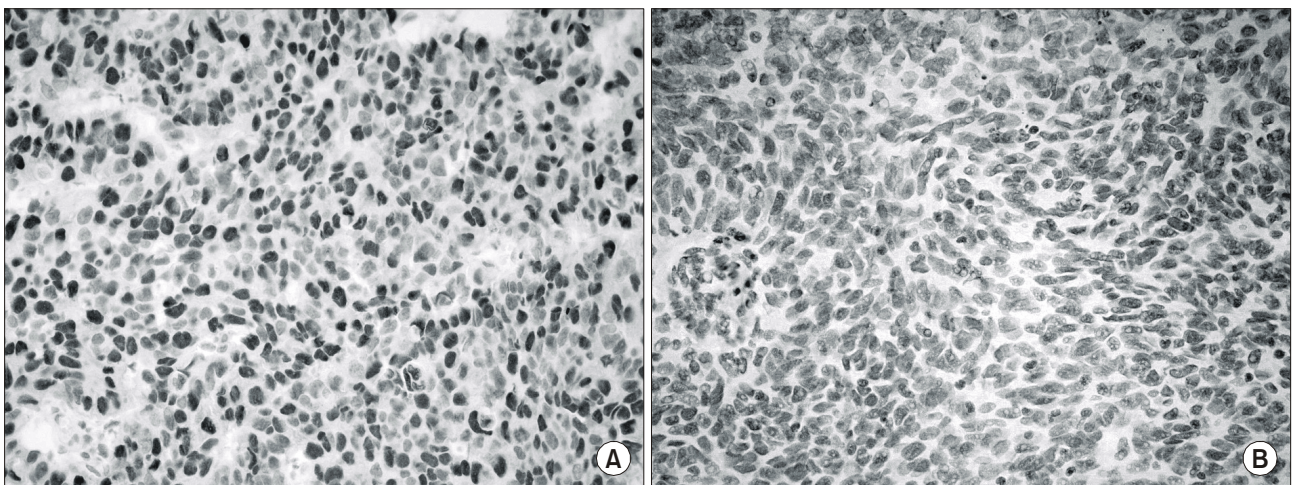


Fig. 1. Immunohistochemical staining for E2F3 in bladder cancer. (A) Diffuse staining for E2F3 in the nucleus of the tumor cells (hematoxylin counterstain, x400). (B) Negative staining for E2F3 in the nucleus of the tumor cells (hematoxylin counterstain, x400).

Table 1. Relationship of the E2F3 expression with superficial and invasive bladder cancer

Stage	E2F3 (+)	E2F3 (-)
Ta	2	29
T1	8	45
Subtotal (superficial)	10	74
T2	10	6
T3	2	3
T4	1	3
Subtotal (invasive)	13	12

$p < 0.001$

Table 2. Relationship of the E2F3 expression with the grade of superficial and invasive bladder cancer

Grade	E2F3 (+)	E2F3 (-)
Grade I	6	56
Grade II	9	21
Grade III	8	9
Total	23	86

$p = 0.001$

결 과

총 방광암 109례 중 23례 (21.1%)에서 E2F3가 발현된 것으로 나타났다 (Fig. 1). E2F3는 표재성 암조직 84례 중 10례에서 양성으로 나타나 11.9%의 양성률을 보였으며, 침윤성 암조직 25례 중 13례에서 양성으로 나타나 52.5%의 양성률을 나타내어 표재성 암보다 침윤성 암에서 유의하게 양성률이 높게 나타났다 ($p < 0.001$, Table 1).

암의 분화도에 따른 E2F3의 양성률은 Grade I에서 62례 중 6례 (9.7%), Grade II에서 30례 중 9례 (30%), Grade III에서 17례 중 8례 (47.1%)로 나타나 분화도가 증가할수록 E2F3의 양성률은 증가하였다 ($p = 0.001$, Table 2).

표재성 방광암에서 재발한 경우를 분석한 결과 재발 시 E2F3양성인 경우는 10례 중 5례에서 재발하였으며, E2F3음성인 환자 74례에서는 38례에서 재발하여 표재성 방광암에서 E2F3의 발현과 재발과의 연관은 통계적 유의성은 없었다 ($p = 0.936$, Table 3). 표재성 방광암에서 재발하였을 때 침윤암으로 진행된 예를 분석한 결과 E2F3양성인 경우는 재발환자 5례 중 2례에서 침윤암으로 진행하였으며, E2F3음

Table 3. Relationship of the E2F3 expression with recurrence of superficial bladder cancer

	E2F3 (+)	E2F3 (-)
Recurrence (+)	5	38
Recurrence (-)	5	36
Total	10	74

$p = 0.936$

Table 4. Relationship of the E2F3 expression with the progression of recurrent superficial bladder cancer

	E2F3 (+)	E2F3 (-)
Progression (+)	2	13
Progression (-)	3	25
Total	5	38

$p = 1.000$

성인 경우는 재발환자 38례 중 13례에서 침윤암으로 진행하였다. 표재성 방광암에서 침윤암으로 진행된 경우 E2F3의 발현과 침윤성과의 연관은 통계적 유의성이 없었다 ($p = 1.000$, Table 4).

고 찰

방광암 중 표재성 방광암은 70% 정도의 비율로 발생하며 50-70%에서 재발하며, 10-15%에서 침윤성 암으로 진행되므로 표재성 방광암 발생 시 재발 및 침윤성 암으로의 진행을 예상하기 위한 다양한 연구들이 시도되고 있다. 방광암의 진행에 있어서 유전자의 증폭은 매우 중요한 역할을 하며, 그중 흔하게 유전자의 증폭이 관찰되는 부위가 6p22 유전자이다. 6p22 유전자에서 암 유전자로서의 가능성이 높은 유전자로 생각되는 인자인 E2F3는 retinoblastoma suppressor gene (pRb)에 의해 조절되는 E2F family 유전자에 속하며, 세포증식에 필수적인 유전자의 세포주기조절을 담당하는 전사인자이다.^{8,15} E2F family 유전자는 G1-S 단계의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 생각하며,^{7,16} 여러 인체종양에서 종양발생에 대한 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, E2F family 유전자에 대한 연구결과로 Saito 등⁹은 E2F1의 복제숫자의 증가 및 과발현이 erythroleukemia 세포주에서 발견되며, Rabbani 등¹⁰은 E2F1의 발현이 감소될 경우 방광암전이로 진행될 위험성이 증가한다고 발표하였

다. pRb는 세포주기의 G1 단계에서 E2F에 결합되어 있으며, 이 결합상태 동안 E2F의 전사활동성은 억제되며 G1-S 변이기간에 pRb는 cyclin-dependent kinase에 의해 인산화되면서 분리된 E2F는 전사를 활성화한다. 정상상태에서 pRb는 세포주기 중 G1-S에서 전사인자인 E2F 및 다른 세포단백들과 결합하여 전사를 방해함으로써 세포주기의 진행을 억제한다. pRb의 제거로 인하여 E2F 유전자를 방출하게 됨으로써 세포의 증식효과를 얻게 되어 종양이 발생할 수 있다고 생각한다.

E2F family 유전자 중 E2F3에 대해 발표된 결과에 따르면, Humbert 등¹¹은 E2F3에 의해 조절되는 유전자가 G1-S 변이 시기 및 DNA 합성률, 세포증식률을 결정한다고 보고하였으며, E2F3는 정상세포 및 종양세포 모두에서 증식을 조절하는 유전자의 전이 활성화에 매우 중요하다고 발표하였다. Leone 등¹⁷은 E2F3의 활성도가 감소할 경우 증식세포에서 S 단계로의 유도가 되지 않음을 관찰하여, E2F3의 활성도는 증식세포의 세포주기에서 중요한 역할을 한다고 발표하였다. Saavedra 등⁷은 E2F3는 세포주기에서 DNA 및 중심체 복제를 조정하는 중요한 역할을 담당한다고 보고하였다.

최근 E2F3의 과발현 및 증폭이 비뇨기암 중 방광암과 전립선암의 발생 및 진행을 촉진하는 기전이 될 수 있다고 보고되었다. Feber 등¹²은 방광암 세포주에서 면역조직화학염색을 시행하여 101례 중 33례 (32.7%)에서 세포핵 부위에서 E2F3가 과발현되었으며, 분화도가 증가됨에 따라 E2F3의 발현되는 빈도가 증가하였고, 표재성 방광암에 비하여 침윤성 방광암에서 E2F3의 발현되는 빈도가 증가하였으며 이는 통계학적으로 유의하여, E2F3 유전자가 방광암의 암 유전자 가능성이 있다고 주장하였다. Oegerli 등¹³은 방광암조직을 면역조직화학염색을 시행하여 1,334례 중 231례 (17.3%)에서 E2F3에 양성으로 염색이 되었으며, 분화도가 증가됨에 따라 E2F3의 발현되는 빈도가 증가하였고, 표재성 방광암에 비하여 침윤성 방광암에서 E2F3의 발현되는 빈도가 증가하였으며 이는 통계학적으로 유의하였다고 보고하여 E2F3의 발현은 방광암의 일부에서 세포증식을 활성화함으로써 종양세포의 성장을 돕는 것으로 생각한다고 발표하였다. 전립선암에서 E2F3의 발현에 대한 연구결과, Foster 등¹⁴은 전립선암 조직의 면역조직화학염색을 시행하여 147례 중 98례 (67%)에서 세포핵의 E2F3의 발현이 관찰되었고, E2F3의 발현이 있었던 환자에서 생존율이 낮게 나타나, E2F3가 발현되는 환자의 경우 E2F3가 전립선암의 발생 및 진행을 조절하는 중요한 인자가 될 수 있을 것으로 보고하였다.

저자들은 방광암 조직의 E2F3의 발현에 대해 면역화학염색방법을 이용하여 조사하였으며, 21.1%에서 양성으로 발

현되었다. E2F3는 표재성 암보다 침윤성 암에서 유의하게 양성률이 높게 나타났고, 분화도가 증가할수록 E2F3의 양성률은 증가하여 병기와 분화도가 높을수록 양성률이 높게 나타났으며 통계학적으로 유의한 결과를 보였다. 본 연구에서 방광암에서 E2F3의 양성률 및 분화도와 병기에 따른 양성률은 다른 연구결과와 유사한 결과를 보여 E2F3의 암 유전자로서의 가능성을 나타냈으나, E2F3의 발현은 방광암 환자의 재발 및 재발환자에서 침윤성 암으로의 진행과 연관이 없는 것으로 나타나 환자의 예후와는 연관성이 없는 결과를 보였다. 따라서, E2F3가 암 유전자로서의 가치가 있는가에 대한 문제는 추후 더 많은 환자를 대상으로 하여 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

본 연구결과에서 E2F3는 침윤성 방광암에서 표재성 방광암에 비하여 유의하게 발현빈도가 높았고, 분화도의 증가에 따라 발현빈도가 높게 나타났다. 그러나 E2F3의 발현은 표재성 방광암의 재발이나 진행여부와 상관이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 E2F3가 방광암의 발생에 일정 역할을 담당한다는 것을 유추할 수 있으나 방광암의 재발 및 진행을 예측함으로써 환자의 예후를 예견할 수 있는 인자의 역할은 할 수 없을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Simon R, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe H, Bocker W. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol* 2000;17:1025-9
2. Koo SH, Kwon KC, Ihm CH, Jeon YM, Park JW, Sul CK. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;110:87-93
3. Hovey RM, Chu L, Balazs M, DeVries S, Moore D, Sauter G, et al. Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases. *Cancer Res* 1998;58:3555-60
4. Kim WJ, Yoon SJ. Current trend in molecular aspects of bladder cancer. *Korean J Urol* 2005;46:211-20
5. Wu Q, Hoffmann MJ, Hartmann FH, Schulz WA. Amplification and overexpression of the ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. *Mol Cancer* 2005;4:16
6. Bruch J, Schulz WA, Haussler J, Melzner I, Bruderlein S, Moller P, et al. Delineation of the 6p22 amplification unit in urinary bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2000;60:4526-30
7. Saavedra HI, Maiti B, Timmers C, Altura R, Tokuyama Y, Fukasawa K, et al. Inactivation of E2F3 results in centrosome amplification. *Cancer Cell* 2003;3:333-46

8. Wu L, Timmers C, Malti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 2001;414:457-62
9. Saito M, Helin K, Valentine MB, Griffith BB, Wilman CL, Harlow E, et al. Amplification of the E2F1 transcription factor gene in the HEL erythroleukemia cell line. *Genomics* 1995;25:130-8
10. Rabbani F, Richon VM, Orlov I, Lu ML, Drobnjak M, Dudas M, et al. Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:874-81
11. Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA. E2F3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev* 2000;14:690-703
12. Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, et al. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004;23:1627-30
13. Oeggerli M, Tomovska S, Schrami P, Calvano-Forte D, Schaefroth S, Simon R, et al. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2004;23:5616-23
14. Foster CS, Falconer A, Dodson AR, Norman AR, Dennis N, Fletcher A. Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene* 2004;23:5871-9
15. Araki K, Nakajima Y, Eto K, Ikeda M. Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene* 2003;22:7632-41
16. Zhu W, Giangrande PH, Nevins JR. E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J* 2004;23:4615-26
17. Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, et al. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev* 1998;12:2120-30