하인두 편평세포암에서 간세포성장인자와 그 수용체인 c-Met의 발현

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 생화학교실,[2] 병리학교실,[3] 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실[4]
김철호[1] · 문성균[1] · 배준호[1] · 이재호[2] · 한재호[3] · 최은창[4]

Expression of HGF/c-Met in Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Chul-Ho Kim, MD[1], Sung-Kyun Moon, MD[1], Joon-ho Bae, MD[1], Jae Ho Lee, MD[2], Jae Ho Han, MD[3] and Eun Chang Choi, MD[4]
[1]Department of Otolaryngology, [2]Biochemistry, and [3]Pathology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea; and [4]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Hepatocyte growth factor (HGF), a potent stimulator of hepatocyte growth, stimulates motility, invasiveness, proliferation, and morphogenesis of epithelium, and may be involved in physiologic and pathologic processes such as embryogenesis, wound healing, organ regeneration, inflammation, and tumor invasion. So we examined the role of the HGF/c-Met on invasion and metastasis of hypopharyngeal squamous cell carcinoma (SCC). We performed immunohistochemical stains on 40 normal mucosas and 40 SCCs of hypopharynx with HGF antibody and c-Met antibody. For RT-PCR and Western blot, fresh normal tissues and cancer tissues in hypopharynx obtained from five patients were used. The positive rates of HGF and c-Met expression in hypopharyngeal SCC were 77.5% and 70%, respectively. HGF staining was significantly correlated with lymph node metastasis and pathologic stage ($p<0.05$). c-Met staining was only significantly correlated with lymph node metastasis ($p<0.05$). The increased expresssion of c-Met mRNA (RT-PCR) and protein (Western Blot) were detected in hypopharyngeal cancer tissue. These results suggest that HGF may play an important role in the progression of hypopharyngeal cancer. **(Korean J Otolaryngol 2004;47:1135-41)**

KEY WORDS : Hepatocyte Growth Factor (HGF) · c-Met · Hypopharyngeal cancer.

서 론

하인두암은 두경부에 발생하는 암종 중 예후가 가장 나쁜 암에 속하는데 그 이유는 대부분의 하인두암은 진행된 후에야 진단되는 경우가 많고 주변의 중요구조물 - 후두, 경동맥, 내경정맥, 뇌신경 - 로의 침습이 초기에 잘 일어나며 종양이 점막하 전파(submucosal spread)가 흔하고 림프절 전이와 원격전이를 잘하는 특성이 있고 이차암(second primary tumor)의 발병율이 높기 때문이다. 이러한 이유로 다양한 치료법에 대한 연구와 시도에도 불구하고 지난 20년간 예후가 크게 개선되지 못하고 있다. 이러한 하인두암의 빠른 증식과 침습적인 성향 그리고 전이를 잘하는 특성을 분자생물학적인 접근을 통해 연구한다면 하인두암을 이해하고 치료하는데 도움이 되며 궁극적으로 환자의 치료율과 생존율을 높이는데 기여하리라 생각된다.

일반적으로 종양의 침습과 전이의 과정에는 종양과 숙주 사이의 여러 반응(tumor and host interaction)이 필요한데 이에는 간질 변화(stromal alterations)가 종양의 악성화에 앞서 선행되고 이어 종양세포와 섬유모세포(fibroblast), 대식세포(macrophage), 림프구(lymphocyte), 중성구(neutrophils)와 내피세포(endothelial cells) 등과 같은 간질세포간의 반응을 통해 세포외 기질의 변화, 신생혈관생성, 종양의 전이 및 침습에 관여한다는 것이 알려졌다.[1)] 이러한 현상에 대해 Matsumoto 등[1)]은 구강암환자에서 치주의 섬유모세포가 구강의 편평세포암의 침습을 크게 증가시킨다는 것을 증명했다. 이러한 과정에 관여하는 물질 가운데 하나가 hepatocyte growth factor(HGF)로 이는 peptide growth factor인데 주로 간세포(hepatocyte)의 성장에 관여하는 것으로만 알려져 있다가 이후에 간세포뿐만 아니라 위장관

논문접수일 : 2004년 2월 17일 / 심사완료일 : 2004년 5월 13일
교신저자 : 최은창, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8481 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : eunchangmd@yumc.yonsei.ac.kr

상피세포, 각질세포 등을 위시한 여러 상피세포의 증식을 촉진하는 능력이 있음이 알려졌으며, 일부 암세포에 있어서는 protease의 분비를 통해 종양의 활동(motility)과 침습(invasiveness)을 일으키고 형질생성(morphogenesis)과 신생혈관의 생성(angiogenesis)에 관여한다고 알려지게 되었다.[2)3)] HGF의 최초의 발견은 1984년에 거의 동시에 3군데 실험실에서 이루어졌고[4-6)] 1989년에는 그 분자구조가 밝혀졌다.[7)] 1991년에는 세포의 유리과정에 작용하는 scatter factor가 HGF와 동일한 물질임이 밝혀져 간세포 성장인자를 HGF/SF로 부르기도 한다.[8)] 분비된 HGF는 표적세포의 수용체에 결합하여 tyrosine kinase를 활성화하여 작용이 일어나는데 이 수용체는 proto-oncogene으로 잘 알려진 c-met gene이 생산한다는 사실이 밝혀졌다.[9)] HGF와 c-Met은 paracrine 기전으로 서로 상호작용하여 암의 진행을 촉진하다는 증거가 실험세포에서 증명이 되었지만 아직까지는 하인두암에서 HGF와 c-Met의 역할에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 c-met oncogene이 신체의 여러 상피세포와 상피에서 유래한 암종에서 발현되므로 하인두의 편평세포암종에서도 c-met oncogene과 HGF가 발현되어 하인두암의 증식과 전이 과정에서 중요한 역할을 하리라는 가정을 규명하는데 목적이 있다. 이를위해 일차적으로 환자의 조직에서 HGF와 c-Met의 발현을 확인하고 종양의 병기, 림프절 전이, 재발과 환자의 생존여부에 따른 발현의 차이를 알아보고 하인두암의 신선조직에서의 HGF와 c-Met의 m-RNA와 protein를 확인하고자 한다.

대상 및 방법

대상환자

면역조직화학적 염색을 위해서 아주대학교와 연세대학교 이비인후과학교실에서 1994년 3월부터 1998년 4월까지 하인두암으로 수술 받은 환자 중 Hematoxylin-eosin 염색 표본을 검토하여 파라핀 포매 조직의 보관 상태가 양호한 40명을 선정하여 대상으로 하였다. 이들의 평균 나이는 60.1±8.4(평균±표준편차)세로서 43세에서 76세까지 분포하였으며 남자는 38명 여자는 2명이었다. 대상 환자들은 모두 하인두암의 편평세포암으로 AJCC(2002)의 규정에 따라 병기를 분류하였을 때 Ⅰ기는 3명(7.5%), Ⅱ기는 4명(10%), Ⅲ기는 10명(25%), Ⅳ기는 23명(57.5%)이었다. 조직의 분화도는 병리조직학적 소견에 따라 well, moderate, poor differentiation으로 구분하였다. 환자들의 생존여부는 진료기록부 및 전화 상담을 통하여 모두 확인할 수 있었다.

하인두암 조직에서 시행한 RT-PCR과 Western blotting을 위해서는 1년 이내에 수술한 하인두암 환자 5명의 정상부위 조직과 암 조직을 절제 직후 액화질소 통에 넣어 급속 동결시킨 뒤 -70℃에 냉동 보관한 신선조직들을 이용하였다. 5명 모두 하인두의 편평세포암으로 전후두절제술을 시행 받은 환자가 3명, 전후두절제술과 부분인두절제술을 시행 받은 환자가 1명, 전인후두절제술을 시행 받은 환자가 1명이었다.

c-Met와 HGF에 대한 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색은 labelled streptoavidin biotin kit (LSAB ; DAKO Co., CA. USA)를 이용하였다. 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시킨 후 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀 과정을 거친 후 계열 농도별 ethanol에 처리한 후 증류수로 5분간 함수시켰다. 10 mM citrate buffer(pH 6)에서 10분간 microwave에서 끓여 항원을 노출시킨 후 내인성 과산화 효소의 활동을 억제시키기 위해 3% H_2O_2가 포함된 100% methanol액으로 10분간 처리하였다. HGF에 대한 일차항체는 human 항 HGF affinity purified polyclonal goat antibody(R & D systems, Inc, MN, USA)를 사용하였고 c-Met에 대한 일차항체는 human 항 HGF receptor(c-Met) polyclonal goat antibody(R & D system)를 1 : 100으로 희석하여 사용하고, 4℃에서 하루밤 동안 반응시킨 후 universal secondary biotinylated antibody와 R.T.U VECTASTAW® ELITE ABC kit(Vector Laboratories, Inc., CA, USA)로 상온에서 각각 30분간 처리하여 이차항체염색 및 표지항체염색을 하였다. 발색제인 DAB(DAKO)로 약 5분간 반응시키고, 10초동안 Hematoxylin으로 대조염색하였다. Semisynthetic crystal mount(DAKO)로 mounting한 후, cover glass를 덮어 광학현미경으로 관찰하였다.

RT-PCR에 의한 HGF와 c-Met의 mRNA 측정

냉동된 조직을 1 ml의 TRIzol®(GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA) 시약에 균질화시킨 후, 총 RNA를 추출하였다. 하인두암과 정상조직에서 추출된 총 RNA 2 μg을 각각 Omniscript Reverse Transcriptase kit(20511, Qiagen Germany)의 반응혼합물{10X Buffer RT 2.0 μl, dNTP Mix(5 mM each dNTP) 2.0 μl, Oligo-dT primer(10 μl) 2.0 μl, RNase inhibitor(10 units/μl) 1.0 μl, Omniscript Reverse Transcriptase 2 units, RNase-free water} 20 μl에 넣고 37℃에서 60분, 94℃에서 5분간 역전사하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Minicycler™(MJ research,

USA)를 사용하였고 합성된 cDNA를 Taq DNA polymerase 1 unit(Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA)과 각각의 primer를 넣어 증폭시켰다. 이 실험에서 사용된 human HGF primer와 human c-Met primer의 염기배열 순서는 다음과 같다.

human HGF ;

sense : 5 '- ACA TCG TCA CTT CTG GC - 3 '

antisense : 5 '- ATC CAT CCT ATG TTT GTT CG - 3 '

human c-Met ;

sense : 5 '- AGT AGC CTG ATT GTG CAT TT - 3 '

antisense : 5 '- TCT TTC ATG ATG CCC TC - 3 '

PCR과정은 초기 변성을 96℃에서 3분간 실시한 후, 96℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간을 총 30 cycles을 실시하고 신전(extension)은 72℃에서 5분간 시행하였다.

Western blotting을 이용한 c-Met의 발현 검색

다섯명의 환자에서 얻은 하인두암 조직을 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음 단백질분해 억제제(100 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg/ml leupeptin)가 첨가된 RIPA(RadioImmunoPrecipitation) buffer 1 ml{150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% Deoxycholate}에 넣고 균질화 하였다. 이 균질액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였는데 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. Well 당 20 μg의 단백질을 분리하기 위해 sodium dodesyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하여 분리한 후 nitrocellulose filter(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 옮긴 다음 4℃에서 하루 밤 동안 항c-Met항체를 반응시켰다. 다음날 filter를 0.1% Tween-20이 함유된 Tris buffered saline(TBS) 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Amersham)와 donkey anti-mouse antibody(Amersham)로 각각 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system(ECL, Amersham)을 이용하여 X-ray film으로 확인하였다.

통계적 분석

면역조직화학적 염색결과는 Fisher 's exact test, Mantel-Haenzel test를 시행하였고 생존분석은 Kaplan-Meier법을 이용하였으며 그 의의는 Log-rank test로 평가하였으며 모든 통계는 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의의 있는 것으로 판정하였다.

결 과

하인두암 조직의 c-Met과 HGF의 발현

c-Met과 HGF에 대한 면역조직화학염색을 시행한 후 Taniguchi 등[17]이 제안한 대로 면역조직화학염색시 세포막이나 세포질에서의 발현이 전체 세포 중 30%미만에서 양성을 보이는 경우를 음성, 30%이상의 세포에서 양성을 보이는 경우를 양성이라고 판정하였다.

HGF의 면역조직화학염색시 대상 40예의 환자 중 31예(77.5%)에서 양성을 보였는데(Table 1), 대부분의 조직슬라이드에서 HGF의 발현은 주로 암세포주변의 기질세포(stromal cell)에서 강하게 염색이 되었다. 기질세포내에서는 주로 세포질내에 미만성으로 진하게 염색된 경우가 가장 많았으며 일부는 세포막을 따라 염색되기도 하였다. 일부 조직에서는 암세포에서도 HGF의 염색이 확인되기도 하였으며 일부 종양 주변의 정상세포에서도 상피세포의 기저층에서 약한 염색이 확인되기도 하였다(Fig. 1). 종양의 크기에 따른 HGF의 염색양상을 보면 원발종양의 크기가 4 cm 이하인 T1과 T2에서는 63.6%, 종양의 크기가 4 cm 이상인

Table 1. Correlation between the expression pattern of HGF and clinicopathologic factors. The positive rates of HGF expression in hypopharyngeal SCC were 77.5%. HGF staining was siginificantly correlated with lymph node metastasis and pathologic stage ($p<0.05$)

Variables		Expression of HGF (%)		p-value
		Negative (22.5)	Positive (77.5)	
T	1, 2 (n=11)	4 (36.4)	7 (63.6)	0.227[1]
	3, 4 (n=29)	5 (17.2)	24 (82.8)	
N	- (n=13)	6 (47)	7 (53)	0.038[1]
	+ (n=27)	3 (11.1)	24 (88.9)	
M	- (n=34)	8 (23.5)	26 (76.5)	1.000[1]
	+ (n=6)	1 (16.7)	5 (83.3)	
Stage	I, II (n=6)	4 (66.7)	2 (33.3)	0.016[1]
	III, IV (n=34)	5 (14.7)	29 (85.3)	
Differentiation	Well (n=11)	1 (9.1)	10 (90.9)	0.103[2]
	Moderate (n=16)	4 (25)	12 (75)	
	Poor (n=13)	4 (30.7)	9 (69.3)	
Recurrence	Yes (n=13)	1 (7.7)	12 (92.3)	0.226[1]
	No (n=27)	8 (29.6)	19 (70.4)	

1) calculated by Fisher's exact test ($p<0.05$)
2) calculated by Mantel-Henzel test ($p<0.05$)

T3와 T4에서는 82.8%로 종양의 크기가 큰 경우에 HGF의 발현이 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 의의는 없었다(Table 1). 림프절 전이가 없는 경우 HGF의 발현이 7/13예 (53%)에서 나타났으나 림프절 전이가 있는 경우 24/27예(88.9%)에서 나타나 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다($p<0.05$). 전신전이의 경우 전이가 없는 군(76.5%)에 비해 전이가 있는 군에서(83.3%) HGF의 발현이 높았으나 두 군간의 통계적인 차이는 없었다. 병기에 따른 분류에서는 조기암에 속하는 Ⅰ, Ⅱ기에서는 HGF의 발현이 2/6예(33.3%)였으나 진행암에 속하는 Ⅲ, Ⅳ기에서는 29/34예(85.3%)로 병기가 진행할수록 HGF의 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 병리학적인 분화도의 영향을 보았을 때 분화도에 따른 HGF의 발현의 차이는 없었고 재발여부에 따른 분석에서는 재발이 있는 경우 12/13예(92.3%)였고 재발이 없는 경우 19/27예(70.4%)로 발현에 있어 차이는 있었으나 통계적인 유의성은 없었다.

한편 c-Met의 경우 면역조직화학염색시 HGF와는 달리 기질세포에는 염색이 거의 없고 주로 암세포에 강하게 염색이 되었으며 일부 정상세포에도 약하게 염색이 되었다. 암세포내에서는 세포질에 미만형으로 강하게 염색된 경우가 가장 많았다(Fig. 2). 대상 40예의 환자 중 28예(70%)에서 양성을 보였다(Table 2). 종양의 크기에 따른 c-Met의 발현을 보면 T1, T2에서는 7/11예(63.6%)였고 T3, T4에서는 21/29예(72.4%)로 종양이 클수록 c-Met의 발현이 증가되었으나 통계적인 차이는 없었다. 림프절 전이가 있는 경우 22/27예(81.5%)로 전이가 없는 경우 6/13예(46.2%)에 비해 c-Met의 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 전신전이의 경우 전이가 없는 군 23/34예(67.6%) 에 비해 전이가 있는 군 5/6(83.3%)에서 c-Met의 발현이 높았으나 두 군간의 통계적인 차이는 없었다. 병기에 따른 분류에서는 병기가 진행암인 경우(76.5%)가 조기암(33.3%)에 비해 c-Met의 발현이 증가되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 병리학적인 분화도에 따른 c-Met의 발현에는 차이가 없었고 재발에 따른 c-Met의 발현에서도 재발된 경우(76.9%)가

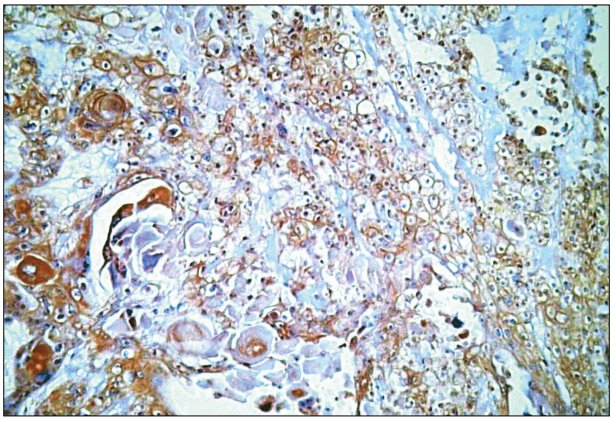

Fig. 1. Immunohistochemical localization of HGF protein in hypopharyngeal SCC tissue. HGF was stained mainly in stromal tissue around cancer cells but occasionally in cancer cells and basal layer of normal cells (×200).

Table 2. Correlation between the expression pattern of c-Met and clincopathologic factors. The positive rates of c-Met expression in hypopharyngeal SCC were 70%. c-Met staining was only significantly corrected with lymph node metastasis ($p<0.05$)

Variables		Expression of c-Met (%)		p-value
		Negative (30)	Positive (70)	
T	1, 2 (n=11)	4 (36.4)	7 (63.6)	0.704[1]
	3, 4 (n=29)	8 (27.6)	21 (72.4)	
N	- (n=13)	7 (53.8)	6 (46.2)	0.032[1]
	+ (n=27)	5 (18.5)	22 (81.5)	
M	- (n=34)	11 (32.4)	23 (67.6)	0.648[1]
	+ (n=6)	1 (16.7)	5 (83.3)	
Pathologic stage	I, II (n=6)	4 (66.7)	2 (33.3)	0.055[1]
	III, IV (n=34)	8 (23.5)	26 (76.5)	
Pathologic grades	Well (n=11)	3 (27.3)	8 (72.7)	0.851[2]
	Moderate (n=16)	6 (37.5)	10 (62.5)	
	Poor (n=13)	3 (23.1)	10 (76.9)	
Recurrence	Yes (n=13)	3 (23.1)	10 (76.9)	0.716[1]
	No (n=27)	9 (33.3)	18 (66.7)	

1) calculated by Fisher's exact test ($p<0.05$)
2) calculated by Mantel-Henzel test ($p<0.05$)

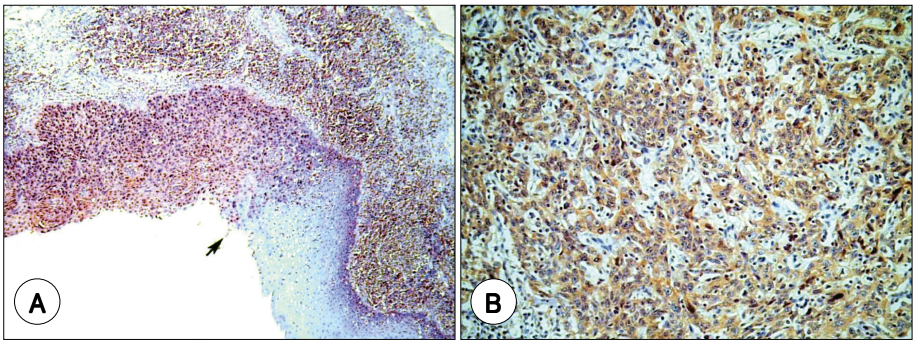

Fig. 2. Immunohistochemical expression of c-Met in the human hypopharyngeal carcinoma tissue. There was strong c-Met expression in cytoplasm of cancer cells but not in normal cells. Transition zone was shown in an apparent form (black arrow) ; magnification ×40 (A). It was shown that the expression was in the cytoplasm of cancer cells diffusely and strongly ; magnification ×200 (B).

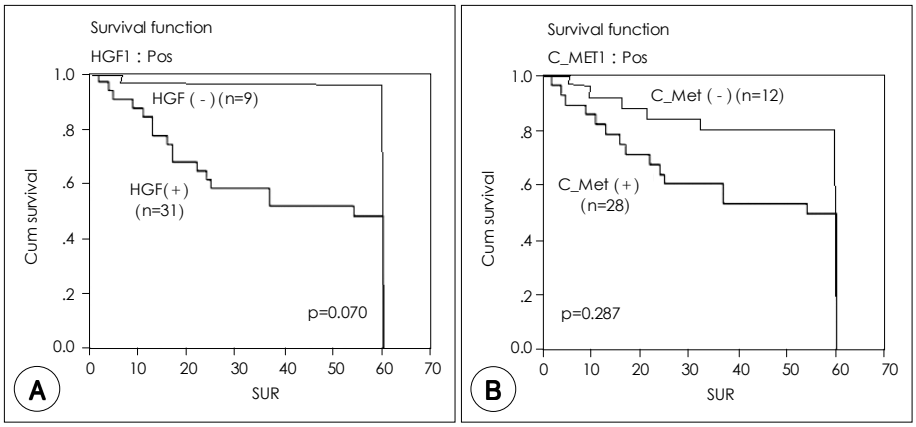

Fig. 3. Survival curves of hypopharyngeal carcinoma patients according to the expression of HGF (A) and c-Met (B).

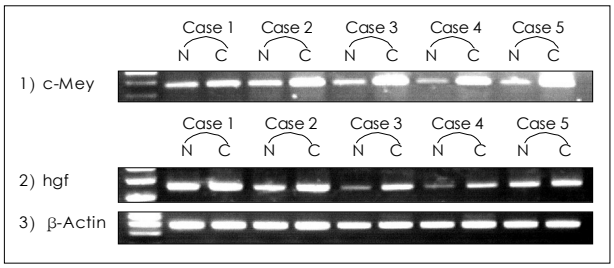

Fig. 4. RT-PCR analysis of HGF and c-Met expression in normal hypopharyngeal mucosa, hypopharyngeal cancer. The increased expression of HGF mRNA and c-Met mRNA were detected in hypopharyngeal cancer tissues.

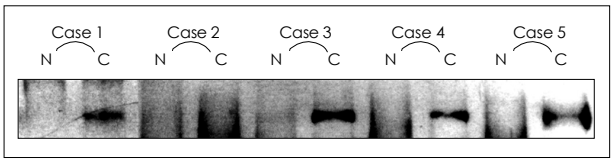

Fig. 5. Western Blotting in hypopharyngeal cancer tissue. The increased expression of c-Met protein were detected in cancer tissues (except Case 2).

재발되지 않은 경우(66.7%)에 비해 발현율은 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

추적기간 중 전체 40예의 환자중 17예(42.5%)가 사망하였는데 이중 10예는 국소재발에 의해서 사망하였고 4예는 전신전이에 의해, 2예는 국소재발과 전신전이에 의해 사망하였다. 생존분석은 Kaplan - Meier법을 이용하였고 그 의의는 Log - rank test로 평가하였을 때 HGF의 발현이 없었던 군이 있었던 군에 비해 생존율에서 차이는 있었으나 p - value 0.07로 통계적인 유의성은 없었다. c - Met의 발현도 생존율에는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3, $p>0.05$).

하인두암 조직에서의 RT - PCR과 Western blotting

하인두암 환자 5명의 신선조직에서 시행한 c - Met의 RT - PCR결과 3명에서는 정상 조직에 비해 암조직에서 뚜렷하게 발현이 증가되었고 2명의 환자에서는 정상보다 암조직에서 발현이 조금 더 증가된 것으로 확인되었다. HGF의 발현은 2명에서는 암조직에서의 발현이 강하였고 1명에서는 암조직에서 발현이 약간 증가한 것으로 보였으며 나머지 2명에서는 발현 정도의 차이가 미미했다(Fig. 4).

한편 하인두암 환자 5명에서 시행한 Western blotting의 결과상 c - Met의 발현에서 1명을 제외하고 4명에서 정상에서는 발현이 되지 않고 암조직에서 강하게 발현되는 것이 확인되었다(Fig. 5).

고 찰

HGF는 정상적인 상태에서 세포의 증식, 이동, 침습, 관(tube)형성과 혈관형성에 관여하여 상처의 치유나 몸의 기관을 형성하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[2)3)] 이러한 생리적이고 발생학적으로 중요한 기능 외에 종양 등의 병적인 상태에서도 이와 유사한 기능을 하는 것이 알려지면서 종양의 침습이나 전이에 있어 HGF의 역할에 대한 연구가 위장관암, 폐암, 췌장암, 백혈병, 유방암 등의 다양한 암종에서 진행되어 왔다.[10 - 13)] 이러한 연구의 결과 HGF가 종양주변의 섬유아세포에서 분비되어 암세포가 주변 기질로 침습하는 것을 돕는 역할을 하는것으로 알려지게 되었다. 이러한 암세포의 이동과 침습이 종양의 림프절 전이와 전신전이의 기초가 될 수 있는데 두경부암에서 이러한 침습과 전이를 가장 잘하는 종양이 하인두암이라고 할 수 있다. HGF가 종양의 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로 하인두암의 종양학적 특성을 이해하는데 HGF가 기여하리라고 생각하나 아직까지는 하인두암에서 HGF에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 하인두암에서 HGF와 수용체인 c - Met의 발현이 발현되는지 이러한 발현이 임상적으로 어떠한 의미가

있는지 알아보고자 하였다.

c-Met은 190 kDa의 receptor tyrosine kinase로서 170 kDa의 전구물질이 glycosylation과정을 거쳐 완성된 단백질로 세포외(extracellular)의 50 kDa α-subunit과 경세포막(transmembrane) 형태로 존재하여 tyrosine phosphorylation이 일어나는 145 kDa의 β-subunit로 구성되어 있다.[9] 이러한 c-Met을 지닌 세포는 간세포, 섬유모세포, 각질세포, 멜라닌 세포 등과 신장, 폐, 비장, 조혈 세포, 난소 등으로 알려져 있다.[9] 이 단백질에 결합하여 활성을 유발하는 ligand는 100 kDa의 heparin-binding polypeptide인 HGF로 세포의 증식, 분산, 이동, 침습과 혈관형성 등에 관여한다. HGF는 주로 섬유아세포, 평활근과 백혈구 등에서 생성 된다.[3] Uchida 등[14]에 의하면 구강의 섬유아세포는 HGF, TGF-β, IL-1, IL-6, IL-8, tumor necrotic factor-α, bFGF, vascular endothelial cell growth factor 등의 다양한 성장인자(growth factor)와 cytokine을 분비하는데 이러한 물질 중 HGF가 구강암세포의 침습과 전이에 가장 영향을 준다고 한다.

본 연구에서 40예의 하인두암에 대해 HGF와 c-Met에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 각각 77.5%와 70%에서 과발현을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 대부분의 하인두암이 c-Met 단백질을 생산하며 암에서 발생되는 어떠한 유도물질에 의해 암주변의 기질세포에서 HGF의 생성이 증가된다는 것을 의미한다. 기존의 하인두암에서의 연구가 없어 선행 연구와의 비교는 불가능하지만 후두암환자를 대상으로한 면역조직화학염색에서는 전체 82예 중 45예(54.9%)에서 c-Met 발현을 확인한 바 있었다.[15] 면역조직화학염색에 있어 중요한 것이 판독기준인데 위암을 대상으로 한 연구에서는 정상상피세포에서도 약 10%에서 c-Met의 발현이 관찰되기 때문에 암세포에서 c-Met의 발현이 10% 이상인 경우를 양성으로 정의한 연구도 있고,[16] 30% 이상의 암세포에서 c-Met이 발현된 경우에만 양성으로 판정한 연구도 있었다.[17] 본 연구에서는 microwave에서 항원 노출을 높이는 과정을 수행하였고 HGF와 c-Met에 대한 항체를 1 : 100의 높은 농도로 처리하였으므로 HGF와 c-Met의 발현이 30% 이상의 암세포에서 발현되고 염색강도가 중등도이상의 강도를 보인 경우를 양성이라고 정의하였다.

HGF의 경우에는 림프절 전이가 있는 경우와 임상병기가 높은 경우에 그 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었고 c-Met의 경우에는 림프절 전이가 있는 경우에 그 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었지만 결과에서 보여주듯이 대체적으로 HGF와 c-Met에 양성인 경우에 종양의 크기, 전신전이와 재발이 증가된 양상을 보여 보다 많은 증례를 분석을 시행하면 보다 유의한 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다. 앞서 기술한대로 Sawatsubashi 등[15]이 시행한 후두암환자를 대상으로 한 면역조직화학염색에서는 전체 82예 중 45예(54.9%)에서 c-Met 발현을 확인하였는데 림프절 전이는 12예중 10예 즉 83.3%의 발현을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 보아 본 연구와 마찬가지로 종양의 이동과 침습에 HGF와 c-Met이 중요한 역할을 하는 것으로 보이며 동일한 조건하에서의 검사가 필요할 수 있지만 하인두암에서 종양의 침습과 전이에서 중요한 역할을 하는것으로 알려진 HGF와 c-Met의 발현이 후두암에서 보다 증가된 것은 아마도 하인두암이 후두암에 비해 보다 공격적인 암일 가능성을 시사하는 것으로 생각된다.

Di Renzo 등[18]은 c-Met의 발현을 Western blotting으로 분석하였는데, 16예의 정상 위상피조직 모두에서 c-Met의 발현을 관찰하였고, 21예의 위암조직 모두에서도 c-Met 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다. 한편, 위암조직의 경우는 정상 위조직보다는 더 강한 발현을 보였다는 점으로 보아 대부분의 암의 진행에 c-Met의 활성화가 관련이 있음을 알 수 있다. 본 연구에서 HGF와 c-Met의 발현을 보이지 않은 경우에도 실제로는 조직내에 HGF와 c-Met이 적은 양이나마 존재할 것으로 추측되나 paraffin 포매에 저장된 조직에서 측정하기에는 미량이었기 때문에 면역조직화학적 염색법으로는 관찰할 수 없었다고 생각한다. 따라서 향후에는 면역조직화학염색상의 발현유무 뿐 아니라 조직내에 HGF의 농도를 측정하거나 Western blotting 등의 연구를 통해 종양의 진행하면서 HGF와 c-Met의 농도나 발현의 차이를 확인하는 연구가 필요하리라 생각된다.

생존분석의 경우 HGF와 c-Met의 발현율과 생존율사이의 통계적인 유의성은 없었으나 HGF의 경우 p-value가 0.07로 나타나 좀 더 많은 증례를 분석하면 통계적인 유의성을 확인할 수 있을 것이라 생각된다.

흥미로운 연구중에 하나는 정상과 종양에서 발현되는 HGF의 발현차이를 이용하여 HGF가 일종의 종양표시자(tumor marker)와 같은 역할을 한다는 보고가 있는데[19] 혈중 HGF의 농도가 위선암(gastric adenocarcinoma)에서 조기암에 속하는 stage Ⅰ과 Ⅱ에서는 정상과 비교해서 차이를 보이지 않았지만 stage Ⅲ와 Ⅳ에서는 정상보다 의미있게 높은 수치를 보였고 이러한 결과는 stage의 진행에 따라 증가함이 관찰되었다. 이 연구에서 높게 측정되었던 술전 HGF 수치는 술후 1개월에 정상으로 감소하였으나 재발한 경우에는 술전보다 더 높은 수치를 기록하여 HGF가 조기암에서는 수치가 높지 않아 민감도가 떨어지나 암수술

후의 재발여부 등을 확인하는데에는 유용한 종양표지자로서의 역할을 하리라고 주장하였다.[19] 이러한 연구는 종양의 성장과 전이에 있어 HGF가 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 증거라고 할 수 있다. Shimura 등[20]은 암세포의 주변에 위치한 섬유아세포에서 HGF가 생산되어 암세포에 작용하는 paracrine 기전을 제시한 바 있는데 본 연구에서도 HGF가 주변의 기질세포에서 강하게 발현되는 것이 이러한 paracrine 기전에 의해 종양세포에서 분비되는 어떠한 HGF의 분비유도물질에 의해 섬유아세포 등의 기질세포에서 HGF가 분비되는 것으로 추측된다.

하인두암 환자의 신선조직에서 시행한 RT-PCR의 결과에서 보면 정상의 경우에도 HGF와 c-Met의 발현이 일부에서 강하게 나타났는데 이에 대한 정량적인 검사가 필요할 수도 있으나 이는 정상조직을 얻을 때 종양 절제의 변연에서 주로 얻었는데 이럴 경우 암 주변 조직에서도 c-Met과 HGF에 대한 mRNA의 발현이 유도될 수도 있다는 추정이 가능하다. 향후 암 조직과 멀리 떨어진 곳에서 정상조직을 얻을 수 있다면 이에 대한 연구와 비교하는것도 좋으리라 생각된다. Western blotting에서는 1예를 제외하고 나머지 4예에서는 정상 조직에서는 c-Met의 단백질을 확인할 수 없었고 암 조직에서만 c-Met의 발현을 확인할 수 있어 HGF나 c-Met의 mRNA 발현이 있어도 이러한 것이 모두 HGF나 c-Met을 만드는 것이 아니라는 추정이 가능하나 이에 대한 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

본 연구를 정리하면 하인두암에서 면역조직화학적 염색상 HGF와 c-Met의 높은 발현율을 볼 수 있었고 HGF는 림프절 전이와 종양의 임상적 병기의 증가에서 c-Met는 임상적 병기의 증가에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 하인두암 조직에서 HGF와 c-Met의 m-RNA 발현과 HGF와 c-Met 단백질의 발현이 정상 조직에 비해 암조직에서 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 HGF과 c-Met의 발현이 하인두암의 림프절 전이와 환자의 예후와 관련이 있는 것으로 판단되며 향후 좀 더 많은 증례분석과 하인두암 세포주에서의 증식, 이동과 침습에 있어서의 HGF 영향에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

중심 단어 : 간세포성장인자(HGF) · c-Met · 하인두암.

REFERENCES

1) Matsumoto K, Matsumoto K, Nakamura T, Kramer RH. *Hepatocyte growth factor/Scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase ($p125^{FAK}$) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. J Biol Chem 1994;269:31807-13.*
2) Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeimer W. *Scatter factor. Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. J Cell Biol 1990;111:2097-108.*
3) Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nichkoloff BJ, Kinsella JL, *et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:1937-41.*
4) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. *Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Common 1984;122:1450-9.*
5) Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Leutteke NC. *Control of hepatocyte replication by two serum factors. Cancer Res 1984;44:4414-9.*
6) Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. *Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. J Cell Physiol 1984;119:183-92.*
7) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, *et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature 1989;342:440-3.*
8) Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, *et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7001-5.*
9) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, *et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science 1991;251:802-4.*
10) Boros P, Miller CM. *Hepatocyte growth factor: A multifunctional cytokine. Lancet 1995;345:293-5.*
11) Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. *Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. Cell 1991;67:901-8.*
12) Wang Y, Selden AC, Morgan N, Stamp GW, Hodgson HJ. *Hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human mammary epithelium. Am J Pathol 1994;144:675-82.*
13) Yanagita K, Nagaike M, Ishibashi H, Niho Y, Matsumoto K, Nakamura T. *Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. Biochem Biophys Res Commun 1992;182:802-9.*
14) Uchida D, Kawamata H, Omotemara F, Nakashiro K, Kimura-Yanagawa T, Hino S, *et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. Int J Cancer 2001;93:489-96.*
15) Sawatsubashi M, Sasatomi E, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. *Expression of c-Met in laryngeal carcinoma. Virchows Arch 1998;432:331-5.*
16) Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, *et al. The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. Cancer 1999;85:1894-902.*
17) Taniguchi K, Yonemura Y, Nojima N, Hirono Y, Fushida S, Miwa K, *et al. The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor. Cancer 1998;82:2112-22.*
18) Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, De Stefani A, *et al. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. Oncogene 2000;19:1547-55.*
19) Han SU, Lee JH, Kim WH, Cho YK, Kim MW. *Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma. World J Surg 1999;23:1176-80.*
20) Shimura H, Date K, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M. *Induction of invasive growth in a gall-bladder cancer cell line by hepatocyte growth factor in vitro. Jpn J Cancer Res 1995;86:662-9.*