

CD133 발현은 줄기세포에 국한되어 있지 않으며, 전이 대장암의 CD133 양성 및 음성 세포 모두가 암줄기세포의 종양 형성능을 갖는다

(CD133 Expression Is Not Restricted to Stem Cells, and Both CD133⁺ and CD133⁻ Metastatic Colon Cancer Cells Initiate Tumors. The Journal of Clinical Investigation 2008;118:2111-2120)

요약: 대장암줄기세포는 CD133 양성 장줄기세포에서 유래한다고 생각되었고, 최근 발표된 논문에서 대장암세포의 일부 세포군에서만 CD133이 발현되며, 이러한 CD133 양성 대장암세포군만이 종양 형성이 가능하다고 알려져 왔다. 그러나 전이 대장암에 대하여 CD133 양성 종양세포의 역할은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 CD133 promoter에 의해 유발되는 *lacZ* 발현을 이용한 knockin *lacZ* reporter mouse (CD133^{lacZ/+})를 만들어 해당 마우스에서 또는 종양형성과정에서 CD133 발현을 추적할 수 있게 실험을 고안하였다. 이 마우스 모델의 면역화학염색에 의해 CD133 발현은 줄기세포에만 국한되어 있지 않으며, 마우스와 사람 모두에서 분화된 대장 상피세포에서도 발현됨을 확인하였다. 또한 *Il10*^{-/-} CD133^{lacZ/+} 마우스를 이용한 만성염증에 의한 선암종발생 모델에서 상피접착인자인 EpCAM이 양성인 대장종양세포 대부분에서 CD133 양성 소견을 보였다. 유사하게 인간 대장암 상피세포에서도 CD133은 폭넓은 양성 소견을 보였고, CD133 음성세포는 대부분 간질세포나 염증세포들이었다. 그러나 CD133 발현은 사람의 전이 대장암에서 종양 형성을 유발하는 세포군 감별에 충분한 표지자가 되지 못하였다. 즉 CD133 양성 및 음성 전이 대장암 세포군 모두에서 실험실 배양 시 colonosphere를 형성하고, NOD/SCID 마우스에서 종양을 잘 형성할 수 있었다. 오히려 CD133 음성 전이 대장암 세포군이 더 공격성이 강한 종양을 형성하고, CD44 (CD44⁺CD24⁻) 등 cancer-initiating cell의 전형적인 표지자를 발현하였다. 반면에 CD133 양성세포는 오히려 CD44^{low}CD24⁺ 세포들이 많았다. 결론으로 CD133 발현은 장줄기세포나 대장암의 cancer-initiating cell에만 국한되어 있지 않으며, 전이 암화과정에서 CD133 양성의 암세포군으로부터 더 공격적인 CD133 음성 암세포군이 형성됨을 알 수 있다.

해설: 줄기세포에 대한 이해는 조직 복구나 암화과정의 이해에 있어 매우 중요하며, 암줄기세포의 개념은 종양의 극히 일부분의 세포들만이 다시 종양을 생성할 능력을 가지고 있다는 것으로 궁극적인 암치료의 표적으로서 많은 연구들이 진행되고 있다. 이러한 줄기 및 암줄기세포의 연구 및

이해에 있어 가장 중요한 기본이 되는 것이 줄기 및 암줄기 세포를 확인하고 분리할 수 있는 표지자이다. CD133은 여러 정상 조직과 종양에서 줄기 및 암줄기세포의 표지자로서 알려져 왔으나^{1,2} 본 연구에서는 대장암에서 그렇지 않을 수 있음을 보여준 결과라고 할 수 있다.³ 따라서 CD133이 대장의 줄기 및 암줄기세포의 표지자라는 근거는 다시 수정이 필요한 내용이 되었다.

Prominin-1으로도 알려진 CD133은 세포표면 단백질로 아직 기능이 잘 알려져 있지 않다. 사람의 조혈줄기세포 및 신경줄기세포 등의 표지자로 알려지며 각광받게 되었다.^{4,5} 대부분의 연구에서 CD133의 한 epitope을 인지하는 AC133 클론을 이용한 CD133에 대한 단클론 항체를 연구에 이용하고 있는데 사실 이 한 가지 표지자를 이용한다는 것은 충분치 않을 수 있다. 그런 면에서 연구자들은 처음으로 knock-in reporter 마우스 모델을 이용하여 정상 및 종양세포에서 CD133 발현 세포를 추적 관찰하였다. 따라서 CD133 항체에만 의존했던 기존 연구에 비해 훨씬 정확한 정보를 줄 수 있었다. 그 결과 놀랍게도 CD133 발현은 많은 상피세포 조직에서 폭넓게 분포되어 있음을 보였다. 다른 최근 발표에 따르면 다른 기관의 분화상피에서도 CD133이 발현되는 것으로 알려져 있다.^{6,7}

기존에 발표된 논문에서 대장의 일부 세포에서만 CD133을 발현하는 것으로 알려졌지만 이 논문에서는 많은 조직의 대부분의 상피세포에서 발현되는 것을 보였으며, 특히 세포막의 돌출 부위 즉 microvilli에 CD133 발현이 집중되어 있다. 따라서 상피세포의 상부 표면(apical surface)에 발현이 주로 있으므로 일반적으로 보일 수 있는 염색상의 오류와 감별해야 하고, 또한 상부 표면의 microvilli에 국한된 발현이므로 microvilli가 소실되지 않도록 조직 관리에도 유의하여야 하며 조직 단면의 염색 해석에도 유의하여야 한다.⁸ 그러나 다른 중요한 점은 항체 클론에 따라 같은 단백질에서도 다른 epitope을 인식할 수 있다는 점이다. 즉 어떤 특별한 조건에서는 단백질의 변형이 있을 수 있고 그에 따라 인식하는 epitope에 차이가 있을 수 있다. 줄기세포라는 특이 조건에서 같은 단백질이라도 특이 epitope의 변형이 있고, 바로 그 변

형된 epitope에 대한 항체가 이용되었다면 분화된 세포에도 존재하는 같은 단백질이라도 줄기세포에 특이적인 표지자가 될 수 있다. AC133 클론에 있어 glycosylation이 있을 수 있는데 glycosylation된 AC133 epitope이 줄기세포에 특이적인지는 추가 연구가 필요하다.⁹

정상 상피세포에서 CD133의 폭넓은 발현은 과연 암줄기세포에서는 어떤가 하는 의문이 들게 한다. 사실 암줄기세포의 중요성은 치료에 있어 중요한 표지자가 된다는 것이므로 주위 정상세포와 구별되는 표지자여야 한다. 현재까지 CD133은 암줄기세포의 표지자로서 많이 이용되어왔고, 처음 정상 조혈세포의 표지자로 보고되었다가, 그 후 고형암으로서 muduloblastoma, glioblastoma, 그리고 여러 상피세포암의 암줄기세포의 표지자로 알려졌다.^{1,2,10-12} 그러나 연구자들은 CD133가 많은 상피세포의 대부분에서 발현되고, CD133 발현 암세포가 전이 대장암의 종양 형성능과는 직접적인 관계가 없다는 점에서 기존의 내용과 다른 관점을 보이고 있다. 연구자들의 논문내용과 기존의 주요 논문 결과로 보면 대장암줄기세포와 암줄기세포가 아닌 암세포 간의 CD133 발현 차이는 발현 유무가 아니라 상대적인 발현 정도가 다르다고 해석할 수 있다. 따라서 양성/음성의 비교보다는 고 발현/저발현의 구분이 더 타당할 수 있다. 암줄기세포에서 CD133 발현은 뇌종양에서 처음 보고되고 그 후 전립선, 췌장 등에서 CD133 양성 암세포의 종양 형성능이 증명되어 왔다.¹⁰⁻¹² 특히 기존의 대장암줄기세포에 대한 주요 논문에서는 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 방법에 의해 CD133 양성 암세포를 분리한 후 종양 형성능을 NOD/SCID 마우스에서 분석한 반면,¹² 이번 논문의 연구자들은 염색을 통한 현미경 관찰에 의존한 결과로서 대부분의 종양 상피세포에서 CD133을 관찰하였다. 연구자들의 염색을 통한 관찰에서 보면 EpCAM을 같이 염색하여 상피세포임을 확인 비교하여 종양 내에서 상피세포가 아닌 세포들의 경우 대부분이 CD133 음성임을 확인하였다. 따라서 앞서 Nature에 발표된 두 연구에서¹² CD133 발현만으로 FACS로 분리한 세포는 상피세포가 아닌 세포들이 포함될 수도 있고 그에 따라 CD133 음성으로 분리한 세포에는 암조직 중 상피세포가 아닌 세포들만 포함되어 종양형성능이 없어 보일 수 있다는 설명이다. 연구자들이 고안한 *Il10^{-/-}CD133^{lacZ/+}* 마우스를 이용한 종양형성 모델에서도 보면 이와 동일한 소견을 보였다.

또 한 가지 이 연구의 중요한 소견은 전이암의 경우, 원발성 대장암의 대부분에서 CD133 양성이던 암세포와는 달리 CD133 양성 암세포와 함께 CD133 음성 암세포가 뚜렷이 나누어져 관찰된다는 것이다. 그 뿐만 아니라 CD133 양성 및 음성 세포 모두 NOD/SCID 마우스에서 종양 형성능이 있음을 보였다. 흥미롭게도 CD133 음성 전이 암세포가 종

양 증식력이 더 높았으며, CD133 양성 전이 암세포는 CD133 양성 및 음성 암세포로 증식하였지만 CD133 음성 전이 암세포는 CD133 음성 암세포로만 증식하였다. 이런 결과로 연구자들은 CD133 양성 암세포에서 분화된 암상피세포에서 특이적인 분자들의 발현이 줄어들면서 EMT (epithelial-mesenchymal transition)의 과정으로 CD133 음성 암세포가 발생하게 되고 그에 따라 더욱 증식력이 강한 종양이 발생하게 된다고 설명한다. 이러한 결과는 분명 앞서 Nature에 발표된 논문과 비교하면¹² 상반되는 결과이다. 물론 원발 종양과 전이 종양의 차이라고 볼 수도 있으며, 본 연구에서는 원발 종양에서 염색에 의한 현미경 관찰만 하고 FACS 후 마우스에서의 종양 형성능 평가는 하지 않았으므로 아직 어떤 결론을 내리기에는 이르다.

앞에서도 설명했듯이 줄기 및 암줄기세포에서 CD133 양성고 음성의 구분보다는 상대적인 발현 정도에 의해 CD133 발현의 고발현군과 저발현군으로의 분리가 더 타당할 수도 있다. 그러나 아직 이에 대한 많은 추가 연구가 필요하고, 설사 CD133 발현의 많고 적음이 암줄기세포의 감별점이라고 해도 과연 이런 상대적 발현 차이만으로 암줄기세포 표지자로서 적당할 수 있는지 또한 의문이다.

이상의 결과로 최소한 전이 대장암에서 CD133은 더 이상 암줄기세포의 표지자로서 의미가 적어진다. 그러나 EpCAM과 CD133을 포함한 여러 표지자의 조합에 의한 암줄기세포 후보군의 분리와 이들의 종양 형성능을 시험하는 연구가 필요할 것이다. 특히 대장암은 유전 그리고 후성 변이의 특성이 비교적 잘 알려져 있으므로 이에 따른 대장암 줄기세포의 표지자 특성에 대한 연구 또한 의미가 있을 것이다. 예후와 관련된 추가연구와 암줄기세포에 대한 표적치료에서의 표지자로서 향후 연구가 주목된다.

(정리: 연세대학교 의과대학 내과학교실 김태일)

참고문헌

1. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-110.
2. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-115.
3. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133⁺ and CD133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008;118:2111-2120.
4. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, charac-

- terization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-5021.
5. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-5012.
 6. Lardon J, Corbeil D, Huttner WB, Ling Z, Bouwens L. Stem cell marker prominin-1/AC133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas. *Pancreas* 2008;36:e1-e6.
 7. Florek M, Haase M, Marzesco AM, et al. Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005;319:15-26.
 8. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12425-12430.
 9. Corbeil D, Röper K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000;275:5512-5520.
 10. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-5828.
 11. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
 12. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946-10951.