

수술을 시행한 비소세포 폐암 환자에서 EGFR, MMP-9 및 C-erbB-2의 발현과 환자 생존율과의 관계

고려대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실¹

이승현, 정진웅, 이경주, 이승현, 김세중, 하은실, 김정하, 이은주, 허규영, 정기환, 정혜철, 이승룡, 이상엽, 김제형, 신 철, 심재정, 인광호, 강경호, 유세화, 김철환¹

The Relationship between Expression of EGFR, MMP-9, and C-erbB-2 and Survival Time in Resected Non-Small Cell Lung Cancer

Seung Heon Lee, M.D., Jin Yong Jung, M.D., Kyoung Ju Lee, M.D., Seung Hyeun Lee, M.D., Se Joong Kim, M.D., Eun Sil Ha, M.D., Eun Joo Lee, M.D., Gyu Young Hur, M.D., Ki Hwan Jung, M.D., Hye Cheol Jung, M.D., Sung Yong Lee, M.D., Je Hyeong Kim, M.D., Sang Yeub Lee, M.D., Chol Shin, M.D., Jae Jeong Shim, M.D., Kwang Ho In, M.D., Kyung Ho Kang, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Chul Hwan Kim, M.D.¹

Department of Internal Medicine, ¹Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Non-small cell lung cancer (NSCLC) is a common cause of cancer-related death in North America and Korea, with an overall 5-year survival rate of between 4 and 14%. The TNM staging system is the best prognostic index for operable NSCLC. However, epidermal growth factor receptor (EGFR), matrix metalloproteinase-9(MMP-9), and C-erbB-2 have all been implicated in the pathogenesis of NSCLC and might provide prognostic information.

Methods : Immunohistochemical staining of 81 specimens from a resected primary non-small cell lung cancer was evaluated in order to determine the role of the biological markers on NSCLC. Immunohistochemical staining for EGFR, MMP-9, and C-erbB-2 was performed on paraffin-embedded tissue sections to observe the expression pattern according to the pathologic type and surgical staging. The correlations between the expression of each biological marker and the survival time was determined.

Results : When positive immunohistochemical staining was defined as the extent area>20%(more than Grade 2), the positive rates for EGFR, MMP-9, and C-erbB-2 staining were 71.6%, 44.3%, and 24.1% of the 81 patients, respectively. The positive rates of EGFR and MMP-9 stain for NSCLC according to the surgical stages I, II, and IIIa were 75.0% and 41.7%, 66.7% and 47.6%, and 76.9% and 46.2%, respectively. The median survival time of the EGFR(-) group, 71.8 months, was significantly longer than that of the EGFR(+) group, 33.5 months.(p=0.018, Kaplan-Meier Method, log-rank test).. The MMP-9(+) group had a shorter median survival time than the MMP-9(-) group, 35.0 and 65.3 months, respectively (p=0.2). The co-expression of EGFR and MMP-9 was associated with a worse prognosis with a median survival time of 26.9 months, when compared with the 77 months for both negative-expression groups (p=0.0023). There were no significant differences between the C-erbB-2(+) and C-erbB-2 (-) groups.

Conclusion : In NSCLC, the expression of EGFR might be a prognostic factor, and the co-expression of EGFR and MMP-9 was found to be associated with a poor prognosis. However, C-erbB-2 expression had no prognostic significance. (*Tuberc Respir Dis 2005; 59: 286-297*)

Key words : Non-Small Cell Lung Cancer, EGFR, MMP-9, C-erbB-2

서 론

비소세포 폐암 (non small cell lung cancer)은 전 세계적으로 악성 종양 관련 사망의 중요한 원인을 차

지 하고 있는 질환으로, 폐암 중 75%-88%를 차지하고 있는 암이며, 그 중 편평 상피세포암 (35%-71%), 선암 (9%-29%), 그리고 대세포암 (3%-16%)이 대부분을 차지하고 있다¹. 비소세포 폐암의 치료는 임상병기가 Ia부터 IIIa까지는 수술 치료를 시행하며, 각 수술 병기에 따른 5년 생존율도 병기가 진행함에 따라 불량하여, 조기 발견과 조기 치료가 필요한 질환으로, 그 다양한 치료법의 발전에도 불구하고, 그 예후는 5년 생존율이 남자는 12.6%, 여자는 16.2%로 매우 불량한 것으로 보고되고 있다¹. 일반적으로 폐암의 예후

Address for correspondence : **Jae Jeong Shim, M.D.**
Department of Internal Medicine, Guro Hospital, Korea University. 80, Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, Korea
Phone : 02-818-6639 Fax : 02-865-9670
E-mail : jaejshim@korea.ac.kr

Received : Dec. 9. 2004

Accepted : Aug. 25. 2005

를 예측할 수 있는 지표로는 TNM 병기가 사용되고 있으나 그 정확도에 있어서 부정확한 측면이 있어, 악성 종양의 기저 생물학적 특성을 고려한 지표들에 대한 연구의 필요성이 제기되었고, 이러한 지표들 중에 대표적인 것들이 종양 세포들에서 발현되는 Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) 및 *C-erbB-2*이다.

EGFR family는 ErbB-1 (EGFR, HER1), ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3), 그리고 ErbB-4 (HER4)로 구성된다. EGFR은 170kDa의 세포 표면 glycoprotein인 erb/HER (Human Epidermal growth factor Receptor) type 1 tyrosine kinase receptor family이며, 세포의 증식과 분화에 관여한다. 보통 암 전구단계 병변 (preneoplastic lesion)이나 암 단계 병변 (neoplastic lesion)에서 발현이 증가하고, 과잉 발현 되는 경우에는 나쁜 예후를 나타낸다는 보고도 있고, 그렇지 않다는 보고도 있어 아직 논란이 있는데, 폐암의 경우에는 편평 상피세포 폐암에서 발현이 증가되는 것으로 보고된바 있다².

Matrix Metalloproteinases (MMP)는 zinc-dependent endopeptidase로 정상적으로는 조직의 재형성 (tissue remodeling)이나 배태발육 (embryogenesis)에 관여하며, 종양 세포나 결체 조직 세포들로부터 생성된다. MMP는 세포외 기질과 세포 기저막을 분해 시키며, 세포 유착(cell adhesion)과정을 변형 시키고 종양의 전이를 촉진 시킨다. 이러한 작용에 있어서 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9(gelatinase B)이 가장 중요한 역할을 하게 되는데 이들의 활동성을 주로 버텸 섬유 모세포, 침윤 대식세포, 그리고 암세포의 세포질에서 관찰할 수 있다³. 특히 MMP-9은 M_r 92,000 gelatinase로서 type IV collagen을 분해 시키며, MMP-2와는 다르게 ras-inducible유전자로 암 세포의 발현에 있어서 EGFR의 자극으로 인한 ras/MAP kinase 신호 전달체계를 통해서 upregulation의 과정을 거치는 것으로 알려져 있어서 본 연구에서 선정 하였다⁴⁵.

C-erbB-2 종양 단백질은 EGFR family에 속하는 type 2 tyrosine kinase로서 세포내 신호 전달을 유발 하여 세포의 성장과 분화를 일으키는데 중요한 역할을 하며, *C-erbB-2*가 과잉 발현 되는 경우는 cisplatin과

paclitaxel등을 포함한 다양한 항암제에 대한 과민성이 감소하는 것으로 보고 된바⁶ 있어서 *C-erbB-2*의 발현 양상을 고찰하는 것은 anti-HER-2 monoclonal antibody의 투여 여부 또는 항암제에 대한 과민성 여부를 예측하는데 있어서 좋은 정보를 제공해 줄 수 있으며, *C-erbB-2*는 또한 유방암, 난소암, 위암, 대장암, 그리고 비소세포 폐암등 인간의 모든 암의 30%에서 과잉발현 및 증폭을 하는 것으로 알려져 있어서⁷ 본 연구에서 선정 하였는데, *C-erbB-2*는 비소세포 폐암의 경우 2%에서부터 40%등으로 다양하게 발현 되고⁸⁻¹⁰, 특히 선암에서 나쁜 예후와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁰.

폐암에서 이와 같은 생물학적 표지자들에 대한 연구들에 의하면 EGFR과 MMP-9이 모두 발현 되는 경우에 예후가 좋지 않은 것으로 보고된 바 있으며³, 따라서 다양한 생물학적 표지자에 대한 고찰과 발현의 상호 관계를 연구하는 것이 환자의 예후를 예측하는 데 있어서 중요한 의미가 있을 것으로 사료 된다.

따라서 본 연구는, 비소세포 폐암에서, EGFR, MMP-9, 및 *C-erbB-2*의 발현 양상을 면역 조직 화학적 염색을 통해서 관찰 하였고, 생물학적 표지자의 암 조직 병리 종류에 따른 면역 조직 화학적 염색 양상과 수술 병기에 따른 면역 조직 화학적 염색 양상을 고찰 하였으며, 이와 연관하여 폐암 수술 후 환자들의 생존율과의 상관성 및 환자들의 임상 특성을 고찰 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자 선정과 조사 방법

1995년부터 2001년까지 고려 대학교 구로 병원 및 안암 병원에 내원해서 원발성 비소세포 폐암으로 확진 후 치료 목적의 외과적 절제술을 시행 받은 81명 환자의 조직을 대상으로 연구하였다. 환자들의 임상 정보 및 생존 여부는 의무기록 및 전화통화를 통하여 후향적으로 조사 하였으며, 수술 후 합병증이나 다른 원인으로 사망한 환자들의 경우는 제외 하였다.

2. 형태학적 고찰

실험 대상군의 폐 조직을 5 μ m의 두께로 절단한 후, 파라핀을 제거하고, H/E 염색 (hamatoxylin and eosin stain)을 시행하여 염색하여, 기본적인 형태학적 관찰을 시행하였다.

3. EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2*에 대한 면역 조직 화학 염색

미리 준비된 5 μ m의 파라핀 절편으로부터 파라핀을 제거하고, 재수화 시킨 후, 메틸알콜에서 0.3%의 과산화수소수 (H_2O_2)로 조직내의 페록시다제 (peroxidase)를 억제하고, phosphate-buffered saline (PBS) + 1% bovine serum albumin + 0.05% Tween 20을 희석 용매 (buffer solution)로 이용하였다. 1차 항체로, 항원 결정 부위(epitope)를 cell surface domain에 갖는 부위를 식별하기 위해서 항원과의 결합 부위인 Fab (antigen binding fragment)를 가진 면역 글로블린인, mouse origin anti Human EGFR Ab (dilution 1:200; Calbiochem, La Jolla, California, USA), mouse origin anti Rat MMP-9 Ab (dilution 1:500; Oncogene science Inc, Cambridge, Massachusetts, USA) 그리고 rabbit origin anti Human erbB-2 Ab (dilution 1:500; DAKO, Denmark)를 실온에서 1시간 동안 결합시킨 후 PBS로 세척하였다. 2차 항체는 실온에서 1시간 동안 biotinylated horse anti-mouse antibody (dilution, 1:250; Vector laboratories, Burlingame, California, USA)와 반응시켰으며, 결합된 항체는 avidin-biotin-peroxidase complex method (Elite ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, California, USA)를 이용하였고, DAB시약 (CAT NO SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, California, USA)으로 염색하여 관찰하였으며, hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다.

4. EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2* 염색 부위의 정량화

각 조직에서 EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2*의 발현 정도는 중앙 세포 부위를 각 조직마다 확인 후에,

각각의 부위에서 각각의 단 클론성 항체로 염색된 부위를 고배율 ($\times 400$) 시야에서 확인하고(Figure 1), 40배의 시야에서 염색범위를 백분율로 나타냈으며, 중앙이 있는 모든 부위에서의 염색 양성률을 더하여 평균을 구한 뒤, Cox등³이 사용한 4개의 scale로 나눈 등급을 이용하여 분류하였다. 중앙 세포 조직에서 염색 부위가 전혀 없는 경우는 0(Grade 0), 0%<염색 범위<20% 범위는 1+ (Grade 1), 20% \leq 염색범위 <50% 범위는 2+ (Grade 2), 50% \leq 염색범위는 3+ (Grade 3)로 분류하였고, 염색 음성군과 양성군으로 구분하여 보기 위해서, 인위적으로 Grade 0 과 Grade 1을 염색 음성군으로 분류하고, Grade 2 와 Grade 3을 염색 양성군으로 분류 하였으며, 각 병기와의 연관을 관찰하기 위해서 수술 병기는 TNM 병기로 분류 하였다. 그리고 염색 범위를 판정 하는데 있어서, 염색 조직의 물리적 변형이 있어 Grade를 판정할 수 없는 슬라이드는 제외한 후 각 조직에 대한 관찰을 비교 시행 하였다.

5. 통계적 분석

결과 분석은 SPSS[®] for Windows Release 10.0 (SPSS Inc. USA)을 사용하여, 환자의 임상특성을 평균 \pm 표준편차 (mean \pm standard deviation)로 나타내었다. 폐암의 병리 조직형, TNM 병기에 따른 각 생물학적 표지자의 염색 양성률의 비교는 Chi-squared test로 하였으며, 환자들의 생존기간의 산출은 Kaplan-Meier Method로 하였으며, 각 그룹들간의 생존을 비교는 log rank test를 사용하였다. 그리고 SAS 프로그램을 사용하여 다변량 분석 및 hazard ratio를 산출 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성 및 임상 경과

연구에 포함된 환자들의 특성은 (Table 1), 남자:여자=52명:29명이었고, 평균 연령은 60.4 \pm 11.3세였으며, 81명의 수술 환자들 중 선암이 39명 (48.1%)으로 가

Table 1. Clinical and Histological characteristics of patients with non-small cell lung cancer

Feature	Number	%
Age	60.4 ± 11.3 yrs	
Sex		
Male	52	64.2
Female	29	35.8
Histology		
Adenocarcinoma	39	48.1
Squamous cell carcinoma	32	39.5
Large cell carcinoma	2	2.5
Giant cell carcinoma	2	2.5
Carcinoid tumor	1	1.2
Bronchioloalveolar carcinoma	1	1.2
Adenosquamous carcinoma	2	2.5
fetal adenocarcinoma	1	1.2
Mucoepidermoid carcinoma	1	1.2

Table 2. Clinical results of patients with non-small cell lung cancer

Feature	Number	%
Survival	47	58
Death	34	42
Post operative recurrence	44	54.3
Mean follow up period	30.3 ± 21.4 mon	
Follow up range	3.0 mon-82.0 mon	
Median survival time	54.0 ± 10.0mon	

장 많았고, 편평상피세포암이 32명 (39.5%)이었으며, 대세포암 (large cell carcinoma)은 2명 (2.5%), 거대 세포암 (giant cell tumor)이 2명 (2.5%) 이었고 그 외에도 carcinoid tumour가 1명 (1.2%), bronchioloalveolar carcinoma (BAC)가 1명 (1.2%), adenosquamous carcinoma가 2명 (2.5%), fetal adenocarcinoma가 1명 (1.2%), mucoepidermoid carcinoma가 1명 (1.2%) 이었다.

추적 관찰 기간은 (Table 2) 평균 30.3 ± 21.4 개월 (3개월 ~ 82개월) 이었으며, 81명의 환자 중 47명(58.0%)의 환자가 생존 하였으며, 평균 생존 기간은 51.0 ± 4.0 개월 이었고 중앙 생존 기간은 54.0 ± 10.0 개월 이었다. 환자 중 36명(44.4%)은 수술병기 I, 21명(25.9%)은 수술병기 II, 13명(16%)은 수술병기 IIIa, 10명(12.3%)은 수술병기 IIIb, 그리고 1명(1.2%)은 수술병기 IV이었으며, 폐암 수술 후 환자 중 44명 (54.3%)이 재발 하였고, 34명(42.0%)이 폐암으로 사망 하였다.

환자의 병기(stage)는 흉부 컴퓨터 촬영상 Ib가 27명(33.3%), 수술 병기상 에서도 Ib가 25명(30.9%)으

Table 3. Surgical TNM staging of patients with non-small cell lung cancer

TNM stage	Number	(%)
I	36	(44.4)
II	21	(25.9)
IIIa	13	(16.0)
IIIb	10	(12.3)
IV	1	(1.2)
Total	81	(100.0)

로 가장 많았으며, 환자 중 37명(45.7%)이 수술 전이나 수술 후에 항암 화학 약물 치료를 받았다. 모든 환자의 수술 전 임상적 병기 (clinical stage)가 IIIa 이하의 병기를 보이고 있었으나, 11명의 환자의 경우에 있어서는 수술 병기 (surgical stage)상 IIIb 이상으로 더 진행된 병기를 보이고 있었다 (Table 3).

2. 면역 조직화학 염색과 병리 조직형과 관계

Grade 2이상의 염색 양성군과 암 조직 병리형과 비교해서 보면 (Figure 1, Table 4), 전체 종양에서 EGFR 염색 양성률은 71.6%, MMP-9 염색 양성률은 44.3%,

*C-erbB-2*의 염색 양성률은 24.1%를 보였고, EGFR과 MMP-9이 모두 양성인 경우는 34.2%에서 관찰되었으며, EGFR, MMP-9, 및 *C-erbB-2*가 모두 양성인 경우는 14.1%였다.

EGFR 염색 양성의 경우 편평상피세포암이 75.0%로 선암의 EGFR 염색 양성률 63.4%보다 높게 나타났으나 통계적 유의성은 없었으며($p=0.3$, chi-squared test), 이 두 조직을 제외한 다른 조직군에서의 EGFR

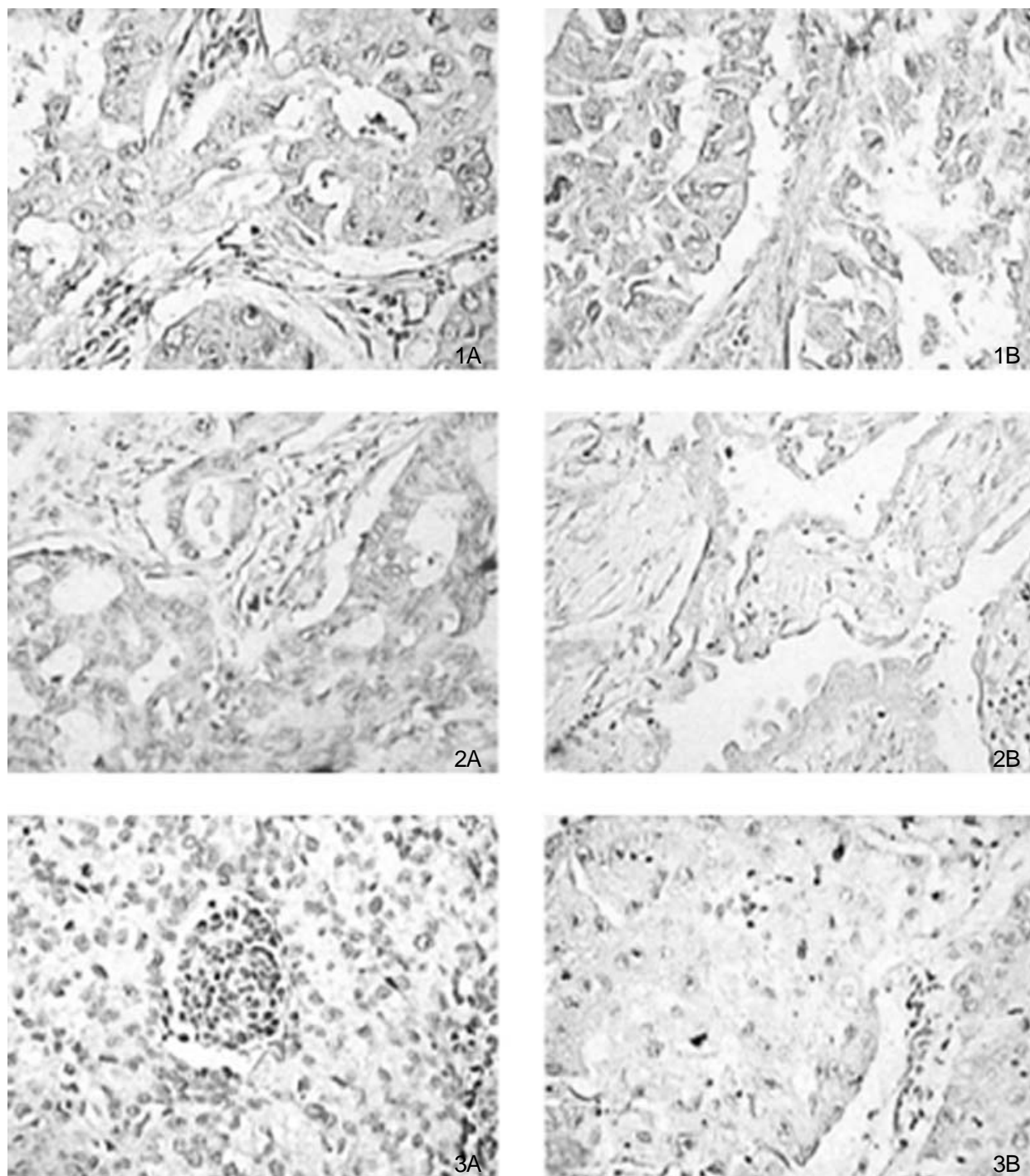


Figure 1. Non small cell lung cancer stained with immunohistochemical stain (X 400). (1A, 1B) Adenocarcinoma of EGFR negative and positive stain. (2A, 2B) Adenocarcinoma of MMP-9 negative and positive stain. (3A, 3B) Squamous cell carcinoma of *C-erbB-2* negative and positive stain.

Table 4. The positivity of immunohistochemical stain and pathologic type

	Adeno. ca. *	Squa.cell.ca. †	Others‡	Total
Stain	No.(%)	No.(%)	No.(%)	No.(%)
EGFR +	26/41 (63.4)	24/32 (75.0)	8/8 (100.0)	58/81 (71.6)
MMP-9 +	18/41 (43.9)	13/30 (43.3)	4/8 (50.0)	35/79 (44.3)
<i>C-erbB-2</i> +	9/41 (22.0)	7/30 (23.3)	3/8 (37.5)	19/79 (24.1)

* Adenocarcinoma

† Squamous cell carcinoma

‡ Pathologic types are carcinoid tumour, large cell carcinoma, giant cell carcinoma, adenosquamous cell carcinoma, and mucoepidermoid carcinoma.

Table 5. The positivity of immunohistochemical stain and surgical stage

	Stage I	Stage II	Stage IIIa	Total
Stain	No.(%)	No.(%)	No.(%)	No.(%)
EGFR +	27/36 (75.0)	14/21 (66.7)	10/13(76.9)	51/70(72.9)
MMP-9 +	15/36 (41.7)	10/21 (47.6)	6/13(46.2)	31/70(44.3)
<i>C-erbB-2</i> +	7/36 (19.4)	8/20 (40.0)	4/13(30.8)	19/69(27.5)

염색 양성률은 100.0%로 높게 나타났다. MMP-9 염색 양성률의 경우는 선암, 편평상피세포암, 다른 조직군에서 각각 43.9%, 43.3%, 50.0%로 발현 빈도가 비슷하였고, *C-erbB-2* 염색 양성률의 경우는 22.0%, 23.3%, 37.5%로 EGFR과 MMP-9에 비해서 양성률이 낮았다. 또한 각 조직형에 대한 생물학적 표지자들의 유의한 양성률 차이는 없었다.

3. 면역 조직 화학 염색과 수술 병기와의 관계

면역 조직 화학 염색 정도와 수술 가능 병기와의 관계(Table 5)는 EGFR 염색의 경우에 수술병기 I, II, IIIa에서 각각 염색 양성률이 75.0%, 66.7%, 76.9%를 나타냈으며, MMP-9의 경우에 41.7%, 47.6%, 46.2%를 나타냈고, *C-erbB-2*의 경우에는 19.4%, 40.0%, 30.8%의 염색 양성률을 보였으며, 수술 병기에 따른 염색 양성률의 유의한 차이는 없었다.

4. 면역 조직 화학 염색과 환자 생존율과의 관계

수술 병기 I, II, IIIa 에 따른 환자의 2년 생존율은 각각 83.9%, 70.7%, 53.8% 였으며, 5년 생존율은 72.2%, 46.3%, 0%를 나타냈다. 그리고 수술 병기 I, II, IIIa 에

따른 환자의 중앙 생존 기간은 각각 82.0개월, 47.7개월, 32.1개월로써 각 수술 병기에 따라서 환자 생존기간이(Figure 2) 통계적으로 유의한 차이를 보였는데 ($p=0.001$, Kaplan-Meier method, log rank test), 본 연구에서는 또한 각 생물학적 표지자의 양성률에 따른 환자의 생존 기간의 차이 여부를 고찰 하였다.

EGFR 양성군은 중앙 생존 기간이 33.5개월로써 EGFR 음성군의 71.8개월 보다 통계적으로 유의한 불량한 예후(Figure 3)를 나타냈다($p<0.05$). 그리고 MMP-9 양성군은 중앙 생존기간이 35.0개월로써 MMP-9 음성군의 65.3개월보다 불량한 생존 곡선의 양상을 나

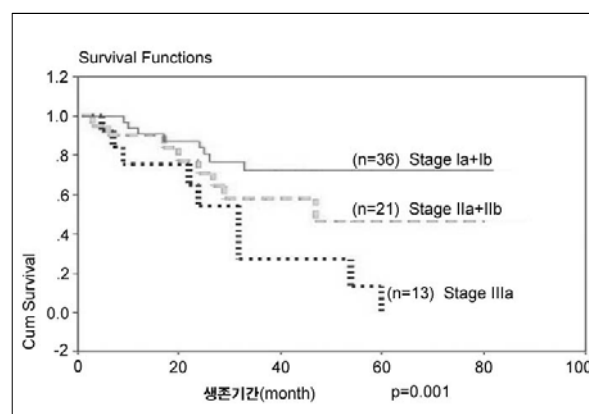


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves for surgical stage I, II, and IIIa according to TNM stage.

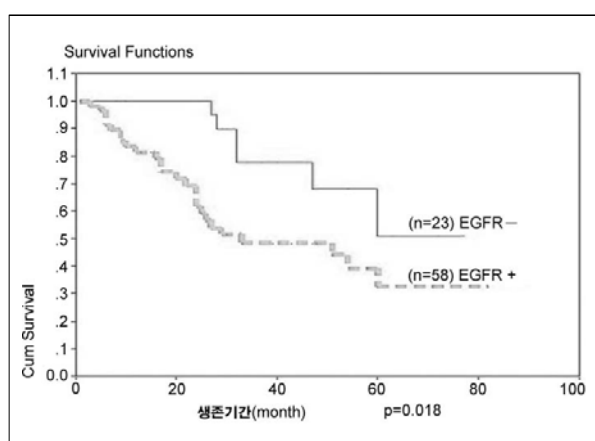


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves for negative expression of EGFR and positive expression of EGFR.

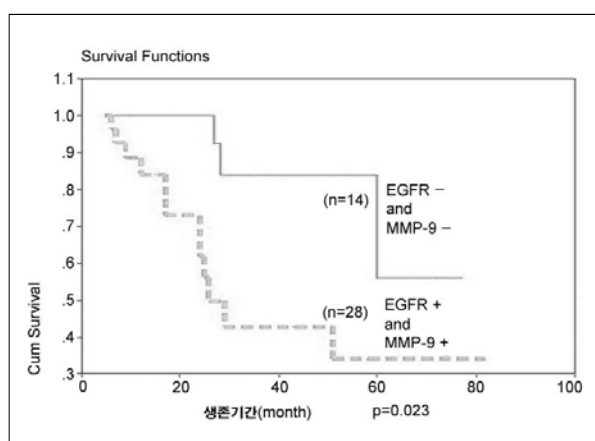


Figure 4. Kaplan-Meier survival curves for negative expression of both EGFR and MMP-9 and positive expression of both EGFR and MMP-9.

타냈으나, 통계적 유의성은 없었다. 또한 *C-erbB-2* 양성군은 중앙 생존기간이 44.2개월, *C-erbB-2* 음성군은 58.4 개월을 나타냈으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. EGFR과 MMP-9 동시 양성군은 전체 환자의 34.2%로써 중앙 생존 기간이 26.9개월로써 EGFR과 MMP-9 동시 음성군의 77.0개월보다 통계적으로 유의한 불량한 예후(Figure 4)를 나타냈다 ($p < 0.05$). 하지만 EGFR과 MMP-9 동시 양성군은 중앙 생존 기간이 26.0개월로써 EGFR만 양성인 군의 54.0개월보다 통계적으로 유의한 생존율의 차이는 보이지 않았으며, MMP-9 과 *C-erbB-2* 동시 양성군과 EGFR과 *C-erbB-2* 동시 양성군은 각각의 동시 음성군에 비해서 유의한 생존 기간의 차이는 보이지 않았다. 한편 다변량 분석을 통하여, 각 생화학적 지표에 대한 생존율을 비교 하였는데, EGFR, MMP-9, *C-erbB-2*, 그리고 수술적 병기에 대한 생존율의 hazard ratio를 각각 산출 하였다(Table 7). EGFR의 hazard ratio는 0.189(95% C.I.:0.052-0.679), MMP-9은 0.386 (95% C.I.:0.145-1.024), *C-erbB-2*는 1.669(95% C.I.: 0.612-4.551), 그리고 수술적 병기(I, II, IIIa)는 2.897 (95% C.I.:1.590-5.277)로서 EGFR 양성일 때 다른 지표들 보다 통계적으로 유의하게 ($p < 0.05$) 저조한 생존율을 나타냈으며 MMP-9도 유의한 성향을 보였다. ($p < 0.05$).

Table 6. The survival time and expression of biologic marker

Stain	No.	Expression(%)	Mean(Mon.)	Median(Mon.)	p value
EGFR +	81	71.60%	45.0 ± 5	33.5	0.018
EGFR -			61.5 ± 5	71.8	
MMP-9+	79	44.30%	45.0 ± 6	35.0	0.2
MMP-9 -			53.0 ± 5	65.3	
<i>C-erbB-2</i> +	79	24.10%	49.0 ± 7	44.2	0.7
<i>C-erbB-2</i> -			51.4 ± 4	58.4	

Table 7. Hazard ratios (relative risks) estimated by multivariate analysis. Cancer-specific survival

Variable	RR	95% CI	p value
Stage(I, II, IIIa)	2.897	1.590-5.277	0.0005
EGFR +	0.189	0.052-0.679	0.0107
MMP-9 +	0.386	0.145-1.024	0.0558
<i>C-erbB-2</i> +	1.669	0.612-4.551	0.3167

고 찰

비소세포 폐암의 원인과 병태생리에 관한 여러 연구와 노력들이 시도 되었는데, 본 연구에서는 폐암의 병인에 관여하는 여러 생물학적 표지자 중 최근 관심을 모으고 있는 EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2*에 대해 연구 하였다. 비소세포 폐암의 성장은 세포의 증식과 세포의 손실의 균형으로 결정되는데, 세포의 손실은 괴사 (necrosis)와 세포자멸 (apoptosis, programmed cell death)로 발생한다. 성공적인 종양의 치료는 주로 세포 자멸의 반응 과정을 유발하는 것으로, EGFR tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)인 Iressa® (ZD 1839)는 신호 전달을 억제하여 상피 세포 증식을 감소시키고 apoptosis를 증가시키는데, EGFR kinase의 체성 변이(somatic mutation)가 있는 환자에서 반응율이 증가하는 것으로 보고 되고 있으며, *C-erbB-2*에 대한 약한 억제 작용도 있는 것으로 보고 되고 있다¹². 또한 종양의 원격 전이에 관여하는 효소인 MMP를 억제하는 matrix metalloproteinase inhibitor (MMPI)가 새로운 항암제로 많은 연구¹³가 시행되고 있는 상태이다.

비소세포 폐암의 경우에 있어서 Cox등³은 EGFR의 양성 발현율은 55.1%, 그리고 MMP-9의 경우는 52.1%로 보고 하였고, Schneider등¹³은 *C-erbB-2*의 발현율을 54.4%로 보고 하였는데, *C-erbB-2*의 경우는 비소세포 폐암의 경우 2%에서부터 40% 등으로 다양한 발현 양상이 보고되고⁸⁻¹⁰ 있으며 폐암의 예후와의 관계가 미비한 것으로도 생각 된다⁸. 본 연구에서는 EGFR 염색 양성률은 71.6%, MMP-9 염색 양성률은 44.3%, 그리고 *C-erbB-2*의 염색 양성률은 24.1%로 EGFR 염색 양성률이 가장 높게 나타났는데, 기존의 연구결과들과의 차이는 각 항체의 희석배수의 차이나, 염색 양성률 설정기준의 차이 때문으로 사료된다. 각 병리 조직에 따른 EGFR의 발현 정도는 의미 있는 차이는 보이지는 않았는데, 편평 상피 세포암에서 75%의 염색 양성률로 선암의 63.4%의 염색 양성률보다 약간 더 높은 양성률을 보였고, MMP-9과 *C-erbB-2*의 경우는 두 조직에서 비슷한 수준의 염색 양성률을 나타냈으며, 이외의 다른 조직군에서는 EGFR, MMP-9

및 *C-erbB-2* 모두에서 전반적으로 높은 염색 양성률을 나타냈다. 생화학적 표지자의 발현율을 살펴보면, 대세포성 폐암과 편평상피세포 폐암에서 선암보다 EGFR이 발현율이 높고, EGFR과 MMP-9이 모두 발현 되는 경우에 예후가 나쁘며, MMP-9의 경우에는 수술 병기가 초기일 때, 그리고 MMP-9의 발현이 많이 된 경우에 환자의 예후가 나쁜 것으로 보고³ 되고 있는데, 본 연구에서는 편평상피세포암에서 EGFR 양성률이 75.0%로, 선암의 63.4% 보다 더 높은 염색 양성률을 보여 Cox 등¹⁷의 연구 결과에서의 55.1%와 52.1% 보다는 높지만 두 조직에서 비슷한 양성률을 나타냈다. 그리고 수술 병기의 진행에 따른 EGFR, MMP-9, 그리고 *C-erbB-2*의 염색 양성률의 차이를 고찰해 보았을 때, 각 생물학적 표지자의 염색 양성률의 차이는 보이지 않았는데, 수술 병기의 진행에 따른 각 생물학적 표지자의 유의한 차이가 보고¹⁴된 경우를 보면, 비소세포 폐암에서 MMP-9과 MMP-2의 발현 정도를 각 수술병기에 따라서 구분해 보았을 때, 병기가 I기 또는 II 기보다 병기가 III기일 때 각 MMP-9과 MMP-2의 발현이 더 높았다고 보고 하였고, 본 연구와 다른 점은 염색 양성률의 기준이 10%였고, 수술 병기 I, II, III에 따른 MMP-9의 염색 양성률은 33%, 71%, 71%로 수술병기 II와 III의 양성률은 비슷한 결과를 보였었다. 하지만 EGFR 염색 양성률과 이미 결과에서 기술된 환자 생존율과의 유의한 상관 관계를 고려해 볼 때, EGFR의 발현 정도에 따른 각 환자의 생물학적 병기 설정이 환자의 예후를 추측하는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

EGFR과 MMP-9의 연관성과 또한 2가지 생물학적 표지자의 동시 발현과 종양의 예후에 대한 관심이 높아지고 있는데, Rosenthal등¹⁵은 erb/HER (human epidermal growth factor receptor) type 1 receptor는 MMP를 증가시키는 것으로 보고하고 있고, 이는 ras/MAP kinase/AP-1/ets-1의 경로를 통해서 E-cadherin을 감소시키게 되며, E-cadherin의 감소는 MMP-9를 상승시켜서 사망률을 높인다고 한다^{16,17}. 그러므로 본 연구 결과에서와 같이 EGFR과 MMP-9의 동시 발현과 환자 생존율의 유의한 상관 관계를

고려 해 볼 때 EGFR과 MMP-9의 동시 발현 정도에 따른 각 환자의 생물학적 병기 설정 및 환자 예후 추측이 가능 할 것으로 사료된다.

*C-erbB-2*에 대한 염색 양성 결과를 살펴 보면, 다른 연구들 에서도 *C-erbB-2*와 비소세포 폐암과의 상관성 여부에 대해서는 논란이 많은데, 본 연구에서 *C-erbB-2*의 염색 양성률은 다른 생물학적 표지자에 비해서 24.1%로 낮게 나타났고, 각 조직형에 따른 염색 양성률을 비교해 보면, 선암의 22.0%, 편평 상피세포암의 23.3%, 두 조직 이외의 다른 조직군에서 37.5%로 다른 생물학적 표지자 보다 전반적으로 낮은 염색 양성률을 보였다. 이 이유는, 폐암에서는 비소세포 폐암이 소세포암보다 *C-erbB-2*의 발현을 더 많이 한 것으로 나타나기는 하지만, 비소세포 폐암 에서 *C-erbB-2*의 발현은 유방암의 경우와 같은 높은 염색 양성률을 보이진 않는데 이는 유방암의 경우에는 대부분의 경우 유전자 증폭이 나타나지만 비소세포 폐암에서는 유전자 증폭 이 잘 나타나지 않기 때문인 것 같다¹⁸. 본 연구에서 *C-erbB-2*의 낮은 염색 양성률과 선암과 편평상피세포암을 제외한 다른 조직군에서의 더 높은 양성률을 고려해 볼 때 비소세포 폐암에서 선암과 편평상피세포암 이외의 세부 병리 조직에 대한 *C-erbB-2* 발현에 관한 연구 및 발현 양성군과 음성군에 따른 임상 차이에 대한 연구가 시행되어야 할 것이다.

각 수술 병기에 따른 환자의 생존 기간의 차이는 통계적 유의성을 보여서 ($p=0.001$), 본 연구의 기존 수술병기에 따른 생존율의 유의성을 나타냄과 동시에, 본 연구에서는 또한 각 생물학적 표지자의 양성률에 따른 환자의 생존 기간의 차이 여부를 고찰 하였다. 비소세포 폐암 환자에서 EGFR의 발현율과 생존율의 유의한 관계는 이미 보고된 바가 있는데, 김 학렬¹⁹등은 57명의 환자에서 EGFR의 발현 유무와 세포의 S and G1 phase fraction정도를 비교하였을 때, 그리고 수술병기와 생물학적 표지자의 발현정도의 비교에서는 의미있는 결과를 도출하지 못하였으나 EGFR의 발현유무와 중앙 생존율의 유의한 관계를 보고 하였었는데, EGFR(+)군과 EGFR(-) 군에서 2년 생존율은 각각 53%, 84%였고, 중앙 생존기간은

각각 26개월, 53개월로($p<0.05$)보고 하였다. 그리고 Selvaggi G.²⁰ 등도 130명의 폐암 환자에서 EGFR의 발현정도에 따른 생존율을 보고 하였는데, 염색양성 기준 cut-off 값을 10%로 하였을 때 EGFR(+)군과 EGFR(-) 군에서 2년 생존율은 각각 43%, 70%였고, 중앙 생존기간은 각각 18개월, 50개월로 EGFR(+)군에서의 생존율이 유의하게 낮게 나타났다($p<0.001$). 본 연구에서는 각각의 중앙 생존기간이 33.5개월 과 71.8개월로 모두 약간 높은 수치를 나타냈는데 EGFR 양성군이 EGFR 음성군에 비해서 통계적으로 유의한 불량한 예후를 나타냈다($p<0.05$). 또한 이는 다변량 분석을 통해서 EGFR, MMP-9, *C-erbB-2* 및 수술적 병기에 대한 생존율의 hazard ratio를 각각 산출 하였을 때도 EGFR 양성자의 hazard ratio가 0.189(95% C.I.:0.052-0.679, $p=0.0107$)로 EGFR양성의 유무가 환자 생존에 있어서 중요한 역할을 함을 다시 확인 할 수 있었다.

폐암 환자에서 MMP-9의 염색정도와 생존율의 관계에 있어서는 Pinto CA⁵ 등은 152명의 선암 환자를 대상으로, 중앙 염색값인 11.2%를 기준으로 해서 MMP-9(+)군과 MMP-9(-)군으로 나누었을 때 MMP-9(+)군의 중앙 생존기간은 11개월로, MMP-9(-)군에서는 중앙 생존값에 이르지 못했으나 평균 생존기간을 >62개월로 보고 하였고 MMP-9의 염색정도와 환자의 불량한 예후와의 깊은 상관관계를 보고 하였다. ($p<0.05$) 그리고 Siene W등²¹도 비소세포 폐암 환자 143명을 대상으로 MMP-9의 염색 양상을 고찰 했을 때 homogeneous하면서 전체의 5-95%를 차지하는 경우에 있어서 MMP-9의 염색 정도와 환자의 불량한 생존율과 유의한 상관 관계가 있음을 보고 하였다. 본 연구에서는 MMP-9 양성군은 중앙 생존기간이 35개월로써 Pinto CA의 연구보다 다소 높게 나왔고 통계적 유의성은 없었지만, MMP-9 음성군의 65.3개월보다 불량한 생존 곡선의 양상을 나타냈으며, 다변량 분석을 통한 생존율 비교에서도 다른 변수들에 비해서 MMP-9이 양성일 경우 생존 여부의 hazard ratio가 0.386(95% C.I.:0.145-1.024, $P=0.058$)로 통계적으로 의미있는 값에 가깝게 보이므로, 환자 대상군을 늘려서 조사 한다면 유의성을 나타낼 것으로 사료된다. 그

리고 Cox등에 의하면 MMP-9의 경우에는 수술 병기가 초기일 때 MMP-9의 발현이 많이 된 경우에 환자의 예후가 나쁜 것으로 보고³ 하였고 EGFR과 MMP-9이 모두 발현 되는 경우에 예후가 나쁘다고 보고 한 바 있어 더 많은 연구가 지속되면 의미있는 결과가 도출될 것으로 사료된다.

또한 *C-erbB-2* 양성군은 중앙 생존기간이 44.2개월, *C-erbB-2* 음성군은 58.4 개월을 나타냈으나 통계적으로 유의한 차이는 없었는데, *C-erbB-2*의 경우는 발현이 증가 할수록 생존율이 오히려 증가하는 역비례의 관계를 보인 연구도 있고²², 발현율과 생존율이 상관없는 등²³ 다양한 결과를 보고하고 있는데, 본 연구에 있어서도 발현율과 생존율의 유의성이 나타나지 않았으며, 이에 대한 전향적 연구가 더욱 시행되어야 할 것이다.

한편 EGFR과 MMP-9 동시 양성군과 환자의 예후와의 상관 관계를 Cox 등³은 기술 하였는데, 비소세포 폐암 환자 167명중 36.5%인 61명의 환자의 폐암 세포 조직에서 EGFR과 MMP-9이 각각 20%이상 염색이 된 동시 양성 발현을 보였고, Cox proportional hazard regression analysis를 시행하였을 때, 혈관 숫자를 개수한 Chalkley count 이외에도 폐암 세포에서의 EGFR과 MMP-9이 동시 양성인 환자에서 생존 예후와의 상관 관계가 통계적으로 유의하게 불량한 예후를 나타냈다($p < 0.01$). 본 연구에서는 세포 EGFR과 MMP-9 동시 양성군은 전체 환자의 34.2%에서 나타났는데, 중앙 생존 기간이 26.9개월로써 EGFR과 MMP-9 동시 음성군의 77개월보다 통계적으로 유의한 불량한 예후를 나타냈으며, 이는 EGFR이 ras/MAP kinase 신호 전달 체계를 통해서 MMP-9을 상승 조절(up-regulation) 하는 기전으로 상호 영향을 미치고 있는 것으로 생각 할 수 있고, 이로써 비소세포 폐암 환자의 향후 예후를 예측하는데 있어서 EGFR과 MMP-9의 발현 정도가 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 EGFR과 MMP-9 동시 양성군은 중앙 생존 기간이 26.0개월로써 EGFR만 양성군의 54.0개월보다 통계적으로 유의한 생존율의 차이는 보이지 않았고, MMP-9 과 *C-erbB-2* 동시 양성군과 EGFR과 *C-erbB-2* 동시 양성군은 각각의 동시

음성군에 비해서 유의한 생존 기간의 차이를 보이지 않았는데 이는 *C-erbB-2*의 낮은 양성률과 염색 양성군과 음성군의 유의하지 않은 생존율의 차이 때문인 것으로 사료된다.

결론적으로, 다른 연구등에서 보고하고 있듯이 생물학적 표지자가 환자의 예후 추측 인자로 이용되고 수술후 항암 보조 약물 치료 등의 환자 치료 방침을 결정할 때 많은 도움을 줄 수 있는 것으로 사료되고, 본 연구에서 의 결과를 바탕으로 EGFR과 MMP-9의 발현율을 고찰 한다면 환자 예후와의 상관 관계를 예측하고 임상 치료에 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 비소세포 폐암의 예후와 치료 방향을 결정하기 위해서는 여러 다른 종류의 생물학적 표지자에 대한 연구와 함께 비소세포 폐암 중 선암과 편평상피세포암 이외의 세부 병리 조직에 대한 발현율 및 환자의 생존율에 관한 연구도 병행 되어야 하며, 환자의 생존율과 각 생물학적 표지자의 상관성에 대한 전향적 연구도 시행 되어야 할 것이다.

요 약

서 론 :

비소세포 폐암은 악성 종양 관련 사망의 중요한 원인 질환으로, 주요 병태생리 기전에 관여하는 EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2*의 발현 양상을 관찰 하는 것이 환자의 예후와 향후 치료 방향을 결정하는데 도움이 될 수 있다.

방 법 :

1995년 부터 2001년 까지 고려 대학교 의료원에 내원 후 원발성 비소세포 폐암 확진 후 외과절제술을 받은 81명 환자의 조직에 EGFR, MMP-9 및 *C-erbB-2* 면역 조직 화학 염색 및 정량화 후, 환자들의 특성 및 생존 기간과 함께, 조직 및 수술 병기에 따른 생물학적 표지자의 발현 양상을 후향적 고찰 하였다.

결 과 :

각 종양 조직 부위의 20%이상 염색되는 Grade 2 이상의 염색 양성률은, 편평상피세포암과 선암에서 EGFR은 75.0%와 63.4%, MMP-9은 43.3%와 43.9%, *C-erbB-2*는 23.3%와 22.0%를 보였다. 수술 병기가

I, II, IIIa 일때 EGFR 염색 양성률은 각각 75.0%, 66.7%, 76.9%, MMP-9은 41.7%, 47.6%, 46.2%, 그리고 *C-erbB-2* 는 19.4%, 40.0%, 30.8%를 보였다. EGFR 양성군은 중앙 생존기간이 33.5개월로 EGFR 음성군의 71.8개월보다 유의한 불량한 예후를 나타냈다.($p < 0.05$). 그리고 MMP-9 양성군은 중앙 생존기간 35개월로 MMP-9 음성군의 65.3개월보다 불량한 생존 곡선의 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 또한 *C-erbB-2* 양성군은 중앙 생존기간이 44.2개월, *C-erbB-2* 음성군은 58.4개월을 나타냈으나 통계적 유의한 차이는 없었다. EGFR과 MMP-9 동시 양성군은 전체 환자의 34.2%로서 중앙 생존기간이 26.9개월로 EGFR과 MMP-9 동시 음성군의 77.0개월보다 유의한 불량한 예후를 나타냈다($p < 0.05$)

결 론 :

비소세포 폐암 에서 EGFR의 양성군에서 음성군 보다 환자의 생존기간이 불량하였고, EGFR과 MMP-9의 동시 양성군에서 동시 음성군보다 생존기간이 불량하였다. *C-erbB-2*는 다른 생물학적 표지자에 비해서 낮은 염색 양성률을 나타냈으며 특이한 상관관계는 보이지 않았다.

참 고 문 헌

1. Osann KE, Ernster VL, Mustacchi P. Chapter 45. Epidemiology of lung cancer. In: Murray JF, Nadel JA, editors. Textbook of respiratory medicine. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, company; 2001. p. 1395-407.
2. Perez-Soler R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist* 2004;9:58-67.
3. Cox G, Jones JL, Andi A, Walker DA, O'Byrne KJ. A biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Thorax* 2001;56:561-6.
4. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-92.
5. Pinto CA, Carvalho PE, Antonangelo L, Garripa A, da Silva AG, Soares F, et al. Morphometric evaluation of tumor matrix metalloproteinase 9 predicts survival after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2003;9:3098-104.
6. Tsai CM, Chang KT, Perng RP, Mitsudomi T, Chen MH, Kadoyama C, et al. Correlation of intrinsic che-

7. Akita K, Inagaki H, Sato S, Niimi T, Maeda H, Ninomiya S, et al. P185^{HER-2/neu} and P21^{CIP1/WAF1} expression in primary tumors and lymph node metastases in Non-small lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1007-11.
8. Pfeiffer P, Calussen PP, Andersen K, Rose C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185 HER-2 patients with systematically untreated non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer* 1996;74:86-91.
9. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, et al. P185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990;50:5184-7.
10. Diez M, Pollan M, Maestro M, Torres A, Ortega D, Gomez A, et al. Prediction of recurrence by quantification of p 185neu protein in non-small cell lung cancer tissue. *Br J Cancer* 1997;75:684-9.
11. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839(Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2001;7:1459-65.
12. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621-30.
13. Schneider PM, Praeuer HW, Stoeltzing O, Boehm J, Manning J, Metzger R, et al. Multiple molecular marker testing(p-53, C-ki-ras, C-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000;83: 473-9.
14. Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NS, Gatter KC, Camichael J. Association between expression of 72-kilodalton gelatinase and tumour spread in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:574-8.
15. Rosenthal EL, Johnson TM, Allen ED, Apel IJ, Punturieri A, Weiss SJ. Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor and scatter factor stimulated invasion of carcinoma cells. *Cancer Res* 1998;58: 5221-30.
16. O-charoenrat P, Rhys-Evens P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 2000;86:307-17.
17. Cox G, Jones JL, O'Byrne KJ. MMP-9 and the ep-

- idermal growth factor receptor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2349-55.
 18. Llorens A, Rodrigo I, Lopez-Barcons L, Gonzalez-Garrigues M, Lozano E, Vinyals A, et al. Down regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhance a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab Invest* 1998;78:1131-42.
 19. Kim HR, Jeong ET. Expression of EGFR in non-small cell lung cancer and effects on survival. *Tuberc Respir Dis* 1997;44:1285-95.
 20. Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, de Giuli P, Borasio P, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28-32.
 21. Sienel W, Hellers J, Morresi-Hauf A, Lichtinghagen R, Mutschler W, Jochum M, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003;103:647-51.
 22. O'Byrne KJ, Cox G, Swinson D, Richardson D, Edwards JG, Lolljee J, et al. Towards a biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:S83-9.
 23. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997;15:2858-65.
-