

방광암에서 Gli2 및 Gli3 발현의 임상적 의의

Clinical Significance of the Expression of Gli2 and Gli3 in Bladder Cancer

Kwang-Hee Han, Yunbyung Chae, Pildu Jeong, Yong-June Kim, Seok-Joong Yun, Sang-Cheol Lee, Wun-Jae Kim

From the Department of Urology, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju, Korea

Purpose: The HedgehogGli (HHGli) signaling pathway controls many aspects of tissue patterning, cell proliferation, differentiation and regeneration, and regulates the number of cells in various organs. Inappropriate and uncontrolled activation of the HHGli signaling pathway has been demonstrated in a variety of human cancers. The Gli1, Gli2, and Gli3 genes encoding the Gli family transcription factors play a role as HH effectors. This study examined the significance in Gli2 and Gli3 expression in human bladder cancer.

Materials and Methods: The tumor tissues were obtained from 144 patients with a primary bladder cancer. The mRNA levels of Gli2, and Gli3 were examined using a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay in 144 tumor specimens, and immunohistochemical staining was performed on 127 tumor paraffin blocks. The relationships between their expression and the pathological or clinical characteristics, such as tumor stage, grade, recurrence and progression were also analyzed.

Results: Gli2 mRNA expression was higher in the invasive bladder tumors than in the superficial bladder tumors ($p < 0.001$) but, there was no difference in Gli3 mRNA expression according to the tumor stage and grade. The multivariate Cox regression model revealed that Gli2 mRNA expression (hazards ratio (HR): 2.329, 95% confidence interval (CI): 1.043-5.202, $p = 0.039$) was the only strong predictor of superficial bladder tumor recurrence. Kaplan-Meier analysis also showed identical results (log-rank test, $p = 0.043$).

Conclusions: The enhanced expression of Gli2 mRNA was strongly correlated with the recurrence of superficial bladder cancer. These results suggest that Gli2 may be a useful marker for assessing the recurrence of superficial bladder cancer in human bladder cancers. (Korean J Urol 2008; 49:696-702)

Key Words: Bladder tumor, Gli, Marker

대한비뇨기과학회지
제 49 권 제 8 호 2008

충북대학교 의과대학 비뇨기과학교실

한광희 · 채윤병 · 정필두 · 김용준
윤석중 · 이상철 · 김원재

접수일자 : 2008년 4월 4일
채택일자 : 2008년 6월 17일

교신저자: 김원재
충북대학교병원 비뇨기과
충북 청주시 흥덕구 개신동
62번지
☎ 361-711
TEL: 043-269-6371
FAX: 043-269-6143
E-mail: wjkim@cbnu.ac.kr

이 논문은 2007년도 충북대학교 학술연구
지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었
음.

서 론

방광암은 우리나라에서 비뇨기계 암 중 가장 발생률이 높은 질환으로, 연령이 증가할수록 발생률이 증가하고, 남성이 여성에 비해 3-4배 정도 많이 호발한다.¹ 표재성 방광암은 요도경유절제술만으로 치료가 가능하지만 재발률이 60-70%에 달하며 이 중 재발한 암의 20-30%가 병기와 분화

도가 진행된다.^{2,3} 이러한 방광암의 특성 때문에 요도경유절제술만으로 표재성 방광암을 치료하는 것에는 한계가 있으며, 술 후 잦은 재발과 병기의 진행은 환자 및 비뇨기과 의사들에게 큰 문제이다. 방광암의 재발 및 진행의 위험성이 높은 고위험군 환자군을 적절히 선별하여 효과적인 추가 치료를 시행하는 것은 방광암의 재발 및 진행을 예방하는데 많은 도움을 줄 수 있다. 그러나 현재까지 전통적으로 방광암의 예후를 측정하는데 이용되는 임상 및 병리학적

지표는 고위험 환자군을 선별하는데 제한적이어서, 보다 효과적으로 예측할 수 있는 지표의 발견이나 치료법의 개발이 필요하다.

종양이 세포의 일부에서 줄기세포와 같은 방식으로 증식한다거나 정상 줄기세포에서 기원한다는 점 등 때문에 종양의 발생과정을 줄기세포의 관점에서 이해하려는 많은 노력이 있어왔다. 조직손상과 재생과정이 빈번히 반복적으로 발생하게 되어 지속적으로 줄기세포가 활성화되면 활성화된 줄기세포의 숫자가 점차적으로 증가하게 되고 이 과정에서 줄기세포가 다양한 원인에 의하여 종양 줄기세포로 변환이 일어나게 되면 종양이 발생하게 된다. 이러한 종양 줄기세포 발생 과정 역시 Hedgehog (HH) 신호전달체계가 관여하게 된다.^{4,5} HH 단백질 중 SHH가 가장 중요한 기능을 하며 정상세포의 세포성장과 척추동물과 비척추동물에서 초기 배아의 형성뿐 아니라 인체 암과도 관련되어 있다.⁶ SHH 신호전달체계를 활성화하는 기전은 여러 가지가 있으며 proto-oncogene인 SHH, smoothened (Smo)의 기능적인 변이, 전사인자인 Gli1, Gli2 및 Gli3의 과형성 혹은 암 억제 유전자인 patched (Ptc)의 억제 감소 등이 있다. 최근 위암, 췌장암, 폐암, 횡문근육종 및 전립선암 등 다양한 암이 SHH 신호전달체계의 이상으로 인해 유도되는 것으로 알려져 있다.^{7,8} Gli 단백질은 다기능 전사인자로, SHH 신호전달체계의 정도에 따라 Gli 단백질의 활성화는 직접적인 영향을 받는다. SHH의 활성화가 없는 상태에서 Gli는 단백질분해효소에 의해 분해되어 전사억제 인자로서의 역할을 하게 되나, SHH의 자극에 의해서 Gli는 전사유도의 기능을 갖게 된다.^{9,10} 척추동물에서 Gli family는 Gli1, Gli2 및 Gli3의 3가지 형태가 있으며, 이들은 각기 다른 기능을 가지고 있으나, 돌연변이에 의해서 이러한 조절 기능이 소실되면 Gli 단백질의 과다발현에 의해서 표적유전자의 전사가 일어나 다양한 암이 발생하게 된다.

본 연구에서는 초발성 방광 이행상피세포암 조직에서 SHH 신호전달체계에 중요한 전사인자로 역할을 하는 Gli2 및 Gli3 단백질 발현의 정도에 따른 방광암의 임상 및 병리학 적 특성과의 관련성에 대한 조사를 real-time polymerase chain reaction (PCR) 및 면역조직화학염색법을 사용하여 방광암의 예후 인자로서의 역할에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

병리학적으로 방광 이행상피세포암으로 확진된 초회 방광암 환자 144례를 대상으로 하였다. 모든 예의 방광암 조직에서 추출한 RNA를 이용하여 Gli2 및 Gli3에 대한 real-

time PCR assay를 시행하였으며 이 중 방광암 조직이 이용 가능한 127례에서는 면역조직화학 검사를 시행하였다. 조직 검사시행 전 모든 환자에게 사전 동의를 구하였으며, 본 연구는 임상시험위원회의 승인을 취득한 후 시행하였다 (임상시험결과 통지서 2006-1).

방광 이행상피세포암의 병기는 1997년 American Joint Committee on Cancer-Union Internationale Control le Cancer (AJCC-UICC)의 TNM 분류에 따랐으며, 분화도는 World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP)의 분류에 근거하였다. 병리학적 병기가 Ta 및 T1인 경우에 표재성 방광암이라 정하였고, T2-4인 경우에는 침윤성 방광암으로 정하였다. 조직학적 분화도가 1등급 혹은 2등급인 경우에는 저등급 종양으로, 분화도가 3등급인 경우에는 고등급 종양이라 정하였다. 표재성 방광암의 재발은 표재성 방광암 환자의 추적 기간 중 병기의 진행 없이 반복하여 종양이 재발한 경우로, 진행은 적절한 치료 후에도 표재성 방광암이 침윤성 암으로 또는 전이성 방광암으로 되거나 침윤성 방광암이 전이성 방광암으로 되는 경우로 정의하였다.

2. 조직에서 RNA 추출 및 cDNA 합성

TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 이용하여 RNA를 조직에서 분리하였다. 추출된 전체 RNA는 분광광도계 (Perkin Elmer, MBA2000, Fremont, USA)를 이용하여 농도를 측정한 후 1.1% RNA gel에서 전기영동을 하여 RNA band를 확인하였다. cDNA를 합성하기 위하여 조직에서 추출한 RNA 0.5 µg/µl를 DEPC 증류수로 희석한 후 사용하였다. First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 cDNA를 합성하였다.

3. Real-time PCR

방광암 조직에서 Gli2와 Gli3의 mRNA 발현 양을 측정하기 위하여 real-time PCR을 시행하였다. Real-time PCR은 Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) PCR 기계를 사용하여 수행하였다. Gli2 (120bp)를 증폭시키기 위해서 5'-TGA CTG TAA GCA AGG AGG GC-3'과 5'-GGA TGT GCT CGT TGT TGA TG-3'을 primer로 사용하였고, Gli3 (210bp)를 증폭시키기 위해서 5'-GGA GAG AAG AAG GAG TTC GT-3'과 5'-GAC GTA TGG TTT CTC TCC AG-3'을 primer로 사용하였다. PCR 반응액은 cDNA 1 µl, 2xSYBR Premix EX Taq buffer 7.5 µl, 양 방향의 primer 각각 0.5 µl를 첨가하여 최종 15 µl를 만든 후 PCR을 시행하였다. Gli2 및 Gli3 mRNA의 발현을 정량화하기 위하여 우선 임의의 샘플

에서 증폭된 PCR 산물을 이용하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 램프 하에서 band를 확인하였다. 확인된 band를 gel에서 잘라낸 후 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 한양대학교 (주)바이오닉스에 의뢰하여 automated laser fluorescence sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Shelton, CT, USA)를 이용하여 염기서열을 조사한 후 본 실험의 결과와 일치함을 확인하였다. 또한 정제된 PCR 산물을 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정한 후 10배씩 연속적으로 희석하여 real-time PCR 정량에 필요한 표준 곡선을 작성하는데 사용하였다. PCR 조건은 각각 96°C에서 20초간 denaturation 후 40주기 동안 96°C에서 denaturation 2초, 60°C에서 annealing 15초 및 72°C에서 extension 15초를 시행하였다. Melting program은 72°C와 95°C 사이에서 45초마다 1°C씩 증가시키면서 실행하였다. Spectral 결과는 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0 Build 14 (Corbett Research, Mortlake, Australia)에 의하여 측정 및 분석하였다. 측정된 Gli mRNA 값을 보정하기 위해 GAPDH를 사용하여 동일한 방법으로 동시에 측정 및 분석하였다.

4. 면역조직화학염색 및 평가

일차 항체로는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, Santa Cruz, USA) 제품을 사용하였으며 면역조직화학염색은 DakoCytomation Immunostaining Kit (Produktionsvej, Glostrup, Denmark)를 사용하여 제작사에서 제공한 방법에 따라 염색을 시행하였다. 이후 Liquid 3, 3'-diaminobenzidine (DiNonA, 서울, 한국)으로 5분간 면역염색하였으며, Meyer's hematoxylin으로 염색, 탈수 후 Canada balsam으로 슬라이드에 고정하였다. 핵염색은 0.1% TWEEN 20이 포함된 증류수였다. 염색의 강도와 염색된 상피세포의 비율을 모두 평가하기 위해서 Sinicrope 등¹¹의 방법을 이용하였다. 면역염색은 세포의 핵에 염색된 정도에 따라 3가지 강도로 분류하였는데 약한 염색은 1, 중간 정도는 2, 강한 염색은 3으로 분류하였다. 염색된 세포의 비율은 전체 상피세포의 수 중에 염색된 세포의 비율에 따라 5가지로 분류하였는데 5% 미만은 0, 5%에서 25%는 1, 26%에서 50%는 2, 51%에서 75%는 3, 75%를 초과한 경우는 4로 분류하였다. 각각의 표본에서 염색의 강도와 염색된 세포의 비율의 점수를 합쳐서 면역반응점수를 구하였다.

5. 통계학적 분석

mRNA 값의 비대칭 발현 값을 보정하기 위해 로그변환 후 통계 분석에 이용하였으며, 이들에 대한 결과는 평균 (95%

신뢰구간)의 값을 역로그 변환하여 기술하였다.¹² mRNA 값 및 면역조직화학염색의 임상적 변수와의 연관성은 각각 Student's t-test 및 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 수진자 판단곡선을 이용하여 방광 이행상피세포암의 재발, 진행 및 사망을 예측할 수 있는 민감도 및 특이도가 가장 높은 값을 mRNA의 절단치로하여 높은 군과 낮은 군으로 분류하였다. Gli2와 방광 이행상피세포암의 재발, 진행 및 생존의 연관성은 Kaplan-Meier 생존분석 방법의 log-rank test를 이용하여 검증하였다. 방광암의 예후에 미치는 인자에 대한 정의는 EORTC 연구에 따라 분류하였으며,¹³ 이들 인자 및 Gli2와 Gli3의 mRNA 발현 정도 (낮은 군, 높은 군)를 Cox 비례위험 회귀모형을 이용하여 방광암의 재발, 진행 및 생존의 영향에 대한 단변량 및 다변량 분석을 시행하였다. 통계학적 분석은 SPSS 프로그램 (version 12.0)을 이용하였고, p값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 특성

환자의 술 전 평균 연령은 65.3±11.2세였다. 성별은 남자 82.6% (119/144명), 여자 17.4% (25/144명)였고, 병기별로 표재성 방광암 92례 (63.9%), 침윤성 방광암이 52례 (36.1%)였다. 조직학적 분화도는 저등급 91례 (63.2%), 고등급 53례 (36.8%)였다. 평균 추적관찰 기간은 42.3개월 (1-128, 중앙값 28.8)이었다. 그 외 대상군의 임상 및 병리학적 특성은 Table 1에 기술하였다.

2. Real-time PCR에서 Gli2와 Gli3 mRNA의 발현

방광암 조직에서 Gli2 mRNA의 발현은 표재성 방광암보다 침윤성 방광암에서 유의하게 높은 발현을 보였으며, 고등급 종양에서 저등급 종양보다 높은 발현을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 또한 Gli3 mRNA의 발현 정도도 방광암의 병기 및 분화도와와의 관련성은 없었다 (Table 2).

3. Gli 2와 Gli 3 mRNA의 발현에 따른 방광암의 재발, 진행, 생존과의 관계

방광암의 재발, 진행, 생존, 암특이 생존에 영향을 미치는 임상적 인자들 (연령, 성별, 병기, 등급, 종양 개수, 크기, Gli2와 Gli3 mRNA 발현 정도)을 Cox 비례위험 회귀모형을 이용하여 단변량 및 다변량 분석을 시행한 결과, Gli2 mRNA 발현 정도는 표재성 방광암의 재발을 예측할 수 있는 유일한 예후인자였다 (HR: 2.329, 95% 신뢰구간: 1.043-5.202) (Table 3). 그러나 Gli2와 Gli3 mRNA 발현 정도는 방

Table 1. Clinical and pathological features of the primary bladder transitional cell carcinomas

Variables	No. of patients (%)
Sex	
Male	119 (82.6)
Female	25 (17.4)
Age (years)	65.3±11.2
Stage	
Superficial	92 (63.9)
Invasive	52 (36.1)
Grade	
Low	91 (63.2)
High	53 (36.8)
Superficial recurrence	
Non-recurred	64 (69.6)
Recurred	28 (30.4)
Progression	
Non-progressed	119 (82.6)
Progressed	25 (17.4)
Invasive bladder cancer progression	9 (36.0)
Superficial bladder cancer progression	16 (64.0)
Survival	
Alive	92 (63.9)
Deceased	52 (36.1)
Cancer specific cause	29 (55.8)
Other cause	23 (44.2)

Table 2. Gli2 and Gli3 mRNA expression levels of primary bladder transitional cell carcinomas

Variables	Gli2*	p-value [†]	Gli3*	p-value [†]
Stage		<0.001		0.649
Superficial	3.8 (2.9-4.9)		6.3 (4.9-8.2)	
Invasive	13.9 (9.3-20.7)		7.0 (4.6-10.8)	
Grade		0.155		0.617
Low	5.3 (3.9-7.1)		6.9 (5.3-8.9)	
High	7.6 (5.0-11.5)		6.1 (4.0-9.3)	

*10³ copies/μl, †: Student's t-test

광암의 진행, 생존 및 암특이 생존율과의 연관성은 없었다. 표재성 방광암 환자에서 Gli2 mRNA의 발현과 재발에 대한 관계를 Kaplan-Meier 생존 분석을 이용하여 분석한 결과 비슷한 소견이 관찰되었다 (log-rank test, p=0.043) (Fig. 1). 그러나 Gli2 mRNA 및 Gli3 mRNA의 발현 정도와 방광암의 진행, 생존 및 암특이 생존율과의 연관성은 없었다.

4. 면역조직화학염색법에서 SHH의 발현

Gli2의 면역반응점수는 표재성 방광암보다는 침윤성 방

Table 3. Multivariate analysis for the prediction the recurrence of superficial bladder cancer

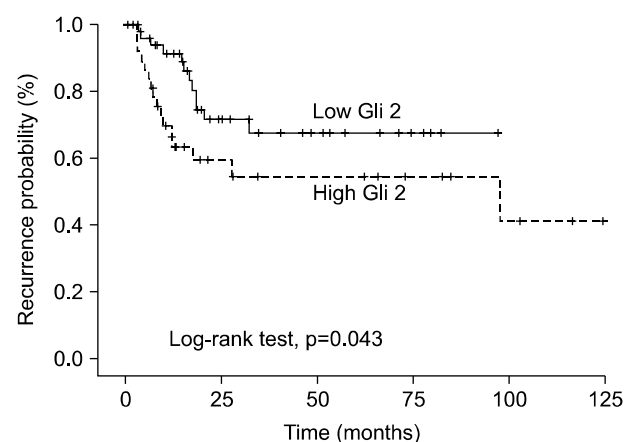
Variables	HR (95% CI)	p-value
Age (≤65 vs >65 years)	1.011 (0.414-2.469)	0.981
Sex (male vs female)	1.782 (0.624-5.092)	0.281
Stage (Ta vs T1)	1.672 (0.542-5.157)	0.371
Grade (low vs high)	1.106 (0.542-5.157)	0.854
Number		
Single	Reference	—
2 to 7	1.156 (0.447-2.987)	0.756
>8	1.720 (0.491-6.030)	0.397
Size (≤3cm vs >3cm)	1.084 (0.491-2.393)	0.842
Gli 2 (low vs high)	2.329 (1.043-5.202)	0.039
Gli 3 (low vs high)	0.579 (0.252-1.333)	0.199

HR: hazards ratio, CI: confidence interval

Table 4. Gli2 and Gli3 immunohistochemical staining scores in primary bladder transitional cell carcinomas

Variables	No. (%)	Gli2	p-value*	Gli3	p-value*
Stage			0.008		0.039
Superficial	76 (59.8)	5.47±2.16		6.03±2.15	
Invasive	51 (40.2)	6.21±2.27		6.97±2.67	
Grade			0.023		0.010
Low	80 (63.0)	5.34±1.77		5.96±2.37	
High	47 (37.6)	6.28±2.62		7.11±2.51	

*: Mann-Whitney U test

**Fig. 1.** Time to recurrence in superficial bladder tumor with Gli2 mRNA expression levels.

광암에서, 저등급 종양에서 보다는 고등급 종양에서 유의하게 높았다. Gli3의 면역반응점수에서도 침윤성 및 고등급 방광암에서 통계적으로 유의하게 높았다 (Table 4) (Fig. 2).

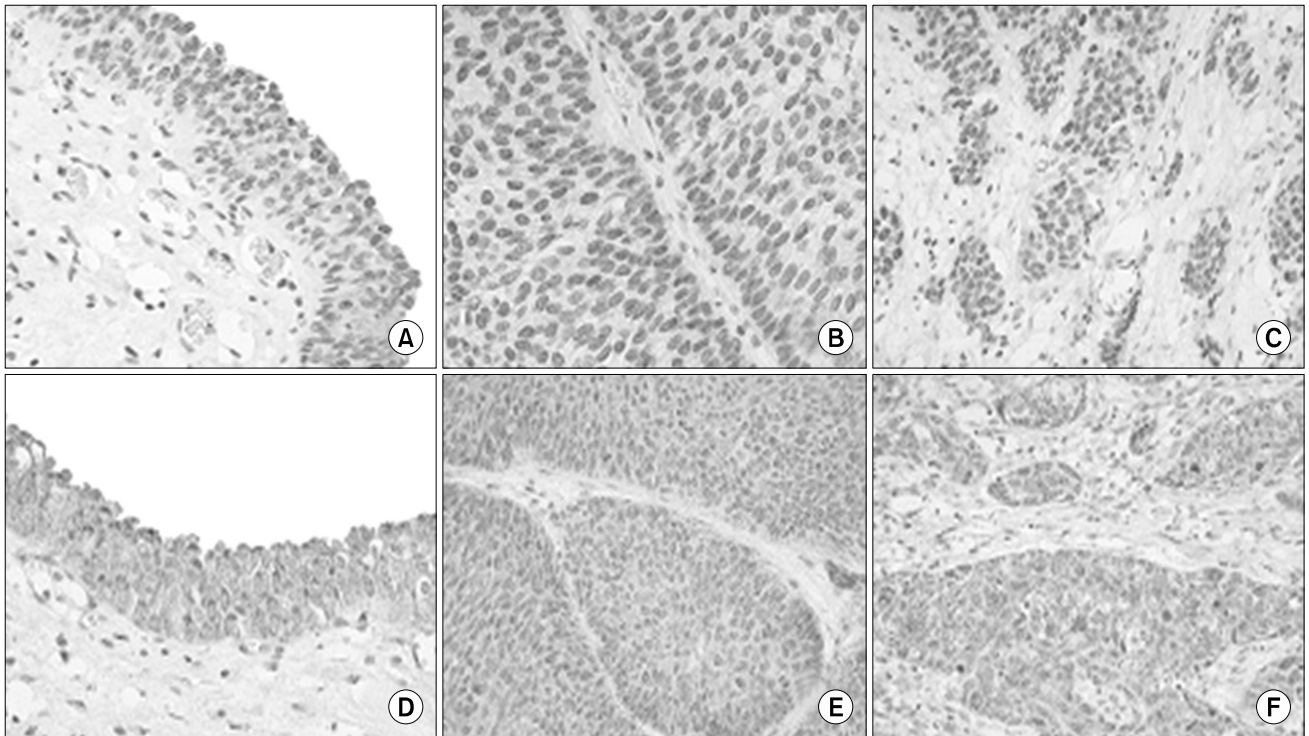


Fig. 2. Immunohistochemical staining of Gli2 in the normal bladder mucosa (A), superficial bladder tumor (B), invasive bladder tumor (C) and Gli3 in normal bladder mucosa (D), superficial bladder tumor (E), invasive bladder tumor (F).

고 찰

초파리 연구에서부터 밝혀지기 시작한 HH 신호전달체계는 그 후 많은 연구에 의해 발생 중 신경계, 호흡기계, 순환기계, 팔다리발생 등 각종 장기 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 분비된 HH 단백질은 주변세포에 작용하여 발생 중 세포의 운명을 결정하며, 세포의 분화와 증식을 유도할 수 있으며, 또한 분비세포를 중심으로한 단백질 농도경사에 따라 세포의 운명이나 분화가 다르게 나타난다.^{6,14} HH 단백질의 이러한 형태발생인자로서의 작용은 초파리에서부터 생쥐까지, 그리고 팔, 다리형성, 신경관 형성 등 여러 장기형성에도 그대로 보존되어 있다. 최근 연구에서 HH 신호전달체계가 성인의 줄기세포 유지에 관여하며, Greig cephalopolysyndactyly, Pallister Hall syndrome, VATER syndrome 등의 각종 선천성질환 및 폐암, 위암, 식도암, 췌장암 및 전립선암 등의 발생에도 관여하는 것이 알려지면서 그 임상적 중요성이 부각되었다.^{7,8,15-17}

HH 전달체계에는 Ptch 단백질과 Smo 단백질이 주로 관여하는데, HH 단백질의 발현이 없는 정상 상태에서는 세포 표면에 있는 Ptch가 세포 내 단백질인 Smo와 결합하여 활성화를 억제한다. 하지만 HH 신호전달체계가 활성화되면

Ptch와 Smo는 분리되고 Smo가 활성화되어 HH 신호전달체계의 하부 경로 구성요소인 Gli가 표적 세포 유전자를 발현시킨다.^{18,19} HH 신호전달체계의 활성화는 cyclin D2 (CCND2), forkhead transcription factor (FOXO1), jagged 2 (JAG2), Ptch1, Gli 등에 영향을 받는다.²⁰ 따라서 이들 신호체계에서 proto-oncogene인 SHH, Smo의 기능적인 변이, 전사인자인 Gli1, Gli2 및 Gli3의 과형성 혹은 암 억제 유전자인 Ptch의 억제 감소 등의 이상이 발생할 경우 암이 발생하게 된다.²¹ 일반적으로 Gli1과 Gli2는 전사유도인자로서의 기능을 가지고 Gli3는 전사 억제 기능과 일부에서 전사 유도인자로서의 기능을 가진다.²²⁻²⁴ Gli1은 HH 전달체계가 활성화된 모든 세포에서 전사 유도인자로서 작용하지만 Gli2와 Gli3는 세포 내의 특정 물질에 따라 전사억제인자 또는 유도인자로 작용한다.²⁴ Gli family는 HH 신호전달 체계의 중요한 역할을 하게 되는데, 이들 전달체계의 활성화에 문제가 되어 악성 신경아교종, 구강 편평상피세포암, 이틀배 횡문근육종 등이 있다.²⁵⁻²⁷

본 연구에서 Gli2 mRNA 발현은 진행된 병기에서 발현이 증가하였으며, 비록 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았으나 고등급 종양에서 증가되어 나타났다. 그러나 Gli3의 경우 병리학적 병기 및 분화도와 관련성을 보이지 않는 것은 Gli family의 3가지 단백질이 서로 다른 기능을 가

지고 있음을 의미한다. 면역조직화학염색법을 이용하여 Gli2와 Gli3의 염색 농도와 방광암과의 관계에 대한 조사결과 real-time PCR법의 결과와 완전히 일치하지는 않는 결과를 보이고 있다. 이러한 차이는 여러 가지로 추론할 수가 있는데 첫째, 면역조직화학염색법의 정성적 분석방법인 반면 real-time PCR의 정량적 분석 방법이기 때문에 차이가 있을 수 있다. 둘째, 면역조직화학염색법은 판독이 눈에 의하여 이루어지는 것이기 때문에 여러 가지 방법으로 보정을 하더라도 판독자의 주관에 일부 관여할 수 있다. 셋째, 면역조직화학염색법에 사용하는 항체의 역가에 의해서도 결과에 차이를 보일 수 있을 것이다. 중요한 점은 전반적으로 면역조직화학염색법과 real-time PCR의 결과가 대체로 일치한다면 표적 유전자의 발현을 정성적인 단백질 발현보다는 정량적인 RNA 측정을 통하여 임상 경과와 비교하는 것이 적절할 수 있다. 방광 이행상피세포암은 이중 세포 집단의 복합체이며 병기, 저등급과 고등급, 진행 및 침윤성 방광암에서의 악성화 가능성에 따라 각각 다른 임상 양상과 분자 생물학적 특성을 가진다.²⁸ 본 연구 결과 HH 신호전달 체계의 하나인 Gli2의 발현은 표재성 방광암보다는 침윤성 방광암에서 발현이 증가되어 고병기 방광암과의 연관성을 보였다. 또한 표재성 방광암의 경우 방광암의 재발과 연관된 인자들에 대한 다변량분석을 시행한 경우 Gli2의 발현은 표재성 방광암의 재발과 관련이 있었으며, 방광암의 진행 및 생존과의 연관성은 보이지 않았다. 본 연구 결과를 종합적으로 분석해 보면, Gli2의 발현의 증가는 표재성 방광암의 재발 및 고병기 방광암의 발생과 연관 있는 것으로 생각된다. 그러나 이들 결과는 방광암이 다양한 특성을 가진다는 점을 고려할 때, Gli2의 발현이 방광암의 미치는 영향에 대해서는 보다 정확한 기능적 연구를 통해 정확한 기전에 대한 추가 연구가 필요하다. 방광암의 발생, 병기, 분화도, 재발, 진행 및 생존을 단일 인자로 예측할 수 있다면 이는 이상적인 방광암의 표지자로 활용이 가능할 수 있다. 그러나 하나의 인자로 다양한 특성을 가진 방광암의 특성을 파악하는 데는 한계가 있다. 따라서 각각의 임상 양상에 맞는 적절한 인자를 발견하여 이들의 특성을 파악하는 것이 더욱 효과적이고 구체적인 표지자라 생각한다. 잦은 재발과 진행, 치료 방법 결정을 위한 논란이 많은 표재성 방광암의 예후 인자들을 찾는다는 점에서, 본 연구결과 표재성 방광암에서 Gli2의 발현의 정도에 따른 예후의 차이는 고위험 환자에 대한 선별 및 현재 많은 곳에서 시도되는 새로운 표적치료제의 개발에 도움을 줄 것으로 생각한다. 이러한 관점에서 Gli2의 발현은 표재성 방광암의 재발을 예측할 수 있는 중요한 예측인자로 생각된다. Gli2 및 Gli3에 의해 전사활성화되는 표적 유전자의 활성화에 대한 추가적인 연구는

방광암의 본질을 이해하는데 도움을 줄 뿐 아니라 이들을 기존의 위험인자를 보완할 수 있는 지표로 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

HH 신호전달체계의 중요한 인자인 Gli2의 활성화는 방광암의 병기와 관련이 있으며, 표재성 방광암의 재발을 예측할 수 있는 강력한 인자이다. 따라서 표재성 방광암에서 전통적인 임상 및 병리학적 특성과 Gli2의 발현에 대한 평가를 병용하여 시행할 경우 표재성 방광암에서 재발의 위험이 높은 환자군에 대한 선별이 가능하게 되어 조기에 적절한 치료를 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Kim WJ, Chung JJ, Hong JH, Kim CS, Jung SI, Yoon DK. Epidemiological study for urologic cancer in Korea (1998-2002). *Korean J Urol* 2004;45:1081-8
- Hudson MA, Catalona WJ. Urothelial tumors of the bladder, upper tracts and prostate. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, editors. *Adult and pediatric urology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby; 1996;1379-464
- Messing EM. Urothelial tumors of the bladder. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh urology*. 9th ed. Pennsylvania: Saunders; 2006;2426-7
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432:324-31
- Kopper L, Hajdu M. Tumor stem cells. *Pathol Oncol Res* 2004;10:69-73
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059-87
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JJ, Eberhart CG, Watkins DN, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002;297:1559-61
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-6
- Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:24-33
- Ruiz i Altaba A. The works of GLI and the power of hedgehog. *Nat Cell Biol* 1999;1:E147-8
- Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41
- Bland JM, Altman DG. Transformations, means, and confidence

- intervals. *BMJ* 1996;312:1079
13. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466-75
14. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 1996;384:176-9
15. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172-80
16. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 2003;6:21-7
17. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 2003;39:937-50
18. Hooper JE, Scott MP. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 1989;59:751-65
19. Ha YS, Yun SJ, Kim YJ, Lee SC, Kim WJ. Utility of Smo as a prognostic marker for human bladder tumors. *Korean J Urol* 2007;48:997-1003
20. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 2006;18:1019-23
21. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. Activating smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998;391:90-2
22. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999;126:3915-24
23. Shin SH, Kogerman P, Lindstrom E, Toftgard R, Biesecker LG. GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila* cubitus interruptus protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2880-4
24. Stecca B, Ruiz i Altaba A. The therapeutic potential of modulators of the Hedgehog-Gli signaling pathway. *J Biol* 2002;1:9
25. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 1987;236:70-3
26. Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:4232-42
27. Gordon AT, Brinkschmidt C, Anderson J, Coleman N, Dockhorn-Dworniczak B, Pritchard-Jones K, et al. A novel and consistent amplicon at 13q31 associated with alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:220-6
28. Al-Sukhun S, Hussain M. Molecular biology of transitional cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;47:181-93