

위암 조직에서 Integrin $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ 아단위의 발현

연세대학교 의과대학 내과학교실, 외과학교실[†], 소화기병연구소, Brain Korea 21 Project for Medical Sciences*

감창우 · 박승우 · 신 올* · 김현욱 · 김한수 · 송시영 · 정재복 · 강진경 · 노성훈[†]

Expression of Integrin $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ Subunits in Gastric Cancer

Chang Woo Gham, M.D., Seung Woo Park, M.D., Yule Shin*,
Hyun Wook Kim, M.D., Han Soo Kim, Ph.D., Si Young Song, M.D.,
Jae Bock Chung, M.D., Jin Kyung Kang, M.D., and Sung Hoon Noh, M.D.[†]

Departments of Internal Medicine and Surgery[†], Institute of Gastroenterology,
Brain Korea 21 Project for Medical Sciences*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: The integrins play a central role in maintaining the morphology of cell and tissue, growth, differentiation, migration, survival and apoptosis of cells, and angiogenesis. Although integrins are implicated in carcinogenesis and tumor angiogenesis, their precise contributions to the process are largely unknown. **Methods:** For paraffin embedded tissue samples of 102 gastric cancers (23 differentiated, 79 undifferentiated), the expression of integrin $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ subunits and factor VIII were examined by immunohistochemical staining. The relationships between the expression of each integrin and several clinicopathologic parameters were analyzed. **Results:** The positive rates of integrins were as follows: $\alpha 5$ 24%, $\beta 1$ 8%, $\alpha 6$ 16%, $\beta 4$ 24%, αV 29%, and $\beta 3$ 34%. The expression of $\alpha 5$, $\alpha 6$, and αV was well correlated with the expression of $\beta 1$, $\beta 4$, and $\beta 3$, respectively. The αV integrin was highly expressed in tumors of advanced T stage. The expressions of $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrins were significantly higher in differentiated tumors, but the $\beta 3$ integrin was significantly expressed in undifferentiated tumors. The number of tumor vessels has positive correlation with αV integrin expression. **Conclusions:** These findings suggest that integrin $\alpha 6\beta 4$ is one of the key factors in determining tumor differentiation and growth pattern. The integrin $\alpha V\beta 3$ may be related to the angiogenesis especially in advanced gastric cancer. (*Korean J Gastroenterol* 2002;40:355-363)

Key Words: Stomach neoplasms; Integrin; Immunohistochemical stain

서 론

Integrin은 세포와 세포, 세포와 세포의 기질 간의 부착에

중요한 역할을 하는 수용체군이다.¹⁻⁴ 모든 integrin은 경세포막 당단백(transmembrane glycoprotein)인 α 와 β 아단위(subunit)의 비공유적 결합으로 이루어져 있는데, α 와

접수: 2002년 6월 24일, 승인: 2002년 10월 8일
연락처: 박승우, 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: (02) 361-5484, Fax: (02) 393-6884
E-mail: swoopark@yumc.yonsei.ac.kr

Correspondence to: Seung Woo Park, M.D.
Department of Internal Medicine, Yonsei University College of
Medicine
134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-361-5484, Fax: +82-2-393-6884
E-mail: swoopark@yumc.yonsei.ac.kr

β 아단위는 각각 비교적 긴 세포외 영역, 짧은 경세포막 영역, 그리고 다양한 길이의, 끝에 카르복실기를 가진 세포내 영역으로 이루어져 있다.¹ 현재까지 서로 다른 18개의 α 아단위와 8개의 β 아단위들의 조합으로 형성된 24개 이상의 $\alpha\beta$ 이형체(heterodimer)가 알려져 있다.⁵ 이와 같이 서로 다른 아단위들이 다양하게 조합을 이룸으로써 integrin이 여러 가지의 세포외 기질 단백질들을 인식하고 반응할 수 있게 된다. Integrin은 세포의 부착, 이동, 세포내 골격 형성과^{1,2} 세포의 증식, 분화, 그리고 혈관형성에 중요한 역할을 하며, 이는 세포막을 경계로 하여 세포로부터 기질로, 기질로부터 세포로 향하는 양방향의 신호전달에 의한다.^{6,9}

위암은 우리 나라에서 발생하는 가장 흔한 암이며 세계적으로도 폐암 다음으로 흔한 암이다. 위암의 발생에는 위 축성 위염과 관련된 *Helicobacter pylori*의 감염, 장상피 화생 등의 연관성이 보고되어 있으나 현재까지 발암과정에 관련된 유전적 변이에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다. 위암은 역학적인 측면에서 볼 때 다음 두 가지의 조직학적 아형으로 분류된다. 장형(intestinal type)은 분화도가 비교적 좋고 세포들 간의 결합이 유지되어 뚜렷이 구별되는 선(gland)을 형성하면서 성장하며 육안으로는 주로 Borrmann 1, 2형에 해당한다. 미만형(diffuse type)은 분화도가 나빠 선을 형성하지 않으며, 흔히 인환세포(signet-ring cell)들과 점액이 관찰되는 경우로서 종양세포들이 침윤성으로 성장하여 육안으로는 주로 Borrmann 3, 4형을 보이며 예후가 불량하다.¹⁰ 그러나 위암의 발암과정에서 실제로 어떠한 유전적 변이나 기전을 통하여 이러한 분화와 성장 양상의 차이를 보이는지에 대해서는 아직 명확히 밝혀진 바가 없다.

본 연구는 세포의 증식, 분화, 그리고 혈관형성 등에 관여하는 여러 가지 integrin의 아단위들에 대하여 위암 조직에서 면역조직화학염색을 시행함으로써, 그 결과를 TNM 병기, 조직학적 분화도 등과 비교 분석하여 위암에서의 integrin의 역할을 규명해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1995년부터 1998년까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 근치적 또는 고식적 위절제술을 시행받은 102예를 대상으로 하였고, 임상소견은 의무기록을 통하여 조사하였다.

2. 방법

1) 수술 조직

10% 포르말린 고정 후 파라핀 용액에 포매된 조직을 이용하여 5 μ m 두께로 박편한 슬라이드에 염색을 시행하였다. 각 종양 박편을 먼저 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색을 시행하여 조직학적 분화도에 따라 분화형(well and moderately differentiated type)과 미분화형(poorly differentiated and signet-ring cell type)으로 구분하였다.

2) 면역조직화학염색

Integrin $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ 아단위들에 대한 항체(goat polyclonal, Santa Cruz[®] Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 이용하여 avidin-biotin-peroxidase complex method로 시행하였다. 간략히 기술하면, 슬라이드를 Xylene에 20분간 2회 담구어 파라핀을 제거한 후 100% 에탄올에 5분간 3번, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30% 에탄올에 순서대로 1분씩 채수화하였다. 이후 각 과정이 끝날 때마다 phosphate buffered saline을 사용하여 충분한 세척을 시행하였다. Peroxidase 활성화를 차단하기 위하여 100% 메탄올 200 ml와 30% 과산화수소수 2 ml의 혼합액(0.3% H_2O_2 in methanol)에 20분간 처리하였다. 항원을 노출시키기 위하여 슬라이드가 citrate buffer 용액에 잠긴 채로 microwave 오븐에서 3분간 가열한 후 흐르는 수돗물로 식혔으며, 10%로 희석된 당나귀 혈청을 이용하여 1시간 동안 비특이적 결합을 차단하였다. 일차 항체 처리는 monoclonal 항체를 1:200(최종 농도, 1 μ g/ml)으로 희석하여 사용하였으며 4°C에서 약 16시간 동안 시행하였다. 이차 항체와 streptavidin (conjugate) (DAKO[®], Glostrup, Denmark) 처리는 각각 30분씩 시행하였다. Chromogen 처리는 현미경으로 확인하면서 3분30초 가량 시행하였고, hematoxylin 원액으로 대조염색을 시행하였다.

3) 면역조직화학염색의 판독

뚜렷한 세포막의 염색을 보이는 종양세포가 전체의 10% 이상을 차지하거나, 미만성의 세포질 염색을 보이는 세포가 전체의 40% 이상을 차지하는 경우를 양성으로 정의하였다. 양성으로 정의된 경우, 발현 정도에 따라 50% 이상의 종양세포에서 세포질 또는 세포막에 강 염색상으로 보이는 경우를 2+, 기타 양성인 경우를 1+로 하였으며 음성으로 판정된 경우는 0으로 정의하였다. 조직 박편 내에 포함되어 있는 정상 조직에서의 염색상을 함께 판독하여 종양부와 비종양부 간의 발현 정도를 비교하였다. Integrin 아단위의 발현과 혈관생성 사이의 상관관계를 분석하기 위하여 혈관 내피세포 표지자인 Factor VIII (von Willebrand factor)에 대한 항체(mouse, DAKO)를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 현미경상 관상 또는 타원형의 구조를 보이

면서 내피세포로 둘러싸여 있어 분명하게 미세혈관으로 판단되는 구조만을 대상으로, 200배 시야에서 종양 부위 중 신생혈관의 밀도가 가장 높아 보이는 두 곳에서 그 수를 센 다음 평균값을 구하였다.

3. 통계 분석

각 integrin 아단위의 발현 여부와 종양 조직의 분화도, 그리고 병리학적 T, N 병기와와의 상관관계에 대해서는 분할표를 이용한 chi-square test와 비모수 Binomial test를 사용하였다. 또한 Spearman's correlation coefficients (γ)의 결정을 통하여 각 integrin 아단위의 발현 여부 사이의 연관성에 대하여 조사하였고, 종양부의 미세혈관 수와 각 integrin 아단위의 발현 정도 사이의 상관관계에 대해서는 Independent-samples t test를 이용하였다. 모든 통계 분석은 SPSS 10.0 프로그램을 사용하였고, p<0.05를 통계적으로 유의한 기준으로 판단하였다.

결 과

1. 환자군의 특성

총 102명(남자 53명, 여자 49명)의 평균 연령은 46±15(범위, 18~80)세였다. AJCC 병기 분류법에 의한 병리학적 TNM 병기로 구분하였을 때 I/II 병기가 53예, III/IV 병기가 49예였다. 조직의 분화도에 따라서는 분화형이 23예, 미분화형이 87예였고, T 병기에 따라서는 T1/T2 병기가 41예, T3/T4 병기가 61예였다. 림프절 전이 여부는 전이가 없었던 경우가 47예, 전이가 있었던 경우가 55예였다(Table 1).

Table 1. Characteristics of the Patients

Age* (yr, range)	46±15 (18-80)
Sex (M/F)	53/49
TNM stage	
I & II / III & IV	53/49
T stage	
T1 & T2 / T3 & T4	41/61
N stage	
Node negative / positive	47/55
Differentiation [†]	
Differentiated / Undifferentiated	23/79

* Mean±SD.

[†] The differentiated type includes well and moderately differentiated types and the undifferentiated type includes poorly differentiated and signet-ring cell types.

2. Integrin 아단위들의 발현 양상

각 integrin 아단위들은 종양세포의 세포막 또는 세포질에서 발현되었으며 세포막에만 선명하게 염색되는 경우, 세포막과 세포질에 모두 강하게 염색되는 경우, 세포질에만 약하게 염색되는 경우, 세포질에만 강하게 염색되는 경우, 전혀 염색이 되지 않는 경우 등으로 분류되었다. 50% 이상의 종양세포에서 세포막에 강하게 염색되는 경우에는 거의 모든 예에서 세포질에도 강하게 염색되는 경향을 보였다. 비종양부의 정상 상피세포에서도 발현 양상은 비슷하였으나(Fig. 1A, B) 종양부와 동일한 양상을 보이지는 않았다. α5, β1, α6, β4 아단위들에서는 발현이 주로 위 내강쪽(정상 조직에서는 점막층) 부위에서 연속적인 발현을 보이는 경우가 많았지만, αV와 β3 아단위에서는 종양의 심부에서 더 많은 발현이 관찰되는 경우가 많았으며 발현 위치가 연속적이지는 않았다(Fig. 1D).

종양 부위에서 각 아단위의 양성률은 α5 24%, β1 8%, α6 16%, β4 24%, αV 29%, β3 34%로 αV와 β3 아단위의 발현 양성률이 가장 높았으며, β1 아단위의 양성률이 가장 낮았다. 종양부에서의 integrin 발현 정도를 비종양부에서와 비교해 보았을 때, α6와 β4 아단위는 비종양

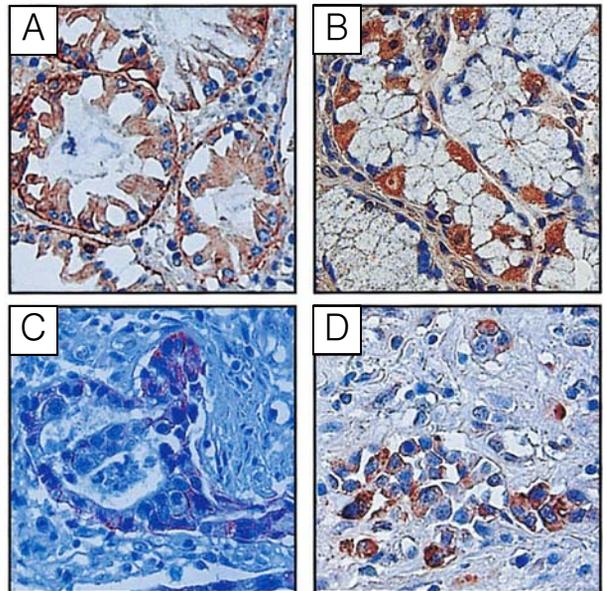


Fig. 1. Immunohistochemical staining of gastric cancers and normal tissues. Pictures are taken from a few excellent immunohistochemical staining cases. Immunohistochemical staining revealed strong reactivity (A) on plasma membrane with the anti-α6 antibody and (B) in focal cytoplasm with anti-β4 antibody on normal gastric mucosal epithelium. (C) Strong expression of β4 on membrane is seen on differentiated-type cancer. (D) Anti-αV antibody shows cytoplasmic staining on undifferentiated-type cancer (immunohistochemical stain, ×400).

부위에 비하여 중앙 부위에서 발현이 감소된 경우가 많았다(감소된 경우: α6 63% (64/102), β4 41% (42/102)) (Fig. 2). 그러나 α5, β1, αV, β3 아단위는 대부분 중앙 부위와 비중앙부의 발현 정도가 유사하였다. 각 위암 조직에서 발현되는 양상에 대하여 여러 아단위들 간의 상관관계에서는 α5와 β1, α6와 β4, 그리고 αV와 β3가 상호 연관성이 있었다(p<0.05) (Table 2).

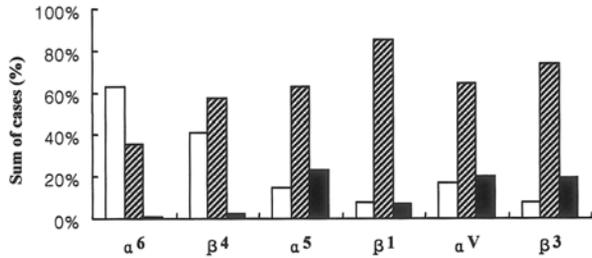


Fig. 2. Changes of integrin expression level at tumor region compared with non-tumor region. The bar represents incidence (%) of decreased (□), equivalent (▨), and increased (■) expression levels compared to non-tumor region. While the α6 and β4 expressions were decreased at tumor region frequently (α6 63%, β4 41%), α5, β1, αV, and β3 showed little changes in the majority of cases.

Table 2. Correlation between Expression of the Each Subunit

Subunits	α5	α6	αV
β1	0.268*	-0.026	0.132
β3	0.135	-0.028	0.621*
β4	0.074	0.396*	0.048

Data are expressed as correlation coefficients (γ).

* p<0.05.

3. 중앙 부위에서 Integrin의 발현과 병리학적 특성과의 상관관계

Integrin의 발현은 나이나 성별과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 조직학적 분화 정도에 따라 비교해 보면, α6와 β4 아단위의 발현율은 분화형에서 각각 39% (9/23), 61% (14/23)로 미분화형에서의 9% (7/79), 13% (10/79)보다 의미 있게 높았으며, 인환 세포형(signet-ring cell type)에서는 모두 음성이었다(Fig. 3). 그러나 αV와 β3 아단위의 발현율은 분화형에서 각각 13% (3/23), 13% (3/23)로 미분화형에서의 34% (27/79), 41% (32/79)보다 낮았으나, β3의 경우만 통계학적인 의미가 있었다(Fig. 4). α5와 β1 아단위에서는 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이가 없었다. 중앙 병기에 따른 비교에서는, αV와 β3 아단위의 발현율

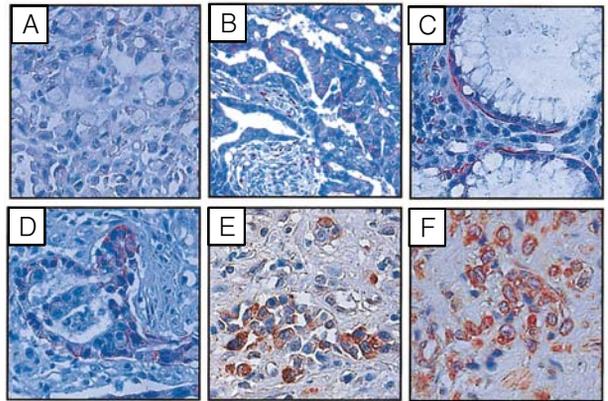


Fig. 3. Expression patterns of integrins in gastric cancer. (A) α6 is not expressed in signet-ring cell type tumor, (B) but is distinctly expressed on differentiated-type tumor on the cell membrane. (C) β4 expression is seen on the normal region and (D) on differentiated type tumor. (E) αV and (F) β3 show higher expression rates in tumor of undifferentiated-type or of advanced T stage (immunohistochemical stain, ×400).

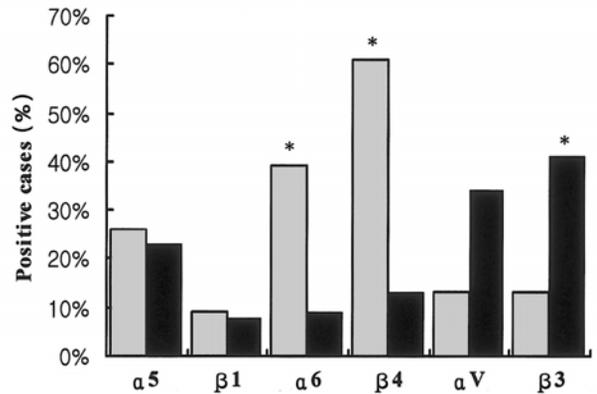


Fig. 4. Integrin expression according to differentiation of gastric cancer. The bar represents the percentage of positive cases in differentiated-type (■) and undifferentiated-type (■) tumors. The expression rates of α6 and β4 were higher in the differentiated-type tumors (α6 39%:9%, β4 61%:13%), while β3 showed significantly higher expression rate on the undifferentiated-type tumors (13%:41%) (*p<0.05).

은 T1/T2 병기에서 각각 15% (6/41), 29% (12/41)로 T3/T4 병기에서의 39% (24/61), 38% (23/61)보다 낮았으나, αV 아단위의 경우만 통계학적인 의미가 있었다(Fig. 5). α5와 β1, α6와 β4 아단위에서는 T 병기에 따른 발현율의 차이가 없었다. 림프절의 전이 여부에 따라서는 αV와 β3 아단위의 발현율은 림프절 전이 양성에서 각각 38% (21/55), 42% (23/55)로 림프절 전이 음성에서 19% (9/47), 26% (12/47)보다 높았으나 통계학적인 의미는 없었다. α5와 β1, α6와 β4 아단위에서는 림프절의 전이 여부에 따른 발현율의 차이가 없었다.

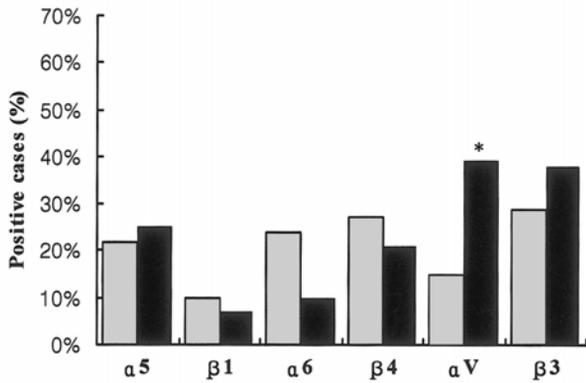


Fig. 5. Integrin expression according to T stage of gastric cancer. The bar represents the percentage of positive cases in T1/T2 stage (■) and T3/T4 stage (■) tumors. Statistically significant expression of αV integrin was seen on the majority of the advanced T stage tumor cases (15%:39%) (*p<0.05).

4. Integrin의 발현과 혈관생성과의 상관관계

αV와 β3 아단위는 주로 인환 세포형을 포함한 미분화 형에서 발현되었는데, 종양 부위에서 αV와 β3 아단위가 발현되는 부위와 factor VIII 양성을 보이는 미세혈관이 주로 관찰되는 부위는 서로 일치하였다(Fig. 6). 종양부의 혈관생성 정도와 비교시 αV와 β3 아단위의 발현 정도가 높을수록 미세혈관이 발달된 경우가 많았으며, αV의 경우 발현 정도가 0이었던 경우가 평균 13개의 미세혈관 수를 보인 반면 2+의 경우 평균 31개를 보임으로써 의미 있는 차이를 보였다(p<0.05, Fig. 7). 그러나 α5와 β1, α6와 β4 아단위의 발현은 혈관생성 정도와 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

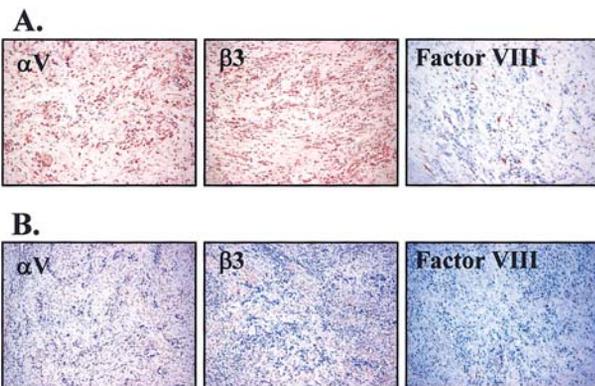


Fig. 6. Angiogenesis and expression of integrin αV, β3. (A) αV and β3 integrin subunits were highly expressed on the advanced T stage gastric cancer. (B) On the contrary, negative staining of αV, β3, and factor VIII was seen on the T1 stage tumors (immunohistochemical stain, ×200).

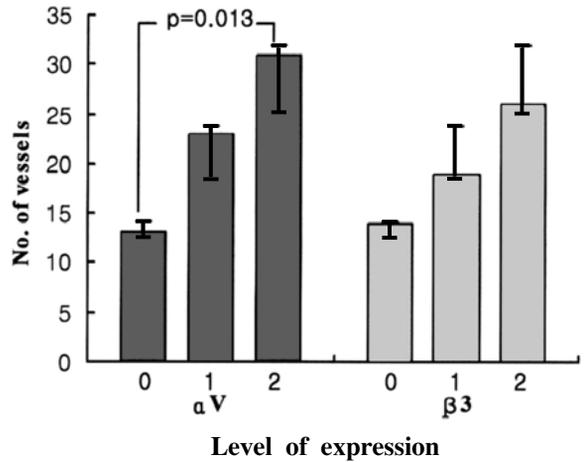


Fig. 7. Correlation between angiogenesis and expression level of integrin αV and β3. The number of vessels was positively correlated to expression level of αV (p=0.013). Similar pattern was shown in the case of integrin β3. The level of expression was defined as follows: 2+, >50% of tumor cells were strongly stained regardless of the site; 1+, <50% of tumor cells were stained; 0, no cells were stained.

고찰

세포와 세포 간의 결합을 매개하는 구조에는 adherens junction, tight junction, desmosome, gap junction 등이 있고, 세포와 기질 간의 결합을 매개하는 구조에는 focal adhesion과 hemidesmosome이 알려져 있다. 이들 결합을 매개하는 세포 부착 분자들에는 cadherin, immunoglobulin (Ig) superfamily, selectin, mucin, 그리고 integrin의 다섯 가지 군이 포함된다.¹¹ α와 β 아단위로 구성되어 있는 integrin은 주로 focal adhesion에서 세포와 기질의 결합을 매개하는데 α 아단위가 세포의 기질의 리간드와 결합하고 세포 내부에서는 β 아단위가 세포골격 단백질의 하나인 actin과 결합한다. 과거에는 integrin이 세포의 기질의 단백질과 세포 내부의 골격단백 사이의 연결을 매개함으로써 일차적으로는 세포의 모양과 조직의 형태를 유지하는 단순한 결합 단백질로서의 역할만을 수행한다고 생각되었다. 그러나 근래에는 다양한 생리적 조절 즉, 발생, 창상 치유, 염증반응, 세포의 이동 및 분화 등에도 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. Integrin은 α, β 아단위가 결합한 이형체 단백질로서 현재까지 서로 기능이 다른 18개의 α 아단위와 8개의 β 아단위가 알려져 있는 매우 복잡한 단백질군으로, 각각의 α,β 아단위가 결합하여 24가지 이상의 다양한 이형체를 형성한다. 그리고 integrin을 구성하는 β 아단위의 종류에 따라 결합하는 세포의 기질의 리간드에 대한 특이성이 부여되며, integrin을 매개로 한 세포와 기질 간의 결합을 통

하여 세포 내부에서 세포외 기질로, 기질에서 세포 내부로 향하는 양방향 신호전달이 이루어진다. 또한 integrin은 세포외 기질에 존재하는 리간드와 결합할 뿐 아니라, 세포막에서는 여러 성장인자 수용체(growth factor receptor)와 서로 신호를 주고 받는다는 사실이 최근 알려지고 있다.

세포의 성장과 분화에 관련된 대부분의 단백질은 발암과정에서 암세포의 성장, 분화, 사멸 등에도 핵심적인 역할을 담당한다. Integrin 역시 발생과 분화에 필수적인 역할을 수행하는 단백질로, 발암과정과 같은 병적 상태에서도 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 저자 등은 위암 조직에서 면역조직화학염색을 통하여 integrin $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ 아단위의 발현을 분석함으로써, 위암의 발암과정에 있어서 integrin의 역할에 대해 알아보려고 하였다.

본 연구에서는 integrin이 정상 세포에서 정상적으로 발현되는 세포 부착 수용체군임을 감안하여, 판독의 오류를 최소화하기 위하여 중앙부에서 뚜렷하게 발현이 관찰되는 경우만을 양성으로 정의하였다. 타 연구에서 integrin $\beta 4$ 의 양성률이 분화형의 경우 90.5%, 미분화형의 경우는 70.5%로 보고되었던 것에 비하여,¹² 본 연구에서는 61%, 13%로 낮았던 가장 큰 이유는 판독시 보다 엄격한 기준을 적용하였기 때문으로 생각된다.

대부분의 integrin은 세포내 영역이 50개 이하의 아미노산으로 구성되어 있어 그 길이가 짧으나, $\beta 4$ 아단위에서만은 유독 1,000개 이상의 아미노산으로 구성되어 있어¹ 세포내 영역이 매우 크다. 이러한 $\beta 4$ 아단위는 $\alpha 6$ 아단위와 결합하여 기질에 존재하는 리간드 중의 하나인 laminin과¹³⁻¹⁵ 결합한다. $\alpha 6\beta 4$ integrin의 특징인 이러한 큰 $\beta 4$ 세포내 영역이 $\alpha 6\beta 4$ integrin의 세포골격간 상호작용 및 신호전달 체계를 조정하는 데에 많은 역할을 한다고 알려져 있으나, 그 특정 부위 및 특성의 규명은 현재까지 이루어지지 않고 있다. Knock-out 마우스와 형질변환 마우스 연구를 통하여 명확하게 밝혀진 $\alpha 6\beta 4$ integrin의 주된 기능은 특히 상피에서 세포의 모양과 상피조직의 형태를 유지하는 것이다.¹⁶⁻¹⁸ 대부분의 integrin 이형체는 세포 내에서 actin과 결합하는데 반하여 $\alpha 6\beta 4$ integrin은 세포 내에서 intermediate filament와 연결되어 있는 세포 결합 구조인 hemidesmosome에 집중적으로 분포하고 있다.¹⁹ Hemidesmosome은 여러 단백질의 복합체로서 상피 세포들을 기저막에 부착하고, 세포골격을 세포외 기질에 연결하는 역할을 한다.^{20,21}

본 연구에서 $\alpha 6\beta 4$ integrin은 대부분의 분화형 선암에서는 세포막을 따라 강하게 염색되는 양상을 보였으나, 인환세포형을 포함한 미분화형은 매우 낮은 양성률을 보였고 염색되는 부위도 주로 세포질에 국한되었다. 분화형의 위암은 세포와 세포 간의 결합이 유지된 채 선조직의 형태를 이루면서 팽창하는 양상으로 증식하여 주로 Borrmann 1, 2

형의 육안적 형태를 보이지만, 미분화형의 위암세포는 세포와 세포 간의 결합이 미약하며 개개의 세포가 원 종피에서 탈락하여 주변의 기질로 침윤하면서 성장하여 주로 Borrmann 3, 4형의 육안적 형태를 보인다. 분화형 위암에서 $\alpha 6\beta 4$ integrin의 세포막 분포가 유지되어 있다는 점은, 정상 조직에서 hemidesmosome에 집중되어 있는 $\alpha 6\beta 4$ integrin이 세포와 조직의 형태를 유지하는 기능을 담당하듯이 위암 조직의 분화도와 형태를 결정하는 중요한 역할을 담당할 수 있다는 점을 시사한다. 이를 뒷받침하는 것으로 위암 절제 조직에서의 면역조직화학염색상 $\beta 4$ integrin의 양성률이 분화형 암에서 미분화형 암에 비하여 유의하게 높았으며, integrin $\beta 4$ 양성군에서 유의하게 복막 전이가 낮았고, 이를 SCID 마우스를 이용한 xenograft 모델에서 확인한 연구가 있었다. 또한 방광암에서 integrin $\beta 4$ 발현의 감소가 laminin을 따라서 암세포의 이동성을 증가시킴으로써 암세포가 상피조직내에서 측면으로 확산되어 가는 소견과 관계가 있다는 보고도 있다.²² 본 연구 결과도 역시 integrin $\alpha 6\beta 4$ 가 발암과정에서 억제 역할을 할 가능성을 시사하고 있으나 이와 상반된 보고들도 있다. 과발현된 integrin $\alpha 6\beta 4$ 가 암세포의 성장과 침윤에 관련된 HGF (hepatocyte growth factor)의 수용체인 C-Met에 의하여 인산화됨으로써 Shc 및 PI3K와 결합하여 하부 신호전달 경로인 Ras-및 PI3K-신호전달 경로를 활성화시킨다는 연구가 있었다.²³ 다른 연구에서는 $\alpha 6\beta 4$ integrin이 phosphoinositide 3-OH Kinase (PI3K)의 활성화를 통해, 상피세포 및 암세포의 이동과 침윤에 대한 신호전달 체계에 중요한 역할을 하며, 여기에는 C-Met뿐 아니라 ErbB-2와 같은 여러 성장인자 수용체 등과의 상호 신호전달(crosstalk)이 관여한다고도 보고되었다.²⁴⁻³⁰ 이와 같은 서로 상반된 연구 결과는 첫째, 조직에 따라 발암과정에 관여하는 $\alpha 6\beta 4$ integrin의 역할에 차이가 있을 수 있으며 둘째, $\alpha 6\beta 4$ integrin을 매개로 하는 신호전달이 세포외 기질 리간드와 결합을 통한 경로는 물론, 세포막에 위치하는 여러 성장인자 수용체와 상호작용을 통한 경로가 복잡하게 얽혀 있기 때문에, 다른 신호전달 경로의 활성화 또는 불활성화 상태에 따라 $\alpha 6\beta 4$ integrin에 의한 생물학적 영향이 다르게 나타날 수 있음을 시사한다. 위암 조직에서 시행된 $\alpha 6\beta 4$ integrin 발현에 대한 연구는 매우 드물어서 본 연구와 타 연구들의 결과를 종합하면 $\alpha 6\beta 4$ integrin은 위암세포의 분화도와 밀접한 관련을 가지며 이는 암세포의 침윤성에 억제인자로서의 기능을 수행할 것으로 판단된다. 본 연구에서 자료를 제시하지는 않았으나 전암병변으로 인정되는 장상피화생을³¹ 보이는 비종양부에서도 $\alpha 6$ 와 $\beta 4$ 아단위는 강한 발현을 보이고 있어, 위암 발생과정의 초기 단계에서 선조직의 형태를 유지하는 단계에서는 $\alpha 6\beta 4$ integrin의 발현이 유지된다고

추정된다.

고형암의 지속적인 성장에는 성장에 필요한 산소와 영양분을 공급해 줄 새로운 혈관을 생성하도록 자극하는 능력과 혈관신생을 통해 종양세포를 혈액순환 내로 전파시키는 능력이 필수적이며 이는 원발암의 성장은 물론 전이성 병변의 성장에도 필수적인 요소이다.³²⁻³⁴ 최근 수년간 종양의 혈관신생과 관계된 많은 분자들이 확인되었는데, 혈관내피 성장요소(vascular endothelial growth factor, VEGF), VEGF 수용체, angiopoietin들, Tie 수용체, integrin과 matrix proteinase가 이에 속한다.^{35,36} Integrin에서는 α5β1과 αVβ3 등이 혈관신생과 관계가 있으며,³⁷ 인간의 제대 내피세포에서 발현을 보이는 integrin αVβ3와 51은 *in vitro* 상에서 상호간의 신호전달이 관찰되기도 하였다.³⁸⁻⁴⁰ Integrin α5β1은 주로 focal adhesion에 분포하는 세포결합 단백질로서 세포외 기질에 분포하는 fibronectin과 주로 결합하며, β1 아단위의 세포내 영역 미부의 변이에 따라 β1A, β1B, β1C와 β1D로 나누어지는데 변이형에 따라 기능상의 차이가 있다.⁵ Focal adhesion은 세포의 이동시 세포외 기질에 세포를 부착시킴으로써 세포골격의 수축에 따라 세포가 전방향으로 움직일 때 지지점의 역할을 하며, focal adhesion을 통한 신호전달은 세포의 운동성과 생존성에 영향을 준다. 따라서 α5β1 integrin은 Bcl-2 발현을 증가시켜 세포의 생존성을 증가시키고,⁴¹ 기질분해효소인 MMP-2 (matrix metalloproteinase-2), MMP-3, MT1-MMP의 발현을 증가시켜 세포의 침윤성,⁴² 세포의 운동성⁴³ 및 신생혈관의 생성을 증가시킨다. 저자 등은 위암이 진행병기일수록, 침윤성이 높은 미분화형일수록 integrin α5, β1의 발현이 증가할 것으로 예상하였으나, 본 연구에서는 종양부에서 integrin α5, β1의 양성률은 24%, 8%로 비종양부와 차이를 보이지 않았고 T-병기에 따른 양성률의 차이도 보이지 않았다. 이는 위암의 진행에 있어서 α5β1 integrin의 역할을 배제하는 소견으로 해석되나, β1 아단위는 α5 아단위뿐만 아니라 α1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 아단위와도 이형체를 형성하기 때문에,⁴² 다른 α 아단위와 결합을 통하여 침윤성에 영향을 줄 가능성은 배제할 수 없다.

Integrin αVβ3에 대한 길항제가 혈관생성이 이루어지고 있는 혈관 부위에서 apoptosis를 유발함으로써 종양의 퇴행을 촉진한다는⁴⁴ 연구가 있었던 이래로, 혈관생성과 integrin αVβ3의 관계를 뒷받침하는 여러 연구 결과들이 발표되었다. 그 작용 기전에 대해서는 COX-2와 Cdc42/Rac 의존형 내피세포의 이동과 관련되어 있다는 연구가 있다.⁴⁵ 본 연구에서 αV, β3 integrin 아단위는 주로 진행된 T 병기의 위암세포에서 발현되었고 그 발현 부위는 factor VIII의 발현 부위와 동일하였으며, β3 integrin 아단위는 미분화형에서 발현율이 유의하게 증가되어 있었다. 이러한 결과는

위암(특히 미분화형)에서 integrin αVβ3가 신생혈관의 생성에 중요한 역할을 담당할 가능성을 시사한다. 또한 다른 연구에서는 αVβ3가 암의 혈관신생에 관여하며, 이러한 혈관신생이 종양의 성장과 전이에 있어서 필수적이라는 점을 바탕으로 integrin αVβ3에 대한 humanized monoclonal antibody (Vitaxin)를 이용하여 암에 대한 항혈관생성 치료의 제 1상 임상시험을 수행하여, Vitaxin의 안전성과 잠재적 항암 효과를 보여 주었다.⁴⁶ 그러나 최근의 한 연구에서는 β3 integrin 또는 β3, β5 integrin의 knock-out 마우스가 생존이 가능하였으며, 또한 생식 능력이 있었고, 오히려 병적인 상태에서는 혈관신생이 증가됨을 보여 줌으로써, αVβ3와 αVβ5 integrin이 혈관 발달이나 병적 혈관신생에서 필수적은 아니라는 상반된 주장을 하였다.⁴⁷ 이러한 연구 결과들이 차이를 보이는 점은 혈관신생 과정에는 특정 integrin이 단독으로 작용하는 것이 아니라, integrin과 integrin, integrin과 여러 성장요소 수용체, 그리고 세포외 기질 간의 상호복합적 작용이 관여하기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 본 연구에서 αVβ3 integrin의 발현이 미세혈관 수와 밀접한 연관을 가지면서 진행된 병기에서 발현율이 높다는 점은 αVβ3 integrin이 위암의 진행과정에서 중요한 역할을 담당할 수 있다는 점을 시사한다. 추후 이의 규명을 위하여 αVβ3 integrin 형질전환 세포주를 이용한 *in vivo* xenograft 모델에서 신생혈관의 생성에 대한 분석과 항 αVβ3 integrin 항체를 이용한 실험적 치료 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 integrin α6β4는 위암의 분화와 관계가 있으며 발암과정에서 억제 역할을 하고, integrin αVβ3는 특히 진행된 위암에서의 혈관신생과 관련되어 있을 가능성이 높다고 생각된다. 그러나 integrin군에는 여러 아단위가 존재하고 아단위들이 결합하여 더욱 많은 수의 이형체를 형성함으로써 다양한 신호전달 경로에 관여하며, 세포막 성장인자 수용체와도 얽혀 있는 복잡한 신호전달 경로를 고려할 때 단순한 인과관계의 범칙으로만 설명하기는 어렵다. 따라서 향후 integrin의 역할을 규명하기 위한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험이 지속적으로 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적: Integrin은 세포의 부착, 이동, 증식, 분화, 그리고 혈관형성에 중요한 역할을 한다고 알려진 세포막 수용체 군이다. 그러나 위암 발암과정에서 integrin의 역할은 아직 명확하지 않은 상태이다. 본 연구는 위암 발암과정과 관련이 있을 것으로 예상되는 α5, α6, αV, β1, β3와 β4 아단위를 선택하여 위암 조직에서의 발현과 병리조직학적 특성 및 임상적 특성을 비교하였다. 대상 및 방법: 파라핀

용액에 포매된 102개의 위암 조직을 avidin-biotin-peroxidase complex method로 면역조직화학염색을 시행하였다. 조직학적 분화도에 따라 분화형(well and moderately differentiated type 23예)과 미분화형(poorly differentiated and signet-ring cell type 79예)으로 구분하였다. 총 종양세포의 10% 이상에서 세포막에 뚜렷하게 염색되거나, 40% 이상에서 세포질 내에 약하게 염색되는 경우를 양성으로 정의하였으며, 그 발현 정도는 50% 이상의 종양세포에서 강하게 염색된 경우를 2+, 그 이하는 1+, 음성 판정시는 0으로 정의하였다. 종양내 혈관신생 정도는 현미경 200배 한 시야상의 미세혈관 수로 정의하였다. 결과: 각 아단위의 양성률은 $\alpha 5$ 24%, $\beta 1$ 8%, $\alpha 6$ 16%, $\beta 4$ 24%, αV 29%, $\beta 3$ 34%로, 양성 여부는 $\alpha 5$ 와 $\beta 1$, $\alpha 6$ 와 $\beta 4$, 그리고 αV 와 $\beta 3$ 가 상호관련이 있었다($p < 0.05$). 조직학적 분화 정도에 따라 $\alpha 6$ 와 $\beta 4$ 의 경우 발현율이 분화형에서 미분화형에 비하여 의미 있게 높았으며, $\beta 3$ 의 경우엔 미분화형에서 발현율이 더 높았다($p < 0.05$). 종양 병기에 따라 비교해 보았을 때, αV 가 진행된 T 병기의 위암에서 의미 있게 높은 발현율을 보였다($p < 0.05$). αV 와 $\beta 3$ 는 주로 미분화형에서 발현되었으며, 발현 위치는 factor VIII과 동일하였다. 종양부의 혈관생성 정도와 비교시 αV 의 발현 정도에 따라 미세혈관 수가 의미 있는 차이를 보였다($p < 0.05$). 결론: Integrin $\alpha 6\beta 4$ 는 위암의 분화도와 성장 양상을 결정짓는 주 요소들 중의 하나로서 위암 발암과정에서 억제 역할을 할 가능성이 있으며, 진행된 위암에서 발현이 증가하는 integrin $\alpha V\beta 3$ 는 신생혈관의 생성과 연관이 있을 것으로 추정된다. 향후 이의 규명을 위한 형질전환세포를 이용한 *in vivo* xenograft 동물 모델에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

색인단어: 위암, Integrin, 신생혈관, 면역조직화학염색

참 고 문 헌

- Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-554.
- Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990;8:365-400.
- Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87:1-5.
- Giancotti FG. Complexity and specificity of integrin signaling. *Nat Cell Biol* 2000;2:E13-E14.
- Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 2001;11:466-470.
- Faull RJ, Ginsberg MH. Inside-out signaling through integrins. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:1091-1097.
- Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:766-771.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:220-231.
- Lauren PA, Nevalainen TJ. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma: A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer* 1993;71:2926-2933.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. *Molecular cell biology*, 4th ed. New York: Freeman, 2000.
- Ishii Y, Ochiai A, Yamada T et al. Integrin 64 as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology* 2000;118:497-506.
- Mercurio AM. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol* 1995;5:419-423.
- Kikkawa Y, Sanzen N, Fujiwara H, Sonnenberg A, Sekiguchi K. Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *J Cell Sci* 2000;113:869-876.
- Pouliot N, Connolly LM, Moritz RL, Simpson RJ, Burgess AW. Colon cancer cells adhesion and spreading on autocrine laminin-10 is mediated by multiple integrin receptors and modulated by EGF receptor stimulation. *Exp Cell Res* 2000;261:360-371.
- Dowling J, Yu QC, Fuchs E. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol* 1996;134:559-572.
- Raghavan S, Bauer C, Mundschau G, Li Q, Fuchs E. Conditional ablation of $\beta 1$ integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination. *J Cell Biol* 2000;150:1149-1160.
- van der Neut R, Krimpenfort P, Calafat J, Niessen CM, Sonnenberg A. Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin beta4 null mice. *Nat Genet* 1996;13:366-369.
- Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H et al. Integrin $\alpha 6\beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 1991;113:907-917.
- Schwartz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW. Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:461-491.
- Borradori L, Sonnenberg A. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:647-656.

22. Harabayashi T, Kanai Y, Yamada T et al. Reduction of integrin $\beta 4$ and enhanced migration on laminin in association with intraepithelial spreading of urinary bladder carcinomas. *J Urol* 1999;161:1364-1371.
23. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for $\alpha 6\beta 4$ integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 2001;107:643-654.
24. Nguyen BP, Gil SG, Carter WG. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:31896-31907.
25. Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the $\alpha 6\beta 4$ integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997;91:949-960.
26. O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM. Release of cAMP gating by the $\alpha 6\beta 4$ integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J Cell Biol* 1998;143:1749-1760.
27. O'Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the $\beta 4$ integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 2000;148:253-258.
28. Gambaletta D, Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, Falcioni R. Cooperative signaling between $\alpha 6\beta 4$ integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 2000;275:10604-10610.
29. Hintermann E, Bilban M, Sharabi A, Quaranta V. Inhibitory role of $\alpha 6\beta 4$ -associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on $\alpha 3\beta 1$ integrin. *J Cell Biol* 2001;153:465-478.
30. Shaw LM. Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the $\alpha 6\beta 4$ integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol Cell Biol* 2001;21:5082-5093.
31. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 1991;32:1110-1113.
32. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
33. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407.
34. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
35. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.
36. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessels formation. *Nature* 2000;407:242-248.
37. Rupp PA, Little CD. Integrins in vascular development. *Circ Res* 2001;89:566-572.
38. Simon KO, Nutt EM, Abraham DG, Rodan GA, Duong LT. The $\alpha V\beta 3$ integrin regulates $\alpha 5\beta 1$ -mediated cell migration toward fibronectin. *J Biol Chem* 1997;272:29380-29389.
39. Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin $\alpha V\beta 3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin $\alpha 5\beta 1$ and protein kinase A. *J Biol Chem* 2000;275:33920-33928.
40. Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. *Am J Pathol* 2000;156:1673-1683.
41. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6161-6165.
42. Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:16-24.
43. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 1998;9:1863-1871.
44. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M et al. Integrin $\alpha V\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157-1164.
45. Dormond O, Foletti A, Paroz C, Regg C. NSAIDs inhibit $\alpha V\beta 3$ integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* 2001;7:1041-1047.
46. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR et al. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha V\beta 3$. *Clin Cancer Res* 2000;6:3056-3061.
47. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC et al. Enhanced pathologic angiogenesis in mice lacking $\beta 3$ integrin or $\beta 3$ and $\beta 5$ integrins. *Nat Med* 2002;8:27-34.