

자궁 경부 상피내 종양에서 p16^{INK4a},
cdk4, pRb 의 이상 발현 및 high risk
HPV 감염 여부, 재발과의 상관 관계

연세대학교 대학원
의 학 과
남 은 지

자궁 경부 상피내 종양에서 p16^{INK4a},
cdk4, pRb의 이상 발현 및 high risk
HPV 감염 여부, 재발과의 상관 관계

지도 박 용 원 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005년 12월 15일

연세대학교 대학원

의 학 과

남 은 지

남은지의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 15일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 따뜻한 격려와 아낌없는 지도를 베풀어 주신 박용원 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 바쁘신 가운데도 아낌없는 조언과 관심을 보내주신 조남훈 교수님과 김호근 교수님, 김성훈 교수님께 또한 감사를 드립니다.

항상 사랑으로 보살펴 주시고 격려로 이끌어주신 그 무엇보다도 소중한 부모님께 이 논문을 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	iii
국문 요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 연구 대상	7
2. 실험 방법	8
III. 결과	12
IV. 고찰	22

V. 결론	26
-------	----

참고 문헌	27
-------	----

영문 요약	34
-------	----

그림 차례

Figure 1. p16 ^{INK4a} 의 면역조직화학적 염색상	13
Figure 2. cdk4의 면역조직화학적 염색상	14
Figure 3. pRb의 면역조직화학적 염색상	15
Figure 4. 자궁경부 상피내 종양의 병기와 p16 ^{INK4a} , cdk4, pRb의 이상발현 정도 (%)와의 상관 관계	17

표 차례

Table 1. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기에 따른 p16 ^{INK4a} , cdk4, pRb의 염색 정도	12
Table 2. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기에 따른 고위험군 HPV감염률	18
Table 3. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기별 고위험군 HPV 감염 여부에 따른 p16 ^{INK4a} , cdk4, pRb의 발현률	19

Table 4. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기별 재발 여부에 따른

p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현률 21

국문요약

자궁경부 상피내 종양에서 p16^{INK4a}, cdk4,
pRb의 이상발현 및 high risk HPV 감염 여부,
재발과의 상관 관계

목적 : 자궁경부 상피내 종양에서 세포 주기 조절 단백질 p16^{INK4a}, cdk4,
pRb의 이상발현 정도를 살펴보고 이들이 고위험군 HPV 감염 및 재발 등 임상적 특성과 연관이 있는지 알아보려고 하였다.

연구방법 : 2001년 1월부터 2003년 12월까지 본원 산부인과에 내원하여 자궁경부 착공생검 (colposcopy directed punch biopsy) 및 환상투열절제술 (conization) 또는 제 1형 확대형 자궁적출술 (type I extended hysterectomy)를 시행 받고 조직병리학적으로 자궁경부 상피내 종양을 진단 받은 265개의 파라핀 포매 조직 절편으로 tissue array를 제작하여 면

역조직화학 염색을 시행하였다. 염색 시약은 CINtec™ p16^{INK4a} Histology kit (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA, USA), cdk4 (DCS156) Mouse mAb (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 및 retinoblastoma (Rb) Ab-1 (Neomarkers, Drive Fremont, CA, USA)를 사용하였다. 염색 결과의 판독은 두 명의 독립된 관찰자에 의해 분석되었고 400배 광학현미경하 시야에서 관찰하여 전체 관찰된 상피 세포 수 중 염색된 세포 수를 세어 백분율 단위로 표기하였다. HPV 감염 검사로는 자궁경부 상피내 종양 진단 당시 HPV microarray DNA chip (바이오메드, 서울, 한국, 이하 DNA chip)을 시행하였다.

결과 : 자궁경부 상피내 종양의 조직 병리학적 진행 정도와 p16^{INK4a}, cdk4의 발현 정도는 통계적으로 유의하게 양의 상관 관계를 보였으며 반면 pRb의 발현과는 통계적으로 유의하게 음의 상관관계를 보였다. 저등급 상피내병변 (CIN1)에서는 고위험군 HPV 감염이 있는 경우 유의하게 p16^{INK4a} 단백 이상 발현이 증가하였으나, 고등급 상피내 병변 (CIN2,

CIN3, CIS)에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 p16^{INK4a}의 경우 자궁경부 상피내종양 병변에서 재발군에서 비재발군에 비해 통계적으로 유의하게 발현률이 낮았다. pRb는 고등급 자궁경부 상피내 종양(CIN2, CIN3, CIS)에서 통계적으로 유의하게 재발군에서 발현률이 높았으며 비록 통계적으로 유의하지 않았으나 저등급 상피내종양에서도 재발군에서 pRb의 발현률이 높은 경향을 보였다.

결론 : 본 연구 결과에 따르면 p16^{INK4a}의 발현은 재발군에서 통계적으로 유의하게 감소되었고 pRb의 발현은 재발군의 고등급 상피내 병변에서 증가되는 소견을 보였다. 따라서 p16^{INK4a} 및 pRb의 면역조직화학염색결과가 자궁경부 상피내 종양의 예후 인자로서 치료 방침을 결정하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 자궁경부 상피내종양, HPV, 재발, p16^{INK4a}, cdk4, pRb, 면역조직화학염색

자궁경부 상피내 종양에서 p16^{INK4a}, cdk4,
pRb의 이상발현 및 high risk HPV 감염 여부,
재발과의 상관 관계

< 지도 ; 박 용 원 교수 >

연세대학교 대학원 의학과

남 은 지

I. 서 론

자궁경부암은 특히 한국 여성에서 발생률이 높은 중요한 질환으로 5-15
년정도 전구 병소 형태인 자궁경부 상피내 종양 단계를 거쳐 침윤성 병변
으로 진행된다. 인유두종 바이러스 (human papilloma virus, 이하 HPV)의

감염이 자궁경부암의 발생에 가장 중요한 원인임은 현재까지 광범위한 역학조사 및 분자생물학적인 연구에 의해 이미 밝혀져 있다.¹ HPV는 double stranded DNA 바이러스로서 현재까지 약 80여종 이상이 알려져 있으며, 이중 생식기에 존재하는 인유두종 바이러스는 크게 고위험 인유두종 바이러스형 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69)과, 저위험 인유두종 바이러스형 (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44)으로 나뉜다. 특히 고위험군 HPV의 지속적인 감염이 자궁경부암의 발생과 직접 연관이 있는 것으로 보여진다.²⁻⁴

HPV가 자궁경부암을 유발하는 기전은 고위험군 HPV의 E6 및 E7 단백질이 각각 p53 및 pRb 세포주기 억제단백의 기능을 억제함으로써 세포주기 G1에서 S로의 이행을 억제하지 못하여 발생된다고 생각되고 있다.⁵⁻⁶ p16^{INK4a}는 cdk4 및 cdk6와 작용하여 세포증식 촉진단백인 cyclin D/cdk4,6 complex의 형성을 방해하여 cdk에 의한 pRb의 인산화 (phosphorylation)을 억제하여 cyclin dependent kinase inhibitor로서 작용한다.⁷ 종양억제단백인 pRb가 인산화되면 pRb와 결합하고 있던 전사조

절인자인 E2F가 유리되어 세포주기가 G1에서 S기로 이행되도록 유도한다.⁸ 그러나 HPV 감염으로 인하여 E7단백이 pRb와 결합하게 되면 E2F는 pRb로부터 유리되어 G1-S 세포주기 이행에 관련된 유전자의 발현을 촉진하게 된다.⁹ HPV E7 단백질에 의해 pRb의 기능이 불활성화되면 pRb와 p16^{INK4a}의 음성 되먹임 (negative feedback)기전으로 인해 상반적으로 p16^{INK4a}는 과발현 (overexpression) 하게 된다. ⁹⁻¹²

본 연구에서는 상기의 문헌 지견을 바탕으로 자궁경부 상피내 종양의 암 발생 (tumorigenesis)에 관계하는 세포조절주기 단백질인 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현을 관찰하고 이와 아울러 고위험군 HPV 감염 및 재발 여부와 세포주기 단백질발현 정도를 비교하여 p16^{INK4a}, cdk4 및 pRb의 임상적 유용성을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

2001년 1월부터 2003년 12월까지 본원 산부인과에 내원하여 자궁경부
작공생검 (punch biopsy) 및 자궁경부 환상투열 절제술 (conization) 또는
제 1형 확대형 전자궁적출술 (type I extended hysterectomy)을 시행 받
고 조직병리학적으로 자궁경부 세포내 종양(cervical intraepithelial
neoplasia, 이하 CIN)을 진단 받은 환자들의 파라핀 포매 조직 절편으로
tissue array를 제작하였다 (by Petagen Inc. Seoul, Korea). Tissue array
는 117개의 CIN1 병변과 44개의 CIN2, 60개의 CIN3, 44개의 CIS로 구성
되었다. 자궁 근종 등 양성 병변으로 전자궁적출술을 시행 받고 조직병리
학적으로 자궁경부에 종양성 병변이 없는 10예를 대조군으로 사용하였다.

대상 환자들 중 고등급상피내병변 (CIN2, CIN3 or carcinoma in situ of
uterine cervix, 이하 CIS)을 진단받은 환자들은 모두 치료로서 자궁경부
환상투열절제술 또는 제1형 확대형 전자궁절제술을 시행받았다. 저등급상

피내병변 (CIN I)을 진단받은 환자들은 냉동치료 (cryotherapy), 레이저 치료, 또는 자궁경부 환상투열절제술을 시행받았다. 이후 3개월에서 6개월 사이의 간격으로 추적검사로서 자궁경부 세포도말검사 또는 질확대경검사 검사를 시행하였으며 의심되는 병변이 있는 경우 질확대경 조준하 자궁경부 착공생검을 시행하였다. 2년 이상 추적 관찰 기간 중 시행한 생검 결과 상 다시 자궁경부 상피내 중양 병변이 진단되는 경우를 재발로 판정하였다.

2. 방법

가. 고위험군 HPV의 검출

고위험군 HPV검출에는 인유두종 바이러스 oligonucleotide microarray DNA chip (Biomedlab Co., Seoul, Korea) 또는 HPV hybrid capture II ® kit (Digene/Abbott, Clopper Road, Gaithersburg, Maryland, USA)를 사용하여 검사하였다. 고위험군에 속하는 아형은 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69이며, 저위험군에 속하는 아형은 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44이었다.

나. 면역조직화학염색 (immunohistochemical staining) 및 관독

(1) p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 면역조직화학염색

p16^{INK4a}의 염색은 CINtecTM p16^{INK4a} Histology kit (DAKOCytomation, Carpinteria, CA, USA)를 사용하였고 제작회사의 사용 설명서에 따라 염색을 시행하였다. Cdk4 및 pRb의 염색은 cdk4 (DCS156) Mouse mAb (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 및 retinoblastoma (Rb) Ab-1 (Neomarkers, Drive Fremont, CA, USA)을 이용하여 시행하였다. Tissue array로 제작된 파라핀 포매 조직을 섭씨 38도의 열판과 섭씨 60도의 오븐에서 각 2시간 동안 둔 후 파라핀 제거와 함께 함수과정을 거쳤다. Xylene에 슬라이드를 넣은 후 5분씩 3회 반복하여 탈파라핀을 시행 후 100%, 90%, 70% 알코올에 슬라이드를 1분씩 두어 xylene이 빠지도록 하였다. 흐르는 물에 5분간 씻은 후 cdk4와 pRb의 경우 3%H₂O₂에 10분간 담갔다. Epitope retrieval를 위해 citrate buffer를 넣고 10분간 예열 후 slide를 넣고 15분간 데운다. 증류수에 슬라이드를 담귀서 20분간 식힌 후 세척 완충액 (wash buffer)에 5분간 담갔다. 그 후 peroxidase-blocking reagent 200μl를 떨어뜨리고 10분간 처리하고 슬라이드를 꺼내어 citrate

buffer에 3분간 담근 후 (3회 반복), 슬라이드를 완충액에서 꺼내어 잘 털어준 다음 미리 희석해둔 일차 항체와 음성대조시약을 1:25로 희석하여 각각의 검체에 떨어뜨린 다음 습성 배양기 (wet incubator box)에 마르지 않도록 뚜껑을 잘 덮어서 실온에서 1시간 반응시켰다. 슬라이드를 꺼내어 세척 완충액에 3분간 담근 후 발색시약 200 μ l를 각각의 검체에 떨어뜨린 다음 습성배양기에 마르지 않도록 뚜껑을 잘 덮어서 30분간 습성 시킨 후, 슬라이드를 꺼내어 세척완충액에 3분간 담갔다 (3회 반복). 슬라이드를 완충액에서 꺼내어 잘 털어준 후 미리 만들어 놓은 substrate-chromogen solution 200 μ l 를 각각의 검체에 떨어뜨린 다음 습성배양기에 10분간 습성시켰다. 슬라이드를 꺼내어 증류수에 행구고, 슬라이드를 hematoxylin bath에 1분간 담근 후, 슬라이드를 꺼내어 다시 증류수에 행궜다. 100%, 90%, 70% 알코올에 1분씩 둔 후, xylene에 슬라이드를 넣은 후 10분간 두었다. Histomount를 사용하여 coverslip으로 mount하였다.

(2) 결과 판독 및 통계 처리

p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 조직발현의 판독은 400배 광학현미경하 시야에서

관찰하여 전체 관찰된 상피 세포 중 염색된 세포의 수를 세어 백분율 단위로 표기하였다. 모든 슬라이드는 두명의 독립된 관찰자에 의해 분석되었다. 각 조직학적 유형에 따른 고위험군 HPV감염 여부, 재발 여부, p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현 정도의 관계를 one-way ANOVA test, t-test, Pearson's correlation test (SPSS 12.0)로 분석하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결과

Table 1은 자궁 경부 상피내 종양의 병기에 따른 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 염색 정도를 나타낸 표이다. Figure 1, 2, 3는 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 염색상이다.

Table 1. 자궁 경부 상피내 종양의 병기에 따른 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 염색 정도

Pathologic grade	p16 ^{INK4a}		cdk4		pRb	
	Expression		Expression		Expression	
	n	rate	n	rate	n	rate
CIN1	109	27.2%	107	23.4%	110	47.8%
CIN2	41	36.9%	40	28.3%	39	41.3%
CIN3/CIS	87	61.9%	83	40.0%	87	19.4%
total	237		230		236	
P value*		<0.001		<0.001		<0.001

* : One-way ANOVA test, significant if <0.05

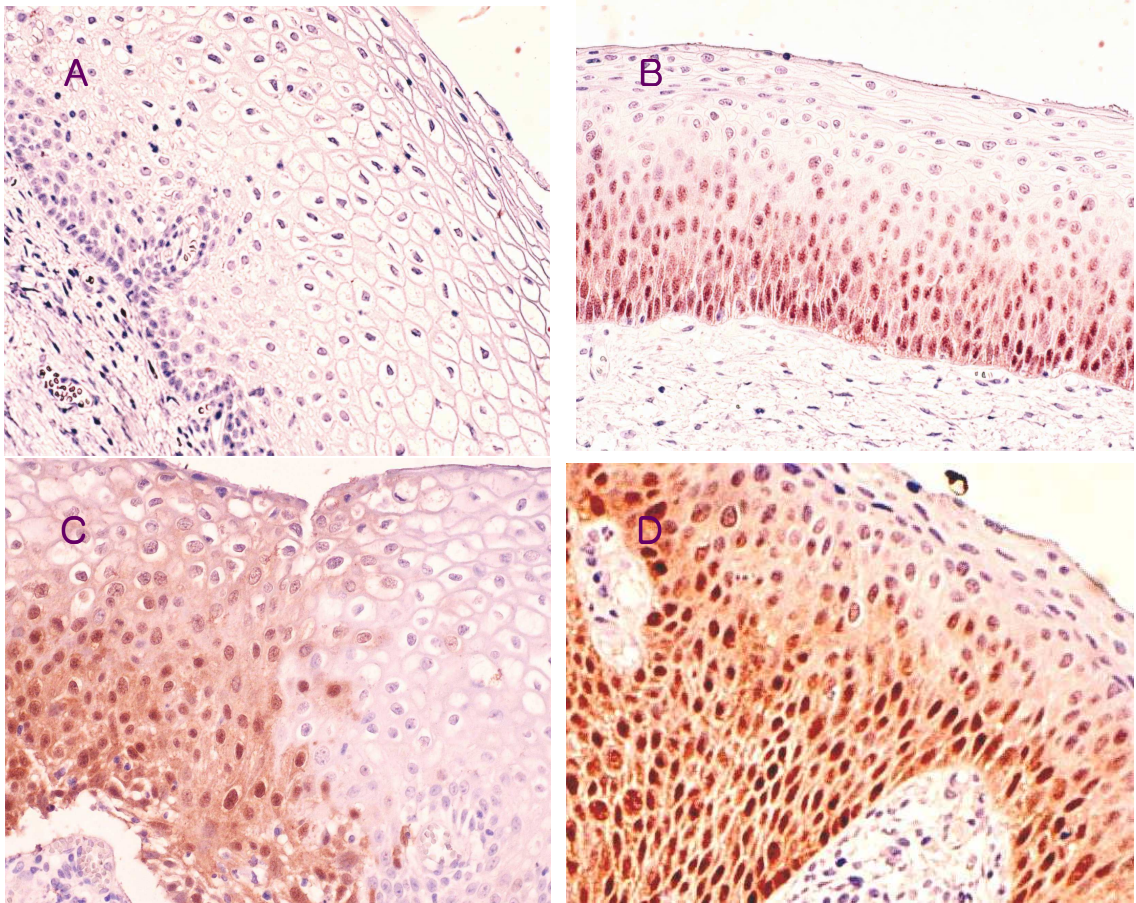


Figure 1. p16^{INK4a}의 면역조직화학적 염색상

A. Negative p16^{INK4a} immunohistochemical staining in normal cervical tissues. B&C. 50 ~ 60% positive p16^{INK4a} immunohistochemical staining in CIN tissues. D. 90% positive for p16^{INK4a} immunohistochemical staining in invasive cervical cancers

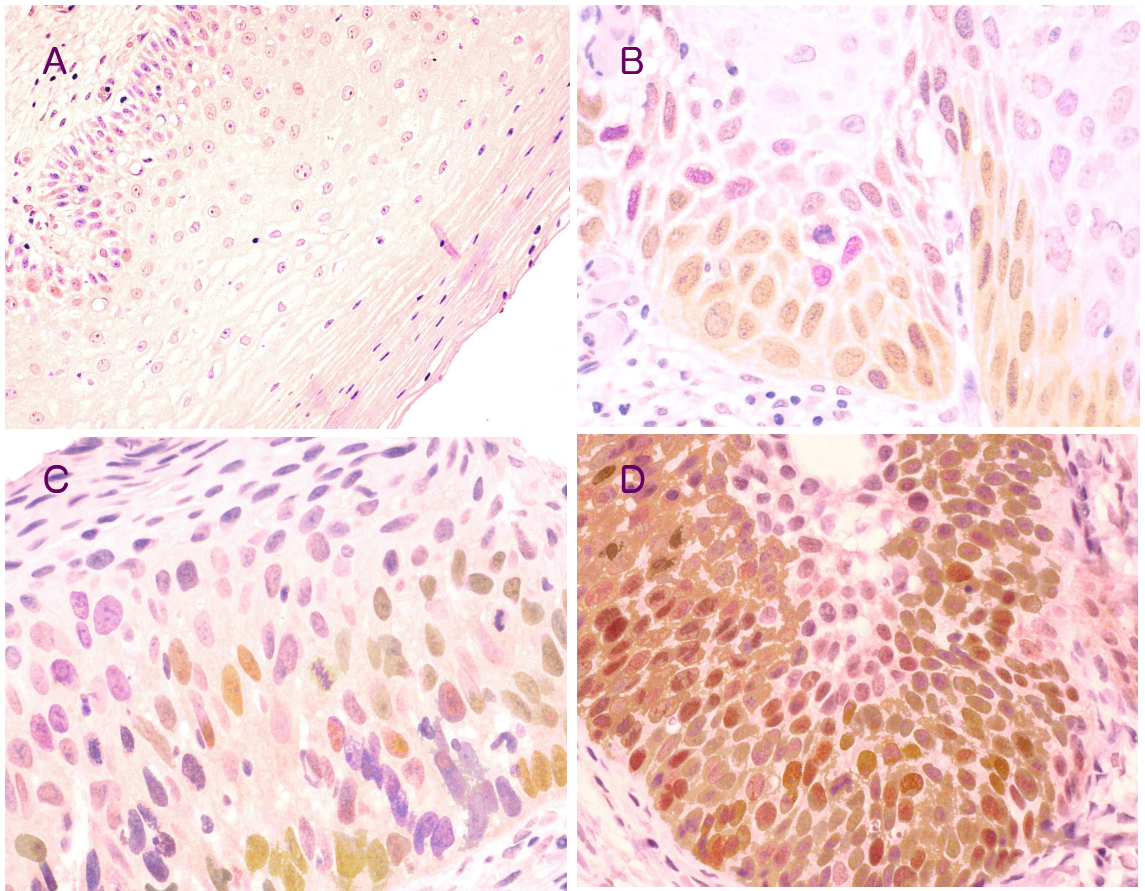


Figure 2. cdk4의 면역조직화학적 염색상

A. 10% positive cdk4 immunohistochemical staining in normal cervical tissues. B. 40% positive cdk4 immunohistochemical staining in CIN1 tissues. C. About 40% positive cdk4 immunohistochemical staining in CIN2 tissues. D. 70% positive for cdk4 immunohistochemical staining in CIS.

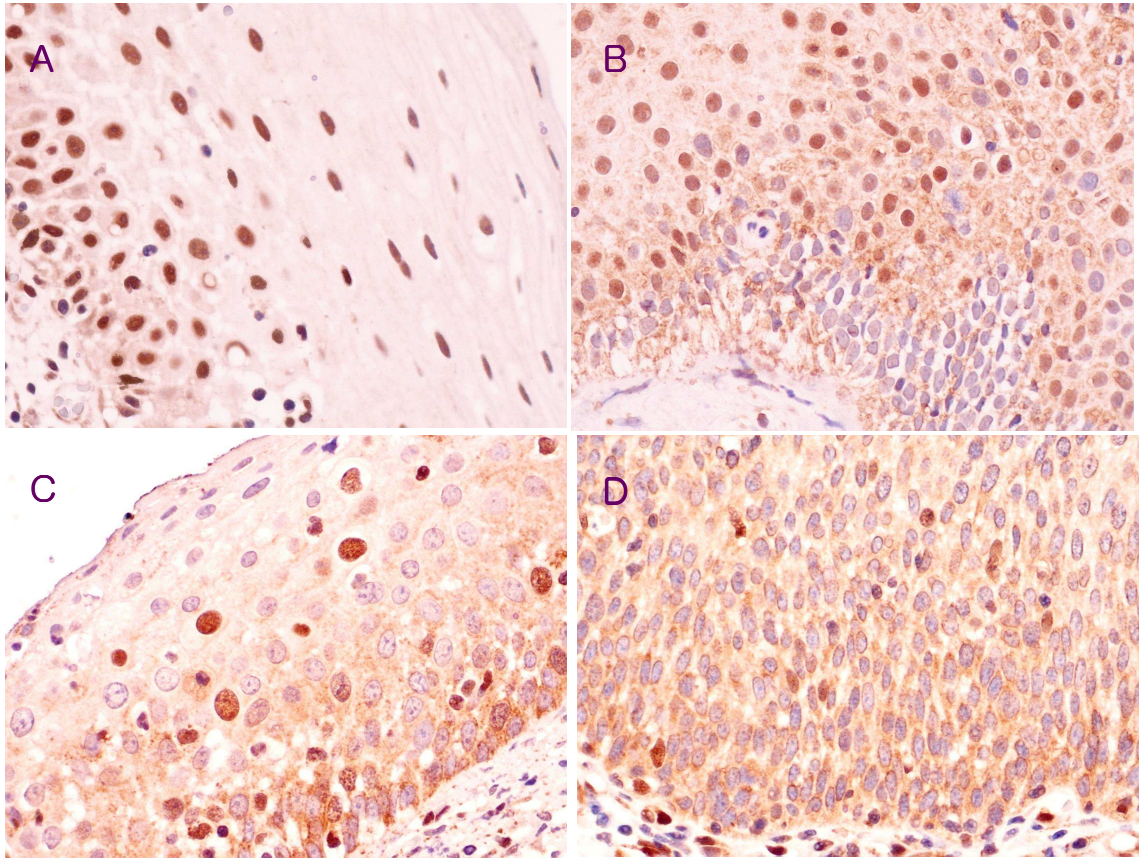


Figure 3. pRb의 면역조직화학적 염색상

A. 80% positive pRb immunohistochemical staining in normal cervical tissues. B. 60% positive pRb immunohistochemical staining in CIN1 tissues. C. 30% positive pRb immunohistochemical staining in CIN2 lesion. D. 10% positive for pRb immunohistochemical staining in CIS.

자궁경부 상피내 종양의 조직 병리학적 진행 정도와 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 이상 발현 정도와는 통계적으로 유효하게 차이가 있었다 (Table 1). 저등급 자궁경부 상피내 종양에서 고등급 자궁경부 상피내 종양으로 진행함에 따라 p16^{INK4a} 및 cdk4의 이상 발현 정도가 통계적으로 유의하게 증가하여 양의 상관관계를 보였다. 또한 pRb의 경우 고등급 자궁경부 상피내 병변으로 진행할수록 이상발현 정도가 감소하여 조직병리학적 진행 정도와 통계적으로 유의하게 음의 상관관계를 보였다 (Figure 4). p16^{INK4a}와 cdk4의 발현정도는 뚜렷한 양의 상관관계를 보였고 이들과 pRb와의 관계는 음의 상관관계를 보였다. pRb와 p16^{INK4a}/cdk4의 연관성을 분석해보았을 때 이들은 음의 상관관계를 가졌다. 이 관계는 모두 통계적으로 유의하였다 (Pearson's correlation test, $p < 0.05$).

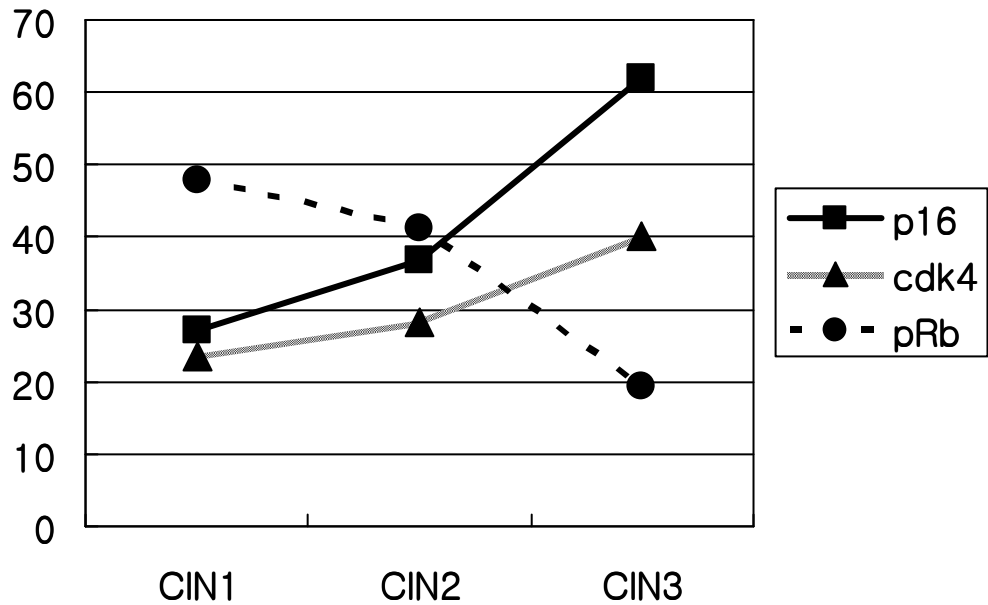


Figure 4. 자궁 경부 상피내 종양의 병기와 p16^{INK4a}, cdk4, pRb 의 이상 발현 정도 (%)와의 상관 관계

고위험군 HPV는 CIN1에서는 실험군의 69.9%에서 검출되었고 CIN2에서는 73.5%, CIN3 및 CIS에서는 70.1%가 검출되어 조직병리학적 등급과 HPV 고위험군 감염률과는 관계는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

Table 2. 자궁경부 상피내종양의 조직학적 병기에 따른 고위험군 HPV 감염률

Pathologic grade	Case number of HPV tested	Number of high risk HPV infected case	High risk HPV infection rate(%)
CIN1	93	65	69.9
CIN2	34	25	73.5
CIN3/CIS	87	61	70.1
Total (mean)	214	151	(70.6)

고위험군 HPV감염 여부에 따라 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현 정도와의 관계를 자궁경부 상피내 종양의 병기 별로 분석해본 결과 고위험군 HPV에 감염되었을 경우 p16^{INK4}의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 경증 상피이형성증 (CIN1)에서는 고위험군 HPV감염이 있는 경우 유의하게 p16^{INK4a} 이상발현이 증가하였다 (p<0.05). 그러나 중등도 또는 중증 상피내 이형성증 (CIN2, CIN3 or CIS)의 경우 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현은

고위험군 HPV 감염과 통계적으로 유의한 관계를 보이지 않았다 (Table 3).

Table 3. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기별 고위험군 HPV 감염

여부에 따른 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현률

Pathologic grade	HPV infection status	Mean P16 ^{INK4a} (%)	Mean Cdk4(%)	Mean pRb(%)
CIN1	No	18.9*	20.4	50.0
	High risk HPV+	33.0	26.0	47.2
CIN2	No	30.0	25.0	40.0
	High risk HPV+	39.0	30.2	40.0
CIN3/CIS	No	59.1	44.4	18.2
	High risk HPV+	63.4	35.3	22.7

;* p value was obtained using t-test and p<0.05

p16^{INK4a}의 경우 저등급 및 고등급 상피내종양 병변 모두에서 재발군에서 비재발군에 비해 통계적으로 유의하게 발현률이 낮았다. pRb는 고등급 자궁경부 상피내 종양 (CIN2, CIN3, CIS)에서 통계적으로 유의하게 재발군에서 발현률이 높았으며 비록 통계적으로 유의하지 않았으나 저등급 상피내종양에서도 재발군에서 pRb의 발현률이 높은 경향을 보였다 (Table 4).

Table 4. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 병기별 재발 여부에 따른 p16^{INK4a}, cdk4, pRb의 발현률

pathologic		p16 ^{INK4a}		cdk4		pRb	
grade	recur	N (%)	mean	N (%)	mean	N (%)	mean
CIN1	N	83	29.0	81	23.6	84	47.4
	Y	14(14.4)	25.4	16(16.5)	26.3	16(16.0)	48.1
	N/A	12		10		10	
CIN2	Y	36	38.5	35	28.1	34	40.0
	N	4(10.0)	27.5	4(10.3)	21.3	4(10.5)	45.0
	N/A	1		1		1	
CIN3/CIS	N	74	63.9	69	35.9	75	17.6
	Y	7(8.6)	44.3	7(9.2)	30.7	8(9.6)	33.8
	N/A	6		6		4	
Total	N	193	*44.2	185	29.1	193	£34.5
	Y	25(11.5)	31.0	27(12.7)	26.7	28(12.7)	43.6
	N/A	19		17		15	

* ; p value was obtained using t-test and p<0.05

N/A ; non- available data

£ ; p value was significant only in the high grade intraepithelial lesion (CIN2+ CIN3/CIS)

IV. 고찰

HPV감염은 자궁경부암의 발생에 가장 큰 원인으로 알려져 있다. HPV감염에 의한 자궁경부의 암화 과정은 HPV의 E6 및 E7 단백질이 세포조절주기 단백질의 기능을 저하함으로써 생겨남이 알려져 있다. 본 연구에서는 자궁경부 상피내종양에서 HPV의 E7의 주요 타겟으로 알려져 있는 RB pathway ($p16^{INK4a}$ -cdk4/cyclinD1-pRb pathway)의 변화를 관찰하여 고위험군 HPV감염과의 연관성 및 예후와의 관계를 살펴보고자 하였다. 이전 연구 결과에서 $p16^{INK4a}$ 의 과발현 (overexpression)이 자궁경부암을 포함한 대장암, 폐암, 식도암, 구강암 등에서 이미 알려진 바 있다.¹³⁻¹⁶ $p16^{INK4a}$ 의 과발현의 기전은 현재까지 명확하게 밝혀지지 않았으나 HPV E7이 ubiquitin 의존성 단백질분해계에 의해 pRb의 분해를 초래하여 상보적으로 $p16^{INK4a}$ 발현이 증가한다는 의견이 제시된 바 있다.¹⁶⁻¹⁸ 또한 자궁경부 이형성의 등급이 증가할수록 cdk4의 발현이 증가하였는데 이는 cdk억제자인 $p16^{INK4a}$ 의 과발현에도 불구하고 HPV의 증식이 숙주 세포의 증식을 통해 이루어지는 과정에서 증가되는 것으로 사료된다. 본 연구에

서는 자궁경부 상피내 종양의 조직병리학적 등급이 증가할수록 p16^{INK4a}와 cdk4의 발현이 증가하였으며 pRb의 발현은 감소하여 위 가설과 일치된 결과를 보였다. 특히 p16^{INK4a}의 경우 자궁근종으로 전자궁적출술을 시행한 10예를 대상으로 면역조직화학검사를 시행한 결과 p16^{INK4a}의 발현이 매우 낮고 (0~10%), 자궁경부 상피내 종양의 이형 세포의 경우 뚜렷이 염색되어 자궁경부 상피내종양 진단의 재현성 (reproducibility)을 증가시키는 객관적인 표지로서 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 고위험군 HPV감염이 있는 경우 p16^{INK4a} 이상발현이 증가하였으며 이는 이전 연구 결과들과 일치한다. ¹⁹⁻²⁰ 이는 고위험군 HPV의 E7단백에 의해 pRb의 발현이 저하되어 음성 되먹이 기전에 의하여 p16^{INK4a}의 발현이 더욱 증가하기 때문으로 추정된다. Nakao 등은 p16^{INK4a}의 과발현이 늦게 악성화 (late malignant transformation)과정에 관여하는 것이 아니라 암발생 초기 불멸화 과정 (immortalization)에서 증가함을 보고한 바 있다. ²¹ 따라서 pRb의 기능의 불활성화 및 16^{INK4a}의 과발현은 암발생 (carcinogenesis)의 비교적 초기 과정에 이루어지는 것

으로 보이고 특히 CIN1 병변에서 통계적으로 유의하게 p16^{INK4a}의 발현이 증가한 본 연구 결과에 부합하는 것으로 사료된다. Geradts 등은 면역조직화학적 방법에 의한 p16^{INK4a}의 핵염색이 Western blot의 결과와 일치하였다고 보고하여 암화 과정을 연구하는데 있어 p16^{INK4a}의 경우 면역조직화학 검사가 좋은 연구 방법이 될 수 있음을 시사한 바 있다.²² 다만 상피 세포의 기저층 (basal epithelium) 및 가시층 (spinous epithelium)에서는 p16^{INK4a}가 강하게 염색된 데 반해 HPV의 감염에 의해 생겼다고 믿어지는 원반 세포 (koilocytes)나 HPV의 복제 (viral replication)이 가장 활발히 이루어지는 과립층 (granular layer)에서는 p16^{INK4a}가 거의 음성 소견을 보였다. 결론적으로 p16^{INK4a}의 과발현이 고위험군 HPV감염을 시사하는 표지로서 사용될 수 있는 가능성을 다시 한번 확인할 수 있었다.

RB pathway에 관여하는 세포주기조절단백의 악성 종양의 통상적인 임상병리학적 예후 인자로서의 역할에 대해서는 현재까지는 논란의 여지가 많다. P16^{INK4a}의 경우 결과의 불일치 (discrepancy)가 두드러진다. 난소암 (ovarian carcinoma)이나 전립선암 (prostate cancer)에서는 p16^{INK4a}

발현이 증가하는 것이 나쁜 예후와 관계가 있다는 논문들이 발표된 바 있다.²³⁻²⁴ 반대로 악성흑색종 (melanoma)이나 췌장암 (pancreatic cancer)에서는 p16^{INK4a}의 발현 감소가 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고들이 있었다.²⁵⁻²⁶ 하지만 이러한 상반되는 결과들은 암종의 pRb status와 관련지어 설명될 수 있다. 즉 주로 pRb가 활성화된 종양 (Rb positive tumor)에서는 pRb를 불활성화 시킬 정도의 충분한 cdk4를 활성화하기 위해 p16^{INK4a}의 활성이 감소되는데 반해 주로 pRb가 불활성화되어 있는 종양 (Rb negative tumor)에서는 cyclinD1의 과발현이 필요치 않으므로 p16^{INK4a} 발현이 상보적으로 증가된다.²⁷ 본 연구에서는 p16^{INK4a}가 재발군에서 비재발군에서보다 통계적으로 유의하게 낮은 발현을 보였고 pRb와 음의 상관관계를 보여 이전 연구와 일치된 결과를 보였다.²⁸ 따라서 p16^{INK4a} 및 pRb의 면역조직화학 검사는 자궁경부 상피내 종양의 예후 인자로 사용가능 할 뿐만 아니라 치료 방침을 정하는데 보조적 수단으로 이용 가능할 것으로 사료된다.

V. 결론

위 연구 결과를 종합하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 조직병리학적 등급이 증가할수록 p16^{INK4a} 및 cdk4의 발현은 발현이 증가하였고 pRb는 발현이 감소하였다.
2. 고위험군 HPV에 감염되어 있는 경우 CIN1에서 p16^{INK4a}의 이상 발현이 증가하여 p16^{INK4a}가 암발생 (carcinogenesis)의 비교적 초기 과정에 관여하는 것으로 보인다.
3. 재발군에서 p16^{INK4a}의 발현이 저하되고 pRb의 발현이 증가하여 p16^{INK4a} 및 pRb의 면역조직학적 염색 결과가 예후 인자로 사용될 수 있을 것으로 사료 된다.

VI.참고 문헌

1. Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Cur Topics Micro Immunol 1977;78:1-30.
2. Pfister H. Human papillomavirus and genital cancer. Adv Cancer Res 1987;48:113-147.
3. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol 1992;79:328-337.
4. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995;87:796-802.

5. Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, et al. p53-dependent G1 arrest involves pRb-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5320-5324.
6. Thomas M, Massini P, Jenkins J, Banks L. HPV 18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 1995;10:261-268.
7. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibition of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
8. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular targets for the RB protein. *Cell* 1991;65:1053-1061.
9. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-937.

10. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.
11. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-440.
12. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4350-4354.
13. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741-1748.
14. Esteller M, Gonzales S, Risques RA, Marcuello E, Manges R, Germa JR, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol*

2001;19:299-304.

15. Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand

T, et al. Analysis of p53/BAX/p16^{INK4a}/CDKN2 in esophageal

squamous cell carcinoma: high BAX and p16^{INK4a}/CDKN2

identifies patients with good prognosis. J Clin Oncol

2001;19:2272-2281.

16. Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon HE, Komoto Y, Oue T,

et al. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in

non small cell lung cancers: an immunohistochemical study. Int J

Cancer 1996;65:442-445.

17. Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Wang Z. The

retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation

by the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev

1996;10:2949-2959.

18. Hateboer G, Kerkhoven RM, Shvarts A, Bernards R,

Beijersbergen RL. Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev* 1996;10:2960-2970.

19. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-284.

20. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14^{ARF} is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int* 2002;52:375-383.

21. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer*

1997;75:1410-1416.

22. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln EL.

Immunohistochemical detection of suppressor gene1

(CdkN2/MTS1) product p16^{INK4a} in archival human solid tumors:

correlation with retinoblastoma protein expression. Cancer Res

1995;55:6006-6011.

23. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC,

Wright RG, et al. Increased expression of cyclin-dependent

kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16^{INK4A} in ovarian

cancer is associated with progression and unfavourable

prognosis Int J Cancer 1997;74:57-63.

24. Halvorsen OJ, Hostmark J, Haukaas S, Hoisaeter PA, Akslen LA.

Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized

prostate carcinoma Cancer 2000;88:416-424.

25. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna

- MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004;164:193-203.
26. Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, et al. p16^{INK4a} is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16^{INK4a}, p53, MDM2, and Rb. *Ann Surg* 2002;235:51-59.
27. Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, et al. Multiple mechanisms of p16^{INK4A} inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995;55:6200-6209.
28. Ghazizadeh M, Jin E, Shimizu H, Fujiwara M, Arai S, Ohaki Y, et al. Role of cdk4, p16INK4, and Rb expression in the prognosis of bronchioloalveolar carcinomas. *Respiration* 2005;72:68-73.

Abstract

Relationship between p16^{INK4a}, pRb, cdk4 and

High risk HPV infection and recurrence

Eun Ji Nam

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yong Won Park)

Purpose: The p16^{INK4A} family specifically interferes with the formation of the cyclin D1-dependent kinase complex, CDK4. Loss of functional p16^{INK4A} may result in unregulated CDK4 activity, leading to persistent retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation and uncontrolled cellular

proliferation. The purpose of this study was to evaluate the expressions of p16^{INK4a}, CDK4, and pRb (RB pathway) in cervical intraepithelial neoplasia(CIN), and then to determine the relationship between CIN grade and the status of RB pathway.

Methods: The study group was comprised of 265 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue array sections of the uterine cervix collected from women who underwent biopsy or conization or hysterectomy at Yonsei university hospital from Jan 2001 to December 2003. Immunohistochemical staining for p16^{INK4A}, CDK4 and pRb was performed by using CINTecTM p16^{INK4A} Histology kit (DAKOCytomation, Carpinteria, CA, USA), CDK4 (DCS156) Mouse mAb (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) and retinoblastoma (Rb) Ab-1 (Neomarkers, Drive Fremont, CA, USA). Immunostaining of the sections was reviewed by two independent pathologists. Expression rates of RB pathway

components were calculated as the proportion of positive cells within total cells in the x400 microscopic field. HPV detection and genotyping was performed with HPV DNA Chip, a PCR-based DNA microarray system provided by Microarray Center, Biomedlab Co (Seoul, Korea). Statistical analysis was carried out by ANOVA test, Student's *t* test, Pearson's correlation test.

Results: The mean expression rate of p16^{INK4A} was 27% in CIN I, 36% in CIN II, and 61% in CIN III. There was positive correlation between p16^{INK4A} expression rate and grade of cervical lesion ($p < 0.001$). The mean expression rate of Cdk4 was 23% in CIN I, 28% in CIN II, and 35% in CIN III. There was positive correlation between CDK4 expression rate and grade of cervical lesion ($p < 0.001$). The mean expression rate of pRb was 47% in CIN I, 41% in CIN II, and 19% in CIN III. There was reverse correlation between pRb expression rate

and grade of cervical lesion ($p < 0.001$). The expression rate of p16^{INK4A} was higher (33%) in CIN I with high risk HPV infection, than in CIN I without high risk HPV infection (18%) ($p = 0.007$). In all CIN lesions, the expression rate of p16^{INK4A} was lower in recurred group than without than in those which did not recur. ($p < 0.05$) The expression rates of pRb was higher in CIN2 and CIN3 that later recurred than in those which did not recur. ($p < 0.05$)

Conclusions: With increasing CIN grade, p16^{INK4A} and CDK4 expression was also increased, but pRb expression was decreased. Relatively decreased p16^{INK4a} expressions and increased pRb expressions significantly cooperate to predict a recurrence of the CIN lesions.

Key words : Cervical intraepithelial neoplasia, HPV, recurrence, p16^{INK4a}, CDK4, pRb, Immunohistochemical staining