

## 제1기 비소세포폐암에서 APT1 발현의 임상적 의미

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 내과학교실, <sup>2</sup>한림대학교 의과대학 춘천성심병원 내과학교실

신정아<sup>1</sup>, 이창률<sup>2</sup>, 변민광<sup>1</sup>, 장윤수<sup>1</sup>, 김세규<sup>1</sup>, 장 준<sup>1</sup>, 안철민<sup>1</sup>, 김형중<sup>1</sup>

## The Clinical and Pathologic Features according to Expression of Acyl Protein Thioesterase-1 (APT1) in Stage I Non-small Cell Lung Cancer

Jung Ar Shin, M.D.<sup>1</sup>, Chang Ryul Lee, M.D.<sup>2</sup>, Min Kwang Byun, M.D.<sup>1</sup>, Yoon Soo Chang, M.D.<sup>1</sup>, Se Kyu Kim, M.D.<sup>1</sup>, Joon Chang, M.D.<sup>1</sup>, Chul Min Ahn, M.D.<sup>1</sup>, Hyung Jung Kim, M.D.<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, <sup>1</sup>Yonsei University College of Medicine, Seoul, <sup>2</sup>Chuncheon Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

**Background:** Acyl protein thioesterase-1 (APT1) is a cytosolic protein that may function in the depalmitoylation of numerous proteins, including the Ras family. However, the clinical role of depalmitoyl thioesterase in human cancer is not known. We evaluated the APT1 expression in lung cancer tissue and its clinicopathological findings according APT1 expression pattern.

**Methods:** APT1 expression was examined by immunohistochemistry in the tumor tissue from 79 patients, who had undergone curative surgical removal of the primary lesion; all patients had been diagnosed with stage I non-small cell lung cancer between 1993 and 2004, at Gangnam Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea.

**Results:** The APT1 expression was seen in 50 out of 79 (63.3%) cases. The positive APT1 expression was significantly related with histologic subtype and T stage, but was not influenced by differentiation. The positive APT1 expression was not significantly related to patient age, gender, or smoking history. The median follow-up duration was 10.0 years; the 5-year survival rate was 71.0%. The positive APT1 expression group showed significantly worse overall survival and worse disease-free survival without statistical significance.

**Conclusion:** We conclude that positive APT1 expression in stage I lung cancer after surgery is closely associated with overall survival. To evaluate APT1 as a prognostic marker in lung cancer, comprehensive studies on advanced stage cases are needed.

**Key Words:** Acyl protein thioesterase; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung; Biological Markers

## 서 론

비소세포폐암은 전체 폐암의 75~80%를 차지하며 외과적 절제와 항암 약물요법, 방사선요법을 통한 적극적인 치료에도 불구하고 여전히 전세계적으로 가장 흔한 암 사

망의 원인이다<sup>1</sup>. 특히 근치적 절제술을 받은 1기 비소세포 폐암 환자의 20%, 2기의 30% 이상이 재발하는 것으로 알려져 있다<sup>2</sup>. 이러한 사실들을 바탕으로 병기나 조직학적 유형 이외에 폐암의 예후를 예측하고 나아가 치료 계획을 결정할 수 있는 생물학적 지표들에 대한 연구가 이루어지고 있다.

단백에 팔미틴산염기를 붙이는 단백질 아실 트랜스퍼레이즈(acyl transferase, PAT)는 여러 종류가 밝혀져 있지만 팔미틴산염기를 떼서 분리된 단백을 세포질로 이동하게 하는 탈팔미틴산화 타이오이스티라아제(thioesterase)는 포유류에서는 세 가지 종류 밖에 밝혀져 있지 않

Address for correspondence: **Hyung Jung Kim, M.D.**  
Department of Internal Medicine, Gangnam Severance Hospital, 712, Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-270, Korea  
Phone: 82-2-2019-3309, Fax: 82-2-3463-3882  
E-mail: khj57@yuhs.ac  
Received: Mar. 9, 2010  
Accepted: Mar. 31, 2010

다. 그 중 Ras 단백질에 작용하는 Acyl protein thioesterase-1 (APT1)은 라이소포스포라이페이스-1 (lysophospholipase-1, LYPLA1)로도 불리며, 세포질에 존재하는 단백질로 Ras 단백질 뿐 아니라 G 단백질, 내피 산화질소 합성효소 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 등에서 팔미틴 산염기를 떨어뜨리는 것으로 밝혀져 있다<sup>3</sup>. 특히 PAT에 대해서는 대장암을 포함한 여러 종양 질환들과 그 관련성이 밝혀져 있으나<sup>4</sup> 탈팔미틴산화 타이오이스터효소에 대해서는 충분한 연구가 이루어져 있지 않은 실정이다.

본 연구는 Ras 단백질의 팔미틴산화-탈팔미틴산화 균형을 조절하는 APT1을 근치적 수술을 받은 1기 비소세포폐암 환자 79명의 조직에서 발현을 평가하여 APT1의 발현 양상과 임상 요소들 간의 상관관계를 확인하고 예후 인자의 의미가 있는지 알아보려고 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 환자 선정과 조사 방법

1993년부터 2004년까지 연세대학교 의과대학 강남세브란스병원을 방문하여 조직학적으로 원발성 비소세포폐암으로 진단받은 후 근치목적으로 절제술을 시행 받은 환자 중 제1병기 비소세포폐암 환자 79명을 대상으로 하였다. 수술 전후로 재발이 발견될 때까지 항암화학요법이나 방사선요법을 받은 적이 없는 환자들을 대상으로 하였다.

### 2. 면역조직화학 염색 방법

10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 probe-on 슬라이드에 부착하여 자일렌으로 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 연속적으로 재수화시키고, 내인성 과산화효소 작용을 차단하기 위해 3% 과산화수소수로 처리하였으며, 조직의 고정과 파라핀 포매 과정에서 감추어졌던 항원을 노출시키고 복구하여 예민도를 높이기 위해 구연산 완충액(pH 6.0)에 담근 후 700 W 마이크로파로 15분간 처리하였다. 다클론 항체인 rabbit anti-lysophospholipase 1 (Abcam, Cambridge, UK) 1:200 희석액을 떨어뜨려 습윤 상태의 실온에서 2시간 반응시킨 후 제초회사 권고에 따라 EnVision™ Detection Systems (Dako Co., Carpinteria, CA, USA)을 이용하여 표준화된 avidin-biotin 면역조직화학염색 방법으로 시행하였다. 발색시약으로 Diaminobenzidine을 사용하였으며 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

매 실험마다 rat liver 조직을 양성대조군으로 염색하였으며<sup>5</sup>, 인접한 정상 기관지 상피를 internal reference로 사용하였다. 면역조직화학 염색판정은 발현 비율과 발현 강도의 합산으로 하였고 총점 1점 이하를 cut-off로 책정하였다. 발현 비율은 염색양성세포의 비율에 따라 4단계로 분류하였다(0, 양성세포 5% 미만; 1+, 양성세포 5~30%; 2+, 양성세포 30~50%; 3+ 양성세포 50% 이상). 발현 강도는 약하게 발색되는 것을 0점, 중등도로 발색되는 것을 1점, 강하게 발색되는 것을 2점으로 점수를 매겼다. 모든 슬라이드는 2명의 숙련된 병리과 의사가 이중맹검법(double blind method)으로 광학현미경 200배 하에서 여러 필드를 관찰하여 판정하였다.

### 3. 통계적 분석

통계 처리는 PC용 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 임상병리학적 인자와 APT1 발현 정도와의 관련성을 평가하기 위해 t-test와 chi-square test를 이용하였다. 환자들의 생존기간 산출은 Kaplan-Meier Method를 사용하였으며, 각 군간의 생존을 비교는 다른 인자와의 연관성을 배제하고 APT1과 예후와의 상관성을 확인하기 위해 multivariate analyses를 이용하여 Cox proportional hazard model을 이용하였다. Multivariate analysis에는 연령, 성별, ECOG를 포함하였다.  $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 환자들의 특성

전체 환자 중 61명(77.2%)이 남성이었고, 18명(22.8%)이 여성이었으며, 평균 연령은 61.32세(31~83세)였다. 39명(49.4%)이 편평상피세포암이었고, 25명(31.6%)은 선암, 13명(16.5%)은 세기관지폐포암중, 2명(2.5%)이 대세포암이었다.

### 2. APT1 발현과 임상병리학적 인자들과의 관련성

APT1은 50명(63.3%)에서 양성 발현이 관찰되었다(Table 1, Figure 1). 모든 조직병리학적 아형의 암에서 APT1은 세포질에서만 균질하지 않게 발현되었고 핵 내 발현은 없었다(Figure 1B, D, E, inset).

환자의 나이, 성별이나 흡연력은 발현 양성군과 음성군 사이에 유의한 차이가 없었으며, 분화도도 발현 양성군과 음성군 사이에 차이가 없었다. 그러나 종양의 크기를 반

Table 1. Analysis of the patients with stage 1 NSCLC according to the expression status of APT1

	Total	APT-1 expression		p-value
		Negative	Positive	
Age, yr*		62.86±8.97	60.44±9.79	0.278
Gender				0.119
Male	61	25	36	
Female	18	4	14	
Smoking				0.143
Never-smoker	32	9	23	
Ex/Current smoker	47	20	27	
(Pack-years)*		49.15±22.82	41.17±24.78	0.265
Histologic subtypes				0.035 <sup>†</sup>
SCC	39	16	23	
Adenocarcinoma	25	10	15	
BAC	13	1	12	
Large cell carcinoma	2	2	0	
Grade of differentiation				0.779
Well	26	9	17	
Moderate	24	8	16	
Poor	17	6	11	
Unclassified	12	6	6	
TNM stage				0.002 <sup>†</sup>
T1N0M0 (IA)	29	5	24	
T2N0M0 (IB)	50	24	26	
Distant metastasis	16	3	13	0.081
Recurrence	23	6	17	0.159
Cancer-related death	19	6	13	0.403
Mean survival time (95% CI), mo				
Disease-free		133.60 (111.24~155.95)	122.13 (107.45~136.81)	0.226
Overall		153.83 (136.53~171.13)	131.69 (120.32~143.07)	0.038 <sup>†</sup>
Total evaluated	79	29	50	

NSCLC: non-small cell lung cancer; SCC: squamous cell carcinoma; BAC: bronchioloalveolar carcinoma; TNM: tumor-node-metastasis; CI: confidence interval.

\*Mean±standard deviation, <sup>†</sup>p-value <0.05.

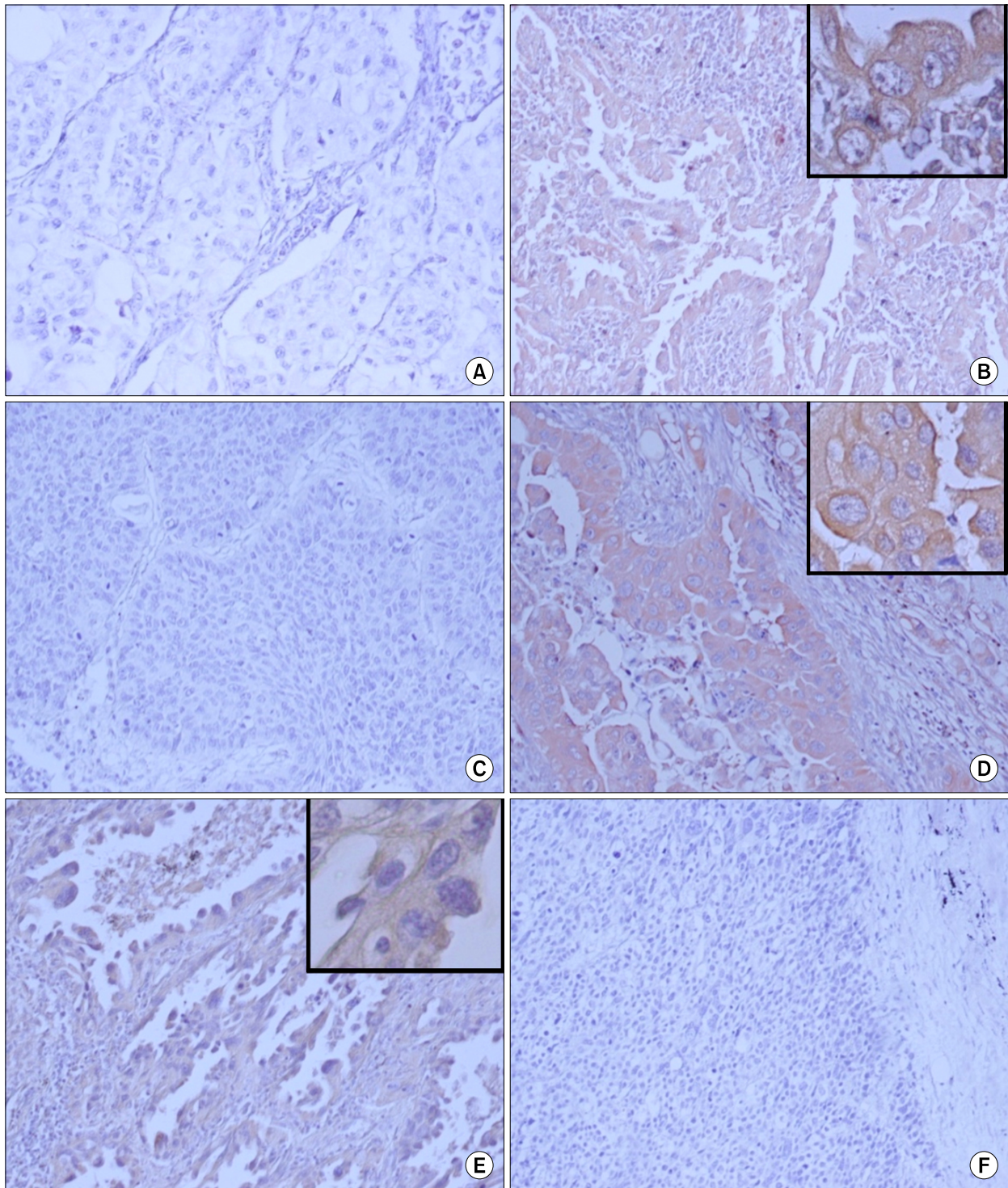
영하는 T 병기에 따른 APT1 발현율은 IA 병기 24/29 (82.8%), IB 병기 26/50 (52.0%)로 종양의 크기가 증가할 수록 APT1 양성률이 감소하는 경향을 보였다(p=0.002,  $\chi^2$  test). 또 조직병리학적으로 APT1의 발현율은 편평상피세포암 16/39 (55.2%), 선암 15/25 (60.0%), 세기관지 폐포암 12/13 (92.1%), 대세포암 0/2 (0.0%)으로 세기관지폐포암중에서 유의하게 APT1 발현율이 높았다(p=0.035,  $\chi^2$  test) (Table 1).

### 3. APT1 발현에 따른 재발률 및 생존율의 비교

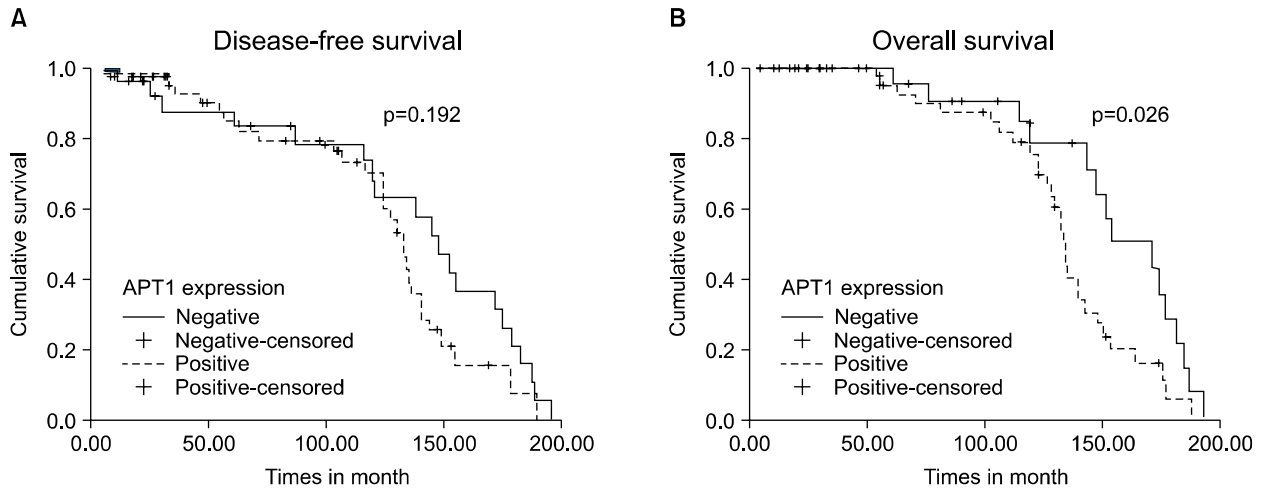
전체 환자들의 중앙 생존기간은 9.97년(95% confidence interval [CI], 8.96~10.98년)이었고, 5년 생존율은

70.9%이었다. 25명(31.6%)이 추적 중 사망하였으며 이 중 19명(24.1%)이 폐암과 관련하여 사망하였다. 추적 중 23명(29.1%)이 재발하였으며 이 중 16명(20.3%)은 원격전이 발견되었다. 비록 유의성은 없었지만 APT1 양성군에서 더 많은 원격전이(13/50 [26.0%] vs. 3/29 [10.3%], p=0.081)와 재발(17/50 [34.0%] vs. 6/23 [26.1%], p=0.159)이 관찰되었다. 또한 무병생존기간도 양성군이 음성군보다 짧았다(122.13개월[95% CI, 107.45~136.81개월] vs. 133.60개월[95% CI, 111.24~155.95개월], p=0.226).

아울러 전체 생존 기간(overall survival)은 APT1 양성군에서 음성군에 비해 유의하게 짧았다(131.69개월[95%



**Figure 1.** APT1 expression in lung cancer tissues. An adenocarcinoma has no APT1 expression (A), whereas other has strong (B; inset,  $\times 400$ ). Also squamous cell carcinoma shows no expression (C) vs, strong expression (D; inset,  $\times 400$ ). Most of bronchioloalveolar carcinoma (E) and large cell carcinoma (F) has no APT1 expression ( $\times 200$ ) (Immunohistochemistry).



**Figure 2.** Survival analysis of stage I lung cancer patients according to APT1 expression. The positive expression of APT1 do not significantly influence disease-free survival (A) but showed worse overall survival (B) of lung cancer patients.

CI, 120.32~143.07개월] vs. 153.83개월[95% CI, 136.53~171.13개월],  $p=0.038$ ) (Table 1, Figure 2).

### 고찰

초기 병기의 비소세포폐암은 수술 절제로 완치를 기대할 수 있으나 재발률은 여전히 높다. 따라서 지속적으로 예후와 관련하여 종양의 병기와 조직학 유형의 분류가 새로이 개정되고 있으며, 그 외에도 예후와 관련된 종양의 생물학적 표지자의 발굴에 대한 연구가 진행되어 오고 있다. 본 연구에서는 수술적 절제술을 받은 제1기 비소세포 폐암 환자의 종양 조직에서 면역조직화학염색법을 통해 APT1 발현이 종양 크기와 전체 생존 기간에 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다.

APT1은 탈팔미틸산화 과정을 통해 대표적으로 Ras 단백질의 팔미틸산화-탈팔미틸산화 균형을 조절하는 것으로 알려져 있다. Ras와 MAPK를 통한 신호전달 통로는 암 형성 과정에 다양한 방식으로 관여하는데 식도암이나 유방암에서는 Ras의 유전자 증폭 및 과발현이 관련 있으며, 악성흑색종이나 갑상선 유두종의 경우는 Ras가 아닌 B-raf에 의한 MAPK 활성화와 관련되며, 난소장액샘암종의 경우에는 K-ras나 B-raf와 무관한 MAPK 활성화와 관련되어 있다. 폐암에서는 K-ras의 활성돌연변이로 인한 MAPK 활성화가 Ras 관련 암 형성의 주요 기전으로 밝혀졌다<sup>6</sup>. K-ras 돌연변이는 폐 선암에서 발견되는 Ras 돌연변이의 90%를 차지하며, 비소세포폐암에서 발견되는 K-ras 돌연

변이의 97%가 코돈 12나 13의 점돌연변이다<sup>7</sup>.

MAPK는 여러 성장인자를 포함한 다양한 신호에 반응하여 활성화되며, GTP-의존 방식에 의해 K-ras와 직접적으로 작용하며 여러 통로의 조절 이상으로 세포사멸을 유도한다. 암유발성 Ras는 세포막 뿐만 아니라 세포질그물과 골지체에서도 활성화되며, 골지체에서 활성화된 Ras의 신호전달 역시 온전한 형질전환력을 가지면서 세포막에서 보내는 신호전달과 비교하여 크게 차이가 없거나<sup>8</sup> 지속되는 경향을 보인다<sup>9</sup>. 따라서 APT1의 과발현이 단백질의 팔미틸산화-탈팔미틸산화 간의 균형을 깨뜨려 Ras의 지질대극소화와 막 결합력을 떨어뜨리면 이로 인해 MAPK 활성화가 약화될지, 오히려 세포질 내 APT1의 농도가 증가하여 Ras의 골지체-세포질그물을 통한 지속적인 신호전달이 활성화될지에 대해서는 아직까지 뚜렷하게 밝혀진 바가 없다.

기존 연구에서 K-ras 돌연변이는 폐 선암 내에서 흡연군에서도 발견되는 한편, 비흡연자의 17~20%에서도 발견되는 것으로 알려져 있다<sup>7</sup>. 본 연구에서 APT1의 발현은 흡연력과 상관관계가 없었다.

기존의 생체 외 실험에서 K-ras 돌연변이는 암 형성 과정의 초기 단계에서 중요한 것으로 알려져 있으나<sup>10</sup>, 본 연구에서는 T2 병기보다 T1 병기에서 APT1 발현 양성률이 높았다. 그러나 통계학적인 의미를 얻지는 못했지만 APT1 발현 양성군에서 원격전이와 재발이 많이 발생하는 경향과 무병생존기간의 감소를 보였으며 통계학적으로 의미 있는 전체생존기간의 감소를 보였다. 이런 결과는

APT1이 종양의 성장, 침습 및 전이에 영향을 줄 것으로 생각되며, 유의한 결과를 얻기 위하여 많은 증례와 다양한 설계의 연구가 필요할 것으로 생각한다.

K-ras 돌연변이는 세기관지폐포암종을 포함하여 폐 선암에서는 15~30%까지 발견되는데 비해 다른 조직학적 아형에서는 거의 발견되지 않는다. 특히 세기관지폐포암종의 경우, 비점액형의 6~14%, 점액형의 67~76%까지도 K-ras 돌연변이가 관찰된다<sup>11,12</sup>. 본 연구에서는 다른 조직학적 아형에 비해 특히 세기관지폐포암종 12/13 (92.3%)에서 APT1이 발현되었으며, K-ras 돌연변이를 포함한 세기관지폐포암종의 암 형성에 특히 APT1이 연관될 것으로 추정된다.

그러나 다른 조직학적 아형보다 상대적으로 양호한 것으로 알려진 세기관지폐포암종에서와, T2 병기보다 T1 병기에서 더 높은 빈도의 APT1의 발현에도 불구하고 APT1 양성군은 전체생존기간의 감소 등 불량한 예후를 보였다. 이는 세기관지폐포암종의 환자수가 적어 적은 빈도의 재발과 사망에도 상대적으로 높은 비율을 차지하게 된 것이 하나의 이유일 것으로 추정된다. 더 의미 있는 결과를 얻기 위해서는 더 많은 환자군에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 폐 편평상피세포암의 16/39 (55.3%)에서도 APT1의 발현이 관찰되는 점을 볼 때, APT1이 폐암의 암 형성 과정에 관여하는 것이 비단 돌연변이형의 Ras뿐만 아니라, 야생형의 Ras나 eNOS 등 암 형성 과정에 관여할 수 있는 다른 APT의 기질들과도 관련성이 있을 가능성을 시사한다. APT1과 폐암의 암 형성 과정에 대한 깊이 있는 연구를 위해서는 Ras, eNOS 등 후보 단백질과의 이중 염색과, 환자의 K-ras 돌연변이 상태 확인 등을 통해 APT1과의 연관성을 밝히는 것이 필요하겠다.

본 연구는 암조직에서의 APT1의 발현 양상과 그 임상적 의미를 찾고자 한 첫 연구이나 증례 수가 충분하지 않고 제1병기에서만 관찰한 결과로 암 형성 과정에서 진행, 침습 및 전이 과정에서의 역할을 평가하는 데 한계가 있다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
2. Subotic D, Mandaric D, Radosavljevic G, Stojic J, Gajic M, Ercegovac M. Relapse in resected lung cancer revisited: does intensified follow up really matter? A prospective study. *World J Surg Oncol* 2009;7:87.
3. Wang A, Dennis EA. Mammalian lysophospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1439:1-16.
4. Baekkeskov S, Kanaani J. Palmitoylation cycles and regulation of protein function (Review). *Mol Membr Biol* 2009;26:42-54.
5. Sugimoto H, Hayashi H, Yamashita S. Purification, cDNA cloning, and regulation of lysophospholipase from rat liver. *J Biol Chem* 1996;271:7705-11.
6. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK Pathway. *J Thorac Oncol* 2006;1:7-9.
7. Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS Mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:201-5.
8. Quatela SE, Philips MR. Ras signaling on the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:162-7.
9. Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, et al. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 2002;4:343-50.
10. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 2001;410:1111-6.
11. Sakuma Y, Matsukuma S, Yoshihara M, Nakamura Y, Noda K, Nakayama H, et al. Distinctive evaluation of nonmucinous and mucinous subtypes of bronchioalveolar carcinomas in EGFR and K-ras gene-mutation analyses for Japanese lung adenocarcinomas: confirmation of the correlations with histologic subtypes and gene mutations. *Am J Clin Pathol* 2007;128:100-8.
12. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:857-65.