

## 난소의 상피성 종양에서 c-Met의 발현

경북대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 병리학교실<sup>2</sup>  
김보섭<sup>1</sup> · 박일수<sup>1</sup> · 이윤순<sup>1</sup> · 구태본<sup>1</sup> · 박태인<sup>2</sup>

**목적** : 이 연구는 상피성 난소암에 있어서 c-Met의 발현을 알아보기 위함이다.

**연구 방법** : 상피성 난소 종양 50개의 파라핀 포매괴를 c-Met에 대해 면역조직염색을 시행하였다. 그 후 c-Met의 발현을 조직형, 종양 크기, 그리고 병기 등의 임상병리학적 변수들과 연관시켜 보았다.

**결과** : c-Met의 발현이 전체 50예 중 29예 (58%)에서 관찰되었으나 종양의 조직형, 종양크기 및 병기등의 임상병리학적 변수들은 c-Met의 발현과 연관성이 없었다.

**결론** : c-Met의 발현은 진행된 상피성 난소암의 예후 인자로 쓰일 가능성이 있으나 이를 임상에서 응용하기 위해서는 더 많은 인구집단을 대상으로 한 연구가 행해져야 한다.

**중심단어** : c-Met, 상피성 난소암, 예후

## 서 론

종양의 형성과정은 여러 종류의 세포에서 각각 다른 여러 가지의 기전이 작용하여 발생한다. 정상세포에서는 세포의 증식, 분화, 이주 및 세포자멸사 등의 여러 가지 조절인자에 의해서 통제되어 정확하게 조절되고 있으나 이러한 조절장치의 한 부분에 이상이 생기면 질병이 발생하게 되며 종양도 이러한 조절장치의 이상으로 발생하게 된다. 최근의 종양발생에 관한 연구 중 많은 부분이 성장인자와 성장인자 수용체에 관한 연구이며 이들 성장인자와 수용체의 유전자 분석으로 종양발생과정에서의 역할과 예후인자로서의 역할에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>1-4</sup>

이러한 성장 인자 중 하나인 간세포성장인자 (Hepatocyte growth factor, 이하 HGF)는 상피세포의 암변환과

암세포의 이동에 관여하는 운동인자들 중 하나로 알려져 있다. 또 HGF는 수용체와 결합하여 세포자멸사와 신생혈관형성과정에 관여한다.<sup>5-8</sup> HGF receptor family는 tyrosine kinase activity를 가진 Met, Ron 및 Sea 세 종류가 있다. Met 단백질은 c-Met oncogene에 의해 발현되며 주변 간엽조직에서 발현된 HGF에 의해서 활성화되어 세포내의 신호전달체계를 연속적으로 활성화시킴으로서 암 발생과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup> 이 수용체는 간, 위, 갑상선, 전립선 및 자궁내막 등의 많은 암종에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있고 그 발현 정도와 종양의 분화도, 병기, 전이유무와의 연관성에 대한 연구가 이루어지고 있다. 특히 간세포 암종에서는 암종의 분화 정도에 반비례하여 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>10-14</sup>

난소암은 여성에서 흔히 발생하는 악성 종양으로 부인과 암종에서 가장 많은 사망원인이 되는 암종의 하나이다.<sup>15</sup> 난소암이 높은 사망률을 보이는 이유는 환자의 임상증상이 늦게 나타나며 진단 당시 약 2/3의 환자가 병기 3 또는 4의 높은 병기를 보이기 때문이다. 즉, 많은 환자들이 진단 당시에 벌써 복강 내 전이와 주변 조직 침윤 등을 보인다. 최근 수술 방법의 발달과 항암약물요법의 발달에도 불구하고 진행성 난소암의 5년 생존율은

논문접수일 : 2007년 11월 14일 채택일 : 2007년 11월 21일

교신저자 : 박일수, 700-721 대구시 중구 삼덕 2가 50

경북대학교 의과대학 산부인과학교실

전화 : 053) 420-5731 · 전송 : 053) 423-7905

E-mail : parkis@knu.ac.kr

이 연구는 2003년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

과거와 비교하여 개선된 점을 보이지 않는다.<sup>15</sup> 따라서 좀 더 체계적인 조기발견 방법과 좀 더 효과적인 예후인자의 발견이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 상피성 난소 종양중 가장 흔한 장액성과 점액성 난소암을 대상으로 c-Met의 발현도를 조사하고, 종양의 조직형, 종양의 병기, 종양의 크기 등의 임상인자들과 상관관계를 밝혀 예후 인자로서의 가능성을 조사하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구재료

연구 재료는 최근 경북대학교병원에서 수술로 절제된 난소 조직 중 장액성 및 점액성 상피성 난소암으로 진단된 증례 중 비교적 보존 상태가 양호한 파라핀 포매된 50예를 실험대상으로 선정하였다. 연구 대상 환자들의 임상기록 및 병리 보고서를 검토하여 종양의 크기를 조사하고 병기는 FIGO 분류법에 따라 병기 I에서 IV까지 분류하였다.

### 2. 면역조직화학적 염색

각 증례 당 형태학적으로 가장 잘 보존된 파라핀 블록 한 개를 선택하여 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 organosaline을 부착한 슬라이드(probe-on plus slide, Fisher Scientific, USA)에 절편을 만들어 100% xylene으로 파라핀을 제거한 후 100%, 90% 및 75% 알콜로 재수화 하였다. Microwave는 전자렌지를 이용하여 10 mM citrate buffer (pH 6.0)를 750 watt로 5분간 먼저 가운 후에 슬라이드를 넣고 5분간 2회 가운 처리하여 항원 표출 후 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮추며 이어서 Tris buffered saline (TBS, 50mM, pH 7.4)으로 세척한 후 0.3 % 과산화 수소수를 15분간 작용시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 조직 내 비특이 항원을 차단하기 위해 normal horse serum에 30분간 반응시켰다. 일차항체는 c-Met (Santa Cruz, USA, 1:300)를 사용하며, chamber에 두고 4°C 수조에서 하룻밤동안 반응을 시킨후 TBS 완충액으로 3회 세척하였다. 이차 항체(Vector Elite kit, Vector Laboratories, USA)를 30분간 반응시킨 후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent를 사용하여 실온에서 45분간 반응시켰다. TBS에 세척 후 Tris-HCl (pH 7.6) 완충용액에 세척한 후

diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma Chemicals, USA)로 2-3분간 도포하여 발색한 후 증류수에 수세하고 10% Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 봉입하여 슬라이드를 완성하였다.

c-Met에 대한 면역조직화학적 염색의 평가는 종양세포의 10% 이상에서 세포막과 세포질내에 분명히 갈색의 과립상으로 염색된 경우 양성으로 판정하였다. 단, 탐식 세포에 의한 양성반응은 조직학적 형태로 구별하였으며 종양의 괴사가 있는 부위는 판독하지 않는다.

### 3. 통계분석

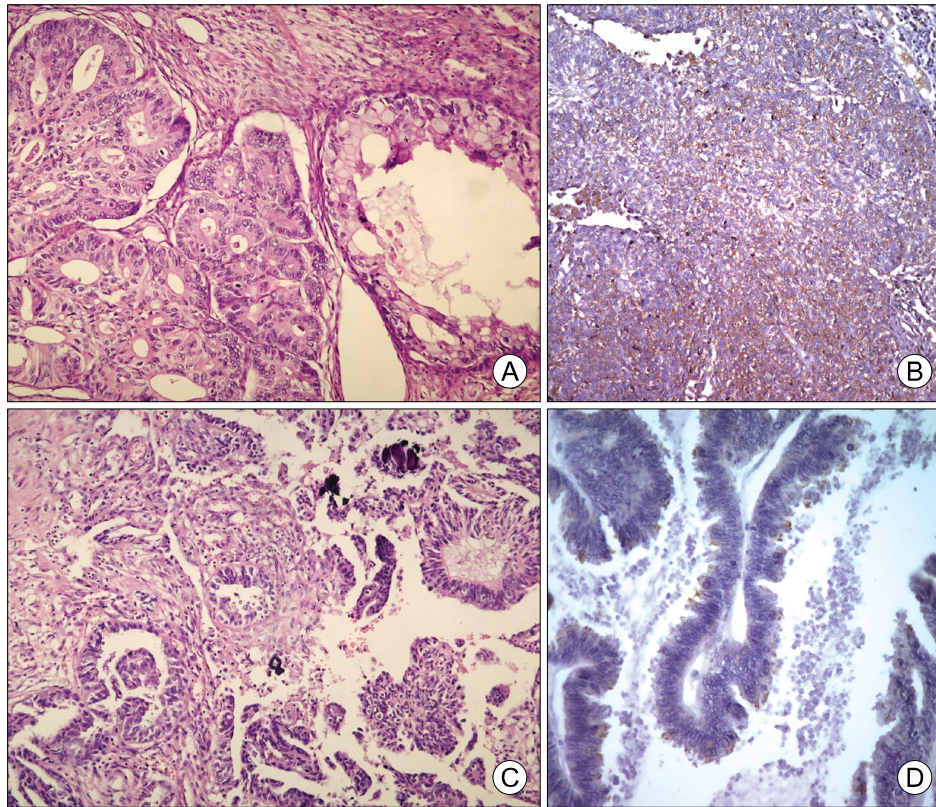
통계분석에는 SPSS version 12.0k를 사용하였다. 상피성 난소종양에 있어서 c-Met의 발현도와 종양의 조직형, 종양의 크기, 임상 병기와의 관련성은  $\chi^2$ -검정을 사용하여 통계학적 유의성 여부를 조사하였다.

## 결 과

c-Met에 대한 면역조직화학적 염색에서 c-Met은 종양 세포의 세포막에 강하게 염색 되었고 세포질의 일부에서 양성 반응을 보였다(Fig. 1). 50예의 상피성 난소 종양 중 29예 (58%)에서 양성 염색반응을 보였으며 21예 (42%)에서 음성 반응을 보였다. 장액성 난소암 30예 중 17예 (56.7%)에서 양성 염색반응을 보였으며 13예 (43.3%)에서 음성 반응을 보였다. 점액성 난소암 20예 중 12예 (60%)에서 양성 염색반응을 보였고 8예 (40%)에서 음성 반응이었다. 종양의 크기가 6 cm 보다 작은 경우는 63.6%의 양성율을 보였고 종양의 크기가 6 cm 보다 큰 경우는 53.6%의 양성율을 보였다. 종양의 병기가 1인 경우는 9예 중 5예 (51.6%)에서 양성반응을 보였고 병기 2는 9예중 6예 (66.7%), 병기 3은 30예중 16예 (53.3%), 병기4는 2예 모두에서 양성반응을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 1).

## 고 찰

암세포의 침윤과 전이는 악성 종양의 대표적인 생물학적 특성이다. 종양 세포가 원래의 종괴로부터 탈출하여 혈관 또는 림프관으로 들어가 먼 위치에서 이차적인 성장을 하기 위하여 여러 단계를 거쳐야 한다. 종양 세포



**Fig. 1. (A) Mucinous cystadenocarcinoma, H&E  $\times 200$  (B) Strong positive immunoreactivity for c-Met in mucinous cystadenocarcinoma,  $\times 200$  (C) Serous cystadenocarcinoma, H&E  $\times 200$  (D) Weakly positive immunoreactivity for c-Met in serous cystadenocarcinoma,  $\times 400$ .**

**Table 1. Relation between clinicopathologic characteristics and c-Met expression in ovarian epithelial tumor**

Clinicopathologic characteristics	No	c-Met expression		p-value
		Positive n (%)	Negative n (%)	
Histologic type				0.8150
Serous tumor	30	17 (56.7)	13 (43.3)	
Mucinous tumor	20	12 (60.0)	8 (40.0)	
Tumor size				0.4741
$\leq 6$ cm	22	14 (63.6)	8 (36.4)	
$> 6$ cm	28	15 (53.6)	13 (46.4)	
Surgical stage				0.5691
I	9	5 (55.6)	4 (44.4)	
II	9	6 (66.7)	3 (33.3)	
III	30	16 (53.3)	14 (46.7)	
IV	2	2 (100)	0 (0)	

는 전이 과정에서 세포의 기질을 통과해야 한다. 첫 번째 장벽은 기저막을 통과해야 하는데 기저막은 세포의 기질 중에서 고도로 특수화된 판이다. 다음으로 종양 세포는 간질 결합 조직을 통과해야 하며 마지막으로 혈관 기저막을 통과함으로써 순환계 내로 들어갈 수 있다. 종양

세포가 혈관을 따라 이동한 후에 다른 장기에 정착하려면 위의 단계를 반복한다. 그러므로 전이 세포의 가장 중요한 속성은 세포의 기질을 분해하면서 통과하는 능력이다. 세포의 기질은 기저막과 간질 결합 조직의 두 가지로 구분한다. 기저막은 간질 결합 조직으로부터 상피나 내피세포를 분리하는 농축된 판과 같은 구조이며 제 4형 콜라겐, 라미닌, 프로테오글리칸 등의 물질로 구성되어 있다. 라미닌은 제 4형 콜라겐과 프로테오글리칸에 고도로 친화성이 있고 또한 상피 세포에 존재하는 리미닌 수용체를 통해 상피 세포막에 강하게 결합되어 있다. 종양 세포가 수용체를 매개로 라미닌에 부착하는 것이 침입과 전이를 위해 필수적이다. 이러한 암세포의 침윤과정에는 여러 인자들이 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>16-18</sup>

HGF는 세포의 증식과 종양의 침윤에도 관여하며 Met 단백이라는 고친화성 수용체와 결합한다. Met 단백질은 c-Met oncogene에 의해 발현되며 tyrosine kinase activity를 가진 transmembrane 190kDa heterodimer로 50kDa의 extracellular  $\alpha$ -subunit와 145kDa의  $\beta$ -subunit로 구성되어 있다. Met 단백질은 주로 상피조직에서 발현되며 주변

간엽조직에서 발현된 HGF에 의해서 활성화되어 세포내의 신호전달체계를 연속적으로 활성화시킨다.<sup>19,20</sup> c-Met oncogene과 종양과의 연관성에 관한 처음 연구에서 Kuniyasu 등<sup>10</sup>은 위암 세포에서 c-Met mRNA의 과발현이 종양의 병기, 림프절 전이 및 침윤도와 연관성이 있다고 보고하였다. 그 후 여러 연구에서 간, 위, 갑상선, 전립선 및 자궁내막 등 고형 암종에서 c-Met 발현이 증가하는 것으로 알려졌고 그 발현 정도와 종양의 예후와의 연관성에 대한 연구가 이루어지고 있다.<sup>10-14</sup>

난소암에서 c-Met oncogene의 발현과 종양의 진행 정도에 관한 연구는 많지 않으며 지금까지의 몇몇 연구에서도 서로간의 이견은 많은 실정이다. Di Renzo 등<sup>21</sup>은 난소암의 초기에 c-Met의 과발현이 관찰되고 이는 난소암의 좋은 예후인자로 작용할 것으로 추측하였다. 그러나 Fracchioli 등<sup>22</sup>은 c-Met의 발현과 난소암의 조직형, 병기, 약물요법에 대한 반응성 등의 임상양상과는 상관성이 없었다고 주장하였다. 최근의 연구에서 Ayhan 등<sup>23</sup>은 진행성 상피성 난소암에서 면역염색을 통한 c-Met의 발현을 연구하였는데 이 연구에 의하면 조직학적 등급이 높고 림프절 전이가 있는 난소암에서 c-Met의 발현이 증가하는 것을 관찰하였고 c-Met의 과발현이 난소암의 예후인자로 유용할 것이라고 주장하였다. 본 연구에서는 50예의 상피성 난소 종양 중 29예 (58%)에서 양성 염색 반응을 보였는데 이는 Ayhan 등<sup>23</sup>의 연구에서와 유사한 c-Met의 발현율을 보였으나 종양의 조직형, 종양의 크기 및 병기등의 임상 인자와는 통계학적인 연관성을 관찰할 수 없었다. 하지만 더 많은 증례를 대상으로 좀 더 다양한 임상 양상을 비교하는 연구가 이루어짐으로써 c-Met의 예후인자로서의 유용성을 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Berchuck A, Olt GJ, Everitt L, Soisson AP, Bast RC Jr, Boyer CM. The role of peptide growth factors in epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 255-62.
- Hartmann LC, Podratz KC, Keeney GL, Kamel NA, Edmonson JH, Grill JP, et al. Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 64-9.
- Sui L, Dong Y, Ohno M, Sugimoto K, Tai Y, Hando T, et al. Implication of malignancy and prognosis of p27 (kip1), Cyclin E, and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 56-63.
- Kimmig R, Wimberger P, Hillemanns P, Kapsner T, Caspari C, Hepp H. Multivariate analysis of the prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 21-31.
- Goke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 1998; 274: 809-18.
- Matsubara Y, Ichinose M, Yahagi N, Tsukada S, Oka M, Miki K, et al. Hepatocyte growth factor activator: a possible regulator of morphogenesis during fetal development of the rat gastrointestinal tract. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 477-84.
- Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, et al. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int* 1998; 54: 1128-38.
- Lamszus K, Jin L, Fuchs A, Shi E, Chowdhury S, Yao Y, et al. Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab Invest* 1997; 76: 339-53.
- Medico E, Mongioli AM, Huff J, Jelinek MA, Follenzi A, Gaudino G, et al. The tyrosine kinase receptors Ron and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 495-504.
- Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 227-32.
- Pisters LL, Troncoso P, Zhau HE, Li W, von Eschenbach AC, Chung LW. c-Met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* 1995; 154: 293-8.
- Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 25: 862-6.
- Bae-Jump V, Segreti EM, Vandermolen D, Kauma S. Hepatocyte growth factor (HGF) induces invasion of endometrial carcinoma cell lines in vitro. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 265-72.
- Scarpino S, Stoppacciaro A, Colarossi C, Cancellario F, Marzullo A, Marchesi M, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumour invasiveness in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 1999; 189: 570-5.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 15-36.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell motility. *Nature* 1987; 327: 939-42.
- Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg

- ID. Purified scatter factor stimulates epithelial and endothelial cell migration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 195: 34-43.
18. Stoker M. Effect of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1989; 139: 565-9.
19. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene products. *Science* 1991; 251: 802-4.
20. Komado M, Kitamura N. The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of c-Met receptor. *Oncogene* 1993; 8: 2831-90.
21. Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, et al. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 658-62.
22. Fracchioli S, Katsaros D, Maggiora P, Di Renzo MF, Massobrio M. Evaluation of Ron and Met proto-oncogene expression in epithelial ovarian tumors [Abstract]. *Minerva Ginecol* 1999; 51: 359-64.
23. Ayhan A, Ertunc D, Tok EC, Ayhan A. Expression of the c-Met in advanced epithelial ovarian cancer and its prognostic significance. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 618-23.

## Expression of c-Met in ovarian epithelial tumor

Bo Seop Kim<sup>1</sup>, Il Soo Park<sup>1</sup>, Yoon Soon Lee<sup>1</sup>, Tae Bon Koo<sup>1</sup>, Tae In Park<sup>2</sup>

*Departments of Obstetrics and Gynecology<sup>1</sup> and Pathology<sup>2</sup>, Kyungpook National University College of Medicine, Daegu, Korea*

**Objective :** This study was performed to evaluate the expression of c-Met in epithelial ovarian carcinoma.

**Methods :** Paraffin-embedded tissues from 50 epithelial ovarian adenocarcinomas were stained immunohistochemically for c-Met expression. The expression of c-Met was correlated with clinicopathologic parameters including, histologic type, tumor size, and tumor stage.

**Results :** c-Met expression was found in 29 cases (58%) among 50 ovarian cancers. In clinicopathologic study, c-Met expression of epithelial ovarian carcinomas did not show the correlation with clinicopathologic parameters such as histologic type, tumor size and stage.

**Conclusion :** c-Met expression might be a potential prognostic marker for patients with advanced stage epithelial ovarian cancers. However, larger population-based studies should be performed to determine the prognostic potential of c-Met expression in advanced ovarian carcinoma.

**Key Words :** c-Met, Epithelial ovarian cancer, Prognosis