대부종콜포회지 제8권 제4호 1997
Vol. 8, No. 4, Dec., 1997

자궁경부종양에서 Cathepsin-D 표현의 의의

경북대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*
이춘희 · 김세진 · 전상식 · 이택후 · 조영래 · 채종민*

=Abstract=

Significance of Cathepsin-D Expression in Uterine Cervical Neoplasia

Chun-Hee Lee, M.D., Sae-Jin Kim, M.D., Sang-Sik Chun, M.D.,
Tack-Hoo Lee, M.D., Young-Lae Cho, M.D., Jong-Min Chae, M.D.*
*Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology**
College of Medicine, Kyungpook National University, Taegu, Korea

Various clinical and histopathologic characteristics are currently used to obtain prognostic information about cervical carcinoma, but they do not predict accurately the outcome for any individual patients. Thus, there is a need to identify additional tumor characteristics that are able to predict more accurately the outcome for an individual patient with cervical cancer.

In this study, we explored the relationship between cathepsin-D expression and progression of the cervical neoplasia, the correlation between response to neoadjuvant chemotherapy and cathepsin-D expression, and we investigated if tumor cell cathepsin-D expression could serve as a prognostic factor in cervical carcinoma.

Tumor tissues were obtained from 14 patients with cervical intraepithelial neoplasia and 52 patients with squamous cell carcinoma of the cervix. Cathepsin-D expression was identified by immunohistochemical methods using monoclonal antibody cathepsin-D (BioGene).

Positive cathepsin-D immunoreaction in greater than 30% of carcinoma cells was scored as high expression.

High cathepsin-D expression was seen in 15 of 52 invasive cervical cancer but was absent in cervical intraepithelial neoplasia.

It was shown that cathepsin-D expression was independent of the tumor grade, tumor size, lymph node involvement, depth of invasion, parametrial invasion, and response to chemotherapy.

In disease free survival analysis by log-rank test, cathepsin-D expression was not significantly associated with survival.

These results show that cathepsin-D expression is not a clinically useful adjunct to assessment of prognosis in invasive squamous cell carcinoma of the cervix.

Keywords: Uterine cervical neoplasia, Cathepsin-D expression, Prognostic factor

I. 서 론

종양세포에서 분비되는 protease에 의한 기저막구조의 분해는 종양세포의 침윤과정에서 중요한 역할

을 한다고 알려져 있다.[1,2]

Cathepsin-D는 1979년 Westley와 Rochefort[3]가 처음으로 인간의 유방암 세포주에서 증명한 lysosomal protease이며 이는 종양의 증식과 extracellular matrix의 분해작용에 의한 종양의 전이 촉진에 관계한다고 한다.

유방암[4-7]과 방광암[8] 등에서 cathepsin-D의 표현 정도는 독립적인 예후인자로서의 의의가 증명되고 있으나 자궁경부암에 대한 연구는 아직까지 되고 있지 않다.

자궁경부암은 한국 여성의 부인암 중에서 그 빈도가 단연 높은 악성종양이며 요즈음의 치료 경향은 국소적으로 종양의 진행이 많이 된 경우에서 선행 항암화학요법을 실시하여 수술적 요법이나 방사선 치료 후의 생존율을 높이려는 방향으로 진행되고 있다.[9-11] 그러나 동일한 임상병기에서나 종양세포의 분화도가 비슷한 경우에서도 치료의 성적과 예후에서 많은 차이가 나타날 수 있기 때문에 치료전 종양조직에서 새로운 생물학적 악성도의 지표를 찾으려는 노력이 계속되고 있다.[12-14]

악성종양에 의한 사망의 원인 중 가장 중요한 전이에 대한 정확한 기전은 아직까지 밝혀져 있지는 않지만 기저막의 구성성분인 type IV collagen과 laminin의 분포양상[2]과 cathepsin-D protease 등의 전이에 대한 역할이 밝혀짐에 따라서[1-3] 이들의 임상적 적용이 최근에 많은 관심을 끌고 있다.

이에 저자는 자궁경부종양의 치료전 생검조직을 이용하여 면역조직화학염색 방법으로 cathepsin-D의 표현정도를 조사하여 cathepsin-D의 자궁경부종양의 진행에 관한 역할과 자궁경부암의 예후인자로서의 가능성을 조사하여 보았다.

II. 연구 대상 및 방법

조직학적으로 진단된 자궁경부의 상피내종양 14예와 침윤성 편평상피세포암 52예를 대상으로 하였으며 46예의 환자에서는 cisplatin을 기본으로 한 복합 선행 항암화학요법을 실시하였다.

면역조직화학 염색방법은 다음과 같이 하였다. 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매된 조직을 3㎛ 두께로 박절하여 ProbeOn plus 슬라이드(Fisher Scientific, PA, USA)에 부착하고 파라핀의 제거와 알코올의 수세 과정 이후 5분간 10% H_2O_2로 조직 내에 있는 peroxidase를 제거시키고 난 다음 조직내 항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 동물혈청으로 비특이성 항원을 차단시켰다. 이후 cathepsin-D에 대한 1차 항체(BioGenex, CA, USA)를 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 2차 항체로는 Vector Elite kit(Vector, CA, USA)로 10분간 반응시켰으며 DAB를 사용하여 발색반응을 일으킨 후 헤마톡실린으로 배경염색을 하였다. 면역조직화학염색의 정확한 판독과 발생반응의 정도를 비교하기 위하여 실험의 양성대조군으로 유방암 조직을 이용하였다. 종양조직 내에서의 cathepsin-D 표현은 종양세포에 따라서 그 표현정도에 차이가 많이 있었으나 종양세포 세포질내의 cathepsin-D에 대한 면역 염색반응에서 양성을 보이는 종양세포의 수가 전체적으로 30% 이상일 때 고표현군으로 표시하였으며 염색이 안된 경우를 포함하여 나머지군 모두를 저표현군으로 대별하였다(Fig. 1).

III. 연구 결과

침윤성 자궁경부암군에서 cathepsin-D의 고표현은 52예 중 15예에서 있었으며 자궁경부 상피내종양에서 고표현은 1예도 없었으나 자궁경부 상피내종양 14예 중 6예에서는 경한 정도의 cathepsin-D 표현양상은 관찰되었다(Table 1).

침윤성 자궁경부암의 기존의 임상병리조직학적 예후인자들인 종양 세포의 분화정도, 종양의 크기, 임파절 전이, 침윤의 깊이, 그리고 자궁방조직 침윤 등과 종양세포 내의 cathepsin-D 표현 정도와는 아무런 통계학적인 상관관계가 없었으며(Table 2) 치료 후의 무병생존율과 종양세포 내의 cathepsin-D 표현정도를 포함한 기존 예후인자들과의 통계학적 의의를 구하기 위하여 log-rank test를 실시한 결과 임파절 전이와 침윤의 깊이 그리고 종양의 자궁방 조직침윤은 통계학적인 의의가 있었으나 cathepsin-D 표현의 정도는 무병생존율과 아무런 상관이 없었다(Table 3).

IV. 고 찰

악성종양의 예후를 결정하는 여러 임상적 또는

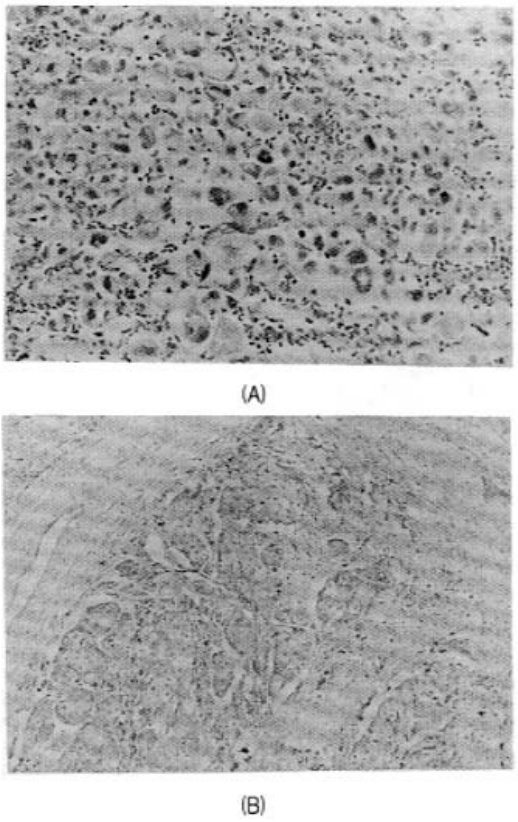

Fig 1. Immunohistochemical staining of invasive squamous cell carcinoma of the cervix with a monoclonal antibody to the cathepsin-D protein.
(A) Strong positivity for cathepsin-D in the cytoplasm of cancer cells. (x 200)
(B) Catheprin-D immunoreactivity was present in the tumor cell nests. (x 100)

Table 1. Expression of cathepsin-D in CIN and invasive cervical cancer

	Cathepsin-D Expression			
	High		Low	
	No.	%	No.	%
CIN	0	0	14	100
Invasive	15*	29	37	71

CIN: Cervical intraepithelial neoplasia
Low: were grouped together with the CD-negative cases
*$P < 0.05$ by the chi-square test

병리조직학적 인자들의 의의가 각각의 종양에서 차이가 많으며[15-17] 또한 동일한 임상병기나 세포의 분화도를 가진 악성종양에서도 항암약제에 대한 반응이나 수술 혹은 방사선요법후의 치료성적이 다양하게 나타날 수 있기 때문에 종양의 치료전 생검조직을 이용하여 악성종양조직의 맥관형성정도[14]와 종양세포의 apoptosis 출현 빈도[13] 등의 생물학적 성상을 예후 측정의 지표로 이용하려는 시도가 많이 되고 있으며 치료적인 영역에까지 응용이 되고 있다.[18] 또한 기저막의 구성 성분인 type IV collagen 과 laminin의 분포양상과[12] cathepsin-D 등의 protease 발현정도가 악성종양환자의 사망에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 가장 중요한 소견인 전이와 관계하여 최근에 많은 관심을 끌고 있다.[1-3] Cathepsin-D는 1979년 Westley와 Rochefort가 유방암세포주 MCF-7을 이용하여 처음으로 증명한 lysosomal protease인데 정상조직에서도 넓게 분포되어 있으나 유방암세포에서 가장 많이 분비되는 protease이다.

Cathepsin-D 농도는 유방암[4-7]과 자궁내막암[9] 등의 hormone 의존성 종양에서 steroid hormone receptor 표현과 밀접한 관계가 있으며 악성종양세포에서 분비된 protease는 기저막의 구성성분을 포함하여 extracellular matrix를 분해해서 종양의 전이를 촉진시킨다고 하며 또한 종양의 성장에도 관여한다고 한다.[1-3]

본 연구에서도 경한 정도의 종양세포 내 cathepsin- D 표현양성은 자궁경부 상피내종양에서도 관찰되었지만 고표현은 단지 침윤성 자궁경부암에서만 볼 수 있어서 어떤 기전으로든 종양세포의 cathepsin-D 표현정도는 종양의 침윤성과 관계가 있음을 알 수 있었다. 면역조직화학염색을 이용한 cathepsin-D의 발현정도나 악성종양조직의 cytosol extract의 cathepsin-D 양을 측정하여 유방암[4-7]과 방광암[9] 등에서 예후적 의의에 대한 연구가 많이 되어 있으면서 악성종양의 재발과 전이 그리고 생존율과의 관계에 대한 연구결과도 매우 다양하게 보고되고 있지만 자궁경부암에 대한 연구는 아직까지 많이 되어있지는 아니한 실정이다.

Scambia 등[9]은 자궁경부암세포에서 cathepsin-D양은 임상병리학적 예후인자들과 상관관계는 없었으나 cathepsin-D양이 많을수록 생존율을 포함하여 예후는 나빠지는 경향을 보였으며 선행항암화학요법에 반응이 없었던 예에서 종양세포 내 cathepsin-D양의 정도가 의미있게 낮았다고 하면서 cathepsin-D 표현이 낮

Table 2. Relation ship between expression of cathepsin-D and clinicopathologic characteristics in invasive cervical cancer

Characteristics	Cathepsin-D expression				P*
	High		Low		
	No.	%	No.	%	
Age					
< 50 yeats	5	29	12	71	
≥ 50 years	10	29	25	71	NS
Grade					
G 1-2	12	36	21	64	
G 3	8	42	11	58	NS
Tumor size					
< 4 cm	7	29	17	71	
≥ 4 cm	8	29	20	71	NS
Lymph node involvement					
No	10	29	25	71	
Yes	4	27	11	73	NS
Depth of invasion					
< 10 mm	9	30	21	70	
≥ 10 mm	4	22	14	78	NS
Parametrial invasion					
No	14	35	26	65	
Yes	2	22	7	78	NS
Response to chemotherapy					
Good	11	41	16	59	
Poor	6	32	13	68	NS

P* by the chi-square test

NS: not significant

Good: complete clinical and pathological response

Table 3. Disease Free Survival Analysis

Variable	Categories	P*
Cathepsin-D expression	High, Low	NS
Tumor size	≤ 4 cm, > 4 cm	NS
Node status	− , +	< 0.05
Invasion depth	≤ 1 cm, > 1 cm	< 0.05
Parametrial invasion	− , +	< 0.05

P* by Log - rank test

NS: not significant

은 예에서의 나쁜 예후는 화학요법에 대한 낮은 반응과 관계된다고 하였다.

면역조직화학염색을 이용한 저자의 경우에서는 종양세포의 cathepsin-D 표현의 정도는 자궁경부암의 기존의 임상병리학적 예후인자들과의 상관관계는 마찬가지로 없었으나 항암약물요법후 임상적 혹은 병리조직학적 소견에서 자궁경부암의 완전관해가 일어난 예에서 그렇지 않은 경우에 비하여 종양세포 내의 cathepsin-D 표현의 정도가 높은 경우가 많이 있었지만 통계학적인 의미는 없었으며 무병생존율과 종양세포 내의 cathepsin-D 표현의 정도 또한 아무런 관계가 없었다. 그러나 종양세포 내의 cathepsin-D 농

도나 종양세포의 cathepsin-D에 대한 면역조직화학적 염색방법을 이용한 유방암에서의 연구결과들을 살펴보면 종양세포 내의 cathepsin-D 양이 많거나 cathepsin-D 염색이 많이 되는 유방암에서 예후가 나쁘다고 하는 연구들[5-7]이 있는 반면 예후와는 아무런 관계가 없거나[6] 혹은 예후가 좋다고 보고한 예[4]도 있으며 방광암[8]과 자궁내막암[9]에서도 서로 상반되는 결과가 보고되는 등 아직까지는 cathepsin-D의 표현정도를 임상적으로 이용할 수 있는 예후인자로 적용하기에는 문제가 있다고 하겠다. 또한 같은 종양에서도 다양한 결과가 나올 수 있는 실험상의 문제로서는 기질을 포함한 종양조직내의 모든 cathepsin-D의 양을 측정하는 cytosol extract를 이용하는 방법과 종양세포 내의 면역조직화학염색을 이용하는 방법상의 차이와 동일한 면역조직화학방법을 이용한 경우라도 사용한 항체의 종류와 그리고 조직의 고정과 파라핀 포매 정도에 따른 cathepsin-D에 대한 면역반응의 영향 등을 들 수가 있겠다.[6]

이러한 이유 등으로 이미 고정된 종양조직을 이용하여 면역조직화학적 염색방법을 이용한 연구는 실험의 환경에 따라서 어느 정도 실험성적이 영향을 받을 수 있기 때문에 실험의 성적에 다소 신뢰성이 떨어질 수 있는 단점이 있다고 할 수 있겠다. 결론적으로 steroid hormone receptor를 갖고 있는 유방암[4-7]과 자궁내막암[9] 등의 hormone 의존성 종양에서 종양세포 내의 cathepsin-D 표현정도는 독립적인 예후인자로서의 가능성이 증명되고 있지만 자궁경부암에서의 결과는 자궁경부 상피내종양에서 침윤성암으로의 진행에 있어서 cathepsin-D가 관여는 되지만 예후인자로서의 가능성이나 기타 임상적 응용에는 문제가 있다고 하겠으며 새로운 실험방법과 실험대상자의 선정 등을 고려한 더 많은 연구가 필요하다고 생각한다.

V. 결 론

자궁경부암에서 동일한 종양세포의 분화도나 임상병기를 가진 경우라도 항암화학요법이나 방사선치료 후의 성적에 차이가 많이 나타나며 임상병기와 종양의 크기나 임파절 전이 그리고 침윤의 깊이 등의 임상병리 조직학적 예후인자들의 효용성의 제한 때문에 종양자체의 생물학적 악성도의 지표를 찾으려는 시도가 많이 되고 있어서 자궁경부 상피내종양 14예와 침윤성 편평상피 세포암 52예를 대상으로 종양세포 세포질내의 cathepsin-D 표현의 정도를 면역화학염색을 하여 다음과 같은 성적을 얻었다. 자궁경부 상피내종양군에서 cathepsin-D의 고표현은 1예도 없었으나 침윤성 자궁경부암군 52예 중 15예에서 고표현양상을 관찰할 수 있어서 cathepsin-D가 침윤성암으로의 진행과 관계 있음을 알 수 있었다.

종양세포 세포질내의 cathepsin-D 표현의 정도는 침윤성 자궁경부암의 기존의 임상병리조직학적 예후인자들인 종양세포의 분화정도, 종양의 크기, 임파절 전이, 침윤의 깊이, 그리고 자궁방 조직침윤 등과 아무런 통계학적인 상관관계가 없었다. 또한 무병생존율과도 아무런 상관관계가 없었으며 선행항암화학요법에 대한 종양의 반응도와도 의미 있는 상관관계를 볼 수 없어서 면역조직화학 염색방법을 이용하여 종양세포 세포질내의 cathepsin-D 표현정도를 조사하는 것은 침윤성 자궁경부암의 임상에 도움이 되지 않을 것으로 사료된다.

- References -

1. Briozzo P, Morisset M, Capony F et al: In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. Cancer Res 1988; 48: 3688-3692.
2. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P et al: Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. Cancer Res 1989; 49: 3904-3909.
3. Westly B, Rochefort H: Estradiol induced proteins in the MCF7 human breast cell line. Bioche Biophys Res Commun 1979; 90: 410-416.
4. Henry JA, McCarthy AL, Angus B et al: Prognostic significance of the estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. Cancer 1990; 65: 265-271.
5. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC et al: Cathepsin D and prognosis in breast cancer. N Engl J Med 1990; 322: 297-302.
6. Charpin C, Devictor B, Bonnier P et al: Cathepsin D immunocytochemical assays in breast carcinomas: Image analysis and correlation to prognostic factors.

Journal of Pathology 1993; 170: 463-470.

7. Isola J,Weitz S, Visakorpi T et al: Cathepsin D expression detected by immunohisto-chemistry has independendent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. J Clin Oncol 1993; 11: 36-43.
8. Liponnen PK: Expression of cathepsin D in transitional cell bladder tumors. Journal of Pathology 1996; 178: 59-64
9. Sesti F, Mantenuto L, Ciancaglini G et al: Chemotherapy of carcinoma of the cervix uteri. Current approaches. G Ital Oncol 1989; 9: 125-128.
10. Scambia G, Benedetti P, Foti E et al: Multiple tumour marker assay in advanced cervical cancer: relationship to chemotherapy response and clinical outcome. Eup J Cancer 1996; 32: 259-263.
11. Zarcone R, Bellini P, Cardone G et al: Chemotherapy and cervical cancer: present trends. Eur J Gynecol Oncol 1996; 17: 148-150.
12. Ehrmann RL, Dwyer IM, Yavner D et al: An immunoperoxidase study of laminin and type IV collagen distribution in carcinoma of the cervix and vulva. Obstet Gynecol 1988; 72: 257-262.
13. Kerr JFR, Winterford CM, and Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994; 73: 2013-2026.
14. Schlenger K, Hockel M, Mitze M et al: Tumor vascularity - a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. Gynecol Oncol 1995; 177: 57-63.
15. O'Brien DM and Carmichael JA: Presurgical prognostic factors in carcinoma of the cervix, Stages IB and IIA. Am J Obstet Gynecol 1987; 158: 250-254.
16. Burghardt E, Pickel H, Haas J et al: Prognostic factors and operative treatment of Stages IB to IIB cervical cancer. Am J Obstet Gynecol 1987; 156: 988-996.
17. Burke TW, Hoskins WJ, Heller PB et al: Prognostic factors associated with radical hysterectomy failure. Gynecol Oncol 1987; 26: 153-159.
18. Sledge GW: Implications of the new biology for therapy in breast cancer. Semin Oncol 1996; 23: 76-81.
19. Scambia G, Benedetti P, Ferrandina G et al: Significance of cathepsin-D expression in uterine tumors. Eur J Cancer 1995; 31A; 1449-1454.