

난소암 조직에서 HLA-G의 발현과
예후 인자와의 상관성

연세대학교 대학원
의 학 과
홍 원 기

난소암 조직에서 HLA-G의 발현과
예후 인자와의 상관성

지도 김 영 태 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

홍 원 기

홍원기의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 항상 깊은 관심을 가지고 지도해 주신 김영태 교수님께 진심으로 감사를 드리며, 지도 편달을 아끼지 않으신 이혜연, 김종선 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 실험을 도와준 강명화 연구원, 통계 분석을 도와준 정미영 양께 감사를 드립니다.

의학도의 길에 들어선 지 적지 않은 세월이 흘렀습니다. 오늘에 이르기까지 무한한 사랑과 격려로 이끌어주신 그 무엇보다도 소중한 부모님, 동생과 그리고 항상 곁에서 학업에 전념할 수 있게 힘이 되어준 사랑하는 아내 윤정현에게 이 논문을 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	iii
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 대상	7
2. 병리조직검사	7
3. 예후 인자	8
4. 연구 방법	8
가. Quantitative real time RT polymerase chain reaction.....	8
나. Western blot analysis	10
5. 통계 분석	12

III. 결 과	13
1. 임상소견.....	13
2. 대조군 난소 조직과 난소암 조직에서 quantitative real time RT-PCR에 의한 HLA-G 발현 분석	15
3. 대조군 난소 조직과 난소암 조직에서 Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석.....	16
4. 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현, 단백질의 발현과 임상 병리학적 예후인자들과의 상관성	17
IV. 고 찰.....	19
V. 결 론	24
참고 문헌.....	25
영문 요약.....	30

그림 차례

Figure 1. Comparison of mRNA expression of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR	16
Figure 2. Comparison of protein analysis of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by Western blot analysis	17

표 차례

Table 1. Clinicopathological characteristics of ovarian cancer patients.....	14
Table 2. Comparison of mRNA expression of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR	15
Table 3. Level of mRNA and protein expression of HLA-G in various clinicopathological factors	18

국문 요약

난소암 조직에서 HLA-G 발현과 예후 인자와의 상관성

목적: 본 연구는 악성 난소암에서 quantitative real-time RT PCR과 Western blot analysis을 이용하여 HLA-G의 mRNA와 단백질의 발현 정도를 측정 한 후, 이의 발현 정도에 따라 HLA-G의 발현의 의미와 난소암의 다른 예후 인자와의 상관 관계를 연구하고자 한다.

재료 및 방법: 연세대학교 세브란스병원 산부인과에서 1997년부터 2005년 현재까지 난소 종양으로 진단받은 환자 중 43명의 난소 조직을 실험군으로, 정상 난소 조직 5예를 대조군으로 하여 전향적인 연구를 시행하였다. 악성 난소암 환자는 기초 검사를 시행한 후 병기 결정을 위한 개복술을 시행하였으며 수술 후 보조항암화학 요법을 시행하였다. Quantitative real time RT PCR과 Western blot analysis를 이용하여 HLA-G의 mRNA 와 단백질의 발현을 측정하였다.

결과: 난소암 조직에서의 HLA-G의 mRNA 발현의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 의 median값은 1.21 (0-9)였고, 대조군 난소 조직에서의 median 값은 0.01 (0-0.02)로 나타나 난소암 조직과 대조군 난소 조직 사이에 HLA-G의 mRNA 발현 차이는 통계적으로 유의하였다 ($P=0.005$). Western blot analysis에 의해 난소암 조직과 대조군 난소 조직에서의 단백질 발현은 거의 차이를 보이지 않았으며, 통계적 유의성이 없었다. 난소암

에서의 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 임상 병리학적 예후 인자와의 비교에 있어서 진단 당시의 혈청 내 CA 125 와 HLA-G 단백질 발현과의 사이에서 통계적으로 유의한 상관성을 보였으며 ($P=0.02$) 다른 임상 병리학적 예후 인자와는 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

결론: 본 연구 결과에 의하면 HLA-G가 정상 대조군 난소에 비해 난소암에서 높게 발현되므로 난소암의 암발생기전 (carcinogenesis)에 있어서 HLA-G가 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. HLA-G의 단백질 발현은 다른 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았지만, 예후 인자 중 하나인 혈청 내 CA 125와 유의한 상관관계를 나타내었다. 이는 HLA-G가 예후 인자로 사용되기 위해서는 향후 생존율과 연관된 연구가 추가로 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

핵심 되는 말: 난소암, HLA-G, quantitative real time RT PCR, Western blot analysis

난소암 조직에서 HLA-G 발현과 예후 인자와의 상관성

< 지도교수 김 영 태 >

연세대학교 대학원 의학과

홍 원 기

I. 서 론

난소암은 선진국에서는 발생률이 부인암 중 2번째로 높으며, 사망률은 전체 암의 4번째 높은 악성 종양이다. 미국의 경우 매년 약 25,000명의 환자가 진단되고 3.8%를 차지하는 것으로 보고되었다.^{1,2} 난소암은 초기에는 자각 증상이 거의 없으므로, 대부분 질병이 상당히 진행되고 난 FIGO (International Federation of Obstetrics and Gynecology) 수술적 병기 III-IV기에 70-75%의 환자가 발견되고, 여전히 완치가 힘든 질환이며 진행성 난소암 환자의 대부분은 불량한 예후를 나타내고 있다. 난소암의 예후 인자로 알려진 것들에는 여러 가지가 있지만 이들 중 중요시 되는 것들이 병기 (stage), 조직학적 분화도 (histologic grade), 혈청 내

CA-125 수치, 잔류 암의 크기 (residual tumor size), 유세포분석법 (flow cytometry)을 통한 DNA 정량 검사 등 이다.³ 난소암의 치료를 위해서 수술 요법, 항암 화학요법, 방사선 요법과 더불어 면역 요법을 이용한 다양한 시도가 이루어지고 있는 현실이다. 면역 요법을 이용한 방법으로는 cytokines를 이용하여 항암 화학요법과 겸용하여 사용한 바 있다.⁴

면역학적 관점에서 보았을 때, 종양 세포에서 발견되는 항원은 주조직접합체 (major histocompatibility complex, MHC)와 결합하게 되는데 인간에서는 인체 백혈구 항원 (Human leukocyte antigen, HLA)/펩타이드 (peptide) 복합체의 형태로 T 세포에 의해 감작된다. 암세포가 이러한 비고전적 MHC class I 발현을 손상시켜 T 세포와 암세포간의 반응이 저지된다.⁵ 비고전적 MHC class I gene 중의 한 형태인 HLA-G는 세포막 접합체 형태 (HLA-G1, -G2, -G3, -G4)와 수용성 (HLA-G5, -G6, and -G7)으로 구분되고 있고⁶ 주로 산모-태아 사이에 있어서 산모의 면역 체계로부터 태아를 보호하기 위해 발견되는 것으로⁷ 밝혀지게 되었는데 악성 종양 세포에서도 면역 회피의 기전과 관련되어 이러한 분자 (molecule)의 발현이 보고되었다.⁸ HLA-G는 NK (natural killer) 세포, T세포 등과 같은 여러 면역학적 인체 방어 기전에 관여하는 세포들을 방해함으로써 면역 체계로부터 종양 세포를 인지하지 못하도록 하는데 관여하는 것 생각되어지고 있다.⁹ 실험실 결과에서 단핵구의 HLA-G 분비는 TH1 cytokines 에 의해 영향을

받고 있으며, HLA-G 의 발현이 T 세포와 NK 세포의 기능을 방해함으로써, 악성 암이 면역 체계로부터 벗어나게하고 악성 암의 진행을 도와준다고 발표되었다.¹⁰ 또한, HLA-G의 다른 역할은 림프구와 수지상 세포 (dendritic cell) 의 수용체에 결합하여 세포독성 T 림프구의 용해 작용을 저해시키며 cytokines의 생성을 조절하는 작용 및 혈관 신생 등에 관여하는 것으로 보고되었다.^{11,12} 악성 흑색종, 신세포암, 폐암, 난소암에 있어서 면역학적으로 암세포에 대하여 HLA-G는 종양의 악성 변화에도 불구하고 체내의 면역 체계로부터의 면역 작용을 방해하는 역할을 하고 있으며 세포 독성에 의한 세포 사멸이 HLA-G에 의해 억제된다고 보고되고 있다.¹³ 기존의 연구에서 발표한 바에 의하면 난소암 조직에서 Western blot analysis를 이용하여 HLA-G의 발현을 보고 하였는데 난소암 조직 중 53%에서 HLA-G의 발현되었다고 하고,¹⁴ 또 다른 연구에서는 악성 암 환자 중 난소암에서는 51%, 유방암에서는 25%의 악성 복수 내에서 HLA-G의 발현이 나타났다.¹⁵ 현재까지 난소암에서의 HLA-G 발현에 대한 연구는 극소수 진행된 상태이고, 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현이나 단백질 발현을 동시에 보고한 연구는 아직 전무한 상태이다. 이에 따라 본 저자들은 난소암 조직에서 quantitative real-time RT PCR을 이용하여 HLA-G의 mRNA level을 측정하고, Western blot analysis를 이용하여 protein level을 측정하여, 그 발현 정도가 다른 예후 인자인 난소암의 병기, 혈청 내 CA-125 수치, 유세포 분석법을 이용한 DNA

flow cytometry, 림프절 전이 유무 등과의 상관성이 있는지를 분석하여 HLA-G가
난소암의 양상과 예후적 인자로써 의의가 있는지에 대해 연구 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

연세대학교 세브란스 병원 산부인과에서 1997년부터 2005년 현재까지 난소암으로 진단받은 환자 43예를 실험군으로, 정상 난소 조직 5예를 대조군으로 한 연구를 시행하였다. 모든 악성 난소암 환자는 기초 검사를 시행한 후 병기 결정을 위한 개복술을 시행하였으며, 수술 후 보조항암화학요법을 시행하였다.

2. 병리조직검사

세포형태, 조직학적 분화도와 병기에 있어서는 WHO criteria와 FIGO 병기에 따라 분류되었다. 조직학적 분화도는 grade 1은 고형성 부분이 5% 미만인 경우로 하였고, grade 2는 고형성 부분이 5% 이상 50% 미만인 경우로 하였으며, grade 3는 고형성 부분이 50% 이상인 경우로 하였다.¹⁶

3. 예후 인자

다양한 예후 인자는 다음과 같은 기준으로 나누었다. 혈청 내 CA-125 수치는 처음 환자가 병원 내원 시의 수치를 기준으로 하였으며, 진단 당시의 난소 종양의 크기, 병기 결정을 위한 개복술을 시행하여 early-stage (I, II)와 advanced-stage (III, IV)로 나누었고, 림프절 전이 유무, 병기 결정을 위한 개복술을 시행한 후 난소 조직의 조직학적 분류, 조직 분화도와 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry, 수술 후 잔류암의 크기는 장경 2cm이하의 경우와 이상의 경우로 나누었다.

4. 연구 방법

가. Quantitative real-time RT polymerase chain reaction

본원에서 시행한 수술에 의해 얻어진 암조직을 질소탱크에 보관하고, 수술적 병기에 따라 암조직을 선택한 후 실험을 위한 검체를 LN2 gas 내에서 막자 사발을 이용하여 분쇄 시킨 후 RNA extraction kit (Promega, Madison, Wisc., USA) 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (1 μ g) 는 oligo dT를 primer로 해서 역전사 (reverse transcription) 를 실시하였다. 역전사를 통한 상보적 DNA

(complementary DNA, cDNA) 합성은 역전사 효소 (reverse transcriptase, Formentas life science CA, USA) 를 이용했으며 이때의 상태는 70°C 5분, 37°C 60분, 70°C 10분을 사용하였다. 합성된 cDNA는 -20°C에 사용 전까지 보관하였다.

실시간 정량 PCR (quantitative real time RT PCR)은 ABI 7700 Prism sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하였다. HLA-G의 mRNA의 발현을 측정하기 위해 사용한 primer는 Applied Biosystems as assay on demand product로 Assay ID는 Hs00365950_g1를 사용하였으며 internal control로 house keeping gene인 GAPDH의 Assay ID는 Hs99999905_m1를 사용하였다.

Quantitative real-time RT PCR반응은 총 50 μ l 로 하였으며 TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 primers 그리고 probes를 섞어서 만들었다. 이것을 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA)에 넣었다. 사용한 thermal cycler parameters는 첫번째 stage 로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 그리고 두번째 stage 로는 denaturation 을 위해 95°C에서 15초, aneling/extension 을 위해 60°C에서 1분, 이 과정을 50 cycles 반복했다.

RT-PCR 에는 2개의 primer가 필요한데, quantitative real-time PCR 에는 이들 primer 사이에 probe가 하나 더 필요하다. 그리고, 이 probe 의 5' 쪽에는

FAM이라는 형광물질이 (GAPDH 경우는 VIC 형광물질), 3' 쪽에는 TAMRA 라는 물질을 가지고 있다. 이들은 가까이 있을 때는 TAMRA가 FAM의 형광을 억제시켜 탐지할 수 없지만, 떨어지면 FAM의 형광을 탐지할 수 있다. 따라서, DNA 중합효소 (DNA polymerase)의 nuclease activity에 의하여 PCR과정 중 template 중간에 붙어있는 probe가 분해 되어 FAM 의 형광이 나타난다. 형광의 세기는 사이클이 증가할수록 세진다. 따라서, 표준 시료와 비교하면 증폭되는 양을 정확하게 정량 할 수 있다. 대조군 세포주로는 JEG3 cell 을 이용하였다.

Real-time PCR의 결과는 “comparative Ct method of quantitation” ($\Delta\Delta Ct$ -Threshold Cycles) 방법을 이용했으며 이 방법은 ABI Prism Sequence Detection System User Bulletin2의 형식을 outline으로 해서 계산되었다.

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene}) - Ct (\text{GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tumor sample}) - \Delta Ct (\text{control})$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

나. Western Blot analysis

막자 사발을 통해 분쇄시킨 난소 조직 샘플들과 세포주 (JEG3 cell)에 lysis buffer (Cell Signaling Technology, Inc. USA)를 넣고 ice 에 10분 incubation한 후에 4°C에서 14000rpm 으로 원심분리하여 가라앉힌 후 세포 상층액을 얻었다. 단백질

정량은 Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 를 이용했다. 이렇게 얻은 단백질은 환원제를 포함하는 mini-SDS-PAGE gel (10 or 8%) electrophoresis를 통해 분리시켰다. 전기 영동 후 gel을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., USA)에 상온에서 blotting 한 후 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)로 2시간 상온에서 blotting 하였다. 4°C에서 primary HLA-G mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 GAPDH mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 overnight 처리하고, TBST washing buffer 로 10분씩 3번 씻어주었다. 세척 후 secondary antibody anti-mouse IgG (horseradish peroxidase conjugated antibody) 를 상온에서 1시간 처리하고, TBST로 20분씩 3번 씻어주었다. 1, 2차 antibody는 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)에 1:1000으로 희석하여 사용하였다. ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) I, II를 1:1로 섞어 membrane과 1분정도 반응시켰다. per X-ray film에 30초, 1분, 5분 노출시켜 얻은 결과에서 단백질 양의 정량화를 위해 laser densitometer 와 analysis software (IMAGE READER BAS-1000 lite, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다.

5. 통계 분석

통계는 서술적 통계를 사용하였으며 두 그룹 간의 비교 분석에는 Wilcoxon Rank Sums test와 세 그룹 이상 간의 비교 분석에는 Kruskal-Wallis test 를 사용하였으며 P -value 가 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 임상 소견

난소암 조직 43예를 실험군으로 정상 난소 조직 5예를 대조군으로 선정하였다. 43예의 악성 난소암 환자들의 연령 중앙값은 51.5세 (18-72세)이었고, 50세 이상인 환자는 60.5% 였다. 수술적 병기는 각각 I기 7예 (16.3%), II기 4예 (9.3%), III기 24예 (55.8%), IV기 8예 (18.6%)로 III기가 가장 많았고, I기와 II기를 합쳐 초기 병기 (early stage), III기와 IV기를 합쳐 진행된 병기 (advanced stage)로 분류하였을 때, 진행된 병기가 74%에 해당하였다. 병리조직학적 분화도는 grade 1이 6예 (13.8%), grade 2가 10예 (23.5%), grade 3이 27예 (62.7%)이었다. 세포형에 따라 분류하면 이 중에서 장액성 (serous type)이 25예 (58.2%)로 제일 많았고, 점액성 (mucinous)이 4예 (9.4%), 투명세포성 (clear cell type) 7예 (16.2%), 그 외 기타 세포형이 7예 (16.2%)이었다. 림프절 전이는 14예 (32.5%)에서 있었고 잔류암의 크기는 2cm을 기준으로 구분하였고, 2cm 이상인 경우가 9예 (20.9%)에 해당하였다. 혈청 내 CA 125 값이 35 U/mL보다 높았던 경우는 34예 (79.1%), 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry상 aneuploidy는 28예 (65.1%)이었다 (Table 1).

Table 1. Clinicopathological characteristics of ovarian cancer patients

	No.	%
Age (years)		
median	51.5	
range	18-72	
Stage		
I	7	16.3
II	4	9.3
III	24	55.8
IV	8	18.6
Grade		
1	6	13.8
2	10	23.5
3	27	62.7
Histopathology		
serous	25	58.2
mucinous	4	9.4
clear cell	7	16.2
undifferentiated	7	16.2
LN metastasis		
positive	14	32.5
negative	29	67.5
Residium		
≤ 2 cm	34	79.1
> 2 cm	9	20.9
CA 125 (U/mL)		
≤ 35	9	20.9
> 35	34	79.1
DNA flow cytometry		
diploidy	15	34.9
aneuploidy	28	65.1

2. 대조군 난소 조직과 난소암 조직에서 quantitative real time RT-PCR에 의한 HLA-G의 mRNA 발현 분석

신선한 정상 대조군 난소 조직과 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현을 측정하기 위해서 TaqMan probe를 이용한 quantitative real time RT-PCR을 사용하였다. HLA-G의 real time RT-PCR의 정량은 GAPDH를 internal control로 하고 JEG3 cell을 control로 하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 구하였는데 난소암 조직에서 HLA-G의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값은 1.21 (0-9)였고, 대조군 조직에서는 0.01 (0-0.02)로 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현이 증가하였다. ($P=0.005$) 두 그룹간의 차이는 통계적으로 유의하였다 (Figure 1, Table 2).

Table 2. Comparison of mRNA expression of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR

Group	HLA-G ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ value)	
	Median (Range)	
Control (n=5)	0.01 (0-0.02)	
Ovarian cancer (n=43)	1.21 (0-9)*	

* $P=0.005$ (ovarian cancer vs. control)

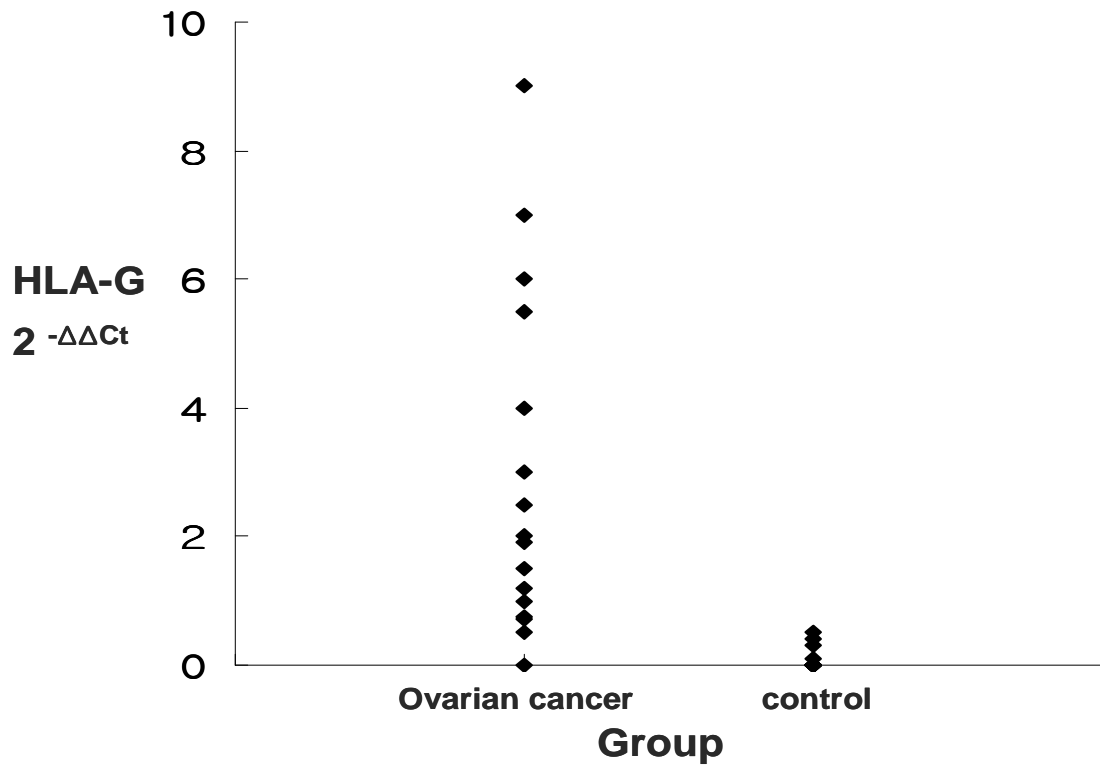


Figure 1. Comparison of mRNA expression of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR

3. 대조군 난소 조직과 난소암 조직에서 Western blot analysis에 의한 HLA-G의 단백질 발현 분석

본 연구에서는 Western blot analysis에 의해 난소암 조직에서 HLA-G의 단백질 발현이 측정하였다 (Figure 3). 대조군 난소 조직에서의 단백질 발현을 1로 보았을 때, 난소암 조직에서의 HLA-G의 발현은 평균 1.03 (0-1.13)으로 통계적으로 유의한 차이가 없었다. ($P=0.85$)

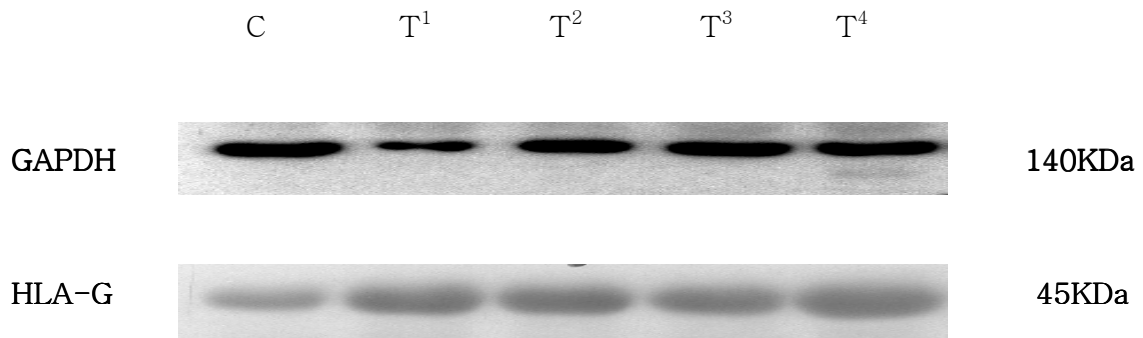


Figure 2. Comparison of protein analysis of HLA-G of ovary between control and ovarian cancer group by Western blot analysis

C: control, T: ovarian cancer

T¹: > 35 (CA 125), T²: ≤ 35 (CA 125), T³: early stage, T⁴: advanced stage

4. 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현, 단백질의 발현과 임상 병리학적

예후인자들과의 상관성

본 연구에서는 43 예의 난소암 환자에서 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 임상 병리학적 소견과의 상관성을 보았다 (Table 3). 난소암에서의 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 임상 병리학적 소견 (나이, 병기, 조직학적 분화도, 세포형, 림프절 전이 여부, 잔류암 크기, 혈청 내 CA 125, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과)과의 비교에 있어서 HLA-G 단백질 발현과의 사이에서 진단 당시의 CA 125가 35 이상인 경우와 이하인 경우로 나누었을 때 통계적으로

유의한 차이를 보였으며 ($P=0.02$) 다른 임상 병리학적 예후 인자와는 통계적으로

유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

Table 3. Level of mRNA and protein expression of HLA-G in various clinicopathological factors

	No. (%)	RT-PCR	Western blot
		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ value	DV [†]
		Median (Range)	
Age (years)			
≤ 50	17 (39.5)	2.10 (0.09-8.75)	1.0 (0.98-1.12)
> 50	26 (60.5)	0.81 (0.12-4.96)	0.98 (0.95-1.13)
Stage			
early stage (I, II)	11 (25.6)	2.54 (0.12-4.96)	1.01 (0.96-1.09)
advanced stage (III, IV)	32 (74.4)	0.84 (0.05-7.06)	0.99 (0.95-1.15)
Grade			
1	6 (13.8)	2.10 (0.01-4.96)	1.04 (0.96-1.12)
2	10 (23.5)	1.06 (0.06-4.53)	1.10 (0.99-1.12)
3	27 (62.7)	0.82 (0.27-7.67)	0.99 (0.95-1.07)
Histopathology			
serous	25 (58.2)	0.45 (0.05-7.06)	1.04 (0.97-1.16)
mucinous	4 (9.4)	2.10 (2.0-4.96)	0.96 (0.95-1.04)
clear cell	7 (16.2)	1.0 (0-1.04)	1.03 (0.95-1.13)
undifferentiated	7 (16.2)	0.91 (0.84-0.99)	0.87 (0.55-0.71)
LN metastasis			
positive	14 (32.5)	0.90 (0.05-6.59)	0.99 (0.95-1.15)
negative	29 (67.5)	1.42 (0.45-4.96)	0.99 (0.95-1.12)
Residium			
≤ 2 cm	34 (79.1)	0.84 (0.09-4.96)	1.01 (0.95-1.15)
> 2 cm	9 (20.9)	0.83 (0.71-0.90)	0.98 (0.95-1.07)
CA 125 (U/mL)			
≤ 35	9 (20.9)	0.79 (0.12-2.0)	0.95 (0.94-0.96)
> 35	34 (79.1)	1.47 (0.05-7.06)	1.03 (0.96-1.15)*
DNA flow cytometry			
diploidy	15 (34.9)	0.84 (0.45-4.96)	0.98 (0.95-1.07)
aneuploidy	28 (65.1)	1.02 (0.01-6.59)	1.06 (0.94-1.18)

† DV; densitometer value, * $P=0.025$

IV. 고 찰

난소암은 보건복지부에서 시행한 한국중양 암 등록사업 연례보고서에 의하면, 2001년 여성 10대 암 중에 하나이며, 현재까지 부인암에 있어서는 중요한 사망 원인의 하나이다. 난소암 환자의 대부분은 증상이 없어 진단 당시 이미 진행된 소견을 보이는 예가 많다. 치료로는 표준적 치료 방법으로 일차적으로 병기 결정 및 진행된 환자에서 수술로 암세포를 줄이는 중양 감축술 (debulking surgery)을 시행하며, 수술 후 보조 항암화학요법의 치료법이 시행되어오고 있으나 여전히 치료가 힘들고 재발이 잘 되는 질환으로 알려져 있다.

최근에 난소암의 치료를 위한 면역학적 측면에서의 접근이 대두되는 가운데, Windbichler 등은 interferon- γ 와 platinum-based 항암화학요법을 이용한 면역학적 치료를 보고 하였고¹⁷, 또한, 난소암에서 interferon- α 의 복강 내 주입으로 NK세포의 암세포에 대한 세포독성 세포사멸 기능을 증진 시킨다는 연구도 보고되고 있다.¹⁸ 이렇듯 면역학적인 측면에서 난소암의 치료에 접근하는 가운데 이미 다른 악성 암에서 암세포의 표면에 발현되어 암세포를 인체의 면역학적 방어 기전으로부터 보호하는 역할을 하는 HLA-G가 보고되었다.

HLA-G는 비고전적 MHC class I 항체로써 면역학적으로 CD94/NKG2 의 이질 이합체 (heterodimer) 로 CD8 T 세포의 수용체에 접합하여 NK 세포와 상호

작용을 하게 된다. 기전이 정확하게 밝혀지지는 않았지만 HLA-G는 직접적 혹은, 간접적으로 NK세포의 면역학적 세포 사멸을 방해하게 된다.¹⁹ 이러한 악성 암에서의 HLA-G의 발현과 역할의 특징을 밝혀내는 연구가 최근 몇 년간 급진적으로 발전하는 가운데, HLA-G의 생물학적인 중요성은 아직 확립된 바 없지만 암세포와 인체 내의 면역 식세포 (phagocytes) 사이의 상관 관계에서 중요한 역할을 한다. Urosevic 등은 HLA-G는 interleukin-10에 의해 발현이 상향 조절되어 Th2-type의 면역학적 기전에 따라 인체 내의 면역학적 기전으로부터 암세포를 보호하는 역할을 한다고 폐암과 림프종에서 보고하고 있다.^{20,21} 이러한 이론은 신세포암이나 악성 흑색종에서도 보고 되었다.^{22,23}

Malmberg 등은 난소암 조직에서 Western blot을 이용하여 HLA-G의 발현을 보고하였는데 난소암 조직 중 53%에서 HLA-G가 발현되었다고 하였다.¹⁴ 본 연구에서는 real time RT-PCR 을 시행하여 난소암 조직의 약 88%에서 HLA-G의 발현이 보고되었다. 기존의 연구에서보다 높은 발현율을 보인 원인에는 본 연구는 real time RT PCR을 사용하였고, real-time RT PCR은 PCR보다 더 정량적이라는 점이고, 만약 두 실험 방법 모두 40 cycle을 돌린다면 PCR은 40번을 돌린 후의 gene expression 결과만 확인할 수 있으나 real-time RT PCR은 각 cycle 마다 얼마만큼의 gene expression이 되고 있는지를 확인할 수 있다. 왜냐하면 PCR과 다르게 real-time RT PCR에 사용하는 primer에는 probe라는 것이 포함되어

있어서 각 cycle 마다 기계가 체크를 할 수 있게 된다. 이러한 차이로 인해 기존의 다른 연구에 비해 HLA-G의 발현이 높게 나타났다고 생각하였다.

또한, Singer 등은 악성 종양환자의 복수에서 HLA-G를 검출 하였으며 이는 난소암 환자 중 61%, 유방암 환자 중 25%에서 HLA-G의 발현을 보고하였고, 이는 정상 조직이나 양성 질환 조직에서는 발현이 되지 않는 것으로 보고하였다.¹⁵

Davidson 등은 난소암 환자의 삼출액에서 면역조직화학염색법을 사용하여 HLA-G를 검출 하였으며 이는 난소의 고형암을 가진 환자의 50% 이상에서 검출 되었으며 항암 화학요법 중이나, 그 이후에 HLA-G의 발현이 감소하는 것으로 보고하였다. 또한, FIGO 병기, 조직학적 분화도, 잔류암의 크기 등의 예후인자와는 상관관계는 없지만 HLA-G가 발현된 난소암 환자군이 항암화학요법에 더 좋은 반응을 보이고 더 좋은 생존율을 보이고 있다고 보고하였다.²⁴ 이는 아직 확실한 면역학적 기전은 밝혀지지 않았지만 HLA-G가 발현된 군에서 항암 화학요법 후에 손상받은 암세포를 NK 세포가 사멸 시키는데 상호 관련이 있다고 예측하고 있으며 이러한 부분에 있어서는 향후 심화된 연구가 필요하다고 생각된다.

난소암의 예후 인자로 알려진 것들로는 병기, 조직학적 분화도, 혈청 내 CA-125 수치, 잔류암의 크기, 유세포 분석법 등이 있으며^{25,26} 본 연구에서는 이러한 다양한 임상 병리학적인 예후 인자와 더불어 면역학적인 예후 예측 인자로서 HLA-G에 대해 분석하였다. 난소암에서 HLA-G가 발현됨을 quantitative real time RT-

PCR을 이용하여 mRNA를 검출하였고, HLA-G의 단백질 검출은 Western blot analysis를 이용하였다. HLA-G의 mRNA는 암 조직에서 정상 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타나는 결과를 보였다. 단백질 발현은 정상 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다.

HLA-G의 mRNA 발현이나 단백질 발현과 다른 임상병리학적 예후 인자들인, FIGO 병기, 조직학적 분화도, 잔류암의 크기, 세포형, 유세포 분석 결과와의 비교에 있어서는 통계적으로 유의한 상관성을 보이지 않았으나, 암 조직에서의 HLA-G 단백질 발현이 환자 혈청 내의 CA 125 수치와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다. 폐암을 대상으로 한 다른 연구에서는 종양의 조직학적 등급에 따라 HLA-G의 발현에 차이가 있다고 보고하고 있으나²⁰, 난소암에서는 아직 조직학적 등급이나, 임상적 특성과 HLA-G의 발현과의 명확한 연관성은 없는 것으로 조사되고 있다. 이러한 결과로 보아 난소암이 신체 내의 세포독성 항 종양 반응에 대한 회피에 HLA-G가 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있다.

결론적으로 본 연구에서는 HLA-G가 정상 대조군 난소에 비해 난소암에서 높게 발현됨이 관찰되었고, 이는 난소암의 암발생기전 (carcinogenesis)에 있어서 HLA-G가 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. HLA-G의 단백질 발현은 다른 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았지만, 예후 인자 중 하나인 혈청 내 CA 125와 유의한 상관관계를 보이는 결과를 나타내었다. HLA-G의 발현

정도와 향후 생존율과의 상관관계에 대한 연구가 추가로 뒷받침 된다면 난소암의
예후 인자로 사용 될 수 있다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 HLA-G가 정상 대조군 난소에 비해 난소암에서 높게 발현됨이 관찰되므로 난소암의 암발생기전 (carcinogenesis)에 있어서 HLA-G가 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. HLA-G의 단백질 발현은 다른 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았지만, 예후 인자 중 하나인 혈청 내 CA 125와 유의한 상관관계를 나타내었다. 이는 HLA-G가 예후 인자로 사용되기 위해서는 향후 생존율과 연관된 연구가 추가로 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M, Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin 2001; 51: 15-36.
2. 보건복지부. 한국중앙암등록 사업 연례보고서. 서울, 2003.
3. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer : epidemiology, biology, and prognostic factors. Semin Surg Oncol 2000; 19: 3-10.
4. Baker W. Molecular biology and genetics of epithelial ovarian cancer in update on epithelial ovarian cancer. Obstet Gynecol Clin North Am 1994; 21: 25-40.
5. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. Semin Cancer Biol 2002; 12: 3-13.
6. Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and -E: fundamental and physiopathological aspects. Immunol Today 2000; 21: 532-4.
7. Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E; fundamental and pathophysiological aspect. Immunol Today 2000; 21: 532-4.
8. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 4510-5.

9. Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5249-54.
10. Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 371-7.
11. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 1998; 160: 3096-100.
12. Allan DS, Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS, Ellis SA, et al. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1149-56.
13. Ibrahim el C, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer* 2004 10; 108: 243-50.
14. Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K,

et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2002; 110: 1515-23.

15. Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4460-4.

16. Serov F, Scully RE, Solbin LE. Histologic typing of ovarian tumors. In: *International Classification of Tumors*. Geneva: World Health Organization, 1973.

17. Windbichler G, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, et al. γ -interferon reduces expression of the protooncogen c-erb-2 in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1990; 50: 7037-41.

18. Berek JS, Welandar C, Schink JC, Grossberg H, Montz FJ, Zigelboim J. A phase I-II trial of intraperitoneal cisplatin and α -interferon in patients with persistent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1991; 75: 10-4.

19. Pazmany L, Mandelboim O, Gomez VM, Daniel MD, Todd CB, Hugh TR et al. Human leucocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. *J Repro Immunol* 1999; 43: 127-37.

20. Urosevic M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, et al.

Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 2001; 159: 817- 24.

21. Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002; 99: 609- 17.

22. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4510-5.

23. Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6838- 45.

24. Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, et al. HLA-G expression in effusion is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 42-7.

25. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian

carcinoma : the Gynecologic Oncology Group experience. J Clin Oncol 1991; 9:
138-50.

26. Baak JP, Chan KK, Stolk JG, Kenemans P. Prognostic factors in borderline
and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. Pathol Res Pract
1987; 182: 755-74.

Abstract

**Correlation of HLA-G gene Expression with Various Prognostic Factors
in Ovarian Carcinoma**

Won Ki Hong

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Tae Kim)

Objective: The objective of this study was to determine the relationship between the expression of mRNA and proteins of HLA-G and other clinicopathologic prognostic factors of ovarian cancer .

Material and Methods: 43 patients diagnosed with ovarian cancer in Severance Hospital from 1997 to 2005 and 5 patients with normal ovarian tissues (controls) were enrolled in this prospective study. The patient group all went through baseline studies with staging laparotomy and adjuvant chemotherapy. Quantative real-time RT PCR and Western blot analysis was used in detecting

the expression of mRNA and proteins of HLA-G.

Results: The mRNA expression of HLA-G ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ value) in cancer group was 1.21 (0-9), and 0.01 (0-0.02) in control group which was statistically significant. ($P=0.005$) The expressed protein levels did not show any differences between the cancer and control groups. There also was a significant relationship between the serum CA 125 at the time of diagnosis and the HLA-G protein levels. ($P=0.02$) However, other clinicopathologic prognostic factors were not statistically significant.

Conclusion: Our results showed that HLA-G expression levels were much higher in ovarian cancer patient group than in those of control group, thus HLA-G plays an important role in carcinogenesis of ovarian cancer. Protein levels of HLA-G had low significance with other prognostic factors, whereas serum CA 125 showed a statistically significant relation with protein levels of HLA-G. This showed that further studies based on the correlation between HLA-G and survival rate are needed to support HLA-G as a prognostic factor of ovarian cancer.

Key Words: Ovarian cancer, HLA-G, quantitative real time RT PCR, Western blot analysis.