

세포고사 억제 유전자 Survivin의 발현과 신경모세포종의 예후

¹한림대학교 의과대학 외과학교실, ²연세대학교 의과대학 외과학교실, ³Brain Korea 21 Project for Medical Science
안수민¹ · 오정탁² · 한석주² · 황의호² · 최승훈^{2,3}

Anti-apoptosis Gene, Survivin Expression and Prognosis of Neuroblastoma

Soo Min Ahn, M.D.¹, Jung-Tak Oh, M.D.², Seok Joo Han, M.D.², Eui Ho Hwang, M.D.² and Seung Hoon Choi, M.D.^{2,3}

Purpose: The prognostic significance of survivin expression (SE), which has been reported to be an inhibitor of apoptosis protein, was examined in order to identify a more accurate prognostic grouping of neuroblastomas.

Methods: Thirty-seven tumor specimens were obtained between 1992 and 2002. The SE level was examined by immunohistochemical techniques using paraffin-embedded tissues, and was scored as being positive when more than 5% of the cells reacted with the anti-survivin antibody. The outcome of the stratified potential prognostic groups was evaluated according to age, location, stage, Shimada class and SE. The correlation between the SE level and the prognostic factors were analyzed using a univariate assessment. The predictive value of SE in the prognosis was determined using a multivariate assessment.

Results: The median follow up period was 23 months. The 5-year overall survival rate was significantly reduced with an advanced stage, adrenal primary, unfavorable Shimada class and positive SE (P=.01, .01, .02 and .00). A positive SE was correlated with old age, advanced stage and an unfavorable Shimada class (P=.03, .00 and .03). The relative risk of the SE positive group was 5.20 (P=.01). Survivin was expressed in 73% of recurrent cases, but in only 31% of non-recurrent cases (P=.04).

Conclusions: Survivin expression is a valid independent prognostic factor for a neuroblastoma, which correlates with

the disease progression and a poor prognosis. (J Korean Surg Soc 2005;68:56-60)

Key Words: Neuroblastoma, Prognosis, Inhibitor of apoptosis protein, Survivin

중심 단어: 신경모세포종, 예후, 세포고사 억제 단백질, 서바이빈

¹Department of Surgery, Hallym University College of Medicine, ²Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, ³Brain Korea 21 Project for Medical Science

서 론

신경모세포종은 특징적으로 자가 퇴행하는 경우가 발견되지만, 대개의 경우 공격적이며 재발률이 높다.(1,2) 연령, 병기, 조직병리학적 분류형 및 다양한 분자생물학적 요인 등이 임상적 경과에 영향을 준다.(3) 이러한 인자들은 종양 세포의 생존력 및 공격성과 관련이 있으며, 신경모세포종의 경과를 예측하고, 치료의 방향을 설정하는 데 있어 결정적 역할을 한다.(4) 원발 병소에 대한 수술적 치료가 가장 중요하지만, 각 환자의 다양한 예후 인자를 파악하여 항암 화학약물요법의 시기, 종류, 용량 및 외부방사선치료 방법을 결정하는 것이 신중히 고려해야 한다.(5,6) 이러한 예후 인자를 고려한 치료 방법의 설정이 신경모세포종 환자의 생존율을 높이는데 일정한 기여를 한 것이 사실이나, 5년간 전체 생존율은 52~71% 정도로 보고되고 있다.(4-6) 따라서 생존율 향상을 위해서는, 적절한 치료 방법 설정을 위해 고려해야 할 객관적 자료로서 새로운 독립 예후 인자를 확립하는 것이 필요하다.

적절한 세포고사(apoptosis)의 조절은 조직의 항상성 유지와 발달에 필수적 요소이다. 세포고사의 저해 또는 촉진 요인들 간의 불균형에 의해서 세포의 생존력이 결정될 수 있으며, 이러한 세포고사 과정의 저해는 종양의 병태학적 발생과정과 질병의 진행에 영향을 준다.(7-9) 세포고사 억제 단백질(IAP: inhibitor of apoptosis protein)의 일종인 survivin은 신경모세포종을 비롯한 종양 세포와 태아조직에서 다양한

책임저자 : 최승훈, 서울시 서대문구 신촌동 134번지
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-361-5553, Fax: 02-313-8289
E-mail: shchoi@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2004년 5월 11일, 게재승인일 : 2004년 9월 9일
본 논문의 요지는 2003년 대한외과학회 추계학술대회에서 구연되었음.

본 논문은 Brain Korea 21 Project for Medical Science 연구비 보조에 의한 것임.

정도로 발현되며, 정상 분화된 성숙세포에서는 발현되지 않는다. survivin 유전자는 17q25 염색체 상에 존재하며, 세포질 내에 발현된 survivin 단백질은 effector caspases 와 결합하여 세포고사 과정을 차단함으로써 종양 세포의 증식을 촉진시키고 생존력을 증가시킨다.(10-14) 본 연구에서는 각 신경모세포종 세포질 내에서의 survivin의 발현 유무와 임상 경과 및 기존의 예후 인자와의 관련성을 조사하여, 새로운 독립 예후 인자로서의 가치를 평가하고자 한다.

방 법

1992년 1월부터 2002년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원 소아외과에서 신경모세포종으로 수술을 시행 받은 41명의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 의무기록을 후향적으로 조사하여 환자의 연령, 원발 종양의 위치, INSS (International Neuroblastoma Staging System) 병기를 분류하였고, 정기 외래 추적관찰 결과와 전화 면담을 통해 최종 질병상태와 생존여부를 확인하였다. 파라핀 봉매 종양조직 (Paraffin-embedded tumor tissue)에 대해 헤마톡실린과 에오신(Hematoxylin-eosin, H&E) 염색을 재 시행하여 한 사람의 숙련된 병리학자에 의해 조직학적 분화도를 평가하였다. 종양 조직의 survivin 발현은 면역조직화학염색(Immunohistochemical stain)을 시행하여 세포질 내의 양성 발색 반응 세포수를 전산화된 이미지 분석 프로그램(Mocha™, Image analysis software)을 이용하여 정량화 하였다. 일차 항체는 Affinity-purified rabbit anti-human survivin antibody (RnD System biochemistry, Inc. USA)를, 발색 반응은 ChemMate Envision kit (K5007, DACO, Japan)를 사용하였다. 종양 조직의 survivin 발현 판독기준은 10개의 고배율 광학현미

경 시야에서 양성 발색 반응을 보인 세포수가 5% 이상인 경우로 하였다.

연령(저 연령, <1세; 고 연령, >1세), INSS 병기(조기암, 1/2기; 진행암, 3/4기), 원발 병소의 위치(부신 원발 종양; 부신 외 원발 종양), Shimada 분류(양호 조직형, favorable histology, FH; 불량 조직형, unfavorable histology, UH) 및 survivin 발현 유무(발현, 비 발현)에 따라 환자 군을 분류하고, Log-rank test를 이용하여 생존율 차이를 분석하였다. 통계학적으로 유의한 생존율 차이를 보인 환자 군에서 두 계층간의 survivin 발현율 차이를 Chi-square test를 이용하여 분석하였다. Cox's proportional hazard model을 이용하여, survivin 발현이 신경모세포종에 있어서 새로운 독립 예후 인자로서 가치를 가지는지 평가하였다. 원발 병소에 대한 수술, 항암약물요법 및 외부방사선치료 후 골수 생검 및 방사선영상 검사 상, 원발 병소와 초기 원격 전이 부위에서 종양의 증거가 없는 환자 군을 일차 관해(remission) 군으로 분류하고, 비관해군과의 survivin 발현율 차이를 분석하였고, 일차 관해 후 재발 군과 비 재발 군 간의 survivin 발현율의 차이를 Chi-square test를 이용하여 분석하였다. 모든 통계 처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS) version 11.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하였고 유의 수준은 P-value < .05로 검증하였다.

결 과

추적 관찰이 가능한 환자는 모두 37명이었고, 남녀 비율은 1 : 1 (남자, 19; 여자, 18)이었다. INSS 병기 분류 상 1기 10.8% (n=4), 2기 21.6% (n=8), 3기 24.3% (n=9), 4기 43.2% (n=16)이었고 4-s기는 없었다. 추적 관찰기간의 중앙값은 23개월(1~121개월)이었다. 진단 당시 평균 연령은 4.74.0세

Table 1. Overall survival at 5 years according to age, stage, primary location, shimada class and survivin expression

		5-yr neuroblastoma specific survival rate,%, (No.)	P-value
Age	<1 yr	60.4 (8)	0.078
	>1 yr	37.5 (29)	
Stage	1, 2	68.7 (12)	0.013
	3, 4	23.1 (25)	
Location	Adrenal	22.3 (23)	0.015
	Extra adrenal	59.8 (14)	
Shimada class	FH	63.7 (19)	0.022
	UH	21.4 (18)	
SE	Positive	15.4 (22)	0.008
	Negative	70.5 (15)	

SE = survivin expression; FH = favorable histology; UH = unfavorable histology.

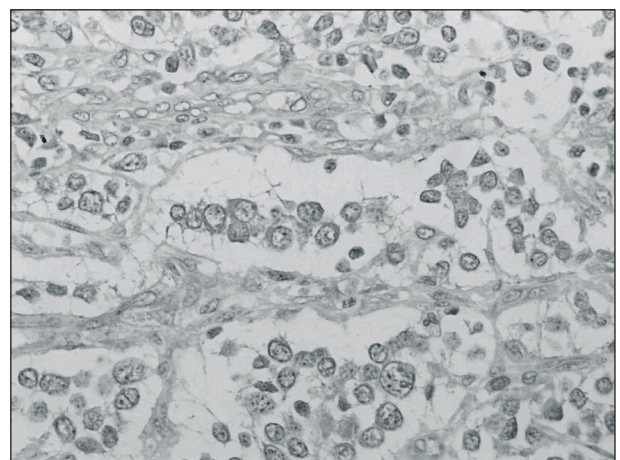


Fig. 1. Most of the neuroblasts are SE (+) in 4-year-old patient (primary left adrenal gland, stage 4, Shimada unfavorable histology)(H & E stain background, ×200).

(중앙값 2.7세)였다. 저 연령과 고 연령 군은 각각 21.6% (n=8)와 78.4% (n=29)이었다. 부신 원발 종양과 부신 외 원발 종양 군은 각각 62% (n=23)와 38% (n=14)였다. 부신 외 종양은 대부분 복강 내(n=10)에 있었고, 그 외에 종격동(n=2)과 골반강(n=1) 및 경부(n=1)에 있었다. 수술 후 전체 생존율은 2년간 57.8%이었고 5년간 38.4%였다. 5년간 전체 생존율은 진행암 군(23%)이 조기암 군(68%) 보다 낮았으며, 부신 원발 종양 군(22%)이 부신 외 종양 군(59%)보다 낮았고, 불량 조직형 군(21%)이 양호 조직형 군(63%)보다 낮았다(P=.01, .01, .02). 연령 군 별 생존율 차이는 없었다(P=.07)(Table 1). 고배율 현미경 시야에서 survivin 양성 발현 세포질은 H & E 배경 염색과 대별되어 담갈색으로 관찰되었고(Fig. 1), 전체 환자 군에서 survivin의 발현율은 59.4%

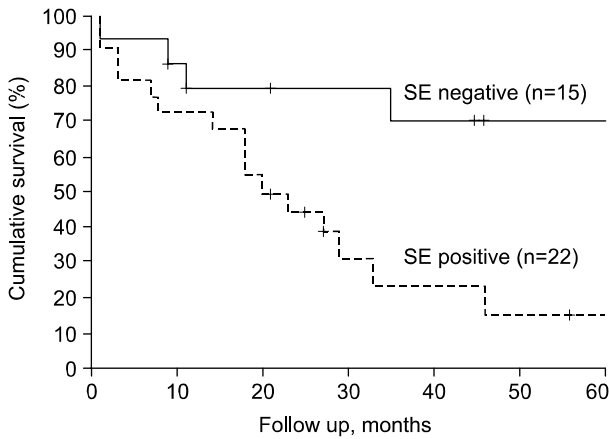


Fig. 2. Neuroblastoma specific 5-year overall survival rate according to survivin expression (SE, survivin expression, P=.008).

Table 2. Univariate analysis for correlation between SE and the poor prognostic factors by Chi-square test

		SE, % (No.)		P-value
		Negative (15)	Positive (22)	
Age	< 1 yr	75.0 (6)	25.0 (2)	0.030
	> 1 yr	30.1 (9)	69.9 (20)	
Stage	1,2	84.6 (11)	15.4 (2)	0.001
	3,4	16.7 (4)	83.3 (20)	
Location	Adrenal	43.5 (10)	56.5 (13)	0.453
	Extra adrenal	35.7 (5)	64.3 (9)	
Shimada Class	FH	57.9 (11)	42.1 (8)	0.030
	UH	22.2 (4)	77.8 (14)	

SE = survivin expression; FH = favorable histology; UH = unfavorable histology.

(n=22)였다. survivin 발현 군이 비 발현 군보다 5년간 전체 생존율이 낮았다(15% vs 70%, P=.00)(Fig. 2). 고 연령, 진행암, Shimada 불량 조직형 군에서 각각 survivin의 발현율이 높았고(P=.03, .00, .03), 원발 병소에 따른 발현율 차이는 없었다(P=.45)(Table 2). survivin 발현 군과 불량 Shimada 분류군의 상대위험도가 각각 높게 나타났다(RR=5.20, P=.01; RR=6.55, P=.01)(Table 3). 비 관해 환자 군과 재발 환자 군에서 각각 survivin의 발현율이 높게 나타났다(84.6% vs 45.8%, P=.02; 72.7% vs 30.8%, P=.04)(Table 4).

고찰

신경모세포종의 다양한 예후인자를 확립하는 것은 치료 방법의 설정에 반드시 필요하다. 병기와 연령은 신경모세포종의 가장 중요한 임상적 예후 인자이며, ferritin, lactate dehydrogenase, neuron-specific enolase의 혈청 내 농도와 요중 catecholamine 대사 산물의 양 및 N-myc amplification, DNA ploidy, 1p deletion, 17q gain 등의 분자유전학적 표지자가 예후 인자로 밝혀져 있다.(4-6) 저자들은 11년간의 의무

Table 3. Adjusted hazard ratio in relation to prognostic factors (Multivariate analysis)

Prognostic factors	RR	95% CI	P-value
Stage	0.69	0.187~2.546	0.577
Location	0.41	0.125~1.362	0.146
Shimada class	5.20	1.388~19.525	0.014
SE	6.55	1.408~30.489	0.017

SE = survivin expression; RR = relative risk; CI = confidence interval.

Table 4. Univariate analysis for correlation between SE and remission/recurrence by Chi-square test

		SE, % (n)		P-value
		Negative (15)	Positive (22)	
Remission	Yes (n=24)	54.2 (13)	45.8 (11)	0.024
	No (n=13)	15.4 (2)	84.6 (11)	
Recurrence	Yes (n=11)	27.3 (3)	72.7 (8)	0.040
	No (n=13)	69.2 (9)	30.8 (4)	

SE = survivin expression.

기록을 후향적으로 조사하였기 때문에, 기존에 알려진 모든 예후 인자에 대한 자료를 분석할 수는 없었다. 따라서 대상 군 내부에서의 선택오류(selection bias)를 배제하기 위하여, survivin 발현 유무와 함께 기존에 보고된 예후 인자들 중에서 연령, 병기, 원발 병소, Shimada 분류형 만을 조사하였다. 각 인자별로 계층화된(stratified) 환자 군 간의 생존율 차이를 조사한 결과 3기 이상의 병기, 부신 원발 종양, Shimada 불량 조직형 군에서 유의한 생존율 감소를 보여 기존의 보고와 일치하였다.(4-6)

강력한 예후 인자인 연령에 따른 생존율 차이가 통계학적 유의성을 나타내지 않았고, 단지 고 연령이 질병의 불량한 임상 경과와 연관성을 갖는 경향만을 보였다(P=.07). 이는 대상 군의 연령 분포가 고 연령 군(78%)에 치우쳐 통계학적 분석 상 유의성을 찾을 수 없었던 것으로 생각된다. 또한 5년간 전체 생존율이 38%로서 타 기관의 보고(51~71%) 보다 낮았는데,(6,15-17) 강력한 불량 예후 인자인 고 연령 군의 비율이 높고 진단 시기가 기존의 보고보다 늦었기 때문이라고 생각된다(고 연령군, 78% vs 45~52%; 연령의 중앙값, 33개월 vs 16개월)(18,19). 문헌 조사에 의하면, 예후인자 별 환자의 구성 비율은 진행암 59~65%, 부신 원발 종양 57~64%이고, 불량 Shimada 조직형은 49~54% 이었다.(4-6,16-22) 대상 군에서는 진행암과 부신 원발 종양 및 불량 Shimada 조직형의 비율이 각각 67%와 62% 및 49%로 기존의 보고와 같았다.

survivin 발현 유무를 조사하기 위해 사용된 면역조직화학염색법은 다른 종류의 종양에서 survivin 발현을 조사하는 데에 광범위하게 사용되고 있으며, 기술적으로 용이하고 소요 시간을 단축할 수 있는 장점이 있고, 파라핀 봉매 조직의 염색 결과에 대한 신뢰성이 확보되어 있다. survivin 발현을 평가할 수 있는 보다 정확한 방법으로서 Western blot method를 고려할 수 있으나, 장기 보관된 파라핀 봉매 조직을 이용하는 경우 정확성과 신뢰도가 제한을 받을 수 있으므로 연구 방법에서 제외하였다.

전체 종양 조직에서의 survivin 발현율은 기존의 보고와 유사하였으며,(23) survivin 발현 군이 비 발현 군보다 현저한 생존율 감소를 나타내어 질병의 불량한 경과와 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한, 통계학적으로 유의한 생존율 감소를 유발했던 인자인 진행 병기 및 Shimada 불량 조직형 군에서 survivin 발현율이 유의하게 높게 나타나 다른 불량 예후인자와도 연관성이 있음을 알 수 있었다. 비록 연령 군 별 생존율이 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 이와 무관하게 고 연령 군에서 survivin 발현율이 높게 나타났다(P=.03). 따라서 신경모세포종 조직에서의 survivin 발현이 기존의 불량 예후 인자와 관련성이 있음이 확인되었다.

이상의 결과 병기, 원발 종양의 위치, Shimada 분류형 및 survivin 발현유무를 신경모세포종의 예후인자로 가정하고

다변량 분석을 시행하였다. Shimada 분류형에는 조직형과 함께 연령 요인이 포함되므로, covariates 항목에서 연령은 제외하였다. 불량 Shimada 분류 군과 survivin 발현 군에서의 상대위험도는 각각 5.20, 6.55로 유의하게 증가하여, 기존에 알려진 Shimada 분류형과 함께 세포질 내의 survivin 발현이 신경모세포종의 새로운 독립 예후인자임을 알 수 있었다.

Sandler 등(24)의 보고에 의하면 일차 관해 군의 survivin 발현율은 27.7%로 낮았지만, 이후 재발한 환자 군에서는 90%의 높은 발현율을 나타내었다. 저자들의 연구에서는 비 관해 군에서의 survivin 발현율은 일차 관해 군에서의 발현율보다 유의하게 높았고(84.6% vs 45.8%), 일차 관해 후 재발이 발생한 환자 군의 survivin 발현율은 무병 생존 환자군보다 현저히 높았다(72.7% vs 30.8%). 따라서, 고유한 세포고사 억제(anti-apoptosis) 기능을 수행하는 survivin이 신경모세포종 세포질 내에서 발현되어, 수술, 항암약물 및 외부방사선조사 등의 치료에 대한 저항성을 증가시키고, 국소재발 및 원격전이와 같은 질병의 진행과 관련성이 있음을 알 수 있었다.

결 론

세포고사 억제 유전자 survivin의 신경모세포종 세포질 내 발현은 종양의 생존력을 증가시켜 치료에 대한 저항성을 유발하고, 질병의 진행을 촉진하는 새로운 독립 예후 인자로서의 가치를 가진다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997. p.761-97.
- 2) Grosfeld JL, Rescorla FJ, West KW, Goldman J. Neuroblastoma in the first year of life: clinical and biologic factors influencing outcome. Semin Pediatr Surg 1993;2:37-46.
- 3) Coldman AJ, Fryer CJH, Elwood JM. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumour site, and sex on prognosis. Cancer 1980;46:1896-901.
- 4) Saito T, Tsunematsu Y, Saeki M, Honna T, Masaki E, Kojima Y, et al. Trends of survival in neuroblastoma and independent risk factors for survival at a single institution. Med pediatr Oncol 1997;29:197-205.
- 5) Ladenstein R, Urban C, Gadner H, Fink FM, Zoubek A, Eminger W, et al. First experience with prognostic factors in unselected neuroblastoma patients: The Austrian neuroblastoma 87 study. Eur J Cancer 1995;31:637-41.
- 6) Loretta Lau. Neuroblastoma: A single institution's experience with 128 children and an evaluation of clinical and biological

- prognostic factors. *Pediatric Hematology and Oncology* 2002; 19:79-89.
- 7) Miller L, Marx J. Apoptosis. *Science* 1998;281:1301.
 - 8) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
 - 9) Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;6:777-9.
 - 10) Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspase, anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20.
 - 11) Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999;1:461-6.
 - 12) Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patient with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:33-40.
 - 13) Bown N. Neuroblastoma tumor genetics. Clinical and biological aspects. *J Clin Path* 2001;54:897-911.
 - 14) Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, Kandimalla ER, Agrawal S, Shafit-Zagardo B. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem* 2001;79:426-36.
 - 15) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M, Yamamoto K. Long term survival of advanced neuroblastoma with MYCN amplification: a report of 19 patients surviving disease free for more than 66 months. *J Clin Oncol* 1999;17:3216-20.
 - 16) Michael P, Quaglia L. Surgical management of neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg* 2001;10:132-9.
 - 17) Tonini GP, Boni L, Pession A, Rogers D, Iolascon A, Basso G, et al. MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. *J Clin Oncol* 1997;15:85-93.
 - 18) Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, et al. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 1998;16:1265-9.
 - 19) Moppett J, Haddadin J, Foot AB. Neonatal neuroblastoma. *Arch Dis Child Neonatal* 1999;81:134-7.
 - 20) Nishihira H, Toyoda Y, Tanaka Y, Ijiri R, Aida N, Nishi T, et al. Natural course of neuroblastoma detected by mass screening: A 5-year prospective study at a single institution. *J Clin Oncol* 2000;18:3012-7.
 - 21) Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Lemieux B, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041-6.
 - 22) Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Michaelis J, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-53.
 - 23) Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-3.
 - 24) Sandler A, Scott D, Azuhata T, Takamizawa S, O'Dorisio S. The Survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2002;37:507-11.