

세포고사 억제 유전자 survivin의 발현과
신경모세포종의 예후

연세대학교 대학원
의학과
안수민

세포고사 억제 유전자 survivin 의 발현과
신경모세포종의 예후

지도 최 승 훈 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의학과

안 수 민

안수민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 학문적인 지도 편달과 아낌없는 격려를 보내 주신 최승훈 교수님께 진심으로 감사 드리며, 연구계획과 진행에 대해 자문해주신 유철주 교수님께도 심심한 감사를 올립니다. 논문의 완성을 위해 반복되는 작업들을 마다 않고 도와 주신 김세훈 선생님과 실험실 식구들의 노고에 깊은 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

아울러 통계 처리에 도움을 주신 형우진 선생님과 오정탁 선생님께도 감사 드립니다.

무엇 보다 오늘의 소아외과의로서 인성과 학문적 기초를 닦아주신 황의호 선생님께 감사 드리며, 항상 힘이 되어 준 가족과 함께 작은 성취를 나누고 싶습니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 연구 범위	6
2. 연구 방법	8
가. 연구 대상	8
나. 면역조직화학염색	8
다. 통계 분석	9
라. Staining	Protocol
10	
III. 결과	14
1. 대상 군의 일반적 특성	14
2. 연령, 병기, 원발 병소 및 Shimada 분류 군에 따른 생존율 분석	14
3. 면역조직화학염색 결과 및 survivin 발현에 따른 생존율 분석	15

4. survivin 발현 유무와 연령, 병기, 원발 병소 및

Shimada 분류형과의 관련성 _____ 17

5. 예후 인자 별 상대위험도	18
6. 일차 관해 여부와 재발 유무에 따른 survivin 의 발현율	19
IV. 고찰	20
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	29

그림 차례

그림 1. 면역조직화학염색 결과 ————— 16

그림 2. survivin 발현에 따른 생존율 ————— 17

표 차례

표 1. 연령, 병기, 원발 병소 및 Shimada 분류 군에 따른 생존율 분석 ————— 15

표 2. survivin 발현 유무와 연령, 병기, 원발 병소 및 Shimada 분류형과의 관련성 ————— 18

표 3. 예후 인자 별 상대위험도 ————— 18

표 4. 일차 관해 여부와 재발 유무에 따른 survivin 의 발현율 ————— 19

국문요약

세포고사 억제유전자 survivin의 발현과 신경모세포종의 예후

다양한 임상적 요인 및 분자유전학적 인자들이 신경모세포종의 예후에 결정적 영향을 미친다. 따라서 새로운 예후 인자를 발견하여 치료 방법의 설정에 응용함으로써 생존율 향상에 기여할 수 있다. 본 연구에서는 다양한 인간 암세포에서 발현되는 세포고사 억제 유전자인 survivin의 신경모세포종 세포 내 발현을 조사하고 임상적 경과에 미치는 영향을 분석하여, 새로운 독립 예후 인자로서의 가치를 평가하고자 하였다. 신경모세포종으로 수술을 시행 받은 41명의 환자를 대상으로 하였다. 면역조직화학염색법을 이용하여 파라핀 봉매(paraffin-embedded) 신경모세포종 조직 내에서 survivin의 발현 정도를 조사하였다. 연령, 병기, 원발 병소의 위치, Shimada 분류형 및 survivin 발현 유무에 따른 환자 군의 생존율 차이를 분석하고, survivin 발현과 불량 예후 인자와의 관련성을 분석하였다. 다변량 분석을 시행하여 독립 예후 인자를 평가하였다. 일차 관해 여부와 재발 유무에 따른 환자 군 간의 survivin 발현을

차이를 분석하였다. 추적관찰기간의 중앙값은 23 개월(1-121 개월)이었고, 2 년 및 5 년간 전체생존율은 각각 57.8%와, 38.4%이었다. 진행암(INSS stage 3,4), 부신 원발 종양, 불량 Shimada 분류형 및 survivin 발현 군에서 유의한 생존율 감소가 있었다($p = .01, .01, .02, .00$). 전체 환자 군에서 survivin 의 발현율은 59.4%($n=22$)였다. 고 연령, 진행암, 불량 Shimada 분류형 군에서 각각 survivin 발현율이 높았다($p = .03, .00, .03$). survivin 발현 군과 불량 Shimada 분류형 군에서 각각 상대위험도가 높게 나타났다($RR=6.55, p = .01; RR=5.20, p = .01$). 비관해 환자 군과 재발 환자 군에서 각각 survivin 발현율이 높았다($p = .02, .04$). 세포고사 억제 유전자 survivin 의 신경모세포종 세포질 내 발현은 종양의 생존력을 증가시켜 치료에 대한 저항성을 유발하고, 질병의 진행을 촉진하는 새로운 독립 예후 인자로서의 가치를 가진다고 생각된다.

핵심되는 말: 신경모세포종, 예후, 세포고사 억제, 서바이빈

세포고사 억제 유전자 survivin의 발현과 신경모세포종의 예후

<지도 최 승 훈 교수>

연세대학교 대학원 의학과

안 수 민

I. 서론

신경모세포종은 소아기에 발생하는 고형 종양 중에서, 두개강 내 종양을 제외하고 가장 흔한 악성 종양으로서, 소아기 전체 종양의 8-10%를 차지한다. 신경모세포종은 특징적으로 자가 퇴행하는 경우가 발견되지만, 대개의 경우 공격적이며 재발률이 높다^{1,2}. 원발 병소에 대한 수술, 항암약물요법 및 외부방사선치료를 병합하여 생존율이 향상 되었으나, 연령, 병기, 조직병리학적 분류형 및 다양한 분자생물학적 요인 등이 임상적 경과에 영향을 준다³. 이러한 예후 인자들은 종양 세포의 생존력 및 공격성과 관련이 있으며, 신경모세포종의 경과를 예측하고, 치료 방향을 설정하는데 있어 결정적 역할을 한다⁴. 따라서 각

환자의 다양한 예후 인자를 고려하여 원발 병소에 대한 수술 및 암화학요법요법의 시기, 종류, 용량, 외부방사선치료 방법을 결정하는 것이 질병의 경과를 호전시키기 위해 신중히 고려되어야 한다^{5,6}. 이러한 기존의 예후 인자를 고려한 치료 방법의 설정이 생존율을 높이는데 일정한 기여를 한 것이 사실이나, 현재까지 5 년간 전체 생존율은 52%-71% 정도로 보고 되고 있다⁴⁻⁶. 따라서 생존율 향상을 위해서는, 적절한 치료 방법 설정을 위해 고려해야 할 객관적 자료로서 새로운 독립 예후 인자에 대한 확립이 필요하다고 생각된다.

세포고사(apoptosis)는 세포의 자살 프로그램을 활성화 시켜, 자연 세포사를 유발하는 일련의 과정이며, 적절한 자가 세포사멸(apoptosis)의 조절은 조직의 항상성 유지와 발달에 필수적 요소이다. 따라서 세포고사 과정의 저해 또는 촉진 요인들 간의 불균형에 의해서 세포의 생존력이 결정될 수 있으며, 이러한 세포고사 과정의 저해는 종양의 병태학적 발생과정과 질병의 진행에 영향을 준다⁷⁻⁹. 세포고사 억제 단백(IAP: inhibitor of apoptosis protein)의 일종인 survivin 은 신경모세포종을 비롯한 종양 세포와 태아조직에서 다양한 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 종양의 생존력을 증가시킨다¹⁰⁻¹⁴. 본 연구에서는 각 신경모세포종 세포질 내에서의 survivin의 발현 유무와 임상 경과 및 기존의 예후 인자와의 관련성을 조사하여, 새로운 독립 예후 인자로서의 가치를 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구범위

Survivin 의 발현이 신경모세포종의 예후 인자로서의 가치를 가지는가를 밝히기 위해서는, 환자 군에 대한 추적 관찰 결과, 각 환자 별 기존의 예후 인자 파악, 종양 조직의 확보, 면역조직화학염색을 이용한 survivin 발현 유무 판정 및 통계학적 분석이 필요하다. 환자에 대한 추적관찰 결과를 얻기 위해서는 외래 진료 및 전화 면담을 이용하였다. 기존의 예후 인자와 survivin 의 관련성 검증 절차를 위해 의무기록을 후향적으로 조사하여 공통적으로 수집할 수 있는 일반 정보 및 대상 기간 내에서 동일하게 시행된 검사 항목을 파악하여 분석 가능한 인자의 목록을 작성하였다. 예후 인자에 대한 후향적 조사라는 제한점으로 인해 일관된 검사결과를 확보하지 못했으므로 선택오류(selection bias)를 없애기 위해 분석 대상 예후 인자를 연령, 병기, 원발 병소, Shimada 조직형, survivin 발현 유무로 한정하였다. 종양 조직은 대상 기간 동안 병리학과에 보관된 파라핀 봉매 조직(Paraffin embedded tissue)을 이용하였다. 면역화학조직염색법은 타 종양 세포에서의 survivin 발현에 관한 연구에서 광범위하게 사용되고 있으며, 조작이 비교적 용이하고 소요 시간을 줄일 수 있는 장점이 있으며 파라핀 봉매 조직에서

염색 결과의 신뢰성이 확보되어 있다. survivin 단백 발현을 평가 할 수 있는 정확한 방법으로서 Western blot method 고려할 수 있으나, Paraffin embedded tissue 를 이용하므로 정확성과 신뢰도가 제한을 받을 수 있으므로 연구 방법에서 제외하였다. survivin 발현의 정도는 동일 현미경 시야 하에서 발색 반응 세포 수를 세어 일차 정량적 자료(metric variable)화 한 후, 발색 반응 세포수가 일정 비율 이상인 경우를 양성으로 판독하고 정성적 자료(non metric variable)로 전환하여 통계학적 처리를 시행하였다. 대상 군 내에서 일차적으로 상정한 예후 인자와 survivin 의 발현유무를 기준으로 환자 군을 계층화(stratification)하여 각 인자 별 생존율 차이를 분석하였다. 이차적으로 생존율 차이를 유발한 요인을 예후 인자로 가정하고 survivin 발현과의 연관성을 분석하고, 최종 단계로 Cox proportional hazard model 을 이용하여 독립 예후 인자를 선별하였다. 이상의 과정에서 survivin 이 통계학적으로 의미 있는 독립 예후 인자로 판명된다면, ‘survivin 발현은 신경모세포종 치료 방향의 설정에 고려되어야 할 독립 예후 인자이다.’ 는 결론을 얻을 수 있다고 가정하였다.

2. 연구 방법

가. 연구 대상

1992 년 1 월부터 2002 년 12 월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원 소아외과에서 신경모세포종으로 수술을 시행 받은 41 명 중 추적 관찰이 가능한 37 명의 환자를 대상으로 하였다. 의무기록을 통하여 환자의 연령, INSS(International Neuroblastoma Staging System) 병기, 원발 병소의 위치를 후향적으로 조사한 후, 외래 추적관찰 결과를 확인하여 대상 환자 군의 생존여부와 현재의 질병상태를 조사하였다. 종양 조직은 파라핀 봉매 종양 조직을 이용하여 H & E 염색을 시행한 후 한 명의 숙련된 병리학자에 의해 조직의 분화도를 재평가하고 후 Shimada 분류형에 따라 대상 군을 계층화 하였다.

나. 면역조직화학염색

면역조직화학염색을 시행하여 survivin 발현 정도를 평가하였다. 1 차 항체는 Affinity-purified rabbit anti-human survivin antibody (R & D System, Inc, USA)를 사용하며, 발색 반응은 ChemoMate Envision kit (K5007, DACO, Japan)와 LSAB + / HRP kit (K0690, DACO, Japan) 두 가지 방법을 사용하여 평가하였으며, 최종적으로 발색 반응이 선명한 후자를 선택하였다. 세포질 내의 양성 발색 반응

세포 수를 전산화 된 이미지 분석 프로그램(Mocha™, Image analysis software, USA)을 이용하여 정량화하였다. 발색 반응의 양성 판독기준은 고 배율 현미경하에서 발색 반응을 보인 세포수가 전체의 5% 이상인 경우로 정하였다.

다. 통계 분석

연령, INSS 병기, 원발 병소의 위치, Shimada 조직 분류 및 survivin 발현 유무에 따라 환자 군을 계층화하여 단변량 분석을 시행한 후 생존율에 영향을 미치는 인자를 평가하였다(Kaplan-Meier method & Log-rank test). 통계적학적으로 유의한 생존율 차이를 보인 인자를 본 대상 군에서의 예후인자로 가정하고 survivin 발현 유무와의 연관성을 분석하였다(Chi-square test). 최종 단계로 Cox's proportional hazard model 을 이용한 다변량 분석을 시행하여 신경모세포종의 임상 경과에 영향을 미치는 독립 예후 인자를 평가하였다. 수술 및 항암약물치료 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 비재발 군 간의 survivin 발현율의 차이를 Chi-square test 를 이용하여 분석하였다. 모든 통계 처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS) version 11.0

for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하였고 유의 수준은 $p\text{-value} < .05$ 로 검증하였다.

라. Staining Protocol

Step 1: Hydration.

- 1) Xylene 에 slide 를 넣은 후 10 분간 탈 파라핀 한다.
- 2) 새로운 Xylene 에 slide 를 넣은 후 10 분간 탈 파라핀 한다.
- 3) 100% Alcohol 에 slide 를 1 분간 넣어 Xylene 을 제거한다.
- 4) 95% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 5) 85% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 6) 75% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 7) 증류수에 slide 를 3 분간 둔다.
- 8) 새로운 증류수에 3 분간 둔다.

Step 2: Demasking.

- 1) slide 를 TRS buffer 에 넣은 후 Autoclave 에서 121C° , 15 분간 처리한다.
- 2) 새로운 증류수에 10 분간 행군다.
- 3) DACO pen 으로 조직 주변에 경계를 표시한다.
- 4) TBS buffer 에 5 분간 처리한다.

Step 3: 3% H2O2 Blocking.

- 1) Bottle 1 의 3% H2O2 Blocking, 5 분간 처리한다.
- 2) slide 를 꺼내어 TBS buffer 에 행구어 새로운 TBS buffer 에 10 분간 둔다.

Step 4: Primary antibodies and Negative control.

- 1) slide 를 buffer 에서 꺼내어 specimen 주변을 닦는다.
- 2) primary Ab 와 negative control reagent 를 각각의 specimen 에 충분히 떨어뜨린다.
- 3) 30 분간 wet incubation box 에 마르지 않도록 덮어 둔다.
- 4) slide 를 꺼내어 TBS buffer 에 행구어 새로운 TBS buffer 에 10 분간 둔다.

Step 5: Link antibody

- 1) slide 를 buffer 에서 꺼내어 잘 털어준 다음 specimen 주변을 닦는다.

- 2) Bottle 3 의 DACO link Ab 를 각각의 specimen 에 충분히 적신다.
- 3) 15 분간 wet incubation box 에 마르지 않도록 뚜껑을 잘 덮어둔다.
- 4) slide 를 꺼내어 TBS buffer 에 헹구어 새로운 TBS buffer 에 10 분간 둔다.

Step 6: Steptavidin Peroxidase

- 1) slide 를 buffer 에서 꺼내어 잘 털어준 다음 specimen 을 닦는다.
- 2) Bottle 4 의 DACO streptavidin peroxidase 를 각각의 specimen 에 충분히 적신다.
- 3) 15 분간 wet incubation box 에 마르지 않도록 보관한다.
- 4) slide 를 꺼내어 TBS buffer 에 헹군다.

Step 7: Substrate-Chromogen solution

- 1) slide 를 buffer 에서 꺼내어 잘 털어준 다음 specimen 주변을 닦는다.
- 2) 미리 만들어 둔 substrate chromogen solution 를 각각의 specimen 에 충분히 적신다.
- 3) 5 분간 wet box 에 마르지 않도록 보관한다.
- 4) slide 를 꺼내어 증류수에 헹군다.

Step 8: Counter stain

- 1) slide 에 hematoxylin 을 떨어준다.
- 2) slide 를 꺼내어 증류수에 행구어 둔다.
- 3) Ammonia water 에 10 회 dipping 한다.
- 4) 증류수에 2 분간 담가 행군다.

Step 9: Dehydration

- 1) 75% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 2) 85% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 3) 95% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 4) 100% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 5) 새로운 100% Alcohol 에 slide 를 1 분간 둔다.
- 6) Xylene 에 slide 를 넣은 후 10 분간 둔다.
- 7) 새로운 Xylene 에 slide 를 10 분간 둔다.

Step 10: Mounting

Hystolyte 를 사용하여 cover slip 으로 mount 한다.

Ⅲ. 결과

1. 대상 군의 일반적 특성

추적 관찰이 가능한 환자는 모두 37 명이었고, 남녀 비율은 1:1(남자, 19; 여자, 18)이었다. INSS 병기 분류 상 1 기 10.8%(n=4), 2 기 21.6%(n=8), 3 기 24.3%(n=9), 4 기 43.2%(n=16)이었고 4-s 기는 없었다. 추적 관찰기간의 중앙값은 23 개월(1-121 개월)이었다. 진단 당시 평균 연령은 4.7 ± 4.0 세(중앙값 2.7 세)였다. 저연령과 고연령 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.

2. 연령, 병기, 원발 병소 및 Shimada 분류 군에 따른 생존율 분석

수술 후 전체 생존율은 2 년간 57.8%이었고 5 년간 38.4%였다. 5 년간 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).

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	< 1yr	60.4 (8)	0.078
	> 1yr	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.

3. 면역조직화학염색 결과 및 survivin 발현에 따른 생존율 분석

고배율 현미경 시야에서 survivin 양성 발현 세포질은 헤마톡실린과 에오신 배경 염색과 대별되어 담갈색으로 관찰되었다(Fig. 1).

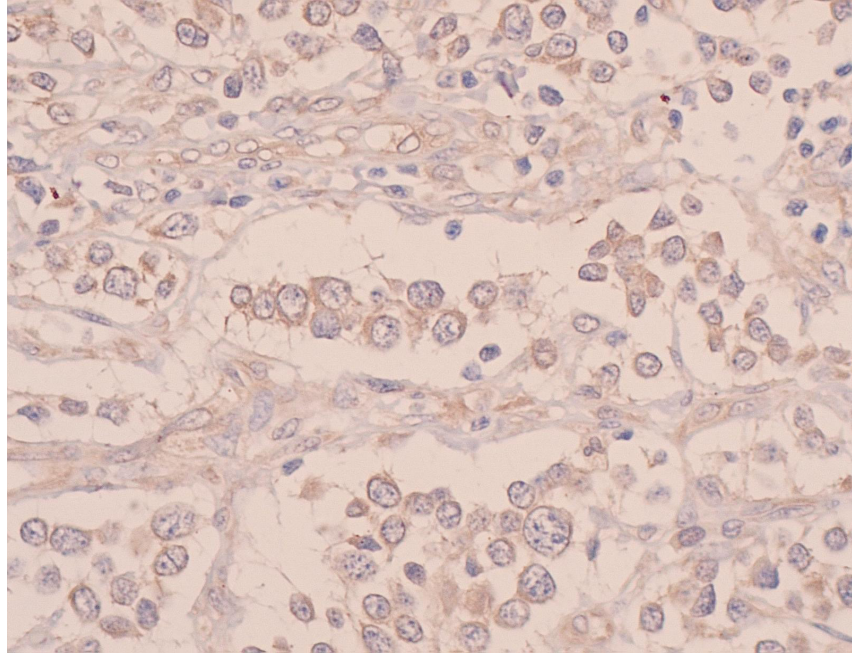


Fig. 1. Most of the neuroblasts are SE (+) in 4-year-old patient (primary left adrenal gland, stage 4, Shimada unfavorable histology) (H & E stain background, $\times 200$).

전체 환자 군에서 survivin 의 발현율은 59.4%(n=22)였고, survivin 발현 군이 비 발현 군 보다 5년간 전체 생존율이 낮았다(15% vs 70%, p= .00)(Fig. 2).

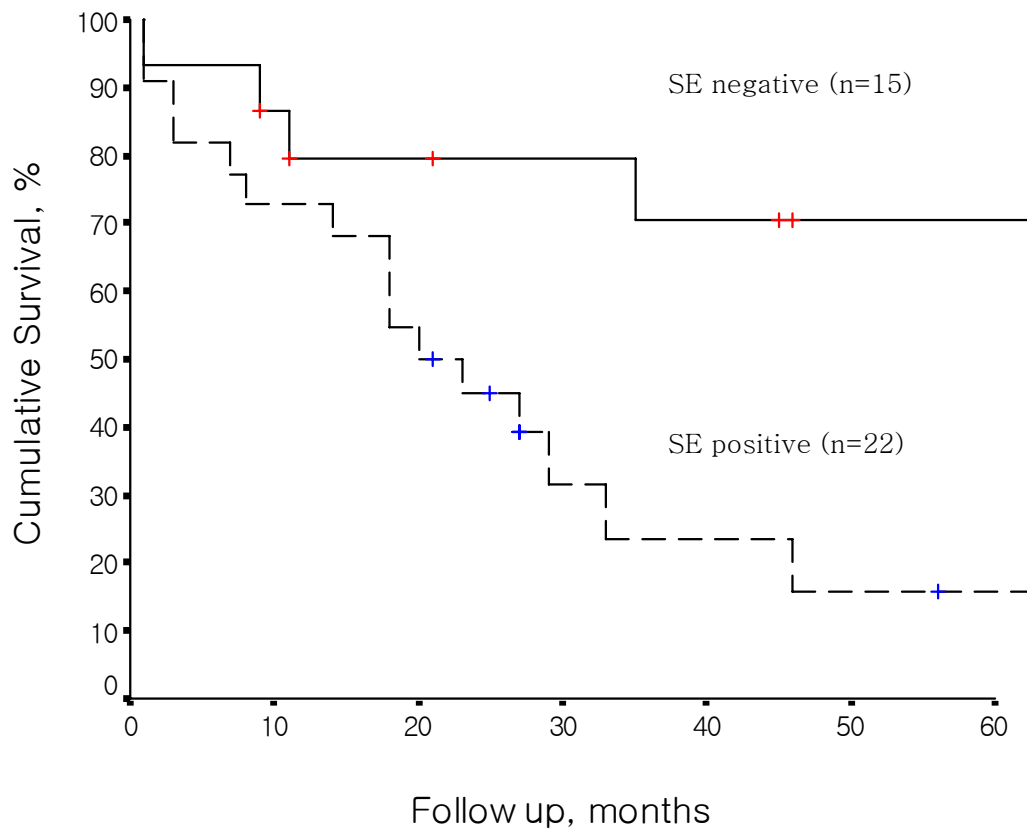


Fig.2. Neuroblastoma specific 5-year overall survival rate according to survivin expression (SE, survivin expression; $p=0.008$)

4. survivin 발현 유무와 연령, 병기, 원발 병소 및 Shimada 분류형과의 관련성

고 연령, 진행암, Shimada 불량 조직형 군에서 각각 survivin 의 발현율이 높았고($p= .03, .00, .03$), 원발 병소에 따른 발현율 차이는 없었다($p= .45$)(Table 2).

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	< 1yr	75.0 (6)	25.0 (2)	0.030
	> 1yr	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	FH	57.9 (11)	42.1 (8)	0.030
Class	UH	22.2 (4)	77.8 (14)	

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

5. 예후 인자 별 상대위험도

survivin 발현 군과 불량 Shimada 분류 군의 상대위험도가 각각 높게 나타났다(RR=6.55, p= .01; RR=5.20, p= .01)(Table 3).

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.

6. 일차 관해와 재발 유무에 따른 survivin 의 발현율

비 관해 환자 군과 재발 환자 군에서 각각 survivin 의 발현율이 높게 나타났다(84.6% vs 45.8%, $p = .02$; 72.7% vs 30.8%, $p = .04$)(Table 4).

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)	
		SE, % (n)		P-value
		Negative (12)	Positive (12)	
Recurrence	Yes(n=11)	27.3 (3)	72.7 (8)	0.040
	No (n=13)	69.2 (9)	30.8 (4)	

SE=survivin expression

IV. 고찰

신경모세포종의 다양한 예후인자를 확립하는 것은 치료 방법의 설정에 반드시 필요하다. 병기와 연령은 신경모세포종의 가장 중요한 임상적 예후 인자이며, ferritin, lactate dehydrogenase, neuron-specific enolase 의 혈청 내 농도와 요중 catecholamine 대사 산물의 양 및 N-myc amplification, DNA ploidy, 1p deletion, 17q gain 등의 분자유전학적 표지자가 예후 인자로 밝혀져 있다⁴⁻⁶. 저자들은 11 년간의 의무기록을 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 보고 된 예후 인자들 중에서 연령, 병기, 원발 병소, Shimada 분류형 만을 조사하였다. 각 인자 별로 계층화된(stratified) 환자 군 간의 생존율 차이를 조사한 결과 3 기 이상의 병기, 부신 원발 종양, Shimada 불량 조직형 군에서 유의한 생존율 감소를 보여 기존의 보고와 일치하였다⁴⁻⁶.

강력한 예후 인자인 연령에 따른 생존율 차이가 통계적인 유의성을 나타내지 않았고, 단지 고 연령이 질병의 불량한 임상 경과와 연관성을 갖는 경향을 보였다($p = .07$). 이는 대상 군의 연령 분포가 고 연령 군(78%)에 치우쳐 통계 분석

상 유의성을 찾을 수 없었던 것으로 생각된다. 또한 5 년간 전체 생존율이 38%로서 타 기관의 보고(51-71%) 보다 낮았는데^{6,15-17}, 강력한 불량 예후 인자인 고 연령군의 비율이 높고 진단 시기가 기존의 보고 보다 늦기 때문이라고 생각된다(고 연령군, 78% vs 45-52%; 연령의 중앙값, 33 개월 vs 16 개월)^{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 평가 할 수 있는 보다 정확한 방법으로서 Western blot method 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 유사하였으며²³, survivin 발현 군이 비 발현 군 보다 현저한 생존율 감소를 나타내어 질병의 불량한 경과와 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한, 통계적으로 유의한 생존율 감소를 유발했던 인자인 진행 병기 및 Shimada 불량 조직형 군에서 survivin 발현율이 유의하게 높게 나타나 다른 불량 예후 인자와도 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 확인 되었다.

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, 6.55 로 유의하게 증가하여, 기존에 알려진 Shimada 분류형과 함께 세포질 내의 survivin 발현이 신경모세포종의 새로운 독립 예후인자임을 알 수 있었다.

Sandler 등²⁴의 보고에 의하면 일차 관해 군의 survivin의 발현율은 27.7%로 낮았지만, 이후 재발한 환자 군에서는 90%의 높은 발현율을 나타내었다. 저자들의 연구에서는 비 관해 군에서의 survivin 발현율은 일차 관해 군에서의 발현율 보다 유의하게 높았고(84.6% vs 45.8%), 일차 관해 후 재발이 발생한 환자 군의 survivin 발현율은 무병 생존 환자군 보다 현저히 높았다(72.7% vs 30.8%). 따라서, 고유한 세포고사 억제(anti-apoptosis) 기능을 수행하는 survivin이 신경모세포종 세포질 내에서 발현되어, 수술, 항암약물요법 및 외부방사선조사 등의 치료에 대한 저항성을 증가시키고, 국소재발 및 원격전이와 같은 질병의 진행과 관련성이 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

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

참 고 문 헌

- 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.761-797.
- 2) Grosfeld JL et al. Neuroblastoma in the first year of life: clinical and biologic factors influencing outcome. Semin Pediatr Surg 1993;2:37.
- 3) Coldman AJ, Fryer CJH, Elwood JM. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumour site, and sex on prognosis. Cancer 1980;46:1896-1901.
- 4) Saito T, Tsunematsu Y, Saeki M, 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, et al. First experience with prognostic factors in unselected neuroblastoma patients: The Austrian neuroblastoma 87 study. Eur J Cancer 1995;31:637-641.
- 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;88:355-365.
- 9) Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;6: 777-779.
- 10) Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, Caspase, anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320.
- 11) Li F, Ackermann EJ, Bennett FC, et al. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999;1:461-466.
- 12) Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, et al. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patient with hepatocellular carcinoma. 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, et al. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent pathways. *J Neurochem* 2001;79:426-436.

- 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;17:3216-3220.
- 16) Michael P, Quaglia L. Surgical management of neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg* 2001;10:132-139.
- 17) Tonini GP, Boni L, Pession A, 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;16:1265-1269.
- 19) Moppett J, Haddadin J, Foot ABM. Neonatal Neuroblastoma. *Arch Dis Child Neonatal* 1999;81:134-137.
- 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(16):3012-3017.
- 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(14):1041-1046.

- 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(14):1047-1053.
- 23) Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-883.
- 24) Sandler A, Scott D, Azuhata T, Takamizawa S, O'Dorisio S. The Survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Ped Surg* 2002;37:507-511.

Abstract (In English)

Anti-apoptosis gene, Survivin Expression and Prognosis of Neuroblastoma

Soo Min Ahn

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung Hoon Choi)

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 neuroblastoma. 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 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. The median follow up period was 23 months. The 5-year overall survival rate was significantly reduced with the advanced stage, adrenal primary, unfavorable Shimada class, and positive SE (p= .01, .01, .02, .00). The positive SE correlated with old age, advanced stage, and an unfavorable Shimada class (p=.03, .00, .03). The relative risk of the SE positive group was 6.55 (p=.01). Survivin was expressed in 73% of the recurred cases, but in only 31% of the non-recurred cases (p=.04). Survivin expression is a valid independent prognostic factor for neuroblastoma, and it correlates with the disease progression and a poor prognosis.

Key Words: neuroblastoma, prognosis, inhibitor of apoptosis protein, survivin